

Synthese und Evaluierung makrozyklischer ^{68}Ga -MPI-Tracer auf Pyridaben-Basis

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

Am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Verena Nagel

Geboren in Düsseldorf

Mainz, November 2013

Meinen Eltern

Wichtig ist, dass man nicht aufhört zu fragen.

(Albert Einstein, 1879 - 1955)

Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen weltweit zu den Hauptursachen, die zu frühzeitigem Tod führen. Pathophysiologisch liegt eine Gefäßwandverdickung durch Ablagerung arteriosklerotischer Plaques (Arteriosklerose) vor. Die molekulare Bildgebung mit den nuklearmedizinischen Verfahren SPECT und PET zielt darauf ab, minderperfundierte Myokardareale zu visualisieren, um den Krankheitsverlauf durch frühzeitige Therapie abschwächen zu können. Routinemäßig eingesetzt werden die SPECT-Perfusionstracer [^{99m}Tc]Sestamibi und [^{99m}Tc]Tetrofosmin. Zum Goldstandard für die Quantifizierung der Myokardperfusion werden allerdings die PET-Tracer [¹³N]NH₃ und [¹⁵O]H₂O, da eine absolute Bestimmung des Blutflusses in mL/min/g sowohl in der Ruhe als auch bei Belastung möglich ist. 2007 wurde [¹⁸F]Flurpiridaz als neuer Myokardtracer vorgestellt, dessen Bindung an den MC I sowohl in Ratten, Hasen, Primaten als auch in ersten klinischen Humanstudien eine selektive Myokardaufnahme zeigte. Um eine Verfügbarkeit des Radionuklids über einen Radionuklidgenerator gewährleisten zu können, sollten makrozyklische ⁶⁸Ga-Myokard-Perfusionstracer auf Pyridaben-Basis synthetisiert und evaluiert werden. Die neue Tracer-Klasse setzte sich aus dem makrozyklischen Chelator, einem Linker und dem Insektizid Pyridaben als Targeting-Vektor zusammen. Struktur-Affinitätsbeziehungen konnten auf Grund von Variation des Linkers (Länge und Polarität), der Komplexladung (neutral und einfach positiv geladen), des Chelators (DOTA, NODAGA, DO2A) sowie durch einen Multivalenzansatz (Monomer und Dimer) aufgestellt werden. Insgesamt wurden 16 neue Verbindungen synthetisiert. Ihre ⁶⁸Ga-Markierung wurde hinsichtlich pH-Wert, Temperatur, Vorläufermenge und Reaktionszeit optimiert. Die DOTA/NODAGA-Pyridaben-Derivate ließen sich mit niedrigen Substanzmengen (6 - 25 nmol) in 0,1 M HEPES-Puffer (pH 3,4) bei 95°C innerhalb 15 min mit Ausbeuten > 95 % markieren. Für die DO2A-basierenden Verbindungen bedurfte es einer mikrowellengestützten Markierung (300 W, 1 min, 150°C), um vergleichbare Ausbeuten zu erzielen. Die *in vitro*-Stabilitätstests aller Verbindungen erfolgten in EtOH, NaCl und humanem Serum. Es konnten keine Instabilitäten innerhalb 80 min bei 37°C festgestellt werden. Unter Verwendung der „shake flask“-Methode wurden die Lipophilien (log D = -1,90 – 1,91) anhand des Verteilungsquotienten in Octanol/PBS-Puffer ermittelt. Die kalten Referenzsubstanzen wurden mit GaCl₃ hergestellt und zur Bestimmung der IC₅₀-Werte (34,1 µM – 1 µM) *in vitro* auf ihre Affinität zum MC I getestet. *In vivo*-Evaluierungen erfolgten mit den zwei potentesten Verbindungen [⁶⁸Ga]VN160.MZ und [⁶⁸Ga]VN167.MZ durch µ-PET-Aufnahmen (n=3) in gesunden Ratten über 60 min. Um die Organverteilung ermitteln zu können, wurden *ex vivo*-Biodistributionsstudien (n=3) vorgenommen. Sowohl die µ-PET-Untersuchungen als auch die Biodistributionsstudien zeigten, dass es bei [⁶⁸Ga]VN167.MZ zwar zu einer Herzaufnahme kam, die jedoch eher perfusionsabhängig ist. Eine Retention des Tracers im Myokard konnte in geringem Umfang festgestellt werden.

Abstract

Cardiovascular diseases are the main causes world wide for sudden death. Arteriosclerosis is characterised by a thickening of vascular walls due to settlement of arteriosclerotic plaques in the vessels. Molecular Imaging using the SPECT- and PET-techniques aims to visualize low perfusion areas in the myocardium for early diagnosis and treatment. Routinely used SPECT-tracers are [^{99m}Tc]sestamibi and [^{99m}Tc]tetrofosmin. The gold-standard for myocardial perfusion quantification is the use of PET-tracers [¹³N]NH₃ and [¹⁵O]H₂O due to the possibility of measuring the blood flow during rest and exercise in mL/min/g. [¹⁸F]Flurpiridaz, a MC I-inhibitor, was introduced as new myocardial perfusion agent in 2007. Biological evaluations in rats, rabbits, primates and also first clinical human studies proofed selective accumulation the heart. The synthesis and evaluation of macrocyclic ⁶⁸Ga-MPI-tracers using the insecticide pyridaben as TV is the aim of this work. Easier availability of the radionuclide by using a radionuclide-generator is achieved. The new class of MPI-tracer consists of a macrocyclic chelator, a linker and of pyridaben as TV. Structure-affinity studies could be performed by varying the linker (length and polarity), the charge of the complex (neutral vs. positively charged), the chelator (DOTA, DO2A and NODAGA) and by applying multivalent structures (monomer vs. dimer). In total 16 new tracers have been synthesised. ⁶⁸Ga-labelling was optimized regarding pH, temperature, amount of precursor and reaction time. DOTA/NODAGA-derivatives could be labelled using a low amount of precursor (6 - 25 nmol) in 0.1 M hepes-buffer (pH 3.4) at 95°C for 15 min in yields > 95 %. The DO2A-based tracer needed a microwave-assisted labelling procedure (300 W, 1 min, 150°C) to give the same results. *In vitro* stability tests have been performed in EtOH, human serum, 0.9 % NaCl-solution. No instabilities have occurred during 80 min at 37°C. Using the "shake flask-method" the log D (log D = -1.90 – 1.91) values have been determined by analysing the distribution in octanol/PBS-buffer. The cold reference compounds have been made using GaCl₃ and used for IC₅₀-values (34.1 μM – 1 μM) determination. SMPs have been applied for measuring the enzyme activity for MC I. *In vivo* evaluations have been performed in healthy sprague dawley rats with the most promising tracers [⁶⁸Ga]VN160.MZ and [⁶⁸Ga]VN167.MZ by μ-PET-studies (n=3) for 60 min. *Ex vivo* biodistributions (n=3) have also been done. Both the μ-PET-studies and the biodistributions showed a moderate heart uptake for [⁶⁸Ga]VN167.MZ. The high background uptake implies that the accumulation in the heart is likely caused by perfusion. Further *in vitro* assays in living mitochondria might be helpful for understanding the uptake mechanism.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Herz	3
1.2. Arteriosklerose und die koronare Herzkrankheit	4
1.3. Diagnostik des Myokards	6
1.4. Der Mitochondrien Komplex I als Target	17
2. Problemstellung und Zielsetzung	27
3. Ergebnisse und Diskussion	31
3.1. Organische Synthesen	34
3.2. ⁶⁸ Ga-Markierungen	53
3.3. <i>In vitro</i> -Evaluierungen	64
3.4. Biologische Evaluierungen des [⁶⁸ Ga]VN167.MZ und des [⁶⁸ Ga]VN160.MZ	73
4. Experimenteller Teil	79
4.1. Allgemeines und Messgeräte	79
4.2. Organische Synthesen	81
4.3. Synthese der inaktiven Komplexe	120
4.4. ⁶⁸ Ga-Markierungen	127
4.5. <i>In vitro</i> -Evaluierungen	128
4.6. Biologische Evaluierungen des [⁶⁸ Ga]VN167.MZ und des [⁶⁸ Ga]VN160.MZ	129
5. Zusammenfassung und Ausblick	131
6. Anhang	135
6.1. Literaturverzeichnis	135
6.2. Abkürzungsverzeichnis	138
6.3. Abbildungsverzeichnis	141
6.4. Tabellenverzeichnis	143

1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen weltweit zu den Hauptursachen, die zu körperlicher Beeinträchtigung bis hin zu frühzeitigem Tod führen. Pathophysiologisch liegt eine Gefäßwandverdickung durch Ablagerung arteriosklerotischer Plaques (Arteriosklerose) vor, die sich über mehrere Jahre hinweg - meist asymptomatisch - entwickelt und schließlich, häufig im mittleren Alter, charakteristische Symptome verursacht. Hierzu zählen die aus der Organminderperfusion resultierenden akuten koronaren sowie zerebralen Komplikationen, die trotz medizinischem Einsatz auf Grund ihrer Schwere einen letalen Ausgang haben können.

Laut WHO sind kardiovaskuläre Erkrankungen global die häufigsten Todesursachen. 2008 starben 17,3 Mio. Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Krankheiten, was 30 % aller registrierten Todesfälle entspricht. 7,3 Mio. dieser Todesfälle kamen auf Grund einer koronaren Herzkrankheit (KHK) und 6,2 Mio. durch das Auftreten eines Herzinfarktes zustande.¹

Das Herabsetzen der Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen zeigt eine Verringerung der Krankheitslast sowie der Mortalität. Zu den verhaltensbedingten Risikofaktoren, die eine kardiovaskuläre Krankheit begünstigen, zählen übermäßiger Tabakkonsum, unausgewogene Ernährung und mangelnde körperliche Aktivität. Deren primäre Auswirkungen sind Bluthochdruck, Diabetes und erhöhte Blutfettwerte, die wiederum Veränderungen des Herz-Kreislaufsystems nach sich ziehen. Ein erhöhter Body Mass Index (BMI) korreliert nachweislich mit der Prävalenz und der Intensität kardiovaskulärer Erkrankungen.² Folglich wird dieses Krankheitsbild meist ausschließlich mit den im Überfluss lebenden Wohlstandsländern in Verbindung gebracht. Tatsächlich jedoch stammten 80 % der 2008 auf Grund Herz-Kreislauf-Erkrankungen verstorbenen Personen aus Niedrig- und Mittellohnländern. Als Gründe hierfür sind insbesondere intensiver Tabakkonsum, unzureichende medizinische Versorgung sowie die damit kaum vorhandenen Präventivmaßnahmen und Kontrolluntersuchungen zu nennen.

Für solche Kontrolluntersuchungen steht eine Reihe verschiedener Methoden zur kardialen Bildgebung zur Verfügung. Konventionelle, nichtinvasive Routineverfahren wie die Echokardiographie und das Echokardiogramm sind ohne größeren technischen Aufwand in der Lage, anatomische und funktionelle Anomalien des Myokards aufzudecken. Des Weiteren kommen komplexe Techniken wie die Angiographie, Computertomographie (CT) und das Magnetresonanz Imaging (MRI) zum Einsatz. Diese erlauben eine detaillierte Darstellung der Koronargefäße, so dass vorliegende Stenosen, welche die Organperfusion beeinträchtigen und oft schwerwiegende kardiale Komplikationen zur Folge haben, diagnostiziert werden können. Erstrebenswert ist darüber hinaus eine Visualisierung der physiologischen und metabolischen Prozesse im Myokard, um frühzeitig gestörte Stoffwechsellvorgänge zu entdecken und der Manifestation einer kardiovaskulären Krankheit durch Senken der Risikofaktoren entgegenwirken zu können.³

Dieser Ansatz wird beim Molekularen Imaging (MI) verfolgt. Die molekulare Bildgebung ist ein schnellwachsender Forschungsbereich, der darauf abzielt, im lebenden Organismus biologische Prozesse auf molekularer und zellulärer Ebene darzustellen und gleichzeitig zu quantifizieren.^{4,5} Hierbei wird das von George de Hevesy 1913 postulierte „Tracer-Prinzip“ angewandt. Der Tracer ist meist ein biogenes Molekül, das mit einem Radionuklid als Sonde markiert wird. Zu seinen essentiellen Voraussetzungen gehören die Wiedergabe der Stoffwechsellvorgänge *in vivo* ohne

Einflussnahme sowie die Möglichkeit, niedrige Dosen applizieren zu können, sodass keine Toxizität von der Sonde ausgeht. Anwendung finden meist nuklearmedizinische Verfahren wie die SPECT und die PET. Beide Messverfahren basieren auf der äußerlichen Detektion von Strahlung, die von dem applizierten Tracer ausgeht.

Steigende Lebenserwartungen, verbesserte medizinische Versorgung und ein hoher Lebensstandard resultieren in einer ebenfalls steigenden Prävalenz für kardiovaskuläre Erkrankungen. Daher stehen die Entwicklung und Evaluierung innovativer Verbindungen zur Diagnostik kardiovaskulärer Krankheiten im Vordergrund.

Angesichts vielversprechender Ergebnisse der molekularen Bildgebung unter Verwendung der nicht-invasiven Techniken SPECT und PET liegt der Fokus insbesondere auf der Gewinnung neuer, für die jeweilige medizinische Fragestellung adaptierter Tracer.⁶⁻⁸

Das Ziel dieser Arbeit ist die Synthese und Evaluierung einer neuen Stoffklasse von Myokardperfusionstracern, die unter Verwendung des PET-Nuklids ⁶⁸Ga hochauflösende Bilder des Myokards liefern und die Vitalitätsbeurteilung somit vereinfachen. Dazu sollte der Generatorbasierte Positron-Emitter ⁶⁸Ga über einen geeigneten Chelator an eine myokardspezifische Einheit in Form des Mitochondrien Komplex I (MC I) Inhibitors Pyridaben gebunden werden.

In den folgenden Kapiteln wird auf den Hintergrund sowie die Herstellung und Evaluierung der entwickelten Verbindungen detailliert eingegangen.

1.1. Das Herz

Zur Versorgung aller Organe pumpt das Herz das gesamte Blutvolumen innerhalb einer Minute durch den Körper. Ein gesundes Herz hat ein Gewicht von ca. 300 g und repräsentiert somit etwa 0,5 % des Körpergewichts. Die rechten und linken Herzhälften bilden zusammen eine Einheit und bestehen jeweils aus einem Atrium und einem Ventrikel. Verantwortlich für die rhythmischen Kontraktionen ist die Herzmuskulatur, das Myokard, welche durch spezielle Schrittmacherzellen zur Kontraktion angeregt wird. Sein Aufbau ähnelt der Skelettmuskulatur. Charakteristisch sind jedoch zahlreiche Herzmuskelfasern, die bedingt durch eine hohe Stoffwechselaktivität, über eine hohe Mitochondriendichte verfügen. Das Herzmuskelgewebe wird in Ruhe von 0,8 - 0,9 mL Blut/g*min durchströmt, was 5 % des gesamten Herzzeitvolumens entspricht. Die rechte Herzkammer pumpt das Blut über den Truncus pulmonalis in die Lunge, nach Oxygenierung gelangt es über die Lungenvenen auf die linke Herzseite, von wo es über die Aorta den Körper versorgt.

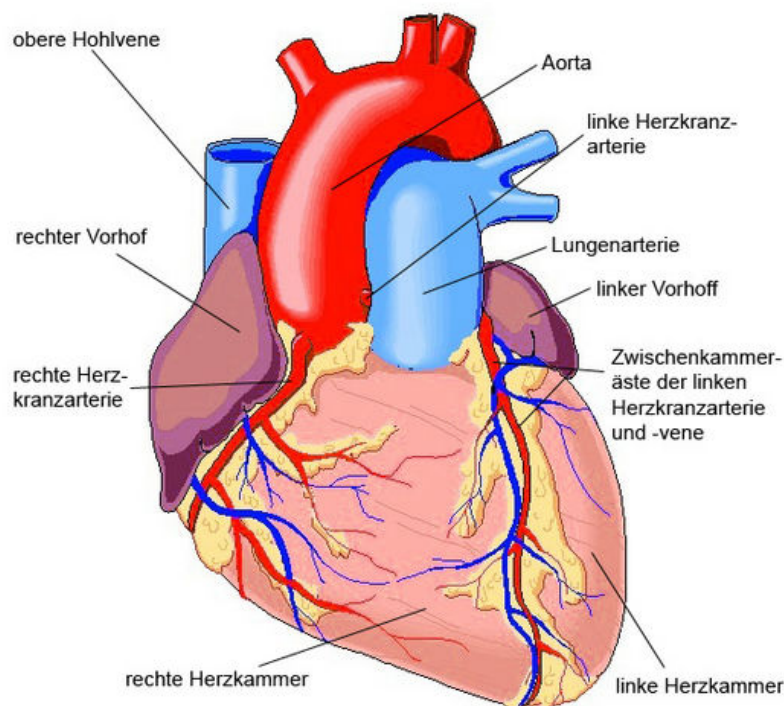


Abbildung 1: Anatomie des Herzens⁹

Über zwei Koronararterien, die knapp oberhalb der Aortenklappe entspringen, erfolgt die arterielle Versorgung des Herzens, wobei die linke Koronararterie 80 % des Blutstroms für die Herzversorgung aufnimmt. In Ruhe ist die Sauerstoffverfügbarkeit des Bluts vollständig ausgenutzt, sodass bei körperlicher Anstrengung eine Mehrdurchblutung notwendig ist.

Freie Fettsäuren, Laktat und Glukose dienen dem Myokard zur Energiegewinnung. Während in Ruhe hauptsächlich freie Fettsäuren genutzt werden, übernimmt nicht umgesetztes Laktat die Versorgung bei körperlicher Anstrengung. Dieser Energielieferant ist auf Grund der Verbindung zum Citratzyklus sauerstoffabhängig (aerober Stoffwechsel). Folglich kommt es bei enormer Belastung (anaerober Stoffwechsel) zur Laktatproduktion statt zur Laktataufnahme.

1.2. Arteriosklerose und die koronare Herzkrankheit

1.2.1. Pathophysiologie der Arteriosklerose

Eine häufige Form der kardiovaskulären Krankheiten ist die koronare Herzkrankheit (KHK), bei der die Herzkranzgefäße (Koronararterien) erkrankt sind. Meist liegt die Ursache in einer manifestierten Arteriosklerose.

Das Risiko innerhalb einer durchschnittlichen Lebensdauer eine Arteriosklerose zu entwickeln, ist sehr hoch. Während lediglich 17 % der Jugendlichen Anzeichen einer KHK aufweisen, sind bereits 85 % der 50-Jährigen betroffen.⁹ Ausgangspunkt der Krankheit ist in der Regel das metabolische Syndrom. Hierunter versteht man die Entgleisung physikalischer und metabolischer Prozesse, wodurch das Risiko, eine kardiovaskuläre Krankheit zu entwickeln, stark ansteigt. Übergewicht, unausgewogene Ernährung, Rauchen sowie mangelnde körperliche Aktivität führen zu den Risikofaktoren Bluthochdruck, Diabetes und Hypercholesterinämie.¹⁰ Patienten mit einem metabolischen Syndrom besitzen ein 1,5-3-fach erhöhtes Risiko für eine KHK und einen Hirninfarkt.¹¹⁻¹³ Hauptsächlich sind Männer mittleren Alters betroffen¹⁴, deren Gefahr, einen Myokardinfarkt zu erleiden, bei 42 % liegt.¹⁵

Die Entstehung und Progression einer Arteriosklerose lässt sich in vier Stadien einteilen (Abb. 2a-d):

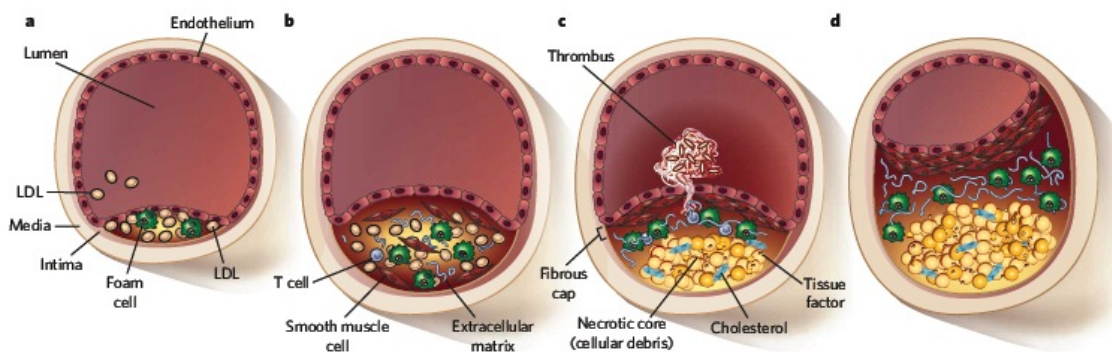


Abbildung 2: Entwicklungsstadien der Arteriosklerose¹⁰

Stellen, an denen der laminare Fluss in der Arterie unterbrochen ist, zählen zu den ablagerungsgefährdeten Arealen. Zunächst durchdringen low-density Lipoproteine (LDL) die Intima der Gefäßwand und sammeln sich in deren Extrazellulärraum an. Nachweislich tragen LDL zu einem erhöhten Lipophilen Index (LI) bei, der mit einer verstärkten Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer KHK einhergeht.¹¹ Makrophagengesteuerte Phagozytose resultiert in einer übermäßigen, unkontrollierten Aufnahme der LDL in das Gefäßlumen. Es bilden sich lipidgefüllte Schaumzellen, die für die Entstehung von zunächst apathologischen Fettschlieren verantwortlich sind. (Abb. 2a)

Anschließend kommt es zu einer vermehrten Sekretion von extrazellulären Matrixbestandteilen wie Kollagen. Diese verstärken die Retention und Anlagerung von LDL. Monozyten und T-Zellen

erscheinen und lösen eine chronische Entzündung der betroffenen Läsion aus. Um die Gefäßverengung durch den wachsenden Plaque zu kompensieren, kommt es zu einem Umbau der Arterie: bei gleichbleibendem Lumen vergrößert sich der Gefäßdurchmesser (Glagov-Phänomen). (Abb. 2b)

Das nächste Stadium wird von der Bildung eines nekrotischen Kerns innerhalb der Plaque geprägt. Ein Absterben der Schaumzellen zieht eine Freisetzung deren Bestandteile – hauptsächlich Cholesterin – nach sich. Zusätzlich formen die glatten Muskelzellen unterhalb des Endotheliums eine fibröse Kappe, die die Plaque von der Blutversorgung trennt. Somit entsteht ein Bereich, der als nekrotischer Kern bezeichnet wird. Nun besteht die Möglichkeit einer Plaqueruptur sowie einer Erosion des Endotheliums. In beiden Fällen gelangen thromboseauslösende Komponenten in das Gefäßlumen und formieren sich zu einem Thrombus. Ab einer gewissen Größe blockiert dieser die Arterie und resultiert poststenotisch in einer akuten Ischämie des Myokards. (Abb. 2c)

Ohne Aufplatzen der Läsion ist ein fortschreitendes Wachstum die Folge, sodass in der Endphase der Plaque fast vollständig das Lumen obstruiert und schließlich eine klinisch relevante Minderperfusion des Myokards verursacht. (Abb. 2d)

Problematisch und unberechenbar sind die asymptomatischen Plaques im 3. Entwicklungsstadium. Hierbei ist die Gefahr einer Ruptur allgegenwärtig und verursacht die Mehrheit aller Herzinfarkte, Hirnschläge und plötzlichen Todesfälle. Lediglich 16 % der Infarkte sind auf Stenosierungen >70 % zurückzuführen.¹²

Meist jedoch resultiert auf Grund des zunächst kompensatorisch aufrechterhaltenen Arterienlumens keine Einschränkung des Blutflusses.

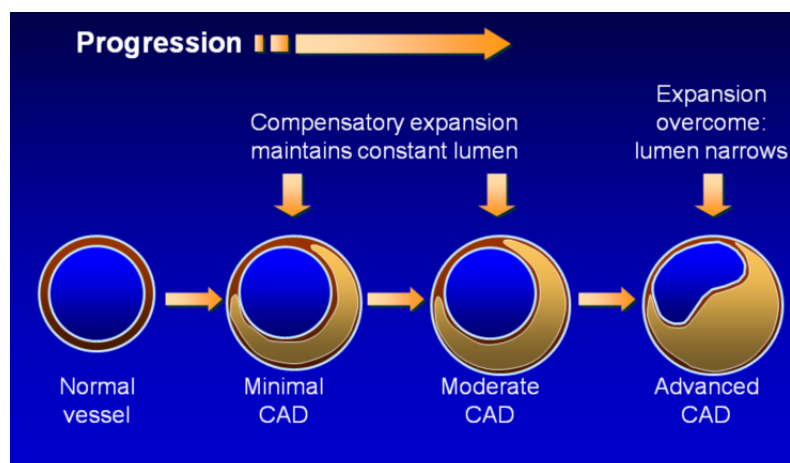


Abbildung 3: Vaskularer Gefäßumbau nach Glagov et al. 1987¹³

Arteriosklerotische Plaques können zwar mittels invasiver Herzkatheteruntersuchung dargestellt werden, allerdings erschwert die Größenordnung von weniger als 100 µm eine Visualisierung. Reißgefährdete Plaques weisen eine fibröse Kappe mit weniger als 65 µm Dicke auf.¹⁴ Folglich bedarf es neben den konventionellen Verfahren wie MRI, CT und Kardioangiographie neuer Ansätze aus dem Bereich der molekularen Bildgebung, um den myokardialen Blutfluss zu quantifizieren.

1.3. Diagnostik des Myokards

Zur Myokarddiagnostik eignen sich verschiedene Verfahren, deren Einsatz je nach klinischer Fragestellung, diagnostischem Nutzen und örtlicher Verfügbarkeit entschieden wird.³ Das Hauptinteresse besteht in der Beurteilung von Myokardperfusion in Ruhe vs. Belastung (Myocard-Perfusion Imaging MPI), Funktion des linken Ventrikels und Myokardviabilität (Stunning vs. Hibernating). Im Zuge einer manifesten KHK kommt es häufig zu ischämischen Zwischenfällen, die in ihrem Schadensausmaß sehr unterschiedlich sein können. Um den Erfolg einer Revaskularisierung abschätzen zu können, ist die Myokardviabilitätsbestimmung von großer Bedeutung. Infarziertes Gewebe bezeichnet man als nicht-viabel und nicht-infarziertes Gewebe als viabel.

Viables Gewebe kann selbst in zwei Modifikationen mit gestörter Funktion vorliegen: „stunned“ („betäubt“) oder „hibernating“ („winterschlafend“).²⁰ „Betäubtes“ Myokard liegt bei einer anhaltenden postischämischen kontraktile Dysfunktion trotz wiederhergestellter Normalperfusion vor. Häufig tritt dies als Folge eines Herzinfarktes oder einer Herz-OP auf. Eine Verbesserung tritt spontan ein.²¹

„Winterschlafendes“ Gewebe zeichnet sich durch einen minderperforationsbedingten, herunter geregelten Metabolismus aus, der in 60 % der Fälle nach Revaskularisierung vollständig reversibel ist.²⁰

1.3.1. Klassische kardiale Bildgebung

1.3.1.1. Röntgen-Thorax

Das konventionelle Röntgen ist die älteste Methode, um Herzerkrankungen zu diagnostizieren. Vergrößerte Herzhöhlen sowie pathologisch veränderte Herzformen können dargestellt werden. Außerdem ist eine indirekte Funktionsbeurteilung möglich. Die unkomplizierte Durchführung bei geringem Kostenaufwand lässt das Röntgen zu einem klinischen Standardverfahren in der kardialen Diagnostik werden.

1.3.1.2. Angiographie

Über einen in der Leistengegend perkutan eingebrachten Katheter, welcher bis in die Herzkammern und an die Koronarostien vorgeschoben wird, erfolgt die Applikation eines Kontrastmittels, dessen Distribution per Röntgenaufnahme analysiert wird. Das Beurteilen des vorliegenden Stenosegrades erfolgt lediglich visuell und ist somit stark operateurabhängig. Ein weiterer Nachteil ist, dass Frühstadien einer Arteriosklerose auf Grund des Glagov-Phänomens nicht detektierbar sind. Dennoch handelt es sich bei der Koronarangiographie um den „Goldstandard“ der kardiologischen Diagnostik. Dies ist zurückzuführen auf einen relativ unkomplizierten Untersuchungsablauf sowie eine gute Patienten-Compliance.

1.3.1.3. Echokardiographie

Ultraschalluntersuchungen des Myokards liefern zweidimensionale, anatomische Informationen. Neben den Ventrikel- und Klappenfunktionen lässt sich auch die Blutflussgeschwindigkeit evaluieren. Intravaskulärer Ultraschall erlaubt die Darstellung von Läsionen, die mittels Angiographie nicht

registriert werden. Bedingt durch die einfache Methodik, niedrige Kosten sowie risikofreie Abwicklung ist diese Myokarddiagnostik weit verbreitet.

1.3.1.4. Magnetresonanztomographie (MRT)

Die physikalische Grundlage des MRT ist die Kernspintomographie. Resonant angeregte Protonen erzeugen in einem starken Magnetfeld ein elektrisches Signal. Da verschiedene Gewebearten unterschiedliche Relaxationszeiten aufweisen, entstehen kontrastreiche Bilder mit einer Auflösung von ca. 10 μm . Sowohl anatomische als auch funktionelle Einblicke können erhalten werden. Die Gabe eines Kontrastmittels (z.B. Gd-DTPA) verbessert Strukturabgrenzungen. Quantitative Myokardperfuisionsbestimmungen sind problemlos möglich. Das Auskommen ohne ionisierende Strahlung, eine hohe Reproduzierbarkeit und die hohe Auflösung lassen sie zu einem der wichtigsten diagnostischen Verfahren der Kardiologie werden. Von Nachteil sind jedoch relativ lange Messzeiten, die Nierentoxizität des Kontrastmittels und eine niedrigere Sensitivität im Vergleich zu nuklearmedizinischen Methoden.

1.3.1.5. Computertomographie (CT)

Unter Verwendung von Röntgenstrahlung werden eindimensionale Absorptionsprofile des zu charakterisierenden Bereichs aus diversen Richtungen ermittelt. Erst die anschließende, computergesteuerte Bildrekonstruktion anhand der einzelnen Transversalschnitte erlaubt das Erstellen von Volumengrafiken. Die hohe Auflösung, eine gute Sensitivität und kurze Messzeiten begründen den hohen diagnostischen Stellenwert des CT. Außerdem können damit die Quantifizierung des Koronarkalks, der Myokardperfusion und die Darstellung der Herzkranzgefäße erfolgen. Nachteilig sind die hohe Strahlenbelastung von ca. 7,5 mSv³, hohe Kosten, die Applikation von jodhaltigem Kontrastmittel sowie die nur kaum mögliche Differenzierung zwischen vitalem und abgestorbenem Gewebe im Rahmen des Therapiemonitorings.

1.3.2. Nuklearmedizinische Diagnosemethoden

Trotz sehr guter Darstellung der Herzgefäße mittels MRT, CT und Echokardiographie sind diese Verfahren auf anatomische und funktionelle Informationen limitiert. Verstärkt liegt das Interesse jedoch auf der Überwachung metabolischer und physiologischer Prozesse mittels molekularer Bildgebung. Auf diese Weise entsteht die Möglichkeit einer früheren Diagnose, verbesserten Kontrolle des Krankheitsverlaufs und optimierter Therapieüberwachung.^{6,15}

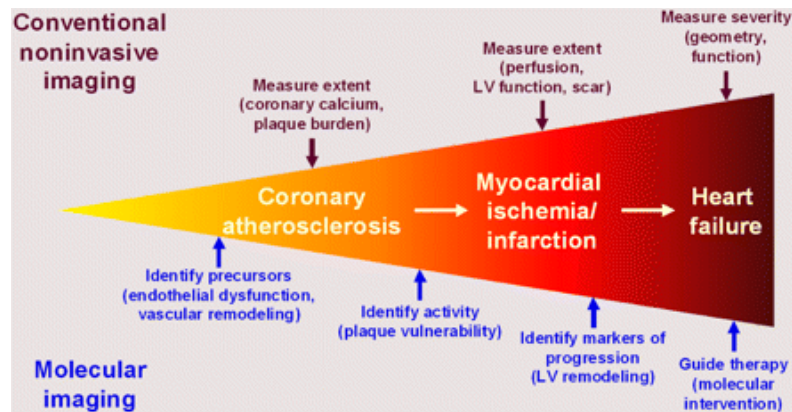


Abbildung 4: Konventionelle Diagnostik vs. Molekularer Bildgebung während einer KHK-Entwicklung³

Häufig kommt ein Tracer = Radiopharmakon zum Einsatz, der krankheitsspezifische Stoffwechsellvorgänge visualisiert.

Messtechniken solcher Radiopharmazeutika sind die SPECT und die PET. Hierbei wird die am Target selektiv angereicherte radioaktive Sonde über ihre emittierte Strahlung extern detektiert. SPECT /PET-Myokardperfusionsmessungen zeigen minderdurchblutete Areale anhand einer verringerten Traceraufnahme an. Meist erfolgt die Gabe von zwei Dosen, um die Myokardperfusion sowohl in Ruhe als auch unter Belastung zu beurteilen. Höhere Blutflüsse können entweder durch körperliche Anstrengung oder durch pharmakologisch induzierten Stress erzeugt werden.

Die initiale Gewebsaufnahme des Radiopharmakons hängt sowohl vom Blutfluss als auch von der Plasmaproteinbindung ab. Lipophile, einfach positiv geladene Moleküle passieren leicht Zellmembranen und reichern sich im Myokard an. Dennoch gibt es unterschiedliche Transportmechanismen zur Überwindung von Membranen:¹⁶

A) Passiver Transport

1. Substanzen passieren Membranen auf Grund des vorliegenden Konzentrationsgefälles zwischen Intra- und Extrazellularraum → einfache Diffusion (^{99m}Tc -Tracer, ^{15}O H₂O, ^{13}N NH₃).
2. Ein Transportprotein (Carrier-/Kanalprotein) ist für die Zellaufnahme einer Substanz verantwortlich. Es handelt sich hierbei um einen energieunabhängigen Prozess, der nicht entgegen eines Konzentrationsgefälles verläuft → erleichterte Diffusion (^{18}F FDG, ^{123}I BMIPP, ^{123}I MIBG).

B) Aktiver Transport

1. Substanzen werden entgegen eines Konzentrationsgefälles energieabhängig über Membranen transportiert → primär aktiver Transport (K⁺, TI⁺, Rb⁺ gekoppelt an Na⁺/K⁺-ATPase) Dieses System eignet sich perfekt für Radiopharmaka, da so eine hohe Traceranreicherung in der Zelle in Kombination mit einem geringen Plasmaspiegel vorliegt.

- Ein unter Energieaufwand geschaffenes Konzentrationsgefälle ermöglicht den passiven Transport durch Ionenkanäle/Carrier → sekundär aktiver Transport.

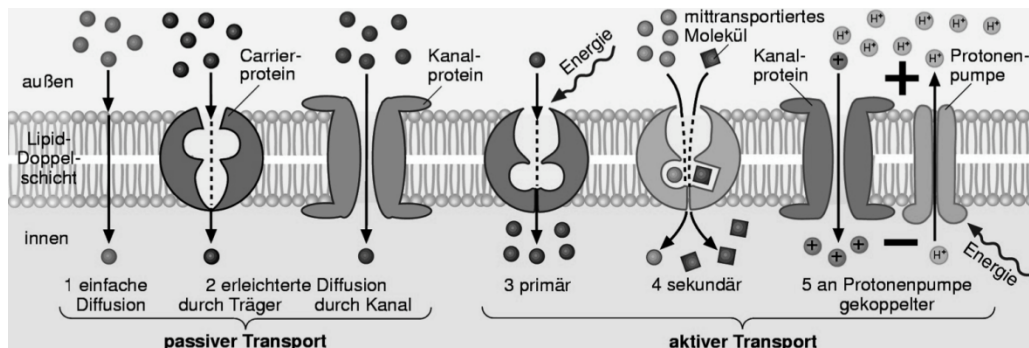


Abbildung 5: Membrantransportmechanismen¹⁷

Nach Überqueren der Zellmembran akkumulieren lipophile, positiv geladene Moleküle selektiv im Myokard. Ursachen hierfür konnten in Zellversuchen gezeigt werden:¹⁸

- Die Plasmamembranpotentiale von Myozyten sind stärker ausgeprägt als in Fibroblasten, woraus eine zehnfach höhere Anreicherung resultiert.¹⁹
- Die Mitochondrienmembranpotentiale der Myozyten sind höher als in Fibroblasten.
- Das Mitochondrienvolumen ist in Myozyten größer.

Neben der Perfusionsdiagnostik sind die Beurteilung des myokardialen Metabolismus und die sympathische Innervierung des Herzens von Relevanz.

1.3.2.1. Die SPECT und SPECT-Myokard-Tracer

Bei der SPECT handelt es sich um ein diagnostisches Verfahren, das auf der Funktionsweise einer Szintigraphie basiert. Dem Patienten wird ein γ -emittierendes Radionuklid bzw. eine mit einem γ -Emitter markierte Substanz injiziert und dessen Distribution unter Verwendung von rotierenden Gammakameras detektiert. Die erhaltenen, planaren Aufnahmen werden in Schnittbilder umgerechnet und erlauben somit die Funktionsbeurteilung diverser Organe. Der Nachteil der SPECT ist jedoch ihre limitierte räumliche Auflösung von etwa 10 mm.

Medizinisch relevante SPECT-Nuklide sind ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{125}I , ^{111}In und ^{201}Tl .

Der Großteil aller Befunde bezüglich der Myokardperfusion erfolgt mittels SPECT-MPI.⁷ 1970 wurden erste SPECT-Untersuchungen mit ^{201}Tl TICl ($t_{1/2} = 73,1 \text{ h}$) durchgeführt.²⁰ Das K^+ -Analogon wird von den Myozyten über die Na^+/K^+ -ATPase aus dem Plasma extrahiert und reichert sich proportional zum Blutfluss im Myokard an. Neben der Herzperfusion kann auch die Myokardvitalität auf winterschlafendes Gewebe überprüft werden.

Allerdings erfolgt die Thallium-Umverteilung in geschädigtem Gewebe nur langsam oder unvollständig, was in einer unterbewerteten Vitalität resultiert.²⁰

Seit den 1990er Jahren finden die ^{99m}Tc-markierten Substanzen Sestamibi und Tetrofosmin routinemäßig Anwendung in der Blutflussdiagnostik. Die einfach positiv geladenen, lipophilen Moleküle akkumulieren durch das vorliegende Membranpotential in den Myozyten. Beide Tracer sind unter dem Namen Cardiolite® bzw. Myoview® zugelassene Radiopharmaka und in Kit-Form erhältlich. Entscheidender Vorteil des Technetiums ist die Verfügbarkeit über einen Radionuklid-generator.

Zusätzlich finden ¹²³I-markierte Substanzen Anwendung. Die Darstellung der sympathischen Innervation geschieht mit dem Noradrenalin-Analogon [¹²³I]Metaiodbenzylguanidin (MIBG). Sympathische Nerven reagieren empfindlicher auf Ischämien als das Myokard selbst, so dass es auch ohne nekrotische Gewebsveränderungen zur Schädigung der Nerven kommen kann. Das Absterben von Nervenzellen führt oft zu Herzrhythmusstörungen. Degenerierte Nerven können mit MIBG identifiziert werden, wodurch die Auswahl von Patienten für ein Herzschrittmacherimplantat erleichtert wird.

Die metabolische Entgleisung nutzt der bekannteste Fettsäuretracer β-methyl-p-[¹²³I]iodphenyl-pentadecan-Säure (BMIPP). Da eine Aufnahme lediglich in aktives Herzgewebe erfolgt, kommt die Verbindung hauptsächlich bei der Infarkt Diagnostik zum Einsatz.²⁰

Außerdem gibt es eine Reihe von weiteren Myokardtracern, die darauf abzielen, eine im Frühstadium befindliche KHK zu entdecken. Allerdings sind sie größtenteils noch nicht Bestandteil klinischer Routine. [^{99m}Tc]Annexin A5 wird eingesetzt, um reißgefährdete, arteriosklerotische Plaques zu visualisieren. Das Annexin bindet an Phospholipide, die auf der Oberfläche apoptotischer Zellen vorliegen. Jedoch handelt es sich nicht um eine spezifische Interaktion, da ebenfalls eine Anlagerung an Thrombozyten stattfindet.⁴ [^{99m}Tc]Interleukin-2 interagiert mit aktivierten T-Zellen und erlaubt die Visualisierung von entzündeten Zellen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, mit Hilfe des Antikörpers [^{99m}Tc]MDA2 in Plaques vorliegende LDL darzustellen.⁶

1.3.2.2. Das Funktionsprinzip der PET und PET-Myokard-Tracer

Die PET ist ein szintigraphisches Messprinzip, das auf der Nutzung von Positronenemittern basiert. Als geeignete Radionuklide eignen sich somit protonenreiche Kerne, die sich durch Umwandlung eines Protons in ein Neutron stabilisieren. Während des Kernprozesses entstehen außerdem ein Positron β⁺ und ein Elektron-Neutrino ν_e, das der Spinerhaltung dient.

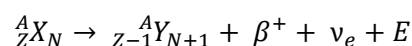


Abbildung 6: β⁺-Zerfallsgleichung

Die freiwerdende Energie E ist nuklidspezifisch und verteilt sich auf alle drei Zerfallsprodukte, was in einer kontinuierlichen Energieverteilung resultiert. Das emittierte Positron kinetischer Energie wechselwirkt zunächst auf einer Strecke von meist weniger als 2 mm unter Energieabgabe mit

umliegendem Gewebe. Trifft es – nun auf thermischem Energieniveau – auf ein Elektron, entsteht intermediär ein Positronium. Das Positronium wiederum annihiliert unter der Aussendung zweier kollinear γ -Quanten, die nahezu einen Winkel von 180° zu einander aufweisen. Ein den Patienten ringförmig umgebendes Detektorsystem registriert ausschließlich koinzident einfallende Quanten und detektiert somit den Ort der Annihilation und nicht die Stelle des β^+ -Zerfalls.

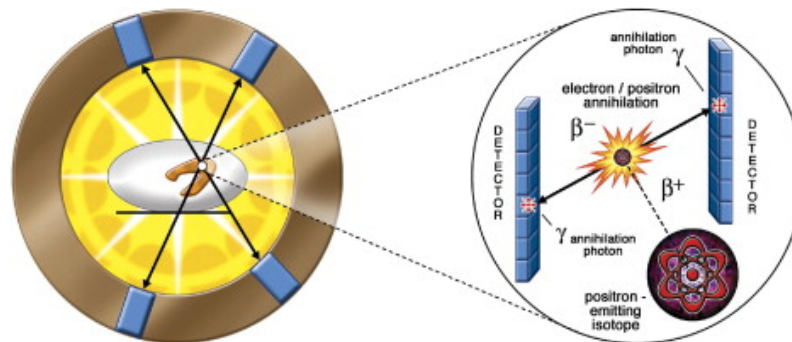


Abbildung 7: Koinzidentes Messprinzip der PET²¹

Folglich entsteht durch die Positronen-Reichweite, die von der Positronenenergie und der jeweiligen Gewebedichte abhängig ist, eine gewisse Unschärfe. So kann bei einem Detektordurchmesser von 70 cm mit einem Auflösungsverlust von etwa 1,5 mm gerechnet werden.²² Die Detektorvielfzahl ist für die hohe Auflösung von 4 – 7 mm der PET-Messungen verantwortlich.²¹

Obwohl MPI zur KHK-Diagnostik meist mit SPECT durchgeführt wird, steigt das Interesse an PET-Perfusionstracern stark an.²³ Dies begründet sich hauptsächlich in der besseren Aussagequalität von PET-Bildern. Ursache hierfür ist die höhere räumliche Auflösung, der stärkere Kontrast sowie die größere Sensitivität.²⁴ Bateman et al. zeigten, dass PET-MPI mit einer gesamt-diagnostischen Präzision von 93 % dem SPECT-MPI mit lediglich 73 % deutlich überlegen ist. Auch die Diagnose von KHK zeigt ähnliche Ergebnisse: 71 % gegenüber 48 %.²⁵

Zum Goldstandard für die Quantifizierung der Myokardperfusion wird die PET, da eine absolute Bestimmung des Blutflusses in mL/min/g sowohl in der Ruhe als auch bei Belastung möglich ist.²⁴ Ein nicht zu vernachlässigender Vorteil besteht in dem Einsatz von biogenen Radionukliden, die dadurch direkt appliziert oder relativ unkompliziert in Biomoleküle eingebaut werden können.

Tabelle 1: Medizinisch relevante PET-Nuklide^{26,27}

Nuklid	T _{1/2} /min	Kernreaktion	E _{β+max}	Anwendung
¹¹ C	20,30	¹⁴ N(p,α) ¹¹ C	0,959 MeV	Perfusion, Diagnostik
¹³ N	9,96	¹⁶ O(p,α) ¹³ N	1,197 MeV	Perfusion
¹⁵ O	2,03	¹⁴ N(d,n) ¹⁵ O	1,738 MeV	Perfusion
¹⁸ F	109,65	¹⁸ O(p,n) ¹⁸ F	0,633 MeV	Metabolismus
⁶⁸ Ga	67,71	⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga	1,898 MeV	Perfusion, Diagnostik
⁸² Rb	1,15	⁸² Sr/ ⁸² Rb	3,148 MeV	Perfusion

In den letzten Jahren wurden die Vorzüge des CT mit denen der PET/SPECT in Kombinationsgeräten vereint. Folglich liefert eine Untersuchung exakte morphologische Informationen (CT) sowie hoch aufgelöste, biologische Informationen (PET).

Für PET-Myokardperfusionsmessungen stehen traditionell drei Nuklide zur Auswahl: ¹³N, ¹⁵O, ⁸²Rb. Ihre Halbwertszeiten liegen in einer Größenordnung. Die Herstellung von ¹³N und ¹⁵O erfolgt an einem Zyklotron, das - bedingt durch die kurze Halbwertszeit - in unmittelbarer Nähe zu ihrem Applikationsort liegen muss. Chemische Synthesen sind nur limitiert möglich. ⁸²Rb besitzt die beste, mobile Verfügbarkeit auf Grund seines Radionuklidgeneratorsystems.

[¹³N]NH₃ diffundiert nach Injektion als neutrales Molekül in die Myozyten und wird dort als [NH₄]⁺ vorliegend enzymatisch in den Glutamin-Pool eingeschleust und in der Zelle zurückgehalten. Man spricht von „metabolischem Trapping“. ²⁴ Somit liegt trotz kurzer, physikalischer Halbwertszeit eine relativ lange biologische Halbwertszeit vor. Da es sich um einen nicht-diffundierfähigen Tracer handelt, verhält sich die Netto-Extraktionsrate invers zum Blutfluss: bei steigendem Blutfluss nimmt die Tracerretention ab. Eine resultierende Unterschätzung der Myokardperfusion bei hohen Flüssen (>2,5 mL/min/g) ist von Nachteil. ²⁸

Die Applikation von [¹⁵O]H₂O läuft entweder als direkte Injektion oder als Inhalation von [¹⁵O]CO₂ mit anschließender Hydrierung zu [¹⁵O]H₂O seitens der in der Lunge vorkommenden Carboanhydrase ab. ²⁴ Der Tracer diffundiert frei in die Myozyten und weist auch bei hoher Flussrate eine lineare Beziehung zwischen Aufnahme und Blutfluss auf.

⁸²RbCl wird über den ⁸²Sr/⁸²Rb-Generator gewonnen. Das K⁺-Analogon passiert nach Injektion die Kapillarmembran und wird mit Hilfe der Na⁺/K⁺-ATPase aktiv aus dem Plasma in die Myozyten transportiert. Dies geschieht in Abhängigkeit von der Perfusion. ²⁹ Nachteilig ist die relativ hohe β⁺-Energie, die in einer größeren, räumlichen Unschärfe resultiert. Zusätzlich zeigt auch ⁸²RbCl charakteristische Merkmale eines nicht-diffundierfähigen Markers (Netto-Extraktionsrate invers zum Blutfluss).

Metabolismus-Diagnostika konzentrieren sich auf radioaktiv-markierte Glukose und Fettsäuren. Ein Ansatz ist die biogene Markierung der Substrate, da die Verstoffwechslung von markiertem und natürlichem Substrat identisch ist. Hierfür wird meist ¹¹C verwendet, das ein benachbartes Zyklotron unabdingbar macht. [1-¹¹C]Glukose bewertet die Glukoseaufnahme, [1-¹¹C]Palmitat spiegelt die Fettsäureaufnahme/-oxidation wider und [1-¹¹C]Acetat lässt Rückschlüsse zum Sauerstoffverbrauch

zu.³⁰ Ein anderer Ansatz ist die Applikation des Substratanalogons [2-¹⁸F]Fluor-2-desoxy-D-Glukose (FDG). [2-¹⁸F]FDG wird analog zur normalen Glukose über Transporter in die Zelle aufgenommen, dort von der Hexokinase phosphoryliert und intrazellulär getrappt, da eine weitere Umsetzung nicht mehr erfolgt.

Die myokardiale Viabilitätsanalyse des linken Ventrikels erfolgt in der Regel mit [2-¹⁸F]FDG. Im Allgemeinen nutzt man eine Kombination aus Blutfluss- und Glukosebildung in Form von [¹³N]NH₃/ [2-¹⁸F]FDG oder ⁸²Rb/[2-¹⁸F]FDG. Winterschlafendes und wiederholt ischämisches Gewebe lassen sich auf Grund eines Missverhältnisses von Perfusion/Metabolismus identifizieren ([2-¹⁸F]FDG > [¹³N]NH₃/⁸²Rb). Narbengewebe hingegen zeigt charakteristischerweise in beiden Untersuchungsverfahren eine reduzierte Aufnahme.^{15,31}

Vorhersagen bezüglich des medizinischen Nutzens einer Revaskularisierung von geschädigtem Gewebe sind somit möglich.

1.3.3. Das PET-Nuklid ⁶⁸Ga

1.3.3.1. Die Chemie des Galliums

Das selten vorkommende Metall Gallium ist ein Element der 3. Hauptgruppe (Borgruppe) im Periodensystem und besitzt die Elektronenkonfiguration [Ar]3d¹⁰4s²4p¹. ⁶⁸Ga spielt eine bedeutende Rolle als PET-Nuklid. Es zerfällt innerhalb 67,71 min über einen 89 %igen β⁺-Zerfall mit einer maximalen β⁺-Energie von 1,9 MeV in das stabile ⁶⁸Zn. Der vernachlässigbare Anteil an γ-Emission (1,077 keV; 3,22 %) bewirkt eine geringe Strahlenbelastung des Patienten. Optimale pharmakokinetische Eigenschaften ergeben sich aus der relativ kurzen Halbwertszeit, die sehr gut mit den Kinetiken der meisten Radiopharmaka harmoniert.³² Zusätzliche Attraktivität erlangt ⁶⁸Ga durch seine Verfügbarkeit über den ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-Radionuklidgenerator, der eine Zyklotron-unabhängige Produktion direkt am Applikationsort ermöglicht.

⁶⁸Ga kommt hauptsächlich in der Oxidationszahl +III (3d¹⁰) vor. In wässriger Lösung liegt Gallium als dreiwertiges, hydratisiertes Ion vor. Allerdings ist es nur im Sauren stabil, da bei einem höheren pH von 3 - 7 Hydrolyse zum unlöslichen Gallat Ga(OH)₃ erfolgt. Anhand des HSAB-Konzepts lässt sich ⁶⁸Ga als harte Säure klassifizieren, die mit harten Lewis Basen (N, O als Donoratome) wie Carboxylate, Phenole, Phosphonate, Amine thermodynamisch stabile Komplexe bildet. Die stabilsten Komplexe bildet ⁶⁸Ga mit der Koordinationszahl (KZ) 6, wobei auch vier- und fünffach koordinierte Verbindungen auftreten. Ga³⁺ zeigt eine hohe Ähnlichkeit zur Koordinationschemie des Fe³⁺. Als Ursachen sind fast identische Ionenradien (62 pm für Ga³⁺ und 65 pm für Fe³⁺), die gleiche stabile Oxidationsstufe +III, die daraus resultierenden, vergleichbaren Elektronenkonfigurationen (Ga³⁺: 3d¹⁰; Fe³⁺: 3d⁵), ähnliche Elektronegativitäten (EN (Ga): 1,81; EN (Fe): 1,83) und die übereinstimmende KZ sechs zu nennen.³³

1.3.3.2. Der ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-Radionuklidgenerator

Eine Alternative zu Zyklotron-produzierten β⁺-Emittlern sind PET-Nuklide, die über einen Radionuklidgenerator verfügbar sind. Radionuklidgeneratoren enthalten in der Regel ein langlebiges Mutternuklid, das auf einer stationären Phase fixiert ist und durch seinen Zerfall das gewünschte

Tochternuklid generiert. Eine selektive Elution der Tochter gelingt dann, wenn eine chemische Diversität der beiden vorliegt. Die Kombination des langlebigen ^{68}Ge ($t_{1/2} = 270,95 \text{ d}$) mit ^{68}Ga ($t_{1/2} = 67,71 \text{ min}$) liegt im säkularen Gleichgewicht vor. Weitere wichtige PET-Nuklidgeneratoren sind $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$, $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ und $^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$.

Tabelle 2: Medizinisch relevante Radionuklidgeneratoren

Generator	Mutter ($t_{1/2}$)	Tochter ($t_{1/2}$)
$^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$	47,3 a	3,93 h
$^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$	9,26 h	9,74 min
$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$	270,8 d	67,71 min
$^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$	25,6 d	1,27 min
$^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$	28,5 d	2,67 d

^{68}Ge wird meist über eine (p,2n)-Reaktion ausgehend von ^{69}Ga -Targets hergestellt.

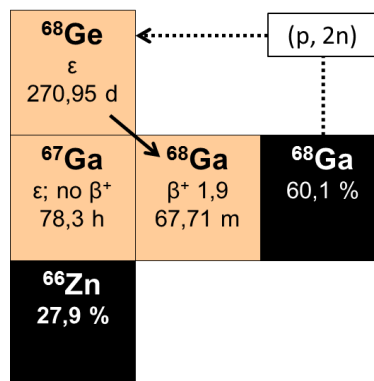


Abbildung 8: ^{68}Ge -Produktion³²

Als stationäre Phase der kommerziellen Generatoren kommen hauptsächlich anorganische Materialien wie TiO_2 und SnO_2 zum Einsatz, da sie weniger anfällig gegenüber Radiolyse sind als organische. Die Elution des ionischen ^{68}Ga erfolgt trägerfrei mit verdünnter Salzsäure, deren Konzentration je nach Generatortyp variiert. So kann bei neuen Systemen 70 - 80 % des generierten ^{68}Ga erhalten werden, wobei die Elutionsausbeute mit dem Alter abnimmt. Der ^{68}Ge -Durchbruch beträgt etwa 0,01 - 0,001 % und steigt mit der Elutionsanzahl. Da das Primäreluat neben dem ^{68}Ge auch Verunreinigungen wie $^{68}\text{Zn}^{2+}$, Fe^{3+} und Ti^{4+} enthält, ist eine anschließende Aufreinigung von Vorteil. Hierfür sind drei Varianten etabliert:

- Fraktionierung des Eluats: Ohne weitere Aufreinigung werden die Fraktionen mit mind. 66 % der maximalen ^{68}Ga -Aktivität verwendet. Eine Volumenreduktion wird unter Aktivitätsverlusten erreicht.³⁴
- Kationen-Austauscher: Das Generatoreluat läuft über einen Kationenaustauscher, $^{68}\text{Ga}^{3+}$ wird fixiert und erst nach Waschsritten selektiv in geringem Volumen mit verschiedenen Lösungen eluiert.^{35,36}
- Anionen-Austauscher: Elution mit höher konzentrierter HCl liefert $[\text{}^{68}\text{GaCl}_4]^-$, das auf dem Anionenaustauscher absorbiert und nach Aufreinigung selektiv mit wenig Wasser eluiert wird.³⁷

Durch das Kationenaustauscher-basierte Post-Prozessing des Primäreluats können ^{68}Ga -Radiopharmaka sicher, reproduzierbar und mit hohen spezifischen Aktivitäten synthetisiert werden.³⁸ Zudem erleichtert das verringerte Volumen die pH-Wert-Einstellung, die für eine optimale ^{68}Ga -Markierung notwendig ist.

Von Vorteil ist ein Generatorsystem auch dadurch, dass die Radiotracer-synthese direkt am Einsatzort unter geringem Kostenaufwand durchgeführt werden kann. Zusätzlich erlauben als Kit verfügbare Tracer eine zu jeder Zeit mögliche, direkte Radiopharmakonherstellung. Die Summe dieser Vorteile hat in den letzten zehn Jahren zu einem verstärkten Interesse an ^{68}Ga -Anwendungen geführt. Sowohl in der Tumordiagnostik als auch in Therapieplanung konnten ^{68}Ga -Radiopharmaka vielversprechende Ergebnisse vorweisen.^{38,39}

1.3.3.3. Komplexchemie des Galliums

Als Metall kann Gallium keine kovalenten Bindungen mit organischen Molekülen eingehen. Zur Komplexierung werden daher Chelatoren eingesetzt, die es stabil koordinieren. Im Vergleich zu reinen Chelatoren verfügen bifunktionelle Chelatoren (BFC) zusätzlich zu den für das Radiometall notwendigen sechs Koordinationsstellen über eine weitere funktionelle Gruppe, um an einen Targeting-Vektor (TV) kovalent anknüpfen zu können. Zwischen Chelator und TV ist optional ein Linker eingebaut, dessen jeweilige Struktur sowohl Variationen in der Pharmakokinetik erlaubt als auch den Abstand zwischen Pharmakophor und bildgebender Einheit vergrößert.⁴⁰

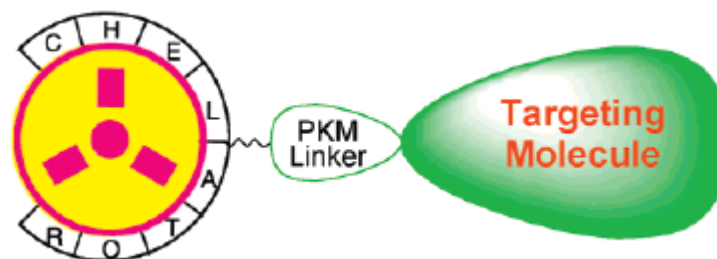


Abbildung 9: Aufbau eines BFCs⁴⁰

Bevorzugt wurden in letzten Jahren zyklische Chelatoren eingesetzt, da diese für dreiwertige Metalle eine hohe thermodynamische und kinetische Stabilität besitzen. Somit ist eine Transchelatierung durch das im Blut vorliegende Plasmaprotein Transferrin, welches eine hohe Affinität gegenüber Ga^{3+} besitzt, nicht möglich. Etabliert sind die makrozyklischen BFCs 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) und 1,4,7-Triazacyclononan-1-glutarsäure-4,7-diessigsäure (NODAGA), das eine strukturelle Variation des monofunktionalen Chelators 1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure (NOTA) ist.

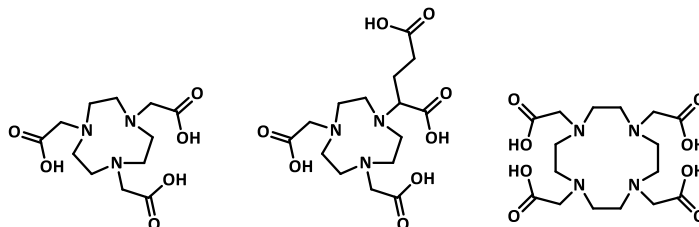


Abbildung 10: Strukturen von NOTA, NODAGA und DOTA

Der Hohlraum innerhalb der Triazaliganden hat die ideale Größe zur Koordination des Ga^{3+} . Dies spiegelt sich in der hohen thermodynamischen Stabilitätskonstante für $^{68}\text{Ga}[\text{NOTA}]$ mit $\log K = 30,98$ ($^{68}\text{Ga}[\text{DOTA}]$: $\log = 21,33$) und in der hohen Markierungseffizienz bei Raumtemperatur (RT) wider. DOTA als größerer, zwölfzähliger Ligand benötigt zwar höhere Markierungstemperaturen, ergibt aber dennoch kinetisch sehr stabile Verbindungen.⁴¹ Neuere Strukturen wie 1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-tris(methyl(2-carboxyethyl)phosphinsäure (TRAP-Pr)⁴² und 6-Amino-6-methylperhydro-1,4-diazepin-N,N',N'-tetraessigsäure (AAZTA)⁴³ nutzen die Selektivität des NOTA-Grundgerüsts und erzielen äußerst ^{68}Ga -affine Chelatoren.

1.3.3.4. ^{68}Ga -Myokardtracer

Eine Reihe myokardaffiner Verbindungen, die sich mit ^{68}Ga markieren lassen, wurden bereits entwickelt.

Green et al. synthetisierten verschiedene azyklische Schiff'sche Base-Komplexe der Struktur 1,1,1-tris-(5-Methoxy-salicylaldiminmethyl)ethan $[(\text{sal})_3\text{tame}]$ und 1,1,1-tris-(alkoxysalicylaldiminmethyl)ethan $[(\text{ROsal})_3\text{tame}]$. Hierbei handelt es sich um lipophile, neutrale Verbindungen, die auf Grund ihrer Blutflussabhängigkeit nur bedingt zur Perfusionsdiagnostik geeignet sind.⁴⁴ Variationen durch Addition von Alkyloxy-Substituenten am Ethyl-Rückgrat erfolgten dahingehend, dass durch größere Lipophilie die Herzaufnahme gesteigert werden sollte. Eine Verbesserung führte zu einer erhöhten Leberaufnahme.⁴⁵ Hsiao et al. gelang es, über die Einführung von Alkylsubstituenten an die bekannten BAPEN-Rückgrate, lipophile, einfach positiv geladene Tracer herzustellen. Diese verfügen über eine mit den $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Derivaten vergleichbare Myokardanreicherung.⁴⁶

Des Weiteren ist die Entwicklung von bis-Aminoethanthiol-cyclohexyl (BAT-TECH) Liganden zur Visualisierung des Herzens beschrieben. Die ^{68}Ga -Komplexe fluten schnell im Myokard an, werden aber relativ schnell ausgewaschen, was zu ungünstigen Herz/Blut-Werten führt. Außerdem resultiert die hohe Lipophilie der Substanzen in vermehrter Leberaufnahme.^{47,48}

Cutler et al. synthetisierten 1999 den S_3N -Liganden Tris-(2-mercaptobenzyl)amin. Auf Grund des lipophilen Charakters sowie der Ladungsneutralität des Komplexes erfolgt verstärkt eine Anreicherung in Hirn, Herz und Leber.

1.3.4. Der ideale Myokardperfusionstracer

Um den Blutfluss exakt quantifizieren zu können, sollte der Tracer eine gute Bioverfügbarkeit besitzen, die durch eine hohe First-Pass-Effekt-Extraktionsrate (FPER ≈ 1) zustande kommt. Von den etablierten Verbindungen weist lediglich $[^{15}O]H_2O$ dieses Kriterium auf; alle anderen (^{99m}Tc -Derivate, ^{201}Tl , ^{83}Rb) sind durch Werte < 1 gekennzeichnet. Dies führt zu einem Plateau bei hohen Flussraten, sodass bei 2 - 2,5fach erhöhter Ruheperfusion geringgradig ischämisches Gewebe nicht diagnostizierbar ist. Eine Tracerakkumulation mittels freier Diffusion fördert zusätzlich die FPEF.²³

Des Weiteren ist die Retention des Tracers nötig. Wird das Radiopharmakon im Herzen zurückgehalten, können auf Grund hoher Zählraten und einer stabilen Verteilung mit geringer Hintergrundaktivität, hochwertige Bilder erhalten werden. Auch Stressdiagnostik unter körperlicher Anstrengung kann bei retinierenden Tracern angewandt werden. Erstrebenswert ist eine einmalige Tracerinjektion für Ruhe- und Belastungsmessungen.

Außerdem ermöglicht der Einsatz kurzlebiger Radionuklide die Aufnahme schneller Serienbilder.³⁰

1.4. Der Mitochondrien Komplex I als Target

1.4.1. Die Mitochondrien und ihre Funktion

Aerobe Zellen gewinnen den Großteil ihrer benötigten Energie in Form von ATP durch die in den Mitochondrien ablaufende Atmungskette. Substratkettenphosphorylierung außerhalb dieser Elektronentransportkette stellt zusätzlich kurzfristig verfügbare Energie bereit.

Während der Atmungskette ablaufende, biochemische Redoxreaktionen übertragen Elektronen, die in Form von NADH, FMNH₂ und FADH₂ aus dem Citratzyklus und der β -Oxidation eingeschleust werden, auf ein Oxidationsmittel, wodurch die Reduktion von O₂ zu H₂O statt findet.⁴⁹

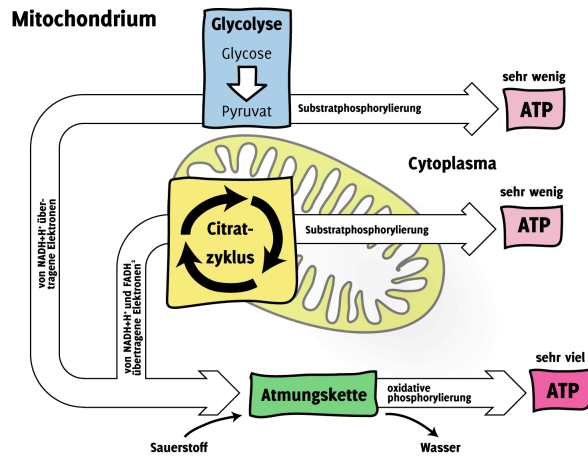


Abbildung 11: Energiegewinnung von Zellen⁵⁰

Der Ort, an dem die Atmungskette abläuft, ist bei Eukaryoten die innere Mitochondrienmembran. Mitochondrien sind Zellorganellen, die von einer Doppelmembran umschlossen sind und eigene DNA besitzen. Die äußere Membran enthält zahlreiche Porine (integrale Proteinkanäle), wodurch Ionen und Moleküle (bis zu 5000 Da) aus dem Zytosol in das Mitochondrium diffundieren können. Bedingt durch das Vorhandensein der ATP-Synthase besitzt die innere Mitochondrienmembran die wichtigste Funktion des Zellorganismus. Sie begrenzt die Matrix, in der Ribosomen, mitochondriale DNA und verschiedene Enzyme, die an der Gewinnung von Reduktionsäquivalenten beteiligt sind, vorliegen. Cristae, die Einstülpungen der inneren Mitochondrienmembran, führen zu einer Oberflächenvergrößerung und erhöhen damit die ATP-Syntheserate.

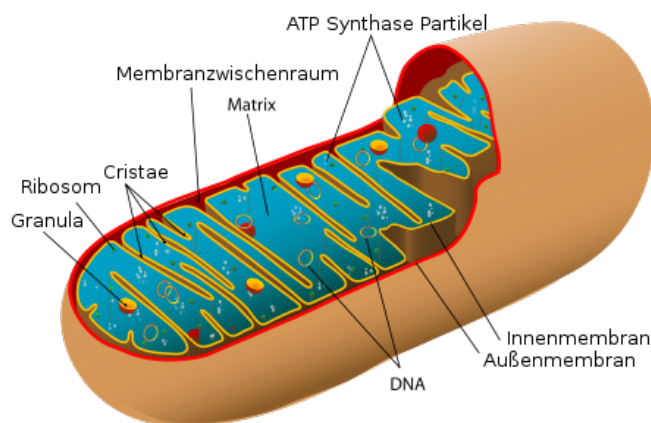


Abbildung 12: Aufbau eines Mitochondriums⁵¹

Das Zusammenspiel von oxidativer Phosphorylierung und Chemiosmosis zur ATP-Herstellung wurde bereits 1961 von Peter Mitchell postuliert (Mitchell-Hypothese).⁵² Seine Entdeckung, dass der Konzentrationsunterschied der Na^+/H^+ -Ionen inner- und außerhalb der Matrix für den Antrieb der ATP-Synthase verantwortlich ist, wurde 1978 mit dem Nobelpreis in Chemie ausgezeichnet.

Die Atmungskette setzt sich aus vier Enzymkomplexen zusammen, die für den Elektronentransport verantwortlich sind und auf Grund der Protonentranslokation ein Membranpotential aufbauen, das im letzten Schritt die ATP-Synthase zur Energiegewinnung antreibt.

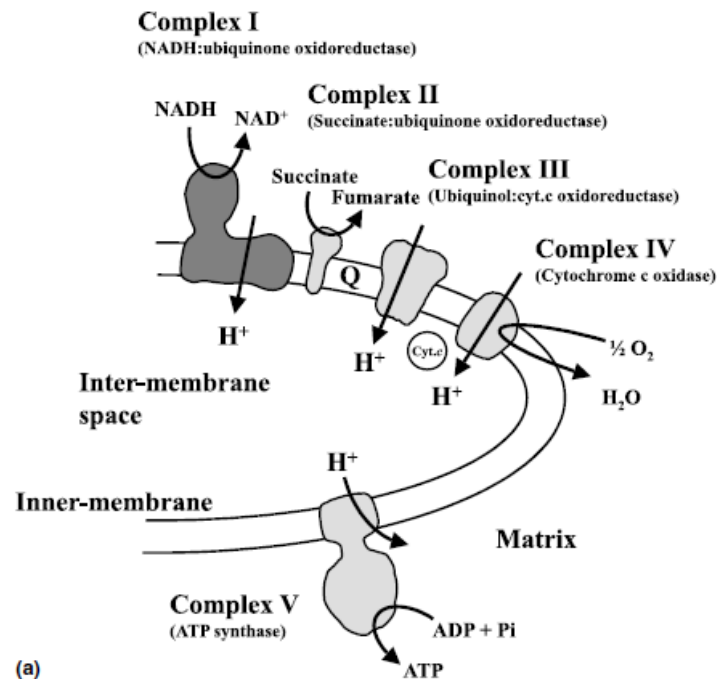


Abbildung 13: Die Atmungskette⁵³

Der Eintritt des NADH als Wasserstoffüberträger erfolgt an Komplex I, der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase. Elektronen fließen ausgehend von NADH über die prosthetischen Gruppen auf das Ubichinon (Q), welches zu Ubichinol (QH₂) reduziert wird. Pro erhaltenem NAD⁺ wandern 3 - 4 H⁺ in den Intermembranraum. Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase, stellt die Verbindung zum Citratzyklus her. Succinat wird zu Fumarat oxidiert, wodurch Elektronen auf Q übertragen werden und dessen Reduktion zu QH₂ abläuft. Allerdings liefert dieses Enzym keinen Beitrag zum Aufbau des Protonengradienten. Die Cytochrom-c-Reduktase bildet den dritten Proteinkomplex. Zwei Q werden reduziert, und 4 H⁺ tragen zum Protonengradienten bei. Die Cytochrom-c-Oxidase bildet den vierten Bestandteil der Atmungskette. Eine Elektronenübertragung auf O₂ resultiert in der Oxidation des Cytochroms c und in der Bildung zweier Wassermoleküle, wobei 4 weitere H⁺ aus der Matrix gepumpt werden. In Komplex V, der ATP-Synthase, erfolgt die protonenabhängige ATP-Synthese.

Organe bzw. Zellen mit einem großen Energiebedarf - wie Gehirn, Muskeln und speziell das Herz - besitzen eine besonders hohe Anzahl an Mitochondrien. Hier kann das Organvolumen bis zu 36 % aus Mitochondrien bestehen.⁵⁴ Folglich bieten sich die Mitochondrien als Target zur Visualisierung des Myokards mittels PET an, da mit einer selektiven Anreicherung des Radiopharmakon zu rechnen ist.

1.4.2. Aufbau und Funktion des Mitochondrien-Komplexes I

Die Isolierung des größten und kompliziertesten Enzyms der Elektronentransportkette erfolgte vor 50 Jahren.⁵⁵ Dennoch sind sowohl die Molekularstruktur als auch der exakte Mechanismus noch nicht vollständig geklärt.^{56,57}

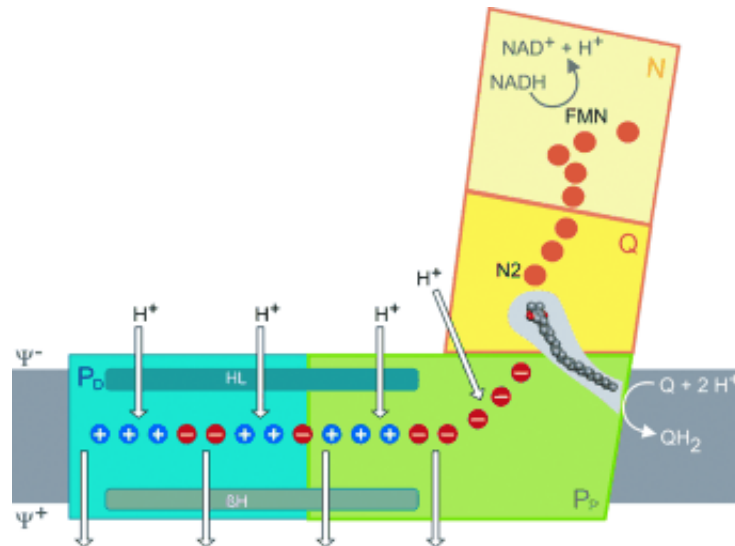


Abbildung 14: Schematisches Model des MC I⁵⁸

Der Komplex I ist L-förmig in die Membran eingebaut und setzt sich aus zwei Domänen, die sich etwa im 90°-Winkel zu einander befinden, zusammen: ein Arm reicht in die periphere Matrix hinein; der andere ist vollständig in die Membran integriert.⁵⁹ Insgesamt sind in Säugetieren bis zu 46 Untereinheiten (UE) bekannt, die eine Gesamtmasse von ca. 1000 kDa ergeben.^{60,61} 14 zentralen UE können bioenergetische Funktionen zugeordnet werden,⁶²⁻⁶⁴ wohingegen die Funktion der 32 zusätzlichen UE noch ungeklärt ist.⁶⁵ Der periphere, hydrophile Arm besteht aus 7 Untereinheiten, die sowohl das Bindungsmotiv des FMN, der Fe-S-Cluster als auch des NADH aufweisen.⁶⁴ 52 – 59 Transmembranhelices verankern die 7 hydrophoben UE des membrangebundenen Arms in der Lipiddoppelschicht. Obwohl alle prosthetischen Gruppen dem peripheren Arm zugeordnet wurden, muss der Protonen-Pump-Mechanismus im hydrophoben Teil des Enzyms lokalisiert sein.⁶⁶

Die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase lässt sich in drei funktionelle Module unterteilen

1. Das **N-Modul**: Hier findet die Elektronenübertragung von NADH, über FMN auf die 4 Fe-S-Cluster (N3, N1b, N4, N5) statt. Es beinhaltet die 75 kDa-, 51 kDa- und 24k Da-UE.⁶⁷ Das FMN ist nicht-kovalent an die 51-kDa UE gebunden, an deren N-Terminus die NADH-Bindungsstelle sitzt.⁶⁸
2. Das **Q-Modul**: Es akzeptiert die Elektronen des N-Moduls und gibt sie über drei weitere Fe-S-Cluster (N6a, N6b, N2) an das Q ab. Zusammengesetzt ist es aus der 49 kDa-, 30 kDa-, TYKY- und PSST-UE. N2 gilt als direkter Elektronenüberträger auf Q und bildet in Kombination mit der 49 kDa-UE das katalytische Zentrum.⁶⁹

3. **Das P-Modul:** Das P-Modul umfasst die ND1-, ND2-, ND3-, ND4-, ND4L-, ND5- und ND6-UE und lässt sich in eine proximale und distale Domäne untergliedern,⁷⁰ die von einer langen, lateralen Helix und mehreren β -Haarnadel-Helixelementen verbrückt wird.⁷¹ ND2, ND4, ND5 scheinen aus Na^+/H^+ -Antiportern entstanden zu sein. Folglich wird ihnen die Protonentranslokation zugeordnet.⁶⁸ Außerdem ist ein viertes Protonenpumpelement bekannt. Somit stimmt die Anzahl der Protonenpumpelementen mit den stöchiometrisch bestimmten 4 H^+ überein.⁵⁸

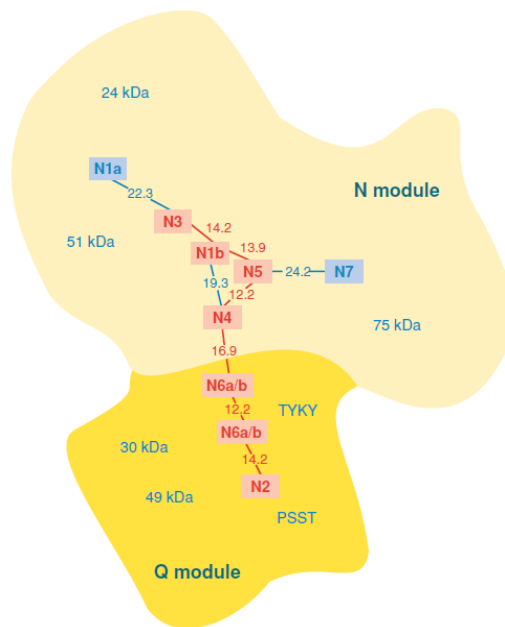


Abbildung 15: Untereinheiten der N- und Q-Module des MC I⁵⁷

Der periphere Arm setzt sich aus N- und dem Q-Modul zusammen. Ausgehend von der Q-Bindungstasche verknüpfen positiv und negativ geladene Reste, die auf einer Linie in der Mitte des P-Moduls verlaufen, die Protonenpumpelemente innerhalb der Membran.⁷²

Konservierte Aminosäuren bilden die Substratbindungstasche um die PSST- und TYKY-UE. Eine hydrophobe Plattform aus Val-88, Val-145 und Val-460 ebnet den Zugang des Ubichinons, das an den Tyrosinrest Tyr-144 direkt bindet. Lys-407 und Asp-458 formen eine hydrophile Region, womit insgesamt ein enger, amphiphiler Weg für das Substrat Ubichinon entsteht.⁷³ Ubichinon tritt über eine Wasserstoffbrücke zwischen der phenolischen Hydroxygruppe und dem Chinoncarbonyl mit Tyr-144 in Kontakt.⁷⁴

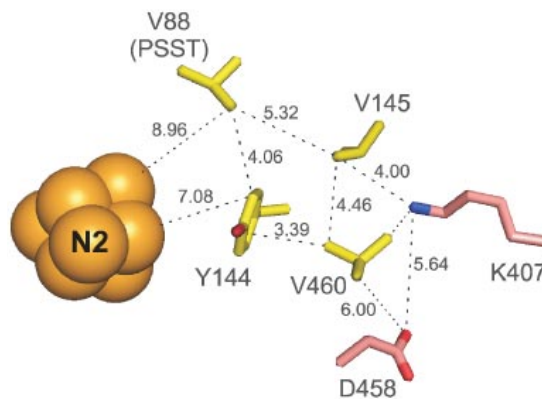


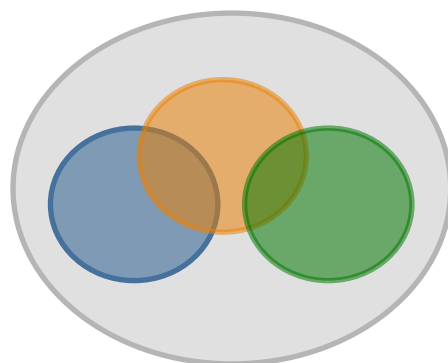
Abbildung 16: Konservierte Reste in der Umgebung der N2-UE⁷³

Der genaue Mechanismus des Enzyms war lange Zeit ungeklärt.⁵⁸ Konformationsänderungen, die von den Redoxvorgängen abhängig sind, sollen die Protonenpumpelemente indirekt oder direkt in Gang setzen.^{66,75-77} Ein weiterer Vorschlag war die Existenz einer inaktiven (D)/aktiven (A) Modifikation des Enzyms. Die Umwandlung erfolgt durch Reduktion bzw. Oxidation, aber auch auf Grund höherer Temperaturen (37°C) und zweiwertiger Kationen.⁷⁸ Die redoxabhängige Konformationsänderung konnte vor kurzem bestätigt werden.⁷²

1.4.3. Mitochondrien Komplex I-Inhibitoren

Bei Insektiziden und Akariziden, die in der Agrarwirtschaft eingesetzt werden, handelt es sich häufig um MC I-Inhibitoren. Indem sie die Elektronenübertragung von N2 auf die Q unterbinden, wird die gesamte Elektronentransportkette unterbrochen.^{79,80} Komplex I erlangte in den 1990er Jahren ein erneuertes Interesse, da dem Neurotoxin 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,-tetrahydropyridin (MPTP) Parkinson-ähnliche Symptome zugeordnet werden konnten. Bedingt durch dessen Interaktion mit dem MC I konnte gefolgert werden, dass hier auftretende Defizite an neurodegenerativen Krankheiten und Enzephalomyopathien mitbeteiligt sind.⁸¹

Das Substrat Q und Inhibitoren besitzen denselben Bindungsort. Innerhalb der Bindungstasche setzen sich drei unterschiedliche, jedoch überlappende Bindungsstellen zu einer gemeinsamen Bindungsdomäne zusammen.⁵⁹ Mit dem Substrat Q konkurrieren eine Reihe hydrophober Inhibitoren um die Anlagerung an die Bindungsdomäne. Sie lassen sich in zwei⁸² bzw. drei⁸³ Klassen unterteilen. Bei Typ A handelt es sich um Q-Antagonisten, Typ B-Vertreter sind QH-Antagonisten, und Typ C-Inhibitoren werden als Q-Antagonisten angesehen. Geht man von einer Unterteilung in nur zwei Klassen aus, entspricht der kompetitive Typ A Klasse I, und Klasse II ist mit dem nicht-kompetitiven Typ B gleichzusetzen.^{59,82}

**A / I**

Piericidin A
DQA
Rolliniastatine
Fenzaquin

B / II

Rotenon
Pyridaben

C

Capsaicin

Abbildung 17: Bindungsstellen von MC I-Inhibitoren innerhalb der Bindungsdomäne des Enzyms mit charakteristischen Inhibitoren (adaptiert von Okun et al.⁵⁹)

Die große chemische Vielfalt der MC I-Inhibitoren lässt kaum Rückschlüsse über strukturelle Anforderungen für eine affine Enzymbindung zu. Lediglich das Vorhandensein eines Heterozyklus mit einem langen, hydrophoben Rest stellt eine strukturelle Gemeinsamkeit dar.⁸⁴ Der bekannteste Vertreter ist das Rotenon.

Kommerziell erhältliche Alkylaminoquinazolin-Insektizide mit sehr hohen Affinitäten zum MC I sind SAN 548A, Sandoz (DQA) ($IC_{50} = 3,8$ nM), Fenzaquin (AQ) (EL-436, DowElanco) ($IC_{50} = 4,0$ nM) und Pyridaben (NC-129, Nissan Chem), ($IC_{50} = 8,0$ nM).⁵⁶ Des Weiteren ist bekannt, dass Detergentien wie Triton X-100 und Thesit ebenfalls in der Lage sind, den MC I zu inhibieren, jedoch nur im μ M-Bereich.⁸⁵

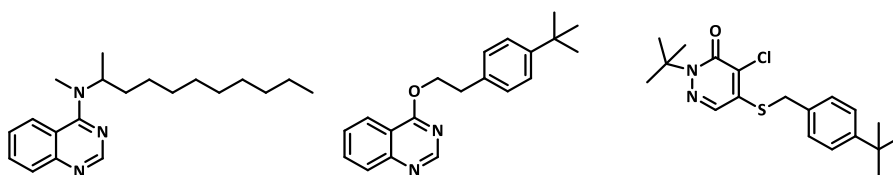


Abbildung 18: Strukturen von SAN 548 A, Fenzaquin und Pyridaben

1.4.4. [¹⁸F]Flurpiridaz

Infolge seines hohen Energiebedarfs weist das Myokard eine hohe Mitochondriendichte auf, wodurch es sich als Target bei der Entwicklung neuer Myokardtracer anbietet. 2006 stellten Madar et al. mit dem [¹⁸F]Fluorbenzyltriphenylphosphium-Ion den ersten ¹⁸F-markierten Herztracer vor.⁸⁶ Mehrere radiomarkierte Insektizide, die am MC I angreifen, wurden bereits evaluiert. [¹²⁵I]Rotenon zeigte *in vivo* eine höhere FPER und längere Retentionszeiten als Sestamibi.⁸⁷ Sowohl ¹⁸F-markiertes

Chromen⁸⁸ als auch ¹⁸F-markiertes Dihydrorotenon⁸⁹ eignen sich zur Myokardperfusions-Diagnostik. 2007 wurde [¹⁸F]BMS-747158-02 als neuer Myokardtracer vorgestellt.^{90,91} Das Analogon des Insektizids Pyridaben zählt zu den MC I-Inhibitoren und wird auch als [¹⁸F]Flurpiridaz bezeichnet. Der IC₅₀ für [¹⁹F]Flurpiridaz konnte über die spezifische Bindung an Myozyten bestimmt werden und liegt bei 16,6 ± 3 nmol/L.⁹¹

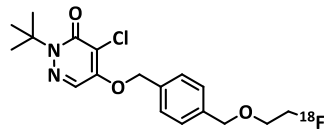


Abbildung 19: Struktur von [¹⁸F]Flurpiridaz

Sowohl in Mäusen,⁹¹ Ratten,⁹² Hasen, Schweinen⁹³ und nicht-humanen Primaten⁹⁰ weist [¹⁸F]Flurpiridaz eine schnelle, selektive Anreicherung im Myokard und einen sehr niedrigen wash-out innerhalb 120 min auf, wodurch exzellente Bilder mit niedriger Hintergrundaktivität resultieren.

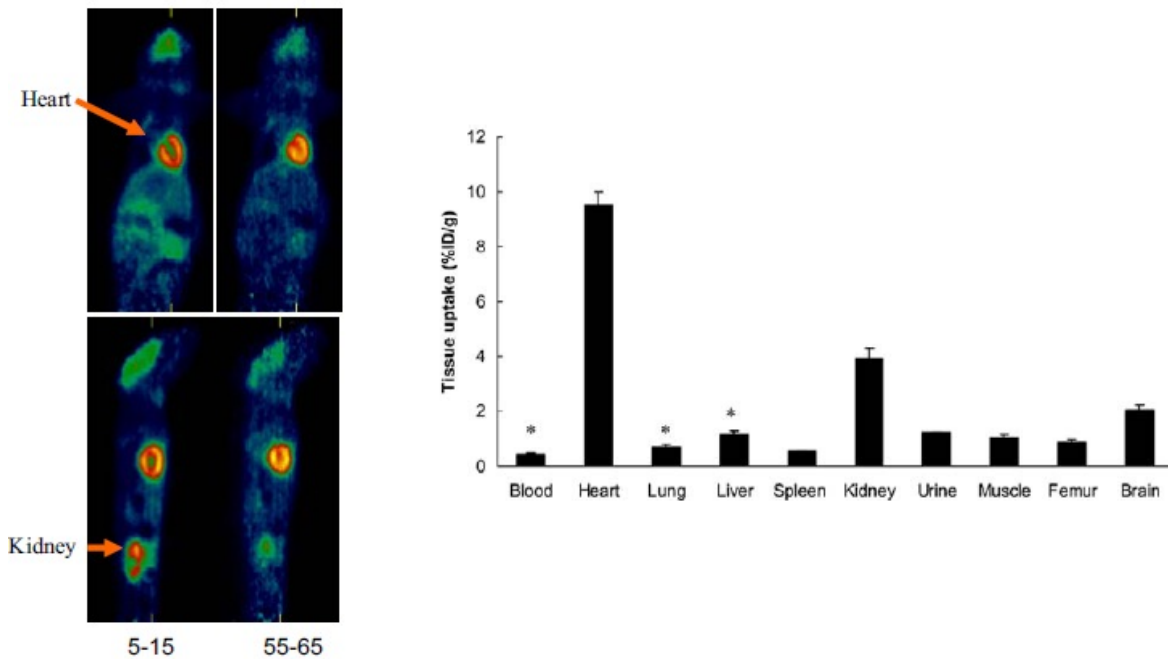


Abbildung 20: Koronale (oben) und sagittale (unten) [¹⁸F]Flurpiridaz-PET Aufnahmen nach 5 - 15 und 55 - 65 min (links); Biodistribution in Mäusen (n = 4) 60 min nach Injektion (rechts)⁹¹

Mit einer an Ratten evaluierten, blutflussunabhängigen (5 – 15 mL/min) FPER > 0,9 liegt eine Linearität zwischen Traceraufnahme und myokardialen Blutfluss vor. Folglich eignet sich [¹⁸F]Flurpiridaz zur Aufnahme von stressinduzierter Perfusion.⁹² Biodistributionsstudien des [¹⁸F]Flurpiridaz in Ratten zeigten nach 15 min im Vergleich zu [^{99m}Tc]Sestamibi eine höhere Myokardanreicherung 3,5 ± 0,3 vs. 1,9 ± 0,1 (%ID/g)), bessere Herz/Lungen-Verhältnisse (9,5 ± 0,8 vs. 2,0 ± 0,1 (%ID/g)) sowie Herz/Leber-Verhältnisse (2,6 ± 0,3 vs. 1,9 ± 0,1 (%ID/g)). Permanente und kurzfristige Okklusionen stellte der Fluortracer in besserem Kontrast zum umliegenden Gewebe

als $[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$ dar. Nach Reperfusion des verengten Gefäßes fand eine Redistribution des Radiopharmakons statt.⁹⁴

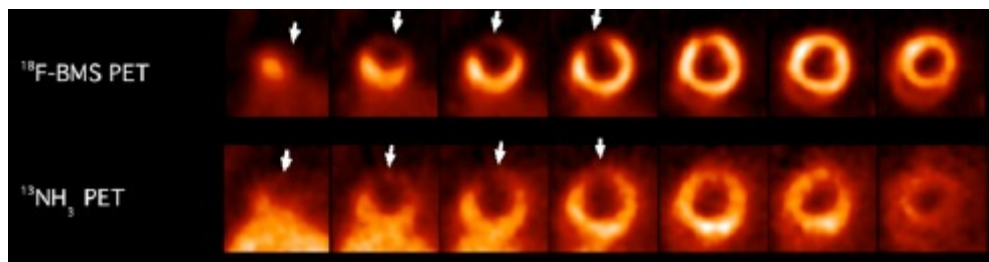


Abbildung 21: Vergleich von $[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$ und $[^{18}\text{F}]\text{Flurpiridaz}$ bei Ratten mit Okklusion nach 15 min der Tracerinjektion; Pfeile zeigen infarzierte Bereiche an⁹⁴

Des Weiteren ergaben Untersuchungen an Ratten mit permanenter/transienter Okklusion exakte Ergebnisse für die Bestimmung der Myokardinfarktgröße sowie der Funktionsbeurteilung des linken Ventrikels.⁹⁵

Die vielversprechenden präklinischen Ergebnisse haben dazu geführt, dass $[^{18}\text{F}]\text{Flurpiridaz}$ in Menschen evaluiert wurde. In Phase I konnte sich $[^{18}\text{F}]\text{Flurpiridaz}$ als sicherer, selektiver Myokardtracer beweisen.⁹⁶ Auch Studien zur Diagnostik der KHK in Phase II ergaben vielversprechende Resultate.⁹⁷

2. Problemstellung und Zielsetzung

Radionuklid-MPI wird seit mehreren Jahren erfolgreich eingesetzt, um minderdurchblutete Myokardbereiche frühzeitig zu erkennen und sowohl den Krankheits- als auch den Therapieverlauf zu prognostizieren. Die Mehrzahl der durchgeführten Perfusionsmessungen erfolgt mit den SPECT-Tracern [^{99m}Tc]Sestamibi und [^{99m}Tc]Tetrofosmin. Ihre Markierungsvorläufer sind in Kit-Form erhältlich und ergeben in Kombination mit dem Generatorkernid ^{99m}Tc eine Verbindung, deren Handhabung und Verfügbarkeit einen flächendeckenden Einsatz ermöglicht. PET-Tracer hingegen erlauben quantitative Aussagen bezüglich der Myokardperfusion. [^{13}N]NH₃ und [^{15}O]H₂O sind häufig verwendete MPI-Tracer, deren sehr kurze Halbwertszeiten allerdings eine unmittelbare Nähe zwischen Synthese- und Applikationsort voraussetzen. $^{82}\text{RbCl}$ ist bedingt durch seine niedrige FPER nur eingeschränkt für quantitative Flussanalysen geeignet. [^{18}F]Flurpiridaz besitzt hervorragende Eigenschaften als MPI-Tracer.

^{68}Ga ist über den $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Radionuklidgenerator verfügbar. ^{99m}Tc -analoge Vorläuferkits sind bereits aus der Octreotidsynthese bekannt, und ihre Handhabung ist seit mehreren Jahren in medizinischen Zentren etabliert. Folglich ist die Entwicklung eines generatorproduzierten PET-MPI-Tracers von großem Interesse.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Synthese eines makrozyklischen MPI-Tracers für das PET-Nuklid ^{68}Ga , der in Kit-Form die flächendeckende Versorgung mit einem quantitativen MPI-Tracer gewährleisten könnte. Als Targeting-Vektor wird die Pyridabeneinheit des [^{18}F]Flurpiridaz gewählt, da dieser Tracer alle die von Glover und Gropler²³ beschriebenen Kriterien eines idealen MPI-Tracers erfüllt.⁹⁸

Die organische Synthese des makrozyklischen MPI-Tracers setzt sich aus vier Komponenten zusammen:

1. Der bifunktionelle Chelator:

Seit vielen Jahren hat sich der Einsatz makrozyklischer, polydenter Liganden für ^{68}Ga bewährt. Sowohl NODAGA als auch DOTA bilden mit ^{68}Ga thermodynamisch stabile und kinetisch inerte Komplexe. Die selektive Anbindung an einen TV erfordert das Vorhandensein einer kopplungsfähigen, funktionellen Gruppe. Hierfür kommen NODAGA/DOTA-Derivate mit einer freien Carbonylgruppe in Frage, die mit primären Aminen unter Verwendung von Kopplungsreagenzien zu Amidbindungen umgesetzt werden können. Außerdem eignen sich Aktivester, die ebenfalls selektiv mit primären Aminen reagieren. Ungeeignet hingegen sind Esterbindungen, da *in vivo* häufig eine Metabolisierung durch Esterasen stattfindet. Eine weitere Möglichkeit ist die Alkylierung des Polyamingerüsts mit dem entsprechenden TV. Außerdem kann die Ladung des Gesamtkomplexes durch die Anzahl an Säuregruppen am Cyclen variiert werden: ^{68}Ga -DOTA ist einfach negativ, ^{68}Ga -DO3A neutral und ^{68}Ga -DO2A einfach positiv geladen.

Folglich sollen

- Stabile NODAGA- und DOTA-TV-Strukturen synthetisiert werden, die eine Temperaturvariation bei der Radiomarkierung ermöglichen.

- der Einfluss der Ladung evaluiert werden, indem sowohl neutrale als auch einfach positiv geladene Komplexe hergestellt werden. Das bestehende Membranpotential in den Myozyten begünstigt die Aufnahme positiv geladener Strukturen.
- ein bzw. zwei TVen angeknüpft werden, um so den Effekt der Multivalenz zu testen. Hierbei geht man davon aus, dass das Einbringen von mehreren TVen in einem Molekül die Wahrscheinlichkeit seiner Bindung an die biologische Zielstruktur erhöht. Dies lässt sich einerseits mit einer größeren Konzentration des TV an der Zielstruktur erklären (Konzentrationseffekt; statistischer Effekt). Andererseits wird auch eine gleichzeitige Bindung des dimeren Moleküls an zwei benachbarte Zielstrukturen diskutiert (multivalente Bindung).^{99,100}

2. Der Linker:

Bei unmittelbarer Nachbarschaft beider Strukturen besteht die Gefahr des Affinitätsverlustes. Sterische Hinderung durch den relativ großen Liganden kann eine erschwerte Anlagerung des TVs in der Enzymbindungstasche zur Folge haben. Um den Abstand zwischen TV und Chelator zu vergrößern, wird meist ein Linker eingebaut. Zusätzlich zur Abstandsverlängerung dient der Linker zur Modifikation der pharmakokinetischen Eigenschaften. Polyethylenglykol (PEG)-Strukturen werden eingesetzt, um die Polarität des Moleküls zu erhöhen. Je mehr PEG-Einheiten verwendet werden, desto ausgeprägter ist der polare Charakter der resultierenden Verbindung. Alkylketten hingegen erhöhen die Lipophilie des Moleküls.

Daher gilt es, den Einfluss des Linkers hinsichtlich folgender Merkmale zu untersuchen:

- Länge: Variationen der Abstandsgröße (kurz vs. lang) ermöglichen die Evaluierung der sterischen Hinderung bezüglich der Affinität des Komplexes.
- Typ: Die Auswirkungen der Art des gewählten Linkers lassen sich durch den Vergleich zwischen polaren, hydrophilen PEG-Einheiten und unpolaren, lipophilen Alkylketten nachvollziehen. Zusätzlich spiegelt sich die Anzahl der jeweiligen Einheiten in der Lipophilie wider. Diese hat ebenfalls einen Effekt auf die Mitochondrienaufnahme: lipophile Verbindungen sind in der Lage, die Lipiddoppelschicht zu durchqueren.

3. Der TV:

Insektizide, die als MC I-Inhibitoren agieren, eignen sich als myokardiale TVen und wurden in der Literatur als potente MPI-Tracer beschrieben.⁸⁷⁻⁸⁹ Die Struktur des Pyridabens soll als TV eingesetzt werden, da das fluormarkierte Derivat [¹⁸F]Flurpiridaz bereits gezeigt hat, eine KHK spezifisch identifizieren zu können.⁹⁷

4. Die Kopplung von BFC und TV:

Um eine Kopplung an den Chelator durchführen zu können, muss zunächst eine Modifikation erfolgen. Purohit et al. stellten 2008 systematische Struktur-Affinitätsbeziehungen auf, die die pharmakophoren Reste im Pyridaben identifizierten.¹⁰¹ Veränderungen an der *tert*-butyl

Gruppe am Pyridazinon resultieren in Affinitätsverlusten.¹⁰² Auch das Chloratom zählt zu den affinen Merkmalen. Das Heteroatom im Linker kann variiert werden; Schwefel ist durch Sauerstoff ohne große Affinitätsverluste ersetzbar. Die Benzylverknüpfung zwischen Heteroatom und Linker muss erhalten bleiben. Eine zusätzliche Methylengruppe reduziert die Affinität deutlich. Strukturelle Veränderungen werden an der Benzylgruppe toleriert, solange eine Substitution mit einer Alkyleinheit in *para*-Stellung erfolgt.¹⁰¹

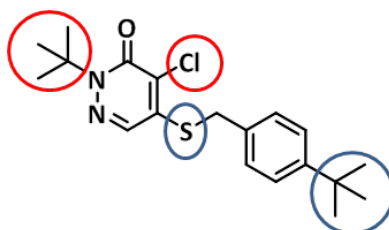


Abbildung 22: Pharmakophore Reste des Pyridabens

Bei der Synthese des TV müssen folglich bestimmte Affinitätsanforderungen erfüllt werden:

- Eine Anbindung des Linkers kann ausschließlich am Benzylring in *para*-Stellung vorgenommen werden.
- Die Modifikation zur Kopplung mit dem Liganden muss endständig am Linker erfolgen.
- Nach der Kopplung durchgeführte Reaktionen müssen mit der Stabilität des TVs kompatibel sein.

Die erhaltenen TV-Chelatoren-Strukturen sollen auf ihre Affinität gegenüber MC I getestet werden. Anhand der IC_{50} -Werte ist die Aufstellung von Struktur-Affinitäts-Beziehungen möglich. Zusätzlich muss die Lipophilie der ^{68}Ga -Komplexe ermittelt werden, da diese ebenfalls Einfluss auf das Bindungsvermögen hat. Außerdem ist die Optimierung der Radiomarkierung mit ^{68}Ga notwendig, um eine möglichst hohe spezifische Aktivität zu erzielen. Stabilitätstests der erhaltenen ^{68}Ga -Komplexe sind vor der Durchführung von Tier- μPET -Studien unabdingbar. Mittels dieser Evaluierungen soll die potenteste Struktur identifiziert und *in vivo* auf ihre Akkumulation im Myokard getestet werden.

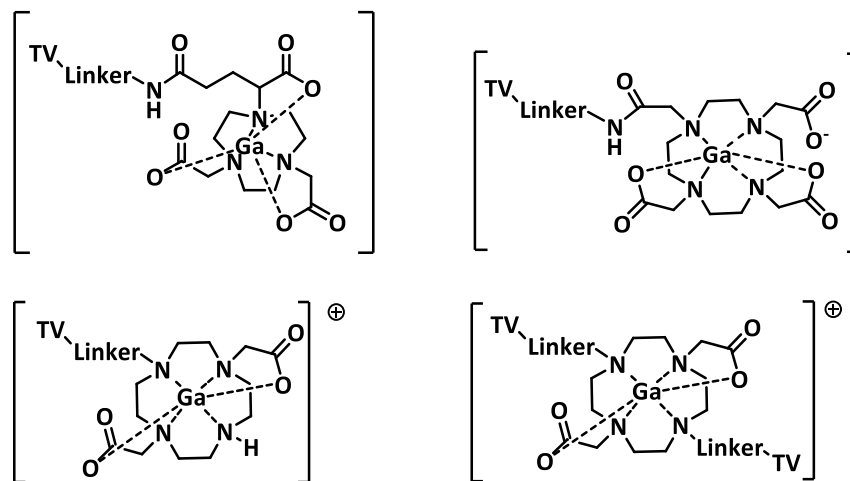
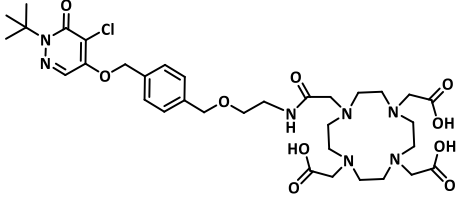
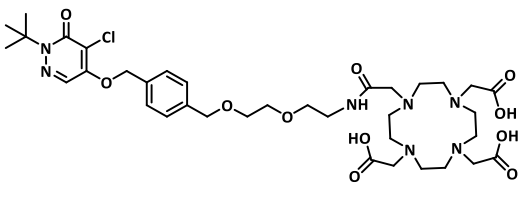
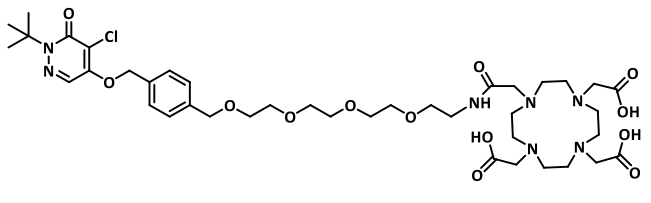
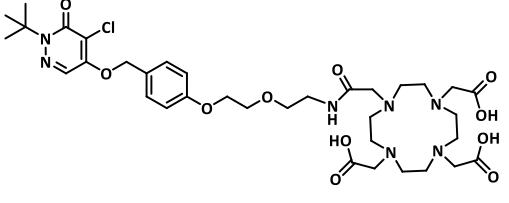


Abbildung 23: Zielstrukturen: neutrale NODAGA- und DOTA-TV-Komplexe (oben) und einfach positiv geladene mono- und dimere-DO2A-TV-Komplexe (unten)

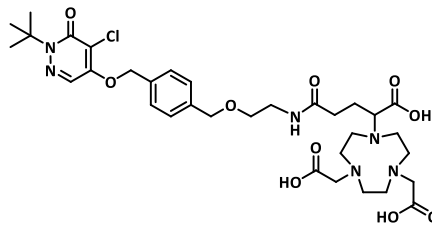
3. Ergebnisse und Diskussion

Es konnten erfolgreich 16 neue makrozyklische Pyridaben-MPI-Tracer synthetisiert werden, die nach Markierung mit dem PET-Nuklid ^{68}Ga für die myokardiale Diagnostik geeignet sein können. Alle Derivate wurden nach HPLC-Aufreinigung hinsichtlich Radiomarkierung, *in vitro*-Stabilität, Lipophilie sowie MC I-Affinität evaluiert. Anhand dieser Daten konnten die potentesten Derivate identifiziert und in biologischen Studien auf ihr *in vivo*- und *ex vivo*-Verhalten getestet werden. μ -PET-Untersuchungen an Ratten sowie Biodistributionsanalysen erfolgten. Die daraus erhaltenen Ergebnisse ermöglichten Rückschlüsse auf Struktur-Affinitätsbeziehungen innerhalb der neuen Klasse an Myokardtracern. Hierbei spielte die systematische Variation struktureller Einheiten eine bedeutende Rolle.

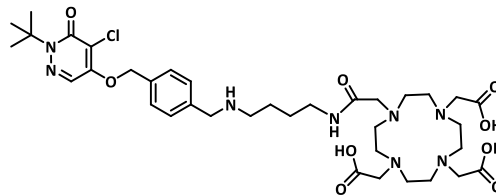
Tabelle 3: Name und Struktur der synthetisierten Markierungsvorläufer

Verbindung	Struktur
VN68.MZ	
VN73.MZ	
VN79.MZ	
VN94.MZ	

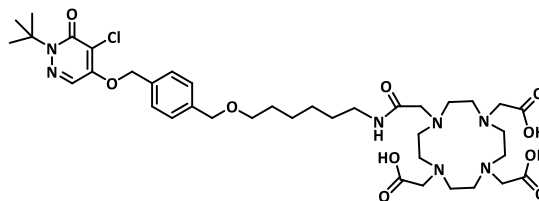
VN108.MZ



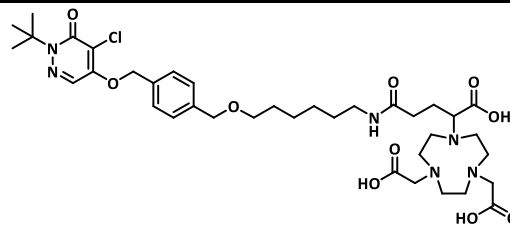
VN110.MZ



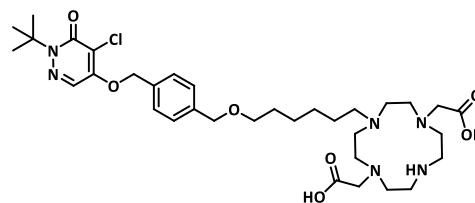
VN143.MZ



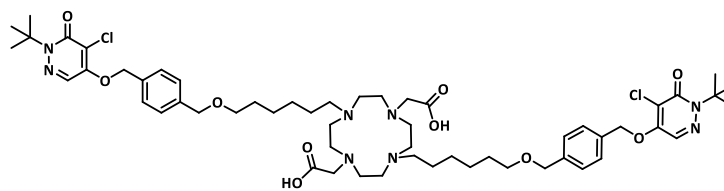
VN213.MZ



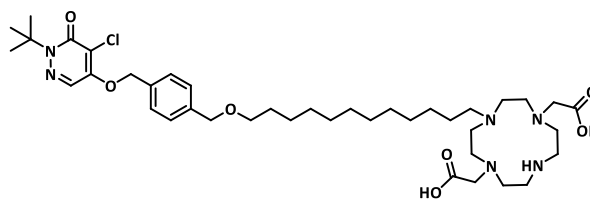
VN195.MZ



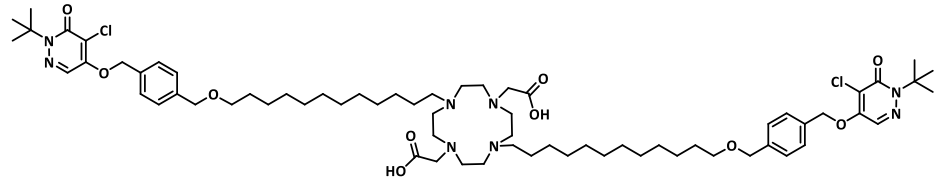
VN165.MZ



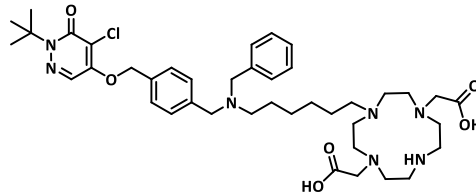
VN167.MZ



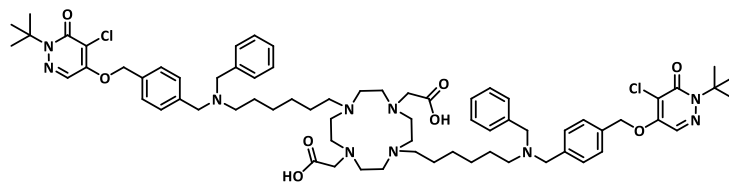
VN160.MZ



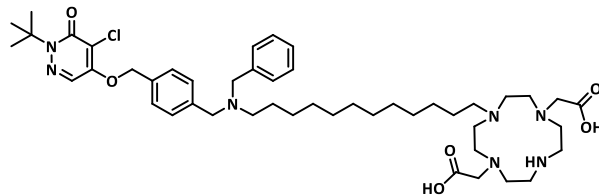
VN223.MZ



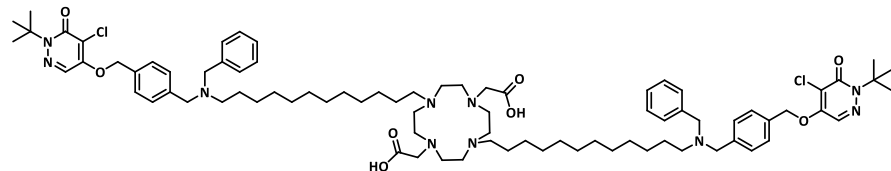
VN214.MZ



VN189.MZ



VN219.MZ



3.1. Organische Synthesen

Die präparative Synthese der makrozyklischen Pyridaben-MPI-Tracer setzte sich aus mehreren Einzelsynthesen zusammen. Zunächst war es notwendig, den Pyridaben-Grundkörper, an den die Linkervariationen gekoppelt werden konnten, herzustellen. Die Modifikation der endständigen funktionellen Gruppe zur Umsetzung mit dem Chelator erfolgte je nach Bedarf des entsprechenden Kopplungstyps. Als Liganden des ^{68}Ga wurden zum einen DOTA- bzw. NODAGA-NHS-Ester eingesetzt, die selektiv mit primären Aminen reagieren. Hieraus ergaben sich bei der ^{68}Ga -Markierung neutrale Komplexe. Eine Myokardanreicherung der Komplexe basierte in diesem Fall ausschließlich auf dem Vorhandensein des myokardaffinen TVs. Zusätzlich wurden sowohl mono- als auch dimere Alkylierungen eines DO2A-Derivats mit den entsprechenden Pyridaben-Alkyl-Bromiden durchgeführt. Die Verwendung der Leitstruktur des DO2A resultierte nach der Umsetzung mit ^{68}Ga in einfach positiv geladenen Komplexen. Eine Akkumulation sollte durch zusätzliches Ausnutzen des Membranpotentials erfolgen. Somit vereinten die DO2A-Derivate zwei Myokard-dirigierende Faktoren gleichzeitig in einem Molekül: die Ladung und den TV.

3.1.1. Synthese des Heterozyklus DCP 2

Allen makrozyklischen Pyridaben-Tracern diene das Pyridazin-Derivat DCP 2 als Ausgangsstoff für die Synthese der verschiedenen TV-Strukturen.

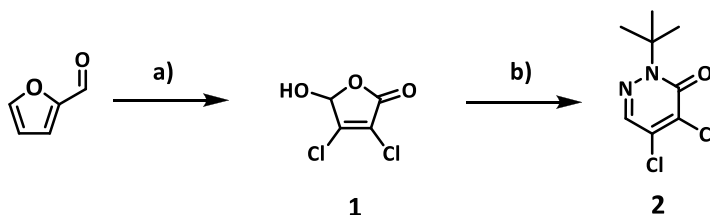


Abbildung 24: Synthese des DCP 2: a) MnO_2 , HCl , 60°C , 45 %; b) *tert*-Butylhydrazinhydrochlorid, Na_2CO_3 , 40°C , 4 h, 59 %

Nach einer Vorschrift von Mou et al.¹⁰³ erfolgte zunächst die Oxidation von Furfurylaldehyd in Anwesenheit von konzentrierter Salzsäure durch Braunstein. Das dichlorierte Produkt **1** konnte in Ausbeuten von 45 - 60 % gewonnen werden. Als maximale Ansatzgröße wurde 10 g des Furfurylaldehyds gewählt, da die Reaktion stark exotherm verlief und größere Eduktmengen die Reaktionsführung deutlich erschwert hätten. Die anschließende Umsetzung mit *tert*-Butylhydrazinhydrochlorid in schwach basischer Lösung bei 40°C ergab mit 48 - 59 % DCP **2**. Die Gesamtausbeute von nur 27 % über beide Stufen stellte, obwohl das DCP **2** als Grundbaustein aller Pyridaben-Derivate diene, kein Problem dar. Kostengünstige Edukte sowie die unkomplizierte Reaktionsführung ohne säulenchromatographische Aufreinigung erlaubten eine schnelle Resynthese bei Bedarf.

3.1.2. Synthese des Pyridaben-Derivats HB-P2OP 13

Bereits im ersten Syntheseschritt erfolgte die Kopplung zwischen der Linkereinheit und dem Benzylgerüst des Pyridabens. Das Einführen der pharmakophoren Struktur DCP 2 geschah erst am Syntheseende.

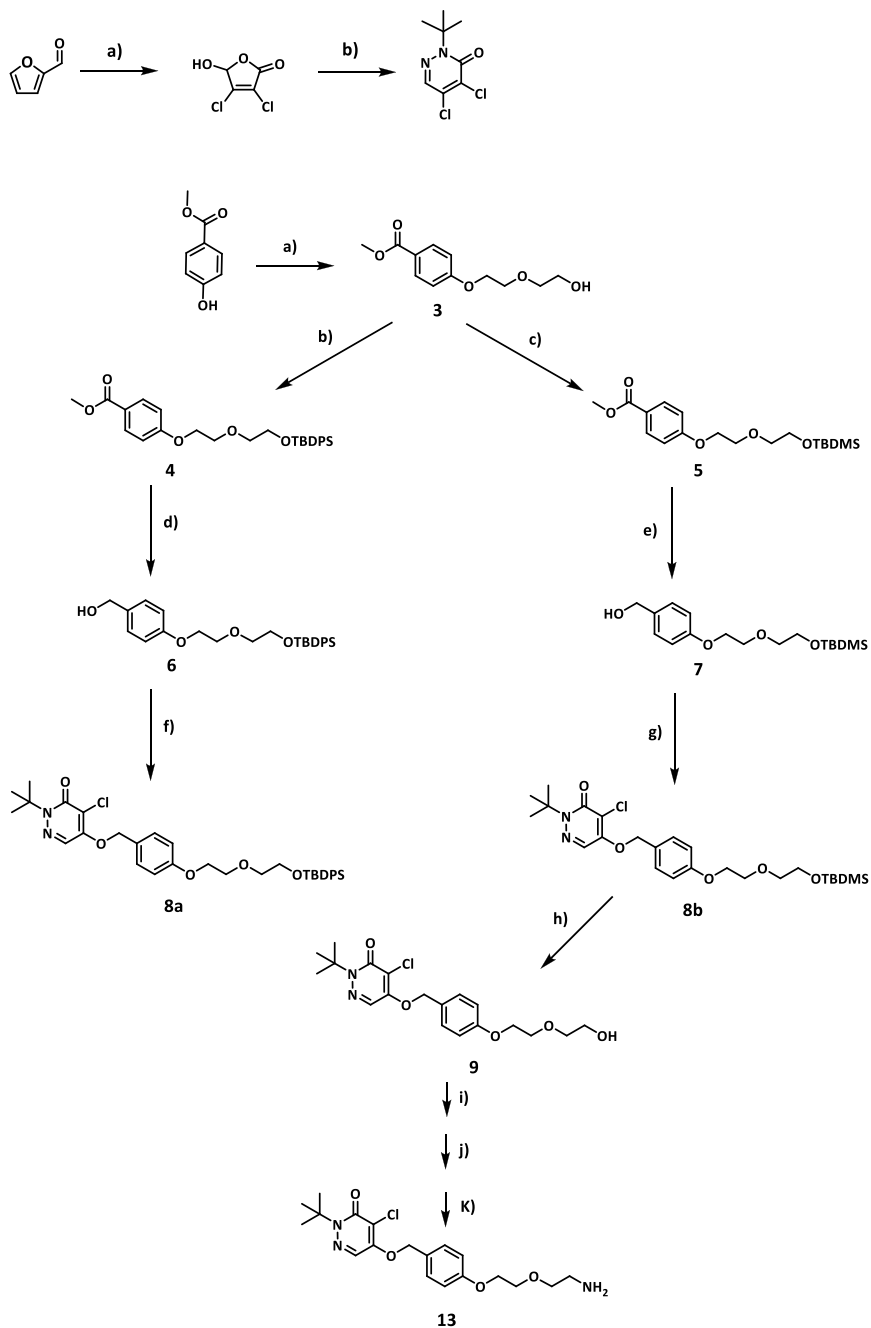


Abbildung 25: Synthese des HB-P2OP-Derivats 13

a) Chlorethoxyethanol, K_2CO_3 , $70^\circ C$, 24 h, 74 %; b) TBDPSCl, DMF, Imidazol, $80^\circ C$, 4 h, 78 %; c) TBDMScI, DMF, Imidazol, $80^\circ C$, 4 h, 48 %; d) $LiAlH_4$, Et_2O , RT, 2 h, 79 %; e) $LiAlH_4$, Et_2O , RT, 2 h, 82 %; f) DCP, DMF, Cs_2CO_3 , $60^\circ C$, 12 h, 19 %; g) DCP, DMF, Cs_2CO_3 , $60^\circ C$, 12 h, 79 %; h) TBAF, THF, RT, 2 h, 70 %; i) $MsCl$, DMF, Et_3N , RT, 2 h, 77 %; j) NaN_3 , DMF, RT, 12 h, 52 %; k) Ph_3P , THF, H_2O , RT, 12 h, 80 %

Methyl-4-hydroxybenzoat wurde zunächst in einer nukleophilen Substitution mit 2-(2-Chlorethoxy)ethanol zu **3** mit 74 % umgesetzt. Vor der Esterreduktion musste am freien Alkohol eine Schutzgruppe eingeführt werden. Sowohl *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPSCI) als auch *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMSCI) kamen als Silylschutzgruppe zum Einsatz, sodass die geschützten Alkohole **4** und **5** in Ausbeuten von 78 und 72 % gewonnen werden konnten. Mit Lithiumaluminiumhydrid wurde im nächsten Schritt der Methyl-ester reduziert und ergab die Benzylalkohole **6** und **7** mit 79 und 82 % Ausbeute. Die anschließende Umsetzung mit dem Pyridazin-Derivat **2** verlief für die unterschiedlich geschützten Verbindungen inkongruent. In Dimethylformamid mit Cäsiumcarbonat als Base wurde die nukleophile Substitutionsreaktion des Heterozyklus **2** mit den Benzylalkoholen **6** bzw. **7** durchgeführt. Das TBDMS-geschützte Derivat **8b** konnte nach 12 h Refluxieren in Ausbeuten von 73 % erhalten werden. Die Reaktion zwischen DCP **2** und dem TBDPS-geschützten Benzylalkohol **6** konnte trotz Screenings bezüglich Art der Base, Basenmenge, Temperatur, Lösemittel und Reaktionszeit lediglich Ausbeuten von max. 19 % erzielen. Es wurde neben der literaturbeschriebenen Schutzgruppe TBDMSCI¹⁰⁴ auch das sterisch anspruchsvollere TBDPSCI verwendet, da es eine höhere Basenstabilität aufweist als das räumlich kleinere TBDMSCI. Allerdings schienen die zwei Phenyleinheiten die Reaktion mit **2** fast vollständig zu unterdrücken. Da keine Stabilitätsprobleme der Schutzgruppe bei Einsatz von Cäsiumcarbonat auftraten, wurde daraufhin ausschließlich das TBDMS-geschützte Derivate **8b** hergestellt. Die Entschützung mit Tetrabutylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran zu den freien Alkoholen **9a** und **9b** verlief mit Ausbeuten von 70 und 68 %. Das Einführen der Mesylabgangsgruppe ergab die mesylierte Verbindung **11** mit 77 % Ausbeute. Um für die NHS-Ester-Umsetzung ein Amin-Derivat zu generieren, erfolgte nach Sawicki et al.¹⁰⁵ zunächst eine nukleophile Substitution des Tosyl-Derivats **11** mit Natriumazid zu dem entsprechenden Azid **12** in 52 %iger Ausbeute. Die Reduktion des Azids **12** zu dem Amin **13** wurde mit Triphenylphosphin in wässrigem Medium durchgeführt und ergab das Produkt mit einer Ausbeute von 80 %.

3.1.3. Synthese des Pyridaben-Benzylbromids **16**

Um auf kürzerem Weg eine größere Anzahl an Pyridaben-Derivaten synthetisieren zu können, wurde die Herstellungsmethode aus dem Patent PCT/US2011/024109 verwendet.¹⁰⁶ Von Vorteil war hier der Einsatz des symmetrischen 1,4-Phenylendimethanols als Benzyleinheit, da somit auf aufwendige Schutzgruppenchemie wie bei Mou et al. verzichtet werden konnte. Nach nur zwei Syntheseschritten war die Anknüpfung verschiedener Linkerstrukturen möglich.

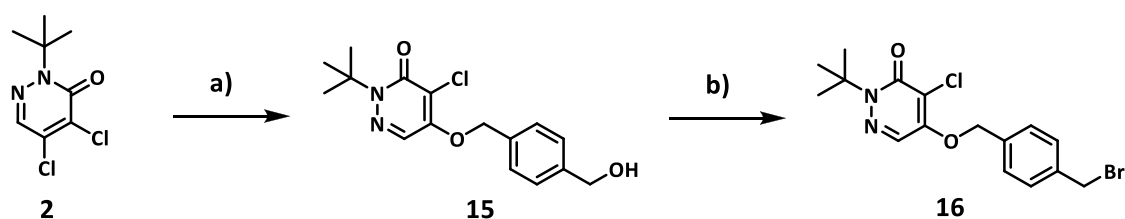


Abbildung 26: Synthese des Pyridaben-Benzylbromids **16**

a) 1,4-Phenylendimethanol, DMF, Cs₂CO₃, 65°C, 6 h, 63 %; b) PBr₃, DCM, RT, 1 h, 78 %

1,4-Phenylendimethanol wurde im 5-fachen Überschuss vorgelegt. Die Addition von **2** erfolgte tropfenweise bei 65°C innerhalb von 2 h, um eine Di-Substitution zu minimieren. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Edukt zu großen Teilen wieder erhalten werden. Die Umsetzung mit Phosphortribromid ergab das Pyridaben-Benzylbromid **16** in Ausbeuten von 78 %. Der Grundkörper **16** diente als Ausgangsverbindung sowohl für die Herstellung der Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivate, des Pyridaben-Bn-O-PEG-NODAGA-Derivats und des Pyridaben-Bn-N-C₄-DOTA-Derivats als auch für die Synthesen der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂- und Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-Derivate. Die Benzylbromid-Einheit eignete sich hervorragend in der Durchführung nukleophiler Substitutionen. Ihre Reaktivität lässt sich mit dem Vorhandensein des Broms als ideale Abgangsgruppe erklären.

3.1.4. Synthese der Pyridaben-Bn-PEG-DOTA- und Pyridaben-Bn-PEG-NODAGA-Derivate und des Pyridaben-Bn-N-C₄-DOTA-Derivats

3.1.4.1. Synthese der Pyridaben-Bn-O-PEG-Hydroxyl-Derivate **17-19**

Die Umsetzung des Pyridaben-Benzylbromids **16** mit Polyethylenglykoleinheiten unterschiedlicher Länge generierte in unkomplizierten Synthesen die Pyridaben-Bn-O-PEG-Hydroxyl-Derivate **17**, **18** und **19**. Um den Einfluss des Linkers evaluieren zu können, wurden Mono-, Di- und Tetraethylenglykol verwendet. Somit war es zum einen möglich, den Einfluss des Abstands zwischen Chelator und TV auf die Enzymaffinität zu untersuchen. Zum anderen wurden verschieden polare Strukturen erhalten, die eine Analyse hinsichtlich Lipophilie/Hydrophilie erlaubten.

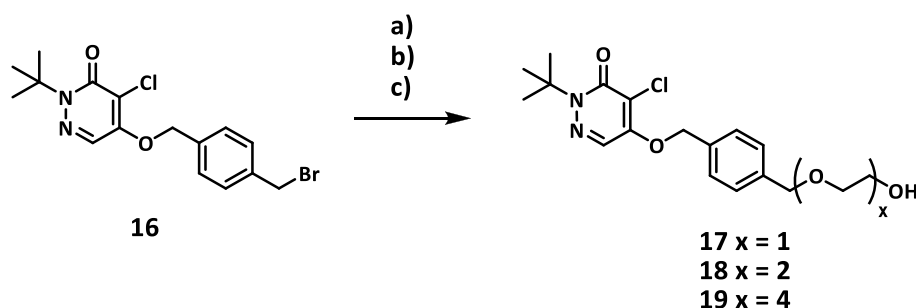


Abbildung 27: Synthese der Pyridaben-Bn-O-PEG-Hydroxyl-Derivate **17**, **18** und **19**
 a) Ethylenglykol, KOtBu, THF, 60°C, 18 h, 58 %; b) Diethylenglykol, KOtBu, THF, 60°C, 18 h, 68 %; c) Tetraethylenglykol, KOtBu, THF, 60°C, 18 h, 62 %

Der jeweilige Glykol **17**, **18** und **19** wurde mit Kalium-*tert*-Butanolat versetzt und das Pyridaben-Benzylbromid **16** als Lösung addiert. Um eine Mono-Substitution zu favorisieren, war ein 100-facher Überschuss des Glykols notwendig. Da es sich bei den verwendeten Edukten um kostengünstige Standardchemikalien handelte, konnte dies ohne Rückgewinnung erfolgen. Die Pyridaben-Bn-O-PEG-Hydroxyl-Derivate **17**, **18** und **19** wurden nach säulenchromatographischer Aufreinigung in Ausbeuten von 58, 68 und 62 % erhalten.

3.1.4.2. Synthese der Pyridaben-Bn-PEG-Amino-Derivate 28-30

Für die geplante Umsetzung mit dem DOTA- und NODAGA-NHS-Ester war es erforderlich, die Alkohole **17**, **18** und **19** in primäre Amine umzuwandeln. Zunächst wurden die Pyridaben-Bn-O-PEG-Hydroxyl-Derivate **17**, **18** und **19** in hohen Ausbeuten mesyliert, sodass im Anschluss für die nukleophile Substitution mit Natriumazid eine geeignete Abgangsgruppe vorhanden war. Die Reduktion der Azide **25**, **26** und **27** in wässriger Lösung mit Triphenylphosphin ergab die entsprechenden Amine **28**, **29** und **30** mit Ausbeuten von 51, 53 und 78 %.

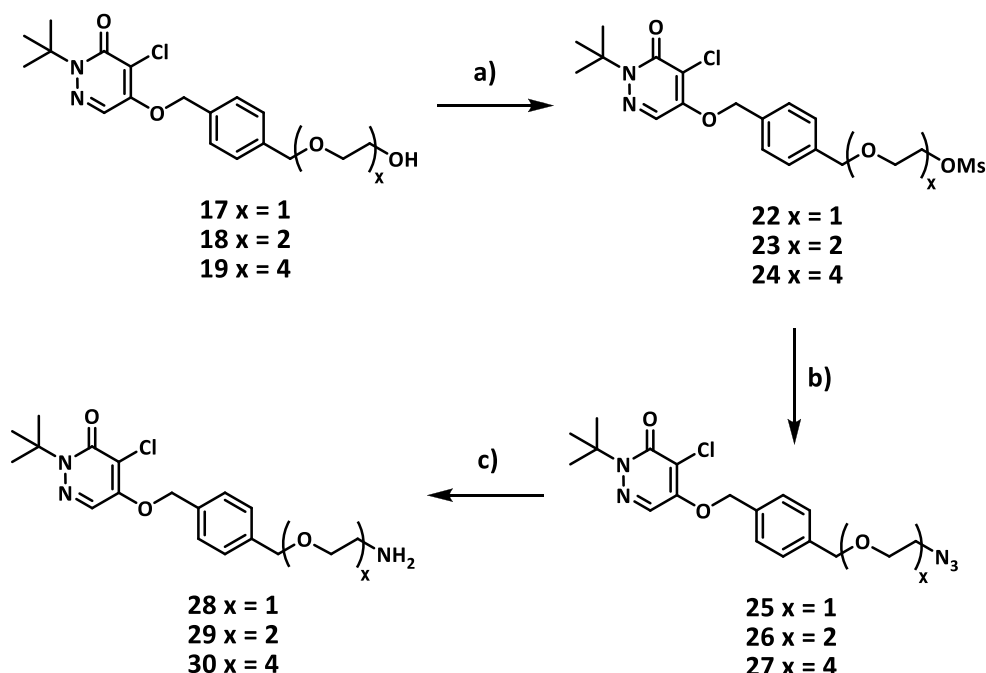


Abbildung 28: Synthese der Pyridaben-Bn-O-PEG-Amino-Derivate **28**, **29** und **30**

a) MsCl, CH₂Cl₂, Et₃N, RT, 12 h, 81 - 89 %; b) NaN₃, DMF, RT, 12 h, 65 - 72 %; c) Ph₃P, THF, H₂O, RT, 12 h, 51 - 78 %

3.1.4.3. Synthese des Pyridaben-Bn-N-C₄-Amino-Derivats 31

Außerdem erfolgte die Reaktion des Pyridaben-Benzylbromids **16** mit 1,4-Diaminobutan. Somit konnte unter Verwendung des Diaminoalkyl-Linkers in einer Einstufen-Synthese ein unpolares Derivat synthetisiert werden. Zusätzlich dürfte das sekundäre, benzyliche Amin unter physiologischen Bedingungen in protonierter Form vorliegen, woraus ein positiv geladenes Molekül resultiert. Folglich konnte mit dem Pyridaben-Bn-N-C₄-Amino-Derivat **31** im direkten Vergleich zu den Pyridaben-Bn-O-PEG-Amino-Derivaten **28**, **29** und **30** eine lipophilere Struktur hergestellt werden.

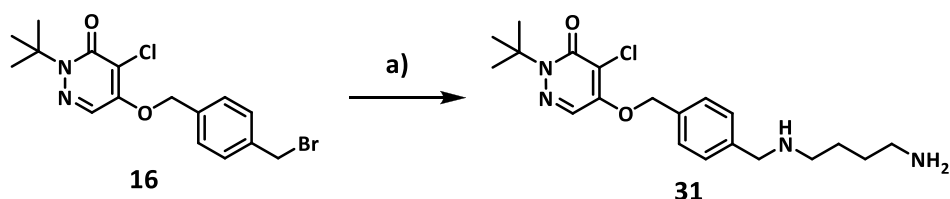


Abbildung 29: Synthese des Pyridaben-Bn-N-C₄-Amino-Derivats **31**
 a) 1,4-Diaminobutan, THF, RT, 12 h, 56 %

3.1.4.4. Synthese der Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivate VN68.MZ, VN73.MZ, VN79.MZ und VN94.MZ und des Pyridaben-Bn-O-PEG-NODAGA-Derivats VN108.MZ und des Pyridaben-Bn-N-C₄-DOTA-Derivats VN110.MZ

Als kopplungsfähige, makrozyklische Chelatoren wurden die DOTA- und NODAGA-NHS-Ester gewählt. Ihr Vorteil ist die selektive Reaktion des Aktivesters mit primären Aminen zu Amid. Zusätzlich war es notwendig, bereits entschützte Chelatoren zu verwenden, da die kommerziell erwerblichen DOTA- und NODAGA-Derivate ausschließlich in Form von *tert*-Butylestern erhältlich sind. Ein einmaliger Reaktionsansatz zeigte jedoch, dass die Pyridazin-Einheit nicht mit der erforderlichen Trifluoressigsäure-Entschützung kompatibel ist. Der *tert*-Butylrest am Pyridazin-Stickstoff wird unter stark sauren Bedingungen ebenso abgespalten wie die Esterfunktion.

Die Umsetzungen von NHS-Ester und Pyridaben-Aminen erfolgte in trockenem Dimethylformamid mit Triethylamin als Base. VN68.MZ **32**, VN73.MZ **33**, VN79.MZ **34**, VN94.MZ **35**, VN110.MZ **36** und VN108.MZ **37** konnten nach semi-präparativer HPLC-Aufreinigung in Ausbeuten von 29 - 73 % erhalten werden.

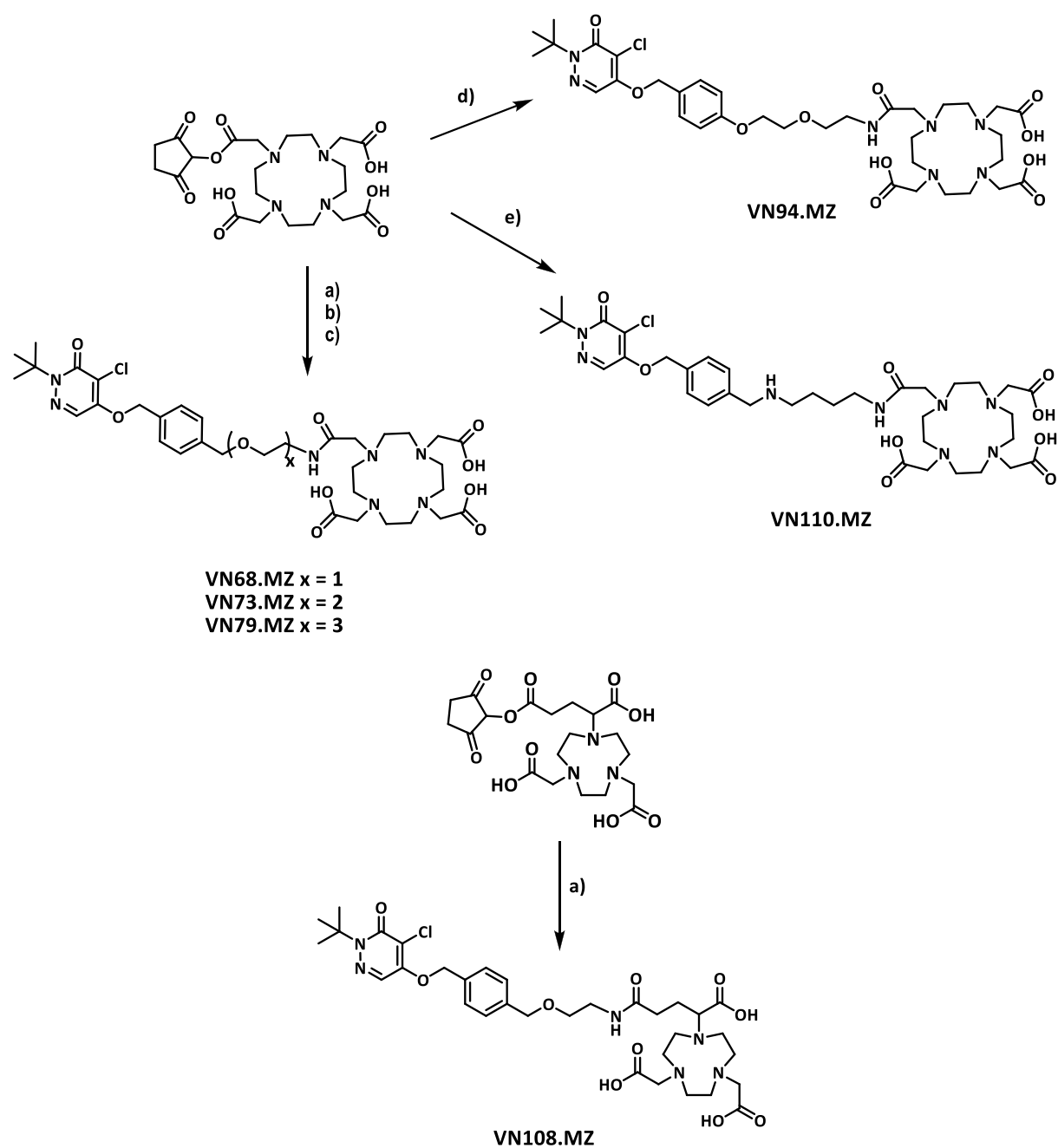


Abbildung 30: Synthese der Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivate VN68.MZ, VN73.MZ, VN79.MZ und VN94.MZ, des Pyridaben-Bn-O-PEG-NODAGA-Derivats VN108.MZ und des Pyridaben-Bn-N-C₄-DOTA-Derivats VN110.MZ

a) **28**, DMF, Et₃N, RT, 12 h, 50 %; b) **29**, DMF, Et₃N, RT, 12 h, 53 %; c) **30**, DMF, Et₃N, RT, 12 h, 78 %; d) **13**, DMF, Et₃N, RT, 12 h, 29 %; e) **31**, DMF, Et₃N, RT, 12 h, 48 %

3.1.5. Synthese des [^{18}F]Flurpiridaz-Markierungsvorläufers **20** und des kalten Standards [^{19}F]Flurpiridaz **21**

Um die Vergleichbarkeit der geplanten *in vitro*- und *in vivo*-Evaluierungen gewährleisten zu können, wurde sowohl der ^{18}F -Markierungsvorläufer **20** für die ^{18}F -Fluorierung zur Herstellung des [^{18}F]Flurpiridaz als auch die inaktive Referenzsubstanz [^{19}F]Flurpiridaz **21** synthetisiert.

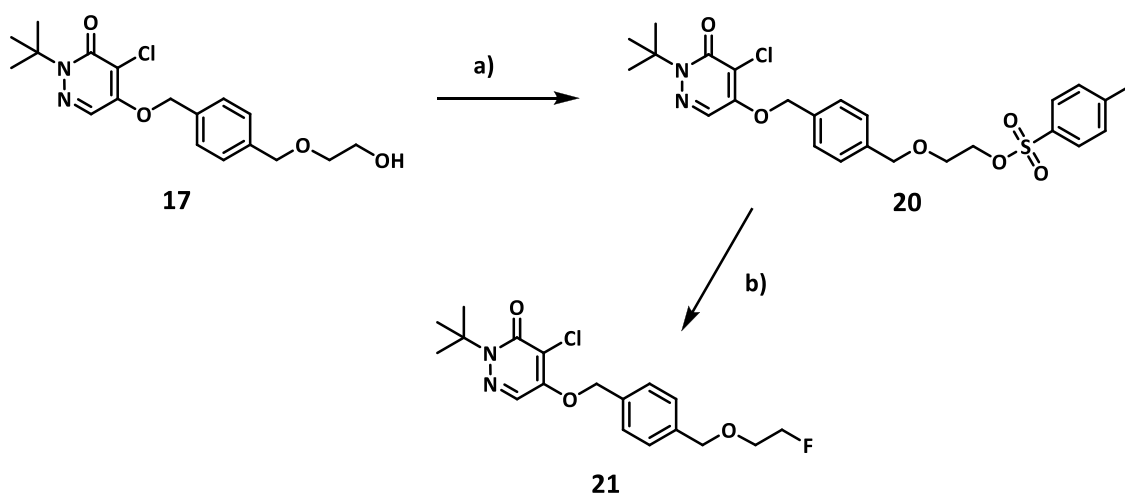


Abbildung 31: Synthese des [^{19}F]Flurpiridaz **21** und ^{18}F -Markierungsvorläufers **20**

a) MsCl , CH_2Cl_2 , DIPEA, DMAP, RT, 2 h, 80 %;

b) DAST, 0°C , CH_2Cl_2 , RT, 30 min, 50 %

3.1.6. Synthese der Pyridaben-Bn-O- C_6/C_{12} -, Pyridaben-Bn-N(Bn)- C_6/C_{12} -DO2A-Derivate und der Pyridaben-Bn-O- C_6 -DOTA- und Pyridaben-Bn-O- C_6 -NODAGA-Derivate

Die Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivate, das Pyridaben-Bn-O-PEG-NODAGA-Derivat und das Pyridaben-Bn-N- C_4 -DOTA-Derivat besitzen mit dem Insektizid als TV eine myokardaffine Einheit, die eine Herzakkumulation allein bewirken sollte. Nach der ^{68}Ga -Markierung entstehen neutrale Komplexe. Von den $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tracern Sestamibi und Tetrofosmin ist bekannt, dass eine Myokardanreicherung auf Grund der positiven Komplexladung erfolgt. Hierfür ist das bestehende Membranpotential verantwortlich. Da im Cytosol ein negatives und im Extrazellulärraum ein positives Potential vorliegt, diffundieren positiv geladene Substanzen entlang des Konzentrationsgefälles in die Zelle hinein. Daher sollten einfach positiv geladene ^{68}Ga -Chelat-Strukturen generiert werden, um einen eventuell vorhandenen, zusätzlichen Einfluss der positiven Komplexladung evaluieren zu können. Eine geeignete makrozyklische Leitstruktur zur Synthese geladener DOTA-Derivate ist DO2A. Die zwei freien Ring-Stickstoffe erlauben das Einbringen des TVs in Form einer Alkylierungsreaktion. Über eine stöchiometrische Reaktionsführung ist es außerdem möglich, sowohl ein mono- als auch ein di-alkyliertes DO2A-Derivat zu erhalten. Dies sollte nach dem beschriebenen Effekt der Multivalenz die Bindungswahrscheinlichkeit an der Zielstruktur erhöhen.^{99,100} Zusätzlich erlaubt der Einsatz verschiedener Linkerlängen (C_6 und C_{12}) den Einfluss des Abstands auf die MC I-Affinität zu

evaluieren. Eine weitere Variation wurde durch unterschiedliche Heteroatome (N und O) zwischen der Pyridaben-Bn- und Linkereinheit erzielt. Der Einsatz von Alkyl-Linkern anstatt PEG-Linkern sollte eine Erhöhung der Lipophilie im Vergleich zu den Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivaten und dem Pyridaben-Bn-O-PEG-NODAGA-Derivat bewirken.

3.1.6.1. Synthese des DO2A-(OMe)₂ **40**

Die einzelnen Aufreinigungsschritte zwischen den Synthesestufen erfordern geschützte Cyclen-Derivate, da ansonsten Säulenchromatographien nur unter erschwerten Bedingungen durchgeführt werden können. Daher erfolgte zuerst die Synthese des DO2A-Derivats **40**, dessen Carboxylgruppen als Methylester vorlagen. Diese ermöglichten eine Entschützung unter basischen Bedingungen, die mit der Stabilität des Pyridazins kompatibel war. Anhand der von Kline et al.¹⁰⁷ und Kalesse et al.¹⁰⁸ publizierten Methoden wurde die DO2A-(OMe)₂-Synthese durchgeführt.

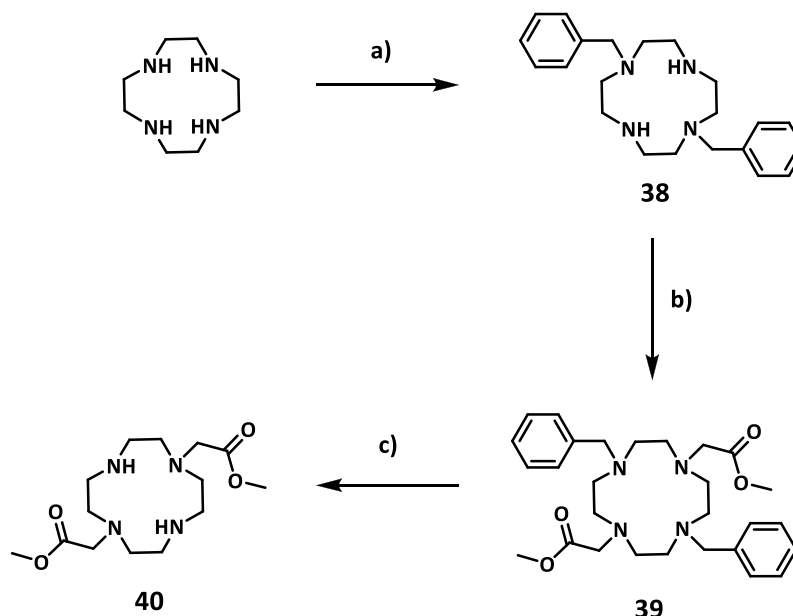


Abbildung 32: Synthese des DO2A-(OMe)₂ **40**

a) Benzylchloroformiat, Wasser, pH 3, RT, 15 h, 95 %;

b) Methylbromacetat, MeCN, DIPEA, 40°C, 12 h, 58 %; c) 10 % Pd/C, MeOH, RT, 3 h, quant.

Die Umsetzung von Cyclen mit Benzylchloroformiat in wässriger Lösung bei pH 3 ergab selektiv das dibenzylgeschützte Cyclen-Derivat **38** in quantitativen Ausbeuten. Anschließende Alkylierung mit Methylbromacetat bei 40°C für lieferte in 63 - 74 %iger Ausbeute das alkylierte Produkt **39**. Generell eigneten sich DCM/MeOH-Mischungen zur Separation verschieden substituierter Cyclen-Derivate. Bei **39** jedoch konnte keine vollständige Aufreinigung in diesem System erreicht werden. Mit einer mobile Phase aus EA/Hex (3:1) wurde eine effektive Trennung zwischen dem di-alkyliertem Produkt und dem monoalkyliertem Nebenprodukt erzielt. Die katalytische Hydrierung des dibenzyl-

geschützten Cyclen-Derivats **39** mit 10 % Pd/C ergab das DO2A-(OMe)₂ **40** in quantitativen Ausbeuten. Das erhaltene DO2A-(OMe)₂ **40** konnte für die Alkylierung mit Pyridaben-Brom-Derivaten eingesetzt werden.

3.1.6.2. Synthese der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂- und Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-Brom-Derivate und des Pyridaben-Bn-O-C₆-Amin-Derivats

Zur Untersuchung des Einflusses des Heteroatoms zwischen Benzylgruppe und Linker wurden Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂- sowie Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-Derivate synthetisiert. Der Pyridaben-Benzylalkohol **15** diente als Grundkörper, der mit der entsprechenden Linkereinheit umgesetzt wurde.

3.1.6.2.1. Synthese der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-Brom-Derivate **41** und **42**

Die Deprotonierung des Pyridaben-Benzylalkohols **15** erfolgte mit 60 %igem NaH in DMF bei 0°C. Das jeweilige Dibromalkan wurde langsam addiert und die Reaktionsmischung bei RT für 8 h gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnten die Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-Brom-Derivate **41** und **42** in Ausbeuten von 33 und 20 % erhalten werden. Als Grund für die relativ geringen Ausbeuten ist die ablaufende Di-Substitution des Dibromalkans zu nennen. Die Reaktion verschob sich mit zunehmender Kettenlänge des Dibromalkans zur Bildung des Nebenprodukts (NP), da der größere Abstand eine verringerte sterische Hinderung bewirkte. Um die Reaktion in Richtung des gewünschten Produkts zu verschieben, wäre es günstiger gewesen, das Dibromalkan vorzulegen, um einen Überschuss des Pyridaben-Benzylalkohols **15** in der Lösung zu vermeiden.

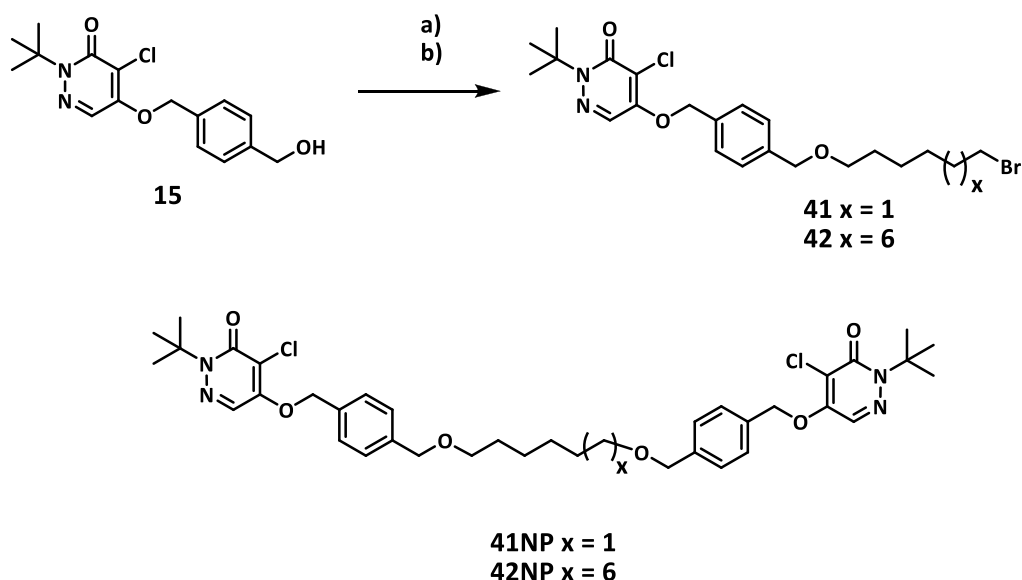


Abbildung 33: Synthese der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-Brom-Derivate **41** und **42**
 a) 1,6-Dibromhexan, DMF, 0°C, 60 % NaH, RT, 8 h, 33 %;
 b) 1,6-Dibromdodecan, DMF, 0°C, 60 % NaH, RT, 8 h, 20 %

3.1.6.2.2. Synthese des Pyridaben-Bn-O-C₆-Amin-Derivats **44**

Um einen direkten Vergleich zwischen PEG- und Alkyl-Linker vornehmen zu können, wurde das Pyridaben-Bn-O-C₆-Bromid **41** nach Sawicki et al.¹⁰⁵ in das primäre Amin **44** überführt.

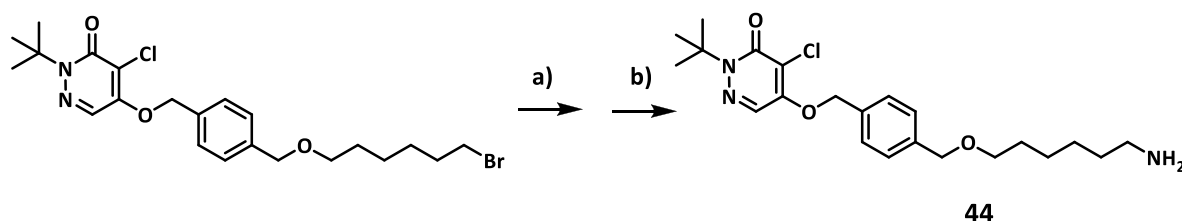


Abbildung 34: Synthese des Pyridaben-Bn-O-C₆-Amin-Derivats **44**
 a) NaN₃, DMF, RT, 12 h, 55 %; b) PH₃P, THF, Wasser, RT, 12 h, 75 %

3.1.6.2.3. Synthese der Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-Brom-Derivate

Die Herstellung der Pyridaben-Bn-N-C₆/C₁₂-Brom-Derivate bedurfte mehrerer Syntheserouten, da die anschließende Umsetzung mit DO2A-(OMe)₂ zu Problemen führte. Generell sollte das Pyridaben-Benzylbromid **16** mit einem Aminoalkohol umgesetzt und die endständige Hydroxyl-Funktion mittels Appel-Halogenierung in das entsprechende Brom-Derivat überführt werden.

Syntheseroute A: Synthese des Pyridaben-Bn-N-C₆-Brom-Derivats **44b**

Der erste Ansatz bestand in der mono-N-Alkylierung des 6-Amino-1-hexanols mit dem Pyridaben-Benzylbromid **16** in Acetonitril und Kaliumcarbonat als Base. Nach 12 h Rühren bei 40°C und säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Pyridaben-Bn-N-C₆-Hydroxy-Derivat **44b** mit 31 % isoliert werden. Als unerwünschtes Nebenprodukt konnte die di-N-alkylierte Verbindung identifiziert werden. Die anschließende Bromierung mit Tetrabrommethan und Triphenylphosphin nach Appel gelang in guten Ausbeuten. Bei Reaktion mit DO2A-(OMe)₂ **40** konnte jedoch keine Alkylierung festgestellt werden. Sowohl die Analyse mittels LC-MS als auch per ¹H-NMR identifizierte ein intramolekulares Cyclisierungsprodukt. Das reaktive sekundäre Amin reagierte mit dem endständigen Bromid zu einem Aminocycloheptan NP.

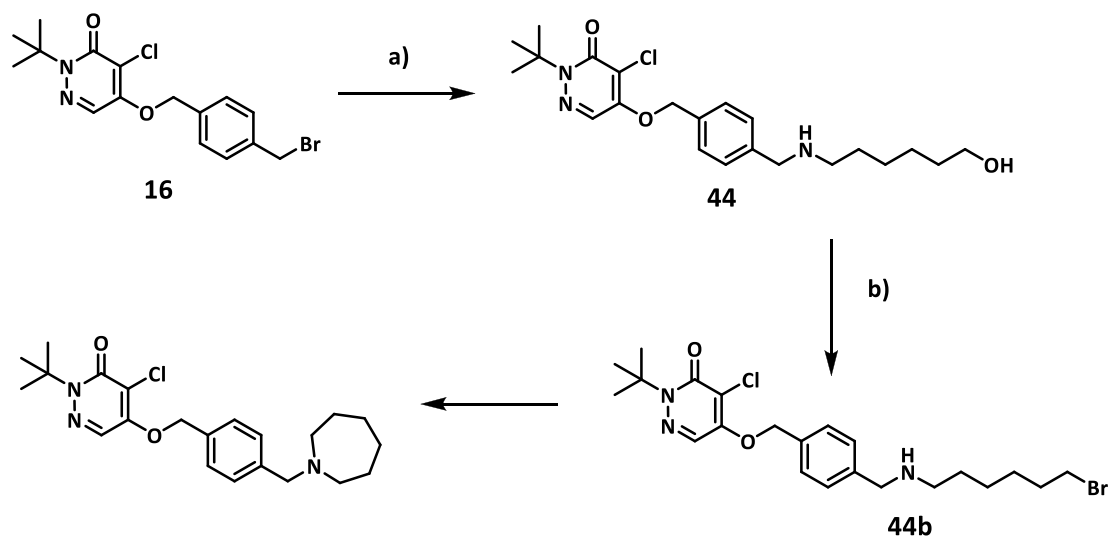


Abbildung 35: Route A: Synthese des Pyridaben-Bn-N-C₆-Brom-Derivats **44b** mit NP
 a) 6-Amino-1-hexanol, MeCN, K₂CO₃, 40°C, 12 h, 31 %; b) CBr₄, DCM, Ph₃P, RT, 30 min

Verschiedene Reaktionsbedingungen hinsichtlich Temperatur, Basenzusatz, Verdünnung und Reaktionszeit wurden evaluiert. Die Cyclisierung konnte allerdings nicht verhindert werden. Das sich bevorzugt bildende Aminocycloheptan korrelierte mit der Bildungstendenz für Siebenringe von ca. 90 % nach Thorpe-Ziegler-Bedingungen – auch wenn hierbei die Reaktion von α,ω -Dinitrilen berücksichtigt wird.

Syntheseroute B: Synthese des Pyridaben-Bn-N(Cbz)-C₆-Brom-Derivats **46b**

Um den Ringschluss zu verhindern, erfolgte in der Syntheseroute B die Einführung einer Schutzgruppe am sekundären Amin des Pyridaben-Bn-N-C₆-Hydroxy-Derivats **44**. Die Umsetzung mit Benzylchlorformiat (CBzCl) ergab das CBz-geschützte **46** in nahezu quantitativen Ausbeuten. Allerdings konnte der endständige Alkohol weder nach Appel noch unter Verwendung von Phosphortribromid oder N-Bromsuccinimid in das Bromid überführt werden. Folglich unterbindet die CBz-Schutzgruppe durch sterische Hinderung die Bromierung.

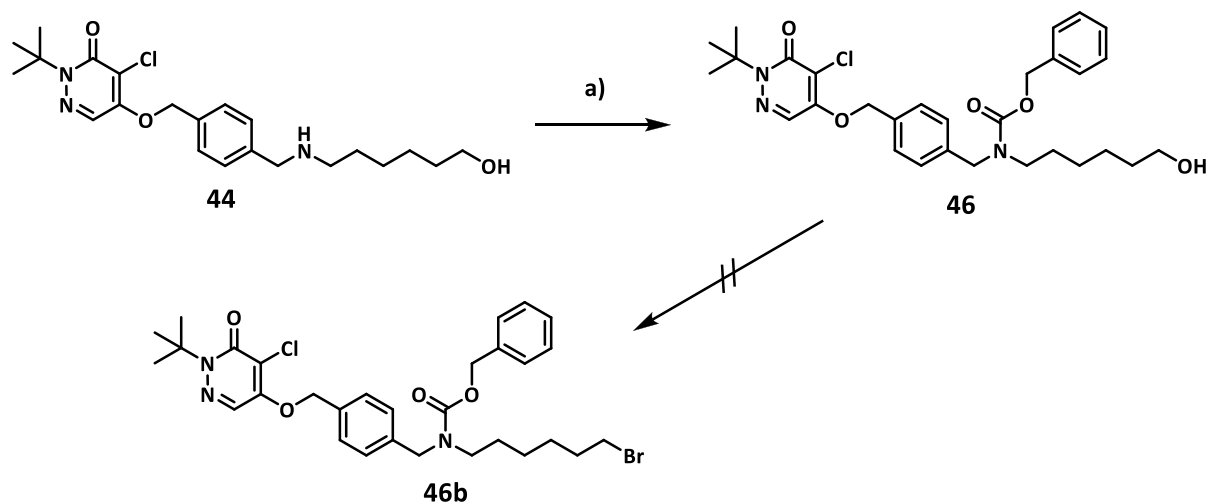


Abbildung 36: Route B: Synthese des Pyridaben-Bn-N(CBz)-C₆-Brom-Derivats **46b**
 a) Benzylchloroformiat, 0°C, 1,5 h, 86 %

Syntheseroute C: Synthese der Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-Brom-Derivate **51** und **52**

Als Alternative zur CBz-Schutzgruppe erfolgte die Synthese der benzylgeschützten Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-Brom-Derivate **51** und **52**. Hierfür wurde der entsprechende Aminoalkohol nach einer Vorschrift von Del Valle et al.¹⁰⁹ zunächst mit einer reduktiven Aminierung unter Verwendung von Benzaldehyd und Natriumborhydrid mono-benzyliert. Die N-benzylgeschützten Aminoalkohole **47** und **48** konnten in Ausbeuten von 46 und 42 % isoliert werden. Die anschließende nukleophile Substitutionsreaktion mit dem Pyridaben-Benzylbromid **16** in Acetonitril/Kaliumcarbonat lieferte nach 2 h Rühren bei 55°C und säulenchromatographischer Aufreinigung die Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-Hydroxy-Derivate **49** und **50** in Ausbeuten von 50 und 57 %. Es wurde ausschließlich das N-alkylierte Produkt isoliert, da das sekundäre Amin reaktiver ist als die Hydroxylgruppe. Im nächsten Schritt konnten mittels Appel-Bromierung die Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-Brom-Derivate **51** und **52** in Ausbeuten von 70 und 80 % gewonnen werden.

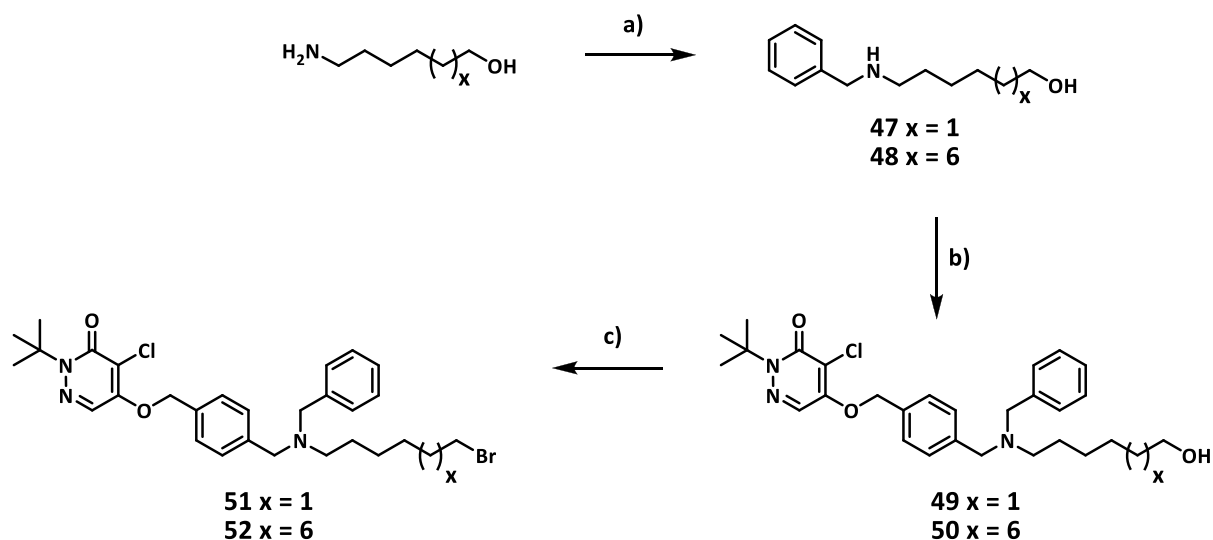


Abbildung 37: Synthese der Pyridaben-Bn-N-C₆/C₁₂-Brom-Derivate **51** und **52**

a) Benzaldehyd, MeOH, NaBH₄, 0°C, 2 h, 42 - 46 %; b) **16**, MeCN, K₂CO₃, 55°C, 2 h, 50 - 57 %; c) CBr₄, 0°C, DCM, Ph₃P, RT, 1 h, 70 - 84 %

3.1.6.3. Synthese der Pyridaben-Bn-O-C₆-DOTA- und Pyridaben-Bn-O-C₆-NODAGA-Derivate VN143.MZ und VN213.MZ

Eine Kopplung des Pyridaben-Bn-O-C₆-Amin-Derivats **44** mit den DOTA- und NODAGA-NHS-Estern konnte somit analog der Pyridaben-Bn-O-PEG-Amin-Derivate **25** - **27** erfolgen. Die erhaltenen Pyridaben-Bn-O-C₆-DOTA- und Pyridaben-Bn-O-C₆-NODAGA-Derivate VN143.MZ **53** und VN213.MZ **54** wurden nach semi-präparativer HPLC-Aufreinigung in Ausbeuten von 35 - 60 % erhalten.

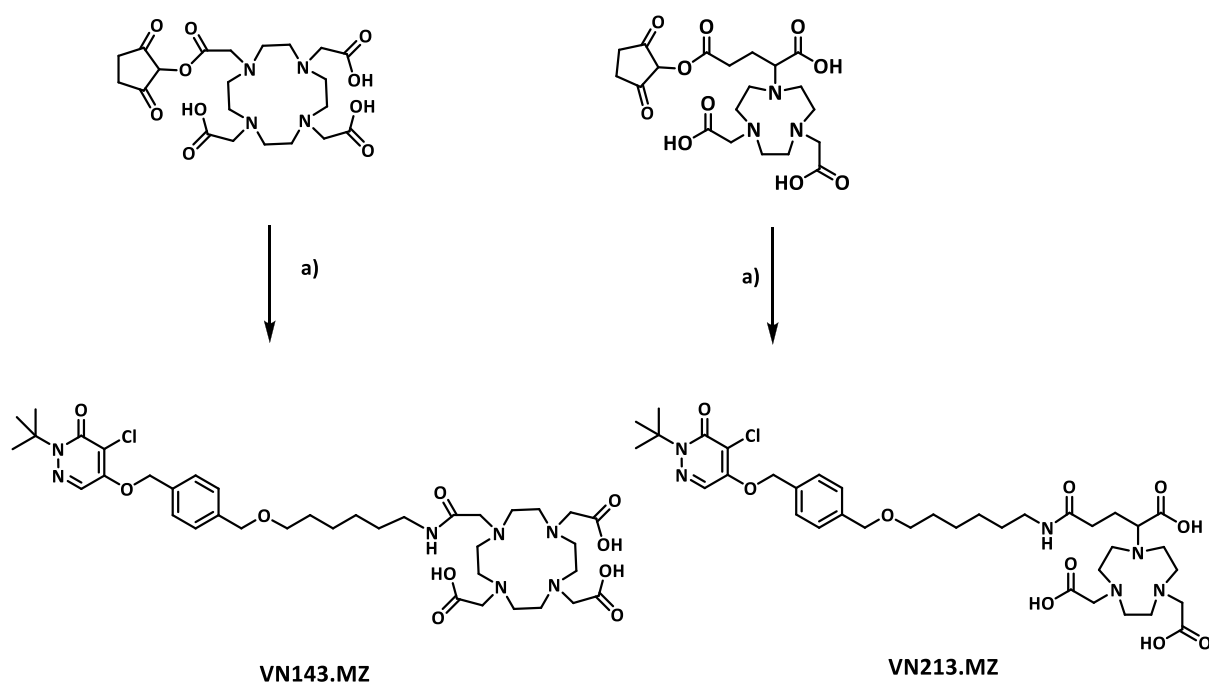


Abbildung 38: Synthese der Pyridaben-Bn-O-C₆-DOTA- und Pyridaben-Bn-O-C₆-NODAGA-Derivate VN143.MZ und VN213.MZ
 a) **44**, DMF, Et₃N, RT, 12 h, 35 - 60 %

3.1.7. Synthese der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂- und Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate

3.1.7.1. Synthese der mono-Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate **55** und **56**

Die mono-Alkylierung des DO2A-(OMe)₂ **40** mit den Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-Brom-Derivaten **41** und **42** erfolgte in Acetonitril bei 55°C über Nacht. Essentiell waren die Verwendung eines DO2A-(OMe)₂ Unterschusses sowie die basenfreie Reaktionsführung. Sobald die Reaktion unter Basenzusatz stattfand, konnten ausschließlich di-alkylierte Produkte isoliert werden. Die mono-Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate **55** und **56** wurden nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit Ausbeuten von 28 und 24 % erhalten.

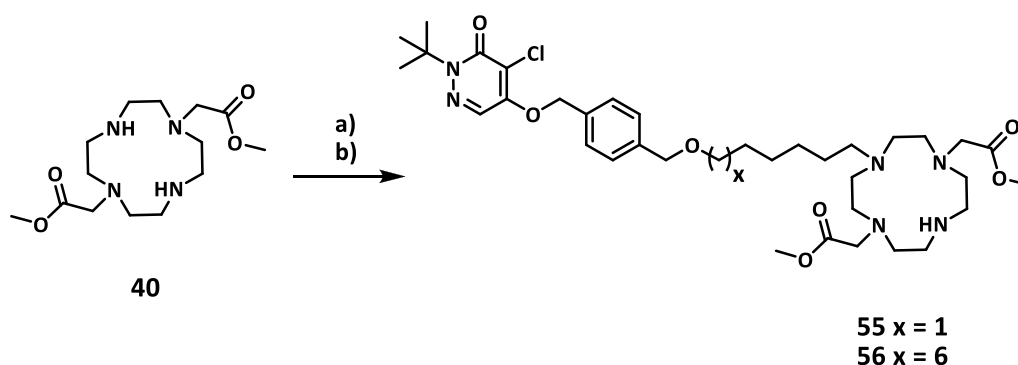


Abbildung 39: Synthese der mono-Pyridaben-O-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate **55** und **56**
a) **41**, MeCN, 55°C, 12 h, 28 %; b) **42**, MeCN, 55°C, 12 h, 24 %

3.1.7.2. Synthese mono-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate **57** und **58**

Die Alkylierung von DO2A-(OMe)₂ **40** mit den Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-Brom-Derivaten **51** und **52** wurde analog der O-Derivate durchgeführt und erzielte die mono-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate **57** und **58** mit 35 und 64 % Ausbeute.

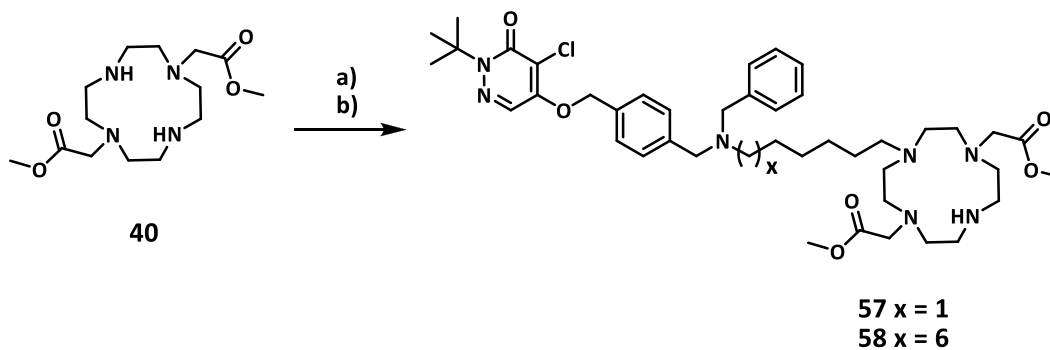


Abbildung 40: Synthese der mono-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate: **57** und **58**
a) **51**, MeCN, 55°C, 12 h, 35 %; b) **52**, MeCN, 55°C, 12 h, 64 %

3.1.7.3. Synthese der di-Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate **59** und **60**

Die di-Alkylierung des DO2A-(OMe)₂ **40** mit zwei Äquivalenten der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-Brom-Derivate **41** und **42** in Acetonitril mit Kaliumcarbonat als Base ergab die di-Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate **59** und **60** nach säulenchromatographischer Aufreinigung in Ausbeuten von 63 und 73 %.

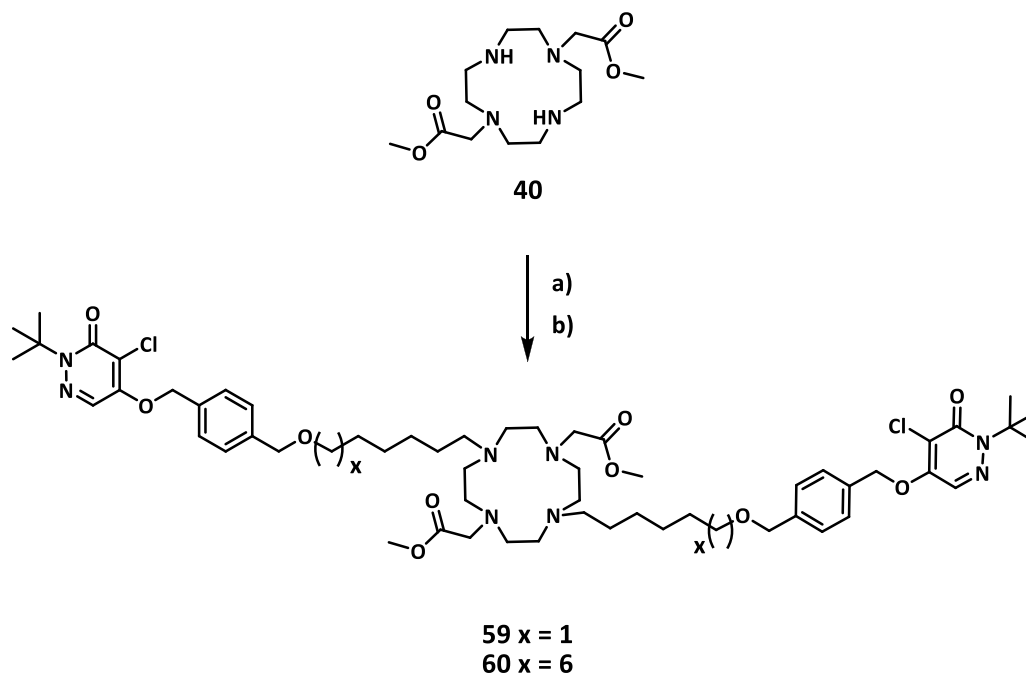


Abbildung 41: Synthese der di-Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate **59** und **60**
 a) **41**, MeCN, K₂CO₃, 55°C, 12 h, 63 %; b) **42**, MeCN, K₂CO₃, 55°C, 12 h, 73 %

3.1.7.4. Synthese der di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate **61** und **62**

Analog wurde die di-Alkylierung unter Verwendung der Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-Brom-Derivate **51** und **52** durchgeführt und lieferte die di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate **61** und **62** mit 68 und 45 % Ausbeute.

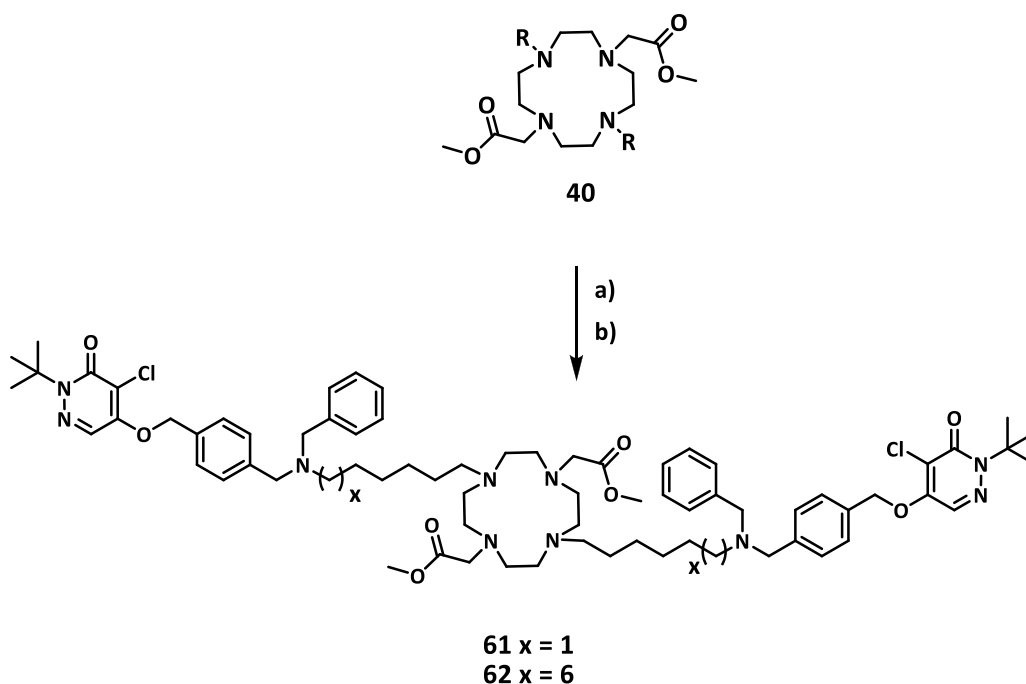


Abbildung 42: Synthese der di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate **61** und **62**
 a) **51**, MeCN, K₂CO₃, 55°C, 12 h, 68 %; b) **52**, MeCN, K₂CO₃, 55°C, 12 h, 64 %

3.1.8. Entfernen der Schutzgruppen

3.1.8.1. Entfernen der Benzylschutzgruppe

Um die synthetisierten Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate **57**, **58** und **61**, **62** mit dem Pyridaben-Bn-N-C₄-DOTA-Derivat VN110.MZ vergleichen zu können, sollte die Benzylschutzgruppe durch katalytische Hydrierung mit 5 % Pd/C entfernt werden. Da neben der Schutzgruppe auch in der Pyridaben-Leitstruktur eine Benzyleinheit vorhanden ist, wurde das Molekül an dieser Stelle ebenfalls gespalten. Sowohl per HPLC als auch anhand eines ¹H-NMR-Spektrums konnte der Anfangsbaustein DCP identifiziert werden. Auf Grund mangelnder Entschützungsalternativen, die mit der gesamten Verbindung kompatibel sind, blieb die Benzyleinheit erhalten, sodass ein tertiäres Amin resultiert. Von Vorteil ist hierbei, dass es sich bei dem Phenylring um einen stark unpolaren Rest handelt, der zu einer Lipophilieerhöhung der Verbindung beiträgt. Außerdem läge das sekundäre Amin unter physiologischen Bedingungen in protonierter Form vor. Da jedoch bereits eine positive Ladung des Komplexes nach ⁶⁸Ga-Markierung vorliegt, ist eine zusätzliche Ladung im Molekül nicht erwünscht.

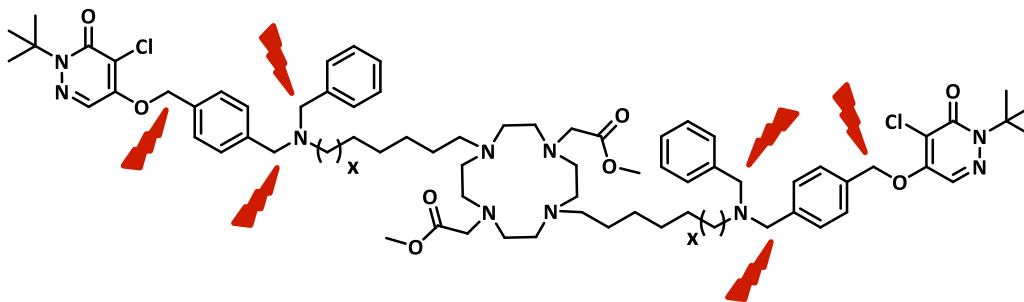


Abbildung 43: Nebenreaktion mit Abspaltungen der Benzylfunktionen der Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate **57**, **58** und **61**, **62** mit Pd/C

3.1.8.2. Entschützen der Methylester mit Lithiumhydroxid

Im letzten Schritt wurde die Spaltung der Methylester des DO2A-(OMe)₂ der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂- und Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-Derivate in wässriger Lösung mit Lithiumhydroxid durchgeführt. Die Aufreinigung der Endstufen erfolgte mittels semi-präparativer HPLC.

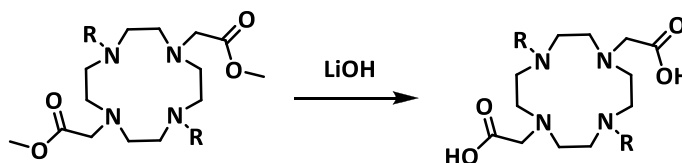


Abbildung 44: Entschützung der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂- und Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-Derivate mit LiOH

3.1.9. Synthese der ^{67/69}Ga-Komplexe

Um die Enzymaktivität der synthetisierten Pyridaben-Chelator-Derivate untersuchen zu können, erfolgte die Herstellung der ^{67/69}Ga-Referenzverbindungen. Der Markierungsvorläufer wurde in einem auf pH 3 eingestellten Wasser/Methanol-Gemisch gelöst und zusammen mit im Überschuss zugegebenen GaCl₃ erhitzt. Semi-präparative Aufreinigung per HPLC ergab die inaktiven Komplexe. Diese besitzen die gleichen Eigenschaften bezüglich Ladung und räumlicher Anordnung wie die ⁶⁸Ga-markierten Komplexe.

3.2. ^{68}Ga -Markierungen

Der Elution des Generators mit 0,1 M HCl folgte das Kationen-Austauscher-basierte Post-Prozessing zur Abtrennung von Fremdmetallen. 400 μL aufgereinigtes Generatoreluat wurde zusammen mit dem jeweiligen Puffer im Thermomixer inkubiert, und Markierungskinetiken wurden durch Entnahme von 5 μL Aliquote zu festgelegten Zeitpunkten aufgenommen. Für Optimierungszwecke wurde die Reaktion hinsichtlich pH-Wert der Markierungslösung, Temperatur, eingesetzter Vorläufermenge und Reaktionsdauer untersucht. Die ^{68}Ga -Markierungen aller synthetisierten Liganden erzielten Ausbeuten > 95 % unter optimierten Reaktionsbedingungen.

3.2.1. Einfluss des pH-Werts auf die ^{68}Ga -Markierung

Anhand der Markierung des Pyridaben-Bn-O-PEG-NODAGA-Derivats VN108.MZ (14 nmol) wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Markierungsausbeute evaluiert. Als Reaktionslösung kam sowohl 0,1 M Natriumacetat-Puffer als auch variable Wasser/ N_2 -Gemische zum Einsatz.

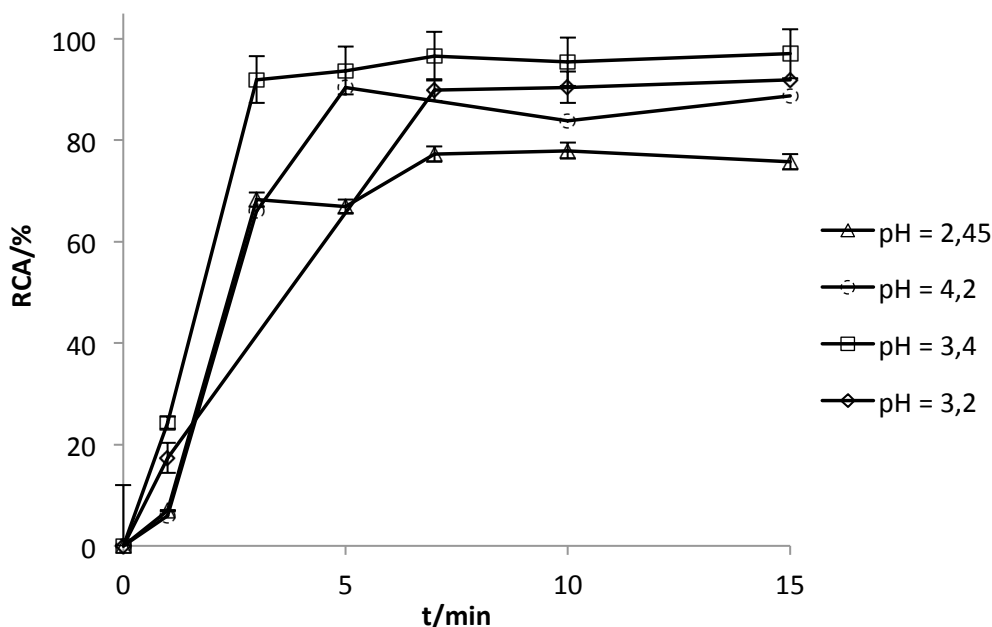


Abbildung 45: pH-Wert Optimierung der ^{68}Ga -Markierung des Pyridaben-Bn-O-PEG-NODAGA-Derivats VN108.MZ (14 nmol) bei 50°C

Die höchsten Markierungsausbeuten konnten bei einem pH-Wert von 3,4 erzielt werden. Bereits nach 3 min Reaktionsdauer lagen die Ausbeuten > 90 %. Daher wurde für alle folgenden Markierungen der pH-Wert der Reaktionslösung auf 3,4 festgelegt.

3.2.2. Einfluss des Puffers auf die ^{68}Ga -Markierung

Der Einfluss des Puffers auf die ^{68}Ga -Markierung wurde repräsentativ für das Pyridaben-Bn-O-PEG-NODAGA-Derivat VN108.MZ (14 nmol) getestet. Als anorganischer Puffer kam 5 mL 0,1 M Natriumacetat zum Einsatz, der bereits für einige DOTA-Peptid-Markierungen etabliert ist.¹¹⁰ Zusätzlich wurden 400 μL 0,1 M 2-(4-(2-Hydroxy-ethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer (pH) als organische Puffersubstanz verwendet. Auch hierfür sind Anwendungen beschrieben.¹¹¹ Der pH-Wert der finalen Markierungslösung in HEPES-Puffer beträgt ebenfalls 3,4.

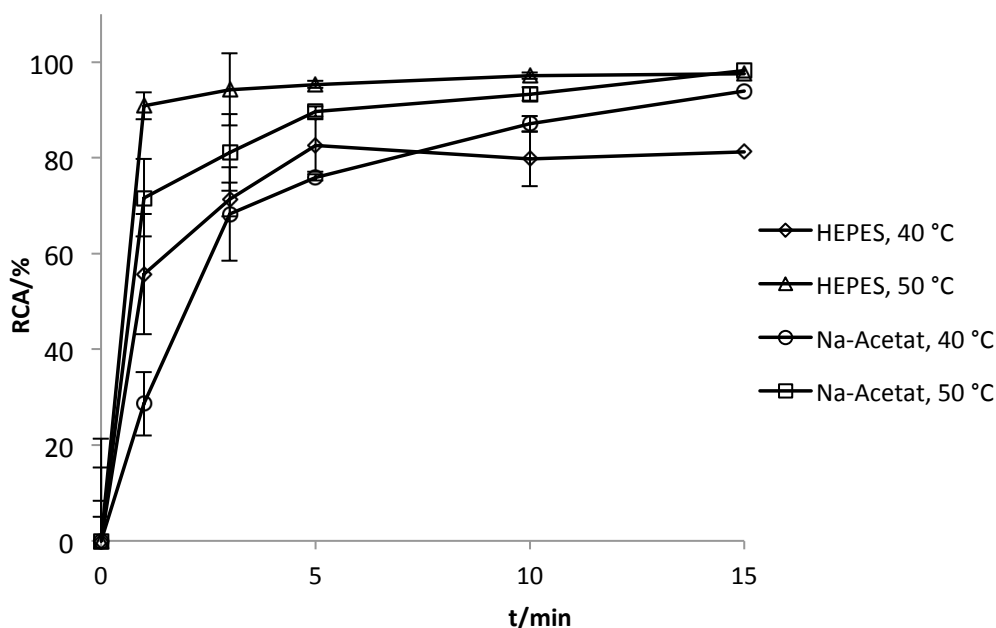


Abbildung 46: Einfluss des Puffers auf die ^{68}Ga -Markierung für das Pyridaben-Bn-O-PEG-NODAGA-Derivat VN108.MZ (14 nmol)

Der Vergleich zwischen Natriumacetat- und HEPES-Puffer bei 40°C und 50°C ergab nur für höhere Temperaturen bessere Ausbeuten bei HEPES (91 % nach 1 min) als bei Natriumacetat (72 % nach 1 min). Da es sich bei dem hier evaluierten Chelator um ein NODAGA-Derivat handelt, sind hohe Markierungsausbeuten bei geringeren Temperaturen möglich. Die Mehrheit der restlichen Liganden jedoch sind DOTA-Derivate, deren Markierung erst bei hohen Temperaturen (95°C) erfolgt. Somit wurde für die folgenden Markierungen HEPES als Standard-Puffer gewählt.

3.2.3. Optimierte ^{68}Ga -Markierungsbedingungen der Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivate VN68.MZ, VN73.MZ, VN79.MZ und VN94.MZ sowie der Pyridaben-Bn-O-PEG-NODAGA- und Pyridaben-Bn-N-C₄-DOTA-Derivate VN108.MZ und VN110.MZ

Infolge der optimalen Reaktionsbedingungen bei pH 3,4 in 0,1 M HEPES-Puffers wurde die geringst mögliche Vorläufermenge der jeweiligen Substanz durch Aufnahme von Markierungskinetiken ermittelt. Alle synthetisierten Chelator-PEG-Pyridaben-Derivate lassen sich bei niedrigen Vorläufermengen (6 - 20 nmol) mit Ausbeuten > 95 % mit ^{68}Ga markieren.

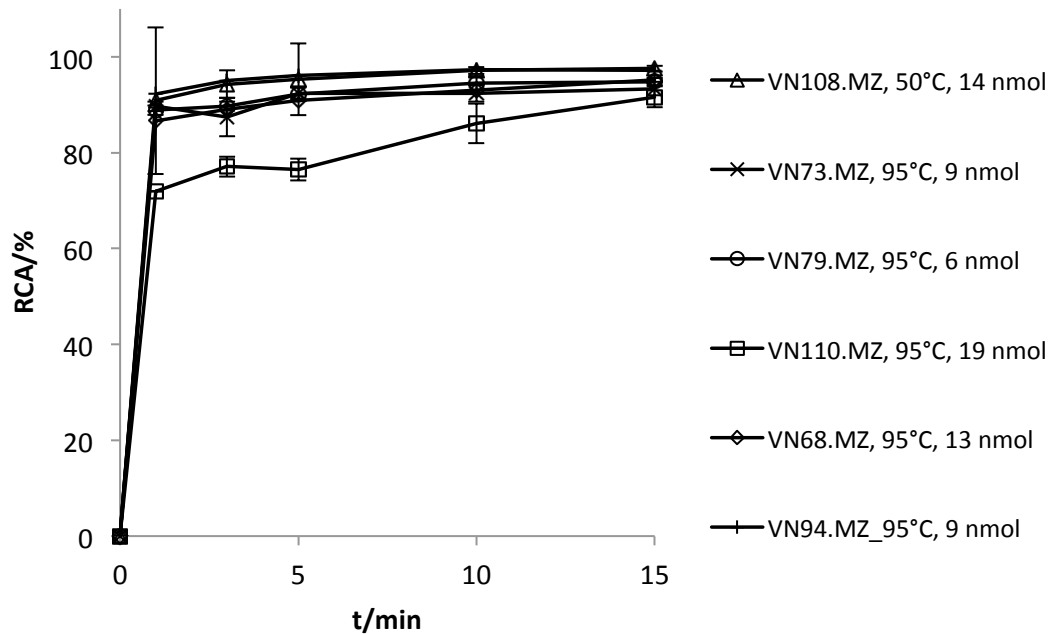


Abbildung 47: Optimierte ^{68}Ga -Markierungsbedingungen der Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivate VN68.MZ, VN73.MZ, VN79.MZ und VN94.MZ sowie der Pyridaben-Bn-O-PEG-NODAGA- und Pyridaben-Bn-N-C₄-DOTA-Derivate VN108.MZ und VN110.MZ in 0,1 M HEPES-Puffer pH 7

Die Ausbeuten wurden mittels Radio-DC (0,1 M Citratpuffer) bestimmt. Der ^{68}Ga -Produkt-Komplex blieb mit einem $R_f = 0$ auf dem Startfleck liegen, freies ^{68}Ga lief mit einem $R_f = 9$ als ^{68}Ga -Citrat-Komplex mit der Laufmittelfront.

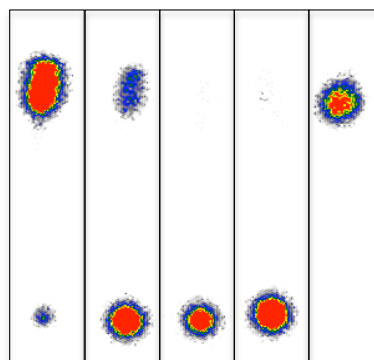


Abbildung 48: Radio-DC (0,1 M Natriumcitrat-Puffer) einer repräsentativen Kinetik der ^{68}Ga -Markierung von Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivaten nach 1, 3, 10, 15 min, $^{68}\text{GaCl}_3$; ^{68}Ga -Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA $R_f = 0$, ^{68}Ga -Citrat $R_f = 9$

3.2.4. Optimierte ^{68}Ga -Markierungsbedingungen der synthetisierten Pyridaben-Bn-O-C₆-DOTA- und Pyridaben-Bn-O-C₆-NODAGA-Derivate VN143.MZ und VN213.MZ

Analog zu den Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivaten VN68.MZ, VN73.MZ, VN79.MZ und VN94.MZ wurden die Pyridaben-Bn-O-C₆-DOTA- und Pyridaben-Bn-O-C₆-NODAGA-Derivate VN143.MZ und VN213.MZ hinsichtlich der Vorläufermenge und Temperatur evaluiert. Auch diese Verbindungen erzielten Markierungsausbeuten > 95 % bei geringem Vorläufereinsatz.

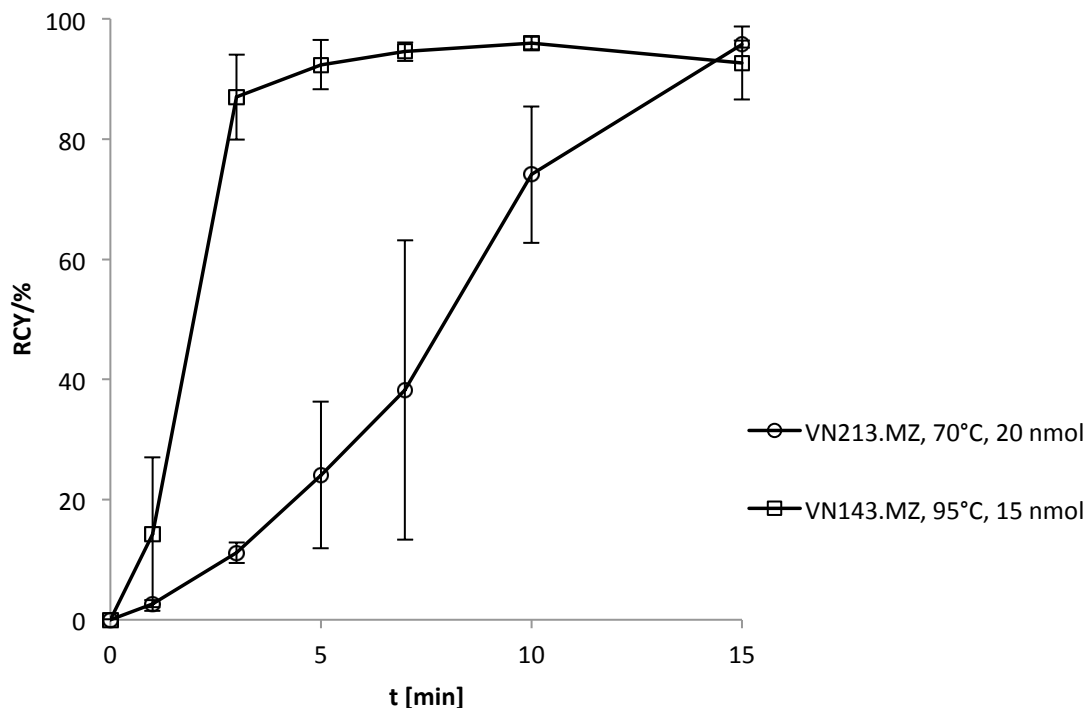


Abbildung 49: Optimierte ^{68}Ga -Markierungskinetiken der Pyridaben-Bn-O-C₆-DOTA- und Pyridaben-Bn-O-C₆-NODAGA-Derivate VN143.MZ und VN213.MZ

3.2.5. Einfluss der Temperatur auf die ^{68}Ga -Markierung der Pyridaben-DO2A-Derivate

3.2.5.1. ^{68}Ga -Markierungsbedingungen der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂- und Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-Derivate bei 95°C im Thermomixer repräsentativ für VN165.MZ

Die Markierung der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂- und Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-Derivate erfolgte zunächst repräsentativ für das di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DOTA-Derivat VN165.MZ im Thermomixer bei 95°C. Der Einsatz von 30 nmol ergab nach 15 min lediglich 30 % markiertes Produkt. Auch ein Erhöhen der Vorläufermenge bis auf 200 nmol konnte maximale Ausbeuten von 73 % nach 15 min erzielen.

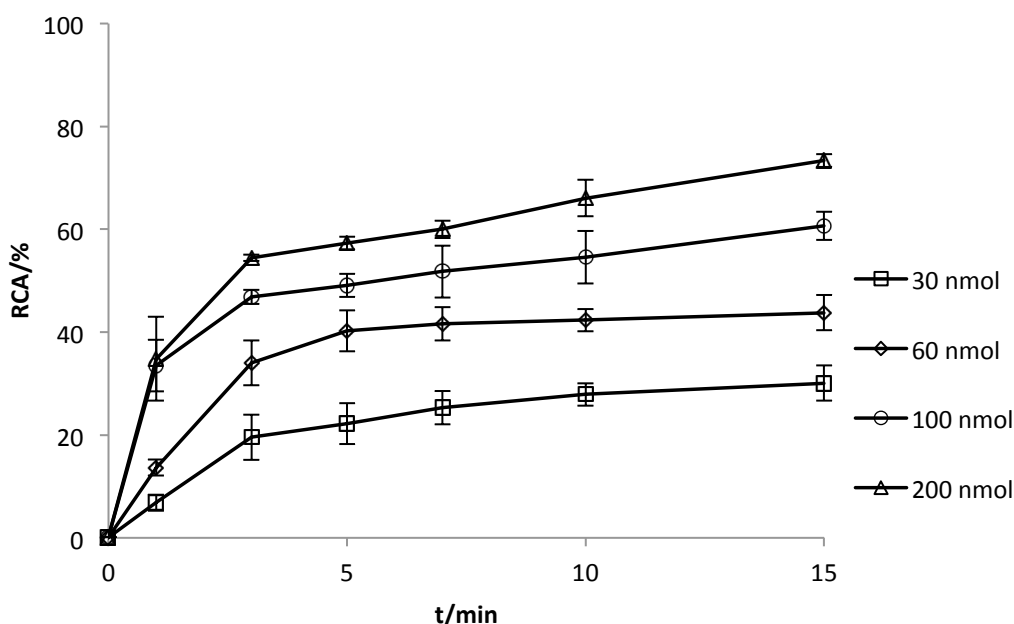


Abbildung 50: ⁶⁸Ga-Markierungskinetiken des di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DOTA-Derivats VN165.MZ mit variabler Vorläufermenge bei 95°C

3.2.5.2. Markierungsbedingungen der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂- und Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-Derivate bei 95°C in der Mikrowelle repräsentativ für VN165.MZ

Da Ausbeuten > 95 % sowie hohe spezifische Aktivitäten für *in vivo*-Evaluierungen unabdingbar sind, wurde die Markierung der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂- und Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-Derivate in der Mikrowelle (MW) (1 min Ramp, 95°C, 300 W) getestet. Für das di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DOTA-Derivat VN165.MZ (30 nmol) resultierten nach 5 min 88 %, was eine Steigerung um 66 % im Vergleich zur konventionellen Methode (K) ergab. Allerdings konnte innerhalb weiterer 10 min keine zusätzliche Ausbeutesteigerung erzielt werden.

3.2.5.3. ⁶⁸Ga-Markierungsbedingungen der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂- und Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-Derivate bei 150°C in der MW repräsentativ für das di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivat VN165.MZ

Um Markierungsausbeuten > 95 % zu erzielen, wurde die Mikrowellenreaktion bei 150°C (1 min Ramp, 300 W) bei verschiedenen Zeitpunkten evaluiert. Die Parameter der Reaktionslösung stimmten mit den allgemeinen Markierungsbedingungen überein. Für alle synthetisierten Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂- und Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-Derivate – sowohl mono- als auch di-substituierten DO2A-Derivate – konnten bereits nach 1 min Reaktionszeit Ausbeuten > 95 % erhalten werden. Zudem konnte die Vorläufermenge auf 5 nmol herabgesetzt werden. Diese Reaktionsbedingungen wurden mehrfach für niedrige Aktivitätsmengen (10 - 20 MBq) als auch für höhere Aktivitäten (300 – 600 MBq) reproduzierbar evaluiert.

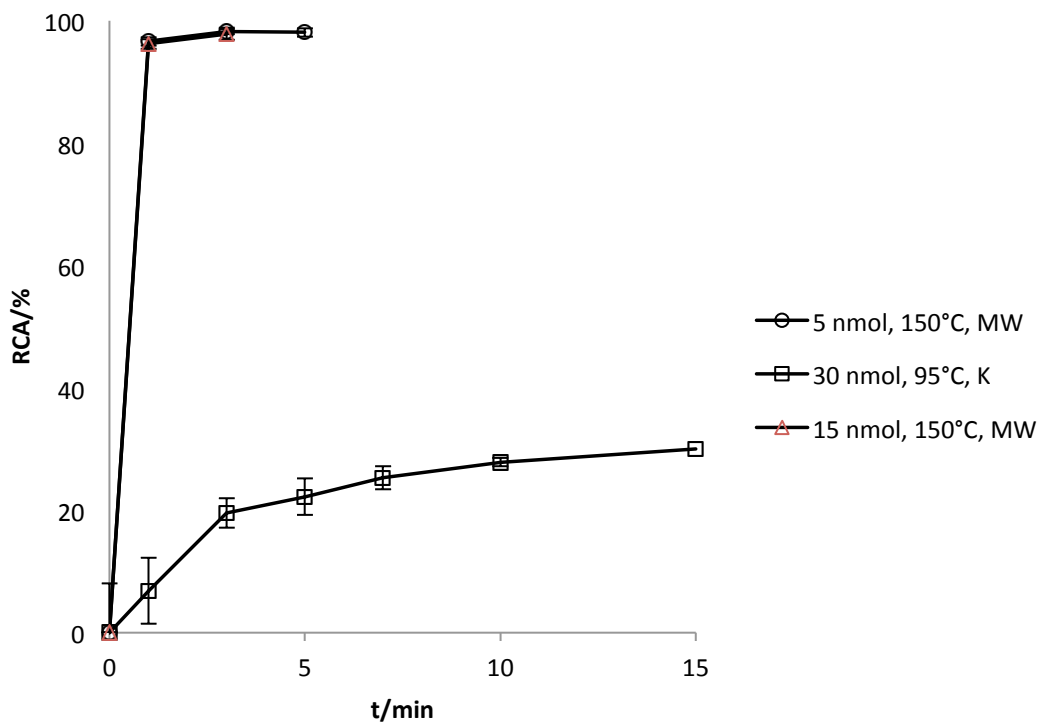


Abbildung 51: ^{68}Ga -Markierungskinetiken für das di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO₂A-Derivat VN165.MZ (5 – 30 nmol) K vs MW bei 95 °C und 150 °C repräsentativ

Folglich ist es möglich, Markierungsausbeuten >95 % für dimere als auch monomere Chelator-TV-Strukturen mit dem Einsatz der MW zu erzielen, die bei konventioneller Umsetzung nur 30 – 50 % Produkt ergaben. Die kurze Reaktionszeit von nur 1 min resultiert in geringen, zerfallsbedingten Aktivitätsverlusten. Ausbeutebestimmungen erfolgten in der Regel mittels DC, konnten aber ebenfalls per HPLC bestätigt werden, so dass die Entstehung von Nebenprodukten ausgeschlossen werden konnte.

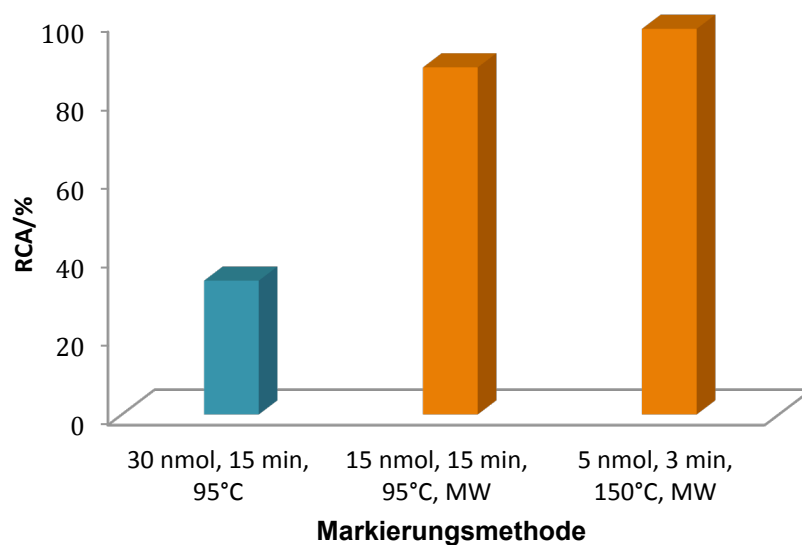


Abbildung 52: Vergleich der ^{68}Ga -Markierungsausbeuten der Pyridaben-DO2A-Derivate mit verschiedenen Methoden

3.2.6. Vergleich der ^{68}Ga -Markierung für die mono-Pyridaben-Bn-O-C₆- und di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivate VN195.MZ und VN165.MZ

Der Einfluss einer monomeren bzw. dimeren Verbindung auf die Markierungsausbeute wurde mit jeweils 30 nmol bei 95°C in der MW anhand des mono-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivats VN195.MZ und des di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivats VN165.MZ untersucht.

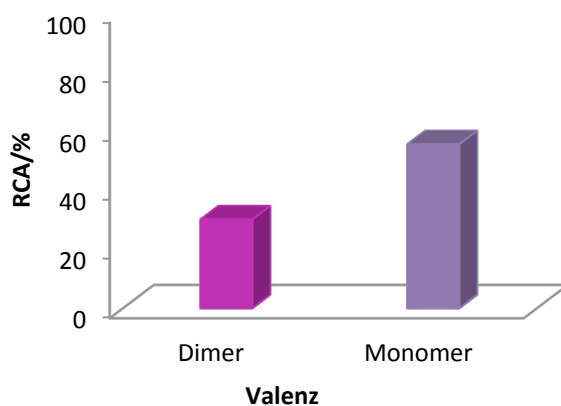


Abbildung 53: Vergleich der ^{68}Ga -Markierungsausbeuten der mono- und dimeren Pyridaben-DO2A-Derivate (30 nmol, 95 °C, 15 min)

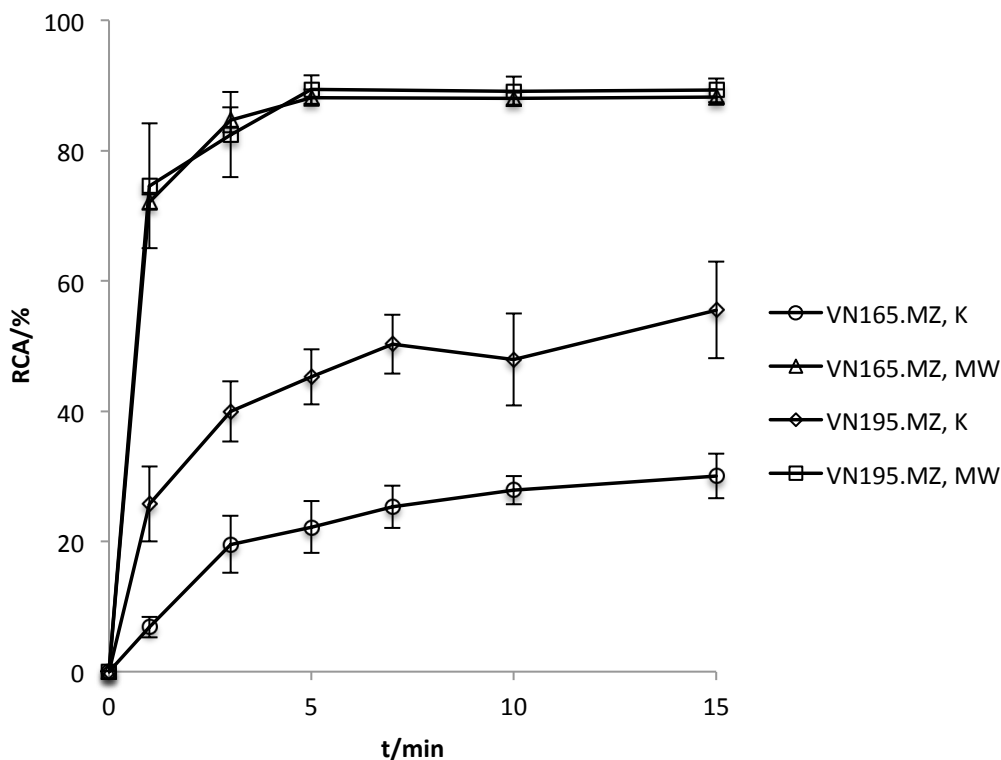


Abbildung 54: ^{68}Ga -Markierungskinetiken des mono-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivats VN195.MZ vs. des di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivats VN165.MZ (30 nmol, 95 °C, K/MW)

Bei der Markierung der Verbindungen mit der konventionellen Methode ließ sich ein großer Unterschied feststellen: Die monomere Verbindung erzielte nach 15 min eine 26 % höhere Markierungsausbeute als die dimere. Sowohl VN195.MZ (56 %) als auch VN165.MZ (30 %) ergaben nach 15 min bei 95 °C konventioneller Markierung dennoch Ausbeuten deutlich < 95 %. Erfolgte die Reaktion in der MW bei 95 °C, zeigten beide Substanzen eine identische Markierungskinetik. Nach 15 min lagen die Werte von VN195.MZ und VN165.MZ bei knapp 90 %. Eine ausreichend effiziente ^{68}Ga -Markierung >95 % konnte nicht erhalten werden.

DO2A besitzt lediglich sechs Koordinationsstellen. Somit sind keine weiteren koordinierenden Gruppen wie bei DOTA oder DO3A vorhanden. Folglich sinkt die Markierungseffizienz der DO2A-Derivate. Die höheren Markierungsausbeuten für die monomere Struktur VN195.MZ bei konventioneller Markierung lässt sich eher durch eine geringere sterische Hinderung erklären. ^{68}Ga kann von VN195.MZ einfacher komplexiert werden als bei VN165.MZ, da hier beide freien Ring-Stickstoffe mit einem großen Rest alkyliert vorliegen. Dadurch ist die Diffusion des ^{68}Ga in den Cycleninnenraum erschwert. Bei einer Reaktionsführung in der MW ist eine gleichmäßige und direkte Erwärmung der Reaktionslösung gewährleistet. Außerdem werden höhere Reaktionsausbeuten auf Grund größerer Reaktionsgeschwindigkeiten erzielt. Thermische Effekte führen zur Verkürzung der Reaktionsdauer, so dass hohe Ausbeuten ohne die Bildung von Nebenprodukten realisiert werden können.

Diese Eigenschaften von MW-Reaktionen ermöglichen eine effizientere und schnellere Markierung der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂- und Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-Derivate. Die Komplexierung des ⁶⁸Ga wird erleichtert und zieht eine Steigerung der Markierungsausbeuten gegenüber der konventionellen Methode um 30 % bzw. 60 % nach sich. Somit konnten sowohl monomere als auch dimere Chelator-TV-Strukturen mit hohen Ausbeuten erhalten werden. Die erhaltenen Ergebnisse korrelieren mit den von Riss et al. publizierten Werten für die ⁶⁸Ga-Markierung von DO2A-(butyl-L-Tyrosin)₂. Für diese Strukturen wurden bei vergleichbaren Markierungsbedingungen (13 nmol Vorläufersubstanz, 90 °C, 15 min) Ausbeuten von ca. 90 % erzielt. Auch hier ermöglichte erst die MW-gestützte Reaktionsführung (150 °C, 250 W, 3 min) Ausbeuten >95 %.¹¹²

3.2.7. Einfluss der Länge des Linkers auf die ⁶⁸Ga-Markierung

Um den Einfluss des Abstands zwischen Chelator und TV auf die MC I Affinität zu evaluieren, wurden ein Hexyl- und ein Dodecyl-Linker verwendet. Ob die unterschiedliche Länge ebenfalls die ⁶⁸Ga-Markierung beeinflusst, wurde anhand des di-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivats VN160.MZ und des di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivats VN165.MZ untersucht. Die Markierung der beiden Derivate erfolgte jeweils mit 30 nmol bei 95 °C im Thermomixer, da nur für die konventionelle Reaktionsführung Unterschiede einzelner Verbindungen auftreten.

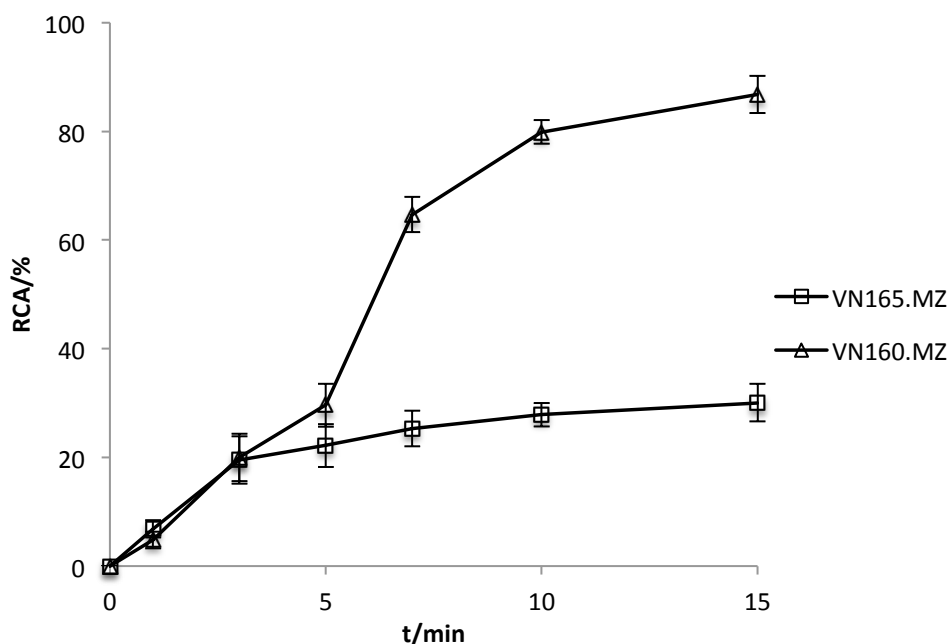


Abbildung 55: Vergleich der ⁶⁸Ga-Reaktionskinetiken des di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivats VN165.MZ und des di-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivats VN160.MZ bei 95 °C, 30 nmol

Die unterschiedliche Länge des Linkers spiegelte sich in der Markierungsausbeute deutlich wieder. Für das O-C₁₂-Derivat konnte nach 15 min 87 % Produkt erzielt werden, wohingegen das vergleichbare O-C₆-Derivat nur 30 % ergab. Der größere Abstand zwischen Chelator und TV erleichtert eine Koordination des ⁶⁸Ga, da hier der sterische Einfluss des großen Pyridabens nicht unmittelbar gegeben ist.

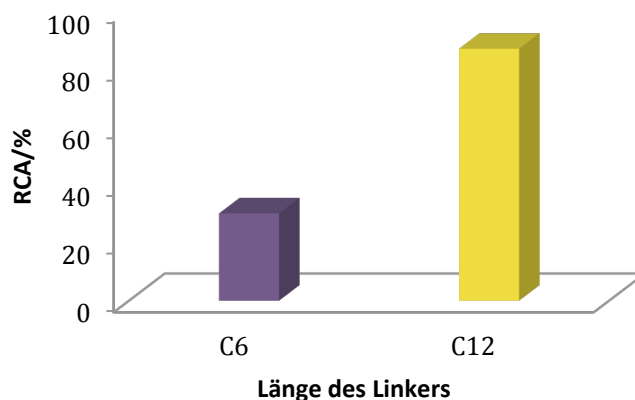


Abbildung 56: Vergleich der ⁶⁸Ga-Markierungsausbeuten des mono-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivats VN195.MZ und des di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivats VN165.MZ (30 nmol, 95 °C, 15 min)

3.2.8. Einfluss des Heteroatoms zwischen TV und Linker auf die ⁶⁸Ga-Markierung

Synthetisiert wurden Pyridaben-Bn-Linker-Derivate mit einem Sauerstoff- bzw. einem Stickstoff-Atom als Brückenglied zwischen TV und Linker. Eventuelle Unterschiede sollte der Vergleich der ⁶⁸Ga-Markierungskinetiken des di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivats VN165.MZ und des di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆-DO2A-Derivats VN214.MZ ergeben. Die ⁶⁸Ga-Markierung erfolgte nach dem Standardverfahren konventionell bei 95°C mit jeweils 30 nmol Vorläufersubstanz.

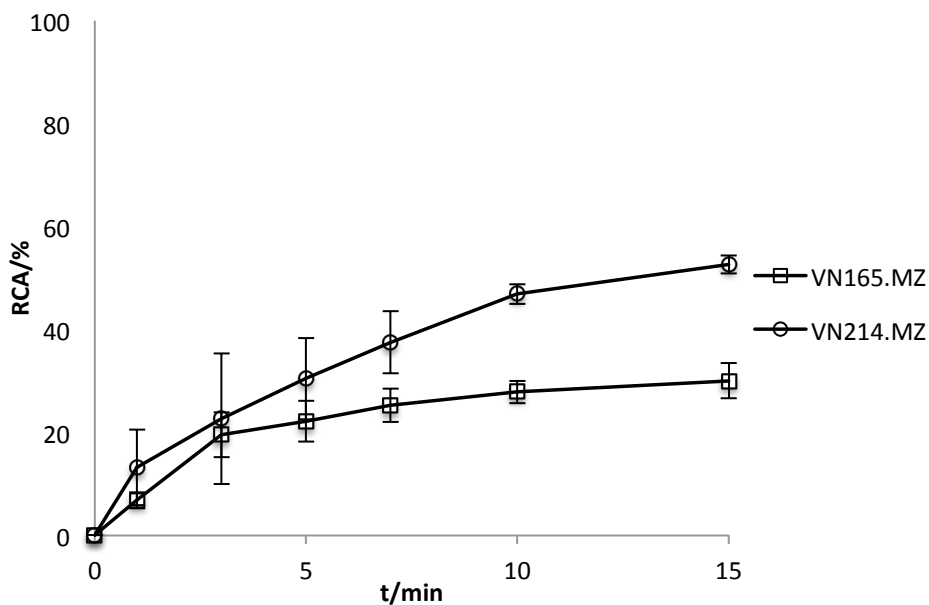


Abbildung 57: ^{68}Ga -Markierungskinetik des di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivats VN165.MZ und des di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆-DO2A-Derivats VN214.MZ (30 nmol, 95 °C)

Das VN214.MZ zeigte nach 15 min mit 53 % eine höhere Markierungsausbeute als das VN165.MZ mit nur 30 %. Als Ursache hierfür kann das freie Elektronenpaar des Stickstoffes gesehen werden, das vermutlich die Komplexierung des ^{68}Ga zusätzlich zu den restlichen Koordinationsstellen unterstützt.

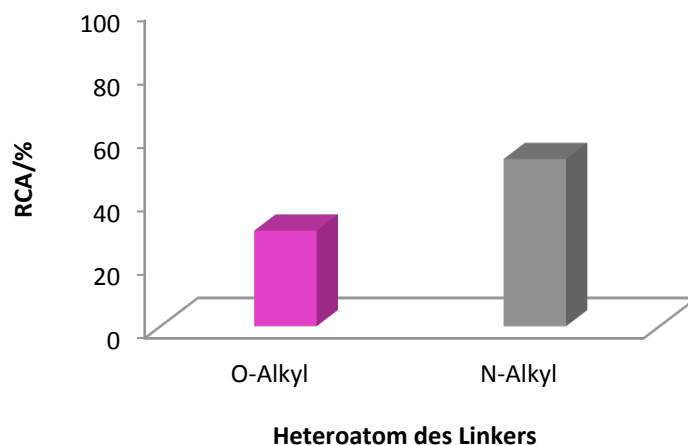


Abbildung 58: Vergleich der ^{68}Ga -Markierungsausbeuten des di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆-DO2A-Derivats VN214.MZ und des di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivats VN165.MZ (30 nmol, 95 °C, 15 min)

3.3. In vitro-Evaluierungen

3.3.1. Lipophiliebestimmungen der ⁶⁸Ga-markierten Pyridaben-Chelat-Strukturen

Die Lipophilien der ⁶⁸Ga-markierten Verbindungen wurden mit der „shake flask-Methode“ ermittelt. Zunächst erfolgte die ⁶⁸Ga-Markierung der jeweiligen Substanz. Für vergleichbare Ausgangsbedingungen wurde anschließend das Produkt mit einer Festphasenextraktion aufgereinigt und in PBS-Puffer/Octanol aufgenommen. Der Verteilungskoeffizient der 1. und 2. Rückextraktion wurde sowohl mittels Curiemeter als auch per Imager bestimmt. Da beide Werte innerhalb der Standardabweichung übereinstimmten, wurde der Mittelwert beider Auswertungen zur Berechnung des log D-Wertes herangezogen.

$$\log D = \frac{\text{Aktivität (Octanol)}}{\text{Aktivität (PBS-Puffer)}}$$

Formel 1: Berechnung des log D-Wertes

Somit konnten folgende Lipophilien für die synthetisierten Strukturen ermittelt werden:

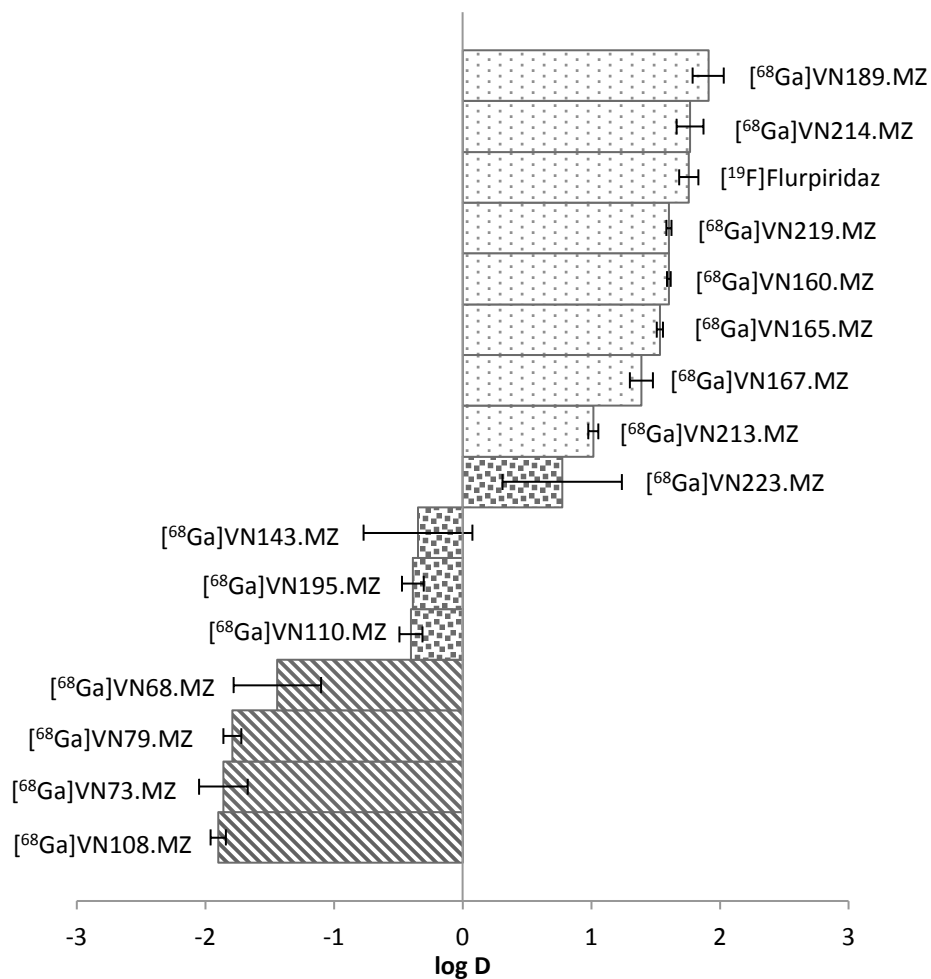


Abbildung 59: Graphische Darstellung der log D-Werte der ⁶⁸Ga-Pyridaben-MPI-Tracer

Tabelle 4: Ergebnisse der Lipophiliebestimmung - geordnet nach steigenden log D-Werten

Verbindung	log D	Standardabweichung
[⁶⁸ Ga]VN108.MZ	-1,90	± 0,34
[⁶⁸ Ga]VN73.MZ	-1,86	± 0,19
[⁶⁸ Ga]VN79.MZ	-1,79	± 0,07
[⁶⁸ Ga]VN68.MZ	-1,44	± 0,06
[⁶⁸ Ga]VN94.MZ	-1,29	± 0,27
[⁶⁸ Ga]VN110.MZ	-0,40	± 0,09
[⁶⁸ Ga]VN195.MZ	-0,39	± 0,03
[⁶⁸ Ga]VN143.MZ	-0,35	± 0,09
[⁶⁸ Ga]VN223.MZ	0,78	± 0,11
[⁶⁸ Ga]VN213.MZ	1,02	± 0,02
[⁶⁸ Ga]VN167.MZ	1,39	± 0,04
[⁶⁸ Ga]VN165.MZ	1,53	± 0,46
[⁶⁸ Ga]VN160.MZ	1,60	± 0,42
[⁶⁸ Ga]VN219.MZ	1,61	± 0,08
[¹⁹ F]Flurpiridaz	1,76	± 0,12
[⁶⁸ Ga]VN214.MZ	1,77	± 0,02
[⁶⁸ Ga]VN189.MZ	1,91	± 0,09

Die Lipophilien der synthetisierten makrozyklischen ⁶⁸Ga-Pyridaben-MPI-Tracer variieren sehr stark. Es lassen sich drei Gruppen erstellen:

- Ein Teil der Verbindungen besitzt einen hohen, negativen log D-Wert ([⁶⁸Ga]VN108.MZ – [⁶⁸Ga]VN94.MZ) und kann daher als hydrophil bezeichnet werden (log D 1,90 bis -1,44).
- Ein weitere Reihe von Substanzen besitzen einen hohen, positiven log D-Wert ([⁶⁸Ga]VN213.MZ – [⁶⁸Ga]VN189.MZ) und können lipophil genannt werden (log D 1,02 bis 1,90).
- Bei der dritten Gruppe handelt es sich um Verbindungen, die zwar einen positiven bzw. negativen log D-Wert haben ([⁶⁸Ga]VN110.MZ – [⁶⁸Ga]VN213.MZ), jedoch auf Grund der Standardabweichung eher im neutralen Bereich um den Nullpunkt einzuordnen sind und als amphiphil bezeichnet werden können (log D -0,40 bis 0,78). Der Grund für den hohen Fehler bei der Lipophiliebestimmung dieser Gruppe lässt sich durch die etwa

gleich gute Löslichkeit in Octanol und PBS-Puffer erklären. Somit erfolgt eine weniger effiziente Separation in nur eine Phase im Vergleich zu den eindeutig lipophilen bzw. hydrophilen Verbindungen.

Zu den hydrophilen Strukturen zählen die ^{68}Ga -Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivate, ^{68}Ga -Pyridaben-Bn-O-C₆-DOTA- und ^{68}Ga -Pyridaben-Bn-O-C₆-NODAGA-Derivate. Mit steigender Anzahl an PEG-Einheiten nimmt der log D-Wert ab. Der Austausch des PEG-Linkers gegen einen Alkyl-Linker resultiert in einem deutlichen Anstieg in der Lipophilie. Das ^{68}Ga -Pyridaben-Bn-O-PEG₂-DOTA-Derivat [^{68}Ga]VN73.MZ besitzt einen log D von -1,86, wohingegen das vergleichbare [^{68}Ga]VN143.MZ mit einem OC₆-Linker mit -0,35 deutlich lipophiler ist. Die größte Lipophilieerhöhung weisen die Pyridaben-Bn-Alkyl-DO2A-Derivate auf, da eine direkte Alkylierung mit dem TV an den Cyclen-Stickstoffen erfolgt. Somit wird die polare Amindbindung, die bei den Pyridaben-PEG-DOTA-Verbindungen vorliegt, umgangen. Das Ausmaß der Lipophilieerhöhung hängt von der Linkerlänge ab. [^{68}Ga]VN195.MZ (OC₆) hat einen log D von -0,39, wobei [^{68}Ga]VN167.MZ (OC₁₂) durch einen Wert von 1,39 charakterisiert ist.

Dimere DO2A-Strukturen – unabhängig von der Art des Linkers - besitzen höhere log D-Werte als die entsprechenden Monomere. Den größten Anstieg zeigen die C₆-Strukturpaare: für das OC₆ Dimer liegt eine Erhöhung um 1,92 vor; das NC₆ Dimer führt zu einer Steigerung der Lipophilie um 0,99. Die Werte der C₁₂-Monomer/Dimer-Paare unterscheiden sich nur gering.

Insgesamt konnte der Wechsel von PEG-Linkern zu Alkyl-Linkern einen deutlichen Anstieg des log D-Wertes erreichen. Sowohl die Alkylierungs-Kopplung an das Cyclen als auch die Linkerverlängerung resultieren in unpolareneren Strukturen. Zusätzlich konnte die Lipophilie durch die Synthese dimerer Pyridaben-Bn-Alkyl-DO2A-Derivate erhöht werden, sodass einige der Verbindungen eine vergleichbare Lipophilie wie das [^{19}F]Flurpiridaz (log D = 1,76) besitzen.

3.3.2. Stabilitätsbestimmungen der ^{68}Ga -markierten Pyridaben-Chelat-Strukturen

Vor *in vivo*-Evaluierungen ist es nötig, die Stabilität der radiomarkierten Verbindung in den relevanten Medien zu testen, um so eine sichere Anwendung garantieren zu können. Hierzu zählen:

- Humanes Serum, da das Radiopharmakon intravenös appliziert wird. Direkter Kontakt zu Blut und den darin enthaltenen Plasmaproteinen – insbesondere Transferrin – sollte zu keinen Stabilitätsverlusten führen.
- 0,9 %ige NaCl-Lösung, da als Injektionslösung nach Entfernen des organischen Lösemittels isotonische Kochsalzlösung eingesetzt wird.
- Ethanol, da auf Grund der hohen Tracer-Lipophilien oft ein geringer Ethanolzusatz nötig ist, um ein Anhaften an der Spritzenwänden zu reduzieren und möglichst die gesamte Aktivität injizieren zu können. Außerdem wird Ethanol bei den lipophilen Verbindungen als Lösemittel zum Ansetzen der Markierungsvorläufer-Stammlösung verwendet.

Folglich wurde die Stabilität der makrozyklischen Pyridaben-MPI-Tracer in allen drei Medien über einen Zeitraum von 80 min evaluiert.

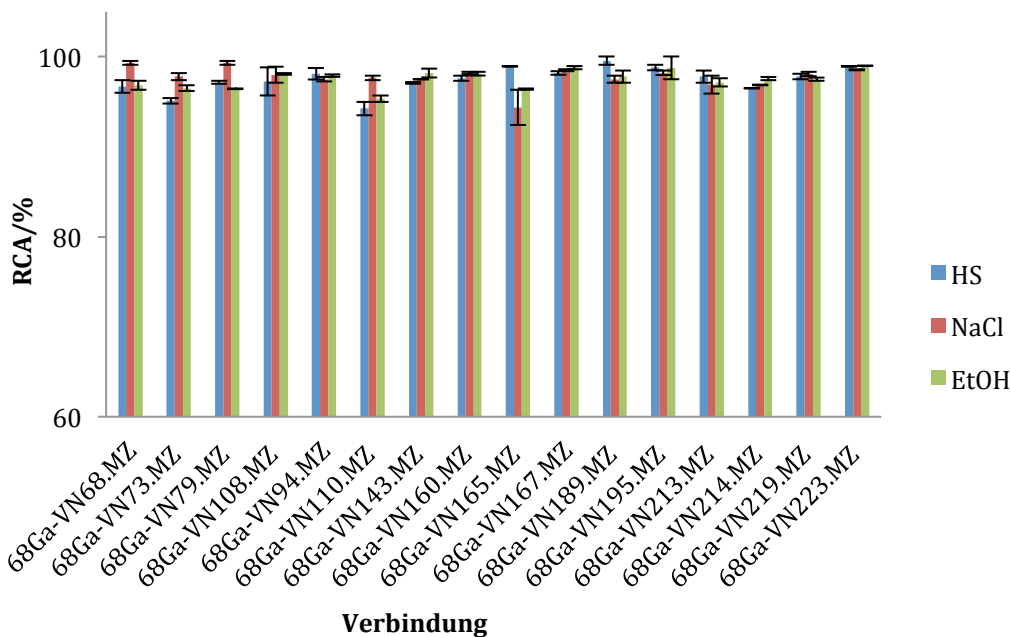


Abbildung 60: Stabilitäten der makrozyklischen ^{68}Ga -Pyridaben-MPI-Tracer in humanem Serum (HS), Ethanol (EtOH) und 0,9 %iger Kochsalzlösung (NaCl) nach 80 min

Alle der hergestellten Verbindungen sind sowohl in HS, EtOH als auch NaCl über einen Zeitraum von 80 min stabil, da kein Verlust der radiochemischen Ausbeute (RCA) festgestellt werden konnte. Die Ausbeute wurde mittels Radio-DC (Eluent: 0,1 M Natriumcitrat-Puffer, pH 4) bestimmt, und die erhaltenen Werte wurden zusätzlich per HPLC (10 % MeOH/H₂O (0,1 % TFA) → 90 % MeOH/H₂O (0,1 % TFA) in 20 min) bestätigt. Freies ^{68}Ga -Hepes wurde nach 3,7 min eluiert, [^{68}Ga]VN167.MZ als zweifacher Peak nach 18,8 - 20,4 min. Das Vorhandensein zweier Peaks für [^{68}Ga]VN167.MZ begründete sich durch Komplexisomerie. Da beide Peaks bereits nach Mischung der N₂-Lösung mit dem Markierungs-vorläufer im HEPES-Puffer vorlagen, lag keine Zersetzung durch die anschließende MW-Markierung vor. Zusätzlich traten beide Peaks in variablen Intensitäten unverändert nach 80 min Stabilitätstest auf.

Da die RCA stets oberhalb von 95 % lag, ist bei biologischen Evaluierungen nicht mit Instabilitäten durch die getesteten Medien zu rechnen.

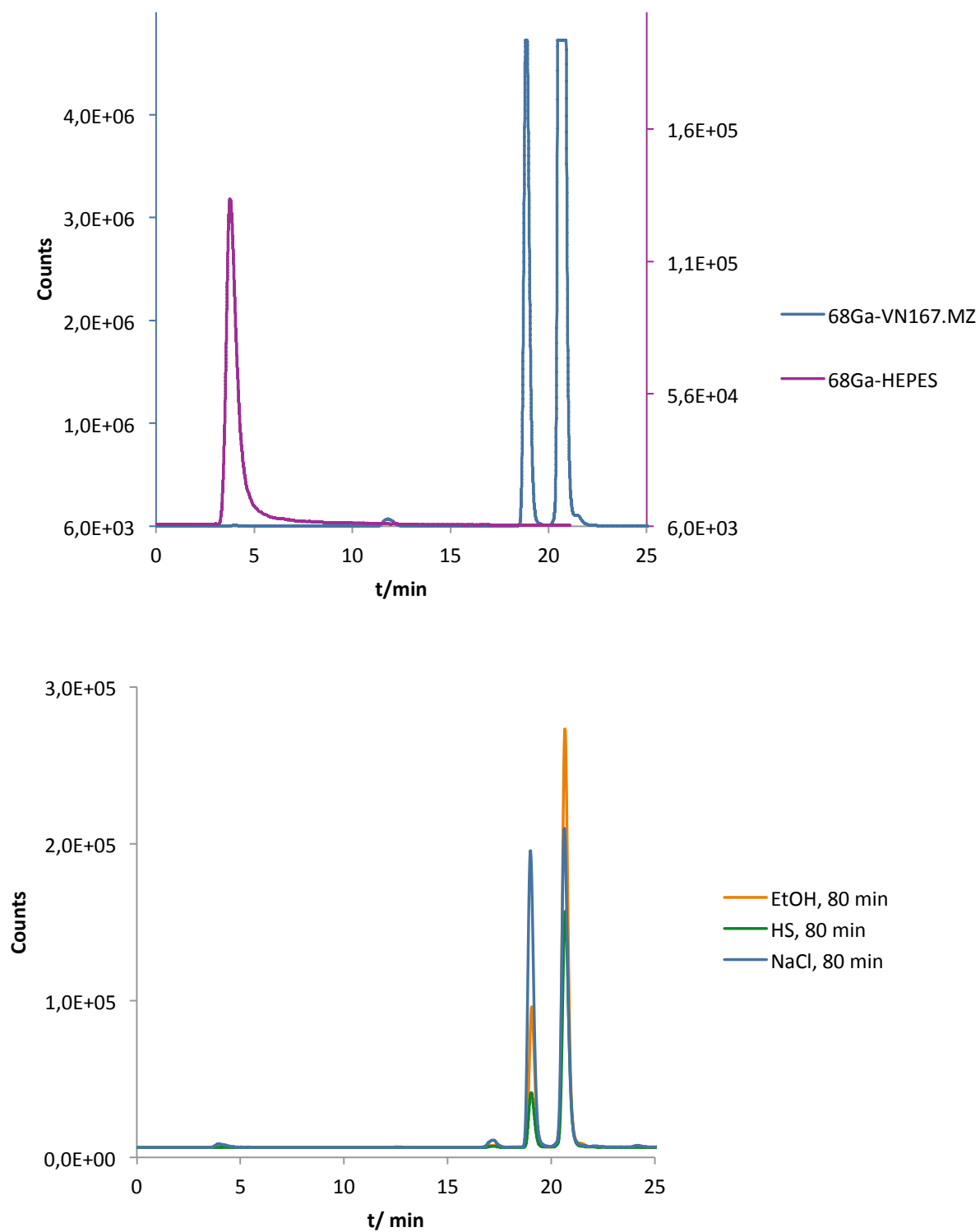


Abbildung 61: HPLC-Diagramme der Stabilitätstest: ^{68}Ga HEPES und ^{68}Ga VN167.MZ ($t = 0$) (oben); ^{68}Ga VN167.MZ nach 80 min in EtOH, HS und NaCl (unten)

3.3.3. Affinitätsbestimmungen der Ga-markierten Pyridaben-Chelat-Strukturen

Die Bindungsstärke eines Substrats an das entsprechende Enzym lässt sich durch die Affinität ausdrücken. Zunächst bindet das Substrat an das Enzym und formt einen Enzym-Substrat-Komplex, der später das Produkt und das freie Enzym freisetzt. Die Assoziationskonstante K_a beschreibt die Affinität zwischen Enzym und Substrat. Je größer K_a , desto höher ist die Affinität. In der Regel wird allerdings die Dissoziationskonstante K_d verwendet. Hier gilt: je höher die Affinität, desto kleiner K_d .



$$K_a = \frac{[ES]}{[E] \times [S]}$$

$$K_d = \frac{[E] \times [S]}{[ES]}$$

Formel 2: Massenwirkungsgesetz für Enzym-Substrat-Wechselwirkungen

Angaben zur Wirkungsstärke von Inhibitoren erfolgen unter Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration IC_{50} . Der Wert gibt die erforderliche Inhibitorkonzentration an, die zum Herabsetzen der Substrataktivität auf 50 % notwendig ist. Um die Affinität zwischen Enzym und Inhibitor zu beschreiben, wird meist die inhibitorische Dissoziationskonstante K_i verwendet, die mit dem IC_{50} über folgende Gleichung zusammenhängt:

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \times K_i$$

Formel 3: Zusammenhang zwischen K_i und IC_{50}

Die inaktiven Komplexe der Chelat-Pyridaben-Strukturen wurden als Referenzsubstanz hergestellt, um die Affinitäten, die real *in vivo* bei Applikation des Tracers vorliegen, bestmöglich ermittelt zu können. Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte der Referenzverbindungen wurde sowohl die Inhibierung der NADH-Oxidation als auch die NADH:Q₁-Umsetzung an bovinen Submitochondrial Particles (SMPs) evaluiert. Als Test-Kontrollsubstanzen kamen DQA und Flurpiridaz zum Einsatz. Die NADH:Q₁-Analyse bewertete ausschließlich die Interaktion von Substanz und MC I. Eine generelle Beurteilung der NADH-Oxidation umfasste Aktivitäten der MC I, III und IV.

Einige der Substanzen waren schlecht löslich in den möglichen Lösemitteln, sodass nicht für alle Verbindungen die gewünschten Werte ermittelt werden konnten.

Tabelle 5: Ergebnisse der IC₅₀-Bestimmungen der makrozyklischen Ga-Pyridaben-MPI-Tracer (5 mM in DMSO/EtOH)

Verbindung	IC ₅₀ NADH:Q1	IC ₅₀ NADH-Oxidation
Ga-VN68.MZ	34,1 µM	17,4 µM
Ga-VN73.MZ	-	44,9 µM
Ga-VN79.MZ	-	33,1 µM
Ga-VN94.MZ	-	45,5 µM
Ga-VN108.MZ	-	-
Ga-VN110.MZ	14,8 µM	6,9 µM
Ga-VN143.MZ	1,3 µM	0,6 µM
Ga-VN160.MZ	1,1 µM	0,7 µM
Ga-VN165.MZ	2,3 µM	1,6 µM
Ga-VN167.MZ	1,6 µM	1,0 µM
Ga-VN189.MZ	8,1 µM	7,6 µM
Ga-VN195.MZ	8,4 µM	6,2 µM
Ga-VN213.MZ	2,8 µM	2,0 µM
Ga-VN219.MZ	3,9 µM	2,6 µM
Ga-VN214.MZ	2,8 µM	2,4 µM
Ga-VN223.MZ	3,9 µM	2,2 µM
Flurpiridaz	19 nM	4,6 nM
DQA	11 nM	9 nM

Obwohl Purohit et al.¹⁰¹ eine sterische Toleranz in para-Stellung der Benzylgruppe postulierten, resultiert die Anknüpfung eines makrozyklischen Chelators in deutlichen Affinitätsänderungen. Allerdings handelte es sich bei den publizierten Struktur-Affinitätsbeziehungen um Pyridaben-Derivate, die durch das Einbringen von Mono/Di-PEG-Einheiten ebenso wie sterisch relativ unproblematische Alkylketten charakterisiert wurden.¹⁰¹ Die Kopplung zwischen Chelator und Insektizid führte zu einem größeren und schweren Molekül. Das Flurpiridaz besitzt ein Molekulargewicht von 391 g/mol, wohingegen die Ga-Chelator-Pyridaben-Derivate mindestens das doppelte Gewicht, meistens sogar über 1000 g/mol wiegen.

Dennoch lässt sich anhand der Werte für die IC₅₀-Bestimmung der NADH:Q1 sagen, dass die synthetisierten makrozyklischen Ga-Pyridaben-Derivate in der Lage sind, den MC I zu inhibieren. Ga-Pyridaben-Bn-Alkyl-DO2A-Derivate zeigen höhere Affinitäten zu MC I. Die hydrophilen Ga-Pyridaben-Bn-PEG-DOTA- und Ga-Pyridaben-Bn-PEG-NODAGA-Derivate liegen in einem Bereich von etwa 20 –

40 μM , wohingegen die IC_{50} -Werte der Ga-Pyridaben-Bn-Alkyl-DO2A-Derivate sich im einstelligen μM -Bereich befinden. Begründen lässt sich dies in der erhöhten Lipophilie durch den Austausch des hydrophilen PEG-Linkers gegen einen unpolaren Alkyl-Linker.

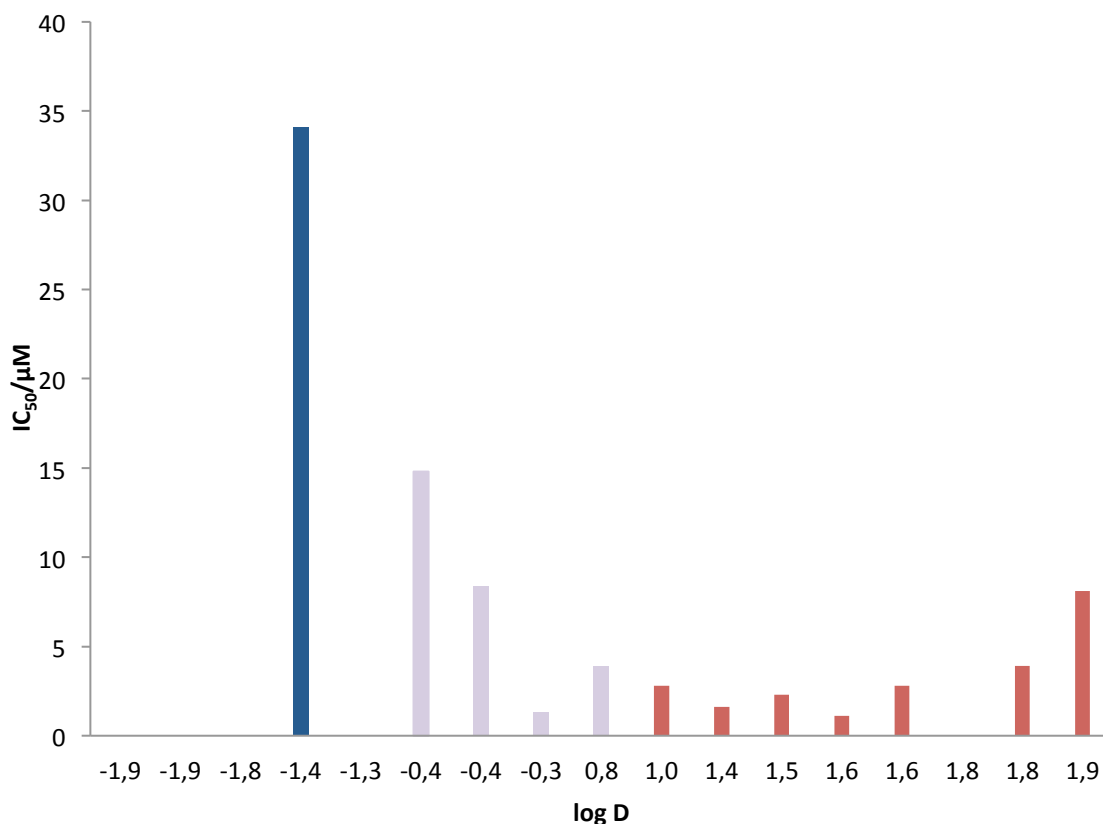


Abbildung 62: Abhängigkeit des IC_{50} -Werts von der Lipophilie

Bei den Ga-DO2A-Strukturen handelt es sich nach Metallkomplexierung um einfach positiv geladene Moleküle. Ga-Pyridaben-DOTA- und Ga-Pyridaben-NODAGA-Strukturen hingegen sind ungeladen. Es ist bekannt, dass einfach positiv geladene, lipophile Moleküle auf Grund des Membranpotentials vermehrt über die Zellmembran in das Myokard gelangen. Allerdings konnte kein positiver Einfluss von geladenen Verbindungen in dieser Versuchsreihe festgestellt werden. Das ungeladene Ga-Pyridaben-Bn-O-C₆-DOTA-Derivat Ga-VN143.MZ entspricht der positiv geladenen Variante des Ga-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivats Ga-VN195.MZ. Da in beiden Fällen das gleiche Ga-Pyridaben-Bn-O-C₆-Derivat eingesetzt wurde, ist ein direkter Vergleich möglich. Mit einer Affinität von 8,4 μM besitzt die geladene Variante sogar eine leicht schlechtere Bindungstendenz als das neutrale Ga-VN143.MZ mit 1,3 μM . Offensichtlich spielt hauptsächlich die Lipophilie eine Rolle bei der Affinität für MC I. Der Vergleich der zwei eingesetzten Chelatoren DOTA und NODAGA ergab ebenfalls IC_{50} , die sehr nahe bei einander liegen. Die Variation des Heteroatoms zwischen Linkereinheit und TV erzielte vergleichbare Werte. Sowohl das Ga-Pyridaben-N(Bn)-C₆- als auch das entsprechende Ga-Pyridaben-Bn-O-C₆-Derivat ergaben beide Affinitäten von ca. 3 μM . Folglich hat der relativ große Benzylrest am N keinen minimierenden Affinitätseinfluss. Des Weiteren spielte die Länge des Linkers eine verminderte Rolle für die Bindungsgüte des Tracers. Das Ga-VN195.MZ repräsentiert das C₆-Linker-Derivat mit einer Affinität von 8,4 μM . Das Ga-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivat Ga-VN167.MZ besitzt einen C₁₂-Linker und einen IC_{50} -Wert von 1,6 μM . Ein Vergleich der Ga-Pyridaben-

Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂Derivate konnte diese Ergebnisse nicht bestätigen: beide Verbindungen liegen im Bereich von ca. 2 µM.

Außerdem sollte das Einbringen mehrerer TVen eine auf der Theorie des Multivalenzansatzes basierende Affinitätssteigerung nach sich ziehen. Setzt man die Werte der monomeren- und dimeren Strukturen ins Verhältnis, lassen sich zwar kleinere Unterschiede feststellen, dennoch liegt die absolute Verringerung maximal bei -0,61 (für den Vergleich des Ga-di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivats Ga-VN165.MZ mit dem Ga-VN195.MZ).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Verwendung des lipophileren Alkyl-Linkers eine Affinitätssteigerung um eine Größenordnung bewirken konnte. Die verschiedenen Variationsmuster der einzelnen Derivate spiegelten sich nur gering in den IC₅₀-Werten wider.

Tabelle 6: *In vitro*-Affinitäten und Lipophilien der makrozyklischen Ga-Pyridaben-MPI-Tracer

Verbindung	log D	IC ₅₀ /µM
Ga-VN68.MZ	-1,44 ± 0,06	34,1
Ga-VN73.MZ	-1,86 ± 0,19	44,9
Ga-VN79.MZ	-1,79 ± 0,07	33,1
Ga-VN94.MZ		
Ga-VN108MZ	-1,90 ± 0,34	-
Ga-VN110.MZ	-0,40 ± 0,09	14,8
Ga-VN143.MZ	-0,35 ± 0,09	1,3
Ga-VN213.MZ	1,02 ± 0,02	2,8
Ga-VN195.MZ	-0,39 ± 0,03	8,4
Ga-VN165.MZ	1,53 ± 0,46	2,3
Ga-VN167.MZ	1,39 ± 0,04	1,6
Ga-VN160.MZ	1,60 ± 0,42	1,1
Ga-VN223.MZ	0,78 ± 0,11	3,9
Ga-VN214.MZ	1,77 ± 0,02	2,8
Ga-VN189.MZ	1,91 ± 0,09	8,1
Ga-VN219.MZ	1,61 ± 0,08	3,9
Flurpiridaz	1,76 ± 0,12	0,019

3.4. Biologische Evaluierungen des [^{68}Ga]VN167.MZ und des [^{68}Ga]VN160.MZ

Nachdem die ^{68}Ga -Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivate sowohl bezüglich ihrer *in vitro*-Stabilitäten als auch ihrer IC₅₀-Werte für die Inhibition des MC I evaluiert wurden, konnten das ^{68}Ga -mono-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivat [^{68}Ga]VN167.MZ und das ^{68}Ga -di-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivat [^{68}Ga]VN160.MZ als die potentesten Strukturen identifiziert werden. Mit beiden Verbindungen wurden sowohl *in vivo*-Studien in Form von μ -PET-Aufnahmen als auch *ex vivo*-Biodistributionstests (n = 3) an gesunden, männlichen Sprague Dawley Ratten (ca. 270 g) vorgenommen. Zusätzlich erfolgte eine Vergleichsstudie mit [^{18}F]Flurpiridaz.

3.4.1. μ -PET-Studien mit [^{68}Ga]VN167.MZ und [^{68}Ga]VN160.MZ

Nach Bestimmung der *in vitro*-Affinitäten der Ga-Pyridaben-Chelat-Strukturen sollte ebenfalls das Verhalten *in vivo* evaluiert werden. Die bei der Affinitätsbestimmung verwendeten SMPs beinhalteten zwar Komplex I-V der Atmungskette in aktiver Form, jedoch befanden sich diese in inaktiven Mitochondrien. Zur Beurteilung *in vivo* wurde das biologische Verhalten in gesunden Ratten in μ -PET-Studien evaluiert. Nach intravenöser Applikation des ^{68}Ga -markierten Tracers erfolgte ein dynamischer Scan über 60 min sowie eine 15 minütige Ganzkörperaufnahme.

Die Auswertung des dynamischen Scans ergab folgende Zeit-Aktivitätskurven für das Herz als Region of Interest:

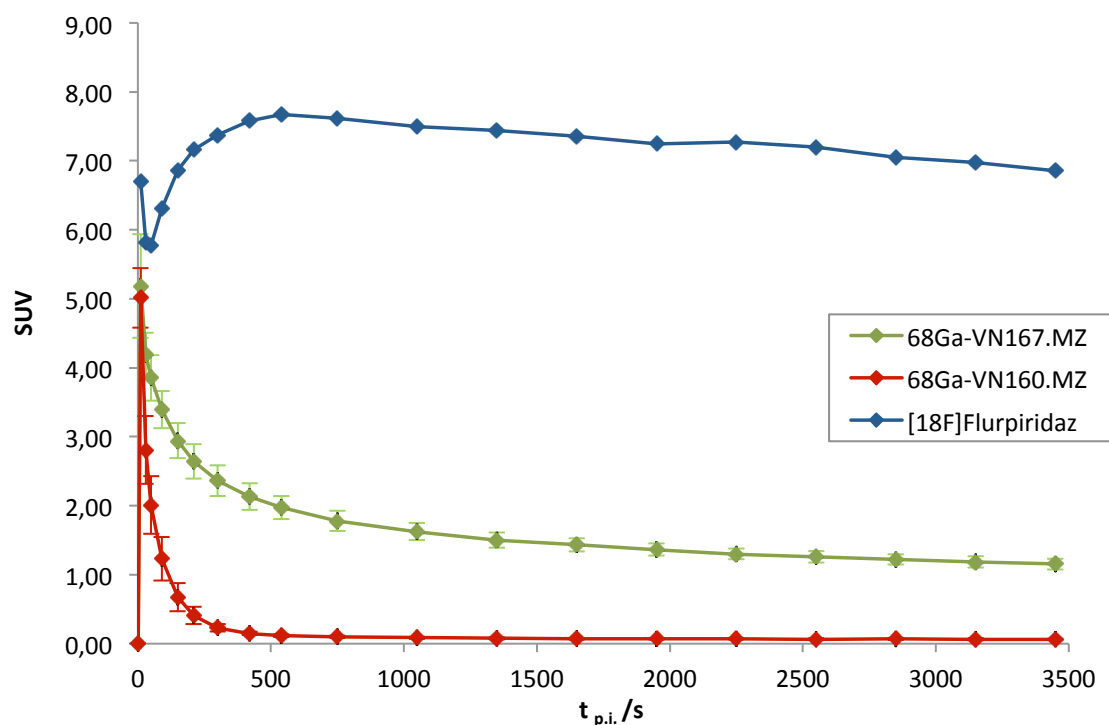


Abbildung 63: Herz-Zeit-Aktivitätskurven für das ^{68}Ga -mono-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivat [^{68}Ga]VN167.MZ, ^{68}Ga -di-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivat [^{68}Ga]VN160.MZ und [^{18}F]Flurpiridaz für 0 – 60 min

Beide Verbindungen zeigten zu Beginn der Messung sehr hohe SUV-Werte von über 5, die auf die Bolusapplikation des Radiotracers zurückzuführen ist. Innerhalb der ersten 3 min fielen die Kurven stark ab und erreichten einen relativ konstanten Wert, dessen Änderung nur noch gering war. [⁶⁸Ga]VN160.MZ war bereits nach 8 min aus dem Herzen ausgewaschen, da hier ein SUV < 0,1 vorlag. [⁶⁸Ga]VN167.MZ zeigte eine deutliche langsameren Herz-wash-out. Diese verdeutlichten auch die SUV-Werte nach 60 min der beiden Tracer im Vergleich: [⁶⁸Ga]VN167.MZ besaß einen SUV von $1,15 \pm 0,08$ [⁶⁸Ga]VN160.MZ lediglich $0,06 \pm 0,01$. Das ebenfalls evaluierte [¹⁸F]Flurpiridaz zeigte nach 60 min einen konstanten SUV von 6 – 7. Es konnte kein wash-out festgestellt werden, was mit den Untersuchungen bei Ratten, Hasen und Primaten übereinstimmte.^{113,114}

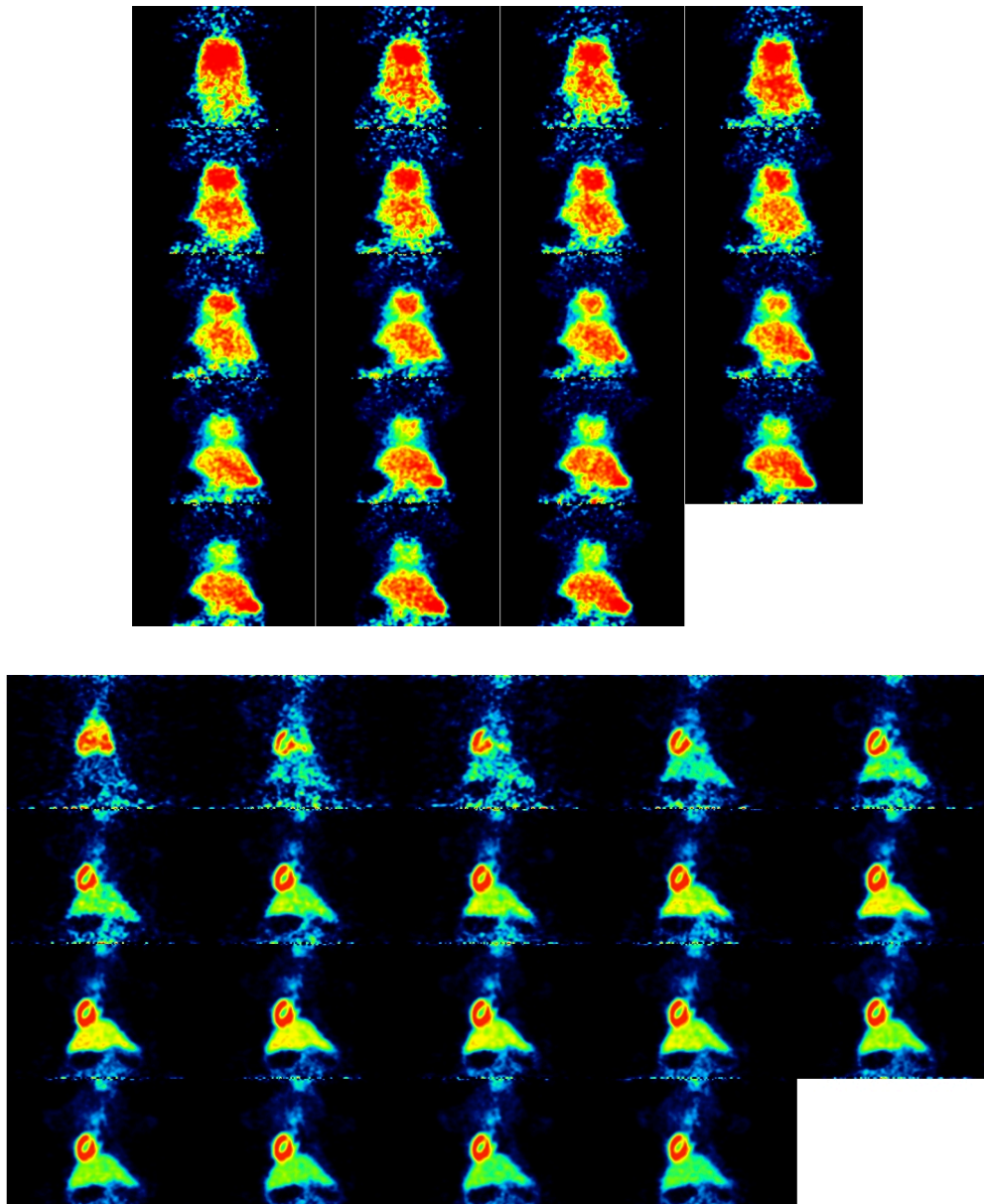


Abbildung 64: Vergleich der dynamischen PET-Bilder *in vivo* innerhalb 0 – 60 min in koronaler Schnittebene von [⁶⁸Ga]VN167.MZ (oben) und [¹⁸F]Flurpiridaz (unten); der ⁶⁸Ga-Uptake ist in gemittelten SUVs mit einem Farbcode von 0 – 8 für [¹⁸F]Flurpiridaz und 0 – 3 für [⁶⁸Ga]VN167.MZ dargestellt

Die abgebildeten 19 Frames, die den jeweiligen Rekonstruktionszeiten (3 × 20 s, 3 × 60 s, 3 × 120 s, und 10 × 300 s) entsprechen, repräsentieren die dynamische PET-Aufnahme von [⁶⁸Ga]VN167.MZ und [¹⁸F]Flurpiridaz. Für [⁶⁸Ga]VN167.MZ zeigte sich bereits nach 4 min eine Akkumulation des Tracers im Herz. Eine Clearance der Verbindung war bereits nach 10 min deutlich erkennbar. Zudem konnte ebenfalls eine sehr hohe Anreicherung in Leber und Niere festgestellt werden. Da der log D des Tracers bei 1,39 lag und somit zum mittleren Bereich zählte, ließen sich beide Ausscheidungswege erklären. Für die medizinische Diagnostik sind hohe Herz/Leber-Verhältnisse wichtig, da die beiden Organe direkt nebeneinander liegen und eine zu hohe Leberaufnahme keine exakte Organabgrenzung erlaubt. Die in den PET-Studien erhaltenen Organanreicherungen korrelieren mit ermittelten Daten für die *ex vivo*-Organverteilung. Es konnten keine scharf abgegrenzten Anreicherungsgebiete im Herzen für [⁶⁸Ga]VN167.MZ festgestellt werden. Die eher diffuse Aufnahme deutete auf eine perfusionsbedingte Traceranreicherung hin. Damit einher gingen die aus den Bidistributionsstudien erhaltenen, hohen Blutaktivitäten. Generell konnte eine ausgeprägte Hintergrundaktivität festgestellt werden. [¹⁸F]Flurpiridaz hingegen zeigte bereits innerhalb der ersten Minute eine selektive Herzaufnahme, bei mäßiger Hintergrundaktivität. Innerhalb der gemessenen 60 min blieb die Herzakkumulation konstant, allerdings konnte auch bei dem fluorinierten Tracer nach 10 min eine hohe Leberaufnahme festgestellt werden. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den von Berman et al. durchgeführten Studien überein.⁹⁷ Folglich wurde [¹⁸F]Flurpiridaz in den Mitochondrien stärker retiniert, [⁶⁸Ga]VN167.MZ hingegen erreicht nach 60 min auf Grund des schnelleren wash-outs geringere SUV-Werte, so dass die Aktivitätsanreicherung eher der Herzperfusion zu zuordnen ist. Ebenfalls für eine perfusionsbedingte Anreicherung spricht, dass [¹⁸F]Flurpiridaz selektiv das Myokard visualisierte, [⁶⁸Ga]VN167.MZ hingegen eine vollständige Organanreicherung zeigte. Der SUV-Wert von [⁶⁸Ga]VN167.MZ lag dennoch nach 60 min in vergleichbarer Größenordnung einiger ⁶⁸Ga-Schiffsche Basen.¹¹⁵

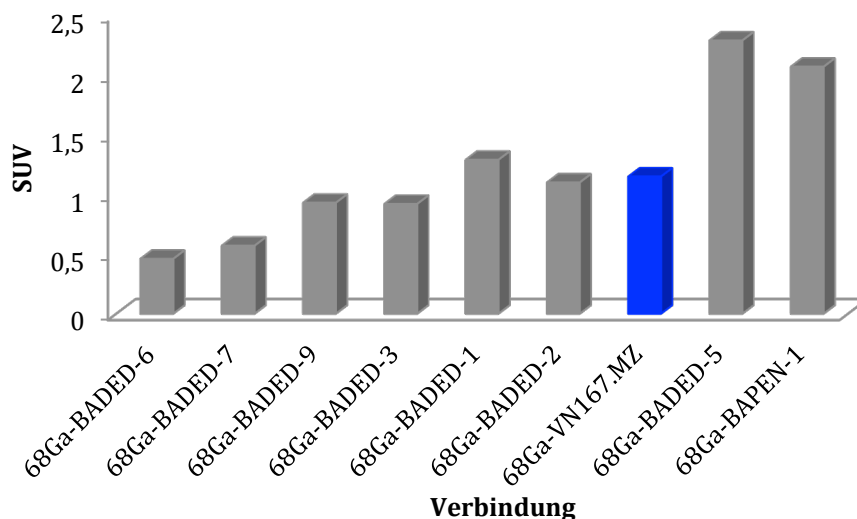


Abbildung 64: Vergleich der SUV-Werte der ⁶⁸Ga-Schiffsche Basen mit [⁶⁸Ga]VN167.MZ¹¹⁵

Eine vollständige Vergleichbarkeit der SUV-Werte ist jedoch nicht gegeben, da die ^{68}Ga -Schiffsche Basen - analog dem [^{18}F]Flurpiridaz eine gezielte Myokardanreicherung aufweisen, wohingegen [^{68}Ga]VN167.MZ im gesamten Herz akkumuliert.

3.4.2. Biodistributionsstudien von [^{68}Ga]VN167.MZ und [^{68}Ga]VN160.MZ

Zur Bestimmung der genauen Tracer-Organverteilung wurden Biodistributionsstudien an ca. 290 g schweren, männlichen Sprague Dawley Ratten mit ^{68}Ga -mono-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivat [^{68}Ga]VN167.MZ, ^{68}Ga -di-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivat [^{68}Ga]VN160.MZ und [^{18}F]Flurpiridaz durchgeführt. Als Zeitpunkte wurden 10 und 60 min nach Tracerinjektion gewählt, um die erhaltenen Werte mit denen von Huisman et al.¹¹⁶ vergleichen zu können. Unter Berücksichtigung des Organgewichts wurde die prozentuale injizierte Dosis pro g Gewebe (%ID/g) ermittelt.

Tabelle 7: Ergebnisse der Biodistributionen von [^{68}Ga]VN167.MZ und [^{68}Ga]VN160.MZ nach 10 und 60 min

Organ	[^{68}Ga]VN167.MZ		[^{68}Ga]VN160.MZ	
	% ID/g Gewebe 10 min	% ID/g Gewebe 60 min	% ID/g Gewebe 10 min	% ID/g Gewebe 60 min
Lunge	1,06 ± 0,25	1,49 ± 0,39	0,55 ± 2,44	0,40 ± 3,64
Leber	0,95 ± 0,11	1,63 ± 0,23	4,58 ± 0,28	7,94 ± 0,25
Milz	0,53 ± 0,55	0,61 ± 0,15	7,58 ± 3,61	5,81 ± 2,86
Niere	2,52 ± 0,44	4,70 ± 1,25	1,05 ± 1,87	0,11 ± 0,03
Muskel	0,26 ± 0,04	0,31 ± 0,09	0,04 ± 0,05	0,01 ± 0,00
Herz	0,75 ± 0,06	0,79 ± 0,11	0,07 ± 0,04	0,04 ± 0,01
Blut	2,29 ± 1,98	1,84 ± 0,34	0,17 ± 0,07	0,04 ± 0,01
Herz/Blut	0,37 ± 0,13	0,43 ± 0,02	0,43 ± 0,07	0,59 ± 0,30
Herz/Lunge	0,73 ± 0,13	0,55 ± 0,06	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,09
Herz/Leber	0,80 ± 0,08	0,48 ± 0,01	0,10 ± 0,12	0,01 ± 0,00

[^{68}Ga]VN167.MZ lag mit $0,75 \pm 0,06$ %ID/g nach 10 min im Herzen vor. Eine vermehrte Aufnahme in Lunge, Leber und besonders in der Niere war ebenfalls festzustellen. Der von $2,52 \pm 0,44$ %ID/g auf $4,70 \pm 1,25$ %ID/g gestiegene Wert für die Niere veranschaulichte die renale Exkretion. Dies korrelierte mit den Biodistributionsdaten des [^{18}F]Flurpiridaz laut^{90,91}. Das Herz zeigte nach 60 min einen Wert von $0,79 \pm 0,11$ %ID/g, der sich im Vergleich zu dem 10 min Wert kaum veränderte. Die PET-Bilder sowie die ermittelten SUVs deuteten allerdings auf einen relativ schnellen wash-out hin. Auch die Herz/Leber-, Herz/Lunge- und Herz/Blut-Verhältnisse mit Werten < 1 veranschaulichten die hohe Aufnahme in die Ausscheidungsorgane. Für medizinische Anwendungen jedoch sind hohe Herz/Organ-Verhältnisse zur idealen Diagnostik notwendig. Die hohe Blutaktivität nach 60 min deutete darauf hin, dass die Tracer-Clearance nicht vollständig ist und die Substanz weiterhin im Blut

zirkuliert. Ein Grund hierfür könnte das Molekulargewicht von 775 g/mol sein, das ca. doppelt so viel wie das [^{18}F]Flurpiridaz beträgt. Der für das ^{68}Ga -Derivat erhaltene Wert für die Anreicherung im Herzen nach 60 min liegt mit 0,79 deutlich unter dem von Huisman et al. publizierten Wert für das [^{18}F]Flurpiridaz.¹¹⁶

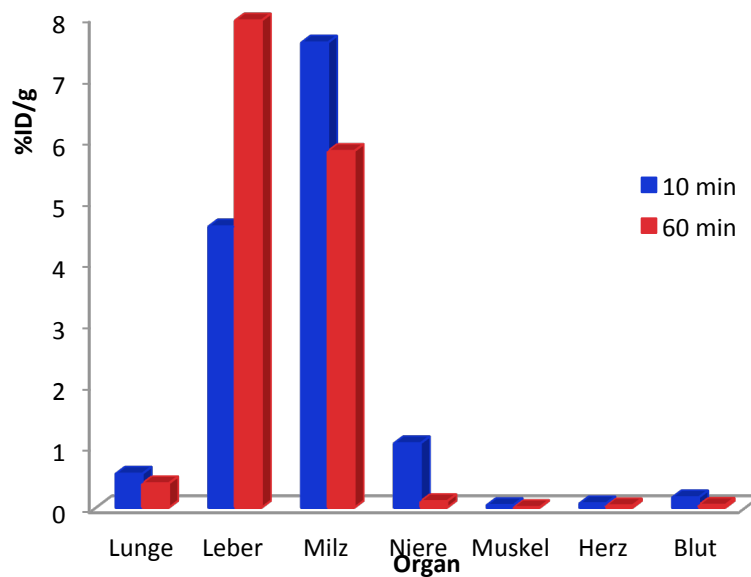
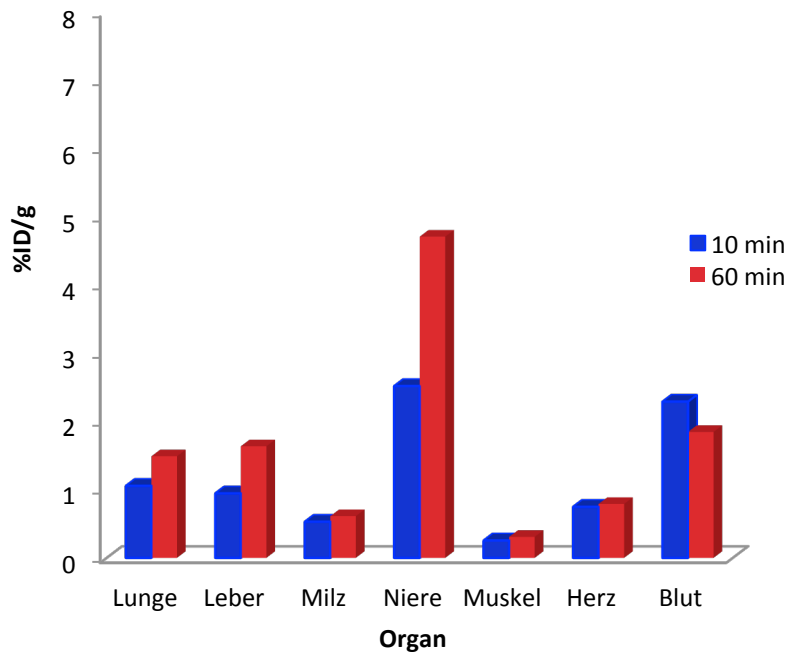


Abbildung 65: Organverteilung [^{68}Ga]VN167.MZ (oben) und [^{68}Ga]VN160.MZ (unten) in gesunden Ratten nach 10 und 60 min

Das dimere $[^{68}\text{Ga}]\text{VN160.MZ}$ zeigte eine unterschiedliche Organverteilung. Bereits nach 10 min war der Tracer aus dem Herzen ausgewaschen ($0,07 \pm 0,04$ % ID/g). Sowohl nach 10 als auch nach 60 min lag die gesamte Aktivität in der Leber und Milz vor. Verdeutlicht wurde dies durch sehr hohe Leber- und Milzaufnahmen ($7,94 \pm 0,25$ und $5,81 \pm 2,86$ % ID/g nach 60 min). Es fiel auf, dass auch nach 60 min fast keine Anreicherung in der Niere zu finden war, obwohl laut Yalamanchili et al. sowie Maddahi et al. $[^{18}\text{F}]\text{Flurpiridaz}$ eine Ausscheidung über die Niere aufweist.^{91,117} Als Vergleich erfolgte ebenfalls die Biodistribution für $[^{18}\text{F}]\text{Flurpiridaz}$ durchgeführt. Die äquivalenten Daten des $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Sestamibi}$.

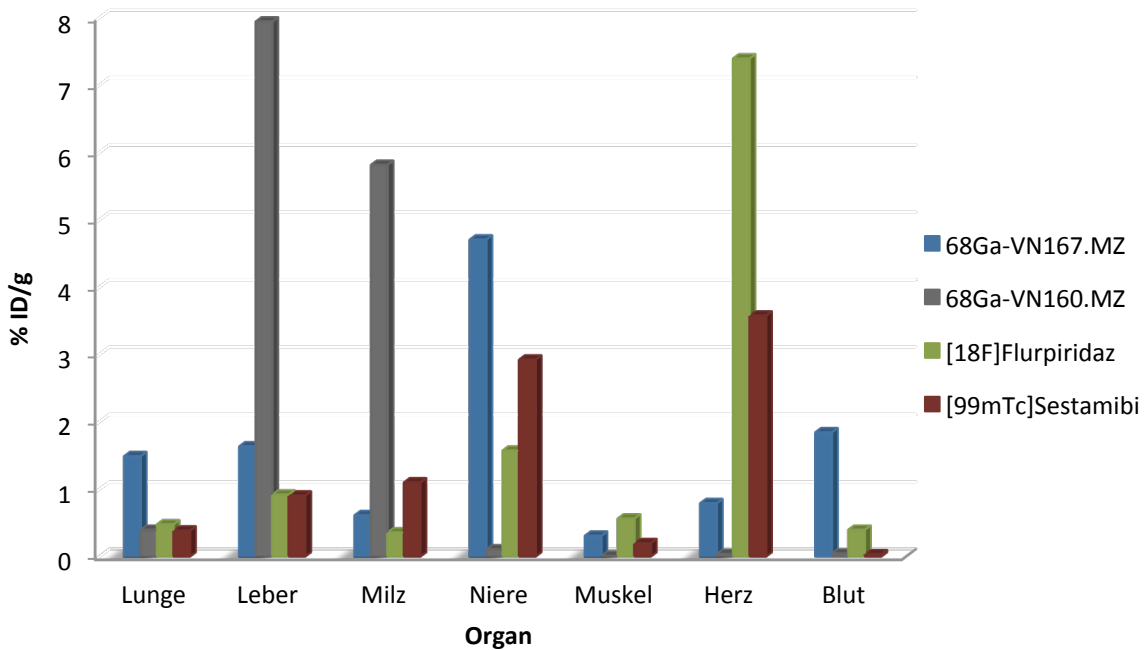


Abbildung 66: Vergleich der Organverteilung 60 min p. i. für $[^{68}\text{Ga}]\text{VN167.MZ}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{VN160.MZ}$, $[^{18}\text{F}]\text{Flurpiridaz}$ und $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Sestamibi}$

Im direkten Vergleich der vier Verbindungen zeigte $[^{18}\text{F}]\text{Flurpiridaz}$ nach 60 min 7,4 den höchsten Myokarduptake, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Sestamibi}$ mit 3,58 % ID/g ca. die Hälfte davon. $[^{68}\text{Ga}]\text{VN167.MZ}$ wurde zu 0,79 % nach 60 min noch in dem Herz retiniert. Somit konnte es nur ca. ein Drittel der Aufnahme des $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Sestamibi}$ erreichen. Der Eliminierungsprozess stimmte mit dem des $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Sestamibi}$ überein: beide Substanzen wurden hauptsächlich über die Niere ausgeschieden, wohingegen der Fluortracer zwar ebenfalls renal eliminiert wurde, jedoch auch die geringste Hintergrundaktivität aufweisen konnte. Die Kombination aus den PET-Ergebnissen und den Biodistributionsdaten zeigte, dass die neu synthetisierten Strukturen keine Verbesserung der bereits etablierten Myokard-Tracer erreichen konnten. Sowohl $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Sestamibi}$ als auch $[^{18}\text{F}]\text{Flurpiridaz}$ waren den makrozyklischen Pyridaben-Derivaten überlegen. Als Grund hierfür sind die Affinitäten der neuen Tracerklasse zu nennen. $[^{18}\text{F}]\text{Flurpiridaz}$ besitzt einen IC_{50} von 11 nM ¹⁰¹, wohingegen die optimierten Pyridaben-DO2A-Verbindungen nur Affinitäten von $1 \mu\text{M}$ erreichen. Dennoch liegt der SUV für $[^{68}\text{Ga}]\text{VN167.MZ}$ erhaltene $\text{SUV}_{\text{Myokard}}$ mit $0,79 \pm 0,11$ im Bereich der Werte, die für ^{68}Ga -Schiffsche Basen ($0,46 - 3,16$) bekannt sind.

4. Experimenteller Teil

4.1. Allgemeines und Messgeräte

Alle verwendeten Chemikalien wurden von kommerziellen Anbietern (ABCR, Acros Organics, Alfa Aesar, Chematech, Fisher Scientific, Fluka, Merck und Sigma-Aldrich) erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden über Sigma-Aldrich bezogen; deuterierte Lösungsmittel zur NMR-Spektroskopie über Deutero GmbH.

Für die radioaktiven Markierungen mit ^{68}Ga kam ein $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator (Cyclotron Obninsk Ltd. Co., Russland) oder ein EZAG-IGG-100-Generator (Eckert & Ziegler AG, Berlin) zum Einsatz. Die Startaktivitäten nach Elution lagen im Bereich zwischen 100 – 700 MBq.

Zur Durchführung der biologischen Evaluierungen wurden Sprague Dawley Ratten von Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland bezogen.

4.1.1. Messgeräte

- Kernresonanzspektroskopie:
Messungen der ^1H und ^{13}C -Spektren erfolgten an einem Bruker 300, 400 und 600 Ultrashield TM) sowie an einem Bruker 300 Advance III HD (Bruker, Billerica, Ma, United States). Chemische Verschiebungen sind im Vergleich zu Tetramethylsilan ($\delta = 0$) als Standard angegeben und auf den jeweiligen Lösungsmittelpeak normiert. Mittels MestReNova 7 wurde die Spektrenauswertung durchgeführt.
- Massenspektrometrie:
ESI-Massenspektren wurden mit einem Thermo Quest Navigator Instrument (Thermo Electron) bestimmt. Zusätzlich erfolgten Messungen an einer 6130 Quadropole LC/MS in Kombination mit 1220 Infinity LC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States).
- HPLC:
Die Aufreinigung der Markierungsvorläufer wurde mittels semi-präparativer HPLC mit einer Dionex ICS-Series 5000 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, United States).
- Aktivitätsmessungen:
Die Aktivitäten wurden mit einem Isomed 2000-Aktimeter (MED Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH, Dresden, Deutschland) ermittelt. Radio-Dünnschichtchromatographische (DC) Auswertungen fanden an einem Instant Imager (Canberra Packard, Schwadorf, Österreich) statt.
- PET-Messungen:
Aufnahmen erfolgten an einem μPET Focus 120 Klein-Tier-PET-Scanner (Siemens/Concorde, Knoxville, USA).
- Gewebeaktivität:
Die bei den Biodistributionen entnommenen Gewebeproben wurden mit dem Gamma-Counter Wizard²® der Firma Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland vermessen.

- MC I-Aktivitätsbestimmungen:
Bestimmung der NADH-Oxidation erfolgte mit einem Tecan infinite M200 Pro (96-well Mikrotiterplatte; Greiner, #655101, 200 μ L Messvolumen), (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz).

4.1.2. Chromatographische Methoden

Zur Reaktionskontrolle wurden DC-Fertigfolien der Firma Merck, Darmstadt, Kieselgel 60, F254 mit der angegebenen Laufmittelzusammensetzung (v/v) verwendet. Die Detektion inaktiver Substanzen fand unter UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) statt. Bei radioaktiven Verbindungen wurde der Instant Imager benutzt.

Säulenchromatographische Trennungen erfolgten unter Normaldruck. Kieselgel 60 der Partikelgröße 0,04 - 0,063 mm von Acros, Fisher Scientific und Sigma Aldrich wurde als stationäre Phase eingesetzt.

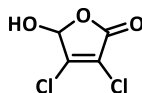
Für die Festphasenextraktion wurden C-18 Strata-X-Kartuschen (30 mg) (Phenomenex, Torrance, CA, United States) verwendet.

Die Aufreinigung der Markierungsvorläufer erfolgte über semi-präparative HPLC mit einer Synergi 4u Max-RP 80 A (250 x 10.00 mm), Phenomenex. Für analytische Kontrollen (inaktiv/radioaktiv) wurde die Synergi 4u Max-RP 80 A (250 x 4.6 mm), Phenomenex, verwendet.

4.2. Organische Synthesen

4.2.1. Synthese des Heterozyklus DCP

3,4-Dichloro-5-hydroxyfuran-2(5H)-on **1**



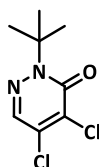
MnO₂ (8,0 g; 92,0 mmol) wurde portionsweise zu eisgekühlter konz. HCl (48 mL; 58,0 mmol) gegeben. Furfurylaldehyd (2,4 g; 25,0 mmol) wurde langsam bei 0 – 10°C zugetropft und 30 min unter Eiskühlung gerührt. Es wurde auf 60°C erhitzt, MnO₂ (4,2 g; 50,0 mmol) zugegeben und die Suspension auf 100°C erhitzt, bis sich die Lösung orange färbt. Nach Abkühlen auf RT wurde der Feststoff abgesaugt, der Rückstand in Et₂O (10 mL) gelöst und erneut filtriert. Das Filtrat wurde aufkonzentriert, Umkristallisation mit Wasser ergab das Produkt als farblose Kristalle (1,9 g; 45 %).

¹H-NMR ((DMSO-d₆, 300 MHz) δ (ppm)): 8,65 (s, 1 H, OH), 6,24 (s, 1 H, HO-C-H)

¹³C-NMR ((DMSO-d₆, 75 MHz) δ (ppm)): 96,95; 121,33; 149,87; 163,16

MS (FD) m/z: 168,07; 170,07; 172,06 [M+H]⁺; 169,08; 171,06; 173,08 [MH+H]⁺

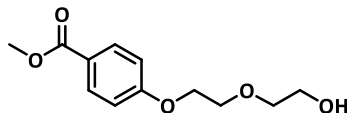
2-tert-Butyl-4,5-dichloropyridazin-3(2H)-on (DCP) **2**



1 (3,3 g; 19,5 mmol) und Na₂CO₃ (0,9 g; 8,7 mmol) wurden in Wasser (30 mL) unter Eiskühlung gerührt, bis eine klare Lösung entstand. *Tert*-butylhydrazinhydrochlorid (2,4 g, 19,5 mmol) wurde addiert und die Lösung 3 h unter Eiskühlung gerührt. Nach Filtration wurde der Rückstand mit Wasser gewaschen, in Benzol (37 mL) gelöst, Essigsäure (5,2 g) zugegeben und die Mischung 4 h bei 35-45°C gerührt. Es wurde Wasser (5 mL) addiert, die organische Phase abgetrennt und nacheinander mit 1,25 M NaOH-Lösung (5 mL), 3 M HCl-Lösung (5 mL) und 5 mL Wasser gewaschen. Trocknung mit Na₂SO₄ und Entfernung des Lösemittels im Vakuum ergaben das Produkt als orangene Kristalle (2,6 g; 59 %).

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,72 (s, 1 H, N=C-H); 1,64 (s, 9 H, N(CH₃)₃)

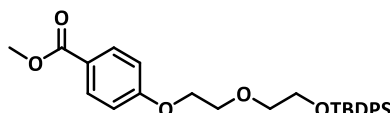
¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 27,63; 66,99; 133,47; 135,85; 156,88

4.2.2. Synthese des HB-P2OP-Derivats nach Mou et al.¹⁰³**Methyl-4-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)benzoat **3****

Methyl-4-hydroxybenzoat (15,0 g; 98,6 mmol) wurde in Cyclohexanon (250 mL) gelöst, KI (8,2 g; 49,29 mmol) und K_2CO_3 (27,22 g; 197,2 mmol) zugegeben und unter Argon gerührt. 2-(2-Chloroethoxy)ethanol (30,7 g; 246,5 mmol) wurde addiert und die Mischung 24 h refluxiert. Nach Abkühlen auf RT wurde filtriert und das Filtrat aufkonzentriert. Säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc; $R_f = 0,6$) ergab das Produkt (17,7 g; 74 %) als farbloses Öl.

1H -NMR (($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm)): 7,97 (d, $J = 9$ Hz, 2H, CO-Ar); 6,92 (d, $J = 9$ Hz, 2H, O-Ar); 4,16 (t, $J = 6$ Hz, 2H, Ar-O- CH_2); 3,86 (t, $J = 6$ Hz, 2H, Ar-O- CH_2 - CH_2); 3,86 (s, 1H, O- CH_3); 3,77-3,73 (m, 2H, CH_2 - CH_2 -OH); 3,68-3,64 (m, 2H, CH_2 - CH_2 -OH); 2,25 (s, 1H, OH)

^{13}C -NMR (($CDCl_3$, 75 MHz) δ (ppm)): 51,83; 61,70; 67,44; 69,40; 72,59; 114,11; 122,84; 131,56; 162,36; 166,75

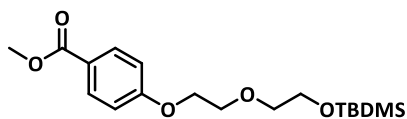
Methyl-4-(2-(2-(*tert*-butyldiphenylsiloxy)ethoxy)ethoxy)benzoat **4**

Zu **3** (9,7 g; 40,0 mmol), gelöst in trockenem DMF (70 mL), wurden Imidazol (4,4 g; 64,0 mmol) und *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (16,5 g; 60,0 mmol) addiert. Die Mischung wurde 4 h unter Argon bei 80°C gerührt. Nach Aufkonzentration wurde der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/EA 7:1; $R_f = 0,4$) und ergab das Produkt (14,9 g; 78 %) als farbloses Öl.

1H -NMR (($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm)): 7,99 (d, $J = 9$ Hz, 2H, CO-Ar); 7,69 (d, $J = 9$ Hz, 4H, Si-Ar); 7,4 - 7,33 (m, 6H, Si-Ar); 6,92 (d, $J = 9$ Hz, 2H, O-Ar); 4,13 (t, $J = 6$ Hz, 2H, Ar-O- CH_2); 3,89 (s, 1H, O- CH_3); 3,87 - 3,82 (m, 4H, Ar-O- CH_2 - CH_2 , CH_2 - CH_2 -OSi); 3,68 (t, $J = 6$ Hz, 2H CH_2 - CH_2 -OSi); 1,05 (s, 9H *tert*-butyl)

^{13}C -NMR (($CDCl_3$, 75 MHz) δ (ppm)): 19,16; 26,78; 51,08; 63,49; 67,61; 69,22; 72,68; 114,15; 122,65; 127,60; 129,59; 131,51; 133,59; 135,59; 162,57; 166,81

MS (ESI) m/z : 501,20; 502,22; 503,22 [$M+Na$]⁺

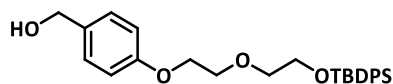
Methyl-4-(2-(2-(*tert*-butyldimethylsiloxy)ethoxy)ethoxy)benzoat 5

Zu **3** (2,1 g; 9,0 mmol), gelöst in trockenem DMF (20 mL), wurden Imidazol (1,0 g; 14,0 mmol) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (2,2 g; 14,0 mmol) addiert. Die Mischung wurde 4 h unter Argon bei 80°C gerührt. Nach Aufkonzentration wurde der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/EA 3:1; $R_f = 0,6$) und ergab das Produkt (1,4 g; 48 %) als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,98 (d, $J = 9$ Hz, 2H, CO-Ar); 6,93 (d, $J = 9$ Hz, 2H, CH_2 -Ar); 4,16 (t, $J = 6$ Hz, 2H, Ar-O- CH_2); 3,90 - 3,86 (m, 5H, Ar-O- CH_2 - CH_2 , O- CH_3); 3,79 (t, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2 - CH_2 -OSi); 3,63 (t, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2 - CH_2 -OSi); 0,89 (s, 9H, *tert*-butyl) 0,07 (s, 6H, Si-(CH_3)₂)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm)): 18,9; 25,87; 51,71; 62,87; 67,71; 69,57; 72,86; 107,45; 114,13; 122,63; 131,44; 162,51; 166,82

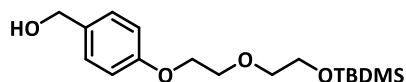
MS (ESI) m/z : 355,19 [M+H]⁺

4-(2-(2-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)ethoxy)ethoxy)phenylmethanol 6

Eine Lösung aus **4** (9,6 g; 20,0 mmol) in trockenem Et₂O (110 mL) wurde langsam unter Eiskühlung zu LiAlH₄ (1,8 g; 48,0 mmol) in trockenem Et₂O (80 mL) getropft. Anschließend wurde 2 h unter Eiskühlung, dann 2 h bei RT gerührt. Wasser wurde tropfenweise zu der Reaktionsmischung addiert, bis keine Gasbildung mehr zu beobachten war. Der pH wurde auf 6 eingestellt und die Mischung filtriert. Nach Trocknung über Na₂SO₄ und Einengung des Filtrats wurde **6** (7,0 g; 79 %) als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,68 - 7,65 (m, 4H, Si-Ar); 7,40 - 7,33 (m, 6H, Si-Ar); 7,29 (d, $J = 9$ Hz, 2H, CH_2 -Ar); 6,92 (d, $J = 9$ Hz, 2H, O-Ar); 4,62 (s, 2H, HO- CH_2 -Ar); 4,16 - 4,13 (m, 2H, Ar-O- CH_2 - CH_2); 3,88 - 3,86 (m, 2H, Ar-O- CH_2 - CH_2); 3,78 - 3,75 (m, 2H, CH_2 -CH-OSi); 3,70 - 3,66 (m, 2H, CH_2 - CH_2 -OSi); 1,07 (s, 9H, *tert*-butyl)

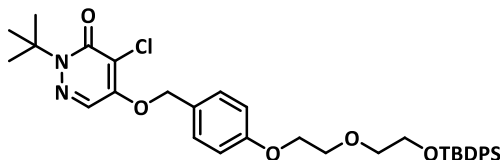
MS (ESI) m/z : 473,22; 474,23 [M+Na]⁺

2-(2-(4-(Hydroxymethyl)phenoxy)ethoxy)ethanol 7

Eine Lösung aus **5** (0,9 g; 2,5 mmol) in trockenem Et₂O (10 mL) wurde langsam unter Eiskühlung zu LiAlH₄ (0,2 g; 6,0 mmol) in trockenem Et₂O (10 mL) getropft. Anschließend wurde 2 h unter Eiskühlung, dann 2 h bei RT gerührt. Wasser wurde tropfenweise zu der Reaktionsmischung addiert, bis keine Gasbildung mehr zu beobachten war. Der pH wurde auf 6 eingestellt und die Mischung filtriert. Nach Trocknung über Na₂SO₄ und Einengung des Filtrats wurde das Produkt (0,7 g; 82 %) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,28 (d, *J* = 9 Hz, 2H, CO-Ar); 6,91 (d, *J* = 9 Hz, 2H, CH₂-Ar); 4,61 (s, 2H, HO-CH₂-Ar); 4,13 - 4,10 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂); 3,87 - 3,84 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂); 3,81 - 3,78 (m, 2H, CH₂-CH₂-OSi); 3,65 - 3,61 (m, 2H, CH₂-CH₂-OSi); 1,68 (s, 1H, OH), 0,89 (s, 9H, *tert*-butyl); 0,07 (s, 6H, Si-(CH₃)₂)

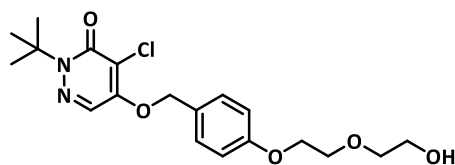
¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 25,88; 62,74; 64,94; 67,47; 69,76; 72,83; 114,63; 128,53; 133,25

2-*tert*-Butyl-5-(4-(2-(2-(*tert*-butyldiphenylsiloxy)ethoxy)ethoxy)benzyloxy)-4-chloropyridazin-3-(2H)-on 8

Zu **6** (2,4 g; 5,4 mmol), gelöst in trockenem DMF (25 mL), und Cs₂CO₃ (2,6 g; 8,0 mmol) wurde langsam eine Lösung von DCP (0,3 g; 1,3 mmol) in trockenem DMF (15 mL) bei 60°C getropft. Nach 12 h Rühren bei 60°C wurde die Mischung filtriert und das Filtrat aufkonzentriert. Säulen-chromatographische Aufreinigung (PE/EA 3:1, R_f = 0,4) ergab das Produkt (0,2 g; 19 %) als gelbes Öl.

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,73 (s, 1H, N=C-H); 7,69 (d, *J* = 9 Hz, 4H, Si-Ar); 7,39 - 7,30 (m, 8H, Si-Ar, CH₂-Ar); 6,94 (d, *J* = 9 Hz, 2H, O-Ar); 5,24 (s, 2H, HO-CH₂-Ar); 4,1 - 4,08 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂); 3,87 - 3,82 (m, 4H, Ar-O-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-OSi); 3,87 - 3,86 (m, 2H, CH₂-CH₂-OSi); 1,63 (s, 9H, N(CH₃)₃); 1,1 (s, 9H, *tert*-butyl)

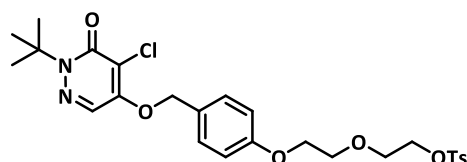
MS (ESI) *m/z*: 657,32; 658,33; 659,32 [M+Na]⁺

2-tert-Butyl-4-chloro-5-4-(2-(2-hydroethoxy)ethoxy)benzyloxy)pyridazin-3-(2H)-on 9

TBAF (1 mL; 1 M in THF) wurde zu **8** (186,0 mg; 0,3 mmol) in trockenem THF (5 mL) addiert und 2 h bei RT gerührt. Die Mischung wurde mit EtOAc (3 mL) verdünnt und zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und aufkonzentriert. Das Produkt (80,0 mg; 70 %) wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (CH₂Cl₂/MeOH 10:1, R_f = 0,3) als schwach gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,72 (s, 1H, N=C-H); 7,33 (d, J = 9 Hz, 2H, CO-Ar); 6,95 (d, J = 9 Hz, 2H, O-Ar); 5,24 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,16 - 4,13 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂); 3,89 - 3,86 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂); 3,78 - 3,74 (m, 2H, CH₂-CH₂-OH); 3,70 - 3,66 (m, 2H, CH₂-CH₂-OH); 1,62 (s, 9H, N(CH₃)₃)

¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 26,51; 27,80; 61,67; 66,30; 67,41; 69,52; 71,68; 72,55; 114,95; 125,22; 127,59; 128,92; 134,76; 153,69; 159,02

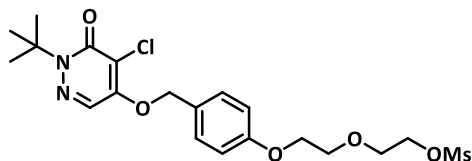
2-(2-(4-((1-tert-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)phenoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzensulfonat 10

9 (73,0 mg; 0,2 mmol), gelöst in trockenem CH₂Cl₂ (2 mL), wurde mit Tosylchlorid (53,0 mg; 0,3 mmol), DIPEA (37,0 mg; 0,3 mmol) und DMAP (34,0 mg; 0,3 mmol) versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT wurde die Mischung filtriert und eingedunstet. Das Filtrat wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH₂Cl₂/MeOH 100:1, R_f = 0,3) und ergab das Produkt (84,0 mg; 83 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,79 (s, 1H, N=C-H); 7,75 (d, J = 9 Hz, 2H, CH₂-Ar); 7,31 - 7,28 (m, 4H, S-Ar); 6,91 (d, J = 9 Hz, 2H, O-Ar); 5,23 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,19 - 4,16 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂); 4,06 - 4,03 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂); 3,79 - 3,73 (m, 4H, CH₂-CH₂-OH, CH₂-CH₂-OH); 2,40 (s, 3H, CH₃-Ar-S); 1,62 (s, 9H, N(CH₃)₃)

MS (FD) m/z: 551,45; 553,47 [M+H]⁺

2-(2-(4-((1-*tert*-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4yloxy)methyl)phenoxy)ethoxy)-ethyl methansulfonat 11



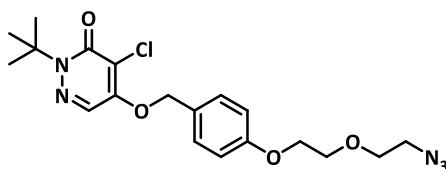
9 (924,0 mg; 2,3 mmol) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (20 mL) gelöst und Et_3N (357 μL ; 2,6 mmol) addiert. Die Reaktionsmischung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und Mesylchlorid (293,0 mg; 2,6 mmol) auf einmal addiert. Nach Entfernen des Eisbads wurde über Nacht bei RT gerührt. Aufkonzentration der Reaktionslösung und säulenchromatographische Aufreinigung (PE/EA 1:2, $R_f = 0,5$) ergaben das Produkt (853,0 mg; 77 %) als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ ($(\text{CDCl}_3, 300 \text{ MHz}) \delta$ (ppm)): 7,73 (s, 1H, N=C-H); 7,33 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 6,92 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H, O-Ar); 5,23 (s, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 4,41 - 4,38 (m, 2H, Ar-O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 4,15 - 4,10 (m, 2H, Ar-O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,89 - 3,82 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OMs}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OMs}$); 3,04 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-S}$); 1,62 (s, 9H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($(\text{CDCl}_3, 75 \text{ MHz}) \delta$ (ppm)): 27,80; 37,64; 66,30; 67,34; 69,07; 69,18; 69,72; 71,64; 77,42; 114,86; 125,17; 128,98; 153,68; 158,93

MS (ESI) m/z : 475,15; 477,13 $[\text{M}+\text{H}]^+$

5-(4-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)benzyloxy)-2-*tert*-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 12

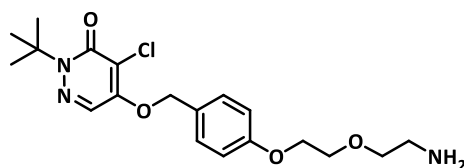


11 (0,8 g; 1,7 mmol) wurde in trockenem DMF (20 mL) gelöst und NaN_3 (2,2 g; 33,4 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Filtration und Aufkonzentration des Filtrats ergab die säulenchromatographische Aufreinigung (PE/ Et_2O 1:1, $R_f = 0,2$) das Produkt (0,4 g; 52 %) als gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ ($(\text{CDCl}_3, 300 \text{ MHz}) \delta$ (ppm)): 7,72 (s, 1H, N=C-H); 7,33 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 6,95 (d, $J = 9 \text{ Hz}$, 2H, O-Ar); 5,24 (s, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-Ar}$); 4,14 (t, $J = 6 \text{ Hz}$, 2H, Ar-O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,86 (t, $J = 6 \text{ Hz}$, 2H, Ar-O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$); 3,74 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$); 3,41 (t, $J = 6 \text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$); 1,62 (s, 9H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($(\text{CDCl}_3, 75 \text{ MHz}) \delta$ (ppm)): 27,80; 50,64; 66,29; 67,31; 69,10; 70,23; 71,70; 76,58; 77,00; 77,41; 114,92; 125,21; 127,11; 128,91; 153,69; 159,07

MS (ESI) m/z : 422,16; 424,18 $[\text{M}+\text{H}]^+$

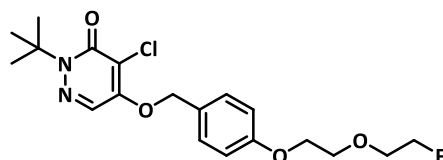
5-(4-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)benzyloxy)-2-tert-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 13

12 (336,0 mg; 0,8 mmol) wurde in THF (8 mL) gelöst und Triphenylphosphin (315,0 mg; 1,2 mmol) hinzugefügt. Nach Addition von H₂O (22 µL) wurde die Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Aufkonzentration und säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 8:1; 3 % NH₄OH; R_f = 0,3) ergaben das Produkt (253,0 mg; 80 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,72 (s, 1H, N=C-H); 7,32 (d, *J* = 9 Hz, 2H, CH₂-Ar); 6,95 (d, *J* = 9 Hz, 2H, O-Ar); 5,24 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,15 (t, *J* = 6 Hz, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂); 3,83 (t, *J* = 6 Hz, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂); 3,59 (t, *J* = 6 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH₂); 2,90 (t, *J* = 6 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH₂); 1,83 (bs, 2H, NH₂); 1,62 (s, 9H, N(CH₃)₃)

¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 27,92; 53,54; 64,28; 66,45; 67,41; 69,07; 71,79; 114,94; 125,29; 127,20; 129,14; 153,84; 159,02

MS (ESI) *m/z*: 396,15; 398,17 [M+H]⁺

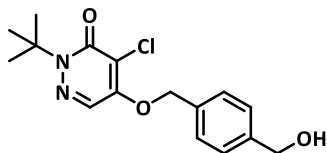
2-tert-Butyl-4-chloro-5-(4-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)benzyloxy)pyridazin-3(2H)-on 14

10 (20,0 mg; 0,1 mmol) gelöst in trockenem CH₂Cl₂ (2 mL) wurde auf 0°C gekühlt und DAST (10 mg; 0,06 mmol) zugetropft. Die Mischung wurde langsam auf RT gebracht und 30 min bei RT gerührt. Aufkonzentration der Lösung und säulenchromatographische Aufreinigung (PE/EA 1:1; R_f = 0,5) ergaben das Produkt (12,0 mg; 60 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,72 (s, 1H, N=C-H); 7,33 (d, *J* = 9 Hz, 2H, CO-Ar); 6,95 (d, *J* = 9 Hz, 2H, O-Ar); 5,24 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,67 - 4,66 (m, 1H, CH₂-CH₂-F); 4,53 - 4,50 (m, 1H, CH₂-CH₂-F); 4,17 - 4,14 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂); 3,91 - 3,86 (m, 3H, CH₂-CH₂-F; Ar-O-CH₂-CH₂); 3,79 - 3,76 (m, 1H, CH₂-CH₂-F); 1,62 (s, 9H, N(CH₃)₃)

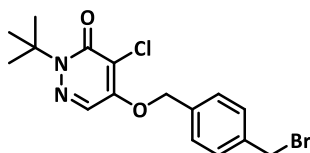
¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 25,25; 27,84; 28,14; 28,23; 29,68; 30,96; 50,88; 66,35; 67,46; 69,30; 69,57; 71,72; 77,20; 114,93; 125,21; 128,98; 153,73; 159,07

4.2.3. Synthese des Pyridaben-Benzylbromids nach PCT/US2011/024109

2-(*tert*-Butyl)-4-chloro-5-((4-(hydroxymethyl)benzyl)oxy)pyridazin-3(2H)-on **15**

DCP (1,5 g; 6,8 mmol) gelöst in trockenem DMF (3 mL) wurde langsam unter Rühren zu einer Mischung aus 1,4-Phenylendimethanol (4,8 g; 34,4 mmol) in trockenem DMF (20 mL) und Cs₂CO₃ (9,0 g; 28,0 mmol). Die Mischung wurde 6 h auf 65°C erhitzt. Nach Reaktionsende wurde die Lösung filtriert, das Filtrat mit gesättigter NaCl-Lösung (2 mL) verdünnt und mit CHCl₃ extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und aufkonzentriert. Säulenchromatographische Aufreinigung (EA/PE 2:1; R_f = 0,7) ergab das Produkt als farbloses Öl. Das Edukt 1,4-Phenylendimethanol konnte zu großen Teilen zurückgewonnen werden.

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,72 (s, 1H, N=C-H); 7,40 (s, 4H, Ar); 5,30 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,71 (s, 2H, Ar-CH₂-OH); 1,61 (s, 9H, N(CH₃)₃)

5-(4-(Bromomethyl)benzyloxy)-2-*tert*-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on **16**

Zu **15** (3,9 g; 12,7 mmol), gelöst in trockenem CH₂Cl₂ (40 mL), wurde eine 1,0 M Lösung PBr₃ (1,7 g; 6,4 mmol) in trockenem CH₂Cl₂ innerhalb von 30 min bei RT zugegeben. Nachdem die Mischung 1 h bei RT rührte, wurde mit Wasser (5 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ extrahiert. Es wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (10 ml) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und die organische Phase aufkonzentriert. Das Produkt (3,8 g; 78 %) wurde als gelber Feststoff erhalten.

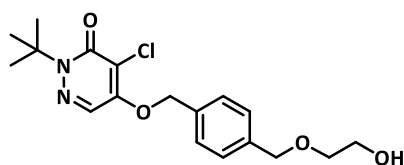
¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,72 (s, 1H, N=C-H); 7,44 - 7,35 (m, 4H, Ar); 5,28 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,48 (s, 2H, Ar-CH₂-Br); 1,61 (s, 9H, N(CH₃)₃)

¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 27,78; 32,68; 66,41; 71,31; 118,17; 124,91; 127,41; 128,56; 129,19; 129,42; 129,58; 135,05

4.2.4. Synthese der Pyridaben-Bn-O-PEG-Hydroxy-Derivate

Der jeweilige Glykol (Mono-, Di- und Tetraethylenglykol) (130,0 mmol) wurde mit Kalium-*t*-Butoxid (1,5 mmol) versetzt und gerührt bis eine klare Lösung erhalten wurde. **16** (1,6 mmol) in trockenem THF (5 mL) wurde auf einmal zu der Lösung gegeben, die Mischung 18 h auf 60°C erhitzt. Es wurde mit Wasser (2 mL) verdünnt und mit CHCl₃ extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und aufkonzentriert. Säulenchromatographische Aufreinigung ergab das Produkt als farbloses Öl.

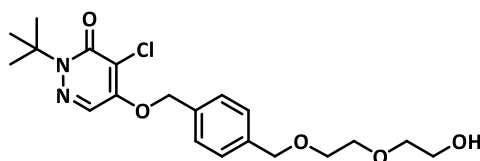
2-(*tert*-Butyl)-4-chloro-5-((4-((2-hydroxyethoxy)methyl)benzyl)oxy)pyridazin-3(2H)-on **17**



EA/PE 2:1; R_f = 0,3; 58 %

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,71 (s, 1H, N=C-H); 7,40 (s, 4H, Ar); 5,31 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,58 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 3,79 - 3,76 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,64 - 3,60 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 1,87 (1H, s, OH); 1,62 (s, 9H, N(CH₃)₃)

2-*tert*-Butyl-4-chloro-5-(4-((2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)methyl)benzyloxy)pyridazin-3(2H)-on **18**



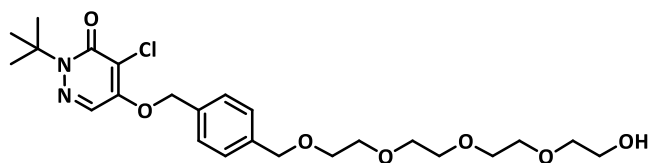
EA; R_f = 0,4; 68 %

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,71 (s, 1H, N=C-H); 7,39 (s, 4H, Ar); 5,30 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,58 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3,75 - 3,60 (m, 8H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂); 2,13 (1H, s, OH); 1,62 (s, 9H, N(CH₃)₃)

¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 27,30; 27,70; 61,60 66,26; 69,60; 70,29; 71,50; 72,37; 72,69; 118,03; 124,96; 127,11; 128,11; 137,18; 138,69; 153,56; 158,90

MS (LCMS) m/z: 411,16; 413,15 [M+H]⁺

2-tert-Butyl-4-chloro-5-(4-(13-hydroxy-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)benzyloxy)pyridazin-3(2H)-on 19



CHCl₃/Aceton 2:1; R_f = 0,4; 62 %

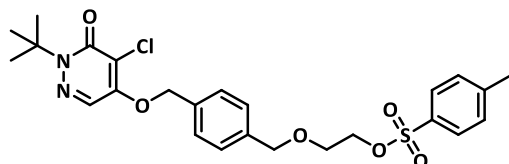
¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,71 (s, 1H, N=C-H); 7,38 (s, 4H, Ar); 5,29 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,56 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 3,71 - 3,57 (m, 16H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂); 2,63 (s, 1H, OH), 1,61 (s, 9H, N(CH₃)₃)

¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 27,78; 61,65; 66,33; 69,64; 70,26; 70,48; 70,51; 70,55; 71,60; 72,47; 72,74; 76,58; 118,17; 125,03; 127,12; 128,19; 134,12; 138,99; 153,62; 158,98

MS (LCMS) m/z: 499,21; 501,22 [M+H]⁺

4.2.5. Synthese des Flurpiridaz-Markierungsvorläufers

2-(4-((1-tert-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)benzyloxy)ethyl-4-methylbenzensulfonat 20

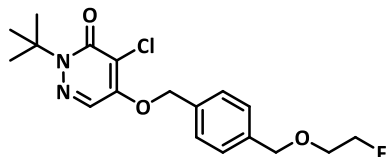


17 (317,0 mg; 0,9 mmol), gelöst in trockenem CH₂Cl₂ (2 mL), wurde mit Tosylchlorid (258,0 mg; 1,4 mmol), DIPEA (175,0 mg; 1,4 mmol) und DMAP (165,0 mg; 1,4 mmol) versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT wurde die Mischung filtriert und eingengt. Das Filtrat wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EA/PE 2:1, R_f = 0,7) und ergab das Produkt (355,0 mg; 80 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,78 (d, J = 9 Hz, 2H, CO-Ar); 7,72 (s, 1H, N=C-H); 7,37 (d, J = 9 Hz, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 5,29 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,48 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 4,20 - 4,17 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,69 - 3,66 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 2,42 (s, 3H, CH₃-Ar-S); 1,61 (s, 9H, N(CH₃)₃)

4.2.6. Synthese des kalten Flurpiridaz-Standards

2-(*tert*-Butyl)-4-chloro-5-((4-((2-fluoroethoxy)methyl)benzyl)oxy)pyridazin-3(2*H*)-on 21



17 (50,0 mg; 0,1 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (2 mL) wurde auf 0°C gekühlt und DAST (28,0 mg; 0,2 mmol) zugetropft. Die Mischung wurde langsam auf RT gebracht und 30 min bei RT gerührt. Aufkonzentration der Lösung und säulenchromatographische Aufreinigung (EA/PE 2:1; $R_f = 0,8$) ergaben das Produkt (25,0 mg; 50 %) als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,71 71 (s, 1H, N=C-H); 7,40 (s, 4H, Ar); 5,31 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 4,69-4,66 (m, 1H, Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2); 4,60 (s, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2); 4,53 - 4,50 (m, 1H, Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2); 3,81 - 3,78 (m, 1H, Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2); 3,71 - 3,68 (m, 1H, Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2); 1,62 (s, 9H, N(CH_3)₃)

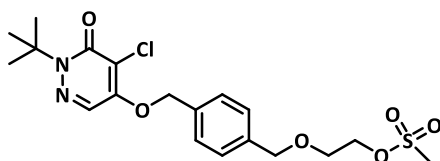
MS (ESI) m/z : 391,16; 392,16; 393,16; 394,16 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

4.2.7. Synthese der Pyridaben-Bn-O-PEG-Amino-Derivate nach Sawicki et al.¹⁰⁵

4.2.7.1. Mesylierung der Pyridaben-Bn-O-PEG-Hydroxy-Derivate

Das jeweilige Pyridaben-PEG-Derivat (2,0 mmol) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (10 mL) gelöst und Et_3N (1,95 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde auf 0°C gekühlt und Mesylchlorid (2,0 mmol) addiert. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde die Mischung filtriert, nach Aufkonzentration säulenchromatographisch aufgereinigt und ergab das Produkt als farbloses Öl.

2-(4-((1-*tert*-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)benzyloxy)ethyl methansulfonat 22



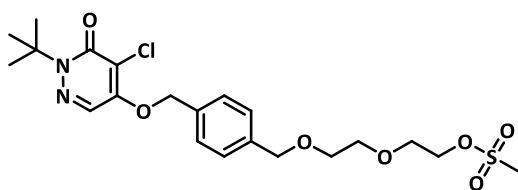
EA/PE 2:1; $R_f = 0,5$; 85 %

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,72 (s, 1H, N=C-H); 7,39 (s, 4H, Ar); 5,31 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,59 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 4,42 - 4,39 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,78 - 3,75 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,04 (s, 3H, S-CH₃); 1,62 (s, 9H, N(CH₃)₃)

¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 27,75; 37,59; 66,33; 67,98; 68,92; 71,48; 72,77; 118,19; 124,97; 127,24; 128,14; 134,49; 153,57

MS (LCMS) m/z: 445,11; 447,11 [M+H]⁺

2-(2-(4-((1-*tert*-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)benzyloxy)ethoxy)ethylmethansulfonat 23



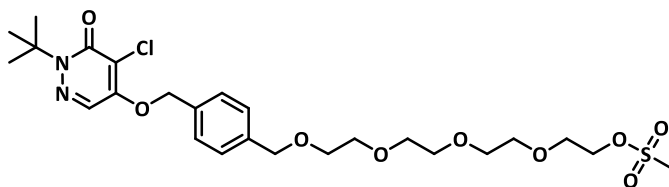
EA; R_f = 0,7; 89 %

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,71 (s, 1H, N=C-H); 7,38 (s, 4H, Ar); 5,30 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,56 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 4,39 - 4,36 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,78 - 3,75 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,70 - 3,63 (m, 4H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,02 (s, 3H, S-CH₃); 1,62 (s, 9H, N(CH₃)₃)

¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 27,77; 37,59; 66,33; 69,64; 70,26; 70,51; 70,55; 71,60; 72,47; 72,74; 76,58; 118,21; 125,03; 127,12; 128,19; 134,12; 138,99; 153,62; 158,98

MS (LCMS) m/z: 498,13; 491,12 [M+H]⁺

1-(4-((1-*tert*-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)phenyl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl-methansulfonat 24



CHCl₃/Aceton 2:1; R_f = 0,6; 81 %

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,71 (s, 1H, N=C-H); 7,38 (s, 4H, Ar); 5,30 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,56 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 4,36 - 4,33 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,75 - 3,72 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,64 (m, 12H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,05 (s, 3H, S-CH₃), 1,61 (s, 9H, N(CH₃)₃)

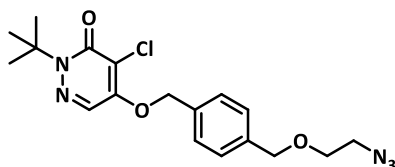
^{13}C -NMR ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 27,96; 50,75; 66,47; 69,65; 70,10; 70,72; 71,74; 72,86; 118,27; 125,15; 127,26; 128,21; 134,24; 139,13; 153,74; 159,04

MS (LCMS) m/z : 577,19; 579,17 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

4.2.7.2. S_N der Pyridaben-Bn-O-PEG-Mesyl-Derivate mit Natriumazid

Das entsprechende Mesylat (0,7 mmol) wurde in trockenem DMF (10 mL) gelöst und NaN_3 (1,5 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Filtration und Aufkonzentration des Filtrats ergab die säulenchromatographische Aufreinigung das Produkt als farbloses Öl.

5-(4-((2-Azidoethoxy)methyl)benzyloxy)-2-tert-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 25



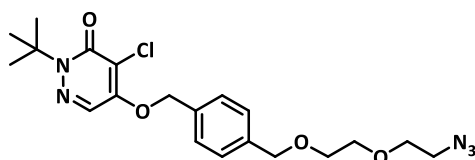
PE/EA 1:1, $R_f = 0,8$; 65 %

^1H -NMR ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,71 (s, 1H, N=C-H); 7,40 (s, 4H, Ar); 5,30 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 4,58 (s, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2); 3,69 - 3,67 (m, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2); 3,44 - 3,40 (m, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2); 1,62 (s, 9H, N(CH_3) $_3$)

^{13}C -NMR ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 27,85; 50,82; 66,53; 69,20; 71,57; 72,86; 118,21; 125,25; 127,34; 128,17; 134,38; 138,61; 153,87; 159,36

MS (LCMS) m/z : 392,14; 394,13 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

5-(4-((2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)methyl)benzyloxy)-2-tert-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 26



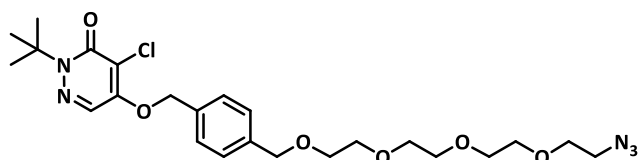
PE/EA 1:1, $R_f = 0,7$; 72 %

^1H -NMR ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,70 (s, 1H, N=C-H); 7,37 (s, 4H, Ar); 5,28 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 4,56 (s, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2); 3,68 - 3,64 (m, 6H, Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2 , Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2 -O- CH_2 - CH_2); 3,39 - 3,56 (m, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2 -O- CH_2 - CH_2 - N_3); 1,60 (s, 9H, N(CH_3) $_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 27,84; 50,70; 66,38; 69,76; 70,09; 70,79; 71,56; 72,86; 118,15; 125,11; 127,33; 128,18; 134,26; 138,99; 153,69; 159,03

MS (LCMS) m/z : 435,16; 437,17 $[\text{M}+\text{H}]^+$

5-(4-(13-Azido-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)benzyloxy)-2-tert-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 27



$\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ 2:1; $R_f = 0,8$; 71 %

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,71 (s, 1H, $\text{N}=\text{C-H}$); 7,38 (s, 4H, Ar); 5,30 (s, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-Ar}$); 4,57 (s, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-O-CH}_2$); 3,69 - 3,35 (m, 14H, $\text{Ar-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2$); 3,37 (t, $J = 6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 1,62 (s, 9H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$)

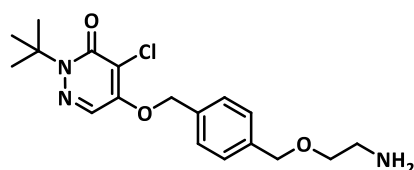
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 27,79; 50,64; 66,35; 69,69; 69,99; 70,60; 70,66; 71,62; 72,74; 118,20; 125,03; 127,14; 128,19; 134,12; 139,08; 153,62; 159,00

MS (LCMS) m/z : 524,21; 526,22 $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.2.7.3. Reduktion der Pyridaben-Bn-O-PEG-Azid-Derivate

Das jeweilige Azid (0,3 mmol) wurde in THF (5 mL) gelöst. Zu der Lösung wurden Ph_3P (0,5 mmol) und Wasser (6 μL) addiert und die Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Aufkonzentration und säulenchromatographische Aufreinigung ergaben das Produkt als farbloses Öl.

5-(4-((2-Aminoethoxy)methyl)benzyloxy)-2-tert-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 28



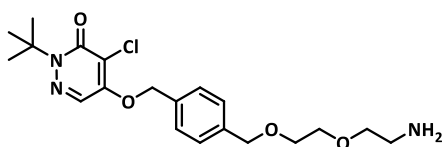
DCM/MeOH 8:1; 3 % NH_4OH ; $R_f = 0,5$; 51 %

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,70 (s, 1H, N=C-H); 7,37 (s, 4H, Ar); 5,28 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 4,53 (s, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2); 3,55 (t, $J = 6$ Hz, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2); 2,92 (t, $J = 6$ Hz, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2); 1,60 (s, 9H, N(CH_3) $_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 27,93; 28,57; 41,35; 66,52; 70,97; 71,64; 72,74; 118,30; 125,34; 127,34; 128,25; 134,36; 138,89; 153,77; 159,06

MS (ESI) m/z : 366,16; 368,16; $[\text{M}+\text{H}]^+$

5-(4-((2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)methyl)benzyloxy)-2-*tert*-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 29



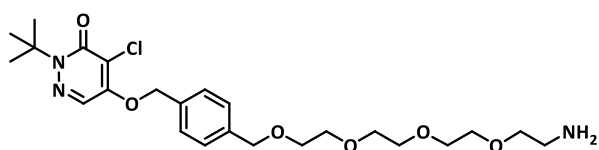
DCM/MeOH 5:1; 3 % NH_4OH ; $R_f = 0,7$; 53 %

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,71 (s, 1H, N=C-H); 7,39 (s, 4H, Ar); 5,30 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 4,57 (s, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2); 3,65 (s, 4H Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2); 3,54 (t, $J = 6$ Hz, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2 -O- CH_2 - CH_2 - NH_2); 2,88 (t, $J = 6$ Hz, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2 -O- CH_2 - CH_2 - NH_2); 1,62 (s, 9H, N(CH_3) $_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 27,92; 28,56; 40,10; 53,54; 64,28; 66,45; 67,41; 68,88; 69,52; 71,79; 114,94; 125,29; 127,20; 129,14; 153,84; 159,13

MS (LCMS) m/z : 410,17; 412,18 $[\text{M}+\text{H}]^+$

5-(4-(13-Amino-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)benzyloxy)-2-*tert*-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 30



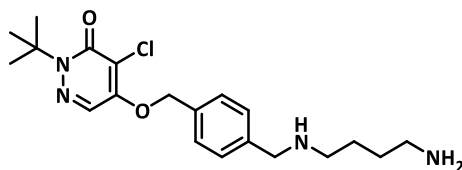
DCM/MeOH 8:1; 3 % NH_4OH ; $R_f = 0,3$; 69 %

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,70 (s, 1H, N=C-H); 7,37 (s, 4H, Ar); 5,29 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 4,55 (s, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2); 3,70 - 3,43 (m, 12H, Ar- CH_2 -O- CH_2 - CH_2 -O- CH_2 - CH_2 -O- CH_2 - CH_2 -O- CH_2 - CH_2); 3,48 (t, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2 - CH_2 - NH_2), 2,82 (t, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2 - CH_2 - NH_2), 1,60 (s, 9H, N(CH_3) $_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 27,77; 50,65; 66,31; 69,69; 69,99; 70,60; 70,66; 71,62; 72,74; 118,20; 125,03; 127,14; 128,19; 134,12; 139,08; 153,62; 159,00

MS (LCMS) m/z : 497,15; 498,15; 499,15 $[\text{M}+\text{H}]^+$

5-(4-((4-Aminobutylamino)methyl)benzyloxy)-2-tert-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 31



16 (50,0 mg; 0,1 mmol) wurde in trockenem THF (25 mL) gelöst. 1,4-Diaminobutan (475,0 mg; 15,4 mmol) wurde hinzugefügt und die Mischung über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel sowie überschüssiges 1,4-Diaminobutan wurden im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 6:1, $R_f = 0,4$) ergab das Produkt (62 %) als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,71 (s, 1H, N=C-H); 7,32 (s, 4H, Ar); 5,26 (s, 2H, NH- CH_2 -Ar); 3,73 (s, 2H, Ar- CH_2 -NH- CH_2); 3,84 - 3,72 (m, 2H, Ar- CH_2 -NH- CH_2); 2,65 - 2,51 (m 4H, Ar- CH_2 -NH- CH_2 - CH_2 - CH_2 -NH $_2$); 1,60 (s, 9H, N(CH_3) $_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 26,80; 27,68; 28,01; 28,34; 40,81; 53,04; 66,65; 71,62; 118,34; 125,18; 127,42; 128,65; 133,46; 139,95; 154,10; 159,54

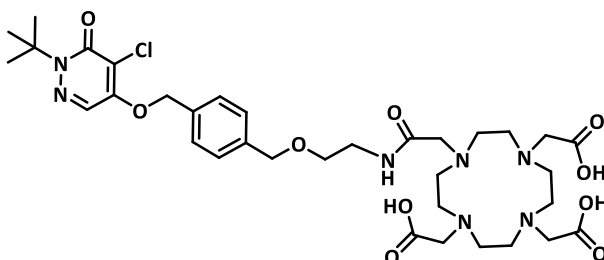
MS (ESI) m/z : 393,23; 395,24 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; 394,24; 396,24 [$\text{MH}+\text{H}$] $^+$

4.2.8. Synthese der Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA/NODAGA-Derivate

DOTA-NHS (0,05 mmol) wurde in trockenem DMF (2 mL) gelöst. Das Pyridaben-PEG-Amino-Derivat (0,048 mmol) und TEA (134 μL) wurden addiert. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels erfolgte eine Aufreinigung mittels HPLC (analytische Synergi Max-RP: 20 % MeOH/ H_2O ; 0,1 % TFA \rightarrow 80 % MeOH/ H_2O ; 0,1 % TFA in 25 min, 3,3 mL/min) und ergab das Produkt als farblosen Feststoff.

Pyridaben-Bn-O-PEG $_1$ -DOTA-Derivat VN68.MZ

2,2',2''-(10-(2-(2-(4-((1-tert-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyloxy)ethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triessigsäure 32



t_R : 14,7 min; 50 %

$^1\text{H-NMR}$ ((MeOD_4 , 600 MHz) δ (ppm)): 8,07 (s, 1H, N=C-H); 7,44 - 7,37 (q, $J = 8$ Hz, 4H, Ar); 5,39 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 4,51 (s, 2H, Ar- CH_2 -O- CH_2); 3,81 - 3,75 (m, 9H, NR- CH_2 ; CH_2 -CO $_2\text{H}$); 3,55 - 3,54 (m, 2H,

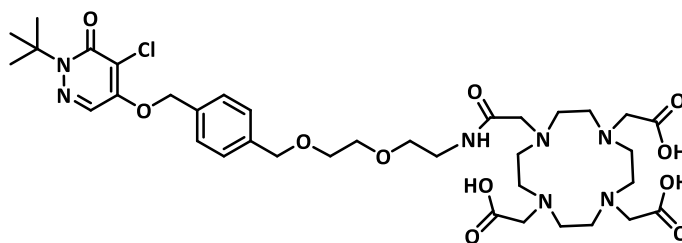
Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,41 - 3,39 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,21 - 3,13 (m, 13H, NR-CH₂); 1,59 (s, 9H, N(CH₃)₃)

¹³C-NMR ((MeOD₄, 150 MHz) δ (ppm)): 28,20; 40,41; 51,32; 55,21; 67,74; 67,74; 69,83; 72,89; 73,49; 118,22; 127,67; 128,93; 129,41; 136,12; 140,35; 156,01; 161,01

MS (ESI) m/z: 752,35; 754,34 [M+H]⁺; 753,35; 755,35 [MH+H]⁺

Pyridaben-Bn-O-PEG₂-DOTA-Derivat VN73.MZ

2,2',2''-(10-(2-(2-(2-(4-((1-tert-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyloxy)ethoxy)ethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)-triessigsäure 33



t_R: 14,0 min; 64 %

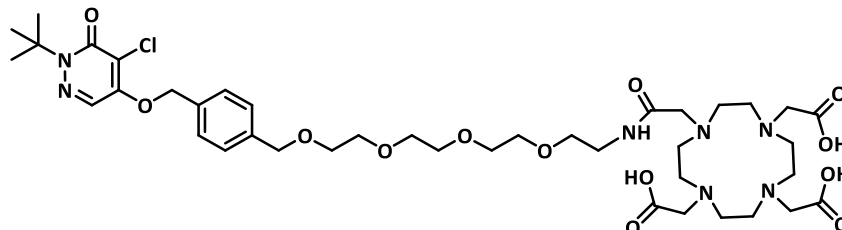
¹H-NMR ((MeOD₄, 600 MHz) δ (ppm)): 8,13 (s, 1H, N=C-H); 7,46 (q, J = 8 Hz, 4H, Ar); 5,44 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,59 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 3,85 - 3,75 (m, 6H, CH₂-CO₂H); 3,70 - 3,67 (m, 4H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH=CO); 3,60 - 3,54 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH=CO); 3,42 - 3,36 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 3,35 - 3,23 (m, 18H; CH₂-CO₂H, NR-CH₂); 1,66 (s, 9H, N(CH₃)₃)

¹³C-NMR ((MeOD₄, 150 MHz) δ (ppm)): 26,77; 38,81; 49,87-49,49; 53,85; 54,73; 66,20; 68,93; 69,40; 69,72; 71,48; 72,37; 118,23; 126,22; 127,49; 134,83; 138,79; 154,55; 159,56

MS (ESI) m/z: 796,37; 798,37 [M+H]⁺; 797,37; 799,38 [MH+H]⁺

Pyridaben-Bn-O-PEG₄-DOTA-Derivat VN79.MZ

2,2',2''-(10-(1-(4-((1-*tert*-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)phenyl)-15-oxo-2,5,8,11-tetraoxa-14-aza-hexadecan-16-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triessigsäure 34



t_R : 14,4 min; 73 %

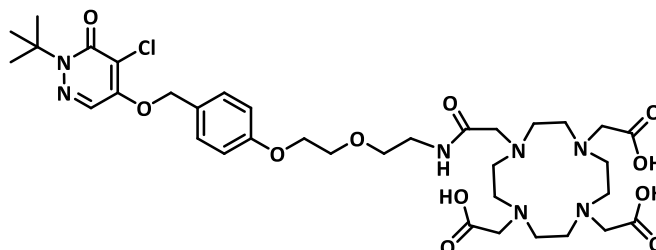
¹H-NMR ((MeOD₄, 400 MHz) δ (ppm)): 8,12 (s, 1H, N=C-H); 7,45 (q, $J = 8$ Hz, 4H, Ar); 5,44 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,58 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 3,88 - 3,73 (m, 6H, CH₂-CO₂H); 3,71 - 3,59 (m, 12H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,59 - 3,51 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH=CO), 3,41 - 3,36 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 3,32 - 3,21 (m, 18H; NH=CO-CH₂; NR-CH₂); 1,64 (s, 9H, N(CH₃)₃)

¹³C-NMR ((MeOD₄, 100 MHz) δ (ppm)): 28,16; 40,26; 50,59; 51,56; 54,79; 55,34; 67,65; 70,37; 70,73; 71,03; 71,48; 72,97; 73,60; 118,11; 127,57; 128,81; 129,32; 136,15; 140,35; 156,06; 161,06

MS (ESI) m/z : 884,40; 886,41 [M+H]⁺; 885,42; 887,42 [MH+H]⁺

Pyridaben-Ph-O-PEG₂-DOTA-Derivat VN94.MZ

2,2',2''-(10-(2-(2-(2-(4-((1-*tert*-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)phenoxy)-ethoxy)ethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triessigsäure 35



t_R : 16,3 min; 29 %

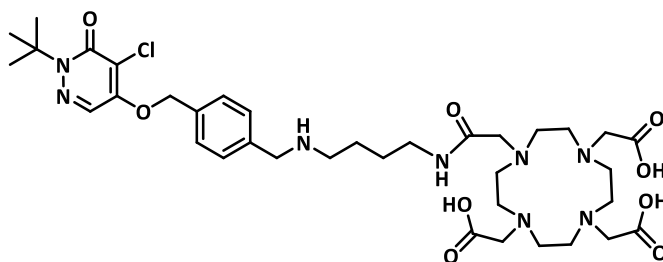
¹H-NMR ((MeOD₄, 400 MHz) δ (ppm)): 8,12 (s, 1H, N=C-H); 7,28-7,24 (m, 2H, Ar); 6,92-6,90 (5,39 m, 2H, Ar); 5,34 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,51 - 4,49 (m, 4H, Ar-O-CH₂-CH₂); 3,86-3,66 (m, 6 H, CH₂-CO₂H); 3,66 - 3,64 (m, 2H, Ar-O-CH₂-CH₂-O-CH₂); 3,46 - 3,37 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,25 - 3,13 (m, 10H, CH₂-CO₂H; NR-CH₂); 1,62 (s, 9H, N(CH₃)₃)

^{13}C -NMR ((MeOD₄, 100 MHz) δ (ppm)): 26,82; 38,87; 49,93-49,42; 54,59-54,04; 56,72; 63,38; 65,65; 66,25; 67,25; 71,62; 73,96; 114,58; 126,30; 127,57; 128,36; 129,62; 154,74; 159,16

MS (LCMS) m/z : 785,21; 787,20 [M+H]⁺; 786,20; 788,21 [MH+H]⁺

Pyridaben-Bn-N-C₄-DOTA-Derivat VN110.MZ

2,2',2''-(10-(2-(4-(4-((1-*tert*-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)benzyl-amino)butylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triessigsäure 36



t_R : 11,8 min (20 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA → 80 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA in 11 min, 3,3 mL/min); 48 %

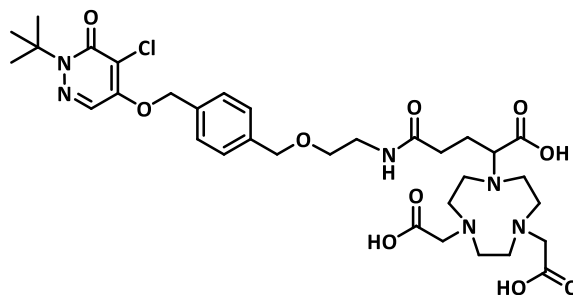
^1H -NMR ((MeOD₄, 600 MHz) δ (ppm)): 8,11 (s, 1H, N=C-H); 7,57 (s, 4H, Ar); 5,46 (s, 2H, NH-CH₂-Ar); 4,24 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-CH₂); 3,98 - 3,83 (m, 2H, Ar-CH₂-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH); 3,79-3,71 (m, 2H, Ar-CH₂-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH); 3,53 - 3,32 (m, 8H, CH₂-CO₂H); 3,27 - 3,03 (m, 16H, NR-CH₂); 1,82-1,72 (m, 2H, Ar-CH₂-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH); 1,59 (s, 9H, N(CH₃)₃); 1,62-1,55 (m, 2H, Ar-CH₂-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH)

^{13}C -NMR ((MeOD₄, 100 MHz) δ (ppm)): 22,47; 25,76; 26,73; 37,36; 46,56; 49,89; 50,53; 54,55; 66,32; 71,11; 118,09; 126,18; 127,94; 130,06; 132,00; 136,73; 154,53; 159,54

MS (ESI) m/z : 779,45; 781,46 [M+H]⁺; 780,46; 782,46 [MH+H]⁺

Pyridaben-Bn-O-PEG₁-NODAGA-Derivat VN108.MZ

2,2'-(7-(4-(2-(4-((1-*tert*-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)benzyl-oxy)ethylamino)-1-carboxy-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonan-1,4-diyl)diessigsäure 37



NODAGA-NHS (20,0 mg; 0,03 mmol) wurde in trockenem DMF (2 mL) gelöst. **28** (11,0 mg; 0,03 mmol) und TEA (19 μ L) wurden addiert. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels erfolgte eine Aufreinigung mittels HPLC (t_R : 11,8 min (20 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA \rightarrow 80 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA in 12 min, 3,3 mL/min) und ergab das Produkt (11,0 mg; 51 %) als weißen Feststoff.

¹H-NMR ((MeOD₄, 600 MHz) δ (ppm)): 8,13 (s, 1H, N=C-H); 7,49-7,42 (m, 4H, Ar); 5,45 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,57 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 3,96 - 3,72 (m, 4H, CH₂-CO₂H); 3,68 - 3,58 (m, 1H, CH-CO₂H); 3,56-3,39 (m, 4H, NH-CO-CH₂-CH₂); 3,26-2,85 (m, 9H, NR-CH₂); 2,49-2,34 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 1,66 (s, 9H, N(CH₃)₃); 1,38-1,28 (m, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂)

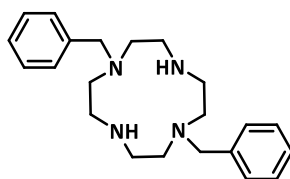
¹³C-NMR ((MeOD₄, 100 MHz) δ (ppm)): 22,85; 25,25; 26,75; 32,02; 39,01; 50,61; 53,95; 55,59; 63,39; 63,94; 66,33; 68,59; 71,48; 72,11; 116,75; 126,14; 127,45; 127,93; 128,38; 134,73; 138,96; 154,67; 159,64

MS (ESI) m/z : 723,38; 725,38 [M+H]⁺; 724,38; 726,38 [MH+H]⁺

4.2.9. Synthese der Pyridaben-Bn-Alkyl-DO2A-/DOTA-/NODAGA-Derivate

4.2.9.1. Synthese von DO2A-(OMe)₂

1,7-Dibenzyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan 38



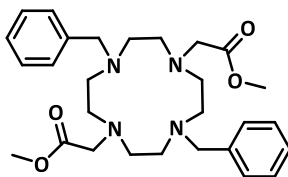
Cyclen (2,0 g; 11,6 mmol) wurde in Wasser (15 mL) gelöst und der pH-Wert mittels Zugabe von 6 M HCl auf pH 3 eingestellt. Benzylchlorformiat (5,0 g, 4,1 mL, 29,0 mmol) gelöst in Dioxan (30 mL) wurde innerhalb 4 - 5 h zugetropft. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 2 M NaOH auf pH 3

gehalten. Nach erfolgter Zugabe wurde 15 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde entfernt, der Rückstand in 2 M NaOH (50 mL) aufgenommen und mit Et₂O (15 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und einkonzentriert. Das Produkt (4,7 g; 95 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,37 - 7,27 (m, 10H, Ar); 5,15 (s, 4H, Ar-CH₂-O); 3,49 - 3,13 (m, 8H, NR-CH₂); 2,95 - 2,64 (m, 8H, NH-CH₂)

MS (ESI) m/z: 441,27 [M+H]⁺

1,7-Diameisensäurebenzylester-4,10-diessigsäuremethylester-1,4,7,10-tetraaza-cyclododecan 39



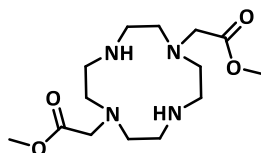
1,7-Diameisensäurebenzylester-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (3 g; 6,4 mmol) wurde in trockenem MeCN (35 mL) gelöst. DIPEA (1,9 g; 2,5 mL; 14,4 mmol) wurde hinzugegeben und die Reaktionsmischung auf 40°C erhitzt. Innerhalb 1 h wurde Methylbromacetat (2,1 g; 1,3 mL; 13,4 mmol) hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei 40°C gerührt. Nach Aufkonzentration der Reaktionsmischung erfolgte eine säulenchromatographische Aufreinigung (Hex/EA 1:3, R_f = 0,3) und ergab das Produkt (3,7 mmol; 58 %) als schwachgelbes Öl.

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,37 - 7,27 (m, 10H, Ar); 5,29 (s, 6H, OCH₃), 5,11 (s, 4H, Ar-CH₂-O); 3,64 (br s, 4H, CH₂-CO₂CH₃); 3,49 - 3,26 (m, 10H, NR-CH₂; NH-CH₂); 2,85 (br s, 6H, NH-CH₂)

¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 47,27-46,34; 51,49; 55,11-54,01; 67,19; 128,11; 128,59; 136,84; 156,56; 171,59

MS (ESI) m/z: 585,31 [M+H]⁺

Dimethyl 2,2'-(1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diacetat 40



1,7-Diameisensäurebenzylester-4,10-diessigsäuremethylester-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (895,0 mg; 1,5 mmol) wurden in MeOH (10 mL) gelöst und 10 % Pd/C (90 mg) addiert. Die Hydrierung erfolgt mittels eines H₂-gefüllten Ballons innerhalb 3 h. Nach Filtration der Lösung über Celite wurde das Lösemittel entfernt und ergab das Produkt (442,0 mg; 96 %) als farbloses Öl.

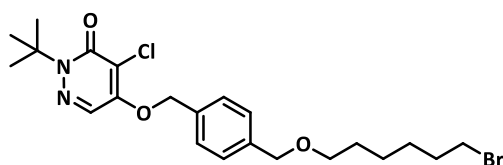
$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 3,62 (s, 6H, CH_3), 3,38 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{CH}_3$); 2,76 - 2,72 (m, 8H, NR-CH_2); 2,57 - 2,54 (m, 8H, NH-CH_2)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 45,43; 51,42; 52,05; 56,04; 172,01

4.2.9.2. Synthese der Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-Brom-Derivate

15 (3,1 mmol) wurden in trockenem DMF (5 mL) gelöst und auf 0°C abgekühlt. Es wurde 60 % NaH (125 mg) hinzugefügt und die Mischung 20 min gerührt. Das Dibromalkan (6,2 mmol) wurde langsam hinzugetropft und 15 min bei 0°C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Extraktion mit Wasser wurde die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und aufkonzentriert. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie. Das Produkt konnte als farbloses Öl erhalten werden.

5-(4-((6-Bromohexyloxy)methyl)benzyloxy)-2-tert-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 41



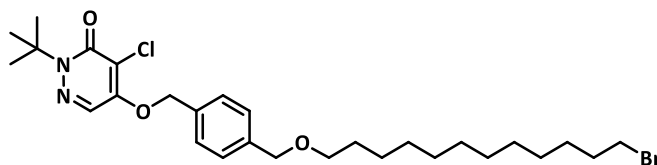
Hex/EA 1:1; R_f = 0,89; 33 %

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,71 (s, 1H, N=C-H); 7,39 (s, 4H, *Ar*); 5,30 (s, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-Ar}$); 4,49 (s, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-O}$); 3,48 (t, J = 6 Hz, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-(CH}_2)_5$); 3,39 (t, J = 6 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Br}$); 1,89 - 1,80 (m, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$); 1,61 (s, 9H, $\text{N(CH}_3)_3$); 1,49 - 1,36 (m, 6H, $(\text{CH}_2)_3\text{-CH}_2\text{-Br}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 25,50; 28,03; 29,56; 32,77; 33,93; 66,60; 70,54; 71,75; 72,56; 118,13; 125,16; 127,27; 128,05; 134,15; 139,42; 153,82; 159,14

MS (LCMS) m/z : 484,12; 486,11; 485,11; 487,12 [M+H]⁺

5-(4-((12-Bromododecyloxy)methyl)benzyloxy)-2-tert-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 42



Hex/EA 1:1; $R_f = 0,7$; 20 %

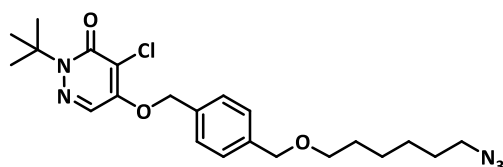
$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,71 (s, 1H, N=C-H); 7,38 (s, 4H, Ar); 5,31 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 4,50 (s, 2H, Ar- CH_2 -O); 3,50 (t, $J = 6$ Hz, 2H, O- CH_2 -(CH_2)₅); 3,38 (t, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2 -Br); 1,83 (qi, 2H, O- CH_2 - CH_2); 1,62 (s, 9H, N(CH_3)₃); 1,48 - 1,27 (m, 18H, (CH_2)₉)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 26,32; 27,98; 28,30; 28,89; 29,73-29,56 (m); 29,89; 32,96; 34,23; 66,53; 71,82; 72,54; 72,77; 118,11; 125,22; 127,30; 127,80; 128,24; 134,16; 139,67; 153,79; 159,17

MS (LCMS) m/z : 588,19; 589,20; $[\text{M}+\text{H}]^+$; 570,20; 571,20; $[\text{M}+\text{Na}]^+$

4.2.9.3. Synthese des Pyridaben-Bn-O-C₆-Amin-Derivats

5-(4-((6-Azidohexyloxy)methyl)benzyloxy)-2-tert-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 43



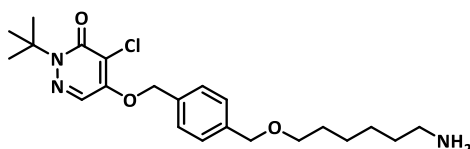
42 (105,0 mg; 0,2 mmol) wurden in trockenem DMF (2mL) gelöst und Natriumazid (145,0 mg; 2,2 mmol) addiert. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Filtration und Aufkonzentration des Filtrats ergab die säulenchromatographische Aufreinigung (Hex/EA 4:1; $R_f = 0,5$) das Produkt (50,1 mg; 55 %) als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,71 (s, 1H, N=C-H); 7,38 (s, 4H, Ar); 5,30 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 4,50 (s, 2H, Ar- CH_2 -O); 3,48 (t, $J = 6$ Hz, 2H, O- CH_2 -(CH_2)₅); 3,25 (t, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2 -N₃); 1,64 - 1,62 (m, 13H, ; O- CH_2 - CH_2 - CH_2 ; N(CH_3)₃); 1,41 - 1,38 (m, 4H, CH_2 - CH_2 - CH_2 -N₃)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 25,96; 26,67; 27,94; 28,85; 29,67; 51,49; 66,48; 70,58; 71,78; 72,55; 118,15; 125,21; 127,30; 128,24; 134,18; 139,52; 153,73; 159,14

MS (ESI) m/z : 448,25; 450,24 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 470,22; 472,22 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

5-(4-((6-Amino-hexyloxy)methyl)benzyloxy)-2-tert-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 44



43 (51,0 mg; 0,1 mmol) wurde in THF (1 mL) gelöst. Zu der Lösung wurden Ph₃P (45,0 mg; 0,2 mmol) und Wasser (5 µL) addiert und die Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Aufkonzentration und säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 8:1; 3 % NH₄OH; R_f = 0,3) ergab das Produkt (35,0 mg; 75 %) als farbloses Öl.

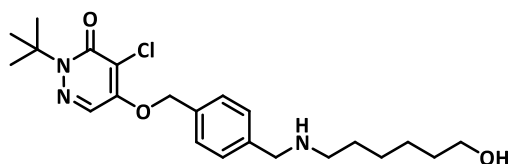
¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,70 (s, 1H, N=C-H); 7,37 (s, 4H, Ar); 5,29 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,48 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3,47 (t, J = 6 Hz, 2H, O-CH₂-(CH₂)₅); 2,68 (t, J = 6 Hz, 2H, CH₂-NH₂); 1,82 (bs, 2H, NH₂); 1,61 (s, 11H, N(CH₃)₃; O-CH₂-CH₂); 1,47 - 1,31 (m, 6H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)

¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 26,13; 26,80; 27,95; 29,80; 33,45; 42,11; 66,39; 70,77; 71,78; 72,51; 118,13; 125,20; 127,27; 128,21; 134,17; 139,56; 153,77; 159,14

MS (ESI) m/z: 422,2217; 424,2122 [M+H]⁺ berechnet C₂₂H₃₂ClN₃O₃: 421,2132 [M+H]⁺

4.2.9.4. Synthese der Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-Brom-Derivate

2-tert-Butyl-4-chloro-5-(4-((6-hydroxyhexylamino)methyl)benzyloxy)pyridazin-3(2H)-on **45**



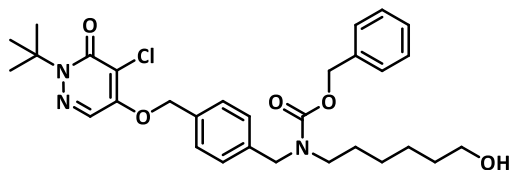
Zu einer Lösung von 6-Amino-1-hexanol (91,0 mg; 0,8 mmol) in trockenem MeCN (10 mL) wurde K₂CO₃ (108,0 mg; 2,3 mmol) addiert und die Reaktionsmischung auf 40°C erwärmt. **16** (300,0 mg; 0,8 mmol) in trockenem MeCN (15 mL) wurde langsam zugetropft. Nach Rühren über Nacht wurde die Suspension filtriert und das Filtrat eingedunstet. Die säulenchromatographische Aufreinigung (Hex/EA 1:2; R_f = 0,6) ergab das Produkt (100,0 mg; 31 %) als oranges Öl.

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,72 (s, 1H, N=C-H); 7,56 (d, J = 9 Hz, 4H, Ar); 7,40 (d, J = 9 Hz, 4H, Ar); 5,26 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,03 (s, 2H, Ar-CH₂-NH); 3,56 (t, J = 6 Hz, 2H, CH₂-OH); 2,80 (t, J = 6 Hz, 2H, NH-CH₂); 1,79 - 1,71 (m, 2H, CH₂-CH₂-OH); 1,62 (s, 9H, N(CH₃)₃); 1,52 - 1,45 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂); 1,35 - 1,33 (m, 4H, NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)

¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 25,23; 26,38; 26,68; 27,96; 28,57; 32,15; 47,32; 51,40; 62,23; 66,68; 71,44; 115,71; 118,25; 125,15; 127,66; 130,66; 133,12; 135,69; 133,74; 159,00

MS (ESI) m/z: 422,20; 424,22 [M+H]⁺

Benzyl 4-((1-tert-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)benzyl(6-hydroxyhexyl)carbamate 46



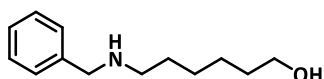
16 (470,0 mg; 1,1 mmol) wurde in 10 % iger Na_2CO_3 -Lösung/EtOAc 1:1 (50 mL) und auf 0°C abgekühlt. Benzylchlorformiat (213,0 mg; 178 μL ; 1,2 mmol) wurde tropfenweise addiert und die Reaktionslösung 1,5 h bei 0°C gerührt. Nach Addition von Wasser (10 mL) wurde mittels Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und einkonzentriert. Das Produkt (530,0 mg; 86 %) wurde als schwach gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,72 (s, 1H, N=C-H); 7,36 - 7,26 (m, 9H, Ar); 5,27 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 5,15 (d, $J = 6$ Hz, 2H, Ar- CH_2 - CO_2); 4,49 (s, 2H, Ar- CH_2 -NH); 4,11 - 4,07 (m, 2H, N- CH_2); 3,33 - 3,14 (m, 2H, CH_2 -OH); 1,63 (s, 9H, N(CH_3) $_3$); 1,56 - 1,46 (m, 4H, CH_2 - CH_2 - CH_2 -OH); 1,41 - 1,13 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 - CH_2)

4.2.9.4.1. Mono-Benzylisierung der Aminoalkohole nach del Valle et al.¹⁰⁹

Der Aminoalkohol (4,3 mmol) wurde in trockenem MeOH (10 mL) gelöst und Na_2SO_4 (40,0 mg) hinzugefügt. Benzaldehyd (4,3 mmol) wurde addiert und die Reaktionsmischung bei RT 1 h gerührt. Nach Filtration wurde NaBH_4 (8,5 mmol) portionsweise bei 0°C zugegeben und die Reaktion langsam auf RT gebracht und 1 h gerührt. Methanol wurde entfernt, der Rückstand in $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ aufgenommen und extrahiert. Die organische Phase wurde zweimal mit H_2O (5 mL) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet. Filtration und Entfernung des Lösemittels ergaben das Produkt als farbloses Öl.

6-(Benzylamino)hexan-1-ol 47

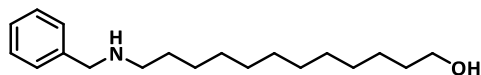


46 %

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7,35 - 7,21 (m, 5H, Ar); 3,78 (s, 2H, Ar- CH_2); 3,60 (t, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2 -OH); 2,62 (t, $J = 6$ Hz, 2H, NH- CH_2); 1,74 (bs, 1H, NH); 1,57 - 1,50 (m, 4H, NH- CH_2 - CH_2 - CH_2); 1,37 - 1,33 (m, 4H, CH_2 - CH_2 - CH_2 -OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 25,73; 27,15; 29,87; 32,76; 49,25; 54,01; 62,84; 127,26; 128,37; 128,56; 139,93

12-(Benzylamino)dodecan-1-ol **48**



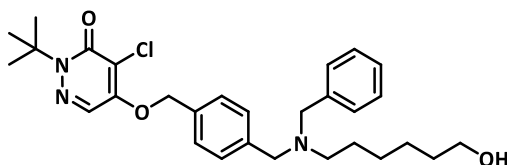
42 %

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,39 - 7,21 (m, 5H, Ar); 3,78 (s, 2H, Ar- CH_2); 3,62 (t, $J = 6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 2,62 (t, $J = 6$ Hz, 2H, NH- CH_2); 1,59 - 1,46 (m, 6H, NH- $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_2\text{-OH}$); 1,39 - 1,18 (m, 14H, NH- $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_2\text{-OH}$)

4.2.9.4.2. Alkylierung der Benzylaminoalkohole mit dem Pyridaben-Benzylbromid

Benzylaminoalkohol (1,9 mmol) wurde in trockenem MeCN (13 mL) gelöst und K_2CO_3 (3,1 mmol) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde auf 55°C erwärmt und **16** (1,9 mmol) in trockenem MeCN (10 mL) zu getropft. Nach 2 h Rühren bei 55°C wurde die Suspension filtriert, eingengt und säulenchromatographisch aufgereinigt. Das Produkt konnte als farbloses Öl erhalten werden.

5-(4-((Benzyl(6-hydroxyhexyl)amino)methyl)benzyloxy)-2-*tert*-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on **49**

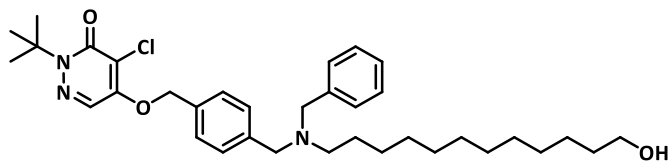


Hex/EA 1:1; $R_f = 0,5$; 50 %

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,73 (s, 1H, N=C-H); 7,42 - 7,20 (m, 9H, Ar); 5,29 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 3,59 (t, $J = 6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 3,54 (s, 4H, N- CH_2 -Ar); 2,40 (t, $J = 6$ Hz, 2H, N- CH_2 -alkyl); 1,62 (s, 9H, N(CH_3) $_3$); 1,56 - 1,47 (m, 4H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$); 1,34 - 1,23 (m, 4H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 25,63; 27,08; 28,00; 32,85; 53,43; 58,09; 58,50; 63,09; 66,52; 71,97; 118,23; 125,29; 126,97; 127,16; 128,32; 128,89; 129,40; 153,89; 159,18

MS (LCMS) m/z : 512,20; 513,20; 514,20; 515,21 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

5-(4-((Benzyl(12-hydroxydodecyl)amino)methyl)benzyloxy)-2-tert-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 50


Hex/EA 2:1; $R_f = 0,5$; 57 %

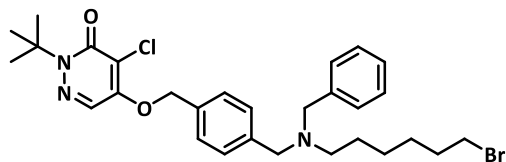
$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,72 (s, 1H, N=C-H); 7,48 - 7,20 (m, 9H, Ar); 5,29 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 3,63 (t, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2 -OH); 3,55 (s, 4H, N- CH_2 -Ar); 2,40 (t, $J = 6$ Hz, 2H, N- CH_2 -alkyl); 1,62 (s, 9H, N(CH_3)₃); 1,58 - 1,45 (m, 6H, CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -OH); 1,38 - 1,11 (m, 16H, N- CH_2 -(CH_2)₈)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 25,88; 27,09; 27,37; 27,88; 29,71; 32,93; 53,64; 58,02; 58,44; 63,19; 66,45; 71,96; 118,22; 125,27; 126,92; 127,13; 127,70; 128,29; 128,85; 129,37; 133,33; 139,97; 141,20; 153,82; 159,21

MS (LCMS) m/z : 596,3; 597,4; 598,3 [$\text{M}+\text{H}$]⁺

4.2.9.4.3. Appel-Bromierung der Pyridaben-Bn-N(Bn)-Hydroxy-Derivate

Der entsprechende Benzylaminalkohol (0,8 mmol) wurde in trockenem DCM (3 mL) gelöst und Triphenylphosphin (1,0 mmol) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C gekühlt und Tetrabrommethan (1,0 mmol) portionsweise addiert. Nach 1 h Rühren bei RT wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt. Das Produkt konnte als schwach gelbes Öl erhalten werden.

5-(4-((Benzyl(6-bromohexyl)amino)methyl)benzyloxy)-2-tert-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on 51


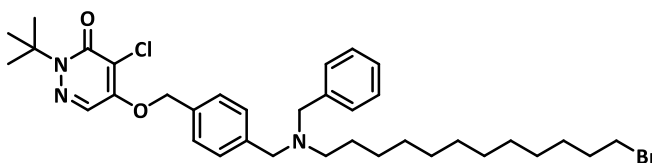
Hex/EA 1:1; $R_f = 0,7$; 84 %

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,73 (s, 1H, N=C-H); 7,42 - 7,20 (m, 5H, Ar); 5,29 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 3,55 (s, 4H, N- CH_2 -Ar); 3,35 (t, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2 -Br); 2,41 (t, $J = 6$ Hz, 2H, N- CH_2); 1,80 (q, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2 - CH_2 - CH_2 -Br); 1,63 (s, 9H, N(CH_3)₃); 1,49 (q, $J = 6$ Hz, 2H, N- CH_2 - CH_2 - CH_2); 1,35 - 1,24 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -Br)

^{13}C -NMR ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 26,32; 27,96; 32,77; 34,03; 53,32; 58,07; 58,49; 66,46; 71,91; 118,26; 125,22; 127,14; 128,29; 128,84; 129,35; 133,40; 153,85; 159,15; 174,39

MS (LCMS) m/z : 597,6; 599,5; 601,6 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

5-(4-((Benzyl(12-bromododecyl)amino)methyl)benzyloxy)-2-*tert*-butyl-4-chloropyridazin-3(2H)-on
52



Hex/EA 2:1; R_f = 0,9; 70 %

^1H -NMR ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,72 (s, 1H, N=C-H); 7,51 - 7,22 (m, 9H, Ar); 5,29 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 3,59 (s, 4H, N- CH_2 -Ar); 3,40 (t, J = 6 Hz, 2H, CH_2 -Br); 1,89 - 1,80 (q, 2H, N- CH_2 -alkyl); 1,64 (s, 9H, N(CH_3) $_3$); 1,59 - 1,44 (m, 2H, N- CH_2 -(CH_2) $_{10}$); 1,41 - 1,39 (m, 2H, N- CH_2 -(CH_2) $_{10}$); 1,35 - 1,12 (m, 16H, N- CH_2 -(CH_2) $_{10}$)

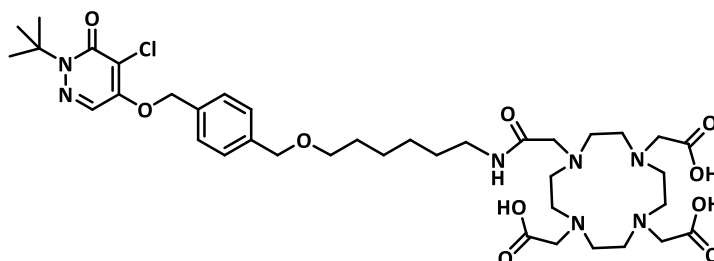
^{13}C -NMR ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 27,32; 27,99; 28,30; 28,96; 29,56; 29,67; 32,96; 33,84; 57,78; 57,88; 66,57; 71,79; 110,17; 118,43; 125,22; 127,22; 128,43; 128,98; 129,67; 153,85; 159,16; 174,35

MS (LCMS) m/z : 658,2; 659,2; 660,2 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

4.2.9.5. Synthese der Pyridaben-Bn-O-C₆-DOTA/NODAGA-Derivate

Pyridaben-Bn-O-C₆-DOTA-Derivat VN143.MZ

2,2',2''-(10-(2-(6-(4-((1-*tert*-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyloxy)hexylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triessigsäure 53



DOTA-NHS (27,0 mg; 0,04 mmol) wurde in trockenem DMF (2 mL) gelöst. **44** (15,0 mg; 0,04 mmol) und TEA (21 μ L) wurden addiert. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels erfolgte eine Aufreinigung mittels HPLC (t_R : 20,2 min (20 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA \rightarrow 80 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA in 19 min, 3 mL/min); und ergab das Produkt (10 mg; 35 %) als weißen Feststoff.

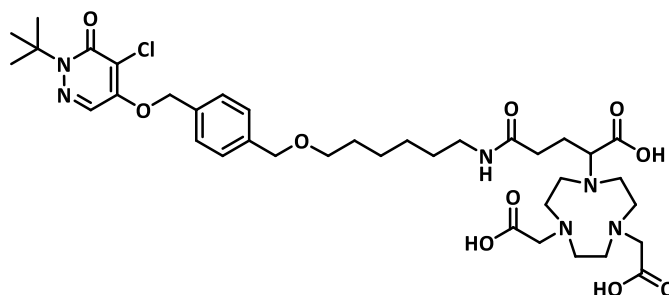
¹H-NMR ((MeOD₄, 600 MHz) δ (ppm)): 8,14 (s, 1H, N=C-H); 7,49 (d, J = 6 Hz, 2H, Ar); 7,42 (d, J = 6 Hz, 2H, Ar); 5,45 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,54 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3,93 - 3,81 (m, 6H, CH₂-CO₂H); 3,68 (s, 1H, NH=CO); 3,54 (t, J = 6 Hz, 3H, NH=CO-CH₂) 3,68 - 3,15 (m, 16H, NR-CH₂); 1,74 - 1,69 (m, 2H, CH₂-NH=CO); 1,66 (s, 9H, N(CH₃)₃); 1,59 - 1,31 (m, 10H, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH=CO)

¹³C-NMR ((MeOD₄, 150 MHz) δ (ppm)): 26,92; 27,83; 28,09; 30,26; 30,63; 40,58; 50,92; 51,50; 54,99; 67,68; 71,51; 72,93; 73,43; 118,14; 127,62; 128,82; 129,23; 136,07; 140,57; 156,01; 161,01

MS (ESI) m/z: 830,3828; 831,3951; 832,766; 833,5381; 834,0347 [M+Na]⁺; berechnet C₃₈H₅₈ClN₇O₁₀: [M+Na]⁺ 830,3819

Pyridaben-Bn-O-C₆-NODAGA-Derivat VN213.MZ

2,2'-(7-(4-(6-(4-((1-tert-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyloxy)hexylamino)-1-carboxy-4-oxobutyl)-1,4,7-triazacyclononan-1,4-diyl)diessigsäure 54



NODAGA-NHS (20,0 mg; 0,03 mmol) wurde in trockenem DMF (2 mL) gelöst. **44** (15,0 mg; 0,04 mmol) und TEA (21 μ L) wurden addiert. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels erfolgte eine Aufreinigung mittels HPLC (t_R : 14,4 min (20 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA \rightarrow 80 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA in 19 min, 3 mL/min); und ergab das Produkt (8 mg; 34 %) als weißen Feststoff.

¹H-NMR ((MeOD₄, 600 MHz) δ (ppm)): 8,12 (s, 1H, N=C-H); 7,46 (d, J = 6 Hz, 2H, Ar); 7,41 (d, J = 6 Hz, 2H, Ar); 5,44 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,52 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3,89 - 3,80 (m, 4H, CH₂-CO₂H); 3,65 (s, 1H, NH=CO); 3,58 - 3,48 (m, 3H, NH=CO-CH₂; N-CH-CO₂H) 3,36 - 3,03 (m, 14H, NH=CO-CH₂-CH₂; NR-CH₂); 1,71 - 1,66 (m, 2H, CH₂-NH=CO); 1,65 (s, 9H, N(CH₃)₃); 1,51 - 1,25 (m, 10H, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH=CO)

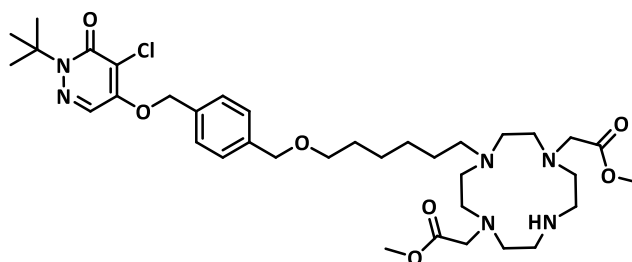
¹³C-NMR ((MeOD₄, 100 MHz) δ (ppm)): 26,90; 27,85; 28,19; 30,39; 30,63; 33,59; 40,44; 50,90; 51,53; 54,97; 67,67; 71,48; 72,94; 73,41; 118,17; 127,51; 128,80; 129,22; 136,03; 140,54; 156,05; 161,02

MS (ESI) m/z : 779,3750; 780,3763; 781,3783; 782,3809 $[M+H]^+$; berechnet $C_{37}H_{55}ClN_6O_{10}$: 778,3668 $[MH+H]^+$

4.2.9.6. Synthese der mono-Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate

Zu einer Lösung von DO2A-(OMe)₂ (0,3 mmol) in trockenem MeCN (5 mL) wurde das entsprechende Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-Brom-Derivat (0,3 mmol) in trockenem MeCN (2 mL) langsam bei 55°C zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt. Aufkonzentration der Lösung und anschließende säulenchromatographische Aufreinigung ergaben das Monomer und geringe Anteile an Dimer als gelbe Öle.

Dimethyl 2,2'-(4-(6-(4-((1-tert-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyl-oxy)hexyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 55



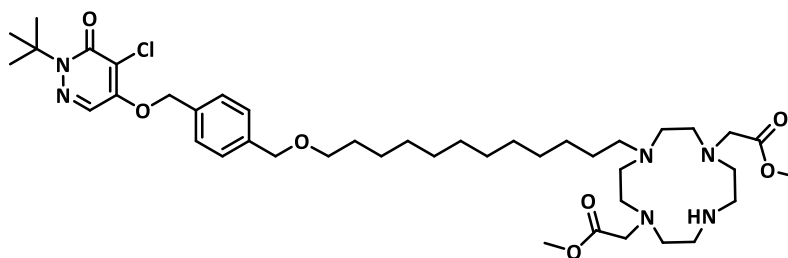
DCM/MeOH 8:1; 3 % NH₄OH; R_f = 0,6; 28 %

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,72 (s, 1H, N=C-H); 7,38 (s, 4H, Ar); 5,31 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,50 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3,69 (s, 6H, OCH₃); 3,48 (t, J = 6 Hz, 2H, O-CH₂); 3,06 - 2,96 (m, 4H, CH₂-CO₂-CH₃); 2,90 - 2,70 (m, 8H, N-CH₂-CH₂-N); 2,66 - 2,46 (m, 8H, N-CH₂-CH₂-N); 1,62 (s, 9H, N(CH₃)₃); 1,48 - 1,18 (m, 10H, O-CH₂-(CH₂)₅);

¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 26,37; 27,67; 27,99; 28,72; 29,88; 47,12; 49,87; 51,03; 51,67; 56,77; 66,55; 70,72; 71,81; 72,59; 118,19; 125,21; 127,27; 128,24; 134,23; 139,54; 153,87; 159,17; 171,91

MS (ESI) m/z : 721,51; 723,54 $[M+H]^+$

Dimethyl-2,2'-(4-(12-(4-((1-tert-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyloxy)dodecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 56



DCM/MeOH 8 :1, 3 % NH₄OH; R_f = 0,6; 24 %

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,70 (s, 1H, N=C-H); 7,36 (s, 4H, Ar); 5,29 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,48 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3,68 (s, 6H, OCH₃); 3,48 - 3,43 (m, 4H, O-CH₂, CH₂-N); 3,04 - 2,90 (m, 4H, CH₂-CO₂-CH₃); 2,71 - 2,59 (m, 12H, N-CH₂-CH₂-N); 2,59 - 2,46 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-N); 1,60 (s, 9H, N(CH₃)₃); 1,38 - 1,12 (m, 20H, (CH₂)₁₀)

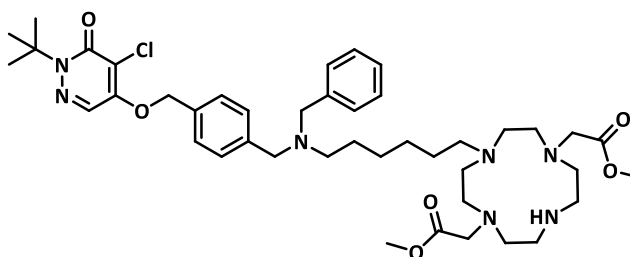
¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 26,29; 27,93; 29,71; 46,02; 47,38; 49,74; 51,09; 51,26; 51,69; 52,09; 56,20; 56,94; 66,40; 70,92; 71,77; 72,48; 118,17; 125,18; 127,27; 128,18; 134,12; 139,58; 153,84; 159,07; 171,70

MS (LCMS) m/z: 805,4; 807,4 [M+H]⁺

4.2.9.7. Synthese der mono-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate

Zu einer Lösung von DO2A-(OMe)₂ (0,3 mmol) in trockenem MeCN (5 mL) wurde das entsprechende Pyridaben-N(Bn)-C₆/C₁₂-Brom-Derivat (0,3 mmol) in trockenem MeCN (2 mL) langsam bei 55°C zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt. Aufkonzentration der Lösung und anschließende säulenchromatographische Aufreinigung ergaben das Monomer und geringe Anteile an Dimer als gelbe Öle.

Dimethyl 2,2'-(4-(6-(benzyl(4-((1-tert-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyl)amino)hexyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diacetat 57



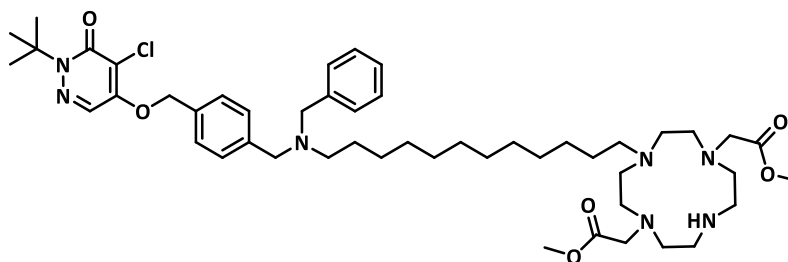
DCM/MeOH 4:1; 1 % NH₄OH; R_f = 0,6; Monomer 35 %; Dimer 19 %

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,74 (s, 1H, N=C-H); 7,50 - 7,21 (m, 9H, Ar); 5,29 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 3,69 (s, 6H, OCH_3); 3,65 - 3,55 (m, 4 H, benzyl-N- CH_2 -alkyl); 3,49 (s, 4 H, N- CH_2 -Ar); 3,14 - 3,03 (m, 4H, CH_2 - CO_2 - CH_3); 2,95 - 2,84 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 -N); 2,95 - 2,84 (m, 8H, N- CH_2 - CH_2 -N); 2,61 - 2,35 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 -N); 1,62 (s, 9H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$); 1,58 - 1,43 (m, 2H, N- CH_2 -alkyl); 1,36 - 1,07 (m, 10H, N- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -N)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 21,48; 27,19; 27,47; 27,89; 47,18; 49,33; 50,76; 51,13; 51,67; 53,30; 56,86; 57,82; 66,44; 71,82; 118,31; 125,18; 127,20; 128,30; 128,96; 129,46; 133,60; 153,80; 159,09; 171,77

MS (LCMS) m/z: 810,4; 811,4; 812,4; 813,4 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

Dimethyl 2,2'-(4-(12-(benzyl(4-((1-tert-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyl)amino)dodecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 58



DCM/MeOH 6 :1; R_f = 0,7; 64 %

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,73 (s, 1H, N=C-H); 7,41 - 7,18 (m, 9H, Ar); 5,28 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 3,65 (s, 6H, $-\text{OCH}_3$); 3,53 (s, 4H, N- CH_2 -Ar); 3,41 (s, 4H, CH_2 - CO_2 - CH_3); 3,04 - 2,68 (m, 16H, N- CH_2 - CH_2 -N); 2,39 (t, J = 6 Hz, 2H, benzyl-N- CH_2); 1,61 (s, 9H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$); 1,55 - 1,44 (m, 2H, CH_2 -N); 1,38 - 1,11 (m, 20H, N- CH_2 - $(\text{CH}_2)_{10}$ - CH_2)

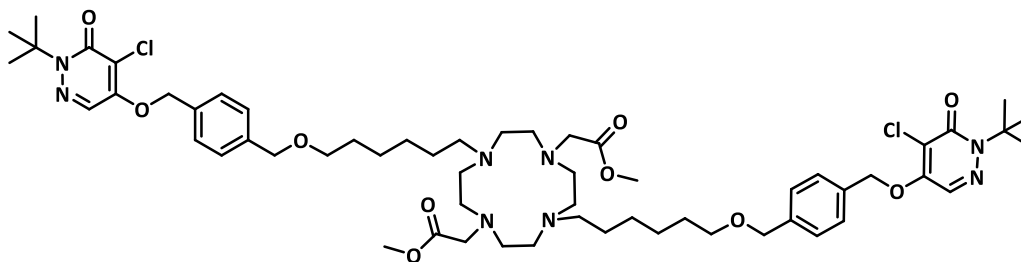
$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 20,23; 27,31; 27,97; 29,65; 47,66; 49,50; 50,85; 51,75; 53,65; 57,20; 57,93; 58,40; 66,49; 71,88; 118,29; 125,14; 127,13; 128,27; 128,83; 129,34; 153,81; 159,30; 171,68

MS (LCMS) m/z: 894,5; 895,5; 896,4; 897,5 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

4.2.9.8. Synthese der di-Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate

DO2A-(OMe)₂ (0,2 mmol) wurde in trockenem MeCN (12 mL) gelöst, K_2CO_3 (0,4 mmol) addiert und die Reaktionsmischung auf 65°C erhitzt. Das entsprechende Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-Brom-Derivat (0,2 mmol), gelöst in trockenem MeCN (5 mL), wurde langsam zugetropft. Nach 12 h wurde die Mischung filtriert, eingeeengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt. Das Produkt konnte als schwach gelbes Öl erhalten werden.

Dimethyl 2,2'-(4-(6-(4-((1-*tert*-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)benzyl-oxo)hexyl)-10-(5-(4-((1-*tert*-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)benzyloxy)-penty)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 59



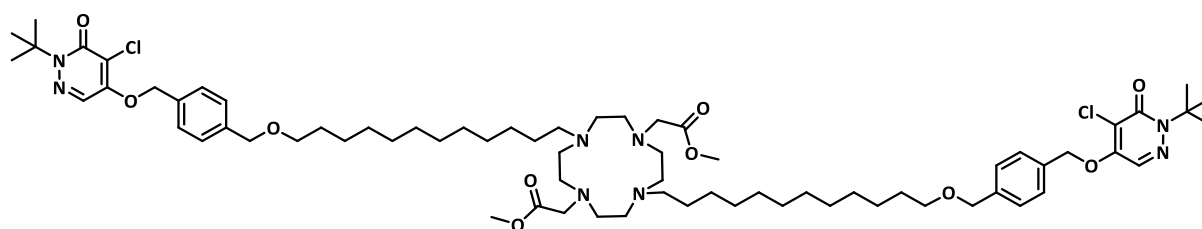
DCM/MeOH 7:1, 2 % NH₄OH; R_f = 0,7; 62 %

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,73 (s, 2H, N=C-H); 7,36 (s, 8H, Ar); 5,30 (s, 4H, O-CH₂-Ar); 4,48 (s, 4H, Ar-CH₂-O); 3,67 (s, 6H, O-CH₃), 3,49 - 3,45 (m, 4H; O-CH₂-alkyl); 3,39 (s, 4H, CH₂-CO₂-CH₃); 3,15 - 2,71 (m, 24H, N-CH₂-CH₂-N, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N); 1,61 (bs, 18H, N(CH₃)₃); 1,58 - 1,29 (m, 12H, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N)

¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 26,22; 28,00; 29,69; 52,63; 66,53; 70,63; 71,79; 72,58; 118, 32; 125,23; 127,40; 128,20; 134,22; 139,42; 153,81; 159,16

MS (ESI) m/z: 1125,5895; 1126,6127; 1127,6227; 11129,5894; 1130,5872; 1131,5852 [M⁺+H]; berechnet C₅₈H₈₆Cl₂N₈O₁₀: 1124,544 [M+H]⁺

Dimethyl 2,2'-(4,10-bis(12-(4-((1-*tert*-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyloxy)dodecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 60



DCM/MeOH 7 :1, 3 % NH₄OH; R_f=0,61; 73 %

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,71 (s, 2H, N=C-H); 7,36 (s, 8H, Ar); 5,29 (s, 4H, O-CH₂-Ar); 4,48 (s, 4H, Ar-CH₂-O); 3,68 (s, 6H, OCH₃), 3,48 - 3,42 (m, 4H; O-CH₂-alkyl); 3,39 - 3,39 (m, 4H, CH₂-CO₂-CH₃); 3,08 - 2,61 (m, 16H, N-CH₂-CH₂-N); 2,46 - 2,29 (m, 4H, N-CH₂-alkyl); 1,60 (bs, 18H, N(CH₃)₃); 1,49 - 1,22 (m, 40H, O-CH₂-(CH₂-CH₂-CH₂-CH₂)₁₀-CH₂-N)

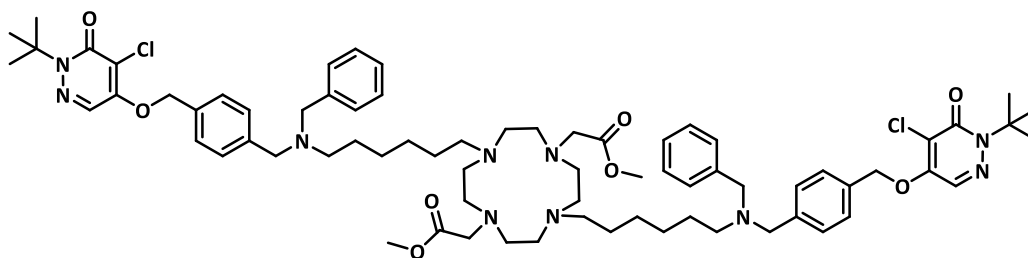
¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 26,30; 27,34; 27,94; 29,61; 29,67; 29,86; 51,79; 52,63; 56,13; 66,37; 70,91; 71,68; 72,49; 118,31; 125,18; 127,28; 128,17; 134,13; 139,57; 153,69; 159,11

MS (ESI) m/z : 1293,74; 1294,75; 1295,75; 1296,78; 1297,80 [M+H]⁺

4.2.9.9. Synthese der di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-(OMe)₂-Derivate

Zu einer Lösung von DO2A-(OMe)₂ (0,2 mmol) in trockenem MeCN (5 mL) und K₂CO₃ (0,5 mmol) wurde das entsprechende Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-Brom-Derivat (0,4 mmol) in trockenem MeCN (2 mL) bei 55°C langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt. Nach Filtration, Aufkonzentration des Filtrats und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Produkt als gelbes Öl erhalten werden.

Dimethyl-2,2'-(4-(6-(benzyl(4-((1-tert-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)-methyl)-benzyl)amino)hexyl)-10-(5-(benzyl(4-((1-tert-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)-methyl)benzyl)amino)pentyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 61



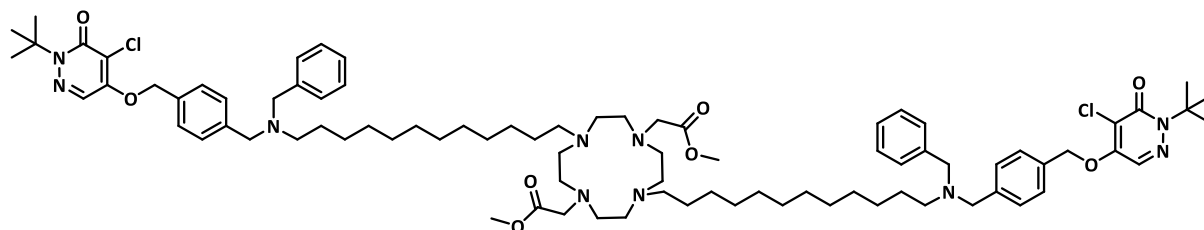
DCM/MeOH 4:1; 1 % NH₄OH; R_f = 0,7; 68 %

¹H-NMR ((CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)): 7,75 (s, 2H, N=C-H); 7,40 - 7,17 (m, 9H, Ar); 5,28 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 3,65 (s, 6H, OCH₃); 3,53 (bs, 8H, N-CH₂-Ar); 3,38 (s, 4H, CH₂-CO₂-CH₃); 3,18 - 3,09 (m, 6H, N-CH₂-CH₂-N); 3,03 - 2,91 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-N); 2,91 - 2,79 (m, 6H, N-CH₂-CH₂-N); 2,39 (t, J = 6 Hz, 2H, Ar-CH₂-N-CH₂); 1,61 (s, 18H, N(CH₃)₃); 1,55 - 1,40 (m, 10H, Ar-CH₂-N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N); 1,3 - 1,12 (m, 10H, Ar-CH₂-N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N)

¹³C-NMR ((CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)): 21,45; 27,08; 27,93; 49,02; 52,05; 52,62; 53,49; 58,07; 58,43; 66,52; 71,94; 118,21; 125,26; 127,01; 127,25; 128,33; 128,83; 129,31; 139,44; 153,88; 159,11; 171,22

MS (ESI) m/z : 1303,6; 1304,6; 1305,5; 1306,6; 1307,6; 1308,6 [M+H]⁺

Dimethyl 2,2'-(4,10-bis(12-(benzyl(4-((1-tert-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)-methyl)benzyl)amino)dodecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 62



DCM/MeOH 10:1; $R_f = 0,6$; 45 %

$^1\text{H-NMR}$ ((CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)): 7,73 (s, 1H, N=C-H); 7,41 - 7,18 (m, 18H, Ar); 5,27 (s, 4H, O- CH_2 -Ar); 3,68 (s, 6H, O- CH_3), 3,53 (s, 8H, N- CH_2 -Ar); 3,40 (s, 4H, CH_2 - CO_2 - CH_3); 3,21 - 3,04 (m, 6H, N- CH_2 - CH_2 -N); 3,04 - 2,94 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 -N); 2,94 - 2,76 (m, 6H, N- CH_2 - CH_2 -N); 2,38 (t, $J = 6$ Hz, 4H, benzyl-N- CH_2); 1,61 (s, 18H, N(CH_3) $_3$); 1,57 - 1,41 (m, 8H, N- CH_2 - CH_2 - CH_2 -alkyl); 1,39 - 1,10 (m, 36H, N- CH_2 - CH_2 - CH_2 -(CH_2) $_9$ -N)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)): 15,98; 20,18; 23,58; 27,03; 27,29; 28,03; 29,70; 48,85; 51,86; 52,63; 53,21; 53,75; 56,15; 57,98; 58,38; 66,46; 71,93; 115,10; 118,19; 125,33; 126,87; 127,11; 128,17; 128,80; 129,30; 131,38; 133,30; 139,89; 141,07; 153,78; 159,15; 171,14

MS (LCMS) m/z : 737,4; 738,4; 739,3; 740,3; 741,4; 742,4 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

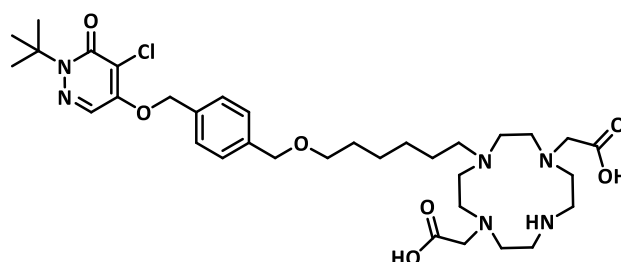
4.2.9.10. Synthese der Pyridaben-Bn-Alkyl-DO2A-Derivate

Entschützung der Methylester mit LiOH

Das jeweilige Pyridaben-Bn-Alkyl-DO2A-(OMe) $_2$ -Derivat (1 äq) wurde in THF/H $_2$ O 5:1 (1 mL) gelöst und LiOH (2,2 äq) addiert. Die Reaktionsmischung wurde 1 h im Ultraschallbad gemixt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mittels HPLC und ergab das Produkt als weißen Feststoff.

mono-Pyridaben-Bn-O-C $_6$ -DO2A-Derivat VN195.MZ

2,2'-(4-(6-(4-((1-*tert*-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyloxy)hexyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 63



t_R : 10,7 min (20 % MeCN/H $_2$ O; 0,1 % TFA \rightarrow 90 % MeCN/H $_2$ O; 0,1 % TFA in 19 min, 3 mL/min); 31 %

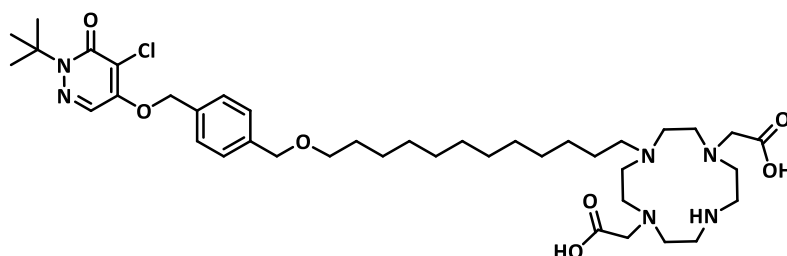
$^1\text{H-NMR}$ ((MeOD, 300 MHz) δ (ppm)): 8,14 (s, 1H, N=C-H); 7,45 (dd, $J = 9$ Hz, 4H, 12 Hz); 5,45 (s, 2H, O- CH_2 -Ar); 4,54 (s, 2H, Ar- CH_2 -O); 3,55 - 3,53 (m, 4H, CH_2 - CO_2 H); 3,39 - 3,28 (m, 2H, O- CH_2 -alkyl); 3,28 - 2,80 (m, 16H, N- CH_2 - CH_2 -N); 1,86 - 1,75 (m, 2H, N- CH_2 -alkyl); 1,66 (s, 9H, N(CH_3) $_3$); 1,55 - 1,32 (m, 8H, O- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -N)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((MeOD, 100 MHz) δ (ppm)): 24,30; 26,95; 27,46; 28,20; 30,43; 43,74; 51,05; 51,55; 54,20; 55,57; 67,69; 71,31; 72,84; 73,55; 118,17; 127,70; 128,74; 129,17; 136,19; 140,58; 175,45

MS (ESI) m/z : 693,33; 694,36; 695,36; $[M+H]^+$; 715,34; 716,36; 717,35 $[M+Na]^+$

mono-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivat VN167.MZ

2,2'-(4-(12-(4-((1-*tert*-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyloxy)-dodecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 65



t_R : 12,7 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 80 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 17 min, 3 mL/min); 31 %

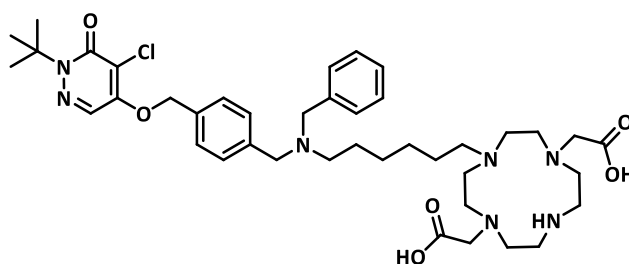
¹H-NMR ((MeOD, 300 MHz) δ (ppm)): 8,13 (s, 1H, N=C-H); 7,41 (dd, $J = 9$ Hz, 4H, 12 Hz); 5,45 (s, 2H, O-CH₂-Ar); 4,53 (s, 2H, Ar-CH₂-O); 3,58 - 3,49 (m, 4H, CH₂-CO₂H); 3,43 - 3,38 (m, 2H, O-CH₂-alkyl); 3,29 - 2,83 (m, 16H, N-CH₂-CH₂-N); 1,87 - 1,74 (m, 2H, N-CH₂-alkyl); 1,66 (s, 9H, N(CH₃)₃); 1,62 - 1,55 (m, 2H, O-CH₂-CH₂); 1,44 - 1,23 (m, 18H, O-CH₂-CH₂-(CH₂)₉)

¹³C-NMR ((MeOD, 75 MHz) δ (ppm)): 25,08; 27,25; 27,69; 28,17; 30,33; 30,72; 43,81; 49,81; 49,85; 51,00; 51,56; 54,15; 67,66; 71,57; 72,94; 73,41; 118,19; 127,62; 128,75; 128,81; 129,21; 136,03; 140,60; 156,00; 161,00; 175,33

MS (LCMS) $m/z = 774,6; 775,6; 776,5 [M+H]^+$

mono-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆-DO2A-Derivat VN223.MZ

2,2'-(4-(6-(Benzyl(4-((1-*tert*-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyl)-amino)hexyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 64



t_R : 10,8 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 90 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 19 min, 3 mL/min); 25 %

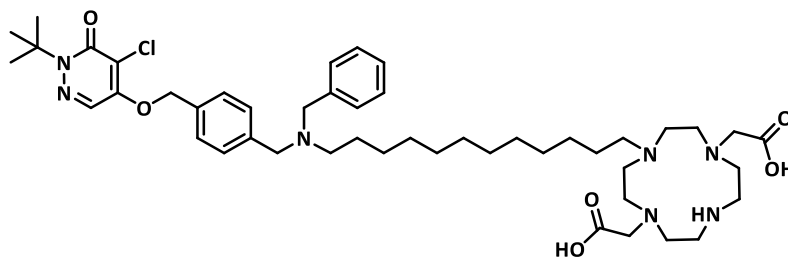
$^1\text{H-NMR}$ ((MeOD₄, 600 MHz) δ (ppm)): 8,16 (s, 1H, N=C-H); 7,63 (d, J = 12 Hz, 2H, Ar); 7,57 (d, J = 12 Hz, 2H, Ar); 7,51 (s, 5H, Ar); 5,51 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 4,42 (d, J = 12 Hz, 4H, Ar-CH₂-N); 3,52 (s, 4H, CH₂-CO₂H); 3,44 - 3,38 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-alkyl); 3,06 - 2,97 (m, 14H, N-CH₂-CH₂-N); 2,97 - 2,90 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-alkyl); 1,81 - 1,78 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂); 1,64 (s, 9H, N(CH₃)₃); 1,47 - 1,32 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((MeOD₄, 100 MHz) δ (ppm)): 22,71; 25,67; 26,68; 42,51; 49,77; 50,20; 52,05; 53,26; 53,79; 56,41; 56,99; 66,44; 70,92; 78,21; 116,97; 126,06; 128,27; 129,04; 129,31; 130,81; 131,43; 137,57; 154,45; 159,90; 174,34

MS (ESI) m/z : 782,39; 783,41; 784,42 [M+H]⁺

mono-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₁₂-DO2A-Derivat VN189.MZ

2,2'-(4-(12-(Benzyl(4-((1-*tert*-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyl)-amino)dodecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 66



t_R : 9,4 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 90 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 16 min, 3 mL/min); 21 %

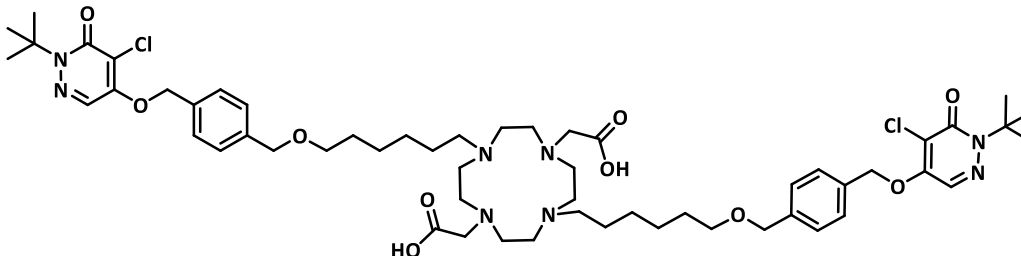
$^1\text{H-NMR}$ ((MeOD₄, 600 MHz) δ (ppm)): 8,13 (s, 1H, N=C-H); 7,62 (dd, J = 6 Hz, 2H, Ar); 7,55 (dd J = 6 Hz, 2H, Ar); 7,52 - 7,47 (m, 5H, Ar); 5,49 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 4,40 (d, J = 6 Hz, 4H, Ar-CH₂-N); 3,50 (s, 4H, CH₂-CO₂H); 3,42 - 3,37 (m, 2H, N-CH₂-alkyl); 3,29 - 3,02 (m, 16H, N-CH₂-CH₂-N); 2,94 - 2,87 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-alkyl); 1,81 - 1,78 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-CH₂-alkyl); 1,64 (s, 9H, N(CH₃)₃); 1,40 - 1,22 (m, 16H, N-CH₂-CH₂-CH₂-alkyl)

$^{13}\text{C-NMR}$ ((MeOD₄, 100 MHz) δ (ppm)): 24,45; 27,62; 28,15; 30,11; 30,53; 30,75; 43,89; 49,94; 51,07; 51,56; 53,37; 54,46; 55,54; 57,91; 58,45; 67,75; 72,31; 118,27; 127,49; 129,51; 130,54; 130,76; 131,19; 131,36; 132,12; 132,70; 139,08; 155,81; 160,87; 175,54

MS (ESI) m/z : 866,5328; 868,5372; 870,7385 [M+H]⁺; berechnet C₄₇H₇₂ClN₇O₆: 866,5311 [M+H]⁺

di-Pyridaben-Bn-O-C₆-DO2A-Derivat VN165.MZ

2,2'-(4-(6-(4-((1-tert-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)benzyloxy)-hexyl)-10-(5-(4-((1-tert-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)benzyl-oxy)pentyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 67



t_R : 10,8 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 90 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 13 min, 3 mL/min); 24 %;

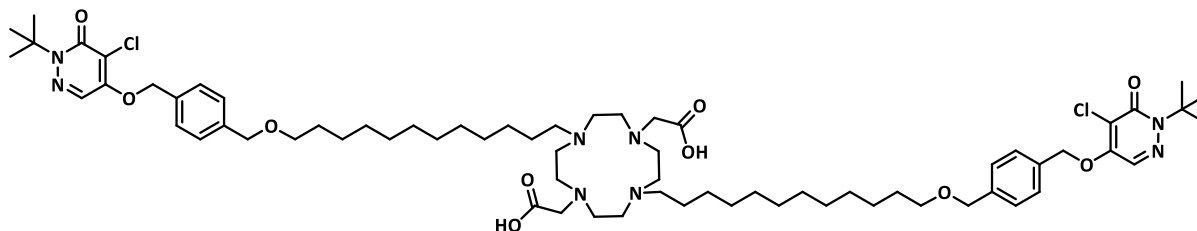
¹H-NMR ((MeOD, 300 MHz) δ (ppm)): 8,11 (s, 2H, N=C-H); 7,42 (dd, *J* = 9 Hz, 8H, Ar); 5,42 (s, 4H, O-CH₂-Ar); 4,51 (s, 4H, Ar-CH₂-O); 3,54 - 3,50 (m, 4H, O-CH₂-alkyl); 3,47 - 3,34 (m, 8H, CH₂-CO₂H, N-CH₂-CH₂-N); 3,28 - 2,96 (m, 12H, N-CH₂-CH₂-N); 1,87 - 1,72 (m, 4H, N-CH₂-alkyl); 1,64 (s, 9H, N(CH₃)₃); 1,52 - 1,35 (m, 16H, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N)

¹³C-NMR ((MeOD, 75 MHz) δ (ppm)): 17,44; 18,66; 24,43; 26,90; 27,39; 28,17; 30,46; 50,06; 51,64; 54,35; 55,66; 67,66; 71,41; 72,93; 73,47; 118,19; 127,61; 128,81; 129,20; 135,97; 140,55; 155,95; 160,92; 175,54

MS (LCMS) *m/z*: 1097,2; 1098,2; 1099,2; 1000,2; 1001,3 [M+H]⁺

di-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivat VN160.MZ

2,2'-(4,10-bis(12-(4-((1-tert-Butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyloxy)-dodecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 69



t_R : 13,2 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 90 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 13 min, 3 mL/min); 33 %

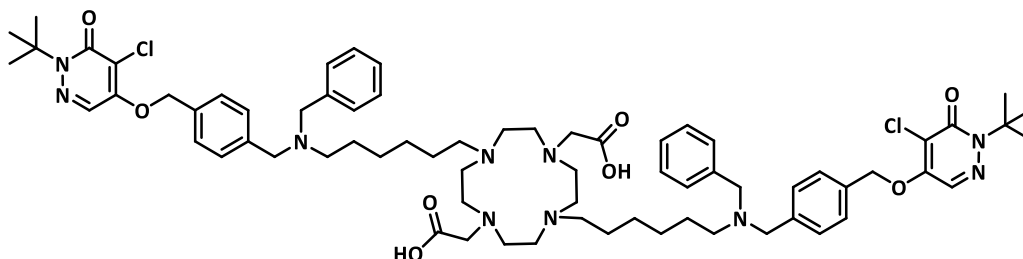
¹H-NMR ((MeOH, 300 MHz) δ (ppm)): 8,10 (s, 2H, N=C-H); 7,42 (q, *J* = 9 Hz, 8H, Ar); 5,42 (s, 4H, O-CH₂-Ar); 4,51 (s, 4H, Ar-CH₂-O); 3,51 - 3,49 (m, 8H; O-CH₂-alkyl; CH₂-CO₂H); 3,42 - 3,35 (m, 6H, N-CH₂-CH₂-alkyl); 3,28 - 2,98 (m, 16H, N-CH₂-CH₂-N); 1,84 - 1,72 (m, 4H, O-CH₂-CH₂); 1,63 (s, 18H, N(CH₃)₃); 1,63 - 1,55 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-CH₂); 1,42 - 1,23 (m, 30H, O-CH₂-CH₂-(CH₂-CH₂)₇-CH₂-CH₂-N)

^{13}C -NMR ((MeOD, 75 MHz) δ (ppm)): 24,60; 27,24; 27,66; 28,18; 30,32; 30,50; 30,56; 30,65; 40,35; 50,03; 51,62; 54,17; 55,80; 67,58; 71,45; 72,84; 73,39; 118,14; 127,52; 128,68; 129,21; 136,09; 140,57; 155,89; 160,97; 175,40

MS (ESI) m/z : 1265,69; 1267,70; 1269,73 $[\text{M}+\text{H}]^+$

di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆-DO2A-Derivat VN214.MZ

2,2'-(4-(6-(Benzyl(4-((1-*tert*-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyl)-amino)hexyl)-10-(5-(benzyl(4-((1-*tert*-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyl)amino)pentyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 68



t_R : 13,0 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA \rightarrow 90 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 13 min, 3 mL/min); 37 %

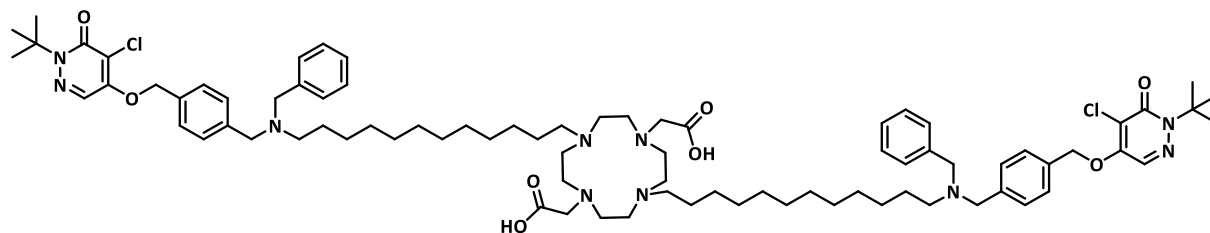
^1H -NMR ((MeOD₄, 600 MHz) δ (ppm)): 8,14 (s, 2H, N=C-H); 7,6 (dd, $J = 8$ Hz, 4H, Ar); 7,57 (dd, $J = 8$ Hz, 4H, Ar); 7,49 (s, 10H, Ar); 5,48 (s, 4H, N-CH₂-Ar); 4,40 (d, 8H, Ar-CH₂-N); 3,47 (s, 4H, CH₂-CO₂H); 3,43 - 3,35 (m, 8H, N-CH₂-alkyl); 3,22 - 3,15 (m, 8H, N-CH₂-CH₂-N); 3,10 - 3,00 (m, 8H, N-CH₂-CH₂-N); 1,88 - 1,80 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-alkyl); 1,79 - 1,70 (m, 4H, N-CH₂-alkyl); 1,64 (s, 9H, N(CH₃)₃); 1,39 - 1,27 (m, 10H, N-CH₂-alkyl)

^{13}C -NMR ((MeOD₄, 100 MHz) δ (ppm)): 24,05; 24,25; 26,85; 27,07; 28,15; 50,16; 51,73; 53,37; 54,85; 55,24; 57,77; 58,29; 67,74; 72,39; 117,21; 118,26; 119,15; 127,52; 129,52; 130,49; 130,83; 131,24; 132,22; 132,71; 138,92; 155,86; 160,92; 175,51

MS (ESI) m/z : 1275,6887; 1277,6887; 1279,7036; 1276,6949; 1278,6960; 1280,6986 $[\text{M}+\text{H}]^+$
berechnet C₇₀H₉₆Cl₂N₁₀O₈: 1274,6860 $[\text{M}+\text{H}]^+$

di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₁₂-DO2A-Derivat VN219.MZ

2,2'-(4,10-bis(12-(Benzyl(4-((1-tert-butyl-5-chloro-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-4-yloxy)methyl)-benzyl)amino)dodecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diyl)diessigsäure 70



t_R : 11,0 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 90 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 13 min, 3 mL/min); 41 %

¹H-NMR ((MeOD₄, 600 MHz) δ (ppm)): 8,12 (2, 1H, N=C-H); 7,61 (d, *J* = 6 Hz, 4H, Ar); 7,53 (d, *J* = 6 Hz, 4H, Ar); 7,50 - 7,45 (m, 10H, Ar); 5,49 (s, 2H, N-CH₂-Ar); 4,40 (d, *J* = 6 Hz, 8H, Ar-CH₂-N); 3,50 - 3,30 (m, 8H, CH₂-CO₂H; N-CH₂-CH₂-CH₂-alkyl); 3,21 - 3,01 (m, 16H, N-CH₂-CH₂-N); 1,81 - 1,71 (m, 8H, N-CH₂-CH₂-CH₂-alkyl); 1,63 (s, 18H, N(CH₃)₃); 1,39 - 1,20 (m, 32H, N-CH₂-CH₂-CH₂-alkyl)

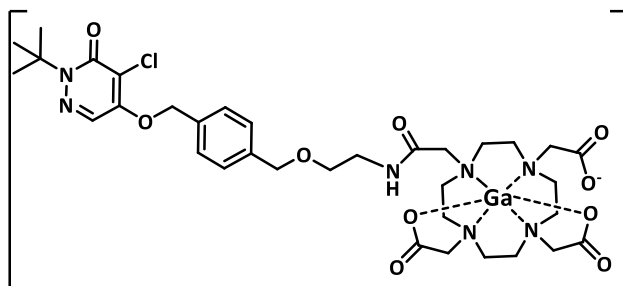
¹³C-NMR ((MeOD₄, 150 MHz) δ (ppm)): 23,01; 26,22; 26,72; 28,64; 28,92; 29,06; 29,11; 29,31; 39,01; 48,82; 50,09; 51,68; 54,12; 55,18; 56,65; 57,07; 66,34; 70,96; 118,04; 126,08; 128,13; 129,03; 129,93; 130,73; 131,25; 137,67; 154,46; 159,94; 174,89

MS (ESI) *m/z*: 1443,8785; 1444,8937; 1145,8812; 1446,8833; 1447,8992 [M+H]⁺, berechnet C₈₂H₁₂₀Cl₂N₁₀O₈: 1443,8063 [M+H]⁺

4.3. Synthese der inaktiven Komplexe

GaCl₃ wurde in 50-fachem Überschuss in einer MeOH/H₂O-Mischung 3:1 (1 mL) gelöst und mit 0,1 M NaOH auf pH 3 eingestellt. Der jeweilige Markierungsvorläufer (2 – 5 mg) wurde in H₂O (0,2 mL) gelöst und zu der GaCl₃-Lösung addiert. Die Mischung wurde 2 - 8 h bei 95°C erhitzt und mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt. Der inaktive Komplex wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ga-VN68.MZ

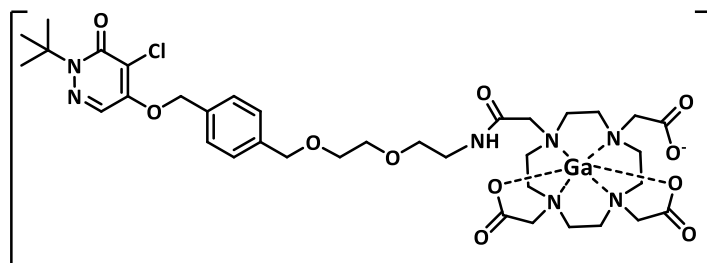


t_R : 15,6 min (20 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA → 80 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA in 15 min, 3,3 mL/min); 21 %

¹H-NMR ((MeOD₄, 600 MHz) δ (ppm)): 8,13 (s, 1H, N=C-H); 7,46 (d, $J = 6$ Hz, 2H, Ar); 7,42 (d, $J = 6$ Hz, 2H, Ar); 5,50 (s, 1H, O-CH₂-Ar); 5,44 (s, 1H, O-CH₂-Ar); 4,55 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 4,02 - 3,91 (m, 4H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,82 (s, 2 H, CH₂-CO₂H); 3,81 (s, 2 H, CH₂-CO₂H); 3,77 (s, 1 H, CH₂-CO₂H); 3,59 - 3,57 (m, 2H, CH₂-CO₂H); 3,47 - 3,31 (m, 16H, N-CH₂-CH₂-N); 1,64 (s, 9H, N(CH₃)₃)

MS (ESI) m/z : 818,2394; 820,2407; 822,2446 [M+H]⁺; berechnet C₃₄H₄₇ClGaN₇O₁₀: 817,2329

Ga-VN73.MZ

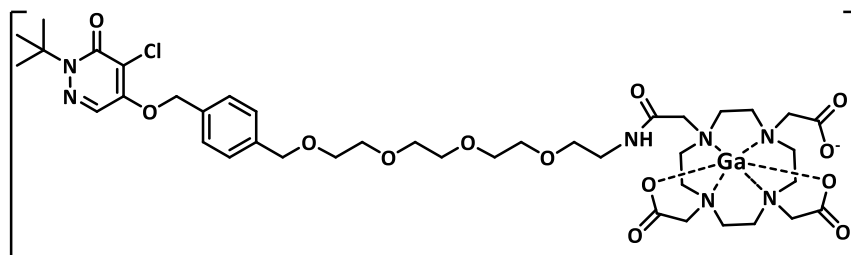


t_R : 20,9 min (20 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA → 90 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA in 18 min, 3 mL/min); 27 %

¹H-NMR ((MeOD₄, 600 MHz) δ (ppm)): 8,15 (s, 1H, N=C-H); 7,52 (d, $J = 6$ Hz, 2H, Ar); 7,46 (d, $J = 6$ Hz, 2H, Ar); 5,52 (s, 1H, O-CH₂-Ar); 5,48 (s, 1H, O-CH₂-Ar); 4,60 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 4,09 - 3,89 (m, 4H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,82 (s, 2H, CH₂-CO₂H); 3,79 (s, 2H, CH₂-CO₂H); 3,72 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH=CO); 3,67 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH=CO); 3,65 - 3,58 (m, 2H, CH₂-CO₂H); 3,46 - 3,38 (m, 16H, N-CH₂-CH₂-N); 1,66 (s, 9H, N(CH₃)₃)

MS (ESI) m/z : 862,32; 864,33 866,32 [M+H]⁺; 884,31; 886,31; 888,31 [M+Na]⁺ berechnet C₃₆H₅₁ClGaN₇O₁₁: 861,2591

Ga-VN79.MZ

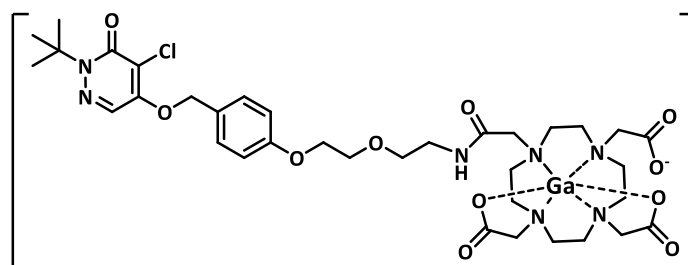


t_R : 21,9 min (20 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA → 90 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA in 18 min, 3 mL/min); 31 %

¹H-NMR ((MeOD₄, 600 MHz) δ (ppm)): 8,17 (s, 1H, N=C-H); 7,50 (d, *J* = 6 Hz, 2H, Ar); 7,46 (d, *J* = 6 Hz, 2H, Ar); 5,54 (s, 1H, O-CH₂-Ar); 5,47 (s, 1H, O-CH₂-Ar); 4,60 (s, 2H, Ar-CH₂-O-CH₂); 4,02 - 3,92 (m, 4H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂); 3,81 (s, 2H, CH₂-CO₂H); 3,79 (s, 2H, CH₂-CO₂H); 3,74 - 3,58 (m, 12H, Ar-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH=CO); 3,65 - 3,58 (m, 2H, CH₂-CO₂H); 3,43 - 3,31 (m, 16H, N-CH₂-CH₂-N); 1,66 (s, 9H, N(CH₃)₃)

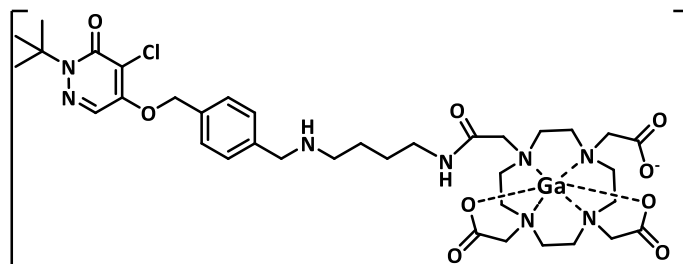
MS (ESI) *m/z*: 950,3183; 951,3211; 952,3245; 954;3328 [M+H]⁺; berechnet C₄₀H₅₉ClGaN₇O₁₃: 949,3115

Ga-VN94.MZ



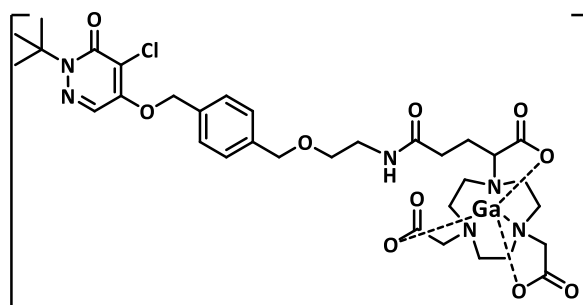
t_R : 23,4 min (20 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA → 90 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA in 18 min, 3 mL/min); 24 %

MS (ESI) *m/z*: 848,31; 849,32; 849,32; 850,31; 851,32; 852,32 [M+H]⁺, berechnet C₃₅H₄₉ClGaN₇O₁₁: 847,2434

Ga-VN110.MZ

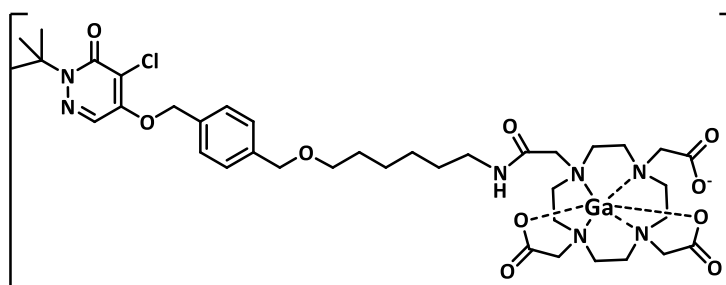
t_R : 14,5 min (20 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA → 90 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA in 18 min, 3 mL/min); 29 %

MS (ESI) m/z : 845,35; 846,35; 847,34; 848,35; 849,34 [M+H]⁺

Ga-VN108.MZ

t_R : 12,5 min (20 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA → 90 % MeOH/H₂O; 0,1 % TFA in 18 min, 3 mL/min); 32 %

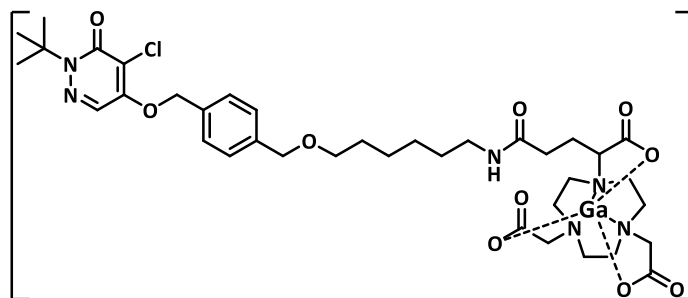
MS (ESI) m/z : 790,78; 791,28; 791,78 [M+H]⁺

Ga-VN143.MZ

t_R : 14,5 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 50 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 12 min, 3 mL/min); 36 %

MS (LCMS) m/z : 874,0; 875,0; 876,0 [M+H]⁺

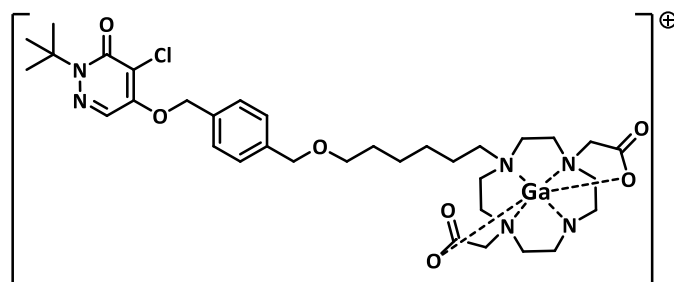
Ga-VN213.MZ



t_R : 12,0 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 40 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 15 min, 3 mL/min); 43 %

MS (ESI) m/z: 848,46; 849,47; 850,46; 851,46; 852,46 [M+H]⁺

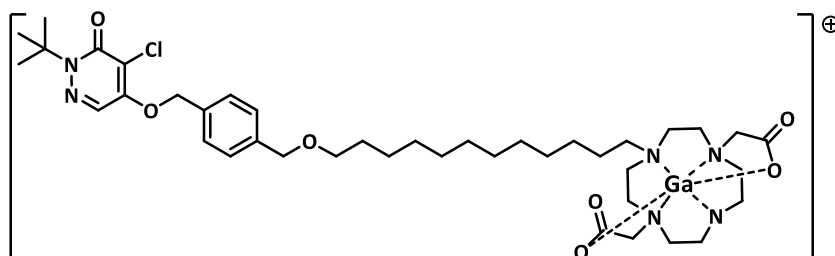
Ga-VN195.MZ



t_R : 15,0 min (20 % MeCN/H₂O 0,1 % TFA → 50 % MeCN/H₂O 0,1 % TFA in 12 min, 3 mL/min); 29 %

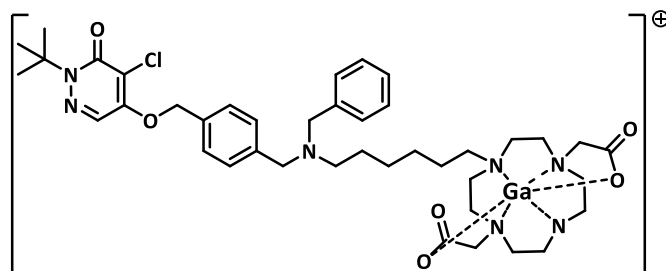
MS (ESI) m/z: 848,46; 849,47; 850,46; 851,46; 852,46 [M+H]⁺

Ga-VN167.MZ



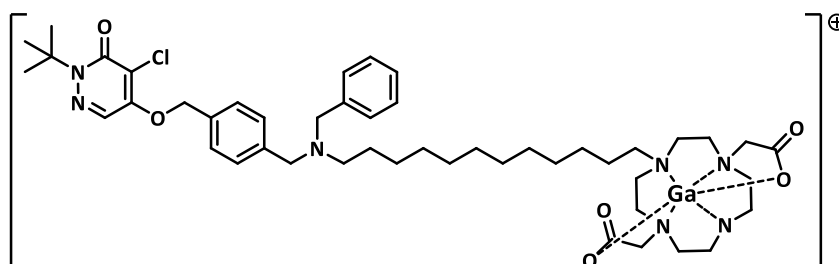
t_R : 22,0 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 50 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 17 min, 3 mL/min); 37 %

MS (LCMS) m/z: 843,2; 844,1; 845,2; 846,0 [M+H]⁺

Ga-VN223.MZ

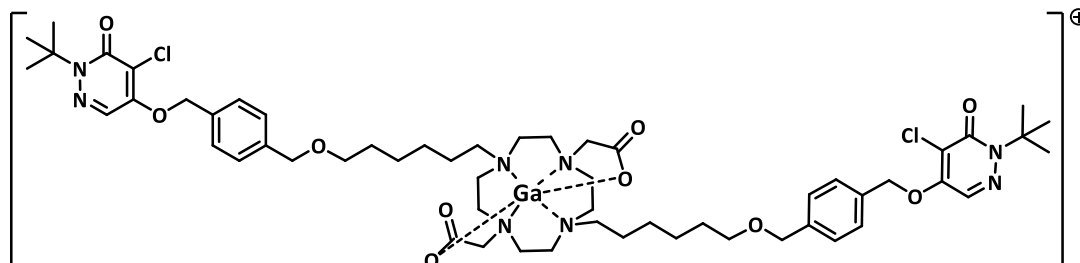
t_R : 11,0 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 50 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 12 min, 3 mL/min); 33 %

MS (ESI) m/z : 848,46; 849,47; 850,46; 851,46; 852,46 [M+H]⁺

Ga-VN189.MZ

t_R : 12,0 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 30 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 13 min, 3 mL/min); 38 %

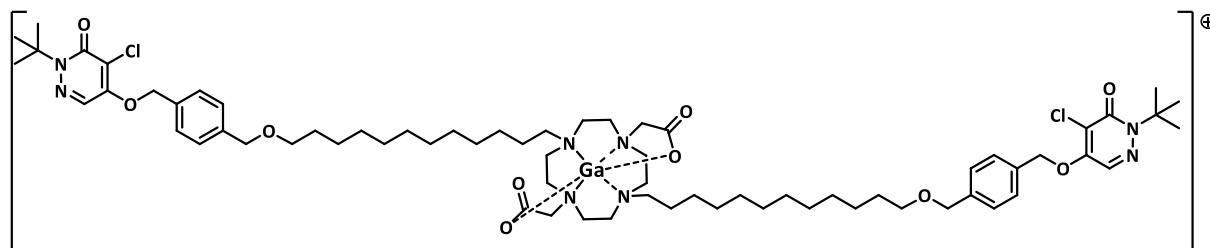
MS (LCMS) m/z : 932,2; 933,2; 934,1; 935,2 [M+H]⁺

Ga-VN165.MZ

t_R : 24,0 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 50 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 17 min, 3 mL/min); 31 %

MS (LCMS) m/z : 1163,2; 1164,2; 1165,2; 1166,1; 1167,2 [M+H]⁺

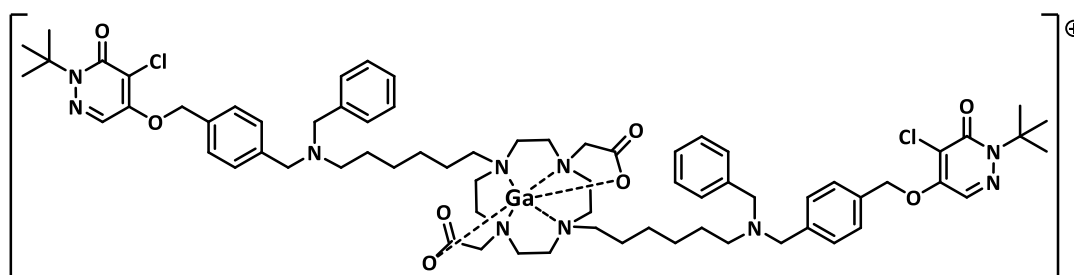
Ga-VN160.MZ



t_R : 22,3 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 30 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 17 min, 3 mL/min); 28 %

MS (LCMS) m/z : 1131,4; 1332,4; 1333,3; 1334,4; 1335,3 [M+H]⁺

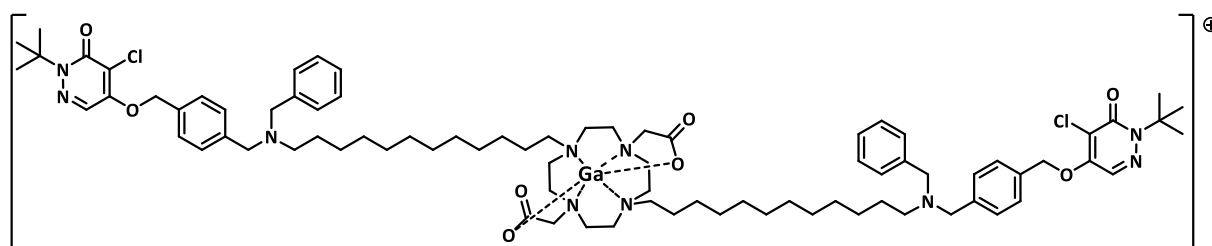
Ga-VN214.MZ



t_R : 15,6 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 50 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 10 min, 3 mL/min); 28 %

MS (LCMS) m/z : 671,2; 672,2; 673,1 [M+2H]²⁺

Ga-VN219.MZ



t_R : 10,6 min (20 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA → 90 % MeCN/H₂O; 0,1 % TFA in 16 min, 3 mL/min); 28 %

MS (ESI) m/z : 1511,77; 1512,77; 1513,78; 1514,78; 1515,79; 1516,79 [M+H]⁺; 755,37; 755,88; 756,35; 756,86; 757,37; 757,88; 758,39; 758,90 [M+2H]²⁺

4.4. ^{68}Ga -Markierungen

- Allgemein:

^{68}Ga wurde für die radioaktiven Markierungen aus der Elution nach dem Standardverfahren des $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators gewonnen und durch das Kationenaustauscher-basierte Post-Processing nach Zernosekov et al.³⁵ aufgereinigt. Zur Entfernung störender Fremdmetalle wurde der Austauscher zunächst mit 1 mL N1 (80 % Aceton/ 0,15 M HCl) gewaschen. Die Elution des ^{68}Ga erfolgte durch 400 μL N2 (97,6 % Aceton/0,05 M HCl).

Für die konventionelle Markierung der DOTA/NODAGA-Derivate wurden 400 μL HEPES-Puffer (0,1 M; pH 7) und 400 μL N2 im Eppendorfgefäß zunächst 1 min bei Reaktionstemperatur vortemperiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe der X μL Verbindung (1 mg/mL) gestartet und im Thermomixer über die Reaktionszeit hinweg geschüttelt. Zur Markierung der DO2A-Derivate kam die mikrowellengestützte Radiomarkierung zum Einsatz. Hierbei wurden 400 μL HEPES-Puffer, 400 μL N2 und der Markierungsvorläufer im geschlossenen Reaktionsvial vorgelegt und in der Mikrowelle (1 min Ramp, 150°C, 300 W, 1 min) erhitzt.

- Markierungsoptimierung:

Die Radiomarkierung mit ^{68}Ga wurde hinsichtlich Temperatur, pH, und Vorläufermenge optimiert. Hierfür erfolgte die Markierung nach oben beschriebenem Verfahren. Reaktionskinetiken wurden durch die Entnahme von Aliquots nach 1, 3, 5, 7, 10, 15 min aufgenommen und mittels Radio-DC analysiert.

- Aufreinigung mittels Festphasenextraktion:

Das Abtrennen von freiem ^{68}Ga aus der Markierlösung erfolgte mittels Festphasenextraktion. Die Pufferlösung wurde auf einer konditionierten Strata X fixiert. Elution mit 1 mL Wasser entfernte freies ^{68}Ga . Das Produkt wurde mit 0,5 mL EtOH eluiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels konnte der aufgereinigte Komplex weiter verwendet werden.

4.5. *In vitro*-Evaluierungen

4.5.1. Lipophiliebestimmungen ⁶⁸Ga-markierten Pyridaben-Chelat-Strukturen

Um die Polarität der ⁶⁸Ga-markierten Komplexe zu evaluieren, wurde mit der „shake flask-Methode“ der Verteilungsquotient log D zwischen Octanol/PBS-Puffer ermittelt.¹¹⁸

Der Komplexe wurde nach dem Standardverfahren synthetisiert und aufgereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde die markierte Verbindung in Octanol bzw. PBS-Puffer aufgenommen und in 4 Eppendorfgefäße (V1-V4) zu jeweils ca. 10 MBq aufgeteilt. Jedes Gefäß wurde auf einen Inhalt von 700 µL Octanol und 700 µL PBS-Puffer gebracht. Die Durchmischung erfolgte mittels Thermomixer (1500/s). Nach Phasentrennung bei 12000 U/s wurden 3 µL der Octanolphase auf ein Papier aufgetragen. 400 µL der Octanolphase aus V1 wurden in das neue Gefäß (1O1) überführt, 400 µL Mischphase verworfen und 3 µL der Pufferphase analog zu der Octanolphase aufgetragen. 400 µL PBS-Puffer wurde in das Gefäß 1W1 überführt. Sowohl die 1O1 als auch die 1W1 Fraktion wurden im Curiemeter vermessen. Zudem wurden die Papier-Aliquots mit dem Instant Imager ausgewertet. Die Phase mit der größeren Aktivitätsmenge wurde für den nächsten Extraktionszyklus (1.Rückextraktion) eingesetzt.

Analog wurde mit V2-V4 verfahren. Die erste Extraktion spielte für die Auswertung keine Rolle. Nur die Ergebnisse der ersten und zweiten Rückextraktion wurden zur Lipophiliebestimmung berücksichtigt.

4.5.2. Bestimmungen der *in vitro*-Stabilitäten

Die Bestimmung der *in vitro*-Stabilitäten der ⁶⁸Ga-Pyridaben-Komplexe wurde nach dem Verfahren von Feller et al. durchgeführt.¹¹⁸ Jeweils 20 µL der aufgereinigten Verbindungen wurden bei 37°C im Thermomixer in 400 µL 0,9 %iger NaCl-Lösung, 400 µL EtOH, 400 µL Apo-Transferrin (1mg/mL PBS-Puffer) und 400 µL humanem Serum (Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen) inkubiert. Aliquots wurden nach 0, 15, 30, 45, 60 und 80 min entnommen und per Radio-DC (0,1 M Citratpuffer pH 4) analysiert. Ebenso erfolgte eine Kontrolle mittels HPLC.

4.5.3. *In vitro*-Enzymaktivitätsbestimmungen

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte der inaktiven Ga-Pyridaben-Komplexe erfolgte an Rinder-SMPs, die nach bekanntem Verfahren hergestellt wurden.¹¹⁹ Es wurde sowohl die NADH-Oxidation als auch die NADH-Q₁-Aktivität ermittelt (n = 3). Bei einer Wellenlänge von 340 – 400 nm wurde die NADH-Oxidation mit einem Tecan infinite M200 Pro (96-well Mikrotiterplatte; Greiner, #655101, 200 µL Messvolumen) bei 30°C innerhalb von 3,40 min aufgezeichnet. Zur Berechnung wurde die Schichtdicke von 0,63 verwendet. Die zu analysierenden Ga-Pyridaben-Komplexe wurden in DMSO/EtOH gelöst (5 mM). In 1 mL MOPS-Puffer (20 mM Na-MOPS, 50 mM NaCl, pH 7,4) wurden 3,66 µL SMP gelöst. Der Reaktionspuffer bestand aus 150 µM NADH in MOPS-Puffer.

Zur Bestimmung der NADH-Oxidation (Komplex I, II und IV) wurde 70 M Q₁ (1,4 µL; 10 mM) zusammen mit 50 µL SMP (25 µg/mL) vorgelegt. Nach Addition der zu testenden Ga-Pyridaben-Komplexe (2 µL) in den Konzentrationen 0, 1, 2, 4, 6, 10 und 20 µM wurde die Reaktion durch

Zugabe von 148 µL Reaktionspuffer (112 µM NADH) gestartet. Alle 13 s erfolgte die Bestimmung der NADH-Oxidation.

Um die NADH-Q₁-Aktivität zu ermitteln, wurde analog der Bestimmung der NADH-Oxidation vorgegangen. Der eingesetzte Reaktionspuffer enthielt allerdings zusätzlich 2 mM KCN als Inhibitor des MC IV. Somit war eine selektive Analyse des MC I möglich. Durch Auftragung der erhaltenen Enzymaktivitäten gegen die Konzentration der Testsubstanzen konnten die IC₅₀-Werte bestimmt werden.

4.6. Biologische Evaluierungen

4.6.1. *In vivo*-µ-PET-Untersuchungen

Für die µ-PET-Untersuchungen wurden ca. 290 g schwere männliche Sprague Dawley Ratten verwendet. Sowohl [⁶⁸Ga]VN160.MZ als auch [⁶⁸Ga]VN167.MZ wurde mit n=3 evaluiert. Das Narkosemittel bestand aus einem 2%igen Isofluran-Sauerstoffgemisch. Die Applikation des Radio-tracers erfolgte intravenös über die Schwanzvene in Form einer Bolusinjektion. Die ⁶⁸Ga-Markierung von VN160.MZ und VN167.MZ erfolgte analog 4.4. Da die radiochemische Ausbeute > 98 % betrug, konnte nach Abdampfen des Acetons die Markierlösung ohne weitere Aufreinigungsschritte verwendet werden. Isotonische Kochsalzlösung wurde zum Verdünnen eingesetzt, sodass ein Injektionsvolumen von 0,6 – 0,8 mL vorlag. Es wurde ca. 0,1 v% Ethanol zugesetzt, da ansonsten ein Teil der Aktivität in der Spritze zurückblieb. Für [⁶⁸Ga]VN167.MZ wurden 21,10 ± 3,75 MBq injiziert, wobei im Schnitt 10,42 ± 1,19 MBq in der Spritze auf Grund der hohen Lipophilie verblieb. 23,58 MBq ± 1,26 injizierte Aktivität pro Tier wurde bei VN160.MZ eingesetzt. In der Spritze hafteten 6,07 ± 1,95 MBq nach erfolgter Applikation. Der Injektion folgte eine Spülung mit 200 µL heparinierter Kochsalzlösung.

Während der Untersuchung befanden sich die Tiere auf dem Rücken liegend mit dem Kopf zuerst positioniert (head-first-suspine position). Zunächst erfolgte eine Transmissionsmessung (15 min) unter Verwendung einer externen ⁵⁷Co-Quelle. Anschließend wurde für 60 min ein dynamischer Scan des Thorax sowie eine Ganzkörperaufnahme innerhalb von 15 min erstellt.

Die Auswertung der Daten erfolgte anhand der Software PMOD (PMOD Technologies LTD), wobei das Herz mit den dazugehörigen Volumes of Interest (VOIs) manuell erstellt wurde.

Aus den erhaltenen Daten konnten die Standardized Uptake Values (SUVs) kalkuliert werden:

$$\text{SUV} = \left(\text{Aktivität VOI} \left[\frac{\text{Bq}}{\text{mL}} \right] \times \text{Körpergewicht} [\text{g}] \right) \times \text{inj. Dosis} [\text{Bq}]$$

Formel 4: Berechnung der SUV-Werte

4.6.2. *Ex vivo*-Biodistributionen

Um eine genaue Organverteilung der MPI-Tracer aufstellen zu können, wurden Biodistributionen ($n=3$) mit den bereits für μ -PET-Untersuchungen verwendeten Verbindungen [^{68}Ga]VN160.MZ und [^{68}Ga]VN167.MZ vorgenommen. Zusätzlich erfolgte eine Biodistribution an [^{18}F]Flurpiridaz, um eine Vergleichbarkeit der Daten gewährleisten zu können. 290 g schwere Sprague Dawley Ratten wurden für die Versuche eingesetzt. Es wurden sowohl für 10 min als auch für 60 min Daten erstellt. Für die 10 min Biodistribution von [^{68}Ga]VN167.MZ erfolgte die Injektion von $8,25 \pm 1,79$ MBq. $15,65 \pm 3,69$ MBq wurden für die 60 min Biodistributionsuntersuchungen injiziert. Bei [^{68}Ga]VN160.MZ waren $7,92 \pm 2,25$ MBq für 10 min und $17,39 \pm 0,56$ MBq für 60 min die injizierten Aktivitätsmengen. Jeweils 10 bzw. 60 min nach Tracer-Applikation erfolgte die Tötung der Tiere, die zu untersuchenden Organe (Lunge, Leber, Milz, Niere, Muskel, Herz, Blut) wurden entnommen und das Gewicht der entnommenen Probe ermittelt. Die Bestimmung der Gewebeaktivität wurde mit einem automatischen Gamma-Counter durchgeführt. Errechnet wurde die Gewebesdosis in %, bezogen auf die gesamtinjizierte Dosis, so dass die erhaltenen Werte in %ID/g angegeben werden konnten.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Innerhalb dieser Arbeit konnten 16 neue makrozyklische MPI-Tracer auf Pyridaben-Basis hergestellt werden, die eine ^{68}Ga -Markierung erlauben. Die erhaltenen Verbindungen setzen sich aus einem makrozyklischen Chelator, einem Linker und dem derivatisierten Pyridaben als TV zusammen. Um Struktur-Affinitätsbeziehungen der synthetisierten Verbindungen zum MC I aufstellen zu können, erfolgten systematische Variationen der einzelnen Bestandteile. Diese bestanden aus:

1. dem Einsatz unterschiedlicher makrozyklischer Chelatoren:
Zum einen wurden DOTA- und NODAGA-NHS-Ester verwendet. Eine direkte Kopplung eines Pyridaben-Amin-Derivats war selektiv ohne nachfolgende Syntheseschritte möglich. Durch Koordination des ^{68}Ga konnten neutrale Komplexe erhalten werden. Zum anderen erfolgte die Synthese von DO2A-(OMe)₂, da eine basische Spaltung der Esterfunktion zur freien Carbonsäure für die Stabilität des Pyridabens erforderlich war. Die zwei sekundären Ring-Stickstoffe ermöglichten eine Einführung des TVs über eine Alkylierung mit den entsprechenden Pyridaben-Bromid-Derivaten. Eine Komplexierung des ^{68}Ga resultierte hier in einer positiven Komplexladung. Es konnten 6 unterschiedliche Pyridaben-DOTA- und 2 verschiedenen Pyridaben-NODAGA-Strukturen erhalten werden.
2. der Verwendung variabler Linker-Strukturen:
Ein Abstand zwischen den Chelator und TV in Form eines Linkers sollte die Affinität der Gesamtstruktur gegenüber dem MC I erhalten. Die verwendeten Mono-, Di- und Tetraethylenglykole generierten einen hydrophilen Molekülcharakter. Um lipophile Verbindungen zu erhalten, wurden sowohl Hexyl- als auch Dodecyl-Linker eingesetzt. Somit konnte der Einfluss der Linkerlänge sowie der Polarität der Verbindungen auf die MC I-Affinität anhand der erhaltenen Pyridaben-Bn-O-PEG- und Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-Derivate evaluiert werden.
3. der Variation des Heteroatoms zwischen Pyridaben-Einheit und Linker:
Die Originalstruktur des Pyridabens enthält einen Schwefel als Heteroatom zwischen der Pyridaben-Benzyl und Alkylrest. Da der Austausch gegen ein Stickstoff- oder Sauerstoff-Atom an dieser Stelle keinen Einfluss auf die Affinität hat, jedoch zu stabileren Verbindungen führt, wurden sowohl Pyridaben-Bn-O-Alkyl- als auch Pyridaben-Bn-N(Bn)-Alkyl-Derivate synthetisiert.
4. Unterschiedliche Kopplungsreaktionen zwischen Chelator und TV:
Für die Kopplung zwischen dem DOTA- und NODAGA-NHS-Ester wurden die Pyridaben-Bn-O-PEG-Hydroxyl-Derivate in primäre Amine überführt und zu Amiden umgesetzt. Die Reaktion der Pyridaben-Bn-O-Alkyl- und Pyridaben-Bn-N(Bn)-Alkyl-Bromid-Derivate mit DO2A-(OMe)₂ ergaben mono- und di-alkylierte Verbindungen. Der Einfluss von multivalenten Strukturen auf die MC I-Affinität konnte anhand der mono- und di-Pyridaben-Bn-O-Alkyl-DO2A- sowie mono- und di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-Alkyl-DO2A-Derivate evaluiert werden.

Die ^{68}Ga -Markierung der erhaltenen 16 makrozyklischen Pyridaben-Chelat-Strukturen wurde hinsichtlich Temperatur, pH-Wert der Reaktionslösung, Vorläufermenge und Reaktionszeit optimiert.

Bei 95°C im Thermomixer konnten alle Pyridaben-DO2A-Derivate mit Ausbeuten > 95 % innerhalb 15 min bei geringem Vorläufereinsatz von 6 – 19 nmol markiert werden. Um vergleichbare Ausbeuten für die Pyridaben-DO2A-Derivate erzielen zu können, wurde eine mikrowellengestützte Reaktionsführung gewählt. Dadurch ließen sich die Pyridaben-DO2A-Derivate mit 5 nmol innerhalb 1 min bei 150°C (1 min Ramp, 300 W) mit Ausbeuten > 95 % markieren. Die ⁶⁸Ga-Markierung wurde bezüglich Linkerlänge, eingesetztes Heteroatom sowie Mono- und Dimer-Struktur bei 95°C im Thermomixer untersucht: Der Dodecyl-Linker, der Sauerstoff als Heteroatom und die dimere Struktur resultierten jeweils in niedrigeren Markierungsausbeuten.

Die ⁶⁸Ga-markierten Verbindungen waren über 80 min in Ethanol, humanem Serum und isotonischer Kochsalzlösung stabil.

Mittels der „shake flask-Methode“ wurden die Lipophilien der ⁶⁸Ga-markierten Verbindungen bestimmt. Die Pyridaben-PEG-DO2A/NODAGA-Verbindungen sind hydrophil (log D = -1,90 - -0,4), wohingegen die Pyridaben-Bn-O-Alkyl-DO2A und-Pyridaben-Bn-N(Bn)-Alkyl-DO2A-Derivate lipophil (log D = 0,78 – 1,91) sind.

Durch Synthese der inaktiven Referenzverbindungen konnte in Rinder-SMPs die Affinität zum MC I bestimmt werden. Alle makrozyklischen Pyridaben-Strukturen besaßen Affinitäten im μ-molarem Bereich. Die IC₅₀-Werte der Ga-Pyridaben-PEG-DO2A/NODAGA-Verbindungen lagen zwischen 45 und 33 μM, die der Pyridaben-Bn-O-Alkyl- und-Pyridaben-Bn-N(Bn)-Alkyl-Derivate zwischen 8 und 1 μM. Folglich konnte die erhöhte Lipophilie durch Verwendung von Alkyl-Linkern eine Steigerung der Affinität zum MC I um eine Größenordnung bewirken. Ga-mono- und di-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivate konnten als potenteste Verbindungen identifiziert werden und wurden in gesunden Sprague-Dalwey Ratten evaluiert.

In vivo-μ-PET-Untersuchungen sowie *ex vivo*-Biodistributionen nach 10 und 60 min erfolgten mit n = 3. Der SUV_{Herz} des ⁶⁸Ga-mono-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivats [⁶⁸Ga]VN167.MZ lag nach 60 min bei 1,15 ± 0,08, wohingegen das ⁶⁸Ga-di-Pyridaben-Bn-O-C₁₂-DO2A-Derivat [⁶⁸Ga]VN160.MZ bereits nach 8 min vollständig ausgewaschen war. [⁶⁸Ga]VN167.MZ zeigte einen renalen und hepato-biliaeren Ausscheidungsweg; [⁶⁸Ga]VN160.MZ hingegen zeigte eine ausschließliche Anreicherung in Leber und Milz.

[⁶⁸Ga]VN167.MZ und [⁶⁸Ga]VN160.MZ mit Affinitäten im μ-molaren Bereich konnten eine Akkumulation im Herzen bewirken. Der schnelle wash-out und die diffuse Verteilung sprechen allerdings für eine perfusions-basierte Anreicherung. Daher ist es zunächst notwendig, weitere Studien mit anschließenden Optimierungsprozessen an den bereits wirksamen MC I-Inhibitoren vorzunehmen. Diese könnten durch folgende Schritte erzielt werden:

1. Die positive Komplexladung der ⁶⁸Ga-markierten mono- und di-Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-DO2A-Derivate sowie der mono- und di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C₆/C₁₂-DO2A-Derivate sollten mittels Elektrophorese bestätigt werden.
2. Bisher wurden die MC I-Affinitäten in Rinderherz-SMPs bestimmt. Hier liegen die aktiven Komplexe in inaktiven Mitochondrien vor. Daher wäre die Verwendung von intakten Mitochondrien, die über das Membranpotential verfügen, interessant. Somit könnte eine Evaluierung, ob die Verbindungen in der Lage sind, eine intakte Mitochondrienmembran zu überwinden, getestet werden.

3. Die selektive Aufnahme von [⁶⁸Ga]VN160.MZ sollte analysiert werden. Zum einen sollte durch eine Blocking-Studie mit einem affinen, nicht-radioaktiven MC I-Inhibitor untersucht werden, ob eine Anreicherung des ⁶⁸Ga-Tracers unterbunden werden kann. Zum anderen könnten die MC I-Affinitätstests ebenso an Rinderleber-Mitochondrien durchgeführt werden. Somit wäre es möglich festzustellen, ob unterschiedliche Mitochondrienarten verschiedene Affinitäten zu den makrozyklischen-Pyridaben-Derivaten aufweisen.
4. Strukturelle Variationen der Pyridaben-Chelat-Verbindungen könnten zur Steigerung der MC I-Affinitäten durch folgende Schritte erzielt werden:
 - Kationische Triphenylphosphonium-Strukturen wurden bereits mehrfach als Radiotracer zur MPI-Diagnostik eingesetzt.^{86,120,121} In Studien konnte gezeigt werden, dass das Einführen einer Methoxy-Funktion am Phenylring die Aufnahme in Mitochondrien fördert. Diese Ethergruppen ähneln den Strukturen der ^{99m}Tc-Derivate Sestamibi und Tetrofosmin.¹²² Eine Alkylierung der mono-Pyridaben-Bn-O-C₆/C₁₂-DO2A-Derivate mit einem entsprechenden Triphenylphosphonium-Bromid könnte die Mitochondrienaufnahme der markozyklischen Pyridaben-Chelat-Strukturen fördern.
 - Die Verwendung anderer Chelatoren für ⁶⁸Ga sollte evaluiert werden. Kleinere Liganden wie das AAZTA besitzen eine geringere sterische Hinderung und könnten bessere Affinitäten zum MC I begünstigen.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

β	Beta
β^+	Positron
%	Prozent
°	Grad
A	Massenzahl
AAZTA	6-[bis(Hydroxycarbonylmethyl)amino]-1,4-bis(hydroxycarbonylmethyl)-6-methyl-perhydro-1,4-diazepin
AQ	Fenazaquin = EL-436
ATP	Adenosiontriphosphat
BAT-TECH	Bis-Aminoethanthiolcyclohexyl
BFC	Bifunktionaler Chelator
BMI	Body Mass Index
BMIPP	β -Methyl-p-iodphenylpentadecansäure
Bn	Benzyl
CbzCl	Benzylchlorformiat
CT	Computertomographie
d	Tag/Duplett
Da	Dalton
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DCP	2- <i>tert</i> -Butyl-4,5-dichloropyridazin-3(2H)-on
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DQA	= SAN 548A
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
E	Energie/Enzym
EN	Elektronegativität
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	et alumni
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDG	Fluor-2-desoxy-D-Glukose
FMN	Flavinmononukleotid
FPER	First-Pass-Extraktionsrate
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HPLC	High-performance liquid chromatography
HS	Humanes Serum
HSAB	Hard and soft acids and bases
IC ₅₀	Halbmaximale Inhibitorkonzentration
ID	Injizierte Dosis
<i>J</i>	Kopplungskonstante
k	Kilo
K	Konventionelle Methode
keV	Kiloelektronenvolt
KHK	Koronare Herzkrankheit
KZ	Koordinationszahl
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LDL	Low-Density Lipoproteine
LI	Lipophiler Index
Log	Dekadischer Logarithmus
log D	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
m	Multipllett
M	Masse/Molarität
MBq	Mega-Becquerel
MC I	Mitochondrien Komplex I
MeV	Megaelektronenvolt
MHz	Mega-Hertz
MI	Molekular Imaging
MIBG	Metaiodbenzylguanidin
min	Minute
Mio	Millionen
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MPI	Myokardperfusions-Imaging
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,-tetrahydropyridin
MRI	Magnetresonanz-Imaging
MRT	Magnetresonanztomographie
MsCl	Mesylchlorid
mSv	Millisievert
MW	Mikrowelle
N	Neutronenzahl
n	Neutron
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NMR	Kernspinresonanz
NODAGA	1,4,7-Triazacyclononan-1-glutarsäure-4,7-diessigsäure
NOTA	1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure
NP	Nebenprodukt
OP	Operation
p	Proton
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronemissionstomographie
pm	Pikometer
Q	Ubichinon
QH ₂	Ubichinol
RCA	Radiochemische Ausbeute
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
S	Substrat
s	Sekunde/Singulett
SMP	Submitochondrial particles
SPECT	Einzelphotonenemissions-Computertomographie
SUV	Standardized uptake value
t	Triplet
t _{1/2}	Halbwertszeit
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMSCI	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TBDPSCI	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilylchlorid
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TRAP	1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-phosphinsäure
TV	Targeting-Vektor
UE	Untereinheit
V	Vial
vs.	versus
W	Watt
WHO	World Health Organization
Z	Ordnungszahl
γ	Gamma
ε	Elektroneneinfang
μm	Mikrometer
ν _e	Neutrino

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Anatomie des Herzens ⁹	3
Abbildung 2:	Entwicklungsstadien der Arteriosklerose ¹⁰	4
Abbildung 3:	Vaskularer Gefäßumbau nach Glagov et al. 1987 ¹³	5
Abbildung 4:	Konventionelle Diagnostik vs. Molekularer Bildgebung während einer KHK-Entwicklung ³	8
Abbildung 5:	Membrantransportmechanismen ¹⁷	9
Abbildung 6:	β^+ -Zerfallsgleichung	10
Abbildung 7:	Koinzidentes Messprinzip der PET ²¹	11
Abbildung 8:	⁶⁸ Ge-Produktion ³²	14
Abbildung 9:	Aufbau eines BFCs ⁴⁰	15
Abbildung 10:	Strukturen von NOTA, NODAGA und DOTA	16
Abbildung 11:	Energiegewinnung von Zellen ⁵⁰	18
Abbildung 12:	Aufbau eines Mitochondriums ⁵¹	18
Abbildung 13:	Die Atmungskette ⁵³	19
Abbildung 14:	Schematisches Model des MC I ⁵⁸	20
Abbildung 15:	Untereinheiten der N- und Q-Module des MC I ⁵⁷	21
Abbildung 16:	Konservierte Reste in der Umgebung der N2-UE ⁷³	22
Abbildung 17:	Bindungsstellen von MC I-Inhibitoren innerhalb der Bindungsdomäne des Enzyms mit charakteristischen Inhibitoren (adapatiert von Okun et al. ⁵⁹)	23
Abbildung 18:	Strukturen von SAN 548 A, Fenazaquin und Pyridaben	23
Abbildung 19:	Struktur von [¹⁸ F]Flurpiridaz	24
Abbildung 20:	Koronale (oben) und sagittale (unten) [¹⁸ F]Flurpiridaz-PET Aufnahmen nach 5 - 15 und 55 - 65 min (links); Biodistribution in Mäusen (n = 4) 60 min nach Injektion (rechts) ⁹¹	24
Abbildung 21:	Vergleich von [¹³ N]NH ₃ und [¹⁸ F]Flurpiridaz bei Ratten mit Okklusion nach 15 min der Tracerinjektion; Pfeile zeigen infarzierte Bereiche an ⁹⁴	25
Abbildung 22:	Pharmakophore Reste des Pyridabens	29
Abbildung 23:	Zielstrukturen: neutrale DOTA- und NODAGA-TV-Komplexe (oben) und einfach positiv geladene mono- und dimere-DO2A-TV-Komplexe (unten)	30
Abbildung 24:	Synthese des DCP 2: a) MnO ₂ , HCl, 60°C, 45 %; b) <i>tert</i> -Butylhydrazinhydrochlorid, Na ₂ CO ₃ , 40°C, 4 h, 59 %	34
Abbildung 25:	Synthese des HB-P2OP-Derivats 13	35
Abbildung 26:	Synthese des Pyridaben-Benzylbromids 16	36
Abbildung 27:	Synthese der Pyridaben-Bn-O-PEG-Hydroxyl-Derivate 17, 18 und 19	37
Abbildung 28:	Synthese der Pyridaben-Bn-O-PEG-Amino-Derivate 28, 29 und 30	38
Abbildung 29:	Synthese des Pyridaben-Bn-N-C ₄ -Amino-Derivats 31	39
Abbildung 30:	Synthese der Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivate VN68.MZ, VN73.MZ, VN79.MZ und VN94.MZ, des Pyridaben-Bn-O-PEG-NODAGA-Derivats VN108.MZ und des Pyridaben-Bn-N-C ₄ -DOTA-Derivats VN.110MZ	40
Abbildung 31:	Synthese des [¹⁹ F]Flurpiridaz 21 und ¹⁸ F-Markierungsvorläufers 20	41
Abbildung 32:	Synthese des DO2A-(OMe) ₂ 40	42
Abbildung 33:	Synthese der Pyridaben-Bn-O-C ₆ /C ₁₂ -Brom-Derivate 41 und 42	43
Abbildung 34:	Synthese des Pyridaben-Bn-O-C ₆ -Amin-Derivats 44	44

Abbildung 35:	Route A: Synthese des Pyridaben-Bn-N-C ₆ -Brom-Derivats 44b mit NP	45
Abbildung 36:	Route B: Synthese des Pyridaben-Bn-N(CBz)-C ₆ -Brom-Derivats 46b	46
Abbildung 37:	Synthese der Pyridaben-Bn-N-C ₆ /C ₁₂ -Brom-Derivate 51 und 52	47
Abbildung 38:	Synthese der Pyridaben-Bn-O-C ₆ -DOTA- und Pyridaben-Bn-O-C ₆ -NODAGA-Derivate VN143.MZ und VN213.MZ	48
Abbildung 39:	Synthese der mono-Pyridaben-O-C ₆ /C ₁₂ -DO2A-(OMe) ₂ -Derivate 55 und 56	49
Abbildung 40:	Synthese der mono-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C ₆ /C ₁₂ -DO2A-(OMe) ₂ -Derivate: 57 und 58	49
Abbildung 41:	Synthese der di-Pyridaben-Bn-O-C ₆ /C ₁₂ -DO2A-(OMe) ₂ -Derivate 59 und 60	50
Abbildung 42:	Synthese der di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C ₆ /C ₁₂ -DO2A-(OMe) ₂ -Derivate 61 und 62	51
Abbildung 43:	Nebenreaktion mit Abspaltungen der Benzylfunktionen der Pyridaben-Bn-N(Bn)-C ₆ /C ₁₂ -DO2A-(OMe) ₂ -Derivate 57, 58 und 61, 62 mit Pd/C	52
Abbildung 44:	Entschützung der Pyridaben-Bn-O-C ₆ /C ₁₂ - und Pyridaben-Bn-N(Bn)-C ₆ /C ₁₂ -DO2A-Derivate mit LiOH	52
Abbildung 45:	pH-Wert Optimierung der ⁶⁸ Ga-Markierung des Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivats VN108.MZ (14 nmol) bei 50°C	53
Abbildung 46:	Einfluss des Puffers auf die ⁶⁸ Ga-Markierung für das Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivat VN108.MZ (14 nmol)	54
Abbildung 47:	Optimierte ⁶⁸ Ga-Markierungsbedingungen der Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivate VN68.MZ, VN73.MZ, VN79.MZ und VN94.MZ sowie der Pyridaben-Bn-O-PEG-NODAGA- und Pyridaben-Bn-N-C ₄ -DOTA-Derivate VN108.MZ und VN110.MZ in 0,1 M HEPES-Puffer pH 7	55
Abbildung 48:	Radio-DC (0,1 M Natriumcitrat-Puffer) einer repräsentativen Kinetik der ⁶⁸ Ga-Markierung von Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA-Derivaten nach 1, 3, 10, 15 min, ⁶⁸ GaCl ₃ ; ⁶⁸ Ga-Pyridaben-Bn-O-PEG-DOTA R _f = 0, ⁶⁸ Ga-Citrat R _f = 9	55
Abbildung 49:	Optimierte ⁶⁸ Ga-Markierungskinetiken der Pyridaben-Bn-O-C ₆ -DOTA- und Pyridaben-Bn-O-C ₆ -NODAGA-Derivate VN143.MZ und VN213.MZ	56
Abbildung 50:	⁶⁸ Ga-Markierungskinetiken des di-Pyridaben-Bn-O-C ₆ -DOTA-Derivats VN165.MZ mit variabler Vorläufermenge bei 95°C	57
Abbildung 51:	⁶⁸ Ga-Markierungskinetiken für das di-Pyridaben-Bn-O-C ₆ -DO2A-Derivat VN165.MZ (5 – 30 nmol) K vs MW bei 95 °C und 150 °C repräsentativ	58
Abbildung 52:	Vergleich der ⁶⁸ Ga-Markierungsausbeuten der Pyridaben-DO2A-Derivate mit verschiedenen Methoden	59
Abbildung 53:	Vergleich der ⁶⁸ Ga-Markierungsausbeuten der mono- und dimeren Pyridaben-DO2A-Derivate (30 nmol, 95 °C, 15 min)	59
Abbildung 54:	⁶⁸ Ga-Markierungskinetiken des mono-Pyridaben-Bn-O-C ₆ -DO2A-Derivats VN195.MZ vs. des di-Pyridaben-Bn-O-C ₆ -DO2A-Derivats VN165.MZ (30 nmol, 95 °C, K/MW)	60
Abbildung 55:	Vergleich der ⁶⁸ Ga-Reaktionskinetiken des di-Pyridaben-Bn-O-C ₆ -DO2A-Derivats VN165.MZ und des di-Pyridaben-Bn-O-C ₁₂ -DO2A-Derivats VN160.MZ bei 95 °C, 30 nmol	61
Abbildung 56:	Vergleich der ⁶⁸ Ga-Markierungsausbeuten des mono-Pyridaben-Bn-O-C ₆ -DO2A-Derivats VN195.MZ und des di-Pyridaben-Bn-O-C ₆ -DO2A-Derivats VN165.MZ (30 nmol, 95 °C, 15 min)	62

Abbildung 57:	^{68}Ga -Markierungskinetik des di-Pyridaben-Bn-O-C ₆ -DO2A-Derivats VN165.MZ und des di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C ₆ -DO2A-Derivats VN214.MZ (30 nmol, 95 °C)	63
Abbildung 58:	Vergleich der ^{68}Ga -Markierungsausbeuten des di-Pyridaben-Bn-N(Bn)-C ₆ -DO2A-Derivats VN214.MZ und des di-Pyridaben-Bn-O-C ₆ -DO2A-Derivats VN165.MZ (30 nmol, 95 °C, 15 min)	63
Abbildung 59:	Graphische Darstellung der log D-Werte der makrozyklischen Pyridaben-MPI-Tracer	64
Abbildung 60:	Stabilitäten der makrozyklischen ^{68}Ga -Pyridaben-MPI-Tracer in humanem Serum (HS), Ethanol (EtOH) und 0,9 %iger Kochsalzlösung (NaCl) nach 80 min	67
Abbildung 61:	HPLC-Diagramme der Stabilitätstest: ^{68}Ga -HEPES und [^{68}Ga]VN167.MZ (t = 0) (oben); [^{68}Ga]VN167.MZ nach 80 min in EtOH, HS und NaCl (unten)	68
Abbildung 62:	Abhängigkeit des IC ₅₀ -Werts von der Lipophilie	71
Abbildung 63:	Herz-Zeit-Aktivitätskurven für das ^{68}Ga -mono-Pyridaben-Bn-O-C ₁₂ -DO2A-Derivat [^{68}Ga]VN167.MZ, ^{68}Ga -di-Pyridaben-Bn-O-C ₁₂ -DO2A-Derivat [^{68}Ga]VN160.MZ und [^{18}F]Flurpiridaz für 0 – 60 min	73
Abbildung 64:	Vergleich der dynamischen PET-Bilder <i>in vivo</i> innerhalb 0 – 60 min in koronaler Schnittebene von [^{68}Ga]VN167.MZ (oben) und [^{18}F]Flurpiridaz (unten); der ^{68}Ga -Uptake ist in gemittelten SUVs mit einem Farbcode von 0 – 8 für [^{18}F]Flurpiridaz und 0 – 3 für [^{68}Ga]VN167.MZ dargestellt	74
Abbildung 65:	Organverteilung [^{68}Ga]VN167.MZ (oben) und [^{68}Ga]VN160.MZ (unten) in gesunden Ratten nach 10 und 60 min	77
Abbildung 66:	Vergleich der Organverteilung 60 min p. i. für [^{68}Ga]VN167.MZ, [^{68}Ga]VN160.MZ, [^{18}F]Flurpiridaz und [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Sestamibi	78

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Medizinisch relevante PET-Nuklide	12
Tabelle 2:	Medizinisch relevante Radionuklidgeneratoren	14
Tabelle 3:	Name und Struktur der synthetisierten Markierungsvorläufer	31
Tabelle 4:	Ergebnisse der Lipophiliebestimmung- geordnet nach steigenden log D-Werten	65
Tabelle 5:	Ergebnisse der IC ₅₀ -Bestimmungen der makrozyklischen Ga-Pyridaben-MPI Tracer (5 mM in DMSO/EtOH)	70
Tabelle 6:	<i>In vitro</i> -Affinitäten und Lipophilien der makrozyklischen Ga-Pyridaben MPITracer	72
Tabelle 7:	Ergebnisse der Biodistributionen von [⁶⁸ Ga]VN167.MZ und [⁶⁸ Ga]VN160.MZ nach 10 und 60 min	76

6.4. Literaturverzeichnis

1. WHO, Fact Sheet Nr 317. (2013).
2. Labounty, T. M. *et al.* Body mass index and the prevalence, severity, and risk of coronary artery disease: an international multicentre study of 13,874 patients. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* **14**, 456–463 (2013).
3. Knez, A. & *et al.* Bildgebende Verfahren in der Diagnostik des Herzens. *Radiol.* 103–110 (2000).
4. Saraste, A., Nekolla, S. G. & Schwaiger, M. Cardiovascular molecular imaging: an overview. *Cardiovasc. Res.* **83**, 643–652 (2009).
5. Anderson, C. J. *et al.* Design of Targeted Cardiovascular Molecular Imaging Probes. *J. Nucl. Med.* **51**, 3S–17S (2010).
6. Sanz, J. & Fayad, Z. A. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* **451**, 953–957 (2008).
7. Dowsley, T. *et al.* The role of noninvasive imaging in coronary artery disease detection, prognosis, and clinical decision making. *Can. J. Cardiol.* **29**, 285–296 (2013).
8. Bengel, F. M. Atherosclerosis imaging on the molecular level. *J. Nucl. Cardiol. Off. Publ. Am. Soc. Nucl. Cardiol.* **13**, 111–118 (2006).
9. Herzanatomie. at <<http://www.herzchirurgie.uniklinikum-jena.de/Herzchirurgie/Koronare+Herzkrankheit.html>>
10. Rader, D. J. & Daugherty, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* **451**, 904–913 (2008).
11. Toledo, E. *et al.* A Novel Fatty Acid Profile Index--the Lipophilic Index--and Risk of Myocardial Infarction. *Am. J. Epidemiol.* (2013).
12. Falk, E., Shah, P. K. & Fuster, V. Coronary plaque disruption. *Circulation* **92**, 657–671 (1995).
13. Physicians` Academy of Continuing Education. at <www.pace-cme.org>
14. Sakakura, K. *et al.* Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ.* **22**, 399–411 (2013).
15. Wu, J. C., Bengel, F. M. & Gambhir, S. S. Cardiovascular molecular imaging. *Radiology* **244**, 337–355 (2007).
16. Mousa, S. A., Williams, S. J. & Sands, H. Characterization of in vivo chemistry of cations in the heart. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **28**, 1351–1357 (1987).
17. Membrantransportmechanismen. at <www.school-scout.de>

18. Chiu, M. L., Kronauge, J. F. & Piwnica-Worms, D. Effect of mitochondrial and plasma membrane potentials on accumulation of hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium(I) in cultured mouse fibroblasts. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **31**, 1646–1653 (1990).
19. Horres, C. R., Aiton, J. F. & Lieberman, M. Potassium permeability of embryonic avian heart cells in tissue culture. *Am. J. Physiol.* **236**, C163–170 (1979).
20. Cavieres, J. D. & Ellory, J. C. Thallium and the sodium pump in human red cells. *J. Physiol.* **243**, 243–266 (1974).
21. Schindler, T. H., Schelbert, H. R., Quercioli, A. & Dilsizian, V. Cardiac PET imaging for the detection and monitoring of coronary artery disease and microvascular health. *JACC Cardiovasc. Imaging* **3**, 623–640 (2010).
22. Alessio, A. M., Butterworth, E., Caldwell, J. H. & Basingthwaite, J. B. Quantitative imaging of coronary blood flow. *Nano Rev.* **1**, (2010).
23. Glover, D. K. & Gropler, R. J. Journey to find the ideal PET flow tracer for clinical use: are we there yet? *J. Nucl. Cardiol. Off. Publ. Am. Soc. Nucl. Cardiol.* **14**, 765–768 (2007).
24. Anagnostopoulos, C., Georgakopoulos, A., Pianou, N. & Nekolla, S. G. Assessment of myocardial perfusion and viability by Positron Emission Tomography. *Int. J. Cardiol.* **167**, 1737-1749 (2013).
25. Bateman, T. M. *et al.* Diagnostic accuracy of rest/stress ECG-gated Rb-82 myocardial perfusion PET: comparison with ECG-gated Tc-99m sestamibi SPECT. *J. Nucl. Cardiol. Off. Publ. Am. Soc. Nucl. Cardiol.* **13**, 24–33 (2006).
26. Audi, G., Bersillon, O., Blachot, J. & Wapstra, A. H. The NUBASE evaluation of nuclear and decay properties. **729**, 3–128 (2003).
27. Cho, Z. H. *et al.* Positron ranges obtained from biomedically important positron-emitting radionuclides. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **16**, 1174–1176 (1975).
28. Beanlands, R. S. *et al.* Noninvasive quantification of regional myocardial flow reserve in patients with coronary atherosclerosis using nitrogen-13 ammonia positron emission tomography. Determination of extent of altered vascular reactivity. *J. Am. Coll. Cardiol.* **26**, 1465–1475 (1995).
29. Selwyn, A. P. *et al.* Relation between regional myocardial uptake of rubidium-82 and perfusion: absolute reduction of cation uptake in ischemia. *Am. J. Cardiol.* **50**, 112–121 (1982).
30. Russell, R. R., 3rd & Zaret, B. L. Nuclear cardiology: present and future. *Curr. Probl. Cardiol.* **31**, 557–629 (2006).
31. Stirrup, J., Maenhout, A., Wechalekar, K. & Anagnostopoulos, C. Radionuclide imaging in ischaemic heart failure. *Br. Med. Bull.* **92**, 43–59 (2009).
32. Maecke, H. R. & André, J. P. ⁶⁸Ga-PET radiopharmacy: A generator-based alternative to ¹⁸F-

- radiopharmacy. *Ernst Scher. Res. Found. Work.* 215–242 (2007).
33. Green, M. A. & Welch, M. J. Gallium radiopharmaceutical chemistry. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B* **16**, 435–448 (1989).
 34. Breeman, W. A. P. *et al.* Radiolabelling DOTA-peptides with ^{68}Ga . *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **32**, 478–485 (2005).
 35. Zhernosekov, K. P. *et al.* Processing of Generator-Produced ^{68}Ga for Medical Application. *J. Nucl. Med.* **48**, 1741–1748 (2007).
 36. Mueller, D. *et al.* Simplified NaCl based ^{68}Ga concentration and labeling procedure for rapid synthesis of (^{68}Ga) radiopharmaceuticals in high radiochemical purity. *Bioconjug. Chem.* **23**, 1712–1717 (2012).
 37. Meyer, G.-J., Mäcke, H., Schuhmacher, J., Knapp, W. H. & Hofmann, M. ^{68}Ga -labelled DOTA-derivatised peptide ligands. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **31**, 1097–1104 (2004).
 38. Rösch, F. $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators: past, present, and future. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progrès Dans Rech. Sur Cancer* **194**, 3–16 (2013).
 39. Rösch, F. Past, present and future of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators. *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.* **76**, 24–30 (2013).
 40. Liu, S. & Edwards, D. S. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjug. Chem.* **12**, 7–34 (2001).
 41. Fani, M., André, J. P. & Maecke, H. R. ^{68}Ga -PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol. Imaging* **3**, 67–77 (2008).
 42. Notni, J., Pohle, K. & Wester, H.-J. Comparative gallium-68 labeling of TRAP-, NOTA-, and DOTA-peptides: practical consequences for the future of gallium-68-PET. *EJNMMI Res.* **2**, 28 (2012).
 43. Waldron, B. P. *et al.* Structure and stability of hexadentate complexes of ligands based on AAZTA for efficient PET labelling with gallium-68. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **49**, 579–581 (2013).
 44. Green, M. A. *et al.* Gallium-68 1,1,1-tris (5-methoxysalicylaldiminomethyl) ethane: a potential tracer for evaluation of regional myocardial blood flow. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **26**, 170–180 (1985).
 45. Green, M. A. *et al.* Potential gallium-68 tracers for imaging the heart with PET: evaluation of four gallium complexes with functionalized tripodal tris(salicylaldimine) ligands. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **34**, 228–233 (1993).
 46. Hsiao, Y.-M., Mathias, C. J., Wey, S.-P., Fanwick, P. E. & Green, M. A. Synthesis and biodistribution of lipophilic and monocationic gallium radiopharmaceuticals derived from N,N'-bis(3-aminopropyl)-N,N'-dimethylethylenediamine: potential agents for PET myocardial imaging with ^{68}Ga . *Nucl. Med. Biol.* **36**, 39–45 (2009).

47. Kung, H. F. *et al.* A new myocardial imaging agent: synthesis, characterization, and biodistribution of gallium-68-BAT-TECH. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **31**, 1635–1640 (1990).
48. Plössl, K. *et al.* A novel gallium bisaminothiolate complex as a myocardial perfusion imaging agent. *Nucl. Med. Biol.* **35**, 83–90 (2008).
49. Hirst, J. Mitochondrial complex I. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 551–575 (2013).
50. Biologie und Sport. (2013). at <<http://www.oliverkohlhaas.de/biologie/stoffwechsel/zellatmung/>>
51. Mitochondrium. at <<http://de.wikipedia.org/wiki/Mitochondrium>>
52. Mitchell, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 144–148 (1961). doi:10.1038/191144a0
53. Yano, T. The energy-transducing NADH: quinone oxidoreductase, complex I. *Mol. Aspects Med.* **23**, 345–368 (2002).
54. Schrader, J. & Kelm, M. in *Physiologie* 147 (Georg Thieme Verlag, 2005).
55. Hatefi, Y., Haavik, A. G. & Griffiths, D. E. Studies on the electron transfer system. XL. Preparation and properties of mitochondrial DPNH-coenzyme Q reductase. *J. Biol. Chem.* **237**, 1676–1680 (1962).
56. Lümme, P. Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 287–296 (1998).
57. Brandt, U. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 69–92 (2006).
58. Brandt, U. Inside View of a Giant Proton Pump. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **29**, 7358–7360 (2013).
59. Okun *et al.* Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I. **5**, 2625–2630 (1999).
60. Hirst, J., Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J. & Walker, J. E. The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1604**, 135–150 (2003).
61. Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J., Hirst, J. & Walker, J. E. Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2**, 117–126 (2003).
62. Hinchliffe, P. & Sazanov, L. A. Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* **309**, 771–774 (2005).

-
63. Weidner, U. *et al.* The gene locus of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I. *J. Mol. Biol.* **233**, 109–122 (1993).
 64. Ohnishi, T. Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 186–206 (1998).
 65. Cardol, P. *et al.* Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **1658**, 212–224 (2004).
 66. Brandt, U. Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 79–91 (1997).
 67. Tran-Betcke, A., Warnecke, U., Böcker, C., Zaborosch, C. & Friedrich, B. Cloning and nucleotide sequences of the genes for the subunits of NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* **172**, 2920–2929 (1990).
 68. Fearnley, I. M. & Walker, J. E. Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 105–134 (1992).
 69. Duarte, M., Pópulo, H., Videira, A., Friedrich, T. & Schulte, U. Disruption of iron-sulphur cluster N2 from NADH: ubiquinone oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **364**, 833–839 (2002).
 70. Dröse, S. *et al.* Functional dissection of the proton pumping modules of mitochondrial complex I. *PLoS Biol.* **9**, e1001128 (2011).
 71. Hunte, C., Zickermann, V. & Brandt, U. Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science* **329**, 448–451 (2010).
 72. Baradaran, R., Berrisford, J. M., Minhas, G. S. & Sazanov, L. A. Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* **494**, 443–448 (2013).
 73. Tocilescu, M. A., Fendel, U., Zwicker, K., Kerscher, S. & Brandt, U. Exploring the ubiquinone binding cavity of respiratory complex I. *J. Biol. Chem.* **282**, 29514–29520 (2007).
 74. Tocilescu, M. A., Zickermann, V., Zwicker, K. & Brandt, U. Quinone binding and reduction by respiratory complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1883–1890 (2010).
 75. Ohnishi, T. & Salerno, J. C. Conformation-driven and semiquinone-gated proton-pump mechanism in the NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *FEBS Lett.* **579**, 4555–4561 (2005).

76. Brandt, U., Kerscher, S., Dröse, S., Zwicker, K. & Zickermann, V. Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism? *FEBS Lett.* **545**, 9–17 (2003).
77. Friedrich, T. Complex I: a chimaera of a redox and conformation-driven proton pump? *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 169–177 (2001).
78. Zickermann, V. *et al.* Challenges in elucidating structure and mechanism of proton pumping NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Bioenerg. Biomembr.* **40**, 475–483 (2008).
79. Latli, B., Wood, E. & Casida, J. E. Insecticidal quinazoline derivatives with (trifluoromethyl)diaziranyl and azido substituents as NADH:ubiquinone oxidoreductase inhibitors and candidate photoaffinity probes. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 445–450 (1996).
80. Hollingworth, R. M., Ahammadsahib, K. I., Gadelhak, G. & McLaughlin, J. L. New inhibitors of complex I of the mitochondrial electron transport chain with activity as pesticides. *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 230–233 (1994).
81. Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G. & Preis, D. The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem. FEBS* **197**, 563–576 (1991).
82. Friedrich, T. *et al.* Two binding sites of inhibitors in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). Relationship of one site with the ubiquinone-binding site of bacterial glucose:ubiquinone oxidoreductase. *Eur. J. Biochem. FEBS* **219**, 691–698 (1994).
83. Degli Esposti, M. & Ghelli, A. The mechanism of proton and electron transport in mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1187**, 116–120 (1994).
84. Hideto Miyoshi. Structure-activity relationships of some complex I inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 236–244 (1998).
85. Okun, J. G., Zickermann, V., Zwicker, K., Schägger, H. & Brandt, U. Binding of detergents and inhibitors to bovine complex I - a novel purification procedure for bovine complex I retaining full inhibitor sensitivity. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 77–87 (2000).
86. Madar, I. *et al.* Characterization of uptake of the new PET imaging compound ¹⁸F-fluorobenzyl triphenyl phosphonium in dog myocardium. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **47**, 1359–1366 (2006).
87. Marshall, R. C. *et al.* Kinetic analysis of ¹²⁵I-iodorotenone as a deposited myocardial flow tracer: comparison with 99mTc-sestamibi. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **42**, 272–281 (2001).
88. Radeke, H. *et al.* Synthesis and biological evaluation of the mitochondrial complex 1 inhibitor 2-[4-(4-fluorobutyl)benzylsulfanyl]-3-methylchromene-4-one as a potential cardiac positron emission tomography tracer. *J. Med. Chem.* **50**, 4304–4315 (2007).

89. Marshall, R. C. *et al.* Kinetic analysis of ^{18}F -fluorodihydrorotenone as a deposited myocardial flow tracer: comparison to ^{201}Tl . *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **45**, 1950–1959 (2004).
90. Yu, M. *et al.* BMS-747158-02: a novel PET myocardial perfusion imaging agent. *J. Nucl. Cardiol. Off. Publ. Am. Soc. Nucl. Cardiol.* **14**, 789–798 (2007).
91. Yalamanchili, P. *et al.* Mechanism of uptake and retention of F-18 BMS-747158-02 in cardiomyocytes: a novel PET myocardial imaging agent. *J. Nucl. Cardiol. Off. Publ. Am. Soc. Nucl. Cardiol.* **14**, 782–788 (2007).
92. Huisman, M. C. *et al.* Initial characterization of an ^{18}F -labeled myocardial perfusion tracer. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **49**, 630–636 (2008).
93. Nekolla, S. G. *et al.* Evaluation of the novel myocardial perfusion positron-emission tomography tracer ^{18}F -BMS-747158-02: comparison to ^{13}N -ammonia and validation with microspheres in a pig model. *Circulation* **119**, 2333–2342 (2009).
94. Higuchi, T. *et al.* A new ^{18}F -labeled myocardial PET tracer: myocardial uptake after permanent and transient coronary occlusion in rats. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **49**, 1715–1722 (2008).
95. Sherif, H. M. *et al.* Evaluation of a novel ^{18}F -labeled positron-emission tomography perfusion tracer for the assessment of myocardial infarct size in rats. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2**, 77–84 (2009).
96. Maddahi, J. *et al.* Phase I, first-in-human study of BMS747158, a novel ^{18}F -labeled tracer for myocardial perfusion PET: dosimetry, biodistribution, safety, and imaging characteristics after a single injection at rest. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **52**, 1490–1498 (2011).
97. Berman, D. S. *et al.* Phase II safety and clinical comparison with single-photon emission computed tomography myocardial perfusion imaging for detection of coronary artery disease: flurpiridaz F 18 positron emission tomography. *J. Am. Coll. Cardiol.* **61**, 469–477 (2013).
98. Yu, M., Nekolla, S. G., Schwaiger, M. & Robinson, S. P. The next generation of cardiac positron emission tomography imaging agents: discovery of flurpiridaz F-18 for detection of coronary disease. *Semin. Nucl. Med.* **41**, 305–313 (2011).
99. Pieters, R. J. Maximising multivalency effects in protein-carbohydrate interactions. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 2013–2025 (2009).
100. Ruzza, P., Marchiani, A., Antolini, N. & Calderan, A. Peptide-receptor ligands and multivalent approach. *Anticancer Agents Med. Chem.* **12**, 416–427 (2012).
101. Purohit, A. *et al.* Synthesis and biological evaluation of pyridazinone analogues as potential cardiac positron emission tomography tracers. *J. Med. Chem.* **51**, 2954–2970 (2008).

102. Hirata, K., Kawamura, Y. & Kudo, M. Development of a New Acaricide, Pyridaben. **20**, 213–221 (1995).
103. Mou, T. *et al.* Preparation and biodistribution of [¹⁸F]FP2OP as myocardial perfusion imaging agent for positron emission tomography. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 1312–1320 (2010).
104. Mou, T. *et al.* Synthesis and preliminary evaluation of ¹⁸F-labeled pyridaben analogues for myocardial perfusion imaging with PET. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **53**, 472–479 (2012).
105. Sawicki, M. *et al.* Bisphosphonate sequestering agents. Synthesis and preliminary evaluation for in vitro and in vivo uranium(VI) chelation. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 2768–2777 (2008).
106. PCT/US2011/024109. (2011).
107. Kline, S. J., Betebenner, D. A. & Johnson, D. K. Carboxymethyl-substituted bifunctional chelators: preparation of aryl isothiocyanate derivatives of 3-(carboxymethyl)-3-azapentanedioic acid, 3,12-bis(carboxymethyl)-6,9-dioxo-3,12-diazatetradecanedioic++ + acid, and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid for use as protein labels. *Bioconjug. Chem.* **2**, 26–31 (1991).
108. Kalesse, M. & Loos, A. Remarkable hydrolysis of phosphodiester by neutral lanthanide(III) DO3A complexes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 2063–2068 (1996).
109. Del Valle, J. R. & Goodman, M. An efficient RCM-based synthesis of orthogonally protected meso-DAP and FK565. *J. Org. Chem.* **69**, 8946–8948 (2004).
110. Velikyan, I. The diversity of ⁶⁸Ga-based imaging agents. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progrès Dans Rech. Sur Cancer* **194**, 101–131 (2013).
111. Velikyan, I., Maecke, H. & Langstrom, B. Convenient preparation of ⁶⁸Ga-based PET-radiopharmaceuticals at room temperature. *Bioconjug. Chem.* **19**, 569–573 (2008).
112. Riss, P. J., Burchardt, C. & Roesch, F. A methodical ⁶⁸Ga-labelling study of DO2A-(butyl- l-tyrosine)₂ with cation-exchanger post-processed ⁶⁸Ga: practical aspects of radiolabelling. *Contrast Media Mol. Imaging* **6**, 492–498 (2011).
113. Kung, H. F. *et al.* A new myocardial imaging agent: synthesis, characterization, and biodistribution of gallium-68-BAT-TECH. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **31**, 1635–1640 (1990).
114. Yu, M. *et al.* Assessment of ¹⁸F-labeled mitochondrial complex I inhibitors as PET myocardial perfusion imaging agents in rats, rabbits, and primates. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **36**, 63–72 (2009).
115. Zimny, M. Synthese und Evaluierung von ⁶⁸Ga-Schiff'schen Basen zur Diagnostik der koronaren Herzerkrankung. (2013).
116. Huisman, M. C. *et al.* Initial characterization of an ¹⁸F-labeled myocardial perfusion tracer. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **49**, 630–636 (2008).

-
117. Maddahi, J. Properties of an ideal PET perfusion tracer: new PET tracer cases and data. *J. Nucl. Cardiol. Off. Publ. Am. Soc. Nucl. Cardiol.* **19 Suppl 1**, S30–37 (2012).
 118. Fellner, M. *et al.* Assessing p-Glycoprotein (Pgp) Activity In Vivo Utilizing ^{68}Ga -Schiff Base Complexes. *Mol. Imaging Biol.* **13**, 985–994 (2010).
 119. Okun *et al.* Properties of the common inhibitor-binding domain in mitochondrial NADH-dehydrogenase (complex I). *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 596–601 (1999).
 120. Srivastava, P. C., Hay, H. G. & Knapp, F. F., Jr. Effects of alkyl and aryl substitution on the myocardial specificity of radioiodinated phosphonium, arsonium, and ammonium cations. *J. Med. Chem.* **28**, 901–904 (1985).
 121. Yang, C.-T. *et al.* ^{64}Cu -labeled 2-(diphenylphosphoryl)ethyldiphenylphosphonium cations as highly selective tumor imaging agents: effects of linkers and chelates on radiotracer biodistribution characteristics. *Bioconjug. Chem.* **19**, 2008–2022 (2008).
 122. Kim, Y.-S. *et al.* Effects of targeting moiety, linker, bifunctional chelator, and molecular charge on biological properties of ^{64}Cu -labeled triphenylphosphonium cations. *J. Med. Chem.* **51**, 2971–2984 (2008).

Danksagung

Keine Schuld ist dringender als die, Danke zu sagen.

Marcus Cicero (106 v. Chr. – 43 v. Chr.)

Herzlichen Dank an alle, die mich unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die Arbeit selbst durchgeführt und keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Verena Nagel

Mainz, November 2013