ETH zürich

ETH Library

Synthese und in vitro Evaluation funktionalisierter Steroide markiert mit Tc99m

Diplomarbeit

Master Thesis

Author(s):
Müller, Cristina

Publication date:
2000

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-004261271

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Eidgenössische Technische Hochschule Zürich

Ecole polytechnique fédérale de Zurich
Politecnico federale di Zurigo
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

Departement Angewandte Biowissenschaften

Institut für Pharmazeutische Wissenschaften

Synthese und in vitro Evaluation funktionalisierter Steroide markiert mit Tc99m

Diplomarbeit

von

Cristina Müller

Bürgerin von Vordemwald AG

Referent: Prof. Dr. P. August Schubiger
Paul Scherrer Institut, Villigen

Korreferent: Dr. Roger Schibli
Paul Scherrer Institut, Villigen

06. März 00 bis 28. Juli 00

Ich bedanke mich:

bei meinem Betreuer Dr. Roger Schibli für die vielen Stunden, die er investiert hat, und für seine stetige Hilfsbereitschaft im Labor und vor dem Computer. Es ist ihm gelungen, mich für die Chemie neu zu begeistern.

bei Cécile Dumas für ihre Hilfe bei den organisch-chemischen Synthesen und die Betreuung während Rogers Abwesenheit.

bei Judith Stahel für die Unterstützung bei den „aktiven“ Arbeiten.

bei Jeannine Petrig, Jan Baumeister, Dr. Rolf Schwarzbach, Dominik Kunz und Simon Schweri für die herzliche Aufnahme in der Forschungsgruppe und die Hilfsbereitschaft im Labor.

bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des „Center for Radiopharmaceutical Science“, die mich bei meiner Arbeit unterstützt und zu einer guten Atmosphäre beigetragen haben.

bei Prof. P. A. Schubiger, der mir die Diplomarbeit am PSI ermöglicht hat.

bei meiner Mutter für die moralische Unterstützung während der Diplomzeit.

bei meinem Vater für die finanzielle Unterstützung.

bei meinem Bruder Samuel für die zahlreichen Tipps rund um den Computer, die er mir zu jeder Tages- und Nachtzeit gegeben hat.

Verwendete Abkürzungen

DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
HPLC	Hochdruck-Flüssig-Chromatographie
RP-18	Reversed Phase C-18
R_t	Retentionszeit
HV	Hochvakuum
IR	Infrarot
cm^{-1}	Wellenzahl
m	mittel (medium)
s	stark (strong)
vs	sehr stark (very strong)
w	schwach (weak)
keV	Kiloelektronenvolt
L	Hilfsligand
M	Metallzentrum
MeV	Megaelektronenvolt
MS	Massenspektroskopie
MW	Molmasse
NMR	Kernmagnetische Resonanz
d	Doublett
m	Multiplett
ppm	parts per million
s	Singulett
t	Triplett
PC	Papierchromatographie
PET	Positronen-Emissionstomographie
PP	Phosphatpuffer
R_f	R_f-Wert (ratio of fronts)
RT	Raumtemperatur
SC	Säulenchromatographie
SPET	Single Photon-Emissionstomographie
TEAP	Triethylammoniumphosphat
THF	Tetrahydrofuran
UV-VIS	Ultraviolett/sichtbar
λ	Wellenlänge

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist der bei weitem häufigste Tumor in der westlichen Hemisphäre.

Die Bestimmung der Estrogen-Rezeptor-Konzentration in Tumorzellen ist von entscheidender Bedeutung für die Wahl einer angemessenen Therapie. Aus diesem Grund ist die Entwicklung einer Methode zur nicht-invasiven Bestimmung des Estrogen-Rezeptor-Status von grösstem Interesse. In der nuklearmedizinischen Forschung sucht man nach einem Radiopharmakon, das einerseits an den Estrogen-Rezeptor bindet und andererseits mittels SPET-Kamera detektierbare γ-Strahlung emittiert.

Ziel der Arbeit war die Funktionalisierung und anschliessende Markierung von Steroiden mit ^{99m}Tc-Technetium.

17α-Ethinylestradiol und 17α-Ethinyltestosteron wurden an der Ethinylgruppe mit dem bidentaten Chelatsystem Phenyl-pyridinyl-methylenamin gekoppelt, und die erhaltenen Steroidderivate mittels NMR, IR, MS und UV charakterisiert. Es folgte die makroskopische Umsetzung mit $[NEt_4]_2[ReBr_3(CO)_3]$. Die Rhenium-Komplexe wurden mit denselben Methoden charakterisiert wie die Ausgangsverbindungen. Ferner wurden die Steroidderivate mit dem ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyl-Prekursor *fac*-$[^{99m}Tc(OH_2)_3(CO)_3]^+$ auf dem Tracerniveau umgesetzt und mittels HPLC analysiert.

Die mit dem ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyl-Prekursor markierten Verbindungen wurden in verschiedenen Puffern und in Plasma auf ihre Stabilität geprüft. In weiteren Experimenten wurde die Octanol/Wasser-Verteilung bestimmt und das Estradiolderivat mit einem Antikörper-Testsystem auf seine Affinität geprüft.

Es hat sich gezeigt, dass sowohl 17α-Ethinylestradiol, als auch 17α-Ethinyltestosteron in einer zweistufigen Synthese mit dem Chelatsystem Phenyl-pyridinyl-methylenamin gekoppelt werden können. Die Umsetzung mit dem Rhenium-Tricarbonyl-Prekursor ist bei beiden Derivaten innert Minuten erfolgt und hat zur Bildung von orange-roten Komplexen geführt. Eine Markierung mit dem ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyl-Prekursor ist ebenfalls bei beiden Derivaten gelungen.

Der Estradiolkomplex ist in PBS-Puffer pH 7.4 und pH 8.5 am stabilsten. Der Testosteronkomplex hat sich in sämtlichen Puffersystemen als deutlich weniger stabil erwiesen. In Plasma werden beide Verbindungen innert einer Stunde praktisch vollständig an Plasmaproteine gebunden, wobei unklar bleibt, ob dies nur auf eine unspezifische Bindung zurückzuführen ist, oder ob die dritte Koordinationsstelle der Technetium-Tricarbonyleinheit der Komplexe mit funktionellen Gruppen der Plasmaproteine interagiert.

Der apparente Verteilungskoeffizient log $D_{pH\ 7.4}$ konnte für die markierten Steroidderivate wegen ungenügender Stabilität nicht eindeutig bestimmt werden.

Das Testsystem mit einem für die Stelle C-17 des Estradiols spezifischen Antikörper hat sich als nicht geeignet erwiesen.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 9

1.1. Radiopharmaka 9
1.1.1. Diagnose und Therapie in der Nuklearmedizin 9
1.1.2. Technetium- und Rhenium-Tricarbonyl-Komplexe 11

1.2. Das Mammakarzinom 14
1.2.1. Vorkommen und Häufigkeit 14
1.2.2. Der Estrogen-Rezeptor 14

1.3. Hintergrund und Ziel der Arbeit 16

1.4. Das Steroid-Chelat-System 17
1.4.1. Wahl der Ausgangsverbindungen 17
1.4.2. Wahl der Chelatsysteme 20

2. RESULTATE 21

2.1. Organisch-chemische Synthesen 21
2.1.1. Chelatsysteme 1 und 3 21
2.1.2. Estradiolderivate 5 und 7 21
2.1.3. Testosteronderivat 9 23

2.2. Rhenium-Komplexe 24
2.2.1. NMR-Spektren 25
2.2.2. UV-Spektren 25
2.2.3. IR-Spektren 26

2.3. ^{99m}Tc-Technetium-Komplexe 26
2.3.1. Reinigung der Verbindungen 12b und 14b 27

2.4. Stabilitätsprüfung 27
2.4.1. Puffer-Stabilität 27
2.4.2. Plasma-Stabilität 30

2.5. Verteilung 33
2.5.1. Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient 33

2.6. Affinitätstest 34
2.6.1. Variante 1 34
2.6.2. Variante 2 35

3. DISKUSSION 37

3.1. Organisch-chemische Synthesen 37
3.1.1. Derivatisierung von Ethinylestradiol und Ethinyltestosteron 37
3.1.2. Folgerungen 40

3.2. Rhenium-Komplexe **41**

3.3. ^{99m}Tc-Technetium-Komplexe **42**
3.3.1. Darstellung der Komplexe 12b und 14b 42
3.3.2. Reinigung der Verbindungen 12b und 14b 43

3.4. Stabilitätsprüfung **44**
3.4.1. Puffer-Stabilität 44
3.4.2. Plasma-Stabilität 46
3.4.3. Folgerungen 46

3.5. Verteilung **47**
3.5.1. Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient 47

3.6. Affinitätstest **48**
3.6.1. Variante 1 48
3.6.2. Variante 2 49
3.6.3. Folgerungen 49

4. EXPERIMENTELLER TEIL **51**

4.1. Allgemeine Arbeitstechnik **51**
4.1.1. Reagenzien 51
4.1.2. Puffer 51
4.1.3. Kohlesuspensionen 51
4.1.4. Dünnschichtchromatographie (DC) 52
4.1.5. Säulenchromatographie (SC) 52
4.1.6. Papierchromatographie (PC) 52
4.1.7. Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC) 52
4.1.8. UV-VIS-Spektroskopie 52
4.1.9. IR-Spektroskopie 53
4.1.10. NMR-Spektroskopie 53
4.1.11. Massenspektrometrie (MS) 53
4.1.12. Gamma-Counter 53

4.2. Organisch-chemische Synthesen **53**
4.2.1. Chelatsysteme 53
4.2.2. Estradiolderivate 5 und 7 56
4.2.3. Testosteronderivat 9 61

4.3. Rhenium-Komplexe **64**
4.3.1. $ReBr(5)(CO)_3$] 12a 64
4.3.2. $ReBr(9)(CO)_3$] 14a 66

4.4. Technetium99m-Komlexe **67**
4.4.1. $^{99m}TcCl(5)(CO)_3$] 12b 67
4.4.2. $^{99m}TcCl(9)(CO)_3$] 14b 67
4.4.3. Reinigung der Verbindungen 12b und 14b 67

4.5. Stabilitätsprüfungen **68**

4.5.1. Puffer-Stabilität 68
4.5.2. Plasma-Stabilität 68

4.6. Verteilung 70
4.6.1. Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient 70
4.6.2. Stabilitätskontrolle 70

4.7. Affinitätstest 71
4.7.1. Variante 1 71
4.7.2. Variante 2 72

5. LITERATUR 74

6. SUBSTANZENLISTE 76

1. Einleitung

1.1. Radiopharmaka

1.1.1. Diagnose und Therapie in der Nuklearmedizin

Diagnose und Therapie von Krankheiten mit Hilfe radioaktiv markierter Substanzen, die in einem Gewebe oder Organ angereichert werden, sind Thema der Nuklearmedizin. Die verwendeten Radiopharmaka dienen je nach Radionuklid als Diagnostika oder Therapeutika.

Radiopharmaka der zweiter Generation [1] bestehen aus zwei Komponenten: Ein Biomolekül mit geeigneter Pharmakokinetik wird mit einem Radionuklid markiert. Die Eigenschaften eines derartigen Radiopharmakons werden daher einerseits durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Biomoleküls, andererseits durch die Strahlungseigenschaften des Radionuklids bestimmt.

Für diagnostische Zwecke kommen Radionuklide zur Anwendung, die eine Halbwertszeit von Minuten bis wenigen Stunden haben, damit die Strahlendosis für den Patienten und die Umgebung möglichst gering bleibt. Da die Strahlung gewebedurchdringend sein muss, kommen hauptsächlich γ-Strahler zur Anwendung. Diese sollten zur Detektion mittels SPET-Kamera eine Energie zwischen 100 und 300 keV haben.

Ein weiterer Aspekt ist die Verfügbarkeit der Radionuklide. Natürlich vorkommende Radionuklide sind mit anderen Radionukliden verunreinigt und von diesen nur mit grossem technischen Aufwand zu trennen. Deshalb werden in der Nuklearmedizin ausschliesslich künstliche Radionuklide eingesetzt. Bei Nukliden, die in einem Zyklotron durch Beschuss von stabilen Elementen mit energiereichen Partikeln erzeugt werden (z.B. ^{123}I, ^{67}Ga, ^{201}Tl), ist ein Transport vom Ort der Herstellung in die Klinik notwendig, was oft mit hohen Kosten verbunden ist.

Für gewisse Nuklide wie zum Beispiel ^{99m}Tc-Technetium bieten Generatorsysteme die Möglichkeit zur ständigen Verfügbarkeit. Das Prinzip eines solchen Generators besteht darin, dass ein relativ langlebiges Mutternuklid durch radioaktiven Zerfall ein kurzlebiges Tochternuklid bildet. Letzteres kann nuklearmedizinisch verwendet werden.

Das heute bedeutendste Generatorsystem ist der ^{99}Mo-Molybdän/^{99m}Tc-Technetium-Generator (Fig. 1). Er ermöglicht die Anwendung von nahezu trägerfreiem ^{99m}Tc-Technetium. ^{99}Mo-Molybdän zerfällt mit einer Halbwertszeit von 66.6 Stunden unter Emission von β^--Strahlen zu 86% in den metastabilen Zwischenkern ^{99m}Tc-Technetium. Letzteres geht unter γ-Emission mit einer Halbwertszeit von 6 Stunden in ^{99}Tc-Technetium über. Das Mutternuklid ist an Ionenaustauschermaterial adsorbiert, das sich in einer kleinen Glassäule befindet.

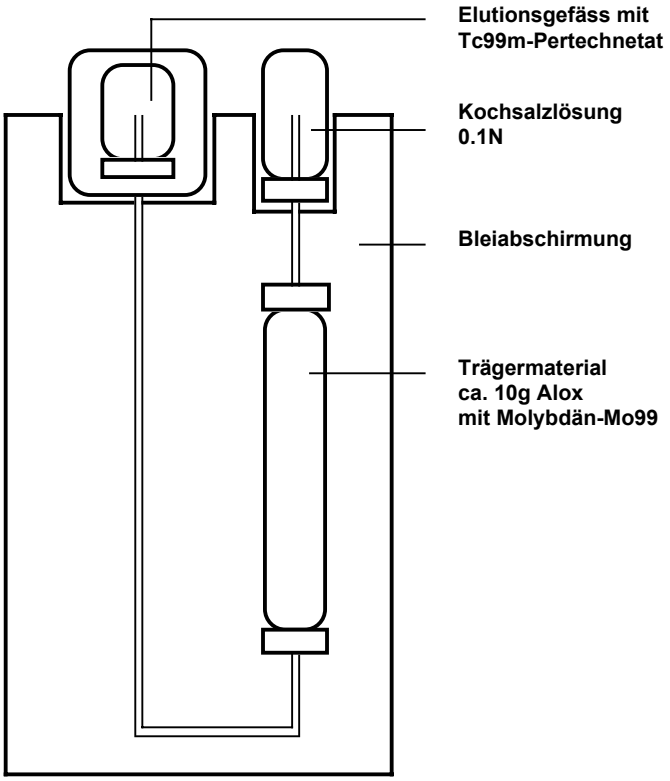


Fig. 1: ^{99}Mo-Molybdän/^{99m}Tc-Technetium-Generator

^{99m}Tc-Technetium lässt sich als Natrium-Pertechnetat $[Na]^+[Tc(VII)O_4]^-$ von der Muttersubstanz $[MoO_4]^{2-}$ durch Elution mit steriler Kochsalzlösung trennen. Eine Elution des Generators ist prinzipiell jederzeit möglich. Die Ausbeute an eluierbarem Tochternuklid variiert jedoch beträchtlich. Die Regeneration nach einer Elution eines ^{99}Mo/^{99m}Tc-Generators dauert ca. 24 Stunden. Die Lösung enthält je nach Alter des Generators mehr oder weniger ^{99}Tc-Technetium. Dieses entsteht sowohl durch Zerfall des Mutter- als auch des Tochternuklids, wodurch die spezifische Aktivität des Eluats mit der Zeit immer mehr abnimmt [1, 2].

Die eluierte Natrium-Pertechnetat-Lösung kann nach Reduktion zur Herstellung von ^{99m}Tc-Technetium-Radiopharmaka verwendet werden. ^{99m}Tc-Technetium ist als reiner γ-Strahler mit einer Halbwertszeit von 6 Stunden ein ideales Radionuklid zur Anwendung in der Diagnostik. Die maximale Energie der Strahlung beträgt 141 keV und kann mittels SPET-Kamera detektiert werden.

Für den Einsatz in der Therapie sind Radionuklide mit anderen Strahlungseigenschaften gefordert: Die Energie der Strahlung soll beim Durchdringen des Tumorgewebes die Zellen zerstören. Geeignet sind deshalb β^--Strahlen, die mit einer Energie von 1-2 MeV etwa 5mm ins Gewebe einzudringen vermögen. Um die therapeutische Anwendung gleichzeitig szintigraphisch zu kontrollieren, ist es vorteilhaft, wenn der Zerfall des verwendeten Radionuklids γ-Strahlung mit einem Zerfallsanteil von 5-20% emittiert.

Die geforderten Eigenschaften werden von ^{188}Re-Rhenium erfüllt. Dieses Radionuklid zerfällt unter Emission von β^--Strahlen mit einer Halbwertszeit von 16.9 Stunden in ^{188}Os-Osmium, wobei die maximale Energie bei 2.1 MeV liegt. Die beim Zerfall gleichzeitig emittierten γ-Strahlen weisen eine Energie von 155 keV auf und können somit mittels SPET-Kamera detektiert werden. Analog dem ^{99m}Tc-Technetium existiert auch für ^{188}Re-Rhenium ein Genera-

tor, der ^{188}W-Wolfram/^{188}Re-Rhenium-Generator, wodurch auch dieses Radionuklid generell verfügbar ist [1].

Die zweite Komponente eines Radiopharmakons zweiter Generation ist das Biomolekül oder der biologische Tracer. Dieses bestimmt die Organspezifität, indem es an einen für das darzustellende oder zu zerstörende Gewebe spezifischen Rezeptor bzw. spezifisches Antigen bindet. Die Tumorspezifität ist für Radiopharmaka zur Therapie eine unabdingbare Voraussetzung. Im Gegensatz zu reinen γ-Strahlern zerstört die harte Teilchenstrahlung der Therapeutika das Gewebe. Bei ungenügender Spezifität könnten auch die gesunden Körperzellen durch die β^--Strahlung zerstört werden.

Ferner bestimmt das Biomolkül den Metabolismus und damit die biologische Halbwertszeit des Radiopharmakons.

1.1.2. Technetium- und Rhenium-Tricarbonyl-Komplexe

Aus den genannten Gründen ist das Radionuklid ^{99m}Tc-Technetium für diagnostische Zwecke in der Nuklearmedizin weit verbreitet. Zur Markierung von Biomolekülen mit ^{99m}Tc-Technetium wurden bisher tetradentate Liganden entwickelt, die ^{99m}Tc-Technetium in der Oxidationsstufe +V über S- oder N-Atome stabilisieren. Als Beispiel sei hier der Mercaptoacetyltriglycin-Ligand erwähnt (Fig. 2).

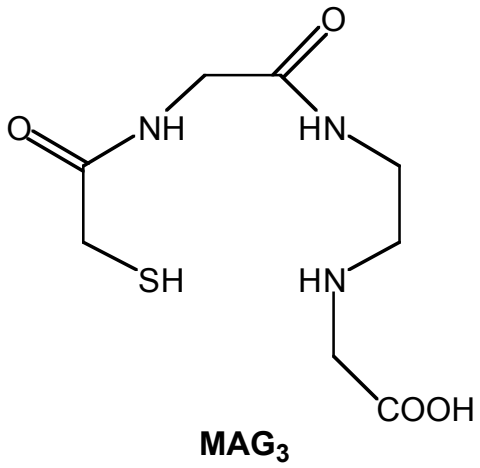


Fig. 2: Als Beispiel ist hier der für Tc(V)-Verbindungen oft verwendete MAG_3-Ligand (Mercaptoacetyltriglycin) gezeigt.

Systeme dieser Art sind verhältnismässig gross. Die biologische Aktivität des markierten Biomoleküls wird deshalb oft beeinträchtigt. Da Technetium in der Oxidationsstufe V zur Disproportionierung neigt, muss es durch Hilfsliganden wie beispielsweise Citrat oder Tartrat komplexiert und stabilisiert werden (Fig. 3).

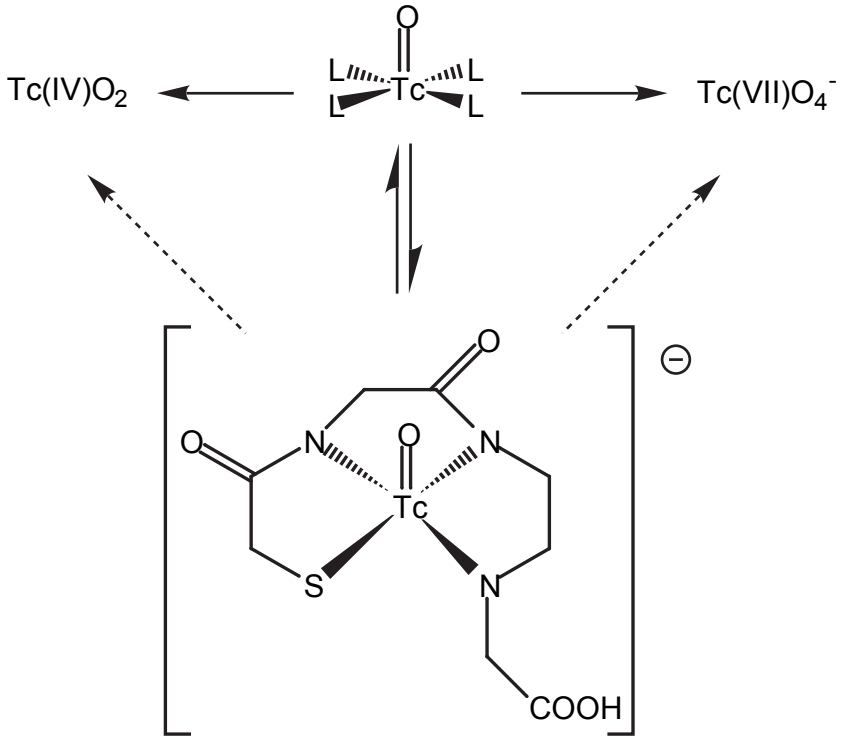


Fig. 3: Hilfsliganden (L) stabilisieren Technetium in der Oxidationsstufe +V und werden anschliessend gegen MAG_3 ausgetauscht → Bildung des stabilen Tc-MAG_3-Komplexes.

Bei Zugabe des zu markierenden Ligandsystems stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem Technetium-Hilfsligand-Komplex und der Bildung des gewünschten Technetium-Ligand-Komplexes ein. Um letzteren mit möglichst hoher Ausbeute zu erhalten, muss der Ligand im Überschuss vorliegen. Dadurch wird oft eine ungenügende spezifische Aktivität erreicht. Um die geforderte spezifische Aktivität zu erlangen, ist eine nachträgliche Reinigung des markierten vom nicht-markierten Biomolekül bzw. vom Zerfallsprodukt meist unumgänglich.

Die Niederdrucksynthese eines ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyl-Komplexes in wässriger Lösung, direkt aus dem Eluat des ^{99}Mo/^{99m}Tc-Generators ist erst vor kurzem entwickelt worden [3, 4, 5]. Erstmals können nun ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyl-Komplexe auf dem Tracerniveau zur Markierung von Biomolekülen hergestellt werden (Fig. 4).

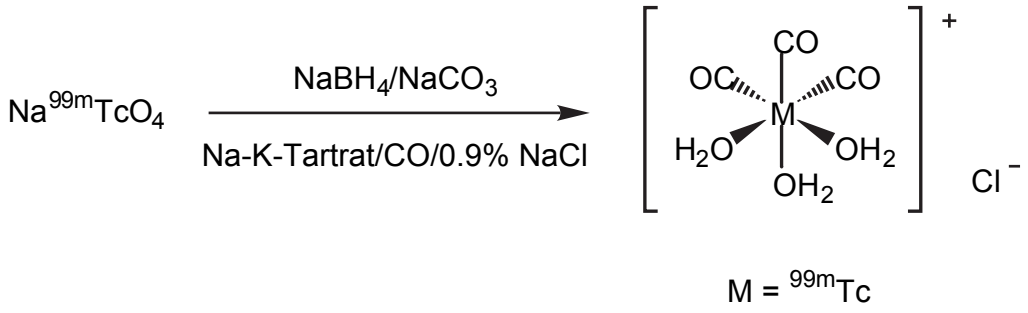


Fig. 4: Synthese von *fac*-[^{99m}Tc$(OH_2)_3(CO)_3]^+$ (**11**) direkt aus dem Eluat des Generators.

Solche Komplexe sind in vieler Hinsicht vorteilhaft: Im Gegensatz zu den herkömmlichen Systemen werden zur Synthese des ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyl-Komplexes (**11**) keine

Hilfsliganden benötigt. Das Tc(I)-Tricarbonylsystem *fac*-[^{99m}Tc$(OH_2)_3(CO)_3]^+$ ist inert und stabil in wässriger Lösung. Ebenfalls vorteilhaft sind die guten Substitutionseigenschaften. Da die Wassermolküle nur schwach gebunden sind, werden sie in Lösung leicht gegen andere Liganden ausgetauscht [6]. Eine Markierung unter milden Bedingungen ist günstig, insbesondere dann, wenn es sich um empfindliche Biomoleküle handelt. Für Proteine ist ein wässriges System sogar Vorraussetzung.

Die Herstellung des Komplexes **11** erfolgt nach einem standardisierten Verfahren mit einer Ausbeute von über 95% (Fig. 5).

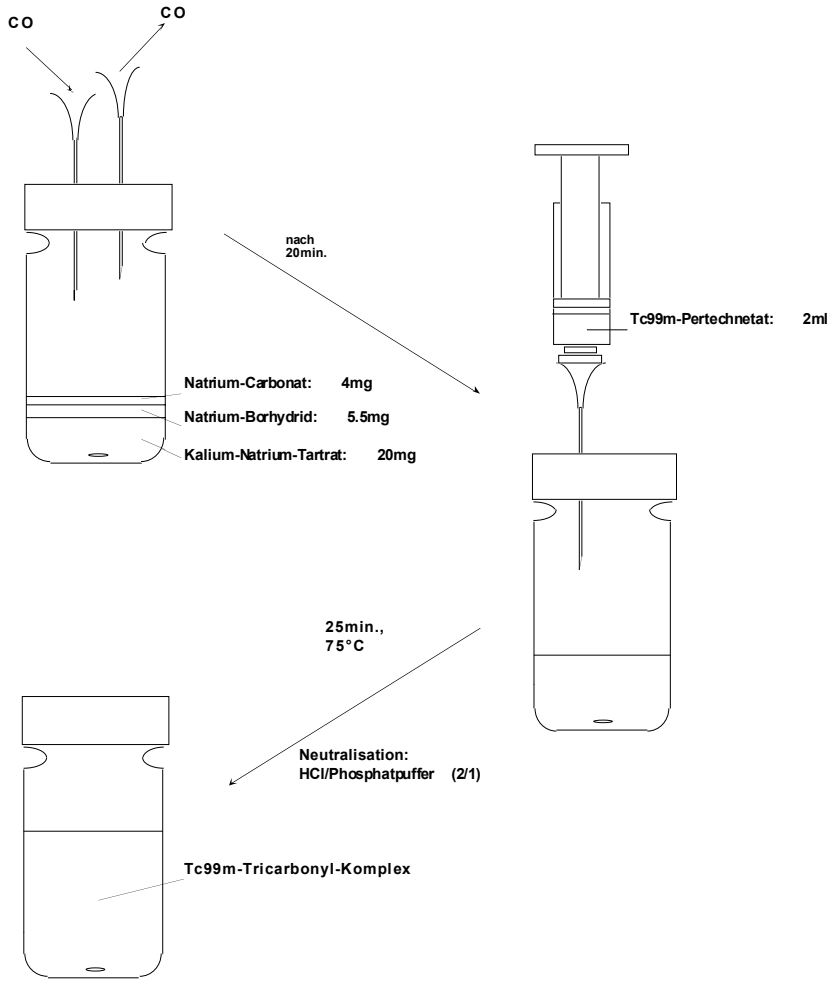


Fig. 5: Standardisiertes Verfahren zur Synthese von *fac*-[^{99m}Tc$(OH_2)_3(CO)_3]^+$ (**11**).

Aus den bereits in Kapitel 1.1.1. erwähnten Gründen ist das Radionuklid ^{188}Re-Rhenium hinsichtlich einer therapeutischen Anwendung in der Nuklearmedizin interessant. Dieses Element befindet sich im Periodensystem unmittelbar unter dem Element Technetium, woraus sich die Ähnlichkeit im chemischen Verhalten erklärt. Ein ^{188}Re-Rhenium-Tricarbonyl-Komplex wird deshalb in analoger Weise zum ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyl-Komplex (**11**) hergestellt. Ferner kann mit dem inaktiven Rhenium makroskopisch ein Tricarbonyl-Komplex (**10**) synthetisiert werden. Dieser dient als Modell zur Markierung von Ligandsystemen. Vorteilhaft ist dabei die Möglichkeit, Verbindungen im makroskopischen Massstab zu synthetisieren und zu analysieren (ohne dass diese radioaktiv markiert werden müssen).

1.2. Das Mammakarzinom

1.2.1. Vorkommen und Häufigkeit

Das Mammakarzinom ist der mit Abstand häufigste Tumor in der westlichen Hemisphäre: von 100‘000 Frauen sind rund 100 betroffen. Allein in Europa sterben jährlich über 75‘000 Frauen an den Folgen dieser Krankheit.

In der Schweiz sind über 20% aller Krebs-Todesfälle auf das Mammakarzinom der Frau zurückzuführen (Fig. 6). Während im Jahr 1954 schon 780 an Brustkrebs erkrankte Frauen starben, waren es 1994 bereits doppelt so viele. Die Sterberate pro 100‘000 hatte sich in diesen 40 Jahren von 30.5 auf ein Maximum von 49.6 im Jahr 1991 erhöht, und liegt 1994 bei 44.6 [7].

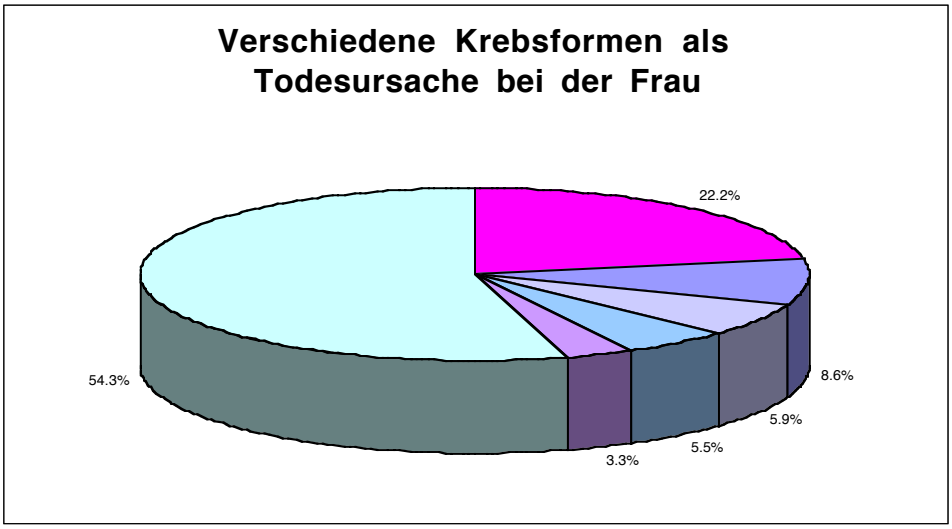


Fig. 6: Krebs als Todesursache bei der Frau: Brustkrebs (22.2%), Lungenkrebs (8.6%), Eierstockkrebs (5.9%), Bauchspeicheldrüsenkrebs (5.5%), Darmkrebs (3.3%), andere Krebsarten (54.3%).

Ferner sei hier auch das Mammakarzinom des Mannes erwähnt. Dabei handelt es sich jedoch um eine seltene Krankheit. Durchschnittlich ist in der Schweiz einer von 350‘000 Männern betroffen. Die Sterberate von 0.3 hat sich in den letzten 40 Jahren praktisch nicht verändert. Bezogen auf die Krebs-Todesfälle beim Mann hat das Mammakarzinom einen Anteil von 0.1% [8].

1.2.2. Der Estrogen-Rezeptor

Wie bei allen Formen von Tumoren spielt auch beim Mammakarzinom der Zeitpunkt der Diagnose für die Überlebenschancen eine wichtige Rolle. Wird der Tumor in einem frühen Stadium erkannt, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass er erfolgreich behandelt werden kann. In einem fortgeschrittenen Tumorstadium ist eine Brustamputation oft unumgänglich. Ein derartiger Eingriff ist für die betroffene Frau mit einer grossen psychischen Belastungen verbunden. Aus diesem Grund ist sowohl die rechtzeitige Erkennung als auch die nicht-invasive Behandlung von besonderem Interesse.

Neben der Früherkennung ist es beim Mammakarzinom von essentieller Bedeutung, den Estrogen-Rezeptor-Gehalt der Tumorzellen bestimmen zu können. Durch diese Kenntnis wird die Wahl einer angemessenen Behandlung erleichtert. Tumorzellen mit einer hohen Konzentration an Estrogen-Rezeptoren werden als ER-positive Tumoren bezeichnet, solche mit einer niederen Konzentration als ER-negative Tumoren. Während ER-positive Tumoren oft erfolgreich mit einer Hormon-Therapie, z.B. mit dem Antiestrogen Tamoxifen, behandelt werden können, sprechen ER-negative Tumoren kaum auf eine endokrine Behandlung an. Sie müssen meist chirurgisch entfernt oder mit cytotoxischer Chemotherapie behandelt werden.

Der Estrogen-Rezeptor gehört als Steroid-Rezeptor zur Gruppe der Nukleären Rezeptor-Superfamilie. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von zur Zeit mehr als 150 bekannten intrazellulären Proteinen, die als Transkriptionsfaktoren eine regulatorische Funktion ausüben. Der Estrogen-Rezeptor, wie auch viele andere Proteine dieser Gruppe, unterscheidet sich von anderen Transkriptionsfaktoren dadurch, dass seine Aktivität durch das Hormon gesteuert wird. Während dieser in Abwesenheit des Hormons nur wenig Aktivität zeigt, bewirkt die Bindung des Hormons oder eines entsprechenden agonistischen Liganden die Umwandlung zu einem aktiven Transkriptionsfaktor. Bei Proteinen der Untergruppe Steroid-Rezeptoren induziert die Hormonbindung die Dissoziation von Heat Shock Proteinen, die an den inaktiven Rezeptor assoziiert sind. Durch Konformationsänderung des Rezeptors kommt es zu dessen Dimerisierung und Interaktion mit der Ziel-DNA, dem sog. Response-Element der betreffenden Gene. Diese Interaktion des Dimers einerseits mit der DNA, andererseits mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Co-Aktivatoren bewirkt die Steuerung der Gen-Expression (Fig. 7).

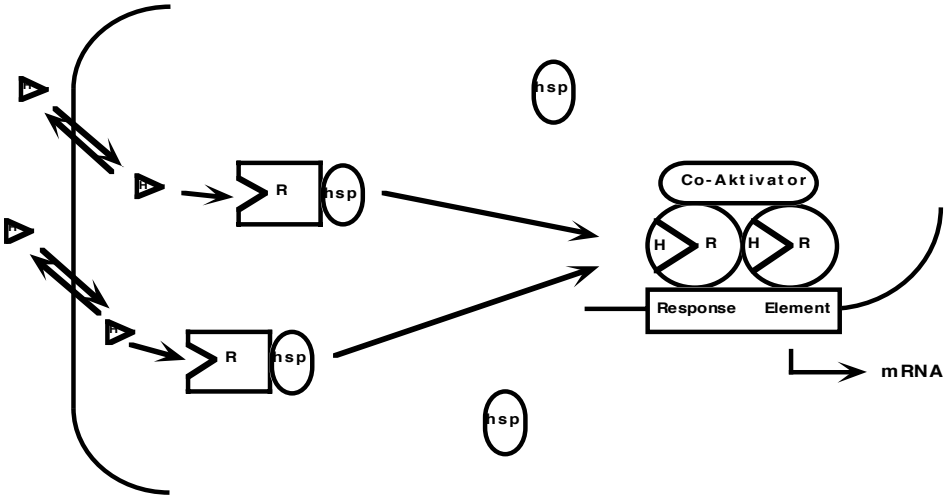


Fig. 7: Die Bindung des Hormons (H) an den Rezeptor (R) induziert die Dissoziation von Heat Shock Proteinen (hsp). Nach Dimerisierung des Rezeptors folgt die Interaktion mit der Ziel-DNA.

Somit sind Rezeptoren dieser Gruppe als sogenannte sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren wichtig für Entwicklung, Differenzierung und Homöostase [9, 10].

Die Frage nach der Funktion der Estrogen-Rezeptoren in Tumorzellen ist bisher nicht vollständig geklärt und stellt deshalb ein Thema der aktuellen Forschung dar.

Die Bestimmung der Hormonrezeptoren im Mammakarzinomgewebe erfolgte bisher nach Biopsie durch immunhistologische Detektion am Gefrierschnitt oder durch biochemische

Rezeptoranalyse am Frischgewebe bzw. an formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe [11].

1.3. Hintergrund und Ziel der Arbeit

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Estrogen-Rezeptorkonzentration und damit zur Diagnosestellung des ER-positiven Tumors könnten in Zukunft PET oder SPET darstellen. Durch diese Techniken wird die Strahlung radioaktiv markierter Pharmazeutika erfasst. Ein entsprechendes Diagnostikum müsste demnach eine, z.B. mit ^{99m}Tc-Technetium radioaktiv markierte Verbindung sein, die spezifisch an den Estrogen-Rezeptor bindet [12]. Ein weiterer Schritt wäre die Radiotherapie, wobei entsprechend geeignete Radionuklide wie z.B. ^{188}Re-Rhenium zur Anwendung kommen könnten.

Da über 60% der Brustkrebstumore ER-positiv sind, ist die Entwicklung eines derartigen ER-spezifischen Radiopharmazeutikums zur Diagnose wie auch zur Therapie von grosser Wichtigkeit [13].

Grundsätzlich werden zwei Strategien für die Entwicklung von ER-bindenden Radiopharmazeutika verfolgt: das konjugierte Design und das integrale Design. Beim integralen Design wird ein Metallchelatsystem in eine Struktur integriert, die ein Steroid-Mimetikum darstellt (Fig. 8) [14]. Systeme dieser Art neigen jedoch zu Instabilität und zeigen aufgrund der veränderten Struktur des Biomoleküls oft nur geringe Rezeptoraffinität.

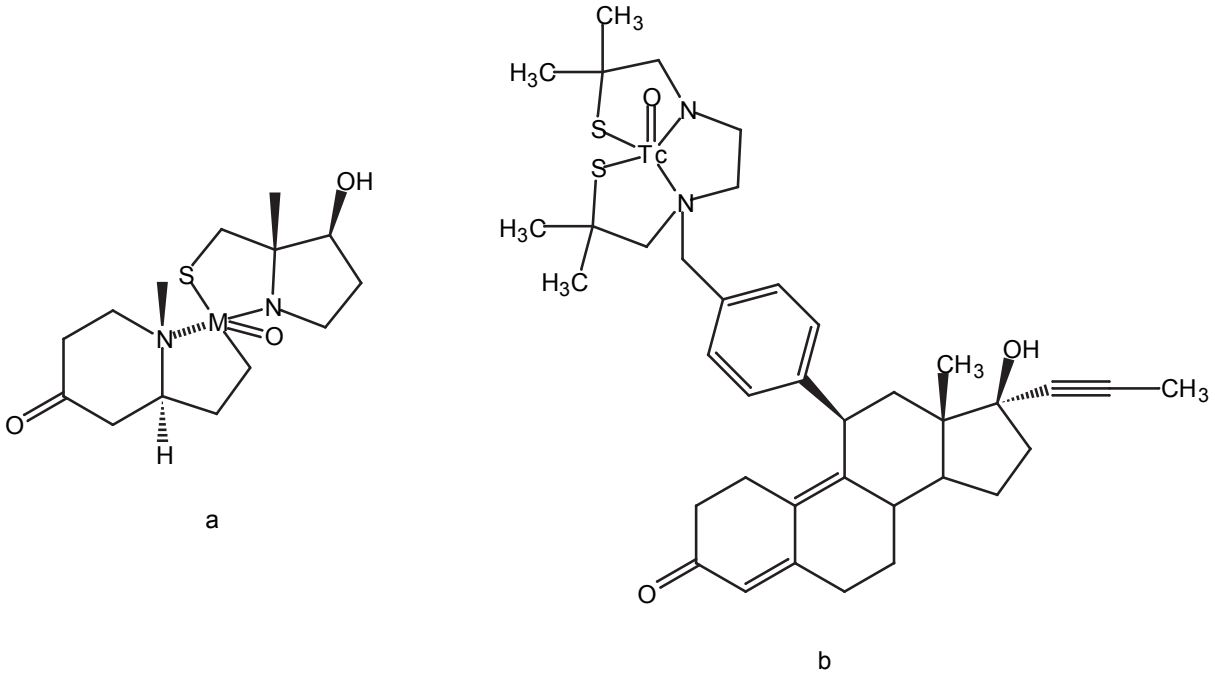


Fig. 8: Beispiel eines integralen Designs (Steroid-Mimetikum) mit integriertem Metallkomplex (M= ^{99m}Tc) (a) [14] und Beispiel eines konjugierten Designs (b), bei dem ein N_2S_2-Chelatsystem an der Position C-7α an ein Steroid gekoppelt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Konzept des konjugierten Designs gewählt. Beim konjugierten Design wird ein Metallchelatsystem über eine Kette, auch Spacer genannt, mit einer sterisch günstigen Stelle eines Biomoleküls konjugiert (Fig 8). Die zur Rezeptor-Bindung

notwendigen Eigenschaften des Biomoleküls, in diesem Fall des Steroids, sollen durch das konjugierte Chelatsystem möglichst nicht beeinträchtigt werden.

Ziel der Diplomarbeit war die Synthese und anschliessende radioaktive Markierung von Steroidderivaten.

Aus den genannten Hintergründen war das weibliche Sexualhormon Estradiol das primär interessierende Steroid. Zum Vergleich wurde ferner das männliche Sexualhomon Testosteron analog derivatisiert. Zur Derivatisierung musste eine geeignete Stelle am Steroidgerüst gewählt werden, d.h. eine Stelle, die für die Bindung des Hormons an den Rezeptor nicht essentiell ist. Durch die Kopplung eines Chelatsystems soll die Affinität zum Rezeptor möglichst wenig beeinträchtigt werden.

In einer ersten Phase wurden die beiden Hormone mit geeigneten Chelatsystemen funktionalisiert. Die auf verschiedenen Synthesewegen hergestellten Verbindungen wurden mit Hilfe analytischer Methoden wie NMR, IR, UV/VIS etc. charakterisiert.

In einer zweiten Phase erfolgte die makroskopische Markierung dieser Verbindungen mit dem inaktiven Rhenium-Tricarbonyl-Prekursor (**10**). Die erhaltenen Rhenium-Komplexe wurden mit den gleichen analytischen Methoden charakterisiert wie die Steroidderivate. Die Markierung mit dem ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyl-Prekursor (**11**) erfolgte auf dem Tracerniveau, wobei die Charakterisierung mittels HPLC durchgeführt wurde.

In einer dritten Phase wurden die radioaktiv markierten Verbindungen auf ihre in-vitro-Stabilität geprüft. Die Verbindungen wurden einerseits in verschiedenen Puffern, andererseits in Plasma bei 37°C inkubiert und mittels HPLC bzw. PC nach definierten Zeitintervallen auf ihre Stabilität geprüft.

Da es sich beim Steroidrezeptor um einen intrazellulären Rezeptor handelt, muss eine daran bindende Substanz zuerst die Zellmembran, d.h. eine lipophile Barriere, überwinden. Es ist deshalb von Interesse, dass die Verbindung lipophile Eigenschaften aufweist. Als Mass für die Lipophilie wurde die Verteilung in einem Octanol-Wasser-System untersucht. Der sog. apparente Verteilungskoeffizient D erlaubt Rückschlüsse auf das pharmakokinetische Verhalten einer Verbindung.

In einer vierten und letzten Phase wurde die Affinität des mit ^{99m}Tc-Technetium markierten Estradiolderivates bezüglich eines Estradiol-Antikörpers untersucht. Dazu wurde ein für die Position C-17 des Estradiols spezifischer Antikörper verwendet.

1.4. Das Steroid-Chelat-System

1.4.1. Wahl der Ausgangsverbindungen

Die Eigenschaften des derivatisierten Hormons sollten hinsichtlich einer effektiven Rezeptorbindung möglichst erhalten werden. Die Interaktion zwischen dem Hormon und der active site des Steroidrezeptors auf molekularer Ebene ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Aus früheren Studien ist jedoch bekannt, dass die active site des Rezeptors vorwiegend hydrophob ist. Des weitern ist bekannt, dass die beiden Hydroxylgruppen des Estradiols an C-3 und an C-17 für eine effektive Rezeptorbindung essentiell sind. Über diese Hydroxylgruppen (Fig. 10) werden bei der Hormon-Rezeptor-Interaktion Wasserstoffbrücken zu funktionellen Gruppen der active site ausgebildet. Derivatisierungen des Estradiols, die zum Verlust der Hydroxylgruppe an C-3 führten, wurden erwartungsgemäss vom Rezeptor kaum noch erkannt, die Rezeptorbindungsaffinität lag unter 1% [15].

Wie bereits erwähnt werden beim konjugierten Design Metallchelat-Systeme über einen Spacer an das Steroid, in diesem Fall an das Estradiol, gekoppelt. Die Rezeptorbindungsaffinität solcher Komplexe kann recht hoch sein, sofern die Kopplung an einer vom Rezeptor tolerierten Stelle des Estradiols erfolgt. Gemäss früheren Studien stellt die Position C-7α des Steroidgerüstes eine Möglichkeit zur Derivatisierung dar (Fig. 9) [12].

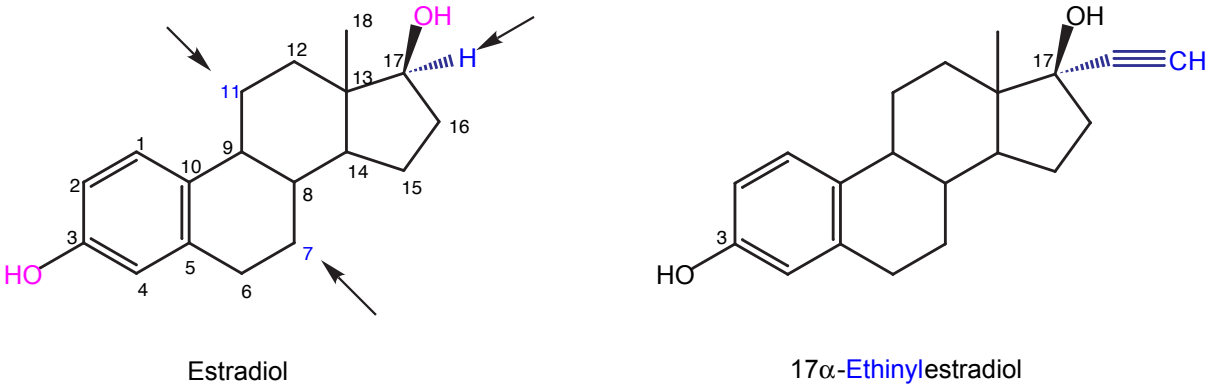


Fig. 9: Estradiol; 17α-Ethinylestradiol als Ausgangsverbindung

In einer anderen Studie wurde die Position C-11β untersucht (Fig. 9). Die Eigenschaften bezüglich Wirkung des Estradiols nach Derivatisierung an dieser Stelle wurden teilweise stark verändert. So wie bei Mifepristone (RU 486) die antiprogestine Wirkung auf dem 11β-Substituenten beruht, bewirkte die Kopplung von Substituenten an der Stelle C-11β des Estradiols zum Teil antiestrogene Effekte [16].

Estradiol, das an der Position C-17α mit einem Phenylrest gekoppelt worden war, zeigte eine Rezeptorbindungsaffinität von 25%. Wurde zwischen das Steroidgerüst des Estradiols und die Phenylgruppe eine Ethinylgruppe eingefügt, lag die Rezeptorbindungsaffinität mit 27% sogar noch leicht höher. Der Einfluss der Ethinylgruppe zeigte sich noch deutlicher bei der Derivatisierung mit organometallischen Substituenten. Die Rezeptorbindungsaffinität für [17α-phenyl-17β-estradiol]tricarbonylchromium lag bei 11%, während die Affinität für [17α-(phenylethinyl)-17β-estradiol]tricarbonylchromium von 24% mehr als doppelt so hoch war [15].

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Derivatisierung 17α-Ethinylestradiol als Ausgangssubstanz gewählt (Fig. 9). Das dreidimensionale Modell dieser Verbindung zeigt, dass die Ethinylgruppe bezüglich des annähernd planaren Steroidgerüstes praktisch senkrecht steht (Fig. 10). Eine Derivatisierung an dieser Stelle sollte die für die Bindung wichtige β-Seite des Steroidgerüstes kaum beeinträchtigen. Ferner zeigten die eben erwähnten Untersuchungen bezüglich Rezeptorbindungsaffinität von Ethinylestradiolderivaten befriedigende Resultate.

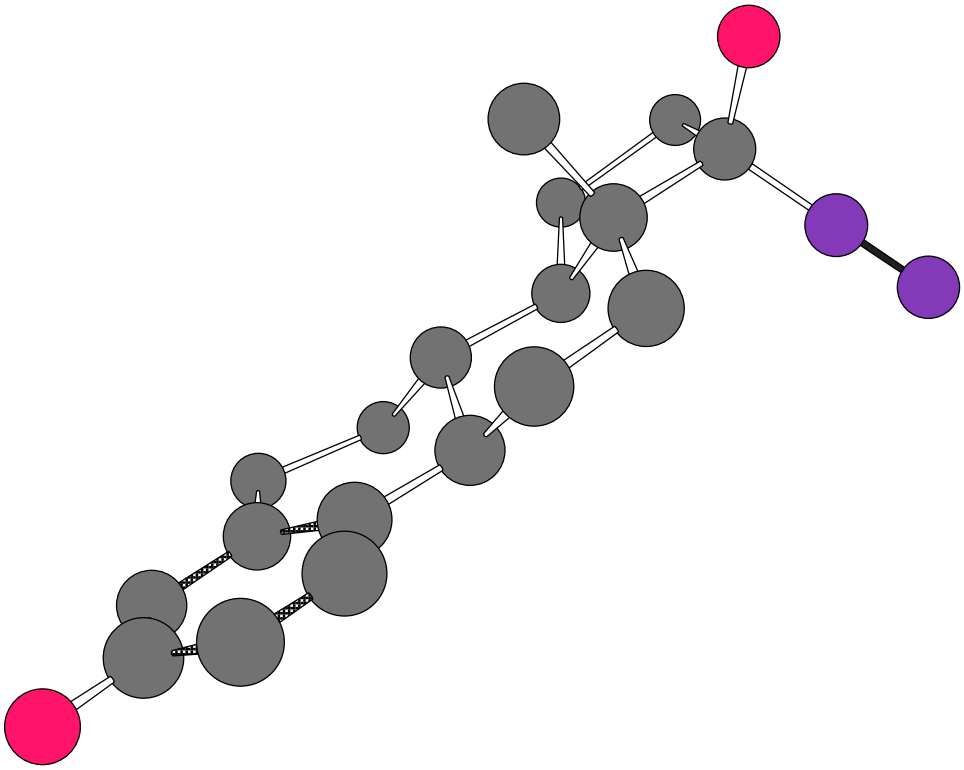
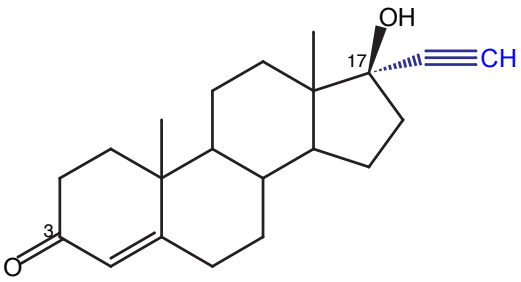


Fig. 10: Dreidimensionale Darstellung des 17α-Ethinylestradiols, rot: Hydroxylgruppen, violett: Ethinylgruppe.

Als weitere Steroidverbindung wurde 17α-Ethinyltestosteron funktionalisiert (Fig. 11). 17α–Ethinyltestosteron unterscheidet sich von 17α–Ethinylestradiol an der Postition C-3 durch eine Ketogruppe statt der Hydroxylgruppe und an der Stelle C-10 durch eine zusätzliche Methylgruppe. Ein weiterer Unterschied ist im Ring A des Steroidgerüstes zu finden. Anstelle des aromatischen Ringes befindet sich beim 17α–Ethinyltestosteron eine Cyclohexeneinheit mit der Doppelbindung zwischen C-4 und C-5. Durch die Derivatisierung dieser Verbindung soll Aufschluss über den Einfluss des Steroidgerüstes erhalten werden.



17α-Ethinyltestosteron

Fig. 11: 17α-Ethinyltestosteron als Ausgangsverbindung.

Das Verhalten bei der Markierung des Testosteronderivates konnte mit jenem des Estradiolderivates verglichen werden. Ferner könnte auch Testosteron als männliches Sexualhormon hinsichtlich endokrin bedingter Tumoren, wie beispielsweise das Prostatakarzinom, ein interessantes Biomolekül darstellen.

1.4.2. Wahl der Chelatsysteme

In früheren Studien wurden bidentate Stickstoffliganden als Chelatoren für die ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyleinheit getestet. Dabei erwiesen sich alle Kombinationen von Stickstoff-Donoren, die eine aromatische Amingruppe enthielten, als extrem effizient [17].

Da Estradiol wie auch Testosteron als Steroide sehr lipophile Verbindungen sind, schien ein Chelatsystem mit lipophilen Eigenschaften naheliegend. An die genannte Stelle der Biomoleküle 17α-Ethinylestradiol bzw. 17α-Ethinyltestosteron wurde deshalb das Chelatsystem Phenyl-pyridinyl-methylenamin gekoppelt (Fig. 12). Die Phenyl-Gruppe stellt den sog. Spacer dar, während die beiden Stickstoffatome des Pyridinyl-methylenamin-Teils die Koordination der ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyleinheit ermöglichen.

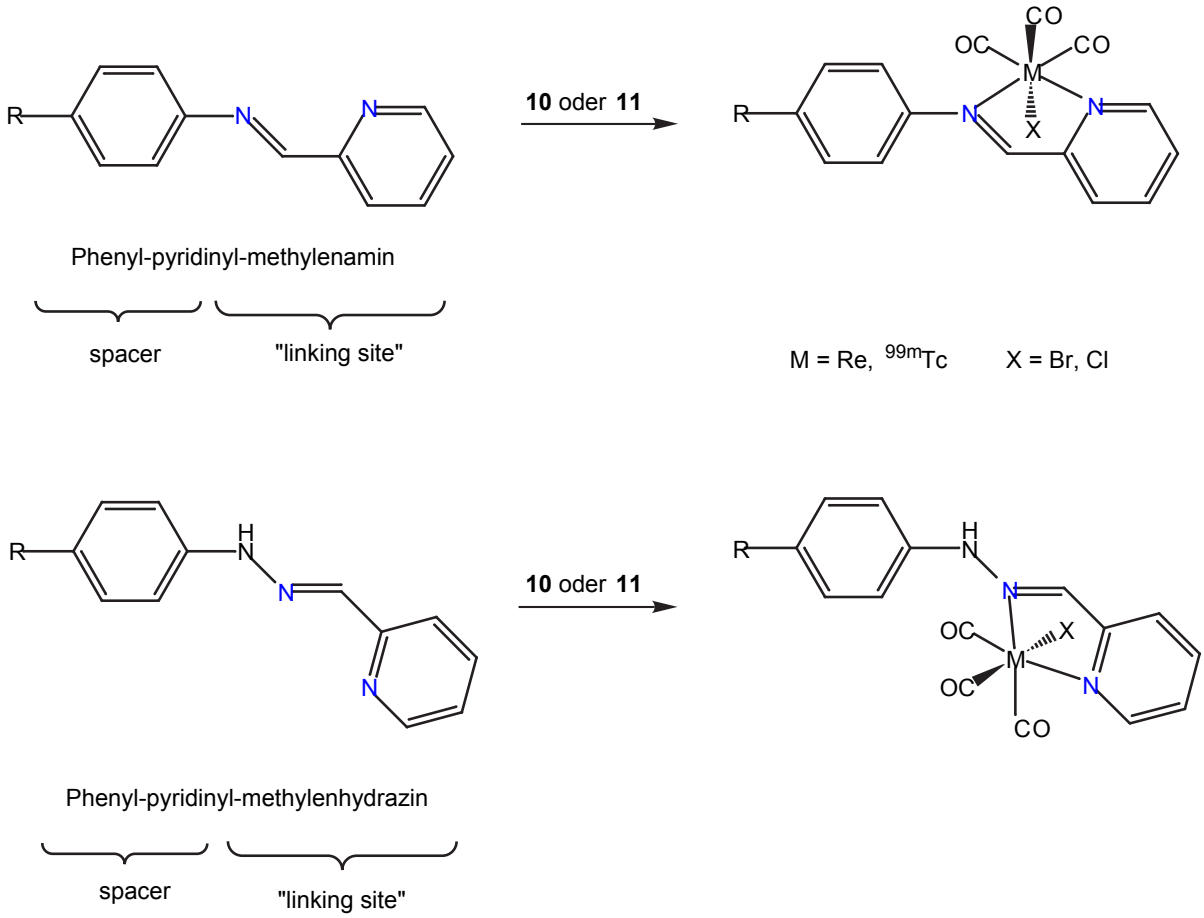


Fig. 12: Bidentate Chelatsysteme koordiniert mit dem Rhenium- (**10**) bzw. ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyl-Prekursor (**11**).

Der Literatur [18] war zu entnehmen, dass ein Hydrazon, entstanden aus einem Hydrazin und einem Aldehyd, stabiler wäre als ein Imin, das aus der leicht reversiblen Schiffschen Base-Reaktion zwischen einem Amin und einem Aldehyd hervorgegangen war. Durch die zusätzliche Amingruppe sollte das System in geringerem Ausmass hydrolysiert werden, wobei eine höhere spezifische Aktivität erwartet würde. Alternativ wurde deshalb das Chelatsystem Phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin synthetisiert, und dessen Kopplung an das Steroid versucht (Fig. 12).

2. Resultate

2.1. Organisch-chemische Synthesen

2.1.1. Chelatsysteme 1 und 3

Die Synthese von Iod-phenyl-pyridinyl-methylenamin (**1**) erfolgte durch Umsetzung von 4-Iod-anilin mit 2-Pyridinaldehyd. Repräsentativ für die vollständige Umsetzung war, dass das NMR-Spektrum für das Imin-H des Produktes **1** bei 8.56ppm ein Singulett zeigte, während das Signal des Aldehyd-H des Eduktes 2-Pyridinaldehyd bei 9.89ppm nicht mehr beobachtet werden konnte. Eine Reinigung des erhaltenen Produktes **1** war nicht notwendig, die Umsetzung war quantitativ (Fig.13).

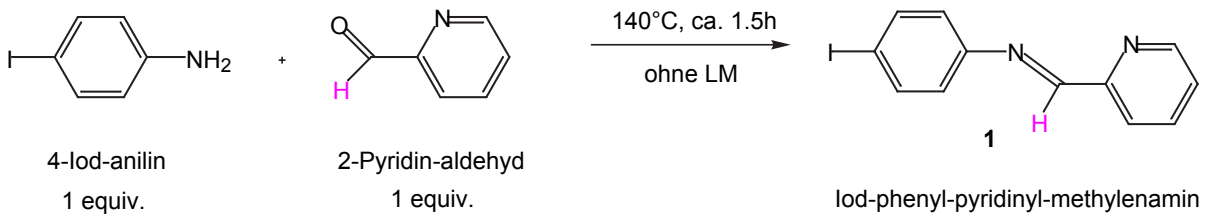


Fig. 13: Synthese des Produktes Iod-phenyl-pyridinyl-methylenamin (**1**).

Die Synthese von Iod-phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin (**3**) erfolgte durch Umsetzung von 4-Iod-phenylhydrazin mit 2-Pyridinaldehyd. Repräsentativ für die vollständige Umsetzung war, dass das NMR-Spektrum für das Imin-H des Produktes **3** bei 7.78ppm ein Singulett zeigte, während das Signal des Aldehyd-H des Eduktes 2-Pyridinaldehyd bei 9.89nm nicht mehr beobachtet werden konnte. Die Ausbeute des gereinigten Produktes **3** betrug 91% (Fig. 14).

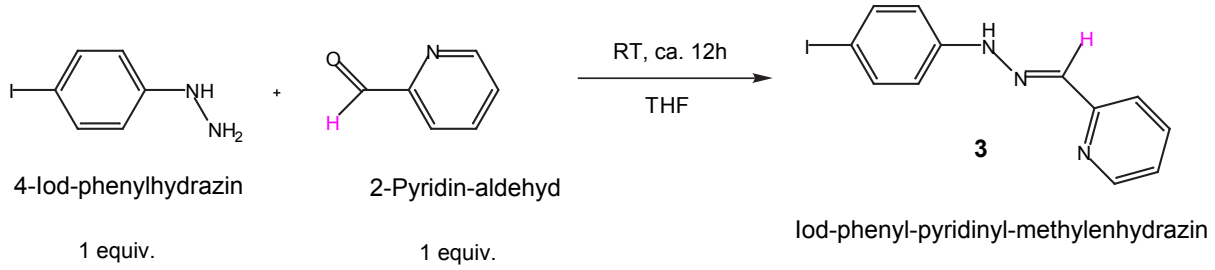


Fig. 14: Synthese des Produktes Iod-phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin (**3**).

2.1.2. Estradiolderivate 5 und 7

Die Umsetzung von 17α-Ethinylestradiol mit 4-Iod-anilin zum Zwischenprodukt 17α-(ethinyl-phenylamin)-17β-estradiol (**4**) gelang mit einer Ausbeute von 57.4% (Fig. 15). Im NMR-Spektrum der gereinigten Verbindung **4** konnte das Singulett bei 2.60ppm des Ethinyl-H von 17α-Ethinylestradiol nicht mehr beobachtet werden.

Die Verbindung **4** wurde mit 2-Pyridinaldehyd zum Produkt 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-estradiol (**5**) umgesetzt (Fig. 15). Repräsentativ für die vollständige Umsetzung war, dass das NMR-Spektrum für das Imin-H des Produktes **5** bei 9.61ppm ein Singulett zeigte, während das Singulett des Aldehyd-H des Eduktes 2-Pyridinaldehyd bei 9.89ppm nicht mehr beobachtet werden konnte.

Die Umsetzung von 17α-Ethinylestradiol mit Iod-phenyl-pyridinyl-methylenamin (**1**) zu 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-estradiol (**5**) gelang unter den gegebenen Bedingungen nicht (Fig. 15).

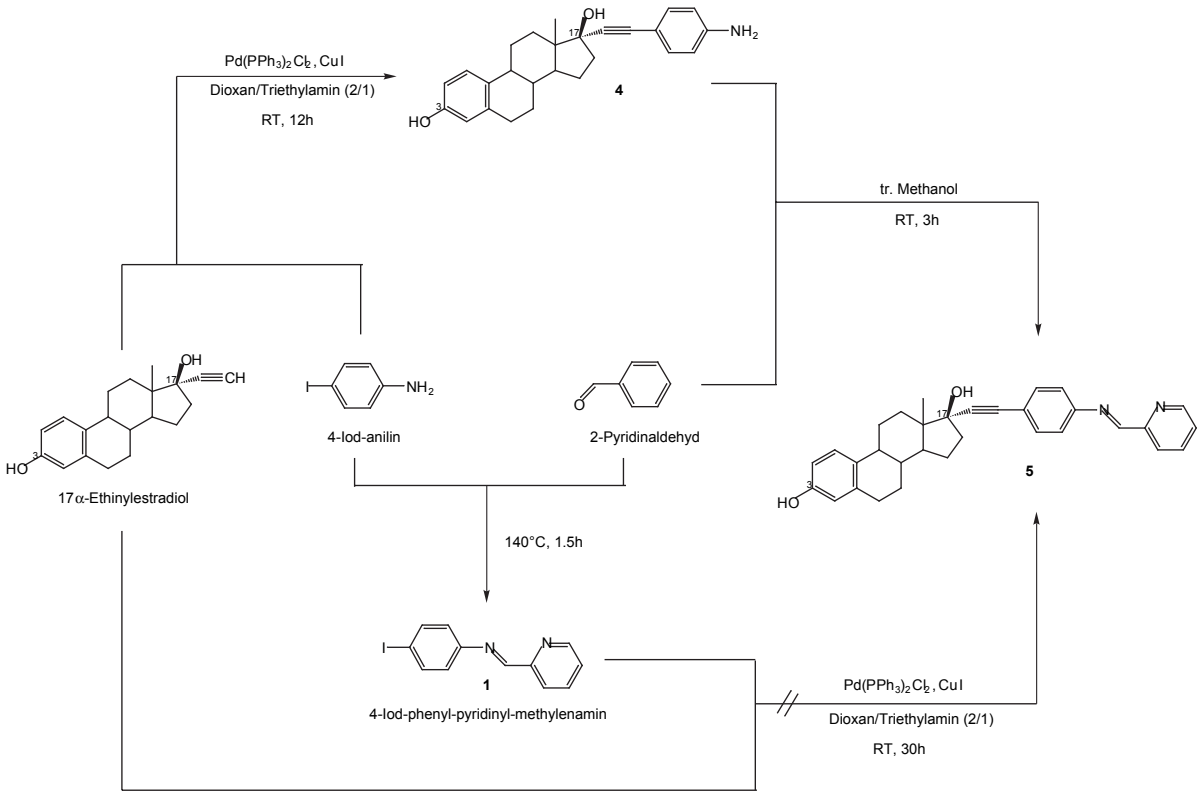


Fig. 15: Synthesewege des Produktes 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-estradiol (**5**).

In einem ersten Schritt erfolgte die Umsetzung von 17α-Ethinylestradiol mit 4-Iod-phenylhydrazin zu 17α-(ethinyl-phenylamin)-17β-estradiol (**6**) (Fig. 16). Das entstandene Zwischenprodukt **6** wurde wegen seiner Licht- und/oder Sauerstoffempfindlichkeit nicht isoliert. Der Versuch, die Verbindung **6** mittels SC zu reinigen, war nicht erfolgreich: die Verbindung zersetzte sich, was an der braun-schwarzen Verfärbung sichtbar wurde. Das Reaktionsgemisch wurde deshalb filtriert und sogleich mit 2-Pyridinaldehyd umgesetzt (Fig. 16). Aufgrund des NMR-Spektrums der gereinigten Substanz konnte nicht sicher festgestellt werden, ob es sich um das Produkt 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin)-17β-estradiol (**7**) handelte. Im Massenspektrum konnte das Signal mit der entsprechenden Molmasse nur mit einer Intensität von 54% gefunden werden.

Die Umsetzung von 17α-Ethinylestradiol mit Iod-phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin (**3**) zu 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin)-17β-estradiol (**7**) gelang unter den gegebenen Bedingungen nicht (Fig. 16).

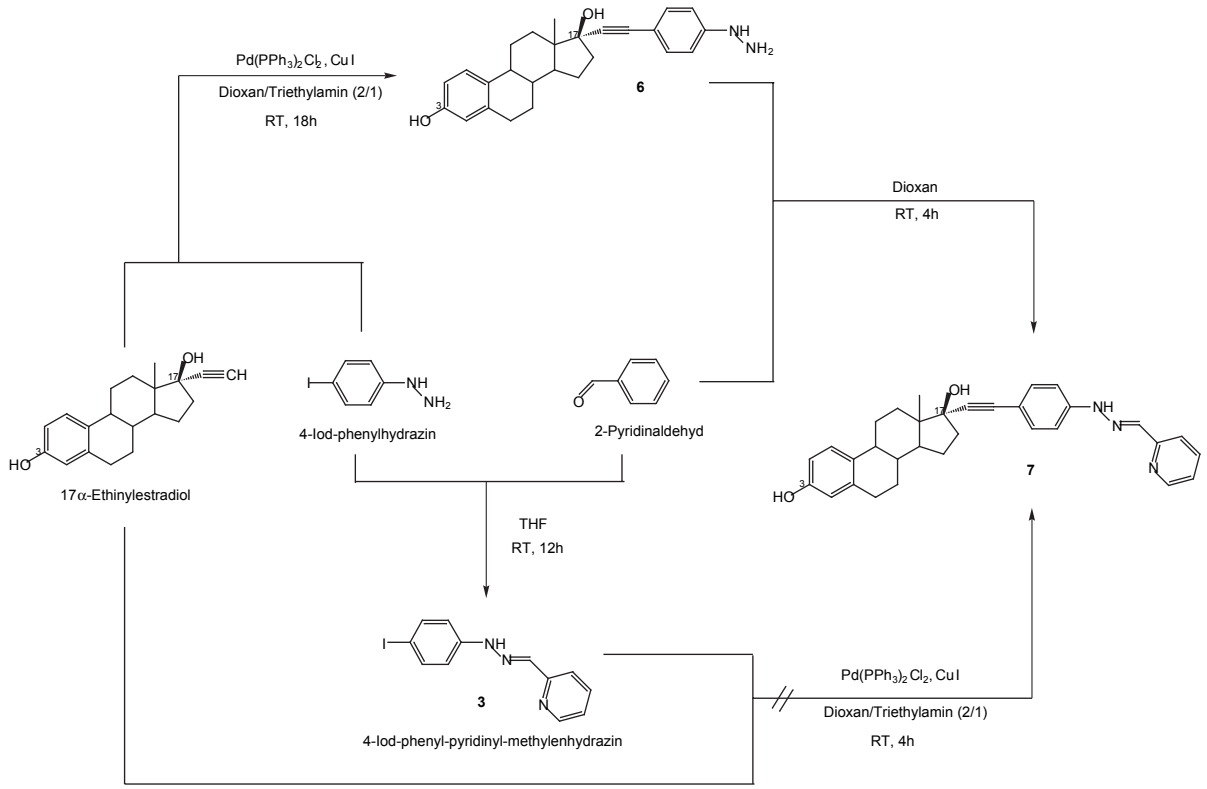


Fig. 16: Synthesewege des Produktes 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin)-17β-estradiol (**7**).

2.1.3. Testosteronderivat 9

Die Umsetzung von 17α-Ethinyltestosteron mit 4-Iod-anilin zum Zwischenprodukt 17α-(ethinyl-phenylamin)-17β-testosteron (**8**) gelang mit einer Ausbeute von 65.3% (Fig. 17). Durch Reinigung mittels SC war eine Isolierung des gewünschten Zwischenproduktes **8** von dem entstandenen Nebenprodukt möglich. Im NMR-Spektrum der Verbindung **8** konnte das Singulett des Ethinyl-H von 17α-Ethinyltestosteron bei 3.29ppm (in DMSO) nicht mehr beobachtet werden.

Das Zwischenprodukt **8** wurde mit 2-Pyridinaldehyd zum Produkt 17α-(ethniyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-testosteron (**9**) umgesetzt (Fig. 17). Im NMR-Spektrum der gereinigten Verbindung **9** wurde das Singulett des Alehyd-H des Eduktes 2-Pyridinaldehyd bei 9.89ppm durch das Singulett des Imin-H des Produktes **9** bei 8.58ppm ersetzt. Die Umsetzung war vollständig.

Die Umsetzung von 17α-Ethinyltestosteron mit Iod-phenyl-pyridinyl-methylenamin (**1**) zum Produkt **9** gelang unter den gegebenen Bedingungen nicht (Fig. 17).

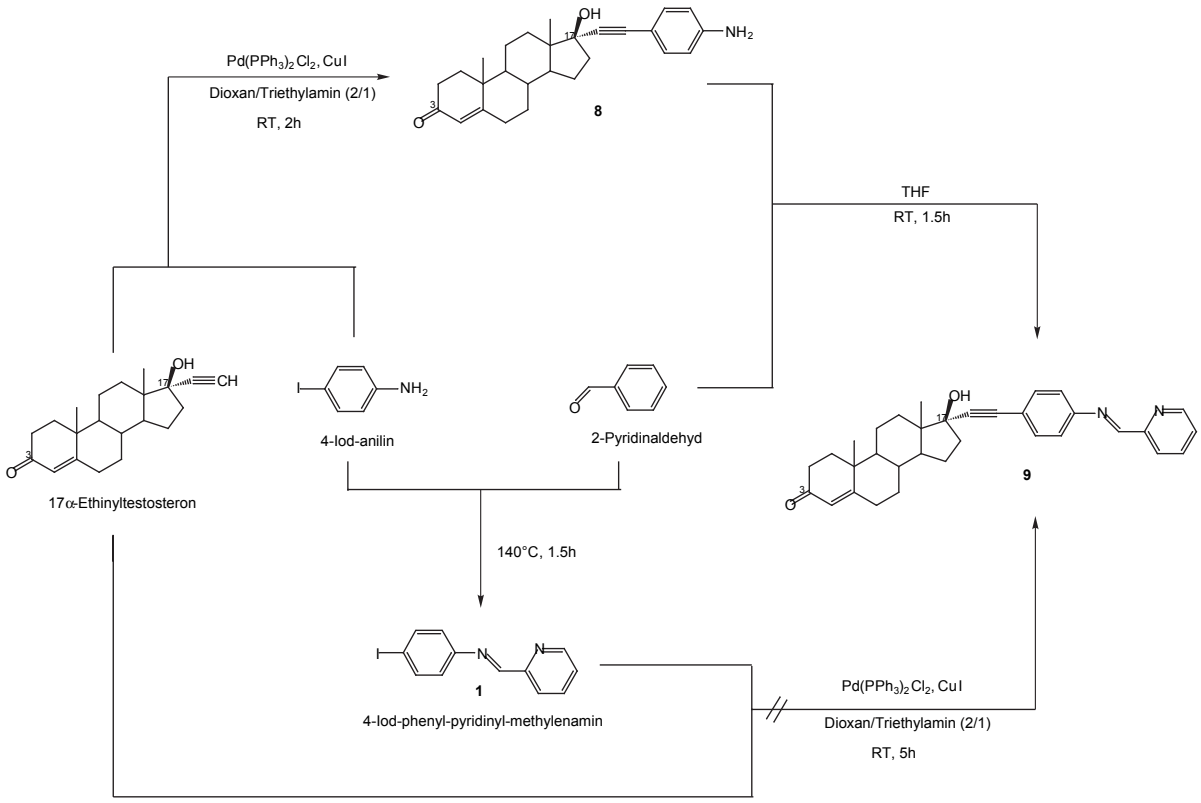


Fig. 17: Synthesewege des Produktes 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-testosteron (**9**).

2.2. Rhenium-Komplexe

Die Verbindungen 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-estradiol (**5**) und 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-testosteron (**9**) wurden mit dem Prekursor $[NEt_4]_2[ReBr_3(CO)_3]$ (**10**) zu den Rhenium-Komplexen $[ReBr(\mathbf{5})(CO)_3]$ (**12a**) und $[ReBr(\mathbf{9})(CO)_3]$ (**14a**) umgesetzt (Fig. 18). Diese wurden mittels NMR, UV und IR analysiert.

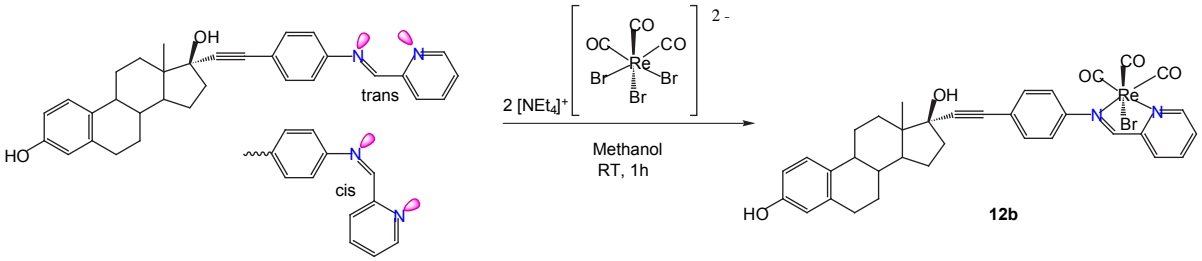


Fig. 18: Syntheseweg des Rhenium-Komplexes (**12b**).

2.2.1. NMR-Spektren

Durch die Koordination des Rhenium-Tricarbonyl-Prekursors (**10**) erfuhren die NMR-Signale der H-Atome der Phenyl-pyridiny-methynlenamin-Gruppe der Verbindungen **5** bzw. **9** eine Tieffeldverschiebung.

In den NMR-Spektren der Rhenium-Komplexe **12a** bzw. **14a** waren nur noch Signale von einem Isomeren zu beobachten .

2.2.1.1. [ReBr(**5**)$(CO)_3$]: **12a**

Die Signale der Protonen H22 und H26 wurden von 7.46ppm (**5**) nach 7.56ppm (**12a**), die Signale der Protonen H23 und H25 von 7.21ppm (**5**) nach 7.47ppm (**12a**) verschoben. Das Signal des Imins (H27) wurde von 8.61ppm (**5**) nach 8.76ppm (**12a**) verschoben. Das Multiplett von 7.27-7.58ppm (**5**) stellte ein Proton des Pyridinringes dar und wurde zu 7.57-7.64ppm (**12a**) verschoben. Ein weiteres Proton des Pyridinringes (m, 7.72-7.94ppm), sowie das Proton H32 (d, 8.22ppm für trans; d, 8.61ppm für cis) wurden zu einem Multiplett (7.99-8.11ppm) (**12a**) vereint. Während im NMR-Spektrum der Verbindung **5** für das Proton H29 zwei Doublett erkennbar waren, eines für das cis-Isomer (8.80ppm) und eines für das trans-Isomer (8.71ppm), zeigte das NMR-Spektrum des Rhenium-Komplexes **12a** für das Proton H29 nur ein Doublett (9.08ppm). Das Multiplett für die Protonen H1 und H2 ändert die Lage von 6.48-6.70ppm (**5**) nach 6.53-6.66ppm (**12a**). Sowohl das Doublett für das Proton H4 bei 7.14ppm (**5**), als auch das Singulett der Methylgruppe C18 bei 0.94ppm (**5**) blieben im Spektrum der Verbindung **12a** an derselben Stelle.

2.2.1.2. [ReBr(**9**)$(CO)_3$]: **14a**

Die Signale der Protonen H23 und H27 wurden von 7.45ppm (**9**) nach 7.55ppm (**14a**), die Signale der Protonen H24 und H26 von 7.21ppm (**9**) nach 7.48ppm (**14a**) verschoben. Das Signal des Imins (H28) wurde von 8.58ppm (**9**) nach 8.76ppm (**14a**) verschoben. Das Multiplett von 7.34-7.42ppm (**9**) stellte ein Proton des Pyridinringes dar und wurde zu 7.60-7.75ppm (**9**) verschoben. Ein weiteres Proton des Pyridinringes (m, 7.78-7.92ppm), sowie das Proton H33 (d, 8.19ppm für trans; d, 7.97ppm für cis) wurden zu einem Multiplett (8.02-8.18ppm) (**14a**) vereint. Während im NMR-Spektrum der Verbindung **9** für das Proton H30 zwei Doublett erkennbar waren, eines für das cis-Isomer (8.80ppm) und eines für das trans-Isomer (8.71ppm), zeigte das NMR-Spektrum des Rhenium-Komplexes **14a** für das Proton H30 nur ein Doublett (9.12ppm). Sowohl das Singulett für das Proton H4 bei 5.73ppm als auch jene der Methylgruppen C18 (0.95ppm) und C19 (1.21ppm) (**9**) blieben im Spektrum der Verbindung **14a** an derselben Stelle.

2.2.2. UV-Spektren

Die UV-Spektren der Rhenium-Komplexe **12a** und **14a** zeigten im Bereich von $\lambda \approx 250$nm ein absolutes Maximum, d.h. bei einer geringfügig kleineren Wellenlänge als die Verbindungen **5** und **9**. Zusätzlich war bei $\lambda \approx 350$nm ein Maximum mit geringerer Intensität zu beobachten, welches bei den Ausgangsverbindungen **5** und **9** nicht vorhanden war.

2.2.3. IR-Spektren

Die Rhenium-Komplexe **12a** und **14a** zeigten im Gegensatz zu den Ausgangsverbindungen **5** und **9** im Bereich 1890-2025cm^{-1} zwei intensive Banden. Dabei handelte es sich um die stark absorbierenden CO-Banden der Tricarbonyleinheit.

2.3. ^{99m}Tc-Technetium-Komplexe

Die Verbindungen 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-estradiol (**5**) und 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-testosteron (**9**) wurden mit [^{99m}Tc(OH$_2$)$_3$(CO)$_3$]$^+$ (**11**) zu den ^{99m}Tc-Technetium-Komplexen [^{99m}TcCl(**5**)(CO)$_3$] (**12b**) und [^{99m}TcCl(**9**)(CO)$_3$] (**14b**) umgesetzt (Fig. 19). Diese wurden mittels HPLC analysiert.

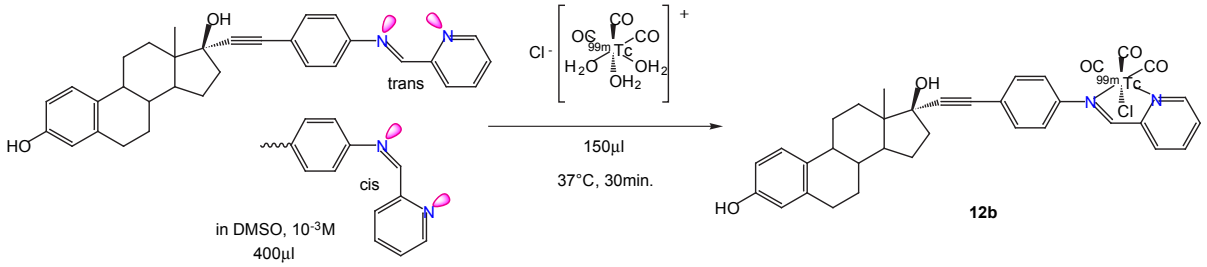


Fig. 19: Syntheseweg des ^{99m}Tc-Technetium-Komplexes (**12b**).

Die Umsetzung der Steroidderivate **5** bzw. **9** mit dem Technetium-Tricarbonyl-Prekursor (**11**) wurde bei der Verbindung **5** optimiert.

Die Umsetzung von 400µl einer 10^{-3}M Lösung der Verbindung **5** in Dichlormethan mit 100µl einer Lösung der Verbindung **11** während 30 Minuten bei 37°C ergab nur 4% Produkt **12b**. Es waren noch 94% Edukt (**11**) vorhanden.

Die Umsetzung von 400µl einer 10^{-3}M Lösung der Verbindung **5** in Methanol mit 100µl einer Lösung der Verbindung **11** während 30 Minuten bei 37°C ergab nur 5% Produkt **12b**. Es waren noch 74% Edukt (**11**) vorhanden. Nach weiteren 150 Minuten Inkubation bei 37°C war praktisch nur noch Pertechnetat vorhanden.

Die Umsetzung von 400µl einer 10^{-4}M Lösung der Verbindung **5** in DMF mit 100µl einer Lösung der Verbindung **11** während 30 Minuten bei 37°C ergab nur 11% Produkt **12b**. Es waren noch 67% Edukt (**11**) vorhanden. Nach weiteren 150 Minuten Inkubation bei 37°C waren noch 10% Produkt **12b** und 46% Edukt (**11**) vorhanden. Der Rest war in Pertechnetat und andere Produkte zerfallen.

Die Umsetzung von 400µl einer 10^{-4}M Lösung der Verbindung **5** in DMSO mit 100µl einer Lösung der Verbindung **11** während 30 Minuten bei 75°C ergab nur 2% Produkt **12b**. Es waren noch 64% Edukt (**11**) vorhanden. 30% der Aktivität erschienen in Form von unbekannten Zerfallsprodukten mit Retentionszeiten zwischen jener des Pertechnetats und jener des Produktes **12b**. Erfolgte die Inkubation bei 37°C statt 75°C, ergab dies eine Umsetzung zu 20% Produkt **12b**, wobei noch 70% Edukt (**11**) vorhanden waren. Nach weiteren 150 Minuten Inkubation bei 37°C waren ca. 3% des Produktes **12b** in Pertechnetat und andere Produkte zerfallen.

Erhöhte man die Ausgangskonzentration der Verbindung **5** auf 10^{-3}M in DMSO, so konnte eine Umsetzung von bis zu 76% Produkt **12b** beobachtet werden.

Die Markierung wurde optimiert, bis es gelang, den Technetium-Tricarbonyl-Prekursor (**11**) zu 87% Produkt **12b** umzusetzen. Dazu wurden 400µl einer 10^{-3}M Lösung der Verbindung **5** in DMSO mit 150µl einer Lösung der Verbindung **11** während 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Fig. 19).

Die Umsetzung von 400µl einer 10^{-3}M Lösung der Verbindung **9** in DMSO mit 150µl einer Lösung der Verbindung **11** während 30 Minuten bei 37°C ergab bis zu 75% Produkt **14b**.

2.3.1. Reinigung der Verbindungen 12b und 14b

Die Trennung der markierten Verbindungen **12b** bzw. **14b** von den nicht-markierten Verbindungen **5** bzw. **9** erfolgte mit dem HPLC-Programm B. Für die nicht-markierten Verbindungen **5** bzw. **9** wurde mittels UV-Detektor eine Retentionszeit von ca. 16 Minuten detektiert, für die markierten Verbindungen **12b** bzw. **14b** wurde eine Retentionszeit von ca. 20 Minuten mittels Aktivdetektor beobachtet. Durch den grossen Unterschied in den Retentionszeiten konnten die Verbindungen **12b** bzw. **14b** problemlos von den Verbindungen **5** bzw. **9** getrennt werden (siehe Kapitel 3.3.2.).

2.4. Stabilitätsprüfung

2.4.1. Puffer-Stabilität

80µl Ausgangslösung der Komplexe **12b** bzw. **14b** wurden in 400µl Puffer bei 37°C inkubiert. Die Stabilität wurde mittels HPLC-Programm A nach definierten Zeitintervallen (1h, 4h, 24h) überprüft. Durch Integration der erhaltenen Signale wurde der Anteil des noch intakten Produktes bzw. die Anteile der Zerfallsprodukte berechnet.

Um den Zerfall der Komplexe [^{99m}TcCl(**5**)$(CO)_3$] (**12b**) bzw. [^{99m}TcCl(**9**)$(CO)_3$] (**14b**) zu analysieren, wurde für die Ausgangslösung das Signal des Produktes als 100% definiert. Die Signale des Produktes der einzelnen Chromatogramme nach 1, 4 und 24 Stunden wurden entsprechend umgerechnet.

Die berechneten Anteile sind den Tab. 1 und 2 zu entnehmen.

Tab. 1: Puffer-Stabilität der Verbindung **12b**.

	11	$[TcO_4]^-$	12b	
Ausgangslösung	14%	4%	82%	→ 100%
PBS pH 7.4 (1x)				
1h, 37°C	-	30%	70%	→ 85%
4h, 37°C	-	33%	67%	→ 82%
24h, 37°C	-	51%	49%	→ 60%
PBS pH 8.5 (1x)				
1h, 37°C	1%	30%	69%	→ 84%
4h, 37°C	-	33%	67%	→ 82%
24h, 37°C	-	50%	50%	→ 61%
PP pH 7.4 (0.1M)				
1h, 37°C	6%	24%	70%	→ 85%
4h, 37°C	-	63%	37%	→ 45%
24h, 37°C	-	84%	16%	→ 20%
PP pH 5.8 (0.1M)				
1h, 37°C	4%	33%	63%	→ 77%
4h, 37°C	1%	49%	50%	→ 61%
24h, 37°C	-	72%	28%	→ 34%

Es zeigte sich (Fig. 20), dass die Verbindung **12b** in PBS-Puffer über einen längeren Zeitraum stabil geblieben war als in Phosphatpuffer (PP), wobei der Verlauf der Zerfallskurven der Verbindung **12b** in PBS-Puffer pH 7.4 (blau) und PBS-Puffer pH 8.5 (gelb) praktisch identisch war. In Phosphatpuffer (PP) pH 5.8 (rot) war die Verbindung **12b** insgesamt etwas stabiler als in Phosphatpuffer (PP) pH 7.4 (grün). Nach einer Stunde waren in Phosphatpuffer (PP) pH 7.4 jedoch mit 85% ein grösserer Anteil der Verbindung **12b** stabil geblieben als in Phosphatpuffer (PP) pH 5.8 nach derselben Zeit.

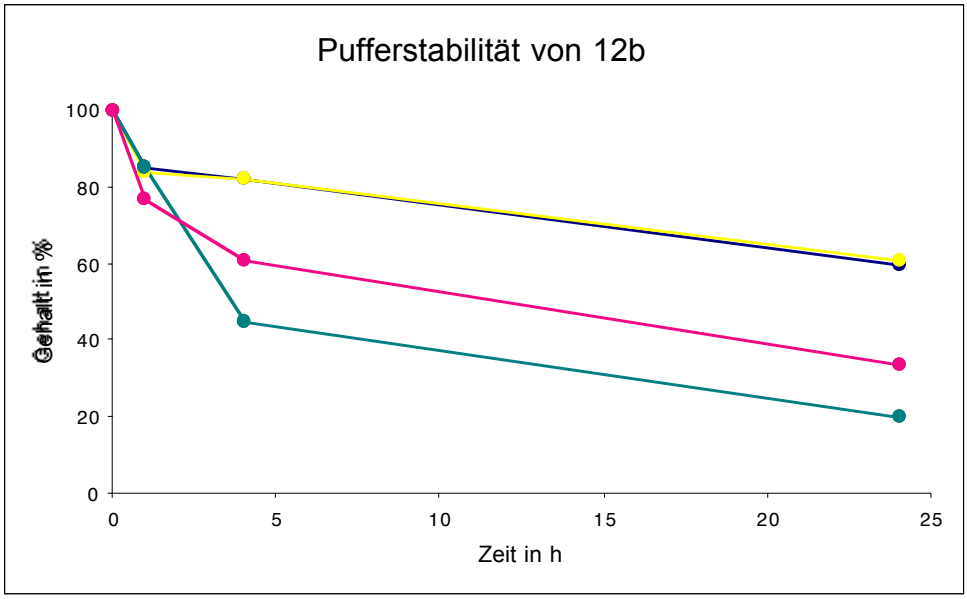


Fig. 20: Pufferstabilität der Verbindung **12b**: PBS-Puffer pH 7.4 (blau); PBS-Puffer pH 8.5 (gelb); Phosphatpuffer pH 7.4 (grün); Phosphatpuffer pH 5.8 (rot).

Tab. 2: Puffer-Stabilität von **14b**

	11	$[TcO_4]^-$	unbekannt t_R=19min.	14b	
Ausgangs-lösung	19%	8%	23%	50%	→ 100%
PBS pH 7.4 (1x)					
1h, 37°C	8%	22%	37%	33%	→ 66%
4h, 37°C	3%	33%	37%	27%	→ 54%
24h, 37°C	-	52%	29%	19%	→ 38%
PBS pH 8.5 (1x)					
1h, 37°C	13%	25%	36%	26%	→ 52%
4h, 37°C	1%	51%	33%	15%	→ 30%
24h, 37°C	-	56%	17%	27%	-
PP pH 7.4 (0.1M)					
1h, 37°C	12%	17%	43%	28%	→ 56%
4h, 37°C	6%	27%	38%	29%	→ 58%
24h, 37°C	6%	41%	29%	24%	→ 48%
PP pH 5.8 (0.1M)					
1h, 37°C	15%	17%	39%	29%	→ 58%
4h, 37°C	7%	23%	48%	22%	→ 44%
24h, 37°C	-	30%	54%	16%	→ 32%

Die Verbindung **14b** zeigte in allen Puffern einen ähnlichen Zerfallsverlauf. Ein deutlicher Unterschied bezüglich Stabilität zwischen PBS-Puffer und Phosphatpuffer (PP) konnte nicht festgestellt werden (Fig. 21).

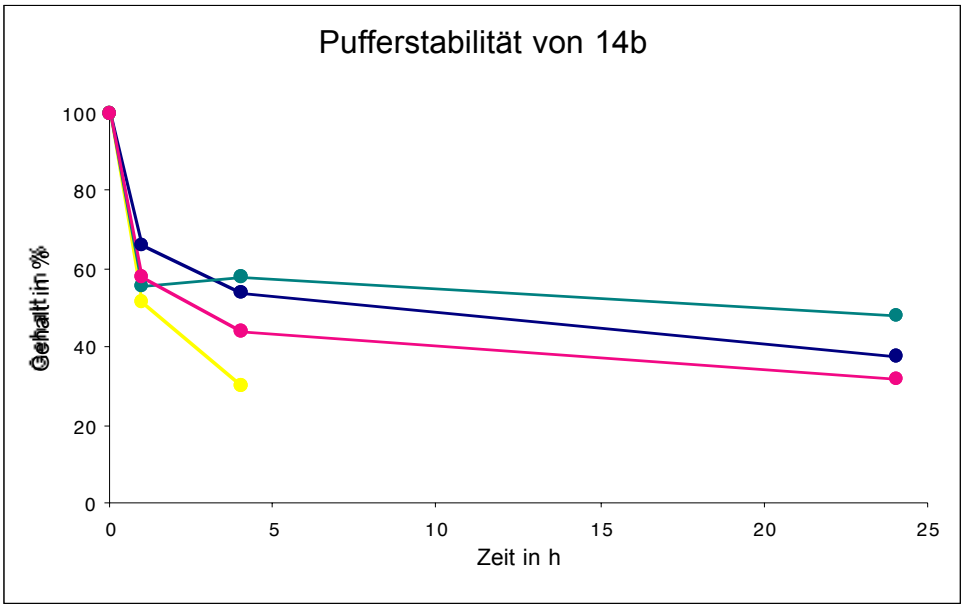


Fig. 21: Pufferstabilität der Verbindung **14b**: PBS-Puffer pH 7.4 (blau); PBS-Puffer pH 8.5 (gelb); Phosphatpuffer pH 7.4 (grün); Phosphatpuffer pH 5.8 (rot).

2.4.2. Plasma-Stabilität

100µl der in PBS-Puffer pH 7.4 mittels HPLC-Programm B gesammelten Fraktion der Komplexe **12b** bzw. **14b** wurden in 100µl Plasma bei 37°C inkubiert. Die Stabilität der Komplexe wurde mittels PC einerseits mit Aceton, andererseits mit 0.9%iger NaCl-Lösung als Elutionsmittel untersucht.

Wurde Aceton als Elutionsmittel verwendet, blieben die markierten Verbindungen **12b** und **14b** bei der Analyse nach 1 bzw. 4 Stunden zu über 90% nach 24 Stunden zu über 80% am Start (Fig. 22, 23). Da die reinen Verbindungen bei den Referenzversuchen mit der Front gelaufen waren, konnte davon ausgegangen werden, dass sie bei der Inkubation in Plasma an Plasmaproteine gebunden worden waren. 2% bis 5% der Aktivität befanden sich bei beiden Verbindungen an der Front des Chromatogramms. Es blieb unklar, ob es sich um das an der Front laufende Zerfallsprodukt Pertechnetat handelte, oder ob es sich um die freie Fraktion der markierten Verbindungen **12b** und **14b** handelte. Ein allfälliger Zerfall in den Technetium-Tricarbonyl-Prekursor (**11**) konnte mit diesem System kaum festgestellt werden, da dies, sofern es in Plasma inkubiert worden war, gemäss Referenz ebenfalls am Start blieb.

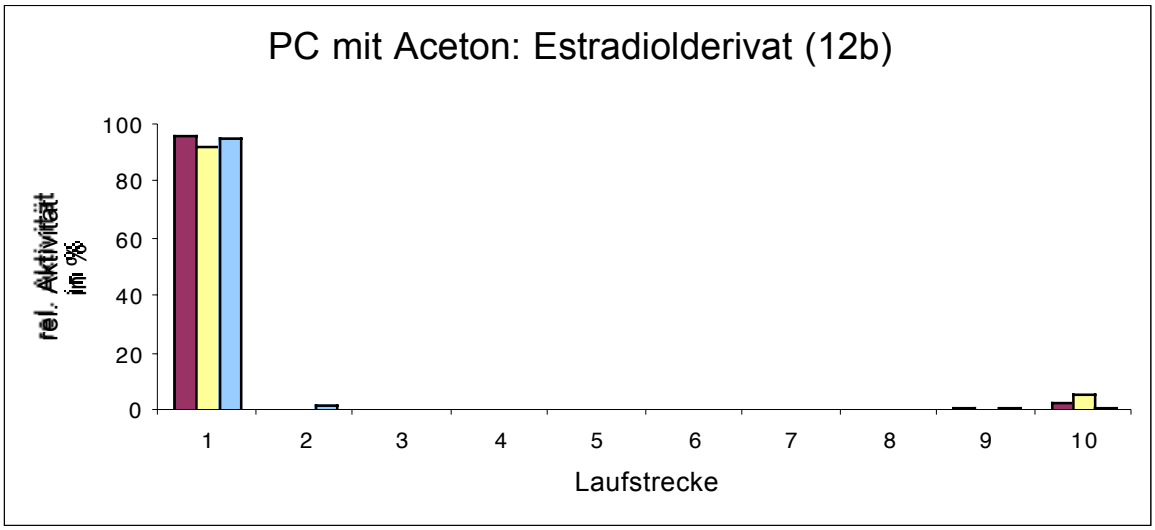


Fig. 22: Papierchromatogramm des Estradiolderivates **12b**: relative Aktivität nach 1h (rot), nach 4h (gelb), nach 24h (blau). (Elutionsmittel = Aceton)

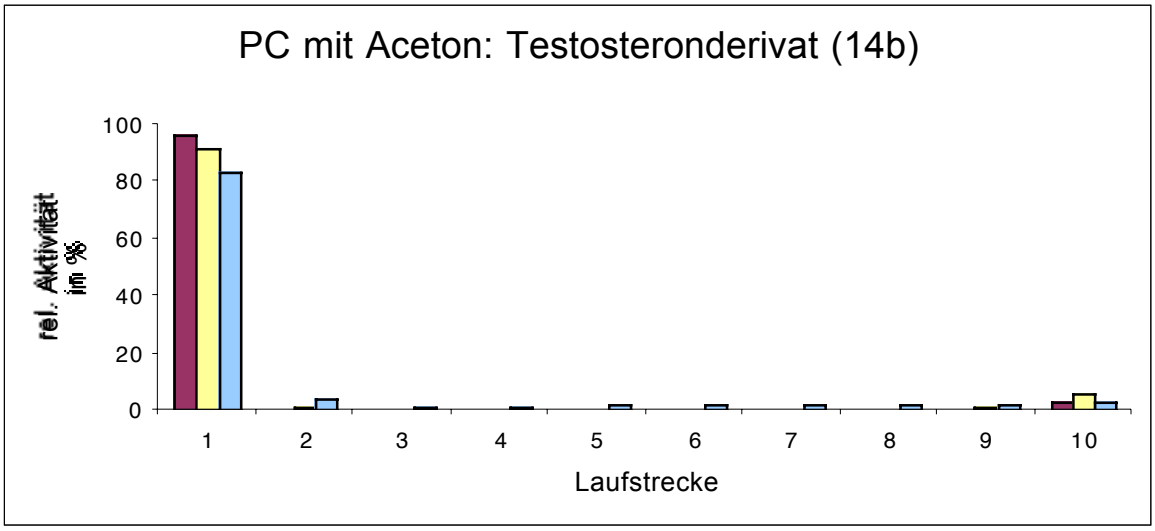


Fig. 23: Papierchromatogramm des Testosteronderivates **14b**: relative Aktivität nach 1h (rot), nach 4h (gelb), nach 24h (blau). (Elutionsmittel = Aceton)

Die Analysen mittels PC wurden mit einem zweiten Elutionsmittel, nämlich 0.9%iger NaCl-Lösung durchgeführt. Hier blieben nach 1 bzw. 4 Stunden Inkubation bei 37°C über 80% der Verbindungen **12b** bzw.**14b** am Start (Fig. 24, 25). Nach 24 Stunden waren noch knapp 40% der Verbindung **12b** und noch 75% der Verbindung **14b** am Start. Ca. 6% befanden sich nach 24 Stunden bei beiden Verbindungen an der Front, der Rest war über die Laufstrecke verteilt, jedoch nicht an einem bestimmten Ort kumuliert. Bei diesem System blieben bei den Referenzversuchen die Verbindungen **12b** bzw.**14b** ohne Inkubation in Plasma am Start, d.h. dass es sich bei der Fraktion, die nicht am Start war, um Zerfallsprodukte handeln musste. Ein deutlicher Zerfall von ca. 40% nach 24 Stunden konnte demnach für die Verbindung **12b** beobachtet werden, während für die Verbindung **14b** ein Zerfall von ca. 10% nach 24 Stunden beobachtet wurde. Aufgrund der Laufstrecke des Pertechnetats bzw. des Technetium-

Tricarbonyl-Prekursors (**11**) im Referenzversuch konnte keine eindeutige Aussage über die Zerfallsprodukte gemacht werden.

Da jedoch mit dem ersten System, unter Verwendung von Aceton als Elutionsmittel, kein signifikanter Zerfall in Pertechnetat beobachtet werden konnte, musste davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Zerfallsprodukten hauptsächlich um Technetium-Tricarbonyl-Prekursor (**11**) handelte.

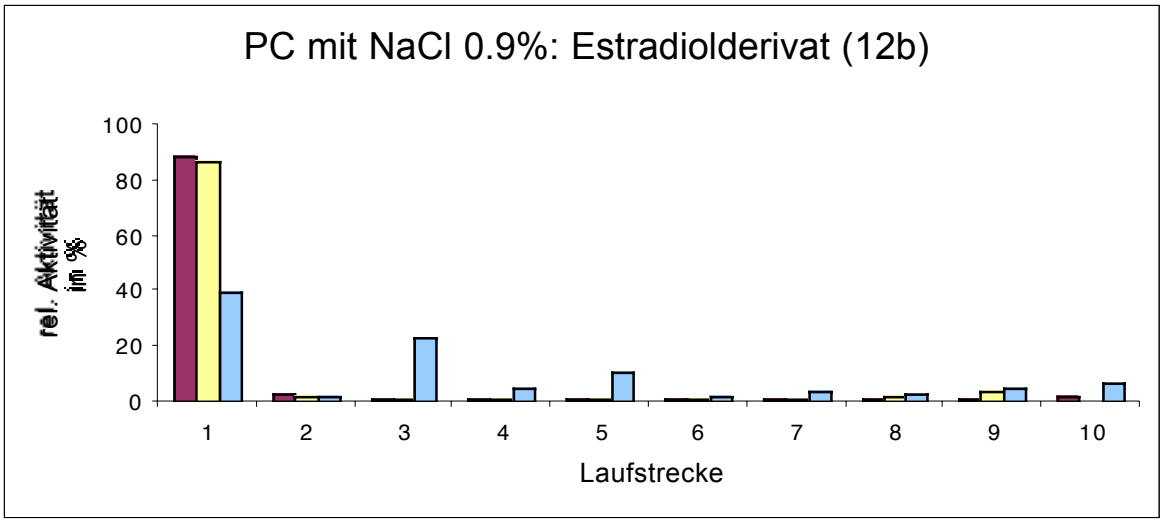


Fig. 24: Papierchromatogramm des Estradiolderivates **12b**: relative Aktivität nach 1h (rot), nach 4h (gelb), nach 24h (blau). (Elutionsmittel = NaCl-Lösung 0.9%)

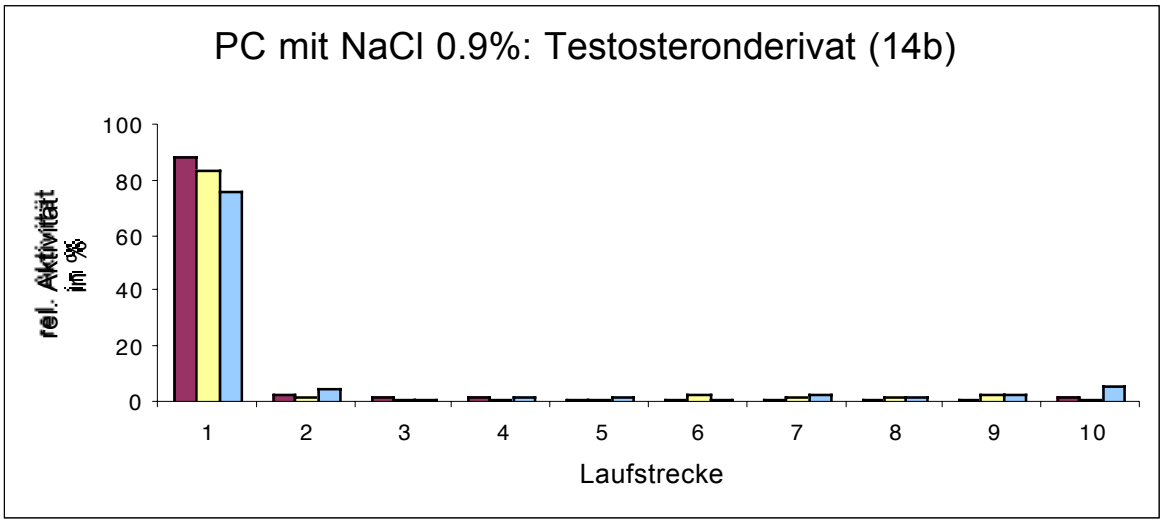


Fig. 25: Papierchromatogramm des Testosteronderivates **14b:** relative Aktivität nach 1h (rot), nach 4h (gelb), nach 24h (blau). (Elutionsmittel = NaCl-Lösung 0.9%)

Anhand der PC mit Methanol/HCl als Elutionsmittel konnten keine eindeutigen Aussagen bezüglich Stabilität gemacht werden, insbesondere deshalb, weil hier nicht die gesammelten Fraktionen der Verbindungen **12b** bzw. **14b**, sondern die Ausgangslösungen verwendet

worden waren. Die Chromatogramme mit diesem System dienten jedoch als Bestätigung der anhand der anderen beiden Systeme erhaltenen Ergebnisse.

2.5. Verteilung

2.5.1. Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient

Der sog. apparente Verteilungskoeffizient D stellt das Verhältnis der totalen Konzentration der zu prüfenden Verbindung in der Octanol-Phase zur totalen Konzentration derselben Verbindung in der Wasser-Phase dar. Der apparente Verteilungskoeffizient D ist ein pH-abhängiger Wert, welcher direkt experimentell bestimmt werden kann. Die Verwendung von D resp. log D ist deshalb nur mit entsprechender pH-Angabe sinnvoll.

Die Berechnung des Konzentrationsverhältnisses der Komplexe [^{99m}TcCl(**5**)(CO)$_3$] (**12b**) bzw. [^{99m}TcCl(**9**)(CO)$_3$] (**14b**) zwischen Octanol- und Wasser-Phase erfolgte durch Messung der Radioaktivität in jeder Phase.

$$D = [\mathbf{12b}]_O / [\mathbf{12b}]_W = [\text{Aktivität}]_O / [\text{Aktivität}]_W$$

$$D = [\mathbf{14b}]_O / [\mathbf{14b}]_W = [\text{Aktivität}]_O / [\text{Aktivität}]_W$$

Die Bestimmung von $D_{pH\ 7.4}$ wurde direkt mit der gesammelten Fraktion der Komplexe **12b** bzw. **14b** nach Zugabe der Octanol-Phase durchgeführt (Bestimmung A). Bestimmungen C und D erfolgten durch Extraktion der Octanol-Phase (siehe Kapitel 4.6.). Die im Gammacounter gemessenen Aktivitäten der Octanol-Phase bzw. Wasser-Phase wurden in Beziehung gesetzt. Aus $D_{pH\ 7.4}$ wurde log $D_{pH\ 7.4}$ berechnet.

Die für **12b** berechneten O/W-Verteilungskoeffizienten sind der Tab. 3 zu entnehmen.

Tab. 3: Bestimmung von log D (pH 7.4) der Verbindung **12b**.

Bestimmung	log D bei pH 7.4 (Mittelwert)	Standardabweichung
A (direkte Bestimmung)	1.97	0.12
B (1. Extraktion)	2.32	0.13
C (2. Extraktion)	1.14	0.05

Die Stabilitätskontrolle mittels HPLC zeigte, dass bei der Bestimmung C in beiden Phasen rund 40% der Verbindung **12b** in Pertechnetat zerfallen waren. Ein Zerfall der Verbindung im Verlauf des Experimentes führte zu unterschiedlichen log D-Werten für die Bestimmungen A, B und C. Ein Mittelwert und damit ein eindeutiger Wert für log D konnte deshalb für die Verbindung **12b** nicht bestimmt werden.

Die für **14b** berechneten O/W-Verteilungskoeffizienten sind der Tab. 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Bestimmung von log D (pH 7.4) der Verbindung **14b**.

Bestimmung	log D bei pH 7.4 (Mittelwert)	Standardabweichung
A (direkte Bestimmung)	1.82	0.03
B (1. Extraktion)	2.15	0.04
C (2. Extraktion)	1.76	0.10

Die Stabilitätskontrolle mittels HPLC zeigte für die Verbindung **14b** keinen Zerfall in Pertechnetat. Die Octanol-Phase wie auch die Wasser-Phase zeigten jedoch neben dem Signal der Verbindung **14b** zwei bzw. ein weiteres Signal unmittelbar vor (und nach) dem Produktsignal. Offensichtlich war die Verbindung **14b** ebenfalls nicht stabil. Es war unklar, wann der teilweise Zerfall stattgefunden hatte. Ein Mittelwert und damit ein eindeutiger Wert für log D konnte deshalb für die Verbindung **14b** ebenfalls nicht bestimmt werden.

2.6. Affinitätstest

2.6.1. Variante 1

Um die an den Antikörper gebundene Fraktion bestimmen zu können, musste vorerst die nicht-gebundene Fraktion durch Zugabe von Kohlesuspension und anschliessender Zentrifugation abgetrennt werden (Fig. 26).

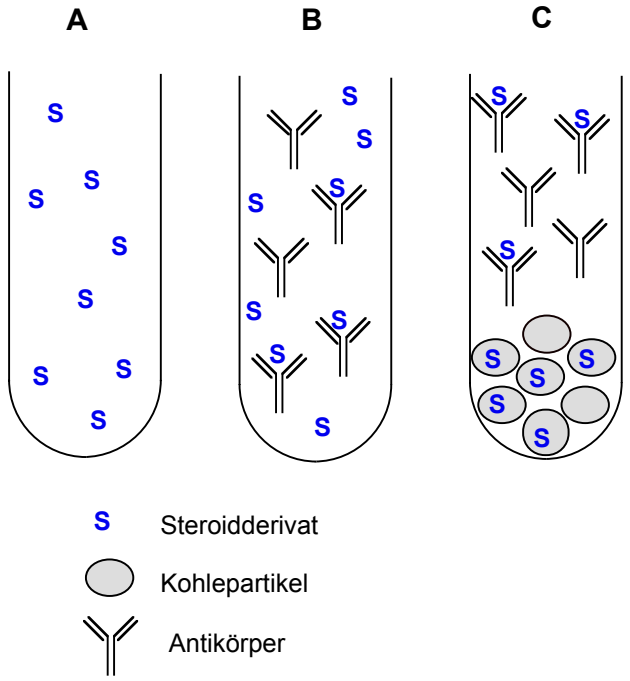


Fig. 26: A: Steroidderivat (Kontrolle); B: Steroidderivat und Antikörper in Lösung; C: nicht-gebundene Fraktion mit Kohlesuspension abgetrennt, gebundene Fraktion im Überstand.

Die Abtrennung der mittels HPLC-Programm B isolierten Komplexe [^{99m}TcCl(**5**)(CO)$_3$] (**12b**) bzw. [^{99m}TcCl(**9**)(CO)$_3$] (**14b**) mit reiner Kohlesuspension unter Verwendung von PBS-Puffer pH 7.4 mit 0.05% Tween 80 war effektiv. Bei Zugabe von 300µl Kohlesuspension konnten 98% der Verbindung **12b** bzw. 99% der Verbindung **14b**, bei Zugabe von 600µl Kohlesuspension konnten 99% der Verbindung **12b** bzw. 99.3% der Verbindung **14b** abgetrennt werden (Tab. 5, 6).

Tab. 5: Abtrennung der Verbindung **12b** in PBS-Puffer pH 7.4 mit 0.05% Tween durch Kohlesuspension.

Kohlesuspension	Aktivität CPM (Mittelwert)	relative Aktivität in %
-	84080	100%
300µl	1580	2%
600µl	878	1%

Tab. 6: Abtrennung der Verbindung **14b** in PBS-Puffer pH 7.4 mit 0.05% Tween durch Kohlesuspension.

Ansatz	Aktivität CPM (Mittelwert)	relative Aktivität in %
-	72240	100%
300µl	910	1%
600µl	474	0.7%

2.6.2. Variante 2

Mit einem Anti-Antikörper, welcher abzentrifugiert werden konnte, sollte der Antikörper und die an ihn gebundene Fraktion des Estradiolkomplexes **12b** abgetrennt werden. Im Überstand sollte anschliessend die nicht-gebundene Fraktion bestimmt werden (Fig. 27).

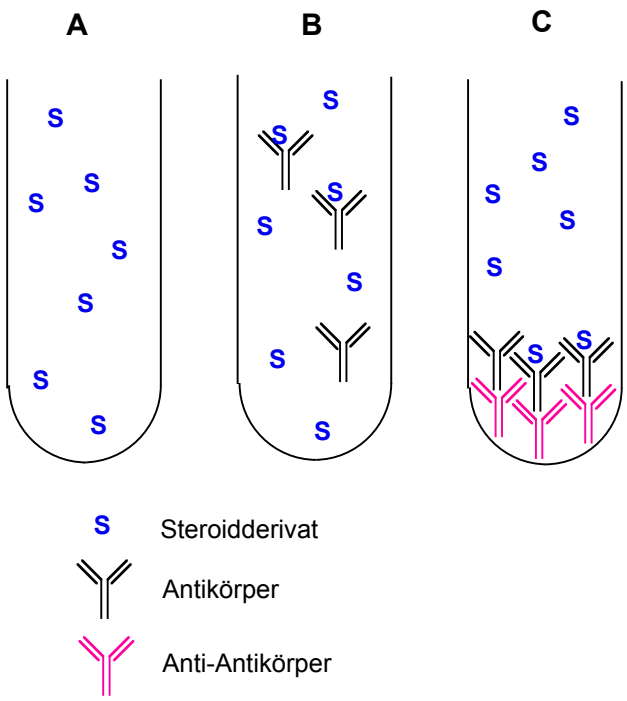


Fig. 27: A: Steroidderivat (Kontrolle); B: Steroidderivat und Antikörper in Lösung; C: gebundene Fraktion durch Bindung an Anti-Antikörper abgetrennt, nicht-gebundene Fraktion im Überstand.

In vier Versuchen, bei denen jeweils der Puffer resp. die Konzentration der Antikörper- bzw. Anti-Antikörperlösung variiert worden waren (siehe Kapitel 4.7.2.), wurde untersucht, ob die Verbindung **12b** vom Antikörper gebunden wurde. Die gemessene Aktivität jeweils des ersten Ansatzes jeder Versuchsgruppe, bei dem die Verbindung **12b** ohne Zusatz von Antikörper und Anti-Antikörper inkubiert worden war, wurde als 100% definiert. Im Falle einer Bindung der Verbindung **12b** durch den Antikörper wäre bei Zugabe von Anti-Antikörper und anschliessender Zentrifugation eine tiefere Aktivität im Überstand gemessen worden, da die gebundene Fraktion der Verbindung **12b** abgetrennt worden wäre.

Alle Ansätze zeigten unabhängig von Puffersystem und Antikörper- bzw. Anti-Antikörperkonzentration Aktivitäten in der gleichen Grössenordnung wie die Ansätze ohne Zusatz von Anti-Antikörper. Gemäss diesen Resultaten war keine Bindung von [^{99m}TcCl(**5**)(CO)$_3$] (**12b**) durch den Antikörper erfolgt.

3. Diskussion

3.1. Organisch-chemische Synthesen

3.1.1. Derivatisierung von Ethinylestradiol und Ethinyltestosteron

Die organisch-chemischen Synthesen können auf zwei Reaktionstypen zurückgeführt werden: die Schiffsche Base Reaktion und die Reaktion nach Sonogashira.

Aldehyde bilden mit Aminen Halbaminale. Halbaminale primärer Amine verlieren unter Ausbildung einer Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindung leicht Wasser, wodurch ein Imin resp. eine Schiffsche Base gebildet wird (Fig. 28).

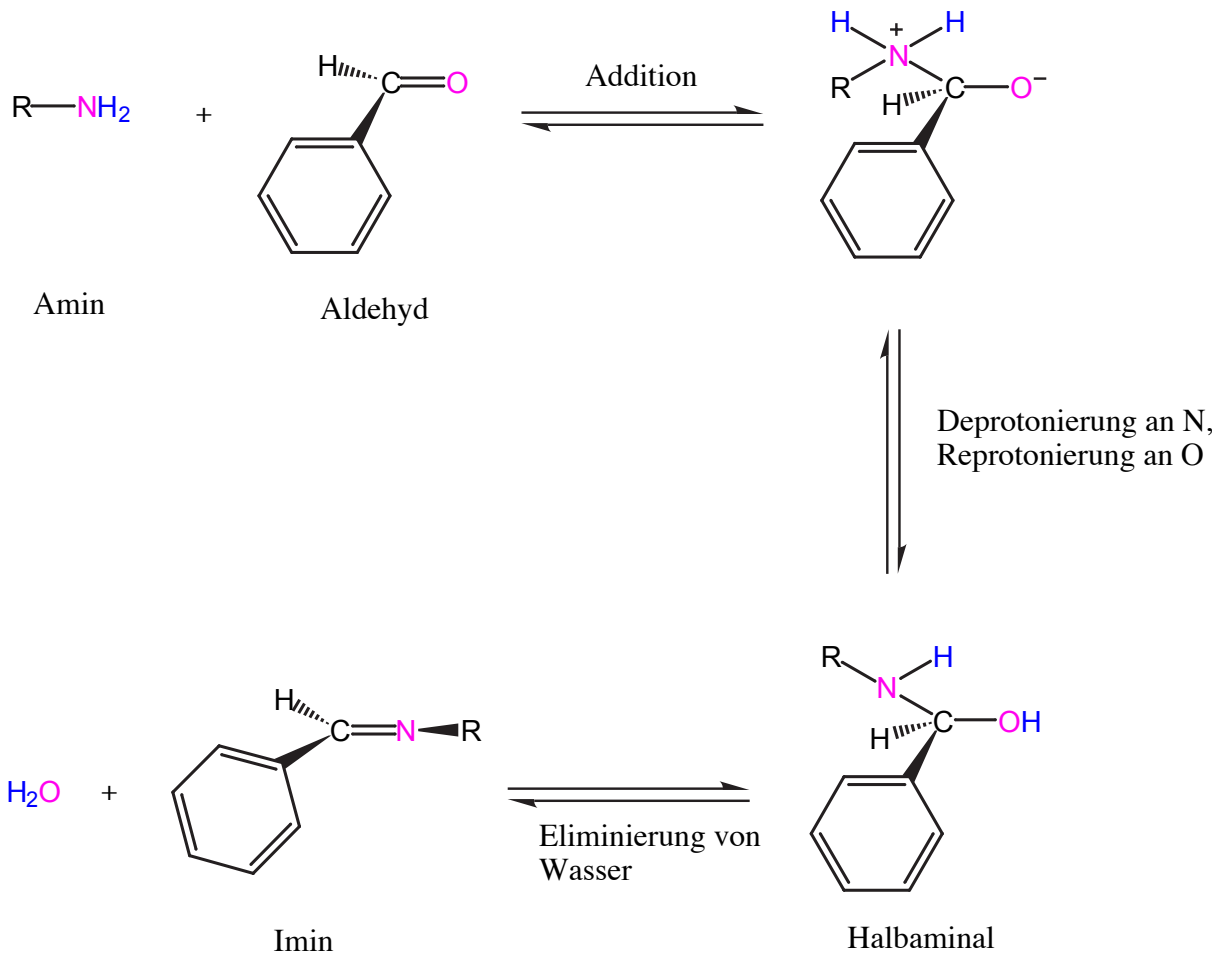


Fig. 28: Schiffsche Base Reaktion

Bei den durchgeführten Synthesen wurde 2-Pyridinaldehyd mit 4-Iod-anilin bzw. mit der Phenylamingruppe, die bereits an die Ethinylgruppe des Steroids gekoppelt worden war, umgesetzt. Neben dem gewünschten Reaktionsprodukt entsteht bei dieser Reaktion Wasser. Aldehyd wird im Überschuss zugegeben, damit die Reaktion möglichst vollständig abläuft. Die Reaktionskontrolle mittels DC hatte bei allen Ansätzen gezeigt, dass die Reaktion innerhalb von ca. 2 Stunden praktisch vollständig abgelaufen war.

Die Kopplung von 4-Iod-anilin bzw. Iod-phenyl-pyridinyl-methylenamin an die Ethinylgruppe des Steroids stellt eine Sonderform der sog. Heck-Reaktion dar und wird nach Sonogashira bezeichnet. Bei dieser Reaktion werden zwei Katalysatoren benötigt: Kupferiodid (CuI) und Dichloro-bis(triphenylphosphin)-Palladium(II) [$Pd(PPh_3)_2Cl_2$] (Fig. 29).

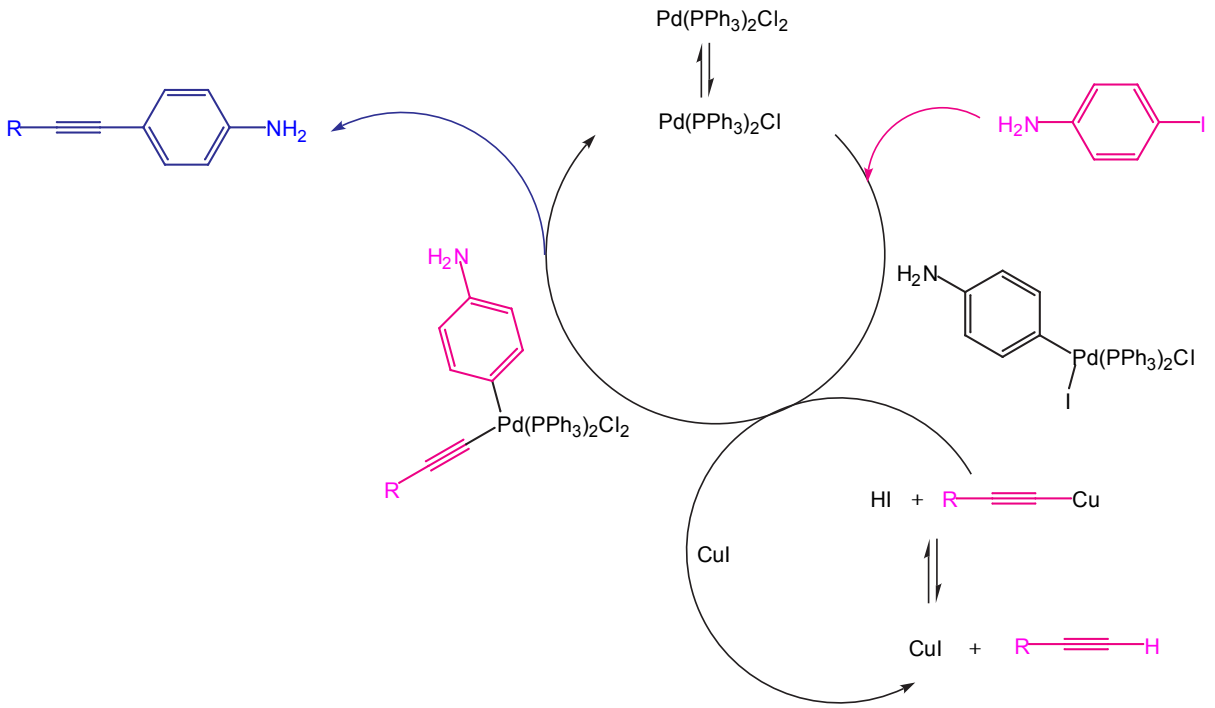


Fig. 29: Reaktion nach Sonogashira

Die Reaktionsbedingungen wurden gemäss Angaben der Literatur [19] gewählt. Das Edukt mit der Ethinylgruppe sollte in 6-fachem Überschuss zugefügt werden. Bei der Durchführung der Synthesen wurde jedoch statt dem 17α-Ethinylestradiol bzw. 17α-Ethinyltestosteron gemäss Literatur, 4-Iod-anilin bzw. Iod-phenyl-pyridinyl-methylenamin (**1**) oder Iod-phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin (**3**) im Überschuss zugefügt. Der Vergleich verschiedener Ansätze zeigte, dass ein 2- bis 4-facher Überschuss die Ausbeute nicht verringerte.

Sowohl bei der Derivatisierung von Ethinylestradiol als auch von Ethinyltestosteron war diese Reaktion nur dann erfolgreich, wenn sie mit 4-Iod-anilin erfolgte. Die direkte Kopplung des ganzen Chelatsystems Iod-phenyl-pyridinyl-methylenamin hatte in beiden Fällen nicht zum gewünschten Produkt geführt. Vermutlich war das Imin unter den gegebenen Bedingungen nicht stabil.

Bei der Bildung einer Doppelbindung durch die Schiffsche Base Reaktion entstehen ein cis- und ein trans-Isomer. Die NMR-Spektren der Verbindungen 17α-(ethniyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-estradiol (**5**) bzw. 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-testosteron (**9**) zeigen, dass die beiden Isomere nicht im Verhältnis eins zu eins gebildet worden sind, sondern eines mit rund 80% bevorzugt worden ist (Fig. 30). Die genannte cis/trans-Isomerie wird in den NMR-Spektren vor allem bei den Protonen H29 und H32 der Verbindung **5** bzw. H30 und H33 der Verbindung **9** sichtbar.

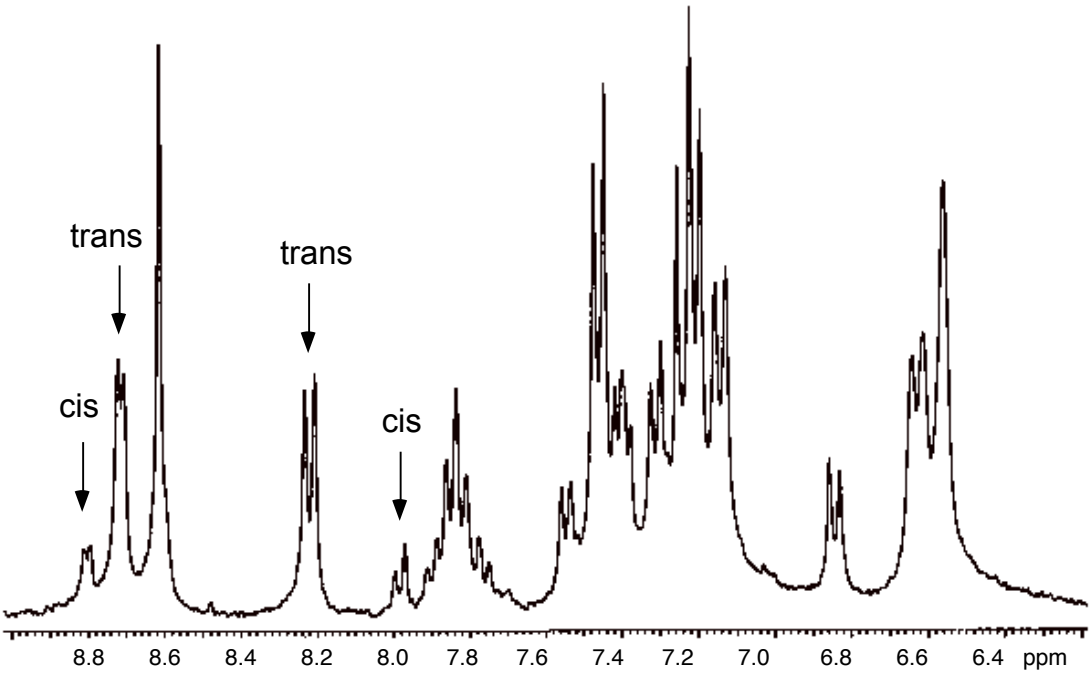


Fig. 30: NMR-Spektrum des Estradiolderivates **5**.

Eine besondere Schwierigkeit ergab sich bei der Umsetzung von 17α-Ethinyltestosteron mit 4-Iod-anilin. Die Reaktionskontrolle mittels DC zeigte zwei Produkte deren R_f-Werte sich nur geringfügig unterschieden. Durch Reinigung mittels SC konnten die beiden Verbindungen getrennt werden. Es zeigte sich, dass es sich beim ersten Produkt um die gewünschte Verbindung 17α-(ethinyl-phenylhydrazin)-17β-estradiol (**8**) handelte, während es sich bei der zweiten Produkt gemäss NMR-Spektrum um ein Dimerisierungsprodukt handeln musste. Die Intensität der Signale der Protonen des Steroidgerüstes stand zu jener der Protonen der Phenylamin-Gruppe im Verhältnis zwei zu eins. Vermutlich hatte die freie Amingruppe des Produktes **8** mit der Ketogruppe des Ringes A eines zweiten Moleküls 17α-Ethinyltestosteron eine Schiffsche Base und somit ein Dimer gebildet (Fig. 31).

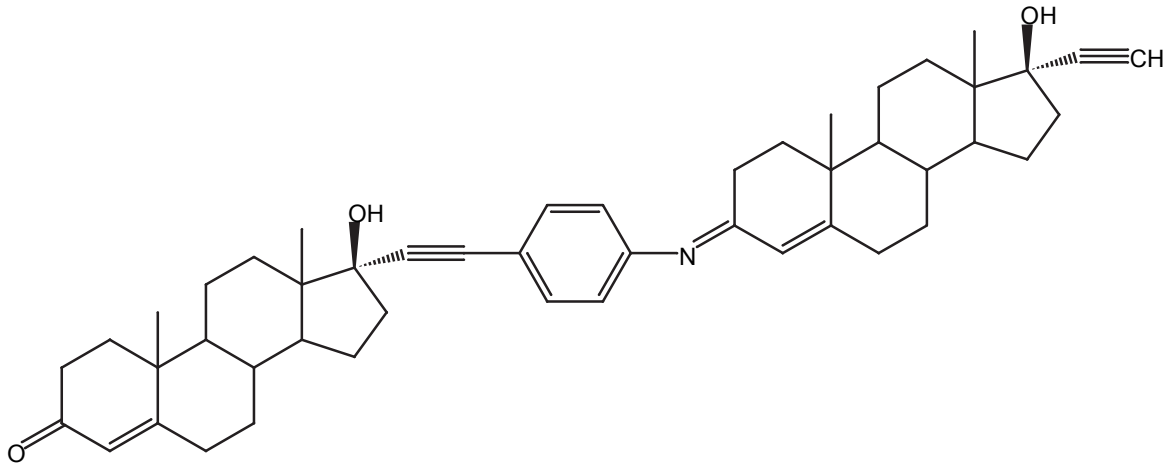


Fig. 31: Nebenreaktion: Dimerbildung durch eine Schiffsche Base Reaktion.

Ein auf diese Weise gebildetes Dimer müsste eine Molmasse von 698g/mol aufweisen. Das MS zeigte jedoch ein Signal bei 645.3. Die Vermutung, dass eine Nebenreaktion abgelaufen resp. ein Nebenprodukt gebildet worden war, konnte bestätigt werden, die vermutete Struktur desselben jedoch nicht. Wurde die Reaktion nach bereits zwei Stunden abgebrochen und das Produkt (**8**) sogleich mittels SC gereinigt, gelang es, die Bildung des Dimerisierungsproduktes praktisch vollständig zu unterbinden.

Betrachtet man ein Modell der beiden Isomeren unter Berücksichtigung der Wasserstoffatome (Fig. 32), wird deutlich, dass das trans-Isomer die bevorzugt gebildete Verbindung sein muss, da die Bildung eines cis-Isomeren sterisch gehindert ist.

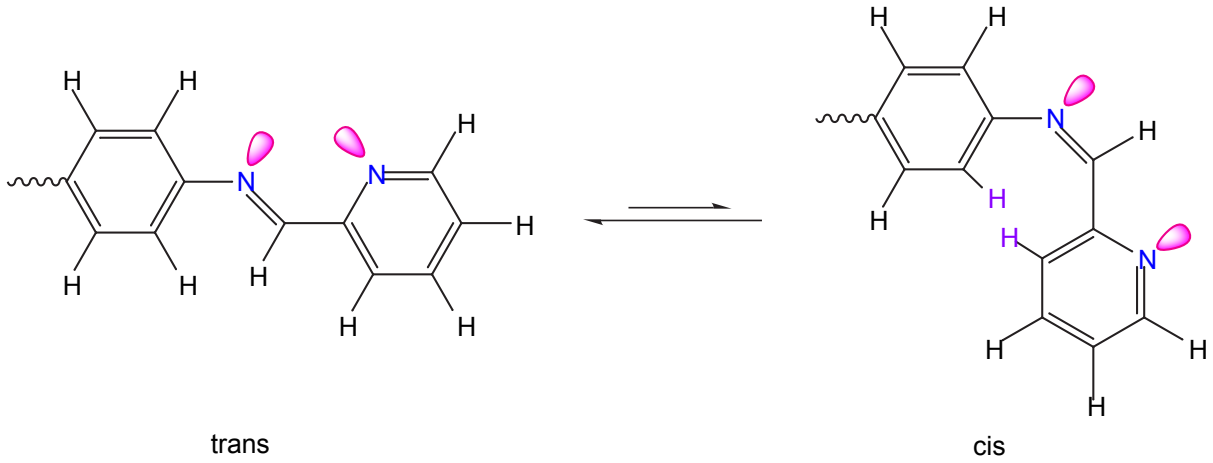


Fig. 32: Sterische Hinderung der Protonen (violett) des cis-Isomeren.

Die Kopplung von 4-Iod-phenyl-hydrazin statt 4-Iod-anilin an das 17α-Ethinylestradiol blieb auch nach mehreren Versuchen erfolglos. Die Farbveränderung bei der Reinigung des Zwischenproduktes 17α-(ethniyl-phenylhydrazin)-17β-estradiol (**6**) zeigte, dass diese Verbindung nicht stabil war. Die direkte Weiterverarbeitung des Reaktionsgemisches durch Zugabe von 2-Pyridinaldehyd führte nicht zum gewünschten Produkt 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin)-17β-estradiol (**7**).

Der Versuch, das ganze Chelatsystem Iod-phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin (**1**) zu koppeln, blieb ebenfalls erfolglos.

3.1.2. Folgerungen

Die Derivatisierung von 17α-Ethinylestradiol bzw. 17α-Ethinyltestosteron gelang, sofern das Chelatsystem Phenyl-pyridinyl-methylenamin in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten an das Steroidderivat angehängt wurde. Bei den Produkten **5** und **9** ist zu 80% das trans-Isomer entstanden, da es gegenüber dem cis-Isomer sterisch weniger gehindert ist.

Während die Reaktionen bei 17α-Ethinylestradiol ohne grosse Schwierigkeiten abgelaufen waren, musste bei der Kopplung von 4-Iod-anilin an das 17α-Ethinyltestosteron verhindert werden, dass ein Dimerisierungsprodukt als Nebenprodukt entstehen konnte. Durch eine kurze Reaktionszeit konnte diese Nebenreaktion jedoch praktisch vollständig unterbunden werden.

Die Kopplung des zweiten Chelatsystems Phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin an 17α-Ethinylestradiol ist nicht erfolgreich abgelaufen. Durch weitere Ansätze müsste herausgefunden werden, unter welchen Reaktionsbedingungen das Zwischenprodukt **6** stabil ist, und das Produkt **7** synthetisiert werden kann.

3.2. Rhenium-Komplexe

Die makroskopische Umsetzung von 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-estradiol (**5**) bzw. 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-testosteron (**9**) mit dem inaktivem Rhenium-Tricarbonyl-Prekursor (**10**) zu den Rhenium-Komplexen [ReBr(**5**)$(CO)_3$] (**12a**) und [ReBr(**9**)$(CO)_3$] (**14a**) erfolgte innert Minuten, was an der orange-roten Verfärbung der Reaktionslösung sichtbar war.

Die NMR-Spektren der Verbindungen **12a** und **14a** zeigen für die Signale der Protonen der Phenyl-pyridinyl-methylenamin-Gruppe gegenüber den Ausgangsverbindungen **5** und **9** eine Tieffeldverschiebung von 0.1 bis 0.3ppm, während für die Signale der Protonen des Steroidgerüstes praktisch keine Verschiebung beobachtet werden kann. Die Koordination des Rhenium-Tricarbonyl-Prekursors (**10**) hat demzufolge einen Einfluss auf die naheliegenden Protonen des Chelatsystems, während die weiter entfernten Protonen des Steroidgerüsts kaum beeinträchtigt werden.

Interessant ist die Tatsache, dass bei den NMR-Spektren der Komplexe **12a** und **14a** im Gegensatz zu den NMR-Spektren der Verbindungen **5** und **9** die cis/trans-Isomerie nicht mehr in Erscheinung tritt (Fig. 33). Für das Proton H29 der Verbindung **12b** bzw. H30 der Verbindung **14a** ist nur noch ein Doublett vorhanden. Aus sterischen Gründen ist es nicht möglich, dass das cis-Isomer einen Komplex mit $[ReBr_3(CO)_3]^{2-}$(**10**) bildet. D.h., wenn zunächst ein dynamisches Gleichgewicht zwischen cis- und trans-Isomer des Liganden vorliegt und dann durch Komplexbildung immer mehr trans-Isomer aus diesem Gleichgewicht entzogen wird, wird sich gleichzeitig immer mehr cis-Isomer in trans-Isomer umlagern, das wiederum zur Komplexbildung in Frage kommt, bis schliesslich aller Ligand verbraucht ist.

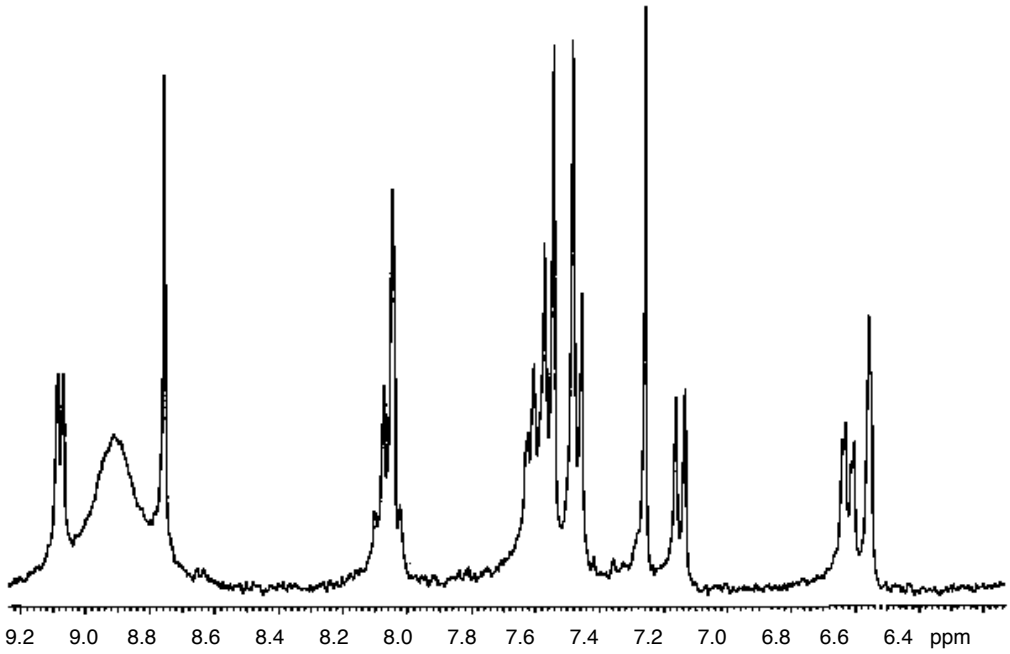


Fig. 33: NMR-Spektrum Rhenium-Komplexes **12a**.

Betrachtet man die cis- und trans-Isomeren der Verbindungen **5** bzw. **9**, wird deutlich, dass die gegenseitige Lage der einsamen Elektronenpaare der Stickstoffatome der Pyridinylmethylenamingruppe sehr unterschiedlich ist: nur beim trans-Isomeren liegen sie in einem zur Koordination des Rhenium-Tricarbonyl-Komplexes (**10**) günstigen Winkel (Fig. 18). Die Auftrennung mittels HPLC-Programm A hat für die Verbindung **12b** wie auch für die Verbindung **14b** ein Signal im UV-Detektor (λ = 254nm) bei einer Retentionszeit von ca. 22 Minuten ergeben.

3.3. ^{99m}Tc-Technetium-Komplexe

3.3.1. Darstellung der Komplexe 12b und 14b

Die Umsetzung von 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-estradiol (**5**) $[^{99m}Tc(OH)_3(CO)_3]^+$ (**11**) zum Technetium-Komplex $[^{99m}TcCl(\mathbf{5})(CO)_3]$ (**12b**) war aufgrund der lipophilen Eigenschaften der Verbindung **5** erschwert. Es zeigte sich, dass einzig DMSO als Lösungsmittel zur Umsetzung geeignet war. Es musste eine 10^{-3}M Lösung der Verbindung **5** hergestellt, und diese mit einer Lösung des Technetium-Tricarbonyl-Prekursors (**11**) in einem Volumenverhältnis von 8 zu 3 umgesetzt werden. Auf diese Weise konnte das Produkt **12b** mit einer Ausbeute von 87% hergestellt werden (Fig. 34).

Das gleiche Vorgehen führte bei der Umsetzung der Verbindung **9** mit $[^{99m}Tc(OH)_3(CO)_3]^+$ (**11**) zum Produkt **14b**, allerdings nur mit einer Ausbeute von 75%. Im Gegensatz zur Verbindung **12b** zeigte das Chromatogramm der Verbindung **14b** ein zusätzliches Signal (R_t = 19min.) einer nicht weiter untersuchten Spezies mit einem Anteil von 11% (Fig. 34).

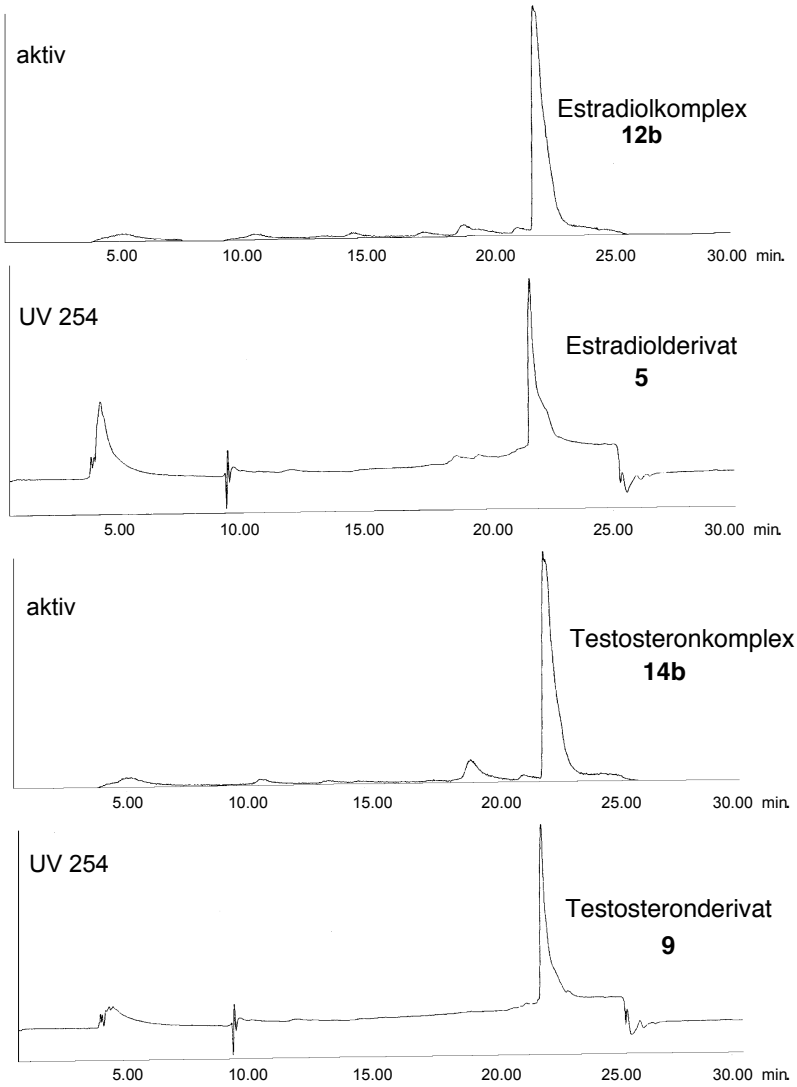


Fig. 34: HPLC-Chromatogramme der markierten Verbindungen **12b** bzw. **14b** und der nicht-markierten Verbindungen **5** bzw. **9**, (HPLC-Programm A).

3.3.2. Reinigung der Verbindungen 12b und 14b

Die Signale der markierten Verbindung **12b** bzw. **14b** und der nicht-markierten Verbindung **5** bzw. **9** erscheinen mit dem HPLC-Programm A mit derselben Retentionszeit von ca. 22 Minuten (Fig. 32). Mit dem HPLC-Programm B ist eine Trennung der markierten (**12b** bzw. **14b**) von den nicht-markierten Verbindungen (**5** bzw. **9**), welche rund 3 Minuten früher erschienen, erreicht worden (Fig. 35). Auf diese Weise ist eine Isolierung der markierten Verbindungen **12b** bzw. **14b** durch Sammeln der Fraktion möglich.

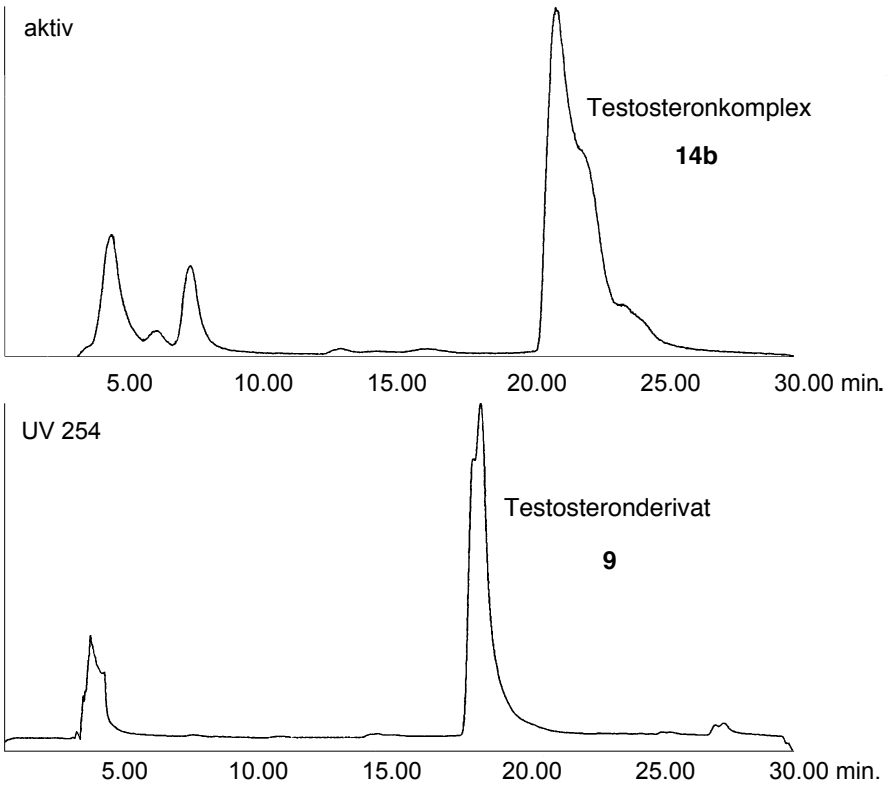


Fig. 35: Unterschiedliche Retentionszeiten des markierten Testosteronderivates **14b** (Aktivdetektor) und des nicht-markierten Testosteronderivates **9** (UV-Detektor), (HPLC-Programm B).

3.4. Stabilitätsprüfung

Um einen Anhaltspunkt bezüglich Stabilität der markierten Verbindungen **12b** und **14b** zu erhalten, wurde in einem ersten Schritt der Zerfall nach Inkubation in Puffer untersucht. Dabei wurden einerseits unterschiedliche Puffersysteme, nämlich PBS-Puffer und Phosphatpuffer, andererseits für jedes Puffersystem zwei unterschiedliche pH-Werte verwendet.

In einem zweiten Schritt wurde die Stabilität nach Inkubation in Plasma geprüft. Hierbei sollte insbesondere eine allfällige Bindung an Plasmaproteine untersucht werden.

3.4.1. Puffer-Stabilität

Die Verbindungen **12b** und **14b** zeigten in den geprüften Puffersystemen eine sehr unterschiedliche Stabilität.

Die besten Resultate wurden für die Verbindung **12b** in PBS-Puffer pH 7.4 (Fig. 36) und PBS-Puffer pH 8.5 erhalten, wo auch nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C noch über 80% intakte Substanz vorhanden war.

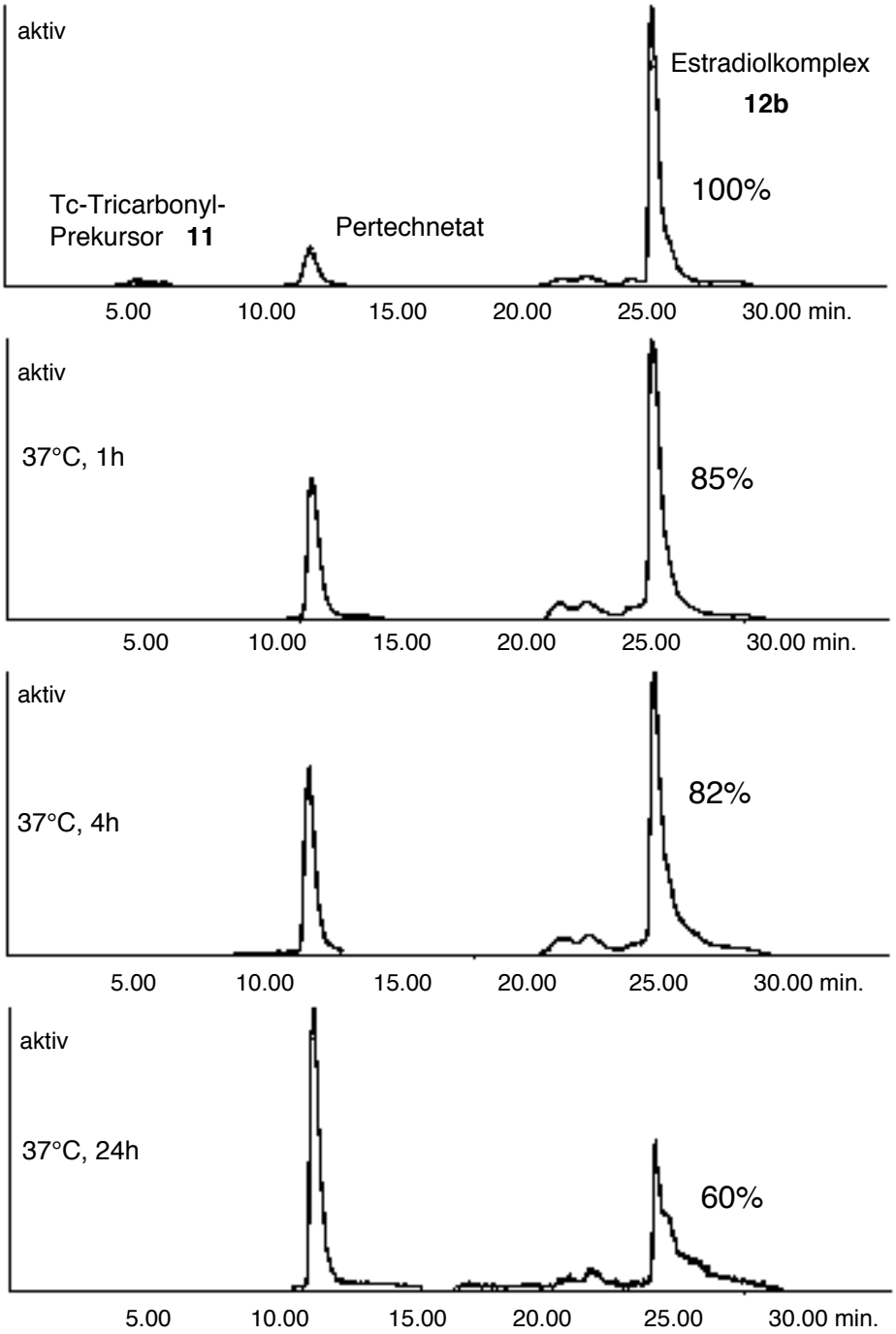


Fig. 36: Stabilitätsprüfung der Verbindung **12b** in PBS-Puffer pH 7.4.

Dies war insofern befriedigend, als PBS-Puffer ein Modellsystem darstellt, das in seiner Zusammensetzung dem physiologischen Milieu von allen verwendeten Puffersystemen am ähnlichsten ist. Dass das Verhalten bei pH 8.5 praktisch identisch war, zeigt, dass die Verbindung auch in leicht basischer Umgebung stabil ist. Beim Zerfallsprodukt handelte es sich praktisch ausschliesslich um Pertechnetat. Ein Zerfall des Moleküls selber im Laufe der Inkubationszeit konnte aufgrund des Chromatogramms nicht festgestellt werden.

Das HPLC-Chromatogramm der Verbindung **14b** zeigte bereits bei der Qualitätskontrolle nach der Umsetzung ein Signal mit einer Retentionszeit von ca. 19 Minuten, welches nicht klar zugeordnet werden konnte (Fig. 34). Im Gegensatz zum Signal des Produktes (**14b**) wurde es vom UV-Detektor bei einer Messwellenlänge von 254nm nicht erfasst. Die Hypothese, dass es sich um das intakte Produkt $[^{99m}Tc(OH_2)(\mathbf{5})(CO)_3]^+$ (**14b**) handeln könnte, bei dem das Chlorid durch ein Wassermolekül ausgetauscht worden war, wurde durch folgenden Versuch widerlegt: Die Verbindung **9** wurde mit einem Überschuss an inaktivem Rhenium-Tricarbonyl-Prekursor (**10**), bei welchem die Halogenide mit Silberhexafluorophosphat ($AgPF_6$) gefällt worden waren, zum Komplex $[Re(OH_2)(\mathbf{5})(CO)_3]^+$ **14a** umgesetzt. Dieser Komplex wurde jedoch nicht bei einer Retentionszeit von 19 Minuten detektiert. Die Tatsache, dass das unbekannte Signal im Chromatogramm des UV-Detektors nicht beobachtet werden konnte, war ein weiteres Indiz, dass es sich nicht um den Komplex **14a** handeln konnte.

Für die Berechnungen der Puffer-Stabilität wurde ausschliesslich das Signal des Produktes (R_t = 22min.) berücksichtigt, d.h. die prozentualen Anteile der einzelnen Analysen wurden auf das Signal des Produktes der Ausgangslösung bezogen und als 100% definiert. Bereits nach einer Stunde waren in PBS-Puffer pH 7.4, maximal noch 66% intakte Substanz **14b** vorhanden. Demzufolge ist die Stabilität der Verbindung **14b** in Puffer gegenüber der Verbindung **12b** deutlich geringer.

3.4.2. Plasma-Stabilität

Die Papierchromatogramme, welche in Aceton bzw. Methanol/HCl entwickelt worden waren, zeigten, dass die reinen Verbindungen **12b** bzw. **14b** an der Front liefen, während bereits nach 1 Stunde Inkubation in Plasma praktisch alle Substanz am Start geblieben war. Die Verbindungen **12b** bzw. **14b** binden demzufolge innert kürzester Zeit praktisch vollständig an Plasmaproteine.

Wie der Literatur [20] zu entnehmen ist, werden sowohl 17α-Ethinylestradiol als auch 17α-Ethinyltestosteron praktisch vollständig an Serumalbumin gebunden. Es war deshalb zu erwarten, dass auch die derivatisierten Verbindungen **12b** und **14b**, zu einem grossen Teil an Serumalbumin gebunden werden, was durch die PC-Experimente eindeutig bestätigt werden konnte.

Es konnte beobachtet werden, dass innert vier Stunden kein signifikanter Zerfall stattfindet. Nach 24 Stunden sind noch 75% der Verbindung **14b** intakt, während nur noch knapp 40% der Verbindung **12b** intakt geblieben sind. Folglich ist im Plasma die Stabilität der Verbindung **12b** über einen Zeitraum von 24 Stunden gegenüber der Verbindung **14b** deutlich geringer.

3.4.3. Folgerungen

17α-Ethinylestradiol und 17α-Ethinyltestosteron sind an derselben Stelle mit dem gleichen Chelatsystem funktionalisiert und unter gleichen Bedingungen mit dem Technetium-Tricarbonyl-Prekursor (**11**) markiert worden. Unterschiede bezüglich Stabilität in Puffer und Plasma müssten deshalb auf die unterschiedlichen Steroidgerüste von 17α-Ethinylstradiol und 17α-Ethinyltestosteron zurückgeführt werden. Dies scheint jedoch wenig wahrscheinlich, da der Hauptunterschied der Steroidgerüste im Ring A, also weit von der koordinierenden Einheit entfernt liegt.

Die starke Bindung an Plasmaproteine kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden:

Wie bereits erwähnt ist aufgrund der hohen Lipophilie eine unspezifische Bindung an Serumalbumin zu erwarten. Ferner ist aus früheren Studien [21] bekannt, dass bei Koordination des Technetium-Tricarbonyl-Prekursors (**11**) an bidentate Liganden, wie beim verwendete Phenyl-pyridinyl-methylenamin, die dritte Koordinationsstelle bei Inkubation in Plasma innerhalb einer Stunde vollständig mit Plasmaproteinen interagiert. Das labil an die dritte Koordinationsstelle der Technetium-Tricarbonyleinheit gebundene Wassermolekül wird leicht ausgetauscht, wodurch diese Stelle mit funktionellen Gruppen der Plasmaproteine reagieren kann (Fig. 37). Dabei besteht die Gefahr, dass die Technetium-Tricarbonyl-Einheit (**11**) durch Transchelierung ganz vom Liganden abgetrennt und vollständig an die Plasmaproteine koordiniert wird.

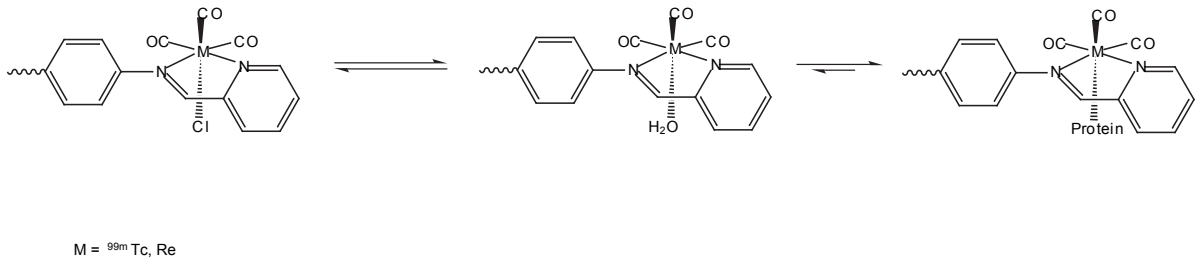


Fig. 37: Dritte Koordinationsstelle: Austausch des Cl^- gegen H_2O und Interaktion mit funktionellen Gruppen von Plasmaproteinen.

Ein weiterer Schritt wird die Funktionalisierung der Steroide mit tridentaten Liganden sein. Aus den mit diesen Verbindungen erhaltenen Ergebnissen der Plasmastabilitätsprüfungen wird eine Aussage über die unspezifische Bindung der Steroide an Protein möglich sein.

Das Signal, welches bei der Auftrennung der Verbindung **14b** mittels HPLC-Programm A im Aktivdetektor mit einer Retentionszeit von ca. 19 Minuten erhalten worden ist, erscheint mit dem HPLC-Programm B mit einer Retentionszeit von ca. 7 Minuten, also weit früher als die Signale der Verbindung **9** (R_t = 16min.) und der Verbindung **14b** (R_t = ca. 20 min.). Dies ist ein Hinweis, dass diese Substanz andere Eigenschaften besitzt als das Edukt (**5**) und das Produkt (**14b**), d.h. dass es sich vermutlich um ein Zerfallsprodukt handelt.

3.5. Verteilung

3.5.1. Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient

Die Bestimmung der Verteilung zwischen Wasser- und Octanol-Phase ergab sowohl für die Verbindung **12b** als auch für die Verbindung **14b** einen apparenten Verteilungskoeffizienten log $D_{pH\ 7.4}$ von rund 2.

Zu beachten ist die Tatsache, dass beide Verbindungen im Verlauf des Experimentes zu einem gewissen Prozentsatz in Pertechnetat und andere Produkte zerfallen sind. Da die Zerfallsprodukte andere Verteilungen aufweisen als die Steroide, kann der berechnete Verteilungskoeffizient dadurch verändert worden sein.

In früheren Studien [22] ist für Estradiol ein log P (absoluter Verteilungskoeffizient) von 3.30 ermittelt worden, für 17α-(Phenylethinyl)-17β-estradiol ein log P von 4.65 und für [17α-(Phenylethinyl)-17β-estradiol]tricarbonylchromium ein log P von 5.03. Das Estradiol-molekül nimmt gemäss diesen Werten durch die Derivatisierung mit einer Phenylethinyl-Gruppe an der Stelle C-17α deutlich an Lipophilie zu. Die Koordination von Tricarbonylchromium hat die lipophilen Eigenschaften zusätzlich erhöht.

Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen, die für die Verbindungen **12b** bzw. **14b** erhalten worden sind, ist nicht möglich, da hier der apparente Verteilungskoeffizient, d.h. die totale Konzentration in der Wasser- bzw. Octanol-Phase bestimmt worden ist, während die Literatur den absoluten Verteilungskoeffizient, d.h. die Konzentration der nicht-ionisierten Spezies in der Wasser- bzw. Octanol-Phase angibt. Ferner handelt es sich bei den Verbindungen **12b** und **14b** um Derivate, die sich von den in der Literatur beschriebenen deutlich unterscheiden. Der berechnete log D von rund 2 scheint etwas tief verglichen mit 3.30 für das nicht-derivatisierte Estradiol. Für die Verbindungen **12b** und **14b** wäre aufgrund der Derivatisierung an C-17α eine höhere Lipophilie und demzufolge ein höherer Verteilungskoeffizient als berechnet zu erwarten.

Die Stabilitätskontrolle hat für die Verbindung **12b** in jeder Phase einen Zerfall in Pertechnetat von mindestens 40% gezeigt, während für die Verbindung **14b** kein Zerfall in Pertechnetat beobachtet worden ist. Dieses Verhalten kann bislang nicht erklärt werden. Durch eine Wiederholung der Experimente sollte das unterschiedliche Verhalten der beiden Verbindungen verifiziert werden.

3.6. Affinitätstest

3.6.1. Variante 1

Um die Affinität von [^{99m}TcCl(**5**)(CO)$_3$] (**12b**) zu testen, stand ein Anitkörper-Testsystem zur Verfügung: der verwendete Antikörper war ein Estradiol-Antikörper, der für die Stelle C-17 des Steroidgerüstes spezifisch war. Zur Abtrennung der nicht-gebundenen Fraktion war eine Dextran-Kohlesuspension in BSA-Puffer vorgesehen. Um zu verhindern, dass die Verbindung **12b** bzw. die Kohle an der Reaktionsgefässwand adsorbiert blieb, sollte Gelatine-Puffer verwendet werden.

In einem ersten Vorversuch wurde die Effektivität der Abtrennung der Verbindung **12b** mittels Dextran-Kohlesuspension und anschliessender Zentrifugation überprüft.

Die Messungen zeigten, dass mit diesem System weniger als 80% der Verbindung **12b** abgetrennt werden konnten. Bei Zugabe der doppelten Menge Kohlesuspension wurden noch weniger, nämlich nur noch 75% der Verbindung **12b** abgetrennt.

Wie aus den durch die Stabilitätsprüfungen in Plasma erhaltenen Resultaten bekannt ist, wird die Verbindung **12b** in relativ kurzer Zeit praktisch vollständig an Plasmaproteine gebunden.

Die Vermutung lag nahe, dass die Verbindung **12b** an das Serumalbumin, das in der für den Test vorgesehenen Dextran-Kohlesuspension zu 5% enthalten war, gebunden wurde, und dadurch eine effektive Abtrennung der Verbindung **12b** durch die Kohle nicht möglich gewesen ist. Die Tatsache, dass bei Zugabe eines grösseren Volumens an Dextran-Kohlesuspension die Abtrennung der Verbindung **12b** tendenziell schlechter möglich gewesen war, bestätigte die Vermutung, dass die Serumalbuminbindung die Ursache war.

Bei Zugabe des Antikörpers hätte man trotz der ungenügenden Abtrennung der nicht-gebundenen Fraktion im Falle einer Bindung der Verbindung **12b** eine höhere Aktivität im Überstand messen müssen. Deshalb wurde in einem Vorversuch Antikörper zu einer Lösung der Verbindung **12b** gegeben, und nach Zugabe von Dextran-Kohlesuspension und anschliessender Zentrifugation die Aktivität im Überstand gemessen. Verglichen mit der Aktivität, welche im Überstand eines Ansatzes ohne Antikörper gemessen worden war, war die Aktivität jedoch keineswegs erhöht. Diese Ergebnisse gaben Hinweise, dass die Verbindung **12b** vom verwendeten Antikörper nicht gebunden werden kann.

Um eine effektivere Abtrennung der nicht-gebundenen Fraktion zu erreichen, wurde ein Versuch mit reiner Kohlesuspension in PBS-Puffer pH 7.4 durchgeführt. Damit konnte eine Abtrennung sowohl der Verbindung **12b** wie auch der Verbindung **14b** von 99% erreicht werden.

Mit diesem Resultat ist einerseits die Hypothese, dass die Verbindung **12b** an das Serumalbumin bindet, bestätigt, andererseits ist ein System zur Bestimmung der Antikörper-Affinität etabliert worden, mit welchem die nicht-gebundene Fraktion effektiv abgetrennt werden kann.

3.6.2. Variante 2

Der zweite Ansatz des Affinitätstests, bei welchem die gebundene Fraktion mittels abzentrifugierbarem Anti-Antikörper abgetrennt, und die nicht-gebundene Fraktion im Überstand gemessen werden konnte, bestätigte die Resultate des ersten Ansatzes.

Die Lösung mit der Verbindung **12b** und Antikörper müsste bei einer allfälligen Bindung der Verbindung **12b** eine höhere Aktivität aufweisen als der Überstand, wo die gebundene Fraktion mittels Anti-Antikörper abgetrennt worden war. Im Experiment zeigte sich, dass Aktivitäten der gleichen Grössenordnung in Lösung und Überstand gemessen wurden.

Diese Resultate bestätigen die beim ersten Ansatz erhaltenen Hinweise, dass die Verbindung **12b** vom Antikörper nicht gebunden werden kann.

3.6.3. Folgerungen

Die Vorversuche zeigten, dass das zur Verfügung stehende Testsystem unter Verwendung von Dextran-Kohlesuspension nicht geeignet war: eine Abtrennung der nicht-gebundenen Fraktion von nur 75% wäre auf jeden Fall zu wenig effektiv, um exakte Bestimmungen durchzuführen.

In beiden Ansätzen, d.h. sowohl die Bestimmung der gebundenen Fraktion durch die Variante 1 als auch die Bestimmung der nicht-gebundenen Fraktion durch die Variante 2 zeigten übereinstimmend, dass keine Bindung durch den Antikörper stattgefunden hat.

Ein möglicher Grund für das Nicht-Binden könnte die Tatsache sein, dass der Antikörper für die Stelle C-17 des Estradiols spezifisch ist. Die Verbindung **12b** ist an der Stelle C-17α durch die Kopplung des Chelatsystems und die Koordination des Technetium-Tricarbonyl-Prekursors (**11**) stark verändert worden, was eine Bindung ev. verunmöglicht.

In einem nächsten Ansatz soll ein Estradiol-Antikörper verwendet werden, der für eine unveränderte Stelle der Verbindung **12b** wie z.B. die Stelle C-3, spezifisch ist.

Die Abtrennung der nicht-gebundenen Fraktion wird mittels reiner Kohlesuspension in PBS-Puffer pH 7.4 erfolgen, da auf diese Weise eine praktisch vollständige Abtrennung erzielt

werden kann. Mit diesem System werden exakte Bestimmungen der Affinität durchgeführt werden können.

4. Experimenteller Teil

4.1. Allgemeine Arbeitstechnik

4.1.1. Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt:

- Anorganische und organische Verbindungen sowie Lösungsmittel: Fluka, Aldrich, Merck
- Ethinyltestosteron: Steraloids Inc. Newport R.I., 02840 USA
- Antikörper/Anti-Antikörper: Anti-Estradiol, ER-110/Immunosorbent, ER-70, In vitro Diagnosticum, Isotopenproduktion, 5303 Würenlingen
- CO-Gas: Carbagas
- Deuterierte Lösungsmittel: Armar
- $[Na][TcO_4]$-Lösung: Generator: Ultratechnekow FM (MO99/TC99M), Mallinckrodt Medical b.v.

Die Lösungsmittel wurden im allgemeinen in der handelsüblichen Reinheit (puriss.) verwendet. Wasserfreies Methanol wurde mit den in der Laborpraxis üblichen Reinigungsmethoden erhalten. Das CO-Gas wurde in der käuflichen Reinheit (99,7%) ohne weitere Trocknung zur Synthese eingesetzt.

4.1.2. Puffer

Phosphatpuffer (PP):	pH 7.4, 0.1M (11.39g Na_2HPO_4/2.38g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ad 1000ml H_2O) pH 5.8, 0.1M (1.21g Na_2HPO_4/10.98g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ad 1000ml H_2O)
PBS-Puffer:	pH 7.4, 1x (5.8g NaCl, 6g Na_2HPO_4/1.5g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ad 1000ml H_2O) pH 8.5, 1x (5.8g NaCl, 6g Na_2HPO_4/1.5g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ad 1000ml H_2O) pH-Einstellung mit NaOH 5M
TEAP-Puffer:	500ml H_2O + 7 Pipetten Triethylamin (TEA); mit H_3PO_4 85% auf pH 2.25 einstellen; ad 1000ml H_2O; 30min. entgasen im Ultraschallbad.
BSA-Puffer:	0.5g Na-azid + 5.0g Albumin bovine fraction V powder Sigma gelöst in 1000ml 0.05M PP pH 7.4
Gelatine-Puffer:	0.2% Gelatine (Stock-Gelatine: 10% steril pyrogenfrei BSD Rotes Kreuz) in 0.05M PP pH 7.4

4.1.3. Kohlesuspensionen

Dextran-Kohlesuspension in BSA-Puffer:	1g Norit A pract. (Part. Grösse = 4-5µm) + 0.1g Dextran T 70 (MG = 70‘000, Pharmacia) suspendiert in 100ml BSA-Puffer
Kohlesuspension in PBS-Puffer:	1g Aktivkohle (Fluka) suspendiert in 100ml PBS-Puffer pH 7.4 (1x).

4.1.4. Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel-60 beschichtete Alufolien (5 x 7.5cm) mit Fluoreszenzindikator (F_{254}) von Merck verwendet.

Für die präparative Dünnschichtchromatographie wurden PSC-Fertigplatten (20 x 20cm) mit einer Schichtdicke von 2mm Kieselgel-60 mit bzw. ohne Fluoreszenzindikator von Merck verwendet.

4.1.5. Säulenchromatographie (SC)

Für die Säulenchromatographie wurde eine 45cm lange Glassäule mit einem Durchmesser von 2cm verwendet. Es wurden jeweils ca. 20g Kieselgel-60 (Korngrösse: 0.063-0.2mm) von Fluka verwendet.

4.1.6. Papierchromatographie (PC)

Für die Papierchromatographie wurden 25cm lange Papierstreifen (Whatman Chromatography Paper 1Chr) verwendet. Als Elutionsmittel wurde Aceton bzw. 0.9%ige NaCl-Lösung bzw. Methanol/HCl 6M (95.5/0.5) verwendet. Die Substanz wurde 2.5cm oberhalb des unteren Randes aufgetragen und über eine Strecke von 13.5cm aufgetrennt. Die Streifen wurden in zehn 1.5cm lange Stücke zerschnitten, so dass 1cm unterhalb und 0.5cm oberhalb der eigentlichen Trennstrecke miterfasst wurden. Für die einzelnen Stücke wurden die R_f-Werte (1: $R_f = 0.02$, 2: $R_f = 0.09$, 3: $R_f = 0.20$, 4: $R_f = 0.31$, 5: $R_f = 0.43$, 6: $R_f = 0.54$, 7: $R_f = 0.65$, 8: $R_f = 0.76$, 9: $R_f = 0.87$, 10: $R_f = 0.98$) berechnet.

4.1.7. Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC)

Die HPLC-Untersuchungen wurden mit einer Merck/HITACHI L-6200 Intelligent Pump, gekoppelt mit einem UV-Detektor Merck/HITACHI L-4000A und einem Radioaktivitätsdetektor LB 506 C-1 von Berthold, durchgeführt. Folgende Säule wurde verwendet: Nucleosil 100-5 C18, Octadecylphase (Länge: 250mm, Ø: 4.6mm, Korngrösse: 5 ± 1.5mm, PorenØ: 100Å). Sofern nicht anders vermerkt erfolgten die Analysen mit einem optimierten Gradientenprogramm (Programm A) über 30 Minuten. Als Elutionsmittel wurde TEAP-Puffer/Methanol (0-3min.: 100/0; 3-6min.: 75/25; 6-9min.: 67/33; 9-22min.: 0/100; 22-30min.: 100/0, wobei 0-20min. 1ml/min. und 20-30min. 2ml/min.) verwendet. Als weiteres Programm (Programm B) wurde ein kontinuierlicher Gradient von TEAP-Puffer/Methanol 50/50 bis 0/100 über 30min. gefahren.

4.1.8. UV-VIS-Spektroskopie

Die UV-VIS-Spektren wurden auf einem Beckman DU 640 Spektrophotometer aufgenommen. Die Verbindungen wurden, gelöst in Methanol (Konzentration: 0.001% (M/V)), in Quarzküvetten gemessen. Der Cut-off von Methanol (HPLC-Qualität) lag bei einer Wellenlänge von $\lambda \approx 240$nm.

4.1.9. IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden auf einem Perkin-Elmer FT-IR 16PC aufgenommen. Die Verbindungen wurden in Form eines Kaliumbromid-Presslings gemessen.

4.1.10. NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden auf einem 300MHz Varian Gemini 2000 NMR-Spektrometer aufgenommen. Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Verbindungen in deuteriertem Chloroform ($CDCl_3$) aufgenommen. Das Chloroform-Signal wurde für die H1-Spektren bei 7.26ppm, für die C13-Spektren bei 77.7ppm festgesetzt.

4.1.11. Massenspektrometrie (MS)

Die Aufnahmen der Elektronenspray-Massenspektren erfolgten am PSI auf einem Micromass VG Trio 2000 Operator.

4.1.12. Gamma-Counter

Aktivitätsmessungen im Rahmen der PC, der Bestimmung des Verteilungskoeffizienten und des Affinitätstestes erfolgten auf einem LKB Wallac, 1282 COMPUGAMMA, Universal Gamma Counter.

4.2. Organisch-chemische Synthesen

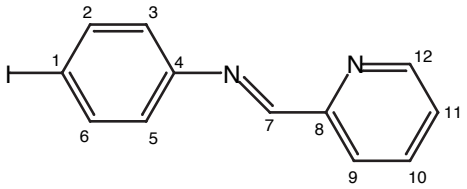
4.2.1. Chelatsysteme

4.2.1.1. Iod-phenyl-pyridinyl-methylenamin: **1**

4.0g (18.3mmol) 4-Iod-anilin wurden in einen 50ml-Zweihalskolben eingewogen und 1.74ml (18.3mmol) 2-Pyridinaldehyd unter Stickstoff zugegeben. Bei einer Ölbadtemperatur von ca. 140°C wurde unter Stickstoff gerührt [23]. Dabei bildete sich eine zähflüssige, braune Masse. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC. Nach ca. 90 Minuten wurde die Reaktion abgebrochen. Im Reaktionsgemisch bildeten sich bereits bei Raumtemperatur einzelne gelb-braune Kristalle. Bei 4°C kristallisierte das Produkt vollständig aus.

DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/Ethylacetat (1/1)	0.50
^{1}H-NMR [ppm]; $CDCl_3$	8.56 (s, 1H, H7) 8.71 (d, 1H), 8.17 (d, 1H) (H9/ H12) 7.81 (t, 1H), 7.39-7.47 (m, 1H) (H10/H11) 7.70-7.75 (m, 2H, H2/H6) 7.01-7.06 (2H, H3/H5)

^{13}C-NMR [ppm]; $CDCl_3$	161.8 (1C)	137.4 (1C)
	155.0 (1C)	126.0 (2C)
	151.3 (1C)	123.8 (2C)
	150.5 (1C)	92.1 (1C)
	139.0 (2C)	



IR [cm^{-1}]; KBr	2924(m)	1622(s)
	2854(w)	1472(s)
	1894(w)	996(m)

UV-VIS [λ_{max}: nm]; CH_3OH 252.7

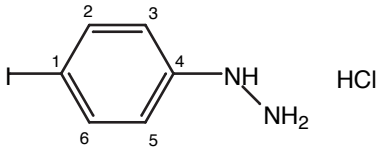
MS-Elektronenspray 331 = M+23; $[C_{12}H_9N_2I]+Na^+$

4.2.1.2. Iod-phenyl-hydrazin-HCl: **2a**

5.0g (22.8mmol) 4-Iod-anilin wurden in einen 100ml-Dreihalskolben eingewogen und in 30ml konz. HCl suspendiert. Bei einer Temperatur von 0°C (NaCl-Eis-Mischung) wurden 1.58g (22.8mmol) Natriumnitrit ($NaNO_2$), gelöst in 10ml dest. Wasser, zugegeben. Die Temperatur erhöhte sich dabei auf 5°C. Es wurde wieder auf 0°C gekühlt und während 15 Minuten unter Stickstoff gerührt. 8.66g (45.6mmol) Zinnchlorid ($SnCl_2$) wurden in 15ml konz. HCl gelöst und zugegeben. Bei Raumtemperatur wurde während 1 Stunde gerührt. Dabei erhöhte sich die Temperatur und es bildete sich eine gelbe Ausfällung. Es wurde abgenutscht und der Rückstand am HV getrocknet.

Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisation. Der Rückstand wurde in 20ml Ethanol unter Rückfluss auf 70-75°C erhitzt. Bei Zugabe von weiteren 50ml Ethanol löste sich praktisch alles. Die gelöste Substanz wurde abdekantiert und abgekühlt, wobei das Produkt ausfiel. Es wurde abgenutscht und am HV getrocknet [24].

^{1}H-NMR [ppm]; D_2O	7.58 (d, 2H, H2/H6)
	6.68 (d, 2H, H3/H5)

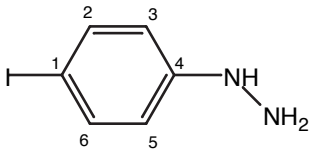


MW	270.5; $[C_6H_7N_2I \cdot HCl]$

4.2.1.3. Iod-phenyl-hydrazin: **2b**

500mg (1.85mmol) Iodphenylhydrazin-HCl wurden in einen 100ml-Weithalskolben gegeben. Durch Zugabe von ca. 80ml NaOH (0.1M) wurde neutralisiert, was an der Ausfällung eines praktisch weissen Produktes sichtbar war. Es wurde dreimal mit je 40ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und dreimal mit je 20ml gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet. Das Produkt wurde am HV getrocknet. Es handelte sich um feine, weiss-gelbe Nadeln.

Smp. [°C];	97
DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/Ethylacetat (1/1)	0.47 und 0.79
^{1}H-NMR [ppm]; $CDCl_3$	7.49 (d, 2H, H2/H6) 6.62 (d, 2H, H3/H5) 5.19 (s, 1H, NH) 3.56 (s, 2H, NH_2)



MS-Elektronenspray	234.9 =M+1; $[C_6H_7NI]+H^+$

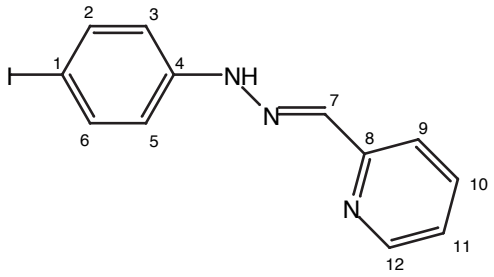
4.2.1.4. Iod-phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin: **3**

200mg (0.85mmol) 4-Iod-phenylhydrazin (**2b**) und 10ml THF wurden in einen 50ml-Zweihalskolben gegeben. 81µl (0.85mmol) 2-Pyridinaldehyd wurden unter Stickstoff zugegeben. Bei Raumtemperatur wurde unter Stickstoff gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC. Nach ca. 12 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen.

Die Reinigung erfolgte mittels SC. Als Elutionsmittel wurde iso-Hexan/Ethylacetat (1/1) verwendet. Das am HV eingeengte Reaktionsgemisch wurde in wenig THF auf die Säule aufgetragen. Die gesammelten Fraktionen wurden am HV getrocknet. Die Ausbeute betrug 91%.

DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/Ethylacetat (1/1)	0.20
DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/THF (1/1)	0.47

DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/THF (2/3)	0.55	
^{1}H-NMR [ppm]; $CDCl_3$	8.55 (d, 1H, H12) 7.96 (t, 2H, H9/H10) 7.78 (s, 1H, H7) 7.69 (t, 1H, H11) 7.56 (d, 2H, H2/H6) 7.20 (t, 1H, NH) 6.93 (d, 2H, H3/H5)	
^{13}C-NMR [ppm]; $CDCl_3$	179.3 (1C) 150.1 (1C) 144.5 (1C) 138.8 (1C) 123.8 (1C) 123.4 (1C)	120.8 (1C) 120.3 (1C) 116.0 (1C) 115.7 (1C) 82.9 (1C) 76.0 (1C)



IR [cm^{-1}]; KBr	2996(m) 1604(m) 1566(vs) 1482(s) 1430(m)	1352(m) 1284(s) 1264(s) 1152(s) 994(m)
UV-VIS [λ_{max}: nm]; CH_3OH	249.4 (rel. Max.) 357.7 (abs. Max.)	
MS-Elektronenspray	324.0 = M+1; $[C_{12}H_{11}N_3I]+H^+$ 345.8 = M+23; $[C_{12}H_{11}N_3I]+Na^+$	

4.2.2. Estradiolderivate 5 und 7

4.2.2.1. 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-estradiol: **5**

100mg (0.34mmol) 17α-Ethinylestradiol wurden in einen 50ml-Zweihalskolben eingewogen. 624mg (2.02mmol) der Verbindung **1**, gelöst in 2ml Dioxan, und 2ml Triethylamin wurden unter Stickstoff zugegeben. 12.9mg (0.068mmol) Kupferiodid (CuI) und 23.9mg

(0.034mmol) Dichloro-bis(triphenylphosphin)-Palladium(II) [$Pd(PPh_3)_2Cl_2$] wurden in je 1ml Dioxan gelöst und zugegeben [19]. Bei Raumtemperatur wurde unter Stickstoff über Nacht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC. Nach ca. 30 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert und am HV eingeengt und getrocknet.

Die Reinigung erfolgte mittels SC. Als Elutionsmittel wurde iso-Hexan/Ethylacetat (3/2) verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde in wenig Dichlormethan auf die Säule aufgetragen. Die gesammelten Fraktionen wurden am HV getrocknet.

DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/Ethylacetat (1/1)	0.20
DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/Ethylacetat (3/2)	0.12
MW	476.6; [$C_{32}H_{32}N_2O_2$]

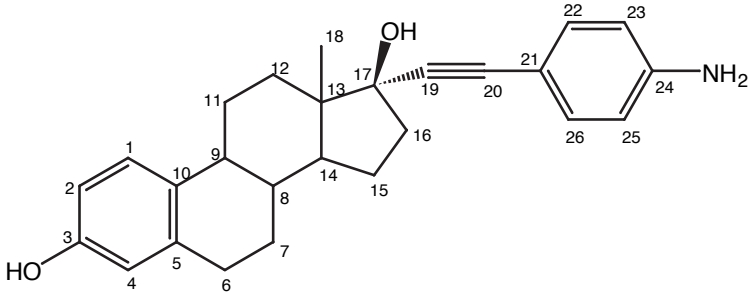
4.2.2.2. 17α-(ethinyl-phenylamin)-17β-estradiol: **4**

500mg (1.69mmol) 17α-Ethinylestradiol wurden in einen 100ml-Zweihalskolben eingewogen. 2.2g (10.12mmol) 4-Iodanilin, gelöst in 10ml Dioxan, und 10ml Triethylamin wurden unter Stickstoff zugegeben. 64.4mg (0.34mmol) Kupferiodid (CuI) und 118.6mg (0.17mmol) Dichloro-bis(triphenylphosphin)-Palladium(II) [$Pd(PPh_3)_2Cl_2$] wurden in je 5ml Dioxan gelöst und zugegeben [19]. Das Reaktionsgemisch verfärbte sich von gelb nach rot. Bei Raumtemperatur wurde unter Stickstoff gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC. Nach ca. 12 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde vom schwarzen Rückstand abpipettiert, in einen Einhalskolben überführt und am HV eingeengt.

Die Reinigung erfolgte mittels SC. Als Elutionsmittel wurde iso-Hexan/Ethylacetat (1/1) verwendet. Das am HV eingeengte Reaktionsgemisch wurde in wenig Dichlormethan auf die Säule aufgetragen. Die gesammelten Fraktionen wurden am HV getrocknet. Die Ausbeute betrug 57.4%.

DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/Ethylacetat (1/1)	0.50
DC [R_f-Wert]; Dichlormethan/Methanol (9/1)	0.50
^{1}H-NMR [ppm]; $CDCl_3$	7.25 (d, 2H, H22/H26) 7.17 (d, 1H, H4) 6.55-6.64 (m, 4H, H1/H2/H23/H25) 4.63 (s, 1H, OH) 3.78 (s, 2H, NH_2) 2.74-2.92 (m, 2H, Steroid) 1.20-2.44 (m, 14H, Steroid) 0.92 (s, 3H, H18)

^{13}C-NMR [ppm]; $CDCl_3$	154.0 (1C)	50.3 (1C)
	174.2 (1C)	48.3 (1C)
	139.0 (1C)	44.3 (1C)
	133.7 (2C)	40.2 (1C)
	133.4 (1C)	39.7 (1C)
	127.6 (1C)	33.7 (1C)
	115.9 (1C)	30.4 (1C)
	115.4 (2C)	27.9 (1C)
	113.3 (1C)	27.2 (1C)
	113.1 (1C)	23.6 (1C)
	91.1 (1C)	14.9 (1C)
	81.1 (1C)	13.6 (1C)



IR [cm^{-1}]; KBr	2926(m)	1286(m)
	2860(w)	1250(m)
	1610(m)	1050(w)
	1512(m)	1014(w)

UV-VIS [λ_{max}: nm]; CH_3OH 271.0

MS-Elektronenspray 410.1 = M+23; $[C_{26}H_{29}NO_2]+Na^+$

4.2.2.3. 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-estradiol: **5**

200mg (0.52mmol) der Verbindung **4** wurden in einen 50ml-Zweihalskolben eingewogen. Unter Stickstoff wurden 6ml trockenes Methanol und 98µl (1.032mmol) 2-Pyridinaldehyd zugegeben. Bei Raumtemperatur wurde unter Stickstoff gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC. Das Reaktionsgemisch veränderte seine Farbe nach wenigen Minuten von rotbraun nach gelb. Die Reaktion wurde nach ca. 3 Stunden abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde am HV eingeengt. Der Rückstand war eine ölige Substanz, die stark nach 2-Pyridinaldehyd roch.

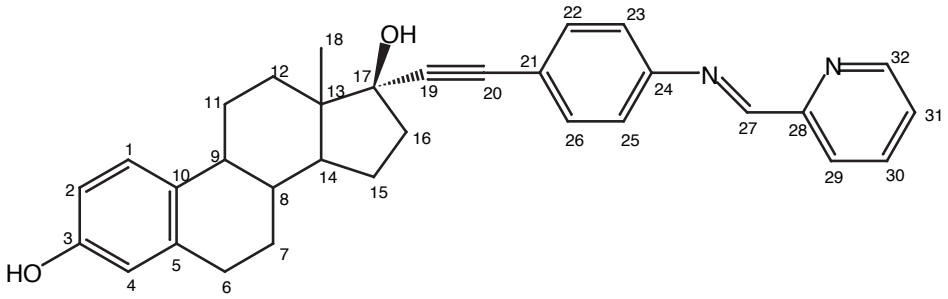
Zur Entfernung des überschüssigen 2-Pyridinaldehyds wurden ca. 5ml dest. Wasser zugegeben. Das klebrige Produkt wurde durch Behandlung im Ultraschallbad in ein feines, beiges Pulver überführt. Das Produkt wurde abgenutscht und am HV getrocknet.

DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/Ethylacetat (1/1) 0.42

DC [R_f-Wert]; Dichlormethan/Methanol (9/1) 0.63

^{1}H-NMR [ppm]; $CDCl_3$	8.80 (d, 0.19H, H29, cis) 8.71 (d, 0.81H, H29, trans) 8.61 (s, 1H, H27) 8.22 (d, 0.81H, H32, trans) 7.98 (d, 0.19H, H32, cis) 7.72-7.94 (m, 1H) 7.27-7.58 (m, 1H) (H30/H31) 7.46 (d, 2H, H22/H26) 7.21 (d, 2H, H23/H25) 7.14 (d, 1H, H4) 6.48-6.70 (m, 2H, H1/H2) 1.00-3.85 (m, 17H, Steroid) 0.94 (s, 3H, H18)

^{13}C-NMR [ppm]; $CDCl_3$	161.7 (1C)	116.2 (1C)
	161.3 (1C)	115.9 (1C)
	154.4 (1C)	113.6 (1C)
	150.5 (1C)	113.3 (1C)
	150.1 (1C)	50.7 (1C)
	138.9 (1C)	48.4 (1C)
	137.5 (1C)	46.5 (1C)
	133.2 (1C)	44.5 (1C)
	132.9 (1C)	44.2 (1C)
	127.3 (1C)	40.0 (1C)
	127.1 (1C)	33.8 (1C)
	126.2 (1C)	30.4 (1C)
	123.0 (1C)	27.1 (1C)
	122.5 (1C)	23.6 (1C)
	122.0 (1C)	13.7 (1C)
	121.8 (1C)	9.6 (1C)



IR [cm^{-1}]; KBr	2928(m)	1286(w)
	2866(w)	1248(w)
	1620(m)	1056(w)
	1502(s)	1004(w)

UV-VIS [λ_{max}: nm]; CH_3OH	277.2
MS-Elektronenspray	499.2 = M+23 $[C_{32}H_{32}N_2O_2]+Na^+$

4.2.2.4. 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin)-17β-estradiol: **7**

50mg (0.17mmol) 17α-Ethinylestradiol wurden in einen 50ml-Zweihalskolben eingewogen. 109.0mg (0.34mmol) der Verbindung **3**, gelöst in 1ml Dioxan, und 1ml Triethylamin wurden unter Stickstoff zugegeben. 6.5mg (0.04mmol) Kupferiodid (CuI) und 11.9mg (0.02mmol) Dichloro-bis(triphenylphosphin)-Palladium(II) $[Pd(PPh_3)_2Cl_2]$ wurden in je 0.5ml Dioxan gelöst und zugegeben [19]. Bei Raumtemperatur wurde unter Stickstoff gerührt. Die Reaktion wurde mittels DC verfolgt. Nach ca. 4 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen.

Die Reinigung erfolgte mittels SC. Als Elutionsmittel wurde iso-Hexan/THF (2/3) verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde am HV etwas eingeengt und auf die Säule aufgetragen. Es zeigte sich, dass das Produkt nicht separat abgetrennt werden konnte. Die Fraktionen wurden am HV getrocknet. Es handelte sich um eine rot-schwarze, ölige Substanz.

Es wurden ca. 3ml dest. Wasser zugeben. Nach Rühren und Behandlung im Ultraschallbad wurde abgenutscht und der Rückstand am HV getrocknet.

Die weitere Reinigung des Produktes erfolgte mittels präparativer DC, wobei als Elutionsmittel iso-Hexan/THF (2/3) verwendet wurde. Die leuchtend gelbe Bande wurde aus der DC-Platte isoliert und in einen 50ml-Weithalskolben gegeben. Nach Zugabe von ca. 5ml THF wurde während ca. 1 Stunde gerührt. Das Kieselgel wurde abgenutscht und das Filtrat am HV eingeengt und getrocknet. Die Ausbeute betrug 34.5%.

DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/THF (2/3)	0.33
DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/THF (1/1)	0.23
MW	491.6; $[C_{32}H_{33}O_2N_3]$

4.2.2.5. 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenhydrazin)-17β-estradiol: **7**

100mg (0.34mmol) 17α-Ethinylestradiol wurden in einen 50ml-Zweihalskolben eingewogen. 157.9mg (0.67mmol) 4-Iodphenylhydrazin (**2a**), gelöst in 2ml Dioxan, und 2ml Triethylamin wurden unter Stickstoff zugegeben. 12.9mg (0.067mmol) Kupferiodid (CuI) und 23.9mg (0.034mmol) Dichloro-bis(triphenylphosphin)-Palladium(II) $[Pd(PPh_3)_2Cl_2]$ wurden in je 1ml Dioxan gelöst und zugegeben [19]. Das Reaktionsgemisch wurde vorerst rot und änderte die Farbe nach gelb. Bei Raumtemperatur wurde über Nacht unter Stickstoff gerührt. Die Reaktion wurde mittels DC verfolgt. Nach ca. 18 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde durch Celite filtriert und mit Dioxan gespült. Das Filtrat war eine orangefarbene klare Flüssigkeit.

Das Filtrat wurde sogleich mit 64µl (0.67mmol) 2-Pyridinaldehyd umgesetzt. Bei Raumtemperatur wurde unter Stickstoff gerührt. Die Reaktion wurde mittels DC verfolgt. Nach 4 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen.

Die Reinigung erfolgte mittels SC, wobei als Elutionsmittel iso-Hexan/THF (1/1) verwendet wurde. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden vereinigt und das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen. Die Ausbeute betrug 13.7%.

DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/Ethylacetat (2/3) **6**	0.27
DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/THF (1/1) **7**	0.23
MS-Elektronenspray	492.1 = M+1; $[C_{32}H_{33}N_3O_2]+H^+$ (54%)

4.2.3. Testosteronderivat 9

4.2.3.1. 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenymin)-17β-testosteron: **9**

150mg (0.48mmol) 17α-Ethinyltestosteron wurden in einen 50ml-Zweihalskolben eingewogen. 221.9mg (0.72mmol) der Verbindung **1**, gelöst in 3ml Dioxan, und 3ml Triethylamin wurden unter Stickstoff zugegeben. 18.3mg (0.10mmol) Kupferiodid (CuI) und 33.7mg (0.005mmol) Dichloro-bis(triphenylphosphin)-Palladium(II) $[Pd(PPh_3)_2Cl_2]$ wurden in je 1.5ml Dioxan gelöst und zugegeben [19]. Bei Raumtemperatur wurde unter Stickstoff gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC. Nach ca. 5 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde genutscht, um die ausgefallene Substanz zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde mit Stickstoff abgeblasen. Bei Zugabe von THF fiel wiederum eine weisse Substanz aus, die abgenutscht werden musste.

Die Reinigung erfolgte mittels SC. Als Elutionsmittel wurde iso-Hexan/Ethylacetat (1/1) verwendet. Das Filtrat wurde etwas eingeengt und auf die Säule aufgetragen. Die gesammelten Fraktionen wurden am HV getrocknet. Die Substanz war von öliger Konsistenz. Es wurden ca. 3ml dest. Wasser zugegeben und das Produkt durch Behandlung im Ultraschallbad in ein feines, fast weisses Pulver überführt. Es wurde abgenutscht und am HV getrocknet.

DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/Ethylacetat (1/1)	0.38
MW	492.7; $[C_{33}H_{36}O_2N_2]$

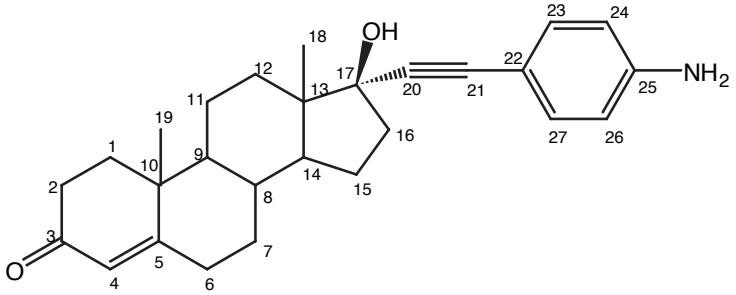
4.2.3.2. 17α-(ethinyl-phenylamin)-17β-testosteron: **8**

200mg (0.64mmol) 17α-Ethinyltestosteron wurden in einen 50ml-Zweihalskolben eingewogen. 280.3mg (1.28mmol) 4-Iodanilin, gelöst in 4ml Dioxan, und 4ml Triethylamin wurden unter Stickstoff zugegeben. 24.6mg (0.13mmol) Kupferiodid (CuI) und 44.9mg (0.06mmol) Dichloro-bis(triphenylphosphin)-Palladium(II) $[Pd(PPh_3)_2Cl_2]$ wurden in je 2ml Dioxan gelöst und zugegeben [19]. Bei Raumtemperatur wurde unter Stickstoff gerührt. Die Reaktion wurde

mittels DC verfolgt. Nach ca. 2 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde vom schwarzen Rückstand abpipettiert und in einen Einhalskolben überführt.

Die Reinigung erfolgte mittels SC. Als Elutionsmittel wurde iso-Hexan/Ethylacetat (1/1) verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde am HV etwas eingeengt und auf die Säule aufgetragen. Die gesammelten Fraktionen wurden am HV getrocknet. Die Ausbeute betrug 65.3%.

DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/Ethylacetat (1/1)	0.44
^{1}H-NMR [ppm]; $CDCl_3$	7.21 (d, 2H, H23/H27) 6.58 (d, 2H, H24/H26) 5.73 (s, 1H, H4) 3.80 (s, 2H, NH_2) 0.81-2.52 (m, 14H, Steroid) 1.20 (s, 3H, H19) 0.92 (s, 3H, H18)



IR [cm^{-1}]; KBr	2938(m)	1278(w)
	1656(vs)	1234(w)
	1610(s)	1018(w)
	1514(s)	912(w)
UV-VIS [λ_{max}: nm]; CH_3OH	270.5	
MS-Elektronenspray	426.2 = M+23; $[C_{27}H_{33}NO_2]+Na^+$	

4.2.3.3. 17α-(ethinyl-phenyl-pyridinyl-methylenamin)-17β-testosteron: **9**

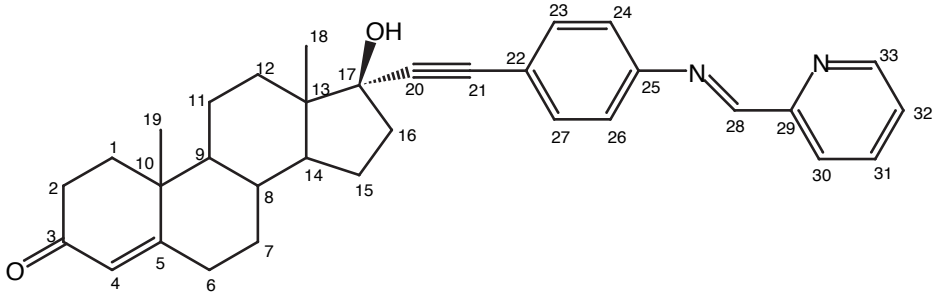
160mg (0.40mmol) der Verbindung **8** wurden in einen 50ml-Zweihalskolben eingewogen. Unter Stickstoff wurden 5ml THF und 75µl (0.80mmol) 2-Pyridinaldehyd zugegeben. Bei Raumtemperatur wurde unter Stickstoff gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC. Die Reaktion wurde nach ca. 1.5 Stunden abgebrochen. Das Lösungsmittel wurde am HV abgedampft. Der Rückstand war eine feste, gelbe Substanz, die stark nach 2-Pyridinaldehyd roch.

Zur Entfernung des überschüssigen 2-Pyridinaldehyds wurden ca. 4ml dest. Wasser zugegeben. Das klebrige Produkt wurde durch Behandlung im Ultraschallbad in ein feines beiges Pulver überführt. Das Produkt wurde abgenutscht und am HV getrocknet.

DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/Ethylacetat (1/1) 0.32

^{1}H-NMR [ppm]; $CDCl_3$

8.80 (d, 0.18H, H30, cis)
8.71 (d, 0.82H, H30, trans)
8.58 (s, 1H, H28)
8.19 (d, 0.82H, H33, trans)
7.97 (d, 0.18H, H33, cis)
7.78-7.92 (m, 1H),
7.34-7.42 (m, 1H) (H31/H32)
7.45 (d, 2H, H23/H27)
7.21 (d, 2H, H24/H26)
5.73 (s, 1H, H4)
0.80-2.60 (16H, Steroid)
1.21 (s, 3H, H19)
0.95 (s, 3H, H18)



^{13}C-NMR [ppm]; $CDCl_3$

200.2 (1C)	80.8 (1C)
179.4 (1C)	65.5 (1C)
171.8 (1C)	54.2 (1C)
161.9 (1C)	51.1 (1C)
161.4 (1C)	47.9 (1C)
154.9 (1C)	39.6 (1C)
150.7 (1C)	39.3 (1C)
150.2 (1C)	34.7 (1C)
137.3 (1C)	34.1 (1C)
133.3 (1C)	33.6 (1C)
128.6 (1C)	32.4 (1C)
126.2 (1C)	31.9 (1C)
124.6 (1C)	24.1 (1C)
122.9 (1C)	21.5 (1C)
114.3 (1C)	18.0 (1C)
93.8 (1C)	13.6 (1C)
86.5 (1C)	

IR [cm^{-1}]; KBr	2934(m)	1274(w)
	2854(w)	1248(w)
	1670(s)	1070(w)
	1654(s)	1008(w)
UV-VIS [λ_{max}]; CH_3OH	276.3	
MS-Elektronenspray	515.0 = M+23; $[C_{33}H_{36}O_2N_2]+Na^+$	

4.3. Rhenium-Komplexe

4.3.1. [ReBr(5)(CO)$_3$] 12a

50.0mg (0.10mmol) der Verbindung **5** wurden in einen 50ml-Zweihalskolben eingewogen und 1ml Methanol zugegeben. 80.7mg (0.10mmol) Rhenium-Tricarbonyl-Prekursor (**10**) wurden in 2ml Methanol gelöst und zugegeben. Die Farbe änderte sich innert Minuten von gelb nach dunkelorange. Bei Raumtemperatur wurde unter Stickstoff gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC. Nach 1 Stunde wurde die Reaktion abgebrochen.

Die Reinigung erfolgte mittels SC. Als Elutionsmittel wurde iso-Hexan/THF (1/4) verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde am HV eingeengt. Es wurde wenig THF zugegeben und filtriert. Das durchsichtige rote Filtrat wurde auf die Säule aufgetragen. Die gesammelten Fraktionen wurden am HV getrocknet. Die Konsistenz des Produktes blieb ölartig.

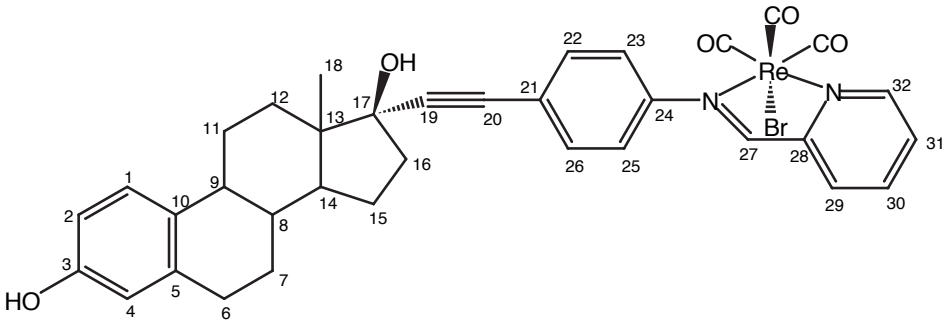
Die Substanz wurde in ca. 3ml Methanol gelöst und in ein Penicillinfläschchen überführt. Es wurden ca. 1ml dest. Wasser zugegeben und das Penicillinfläschchen offen stehen gelassen. Das Methanol verdunstete während sich feine orange-rote Nadeln bildeten. Es wurde abgenutscht und der Rückstand am HV getrocknet.

DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/THF (1/4)	0.64
DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/THF (1/2)	0.48
DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/THF (2/3)	0.28

HPLC [R_t in min.]; TEAP-Puffer (pH 2.5)/Methanol 22.4 (91%) UV-254nm

^{1}H-NMR [ppm]; $CDCl_3$	9.08 (d, 1H, H29) 8.76 (s, 1H, H27) 7.99-8.11 (m, 2H), 7.57-7.64 (m, 1H) (H30/H31/H32) 7.56 (d, 2H, H22/H26) 7.47 (d, 2H, H23/H25) 7.15 (d, 1H, H4) 6.53-6.66 (m, 2H, H1/H2) 2.81 (s, 2H, Steroid) 1.32-2.52 (m, 15H, Steroid) 0.94 (s, 3H, H18)

^{13}C-NMR [ppm]; $CDCl_3$	195.7 (1C)	113.2 (1C)
	186.3 (1C)	96.0 (1C)
	166.5 (1C)	85.5 (1C)
	166.2 (1C)	81.1 (1C)
	155.8 (1C)	50.4 (1C)
	154.3 (1C)	48.4 (1C)
	154.0 (1C)	44.4 (1C)
	150.8 (1C)	44.8 (1C)
	139.5 (1C)	40.0 (1C)
	133.6 (2C)	33.9 (1C)
	129.6 (1C)	30.3 (1C)
	127.3 (1C)	27.9 (1C)
	125.3 (1C)	23.7 (1C)
	123.0 (2C)	16.8 (1C)
	116.1 (1C)	13.6 (1C)
	115.8 (1C)	9.6 (1C)
	113.5 (1C)	



IR [cm^{-1}]; KBr	2928(m)	1718(w)
	2022(vs)	1562(m)
	1922(vs)	1182(m)
	1898(vs)	1034(m)

UV-VIS [λ_{max}]; CH_3OH	250.7 (abs. Max.) 349.8 (rel. Max.)

MW 826.7; $[ReBr(C_{32}H_{32}N_2O_2)(CO)_3]$

4.3.2. [ReBr(9)(CO)$_3$] 14a

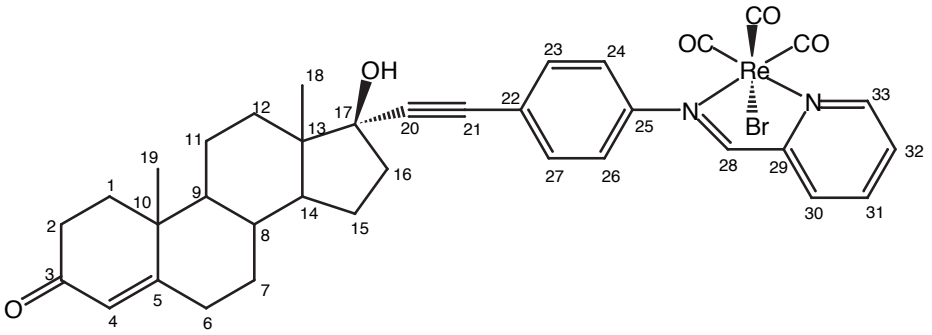
25.0mg (0.051mmol) der Verbindung **9** wurden in einen 50ml-Zweihalskolben eingewogen und 0.5ml Methanol zugegeben. 39.0mg (0.051mmol) Rhenium-Tricarbonyl-Prekursor (**10**) wurden in 0.5ml Methanol gelöst und zugegeben. Die Farbe änderte sich innert Minuten von gelb nach orange. Bei Raumtemperatur wurde unter Stickstoff gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC. Nach 1 Stunde wurde die Reaktion abgebrochen.

Die Reinigung erfolgte mittels SC. Als Elutionsmittel wurde iso-Hexan/THF (1/2) verwendet. Das am HV eingeengte Reaktionsgemisch wurde auf die Säule aufgetragen. Die gesammelten Fraktionen wurden am HV getrocknet. Es wurden ca. 2ml dest. Wasser zum öligen Rückstand gegeben. Nach Rühren und Behandlung im Ultaschallbad wurde abgenutscht. Der Rückstand wurde am HV getrocknet.

DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/THF (1/2)	0.48
DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/THF (2/3)	0.28
DC [R_f-Wert]; iso-Hexan/Ethylacetat (1/4)	0.17

HPLC [R_t in min.]; TEAP-Puffer (pH 2.5)/Methanol 22.8 (75%) UV-254nm

^{1}H-NMR [ppm]; $CDCl_3$	9.12 (d, 1H, H30) 8.76 (s, 1H, H28) 8.02-8.18 (m, 2H), 7.60-7.75 (m, 1H) (H31/H32/H33) 7.55 (d, 2H, H23/H27) 7.48 (d, 2H, CH24/H26) 5.74 (s, 1H, H4) 0.06-3.55 (20H, Steroid) 1.22 (s, 3H, H19) 0.96 (s, 3H, H18)



IR [cm^{-1}]; KBr	2924(m)	1654(s)
	2854(w)	1262(w)
	2022(vs)	1054(w)
	1898(vs)	1020(w)
UV-VIS [λ_{max}]; CH_3OH	244.7 (abs. Max.)	
	345.6 (rel. Max.)	
MW	842.8; $[ReBr(C_{33}H_{36}N_2O_2)(CO)_3]$	

4.4. Technetium99m-Komlexe

4.4.1. $[^{99m}TcCl(5)(CO)_3]$ 12b

400µl einer 10^{-3}M Stammlösung der Verbindung **5** in DMSO wurden in ein Penicillinfläschchen gegeben, dieses verschlossen, und die Lösung während ca. 5 Minuten mit Stickstoff begast. 150µl einer Lösung des Technetium-Tricarbonyl-Prekursors (**11**) wurden zugegeben und während 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels HPLC.

HPLC [R_t in min.]; TEAP-Puffer (pH 2.5)/Methanol 22.0 (87%) aktiv

4.4.2. $[^{99m}TcCl(9)(CO)_3]$ 14b

400µl einer 10^{-3}M Stammlösung der Verbindung **9** in DMSO wurden in ein Penicillinfläschchen gegeben, dieses verschlossen, und die Lösung während ca. 5 Minuten mit Stickstoff begast. 150µl einer Lösung des Technetium-Tricarbonyl-Prekursors (**11**) wurden zugegeben und während 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels HPLC.

HPLC [R_t in min.]; TEAP-Puffer (pH 2.5)/Methanol 22.0 (75%) aktiv

4.4.3. Reinigung der Verbindungen 12b und 14b

Die Auftrennung mittels HPLC-Programm A zeigte für die Verbindungen **12b** bzw. **14b** im Aktivdetektor und für die Verbindungen **5** bzw. **9** im UV-Detektor (254nm) praktisch die gleiche Retentionszeit (Fig.34). Es musste deshalb ein Gradientensystem etabliert werden, welches erlaubte, die mit dem Technetium-Tricarbonyl-Prekursor (**11**) markierten Verbindungen **12b** bzw. **14b** von den nicht-markierten Verbindungen **5** bzw.**9** zu trennen.

Als Elutionsmittel wurde wie beim Programm A ein TEAP-Puffer (pH 2.5)/Methanol-Gemisch verwendet. Mit einem Gradientenprogramm von 50%/50% bis 0%/100% über 30 Minuten wurde eine Trennung der Signale für die Verbindungen **12b** bzw. **14b** (R_t = 20 Minuten, Aktivdetektor) und die Verbindungen **5** bzw. **9** (R_t = 16 Minuten, UV-Detektor) erhalten (Fig.35).

Mit diesem Trennsystem konnte die Fraktion der markierten Verbindungen **12b** bzw. **14b** gesammelt und damit von den nicht-markierten Verbindungen **5** bzw. **9** abgetrennt werden.

4.5. Stabilitätsprüfungen

4.5.1. Puffer-Stabilität

Die Stabilität der Verbindungen **12b** bzw. **14b** wurde in Phosphatpuffer (PP) (0.1M) pH 7.4 bzw. pH 5.8 und PBS-Puffer (1x) pH 7.4 bzw. pH 8.5 geprüft.

80µl Ausgangslösung in 400µl Puffer wurden bei 37°C inkubiert. Nach 1, nach 4 und nach 24 Stunden wurden die Verbindungen mittels HPLC analysiert.

Die Auftrennung mittels HPLC-Standardprogramm ergab folgende Retentionszeiten: für ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyl (**11**) 4.7 Minuten, für Natrium-Pertechnetat [Na][TcO_4] 10.5 Minuten und für die Verbindung **12b** bzw. **14b** ca. 22 Minuten.

4.5.2. Plasma-Stabilität

100µl der in PBS-Puffer pH 7.4 gesammelten Fraktion der Verbindung **12b** bzw. **14b** (für das System Methanol/HCl wurde die Ausgangslösung inkubiert) und 100µl Plasma wurden bei 37°C inkubiert. Nach 1, nach 4 und nach 24 Stunden wurde die Stabilität mittels PC überprüft. Als Elutionsmittel wurde Aceton bzw. 0.9%ige NaCl-Lösung bzw. Methanol/HCl 6M (95.5/0.5) verwendet.

Zum Vergleich der R_f-Werte wurde die PC mit der gesammelten Fraktion der Verbindung **12b** bzw. **14b** (für das System Methanol/HCl wurde die Ausgangslösung verwendet) ohne Inkubation in Plasma durchgeführt. Die R_f-Werte sind der Tab. 7 zu entnehmen.

Tab. 7: R_f-Werte von **12b** bzw. **14b** in verschiedenen Elutionsmitteln

Verbindung	Elutionsmittel	R_f-Wert
12b	Aceton	0.98
12b in Plasma	Aceton	0.02
12b	Methanol/HCl	0.87
12b in Plasma	Methanol/HCl	0.02
12b	NaCl 0.9%	0.02
12b in Plasma	NaCl 0.9%	0.02
14b	Aceton	0.98
14b in Plasma	Aceton	0.02
14b	Methanol/HCl	0.98
14b in Plasma	Methanol/HCl	0.02
14b	NaCl 0.9%	0.02
14b in Plasma	NaCl 0.9%	0.02

Zusätzlich wurde die PC mit Natrium-Pertechnetat [Na][TcO_4] bzw. mit dem ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyl-Prekursor (**11**) durchgeführt. Die PC wurde mit den reinen Lösungen und nach Inkubation in Plasma bei 37°C durchgeführt. Die R_f-Werte sind der Tab. 8 zu entnehmen.

Tab. 8: R_f-Werte des Natrium-Pertechnetats bzw. Technetium-Tricarbonyl-Prekursors (**11**) in verschiedenen Elutionsmitteln

Verbindung	Elutionsmittel	R_f-Wert
$NaTcO_4$	Aceton	0.98
$NaTcO_4$ in Plasma	Aceton	0.98
$NaTcO_4$	Methanol/HCl	0.43
$NaTcO_4$ in Plasma	Methanol/HCl	0.54
$NaTcO_4$	NaCl 0.9%	0.54
$NaTcO_4$ in Plasma	NaCl 0.9%	0.65
$Tc(OH_2)_3(CO)_3$	Aceton	0.02
$Tc(OH_2)_3(CO)_3$ in Plasma	Aceton	0.02
$Tc(OH_2)_3(CO)_3$	Methanol/HCl	0.76
$Tc(OH_2)_3(CO)_3$ in Plasma	Methanol/HCl	0.02
$Tc(OH_2)_3(CO)_3$	NaCl 0.9%	0.76
$Tc(OH_2)_3(CO)_3$ in Plasma	NaCl 0.9%	0.87

4.6. Verteilung

4.6.1. Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient

Zur Bestimmung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (log $D_{pH\ 7.4}$) wurde Ausgangslösung mittels HPLC aufgetrennt, und die Fraktion (ca. 1ml) der markierten Steroidderivate **12b** bzw.**14b** in 1ml PBS (1x) pH 7.4 gesammelt. Die Reinheitskontrolle der gesammelten Fraktion erfolgte mittels HPLC, wobei nur noch das Signal der markierten Verbindungen **12b** bzw. **14b** mit einer Retentionszeit von ca. 22 Minuten erschien.

Nach Zugabe von 2ml Octanol wurde während ca. 1 Minute geschüttelt und anschliessend während 5 Minuten zentrifugiert. Für die Bestimmung A wurden von jeder Phase 3 mal 10µl im Gammacounter gemessen. Für die Bestimmung B wurden 1.5ml der Octanol-Phase (A) zu 1.5ml PBS (1x) pH 7.4 gegeben. Nach Schütteln und Zentrifugation wurden wiederum von jeder Phase 3 mal 10µl im Gammacounter gemessen. Für die Bestimmung C wurden 1ml der Octanol-Phase (B) zu 1ml PBS (1x) pH 7.4 gegeben und analog der Bestimmung B verfahren.

4.6.2. Stabilitätskontrolle

Die Octanol-Phasen und die Wasser-Phasen der Bestimmung C für die Verbindungen **12b** bzw. **14b** wurden zur Stabilitätskontrolle mittels HPLC aufgetrennt.

Für den Estradiolkomplex (**12b**) zeigte die Auftrennung der Wasser-Phase, dass nur noch 60% der Verbindung **12b** vorhanden waren, während die restlichen 40% in Natrium-Pertechnetat zerfallen waren. Die Auftrennung der Octanol-Phase zeigte 44% Natrium-Pertechnetat, 28% der Verbindung **12b** und unmittelbar danach ein Doppelsignal (R_t = 22.2min.), welches ebenfalls 28% ausmachte.

Für das Testosteronderivat zeigte die Auftrennung der Wasser-Phase, dass noch 89% der Verbindung **14b** vorhanden waren. 4% waren in Natrium-Pertechnetat zerfallen, während 7% ein

unbekanntes Zerfallsprodukt (R_t = 18.9min.) darstellten. Die Auftrennung der Octanol-Phase zeigte für die Verbindung **14b** ein Signal, das 60% ausmachte. 14% erschienen in einem Signal unmittelbar vorher (R_t = 18.9min.) und 26% unmittelbar nachher (R_t = 22.2min.).

4.7. Affinitätstest

Das mit dem ^{99m}Tc-Technetium-Tricarbonyl-Prekursor (**11**) markierte Estradiolderivat (**12b**) wurde auf seine Affinität geprüft. Das zur Verfügung stehende Testsystem bestand aus einem Estradiol-Antikörper, der für die Position C-17 des Steroidgerüstes spezifisch war. Ob die Verbindung **12b** trotz Derivatisierung an der Position C-17α vom genannten Antikörper gebunden werden konnte, war ungewiss.

Die Durchführung des Affinitätstests erfolgt mit der mittels HPLC-Programm B isolierten Verbindung **12b**.

4.7.1. Variante 1

Nach Inkubation der Verbindung **12b** und Antikörper sollte die Bestimmung der an den Antikörper gebundenen Fraktion erfolgen. Vorerst musste jedoch die nicht-gebundene Fraktion abgetrennt werden. Dies sollte durch Zugabe einer Kohlesuspension geschehen, indem die freie Fraktion von der Kohle gebunden und durch die darauffolgende Zentrifugation abgetrennt werden sollte.

In einem Vorversuch wurde getestet, ob die Abtrennung der mittels HPLC-Programm B isolierten Komplexe **12b** bzw. **14b** durch Kohlesuspension und anschliessender Zentrifugation effektiv war..

Die pipettierten Ansätze sind den Tab. 9 und 10 zu entnehmen.

Tab. 9: Affinitätstest, Variante 1: Abtrennung des Estradiolkomplexes **12b** durch Kohlesuspension.

Ansatz	12b	PBS-Puffer pH 7.4 + 0.05% Tween 80	Kohlesuspension
1	100µl	900µl	-
2	100µl	600µl	300µl
3	100µl	300µl	600µl

Tab. 10: Affinitätstest, Variante 1: : Abtrennung des Testosteronkomplexes **14b** durch Kohlesuspension.

Ansatz	14b	PBS-Puffer pH 7.4 + 0.05% Tween 80	Kohlesuspension
4	100µl	900µl	-
5	100µl	600µl	300µl
6	100µl	300µl	600µl

Alle Ansätze wurden auf dem Vortex gemischt und bei Raumtemperatur während 30 Minuten inkubiert. Die Ansätze 2, 3, 5 und 6 wurden während 10 Minuten zentrifugiert (10000U/min.). Von jedem Ansatz wurden 3 mal 50µl der Lösung bzw. des Überstandes im Gammacounter gemessen.

4.7.2. Variante 2

Die Abtrennung der gebundenen Fraktion und die anschliessende Messung der nicht-gebundenen Fraktion stellte eine indirekte Möglichkeit zur Bestimmung der Bindungsaffinität dar. Durch Zugabe eines Anti-Antikörpers, welcher abzentrifugiert werden konnte, sollte der Antikörper und damit die an ihn gebundene Fraktion der Verbindung **12b** abgetrennt werden. Durch Messung des Überstandes sollte anschliessend bestimmt werden, wieviele Prozent noch vorhanden resp. nicht-gebunden waren. Aus dem Anteil der nicht-gebundenen Fraktion sollte dann die gebundene Fraktion berechnet werden.

Die markierte Verbindung **12b** wurde in I: 0.5ml PBS-Puffer (1x) pH 7.4 mit 0.05% Tween 80 bzw. in II: 0.5ml Gelatine-Puffer gesammelt.

Die Estradiol-Antikörper bzw. Anti-Estradiol-Antikörper wurden in A: 5ml PBS-Puffer (1x) pH 7.4 mit 0.05% Tween 80, B: 10ml PBS-Puffer (1x) pH 7.4 mit 0.05% Tween 80, C: 5ml-Gelatine-Puffer, D: 10ml-Gelatine-Puffer gelöst.

Die pipettierten Ansätze sind der Tab.11 zu entnehmen.

Tab. 11: Affinitätstest Variante 2; pipettierte Ansätze.

Ansatz	12b	Puffer: PBS/Tween (a) Gelatine (b)	Estradiol-Antikörper	Anti-Estradiol-Antikörper
1	I: 100µl	a: 900µl	-	-
2	I: 100µl	a: 800µl	A: 100µl	-
3	I: 100µl	a: 700µl	A: 100µl	A: 100µl
4	I: 100µl	a: 600µl	A: 100µl	A: 200µl
5	I: 100µl	a: 900µl	-	-
6	I: 100µl	a: 800µl	B: 100µl	-
7	I: 100µl	a: 700µl	B: 100µl	B: 100µl
8	I: 100µl	a: 600µl	B: 100µl	B: 200µl
9	II: 100µl	b: 900µl	-	-
10	II: 100µl	b: 800µl	C: 100µl	-
11	II: 100µl	b: 700µl	C: 100µl	C: 100µl
12	II: 100µl	b: 600µl	C: 100µl	C: 200µl
13	II: 100µl	b: 900µl	-	-
14	II: 100µl	b: 800µl	D: 100µl	-
15	II: 100µl	b: 700µl	D: 100µl	D: 100µl
16	II: 100µl	b: 600µl	D: 100µl	D: 200µl

Alle Ansätze wurden auf dem Vortex gemischt und bei Raumtemperatur während 60 Minuten inkubiert. Die Ansätze 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16 wurden während 10 Minuten zentrifugiert (10000U/min.). Von jedem Ansatz wurden zweimal 100µl der Lösung bzw. des Überstandes gemessen.

5. Literatur

[1] J. R. Dilworth, S. J. Parrott, „The biomedical chemistry of technetium and rhenium“, Chem. Soc. Reviews 1998, 27, 43.

[2] T. Schaub, „Nuklearmedizin“, Thieme 1990

[3] R. Alberto, R. Schibli, A. Egli, P. A. Schubiger, W. A. Herrmann, G. Artus, U. Abram, T. A. Kaden, „Metal carbonyl syntheses; low pressure carbonylation of $[MOCl_4]^-$ and $[MO_4]^-$, M = Tc, Re, $[NEt_4]_2[MCl_3(CO)_3]$“, J. Organomet. Chem. 1995, 493, 119.

[4] Patent Appl. Eur. Pat. Nr. 972012322

[5] R. Alberto, R. Schibli, A. Egli, P. A. Schubiger, U. Abram, T. A. Kaden, „A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of $[^{99m}Tc(OH_2)_3(CO)_3]^+$ from $[^{99m}TcO_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand“, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 7987.

[6] R. Alberto, A. Egli, U. Abram, K. Hegetschweiler, V. Gramlich, P. A. Schubiger, „Synthesis and reactivity of $[NEt_4]_2[ReBr_3(CO)_3]$. Formatin and stuctural characterisation of the clusters $[NEt_3][Re_3(\mu_3\text{-}OH)(CO)_9]$ and $[NEt_3][Re_2(\mu\text{-}OH)_3(CO)_6]$ by alkaline titration“, J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1994, 2815.

[7] Cancer Mondial: www-dep.iarc.fr

[8] K. Prechtel, V. Prechtel, „Mammakarzinom des Manns“, Pathologe 1997, 18, 45.

[9] S. Aliau, D. El Garrouj, A. Yasri, B. S. Katzenellenbogen, J.-L. Borgna, „17α-(Haloacetamidoalkyl)estradiols alkylate the human estrogen receptor at cysteine residues 417 and 530“, Biochemistry 1997, 36, 5861.

[10] K. E. Carlson, I. Choi, A. Gee, B. S. Katzenellenbogen, J. A. Katzenellenbogen, „Altered ligand binding properties and enhanced stability of a constitutively active estrogen receptor: evidence that an open pocket conformation is required for ligand interaction“, Biochemistry 1997, 36, 14897.

[11] C. Wilkens, T. Beck, W. Weikel, C. Brumm, K. Pollow, „Hormonrezeptorbestimmung am Mammakarzinomgewebe, Vergleich neuer immunhistologischer Techniken mit der biochemischen Rezeptortestung“, Pathologe 1995, 16, 256.

[12] M. B. Skaddan, F. R. Wüst, J. A. Katzenellenbogen, „Synthesis and binding affinities of novel Re-containing 7α-substituted estradiol compexes: models for breast cancer imaging agents“, J. Org. Chem. 1999, 64, 8108.

[13] D. H. Hunter, L. G. Luyt, „Single isomer technetium-99m tamoxifen conjugates“, Bioconjugate Chem. 2000, 11, 175.

[14] R. K. Hom, D. Y. Chi, J. A. Katzenellenbogen, „Heterodimeric bis(amino thiol) complexes of oxorhenium(V) that mimic the structure of steroid hormones. Syhthesis and stereochemical issues“, J. Org. Chem. 1996, 61, 2624.

[15] H. El Amouri, A. Vessières, D. Vichard, S. Top, M. Gruselle, G. Jaouen, „Syntheses and affinities of novel organometallic-labeled estradiol derivatives: a stucture-affinity relationship“, J. Med. Chem. 1992, 35, 3130.

[16] D. Osella, G. Cavigiolio, M. Vincenti, A. Vessières, I. Laios, G. Leclercq, E. Napolitano, R. Fiaschi, G. Jaouen, „The first organolmetallic derivative of 11β-ethinylestradiol, a potential high-affinity marker for the estrogen receptor“, J. Org. Chem. 2000, 596, 242.

[17] R. Alberto, R. Schibli, A. P. Schubiger, U. Abram, H.-J. Pietzsch, B. Johannsen, „First application of *fac*-[^{99m}Tc$(OH_2)_3(CO)_3]^+$ in bioorganometallic chemistry: design, structure, and in vitro affinity of a 5-HT_{1A} receptor ligand labeled with ^{99m}Tc“, J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 6076.

[18] G. T. Hermanson, „Bioconjugate techniques“, Academic Press 1996, 159.

[19] F. Stieber, U. Grether, H. Waldmann, „An oxidation-labile traceless linker for solid-phase synthesis“, Angew. Chem. Int. Ed. 1999, 38, 1073.

[20] J. Morant, H. Ruppanner „Arzneimittelkompendium der Schweiz“ 1998, Documed.

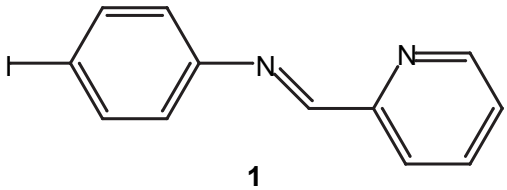
[21] R. Schibli, R. La Bellea, R. Alberto, E. Garcia-Garayoa, K. Ortner, „Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of ^{99m}Tc(I)-Tricarbonyl complexes: a hint for the future functionalization of biomolecules“, Bioconjugate Chem. 2000, 11, 345.

[22] S. Top, H. El Hafa, A. Vessières, J. Quivy, J. Vaissermann, D.W. Hughes, M. J. McGlinchey, J.-P. Mornon, E. Thoreau, G. Jaouen „Rhenium carbonyl complexes of β-estradiol derivatives with high affinity for the estradiol receptor: an approach to selective oganometallic radiopharmaceuticals“, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 8372.

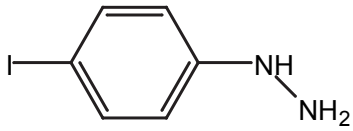
[23] G. Schmauss, P. Barth, „Über Kobalt- und Nickelkomplexe substituierter 2-Pyridinalphenylimine“, Z. Naturforsch.1970, 25b, 789.

[24] F. A. Harden, R. J. Quinn, P. J. Scammells, „Synthesis and adenosine receptor affinity of a series of pyrazolo[3,4-d]pyrimidine analogues of 1-methylisoguanosine“, J. Med. Chem. 1991, 34, 2892.

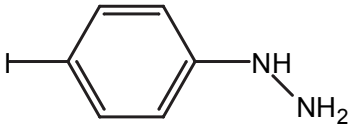
6. Substanzenliste



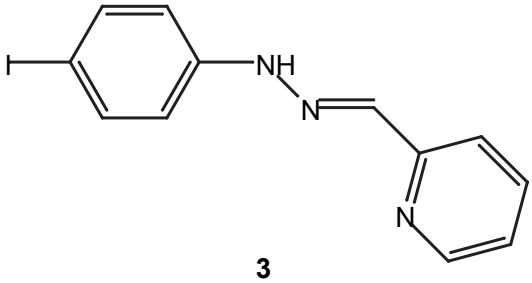
1



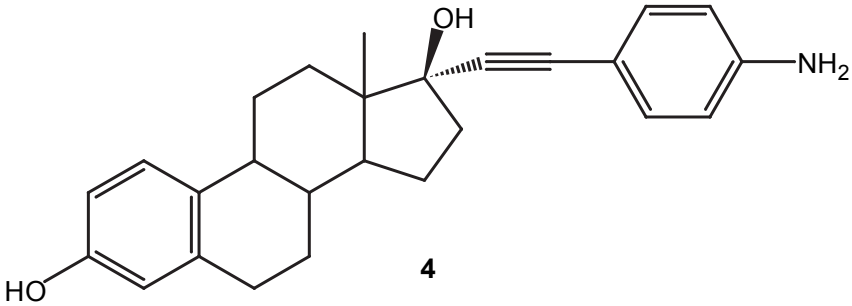
HCl



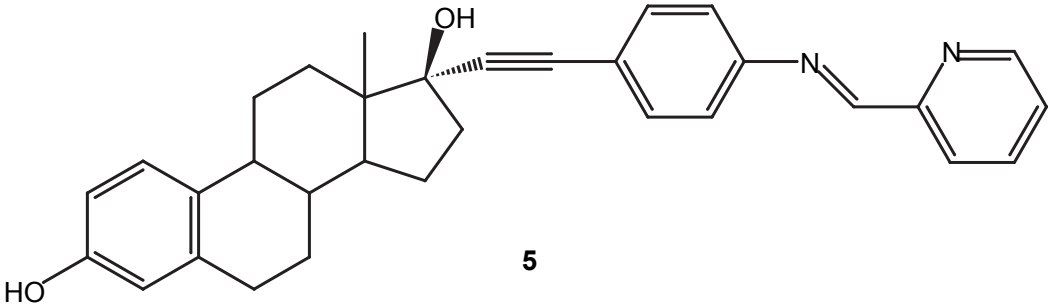
2a **2b**



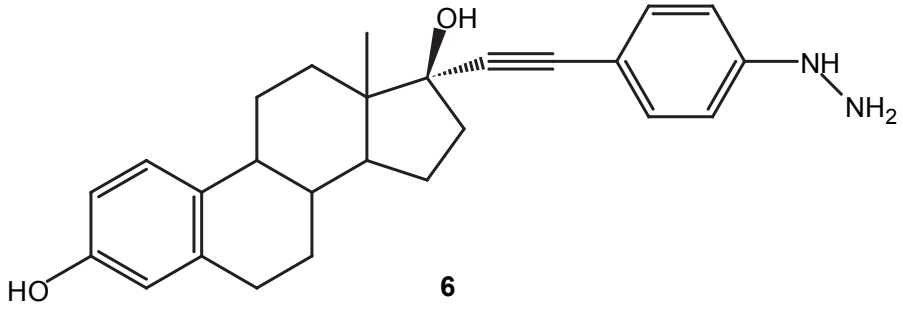
3



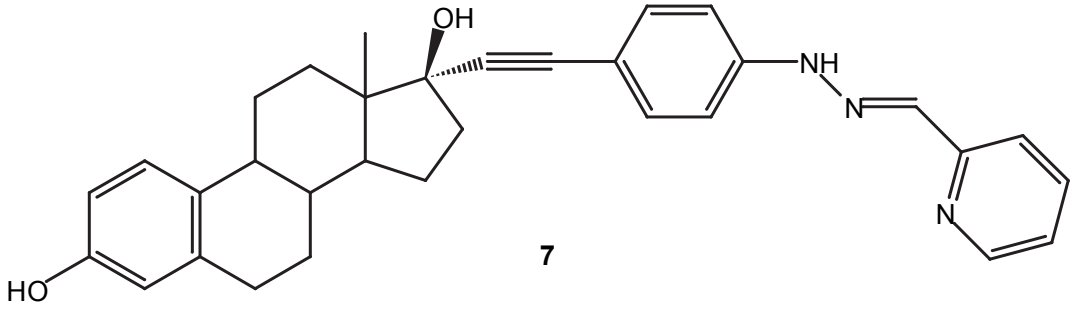
4



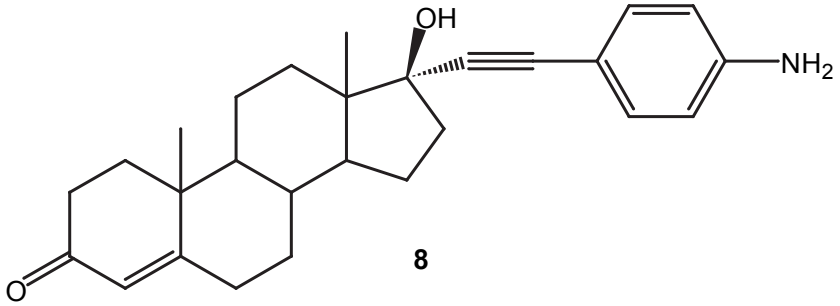
5



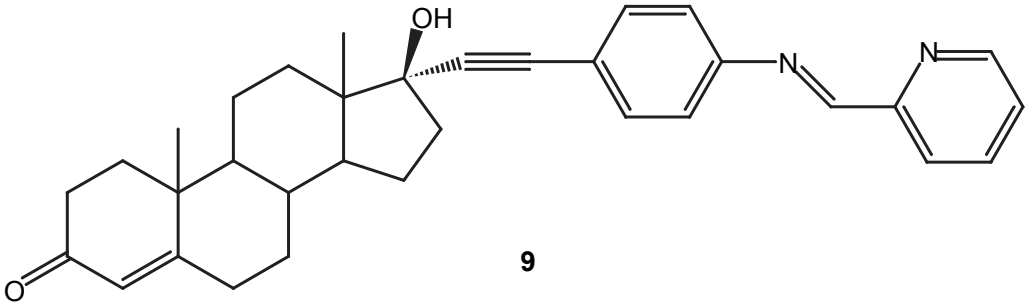
6



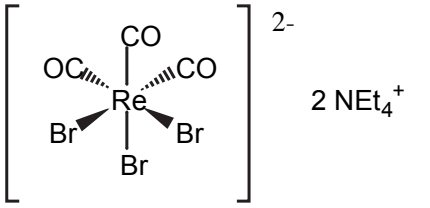
7



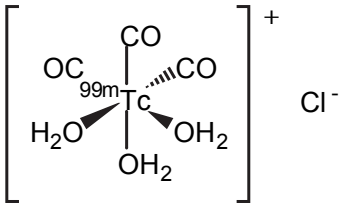
8



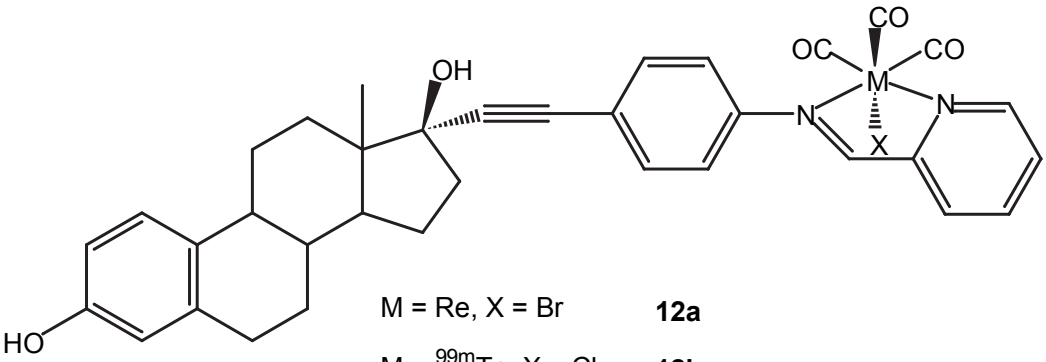
9



10

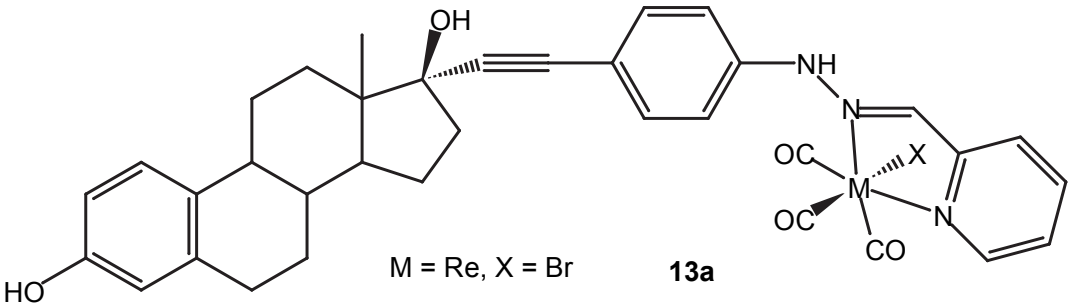


11



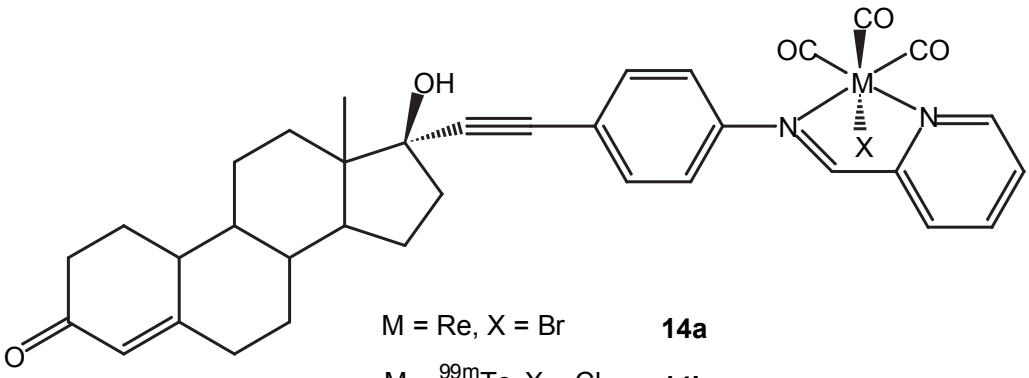
M = Re, X = Br **12a**

M = ^{99m}Tc, X = Cl **12b**



M = Re, X = Br **13a**

M = ^{99m}Tc, X = Cl **13b**



M = Re, X = Br **14a**

M = ^{99m}Tc, X = Cl **14b**