



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Einfluss von Metaboliten und Lipophilie auf die
Verfügbarkeit an der Zielregion“

Verfasserin

Chrysoula Vraka Bakk.rer.nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Ernährungswissenschaften

Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

Die Durchführung der Masterarbeit erfolgte in der
Arbeitsgruppe „Radiochemie und Biomarker Entwicklung“ am Department für
Nuklearmedizin der Medizinischen Universität Wien am AKH Wien
unter der Leitung von
Professor Dr. Markus Mitterhauser und assoc. Professor PD Dr. Wolfgang Wadsak

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Professor Dr. Markus Mitterhauser, assoc. Professor PD Dr. Wolfgang Wadsak und Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner für die interdisziplinäre Zusammenarbeit bedanken, die mir die Durchführung der Masterarbeit in der Radiochemie und Biomarker Entwicklung ermöglicht hat.

An dieser Stelle möchte ich auch der gesamten Arbeitsgruppe der Nuklearmedizin danken, die mich fachlich unterstützt und ein hervorragendes Arbeitsklima geschaffen hat.

Besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Mag. Lukas Nics für die tatkräftige Unterstützung bei allen Fragen und Problemen, für die Einführung in die Laborarbeit der Radiochemie, der Metaboliten-Versuche und der HPLC und vor allem für seine Geduld und freundliche Art.

Inhaltsangabe

1.	Einleitung.....	9
1.1.	1.1 Aufgabenstellung.....	12
2.	Grundlagen und Definitionen.....	13
2.1.1.	Radiopharmaka (PET-Tracer).....	13
2.2.	[¹⁸ F]FE@SUPPY	15
2.2.1.	FE@SUPPY und Analoga	15
2.2.2.	Fluor 18 und seine Produktion.....	17
2.3.	Adenosin.....	18
2.3.1.	Adenosin A3- Rezeptor	19
2.4.	Pharmakokinetik.....	20
2.4.1.	Biotransformation	22
2.5.	Enzyme.....	23
2.5.1.	Einleitung	23
2.5.2.	Klassifizierung.....	24
2.5.3.	Enzyminhibition	25
2.5.4.	Modifikation der Enzymaktivität.....	26
2.5.5.	Enzymkinetik.....	26
2.5.5.1.	Substratkonzentration	28
2.5.6.	Carboxylesterase.....	29
2.5.6.1.	Klassifizierung und katalytische Eigenschaften	29
2.5.7.	Mikrosomen und Cytochrom P450 Komplexe	32
2.5.7.1.	Struktur und Klassifizierung der CYPs.....	32
2.6.	Blut-Hirn-Schranke.....	33
2.6.1.	Transportsysteme.....	35
2.7.	Lipophilie	36
3.	Methodik.....	38
3.1.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	38
3.1.1.	Aufbau einer HPLC-Anlage.....	39
3.2.	Metaboliten-Versuche.....	40
3.2.1.	Apparaturen	41
3.2.2.	Reagenzien.....	41
3.2.3.	Versuchsbeschreibung.....	42
3.2.3.1.	Eingrenzung der möglichen Metaboliten.....	42
3.2.3.2.	Standards.....	44

3.2.3.3.	Carboxylesterase-Ansätze	44
3.2.3.4.	Identifizierung der Produkte.....	45
3.2.3.1.	Proben-Recovery in der RP-HPLC.....	45
3.2.3.2.	Erstellung von Regressionsgeraden.....	46
3.2.3.3.	Chromatographische Auswertung	47
3.2.3.4.	Berechnung der Produktsteigung	49
3.2.3.5.	Erstellung der Kinetik	51
3.2.4.	Ergebnisse.....	51
3.2.4.1.	FE@SUPPY:11.....	51
3.2.4.2.	DFE@SUPPY	51
3.2.4.3.	DFE@SUPPY:2	51
3.2.4.4.	Me@SUPPY:21.....	51
3.2.4.5.	Me@SUPPY:11.....	51
3.2.4.6.	SUPPY:0.....	52
3.2.4.7.	FEMe@SUPPY	52
3.2.4.8.	FEMe@SUPPY:2	52
3.2.4.9.	(Me) ² @SUPPY.....	53
3.2.4.10.	(FE) ² @SUPPY.....	53
3.3.	Lipophilie-Versuche.....	54
3.3.1.	Apparaturen	54
3.3.2.	Reagenzien.....	55
3.3.3.	Versuchsbeschreibung.....	56
3.3.4.	Berechnung.....	56
3.3.5.	Resultate	57
4.	Diskussion	58
5.	Schlussbetrachtung	62
6.	Zusammenfassung	64
7.	Abstract	66
8.	Literatur	68
9.	Tabellenverzeichnis	I
10.	Abbildungsverzeichnis.....	I
11.	Abkürzungen	III
12.	Strukturverzeichnis.....	V
13.	Formelverzeichnis.....	IX
14.	Curriculum Vitae.....	XII

1. Einleitung

Die Nuklearmedizin umfasst die Anwendung offener radioaktiver Substanzen am Menschen, die die morphologische Bildgebung durch Magnetresonanztomographie, Computertomographie und Röntgen im Bereich der Diagnostik unterstützt, sowie vor allem die Strahlentherapie („interne und externe“). Man spricht von einer funktionellen Bildgebung, die verwendet werden kann um Transport, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung eines radioaktiv markierten Stoffes oder eines radioaktiven Isotops qualitativ und quantitativ nachzuvollziehen. In der nuklearmedizinischen Diagnostik werden neben den bekannten *in vivo* Untersuchungen, wie in der Schilddrüsendiagnostik auch *in vitro* Verfahren, wie z.B. das Radioimmunassay (RIA) angewandt. Die Handhabung von z.B. RIAs wird durch kommerzielle Testkits erleichtert und führt zu keinerlei allergischen, toxikologischen oder immunologischen Reaktionen oder Strahlungsbelastungen, da diese Untersuchungen *ex vivo* (Blut, Urin, Stuhl und Gewebe) durchgeführt werden. Hingegen führt die Injektion von Radionukliden zu einer Strahlenbelastung, aber ebenfalls zu keinen der erwähnten Reaktionen, da sich die injizierten Substanzmengen im Bereich von Pico- bis Nanogramm bewegen. Die Konzentrationen in der Positronen Emissions Tomographie (PET) sind somit zu niedrig um toxikologische Effekte auszulösen.

Die Nuklearmedizin zählt zu den jüngsten medizinischen Disziplinen, sie basiert und stützt sich auf Ergebnisse der Physik, Biochemie und medizinischer Grundlagenforschung. Durch den Einsatz von Programmen zur Bildbearbeitung besteht eine enge Zusammenarbeit mit der Informatik.

Man spricht von einer jungen Disziplin, weil die Entdeckungen, die für die nuklearmedizinische Anwendung gebraucht werden, erst Ende des 19.Jhd. gemacht worden sind, darüber hinaus wurden diese zusätzlich in einer sehr engen Zeitperiode entdeckt.

Der Physiker Henri Becquerel entdeckte durch Zufall die natürliche Radioaktivität von Uranerzen (1896), kurz nach der Entdeckung der X-Strahlen (später Röntgenstrahlung genannt) durch Wilhelm Conrad Röntgen. 1898 beschrieb das verheiratete Paar, Pierre und Marie Curie, dass nicht nur Uran Strahlung emittiert, sondern auch Thorium, Polonium und Radium. In den folgenden 20 Jahren erarbeiteten Max Planck (Quantentheorie, 1900), Albert Einstein (Relativitätstheorie 1905 und 1916), Ernest Rutherford (Atommodell, 1911) und Niels Bohr (Erweiterung des Atommodells, 1913) die kernphysikalischen Grundlagen. 1923 wurde zum ersten Mal ein radioaktiv markierter Indikator für eine biologische Untersuchung verwendet: György Hevesy untersuchte die Bleiabsorption einer Pflanze durch Messung der

Bleiakkumulation. Zu dieser Zeit waren nur natürlich vorkommende Radioisotope verfügbar, sodass die Untersuchungsmöglichkeiten eingeschränkt waren. Der große Durchbruch und das Ende der sogenannten klassischen Nuklearmedizin gelangen mit der Entdeckung der künstlichen Radioaktivität durch Irene Curie und ihrem Ehemann Frederic Joliot. Schließlich mit der bedeutenden Entdeckung von E. Rutherford, dass die Struktur der Materie durch Beschuss von Alphapartikel des Radiums geändert werden kann und der darauf basierenden Entwicklung des Zyklotrons (E. O. Lawrence und M. S. Livingston, 1932). Die Benutzung neuer Partikel mit größerer Durchdringtiefe erlaubte die Produktion von immer mehr künstlichen Radionukliden. 1947 nutzte Hartmut Kallmann erstmals die Fähigkeit von besonderen Kristallen Gamma-Strahlen (γ -Strahlen oder γ -Quanten) zu absorbieren und Szintillationen auszusenden. Die Konstruktion des thalliumaktivierten Natriumjodid-Detektors (1948, Hofstadter) legte den Grundstein für die Innovationen von Single-Photon-Emission-Computed-Tomographie (SPECT) und PET, da diese nicht nur empfindlicher als andere Kristalle sind, sondern auch aus dem flüssigen Zustand großflächig auskristallisieren können. 1951 glückte dem Physiker Benedict Cassen, mit dem von ihm entwickelten rektilinearen Scanner, die erste bildliche Darstellung. 1958 gelang es Hal O. Anger mit der Einführung der Szintillationskamera (Gamma-Kamera) das auf dem Oszillographen abgebildete Ortssignal der örtlichen Verteilung des Radionuklids zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung darzustellen. Mit der Gamma-Kamera fand auch das bereits 1938 produzierte ^{99m}Tc seinen Einsatz. Es war aufgrund seiner geringeren Gamma-Energie wesentlich besser geeignet als z.B. ^{131}I . Die neueren technischen Entwicklungen, wie SPECT und PET, umfassen die tomographische Darstellung der Radionuklidverteilung im Körper. Insbesondere die PET eröffnete und eröffnet uns weiterhin völlig neue diagnostische Möglichkeiten. Mit Hilfe von Positronenstrahlern wie ^{15}O , ^{11}C und ^{18}F sind biochemische Reaktionen darstellbar, die bisher nur *in-vitro* nachweisbar waren. Diese sogenannte „*in-vivo*-Chemie“ wird noch weiterhin wichtige Fortschritte im Verständnis funktioneller Abläufe hervorbringen und vor allem Fragen zu neurologischen, psychiatrischen Erkrankungen sowie onkologischen Erkrankungen beantworten.

Die Entwicklung von PET-Radiopharmaka ist somit interessant, um zum einen, nähere Einblicke in die biochemischen Mechanismen pathophysiologischer Prozesse verschiedener Erkrankungen zu gewinnen und zum anderen, um Informationen über unbekannte physiologische Mechanismen von z.B. neu entdeckten Rezeptorsubtypen zu erhalten.

Die Entwicklung eines PET-Tracers beginnt mit der Idee für ein Molekül mit geeigneter chemischer Struktur (guten Bindungseigenschaften) zu einer geeigneten Zielregion. Wenn das

Molekül diese Voraussetzungen erfüllt, wird es synthetisiert und die präklinischen Parameter werden erhoben um seine Eignung zu verifizieren. Parallel wird der Tracer radiochemisch mit einem PET-Nuklid (^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{82}Rb oder ^{68}Ga) markiert. Die zwei wichtigsten Aspekte im Entwicklungsprozess von neuen Radiopharmaka sind: eine einfache und verlässliche Produktionsmethode für den PET-Tracer (optimalerweise automatisiert) und die präklinischen Evaluierungsparameter für eine humane Applikation.

In der präklinischen Testung von Radiopharmaka und Tracern, zählen neben der Evaluierung der Affinität und Selektivität zu einer definierten Zielregion (Rezeptor, Transporter etc.) durch μ -PET-, Biodistributions- und Autoradiographie-Experimenten (Gewebschnitte) auch die metabolische Stabilität sowie die Lipophilie ($\log P$).

2008 wurde von der Arbeitsgruppe „Radiochemie und Biomarker Entwicklung“ am Department für Nuklearmedizin der Medizinischen Universität Wien [^{18}F]FE@SUPPY (2-[^{18}F]fluoroethyl 4,6-diethyl-5-(ethylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinate) als der erste PET-Tracer, sowie das Derivat [^{18}F]FE@SUPPY:2 ((ethyl 4,6-diethyl-5-((2-[^{18}F]fluoroethylthio)carbonyl)-2-phenylnicotinate), für den Adenosin A3 Rezeptor (A3R) vorgestellt. Der A3R wird während verschiedener pathologischer Prozesse (z.B. Tumorbildung) besonders hoch exprimiert, jedoch fast nicht in Zellen von gesunden Geweben. Mögliche Einsatzgebiete von Tracern des A3R umfassen Entzündungsprozesse, onkologische Gegebenheiten, wie solide Tumore und Brust-, Dickdarm-, Lungen-, Pankreas-, Prostata-, Melanom- und Hirnmetastasen. Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Ischämie, neurologische Erkrankungen wie zerebrale Ischämie, aber auch Glaukom und Epilepsie zählen ebenfalls zu den pathologischen Formen bei denen der A3R-Tracer ein wichtiges diagnostisches Werkzeug darstellen könnte. Neben dem ersten FE@SUPPY(2-fluoroethyl 4,6-diethyl-5-(ethylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinate)-Derivat, FE@SUPPY:2 ((ethyl 4,6-diethyl-5-((2-fluoroethylthio)carbonyl)-2-phenylnicotinate), ist noch eine ganze Reihe anderer SUPPY-Analoga entstanden, die als zusätzliche potentielle Radiotracer für den A3R im Rahmen der Masterarbeit vorgestellt werden [1,2, 5,10, 11].

In der vorliegenden Arbeit wird die chemische Struktur der neuen Analoga bzw. die Unterschiede zu den erwähnten Vorläufersubstanzen FE@SUPPY und FE@SUPPY:2 tabellarisch dargestellt. Schwerpunkt der Arbeit ist die Bestimmung der metabolischen Stabilität und die Ermittlung der Lipophilie.

Im allgemeinen Teil wird das Biotransformationssystem und dabei speziell die Carboxylesterase (CES) besprochen. Da alle abgeleiteten Analoga und Metaboliten dieser Ausgangssubstanzen Ester (Thioester und Carbonsäureester) enthalten, wurden zur

Bestimmung des enzymatischen Abbaus CESs verwendet, die in der Lage sind beide Esterfunktionen zu hydrolysieren.

Da dieser Rezeptortyp ubiquitär im menschlichen Organismus vertreten ist, müssen die Tracer außer der Bindung zum A3R noch andere chemisch-physikalische Eigenschaften (Lipophilie) erfüllen. Die FE@SUPPY Analoga sollten als Tracer des Zentralnervensystems (Gehirn) Verwendung finden, daher ist es nötig die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überwinden zu können (z.B. durch passive Diffusion). Die einleitenden Kapitel beschreiben deshalb auch die BHS, einschließlich der Transportsysteme, sowie Grundsätzliches zur Lipophilie. Im Methodenteil finden sich Versuchsbeschreibungen zur Ermittlung der Stabilität gegenüber der CES und Experimente zur Ermittlung der log P-Werte.

1.1. 1.1 Aufgabenstellung

[¹⁸F]FE@SUPPY ist der erste bereits vorgestellte PET-Tracer [10, 11], der affin und selektiv zum A3R ist. Diese wurden anhand von μ -PET Versuchen in Ratten, Biodistributionsstudien und Autoradiographien festgestellt [4, 5]. Sowohl FE@SUPPY, als auch sein erstes Derivat FE@SUPPY:2, zeigten in *in vitro* und in *in vivo* Versuchen einen Abbau durch das Enzym CES (Michaelis-Menten Konstante (K_M): FE@SUPPY 20.1, Maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{MAX}): FE@SUPPY 0.038 und $K_{M_FE@SUPPY:2}$ 13.1, $V_{MAX_FE@SUPPY:2}$ 0.015) [11, 32]. Chemisch gesehen beinhalten alle FE@SUPPY Analoga einen Carboxylester und/oder einen Thioester. Da die CES nicht nur spezifisch Carbonsäureester hydrolysiert, sondern auch andere schwefelhaltige Ester spaltet, eignet sie sich im Falle der vorliegenden Substrate zur Beurteilung der Stabilität gegenüber des Phase I Systems [36].

Aufgabe und Ziel dieser Masterarbeit war es, metabolisch stabilere FE@SUPPY-Analoga zu finden, die darüber hinaus in der Lage sind die BHS zu passieren. Verwendet wurden die FE@SUPPY-Derivate FE@SUPPY:11(2,4-diethyl-5-((2-fluoroethoxy)carbonyl)-6-phenylpyridine-3-carbothioic S-acid), DFE@SUPPY(4,6-diethyl-5-(ethylsulfanylcarbonyl)-2-phenylpyridine-3-carboxylate), DFE@SUPPY:2(2,4-diethyl-5-(ethoxycarbonyl)-6-phenylpyridine-3-carbothioic S-acid), Me@SUPPY:11(2,4-diethyl-5-(methoxycarbonyl)-6-phenylpyridine-3-carbothioic S-acid), Me@SUPPY:21(4,6-diethyl-5-(methylsulfanylcarbonyl)-2-phenylpyridine-3-carboxylate), (Me)²@SUPPY (methyl 4,6-diethyl-5-(methylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinate), FEMe@SUPPY:2 (methyl 4,6-diethyl-5-((2-fluoroethylthio)carbonyl)-2-phenylnicotinate),

FEMe@SUPPY (2-fluoroethyl 4,6-diethyl-5-(methylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinate) und (FE)²@SUPPY (2-fluoroethyl 4,6-diethyl-5-((2-fluoroethylthio)carbonyl)-2-phenylnicotinate). Die *in vitro* Metaboliten-Versuche mit der CES bzw. Lipophilie-Bestimmungen nach Donovan und Pescatore, 2002 [35] wurden mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert.

2. Grundlagen und Definitionen

2.1.1. Radiopharmaka (PET-Tracer)

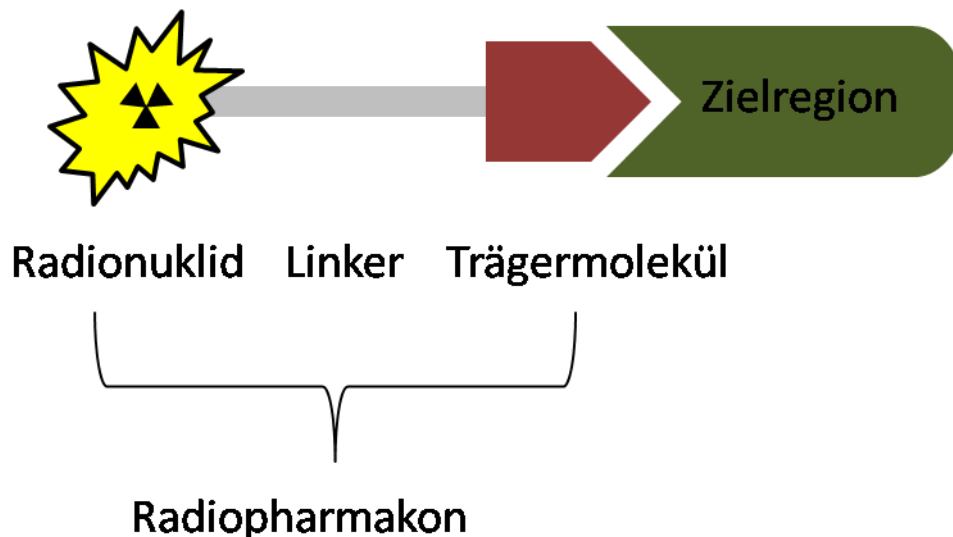


Abbildung 1 Erkennungsprinzip und Aufbau eines Radiotracers [modifiziert nach 1].

Ein typischer Tracer besteht aus drei Grundkomponenten, dem signalgebendem Teil (nicht metallischem oder metallischem Radionuklid), dem Linker oder Spacer (einer kovalente Bindung, Komplexbildner etc.), der das Radionuklid und die dritte Komponente, den Adressant bzw. Träger (biologischer Tracer, Molekül mit geeigneter Pharmakokinetik oder Pharmakon), verbindet. In der radiopharmazeutischen Arzneimittelentwicklung steht die Fragestellung im Vordergrund, welche Effekte mit Hilfe des Radiotracers in einer *in vivo*-Untersuchung oder Therapie erzielt werden sollen. Ein zusammenfassender Merksatz lautet „Was ich markiere, bestimmt was ich sehe!“ [1, 29]

„Radioaktive Arzneimittel sind Zubereitungen, die sehr geringe Mengen von einem Radionuklid enthalten und deren Strahlungsaktivität diagnostisch oder therapeutisch genutzt

wird (Radiotracer). Hierbei finden vor allem Radionuklide mit kurzer Halbwertszeit Verwendung, die entweder γ -Strahlung (Anwendung als Diagnostika wegen der guten extrakorporalen Messbarkeit der Strahlung) oder β -Strahlung emittieren (Anwendung als Therapeutika wegen ihrer lokal begrenzten Strahlungswirkung)“ [57, 58]. PET-Tracer, emittieren zwei γ -Strahlen (180° Winkel, 511 keV), die aus der Annihilation des Positrons und Elektrons entstehen. Dieses Prinzip wird für die diagnostische Bildgebung genutzt- die Strahlung wird hierbei extrakorporal gemessen. Nach Injektion entsteht eine Imbalance der Verteilung im Körper. Die Tracer reichern sich in jenen Geweben an, in denen sie metabolisch aktiv sind oder in jenen zu denen sie eine Affinität ausweisen. Die PET nutzt das Prinzip der unterschiedlichen Verteilung bzw. Anreicherung der Radiopharmaka im Körper und erhält in den Regionen der Anlagerung stärkere Signale.

Durch die Markierung mit Radioisotopen wie ^{15}O , ^{13}N , und ^{11}C , aber auch ^{18}F und $^{99\text{m}}\text{Tc}$, werden in *in vivo* Messungen metabolische Umsätze (Transport-, Perfusions- und Verteilungsprozessen), sowie *in vivo* Dichtemessung von Transportsystemen und Rezeptoren bildlich dargestellt. Weitere Beispiele des sogenannten Targeting sind der passive Transport durch Diffusion (Lungenventilation), Adsorptionseffekte (Knochenmetabolismus), Ionentransport (Schilddrüse), Kapillarblockaden (Auslösung von Mikroembolien), Phagozytose, aktiver Transport (Niere und Schilddrüse), Sequestration von Zellen, Metabolismus, Bindung an Rezeptoren und Transporter und Antigen-Antikörper-Komplex-Formationen.

Voraussetzungen für die diagnostische Anwendung sind niedrige Strahlenbelastung (Halbwertszeit, Art der Strahlung) für Patienten und Personal, kostengünstige und ausreichende Herstellungsmöglichkeit, Gamma-Energie in einem für die Messgeräte günstigen Bereich (z.B. PET 511 keV) und biochemische Eigenschaften, die die Markierung von Pharmaka erlauben. Unter den biochemischen Charakteristika versteht man die Ladung des Moleküls, Molekülgröße, Proteinbindung, Löslichkeit, Stabilität und die Biodistribution. Zusammenfassend sollte ein geeigneter Radioligand für eine erfolgreiche funktionelle Bildgebung mittels PET durch hohe Affinität, hohe Selektivität, geringe unspezifische Bindung, definierte pharmakokinetische Eigenschaften und das Fehlen von störenden radioaktiven Metaboliten an der Zielregion charakterisiert sein. Letztere Eigenschaft erfordert hohe metabolische Stabilität gegenüber dem Abbau durch Enzyme [1, 2, 29].

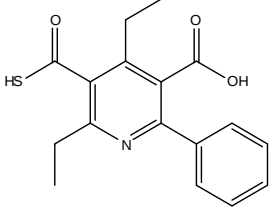
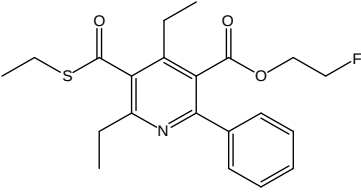
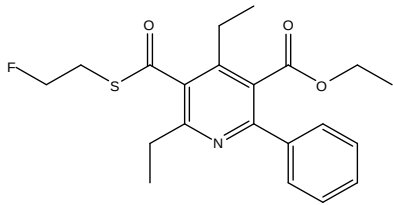
2.2. [¹⁸F]FE@SUPPY

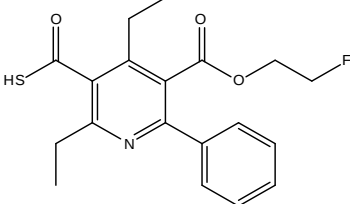
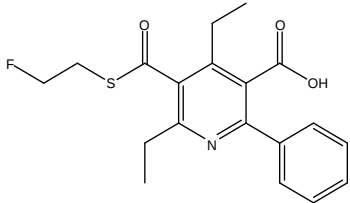
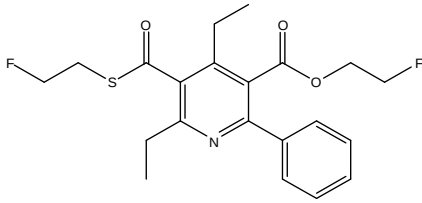
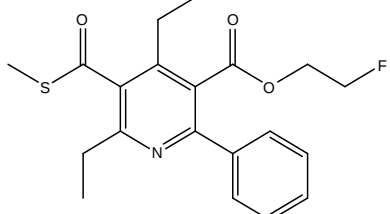
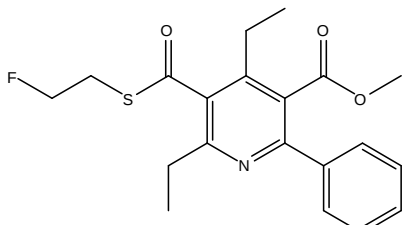
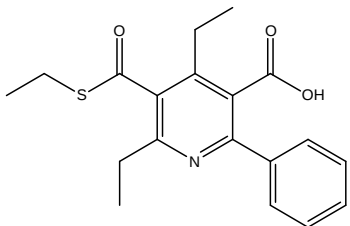
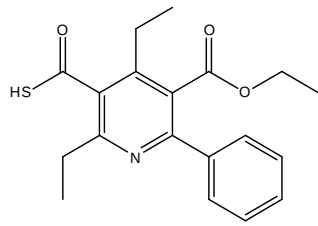
[¹⁸F]FE@SUPPY wurde als erster PET-Tracer für den A3 Rezeptor vorgestellt. Es handelt sich um einen Antagonisten [10]. Dieser und auch seine Derivate befinden sich in der präklinischen Entwicklung als Tracer für den Adenosin Subtyp 3 Rezeptor. Für [¹⁸F]FE@SUPPY beträgt die Affinität zum humanen A3R K_i 4.22 nM und es weist eine Selektivität von 2700 A1R/A3R auf [4]. Im Vergleich dazu weist Adenosin selbst nur eine geringe Affinität von $K_i = \sim 1 \mu\text{M}$ [69] zum A3R auf. In Tierversuchen zeigte sich die größte [¹⁸F]FE@SUPPY – Aufnahme in der Leber, sowie eine ausgeprägte Verteilung in Nieren, Lunge und Herz. Im Gehirn wurde hingegen nur eine mittlere bis kleine Aufnahme gemessen. Der erwähnte Rezeptortyp wird in Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen gebracht (siehe Kapitel 2.3 und 2.3.1) [4, 5, 10, 11].

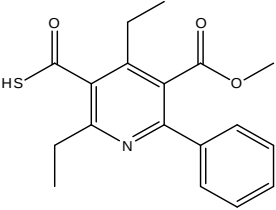
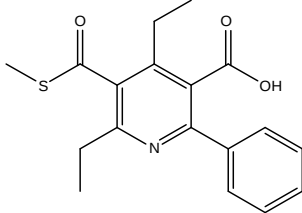
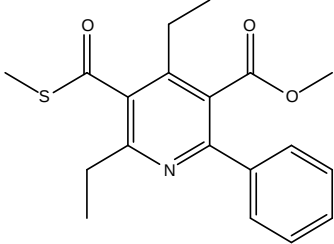
2.2.1. FE@SUPPY und Analoga

Die Derivate des FE@SUPPY unterscheiden sich hinsichtlich ihrer chemischen Reste an der Carboxylsäure beziehungsweise an der Thioisäure. Sie beinhalten somit Thio- und Carboxylester. Unter Tabelle 1 finden sich alle Analoga, einschließlich einer Auflistung ihrer chemischen Reste an Carboxyl- bzw. Thioisäure und ihrer Struktur.

Tabelle 1 Unterscheidung der FE@SUPPY-Derivate

Analogon ¹⁾	Rest an der Carbonsäure	Rest an der Thioisäure	Struktur
SUPPY:0	-	-	
FE@SUPPY	Fluorethyl	Ethyl	
FE@SUPPY:2	Ethyl	Fluorethyl	

FE@SUPPY:11	Fluorethyl	-	
FE@SUPPY:21	-	Fluorethyl	
(FE) ² @SUPPY	Fluorethyl	Fluorethyl	
FEMe@SUPPY	Fluorethyl	Methyl	
FEMe@SUPPY:2	Methyl	Fluorethyl	
DfE@SUPPY	-	Ethyl	
DfE@SUPPY:2	Ethyl	-	

Me@SUPPY:11	Methyl	-	
Me@SUPPY:21	-	Methyl	
(Me) ² @SUPPY	Methyl	Methyl	

¹⁾ Siehe Strukturverzeichnis für IUPAC-Nomenklatur

2.2.2. Fluor 18 und seine Produktion

¹⁸F wird für die Herstellung von vielen in der Routine eingesetzten diagnostischen Radiotracer verwendet. Der wohl bekannteste Tracer ist die ¹⁸F-Fluordesoxy-Glucose ([¹⁸F]FDG). Die Halbwertszeit von ¹⁸F liegt bei 109,8 min und erlaubt somit den Transport dieser [¹⁸F]-Tracer an andere PET-Zentren, ist aber gleichzeitig kurz genug um die Strahlendosis zu begrenzen. Fluor-18 ist kein natürlich vorkommendes Radionuklid und wird deshalb im Zyklotron hergestellt. In der ¹⁸O(p, n) ¹⁸F-Reaktion wird das Sauerstoffisotop, ¹⁸O, mit Protonen beschossen und ¹⁸F gewonnen [1, 29]. Durch diesen Beschuss wird ein Neutron aus dem Atomkern hinaus katapultiert. Die Atommasse (A) bleibt gleich, während sich die Ordnungszahl (Z) um 1 reduziert.

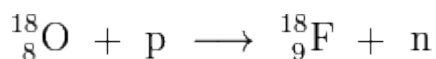


Abbildung 2 ¹⁸O(p, n) ¹⁸F-Reaktion

2.3. Adenosin

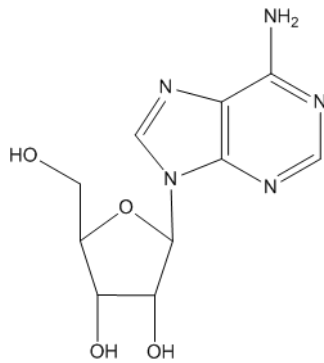


Abbildung 3 Chemische Struktur des Adenosins.

Adenosin (((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-Aminopurin-9-yl)- 5-(hydroxymethyl)oxolan-3,4-diol)) ist ein natürlich vorkommendes Nukleosid, das aus der Purinbase Adenin und einer β- D Ribose besteht. Als Desoxyribonukleinsäure- und Ribonukleinsäurebestandteil (Polynucleotide), sowie als Hauptkomponente der energiereichen Phosphatverbindungen Adenosin-Mono/Di/Tri-Phosphat (AMP, ADP und ATP) und der Coenzyme Nicotinamidadenindinukleotidphosphat und Nicotinamidadenindinukleotid ist Adenosin ubiquitär im menschlichen Körper enthalten. Es fungiert somit als Erbinformationsträger, Energieüberträger und Modulator verschiedener Signalkaskaden, in dem es beispielsweise als Autakoid direkt an G-Protein gekoppelten Adenosinrezeptoren (A1, A2A, A2B und A3) bindet. Adenin kann *de novo* synthetisiert, im Stoffwechsel recycelt oder mit der Nahrung aufgenommen werden. Die extrazelluläre Hauptquelle des Adenosins bildet der Abbau von ATP durch Ectonukleotidasen nach dem Transport aus dem Intrazellulärraum durch die Equilibrativen Nucleosid Transporter.

Wie schon erwähnt sind die Wirkungen von Adenosin vielseitig und essentiell. Durch Stimulierung der Ausschüttung verschiedener Neurotransmitter wie Dopamin, Acetylcholin oder Noradrenalin, hat Adenosin Einfluss auf das kardiovaskuläre System, auf das Zentralnervensystem und den Magen-Darmtrakt. Außerdem hat es immunmodulierende Effekte, wie zum Beispiel die Stimulation von eosinophilen Granulozyten. Adenosin hat darüber hinaus einen großen Einfluss auf die Zellproliferation, dies wurde durch die Anwendung von Pharmaka bestätigt, die adenosinsteigernde Effekte auslösen und die Tumorsensitivität gegenüber Zytostatika erhöhen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Adenosin eine Vielzahl von Funktionen im Körper erfüllt, die abhängig von der vorliegenden Form des Adenosins, der Konzentration und der Aktivierung bzw. Blockierung der verschiedenen Rezeptorsubtypen sind. Die Ausprägungen der verschiedenen Adenosinrezeptorsubtypen könnten mit zahlreichen Krankheitsbildern in Zusammenhang stehen. Forschungsrelevante Anwendungsgebiete sind Tumordiagnostik und –therapie, Entzündungsreaktionen, kardiovaskuläre Erkrankungen und neurodegenerative Effekte [5, 6, 7, 9, 10, 16].

2.3.1. Adenosin A₃- Rezeptor

Die Adenosinrezeptoren gehören zu den purinergen Rezeptoren und können weiter in zwei Gruppen, dem purinergen Rezeptor 1 (P1) und dem purinergen Rezeptor 2 (P2), eingeteilt werden. Neben den Adenosinrezeptorsubtypen A₁, A_{2a} und A_{2b}, gehört auch der A₃ zur Gruppe der P1 [48]. Sie weisen alle eine unterschiedliche Affinität zu Adenosin auf. Vergleicht man die einzelnen Affinitäten fällt auf, dass Adenosin eine höhere Affinität zu den Rezeptorsubtypen A₁ und A_{2a} (K_i= 10-30 nM) aufweist als zu den Subtypen A_{2b} und A₃ (K_i= ~1µM) [5]. Die P1 aktivieren (A_{2a}/A_{2b}) oder inhibieren (A₁/A₃) die Adenylatzyklase (AC) oder zyklisches AMP (cAMP)-Signalwege über die Bindung durch Adenosin. Alle Adenosinrezeptorsubtypen sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Superfamilie GPCR). GPCR sind integrale Membranproteine, die aus sieben transmembranen Helices bestehen und an der Oberfläche der Membranaußenseite gelegen sind. Der Ligand Adenosin bindet an der Rezeptorbindungsseite der Extrazellulärseite und aktiviert das G-Protein. Das inaktive G-Protein enthält ein Guanindiphosphat, welches abgespalten wird. Daraus resultiert eine erhöhte Affinität des G-Proteins zum Guanintriphosphat, welches nun bindet und die Auslösung eines Signalweges bewirkt. Dabei kann durch Rezeptoraktivierung ein Signalweg aktiviert oder inhibiert werden. Die Aktivierung der Adenosinrezeptoren A_{1/3} inhibiert die AC, während die Aktivierung von A_{2A/2B} die AC und den cAMP-Signalweg stimuliert. Im Detail induzieren GPCR ihr Signal entsprechend der verschiedenen G-Proteine: G_s (Stimuliert die AC), G_i (Inhibiert die AC), G_q (Aktiviert die Phospholipase C) und G_{12/13} (Beeinflusst die Durchlässigkeit von Ionenkanälen, wie der Cl⁻Kanäle). Neben dem AC Signalweg, modulieren die Adenosinrezeptoren also auch Phospholipase C, den MAPK Kinase Weg und die Proteinkinase A-Konzentrationen. Diese Secondmessenger-Kaskaden und Signalwege werden mit inflammatorischen Reaktionen und Tumormutationen in Verbindung gebracht.

An dieser Stelle ist erwähnenswert, dass der A3R in hohen Konzentrationen in verschiedenen Tumorgeweben exprimiert wird [6, 9].

A3R-Antagonisten und A3R-Agonisten könnten vor inflammatorischen und allergischen Reaktionen, wie der Ausschüttung von Histamin aus Mastzellen schützen und Hypotensionen entgegenwirken, während hoch selektive Agonisten kardioprotektiv wirken [46]. Eine 2011 veröffentlichte Arbeit von Zhu et al. Beschreibt die Aktivierung des Serotonintransporters (5-HTT) durch Aktivierung des A3R *in vivo*, *ex vivo* und *in vitro* (in A3R -/- Knockoutmäusen findet keine Stimulation statt) [50]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der A3R auch im Zusammenhang mit zahlreichen psychiatrischen Erkrankungen steht. Zukünftige Anwendungsmöglichkeiten könnten außerdem aufgrund der erhöhten Dichte in Krebszellen (beispielsweise Kolonkarzinom und -zelllinien, Prostatakrebszellen, Brustkrebszellen sowie Lungenkrebs, Melanomen und Leukämiezellen) Tumortheraeutika oder Tracer, die für die Diagnostik verwendet werden könnten, sein. A3R-Agonisten stimulieren in gesunden Zellen die Produktion von Wachstumsfaktoren über die Induktion des Nuclear Factor ‘kappa-light-chain-enhancer’ of activated B-cells (Nfk-B) Signalfaden. In Tumorzellen erzielen sie jedoch entgegengesetzte Wirkung und lösen Apoptose aus und induzieren wachstumshemmende Faktoren über Aufhebung der Nfk-B und Wnt Signalwege [55, 56]. Über den A3R ist noch nicht vieles bekannt, jedoch stehen die Änderungen in der Expressionsrate, Hemmung und Aktivierung des Rezeptors in Diskussion an verschiedenen Pathomechanismen beteiligt zu sein (neurologische, affektive Störungen, kardiovaskuläre, onkologische und inflammatorische Prozesse) [6, 7, 47, 55, 56, 69].

2.4. Pharmakokinetik

Die Pharmakologie ist die Wissenschaft von den Wechselwirkungen zwischen Stoffen (Xenobiotika) und Lebewesen. Sie beschreibt den gesamten Prozess beginnend mit der Aufnahme bis hin zur Ausscheidung einer pharmakologisch aktiven Substanz. Auch endogene Stoffe, Nährstoffe und andere zugeführten Substanzen unterliegen einer Kinetik und den Einzelschritten der Liberation, Absorption, Distribution, dem Metabolismus sowie der Exkretion. Häufig findet man die zusammenfassende Abkürzung „LADME“. Wie auch im Falle der Abkürzung LADME werden Metabolismus und Biotransformation in der Pharmakologie oft synonym verwendet, dabei ist mit dem Ausdruck „Metabolismus“ eigentlich die Gesamtheit der LADME-Prozesse gemeint. Aus der Sicht des verwendeten

Terminus „Metabolit“, der für ein Produkt der xenobiotischen Biotransformation steht, wird auch in dieser Arbeit Biotransformation und Metabolismus gleichgesetzt.

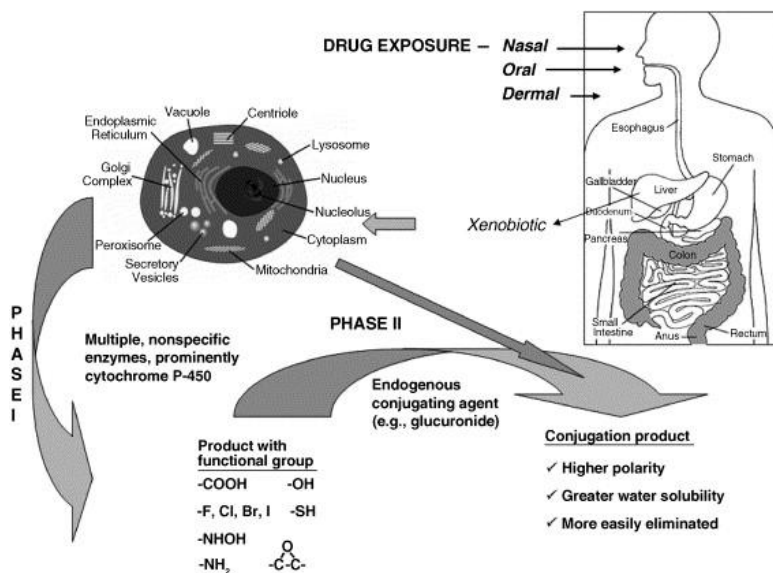
Damit ein Radiopharmakon bzw. Radiotracer klinische Verwendung finden kann, sind neben der Standardisierung der Synthese, sowohl des markierten Tracers als auch des Präkursors, die Strahlenbelastung und vor allem die metabolische Stabilität gefragt. Eine schnelle Metabolisierung kann mit einer erhöhten Ausscheidungsrate, einem fehlerhaften Signal durch radioaktive Metaboliten in der Zielregion oder eine Affinitätsverminderung durch enzymatische Spaltung bzw. Veränderung der Molekülstruktur einhergehen.

Ein Pharmakon, genauso wie jede andere dem Körper zugeführte Substanz, unterliegt der Biotransformation, die zu Spaltungen und Modifizierungen der Molekülstruktur führt. Die Bedeutung der Biotransformation liegt in der Detoxifizierung von Substanzen (Kancerogenen, Toxinen und Medikamenten) durch Inaktivierung oder durch Ausscheidung. Verantwortlich dafür sind detoxifizierende Enzyme. Neben den essentiellen Nährstoffen zur Energiegewinnung und Stoffwechselleistungen, inkorporiert der Mensch auch unzählige Xenobiotika (sekundäre Pflanzenstoffe, Medikamente, Pestizide usw.) [19].

Annähernd jedes Medikament ist lipophil, das wird mit der effektiveren Resorption lipophiler Substanzen aus dem Magen-Darm-Trakt erklärt (im Vergleich zu hydrophileren Stoffen gleichen molekularen Gewichts). Dies bedeutet gleichzeitig eine limitierte biliäre und renale Ausscheidung und eine Steigerung der Akkumulationswahrscheinlichkeit im Körper. Im Laufe der Evolution bildete sich deshalb ein komplexes Enzymsystem, mit dessen Hilfe natürliche Xenobiotika, wie Phytoalexine abgebaut und ausgeschieden werden können. Dieses Enzymsystem ist heute in der Lage neben endogenen Substanzen viele Xenobiotika (Pestizide, Medikamente, Phytoalexine, Toxine usw.) abzubauen. Alle lebenden Organismen besitzen derartige Systeme zum Abbau von exogen zugeführten Stoffen und endogenen Substanzen. Vor allem Darmepithelzellen, Leberzellen beziehungsweise das endoplasmatische Retikulum (ER), sowie die Mitochondrien sind metabolisch hochaktive Organe bzw. Organellen. Nach Passieren des Darmtraktes oder der Leber kann ein sogenannter „First-Pass-Effekt“ auftreten; damit ist eine direkte Metabolisierung unmittelbar nach Aufnahme oder Passieren des entsprechenden Körperorgans gemeint. Enzyme unterscheiden nicht zwischen endogenen und exogenen Stoffen, jedoch liegt im Vergleich zu Xenobiotika bei endogenen Stoffen eine sehr enge Substratspezifität vor [1,3, 15].

2.4.1. Biotransformation

Die Biotransformation umfasst zwei verschiedene Prozesse, die man als Phase I und Phase II bezeichnet. Entsprechend werden auch die an der jeweiligen Phase beteiligten Enzyme in Phase I und Phase II-Enzyme eingeteilt. In der Phase I werden lipophile Substrate durch Oxidation, Reduktion, Decarboxylierung und Hydroxylierung zu hydrophileren Zwischenprodukten, die nun freie funktionelle Gruppen (Carboxylgruppe, Hydroxylrest, Aminogruppen etc.) besitzen. Diese Produkte, auch Primärprodukte genannt, entstehen häufig durch die katalytische Wirkung des Cytochrom-P450 (CYP450) Enzymkomplexes. In der Phase II der Biotransformation übertragen verschiedene Transferasen endogene Agenzien, wie Sulfonsäuren, Aminosäuren und Glucuronide auf die Primärprodukte und



konjugieren diese an funktionelle Gruppe. Die Konsequenz der Konjugationsreaktionen ist die Inaktivierung von Pharmaka und anderen Substanzen, eine erhöhte Hydrophilie und Polarität, sowie in Folge eine verbesserte Elimination.

Abbildung 4 zeigt beispielhaft die Biotransformation an den ER der Leber durch Phase I und Phase II Enzyme [60].

Außerdem wird der Weg der Exposition (nasal, dermal oder durch orale Inkorporation) aufgezeigt und es erfolgt eine Auflistung der funktionellen Gruppen der Phase I Reaktion und der Produkteigenschaften nach Phase II-Konjugationsreaktionen.

Die Enzymaktivität variiert individuell und zwischen Bevölkerungsgruppen, sodass der Metabolismus in einer unterschiedlichen Effizienz abläuft, man spricht von Schnell- bzw. Langsam-Metabolisierern. Gründe dafür sind Fehlen von substratspezifischen Enzymen, Transformationen der Enzyme, Überproduktion oder Inhibition von Enzymen. Die Ätiologie dafür liegt im Alter, dem Geschlecht, der Genetik (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) und ist mit Wechselwirkungen mit Medikamenten und Nahrungsmitteln (Drug-Drug-Interaction und Drug-Nutrient-Interaction) assoziiert.

2.5. Enzyme

2.5.1. Einleitung

In jedem lebenden Organismus spielen sich verschiedene chemische Reaktionen permanent und reichlich ab. In den meisten Fällen würde eine spontane Reaktion gar nicht oder nur sehr langsam und mit hohem Energieaufwand erfolgen. Mit Hilfe von Enzymen und Ribozymen laufen diese Reaktion kontrolliert ab. Enzyme sind Biokatalysatoren, die Reaktionen beschleunigen, in dem sie die Aktivierungsenergie senken. Im Gegensatz zu anderen in der Chemie verwendeten Katalysatoren, setzt ein Enzym nur ein spezifisches oder nur wenige Substrate um. Isoenzyme besitzen eine andere Aminosäuresequenz, katalysieren aber das gleiche Substrat bzw. die gleiche Reaktion. Abbildung 5 zeigt die erhöhte Aktivierungsenergie einer Reaktion ohne Enzymbeteiligung, im Vergleich zu einer mit Enzymbeteiligung. Die Reaktionsgeschwindigkeit kann bis um den Faktor 10^8 bis 10^{20} beschleunigt werden [26]. Katalysatoren beschleunigen chemische Reaktionen ohne die Gleichgewichtslage zu verändern. Während der Reaktion gehen Enzym und Substrat kurzzeitig eine Verbindung ein (Enzym-Substrat-Komplex, ES), in der die Reaktionsfähigkeit des Substrates deutlich erhöht ist (Siehe Kapitel 2.5.5. Enzymkinetik, Abb. 6). Durch Konformationsänderung des Enzyms und nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichts erfolgt die Umwandlung zum Produkt. Nach Trennung des entstandenen ES, kehrt der Katalysator wieder in seine ursprüngliche Form zurück [15, 16, 17].

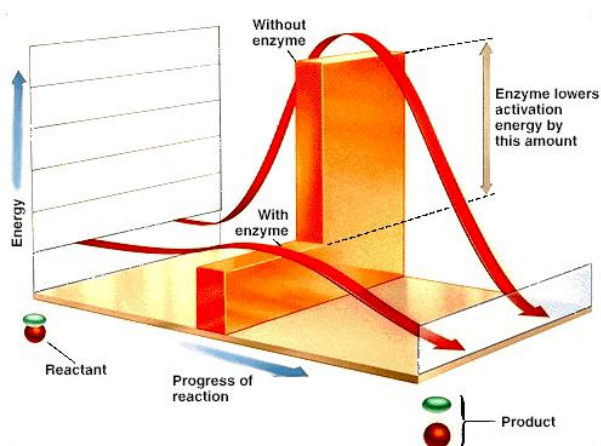


Abbildung 5 Unterschied der Aktivierungsenergie mit und ohne Enzym.

Unter Biokatalysatorenbeteiligung (Enzym oder Ribozym) verringert sich die Aktivierungsenergie und die Reaktionsgeschwindigkeit beschleunigt sich, während sich die Gleichgewichtslage der katalysierenden Reaktion nicht verändert [26].

2.5.2. Klassifizierung

Die internationale Union der Biochemie und Molekularer Biologie führte ein hierarchisches Klassifikations- und Nomenklatorsystem ein, das auf der Art der Reaktion basiert und allgemeine Gültigkeit besitzt. In Tabelle 2 sind die sechs Hauptklassen aufgelistet, zusätzlich wird die Art der katalysierten Reaktion beschrieben und Enzymbeispiele aufgeführt.

Tabelle 2 Enzymklassen, ihre katalytischen Eigenschaften und Enzymbeispiele.

Klasse	Reaktion und Funktion	Beispiele
Oxidoreduktase	$\mathbf{S_{red} + S'_{ox} \longleftrightarrow S_{ox} + S'_{red}}$ Oxidation eines Substrates bei gleichzeitiger Reduktion eines anderen	Lactatdehydrogenase Succinatdehydrogenase Pyruvatdehydrogenase
Transferasen	$\mathbf{S_1-S_2 \longleftrightarrow S_1 + S_2}$ Transfer verschiedener funktioneller Gruppen von einer Substanz auf eine andere	Hexokinase Glykogenphosphorylase
Hydrolasen	$\mathbf{S_1-S_2 + H_2O \longleftrightarrow S_1-OH + S_2-H}$ Hydrolytische Spaltung von funktionellen Gruppen oder Substanzen	Proteasen, Peptidasen Esterasen Glykosidasen
Lyasen	$\mathbf{S_1-X + S_2 \longleftrightarrow S_1 + S_2-X}$ Nicht hydrolytische Spaltung von funktionellen Gruppen oder Substanzen	Aldolase Transketolase Fumarase
Isomerasen	Isomerisation : Umwandlung isomerer Verbindungen	Retinalisomerase Triosephosphatisomerase UDP-Galactose-4-Epimerase
Ligasen	Energieabhängige Verknüpfung von Bindungen	Pyruvatcarboxylase Acyl-CoA-Synthetase Glutaminsynthetase

[Modifiziert nach 16]

2.5.3. Enzyminhibition

Die Enzyminhibition ist ein relevanter Bereich und kommt sehr häufig im Organismus vor. Neben physiologischen Inhibitoren (Proteinaseinhibitoren), kommen auch unphysiologische Hemmstoffe vor. Zu diesen zählen viele Zellgifte und Arzneimittel. Substanzen, die die katalytische Aktivität eines Enzyms ändern, werden als Effektoren bezeichnet. Dabei sind positive Effektoren Aktivatoren (verbesserte katalytische Leistung) und negative werden als Hemmstoffe oder Inhibitoren (I) bezeichnet. Es werden zwei Klassen von I unterschieden: die Reversiblen und die Irreversiblen. Eine weitere Einteilung erfolgt nach Bindungsort. Erfolgt die Inhibition am aktiven Zentrum, spricht man von einer isosterischen Hemmung und bei einer Bindung außerhalb des aktiven Zentrums von einer allosterischen Hemmung.

Hat ein I strukturelle Ähnlichkeit zum Substrat und konkurriert mit diesem um die gleiche Bindungsstelle des Enzyms, wird er kompetitiver Inhibitor genannt. Ist I affiner oder in einer höheren Konzentration vorhanden, wird ein Enzym-Inhibitor-Komplex (EI) gebildet, mit dem Unterschied, dass keine Reaktion ausgelöst wird. Je höher die Affinität von I zum Enzym ist, desto mehr EI entstehen und desto weniger freies Enzym ist vorhanden. Das bedeutet, dass die messbare Reaktionsgeschwindigkeit (V) verlangsamt ist. Wenn dagegen die Konzentration oder die Affinität des I zum Enzym gering ist, wäre die freie Enzymkonzentration höher. In diesem Fall ist V unverändert. Verdeutlicht werden kann dies anhand der Inhibitionskonstante, K_i . Je kleiner der numerische Wert für K_i ist, umso potenter ist die Wirkung von I für das betreffende Enzym ($K_i = [E] \cdot [I] / [EI]$).

Für beide Situationen gilt: Bei Erhöhung der Substratkonzentration ([S]), reduziert sich die Konkurrenz durch I und die Wahrscheinlichkeit einer ES-Bildung nimmt zu. Mit Erhöhung des ES/EI Quotienten nimmt somit auch V zu. Eine kompetitive Enzyminhibition kann durch Erhöhung der [S] aufgehoben werden. Diese Verhältnisse gelten nur für reversible Hemmungen, da bei irreversiblen Hemmungen der EI bis zum Abbau des gesamten Komplexes erhalten bleibt.

Nichtkompetitive Inhibitoren besitzen keine chemischen Ähnlichkeiten zum Substrat und konkurrieren deshalb nicht mit diesem um die gleiche Bindungsstelle. Sie sind in der Lage an einer anderen Stelle des Enzyms zu binden und das sowohl am freien Enzym, als auch unter Ausbildung eines Enzym-Inhibitor-Substrat-Komplex (EIS). Deshalb ist häufig nur die $V_{\max}$ eines Enzyms reduziert, ohne dass sich K_m verändert. EIS zerfällt langsamer zum Produkt als ES, die Reaktion kommt also nie vollständig zum Stillstand. Das heißt, die einfache nichtkompetitive Hemmung verändert die Affinität des Enzyms bzw. EI zum Substrat nicht und es findet durch die Bindung von I keine Konformationsänderung am aktiven Zentrum des

Enzyms statt. Da allerdings Wechselwirkungen (Konformationsänderungen etc.) über große Distanzen in Proteinen stattfinden, gehört diese Form der reversiblen Inhibition zu den Seltensten. Die unkompetitive Hemmung kommt hingegen häufiger vor und führt aufgrund der ausschließlichen Bindung an ES auch zu keiner Konformationsänderung des aktiven Zentrums. Auch in diesem Fall ist V verringert. Bei der irreversiblen Hemmung kann nicht zwischen Inhibitoren und Enzymgiften unterschieden werden, auch durch Erhöhung der $[S]$ kann die Hemmung nicht wieder aufgehoben werden. Die eigentliche Inhibition beruht auf einer Reaktion der für die Enzymkatalyse essentiellen Sulfhydrylgruppen.

Enzyminhibitoren haben in der Medizin große Relevanz. Viele Antibiotika basieren auf dem Prinzip der Enzymhemmung, um spezielle Stoffwechselwege von Bakterien zu unterdrücken und ihnen damit Lebensgrundlagen zu entziehen [16].

2.5.4. Modifikation der Enzymaktivität

Die Quantifizierung von Enzymen erfolgt generell mittels Bestimmung der Enzymaktivität und Determinanten, die diese beeinflussen. Als hoch aktive Katalysatoren sind Enzyme nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden. Der Nachweis erfolgt daher indirekt, über den Nachweis der Reaktion und des Reaktionsausmaßes. Die Enzymaktivität ist abhängig von Cofaktoren, Substratkonzentrationen, Temperatur, pH-Bereich, Ionenbalance und der Enzymqualität selbst.

Jede chemische oder physikalische Veränderung der Umgebung und der Konstellation hat einen Einfluss auf die Enzymaktivität.

2.5.5. Enzymkinetik

Die Enzymkinetik visualisiert und beantwortet die Frage der Geschwindigkeit einer Enzymreaktion verschiedener Substratkonzentrationen zu einer definierten Enzymkonzentration. Die SI-Einheiten Katal (kat) beschreibt die Enzymaktivität (katalytische Aktivität), dabei entspricht 1 kat der Enzymmenge die 1 mol Substrat pro Sekunde unter definierten Bedingungen umsetzt, während die alte Bezeichnung U (Unit oder International Unit (IU)) der Enzymmenge entspricht die 1 μmol Substrat pro Minute unter definierten Bedingungen umsetzt. In medizinischen Bereichen ist es weiterhin üblich mit IU zu arbeiten ($1 \text{ kat} = 1 \times \text{mol/s} = 60 \times 10^6 \text{ U}$). Es existieren zahlreiche Darstellungsformen wie die Michaelis-Menten Kinetik, Time Course Analysen, Lineare Plots, sigmoide Kinetiken oder

Pre-Steady State Kinetiken. Eine häufig verwendete und bekannte Form der Darstellung ist die Michaelis-Menten Kinetik. Viele andere Formen basieren auf diesem 1913 vom deutschen Biochemiker Leonor Michaelis und der kanadischen Medizinerin Maud Leonora Menten entworfenen chemischen Enzym-Reaktions-Modell.

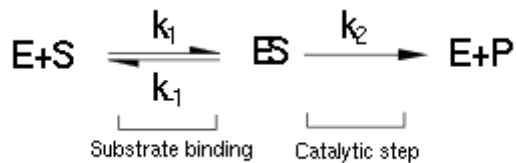
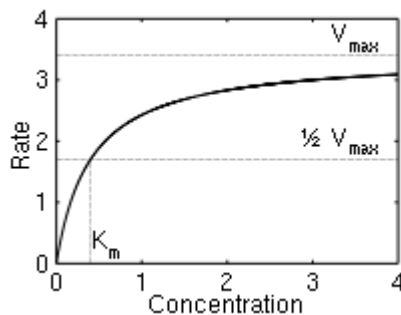


Abbildung 6 Enzym-Reaktion Modell (nach Michaelis-Menten) [16].

[E] beschreibt die Enzymkonzentration, [S] die Konzentration des Substrates, [ES] die des Enzym-Substrat Komplexes und [P] steht für die aus dem Substrat entstandene Produktkonzentration. k_1 , k_{-1} und k_2 stehen für die Konstanten der Reaktionsgeschwindigkeit, wobei k_1 definiert ist als Gleichgewichtskonstante, die zur ES-Bildung führt, während k_{-1} für die umgekehrte Reaktion hin zum freien Enzym und Substrat steht. Dementsprechend ist mit k_2 die Konstante der Reaktion gemeint, die zur Bildung des Produktes und des erneut freigesetzten Enzyms führt.



$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Abbildung 7 zeigt eine typische Sättigungskurve der Michaelis-Menten Kinetik mit den beschreibenden Werten K_m , $V_{\max}$ und $\frac{1}{2} V_{\max}$.

Auf der Abszisse ist die Konzentration des Produktes und der Ordinate die Reaktionsrate, also Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen [16].

Abbildung 8 zeigt Michaelis-Menten Gleichung unter Bezugnahme der Kinetik [16].

Die Michaelis-Menten Gleichung unter Abbildung 8 beschreibt die Werte $V_{\max}$, K_m und [S]. $V_{\max}$ ist definiert als maximale Umsatzrate, die in dieser Reaktion bei konstanter Enzymkonzentration erreicht werden kann. Dies entspricht einer Substratsättigung des

Enzyms. K_m , ist definiert als $[S]$, bei der die Umsatzrate halb so groß ist wie V_{max} bzw. eine Halbsättigung der Enzyme vorliegt. K_m kann aber auch als inverse Einheit der Substrataffinität zum Enzym interpretiert werden. Ein kleiner numerischer K_m -Wert ist mit einer hohen Affinität von Substrat zu Enzym assoziiert ($K_m = [E] \times [S] / [ES]$), daraus resultiert ein schneller Anstieg bis zu V_{max} . Umgekehrt steht ein großer numerischer K_m für eine geringe Affinität und somit für eine höhere Stabilität des Substrates gegenüber dem Enzym und führt zu einer längeren Sättigungsphase, entsprechend mit einem höheren V_{max} , also einer verlangsamten Umsatzrate. Die Werte K_m , V_{max} und $\frac{1}{2} V_{max}$ können zur graphischen Verdeutlichung an Abbildung 7, der Kinetik, abgelesen werden. In anderen Worten ausgedrückt, beschreibt die Michaelis-Menten Gleichung die Veränderung der $[P]$ über die Veränderung in der Zeit [16, 17, 30, 33].

2.5.5.1. Substratkonzentration

Die $[S]$ beeinflusst die Enzymkinetik. Die folgenden Punkte beschreiben kurz, in welcher Hinsicht die Enzymreaktion verändert wird.

(1) Bei sehr geringer $[S]$, ist nicht die volle Arbeitskapazität der Enzyme ausgeschöpft, sodass die „Turnover-Rate“ linear mit der Substratkonzentration steigt. Die meisten Enzyme liegen frei vor. Graphisch dargestellt würde dies eine exponentiell ansteigende Gerade sein oder der Initialphase der Michaelis-Menten Kinetik entsprechen. In dieser Phase der Michaelis-Menten Kinetik ist V von $[S]$ abhängig.

(2) Am Punkt der $\frac{1}{2} V_{max}$ liegt die Hälfte der Enzyme frei und die andere Hälfte als ES vor. Dementsprechend wird mit Erhöhung der $[S]$ die Konzentration der ES erhöht und die Konzentration der freien Enzyme reduziert. Ein Grund dafür ist, dass mit steigender $[S]$ auch die Wahrscheinlichkeit für die „Kollision“ von Enzym und Substrat steigt und es somit zur Bildung von ES kommt.

(3) Wird $[S]$ schrittweise erhöht, während alle anderen Bedingungen (Enzymkonzentration, Temperatur etc.) gleich bleiben, so erreicht die Initialgeschwindigkeit, V , einen maximalen Wert, V_{max} , der durch weitere Substratzugabe nicht mehr verändert werden kann. Alle Enzyme haben Substrat gebunden, die Enzyme sind substratgesättigt [16, 33].

2.5.6. Carboxylesterase

Die CESs sind 60 kDa schwere Enzyme, die ubiquitär im Säugetierorganismus verteilt sind, mit der größten Konzentration bzw. dem höchsten Expressionsprofil in den ER der Leberzellen. CESs gehören zu den Phase I Enzymen der Biotransformation und werden innerhalb dieser Gruppe zu den Hydrolasen gezählt (dritte Hauptklasse der Enzyme, α , β -hydrolase-fold family). Zu den Hydrolasen gehören außer den CESs auch die Pseudocholinesterasen und die Paraoxonasen, diese sind in der Lage funktionelle Gruppen von Xenobiotika wie Carboxylester, Amide, Thioester, Phosphorsäureester und Säureanhydride zu hydrolysieren. Die Hydrolyse der Carboxylester, Amide und Thioester wird zum größten Teil von den CESs katalysiert, die wie bereits erwähnt in verschiedenen Geweben und im Serum lokalisiert sind. Außerdem sind zwei Subtypen im Blut zu finden, die echte Acetylcholinesterase, die an der Erythrozytenmembran als dimeres Enzym vorliegt (im Gegensatz zur tetrameren Struktur des gleichen Enzyms im Nervensystem) und die Pseudocholinesterase, welche auch als Butyrylcholinesterase bekannt ist und im Serum zu finden ist. Durch die katalytische Wirkung der CESs an zahlreichen verschieden chemisch-funktionellen Gruppen wird klar, dass diese einen wichtigen Part in der Detoxifikation und der metabolischen Aktivierung von endogenen und exogenen Substanzen wie Pharmaka, diversen Umweltgiften und Kanzerogenen einnimmt und deshalb häufig für *in vitro* Metaboliten-Versuche herangezogen wird. In der Arzneimittelentwicklung werden sie häufig zur Testung der metabolischen Stabilität verwendet und ein weiteres interessantes Themengebiet umfasst die Entwicklung von Prodrugs, die erst durch Spaltung durch CESs ihre Wirkung erzielen [15, 20, 21, 22, 28, 54].

2.5.6.1. Klassifizierung und katalytische Eigenschaften

Die Klassifizierung der katalysierenden Reaktion (Substratspezifität) der CESs erscheint, basierend auf der Richtlinien der International Union of Biochemistry, unrealisierbar, da vermehrt klar wird, dass Esterasen eine überlappende und große Substratspezifität gegenüber verschiedenen Estern und Amiden aufweisen. Daher existieren verschiedene Klassifizierungssysteme der CESs. Eine 1953 von W.N. Aldridge vorgeschlagene Klassifizierung [28], basiert auf der natürlichen Interaktion der Esterasen mit Organophosphaten. Dabei werden drei Hauptklassen unterschieden (A-C): Die A-Esterasen hydrolysieren Organophosphate, während die B-Esterasen durch diese in ihrer katalytischen Wirkung inhibiert werden und die C-Esterasen keinerlei Wechselwirkungen mit

Organophosphaten aufweisen. Die CESs sowie die Cholinesterasen gehören der Klasse B an. 1966 postulierte K.-B. Augustinsson [28], dass der Hauptunterschied der Klassen A und B nicht die Wechselwirkungen mit Organophosphaten sei, sondern der Aminosäurerest am aktiven Zentrum. Die A-Esterasen beinhalten einen Cysteinrest, während die B-Esterasen einen Serinrest enthalten. Diese Vermutung wurde jedoch nur für die B-Esterasen bestätigt, weshalb man sie auch als Familie der Serin-Esterasen bezeichnet. Nachdem die CESs eine Vielzahl von katalytischen Funktionen aufweisen, also nicht ausschließlich Carboxylester spalten, ist eine Einteilung nach Funktion schwierig. Auf dieser Grundlage macht die Einteilung nach Vergleich der Aminosäuresequenzen (egal welcher Spezies) mit der humanen Carboxylesterasesequenz mehr Sinn, wie es Satoh und Hosokawa 1998 vorschlugen. Danach werden fünf Hauptgruppen unterschieden, die als Isoenzyme CES1, CES2, CES3, CES4 und CES5 bezeichnet werden. Unter die Hauptgruppen CES1 und CES2 fallen die meisten CESs, es sind also die zwei größten Gruppen besagter Isoenzyme. Diese fünf Hauptgruppen (CES1-CES5) der Isoenzyme repräsentieren die Enzymfamilie und können weiter in insgesamt acht Subfamilien (A bis H) eingeteilt werden. In der ersten Familie werden beispielsweise drei Subfamilien CES 1A, CES 1B und CES 1C unterschieden. Die erste Subfamilie kann wiederum in Gruppen unterteilt werden, die wie folgt bezeichnet werden CES 1A1, 1A2, und 1A3. Die anschließende Nummerierung nach der Beschreibung der Subfamilie mittels Buchstaben (A-H), beschreibt ein individuelles Gen [20, 21, 22].

Wie mehrfach erwähnt katalysieren alle Isoenzyme der CESs effektiv die Hydrolyse von verschiedenen Estern zu freien Säuren und Alkoholen und die Hydrolyse von Amiden. Laut Satoh und Hosokawa differiert die Funktion der Subfamilien jedoch in ihrer Substratspezifität und sie katalysieren somit spezielle Ester. Zum Beispiel spaltet CES1 hauptsächlich Substrate mit kleinen Alkoholgruppen und langen Acylresten, aber es kann auch mit kurzkettigen Acylgruppen und langkettigen Alkoholresten reagieren, während das Isoenzym CES2 nur Substrate mit langkettigen Alkoholen und kurzkettigen Acylresten identifiziert und katalysiert [20]. Die Variation in Struktur, Funktion und Lokalisation ist im Laufe der Evolution durch Gendopplungen (Copy Number Variations), alternative messenger RNA Prozesse (alternatives Splicing) und post-translationale Modifikationen zu erklären [21].

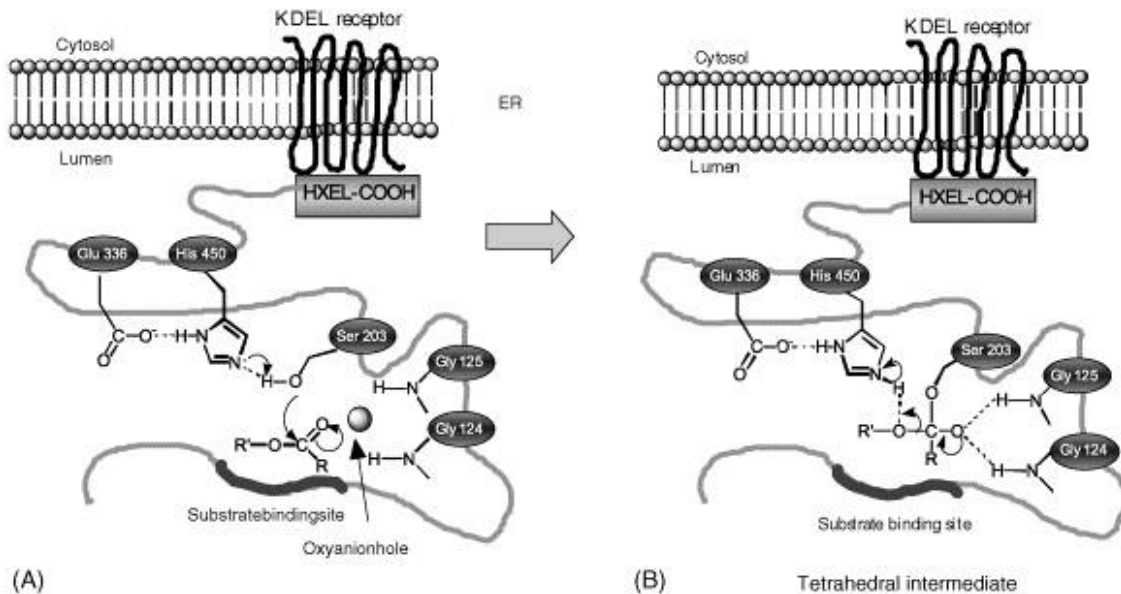


Abbildung 9 Vorgeschlagener Mechanismus der Carboxylesterase-Aktion [22].

Abbildung 9 zeigt die Substratbindung (A) und die Bildung des Intermediats (B) durch Ladungs- und Doppelbindungsverschiebungen. HXEL-COOH beschreibt den C-Terminus nach Einbuchstabenamino-säurecode und KDEL-Rezeptor sorgt für die Retention der Enzyme auf die luminale Seite. Die katalytische Funktion der CES beruht auf der Aminosäuretriade Serin (S), Glutaminsäure (E) und Histidin (H). Es erfolgt eine Ladungsübertragung innerhalb dieser drei Aminosäuren (AS), aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften. Die positiv geladene (basische) AS, H, die aufgrund der Säurefunktionen negativ geladenen E und S, welches einen nukleophilen Rest aufweist, sind an der Bindung von Substraten beteiligt. Aufgrund des nukleophilen Angriffs wird das tetrahedrale Intermediat gebildet, dabei zerfällt die Doppelbindung (nun vier Bindungen) am C-Atom des Carboxylesters, dieses Zwischenprodukt wird durch Wasserstoffbrücken stabilisiert und schließlich der Ester hydrolysiert und die Produkte entstehen.

Lebermikrosomen aller Säugetierspezies enthalten zumindest eine Carboxylesterase, aber die exakte Menge der exprimierten CESs ist in jeder Art von Spezies und Gewebe unbekannt. Weil CESs Glycoproteine sind, kann eine Variation im Kohlenhydratgehalt zu multiplen Formen des Enzyms führen. In der Konsequenz bedeutet dies, dass die große Anzahl an CESs, die mittels isoelektrischer Fokussierung und nichtdenaturierender Gelelektrophorese identifiziert worden sind, wahrscheinlich die Menge an codierenden Genen überschätzt [20].

2.5.7. Mikrosomen und Cytochrom P450 Komplexe

Mikrosomen (griech. Für „kleine Körper“) sind Membranausstülpungen bzw. Fragment der ER und entstehen z.B. durch Homogenisierung von Hepatozyten. Sie beinhalten Enzymkomplexe des Phase I (CYP450) sowie zumindest einen CES-Subtyp. Die Enzymkomplexe katalysieren Hydroxylierungen, Oxidationen, Reduktionen und Decarboxylierungen von Xenobiotika. Dabei entstehen funktionelle Gruppen, die innerhalb der Phase II mit endogenen Substanzen konjugiert werden können und aufgrund der dadurch erhöhten Hydrophilie vermehrt bzw. schneller eliminiert werden (siehe Kapitel Biotransformation 2.4.1) [15].

2.5.7.1. Struktur und Klassifizierung der CYPs

CYP450 von Säugetierspezies sind an Mitochondrien und ER membrangebunden und inkludieren Hämproteine mit Hämeisen. Der Stickstoff des Hämrings bindet direkt vier Liganden, aber kann aufgrund seiner flachen Struktur darüber hinaus zwei weitere Liganden oben und unten binden. Der fünfte Ligand ist ein Thiolat, welches negativ geladen ist und an die Hämbindungsseite der aktiven Seite des Cytochroms bindet [24].

CYP450s werden in Familien und Subfamilien je nach genetischer Ähnlichkeit unterteilt. Bei einer Aminosäuresequenz-Similiarität von 40% und mehr gehören diese einer Familie an, bei einer Ähnlichkeit größer als 55% werden sie in die gleiche Subfamilie eingeteilt [15]. Bis heute sind 57 CYP Gene sequenziert worden und 58 Pseudogene. Die 57 Gene codieren für die 18 Familien und 44 Subfamilien der CYP450. Pseudogene translatieren keine Proteine. [23]. Die folgende Tabelle 3 zeigt die drei wichtigsten CYP-Familien, ihre Funktion im Metabolismus, sowie die Anzahl der Gene, die für diese Familie codiert [25].

Tabelle 3 Drei Familien der Cytochrom P 450 Enzyme und ihre Funktionen

	CYP1	CYP2	CYP3
Menge der Gene und Subfamilien ¹⁾ (Genname)	3 Gene 3 Subfamilien (CYP1A1, 2CA2, CYP 1B1)	16 Gene (2A6, 2A7, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 2J2, 2R1, 2S1, 2U1, 2W1) 13 Subfamilien	4 Gene (3A4, 3A5, 3A7, 3A43) 1 Subfamilien
Hauptfunktion (Beispiele)	Fremdstoff-metabolismus Hydroxylierung von Estrogen Oxydation von Uroporphyrinogen Aktivierung von Komponenten zu Karzinogenen	Fremdstoff-metabolismus Detoxifizierung Hydroxylierung von Steroiden Katalysierung von Taxol, ein Chemotherapeutikum Metabolisierung von Omeprazol, einem Protonpumpen-Inhibitor	Fremdstoff-metabolismus (einer der wichtigsten) Metabolisierung von mehr als 120 verschiedenen Substanzen (Arzneimittel etc.)
Induzierende (↑) und reduzierende (↓) Faktoren	↑ Polyzyklische Hydrocarbone (aus Zigarettenrauch und verkohltem Essen)	↑ Barbiturate	↑ Alkohol ↓ Antimykotika

¹⁾ Das Präfix CYP wird vor jedem Gen-Namen eingefügt [24]

2.6. Blut-Hirn-Schranke

Die BHS ist eine physiologische Barriere zwischen dem externen Blutfluss (Blutkreislauf) und der Extrazellulärflüssigkeit des Zentralnervens-Systems (ZNS) und in allen Tetrapoden vorhanden. Die Hauptaufgabe der BHS befindet sich in der Regulierung bzw. die Blockade des Stofftransfers (Toxine, Pathogene, Glucose, Neurotransmitter usw.) zwischen peripheren Blutkreislauf und ZNS.

Die BHS besteht im Wesentlichen aus Endothelzellen (EZ), die über Tight Junctions (TJ) eng mit einander verbunden sind, sowie aus weiteren Zelltypen den Astrozyten und Perizyten und der Basallamina, die von den endothelialen Zellen sezerniert wird und diese umschließt. Zusammen bilden sie einen engen Zellverbund (der Abstand zwischen EZ und Astrozyten bzw. Perizyten beträgt nur 20nm), der nur schwer passierbar ist.

Die Basallamina ist eine Proteinschicht, die aus Kollagen Typ IV, Heparinsulfat-Proteoglykan, Laminin, Fibronectin und anderen extrazellulären Matrixproteinen gebildet wird. Die sternenförmigen Astrozyten, die auch nach der Geburt teilungsfähig verbleiben, umschließen die EZ. Ihre Hauptfunktion liegt in der Nährstoffversorgung der EZ und darüber hinaus beeinflussen sie durch Botenstoffausschüttung die Durchlässigkeit des Endothels. Neben den Astrozyten sind auch die Perizyten an der BHS-Funktion beteiligt. Etwa 20 % der EZ sind mit Perizyten verankert und jede zweite bis vierte EZ ist mit einem Perizyt fest verbunden unter Ausbildung von drei verschiedenen Arten von Verknüpfungen: Dies sind fokale Adhäsion (Adhesion Plaques) und Peg-and-Socket Kontakte (durch Ausstülpungen ineinander greifende Areale der EZ-Membran und des Perizyts), die Gap Junctions (kanalbildende Proteinkomplexe und Adhäsionsproteine) und TJ [38, 39]. Die TJ schließen einen parazellulären Transport aus, folglich einen Transport durch Membranen benachbarter Zellen.

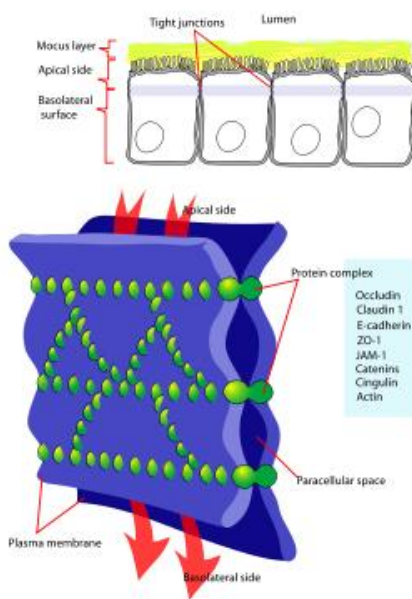


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Tight Junction an der Blut-Hirn-Schranke.

Diese engen Verbindung bestehen aus verschiedenen Transmembranproteinen der Claudin und Occludin Familien. Die endothelialen Zellen des ZNS exprimieren nur zwei Claudine, das Claudin-5 und Claudin-12, wobei die Funktionen im Bezug auf die BHS für das Claudin-5 mit Knockout-Mäusen (CLDN-5 Gen) nachgewiesen wurden [49].

Neben der diskutierten physiologischen Barriere (anatomischer Aufbau), ist die enzymatische Barriere erwähnenswert. Das Gehirn ist ein metabolisch hochaktives Organ, die hohe Mitochondriendichte und die darin enthaltenen

Enzyme deuten darauf hin. In den EZ sind nicht nur hohe Konzentrationen, sondern es sind auch viele verschiedene Enzymklassen vertreten. Neben dem metabolischen Gleichgewicht (Energiegewinnung), sorgen diese auch für den Auf- und Abbau von Neurotransmittern. Beispiele für die im ZNS befindlichen Enzyme sind die γ -Glutamyltransferase, die alkaline Phosphatase und die Glucose-6-Phosphatase und weitere metabolisierende Enzyme, wie Catechol-O-Methyltransferase, Monoaminoxidase oder CYP450 Familie. Aufgrund der hohen Enzymdichte unterliegen Substrate teilweise schon während des Passierens oder des Transportes durch die BHS der Biotransformation [12, 13, 14, 18].

2.6.1. Transportsysteme

Die engverbundenen zellulären Strukturen der BHS, erlauben nur wenigen kleinen lipophilen Molekülen den Weg ins ZNS (O_2 , CO_2 und Hormone) und beschränkt die Diffusion von Größeren oder Hydrophileren oder mikroskopischen Objekten (Bakterien).

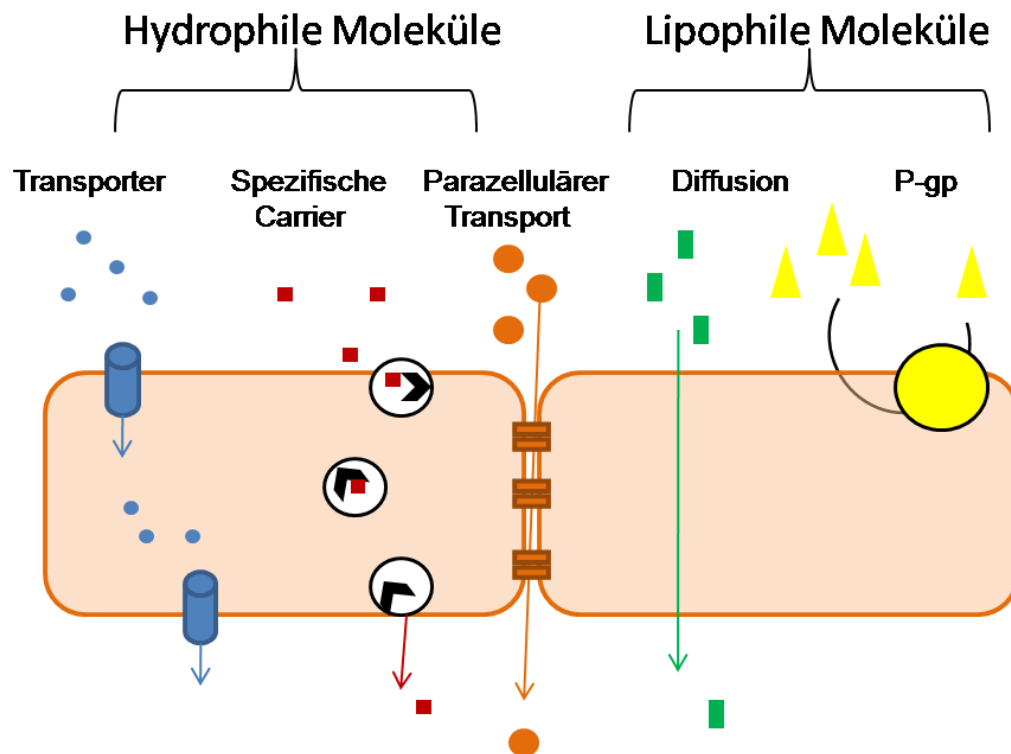


Abbildung 11 Multimodales Transportsystem der Blut-Hirn-Schranke [modifiziert nach 27].

Die BHS weist neben der passiven Diffusion auch verschiedene aktive Transportsysteme auf, deshalb werden diese auch multimodal genannt. Hydrophile Nährstoffe und andere Peptide passieren die BHS durch spezifische Transporter, andere kleine hydrophile Substanzen (Wasser, Glycerin und Harnstoff) sind wie oben aufgezeigt in der Lage die TJ parazellulär passiv zu durchqueren. Die passive Diffusion (freie Diffusion) ist dabei die einfachste Form – neben der Molekülgröße, sind auch Faktoren wie Lipophilie (siehe nächstes Kapitel 2.4.2), Wasserstoffbindungspotentiale, polare Oberfläche und die Anzahl der rotierbaren Bindungen entscheidend [18]. Kleine lipophile Moleküle diffundieren ohne Schwierigkeiten. Ein Molekül mit einer Masse von 200 g mol^{-1} ist 100-mal permeabler als ein Molekül mit der

Masse von $450\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, der oft angegebene Höchststrahlen von $200\text{--}500\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ist also nicht als digitale Barriere anzusehen [64].

Ein anderer Transportweg für „komplexere“ Moleküle, sind spezielle Transporter (P-Glycoproteine (P-gp), Aminosäure- und Glucosetransporter), man spricht vom sogenannten Carrier-vermittelten Transport, diese können aktiv (unter Energieverbrauch) oder als erleichterte Diffusion (kein Energieverbrauch) ablaufen.

Eine weitere Form des passiven Wegs, bildet die kanalvermittelte Permeabilität. Wasser ist zwar ein sehr kleines Molekül, kann allerdings nicht durch die hydrophoben Knicks in der Lipiddoppelschicht diffundieren, jedoch durch spezielle Kanäle, den Aquaporinen. Aquaporine sind Transmembranproteine, die in der Lipiddoppelschicht eingelagert sind und hydrophilen Substanzen ermöglichen, wie Wasser die Barriere zu durchqueren [67].

Neben den passiven Formen gibt es auch aktive Transporter. „Aktiv“ bedeutet in diesem Zusammenhang unter Energieverbrauch (ATP) [63]. Ein Beispiel dafür ist das P-gp, welches eine Vielzahl von Molekülen über die Blutschranke ins ZNS je nach Nutzen hinein oder hinaus transportiert.

Der letzte zu erwähnende Mechanismus ist die Endozytose oder Transzytose genannt. Dieser kann in zwei Subprozesse eingeteilt werden: der rezeptorvermittelten Transzytose und der adsorptionsvermittelten Transzytose. Beispiele für erstere sind Transferrin, der Leptin- und Insulin Rezeptor [62]. Die adsorptionsvermittelte Transzytose, auch kationische Transzytose genannt, arbeitet mittels elektrostatischen Interaktionen. Die positiv geladenen Moleküle (Kationen) interagieren mit der durch Glycoproteine negativ geladenen Endothelialzellenoberfläche. Es erfolgt wie bei der rezeptorvermittelten Transzytose eine Internalisierung in Form von „coat pits“ und eine Freisetzung auf der abluminalen Seite [61].

2.7. Lipophilie

Die wichtigste physikalische Eigenschaft, die die biologische Aktivität von Substanzen betrifft, ist ohne Zweifel die Lipophilie. Damit eine Substanz die BHS passieren kann, ist neben Moleküleigenschaften wie Größe, Wasserstoffbindungspotentiale, polare Oberflächenareale und Anzahl der rotierbaren Bindung, die Lipophilie entscheidend.

Der Verteilungskoeffizient (P oder auch D genannt) ist ein Maß für die Lipophilie eines Stoffes und beschreibt das Konzentrationsverhältnis in zwei nicht mischbaren Phasen. Bei den zwei Phasen handelt es sich meist um das sehr lipophile 1-Octanol und um eine wässrige Phase, beispielsweise ein Puffer (pH 7-7.4). Man spricht somit vom 1-Octanol-Wasser

Verteilungskoeffizient (K_{ow}), in der englischen Literatur oft auch als P oder D angegeben. 1962 entwickelten Hansch und Fujita diese Messung der Lipophilie und drückten den Verteilungskoeffizienten logarithmisch als $\log P_{ow}$ aus. Verwendet man andere Methoden, wie zum Beispiel HPLC Verfahren zur Messung, spricht man einfach vom $\log P$ bzw. $\log D$. Die zwei dimensionslosen Maße, $\log P$ und $\log D$, unterscheiden sich in der Definition jedoch leicht, können daher nicht synonym verwendet werden.

Der $\log P$ beschreibt den logarithmischen Verteilungskoeffizienten eines unionisierten gelösten Stoffes (Soluten) zwischen den zwei Phasen. Im Gegensatz dazu, bezieht sich der $\log D$ auf alle Spezies, der unionisierten sowie der ionisierten Form, die durch Dissoziation und Assoziation entstehen. Der $\log D$ definiert also den Logarithmus des Verhältnisses der Gesamtkonzentration aller Spezies in einem Solventen zu der Summe aller Spezies in der anderen Phase. Das Vorliegen einzelner Spezies ist pH-abhängig, weshalb der pH-Wert bei jeder Messung und Angabe der Lipophilie definiert werden muss. $\log D$ und $\log P$ sind für unionisierte Soluten jedoch pH-Wert unabhängig und gleichzusetzen. Zur Verdeutlichung der Unterschiede und zum Verständnis des Verteilungskoeffizienten, sind in Abbildung 12 und 13 die Formeln des $\log P$ bzw. $\log D$ angeführt.

$$\log P_{oct/wat} = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{un-ionized water}}} \right)$$

$$\log D_{oct/wat} = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{ionized water}} + [\text{solute}]_{\text{neutral water}}} \right)$$

Abbildung 12 und 13 Maß für die Lipophilie $\log P$ und unter Einbezug der Solutenspezies $\log D$.

Es gibt zahlreiche Methoden die zur Bestimmung der Lipophilie herangezogen werden. Die älteste, einfachste und wohl bekannteste Methode sind die Schüttelversuche mit Scheidetrichtern oder Röhrchen (shake-flask und tube method), mit denen man den K_{ow} bzw. $\log P_{ow}$ angibt. In den zwei vorgeschüttelten Phasen (Octanol und wässrige Phase) wird die Substanz hinzugefügt und unter weiterführendem Schütteln gelöst und verteilt. In der Literatur wird meist eine bis mehrere Waschphasen beschrieben, in denen die wässrige Phase abgelassen und Neue hinzugefügt wird. Nach jedem Waschschrift verteilt sich die Substanz wieder im gleichen Verhältnis zwischen den Phasen. Es erfolgt die Konzentrationsbestimmung des gelösten Stoffes in den zwei Phasen, im Fall einer radioaktiv

markierten Substanz über die Messung im Gamma-Counter oder durch Injektion der Phasen in die HPLC und Berechnung des Verhältnisses.

Modernere Methoden werden direkt mit der HPLC ausgeführt. Die Messung basiert auf einer Korrelation der Retentionszeiten (R_t) zu Referenzsubstanzen, meistens nutzt man die Extrapolation von Retentionsindices, wie den Retentionsfaktor k' auf 100% wässrigen Konditionen. Dieser k' Faktor (bei 100% Wasser) wird dann mit bekannten $\log P_{ow}$ -Werten korreliert, um eine Regressionsgleichung für die Säule, den Solventen und die Klasse der Komponente zu erhalten [53]. Neben der durchgeführten Methode zur Bestimmung des $\log P$ (siehe Kapitel 3.3; [35]), existiert noch eine weitere spezielle HPLC-Methode, die Immobilized Artificial Membrane-Chromatographie (IAM). Die IAM, welche eine mit Phosphatidylcholin modifizierte stationäre Phase darstellt, findet Anwendung um die Permeabilität (P_m) und den Membran-Verteilungskoeffizienten (K_m) zu bestimmen. Diese Werte dienen der Vorhersage, ob ein Pharmakon passive BHS-Durchlässigkeit aufweist [31, 34, 40].

Vergleicht man die Schüttelmethode mit den HPLC-Methoden bezüglich ihrer Handhabung, sind die HPLC Strategien simpler, schneller, effizienter und reproduzierbarer, das nötige Equipment findet sich in jedem Labor, jedoch sind geeignete Standards nötig.

Da es schwierig ist für alle Chemikalien den K_{ow} zu messen, gibt es verschiedenste Modelle für die Abschätzung, z.B. durch Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR) oder durch Linear Free Energy Relationships. Hierfür genügt die Eingabe der chemischen Struktur bzw. Nomenklatur der Probe in die entsprechenden Programme.

Je niedriger (auch negativer Bereich), desto hydrophiler und je größer der Wert, desto höher die lipophilen Eigenschaften.

3. Methodik

3.1. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die High Pressure (oder Performance) Liquid Chromatography oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie ist ein analytisches Verfahren zur Trennung von Substanzmischungen in ihre Einzelkomponenten. Dieses Verfahren dient neben der qualitativen Analyse, für die man üblicherweise Standards einsetzt, auch einer quantitativen Aussage mittels derer Konzentration erhoben werden können. Die Trennung basiert auf dem Prinzip der Interaktionen einer zu trennenden Substanz mit der stationären bzw. mobilen Phase. Je affiner, beziehungsweise je größer die Wechselwirkung der Substanz zur stationären

Phase ist, desto länger verbleibt diese in der Säule und die Retentionszeit verlängert sich. Entsprechend verkürzt sich die Retentionszeit bei wenigen oder keinen Wechselwirkungen. Die stationäre Phase entspricht in der HPLC der Säule, wobei hier grundsätzlich meist zwischen Normalphase (normale phase, NP) und der Umkehrphase (reversed phase, RP) zu unterscheiden ist. Bei der Normalphase (NP-HPLC) handelt es sich um eine polare stationäre Phase, in der die Säulenmatrix aus Kieselgel oder Silicagel besteht. Entsprechend der Wechselwirkung werden polare Substanzen länger an der Säulenmatrix adsorbiert, andererseits steigt die Elution aus der Säule mit steigender Polarität des Laufmittels. Die Elutionskraft von verschiedenen Chemikalien (Eluenten) ist als elutrope Reihe tabellarisiert. Bei der NP-HPLC sind größtenteils organische Lösungsmitteln in Verwendung. Die Säule der Umkehrphase (RP) besteht ebenfalls aus Silicagel. Die Siliziummoleküle werden mit langkettigen Kohlenwasserstoffen modifiziert, sodass eine unpolare Oberfläche entsteht. Die RP-HPLC ist die am häufigsten verwendete Form der HPLC; hier werden unpolare Substanzen retiniert und die Elutionskraft sinkt mit steigender Polarität des Laufmittels bzw. steigt je unpolarer das Laufmittel ist [59].

3.1.1. Aufbau einer HPLC-Anlage

Die HPLC ist aus den Grundelementen Injektor, Pumpe, Säule und Detektor aufgebaut. Über den Injektor, gebräuchlich ist ein 6-Wegeventil, werden die Proben in das HPLC-System eingeschleust. Die Probe gelangt in der Load-Position des Injektors zunächst in die Schleife, während der Eluent an der Probenschleife vorbeigeleitet wird, überschüssiges Probenmaterial sammelt sich im Abfallbehältnis. Im zweiten Schritt, der Inject-Position, wird die Probe von der Schleife in den Hochdruckbereich geschaltet zur Säule transportiert. Modernere Anlagen sind meist mit einem Autosampler ausgestattet, der die Probenaufnahme und die Injektion automatisiert. Die Proben werden in Ein- oder Mehrwegfläschen überführt und für die Analyse in einer Probenplatte mit nummerierten Positionen gelagert, die mit einem Kühlsystem ausgestattet ist um eine möglichst konstante Temperatur während der Analysen zu gewährleisten.

Die Pumpe, die einen Systemdruck von bis zu 400 bar erreichen kann, befördert Probe bzw. Eluenten zur Säule und ist dafür zuständig den Flow (Fließgeschwindigkeit, ml/min) des Laufmittels unter Druckveränderung konstant zu halten. Die Pumpeneinheit besteht aus dem Pumpenkopf, dem Ein- und Auslassventil und der Kolben- und Kammereinheit. Unterschieden werden die zwei Grundmodelle der Einkolbenpumpen und

Zweikolbenpumpen. Vorteil des Letzteren ist die Pulsationsreduktion. Fester Bestandteil von vielen isokratischen und Gradientenpumpen ist ein Entgaser. Dieser beseitigt Lufteinschlüsse im Laufmittel. Die Gradientenpumpen können mittels Gradientenventil verschiedene Eluenten zusammensetzen und besitzen den Vorteil, dass nicht zwingend ein Laufmittelgemisch herzustellen ist.

Die am häufigsten verwendeten Detektoren sind online nachgeschaltete UV/VIS-Detektoren, Fluoreszenzdetektoren und das Massenspektrometer. Hinzu kommt beim Arbeiten mit offenen radioaktiven Isotopen der Radiodetektor. Oft werden auch zwei in Serie geschaltete Detektoren verwendet, z.B. ein UV/ -Detektor in Kombination mit einem Radiodetektor. Der UV/VIS-Detektor misst die Absorption der Probe bei unterschiedlicher Wellenlänge. Durch eine Durchflussszelle wird Licht einer Deuterium- bzw. Wolframlampe bestimmter Wellenlängen eingestrahlt und mittels einer Photodiode als abgeschwächtes Licht aufgefangen und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Der Radiodetektor hingegen sendet Szintillation nach Anregung der Kristalle durch γ -Strahlen aus. Die beim Zerfall von Radioisotopen eintreffenden Photonen werden mittels Natriumiodid-Kristall detektiert, verstärkt und durch eine Auswerteinheit graphisch dargestellt. Bei der Verwendung von zwei nachgeschalteten Detektoren ist zu bedenken, dass die Peaks in den zwei parallel angezeigten Chromatogrammen nicht zeitgleich eintreffen, obwohl es sich um die gleiche Substanz handelt. Die Zeitdifferenz kann mittels Durchlaufgeschwindigkeit, Volumen und Weges der Leitung von einem Detektor zum nächsten berechnet werden, um auszuschließen, dass es sich möglicherweise um einen anderen Analyten handelt, wird zusätzlich vorher mit Standards gearbeitet und/oder Proben gespiked [65].

3.2. Metaboliten-Versuche

Das Grundprinzip besteht in der Messung des Abbaus einer Substanz durch ein bestimmtes Enzym oder durch Enzymkomplexe. Die zu testende Substanz wird dabei unter physiologischen Bedingungen *in vitro* mit dem Enzym inkubiert, die Reaktion wird zu unterschiedlichen und festgelegten Zeitpunkten (z.B. 0h, 2h, 4h, 6h) gestoppt, indem das Enzym denaturiert wird. Zum Zeitpunkt 0h findet noch kein Abbau statt. Die Quantifizierung des Substanzabbaus und der Produktzunahme erfolgt mittels HPLC und Berechnung mit Hilfe von erstellten Standardgeraden. Die Stabilität wird mittels Michaelis-Menten Kinetik über K_m und V_{max} erhoben und interpretiert.

In den folgenden Unterkapiteln 3.2.3. wird der genaue Versuchsablauf beschrieben einschließlich Angaben zu Apparaturen und Verbrauchsmaterialien.

3.2.1. Apparaturen

Verwendet wurde ein Agilent 1100/1200 HPLC-System, welches aus einem Diodenarray-UV-Detektor (Messung bei 254 nm), einer quaternären Pumpe (Agilent 1200 Serie), sowie einem Vakuum-Degasser (1200 Agilent Serie) und einem Autosampler (1290 Infinity Serie) besteht. Über ein an die Probenplatte gekoppeltes Kühlsystem (1290 Infinity Serie) wurde die Temperatur konstant gehalten und dadurch Probenkonzentrierungen durch Verdunstung vermieden. Die Kontrolle der Anlage und die nötigen Einstellungen zur Methode wurden mit der Gina Star Software Version 4.08 durchgeführt. Die Injektionsmenge jeder Messung der Carboxylesterase-Ansätze lag bei 20 µl, die Durchflussgeschwindigkeit bei 2 ml/min und einem isokratischen Laufmittelverhältnis eines ACN-Citratpuffergemisches von 68:32. Das Trinatriumcitrat wurde mit einer MTTLER PJ 300 Waage eingewogen und der pH-Wert des hergestellten Citratpuffers (pH 2.5) mit einem pH-Meter (WTW pH 537, Micorprocessor) eingestellt. Als stationäre Phase wurde eine LiChrospher LICHROART® RP-18e (5µm), 125x4mm Säule, sowie eine Vorsäule von 4x4mm gewählt. Zur Durchführung des Versuches wurden ausschließlich Kolbenhubpipetten (10 µl- 1000 µl) und Reaktionsgefäße (1,5 ml) der Firma Eppendorf verwendet. Die Reinsubstanzen wurden mit einer Sartorius Waage (Mechatronics Supermicro) eingewogen, in DMSO gelöst und in der entsprechenden Konzentration dem Versuchsansatz zugefügt. Dieser wurde im Thermomixer (Eppendorf compact) bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden mit einem Vortex (LABINCO L24) gemischt und in einer Hettich Zentrifuge (Universal 30 RF), die über ein Kühlsystem verfügt, zentrifugiert (23.000 g, 4 min und 4° C). Der Überstand mittels der oben beschriebenen HPLC Anlage analysiert.

3.2.2. Reagenzien

Tabelle 4 Reagenzien der Metaboliten-Versuche

Mobile Phase :	Citratpuffer pH 2,5, 32%:AcN 68%
Trisodium Citrate Dihydrate CAS 6132-04-3 (Sigma, Steinheim, Germany)	10g Trisodium Citrat Dihydrat
HCL	+500mL Aqua purificata
Combi Tritisol® CAS 7647-01-0 (Merck,	

Darmstadt, Germany) NaOH CAS 1310-73-2 (Merck, Darmstadt, Germany) Acetonitril (ACN) G Chrosolv ® for HPLC, super gradient grade CAS 75-05-8 (Sigma, Steinheim, Germany)	+34mL HCL auf 1 L mit Aqua purificata (Braun Melsung AG) auffüllen pH- Korrektur mit HCL bzw. NaOH
Phosphat Puffer (PBS) pH 7,4 10x Konzentrat Lot No. 11230-37 (Morphisto, Frankfurt am Main, Germany)	1:10 Verdünnung mit Aqua purificata
Stoppreagenz: Methanol CAS 67-56-1 (Merck, Darmstadt, Germany) Acetonitril (ACN) CAS 75-05-8 (Sigma, Steinheim, Germany)	1:10 MeOH/ACN
Esterase from Porcine Liver, Crude; Lyophilized powder containing less than 5% buffer salts 27 units/ mg solid CAS 9016-18-6 (Sigma, Steinheim, Germany)	Aliquotiert zu 200 IU in PBS (pH 7.4)
FE@SUPPY Analoga in Zusammenarbeit mit dem Department für Arznei- und Naturstoffsynthese, Universität Wien DMSO CAS 67-68-5 (Sigma, Steinheim, Germany)	1mg/ml in DMSO

3.2.3. Versuchsbeschreibung

3.2.3.1. Eingrenzung der möglichen Metaboliten

Die CES katalysiert nahezu ausschließlich die Hydrolyse von Estern, weshalb nur FE@SUPPY-Derivate selbst und kleinere Spaltprodukte wie Fluoroethanol oder Methanol als mögliche Metaboliten entstehen können. Die Festlegung bzw. Eingrenzung der möglichen Produkte wird benötigt, um die tatsächlichen Metaboliten mittels Standard im HPLC-System zu identifizieren.

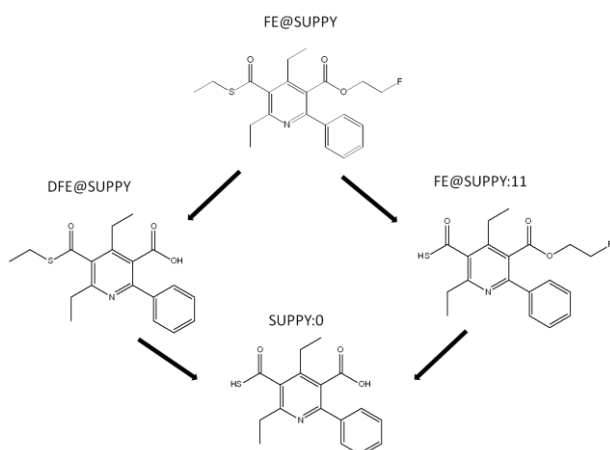


Abbildung 14 zeigt mögliche CES katalysierte Metaboliten von FE@SUPPLY

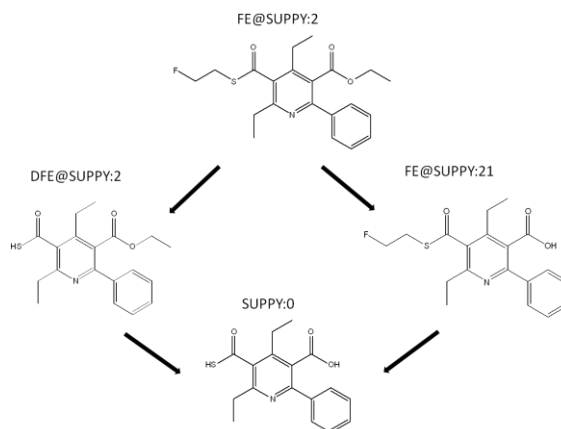


Abbildung 15 zeigt mögliche CES katalysierte Metaboliten von FE@SUPPLY:2

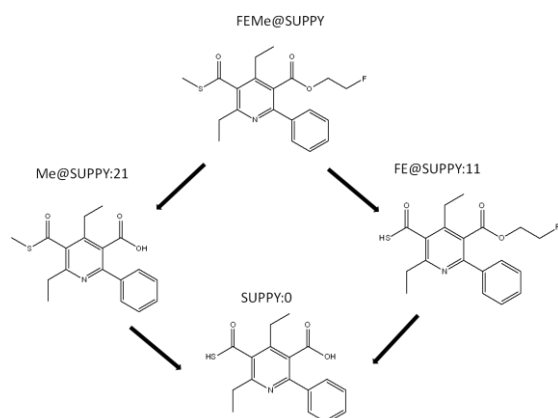


Abbildung 16 zeigt mögliche CES katalysierte Metaboliten von FEMe@SUPPLY

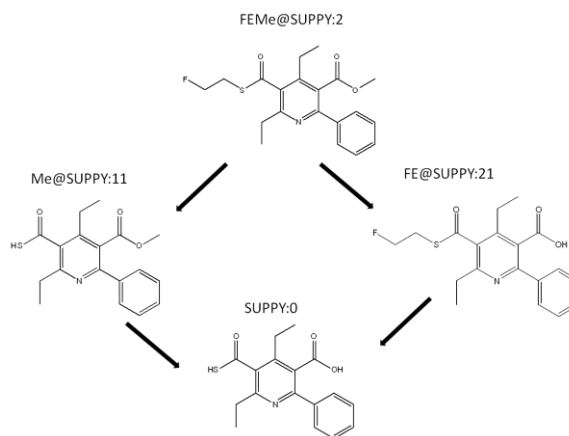


Abbildung 17 zeigt mögliche CES katalysierte Metaboliten von FEMe@SUPPLY:2

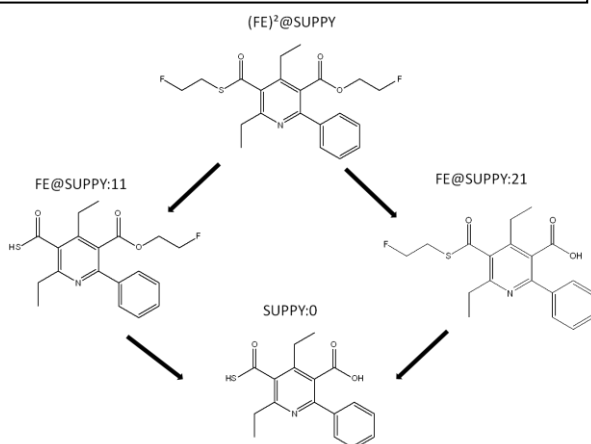


Abbildung 18 zeigt mögliche CES katalysierte Metaboliten von (FE)²@SUPPLY

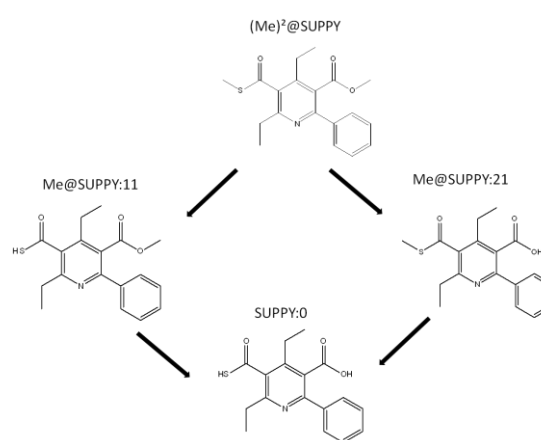


Abbildung 19 zeigt mögliche CES katalysierte Metaboliten von (Me)²@SUPPLY

3.2.3.2. Standards

In Einzelschritten werden die auf ihre metabolische Stabilität zu testenden neun Derivate (siehe Tabelle 5) mit ihren jeweiligen möglichen Metaboliten in die HPLC eingespritzt, um eine erfolgreiche qualitative Trennung von Edukt und möglichem Produkt zu überprüfen und evtl. die HPLC Konditionen zu optimieren und anzupassen (HPLC Konditionen siehe Unterkapitel 3.2.3.3.). Die Standards dienen der Identifizierung der Produkte anhand der R_f bei gleichen HPLC Bedingungen.

3.2.3.3. Carboxylesterase-Ansätze

Durchgeführt wurden die CES-Ansätze in einem Gesamtvolumen von 250 μ l im Triplikat ($n=3$) mit einer konstanten Enzymmenge von 80 IU und unterschiedlichen Konzentrationen (10, 20, 50 und 100 μ g/ml) der FE@SUPPY Derivate um eine optimale Sättigungskurve zu generieren.

Die CES und der Phosphatpuffer (pH 7.4) wurden im Thermomixer unter permanenten Rotierbewegungen (900 rpm) präinkubiert und auf konstanten 37° C gehalten. Die Reaktionsgefäße wurden zusätzlich mit Parafilm verschlossen, um die Proben vor Verdunstung zu schützen.

Nach Substratzugabe, wurde zügig mit dem Vortex gemischt und der Ansatz weiter im Thermomixer inkubiert.

Zu den definierten Zeitpunkten (0, 1, 2, 4 h) wurden jeweils 50 μ l Aliquot aus den Ansätzen entnommen und in bereits mit Stoppreagenz (50 μ l) gefüllte Eppendorfreaktionsgefäße 1:1 pipettiert, gemischt und bei 4°C und 23000 g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein HPLC-Vial überführt und jeweils 20 μ l mittels HPLC analysiert.

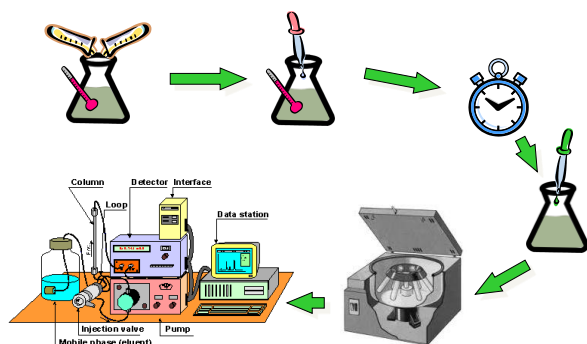


Abbildung 20 zeigt schematisch den Versuchsablauf.

Die chromatographische Auswertung erfolgte nach den Angaben unter Punkt 3.2.1.

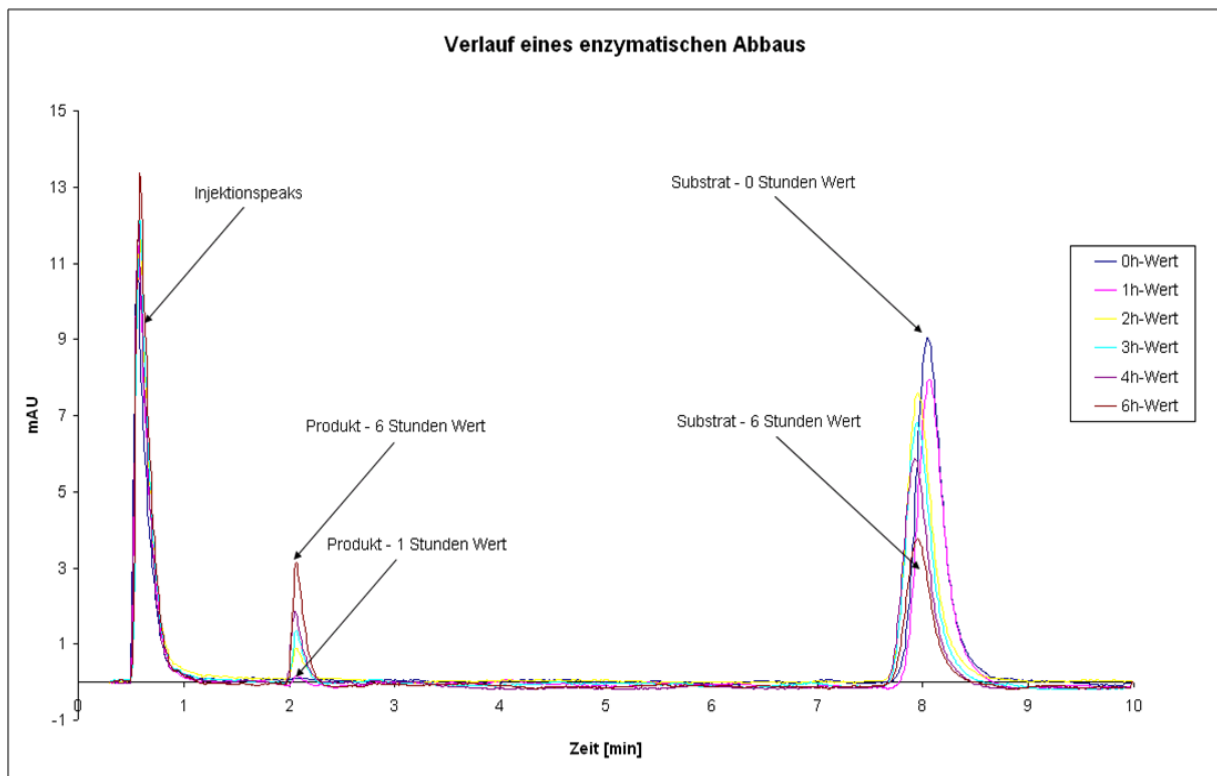


Abbildung 21 Schematische Darstellung des Verlauf einen enzymatischen Abbaus [70].

In Abbildung 15 ist ein chromatographischer Verlauf des enzymatischen Abbaus zu erkennen. Zum Zeitpunkt 0 Stunden ist die Gesamtkonzentration des Substrates vorhanden. Im Verlauf der Reaktion nimmt die „Area under the Curve“ (AUC) des Substratpeaks ab, während sich ein Produktpeak bildet und dieser über die Zeit steigt.

3.2.3.4. Identifizierung der Produkte

Die R_t der Produkte im Chromatogramm des Metaboliten-Ansatzes (Kapitel 3.2.3.3) werden mit denen, der zuvor eingespritzten Standards der möglichen Metaboliten qualitativ überprüft (Kapitel 3.2.3.2.) und die Produkte identifiziert.

3.2.3.1. Proben-Recovery in der RP-HPLC

Ein weiteres wichtiges Mittel um die Sicherheit der Methodik zu überprüfen, stellt die sogenannte Recovery dar. Dabei werden die zu testenden Analoga unter gleichen

chromatographischen Bedingungen (Laufmittel und –verhältnis, sowie Fließgeschwindigkeit und Wellenlänge) im Triplikat mit und ohne Trennsäule injiziert. Ist die AUC bzw. die errechnete Konzentration des entsprechenden Analogons (über Standardgeraden zu berechnen) mit und ohne Trennsäule die Selbe, spricht man von einer 100%igen Recovery. Die Bestimmung der Recovery ist nötig, um sicher zu gehen, dass keiner der Analyten bzw. Teilkonzentration in der Säule verbleibt und die Standardgeraden verlässlich sind [37].

3.2.3.2. Erstellung von Regressionsgeraden

Zur Auswertung der Chromatogramme aus den Metaboliten-Versuchen (Kapitel 3.2.3.3) wurden zu jedem Derivat, das in den Versuchen verwendet worden ist (siehe Tabelle 5) und für das jeweilige identifizierte Produkt Standardgeraden erstellt.

Für die Erstellung der Standardgeraden (Regressiongeraden) wurden im Triplikat Verdünnungsreihen erstellt, die unter den gleichen chromatographischen Bedingungen ausgewertet wurden. Die Standardgerade und ihre Geradengleichung wurden im Excel 2007 erstellt. Zu beachten war, dass die für Geraden verwendeten Konzentration, die Konzentrationsbereiche abdecken, in denen auch die Probe bzw. das Produkt lagen. Abbildung 16 und 17 zeigen anhand der zwei Derivate (FEMe@SUPPY und FEMe@SUPPY:2) beispielhaft Regressionsgeraden der Derivate und ihrer Produkte Me@SUPPY:11 bzw. FE@SUPPY:21.

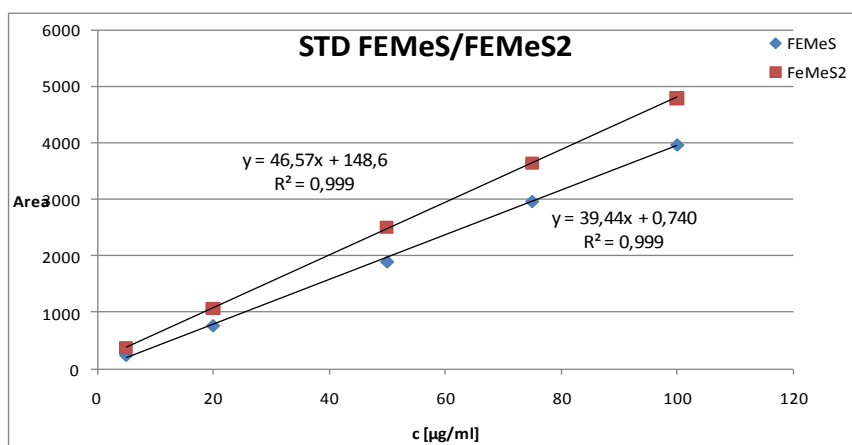


Abbildung 22 Regressionsgeraden der Derivate FEMe@SUPPY und FEMe@SUPPY:2.

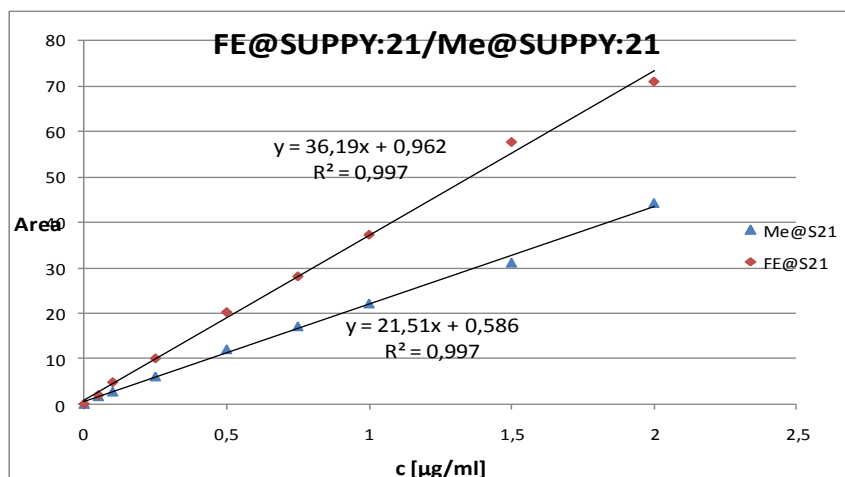


Abbildung 23 Regressionsgeraden der Produkte FE@SUPPY:21 und Me@SUPPY:21.

Die Geraden werden zur Berechnung der Produktkonzentration bzw. –zunahme herangezogen und dienen ebenfalls der Überprüfung der Sensitivität der Methode.

3.2.3.3. Chromatographische Auswertung

Für eine Kinetik wurden 180 Chromatogramme analysiert. Insgesamt wurden vier Konzentration des Substrates (10, 20, 50 und 100 µg/ml) verwendet, im Triplikat waren es 12 Versuchsansätze, die je dreimal zu jedem Stoppzeitpunkt (0, 1, 2, 3 und 4h) in die HPLC zur injiziert wurden. Die Entwicklung der AUC wurde über die Zeit (0h bis 4h) einer Konzentration betrachtet. Unter Abbildung 18 und 19 sieht man Chromatogramme des 100µg/ml – Ansatzes zum Zeitpunkt 0h (Abb.18) und 3h (Abb. 19).

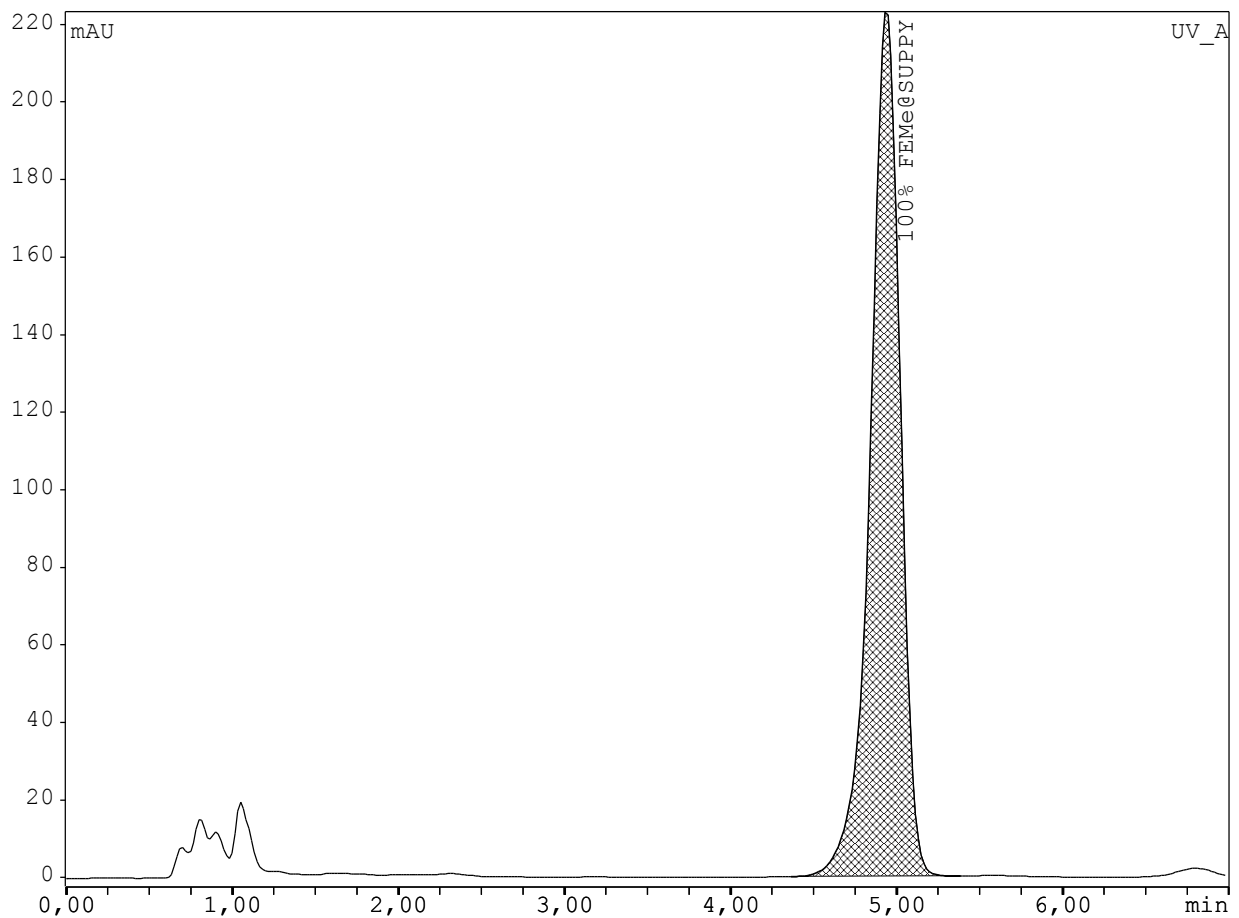


Abbildung 24 Das Chromatogramm zeigt den Zeitpunkt 0h des 100µg/ml Ansatzes.

Zum Zeitpunkt 0h hat noch kein Abbau des Substrates stattgefunden. Der Substratpeak (FEMe@SUPPY) sollte der im CES-Ansatz eingesetzten Konzentration entsprechen. Die Konzentration wird mittels der zuvor erstellten Standardgerade (Abb. 16) überprüft und/oder korrigiert.

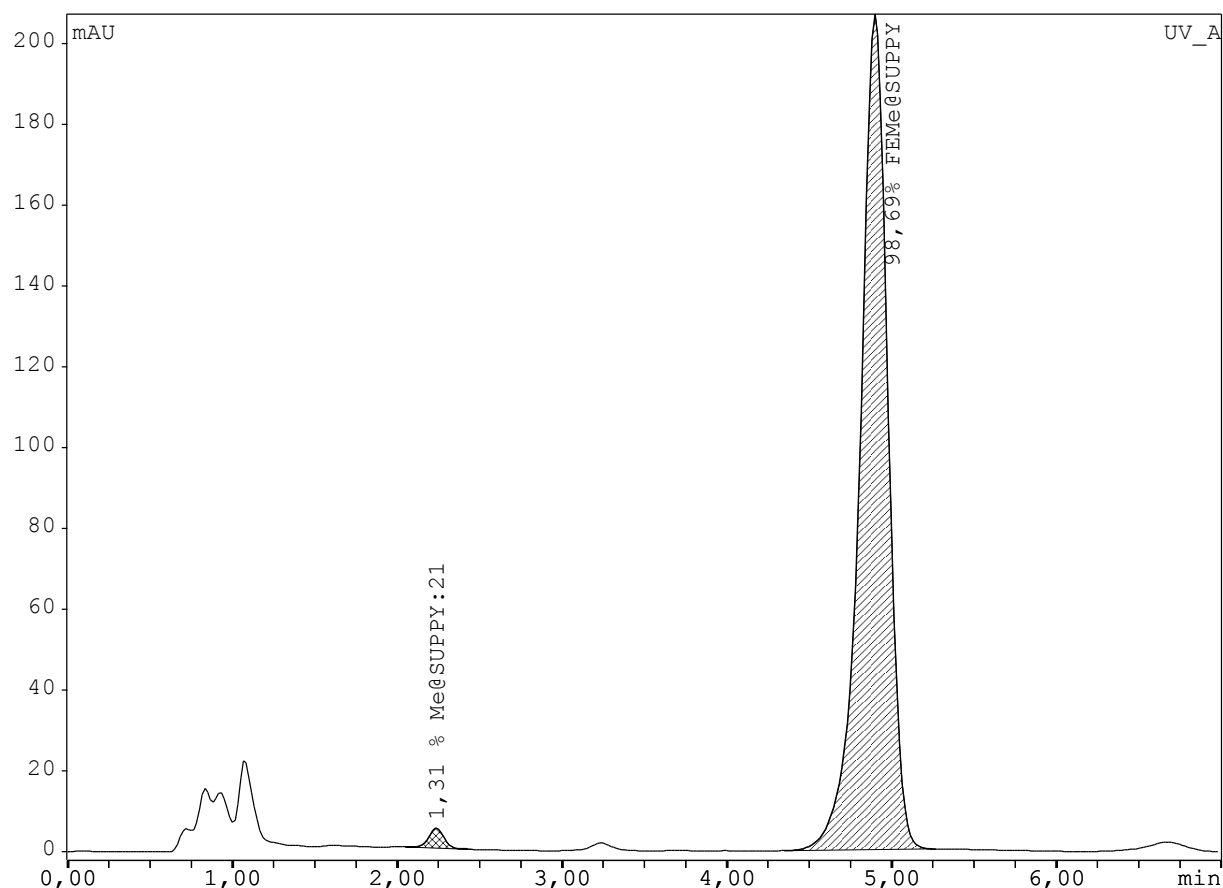


Abbildung 25 Produktbildung.

Nach 3 Stunden zeigte sich ein Abbau. Der Substratpeak (FEMe@SUPPY) verringerte sich prozentual um 1,31% unter Bildung des Produktes, Me@SUPPY:21.

3.2.3.4. Berechnung der Produktsteigung

Mittels der erhaltenen Mittelwerte der AUC der Produkte (dreifache Injektion pro Vial) wurde die Produktkonzentration berechnet und unter Einbezug des molekularen Gewichts (g/mol) der identifizierten Produkte die Konzentration in mmol/ L umgerechnet. Nach Erhalt der Produktkonzentration erfolgte die Berechnung der Produktsteigung (m) zu jedem Versuchsansatz (Konzentration 10- 100µg/ml) über die Zeit (0h bis 4h).

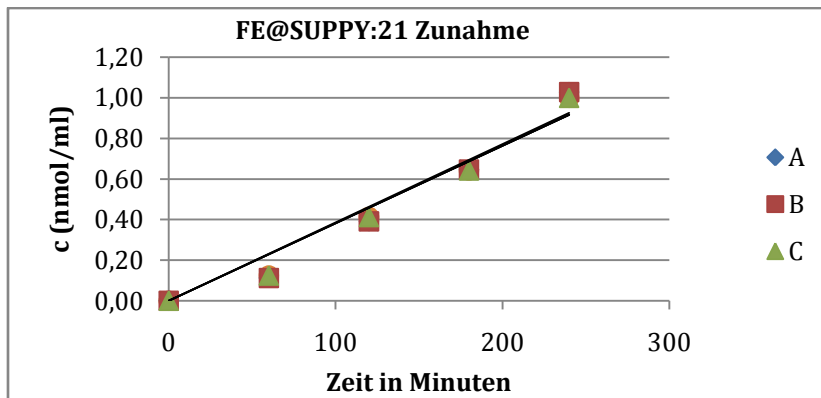


Abbildung 26 zeigt die Produktzunahme (Konzentration [nmol/l]) über die Zeit am Beispiel des 20 µg/ml Substratansatzes des gebildeten Produktes FE@SUPPY:21. A, B und C stehen für das Triplikat und setzen sich jeweils aus dem Mittelwert der dreifachen Analyse pro Versuchsansatz zusammen.

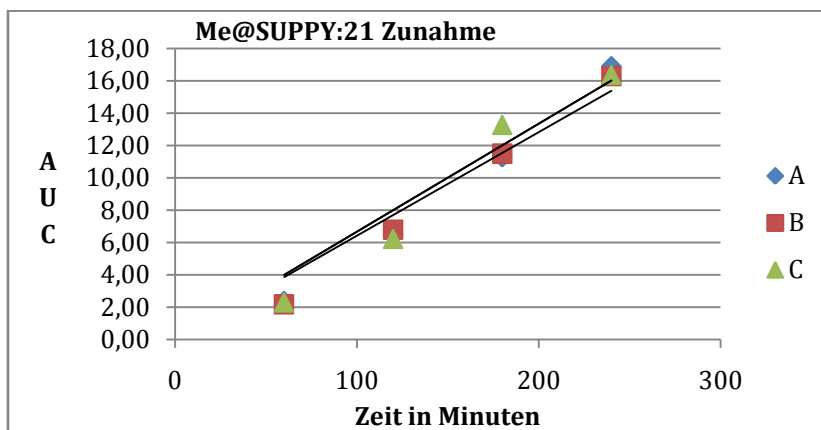


Abbildung 27 zeigt die Produktzunahme (AUC) über die Zeit am Beispiel des 20 µg/ml Substratansatzes des gebildeten Produktes Me@SUPPY:21. A, B und C stehen für das Triplikat und setzen sich jeweils aus dem Mittelwert der dreifachen Analyse pro Versuchsansatz zusammen.

Die Produktzunahme wurde für jede Konzentration der Versuchsansätze (10, 20, 50 und 100µg/ml Substrat) erstellt, in dem die AUC oder die Konzentration bezogen auf die Zeit graphisch darstellt wurde. Mit der erhaltenen Gerade wurde m ($m = \Delta y / \Delta x$) mittels Excel 2007 berechnet. Für die unter Abb. 20 und 21 erwähnten Produkte ergaben sich die Steigungen, die in Tabelle 6 aufgelistet sind.

Tabelle 5 Produktsteigungen der Triplikate am Beispiel von FE@SUPPY:21 und Me@SUPPY:21 zur Konzentration des Versuchsansatz

	m (A)	m (B)	m (C)
c [$\mu\text{g/ml}$]	FE@SUPPY:21		
10	0,00962	0,01034	0,01082
20	0,01383	0,01292	0,01316
50	0,01797	0,02048	0,01900
100	0,02031	0,02141	0,02046
	Me@SUPPY:21		
c [$\mu\text{g/ml}$]			
10	0,03396	0,0297	0,03135
20	0,01954	0,01917	0,02004
50	0,05279	0,05688	0,06887
100	0,06471	0,05221	0,06319

3.2.3.5. Erstellung der Kinetik

m und die Produktkonzentration (mmol/L) der Triplikate über die Zeit (mmol/L/min) wurden in das Programm GraphPad Prism 5 ® überführt und die Kinetiken erstellt,

3.2.4. Ergebnisse

3.2.4.1. FE@SUPPY:11

FE@SUPPY:11 zeigt im Triplikat und bei Ansätzen verschiedener Substratkonzentrationen keinen Abbau.

3.2.4.2. DFE@SUPPY

DFE@SUPPY zeigt keinen Abbau.

3.2.4.3. DFE@SUPPY:2

Auch DFE@SUPPY:2 zeigt keinen Abbau.

3.2.4.4. Me@SUPPY:21

Es erfolgt kein Abbau.

3.2.4.5. Me@SUPPY:11

Auch Me@SUPPY:11 zeigt keinen Abbau.

3.2.4.6. SUPPY:0

SUPPY:0 zeigt keinen Abbau.

3.2.4.7. FEMe@SUPPY

FEMe@SUPPY wird zu Me@SUPPY:21 abgebaut ($V_{\max}$: 0,03870 und K_m :15,12)

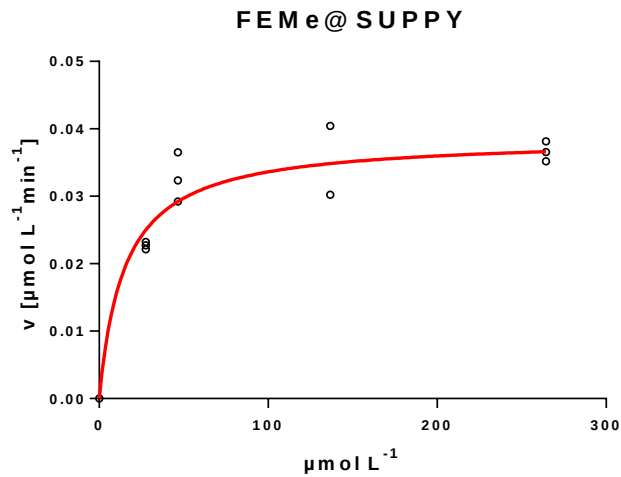


Abbildung 28 Michaelis-Menten Kinetik des FEMe@SUPPY.

3.2.4.8. FEMe@SUPPY:2

FEMe@SUPPY:2 zeigt einen Abbau zu FE@SUPPY:21 ($V_{\max}$: 0,01285 und K_m :18,50).

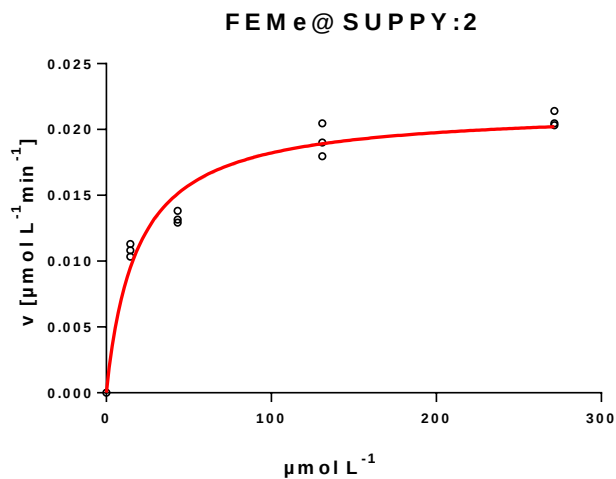


Abbildung 29 Michaelis-Menten Kinetik des FEMe@SUPPY:2.

3.2.4.9. (Me)²@SUPPY

(Me)²@SUPPY zeigt einen Abbau zu Me@SUPPY:21 ($V_{\max}$: 0,02105 und K_m :24,63).

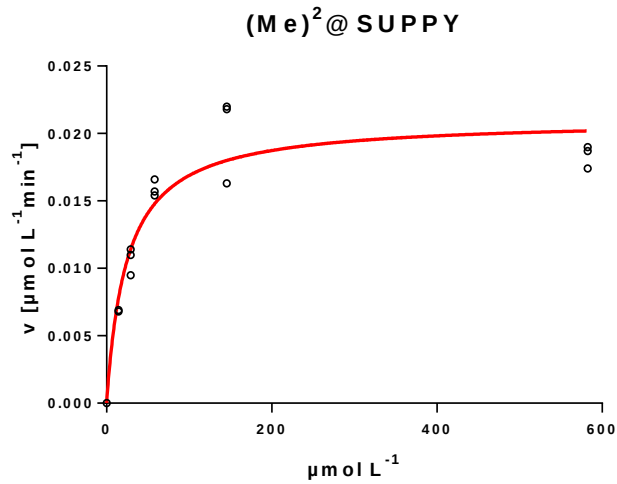


Abbildung 30 Michaelis-Menten Kinetik des (Me)²@SUPPY.

3.2.4.10. (FE)²@SUPPY

Für (FE)²@SUPPY wurde FE@SUPPY:21 als Metabolit identifiziert ($V_{\max}$: 0,01285 und K_m :34,16).

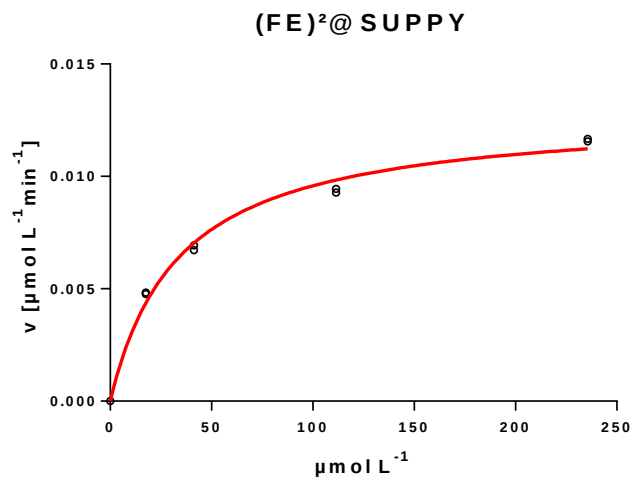


Abbildung 31 Michaelis-Menten Kinetik des (FE)²@SUPPY.

Tabelle 6 zeigt die $V_{\max}$ und K_m Werte der abbauenden FE@SUPPY-Analoga im Vergleich zu den bereits vorgestellten A3R-Antagonisten FE@SUPPY und FE@SUPPY:2.

	FE@ SUPPY	FE@ SUPPY:2	(Me)²@ SUPPY	FEMe@ SUPPY	FEMe@ SUPPY:2	(FE)²@ SUPPY
$V_{\max}$	0,038	0,01487	0,02105	0,03870	0,02159	0,01285
K_m	20,12	13,11	24,63	15,12	18,50	34,16

3.3. Lipophilie-Versuche

Im Gegensatz zu den allgemein beschriebenen HPLC-Methoden zur Messung der Lipophilie, handelt es sich bei dem Assay nach Donovan und Pescatore (2002) um eine direkte Generierung des $\log P_{ow}$ durch Nutzung von R_t der Referenzsubstanzen und der Analyten mit einem schnellen Methanol-Wasser-Gradienten. Dabei wird, unter Einbezug der Differenzen der R_t von Analyt und Referenzsubstanzen und der bekannten $\log P$ Werte der Referenzen, der $\log P$ -Wert der Probe errechnet. Als Referenzsubstanzen werden Toluol und Triphenylen verwendet. Da Toluol einen $\log P$ von ca. 2,7 aufweist, und dieser Wert im „logP-Fenster“ eines potentiellen Hirn-Tracers liegt kann es möglich sein, dass Tracer ebenfalls zu diesem Zeitpunkt retinieren. Deshalb wird die Analyse parallel mit zwei Wellenlängen (260 nm und 285 nm) durchgeführt. Die Wellenlänge von 260 nm wird deshalb gewählt, da hier die meisten kleinen Moleküle das Licht gut absorbieren. Die R_t von koinzident eintreffenden Peaks können somit dennoch gemessen werden, da Toluol bei 285 nm nicht mehr absorbiert.

3.3.1. Apparaturen

Als HPLC wurde ein Agilent 1100/1200 System verwendet, welche aus einem Diodenarray-UV-Detektor (Messung bei 260 und 285 nm), einer quaternäre Pumpe sowie einem Entgaser und einem Autosampler besteht. Die Proben konnten über ein Kühlsystem in der richtigen Temperatur bis zur Messung in der Probenplatte aufbewahrt werden. Die Kontrolle der Anlage und die nötigen Einstellungen zur Methode wurden mit der Gina Star Software Version 4.08 durchgeführt. Als stationäre Phase wurde eine ODP-Säule (short octadecyl-poly(vinyl alcohol)) der Firma Supelco (Katalognummer:59313C40, Verkauf über Sigma-Aldrich) gewählt. Zur Durchführung des Versuches wurden ausschließlich Kolbenhubpipetten (10 μ l- 1000 μ l) und Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml) der Firma Eppendorf verwendet. Die Reinsubstanzen wurden mit einer Supermicro Waage (Sartorius Mechatronics) eingewogen und im „Cocktail“, mit den enthaltenen Referenzsubstanzen (siehe 3.3.2. Reagenzien) gelöst

und mit dem Vortex (LABINCO L24) durchmischt. Die Injektionsmenge lag bei jeder Messung bei 2 µl und es wurde mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min und einem linearen Gradienten (von 10% Methanol: 90% Natriumphosphat-Puffer 0,01 M auf 100% Methanol in 9,4 min) gearbeitet.

3.3.2. Reagenzien

Tabelle 7 Reagenzien der log P-Versuche

Laufmittel: Puffer 0,01 M Natriumphosphat (pH 7 und pH 7.4) Na₂HPO₄ CAS 10028-24-7 (Dihydrat) (Merck, Darmstadt, Germany) NaH₂PO₄ CAS 10049-21-5 (Monohydrat) (Merck, Darmstadt, Germany) MeOH CAS 67-56-1 (Merck, Darmstadt, Germany)	2,57g Na₂HPO₄ + 1,46g NaH₂PO₄ in 1 L aqua purificata Linearer Gradient von 10% MeOH auf 100% in 9,4 Minuten
“Cocktail” : Triphenylen (98%) CAS 217-59-4 (Sigma, Steinheim, Germany) Toluol CAS 108-88-3 (Merck, Darmstadt, Germany) MeOH CAS 67-56-1 (Merck, Darmstadt, Germany)	2 mg Toluol + 20 mg Triphenylen in 200 ml MeOH gelöst = 10µg/ml Toluol und 100µg/ml Triphenylen
Substrate: (SUPPY:0, Me@SUPPY:21, Me@SUPPY:11, (Me)²@SUPPY, DFE@SUPPY, DFE@SUPPY:2, FE@SUPPY, FE@SUPPY:2, FE@SUPPY:21, FE@SUPPY:11, FE²@SUPPY, FEMe@SUPPY, FEMe@SUPPY:2) in Zusammenarbeit mit dem Department für Arznei- und Naturstoffsynthese, Universität Wien	Einwaage 1 mg lösen in 1ml „Cocktail“ =Substratkonzentration 1mg/ml „Cocktail“

3.3.3. Versuchsbeschreibung

Die Substrate wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in dem „Cocktail“, der aus Triphenylen und Toluol in Methanol bestand, gelöst und 2 µl per Autosampler injiziert. Die Temperatur der Trennsäule betrug 18° bis 22°C (Raumtemperatur), der Diodenarray-Detektor wurde auf die Wellenlängen 260nm und 285 nm gestellt, sodass zwei Chromatogramme parallel erhalten wurden. Die Standardkonditionen dieser Methode waren eine 1,5 ml/min Durchflussrate (flow-rate) mit einem linearen Gradienten von 10% Methanol (90% Natriumphosphat-Puffer 0,01 M) auf 100% Methanol in 9,4 min und einer Equilibrierungszeit von 6 min zwischen den einzelnen runs [35].

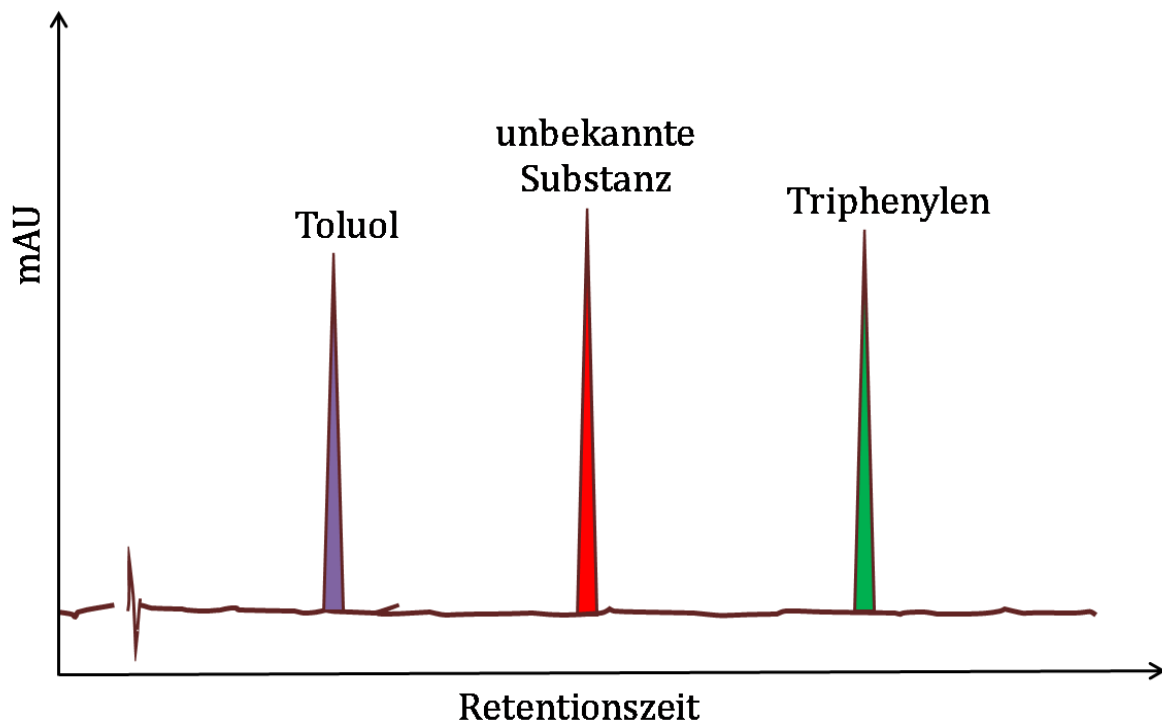


Abbildung 32 Schematische Darstellung eines Chromatogramms

3.3.4. Berechnung

Die für die Berechnung notwendigen log P Werte von Triphenylen und Toluol wurden Tabelle 9 (Pomona College Database) entnommen. Sie stammen aus verschiedenen HPLC-Verfahren, Durchschnittswerten aus der Fachliteratur und QSAR- Berechnungen (siehe Kapitel Lipophilie 2.7.). Die log P-Werte und die R_t wurden in die Formel eingesetzt:

$$\log P_{\text{unknown}} = \frac{(\log P_{\text{tol}} - \log P_{\text{triph}}) \cdot t_{\text{unknown}} + t_{\text{tol}} \cdot \log P_{\text{triph}} - t_{\text{triph}} \cdot \log P_{\text{tol}}}{t_{\text{tol}} - t_{\text{triph}}}$$

Tabelle 8 log P Werte unterschiedlicher Quellen der Referenzsubstanzen.

¹⁾	log P Toluol	log P Triphenylen
[8]	2,74	5,49
Av. Lit	2,72	5,49
HPLC	2,61	6,27

¹⁾log P nach [8], Av.Lit.- Durchschnittswerte für den log P aus der Literatur und HPLC-HPLC Methode in der Retentionsindices verwendet wurden

3.3.5. Resultate

Für die Durchführung der Methode wurden zwei pH Werte (7.0 und 7.4) gewählt, die den Neutralbereich und den physiologischen pH-Wert widerspiegeln.

Tabelle 9 Ergebnisse HPLC log P_{ow}

Substrat	HPLC logP _{ow} ^{7.4}	HPLC logP _{ow} ^{7.0}
FE@SUPPY	4,02	4,00
FE@SUPPY:2	4,04	3,99
FE@SUPPY:11	5,18	5,15
FE@SUPPY:21	0,58	0,66
DFE@SUPPY	0,93	0,97
DFE@SUPPY:2	5,29	5,26
Me@SUPPY:11	5,17	5,18
Me@SUPPY:21	0,28	0,32
(Me) ² @SUPPY	3,71	3,66
FEMe@SUPPY:2	3,88	3,83
FEMe@SUPPY	3,83	3,81
FE ² @SUPPY	3,97	3,95
SUPPY:0	1,82	1,83

4. Diskussion

Ziel dieser zwei vorgestellten präklinischen Methoden (CES-Ansätze und log P-Experimente) war es erste Aussagen über die metabolische Stabilität und Lipophilie der neuen Derivate zutreffen. Mit den erhaltenen Ergebnissen ist es möglich stabilere Alternativen zu den bereits vorgestellten Ausgangssubstanzen FE@SUPPY und FE@SUPPY:2 zu finden und Vorhersagen über die unspezifisch Bindung, sowie die BHS-Durchlässigkeit zu treffen. Die kostengünstigen und schnellen Techniken ermöglichen somit ein einfaches erstes Selektionsverfahren der erwähnten zwei Parameter für Pharmaka (Tracer), die dann in weiteren spezifischeren *in vitro* Modellen (Autoradiographien, Metabolismus-Experimente und Zellbindungsstudien), aber auch *in vivo* (μ PET) auf weitere Eigenschaften und Eignung getestet werden. Aufgrund der chemischen Struktur der diversen FE@SUPPY Analoga ist die Testung des Abbaus durch die CES durchaus geeignet um erste Aussagen über den Phase I Metabolismus und die Stabilität der einzelnen Substanzen zu treffen. Darüber hinaus katalysiert die CES nicht substratspezifisch, sie ist in der Lage auch andere Ester abzubauen, das macht sie für diese Substanzklasse (Thio- und oder Carboxylester mit unterschiedlich langen Alkylresten) zum Enzym der Wahl.

Porcine Leberesterase (PLE1) weist eine hohe genetische Übereinstimmung (über 75%) zur humanen Lebercarboxylesterase (hCE) auf und wird deshalb der CES 1 Familie der Subfamilie C zugeordnet. Aufgrund der genetischen engen Verwandtschaft der hCE und der PLE1, ergibt sich eine enge strukturelle Ähnlichkeit. Die 60kDa schwere PLE1 gehört ebenfalls zu den α , β -Hydrolasen und weiter zu den Serinesterasen, sie beinhaltet somit im katalytischen Zentrum ebenso wie die hCE die S, H und Asparagin (D) (bzw. E) –Triade [45]. Dem vorgeschlagenen Ester-Hydrolyse Schema nach Hosokawa (1998) zu Folge, das auf den Wechselwirkungen der S-H-E Triade basiert, sollten die katalytischen Eigenschaften der PLE mit der hCE vergleichbar sein. Mit Ausnahme der PLE Subtypen, die einen Asparaginrest statt des Glutaminsäurerestes enthalten. Dennoch ist hier die gleiche hydrolytische Eigenschaft nicht auszuschließen, da auch die D eine saure Aminosäure darstellt, die die Ladungsübertragung gewährleisten kann [45]. Vergleicht man die spezifische Aktivität (μ mol/mg Protein pro Minute) von CES verschiedener Säugetierspezies (Tab. 11) an Hand der Umsetzung von Referenzsubstanzen, die diverse Ester enthalten, erkennt man, dass die porcinen Esterasen (P1), sowie durchschnittlich die Esterasen der Ratten und Meerschweinchen deutlich höher Aktivitäten aufweisen als die hCE [21].

Tabelle 10 Katalytische Aktivität von isolierten Carboxylesterase Isoenzymen aus Lebermikrosomen verschiedener Säugetiere.

Spezifische Aktivität (µmol/mg Protein pro Minute)					
Säugetier-Isoenzym	PNPA ¹	MALA ¹	BUTA ¹	ISOC ¹	Pal-CoA ¹
Ratte RH1	44,8	0,011	3,44	0,268	0,009
RL1	76,4	0,201	<0,005	<0,001	0,686
Meerschweinchen GPH1	98,9	1,13	2,24	3,18	0,031
GPL1	288	0,982	3,70	17,7	0,214
GPL2	50,5	<0,002	<0,005	0,294	0,025
Hausschwein P1	327	2,13	111	0,333	0,089
Mensch HU1	5,84	0,467	0,483	0,010	0,025
HU2	3,48	0,673	0,427	0,003	0,028
HU3	1,23		0,44	7,33	0,093

¹PNPA, *p*-Nitrophenylacetat (ein Esterasesubstrat, Referenzsubstanz); MALA, Malathion (ein Dithiophosphorsäureester); BUTA, Butanilicain; ISOC, Isocarboxazid (enthält ein Carbonsäureester); Pal-CoA, Palmitoyl-CoA (ein Acyl-CoA Thioester) [21]

Vergleicht man andere Enzymeigenschaften der Carboxylesterasen-Isoenzyme verschiedener Säugetierspezies, wie zum Beispiel das molekulare Gewicht (kDa) und den isoelektrischen Punkt (pI), sind die Unterschiede zwischen Hausschwein (P1: 58-62 kDa und pI zwischen 5.2 und 5.4), Meerschweinchen (GPH1: 57 kDa und pI von 5.3) und Mensch (HU1: 60 kDa und pI von 5.6) sehr gering. Was aufgrund der hohen genetischen und strukturellen Similarität zurückzuführen ist [21, 45, 20, 22, 44]. Aufgrund dieser Parallelen liegt die Vermutung nahe, dass die katalytischen Eigenschaften der PLE und der hCE vergleichbar sein könnten. Diese Hypothese muss allerdings in Versuchen mit hCE bestätigt werden.

Wie erwähnt liegen im Körper zahlreiche andere Enzymklassen vor, die in der Lage sind an verschiedenen Stellen der Substrate anzugreifen. Ein durchaus größeres Problem stellt die Übertragbarkeit von *in vitro* Methoden auf *in vivo* Modelle dar. Die Speziesunterschiede erweisen sich als vielschichtig. Gemeint sind Unterschiede in Körpergröße und Körpergewicht und keine genetischen Variationen. Diese haben einen enormen Einfluss auf ADME. Die Absorption verhält sich bei allen Säugetierarten aufgrund der gleichen epithelialen Struktur des Darms vergleichbar, die Blutzirkulation unterscheidet sich jedoch um die 4fache Geschwindigkeit, vergleicht man Ratte (15 Sekunden bei 250g Körpergewicht)

und den Menschen (50 Sekunden bei 70 kg KG). Vergleicht man weiter Gewichtsprozente der Ausscheidungs- und metabolisch aktivsten Organe, wie Niere und Leber, fällt auf, dass diese einen deutlich größeren Anteil am Gesamtkörpergewicht der Ratte haben (Niere 0,9% und Leber 4,5%), beim Menschen ist der prozentuelle Anteil weniger als halb so groß (Niere 0,4% und Leber 2%). Ratten metabolisieren, verteilen und eliminieren Xenobiotika schneller [52]. Eine 2012 publizierte Arbeit von Martić-Kehl und Kollegen berichtet von einer sicheren Übertragbarkeit von *in vitro* Modellen auf den Menschen von weniger als 50% [68].

Die Messung des $\log P_s$ ist im Vergleich zu den „Shake-Flask“ Methoden, wie bereits erwähnt, sehr simple, kostengünstig, schnell und reproduzierbar. Trotz der direkten Messung des $\log P_{ow}$ Werte durch die Schüttelversuche, überwiegen die Schwierigkeiten mit der Handhabung mit sehr lipophilen Substanzen. Die Ermittlung von Konzentrationen unmarkierter Tracer in der Octanolphase mittels RP-HPLC erwies sich als schwer, da es bei 1-Octanol aufgrund seiner chemischen Eigenschaften (Lipophilie) und der hohen Viskosität (9 mPa *s) [51] zu Peakausdehnungen und -verformungen kommt (optimal ist ein Gauß-Peak). Die Ergebnisse der Shake-Flask Methoden variierten stark durch die Anzahl der Waschschrte und durch Auswahl des Lösungsmittels, in dem der unmarkierte bzw. markierte Analyt vorgelöst (DMSO, Puffer, ACN etc.) war. Die Resultate waren nach striktem befolgen von verschiedenen „Shake-Flask“ und „Tube“-Methoden, aber auch nach Modifikationen nicht reproduzierbar und untereinander nicht vergleichbar [41, 42, 43]. Deshalb wurden im Laufe der Jahre versucht simplere, zeitlich weniger aufwendige und kostengünstigere Methoden zu entwickeln, die reproduzierbare Ergebnisse liefern.

Die Verwendung von Programmen, mit deren Hilfe der $\log P$ berechnet und geschätzt wird, ist recht einfach und kostengünstig. Der größte Vorteil besteht darin, dass der $\log P$ einer sehr hohe Anzahl an Substanzen geschätzt werden kann (durch einfach Eingabe der chemischen Struktur in die entsprechenden Programme). Das Problem bei diesen Programmen ist, dass intramolekulare Interaktionen unberücksichtigt bleiben.

Die Methode nach Donovan-Pescatore hat eine gute Präzision und korreliert gut mit ermittelten und allgemein bekannten $\log P_{ow}$ Werten. Es werden nur geringe Mengen zur Analyse benötigt (Konzentration 1mg/ml bei einer Injektionsmenge von nur 2 μ l) und die Methode kann aufgrund der Verwendung von Puffern bei einem pH zwischen 2 und 13 durchgeführt werden und ist darüber hinaus eine sehr schnelle Methoden mit nur 7 Minuten pro Messung im Vergleich zu anderen HPLC $\log P$ -Versuchen (bis zu 15 min) oder der IAM (30 min) [35,40]. Aufgrund der Extrapolation auf 100% Methanol und der kurzen Säule stellen hydrophobe Substanzen kein Problem dar. Die kurze ODP- Säule zeigt gute

Genauigkeit, auch für Substanzen mit starken Wasserstoffbindungspotentialen und funktionellen Gruppen, sie korreliert damit besser mit den log P- Werten als andere Säulen (PS-DVB und andere nicht-Silica Säulen) [35]. Außerdem besitzen die ODP-Säulen keine freien bzw. ungeschützten Si-OH oder Al-OH Gruppen, die mit Säuren und Basen interagieren würden. Diese Interaktionen resultieren meist in einer Überschätzung des log Ps von Substanzen mit basischen Gruppen. Der Vergleich solcher extremer Extrapolationen zu Messungen in anderen Labors ist schwer, deshalb sind die internen Standards nötig. Die zwei internen Standards erlauben es Differenzen in der Durchflussrate und prozentuelle Komposition des Laufmittels von Messung zu Messung zu korrigieren. Die Referenzsubstanzen sind gut evaluiert und die aus der Literatur entnommen log P Werte variieren nur sehr gering.

Eine 2012 veröffentlichte Arbeit von Adriana Alexandre S. Tavaras und Kollegen an der Universität Glasgow beschäftigte sich mit der Permeabilität von neuartigen Radiotracer durch die BHS, unter der Fragestellung inwieweit die verschiedenen HPLC-Methoden auf *in vivo* Modelle übertragbar sind und eine frühe Selektion von Kandidat-Tracern möglich ist. Sie kommen zu dem Schluss, dass die PPB % ($r^2 = 0,65$) und die P_m ($r^2 = 0,77$) besser mit der injizierten Gesamtdosis (ID%) an Radiotracer korrelieren als mit den log P Werten ($r^2 = 0,47$). Der log P sollte den Autoren zu Folge deshalb nicht zur guten Vorhersage bezüglich der passiven Diffusion durch die BHS herangezogen werden [40, 34]. Der log P korreliert eventuell nicht im gleichen Ausmaß mit der BHS-Durchlässigkeit wie P_m und PPB, da Eigenschaften wie Molekülgröße, Wasserstoffbindungspotentiale, polare Oberflächenareale und Anzahl der rotierbaren Bindung nicht mit einbezogen werden. Auch der geringe uptake von FE@SUPPY (trotz eines log P Wertes von 4,00) in das Gehirn [5] spiegelt diese Hypothese wider [40].

Versucht man die Ergebnisse aus den CES-Ansätzen und die der log P Werte zusammenzufassen, kommt man zu dem Schluss, dass aus metabolischer und aus Sicht der Lipophilie wahrscheinlich keines der FE@SUPPY-Analoga als Hirntracer Verwendung finden wird. Die stabilen Derivate, DFE@SUPPY und Me@SUPPY:21, sind wegen ihrer hohen Hydrophilie trotz Stabilität gegenüber der CES als Hirntracer auszuschließen. FE@SUPPY:11, DFE@SUPPY:2 und Me@SUPPY:11 hingegen weisen eine hohe Stabilität und eine hohe Lipophilie (im Bereich von HPLC log $P_{ow}^{7.4}$ 5) auf. Nachdem die log P Messung nach Donovan und Pescatore eine sichere Methode ist zur Bestimmung der Lipophilie, jedoch wahrscheinlich nicht als Vorhersage der Passierbarkeit durch die BHS herangezogen werden kann, wird man mit diesen Molekülen weitere Messungen anstreben,

die die passive Diffusion durch die BHS eher vorhersagt. Zu beachten ist aber, dass die hohe Lipophilie für ein unspezifisches Binden spricht. Es kann also sein, dass FE@SUPPY:11, DFE@SUPPY:2 und Me@SUPPY:11 zwar die BHS passieren, dort aber unspezifisch binden, was zu einer Fehlinterpretation der radioaktiven Signale in der PET führen kann.

Auf der einen Seite liegen die Analoga FEMe@SUPPY, FEMe@SUPPY:2, (FE)²@SUPPY und (Me)²@SUPPY in einem guten HPLC log P_{ow} Bereich, in dem ein passives Passieren der BHS möglich sein kann. Auch hier sollten weitere Messungen, die besser mit der BHS-Durchlässigkeit korrelieren, durchgeführt werden. Auf der anderen Seite werden diese jedoch durch das Phase I Enzym CES hydrolysiert. Ein rascher Metabolismus muss allerdings nicht zwangsläufig zu einem Ausschluss als Tracers führen – weitere präklinische Untersuchungen sind notwendig, um eine Entscheidung bezüglich einer klinischen Applikation zu treffen. Ein Beispiel bildet das [carbonyl-¹¹C]WAY 100635, das eine hohe Abbaurate (nach 5 min p.i. sind nur noch ca. 25% erhalten) aufweist, aber alle anderen geforderten Eigenschaften für einen Scan an einer spezifischen Zielregion (Serotonin-A1-Rezeptor, 5HTA1) aufweist [66]. [Carbonyl-¹¹C]WAY 100635 findet bereits in klinischen Studien Verwendung.

5. Schlussbetrachtung

Sowohl FE@SUPPY, als auch FE@SUPPY:2 ((ethyl 4,6-diethyl-5-((2-fluoroethylthio)carbonyl)-2-phenylnicotinate) zeigen eine geringe Stabilität gegenüber der Carboxylesterase (CES) und einen geringen Hirn-uptake, weshalb eine Serie von Derivaten synthetisiert und auf ihre metabolische Stabilität gegenüber dem Phase I Enzym analysiert wurde. Ebenfalls wurde die Lipophilie (log P) der FE@SUPPY-Analoga bestimmt. FE@SUPPY:11, DFE@SUPPY, Me@SUPPY:21 und Me@SUPPY:11 zeigten keinen Abbau und sind damit stabiler als die Leitsubstanz, während die Derivate FEMe@SUPPY, FEMe@SUPPY:2, (Me)²@SUPPY und (FE)²@SUPPY gegenüber der CES weniger stabil waren. Vergleicht man die Michaelis-Menten Konstanten (K_m), sind alle untersuchten Analoga stabiler als FE@SUPPY:2. (Me)²@SUPPY und (FE)²@SUPPY sogar stabiler als FE@SUPPY.

Die HPLC log P_{ow}-Werte schwanken trotz der engen strukturellen Ähnlichkeiten in einem großen Bereich zwischen einem HPLC log P_{ow}^{7.4} von 0,28 (hydrophil) bis zu 5,20 (lipophil). Als Bluthirnschranken (BHS)-gängig (passive Diffusion) gelten Substanzen, deren log P

Werte zwischen 2 und 4 liegen, aber es sind zusätzliche Methoden erforderlich, um eine bessere Vorhersage der BHS-Durchlässigkeit zu treffen.

Nichts desto trotz geht aus der Diskussion und aus den fehlenden Information aller FE@SUPPY-Analoga bezüglich ihrer Affinität zum Adenosin 3 Rezeptor (A3R) (Autoradiographien, Zellbindungsstudien und eventuell μ PET) hervor, dass nur unter metabolischer Ansicht eine Aussage zur Eignung getroffen werden kann. Aus Sicht der Stabilität gegenüber der CES sind Me@SUPPY:11, Me@SUPPY:21, DFE@SUPPY:2, DFE@SUPPY und FE@SUPPY:11 interessant für weitere Metaboliten-Experimente. Betrachtet man jedoch die nicht geeigneten log P Werte, werden sie wahrscheinlich ohne weitere Versuche wie Permeabilitäts-Messungen (P_m) und Plasmaprotein-Bindung (PPB) möglicherweise keine Eignung als Hirntracer finden. Diese Vermutung bestätigten auch Tierversuche an Ratten mit [18 F]FE@SUPPY und [18 F]FE@SUPPY:2, nachdem der Gehirnuptake im Vergleich zu anderen Organen wie Lunge, Leber und Nieren nur mittelmäßig bis sehr gering war [5].

Abschließend kann man sagen, dass erst mittels Bindungsstudien ein geeignetes Affinitätsprofil erstellt werden kann, um eine Aussage über die Tracereignung zu treffen. Zusätzlich werden in weiteren Metaboliten-Studien zum einen mit humanen Esterasen, sowie mit humanen Mikrosomen und zum anderen mit humanem Plasma-Versuchen der Abbau bestimmt und Metaboliten identifiziert. Dies ermöglicht weitere Aussagen über die enzymatische Stabilität. Auch weitere Messungen betreffend der Lipophilie, P_m , sowie PPB werden genauere Aussagen über die Eignung als Hirntracer gestatten [31, 34, 40].

Schließlich wird man über Tierversuche eine Aussage über die Verteilung und die passive Diffusion durch die BHS treffen können [5, 32, 40].

Wie aus den Kapiteln A3R und Adenosin hervorgeht, wird der A3R mit der Tumorentstehung, sowie inflammatorischen und kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang gesetzt. Die hohe Expressionsrate an inflammatorischen Zellen und Tumoren ist ein Hinweis darauf, genau wie diverse Experimente mit A3 (-/-) Knockout (KO)-Tieren zeigen. Ein wirksamer A3R-Antagonist könnte somit nicht nur Therapiemöglichkeit für zahlreiche Erkrankungen (Chronisch obstruktive Lungenkrankheit, Allergien und Arthritis) sein, sondern auch als Nachweise für die klinische Wirkung von Pharmaka gelten, die für diese Erkrankungen eingesetzt werden. Im Bezug zu kardiovaskulären Effekten ist die Signalweiterleitung sicherlich ein Diskussionsthema, da im Herzgewebe der A3R im Vergleich zu anderen Geweben der Peripherie nur sehr gering exprimiert wird, jedoch deutliche Effekte nachgewiesen wurden [6, 52, 56].

6. Zusammenfassung

Hintergrund: [^{18}F]FE@SUPPY (2-[^{18}F]fluoroethyl 4,6-diethyl-5-(ethylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinate) wurde als erster Positronen Emissions Tomographie (PET-)Tracer für den Adenosin A3 Rezeptor (A3R) vorgestellt. Seine hervorragende Affinität und Selektivität für diesen Rezeptortyp wurde mit Autoradiographie-, Biodistribution und μ -PET-Experimenten gezeigt. FE@SUPPY (2-fluoroethyl 4,6-diethyl-5-(ethylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinate) trägt sowohl einen Carboxylester als auch einen Thiocarboxylester. Beide Esterfunktionen können enzymatisch durch die Carboxylesterase (CES) hydrolysiert werden. Ziel dieser Arbeit war es, ein metabolisches Profil einer Reihe von FE@SUPPY und FE@SUPPY:2 ((ethyl 4,6-diethyl-5-((2-fluoroethylthio)carbonyl)-2-phenylnicotinate)-Derivaten zu erstellen und darüber hinaus mittels Lipophilie-Experimenten Aussagen über die Möglichkeit der passiven Diffusion durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu treffen. *In-vitro* Experimente mit CES zeigten, dass FE@SUPPY und FE@SUPPY:2 deutlich durch dieses Enzym abgebaut wurden ($K_{\text{M_FE@SUPPY}}$ 20.1, $V_{\text{MAX_FE@SUPPY}}$ 0.038 und $K_{\text{M_FE@SUPPY:2}}$ 13.1, $V_{\text{MAX_FE@SUPPY:2}}$ 0.015). Dieser enzymatische Abbau wurde auch in Experimenten an Ratten beobachtet. Die log P Experimente wurden mit einer HPLC-Methode durchgeführt und ergab HPLC log $P_{\text{ow}}^{\text{pH } 7.4}$ Werte von 4,00 für FE@SUPPY und 3,99 für FE@SUPPY:2. Diese HPLC log P_{ow} Werte erlauben die passive Diffusion durch die BHS. Ein guter Bereich für eine passive Diffusion wäre ein HPLC log P_{ow} von 2 bis 4.

Methoden: Die Experimente wurden unter physiologischen Bedingungen (phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4 und 36°C) in einem Triplikat (n=3) durchgeführt, dabei wurden verschiedene Mengen der jeweiligen unmarkierten Substrate verwendet und eine definierte Menge des spezifischen Enzyms (80 IU porcine CES). Als Substrate wurden FE@SUPPY:11 (2,4-diethyl-5-((2-fluoroethoxy)carbonyl)-6-phenylpyridine-3-carbothioic S-acid), DFE@SUPPY (4,6-diethyl-5-(ethylsulfanylcabonyl)-2-phenylpyridine-3-carboxylate), DFE@SUPPY:2 (2,4-diethyl-5-(ethoxycarbonyl)-6-phenylpyridine-3-carbothioic S-acid), Me@SUPPY:11 (2,4-diethyl-5-(methoxycarbonyl)-6-phenylpyridine-3-carbothioic S-acid), (Me) 2 @SUPPY, Me@SUPPY:21(4,6-diethyl-5-(methylsulfanylcabonyl)-2-phenylpyridine-3-carboxylate), (FE) 2 @SUPPY, FEMe@SUPPY und FEMe@SUPPY:2 verwendet. Aliquote der Inkubationsreaktion wurden nach definierten Zeitpunkten (0, 60, 120, 180 und 360 min) entnommen und 1:1 mit einem Stoppreagenz aus Acetonitril/Methanol (10:1) präzipitiert. Nach Zentrifugation (10000 rpm, 3 min) der gestoppten Reaktion, wurde der erhaltene Überstand mittels HPLC analysiert: Agilent 1100

System mit einem Diodenarray-Detektor (DAD) in einem Wellenlängenbereich von 240 und 254nm; Stationäre Phase war eine 5µm Partikelgröße RP-18 Säule. Die mobile Phase bestand aus einem Natriumcitrat- (pH 2,5) und Acetonitrilgemisch (32:68). Die Lipophilie-Experimente wurden in einem Triplikat (n=3) mittels HPLC-Methode zur direkten Generierung der log P_{ow} mit den unmarkierten Substraten nach Donovan und Pescatore (2002) durchgeführt.

Ergebnisse: Die *in-vitro* Analysen zeigten keinen Abbau von FE@SUPPY:11, DFE@SUPPY, DFE@SUPPY:2 Me@SUPPY:11, und Me@SUPPY:21 durch CES nach 4 Stunden. Selbst nach 24 Stunden zeigten die Substrate keinen Metabolismus. Im Gegensatz dazu wurden (FE)²@SUPPY, (Me)²@SUPPY, FEMe@SUPPY und FEMe@SUPPY nach 4 Stunden abgebaut. Die Tabelle zeigt V_{max} und K_m der entsprechenden Substrate.

	(Me) ² @SUPPY	FEMe@SUPPY	FEMe@SUPPY:2	(FE) ² @SUPPY
V _{max}	0,02105	0,03870	0,02159	0,01285
K _m	24,63	15,12	18,50	34,16

Die HPLC log P_{ow}^{7.4} Werte lagen in einem Bereich zwischen 0,32 und 5,26. Im Detail: 5,15 für FE@SUPPY:11, 0,97 für DFE@SUPPY, 5,26 für DFE@SUPPY:2, 5,18 für Me@SUPPY:11, 0,32 für Me@SUPPY:21, 3,66 für (Me)²@SUPPY, 3,83 für FEMe@SUPPY:2, 3,81 für FEMe@SUPPY und 3,95 für (FE)²@SUPPY.

Schlussfolgerung: Auf Grundlage der Ausgangssubstanzen FE@SUPPY und FE@SUPPY:2 wurde eine Reihe von Analoga synthetisiert und ihr metabolisches Profil erstellt. Unter Betrachtung der Ergebnisse der CES-Versuche sind die analysierten Substrate mit Ausnahme von (FE)²@SUPPY, (Me)²@SUPPY, FEMe@SUPPY und FEMe@SUPPY sehr stabil. Vergleicht man die K_m Werte aller abbauenden Substrate, zeigten (Me)²@SUPPY und (FE)²@SUPPY die größte Stabilität gegenüber dem Abbau durch die CES. Die hohen Lipophilie von FE@SUPPY:11, DFE@SUPPY:2 und Me@SUPPY:11 könnten in einer unspezifischen Bindung resultieren, während die niedrigeren log P-Werte von Me@SUPPY:21 und DFE@SUPPY im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen zu niedrig sind um die BHS passieren zu können. (Me)²@SUPPY, FEMe@SUPPY:2, FEMe@SUPPY sowie (FE)²@SUPPY hingegen zeigen einen Lipophiliebereich, in dem die passive Diffusion durch die BHS möglich wäre, jedoch zeigen sie eine erhöhte enzymatische Abbaurate durch die CES. Erst nach weiteren präklinischen Evaluierungen, die Aussagen über die Affinität und Selektivität (Bindungsstudien) zulassen und weiteren Metaboliten-Versuchen, können Entscheidungen über die Applizierbarkeit als PET-Tracer getroffen werden.

7. Abstract

Aim: [^{18}F]FE@SUPPY (2-[^{18}F]fluoroethyl 4,6-diethyl-5-(ethylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinate) was evaluated as the first PET-tracer for the Adenosin A3 receptor (A3R) [10]. It shows excellent affinity and selectivity for this receptor-type [4]. This was demonstrated by autoradiography, biodistribution and μ -PET experiments. Chemically, FE@SUPPY (2-fluoroethyl 4,6-diethyl-5-(ethylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinate) carries one carboxylic and one thiocarboxylic ester group within its molecule. These ester functions are primarily cleaved by the presence of Carboxylesterase (CES). The aim of the present study was the quantification of the metabolic profiles and the log P_{ow} with a common HPLC method [35] of a series of analogue structures derived from FE@SUPPY and FE@SUPPY:2 ((ethyl 4,6-diethyl-5-((2-fluoroethylthio)carbonyl)-2-phenylnicotinate) to find a metabolically more stable tracer for the application towards the A3R. *In-vitro* experiments with CES showed that FE@SUPPY and FE@SUPPY:2 were considerably degenerated by those enzymes ($K_{\text{M_FE@SUPPY}}$ 20.1, $V_{\text{MAX_FE@SUPPY}}$ 0.038 and $K_{\text{M_FE@SUPPY:2}}$ 13.1, $V_{\text{MAX_FE@SUPPY:2}}$ 0.015). This rapid degeneration was also observed in rat experiments. The log P values at the pH of 7.4 were 4.00 for FE@SUPPY and 3.99 for FE@SUPPY:2, respectively. These values demonstrate that a passive diffusion through the BBB is possible. A suitable range to pass the BBB via passive diffusion would be from 2 to 4.

Materials and methods: Experiments were performed in triplicate (n=3), using different amounts of the particular unlabeled substrates. Experiments were conducted with FE@SUPPY:11(2,4-diethyl-5-((2-fluoroethoxy)carbonyl)-6-phenylpyridine-3-carbothioic S-acid), DFE@SUPPY(4,6-diethyl-5-(ethylsulfanylcarbonyl)-2-phenylpyridine-3-carboxylate), DFE@SUPPY:2(2,4-diethyl-5-(ethoxycarbonyl)-6-phenylpyridine-3-carbothioic S-acid), Me@SUPPY:11(2,4-diethyl-5-(methoxycarbonyl)-6-phenylpyridine-3-carbothioic S-acid), (Me) 2 @SUPPY, Me@SUPPY:21(4,6-diethyl-5-(methylsulfanylcarbonyl)-2-phenylpyridine-3-carboxylate), (FE) 2 @SUPPY, FEMe@SUPPY and FEMe@SUPPY:2 under physiological conditions (porcine carboxyl esterase 80IU, 36°C, phosphate-buffered saline pH 7.4). The incubation reactions were stopped by adding acetonitrile/methanol (10:1) at 0, 180, and 360 minutes, respectively. After centrifugation (10000rpm, 4min) of the reaction mixtures, the obtained supernatant was subjected to HPLC analysis: Agilent 1100 system with a diode array UV detector at a range from 240 to 254nm; stationary phase was a 5 μm particle size RP-18 column, in each case. The mobile phase consisted of a mixture of sodium citrate (pH 2.5) and

acetonitrile (32:68). Lipophilicity experiments ($\log P_{ow}$) were performed in triplicate by using the common HPLC method by Donovan and Pescatore (2002).

Results: The *in-vitro* assays showed no cleavage of FE@SUPPY:11, DFE@SUPPY, DFE@SUPPY:2 Me@SUPPY:11, and Me@SUPPY:21 against CES after 6 hours. Even after 24 hours the substances showed no metabolism. In contrast (FE)²@SUPPY, (Me)²@SUPPY, FEMe@SUPPY and FEMe@SUPPY were cleaved after 4 hours significantly. Chart 1 shows the K_m and V_{max} values for the degraded substrates.

	(Me) ² @SUPPY	FEMe@SUPPY	FEMe@SUPPY:2	(FE) ² @SUPPY
V_{max}	0.02105	0.03870	0.02159	0.01285
K_m	24.63	15.12	18.50	34.16

The HPLC $\log P_{ow}$ ^{7.4} showed values between 0.32 and 5.26. The values were in detail: 5.15 for FE@SUPPY:11, 0.97 for DFE@SUPPY, 5.26 for DFE@SUPPY:2, 5.18 for Me@SUPPY:11, 0.32 for Me@SUPPY:21, 3.66 for (Me)²@SUPPY, 3.83 for FEMe@SUPPY:2, 3.81 for FEMe@SUPPY and (FE)²@SUPPY for 3.95, respectively.

Conclusion: On the basis of the lead compounds FE@SUPPY and FE@SUPPY:2 a series of analogues have been synthesized and metabolically analyzed. Hence, from a metabolic point of view the stability of the stated substances except FE²@SUPPY, Me²@SUPPY, FEMe@SUPPY and FEMe@SUPPY against CES is very high. Comparing the K_m values of FE@SUPPY and FE@SUPPY:2, the analogues (Me)²@SUPPY and (FE)²@SUPPY showed a higher stability against CES. The $\log P$ values of FE@SUPPY:11, DFE@SUPPY:2 and Me@SUPPY:11 could lead to unspecific binding, whereas the values of Me@SUPPY:21 and DFE@SUPPY are comparatively too low to pass the BBB. (Me)²@SUPPY, FEMe@SUPPY:2, FEMe@SUPPY and (FE)²@SUPPY showed values, which allow them to pass the BBB via passive diffusion, but are fast degraded by CES.

However, binding studies of stable analogues will have to be conducted to assess the binding profile of the selected substances towards the A3R. On the basis of these results, a decision upon an improved applicability of one of the evaluated molecules as a PET-tracer will be possible.

8. Literatur

1. Dietlein M, Eschner W, Kopka K, Wecksesser M, Wellner U. Nuklearmedizin Basiswissen und klinische Anwendung. 5.Auflage. Stuttgart: Schattauer; 2003.
2. Hermann HJ. Nuklearmedizin. 4. Auflage. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg; 1998.
3. Lin JH, Lu AY. Role of Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Discovery and Development. *Pharmacol Rev* 1997;49:403-49.
4. Li AH, Moro S, Forsyth N, Melman N, Ji XD, Jacobson KA. Synthesis, CoMFA analysis, and receptor docking of 3,5-diacetyl-2, 4-dialkylpyridine derivatives as selective A₃ adenosine receptor antagonists. *J Med Chem* 1999;42:706-21.
5. Haeusler D. Preclinical tools in PET-tracer development: Automatisierung und biopharmaceutical evaluation with special emphasis on the adenosine A₃ receptor [dissertation]. Vienna (A): University of Vienna; 2010.
6. Gessi S, Merighi S, Varani K, Leung E, Lennan SM, Borea PA. The A₃ adenosine receptor: An enigmatic player in cell biology. *Pharmacol Therapeut*, 2008;117:123-40.
7. Kim DH, Sim T. Novel small molecule Raf kinase inhibitors for targeted cancer therapeutics. *Arch Pharm Res*, 2012;35:605–15.
8. Tomilin C, editor. The Pesticide Manual-A World Compendium. British Crop Protection Council/Royal Society of Chemistry; Bath, 2000.
9. Kohno Y, Ji X, Mawhorter SD, Koshiba M, Jacobson KA. Activation of A₃ adenosine receptors on human eosinophils elevates intracellular calcium. *Blood* 1996;88:3569-74.

10. Wadsak W, Mien L, Shanab K, Ettlinger D, Haeusler D, Sindelar K, et al. Preparation and first evaluation of [18F]FE@SUPPY: a new PET tracer for the adenosine A3 receptor. Nucl Med Biol 2008;35:61-6.

11. Haeusler D, Nics L, Mien L, Ungersboeck J, Lanzenberger R, Shanab K, et al. [18F]FE@SUPPY and [18F]FE@SUPPY:2 metabolic considerations. Nucl Med Biol 2010;37:421-6.

12. Rubin LL, Hall E, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, et al. A Cell Culture Model of the Blood-Brain Barrier. J Cell Biol 1991;115:1725-35.

13. Janzer CR, Martin RC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. Nature 1987; 325:253-8.

14. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine Structural Localization of a Blood-Brain Barrier to Exogenous Peroxidase. J Cell Biol 1967;34:207-17.

15. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage. München (D): Elsevier Urban & Fischer Verlag; 2005.

16. Löffler G. Basiswissen der Biochemie mit Pathobiochemie. 7. Auflage. Heidelberg (D): Springer Medizin Verlag; 2008.

17. Brettar C. Forscher lüften Geheimnisse der Enzyme. Universität Saarbrücken, Deutschland (Ausblick Entwicklung spezieller Pharmaka, die auf eine Enzymhemmung basieren). [cited 2012 Sep 4] Available from: URL: <http://www.uni-saarland.de/verwalt/presse/campus/2001/2/08-Enzyme-f.html>

18. Ecker GF, Noe CR. In silico prediction models for blood-brain barrier permeation. Curr Med Chem 2004;11:1617-28.

19. Bursch W. Fremdstoffmetabolismus. Medizinische Universität Wien (MUW) [cited 2012 Sep 5] Available from: URL:

http://anchem.univie.ac.at/fileadmin/user_upload/anchem/SS2010/Bursch_Tox/5Fremdstoffmetabolismus_SS_2010_Bursch.pdf

20. Hosokawa M. Structure and Catalytic Properties of Carboxylesterase Isozymes Involved in Metabolic Activation of Prodrugs. *Molecules* 2008; 13:412-31.
21. Satoh T, Hosokawa M. The Mammalian Carboxylesterase: From Molecules to Functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38:257–88.
22. Satoh T, Hosokawa M. Mini review: Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chem Bio Interact* 2006;162:195-211.
23. Nelson DR. Cytochrome P450 and the individual of species. *Arch Biochem Biophys* 1999; 369:1-10.
24. Nelson DR, et al. Comparison of cytochrome P45 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splicing variants. *Pharmacogenet genomics* 2009;14:1-18.
25. Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, et al. Human Cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 1999;20:1-137.
26. Brown A. Explain that enzymes lower the activation energy of the chemical reactions that they catalyse. [cited 2012 Nov 11] Available from:URL: http://www.tokresource.org/tok_classes/biobiobio/biomenu/enzymes/index.htm
27. Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol dis* 2010;37:48–57.
28. Parkinson A. Biotransformation of Xenobiotics. Copyright © 2001 by The McGraw-Hill Companies Retrieved from: URL: www.knovel.com
29. Mitterhauser M. VO Radiopharmazeutische Technologie I. Universität Wien. Skriptum 2009.

30. Kratzel M. Pharmazeutische Bioanalytik. Universität Wien. Vorlesungsunterlagen Teil 11, 2011.
31. Cohen DE, Leonard MR. Immobilized artificial membrane chromatography: a rapid and accurate HPLC method for predicting bile salt-membrane interactions. *J lipid res* 1995;36:2451-8.
32. Nics L, Vranka C, Haeusler D, Wadsak W, Wagner KH, Shanab K, et al. [abstract]. Badhofgastein und Annual congress of the European Association of Nuclear Medicine (EANM); October 15-19, 2011; Birmingham, GB.
33. Menten L, Michaelis MI. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* 1913;49:333–69.
34. Yoon CH, Kim SJ, Shin BS, Lee KC, Yoo SD. Rapid Screening of Blood-Brain Barrier Penetration of Drugs Using the Immobilized Artificial Membrane Phosphatidylcholine Column Chromatography. *J Biomol Screen* 2006;11:13-20.
35. Donovan SF, Pescatore MC. Method for measuring the logarithm of the octanol–water partition coefficient by using short octadecyl–poly(vinyl alcohol) high-performance liquid chromatography columns. *J Chrom A* 2002;952:47-61.
36. Nics L, Haeusler D, Wadsak W, Wagner KH, Dudczak R, Kletter K, et al. The stability of methyl-, ethyl- and fluoroethylesters against carboxylesterases in vitro: there is no difference. *Nucl Med Bio* 2011; 38:13-7.
37. Stevens J, Hamstra A, Roenneburg L, Hegeman T, Esser C, Black R, et al. Optimizing Purified Sample Recovery on Reverse-Phase HPLC Systems. *Gilson-Solution at work for you* 2003;319309-01:1-8.
38. Rucker HK, Wynder HJ, Thomas WE. Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull* 2000;51:363–9.

39. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat neurosci* 2011;14:1398–405.
40. Tavares AAS, Lewsey J, Dewar D, Pimlott SL. Radiotracer properties determined by high performance liquid chromatography: a potential tool for brain radiotracer discovery. *Nucl Med Bio* 2012;39:127-35.
41. Rubas W, Cromwell MEM. The effect of chemical modifications on octanol/water partition (log D) and permeabilities across Caco-2 monolayers. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;23:157-62.
42. Berthod A, Carda-Broch S. Determination of liquid–liquid partition coefficients by separation methods. *J Chrom A* 2004;1037:3-14.
43. Wilson AA, Jin L, Garcia A, DaSilva JN, Houle S. An admonition when measuring the lipophilicity of radiotracers using counting techniques. *Appl Rad Isotopes* 2001;54:203-8.
44. Crow JA, Borazjani A, Potter PM, Ross MK. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *YTAAP* 2007;221:1–12.
45. Hasenpusch D, Bornscheuer UT, Langel W. Simulation on the structure of pig liver esterase. *J Mol Model* 2011;17:1493–506.
46. Baraldi PG, Cacciari B, Romagnoli R, Merighi S, Varani K, Borea PA, et al. A3 Adenosine Receptor Ligands: History and Perspectives. *Med Res Rev* 2000;20:103–28.
47. Cohen S, Stemmer SM, Zozulya G, Ochaion A, Patoka R, Barer F, et al. CF102 an A3 Adenosine Receptor Agonist Mediates Anti-Tumor and Anti-Inflammatory Effects in the Liver. *J Cell Physiol* 2011;226:2438–47.
48. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz K-N, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53:527-52.

49. Kübelbeck A. Schematische Darstellung der Tight Junctions der Blut-Hirn-Schranke. [cited 2013 Jan 13]. Available from:URL: http://de.wikipedia.org/w/index.php ?title=Datei :Cellular_tight_junction_de.png&filetimestamp=20090301080503
50. Zhu C-B, Lindler KM, Campbell NG, Sutcliffe JS, Hewlett WA, Blakely RD. Colocalization and Regulated Physical Association of Presynaptic Serotonin Transporters with A3 Adenosine Receptors. *Mol Pharmacol* 2011;80:458–65.
51. IFA- Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. GESTIS-Stoffdatenbank. [cited 2013 Jan 24]. Available from:URL: [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/037840.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/037840.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0)
52. Rothermel BA, Hill JA. Adenosine A3 Receptor and Cardioprotection: Enticing, Enigmatic, Elusive. *Circulation* 2008;118:1691-3.
53. Nic M, Jirat J, Kosata B, editors. retention index, I in column chromatography. 2006 [cited 2012 Nov 11]. Available from:URL: <http://goldbook.iupac.org/R05360.html>.
54. Ross MK, Crow JA. Human Carboxylesterases and their Role in Xenobiotic and Endobiotic Metabolism. *J Biochem Mol Toxic* 2007;21:187-96.
55. Gessi S, Merighi S, Varani K, Cattabriga E, Benini A, Mirandola P, et al. Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: Focus on the A₃ adenosine subtype. *J Cell Physio* 2007;211:826–36.
56. Fishman P, Bar-Yehuda S, Synowitz M, Powell JD, Klotz KN, Gessi S, et al. Adenosine Receptors and Cancer. Wilson CN, Mustafa SJ, editors. *Adenosine Receptors in Health and Disease*. Handbook of Experimental Pharmacology 193. Berlin, Heidelberg; Springer-Verlag, 2009.
57. Pschyrembel W. Klinisches Wörterbuch. 259.Auflage. Berlin (D): Gruyter Verlag; 2002.

58. Europäisches Arzneibuch, Nachtrag 2000, 125, Monographie Radioaktive Arzneimittel/Radiopharmazeutika.
59. Kromidas S. HPLC für Einsteiger. © by NOVIA, Alle Rechte bei NOVIA GmbH.
60. Kaushik R, Levine B, LaCourse WR. *Anal Chim Acta* 2006;556:255–66.
61. Hervé FA, Ghinea N, Scherrmann JM. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J* 2008;10:455–72.
62. Roberts RL, Fine RE, Sandra A. Receptor-mediated endocytosis of transferrin at the blood-brain barrier. *J Cell Sci* 1993;104:521–32.
63. Fromm M. Transport in Membranen und Epithelien. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, editors. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31.Auflage. Heidelberg: Verlag Springer Medizin; 2010. p. 41–54.
64. Kaliszan R, Markuszewski M. Brain/blood distribution described by a combination of partition coefficient and molecular mass. *Int J Pharm* 1996;145:9–16.
65. Agilent 1100 System Series, HPLC Value System. User`s Guide Copyright Agilent Technologies 1999.
66. Nics L, Hahn A, Zeilinger M, Vranka C, Ungersboeck J, Haeusler D, et al. Quantification of the radio-metabolites of the serotonin-1A receptor radioligand [carbonyl-11C]WAY-100635 in human plasma: an HPLC-assay which enables measurement of two patients in parallel. *Appl Rad Isotopes* 2012;70:2730–6.
67. Badaut J, Brunet J-F. Aquaporins in the brain: from aqueduct to “multi-duct”. *Metab Brain Dis* 2007;22:251–63.
68. Martić-Kehl MI, Schibli R, Schubiger PA. Can Animal Data Predict Human Outcome? Problems and Pitfalls of Translational Animal Research. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012;39:1492–6.

69. Müller CE, Scior T. Adenosine receptors and their modulators. *Pharma Acta Helv* 1993;68:77-111.
70. Nics L, Haeusler D, El-Samahi H, Wadsak W, Mien L-K, Ungersböck J, et al. FE@SUPPY und FE@SUPPY:2: metabolische Überlegungen.
7. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Nuklearmedizin, 2009 Jan 22-24, Salzburg, Austria. Abstract Congress Proceedings.

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Unterscheidung der FE@SUPPY-Derivate.....	15
Tabelle 2 Enzymklassen, ihre katalytischen Eigenschaften und Enzymbeispiele.	24
Tabelle 3 Drei Familien der Cytochrom P 450 Enzyme und ihre Funktionen.....	33
Tabelle 4 Reagenzien der Metaboliten-Versuche	41
Tabelle 5 Produktsteigungen der Triplikate am Beispiel von FE@SUPPY:21 und Me@SUPPY:21 zur Konzentration des Versuchsansatz	51
Tabelle 6 zeigt die $V_{\max}$ und K_m Werte der abbauenden FE@SUPPY-Analoga im Vergleich zu den bereits vorgestellten A3R-Antagonisten FE@SUPPY und FE@SUPPY:2.	54
Tabelle 7 Reagenzien der log P-Versuche	55
Tabelle 8 log P Werte unterschiedlicher Quellen der Referenzsubstanzen.....	57
Tabelle 9 Ergebnisse HPLC log P_{ow}	57
Tabelle 10 Katalytische Aktivität von isolierten Carboxylesterase Isoenzymen aus Lebermikrosomen verschiedener Säugetiere.....	59

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Erkennungsprinzip und Aufbau eines Radiotracers [modifiziert nach 1].	13
Abbildung 2 $^{18}\text{O}(\text{p}, \text{n})$ ^{18}F -Reaktion.....	17
Abbildung 3 Chemische Struktur des Adenosins.....	18
Abbildung 4 zeigt beispielhaft die Biotransformation an den ER der Leber durch Phase I und Phase II Enzyme [60].	22
Abbildung 5 Unterschied der Aktivierungsenergie mit und ohne Enzym.	23
Abbildung 6 Enzym-Reaktion Modell (nach Michaelis-Menten) [16].	27
Abbildung 7 zeigt eine typische Sättigungskurve der Michaelis-Menten Kinetik mit den beschreibenden Werten K_m , $V_{\max}$ und $\frac{1}{2} V_{\max}$	27
Abbildung 8 zeigt Michaelis-Menten Gleichung unter Bezugnahme der Kinetik [16].	27
Abbildung 9 Vorgeschlagerener Mechanismus der Carboxylesterase-Aktion [22].	31
Abbildung 10 Schematische Darstellung der Tight Junction an der Blut-Hirn-Schranke.	34

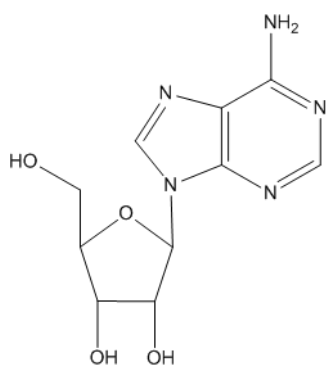
Abbildung 11 Multimodales Transportsystem der Blut-Hirn-Schranke [modifiziert nach 27].	35
Abbildung 12 und 13 Maß für die Lipophilie log P und unter Einbezug der Solutenspezies log D.	37
Abbildung 15 zeigt mögliche CES katalysierte Metaboliten von FE@SUPPY:2	43
Abbildung 14 zeigt mögliche CES katalysierte Metaboliten von FE@SUPPY	43
Abbildung 17 zeigt mögliche CES katalysierte Metaboliten von FEMe@SUPPY:2.....	43
Abbildung 16 zeigt mögliche CES katalysierte Metaboliten von FEMe@SUPPY	43
Abbildung 19 zeigt mögliche CES katalysierte Metaboliten von (Me) ² @SUPPY	43
Abbildung 18 zeigt mögliche CES katalysierte Metaboliten von (FE) ² @SUPPY	43
Abbildung 20 zeigt schematisch den Versuchsablauf.	44
Abbildung 21 Schematische Darstellung des Verlauf eines enzymatischen Abbaus [70].	45
Abbildung 22 Regressionsgeraden der Derivate FEMe@SUPPY und FEMe@SUPPY:2.....	46
Abbildung 23 Regressionsgeraden der Produkte FE@SUPPY:21 und Me@SUPPY:21.....	47
Abbildung 24 Das Chromatogramm zeigt den Zeitpunkt 0h des 100µg/ml Ansatzes.....	48
Abbildung 26 zeigt die Produktzunahme (Konzentration [nmol/l]) über die Zeit am Beispiel des 20 µg/ml Substratansatzes des gebildeten Produktes FE@SUPPY:21 A, B und C stehen für das Triplikat und setzen sich jeweils aus dem Mittelwert der dreifachen Analyse pro Versuchsansatz zusammen.	50
Abbildung 27 zeigt die Produktzunahme (AUC) über die Zeit am Beispiel des 20 µg/ml Substratansatzes des gebildeten Produktes Me@SUPPY:21. A, B und C stehen für das Triplikat und setzen sich jeweils aus dem Mittelwert der dreifachen Analyse pro Versuchsansatz zusammen.	50
Abbildung 28 Michaelis-Menten Kinetik des FEMe@SUPPY.	52
Abbildung 29 Michaelis-Menten Kinetik des FEMe@SUPPY:2.....	52
Abbildung 30 Michaelis-Menten Kinetik des (Me) ² @SUPPY.....	53
Abbildung 31 Michaelis-Menten Kinetik des (FE) ² @SUPPY.....	53
Abbildung 32 Schematische Darstellung eines Chromatogramms	56

11. Abkürzungen

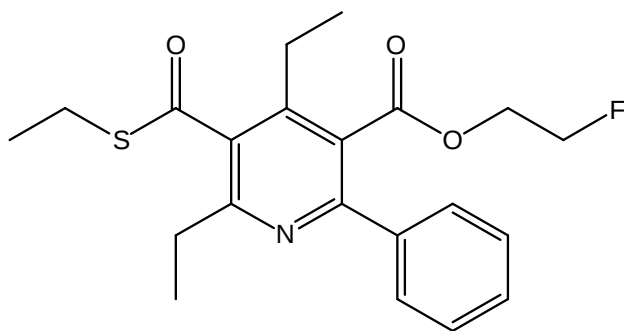
A3R	Adenosin 3 Rezeptor
AC	Adenylatzyclase
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosin-Di-Phosphat
AMP	Adenosin-Mono-Phosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
AUC	Area Under the Curve, Peakfläche
BHS	Bluthirnschranke
CES	Carboxylesterase
CYP	Cytochrom P
D	Asparaginsäure
DAD	Diodenarray-Detektor
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Glutamin
[E]	Enzymkonzentration
EI	Enzym-Inhibitor Komplex
EP	Enzym-Produkt Komplex
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ES	Enzym-Substrat Komplex
[ES]	Enzym-Substrat Komplex- Konzentration
ESI	Enzym-Substrat-Inhibitor Komplex
[ESI]	Enzym-Substrat-Inhibitor Komplex- Konzentration
EZ	Endothelzelle
GDP	Guanindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanintriphosphat
H	Histidin
HPLC	High-performance liquid chromatography
5-HTT	5-Hydroxytryptamintransporter (Serotonintransporter)
hCE	humane Carboxylesterase
I	Inhibitor
[I]	Inhibitorkonzentration
IAM	Immobilized Arificial Membrane-Chromatographie
ID	Injizierte Dosis
IU	International Unit
kat	Katal
kDa	Kilo Dalton

keV	Kiloelektronen Volt
K_m	Michaelis-Menten Konstante
K _m	Membran-Verteilungskoeffizient
L	Leucin
LADME	Liberation, Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion
m	Steigung
MAPK	Mitogen-Activated Protein-Kinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF κ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NP-HPLC	Normal-Phase HPLC
[P]	Produktkonzentration
P1	Purin Rezeptoren 1
P-gp	P-Glycoproteine (Transporter)
pI	Isoelektrischer Punkt
PLE	Porcine Leberesterase
P _m	Permeabilität
PPB	Plasma Protein Bindung
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Reverse-Phase HPLC
R _t	Retentionszeit
S	Serin
[S]	Substratkonzentration
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TJ	Tight Junctions
V	Reaktionsgeschwindigkeit
V _{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
$\frac{1}{2} V_{max}$	Halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit
Wnt	Wingless und Int-1 (Signalprotein)
X	Unbekannte Aminosäure
ZNS	Zentrales Nervensystem

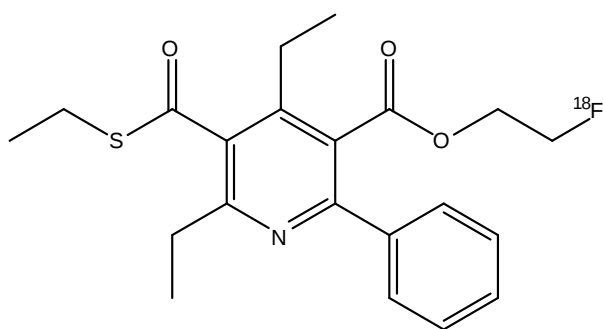
12.Strukturverzeichnis



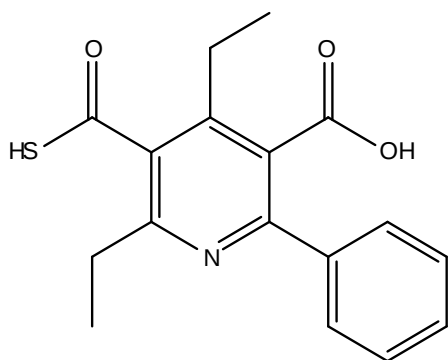
Adenosin (((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-Aminopurin-9-yl)- 5-(hydroxymethyl)oxolan-3,4-diol))



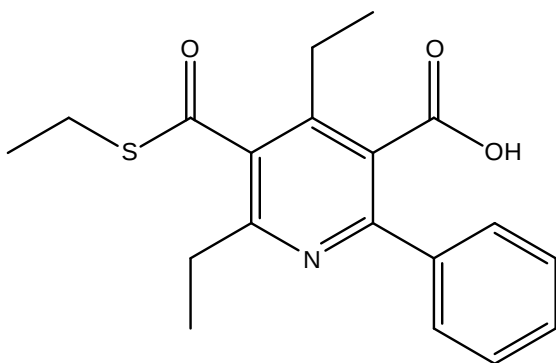
FE@SUPPY (2-fluoroethyl 4,6-diethyl-5-(ethylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinate)



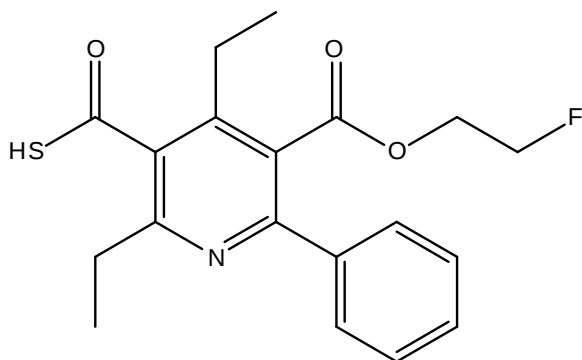
[¹⁸F]FE@SUPPY (2-[¹⁸F]fluoroethyl 4,6-diethyl-5-(ethylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinate)



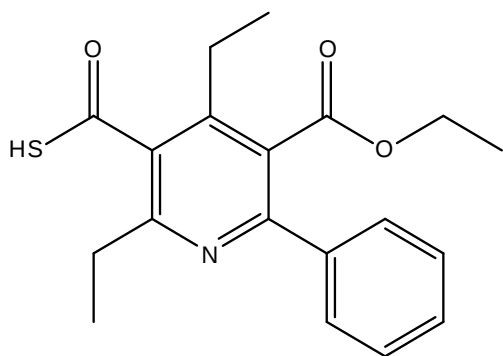
SUPPY:0 (4,6-diethyl-2-phenyl-5-thiocarboxynicotinic acid)



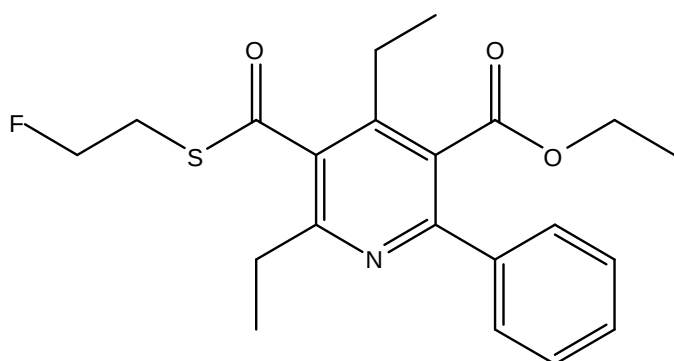
DFE@SUPPY (4,6-diethyl-5-(ethylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinic acid)



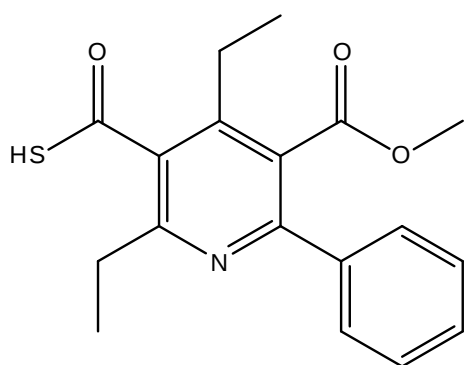
FE@SUPPY:11 (2,4-diethyl-5-((2-fluoroethoxy)carbonyl)-6-phenylpyridine-3-carbothioic S-acid)



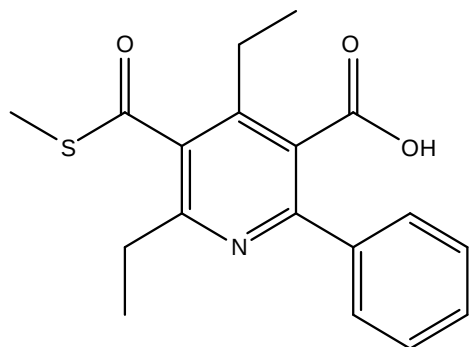
DFE@SUPPY:2 (5-(ethoxycarbonyl)-2,4-diethyl-6-phenylpyridine-3-carbothioic S-acid)



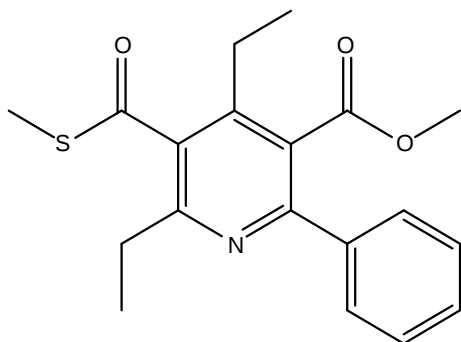
FE@SUPPY:2 (ethyl 4,6-diethyl-5-((2-fluoroethylthio)carbonyl)-2-phenylnicotinate)



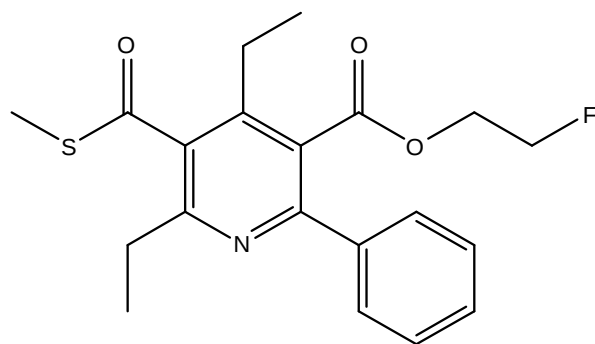
Me@SUPPY:11 (2,4-diethyl-5-(methoxycarbonyl)-6-phenylpyridine-3-carbothioic S-acid)



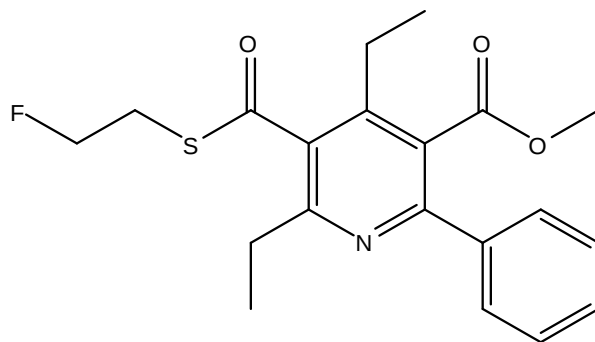
ME@SUPPY:21 (4,6-diethyl-5-(methylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinic acid)



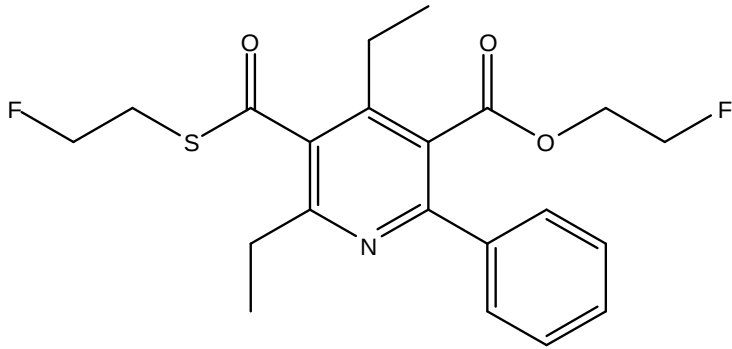
(Me)²@SUPPY (methyl 4,6-diethyl-5-(methylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinate)



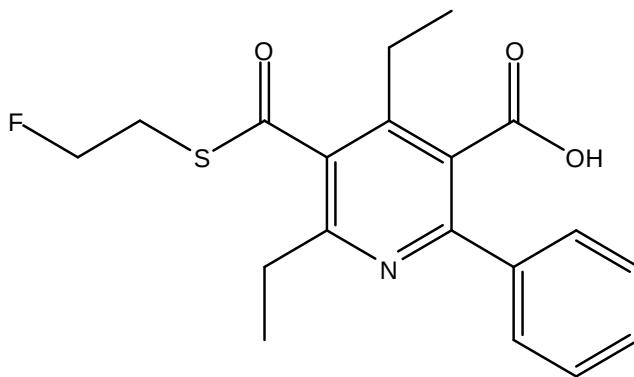
FEMe@SUPPY (2-fluoroethyl 4,6-diethyl-5-(methylthiocarbonyl)-2-phenylnicotinate)



FEMe@SUPPY:2 (methyl 4,6-diethyl-5-((2-fluoroethylthio)carbonyl)-2-phenylnicotinate)

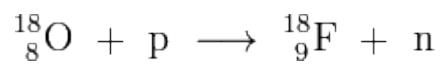


FE²@SUPPY (2-fluoroethyl 4,6-diethyl-5-((2-fluoroethylthio)carbonyl)-2-phenylnicotinate)



FE@SUPPY:21 (4,6-diethyl-5-((2-fluoroethylsulfanyl)carbonyl)-2-phenylpyridine-3-carboxylate)

13. Formelverzeichnis



¹⁸O(p, n) ¹⁸F-Reaktion

$$K_i = [\text{E}] * [\text{I}] / [\text{EI}]$$

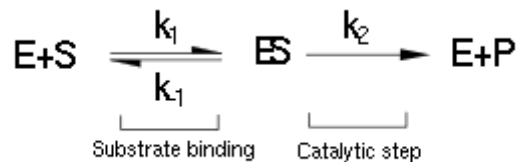
Gleichung der Inhibitionskonstante K_i

ES/EI

Enzym-Substrat-/Enzym-Inhibitor Quotient

$$1 \text{ kat} = 1 \times \text{mol/s} = 60 \times 10^6 \text{ U}$$

Umrechnung Katal zu Unit



Enzym-Reaktions Modell nach Michaelis-Menten

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}.$$

Michaelis-Menten Gleichung

$$K_m = [E] \times [S] / [ES]$$

Michaelis-Menten Konstante

$$\log P_{\text{oct/wat}} = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{water}}^{\text{un-ionized}}} \right)$$

Berechnung des log P_{ow}

$$\log D_{\text{oct/wat}} = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{water}}^{\text{ionized}} + [\text{solute}]_{\text{water}}^{\text{neutral}}} \right)$$

Berechnung Log D_{ow}

$$\log P_{\text{unknown}} = \frac{(\log P_{\text{tol}} - \log P_{\text{triph}}) \cdot t_{\text{unknown}} + t_{\text{tol}} \cdot \log P_{\text{triph}} - t_{\text{triph}} \cdot \log P_{\text{tol}}}{t_{\text{tol}} - t_{\text{triph}}}$$

Berechnung des HPLC log P_{ow} nach Donovan und Pescatore (2002)

14. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Chrysoula Vraka Bakk. rer. nat
Hauptwohnsitz	Hasner Str. 116/43 A-1160 Wien
geboren am	03.01.1987 in Düsseldorf
Staatsbürgerschaft	Griechenland
Familienstand	ledig
Kontakt	Handynr.: 0650/4200879 E-Mail-Adresse: chrysoula.vraka@gmx.at

Schulausbildung

1993-1997	Volksschule in Düsseldorf
1997-2006	St. Ursula – Gymnasium in Düsseldorf Schwerpunkt: Biologie, Ernährungslehre

Hochschulstudium

Seit 2006	Uni Wien, Ernährungswissenschaften Abschluss 2010: Bakk. rer. nat.
-----------	---

Praktika

(2005-2012)	Praktikum in der Kardiologie-Ambulanz
-------------	---------------------------------------

(Kinderklinik) der Universitätsklinik Düsseldorf.

Büroarbeiten in der HNO Praxis von Dr. Lindemann in Erkrath.

Februar 2011 Praktikum in der Radiopharmazie der Nuklearmedizin AKH Wien

WS 2012/ SS 2013 Tutorin der Übungen zur Ernährung des Menschen I, Universität Wien

2012-2013 Schreib- und Recherchearbeiten an der Krebsforschung Wien für Prof. Siegfried Knasmüller

Publikationen und wissenschaftliche Präsentationen:

L. Nics, A. Hahn, M. Zeilinger, C. Vranka, J. Ungersböck, D. Häusler, S. Hartmann, K-H. Wagner, R. Lanzemberger, W. Wadsak, M. Mitterhauser; Quantification of the radio-metabolites of the serotonin-1A receptor radioligand [carbonyl-¹¹C]WAY-100635 in human plasma: An HPLC-assay which enables measurement of two patients in parallel. Applied Radiation and Isotopes 70 (2012) 2730–2736

Nics L., Vranka C., Häusler D., Wagner K-H., Shanab K., Spreitzer H., Wadsak W., Mitterhauser M.; FE@SUPPLY-DERIVATES WITH HIGH METABOLIC STABILITY: A NEW GENERATION OF PUTATIVE PET-TRACERS FOR THE ADENOSINE A₃-RECEPTOR?; Poster, International conference on lifestyle, oxidative stress and diabetes mellitus (Diaplant), 8. – 9. Nov., 2012, Modra, Slowakei