

**SYNTHESE, RADIOMARKIERUNG UND BIOCHEMISCHE SOWIE PRÄKLINISCHE
EVALUIERUNG NEUER AMINOPEPTIDASE N- UND
FIBROBLASTEN-AKTIVIERUNGS-PROTEIN α - AFFINER
VERBINDUNGEN FÜR DIE MOLEKULARE BILDGEBUNG MITTELS
POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE**



**DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES DER
JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG**

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin Magdalena Schneider
aus Löbau

Würzburg 2014

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

Die vorliegende Dissertation wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Tanja Schirmeister und Prof. Dr. Samuel Samnick von März 2010 bis März 2013 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg und in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Würzburg angefertigt.

DANKSAGUNG

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Personen durch ihre Unterstützung beigetragen, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Samuel Samnick für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe promovieren und ein so interessantes und vielfältiges Thema bearbeiten zu dürfen.

Besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Tanja Schirmeister für die Betreuung dieser Doktorarbeit und die Möglichkeit sämtliche Analytik und Enzymtests in ihrem Arbeitskreis durchführen zu können.

Für ihre Mitarbeit und Unterstützung danke ich:

- meinen Kolleginnen und Kollegen in der Abteilung für Radiochemie: Elke Thomas, Heike Göbel, Dr. Ina Israel, Katja Hirsch, Bettina Mahren, Dr. Carina Rikanović, Dr. Andreas Schirbel, Dr. Markus Schiller, Dr. Ehab Al-Momani, Bernd Hallmann, Dominik Richter, Sebastian Liebisch und Dr. Gerhard Jörg (ganz besonders dem PET-Team Ina, Katja und Domi, mit denen ich bei allen Tier-Experimenten großartig zusammen gearbeitet habe und Katja auch für die Einführung in den Umgang mit Zellen, auch wenn es die Uptake-Versuche leider nicht in diese Arbeit geschafft haben; außerdem noch dem Radiopharmazie-Team Ina, Markus und Andreas, bei denen ich den Umgang mit radioaktiven Stoffen und die Markierung mit Gallium, Iod und Fluor lernen durfte)
- den Mitarbeiterinnen in der Pharmazie: Anna Kucharski, Sabine Mährlein und Nicole Heindl für das Beibringen der Durchführung von enzymatischen Tests
- unseren Kooperationspartnern aus der Kardiologie: Annette Berbner, Yasmin Habbaba und Dr. Jochen Tillmanns für die Anfertigung vieler Gewebeschnitte und die Einführung in Gewebefärbungen und Mikroskopieren.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Mädels Caro und Babsi, die mir beim NMR messen und beim Masseproben weiterreichen eine wahnsinnige Hilfe waren und so manch erfreuliches Ergebnis überbrachten.

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, die mir durch ihre Liebe und Unterstützung die Motivation verliehen hat, diese drei Jahre Doktorarbeit zu meistern.

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINFÜHRUNG	15
1	EINLEITUNG	15
1.1	Herz-Kreislauf-Erkrankungen	15
1.2	Myokardinfarkt.....	15
1.3	Remodeling	17
1.4	Angiogenese und beteiligte Proteasen sowie Rezeptoren	18
1.5	Nuklearmedizinische Untersuchungen des Herzens.....	27
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	33
2.1	Aufgabenstellung zu den PET-Tracern für FAP	35
2.2	Aufgabenstellung zum PET-Tracer für APN	38
II	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	40
3	SYNTHESEN VON VORSTUFEN UND REFERENZEN DER PET-TRACER FÜR FAP	40
3.1	Glycin-Teil	42
3.2	Prolin-Teil	51
3.3	Glycin-Prolin-Analoga.....	53
3.4	Résumé Kapitel 3	58
4	ENZYMKINETIK	61
4.1	Michaelis-Menten-Gleichung	61
4.2	Analyse kinetischer Daten	63
4.3	Hemmung.....	64
4.4	Fluorimetrische Enzym-Assays.....	68
4.5	Résumé Kapitel 4	75
5	RADIOMARKIERUNGEN	77
5.1	Allgemeines.....	77
5.2	Positronen-Emitter-markierte FAP-affine Verbindungen	77
5.3	[⁶⁸ Ga]Gallium-markierte APN- und Integrin $\alpha_v\beta_3$ -affine Peptide.....	96
5.4	Résumé Kapitel 5	103
6	IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN	105
6.1	Kleintier-PET	105
6.2	Tiermodell	106
6.3	Ablauf einer PET-Untersuchung	106
6.4	PET-Untersuchungen mit [¹⁸ F]Fludeoxyglucose	107

6.5	Auswertung der PET-Aufnahmen	109
6.6	⁶⁸ Ga-NOTA-NGR/-RGD Vergleichsstudie	113
6.7	[¹²⁴ I]Iod-markierter PET-Tracer für FAP	140
6.8	Résumé Kapitel 6	144
7	AUTORADIOGRAPHIE	145
7.1	Allgemeines	145
7.2	Tiermodell	145
7.3	Gewebeschnitte	146
7.4	Vergleich mit HE-Färbung	146
7.5	Auswertung der Autoradiographie-Aufnahmen	147
7.6	Durchführung mit 1-(2-[¹²⁴ I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril	147
7.7	Durchführung mit ⁶⁸ Ga-NOTA-NGR	147
7.8	Résumé Kapitel 7	150
8	GEWEBEFÄRBUNGEN	151
8.1	HE-Färbungen	151
8.2	Immunohistochemie	154
8.3	Résumé Kapitel 8	166
9	ZUSAMMENFASSUNG	167
10	SUMMARY	174
III	EXPERIMENTELLER TEIL	180
11	GERÄTE, MATERIALIEN UND METHODEN	180
11.1	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	180
11.2	Verwendete Radionuklide für die Markierung	181
11.3	Verwendete Geräte	181
11.4	Chromatographische Methoden	185
12	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG ORGANISCHER VERBINDUNGEN	187
12.1	Glycin-Teil	188
12.2	Prolin-Teil	217
12.3	Glycin-Prolin-Analoga	218
13	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG RADIOMARKIERTER VERBINDUNGEN	238
13.1	Fluorierung	238
13.2	Iodierung	239
13.3	Markierungen mit Gallium-68	242
14	ENZYM ASSAYS	244

INHALTSVERZEICHNIS

14.1	Testung der Inhibitoren an FAP	244
14.2	Testung der Inhibitoren an DPP IV	245
15	TIEREXPERIMENTE	247
15.1	Tiermodell	247
15.2	Kleintier-PET	248
15.3	Autoradiographie	250
16	GEWEBESCHNITTE	251
16.1	Anfertigung von Gewebeschnitten	251
16.2	HE-Färbung.....	251
16.3	Immunohistochemie	251
17	LITERATUR	255

I EINFÜHRUNG

1 Einleitung

1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen (englisch: cardiovascular diseases = CVD) umfassen sämtliche meist angeborene und nicht durch Verletzung erworbene Krankheiten, die das Herz, die Gefäße und den Blutkreislauf betreffen. In der Epidemiologie und Statistik werden meist diejenigen Krankheiten als Herz-Kreislauf-Erkrankungen bezeichnet, die im Kapitel IX der *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aufgelistet sind.¹ Neben ungesunder Ernährung sind zu wenig physische Aktivität, Tabak- und Alkoholmissbrauch die größten Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind laut WHO die Nummer eins der weltweiten Todesursachen. Auch in Deutschland geht etwa die Hälfte aller Todesfälle auf eine Erkrankung des Herzens oder des Gefäßsystems zurück. Vor allem ältere Menschen sind betroffen, doch die Zahl der Erkrankten unter 50 Jahren steigt. Die Störungen des Herz-Kreislauf-Systems sind vielfältig und verlaufen häufig schleichend. Zum Tode führen letztendlich meist ein Herzinfarkt (Myokardinfarkt) oder ein Hirnschlag (Schlaganfall) als akute Formen dieser Erkrankung.²⁻³

1.2 Myokardinfarkt

Herzinfarkt und Hirnschlag haben vergleichbare Ursachen: Ein Blutgerinnsel (Thrombus) verstopft eine Arterie und unterbindet damit den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen zu den entsprechenden Geweben. Die Herzmuskel- bzw. Nervenzellen sterben aufgrund dieser Unterversorgung ab und sind in ihrer Funktion eingeschränkt. Ein Blutgerinnsel entsteht an der Innenwand des Blutgefäßes und kann dort zur Verstopfung führen oder sich lösen, um als wandernde Gefahr mit dem Blutstrom durch den Körper zu zirkulieren. Solch ein wanderndes Blutgerinnsel nennt man Embolus und die mögliche Folge, der Verschluss von Arterien, wird als Embolie bezeichnet.

Die Verengung des Blutgefäßes resultiert aus arteriosklerotischen Fett- und Kalkablagerungen an der Gefäßwand. Löst sich diese plötzlich und zirkuliert somit im Blutkreislauf, bezeichnet man dies auch als arteriosklerotisches Plaque (siehe Abb. 1.1).

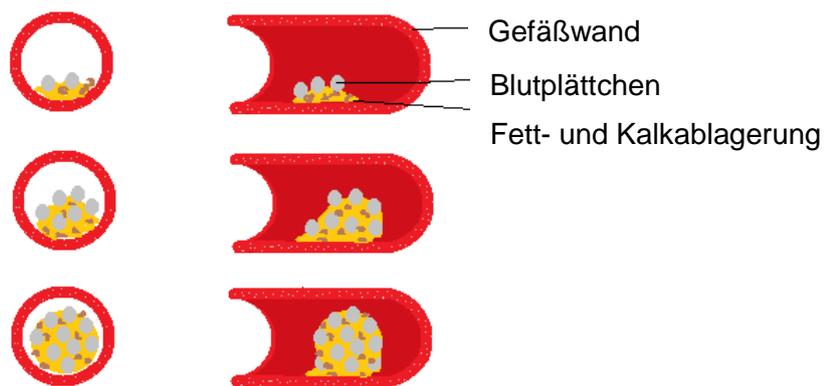


Abb. 1.1: Bildung eines arteriosklerotischen Plaques.

Die Anlagerung von Blutplättchen, die als Reparaturmechanismus des Körpers gedacht ist, lässt einen Thrombus (Blutpfropf) wachsen, der an einer engen Stelle im Gefäßsystem stecken bleibt und somit die Blutzufuhr zum dahinterliegenden Herzmuskel unterbricht. Es erfolgt somit eine Sauerstoffunterversorgung (Ischämie). Je nach Ausmaß und Lokalisation des Infarktes sterben große Teile des Myokardgewebes ab (siehe Abb. 1.2). Im schlimmsten Fall kann es binnen Sekunden zum plötzlichen Herztod kommen.⁴

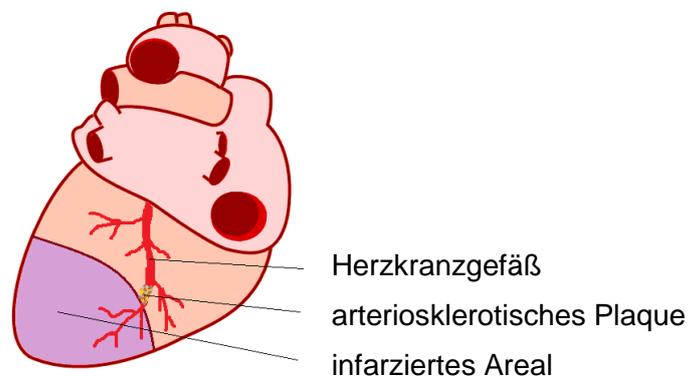


Abb. 1.2: Myokardinfarkt als Absterben von Herzmuskelzellen (Myozyten) in Folge eines Verschlusses eines der Herzkranzgefäße.

Für die Diagnose des Herzinfarktes stehen viele Methoden, wie die pathologische Untersuchung und Messung kardialer Proteine im Blut, Elektrokardiographie (EKG) sowie Bildgebungstechniken wie die Magnetresonanztomographie (MRT), die Myokardperfusionsszintigraphie und FDG-PET zur Vitalitätsuntersuchung sowie die Echokardiographie und Kontrast-Ventrikulographie zur Verfügung.⁵

1.3 Remodeling

Das kardiale Remodeling beschreibt die Umbauvorgänge, die sich klinisch als Hypertrophie, Dilatation und Fibrosierung des Myokards manifestieren. Ursachen dieser ungünstigen Umbauprozesse am Herzen sind in erster Linie der Myokardinfarkt aber auch Drucküberlastung (Aortenstenose, Hypertonie), Volumenüberlastung (Herzklappeninsuffizienz), inflammatorische Herzmuskelerkrankungen (Myokarditis) oder idiopathische Kardiomyopathie. Während das kardiale Remodeling initial eine kompensatorische Reaktion ist, entwickelt es sich häufig zu einem maladaptiven Prozess mit der Folge einer Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod. Im Fall des Myokardinfarktes zeigen sich Gewebeveränderungen im Sinne einer Wundheilungsreaktion mit Freisetzung multipler neuro-humoraler Faktoren, inflammatorischer Zellinfiltration, Resorption von nekrotischem Gewebe sowie Umbau der extrazellulären Matrix mit Ausbildung eines kollagenhaltigen Narbengewebes. Aktivierte Fibroblasten differenzieren zu Myofibroblasten, steigern die Kollagensynthese und tragen zur Ausbildung einer Fibrose sowohl im geschädigten als auch im gesunden Bereich des Herzens bei.⁶ Mit fortschreitender Fibrose und dem Umbau der extrazellulären Matrix dünnt die linksventrikuläre Wand aus und die Pumpfunktion wird erheblich eingeschränkt.⁷

Der Herzmuskel braucht so mehr Energie, um die ursprüngliche Pumpleistung zu erbringen. Das Herz verliert an Effizienz und die Leistungsfähigkeit nimmt ab. Außerdem findet beim Remodeling eine Umorientierung des Herzmuskelfaserverlaufs statt, das Herz verliert seine konische Form und wird zunehmend rundlich. Kombiniert mit dem Funktionsausfall des infarzierten Gewebes tragen diese Einschränkungen zu einer wesentlichen Beeinträchtigung der Herzfunktion bei und sind Ursache für nachfolgende chronische Herzinsuffizienz.⁷ Je größer das Volumen des linken Ventrikels ist, desto schlechter fällt die Prognose über das Überleben für Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz aus.⁸⁻⁹

Das Myokard umfasst drei Komponenten: Myozyten (Muskelzellen), extrazelluläre Matrix und kapillare Mikrozirkulation, die die kontraktile Einheit versorgt. Kardiomyozyten bilden Myofilamente und sorgen durch ihre Funktion als Muskelfasern für die Saug- und Pumpleistung des Hohlorgans. Die extrazelluläre Matrix besteht aus Typ I und III Kollagen und stellt ein viskoelastisches, dynamisches Baugerüst dar, das das Muskelgewebe mit dem Gefäßnetzwerk verbindet. Die Ausdehnung eines Myokardinfarkts beruht auf dem Abbau von Kollagenfasern innerhalb des Myokards, wodurch sich die Gleitfähigkeit für nekrotische Myozyten, auch in nichtinfarzierten Arealen erhöht. Die Spaltung der Kollagenfasern erfolgt durch Serinproteasen und Matrixmetalloproteasen (MMPs).¹⁰ Die

extrazelluläre Matrix beinhaltet außerdem unter anderem Fibroblasten und Zell-Zell-Signalmoleküle (Integrine).¹¹ Fibroblasten sind Zellen, die eine Vielzahl Matrixproteine, Wachstumsfaktoren und Proteasen produzieren. Als Fibrose bezeichnet man den Prozess der Narbenbildung, wobei sich Fibroblasten anhäufen und Proteine der extrazellulären Matrix umverteilt werden. Nach einem Myokardinfarkt besteht die Fibrose nur aus dem Ersatz der abgestorbenen Myocyten.¹² Für eine erfolgreiche Wundheilung ist die Fortbewegung dieser Zellen essentiell wichtig.¹³ Fibroblasten zeigen in aktivierter Form erhöhte Expression der Matrix-Metallprotease (MMP)-2 und Produktion von Kollagen Typ I und III.¹⁴

1.4 Angiogenese und beteiligte Proteasen sowie Rezeptoren

Aufgrund der Sauerstoffunterversorgung innerhalb des ischämischen Myokardgewebes kommt es zur Neuausbildung von Blutgefäßen, der sogenannten Angiogenese. Sie bezeichnet den Vorgang der Einsprossung neuer Blutgefäße (Kapillaren) ausgehend von einem bestehenden Gefäßnetzwerk.¹⁵ Durch diese Maßnahme versucht der Körper ischämisches Gewebe wiederzubeleben, indem es mit sauerstoffreichem Blut versorgt wird. Da die Angiogenese durch Einsprossung ein invasiver Prozess ist, werden proteolytisch aktive Enzyme benötigt. Durch sie wird die Basismembran von Endothelzellen abgebaut, damit diese in das umliegende Gewebe vordringen können. Zudem wird die extrazelluläre Matrix abgebaut, sodass Platz für neue Blutgefäße geschaffen wird. Proteasen spielen eine Schlüsselrolle in der Angiogenese, durch sie werden Wachstumsfaktoren, Cytokine, Rezeptoren und auch Inhibitoren aktiviert und modifiziert. Die daran beteiligten Proteasen agieren intra- oder extrazellulär und treten oft in Multiproteinkomplexen auf.¹⁶ Eine Auswahl von Proteasen ist in Tab. 1.1 zusammengestellt, wobei die fettgedruckten für diese Arbeit wichtig sind und im Folgenden näher beleuchtet werden.

Tabelle 1.1: Perizellulär proteolytisch aktive Proteasen und Rezeptoren, die bei Zellmigration und Angiogenese eine Rolle spielen.¹⁶

Proteasenklasse	Mitglieder
Metalloproteasen	MT1,2,3,5-MMP (transmembran), MT4,6-MMP (+GPI-Anker), MMP-2,9 (+ Rezeptoren MT1-MMP, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und CD44), ADAM-10,15,17, ADAMTS-1
Serinproteasen	u-PA (+ uPAR + GPI-Anker), Plasmin-(ogen)

1 EINLEITUNG

(+ Rezeptor), membranständige Serinproteasen	
Cysteinproteasen	Cathepsin B,L (+ Rezeptor)
Carboxy- und Aminopeptidasen	APN/CD13, DPP IV/CD26
Aspartatproteasen	

Abk.: MMP = Matrixmetallproteinase; MT = Membran-Typ; u-PA = Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator; uPAR = u-PA-Rezeptor; APN = Aminopeptidase N; DDP IV = Dipeptidylpeptidase IV; GPI = Glycosylphosphatidylinositol.

Bei der Angiogenese, eingeschlossen den Umbau der extrazellulären Matrix, die Zellmigration und -invasion und die Freisetzung und Modifizierung von Wachstumsfaktoren, spielen vier Gruppen Endoproteasen wichtige Rollen: die Matrixmetallproteasen (MMPs), die Cathepsin Cysteinproteasen, die Serinproteasen und die Aminopeptidasen. Viele dieser Proteasen sitzen auf der Zelloberfläche und interagieren mit der sie umgebenden Matrix.¹⁷ Sie können als Gruppe der Zelloberflächen-Glycoproteine mit einer Extrazellulardomäne, einer Transmembrandomäne und einem kurzen Rest im Zytoplasma zusammengefasst werden.¹⁸ Eine besondere Aufgabe wird den Enzymen Aminopeptidase N (CD13) und Dipeptidylpeptidase IV (CD26) zugeschrieben.¹⁹

1.4.1 Aminopeptidasen

Aminopeptidasen sind Exopeptidasen, die ein oder zwei Aminosäuren vom *N*-Terminus eines Proteins abspalten.¹⁷ Darüber hinaus sind sie Metallproteasen, die zur Ausübung ihrer Funktion ein zweifach geladenes Kation, zum Beispiel Zn^{2+} , Co^{2+} oder Mn^{2+} benötigen. Sie fungieren als Ectoenzyme und sind am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt.²⁰ Vier Aminopeptidasen sind an der Angiogenese beteiligt: Methionin Aminopeptidase 2 (MeAP2), Aminopeptidase N (APN), Adipozyten-Leucinaminopeptidase (A-LAP) und die Aminopeptidase A (APA). Besonders der Aminopeptidase N (APN) wird eine wichtige Rolle bei der Angiogenese zugeschrieben.²¹ Sie wird in hohem Maße und exklusiv von Endothelzellen wachsender Blutgefäße exprimiert.¹⁷ Sie nimmt vielseitige Aufgaben bei der Angiogenese wahr, eingeschlossen der Fortbewegung und Anhaftung von Endothelzellen.²¹ Die Protease ist ein Zink-benötigendes Typ-II-membranständiges Ectoenzym und identisch mit CD13.²⁰ Ihre Einordnung nach der MEROPS-Datenbank ist Clan MA, Subclan MA(E), Familie M1, M01.001.²² Sie bevorzugt neutrale Aminosäuren und spaltet sie dieser Rangliste folgend von ihrem Substrat hydrolytisch ab:

Ala>Phe>Tyr>Leu>Arg>Thr>Trp>Lys>Ser>Asp>His>Val. Die Aminopeptidase N gehört zur Familie M1 von Metallopeptidasen, die auch Gluzinkine genannt werden.²³ Membranständige APN ist ein nicht-kovalent gebundenes Homodimer mit einer Masse von 160 kDa. Jede Untereinheit besteht aus 967 Aminosäuren (AS) und enthält ein kleines (8-10 AS) N-terminales Segment im Zytosol, eine helikale Transmembrandomäne und einen extrazellulären C-Terminus.²¹

Die Ectopeptidase APN hydrolysiert Angiotensin I um den Vasokonstriktor Angiotensin II zu generieren. Außerdem kommen Metenkephalin, Neurokinin A, Somatostatin, MCP-1 (monocyte chemotactic protein) und MIP-1 (macrophage inhibitory protein) als physiologisches Substrat in Frage.¹⁹ Des Weiteren wurde auch eine Interaktion mit Bradykinin, ein gut charakterisierter Entzündungsmediator und Initiator vaskularer homöostatischer Prozesse, beobachtet.²⁴ Eine Vielzahl natürlich vorkommender Inhibitoren ist bekannt.²⁵ Mithilfe von Phagen-Display Technologie, mit der Tumor-affine Peptide identifiziert werden können, wurde die Sequenz Asparagin-Glycin-Arginin (NGR, siehe Abb. 1.3) als APN-affines Peptid gefunden.²⁶ Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass NGR angiogenetisch aktive APN adressiert. Beispielsweise wurde NGR als cyclisches Peptid mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und im *in-vitro*-Angiogenese Modell erfolgreich untersucht. Die Expression des Enzyms wurde dabei über 14 Tage untersucht, wobei ein Maximum zwischen Tag 3 und 7 durchschritten wird.²⁷ Immunohistochemische Untersuchungen menschlichen Gewebes haben gezeigt, dass in Tumor-Blutgefäßen, Myeloidzellen und Epithelzellen unterschiedliche immunoreaktive Formen von APN exprimiert werden. Das NGR-Peptid bindet an APN-positive Tumor-Blutgefäße, aber nicht an das Epithel gesunder Nieren oder andere APN-reiche Gewebe. Es kann also davon ausgegangen werden, dass eine spezielle angiogenetisch aktive Form von APN vorliegt. Möglicherweise resultiert diese aus unterschiedlicher Glycosilierung oder konformationeller Änderung aufgrund einer Komplexbildung mit anderen Komponenten. In Wirbeltieren taucht die NGR-Sequenz in einigen Proteinen auf. Fibronectin, ein Bestandteil der extrazellulären Matrix zum Beispiel, enthält zwei GNCRG-Sequenzen. Bisher sind eine Vielzahl an Wirkstoffen an das NGR-Peptid gekuppelt worden, um deren Aufnahme in neugebildete Blutgefäße zu erhöhen, darunter antiangiogenetische Wirkstoffe, zytotoxische Wirkstoffe, Krebstherapeutika, usw..²⁸ Als Diagnosemittel für die Angiogenese ist das NGR-Peptid, komplexiert mit Gadolinium (III) (Gd^{3+}), als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie bereits erfolgreich eingesetzt worden.²⁹

1 EINLEITUNG

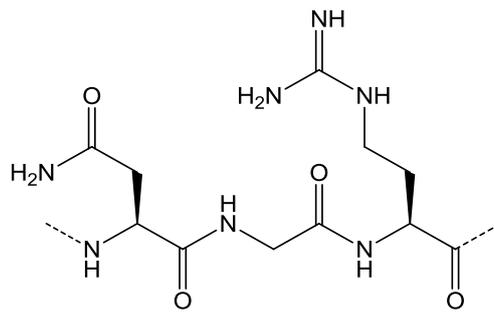


Abb. 1.3: APN-affine Peptidsequenz NGR = Asparagin-Glycin-Arginin.

1.4.2 Serinproteasen

Serinproteasen sind notwendig für die mikrovaskuläre Umstrukturierung von Endothelzellen während der Angiogenese. Sie übernehmen dabei Aufgaben wie die Fortbewegung der Endothelzellen, das Remodeling der extrazellulären Matrix, die Aktivierung von Wachstumsfaktoren und die Freisetzung von maskierten Regulierungsmolekülen. Serinproteasen hydrolysieren peptidische Bindungen ihres natürlichen Substrats mithilfe einer katalytischen Triade, die aus Histidin, Aspartat und Serin besteht (siehe Abb. 1.4).

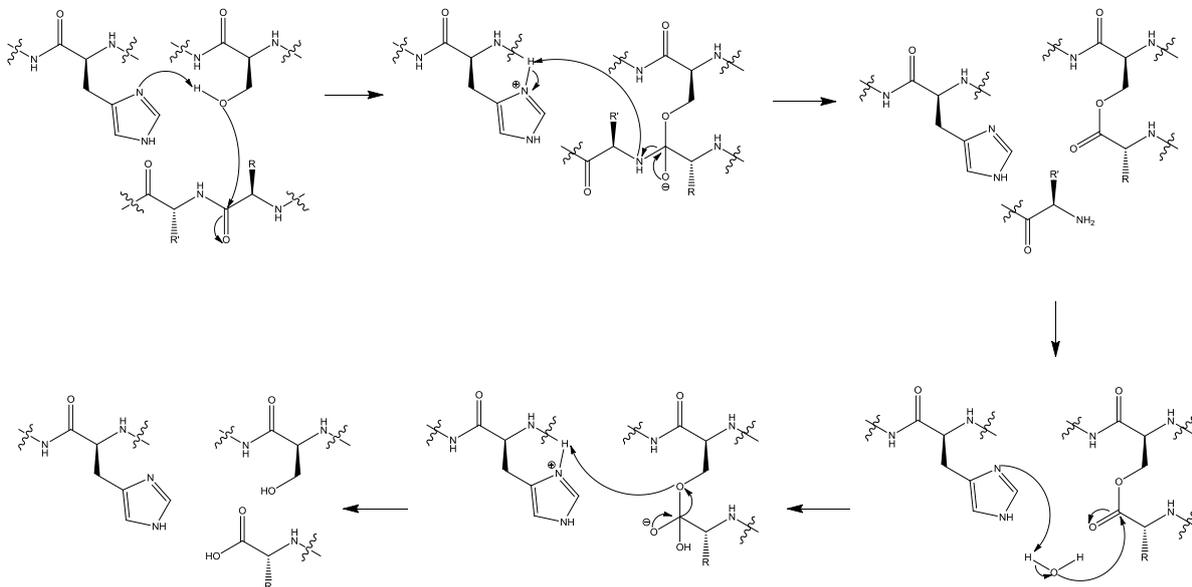


Abb. 1.4: Katalysemechanismus der Serinproteasen: die Hydroxygruppe des Serins wird durch Histidin deprotoniert und greift das Substrat nucleophil am Carbonyl-Kohlenstoffatom der Peptidbindung an. Protonenübernahme vom Histidin führt zur Abspaltung des Aminrests. Durch ein Wassermolekül wird der mit dem Serin veresterte Carbonsäurerest hydrolysiert und ebenfalls abgespalten. Als Resultat sind beide katalytisch aktiven Reste des aktiven Zentrums regeneriert und eine Amidbindung des Substrats wurde hydrolytisch gespalten.

Innerhalb dieser Familie bilden die membranständigen Serinproteasen die Subfamilie der Typ II Transmembran-Serinproteasen (TTPs).³⁰ Zu diesen gehören die Proteasen des Clans SC, die Dipeptidyl Aminopeptidasen, Carboxypeptidasen und die Endopeptidasen. Diese Proteasen spalten bevorzugt AS-Pro-Einheiten (AS = beliebige Aminosäure, Pro = Prolin) von ihrem peptidischen Substrat ab. Zu dieser Klasse gehören die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV, CD26), das Fibroblasten-Aktivierungs-Protein α (FAP, Seprase), DPP7, DPP8, DPP9, Prolyl Carboxypeptidase (PCP), und Acylaminoacyl-peptidase (AAP).³¹ DPP II, DPP8, DPP9, FAP und Prolyl Oligopeptidase (POP) werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit in Struktur und enzymatischer Aktivität auch unter dem Namen DASH (DPP IV activity structure homologues) zusammengefasst.³² Die Tatsache, dass Prolin im Gegensatz zu anderen AS in einer Peptidbindung ein tertiäres Amid bildet, was in seiner sehr starken Bindung und veränderten Geometrie resultiert, macht es den meisten Proteasen unmöglich, diese Amidbindung hydrolytisch zu spalten. Die Prolylpeptidasen sind die einzige Klasse von Proteasen, die Proteine nach einem Prolinrest spalten können.³³

1.4.2.1 Dipeptidylpeptidase IV

Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) ist ein Typ II integrales Membran-Glycoprotein und eine Serinprotease. Sie ist der am besten erforschte Vertreter der Peptidase-Familie S9b, die zusammen mit der Familie der Prolyl Endopeptidasen S9a und der Acylaminoacyl Peptidasen S9c die Familie S9 der Prolyl Oligopeptidasen bildet.³⁴ Aufgrund ihrer atypischen Anordnung der Reste der katalytischen Triade (Ser, Asp, His) im Gegensatz zu Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen (His, Asp, Ser) spricht man bei DPPs und ihren Verwandten von nicht-klassischen Serinproteasen. DPP IV ist ein 110 kDa Protein, das auf „brush border“-Membranen (Membran, deren Oberfläche viele Ausstülpungen hat und deswegen einer Bürste ähnelt) von inneren Organen, Nieren, Epithelzellen, aktivierten T-Zellen und aktivierten Endothelzellen exprimiert ist. DPP IV hat die Fähigkeit Kollagen und Fibronectin zu binden.³⁵ Für DPP IV kommen viele Proteine als Substrat in Frage, eingeschlossen der Substanz P, dem β -Casomorphin, dem Kentsin, dem Somatoliberin, der α -Kette von Fibrin, den Incretinen, zum Beispiel GLP-1 (glucagon-like peptide 1), dem GIP (gastric inhibitory polypeptide),³⁶ den Neuropeptiden und den Chemokinen. Als gesichert gilt, dass Kollagen (bevorzugt Typ I und III) ein Substrat für DPP IV darstellt, das mit seinen vielen Glycin-Prolin- (Gly-Pro-) Sequenzen viele Möglichkeiten zur Hydrolyse bereitstellt (vgl. Abb. 1.6).³⁷ Neben dem bevorzugten Prolin spaltet DPP IV auch nach Alanin und Hydroxyprolin, allerdings in weitaus langsameren Raten.³⁷

Das Amin nimmt dabei die P2 Position ein, Prolin die P1 Position. Die aktivsten Inhibitoren haben eine elektrophile Gruppe ($P(O)(OPh)_2$, $CO-NH-O-COR'$, $B(OH)_2$ oder CN) als Ersatz für das normalerweise zu spaltende $P1-P1'$ Amid des Prolins. Die elektrophile Gruppe wirkt als Lewis-Säure und interagiert mit dem nucleophil angreifenden Serinrest des katalytischen Zentrums von DPP IV. Niedrig nanomolare Inhibition und orale Verfügbarkeit wurde mit den Nitrilverbindungen erzielt.³⁸ Eine große Anzahl diverser *N*-substituierter Glycinverbindungen zeigte gutes inhibitorisches Potential, wenn sie mit Pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril kombiniert wurden.³⁹ Auch größere, sterisch anspruchsvolle Reste werden von der P_2 -Tasche toleriert.⁴⁰ Statt des Glycins sind auch andere Aminosäuren möglich. Besonders potente Inhibitoren sind auch die Prolin-Boronsäuren.⁴¹ Es wird angenommen, dass das leere p-Orbital am Boratom mit dem katalytisch aktiven Serinrest einen stabilen „at“-Komplex bildet, der den Übergangszustand der Amidhydrolyse imitiert.⁴²⁻⁴⁴ Ein intramolekularer Ringschluss, in dem das Stickstoffatom des Amins an das Boratom koordiniert, führt dazu, dass freie Boronsäuren ihre Hemmwirkung in wässriger Lösung bei neutralem pH-Wert verlieren.⁴⁵ Als besonders wirkungsvoller Inhibitor stellte sich die *L*-Valin-*L*-Prolin-(2*R*)-Boronsäure heraus (siehe Abb. 1.5).⁴² Unter dem Namen Talabostat wird es in klinischen Studien als Therapeutikum gegen metastasierenden Darmkrebs (kolorektal Karzinom) getestet und liefert vielversprechende Ergebnisse.⁴⁶⁻⁴⁷

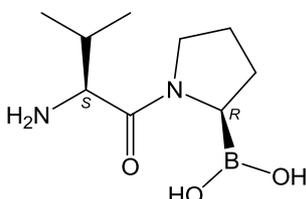


Abb. 1.5: Bester Inhibitor für DPP IV unter den Gly-Pro-Boronsäuren: *L*-Valin-Prolin-(2*R*)-Boronsäure.

1.4.2.2 Fibroblasten-Aktivierungs-Protein α

Fibroblasten-Aktivierungs-Protein α (FAP) (EC 3.4.21.B28),¹⁸ auch Seprase (surface expressed protease) genannt, ist eine membrangebundene Serinprotease und wird exklusiv von aktivierten Fibroblasten und bestimmten stromalen Fibroblasten bei aggressiven Krebsarten exprimiert. Das aktive Enzym ist ein 170 kDa Homodimer, das aus zwei *N*-glycosylierten 97 kDa Untereinheiten besteht.³⁴ Es gehört zur Familie S9b der Peptidasen.¹⁸ Die Einteilung nach der MEROPS-Datenbank ist Clan SC, Familie S9, Unterfamilie S9B, S09.007.²² FAP ist wie DPP IV ein Typ II Transmembranprotein mit einem aus 6 AS bestehenden Teil im Zytoplasma, einer 20 AS Transmembrandomäne am *N*-Terminus und einer extrazellulären Kette aus ~740 AS am *C*-Terminus, die das

katalytische Zentrum in nicht-klassischer Anordnung enthält.³⁵ Die Extrazellulärdomäne enthält eine *N*-terminale β -Propellerdomäne und eine *C*-terminale $\alpha\beta$ -Hydrolasedomäne. Der β -Propeller reguliert den Zugang zur $\alpha\beta$ -Domäne, die die katalytische Triade aus Ser, Asp und His enthält.⁴⁸ FAP und DPP IV sind innerhalb ihrer Familie die Enzyme, die sich in ihrer Sequenz am ähnlichsten sind, sie haben ein zu 68 % identisches katalytisches Zentrum. Um ihre proteolytische Aktivität ausüben zu können, bilden FAP und DPP IV Heterodimere und fungieren im Komplex auf den Filopodia aktivierter Fibroblasten als hocheffektive Einheit im Abbau der extrazellulären Matrix. FAP wird nur in angiogenetisch aktivem, nicht in normalem, gesundem Gewebe exprimiert.^{31,34} FAP unterscheidet sich von DPP IV darin, dass es außer Dipeptidylpeptidasen- auch Endopeptidasenaktivität besitzt, das heißt, es ist in der Lage peptidisches Substrat innerhalb der Kette zu spalten und nicht nur an der *N*-terminal vorletzten Peptidbindung.³¹ Der detaillierte Vergleich von DPP IV und FAP hat gezeigt, dass der Asp⁶⁶³-Rest in DPP IV in FAP durch den Ala⁶⁵⁷-Rest ersetzt ist, was in einer geringeren Azidität der Bindungstasche resultiert. Diese Änderung könnte die geringere Affinität von FAP für *N*-terminale Amine erklären.⁴⁸ Damit besitzt FAP Gelatinase- und Kollagenase-Aktivität. Es spaltet wie DPP IV stets die Amidbindung nach einer Prolin-AS-Einheit.³¹

Als Substrat für FAP gelten denaturiertes Kollagen Typ I und IV und Gelatin.³¹ Die lösliche Form des Antiplasmin Cleaving Enzyme (APCE) wurde kürzlich als FAP identifiziert. Somit wäre auch Met- α 2-Antiplasmin, ein Plasma Glycoprotein der Serpin Superfamilie und der physiologische Inhibitor von Plasmin, ein Schlüsselenzym im Fibrinabbau, ein physiologisches Substrat von FAP.⁴⁹ Die Tatsache, dass weder denaturiertes Kollagen noch Gelatin Bestandteil der extrazellulären Matrix ist, lässt die Frage nach dem natürlichen Substrat von FAP noch offen.¹⁸ Studien zeigen, dass FAP neben DPP IV mit anderen Proteasen, wie den Dipeptidylpeptidasen oder ausgewählten MMPs zusammenarbeitet und bereits teilweise abgebautes Kollagen Typ I und III hydrolysiert.⁵⁰ FAP spaltet wie DPP IV sein peptidisches Substrat nach einem Prolin, dieses besetzt also die P₁-Position. In seiner Funktion als Dipeptidylpeptidase akzeptiert es die meisten AS in der P₂-Position. Um als Endopeptidase zu agieren, benötigt es unbedingt Glycin in der P₂-Position (siehe Abb. 1.6).

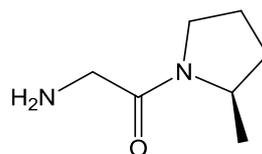


Abb. 1.6: Gly-Pro-mimetische Einheit als DPP IV- und FAP-affine Sequenz.

Es bevorzugt kleine, ungeladene AS an P₃, toleriert aber die meisten AS an P₄, P₁' und P₂'.⁵¹⁻⁵² Wie auch DPP IV und andere DPPs stellt die *L*-Valin-Prolin-(2*R*)-Boronsäure (siehe Abb. 1.5) einen sehr guten Inhibitor für FAP dar.⁵³ *L*-Valin-Prolin-(2*R*)-Boronsäure zeigt aber keine Selektivität, da sie auch sämtliche andere Prolylpeptidasen hemmt. Als selektiver FAP-Inhibitor wurde die Sequenz *N*-Ac-Gly-Pro identifiziert. Um die Endopeptidasen-Aktivität zu adressieren, wurde das Glycin für die P₂-Position gewählt. Die Acetylgruppe kann durch andere Acylreste ersetzt werden, wobei Benzoylreste sehr gute Ergebnisse erzielten, die die extrem hydrophobe S₃ Tasche von FAP besetzen.⁵⁴ Sterisch anspruchsvolle Alkylreste zeigten eine geringere Hemmwirkung an FAP und keinerlei Selektivität gegenüber DPP IV.⁵⁵ Dagegen zeigen die auf der Leitstruktur der Pyroglutamats basierenden Inhibitoren exzellente Inhibition gegenüber FAP und Selektivität gegenüber DPP IV, DPP II, DPP8 und DPP9.⁵⁶ *N*-acylierte Dipeptide haben gegenüber denen mit einer freien NH₂-Gruppe den Vorteil, nicht zu zyklisieren und bilden somit eine chemisch stabilere Substanzklasse.⁴² Neben der Boronsäure wurden auch andere Elektrophile auf ihr Potential in FAP-Inhibitoren untersucht. Als irreversible Inhibitoren werden Peptidyl-Chloromethyl-Ketone, die den Histidinrest des aktiven Zentrums alkylieren und Peptidyl-diphenyl-Phosphonate, die einen Phosphoester mit dem Serinrest des aktiven Zentrums formieren, eingesetzt.⁵² Eine weitere potente Gruppe der FAP-Inhibitoren bilden die Pyrrolidin-(2*S*)-carbonitrile (Pro-CNs, Abb. 1.7). Verglichen mit den Prolin-(2*R*)-Boronsäuren (boroPros) zeigen analoge Verbindungen mit CN (z.B. *N*-Ac-Gly-Pro-CN) zwar geringere Affinität zu FAP, da diese Tatsache aber auch für DPP IV zutrifft, könnte das bei der Entwicklung neuer Inhibitoren für eine Erhöhung der Selektivität genutzt werden.⁴⁸

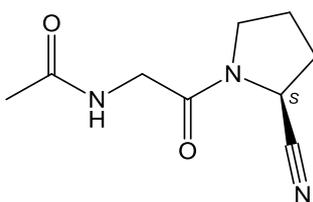


Abb. 1.7: Leitstruktur für FAP-selektive Inhibitoren: *N*-Acetylglycin-pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril.

1.4.3 Integrine

Neben Proteasen sind unter Anderem auch Integrine am Wundheilungsprozess beteiligt. Integrine sind heterodimere Transmembran-Rezeptoren, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Sie werden von fast allen Zelltypen exprimiert.⁵⁷ Sie besitzen außerdem ein zweifach geladenes Kation (Ca^{2+} oder Mg^{2+}) und gehören zur Substanzklasse der Glycoproteine. Die α - und β -Untereinheit sind nicht-kovalent

miteinander verbunden.⁵⁸ Die Integrine helfen dabei, Zellen mit anderen Zellen oder der extrazellulären Matrix zu verbinden.⁵⁹ Endothelzellen exprimieren eine Reihe unterschiedlicher Integrine, wodurch ein breites Spektrum an Komponenten der extrazellulären Matrix gebunden werden kann.⁶⁰ Die Familie der Integrine bildet eine Gruppe von Adhäsionsmolekülen, die als Rezeptoren für eine Vielzahl an Proteinen der extrazellulären Matrix, unter anderem den MMPs dienen. Die Bindung ist von schwächerer Natur als die anderer Zelloberflächenrezeptoren und beruht auf einer Wechselwirkung zur α - oder β -Untereinheit. Die Rezeptoren steuern Zell-Anhaftung und -Migration.⁵⁷ Die Untereinheiten können unterschiedlich kombiniert werden und ergeben so eine Vielzahl verschiedener Integrine.⁶⁰ Bisher sind 9 Typen der β - und 24 Typen der α -Untereinheit bekannt.⁵⁹ Unter allen Integrinen ist wahrscheinlich das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin am meisten in die Regulierung der Angiogenese involviert.⁵⁸ Es wird während der Angiogenese überexprimiert und dient als Rezeptor für das MMP-2. Zusammen mit der Protease bildet es einen funktionellen Komplex auf der Zelloberfläche und wird dafür verantwortlich gemacht, bei der Koordination der proteolytischen Aktivität beteiligt zu sein. Die Expression findet sowohl auf angiogenetisch aktiven Endothelzellen als auch auf Krebszellen statt.⁶¹ Aus diesem Grund ist es ein attraktives Target für Wirkstoffe, die die Angiogenese fördern oder unterbinden sollen.⁵⁷

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist das am besten *in vivo* untersuchte Integrin, das bei der Angiogenese eine Rolle spielt. Eine Blockade des Integrins durch Antikörper oder peptidische Agonisten verhindert die Neuformierung von Blutgefäßen, sei es bei der Neovascularisation (Blutgefäßbildung im Embryo) oder bei Tumorwachstum. Mithilfe von Phage Display Technologie wurde die Sequenz Arginin-Glycin-Aspartat (RGD, siehe Abb. 1.8) als Peptid mit hoher Affinität und Spezifität für die α_v Untereinheit gefunden.⁶⁰ Später wurde erkannt, dass RGD die minimale Erkennungssequenz ist, die in zahlreichen natürlichen Liganden wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, Plasminogen, Thrombospondin, Prothrombin, MMP-2, Laminin, Osteopontin etc. vorkommt. In Studien mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass RGD-basierte Inhibitoren pathologische Angiogenese unterdrücken.⁵⁸ Zahlreiche Inhibitoren unterschiedlicher Affinität, die die RGD-Sequenz enthalten, sind bekannt. Eine Zyklisierung des Peptids wirkt sich positiv auf die Stabilität der Konformation und somit auf die Bindungseigenschaften aus.⁵⁸ Der am besten untersuchte Antagonist des Integrins $\alpha_v\beta_3$ ist der Wirkstoff CilengitideTM (*Merck*), der anti-angiogenetische Effekte *in vitro* und *in vivo* zeigt.⁵⁷ Erst kürzlich endete eine weltweit angelegte klinische Studie der Phase III zur Bekämpfung von sehr aggressiven Hirntumoren (Glioblastom und methyliertem MGMT), wobei aber leider keine Verbesserung gegenüber den etablierten Therapeutika erzielt werden konnte.⁶²⁻⁶³

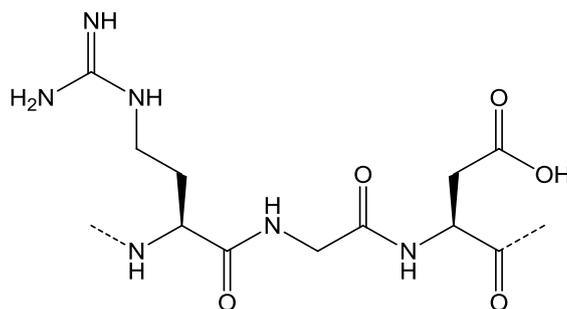


Abb. 1.8: Integrin $\alpha_v\beta_3$ -affine Peptidsequenz RGD: Arginin-Glycin-Aspartat.

1.5 Nuklearmedizinische Untersuchungen des Herzens

Nuklearmedizinische Methoden sind als Diagnoseverfahren in der klinischen Kardiologie etabliert.⁶⁴ Im Gegensatz zu anderen Bildgebungsverfahren, wie der Magnetresonanztomographie (MRT), dem Ultraschall (US) oder dem computerunterstützten Röntgen (CT), die Informationen über anatomische und strukturelle Zustände liefern, sind die nuklearmedizinischen Techniken, wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder die Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (single photon emission computed tomography = SPECT), in der Lage, molekulare Vorgänge im lebenden Organismus in Echtzeit abzubilden. Besonders PET eröffnet Einblicke in physiologische Vorgänge auf molekularer Ebene. Es ist ein nichtinvasives, bildgebendes Verfahren, bei dem die Verteilung eines radioaktiven Wirkstoffes im Patienten dargestellt werden kann. Die radioaktive Sonde, auch Radiopharmakon oder Tracer genannt, ist ein Molekül, das in einer bestimmten Weise mit seinem physiologischen Target wechselwirkt.⁶⁵

1.5.1 Positronen-Emissions-Tomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie ist ein bildgebendes Verfahren zur Diagnose in der Nuklearmedizin, bei der radioaktive Nuklide zum Einsatz kommen, die durch Positronen-Emission zerfallen. Positronen-Emitter (β^+ -Teilchen, e^+) werden im Zyklotron hergestellt und mit ihnen werden Moleküle markiert, die von biologischem Interesse sind. Diese werden meist durch intravenöse Injektion in den zu untersuchenden Organismus eingebracht und verteilen sich dort aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften. Die Wechselwirkung des radioaktiven Wirkstoffes (Radiopharmakon, Tracer) mit dem Körper führt zu einer Anreicherung (Uptake) am Bestimmungsort. Der radioaktive Zerfall des künstlich erzeugten, durch Protonenüberschuss instabilen Kerns, beruht auf dem Zerfall eines Protons in ein Neutron, das im Kern verbleibt und einem Positron, das diesen verlässt.



Gleichung 1.1: Fluor-18 zerfällt in Sauerstoff-18 (selbe Massenzahl, da Proton in Neutron zerfällt) unter Aussendung eines Positrons (e^+) und eines Neutrinos (ν).

Treffen Positronen auf ihre Antiteilchen, die Elektronen (β^- -Teilchen, e^-), zerfallen beide Teilchen aufgrund der Paarvernichtung (Annihilation) unter Aussendung von zwei Photonen, die den umgebenden Körper durchstrahlen und von den umliegenden Detektoren des Tomographen registriert werden. Die Detektoren wandeln die registrierten Ereignisse in ein elektronisches Signal um, aus dem mithilfe von mathematischen Algorithmen ein 3-dimensionales Tomographie-Bild rekonstruiert wird. Wird die Aufnahme in Zeitabschnitte (Frames) unterteilt, ist es möglich, die durch den Zerfall bildlich dargestellten biochemischen Vorgänge als Funktion der Zeit zu messen.

Positronen-emittierende Nuklide zeichnen sich durch charakteristische Halbwertszeiten und Maximalenergien aus. Die Nuklide, die im Rahmen dieser Arbeit von Interesse sind, sind in Tab. 1.2 aufgelistet.

Tabelle 1.2: Ausgewählte PET-relevante Nuklide.

Nuklid	Halbwertszeit	Maximalenergie	β^+ -Zerfallsanteil
${}^{18}\text{F}$	109.8 min	0.63 MeV	97 %
${}^{68}\text{Ga}$	67.5 min	1.89 MeV	89 %
${}^{124}\text{I}$	4.17 d	1.53, 2.14 MeV	23 %

Die Halbwertszeit $T_{1/2}$ gibt die Zeit an, nach der nur noch die Hälfte des radioaktiven Isotops einer Probe vorhanden ist. Die Aktivität nimmt exponentiell gemäß Gleichung 1.2 ab:

$$A(t) = A_{(0)} e^{-t/T_{1/2}}$$

Gleichung 1.2: Die Aktivität zur Startzeit 0 nimmt entsprechend der charakteristischen Halbwertszeit bis zur Messzeit t ab.

Die Aktivität wird in Becquerel ($\text{Bq} = 1/\text{s}$) oder Curie ($\text{Ci} = 37 \cdot 10^9 \text{ Bq}$) angegeben. Das beim Zerfall entstehende Positron hat je nach Energie in elektronenreichem Material eine durchschnittliche Reichweite von 0.01 bis 0.1 cm. Beim Zusammentreffen mit dem Antiteilchen wird die Energie beider Massen nach Einstein in elektromagnetische Energie (2 Photonen) umgewandelt:

1 EINLEITUNG

$$E = mc^2 = m_e c^2 + m_p c^2$$

Gleichung 1.3: Die Energie der durch Annihilation entstehenden Photonen resultiert aus der Masse von Elektron (m_e) und Positron (m_p) gemäß der Relativitätstheorie.

Die ausgesandten Photonen haben eine konstante Energie von zusammen 1022 keV, welche sich aus der Masse für Elektron ($9.1 \cdot 10^{-31}$ kg) und Positron ($9.1 \cdot 10^{-31}$ kg), sowie der Konstante für die Lichtgeschwindigkeit (c) berechnet (siehe Gleichung 1.3). Die beiden Photonen bewegen sich jeweils mit der Energie von 511 keV im Winkel von ca. 180° voneinander fort.⁶⁶

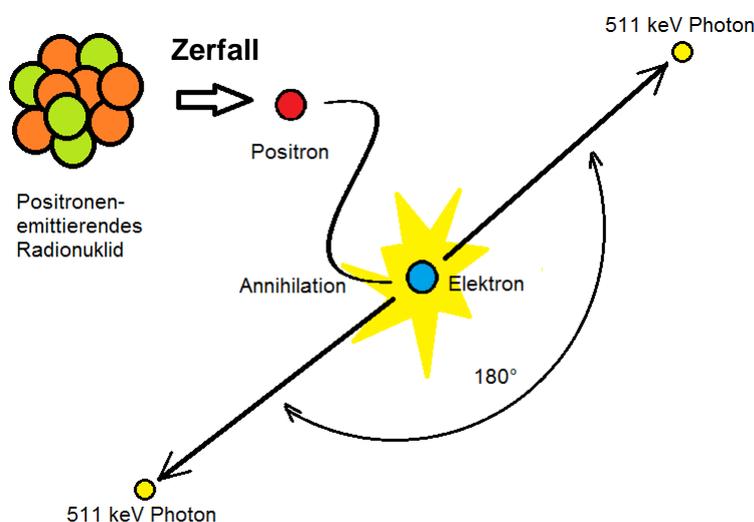


Abb. 1.9: Prinzip des Positronenzerfalls und der Annihilation zu zwei Photonen.

Aufgrund ihrer hohen Energie, die im γ -Strahlen-Bereich des elektromagnetischen Spektrums liegt, können die Photonen den zu untersuchenden Körper durchdringen. PET-Detektoren sind in den meisten Fällen ringförmig angeordnet, sodass das zu untersuchende Objekt gleichmäßig von allen Seiten umrundet ist. Treffen am Detektorring zwei Photonen in einem kleinen Zeitfenster (typischerweise wenige Nanosekunden) ein, so wird dies als ein Ereignis erfasst und gespeichert. Im Zuge der Rekonstruktion wird die Tatsache verwendet, dass die Annihilation (bei einem nicht gestreuten Ereignis) auf der Verbindungslinie der beiden Detektorelemente stattgefunden hat. Aufgrund der geringen Reichweite des Positrons ist somit in guter Näherung auch der Ort des zerfallenden Atoms bestimmt (siehe Abb. 1.9). Die Aufnahmen werden als Schnittbilder angezeigt, welche die Anreicherung des Radiopharmakons durch unterschiedliche Farbabstufungen anzeigt.^{66,67} Abbildung 1.10 zeigt die Entstehung eines Schnittbildes aus dem Zerfall eines Positronenstrahlers innerhalb des Detektorrings.

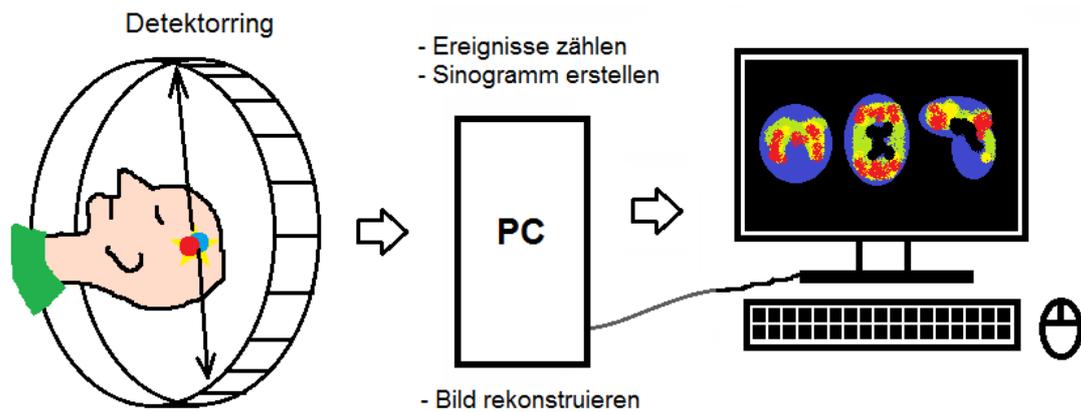


Abb. 1.10: Kopf eines Patienten im Detektorring des Tomographen, Positronenzerfall liefert Schnittbilder des Hirns.

Der Patient wird in Rückenlage mit dem Kopf voran auf der Liege des PETs platziert und in den Detektorring gefahren (siehe Abb. 1.11).



Abb. 1.11: PET zur Anwendung am Menschen (hier in Kombination mit CT)
 © Universitätsklinikum Würzburg, Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin.⁶⁸

1.5.2 PET-Untersuchungen des Herzens

Das wohl bekannteste und am häufigsten eingesetzte Radiopharmakon für die Untersuchung mit PET ist die [¹⁸F]Fludeoxyglucose (FDG),⁶⁷ die dem Patienten intravenös verabreicht wird.⁸

1 EINLEITUNG

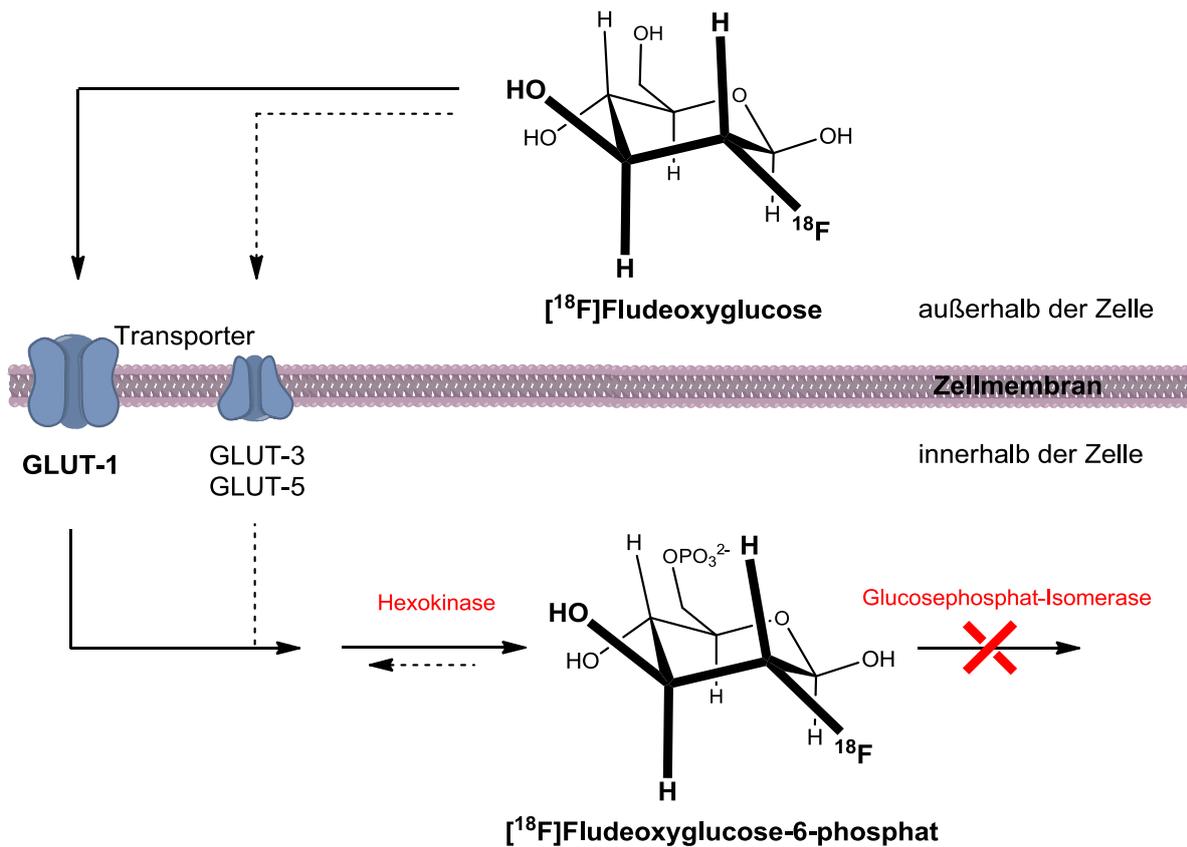


Abb. 1.12: Struktur und veränderter Metabolismus („metabolic trapping“) von $[^{18}\text{F}]$ Fludeoxyglucose (FDG).

Sie wird wie Glucose ins Cytosol transportiert und dort phosphoryliert, das resultierende $[^{18}\text{F}]$ Fludeoxyglucose-6-phosphat kann aber nicht weiter abgebaut werden und reichert sich somit an („metabolic trapping“,⁶⁹ siehe Abb. 1.12). PET liefert Schnittbilder, auf denen der Zuckerstoffwechsel des untersuchten Organismus bildlich dargestellt wird. Regionen, die einen hohen Energiebedarf und somit eine erhöhte Stoffwechselrate haben, zeigen eine größere Anreicherung (Uptake) von FDG als Regionen geringen Energiebedarfs.⁸ FDG wird deshalb zum Nachweis von Myokardviabilität eingesetzt. Zur Untersuchung des Myokard-Metabolismus oder des kardialen sympathischen Nervensystems stehen weitere PET-Tracer zur Verfügung. Theoretisch erlaubt die Radiochemie der PET-Tracer die Produktion einer nahezu grenzenlosen Vielfalt an Biomolekülen zur Untersuchung des Herzens.⁷⁰ Tabelle 1.3 zeigt die PET-Tracer, die derzeit im klinischen Einsatz Anwendung finden.

Tabelle 1.3: PET-Tracer zur klinischen Untersuchung des Herzens.

Tracer	Anwendung
O-15 Kohlenmonoxid	Blut-Pool
O-15 Wasser	Durchblutung
N-13 Ammoniak	Durchblutung
Rb-82	Durchblutung/Viabilität
Cu-64 PTSM	Durchblutung
F-18 Fludeoxyglucose (FDG)	Glucose-Metabolismus
C-11 Acetat	oxidativer Metabolismus/ Durchblutung
C-11 Palmitat	Fettsäure-Metabolismus
C-11 Hydroxyephedrin (HED)	präsynaptisches sympathisches Nervensystem
C-11 CGP 12177	β -adrenerge Rezeptor-Dichte

Nach einem Myokardinfarkt kann durch den Einsatz von FDG geklärt werden, welche Areale und in welchem Ausmaß das Herz von Nekrose betroffen ist, da abgestorbenes Myokard keinen Glucosebedarf hat und somit keinen Uptake zeigt.⁸ Um die molekularen und zellulären Vorgänge bei und nach einem Myokardinfarkt genauer zu verstehen, wird derzeit an neuen Radiopharmaka zu diesem Zweck geforscht. Vorgänge, die für die nuklearmedizinische Bildgebung einen Angriffspunkt zur genaueren Diagnose liefern, sind das ventrikuläre Remodeling, die Aktivität der Matrixmetallproteasen, die Angiogenese, die aktivierte Faktor XIII-Transglutaminaseaktivität und die Apoptose. Zur Diagnose der Angiogenese mittels PET wurden bereits erfolgreich Strategien angewendet, um den vaskularen endothelen Wachstumsfaktor VEGF zu visualisieren. Etabliert ist bereits der Nachweis des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins (siehe Kapitel 1.4.3) durch PET.⁷¹

2 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Fortschritte in der nuklearmedizinischen Diagnostik werden im Wesentlichen durch die Entwicklung geeigneter organ- bzw. krankheitsspezifischer Radiopharmaka geprägt.

Das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt stellt einen maladaptiven Prozess mit Entwicklung einer Herzinsuffizienz und der Gefahr des plötzlichen Herztodes dar. Trotz einiger therapeutischer Möglichkeiten, z.B. den Einsatz von Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, bleibt ein ungünstiges Remodeling der führende Grund für die Herzinsuffizienz, welche einen signifikanten Beitrag zu den hohen kardiovaskulären Morbiditäts- und Mortalitätsraten der Bevölkerung hat.

Nach einem Myokardinfarkt zeigen sich Gewebeveränderungen im Sinne einer Wundheilungsreaktion mit Freisetzung multipler neuro-humoraler Faktoren, inflammatorischer Zellinfiltration, Resorption von nekrotischem Gewebe sowie Umbau der extrazellulären Matrix mit Ausbildung eines kollagenhaltigen Narbengewebes. Aktivierte Fibroblasten differenzieren zu Myofibroblasten, steigern die Kollagensynthese und tragen zur Ausbildung einer Fibrose sowohl im geschädigten als auch im gesunden Bereich des Herzens bei. Mit fortschreitender Fibrose und dem Umbau der extrazellulären Matrix dünnt die linksventrikuläre Wand aus und die Pumpfunktion wird erheblich eingeschränkt.

Die Fibroblasten werden innerhalb der ersten Tage nach Myokardinfarkt aktiviert und wandern im Rahmen der Wundheilung in das geschädigte Gewebe ein. Neben strukturellen Veränderungen des Gewebes findet auch Angiogenese statt, um die Bereiche irreversibel geschädigter Myokardanteile mit neuen Kapillaren zu versorgen. Diese Wachstumsvorgänge werden durch bestimmte, in Folge des Myokardinfarkts vermehrt exprimierte Enzyme stimuliert. Allerdings sind die Aufgaben dieser Proteasen für kardiale Heilungs- und Adaptationsprozesse bei Schädigung und Überlastung nicht hinreichend geklärt.

Zwei bei diesen Umbauprozessen wesentlich beteiligte Proteasen stellen das membranständige Fibroblasten-Aktivierungs-Protein α (FAP) und die Dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV) dar. FAP wird auf aktivierten Fibroblasten vermehrt exprimiert und besitzt Effekte auf Kollagensynthese und -abbau sowie Zellmigration, -proliferation und -invasion. Daher wird postuliert, dass die Inhibition von FAP zu einer Modulation der Fibrosereaktion und des kardialen Remodelings führen kann. Des Weiteren ist bekannt, dass Angiogenese nicht nur mit einer erhöhten membranständigen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression einhergeht, sondern dabei einige andere Enzyme eine ähnlich große Rolle spielen. Ein an der Angiogenese beteiligtes Enzym ist die Metallprotease

Aminopeptidase N (APN, CD13), welche sich auf der äußeren Oberfläche der Membran von Endothelzellen befindet.

Um die Bedeutung und Funktionsweise von Aminopeptidase N (APN) und Fibroblasten-Aktivierungs-Protein α (FAP) während des Remodelings nach Myokardinfarkt auf molekularer Ebene *in vivo* untersuchen und quantifizieren zu können, eignet sich derzeit nur die molekulare Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET).

Ziel dieser Arbeit ist daher, spezifische Radiopharmaka für die nicht-invasive *in-vivo*-Untersuchung von Heilungs- und Remodelingsprozessen nach Myokardinfarkt mit PET zu entwickeln. Es sollen spezifische Radiopharmaka für die *in vivo* und *ex vivo* Darstellung und Quantifizierung der FAP- und der neoangiogenetischen APN-Expression in infarziertem Myokard entwickelt werden, um die Rolle dieser Proteasen bei Remodelings- und Heilungsprozessen aufzuklären.

Für die Untersuchung der Angiogenese soll ein peptidisches Substrat von APN synthetisiert werden, das mit einem Positronenstrahler radioaktiv markiert werden soll. Der synthetisierte Radiotracer soll mittels Kleintier-PET (*in vivo*) und mittels Autoradiographie (*ex vivo*) getestet werden. Zur Überprüfung der Ergebnisse sind immunohistochemische Untersuchungen vorgesehen. Nach dem Vorbild des Tracers ^{68}Ga -NOTA-RGD, der zur Darstellung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins bereits etabliert ist, soll ausgehend von der bekannten APN-affinen Peptidsequenz NGR (siehe Abb. 1.3) ein Peptid entwickelt werden, das durch einen geeigneten Chelatbildner mit Gallium-68 markiert werden kann. Neben der Optimierung der Synthesebedingungen soll eine Formulierung gefunden werden, welche das Radiopharmakon für tierexperimentelle Untersuchungen nutzbar macht. Die Kleintier-PET Untersuchungen verlaufen für den APN-selektiven Radiotracer parallel zu Untersuchungen mit ^{68}Ga -NOTA-RGD, da sowohl APN als auch das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bei der Angiogenese überexprimiert sind. So ist es möglich, die Ergebnisse mit einer bereits etablierten Methode zu vergleichen und zu bewerten.

Das Wundheilungs- und Fibroseverhalten nach Myokardinfarkt soll im Falle des Fibroblasten-Aktivierungs-Proteins α (FAP) in Ratten durch Ischämie/Reperfusion untersucht werden. Des Weiteren sollen molekulare Aktivierungsmechanismen mittels molekularbiologischer und immunohistochemischer Methoden sowie nicht-invasiver molekularer Bildgebung, der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) visualisiert werden. Dazu soll ein peptidomimetischer Inhibitor gefunden werden, um diesen *ex vivo* mittels Autoradiographie und *in vivo* am Kleintier-PET an einem Ischämie/Reperfusion-Rattenmodell zu untersuchen.

Für die Untersuchung der Expression der Serinprotease FAP sollen affine Stoffe synthetisiert werden, die mittels radioaktiver Markierung zu PET-Tracern entwickelt werden. Die Affinität der Verbindungen zu FAP soll in Enzymtestungen (*in vitro*) untersucht und in Vergleich zur Affinität der verwandten Protease DPP IV gestellt werden. Die Inhibitoren sollen reversibel sein und selektiv gegenüber DPP IV. Die radioaktiven Markierungen müssen in Hinblick auf Synthese, Analytik, Aufreinigung und Formulierung für die Anwendung am Kleintier optimiert werden. Die Testung der radioaktiv markierten Inhibitoren soll am Kleintier-PET (*in vivo*) und mittels Autoradiographie (*ex vivo*) erfolgen. Immunohistochemische Untersuchungen sollen die Ergebnisse vervollständigen. Ausgehend von der FAP-affinen Peptidsequenz Gly-Pro (siehe Abb. 1.6) sollen peptidomimetische Inhibitoren für die Endopeptidaseaktivität des Enzyms entwickelt werden. Als Leitstruktur dient dafür das *N*-Acetylglycin-pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril (siehe Abb. 1.7).

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Funktion APN und FAP für Heilungs- und Remodeling-Vorgänge nach Myokardinfarkt und für die Entwicklung des fibrotischen Gewebeumbaus besitzen. Dabei sollen neuartige Radiopharmaka zur Darstellung und Quantifizierung der Heilungs- und Remodelingprozesse nach einem Myokardinfarkt mittels PET bereitgestellt werden.

2.1 Aufgabenstellung zu den PET-Tracern für FAP

Inhibitoren, die für die Serinprotease FAP synthetisiert werden sollen, weisen als Leitstruktur die Peptidsequenz Gly-Pro auf (siehe Kapitel 1.4.2).⁵⁴ Der C-Terminus des Prolins soll hierbei statt der Carbonsäuregruppe eine elektrophile Gruppe enthalten, der *N*-Terminus des Glycins soll mit einer aromatischen Gruppe acyliert werden. Als Vorbilder für Inhibitoren mit aromatischen Resten dienten vorangegangene Arbeiten, die in einem Mini-Review von Wolf zusammengestellt sind.⁵¹ Die aromatische Gruppe muss so geartet sein, dass sie entweder eine Abgangsgruppe für die radioaktive Markierung (ergibt den Precursor) oder das nicht-radioaktive Nuklid entsprechend dem radioaktiven Nuklid (Positronenemitter) des PET-Tracers (ergibt die Referenz) trägt. Abbildung 2.1 zeigt die Grundstruktur für die angestrebten Verbindungen, die als elektrophile Gruppe Carbonitril enthalten und mit einer Abgangsgruppe oder einem nicht-radioaktiven Nuklid (X) substituiert sind.

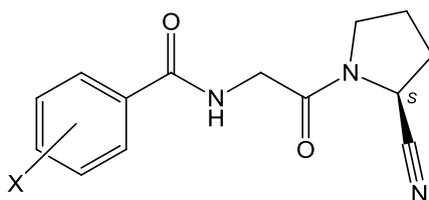
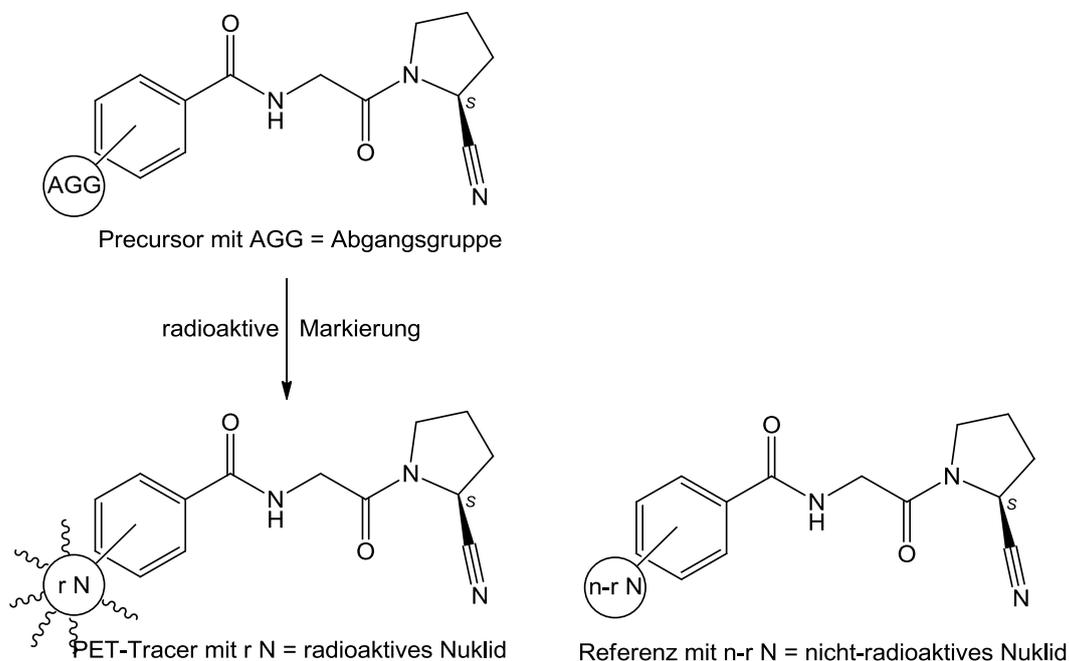


Abb. 2.1: FAP-Inhibitor-Grundstruktur *N*-BzGly-Pro-(*S*)-CN; X = Abgangsgruppe oder nicht-radioaktives Nuklid.

Für die angestrebten PET-Tracer zur Visualisierung des Enzyms FAP sollen die Vorstufen für die radioaktive Markierungen (Precursoren) sowie die Referenzen der radioaktiv markierten Verbindungen durch organische Synthese dargestellt werden.

Die Precursoren der PET-Tracer tragen anstelle des radioaktiven Nuklids eine für die radioaktive Markierung geeignete Abgangsgruppe. Die Referenzen der radioaktiv markierten PET-Tracer tragen statt einem radioaktiven Nuklid das entsprechende natürliche, stabile Isotop. Schema 2.1 zeigt exemplarisch einen Precursor, der eine Abgangsgruppe (AGG) trägt und durch radioaktive Markierung in den PET-Tracer mit radioaktivem Nuklid (rN) überführt wird nebst der Referenz, die das nicht-radioaktive Nuklid ($n-rN$) trägt.



Schema 2.1: Allgemeine Darstellung der Radiomarkierung eines Precursors (oben), des daraus resultierenden PET-Tracers nach der Markierung (links) und der entsprechenden Referenz (rechts).

Die Referenzen sollen als Vergleich in der Analytik der radioaktiv markierten Verbindung und als Inhibitoren in Enzymassays für die Enzyme FAP und DPP IV dienen, in denen ihre Hemmwirkung getestet werden soll.

Die in Abbildung 2.1 gezeigte Radiomarkierung soll im Rahmen dieser Arbeit mit Fluor-18 und Iod-124 durchgeführt werden. Für die Radiofluorierung der in Abb. 2.1 gezeigten Struktur muss der gewählte Precursor am Aromaten eine geeignete Abgangsgruppe, z.B. eine Nitrogruppe oder eine Tetraalkylammoniumgruppe tragen. Als Referenz soll die Verbindung mit natürlichem Fluor anstelle der Abgangsgruppe dargestellt werden.⁷² Für die Markierung mit Iod-124 eignen sich u.a. Brom, Tributylzinn und Talliumsals als Abgangsgruppen, wobei im Rahmen dieser Arbeit zunächst Brom als Abgangsgruppe in den gewählten Precursoren bevorzugt wird. Die Referenz enthält natürlich vorkommendes Iod.⁷³⁻⁷⁴ Anstelle des Halogenaustausches mit Brom ist die radioaktive Markierung auch durch Isotopenaustausch mit Iod möglich, dafür wird als Precursor die iodsubstituierte Verbindung benötigt.⁷⁵

Nachdem für Fluor- und Iod-substituierte Verbindungen dieser Struktur zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung keine experimentellen Daten hinsichtlich ihrer Affinität und Selektivität für FAP zur Verfügung standen, muss die Hemmwirkung in enzymatischen Assays ermittelt werden. Für die in Abb. 2.2 aufgeführten Verbindungen sind bereits enzymatische Assay für FAP und DPP IV etabliert. Die Hemmdaten dieser Inhibitoren sind in Tab. 2.1 zusammengestellt. Dabei ist *N*-AcGly-(2*S*)-Pro-CN für FAP selektiv, die Verbindungen (*S*)-Val-(2*S*)-Pro-CN und (*S*)-Ile-(2*S*)-Pro-CN sind für DPP IV selektiv.^{48,51}

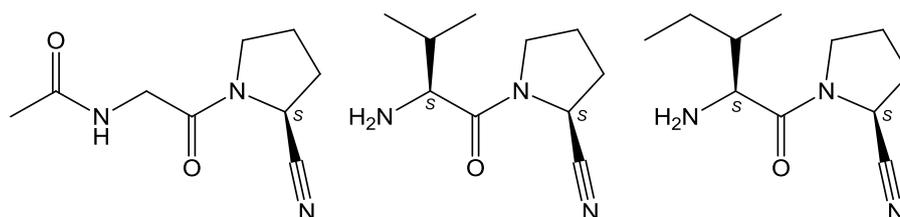


Abb. 2.2: Standardinhibitoren für FAP und DPP IV.

N-AcGly-(2*S*)-Pro-CN (links), (*S*)-Val-(2*S*)-Pro-CN (Mitte) und (*S*)-Ile-(2*S*)-Pro-CN (rechts).

Tabelle 2.1: Übersicht über die K_i -Werte der Standardinhibitoren.

K_i	FAP	DPP IV
<i>N</i>-AcGly-(2<i>S</i>)-Pro-CN	$6.8 \pm 0.4 \mu\text{M}$	$61 \pm 3 \mu\text{M}$
(<i>S</i>)-Val-(2<i>S</i>)-Pro-CN	$340 \pm 10 \mu\text{M}$	$10.1 \pm 0.6 \text{ nM}$
(<i>S</i>)-Ile-(2<i>S</i>)-Pro-CN	$84 \pm 2 \mu\text{M}$	$1.9 \pm 0.1 \text{ nM}$

Mittels organischer Synthese sollen also diverse Verbindungen der Grundstruktur *N*-BzGly-Pro-(*S*)-CN dargestellt werden, die am Aromaten entweder mit einer Abgangsgruppe für die radioaktive Markierung oder mit nicht-radioaktivem Fluor bzw. Iod substituiert sind. Zusätzlich sollen *N*-AcGly-(2*S*)-Pro-CN,⁵¹ (*S*)-Val-(2*S*)-Pro-CN und (*S*)-Ile-(2*S*)-Pro-CN⁴⁸ zum Vergleich mit den neu entwickelten Inhibitoren in enzymatischen Assays synthetisiert werden.

2.2 Aufgabenstellung zum PET-Tracer für APN

Bei der Entwicklung von Radiopharmaka zur PET-Untersuchung von Neo-Angiogenese während der Heilungs- und Remodelingsprozesse nach Myokardinfarkt sollen peptidische Substrate von APN synthetisiert werden, die anschließend mit dem Positronenstrahler Gallium-68 (⁶⁸Ga) mittels Chelat-Komplexierung markiert werden. Mithilfe u.a. der Phagen-Display Technologie wurde die peptidische Sequenz Asparagin-Glycin-Arginin (NGR, siehe Abb. 1.4) als APN-affine Sequenz identifiziert.²⁶ Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass das NGR-Peptid an angiogenetisch aktives, APN-haltiges Gewebe mit hoher Spezifität bindet.²⁷ Des Weiteren ist eine Vielzahl an Wirkstoffen erfolgreich an das NGR-Peptid gekuppelt worden, um deren Aufnahme in neugebildete Blutgefäße zu erhöhen, darunter antiangiogenetische Wirkstoffe, zytotoxische Wirkstoffe und Krebstherapeutika.²⁸ Ferner wurde das NGR-Peptid nach Komplexierung mit Gadolinium (III) als Kontrastmittel für die *in-vivo*-Untersuchung mittels Magnetresonanztomographie bereits erfolgreich eingesetzt.²⁹ Nach dem Vorbild des Tracers ⁶⁸Ga-NOTA-RGD, der zur Darstellung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins bereits etabliert ist, soll ausgehend von der APN-affinen Peptidsequenz NGR ein Peptid entwickelt werden, welches durch einen geeigneten Chelatbildner mit Gallium-68 markiert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit soll das NGR-Peptid über NOTA mit ⁶⁸Ga komplexiert werden. Das synthetisierte ⁶⁸Ga-NOTA-NGR (siehe Abb. 2.3) soll am Kleintier-PET *in vivo* und mittels Autoradiographie *ex vivo* getestet werden und anschließend mit Daten aus immunohistochemischen Analysen korreliert werden. Ferner sollen die Daten der PET-Untersuchung von ⁶⁸Ga-NOTA-NGR mit ⁶⁸Ga-NOTA-RGD verglichen werden.

2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

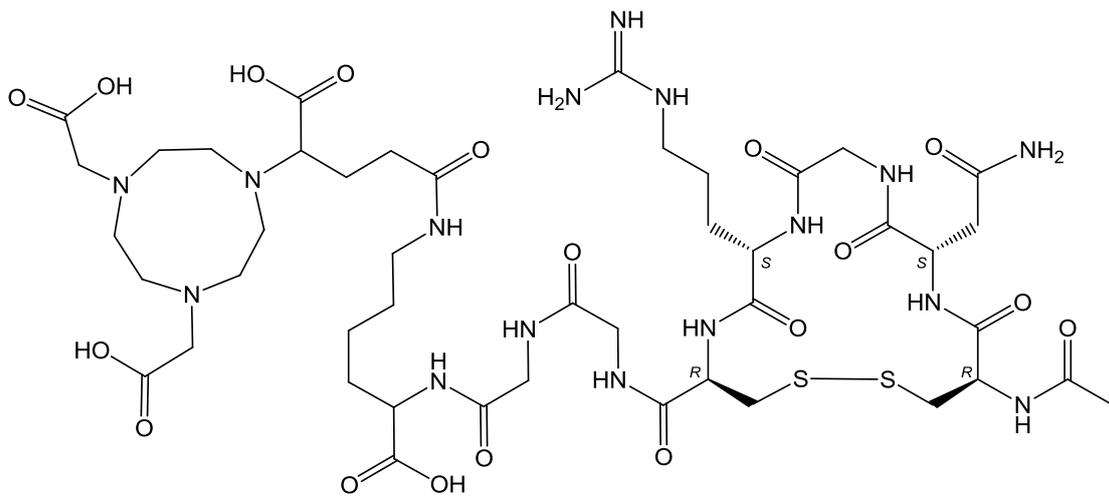
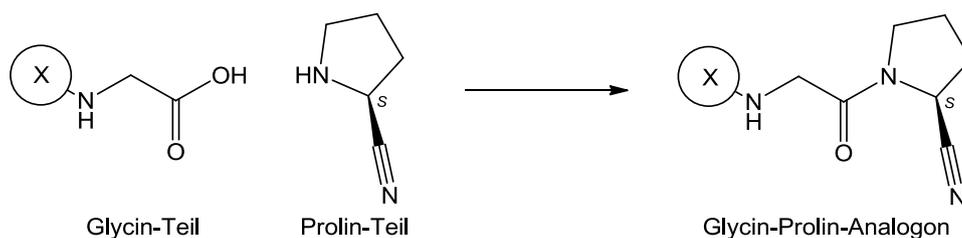


Abb. 2.3: Struktur von NOTA-NGR für die Markierung mit Gallium-68 (^{68}Ga).

II ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3 Synthesen von Vorstufen und Referenzen der PET-Tracer für FAP

Die angestrebten Verbindungen setzen sich aus einem Glycin- und einem Prolin-Teil zusammen, die fertigen Precursoren und Referenzen werden zusammengefasst als Glycin-Prolin-Analoga bezeichnet (siehe Schema 3.1).



Schema 3.1: Glycin-Teil und Prolin-Teil ergeben das Glycin-Prolin-Analogen.

X = Abgangsgruppe oder nicht-radioaktives Nuklid.

Die Synthesestrategien zu sämtlichen Zwischen- und Endstufen sind in den nachfolgenden Schemata zusammengestellt.

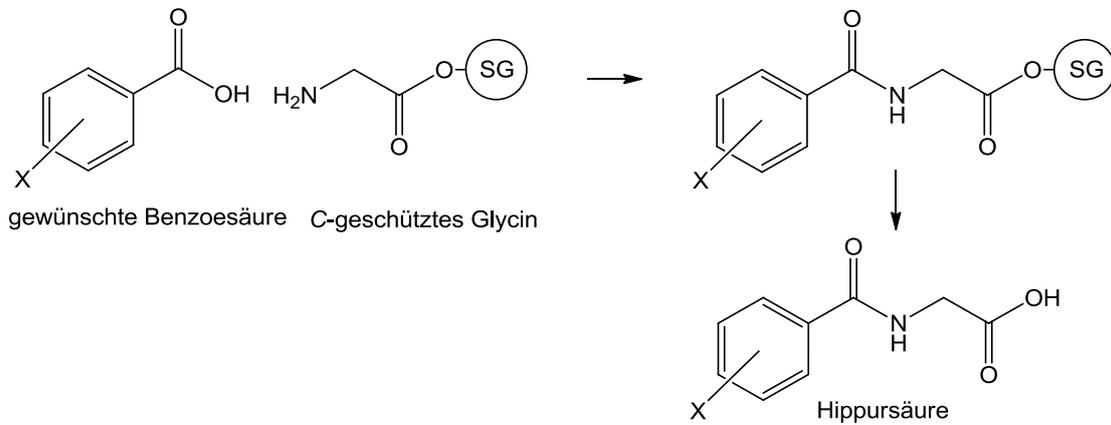
Es werden folgende Abkürzungen verwendet:

X nicht-radioaktives Nuklid **oder** Abgangsgruppe

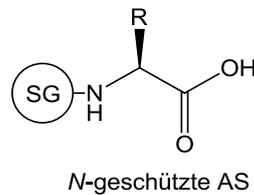
SG Schutzgruppe

AS Aminosäure

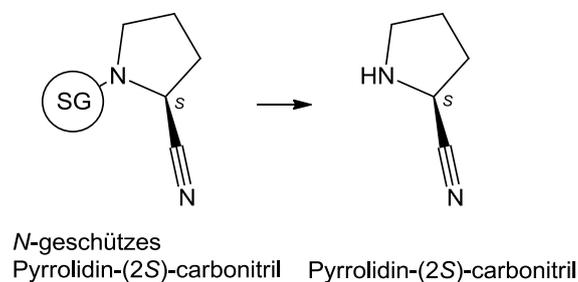
R Rest der Aminosäure, H bei Glycin, (S)-iPr bei (S)-Valin, (S)-iBu bei (S)-Isoleucin

Glycin-Teil**Hippursäuren**

Schema 3.2: Die angestrebten Hippursäuren werden aus einer mit Abgangsgruppe oder nicht-radioaktivem Nuklid (X) substituierten Benzoesäure durch Kupplung mit C-geschütztem Glycin und anschließender Entfernung der Schutzgruppe (SG) dargestellt.

AS

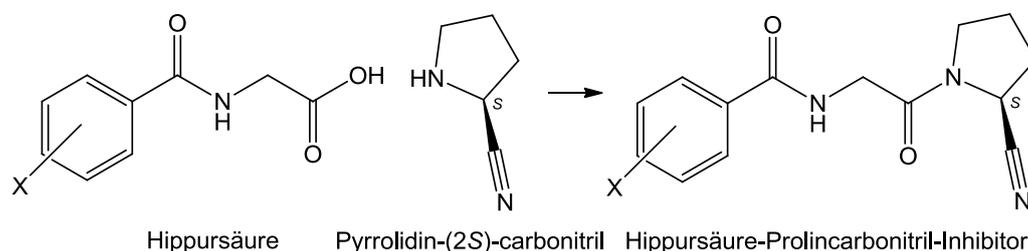
Schema 3.3: Die benötigten N-geschützten Aminosäuren (AS) werden käuflich erworben.

Prolin-Teil**Prolincarbonitril**

Schema 3.4: Das angestrebte Prolincarbonitril wird durch Entfernung der Schutzgruppe (SG) aus N-geschütztem Pyrrolidin-(2S)-carbonitril dargestellt.

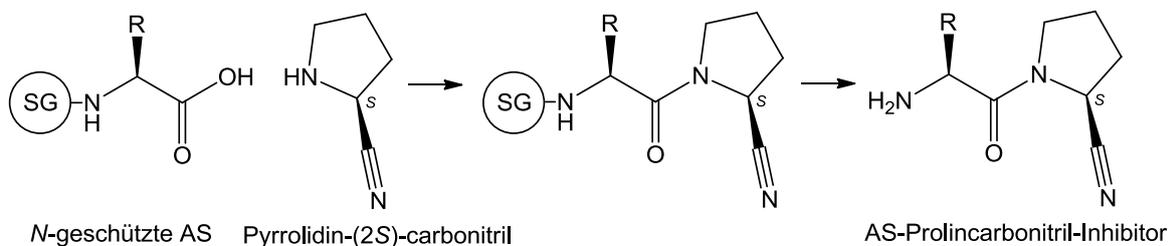
Glycin-Prolin-Analoga

Hippursäure-Prolincarbonitril



Schema 3.5: Die angestrebten Hippursäure-Prolincarbonitril-Inhibitoren werden aus der entsprechenden Hippursäure und Pyrrolidin-(2S)-carbonitril dargestellt.

AS-Prolincarbonitril



Schema 3.6: Die angestrebten Aminosäure-Prolincarbonitril-Inhibitoren werden aus der entsprechenden *N*-geschützten Aminosäure und Pyrrolidin-(2S)-carbonitril sowie Entfernung der Schutzgruppe (SG) dargestellt.

Angaben zu verwendeten Methoden, Reaktionsbedingungen und Ausbeuten folgen in den Unterkapiteln 3.1, 3.2 und 3.3, detaillierte Versuchsdurchführungen werden in Kapitel 12 beschrieben.

3.1 Glycin-Teil

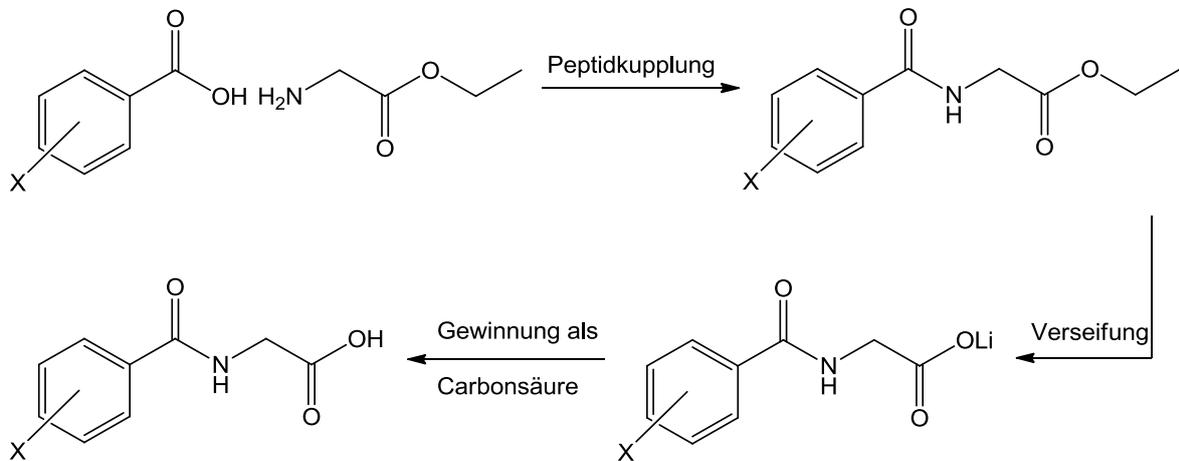
3.1.1 Hippursäuren

Die *N*-Benzoylglycinbausteine (Hippursäuren) werden durch die Verknüpfung von Glycin mit einer entsprechend substituierten Benzoesäure dargestellt.

Die Synthesestrategie der Hippursäuren beläuft sich auf eine Peptidkupplung der mit einer Abgangsgruppe (für Precursoren) oder einem nicht-radioaktiven Nuklid (für Referenzen) substituierten Benzoesäure mit Glycinester und anschließender Abspaltung der Ethyl-

3 SYNTHESEN VON VORSTUFEN UND REFERENZEN FÜR PET-TRACER FÜR FAP

Schutzgruppe. Schema 3.7 zeigt den allgemeinen Synthesepfad zur Darstellung der Hippursäuren. Isolierte Zwischenstufen sind Hippursäureethylester und Lithiumhippurate.

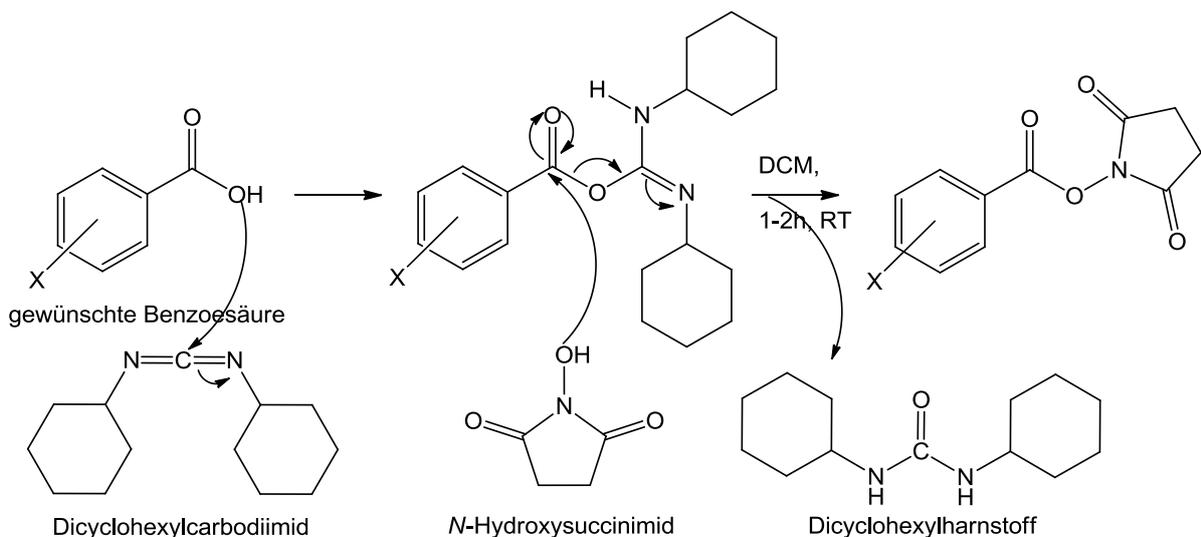


Schema 3.7: Synthesepfad zur Darstellung der Hippursäuren aus einer substituierten Benzoesäure und Glycinethylester.

3.1.1.1 Darstellung der Hippursäureethylester

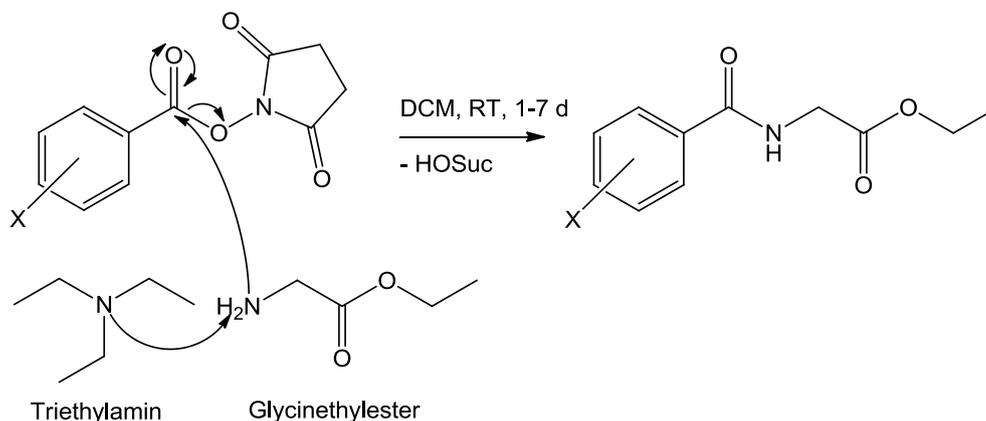
Peptidkupplung einer Benzoesäure und Glycinethylester Hydrochlorid mit DCC und HOSuc

Die Hippursäureethylester werden durch eine Peptidkupplung der gewünschten Benzoesäure mit Glycinethylester Hydrochlorid dargestellt. Als geeignete Kupplungsreagenzien bieten sich Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *N*-Hydroxysuccinimid (HOSuc) an.⁷⁶⁻⁷⁹ Der Mechanismus ist in den Schemata 3.8 und 3.9 gezeigt.



Schema 3.8: Erster Schritt der Kupplung zum Hippursäureethylester mit DCC und HOSuc.

Im ersten Schritt greift die OH-Funktion der Benzoesäure nucleophil am Carbodiimid-Kohlenstoffatom des DCCs an und es bildet sich ein Ester. Dieser wird durch den nucleophilen Angriff der OH-Funktion des HOSucs am Carbonyl-Kohlenstoffatom des Benzoesäureesters verdrängt, wodurch sich der Benzoesäure-OSuc-Aktivester ausbildet und Dicyclohexylharnstoff als Feststoff anfällt.



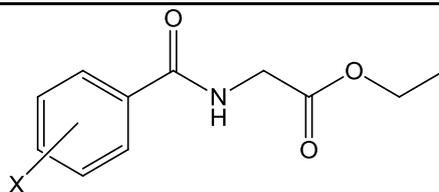
Schema 3.9: Zweiter Schritt der Kupplung einer Benzoesäure und Glycinethylester mit NEt_3 .

Der Aktivester reagiert im zweiten Schritt mit dem durch eine Aminbase (z. B. Triethylamin NEt_3) aus seinem Hydrochlorid-Salz freigesetzten Glycinethylester, der nucleophil am Carbonyl-Kohlenstoffatom des Benzoesäureesters angreift und die *N*-Hydroxysuccinimid-Gruppe wieder substituiert (siehe Schema 3.9).⁷⁶⁻⁷⁷

Nach der beschriebenen Anleitung wurden verschiedene Fluor-, Nitro-, Iod- und Bromhippursäureethylester dargestellt. Es wurden stets ein Äquivalent der entsprechend substituierten Benzoesäure, ein Äquivalent DCC, ein Äquivalent HOSuc, ein Äquivalent Glycinethylester Hydrochlorid und zwei Äquivalente NEt_3 eingesetzt. Die Reaktion wurde in Dichlormethan (DCM) oder Tetrahydrofuran (THF) bei Raumtemperatur (RT, 23 °C) durchgeführt und dauerte zwischen einem Tag und einer Woche. Der Aktivester wurde zunächst aus einer Lösung aus Benzoesäure, DCC und HOSuc durch Abfiltrieren des ausgefällten Dicyclohexylharnstoffs erhalten, was innerhalb von ein bis zwei Stunden komplettiert war. Die resultierende Lösung wurde in ein Gemisch aus Glycinethylester und Aminbase in DCM bzw. THF gegeben, worin die Kupplung zum Zielmolekül stattfand. Die Isolierung des Produkts erfolgte durch wässrige Aufarbeitung und Extraktion mit Essigsäureethylester. In Tab. 3.1 sind alle synthetisierten Hippursäureethylester nebst Reaktionsbedingungen und der höchsten erzielten Ausbeute aufgeführt.

3 SYNTHESEN VON VORSTUFEN UND REFERENZEN FÜR PET-TRACER FÜR FAP

Tabelle 3.1: Übersicht über die synthetisierten Hippursäureethylester.



Verbindungs-Nr.	Substitution X am Aromaten	Lösemittel	Reaktionszeit	Ausbeute
1	2-Cl-6-F	DCM	6 d	99 %
1	2-Cl-6-F	THF	3 d	61 %
1	2-Cl-6-F	THF	7 d	50 %
2	2-F	DCM	6 d	79 %
3	3-F	DCM	6 d	88 %
4	4-F	THF	6 d	98 %
4	4-F	DCM	6 d	78 %
5	2-F-4-F	THF	3 d	92 %
6	2-F-6-F	THF	1 d	86 %
7	2-F-4-F-6-F	THF	1 d	89 %
8	2-Cl-6-NO ₂	DCM	6 d	87 %
9	2-NO ₂	THF	3 d	97 %
10	3-NO ₂	THF	3 d	35 %
11	4-NO ₂	THF	3 d	98 %
11	4-NO ₂	THF	6 d	83 %
12	2-Br	THF	3 d	89 %
13	3-Br	THF	3 d	99 %
14	4-Br	THF	3 d	86 %
14	4-Br	THF	6 d	72 %
15	2-I	THF	6 d	64 %
16	3-I	THF	3 d	92 %
17	4-I	THF	6 d	80 %
17	4-I	DCM	6 d	27 %

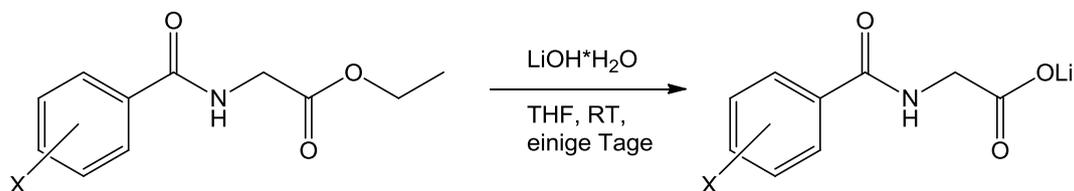
Andere Synthesemethoden mit DCC ohne HOSuc⁸⁰ resultierten in sehr geringen Ausbeuten (z.B.: Verbindung 1, 7 %). Andere Kupplungsreagenzien wie Propylphosphonsäureanhydrid (PPA)⁸¹ oder Carbonyldiimidazol (CDI)⁸² führten nicht zum entsprechenden Produkt. Die Reaktion der gewünschten Benzoessäure mit SOCl₂ zum Säurechlorid und anschließender Kupplung an die Aminosäure zeigten keine oder nur sehr geringe Umsetzung.^{76-77,83-84} Nach einer Methode, bei der Glycinethylester Hydrochlorid und das Säurechlorid der gewünschten Benzoessäure in einem zweiphasigen System aus Wasser und Methyl-Tetrahydrofuran (Me-THF) unter Verwendung der Base Natriumhydrogencarbonat aneinander gekuppelt werden, wurden akzeptable Ausbeuten

von 45-64 % erzielt.⁸⁵ Diese stellte aber keine Alternative zur Kupplung mit DCC und HOSuc dar.

3.1.1.2 Darstellung der Lithiumhippurate

Verseifung der Hippursäureethylester mit LiOH·H₂O

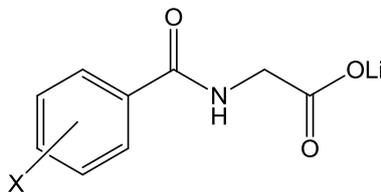
Die Entfernung der Ethylschutzgruppe der Hippursäureethylester erfolgt durch Hydrolyse. Der Ester wird durch Lithiumhydroxid Monohydrat verseift, was bei Raumtemperatur erfolgt (siehe Schema 3.10).⁸⁶ Edukt und Reaktand wurden äquimolar eingesetzt. Die angestrebten Verbindungen wurden bei RT (23 °C) in Tetrahydrofuran (THF) innerhalb von ein bis zwei Wochen dargestellt und konnten in sehr guten Ausbeuten, z.T. sogar quantitativ, erhalten werden. Die Isolierung des festen Produkts gelang durch Filtration.



Schema 3.10: Verseifung des Ethylesters zum Lithiumhippurat.

In Tab. 3.2 sind alle nach dieser Vorschrift synthetisierten Lithiumhippurate nebst ihrer maximal erzielten Ausbeute aufgelistet. War nach 7 Tagen bei der Reaktionskontrolle durch Dünnschichtchromatographie erkennbar, dass die Reaktion erst zum Teil abgelaufen war, wurde die Reaktionszeit auf 15 Tage ausgeweitet, um eine möglichst vollständige Ausbeute zu erzielen.

Tabelle 3.2: Übersicht über die synthetisierten Lithiumhippurate.



Verbindungs-Nr.	Substitution X am Aromaten	Reaktionszeit	Ausbeute
18	2-Cl-6-F	7 d	quant.
19	2-F	7 d	91 %
20	3-F	7 d	80 %
21	4-F	7 d	quant.

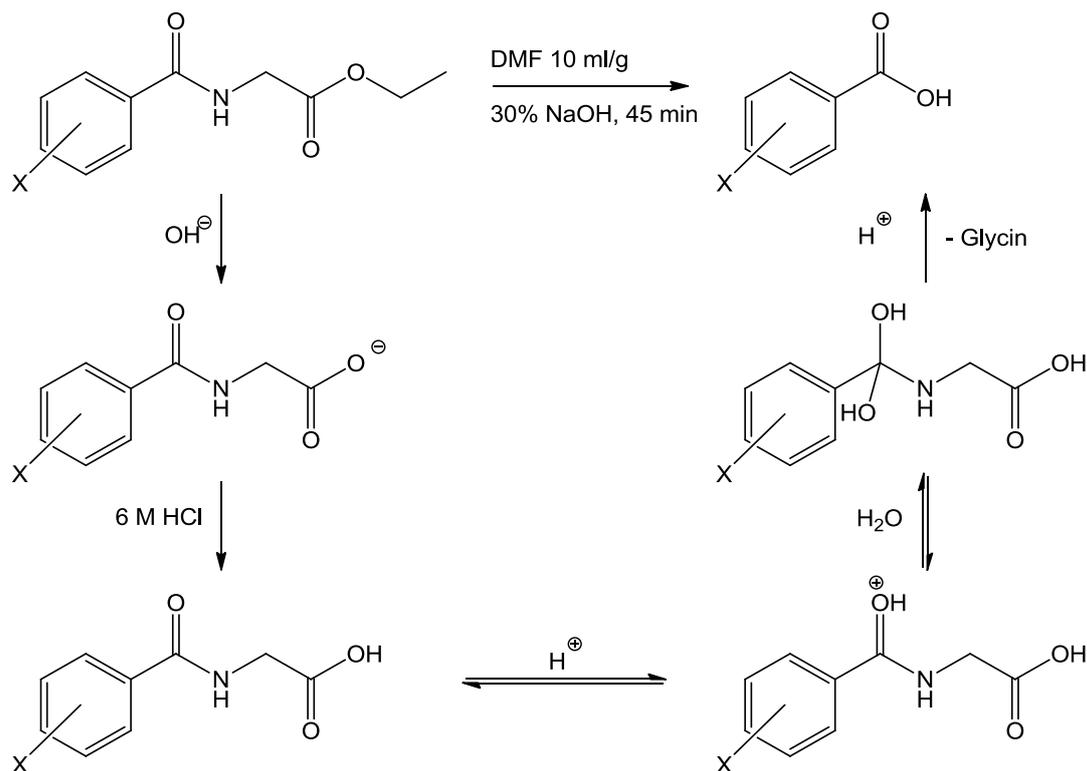
3 SYNTHESSEN VON VORSTUFEN UND REFERENZEN FÜR PET-TRACER FÜR FAP

21	4-F	15 d	quant.
22	2-F-4-F	7 d	80 %
23	2-F-6-F	7 d	96 %
24	2-F-4-F-6-F	7 d	quant.
25	2-Cl-6-NO ₂	7 d	94 %
26	2-NO ₂	7 d	99 %
27	3-NO ₂	7 d	67 %
28	4-NO ₂	7 d	98 %
28	4-NO ₂	15 d	93 %
29	2-Br	7 d	94 %
30	3-Br	7 d	92 %
31	4-Br	15 d	quant.
31	4-Br	14 d	89 %
32	2-I	7 d	74 %
33	3-I	7 d	83 %
34	4-I	7 d	quant.
34	4-I	15 d	quant.

3.1.1.3 Darstellung der Hippursäuren

Verseifung der Hippursäureethylester mit NaOH und HCl

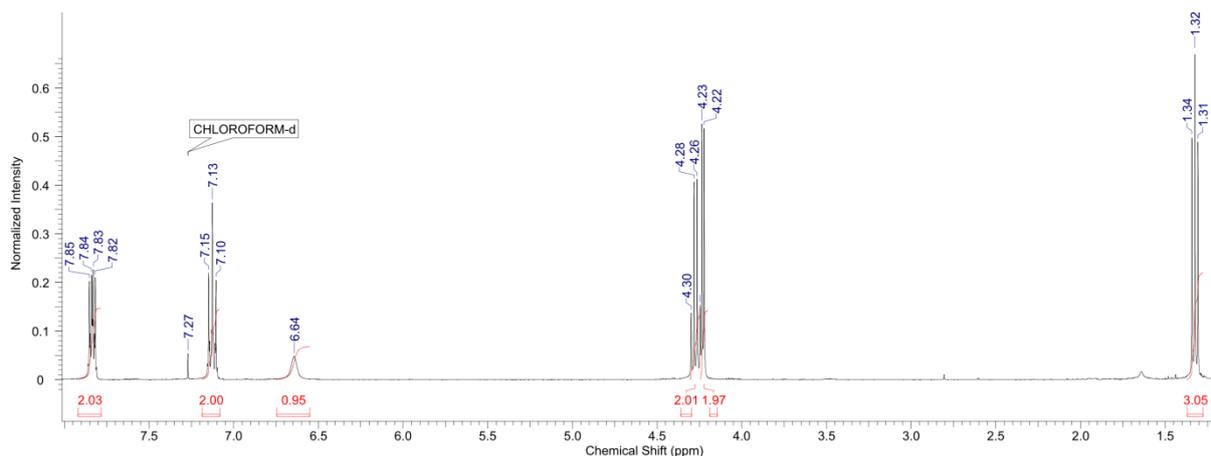
Neben der Verseifung zum Lithiumhippurat wurde eine weitere Methode getestet, die in kürzerer Zeit und ohne Carboxylat-Zwischenstufe zur Carbonsäure führen sollte. Nach dem Vorbild der Vorschrift für Zimtsäureethylester sollte die Ethyl-Schutzgruppe der Hippursäureethylester mit 10 ml/g Dimethylformamid (DMF) und 30 %iger Natronlauge (NaOH) abgespalten werden. Im basischen Milieu liegt die Carbonsäure zunächst als Carboxylat vor. Aufarbeitung mit 6 M Salzsäure (HCl) soll die Hippursäure generieren, die durch Extraktion mit Diethylether gewonnen werden kann.⁸⁷ Bei der Reaktionsdurchführung nach dieser Vorschrift verlief die Ethyl-Schutzgruppenentfernung zunächst schnell, dennoch konnte die Hippursäure nicht gewonnen werden. Die Neutralisation der basischen Lösung mit starker Säure verlief schlecht kontrollierbar und unter extremer Hitzeentwicklung, was zur Zerstörung der Peptidbindung führte. In Schema 3.11 ist der Mechanismus dieser Reaktion gezeigt. Die Abspaltung von EtOH aus dem Ethylester erfolgt durch nucleophilen Angriff des Hydroxidions am Carbonyl-Kohlenstoffatom. Die anschließend durch die starke Ansäuerung protonierte Hippursäure ist am Amid-Kohlenstoffatom instabil gegenüber Hydrolyse und wird durch den nucleophilen Angriff eines Moleküls Wasser in Glycin und Benzoesäure gespalten.



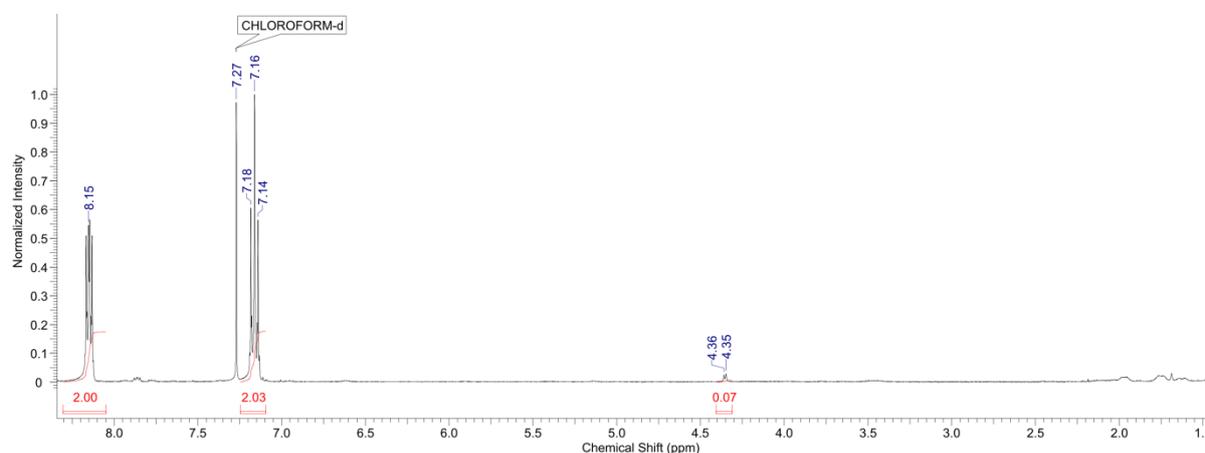
Schema 3.11: Mechanismus der Hydrolyse der Hippursäureethylester mit NaOH und HCl.

Gezeigt werden konnte dies mithilfe von $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Spektrum 3.1 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Ausgangsstoffes (Verbindung 4 = 4-Fluorhippursäureethylester, siehe Tab. 3.1) mit den Signalen für die aromatischen Protonen (Ar-H) bei einer Verschiebung von 7.84 ppm und 7.13 ppm, dem Signal für das Amid-Proton (NH) bei 6.64 ppm, den Signalen für die Methylen-Gruppe des Glycin-Teils bei 4.23 ppm (CH_2) und den Signalen für die Ethylschutzgruppe bei 4.27 ppm (CH_2) und 1.32 ppm (CH_3). Spektrum 3.2 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum für das Produkt, das aus Verbindung 4 mit der beschriebenen Methode dargestellt und isoliert wurde. Das Spektrum zeigt Signale für die aromatischen Protonen bei einer Verschiebung von 8.15 ppm und 7.16 ppm. Die Signale für die Ethylschutzgruppe sind zwar wie gewünscht nicht vorhanden, dafür sind die Signale für das amidische Proton (NH) und für die Methylen-Gruppe (CH_2) des ursprünglichen Glycin-Teils ebenfalls nicht bzw. nur zu einem Bruchteil vorhanden (das Signal bei einer Verschiebung von 4.36 ppm zeigt ein Integral von 0.07). Das Spektrum zeigt demnach nur die Signale für die entsprechende Benzoesäure, die somit zurückgewonnen wurde. Es wurde nicht nur der Ethylrest sondern der gesamte Glycin-Teil abgespalten. Die Bedingungen dieser Reaktionsmethode sind offenbar nicht für die Entfernung von Ethylschutzgruppen von Hippursäureethylester geeignet.

3 SYNTHESEN VON VORSTUFEN UND REFERENZEN FÜR PET-TRACER FÜR FAP



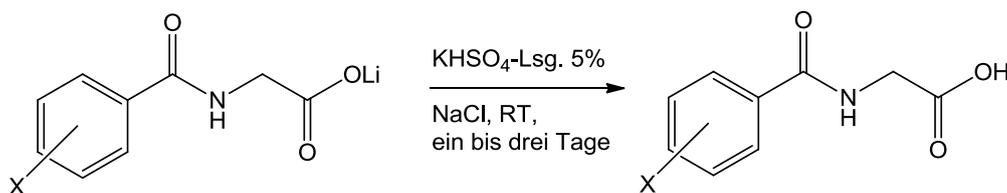
Spektrum 3.1: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Ausgangsstoffes der Verseifung (Verbindung 4).



Spektrum 3.2: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produkts der Verseifung von Verbindung 4 mit NaOH und HCl.

Freisetzung der Carbonsäuren aus den Lithiumhippuraten mit KHSO_4

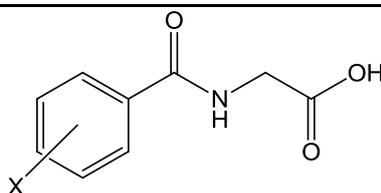
Die Lithiumhippurate werden durch Ansäuern in die Carbonsäuren überführt. Die Reaktion erfolgt unter milden Bedingungen mit Kaliumhydrogensulfatlösung (5 %), die innerhalb von einigen Stunden bei Raumtemperatur abläuft (siehe Schema 3.12).⁸⁸ Zu starkes Ansäuern kann, wie bei der Reaktion mit NaOH und HCl gezeigt, zur Spaltung der Peptidbindung führen.



Schema 3.12: Freisetzung der Hippursäuren durch Ansäuern der Lithiumhippurate.

Die Reaktion wurde in 5 %iger-Kaliumhydrogensulfatlösung ohne zusätzliches Lösemittel unter Zugabe von Natriumchlorid bis zur Sättigung durchgeführt. Die Reaktion fand bei RT (23 °C) statt und dauerte einige Stunden, wurde aber in vielen Fällen einige Tage fortgeführt, was zu einer Steigerung der Ausbeute führte (siehe Verbindungen **38**, **45** und **51** in Tab. 3.3). Das Produkt wurde durch Extraktion mit Essigsäureethylester erhalten. Tab. 3.3 zeigt die erzielten Hippursäuren nebst ihrer maximalen Ausbeute, die anhand dieser Methode dargestellt wurden.

Tabelle 3.3: Übersicht über die synthetisierten Hippursäuren.



Verbindungs-Nr.	Substitution X am Aromaten	Reaktionszeit	Ausbeute
35	2-Cl-6-F	3 d	73 %
36	2-F	3 d	93 %
37	3-F	3 d	85 %
38	4-F	3 d	87 %
38	4-F	1 d	78 %
39	2-F-4-F	3 d	72 %
40	2-F-6-F	3 d	85 %
41	2-F-4-F-6-F	3 d	81 %
42	2-Cl-6-NO ₂	12 h	71 %
43	2-NO ₂	1 d	55 %
44	3-NO ₂	3 d	77 %
45	4-NO ₂	3 d	88 %
45	4-NO ₂	1 d	86 %
46	2-Br	3 d	57 %
47	3-Br	3 d	43 %
47	3-Br	3 d	51 %
48	4-Br	1 d	93 %
49	2-I	3 d	83 %
50	3-I	3 d	85 %
51	4-I	3 d	97 %
51	4-I	1 d	64 %

3.2 Prolin-Teil

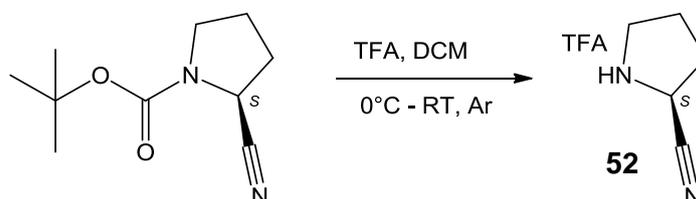
3.2.1 Prolincarbonitril

Das benötigte Pyrrolidin-(2S)-carbonitril kann durch Entfernung der Schutzgruppe vom käuflich erwerbbaeren Boc-Pyrrolidin-(2S)-carbonitril erhalten werden. Die dafür möglichen Methoden sind im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.2.1.1 Darstellung von Pyrrolidin-(2S)-carbonitril

Boc-Entschützung bei Boc-Pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit TFA

Die Boc-Entschützung des Boc-Pyrrolidin-(2S)-carbonitrils erfolgt mittels Ansäuerung mit Trifluoressigsäure (TFA) (siehe Schema 3.13).⁸⁹

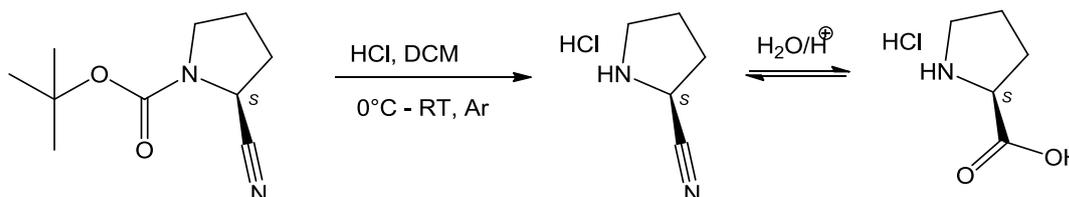


Schema 3.13: Boc-Entschützung von Boc-Pyrrolidin-(2S)-carbonitril.

Die Reaktion wurde in Dichlormethan unter Schutzgas bei 0 °C und mit TFA im Überschuss durchgeführt. Nach zwei Stunden wurde das Lösemittel entfernt und das Produkt (**52**) wurde über Nacht bei 0 °C in Diethylether ausgefällt. Das Pyrrolidin-(2S)-carbonitril wird als TFA-Salz und in einer maximalen Ausbeute von 73 % erhalten. In seltenen Fällen konnte kein Produkt auskristallisiert werden. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf vier bis sechs Stunden wirkte sich positiv auf die Ausbeute aus.

Boc-Entschützung bei Boc-Pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit HCl

Da die Boc-Schutzgruppen-Abspaltung mit Trifluoressigsäure teilweise in unzuverlässigen Ausbeuten erfolgte, wurde als Alternative die Entschützung mit gasförmigem Chlorwasserstoff herangezogen (Schema 3.14).⁹⁰

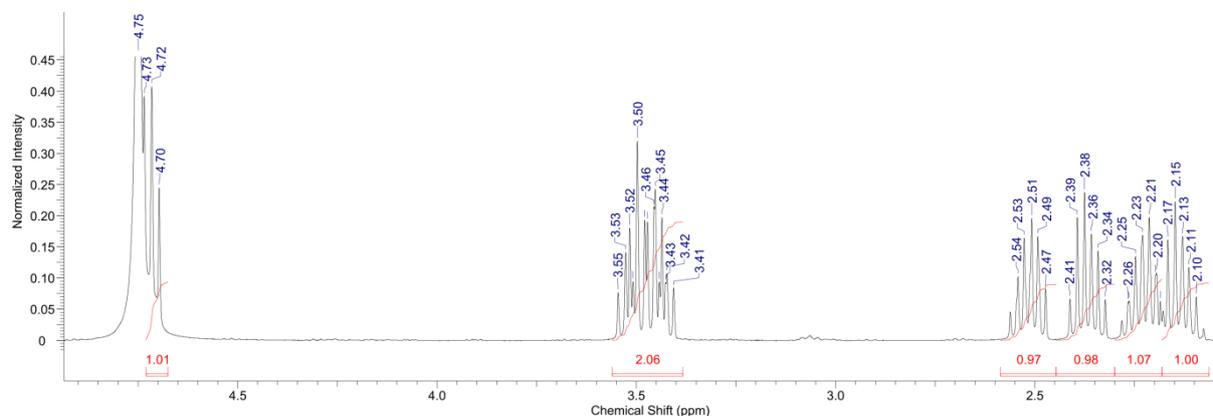


Schema 3.14: Boc-Entschützung mit HCl und teilweiser Umwandlung des Nitrils zur Carbonsäure.

Die Generierung von Chlorwasserstoff erfolgte durch Auftropfen von konzentrierter Salzsäure auf das Trockenmittel Calciumchlorid. Der Chlorwasserstoff wird durch ein Gaseinleitungsrohr in den Reaktor geleitet, in dem der Ausgangsstoff in Dichlormethan bei 0 °C unter Schutzgas vorgelegt wurde. Die Reaktionsdauer betrug acht Stunden. Das Produkt wurde durch Überschichtung mit Diethylether und Lagerung bei 0 °C durch Kristallisation gewonnen. Trotz erheblichen Aufwands verlief die Reaktion nicht komplett wasserfrei, was dazu führte, dass ein Teil des entstehenden Pyrrolidin-(2S)-carbonitrils säurekatalysiert zum (S)-Prolin hydrolysiert wurde (siehe Schema 3.14). Es resultierten Produktgemische im Verhältnis von 70:30 bis 0:100 Pyrrolidin-(2S)-carbonitril zu S-Prolin.

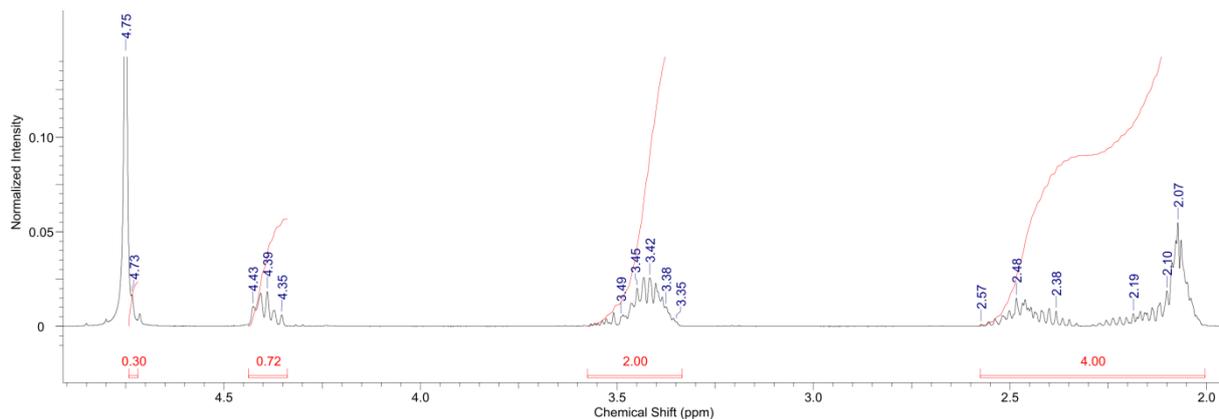
Dies konnte anhand von $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie-Daten gezeigt werden. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt das Proton des Stereozentrums unterschiedliche Verschiebung, je nachdem, ob sich eine Carbonsäure- oder Carbonitrilgruppe in Nachbarstellung befindet. Die Verschiebung des Protons bei Carbonitril entspricht etwa 4.70 ppm, die des Protons bei Carbonsäure 4.40 ppm. Die Zusammensetzung des Gemisches ist über die Integrale der Signale für das Proton auszurechnen. Bei Spektrum 3.3 wurde die Boc-Gruppe nach der Methode mit TFA entfernt, das NMR-Spektrum zeigt ausschließlich Signale für das Carbonitril (1H bei $\delta = 4.72$ ppm). Spektrum 3.4 zeigt eine 70:30 Mischung aus Carbonitril zu Carbonsäure (0.7H bei $\delta = 4.39$ ppm und 0.3H bei $\delta = 4.73$ ppm). Bei Spektrum 3.5 wurde die Nitrilgruppe vollständig zur Carbonsäure hydrolysiert (1H bei $\delta = 4.40$ ppm). Das große Signal bei 4.75 ppm entspricht dem NMR-Lösemittel D_2O . Die beiden CH_2 -Gruppen des Pyrrolidinrings ergeben ein Integral von 4 und haben eine Verschiebung von ca. 2.0-2.6 ppm.

Die Reaktion der Boc-Gruppenentfernung mit Chlorwasserstoff lieferte demnach kein reines Produkt und wurde aufgrund dieser Erkenntnis nicht mehr angewendet.

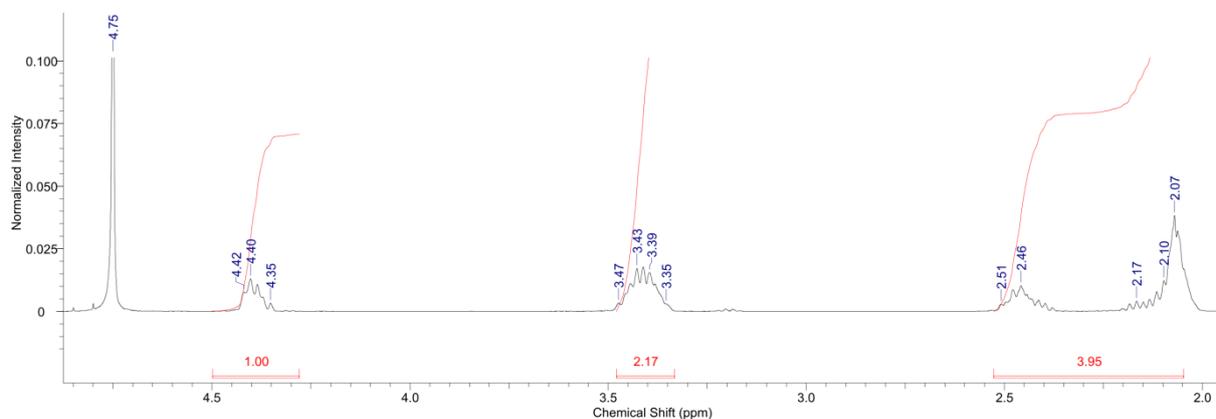


Spektrum 3.3: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Boc-Abspaltung von Boc-Pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit TFA; 1H bei 4.72 ppm.

3 SYNTHESEN VON VORSTUFEN UND REFERENZEN FÜR PET-TRACER FÜR FAP



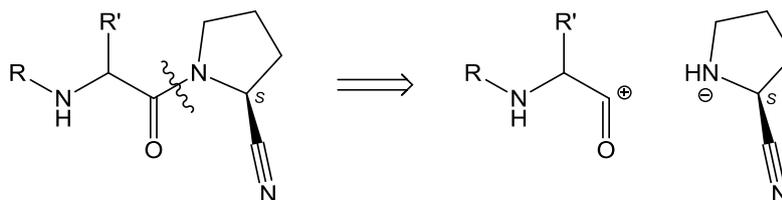
Spektrum 3.4: ^1H -NMR-Spektrum der Boc-Abspaltung von Boc-Pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit HCl; 0.3H bei 4.72 ppm und 0.7H bei 4.39 ppm.



Spektrum 3.5: ^1H -NMR-Spektrum der Boc-Abspaltung von Boc-Pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit HCl; 1H bei 4.40 ppm.

3.3 Glycin-Prolin-Analoga

Wie eingangs erwähnt, setzen sich die Inhibitoren aus einem Glycin- und einem Prolin-Teil zusammen. In Schema 3.15 ist die Retrosynthese für die Grundstruktur der angestrebten Verbindungen gezeigt. Der Glycin-Teil ist dabei entweder eine substituierte Hippursäure oder eine *N*-geschützte Aminosäure. R steht demnach für einen substituierten Benzoylrest oder eine Schutzgruppe, R' steht für ein Wasserstoffatom H bei allen Hippursäuren oder einen bestimmten Rest bei Aminosäuren. Als Prolin-Teil steht Pyrrolidin-(2S)-carbonitril zur Verfügung.



Schema 3.15: Retrosynthese der Inhibitorgrundstruktur.

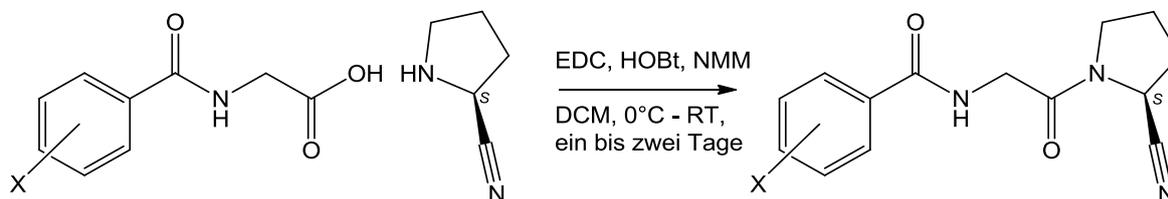
3.3.1 Hippursäure-Prolincarbonitril-Konjugate

Die Verbindung der substituierten Hippursäuren mit Pyrrolidin-(2S)-carbonitril kann durch die im Folgenden beschriebene Peptidkupplungsmethode erfolgen.

3.3.1.1 Darstellung von Hippursäure-pyrrolidin-(2S)-carbonitrilen

Peptidkupplung einer Hippursäure und Pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit EDC und HOBt

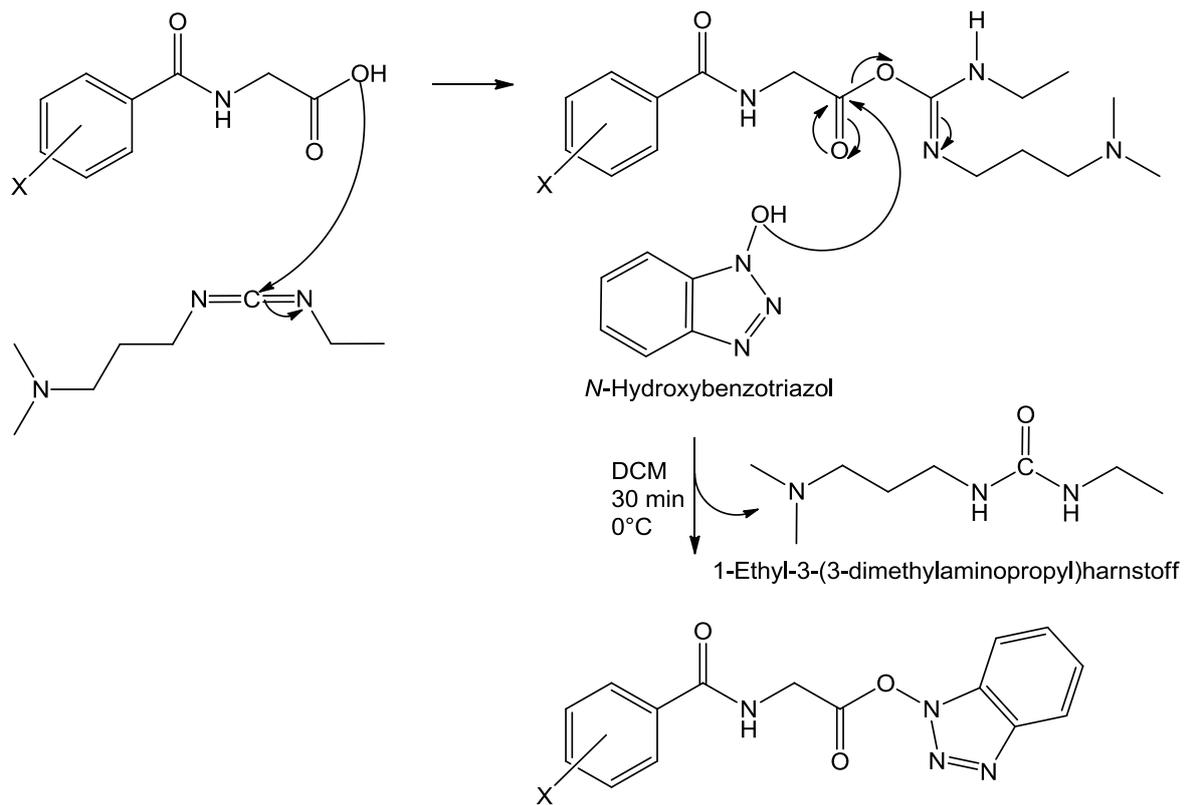
Eine gängige Methode der Verknüpfung von Hippursäure und Pyrrolidin-(2S)-carbonitril ist die Kupplung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (Schema 3.16).⁴²



Schema 3.16: Peptidkupplung einer Hippursäure und Pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit EDC und HOBt.

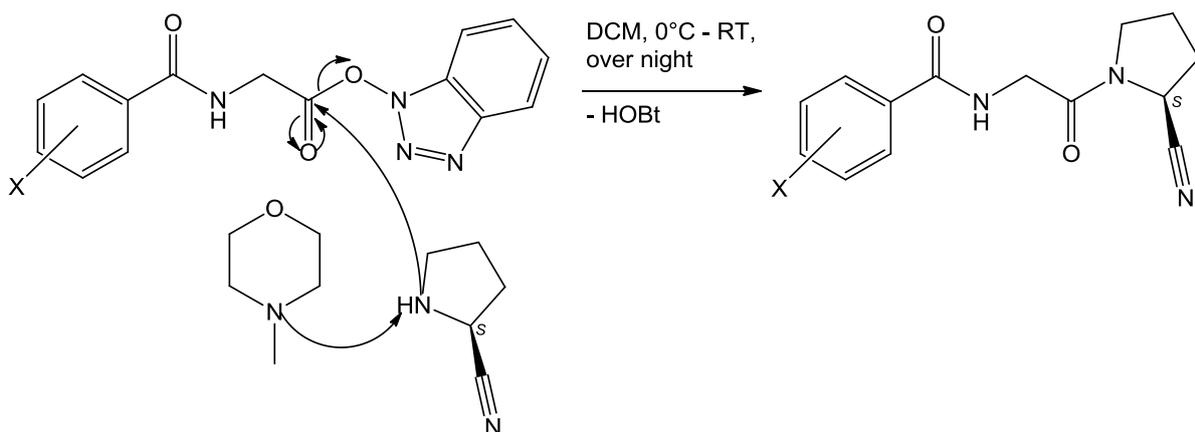
Der Reaktionsmechanismus ist in Schema 3.17 gezeigt. Im ersten Reaktionsschritt greift die OH-Funktion der Hippursäure nucleophil am Carbodiimid-Kohlenstoffatom des EDCs an. Der entstehende Ester wird durch den nucleophilen Angriff der OH-Funktion des HOBts wieder verdrängt unter Abspaltung des 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)harnstoffs und Ausbildung des Aktivesters.

3 SYNTHESEN VON VORSTUFEN UND REFERENZEN FÜR PET-TRACER FÜR FAP



Schema 3.17: Erster Schritt der Peptidkupplung mit EDC und HOBt.

Der gebildete Aktivester aus der Carbonsäure und HOBt wird im zweiten Schritt der Peptidkupplung vom Amin, dem Pyrrolidin-(2S)-carbonitril, nucleophil substituiert (siehe Schema 3.18).^{42,89}

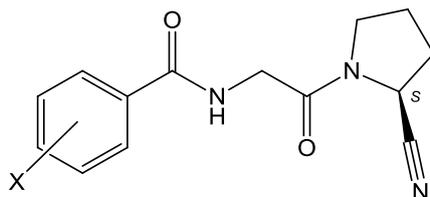


Schema 3.18: Zweiter Schritt der Peptidkupplung mit EDC und HOBt.

Bei der Versuchsdurchführung wurden als Lösemittel Dichlormethan (DCM), ein Äquivalent der gewünschten Hippursäure, ein Äquivalent HOBt (Monohydrat), 1.3 Äquivalente EDC,

zwei Äquivalente *N*-Methylmorpholin (NMM) und ein Äquivalent Pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug zwischen ein und zwei Tagen. Die Ausbeute wurde von der Reaktionsdauer nicht beeinflusst. Eine Übersicht über die synthetisierten Verbindungen ist in Tab. 3.4 gezeigt.

Tabelle 3.4: Übersicht über die synthetisierten Hippursäure-pyrrolidin-(2*S*)-carbonitrile.



Verbindungs-Nr.	Substituion X am Aromat	Reaktionszeit	Ausbeute
53	2-Cl-6-F	2 d	67 %
54	2-F	2 d	62 %
55	3-F	2 d	63 %
56	4-F	1 d	93 %
57	2-F-4-F	2 d	62 %
58	2-F-6-F	2 d	30 %
59	2-F-4-F-6-F	2 d	70 %
60	2-Cl-6-NO ₂	2 d	59 %
61	2-NO ₂	2 d	50 %
62	3-NO ₂	2 d	67 %
63	4-NO ₂	1 d	96 %
63	4-NO	2 d	92 %
64	2-I	2 d	60 %
65	3-I	2 d	76 %
66	4-I	2 d	92 %

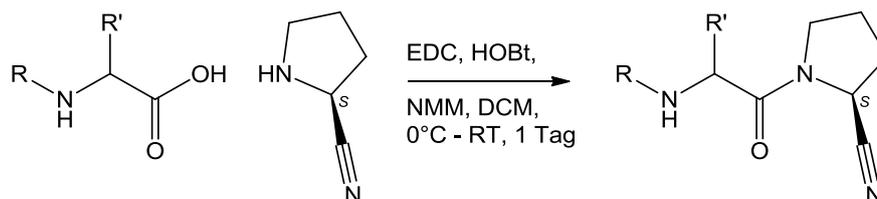
3.3.2 Aminosäure-Prolincarbonitril-Konjugate

Die Verbindungen aus einer Aminosäure und dem Prolin-Teil kann ebenso wie die Verbindungen aus Hippursäuren und Pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril durch Peptidkupplung erfolgen. Es wurden die Aminosäuren *N*Ac-Gly, Boc-(*S*)-Val und Boc-(*S*)-Ile verwendet. Die Boc-Schutzgruppe wurde im Anschluss an die Peptidkupplung abgespalten.

3.3.2.1 Darstellung *N*-geschützter Aminosäure-pyrrolidin-(2*S*)-carbonitrile

Peptidkupplung einer Aminosäure und Pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril mit EDC und HOBT

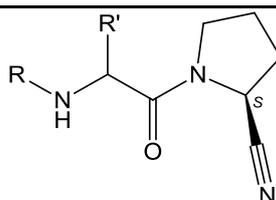
Die Peptidkupplung einer *N*-geschützten Aminosäure und Pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril mit EDC und HOBT (siehe Schema 3.19) erfolgt auf die gleiche Weise wie die Peptidkupplung einer Hippursäure mit Pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril, wie sie in Abschnitt 3.3.1.1 beschrieben ist.⁴²



Schema 3.19: Peptidkupplung einer Aminosäure und Pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril mit EDC und HOBT.

In der Anwendung der Versuchsvorschrift wurden als Lösemittel DCM, ein Äquivalent der gewünschten Aminosäure, ein Äquivalent HOBT (Monohydrat), 1.3 Äquivalente EDC, zwei Äquivalente NMM und ein Äquivalent Pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug einen Tag. Eine Übersicht über die synthetisierten Verbindungen ist in Tab. 3.5 angeführt.

Tabelle 3.5: Übersicht über die synthetisierten Aminosäure-pyrrolidin-(2*S*)-carbonitrile.

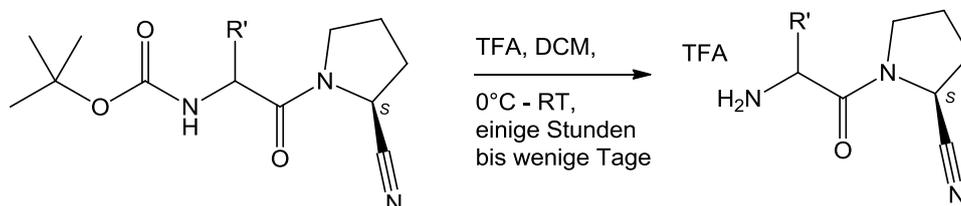


Verbindungs-Nr.	R	R'	Reaktionszeit	Ausbeute
67	Ac	H	1 d	34 %
68	Boc	(<i>S</i>)- <i>i</i> Pr	1 d	49 %
69	Boc	(<i>S</i>)- <i>t</i> Bu	1 d	43 %

3.3.2.2 Darstellung von Aminosäure-pyrrolidin-(2*S*)-carbonitrilen

Boc-Entschützung von Aminosäure-pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril mit TFA

Die Entfernung der Boc-Schutzgruppe von mit einer bestimmten Aminosäure gekoppelten Pyrrolidin-(2S)-carbonitrile erfolgt analog zur bereits beschriebenen Boc-Entschützung mit Trifluoressigsäure (siehe Schema 3.20, siehe Abschnitt 3.2.1.1).⁸⁹



Schema 3.20: Entfernung der Boc-Schutzgruppe des mit einer Aminosäure gekoppelten Pyrrolidin-(2S)-carbonitrils.

Die Reaktion wurde bei 0 °C und unter Schutzgas durchgeführt, als Lösemittel wurde Dichlormethan verwendet. Nach 2 Stunden wurde das Lösemittel bei Raumtemperatur entfernt und das Rohprodukt als TFA-Salz aus Diethylether bei 0 °C auskristallisiert. Das gewünschte Produkt wurde durch Abdekantieren in quantitativer Ausbeute erhalten. Die nach dieser Vorschrift dargestellten Produkte sind in Tab. 3.6 zusammengestellt. Eine Verlängerung der Kristallisationsdauer hatte keinen Einfluss auf die Ausbeute.

Tabelle 3.6: Übersicht über die synthetisierten Aminosäure-Pyrrolidin-(2S)-carbonitrile.

Verbindungs-Nr.	R'	Reaktionszeit	Ausbeute
70	(S)-iPr	2 d	65 %
70	(S)-iPr	7 h	46 %
71	(S)-iBu	8 h	40 %
71	(S)-iBu	2 d	18 %

3.4 Résumé Kapitel 3

3.4.1 Synthese der Hippursäurepyrrolidin-(2S)-carbonitrile

Durch organische Synthese wurden folgende Verbindungen des Typs Hippursäurepyrrolidin-(2S)-carbonitril (Grundstruktur siehe Abb. 3.1) dargestellt:

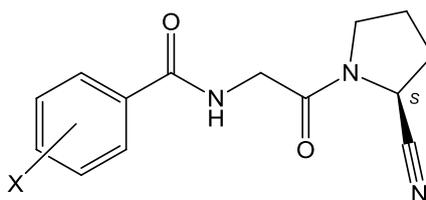


Abb. 3.1: Grundstruktur der Hippursäurepyrrolidin-(2S)-carbonitrile.

X = 2-Cl-6-F (53), 2-F (54), 3-F (55), 4-F (56), 2-F-4-F (57), 2-F-6-F (58), 2-F-4-F-6-F (59), 2-Cl-6-NO₂ (60), 2-NO₂ (61), 3-NO₂ (62), 4-NO₂ (63), 2-I (64), 3-I (65), 4-I (66).

Als Referenzen bei der Radiofluorierung und als Inhibitoren bei enzymatischen Tests werden die fluorierten Verbindungen verwendet, als Precursoren für die radioaktive Fluorierung dienen die nitrierten Verbindungen.

Als Precursoren für die radioaktive Iodierung dienen die iodierten Verbindungen. Die iodierten Verbindungen werden außerdem als Referenzen bei der Radioiodierung und als Inhibitoren bei enzymatischen Tests verwendet.

Die ebenso für die radioaktive Iodierung geeigneten bromierten Precursoren wurden nur bis zur Stufe der Hippursäuren synthetisiert (siehe Abb. 3.2), da die bromierten Hippursäurepyrrolidin-(2S)-carbonitrile zunächst nicht benötigt wurden.

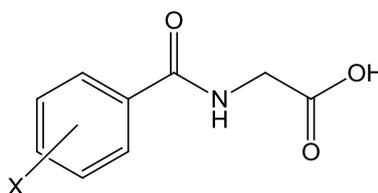


Abb. 3.2: Grundstruktur der Hippursäuren.

X = 2-Br (46), 3-Br (47), 4-Br (48)

Als Precursoren für die Radioiodierung sind sie grundsätzlich besser geeignet, da bromierter Precursor und radioiodierte Verbindung durch HPLC trennbar sind, was bei iodiertem Precursor und radioiodierter Verbindung nicht der Fall ist. Sollten die Hippursäurepyrrolidin-(2S)-carbonitrile im Rahmen der Weiterentwicklung dieser Arbeit benötigt werden, lassen sie sich durch Kupplung der bromierten Hippursäuren an Pyrrolidin-(2S)-carbonitril darstellen (siehe Kapitel 3.3.1.1).

3.4.2 Synthese der Aminosäurepyrrolidin-(2S)-carbonitrile

Durch organische Synthese wurden die Aminosäurepyrrolidin-(2S)-carbonitrile 1-(*N*-Acetylglycin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**67**), 1-((*S*)-Valin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**70**) und 1-((*S*)-Isoleucin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**71**) (von links nach rechts in Abb. 3.3) dargestellt.

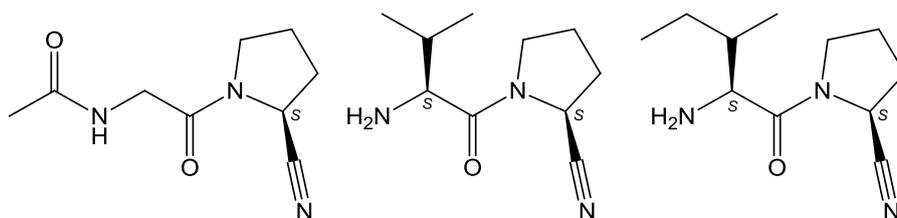


Abb. 3.3: Aminosäurepyrrolidin-(2S)-carbonitrile.

Die Aminosäurepyrrolidin-(2S)-carbonitrile werden zum Vergleich in enzymatischen Tests benötigt (siehe Kapitel 4), da für sie bereits Hemmdaten vorliegen im Gegensatz zu den Hippursäurepyrrolidin-(2S)-carbonitrilen.

Es stehen somit eine Auswahl an Inhibitoren zur enzymatischen Testung an den Proteasen FAP und DPP IV nebst bereits bekannten Inhibitoren (siehe Kapitel 4) sowie Precursoren und Referenzen für die Radiomarkierung mit Fluor-18 und Iod-124 (siehe Kapitel 5) zur Verfügung.

4 Enzymkinetik

Enzyme sind hochspezifische Katalysatoren, die eine Vielzahl von Reaktionen im Organismus ausführen. Die Funktionsweise eines Enzyms besteht im Allgemeinen darin, ein Substrat zum Produkt umzusetzen. Zur Aufklärung der Katalysemechanismen von Enzymen sind kinetische Messungen die wichtigste Methode.⁹¹

4.1 Michaelis-Menten-Gleichung

Ist die Konzentration des Substrats (S) erheblich höher als die Konzentration des Enzyms (E), so wird die Reaktion unabhängig von der Substratkonzentration, die Reaktion ist dann bezüglich der Substratkonzentration nullter Ordnung. Die Gesamtreaktion besteht aus zwei Elementarreaktionen, die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) und dessen Zerfall in Produkt und Enzym (E + P).



Ist die Konzentration des Substrates so hoch, dass das gesamte Enzym zum Enzym-Substrat-Komplex umgewandelt wird, wird der zweite Schritt dieser Reaktion geschwindigkeitsbestimmend. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ergibt sich zu:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] \quad (I)$$

Die Gesamtgeschwindigkeit der Produktion von ES ergibt sich aus der Geschwindigkeit seiner Bildung und seines Zerfalls (Dissoziation).

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] \quad (II)$$

Zur Integration werden zwei vereinfachende Annahmen gemacht. Zum Einen wird angenommen, dass zwischen Enzym und Substrat ein vorgelagertes Gleichgewicht existiert, das heißt, $k_1 \gg k_2$. Zum Anderen wird angenommen, dass sich die Reaktion in einem Fließgleichgewicht befindet. Das heißt, das Substrat ist beinahe für den gesamten Reaktionsverlauf, bis auf die initiale Phase (die ersten Millisekunden nach Zusammenmischen der Reaktanden) und bis das Substrat aufgebraucht ist, im Überschuss vorhanden. Die Geschwindigkeit ist demnach für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes und dessen Verbrauch gleich, das heißt $[ES]$ bleibt in einem stationären Zustand („steady state“). $[ES]$ ist somit in erster Näherung konstant. $[ES]$ wird durch die

experimentell messbare Größe $[E]_T$, der Gesamt-Enzymkonzentration abzüglich der Konzentration des freien Enzyms $[E]$, ausgedrückt.

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (\text{III})$$

Werden Gleichung (II) und (III) kombiniert, ergibt sich:

$$k_1 ([E]_T - [ES]) [S] = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (\text{IV})$$

Durch umstellen erhält man:

$$[ES] (k_{-1} + k_2 + k_1 [S]) = k_1 [E]_T [S] \quad (\text{V})$$

Nach Auflösen ergibt sich:

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{VI})$$

Darin ist K_M die Michaelis-Konstante, die als

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{VII})$$

definiert ist.

Die Anfangsgeschwindigkeit, bevor mehr als ca. 10 % des Substrats umgesetzt worden sind, wird durch die messbaren Größen $[E]_T$ und $[S]$ ausgedrückt:

$$v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{t=0} = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{VIII})$$

Die Maximalgeschwindigkeit wird erreicht, wenn das Substrat im Überschuss vorliegt und das gesamte Enzym mit Substrat gesättigt ist:

$$v_{\max} = k_2 [E]_T \quad (\text{IX})$$

Werden die Gleichungen (VIII) und (IX) kombiniert, ergibt sich:

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{X})$$

Dies ist die Grundgleichung der Enzymkinetik, die Michaelis-Menten-Gleichung. Werden Substratkonzentration gegen die Umsatzgeschwindigkeit aufgetragen, ergibt sich eine Hyperbel (roter Graph in Abb. 4.1).

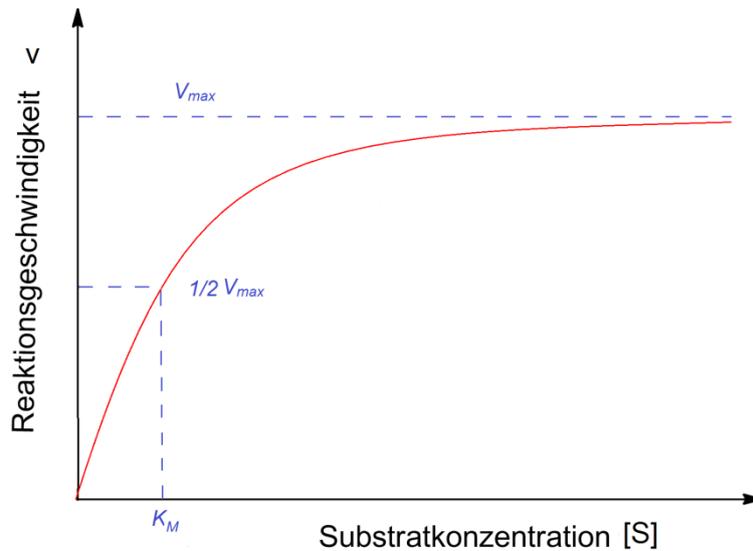


Abb. 4.1: Michaelis-Menten-Diagramm.

Ist $v_0 = v_{\max} / 2$, ergibt sich daraus $[S] = K_M$. Die Michaelis-Konstante K_M gibt die Substratkonzentration $[S]$ an, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht hat. K_M ist neben den Eigenschaften des Enzyms und Substrats von pH-Wert und Temperatur abhängig. K_M ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat, ein kleiner K_M -Wert bedeutet, dass schon geringe $[S]$ ausreicht, um die maximale Geschwindigkeit zu erreichen.⁹¹

4.2 Analyse kinetischer Daten

Praktisch ist v_{\max} aus dieser Art der Auftragung nicht zu bestimmen, da sich die Geschwindigkeit auch bei sehr hohen Substratkonzentrationen nur v_{\max} annähert. Nach der Methode von Lineweaver und Burk wird die Gleichung in die reziproke Form gebracht:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (\text{XI})$$

Werden $1 / v_0$ gegen $1 / [S]$ aufgetragen, ergibt sich eine Gerade mit der Steigung K_M / v_{\max} , die die y-Achse bei $1 / v_{\max}$ schneidet und ihren Ursprung bei $-1 / K_M$ hat (siehe Abb. 4.2) Aufgrund der Ungenauigkeit dieser Auftragung, die sich für kleine $[S]$ ergibt, ist es ratsam computergestützte Verfahren zur Analyse der Messdaten zu verwenden.

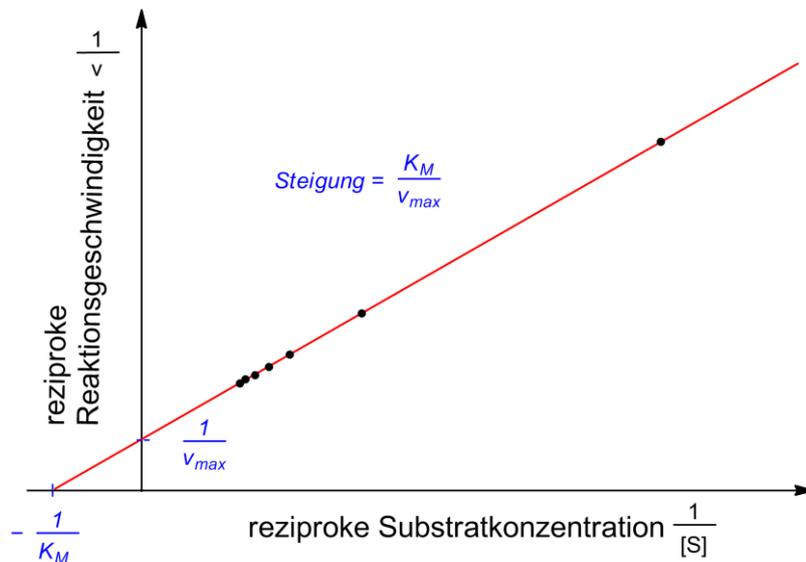


Abb. 4.2: Lineweaver-Burk-Diagramm.

Die katalytische Effizienz kann durch die katalytische Konstante k_{cat} ausgedrückt werden:

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\text{max}}}{[E]_{\text{T}}} \quad (\text{XII})$$

k_{cat} ist auch als Wechselzahl („turnover number“) des Enzyms bekannt. Sie gibt die Anzahl der Reaktionszyklen an, die jedes Enzym pro Zeiteinheit katalysiert. Für den Fall einer einfachen Michaelis-Menten-Reaktion ist $k_{\text{cat}} = k_2$.⁹¹

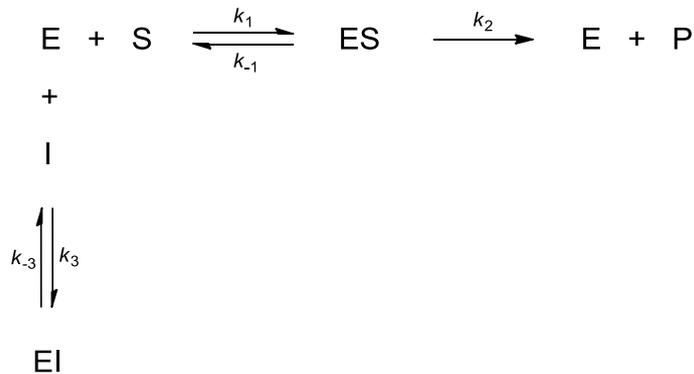
4.3 Hemmung

Substanzen, die die Aktivität eines Enzyms herabsetzen, heißen Inhibitoren. Inhibitoren werden vom Enzym nicht zu Produkten umgesetzt, sondern blockieren es dahingehend, dass es kein Substratmolekül umsetzen kann. Bei der reversiblen Inhibition werden die kompetitive Hemmung, die unkompetitive und die gemischte Hemmung unterschieden. Im Rahmen dieser Arbeit ist die kompetitive Hemmung von Bedeutung, deswegen wird im Folgenden nur diese beschrieben.

Zu unterscheiden von der reversiblen Hemmung ist die irreversible Hemmung. Irreversible Inhibitoren gehen eine kovalente Bindung mit dem Enzym ein, die nicht mehr gelöst werden kann. Das Enzym wird dauerhaft blockiert, deshalb werden diese Inhibitoren auch als Inaktivatoren bezeichnet.⁹¹

4.3.1 Kompetitive Hemmung

Ein kompetitiver Inhibitor ist eine Substanz, die dem natürlichen Substrat strukturell ähnelt und mit ihm um das aktive Zentrum des Enzyms konkurriert. Allgemein ergibt sich für die kompetitive Hemmung folgendes Reaktionsschema (Schema 4.1):



Schema 4.1: Reaktionsschema der kompetitiven Hemmung.

Es wird hierbei angenommen, dass der Inhibitor reversibel an das Enzym bindet. Es ergibt sich das Gleichgewicht:

$$K_1 = \frac{k_{-3}}{k_3} = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]} \quad (\text{XIII})$$

K_1 ist hierbei die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Ein kleiner K_1 -Wert drückt eine hohe Affinität des Inhibitors zum Enzym aus. $[\text{EI}]$ ist katalytisch inaktiv, die Konzentration des aktiven Enzyms $[\text{E}]$ ist herabgesetzt. Die Gesamtkonzentration des anfänglich vorhandenen Enzyms $[\text{E}]_{\text{T}}$ reduziert sich um:

$$[\text{E}]_{\text{T}} = [\text{E}] + [\text{EI}] + [\text{ES}] \quad (\text{XIV})$$

Mit der Annahme, dass „steady state“-Bedingungen herrschen ($[\text{S}] \gg [\text{E}]_{\text{T}}$ und $[\text{E}]_{\text{T}} = [\text{E}]$) ergibt sich aus Gleichung (VI) durch Umstellen:

$$[\text{E}] = \frac{K_M [\text{ES}]}{[\text{S}]} \quad (\text{XV})$$

Nach Einsetzen von Gleichung (XIII) in (XV) ergibt sich:

$$\frac{K_M [\text{ES}]}{[\text{S}]} = \frac{K_1 [\text{EI}]}{[\text{I}]} \quad (\text{XVI})$$

$$[\text{EI}] = \frac{K_M [\text{ES}][\text{I}]}{K_1 [\text{S}]} \quad (\text{XVII})$$

Setzt man dies in Gleichung (XIV) ein, ergibt sich daraus:

$$[E]_T = [ES] \frac{K_M [ES] [I]}{K_I [S]} + \frac{K_M [ES]}{[S]} \quad (\text{XVIII})$$

Und durch Umformungen schließlich:

$$[E]_T = [ES] \left\{ 1 + \frac{K_M}{[S]} \left(\frac{[I]}{K_I} + 1 \right) \right\} \quad (\text{XIX})$$

Durch Auflösen nach [ES] und Einsetzen in Gleichung (IX) ergibt sich daraus:

$$v = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_T [S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)} \quad (\text{XX})$$

Oder vereinfacht:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + K_M \alpha} \quad \text{wobei} \quad \alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad (\text{XXI})$$

α ist dabei ein Faktor, um den K_M durch den Einfluss des Inhibitors scheinbar modifiziert ist. In der Auftragung von v gegen $[S]$ ergibt sich eine umso flachere Kurve, je größer der Faktor α ist. In der Lineweaver-Burk-Auftragung ergibt sich eine Gerade, die denselben Schnittpunkt mit der y-Achse (bei $1/v_{\max}$), aber eine größere Steigung hat, je größer der Faktor α ist, der nicht nur vom jeweiligen K_I -Wert des Inhibitors, sondern auch von der Konzentration des Inhibitors abhängig ist (siehe Abb. 4.3).⁹¹

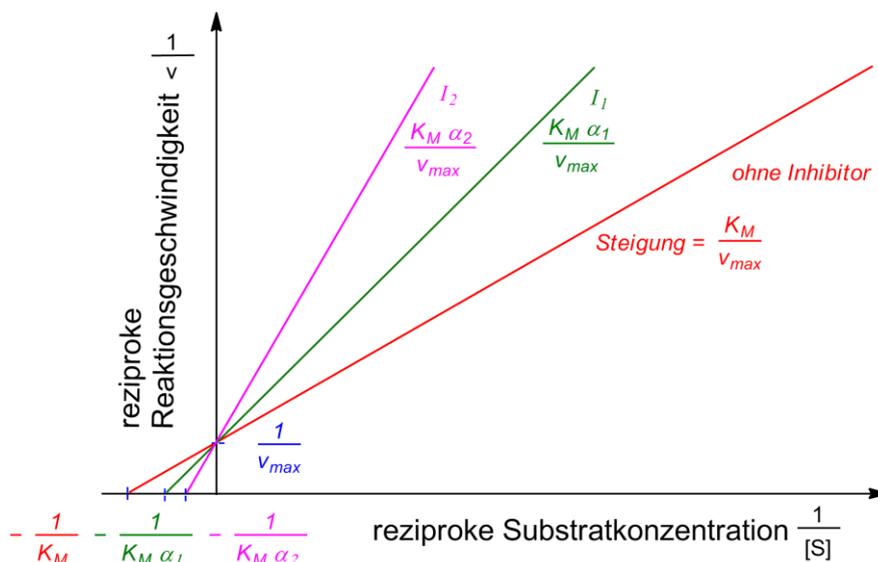


Abb. 4.3: Lineweaver-Burk-Diagramm mit Inhibitoren I_1 und I_2 .

4.3.2 Substratüberschusshemmung

Bei manchen Enzymen kann es durch sehr hohe Substratkonzentrationen zur Bindung eines zweiten Substratmoleküls kommen. Der dadurch entstehende ESS-Komplex ist somit blockiert und kann nicht zu E und P reagieren. Die Geschwindigkeitsgleichung lautet dafür:

$$v_0 = \frac{v_{\max}}{\frac{1 + K_M}{[S]} + \frac{[S]}{K_S}} \quad (\text{XXII})$$

K_S ist die Dissoziationskonstante des ESS-Komplexes. In der Auftragung im Michaelis-Menten-Diagramm entsprechend Abb. 4.1 zur Bestimmung des K_M -Wertes ergibt sich eine Kurve, die sich nicht an v_{\max} annähert, sondern bei einer bestimmten $[S]$ wieder zu niedrigerem v abfällt. Es existiert demnach ein Optimum der Geschwindigkeit für eine bestimmte Substratkonzentration (grüner Graph in Abb. 4.4). Die Maximalgeschwindigkeit und somit die Werte K_M und $\frac{1}{2} v_{\max}$ werden durch Extrapolation des Anstiegs der Kurve bestimmt (roter Graph in Abb. 4.4)⁹¹

Für die Bestimmung des K_M -Wertes bedeutet dies, dass nur die Messwerte herangezogen werden können, die auf dem Anstieg der Kurve liegen (wo der rote und grüne Graph sich noch überlagern, Abb. 4.4). Der K_M -Wert kann deshalb nur in geringerer Genauigkeit bestimmt werden.

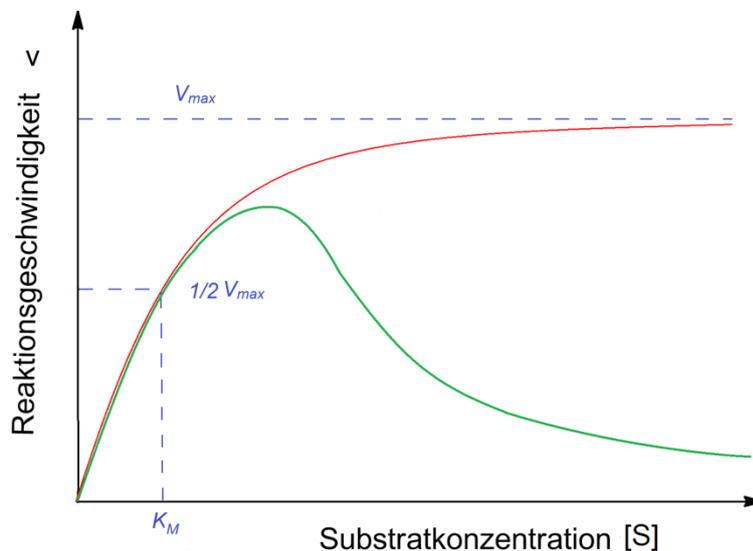


Abb. 4.4: Michaelis-Menten-Diagramm bei Substratüberschusshemmung.

4.3.3 Inhibitoren für FAP

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren für das Enzym FAP sind kovalent reversible, kompetitive Inhibitoren. Sie wurden anhand des natürlichen Substrats entworfen, indem die Erkennungssequenz Gly-Pro (siehe Abb. 1.6) imitiert wurde. Statt der im natürlichen Prolin vorhandenen Carbonsäuregruppe enthalten die Inhibitoren eine Carbonitrilgruppe, die mit dem Serinrest des aktiven Zentrums des Enzyms reagiert. Die nucleophil angreifende OH-Gruppe des Serinrests fungiert dabei als Lewisbase und bildet eine kovalente Bindung mit dem als Lewissäure fungierenden Kohlenstoffatom der Carbonitrilgruppe (vgl. Abb. 1.4). Der entstehende Enzym-Inhibitor-Komplex kann durch Verdrängung durch ein „besseres“ Elektrophil, also das Substrat, wieder gelöst werden. Das gebildete Imidat wird nicht weiter umgesetzt sondern reagiert wieder zurück zum Carbonitril.

4.4 Fluorimetrische Enzym-Assays

Für die Bestimmung der kinetischen Daten wird ein enzymatischer Assay durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein kontinuierlicher, fluorimetrischer Assay durchgeführt, der im Folgenden beschrieben wird.

Beim fluorimetrischen Enzymassay wird ein Substrat verwendet, das aus einem Peptid- und einem Fluoreszenzfarbstoffteil besteht. Das Substrat fluoresziert nicht. Wird es mit einem Enzym zusammengebracht, das in der Lage ist, die Verbindung zwischen Peptid- und Fluorophor hydrolytisch zu spalten, fluoresziert das abgespaltene Fluorophor. Die Fluoreszenz bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge ist mit einem Fluorimeter detektierbar. Die Messung der Fluoreszenz eines Enzym-Substrat-Gemisches nach bestimmten Zeitabständen erlaubt die Bestimmung des Umsatzes des Substrats durch das Enzym als Funktion der Zeit. Das Verhältnis von Fluoreszenz zu Zeit ergibt die Geschwindigkeit der Reaktion.

Für das Enzym FAP wurde das Substrat Z-Gly-Pro-AMC (Benzyloxycarbonyl-Gly-Pro-7-amido-4-methylcoumarin) und für DPP IV wurde H-Gly-Pro-AMC (Gly-Pro-7-amido-4-methylcoumarin) verwendet. Bei der enzymatischen Hydrolyse wird AMC (Aminomethylcoumarin) als Fluorophor abgespalten. Gly-Pro ist ein Dipeptid, das als Erkennungssequenz im natürlichen Substrat für die beiden Enzyme identifiziert wurde. Dabei ist der *N*-Terminus des Substrates für FAP mit der Schutzgruppe Z (Benzyloxycarbonyl) geschützt, um die Endopeptidase-Aktivität des Enzyms zu adressieren, beim Substrat für DPP IV ist der *N*-Terminus frei, da das Enzym nur Dipeptidylpeptidase-Aktivität besitzt (siehe Kapitel 1.4.2). Die Substratreaktion ist am

Beispiel für H-Gly-Pro-AMC in Abb. 4.5 gezeigt. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 380 nm, die Emission bei 460 nm.

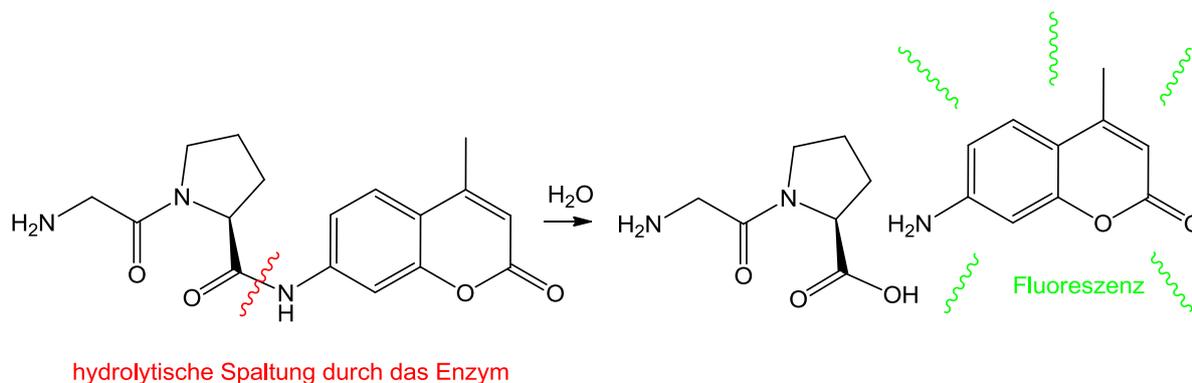


Abb. 4.5: Enzymatische Spaltung von H-Gly-Pro-AMC führt zu H-Gly-Pro und dem fluoreszierenden AMC.

Die fluorimetrischen Enzymassays für FAP und DPP IV wurden nach Literaturvorschrift durchgeführt.^{48,53}

4.4.1 Bestimmung der K_M -Werte

Die K_M -Werte für die Enzyme FAP und DPP IV werden wie in Kapitel 4.1 und 4.2 beschrieben nach der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt. Demnach werden Gemische aus einer bestimmten Konzentration an Enzym mit unterschiedlichen Konzentrationen an Substrat erstellt und deren Fluoreszenzzunahme im Laufe der Zeit mittels des Fluorimeters verfolgt. Die Auftragung der Fluoreszenz gegen die Zeit ergibt für jede Substratkonzentration eine Gerade mit einer bestimmten Steigung. Diese Steigung entspricht der Geschwindigkeit der abgelaufenen Reaktion. Diese Geschwindigkeiten können anschließend im Michaelis-Menten-Diagramm gegen die Substratkonzentrationen aufgetragen werden (oder $1/v$ gegen $1/[S]$ im Falle der Lineweaver-Burk-Auftragung), woraus v_{\max} und K_M bestimmt werden können. Die Auftragung wurde computergestützt mit dem Programm GraFit⁹² durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Testreihen durchgeführt und aus den Ergebnissen der Mittelwert gebildet.

Für FAP und DPP IV ergaben sich folgende Werte:

FAP: $K_M = 45.84 \mu\text{M}$ (Lit.: $90 \mu\text{M}$ ⁹³, $101 \mu\text{M}$ ⁴⁹)

DPP IV: $K_M = 1.57 \mu\text{M}$ (Lit.: $63 \mu\text{M}$ ^{36,93-94})

Da Substratüberschusshemmung auftrat, weichen die K_M -Werte von den Literaturwerten ab.

4.4.2 Bestimmung der K_I -Werte

Zur Bestimmung der K_I -Werte werden die gleichen Assays wie zur Bestimmung der K_M -Werte der Enzyme durchgeführt. Anstelle unterschiedlicher Substratkonzentrationen werden hierbei jedoch eine bestimmte Substratkonzentration und zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors verwendet. Die Inhibitoren setzen die Menge verfügbaren Enzyms zur Reaktion mit dem Substrat herab. Wie bei der Bestimmung der K_M -Werte wird mithilfe des Fluorimeters die steigende Fluoreszenz als Funktion der Zeit gemessen. Auch hier wird für jede Inhibitorkonzentration eine Gerade erhalten, deren Steigung das Verhältnis aus Fluoreszenz pro Zeit angibt. Die Messung teilt sich in zwei Teilschritte auf. Zuerst wird ein sogenanntes „Screening“ durchgeführt. Dabei wird eine Konzentration (üblicherweise 20 μM) festgelegt, die für alle zu untersuchenden Inhibitoren verwendet wird. Diejenigen Inhibitoren, die eine Steigung aufweisen, die einer Hemmung des Enzyms $> 60\%$ entspricht, werden in Verdünnungsreihen genauer untersucht. Diejenigen Inhibitoren, die eine Hemmung von $< 60\%$ zeigen, werden nicht näher untersucht, da ihre Hemmwirkung gering und somit nicht von Interesse ist. In den Verdünnungsreihen werden die beim Screening verwendete Substratkonzentration eingesetzt und zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen eines Inhibitors. In der Auftragung von Fluoreszenz gegen die Zeit wird für jede Inhibitorkonzentration eine Gerade mit unterschiedlicher Steigung erhalten. Aus den Daten dieser Geraden wird der IC_{50} -Wert bestimmt. Der IC_{50} -Wert gibt die Konzentration des Inhibitors an, bei der die Hälfte des Enzyms gehemmt wird. Diese Rechnung wurde mit dem Programm GraFit⁹² durchgeführt. Aus dem IC_{50} -Wert lässt sich anschließend über die Beziehung der Cheng-Prusoff-Gleichung⁹⁵ der K_I -Wert für den jeweiligen Inhibitor bestimmen.

$$K_{\text{app}} = K_I \frac{1 + [\text{S}]}{K_M} \quad (\text{XXIII})$$

Dabei entspricht $K_{\text{app}} \approx \text{IC}_{50}$, woraus sich ergibt:

$$K_I = \frac{\text{IC}_{50}}{\frac{1 + [\text{S}]}{K_M}} \quad (\text{XXIV})$$

4 ENZYMKINETIK

4.4.3 Ermittlung der Hemmdaten der Inhibitoren für FAP und DPP IV

4.4.3.1 Screening

Es wurden jeweils zwei Messreihen durchgeführt und der Mittelwert aus beiden Ergebnissen gebildet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.1 zusammengestellt. Die Hemmung ist in Prozent (%) angegeben, wobei 100 % einer kompletten Hemmung des Enzyms entspricht.

Tabelle 4.1: Hemmung von FAP und DPP IV durch die angeführten Inhibitoren.

Verbindungs-Nr.	R	R'	Hemmung FAP	Hemmung DPP IV
53	2-Cl-6-F-Bz	H	27	6
54	2-F-Bz	H	47	9
55	3-F-Bz	H	67	9
56	4-F-Bz	H	41	6
57	2-F-4-F-Bz	H	37	k.H.
58	2-F-6-F-Bz	H	21	11
59	2-F-4-F-6-F-Bz	H	18	k.H.
64	2-I-Bz	H	76	k.H.
65	3-I-Bz	H	25	k.H.
66	4-I-Bz	H	79	k.H.
67	Ac (= COMe)	H	3	4
70	H	<i>i</i> Pr	7	100
71	H	<i>i</i> Bu	20	100

In einigen Fällen traten negative Werte auf, wobei es sich um Artefakte handelt. Die Hemmwirkung wurde mit k.H. (keine Hemmung) bewertet.

Insgesamt ist zu beobachten, dass alle neuen Inhibitoren bessere Hemmung an FAP als an DPP IV zeigen. Das Ziel, selektive Inhibitoren zu entwickeln wurde demnach erreicht. Die bekannten DPP IV-Inhibitoren (**70**) und (**71**) (grün markiert in Tab. 4.1) zeigen wie erwartet hervorragende Hemmung an DPP IV aufgrund der freien *N*-Termini. Der bekannte Inhibitor (**67**) hätte aufgrund der Acetylgruppe am *N*-Terminus eine Hemmung an FAP aufzeigen müssen, dies konnte leider nicht bestätigt werden.

4.4.3.2 Verdünnungsreihen für FAP

Die Verbindungen (55), (64) und (66) (gelb markiert in Tab. 4.1) wiesen eine Hemmung von > 60 % auf und wurden deswegen in Verdünnungsreihen näher untersucht. Es wurden wieder jeweils zwei Messreihen durchgeführt, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

IC₅₀-Werte

Die IC₅₀-Werte wurden am PC mithilfe des Programms GraFit⁹² berechnet. Sie sind in Tab. 4.2 aufgelistet. Dabei wurde eine der folgenden Gleichungen verwendet, je nachdem, welche den besten Fit lieferte. Zu unterscheiden sind die 4-, die 3-, die 2-Parameter- und die Dixon-Gleichung.⁹⁶

Die 4-Parameter-Gleichung: (y = Substrathydrolyserate des Enzyms, gemessen in Fluoreszenzzunahme pro Minute, y_{\min} = y -Achsen-Minimum, y_{\max} = y -Achsen-Maximum, s = *slope factor* oder Hill-Koeffizient (beschreibt die Steilheit der Kurve))

$$y = \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} + y_{\min} \quad (XXV)$$

Die 3-Parameter-Gleichung: ($y_{\min} = 0$)

$$y = \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} \quad (XXVI)$$

Die 2-Parameter-Gleichung: ($y_{\min} = 0$, $y_{\max} - y_{\min} = \text{range} = v_0$ ist Hydrolyserate bei InhibitorKonzentration = 0)

$$y = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} \quad (XXVII)$$

Die Dixon-Gleichung: (1-Parameter-Gleichung für die Ideal-Bedingungen $s = 1$)

$$y = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{[I]}{K_{app}}\right)^s} \quad (XXVIII)$$

K_i-Werte

Die K_i -Werte wurden unter Verwendung der jeweiligen IC_{50} -Werte und des K_M -Wertes für DPP IV (45.84 μ M) durch Einsetzen in Gleichung (XXIV) (Kapitel 4.4.2) berechnet. Dafür wurde der K_i -Wert für das Ergebnis jeder Messreihe der IC_{50} -Werte einzeln bestimmt und anschließend der Mittelwert gebildet. In Tab. 4.2 sind die K_i -Werte für die untersuchten Verbindungen angeführt.

Tabelle 4.2: IC_{50} -und K_i -Werte der FAP-Inhibitoren mit einer Hemmung von > 60 %.

Verbindungs-Nr.	IC_{50} in μ M	K_i in μ M
55	11.99 \pm 2.85 (2-Parameter-Gleichung)	9.85 \pm 2.34
64	4.90 \pm 1.58 (3-Parameter-Gleichung) (Lit.: 0.115 μ M ⁹⁷)	4.02 \pm 1.30
66	2.89 \pm 0.42 (2-Parameter-Gleichung) (Lit.: 0.511 μ M ⁹⁷)	2.37 \pm 0.34

Die ermittelten K_i -Werte für die Inhibitoren SM (**55**), (**64**) und (**66**) liegen im niedrigen μ M-Bereich. Damit sind sie für die Markierung mit einem Positronenemitter und zur Verwendung als PET-Tracer nur bedingt geeignet. Eine Verbindung, die einen K_i -Wert im niedrigen nM-Bereich gezeigt hätte, wäre wünschenswert gewesen. Die Verbindung (**62**) eignet sich aufgrund der Substitution in Position 3 nicht für die radioaktive Markierung mit Fluor-18. Die Verbindungen (**64**) und (**66**) sind aufgrund der Substitution in Position 2 und 4 gut für die radioaktive Iodierung geeignet, was in Kapitel 7 näher beschrieben wird. Literaturdaten waren nur für die Verbindungen (**67**), (**70**) und (**71**) verfügbar (Lit.: (**67**): 6.8 μ M (K_i); (**70**): 340 μ M (K_i); (**71**): 84 μ M (K_i);⁴⁸). Die Verbindungen zeigten im Screening eine Hemmung von <60 % und wurden deshalb nicht näher untersucht. Die Literaturdaten für Verbindung (**70**) und (**71**) zeigen Werte im hohen μ M-Bereich und deuten deshalb auf eine geringfügige Hemmung hin. Eine weitere Untersuchung war deshalb nicht notwendig.

Der Wert im niedrigen μM -Bereich von Verbindung (**67**) konnte leider nicht bestätigt werden.

4.4.3.3 Verdünnungsreihen für DPP IV

Die Verbindungen (**70**) und (**71**) wiesen eine Hemmung von $> 60\%$ auf und wurden deswegen in Verdünnungsreihen näher untersucht. Es wurden jeweils zwei Messreihen durchgeführt.

IC₅₀-Werte

Die IC₅₀-Werte wurden am PC mithilfe des Programms GraFit⁹² unter Verwendung der 2-Parameter-Gleichung (XXVII) berechnet. Sie sind in Tab. 4.4 aufgelistet.

K_i-Werte

Die K_i-Werte wurden unter Verwendung der jeweiligen IC₅₀-Werte und des K_M-Wertes für DPP IV (1.570 μM) durch Einsetzen in Gleichung (XXIV) (Abschnitt 4.4.2) berechnet. Dafür wurde der K_i-Wert für das Ergebnis jeder Messreihe der IC₅₀-Werte einzeln bestimmt und anschließend der Mittelwert gebildet. Die berechneten K_i-Werte sind in Tab. 4.3 angeführt.

Tabelle 4.3: IC₅₀-und K_i-Werte der DPP IV-Inhibitoren mit einer Hemmung von $> 60\%$.

Verbindungs-Nr.	IC ₅₀ in nM	K _i in nM
70	22.00 \pm 3.80 (2-Parameter-Gleichung)	2.99 \pm 0.52 (Lit.: 10.1 nM ⁴⁸ , 2 \pm 1 nM ⁹⁸)
71	70.75 \pm 2.35 (2-Parameter-Gleichung)	9.60 \pm 0.32 (Lit.: 2.2 \pm 0.5 nM ⁹⁹)

Die Ergebnisse bestätigen die Theorie, dass DPP IV nur Dipeptidylpeptidase-Aktivität besitzt. Alle Verbindungen, die keinen freien N-Terminus haben, weisen eine sehr geringe

Hemmung auf. Nur die bereits bekannten Inhibitoren (**70**) und (**71**) zeigen Hemmwirkung mit K_i -Werten im niedrigen nM-Bereich, die vergleichbar mit Literatur-Werten sind.

4.5 Résumé Kapitel 4

4.5.1 Ergebnisse der Standardinhibitoren

Die Eignung der fluorimetrischen Assays für die Enzyme FAP und DPP IV wurde durch die Testung der Standardinhibitoren 1-((S)-Valin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**70**) und 1-((S)-Isoleucin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**71**) (siehe Abb. 4.6) bestätigt.

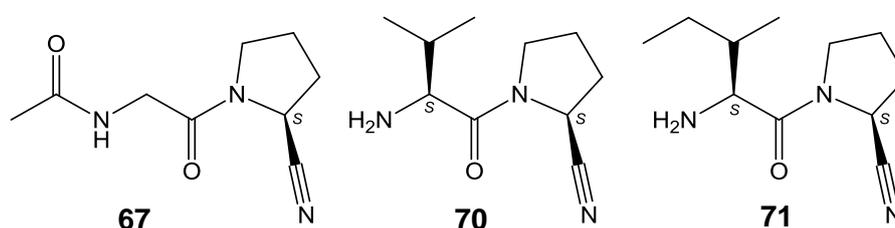


Abb. 4.6: 1-((N-Acetylglycin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**67**), 1-((S)-Valin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**70**) und 1-((S)-Isoleucin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**71**).

Die Ergebnisse des an FAP und DPP IV durchgeführten Screenings und der Verdünnungsreihen sind in Tab. 4.4 angeführt. Der Literaturwert von Verbindung (**67**) für FAP konnte leider nicht bestätigt werden. Hierbei muss es sich um einen Fehler in der Durchführung des Assays, möglicherweise einen Verdünnungsfehler, handeln. Die Ergebnisse von Verbindung (**70**) und (**71**) bestätigen die Literaturwerte.

Tabelle 4.4: Hemmung in % bei 20 μM bzw. K_i -Wert (zzgl. Lit.) der Standardinhibitoren.

Enzym \rightarrow Verbindung \downarrow	FAP	DPP IV
67	3 % (Lit.: $6.8 \pm 0.4 \mu\text{M}^{48}$)	4 % (Lit.: $61 \pm 3 \mu\text{M}^{48}$)
70	7 % (Lit.: $340 \pm 10 \mu\text{M}^{48}$)	$2.99 \pm 0.52 \text{ nM}$ (Lit.: $10.1 \pm 0.6 \text{ nM}^{48}$, $2 \pm 1 \text{ nM}^{98}$)
71	20 % (Lit.: $84 \pm 2 \mu\text{M}^{48}$)	$9.60 \pm 0.32 \text{ nM}$ (Lit.: $1.9 \pm 0.1 \text{ nM}^{48}$, $2.2 \pm 0.5 \text{ nM}^{99}$)

4.5.2 Ergebnisse der neuen Inhibitoren

Die neu entwickelten Inhibitoren zeigten im Screening wie gewünscht bessere Hemmung an FAP als an DPP IV. Das Ziel, FAP-Selektivität zu erreichen wurde somit erfüllt. Abb. 4.7 zeigt die wirksamsten FAP-Inhibitoren 1-(3-Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**55**), 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**64**) und 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**66**).

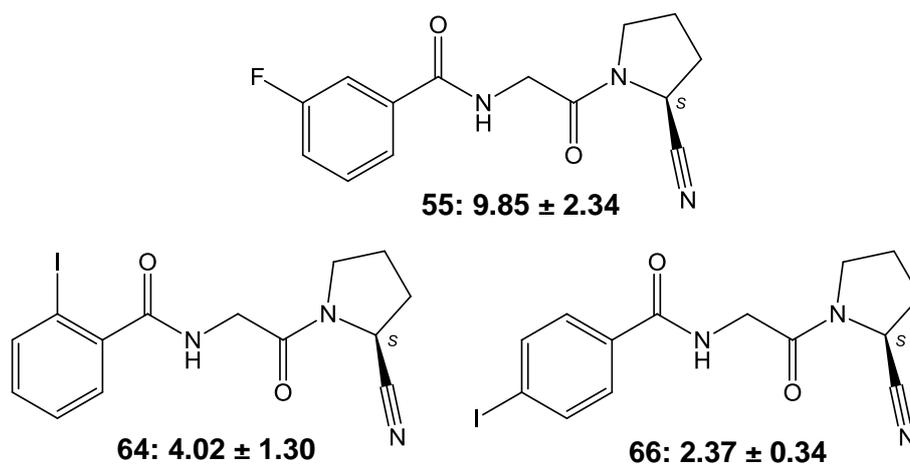


Abb. 4.7: Die wirksamsten FAP-Inhibitoren **55**, **64** und **66** inkl. K_i -Werte in μM .

Die Verbindungen sind jedoch für die PET nur bedingt geeignet, da für dieses Verfahren ein K_i -Wert im nM-Bereich benötigt wird. Die Radiomarkierung und alle weiteren Untersuchungen sollen soweit möglich dennoch durchgeführt werden. Verbindung (**55**) ist aufgrund der Substitution in Position 3 nicht für die Radiofluorierung geeignet. Alternativ sollen 1-(2- und 1-(4-Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril radiofluoriert werden.

5 Radiomarkierungen

5.1 Allgemeines

Ausbeuten von Produkten werden nicht in Stoffmengen (mol), sondern in Zerfällen ($1/s = \text{Bq}$, Becquerel) angegeben, die mithilfe eines Aktivimeters gemessen werden. Ausbeuten werden in Prozent angegeben und sind zerfallskorrigiert. Die Aktivität des eingesetzten radioaktiven Nuklids nimmt während der Reaktion entsprechend seiner Halbwertszeit ab. Die maximal mögliche Ausbeute richtet sich daher nach dem Zeitpunkt, zu dem die Aktivität der Produkte bestimmt wird.

5.2 Positronen-Emitter-markierte FAP-affine Verbindungen

Für die radioaktive Markierung der FAP-affinen Verbindungen standen die PET-Nuklide Fluor-18 (^{18}F) und Iod-124 (^{124}I), sowie der β^- -Strahler Iod-131 (^{131}I) zur Verfügung. Die FAP-affinen Verbindungen haben die in Abbildung 5.1 gezeigte Grundstruktur. Die einzelnen Inhibitoren unterscheiden sich im variablen Substituenten X (Fluor oder Iod) am Aromaten. Sie wurden in enzymatischen Assays auf ihre inhibitorische Wirkung an FAP getestet (siehe Kapitel 4). Die PET-Tracer leiten sich durch Ersatz des Substituenten durch das entsprechende Positronen-emittierende Isotop vom Inhibitor ab.

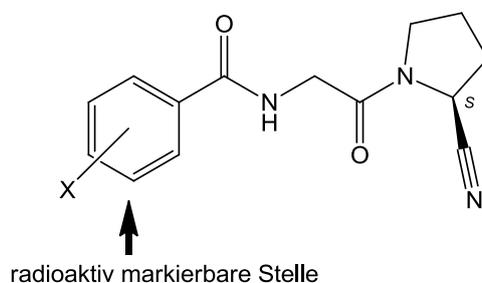


Abb. 5.1: Grundstruktur der FAP-Inhibitoren. X = Fluor- oder Iod-Substituent.

5.2.1 Analytik

Die Analytik zur Identifizierung radioaktiv markierter Verbindungen findet durch Dünnschichtchromatographie (DC) und high performance liquid chromatography (HPLC) statt. Mit diesen beiden Methoden kann die radiochemische Reinheit bestimmt werden. Das gewünschte radiomarkierte Produkt wird ins Verhältnis zu sämtlichen markierten Nebenprodukten gesetzt, die durch DC und HPLC detektiert werden.

DC-Platten werden mit einem Radioaktivitäts-Scanner ausgelesen, der γ -Strahlen oder Photonen registriert, mithilfe einer speziellen Software wird ein Chromatogramm erstellt. So

können Radioaktivitäts-Signale im Chromatogramm Regionen auf der DC-Platte zugeordnet werden. Über die Integrale der Signale lassen sich so prozentuale Anteile der verschiedenen Verbindungen aus der aufgetragenen Probe bestimmen. Ist der R_f -Wert für das gewünschte Produkt bekannt (vorab mit Referenz durch UV-Detektion bestimmt), kann sein prozentualer Anteil ins Verhältnis zu den Nebenprodukten gesetzt werden und gibt so Auskunft über die radiochemische Reinheit. In Abbildung 5.2 ist eine DC-Platte gezeigt, die vom DC-Scanner ausgelesen wird. Im resultierenden Chromatogramm ist der Produktpot als rotes Signal angezeigt.

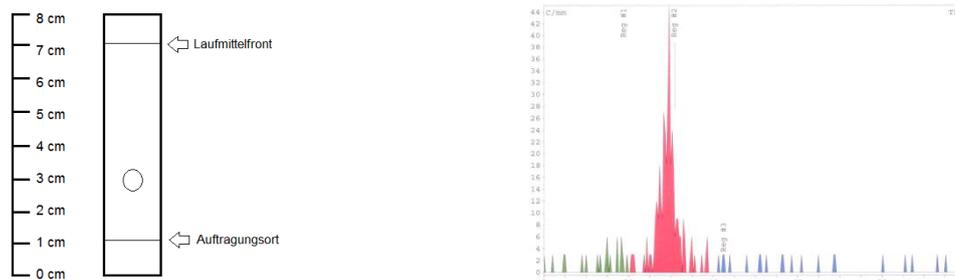


Abb. 5.2: links: DC-Streifen; rechts: Chromatogramm, x-Achse: 0-100 mm, y-Achse: counts/mm; Das Chromatogramm zeigt die detektierte Radioaktivität. Hier ergibt sich eine Reinheit der radioaktiven Verbindung mit einem R_f -Wert von 0.3 (rot markiert) von 77 %.

Die verwendete HPLC-Anlage verfügt über einen Radioaktivitäts- und einen UV-Detektor. Zur Identifizierung einer radioaktiven Substanz muss zunächst eine Trennungsmethode für Precursor und markierte Verbindung entwickelt werden. Diese wird mit der Referenz, d. h. einer Verbindung, die der radioaktiv markierten entspricht, anstelle des radioaktiven aber das natürliche, stabile Isotop enthält, erstellt. Sind die Retentionszeiten für Precursor und Referenz so eingestellt, dass eine Trennung durch präparative HPLC möglich ist, so kann man davon ausgehen, dass auch ein Gemisch aus Precursor und radioaktiv markierter Verbindung getrennt werden kann. Dabei gilt es zu beachten, dass die Entwicklung der Methode mit Precursor und Referenz mit Chromatogrammen des UV-Detektors geschieht, die Anwendung der Methode bei einer Radiomarkierung mittels UV- und Radioaktivitätsdetektor geschieht. Nach einer Radiomarkierung werden die entstandenen Verbindungen entsprechend der Signale im Radioaktivitäts-Chromatogramm mithilfe der präparativen HPLC fraktioniert. Die Fraktion, die anhand des Vergleichs der Retentionszeit mit der Referenz als Produkt in Frage kommt, wird eingengt. Eine Probe daraus wird mit einer Lösung der Referenzverbindung vereinigt und auf die analytische HPLC coinjiziert. Haben im resultierenden Chromatogramm die radioaktive Verbindung im Radioaktivitäts-Chromatogramm und die Referenz im UV-Chromatogramm dieselbe Retentionszeit, so gilt

es als erwiesen, dass die der Referenz entsprechende radioaktive Verbindung synthetisiert wurde, die Reaktion also erfolgreich war. Abbildung 5.3 zeigt ein UV-Chromatogramm der Methodenentwicklung. Die Signale für Precursor (20.5 min) und Referenz (24 min) sind deutlich getrennt, somit ist eine präparative Trennung möglich. Für das Produkt der Radiomarkierung wird eine Retentionszeit im Radioaktivitätschromatogramm von 24 min erwartet.

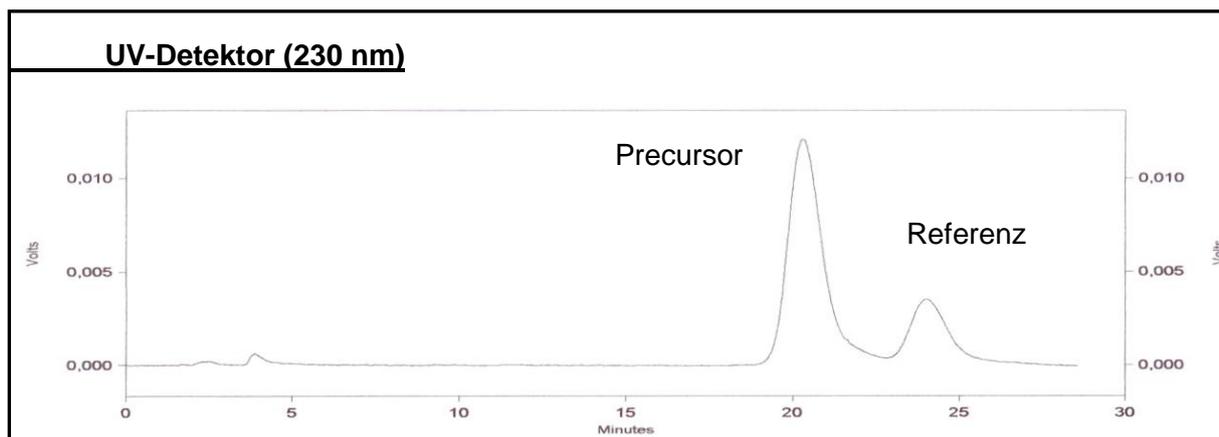
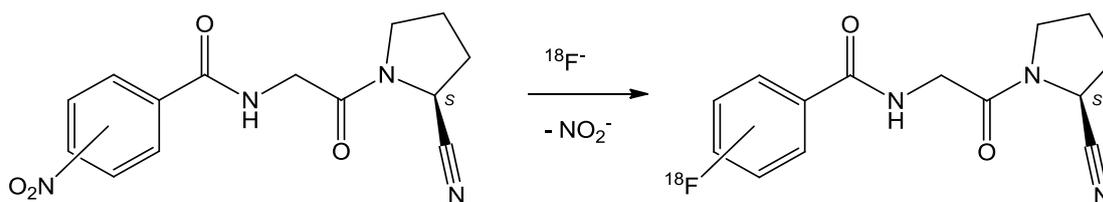


Abb. 5.3: Methodenentwicklung für die HPLC zur präparativen Trennung der Produkte einer Radiomarkierung.

5.2.2 Radiomarkierungen mit [¹⁸F]Fluorid

Die Einführung des Nuklids Fluor-18 erfolgt durch nucleophile aromatische Substitution mittels [¹⁸F]Fluorid (¹⁸F⁻). Für diese Reaktion wird eine Abgangsgruppe und eine elektronenziehende Gruppe in 2- oder 4- (*ortho*- oder *para*-) Stellung am Aromaten benötigt. Typische Abgangsgruppen sind, in der Reihenfolge absteigender Reaktivität sortiert: $\text{NaAlk}_3^+ = \text{NO}_2 > \text{F} > \text{Cl} > \text{Br} > \text{I}$, sowie Mesylat- Tosylat- oder Triflatgruppen. Typische elektronenziehende Gruppen sind, in absteigender Reaktivität sortiert: $p\text{-NO}_2 > p\text{-CF}_3 > p\text{-CN} > p\text{-CHO} > p\text{-Ac} > m\text{-NO}_2$.^{65,67} Die Amidbindung des Benzoylrests zum *N*-Terminus des Glycins stellt also eine gute elektronenziehende Gruppe dar, der Benzoylrest ist idealerweise in 2- oder 4-Stellung mit einer Abgangsgruppe substituiert. Die Wahl der Abgangsgruppe fiel auf die Nitrogruppe, da sie die reaktivste Abgangsgruppe ist und die benötigten Ausgangsstoffe zur Synthese des Precursors (Nitrobenzoesäuren) käuflich erwerbbar sind. Schema 5.1 zeigt das allgemeine Reaktionsschema für die Radiofluorierung von 1-(2- und 1-(4-Nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril zu 1-(2- und 1-(4-[¹⁸F]Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril.



Schema 5.1: Radiofluorierung zu 1-(2- und 1-(4-[^{18}F]Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril.

Die Reaktionsbedingungen für eine nucleophile aromatische Substitution mit [^{18}F]Fluorid müssen bei einer Radiomarkierung genau eingehalten werden. Die Markierung muss unter absolut aprotischen Bedingungen stattfinden, das Lösemittel muss wasserfrei sein und das Precursor-Molekül sollte keine aciden Wasserstoffatome enthalten. Für die nucleophile Substitution wird ein polares Lösemittel benötigt, üblicherweise finden Dimethylsulfoxid (DMSO), Acetonitril (ACN) und *N,N*-Dimethylformamid (DMF) breite Anwendung.⁷² Die Reaktion findet bei hohen Temperaturen von 80-180 °C statt.⁶⁷ Als Fluorierungsreagenz dient $^{18}\text{F}^-$ (n.c.a. = no-carrier added [^{18}F]Fluorid), das in wässriger Lösung zur Verfügung steht. Dieser Lösung wird Kaliumcarbonat und Kryptofix zugesetzt, wodurch „nacktes“ Fluorid erhalten wird, anschließend wird die Lösung einem Trocknungsprozess unterzogen. Die Trocknung wird durch azeotropes Verdampfen des Wassers mit ACN durchgeführt. Ist das [^{18}F]Fluorid komplett trocken, so wird der Precursor in einem geeigneten Lösemittel zugeführt und die Reaktionslösung für einige Zeit unter Schutzgas erhitzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Produktgemisch auf die präparative HPLC gegeben, um überschüssiges $^{18}\text{F}^-$ von markierten Produkten zu trennen. Anschließende Coinjektion einer Probe der vermutlichen Produktfraktion mit der Referenz liefert den Nachweis über den Erfolg der Reaktion.¹⁰⁰

5.2.3 Durchführung und Ergebnisse der Fluorierung

Aufgrund der Bevorzugung der *ortho*- bzw. *para*-Stellung von elektronenziehender Gruppe und Abgangsgruppe bei der nucleophilen aromatischen Substitution werden der 2- und 4-Fluor-Inhibitor verwendet.

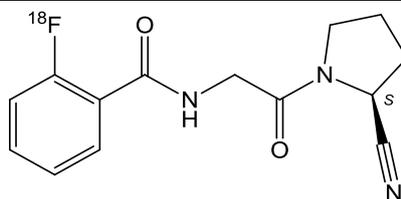
5.2.3.1 1-(2-[^{18}F]Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril

1-(2-Nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**61**) wurde nach in Kapitel 5.2.2 beschriebener Synthesestrategie mit [^{18}F]Fluorid markiert (siehe Schema 5.1).

5 RADIOMARKIERUNGEN

Die detaillierte Versuchsdurchführung ist in Kapitel 13.1 beschrieben. Es wurden durchschnittlich 294 MBq Startaktivität (abhängig von der zur Verfügung stehenden Menge), 5.0 mg Precursor (1-(2-Nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril), 1.0 ml trockenes Lösemittel, 20.0 mg Kryptofix, 30.0 µl 1 M Kaliumcarbonatlösung und 1.0 ml einer 9:1 Mischung der Elutionslösung aus ACN und Wasser eingesetzt. Der Trocknungsprozess wurde bei 90-110 °C unter Argonstrom vollzogen. Die variablen Bedingungen (Lösemittel, Reaktionszeit und Reaktionstemperatur) sind entsprechend dem Versuchsansatz in Tabelle 5.1 angeführt. Die Reaktionslösung wird nach Ablauf der Reaktionszeit ohne weitere Behandlung auf die präparative HPLC gegeben.

Tabelle 5.1: Fluorierung von 1-(2-Nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril.



Ansatz	Lösemittel	Reaktionszeit	Temperatur	Ausbeute
1	ACN	30 min	80 °C	1 %
2	DMF	10 min	140 °C	0 %
3	DMF	20 min	140 °C	0 %
4	DMF	30 min	140 °C	0 %

Leider konnte das gewünschte Produkt nur in einem Versuchsansatz in sehr geringer Ausbeute auf die beschriebene Weise dargestellt werden. Im Folgenden sind die HPLC-Chromatogramme für Ansatz 1 (siehe Tab. 5.1) dargestellt.

Trennung durch präparative HPLC:

Das Reaktionsgemisch wurde nach Ablauf der Reaktionszeit im HPLC-Laufmittel (MeOH/Wasser 3:7) aufgenommen und auf die präparative HPLC injiziert. In Abbildung 5.4 sind das Radioaktivitäts- und das UV-Chromatogramm der Reaktionslösung gezeigt.

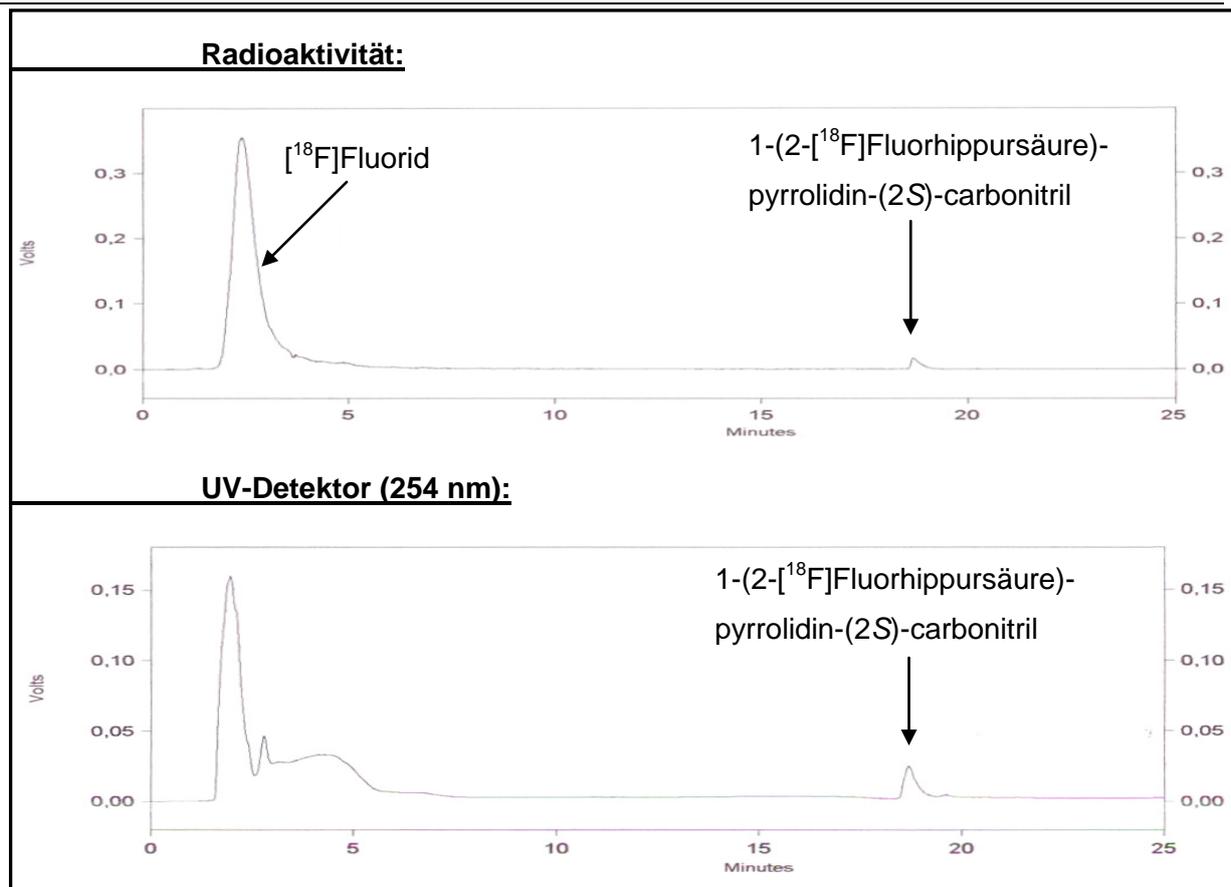


Abb. 5.4: Radioaktivitäts- und UV-Chromatogramm der Fluorierung von 1-(2-Nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril.

Das Signal bei 19 min hat eine Aktivität von 1 MBq. Diese Fraktion wurde gesammelt, eingengt und anschließend zusammen mit der Referenz 1-(2-Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril auf die analytische HPLC coinjiziert.

Coinjektion auf analytische HPLC:

Abbildung 5.5 zeigt im UV-Chromatogramm, dass die Referenz eine Retentionszeit von 19 min hat, genau wie die Produktfraktion bei der präparativen Trennung (siehe Abb. 5.4). Leider ist die Aktivität so gering, dass im Radioaktivitätschromatogramm kein eindeutiges Signal zu erkennen ist.

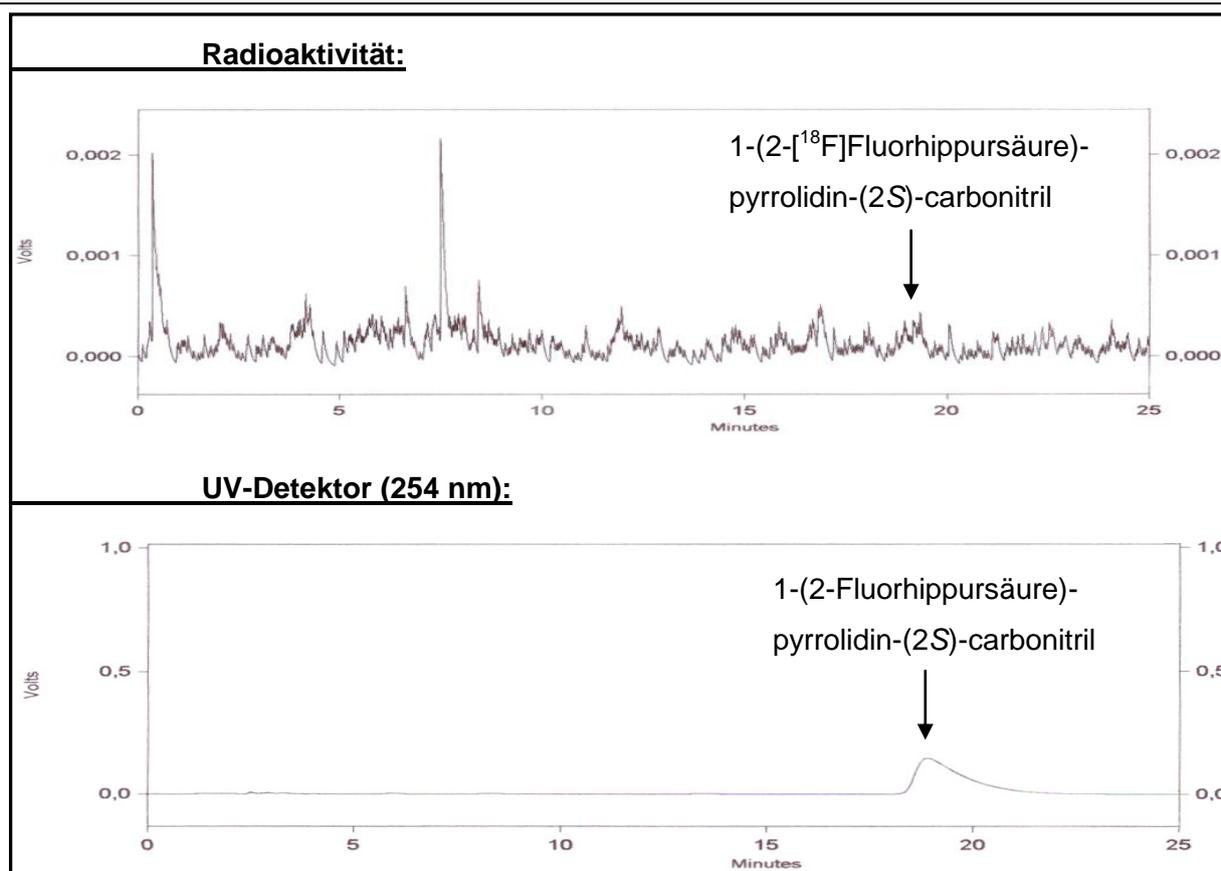


Abb. 5.5: Radioaktivitäts- und UV-Chromatogramm der Coinjektion der Fluorierung von 1-(2-Nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit Referenz 1-(2-Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril.

5.2.3.2 1-(4-[¹⁸F]Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril

1-(4-Nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**63**) wird nach in Abschnitt 5.2.2 beschriebener Synthesemethode mit [¹⁸F]Fluorid markiert (siehe Schema 5.1).

Die Reaktion wurde analog zu der in Kapitel 5.2.3.1 beschriebenen Methode für das *ortho*-Isomer durchgeführt und erfolgte anhand der in Kapitel 13.1 angeführten Vorschrift.

Die Bedingungen wurden bezüglich Temperatur, Reaktionsdauer und Lösemittel variiert. Leider konnte das gewünschte Produkt auf keine der untersuchten Weisen gewonnen werden. Auch eine Variation der Aufarbeitung, bei der nach Ablauf der Reaktionszeit das Reaktionsgemisch in Wasser gelöst und auf eine C-18-Kartusche gegeben wurde, anschließend das Rohprodukt mit Methanol eluiert und die Methanolfraction zur Reinigung auf die präparative HPLC gegeben wurde, führte nicht zum angestrebten Produkt.¹⁰¹

Stellvertretend ist im Folgenden das HPLC-Chromatogramm der Coinjektion einer vermeintlichen Produktfraktion gezeigt. Nachdem die Retentionszeit des Signals im UV-Chromatogramm nicht mit der Retentionszeit im Radioaktivitäts-Chromatogramm

übereinstimmt, gilt es als erwiesen, dass die Markierung nicht zum gewünschten Produkt geführt hat.

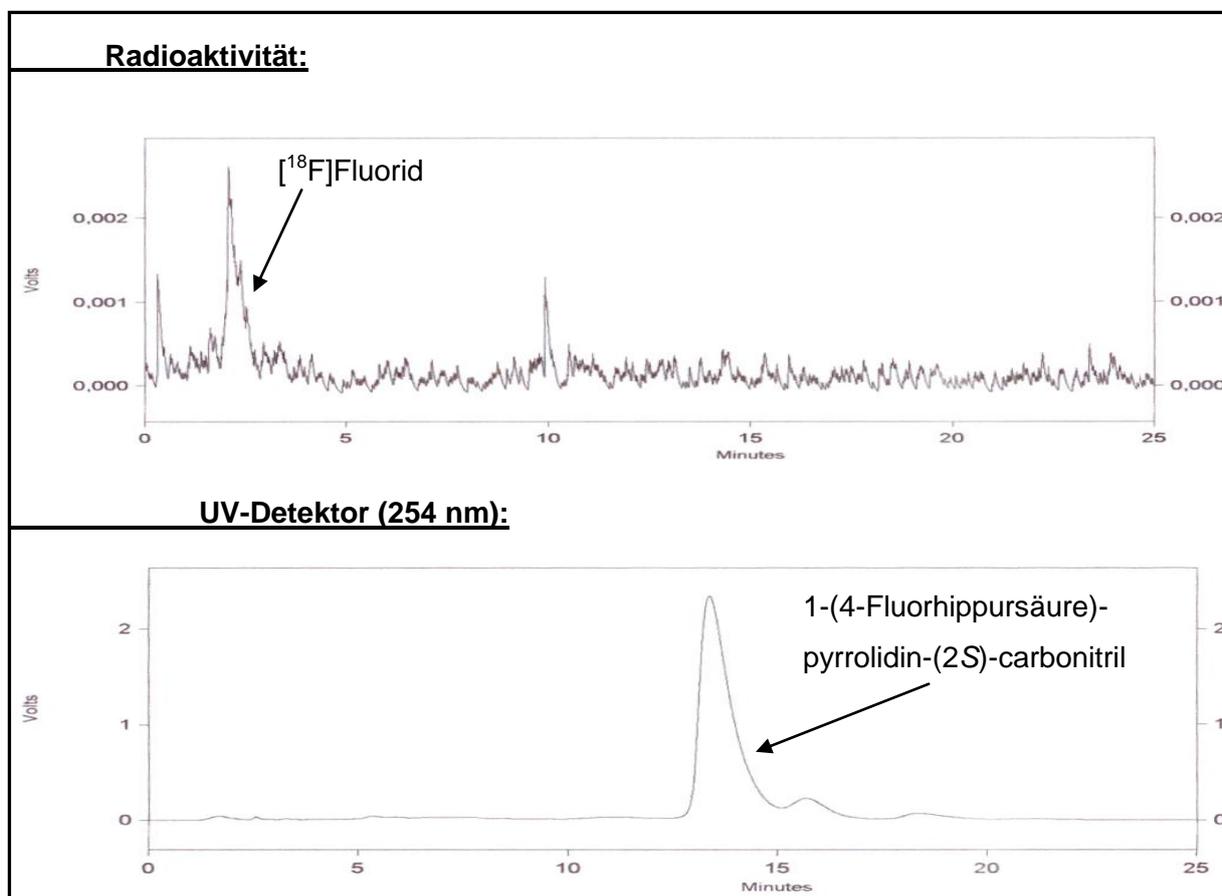


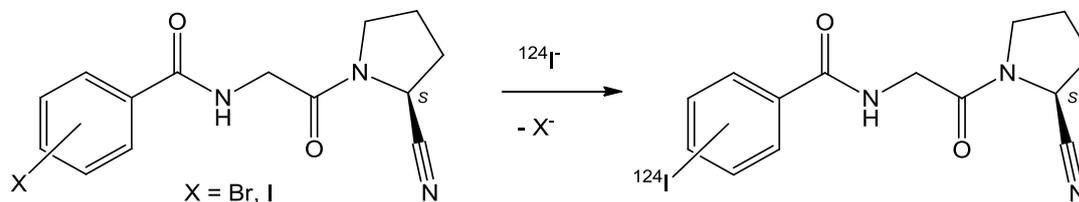
Abb. 5.6: Radioaktivitäts- und UV-Chromatogramm der Coinjektion der Fluorierung von 1-(4-Nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit Referenz 1-(4-Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril.

Aufgrund der Ergebnisse der Enzymassays, die ergaben, dass nur die 3-Fluor-Verbindung akzeptable Hemmwirkung gegen FAP zeigte (siehe Kapitel 4.4.3.1, Tab. 4.1), wurde die radioaktive Fluorierung der 2- und 4-Nitro-Verbindungen nicht weiter verfolgt.

5.2.4 Radiomarkierung mit [¹²⁴I]Iodid

Die Einführung des Radionuklids Iod-124 erfolgt durch nucleophile aromatische Substitution mittels [¹²⁴I]Iodid (¹²⁴I⁻). Wie auch bei der Fluorierung durch nucleophile Substitution wird für die Iodierung eine Abgangsgruppe und eine elektronenziehende Gruppe in 2- oder 4- (*ortho*- oder *para*-) Stellung am Aromaten benötigt. Als Abgangsgruppe wird Bromid⁷³ oder Iodid verwendet, weshalb diese Art der Reaktion auch als Halogen- bzw. Isotopenaustausch bezeichnet wird. Fluor und Chlor eignen sich nicht als Abgangsgruppen.

Die elektronenziehende Gruppe ist idealerweise eine Carboxyl- oder Carbonamidgruppe.^{75,102} Die radioaktive Markierung von Iod-haltigen PET-Tracern für FAP folgt dem in Schema 5.2 abgebildeten Reaktionsschema.



Schema 5.2: Radioiodierung zu 1-(2- und 1-(4-[¹²⁴I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril.

Radioaktives Iodid wird als trägerfreies NaI eingesetzt, das in Natronlauge geringer Konzentration zur Verfügung steht. Zur Reduktion entstehenden elementaren Iods (I_2) wird Natriumbisulfidlösung ($Na_2S_2O_5$) hinzugefügt. Zur Katalyse können geringe Mengen einer Kupfer(I)-Lösung beigegeben werden. Nach einem Trocknungsprozess wird der Precursor in einem geeigneten Lösemittel der Reaktion zugeführt und einige Minuten auf Temperaturen von 160-180 °C erhitzt. Nach Einengen des Gemisches wird dieses direkt auf die präparative HPLC zur Trennung der radioaktiv markierten Produkte gegeben.⁷⁴ Dabei werden, wie bei der HPLC-Trennung für die fluorierten Produkte, überschüssiges [¹²⁴I]Iodid abgetrennt und entstandene iodierte Produkte anhand ihrer Retentionszeit identifiziert. Anschließende Coinjektion der Referenz mit der Produktfraktion auf die analytische HPLC liefert den eindeutigen Nachweis für die Entstehung des Produkts. Der Vorteil der Radioiodierung durch Halogenaustausch mit Br^- liegt darin, dass der Brom-Precursor und der iodierter PET-Tracer mithilfe der HPLC anhand ihrer Retentionszeit separiert werden können. Es wird sogenanntes trägerfreies Produkt erhalten. Beim Isotopenaustausch mit I^- hingegen, bei dem Iod-Precursor und iodierter PET-Tracer dieselbe Retentionszeit zeigen, entsteht deshalb Produkt, das aus einem Gemisch aus der radioaktiven und der nicht-radioaktiven Verbindung besteht, sogenanntes geträgertes Produkt.⁷³

Da die bromierten Precursoren noch nicht zur Verfügung standen (siehe Kapitel 3.4), wurden alle Iodierungen mit iodierten Precursoren und somit unter Isotopenaustausch durchgeführt.

5.2.5 Durchführung und Ergebnisse der Iodierung

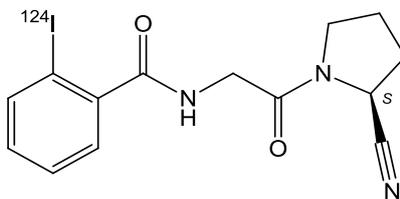
Aufgrund der Bevorzugung der *ortho*- bzw. *para*-Stellung von elektronenziehender Gruppe und Abgangsgruppe bei der nucleophilen aromatischen Substitution und den guten

Ergebnissen im Enzymassay (siehe Kapitel 4.4.3.1 und 4.4.3.2) werden der 2- und 4-Iod-Inhibitor (Verbindungen **64** und **66**) verwendet.

5.2.5.1 1-(2-[¹²⁴I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril

Die Radiomarkierung von 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**64**) erfolgte anhand der in Abschnitt 5.2.4 beschriebenen Methode, die detaillierte Versuchsdurchführung ist in Kapitel 13.2 angegeben. Es wurden 50.0 µl einer 20.0 mM 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril-Lösung in Eisessig und 5.0 µl Natriumbisulfidlösung mit der Konzentration von 5.0 mg/ml eingesetzt. Auf das Kupfersalz (z.B. Cu(I)Cl) zur Katalyse wurde bei dieser Reaktion verzichtet. Tabelle 5.2 zeigt den durchgeführten Versuchsansatz nebst Bedingungen und Ausbeute. Das Produktgemisch wurde ohne weitere Behandlung auf die präparative HPLC zur Trennung gegeben.

Tabelle 5.2: Iodierung von 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit Iod-124.



Ansatz	Lösemittel	Reaktionszeit	Temperatur	Ausbeute
1	Eisessig	10 min	160 °C	59 %

Trennung durch präparative HPLC:

Aufgrund der Erfahrungen aus den Vorversuchen mit [¹³¹I]Iodid-markierten Verbindungen (siehe Kapitel 5.2.5.3) wurde das Signal bei 9.5 min (siehe Abbildung 5.7) als Produktfraktion gesammelt und i. Vak. getrocknet. Auf eine Coinjektion wurde verzichtet, da der Precursor/Referenz im UV-Chromatogramm dieselbe Retentionszeit zeigt. Das gereinigte und lösemittelfreie Produkt wurde in isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen und zur Verwendung als PET-Tracer für Kleintierversuche zur Verfügung gestellt.

5 RADIOMARKIERUNGEN

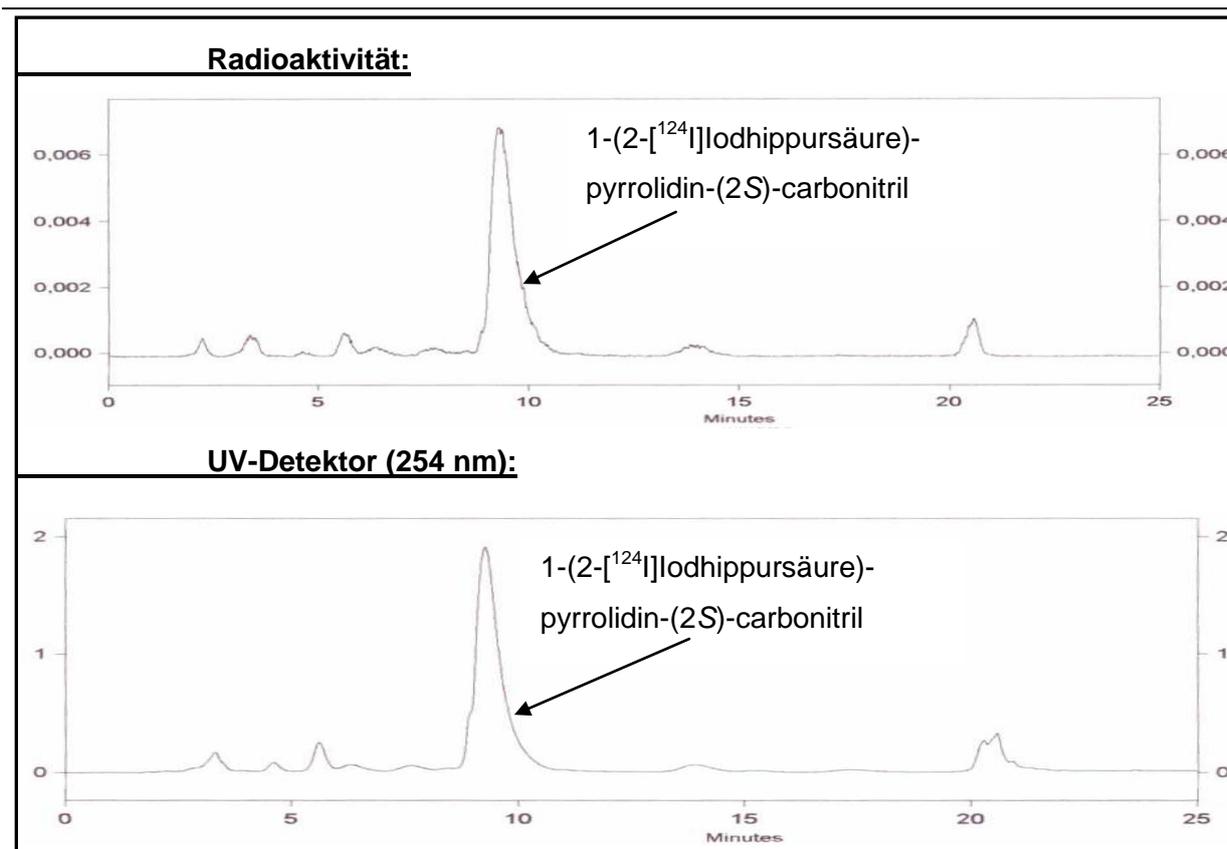
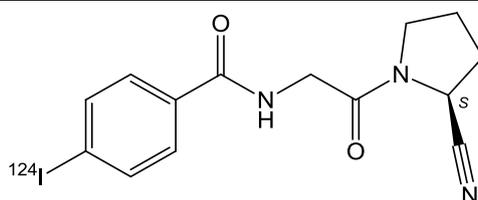


Abb. 5.7: Radioaktivitäts- und UV-Chromatogramm der Iodierung von 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit $[^{124}\text{I}]$ iodid.

5.2.5.2 1-(4- $[^{124}\text{I}]$ iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril

Die Radioiodierung mit $[^{124}\text{I}]$ iodid von 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**66**) verläuft genauso wie von 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (Kapitel 5.2.5.1). Tabelle 5.3 zeigt den durchgeführten Versuchsansatz nebst Bedingungen und Ausbeute.

Tabelle 5.3: Iodierung von 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit Iod-124.



Ansatz	Lösemittel	Reaktionszeit	Temperatur	Ausbeute
1	Eisessig	10 min	160 °C	34 %

Wie auch bei der Markierung mit $[^{131}\text{I}]$ iodid beobachtet werden kann (Kapitel 5.2.5.4), ist die Ausbeute für 1-(4- $[^{124}\text{I}]$ iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril schlechter als für 1-(2-

[^{124}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril, was die Vermutung nahelegt, dass *ortho*-substituierte Verbindungen besser für die nucleophile aromatische Substitution aktiviert sind als *para*-substituierte Verbindungen.

Das Reaktionsgemisch wird in Laufmittel gelöst und auf die präparative HPLC injiziert.

Trennung durch präparative HPLC:

Aufgrund der Erfahrungen aus den Vorversuchen mit [^{131}I]Iodid (siehe Kapitel 5.2.5.4) kann das Signal bei Minute 12 (siehe Abb. 5.8) als Produkt angenommen werden. Da die Retentionszeit des Hauptpeaks im UV-Chromatogramm auch 12 min beträgt, gilt es als bestätigt, dass das gewünschte Produkt synthetisiert wurde und auf eine Coinjektion konnte verzichtet werden.

Die gesammelte Produktfraktion wurde i. Vak. getrocknet und in injektionsfähigem Lösemittel (isotonische Kochsalzlösung) aufgenommen, um als fertiges Radiopharmakon für Tierversuche zur Verfügung zu stehen.

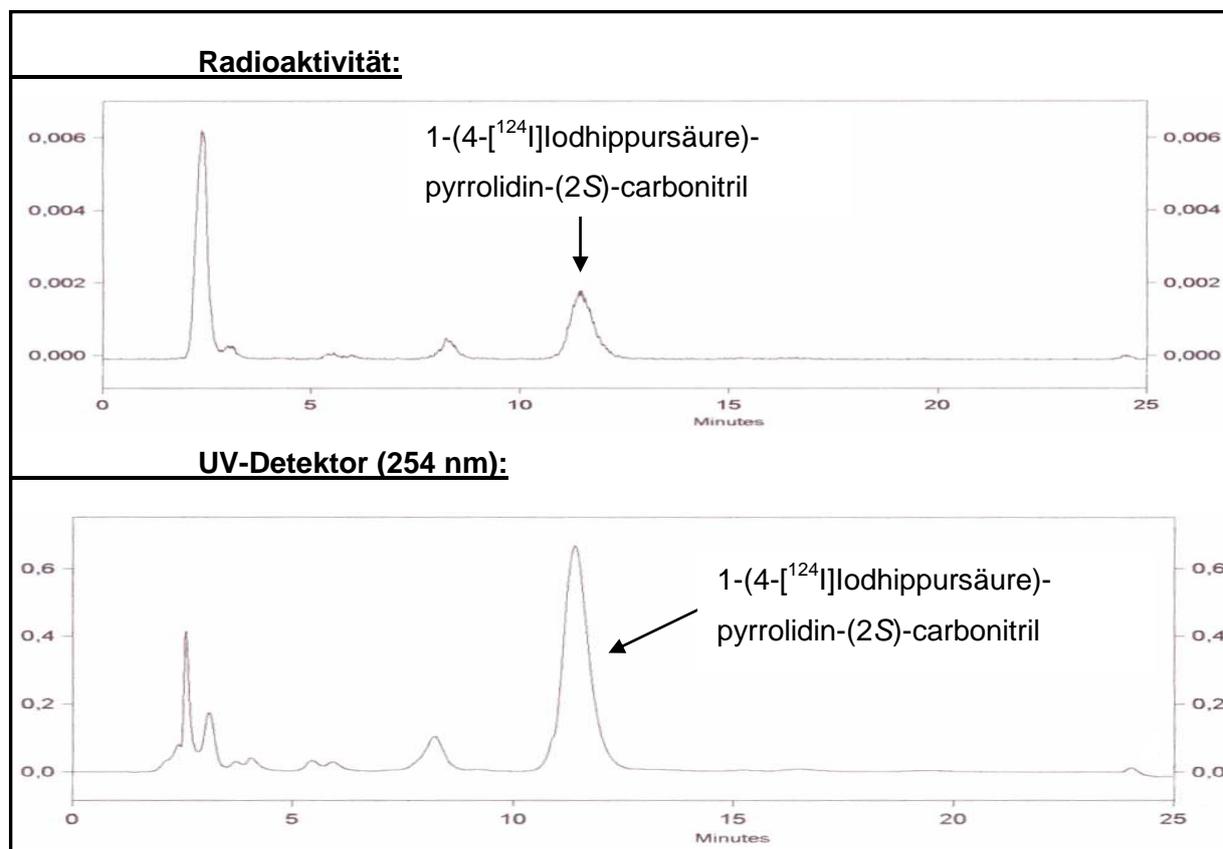


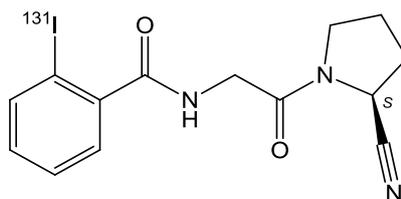
Abb. 5.8: Radioaktivitäts- und UV-Chromatogramm der Iodierung von 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit [^{124}I]Iodid.

5.2.5.3 1-(2-[¹³¹I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril

Um zu testen, ob sich die Precursoren für die radioaktive Iodierung eignen, wurden die Radioiodmarkierungen zunächst mit dem weniger kostspieligen Iod-131 durchgeführt. Die Markierung mit Iod-131 erfolgte nach der gleichen Methode wie für Iod-124 (Abschnitt 5.2.4). Iod-131 ist ein β^- -Strahler und hat eine Halbwertszeit von 8.02 Tagen.

Die radioaktive Markierung von 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**64**) mit [¹³¹I]Iodid erfolgt auf dieselbe Weise (siehe Abschnitt 5.2.5.1) wie mit [¹²⁴I]Iodid. Auf das Kupfersalz (z.B. Cu(I)Cl) zur Katalyse wurde bei dieser Reaktion verzichtet. Tabelle 5.4 zeigt die durchgeführten Versuchsansätze nebst Bedingungen und Ausbeuten. Das Produktgemisch wurde ohne weitere Behandlung auf die präparative HPLC zur Trennung gegeben.

Tabelle 5.4: Iodierung von 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit Iod-131.



Ansatz	Lösemittel	Reaktionszeit	Temperatur	Ausbeute
1	Eisessig	10 min	160 °C	74 %
2	Eisessig	10 min	160 °C	68 %

Trennung durch präparative HPLC:

Die Chromatogramme zeigen beide ein Signal bei 9.5 min, was die Vermutung nahelegt, dass das gewünschte Produkt synthetisiert wurde. Nachdem beim Isotopenaustausch Precursor und Referenz ein- und dieselbe Verbindung sind, ist der Erfolg der Reaktion direkt aus den Chromatogrammen der präparativen HPLC ablesbar. Die Coinjektion ist somit überflüssig, wurde aber der Vollständigkeit halber trotzdem durchgeführt. In Abb. 5.9 sind die Chromatogramme von Ansatz 2 gezeigt.

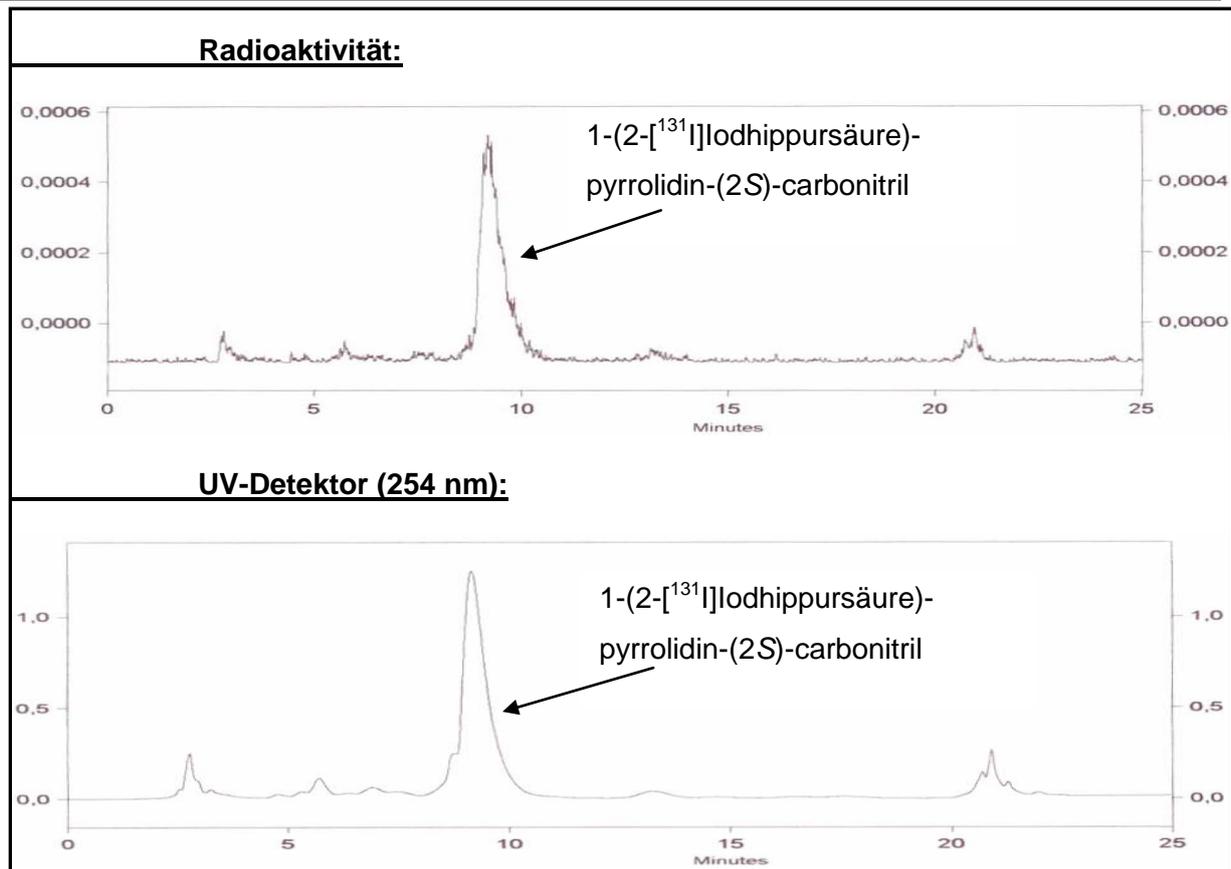
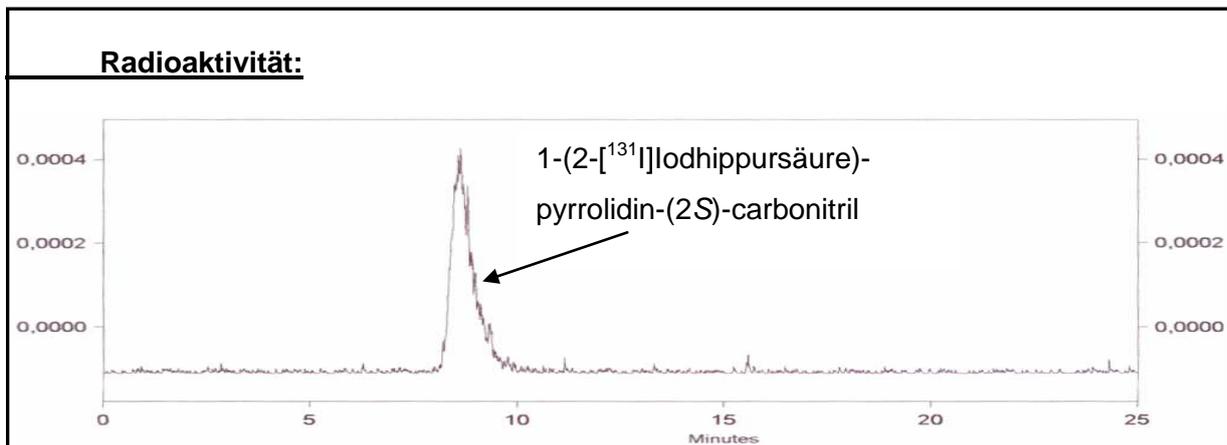


Abb. 5.9: Radioaktivitäts- und UV-Chromatogramm der Iodierung von 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit [¹³¹I]Iodid.

Coinjektion auf analytische HPLC:

Zur Coinjektion wurde eine Probe der Fraktion um das Signal bei Minute 9.5 des präparativen Laufs zusammen mit der Referenz auf die analytische HPLC injiziert. Aufgrund der identischen Retentionszeit im Radioaktivitäts- und im UV-Chromatogramm (siehe Abb. 5.10) gilt die Synthese von 1-(2-[¹³¹I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril als erwiesen.



5 RADIOMARKIERUNGEN

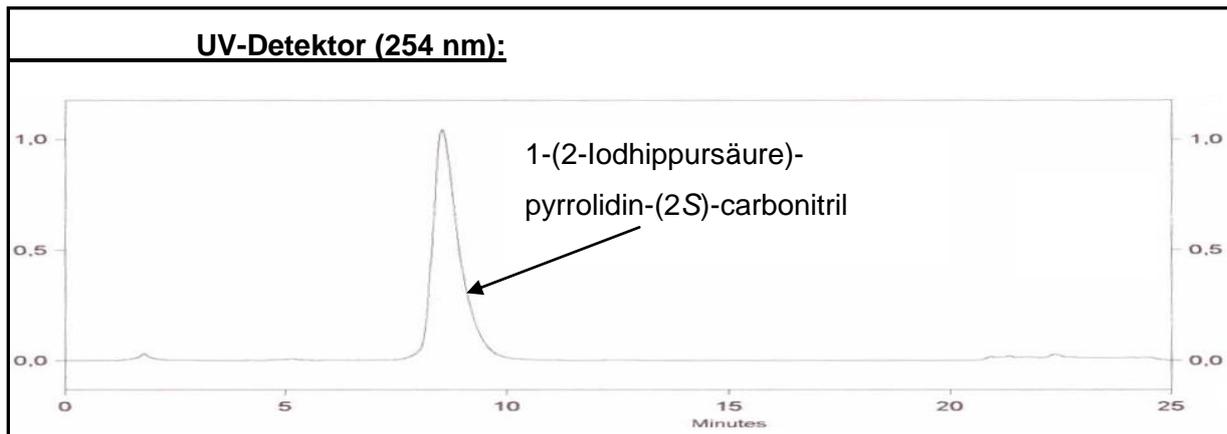
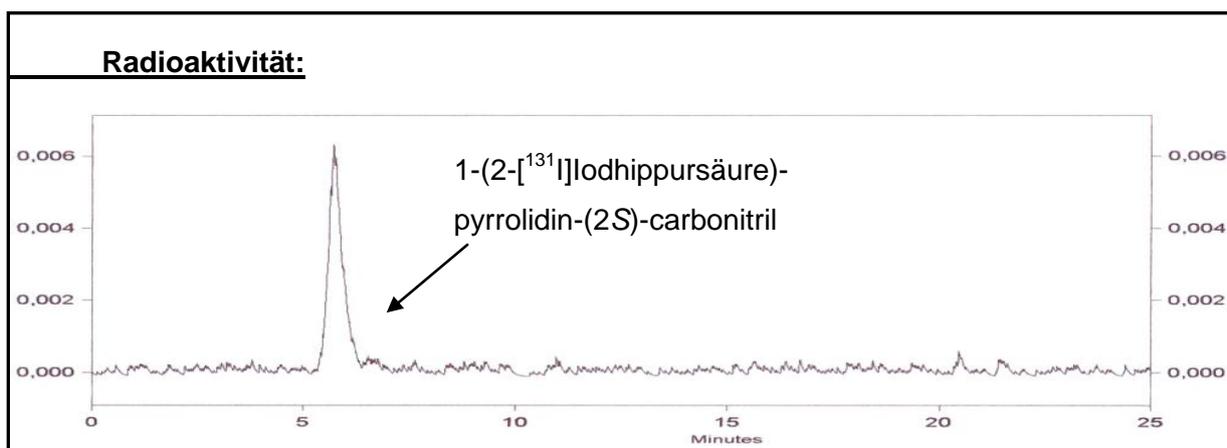


Abb. 5.10: Radioaktivitäts- und UV-Chromatogramm der Coinjektion der Iodierung von 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit $[^{131}\text{I}]$ Iodid mit Referenz 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril.

Um die *in-vitro*-Stabilität von 1-(2- $[^{131}\text{I}]$ Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril für die Verwendung als PET-Tracer zu testen, wird die Produktfraktion i. Vak. getrocknet und in einer injektionsfähigen Flüssigkeit gelöst. In diesem Fall wurde isotonische Kochsalzlösung verwendet. Die Stabilität der markierten Verbindung wurde über die Zeit von 12 h per analytischer HPLC und per DC verfolgt. Die Chromatogramme zeigen keine Zerfallsprodukte, die Verbindung ist in dieser Formulierung für die Zeit einer möglichen PET-Anwendung stabil. In Abb. 5.11 ist stellvertretend das Chromatogramm der Messung nach viereinhalb Stunden gezeigt. Um kürzere Retentionszeiten zu erhalten wurde hierfür ein etwas polarerer Laufmittel gewählt.



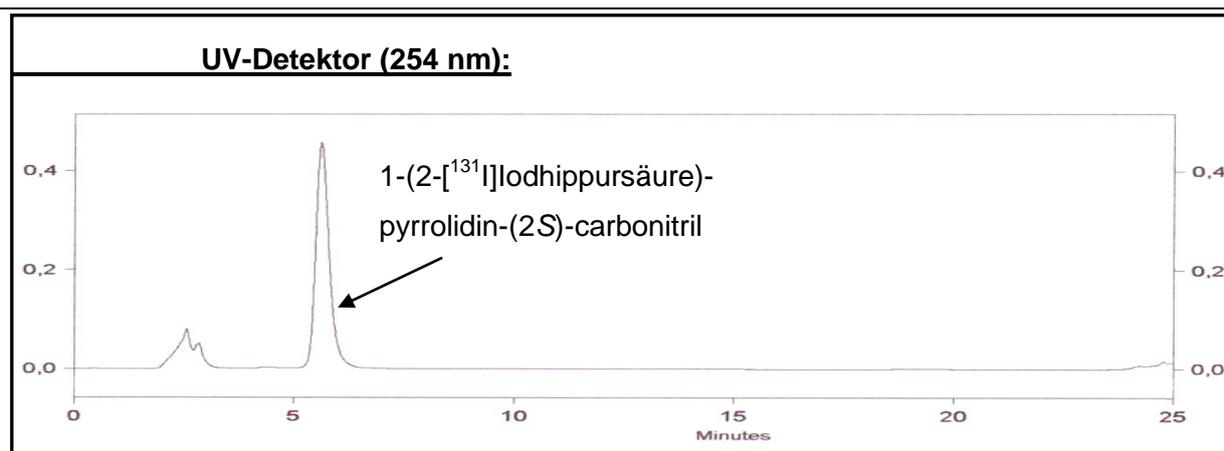
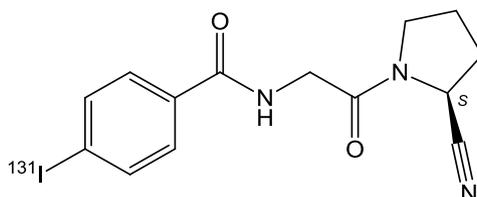


Abb. 5.11: Radioaktivitäts- und UV-Chromatogramm der Stabilitätsmessung von 1-(2-[¹³¹I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril.

5.2.5.4 1-(4-[¹³¹I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril

Die Radiomarkierung von 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**66**) erfolgte wie die Radiomarkierung von 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**64**) anhand der in Abschnitt 5.2.4 und detailliert im Kapitel 13.2 beschriebenen Methode. Es wurden 50.0 µl einer 20.0 mM 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril-Lösung in Eisessig und 5.0 µl Natriumbisulfidlösung mit der Konzentration von 5.0 mg/ml eingesetzt. Tabelle 5.5 zeigt die durchgeführten Versuchsansätze nebst Bedingungen und Ausbeuten. Das Reaktionsgemisch wird direkt nach der Reaktion auf die präparative HPLC gegeben und entsprechend der Signale fraktioniert.

Tabelle 5.5: Iodierung von 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit Iod-131.



Ansatz	Lösemittel	Reaktionszeit	Temperatur	Ausbeute
1 (mit CuCl)	Eisessig	10 min	160 °C	21 %
2	Eisessig	10 min	160 °C	36 %

An den Ausbeuten ist erkennbar, dass das zur Katalyse hinzugefügte Kupfersalz eine Verschlechterung verursachte. Für die geringere Ausbeute verantwortliche Nebenprodukte bestehen möglicherweise aus Kupfer-Komplexen.

Trennung durch präparative HPLC:

Als Produkt kommt das Signal mit einer Retentionszeit von 12.5 min (siehe Abb. 5.12) in Frage, das im UV-Chromatogramm ebenfalls erscheint. Vorab durchgeführte HPLC-Läufe mit der Referenz zeigten ebenfalls eine Retentionszeit von 12.5 min.

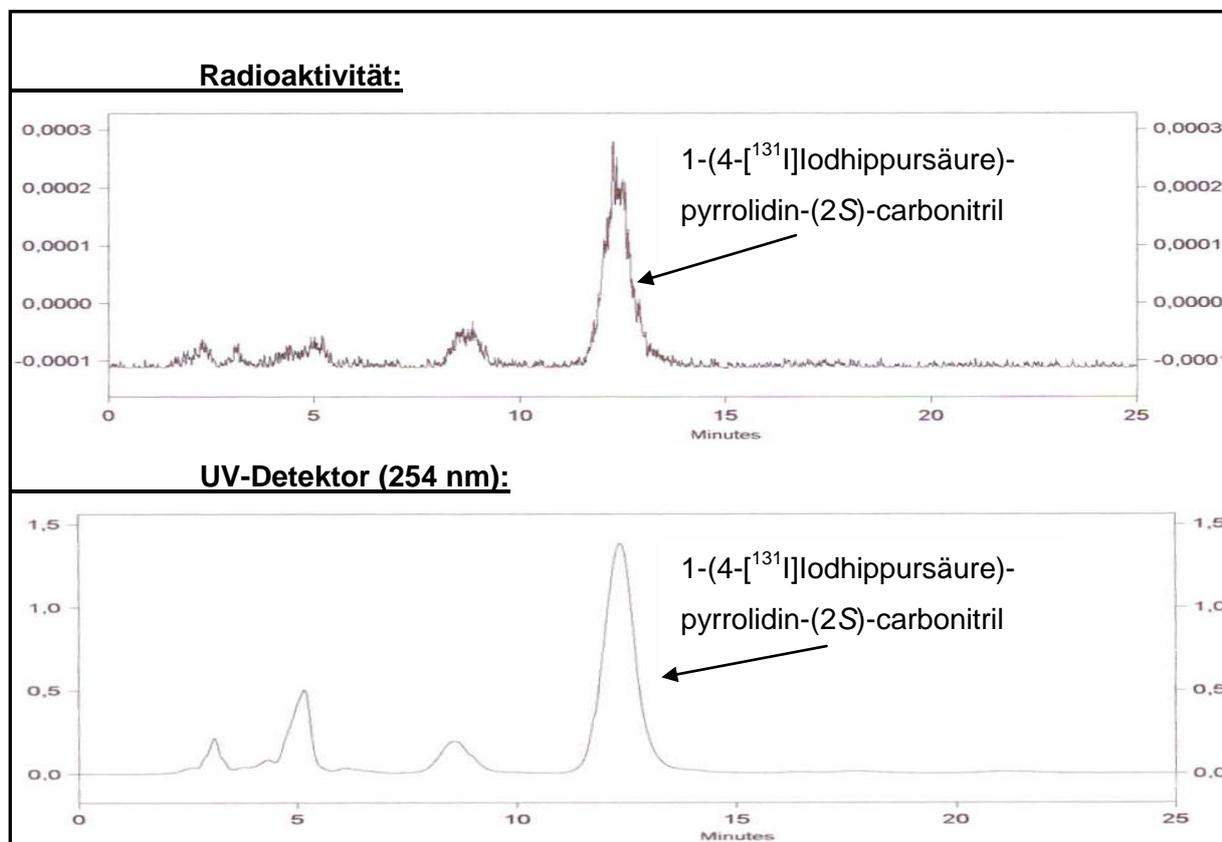


Abb. 5.12: Radioaktivitäts- und UV-Chromatogramm der Iodierung von 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit [¹³¹I]Iodid.

Coinjektion auf analytische HPLC:

Die vermutliche Produktfraktion und eine Probe der Referenz zeigen bei der Coinjektion im Radioaktivitäts- und im UV-Chromatogramm dieselbe Retentionszeit (Abb. 5.13), die Synthese von 1-(4-[¹³¹I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril ist somit bestätigt. Bei der analytischen HPLC ist die Retentionszeit zu Minute 16 verschoben, da ein leicht unpolares Laufmittel verwendet wurde. Für die Stabilitätsversuche wurde dann ein polares Laufmittel gewählt, um dieselben Retentionszeiten wie bei der präparativen HPLC zu erzielen.

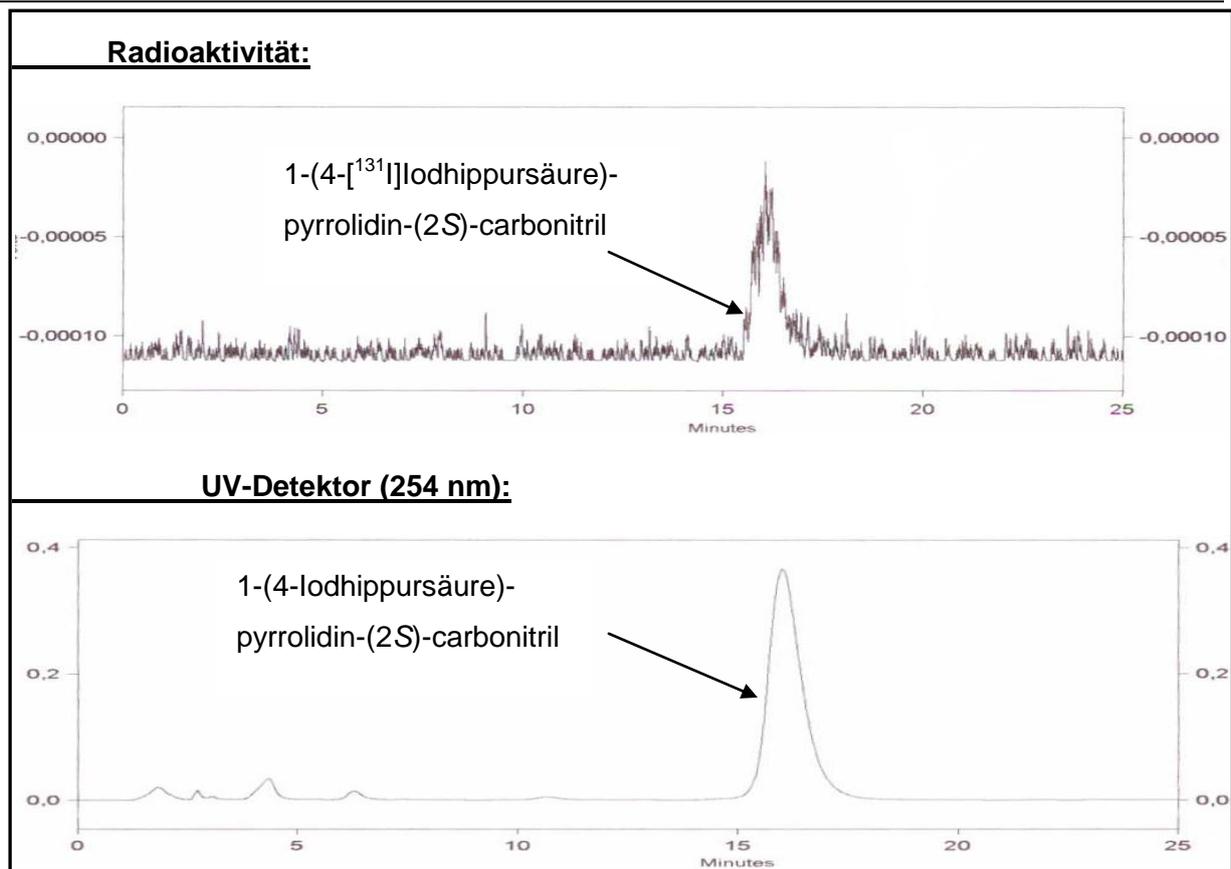
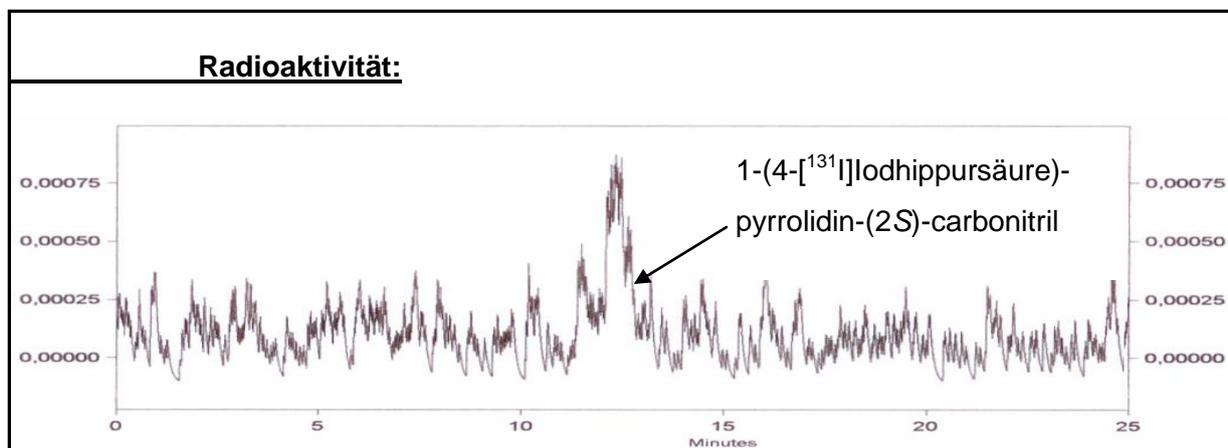


Abb. 5.13: Radioaktivitäts- und UV-Chromatogramm der Coinjektion der Iodierung von 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit [¹³¹I]Iodid mit Referenz 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril.

Auch mit dieser Verbindung wurde die Stabilität in injizierfähiger Lösung (isotonische Kochsalzlösung) über die Zeit von 12 h per HPLC und DC verfolgt. Die Chromatogramme zeigen keine Signale für Spaltprodukte. Das Produkt ist dementsprechend über die untersuchte Zeit stabil. Stellvertretend zeigt Abb. 5.14 die Chromatogramme nach vereinhalf Stunden.



5 RADIOMARKIERUNGEN

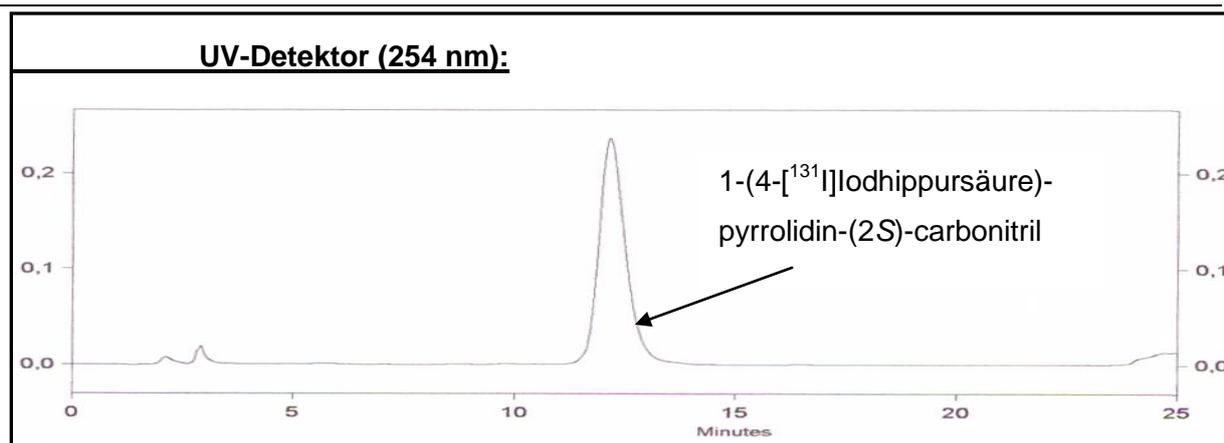


Abb. 5.14: Radioaktivitäts- und UV-Chromatogramm der Stabilitätsmessung von 1-(4-[¹³¹I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril.

Es konnte gezeigt werden, dass 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril und 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit radioaktivem Iodid markiert werden können. Die Methode wurde für die Markierung mit [¹²⁴I]Iodid optimiert, um neue Iod-124-haltige Radiopharmaka zur Aufspürung von FAP mittels PET zu entwickeln (siehe Kapitel 5.2.5.1 und 5.2.5.2).

Insgesamt ist bei den Radioiodierungen zu beobachten, dass die Ausbeuten bei der *ortho*-Iodierung stets höher ausfallen als bei der *para*-Iodierung. Offenbar ist die *ortho*-Position bei der nucleophilen Substitution gegenüber der *para*-Position bevorzugt. Die Ausbeuten sind in Tabelle 5.6 zusammengestellt. Welches Isotop verwendet wird, hat darauf keinen Einfluss.

Tabelle 5.6: Ausbeuten der durchgeführten Radioiodierungen.

Verbindung	Isotop	Substitutionsposition	Ausbeute
1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril	Iod-131	para	21 %
1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril	Iod-124	para	34 %
1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril	Iod-131	para	36 %
1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril	Iod-124	ortho	59 %
1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril	Iod-131	ortho	68 %
1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril	Iod-131	ortho	74 %

Es konnte gezeigt werden, dass 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril und 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril mit [^{124}I]Iodid markiert werden können. Die Stabilität in injektionsfähiger Lösung wurde mit 1-(2-[^{131}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril und 1-(4-[^{131}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril bestätigt. Die Entwicklung neuer Radiopharmaka für die Diagnose des Remodeling-Vorgangs nach Myokardinfarkt mittels PET ist somit gelungen. Mit 1-(2-[^{124}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril und 1-(4-[^{124}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril stehen zwei neue Tracer zum Nachweis von FAP für *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen zur Verfügung.

5.3 [^{68}Ga]Gallium-markierte APN- und Integrin $\alpha_v\beta_3$ -affine Peptide

Gallium-68 ([^{68}Ga]Gallium, ^{68}Ga) wird in einem Generator gewonnen, der eine Säule mit Trägermaterial (organisch oder anorganisch, im Falle dieser Arbeit TiO_2) enthält, auf dem das Mutternuklid Germanium-68 aufgebracht ist. ^{68}Ge wird im Zyklotron durch Bestrahlung von ^{69}Ga mit Protonen in der Kernreaktion $^{69}\text{Ga}(p, 2n)^{68}\text{Ge}$ unter Bildung von zwei Neutronen hergestellt. Innerhalb des Generators zerfällt es in einer Halbwertszeit von 270.8 Tagen zu ^{68}Ga , das wiederum in einer Halbwertszeit von 68.3 Minuten durch Positronenzerfall zerfällt. $^{68}\text{Ga}^{3+}$ wird mit 0.1 M Salzsäure vom Generator eluiert, $^{68}\text{GaCl}_4^-$ wird von einer nachgeschalteten Ionenaustauschersäule aus der Lösung eliminiert. ^{68}Ge wird von Salzsäure nur in Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-5} % mit in den Reaktor eluiert.^{72,103}

5.3.1 Komplexierung von Gallium

Gallium liegt in wässriger Lösung als dreifach positiv geladenes Kation Ga^{3+} (Ga in der Oxidationsstufe III) vor. Aufgrund des geringen Ionenradius von 47-62 pm (bei einer Koordinationszahl von 4-6) und der hohen Ladung gilt es als klassische harte Lewis-Säure. Es ist zur Komplexierung mit Lewis-Base-Donoren (Fluorid, Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefelverbindungen) bestens geeignet. In mehrzähligen Liganden, offen oder cyclisch, wird eine maximale Koordinationszahl von 6 erreicht. Bei hohem pH-Wert hat Ga(III) aufgrund seiner hohen Affinität zu Hydroxidionen die Eigenschaft, den bestehenden Komplex unter Bildung von $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$ zu verlassen.¹⁰⁴⁻¹⁰⁵ Der biologische Transporter Transferrin hat bekanntermaßen eine hohe Affinität zu Ga(III). Komplexe mit Ga(III) für die biologische Anwendung müssen demnach besonders für die Transchelatierung durch dieses Biomolekül inert sein.¹⁰⁵ Auf der Suche nach einem Chelator für Gallium-68, der mit einem Peptid verbunden als Radiopharmakon Anwendung finden soll, gilt es den zu finden,

5 RADIOMARKIERUNGEN

der den stabilsten Komplex mit dem Ga(III)-Kation unter physiologischen Bedingungen bildet. Stabilität kann als $\log K_{ML}$ -Wert ausgedrückt werden, der logarithmischen Form der Komplexbildungskonstante $K_{ML} = [ML] / [M][L]$. In Tabelle 5.7 sind eine Reihe bekannter Chelat-Liganden nebst ihrer Donor-Atome, der Koordinations-zahl, der geometrischen Gestalt und ihrer Stabilitätskonstante angegeben.¹⁰⁵

Tabelle 5.7: Daten für ausgewählte Ga(III)-Chelator Komplexe.

Chelator	Donor-Atome	Koordinations-zahl	Geometrie	$\log K_{ML}$
Transferrin	NO ₅	6		20.05 ± 0.25
TMBA	NS ₃	4	Tetraeder	20.5
EDTA	N ₂ O ₄	6	Oktaeder	21.5 ± 0.5
EC	N ₂ O ₂ S ₂	6	Oktaeder	33.0
DOTA	N ₄ O ₂	6	Oktaeder	21.3
NOTA	N ₃ O ₃	6	Oktaeder	31.0

Transferrin mit seiner Stabilitätskonstante von 20.05 ± 0.25 gilt es zu übertreffen. Werte in diesem Bereich oder darüber werden in den meisten Fällen von sechszähligen Liganden zur Bildung oktaedrischer Komplexe erreicht. Der einzig ähnlich stabile tetraedrische Komplex (Koordinationszahl 4) wird mit dem Chelator Tris(2-mercaptobenzyl)amin (TMBA, siehe Abb. 5.15) gebildet. Stabile oktaedrische Komplexe bilden z.B. *N,N*-Ethylen-di-(S)-cystein (EC) oder Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Abb. 5.15).¹⁰⁵

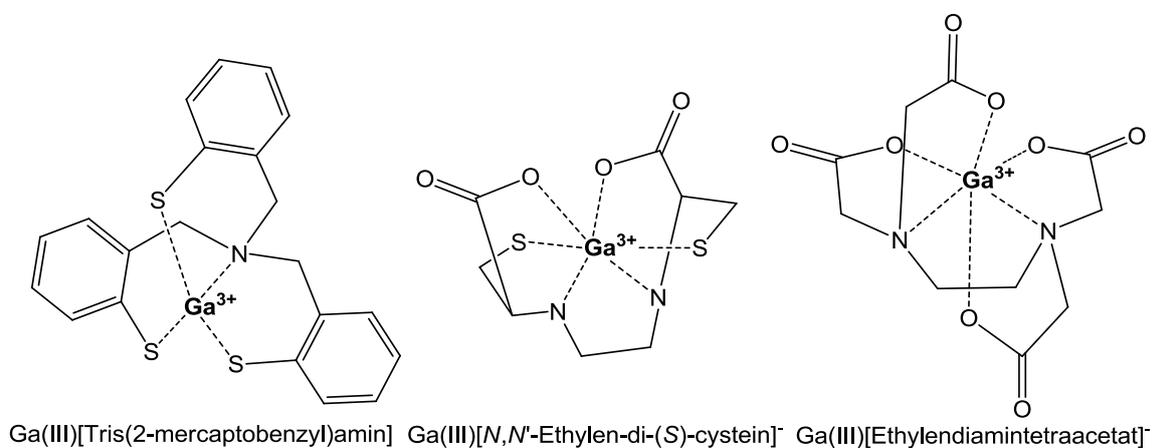


Abb. 5.15: Tetraedrische (links TMBA) und oktaedrische (Mitte EC, rechts EDTA) Ga(III)-Chelatkomplexe.

Bemerkenswert hohe Stabilität zeigt der Chelator NOTA, dessen Komplex mit Ga(III) sich durch extreme Säure-Inertheit auszeichnet. Durch die Geometrie des Chelators ist eine perfekte Anpassung an die Größe des Gallium-Ions (in diesem Komplex hat es einen Ionenradius von 76 pm) und eine effektive Einkapselung möglich. Es bildet sich ein leicht verzerrtes Oktaeder (siehe Abb. 5.16). Die Carboxymethyl-Arme schützen das Gallium-Ion besonders gut gegen nucleophile Angriffe, wodurch sich der Ga(III)-NOTA-Komplex ideal zur Anwendung in einem Radiopharmakon eignet. In zahlreichen Radiopharmaka erfolgreich eingesetzt wird auch der Komplexbildner DOTA (siehe Abb. 5.16), der zwar eine hohe, aber im Vergleich zu NOTA geringere Stabilität des Ga(III)-Komplexes aufweist (siehe Tab. 5.7).

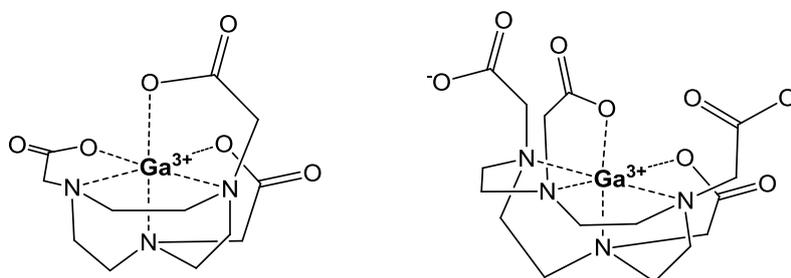


Abb. 5.16: Chelat-Komplexe mit Ga(III), links NOTA, rechts DOTA.

Da es sich bei DOTA um einen achtzähligen Liganden handelt, kann es mehr als die sechs Koordinationsstellen der für das Ga(III) üblichen oktaedrischen Anordnung absättigen. Dies hat zur Folge, dass der zur Verfügung stehende Raum für das Gallium-Ion zu groß ist, weshalb DOTA keinerlei Selektivität gegenüber anderen Metallionen zeigt. Des Weiteren ist die Kinetik der Komplexierung langsamer, wodurch DOTA höhere Temperaturen und längere Reaktionszeiten benötigt als NOTA. Die thermodynamische Stabilität von Ga(III)-DOTA ist ungefähr um zehn Größenordnungen geringer als die von Ga(III)-NOTA. Erstaunlicherweise zeigen viele Radiopharmaka mit DOTA *in vivo* dennoch Stabilität, z.B. ⁶⁸Ga-DOTA-TOC. Bei ⁶⁸Ga-DOTA-RGD konnte aber bereits gezeigt werden, dass die *in vivo*-Stabilität nicht im erforderlichen Maße gegeben ist, nachdem sich an Plasmaproteine gebundenes Radiogallium finden ließ.¹⁰⁵

In der Entwicklung der Radiopharmaka mit den Peptiden RGD und NGR fiel deshalb die Wahl des am besten geeigneten Komplexbildners für Gallium-68 auf NOTA.

5.3.2 **Synthese**

[⁶⁸Ga]Gallium-markierte Peptide werden durch Komplexierung des an das Peptid geknüpften Chelators erhalten.¹⁰⁴ Das vom Generator mit HCl eluierte ⁶⁸Ga³⁺ wird zusammen mit dem Peptid in einer geeigneten Pufferlösung einige Zeit erhitzt. Die detaillierte Synthese ist in Kapitel 13.3 beschrieben. Die erhaltenen Ausbeuten sind stark abhängig vom Alter des ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-Generators. Durch die Halbwertszeit des ⁶⁸Ge bedingt hat der Generator eine Haltbarkeit von ca. einem dreiviertel Jahr. Ein neuer Generator liefert konstant hohe Aktivitäten, die im Laufe der Lebenszeit des Generators immer weiter abnehmen und gegen Ende der Lebenszeit stark schwanken. Das Produkt wird mit <10 % Ethanol in isotonischer Kochsalzlösung gelöst und steht so als injizierfähiger PET-Tracer zur Verfügung.

5.3.3 **Analytik**

Die Ausbeute wird ermittelt, indem die gesamte Radioaktivität, die nach Elution des Generators zu Verfügung steht, bestimmt und zur Radioaktivität des Produkts ins Verhältnis gesetzt wird. Dazu werden sämtliche, bei der Synthese anfallende „Nebenprodukte“ (Abfall, Kartusche etc.) vermessen und gemeinsam mit dem Produkt als 100 % gesetzt.

Die Bestimmung der radiochemischen Reinheit erfolgt durch HPLC und durch RP-(reversed phase)-DC, da das im Peptid-Komplex gebundene ⁶⁸Ga(III) von freiem ⁶⁸Ga³⁺ unterschieden werden muss und sich somit ein polares (wasserhaltiges) Laufmittelgemisch besser als mobile Phase eignet.

Bei der DC dient als Laufmittel 0.1 M Zitronensäure. Überschüssiges ⁶⁸GaCl₃ läuft mit der Laufmittelfront mit und reichert sich am oberen Ende des DC-Streifens an, entstandenes Produkt wird vom Laufmittel nicht transportiert und bleibt am unteren Ende des DC-Streifens liegen. Im vom DC-Scanner gelieferten Chromatogramm können zwei Bereiche definiert werden, deren Integrale die chemische Reinheit in Prozent angeben.

Im Radioaktivitätschromatogramm des HPLC-Laufes erscheinen Signale für unreaktiertes ⁶⁸GaCl₃, das nicht reagiert hat, bei Minute 2-3, das markierte Produkt hat die gleiche Retentionszeit wie das nicht markierte Peptid im UV-Chromatogramm, welches in Vorversuchen erstellt worden ist. Im UV-Chromatogramm ist kein Signal für das Produkt detektierbar, da es in zu geringer Konzentration vorliegt. Die chemische Reinheit wird aus dem Integral des Produktsignals im Radioaktivitätschromatogramm bestimmt.

Die radiochemischen Reinheiten, die per DC und HPLC ermittelt werden, weichen aufgrund der unterschiedlichen Bestimmungsmethodik voneinander ab.

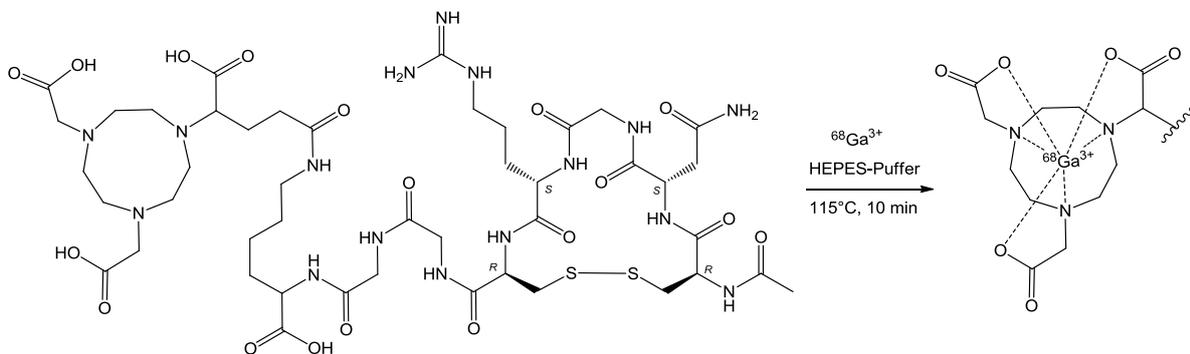
Die *in-vitro*-Stabilität der mit ^{68}Ga markierten Verbindung wird überprüft, indem sie in injektionsfähigem Lösemittel gelöst in regelmäßigen Zeitabständen auf die HPLC injiziert und auf Spaltprodukte untersucht wird.

5.3.4 Durchführung und Ergebnisse

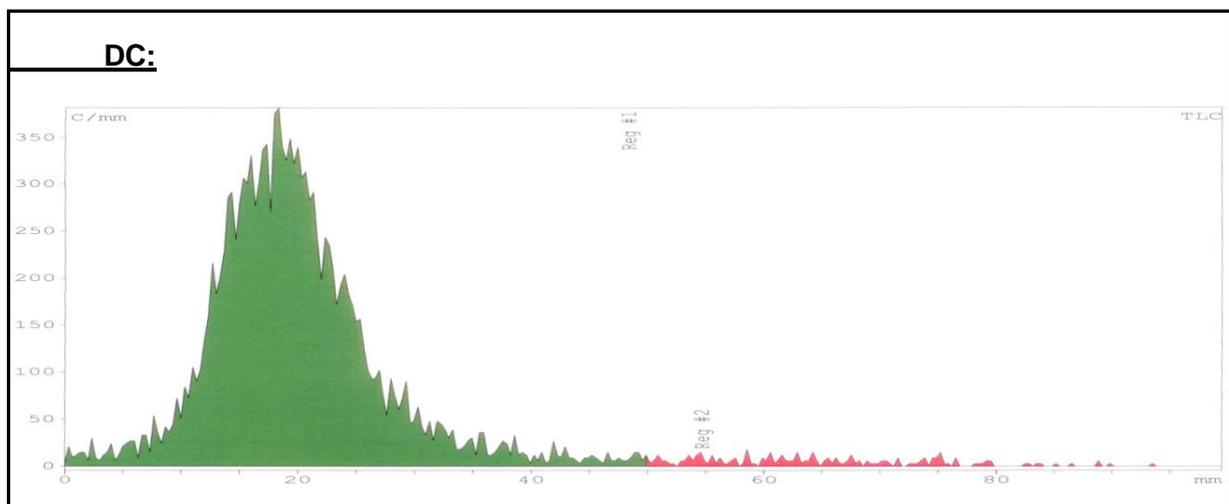
Es wurden zwei verschiedene Puffersysteme untersucht, Acetat- und 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-(HEPES-)Puffer, wobei die Ausbeuten nicht abwichen. Da die Handhabung mit HEPES einfacher war, wurde deshalb dieses System verwendet. Die Reaktionen wurden bei einer Temperatur von 115 °C durchgeführt und die Reaktionszeit betrug 10 min.

5.3.4.1 ^{68}Ga -NOTA-NGR

^{68}Ga -NOTA-NGR wird wie in Kapitel 5.3.2 und detailliert im Kapitel 13.3 beschrieben durch Komplexierung erhalten (siehe Schema 5.3). Es werden Reinheiten von 93 – 99 % (DC), 96 – 100 % (HPLC) und Ausbeuten von >90 % (87 – 324 MBq) erzielt.



Schema 5.3: Komplexierung von NOTA-NGR mit $^{68}\text{Ga}^{3+}$.



5 RADIOMARKIERUNGEN

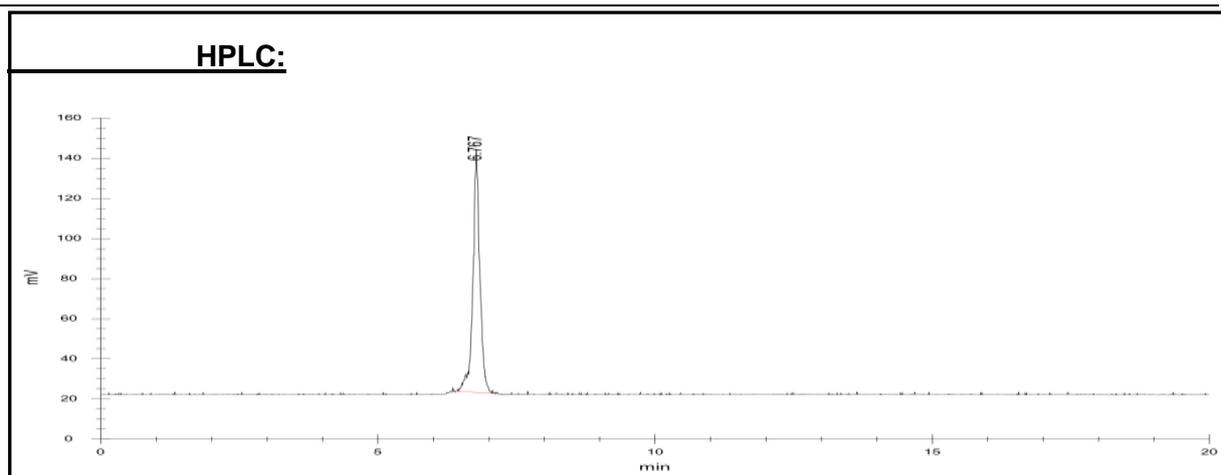


Abb. 5.16: Chromatogramme einer Synthese von ^{68}Ga -NOTA-NGR. Radiochemische Reinheit DC: 96.36 %, HPLC 100%.

Die Überprüfung der Stabilität durch Injektion auf die HPLC erfolgte nach 0, 30, 60, 90, 110, 130 und 150 min, die dabei bestimmten radiochemischen Reinheiten sind in Tabelle 5.8 gezeigt.

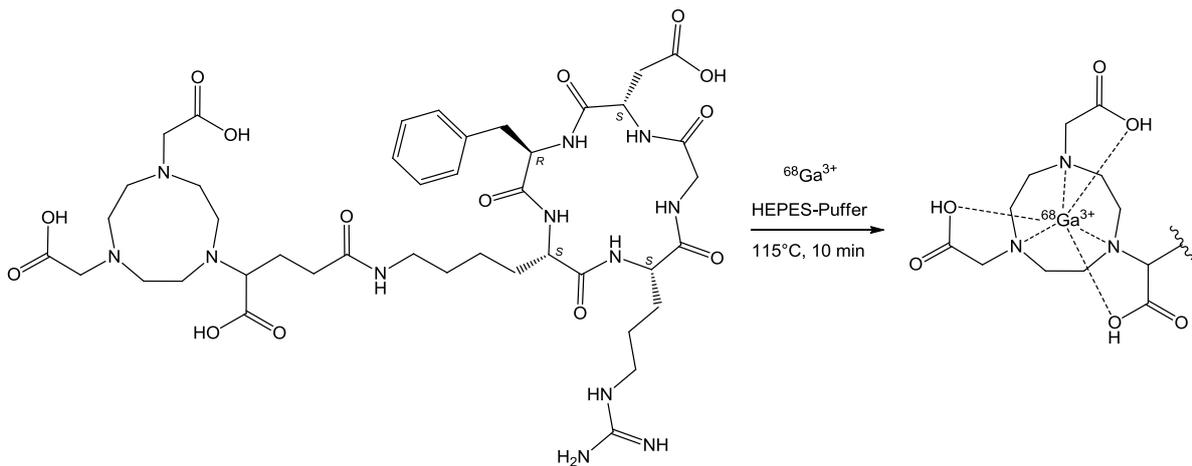
Tabelle 5.8: Radiochemische Reinheit (HPLC) einer Injektionslösung von ^{68}Ga -NOTA-NGR.

Zeit	0	30	60	90	110	130	150
radiochemische Reinheit	100 %	97.085 %	100 %	96.477 %	100 %	100 %	100 %

Die injizierfähige Lösung von ^{68}Ga -NOTA-NGR ist demnach über die Dauer einer Anwendung stabil und da die Synthese in verlässlichen Ausbeuten und Reinheiten erfolgt, ist sie als PET-Tracer geeignet.

5.3.4.2 ^{68}Ga -NOTA-RGD

Die Synthese von ^{68}Ga -NOTA-RGD ist bereits Literatur-bekannt¹⁰⁶ und wird wie in Kapitel 5.3.2 und detailliert im Kapitel 13.3 beschrieben durchgeführt (siehe Schema 5.4). Es werden Reinheiten von 93 – 99 % (DC), 97 – 100 % (HPLC) und Ausbeuten von >90 % (206 – 626) MBq erzielt.



Schema 5.4: Komplexierung von NOTA-RGD mit $^{68}\text{Ga}^{3+}$.

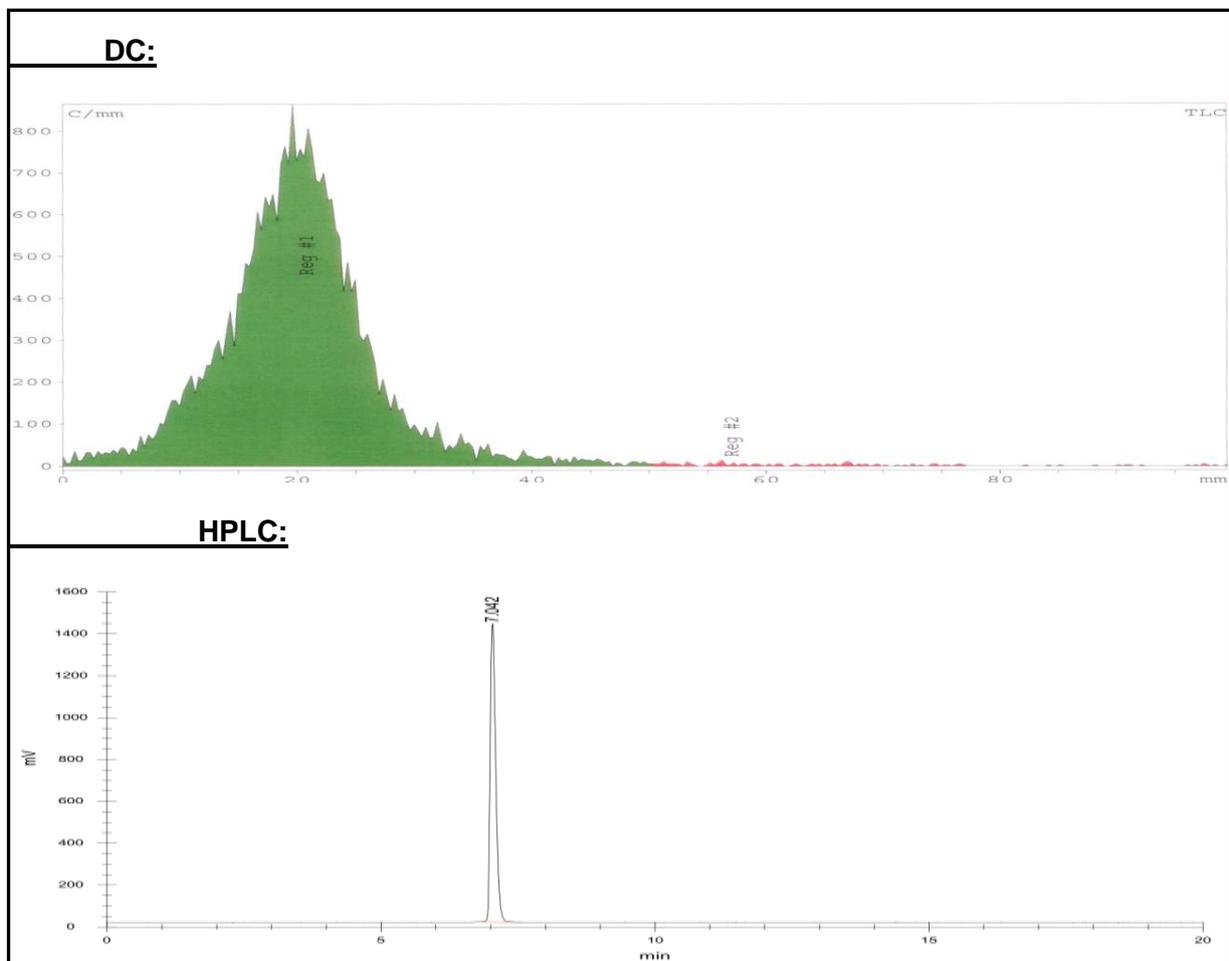


Abb. 5.17: Chromatogramme einer Synthese von ^{68}Ga -NOTA-RGD. Radiochemische Reinheit DC: 98.76 %, HPLC: 100 %.

Die Überprüfung der Stabilität durch Injektion auf die HPLC erfolgt nach 0, 60, 180 und 240 min, die dabei bestimmten radiochemischen Reinheiten sind in Tabelle 5.9 gezeigt.

Tabelle 5.9: Radiochemische Reinheit (HPLC) einer Injektionslösung von ^{68}Ga -NOTA-RGD.

Zeit	0	60	180	240
radiochemische Reinheit	100 %	99.945 %	100 %	100 %

Die injizierfähige Lösung von ^{68}Ga -NOTA-RGD ist demnach über die Dauer einer Anwendung stabil und da die Synthese in verlässlichen Ausbeuten und Reinheiten erfolgt, ist sie als PET-Tracer geeignet.

Mit ^{68}Ga -NOTA-NGR wurde ein neuartiges Radiopharmakon am Vorbild von ^{68}Ga -NOTA-RGD entwickelt. Durch die Etablierung von Synthese, Analytik und Nachweis von Stabilität sind *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen möglich. Es steht somit ein neuer Tracer zur Detektion von APN und zur Diagnose der Angiogenese mittels PET zur Verfügung.

5.4 Résumé Kapitel 5

5.4.1 Radiofluorierung

Die Radiofluorierung mit Fluor-18 wurde an den Precursoren 1-(2- und 1-(4-Nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril unter Zuhilfenahme der Referenzen 1-(2- und 1-(4-Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril durchgeführt. Dabei konnte 1-(2-[^{18}F]Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril in einer Ausbeute von 1 % dargestellt werden.

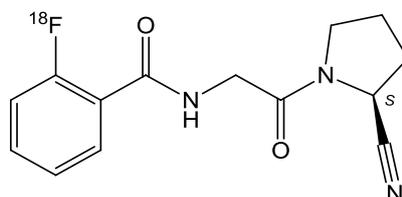


Abb. 5.18: Mit ^{18}F markierter Radiotracer für FAP.

Da 1-(2- und 1-(4-Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril aufgrund ihres schlechten Hemmergebnisses im Enzymassay an FAP (siehe Kapitel 4) nicht als PET-Tracer in Frage kommen und 1-(3-Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**55**), das zwar akzeptable Hemmung an FAP zeigt (siehe Kapitel 4, Tabelle 4.1), nicht für die Radiofluorierung durch nucleophile Substitution geeignet ist, wurde die Radiofluorierung nicht weiter verfolgt.

5.4.2 Radioiodierung

Die Radioiodierung mit Iod-124 und Iod-131 wurde an den Precursoren 1-(2- und 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril unter Zuhilfenahme der Referenzen 1-(2- und 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril durchgeführt. Die beiden Verbindungen wurden aufgrund ihrer guten Hemmergebnisse im Enzymtest an FAP (siehe Kapitel 4, Tab. 4.1) ausgewählt. Dabei konnten 1-(2-[¹²⁴I]-, 1-(4-[¹²⁴I]-, 1-(2-[¹³¹I]- und 1-(4-[¹³¹I])iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril in zufriedenstellenden Ausbeuten dargestellt werden, wobei die Verbindungen mit ¹³¹I nur zu Testzwecken synthetisiert wurden. Die *in-vitro*-Stabilität in injizierfähiger Lösung wurde bestätigt. Die mit ¹²⁴I markierten Verbindungen wurden für *in-vivo*-Untersuchungen am Kleintier-PET (siehe Kapitel 6) und für *ex-vivo*-Versuche mittels Autoradiographie (siehe Kapitel 7) zur Verfügung gestellt.

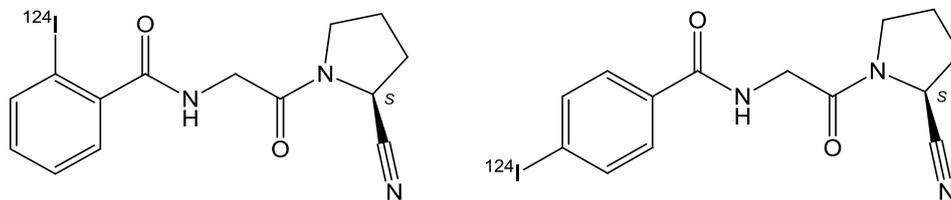


Abb. 5.19: Mit ¹²⁴I markierte Radiotracer für FAP.

5.4.3 Radiomarkierung mit [⁶⁸Ga]Gallium

Die neu entwickelte, APN-affine Sequenz NGR, das mit dem Komplexbildner NOTA verbunden ist, wurde nach dem Vorbild ⁶⁸Ga-NOTA-RGD mit Gallium-68 radiomarkiert. Die Synthese beider cyclischen Peptide erfolgte routinemäßig in guten Ausbeuten und die *in-vitro*-Stabilität der radiomarkierten Tracer in injizierfähiger Lösung wurde bestätigt. Die Radiotracer ⁶⁸Ga-NOTA-RGD und ⁶⁸Ga-NOTA-NGR standen für *in-vivo*-Untersuchungen am Kleintier-PET (siehe Kapitel 6) und für *ex-vivo*-Versuche mittels Autoradiographie (siehe Kapitel 8) zur Verfügung.

6 *In-vivo*-Untersuchungen

In Kleintier-Experimenten am PET soll untersucht werden, ob sich die entwickelten PET-Tracer zur Visualisierung der Wundheilung nach einem Herzinfarkt eignen. In diesen präklinischen *in-vivo*-Testungen soll die Wirksamkeit der entwickelten Radiopharmaka überprüft werden. Der neu entwickelte PET-Tracer ^{68}Ga -NOTA-NGR zur Darstellung des angiogenetisch aktiven Enzyms APN soll im Vergleich zum bereits etablierten Tracer ^{68}Ga -NOTA-RGD zur Darstellung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ getestet werden. Zur Visualisierung des im Remodeling-Prozess aktiven Enzyms FAP soll ein mit einem PET-Nuklid markierter Inhibitor im Kleintier-PET getestet werden. Hierzu wurde der mit Iod-124 markierte Inhibitor 1-(2-[^{124}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**75**) verwendet.

6.1 Kleintier-PET

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Kleintier-PET ist für Tiere mit einem Rumpfdurchmesser von bis zu ca. 10 cm geeignet. Im Gegensatz zum beim Menschen angewandten PET (siehe Abb. 1.11) wird das Tier bäuchlings auf der Liege platziert (siehe Abb. 6.1). Tiere werden während der Messung narkotisiert, da sich Bewegungen negativ auf die Qualität der Aufnahmen auswirken. Die resultierenden Bilder könnten „verwackelt“ erscheinen oder es könnten sich Artefakte bei der Rekonstruktion ergeben.

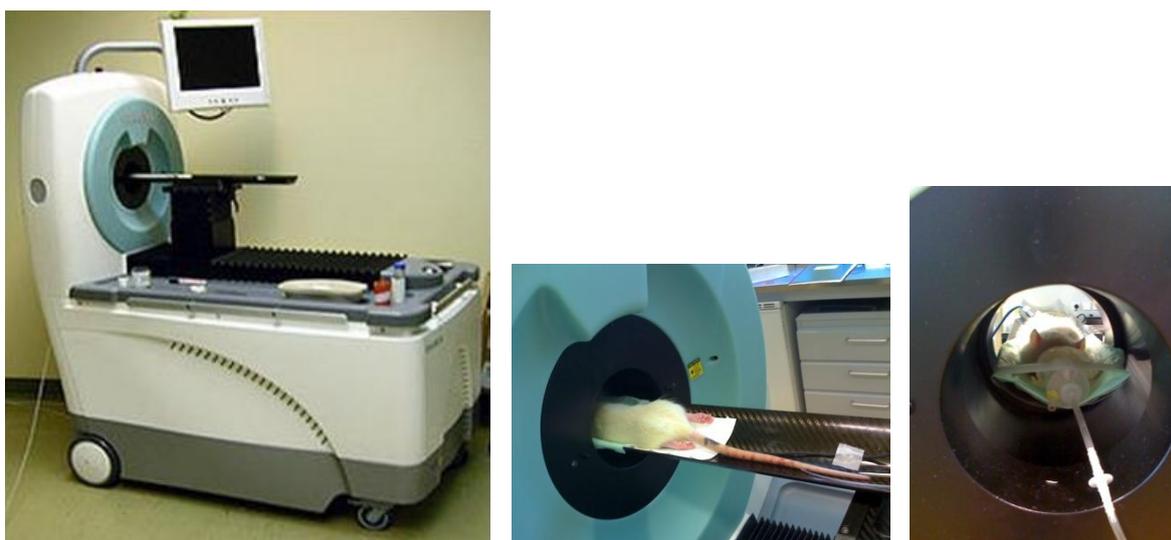


Abb. 6.1: links: Verwendetes Kleintier-PET © Universitätsklinikum Würzburg, Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin ¹⁰⁷. Mitte: Platzierung einer Ratte auf der Liege im Detektorring, rechts: Blick von vorne auf den Detektorring, Ratte mit Narkosemaske (eigene Aufnahmen).

Um die genaue Dosis zu berechnen, die dem Tier appliziert wird, wird ein Protokoll geführt, wann welche Menge des PET-Tracers dem Tier injiziert wird und wann die Messung gestartet wird. Weiterhin wird das Gewicht des Tiers notiert. Zur Injektion verwendete Spritzen müssen rückgemessen werden, da dort kleine Menge radioaktiven Materials zurückbleiben. Dazu muss stets die Uhrzeit der Radioaktivitätsmessung notiert werden, um eine Zerfallskorrektur mit einbeziehen zu können.

6.2 Tiermodell

Für die PET-Untersuchungen wurden als Kleintiere ausschließlich Ratten (Art: *Rattus norvegicus*, Stamm: Wistar) verwendet. Da im gesunden, erwachsenen Organismus die Enzyme APN und FAP nicht exprimiert werden und es das Ziel der Arbeit war, diese Enzyme bei Angiogenese und Remodeling nach einem Myokardinfarkt nachzuweisen, musste im Tiermodell ein heilender Herzinfarkt simuliert werden. Die Tiere erhielten einige Tage vor der PET-Untersuchung per Operation einen künstlichen Myokardinfarkt. Dies geschah durch Ligatur (Abbinden, Zuschnüren) der linken Herzkranzarterie, sodass das Myokard (Herzmuskelgewebe) eine Ischämie (Sauerstoffunterversorgung) erlitt. Aufgrund dieser Sauerstoffunterversorgung wurden Teile des Myokards nekrotisch (sie starben ab). Nach Wiederöffnung des Gefäßes wurde das abgestorbene Areal wieder durchblutet und die Prozesse der Angiogenese und des Remodelings setzten ein. Die während dieser Prozesse exprimierten Enzyme APN und FAP sollten innerhalb der darauffolgenden Wochen nachgewiesen werden. APN sollte dabei ein Expressionsmaximum zwischen Tag 3 und 7 durchlaufen²⁷, für FAP musste das Expressionsmaximum noch ermittelt werden. Die Zeitpunkte, an denen PET-Untersuchungen durchgeführt wurden, wurden dementsprechend angepasst.

6.3 Ablauf einer PET-Untersuchung

Eine PET-Untersuchung verläuft prinzipiell nach folgendem Schema: das Tier wird in Narkose gelegt und der gewünschte Tracer wird injiziert. Unmittelbar danach wird das Tier auf der Liege des PETs platziert und die Messung wird gestartet. Die Untersuchungszeit wird individuell ausgewählt und ist abhängig von dem verwendeten Nuklid, Tracer und der medizinischen Fragestellung. Nach Ablauf jeder PET-Untersuchung wird eine Transmissionsmessung durchgeführt. Die Transmissionsmessung dient der Korrektur von abgeschwächten, gestreuten und absorbierten Photonen. Das Tier wird dazu durch eine in den Scanner integrierte ⁵⁷Co-Quelle von außen bestrahlt. Der Detektor auf der gegenüber-

liegenden Seite der Quelle misst die Intensität der ankommenden Strahlung. Nachdem die Intensität der abgegebenen Strahlung bekannt ist, kann hiermit ein Wert für deren Abschwächung durch das Tier ermittelt werden. Strukturen mit einer großen Dichte (z.B. Knochen) absorbieren mehr Photonen (bzw. schwächen diese ab) als solche mit geringer Dichte. Die berechneten Werte werden während der Rekonstruktion in Form einer Schwächungskorrektur einbezogen.¹⁰⁸

Nach der Transmissionmessung ist das PET-Imaging abgeschlossen und das Tier wird in seinen Käfig gelegt, um aus der Narkose zu erwachen. Die erhaltenen PET-Daten werden anschließend in Kombination mit den protokollierten Daten über injizierte Aktivitäten etc. ausgewertet.

6.4 PET-Untersuchungen mit [¹⁸F]Fludeoxyglucose

Zur Lokalisation des Herzens und der Infarktzone wurden, zusätzlich zu den PET-Untersuchungen mit den genannten neuen Tracern, Messungen mit [¹⁸F]Fludeoxyglucose (FDG) durchgeführt. Wie eingangs (siehe Kapitel 1.5.2) erwähnt, ist FDG ein PET-Tracer, mit dem der Glucosemetabolismus im Organismus und Regionen hohen Energiebedarfs abgebildet werden können.^{8,67} Da das gesunde Herz einen hohen Energiebedarf hat, zeigt es im PET eine hohe Aufnahme/Anreicherung (Uptake) an FDG (siehe Abb. 6.2 links). Die nekrotische Zone des Myokards hat nahezu keinen Glucosebedarf und zeigt deswegen auch einen geringeren Uptake an FDG (siehe Abb. 6.2 rechts). Die äußere OP-Narbe, die aus der Öffnung des Thorax (Brustkorb) resultiert, zeigt ebenfalls einen erhöhten FDG-Uptake.

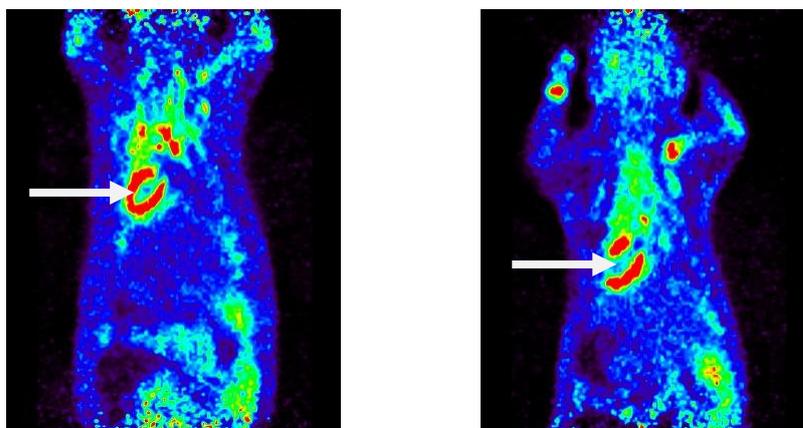


Abb. 6.2: Coronale Schnittebenen von FDG-PET-Bildern von Ratten. links: gesundes Myokard (siehe Pfeil, hufeisenförmig) zeigt hohen Uptake. rechts: ein Teil des Myokards zeigt sehr geringen Uptake, (siehe Pfeil), dort befindet sich die Infarktregion.

Mit FDG können auch andere Organe dargestellt werden. Die Leber befindet sich unterhalb des Herzens und kann aufgrund ihres gleichmäßigen mittleren Uptakes gegenüber benachbarten Strukturen abgegrenzt werden (siehe Abb. 6.3 links). Da FDG renal ausgeschieden wird, zeigen nach einer gewissen Zeit auch Nieren (siehe Abb. 6.3 rechts) und Blase hohe Anreicherung von Radioaktivität.

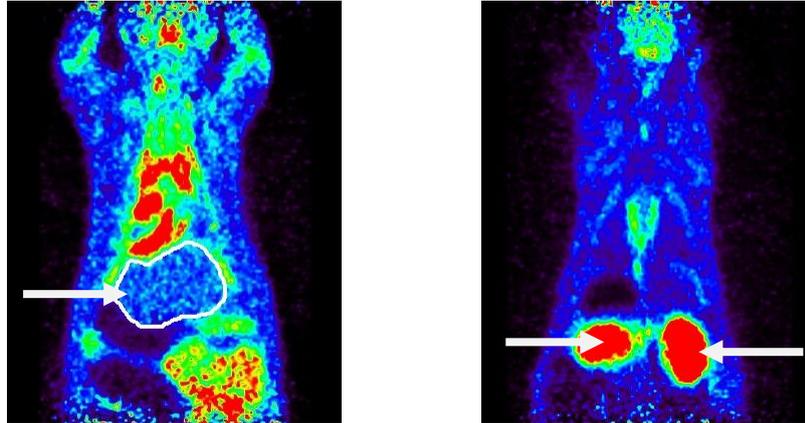


Abb. 6.3: Coronale Schnittebenen von FDG-PET-Bildern von Ratten. links: Die Leber zeigt gleichmäßigen, mittleren Uptake (siehe Pfeil und weiße Umrahmung). rechts: Die Nieren zeigen gegen Ende der Messung hohen Uptake (siehe Pfeile). (selbe Aufnahme nur andere Schnittebene, die Nieren liegen näher am Rücken).

Mit dieser Methode lässt sich die Region des infarzierten Myokards darstellen, in der Angiogenese und Remodeling stattfinden. Bei den Messungen mit einem mit ^{68}Ga markierten Tracer wurde die Messung mit FDG idealerweise unmittelbar nach der ^{68}Ga -Messung durchgeführt, wenn das Tier noch narkotisiert war. Dies war aufgrund der kurzen Halbwertszeit von ^{68}Ga möglich. Das Versuchstier wurde nicht von der Liege des PETs genommen und direkt dort injiziert. So wurde sichergestellt, dass es seine Position genau beibehält. Die Aufnahmen beider Messungen wurden anschließend am PC überlagert. Dazu wurde das Bild der FDG-Messung in schwarz-weiß dargestellt, hierbei entspricht weiß einem hohen, schwarz einem niedrigen Uptake (vgl. Abb. 6.6). Das gesunde Myokard ist weiß abgebildet und die Infarktregion demnach der dunklere Bereich, der gewissermaßen als „Lücke“ im Myokard erkennbar ist (siehe Pfeil in Abb. 6.4). Das Bild der Messung mit einem ^{68}Ga -Tracer wurde in bunt dargestellt, Bereiche mit hohem Uptake sind gelb-rot abgebildet (vgl. Abb. 6.6). So konnte die im FDG-Bild dargestellte Infarktregion auf das ^{68}Ga -Tracer-Bild übertragen werden und es ist erkennbar, ob ein möglicher Uptake im ^{68}Ga -Tracer-Bild auch der Infarktregion entspricht (siehe Abb. 6.4).

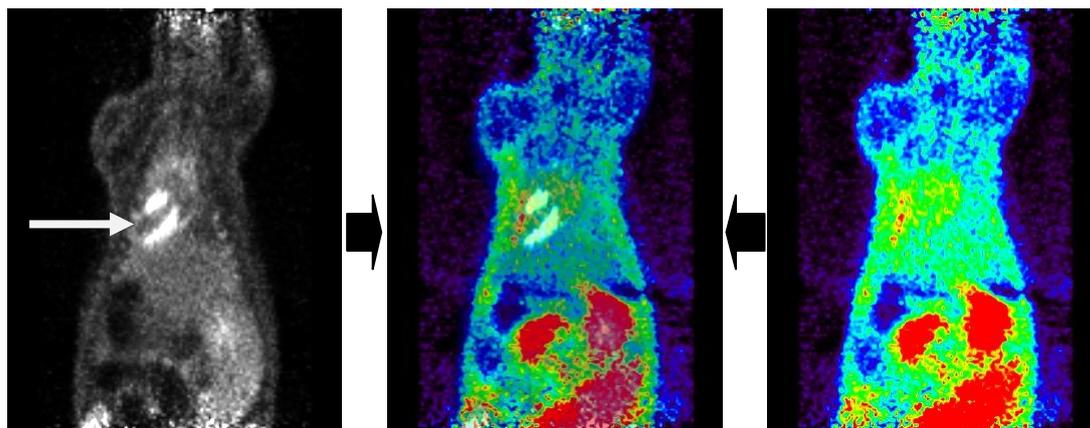


Abb. 6.4: Coronale Schnittebenen von PET-Bildern von Ratten. links: FDG in schwarz-weiß. rechts: ^{68}Ga -NOTA-NGR in bunt. Mitte: Fusion beider Bilder bildet Infarktregion auf ^{68}Ga -NOTA-NGR-Bild ab.

Bei den Messungen mit dem mit ^{124}I markierten FAP-Inhibitor war es leider nicht möglich die Messung mit FDG am selben Tag durchzuführen. Aufgrund der langen Halbwertszeit von ^{124}I würden sich die Zerfälle beider Nuklide überdecken und die FDG-Messung würde kein kontrastreiches Bild liefern. Die Messung mit FDG wurde deshalb schon am Vortag durchgeführt. Das Tier hatte demnach nicht dieselbe Position. Es war jedoch möglich, dies durch die Auswertungssoftware zu korrigieren und somit beide Datensätze in guter Näherung zu fusionieren.

6.5 Auswertung der PET-Aufnahmen

Die vom PET gelieferten Daten können mit verschiedenen Programmen (z.B. Amide ¹⁰⁹) ausgewertet werden. Das PET liefert dazu einen 3D Datensatz. Eine gängige Darstellungsweise ist über die drei Schnittebenen: coronal (vom-Rücken-zum-Bauch-Ebene), sagittal (von-linker-Seite-zu-rechter-Seite-Ebene) und transversal (vom-Schwanz-zur-Schnauze-Ebene).



Abb. 6.5: Schnittebenen im Kleintier. links: coronal, Mitte: sagittal, rechts: transversal.

Die Aufnahmen können in verschiedenen Farbmodi dargestellt werden. In dieser Arbeit werden schwarz-weiß und bunt (NIH) verwendet. Der Farbverlauf verteilt sich prozentual von minimalem (0 %) bis maximalem (100 %) Uptake für den jeweiligen Bildausschnitt (Abb. 6.6).

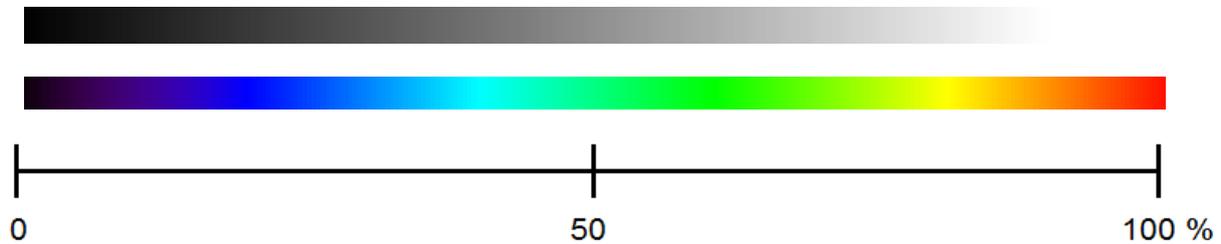


Abb. 6.6: oben: Farbmodus schwarz-weiß. unten: Farbmodus bunt (NIH).

Die Aufnahmen wurden quantitativ ausgewertet, indem mithilfe der Software sogenannte „regions of interest“ (ROIs), genauer gesagt „volumes of interest“ (VOIs), definierte Flächen bzw. Volumen, in das Bild gelegt wurden.

Das Programm bestimmt über eine Kalibrierung die aufgetretenen Ereignisse innerhalb dieses Bereichs und berechnet daraus die Aktivität pro Volumen. Werden diese VOIs nun in unterschiedliche Regionen (z.B. Organe) des untersuchten Organismus gelegt, lässt sich der Uptake dieser miteinander vergleichen. Die Aktivität innerhalb eines VOIs wird in Bq/cm^3 angegeben. Aufgrund der Annahme, dass Gewebe zu über 99 % aus Wasser besteht und der Tatsache, dass Wasser die Dichte von $1 \text{ g}/\text{cm}^3$ hat, kann mithilfe der Aufzeichnungen der injizierten Dosis die Aktivitätsmenge pro Gramm Körpergewicht in Prozent, die „injected dose per gram“ (% ID/g) berechnet werden. Dieser Wert ermöglicht nicht nur verschiedene Organe innerhalb eines Tiers, sondern auch mehrere Tiere untereinander zu vergleichen, auch wenn sich diese in Körpergewicht und injizierter Aktivitätsmenge unterscheiden. Die % ID/g-Werte können als Maß für den Uptake eines Tracers einer bestimmten Untersuchung gesehen werden. Die Auswertung dieser Werte kann grafisch erfolgen. Der % ID/g-Wert kann gegen die Zeit aufgetragen werden, sei es innerhalb einer mehrminütigen dynamischen Messung oder von verschiedenen Messungen an mehreren Tagen, für ein Tier oder für mehrere Tiere. VOIs werden in die Organe gelegt, die für das bestimmte Forschungsziel von Interesse sind. Außerdem wird eine zusätzliche VOI dorthin gelegt, wo ein gleichmäßiger Hintergrund-Uptake vorliegt. Um vergleichbare Ergebnisse zu bekommen, werden die Messwerte der VOIs um den Hintergrund korrigiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im FDG-Bild VOIs in die Infarktzone (nekrotische Teil des Herzmuskels), in das Myokard (intakter Teil des Herzmuskels), in die OP-Narbe (Hautschnitt durch Öffnung des Thorax), in die Leber und in die Pfote (Hintergrund) platziert:

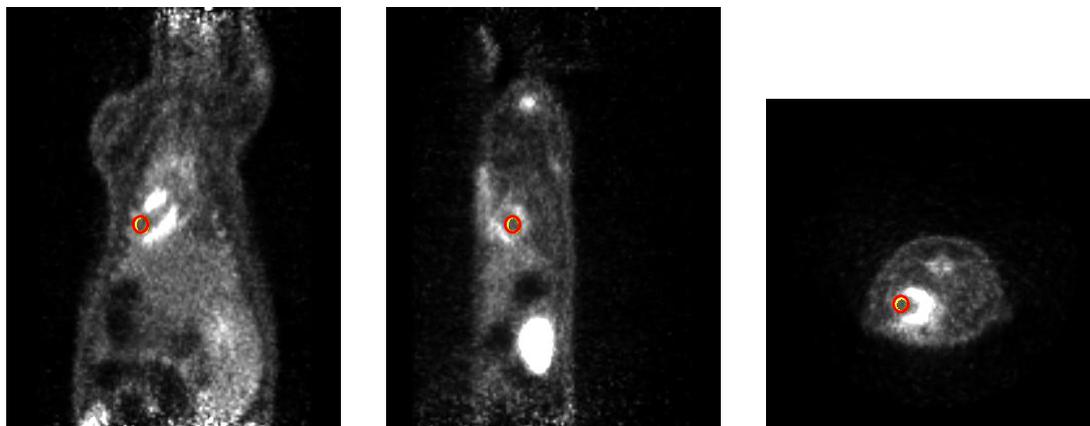
Infarktzone*FDG*

Abb. 6.7: Platzierung des VOI (rotes Ellipsoid) in den Bereich des Myokardinfarktes.

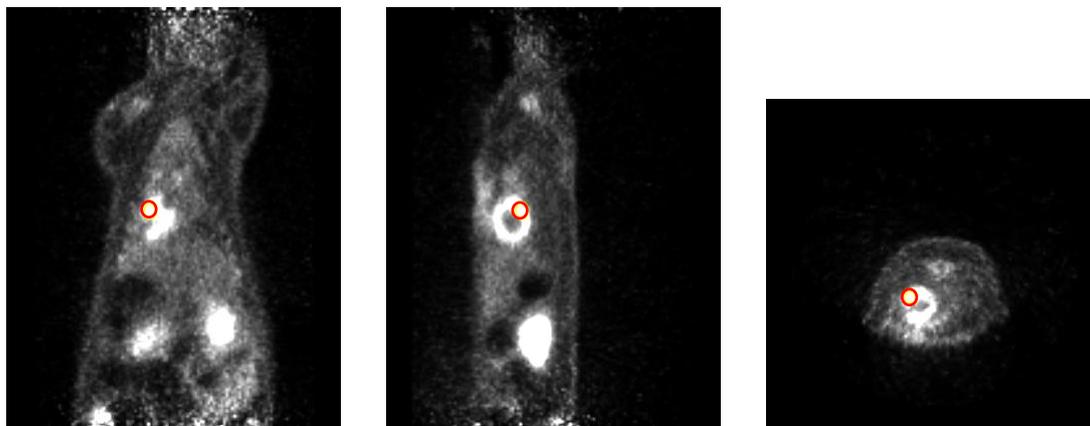
Myokard*FDG*

Abb. 6.8: Platzierung des VOI (rotes Ellipsoid) in den Bereich des gesunden Myokards.

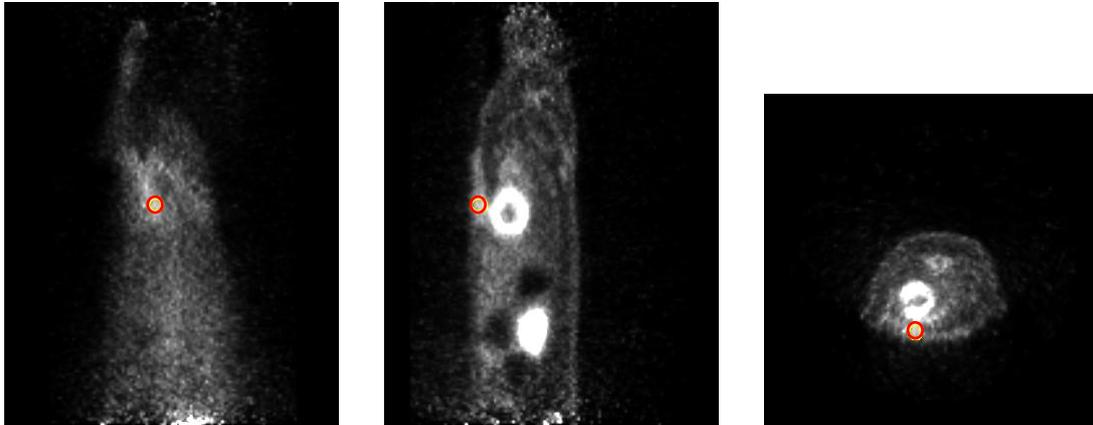
OP-Narbe*FDG*

Abb. 6.9: Platzierung des VOI (rotes Ellipsoid) in den Bereich der OP-Narbe.

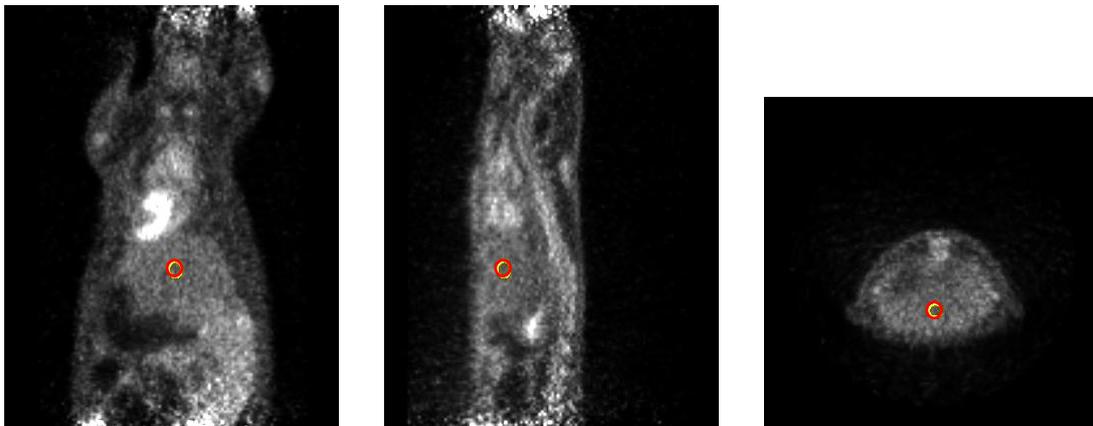
Leber*FDG*

Abb. 6.10: Platzierung des VOI (rotes Ellipsoid) in den Bereich der Leber.

Pfote

FDG

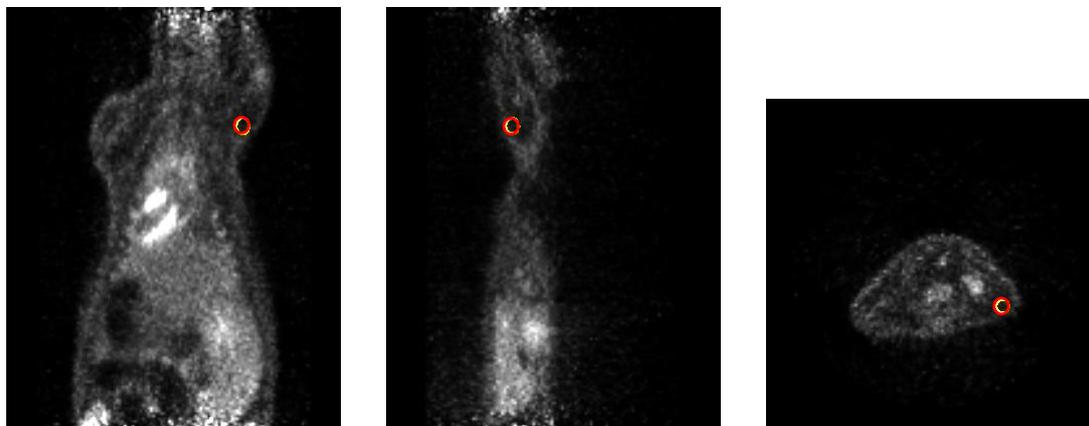


Abb. 6.11: Platzierung des VOI (rotes Ellipsoid) in den Bereich des Hintergrunds (Rand Vorderpfote).

6.6 ^{68}Ga -NOTA-NGR/-RGD Vergleichsstudie

Die Untersuchungen am Kleintier-PET, um APN mit ^{68}Ga -NOTA-NGR und das Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit ^{68}Ga -NOTA-RGD darzustellen, wurden an denselben Versuchstieren durchgeführt. Die Messungen verliefen nach folgendem Zeitplan:

Tag 0:	OP (Erzeugung des Myokardinfarktes)	
Tag 3:	Messung mit ^{68}Ga -NOTA-NGR,	Messung mit FDG;
Tag 4:	Messung mit ^{68}Ga -NOTA-RGD,	Messung mit FDG;
Tag 7:	Messung mit ^{68}Ga -NOTA-NGR,	Messung mit FDG;
Tag 8:	Messung mit ^{68}Ga -NOTA-RGD,	Messung mit FDG;
Tag 21:	Messung mit ^{68}Ga -NOTA-NGR,	Messung mit FDG;
Tag 22:	Messung mit ^{68}Ga -NOTA-RGD,	Messung mit FDG;

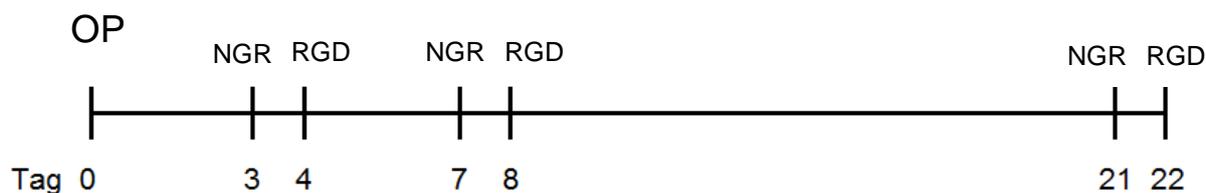


Abb. 6.12: Zeitskala der PET-Messungen mit ^{68}Ga -Tracern über 3 Wochen.

Aufgrund des Zeitaufwandes der PET-Messungen konnten pro Tag nur zwei Tiere untersucht werden. Für den Fall, dass die Untersuchung von mehr als zwei Tieren am selben Tag hätte stattfinden müssen, wurde jeweils den Tieren der Vortritt gewährt, die den geringeren Zeitabstand zur OP hatten. Die Untersuchung der Tiere, deren OP schon länger zurücklag, wurde auf den darauffolgenden Tag verschoben.

Für die Messungen standen 9 Tiere zur Verfügung, darunter zwei Sham-Tiere. Sham-Tiere werden ebenfalls operiert, erhalten aber keinen künstlichen Myokardinfarkt (siehe Kapitel 15.1.2). Sie haben gesunde Herzen und dienen zum Vergleich der Ergebnisse der Infarkt-Tiere.

Die Messung mit FDG dauerte 60 min und wurde von der PET-Software in 6 Zeitabschnitte (Frames 0-5) à 10 min unterteilt. Eine Messung mit einem ^{68}Ga -Tracer dauerte 90 min und wurde in 9 Frames (0-8) à 10 min unterteilt, die dann zu einem Satz Schnittbilder zusammengefasst werden. Die Messzeit für FDG ist aus vorausgegangenen Studien der Arbeitsgruppe so etabliert und erfasst die Anreicherung des Tracers an seinem Bestimmungsort im Einklang mit der Stoffwechsel-Zeit des Organismus und der Halbwertszeit von Fluor-18. Die Messzeit wurde für die ^{68}Ga -Tracer länger gewählt, da unklar war, wann ein maximaler Uptake erreicht werden würde und wie schnell die Tracer im Organismus abgebaut werden würden. Eine noch längere Messzeit würde aufgrund der Halbwertszeit von Gallium-68 keinen Sinn machen.

Dem narkotisierten Tier wurde der ^{68}Ga -Tracer injiziert und anschließend wurde die ^{68}Ga -PET-Messung durchgeführt. 5 min vor Ablauf der 90 min wurde dem Tier eine am individuellen Körpergewicht berechnete Menge Insulin injiziert, um die Aufnahme des FDGs zu verbessern. Nach Ablauf der 90 min wurde dem Tier FDG injiziert und die FDG-PET-Messung wurde gestartet. Nach 15 min erhielt das Tier eine anhand des Körpergewichts bestimmte Menge Glucose, damit das überschüssige Insulin abgebaut werden konnte. Nach Ablauf der 60 min erfolgte die Transmissionsmessung.

Da das Radiopharmakon über die Schwanzvene injiziert wird und dadurch zuerst zum Herz gelangt, befindet sich eine große Menge der radioaktiven Substanz zu Beginn einer Messung im Bereich des Herzens („Blut-Pool“). Von dort aus wird es im ganzen Körper verteilt. Diese Ansammlung radioaktiven Stoffes entspricht nicht dem Uptake, also der Speicherung aufgrund biochemischer Wechselwirkungen zwischen Radiopharmakon und Target (Bestimmungsort, Angriffspunkt im Körper). Nachdem im Rahmen dieser Arbeit die Betrachtung der Herzregion von Bedeutung ist, ist es wichtig, diese anfängliche Anhäufung von Radioaktivität nicht mit in die Berechnungen des Uptakes mit einzubeziehen. Das Ergebnis würde verfälscht werden. Die Verteilung des Radiopharmakons über den Blut-

Pool dauert ca. 30 min. Für die Auswertung wurden demnach im Falle der ^{68}Ga -Tracer jeweils die Frames 4-7 (Minute 40-80) und im Falle von FDG die Frames 4-5 (Minute 40-60) vereint. Der Uptake des ^{68}Ga -Tracer wird erst ab 40 min nach Injektion betrachtet. Nach 80 min ist der Tracer aufgrund seiner Halbwertszeit nur noch in geringer Konzentration vorhanden, sodass auf eine Miteinbeziehung der weiteren Aufnahme verzichtet werden kann. Die im Folgenden dargestellten Bilder sind PET-Aufnahmen von Minute 40-80, die daraus folgenden Uptake-Berechnungen beziehen sich ebenfalls auf die Aufnahmen von Minute 40-80. Die Übernahme der VOIs aus den FDG-Bildern [Infarktzone (nekrotischer Teil des Herzmuskels), Myokard (intakter, gesunder Teil des Herzmuskels), OP-Narbe (Hautschnitt durch Öffnung des Thorax), Leber und Pfote (Hintergrund)] auf die Bilder der ^{68}Ga -Tracer (hier stellvertretend nur an ^{68}Ga -NOTA-NGR gezeigt) führte zu folgenden Abbildungen:

Infarktzone

^{68}Ga -NOTA-NGR

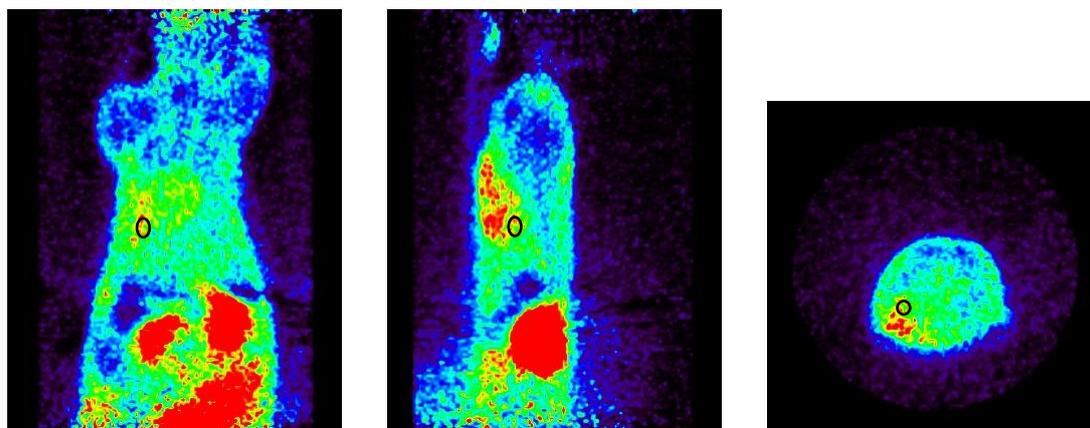


Abb. 6.13: Das im FDG-PET definierte VOI für die Infarktzone wird in den ^{68}Ga -Datensatz übernommen (schwarzes Ellipsoid).

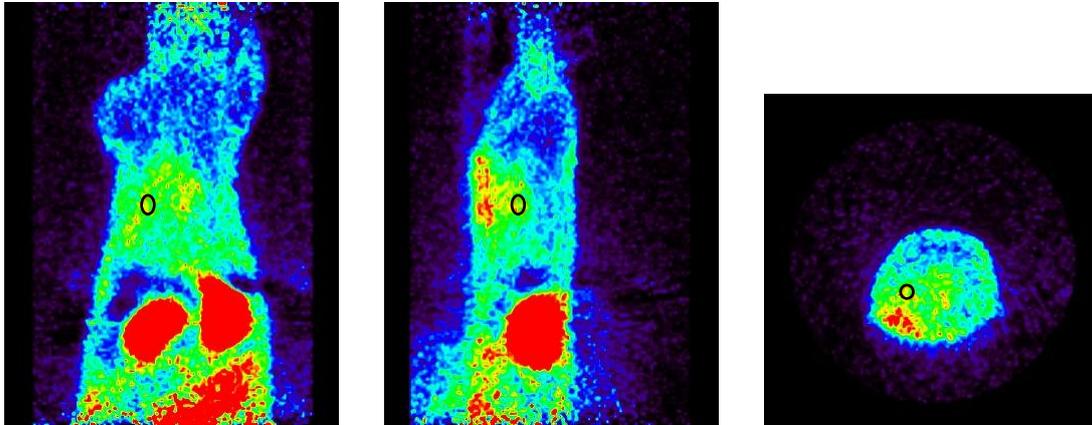
Myokard $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ 

Abb. 6.14: Das im FDG-PET definierte VOI für das Myokard wird in den ^{68}Ga -Datensatz übernommen (schwarzes Ellipsoid).

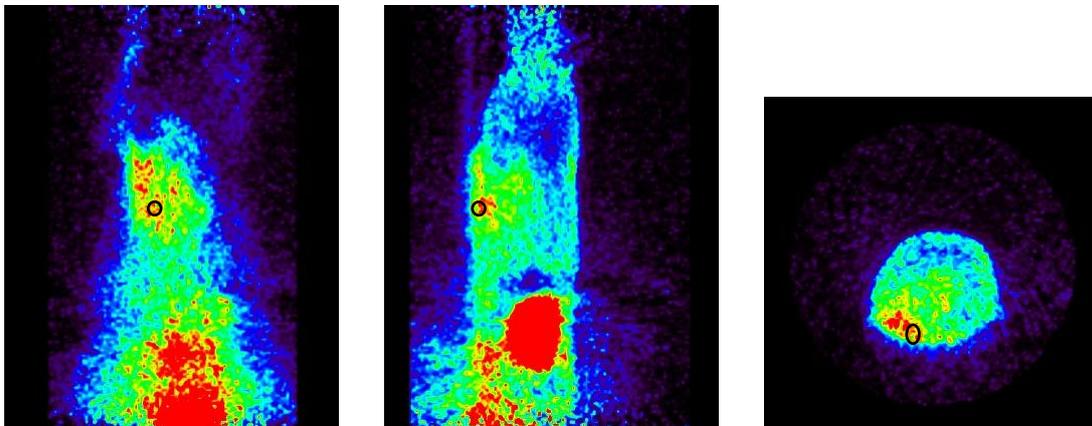
OP-Narbe $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ 

Abb. 6.15: Das im FDG-PET definierte VOI für die OP-Narbe wird in den ^{68}Ga -Datensatz übernommen (schwarzes Ellipsoid).

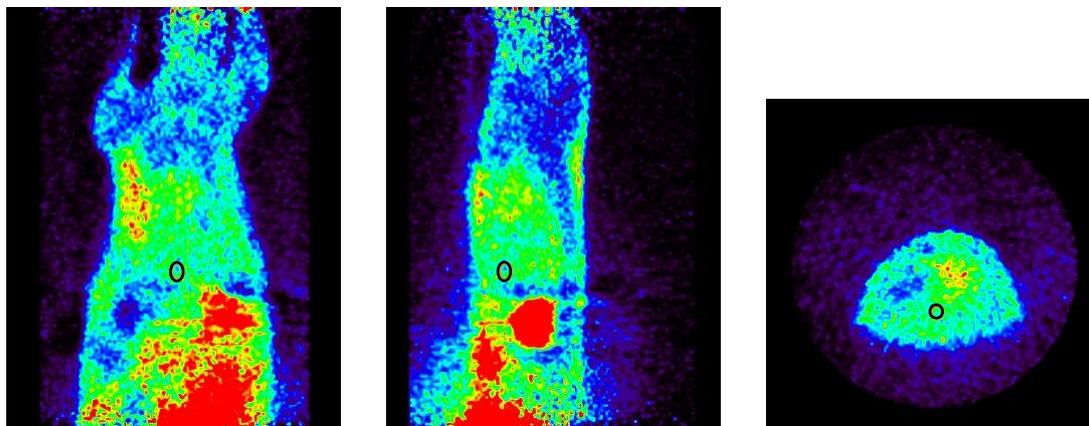
Leber $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ 

Abb. 6.16: Das im FDG-PET definierte VOI für die Leber wird in den ^{68}Ga -Datensatz übernommen (schwarzes Ellipsoid).

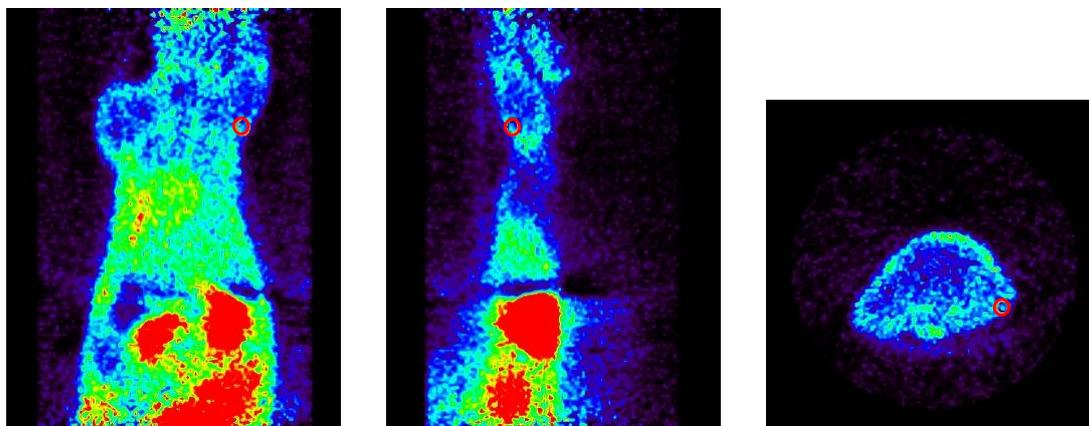
Pfote $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ 

Abb. 6.17: Das im FDG-PET definierte VOI für den Hintergrund (Rand Vorderpfote) wird in den ^{68}Ga -Datensatz übernommen (rotes Ellipsoid).

Die durchgeführten PET-Aufnahmen mit den Tracern $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ und $^{68}\text{Ga-NOTA-RGD}$ sind im Folgenden repräsentativ durch ein coronales Schnittbild dargestellt, da in dieser Ansicht das Herz und die Infarktzone am deutlichsten zu erkennen sind. Dabei werden die Aufnahme mit FDG (schwarz-weiß) und die Aufnahme mit dem ^{68}Ga -Tracer (bunt) fusioniert, um zu verdeutlichen, wo sich die Infarktzone befindet. Es standen 8 Tiere zur Verfügung (Ratte 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9). Die Tiere 3 und 7 sind Sham-Tiere und haben somit keine Infarktzone.

6.6.1 Ratte 1

 ^{68}Ga -NOTA-NGR

Tag 3

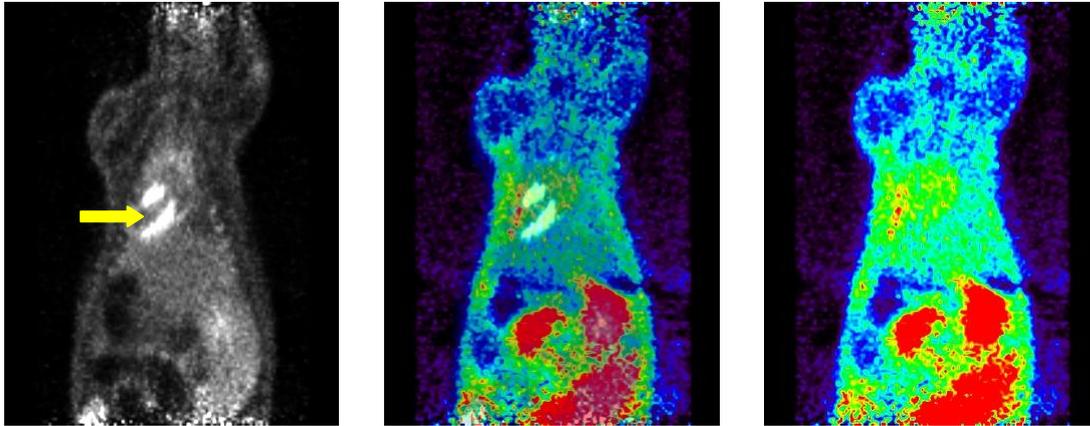


Abb. 6.18: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-NGR. rechts: ^{68}Ga -NOTA-NGR.

Das PET-Imaging mit FDG zeigt, dass Ratte 1 einen deutlichen Myokardinfarkt hat (Lücke im Uptake am Herzen, gelber Pfeil in Abb. 6.18 links). Das PET-Imaging mit ^{68}Ga -NOTA-NGR zeigt erhöhten Uptake im Bereich des Herzens. Durch die Fusion der beiden Bilder lässt sich dieser erhöhte Uptake der Infarktzone zuordnen.

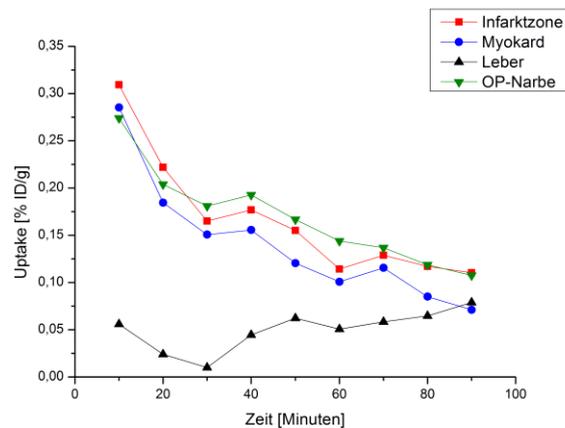


Diagramm 6.1: Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR, Ratte 1, Tag 3.

Diagramm 6.1 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Ratte 1 an Tag 3. Die Bestimmung der Aktivitätsmengen (% ID/g) in den VOIs (Infarktzone, Myokard, Leber, OP-Narbe) zeigt, dass der Uptake in OP-Narbe, Infarktzone und Myokard im Vergleich zur Leber erhöht ist. Da die Bereiche OP-Narbe, Infarktzone und Myokard im Gegensatz zur Leber angiogenetisch aktive Bereiche sind, ist dies ein Hinweis darauf, dass der

Radiotracer ^{68}Ga -NOTA-NGR das in diesen Bereichen erhöht exprimierte Enzym APN adressiert. Der Uptake in die angiogenetisch aktiven Areale nimmt im Laufe der 90-minütigen Messung ab, wohingegen er in der Leber leicht zunimmt. Dies ist auf die Ausscheidung des Tracers zurückzuführen, der zu einem gewissen Teil über die Leber verläuft. Der Großteil des Wirkstoffes wird aufgrund seiner Hydrophilie über Nieren und Blase ausgeschieden, diese Bereiche zeigen auch die höchste Aufnahme (diese wurde nicht quantifiziert). Der hohe Uptake in der OP-Narbe liegt daran, dass Haut-/Fleischwunden stark angiogenetisch aktive Bereiche sind. Der erhöhte Uptake im Myokard kann damit begründet werden, dass Angiogenese vom bereits bestehenden Gefäßnetz ausgeht und somit im die Infarktzone umgebenden, gesunden Gewebe beginnt. Dadurch ist die Expression von APN und somit der Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in der Infarktzone nur leicht gegenüber dem Uptake im gesunden Myokard erhöht. Im Bild des PET-Imagings mit ^{68}Ga -NOTA-NGR erscheint der Uptake deswegen nicht exakt abgrenzbar in der Infarktzone sondern leicht diffus im Bereich des Herzens (siehe Abb. 6.18 rechts).

Tag 7

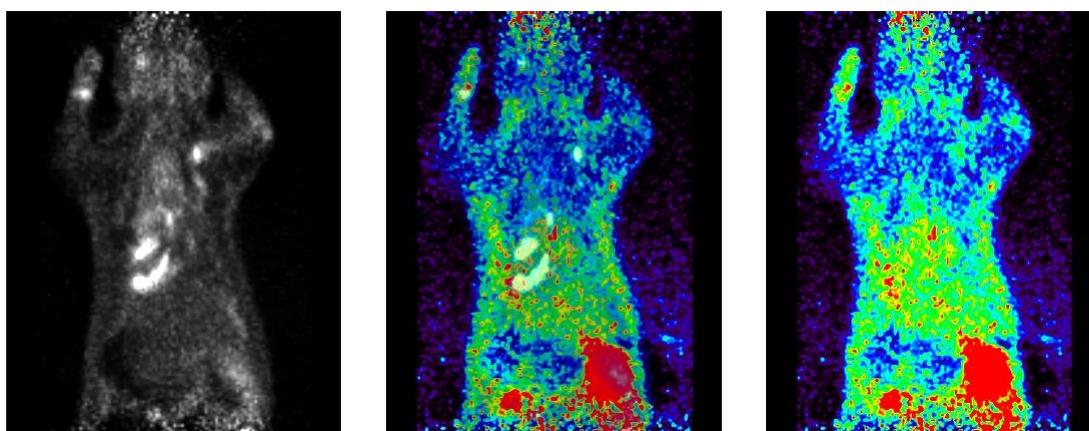


Abb. 6.19: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-NGR. rechts: ^{68}Ga -NOTA-NGR.

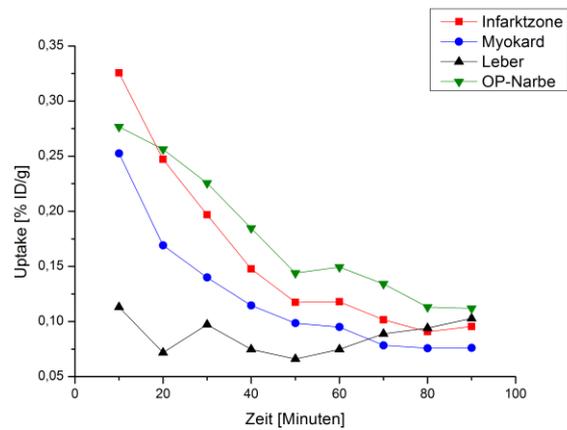


Diagramm 6.2: Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR, Ratte 1, Tag 7.

Diagramm 6.2 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Ratte 1 an Tag 7. Es zeigt die gleichen Charakteristika wie das von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Ratte 1 an Tag 3 (Diagramm 6.1). Der Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR ist in der OP-Narbe am höchsten, in der Infarktzone am zweithöchsten, im gesunden Myokard am dritthöchsten und in der Leber am niedrigsten. Der Uptake nimmt in OP-Narbe, Infarktzone und Myokard im Laufe der 90-minütigen Messung ab, wohingegen er in der Leber leicht zunimmt.

Tag 21

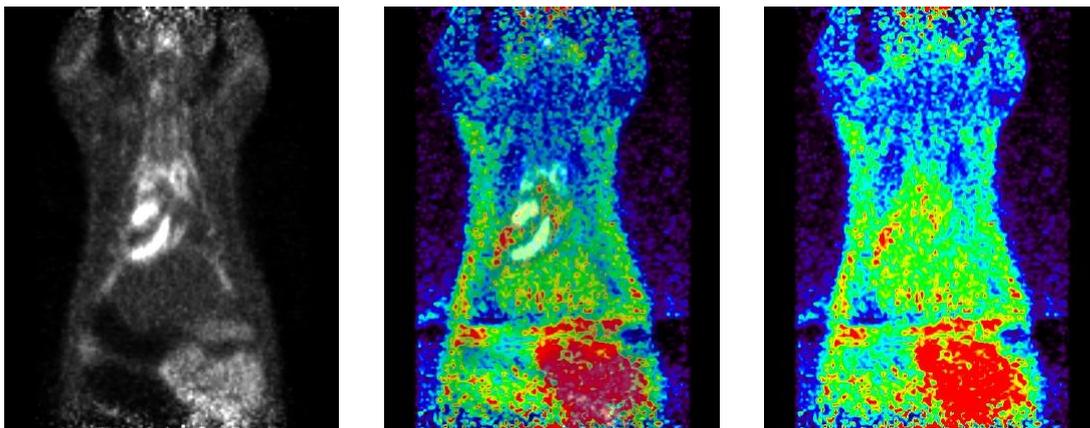


Abb. 6.20: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-NGR. rechts: ^{68}Ga -NOTA-NGR.

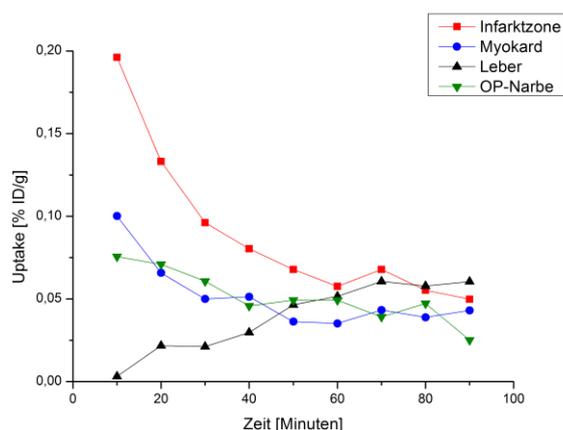
6 *IN-VIVO*-UNTERSUCHUNGEN

Diagramm 6.3: Uptake von $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$, Ratte 1, Tag 21

Das Diagramm 6.3 zeigt den Uptake von $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ in Ratte 1 an Tag 21. Hier ist eine Änderung zu den Tagen 3 und 7 erkennbar (Diagramme 6.1 und 6.2). Der Uptake von $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ ist nun in der Infarktzone am höchsten, in der OP-Narbe und im gesunden Myokard am zweithöchsten (etwa gleich hoch) und in der Leber am niedrigsten. Die Wundheilung in der OP-Narbe ist nach drei Wochen schon erheblich fortgeschritten und die Expression des Enzyms APN ist somit zurückgegangen. In der Infarktzone ist die Angiogenese offenbar noch aktiv und die Expression des Enzyms APN ist noch erhöht.

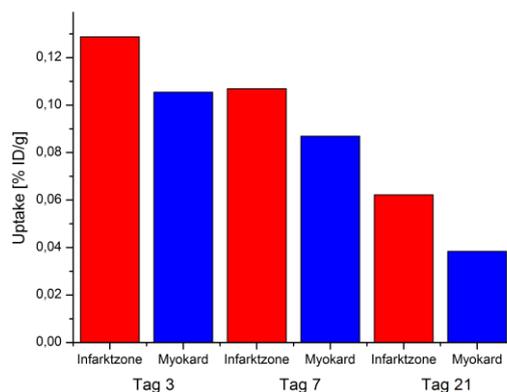


Diagramm 6.4: Uptake in Infarktzone (rot) und Myokard (blau) von $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ in Ratte 1 an Tag 3, 7 und 21.

Diagramm 6.4 zeigt den Uptake von $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ in Ratte 1 an Tag 3, 7 und 21. Hierfür wurden, wie in Kapitel 6.6 beschrieben, die Uptakes der Frames 4-7 (Minute 40-80) einer Messung zu einem Wert gemittelt. Es ist erkennbar, dass der Uptake im Verlauf von

drei Wochen insgesamt zurückgeht. Der Uptake in der Infarktzone ist dabei stets höher als im Myokard.

^{68}Ga -NOTA-RGD

Tag 4

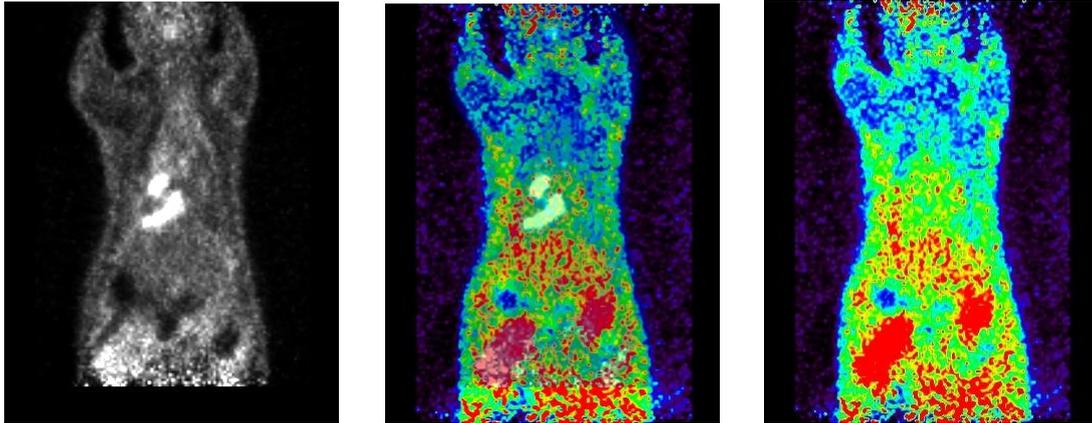


Abb. 6.21: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-RGD. rechts: ^{68}Ga -NOTA-RGD.

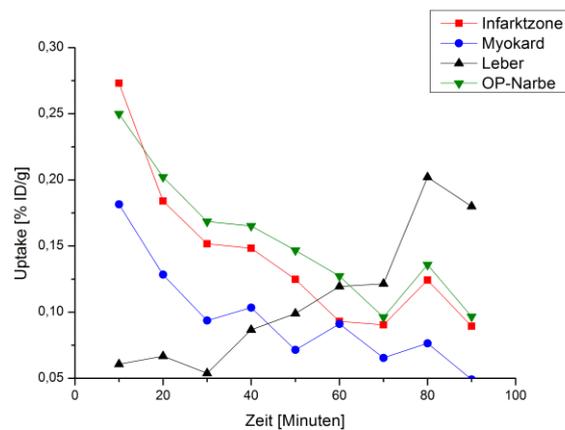


Diagramm 6.5: Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD, Ratte 1, Tag 4.

Das PET-Imaging mit ^{68}Ga -NOTA-RGD liefert ähnliche Ergebnisse wie das für ^{68}Ga -NOTA-NGR, die Auswertung der Radioaktivitätsmengen liefert ein vergleichbares Diagramm. Diagramm 6.5 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 1 an Tag 4. Es ist zu erkennen, dass der Uptake des Radiotracers ^{68}Ga -NOTA-RGD in der OP-Narbe am höchsten, in der Infarktzone am zweithöchsten, im Myokard am dritthöchsten und in die Leber am niedrigsten ist. Die Expression des Rezeptors Integrin $\alpha_v\beta_3$, das Target für ^{68}Ga -NOTA-RGD, ist in den angiogenetisch aktiven Bereichen erhöht. Der Uptake nimmt wie für

^{68}Ga -NOTA-NGR in der OP-Narbe, in der Infarktzone und im Myokard im Laufe der Messung ab, wohingegen er in der Leber ansteigt, was ebenfalls am Ausscheidungsmechanismus liegt. Auffällig ist, dass der Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD in der Leber in größerem Maße zunimmt wie bei ^{68}Ga -NOTA-NGR. Dies ist ebenfalls im Bild des PET-Imagings (Abb. 6.21) zu erkennen.

Tag 8

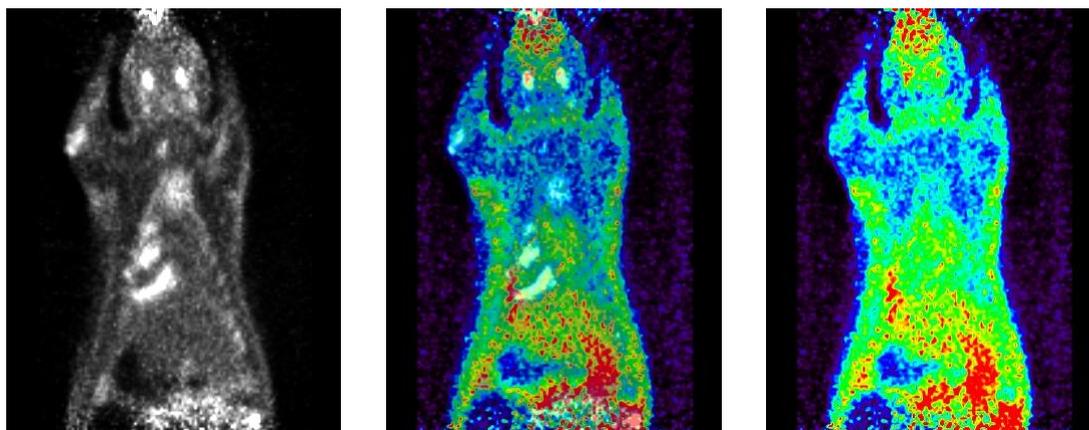


Abb. 6.22: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-RGD. rechts: ^{68}Ga -NOTA-RGD.

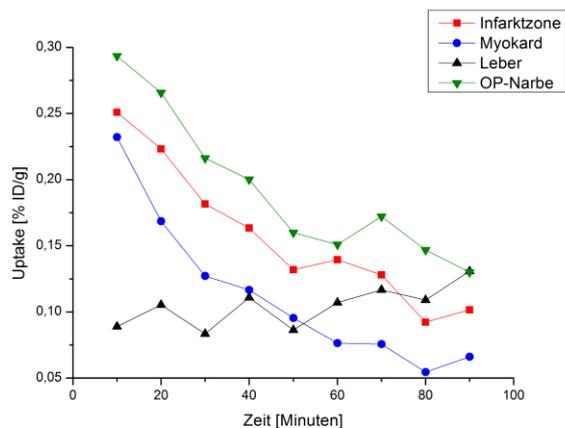


Diagramm 6.6: Uptake von ^{68}Ga -NOTARGD, Ratte 1, Tag 8.

Diagramm 6.6 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 1 an Tag 8. Es zeigt nur minimale Änderung im Vergleich zum Diagramm von Tag 4 (Diagramm 6.5). Der Uptake in die OP-Narbe ist am höchsten, in der Infarktzone am zweithöchsten, im Myokard am dritthöchsten und in der Leber am niedrigsten. Ebenso nimmt der Uptake in den

angiogenetisch aktiven Bereichen im Laufe der 90-minütigen Messung ab, wohingegen er in der Leber stetig ansteigt.

Tag 22

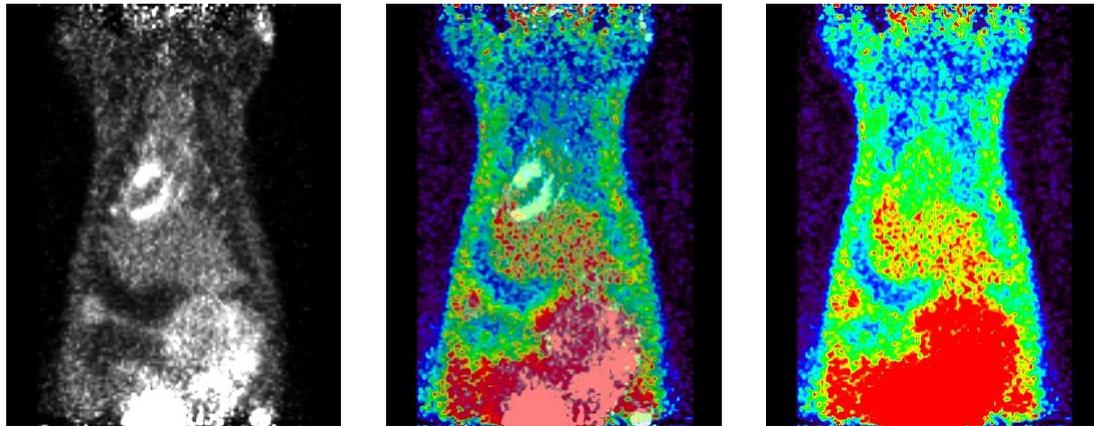


Abb. 6.23: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-RGD. rechts: ^{68}Ga -NOTA-RGD.

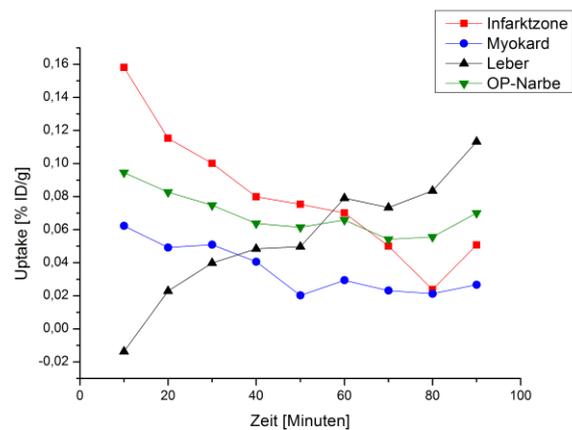


Diagramm 6.7: Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD, Ratte 1, Tag 22.

Diagramm 6.7 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 1 an Tag 22. Es zeigt den gleichen Trend wie das Diagramm des Uptakes von ^{68}Ga -NOTA-NGR an Tag 21 (Diagramm 6.3). Der Uptake des Radiotracers in der OP-Narbe ist aufgrund fortschreitender Wundheilung und rückläufiger Angiogenese zurückgegangen. Der Uptake in der Infarktzone ist somit am höchsten.

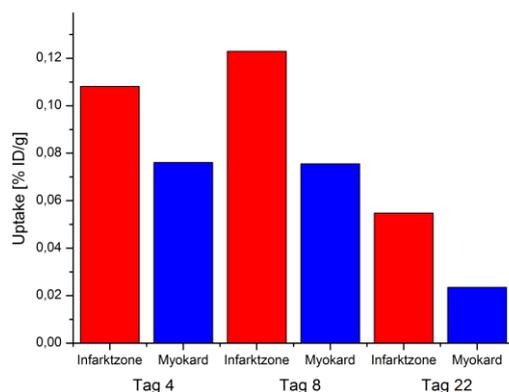


Diagramm 6.8: Uptake in Infarktzone (rot) und Myokard (blau) von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 1 an Tag 4, 8 und 22.

Diagramm 6.8 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 1 an Tag 4, 8 und 22. An Diagramm 6.8 ist erkennbar, dass der Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 1 im Laufe der 3 Wochen insgesamt zurückgeht, obwohl der Uptake in der Infarktzone an Tag 7 ein Maximum durchläuft. Der Uptake in der Infarktzone ist zu jedem Messzeitpunkt höher als im Myokard.

6.6.2 Ratte 2

^{68}Ga -NOTA-NGR

Tag 3

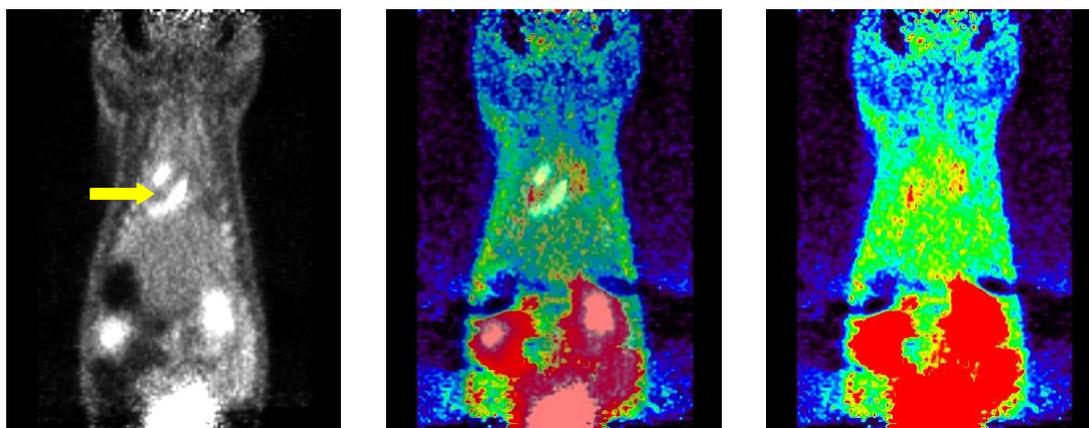


Abb. 6.24: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-NGR. rechts: ^{68}Ga -NOTA-NGR.

Das PET-Imaging zeigt im FDG-Bild einen deutlichen Myokardinfarkt bei Ratte 2 (gelber Pfeil in Abb. 6.24 links). Der im Bild des PET-Imagings von ^{68}Ga -NOTA-NGR optisch erkennbare Uptake ist mithilfe der Fusion beider Bilder der Infarktzone zuzuordnen.

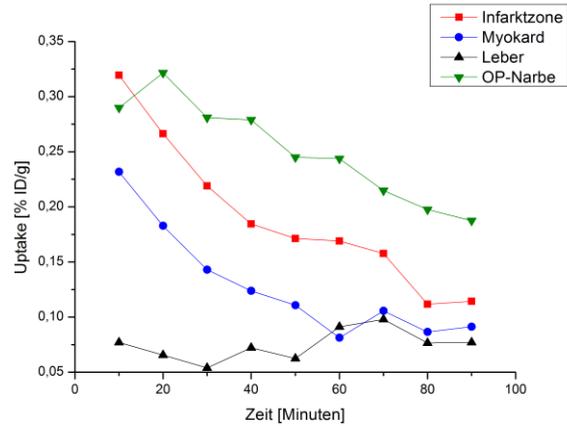


Diagramm 6.9: Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR, Ratte 2, Tag 3.

Diagramm 6.9 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Ratte 2 an Tag 3. Es zeigt die gleichen Trends wie das Diagramm des Uptakes von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Ratte 1 an Tag 3 (Diagramm 6.1). Der Uptake in der OP-Narbe ist am höchsten, in der Infarktzone am zweit- und im Myokard am dritthöchsten. Die Leber zeigt den geringsten Uptake. Im Gegensatz zur Leber, in der der Uptake leicht zunimmt, sinkt die Aufnahme in den angiogenetisch aktiven Bereichen im Laufe der Messung.

Tag 7

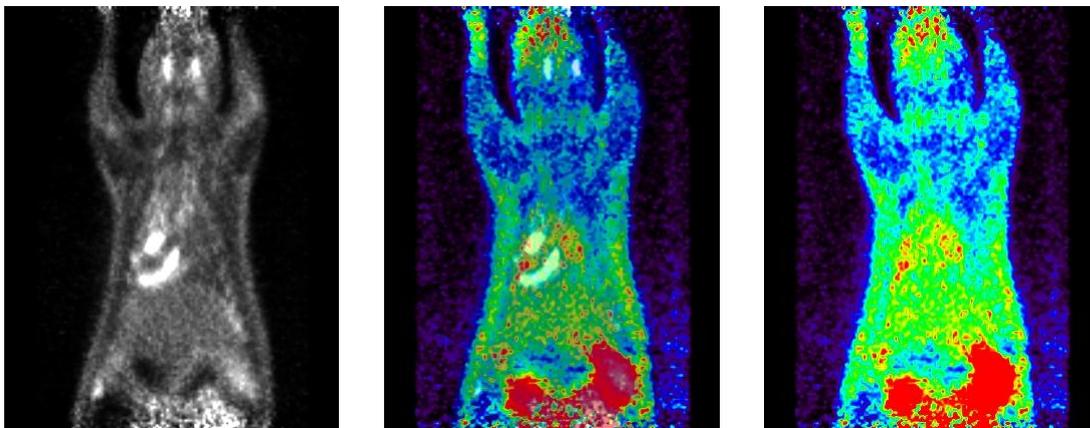


Abb. 6.25: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-NGR. rechts: ^{68}Ga -NOTA-NGR.

6 IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN

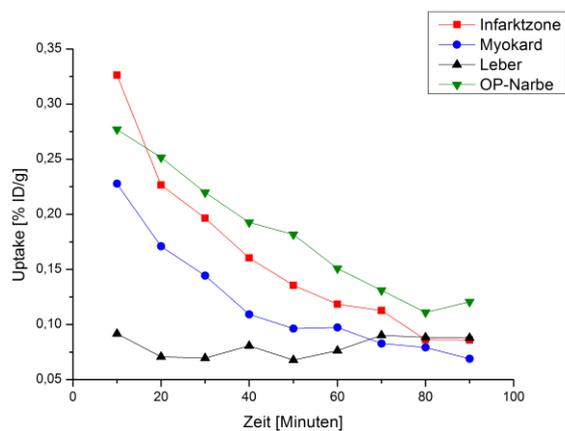


Diagramm 6.10: Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR, Ratte 2, Tag 7.

Diagramm 6.10 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Ratte 2 an Tag 7. Das Diagramm zeigt nur geringfügige Änderungen zum Diagramm des Uptakes von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Ratte 2 an Tag 3 (Diagramm 6.9).

Tag 21

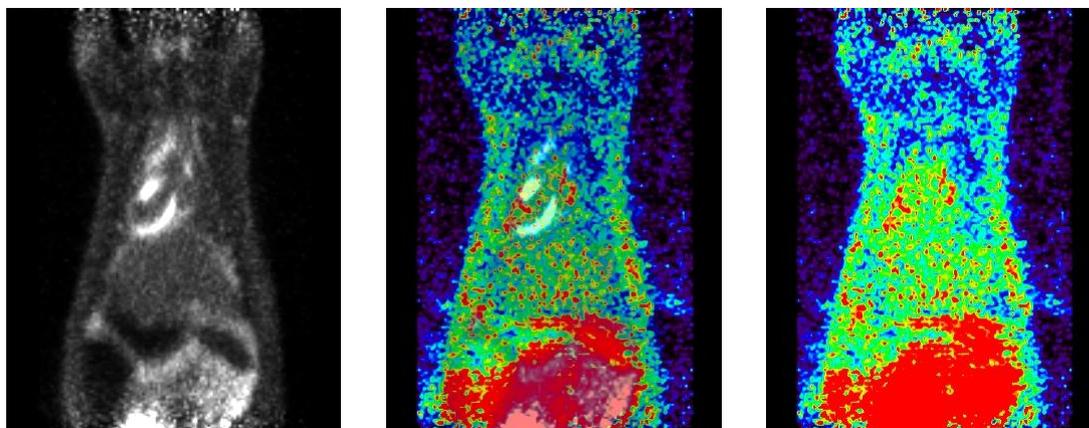


Abb. 6.26: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-NGR. rechts: ^{68}Ga -NOTA-NGR.

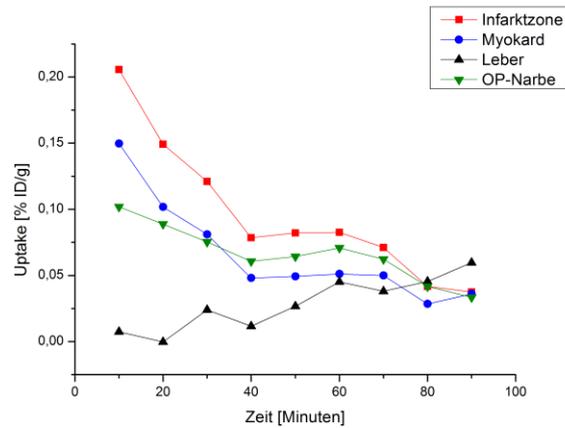


Diagramm 6.11: Uptake von $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$, Ratte 2, Tag 21.

Diagramm 6.11 zeigt den Uptake von $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ in Ratte 2 an Tag 21. Wie schon bei Ratte 1 beobachtet (siehe Diagramm 6.3), fällt der Uptake in der OP-Narbe nach 3 Wochen unter den Wert der Infarktzone. Die Expression von APN ist auch in Ratte 2 in der heilenden Haut-/Fleischwunde stärker zurückgegangen (siehe Diagramm 6.11).

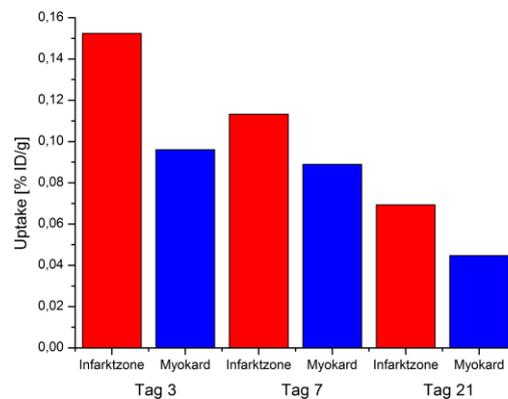


Diagramm 6.12: Uptake in Infarktzone (rot) und Myokard (blau) von $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ in Ratte 2 an Tag 3, 7 und 21.

Diagramm 6.12 zeigt den Uptake von $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ in Ratte 2 an Tag 3, 7 und 21. Es ist zu erkennen, dass der Uptake von $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ in Ratte 2 im Laufe der 3 Wochen insgesamt zurückgeht. Der Uptake in der Infarktzone ist dabei stets höher als im Myokard.

^{68}Ga -NOTA-RGD

Tag 4

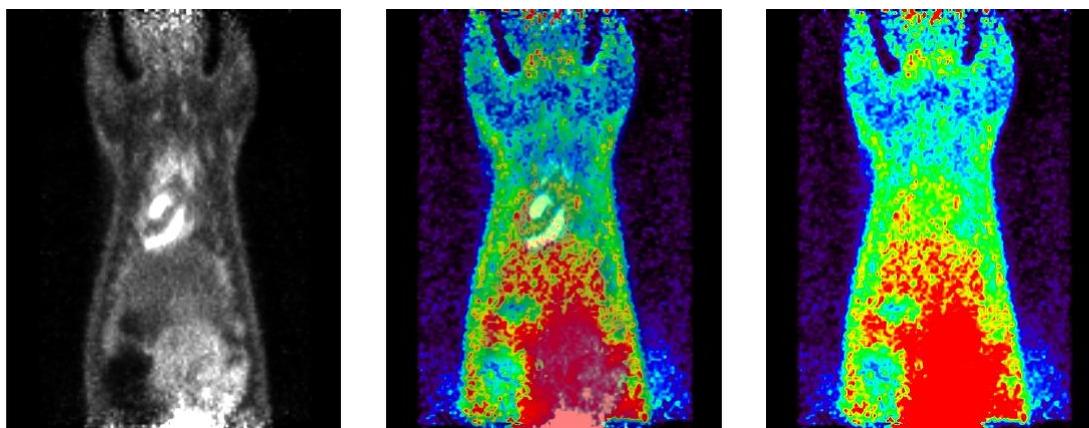


Abb. 6.27: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-RGD. rechts: ^{68}Ga -NOTA-RGD.

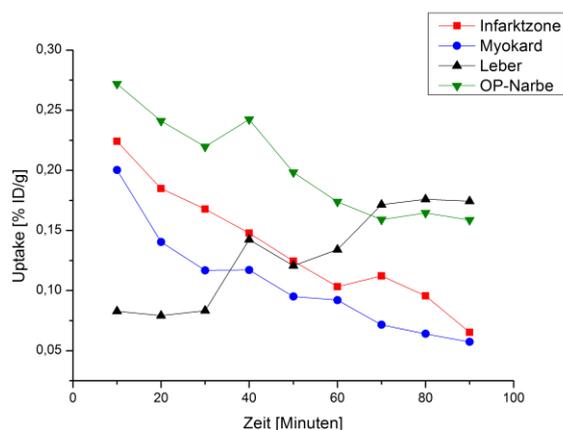


Diagramm 6.13: Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD, Ratte 2, Tag 4.

Diagramm 6.13 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 2 an Tag 4. Es zeigt den gleichen Trend wie das Diagramm des Uptakes von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 1 an Tag 4 (Diagramm 6.5). Der Uptake in der OP-Narbe ist am höchsten, in der Infarktzone am zweithöchsten, im Myokard am dritthöchsten und in der Leber am niedrigsten. Die Aufnahme nimmt im Laufe der Messung ab, wobei das nur für angiogenetisch aktive Bereiche zutrifft. In der Leber, die das ausscheidende Organ ist, steigt die Aufnahme an.

Tag 8

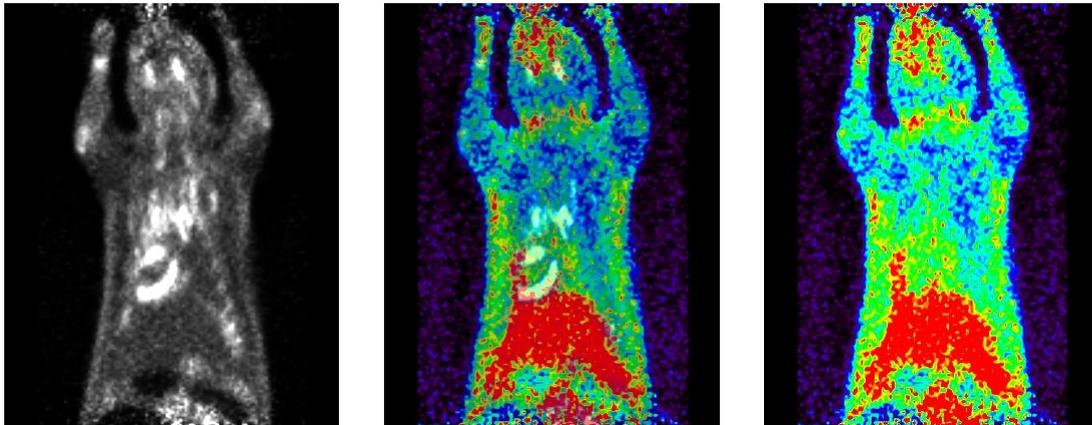


Abb. 6.28: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-RGD. rechts: ^{68}Ga -NOTA-RGD.

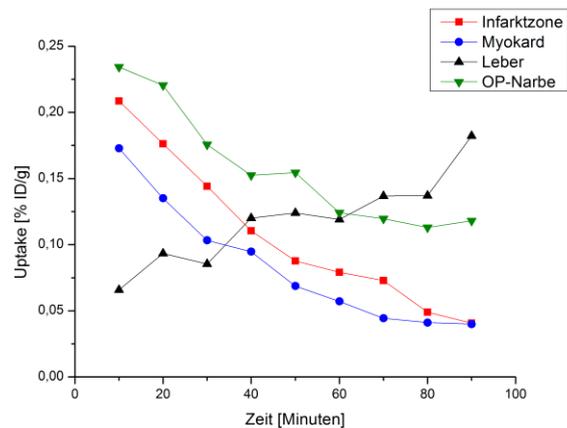


Diagramm 6.14: Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD, Ratte 2, Tag 8.

Diagramm 6.14 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 2 an Tag 8. Es zeigt keine großen Änderungen zum Diagramm des Uptakes von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 2 an Tag 4 (Diagramm 6.13). Diagramm 6.14 ist ebenfalls vergleichbar mit dem Diagramm des Uptakes von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 1 an Tag 8 (Diagramm 6.6).

Tag 22

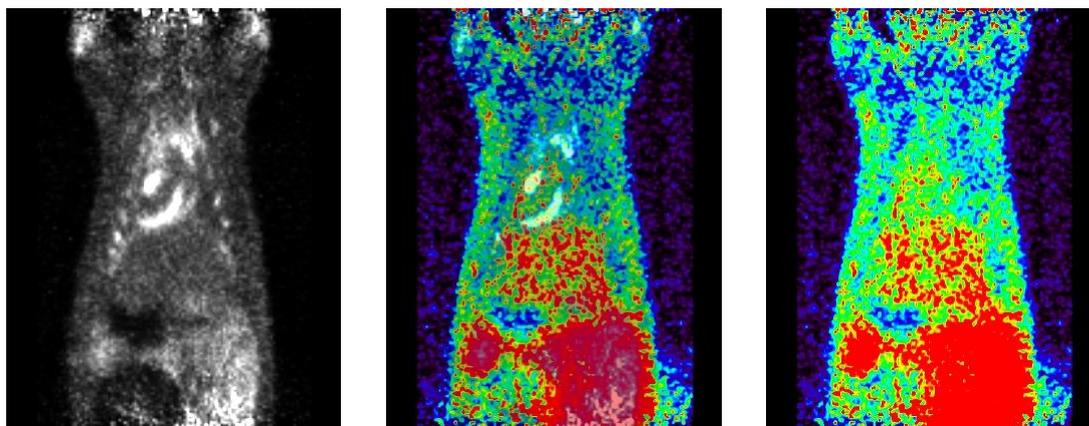


Abb. 6.29: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-RGD. rechts: ^{68}Ga -NOTA-RGD.

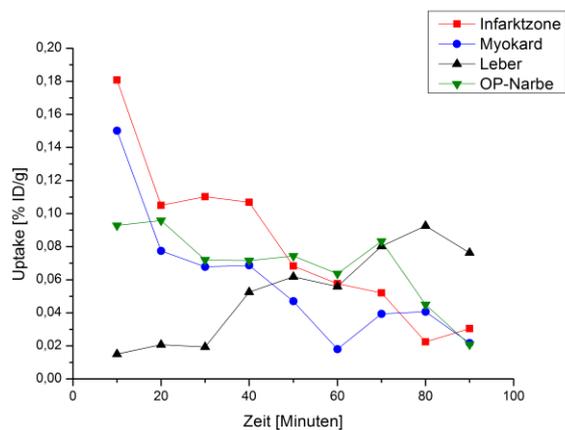


Diagramm 6.15: Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD, Ratte 2, Tag 22.

Diagramm 6.15 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 2 an Tag 22. Auch wenn hier der Unterschied geringer ausfällt, bleiben die Trends der bisherigen Beobachtungen erhalten. Der Uptake in der OP-Narbe fällt nach 3 Wochen unter den Wert der Infarktzone.

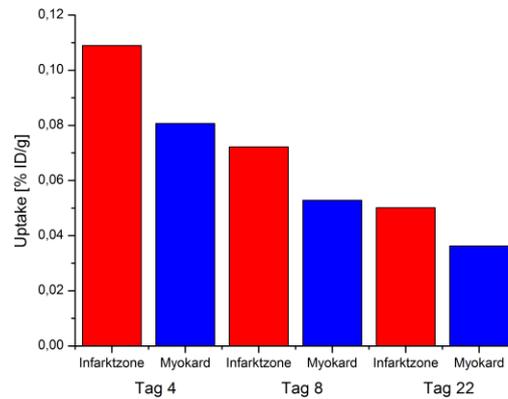


Diagramm 6.16: Uptake in Infarktzone (rot) und Myokard (blau) von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 2 an Tag 4, 8 und 22 bzw. 23.

Diagramm 6.16 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 2 an Tag 4, 8 und 22. Das Diagramm 6.16 zeigt, dass der Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 2 im Laufe der 3 Wochen insgesamt zurückgeht. Dabei ist der Uptake in der Infarktzone stets höher als im Myokard.

6.6.3 Ratte 3 (Sham)

^{68}Ga -NOTA-NGR

Tag 9

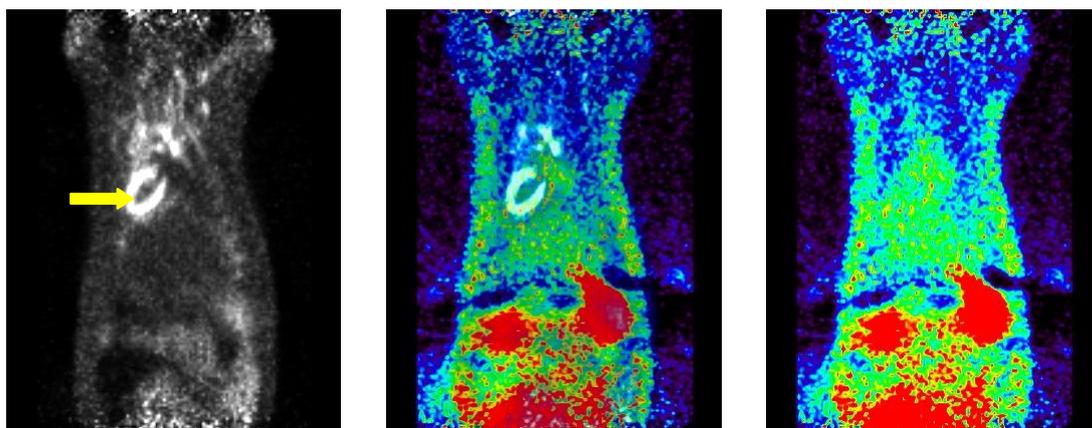


Abb. 6.30: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-NGR. rechts: ^{68}Ga -NOTA-NGR.

Bei Ratte 3 handelt es sich um ein Sham-Tier (siehe Kapitel 15.1.2). Wie im Bild des PET-Imagings mit FDG zu erkennen ist, ist das Myokard unverletzt. Das Tier hat keinen Myokardinfarkt erlitten. Infolgedessen hat es keine Infarktzone und Angiogenese findet im

Bereich des Myokards nicht statt. Das VOI für die Infarktzone wird bei der grafischen Auswertung in den Bereich des Myokards gelegt, der aufgrund der Erfahrung aus der Auswertung der Bilder der Infarkttiere am häufigsten den Infarkt aufweist (gelber Pfeil in Abb. 6.30 links). Die OP-Narbe ist jedoch wie bei den Infarkt-Tieren vorhanden. Das Bild des PET-Imagings mit ^{68}Ga -NOTA-NGR zeigt keinen Uptake im Bereich des Herzens (Abb. 6.30 rechts). Die Tage 3, 7 und 21 waren durch die Messungen mit anderen Tieren blockiert, deswegen konnte nur auf Tag 9 und 22 ausgewichen werden.

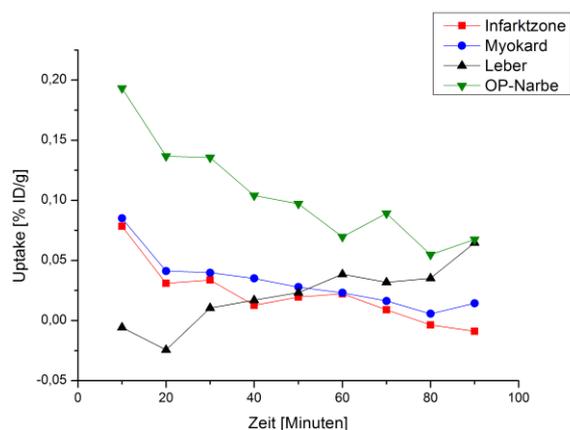


Diagramm 6.17: Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR; Ratte 3, Tag 9.

Diagramm 6.17 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Ratte 3 an Tag 9. Es zeigt insgesamt einen niedrigeren Uptake des Tracers in allen Bereichen im Vergleich mit den Infarkt-Tieren. Da das Sham-Tier keinen Infarkt hat, zeigt das Diagramm folglich, dass die VOIs für Infarktzone und Myokard den gleichen Uptake haben, da sie beide in gesundem Myokard liegen. Der Uptake in der OP-Narbe ist deutlich erhöht im Vergleich zu den anderen Bereichen.

Tag 22

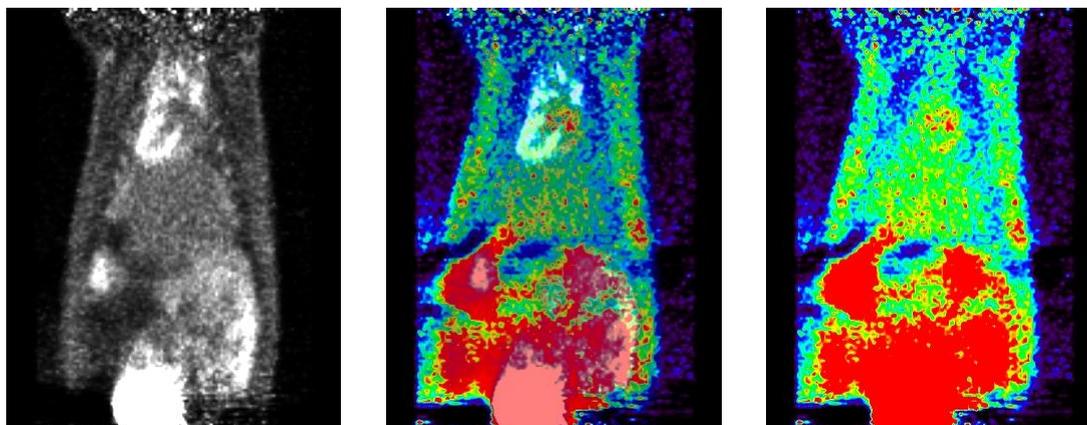


Abb. 6.31: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-NGR. rechts: ^{68}Ga -NOTA-NGR.

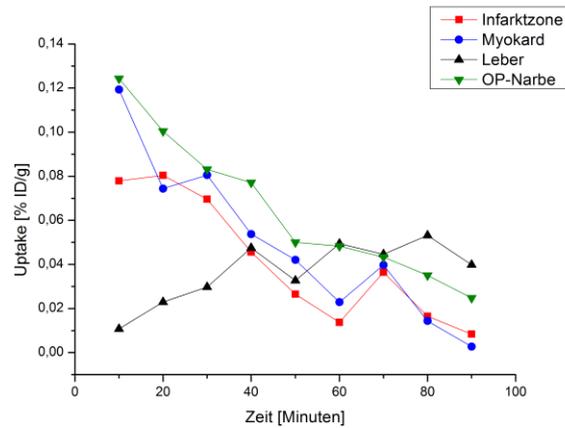


Diagramm 6.18: Uptake von ⁶⁸Ga-NOTA-NGR, Ratte 3, Tag 22.

Diagramm 6.18 zeigt den Uptake von ⁶⁸Ga-NOTA-NGR in Ratte 3 an Tag 22. Es ist zu erkennen, dass der Uptake in der OP-Narbe innerhalb der 3 Wochen in gleicher Weise wie auch bei den Tieren 1 und 2 zurückgegangen ist (siehe Diagramme 6.3 und 6.11). Das VOI für die Infarktzone zeigt einen geringeren Uptake als bei den anderen Tieren, da in Ratte 3 keine Angiogenese am Herzen stattfindet.

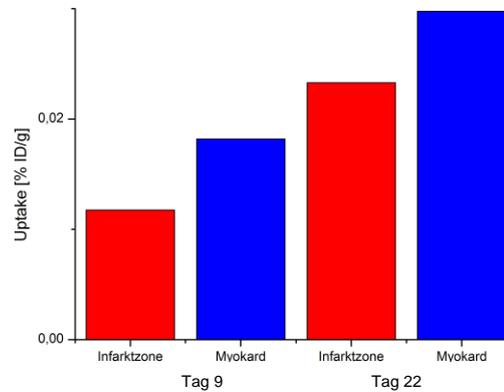


Diagramm 6.19: Uptake in Infarktzone (rot) und Myokard (blau) von ⁶⁸Ga-NOTA-NGR in Ratte 3 an Tag 9 und 22.

Diagramm 6.19 zeigt den Uptake von ⁶⁸Ga-NOTA-NGR in Ratte 3 an Tag 9 und 22. Es ist erkennbar, dass der Uptake von ⁶⁸Ga-NOTA-NGR in Ratte 3 im Myokard höher ist als in der Infarktzone. Der Uptake steigt im Verlauf der 3 Wochen. Es ist darauf hinzuweisen, dass der Uptake insgesamt sehr gering ist (siehe y-Achsen-Skalierung!) im Vergleich zu den Infarkttieren (Diagramme 6.4 und 6.12) und die Unterschiede zwischen den Bereichen

zu vernachlässigen sind. Der Uptake ist in beiden Bereichen zu allen Zeitpunkten nahezu gleich.

^{68}Ga -NOTA-RGD

Tag 23

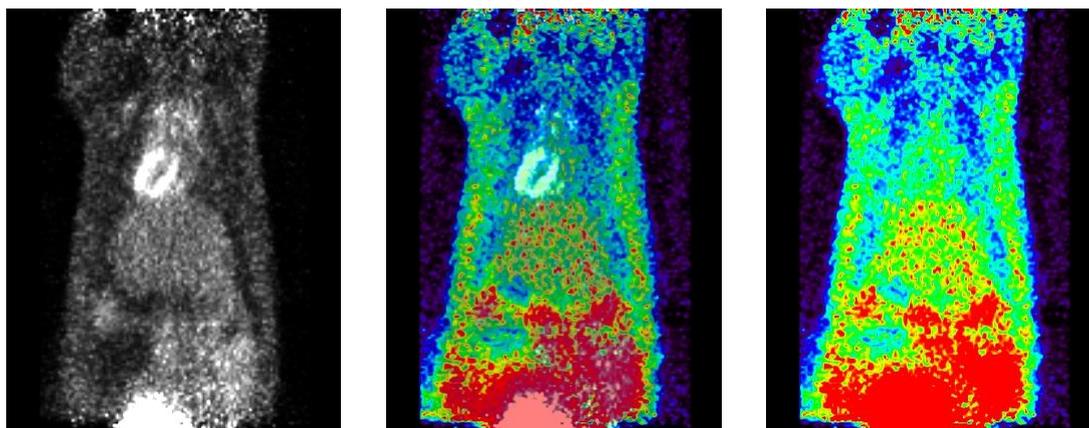


Abb. 6.32: links: FDG. Mitte: Fusion von FDG und ^{68}Ga -NOTA-RGD. rechts: ^{68}Ga -NOTA-RGD.

Die Tage 4, 8 und 22 waren durch die Untersuchungen mit anderen Tieren blockiert, nur Tag 23 stand für eine Untersuchung zur Verfügung.

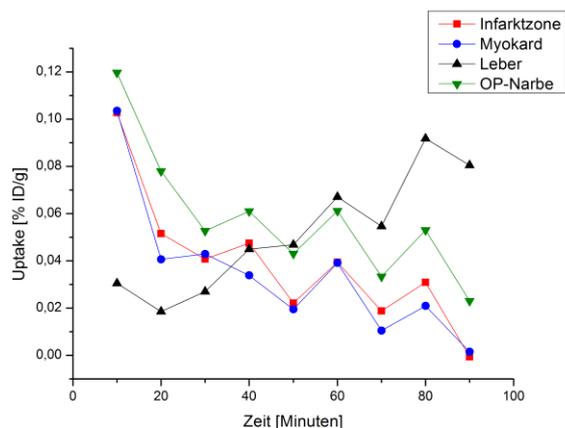


Diagramm 6.20: Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD, Ratte 3, Tag 23.

Diagramm 6.20 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 3 an Tag 23. Es zeigt, dass der Uptake in der OP-Narbe in gleicher Weise wie auch bei den Tieren 1 und 2 zurückgegangen ist. Auch in der Untersuchung mit ^{68}Ga -NOTA-RGD zeigt sich, dass beim

Sham-Tier keine Angiogenese und somit keine erhöhte Expression des Integrins $\alpha_v\beta_3$ am Herzen stattfindet. Dies zeigt sich am geringen Uptake des Tracers im VOI Infarktzone.

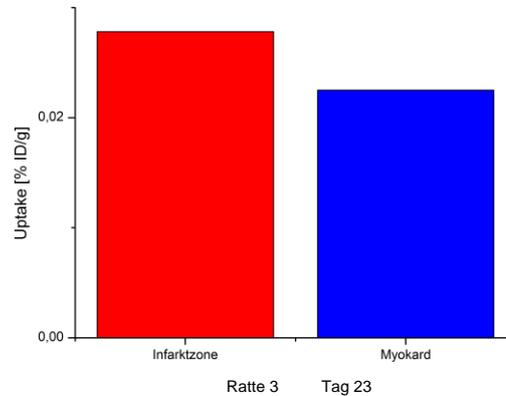


Diagramm 6.21: Uptake in Infarktzone (rot) und Myokard (blau) von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 3 an Tag 23.

Diagramm 6.21 zeigt den Uptakes von ^{68}Ga -NOTA-RGD in Ratte 3 an Tag 23. Der Uptake von ^{68}Ga -NOTA-RGD ist im Sham-Tier ebenfalls insgesamt sehr gering. Hier ist der Uptake in der Infarktzone höher als im Myokard, der Unterschied ist jedoch zu vernachlässigen.

6.6.4 Gesamtauswertung

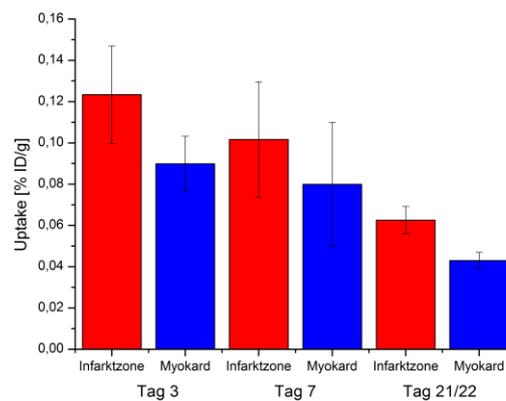


Diagramm 6.22: Durchschnitts-Uptake (mean) aller Infarkttiere von ^{68}Ga -NOTA-NGR in der Infarktzone (rot) und im Myokard (blau). links: Tag 3. Mitte: Tag 7. rechts: Tag 21 bzw. 22.

6 IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN

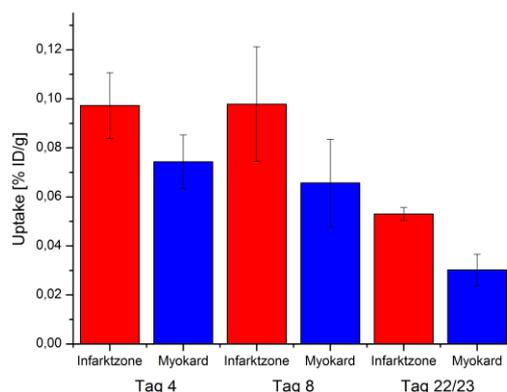


Diagramm 6.23: Durchschnitts-Uptake (mean) aller Infarkttiere von ^{68}Ga -NOTA-RGD in der Infarktzone (rot) und im Myokard (blau). links: Tag 4. Mitte: Tag 8. rechts: Tag 22 bzw. 23.

Die beiden Diagramme 6.22 und 6.23 zeigen den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR bzw. -RGD in der Infarktzone und im Myokard im Verlauf von 3 Wochen. Der Uptake in der Infarktzone ist zu jedem Zeitpunkt höher als im Myokard. Die Aufnahme ist an Tag 3/4 bei ^{68}Ga -NOTA-NGR am höchsten, bei ^{68}Ga -NOTA-RGD an den Tagen 3/4 und 7/8 ungefähr gleich hoch und sinkt im Laufe der 3 Wochen ab. Die Anreicherung von ^{68}Ga -NOTA-NGR ist insgesamt leicht erhöht gegenüber ^{68}Ga -NOTA-RGD.

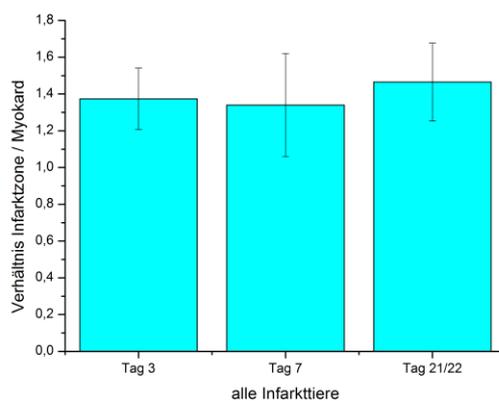


Diagramm 6.24: Verhältnis von Infarktzone zu Myokard aller Infarkttiere mit ^{68}Ga -NOTA-NGR.

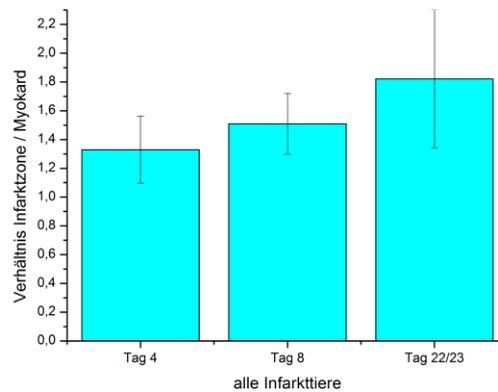


Diagramm 6.25: Verhältnis von Infarktzone zu Myokard aller Infarkttiere mit ^{68}Ga -NOTA-RGD.

Die Diagramme 6.24 und 6.25 zeigen das Verhältnis (Ratio) des Uptakes von Infarktzone zu Myokard. Das Verhältnis des Uptakes in der Infarktzone zum Uptake im Myokard bleibt bei ^{68}Ga -NOTA-NGR im Laufe der 3 Wochen ungefähr gleich, bei ^{68}Ga -NOTA-RGD steigt der Wert leicht an, d.h. der Unterschied von Infarktzone zu Myokard wird deutlicher.

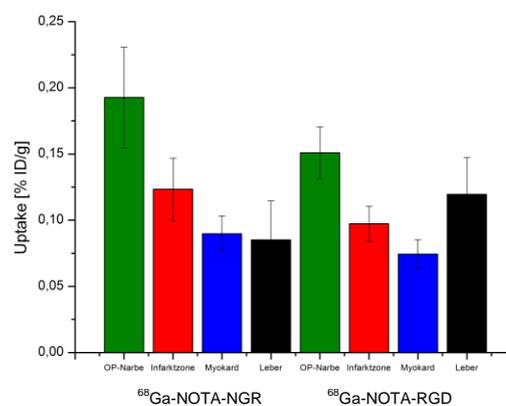


Diagramm 6.26: Durchschnitts-Uptake (mean) aller Infarkttiere Tag 3-4 in der OP-Narbe (grün), in der Infarktzone (rot), im Myokard (blau) und in der Leber (schwarz). links: ^{68}Ga -NOTA-NGR. rechts: ^{68}Ga -NOTA-RGD.

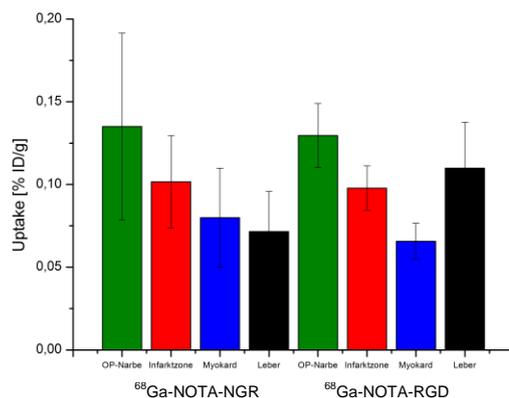
6 *IN-VIVO*-UNTERSUCHUNGEN

Diagramm 6.27: Durchschnitts-Uptake (mean) aller Infarkttiere Tag 7-8 in der OP-Narbe (grün), in der Infarktzone (rot), im Myokard (blau) und in der Leber (schwarz). links: $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$. rechts: $^{68}\text{Ga-NOTA-RGD}$.

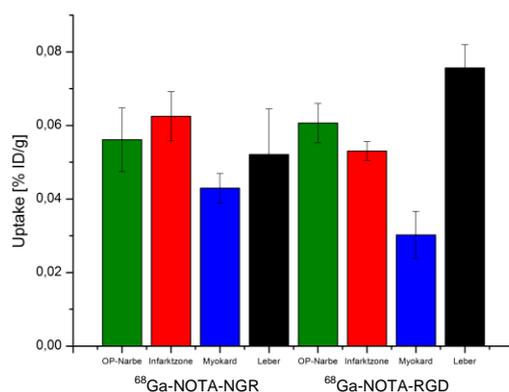


Diagramm 6.28: Durchschnitts-Uptake (mean) aller Infarkttiere Tag 21-23 in der OP-Narbe (grün), in der Infarktzone (rot), im Myokard (blau) und in der Leber (schwarz). links: $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$. rechts: $^{68}\text{Ga-NOTA-RGD}$.

Die Diagramme 6.26-6.28 zeigen, dass der Uptake in allen VOIs beider Tracer im Laufe der 3 Wochen sinkt. $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ zeigt stets einen höheren Uptake als $^{68}\text{Ga-NOTA-RGD}$, abgesehen von der Leber, welche bei $^{68}\text{Ga-NOTA-RGD}$ höhere Werte aufweist. Eine Erklärung dafür ist, dass der Tracer eine höhere Lipophilie aufweist als $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ und somit eine höhere Lebergängigkeit besitzt. Der Trend, dass die OP-Narbe unmittelbar nach der OP den höchsten Uptake, nach 3 Wochen einen geringeren Uptake als die Infarktzone aufweist, ist insgesamt nur bei $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ zu beobachten.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Versuchsreihe gelungen ist. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym APN bei Angiogenese nach einem Myokardinfarkt erhöht exprimiert ist, dass es vom Tracer ^{68}Ga -NOTA-NGR adressiert wird und dass es mittels PET im Kleintierexperiment visuell nachzuweisen ist. Die Ergebnisse für den Uptake im angiogenetisch aktiven Bereich sind im Vergleich mit dem bereits etablierten Tracer ^{68}Ga -NOTA-RGD zur Darstellung des bei Angiogenese vermehrt exprimierten Rezeptors Integrin $\alpha_v\beta_3$ vergleichbar. Der Uptake in der Leber ist weitaus geringer. Dies hat den Vorteil, dass kontrastreichere PET-Aufnahmen möglich sind. Der Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR und somit die Expression von APN ist an Tag 3 am höchsten. An Tag 21 ist die Expression in der Infarktregion höher als in der OP-Narbe, was auf eine langsamere Wundheilung des infarzierten Areals im Gegensatz zur OP-Wunde hindeutet. Der neu entwickelte PET-Tracer ^{68}Ga -NOTA-NGR ist somit zur Darstellung von APN mittels PET geeignet und eine echte Alternative zu ^{68}Ga -NOTA-RGD bei der Bildgebung der Angiogenese.

6.7 [^{124}I]Iod-markierter PET-Tracer für FAP

Wie bei den Untersuchungen mit einem ^{68}Ga -Tracer wird auch bei 1-(2-[^{124}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**75**) eine PET-Messung von 90 min à 9 Frames, gefolgt von einer Transmissionsmessung, durchgeführt. Die FDG-Messung zur Lokalisation des Herzens wird wie bereits erwähnt am Vortag durchgeführt. Auch bei dieser Messung wurden die Aufnahmen der Frames von Minute 40-80 zu einem Satz Schnittbilder kombiniert. Die Auswertung erfolgte sowohl qualitativ anhand der Farbabstufungen in den Bild-Dateien als auch quantitativ anhand der Radioaktivitätsmengen in den VOIs. Es wurden VOIs in die Infarktzone (nekrotischer Teil des Herzmuskels), in das Myokard (intakter Teil des Herzmuskels), in die OP-Narbe (Hautschnitt durch Öffnung des Thorax), in die Leber und in die Pfote (Hintergrund) gelegt (siehe Kapitel 6.5).

6.7.1 Ratte 4

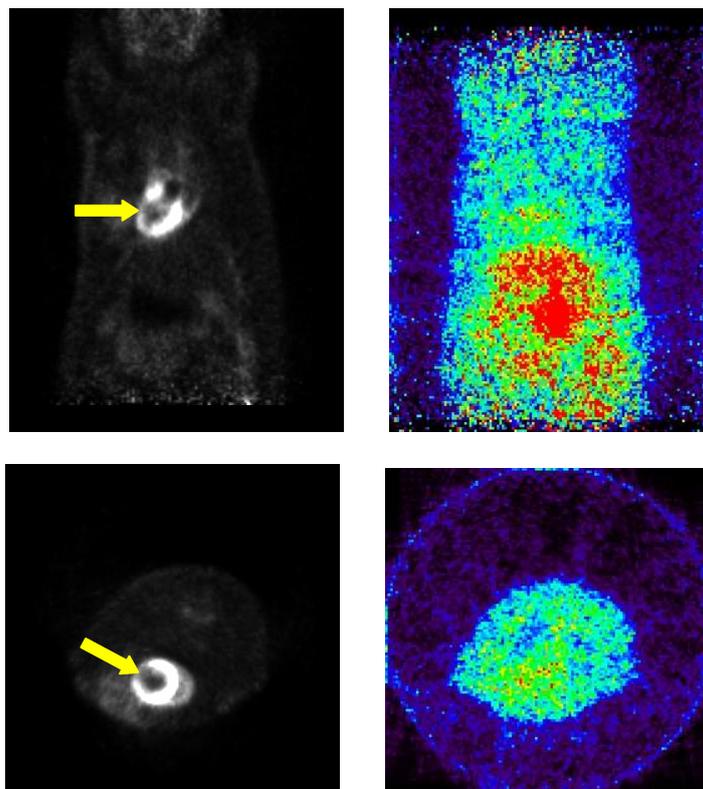


Abb. 6.33: links: FDG. rechts: 1-(2-[^{124}I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril. oben: coronale Schnittebenen. unten: transversale Schnittebenen.

Die PET-Untersuchung mit FDG zeigt im resultierenden Bild einen Myokardinfarkt beim untersuchten Tier (gelbe Pfeile in Abb. 6.33). Die Aufnahme mit 1-(2-[^{124}I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril liefert kein sehr deutliches Bild. Dies ist unter Anderem auf das Zerfallsschema von ^{124}I zurückzuführen. ^{124}I eignet sich nur bedingt als PET-Tracer. Neben Nieren und Leber, die einen hohen Uptake zeigen, ist grob der Bereich am Myokardinfarkt durch leicht erhöhten Uptake abgrenzbar. Dies ist auch im transversalen Schnittbild zu erkennen. Auf die Darstellung fusionierter Bilder wurde hier aufgrund der schlechten Bildqualität der mit dem ^{124}I -Tracer aufgenommenen Bilder verzichtet.

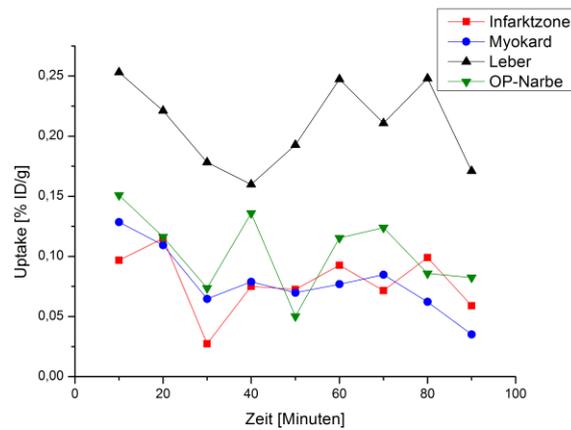


Diagramm 6.29: Uptake von 1-(2-[¹²⁴I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril, Ratte 4, Tag 4.

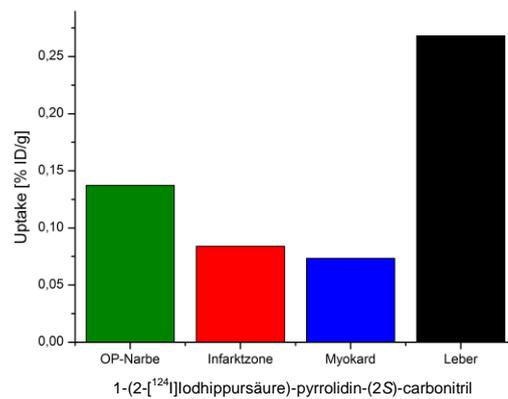


Diagramm 6.30: Uptake von 1-(2-[¹²⁴I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril, Ratte 4, Tag 4.

Die Diagramm 6.29 und 6.30 zeigen, dass der Uptake, wie bei den Untersuchungen mit den beiden ⁶⁸Ga-Tracern, in der OP-Narbe am höchsten, in der Infarktzone am zweithöchsten und im Myokard am niedrigsten ist. Der Uptake in der Leber ist hier extrem hoch, was auf die hohe Lipophilie des Tracers und somit einen raschen Abbau über die Leber hindeutet. Die Tatsache, dass der Uptake in der OP-Narbe und in der Infarktzone höher ist als im Myokard, zeigt, dass eine Wechselwirkung des PET-Tracers mit dem beim Remodeling exprimierten Enzym FAP stattgefunden hat. Leider konnte hier nur eine Messung an Tag 4 durchgeführt werden. Der Verlauf über einen längeren Zeitraum konnte nicht verfolgt werden.

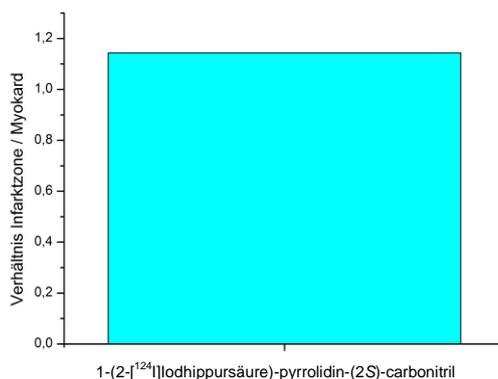


Diagramm 6.31: Verhältnis von Infarktzone zu Myokard mit 1-(2-[¹²⁴I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril.

Diagramm 6.31 zeigt das Verhältnis des Uptakes von Infarktzone zu Myokard. Es beträgt ca. 1.15. Bei den beiden ⁶⁸Ga-Tracern (Diagramme 6.24 und 6.25) werden Verhältnisse von Infarktzone zu Myokard von ca. 1.3 bis 1.8 gemessen. Der mit ¹²⁴I markierte Tracer zeigt demnach ein ungünstigeres Verhältnis, das aber dieselbe Tendenz hat.

Um die Eignung von 1-(2-[¹²⁴I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**75**) als PET-Tracer zur Darstellung des Remodelings nach einem Myokardinfarkt beurteilen zu können, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Der Tracer muss an mehreren Tieren über einen längeren Zeitraum hinweg getestet werden, auch im Vergleich zu Sham-Tieren. Dieser einmalige Versuch lieferte einen ersten Eindruck. Die visuelle Darstellung lässt zwar sehr an Qualität zu wünschen übrig, dies ist aber eindeutig mit der geringen Eignung von ¹²⁴I als PET-Nuklid zu begründen. Der Wirkstoff scheint als Tracer geeignet zu sein, möglicherweise liefert eine Markierung mit dem noch wenig etablierten Nuklid ¹²⁰I ¹⁰² die erhoffte Verbesserung. Die Aufgabenstellung, einen Iod-haltigen Wirkstoff zu finden, der hohe Affinität zu FAP zeigt und mit einem radioaktiven Nuklid markiert werden kann, um als PET-Tracer eingesetzt zu werden, wurde erfüllt.

Anmerkung zu den Diagrammen 6.30 und 6.31: da es sich um ein individuelles Ergebnis handelt, können keine Mittelwerte und somit keine Fehlerbalken gezeigt werden.

6.8 Résumé Kapitel 6

6.8.1 $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}/^{68}\text{Ga-NOTA-RGD}$

Der neu entwickelte Radiotracer $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ wurde *in vivo* an Ratten mithilfe des Ischämie/Reperfusions-Modells am Kleintier-PET getestet. Die Expression des angiogenetisch aktiven Enzyms APN wurde besonders im Bereich des Myokards an den Tagen 3, 7 und 21/22 nach Myokardinfarkt untersucht. Parallel dazu wurden an den Tagen 4, 8 und 22/23 Untersuchungen mit dem bereits etablierten Radiotracer $^{68}\text{Ga-NOTA-RGD}$ zur Visualisierung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ durchgeführt, um die Ergebnisse vergleichen und bewerten zu können. Dabei zeigte sich, dass $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ aufgrund seiner geringeren Lipophilie nicht in gleichem Maße über die Leber abgebaut wird wie $^{68}\text{Ga-NOTA-RGD}$. Die Aufnahme von $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ in die ischämische Zone und das gesunde Myokard ist im Verlauf der 3-wöchigen Studie stets höher als von $^{68}\text{Ga-NOTA-RGD}$. Die Aufnahme von $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ ist in die ischämische Zone stets höher als im Myokard, wobei sich das Verhältnis im Verlaufe der 22 Tage nicht ändert. $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ zeigt ein Aufnahmemaximum an Tag 3, die Expression von APN ist offenbar in diesem Zeitraum am höchsten und nimmt bis Tag 21/22 kontinuierlich ab.

Mit $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ wurde ein neuer Radiotracer zur Diagnose der Angiogenesebedingten APN-Expression nach Myokardinfarkt mittels PET entwickelt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie an Ischämie/Reperfusions-Ratten bestätigte das bereits publizierte Expressionsmaximum von APN im Bereich von Tag 3-7²⁷ und lieferte das Ergebnis, dass das Radiopharmakon $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR}$ zur Darstellung der Angiogenese mittels PET mindestens genauso gut geeignet ist wie $^{68}\text{Ga-NOTA-RGD}$.

6.8.2 1-(2-[^{124}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril

Der neu entwickelte Radiotracer 1-(2-[^{124}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**75**) wurde *in vivo* an einer Ratte mithilfe des Ischämie/Reperfusions-Modells am Kleintier-PET getestet. Die Funktion des beim Remodelingprozesses exprimierten Enzyms FAP wurde an Tag 4 nach Myokardinfarkt untersucht. Dabei ergab sich, dass der Radiotracer erhöhte Aufnahme in die OP-Narbe und die ischämische Zone zeigt im Gegensatz zu inaktivem Gewebe. Die Aufnahme in die ischämische Zone ist höher als in das gesunde Myokard. Diese Ergebnisse liefern eine erste Tendenz in die erwartete Richtung. Um die Eignung von 1-(2-[^{124}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril als Tracer zur Diagnose der Wundheilung nach Myokardinfarkt bestätigen zu können, sind weitere Untersuchungen nötig.

7 Autoradiographie

Mittels Autoradiographie (AURA) kann die Aufnahme eines radioaktiven Wirkstoffes in einem Versuchstier nachgewiesen und visualisiert werden. Aufgrund der höheren Auflösung können mittels AURA im Gegensatz zur PET sehr kleine Gewebeproben und hauchdünne Schnitte untersucht werden. Der Nachteil besteht darin, dass die Tiere zur Untersuchung getötet werden müssen und deshalb nur einmal untersucht werden können.¹¹⁰ Die Expression des bei der Angiogenese beteiligten Enzyms APN und des beim Remodeling-Prozess beteiligten Enzyms FAP soll mithilfe der neu entwickelten PET-Tracer ⁶⁸Ga-NOTA-NGR (**77**) und 1-(2-[¹²⁴I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**75**) mittels Autoradiographie in angiogenetisch aktivem Gewebe nachgewiesen werden.

7.1 Allgemeines

Der auch als Phosphor-Imager oder Radioluminograph bezeichnete Autoradiograph besteht aus einem Scanner, der mit einem roten Laser der Wellenlänge 635 nm betrieben und über einen PC mit entsprechender Software bedient wird.¹¹¹ Zur Anwendung wird eine passende Image-Platte benötigt, die über eine photosensitive Schicht verfügt. Diese Imageplatte kann mit radioaktiven Gewebeproben belegt werden, deren ausgesandte Strahlung (möglich sind α -, β -, γ - sowie UV- und Röntgen-Strahlung¹¹²) eine Veränderung in der photosensitiven Schicht verursacht. Wird die belichtete Platte in den Scanner eingebracht, tastet der Laser die photosensitive Schicht ab und der PC erstellt eine Bilddatei aus den erhaltenen Daten. Die Belichtungszeit richtet sich nach Aktivitätsmenge und verwendetem Nuklid (aufgrund der unterschiedlichen Halbwertszeit) und wird individuell festgelegt.

7.2 Tiermodell

Für die Experimente mit AURA wurde dasselbe Tiermodell verwendet wie für die Kleintier-PET-Untersuchungen. Es wurden Ratten (Art: *Rattus norvegicus*, Stamm: Wistar) verwendet, die per OP einen künstlichen Myokardinfarkt erhalten hatten (siehe Kapitel 6.2 und 15.1.2). Den Versuchstieren wurde in Narkose der entsprechende Tracer über die Schwanzvene injiziert. Nach einer festgelegten Zeit wurden die Tiere getötet und das gewünschte Gewebe wurde herauspräpariert. Dieses kann entweder direkt oder in ein gewünschtes Medium eingebettet auf die Image-Platte aufgebracht werden.

7.3 Gewebeschnitte

Da im Rahmen dieser Arbeit die bei Angiogenese und Remodeling nach einem Myokardinfarkt beteiligten Enzyme APN und FAP nachgewiesen werden sollten, wurden als gewünschte Gewebeproben die Herzen der Tiere entnommen. Alle Versuchstiere hatten einen Myokardinfarkt am linken Ventrikel erhalten. Die Herzen wurden in ein geeignetes Material eingebettet und mit Kältespray schockgefroren. Davon wurden Gefrier-Gewebeschnitte (Kryoschnitte) mit einer Dicke von 5 μm erstellt. Die Schnitte wurden quer zur Längsachse des Herzmuskels angefertigt, wodurch sich ringförmige Scheiben ergaben. Die Schnitte wurden auf Objektträger aus Glas aufgebracht, um sie zu einem späteren Zeitpunkt noch zu Mikroskopie-Zwecken verwenden zu können (siehe Abb. 7.1).

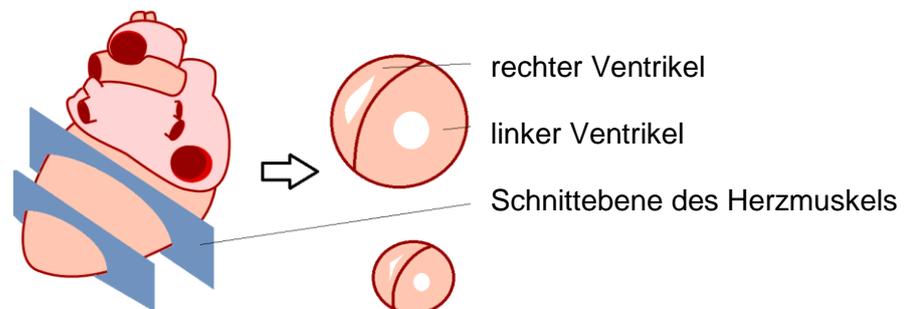


Abb. 7.1: Erstellung von Kryoschnitten des Herzens.

7.4 Vergleich mit HE-Färbung

Im Anschluss an die Untersuchung mittels AURA stehen die Gewebeschnitte für HE-Färbungen (siehe Kapitel 8.1 und 16.2) zur Verfügung. Die HE-(Hämatoxylin-Eosin)-Färbung ¹¹³ ist ein etabliertes Verfahren zur Visualisierung nekrotischen Gewebes im Myokard. Muskelzellen werden dabei rot eingefärbt, Zellkerne blau. Die Infarktzone unterscheidet sich vom Myokard durch ein farbloses, faserartiges Erscheinungsbild. Mit einer an ein Mikroskop angeschlossenen Kamera können Fotos von den gefärbten Schnitten gemacht werden. Die qualitative Auswertung der AURA-Bilder erfolgt im Vergleich zu den Mikroskop-Bildern der HE-Färbung. Durch Gegenüberstellung beider Bilder lässt sich feststellen, in welcher Region des Herzens die mittels AURA detektierte Anreicherung des radioaktiven Wirkstoffes stattgefunden hat.

7.5 Auswertung der Autoradiographie-Aufnahmen

Die Auswertung sowohl der Bilddateien des PET als auch der des Autoradiographen erfolgt mit demselben Programm (Amide¹⁰⁹). Die Anreicherung eines radioaktiven Stoffes kann in verschiedenen Farb- und Graustufen dargestellt werden (siehe Kapitel 6.5). Im Gegensatz zur PET erhält man bei der AURA keine Schnittbilder, da es sich um eine 2-dimensionale Aufnahme handelt. Analog zur Auswertung der PET-Bilder können „regions of interest“ (ROIs) in die Bilder in verschiedene Regionen gelegt werden, um die Anreicherungen quantitativ auswerten zu können. Die Berechnung und quantitative Auswertung erfolgt analog zu den PET-Bildern in % ID/g. Diese Werte können in Diagrammen dargestellt werden (siehe Kapitel 6.5).

7.6 Durchführung mit 1-(2-[¹²⁴I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril

Der Versuch, die Anreicherung von 1-(2-[¹²⁴I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**75**) mittels AURA im Herzgewebe einer Ratte sichtbar zu machen, blieb erfolglos, was auf eine zu geringe injizierte Aktivitätsmenge zurückzuführen ist. Die Untersuchung sollte wiederholt werden, um die Eignung des Tracers beurteilen zu können.

7.7 Durchführung mit ⁶⁸Ga-NOTA-NGR

Es standen drei Versuchstiere zur Verfügung. Ihnen wurde eine Dosis von 34.0 – 36.8 MBq ⁶⁸Ga-NOTA-NGR in Lösung injiziert. Nach 90 min wurden sie geopfert und die Herzen wurden entnommen. Es wurden Kryoschnitte erstellt und auf die Image-Platte gelegt. Nach 4.5 h wurde diese am Autoradiographie-Scanner mit einer Auflösung von 30 µm ausgelesen. Im folgenden Abschnitt sind zwei Beispiele der Kryoschnitte gezeigt, mit denen AURA und HE-Färbung durchgeführt wurde. Die beiden Schnitte stammen vom selben Tier, es wurde ein Schnitt nahe der Herzbasis und ein Schnitt nahe der Herzspitze ausgewählt.

Die Mikroskopie-Aufnahmen entsprechen bei den Totalansichten einer 1.25-fachen und bei den Detailansichten einer 20-fachen Vergrößerung.

7.7.1 Kryoschnitt 1

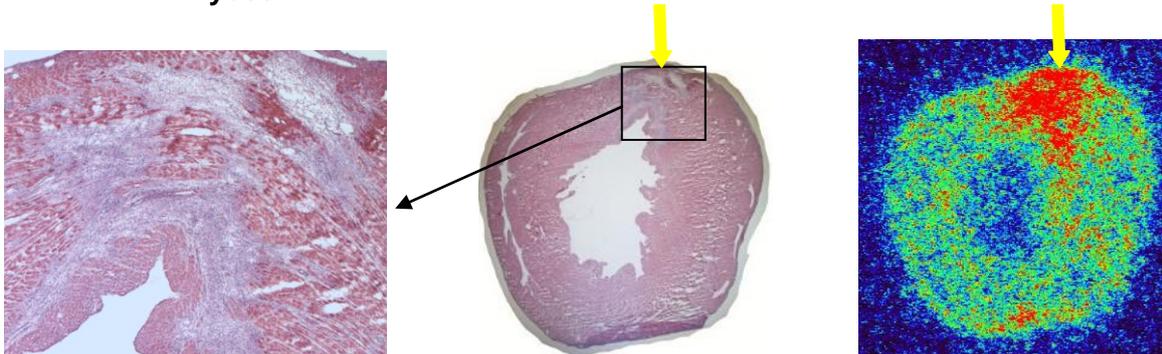


Abb. 7.2: Kryoschnitt 1 links: Vergrößerung der Infarktzone. Mitte: HE-Färbung. rechts: AURA-Bild.

Die Aufnahme von Kryoschnitt 1 zeigt einen deutlichen Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in der rechten oberen Ecke des Schnittes (gelbe Pfeile in Abb. 7.2). Die Mikroskopieaufnahme der HE-Färbung desselben Schnittes zeigt genau an dieser Stelle ein großes Gebiet nekrotischen Gewebes (vgl. Kapitel 8.1).

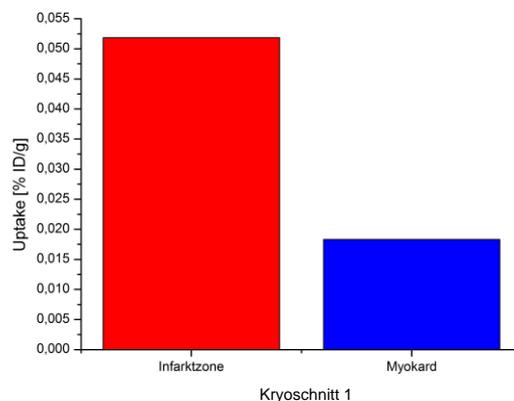


Diagramm 7.1: Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Infarktzone und Myokard im Kryoschnitt 1.

Diagramm 7.1 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Kryoschnitt 1. Es bestätigt die Beobachtungen der Bild-Dateien (Abb. 7.2). Der Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Kryoschnitt 1 ist in der Infarktzone deutlich höher als im Myokard.

7.7.2 Kryoschnitt 2

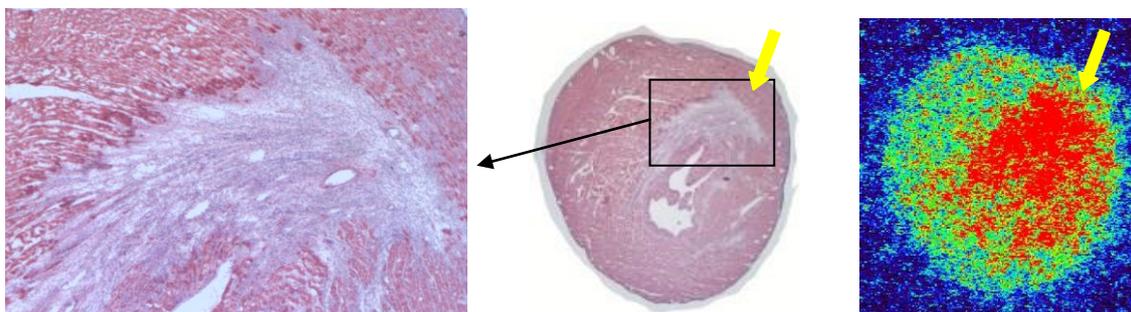


Abb. 7.3: Kryoschnitt 2 links: Vergrößerung der Infarktzone. Mitte: HE-Färbung. rechts: AURA-Bild.

Die Aufnahme von Kryoschnitt 2 zeigt einen hohen Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR im Zentrum des Schnittes (gelbe Pfeile in Abb. 7.3). Die Mikroskopieaufnahme der HE-Färbung desselben Schnittes zeigt an der gleichen Stelle ein großes Gebiet nekrotischen Gewebes (vgl. Kapitel 8.1).

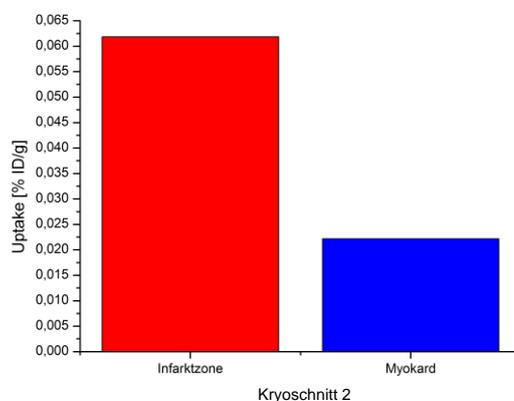


Diagramm 7.2: Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Infarktzone und Myokard im Kryoschnitt 2.

Diagramm 7.2 zeigt den Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Kryoschnitt 2. Es bestätigt die Beobachtungen der Bild-Dateien (Abb. 7.3). Der Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in Kryoschnitt 2 ist in der Infarktzone deutlich höher als im Myokard.

7.7.3 Gesamtauswertung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der neu entwickelte PET-Tracer ^{68}Ga -NOTA-NGR zur Visualisierung des bei der Angiogenese erhöht exprimierten Enzyms APN mittels Autoradiographie geeignet ist. Ratten mit Myokardinfarkt zeigten einen deutlich höheren Uptake von ^{68}Ga -NOTA-NGR in der Infarktzone des Herzens als im gesunden Myokard.

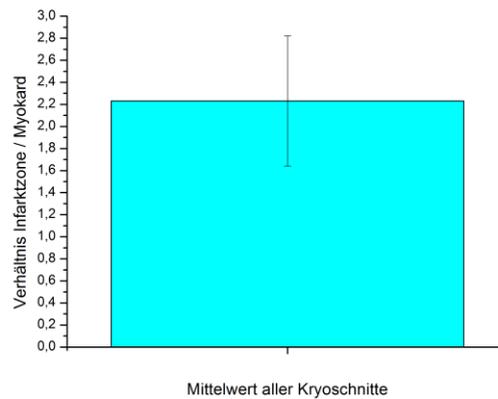


Diagramm 7.3: Verhältnis des Uptakes von ^{68}Ga -NOTA-NGR von Infarktzone zu Myokard.

Diagramm 7.3 zeigt das Verhältnis des Uptakes von ^{68}Ga -NOTA-NGR von Infarktzone zu Myokard. Das Verhältnis wird berechnet, indem der % ID/g-Wert der Infarktzone durch den % ID/g-Wert des Myokards geteilt wird. Ergibt diese Rechnung = 1, so ist der Uptake in beiden Bereiche genau gleich hoch. Ergibt diese Rechnung einen Wert > 1, so ist der Uptake in der Infarktzone höher als im Myokard. Wie in Diagramm 7.3 gezeigt, ist das Verhältnis bei allen Kryoschnitten deutlich über 1 und erreicht Maximalwerte bis zu 3. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Expression des Enzyms APN in der Infarktzone deutlich höher ist als im gesunden Myokard.

7.8 Résumé Kapitel 7

Einer Gruppe von Ischämie/Reperfusion-Ratten wurde der neu entwickelte PET-Tracer ^{68}Ga -NOTA-NGR injiziert. Deren speziell präparierte Herzen wurden mittels Autoradiographie auf ihre Aufnahme des Radiotracers hin untersucht. Dabei zeigte sich eine enorm erhöhte Aufnahme von ^{68}Ga -NOTA-NGR in der ischämischen im Vergleich zur gesunden Zone des Myokards. Die unterschiedlichen Bereiche des Herzens wurden mittels HE-Färbung bestätigt.

8 Gewebefärbungen

Nach Abschluss der PET-Untersuchungen (siehe Kapitel 6) wurden alle Versuchstiere getötet und deren Herzen entnommen. Diese wurden, wie in Kapitel 7.3 beschrieben, präpariert und zu Kryoschnitten verarbeitet. So standen sie für diverse Färbungen und zur anschließenden Auswertung durch Mikroskopie zur Verfügung.

8.1 HE-Färbungen

Die HE- (Hämatoxylin-Eosin-) Färbung ist eine etablierte Methode, um in infarzierten Herzen die Bereiche der Infarktzone und des gesunden Myokards optisch unterscheiden zu können.¹¹³ Im Rahmen dieser Arbeit sollte bei Kryoschnitten von Ratten, die mittels PET untersucht wurden, eine HE-Färbung durchgeführt werden, um nachzuweisen, dass diese Tiere einen Myokardinfarkt hatten und wo genau sich die Infarktzone befand.

Die HE-Färbung dient der morphologischen Untersuchung von Gewebeschnitten und erlaubt die Unterscheidung verschiedener Strukturen anhand ihres unterschiedlichen Anfärbeverhaltens. Hämatoxylin wird während des Färbeprozesses durch Oxidation zu Hämalan aufbereitet, das alle sauren Strukturen blau färbt. Insbesondere Zellkerne werden damit aufgrund der in ihnen enthaltenen Bestandteile angefärbt. Eosin färbt alle basischen Strukturen rot, was vor allem Zellplasmae Proteine umfasst. Im Herzgewebe erscheinen Muskelzellen rot, nekrotisches Gewebe ist nicht gefärbt und die Zellkerne sind blau angefärbt.¹¹⁴⁻¹¹⁷ So werden z.B. nach AURA-Experimenten dieselben Schnitte für HE-Färbung verwendet, um die genaue Lage der Infarktzone zu lokalisieren und die Bilder zu vergleichen (siehe Kapitel 7).

Es standen 9 Versuchstiere zur Verfügung, denen das Herz nach Abschluss der PET-Untersuchungen entnommen wurde. Den Ratten 1, 2, 3 und 5 wurde das Herz nach 23 Tagen entnommen, den Ratten 6, 7, 8 und 9 wurde das Herz an Tag 7 entnommen. Ratte 4 aus dem PET-Versuch mit Iod-124 wurde das Herz nach 4 Tagen entnommen.

Die Mikroskopie-Aufnahmen zeigen die Totalansichten in 1.25-facher, die Ausschnitte in 20-facher Vergrößerung. Der schwarze Rand in den Totalansichten ist mikroskopbedingt.

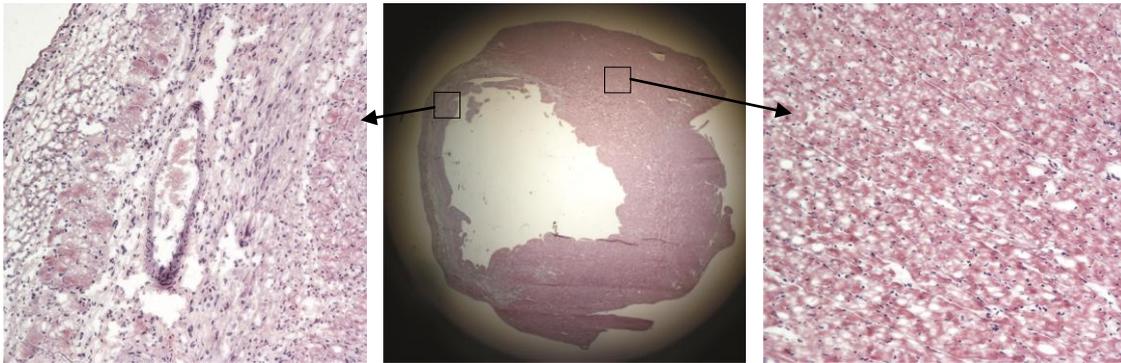
8.1.1 Ratte 1

Abb. 8.1: Mitte: Gesamtansicht der HE-Färbung eines Kryoschnittes von Ratte 1. links: Vergrößerung aus der Infarktzone. rechts: Vergrößerung aus dem Bereich gesunden Myokards.

Ratte 1 hat laut Kryoschnitt einen großen Myokardinfarkt auf der linken Seite der Herzwand. Die infarzierte Ventrikelwand ist im Vergleich zur intakten Seite extrem verdünnt und von faserartiger Struktur (siehe Abb. 8.1). In den Vergrößerungs-Ansichten erkennt man gut, dass die Infarktzone nicht mit Eosin anfärbbar ist und nur wenige Muskelzellen enthält.

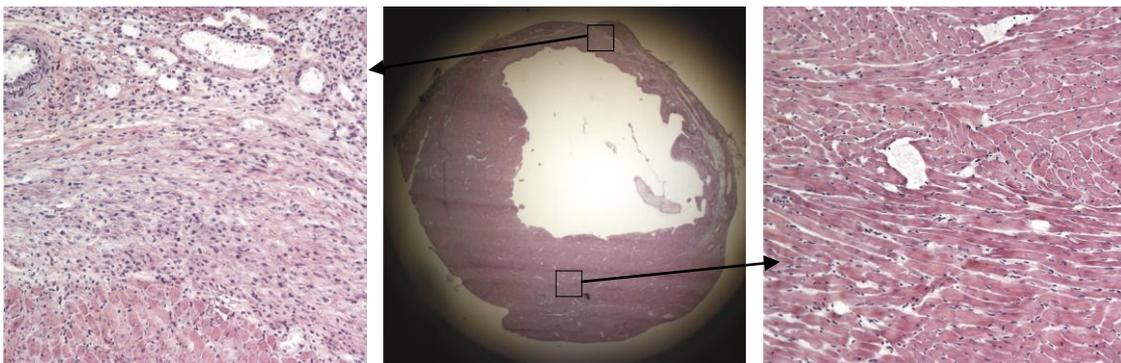
8.1.2 Ratte 2

Abb. 8.2: Mitte: Gesamtansicht der HE-Färbung eines Kryoschnittes von Ratte 2. links: Vergrößerung aus der Infarktzone. rechts: Vergrößerung aus dem Bereich gesunden Myokards.

Ratte 2 hat wie im Kryoschnitt sichtbar einen großen Myokardinfarkt auf der rechten, oberen Seite der Herzwand. Die infarzierte Ventrikelwand ist im Vergleich zur intakten Seite extrem verdünnt und von faserartiger Struktur (siehe Abb. 8.2). In den Vergrößerungs-

Ansichten erkennt man gut, dass die Infarktzone nicht mit Eosin anfärbbar ist und nur wenige Muskelzellen enthält.

8.1.3 Ratte 3

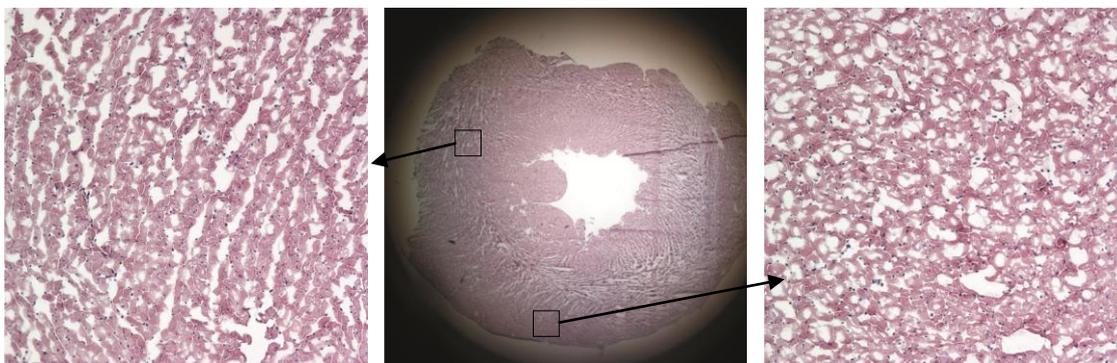


Abb. 8.3: Mitte: Gesamtansicht der HE-Färbung eines Kryoschnittes von Ratte 3. links und rechts: Vergrößerungen aus dem Bereich gesunden Myokards.

Bei Ratte 3 handelt es sich um ein Sham-Tier. Die HE-Färbung des Kryoschnittes zeigt folgerichtig, dass das Tier keinen Myokardinfarkt hat (siehe Abb. 8.3). Die Ventrikelwand ist gleichmäßig dick und besteht rundum aus gesunden Muskelzellen, die mit Eosin rot angefärbt werden.

8.1.4 Ratte 4

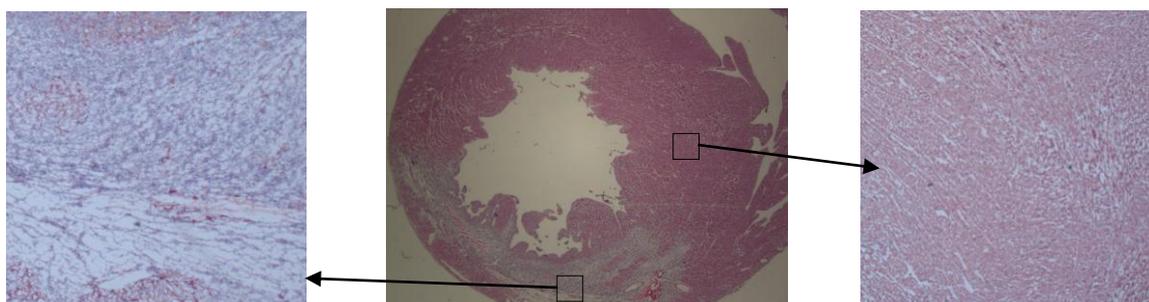


Abb. 8.4: Mitte: Gesamtansicht der HE-Färbung eines Kryoschnittes von Ratte 4. links: Vergrößerung aus der Infarktzone. rechts: Vergrößerung aus dem Bereich gesunden Myokards.

Ratte 4 hat wie im Kryoschnitt sichtbar einen mittelgroßen Myokardinfarkt am unteren Rand der Herzwand. Die infarzierte Ventrikelwand ist leicht verdünnt und von faserartiger Struktur

(siehe Abb. 8.4). In den Vergrößerungs-Ansichten erkennt man gut, dass die Infarktzone nicht mit Eosin anfärbbar ist und nur wenige Muskelzellen enthält.

8.1.5 Gesamtbetrachtung

Die HE-Färbung der Kryoschnitte bestätigt die Annahmen, die aufgrund der PET-Untersuchungen gemacht wurden. Die Ratten 3 und 7 sind Sham-Tiere und haben keinen Myokardinfarkt. Die Ratten 1 und 2 haben einen sehr großen, Ratte 4 einen mittelgroßen, die Ratten 5, 6, 8 und 9 eher kleinen Myokardinfarkt (hier nicht gezeigt). In allen Kryoschnitten infarzierter Herzen konnte die Infarktzone unter dem Mikroskop aufgrund ihrer Struktur und ihres Anfärbeverhaltens gegenüber Eosin lokalisiert werden.

8.2 Immunohistochemie

Immunohistochemie bezeichnet die Anfärbung von Gewebeproben mithilfe von Antikörpern. Antikörper sind Immunglobuline, eine Gruppe von Proteinen, die in 5 Klassen (Ig = Immunglobulin; IgA, IgD, IgE, IgG und IgM) unterteilt wird. Immunglobuline haben eine Y-förmige Struktur und besitzen an den beiden oberen Enden des Ys jeweils eine Antigen-Bindungsstelle.

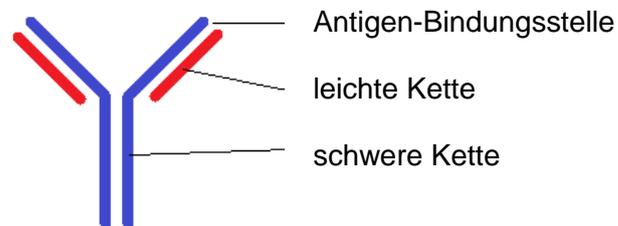


Abb. 8.5 Struktur eines Antikörpers.

Als Antigen kann prinzipiell jede beliebige Substanz dienen. Zur Gewinnung der Antikörper wird ein Tier mit dem Antigen immunisiert. Die durch die Immunisierung gebildeten Lymphozyten werden dem Tier entnommen und mit Myelomzellen fusioniert. Der dabei entstehende Klon eines Hybrid-Myeloms synthetisiert das gewünschte Immunglobulin. Die auf diese Art gewonnenen Immunglobuline werden monoklonale Antikörper genannt. Sie zeichnen sich durch ihre besonders starke und spezifische Bindung zum Antigen aus und können somit in zahlreichen biomedizinischen Untersuchungen verwendet werden.⁹¹

Bei der Antikörperfärbung dient ein bestimmter Faktor in der Gewebeprobe als Antigen, an den das mit einem Farbstoff beladene Immunglobulin bindet. So ist dieser bestimmte

Faktor farblich markiert und kann im Gewebe lokalisiert werden. Es können auch mehrere Faktoren mit unterschiedlichen Antikörpern/Farbstoffen gefärbt werden, so dass sie unterschieden werden können. Die Methode der Antikörperfärbung ist sehr selektiv.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Antikörper zum Einsatz kommen, deren Antigene Faktoren sind, die bei Angiogenese und Remodeling nach einem Myokardinfarkt aktiv sind. Die aus den Herzen der infarzierten Ratten erstellten Kryoschnitte werden mithilfe von Antikörpern auf ein bestimmtes Merkmal hin untersucht und so eingefärbt, dass dieses Merkmal sich farblich abhebt und unter dem Mikroskop erkennbar wird.

Im Detail sollen die Enzyme APN (CD13), das bei der Angiogenese nach einem Myokardinfarkt vermehrt exprimiert wird, mittels Antikörperfärbung in Kleintier-Herz-Gewebeschnitten sichtbar gemacht werden. Zusätzlich sollen auch noch die Proteine CD61, CD68, CD31 und P4H angefärbt werden.

8.2.1 Die LSAB-Methode

Die Avidin-Biotin-Methode ist eine vielfach angewendete Methode der Antikörperfärbung.¹¹⁸ Sie beruht auf der starken Bindung zwischen Streptavidin oder Avidin und dem Vitamin Biotin. Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*) und Avidin (aus Hühnerei) besitzen je vier Bindungsstellen für Biotin, das mit einem sekundären Antikörper konjugiert werden kann.¹¹⁹ Bei der „labeled streptavidin-biotin“(LSAB)-Methode bindet ein primärer Antikörper an das Antigen der Gewebeprobe. An den Primärantikörper bindet der an das Biotin gebundene sekundäre Antikörper. An die drei freien Bindungsstellen des Biotins binden sich nun Streptavidin-Peroxidase-Komplexe. Peroxidase ist ein Enzym, dessen Substrat der gewünschte Farbstoff ist. So werden pro Molekül Antigen drei Moleküle Farbstoff auf das Gewebe aufgebracht. Aufgrund des günstigen Antigen/Farbstoff-Verhältnisses ist diese Färbemethode sehr sensitiv.¹²⁰

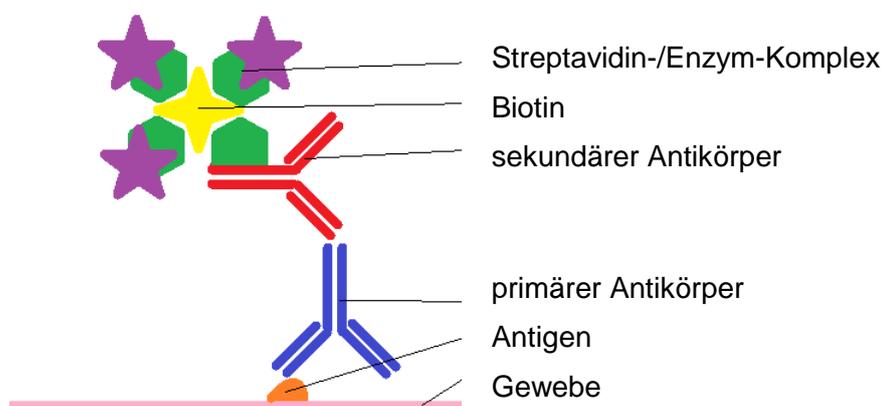


Abb. 8.6: LSAB-Methode.

8.2.2 APN

Wie schon in Kapitel 1.4.1 beschrieben, wird der Aminopeptidase N (APN) eine wichtige Rolle bei der Angiogenese zugeschrieben.²¹ Sie wird in hohem Maße in wachsenden Blutgefäßen und exklusiv von Endothelzellen exprimiert¹⁷ und nimmt vielseitige Aufgaben wahr, eingeschlossen deren Fortbewegung und Anhaftung.²¹ Die Protease APN ist identisch mit CD13. Sie ist ein membranständiges Ectoenzym, wird also auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert, sodass ihr aktives Zentrum in das Lumen (den Innenraum) des Gefäßes ragt, wo das Blut zirkuliert.²⁰

Im Kryoschnitt sind Blutgefäße als Oval-förmiger Querschnitt der röhrenförmigen Gebilde zu erkennen. Da Endothelzellen die Wände von Blutgefäßen auskleiden¹⁵, bilden sie die innere Wand dieser kreisförmigen Querschnitte und grenzen das Lumen vom umliegenden Gewebe ab. Aufgrund der angiogenetischen Vorgänge wird erwartet, besonders viele neu gebildete Blutgefäße im Bereich der Infarktzone zu finden.

CD13 wird mithilfe der LSAB-Methode und einem braunen Farbstoff angefärbt, die Zellkerne werden blau eingefärbt.

Die Bilder werden mithilfe des Mikroskops und der daran angeschlossenen Kamera aufgenommen. Aufgrund der großen Menge können hier nur exemplarisch einige Aufnahmen gezeigt werden.

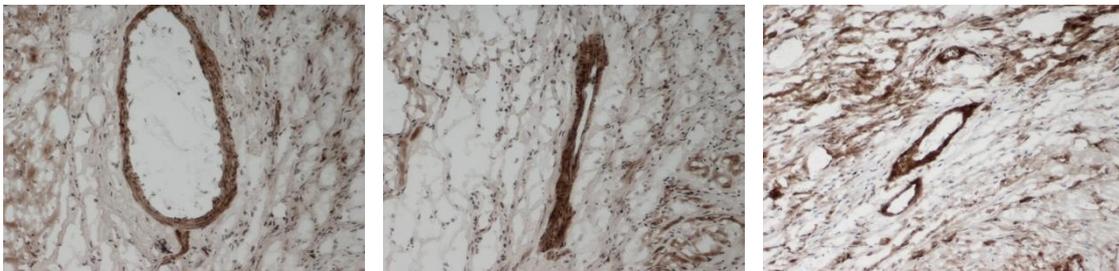


Abb. 8.7: Infarktzone Ratte 1.

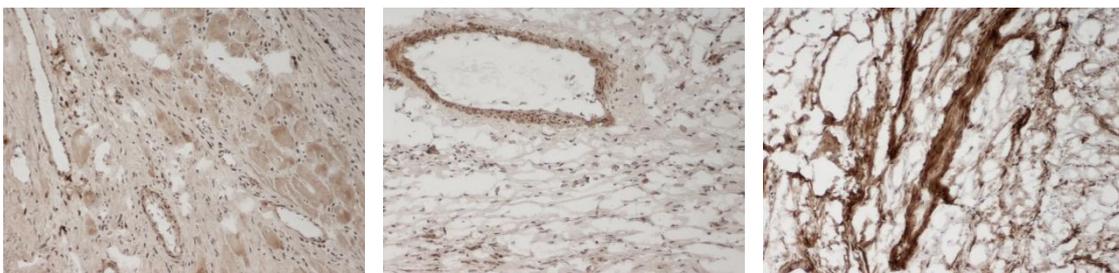


Abb. 8.8: Infarktzone Ratte 2.

Die Mikroskopieaufnahmen der Antikörperfärbungen von CD13 (Abb. 8.7 und 8.8) zeigen bei den Kryoschnitten der Infarkttiere, dass sich viele neue Blutgefäße innerhalb der Infarktzone gebildet haben. Die ovalen Gebilde, die einen Hohlraum umschließen, sind von unterschiedlicher Größe und Form. Je nachdem ob sie längs oder quer zur Wuchsrichtung angeschnitten wurden sind sie entweder länglich oder kreisförmig. Die Infarktzone zeigt eine faserartige Struktur, die mit wenigen Muskelzellen durchmischt ist. Sie weist eine Vielzahl an Zellkernen auf und ist nahezu farblos. Die geringfügig erkennbare hellbraun-gräuliche Farbe entspricht der natürlichen Färbung des Gewebes und ist schon vor dem Färbeprozess in gleichem Maße vorhanden. Die Blutgefäßwände, die Umrandung der Hohlräume, zeigen eine kräftige braune Farbe. Diese Färbung resultiert aus der Antikörperfärbung und bestätigt eine Expression des Antigens CD13 in den Endothelzellen der neu gebildeten Blutgefäße. Im Sham-Tier ist keine Infarktzone vorhanden und es tauchen kaum Blutgefäße auf, der gesamte Kryoschnitt ist einheitlich grau-bräunlich gefärbt.



Abb. 8.9: Kryoschnitt Ratte 3.

Die wenigen vorkommenden Blutgefäße im Herz des Sham-Tiers (im Mittel ein Blutgefäß pro Kryoschnitt, Aufnahme ganz links in Abb. 8.9) zeigen kein Anfärbeverhalten gegenüber der Antikörperfärbung für CD13. Es handelt sich bei diesen Blutgefäßen offenbar nicht um neu gebildete, die somit das Antigen CD13 nicht exprimieren.

8.2.3 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

Wie bereits in Kapitel 1.4.3 erwähnt, ist das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin in die Regulierung der Angiogenese involviert.⁵⁸ Es wird während dieses Prozesses überexprimiert und dient als Rezeptor für die MMP-2. Zusammen mit der Matrixmetalloprotease bildet es einen funktionellen Komplex auf der Zelloberfläche und ist an der Koordination der proteolytischen Aktivität beteiligt. Die Expression findet auf angiogenetisch aktivierten Endothelzellen statt.⁶¹ Die β_3 -Untereinheit bezeichnet man auch als CD61.¹²¹

Die Antikörperfärbung von CD61 erfolgt mithilfe der LSAB-Methode und einem braunen Farbstoff, Zellkerne sind blau dargestellt.

Da CD61 ebenso wie CD13 auf angiogenetisch aktiven Endothelzellen neu gebildeter Blutgefäße exprimiert wird, wird bei der Antikörperfärbung ebenso eine vermehrte Anfärbung der Infarktzone erwartet.

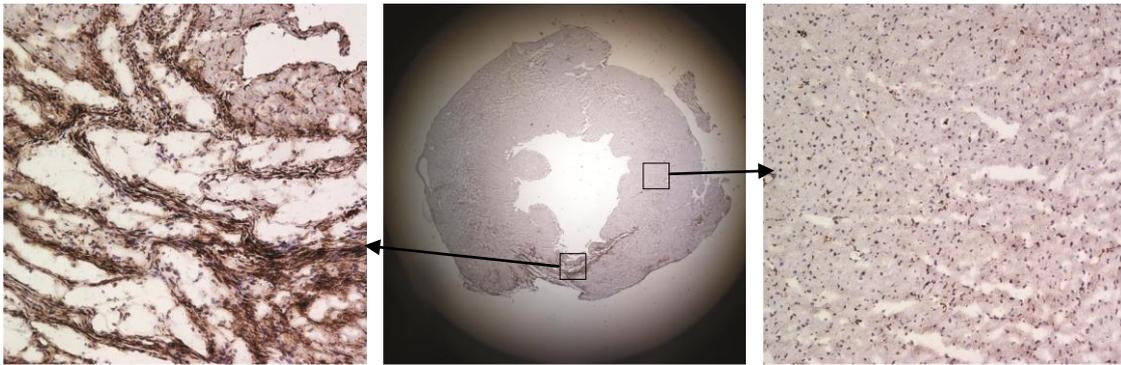


Abb. 8.10: CD61-Antikörperfärbung von Ratte 6. links: Infarktzone. Mitte: Totalansicht. rechts: Myokard.

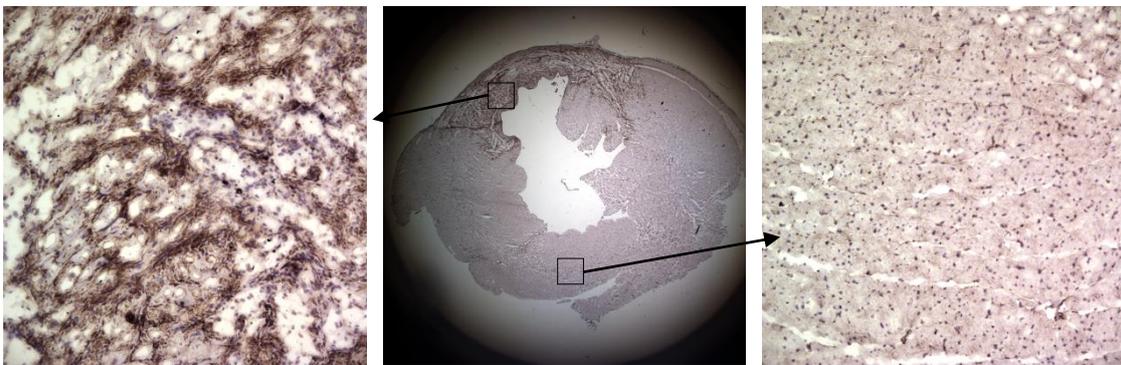


Abb. 8.11: CD61-Antikörperfärbung von Ratte 9. links: Infarktzone. Mitte: Totalansicht. rechts: Myokard.

Die Antikörperfärbung von CD61 zeigt bei den Kryoschnitten der Infarkttiere, dass die Infarktzone deutlich dunkler gefärbt ist als der gesunde Teil des Myokards (siehe Totalansichten, Mitte in Abb. 8.10 und 8.11). Wie die Aufnahmen der Infarktzone zeigen, beschränkt sich die Anfärbung nicht nur auf die Wände der Blutgefäße, sondern durchzieht das gesamte faserartige Gebilde der Infarktzone. Diese ist stark braun gefärbt und bestätigt somit die Expression des Integrins $\alpha_v\beta_3$ in deren Endothelzellen.

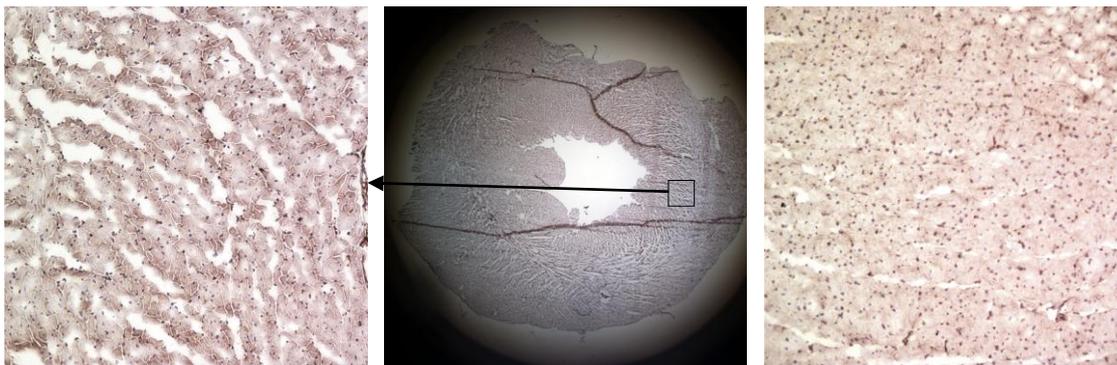


Abb. 8.12: CD61-Antikörperfärbung der Sham-Tiere. links: Myokard Ratte 3. Mitte: Totalansicht Ratte 3. rechts: Myokard Ratte 7.

Die Kryoschnitte der Sham-Tiere 3 und 7 werden bei der Antikörperfärbung von CD61 nicht angefärbt, da sie keine neu gebildeten Blutgefäße besitzen (Abb. 8.12). Die dunklen Streifen in der Totalansicht kommen von Überlappungen des Gewebes während der Schnitt-Präparation.

8.2.4 CD31

Als Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie ist CD31 ein transmembranes Glycoprotein mit einer Masse von 130 kDa, das auch unter dem Namen PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) bekannt ist. Es wird auf der Oberfläche von Blutplättchen, Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert und ist beteiligt an der interzellulären Bindung der Endothelzellen. Ihm wird eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung von Endothelzellen untereinander während der Angiogenese zugeschrieben. Es wird bei einer Vielzahl von Antikörperfärbungen als Endothelzellenmarker verwendet.¹²²

Die Antikörperfärbung von CD31 wird mithilfe der LSAB-Methode und einem braunen Farbstoff durchgeführt, Zellkerne werden blau eingefärbt.

Da CD31 auf allen Endothelzellen exprimiert wird, sollten bei der Antikörperfärbung die Innenwände aller Blutgefäße angefärbt werden.

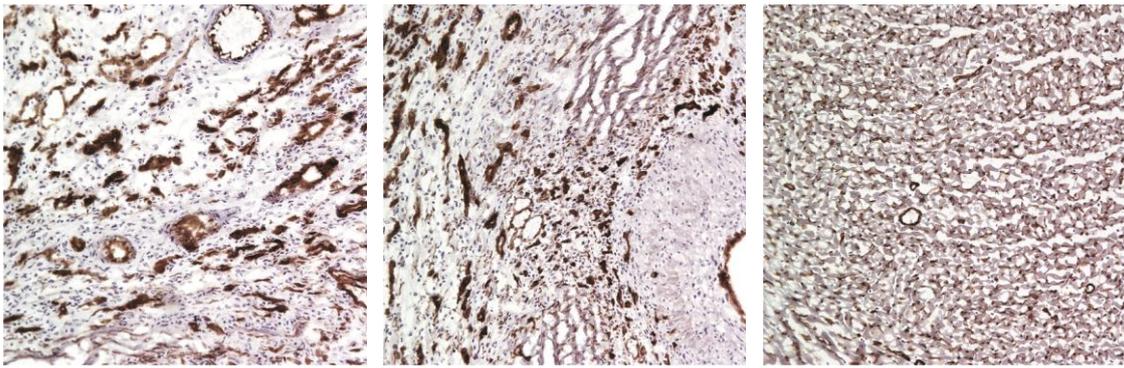


Abb. 8.13: CD31-Antikörperfärbung von Ratte 8. links und Mitte: Infarktzone. rechts: Myokard.

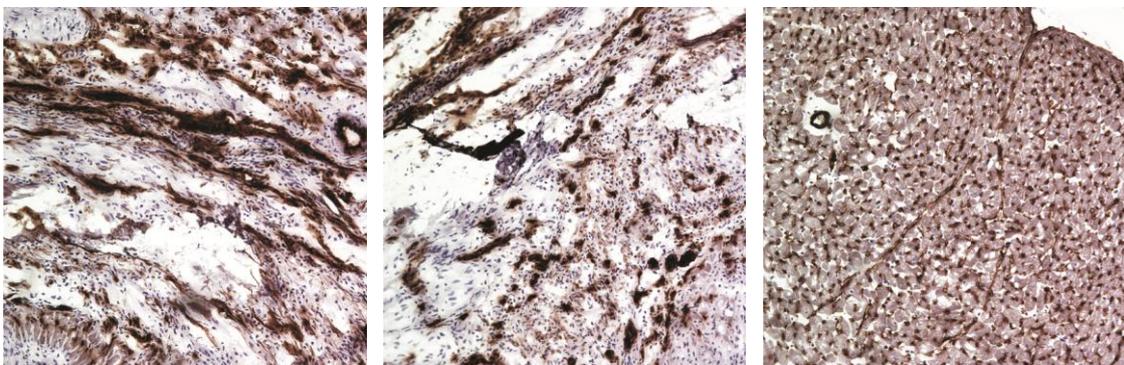


Abb. 8.14: CD31-Antikörperfärbung von Ratte 9. links und Mitte: Infarktzone. rechts: Myokard.

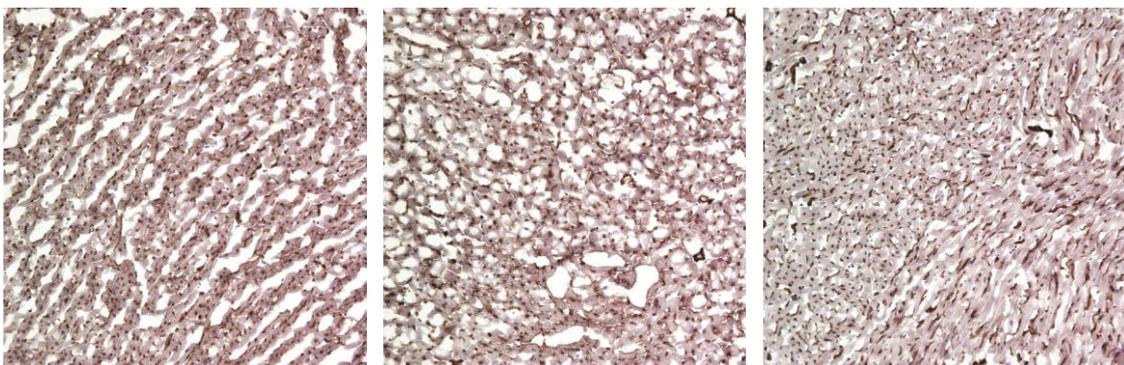


Abb. 8.15: CD31-Antikörperfärbung der Sham-Tiere. links und Mitte: Ratte 3. rechts: Ratte 7.

Da die Bereiche gesunden Myokards komplett mit ausgereiften Mikrokapillaren durchwachsen sind, zeigen sie ebenso wie die Gefäßwände aller neu gebildeter Blutgefäße in den Infarktzone starkes Anfärbeverhalten gegenüber der Antikörperfärbung von CD31, da sie allesamt Endothelzellen, sei es angiogenetisch aktive oder inaktive, enthalten (links in Abb. 8.13 und 8.14). Dies bestätigen auch die Aufnahmen der Sham-Tiere, die ebenso wie die Bereiche gesunden Myokards der Infarkt-Tiere kräftig gefärbt sind (Abb. 8.15). Der

Vergleich mit den Antikörperfärbungen mit CD13 und CD61 (Abb. 8.9 und 8.12) bestätigt, dass CD13 und CD61 nur auf Endothelzellen neu gebildeter Blutgefäße exprimiert werden, da bei diesen Färbungen die Kapillaren des gesunden Myokards nicht angefärbt werden.

8.2.5 Prolyl-4-Hydroxylase

Prolyl-4-Hydroxylase (P4H) ist ein Transmembranprotein, das unter anderem auch auf Fibroblasten exprimiert wird. Es katalysiert die Synthese von (2*S*,4*R*)-4-Hydroxyprolin (Hyp), das erstmals in Gelatin-Hydrosylaten gefunden wurde. Seine physiologische Funktion ist die Stabilisierung der tripel-helikalen Sekundärstruktur von Kollagen.¹²³ P4H spielt bei der Invasion von Fibroblasten und der damit einhergehenden strukturellen Veränderung der extrazellulären Matrix bei Remodeling-Prozessen eine Rolle.

Das Protein P4H sollte in Antikörperfärbungen von Kryoschnitten von infarzierten Herzgeweben in der Infarktzone zu finden sein, wo Remodeling-Prozesse stattfinden.

P4H wird mithilfe der LSAB-Methode gefärbt, P4H erscheint dabei braun, die Zellkerne blau.

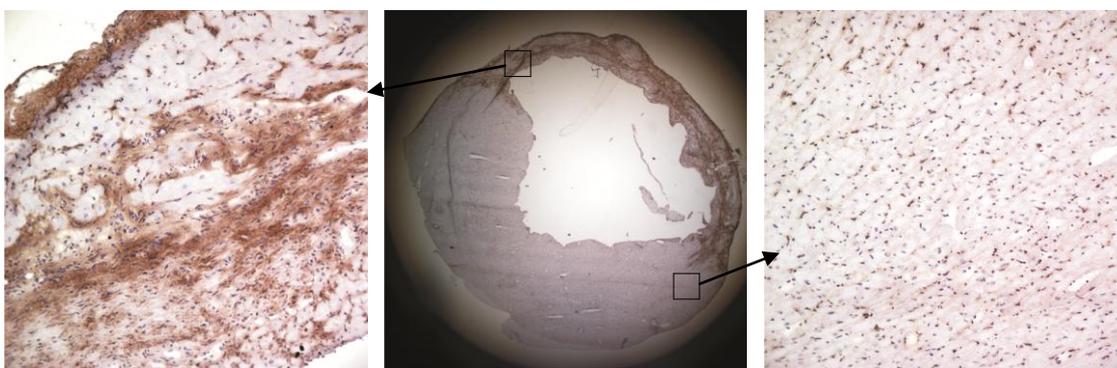


Abb. 8.16: P4H-Antikörperfärbung von Ratte 2. links: Infarktzone. Mitte: Totalansicht. rechts: Myokard.

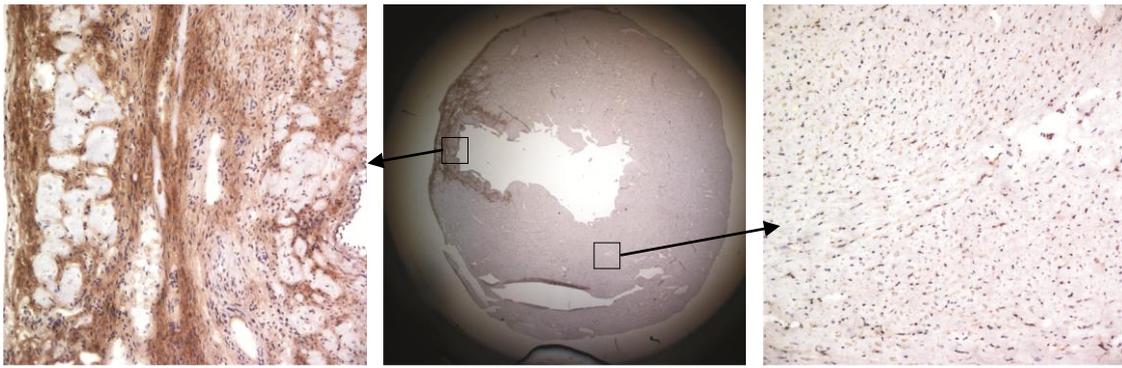


Abb. 8.17: P4H-Antikörperfärbung von Ratte 5. links: Infarktzone. Mitte: Totalansicht. rechts: Myokard.

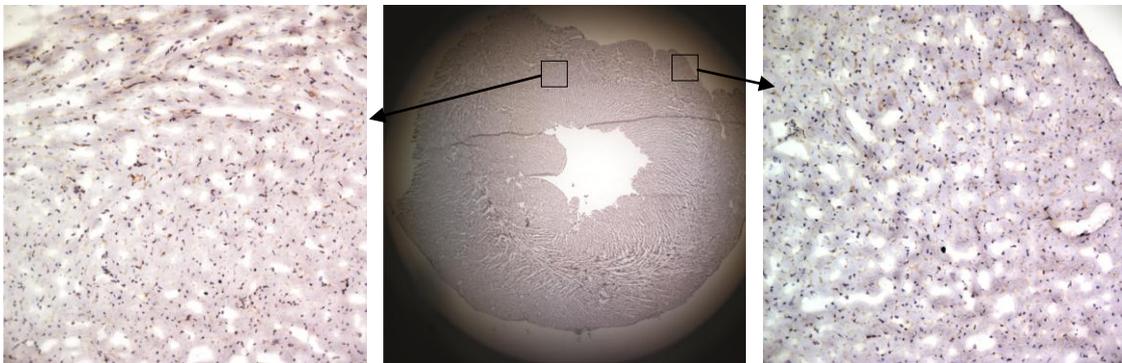


Abb. 8.18: P4H-Antikörperfärbung von Ratte 3. Mitte: Totalansicht. links und rechts: Myokard.

Die Antikörperfärbung von P4H zeigt, dass das Protein nur im Bereich der Infarktzone, wo die Remodeling-Prozesse stattfinden, exprimiert wird. Bereiche gesunden Myokards in Infarkt- und Sham-Tieren werden nicht braun gefärbt und enthalten folglich kein P4H.

8.2.6 CD13-CD31 Doppelfärbung

In einer Doppelfärbung von CD13 und CD31 soll der Unterschied zwischen adulten Endothelzellen, die nur CD31 exprimieren, und angiogenetisch aktiven Endothelzellen, die beide Faktoren exprimieren, gezeigt werden.

Die Färbung wird nach der LSAB-Methode durchgeführt, CD13 ist braun, CD31 grün und die Zellkerne sind blau angefärbt.

8 GEWEBEFÄRBUNGEN

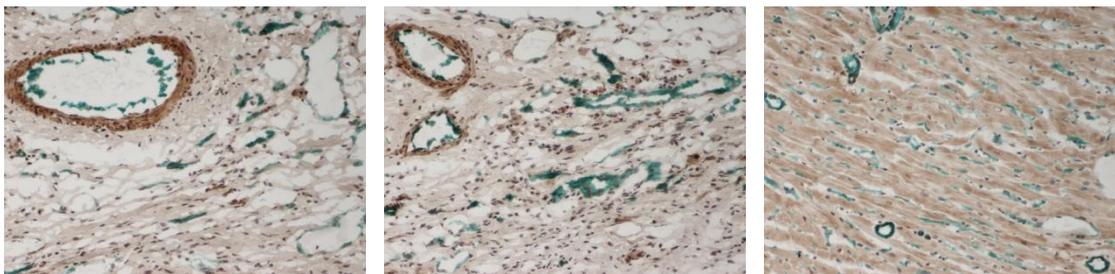


Abb. 8.19: CD13-CD31-Doppelfärbung Ratte 2. links und Mitte: Infarktzone. rechts: Myokard.

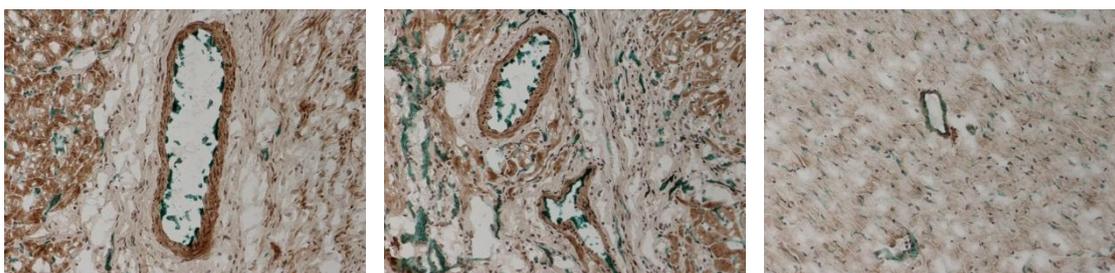
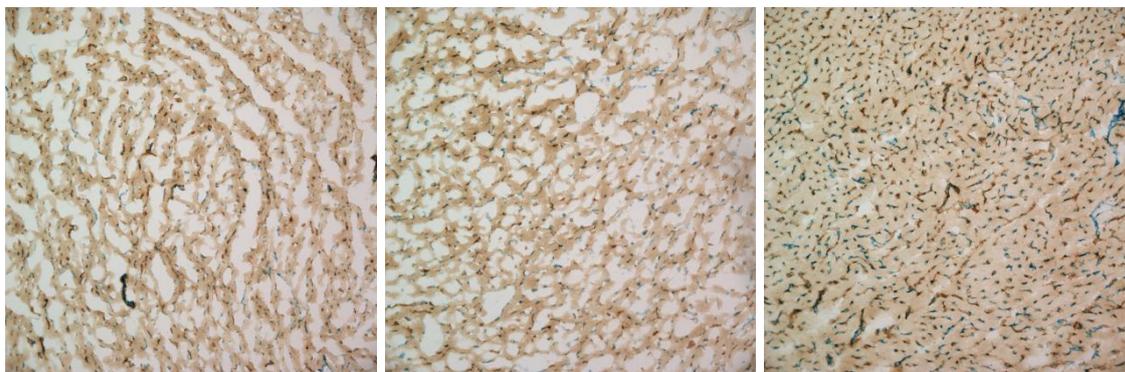


Abb. 8.20: CD13-CD31-Doppelfärbung Ratte 1. links und Mitte: Infarktzone. rechts: Myokard.



**Abb. 8.21: CD13-CD31-Doppelfärbung der Sham-Tiere. links und Mitte: Ratte 3.
rechts: Ratte 7.**

Die Aufnahmen zeigen, dass die neu gebildeten Blutgefäße innerhalb der Infarktzone braun und grün umrandet sind, d.h., dass deren angiogenetisch aktive Endothelzellen CD13 und CD31 exprimieren, wohingegen die großen Gefäße im Bereich gesunden Myokards der Infarkttiere nur grüne Färbung zeigen, d.h. sie enthalten ausgereifte Endothelzellen, die nur CD31 exprimieren. Bei Ratte 2 (Abb. 8.19, Mitte) ist der Unterschied zwischen einem neu gebildeten Blutgefäß, das braun und grün gefärbt ist und adulten Blutgefäßen, die nur grün gefärbt sind sehr gut zu erkennen. Die gesunden Myokardgewebe der Sham-Tiere sind komplett mit grünen Pünktchen durchzogen, sie enthalten also viele reife Mikrokapillaren.

8.2.7 CD13-P4H Doppelfärbung

Die Doppelfärbung von CD13 und P4H soll zeigen, ob das Enzym CD13 tatsächlich nur auf Endothelzellen oder nicht auch auf Fibroblasten exprimiert wird. Eine Expression auf Fibroblasten wird dann bestätigt, wenn die beiden Farben genau auf denselben Zellen des Kryoschnitts zu finden sind.

Die Färbung erfolgt nach der LSAB-Methode, CD13 wird dabei braun, P4H grün gefärbt, die Zellkerne erscheinen blau.

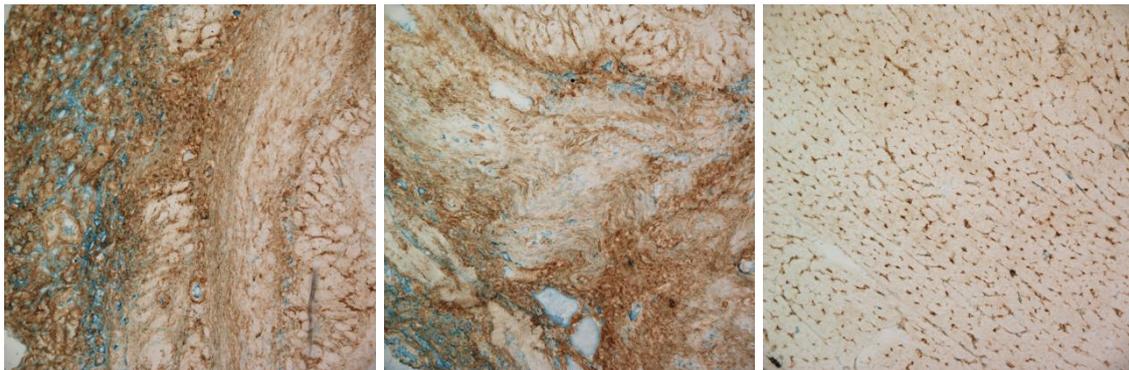


Abb. 8.22: CD13-P4H-Doppelfärbung Ratte 1. links und Mitte: Infarktzone. rechts: Myokard.

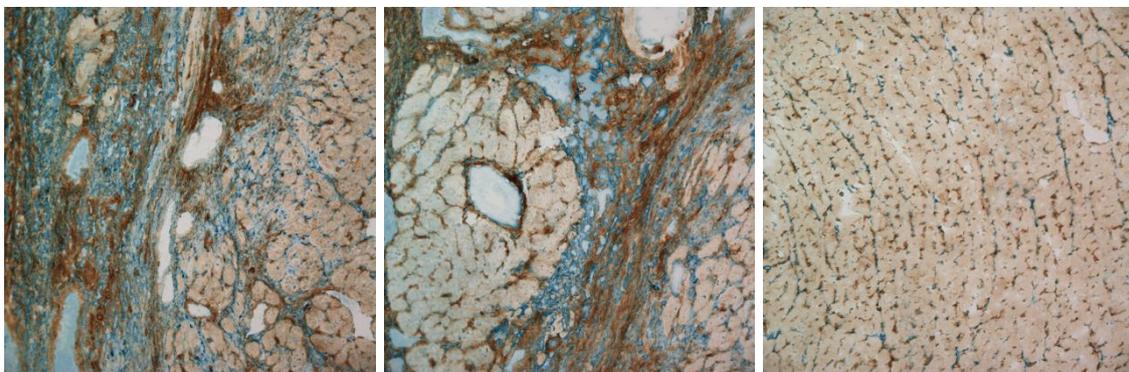


Abb. 8.23: CD13-P4H-Doppelfärbung Ratte 2. links und Mitte: Infarktzone. rechts: Myokard.

Die braun und grün angefärbten Merkmale befinden sich allesamt in den Infarktzone, die Bereiche gesunden Myokards sind so gut wie nicht angefärbt. Auf den Mikroskopieaufnahmen erkennt man, dass braun und grün gefärbte Zellen zwar kräftig durchmischt sind, aber ob eine Anfärbung derselben Zellen stattgefunden hat, ist nicht eindeutig. Eine Expression von CD13 auf Fibroblasten ist somit nicht bestätigt.

8.2.8 CD13-CD68 Doppelfärbung

CD68 ist ein 110 kDa transmembranes Glycoprotein, das in hohem Maße auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Makrophagen spielen bei der Angiogenese eine wichtige Rolle, indem sie die Produktion des Wachstumsfaktors „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) erhöhen.¹²⁴ Der Antikörper CD68 kann deshalb als Marker für Makrophagen und somit auch für angiogenetische Vorgänge eingesetzt werden.

In einer Doppelfärbung von CD13 und CD68 soll gezeigt werden, dass beide Proteine in angiogenetisch aktiven Bereichen exprimiert werden.

Die Färbung erfolgt nach der LSAB-Methode, dabei wird CD13 hellbraun, CD68 grün und die Zellkerne werden blau angefärbt.

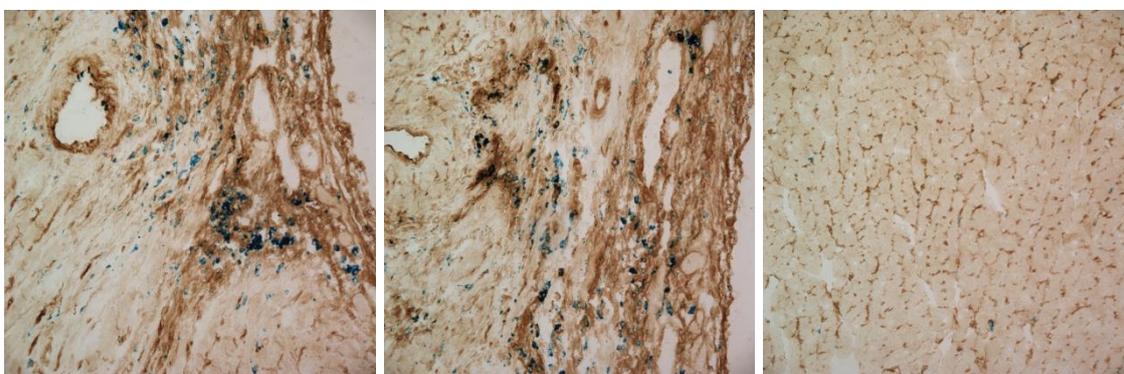


Abb. 8.24: CD13-CD68-Doppelfärbung Ratte 5. links und Mitte: Infarktzone. rechts: Myokard.

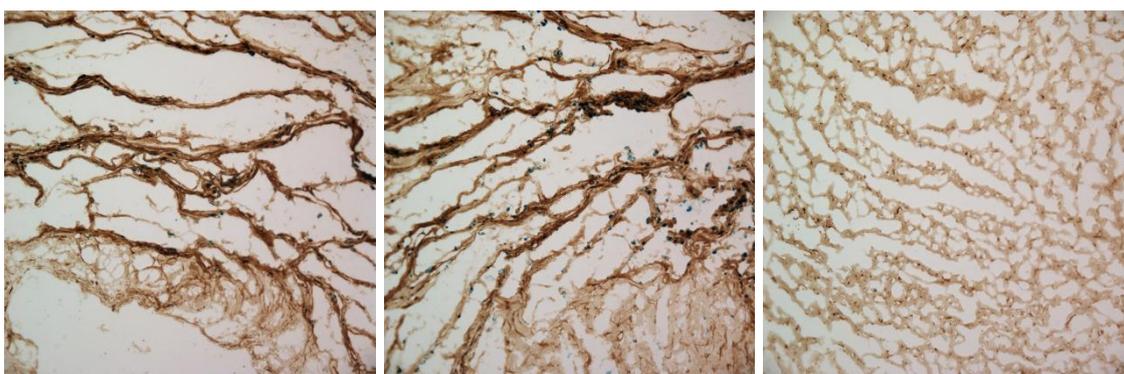


Abb. 8.25: CD13-CD68-Doppelfärbung Ratte 6. links und Mitte: Infarktzone. rechts: Myokard.

Die Doppelfärbung von CD13 und CD68 zeigt, dass CD13 wie auch bei der Einzelfärbung (Kapitel 8.2.2) nur in neu gebildeten Blutgefäßen innerhalb der Infarktzone exprimiert wird (Abb. 8.25 und 8.26). Bereiche gesunden Myokards in den Sham- und Infarkt-Tieren zeigen keine Anfärbung und somit auch keine Expression von CD13. Das von Makrophagen exprimierte Antigen CD68 ist zwar in sehr geringem Maße (siehe Abb. 8.24, links und

Mitte), aber ebenfalls nur in angiogenetisch aktiven Bereichen der Infarktzone zu finden. Dies bestätigt die Beteiligung von Makrophagen bei der Angiogenese.

8.3 Résumé Kapitel 8

Es wurden Kryoschnitte aus den Herzen der mittels PET untersuchten Ischämie/Reperfusionstieren erstellt. Mittels der LSAB-Methode wurden verschiedene Färbungen durchgeführt, um das Vorhandensein verschiedener Epitope im angiogenetisch aktiven Gewebe immunohistochemisch nachzuweisen. Dabei wurde die Expression von APN (CD13), Integrin $\alpha_v\beta_3$ (CD61), CD31 und P4H bestätigt. Die Doppelfärbung von CD13 und CD31 zeigte, dass CD13 auf Endothelzellen frisch gebildeter Blutgefäße innerhalb der ischämischen Zone des Myokards vorhanden ist, wobei CD31 auf adulten Endothelzellen exprimiert wird. Die Doppelfärbung von CD13 und P4H konnte eine Expression von APN auf Fibroblasten nicht bestätigen. Die Doppelfärbung von CD13 und CD68 bestätigte eine Beteiligung von Makrophagen am Angiogenese-/Remodelingprozess nach Myokardinfarkt.

9 Zusammenfassung

Nach einem Myokardinfarkt setzen Wundheilungsprozesse ein, um die Durchblutung wieder herzustellen und nekrotisches Muskelgewebe durch Narbengewebe zu ersetzen. Die Einsprossung neuer Kapillaren vom bestehenden Gefäßnetz aus wird als Angiogenese bezeichnet und geht mit der Expression einer Reihe proteolytisch aktiver Enzyme einher. Beim kardialen Remodeling werden abgestorbene Myozyten mithilfe der Einwanderung von Fibroblasten durch Binde- oder Stützgewebe ersetzt. Bei diesem Prozess sind ebenfalls Proteasen vermehrt exprimiert. Im Rahmen der Angiogenese wird der Aminopeptidase N (APN) eine entscheidende Rolle bei der Einsprossung von Endothelzellen zugesprochen, im Rahmen des Remodelings übernimmt das Fibroblasten-Aktivierungs-Protein α (FAP) Aufgaben bei der Proliferation und Fortbewegung von Fibroblasten.

Durch ihre erhöhte Expression bei den Wundheilungs- und Remodelingsprozessen nach einem Herzinfarkt stellen die Aminopeptidase APN und die Serinproteasen FAP geeignete Angriffspunkte (molekulare Targets) für die Diagnostik und Therapie nach einem Myokardinfarkt dar. Die Diagnostik des Herzens mittels nuklearmedizinischer Methoden befindet sich seit einigen Jahren im Aufschwung. Besonders die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ermöglicht es, physiologische Vorgänge auf molekularer Ebene zu visualisieren. Durch PET ist es möglich, über eine mit einem Positronenstrahler markierte spezifische Sonde biochemische Prozesse in Echtzeit im zu untersuchenden Organismus darzustellen und zu quantifizieren. Diese als Radiopharmakon oder Tracer bezeichnete biochemische Sonde richtet sich nach einem organ- bzw. krankheitsspezifischen Target und kann im Falle eines Enzyms dessen radioaktiv markiertes Substrat oder Inhibitor sein.

Ziel dieser Arbeit war es, spezifische APN- und FAP-affine Tracer für die nicht-invasive Untersuchung der APN- und FAP-Expression im Herzen mittels PET zu entwickeln und dadurch die Rolle von APN und FAP bei Heilungs- und Remodelingsprozessen nach einem Myokardinfarkt besser verstehen bzw. klären zu können. Um die Protease APN mittels PET zu untersuchen, wurden das peptidische Substrat NOTA-NGR (Komplexbildner + cyclisches Peptid inkl. Asparagin-Glycin-Arginin) mit dem Positronen-emittierenden Nuklid Gallium-68 (^{68}Ga) markiert (Abb. 9.1).

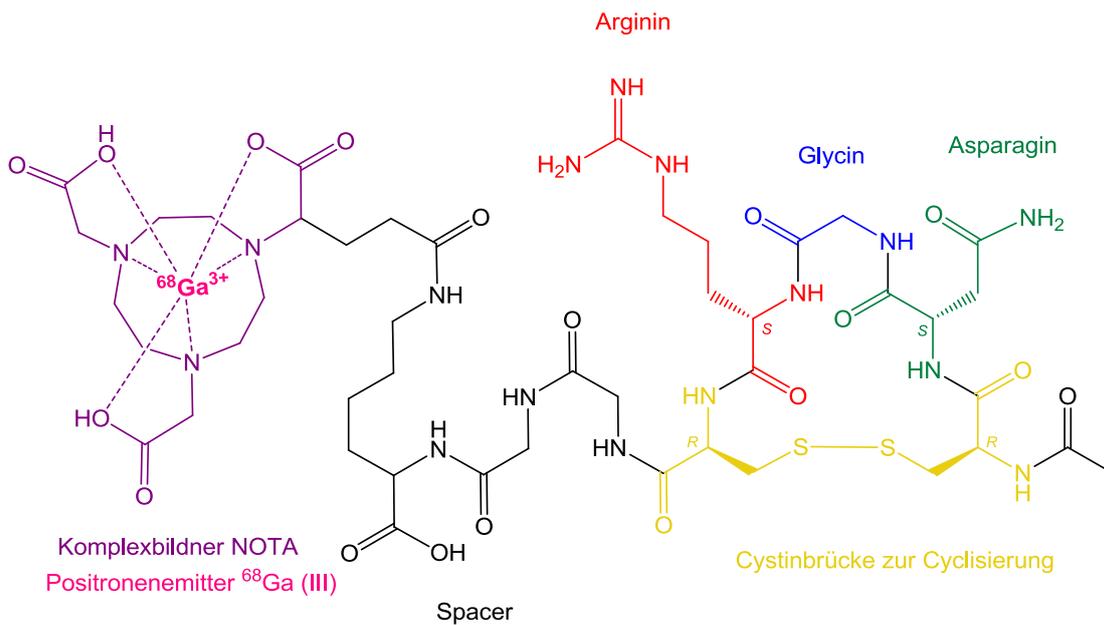


Abb. 9.1: Mit ^{68}Ga (III) markiertes NOTA-NGR (^{68}Ga -NOTA-NGR).

Für die Markierung des cyclischen Peptids wurden im Rahmen dieser Arbeit Synthese, Isolierung und Formulierung entwickelt. Das Potential von ^{68}Ga -NOTA-NGR als PET-Tracer wurde *in vivo* am Infarktmodell mittels Kleintier-PET bewertet und mit ^{68}Ga -NOTA-RGD, einem zur Visualisierung des neo-angiogenetischen $\alpha_v\beta_3$ -Integrins etablierten Tracer, verglichen. Untersuchungen an Modellen der Ischämie/Reperfusion an der Ratte ergaben, dass das neue Radiopharmakon ^{68}Ga -NOTA-NGR zur Bildgebung von APN mittels PET geeignet ist. ^{68}Ga -NOTA-NGR-PET zeigte eine erhöhte ^{68}Ga -NOTA-NGR-Aufnahme im Bereich des Myokardinfarktes im Sinne einer vermehrten Angiogenese. Die Aufnahme des neuen Tracers in infarzierten Arealen war quantitativ höher als in der Untersuchung mit ^{68}Ga -NOTA-RGD. In Autoradiographie-Experimenten wurde ^{68}Ga -NOTA-NGR *ex vivo* untersucht. Kryoschnitte der Herzen von mit dem neuen Tracer behandelten Ratten zeigten eine deutlich erhöhte Akkumulation von ^{68}Ga -NOTA-NGR im ischämischen Bereich im Vergleich zum gesunden Myokard. Der Nachweis der unterschiedlichen Bereiche des Herzens erfolgte mit HE-Färbung.

Die Expression von APN wurde immunohistochemisch mittels APN-spezifischer Antikörper bestätigt. Zur Abgrenzung und zum Vergleich wurden ebenso das Integrin $\alpha_v\beta_3$ und einige andere an der Angiogenese beteiligte Faktoren untersucht. APN stellte sich auch hier als geeignetes Target zum Nachweis der Angiogenese heraus.

Ergebnisse dieser ersten Untersuchungen deuten darauf hin, dass ^{68}Ga -NOTA-NGR einen vielversprechenden neuen PET-Tracer für die Visualisierung und Quantifizierung der APN-Expression im Rahmen der Neo-Angiogenese nach einem Myokardinfarkt darstellt.

Um die Protease FAP mittels PET zu untersuchen, wurden eine Reihe peptidomimetischer Inhibitoren, die die Erkennungssequenz Glycin-Prolin mit einer Carbonitril-Gruppe als elektrophiler Einheit zur kovalent-reversiblen Reaktion mit dem Enzym enthalten, entwickelt. Ausgehend vom *N*-Acetylglycin-pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril als Leitstruktur, erfolgten Modifizierungen über einen Benzoylrest am *N*-Terminus (siehe Abb. 9.2).

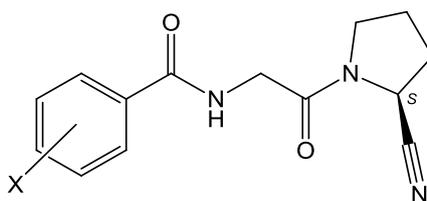
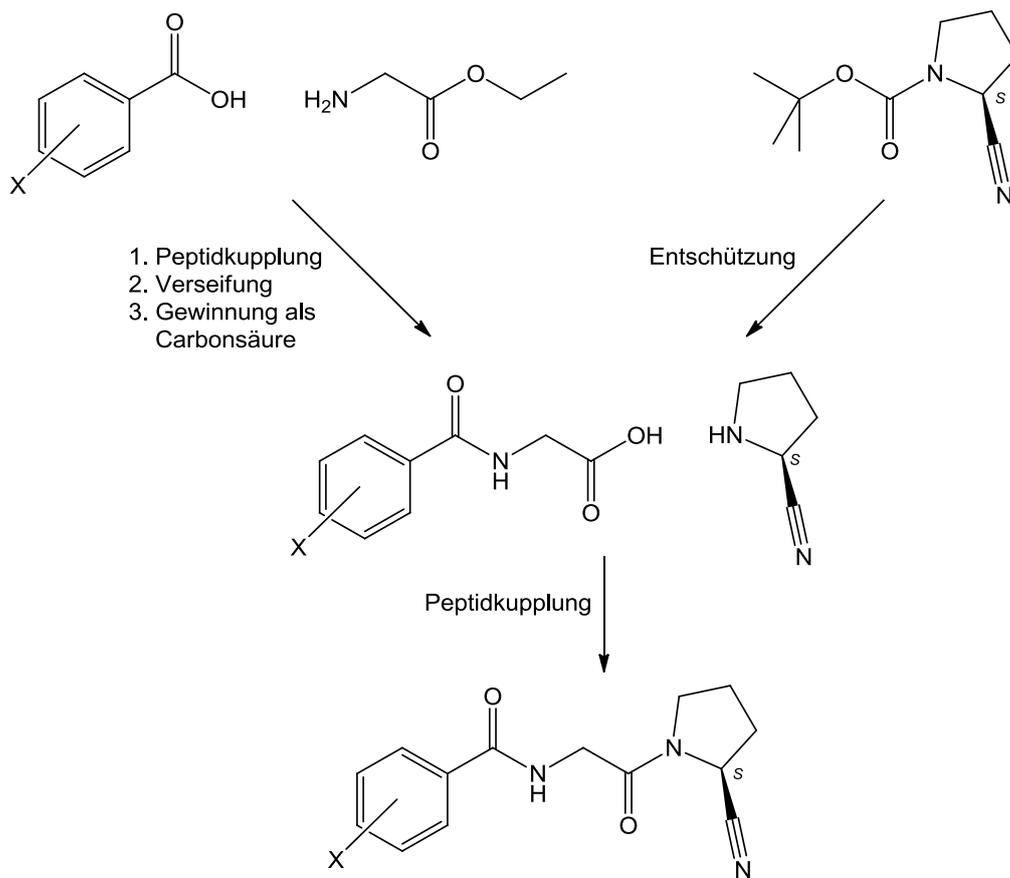


Abb. 9.2: Grundstruktur der FAP-Inhibitoren. X = Substituent.

Die angestrebten Inhibitoren und Vorstufen zur Radiomarkierung wurden ausgehend von verschiedenen substituierten Benzoesäuren dargestellt (Schema 9.1). Im ersten Syntheseschritt wurde die substituierte Benzoesäure mit Glycinethylester gekuppelt. Anschließend wurde die Ethylschutzgruppe mittels Verseifung entfernt und die entsprechende Hippursäure gewonnen. Im zweiten Schritt der Synthese wurde die Boc-Schutzgruppe von Pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril entfernt und stand so für die Peptidkupplung mit den Hippursäuren zur Verfügung.



Schema 9.1: Synthese der FAP-Inhibitoren.

9 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden folgende substituierte Hippursäurepyrrolidin-(2S)-carbonitrile synthetisiert:

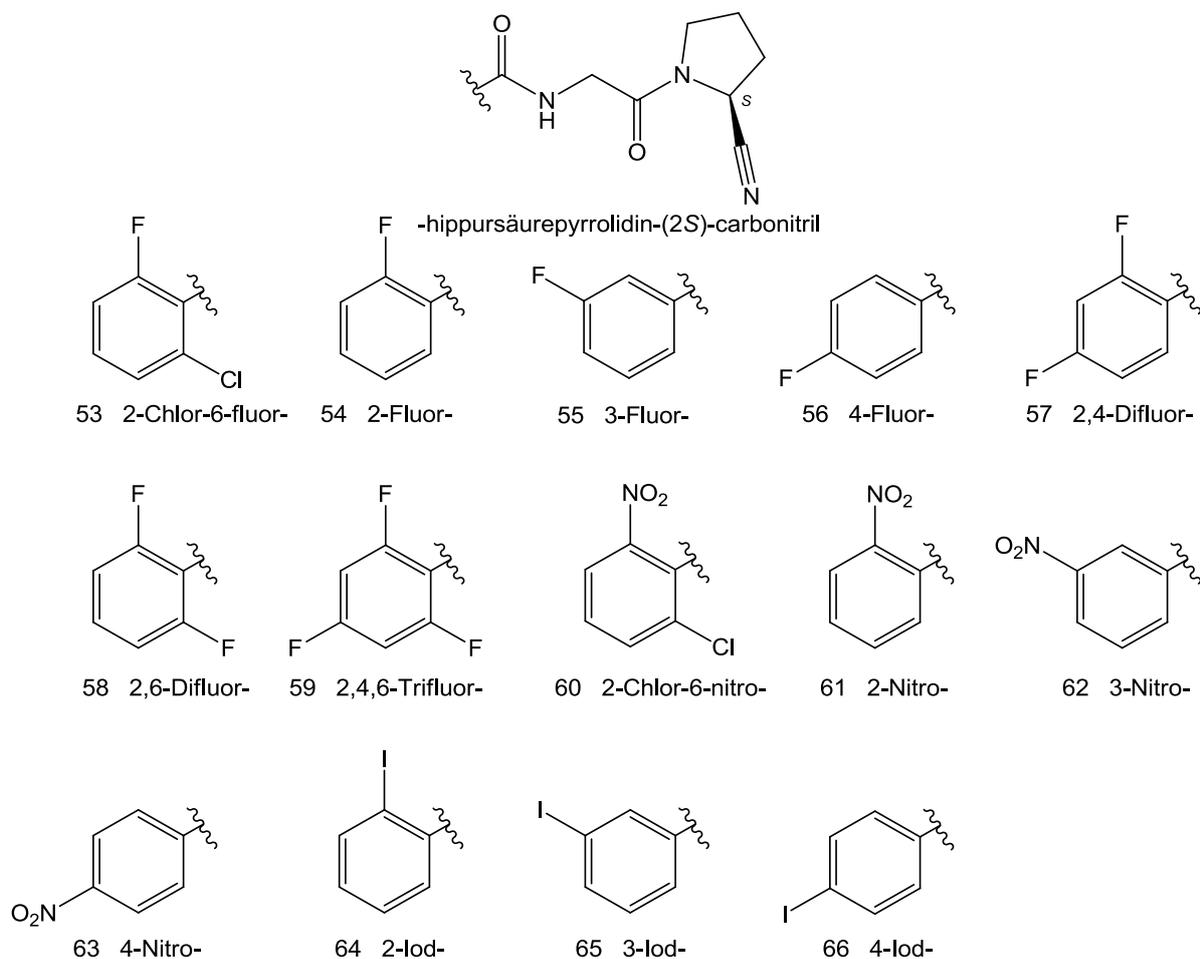


Abb. 9.3: Synthetisierte substituierte Hippursäurepyrrolidin-(2S)-carbonitrile.

Zusätzlich wurden noch bereits bekannte Inhibitoren synthetisiert (Abb. 9.4), die zum Vergleich in den Enzymassays dienen.

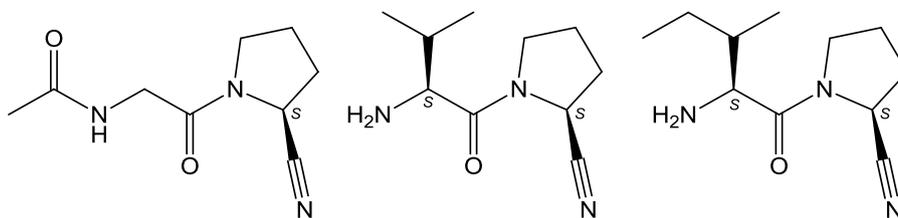


Abb. 9.4: 1-(*N*-Acetylglycin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (67), 1-(*S*)-Valin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (70), 1-(*S*)-Isoleucin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (71).

Zur Evaluierung der enzymhemmenden Wirkung wurden die neuen Inhibitoren an FAP getestet und in Vergleich zur eng verwandten Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) gesetzt, um

die Selektivität zu überprüfen. Die Verbindungen (**55**), (**64**) und (**66**) zeigten die beste inhibitorische Wirkung gegenüber FAP und außerdem Selektivität gegenüber DPP IV. Mit 2.37 – 9.87 μM besitzt keine der entwickelten Verbindungen die erforderliche hohe Affinität in nanomolarem Bereich für einen potentiellen Tracer zur *in-vivo*-Visualisierung einer Enzymexpression mit PET (Abb. 9.5).

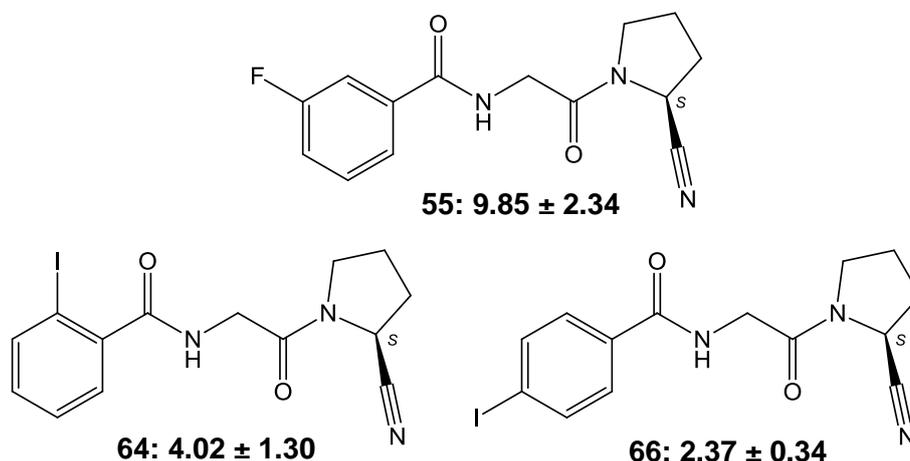


Abb. 9.5: Die besten FAP-Inhibitoren inkl. K_d -Werte in μM .

Um die Inhibitoren mit der besten Hemmung der FAP zum PET-Tracer weiterentwickeln zu können, mussten sie zunächst mit einem Positronenemitter markiert werden. Die Markierung von Verbindung (**64**) und (**66**) erfolgte über Isotopenaustausch, bei dem nicht-radioaktives Iod am aromatischen Ring des Precursors durch das radioaktive Iod-124 (^{124}I) substituiert wurde. Es konnten dadurch die radioiodierten Verbindungen 1-(2-[^{124}I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**75**) und 1-(4-[^{124}I]iod-hippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**76**) synthetisiert werden (Abb. 9.6). Die Darstellung eines entsprechenden radiofluorierten Analogons von Verbindung (**55**) wurde aufgrund der relativ niedrigen Affinität für FAP im Rahmen dieser Arbeit nicht unternommen.

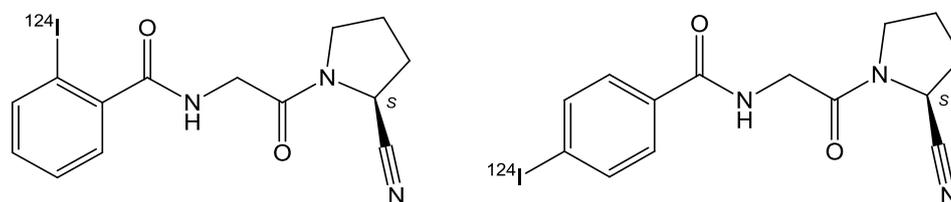


Abb. 9.6: 1-(2-[^{124}I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**75**) und 1-(4-[^{124}I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**76**).

Trotz der relativ niedrigen Affinität für FAP wurde das neue 1-(2-[^{124}I]iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**75**) in Ratten mit Ischämie/Reperfusion mittels Kleintier-PET

getestet. Die Lage der ischämischen Zone wurde im Anschluss durch HE-Färbung bestimmt. *In vivo* zeigte sich eine nur sehr geringe Aufnahme des Radiopharmakons in der ischämischen Zone des Myokards. Damit ist 1-(2-[¹²⁴I]Iod-hippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**75**) kein für den gewünschten Zweck geeigneter PET-Tracer. Nichtsdestotrotz war der Ansatz richtig und es wurde zum ersten Mal ein PET-Tracer dieser Art zur Untersuchung des FAP im Myokardinfarkt hergestellt. Auf der Grundlage dieser Arbeit sollen in nachfolgender Forschungsarbeit weitere FAP-affine Tracer entwickelt werden, um FAP im Rahmen der Wundheilung und des Remodelings nach einem Myokardinfarkt *in vivo* mittels PET darstellen und quantifizieren zu können.

10 Summary

After a myocardial infarction, processes of wound healing are initiated in order to regain perfusion and to replace necrotic muscle tissue with soft tissue. The sprouting of new capillaries from the vasculature is called angiogenesis and goes hand in hand with the expression of several preteolytic enzymes. Cardiac remodeling is the process of replacement of necrotic myocytes with soft tissue through invasion of fibroblasts. For this cause, also a lot of proteases are activated. During angiogenesis, aminopeptidase N (APN) plays an important role in the sprouting of endothelial cells. During the process of cardiac remodeling, fibroblast activation protein α (FAP) is involved in proliferation and migration of cardiac fibroblasts.

Due to their increased expression during woundhealing and remodeling processes after myocardial infarction, the aminopeptidase APN and the serine protease FAP have been identified as potential molecular targets for diagnosis and therapy after myocardial infarction. Diagnosis of the heart by nuclear imaging techniques is a well established method in clinical cardiology. Especially, positron emission tomography (PET) provides information on perfusion, function and metabolism at molecular level. PET allows visualization of biochemical processes *in vivo* using specific radiotracers in real time. This imaging probe is labeled with a positron emitting radionuclide and is called radiopharmaceutical or tracer. In case of an enzyme, the radiopharmaceutical might for example be a labeled substrate of the enzyme.

To visualize the protease APN with PET, the peptidic substrate NOTA-NGR was labelled by the positron emitting nuclide Gallium-68 (^{68}Ga) (fig. 10.1).

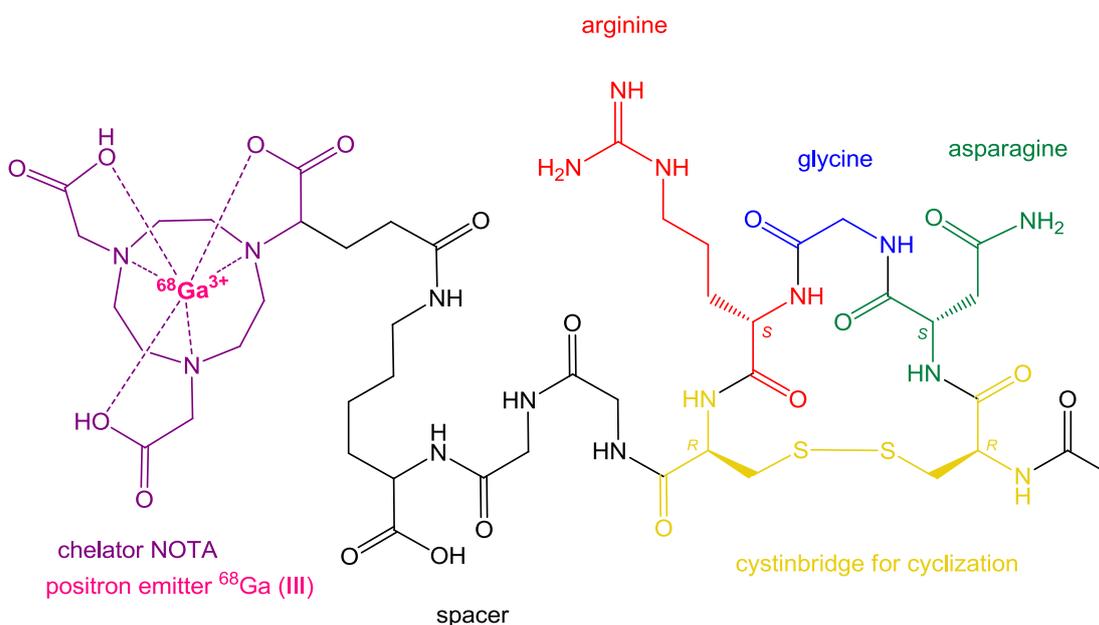


fig. 10.1: NOTA-NGR labelled with $^{68}\text{Ga}(\text{III})$.

^{68}Ga -NOTA-NGR was developed including an improved synthesis, isolation and formulation of the tracer. Its potential as a PET-tracer was assessed *in vivo* using micro-PET and compared to the established tracer ^{68}Ga -NOTA-RGD, used to visualize the integrin $\alpha_v\beta_3$ in angiogenesis. Studies in rats with ischemia/reperfusion showed high uptake of the new radiopharmaceutical ^{68}Ga -NOTA-NGR in myocardial infarction area being used in diagnostic PET imaging of APN. The new tracer shows even a slightly higher uptake in angiogenetic areas compared with results obtained with ^{68}Ga -NOTA-RGD.

^{68}Ga -NOTA-NGR was also examined *ex vivo* using autoradiography, confirming the significant higher accumulation of the tracer in the ischemic area compared with the healthy myocardium. The different areas of the tissue were displayed by HE staining.

For the purpose of immunohistochemistry, the expression of the enzyme APN was verified using antibody staining. Additionally, the integrin $\alpha_v\beta_3$ and several other factors that are involved in angiogenesis were stained. Through antibody staining APN was shown to be a suitable target for the evidence of angiogenesis.

With ^{68}Ga -NOTA-NGR, the development of a new PET-tracer for diagnosis of the expression of APN during angiogenesis after myocardial infarction was successful.

In order to develop an imaging probe suitable for investigation of the protease FAP using PET, several peptidomimetic inhibitors containing the dipeptide motif glycine-proline and the electrophilic moiety carbonitrile were designed. With *N*-Acetylglycine-pyrrolidine-(2*S*)-carbonitrile being the basic structure, modifications were introduced through a benzoic residue at the *N*-terminus (fig. 10.2).

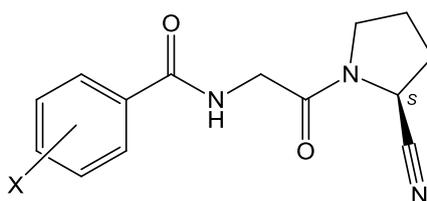
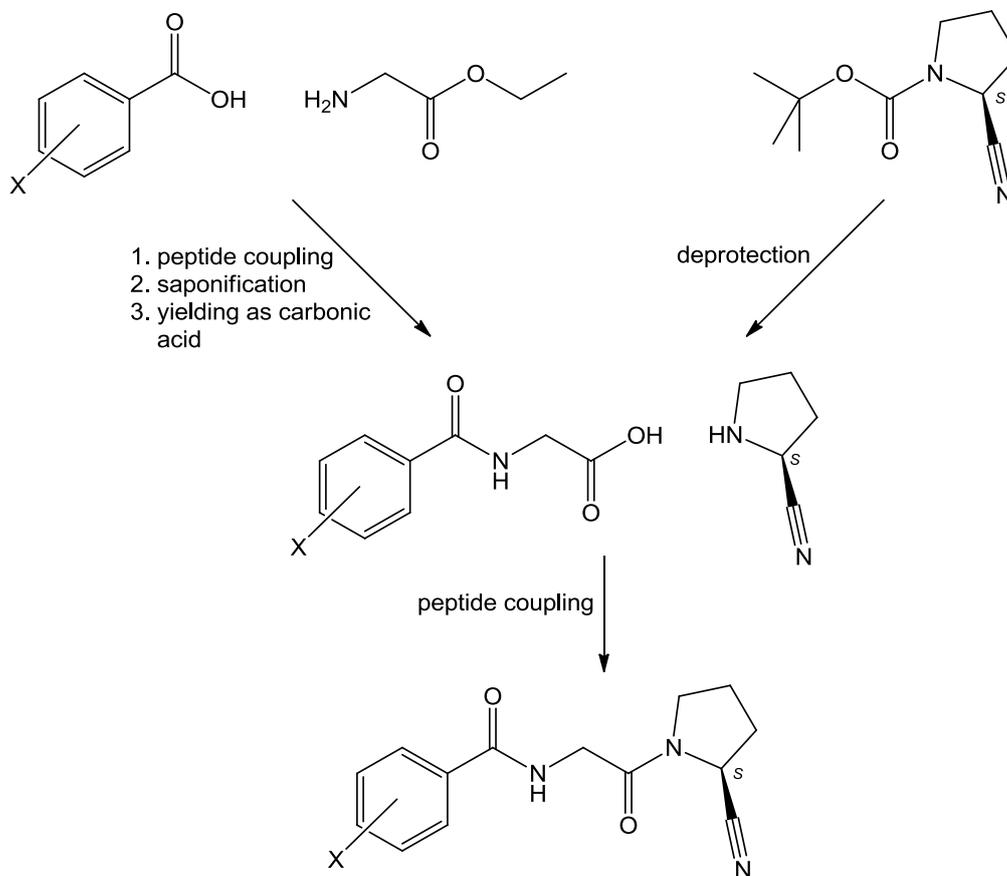


fig. 10.2: Basic structure of the FAP-inhibitors. X = substituent.

The intended inhibitors and precursors for radioactive labeling were synthesized starting with various benzoic acids, shown in scheme 10.1.

In the first step, a substituted benzoic acid was coupled with ethylglycate. Subsequently, the ethyl protecting group was removed through saponification and the resulting hippuric acid was yielded. The second step of the synthesis was the removal of the protecting group

Boc from pyrrolidine-(2*S*)-carbonitrile which then was available for peptide coupling with the hippuric acids.



scheme 10.1: Synthesis of the FAP-inhibitors.

10 SUMMARY

The following hippuric acid-pyrrolidine-(2*S*)-carbonitriles were synthesized (fig. 10.3):

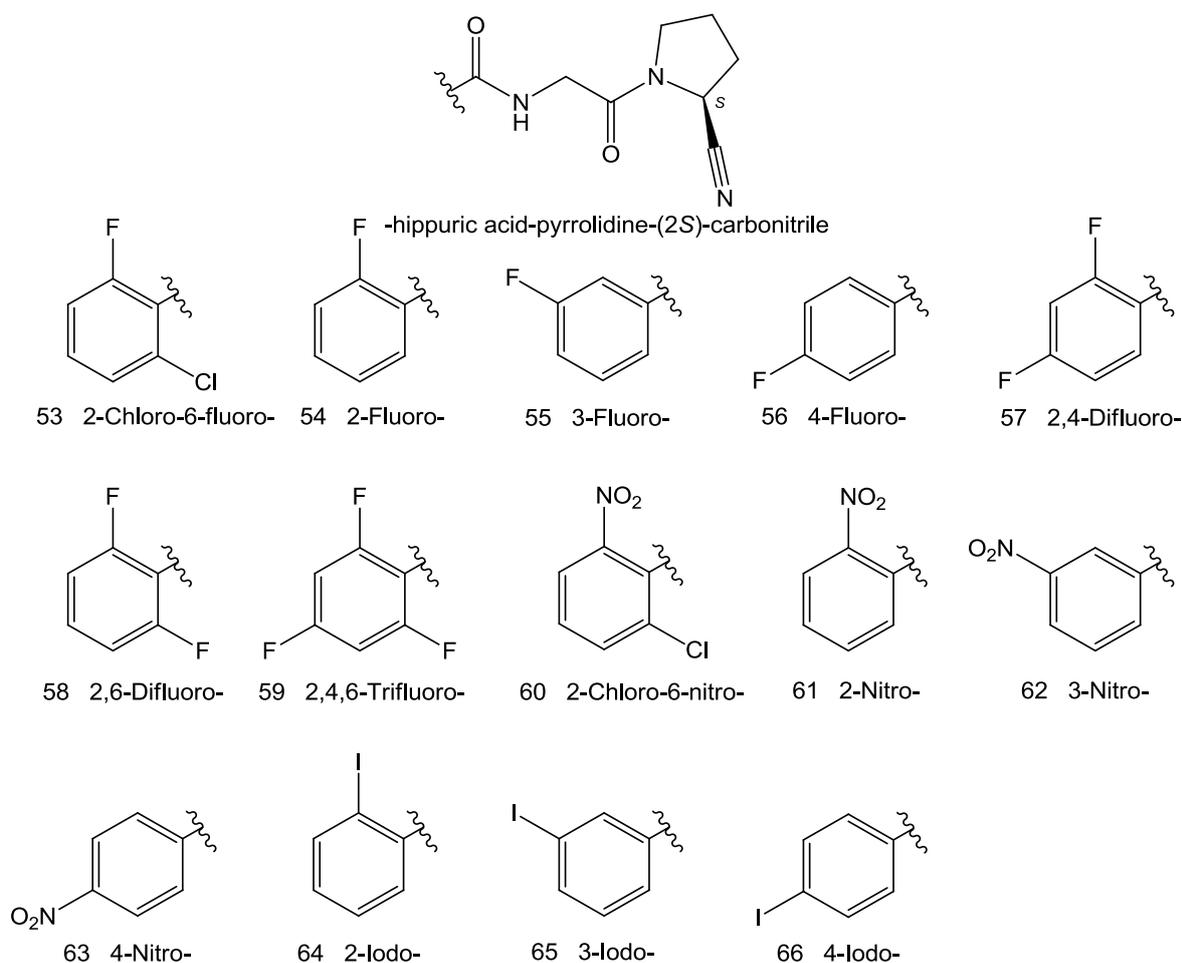


fig. 10.3: Synthesized substituted hippuric acid pyrrolidine-(2*S*)-carbonitriles.

In addition, the well-known inhibitors (**67**), (**70**) and (**71**) (fig. 10.4) were synthesized for comparison to the new ones in enzymatic assay.

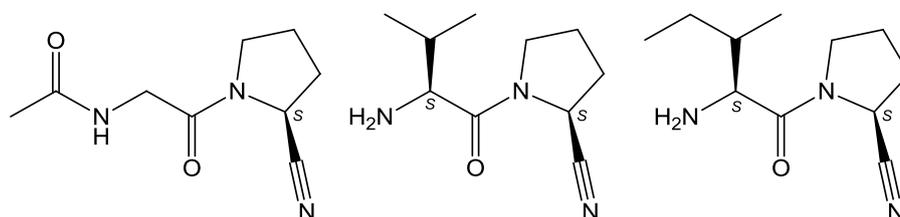


fig. 10.4: 1-(*N*-Acetylglycin)-pyrrolidine-(2*S*)-carbonitrile (67**), 1-((*S*)-Valine)-pyrrolidine-(2*S*)-carbonitrile (**70**), 1-((*S*)-Isoleucine)-pyrrolidine-(2*S*)-carbonitrile (**71**).**

To evaluate their inhibitory effect, the new inhibitors were tested in enzymatic assays using FAP and dipeptidyl peptidase IV, a prolyl peptidase from the same family in order to

compare the results with regard to selectivity. The compounds (**55**), (**64**) and (**66**) showed the highest affinity to FAP and selectivity to DPP IV (fig. 10.5).

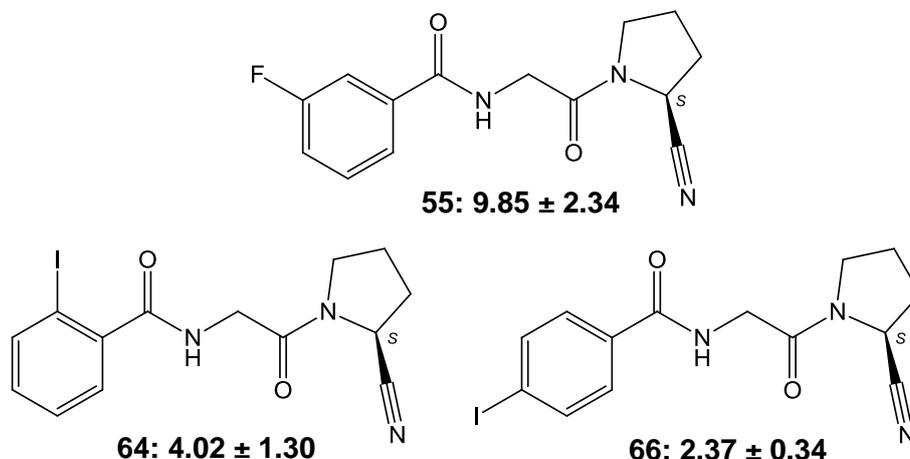


fig. 10.5: FAP-inhibitors with lowest K_i -value in μM .

In order to test the inhibitors with the best inhibitory effect against FAP as potential PET-tracers, they had to be labelled with a positron emitter. The radioactive analogues of compounds (**64**) and (**66**) were obtained following an isotopic exchange of the natural iodine-atom on (**64**) and (**66**) by iodine-124 (^{124}I), resulting in 1-(2- ^{124}I)iodohippuric acid)-pyrrolidine-(2S)-carbonitrile (**75**) and 1-(4- ^{124}I)iodohippuric acid)-pyrrolidine-(2S)-carbonitrile (**76**) (fig. 10.6). Because of the revealed low affinity of the reference compound (**55**) for FAP its radiofluorinated analogue was not further investigated in the present study.

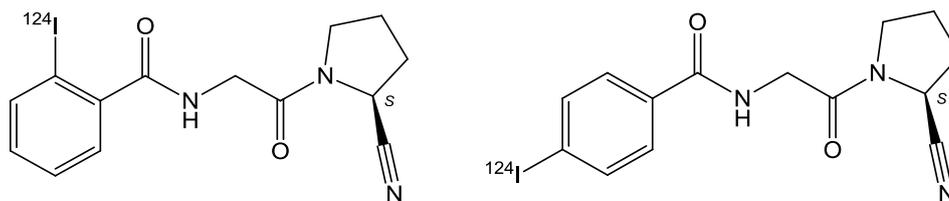


fig. 10.6: 1-(2- ^{124}I)iodohippuric acid)-pyrrolidine-(2S)-carbonitrile (**75**) and 1-(4- ^{124}I)iodohippuric acid)-pyrrolidine-(2S)-carbonitrile (**76**).

1-(2- ^{124}I)iodohippuric acid)-pyrrolidine-(2S)-carbonitrile (**75**) was tested *in vivo* using microPET in rats with myocardial infarction. Very low uptake of the radiopharmaceutical was observed in the ischemic area of the rat's heart. Locations of ischemic and surviving parts of the myocardium were confirmed using HE staining.

To our knowledge, 1-(2- ^{124}I)iodohippuric acid)-pyrrolidine-(2S)-carbonitrile is the first FAP-affine tracer developed for PET investigation. However, its potential as tracer for

10 SUMMARY

investigation of the FAP-expression within the myocardial infarction *in vivo* using PET could not be proven in the present study. Therefore, developments based on the structure of 1-(2-[¹²⁴I]iodohippuric acid)-pyrrolidine-(2S)-carbonitrile are going on in our group, with view to identify a PET-tracer suitable for *in-vivo*-investigation of FAP in healing processes and remodeling after myocardial infarction using PET.

III EXPERIMENTELLER TEIL

11 Geräte, Materialien und Methoden

11.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

11.1.1 Reagenzien für die organische Synthese

Alle verwendeten Chemikalien und Lösemittel wurden von *Alfa-Aesar* (Karlsruhe, Deutschland), *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland), *Merck* (Darmstadt, Deutschland) oder *Sigma-Aldrich* (München, Deutschland) bezogen.

Alle beschriebenen Lösemittel wurden ohne zusätzliche Trocknung verwendet. Herkömmliche Lösemittel wurden durch Destillation am Rotationsverdampfer gereinigt. Als Schutzgas wurde, sofern nötig, Argon verwendet.

11.1.2 Reagenzien für Gewebefärbungen

HE-Färbungen

Hämatoxylin (von *Carl Roth*, Karlsruhe, Deutschland), Natriumiodat, Aluminiumkaliumsulfat, Chloralhydrat, Zitronensäure und Eosin (von *Merck*, Darmstadt, Deutschland).

Immunohistochemie (Antikörperfärbungen)

Normal-goat-Serum (S-1000 von *Vector*, Burlingame CA, USA), normal-horse-Serum (S-2000 von *Vector* Burlingame CA, USA), Avidin/Biotin-Blocking Kit (SP-2001 von *Vector*, Burlingame CA, USA), Vectastain ABC-Kit (PK-6100 von *Vector*, Burlingame CA, USA), DAB-Substrate Kit (ab94665 von *abcam*, Cambridge, UK), HistoGreen (E109 von *Linaris*, Dossenheim, Deutschland), Hämatoxylin (H3404 von *Vector*, Burlingame CA, USA), Primärantikörper CD13 (EPR4059 oder GTX62469 von *GeneTEX*, Irvine CA, USA), Primärantikörper CD61 (ab75872 von *abcam*, Cambridge, UK), Primärantikörper CD31 (mouse anti-rat 550300 von *BD-Pharmingen*, Heidelberg, Deutschland), Primärantikörper CD68 (mouse anti-rat MCA341GA von *AbDSerotec*, Oxford, UK), Primärantikörper P4H (AF5110-1 von *Acris*, Heidelberg, Deutschland), Sekundärantikörper CD13 (biotinylierter anti-rabbit IgG BA1000 von *Vector*, Burlingame CA, USA), Sekundärantikörper CD61 (biotinylierter anti-hamster IgG 550335 von *BD-Pharmingen*, Heidelberg, Deutschland), Sekundärantikörper CD31, CD68 und P4H (biotinylierter anti-mouse IgG BA2001 von *Vector*, Burlingame CA, USA).

11.1.3 Reagenzien für fluorimetrische Enzym-Assays

Die Enzyme Fibroblasten-Aktivierungs-Protein α (FAP) und Dipeptidylpeptidase 4 (DPP IV) wurden von der Firma *R&D Systems* (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) bezogen.

Die Substrate Z-Gly-Pro-AMC (für FAP) und H-Gly-Pro-AMC (für DPP IV) wurden bei der Firma *Bachem* (Bubendorf, Schweiz) erworben.

Sämtliche Lösemittel und Puffer wurden von *Sigma-Aldrich* (München, Deutschland) bezogen.

11.2 Verwendete Radionuklide für die Markierung

Gallium-68 (^{68}Ga) für die Markierung von NOTA-RGD- und NOTA-NGR-Peptiden wurde von einem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator (*Cyclotron Co.* (Obninsk, Russland), bezogen über *Eckert & Ziegler* (Berlin, Deutschland)) gewonnen.

Iod-131 (^{131}I) wurde von der Firma *GE Healthcare* (Braunschweig, Deutschland), Iod-124 (^{124}I) von *Eckert & Ziegler* (Berlin, Deutschland) erworben.

11.3 Verwendete Geräte

11.3.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an einem Spektrometer *Avance 400* der Firma *Bruker* (Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen. Die Arbeitsfrequenz betrug für ^1H -NMR-Spektren 400.13 MHz und für ^{13}C -NMR-Spektren 100.61 MHz, die Messtemperatur lag bei 27 °C. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ -Skala als ppm angegeben und beziehen sich auf $\delta_{\text{TMS}} = 0$, die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Zur Eichung der ^1H -NMR-Spektren dienten die Resonanzsignale der Restprotonen des eingesetzten deuterierten Lösemittels als interner Standard [z.B. $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.25$ ppm, $\delta(\text{d}^6\text{-DMSO}) = 2.50$ ppm] und bei ^{13}C -NMR-Spektren dessen ^{13}C -Resonanzsignale [$\delta(\text{CDCl}_3) = 77.16$ ppm, $\delta(\text{d}^6\text{-DMSO}) = 39.52$ ppm]. Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte mit NMR-Software von *Bruker* und *ACDLabs*. Signalmultiplizitäten sind in folgenden Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett. Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale erfolgte durch Auswertung von H,H-COSY-, HMQC-, und HMBC-Spektren.

11.3.2 Schmelzpunkte

Alle Schmelzpunkte wurden in offener Kapillare an einem Schmelzpunktgerät der Firma *Büchi* (Essen, Deutschland), Typ M-565, bestimmt. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

11.3.3 Infrarotspektroskopie (IR)

Alle IR-Spektren wurden unverdünnt (neat) an einem *Merlin-Biotech*-FTIR-Spektrometer des Typs PharmalyzIR mittels ATR-Einheit aufgenommen. Die Werte der Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ sind in der Einheit cm^{-1} angegeben. Die Kennzeichnung der Intensitäten erfolgt mit den Abkürzungen w (schwach), m (mittel) und s (stark).

11.3.4 Massenspektrometrie (MS)

Elektronenstoß-Massenspektrometrie (EI) wurde mit dem Spektrometer *Finnigan* MAT-8200 (*Thermo Fisher Scientific*, Karlsruhe, Deutschland) bei einem Ionisationspotenzial von 70 eV durchgeführt. Um Elektrosprayionisations-Massenspektren (ESI) aufzunehmen, wurden, sowohl in Kombination mit der HPLC (HPLC-MS mit *Agilent*-1100-HPLC-System) als auch im 'stand-alone'-Betrieb, entweder eine *Agilent* Ionenfalle 1100SL (Kapillartemperatur: 210 °C; ESI-Spannung: 3.5–4.0 kV; N_2 als Trägergas) oder ein 'time-of-flight'-Massendetektor (micrOTOF, Firma *Bruker* (Karlsruhe, Deutschland)) verwendet. Für die zu messenden Analyten wurde Methanol als Lösemittel verwendet.

11.3.5 Spezifische Drehwerte

Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_{\text{D}}^{\text{Temp.}}$ wurden an einem *Perkin-Elmer* 241 Polarimeter (Rodgau, Deutschland) ermittelt (Na_D -Linie, $\lambda = 589 \text{ nm}$).

11.3.6 Fluorimeter

Die Enzym-Assays wurden in weißen 96-Well-Mikrotiterplatten der Firma *Greiner* (Frickenhausen, Deutschland) mit einem Fluorimeter des Typs 200 pro von *Tecan* (Crailsheim, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der Software GraFit⁹² und Excel 2007 (© 2008 Microsoft Corporation).

11.3.7 Aktivimeter

Die Radioaktivität wurde an einem Aktivimeter des Typs VIK-202/VDC-405 der Firma *Veenstra* (Joure, Niederlande) bestimmt. Die Radioaktivitäten von Proben und Injektionslösungen wurden stets für das jeweilige Nuklid bestimmt und sind in Megabecquerel (MBq) angegeben.

11.3.8 Magnetrührer

Organische Synthesen bei Raumtemperatur oder kälter wurden auf Magnetrührern des Typs Heimix-S der Firma *Heidolph* (Schwabach, Deutschland) durchgeführt.

11.3.9 Heizblock für radioaktive Markierungen

Die Erhitzung von Reaktionsgemischen zur radioaktiven Markierung erfolgte in einem Heizblock der Firma *IKA* (Staufen, Deutschland) mit passendem Metalleinsatz.

11.3.10 Rotationsverdampfer

Für das Entfernen von Lösemitteln aus organischen Reaktionsgemischen wurde ein Rotationsverdampfer des Typs Hei-VAP Precision HL/HB/G1 der Firma *Heidolph* (Schwabach, Deutschland) verwendet. Für die Kühlung des Kühlwassers wurde ein Umlaufkühler des Typs Rotacool mini der Firma *Heidolph* (Schwabach, Deutschland) verwendet.

11.3.11 Rotationsverdampfer für radioaktiv markierte Verbindungen

Die Entfernung von Lösemitteln aus Reaktionsgemischen von radioaktiv markierten Verbindungen, oder die Entfernung von Lösemitteln aus Fraktionen, die an der präparativen HPLC gesammelt wurden, erfolgte an einem Rotationsverdampfer des Typs VV micro der Firma *Heidolph* (Schwabach, Deutschland). Die Evakuierung erfolgte mit einer Pumpe des Typs Chemie Hybrid Pumpe RC5 der Firma *Vacuubrand* (Wertheim, Deutschland) und einer zwischengeschalteten Kühlfalle.

11.3.12 Kryotom

Kryoproben von Kleintiergeweben wurden mithilfe von TissueTek der Firma *Sakura Finetek* (Alphen aan den Rijn, Niederlande) erstellt. Die Kryoschnitte wurden an einem Kryotom des Typs CM 1850 der Firma *Leica* (Wetzlar, Deutschland) erstellt.

11.3.13 Mikroskop

Aufnahmen von angefärbten Gewebeschnitten wurden an einem Lichtmikroskop des Typs Axioskop 2 plus der Firma *Zeiss* (Jena, Deutschland) angefertigt. Möglich sind Vergrößerungen von 1:2 – 1:100.

11.3.14 Syntheseautomat für ⁶⁸Ga-Markierungen

⁶⁸Ga-Markierungen wurden an einem Synthesemodul des Typs Variosystem Gallelut der Firma *Scintomics* (Fürstenfeldbruck, Deutschland) durchgeführt. Die Steuerung der automatisierten Synthese erfolgte über einen angeschlossenen PC mit der Software Variocontrol der Firma *Scintomics* (Fürstenfeldbruck, Deutschland).

11.3.15 Autoradiographie

Autoradiographie-Experimente wurden mit einem high resolution radioluminography laser scanner des Typs CR 35 Bio der Firma *raytest* (Straubenhardt, Deutschland) in Kombination mit einer passenden Image-Platte (Image Plate IP 18 x 24 von *biostep*, Jahnsdorf, Deutschland) durchgeführt. Daraus resultierende Bilder hatten eine Auflösung von 30 µm Pixelgröße und wurden mit der Software Amide (amide.exe.0.9.1¹²⁵) ausgewertet.

11.3.16 Kleintier-PET

Untersuchungen mit dem Kleintier-PET wurden mithilfe eines Inveon PET scanners der Firma *Siemens Healthcare* (Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Die Datenverarbeitung erfolgte mit dem Software Paket Inveon Acquisition Workplace → Fourier Rebinning (FORE), 2D OSEM (Ordered subset expectation maximization). Die Bilder wurden mithilfe eines OSEM-Algorithmus rekonstruiert. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software Amide (amide.exe.0.9.1¹²⁵), die Auswertung der Daten mit Excel 2007 (© 2008 Microsoft Corporation).

11.4 Chromatographische Methoden

11.4.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

UV-aktive Verbindungen

Es wurden Fertigfolien aus Kunststoff, beschichtet mit 0.20 mm Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Detektion der Substanzen diente die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, die Eigenfluoreszenz bei 366 nm, sowie das Anfärbeverhalten der Substanzen gegenüber Kaliumpermanganatlösung oder Ioddampf. Die Zusammensetzungen der mobilen Phasen sind in Volumenteilen angegeben.

Radioaktive Verbindungen

Für ⁶⁸Ga-markierte Verbindungen wurden Fertigfolien aus Cellulose (Silica Gel Impregnated Glas Fiber Sheets) der Firma *Agilent Technologies* (Böblingen, Deutschland), für ¹⁸F-, ¹²⁴I- und ¹³¹I-haltige Verbindungen wurden Fertigfolien aus Kunststoff, beschichtet mit 0.20 mm Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Detektion der Substanzen erfolgte mittels eines DC-Scanners des Typs mini Gita der Firma *raytest* (Straubenhardt, Deutschland) unter Verwendung eines NaI-Kristalls. Die mittels der Software TLC control erstellten Chromatogramme wurden mit der Software Gina Star bearbeitet und ausgewertet.

11.4.2 Säulenchromatographie (SC)

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm mesh) der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Säulen wurden nass befüllt. Die Laufmittelzusammensetzungen sind in Volumenteilen angegeben.

11.4.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

analytische/präparative HPLC

Die HPLC-Analytik organischer (inkl. ¹⁸F-, ¹²⁴I- und ¹³¹I-haltiger) Verbindungen wurde an einem HPLC-System der Firma *Shimadzu* (Duisburg, Deutschland) durchgeführt, die mit einem UV/Vis-Detektor (SPD-10A VP) und einem Radioaktivitätsdetektor (*Berthold* LB 1200) ausgestattet ist. Die UV-Detektion erfolgte bei 230 und 254 nm. Die HPLC-Anlage verfügt über eine analytische (LC-10AT VP) und eine präparative (LC-8A) Pumpeneinheit, die mit einer jeweiligen Detektorzelle und jeder beliebigen Säule verwendet werden kann.

Da kein Gradientenmischer vorhanden ist, ist die Anlage nur für isokratische Methoden geeignet. Die Injektionsventile sind vom Typ Rheodyne und die Bedienung erfolgt über einen angeschlossenen PC mit der Software Class-VP 5.032.

Die präparative HPLC erfolgte mittels C-18 Säulen der Größe 250 mm x 10 mm der Firma *CS Chromatographieservice* (Langerwehe, Deutschland). Die Lösemittelzusammensetzungen und die Flussgeschwindigkeiten, die für die jeweilige Trennung verwendet wurde, sind in Kapitel 12 aufgeführt. Die Dauer eines Laufs betrug 25 min. Mit diesem System wurden sowohl organische Stoffgemische aufgetrennt, als auch Trennungen von Reaktionsgemischen nach radioaktiver Markierung vorgenommen.

Die analytische HPLC wurde mit C18 Säulen der Größe 250 mm x 4.6 mm der Firma *CS Chromatographieservice* (Langerwehe, Deutschland) durchgeführt. Die Flussgeschwindigkeit betrug stets 1.3 ml/min, jeder Lauf dauerte 25 min. Mit dieser Methode wurden sowohl organische Stoffgemische, als auch radioaktiv markierte Substanzen auf ihre Reinheit überprüft.

Mit diesem HPLC-System wurden sowohl die Analytik/präparative Auftrennung organischer Verbindungen als auch radiofluorierter und radioiodierter Verbindungen vorgenommen.

analytische HPLC

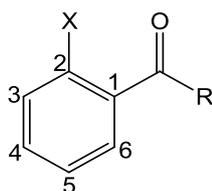
Die Analytik ⁶⁸Ga-markierter Peptide erfolgte an einem HPLC-Gradienten-System der Firma *Scintomics* (Fürstenfeldbruck, Deutschland) mit zwei Pumpen des Typs Variopump LC1, die außerdem mit einem Hochdruckgradientenmischer, einem UV-Detektor des Typs Variodetect UV2 und einem Aktivitätsdetektor des Typs γ -sensor PA ausgestattet ist. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 250 nm. Für die Analytik wurden Säulen des Typs Nucleosil der Firma *CS Chromatographieservice* (Langerwehe, Deutschland) verwendet. Die Bedienung wurde anhand der Steuerungs-Software Chromstar* 7.0 durchgeführt.

12 Synthese und Charakterisierung organischer Verbindungen

Allgemeine Erläuterungen

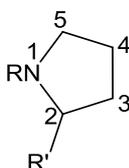
Die Positionen der Ringatome sind wie folgt gekennzeichnet:

Benzoylrest



Die Zuordnung der Signale der Kohlenstoffatome des Benzoylrests im ^{13}C -NMR erfolgt mit der Bezeichnung (Ar für Aromat) Ar-C $\underline{1}$, Ar-C $\underline{2}$ etc., Wasserstoffatome des Aromaten tragen im ^1H -NMR die Bezeichnung Ar-C3- \underline{H} , Ar-C4- \underline{H} etc.

Pyrrolidinrest



Die Kohlenstoffatome im Pyrrolidinring werden beim ^{13}C -NMR mit Py-C $\underline{2}$ Py-C $\underline{3}$ etc., die Wasserstoffatome im ^1H -NMR mit Py-C2- \underline{H} , Py-C3- \underline{H}_2 etc. bezeichnet.

Die im Folgenden angeführten Verbindungen wurden teilweise mehrmals synthetisiert unter geringfügiger Variation bezüglich Reaktionsdauer oder verwendetem Lösemittel (siehe Kapitel 3). Die folgende Liste enthält jeweils ein Beispiel einer erfolgreichen Darstellung der jeweiligen Substanz, dies muss nicht gleichzeitig das Produkt der Synthese mit der maximal erzielten Ausbeute sein.

Aufgrund einer Fremdkernkopplung zwischen ^{13}C - und ^{19}F -Atomen kommt es zu einer Aufspaltung der Signale von Kohlenstoffatomen in einer C-F-Bindung im ^{13}C -NMR, z.B.: siehe Verbindung 1: das Signal für Ar-C $\underline{6}$ besteht aus den beiden Peaks bei 158.32 und 160.82 ppm.

12.1 Glycin-Teil

12.1.1 Hippursäureethylester

Die Hippursäureethylester (Abb. 12.1) tragen am Benzoylrest einen oder mehrere Substituenten (X). X = F, Cl, Br, I oder NO₂ in den Positionen 2, 3, 4 und/oder 6.

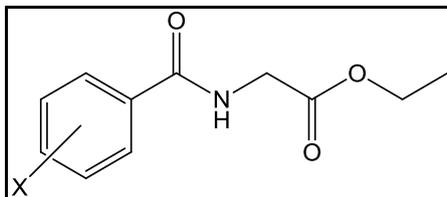


Abb. 12.1: Hippursäureethylester, X = entsprechender Substituent.

Die Hippursäureethylester wurden nach folgender Reaktionsvorschrift dargestellt. Angaben zur Reaktionsdauer sind allgemein gehalten und bei der Auflistung der synthetisierten Verbindungen präzisiert.

Peptidkupplung einer Benzoesäure und Glycinethylester Hydrochlorid

Unter leichtem Erwärmen (bis ca. 35 °C) werden 1 Äquivalent der gewünschten Benzoesäure und 1 Äquivalent *N*-Hydroxysuccinimid in Dichlormethan oder Tetrahydrofuran gelöst. Während die Lösung gerührt wird, wird 1 Äquivalent Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben. Die Aktivierung der Säure zum Aktivester findet unter Ausfällen von Dicyclohexylharnstoff statt, was an einer deutlichen Trübung des Reaktionsgemisches erkennbar ist. Nach ca. 1-2 h wird der Harnstoff abfiltriert und das Filtrat zu einer Lösung aus 1 Äquivalent des gewünschten Amins und 2 Äquivalenten Triethylamin in Dichlormethan oder Tetrahydrofuran gegeben. Die resultierende Mischung wird anschließend einige Tage bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in wenig Essigsäureethylester aufgenommen. Das Gemisch wird einige Minuten gerührt, dabei erneut ausgefallter Harnstoff wird abfiltriert und das Filtrat wird nacheinander mit Wasser, 1 M Salzsäure, 1 M Natriumcarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird anschließend über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Das resultierende Produkt wird im Exsiccator getrocknet.

2-Chlor-6-fluorhippursäureethylester (1)

Synthese: 23 °C, 3 d

12 SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG ORGANISCHER VERBINDUNGEN

- Ansatz: 1.00 g 2-Chlor-6-fluorbenzoesäure (5.73 mmol)
 0.66 g *N*-Hydroxysuccinimid (5.73 mmol)
 1.18 g Dicyclohexylcarbodiimid (5.73 mmol)
 0.80 g Glycinethylester Hydrochlorid (5.73 mmol)
 1.59 ml Triethylamin (1.16 g, 11.46 mmol)
- Lösemittel: 100.00 ml Tetrahydrofuran
- Ausbeute: 0.91 g, 3.50 mmol, 61 %, gelbe hochviskose Flüssigkeit
- R_f: 0.37 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.32 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 4.27 (q, 2H, OCH₂CH₃, *J* = 7.28 Hz), 4.27 (d, 2H, NHCH₂, *J* = 5.02 Hz), 6.45 (bs, 1H, NH), 7.05 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.23 (m, 1H, Ar-C3-H), 7.33 (m, 1H, Ar-C4-H).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.10 (OCH₂CH₃), 41.81 (NHCH₂), 61.79 (OCH₂CH₃), 114.58 (Ar-C₅), 124.74 (Ar-C₁), 125.67 (Ar-C₃), 131.38 (Ar-C₄), 132.53 (Ar-C₂), 158.32, 160.82 (Ar-C₆), 162.31 (C=ONH), 169.25 (C=OO).

2-Fluorhippursäureethylester (2)

- Synthese: 23 °C, 6 d
- Ansatz: 1.00 g 2-Fluorbenzoesäure (7.14 mmol)
 0.82 g *N*-Hydroxysuccinimid (7.14 mmol)
 1.47 g Dicyclohexylcarbodiimid (7.14 mmol)
 1.00 g Glycinethylester Hydrochlorid (7.14 mmol)
 1.98 ml Triethylamin (1.44 g, 14.28 mmol)
- Lösemittel: 100.00 ml Dichlormethan
- Ausbeute: 1.27 g, 5.64 mmol, 79 %, farblose hochviskose Flüssigkeit
- R_f: 0.54 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.31 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 4.26 (q, 2H, OCH₂CH₃, *J* = 7.28 Hz), 4.26 (d, 2H, NHCH₂, *J* = 3.89 Hz), 7.14

(m, 1H, Ar-C3-H), 7.26 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.32 (bs, 1H, NH), 7.48 (m, 1H, Ar-C4-H), 8.10 (m, 1H, Ar-C5-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.11 (OCH₂CH₃), 41.97 (NHCH₂), 61.58 (OCH₂CH₃), 116.18 (Ar-C3), 120.42 (Ar-C1), 124.76 (Ar-C6), 132.02 (Ar-C5), 133.62 (Ar-C4), 159.57, 162.03 (Ar-C2), 163.25 (C=ONH), 169.64 (C=OO).

3-Fluorhippursäureethylester (3)

Synthese: 23 °C, 6 d

Ansatz: 1.00 g 3-Fluorbenzoesäure (7.14 mmol)

0.82 g *N*-Hydroxysuccinimid (7.14 mmol)

1.47 g Dicyclohexylcarbodiimid (7.14 mmol)

1.00 g Glycinethylester Hydrochlorid (7.14 mmol)

1.98 ml Triethylamin (1.44 g, 14.28 mmol)

Lösemittel: 100.00 ml Dichlormethan

Ausbeute: 1.40 g, 6.22 mmol, 88 %, farbloser Feststoff

Smp.: 63 °C

R_f: 0.46 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.30 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 4.20 (d, 2H, NHCH₂, *J* = 5.02 Hz), 4.24 (q, 2H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 6.90 (s, 1H, NH), 7.19 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.39 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.53 (m, 1H, Ar-C2-H), 7.56 (m, 1H, Ar-C6-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.06 (OCH₂CH₃), 41.83 (NHCH₂), 61.64 (OCH₂CH₃), 114.59 (Ar-C2), 118.80 (Ar-C4), 122.50 (Ar-C6), 130.23 (Ar-C5), 135.97 (Ar-C1), 161.44, 163.90 (Ar-C3), 166.14 (C=ONH), 169.89 (C=OO).

4-Fluorhippursäureethylester (4)

Synthese: 23 °C, 6 d

Ansatz: 1.00 g 4-Fluorbenzoesäure (7.14 mmol)

0.82 g *N*-Hydroxysuccinimid (7.14 mmol)

1.47 g Dicyclohexylcarbodiimid (7.14 mmol)

1.00 g Glycinethylester Hydrochlorid (7.14 mmol)

1.98 ml Triethylamin (1.44 g, 14.28 mmol)

Lösemittel: 200.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.24 g, 5.51 mmol, 77 %, farbloser Feststoff

Smp.: 100 °C (100 °C¹²⁶, 95-96 °C¹²⁷)

R_f: 0.35 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.32 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 4.23 (d, 2H, NHC_H₂, *J* = 5.02 Hz), 4.27 (q, 2H, OC_H₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 6.64 (bs, 1H, NH), 7.13 (m, 2H, Ar-C3,5-*H*), 7.84 (m, 2H, Ar-C2,6-*H*).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.14 (OCH₂CH₃), 41.91 (NHCH₂), 61.73 (OCH₂CH₃), 115.78 (Ar-C3,5), 129.46 (Ar-C2,6), 129.95 (Ar-C1), 163.66, 166.17 (Ar-C4), 166.31 (C=ONH), 170.05 (C=OO).

2,4-Difluorhippursäureethylester (5)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 1.00 g 2,4-Difluorbenzoesäure (6.32 mmol)

0.73 g *N*-Hydroxysuccinimid (6.32 mmol)

1.30 g Dicyclohexylcarbodiimid (6.32 mmol)

0.88 g Glycinethylester Hydrochlorid (6.32 mmol)

1.75 ml Triethylamin (1.28 g, 12.64 mmol)

Lösemittel: 200.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.38 g, 5.67 mmol, 90 %, hellgelber Feststoff

Smp.: 76 °C

R_f: 0.56 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.31 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.09 Hz), 4.23 (d, 2H, NHC_H₂), 4.26 (q, 2H, OC_H₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 6.88 (m, 1H, Ar-C5-*H*), 6.99 (m, 1H, Ar-C3-*H*), 7.20 (bs, 1H, NH), 8.12 (m, 1H, Ar-C6-*H*).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.08 (OCH₂CH₃), 41.95 (NHCH₂), 61.63 (OCH₂CH₃), 104.32 (Ar-C5), 112.45 (Ar-C3), 116.92 (Ar-C1), 133.84 (Ar-C6), 159.83, 162.45 (Ar-C2), 162.35 (C=ONH), 163.63, 166.30 (Ar-C4), 169.57 (C=OO).

2,6-Difluorhippursäureethylester (6)

Synthese: 23 °C, 1 d

Ansatz: 1.03 g 2,6-Difluorbenzoesäure (6.50 mmol)
 0.75 g *N*-Hydroxysuccinimid (6.50 mmol)
 1.34 g Dicyclohexylcarbodiimid (6.50 mmol)
 0.91 g Glycinethylester Hydrochlorid (6.50 mmol)
 1.81 ml Triethylamin (1.32 g, 13.00 mmol)

Lösemittel: 300.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.37 g, 5.63 mmol, 86 %, farbloser Feststoff

Smp.: 69 °C

R_f: 0.45 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.32 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 4.25 (d, 2H, NHCH₂, *J* = 4.89 Hz), 4.26 (q, 2H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 6.59 (bs, 1H, NH), 6.96 (m, 2H, Ar-C3,5-H), 7.39 (m, 1H, Ar-C4-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.09 (OCH₂CH₃), 41.81 (NHCH₂), 61.75 (OCH₂CH₃), 111.93, 112.19 (Ar-C3,5), 113.51 (Ar-C1), 132.01 (Ar-C4), 158.85, 158.91, 161.36, 161.43 (Ar-C2,6), 160.33 (C=ONH), 169.34 (C=OO).

2,4,6-Trifluorhippursäureethylester (7)

Synthese: 23 °C, 1 d

Ansatz: 0.95 g 2,4,6-Trifluorbenzoesäure (5.40 mmol)
 0.62 g *N*-Hydroxysuccinimid (5.40 mmol)
 1.11 g Dicyclohexylcarbodiimid (5.40 mmol)
 0.75 g Glycinethylester Hydrochlorid (5.40 mmol)

1.50 ml Triethylamin (1.09 g, 10.80 mmol)

Lösemittel: 200.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.26 g, 4.82 mmol, 89 %, farbloser Feststoff

Smp.: 97 °C

R_f: 0.51 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.31 (t, 3H, OCH₂CH₃, J = 7.15 Hz), 4.23 (d, 2H, NHC_H₂, J = 4.89 Hz), 4.26 (q, 2H, OC_H₂CH₃, J = 7.15 Hz), 6.61 (bs, 1H, NH), 6.73 (m, 2H, Ar-C_{3,5}-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.39 (OCH₂CH₃), 42.12 (NHCH₂), 62.10 (OCH₂CH₃), 101.37 (Ar-C_{3,5}), 110.55 (Ar-C₁), 159.83 (C=ONH), 159.87, 162.67, 165.20 (Ar-C_{2,6}), 162.25, 162.49 (Ar-C₄), 169.59 (C=OO).

2-Chlor-6-nitrohippursäureethylester (8)

Synthese: 23 °C, 6 d

Ansatz: 0.25 g 2-Chlor-6-nitrobenzoesäure (1.24 mmol)
0.14 g *N*-Hydroxysuccinimid (1.24 mmol)
0.26 g Dicyclohexylcarbodiimid (1.24 mmol)
0.17 g Glycinethylester Hydrochlorid (1.24 mmol)
0.34 ml Triethylamin (0.25 g, 2.48 mmol)

Lösemittel: 10.00 ml Dichlormethan

Ausbeute: 0.31 g, 1.08 mmol, 87 %, gelber Feststoff

Smp.: 61 °C

R_f: 0.30 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.33 (t, 3H, OCH₂CH₃, J = 7.17 Hz), 4.29 (q, 2H, OC_H₂CH₃, J = 7.02 Hz), 4.31 (d, 2H, NHC_H₂, J = 4.58 Hz), 6.49 (bs, 1H, NH), 7.54 (m, 1H, Ar-C₄-H), 7.73 (m, 1H, Ar-C₃-H), 8.09 (m, 1H, Ar-C₅-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.10 (OCH₂CH₃), 46.39 (NHCH₂), 60.97 (OCH₂CH₃), 123.06 (Ar-C₅), 130.89 (Ar-C₁), 132.22 (Ar-C₄), 134.50 (Ar-C₂), 136.08 (Ar-C₃), 147.24 (Ar-C₆), 156.76 (C=ONH), 171.75 (C=OO).

2-Nitrohippursäureethylester (9)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 1.00 g 2-Nitrobenzoesäure (5.98 mmol)
 0.69 g *N*-Hydroxysuccinimid (5.98 mmol)
 1.23 g Dicyclohexylcarbodiimid (5.98 mmol)
 0.84 g Glycinethylester Hydrochlorid (5.98 mmol)
 1.66 ml Triethylamin (1.21 g, 11.97 mmol)

Lösemittel: 100.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.46 g, 5.79 mmol, 97 %, farbloser Feststoff

Smp.: 84 °C (92.5-93.5 °C¹²⁸, 81 °C¹²⁹)

R_f: 0.22 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CO(CD₃)₂, 2.04, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.26 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 4.14 (d, 2H, NHCH₂, *J* = 5.90 Hz), 4.19 (q, 2H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 7.71 (m, 2H, Ar-C_{4,6}-H), 7.80 (m, 1H, Ar-C₅-H), 8.02 (m, 1H, Ar-C₃-H), 8.13 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR: (CO(CD₃)₂, 30.38, 100.62 MHz): δ [ppm] = 15.01 (OCH₂CH₃), 42.53 (NHCH₂), 62.10 (OCH₂CH₃), 125.56 (Ar-C₃), 130.48 (Ar-C₆), 132.23 (Ar-C₄), 133.91 (Ar-C₁), 134.74 (Ar-C₅), 149.06 (Ar-C₂), 167.32 (C=ONH), 170.65 (C=OO).

3-Nitrohippursäureethylester (10)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 1.00 g 3-Nitrobenzoesäure (5.98 mmol)
 0.69 g *N*-Hydroxysuccinimid (5.98 mmol)
 1.23 g Dicyclohexylcarbodiimid (5.98 mmol)
 0.84 g Glycinethylester Hydrochlorid (5.98 mmol)
 1.66 ml Triethylamin (1.21 g, 11.97 mmol)

Lösemittel: 40.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 0.54 g, 2.14 mmol, 35 %, farbloser Feststoff

Smp.: 73 °C (86-88 °C¹³⁰, 75 °C¹³¹, 72-73 °C¹²⁸)

- R_f: 0.36 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.34 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 4.28 (d, 2H, NHCH₂, *J* = 5.27 Hz), 4.29 (q, 2H, OCH₂CH₃, *J* = 7.03 Hz), 6.88 (bs, 1H, NH), 7.67 (m, 1H, Ar-C5-H), 8.17 (m, 1H, Ar-C6-H), 8.39 (m, 1H, Ar-C4-H), 8.66 (m, 1H, Ar-C2-H).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.13 (OCH₂CH₃), 42.01 (NHCH₂), 61.93 (OCH₂CH₃), 122.07 (Ar-C₂), 126.35 (Ar-C₄), 129.89 (Ar-C₅), 133.11 (Ar-C₆), 135.35 (Ar-C₁), 148.28 (Ar-C₃), 165.01 (C=ONH), 169.74 (C=OO).

4-Nitrohippursäureethylester (11)

- Synthese: 23 °C, 3 d
- Ansatz: 1.00 g 4-Nitrobenzoesäure (5.98 mmol)
0.69 g *N*-Hydroxysuccinimid (5.98 mmol)
1.23 g Dicyclohexylcarbodiimid (5.98 mmol)
0.84 g Glycinethylester Hydrochlorid (5.98 mmol)
1.66 ml Triethylamin (1.21 g, 11.97 mmol)
- Lösemittel: 100.00 ml Tetrahydrofuran
- Ausbeute: 1.33 g, 5.27 mmol, 88 %, hellgelber Feststoff
- Smp.: 141 °C (147-148 °C¹³², 142 °C¹²⁹, 138.5-140 °C¹³⁰, 138.5-140 °C¹²⁸)
- R_f: 0.39 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.34 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 4.27 (d, 2H, NHCH₂, *J* = 4.89 Hz), 4.30 (q, 2H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 6.73 (bs, 1H, NH), 7.99 (m, 2H, Ar-C_{2,6}-H), 8.32 (m, 2H, Ar-C_{3,5}-H).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.15 (OCH₂CH₃), 42.03 (NHCH₂), 61.98 (OCH₂CH₃), 123.90 (Ar-C_{3,5}), 128.29 (Ar-C_{2,6}), 139.26 (Ar-C₁), 149.84 (Ar-C₄), 165.32 (C=ONH), 169.68 (C=OO).

Die NMR-Daten entsprechen der Literatur.¹³³

2-Bromhippursäureethylester (12)

- Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 1.00 g 2-Brombenzoesäure (4.97 mmol)
 0.57 g *N*-Hydroxysuccinimid (4.97 mmol)
 1.03 g Dicyclohexylcarbodiimid (4.97 mmol)
 0.69 g Glycinethylester Hydrochlorid (4.97 mmol)
 1.38 ml Triethylamin (1.01 g, 9.95 mmol)

Lösemittel: 100.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.26 g, 4.40 mmol, 89 %, farbloser Feststoff

R_f: 0.22 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.33 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.09 Hz), 4.25 (d, 2H, NHC_H₂, *J* = 5.02 Hz), 4.28 (q, 2H, OC_H₂CH₃, *J* = 7.28 Hz), 6.59 (bs, 1H, NH), 7.30 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.38 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.60 (m, 1H, Ar-C3-H), 7.62 (m, 1H, Ar-C6-H).

3-Bromhippursäureethylester (13)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 1.00 g 3-Brombenzoesäure (4.97 mmol)
 0.57 g *N*-Hydroxysuccinimid (4.97 mmol)
 1.03 g Dicyclohexylcarbodiimid (4.97 mmol)
 0.69 g Glycinethylester Hydrochlorid (4.97 mmol)
 1.38 ml Triethylamin (1.01 g, 9.95 mmol)

Lösemittel: 100.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.15 g, 4.02 mmol, 81 %, farbloser Feststoff

R_f: 0.24 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.31 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 4.21 (d, 2H, NHC_H₂, *J* = 5.02 Hz), 4.25 (q, 2H, OC_H₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 6.87 (bs, 1H, NH), 7.29 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.62 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.71 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.95 (m, 1H, Ar-C2-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.09 (OCH₂CH₃), 41.87 (NHCH₂), 61.71 (OCH₂CH₃), 122.73 (Ar-C₃), 125.57 (Ar-C₆), 130.10 (Ar-C₂), 130.34 (Ar-C₅), 134.68 (Ar-C₄), 135.62 (Ar-C₁), 166.01 (C=ONH), 169.92 (C=OO).

4-Bromhippursäureethylester (14)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 1.00 g 4-Brombenzoesäure (4.97 mmol)
 0.57 g *N*-Hydroxysuccinimid (4.97 mmol)
 1.03 g Dicyclohexylcarbodiimid (4.97 mmol)
 0.69 g Glycinethylester Hydrochlorid (4.97 mmol)
 1.38 ml Triethylamin (1.01 g, 9.95 mmol)

Lösemittel: 100.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.13 g, 3.95 mmol, 80 %, farbloser Feststoff

R_f: 0.22 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.32 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 4.22 (d, 2H, NHCH₂, *J* = 5.02 Hz), 4.27 (q, 2H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 6.71 (bs, 1H, NH), 7.58 (m, 2H, Ar-C_{3,5}-H), 7.69 (m, 2H, Ar-C_{2,6}-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.13 (OCH₂CH₃), 41.89 (NHCH₂), 61.75 (OCH₂CH₃), 126.52 (Ar-C₄), 128.66 (Ar-C_{2,6}), 131.84 (Ar-C_{3,5}), 132.54 (Ar-C₁), 166.41 (C=ONH), 169.97 (C=OO).

2-Iodhippursäureethylester (15)

Synthese: 23 °C, 6 d

Ansatz: 1.77 g 2-Iodbenzoesäure (7.14 mmol)
 0.82 g *N*-Hydroxysuccinimid (7.14 mmol)
 1.47 g Dicyclohexylcarbodiimid (7.14 mmol)
 1.00 g Glycinethylester Hydrochlorid (7.14 mmol)
 1.98 ml Triethylamin (1.44 g, 14.28 mmol)

Lösemittel: 100.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.52 g, 4.56 mmol, 64 %, farbloser Feststoff

Smp.: 70 °C

R_f: 0.46 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.29 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 4.18 (d, 2H, NHC₂H₂, *J* = 5.40 Hz), 4.22 (q, 2H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 6.54 (bs, 1H, NH), 7.08 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.35 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.39 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.84 (m, 1H, Ar-C3-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 13.75 (OCH₂CH₃), 41.38 (NHC₂H₂), 61.24 (OCH₂CH₃), 92.00 (Ar-C₂), 127.69 (Ar-C₆), 128.00 (Ar-C₅), 130.91 (Ar-C₄), 139.57 (Ar-C₃), 140.93 (Ar-C₁), 168.78 (C=ONH), 169.12 (C=OO).

3-Iodhippursäureethylester (16)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 1.00 g 3-Iodbenzoesäure (4.03 mmol)
 0.46 g *N*-Hydroxysuccinimid (4.03 mmol)
 0.83 g Dicyclohexylcarbodiimid (4.03 mmol)
 0.56 g Glycinethylester Hydrochlorid (4.03 mmol)
 1.12 ml Triethylamin (0.82 g, 8.06 mmol)

Lösemittel: 200.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.24 g, 3.72 mmol, 92 %, gelber Feststoff

Smp.: 65 °C

R_f: 0.53 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.31 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 4.21 (d, 2H, NHC₂H₂, *J* = 3.89 Hz), 4.26 (q, 2H, OCH₂CH₃, *J* = 7.15 Hz), 6.79 (bs, 1H, NH), 7.17 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.77 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.84 (m, 1H, Ar-C4-H), 8.15 (m, 1H, Ar-C2-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.11 (OCH₂CH₃), 41.77 (NHC₂H₂), 61.74 (OCH₂CH₃), 94.21 (Ar-C₃), 126.19 (Ar-C₆), 130.21 (Ar-C₅), 135.61 (Ar-C₁), 136.14 (Ar-C₂), 140.63 (Ar-C₄), 165.88 (C=ONH), 169.91 (C=OO).

4-Iodhippursäureethylester (17)

Synthese: 23 °C, 6 d

Ansatz: 2.50 g 4-Iodbenzoesäure (10.08 mmol)

	1.16 g <i>N</i> -Hydroxysuccinimid (10.08 mmol)
	2.80 g Dicyclohexylcarbodiimid (10.08 mmol)
	1.41 g Glycinethylester Hydrochlorid (10.08 mmol)
	2.79 ml Triethylamin (2.04 g, 20.16 mmol)
Lösemittel:	200.00 ml Tetrahydrofuran
Ausbeute:	2.68 g, 8.05 mmol, 80 %, farbloser Feststoff
Smp.:	124 °C (130-131 °C ¹³⁴)
R _f :	0.50 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.29 (t, 3H, OCH ₂ CH ₃ , <i>J</i> = 7.15 Hz), 4.17 (d, 2H, NHCH ₂ , <i>J</i> = 5.14 Hz), 4.23 (q, 2H, OCH ₂ CH ₃ , <i>J</i> = 7.15 Hz), 7.00 (bs, 1H, NH), 7.51 (m, 2H, Ar-C _{2,6} -H), 7.74 (m, 2H, Ar-C _{3,5} -H).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 14.07 (OCH ₂ CH ₃), 41.77 (NHCH ₂), 61.61 (OCH ₂ CH ₃), 98.76 (Ar-C ₄), 128.61 (Ar-C _{2,6}), 132.98 (Ar-C ₁), 137.67 (Ar-C _{3,5}), 166.67 (C=ONH), 169.98 (C=OO).

12.1.2 Lithiumhippurate

Die Lithiumhippurate (Abb. 12.2) tragen am Benzoylrest einen oder mehrere Substituenten (X). X = F, Cl, Br, I oder NO₂ in den Positionen 2, 3, 4 und/oder 6.

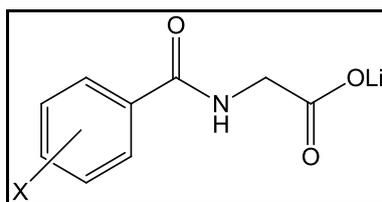


Abb. 12.2: Lithiumhippurate, X = entsprechender Substituent.

Die Lithiumhippurate wurden nach folgender Reaktionsvorschrift dargestellt. Angaben zur Reaktionsdauer sind allgemein gehalten und werden bei der Auflistung der synthetisierten Verbindungen präzisiert.

Verseifung der Hippursäureethylester

1 Äquivalent Hippursäureethylester wird in trockenem Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur vorgelegt und mit 1 Äquivalent Lithiumhydroxid Monohydrat versetzt. Die Suspension wird 7-

15 d bei Raumtemperatur gerührt. Die Gewinnung des Produkts erfolgt durch Abfiltrieren des ausgefällten Feststoffes und anschließendem Trocknen des Rohprodukts im Exsiccator.

Lithium 2-Chlor-6-fluorhippurat (18)

- Synthese: 23 °C, 7 d
- Ansatz: 0.81 g 2-Chlor-6-fluorhippursäureethylester (3.12 mmol)
0.13 g Lithiumhydroxid Monohydrat (3.12 mmol)
- Lösemittel: 50.00 ml Tetrahydrofuran
- Ausbeute: 0.46 g, 1.94 mmol, 62 %, farbloser Feststoff
- Smp.: >300 °C (Zersetzung)
- R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- ¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.95 (s, 2H, NHCH₂), 7.18 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.33 (m, 1H, Ar-C3-H), 7.45 (m, 1H, Ar-C4-H).
- ¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 43.73 (NHCH₂), 114.69 (Ar-C₅), 123.42 (Ar-C₁), 125.63 (Ar-C₃), 131.42 (Ar-C₂), 132.21 (Ar-C₄), 157.73, 160.21 (Ar-C₆), 165.40, (C=ONH), 175.70 (C=OO).

Lithium 2-Fluorhippurat (19)

- Synthese: 23 °C, 7 d
- Ansatz: 1.24 g 2-Fluorhippursäureethylester (5.51 mmol)
0.23 g Lithiumhydroxid Monohydrat (5.51 mmol)
- Lösemittel: 60.00 ml Tetrahydrofuran
- Ausbeute: 1.02 g, 5.02 mmol, 91 %, farbloser Feststoff
- Smp.: >300 °C (Zersetzung)
- R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- ¹H-NMR: (SO(CD₃)₂, 2.50, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.62 (d, 2H, NHCH₂, J = 4.27 Hz), 7.27 (m, 1H, Ar-C3-H), 7.30 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.53 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.80 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.85 (bs, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: ($\text{SO}(\text{CD}_3)_2$, 39.51, 100.62 MHz): δ [ppm] = 44.62 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 116.30 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}3$), 122.71 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}1$), 124.68 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}6$), 130.73 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}5$), 132.78 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}4$), 158.48, 160.95 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}2$), 161.74 ($\underline{\text{C}}=\text{ONH}$), 171.06 ($\underline{\text{C}}=\text{OO}$).

Lithium 3-Fluorhippurat (20)

Synthese: 23 °C, 7 d

Ansatz: 1.84 g 3-Fluorhippursäureethylester (8.17 mmol)

0.34 g Lithiumhydroxid Monohydrat (8.17 mmol)

Lösemittel: 50.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.32 g, 6.50 mmol, 80 %, farbloser Feststoff

Smp.: >300 °C (Zersetzung)

R_f : 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

$^1\text{H-NMR}$: ($\text{SO}(\text{CD}_3)_2$, 2.50, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.62 (s, 2H, $\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 7.34 (m, 1H, $\text{Ar-}\underline{\text{C}}4\text{-}\underline{\text{H}}$), 7.49 (m, 1H, $\text{Ar-}\underline{\text{C}}5\text{-}\underline{\text{H}}$), 7.63 (m, 1H, $\text{Ar-}\underline{\text{C}}2\text{-}\underline{\text{H}}$), 7.70 (m, 1H, $\text{Ar-}\underline{\text{C}}6\text{-}\underline{\text{H}}$), 8.19 (bs, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: ($\text{SO}(\text{CD}_3)_2$, 39.51, 100.62 MHz): δ [ppm] = 44.33 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 114.04 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}2$), 117.85 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}4$), 123.17 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}6$), 130.43 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}5$), 137.39 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}1$), 160.77, 163.20 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}3$), 164.02 ($\underline{\text{C}}=\text{ONH}$), 171.64 ($\underline{\text{C}}=\text{OO}$).

Lithium 4-Fluorhippurat (21)

Synthese: 23 °C, 15 d

Ansatz: 2.72 g 4-Fluorhippursäureethylester (12.08 mmol)

0.51 g Lithiumhydroxid Monohydrat (12.08 mmol)

Lösemittel: 150.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 2.45 g, 12.06 mmol, quant., farbloser Feststoff

Smp.: >300 °C (Zersetzung)

R_f : 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

$^1\text{H-NMR}$: (D_2O , 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.87 (s, 2H, $\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 7.16 (m, 2H, $\text{Ar-}\underline{\text{C}}3,5\text{-}\underline{\text{H}}$), 7.75 (m, 2H, $\text{Ar-}\underline{\text{C}}2,6\text{-}\underline{\text{H}}$).

^{13}C -NMR: (D_2O , 100.62 MHz): δ [ppm] = 43.77 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 115.68 (Ar- $\underline{\text{C}}_{3,5}$), 129.50 (Ar- $\underline{\text{C}}_1$), 129.59 (Ar- $\underline{\text{C}}_{2,6}$), 163.49, 165.97 (Ar- $\underline{\text{C}}_4$), 169.24 ($\underline{\text{C}}=\text{ONH}$), 176.73 ($\underline{\text{C}}=\text{OO}$).

Lithium 2,4-Difluorhippurat (22)

Synthese: 23 °C, 7 d

Ansatz: 1.37 g 2,4-Difluorhippursäureethylester (5.63 mmol)

0.24 g Lithiumhydroxid Monohydrat (5.63 mmol)

Lösemittel: 150.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.00 g, 4.52 mmol, 80 %, blassgelber Feststoff

Smp.: >300 °C (Zersetzung)

R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

^1H -NMR: (D_2O , 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.86 (s, 2H, $\text{NHC}\underline{\text{H}}_2$), 6.95 (m, 1H, Ar- $\text{C}5\text{-}\underline{\text{H}}$), 6.98 (m, 1H, Ar- $\text{C}3\text{-}\underline{\text{H}}$), 7.70 (m, 1H, Ar- $\text{C}6\text{-}\underline{\text{H}}$).

^{13}C -NMR: (D_2O , 100.62 MHz): δ [ppm] = 43.84 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 104.59 (Ar- $\underline{\text{C}}_5$), 112.15 (Ar- $\underline{\text{C}}_3$), 117.41 (Ar- $\underline{\text{C}}_1$), 132.01 (Ar- $\underline{\text{C}}_6$), 159.24, 161.88 (Ar- $\underline{\text{C}}_2$), 163.33, 165.97 (Ar- $\underline{\text{C}}_4$), 165.28 ($\underline{\text{C}}=\text{ONH}$), 176.26 ($\underline{\text{C}}=\text{OO}$).

Lithium 2,6-Difluorhippurat (23)

Synthese: 23 °C, 7 d

Ansatz: 1.35 g 2,6-Difluorhippursäureethylester (5.55 mmol)

0.23 g Lithiumhydroxid Monohydrat (5.55 mmol)

Lösemittel: 100.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.18 g, 5.33 mmol, 96 %, farbloser Feststoff

Smp.: >300 °C (Zersetzung)

R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

^1H -NMR: (D_2O , 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.95 (s, 2H, $\text{NHC}\underline{\text{H}}_2$), 7.08 (m, 2H, Ar- $\text{C}3,5\text{-}\underline{\text{H}}$), 7.52 (m, 1H, Ar- $\text{C}4\text{-}\underline{\text{H}}$).

12 SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG ORGANISCHER VERBINDUNGEN

^{13}C -NMR: (D_2O , 100.62 MHz): δ [ppm] = 43.77 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 111.90, 112.15 ($\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}_{3,5}$), 112.73 ($\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}_1$), 132.84 ($\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}_4$), 158.06, 158.12, 160.54, 160.61 ($\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}_{2,6}$), 163.28 ($\underline{\text{C}}=\text{ONH}$), 175.91 ($\underline{\text{C}}=\text{OO}$).

Lithium 2,4,6-Trifluorhippurat (24)

Synthese: 23 °C, 7 d

Ansatz: 1.26 g 2,4,6-Trifluorhippursäureethylester (4.82 mmol)

0.20 g Lithiumhydroxid Monohydrat (4.82 mmol)

Lösemittel: 100.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.15 g, 4.81 mmol, quant., farbloser Feststoff

Smp.: >300 °C (Zersetzung)

R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

^1H -NMR: (D_2O , 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.93 (s, 2H, $\text{NHC}\underline{\text{H}}_2$), 6.94 (m, 2H, $\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}_{3,5}\text{-}\underline{\text{H}}$).

^{13}C -NMR: (D_2O , 100.62 MHz): δ [ppm] = 43.79 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 101.10 ($\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}_{3,5}$), 109.69 ($\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}_1$), 158.79, 162.48, 164.97 ($\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}_{2,6}$), 162.48 ($\underline{\text{C}}=\text{ONH}$), 161.14, 161.39 ($\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}_4$), 175.88 ($\underline{\text{C}}=\text{OO}$).

Lithium 2-Chlor-6-nitrohippurat (25)

Synthese: 23 °C, 7 d

Ansatz: 0.30 g 2-Chlor-6-nitrohippursäureethylester (1.05 mmol)

0.05 g Lithiumhydroxid Monohydrat (1.05 mmol)

Lösemittel: 50.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 0.26 g, 0.98 mmol, 94 %, hellbrauner Feststoff

Smp.: >300 °C (Zersetzung)

R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

^1H -NMR: ($\text{SO}(\text{CD}_3)_2$, 2.50, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.55 (d, 2H, $\text{NHC}\underline{\text{H}}_2$, $J = 3.97$ Hz), 7.64 (m, 1H, $\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}_4\text{-}\underline{\text{H}}$), 7.92 (m, 1H, $\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}_3\text{-}\underline{\text{H}}$), 8.02 (bs, 1H, NH), 8.11 (m, 1H, $\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}_5\text{-}\underline{\text{H}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$: ($\text{SO}(\text{CD}_3)_2$, 39.51, 100.62 MHz): δ [ppm] = 44.85 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 123.10 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}5$), 130.46 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}4$), 132.08 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}1$), 132.77 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}2$), 135.17 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}3$), 146.77 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}6$), 161.64 ($\underline{\text{C}}=\text{ONH}$), 169.56 ($\underline{\text{C}}=\text{OO}$).

Lithium 2-Nitrohippurat (26)

Synthese: 23 °C, 7 d

Ansatz: 1.46 g 2-Nitrohippursäureethylester (5.79 mmol)

0.24 g Lithiumhydroxid Monohydrat (5.79 mmol)

Lösemittel: 60.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.32 g, 5.73 mmol, 99 %, hellbrauner Feststoff

Smp.: >300 °C (Zersetzung)

R_f : 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

$^1\text{H-NMR}$: ($\text{SO}(\text{CD}_3)_2$, 2.50, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.54 (d, 2H, $\text{NHC}\underline{\text{H}}_2$, $J = 4.27$ Hz), 7.68 (m, 2H, $\text{Ar-C4,6-}\underline{\text{H}}$), 7.75 (m, 1H, $\text{Ar-C5-}\underline{\text{H}}$), 7.97 (m, 1H, $\text{Ar-C3-}\underline{\text{H}}$), 8.02 (bs, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: ($\text{SO}(\text{CD}_3)_2$, 39.51, 100.62 MHz): δ [ppm] = 45.28 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 123.72 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}3$), 129.19 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}6$), 130.13 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}1$), 131.29 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}4$), 133.05 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}5$), 147.62 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}2$), 164.45 ($\underline{\text{C}}=\text{ONH}$), 171.53 ($\underline{\text{C}}=\text{OO}$).

Lithium 3-Nitrohippurat (27)

Synthese: 23 °C, 7 d

Ansatz: 0.54 g 3-Nitrohippursäureethylester (2.14 mmol)

0.09 g Lithiumhydroxid Monohydrat (2.14 mmol)

Lösemittel: 30.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 0.33 g, 1.43 mmol, 67 %, farbloser Feststoff

Smp.: >300 °C (Zersetzung)

R_f : 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

$^1\text{H-NMR}$: ($\text{SO}(\text{CD}_3)_2$, 2.50, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.56 (d, 2H, $\text{NHC}\underline{\text{H}}_2$, $J = 4.64$ Hz), 7.75 (m, 1H, $\text{Ar-C5-}\underline{\text{H}}$), 8.28 (m, 1H, $\text{Ar-C6-}\underline{\text{H}}$), 8.34 (m, 1H, $\text{Ar-C4-}\underline{\text{H}}$), 8.36 (bs, 1H, NH), 8.60 (m, 1H, $\text{Ar-C2-}\underline{\text{H}}$).

12 SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG ORGANISCHER VERBINDUNGEN

¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 43.86 (NHCH₂), 122.34 (Ar-C2), 126.50 (Ar-C4), 130.10 (Ar-C5), 133.49 (Ar-C6), 135.10 (Ar-C1), 147.83 (Ar-C3), 168.01 (C=ONH), 176.52 (C=OO).

Lithium 4-Nitrohippurat (28)

Synthese: 23 °C, 15 d

Ansatz: 2.23 g 4-Nitrohippursäureethylester (8.84 mmol)

0.37 g Lithiumhydroxid Monohydrat (8.84 mmol)

Lösemittel: 100.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.89 g, 8.22 mmol, 93 %, farbloser Feststoff

Smp.: >300 °C (Zersetzung)

R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.94 (s, 2H, NHCH₂), 7.95 (m, 2H, Ar-C2,6-H), 8.29 (m, 2H, Ar-C3,5-H).

¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 43.88 (NHCH₂), 123.86 (Ar-C3,5), 128.47 (Ar-C2,6), 139.41 (Ar-C1), 149.44 (Ar-C4), 168.48 (C=ONH), 176.42 (C=OO).

Lithium 2-Bromhippurat (29)

Synthese: 23 °C, 7 d

Ansatz: 1.20 g 2-Bromhippursäureethylester (4.19 mmol)

0.18 g Lithiumhydroxid Monohydrat (4.19 mmol)

Lösemittel: 70.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.04 g, 3.94 mmol, 94 %, farbloser Feststoff

Smp.: >300 °C (Zersetzung)

R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (SO(CD₃)₂, 2.50, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.49 (d, 2H, NHCH₂, $J = 4.52$ Hz), 7.34 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.42 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.44 (bs, 1H, NH), 7.46 (m, 1H, Ar-C3-H), 7.63 (m, 1H, Ar-C6-H).

Lithium 3-Bromhippurat (30)

- Synthese: 23 °C, 7 d
- Ansatz: 1.37 g 3-Bromhippursäureethylester (4.79 mmol)
0.20 g Lithiumhydroxid Monohydrat (4.79 mmol)
- Lösemittel: 80.00 ml Tetrahydrofuran
- Ausbeute: 1.16 g, 4.39 mmol, 92 %, farbloser Feststoff
- Smp.: >300 °C (Zersetzung)
- R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- ¹H-NMR: (SO(CD₃)₂, 2.50, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.55 (d, 2H, NHCH₂, J = 5.02 Hz), 7.42 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.70 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.82 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.98 (m, 1H, Ar-C2-H), 8.01 (bs, 1H, NH).

Lithium 4-Bromhippurat (31)

- Synthese: 23 °C, 15 d
- Ansatz: 2.20 g 4-Bromhippursäureethylester (7.70 mmol)
0.32 g Lithiumhydroxid Monohydrat (7.70 mmol)
- Lösemittel: 150.00 ml Tetrahydrofuran
- Ausbeute: 2.03 g, 7.70 mmol, quant., farbloser Feststoff
- Smp.: >300 °C (Zersetzung)
- R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- ¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.92 (s, 2H, NHCH₂), 7.66 (s, 4H, Ar-C2,3,5,6-H).
- ¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 43.80 (NHCH₂), 126.10 (Ar-C4), 128.87 (Ar-C2,6), 131.79 (Ar-C3,5), 132.37 (Ar-C1), 169.49 (C=ONH), 176.67 (C=OO).

Lithium 2-Iodhippurat (32)

- Synthese: 23 °C, 7 d
- Ansatz: 1.50 g 2-Iodhippursäureethylester (4.50 mmol)
0.19 g Lithiumhydroxid Monohydrat (4.50 mmol)

12 SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG ORGANISCHER VERBINDUNGEN

Lösemittel: 100.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 1.03 g, 3.30 mmol, 74 %, farbloser Feststoff

Smp.: >300 °C (Zersetzung)

R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (SO(CD₃)₂, 2.50, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.55 (d, 2H, NHCH₂, J = 4.02 Hz), 7.15 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.40 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.43 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.53 (bs, 1H, NH), 7.86 (m, 1H, Ar-C3-H).

¹³C-NMR: (SO(CD₃)₂, 39.51, 100.62 MHz): δ [ppm] = 44.37 (NHCH₂), 93.47 (Ar-C₂), 127.99 (Ar-C₆), 128.19 (Ar-C₅), 130.71 (Ar-C₄), 139.18 (Ar-C₃), 143.05 (Ar-C₁), 167.80 (C=ONH), 170.87 (C=OO).

Lithium 3-Iodhippurat (33)

Synthese: 23 °C, 7 d

Ansatz: 1.23 g 3-Iodhippursäureethylester (3.69 mmol)
0.15 g Lithiumhydroxid Monohydrat (3.69 mmol)

Lösemittel: 40.00 ml Tetrahydrofuran

Ausbeute: 0.95 g, 3.05 mmol, 83 %, farbloser Feststoff

Smp.: >300 °C (Zersetzung)

R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.86 (s, 2H, NHCH₂), 7.18 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.68 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.85 (m, 1H, Ar-C4-H), 8.05 (m, 1H, Ar-C2-H).

¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 43.84 (NHCH₂), 93.63 (Ar-C₃), 126.38 (Ar-C₆), 130.38 (Ar-C₅), 135.15 (Ar-C₁), 136.03 (Ar-C₂), 140.81 (Ar-C₄), 168.65 (C=ONH), 176.57 (C=OO).

Lithium 4-Iodhippurat (34)

Synthese: 23 °C, 15 d

Ansatz: 1.77 g 4-Iodhippursäureethylester (5.31 mmol)
0.22 g Lithiumhydroxid Monohydrat (5.31 mmol)

Lösemittel:	150.00 ml Tetrahydrofuran
Ausbeute:	1.65 g, 5.31 mmol, quant., farbloser Feststoff
Smp.:	>300 °C (Zersetzung)
R _f :	0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
¹ H-NMR:	(D ₂ O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 3.92 (s, 2H, NHCH ₂), 7.53 (m, 2H, Ar-C _{2,6} -H), 7.89 (m, 2H, Ar-C _{3,5} -H).
¹³ C-NMR:	(D ₂ O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 43.79 (NHCH ₂), 98.59 (Ar-C ₄), 128.72 (Ar-C _{2,6}), 132.93 (Ar-C ₁), 137.89 (Ar-C _{3,5}), 169.74 (C=ONH), 176.66 (C=OO).

12.1.3 Hippursäuren

Die Hippursäuren (Abb. 12.3) tragen am Benzoylrest einen oder mehrere Substituenten (X). X = F, Cl, Br, I oder NO₂ in den Positionen 2, 3, 4 und/oder 6.

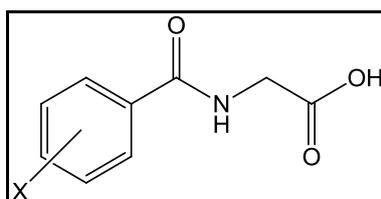


Abb. 12.3: Hippursäuren, X = entsprechender Substituent.

Die Hippursäuren wurden nach folgender Reaktionsvorschrift dargestellt. Angaben zur Reaktionsdauer sind allgemein gehalten und werden bei der Auflistung der synthetisierten Verbindungen präzisiert.

Freisetzung der Carbonsäuren aus den Lithiumhippuraten

1 Äquivalent Lithium-Hippurat wird in 7 Äquivalenten 5%iger Kaliumhydrogensulfatlösung gelöst. Anschließend wird bis zur Sättigung Natriumchlorid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 12 h-3 d bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das wässrige Gemisch 3 mal mit *tert*Butylmethylether oder Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird im Exsiccator getrocknet.

2-Chlor-6-fluorhippursäure (35)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 0.46 g Lithium 2-Chlor-6-fluorhippurat (1.94 mmol)

1.85 g Kaliumhydrogensulfat (13.59 mmol, 36.92 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 0.33 g, 1.43 mmol, 73 %, farbloser Feststoff

Smp.: 194 °C

R_f: 0.10 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.19 (s, 2H, NHCH₂), 7.22 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.37 (m, 1H, Ar-C3-H), 7.48 (m, 1H, Ar-C4-H).

¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 41.76 (NHCH₂), 114.74 (Ar-C₅), 124.43 (Ar-C₁), 125.71 (Ar-C₃), 131.34 (Ar-C₂), 132.34, (Ar-C₄), 158.37, 162.46 (Ar-C₆), 166.07 (C=ONH), 176.12 (C=OO).

2-Fluorhippursäure (36)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 0.50 g Lithium 2-Fluorhippurat (2.46 mmol)

2.35 g Kaliumhydrogensulfat (17.23 mmol, 46.93 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 0.45 g, 2.28 mmol, 93 %, farbloser Feststoff

Smp.: 146 °C (150 °C^{85,135})

R_f: 0.19 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.17 (s, 2H, NHCH₂), 7.24 (m, 1H, Ar-C3-H), 7.31 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.59 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.75 (m, 1H, Ar-C5-H).

¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 41.86 (NHCH₂), 116.51 (Ar-C₃), 120.92 (Ar-C₁), 124.79 (Ar-C₆), 130.12 (Ar-C₅), 134.12 (Ar-C₄), 158.71, 161.19 (Ar-C₂), 167.43 (C=ONH), 173.57 (C=OO).

Die NMR-Daten entsprechen der Literatur (in SO(CD₃)₂ gemessen).⁸⁵

3-Fluorhippursäure (37)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 0.50 g Lithium 3-Fluorhippurat (2.46 mmol)

2.35 g Kaliumhydrogensulfat (17.23 mmol, 46.93 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 0.41 g, 2.08 mmol, 85 %, farbloser Feststoff

Smp.: 154 °C

R_f: 0.13 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.14 (s, 2H, NHCH₂), 7.34 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.49 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.52 (m, 1H, Ar-C2-H), 7.59 (m, 1H, Ar-C6-H).¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 41.67 (NHCH₂), 114.35 (Ar-C₂), 119.34 (Ar-C₄), 123.06 (Ar-C₆), 130.78 (Ar-C₅), 134.92 (Ar-C₁), 161.17, 163.60 (Ar-C₃), 169.76 (C=ONH), 173.52 (C=OO).**4-Fluorhippursäure (38)**

Synthese: 23 °C, 1 d

Ansatz: 2.45 g Lithium 4-Fluorhippurat (12.06 mmol)

11.50 g Kaliumhydrogensulfat (84.44 mmol, 229.97 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 1.21 g, 6.14 mmol, 49 %, farbloser Feststoff

Smp.: 160 °C (173 °C⁸⁵, 114 °C¹³⁵, 170-171 °C¹³⁶, 161-163 °C¹³⁷)R_f: 0.11 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.31 (d, 2H, NHCH₂, J = 5.02 Hz), 6.60 (s, 1H, NH), 7.15 (m, 2H, Ar-C3,5-H), 7.85 (m, 2H, Ar-C2,6-H).¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 41.70 (NHCH₂), 115.83 (Ar-C_{3,5}), 129.08 (Ar-C₁), 129.86 (Ar-C_{2,6}), 163.73, 166.21 (Ar-C₄), 170.11 (C=ONH), 173.70 (C=OO).Die NMR-Daten entsprechen der Literatur (in SO(CD₃)₂ gemessen).⁸⁵

2,4-Difluorhippursäure (39)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 0.90 g Lithium 2,4-Difluorhippurat (4.07 mmol)

3.88 g Kaliumhydrogensulfat (28.50 mmol, 77.60 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 0.63 g, 2.93 mmol, 72 %, hellbrauner Feststoff

Smp.: 124 °C

R_f: 0.21 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.16 (s, 2H, NHCH₂), 7.05 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.09 (m, 1H, Ar-C3-H), 7.79 (m, 1H, Ar-C6-H).

¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 41.75 (NHCH₂), 104.73 (Ar-C₅), 112.31 (Ar-C₃), 117.42 (Ar-C₁), 132.01, (Ar-C₆), 159.32, 161.96 (Ar-C₂), 163.58, 166.22 (Ar-C₄), 166.49, (C=ONH), 173.39 (C=OO).

2,6-Difluorhippursäure (40)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 0.80 g Lithium 2,6-Difluorhippurat (3.62 mmol)

3.45 g Kaliumhydrogensulfat (25.34 mmol, 69.01 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 0.66 g, 3.07 mmol, 85 %, farbloser Feststoff

Smp.: 150 °C (156 °C⁸⁵)

R_f: 0.15 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.26 (d, 2H, NHCH₂), 6.63 (bs, 1H, NH), 6.96 (m, 2H, Ar-C3,5-H), 7.39 (m, 1H, Ar-C4-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 41.83 (NHCH₂), 111.94, 112.20 (Ar-C_{3,5}), 112.49 (Ar-C₁), 132.05 (Ar-C₄), 157.65, 157.68, 161.36, 161.43 (Ar-C_{2,6}), 160.42 (C=ONH), 169.36 (C=OO).

2,4,6-Trifluorhippursäure (41)

- Synthese: 23 °C, 3 d
- Ansatz: 0.90 g Lithium 2,4,6-Trifluorhippurat (3.76 mmol)
3.59 g Kaliumhydrogensulfat (26.35 mmol, 71.76 ml 5%ige Lösung)
Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung
- Ausbeute: 0.71 g, 3.05 mmol, 81 %, blassgelber Feststoff
- Smp.: 181 °C
- R_f: 0.18 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- ¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.18 (s, 2H, NHCH₂), 6.97 (m, 2H, Ar-C_{3,5}-H).
- ¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 41.67 (NHCH₂), 101.17 (Ar-C_{3,5}), 109.50 (Ar-C₁), 158.67, 161.33 (Ar-C₄), 161.42, 162.66, 165.16 (Ar-C_{2,6}), 163.17 (C=ONH), 172.93 (C=OO).

2-Chlor-6-nitrohippursäure (42)

- Synthese: 23 °C, 12 h
- Ansatz: 0.20 g Lithium 2-Chlor-6-nitrohippurat (0.76 mmol)
0.72 g Kaliumhydrogensulfat (5.29 mmol, 14.40 ml 5%ige Lösung)
Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung
- Ausbeute: 0.14 g, 0.54 mmol, 71 %, hellbrauner Feststoff
- Smp.: 161 °C
- R_f: 0.23 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- ¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.24 (s, 2H, NHCH₂), 7.71 (m, 1H, Ar-C₄-H), 7.94 (m, 1H, Ar-C₃-H), 8.23 (m, 1H, Ar-C₅-H).
- ¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 41.68 (NHCH₂), 123.62 (Ar-C₅), 129.69 (Ar-C₁), 131.69 (Ar-C₄), 132.71 (Ar-C₂), 136.13 (Ar-C₃), 146.00 (Ar-C₆), 167.25 (C=ONH), 172.55 (C=OO).

2-Nitrohippursäure (43)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 1.30 g Lithium 2-Nitrohippurat (5.65 mmol)

5.39 g Kaliumhydrogensulfat (39.55 mmol, 107.71 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 0.69 g, 3.08 mmol, 55 %, hellbrauner Feststoff

Smp.: 188 °C (190 °C^{85,138}, 193-194 °C¹³⁹, 185-187 °C¹²⁸)

R_f: 0.15 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.21 (s, 2H, NHCH₂), 7.70 (m, 2H, Ar-C_{4,6}-H), 7.84 (m, 1H, Ar-C₅-H), 8.18 (m, 1H, Ar-C₃-H).

¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 41.60 (NHCH₂), 124.89 (Ar-C₃), 128.92 (Ar-C₆), 130.60 (Ar-C₁), 131.58 (Ar-C₄), 134.79 (Ar-C₅), 145.59 (Ar-C₂), 170.20 (C=ONH), 172.84 (C=OO).

3-Nitrohippursäure (44)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 0.20 g Lithium 3-Nitrohippurat (0.87 mmol)

0.83 g Kaliumhydrogensulfat (6.08 mmol, 16.57 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 0.25 g, 0.67 mmol, 77 %, beiger Feststoff

Smp.: 165 °C (165-166 °C¹⁴⁰, 164-165.5 °C¹²⁸)

R_f: 0.05 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.20 (s, 2H, NHCH₂), 7.76 (m, 1H, Ar-C₅-H), 8.19 (m, 1H, Ar-C₆-H), 8.44 (m, 1H, Ar-C₄-H), 8.66 (m, 1H, Ar-C₂-H).

¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 41.91 (NHCH₂), 122.47 (Ar-C₂), 126.81 (Ar-C₄), 130.21 (Ar-C₅), 133.59 (Ar-C₆), 134.47 (Ar-C₁), 147.94 (Ar-C₃), 168.78 (C=ONH), 173.63 (C=OO).

4-Nitrohippursäure (45)

Synthese: 23 °C, 1 d

Ansatz: 1.89 g Lithium 4-Nitrohippurat (8.22 mmol)

7.83 g Kaliumhydrogensulfat (57.50 mmol, 156.59 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 1.05 g, 4.68 mmol, 55 %, beiger Feststoff

Smp.: 133 °C (137 °C⁸⁵, 130-132 °C¹⁴¹)R_f: 0.22 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.18 (s, 2H, NHCH₂), 7.95 (m, 2H, Ar-C_{2,6}-H), 8.30 (m, 2H, Ar-C_{3,5}-H).¹³C-NMR: (D₂O, 100.62 MHz): δ [ppm] = 41.76 (NHCH₂), 123.90 (Ar-C_{3,5}), 128.55 (Ar-C_{2,6}), 138.79 (Ar-C₁), 149.62 (Ar-C₄), 169.08 (C=ONH), 173.36 (C=OO).Die NMR-Daten entsprechen der Literatur (in SO(CD₃)₂ gemessen).⁸⁵**2-Bromhippursäure (46)**

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 1.00 g Lithium 2-Bromhippurat (3.79 mmol)

3.61 g Kaliumhydrogensulfat (26.52 mmol, 72.21 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 0.56 g, 2.17 mmol, 57 %, farbloser Feststoff

R_f: 0.08 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.27 (m, 2H, NHCH₂, J = 4.89 Hz), 6.64 (bs, 1H, NH), 7.31 (m, 1H, Ar-C₅-H), 7.38 (m, 1H, Ar-C₄-H), 7.59 (m, 1H, Ar-C₃-H), 7.62 (m, 1H, Ar-C₆-H).**3-Bromhippursäure (47)**

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 1.10 g Lithium 3-Bromhippurat (4.17 mmol)

3.97 g Kaliumhydrogensulfat (29.17 mmol, 79.43 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 0.55 g, 2.13 mmol, 51 %, farbloser Feststoff

R_f: 0.11 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.24 (d, 2H, NHCH₂, J = 5.02 Hz), 6.81 (bs, 1H, NH), 7.33 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.65 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.76 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.98 (m, 1H, Ar-C2-H).

4-Bromhippursäure (48)

Synthese: 23 °C, 1 d

Ansatz: 2.17 g Lithium 4-Bromhippurat (8.22 mmol)

7.83 g Kaliumhydrogensulfat (57.54 mmol, 156.70 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 1.98 g, 7.67 mmol, 93 %, farbloser Feststoff

R_f: 0.10 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (CDCl₃, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.16 (d, 2H, NHCH₂, J = 4.64 Hz), 6.98 (bs, 1H, NH), 7.57 (m, 2H, Ar-C3,5-H), 7.71 (m, 2H, Ar-C2,6-H).

2-Iodhippursäure (49)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 0.80 g Lithium 2-Iodhippurat (2.57 mmol)

2.45 g Kaliumhydrogensulfat (18.01 mmol, 49.04 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 0.65 g, 2.13 mmol, 83 %, farbloser Feststoff

Smp.: 173 °C (172 °C¹⁴², 170 °C¹⁴³, 167 °C¹⁴⁴)

R_f: 0.17 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

¹H-NMR: (D₂O, 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.17 (s, 2H, NHCH₂), 7.24 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.46 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.50 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.98 (m, 1H, Ar-C3-H).

^{13}C -NMR: (D_2O , 100.62 MHz): δ [ppm] = 41.65 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 91.49 (Ar- $\underline{\text{C}}2$), 127.99 (Ar- $\underline{\text{C}}6$), 128.40 (Ar- $\underline{\text{C}}5$), 131.76 (Ar- $\underline{\text{C}}4$), 139.79 (Ar- $\underline{\text{C}}3$), 140.39 (Ar- $\underline{\text{C}}1$), 173.10 ($\underline{\text{C}}=\text{ONH}$), 173.15 ($\underline{\text{C}}=\text{OO}$).

3-Iodhippursäure (50)

Synthese: 23 °C, 3 d

Ansatz: 0.80 g Lithium 3-Iodhippurat (2.57 mmol)

2.45 g Kaliumhydrogensulfat (18.01 mmol, 49.04 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 0.67 g, 2.20 mmol, 85 %, blassgelber Feststoff

Smp.: 154 °C (167-169 °C¹⁴³)

R_f: 0.20 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

^1H -NMR: (D_2O , 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.12 (s, 2H, $\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 7.29 (m, 1H, Ar- $\underline{\text{C}}5$ - $\underline{\text{H}}$), 7.79 (m, 1H, Ar- $\underline{\text{C}}6$ - $\underline{\text{H}}$), 7.98 (m, 1H, Ar- $\underline{\text{C}}4$ - $\underline{\text{H}}$), 8.18 (m, 1H, Ar- $\underline{\text{C}}2$ - $\underline{\text{H}}$).

^{13}C -NMR: (D_2O , 100.62 MHz): δ [ppm] = 42.09 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 93.57 (Ar- $\underline{\text{C}}3$), 126.50 (Ar- $\underline{\text{C}}6$), 130.48 (Ar- $\underline{\text{C}}5$), 134.14 (Ar- $\underline{\text{C}}1$), 136.17 (Ar- $\underline{\text{C}}2$), 141.12 (Ar- $\underline{\text{C}}4$), 169.82 ($\underline{\text{C}}=\text{ONH}$), 174.10 ($\underline{\text{C}}=\text{OO}$).

4-Iodhippursäure (51)

Synthese: 23 °C, 1 d

Ansatz: 1.79 g Lithium 4-Iodhippurat (5.76 mmol)

5.49 g Kaliumhydrogensulfat (40.92 mmol, 109.72 ml 5%ige Lösung)

Natriumchlorid bis zur Sättigung der Lösung

Ausbeute: 0.98 g, 3.21 mmol, 51 %, blassgelber Feststoff

Smp.: 190 °C (188-190 °C¹⁴³)

R_f: 0.18 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

^1H -NMR: (CDCl_3 , 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 4.12 (d, 2H, $\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $J = 4.39$ Hz), 6.98 (bs, 1H, $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$), 7.57 (m, 2H, Ar- $\underline{\text{C}}2,6$ - $\underline{\text{H}}$), 7.78 (m, 2H, Ar- $\underline{\text{C}}3,5$ - $\underline{\text{H}}$).

^{13}C -NMR: (D_2O , 100.62 MHz): δ [ppm] = 46.72 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 99.99 ($\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}4$), 128.73 ($\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}2,6$), 133.02 ($\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}1$), 137.93 ($\text{Ar}\text{-}\underline{\text{C}}3,5$), 167.30 ($\underline{\text{C}}=\text{ONH}$), 176.31 ($\underline{\text{C}}=\text{OO}$).

12.2 Prolin-Teil

Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (52)

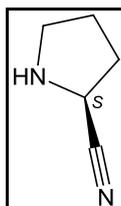


Abb. 12.4: Pyrrolidin-(2S)-carbonitril.

Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (Abb. 12.4) wurde nach folgender Reaktionsvorschrift dargestellt.

Boc-Entschützung bei Boc-Pyrrolidin-(2S)-carbonitril

Boc-Pyrrolidin-(2S)-carbonitril wird in trockenem Dichlormethan gelöst und unter Argon wird bei 0 °C Trifluoressigsäure im Überschuss zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Erneut wird Dichlormethan zugegeben und wieder unter Vakuum entfernt, dies wird bis zu 3 mal wiederholt. Das trockene Rohprodukt wird anschließend mit kaltem Diethylether überschichtet und über Nacht auf 0 °C gekühlt. Die nun Boc-entschützte Verbindung fällt als Trifluoressigsäure-Salz aus. Durch Abdekantieren der überstehenden Lösung erhält man sauberes Produkt als farblosen Feststoff, der im Exsiccator getrocknet wird.

Synthese: 0 °C, 1 d

Ansatz: 0.50 g Boc-Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (2.55 mmol)

5.00 ml Trifluoressigsäure (7.45 g, 65.34 mmol)

Lösemittel: 12.00 ml Dichlormethan

Ausbeute: 0.09 g, 0.43 mmol, 17 %, farbloser hygroskopischer Feststoff

R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

$[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ °C: +67.9° [c = 0.56, CHCl_3]

^1H -NMR: (D_2O , 4.75, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.08-2.29 (2m, 2H, Py-C4-H₂), 2.32-2.56 (2m, 2H, Py-C3-H₂), 3.41-3.55 (m, 2H, Py-C5-H₂), 4.71 (m, 1H, Py-C2-H).

^{13}C -NMR: (D_2O , 400.13 MHz): δ [ppm] = 23.30 (Py-C4), 29.85 (Py-C3), 46.26 (Py-C5), 46.81 (Py-C2), 115.65 (C \equiv N).

Die NMR-Daten entsprechen der Literatur.⁸⁹

12.3 Glycin-Prolin-Analoga

12.3.1 1-Hippursäure-pyrrolidin-(2S)-carbonitrile

Die 1-Hippursäure-pyrrolidin-(2S)-carbonitrile (Abb. 12.5) tragen am Benzoylrest einen oder mehrere Substituenten (X). X = F, Cl, Br, I oder NO_2 in den Positionen 2, 3, 4 und/oder 6.

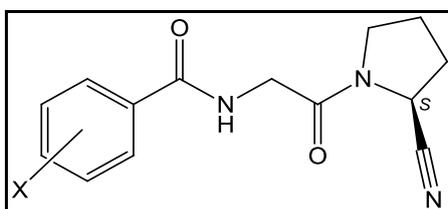


Abb. 12.5: Hippursäureethylester, X = entsprechender Substituent.

Die 1-Hippursäure-pyrrolidin-(2S)-carbonitrile wurden nach folgender Reaktionsvorschrift dargestellt. Angaben zur Reaktionsdauer sind allgemein gehalten und werden bei der Auflistung der synthetisierten Verbindungen präzisiert.

Peptidkupplung einer Hippursäure und Pyrrolidin-(2S)-carbonitril

Zu einer eisgekühlten Lösung von 1 Äquivalent Hippursäure in Dichlormethan werden 1 Äquivalent *N*-Hydroxybenzotriazol Monohydrat und 1.3 Äquivalente 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hinzugefügt. Nach 30 min Rühren bei 0 °C werden 2 Äquivalente *N*-Methylmorpholin und 1 Äquivalent Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (**52**) dazugegeben und das Reaktionsgemisch wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die Lösung wird über Nacht bzw. noch einen weiteren Tag gerührt, danach wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen. Die Lösung wird anschließend nacheinander mit Wasser, 0.2 M Salzsäure, 1 M Natriumhydrogen-carbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird durch Kieselgel filtriert und mit Essigsäureethylester eluiert. Das Lösemittel wird anschließend am Rotationsverdampfer entfernt und das resultierende Produkt wird im Exsiccator getrocknet.

1-(2-Chlor-6-fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (53)

- Synthese: 0-23 °C, 2 d
- Ansatz: 0.09 g 2-Chlor-6-fluorhippursäure (0.38 mmol)
 0.08 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.38 mmol)
 0.07 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.06 g, 0.40 mmol)
 0.03 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.23 mmol)
 0.09 ml *N*-Methylmorpholin (0.08 g, 0.76 mmol)
- Lösemittel: 50.00 ml trockenes Dichlormethan
- Ausbeute: 0.08 g, 0.26 mmol, 67 %, farbloser Feststoff
- Smp.: 138 °C
- R_f: 0.35 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- HPLC: präparative Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm
 Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]
 Flussgeschwindigkeit: 7.0 ml/min
 Retentionszeit: 5.5 min
- [α]_D^{22 °C}: -232.4° [c = 0.50, CHCl₃]
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3302 (m, CON-H), 3084, 2934, 2876 (w, aromat. C-H), 2242 (w, C≡N), 1671, 1644 (s, aromat. C=C, C-H), 1543, 1518 (s, C=ONH), 1446, 1404 (s, -CH₂-), 781 (m, aromat. C-H).
- ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₃ClFN₃O₂, 309.07; gef.: 332.06 [M+Na]⁺
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 100.62 MHz): δ [ppm] = 2.17-2.39 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.50, 3.66 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.15-4.37 (m, 2H, NHC_{H₂}), 4.74 (m, 1H, Py-C2-H), 7.03 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.07 (bs, 1H, NH), 7.20 (m, 1H, Ar-C3-H), 7.31 (m, 1H, Ar-C4-H).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 400.13 MHz): δ [ppm] = 24.94 (Py-C4), 29.81 (Py-C3), 42.36 (NHC_{H₂}), 45.51 (Py-C5), 46.52 (Py-C2), 114.48 (Ar-C5), 117.84 (C≡N), 124.49 (Ar-C1), 125.52 (Ar-C3), 131.28 (Ar-C4), 132.32 (Ar-C2), 158.17, 160.67 (Ar-C6), 162.36 (C=ONHR), 166.71 (C=ONR₂).

1-(2-Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (54)

Synthese: 0-23 °C, 2 d

Ansatz: 0.08 g 2-Fluorhippursäure (0.38 mmol)

0.08 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.38 mmol)

0.07 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.06 g, 0.40 mmol)

0.03 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.23 mmol)

0.09 ml *N*-Methylmorpholin (0.08 g, 0.76 mmol)

Lösemittel: 50.00 ml trockenes Dichlormethan

Ausbeute: 0.06 g, 0.24 mmol, 62 %, farbloser Feststoff

Smp.: 140 °C

R_f: 0.52 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

HPLC: präparative Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm

Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]

Flussgeschwindigkeit: 7.0 ml/min

Retentionszeit: 6.2 min

[α]_D^{22 °C}: -238.9° [c = 0.54, CHCl₃]

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3427 (m, CON-H), 3063, 2993, 2960, 2880 (w, aromat. C-H), 2348, 2236 (w, C≡N), 1646, 1614 (s, aromat. C=C, C-H), 1520 (s, C=ONH), 1481, 1444, 1418 (s, -CH₂-), 792, 757 (m, aromat. C-H).

ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₄FN₃O₂, 275.11; gef.: 298.10 [M+Na]⁺

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.15-2.30 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.50, 3.66 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.16-4.37 (m, 2H, NHC_{H₂}), 4.77 (m, 1H, Py-C2-H), 7.09 (m, 1H, Ar-C3-H), 7.22 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.44 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.72 (bs, 1H, NH), 8.02 (m, 1H, Ar-C5-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 400.13 MHz): δ [ppm] = 24.92 (Py-C₄), 29.76 (Py-C₃), 42.52 (NHC_{H₂}), 45.45 (Py-C₅), 46.49 (Py-C₂), 116.18 (Ar-C₃), 117.95 (C≡N), 120.46 (Ar-C₁), 124.52 (Ar-C₆), 131.54 (Ar-C₅), 133.46 (Ar-C₄), 159.42, 161.90 (Ar-C₂), 163.18 (C=ONHR), 167.17 (C=ONR₂).

1-(3-Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (55)

Synthese: 0-23 °C, 2 d

Ansatz: 0.08 g 3-Fluorhippursäure (0.38 mmol)

0.08 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.38 mmol)

0.07 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.06 g, 0.40 mmol)

0.03 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.23 mmol)

0.09 ml *N*-Methylmorpholin (0.08 g, 0.76 mmol)

Lösemittel: 50.00 ml trockenes Dichlormethan

Ausbeute: 0.07 g, 0.24 mmol, 63 %, farbloser Feststoff

Smp.: 125 °C

R_f: 0.43 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

HPLC: präparative Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm

Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]

Flussgeschwindigkeit: 7.0 ml/min

Retentionszeit: 7.2 min

[α]_D^{22 °C}: -266.3° [c = 0.46, CHCl₃]

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3314 (m, CON-H), 3069, 2988, 2972, 2905 (w, arom. C-H), 2361, 2250 (w, C≡N), 1660, 1634 (s, arom. C=C, C-H), 1583, 1552 (s, C=ONH), 1482, 1436, 1411 (s, -CH₂-), 755, 686 (m, arom. C-H).

ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₄FN₃O₂, 275.11; gef.: 298.10 [M+Na]⁺

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.16-2.32 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.50, 3.70 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.07, 4.50 (m, 2H, NHCH₂), 4.74 (m, 1H, Py-C2-H), 7.10 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.27 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.49 (m, 1H, Ar-C2-H), 7.54 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.86 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 25.00 (Py-C4), 29.69 (Py-C3), 42.22 (NHCH₂), 45.61 (Py-C5), 46.65 (Py-C2), 114.60 (Ar-C2), 118.07 (C≡N), 118.58 (Ar-C4), 122.44 (Ar-C6), 130.00 (Ar-C5), 135.53 (Ar-C1), 161.27, 163.73 (Ar-C3), 165.85 (C=ONHR), 168.27 (C=ONR₂).

1-(4-Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (56)

Synthese: 0-23 °C, 1 d

Ansatz: 0.05 g 4-Fluorhippursäure (0.24 mmol)

0.05 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.24 mmol)

0.04 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.04 g, 0.25 mmol)

0.02 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.14 mmol)

0.05 ml *N*-Methylmorpholin (0.05 g, 0.48 mmol)

Lösemittel: 40.00 ml trockenes Dichlormethan

Ausbeute: 0.06 g, 0.22 mmol, 93 %, farbloser glasiger Feststoff

Smp.: 105 °C

R_f: 0.34 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

HPLC: präparative Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm

Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]

Flussgeschwindigkeit: 7.0 ml/min

Retentionszeit: 5.7 min

[α]_D^{22 °C}: -165.3° [c = 0.59, CHCl₃]

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3333 (m, CON-H), 3072, 2958, 2882 (w, arom. C-H), 2360, 2243 (w, C≡N), 1638, 1602, (s, arom. C=C, C-H), 1543, 1500 (s, C=ONH), 1432 (s, -CH₂-), 851, 765 (m, arom. C-H).

ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₄FN₃O₂, 275.11; gef.: 298.10 [M+Na]⁺

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.15-2.35 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.51, 3.71 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.08, 4.48 (m, 2H, NHC_{H₂}), 4.75 (m, 1H, Py-C2-H), 6.99 (m, 2H, Ar-C3,5-H), 7.71 (bs, 1H, NH), 7.82 (m, 2H, Ar-C2,6-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 25.03 (Py-C4), 29.75 (Py-C3), 42.46 (NHC_{H₂}), 45.61 (Py-C5), 46.66 (Py-C2), 115.47 (Ar-C3,5), 118.05 (C≡N), 129.42 (Ar-C2,6), 129.45 (Ar-C1), 163.47, 165.98 (Ar-C4), 166.13 (C=ONHR), 168.30 (C=ONR₂).

1-(2,4-Difluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (57)

Synthese: 0-23 °C, 2 d

Ansatz: 0.08 g 2,4-Difluorhippursäure (0.38 mmol)

0.08 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.38 mmol)

0.07 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.06 g, 0.40 mmol)

0.03 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.23 mmol)

0.09 ml *N*-Methylmorpholin (0.08 g, 0.76 mmol)

Lösemittel: 50.00 ml trockenes Dichlormethan

Ausbeute: 0.07 g, 0.24 mmol, 62 %, farbloser Feststoff

Smp.: 164 °C

R_f: 0.53 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

HPLC: präparative Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm

Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]

Flussgeschwindigkeit: 7.0 ml/min

Retentionszeit: 7.5 min

[α]_D^{22 °C}: -223.2° [c = 0.56, CHCl₃]

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3418 (m, CON-H), 3066, 3049, 2889 (w, aromat. C-H), 2237 (w, C≡N), 1671, 1642, 1614 (s, aromat. C=C, C-H), 1521 (s, C=ONH), 1487, 1444, 1419 (s, -CH₂-), 768 (m, aromat. C-H).

ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₃F₂N₃O₂, 293.10; gef.: 316.09 [M+Na]⁺

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.16-2.36 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.52, 3.69 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.17-4.37 (m, 2H, NHCH₂), 4.79 (m, 1H, Py-C2-H), 6.87 (m, 1H, Ar-C5-H), 6.98 (m, 1H, Ar-C3-H), 7.67 (bs, 1H, NH), 8.09 (m, 1H, Ar-C6-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 400.13 MHz): δ [ppm] = 25.00 (Py-C4), 29.87 (Py-C3), 42.61 (NHCH₂), 45.52 (Py-C5), 46.58 (Py-C2), 104.41 (Ar-C5), 112.07 (Ar-C3), 116.84 (Ar-C1), 117.89 (C≡N), 133.52 (Ar-C6), 159.87, 162.50 (Ar-C2), 162.37 (C=ONHR), 163.60, 166.27 (Ar-C4), 167.12 (C=ONR₂).

1-(2,6-Difluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (58)

Synthese: 0-23 °C, 2 d

Ansatz: 0.05 g 2,6-Difluorhippursäure (0.23 mmol)

0.05 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.24 mmol)

0.04 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.04 g, 0.25 mmol)

0.02 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.14 mmol)

0.05 ml *N*-Methylmorpholin (0.05 g, 0.48 mmol)

Lösemittel: 50.00 ml trockenes Dichlormethan

Ausbeute: 0.02 g, 0.07 mmol, 30 %, farbloser Feststoff

Smp.: 120 °C

R_f: 0.40 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

HPLC: präparative Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm

Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]

Flussgeschwindigkeit: 7.0 ml/min

Retentionszeit: 4.3 min

[α]_D^{22 °C}: -198.1° [c = 0.52, CHCl₃]

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3308 (m, CON-H), 3067, 2956 (w, arom. C-H), 2158 (w, C≡N), 1672, 1642, 1624 (s, arom. C=C, C-H), 1528 (s, C=ONH), 1465, 1447, 1408 (s, -CH₂-), 793 (m, arom. C-H).

ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₃F₂N₃O₂, 293.10; gef.: 316.09 [M+Na]⁺

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.10-2.45 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.52, 3.67 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.16-4.37 (m, 2H, NHC_{H₂}), 4.78 (m, 1H, Py-C2-H), 6.95 (m, 2H, Ar-C3,5-H), 7.10 (bs, 1H, NH), 7.38 (m, 2H, Ar-C4-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 400.13 MHz): δ [ppm] = 24.99 (Py-C4), 29.88 (Py-C3), 42.42 (NHC_{H₂}), 45.53 (Py-C5), 46.59 (Py-C2), 111.87, 112.13 (Ar-C3,5), 117.82 (C≡N), 131.98 (Ar-C4), 158.74, 158.80, 161.25, 161.32 (Ar-C2,6), 160.42 (C=ONHR), 166.80 (C=ONR₂).

1-(2,4,6-Trifluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (59)

- Synthese: 0-23 °C, 2 d
- Ansatz: 0.09 g 2,4,6-Trifluorhippursäure (0.38 mmol)
 0.08 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.38 mmol)
 0.07 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.06 g, 0.40 mmol)
 0.03 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.23 mmol)
 0.09 ml *N*-Methylmorpholin (0.08 g, 0.76 mmol)
- Lösemittel: 50.00 ml trockenes Dichlormethan
- Ausbeute: 0.08 g, 0.27 mmol, 70 %, farbloser Feststoff
- Smp.: 160 °C
- R_f: 0.47 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- HPLC: präparative Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm
 Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]
 Flussgeschwindigkeit: 7.0 ml/min
 Retentionszeit: 4.7 min
- [α]_D^{22 °C}: -185.0° [c = 0.60, CHCl₃]
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3305 (m, CON-H), 3099, 2938, 2960, 2889 (w, aromat. C-H), 2245 (w, C≡N), 1643, 1616 (s, aromat. C=C, C-H), 1556, 1528 (s, C=ONH), 1484, 1440, 1423, 1404 (s, -CH₂-), 745 (m, aromat. C-H).
- ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₂F₃N₃O₂, 311.09; gef.: 334.08 [M+Na]⁺
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.20-2.33 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.51, 3.67 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.14-4.36 (m, 2H, NHCH₂), 4.76 (m, 1H, Py-C2-H), 6.72 (m, 2H, Ar-C3,5-H), 7.13 (bs, 1H, NH).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 24.98 (Py-C₄), 29.86 (Py-C₃), 42.43 (NHCH₂), 45.54 (Py-C₅), 46.59 (Py-C₂), 101.01 (Ar-C_{3,5}), 110.23 (Ar-C₁), 117.82 (C≡N), 159.59 (C=ONHR), 159.30, 162.07 (Ar-C₄), 162.30, 164.82, 166.41 (Ar-C_{2,6}), 166.77 (C=ONR₂).

1-(2-Chlor-6-nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (60)

Synthese: 0-23 °C, 2 d

Ansatz: 0.09 g 2-Chlor-6-nitrohippursäure (0.38 mmol)

0.08 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.38 mmol)

0.07 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.06 g, 0.40 mmol)

0.03 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.23 mmol)

0.09 ml *N*-Methylmorpholin (0.08 g, 0.76 mmol)

Lösemittel: 50.00 ml trockenes Dichlormethan

Ausbeute: 0.08 g, 0.22 mmol, 59 %, farbloser Feststoff

Smp.: 144 °C

R_f: 0.24 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

HPLC: präparative Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm

Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]

Flussgeschwindigkeit: 7.0 ml/min

Retentionszeit: 5.3 min

[α]_D^{22 °C}: -204.2° [c = 0.50, CHCl₃]

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3251 (m, CON-H), 3079, 2925, 2871 (w, aromat. C-H), 2204 (w, C≡N), 1663, 1643 (s, aromat. C=C, C-H), 1533 (s, C=ONH), 1436, 1414 (s, CH₂-), 759 (m, aromat. C-H).

ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₃ClN₄O₄, 336.06; gef.: 359.05 [M+Na]⁺

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.16-2.33 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.52, 3.67 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.16-4.41 (m, 2H, NHCH₂), 4.70 (m, 1H, Py-C2-H), 7.19 (bs, 1H, NH), 7.49 (m, 1H, Ar-C4-H), 7.69 (m, 1H, Ar-C3-H), 8.04 (m, 1H, Ar-C5-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 24.92 (Py-C4), 29.80 (Py-C3), 42.52 (NHCH₂), 45.57 (Py-C5), 46.48 (Py-C2), 117.87 (C≡N), 122.94 (Ar-C5), 130.40 (Ar-C4), 131.54 (Ar-C1), 133.35 (Ar-C2), 135.22 (Ar-C3), 146.73 (Ar-C6), 163.43 (C=ONHR), 166.72 (C=ONR₂).

1-(2-Nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (61)

Synthese: 0-23 °C, 2 d

Ansatz: 0.09 g 2-Nitrohippursäure (0.38 mmol)

0.08 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.38 mmol)

0.07 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.06 g, 0.40 mmol)

0.03 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.23 mmol)

0.09 ml *N*-Methylmorpholin (0.08 g, 0.76 mmol)

Lösemittel: 50.00 ml trockenes Dichlormethan

Ausbeute: 0.06 g, 0.19 mmol, 50 %, farbloser Feststoff

Smp.: 195 °C

R_f: 0.19 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

HPLC: präparative Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm

Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [2/8]

Flussgeschwindigkeit: 7.0 ml/min

Retentionszeit: 2.6 min

[α]_D^{22 °C}: -90.6° [c = 0.53, CHCl₃]

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3253 (m, CON-H), 3090, 2936, (w, aromat. C-H), 2246 (w, C≡N), 1664, 1638 (s, aromat. C=C, C-H), 1564, 1524 (s, C=ONH), 1433, 1411 (s, CH₂-), 789, 702 (m, aromat. C-H).

ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₄N₄O₄, 302.10; gef.: 325.09 [M+Na]⁺

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 100.62 MHz): δ [ppm] = 2.18-2.39 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.53, 3.70 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.18-4.39 (m, 2H, NHC_{H₂}), 4.79 (m, 1H, Py-C2-H), 6.90 (bs, 1H, NH), 7.60 (m, 2H, m, 2H, Ar-C4,6-H), 7.70 (m, 1H, Ar-C5-H), 8.09 (m, 1H, Ar-C3-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 400.13 MHz): δ [ppm] = 25.04 (Py-C4), 29.93 (Py-C3), 42.67 (NHC_{H₂}), 45.59 (Py-C5), 46.65 (Py-C2), 117.78 (C≡N), 124.66 (Ar-C3), 128.72 (Ar-C6), 130.79 (Ar-C4), 132.19 (Ar-C1), 133.74 (Ar-C5), 146.61 (Ar-C2), 166.41 (C=ONHR), 166.84 (C=ONR₂).

1-(3-Nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (62)

Synthese: 0-23 °C, 2 d

Ansatz: 0.09 g 3-Nitrohippursäure (0.38 mmol)

0.08 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.38 mmol)

0.07 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.06 g, 0.40 mmol)

0.03 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.23 mmol)

0.09 ml *N*-Methylmorpholin (0.08 g, 0.76 mmol)

Lösemittel: 50.00 ml trockenes Dichlormethan

Ausbeute: 0.08 g, 0.25 mmol, 67 %, farbloser Feststoff

Smp.: 193 °C

R_f: 0.33 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

HPLC: präparative Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm

Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]

Flussgeschwindigkeit: 7.0 ml/min

Retentionszeit: 6.7 min

[α]_D^{22 °C}: -2.1° [c = 0.47, CHCl₃]

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3250 (m, CON-H), 3079, 2931, 2878 (w, aromat. C-H), 2189 (w, C≡N), 1674, 1636, 1618 (s, aromat. C=C, C-H), 1561, 1526 (s, C=ONH), 1431, 1402 (s, -CH₂-), 724, 688 (m, aromat. C-H).

ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₄N₄O₄, 302.10; gef.: 325.09 [M+Na]⁺

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.24-2.36 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.56, 3.74 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.18, 4.47 (m, 2H, NHC_{H₂}), 4.81 (m, 1H, Py-C2-H), 7.58 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.80 (bs, 1H, NH), 8.14 (m, 1H, Ar-C6-H), 8.32 (m, 1H, Ar-C4-H), 8.67 (m, 1H, Ar-C2-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 25.08 (Py-C4), 29.84 (Py-C3), 42.47 (NHC_{H₂}), 45.72 (Py-C5), 46.77 (Py-C2), 117.87 (C≡N), 122.39 (Ar-C2), 126.19 (Ar-C4), 129.66 (Ar-C5), 132.84 (Ar-C6), 135.04 (Ar-C1), 148.26 (Ar-C3), 164.73 (C=ONHR), 167.75 (C=ONR₂).

1-(4-Nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (63)

Synthese: 0-23 °C, 1 d

Ansatz: 0.05 g 4-Nitrohippursäure (0.24 mmol)

0.05 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.24 mmol)

0.04 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.04 g, 0.25 mmol)

0.02 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.14 mmol)

0.05 ml *N*-Methylmorpholin (0.05 g, 0.48 mmol)

Lösemittel: 40.00 ml trockenes Dichlormethan

Ausbeute: 0.07 g, 0.23 mmol, 96 %, farbloser Feststoff

Smp.: 152 °C

R_f: 0.35 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

HPLC: präparative Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm

Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]

Flussgeschwindigkeit: 8.0 ml/min

Retentionszeit: 5.4 min

[α]_D^{22 °C}: -136.5° [c = 0.48, CHCl₃]

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3404, 3265 (m, CON-H), 3078, 2952, 2931 (w, arom. C-H), 2324 (w, C≡N), 1640, 1597 (s, arom. C=C, C-H), 1561, 1523 (s, C=ONH), 1488, 1441 (s, -CH₂-), 719, 687 (m, arom. C-H).

ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₄N₄O₄, 302.10; gef.: 325.09 [M+Na]⁺

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.18-2.40 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.54, 3.73 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.18, 4.43 (m, 2H, NHC_{H₂}), 4.79 (m, 1H, Py-C2-H), 7.61 (bs, 1H, NH), 7.99 (m, 2H, Ar-C2,6-H), 8.24 (m, 2H, Ar-C3,5-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 25.06 (Py-C4), 29.85 (Py-C3), 42.51 (NHC_{H₂}), 45.65 (Py-C5), 46.76 (Py-C2), 117.81 (C≡N), 123.73 (Ar-C3,5), 128.32 (Ar-C2,6), 138.87 (Ar-C1), 149.75 (Ar-C4), 165.08 (C=ONHR), 167.50 (C=ONR₂).

1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (64)

Synthese: 0-23 °C, 2 d

Ansatz: 0.15 g 2-Iodhippursäure (0.48 mmol)

0.10 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.48 mmol)

0.09 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.08 g, 0.50 mmol)

0.04 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.29 mmol)

0.09 ml *N*-Methylmorpholin (0.10 g, 0.95 mmol)

Lösemittel: 40.00 ml trockenes Dichlormethan

Ausbeute: 0.11 g, 0.29 mmol, 60 %, gelbe hochviskose Flüssigkeit

R_f: 0.40 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

[α]_D^{22 °C}: -103.9° [c = 0.59, CHCl₃]

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3316 (m, CON-H), 3062, 2926, 2851 (w, aromat. C-H), 2244 (w, C≡N), 1642 (s, aromat. C=C, C-H), 1584, 1524 (s, C=ONH), 1425 (s, -CH₂-), 749, 683 (m, aromat. C-H).

ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₄IN₃O₂, 383.01; gef.: 406.00 [M+Na]⁺

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.19-2.36 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.51, 3.68 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.16-4.35 (m, 2H, NHCH₂), 4.78 (m, 1H, Py-C2-H), 6.90 (bs, 1H, NH), 7.11 (m, 2H, Ar-C4-H), 7.38 (m, 1H, Ar-C6-H), 7.43 m, 1H, Ar-C5-H), 7.88 (m, 1H, Ar-C3-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 25.01 (Py-C4), 29.89 (Py-C3), 42.47 (NHCH₂), 45.56 (Py-C5), 46.59 (Py-C2), 92.46 (Ar-C2), 117.83 (C≡N), 128.13 (Ar-C6), 128.34 (Ar-C5), 131.38 (Ar-C4), 140.01 (Ar-C3), 141.11 (Ar-C1), 166.99 (C=ONHR), 169.22 (C=ONR₂).

1-(3-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (65)

Synthese: 0-23 °C, 2 d

Ansatz: 0.15 g 3-Iodhippursäure (0.48 mmol)

0.10 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.48 mmol)

0.09 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.08 g, 0.50 mmol)

- 0.04 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.29 mmol)
- 0.09 ml *N*-Methylmorpholin (0.10 g, 0.95 mmol)
- Lösemittel: 40.00 ml trockenes Dichlormethan
- Ausbeute: 0.14 g, 0.37 mmol, 76 %, gelbe hochviskose Flüssigkeit
- R_f: 0.50 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- [α]_D^{22 °C}: -103.6° [c = 0.50, CHCl₃]
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3323 (m, CON-H), 3064, 2960, 2929, 2851 (w, aromat. C-H), 2242 (w, C≡N), 1639 (s, aromat. C=C, C-H), 1586, 1538 (s, C=ONH), 1478, 1431 (s, -CH₂-), 751, 720 (m, aromat. C-H).
- ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₄IN₃O₂, 383.01; gef.: 406.00 [M+Na]⁺
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.20-2.34 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.53, 3.69 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.11, 4.41 (m, 2H, NHCH₂), 4.77 (m, 1H, Py-C2-H), 7.10 (m, 1H, Ar-C5-H), 7.59 (bs, 1H, NH), 7.77 (m, 2H, Ar-C6,4-H), 8.16 (m, 1H, Ar-C2-H).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 25.04 (Py-C4), 29.80 (Py-C3), 42.36 (NHCH₂), 45.63 (Py-C5), 46.67 (Py-C2), 94.24 (Ar-C3), 117.95 (C≡N), 126.09 (Ar-C6), 130.07 (Ar-C5), 135.19 (Ar-C1), 136.30 (Ar-C2), 140.51 (Ar-C4), 165.64 (C=ONHR), 167.91 (C=ONR₂).

1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (66)

- Synthese: 0-23 °C, 2 d
- Ansatz: 0.15 g 4-Iodhippursäure (0.48 mmol)
- 0.10 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.48 mmol)
- 0.09 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.08 g, 0.50 mmol)
- 0.04 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.29 mmol)
- 0.09 ml *N*-Methylmorpholin (0.10 g, 0.95 mmol)
- Lösemittel: 40.00 ml trockenes Dichlormethan
- Ausbeute: 0.17 g, 0.44 mmol, 92 %, gelber Feststoff
- Smp.: 148 °C

- R_f: 0.45 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- $[\alpha]_D^{22\text{ }^\circ\text{C}}$: -100.2° [c = 0.58, CHCl₃]
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3318 (m, CON-H), 3060, 2961 (w, arom. C-H), 2240 (w, C≡N), 1639 (s, arom. C=C, C-H), 1592, 1537 (s, C=ONH), 1429 (s, -CH₂-), 799, 742, 677 (m, arom. C-H).
- ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₄H₁₄IN₃O₂, 383.01; gef.: 406.00 [M+Na]⁺
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.20-2.34 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.51, 3.70 (2m, 2H, Py-C5-H₂), 4.06, 4.45 (m, 2H, NHC_{H₂}), 4.76 (m, 1H, Py-C2-H), 7.51 (m, 2H, Ar-C2,6-H), 7.68 (m, 2H, Ar-C3,5-H), 7.75 (bs, 1H, NH).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 25.03 (Py-C4), 29.76 (Py-C3), 42.24 (NHC_{H₂}), 45.61 (Py-C5), 46.66 (Py-C2), 98.91 (Ar-C4), 118.02 (C≡N), 128.64 (Ar-C2,6), 132.59 (Ar-C1), 137.57 (Ar-C3,5), 166.44 (C=ONHR), 168.15 (C=O NR₂).

12.3.3 N-geschützte Aminosäure-pyrrolidin-(2S)-carbonitrile

Die Verbindungen aus einer N-geschützten Aminosäure und Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (Abb. 12.6) tragen am N-Terminus eine Schutzgruppe R (R = Ac oder Boc). Es wurden verschiedene Aminosäuren verwendet, die sich im Rest R' unterscheiden (R' = H für Gly, (S)-iPr für (S)-Val und (S)-iBu für (S)-Ile).

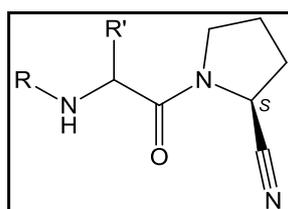


Abb. 12.6: N-geschützte Aminosäure + Pyrrolidin-(2S)-carbonitril, R = Ac oder Boc, R' = H, (S)-iPr oder (S)-iBu.

Die Verbindungen aus einer N-geschützten Aminosäure und Pyrrolidin-(2S)-carbonitril wurden nach folgender Reaktionsvorschrift dargestellt. Angaben zur Reaktionsdauer sind allgemein gehalten und werden bei der Auflistung der synthetisierten Verbindungen präzisiert.

Peptidkupplung einer *N*-geschützten Aminosäure und Pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril

Zu einer eisgekühlten Lösung von 1 Äquivalent der *N*-geschützten Aminosäure in Dichlormethan werden 1 Äquivalent *N*-Hydroxybenzotriazol Monohydrat und 1.3 Äquivalente 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hinzugefügt. Nach 30 min Rühren bei 0 °C werden 2 Äquivalente *N*-Methylmorpholin und 1 Äquivalent Pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril dazugegeben und das Reaktionsgemisch wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die Lösung wird über Nacht gerührt, danach wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen. Die Lösung wird anschließend nacheinander mit Wasser, 0.2 M Salzsäure, 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird durch Kieselgel filtriert und mit Essigsäureethylester eluiert. Das Lösemittel wird anschließend am Rotationsverdampfer entfernt und das resultierende Produkt wird im Exsiccator getrocknet.

1-(*N*-Acetylglycin)-pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril (67)

Synthese: 0-23 °C, 1 d

Ansatz: 0.03 g *N*-Acetylglycin (0.24 mmol)

0.05 g Pyrrolidin-(2*S*)-carbonitril (0.24 mmol)

0.04 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.04 g, 0.25 mmol)

0.02 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.14 mmol)

0.05 ml *N*-Methylmorpholin (0.05 g, 0.48 mmol)

Lösemittel: 40.00 ml trockenes Dichlormethan

Ausbeute: 0.02 g, 0.08 mmol, 34 %, farblose hochviskose Flüssigkeit

R_f: 0.20 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

HPLC: präparative Säule: Kromasil 100-10 C18 250 x 10 mm

Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [9/1]

Flussgeschwindigkeit: 6.5 ml/min

Retentionszeit: 2.6 min

ESI-TOF-MS: ber. f. C₉H₁₃N₃O₂, 195.10; gef.: 218.09 [M+Na]⁺

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 2.07 (s, 3H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3$), 2.22-2.36 (m, 4H, Py-C3- $\underline{\text{H}}_2$, Py-C4- $\underline{\text{H}}_2$), 3.47, 3.63 (2m, 2H, Py-C5- $\underline{\text{H}}_2$), 3.99, 4.13 (m, 2H, NHCH_2), 4.77 (m, 1H, Py-C2- $\underline{\text{H}}$), 6.42 (bs, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 22.89 ($\text{C}\underline{\text{H}}_3$), 24.99 (Py- $\underline{\text{C}}_4$), 29.85 (Py- $\underline{\text{C}}_3$), 42.08 (NHCH_2), 45.51 (Py- $\underline{\text{C}}_5$), 46.56 (Py- $\underline{\text{C}}_2$), 117.87 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 167.52 ($\text{C}=\text{ONHR}$), 170.35 ($\text{C}=\text{ONR}_2$).

1-(Boc-(S)-Valin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (68)

Synthese: 0-23 °C, 1 d

Ansatz: 0.10 g Boc-(S)-Valin (0.48 mmol)

0.10 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.48 mmol)

0.09 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.08 g, 0.50 mmol)

0.04 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.29 mmol)

0.09 ml *N*-Methylmorpholin (0.10 g, 0.95 mmol)

Lösemittel: 40.00 ml trockenes Dichlormethan

Ausbeute: 0.09 g, 0.29 mmol, 49 %, farblose hochviskose Flüssigkeit

R_f : 0.32 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

SC: Cyclohexan/Essigsäureethylester [9/1] - [1/1]

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.00 (m, 6H, $\text{CH}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_2$), 1.43 (s, 9H, $\text{C}=\text{OOC}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_3$), 2.13 (m, 1H, $\text{CH}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_2$), 2.20-2.40 (m, 4H, Py-C3- $\underline{\text{H}}_2$, Py-C4- $\underline{\text{H}}_2$), 3.69, 3.77 (2m, 2H, Py-C5- $\underline{\text{H}}_2$), 4.21 (m, 1H, NHCH), 4.80 (m, 1H, Py-C2- $\underline{\text{H}}$), 5.18 (m, 1H, NH).

1-(Boc-(S)-Isoleucin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (69)

Synthese: 0-23 °C, 1 d

Ansatz: 0.14 g Boc-(S)-Isoleucin (0.60 mmol)

0.13 g Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.60 mmol)

0.11 ml *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (0.10 g, 0.63 mmol)

0.05 g *N*-Hydroxybenzotriazol (0.36 mmol)

	0.13 ml <i>N</i> -Methylmorpholin (0.12 g, 0.12 mmol)
Lösemittel:	40.00 ml trockenes Dichlormethan
Ausbeute:	0.08 g, 0.26 mmol, 43 %, farblose hochviskose Flüssigkeit
R _f :	0.37 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
SC:	Cyclohexan/Essigsäureethylester [9/1] - [1/1]
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.89-0.98 (m, 6H, CHCH ₃ CH ₂ CH ₃), 1.10-1.21 (m, 1H, NHCH), 1.42 (s, 9H, C=OOC(CH ₃) ₃), 1.61, 1.77 (2m, 2H, CHCH ₃ CH ₂ CH ₃), 2.13 (m, 1H, CHCH ₃ CH ₂ CH ₃), 2.19-2.38 (m, 4H, Py-C3-H ₂ , Py-C4-H ₂), 3.69, 3.81 (2m, 2H, Py-C5-H ₂), 4.22, (m, 2H, NHCH), 4.80 (m, 1H, Py-C2-H).

12.3.4 Aminosäure-pyrrolidin-(2S)-carbonitrile

Die Verbindungen aus einer Aminosäure und Pyrrolidin-(2S)-carbonitril (Abb. 12.7) haben einen freien *N*-Terminus. Es wurden verschiedene Aminosäuren verwendet, die sich im Rest R' unterscheiden (R' = (S)-*i*Pr für (S)-Val und (S)-*i*Bu für (S)-Ile).

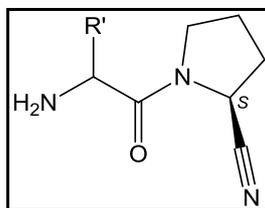


Abb. 12.7: Aminosäure + Pyrrolidin-(2S)-carbonitril, R' = (S)-*i*Pr oder (S)-*i*Bu.

Die Verbindungen aus einer Aminosäure und Pyrrolidin-(2S)-carbonitril wurden nach folgender Reaktionsvorschrift durchgeführt. Angaben zur Reaktionsdauer sind allgemein gehalten und bei der Auflistung der synthetisierten Verbindungen präzisiert.

Boc-Entschützung bei Boc-Aminosäure-Pyrrolidin-(2S)-carbonitril

Die Boc-geschützte Verbindung wird in trockenem Dichlormethan gelöst und unter Argon wird bei 0 °C Trifluoressigsäure im Überschuss zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Erneut wird Dichlormethan zugegeben und abrotiert, dies wird bis zu 3 mal wiederholt. Das trockene Rohprodukt wird anschließend mit kaltem Diethylether überschichtet und einige Stunden bis

Tage auf 0 °C gekühlt. Die nun Boc-entschützte Verbindung fällt als Trifluoressigsäure-Salz aus. Durch Abdekantieren der überstehenden Lösung erhält man sauberes Produkt als farblosen Feststoff, der im Exsiccator getrocknet wird.

1-((S)-Valin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (70)

Synthese: 0 °C, 7 h

Ansatz: 0.09 g Boc-(S)-Valin-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.30 mmol)

5.00 ml Trifluoressigsäure (7.40 g, 64.90 mmol)

Lösemittel: 40.00 ml trockenes Dichlormethan

Ausbeute: 0.03 g, 0.15 mmol, 46 %, gelbe hochviskose Flüssigkeit

R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])

HPLC: präparative Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm

Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]

Flussgeschwindigkeit: 7.0 ml/min

Retentionszeit: 5.6 min

[α]_D^{22 °C}: -72.3° [c = 0.44, CHCl₃]

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2971 (m, CON-H), 2346 (w, C≡N), 1663 (s, C=ONH), 1524, 1450 (s, -CH₂-).

ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₀H₁₇N₃O, 195.14; gef.: 196.14 [M+H]⁺

¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 1.11 (m, 6H, CH(CH₃)₂), 2.13 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.15-2.36 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.59, 3.75 (2bs, 2H, Py-C5-H₂), 4.08 (bs, 1H, NHCH), 4.83 (bs, 1H, Py-C2-H).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 17.31, 18.35 (CH(CH₃)₂), 25.13 (Py-C4), 29.47 (Py-C3), 30.28 (CH(CH₃)₂), 46.78 (Py-C5), 47.15 (Py-C2), 56.93 (NHCH), 118.04 (C≡N), 167.84 (C=ONR₂).

1-((S)-Isoleucin)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (71)

Synthese: 0 °C, 8 h

Ansatz: 0.12 g Boc-(S)-Isoleucin-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (0.39 mmol)

7.00 ml Trifluoressigsäure (10.36 g, 90.86 mmol)

12 SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG ORGANISCHER VERBINDUNGEN

- Lösemittel: 30.00 ml trockenes Dichlormethan
- Ausbeute: 0.03 g, 0.14 mmol, 40 %, farbloser Feststoff
- R_f: 0.00 (Cyclohexan/Essigsäureethylester [2/1])
- HPLC: präparative Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm
Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]
Flussgeschwindigkeit: 7.0 ml/min
Retentionszeit: 6.1 min
- $[\alpha]_D^{22\text{ }^\circ\text{C}}$: -58.3° [c = 0.54, CHCl₃]
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2969 (m, CON-H), 2322 (w, C≡N), 1664 (s, C=ONH), 1524, 1455 (s, -CH₂-).
- ESI-TOF-MS: ber. f. C₁₁H₁₉N₃O, 209.15; gef.: 210.16 [M+H]⁺
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 7.27, 400.13 MHz): δ [ppm] = 0.95 (m, 6H, CHC₃CH₂C₃), 1.50-1.71 (m, 2H, CHCH₃C₂CH₃), 2.09 (m, 1H, CHCH₃CH₂CH₃), 2.14-2.32 (m, 4H, Py-C3-H₂, Py-C4-H₂), 3.58, 3.73 (2bs, 2H, Py-C5-H₂), 4.10 (bs, 1H, NHCH), 4.82 (bs, 1H, Py-C2-H).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 77.00, 100.62 MHz): δ [ppm] = 11.08, 14.50 (CHC₃CH₂C₃), 24.22 (CHCH₃C₂CH₃), 25.13 (Py-C₄), 29.47 (Py-C₃), 36.84 (CHCH₃CH₂CH₃), 46.77 (Py-C₅), 47.23 (Py-C₂), 56.17 (NHCH), 118.01 (C≡N), 168.55 (C=ONR₂).

13 Synthese und Charakterisierung radiomarkierter Verbindungen

13.1 Fluorierung

Die radioaktive Fluorierung erfolgt durch nucleophile Substitution (siehe Kapitel 5.2.2). [^{18}F]Fluorid ($^{18}\text{F}^-$) wird in wässriger Lösung erhalten. Für den Trocknungsprozess wird die wässrige [^{18}F]Fluorid-Lösung auf eine mit Kaliumcarbonat präkonditionierte QMA-Kartusche (Waters Sep-Pak Aceso Plus QMA Carbonate Plus Light Cartridge, 40 mg Sorbent per Cartridge, 40 μm Particle Size, 50/pkg [186004540]) gegeben. Das [^{18}F]Fluorid wird vom Kartuschenmaterial festgehalten, das Wasser wird durchgespült und anschließend verworfen. Nach einmaligem Spülen mit Millipore-Wasser wird das $^{18}\text{F}^-$ mit einer Lösung aus Kryptofix in Acetonitril und Kaliumcarbonat in Wasser von der Kartusche in ein geeignetes Reaktionsgefäß eluiert. Das Reaktionsgefäß besteht aus Glas, hat einen konischen Boden und einen Überdruck-beständigen Deckel mit Septum (z.B. *Wheaton*, High Recovery Vial, 5 ml grad V-vial, transparentes Glas, schwarzer Verschluss aus Phenolharz, Teflonbeschichtetes Gummi-Septum). Durch das Septum werden eine Entlüftungskanüle gesteckt und eine Kanüle, die über eine Schlauchverbindung mit einer Argon-Gasflasche verbunden ist. Das Reaktionsvial wird so vorbereitet in einen Heizblock mit passendem Einsatz gestellt. Für das Abdampfen wird das Reaktionsgefäß auf 95 °C erhitzt und die Argonzufuhr wird auf einen Druck von 1 bar eingestellt. Über die Entlüftungskanüle kann so das Acetonitril/Wasser-Gemisch azeotrop entweichen. Nach 5 Minuten ist der Inhalt des Reaktionsvials bis zur Trockne eingedampft. Es wird 2 mal Acetonitril zugegeben und 5 bzw. schlussendlich 10 Minuten erhitzt, bis der Rückstand im Reaktionsvial vollkommen wasserfrei ist. Beim dritten Abdampfungsvorgang wird die Temperatur des Heizblocks erhöht, sodass die gewünschte Reaktionstemperatur erreicht wird. Schließlich wird der Precursor in einem geeigneten Lösemittel zugegeben und für eine bestimmte Zeit erhitzt. Die beiden Kanülen zur Gaszu- und -abfuhr werden vorher entfernt. Nach Ablauf der Reaktionsdauer wird das Reaktionsvial aus dem Heizblock entfernt und abgekühlt. Nach Messung der Radioaktivität wird der gesamte Inhalt des Reaktionsvials auf die präparative HPLC zur Trennung der radioaktiven Produkte injiziert. Die entsprechend der Signale im Chromatogramm detektierten Verbindungen werden als Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen, die aufgrund ihrer Retentionszeit als Produktfraktionen in Frage kommen, werden am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der verbleibende Rückstand steht so für die Analytik zur Verfügung. Für die analytische HPLC wird zusammen mit der radioaktiven Probe eine Probe der nichtradioaktiven Referenz coinjiziert und deren Retentionszeiten im Radioaktivitäts- und UV-Chromatogramm verglichen.

1-(2-[¹⁸F]Fluorhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (72)

Synthese:	80 °C, 30 min
Ansatz:	5.00 mg 1-(2-Nitrohippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (16.54 mmol)
Lösemittel:	1.00 ml trockenes Acetonitril
Elutionslösung:	19.40 mg 4,13-Diaza-18-krone-6,1,7,10,16-Tetraoxa-4,13-diazacyclo-octadecan (Kryptofix®)
	30.00 µl 1 M Kaliumcarbonatlösung
	0.90 ml Acetonitril
	0.10 ml Wasser
Startaktivität:	213 MBq [¹⁸ F]Fluorid in Wasser (t _{1/2} = 1 h 49 min 41 s)
HPLC präparativ:	Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 10 mm Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [3/7] Flussgeschwindigkeit: 10.0 ml/min Retentionszeit: 19.0 min
HPLC analytisch:	Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 4.6 mm Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [2/8] Flussgeschwindigkeit: 1.3 ml/min Retentionszeit: 19.0 min
Ausbeute:	1 MBq (Endaktivität nach 2 h 26 min), 1 %

13.2 Iodierung

Die radioaktive Iodierung erfolgt durch Isotopenaustausch (nucleophile Substitution) (siehe Kapitel 5.2.4). Radioaktives Iodid ($[^{131}\text{I}]\text{Iodid } ^{131}\text{I}^-$, ($[^{124}\text{I}]\text{Iodid } ^{124}\text{I}^-$) wird in wässriger Natriumhydroxidlösung erhalten. Die gewünschte Radioaktivitätsmenge wird entnommen, in einen kleinen Glaskolben überführt und mit Natriumbisulfidlösung zur Reduktion möglicherweise entstehenden elementaren Iods (I_2) versetzt. Am Rotationsverdampfer wird das Gemisch bis zur Trockne eingengt. Daraufhin werden die Lösung, die den Precursor enthält und eventuell Kupferchloridlösung ($\text{Cu}(\text{I})\text{Cl}$) als Katalysator zugegeben. Bei 160 °C wird der gut verschlossene Reaktionskolben im Ölbad einige Minuten erhitzt. Nach Abschluss der Reaktion wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Messung der Radioaktivität wird der trockene Rückstand in HPLC-Laufmittel aufgenommen und auf eine geeignete Säule zur Trennung injiziert. Die Fraktionen, die aufgrund ihrer

Radioaktivität und Retentionszeit als Produktfraktion relevant sind, werden gesammelt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die verbleibenden Rückstände stehen so für Analysen zur Verfügung. Für die analytische HPLC wird zusammen mit der radioaktiven Probe eine Probe der nichtradioaktiven Referenz coinjiziert und deren Retentionszeiten verglichen. Aufgrund der langen Halbwertszeiten von ^{124}I ($t_{1/2} = 4.1760 \text{ d}$) und von ^{131}I ($t_{1/2} = 8.02 \text{ d}$) wird darauf verzichtet die Uhrzeit zur gemessenen Radioaktivität zu notieren. Zerfallsbedingte Änderungen der Radioaktivität sind vernachlässigbar.

1-(2-[^{131}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (73)

Synthese:	160 °C, 10 min
Ansatz:	50.00 μl 1-(2-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (20.00 mM) 5.00 μl Natriumbisulfidlösung (5.00 mg/ml)
Lösemittel:	100 %ige Essigsäure
Radioaktivität:	10.8 MBq [^{131}I]Iodid in 0.05 M Natriumhydroxidlösung
HPLC präparativ:	Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 4.6 mm Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [3/7] Flussgeschwindigkeit: 1.3 ml/min Retentionszeit: 9.3 min
HPLC analytisch:	Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 4.6 mm Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [3/7] Flussgeschwindigkeit: 1.3 ml/min Retentionszeit: 8.6 min
Ausbeute:	4.2 MBq, 39 %

1-(4-[^{131}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (74)

Synthese:	160 °C, 10 min
Ansatz:	50.00 μl 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (20.00 mM) 5.00 μl Natriumbisulfidlösung (5.00 mg/ml)
Lösemittel:	100 %ige Essigsäure
Radioaktivität:	14.0 MBq [^{131}I]Iodid in 0.05 M Natriumhydroxidlösung
HPLC präparativ:	Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 4.6 mm

Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [3.5/6.5]
Flussgeschwindigkeit: 1.3 ml/min
Retentionszeit: 12.4 min

HPLC analytisch: Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 4.6 mm
Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]
Flussgeschwindigkeit: 1.3 ml/min
Retentionszeit: 16.1 min

Ausbeute: 5.0 MBq, 36 %

1-(2-[¹²⁴I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (75)

Synthese: 160 °C, 10 min

Ansatz: 50.00 µl 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (20.00 mM)
5.00 µl Natriumbisulfidlösung (5.00 mg/ml)

Lösemittel: 100 %ige Essigsäure

Radioaktivität: 19.4 MBq [¹²⁴I]Iodid in 0.02 M Natriumhydroxidlösung

HPLC präparativ: Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 4.6 mm
Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [3.5/6.5]
Flussgeschwindigkeit: 1.3 ml/min
Retentionszeit: 9.2 min

Ausbeute: 11.5 MBq, 59 %

1-(4-[¹²⁴I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (76)

Synthese: 160 °C, 10 min

Ansatz: 50.00 µl 1-(4-Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (20.00 mM)
5.00 µl Natriumbisulfidlösung (5.00 mg/ml)

Lösemittel: 100 %ige Essigsäure

Radioaktivität: 28.5 MBq [¹²⁴I]Iodid in 0.02 M Natriumhydroxidlösung

HPLC präparativ: Säule: Nucleosil 100-10 C18 250 x 4.6 mm
Laufmittelgemisch: Methanol/Wasser [4/6]
Flussgeschwindigkeit: 1.3 ml/min

Retentionszeit: 11.4 min

Ausbeute: 9.6 MBq, 34 %

13.3 Markierungen mit Gallium-68

Die radioaktive Markierung mit Gallium-68 erfolgt durch Komplexierung des Metall-Kations (siehe Kapitel 5.3). Die Markierung der NOTA-Peptid-Verbindungen mit [⁶⁸Ga]Gallium erfolgt an einem automatischen Synthesemodul. ⁶⁸Ga wird als ⁶⁸Ga³⁺ durch Elution des ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-Generators mit 0.1 M Salzsäure gewonnen. Diese Lösung wird automatisch dem Reaktor zugeführt, in dem der Precursor in Wasser und Pufferlösung vorgelegt sind. Das Reaktionsgemisch wird einige Zeit erhitzt und anschließend auf eine mit C18-Material befüllte Kartusche (*Waters Sep-Pak Plus Environmental C18 50/BX Cartridge WAT023635*) gegeben. Um überschüssiges ⁶⁸GaCl₃ oder eventuell entstandene ⁶⁸Ga³⁺-Wasser/Hydroxid-Komplexe zu entfernen, wird die Kartusche mit Wasser gespült. Im Precursor komplexiertes ⁶⁸Ga³⁺ wird vom Kartuschenmaterial festgehalten und anschließend mit Ethanol über einen Sterilfilter in ein Produktgefäß eluiert. Dort wird es mit isotonischer Kochsalzlösung auf ein Volumen verdünnt, dass der Ethanolgehalt auf einen Wert von unter 10 % sinkt. Diese Lösung kann für Analysen verwendet werden. Die Startaktivität kann gerätebedingt nicht bestimmt werden und ist abhängig von der Beschaffenheit und dem Alter des ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-Generators. Dadurch unterliegen die Ausbeuten starken Aktivitätsschwankungen.

⁶⁸Ga-NOTA-NGR ((cyclo[NAc-Cys-Asn-Gly-Arg-Cys])-Gly-Gly-Lys-NOTA) (77)

Synthese: 115 °C, 10 min

Ansatz: 20.00 µg NOTA-NGR (16.79 nmol) in 20.00 µl Wasser

150.00 µg HEPES (35.75mmol) in 90.00 µl Wasser

⁶⁸Ga³⁺ in 0.1 M Salzsäure

Endvolumen: 10 – 11 ml

DC R_f: 0.13 (0.1 M Zitronensäure)

Reinheit: 93 – 99 %

HPLC präparativ: Säule: Nucleosil 100-5 C18 125 x 4.6 mm

Laufmittelgemisch: Acetonitril/Wasser + 0.1 % Trifluoressigsäure
(Gradient von 100 % Wasser zu 100 % Acetonitril)

Flussgeschwindigkeit: 0.7 ml/min

Retentionszeit: 6.5 – 6.8 min
Reinheit: 96 – 100 %
Ausbeute: 87 – 324 MBq (Mittelwert 212 MBq), transparente, farblose Flüssigkeit

⁶⁸Ga-NOTA-RGD (cyclo-[Lys-Arg-Gly-Asp-D-Phe]-NOTA) (78)

Synthese: 115 °C, 10 min
Ansatz: 20.00 µg NOTA-RGD (20.83 nmol) in 20.00 µl Wasser
150.00 µl HEPES (35.75mmol) in 90.00 µl Wasser
⁶⁸Ga³⁺ in 0.1 M Salzsäure
Endvolumen: 10 – 11 ml
DC R_f: 0.14 (0.1 M Zitronensäure)
Reinheit: 97 – 99 %
HPLC präparativ: Säule: Nucleosil 100-5 C18 125 x 4.6 mm
Laufmittelgemisch: Acetonitril/Wasser + 0.1 % Trifluoressigsäure
(Gradient von 100 % Wasser zu 100 % Acetonitril)
Flussgeschwindigkeit: 0.7 ml/min
Retentionszeit: 6.9 – 7.2 min
Reinheit: 99 – 100 %
Ausbeute: 206 – 626 MBq (Mittelwert 294 MBq), transparente, farblose Flüssigkeit

14 Enzymassays

Die Anregungswellenlänge der fluorimetrischen Enzymassays lag bei 380 nm, die Detektionswellenlänge bei 460 nm.

14.1 Testung der Inhibitoren an FAP

14.1.1 Screening

Für das Screening an FAP wurden die Inhibitoren **53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 64, 65, 66, 67, 70** und **71** getestet. Als Assaypuffer wurde ein Trispuffer verwendet (6.055 g Tris (50 mM), 58.4 g NaCl (1 M), 1 g BSA (bovine albumine serum, 1 mg/ml) in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt, pH-Wert auf 7.5 mit Phosphorsäure eingestellt). Das Enzym wurde in einer Verdünnung von 1:100 (1 µl Enzym + 99 µl Puffer) verwendet. Das Substrat Z-Gly-Pro-AMC wurde mit DMSO auf eine Endkonzentration von 10 µM verdünnt. Die Inhibitoren wurden so mit DMSO verdünnt, dass sie eine Endkonzentration von 20 µM erreichten. Der Inhalt eines Wells (Volumen: 200 µl) setzte sich wie folgt zusammen (jeder Inhibitor wurde in zwei Wells getestet) (in Klammern ist jeweils die Endkonzentration im Well angegeben):

Puffer:	165 µl (50 mM)
Enzym:	5 µl (1:100)
Inhibitor:	10 µl (20 µM)
Substrat:	20 µl (10 µM)

Die Inhibitoren **55, 64** und **66** wiesen eine Hemmung von über 60 % auf und wurden deshalb in Verdünnungsreihen näher untersucht.

14.1.2 Verdünnungsreihen

Vom Inhibitor (**55, 64** oder **66**) wurde eine Stammlösung der Konzentration 20 mM hergestellt, die entsprechend verdünnt wurde, um die Endkonzentrationen 0.5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 30 µM, 50 µM und 100 µM im Well zu erhalten. Der Inhalt eines Wells (Volumen: 200 µl) setzte sich wie folgt zusammen (jede Konzentration wurde in zwei Wells getestet) (in Klammern ist jeweils die Endkonzentration im Well angegeben):

Puffer:	165 µl (50 mM)
Enzym:	5 µl (1:100)
Inhibitor:	10 µl (0.5-100 µM)
Substrat:	20 µl (10 µM)

14.1.3 K_M -Wert

Für die Bestimmung des K_M -Wertes wurde der Assay ohne den Einsatz von Inhibitoren durchgeführt, dafür wurde die Konzentration des Substrates variiert. Vom Substrat wurde eine Stammlösung der Konzentration 10 mM hergestellt, die entsprechend verdünnt wurde, um die Endkonzentrationen 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M und 200 μ M im Well zu erhalten. Der Inhalt eines Wells (Volumen: 200 μ l) setzte sich wie folgt zusammen (jede Konzentration wurde in zwei Wells getestet) (in Klammern ist jeweils die Endkonzentration im Well angegeben):

Puffer:	165 μ l (50 mM)
Enzym:	5 μ l (1:100)
Substrat:	30 μ l (1-200 μ M)

14.2 Testung der Inhibitoren an DPP IV

14.2.1 Screening

Für das Screening an DPPIV wurden die Inhibitoren **53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 64, 65, 66, 67, 70** und **71** getestet. Als Assaypuffer wurde ein Trispuffer verwendet (Puffer: 3.028 g Tris (25 mM), in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt, pH-Wert auf 8.0 mit Natronlauge eingestellt). Das Enzym wurde in einer Verdünnung von 1:200 (1 μ l Enzym + 199 μ l Puffer) verwendet. Das Substrat H-Gly-Pro-AMC wurde mit DMSO auf eine Endkonzentration von 10 μ M verdünnt. Die Inhibitoren wurden so mit DMSO verdünnt, dass sie eine Endkonzentration von 20 μ M erreichten. Der Inhalt eines Wells (Volumen: 200 μ l) setzte sich wie folgt zusammen (jeder Inhibitor wurde in zwei Wells getestet) (in Klammern ist jeweils die Endkonzentration im Well angegeben):

Puffer:	180 μ l (25 mM)
Enzym:	5 μ l (1:200)
Inhibitor:	10 μ l (20 μ M)
Substrat:	5 μ l (10 μ M)

Die Inhibitoren 70 und 71 wiesen eine Hemmung von über 90 % auf und wurden deshalb in Verdünnungsreihen näher untersucht.

14.2.2 Verdünnungsreihen

Vom Inhibitor (**70** oder **71**) wurde eine Stammlösung der Konzentration 20 mM hergestellt, die auf die Endkonzentrationen 0.02 μM , 0.04 μM , 0.06 μM , 0.08 μM , 0.1 μM und 0.5 μM im Well verdünnt wurde. Der Inhalt eines Wells (Volumen: 200 μl) setzte sich wie folgt zusammen (jeder Inhibitor wurde in zwei Wells getestet) (in Klammern ist jeweils die Endkonzentration im Well angegeben):

Puffer:	180 μl (25 mM)
Enzym:	5 μl (1:200)
Inhibitor:	10 μl (0.02-0.5 μM)
Substrat:	5 μl (10 μM)

14.2.3 K_M -Wert

Für die Bestimmung des K_M -Wertes wurde der Assay ohne den Einsatz von Inhibitoren durchgeführt, dafür wurde die Konzentration des Substrates variiert. Vom Substrat wurde eine Stammlösung der Konzentration 10 mM erstellt, die auf die Endkonzentrationen 0.1 μM , 0.5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM und 25 μM im Well verdünnt wurde. Der Inhalt eines Wells (Volumen: 200 μl) setzte sich wie folgt zusammen (jede Konzentration wurde in zwei Wells getestet) (in Klammern ist jeweils die Endkonzentration im Well angegeben):

Puffer:	180 μl (25 mM)
Enzym:	5 μl (1:200)
Substrat:	15 μl (0.1-25 μM)

15 Tierexperimente

Alle Tierexperimente wurden unter Beachtung der deutschen Tierschutzgesetze und mit Genehmigung der Regierung von Unterfranken (AZ: K 55.2-2531.01-64/09) durchgeführt.

15.1 Tiermodell

15.1.1 Wahl der Tierarten

Für die PET-Untersuchungen wurden als Kleintiere ausschließlich Ratten (Art: *Rattus norvegicus*, Stamm: Wistar von *Harlan*, Boxmeer, Niederlande) verwendet. Es wurden männliche Tiere im Alter von einigen Monaten untersucht.

15.1.2 OP-Methode

Die Operation der Tiere erfolgt unter Narkose mit Isofluran. Es erfolgt eine Thorakotomie und Ligatur der linken Herzkranzarterie unter Einschluss eines PE10-Schlauches. Die Blutzufuhr wird somit unterbrochen und das Herz erleidet eine Sauerstoffunterversorgung. Nach 20 min wird dieser Schlauch entfernt, das verschlossene Gefäß geöffnet und die Durchblutung wieder hergestellt. Der Thorax wird anschließend mit einer Hautnaht oder Klammern verschlossen. Nach postoperativer Behandlung mit einem starken Schmerzmittel (z.B.: Temgesic® von *Reckitt Benckiser*, Schweiz, Wirkstoff: Buprenorphin Hydrochlorid) wird die Narkose beendet. Bei dieser Methode der Auslösung einer Ischämie mit anschließender Reperfusion werden in den meisten Fällen deutliche Myokardinfarkte erzeugt. Zur Kontrolle wurde außerdem eine Reihe Tiere sham-operiert. Bei diesen Tieren wird nach der Öffnung des Brustkorbs die Ligatur genauso vorbereitet allerdings nicht durchgeführt. Danach wird der Thorax genau wie bei den anderen Tieren verschlossen und die Narkose beendet.

15.1.3 Untersuchungstechnik

Für die Kleintier-PET-Untersuchungen werden die Tiere mit Isofluran narkotisiert. Die Injektion des Radiopharmakons erfolgt über die Schwanzvene. Bei Untersuchungen mit [¹⁸F]Fludeoxyglucose (FDG) werden die zu untersuchenden Tiere einige Stunden vorher gefastet. Fünf Minuten vor Injektion von FDG wird den Tieren Insulin subkutan appliziert, um die Aufnahme des FDGs zu steigern. 15 Minuten nach Injektion von FDG wird den Tieren Glucose subkutan appliziert, um überschüssiges Insulin abzubauen. Die Tiere bleiben

während der gesamten Kleintier-PET-Untersuchung in Isofluran-Narkose, die sofort nach Abschluss der PET-Aufnahme beendet wird.

15.2 Kleintier-PET

15.2.1 Allgemeines

Die narkotisierten und mit einem Radiopharmakon behandelten Tiere werden bäuchlings mit dem Kopf voran auf die Liege des PET-Scanners gelegt. Bei den verwendeten Akquisitionsverfahren werden sämtliche erfasste Ereignisse in einer Datei gespeichert (list-mode acquisition). Die Akquisitionszeit dauert im Allgemeinen einige Minuten bis zu wenigen Stunden und wird wenige Sekunden nach der Injektion gestartet. Die list-mode Daten werden in Frames à 10 min zusammengefasst und mittels eines 2D-OSEM-Algorithmus rekonstruiert. Die Bilddateien bestehen aus 128 x 128 x 159 Voxeln, mit einer Voxelgröße von ca. 0.78 x 0.78 x 0.80 mm³. An die Messung schließt sich eine Transmissionsmessung an. Dabei wird durch eine radioaktive Quelle (Cobalt-57), die neben dem Detektorring im PET eingebaut ist, das Tier 30 min bestrahlt.

Die Auswertung der Bilddateien erfolgt über die Definition von sogenannten „volumes of interest“ (VOIs) (siehe Abschnitt 6.5)

15.2.2 Untersuchung mit ⁶⁸Ga-NOTA-NGR (77)

Dynamische PET-Untersuchungen mit ⁶⁸Ga-NOTA-NGR wurden über eine Dauer von 90 min durchgeführt. Die Messung erfolgte an den Tagen 3, 7 und 21 nach OP. Es erfolgte eine Injektion von jeweils 5.40 bis 16.80 MBq (im Mittel 12.53 MBq) und die Aufnahme wurde unmittelbar nach Injektion gestartet. Die 90 minütige Messung wurde in 9 Frames à 10 min unterteilt. Zur Auswertung wurde die Zeit zwischen 40 – 80 min in Betracht gezogen und somit die Frames 4-7 zu einer Bilddatei kombiniert. Direkt im Anschluss an die Untersuchung mit ⁶⁸Ga-NOTA-NGR wird dem Tier FDG injiziert. Es wurden jeweils zwischen 5.21 und 15.04 MBq (im Mittel 10.10 MBq) injiziert. Die Messung dauert 60 min und wird in 6 Frames à 10 min unterteilt. Zur Auswertung wurde die Zeit zwischen 40 – 60 min in Betracht gezogen und somit die Frames 4-5 zu einer Bilddatei kombiniert.

15.2.3 Untersuchung mit ⁶⁸Ga-NOTA-RGD (78)

Dynamische PET-Untersuchungen mit ⁶⁸Ga-NOTA-RGD erfolgten genau analog zu denen mit ⁶⁸Ga-NOTA-NGR. Die Untersuchungen wurden immer am Folgetag zu denen mit ⁶⁸Ga-

NOTA-NGR durchgeführt, deswegen erfolgten die Messungen an den Tagen 4, 8 und 22 nach OP. Die anschließende Gabe von FDG und die Auswertung der Bilddateien erfolgten analog zu den Untersuchungen mit ^{68}Ga -NOTA-NGR. Es wurden jeweils zwischen 7.27 und 19.48 MBq (im Mittel 13.24 MBq) ^{68}Ga -NOTA-RGD und zwischen 5.62 und 12.83 MBq (im Mittel 9.73 MBq) FDG injiziert.

15.2.4 Untersuchung mit 1-(2-[^{124}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril (75)

Dynamische PET-Untersuchungen mit 1-(2-[^{124}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril wurden über die Dauer von 90 min durchgeführt, die in 9 Frames à 10 min unterteilt wurden. Zur Auswertung wurde die Zeit zwischen 40 – 80 min in Betracht gezogen und somit die Frames 4-7 zu einer Bilddatei kombiniert. Die Untersuchung mit FDG konnte aufgrund der langen Halbwertszeit von Iod-124 nicht am selben Tag erfolgen und wurde deshalb schon am Vortag durchgeführt. Das Tier hatte dadurch nicht exakt dieselbe Position und die Überlagerung der beiden Bilddateien wurde im Nachhinein mithilfe der Auswertungssoftware erzielt. Es wurden 4.11 MBq 1-(2-[^{124}I]Iodhippursäure)-pyrrolidin-(2S)-carbonitril und 16.60 MBq FDG injiziert.

15.2.5 Untersuchung mit [^{18}F]Fludeoxyglucose

Dynamische PET-Untersuchungen mit [^{18}F]Fludeoxyglucose (FDG) wurden über eine Dauer von 60 min durchgeführt. Es erfolgte eine Injektion von jeweils 5.21 und 15.04 MBq (im Mittel 10.10 MBq) und die Aufnahme wurde unmittelbar nach Injektion gestartet. Die 60 minütige Messung wurde in 6 Frames à 10 min unterteilt. Zur Auswertung wurde die Zeit zwischen 40 – 60 min in Betracht gezogen und somit die Frames 4-5 zu einer Bilddatei kombiniert. Die Untersuchung mit FDG erfolgte stets direkt im Anschluss an eine Untersuchung mit einem ^{68}Ga -Tracer. Fünf Minuten vor Injektion von FDG wurde dem Tier subkutan Insulin injiziert, 15 Minuten nach Injektion wurde dem Tier subkutan Glucose injiziert. Die Menge an Insulin und Glucose wurde am Körpergewicht des Tiers berechnet.

15.3 Autoradiographie

15.3.1 Untersuchung mit ^{68}Ga -NOTA-NGR (77)

Die Experimente wurden wie bei den PET-Untersuchungen an Ischämie/Reperfusion-operierten Ratten durchgeführt. Es wurden 34.0 – 36.8 MBq ^{68}Ga -NOTA-NGR injiziert. Nach 90 minütiger Narkose wurden die Tiere getötet und die Herzen entnommen. Die Herzen wurden eingebettet und mit Kältespray Schock-gefroren. Anschließend wurden Kryoschnitte der Dicke 5 μm erstellt und auf die Image-Platte gelegt. Nach einer Belichtungszeit von 4.5 h wurde die Image-Platte am Autoradiographen mit einer Auflösung von 30 μm ausgelesen.

16 Gewebeschnitte

16.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Die mit Kleintier-PET und Autoradiographie untersuchten Tiere wurden geopfert und die Herzen wurden entnommen. Der linke Ventrikel wurde herauspräpariert und in ein geeignetes Medium eingebettet. Nach einigen Stunden Lagerung bei -20 °C wurden am Kryotom Kryoschnitte erstellt. Diese waren 5 µm dick und wurden auf Objektträger aufgebracht. So standen sie für verschiedene Färbungen zur Verfügung und konnten anschließend unter dem Mikroskop betrachtet und ausgewertet werden.

16.2 HE-Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung werden die Kryoschnitte getrocknet und in Aceton 3 min fixiert. Nachdem die Schnitte 10 min getrocknet wurden, werden sie 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend werden sie nach der Methode von Mayer¹¹⁷ 10 min mit Hämalun gefärbt. Unter fließendem Leitungswasser werden die Schnitte innerhalb von 10 min gebläut, danach kurz in destilliertem Wasser gespült. Die Schnitte werden getrocknet und für 7 min mit Eosin bedeckt. Anschließend werden sie 2 mal mit destilliertem Wasser und daraufhin in der Alkoholreihe gespült. Auf 3 mal kurz mit 96 %igen Ethanol folgen 5 min in einer 1:1-Mischung aus 96 %igen Ethanol und Xylol, 5 min in reinem Xylol und 2 mal 5 min in Rotihistol. Das Eindecken der Schnitte erfolgt mit Deckgläschen und Entellan.

16.3 Immunohistochemie

16.3.1 LSAB-Methode

Die Antikörperfärbung der LSAB-Methode (Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode) beruht auf folgender Reihenfolge der verwendeten Reagenzien: Unkonjugierter Primärantikörper + biotinylierter Sekundärantikörper + Avidin-Biotin-Enzymkonjugat + Substrat(Chromogen) = Farbe. Als Chromogene werden 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid Dihydrat (DAB, braun) oder HistoGreen (grün) verwendet. Standardmäßig werden Kryoschnitte von Rattenherzen der Dicke 5 µm verwendet. Die Färbeprozedur verläuft wie folgt:

Die Schnitte werden bei 37 °C aufgetaut und 3 min in Aceton fixiert. Nach 10 minütigem Trocknen werden die Schnitte 3 mal 3 min mit PBS gewaschen, anschließend 10 min in 200 ml Methanol / 2 ml H₂O₂ inkubiert. Nach erneutem 3 mal 3 min waschen mit PBS werden die Schnitte 20 min in Blockingserum inkubiert. Anschließend wird der erste Antikörper auf

die Schnitte gegeben und über Nacht bei 2-4 °C gelagert. Am nächsten Tag werden die Schnitte auf Raumtemperatur gebracht und danach 3 mal 3 min mit PBS gewaschen. Daraufhin wird der zweite Antikörper auf die Schnitte gegeben und eine Einwirkzeit von 30 min eingehalten. Nach 3 mal 3 min Waschen mit PBS werden die Schnitte 30 min mit ABC (Avidin/Biotinylated Enzyme Complex) inkubiert. Die ABC-Lösung muss 30 min vor Gebrauch angesetzt werden (5 ml PBS + 2 Tropfen A + 2 Tropfen B). Nach 3 mal 3 min Waschen mit PBS wird das Chromogen für 45 s auf die Schnitte gegeben. Stellt man die Schnitte für 1 min in Leitungswasser, entwickelt sich die Farbe. Die Schnitte werden kurz getrocknet und danach sehr schnell mit Hämatoxylin behandelt um die Zellkerne blau zu färben. Die Farbe entwickelt sich auch in 1 min Leitungswasser. Die Schnitte werden anschließend in destilliertem Wasser und einer Alkoholreihe gespült (2 min 50 % Ethanol, 2 min 70 % Ethanol, 2 min 100 % Ethanol, 5 min 50 % Xylol / 50 % Ethanol, 2 mal 10 min Xylol). Die Objektträger werden, nachdem alle Schnitte getrocknet sind, mit Vectamount und einem Deckgläschen versiegelt.

16.3.2 CD13

Das Enzym Aminopeptidase N entspricht dem Antigen CD13. Die Antikörperfärbung erfolgt nach der LSAB-Methode.

Als Blockingserum wird normal-goat-Serum (1:100 verdünnt in PBS) verwendet. Als erster Antikörper wird eine Verdünnung von 1:250 (in normal-goat-Serum) gewählt. Der zweite Antikörper ist ein biotinylierter anti-rabbit IgG (1:200 verdünnt in normal-goat-Serum). Gefärbt wird mit DAB und Hämatoxylin.

16.3.3 CD31

Die Antikörperfärbung des Antigens CD31 erfolgt nach der LSAB-Methode. Als Blockingserum wird normal-horse-Serum (1:100 verdünnt in PBS) verwendet. Als erster Antikörper wird eine Verdünnung von 1:50 (in normal-horse-Serum) gewählt. Der zweite Antikörper ist ein biotinylierter anti-mouse IgG (1:200 verdünnt in normal-horse-Serum). Gefärbt wird mit DAB und Hämatoxylin.

16.3.4 CD61

Die Antikörperfärbung des Antigens CD61 (β_3 -Domäne des Integrins $\alpha_v\beta_3$) erfolgt nach der LSAB-Methode. Als Blockingserum wird normal-goat-Serum (1:100 verdünnt in PBS)

verwendet. Als erster Antikörper wird eine Verdünnung von 1:25 (in normal-goat-Serum) gewählt. Der zweite Antikörper ist ein biotinylierter anti-hamster IgG (1:200 verdünnt in normal-goat-Serum). Gefärbt wird mit DAB und Hämatoxylin.

16.3.5 P4H

Die Antikörperfärbung des Antigens P4H erfolgt nach der LSAB-Methode. Als Blockingserum wird normal-horse-Serum (1:200 verdünnt in PBS) verwendet. Als erster Antikörper wird eine Verdünnung von 1:50 (in normal-horse-Serum) gewählt. Der zweite Antikörper ist ein biotinylierter anti-mouse IgG (1:200 verdünnt in normal-horse-Serum). Gefärbt wird mit DAB und Hämatoxylin.

16.3.6 Doppelfärbung CD13-CD31

Die Doppelfärbung der Antigene CD13 und CD31 erfolgt nach der LSAB-Methode. Als Blockingserum wird normal-goat-Serum (1:100 verdünnt in PBS) verwendet. Als erster Antikörper wird derjenige für CD13 (1:50 verdünnt in normal-goat-Serum) gewählt. Der zweite Antikörper ist ein biotinylierter anti-rabbit IgG (1:100 verdünnt in normal-goat-Serum). Nach der Färbung des CD13-Antikörpers mit DAB werden die Schnitte 3 mal 3 min mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min mit Avidin behandelt. Nach 1 min Waschen mit PBS werden die Schnitte 15 min mit Biotin behandelt. Nach 3 mal 3 min Waschen mit PBS erfolgt das Prozedere für das Antigen CD31. Als Blockingserum wird normal horse-Serum verwendet (1:100 verdünnt in PBS). Der erste Antikörper ist 1:50 verdünnt (in normal horse-Serum). Als zweiter Antikörper wird ein biotinylierter anti-mouse IgG gewählt (1:100 in normal-horse-Serum). Der Gebrauch des Chromogens HistoGreen für CD31 erfolgt nach Anmischen der Färbelösung (1 ml HistoGreen-Puffer + 2 Tropfen Chromogen + 2 Tropfen H₂O₂). Die Inkubationszeit beträgt 5 min. Die Zellkerne werden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

16.3.7 Doppelfärbung CD13-CD68

Die Doppelfärbung der Antigene CD13 und CD68 erfolgt nach der LSAB-Methode. Als Blockingserum wird normal-goat-Serum (1:100 verdünnt in PBS) verwendet. Als erster Antikörper wird derjenige für CD13 (1:50 verdünnt in normal-goat-Serum) gewählt. Der zweite Antikörper ist ein biotinylierter anti-rabbit IgG (1:100 verdünnt in normal-goat-Serum). Nach der Färbung des CD13-Antikörpers mit DAB werden die Schnitte 3 mal 3 min mit PBS

gewaschen und anschließend für 20 min mit Avidin behandelt. Nach 1 min Waschen mit PBS werden die Schnitte 20 min mit Biotin behandelt. Nach 3 mal 3 min Waschen mit PBS erfolgt das Prozedere für das Antigen CD68, als Blockingserum wird normal horse-Serum verwendet (1:100 verdünnt in PBS). Der erste Antikörper ist 1:100 verdünnt (in normal horse-Serum). Als zweiter Antikörper wird ein biotinylierter anti-mouse IgG gewählt (1:200 in normal-horse-Serum). Der Gebrauch des Chromogens HistoGreen für CD31 erfolgt nach Anmischen der Färbelösung (1 ml HistoGreen-Puffer + 2 Tropfen Chromogen + 3 Tropfen H₂O₂). Die Inkubationszeit beträgt 5 min. Die Zellkerne werden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

16.3.8 Doppelfärbung CD13-P4H

Die Doppelfärbung der Antigene CD13 und P4H (Prolyl-4-Hydroxylase β) erfolgt nach der LSAB-Methode. Als Blockingserum wird normal-goat-Serum (1:100 verdünnt in PBS) verwendet. Als erster Antikörper wird derjenige für CD13 (1:250 verdünnt in normal-goat-Serum) gewählt. Der zweite Antikörper ist ein biotinylierter anti-rabbit IgG (1:200 verdünnt in normal-goat-Serum). Nach der Färbung des CD13-Antikörpers mit DAB werden die Schnitte 3 mal 3 min mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit Avidin behandelt. Nach 1 min Waschen mit PBS werden die Schnitte 20 min mit Biotin behandelt. Nach 3 mal 3 min Waschen mit PBS erfolgt das Prozedere für das Antigen P4H, als Blockingserum wird normal horse-Serum verwendet (1:200 verdünnt in PBS). Der erste Antikörper ist 1:50 verdünnt (in normal horse-Serum). Als zweiter Antikörper wird ein biotinylierter anti-mouse IgG gewählt (1:200 in normal-horse-Serum). Der Gebrauch des Chromogens HistoGreen für CD31 erfolgt nach Anmischen der Färbelösung (1 ml HistoGreen-Puffer + 2 Tropfen Chromogen + 3 Tropfen H₂O₂). Die Inkubationszeit beträgt 5 min. Die Zellkerne werden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

17 Literatur

- (1) <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#/IX>; 24.05.2013, 08:25.
- (2) www.who.int/factsheets/fs317/en/index.html; *Cardiovascular Diseases 2012*, Fact Sheet 317.
- (3) <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>; 24.05.2013, 08:05.
- (4) *Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt*; Löwel, H.; unter Mitarbeit von: Allmut Hörmann, A. D., Margit Heier,; Christa Meisinger, A. S., Ursula Kaup, Uwe Gösele, Heiko Hymer, Eds.; Robert Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt: Berlin, **2006**; Heft 33.
- (5) Alpert, J. S.; Antman, E.; Apple, F.; Armstrong, P. W.; Bassand, J. P.; de Luna, A. B.; Beller, G.; Breithardt, G.; Chaitman, B. R.; Clemmensen, P.; Falk, E.; Fishbein, M. C.; Galvani, M.; Garson, A.; Grines, C.; Hamm, C.; Jaffe, A.; Katus, H.; Kjekshus, J.; Klein, W.; Klootwijk, P.; Lenfant, C.; Levy, D.; Levy, R. I.; Luepker, R.; Marcus, F.; Naslund, U.; Ohman, M.; Pahlm, O.; Poole-Wilson, P.; Popp, R.; Alto, P.; Pyorala, K.; Ravkilde, J.; Rehnquist, N.; Roberts, W.; Roberts, R.; Roelandt, J.; Ryden, L.; Sans, S.; Simoons, M. L.; Thygesen, K.; Tunstall-Pedoe, H.; Underwood, R.; Uretsky, B. F.; Van de Werf, F.; Voipio-Pulkki, L. M.; Wagner, G.; Wallentin, L.; Wijns, W.; Wood, D.; *Journal of the American College of Cardiology* **2000**, 36, 959.
- (6) Bauersachs, J.; Ertl, G. In *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*; Ganten, D., Ruckpaul, K., Köhrle, J., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: **2006**, 335.
- (7) Doenst, T.; Schlensak, C.; Beyersdorf, F. *Deutsches Ärzteblatt* **2004**, Jahrgang 101, Heft 9, A 570.
- (8) Hoh, C. K. *Nuclear Medicine and Biology* **2007**, 34, 737.
- (9) Shah, A. M.; Solomon, S. D. *European Journal of Heart Failure* **2010**, 12, 779.
- (10) Sutton, M. G. S.; Sharpe, N. *Circulation* **2000**, 101, 2981.
- (11) Gajarsa, J. J.; Kloner, R. A. *Heart Failure Reviews* **2011**, 16, 13.
- (12) Krenning, G.; Zeisberg, E. M.; Kalluri, R. *Journal of Cellular Physiology* **2010**, 225, 631.
- (13) Martin, T. A.; Harding, K. G.; Jiang, W. G. *Angiogenesis* **1999**, 3, 69.
- (14) Rodemann, H. P.; Rennekampff, H.-O. *Functional Diversity of Fibroblasts*; Springer, Netherlands **2011**; Vol. 4.
- (15) Griffioen, A. W.; Molema, G. *Pharmacological Reviews* **2000**, 52, 237.
- (16) van Hinsbergh, V. W. M.; Koolwijk, P. *Cardiovascular Research* **2008**, 78, 203.
- (17) van Hinsbergh, V. W. M.; Engelse, M. A.; Quax, P. H. A. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **2006**, 26, 716.
- (18) O'Brien, P.; O'Connor, B. F. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **2008**, 1784, 1130.
- (19) Bauvois, B. *Oncogene* **2004**, 23, 317.
- (20) Sato, Y. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2004**, 27, 772.
- (21) Fukasawa, K.; Fujii, H.; Saitoh, Y.; Koizumi, K.; Aozuka, Y.; Sekine, K.; Yamada, M.; Saiki, I.; Nishikawa, K. *Cancer Letters* **2006**, 243, 135.
- (22) merops.sanger.ac.uk/index.shtml; 18.02.2014, 12:08. Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Bateman, A. *Nucleic Acids Res* **2012**, 40, D343.
- (23) Mina-Osorio, P. *Trends in Molecular Medicine* **2008**, 14, 361.
- (24) Petrovic, N.; Schacke, W.; Gahagan, J. R.; O'Connor, C. A.; Winnicka, B.; Conway, R. E.; Mina-Osorio, P.; Shapiro, L. H. *blood* **2007**, 110, 142.
- (25) Bauvois, B.; Dauzonne, D. *Medicinal Research Reviews* **2006**, 26, 88.
- (26) Pasqualini, R.; Koivunen, E.; Ruoslahti, E. *Journal of Cell Biology* **1995**, 130, 1189.
- (27) Buehler, A.; van Zandvoort, M. A. M. J.; Stelt, B. J.; Hackeng, T. M.; Schrans-Stassen, B. H. G. J.; Bennaghmouch, A.; Hofstra, L.; Cleutjens, J. P. M.; Duijvestijn,

- A.; Smeets, M. B.; de Kleijn, D. P. V.; Post, M. J.; de Muinck, E. D. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **2006**, *26*, 2681.
- (28) Curnis, F.; Arrigoni, G.; Sacchi, A.; Fischetti, L.; Arap, W.; Pasqualini, R.; Corti, A. *Cancer Research* **2002**, *62*, 867.
- (29) Dirksen, A.; Langereis, S.; de Waal, B. F. M.; van Genderen, M. H. P.; Hackeng, T. M.; Meijer, E. W. *Chemical Communications* **2005**, 2811.
- (30) Aimes, R. T.; Zijlstra, A.; Hooper, J. D.; Ogbourne, S. M.; Sit, M. L.; Fuchs, S.; Gotley, D. C.; Quigley, J. P.; Antalis, T. M. *Thrombosis and Haemostasis* **2003**, *89*, 561.
- (31) Rosenblum, J. S.; Kozarich, J. W. *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, *7*, 496.
- (32) Busek, P.; Malik, R.; Sedo, A. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2004**, *36*, 408.
- (33) Collins, P. J.; McMahon, G.; O'Brien, P.; O'Connor, B. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2004**, *36*, 2320.
- (34) Chen, W. T.; Kelly, T. *Cancer and Metastasis Reviews* **2003**, *22*, 259.
- (35) Gherzi, G.; Dong, H.; Goldstein, L. A.; Yeh, Y.; Hakkinen, L.; Larjava, H. S.; Chen, W. T. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 29231.
- (36) Leiting, B.; Pryor, K. D.; Wu, J. K.; Marsilio, F.; Patel, R. A.; Craik, C. S.; Ellman, J. A.; Cummings, R. T.; Thornberry, N. A. *Biochemical Journal* **2003**, *371*, 525.
- (37) Bermpohl, F.; Loster, K.; Reutter, W.; Baum, O. *Febs Letters* **1998**, *428*, 152.
- (38) Qiao, L.; Baumann, C. A.; Crysler, C. S.; Ninan, N. S.; Abad, M. C.; Spurlino, J. C.; DesJarlais, R. L.; Kervinen, J.; Neeper, M. P.; Bayoumy, S. S.; Williams, R.; Deckman, I. C.; Dasgupta, M.; Reed, R. L.; Huebert, N. D.; Tomczuk, B. E.; Moriarty, K. J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 123.
- (39) Villhauer, E. B.; Brinkman, J. A.; Naderi, G. B.; Dunning, B. E.; Mangold, B. L.; Mone, M. D.; Russell, M. E.; Weldon, S. C.; Hughes, T. E. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 2362.
- (40) Villhauer, E. B.; Brinkman, J. A.; Naderi, G. B.; Burkey, B. F.; Dunning, B. E.; Prasad, K.; Mangold, B. L.; Russell, M. E.; Hughes, T. E. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 2774.
- (41) Flentke, G. R.; Munoz, E.; Huber, B. T.; Plaut, A. G.; Kettner, C. A.; Bachovchin, W. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88*, 1556.
- (42) Coutts, S. J.; Kelly, T. A.; Snow, R. J.; Kennedy, C. A.; Barton, R. W.; Adams, J.; Krolkowski, D. A.; Freeman, D. M.; Campbell, S. J.; Ksiazek, J. F.; Bachovchin, W. W. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39*, 2087.
- (43) Eidam, O.; Romagnoli, C.; Caselli, E.; Babaoglu, K.; Pohlhaus, D. T.; Karpiak, J.; Bonnet, R.; Shoichet, B. K.; Prati, F. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 7852.
- (44) Inglis, S. R.; Zervosen, A.; Woon, E. C. Y.; Gerards, T.; Teller, N.; Fischer, D. S.; Luxen, A.; Schofield, C. J. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 6097.
- (45) Snow, R. J.; Bachovchin, W. W.; Barton, R. W.; Campbell, S. J.; Coutts, S. J.; Freeman, D. M.; Gutheil, W. G.; Kelly, T. A.; Kennedy, C. A.; Krolkowski, D. A.; Leonard, S. F.; Pargellis, C. A.; Tong, L.; Adams, J. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 10860.
- (46) Cunningham, C. C. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2007**, *16*, 1459.
- (47) Narra, K.; Mullins, S. R.; Lee, H.-O.; Strzemkowski-Brun, B.; Magalong, K.; Christiansen, V. J.; McKee, P. A.; Egleston, B.; Cohen, S. J.; Weiner, L. M.; Meropol, N. J.; Cheng, J. D. *Cancer Biology & Therapy* **2007**, *6*, 1691.
- (48) Meadows, S. A.; Edosada, C. Y.; Mayeda, M.; Tran, T.; Quan, C.; Raab, H.; Wiesmann, C.; Wolf, B. B. *Biochemistry* **2007**, *46*, 4598.
- (49) Lee, K. N.; Jackson, K. W.; Christiansen, V. J.; Lee, C. S.; Chun, J. G.; McKee, P. A. *blood* **2006**, *107*, 1397.
- (50) Christiansen, V. J.; Jackson, K. W.; Lee, K. N.; McKee, P. A. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2007**, *457*, 177.
- (51) Wolf, B. B.; Quan, C.; Tran, T.; Wiesmann, C.; Sutherlin, D. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2008**, *8*, 719.

- (52) Edosada, C. Y.; Quan, C.; Tran, T.; Pham, V.; Wiesmann, C.; Fairbrother, W.; Wolf, B. B. *Febs Letters* **2006**, *580*, 1581.
- (53) Edosada, C. Y.; Quan, C.; Wiesmann, C.; Tran, T.; Sutherlin, D.; Reynolds, M.; Elliott, J. M.; Raab, H.; Fairbrother, W.; Wolf, B. B. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 7437.
- (54) Tran, T.; Quan, C.; Edosada, C. Y.; Mayeda, M.; Wiesmann, C.; Sutherlin, D.; Wolf, B. B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 1438.
- (55) Hu, Y.; Ma, L. F.; Wu, M.; Wong, M. S.; Li, B.; Corral, S.; Yu, Z. Z.; Nomanbhoy, T.; Alemayehu, S.; Fuller, S. R.; Rosenblum, J. S.; Rozenkrants, N.; Minimo, L. C.; Ripka, W. C.; Szardenings, A. K.; Kozarich, J. W.; Shreder, K. R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 4239.
- (56) Tsai, T.-Y.; Yeh, T.-K.; Chen, X.; Hsu, T.; Jao, Y.-C.; Huang, C.-H.; Song, J.-S.; Huang, Y.-C.; Chien, C.-H.; Chiu, J.-H.; Yen, S.-C.; Tang, H.-K.; Chao, Y.-S.; Jiaang, W.-T. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 6572.
- (57) Robinson, S. D.; Hodivala-Dilke, K. M. *Current Opinion in Cell Biology* **2011**, *23*, 630.
- (58) Danhier, F.; Le Breton, A.; Preat, V. *Molecular Pharmaceutics* **2012**, *9*, 2961.
- (59) Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter *Molecular Biology of the Cell*; 4th ed. New York, **2002**.
- (60) Stromblad, S.; Cheresh, D. A. *Chemistry & Biology* **1996**, *3*, 881.
- (61) Brooks, P. C.; Stromblad, S.; Sanders, L. C.; vonSchalscha, T. L.; Aimes, R. T.; Stetler-Stevenson, W. G.; Quigley, J. P.; Cheresh, D. A. *Cell* **1996**, *85*, 683.
- (62) Integrin-Hemmer Cilengitide, *Merck- Das Entdeckermagazin* **2011**. [http://magazin.merck.de/de/Life and Assistance/Hirntumor/Cilengitide1.html](http://magazin.merck.de/de/Life_and_Assistance/Hirntumor/Cilengitide1.html); 18.02.2014, 12:18.
- (63) <http://www.merck.de/de/presse/extNewsDetail.html?newsId=C47977D13865FCB9C1257B1D001EF9CA&newsType=1>; 18.02.2014, 13:02.
- (64) Bengel, F. M.; Schwaiger, M. *Radiologe* **2000**, *40*, 897.
- (65) Miller, P. W.; Long, N. J.; Vilar, R.; Gee, A. D. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 8998.
- (66) Simon R. Cherry, M. D. *PET*; Springer, **2006**.
- (67) Cai, L.; Lu, S.; Pike, V. W. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 2853.
- (68) <http://www.nuklearmedizin.ukw.de/petct-zentrum.html>; 18.02.2014, 13:04.
- (69) Pauwels, E. K. J.; Ribeiro, M. J.; Stoot, J.; McCready, V. R.; Bourguignon, M.; Maziere, B. *Nuclear Medicine and Biology* **1998**, *25*, 317.
- (70) Bengel, F. M.; Schwaiger, M. *European Radiology* **1998**, *8*, 1698.
- (71) Jaffer, F. A.; Sosnovik, D. E.; Nahrendorf, M.; Weissleder, R. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2006**, *41*, 921.
- (72) Coenen, H. H. *PET Chemistry*; Springer: Berlin, **2007**.
- (73) Samnick, S.; Kirsch, C.-M. *Nuklearmedizin* **1999**, *38*, 292.
- (74) Samnick, S.; Brandau, W.; Nölken, G.; Gerhards, H. J.; Schober, O. *Nuclear Medicine and Biology* **1997**, *24*, 295.
- (75) Elias, H.; Arnold, C.; Kloss, H. *International Journal of Applied Radiation and Isotopes* **1973**, *24*, 463.
- (76) Bodanszky, M. *Principles of Peptide Synthesis*; 2nd ed.; Springer: Berlin, **1993**.
- (77) Bodanszky, M. *The Practice of Peptide Synthesis*; 2nd ed.; Springer: Berlin, **1994**.
- (78) Balcom, B. J.; Petersen, N. O. *Journal of Organic Chemistry* **1989**, *54*, 1922.
- (79) Korn, A.; Rudolphbohner, S.; Moroder, L. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1717.
- (80) Jeong, Y. C.; Moloney, M. G. *Synlett* **2009**, 2487.
- (81) Wissmann, H.; Kleiner, H. J. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1980**, *19*, 133.
- (82) Conway, S. C.; Perni, R. B. *Synthetic Communications* **1998**, *28*, 1539.
- (83) Dolusic, E.; Larrieu, P.; Blanc, S.; Sapunarcic, F.; Norberg, B.; Moineaux, L.; Colette, D.; Stroobant, V.; Pilotte, L.; Colau, D.; Ferain, T.; Fraser, G.; Galeni, M.; Frere, J. M.;

- Masereel, B.; Van den Eynde, B.; Wouters, J.; Frederick, R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 1550.
- (84) Liu, L.-H.; Zhang, H.; Li, A.-F.; Xie, J.-W.; Jiang, Y.-B. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10441.
- (85) Chavez, F.; Kennedy, N.; Rawalpally, T.; Williamson, R. T.; Cleary, T. *Organic Process Research & Development* **2010**, *14*, 579.
- (86) Schirmeister, T.; Peric, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2000**, *8*, 1281.
- (87) Khurana, J. M.; Sehgal, A. *Organic Preparations and Procedures International* **1994**, *26*, 580.
- (88) Korn, A.; Rudolphbohner, S.; Moroder, L. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 8381.
- (89) Lawandi, J.; Toumieux, S.; Seyer, V.; Campbell, P.; Thielges, S.; Juillerat-Jeanneret, L.; Moitessier, N. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 6672.
- (90) Kelly, T. A.; Fuchs, V. U.; Perry, C. W.; Snow, R. J. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1009.
- (91) Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemie* VCH: Weinheim, **1994**.
- (92) GraFit; 5.0.13, Erithacus Software Ltd.: London, **2006**.
- (93) Lee, K. N.; Jackson, K. W.; Terzyan, S.; Christiansen, V. J.; McKee, P. A. *Biochemistry* **2009**, *48*, 5149.
- (94) Baer, J. W.; Gerhartz, B.; Hoffmann, T.; Rosche, F.; Demuth, H. U. Hildebrandt, M., Klapp, B. F., Hoffman, T., Demuth, H. U., Eds.; Kluwer Academic/Plenum Publ: New York, **2003**, 524, 103.
- (95) Cheng, Y.; Prusoff, W. H. *Biochemical Pharmacology* **1973**, *22*, 3099.
- (96) Stephanie Ludewig, M. K., Markus Schiller, Knut Baumann, Tanja Schirmeister *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2010**, *10*, 368.
- (97) Craig Zimmerman, J. W. B., John Joyal, John Marquis, Jian-cheng Wang WO2010/036814 A2 **2010**.
- (98) Carroll, F. I. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 1775.
- (99) Ashworth, D. M.; Atrash, B.; Baker, G. R.; Baxter, A. J.; Jenkins, P. D.; Jones, D. M.; Szelke, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1996**, *6*, 1163.
- (100) P.A. Schubiger, L. L., M. Friebe *PET Chemistry*; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2007**.
- (101) Lemoine, L.; Becker, G.; Vacher, B.; Billard, T.; Lancelot, S.; Newman-Tancredi, A.; Zimmer, L. *Journal of Nuclear Medicine* **2012**, *53*, 969.
- (102) Coenen, H. H.; Mertens, J.; Maziere, B. *Radioionidation Reactions for Radiopharmaceuticals*; Springer: Dordrecht, Niederlande, 2006.
- (103) Loch, C.; Maziere, B.; Comar, D. *Journal of Nuclear Medicine* **1980**, *21*, 171.
- (104) Velikyan, I.; Maecke, H.; Langstrom, B. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 569.
- (105) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 2858.
- (106) Knetsch, P. A.; Petrik, M.; Griessinger, C. M.; Rangger, C.; Fani, M.; Kesenheimer, C.; von Guggenberg, E.; Pichler, B. J.; Virgolini, I.; Decristoforo, C.; Haubner, R. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2011**, *38*, 1303.
- (107) http://www.zemm.uni-wuerzburg.de/tierhaltung_und_transgene_technologie/equipment/kleintier_pet; 27.03.2013, 10:08.
- (108) Henrik H. El Ali *, R. P. B., Jesper Tranekjær Jørgensen, Rebecca Myschetzky, Andreas Kjaer *Diagnostics* **2012**, *2*, 42.
- (109) <http://amide.sourceforge.net/>; 22.04.2013, 16:04.
- (110) Schmidt, K. C.; Smith, C. B. *Nuclear Medicine and Biology* **2005**, *32*, 719.
- (111) <http://raytest.com/index2.html>; 09.04.2013, 13:45.
- (112) http://www.biostep.de/produkte/Bio_Imaging_Systeme_1754/Bildplatten_Scanner_2095/index.html; 10.04.2013, 09:01.
- (113) Roberts, C. S.; Maclean, D.; Maroko, P.; Kloner, R. A. *American Journal of Cardiology* **1984**, *54*, 407.
- (114) Fischer, E. *Archiv für mikroskopische Anatomie* **1875**, *12*, 349.
- (115) Schwarz, E. *Sitz Akad W math naturw Cl.* **1867**, *55*, 671.
- (116) Cook, H. C. *J Clin Pathol* **1997**, *50*, 716.
- (117) Mayer, P. *Mittheil. a. d.Zool. Station Neapel* **1891**, *10*, 170.

- (118) Hsu, S. M.; Raine, L.; Fanger, H. *J Histochem Cytochem* **1981**, 29, 577.
- (119) Heras, A.; Roach, C. M.; Key, M. E. *Lab Invest* **1995**, 72, 165.
- (120) Chilosi, M.; Lestani, M.; Pedron, S.; Montagna, L.; Benedetti, A.; Pizzolo, G.; Menestrina, F. *Biotech Histochem* **1994**, 69, 235.
- (121) Moreno, A.; Lucena, C.; Lopez, A.; Garrido, J. J.; Perez, L. L. d.; Llanes, D. *Histol Histopathol* **2002**, 17, 347.
- (122) Pusztaszeri, M. P.; Seelentag, W.; Bosman, F. T. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2006**, 54, 385.
- (123) Gorres, K. L.; Raines, R. T. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **2010**, 45, 106.
- (124) Mullerat, J.; Perrett, C. W.; Deroide, F.; Winslet, M. C.; Bofill, M.; Poulter, L. W. *Anticancer Research* **2005**, 25, 693.
- (125) Andreas Markus Loening, S. S. G. **2003**.
- (126) Schiketanz, I.; Stefanescu, A.; Gheorghiu, M. D.; Schiketanz, A.; Balaban, A. T. *Revue Roumaine De Chimie* **1990**, 35, 345.
- (127) Lachicotte, R. J.; Hines, M. A.; Mazat, C. L.; Taylor, R. A.; Beam, C. F. *Synthetic Communications* **1990**, 20, 63.
- (128) Kazuo, M. *Yakugaku Zasshi* **1952**, 72, 627.
- (129) Curtius, T. *Journal für Praktische Chemie* **1916**, 94, 85.
- (130) Feldmann, E. G.; Foye, W. O. *Journal of the American Pharmaceutical Association* **1959**, 48, 419.
- (131) Franzen, H. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1909**, 42, 2465.
- (132) Rao, M. N.; Holkar, A. G.; Ayyangar, N. R. *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, 4717.
- (133) Yoo, W. J.; Li, C. J. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 13064.
- (134) Annunziata, R.; Benaglia, M.; Puglisi, A.; Raimondi, L.; Cozzi, F. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 3976.
- (135) Schiketanz, I.; Schiketanz, A.; Gheorghiu, M. D.; Pascu, M.; Vasile, A.; Balaban, A. T. *Revue Roumaine De Chimie* **1985**, 30, 969.
- (136) Leonte, C.; Carp, E. *Revue Roumaine De Chimie* **1989**, 34, 1241.
- (137) Kuhn, D. G. USA, 1987; Vol. US 4659857.
- (138) Abderhalden, E. *Fermentforschung* **1930**, 12, 180.
- (139) Hoffmann, E.; Jagnicin, B. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1966**, 3, 348.
- (140) Landsteiner, K.; van der Scheer, J. *Jour Exp Med* **1938**, 67, 709.
- (141) Nogami, H. *Yakugaku Zasshi* **1951**, 71, 1494.
- (142) Hartrodt, W. *Nuklearmedizin, Supplementum (Stuttgart)* **1965**, 4, 423.
- (143) Novello, N. J.; Miriam, S. R.; Sherwin, C. P. *Jour Biol Chem* **1926**, 67, 555.
- (144) K. E. Scheer, W. M.-B. *Nuklearmedizin* **1961**, 2, 193.

Die Strukturformeln und Gleichungen dieser Arbeit wurden mithilfe der Programme ChemBioDraw (ChemBioDraw, Level: Ultra, Version 12.0 © 2009 CambridgeSoft), die Grafiken mithilfe von ChemBioDraw und Paint (Paint Windows 7, Version 6.1 © 2009 Microsoft Corporation) erstellt.

Die Diagramme in Kapitel 6 und 7 wurden mit dem Programm Origin (OriginPro 8.5 OG SR1 © 2010 OriginLab Corporation) erstellt.