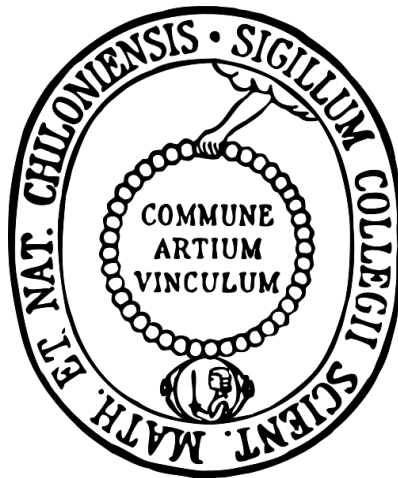


**Radiosynthese und Bioverfügbarkeitsstudien
mittels *in vivo* SPECT-Imaging von
[¹²³I]-markierten Pentamidin-Prodrugs zur
Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Björn Cohrs

Kiel 2013

Referent:

Prof. Dr. Bernd Clement

Korreferent:

PD Dr. Maaz Zuhayra

Tag der mündlichen Prüfung:

11. April 2013

Zum Druck genehmigt:

11. April 2013

Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl
(Dekan)

für meine Freunde und Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Trypanosomeninfektionen	1
1.1.1	Afrikanische Schlafkrankheit	1
1.1.2	Tierpathogene Trypanosomeninfektionen	5
1.1.3	Aufnahme und trypanozide Wirkung von Pentamidin (1) in Trypanosomen.....	7
1.2	Leishmaniose	8
1.3	<i>Pneumocystis</i> Pneumonie (PCP).....	11
1.4	Arzneistoffprofil des Pentamidins (1).....	13
1.4.1	Wirkung und Nebenwirkungen	13
1.4.2	Pharmakokinetik und Metabolismus	13
1.5.	Orale Bioverfügbarkeit und ZNS-Gängigkeit	16
1.5.1	Orale Bioverfügbarkeit	16
1.5.2	Die Blut-Hirn Schranke	17
1.5.2.1	Anatomie und Physiologie der Blut-Hirn Schranke.....	17
1.5.2.2	Stofftransport durch die Blut-Hirn Schranke	18
1.6	Entwicklung von Pentamidin-Prodrugs	19
1.7	Thema und Zielsetzung.....	21
2	Synthesen der nicht radioaktiven Verbindungen	23
2.1	Einleitung und Zielsetzung	23
2.2	Synthesen	24
2.2.1	Direkte Iodierungen von Pentamidin (1) und <i>N,N'</i> -Dihydroxy-pentamidin (2) (Methode A)	24
2.2.2	Synthese von Iodpentamidin (1a) (Methode B).....	25
2.2.3	Synthese von <i>N,N'</i> -Dihydroxyiodpentamidin (2a) (Methode B).....	27
2.2.4	Synthese von <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)iodpentamidin (3a)	28
2.3	Experimenteller Teil der nicht radioaktiven Synthesen	30
2.3.1	Geräte und Materialien	30
2.3.2	Synthesen der nicht radioaktiven Verbindungen.....	32
2.3.2.1	4-Hydroxy-3-iodbenzonitril (5).....	32

2.3.2.2	1-Brom-5-(4-cyan)phenoxy-pentan (6)	33
2.3.2.3	1-(4-cyan)-2-iodphenoxy-5-(4-cyan)phenoxy-pentan (8)	34
2.3.2.4	Iodpentamidin (1a).....	35
2.3.2.5	<i>N,N'</i> -Dihydroxyiodpentamidin (2a).....	37
2.3.2.6	<i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)iodpentamidin (3a).....	39
3	Synthesen der radioaktiven Verbindungen	41
3.1	Einleitung und Zielsetzung	41
3.2	Eigenschaften des Radionuklids	42
3.3	Methoden der Radiomarkierung und Radioiodierung	43
3.3.1	Einleitung.....	43
3.3.2	Direkte Radioiodierungen	44
3.3.2.1	Oxidative Radioiodierungsreaktionen	44
3.3.2.2	Radioiodierung durch elektrophile Substitution via Demetallierung	45
3.3.2.3	Direkte Radioiodierung via Schmelzverfahren.....	46
3.3.3	Isotopenaustauschreaktionen.....	47
3.3.3.1	Einleitung.....	47
3.3.3.2	Isotopenaustauschreaktion mittels Ammoniumsulfat.....	47
3.3.3.3	Kupfer(I)-katalysierte Isotopenaustauschreaktion	48
3.4	Experimenteller Teil der radioaktiven Synthesen	52
3.4.1	Geräte und Materialien	52
3.4.2	HPLC-Methoden	53
3.4.2.1	Radio-HPLC-Methode 1	53
3.4.2.2	Radio-HPLC-Methode 2	54
3.4.2.3	Radio-HPLC-Methode 3	55
3.4.2.4	Radio-HPLC-Methode 4	56
3.4.2.5	Radio-HPLC-Methode 5	57
3.4.2.6	Radio-HPLC-Methode 6	58
3.4.3	Bestimmung der radiochemischen Reinheit, der spezifischen Aktivität und der radiochemischen Ausbeute	59
3.4.4	Synthesen der radioaktiven Verbindungen.....	60
3.4.4.1	[¹²³ I]-Iodpentamidin (1b).....	60
3.4.4.2	[¹²³ I]- <i>N,N'</i> -Dihydroxyiodpentamidin (2b).....	61

3.4.4.3	[¹²³ I]-N,N'-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (3b).....	62
4	SPECT-Imaging Studien	64
4.1	Einleitung.....	64
4.2	SPECT-Imaging.....	65
4.3	Design und Ablauf einer Studie.....	68
4.4	Material und Methoden.....	69
4.4.1	Geräte und Materialien.....	69
4.4.2	Kalibrierungen.....	70
4.4.2.1	Aktivimeter.....	70
4.4.2.2	Gamma-Kamera.....	70
4.4.2.3	Bohrlochmessgerät.....	71
4.4.3	<i>In vivo</i> Untersuchungen.....	72
4.4.3.1	Genehmigung und Haltung der Ratten.....	72
4.4.3.2	Operation der Ratten.....	72
4.4.3.3	Applikation der Substanzen.....	73
4.4.3.4	Durchführung der SPECT-Untersuchungen.....	74
4.4.3.5	Entnahme und Vermessung der Blutproben.....	74
4.4.3.6	Entnahme und Vermessung der Organproben.....	74
4.4.4	Verfahren zur Auswertung und Quantifizierung.....	75
4.4.4.1	Auswertung und Quantifizierung der rekonstruierten Bilder.....	75
4.4.4.2	Auswertung der im Bohrloch gemessenen Organe (Biodistribution).....	77
4.4.4.3	Auswertung der Blutproben.....	78
4.5	Ergebnisse.....	78
4.5.1	Kalibrierungen.....	78
4.5.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen.....	79
4.5.2.1	Einleitung.....	79
4.5.2.2	Statistische Analyse.....	80
4.5.2.3	AUCs und Zeit-Aktivitätsverläufe nach intravenöser Applikation.....	81
4.5.2.4	Biodistribution 24 – 26 h nach intravenöser Applikation.....	92
4.5.2.5	Blutspiegel nach intravenöser Applikation.....	95
4.5.2.6	AUCs und relative Bioverfügbarkeiten nach oraler Applikation.....	98
4.5.2.7	Zeit-Aktivitätsverläufe nach oraler Applikation.....	103

4.5.2.8	Biodistribution 24 – 26 h nach oraler Applikation	110
4.5.2.9	Vergleich der relativen Bioverfügbarkeit von 3b nach oraler Applikation (Studie F) mit und ohne Omeprazol	112
4.5.2.10	Blutspiegel nach oraler Applikation	114
4.5.2.11	<i>In vivo</i> Stabilität der markierten Verbindungen – Akkumulation von ¹²³ I in der Schilddrüse	116
4.6	Diskussion der Ergebnisse	120
5	Zusammenfassung und Ausblick	125
6	Literaturverzeichnis	130
7	Anhang	144
	Abkürzungsverzeichnis	144
	Strukturformelverzeichnis	148
	Erklärung zu §8 Abs. 1 der Promotionsordnung	151
	Danksagung	153
	Lebenslauf	155
	Kurzfassung.....	157
	Abstract	159

1 Einleitung

1.1 Trypanosomeninfektionen

1.1.1 Afrikanische Schlafkrankheit

Die Afrikanische Schlafkrankheit zählt zu den gefährlichsten Trypanosomeninfektionen, die Mensch und Tier in 36 afrikanischen Ländern südlich der Sahara bedrohen [WHO, 2012; Enanga *et al.*, 2002]. Infektionen mit Trypanosomen sind in den betroffenen Regionen von großer sozialer und ökonomischer Bedeutung [Stich *et al.*, 2002]. Obwohl die Verbreitung der Krankheit in den 1960er Jahren durch systematische Vektorbekämpfung und Behandlung erkrankter Menschen und Tiere fast vollständig gestoppt werden konnte, breitete sie sich seit den 1980er Jahren wieder aus [Barrett, 1999; Simarro *et al.*, 2011]. 1998 wurden knapp 40.000 Fälle registriert, die geschätzten Fallzahlen lagen jedoch bei 300.000 [WHO, 2012]. 2005 wurden wieder umfangreiche Screening- und Behandlungskampagnen der betroffenen Bevölkerung zur Bekämpfung der Afrikanischen Schlafkrankheit ins Leben gerufen, wodurch die Zahlen kontinuierlich gesenkt werden konnten [WHO, 2012]. 2010 wurden nur 7.139 neue Fälle registriert, die geschätzten Fallzahlen liegen aktuell bei 30.000 [WHO, 2012].

Die Verbreitung und Übertragung der Krankheitserreger erfolgt durch den Stich der Tsetsefliege [Stemberger, 1987; Enanga *et al.*, 2002]. Das Verbreitungsgebiet der Tsetsefliege erstreckt sich hauptsächlich über die tropischen Länder südlich der Sahara, wo ausreichend viele feuchte Sumpf- und Waldgebiete für die Verbreitung der Fliege vorhanden sind [Bethke, 2007]. Außer Menschen werden u. a. Rinder, Ziegen, Antilopen und Schafe mit Trypanosomen infiziert, die wiederum als Reservoir für die Erreger dienen können [Piekarski, 1993; Kayser *et al.*, 1999]. Die Entwicklung der Trypanosomen ist an einen Wirtswechsel gebunden, das heißt, dass ein Teil der Entwicklung im Insekt, der andere Teil des Entwicklungszyklus im Menschen bzw. Tier stattfindet [Piekarski, 1993]. Trypanosomen sind Protozoen aus der Familie der Trypanosomatidae. Sie haben alle einen spindelförmigen Körper, einen Zellkern, einen Kinetoplasten, keine Zellwand und eine Zuggeißel, die mit dem Zellkörper verbunden ist [Stemberger, 1987; Duszenko, 1998]. In Tabelle 1.1 sind die wichtigsten durch Trypanosomen hervorgerufenen Infektionen zusammengestellt.

Tabelle 1-1: Übersicht über wichtige human- und tierpathogene Trypanosomeninfektionen modifiziert nach Clement [1989] und Gibson [2007]

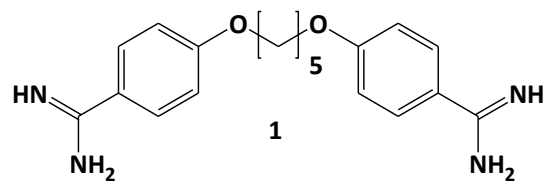
Erreger	Krankheit	Überträger	Verbreitung	Mittel der 1. Wahl
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	Afrikanische Schlafkrankheit/ Trypanosomiasis (chronischer Verlauf)	Tsetsefliege	West- und Zentralafrika	1. Stadium: Pentamidin 2. Stadium: Eflornithin (+ Nifurtimox)
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	Afrikanische Schlafkrankheit/ Trypanosomiasis (akuter Verlauf)	Tsetsefliege	vorzugsweise Ostafrika	1. Stadium: Suramin 2. Stadium: Melarsoprol
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Chagas-Krankheit Amerikanische Trypanosomiasis	Raubwanzen	Süd- und Mittelamerika	Nifurtimox
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Nagana (Pferd, Hund)	Stechfliegen	tropisches Afrika	Diminazen Isometamidiumchlorid
<i>Trypanosoma vivax</i>	Souma (Rind u. a.)	Stechfliegen	Ost-, Westafrika, Südamerika	Diminazen Isometamidiumchlorid
<i>Trypanosoma congolense</i>	Gambiafieber (Rind u. a.)	Stechfliegen	tropisches Afrika	Diminazen Isometamidiumchlorid

Die humane Afrikanische Schlafkrankheit tritt in zwei verschiedenen Formen auf. Die westafrikanische Form, die ca. 95% der humanen Infektionen betrifft, wird durch den Erreger *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) hervorgerufen [WHO, 2012]. Die Erkrankung zeichnet sich durch einen langsamen Verlauf aus [Denise & Barrett, 2001]. Erst nach mehreren Monaten (bis zu zwei Jahren) dringen die Trypanosomen in das ZNS ein [Clement, 1989]. Die ostafrikanische Form, die heute unter 5% der registrierten Fälle ausmacht, wird durch den Erreger *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*)

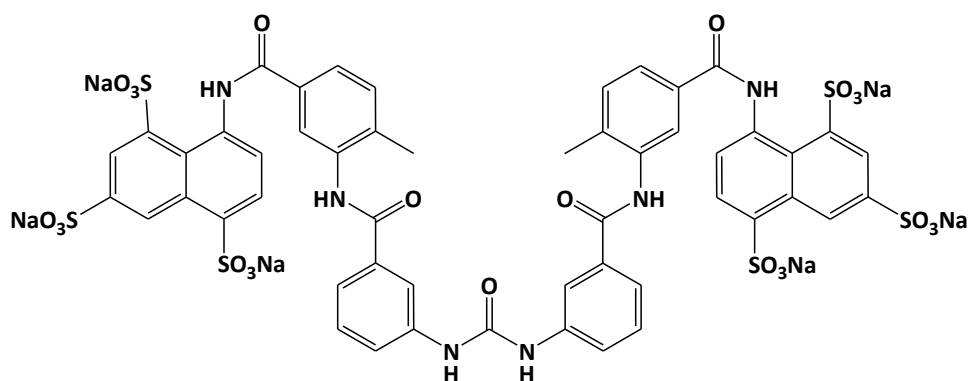
hervorgerufen [WHO, 2012]. Diese Form der Erkrankung zeichnet sich durch einen akuten Verlauf aus [Denise & Barrett, 2001]. Die charakteristischen Symptome treten innerhalb von einigen Wochen bis Monaten nach der Infektion auf [Clement, 1989]. Unbehandelt führen beide Formen der Afrikanischen Schlafkrankheit zum Tod [Legros *et al.*, 2002].

Der Verlauf der Afrikanischen Schlafkrankheit wird in zwei Stadien unterteilt. Das erste Stadium, das als hämolympathisches Stadium bezeichnet wird, beginnt mit einer Primärläsion der Haut an der Stichstelle [Kayser *et al.*, 1999]. Nach Ausbreitung der Erreger im Blut kommt es zu unspezifischen, grippeähnlichen Symptomen wie Fieber und Gelenkschmerzen. Charakteristisch ist das Anschwellen des Nackenlymphknotens (Winterbotten'sches Zeichen) infolge der Erregerausbreitung in den Lymphbahnen [Stich *et al.*, 2002]. Das zweite Stadium beginnt mit dem Eindringen der Trypanosomen in das Zentralnervensystem. Als Ursache hierfür wird ein Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen einer Entzündungsreaktion diskutiert [Masocha *et al.*, 2007; Enanga *et al.*, 2002], in dessen Folge es zur Ausbildung einer chronischen Enzephalopathie mit schleichender Wesensveränderung bis hin zur Apathie kommt [Stich, 2009]. Charakteristisch ist das abnorm erhöhte Schlafbedürfnis, was der Erkrankung den Namen gegeben hat. Unbehandelt sterben die Patienten meist an einer Meningoenzephalitis oder Unterernährung, da ihnen aufgrund ihres komatösen Zustandes keine Nahrungsaufnahme mehr möglich ist [Stich *et al.*, 2002].

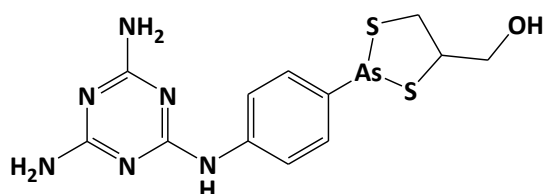
Die aktuellen Screening-Programme in den betroffenen Regionen zielen auf eine frühzeitige Diagnose der Erkrankung noch vor Beginn des zweiten Stadiums ab [WHO, 2012]. Denn wird eine Infektion frühzeitig erkannt, ist eine erfolgreiche Behandlung möglich. Die Auswahl der zur Verfügung stehenden Arzneimittel ist jedoch äußerst begrenzt. Außerdem sind die meisten Substanzen schon sehr alt und haben teilweise gravierende Nebenwirkungen [Steverding, 2010; Pepin & Milford, 1994]. In Abbildung 1-1 sind die Strukturformeln der aktuell zur Verfügung stehenden Arzneistoffe zur Behandlung der humanen Afrikanischen Schlafkrankheit abgebildet.



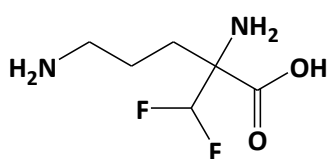
Pentamidin (Pentacarinat®)



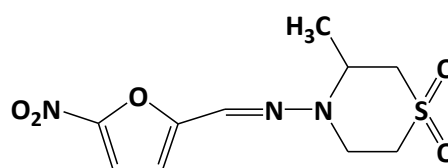
Suramin (Germanin®)



Melarsoprol (Mel B®)



Eflornithin (Ornidyl®)



Nifurtimox (Lampit®)

Abbildung 1-1: Strukturformeln von Arzneistoffen zur Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit [Stich & Steverding, 2002]

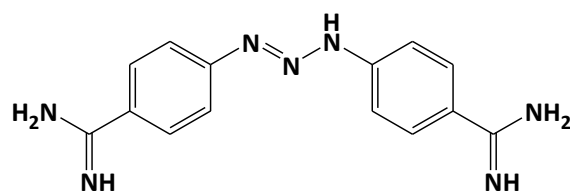
Für die Therapie des ersten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit stehen Suramin und Pentamidin zur Verfügung. Suramin wirkt sowohl gegen *T. b. gambiense* als auch gegen *T. b. rhodesiense*, hat aber nur einen langsamen trypanoziden Effekt [Bouteille *et al.*, 2003].

Gegen *T. b. gambiense*, den Erreger der westafrikanischen Form, wird vor allem Pentamidin **(1)** eingesetzt, was im Gegensatz zu Suramin auch intramuskulär appliziert werden kann [Kayser *et al.*, 1999]. Zur Behandlung des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit müssen die Substanzen die Blut-Hirn Schranke überwinden können [Enanga *et al.*, 2002; Barrett & Fairlamb, 1999]. Lange Zeit standen ausschließlich lipophile Arsen-Verbindungen zur Verfügung, wie beispielsweise das 1949 entwickelte Melarsoprol, welches heute noch das einzige Mittel ist, was zur Behandlung des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit bei *T. b. rhodesiense* Infektion eingesetzt wird [Kennedy, 2006]. Durch die hohe Toxizität des Arsens erleiden 3-10 % der Patienten eine Enzephalopathie mit oft tödlichem Ausgang [Stich *et al.*, 2002; Hasne & Barrett, 2000a; Kennedy, 2004]. Bei einer Infektion mit *T. b. gambiense* kann alternativ statt Melarsoprol das seit 1990 verfügbare Eflornithin gegeben werden, welches ein besseres Nebenwirkungsprofil aufweist [Denise & Barrett, 2001; Sjoerdsma & Schechter, 1999]. Obwohl die Kosten für eine Behandlung mit Eflornithin erheblich höher als mit Melarsoprol sind [Dumas & Bouteille, 2000], konnte Melarsoprol in der Behandlung des zweiten Stadiums bei *T. b. gambiense* Infektionen durch umfangreiche Hilfsprogramme der WHO größtenteils durch Eflornithin ersetzt werden [Simarro, 2011; Burri, 2010]. So wurden bis 2006 noch knapp 90% der Fälle mit Melarsoprol behandelt, 2009 betrug der Anteil nur noch 38% [Simarro, 2011]. Der neueste Therapieansatz besteht seit 2009 in einer kombinierten Behandlung mit Eflornithin und Nifurtimox, welches zur Behandlung der durch *Trypanosoma cruzi* hervorgerufenen Chagas-Krankheit zugelassen ist [Simarro, 2011; Burri, 2010; Pepin *et al.*, 1989; van Nieuwenhove & Declercq, 1981].

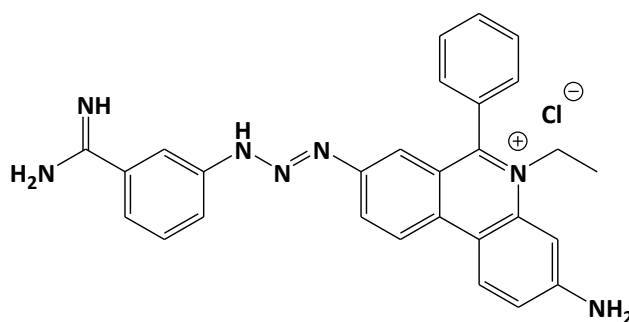
1.1.2 Tierpathogene Trypanosomeninfektionen

Trypanosomeninfektionen von Haus- und Nutztieren stellen in vielen Ländern Zentral- und Ostafrikas sowie in Teilen Südamerikas ein großes veterinärmedizinisches und ökonomisches Problem dar [Meyer, 2007]. Durch die Verbreitung der Vektoren, die ebenso wie die Tsetsefliege zu den Stechfliegen gehören, können viele Weidegebiete in Zentralafrika nicht zur Viehzucht genutzt werden. Zu den wichtigsten tierpathogenen Trypanosomen gehören *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma congolense* und *Trypanosoma vivax* (Tabelle 1-1), die unter anderem die Nagana auslösen. Nagana ist ein Wort der afrikanischen Volksgruppe der Zulu und bedeutet übersetzt so viel wie niedergeschlagen sein [WHO, 2012] und

bezeichnet damit einen Zustand der Tiere, wie er auch bei der humanen Afrikanischen Trypanosomiasis vorkommt. Zur Behandlung werden vor allem Diminazen und Isometamidiumchlorid eingesetzt, wobei sich Diminazen besonders gut zur Behandlung von Rinderinfektionen mit *Trypanosoma congolense* und *Trypanosoma vivax* eignet [Clement, 1989; Kinabo, 1993; Peregrine & Mamman, 1993]. Die Strukturformeln dieser beiden Verbindungen sind in Abbildung 1-2 dargestellt. Obwohl es für die Anwendung am Menschen nicht zugelassen ist, konnte Diminazen bereits erfolgreich zur Behandlung des ersten Stadiums der menschlichen Trypanosomiasis eingesetzt werden [Clement *et al.*, 1992a]. Leider haben sich im Laufe der Zeit Kreuzresistenzen zwischen den zur Behandlung des zweiten Stadiums der humanen Afrikanischen Schlafkrankheit eingesetzten Melaminophenylarsen-Verbindung Melarsoprol und Diminazen ausgebildet (s. 1.1.3) [de Koning, 2001; Barrett & Fairlamb, 1999].



Diminazen (Berenil®)



Isometamidiumchlorid (Samorin®)

Abbildung 1-2: Strukturformeln wichtiger Arzneistoffe zur Behandlung tierpathogener Trypanosomiasen [Moloo & Kutuza, 1990]

1.1.3 Aufnahme und trypanozide Wirkung von Pentamidin (1) in Trypanosomen

Trypanosoma brucei sp. besitzen mehrere Purin Transporter in ihrer Plasmamembran, von denen zwei als Adenosin Transporter identifiziert werden konnten [Carter & Fairlamb, 1993; Hasne & Barrett, 2000b]. Der so genannte P2 Transporter ist verantwortlich für den Transport von Adenosin und Adenin, während der P1 Transporter Adenosin, Guanosin und Inosin transportiert, weil die Trypanosomen nicht zur Eigensynthese dieser Basen befähigt sind [de Koning & Jarvis, 1999]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Melaminophenylarsen-Verbindungen wie Melarsoprol und Diamidine wie Diminazen und Pentamidin (1) ebenfalls über den Nukleosidtransporter P2 in die Trypanosomen gelangen und dort ihre trypanoziden Eigenschaften entfalten können [de Koning *et al.*, 2000; Hasne & Barrett, 2000b; Carter *et al.*, 1999]. Es wird postuliert, dass der P2 Transporter mit den freien Amidinfunktionen der Verbindungen Wasserstoffbrückenbindungen eingehen kann, die er normalerweise mit der amidinähnlichen Funktion des Adenosins ausbildet (Abb. 1-3) [Schlitzer, 2009].

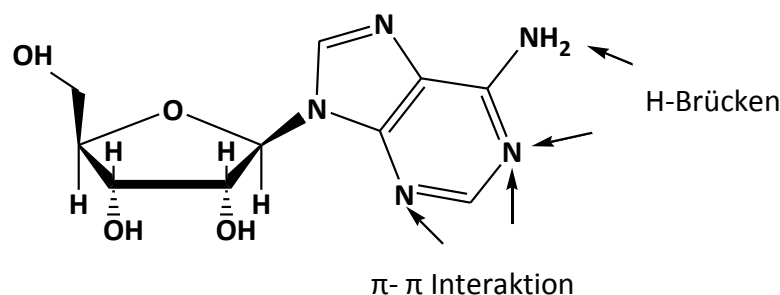


Abbildung 1-3: Wechselwirkungen des P2 Transporters mit Adenosin [de Koning, 2001]

Im Gegensatz zu den Melaminophenylarsen-Verbindungen und Diminazen, die vermutlich fast ausschließlich über diesen Transportweg aufgenommen werden, gelangen nur 50 - 70% des Pentamidins (1) über den P2 Transporter in den Erreger [de Koning, 2001]. Folglich gibt es weitere Transportssysteme, die mit der Aufnahme von Pentamidin (1) in Trypanosomen in Verbindung gebracht werden, wie der *high-affinity pentamidine transporter* (HAPT1) und der *low-affinity pentamidine transporter* (LAPT1) [de Koning & Jarvis, 2001; Bray *et al.*,

2003]. Neueste Untersuchungen deuten auch auf eine Beteiligung des Membranproteins Aquaglyceroporin 2 (AQP2) an der Aufnahme von Melarsoprol und Pentamidin (**1**) in die Trypanosomen hin [Baker *et al.*, 2013; Baker *et al.*, 2012]. Der Verlust oder eine verminderte Substrataffinität des P2 Transporters im Trypanosom führt demnach zur (Kreuz-)Resistenz von Melarsoprol und Diminazen [Denise & Barrett, 2001]. Da Pentamidin (**1**) über verschiedene Transportsysteme in das Trypanosom aufgenommen werden kann, sind Resistenzentwicklungen gegen Pentamidin (**1**) bisher nur selten beobachtet worden [Bridges *et al.*, 2007; Kaminsky & Mäser, 2000; Legros *et al.*, 1999].

Für die Erklärung des molekularen Wirkmechanismus der Diamidine, der zur Apoptose der Trypanosomen führt, gibt es verschiedene Ansätze. Eine der wichtigsten Thesen lautet, dass die positiv geladenen Amidinfunktionen der Diamidine bevorzugt Wechselwirkungen mit den Purinbasen Adenin und Thymin eingehen [Edwards *et al.*, 1992; Laughton *et al.*, 1996; Neidle, 2001]. Da diese Basen gehäuft in der zyklischen kDNS des Kinetoplasten im Mitochondrium der Trypanosomen vorkommen, lagern sich die Diamidine bevorzugt an dieser DNS an [Werbovetz, 2006; Basselin *et al.*, 2002]. In der Folge führt dies zur Linearisierung der zyklischen kDNS sowie zur Hemmung der Kinetoplastenreplikation- und funktion [Schnauffer *et al.*, 2002; Bürenheide, 2006]. Durch die Hemmung der F_0F_1 -ATPase und weiterer noch nicht bekannter Zielstrukturen verursachen die Diamidine einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials [Schlitzer, 2009; Lanteri *et al.*, 2008]. Diese Mechanismen sowie die intrazelluläre Akkumulation in den Trypanosomen bis zu Konzentrationen von 1 mM führen letztendlich zur Apoptose des Parasiten [Bray *et al.*, 2003]. Die Tatsache, dass nukleäre DNS vergleichsweise wenige adenin- und thyminreiche Stellen besitzt, erklärt die geringen Konzentrationen an Diamidinen in der Wirtszelle [Bürenheide, 2006].

1.2 Leishmaniose

Leishmaniose ist ebenfalls wie die Afrikanische Schlafkrankheit eine durch parasitische Protozoen hervorgerufene Infektionskrankheit [Schurgit & Moll, 2009]. Sie ist in 88 Ländern der Erde zu finden, von denen 72 als Entwicklungsländer eingestuft sind [Myler & Fasel, 2008]. Die Erreger sind Leishmanien, die zur Familie der Trypanosomatidae in der Ordnung Kinetoplastidae gehören, und werden durch Sandmücken übertragen [Schurgit & Moll,

2009]. Es gibt vier Formen der humanen Leishmaniose, die von verschiedenen Leishmania-Arten in Abhängigkeit von Region und der Immunantwort des Patienten verursacht werden (Tab. 1-2). Insbesondere bei immunsupprimierten Personen (z. B. HIV-Patienten) und Patienten mit fortgeschrittener Leishmaniose kommt es zu schweren Verläufen und bakteriellen Sekundärinfektionen mit Todesfolge. Bei der kutanen Leishmaniose (Synonyme: Orient-, Aleppo-, Nil- oder Bagdadbeule, Chiclero-Ulkus) bilden sich Hautgeschwüre an exponierten Stellen wie Gesicht, Armen und Beinen, die zwar innerhalb von wenigen Monaten abheilen, aber bleibende Narben hinterlassen und den Patienten stigmatisieren [Wagner & Hohmann, 2004]. Die diffuse kutane Leishmaniose ist eine schwerwiegende Form der kutanen Leishmaniose mit verstreuten und chronischen Hautveränderungen, die sehr schwierig chemotherapeutisch zu behandeln ist und nicht selbstständig abheilt [WHO, 2012]. Eine weitaus schwerere Verlaufsform nimmt die in Südamerika auftretende mukokutane Leishmaniose (Synonyme: Uta, Espundia), bei der die Parasiten aus den kutanen Herden in die Schleimhäute im Nasen-Rachen Raum wandern und bei chronischem Verlauf zu dramatischen Entstellungen des Patienten durch Zerstörung von Nase, Ohren, Lippen und Gaumen führen können. Eine medikamentöse Behandlung ist immer erforderlich [Schurgit & Moll, 2009; WHO, 2012]. Die schwerste Form ist die viszerale Leishmaniose (Synonyme: Kala-Azar, Dum-Dum-Fieber, Kalkuttafieber), die sich durch hohes Fieber, erheblichen Gewichtsverlust, Schwellung der Milz und Leber sowie Anämie auszeichnet. Unbehandelt verläuft die Krankheit innerhalb von zwei Jahren zu 100% letal [Schurgit & Moll, 2009; WHO, 2012]. Die Auswahl an Arzneistoffen zur Behandlung der Leishmaniose ist wie bei der Afrikanischen Schlafkrankheit sehr begrenzt. Trotz ihrer hohen Toxizität sind fünfwertige Antimonverbindungen meist Mittel der ersten Wahl [González *et al.*, 2009]. Als Mittel der zweiten Wahl werden vor allem Aminoglykosid-Antibiotika wie Paromomycin oder liposomales Amphotericin B und Pentamidin (**1**) eingesetzt [González *et al.*, 2009]. Miltefosin ist derzeit der einzige oral verfügbare Arzneistoff und eine wirksame Impfprophylaxe ist noch nicht verfügbar [WHO, 2012]. Zusätzlich erschwert eine zunehmende Resistenzentwicklung die Therapie, so dass die Entwicklung neuer Arzneistoffe gegen die Leishmaniose dringend erforderlich ist [Soeiro *et al.*, 2005].

Tabelle 1-2: Übersicht über die wichtigsten Leishmania-Arten, die Verbreitungsgebiete und klinischen Manifestationen [Schurgit & Moll, 2009]

Erreger	Krankheit	Verbreitung
<i>Leishmania donovani</i>	viszerale Leishmaniose	Indien, China, Ostafrika
<i>Leishmania infantum</i>	kutane Leishmaniose mukokutane Leishmaniose viszerale Leishmaniose	Mittelmeerraum, China, Zentralasien
<i>Leishmania tropica</i>	kutane Leishmaniose viszerale Leishmaniose	Naher Osten, Mittelmeerraum, Zentralasien
<i>Leishmania major</i>	kutane Leishmaniose	Naher und Mittlerer Osten, Mittelmeerraum, Subsahara-Raum
<i>Leishmania aethiopica</i>	kutane Leishmaniose diffuse kutane Leishmaniose	Äthiopien, Kenia, Sudan
<i>Leishmania chagasi</i>	viszerale Leishmaniose	Süd- und Mittelamerika
<i>Leishmania peruviana</i>	kutane Leishmaniose	Anden, Peru, Argentinien
<i>Leishmania braziliensis</i>	kutane Leishmaniose mukokutane Leishmaniose	Tropenwälder Süd- und Mittelamerikas
<i>Leishmania panamensis</i>	kutane Leishmaniose mukokutane Leishmaniose	Panama und Nachbarländer
<i>Leishmania guyanensis</i>	kutane Leishmaniose mukokutane Leishmaniose	Guyana, Amazonasgebiet
<i>Leishmania mexicana</i>	kutane Leishmaniose	Mexico, Guatemala, Belize, Texas
<i>Leishmania amazonensis</i>	kutane Leishmaniose	Brasilien

1.3 *Pneumocystis* Pneumonie (PCP)

Die *Pneumocystis* Pneumonie (früher: *Pneumocystis carinii* Pneumonie) ist die häufigste opportunistische Infektion bei immunsupprimierten Personen [Porollo *et al.*, 2012; Schwartländer & Koch, 1989]. Menschen mit normal funktionierendem Immunsystem sind von dieser Erkrankung äußerst selten betroffen, aber insbesondere Menschen mit fortgeschrittener HIV-Infektion sowie unterernährte Kinder und ältere Menschen können an PCP erkranken [Chinnappan & Velan, 2012]. Bei HIV-Patienten mit einer CD4-Zellzahl $< 200/\mu\text{l}$ ist PCP die Haupttodesursache [Chinnappan & Velan, 2012], weshalb diese Patientengruppe bereits prophylaktisch eine Therapie mit Trimethoprim/Sulfamethoxazol oder Pentamidin (**1**) (inhalativ) erhält [Kovacs & Masur, 1992]. Aber auch Patienten, deren Immunsystem aufgrund einer Chemotherapie oder einer Behandlung mit Immunsuppressiva geschwächt ist, sind ernsthaft von einer PCP Infektion bedroht [Coyle *et al.*, 2012]. Der Erreger dieser Infektion ist der Schlauchpilz *Pneumocystis jirovecii* [Stringer *et al.*, 2002, Stringer *et al.*, 2009]. Leider sind die metabolischen Prozesse, die der Pilz nutzt, um zu wachsen und zu überleben, weitestgehend unbekannt [Porollo *et al.*, 2012]. Er breitet sich in fast allen Fällen in der Lunge aus, kann aber auch in anderen Teilen des Körpers wie Lymphknoten, Knochenmark, Milz, Leber und gelegentlich im Auge wachsen [Chinnappan & Velan, 2012]. Die häufigsten klinischen Symptome sind Fieber, trockener Husten, schneller Herzschlag mit Mühe beim Atmen und gelegentlich Schmerzen oder Engegefühl in der Brust [Chinnappan & Velan, 2012]. Da die PCP ohne medikamentöse Behandlung letal verläuft [Haen *et al.*, 1989], ist eine effektive fungizide Therapie bzw. Prophylaxe von großer Bedeutung. Neben verschiedenen Antibiotika wie Trimethoprim und Sulfamethoxazol spielen auch Antiprotozoika wie Atovaquon und Pentamidin (**1**) eine große Rolle [Porollo *et al.*, 2012]. Obwohl der Wirkmechanismus von Pentamidin (**1**) gegen *Pneumocystis jirovecii* nicht vollständig aufgeklärt ist, kann es sowohl inhalativ zur Prophylaxe als auch intravenös zur Therapie eingesetzt werden [O'Doherty *et al.*, 1993; Monk & Benfield, 1990; Hungeling, 2009].

1.4 Arzneistoffprofil des Pentamidins (1)

1.4.1 Wirkung und Nebenwirkungen

Pentamidin (**1**) wird zur Prophylaxe und Therapie der *Pneumocystis* Pneumonie, bei viszeralen und kutanen Leishmaniosen und im Frühstadium der Afrikanischen Schlafkrankheit mit *T. b. gambiense* als Erreger eingesetzt [Fachinformation Pentacarinat®, 2010]. Zur Erklärung der Wirkmechanismen auf pharmakologischer Ebene gegen die verschiedenen Erreger gibt es verschiedene Theorien (s. 1.1.3). Pentamidin (**1**) hat teils schwerwiegende Nebenwirkungen, die auch nach inhalativer Anwendung auftreten können [Fachinformation Pentacarinat®, 2010]. Vor allem nach intravenöser Applikation kann es zu Hyper- und Hypotension, Hyper- und Hypoglykämie, Pankreatitis, Hepatotoxizität, Nephrotoxizität, Arrhythmien, Nekrosen an der Einstichstelle und einem anaphylaktischen Schock kommen [Bürenheide, 2006]. Da Pentamidin (**1**) eine zytotoxische Wirkung auf die β -Zellen des Pankreas entfalten kann, kommt es zunächst durch die Zerstörung der Zellen zu einer vermehrten Insulinfreisetzung mit hypoglykämischen Folgen und durch den anschließenden Insulinmangel zur Hyperglykämie [Sai *et al.*, 1983].

1.4.2 Pharmakokinetik und Metabolismus

Nach intravenöser Infusion von 4 mg Pentamidindiisethionat (**1**) pro kg Körpergewicht über 2 h werden maximale Plasmaspiegel von etwa 0,5 $\mu\text{g/ml}$ erreicht [Fachinformation Pentacarinat®, 2010]. Terlinden und Römer fanden im Plasma einen biphasischen Eliminationsverlauf mit einer schnellen Verteilungsphase ($t_{1/2\alpha} = 6,5$ min) und einer terminalen Eliminationsphase mit $t_{1/2\beta} = 5$ h [Terlinden & Römer, 1990; Schwarz, 1996]. In der Fachinformation wird die Plasmaclearance mit 248 ± 91 l/h, die Eliminationshalbwertszeit mit $6,4 \pm 1,3$ h, das scheinbare Verteilungsvolumen mit 140 ± 93 l, das Verteilungsvolumen im Steady State mit 821 ± 535 l, die renale Elimination der unveränderten Substanz in 24 h mit 2,5% und die renale Clearance mit $6,2 \pm 3,6$ l/h angegeben [Fachinformation Pentacarinat®, 2010]. Das große Verteilungsvolumen lässt auf eine hohe Gewebebindung schließen [Derendorf *et al.*, 2011]. Die Plasmaproteinbindung wird mit ca. 70% angegeben [Rieckert, 1999]. Pentamidin (**1**) verteilt sich größtenteils in der Niere und weniger in der Leber [Berger

et al., 1990a]. In Lunge, Herz, Milz und Gehirn finden sich eher niedrige Konzentrationen [Bronner *et al.*, 1995]. Die Elimination erfolgt überwiegend renal, aber auch biliär sowie über die Speicheldrüsen [Wingen, 1990; Lidman *et al.*, 1994].

Der Metabolismus von Pentamidin (**1**) ist speziesabhängig und in Mensch und Ratte unterschiedlich [Rieckert, 1999]. Berger *et al.* konnten eine C- und N-Hydroxylierung durch Rattenlebermikrosomen im Rahmen einer Phase I-Reaktion aufzeigen [Berger *et al.*, 1990b, Berger *et al.*, 1991]. In einer weiteren Studie mit [¹⁴C]-markiertem Pentamidin (**1**) konnten die gefundenen Ergebnisse bestätigt und u. a. um die Erkenntnis erweitert werden, dass die Phase I-Metabolite 4-Hydroxybenzamidin und 5-(4'-Amidinophenoxy)pentansäure anschließend in einer Phase II-Reaktion sulfatiert bzw. glucuronidiert werden [Berger *et al.*, 1992]. Ferner konnten Clement und Jung sowohl die N-Hydroxylierung von Pentamidin (**1**) als auch eine anschließende N-Reduktion *in vitro* durch Kaninchenlebermikrosomen und *in vivo* in Ratten nachweisen [Clement *et al.*, 1992b; Clement & Jung, 1994]. Die Reduktion ist dabei die absolut dominierende Reaktion. Mittlerweile konnte bewiesen werden, dass die *in vivo* N-Reduktion weitestgehend CYP450 unabhängig durch das molybdänhaltige mARC-Enzymsystem (*mitochondrial amidoxime-reducing component*) erfolgt (s. Kapitel 1.6) [Havemeyer *et al.*, 2011]. Die Biotransformation von Pentamidin (**1**) in der Ratte ist in den Abbildungen 1-4 und 1-5 dargestellt. Entsprechende Metabolite konnten im Menschen nicht nachgewiesen werden.

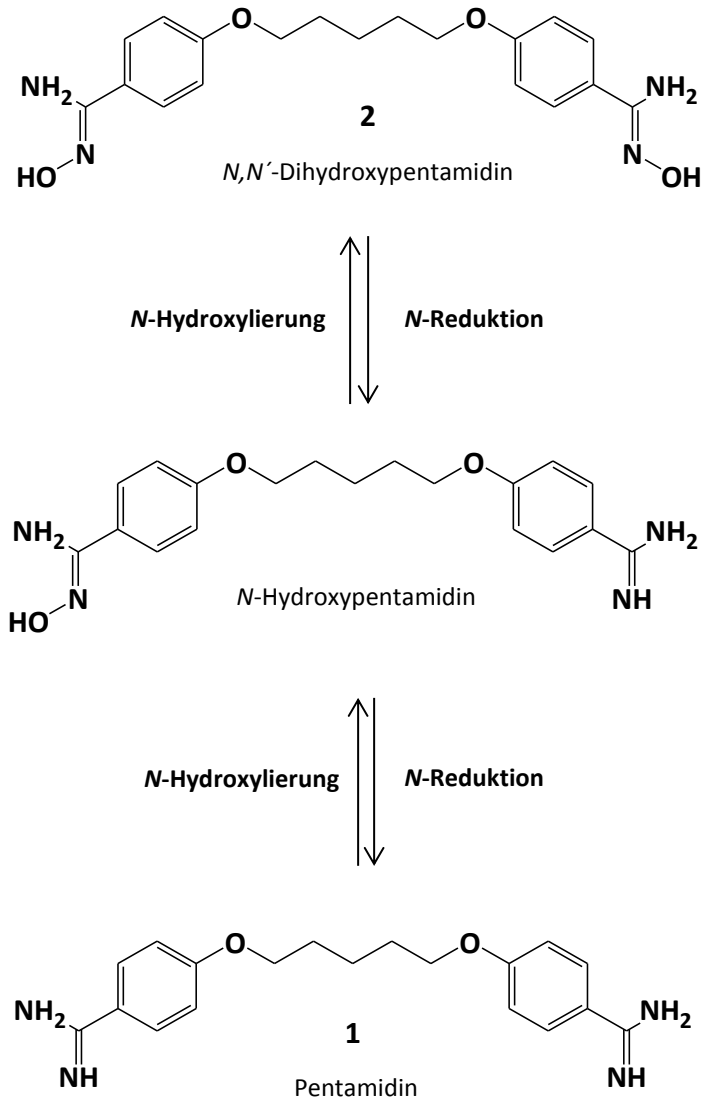


Abbildung 1-4: Phase I-Biotransformation mit *N*-Hydroxylierung und *N*-Reduktion von Pentamidin (**1**) nach Clement *et al.* [1992b]; die *N*-Reduktion ist die dominierende Reaktion

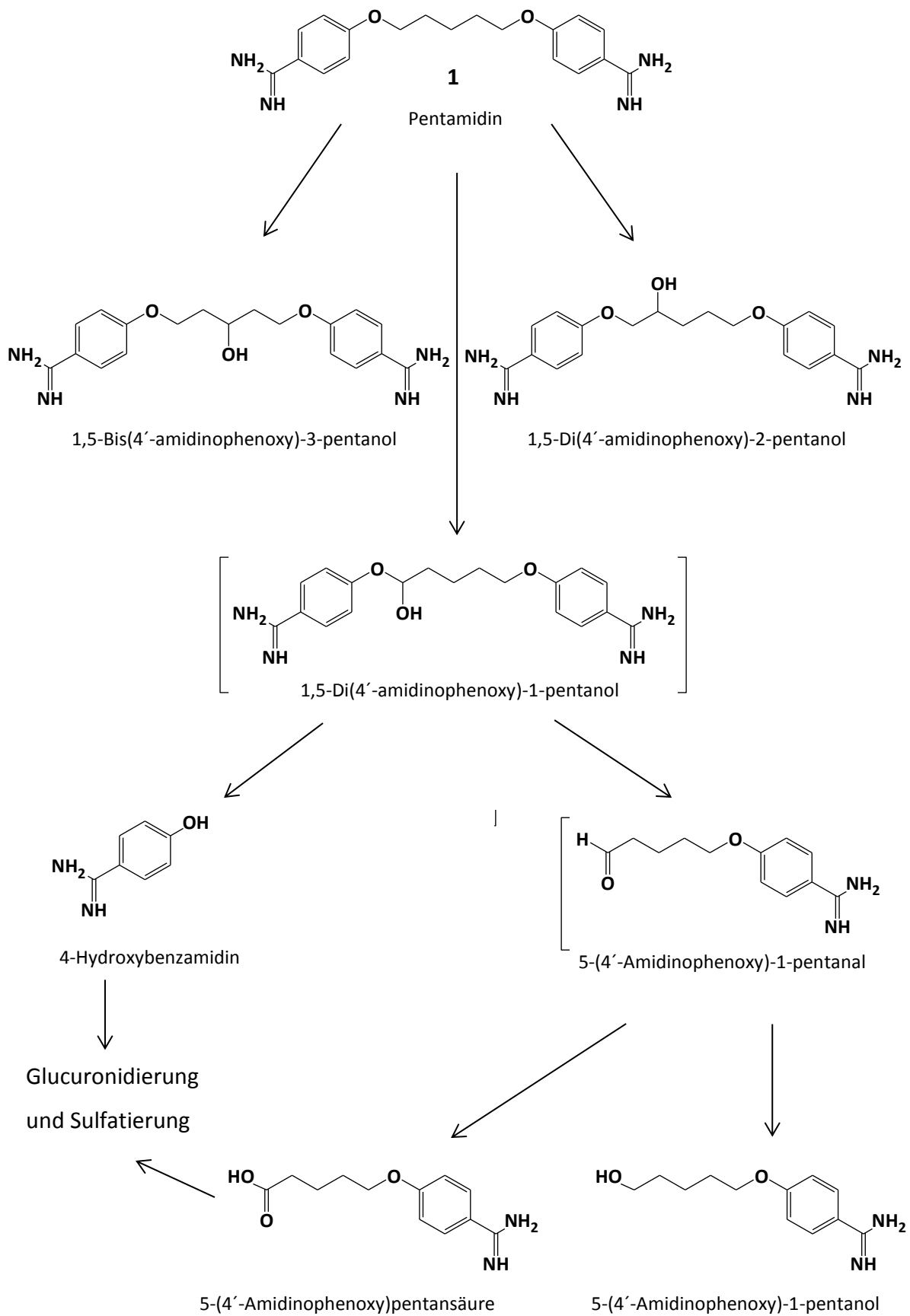


Abbildung 1-5: Phase I und Phase II-Biotransformation in der Ratte mit C-Hydroxylierung von Pentamidin (**1**) nach Berger *et al.* [1992]; in Klammern abgebildete Metabolite konnten nicht isoliert werden

1.5 Orale Bioverfügbarkeit und ZNS-Gängigkeit

1.5.1 Orale Bioverfügbarkeit

Ob ein Arzneistoff aus dem Gastrointestinaltrakt in ausreichendem Maße absorbiert wird und damit bioverfügbar ist, hängt von mehreren Faktoren ab. Physikochemische Parameter wie Lipophilie, Wasserlöslichkeit, Molekülgröße, Ionisationsgrad von Substanzen und die Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden zu können, beeinflussen die pharmakokinetischen Eigenschaften des Arzneistoffs in hohem Maße. Lipinski entwickelte deshalb die sogenannte *rule of five*, die eine Regel für die diffusionsvermittelte Absorption von Arzneistoffen darstellt und in der Arzneistoffentwicklung eine wichtige Rolle spielt. Wenn zwei oder mehr dieser Regeln gebrochen werden, kommt es in über 90 % der Fälle zu ungenügender Absorption bzw. Permeation [Lipinski *et al.*, 2001].

Rule of five:

- nicht mehr als 5 Wasserstoff-Brücken Donatoren (z. B. OH- und NH-Gruppen)
- nicht mehr als 10 Wasserstoff-Brücken Akzeptoren (z. B. O- und N-Atome)
- Molekulargewicht ≤ 500 g/mol
- clog P Wert ≤ 5 oder Mlog P Wert $\leq 4,15$

Die Einordnung von Arzneistoffen hinsichtlich der für das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Arzneistoffresorption relevanten Kriterien der Löslichkeit und Permeabilität erfolgt mithilfe des Biopharmazeutischen Klassifizierungssystems (BCS) [Derendorf *et al.*, 2011]. Im BCS werden die Arzneistoffe in vier Klassen eingeordnet:

Klasse 1: hohe Löslichkeit – hohe Permeabilität

Klasse 2: niedrige Löslichkeit – hohe Permeabilität

Klasse 3: hohe Löslichkeit – niedrige Permeabilität

Klasse 4: niedrige Löslichkeit – niedrige Permeabilität

Bei der Entwicklung oral verfügbarer Arzneistoffe wird möglichst eine Einordnung in Klasse 1 angestrebt, da hier die pharmakokinetischen Eigenschaften am besten kontrollierbar sind.

1.5.2 Die Blut-Hirn Schranke

1.5.2.1 Anatomie und Physiologie der Blut-Hirn Schranke

Während in den meisten Organen ein intensiver Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe stattfindet, ist dies im Gehirn nur beschränkt möglich, weil das Kapillarblut vom Hirngewebe durch die Blut-Hirn Schranke (BHS) getrennt ist. Die BHS ist kein starres Gebilde sondern eine dynamische Barriere, die trotzdem eine Versorgung des Gehirns mit notwendigen Nährstoffen ermöglicht [Colin-Barenque *et al.*, 2012]. Auf diese Weise kann im Hirngewebe ein spezielles, für die Neuronen und Gliazellen adäquates Milieu aufrechterhalten werden [Thews *et al.*, 1999]. Die Barrierefunktion beruht sowohl auf physikalischen (*tight junctions*) als auch auf metabolischen (Enzyme) Eigenschaften.

Die morphologische Basis der BHS stellt das Kapillarendothel dar, das sich im Gehirn durch besonders dichte *tight junctions* auszeichnet, so dass hydrophile, polare Stoffe nicht zwischen den Zellen (= parazellulär) hindurch in das ZNS eindringen können. Das Endothel der KapillargefäÙe wird abluminal von einer Basalmembran umgeben, die fast vollständig von astrozytischen Fußfortsätzen bedeckt wird [Thews *et al.*, 1999]. Astrozyten sind Gliazellen, die selbst keine Barrierefunktion ausüben, aber durch Produktion löslicher Faktoren an der Ausbildung typischer BHS Eigenschaften wie *tight junctions* und Expression von Enzymen beteiligt sind [Colin-Barenque *et al.*, 2012]. Eine weitere Stützfunktion der Kapillaren bildet die ca. 20 nm dünne Basalmembran, welche hauptsächlich aus Proteoglykanen sowie aus Laminin, Fibronectin, Tenascin und Kollagen besteht. An diese Matrixproteine binden die Endothelzellen über Rezeptoren aus der Integrin-Familie und bilden so einen dichten Zellmonolayer, der für die Barrierefunktion der BHS notwendig ist [Dermietzel & Krause, 1991]. Ebenfalls auf der Basalmembran bzw. zwischen Basalmembran und Fußfortsatz befinden sich die Perizyten. Ihre Aufgaben sind die Regulation von Apoptose, Proliferation, Migration und Differenzierung der Endothelzellen sowie die weitere Vaskularisierung des Gehirns [Hellström *et al.*, 2001; Frey *et al.*, 1991]. Ein charakteristisches Merkmal der BHS ist ein Netzwerk von dichten *tight junctions*. Durch bestimmte *tight junction* Proteine wie Occludin und Claudin werden die Endothelzellen dicht zusammengeschlossen, was dem zerebralen BlutgefäÙsystem einen hohen transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) verleiht [Colin-Barenque *et al.*, 2012; Rubin, 1992]. Widerstandsmessungen an mikrovaskulären BlutgefäÙen der Pia Mater

ergaben TEER Werte von ca. $2000 \Omega \times \text{cm}^2$, wogegen der elektrische Widerstand an der Mesenterialarterie nur bei ca. $1-3 \Omega \times \text{cm}^2$ liegt [Fletcher & Callanan, 2012; Butt *et al.*, 1990; Crone & Olesen, 1982].

Um das Gehirn trotz dieser starken Barriere ausreichend mit Nährstoffen versorgen zu können, besitzen die Endothelzellen mehrere Transporter wie z. B. Aminosäuretransporter, Nukleosidtransporter und Glucosetransporter [Colin-Barenque *et al.*, 2012]. Sie können sowohl apikal als auch basolateral exprimiert werden. Diese Transporter bewirken einen transendothelialen Transport von essentiellen Nährstoffen, wie Glucose, Aminosäuren, Purinbasen, Fettsäuren, Cholin, Laktat und einigen wasserlöslichen Vitaminen in das Gehirn [Drewes, 1999]. Zusätzlich gibt es noch Transportsysteme für makromolekulare Substanzen und Peptide wie Insulin und Transferrin. Diese werden durch Rezeptor vermittelte Endozytose ins Gehirn aufgenommen [Pardridge, 1999].

Außerdem existieren auch so genannte Effluxpumpen, die Xenobiotika und neurotoxische Substanzen am Eindringen ins ZNS hindern sollen. Zu diesen zählen u. a. das P-Glykoprotein und organische Anionentransporter (OATs). Für einige der OATs, z. B. OAT2, wird jedoch ein bidirektionaler Transport angenommen [Tsuji & Tamai, 1999].

1.5.2.2 Stofftransport durch die Blut-Hirn Schranke

Die Fähigkeit eines Moleküls, die Blut-Hirn Schranke zu überwinden und ins ZNS einzudringen, hängt ebenfalls von vielen verschiedenen Einflussgrößen ab: Molekulargewicht, Konzentrationsunterschiede, Molekülgröße, sterische Beschaffenheit, Wasserstoff-Brücken Affinität, log P Wert, enzymatische Stabilität, Affinität zu Effluxpumpen, Ladung, Affinität zu Transportern, Plasmaproteinbindung, zerebraler Blutfluss, Verteilung im Gewebe und Clearance [Pardridge, 1998; Abbott *et al.*, 1999]. Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, wie gelöste Stoffe die Blut-Hirn Schranke überwinden können [Fletcher & Callanan, 2012; Thöle, 2000]:

- passive Diffusion, die einem Konzentrationsgradienten folgt (parazellulär oder transzellulär)
- Carrier-vermittelter Transport, der eine selektive Aufnahme aus dem Blut ermöglicht (z. B. Glucose, L-Dopa)
- aktiver ATP-abhängiger Transport

Für eine passive Diffusion durch die BHS müssen die Substanzen entweder eine ausreichend hohe Lipophilie besitzen, damit sie transzellulär das ZNS erreichen können (z. B. Ethanol, Diazepam) oder sehr klein sein, sodass sie über die *tight junctions* parazellulär ins Gehirn gelangen können. Viele niedermolekulare Stoffe, die potentiell die BHS überwinden könnten (z.B. Pharmaka und Hormone), sind jedoch an Plasmaproteine gebunden, die an der Endothelbarriere zurückgehalten werden (z. B. Bilirubin), so dass kaum parazelluläre Diffusion stattfindet [Thews *et al.*, 1999]. Für die transzelluläre Diffusion gilt prinzipiell, dass eine höhere Lipophilie eine schnellere Diffusion ins ZNS bedingt. Es gibt allerdings Ausnahmen, wenn die Substanzen in der Zellmembran akkumulieren oder Substrate von Effluxpumpen sind, wie man beispielsweise für die Zytostatika Doxorubicin und Vincristin nachweisen konnte [Suzuyama *et al.*, 2007].

Zusätzlich zu diesen auf das Molekül bezogenen Faktoren können viele Substanzen und auch Krankheitserreger durch pathologisch bedingte Veränderungen der Blut-Hirn Schranke ungehindert ins ZNS gelangen. Dies ist bei bestimmten entzündlichen Prozessen der Fall, wenn u. a. durch freie Radikalbildung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren insbesondere *tight junction* Proteine angegriffen und zerstört werden [Neuhaus *et al.*, 2012]. Der daraus resultierende Zusammenbruch der BHS wird als eine maßgebliche Ursache für viele Erkrankungen des ZNS angesehen, wie z. B. das zweite Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit [Enanga *et al.*, 2002].

1.6 Entwicklung von Pentamidin-Produgs

Pentamidin (**1**) enthält in seiner Struktur zwei basische Amidinfunktionen, die aufgrund ihres pK_a -Wertes von 11,6 bei physiologischem pH-Wert protoniert werden und somit als mesomeriestabilisierte Kationen vorliegen [Clement, 2002; Hungeling, 2009]. Dies bedingt die mangelnde orale Bioverfügbarkeit des Pentamidins (**1**), da im Prinzip keine diffusionsbedingte Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt erfolgen kann [Hall *et al.*, 1998; Clement *et al.*, 2006]. Für eine effektive Therapie der Leishmaniose, der schweren PCP und der Afrikanischen Schlafkrankheit muss Pentamidin (**1**) daher intravenös oder intramuskulär appliziert werden. Gleiches gilt für die ZNS-Gängigkeit von Pentamidin (**1**), da für die Therapie des Spätstadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit keine ausreichenden Konzentrationen im ZNS erreicht werden [Barrett *et al.*, 2011]. Aktuelle Studien belegen

jedoch eine BHS-Gängigkeit von Pentamidin (**1**) sowie dessen Affinität zu P-Glykoprotein und weiteren *Multidrug Resistance* Proteinen, die Pentamidin (**1**) schnell wieder aus dem ZNS entfernen [Sanderson *et al.*, 2009; Baker *et al.*, 2013; Bray *et al.*, 2003]. Trotz dieser Umstände trat in mehreren Humanstudien eine Heilung der Patienten in der Frühphase des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit mit *T. b. gambiense* Infektion nach Injektion von Pentamidin (**1**) und anderen Diamidinen ein [Doua *et al.*, 1996; Bray *et al.*, 2003; Duggan & Hutchinson, 1951]. Dies unterstreicht die Wichtigkeit und das Potential der Entwicklung neuer ZNS-gängiger und oral verfügbarer Diamidinderivate auf diesem Gebiet. Deshalb sind in den letzten Jahren eine Reihe verschiedener Pentamidin-Prodrugs entwickelt worden, die selbst nur geringe trypanozide Aktivität besitzen [Clement & Raether, 1985]. Durch *N*-Hydroxylierung der Amidinfunktionen konnte die Lipophilie erhöht und die Basizität stark herabgesetzt werden ($pK_a = 5$), so dass eine Protonierung des Moleküls verhindert wird [Clement, 2002]. Eine Aktivierung des Prodrugs zur Wirkform Pentamidin (**1**) konnte bewiesen werden [Clement *et al.*, 1992b; Clement *et al.*, 1988]. Für die *N*-Reduktion der Amidinfunktion ist das CYP450 unabhängige mARC-haltige Enzymsystem verantwortlich, welches aus den drei Komponenten mARC, Cytochrom b_5 (Cyt b_5) und Cytochrom b_5 Reduktase (Cyt b_5 R) besteht [Gruenewald *et al.*, 2008; Havemeyer *et al.*, 2010]. Dieses Enzymsystem spielt generell eine wichtige Rolle bei der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen und damit bei der Aktivierung der sogenannten Amidoxim-Prodrugs sowie bei der Detoxifizierung von mutagenen DNS-Basen Analoga [Havemeyer *et al.*, 2011]. Zur weiteren Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit und ZNS-Gängigkeit wurde eine Erhöhung der Lipophilie durch *O*-Acetylierung der *N*-hydroxylierten Amidinfunktionen durchgeführt [Schwarz, 1996]. Die Wirksamkeit einer oralen Applikation des so geschaffenen doppelten Prodrugs im ersten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden [Clement *et al.*, 2006; Rieckert, 1999; Bürenheide, 2006]. Um die physikochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften zu optimieren, wurden zahlreiche weitere Pentamidin-Prodrugs, die auf verschiedenen Prodrug-Prinzipien basieren, synthetisiert und *in vitro* und *in vivo* hinsichtlich Löslichkeit, Stabilität, enzymatischer Aktivierung, Distribution, ZNS-Gängigkeit und oraler Bioverfügbarkeit untersucht [Hungeling, 2009; Kotthaus *et al.*, 2011]. Aus der Vielzahl der entwickelten Prodrugs kristallisierte sich das an beiden Amidinfunktionen *N*-hydroxylierte und mit Bernsteinsäure veresterte Pentamidin (**1**) (*N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (**3**)) als am besten geeignetes Prodrug

hinsichtlich Löslichkeit, Aktivierung und oraler Bioverfügbarkeit heraus [Kotthaus *et al.*, 2011; Schwering, 2010]. In Abbildung 1-6 ist die metabolische Aktivierung des Doppelprodrugs *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (**3**) zur Wirkform Pentamidin (**1**) dargestellt. Die Spaltung des Esters erfolgt hydrolytisch und enzymatisch durch unspezifische Esterasen [Kotthaus *et al.*, 2011].

1.7 Thema und Zielsetzung

Zur Verbesserung der Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit, aber auch der Leishmaniose und der PCP, wurden zahlreiche Pentamidin-Prodrugs mit dem Ziel entwickelt, einen oral verfügbaren und idealerweise ZNS-gängigen Arzneistoff zur Verfügung zu stellen. Nachdem die Biotransformation und die metabolische Aktivierung der Prodrugs *in vitro* und *in vivo* aufgeklärt werden konnte, wurden erste *in vivo* Untersuchungen in Ratten durchgeführt [Clement *et al.*, 2006; Kotthaus *et al.*, 2011]. In der vorliegenden Arbeit sollten die Prodrugs *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**) und *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (**3**) im Vergleich zu Pentamidin (**1**) mithilfe des bildgebenden Verfahrens Einzelphotonen Emissions Computertomographie (SPECT) näher *in vivo* untersucht werden. Hierfür mussten zunächst radioaktive Synthesen zur Markierung der Verbindungen mit einem γ -Strahler sowie Synthesen der nicht radioaktiven Standardsubstanzen entwickelt werden. In den anschließenden SPECT-Imaging Studien an Ratten sollten die radioaktiv markierten Verbindungen jeweils intravenös und oral appliziert werden und hinsichtlich ihrer Distribution, oralen Bioverfügbarkeit und Blut-Hirn Schranken-Gängigkeit quantitativ untersucht werden.

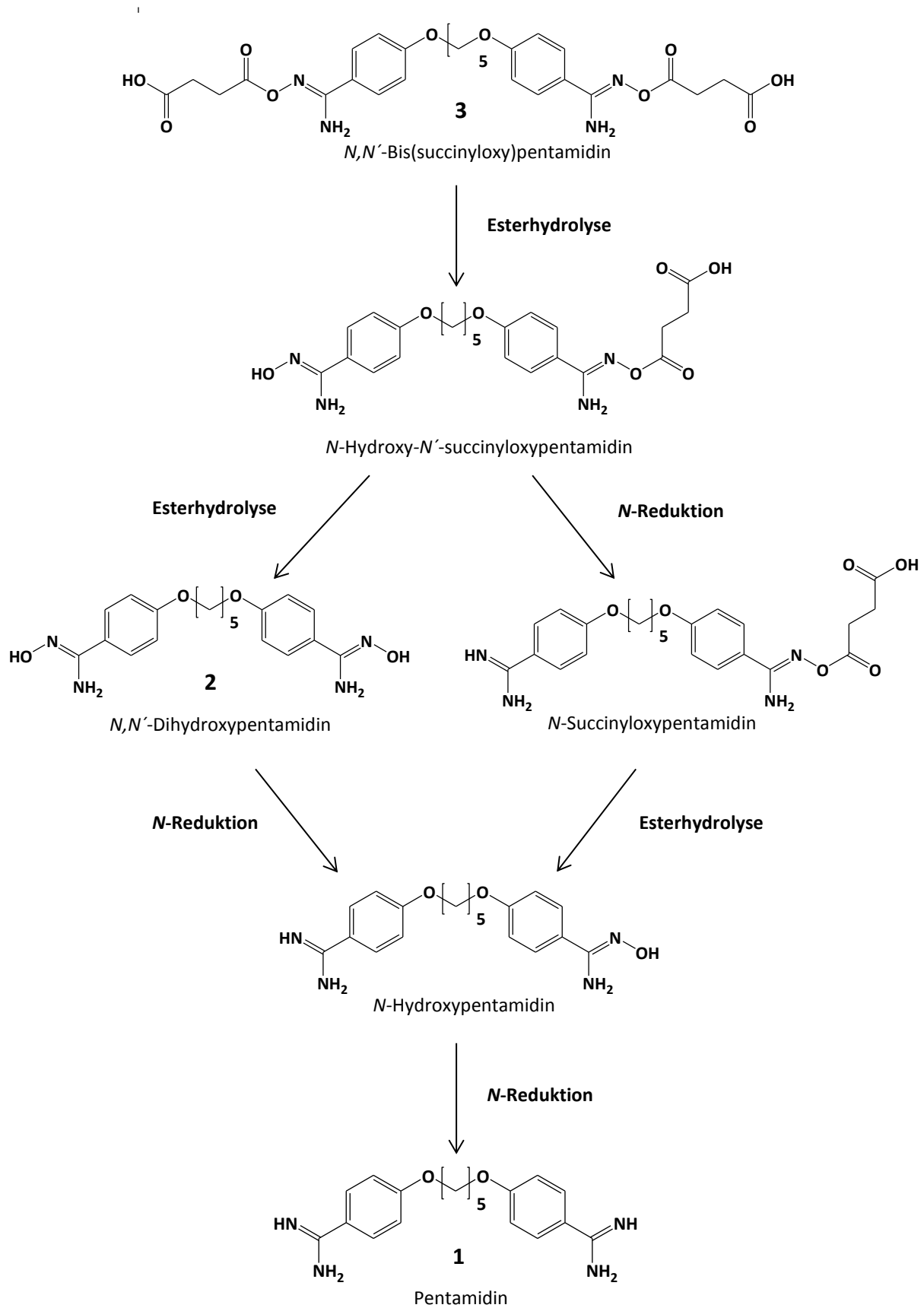


Abbildung 1-6: Metabolische Aktivierung des Doppelprodukts **3** zur Wirkform Pentamidin (**1**) [Kotthaus *et al.*, 2011; Hungeling, 2009]

2 Synthesen der nicht radioaktiven Verbindungen

2.1 Einleitung und Zielsetzung

Für die eindeutige Identifizierung von radioaktiv markierten Verbindungen ist die Synthese nicht radioaktiver Standardsubstanzen unerlässlich. Da die Markierung der Pentamidine mit einem Iod Isotop erfolgen sollte (s. Kapitel 3), mussten zunächst iodierte Pentamidinverbindungen synthetisiert werden. Diese Verbindungen dienten nach vollständiger Charakterisierung als Referenzsubstanzen zur Identifizierung der radioaktiv markierten Verbindungen über die Retentionszeit bei der Radio-HPLC, da eine direkte Charakterisierung der radioaktiven Verbindungen über LC/MS aufgrund der unterhalb der Nachweisgrenze liegenden Konzentrationen nicht möglich ist. Weiterhin wurden die nicht radioaktiven Verbindungen nicht nur als Standards, sondern auch als Precursor für die radioaktiven Markierungen genutzt (s. Kapitel 3.2). Außerdem wurden in zwei Tierstudien größere Mengen der nicht markierten Verbindungen von Iodpentamidin (**1a**) und *N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3a**) zusätzlich zu den entsprechenden markierten Verbindungen appliziert (s. Kapitel 4).

Bei der Betrachtung der zu markierenden Verbindungen fallen mehrere Stellen auf, an denen eine Iodierung möglich sein könnte. Um die Substanzen chemisch so wenig wie möglich zu verändern, wurde eine Monoiodierung bevorzugt, die am einfachsten an einem der beiden Aromaten durchführbar war [Blower *et al.*, 1992].

Es gab zwei gedankliche Ansätze, um die gewünschten monoiodierten Produkte zu erhalten. Entweder führt man eine Iodierung der Verbindungen im letzten Syntheseschritt durch, oder man baut einen bereits iodierten Aromaten zu Beginn der Synthese ein.

Da die uniodierten Verbindungen bereits in vorangegangenen Arbeiten im Arbeitskreis synthetisiert worden waren [Schwarz, 1996; Hungeling, 2009] bzw. im Falle des Pentamidins (**1**) kommerziell erhältlich waren und somit zur Verfügung standen, wurde zunächst der Ansatz der direkten Ringiodierung bei Pentamidin (**1**) und *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**) verfolgt.

2.2 Synthesen

2.2.1 Direkte Iodierungen von Pentamidin (1) und *N,N'*-Dihydroxypentamidin (2) (Methode A)

In Anlehnung an eine allgemeine Vorschrift zur Kerniodierung mit elementarem Iod [Houben & Weyl, 1960] wurde eine Synthese zur Gewinnung von Iodpentamidin (**1a**) und *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) entwickelt. Als Ausgangsverbindungen dienten Pentamidindiisethionat (**1**) (Pentacarinat® 300mg, Sanofi Deutschland GmbH) und *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**), welches nach literaturbekannter Synthese bereits im Arbeitskreis synthetisiert worden war [Ashley *et al.*, 1942; Clement *et al.*, 1985].

Bei 80 °C wurden die Edukte zusammen mit Silbersulfat in einer Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure und Eisessig gelöst und elementares Iod (I₂) über zwei Stunden portionsweise dazugegeben. Unter diesen Reaktionsbedingungen kommt es zu einer Disproportionierung von I₂, wobei die entstehenden Iodidionen dem Gleichgewicht durch Ausfällung mit den in Lösung befindlichen Silberionen entzogen werden (Abb. 2-1). Dies führt zu einer verstärkten Bildung von positiv geladenen Iodoniumionen, die am Aromaten eine elektrophile Substitution bewirken [Houben & Weyl, 1960]. In welcher Form das elektrophile Agens tatsächlich vorliegt, kann an dieser Stelle nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Es ist bekannt, dass in Abhängigkeit von der Schwefelsäurekonzentration und weiterer in Lösung befindlicher Anionen vor allem Diiod- (I₂⁺) und Triiod-Kationen (I₃⁺) gebildet werden, welche ihrerseits noch I₂ unter Bildung des Pentaoid- (I₅⁺), des Pentadecaiod- (I₁₅⁺) und möglicherweise des Heptaoid-Kations (I₇⁺) aufnehmen [Holleman & Wiberg, 1995; Shriver *et al.*, 1997]. Im Folgenden werden zur Vereinfachung nur Iodoniumionen (I⁺) genannt, wohlwissend, dass es sich hierbei aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um freie I⁺-Ionen handelt!

Da die zu iodierenden Edukte zwei identische aromatische Systeme aufweisen, war es bei dieser Reaktion leider unvermeidlich, dass sowohl mono- als auch diiodierte Produkte entstanden, wobei jeder der beiden Aromaten einfach iodiert wurde. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der entstandenen Produkte musste die Aufreinigung mittels HPLC erfolgen (s. Kapitel 2.3), was sowohl einen hohen Zeitaufwand als auch einen hohen Lösungsmiteileinsatz erforderte. Somit war diese Methode zur Gewinnung geringer

Produktmengen, wie sie für die radioaktive Markierung benötigt wurden, zwar gut geeignet, aber zur Produktion größerer Mengen wurde auf die in Kapitel 2.2.2 und 2.2.3 beschriebenen Verfahren umgestellt. Der große Vorteil dieser Methode gegenüber den anderen Verfahren besteht jedoch in der Einfachheit und Kürze der Reaktion, da die gesamte Precursorsynthese als Eintopfreaktion in einem Schritt durchgeführt werden konnte.

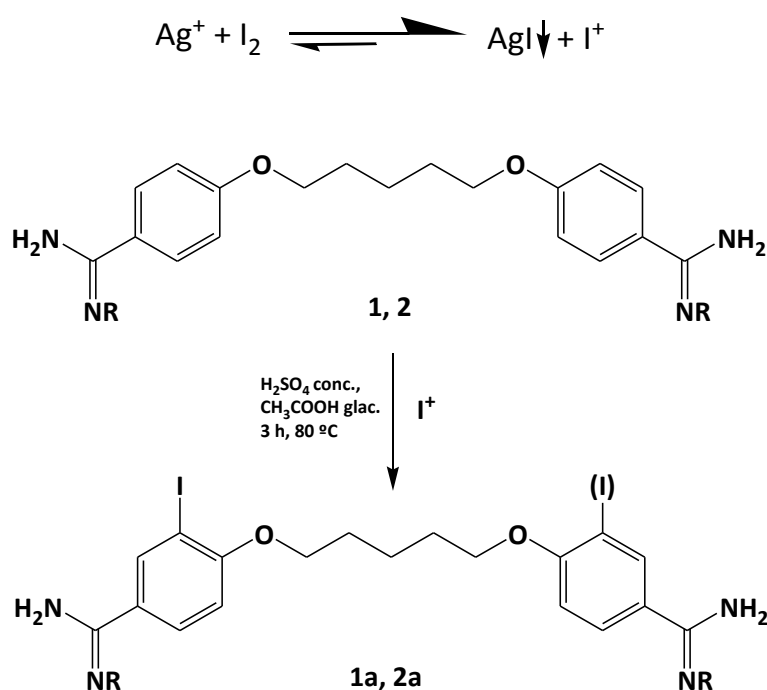
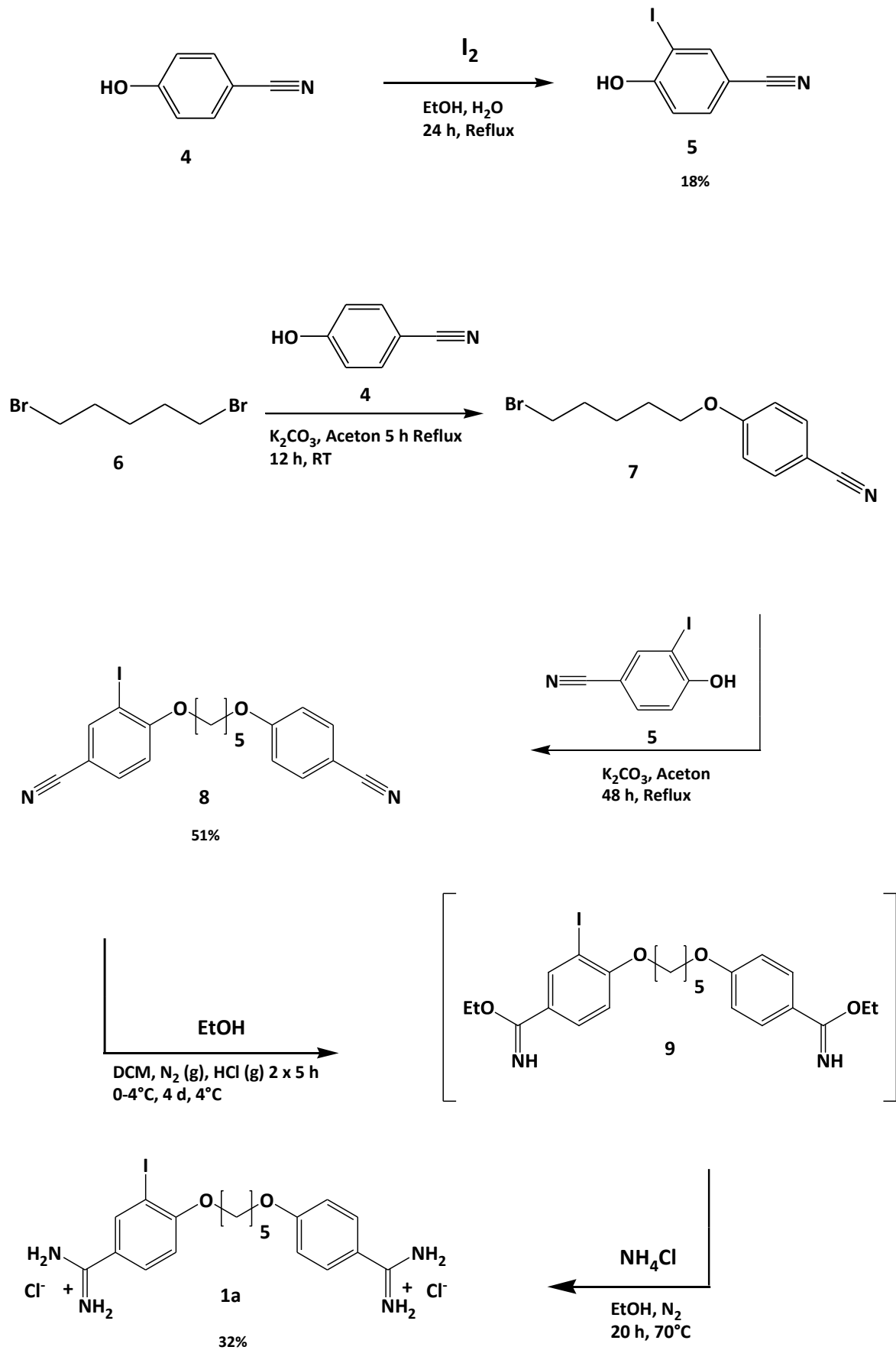


Abbildung 2-1: Darstellung von Iodpentamidin (R = H) (**1a**) und *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (R = OH) (**2a**) (A)

2.2.2 Synthese von Iodpentamidin (**1a**) (Methode B)

Eine andere Möglichkeit zur Synthese von Iodpentamidin (**1**) wurde 1992 von Blower *et al.* entwickelt. Es handelte sich hierbei um eine Abwandlung einer 1949 von Berg und Newbery entwickelten Methode, bei der im ersten Schritt eine Iodierung von 4-Hydroxybenzonnitril (**4**) erfolgte [Berg *et al.*, 1949]. Auch hierbei entstanden mono- und diiodierte Produkte, wobei ersteres durch mehrmalige Umkristallisation aus Wasser rein gewonnen werden konnte. Die Kopplung von 4-Hydroxybenzonnitril (**4**) an 1,5-Dibrompentan (**6**) erfolgte in äquimolaren Mengen, sodass eine einseitige Umsetzung zum 1-Brom-5-(4-cyan)phenoxy-pentan (**7**) bevorzugt eintrat. Nach Kopplung von **5** an **7** in äquimolarer Menge wurde **8** erhalten, welches mittels Pinner-Reaktion über die nicht isolierte Zwischenstufe **9** zum Iodpentamidindihydrochlorid (**1a**) umgesetzt wurde (Abb. 2-2) [Pinner, 1883].


 Abbildung 2-2: Darstellung von Iodpentamidin (**1a**) (B) nach Blower *et al.* [1992]

2.2.3 Synthese von *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) (Methode B)

Die Synthese von *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) verlief bis zur Stufe von **8** analog der Synthese von Iodpentamidin (**1a**). Um **2a** zu erhalten, wurde **8** über 24 Stunden unter Argonatmosphäre mit einem Überschuss an Hydroxylamin umgesetzt (Abb. 2-3). Das Prinzip dieser Reaktion wurde bereits 1985 von Clement mit uniodierten Verbindungen beschrieben [Clement *et al.*, 1985].

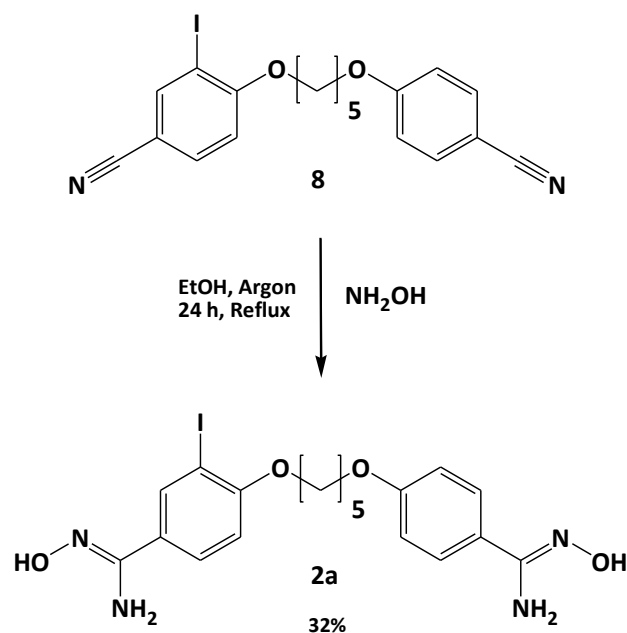


Abbildung 2-3: Darstellung von *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) (B)

2.2.4 Synthese von *N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3a**)

Um *N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3a**) zu erhalten, wurden die Hydroxylgruppen von *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) mit dem Anhydrid der Bernsteinsäure verestert (Abb. 2-4). Die Veresterung verlief unter den gewählten Bedingungen fast quantitativ und basiert auf der 2009 von Hungeling entwickelten Methode [Hungeling, 2009].

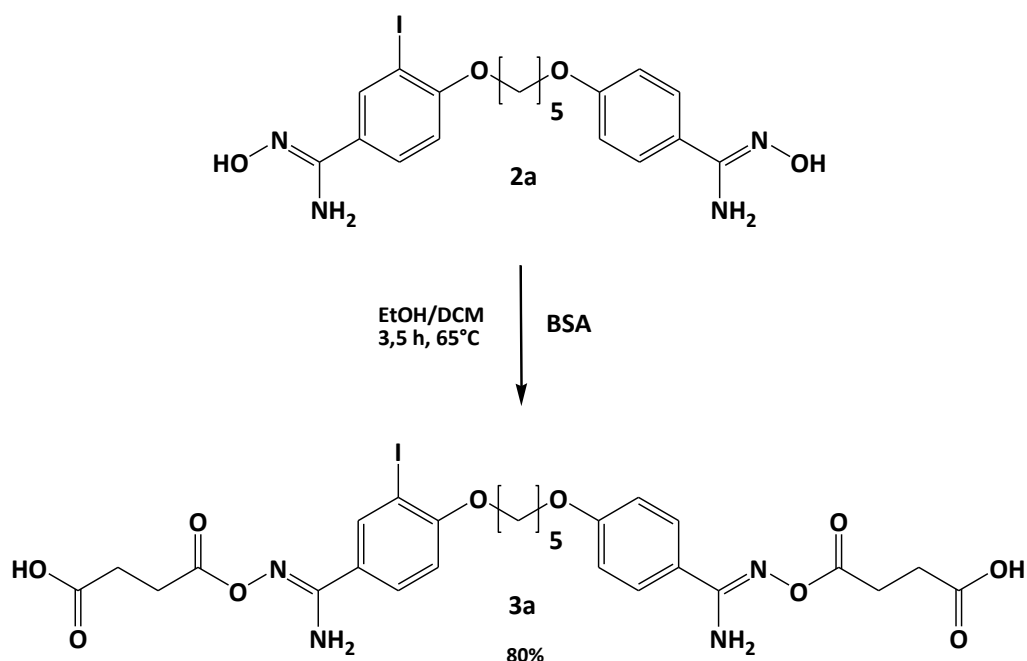
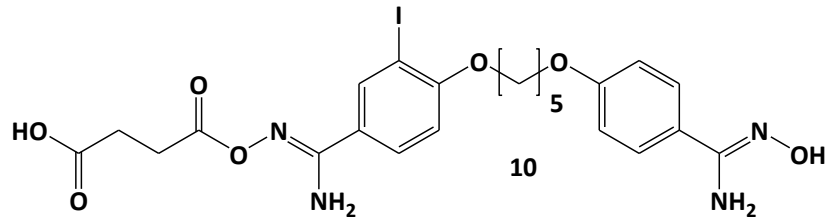


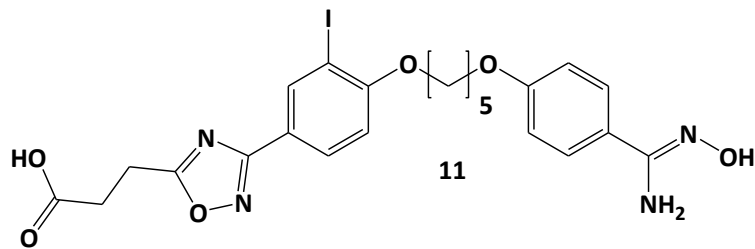
Abbildung 2-4: Darstellung von *N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3a**) (BSA = Bernsteinsäureanhydrid)

Zu lange Reaktionsdauer bzw. zu hohe Temperaturen führten zu Zersetzungen sowie Zyklisierungen zu den jeweiligen Oxadiazol Derivaten [Clement *et al.*, 2006]. In Abbildung 2-5 sind mögliche Nebenprodukte abgebildet, die alle per LC/MS im Anionenmodus nachgewiesen werden konnten (HPLC-Methode: s. 3.3.1.5).



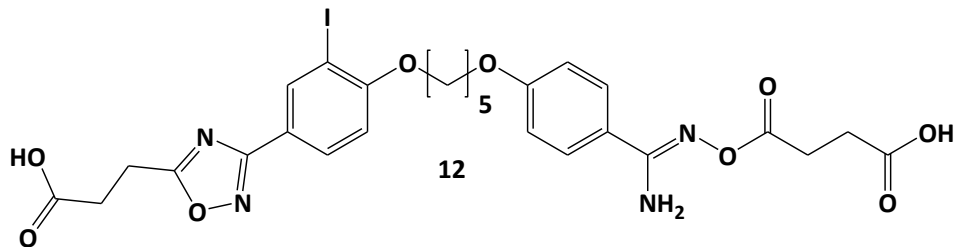
m/z: 597 [M – H]⁻

1-[2-Iod-4-(*N'*-succinyloxyamidino)]phenoxy-
5-[4-(*N*-hydroxyamidino)]phenoxy-pentan



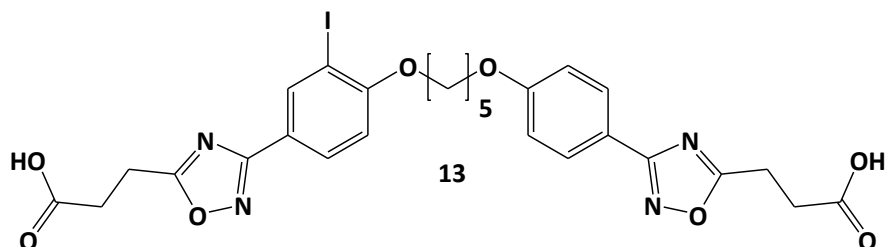
m/z: 579 [M – H]⁻

1-[4-((5-(2-carboxyethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl))-2-iod]phenoxy-
5-[4-(*N*-hydroxyamidino)]phenoxy-pentan



m/z: 679 [M – H]⁻

1-[4-((5-(2-carboxyethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl))-2-iod]phenoxy-
5-[4-(*N*-succinyloxyamidino)]phenoxy-pentan



m/z: 661 [M – H]⁻

1-[4-((5-(2-carboxyethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl))-2-iod]phenoxy-
5-[4-((5-(2-carboxyethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl))]phenoxy-pentan

Abbildung 2-5: Nachgewiesene Nebenprodukte bei der Synthese von *N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3a**)

2.3 Experimenteller Teil der nicht radioaktiven Synthesen

2.3.1 Geräte und Materialien

Elementaranalysen

CHNS Analysator, HEKAtech GmbH

Die Elementaranalysen wurden vom Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektrometer Bruker ARX 300, Bruker Topspin 2.1 Software

^1H -NMR: Messfrequenz = 300.13 MHz

^{13}C -NMR: Messfrequenz = 75.47 MHz

Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS). Ist kein interner Standard angegeben, wurden die Verschiebungen auf die Restlösungsmittelsignale bezogen.

Zur Charakterisierung der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett eines Dubletts, t = Triplett, m = Multiplett, bs = verbreitertes Singulett, J = Kopplungskonstante in Hz, AA',XX' = para-disubstituierter Aromat, AMX = dreifach substituierter Aromat

Die Auswertung erfolgt nach den Regeln für Spektren 1. Ordnung.

LC-MS

Bruker Esquire-LC, Elektrosprayionisierung (ESI) im Kationen- und Anionenmodus, Direkteinlass als Methanol-Wasser-Lösung

Schmelzpunkte

Schmelzpunktapparatur Stuart Scientific SMP3, die Angabe der Schmelzpunkte erfolgt unkorrigiert.

Präparative Chromatographie

Die Aufreinigung von *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) nach 2.3.2.5 (B) wurde mittels Flashchromatographie über eine RP₁₈-Säule (RediSep®) mit der CombiFlash® RETRIEVE durchgeführt.

Präparative HPLC

Die Aufreinigung von Iodpentamidin (**1a**) und *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) nach 2.3.2.4 (A) bzw. 2.3.2.5 (A) wurde mittels präparativer HPLC durchgeführt.

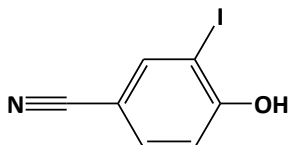
HPLC-Pumpen	Waters 510 Pump, Waters 590 Programmable HPLC Pump	
Detektor	Uvikon 735 LC Kontron Instruments	
Injektor	Rheodyne, 2 ml Schleife	
Integrator	Shimadzu C-R6 A Chromatopac	
Stationäre Phase	DELTA PAK C18 – 300 Å, 30 mm×30 cm, 15 µm spherical (Nihon Waters Ltd., Japan)	
Mobile Phase	2.3.2.4	50 % (v/v) 0,1 N Ammoniumacetat in Wasser, pH 6,3 50 % (v/v) 0,1 N Ammoniumacetat in Methanol
	2.3.2.5	40 % (v/v) 0,1 N Ammoniumacetat in Wasser, pH 6,3 60 % (v/v) 0,1 N Ammoniumacetat in Methanol
Detektion	260 nm	
Flussrate	20 ml/min	
Injektionsvolumen	ca. 1,2 ml manuell	
Kartuschenreinigung	Waters Sep-Pak® Plus C18 cartridge 55-105µm	

Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, Acros, Baker, Sigma-Aldrich, Merck und Roth bezogen. Für die Synthese von Iodpentamidin (**1a**) nach 2.3.2.4 (A) wurde Pentamidindiisethionat (**1**) (Pentacarinat®) von der Firma Sanofi-Aventis, Frankfurt, eingesetzt.

2.3.2 Synthesen der nicht radioaktiven Verbindungen

2.3.2.1 4-Hydroxy-3-iodbenzonitril (5)



Die Synthese erfolgt nach der Vorschrift von Blower *et al.* [1992].

Ausbeute: 18%

Smp.: 136 °C (Literatur: 143 - 144 °C [Blower *et al.*, 1992])

¹H-NMR (DMSO-*d*₆)

δ /ppm = 6.97 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 1H, meta-Position zum Iod), 7.66 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, para-Position zum Iod), 8.15 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, ortho-Position zum Iod), 11.53 (s, 1H, OH)

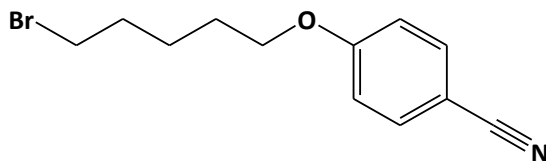
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆)

δ /ppm = 85.1 (ArC-I), 103.0 (I-ArC-CN), 115.2 (CN), 118.0 (I-ArC-H, meta-Position zum Iod), 134.0 (I-ArC-H, para-Position zum Iod), 142.6 (I-ArC-H, ortho-Position zum Iod), 161.0 (I-ArC-OH)

MS (ESI)

$m/z = 246$ [M + H]⁺

2.3.2.2 1-Brom-5-(4-cyan)phenoxyptan (6)



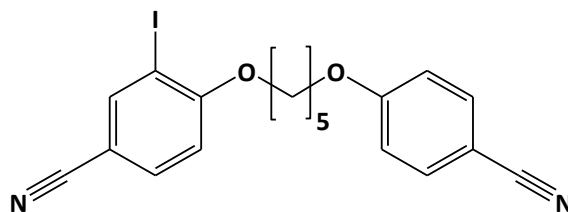
Die Synthese erfolgt nach der Vorschrift von Blower *et al.* [1992] mit Ausnahme folgender Abweichung:

Nach der Reaktion und Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand ohne Destillation aus *n*-Hexan umkristallisiert.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆)

δ /ppm = 1.46-1.59 (m, 2H, Ar-OCH₂CH₂CH₂), 1.69-1.81 (m, 2H, Ar-OCH₂CH₂), 1.81-1.92 (m, 2H, BrCH₂CH₂), 3.55 (t, ³*J* = 6.7 Hz, 2H, BrCH₂), 4.06 (t, ³*J* = 6.4 Hz, 2H, Ar-OCH₂), 7.09 (d, ³*J* = 9.0 Hz, 2H, ArH, meta-Position zur Nitrilfunktion), 7.75 (d, ³*J* = 9.0 Hz, 2H, ArH, ortho-Position zur Nitrilfunktion)

2.3.2.3 1-(4-Cyan-2-iod)phenoxy-5-(4-cyan)phenoxy-pentan (8)



Die Synthese erfolgt nach der Vorschrift von Blower *et al.* [1992].

Ausbeute: 51 %

Smp.: 85 °C (Literatur: 100-102,5 °C [Blower *et al.*, 1992])

¹H-NMR (CDCl₃)

δ /ppm = 1.71-1.80 (m, 2H, Ar-OCH₂CH₂CH₂), 1.88-1.97 (m, 4H, Ar-OCH₂CH₂), 4.06 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, Ar-OCH₂), 4.11 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, I-Ar-OCH₂), 6.81 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, AMX, I-ArH, meta-Position zum Iod), 6.94 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, AA',XX', ArH, meta-Position zur Nitrilfunktion), 7.57 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, AA',XX', ArH, ortho-Position zur Nitrilfunktion), 7.61 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, AMX, I-ArH, para-Position zum Iod), 8.03 (d, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, AMX, I-ArH, ortho-Position zum Iod)

¹³C-NMR (CDCl₃)

δ /ppm = 22.7 (Ar-OCH₂CH₂CH₂), 28.5 (Ar-OCH₂CH₂), 28.6 (Ar-OCH₂CH₂), 68.1 (OCH₂), 69.3 (OCH₂), 86.5 (ArC-I), 103.8 (ArC-CN), 105.9 (I-ArC-CN), 111.4 (I-ArC-H, meta-Position zum Iod), 115.2 (I-ArC-H, para-Position zum Iod), 115.2 (2 x ArC-H, meta-Position zur Nitrilfunktion), 117.6 (CN), 119.2 (CN), 134.0 (2 x ArC-H, ortho-Position zur Nitrilfunktion), 142.7 (I-ArC-H, ortho-Position zum Iod), 160.9 (I-ArC-OCH₂), 162.3 (ArC-OCH₂)

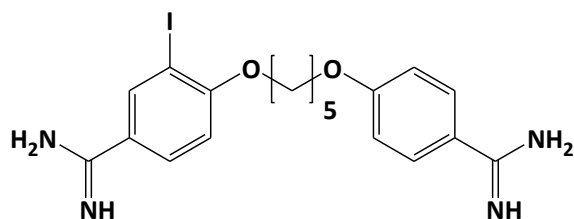
MS (ESI)

m/z = 450 [M + NH₄]⁺, 433 [M + H]⁺

<u>Elementaranalyse</u>		C ₁₉ H ₁₇ IN ₂ O ₂ (432.3)	
Ber.	C 52.79	H 3.96	N 6.48
Gef.	C 52.01	H 3.94	N 6.29

2.3.2.4 Iodpentamidin

1-(4-Amidino-2-iod)phenoxy-5-(4-amidino)phenoxy-pentan (1a)



(A) Es werden 1270 mg (2,1 mmol) Pentamidindiisethionat (**1**) und 220 mg (0,7 mmol) Silbersulfat in einer Mischung aus 5 ml konzentrierter Schwefelsäure und 70 ml Eisessig gelöst und in einem Dreihalskolben vorgelegt. Unter Rühren werden bei 80°C über zwei Stunden 400 mg (1,6 mmol) fein gepulvertes Iod portionsweise zugegeben und anschließend für eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wird der Niederschlag abfiltriert und mit Natriumsulfitlösung sowie mit Methanol gewaschen. Die Waschlösung und das Filtrat werden vereinigt und neutralisiert. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand chromatographisch aufgearbeitet. Die gesammelten Fraktionen werden im Vakuum eingengt und der Puffer mittels Kartuschenreinigung entfernt. Dazu werden die Fraktionen auf die zuvor konditionierte C18-Kartusche aufgeladen, zweimal mit je 1 ml Wasser gespült und dann das Produkt zweimal mit je 1 ml Ethanol eluiert. Nach Entfernung des Ethanols im Vakuum wird das Produkt über Nacht getrocknet. Die Rohausbeute beträgt in etwa 38%.

(B) Die Synthese von Iodpentamidin (**1a**) erfolgt bis zur Stufe von 1-(4-Ethoxycarbimino-2-iod)phenoxy-5-(4-ethoxy-carbimino)phenoxy-pentan (**9**) nach der Vorschrift von Blower *et al.* [1992], welches ohne weitere Aufreinigung und Charakterisierung weiter verwendet wird [Blower *et al.*, 1992].

Um **1a** zu erhalten, werden 200 mg (0,4 mmol) von **9** in 20 ml warmen Ethanol sowie 49 ml (0,9 mmol) Ammoniumchloridlösung gelöst und für 20 Stunden bei 70°C gerührt. Nach Abkühlung auf ca. 60°C werden unter Stickstoffatmosphäre 35 ml Aceton zu der Lösung gegeben, sodass ein öliges Präzipitat entsteht. Nach weiterer Abkühlung kann der feste Anteil abfiltriert und das Produkt als Iodpentamidindihydrochlorid (**1a**) durch Umkristallisation aus Ethanol/Aceton und anschließend aus Wasser/Aceton gewonnen werden.

Ausbeute (B): 66 mg (32 %)

Smp.: 163 °C

¹H-NMR (DMSO-*d*₆)

δ/ppm = 1.61-1.70 (m, 2H, Ar-OCH₂CH₂CH₂), 1.79-1.88 (m, 4H, Ar-OCH₂CH₂), 4.13 (t, ³J = 6.2 Hz, 2H, Ar-OCH₂), 4.20 (t, ³J = 6.2 Hz, 2H, I-Ar-OCH₂), 7.16 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, AA',XX', ArH, meta-Position zur Amidinfunktion), 7.18 (d, ³J = 6.9 Hz, 1H, AMX, I-ArH, meta-Position zum Iod), 7.83 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, AA',XX', ortho-Position zur Amidinfunktion), 7.89 (dd, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, AMX, I-ArH, para-Position zum Iod), 8.27 (d, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, AMX, I-ArH, ortho-Position zum Iod), 8.90 (bs, 2H, NH₂), 8.97 (bs, 2H, NH₂), 9.19 (bs, 2H, NH₂), 9.25 (bs, 2H, NH₂)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆)

δ/ppm = 22.1 (Ar-OCH₂CH₂CH₂), 28.0 (Ar-OCH₂CH₂), 28.1 (Ar-OCH₂CH₂), 68.1 (Ar-OCH₂), 69.3 (I-Ar-OCH₂), 87.1 (ArC-I), 112.1 (I-ArC-H, meta-Position zum Iod), 114.9 (2 x ArC-H, meta-Position zur Amidoximfunktion), 119.3 (ArC-CN₂H₂NH), 121.2 (I-ArC-CN₂H₂NH), 130.2 (2 x ArC-H, ortho-Position zur Amidoximfunktion), 130.4 (I-ArC-H, para-Position zum Iod), 138.6 (I-ArC-H, ortho-Position zum Iod), 161.4 (I-ArC-CN₂H₂NH), 163.1 (ArC-CN₂H₂NH), 163.7 (I-ArC-OCH₂), 164.8 (ArC-OCH₂)

MS (ESI)

m/z = 467 [M + H]⁺, 331 [M + H, - C₇H₇N₂, - NH₃]⁺, 246 [M + H, - C₁₂H₁₇N₂O₂]⁺, 120 [M + H, - C₁₂H₁₆IN₂O₂]⁺

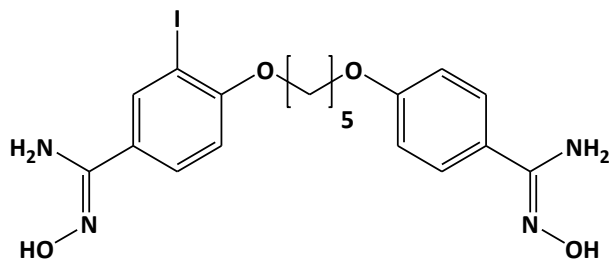
Elementaranalyse C₁₉H₂₃IN₄O₂ × 2 HCl (538.9)

Ber. C 42.30 H 4.64 N 10.39

Gef. C 42.14 H 5.12 N 10.46

2.3.2.5 *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin

1-[4-(*N'*-hydroxyamidino-2-iod)]-phenoxy-5-[4-(*N*-hydroxyamidino)]-phenoxy-pentan (2a)



(A) Die Darstellung und Aufarbeitung erfolgt wie für Iodpentamidin (**1a**) unter 2.3.2.4 (A) beschrieben, mit 2550 mg (6,9 mmol) *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**), 715 mg (2,3 mmol) Silbersulfat und 1340 mg (5,3 mmol) Iodpulver. Die Rohausbeute beträgt in etwa 30%.

(B) Die Synthese erfolgt in Anlehnung an die Vorschrift von Clement *et al.* [1985].

Es werden 216 mg (0,5 mmol) von **8** und 200 mg (6,0 mmol) Hydroxylamin in 40 ml frisch getrocknetem Ethanol gelöst und anschließend unter Argonbegasung bei 90 °C 24 Stunden lang gerührt. Die Lösung wird im Vakuum bis zur Trockne einkonzentriert. Im Anschluss wird der Rückstand in Dichlormethan/Ethanol (8/2) angelöst und über Kieselgel mit Dichlormethan/Ethanol (8/2) chromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute (B): 80 mg (32 %)

Smp.: 129 °C

¹H-NMR (DMSO-*d*₆)

δ /ppm = 1.58-1.68 (m, 2H, Ar-OCH₂CH₂CH₂), 1.76-1.83 (m, 4H, Ar-OCH₂CH₂), 4.01 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, Ar-OCH₂), 4.08 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, I-Ar-OCH₂), 5.70 (s, 2H, NH₂), 5.77 (s, 2H, NH₂), 6.92 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, AA',XX', ArH, meta-Position zur Amidoximfunktion), 6.99 (d, ³J = 9.0 Hz, 1H, AMX, I-ArH, meta-Position zum Iod), 7.59 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, AA',XX', ortho-Position zur Amidoximfunktion), 7.65 (dd, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 3.0 Hz, 1H, AMX, I-ArH, para-Position zum Iod), 8.06 (d, ⁴J = 3.0 Hz, 1H, AMX, I-ArH, ortho-Position zum Iod), 9.43 (s, 1H, OH), 9.53 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (DMSO-d6)

$\delta/\text{ppm} = 22.2$ (Ar-OCH₂CH₂CH₂), 28.2 (Ar-OCH₂CH₂), 28.2 (Ar-OCH₂CH₂), 67.4 (Ar-OCH₂), 68.6 (I-Ar-OCH₂), 86.2 (ArC-I), 111.8 (I-ArC-H, meta-Position zum Iod), 113.9 (2 x ArC-H, meta-Position zur Amidoximfunktion), 125.6 (ArC-CN₂HNO), 126.7 (2 x ArC-H, ortho-Position zur Amidoximfunktion), 126.8 (I-ArC-H, para-Position zum Iod), 127.5 (I-ArC-CN₂HNO), 135.7 (I-ArC-H, ortho-Position zum Iod), 149.4 (I-ArC-CN₂HNO), 150.6 (ArC-CN₂HNO), 157.6 (I-ArC-OCH₂), 159.2 (ArC-OCH₂)

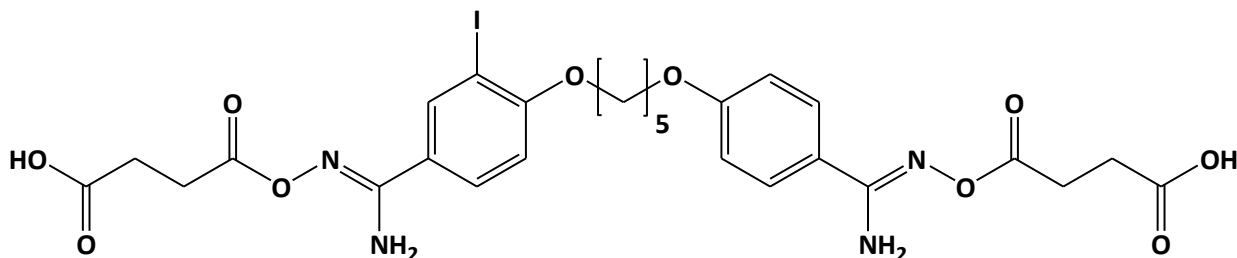
MS (ESI)

$m/z = 499$ [M + H]⁺, 482 [M + H, - NH₃]⁺, 466 [M + H, - NH₂OH]⁺

<u>Elementaranalyse</u>	C ₁₉ H ₂₃ I _N ₄ O ₄ (498.1)		
Ber.	C 45.80	H 4.65	N 11.24
Gef.	C 46.37	H 4.91	N 10.33

2.3.2.6 *N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin

1-[2-Iod-4-(*N'*-succinyloxyamidino)]phenoxy-5-[4-(*N*-succinyloxyamidino)]-phenoxy-pentan (3a)



Die Synthese erfolgt in Anlehnung an die Vorschrift von Hungeling [2009].

Es werden 100 mg (0,2 mmol) *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) in 5 ml trockenem Ethanol vorgelegt und 80 mg (0,8 mmol) Bernsteinsäureanhydrid in 15 ml frisch getrocknetem Dichlormethan gelöst, die anschließend über eine Stunde zugegeben werden. Der Ansatz wird insgesamt 3,5 Stunden lang bei 65 °C gerührt und anschließend im Vakuum bis zur Trockne einkonzentriert. Danach wird der Rückstand fünfmal mit Dichlormethan gewaschen und im Anschluss über Nacht getrocknet.

Ausbeute: 115 mg (80%)

Smp.: 125 °C

¹H-NMR (DMSO-*d*₆)

δ /ppm = 1.62-1.66 (m, 2H, Ar-OCH₂CH₂CH₂), 1.69-1.82 (m, 4H, Ar-OCH₂CH₂), 2.54 (t, ³J = 6.6 Hz, 4H, HOOC-CH₂), 2.67 (t, ³J = 6.6 Hz, 4H, NOOC-CH₂), 4.03 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, Ar-OCH₂), 4.12 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, I-Ar-OCH₂), 6.66 (s, 2H, NH₂), 6.75 (s, 2H, NH₂), 6.99 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, AA',XX', ArH, meta-Position zur Amidoximesterfunktion), 7.06 (d, ³J = 9.0 Hz, 1H, AMX, I-ArH, meta-Position zum Iod), 7.65 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, AA',XX', ArH, ortho-Position zur Amidoximesterfunktion), 7.72 (dd, ³J = 8.7 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, AMX, I-ArH, para-Position zum Iod), 8.10 (d, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, AMX, I-ArH, ortho-Position zum Iod), 12.35 (bs, 2H, COOH)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6)

$\delta/\text{ppm} = 22.2$ (Ar-OCH₂CH₂CH₂), 27.9 (NOOC-CH₂), 27.9 (NOOC-CH₂), 28.1 (Ar-OCH₂CH₂), 28.2 (Ar-OCH₂CH₂), 28.8 (2 x HOOC-CH₂), 67.6 (Ar-OCH₂), 68.8 (I-Ar-OCH₂), 86.3 (ArC-I), 111.9 (I-ArC-H, meta-Position zum Iod), 114.2 (2 x ArC-H, meta-Position zur Amidoximesterfunktion), 123.5 (ArC-CNH₂NO), 125.3 (I-ArC-CNH₂NO), 128.1 (2 x ArC-H, ortho-Position zur Amidoximesterfunktion), 128.3 (I-ArC-H, para-Position zum Iod), 136.9 (I-ArC-H, ortho-Position zum Iod), 155.0 (I-ArC-CNH₂NO), 156.2 (ArC-CNH₂NO), 158.8 (I-ArC-OCH₂), 160.4 (ArC-OCH₂), 170.2 (NOOC), 170.3 (NOOC), 173.6 (2 x COOH)

MS (ESI)

$m/z = 697$ [M - H]⁻, 679 [M - H, - H₂O]⁻, 661 [M - H, - H₂O, - H₂O]⁻, 579 [M - H, - H₂O, - C₄H₄O₃]⁻, 497 [M - H, - C₄H₄O₃, - C₄H₄O₃]⁻

Elementaranalyse C₂₇H₃₁IN₄O₁₀ (698.1)

Ber. C 46.43 H 4.47 N 8.02

Gef. C 46.12 H 4.45 N 7.12

3 Synthesen der radioaktiven Verbindungen

3.1 Einleitung und Zielsetzung

Ziel der radioaktiven Markierung war es, die drei zu untersuchenden Verbindungen mit ^{123}I derart zu markieren, dass die radioaktive Verbindung mit einer für die SPECT-Studie ausreichenden Gesamtaktivität in einer biokompatiblen Lösung, die nicht mehr als 1 ml betragen sollte, gewonnen werden konnte. Das Erreichen einer besonders hohen spezifischen Aktivität spielte für die geplanten SPECT-Untersuchungen hingegen keine Rolle, da Rezeptorbindungsuntersuchungen nicht vorgesehen waren. Das Prinzip der SPECT-Technik wird in Kapitel 4 behandelt. Im Folgenden wird für die markierten Pentamidinverbindungen (**1b**, **2b**, **3b**) öfter der Begriff Tracer verwendet: Ein Tracer bezeichnet ein radioaktiv markiertes Molekül, welches sich *in vivo* ähnlich oder genauso wie die nicht markierte Verbindung verhält und deshalb zur Erforschung biologischer Prozesse dienen kann [Vallabhajosula, 2009]. Ein Tracer besteht aus einem Trägermolekül und einem Radioisotop. In Zusammenhang mit dem Radioisotop werden in der Radiochemie die Begriffe *carrier-free* (*c.f.*), *no carrier added* (*n.c.a.*) und *carrier added* (*c.a.*) verwendet. Die Spezifikation *c.f.* bedeutet, dass das Radioisotop ohne Kontamination durch ein nicht radioaktives Isotop, welches als *carrier* bezeichnet wird, vorliegt [Vallabhajosula, 2009]. In der Realität ist es allerdings schwer, alle Kontaminationen durch natürlich vorkommende Isotope, Zerfallsprodukte und Synthesevorgänge zu eliminieren. Daher hat sich zunehmend der Begriff *n.c.a.* durchgesetzt, um zu verdeutlichen, dass dem Radioisotop kein *carrier* aktiv zugesetzt wurde [Vallabhajosula, 2009]. Für einige chemische Reaktionen ist der Zusatz von nicht radioaktiven Isotopen von Vorteil [Vallabhajosula, 2009]. Für diesen Zweck gibt es die Bezeichnung *c.a.*, was bedeutet, dass dem Radioisotop eine bestimmte Menge an nicht radioaktivem Isotop zugesetzt wurde. Bei *c.a.* Zubereitungen wird zusätzlich zur Radionuklidreinheit die spezifische Aktivität angegeben (s. 3.3.3).

3.2 Eigenschaften des Radionuklids

Für SPECT-Imaging gibt es eine Vielzahl an verschiedenen Radionucliden, mit denen die zu untersuchenden Verbindungen markiert werden können. Bei der Auswahl eines geeigneten Radioisotops spielen verschiedene Aspekte eine wichtige Rolle. Zunächst müssen die chemischen Eigenschaften des Isotops und die Struktur der zu markierenden Verbindung berücksichtigt werden: Eine Markierung muss chemisch möglich sein und die strukturellen Eigenschaften der zu markierenden Verbindung sollten durch das Radioisotop so wenig wie möglich verändert werden. Weitere Schlüsselfaktoren sind insbesondere die Art und Energie der emittierten Strahlung, die physikalische Halbwertszeit und die Verfügbarkeit des Radionuklids. Beim SPECT-Imaging werden γ -Strahler verwendet, deren γ -Energie groß genug sein muss, um ohne signifikante Abschwächung den Körper zu verlassen und klein genug, um am Detektor ein störungsfreies Signal zu erzeugen. Die idealen γ -Energien für SPECT-Imaging liegen zwischen 100 und 300 keV [Mier & Nissen, 2010]. Außerdem dürfen die entstehenden Zerfallsprodukte nicht toxisch sein und sollten möglichst keine Teilchenstrahlung (α - oder β -Strahlung) enthalten, um den Körper nicht zu schädigen. Die physikalische Halbwertszeit muss lang genug sein, um nach Produktion und Transport des Nuklids sowie nach Synthese und Aufreinigung des Tracers eine ausreichend lange Imaging-Studie zu gewährleisten. Andererseits bedeutet eine lange Halbwertszeit eine unnötig lange Strahlenexposition des Körpers [Mier & Nissen, 2010]. Letztendlich muss auch die Verfügbarkeit eines Radionuklids berücksichtigt werden, welche von den lokalen Gegebenheiten abhängig ist. So sind Generator-Nuklide wie ^{99m}Tc i. d. R. leichter und kostengünstiger verfügbar als solche, die mit Hilfe eines Zyklotrons produziert werden müssen. Eine Auswahl an häufig gebrauchten SPECT-Nukliden ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Eine Auswahl an bedeutsamen SPECT-Nukliden [Lissner & Fink, 1992]

Isotop	Halbwertszeit	γ -Energie
	h	keV
^{99m}Tc	6	140
^{111}In	67	172, 245
^{123}I	13	159
^{67}Ga	78	93, 184, 296
^{201}Tl	73	167

Nach Abwägung aller Erfordernisse für die Markierung der Pentamidine (**1**, **2**, **3**) ergibt ^{123}I ein Nuklid, das allen Ansprüchen gerecht wird. Im Vergleich mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$, welches hervorragende physikalische Eigenschaften als SPECT-Nuklid besitzt, bedingt eine Markierung mit ^{123}I lediglich eine minimale strukturelle Veränderung im Molekül [Blower *et al.*, 1992]. Die emittierten Photonen entstammen maßgeblich einer Elektroneneinfangreaktion und besitzen zu 83% eine γ -Energie von 159 keV, sodass gute Voraussetzungen hinsichtlich der Detektion mittels Gamma Kamera gegeben sind [Mier & Nissen, 2010]. Daraus lässt sich ableiten, dass sich ^{123}I durch die Elektroneneinfangreaktion in das Isotop ^{123}Te umwandelt, welches stabil ist und somit eine Exposition des Körpers durch β -Strahlung entfällt [Lieser, 1991]. Die physikalische Halbwertszeit beträgt exakt 13,2235 h und ist damit lang genug, um eine SPECT-Studie über 24 h durchzuführen. Obwohl die Produktion von ^{123}I im Zyklotron erfolgen muss, ist es aufgrund seiner vielfältigen Einsatzmöglichkeiten und optimalen Halbwertszeit kommerziell verfügbar.

Aus diesen Gründen wurden die radioaktiven Markierungen der Pentamidinverbindungen mit ^{123}I durchgeführt.

3.3 Methoden der Radiomarkierung und Radioiodierung

3.3.1 Einleitung

Es existieren verschiedene Möglichkeiten, eine Substanz radioaktiv zu markieren. Idealerweise besitzt die zu markierende Verbindung *per se* ein Atom, welches durch das gewünschte Radionuklid ersetzt werden kann, sodass das Molekül keine strukturelle Veränderung erfährt. Ein Beispiel ist das [^{11}C]-L-Dopa welches in der Positronenemissionstomographie (PET) eingesetzt wird [Vallabhajosula, 2009]. Für SPECT-Imaging stehen allerdings keine Kohlenstoff- oder Wasserstoffisotope zur Verfügung und leider besitzen die Pentamidine (**1**, **2**, **3**) natürlicherweise weder das stabile Iodisotop ^{127}I noch ein anderes Isotop, welches durch ein SPECT-Nuklid ersetzt werden könnte, sodass die radioaktive Markierung durch Einführung eines Fremdatoms erfolgen musste. Dazu gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Ansätze: Entweder versucht man eine direkte Markierung mit ^{123}I an der nicht iodierten Ausgangsverbindung oder man synthetisiert einen iodierten Precursor und tauscht anschließend das stabile ^{127}I mittels einer Isotopenaustauschreaktion

gegen das Radioisotop ^{123}I aus. Da die meisten Methoden der direkten Markierung einfacher und schneller als eine Isotopenaustauschreaktion sind, wurde zunächst eine direkte Radioiodierung der Verbindungen versucht.

3.3.2 Direkte Radioiodierungen

3.3.2.1 Oxidative Radioiodierungsreaktionen

Viele Radioiodierungsverfahren beruhen auf einer elektrophilen Substitution am Aromaten nach vorheriger Oxidation des $^{123}\text{I}^-$. Hunter und Greenwood entwickelten 1962 eine häufig genutzte Methode, indem sie Chloramin T als Oxidationsmittel verwendeten (Abb. 3-1) [Hunter & Greenwood, 1962]. Das in wässriger Lösung gebildete Hypochlorit, welches als oxidierende Spezies betrachtet werden kann, reagiert mit dem radioaktiven Iodid, um ein elektrophiles Agens (vermutlich H_2OI^+ [Mier & Nissen, 2010]) zu bilden [Seevers & Counsell, 1982]. Die bei der Chloramin T-Methode vorherrschenden starken Oxidationsbedingungen können allerdings auch zur Oxidation der zu markierenden Verbindung und unerwünschten Nebenreaktionen führen, was oftmals ein Problem darstellt. Daher wurde eine Reihe von Methoden entwickelt, die unter milderer Oxidationsbedingungen funktionieren. Insbesondere das wasserunlösliche Iodogen dient mittlerweile als Standardreagenz, um oxidationsempfindliche Substanzen mit radioaktivem Iod zu markieren (Abb. 3-1). Dabei wird Iodogen als dünner Film auf die Wand des Reaktionsgefäßes aufgebracht, sodass in wässriger Lösung nach Oxidation des Iodids die Entnahme reaktiver Iodspezies unter Zurücklassen des Oxidationsmittels möglich ist. Somit kann eine oxidative Schädigung der zu markierenden Verbindung minimiert werden [Seevers & Counsell, 1982]. Ähnliche Bedingungen werden durch *N*-Chlor-benzensulfonamid erreicht, welches durch Kopplung an Polystyrolkugeln (= „Iodobeads“) immobilisiert wird (Abb. 3-1) [Markwell, 1982].

Da diese Methoden als einfache und schnelle Standardmethoden etabliert sind, wurden zunächst auf diese Weise Markierungen von Pentamidin (**1**) und *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**) versucht. Leider führte keine dieser Methoden zu einer erfolgreichen Markierung mit ^{123}I . Die Ursache dafür liegt vermutlich in der mangelnden Aktivierung der Aromaten für einen elektrophilen Angriff. Obwohl die Alkoxygruppe einen aktivierenden Effekt bezüglich einer elektrophilen Substitution besitzt, scheint der desaktivierende Effekt der Amidin- bzw. Amidoximfunktion zu überwiegen [Blower *et al.*, 1992].

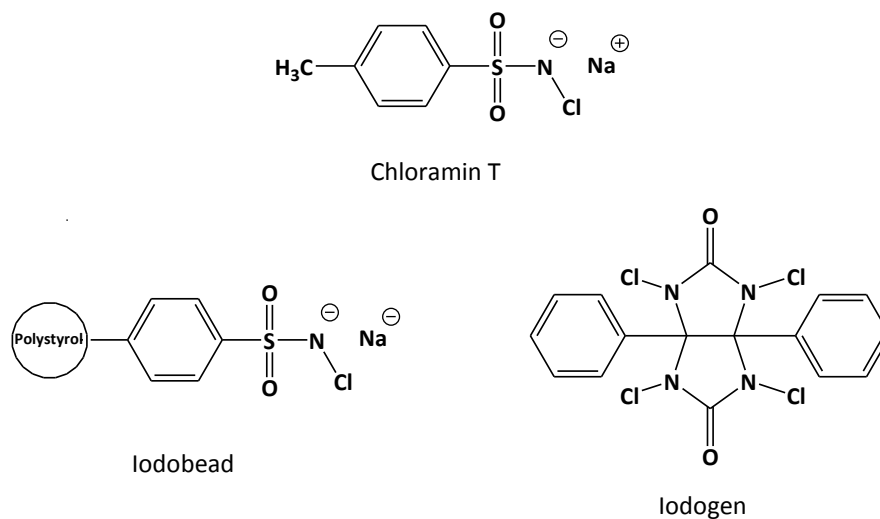


Abbildung 3-1: Eine Auswahl an Oxidationsmitteln, die für direkte Radioiodierungen verwendet werden

3.3.2.2 Radioiodierung durch elektrophile Substitution via Demetallierung

Eine elektrophile Iodierung schwach aktivierter Aromaten erfordert eine Erhöhung der Elektronendichte im Ringsystem. Dies gelingt durch die Synthese von Organometallverbindungen. Die niedrige Elektronegativität der meisten Metalle bedingt eine Polarisierung der Kohlenstoff-Metall Bindung und damit ihre Aktivierung für einen elektrophilen Angriff. Die Instabilität dieser Bindung ermöglicht zudem kurze Reaktionszeiten und milde Reaktionsbedingungen [Mühlhausen, 2005]. Aus der Vielzahl der möglichen Organometallverbindungen werden für Radioiodierungen insbesondere Organoborane, Organostannane und Organothallate genutzt [Finn, 2003].

Für die Markierung der Pentamidine erschien der Weg via aromatischer Thallierung gut geeignet, da Mohammed *et al.* 1997 die Anwendbarkeit dieses Verfahrens für para disubstituierte Benzamide beschrieben hatten. Dabei findet die Thallierung des Aromaten *in situ* in Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur statt [Mohammed *et al.*, 1997]. Nach kurzer Reaktion wird das radioaktive Iodid zugegeben, welches nach Oxidation durch das dreiwertige Thallium als neuer Substituent an die Position des Thalliums am Aromaten tritt. Das Metall geht hierbei als einwertiges Thallium ab (Abb. 3-2) [Elschenbroich *et al.*, 1990]. Auch nach mehrfacher Modifikation dieser Methode hinsichtlich Reaktionsdauer, Temperatur, Konzentration der Reaktanden, Einsatz zusätzlicher Oxidationsmittel, Einsatz

von geträgertem (*c.a.*) Nuklid sowie Erhöhung der Ausgangsaktivität blieben die radiochemischen Ausbeuten von [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**) und [^{123}I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) jedoch unter 2% und konnten nicht gesteigert werden, sodass die erforderliche Aktivität für die geplanten Imaging-Studien mit dieser Methode nicht erreicht werden konnte.

Weitere Versuche, Pentamidin (**1**) und *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**) mit Hilfe von Cer(IV)-triflat ($\text{Ce}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_4$) gemäß einer Methode zu iodieren, die von Mennicke *et al.* für die direkte Radioiodierung schwach aktivierter Aromaten beschrieben worden war, blieben erfolglos [Mennicke *et al.*, 2000].

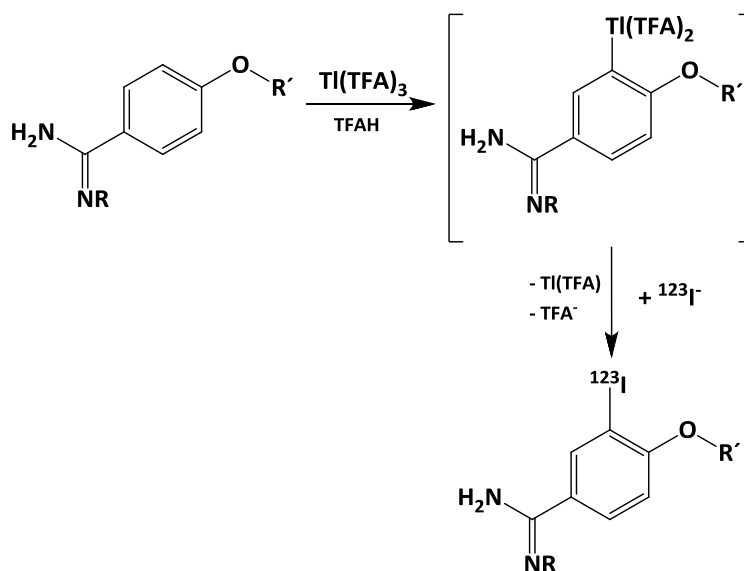


Abbildung 3-2: Radioiodierung mittels $^{123}\text{I}^-$ und $\text{Ti}(\text{TFA})_3$ modifiziert nach Mohammed *et al.* [1997] ($\text{R} = \text{H}$ oder OH , $\text{R}' = (\text{Hydroxy})\text{aminophenoxy}$ pentan)

3.3.2.3 Direkte Radioiodierung via Schmelzverfahren

Eine einfache aber verblüffende Methode der Radioiodierung ist die trockene Schmelze von radioaktivem Iodid mit der uniodierten Ausgangsverbindung [Seevers & Counsell, 1982]. Ursprünglich für die Markierung von Estradiol mit ^{123}I entwickelt [Ghanadian *et al.*, 1975], brachte sie allerdings keine nennenswerten Ausbeuten bei der Radioiodierung von Pentamidin (**1**) und *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**).

3.3.3 Isotopenaustauschreaktionen

3.3.3.1 Einleitung

Aufgrund der ungenügenden elektronischen Aktivierung der Aromaten war es bislang nicht möglich, die Pentamide direkt mit ^{123}I in ausreichendem Maße zu markieren. Da der desaktivierende Effekt der Amdin- bzw. Amidoximfunktion anscheinend überwiegt, blieb nunmehr die Möglichkeit einer nukleophilen Substitutionsreaktion via Isotopenaustausch. Als Precursor dienten dabei die zuvor synthetisierten, monoiodierten Verbindungen Iodpentamidin (**1a**) und *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) (s. Kapitel 2). Da bei Isotopenaustauschreaktionen mit iodierten Ausgangsverbindungen naturgemäß keine hohen spezifischen Aktivitäten erreicht werden können, wurden auch Austauschreaktionen mit bromierten Pentamidinverbindungen versucht, die zuvor synthetisiert worden waren. Diese können chromatographisch von den ^{123}I -markierten Verbindungen getrennt werden, wodurch eine Gewinnung auf *n.c.a.* Niveau erreicht worden wäre. Zum Erfolg führten allerdings nur die Reaktionen mit iodierten Ausgangsverbindungen.

3.3.3.2 Isotopenaustauschreaktion mittels Ammoniumsulfat

Basierend auf einer Methode von Mangner *et al.* für die Radioiodierung von *m*-Iodbenzylguanidin [Mangner *et al.*, 1982], führten Blower *et al.* eine Radioiodierung von Iodpentamidin (**1a**) durch [Blower *et al.*, 1992]. Auf den Grundlagen dieser beiden Methoden und kinetischen Untersuchungen zu der von Mangner *et al.* beschriebenen Isotopenaustauschreaktion [Tešić *et al.*, 1992] wurde eine Methode für die Radioiodierung von Iodpentamidin (**1a**) mittels Isotopenaustausch entwickelt. Die Reaktion lief bereits innerhalb von 15 Minuten bei 180 °C in Eisessig in akzeptablen Ausbeuten ab. Essentiell war hierbei die Zugabe von Ammoniumsulfat, ohne welches keine Reaktion stattfand (Abb. 3-3). Das Arbeiten in einem geschlossenen System unter einem Abzug mit ausreichender Abschirmung oder wenn möglich in einer Heißzelle ist bei diesen Reaktionsbedingungen äußerst ernst zu nehmen, um Kontaminationen durch frei werdendes radioaktives Iod zu vermeiden [Blower *et al.*, 1992].

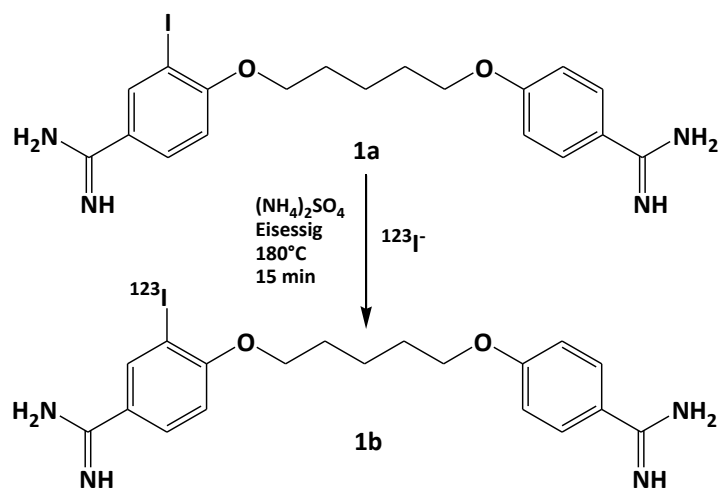


Abbildung 3-3: Darstellung von $[^{123}\text{I}]$ -Iodpentamidin (**1b**) mittels Isotopenaustauschreaktion

Die Markierung von N,N' -Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) war nach dieser Methode nicht möglich, da die Verbindung unter diesen Reaktionsbedingungen schon nach wenigen Minuten fast vollständig zersetzt wurde. Vermutlich kam es u. a. durch das Lösungsmittel zu einer Veresterung der Oximfunktion mit anschließender Zyklisierung zum Oxadiazol-Derivat [Schwarz, 1996; Clement *et al.*, 2006]. Daher wurde die im folgenden Kapitel beschriebene Methode zur Radioiodierung von **2a** entwickelt.

3.3.3.3 Kupfer(I)-katalysierte Isotopenaustauschreaktion

Für die Radioiodierung von N,N' -Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) wurde eine Methode entwickelt, die unter etwas mildereren Bedingungen als das unter 3.3.3.1 beschriebene Verfahren ablief. In Anlehnung an die Kupfer(I)-katalysierte Austauschreaktion, die 1990 von Moerlein beschrieben wurde, lief die Reaktion bereits bei 140°C in Dimethylsulfoxid (DMSO) unter Kupfer(I)-Katalyse im Rahmen einer nukleophilen Substitution ab [Moerlein, 1990]. Entscheidend für den Erfolg der Reaktion waren einerseits die Konzentrationen an Precursor und Kupfer(I)-chlorid (Cu(I)Cl), die im mikromolaren Bereich liegen sollten, sowie andererseits das molare Verhältnis von Precursor zu Cu(I)Cl , welches zwischen fünf und zehn optimale Ergebnisse lieferte [Eersels *et al.*, 2004]. Der postulierte Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 3-4 dargestellt, wobei in Moerleins Arbeit ein bromierter Precursor verwendet wurde.

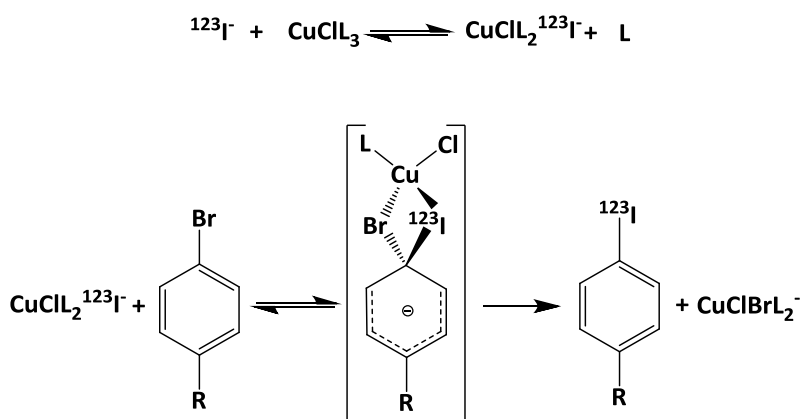


Abbildung 3-4: Hypothetischer Mechanismus der Kupfer(I)-katalysierten nukleophilen Substitution modifiziert nach Moerlein [1990] (L = Ligand)

Eine Herausforderung dieser Tracersynthese stellte die Ermittlung der optimalen Reaktionsdauer dar, welche einerseits von der Reaktionsgeschwindigkeit und andererseits von dem Grad der Zersetzung abhing. Daher war eine exakte Temperaturüberwachung bei dieser Reaktion von besonderer Bedeutung. In Abbildung 3-5 ist beispielhaft der Reaktionsverlauf der Isotopenaustauschreaktion bei der Synthese von [^{123}I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) dargestellt. Über einen Zeitraum von 60 Minuten konnte eine Zunahme des gewünschten Reaktionsproduktes **2b** ($R_t = 10,3$ min) und eine Abnahme an radioaktivem Iodid ($R_t = 1,9$ min) beobachten werden. Jedoch nahmen die radioaktiven Zersetzungsprodukte mit fortschreitender Reaktionsdauer zu. Nach 90 Minuten wurde zwar weiterhin eine Abnahme an freiem [^{123}I]-Iodid und damit ein Fortschreiten der Reaktion beobachtet, jedoch überwog nun die Bildung radioaktiver Neben- und Zersetzungsprodukte (Abb. 3-5). Der Reaktionsweg ist in Abbildung 3-6 a dargestellt.

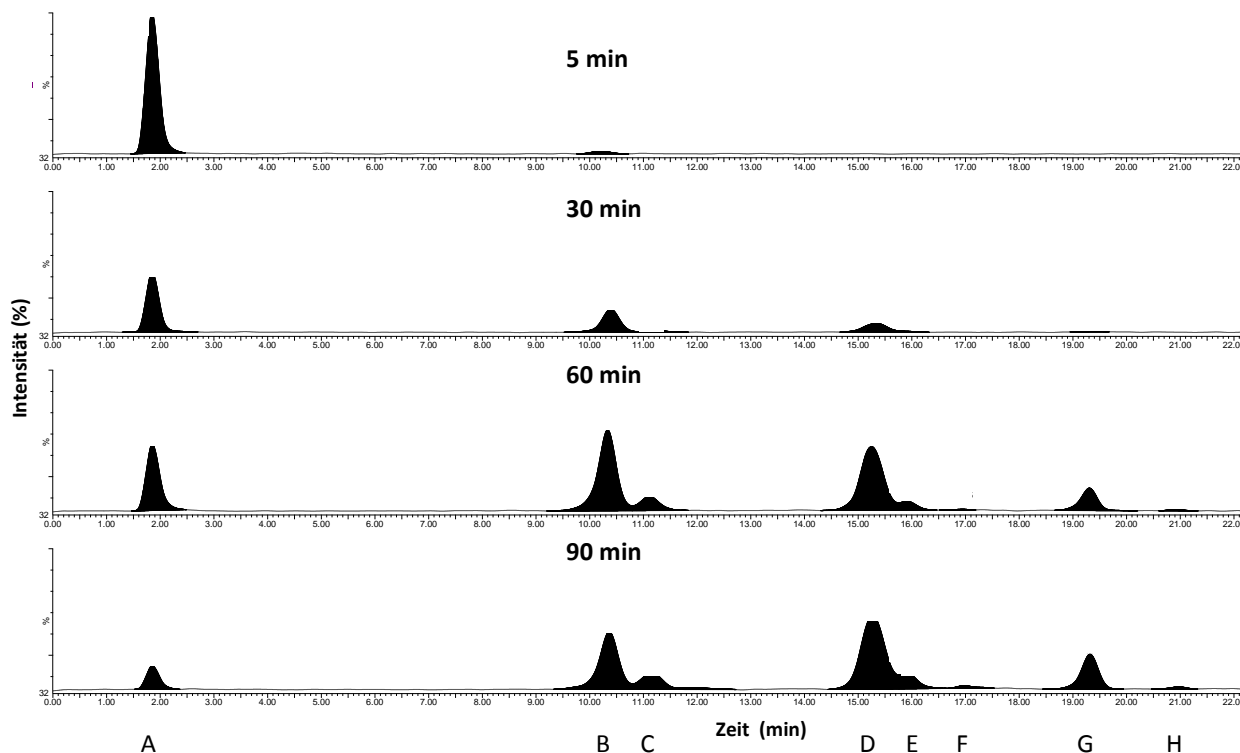


Abbildung 3-5: Repräsentative Radio-HPLC Chromatogramme für den Reaktionsverlauf der Isotopenaustauschreaktion bei der Synthese von [^{123}I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**)

A = ^{123}I ($R_t = 1,9$ min), B = **2b** ($R_t = 10,3$ min), C – H = radioaktive Neben- und Zersetzungsprodukte

Diese Reaktion wurde auch genutzt, um [^{123}I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**) zu synthetisieren. Da eine direkte Isotopenaustauschreaktion aufgrund der Instabilität der Verbindung bei den erforderlichen Reaktionsbedingungen nicht möglich war, wurde die Reaktion zunächst mit *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) durchgeführt. Anschließend konnte die markierte Verbindung durch Zugabe von Bernsteinsäureanhydrid bei 65 °C quantitativ verestert werden (Abb. 3-6 b). Durch Modifikationen dieser Methode, die nötig waren, um die Menge an Wasser zu limitieren, welches die Veresterung verhinderte, fiel die Ausbeute der Gesamtaktivität geringer als bei den anderen Reaktionen aus. Da **3b** in der wässrigen, applikationsfertigen Lösung der Esterhydrolyse unterlag [Hungeling, 2009], ergab die Kontrolle der radiochemischen Reinheit etwas kleinere Werte als bei **1b** und **2b**, wobei die entstandenen Zerfallsprodukte eindeutig als Monoester und **2b** identifiziert werden konnten.

Trotz dieser besonderen Herausforderungen konnten für beide Markierungen die für die geplanten Imaging-Studien erforderlichen Aktivitäten erlangt werden.

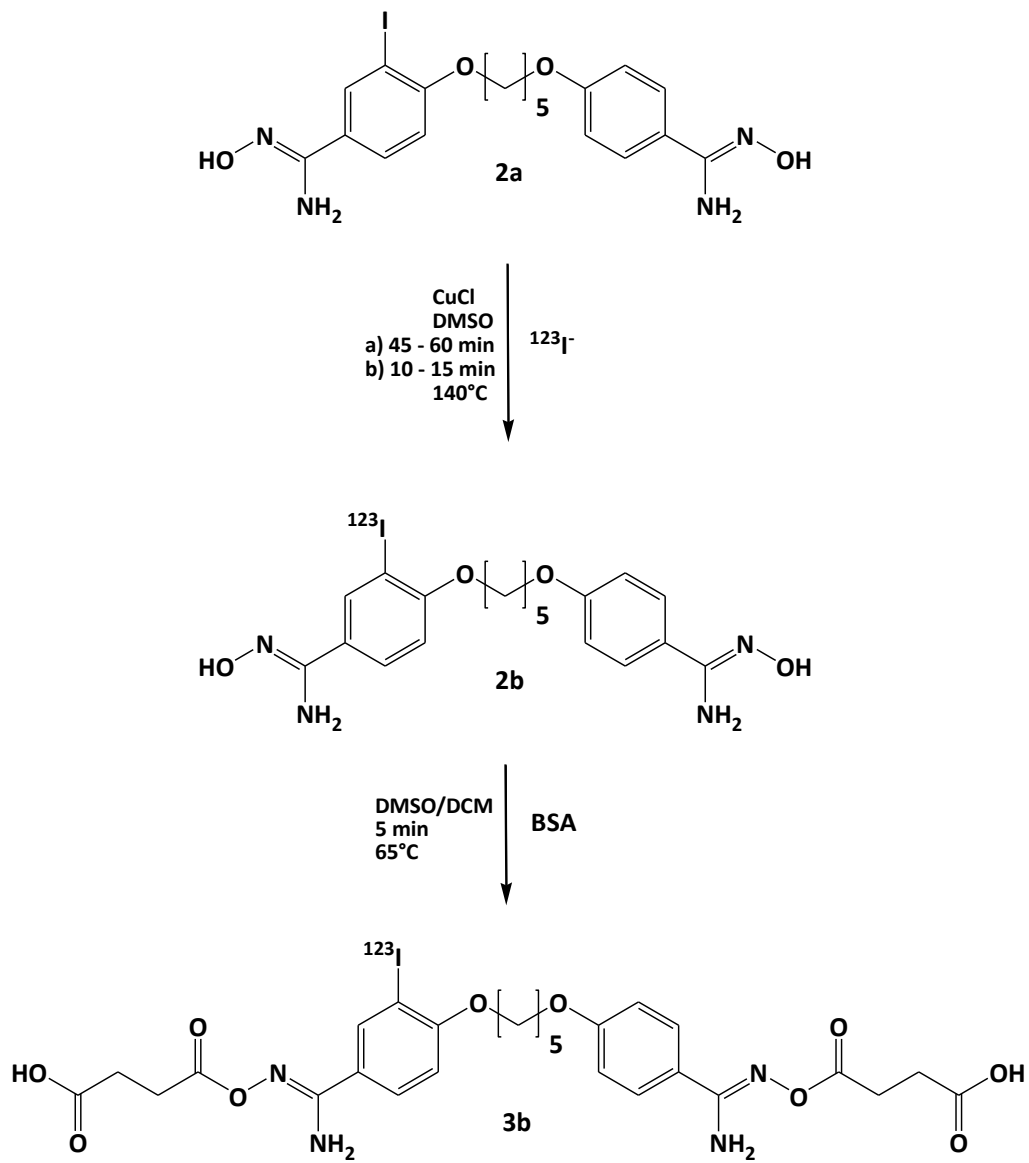


Abbildung 3-6: Darstellung von
 a) [^{123}I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) und
 b) [^{123}I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**) (BSA = Bernsteinsäureanhydrid)

3.4 Experimenteller Teil der radioaktiven Synthesen

3.4.1 Geräte und Materialien

Chemikalien

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Merck, Baker, Sigma-Aldrich und Invitrogen/Gibco bezogen.

Materialien

Die Reaktionsgefäße für die radioaktiven Markierungen waren Kurzgewindeflaschen aus Glas (ND9) mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml und wurden von der Firma Th. Geyer, Renningen, bezogen. Der dazugehörige Kurzgewindeverschluss (ND9) bestand aus Naturkautschuk, war von innen mit Teflon beschichtet und wurde ebenfalls von der Firma Th. Geyer bezogen. Als Heizgerät wurde der Magnetprüher IKA® RH basic mit Thermometer (0 – 350 °C) der IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, benutzt. Zur Zentrifugation der Isotopenlösung wurde die Minifuge der Heraeus Christ GmbH, Osterode am Harz, verwendet. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde das MED Aktivimeter Isomed 1010 der Firma Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH, Dresden, genutzt.

Radioisotop

^{123}I wurde als [^{123}I]-NaI in 0,05 M NaOH von der Firma GE Healthcare aus Eindhoven, Niederlande, bezogen. Es wurde *n.c.a.* ^{123}I mit einer Radionuklidreinheit $\geq 99,9\%$ und einer radiochemischen Reinheit $\geq 98,2\%$ verwendet. Die Aktivitätskonzentration lag je nach Charge zwischen $2,3 \times 10^4$ MBq/ml (625 mCi/ml) und $3,6 \times 10^4$ MBq/ml (980 mCi/ml).

3.4.2 HPLC-Methoden

3.4.2.1 Radio-HPLC-Methode 1 zur Gewinnung von [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**)

HPLC-Pumpen	Beckmann System Gold Programmable Solvent Module 126		
UV-Detektor	Beckmann 166		
Szintillationsdetektor	Natriumiodid-Kristall, Berthold		
Injektor	Rheodyne, 500 µl Schleife		
Software	32 Karat		
Stationäre Phase	Nucleosil® 100 – 3 C18 HD, 50×4,6 mm (Machery Nagel, Düren)		
Mobile Phase	A	PBS, pH 7,0 – 7,2	
	B	EtOH abs., pH 7,0	
Gradientenprofil	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	100	0
	30	0	100
	35	0	100
Detektion	260 nm		
Flussrate	1 ml/min		
Injektionsvolumen	max. 500 µl manuell		
Retentionszeit	1b	12,3 ± 0,2 min	

3.4.2.2 Radio-HPLC-Methode 2 zur Gewinnung von [¹²³I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) sowie zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit von [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**) und [¹²³I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**)

HPLC-Pumpen	Beckmann System Gold Programmable Solvent Module 126		
UV-Detektor	Beckmann 166		
Szintillationsdetektor	Natriumiodid-Kristall, Berthold		
Injektor	Rheodyne, 500 µl Schleife		
Software	32 Karat		
Stationäre Phase	LiChrospher® RP18, 100 – 5, 250×4,6 mm (Merck, Darmstadt)		
Mobile Phase	A	0,1 N Ammoniumacetat in Aqua bidest, pH 6,3	
	B	0,1 N Ammoniumacetat in MeOH	
Gradientenprofil	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	50	50
	55	0	100
	60	0	100
Detektion	260 nm		
Flussrate	1 ml/min		
Injektionsvolumen	max. 500 µl manuell		
Retentionszeiten	1b	8,3 ± 0,2 min	
	3b	8,5 ± 0,2 min	
	2b	15,3 ± 0,6 min	

3.4.2.3 Radio-HPLC-Methode 3 zur Aufreinigung von [¹²³I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**)

HPLC-Pumpen	Beckmann System Gold Programmable Solvent Module 126		
UV-Detektor	Beckmann 166		
Szintillationsdetektor	Natriumiodid-Kristall, Berthold		
Injektor	Rheodyne, 500 µl Schleife		
Software	32 Karat		
Stationäre Phase	Nucleosil® 100 – 3 C18 HD, 50×4,6 mm (Machery Nagel, Düren)		
Mobile Phase	A	Aqua bidest	
	B	EtOH abs., pH 7,0	
Gradientenprofil	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	100	0
	10	100	0
	20	0	100
	30	0	100
Detektion	260 nm		
Flussrate	0,5 ml/min		
Injektionsvolumen	max. 500 µl manuell		
Retentionszeit	2b	23,5 ± 0,5 min	

3.4.2.4 Radio-HPLC-Methode 4 zu Gewinnung von [¹²³I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)-iodpentamidin (**3b**) sowie zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit von [¹²³I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**)

HPLC-Pumpen	Beckmann System Gold Programmable Solvent Module 126		
UV-Detektor	Beckmann 166		
Szintillationsdetektor	Natriumiodid-Kristall, Berthold		
Injektor	Rheodyne, 500 µl Schleife		
Software	32 Karat		
Stationäre Phase	LiChrospher® RP18, 100 – 5, 250×4,6 mm (Merck, Darmstadt)		
Mobile Phase	A	PBS, pH 7,0 – 7,2	
	B	EtOH abs., pH 7,0	
Gradientenprofil	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	70	30
	60	0	100
	65	0	100
Detektion	260 nm		
Flussrate	1 ml/min		
Injektionsvolumen	max. 500 µl manuell		
Retentionszeiten	3b	10,0 ± 0,5 min	
	2b	17,6 ± 0,6 min	

3.4.2.5 Radio-HPLC-Methode 5 zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit von [¹²³I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (3b) sowie LC-MS-Methode zur Identifizierung von Nebenprodukten bei der Synthese von *N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (2a)

HPLC-Pumpen	Agilent 1100 Series		
UV-Detektor	Agilent 1100 DAD		
Szintillationsdetektor	Gabi, Raytest		
Autosampller	Agilent 1100 Series mit Säulenwahlventil		
Säulentemperatur	30 °C		
Software	Masslynx, Waters		
Massenspektrometer	Quattro Premier XE Micromass® MS Technologies, Waters		
Interface	ESI		
API Gas	Stickstoff N50		
Kollisionsgas	Argon 5.0		
Stationäre Phase	LiChrospher® RP18, 100 – 5, 250×4,6 mm (Merck, Darmstadt)		
Mobile Phase	A	0,025 M HFIP + 1 M TEA in Aqua bidest, pH 8,0	
	B	MeOH	
Gradientenprofil	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	70	30
	30	0	100
	35	0	100
Detektion	PDA		
Flussrate	1 ml/min		
Injektionsvolumen	max. 100 µl		

Retentionszeiten	3a, 3b	8,1 ± 0,3 min
	8	13,9 ± 0,1 min
	10	15,5 ± 0,2 min
	2a	18,4 ± 0,4 min
	9	19,1 ± 0,1 min
	11	20,1 ± 0,1 min

3.4.2.6 Radio-HPLC-Methode 6 zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit von [¹²³I]-N,N'-Dihydroxyiodpentamidin (2b)

HPLC-Pumpen	Agilent 1100 Series		
UV-Detektor	Agilent 1100 DAD		
Szintillationsdetektor	Gabi, Raytest		
Autosampler	Agilent 1100 Series mit Säulenwahlventil		
Säulentemperatur	30 °C		
Software	Masslynx, Waters		
Stationäre Phase	LiChrospher® RP18, 100 – 5, 250 × 4,6 mm (Merck, Darmstadt)		
Mobile Phase	A	0,01 M Ammoniumformiat in <i>Aqua bidest.</i>	
	B	MeOH	
Gradientenprofil	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	50	50
	25	0	100
	35	0	100
Detektion	PDA		
Flussrate	0,7 ml/min		
Injektionsvolumen	max. 100 µl		
Retentionszeit	2b	10,9 ± 0,6 min	

3.4.3 Bestimmung der radiochemischen Reinheit, der spezifischen Aktivität und der radiochemischen Ausbeute

Sowohl die Produktion als auch die Bestimmung der radiochemischen Reinheit radioaktiv markierter Produkte wurden mittels Radio-HPLC durchgeführt.

Die radiochemische Reinheit wird als Anteil des betreffenden Nuklids definiert, der in der gewünschten chemischen und entsprechenden molekularen Form vorliegt [Göber *et al.*, 2004]. Zur Bestimmung wurden einige Mikroliter der applikationsfertigen Tracerlösung entnommen und mit einer der unter 3.4.2 beschriebenen HPLC-Methoden untersucht. Anschließend wurden die Peakflächen der radioaktiven Verbindungen im Radio-HPLC Chromatogramm prozentual zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Die spezifische Aktivität gibt das Verhältnis der radioaktiven Verbindung zu der Gesamtmenge an nicht radioaktiver Verbindung an [Schirrmacher *et al.*, 2010]. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde die Aktivität des synthetisierten Radiotracers direkt nach der chromatographischen Aufreinigung im Aktivimeter bestimmt und auf die Menge eingesetzten Precursors bezogen. Die Angabe der spezifischen Aktivität erfolgt in MBq/ μmol .

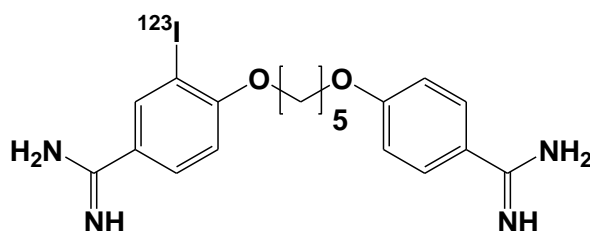
Zur Bestimmung der radiochemischen Ausbeute wurde die gemessene Aktivität des jeweiligen radioaktiven Produkts in der applikationsfertigen Lösung prozentual auf die Aktivität der Lösung direkt vor der chromatographischen Aufreinigung bezogen. Die radiochemischen Ausbeuten wurden nicht zerfallskorrigiert.

Die radionukleare Reinheit ist das in Prozent ausgedrückte Verhältnis der Radioaktivität des Radionuklids, bezogen auf die Gesamtradioaktivität des Tracers [Göber *et al.*, 2004]. Da die Radionuklidreinheit durch den Hersteller bestimmt wurde und der Zerfallsweg von ^{123}I bekannt ist, wurde keine erneute Bestimmung der radionuklearen Reinheit nach der Synthese vorgenommen.

3.4.4 Synthesen der radioaktiven Verbindungen

3.4.4.1 [^{123}I]-Iodpentamidin

[^{123}I]-1-(4-Amidino-2-iod)phenoxy-5-(4-amidino)phenoxyptentan (**1a**)



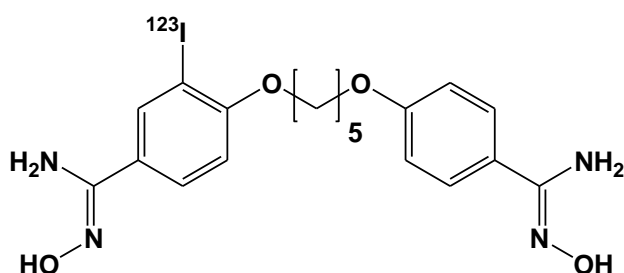
Die radioaktive Markierung von Iodpentamidin (**1a**) mit ^{123}I erfolgt in Anlehnung an bekannte Methoden [Blower *et al.*, 1992; Tešić *et al.*, 1992].

- 1) Zur Herstellung einer Stammlösung werden 4,25 mg (32,2 μmol) Ammoniumsulfat in 1,0 ml Eisessig gelöst und anschließend 1 : 10 mit Eisessig verdünnt.
- 2) Für die radioaktive Markierung werden 148 bzw. 185 MBq ^{123}I verwendet. Vor Entnahme des Isotops wird es im Liefergefäß eine Minute lang bei 60.000 rpm zentrifugiert.
- 3) 150 μg (0,3 μmol) Iodpentamidin (**1a**) werden in 50 μl Eisessig gelöst. Aus dieser Lösung werden 10 μl (64,4 nmol) entnommen und mit 20 μl (64,4 nmol) der 1 : 10 verdünnten Ammoniumsulfat-Stammlösung versetzt. Mit jeweils 10 μl dieser Lösung wird in drei Schritten das Radionuklid aus dem Liefergefäß entnommen und in ein Reaktionsgefäß aus Glas mit Rührfisch überführt, welches danach mit einem teflonbeschichteten Deckel verschlossen wird. Anschließend findet die Reaktion im Ölbad bei 180 °C für 15 Minuten statt. Nach dem Abkühlen wird die Reaktionslösung entnommen, das Reaktionsgefäß mit je 200 μl PBS und Ethanol gewaschen und alle Reaktions- und Waschlösungen vereinigt. Nach Bestimmung der Aktivität erfolgt die Aufreinigung mittels oben beschriebener Radio-HPLC-Methode (3.4.2.1). Die gesammelte Fraktion wird in einer 1 ml Plastikspritze aufgezogen und ihre Aktivität im Aktivimeter bestimmt. Mit einem Teil der Lösung wird die Kontrolle der radiochemischen Reinheit gemäß angegebener Radio-HPLC-Methode (3.4.2.2) durchgeführt.

Radiochemische Ausbeute:	19,8 – 57,5 %
Gesamtaktivität:	25,0 ± 9,3 MBq
Spezifische Aktivität:	215,6 – 665,6 MBq/μmol
Radiochemische Reinheit:	≥ 99 %

3.4.4.2 [¹²³I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin

[¹²³I]-1-[4-(*N'*-hydroxyamidino)-2-iod]-phenoxy-5-[4-(*N*-hydroxyamidino)]-phenoxy-pentan (2b)



Die radioaktive Markierung von *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) mit ¹²³I erfolgt in Anlehnung an eine Methode von Moerlein [Moerlein, 1990].

1) Es wird eine 0,1 molare Lösung von 10,0 mg (0,1 mmol) Kupfer(I)-chlorid in 1,0 ml DMSO hergestellt.

2) Zur radioaktiven Markierung werden 370 MBq ¹²³I verwendet. Vor Entnahme des Isotops wird es im Liefergefäß eine Minute lang bei 60.000 rpm zentrifugiert und das Volumen anschließend *ad* 120 μl mit wasserfreiem DMSO ergänzt.

3) 1 mg (2,0 μmol) *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) werden in 28 μl wasserfreiem DMSO gelöst. Dazu werden 2,0 μl (0,2 μmol) der frischen 0,1 molaren Kupfer(I)-chlorid Lösung und 40 μl Na¹²³I Lösung gegeben. Die Reaktion findet in einem Reaktionsgefäß aus Glas mit Rührfisch statt, welches mit einem teflonbeschichteten Deckel verschlossen wird. Die Radiomarkierung wird im Ölbad für 45 - 60 Minuten bei 140 °C durchgeführt. Nach dem Abkühlen wird die Reaktionslösung entnommen, das Reaktionsgefäß viermal mit je 100 μl Methanol/0,1 N Ammoniumacetat in Wasser (1/1) gewaschen und alle Reaktions- und Waschlösungen vereinigt. Nach Bestimmung der Aktivität im Aktivimeter erfolgt die erste Aufreinigung mittels oben beschriebener Radio-HPLC-Methode (3.4.2.2).

Die gesamte Prozedur wird insgesamt dreimal durchgeführt. Danach werden die gesammelten Fraktionen vereinigt und nach Bestimmung der Aktivität einer zweiten Aufreinigung mittels oben beschriebener Radio-HPLC-Methode unterworfen (3.4.2.3). Die gesammelte Fraktion wird in einer 1 ml Plastikspritze aufgezogen und die Aktivität im Aktivimeter bestimmt. Mit einem Teil der Lösung wird die Kontrolle der radiochemischen Reinheit gemäß einer der oben aufgeführten Radio-HPLC-Methoden (3.4.2.4 oder 3.4.2.6) durchgeführt.

Radiochemische Ausbeute: 10,7 – 28,4 %

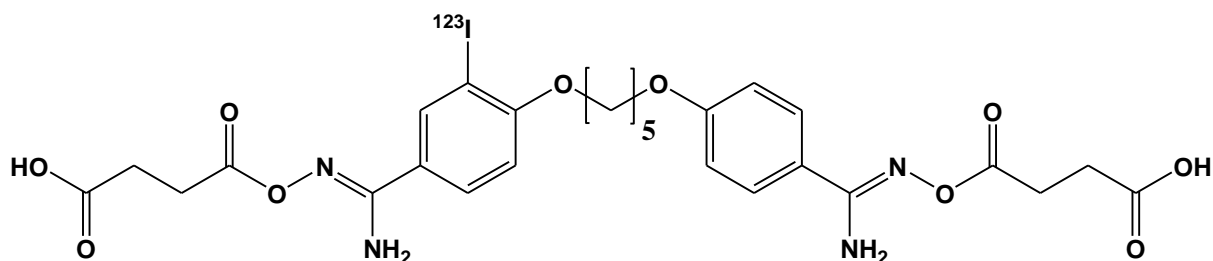
Gesamtaktivität: 19,6 ± 9,6 MBq

Spezifische Aktivität: 5,7 – 20,0 MBq/μmol

Radiochemische Reinheit: ≥ 99 %

3.4.4.3 [¹²³I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin

[¹²³I]-1-[2-Iod-4-(*N'*-succinyloxyamidino)]phenoxy-5-[4-(*N*-succinyloxyamidino)]-phenoxyptan (3b)



1) Es werden eine 0,1 molare Lösung von 10,0 mg (0,1 mmol) Kupfer(I)-chlorid in 1,0 ml DMSO und eine 0,16 molare Lösung von 2,4 mg (24 μmol) Bernsteinsäureanhydrid in 150 μl wasserfreiem Dichlormethan hergestellt.

2) Zur radioaktiven Markierung werden 148 MBq ¹²³I verwendet. Vor Entnahme des Isotops wird es im Liefergefäß eine Minute lang bei 60.000 rpm zentrifugiert und das Volumen anschließend *ad* 120 μl mit wasserfreiem DMSO ergänzt.

3) 500 μg (1,0 μmol) *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) werden in 29 μl wasserfreiem DMSO gelöst. Dazu werden 1,0 μl (0,1 μmol) der frischen 0,1 molaren Kupfer(I)-chlorid Lösung und 40 μl Na¹²³I Lösung gegeben. Die Reaktion findet in einem Reaktionsgefäß aus Glas mit Rührfisch statt, welches mit einem teflonbeschichteten Deckel verschlossen wird. Die

Radiomarkierung wird im Ölbad bei 140 °C für 15 Minuten durchgeführt. Nach dem Abkühlen werden 25 µl (4,0 µmol) der Bernsteinsäureanhydridlösung zur Reaktionslösung gegeben und für 5 Minuten bei 65 °C gerührt. Die gesamte Prozedur wird insgesamt dreimal durchgeführt. Danach werden die Reaktionslösungen entnommen, die Reaktionsgefäße mit je 70 µl PBS gewaschen und alle Reaktions- und Waschlösungen vereinigt. Nach Bestimmung der Aktivität erfolgt die Aufreinigung mittels oben beschriebener Radio-HPLC-Methode (3.4.2.4). Die gesammelte Fraktion wird in einer 1 ml Plastikspritze aufgezogen und die Aktivität im Aktivimeter bestimmt. Mit einem Teil der Lösung wird die Kontrolle der radiochemischen Reinheit gemäß einer der oben aufgeführten Radio-HPLC-Methoden (3.4.2.2 oder 3.4.2.5) durchgeführt.

Radiochemische Ausbeute:	3,6 – 12,6 %
Gesamtaktivität:	7,4 ± 2,7 MBq
Spezifische Aktivität:	1,1 – 4,0 MBq/µmol
Radiochemische Reinheit:	≥ 95 %

4 SPECT-Imaging Studien

4.1 Einleitung

Die Suche nach oral verfügbaren Arzneistoffen zur effektiven Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit führte wie in Kapitel 1 beschrieben zur Entwicklung von Pentamidin-Prodrugs. In vorangegangenen Untersuchungen kristallisierte sich aus der Vielzahl der entwickelten Prodrugs das an beiden Amidinfunktionen *N*-hydroxylierte und mit Bernsteinsäure veresterte Pentamidin (**1**) (*N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (**3**)) als am besten geeignetes Prodrug hinsichtlich Löslichkeit, Aktivierung und oraler Bioverfügbarkeit heraus [Kotthaus *et al.*, 2011; Schwering, 2010]. Aus diesem Grund bestand das Ziel dieser Studie, eine vergleichende Untersuchung hinsichtlich Distribution, oraler Bioverfügbarkeit und Blut-Hirn Schranken-Gängigkeit der [¹²³I]-markierten Verbindungen von Pentamidin (**1**), dem Metaboliten und Prodrug *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**) und dem Ester-Prodrug *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (**3**) mittels *in vivo* SPECT-Imaging in Ratten durchzuführen. In Abbildung 4-1 sind die Strukturformeln der untersuchten Verbindungen und die vereinfachte metabolische Aktivierung der Prodrugs zur Wirkform Pentamidin (**1**) dargestellt.

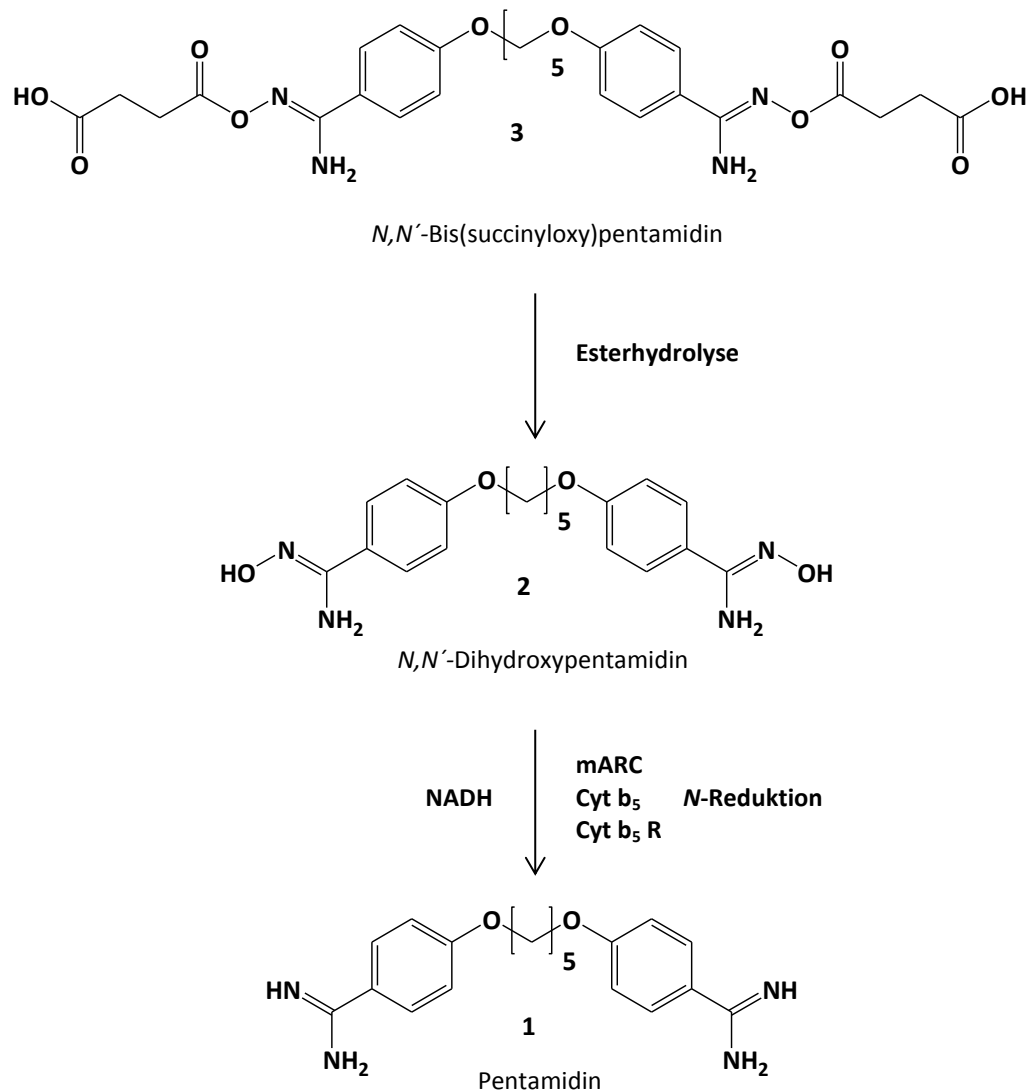


Abbildung 4-1: Vereinfachter Metabolismus der Pentamidin-Prodrugs [Kotthaus *et al.*, 2011]

4.2 SPECT-Imaging

Die SPECT-Technik gehört zu den bildgebenden Verfahren, die dem *Molecular Imaging* (MI) zugeordnet werden. Eine Definition des MI wurde 2005 auf einem Treffen der RSNA (*Radiological Society of North America*) mit der SNM (*Society of Nuclear Medicine*) entworfen, die übersetzt lautet: „MI-Techniken beobachten und zeichnen direkt oder indirekt die räumliche und zeitliche Verteilung von molekularen oder zellulären Prozessen für biochemische, biologische, diagnostische oder therapeutische Anwendungen auf“ [Thakur, 2006]. Zu den wichtigsten MI-Techniken gehören Magnetresonanztomographie (MRT), die zum *Optical-Imaging* (OI) gehörenden Methoden Biolumineszenz-Imaging (BLI)

und Fluoreszenz-Imaging (FI), Ultraschall-Imaging (UI), Positronenemissionstomographie (PET) und Einzelphotonen Emissions Computertomographie (SPECT) [Vallabhajosula, 2009].

Das Prinzip des SPECT-Imagings beruht darauf, dass eine mit einem γ -Strahler radioaktiv markierte Verbindung in ein lebendes Objekt eingebracht wird und sich den Tracereigenschaften entsprechend in diesem verteilt. Die vom Radionuklid emittierten Photonen werden nach Verlassen des Körpers von einem oder mehreren um den Körper rotierenden Detektorköpfen, der Gamma-Kamera, erfasst und somit ein ortsabhängiges Signal generiert. Aus den so erhaltenen Daten wird durch Verwendung von Rekonstruktionsalgorithmen ein dreidimensionales Bild, welches aus zweidimensionalen Schichtbildern zusammengesetzt ist, rekonstruiert. Diese Bildakquisition wird als statische Aufnahme bezeichnet. Es gibt auch die Möglichkeit der zweidimensionalen, dynamischen Akquisition, bei der die Tracerdistribution bei fester Detektorstellung über die Zeit beobachtet werden kann. Eine dynamische Akquisition ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn der Tracer sich so verteilt, dass die Strahlung aus verschiedenen Zielorganen sich nicht überlagert. Vor den Detektor, der i. d. R. aus einem Szintillationskristall und einem Photomultiplier besteht, muss ein sog. Kollimator gesetzt werden. Ein Kollimator besteht aus hochabschirmenden Materialien wie beispielsweise Blei und Wolfram, in die kleine Löcher eingelassen sind. Seitwärts einfallende Photonen werden vom Kollimator absorbiert, und nur senkrecht einfallende Photonen gelangen zum Szintillationskristall. Die Dicke des Kollimators und die Anzahl der Löcher bestimmen die Sensitivität und Auflösung der Gamma-Kamera, sodass für verschiedene Radionuklide je nach γ -Energie unterschiedliche Kollimatoren geeignet sind. Da bei Parallellloch-Kollimatoren die räumliche Auflösung mit zunehmender Entfernung vom Objekt rapide abnimmt, verwendet man zur Abbildung kleiner Objekte wie beispielsweise Ratten Pinhole-Kollimatoren, die wie eine Lochblende funktionieren und eine vergrößerte Abbildung kleiner Objekte und somit eine erheblich verbesserte Ortsauflösung ermöglichen [Vallabhajosula, 2009].

SPECT-Imaging hat den großen Vorteil, dass nur sehr kleine Tracermengen im pico – nanomolaren Bereich eingesetzt werden müssen. Weil biologische Prozesse im Körper dadurch nicht beeinflusst werden, wird SPECT-Imaging zu den nicht invasiven Verfahren gezählt. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, die *in vivo* Tracerverteilung zeitaufgelöst und semiquantitativ zu verfolgen, obgleich eine absolute Quantifizierung mit einigen Schwierigkeiten durchaus möglich ist. Für die Quantifizierung der hier durchgeführten

Studien stellte insbesondere die Schwächungskorrektur der untersuchten Ratten eine Herausforderung dar. Da lediglich ein einfaches Zylinderphantom zur Kalibrierung zur Verfügung stand, gab es je nach Lage des Organs gewisse Abweichungen zwischen tatsächlicher Aktivität und aus den SPECT-Aufnahmen errechneter Aktivität, denn die Schwächung der γ -Strahlung ist durch unterschiedliche Gewebestrukturen im Körper uneinheitlich [Vallabhajosula, 2009]. Eine Möglichkeit der Schwächungskorrektur beim SPECT-Imaging ist die Kalibrierung der letzten SPECT-Aufnahme mittels der aus den Bohrlochmessungen für jedes Organ bestimmten Aktivitäten. Somit hätte man für jedes Organ einen von der Gewebeabschirmung unabhängigen Kalibrierfaktor. Nachteilig ist bei dieser Methode allerdings, dass es sich hierbei nur um eine Ein-Punkt Kalibrierung handelt. Aus diesem Grunde wurde die Kalibrierung in den hier durchgeführten Studien mittels Zylinderphantom durchgeführt und ein Vergleich der gemessenen Biodistributionsdaten mit den aus der letzten SPECT-Aufnahme berechneten Daten als Validierungsmaßnahme vorgenommen. Die Quantifizierungsmethoden werden in Kapitel 4.2 näher beschrieben. Da die SPECT-Aufnahmen nur die Verteilung der Radioaktivität im Körper widerspiegeln, ist für eine eindeutige Lokalisation die zusätzliche Abbildung des anatomischen Hintergrunds notwendig. Zu diesem Zweck muss eine CT- oder MRT-Aufnahme des jeweiligen Versuchstiers gemacht und anschließend mit der SPECT-Aufnahme fusioniert werden. Die modernsten Geräte sind SPECT/CT- bzw. SPECT/MR-Fusionsgeräte, mit dem beide Aufnahmen möglich sind, ohne dass das Versuchstier zu einem anderen Gerät transportiert werden muss und dadurch seine Position verändert.

4.3 Design und Ablauf einer Studie

Die *in vivo* Untersuchungen wurden mit männlichen Sprague Dawley Ratten durchgeführt, die ein Körpergewicht von ca. 350 g hatten. Insgesamt wurden 51 Ratten untersucht, von denen 48 in acht Gruppen zu je sechs Ratten aufgeteilt wurden. Es wurden drei Studien nach intravenöser Applikation der drei [^{123}I]-markierten Pentamidin-Verbindungen (**1b**, **2b**, **3b**), drei Studien nach oraler Applikation von **1b**, **2b** und **3b** und zwei Studien mit zusätzlicher oraler Applikation der nicht radioaktiven Verbindungen **1a** und **3a** durchgeführt (Tab. 4-1). Außerdem wurde zwei Ratten intravenös und einer Ratte oral [^{123}I]-NaI-Lösung zur Kontrolle appliziert.

Tabelle 4-1: Einteilung der Studiengruppen und applizierte Substanzen

Studiengruppe	Substanz	Applikation
A	[¹²³ I]-Iodpentamidin (1b)	intravenös
B	[¹²³ I]- <i>N,N'</i> -Dihydroxyiodpentamidin (2b)	intravenös
C	[¹²³ I]- <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)iodpentamidin (3b)	intravenös
D	[¹²³ I]-Iodpentamidin (1b)	peroral
E	[¹²³ I]- <i>N,N'</i> -Dihydroxyiodpentamidin (2b)	peroral
F	[¹²³ I]- <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)iodpentamidin (3b)	peroral
G	[¹²³ I]- <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)iodpentamidin (3b) + 30,0 mg/kg <i>N,N'</i> -Bis(succinyloxy)iodpentamidin (3a)	peroral
H	[¹²³ I]-Iodpentamidin (1b) + 17,2 mg/kg Iodpentamidin (1a)	peroral

Die Dosierungen der nicht radioaktiven Substanzen **1a** und **3a** richteten sich nach Dosierungen in vorangegangenen Arbeiten mit den nicht iodierten Verbindungen Pentamidin (**1**) und *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (**3**) [Kotthaus *et al.*, 2011]. Die gewählte Dosierung in der genannten Studie lag bei 50 mg/kg KG an **1** und **3**, wobei die Dosierung von **1** auf das Diisethionat-Salz berechnet wurde. Der Anteil an freier Base Pentamidin (**1**) betrug somit 28,7 mg/kg KG. Da die Dosierung in dieser Studie auf 30 mg/kg KG gesenkt werden sollte, ergab sich nach analoger Umrechnung eine Dosis von 17,2 mg/kg KG für die freie Base Iodpentamidin (**1a**) bzw. 19,9 mg/kg KG für das Dihydrochlorid-Salz von **1a**. Bei den Studien A – F wurden außer den für den Isotopenaustausch benötigten Mengen von **1a** und **2a** keine nicht radioaktiven Pentamidin-Verbindungen zugesetzt. Die noch vorhandenen Restmengen an nicht radioaktiver Substanz (**1a**, **2a** und **3a**) aus der Isotopenaustauschreaktion lassen sich aus den in Kapitel 3.4 dargestellten spezifischen Aktivitäten ableiten.

Zu Beginn eines Studientages stand zuerst die Synthese des Radiotracers an. Sobald der Tracer als applikationsfertige Lösung vorlag, wurde er gemäß Protokoll (4.4.3.3) appliziert und der exakte Zeitpunkt zwecks Zerfallskorrektur festgehalten. Nach intraperitonealer Narkotisierung der zu untersuchenden Ratte wurden zu drei Zeitpunkten über 24 Stunden SPECT-Aufnahmen gemacht (4.4.3.4) und Blutproben entnommen (4.4.3.5). Zur Abbildung

des anatomischen Hintergrunds der Ratte wurde zusätzlich eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt (4.4.1). Im Anschluss an die letzte SPECT-Aufnahme wurde die Ratte getötet und ihre Organe zur Bestimmung der Radioaktivität im Bohrlochmessgerät entnommen (4.4.3.6). Die erhaltenen SPECT-Daten wurden rekonstruiert und anschließend quantitativ ausgewertet (4.4.4.1). Als Validierungsmaßnahme wurden die aus den Bohrlochmessungen erhaltenen Daten mit denen der letzten SPECT-Aufnahme abgeglichen (4.4.4.2). Die Daten aus den Studien A – C (iv) und den Studien D – H (peroral) wurden untereinander verglichen sowie die relativen Bioverfügbarkeiten von D – H im Vergleich zu A berechnet (4.5).

4.4 Material und Methoden

4.4.1 Geräte und Materialien

Materialien und Arzneimittel

Heparin-Na (25000 I.E./5 ml Injektionslösung) wurde von der Firma B. Braun, Melsungen, Deutschland, PBS von Invitrogen/Gibco, Darmstadt, Deutschland und Omeprazol (Antra® pro infusione) von AstraZeneca, Wedel, Deutschland bezogen. Die Röhrengefäße zur Vermessung der Blut- und Organproben wurden von der Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland bezogen. Die 1 ml Plastikspritzen zur Blutentnahme und Applikation der Tracer wurden von der Firma BD-Medical, Heidelberg, Deutschland bezogen.

Gamma-Kamera und Imaging-Software

Die SPECT-Aufnahmen wurden mit einer Siemens E.CAM-180 mit zwei Detektorköpfen und pyramidalen Detektoraufsätzen, die aus verformungsstabilem Spezialblei (Pb und Sb) gefertigt wurden, durchgeführt. Als Kollimatoren wurden Multipinhole-Kollimatoren aus einer hochabschirmenden Wolframlegierung (97% W + 1,5% Ni + 1,5% Fe) von 10 mm Dicke verwendet. Die Pinholes besaßen die Form eines Doppelkegels, der axial und transaxial gekippt in das Material gefertigt worden war. Jeder Kollimator hatte 10 Pinholes mit einem Durchmesser von je 3,0 mm. Die Auflösung betrug 2,7 mm. Bei jeder Aufnahme wurden pro Detektorkopf 15 Projektionen bei 360° Rotation gemessen. Je nach Aktivität betrug die

Aufnahmedauer pro Winkelschritt zwischen 60 und 400 Sekunden mit automatischer Zerfallskorrektur. Die Bildverarbeitung erfolgte mittels SciVis HISPECT Rekonstruktionssoftware (SciVis wissenschaftliche Bildverarbeitung GmbH, Göttingen, Deutschland). Als Rekonstruktionsalgorithmus wurde eine dedizierte iterative tomographische Multi-Pinhole SPECT Rekonstruktion (OSEM) mit neun Iterationen angewendet. Die Auswertung der rekonstruierten Bilder erfolgte mittels PMOD-Software Version 3.3 (PMOD Technologies Ltd., Zürich, Schweiz).

Bohrlochmessgerät

Die Aktivitätsmessungen der Organe und Blutproben erfolgten mit dem Berthold-Bohrlochmessgerät Multi Logger LB 5310 der Firma Berthold, Bad Wildbad, Deutschland. Vor jeder Messreihe wurde das Gerät mit einem ^{137}Cs -Prüfstrahler (Aktivität = 37 kBq, 1.10.1998) der Firma Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland kalibriert.

MRT

Die MRT-Aufnahmen erfolgten in der Klinik für Innere Medizin I des UKSH in Kiel mit einem 1,5 T Gerät (Avanto, Siemens) als T2-gewichtete Turbo-Spin-Echo-Sequenz.

4.4.2 Kalibrierungen

4.4.2.1 Aktivimeter

Die Kalibrierung des Aktivimeters wurde vom Hersteller vorgenommen und im Rahmen der routinemäßigen Qualitätskontrolle in der Nuklearmedizin regelmäßig überprüft, so dass der statistische Messfehler < 5% betrug. Durch Bestimmung der Aktivität einer [^{123}I]-NaI-Lösung wurde eine Crosskalibrierung zwischen Aktivimeter, Bohrlochmessgerät und Gamma-Kamera durchgeführt (s. 4.4.2.2 und 4.4.2.3).

4.4.2.2 Gamma-Kamera

Um einen Zusammenhang zwischen den als Detektorsignal ausgegebenen *counts* und der Aktivität in Abhängigkeit von der Aufnahmedauer herzustellen, wurden zur Kalibrierung der Gamma-Kamera Phantommessungen mit einem Zylinderphantom aus Plexiglas

durchgeführt. Das Volumen des Zylinderphantoms betrug 66 ml und der Umfang entsprach in etwa der Größe einer kleinen Ratte.

Zur Absättigung der Wandabsorption wurde das Phantom zunächst komplett mit einer wässrigen NaI-Lösung (1,5 mg/ml) gefüllt. Anschließend wurden 2 ml Flüssigkeit entnommen und das Volumen mit einer radioaktiven [^{123}I]-NaI-Lösung, deren Aktivität zuvor in einer aufgezogenen Plastikspritze im Aktivimeter exakt bestimmt worden war, ergänzt. Somit konnte nach Rückmessung der entleerten Spritze die exakte Aktivität im Phantom zu einem bestimmten Zeitpunkt ermittelt werden. Nach 10-minütiger Durchmischung der Lösung auf einer Schüttelapparatur wurden die SPECT-Phantommessungen über mehrere Tage hinweg durchgeführt, um einen möglichst großen Kalibrierbereich in Abhängigkeit von der Aktivität zu erhalten. Dabei wurden Aufnahmezeiten zwischen 80 und 320 Sekunden pro Winkelschritt bei 15 Winkelschritten und 360° Rotation pro Aufnahme gewählt.

4.4.2.3 Bohrlochmessgerät

Um einen Zusammenhang zwischen den als Detektorsignal ausgegebenen *counts per minute* (cpm) und der Aktivität im Bohrloch vermessener Proben herzustellen, wurden zur Kalibrierung des Bohrlochmessgerätes Messungen mit einer [^{123}I]-NaI-Kalibrierlösung durchgeführt.

Ein 100 ml Messkolben wurde zur Absättigung der Wandabsorption mit einer wässrigen NaI-Lösung (1,5 mg/ml) vollständig gefüllt. Anschließend wurde das Volumen mit einer radioaktiven [^{123}I]-NaI-Lösung, deren Aktivität in einer aufgezogenen Plastikspritze zuvor im Aktivimeter exakt bestimmt worden war, *ad* 100 ml ergänzt. Somit konnte nach Rückmessung der entleerten Spritze die exakte Aktivität im Messkolben zu einem bestimmten Zeitpunkt ermittelt werden. Nach 45 minütiger Durchmischung der Lösung auf einer Schüttelapparatur wurden 100 μl , 500 μl , 1 ml, 2 ml und 5,5 ml je dreimal entnommen, in die Röhrengefäße, die für die Blut- und Organmessungen verwendet wurden, pipettiert und über mehrere Tage hinweg jeweils fünfmal vermessen. Durch die unterschiedlichen Füllstände der Röhren wurden die unterschiedlichen Organgrößen repräsentiert. Die Messzeit im Bohrlochdetektor wurde so eingestellt, dass der statistische Messfehler < 1% betrug.

4.4.3 *In vivo* Untersuchungen

4.4.3.1 Genehmigung und Haltung der Ratten

Die Genehmigung zur Durchführung der Tierversuche wurde am 16.12.2009 durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein erteilt und durch Anzeigen und Anträge vom 5.12.2011, 12.03.2012 und 8.8.2012 erweitert. Die Tierversuche wurden in der Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH) am Campus Kiel durchgeführt. Als Versuchstiere dienten ausschließlich männliche Sprague Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 350 g bei Versuchsbeginn, die von der Firma Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland, in etwa eine Woche vor Versuchsbeginn bezogen wurden.

Die Tiere wurden in der Zentralen Tierhaltung des UKSH in Kiel in Käfigen gehalten und waren einem 12 Stunden hell/dunkel-Zyklus ausgesetzt. Die Ratten erhielten bis zum Tod Standardfutterpellets und Wasser *ad libitum*. Nach der Katheterimplantation (s. 4.2.3.2) wurden die Ratten in Einzelkäfigen gehalten. An den beiden Versuchstagen mussten die Tiere nach Gabe des Tracers aus Strahlenschutzgründen auch über Nacht in der Klinik für Nuklearmedizin bleiben. Da der Zeitraum allerdings kleiner als 48 Stunden war, lag keine Bedingung für eine Haltungsgenehmigung vor. Im Anschluss an die letzte SPECT-Untersuchung wurden die Tiere getötet und die Organe zur weiteren Untersuchung entnommen. Die radioaktiven Überreste wurden bis zum Abklingen der Radioaktivität (mindestens 10 Halbwertszeiten) eingefroren und anschließend fachgerecht entsorgt.

4.4.3.2 Operation der Ratten

Zwei Tage vor Versuchsbeginn wurden den Versuchstieren Katheter implantiert. Die Operation erfolgte in den Räumen der Zentralen Tierhaltung des UKSH in Kiel und wurde durch einen Veterinärmediziner durchgeführt. Je nach Applikationsart wurden ein oder zwei Katheter gelegt, und zwar ein arterieller zur Entnahme von Blutproben und ggf. ein intravenöser zur Tracerapplikation bzw. Applikation von Omeprazol (s. 4.4.3.3). Die Implantation der Katheter erfolgte jeweils in die *Arteria* und *Vena femoralis* wie folgt beschrieben:

Unter Narkose mit Ketamin (100 mg/kg KG) und Xylazin (12 mg/kg KG) wurde die Leistenbeuge eröffnet, um die *Arteria* und *Vena femoralis* frei zu legen. Nach Einführung

eines dünnen Polypropylenschlauches in das entsprechende Blutgefäß wurde dieser subkutan zum Nacken des Tieres geführt und dort fixiert. Die etwa drei Zentimeter aus dem Fell ragenden Katheter waren bis zum Versuch verschlossen. Nach einer Erholungsphase von ein bis zwei Tagen wurde mit den Versuchen begonnen.

4.4.3.3 Applikation der Substanzen

Die Substanzapplikation erfolgte entweder intravenös über den venösen Verweilkatheter oder peroral durch Gavagierung, wobei die intravenöse Gabe bei der bereits narkotisierten Ratte erfolgte (s. 4.4.3.4). Es wurde angestrebt, ca. 10 MBq Tracerlösung pro Ratte zu applizieren, so dass je nach radiochemischer Ausbeute zwischen 0,5 und 1 ml Flüssigkeit in eine Ratte eingebracht wurden. Die Zusammensetzung der Tracerlösung hing je nach Substanz von der vorherigen Aufreinigung und Retentionszeit sowie der Aktivitätskonzentration ab. Bei der radioaktiven Synthese von [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**) (A, D, H) und [^{123}I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) (B, E) waren die erhaltenen Aktivitäten nach der Aufreinigung i. d. R. so hoch, dass sie aliquotiert und mit PBS verdünnt werden konnten, wohingegen [^{123}I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**) (C, F, G) nach Aufreinigung immer direkt als applikationsfertige Lösung vorlag. Die Tracerlösung setzte sich in etwa aus 60% PBS (pH 7,0 - 7,2) und 40% EtOH abs. zusammen. Für die Studien G und H wurden die zusätzlichen Mengen an nicht radioaktiver Substanz in 1 ml der entsprechenden radioaktiven Tracerlösung unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbads suspendiert.

Zur Ermittlung der applizierten Aktivität wurde die Tracerlösung in eine 1 ml Plastikspritze aufgezogen und im Aktivimeter vermessen. Nach der Applikation wurde die leere Spritze und bei oraler Gabe auch die Gavage-Nadel im Aktivimeter zurückgemessen und die exakt applizierte Aktivität durch Differenzbildung unter Berücksichtigung der Halbwertszeit errechnet. Zur späteren Berechnung der Zerfallskorrektur wurde der exakte Zeitpunkt der Tracerapplikation festgehalten.

Bei vier von sechs Ratten der Gruppe F wurde ca. 45 Minuten vor der oralen Applikation von [^{123}I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**) zur Anhebung des Magen pH-Wertes eine Dosis von 3 mg/kg KG Omeprazol (Antra[®] pro infusione) in isotonischer Kochsalzlösung intravenös injiziert [Kwon *et al.*, 2001], um die saure Esterhydrolyse zu verlangsamen.

Die Applikation der Substanzen sowie die SPECT-Untersuchungen erfolgten in der Klinik für Nuklearmedizin unter Einhaltung aller Strahlenschutzmaßnahmen.

4.4.3.4 Durchführung der SPECT-Untersuchungen

Zur Immobilisierung der Ratten während der SPECT-Untersuchung, wurden sie vor jeder Untersuchung mit 100 mg/kg KG Ketamin und 2 mg/kg KG Midazolam narkotisiert. Bei intravenöser Tracerapplikation erfolgte die Narkose bereits vor der Injektion, bei oraler Tracerapplikation erst nachher. Die Dauer einer SPECT-Aufnahme variierte je nach Höhe der applizierten Aktivität und Zeitpunkt: Die erste Aufnahme wurde i. d. R. nach 30 Minuten durchgeführt und dauerte meist zwischen 20 und 30 Minuten, die zweite Aufnahme wurde nach ca. 4 Stunden durchgeführt und dauerte in den meisten Fällen 45 Minuten, die dritte Aufnahme wurde nach ca. 24 Stunden durchgeführt und dauerte in den meisten Fällen 80 Minuten. Die technischen Gegebenheiten der SPECT-Aufnahmen sind in Kapitel 4.4.1 beschrieben. Nach jeder Aufnahme wurde die untersuchte Ratte wieder in ihren Käfig gesetzt.

4.4.3.5 Entnahme und Vermessung der Blutproben

Die Entnahme der Blutproben erfolgte nach intravenöser Applikation bei 0, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 30, 60, 120, 240 und 1440 Minuten über den arteriellen Verweilkatheter. Nach oraler Applikation fanden die Probennahmen bei 0, 30, 60, 120, 240 und 1440 Minuten statt. Je Probe wurden 200 µl Blut entnommen und mit 5 µl Heparin (5000 I.E./ml) versetzt. Anschließend wurden aus jeder Probe 100 µl entnommen, in ein Röhrengefäß überführt und die Aktivität mittels Bohrlochmessung bestimmt. Im Anschluss an jede Blutentnahme wurde das Entnahmevolumen durch die Gabe von heparinierter physiologischer Kochsalzlösung (25 I.E./ml) kompensiert.

4.4.3.6 Entnahme und Vermessung der Organproben

Nach der letzten SPECT-Untersuchung wurden die Versuchstiere durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis Chloralhydrat getötet. Um die Organe vollständig zu entbluten, wurden die Ratten nach der Injektion von Chloralhydrat durch Herzpunktion perfundiert und anschließend die folgenden Organe zur weiteren Untersuchung entnommen: Leber, Nieren, Milz, Herz, Lunge, Gehirn und Schilddrüse. Die Organe wurden in zuvor gewogene Röhrengefäße (13 ml Fassungsvermögen) überführt, und nach Bestimmung des Gewichts durch Differenzwägung im Bohrloch vermessen. Der exakte Zeitpunkt der Messung wurde zwecks Zerfallskorrektur festgehalten.

4.4.4 Verfahren zur Auswertung und Quantifizierung

4.4.4.1 Auswertung und Quantifizierung der rekonstruierten Bilder

Die Auswertung der rekonstruierten Bilder aus den SPECT-Aufnahmen erfolgte mithilfe der PMOD-Software Version 3.3. Nach Fusion der SPECT-Aufnahme mit einer MRT-Aufnahme wurden schichtenweise sogenannte *Regions of Interest* (ROIs), die zusammengesetzt ein *Volume of Interest* (VOI) bilden, über folgende Organe gelegt: Leber, Nieren, Milz, Herz, Lunge, Gehirn und Schilddrüse. Die Summe der *counts* innerhalb einer VOI wurde vom Zeitpunkt des jeweiligen Aufnahmebeginns auf den Zeitpunkt der Applikation gemäß Gleichung 4-1 zerfallskorrigiert. Die Einstellungen der Bildtiefe haben grundsätzlich keinen Einfluss auf Anzahl der *counts* innerhalb einer VOI, sondern dienen lediglich der optischen Bilddarstellung (s. Abb. 4-6, 4-7, 4-8, 4-20 und 4-36). Während der Dauer einer SPECT-Aufnahme fand eine automatische Zerfallskorrektur durch die Aufnahmesoftware auf den Zeitpunkt des Aufnahmebeginns statt.

$$A_0 = A(t) \times e^{\frac{\ln 2 t}{T_{1/2}}}$$

Gleichung 4-1: Zerfallskorrektur der Aktivität auf den Zeitpunkt der Applikation, A_0 = Ausgangsaktivität zum Zeitpunkt $t = 0$, $A(t)$ = Aktivität zum Zeitpunkt t , t = Zeitdauer in h, $T_{1/2}$ = physikalische Halbwertszeit [Göber *et al.*, 2004]

Da die Dauer einer SPECT-Aufnahme von der vorhandenen Aktivität zum jeweiligen Zeitpunkt abhing und damit differierte, wurden die Daten auf die Einheit cpm umgerechnet. Um individuelle Unterschiede in den Organgrößen zu eliminieren, wurden die Daten auf das zuvor bestimmte Organgewicht in Gramm (g) bezogen. Die Umrechnung der so erhaltenen Einheit cpm/g in kBq/g erfolgte über den aus den Phantommessungen ermittelten Kalibrierfaktor. Abschließend wurden die Daten in die allgemein gebräuchliche Einheit %/g umgerechnet (Gleichung 4-2). Die Einheit bezieht sich auf den prozentualen Anteil der applizierten Dosis (oft als $ID = \text{Injected Dose}$ abgekürzt), der sich in 1 g des entsprechenden Organgewebes befindet [Vallabhajosula, 2009].

$$\% ID/g = \frac{\text{Aktivität in 1 g Gewebe (kBq/g)}}{\text{applizierte Dosis (kBq)}} \times 100\%$$

Gleichung 4-2: Berechnung von % ID/g (modifiziert nach Vallabhajosula [2009])

Zur Veranschaulichung ist im Folgenden beispielhaft die Berechnung des Leberwertes 4 h nach oraler Applikation von [¹²³I]-N,N'-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) in Ratte 3 (Studie E) aufgeführt.

Beispielrechnung:

Organgewicht_(Leber): 10,68 g

VOI_(Leber) (t = 4 h): 561.989 counts

SPECT-Aufnahmedauer: 160 s pro Projektion in 15 Winkelschritten = 40 min

Applizierte Aktivität: 10,28 MBq

Kalibrierfaktor aus Phantommessung: 30.386,25 cpm/MBq

T_{1/2} (¹²³I): 13,2 h

$$A_0 = 561.989 \text{ counts} \times e^{\frac{\ln 2 \cdot 4 \text{ h}}{13,2 \text{ h}}} = 693.345 \text{ counts}$$

$$A_0(\text{cpm/g}) = \frac{693.345 \text{ counts}}{40 \text{ min} \times 10,68 \text{ g}} = 1623 \text{ cpm/g}$$

$$A_0(\text{kBq/g}) = \frac{1623 \text{ cpm/g}}{30.386,25 \text{ cpm/MBq}} \times 1000 = 53,41 \text{ kBq/g}$$

$$\% ID/g = \frac{53,41 \text{ kBq/g}}{10,28 \text{ MBq} \times 1000} \times 100\% = \underline{\underline{0,52\%/g}}$$

Die so für jede SPECT-Aufnahme berechneten Konzentrationen können als Zeit-Aktivitätskurve für jede Ratte dargestellt werden. Die Zeit-Aktivitätsverläufe über 24 Stunden geben Aufschluss über die Akkumulation und den Abbau der Substanzen in den verschiedenen Organen. Durch numerische Integration wurde mithilfe der linearen Trapezregel die *area under the curve* (AUC) als Maß für die Organbioverfügbarkeit berechnet

[Langner *et al.*, 2011]. Die Berechnung der Organ-AUC erfolgte nach Gleichung 4-3 über den Zeitraum der ersten bis zur letzten SPECT-Aufnahme. Zur Angabe der relativen Bioverfügbarkeit (rBV) wurden die Organ-AUCs von intravenös appliziertem [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**) (Studie A) gleich 100 % gesetzt und die AUCs, die nach oraler Applikation erhalten wurden, darauf bezogen (Gleichung 4-4) [Kotthaus *et al.*, 2011].

$$AUC(t_1 - t_n) = \frac{1}{2} \sum_{i=2}^n (C_{i-1} + C_i) \times (t_i - t_{i-1})$$

Gleichung 4-3: Berechnung der Organ-AUC mittels linearer Trapezregel (modifiziert nach Langner *et al.* [2011]), t = Zeitpunkt der SPECT-Aufnahme mit n = 3, C = % ID/g

$$F_{rel}(\%) = \frac{AUC_X}{AUC_A} \times 100\%$$

Gleichung 4-4: Berechnung der relativen Bioverfügbarkeit (modifiziert nach Derendorf *et al.* [2011]), AUC_A = AUCs aus Studie A (in %/g×h), AUC_X = AUCs aus den Studien D - H (in %/g×h)

4.4.4.2 Auswertung der im Bohrloch gemessenen Organe (Biodistribution)

Die Daten der Organmessungen im Bohrlochmessgerät werden auch als Biodistributionsdaten bezeichnet [Vallabhajosula, 2009]. Nach Vermessung der Organe wurde eine Zerfallskorrektur vom Zeitpunkt der Vermessung auf den Zeitpunkt der Applikation vorgenommen (Gleichung 4-1), wobei die zuvor gemessene Hintergrundstrahlung vom Messwert subtrahiert wurde. Wie unter 4.4.4.1 beschrieben, wurden die Daten mithilfe des ermittelten Bohrloch-Kalibrierfaktors auf die Einheit %/g umgerechnet (Gleichung 4-2).

Die Darstellung der Biodistributionsdaten erfolgt einerseits vergleichend zum Zeitpunkt t = 24 – 26 h und andererseits als Angabe der rBV. Die rBV bezieht sich in diesem Fall nur auf einen Zeitpunkt und wurde nach Gleichung 4-4 berechnet, wobei statt den AUCs die Organkonzentrationen in %/g nach 24 – 26 h eingesetzt wurden. Des Weiteren dienen die Daten als eine Art Validierung der SPECT-Daten durch Vergleich der letzten SPECT-Aufnahme mit den Biodistributionsdaten. In Abbildung 4-2 ist eine schematische Zusammenfassung zur Datenberechnung gegeben.

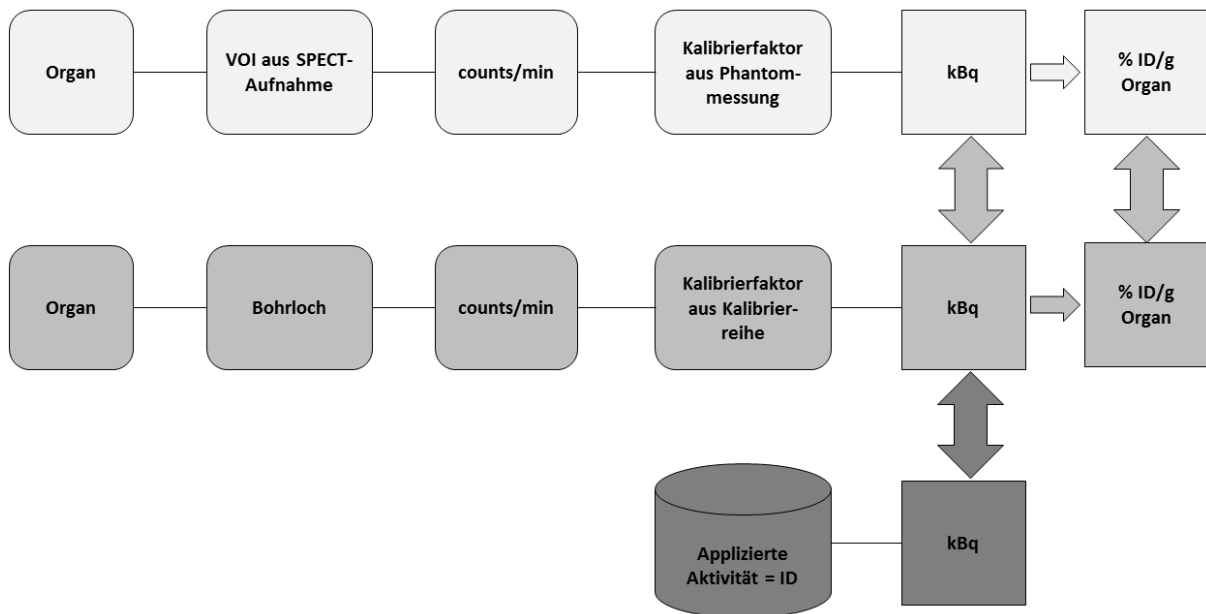


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der Datenberechnung

4.4.4.3 Auswertung der Blutproben

Die Vermessung der entnommenen Blutproben wurde mittels Bohrlochmessung durchgeführt. Wie unter 4.4.4.2 beschrieben, erfolgte eine Zerfallskorrektur auf den Applikationszeitpunkt (Gleichung 4-1). Durch Umrechnung der Aktivität von cpm in kBq wurde die Aktivitätskonzentration im Blut in kBq/ml angegeben. Die AUCs der Blutspiegelkurven wurden mit SigmaPlot Version 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) berechnet. Die Berechnungen der in den Tabellen 4-2 und 4-3 dargestellten pharmakokinetischen Parameter erfolgten mithilfe eines entsprechenden Pharmakokinetikprogramms. Zur Berechnung der Bioverfügbarkeit wurde die AUC des intravenös applizierten [¹²³I]-Iodpentamidins (**1b**) (Studie A) gleich 100 % gesetzt und die AUCs der oral applizierten Verbindungen auf diesen Wert bezogen (Gleichung 4-4).

4.5 Ergebnisse

4.5.1 Kalibrierungen

Für die Gamma-Kamera ergab sich durch die Phantommessungen nach Zerfallskorrektur für den Aktivitätsbereich, in dem die *in vivo* SPECT-Untersuchungen durchgeführt wurden, ein Kalibrierfaktor von 30.386,25 cpm/MBq. Bei halblogarithmischer Auftragung war der

unkorrigierte Zeit-Aktivitätsverlauf für den gewählten Bereich mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,984$ linear.

Für das Bohrlochmessgerät ergab sich nach Zerfallskorrektur ein Kalibrierfaktor von 27.917.396,15 cpm/MBq. Der unkorrigierte Zeit-Aktivitätsverlauf war bei halblogarithmischer Auftragung für den gewählten Bereich mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,999$ linear.

4.5.2 *In vivo* Untersuchungen

4.5.2.1 Einleitung

In allen durchgeführten Untersuchungen wurden die Tracer über ihre Radioaktivität detektiert. Es wurde nicht untersucht, welche Metabolite vorlagen, da dies bereits hinreichend in vorangegangenen Arbeiten mit den entsprechenden nicht iodierten Verbindungen untersucht worden war und der Metabolisierungsweg der Prodrugs bekannt ist (s. Kapitel 1) [Kotthaus *et al.*, 2011; Hungeling, 2009; Bürenheide, 2006; Clement *et al.*, 2006; Bronner *et al.*, 1995; Berger *et al.*, 1992]. Ferner kann eine exakte Bestimmung der Metabolite nur durch Organaufarbeitung und Verwendung von Referenzsubstanzen erfolgen, sodass eine Aussage über mögliche Metabolite durch Auswertung der Bilder nicht möglich ist. Daher kann angenommen werden, dass die detektierten Tracer nicht in ihrer Ausgangsform als Prodrug, sondern als [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**) bzw. entsprechende Metabolite vorlagen [Rieckert, 1999; Bronner *et al.*, 1995; Berger *et al.*, 1992]. Alle Angaben zu den detektierten Tracern beziehen sich deshalb immer auf die applizierte Verbindung.

Ob sich [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**) von Pentamidin (**1**) hinsichtlich der Pharmakokinetik nach intravenöser Applikation unterscheidet, wurde bereits in früheren Studien untersucht [Simon *et al.*, 1997]. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Distributionskinetik von [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**) der Kinetik von Pentamidin (**1**) entspricht. Die Eliminationshalbwertszeit von parenteral appliziertem Pentamidin (**1**), die mit 6 h und Schwankungen zwischen 2,5 h und 22 h angegeben wurde [Scholar & Pratt, 2000; Conte *et al.*, 1986], war bei [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**) mit 41 h und Schwankungen zwischen 26 h und 96 h allerdings verlängert.

Aufgrund der geringen Menge an pharmakologisch wirksamer Substanz wurden keine Nebenwirkungen nach intravenöser Applikation beobachtet. Auch die orale Applikation der

zusätzlichen Mengen von **1a** und **3a** bei den Studien G und H wurde ohne offensichtliche Nebenwirkungen von allen Versuchstieren vertragen. Drei Ratten verstarben vor Versuchsende der Studien A und H an den Folgen der Narkose. Aus Studie D wurde eine Ratte ausgeschlossen, weil bei der Kontrolle der radiochemischen Reinheit nach der Tracersynthese ca. 10% Verunreinigungen mit Nebenprodukten festgestellt wurden.

4.5.2.2 Statistische Analyse

Alle Daten, die aus dem SPECT-Imaging und den Bohrlochmessungen erhalten wurden, wurden einer statistischen Analyse unterzogen. Dazu wurden die Daten der Zeit-Aktivitätsverläufe (0,5 h, 4 h, 24 h), der AUCs über 24 h, der Biodistribution nach 24 - 26 h sowie der Blutspiegelkurven jeweils nach ihrer Applikationsart (intravenös oder peroral) in zwei Gruppen geteilt und innerhalb der Gruppen einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Zuvor wurde auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test und Varianzhomogenität getestet, weil normalverteilte Werte und Varianzhomogenität Voraussetzung zur Durchführung eines ANOVA sind. Nicht in allen Fällen konnten diese Bedingungen erfüllt werden. Deshalb wurde zur Beurteilung aller Werte als parameterfreie Alternative ein Kruskal-Wallis ANOVA durchgeführt, dessen Effizienz bei Vorliegen einer Normalverteilung bei 95% im Vergleich zum parametrischen ANOVA liegt [Lozán & Kausch, 2004]. Die *post-hoc* Analyse erfolgte mithilfe des Dunn's Test, da dieser für Gruppen mit unterschiedlichem Stichprobenumfang geeignet ist.

Der Vergleich der SPECT-Daten nach 24 h mit den Biodistributionsdaten erfolgte je nach Voraussetzung mittels t-Test oder Mann-Whitney U-Test.

Bei allen Testverfahren wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ angenommen.

In einigen Fällen wurde die erforderliche Teststärke (*Power*), die ein Maß für die Aussagekraft eines statistischen Tests ist, von 0,800 aufgrund eines zu niedrigen Stichprobenumfangs nicht erreicht und in der Konsequenz die Nullhypothese angenommen. Daher sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass ein Befund von Nichtsignifikanz nicht bedeutet, dass die Nullhypothese richtig ist [Lozán & Kausch, 2004]! Vielmehr bedeutet dies, dass der Unterschied lediglich nicht groß genug ist, um eine statistische Signifikanz nachzuweisen, was durch Erhöhung der Anzahl an Versuchstieren wahrscheinlich möglich wäre [Lozán & Kausch, 2004].

4.5.2.3 AUCs und Zeit-Aktivitätsverläufe nach intravenöser Applikation

SPECT-Imaging über 24 h

In Abbildung 4-3 sind die Mittelwerte aus den AUCs der Organkonzentrationen nach intravenöser Applikation von **1b** (A), **2b** (B) und **3b** (C) über 24 Stunden zusammen gefasst. Es zeigte sich, dass [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**) größtenteils renal und teilweise über die Leber eliminiert wurde. Geringere Konzentrationen fanden sich in Milz, Herz und Lunge. Die kleinste Menge wurde im Gehirn nachgewiesen. Diese Daten entsprechen bekannten Literaturdaten von Pentamidin (**1**) [Berger *et al.*, 1990a; Bronner *et al.*, 1995; Rieckert, 1999] und von [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**) [Thomas *et al.*, 1997]. Die Prodrugs [¹²³I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) und [¹²³I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**) hingegen wurden hauptsächlich biliär und teilweise renal eliminiert. Diese beiden Eliminationswege waren gegenläufig: Je stärker die Substanz biliär eliminiert wurde, desto geringer waren die Konzentrationen in den Nieren und umgekehrt. Diese Beobachtungen werden durch die in den Abbildungen 4-6, 4-7 und 4-8 gezeigten SPECT-Aufnahmen veranschaulicht. In der Milz wurde **1b** im Vergleich zu **2b** und **3b** am stärksten akkumuliert. Eine starke Anreicherung von Pentamidin (**1**) in der Milz ist ebenfalls literaturbekannt [Bronner *et al.*, 1995]. In der Lunge lieferte **3b** die größten Werte gefolgt von **2b**. Im Gehirn konnte eine signifikant höhere Aktivität nach Applikation von **2b** im Vergleich zu **1b** festgestellt werden. Es konnten folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit $P < 0,05$ festgestellt werden: Leber (A vs. C), Nieren (A vs. C), Milz (A vs. C), Herz (A vs. B), Gehirn (A vs. B; B vs. C).

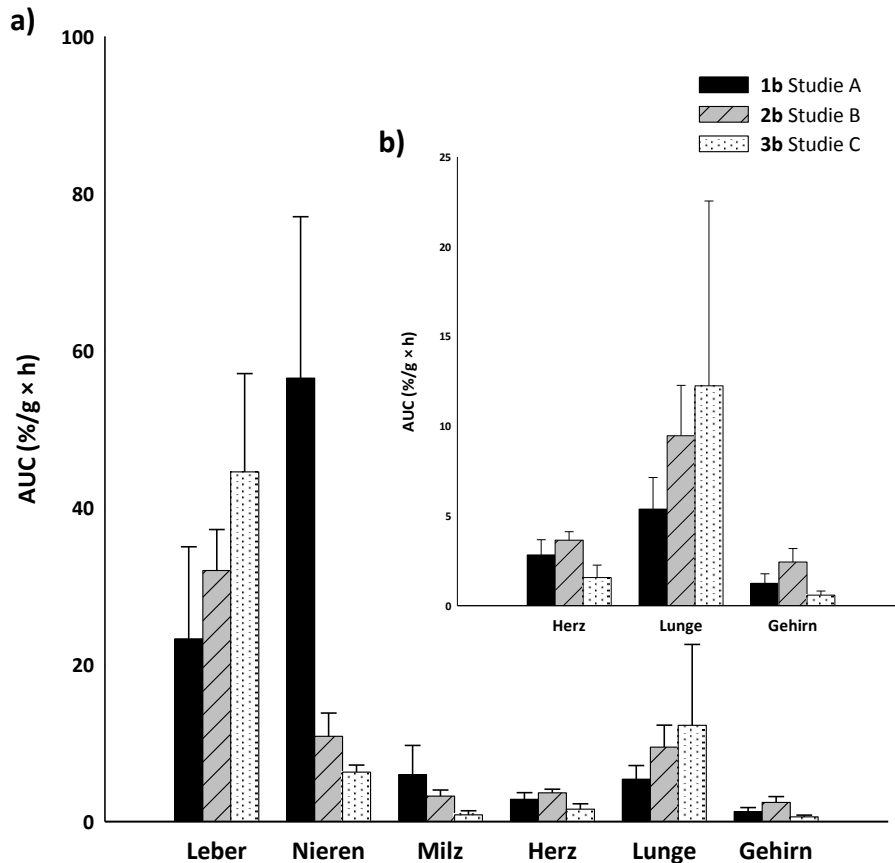


Abbildung 4-3: a) AUCs aus den Zeit-Aktivitätsverläufen über 24 h nach intravenöser Applikation (A: n = 6 (Nieren: n = 5), B: n = 6, C: n = 5), b) vergrößerter Ausschnitt von a) Bei Studie A wurden der Ratte 5 keine Nieren entnommen und somit auch kein Organgewicht bestimmt.

Leber

In Abbildung 4-4 sind die Zeit-Aktivitätsverläufe in der Leber nach intravenöser Applikation von **1b** (A), **2b** (B) und **3b** (C) über 24 Stunden dargestellt.

Wie in Abbildung 4-3 zu erkennen ist, wurden die Prodrugs **2b** und **3b** hauptsächlich über die Leber metabolisiert. Nach Applikation von **3b** waren die höchsten Werte feststellbar. In allen Fällen sanken die Konzentrationen über die Zeit, so dass offenbar keine Akkumulation in den Hepatozyten stattfand. In früheren Studien mit Pentamidin (**1**) konnte ebenfalls ein schneller Abbau von **1** in der Leber festgestellt werden [Bronner *et al.*, 1995; Farinotti *et al.*, 1989]. Diese Beobachtungen werden durch die in den Abbildungen 4-6, 4-7 und 4-8 gezeigten SPECT-Aufnahmen veranschaulicht. Es konnten folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nach 0,5 h, 4 h und 24 h mit $P < 0,05$ festgestellt werden: 0,5 h (A vs. C, B vs. C), 4 h (A vs. C), 24 h (A vs. C).

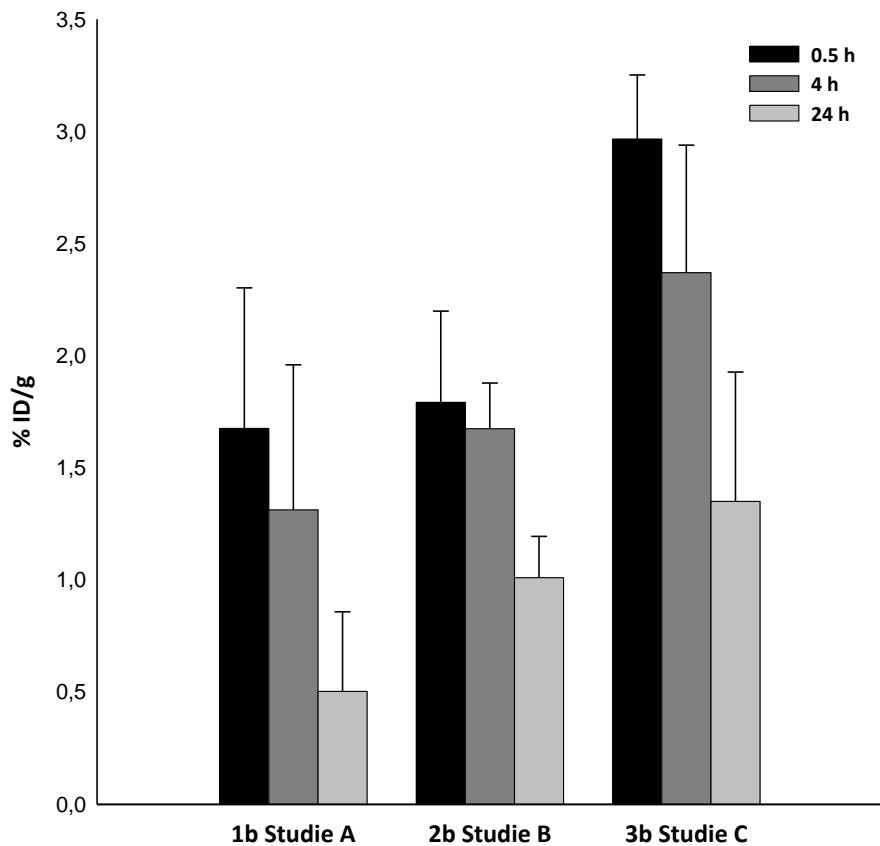


Abbildung 4-4: Zeit-Aktivitätsverläufe in der Leber nach intravenöser Applikation (A: n = 6, B: n = 6, C: n = 5)

Niere

In Abbildung 4-5 sind die Zeit-Aktivitätsverläufe in den Nieren nach intravenöser Applikation von **1b** (A), **2b** (B) und **3b** (C) über 24 Stunden dargestellt.

Die renale Elimination von **1b** ist deutlich ausgeprägter als die der Prodrugs. Auch wenn **1b** offensichtlich langsam aus den Nieren eliminiert wurde, waren nach 24 h noch erhebliche Mengen vorhanden, was durch die Biodistributionsdaten bestätigt wurde (4.3.2.3). Diese Beobachtungen entsprechen Literaturdaten, die in Studien mit nicht iodiertem Pentamidin (**1**) erhoben wurden [Waalkes *et al.*, 1976; Lidman *et al.*, 1994; Berger *et al.*, 1990a]. Möglicherweise ist der ausgeprägte renale Eliminationsweg die Ursache für die Nephrotoxizität von Pentamidin (**1**) [Waalkes *et al.*, 1970]. Da die Konzentrationen nach Applikation der Prodrugs **2b** und **3b** in den Nieren deutlich geringer waren als nach Applikation von **1b**, lässt dies den Schluss auf eine verminderte Nephrotoxizität der Prodrugs zu. Ähnliche Beobachtungen bei einem anderen Pentamidin-Prodrug wurden 1999 von

Rieckert beschrieben [Rieckert, 1999]. In den in den Abbildungen 4-6, 4-7 und 4-8 gezeigten SPECT-Aufnahmen werden die beschriebenen Unterschiede von **1b** zu **2b** bzw. **3b** visuell verdeutlicht. Es konnten folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nach 0,5 h, 4 h und 24 h mit $P < 0,05$ festgestellt werden: 0,5 h (A vs. C), 4 h (A vs. C), 24 h (A vs. C).

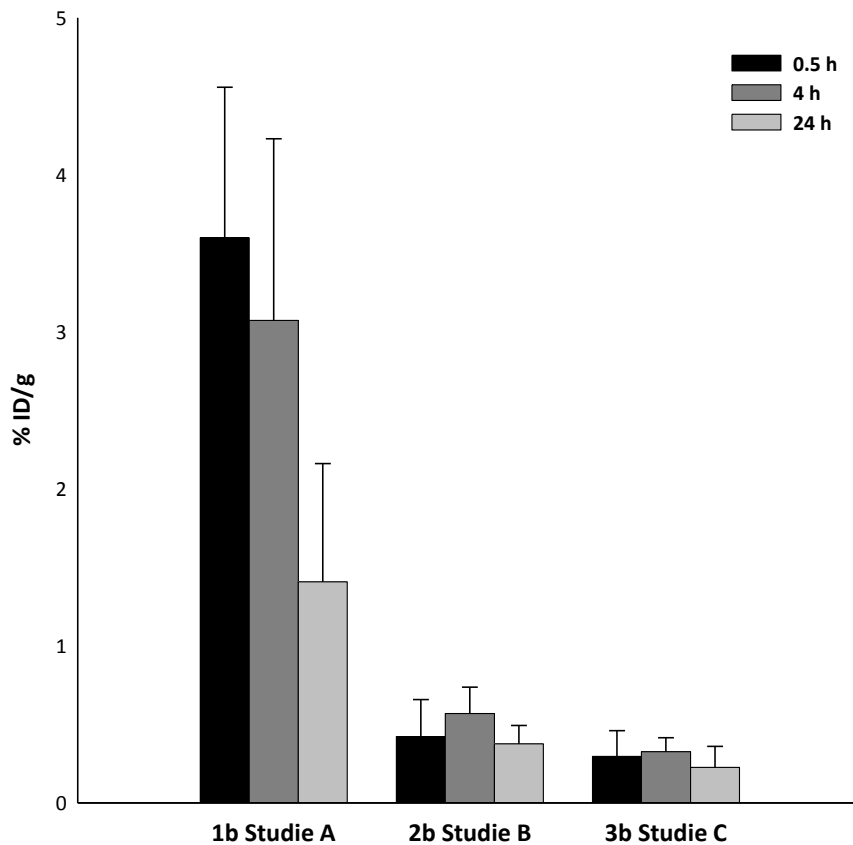


Abbildung 4-5: Zeit-Aktivitätsverläufe in den Nieren nach intravenöser Applikation (A: n = 5, B: n = 6, C: n = 5)

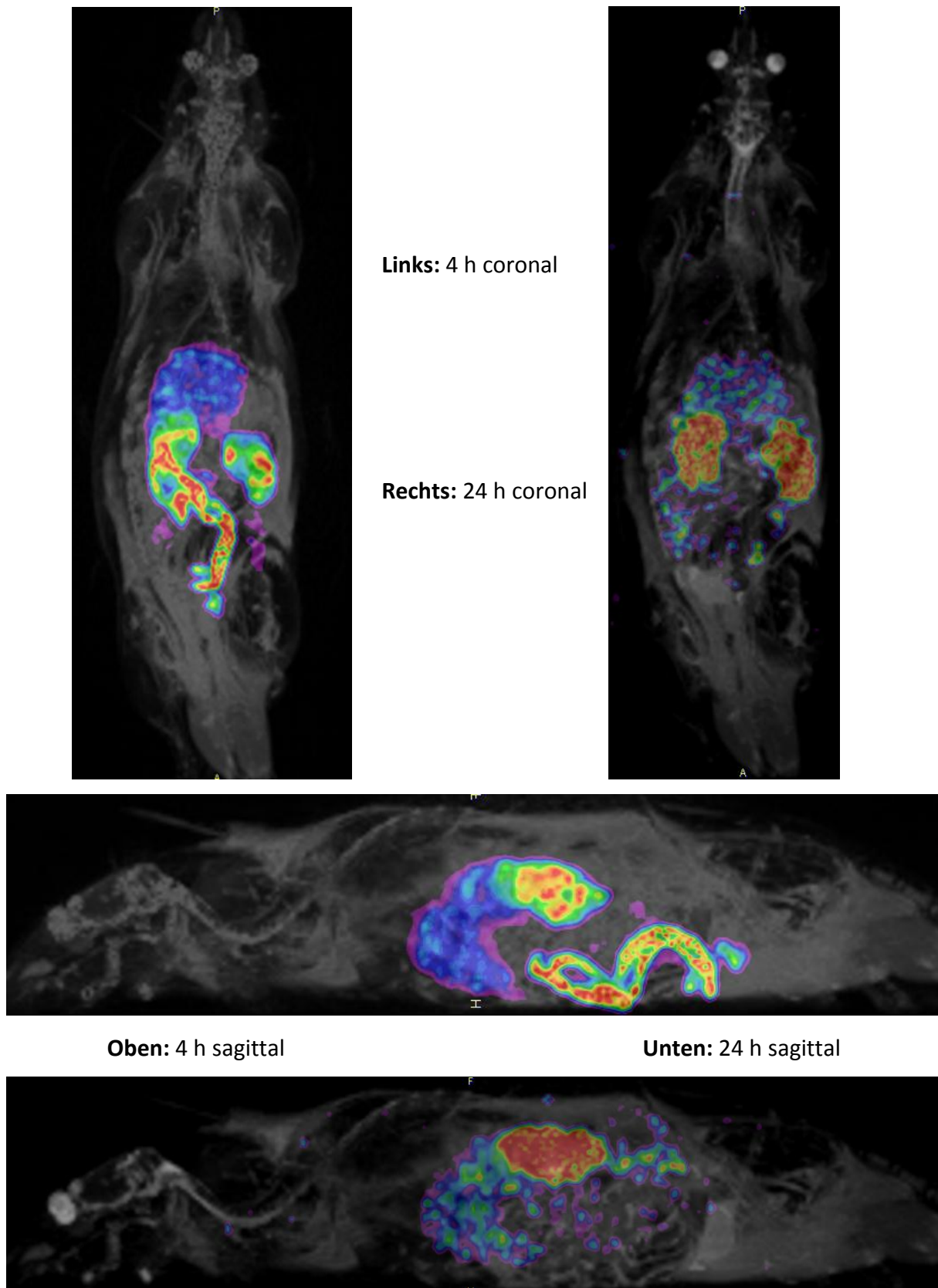


Abbildung 4-6: Fusionierte SPECT/MR-Aufnahmen einer Ratte 4 h und 24 h nach intravenöser Injektion von [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**). Zu sehen sind Leber und Nieren sowie Teile des Darms. Die Nieren treten nach 24 h aufgrund der langsameren renalen Elimination stärker in den Vordergrund.

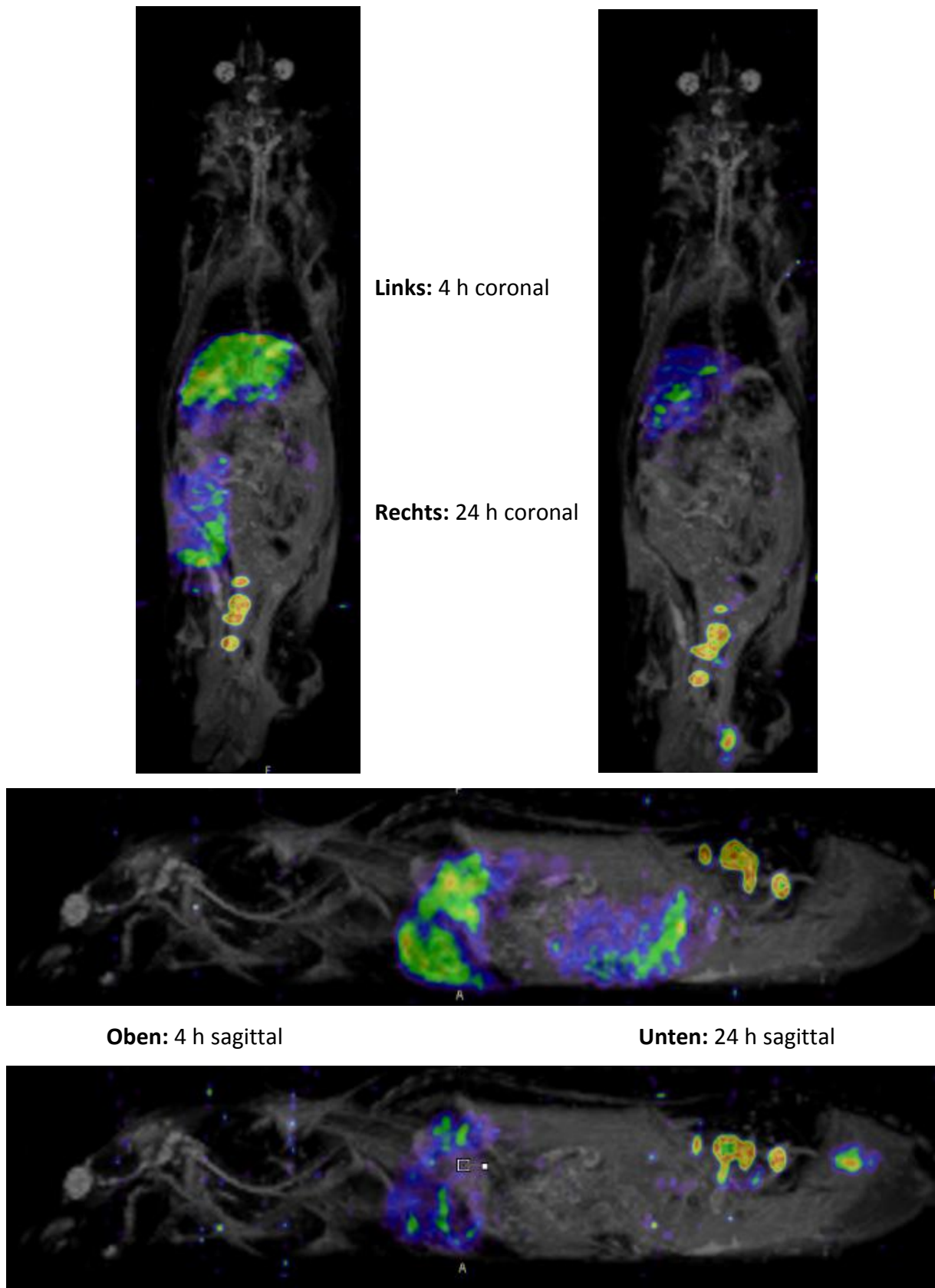


Abbildung 4-7: Fusionierte SPECT/MR-Aufnahmen einer Ratte 4 h und 24 h nach intravenöser Injektion von $[^{123}\text{I}]$ -*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**). Zu sehen sind Anreicherung und Abbau in der Leber sowie Elimination via Fäces in den unteren Darmabschnitten.

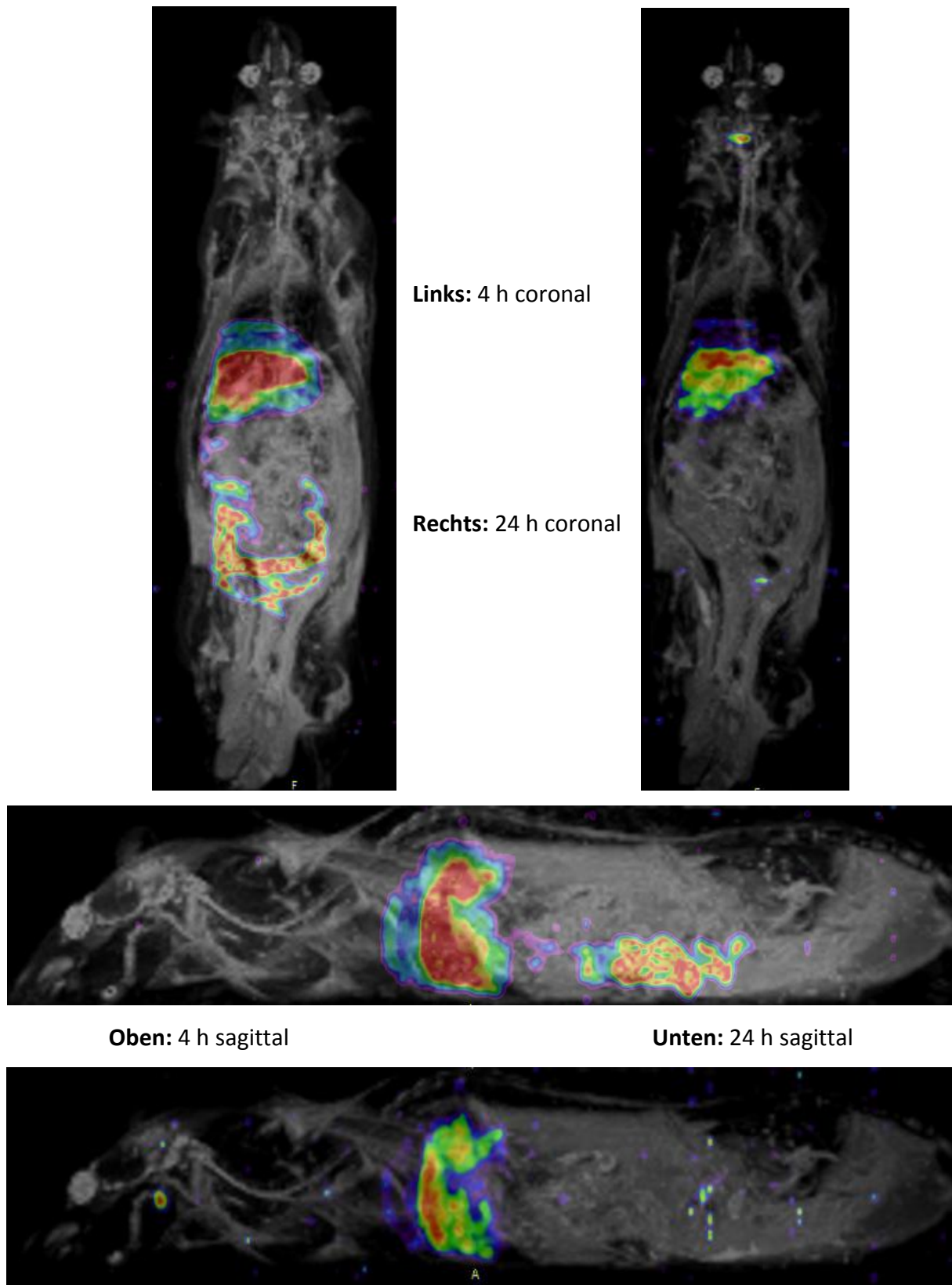


Abbildung 4-8: Fusionierte SPECT/MR-Aufnahmen einer Ratte 4 h und 24 h nach intravenöser Injektion von $[^{123}\text{I}]$ -*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**). Zu sehen sind Anreicherung und Abbau in der Leber sowie Elimination in den unteren Darmabschnitten. Nach 24 h ist Radioaktivität in der Schilddrüse erkennbar.

Milz

In Abbildung 4-9 sind die Zeit-Aktivitätsverläufe in der Milz nach intravenöser Applikation von **1b** (A), **2b** (B) und **3b** (C) über 24 Stunden dargestellt.

Insgesamt war hier bei allen Substanzen ein langsamer Abbau über die Zeit zu beobachten. Die Konzentrationen nach Applikation von **1b** waren insgesamt etwas höher als nach Applikation der Prodrugs. Es konnten folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nach 4 h und 24 h mit $P < 0,05$ festgestellt werden: 4 h (B vs. C), 24 h (B vs. C).

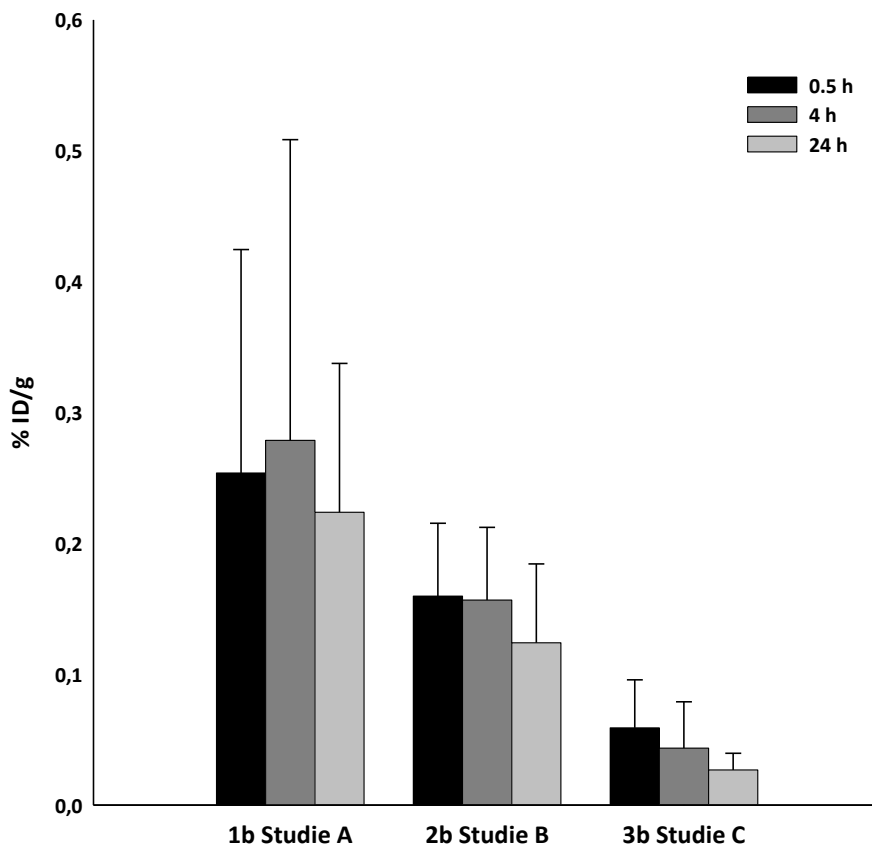


Abbildung 4-9: Zeit-Aktivitätsverläufe in der Milz nach intravenöser Applikation (A: n = 6, B: n = 6, C: n = 5)

Herz

In Abbildung 4-10 sind die Zeit-Aktivitätsverläufe im Herz nach intravenöser Applikation von **1b** (A), **2b** (B) und **3b** (C) über 24 Stunden dargestellt.

Insgesamt konnte hier bei allen Substanzen ein langsamer Abbau über die Zeit beobachtet werden. Es waren keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen Studie A und den Studien B und C feststellbar. Zwischen den Gruppen konnten nach 0,5 h, 4 h und 24 h folgende statistisch signifikante Unterschiede mit $P < 0,05$ festgestellt werden: 0,5 h (A vs. C), 4 h (A vs. C), 24 h (A vs. C).

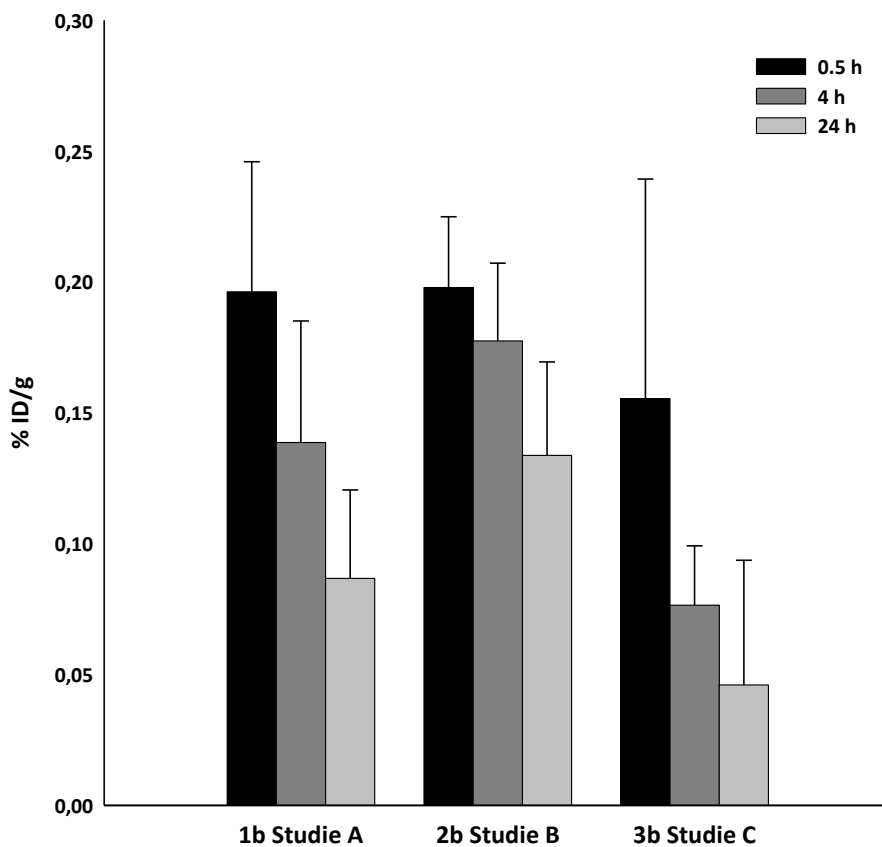


Abbildung 4-10: Zeit-Aktivitätsverläufe im Herz nach intravenöser Applikation (A: n = 6, B: n = 6, C: n = 5)

Lunge

In Abbildung 4-11 sind die Zeit-Aktivitätsverläufe in der Lunge nach intravenöser Applikation von **1b** (A), **2b** (B) und **3b** (C) über 24 Stunden dargestellt.

Insgesamt konnte hier bei allen Substanzen ein kontinuierlicher Abbau über die Zeit beobachtet werden, wobei der Abbau nach Applikation von **3b** am stärksten war. Nach Injektion von **3b** waren die Konzentrationen insbesondere nach 0,5 h am höchsten. Das Prodrug **2b** lieferte nur leicht erhöhte Konzentrationen im Vergleich zu **1b**. Insgesamt waren die Konzentrationen von **1b** in der Lunge literaturgemäß gering [Thomas *et al.*, 1997], weshalb der Einsatz von Pentamidin (**1**) zur Behandlung der *Pneumocystis* Pneumonie (PCP) auch auf inhalativem Weg erfolgt [O'Doherty *et al.*, 1993]. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nach 0,5 h, 4 h und 24 h mit $P < 0,05$ festgestellt werden.

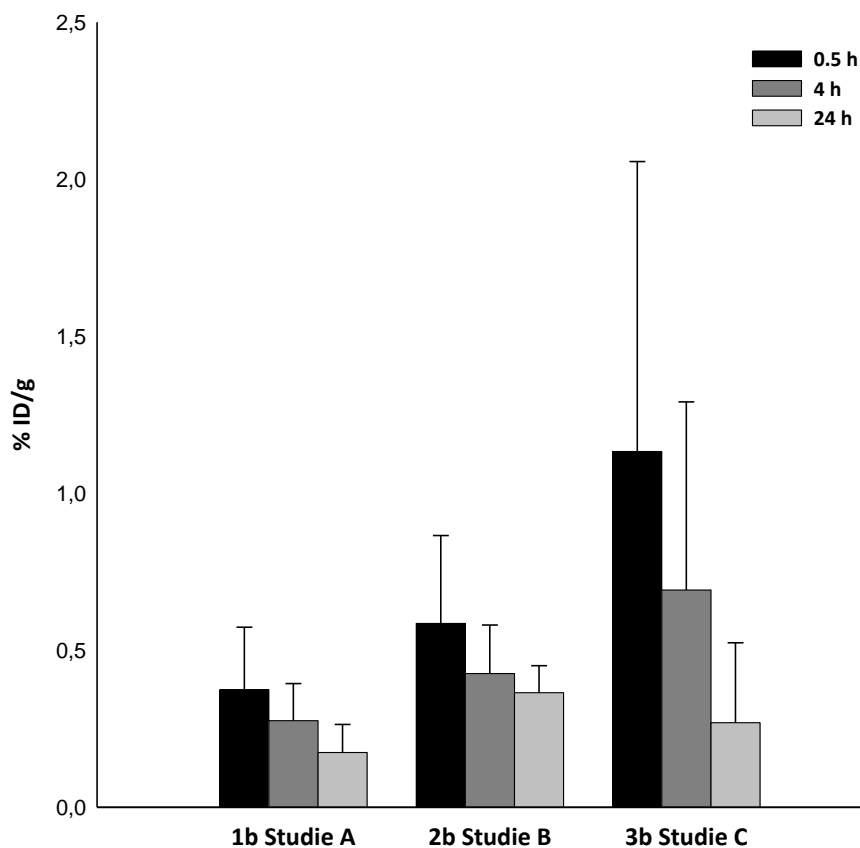


Abbildung 4-11: Zeit-Aktivitätsverläufe in der Lunge nach intravenöser Applikation (A: n = 6, B: n = 6, C: n = 5)

Gehirn

In Abbildung 4-12 sind die Zeit-Aktivitätsverläufe im Gehirn nach intravenöser Applikation von **1b** (A), **2b** (B) und **3b** (C) über 24 Stunden dargestellt.

Insgesamt waren die Konzentrationen, die im Gehirn gefunden wurden, sehr gering. Jedoch war die Konzentration nach Injektion von **2b** in etwa doppelt so hoch wie nach Injektion der anderen beiden Substanzen. Im Gegensatz zu Studie A und C fand in Studie B eine Akkumulation anstelle eines Abbaus über 24 h statt, so dass ein signifikanter Konzentrationsunterschied zu Studie A festgestellt werden konnte. Es konnten folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nach 0,5 h, 4 h und 24 h mit $P < 0,05$ festgestellt werden: 0,5 h (A vs. B), 4 h (A vs. B), 24 h (A vs. B; B vs. C).

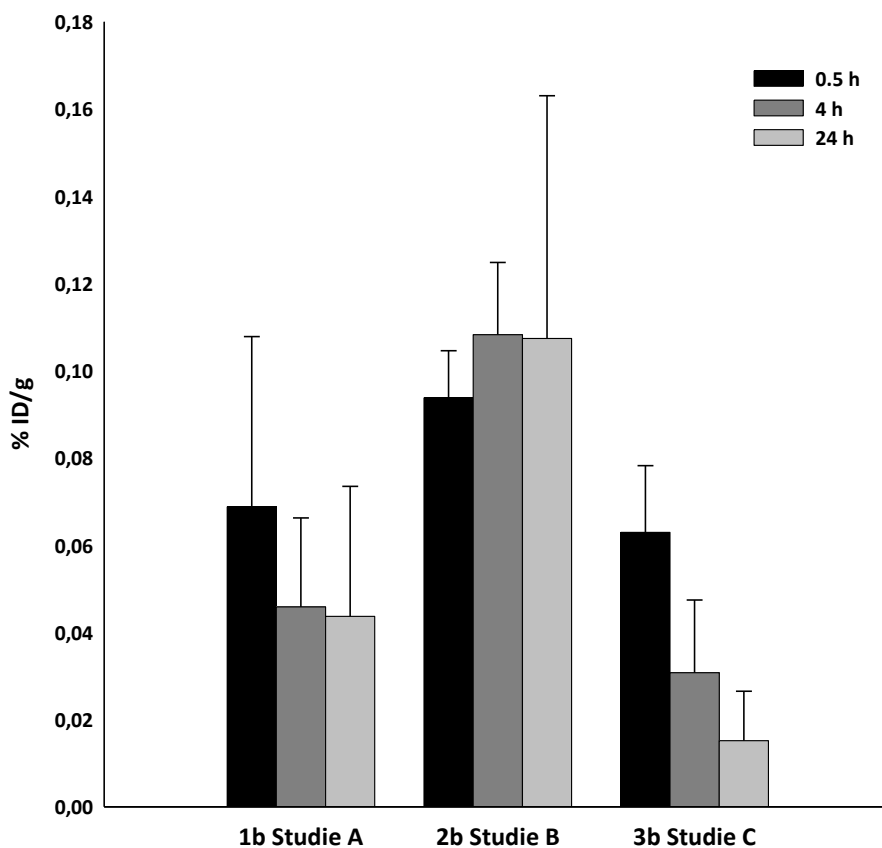


Abbildung 4-12: Zeit-Aktivitätsverläufe im Gehirn nach intravenöser Applikation (A: n = 6, B: n = 6, C: n = 5)

4.5.2.4 Biodistribution 24 – 26 h nach intravenöser Applikation

In Abbildung 4-13 sind die Biodistributionsdaten der Organmessungen 24 – 26 h und in Abbildung 4-14 die Organkonzentrationen der letzten SPECT-Aufnahme 24 h nach intravenöser Applikation von **1b** (A), **2b** (B) und **3b** (C) dargestellt.

Diese Daten wurden mit denen der letzten SPECT-Aufnahme nach 24 Stunden verglichen, um eine Korrelation zwischen den errechneten SPECT-Daten und der tatsächlich gemessenen Aktivität herzustellen. Je nach Lage des Organs gibt es gewisse Abweichungen zwischen der SPECT-Aufnahme und der Biodistribution, weil eine Schwächungskorrektur beim SPECT-Imaging aufgrund der uneinheitlichen Schwächung der Strahlung im Körper nicht standardmäßig durchführbar ist [Vallabhajosula, 2009]. Außerdem konnten die Ratten aus organisatorischen Gründen in einigen Fällen erst 1 – 2 h nach der letzten SPECT-Aufnahme getötet werden, so dass in der Zwischenzeit metabolische Prozesse fortschreiten konnten. Beim statistischen Vergleich der erhaltenen Organkonzentrationen aus Bohrlochmessung und letzter SPECT-Aufnahme mittels t- bzw. Mann-Whitney U-Test (4.2.5) konnte in fast allen Fällen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Mit Ausnahme von Milz und Herz, in denen die statistischen Abweichungen am größten waren, konnte somit für alle anderen Organe eine gute Korrelation der Daten festgestellt werden.

Es konnten folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit $P < 0,05$ festgestellt werden: Nieren (A vs. C), Milz (A vs. C), Herz (B vs. C), Lunge (A vs. B; B vs. C), Gehirn (B vs. C).

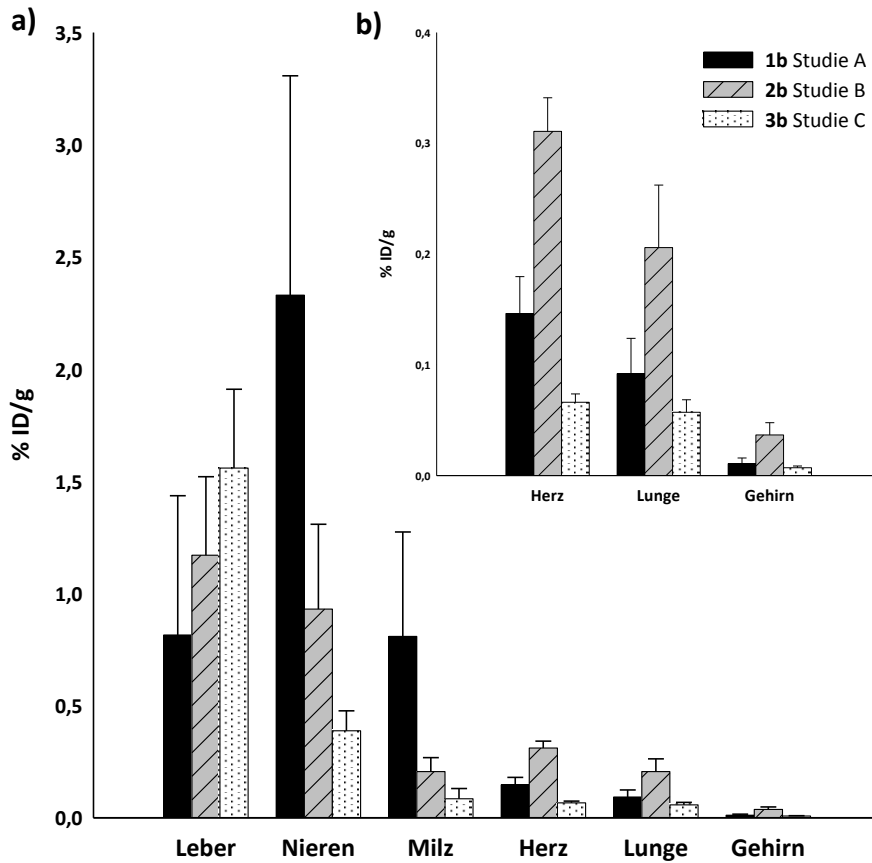


Abbildung 4-13: a) Biodistribution 24 - 26 h nach intravenöser Applikation (A: n = 6 (Nieren: n = 5), B: n = 6, C: n = 5), b) vergrößerter Ausschnitt von a
Bei Studie A wurden der Ratte 5 keine Nieren entnommen.

Es konnten folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit $P < 0,05$ festgestellt werden: Leber (A vs. C), Nieren (A vs. C), Milz (A vs. C), Herz (B vs. C), Gehirn (A vs. B; B vs. C).

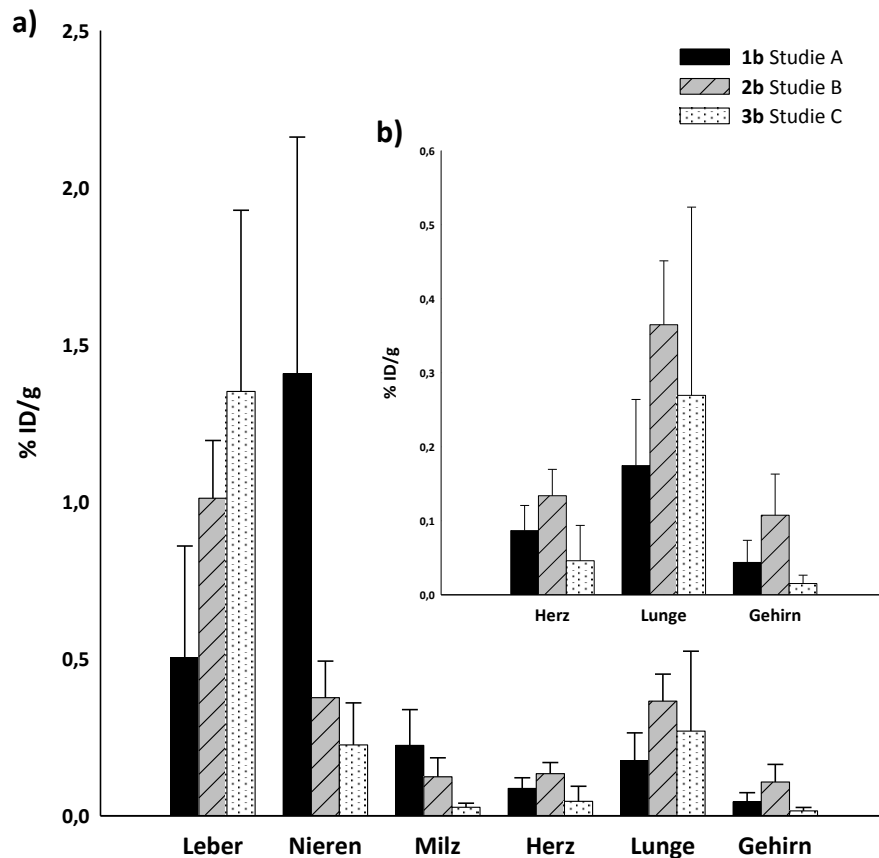


Abbildung 4-14: a) Organkonzentrationen SPECT-Aufnahme 24 h nach intravenöser Applikation (A: n = 6 (Nieren: n = 5), B: n = 6, C: n = 5), b) vergrößerter Ausschnitt von a) Bei Studie A wurden der Ratte 5 keine Nieren entnommen und somit auch kein Organgewicht bestimmt.

In folgenden Fällen wurde eine statistisch signifikante Abweichung zwischen Biodistribution und letzter SPECT-Aufnahme gefunden ($P < 0,05$):

Nieren (B), Milz (A, C), Herz (A, B), Lunge (B), Gehirn (B).

4.5.2.5 Blutspiegel nach intravenöser Applikation

Die Auswertung der Blutproben erfolgte ohne weitere Aufarbeitung. Aus den Vollblutproben ließen sich nach intravenöser Applikation die unten abgebildeten Blutspiegelkurven ermitteln (Abb. 4-15). In allen drei Studien zeigte sich nach der Bolusinjektion eine schnelle Anflutung gefolgt von einem biphasischen Eliminationsverlauf, welcher für Pentamidin (**1**) literaturbekannt ist [Terlinden *et al.*, 1990; Bronner *et al.*, 1995; Bürenheide, 2006; Hungeling, 2009] und aus der halblogarithmischen Darstellung der Blutspiegelkurven in Abbildung 4-16 zu erkennen ist. Eine schnelle Verteilung von [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**) ins periphere Gewebe ist ebenfalls literaturbekannt [Simon *et al.*, 1997].

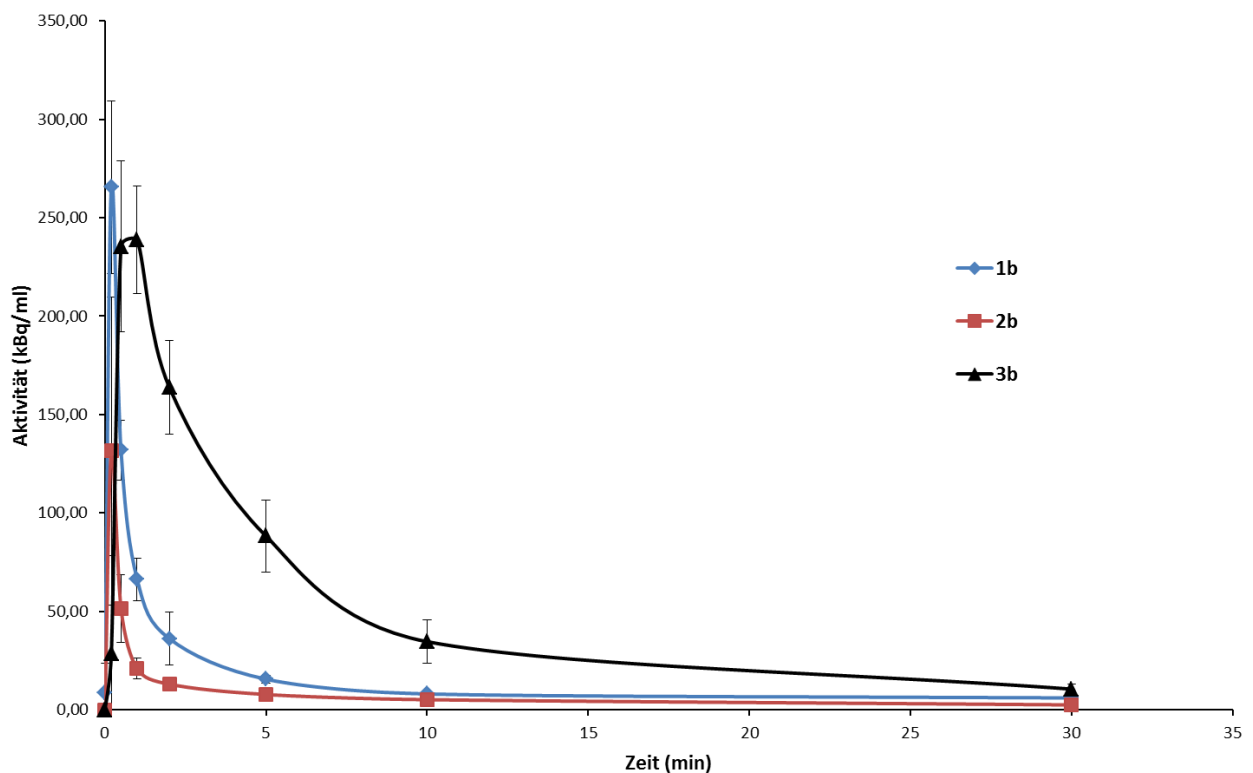


Abbildung 4-15: Lineare Darstellung der Blutspiegelkurven über 30 min nach intravenöser Applikation von [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**), [¹²³I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**), [¹²³I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**) in den Studien A – C (A: n = 3; B: n = 5; C: n = 3)

Aus den ermittelten Blutspiegelkurven wurden die in Abbildung 4-16 dargestellten AUCs sowie die in Tabelle 4-2 dargestellten pharmakokinetischen Parameter berechnet. Die AUC über 24 h in Studie C war statistisch signifikant größer als in Studie B ($P < 0,05$).

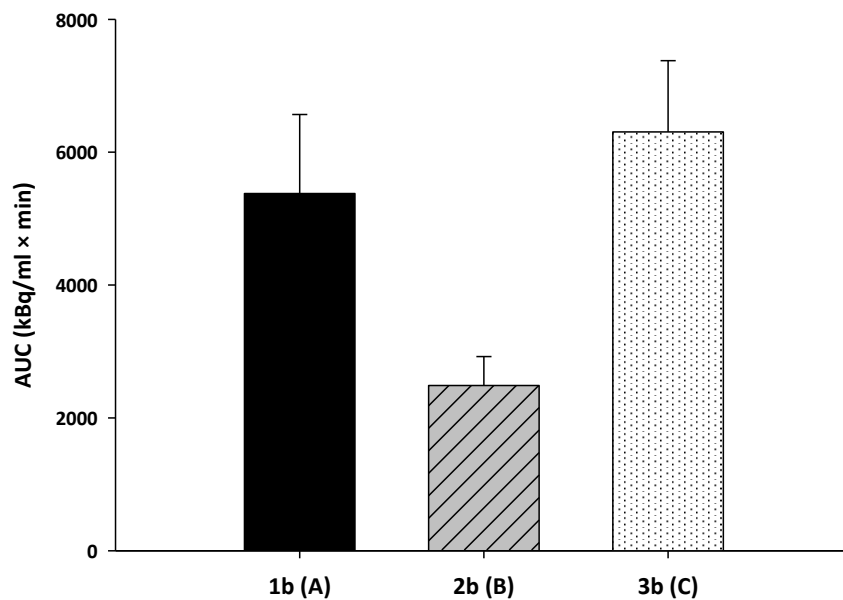
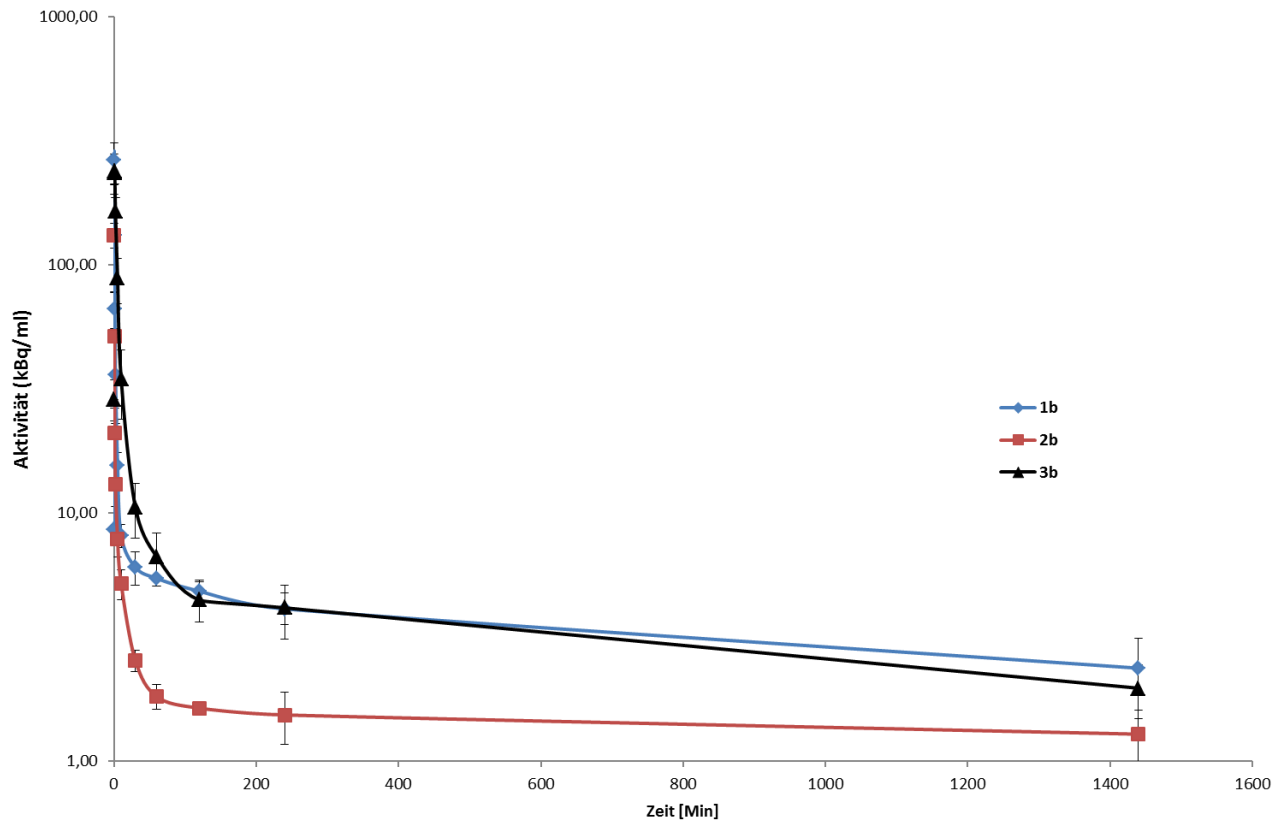


Abbildung 4-16: Halblogarithmische Darstellung der Blutspiegelkurven über 24 h und der daraus berechneten AUCs nach intravenöser Applikation von [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**), [^{123}I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) und [^{123}I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**) in den Studien A – C (A: n = 3; B: n = 5; C: n = 3)

Tabelle 4-2: Pharmakokinetische Parameter nach intravenöser Applikation

Parameter für 10 MBq pro Ratte	Studie A 1b	Studie B 2b	Studie C 3b
Dosis (MBq/kg)	28,57	28,57	28,57
Anzahl der Tiere	3	5	3
AUC (kBq/ml × min)	5378	2487	6306
Cl (ml/(h × kg))	177,1	173,7	181,5
V _d (l/kg)	5,4	17,1	4,9
C _{max} (kBq/ml)	265,6	131,5	238,9
t _{max} (min)	0,2	0,2	1,0
t _{1/2α} (min)	12,0	12,0	19,8
t _{1/2β} (h)	21,0	68,2	18,6

A: [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**), B: [¹²³I]-N,N'-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**), C: [¹²³I]-N,N'-Bis(succinyloxy)-iodpentamidin (**3b**) in den Studien A – C (AUC = area under the curve, Cl = Gesamtkörperclearance, V_d = Verteilungsvolumen, t_{1/2α} = initiale Eliminationshalbwertszeit, t_{1/2β} = terminale Eliminationshalbwertszeit)

Nach Applikation von [¹²³I]-N,N'-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) war der Wert für c_{max} nur etwa halb so groß wie nach Applikation von [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**). Wahrscheinlich ist die Verteilung und Gewebefindung von **2b** aufgrund der deutlich erhöhten Lipophilie wesentlich ausgeprägter als nach Applikation von **1b**, was auch durch das große Verteilungsvolumen unterstrichen wird. Interessanterweise ist die initiale Halbwertszeit von [¹²³I]-N,N'-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**) am längsten, was auf eine ausgeprägte Plasmaproteinbindung schließen lässt [Mutschler, 2008]. Die aus den Blutspiegelkurven ermittelten AUCs waren bei **3b** signifikant am höchsten.

Da die hier ermittelten Werte mit iodierten Verbindungen aus Rattenvollblutproben stammen, ist ein Vergleich mit Literaturdaten, die aus Studien mit anderen Spezies oder aus

Plasmaproben mit nicht iodierten Verbindungen stammen, schwierig. Die Größenordnung deckt sich aber mit den von Simon *et al.* ermittelten Werten aus einer Humanstudie [Simon *et al.*, 1997] sowie mit den bereits angeführten Literaturdaten von Pentamidin (**1**) [Terlinden *et al.*, 1990; Bronner *et al.*, 1995; Bürenheide, 2006; Hungeling, 2009].

4.5.2.6 AUCs und relative Bioverfügbarkeiten nach oraler Applikation

SPECT-Imaging über 24 h

In Abbildung 4-17 sind die Mittelwerte aus den AUCs der Organkonzentrationen nach oraler Applikation von **1b** (D), **2b** (E) und **3b** (F) sowie die Kombination von **3a** + **3b** (G) und **1a** + **1b** (H) über 24 Stunden zusammengefasst. Abbildung 4-18 zeigt die daraus berechneten relativen Bioverfügbarkeiten (rBV) für die jeweiligen Organe. Für die Angabe der relativen Bioverfügbarkeit wurde die Konzentration in den Organen nach intravenöser Applikation von [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**) (Studie A) gleich 100% gesetzt und die Konzentrationen der Tracer nach oraler Applikation auf diesen Wert bezogen.

Mit Ausnahme der Nieren konnten in allen Organen höhere Bioverfügbarkeiten nach Applikation der Prodrugs als nach Applikation von **1b** bzw. **1a** + **1b** nachgewiesen werden. Vor allem in Leber und Gehirn konnten signifikant höhere Bioverfügbarkeiten nach Applikation von **2b** und **3b** festgestellt werden. Diese Beobachtungen stimmen im Prinzip mit früheren Studiendaten von nicht iodierten Verbindungen überein [Kotthaus *et al.*, 2011]. In den Studien G und H, bei denen zusätzliche Mengen der nicht radioaktiven Verbindungen **3a** bzw. **1a** appliziert worden waren, waren in einzelnen Organen (Milz, Herz und Lunge) leicht erhöhte Konzentrationen gegenüber Studie A bzw. F zu erkennen. In Studie H waren die Leber- und Gehirnwerte höher als in Studie A. Die größten Konzentrationen wurden in Leber und Nieren gefunden, was im Einklang mit vorangegangenen Arbeiten steht [Hungeling, 2009]. Die Erkenntnis, dass die Prodrugs durch passive Diffusion in Zellen aufgenommen und nach Metabolisierung zu [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**) durch Effluxtransporter aktiv wieder ausgeschleust werden, erklären die Ergebnisse, die in Kapitel 4.6 diskutiert werden [Sanderson *et al.*, 2009; Baker *et al.*, 2013; Schwering, 2010]. In Abbildung 4-20 sind exemplarisch fusionierte SPECT-Aufnahmen nach oraler Applikation von **1b** aus Studie D gezeigt.

Es konnten folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit $P < 0,05$ festgestellt werden: Leber (D vs. E; D vs. F; D vs. G), Gehirn (D vs. E; D vs. F).

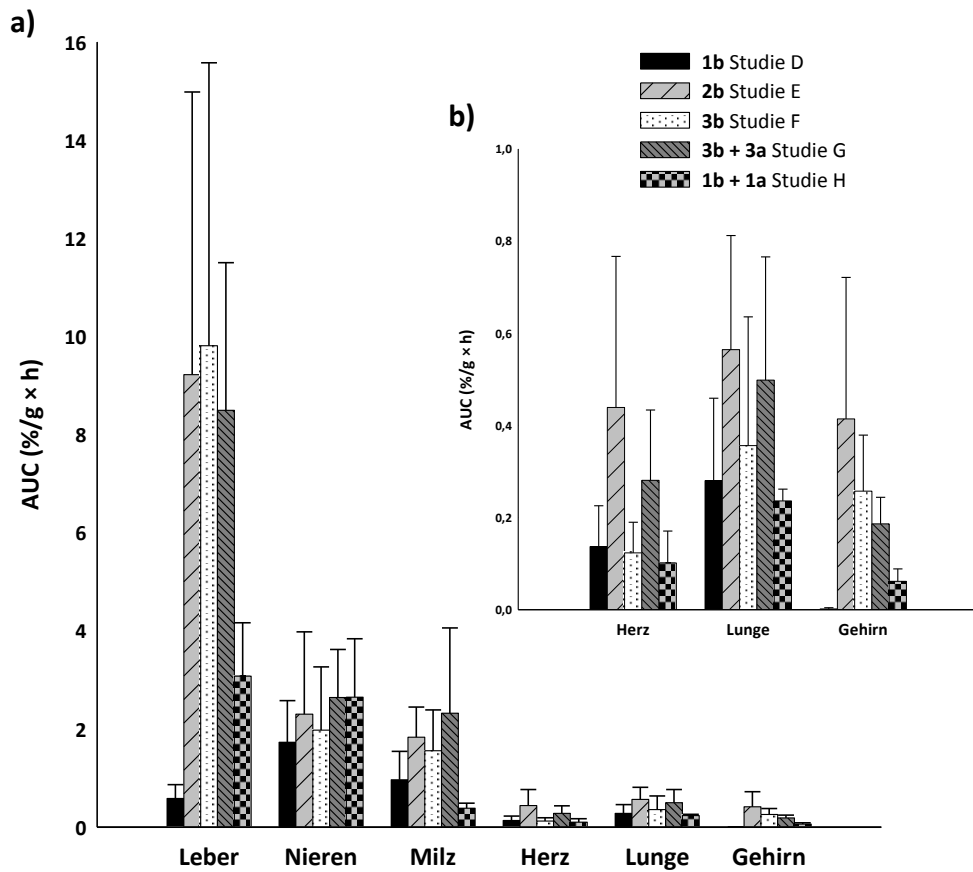


Abbildung 4-17: a) AUCs aus den Zeit-Aktivitätsverläufen über 24 h nach oraler Applikation (D: n = 5 (Gehirn: n = 4), E: n = 6 (Gehirn: n = 5), F - G: n = 6, H: n = 4), b) vergrößerter Ausschnitt von a

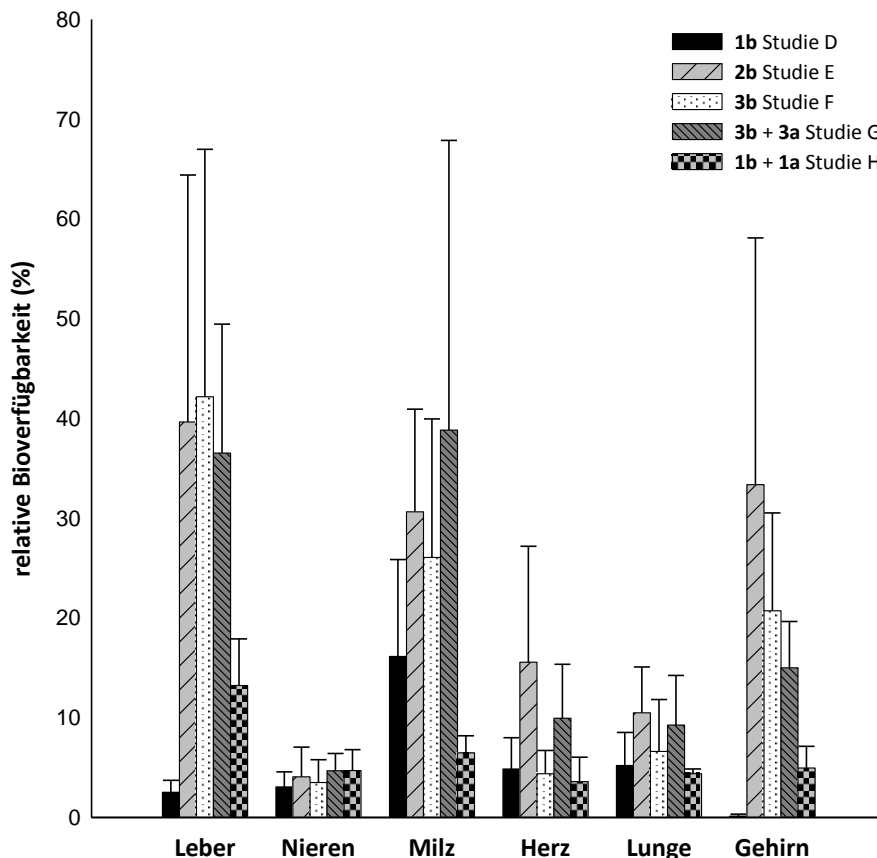


Abbildung 4-18: Relative Bioverfügbarkeit über 24 h nach oraler Applikation (D: n = 5 (Gehirn: n = 4), E: n = 6 (Gehirn: n = 5), F - G: n = 6, H: n = 4)

Bei Studie D wurde bei Ratte 5 keine Aufnahme des Kopfbereichs durchgeführt. Bei Studie E gab es bei Ratte 6 eine Kontamination des Fells im Kopfbereich, wodurch die Aufnahmen des Gehirns nicht auswertbar waren.

Biodistribution nach 24 – 26 h

Die relativen Bioverfügbarkeiten, die aus den Biodistributionsdaten nach 24 – 26 h berechnet wurden, ergänzen sich prinzipiell mit den Daten, die aus den AUCs generiert wurden, zeigen aber deutlichere Unterschiede zwischen den einzelnen Studien auf. Dadurch wird noch stärker deutlich, dass die Tracer nach Applikation der Prodrugs **2b** und **3b** deutlich länger nachgewiesen werden können als nach Applikation von **1b**. Insbesondere bei der Kombinationsstudie G konnten nach 24 - 26 h in allen Organen höhere Bioverfügbarkeiten als bei Studie F nachgewiesen werden. In Lunge, Leber und Milz konnten in Studie G sogar die höchsten Bioverfügbarkeiten gemessen werden.

Es konnten folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit $P < 0,05$ festgestellt werden: Leber (D vs. E; D vs. F), Nieren (D vs. E; D vs. H), Herz (D vs. E; E vs. H), Lunge (D vs. E; D vs. G; E vs. H) Gehirn (D vs. E; D vs. G; E vs. H).

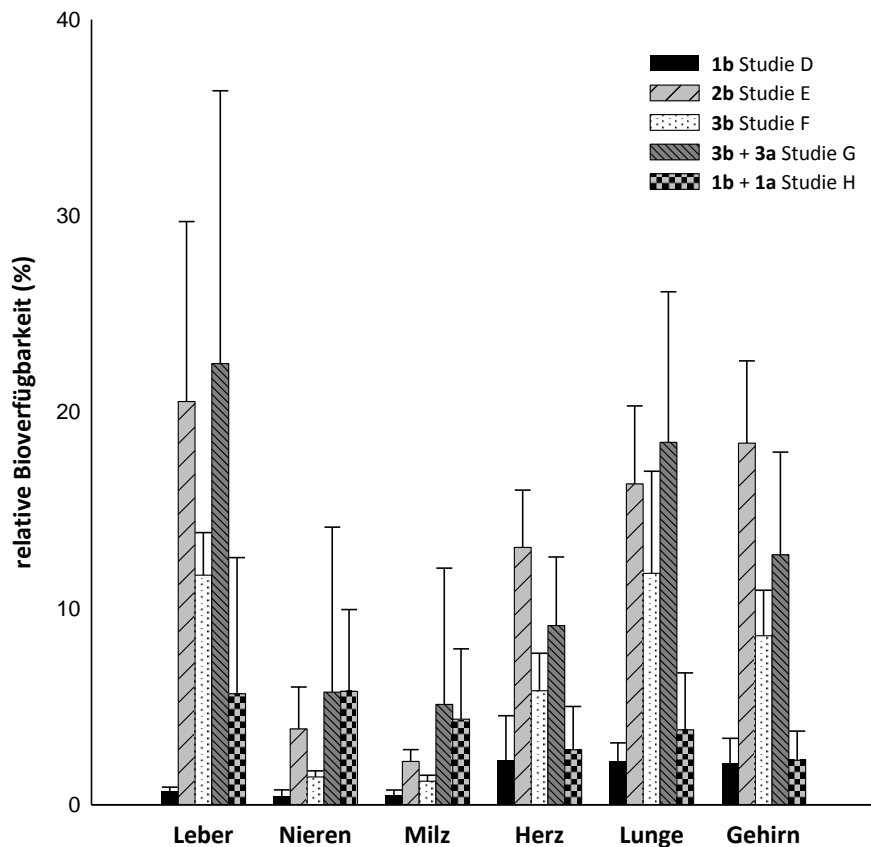


Abbildung 4-19: Relative Bioverfügbarkeit 24–26 h nach oraler Applikation berechnet aus den Biodistributionsdaten (D: n = 5 (Lunge: n = 4), E-G: n = 6, H: n = 4)

Bei Studie D wurde die Lunge von Ratte 4 bei der Organentnahme mit Radioaktivität kontaminiert und somit nach statistischer Berechnung mithilfe des Ausreißertests nach Henning als Ausreißer definiert und aus dem Datensatz entfernt.

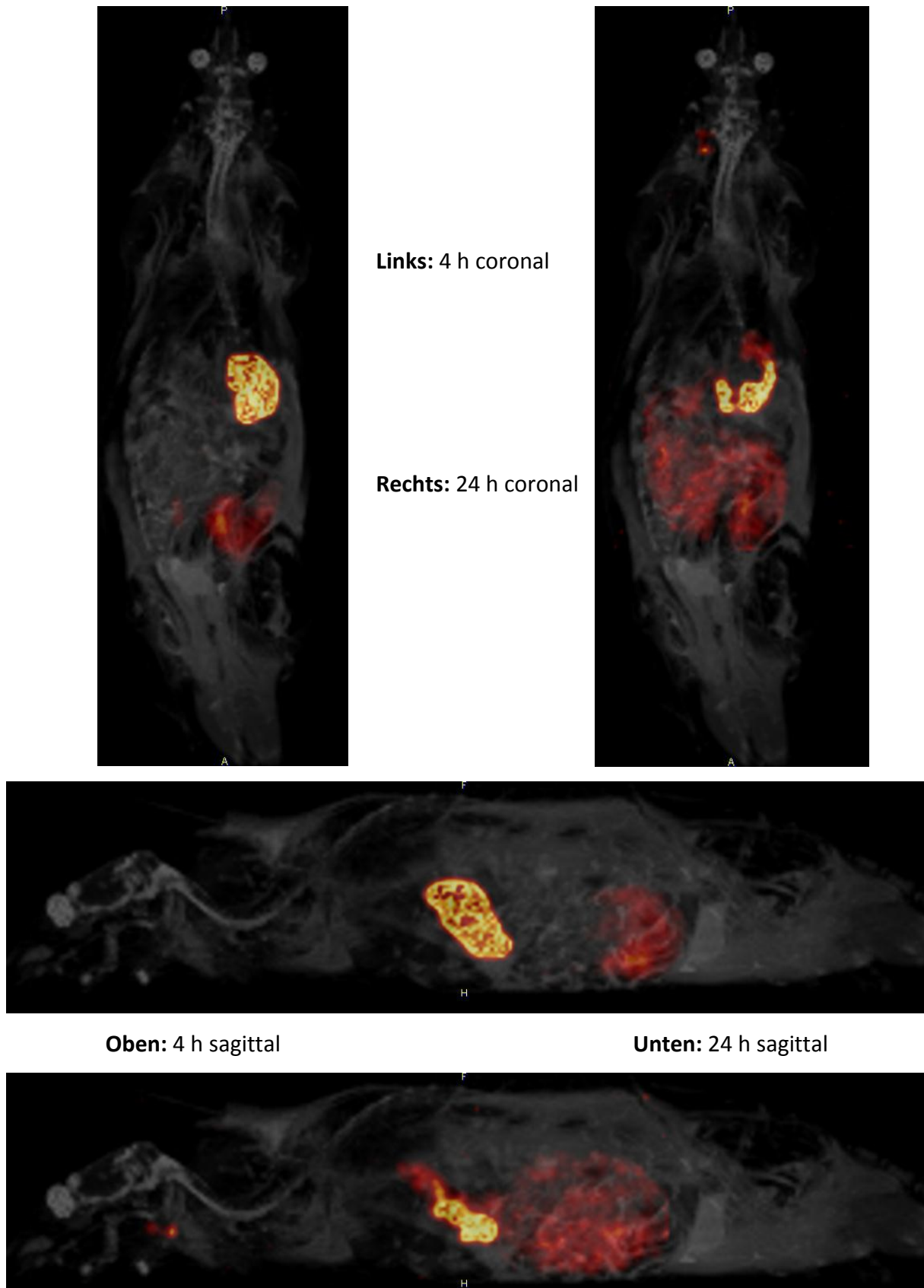


Abbildung 4-20: Fusionierte SPECT/MR-Aufnahmen einer Ratte 4 h und 24 h nach oraler Applikation von [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**). Zu sehen sind der Gastrointestinaltrakt sowie nach 24 h leicht angedeutet die Schilddrüse.

4.5.2.7 Zeit-Aktivitätsverläufe nach oraler Applikation

Leber

In Abbildung 4-21 sind die Zeit-Aktivitätsverläufe in der Leber nach oraler Applikation von **1b** (D), **2b** (E) und **3b** (F) sowie die Kombination von **3a** + **3b** (G) und **1a** + **1b** (H) über 24 Stunden dargestellt.

Wie in Abbildung 4-17 zu erkennen ist, waren in Studie G die höchsten Werte feststellbar. Offenbar fand keine Akkumulation in den Hepatozyten statt, obwohl die Werte nach Applikation von **2b** (E) über 4 h zunächst anstiegen, da **2b** durch passive Diffusion in die Zellen gelangt, und diese erst nach erfolgter *N*-Reduktion über Efflux-Transporter wieder verlassen kann. Aufgrund des sehr hohen Verteilungsvolumens von **2b** (s. 4.5.2.5) findet die Aufnahme in die Leber langsamer und länger statt als bei **3b**, welches sehr schnell in der Leber anflutet. Die Elimination der Tracer in der Leber in den Studien G und H lief über die ersten 4 h deutlich schneller ab als im darauffolgenden Zeitraum. Des Weiteren waren die Konzentrationen in Studie H insgesamt deutlich höher als in Studie D (s. auch Abb. 4-17). Es konnten folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nach 0,5 h, 4 h und 24 h mit $P < 0,05$ festgestellt werden: 0,5 h (D vs. F; D vs. G), 4 h (D vs. E; D vs. F), 24 h (D vs. E; D vs. G).

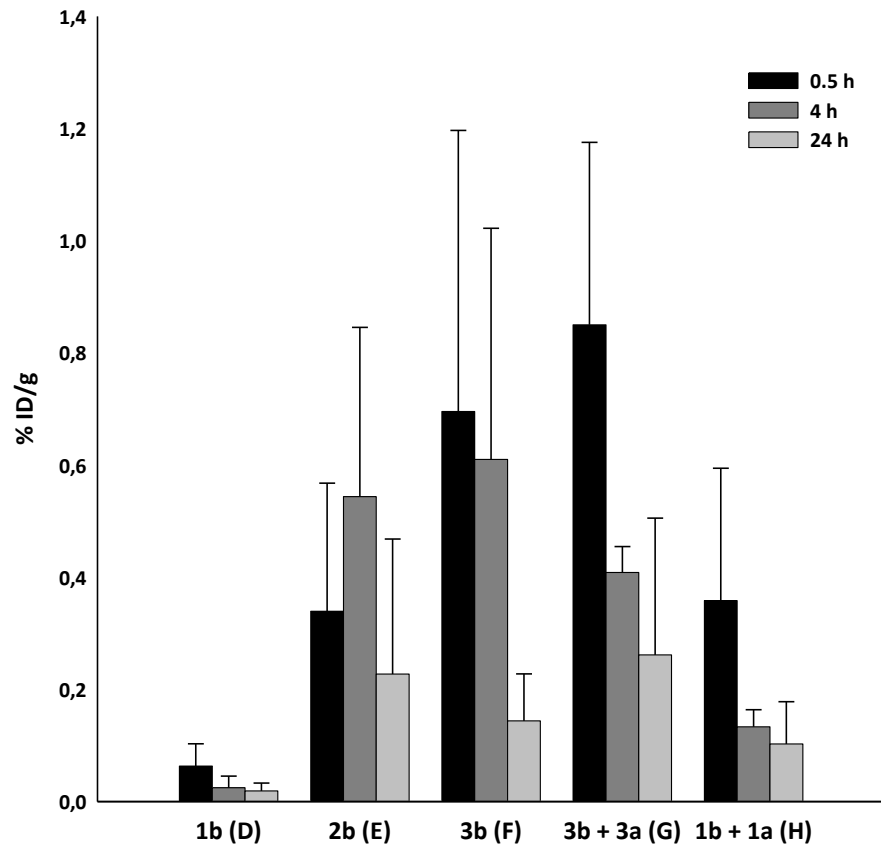


Abbildung 4-21: Zeit-Aktivitätsverläufe in der Leber nach oraler Applikation (D: n = 5, E - G: n = 6, H: n = 4)

Nieren

In Abbildung 4-22 sind die Zeit-Aktivitätsverläufe in den Nieren nach oraler Applikation von **1b** (D), **2b** (E) und **3b** (F) sowie die Kombination von **3a + 3b** (G) und **1a + 1b** (H) über 24 Stunden dargestellt.

Die Tracerkonzentrationen in den Nieren waren bei allen Studien auf einem ähnlichen Niveau, obgleich die Werte nach 0,5 h bei den beiden Kombinationsstudien G und H etwas höher lagen als bei den Studien D, E und F. Der Abbau der Tracer in den Studien G und H lief wie bei den Leberwerten über die ersten 4 h deutlich schneller ab als im darauffolgenden Zeitraum. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nach 0,5 h, 4 h und 24 h mit $P < 0,05$ festgestellt werden.

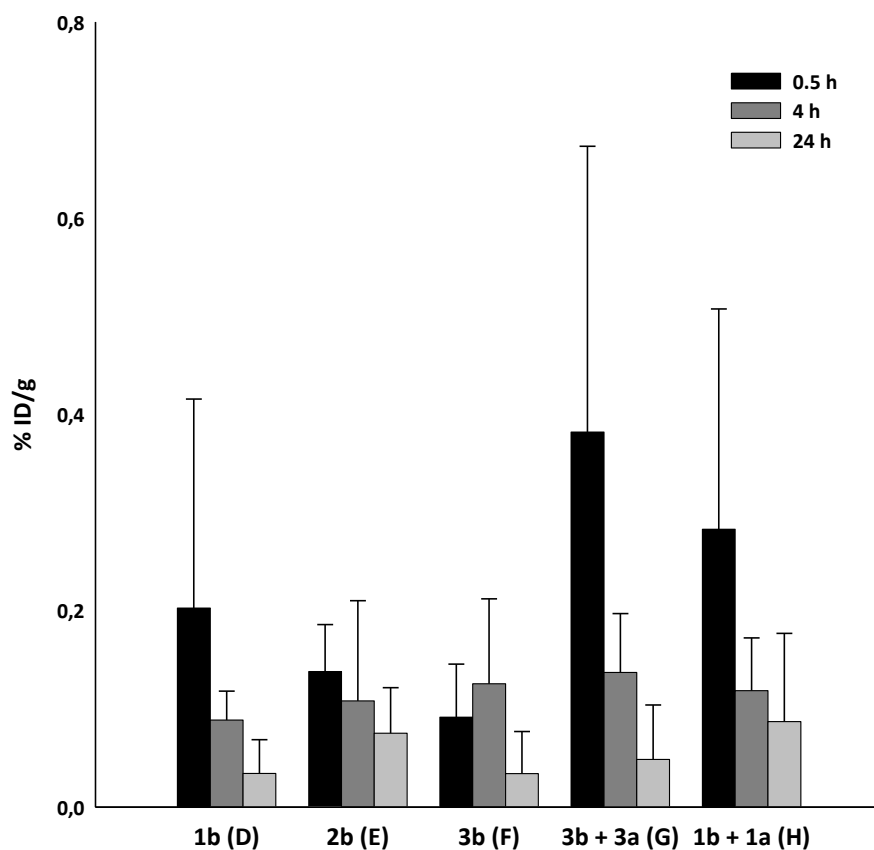


Abbildung 4-22: Zeit-Aktivitätsverläufe in den Nieren nach oraler Applikation (D: n = 5, E-G: n = 6, H: n = 4)

Milz

In Abbildung 4-23 sind die Zeit-Aktivitätsverläufe in der Milz nach oraler Applikation von **1b** (D), **2b** (E) und **3b** (F) sowie die Kombination von **3a** + **3b** (G) und **1a** + **1b** (H) über 24 Stunden dargestellt.

Die Tracerkonzentrationen in der Milz waren bei allen Studien auf einem ähnlichen Niveau, wobei die Werte nach Prodrug Applikation gegenüber den Studien D und H leicht erhöht waren. Insgesamt fand ein Abbau der Substanzen über 24 h statt, obwohl die Werte über 4 h bei den Studien E und H zunächst anstiegen. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nach 0,5 h, 4 h und 24 h mit $P < 0,05$ festgestellt werden.

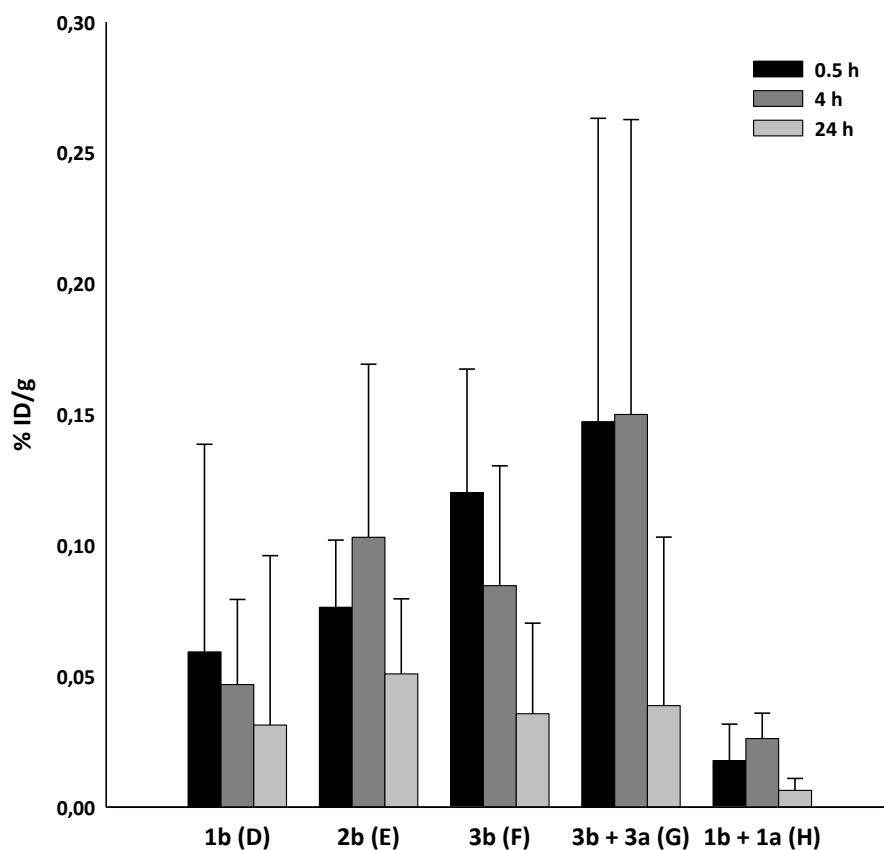


Abbildung 4-23: Zeit-Aktivitätsverläufe in der Milz nach oraler Applikation (D: n = 5, E-G: n = 6, H: n = 4)

Herz

In Abbildung 4-24 sind die Zeit-Aktivitätsverläufe im Herz nach oraler Applikation von **1b** (D), **2b** (E) und **3b** (F) sowie die Kombination von **3a + 3b** (G) und **1a + 1b** (H) über 24 Stunden dargestellt.

Auch hier waren die Tracerkonzentrationen bei allen Studien auf einem ähnlichen Niveau. Insgesamt waren die Konzentrationen im Herz sehr niedrig, was hinsichtlich der Kardiotoxizität (QT-Zeit Verlängerung) positiv zu bewerten ist. Es konnte zwischen Studie D und Studie G nach 24 h ein statistisch signifikanter Unterschied mit $P < 0,05$ festgestellt werden.

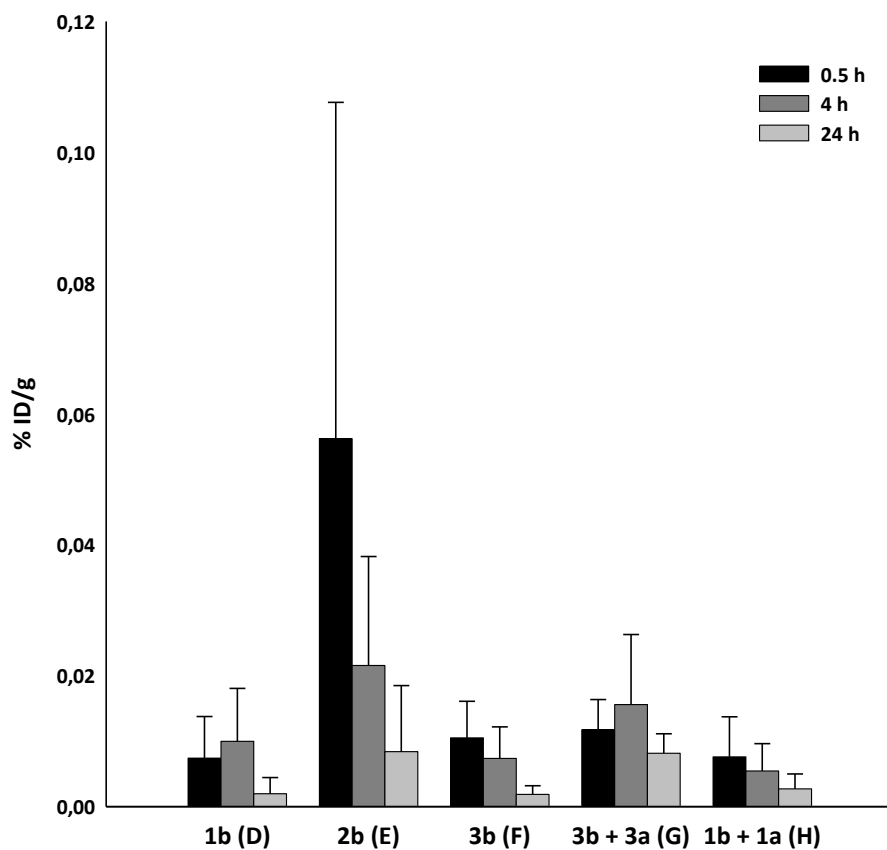


Abbildung 4-24: Zeit-Aktivitätsverläufe im Herz nach oraler Applikation (D: n = 5, E - G: n = 6, H: n = 4)

Lunge

In Abbildung 4-25 sind die Zeit-Aktivitätsverläufe in der Lunge nach oraler Applikation von **1b** (D), **2b** (E) und **3b** (F) sowie die Kombination von **3a** + **3b** (G) und **1a** + **1b** (H) über 24 Stunden dargestellt.

Die Tracerkonzentrationen in der Lunge waren in den Studien E und der Kombinationsstudie G etwas höher als bei den übrigen Studien. Auffällig war, dass die Werte nach Applikation von **2b** in Studie E wie auch schon in der Leber und in der Milz über die ersten vier Stunden zunächst anstiegen, was vermutlich aus einer langsamen Rückverteilung aus dem Gewebe resultiert, da das Verteilungsvolumen von **2b** sehr hoch ist. Diese Beobachtung stützt auch die These, dass **2b** durch passive Diffusion in die Zellen gelangt, und diese erst nach erfolgter *N*-Reduktion über Efflux-Transporter wieder verlassen kann. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nach 0,5 h, 4 h und 24 h mit $P < 0,05$ festgestellt werden.

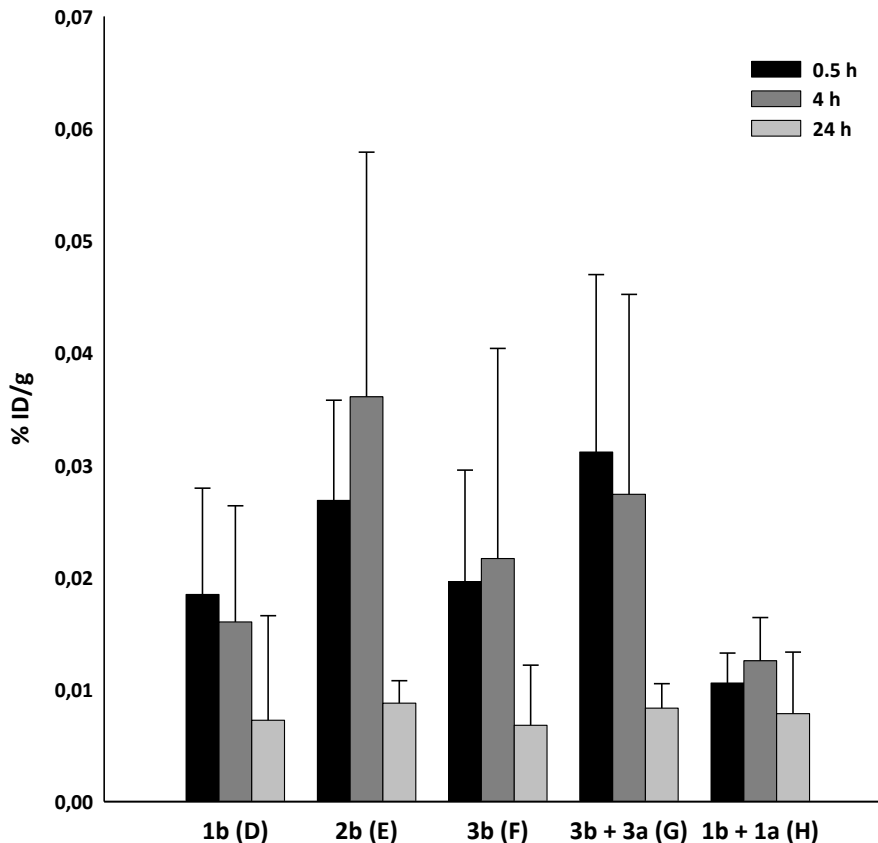


Abbildung 4-25: Zeit-Aktivitätsverläufe in der Lunge nach oraler Applikation (D: n = 5, E-G: n = 6, H: n = 4)

Gehirn

In Abbildung 4-26 sind die Zeit-Aktivitätsverläufe im Gehirn nach oraler Applikation von **1b** (D), **2b** (E) und **3b** (F) sowie die Kombination von **3a** + **3b** (G) und **1a** + **1b** (H) über 24 Stunden dargestellt.

Auch wenn die Konzentrationen insgesamt niedrig lagen, waren doch deutlich erhöhte Tracerkonzentrationen nach Applikation der Prodrugs gegenüber der Applikation von **1b** bzw. **1a** feststellbar, da die bei physiologischem pH-Wert positiv geladenen Amidinfunktionen eine orale Absorption behindern. Die höchsten Werte lieferte hierbei wie auch schon nach intravenöser Applikation das Prodrug **2b**. Insgesamt fand ein langsamer Abbau der Substanzen über die Zeit statt. Es konnten folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nach 0,5 h, 4 h und 24 h mit $P < 0,05$ festgestellt werden: 0,5 h (D vs. E; D vs. F), 4 h (D vs. E; D vs. G), 24 h (D vs. E; D vs. F).

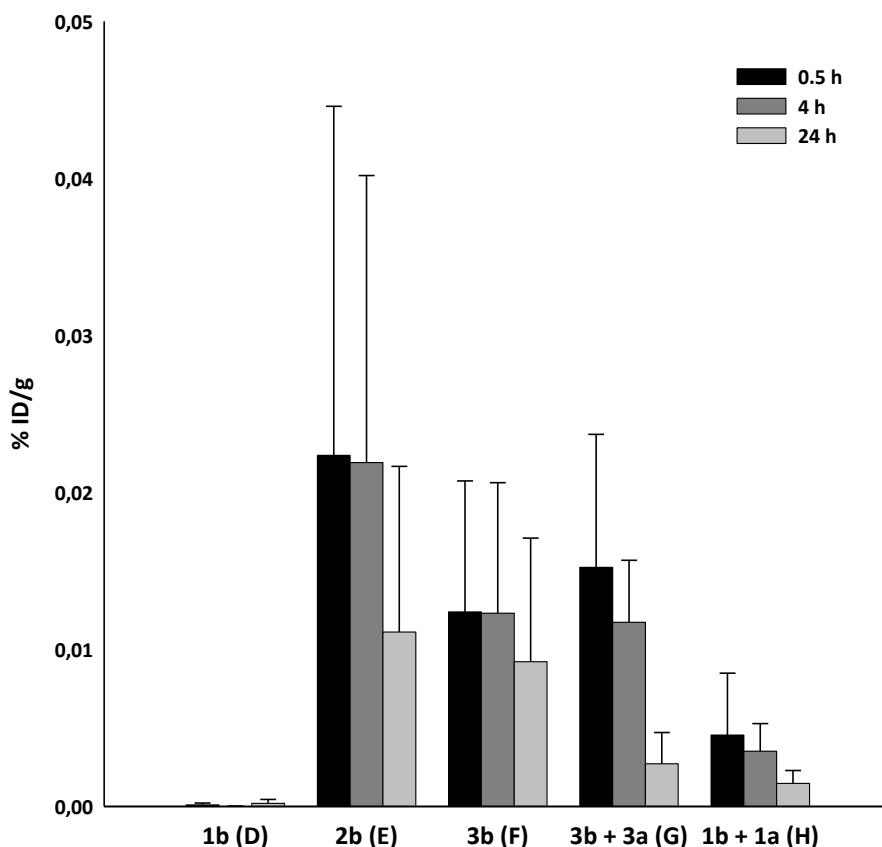


Abbildung 4-26: Zeit-Aktivitätsverläufe im Gehirn nach oraler Applikation (D: n = 4, E: n = 5, F-G: n = 6, H: n = 4)

4.5.2.8 Biodistribution 24 – 26 h nach oraler Applikation

In Abbildung 4-27 sind die Biodistributionsdaten der Organmessungen 24 – 26 h und in Abbildung 4-28 die Organkonzentrationen der letzten SPECT-Aufnahme 24 h nach oraler Applikation von **1b** (D), **2b** (E) und **3b** (F) sowie die Kombination von **3a + 3b** (G) und **1a + 1b** (H) über 24 Stunden dargestellt.

Die Methodik ist bereits unter 4.5.2.4 beschrieben worden. Beim statistischen Vergleich der erhaltenen Organkonzentrationen aus Bohrlochmessung und letzter SPECT-Aufnahme konnte in fast allen Fällen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Insbesondere für Leber, Nieren, Milz und Lunge konnte eine gute Korrelation der Daten festgestellt werden. Es konnten folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit $P < 0,05$ festgestellt werden: Leber (D vs. E; D vs. F), Nieren (D vs. E; D vs. H), Herz (D vs. E; E vs. H), Lunge (D vs. E; D vs. G; E vs. H) Gehirn (D vs. E; D vs. G; E vs. H).

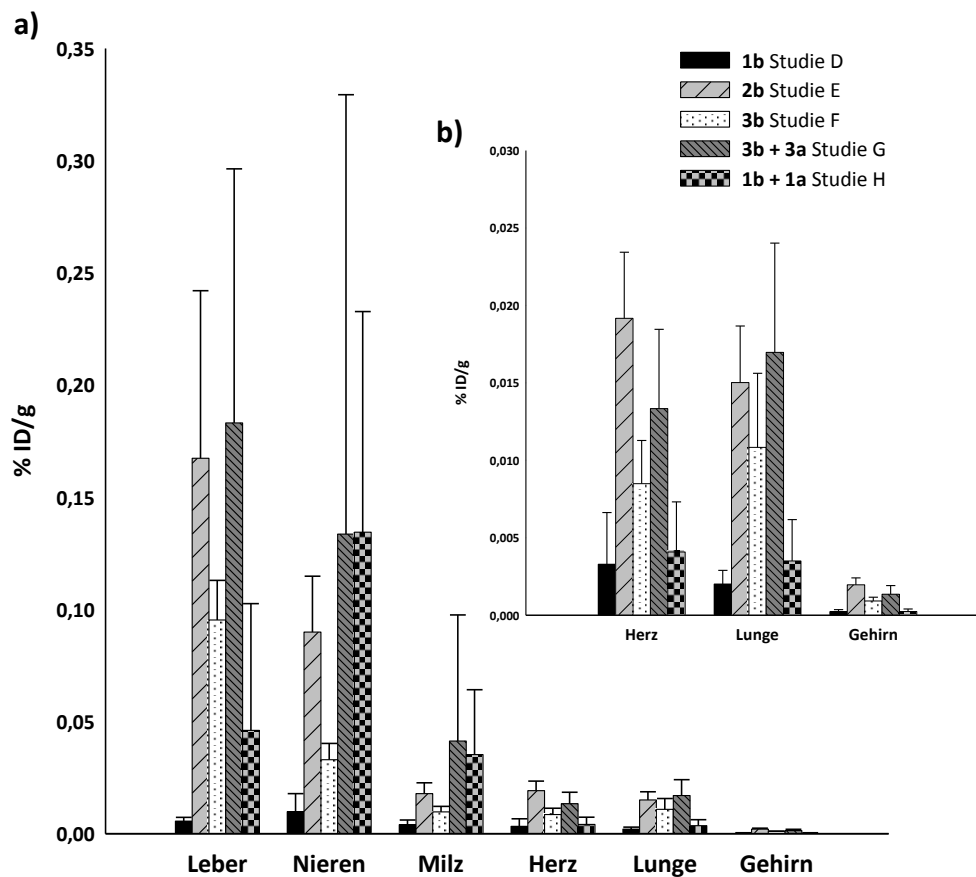


Abbildung 4-27: a) Biodistribution 24 - 26 h nach oraler Applikation (D: n = 5 (Lunge: n = 4), E - G: n = 6, H: n = 4), b) vergrößerter Ausschnitt von a. Bei Studie D wurde die Lunge von Ratte 4 bei der Organentnahme mit Radioaktivität kontaminiert und somit nach statistischer Berechnung mithilfe des Ausreißertests nach Henning als Ausreißer definiert und aus dem Datensatz entfernt.

Es konnten folgende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit $P < 0,05$ festgestellt werden: Leber (D vs. E; D vs. G), Herz (D vs. G), Gehirn (D vs. E; D vs. F).

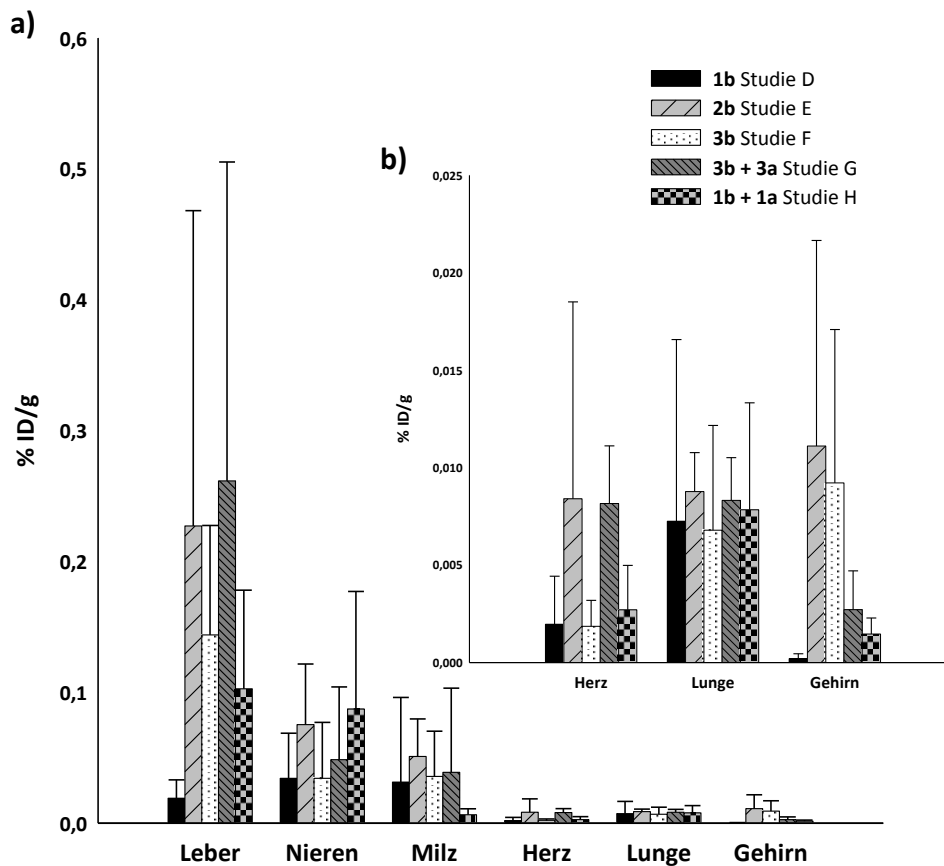


Abbildung 4-28: a) Organkonzentrationen SPECT-Aufnahme 24 h nach oraler Applikation (D: n = 5 (Gehirn: n = 4), E: n = 6 (Gehirn: n = 5), F-G: n = 6, H: n = 4), b) vergrößerter Ausschnitt von a. Bei Studie D wurde bei Ratte 5 keine Aufnahme des Kopfbereichs durchgeführt. Bei Studie E gab es bei Ratte 6 eine Kontamination des Fells im Kopfbereich, wodurch die Aufnahmen des Gehirns nicht auswertbar waren.

In folgenden Fällen wurde eine statistisch signifikante Abweichung zwischen Biodistribution und letzter SPECT-Aufnahme gefunden ($P < 0,05$):

Herz (E, F, G), Lunge (G), Gehirn (F, H)

4.5.2.9 Vergleich der relativen Bioverfügbarkeit von **3b** nach oraler Applikation (Studie F) mit und ohne Omeprazol

In den Abbildungen 4-29 und 4-30 sind die relativen Bioverfügbarkeiten, die aus den AUCs über 24 h und der Biodistribution 24 - 26 h nach oraler Applikation von **3b** (Studie F) mit und ohne vorherige Omeprazolgabe dargestellt. Die rBV wurde wie unter 4.3.2.5 beschrieben berechnet. Nach statistischer Analyse mittels t- bzw. Mann-Whitney U-Test konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Da die Omeprazolgabe offensichtlich keinen Einfluss auf die rBV nach Applikation von **3b** hat, wurden die Ergebnisse zusammengefasst und bei der Kombinationsstudie G auf den Einsatz von Omeprazol verzichtet. Offenbar reichte die Pufferkapazität der applizierten Tracerlösung aus, um eine saure Esterhydrolyse zu verhindern. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit $P < 0,05$ festgestellt werden.

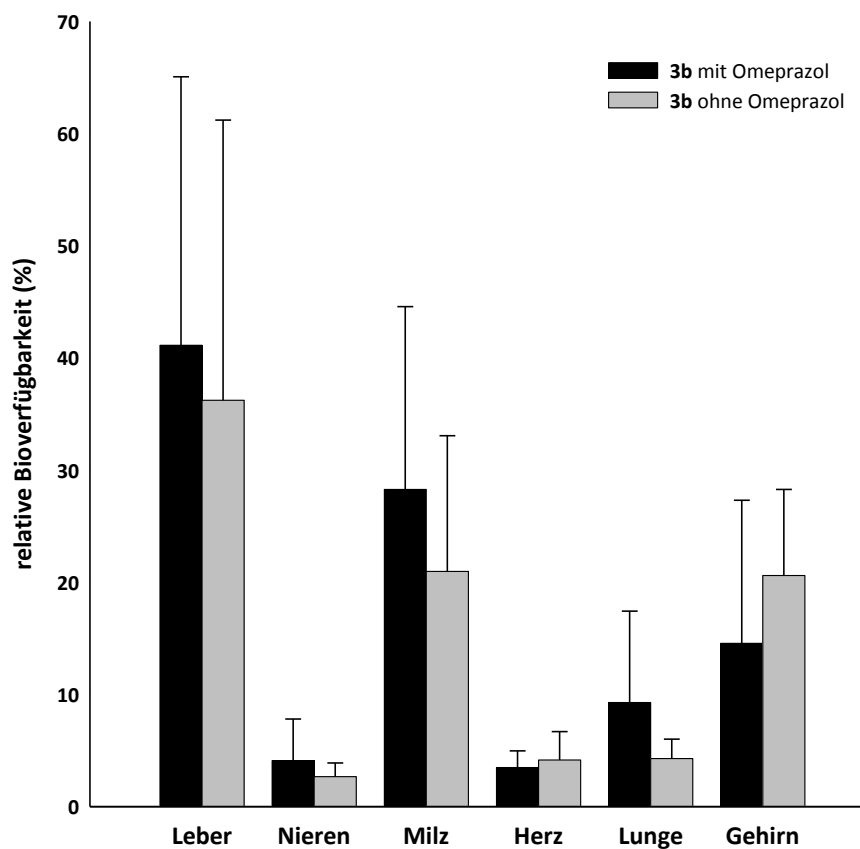


Abbildung 4-29: Vergleich der relativen Bioverfügbarkeit von **3b** berechnet aus den AUCs über 24 h mit und ohne Omeprazolgabe bei Studie F (mit Omeprazol: n = 4, ohne Omeprazol: n = 2)

Auch bei einem Vergleich der Biodistributionsdaten konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit $P < 0,05$ festgestellt werden.

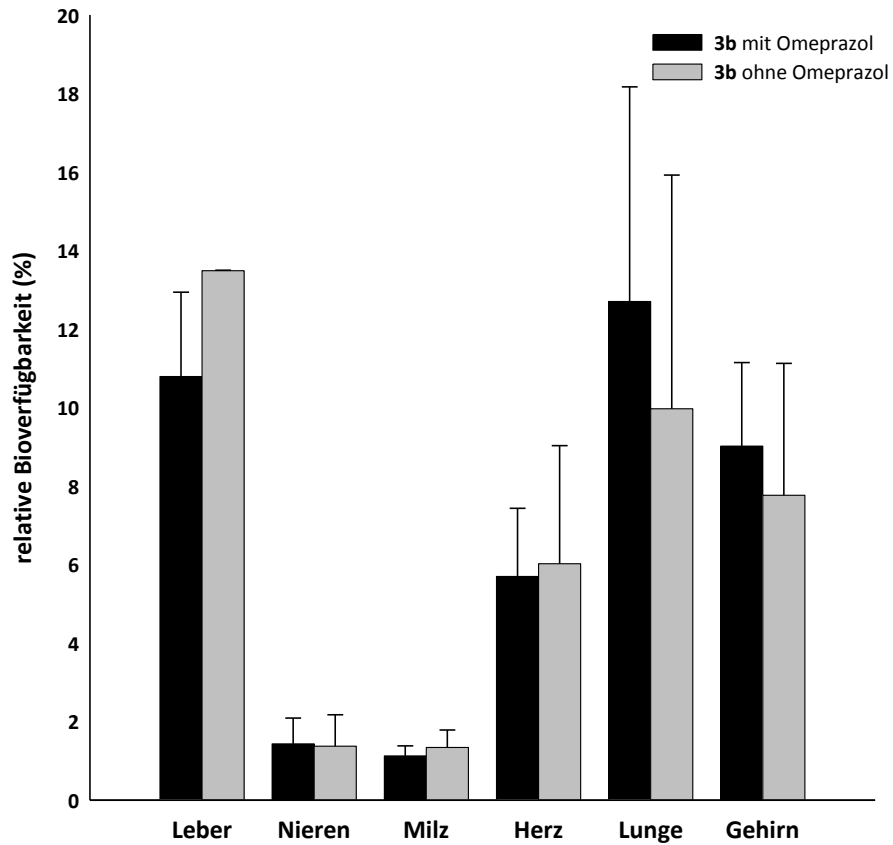


Abbildung 4-30: Vergleich der relativen Bioverfügbarkeit von **3b** berechnet aus den Biodistributionsdaten nach 24 - 26 h mit und ohne Omeprazolgabe bei Studie F (mit Omeprazol: n = 4, ohne Omeprazol: n = 2)

4.5.2.10 Blutspiegel nach oraler Applikation

Die Blutspiegelkurven nach oraler Applikation zeigten für alle Verbindungen einen typischen Verlauf. Nach einer 30 – 60 minütigen Absorptionsphase fand eine langsame Elimination aus dem Blut statt. Aus den ermittelten Blutspiegelkurven wurden die in Abbildung 4-31 dargestellten AUCs sowie die in Tabelle 4-3 dargestellten pharmakokinetischen Parameter berechnet. Statistisch signifikante Unterschiede mit $P < 0,05$ konnten nicht gefunden werden.

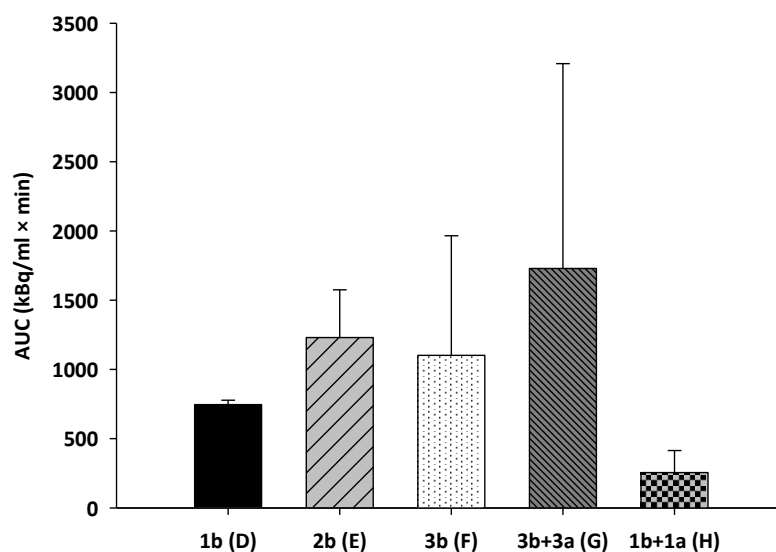
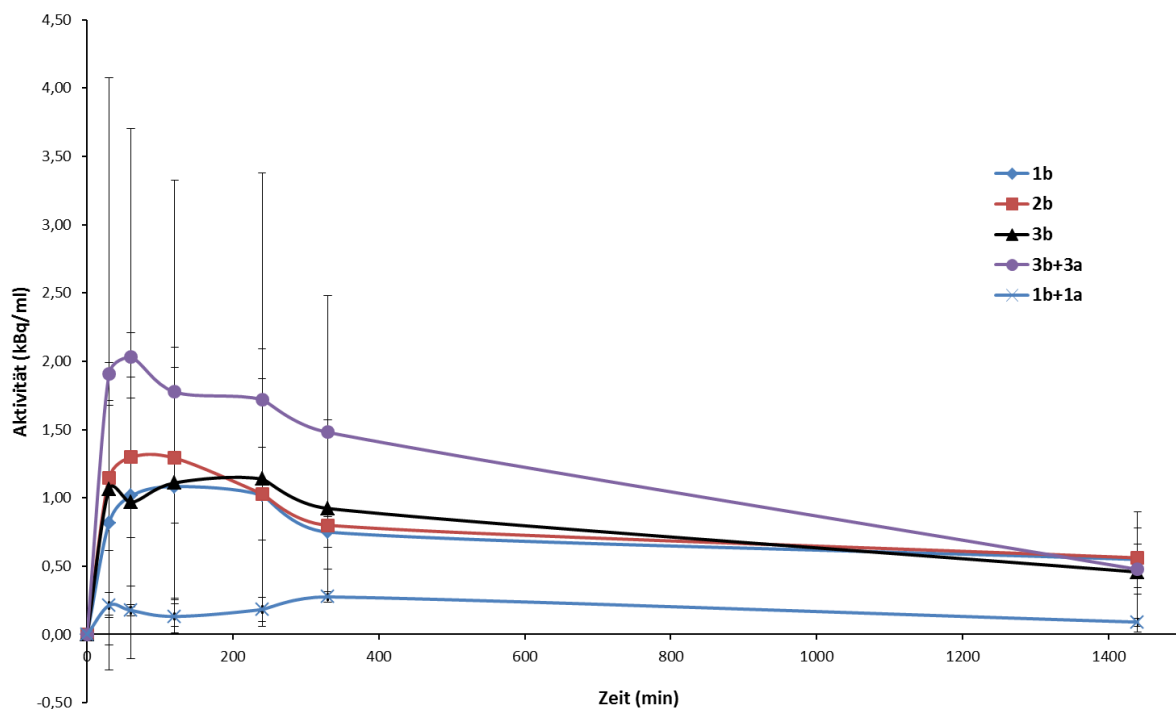


Abbildung 4-31: Lineare Darstellung der Blutspiegelkurven über 24 h und der daraus berechneten AUCs nach peroraler Applikation in den Studien D – H (D: n = 2; E – G: n = 4; H: n = 2)

Tabelle 4-3: Pharmakokinetische Parameter nach peroraler Applikation

Parameter für 10 MBq pro Ratte	Studie D 1b	Studie E 2b	Studie F 3b	Studie G 3a + 3b	Studie H 1a + 1b
Dosis (MBq/kg)	28,57	28,57	28,57	28,57	28,57
Anzahl der Tiere	2	4	4	4	2
AUC (kBq/ml × min)	746	1231	1102	1729	256
Cl (ml/(h × kg))	108,8	172,0	195,6	260,3	235,0
V _d (l/kg)	3,9	5,0	5,3	4,2	3,9
C _{max} (kBq/ml)	1,1	1,3	1,1	2,0	0,2
t _{max} (h)	2,0	1,0	0,5	1,0	0,5
t _{1/2} (h)	24,8	20,3	18,7	11,2	22,5
F _{rel} (%)	13,9	22,9	20,5	32,2	4,8

A: [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**), B: [¹²³I]-N,N'-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**), C: [¹²³I]-N,N'-Bis(succinyloxy)-iodpentamidin (**3b**) in den Studien D – H (AUC = area under the curve, Cl = Gesamtkörperclearance, V_d = Verteilungsvolumen, t_{1/2} = Eliminationshalbwertszeit, F_{rel} = relative Bioverfügbarkeit)

Die aus den nach oraler Applikation erhaltenen Blutspiegelkurven ermittelte Eliminationshalbwertszeit stimmt bis auf bei **2b** sehr gut mit den nach intravenöser Applikation ermittelten Halbwertszeiten überein. Die AUCs, die nach Applikation der Prodrugs erhalten wurden, waren deutlich größer als die, die nach Applikation von **1b** in den Studien D und H erhalten wurden. Der größte c_{max}-Wert und die größte AUC wurden in der Kombinationsstudie G gefunden. Aus den AUCs konnte die relative Bioverfügbarkeit in Bezug auf die intravenöse Applikation von [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**) (Studie A) berechnet werden. Auch hier konnte die deutlich verbesserte orale Bioverfügbarkeit der Prodrugs gegenüber **1b** gezeigt werden, obwohl eine statistische Signifikanz aufgrund des geringen Probenumfangs von n = 2 bzw. 4 nicht bewiesen werden konnte (Abb. 4-32).

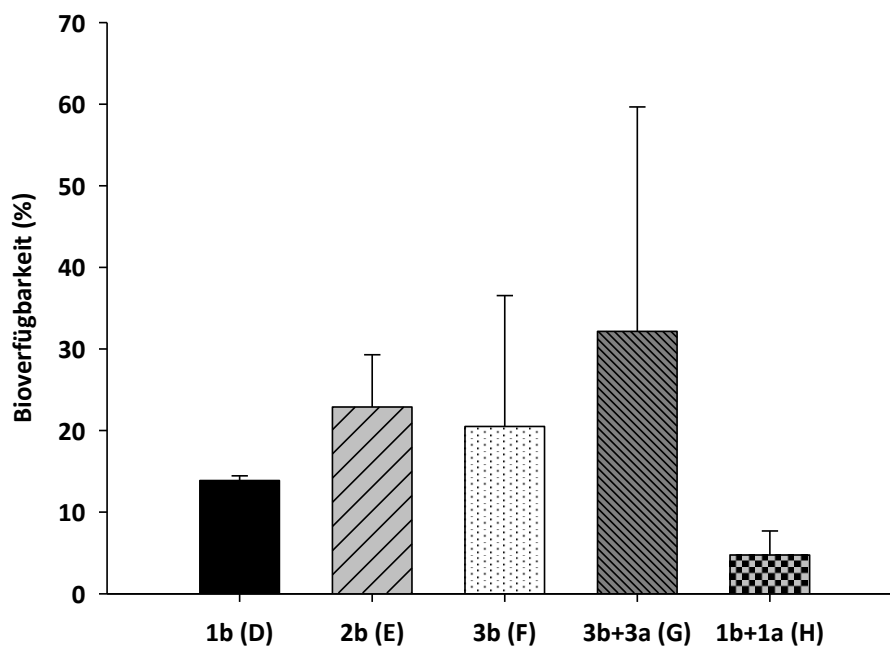


Abbildung 4-32: Relative Bioverfügbarkeit bezogen auf die intravenöse Applikation von [^{123}I]-Iodopentamidin (**1b**) berechnet aus den Blutspiegel-AUCs über 24 h nach oraler Applikation (D: n = 2, E-G: n = 4, H: n = 2)

4.5.2.11 *In vivo* Stabilität der markierten Verbindungen – Akkumulation von ^{123}I in der Schilddrüse

Die *in vitro* und *in vivo* Stabilität von [^{123}I]-Iodopentamidin (**1b**) wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten ausreichend untersucht und nachgewiesen [Blower *et al.*, 1992; O’Doherty *et al.*, 1992; Simon *et al.*, 1997]. Bei *in vivo* Studien kann die Radioaktivität in der Schilddrüse Aufschluss über die *in vivo* Stabilität von [^{123}I]-markierten Verbindungen geben, da sich abgespaltenes [^{123}I]-Iodid in der Schilddrüse anlagern würde [Samnick *et al.*, 2005; O’Doherty *et al.*, 1992]. Eine zusätzliche Akkumulation von radioaktiv markierten Verbindungen in der Schilddrüse kann natürlich nicht ausgeschlossen werden. Da keine Unterscheidung zwischen [^{123}I]-markierten Metaboliten und freiem [^{123}I]-Iodid getroffen werden konnte, diente die Schilddrüse lediglich zur Kontrolle der *in vivo* Stabilität der untersuchten Verbindungen [Chrastina *et al.*, 2010]. In den Abbildungen 4-33 und 4-34 sind die Zeit-Aktivitätsverläufe in der Schilddrüse dargestellt und in Abbildung 4-35 die Biodistribution nach 24 – 26 h. Die Aktivität in der Schilddrüse nach 30 Minuten und 4 h war vernachlässigbar, jedoch konnte in einigen Studien nach 24 h eine gewisse Menge an Radioaktivität festgestellt werden. Die Konzentrationen nach Applikation von [^{123}I]-NaI, welches sich ausschließlich in der Schilddrüse anreicherte (Abb. 4-36), waren nach 24 h

deutlich höher als nach Applikation der [^{123}I]-markierten Pentamidine (**1b**, **2b**, **3b**). Aus den hier gezeigten Daten kann demnach eine ausreichende *in vivo* Stabilität der [^{123}I]-markierten Verbindungen über 24 h abgeleitet werden. Es konnte zu allen Zeitpunkten sowohl nach intravenöser als auch nach oraler Applikation ein statistisch signifikanter Unterschied mit $P < 0,05$ zwischen [^{123}I] und allen anderen Gruppen nachgewiesen werden.

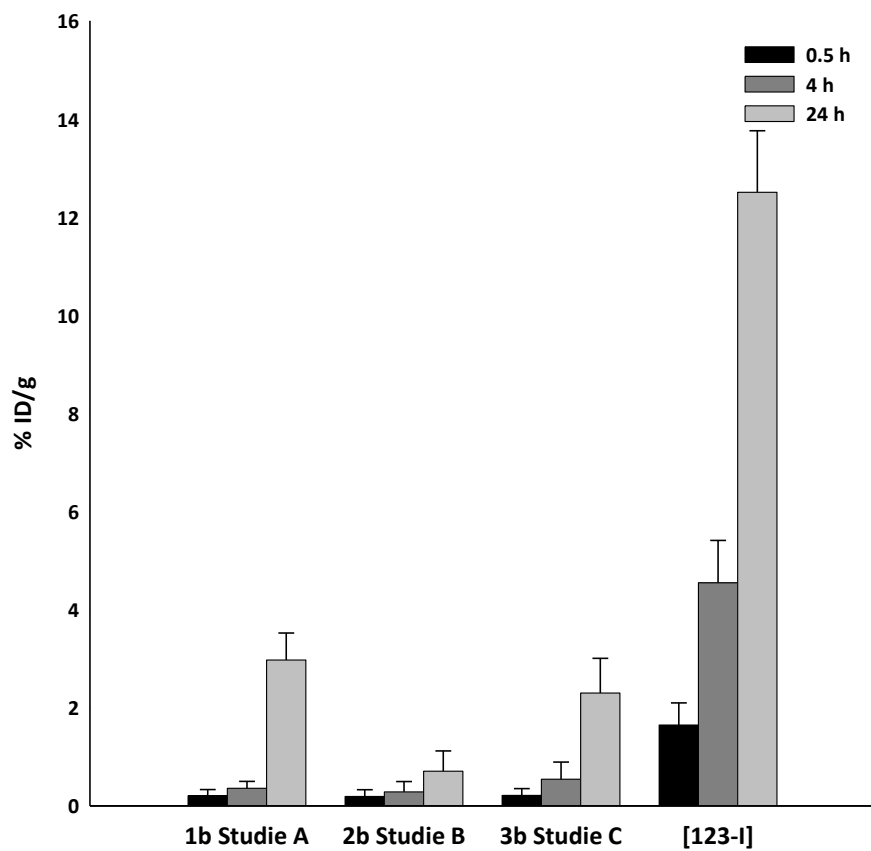


Abbildung 4-33: Zeit-Aktivitätsverläufe in der Schilddrüse nach intravenöser Applikation (A: n = 6, B: n = 6, C: n = 5, [^{123}I]: n = 2)

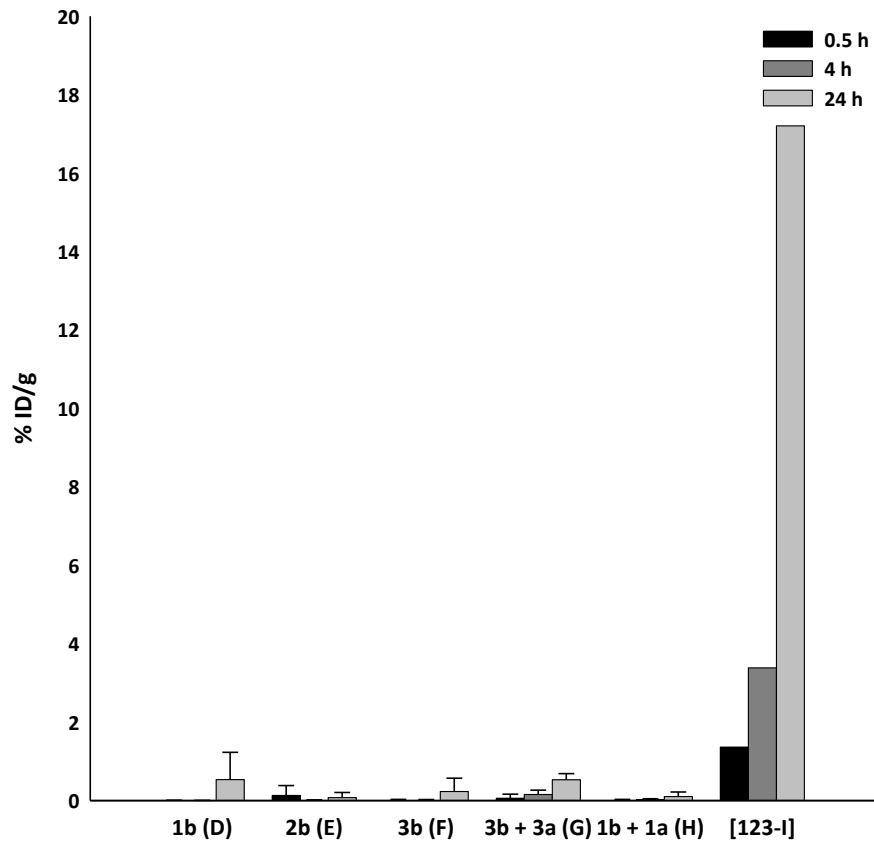


Abbildung 4-34: Zeit-Aktivitätsverläufe in der Schilddrüse nach oraler Applikation (D: n = 5, E - G: n = 6, H: n = 4, [123-I]: n = 1)

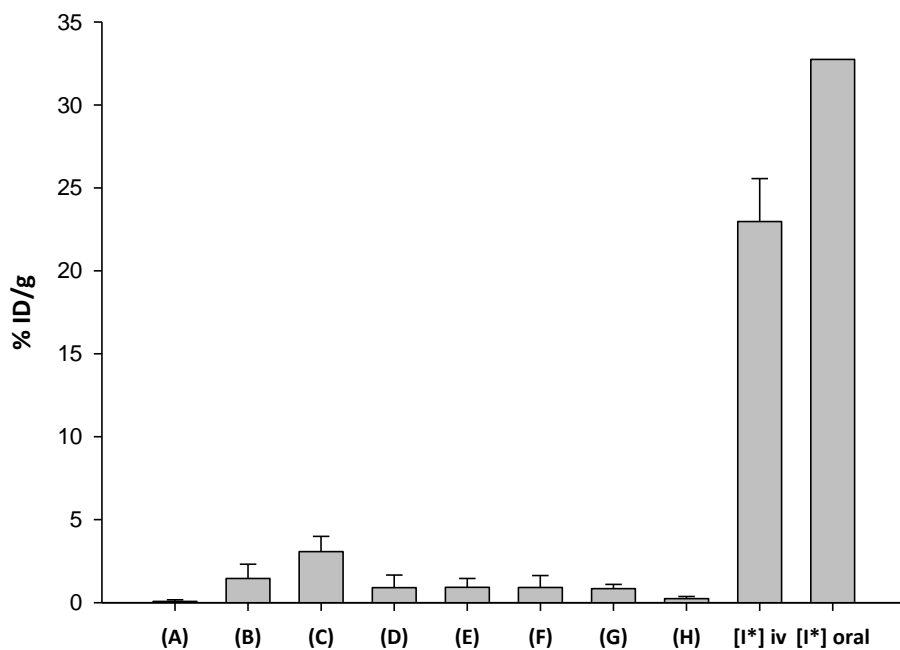
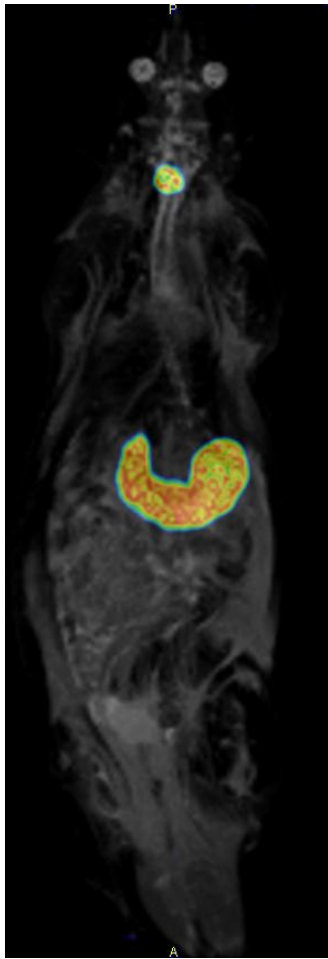


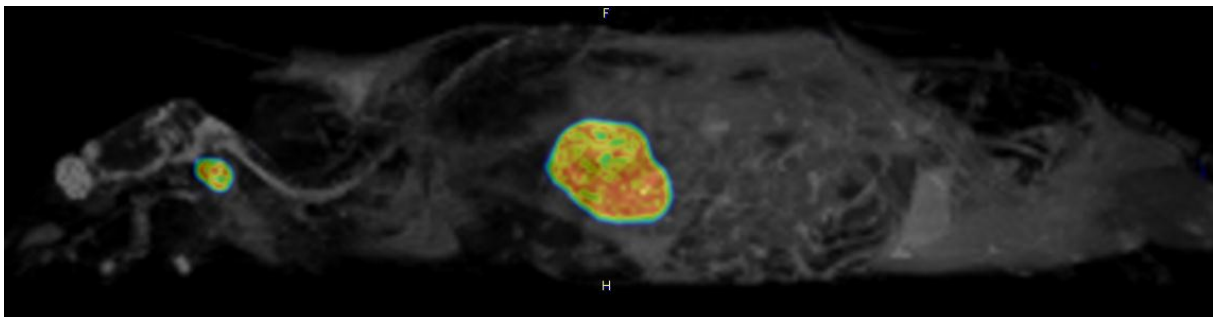
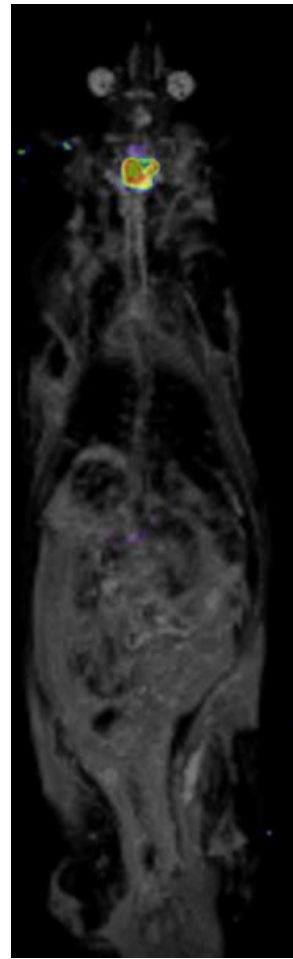
Abbildung 4-35: Biodistribution 24 -26 h in der Schilddrüse nach intravenöser und oraler Applikation (A: n = 6, B: n = 6, C: n = 5, D: n = 5, E - G: n = 6, H: n = 4, [123-I] iv: n = 2, [123-I] oral: n = 1); [123-I] = [123-I]



Links: 4 h nach
oraler Applikation

Coronale Darstellung

Rechts: 24 h nach in-
travenöser Injektion



Oben: 4 h nach oraler Applikation - sagittale Darstellung

Unten: 24 h nach intravenöser Injektion - sagittale Darstellung

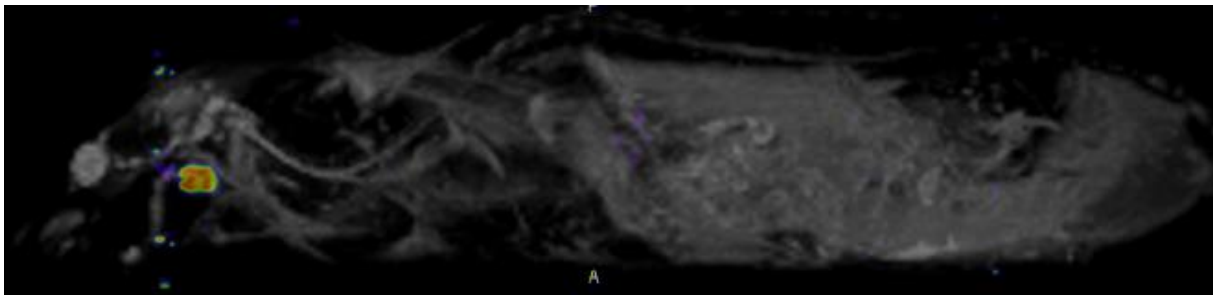


Abbildung 4-36: Fusionierte SPECT/MR-Aufnahmen zweier Ratten 4 h nach oraler und 24 h nach intravenöser Applikation von ^{123}I -NaI. Zu sehen sind die Akkumulation in der Schilddrüse sowie die Radioaktivität im Magen nach oraler Applikation.

4.6 Diskussion der Ergebnisse

Das Ziel der durchgeführten *in vivo* Imaging-Studien war es, die Distribution, die orale Bioverfügbarkeit und die Blut-Hirn Schranken-Gängigkeit von [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**), [^{123}I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) und [^{123}I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**) nach intravenöser und oraler Applikation zu untersuchen.

Die Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit gegenüber [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**) konnte umfassend belegt werden. In allen Organen ebenso wie im Blut wurden nach Applikation der Prodrugs höhere Konzentrationen als nach Applikation von [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**) detektiert. Vor allem in Leber und Gehirn konnten signifikant höhere Bioverfügbarkeiten nach Applikation von **2b** und **3b** festgestellt werden. Diese Beobachtungen stimmen im Prinzip mit früheren Studiendaten von nicht iodierten Verbindungen überein [Kotthaus *et al.*, 2011]. Interessanterweise wurden in der Kombinationsstudie G, in der zusätzlich zur radioaktiv markierten Verbindung **3b** 30 mg/kg der nicht radioaktiven Verbindung **3a** appliziert wurden, außer in Leber und Gehirn in allen Fällen höhere AUCs über 24 h bestimmt als in Studie F, in der keine nicht radioaktive Verbindung nachträglich zugesetzt wurde. Durch die Biodistributionsdaten nach 24 – 26 h waren sogar in allen Organen höhere Konzentrationen in der Kombinationsstudie G nachweisbar. Bei zusätzlicher Applikation von identischen nicht radioaktiven Substanzen, die sich gemäß des Tracerprinzips exakt wie die radioaktive Verbindung verhalten, würde man bei gleicher Verteilung eigentlich eine Abnahme der Radioaktivität in den einzelnen Organen erwarten. Da die Konzentrationen in den Kombinationsstudien G und H gegenüber den Einzelstudien D und F in den meisten Fällen leicht erhöht waren, lässt dies auf einen nicht sättigbaren Aufnahmeprozess in die Zellen durch passive Diffusion und einen entgegengesetzten, sättigbaren aktiven Transport schließen, so dass ein verlängerter Aufenthalt der Substanzen in den Zellen zustande kommt. Für die Prodrugs wird diese Vermutung durch frühere *in vitro* Studien an Caco-2 Zelllinien bestätigt [Schwering, 2010]. In den durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass die dort untersuchten Prodrugs *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**) und *N,N'*-Bis(acetoxy)pentamidin nach Aufnahme in die Zellen größtenteils zum Pentamidin (**1**) metabolisiert und über Effluxtransporter wie P-Glykoprotein und *Multidrug Resistance-Related* Proteine (MRP) aktiv aus der Zelle transportiert werden. Pentamidin (**1**) selbst wird allerdings auch aktiv durch verschiedene Transportproteine aufgenommen und ist bekanntermaßen ein Substrat von P-Glykoprotein und MRP [Sanderson *et al.*, 2009; Baker *et al.*, 2013; Schwering, 2010]. Die

erhöhten Konzentrationen in verschiedenen Organen in Studie H lassen sich dadurch erklären, dass die Influxtransporter im Gegensatz zu den Effluxtransportern bei der applizierten Dosis noch nicht vollständig abgesättigt wurden.

Ein Vergleich der oralen Bioverfügbarkeit nach Applikation von **3b** (Studie F) mit und ohne Omeprazolinjektion zur Anhebung des pH-Wertes im Magen brachte keine offensichtlichen und statistisch signifikanten Unterschiede hervor. Offenbar reichte die Pufferkapazität der applizierten Tracerlösung, die aus Ethanol/PBS bestand, aus, um eine vorzeitige saure Hydrolyse des Esters zu verhindern. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass der pH-Wert des Rattenmagens höher liegt als der des menschlichen und das Volumen nur ca. 3,4 ml beträgt, so dass durch Applikation von 1 ml Pufferlösung der Magen bereits zu einem erheblichen Teil ausgefüllt wird [McConnell *et al.*, 2008]. Somit bringt eine zusätzliche intravenöse Omeprazolapplikation unter diesen Bedingungen keinen zusätzlichen Nutzen zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit, weshalb bei Studie G darauf verzichtet wurde.

Die Auswertung der Blutproben zeigte nach intravenöser Applikation von **1b**, **2b** und **3b** eine schnelle Anflutung gefolgt von einem biphasischen Eliminationsverlauf, welcher für Pentamidin (**1**) literaturbekannt ist [Terlinden & Römer, 1990; Bronner *et al.*, 1995]. Eine schnelle Verteilung von [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**) ins periphere Gewebe ist ebenfalls bekannt [Simon *et al.*, 1997]. Nach Applikation von [¹²³I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) war der Wert für c_{\max} nur etwa halb so groß wie nach Applikation von [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**). Wahrscheinlich ist die Verteilung und Gewebefindung von **2b** aufgrund der deutlich erhöhten Lipophilie wesentlich ausgeprägter als nach Applikation von **1b**, was auch durch das große Verteilungsvolumen unterstrichen wird. Interessanterweise ist die initiale Halbwertszeit von [¹²³I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**) am längsten, was auf eine ausgeprägte Plasmaproteinbindung schließen lässt [Mutschler, 2008]. Weil die drei Verbindungen sich in ihrer Basizität unterscheiden, können sie an unterschiedliche Plasmaproteine binden. **1b** kann als Base an α 1-saures Glykoprotein binden, **2b** hat aufgrund seiner neutralen Eigenschaften anscheinend keine starke Plasmaproteinbindung, sondern verteilt sich wegen seiner hohen Lipophilie schnell ins Gewebe und **3b** kann als Säure an Albumin binden. Die aus den Blutspiegelkurven ermittelten AUCs waren bei **3b** signifikant am höchsten. Nach oraler Applikation konnte für **3b** in der Kombinationsstudie G mit 32,2 % die höchste Bioverfügbarkeit bestimmt werden und war ca. 12 Prozentpunkte höher als in der Einzelstudie F. Bei der oralen Applikation von **1b** war es genau umgekehrt: In der

Einzelstudie Studie D betrug die orale Bioverfügbarkeit 13,9 % und war damit höher als in der Kombinationsstudie H mit 4,8 %. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse aus *in vitro* Transportstudien an Caco-2 Zelllinien, die eine Absorption durch passive Diffusion für das untersuchte Ester-Prodrug des Pentamidins (**1**) und eine sättigbare transporterermittelte Aufnahme für Pentamidin (**1**) selbst belegen [Schwering, 2010].

Bei allen Verbindungen waren Leber und Nieren die Hauptorgane der Distribution. In allen anderen Organen fanden sich eher niedrige Konzentrationen, was sich mit Ergebnissen aus früheren Arbeiten mit den nicht iodierten Substanzen deckt [Hungeling, 2009]. Es konnte gezeigt werden, dass die Prodrugs **2b** und **3b** im Gegensatz zu **1b** sowohl nach intravenöser als auch nach oraler Applikation ausgeprägt in der Leber metabolisiert werden, wo nach Esterhydrolyse vermutlich größtenteils die *N*-Reduktion durch das mARC-haltige Enzymsystem zum Amidin erfolgt [Clement *et al.*, 1992; Clement *et al.*, 2005]. Diese Beobachtung wurde bereits 1999 von Rieckert mit einem Essigsäureester-Prodrug des nicht iodierten Pentamidins (**1**) gemacht und deckt sich mit den hier gefundenen Ergebnissen [Rieckert, 1999]. Ähnliche Ergebnisse konnten 2009 von Hungeling für *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (**3**) gezeigt werden [Hungeling, 2009]. Eine Akkumulation in den Hepatozyten fand allerdings nicht statt. Vielmehr wurden alle Verbindungen biliär eliminiert, was hinsichtlich einer möglichen Hepatotoxizität positiv zu bewerten ist. Diese Beobachtungen decken sich mit Erfahrungen, die in früheren Studien mit Pentamidin (**1**) gemacht wurden [Bronner *et al.*, 1995; Farinotti *et al.*, 1989]. Die Konzentrationen in den Nieren waren insbesondere nach intravenöser Applikation der Prodrugs **2b** und **3b** deutlich geringer als nach Applikation von **1b**. Da die Nephrotoxizität von Pentamidin (**1**) nach intravenöser Gabe eine schwerwiegende Nebenwirkung in der Therapie darstellt [Fachinformation Pentacarinat®, 2010], können die niedrigen Prodrugkonzentrationen in den Nieren auch nach intravenöser Applikation eine Senkung der Nephrotoxizität bedeuten. Sowohl zur Abklärung der Hepato- als auch der Nephrotoxizität der Prodrugs müssen allerdings weiterführende Toxizitätsuntersuchungen durchgeführt werden.

Die Lunge stellt bei der Behandlung der PCP das wichtigste Zielorgan dar, weshalb eine möglichst große Anreicherung der Tracer in der Lunge wünschenswert ist. Insbesondere die Entwicklung eines oral verfügbaren Arzneistoffs würde eine gute Alternative zur inhalativen Therapie darstellen. Nach intravenöser Applikation konnten für beide Prodrugs höhere Konzentrationen in der Lunge als nach intravenöser Injektion von **1b** erzielt werden, wobei

das Ester-Prodrug **3b** die höchsten Werte lieferte. Nach oraler Applikation war die relative Bioverfügbarkeit in der Lunge bei allen Prodrug-Studien etwas größer als nach Applikation von **1b** bzw. **1a+1b**. In den Studien E und G waren die aus den AUCs über 24 h ermittelten Bioverfügbarkeiten für **2b** bzw. **3b** mit $10,5 \pm 4,6\%$ bzw. $9,3 \pm 4,9\%$ am höchsten und lagen etwas höher als die von Kotthaus *et al.* ermittelten Werte für *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (**3**), die eine relative Bioverfügbarkeit in der Lunge von $4,9 \pm 2,7\%$ nach 6 h fanden [Kotthaus *et al.*, 2011]. Aus den Zeit-Aktivitätsverläufen nach oraler Applikation von **2b** konnte über 4 h eine Akkumulation beobachtet werden, die vermutlich aus der langsamen Rückverteilung aus dem Gewebe resultiert, da das Verteilungsvolumen von **2b** sehr hoch ist. Diese Akkumulation, auf die allerdings ein Abbau nach 24 h folgte, ist bezüglich einer möglichen oralen Therapie der PCP mit entsprechenden Dosiswiederholungen positiv zu bewerten, da so möglicherweise die erforderliche effektive Dosis erreicht werden könnte. Hierzu müssen aber nähere Untersuchungen erfolgen.

Um das zweite Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit erfolgreich therapieren zu können, müssen die Substanzen die Blut-Hirn Schranke überwinden können [Enanga *et al.*, 2002]. In der Literatur werden für die Wachstumshemmung von Trypanosomen IC_{50} -Werte von 0,8 – 3,2 nM Pentamidin (**1**) angegeben [Donkor *et al.*, 2003; Ismail *et al.*, 2004; Arafa *et al.*, 2005]. Die Konzentrationen im Gehirn konnten nach intravenöser Applikation von **2b** im Vergleich zu **1b** in etwa verdoppelt werden. Das Ester-Prodrug **3b** brachte leider keine erhöhten Konzentrationen im Gehirn. Wenn man die Blut-Hirn Schranken-Gängigkeit der Substanzen anhand von Lipinski's *rule of five* analysiert (s. 1.5.1), dann verstößt **3b** gegen drei der vier Regeln, **2b** hingegen nur gegen eine. **3b** ist zwar deutlicher lipophiler als **2b**, was eine passive Diffusion durch die Blut-Hirn Schranke eigentlich verbessert, aber **3b** hat auch ein höheres Molekulargewicht und mehr Wasserstoffbrücken Akzeptoren als **2b**. Bei oraler Applikation findet im Rahmen der metabolischen Prodrug-Aktivierung als erstes eine Esterhydrolyse von **3b** statt, so dass nach Aufnahme ins Blut und bei Erreichen der Blut-Hirn Schranke vornehmlich Metabolite von **3b** vorliegen. Nach intravenöser Applikation erreicht **3b** vor der ersten Leberpassage die Blut-Hirn Schranke hauptsächlich unmetabolisiert und ist somit für eine passive transzelluläre Diffusion ungeeignet. Anschließend finden nicht nur Distributions- sondern auch Metabolisierungsprozesse u. a. zu **1b** statt (s. 4.1), sodass keine wesentlich bessere Blut-Hirn Schranken-Gängigkeit als bei Applikation von **1b** erreicht werden kann. Außerdem behindert die hohe Plasmaproteinbindung von **1b** und möglicherweise auch von

3b die Blut-Hirn Schranken-Gängigkeit, da die Plasmaproteine an der Endothelbarriere der Blut-Hirn Schranke zurückgehalten werden. **2b** hingegen erreicht nach intravenöser Bolusinjektion ebenfalls unmetabolisiert die Blut-Hirn Schranke und kann diese aufgrund seiner hohen Lipophilie transzellulär passieren (s. 1.5.2). Da Pentamidin (**1**) selbst nicht effektiv zur Behandlung des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt werden kann, müsste anhand eines entsprechenden *in vivo* Modells an infizierten Tieren geprüft werden, ob die erforderlichen Konzentrationen im ZNS nach intravenöser Applikation von *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**) erreicht werden, um die erkrankten Tiere zu heilen. Entsprechende Studien nach intraperitonealer Injektion von *N,N'*-Bis(valoxy)pentamidin und *N,N'*-Bis(carboxymethoxy)pentamidin sowie nach peroraler Applikation von *N,N'*-Bis(acetoxy)pentamidin blieben leider erfolglos [Hungeling, 2009]. Da **2b** bzw. dessen Metabolite allerdings im Gehirn über 24 Stunden akkumulierten und auch nach 24 Stunden noch eine beachtliche Menge an Radioaktivität detektierbar war, besteht die Chance, dass durch wiederholte intravenöse Applikation des Prodrugs durchaus die erforderlichen Konzentrationen im ZNS erreicht werden können.

Die Stabilität der untersuchten Verbindungen konnte aus der Aufnahme von abgespaltenem [¹²³I]-Iodid in die Schilddrüse abgeleitet werden. Da erst nach 24 h in einigen Fällen Radioaktivität in der Schilddrüse zu finden war und die Menge im Vergleich zur Aktivität nach Applikation einer [¹²³I]-NaI-Lösung sehr gering war, konnte eine ausreichende *in vivo* Stabilität der radioaktiv markierten Verbindungen angenommen werden (s. 4.5.2.11).

[¹²³I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) und [¹²³I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**) zeigten in vielen Fällen vergleichbare Ergebnisse. Im Vergleich der beiden nicht iodierten Prodrugs **2** und **3** ist bei vergleichbaren Ergebnissen das *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (**3**) als das bessere Prodrug anzusehen, da es eine deutlich bessere Wasserlöslichkeit als *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**) besitzt [Kotthaus *et al.*, 2011], was für die Entwicklung eines Arzneistoffs hinsichtlich der Einteilung im Biopharmazeutischen Klassifizierungssystem (BCS) eine wichtige Rolle spielt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Dringlichkeit der Entwicklung neuer Arzneistoffe für die Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit ist aktuell sehr groß. Die zunehmende Resistenzentwicklung gegen bestehende Therapiemöglichkeiten sowie die Auswahl der zur Verfügung stehenden Arzneistoffe führen oft zu Problemen bei der Behandlung von Patienten. Für die Therapie des ersten Stadiums der Afrikanischen Trypanosomiasis stehen Suramin und Pentamidin (**1**) zur Verfügung, die beide weder oral bioverfügbar noch in ausreichendem Maße ZNS-gängig sind. Daher erfolgt die Behandlung des zweiten Stadiums, in dem sich die Erreger bereits im ZNS befinden, mit der toxischen Arsenverbindung Melarsoprol. Nur bei einer Infektion mit *Trypanosoma brucei gambiense*, dem Erreger der chronischen Variante der Afrikanischen Schlafkrankheit, kann eine Therapie mit dem besser verträglichen Eflornithin erfolgen, welches neuerdings in Kombination mit dem zur Behandlung der Chagas-Krankheit zugelassenen Nifurtimox eingesetzt wird. Die Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit ist nicht zuletzt aufgrund der schweren Nebenwirkungen, die nach intravenöser oder intramuskulärer Applikation der Arzneistoffe auftreten, schwierig und erfordert geschultes Personal, was besonders in ländlichen Regionen Afrikas mit geringer Ärztedichte problematisch ist. Zur Verbesserung der Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit wurden daher verschiedene Prodrugs des Pentamidins (**1**) mit dem Ziel entwickelt, einen oral verfügbaren Arzneistoff bereitzustellen und die ZNS-Gängigkeit für eine erfolgreiche Behandlung des zweiten Stadiums zu verbessern. Die metabolische Aktivierung der Prodrugs konnte in vorangegangenen Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen und aufgeklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Prodrugs *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**) und *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (**3**) im Vergleich zu Pentamidin (**1**) mithilfe des bildgebenden Verfahrens Einzelphotonen Emissions Computertomographie (SPECT) *in vivo* hinsichtlich der Distribution, oralen Bioverfügbarkeit und ZNS-Gängigkeit untersucht werden. Beim SPECT-Imaging wird eine mit einem γ -Strahler radioaktiv markierte Verbindung (= Tracer) in ein lebendes Objekt eingebracht, damit die Distribution des Tracers durch Detektion der γ -Strahlung (semi-)quantitativ verfolgt werden kann. Dementsprechend

mussten die Pentamidinverbindungen zuvor mit einem geeigneten SPECT-Nuklid radioaktiv markiert werden. Aufgrund seiner gut geeigneten chemischen und physikalischen Eigenschaften wurde das Iodisotop ^{123}I für die radioaktiven Markierungen ausgewählt. Für die Identifizierung der radioaktiven Verbindungen mittels Radio-HPLC war die Synthese von iodierten Standardsubstanzen nötig.

Die Iodierung von Pentamidin (**1**) und *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**) konnte über zwei verschiedene Syntheserouten erfolgreich durchgeführt werden. Die direkte Iodierung von **1** und **2** hatte den Vorteil, dass sie als Eintopfreaktion in nur einem Schritt möglich war. Da aber neben den gewünschten monoiodierten Produkten auch diiodierte Nebenprodukte entstanden, musste eine zeit- und arbeitsintensive Aufreinigung per HPLC erfolgen. Bei der zweiten Variante wurde ein zuvor iodierter Aromat als Edukt verwendet und anschließend die Verbindungen Iodpentamidin (**1a**) und *N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2a**) von Beginn an aufgebaut. Diese Synthesen gestalteten sich insgesamt aufwändiger, lieferten aber größere Produktmengen. Die Darstellung von *N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3a**) erfolgte durch Veresterung von **2a** und gestaltete sich problemlos.

Nach erfolgreicher Synthese der iodierten Standardverbindungen wurden verschiedene radioaktive Synthesen mit dem Ziel durchgeführt, den jeweiligen Tracer in einer für die SPECT-Imaging Studien ausreichenden Aktivität (5 – 10 MBq pro Ratte) in einer biokompatiblen Lösung und einem maximalen Volumen von 1 ml pro Ratte herzustellen. Alle Versuche, eine direkte Radioiodierung der nicht iodierten Verbindungen durchzuführen, führten aufgrund der mangelnden elektronischen Aktivierung der Aromaten zu keinen nennenswerten Ausbeuten. Eine erfolgreiche Radioiodierung mit ^{123}I erfolgte letztlich mittels Isotopenaustauschreaktion. Aufgrund der extremen Reaktionsbedingungen und der unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der Verbindungen musste für jede Verbindung ein eigenes Markierungsverfahren entwickelt werden. Die Gewinnung und Kontrolle der radiochemischen Reinheit der radioaktiven Produkte [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**), [^{123}I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) und [^{123}I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**) erfolgten mittels Radio-HPLC.

Für die *in vivo* Imaging Studien wurden die radioaktiv markierten Pentamidinverbindungen in acht Gruppen mit jeweils sechs Ratten eingeteilt. Den Tieren der Gruppen A – C wurden die Verbindungen **1b**, **2b** und **3b** intravenös und den Tieren der Gruppen D – F peroral appliziert. In den Studien G und H wurde die Auswirkung einer zusätzlichen peroral

applizierten Dosis der nicht radioaktiven, iodierten Verbindungen **3a** und **1a** auf die Distribution, orale Bioverfügbarkeit und ZNS-Gängigkeit der radioaktiven Verbindungen **3b** bzw. **1b** untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss einer intravenösen Omeprazolgabe auf die Bioverfügbarkeit von oral appliziertem [^{123}I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)iodpentamidin (**3b**) untersucht. Um die *in vivo* Stabilität der radioaktiv markierten Verbindungen zu überprüfen, wurden Kontrollstudien mit [^{123}I]-NaI-Lösung durchgeführt und bezüglich der Aktivität in der Schilddrüse verglichen. Pro Ratte wurden drei SPECT-Aufnahmen über 24 Stunden durchgeführt und anschließend die Organe zwecks weiterer Untersuchung entnommen, sodass die Distribution der Tracer im Verlauf der Zeit verfolgt werden konnte. Außerdem wurden den Tieren Blutproben über 24 Stunden zur Analyse pharmakokinetischer Parameter entnommen.

Die Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit gegenüber [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**) konnte umfassend belegt werden. In allen Organen ebenso wie im Blut wurden nach oraler Applikation der Prodrugs höhere Konzentrationen als nach oraler Applikation von [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**) detektiert. Die Ergebnisse der Kombinationsstudie G, in der zusätzlich zum radioaktiven Prodrug **3b** das nicht radioaktive Prodrug **3a** appliziert wurde, ließen auf einen nicht sättigbaren Aufnahmeprozess durch passive Diffusion und eine Eliminierung aus den Organzellen über sättigbare Transportmechanismen nach intrazellulärer Metabolisierung schließen. Ähnliche Beobachtungen wurden in früheren *in vitro* Studien an Caco-2 Zelllinien mit den Prodrugs *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**) und *N,N'*-Bis(acetoxy)pentamidin gemacht [Schwering, 2010]. Ein Vergleich der oralen Bioverfügbarkeit nach Applikation von **3b** (Studie F) mit und ohne Omeprazolinjektion zur Anhebung des pH-Wertes im Magen brachte keine offensichtlichen und statistisch signifikanten Unterschiede hervor. Offenbar reichte die Pufferkapazität der applizierten Tracerlösung aus, um eine vorzeitige saure Hydrolyse des Esters zu verhindern und machte damit eine zusätzliche intravenöse Omeprazolapplikation überflüssig.

Die Auswertung der Blutproben zeigte nach intravenöser Applikation von **1b**, **2b** und **3b** eine schnelle Anflutung gefolgt von einem biphasischen Eliminationsverlauf. Durch Bewertung der berechneten pharmakokinetischen Parameter konnte für **1b** und **3b** auf eine hohe Plasmaproteinbindung geschlossen werden. **2b** besaß nur einen halb so großen c_{max} -Wert wie **1b** aber ein dreimal so großes Verteilungsvolumen, was auf eine schnelle Verteilung und ausgeprägte Gewebefestbindung schließen lässt.

Bei allen Verbindungen waren Leber und Nieren die Hauptorgane der Distribution. In allen anderen Organen fanden sich eher niedrige Konzentrationen. Eine Akkumulation in den Hepatozyten konnte durch Auswertung der Zeit-Aktivitätsverläufe über 24 Stunden ausgeschlossen werden. Vielmehr wurden alle Verbindungen biliär eliminiert, was hinsichtlich einer möglichen Hepatotoxizität positiv zu bewerten ist. Die Konzentrationen in den Nieren waren insbesondere nach intravenöser Applikation der Prodrugs deutlich geringer als nach Applikation von [^{123}I]-Iodpentamidin (**1b**). Da die Nephrotoxizität von Pentamidin (**1**) nach intravenöser Gabe eine schwerwiegende Nebenwirkung darstellt, lassen die niedrigen Prodrugkonzentrationen in den Nieren auch nach intravenöser Applikation auf eine Senkung der Nephrotoxizität hoffen. Sowohl zur Abklärung der Hepato- als auch der Nephrotoxizität der Prodrugs müssen allerdings weiterführende Toxizitätsuntersuchungen durchgeführt werden.

Bezüglich der ZNS-Gängigkeit konnten die Konzentrationen im Gehirn nach intravenöser Applikation von **2b** im Vergleich zu **1b** in etwa verdoppelt werden. Das Ester-Prodrug **3b** brachte leider keine erhöhten Konzentrationen im Gehirn, was möglicherweise unter anderem auf die starke Bindung an Plasmaproteine zurückzuführen ist, die an der Endothelbarriere der Blut-Hirn Schranke zurückgehalten werden. **2b** bzw. dessen Metabolite akkumulierten allerdings nach intravenöser Applikation im Gehirn über 24 Stunden, sodass die Chance besteht, dass durch wiederholte intravenöse Gabe des Prodrugs durchaus die für eine effektive Behandlung des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit erforderlichen Konzentrationen im ZNS erreicht werden können. Da Pentamidin (**1**) selbst nicht effektiv zur Behandlung des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt werden kann, müsste anhand eines entsprechenden *in vivo* Modells an infizierten Tieren geprüft werden, ob eine Therapie mit *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**) erkrankte Tiere heilen kann.

Die Stabilität der untersuchten Verbindungen konnte aus der Aufnahme von abgespaltenem [^{123}I]-Iodid in die Schilddrüse abgeleitet werden. Da erst nach 24 Stunden in einigen Fällen Radioaktivität in der Schilddrüse zu finden war und die Menge im Vergleich zur Aktivität nach Applikation einer [^{123}I]-NaI-Lösung sehr gering war, konnte eine ausreichende *in vivo* Stabilität der radioaktiv markierten Verbindungen angenommen werden.

Sowohl [^{123}I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin (**2b**) als auch [^{123}I]-*N,N'*-Bis(succinyloxy)-iodpentamidin (**3b**) zeigten in den durchgeführten Untersuchungen ein besseres

pharmakokinetisches Profil hinsichtlich Distribution, oraler Bioverfügbarkeit und ZNS-Gängigkeit als [¹²³I]-Iodpentamidin (**1b**). Ein großer Vorteil des doppelten Ester-Prodrugs *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin (**3**) gegenüber dessen Metaboliten und Prodrug *N,N'*-Dihydroxypentamidin (**2**) ist die deutlich bessere Wasserlöslichkeit, die für die Entwicklung eines Arzneistoffs hinsichtlich der Einteilung im Biopharmazeutischen Klassifizierungssystem (BCS) eine wichtige Rolle spielt.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J.; Chugani, D. C.; Zaharchuk, G.; Rosen, B. R.; Lo, E. H.
Delivery of imaging agents into brain, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1999**, *37*, 253-277.
- Arafa, R. K.; Brun, R.; Wenzler, T.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D.; Stephens, C. E.; Boykin, D. W.
Synthesis, DNA affinity and antiprotozoal activity of fused dicationic compounds and their prodrugs, *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 5480-5488.
- Ashley, J. N.; Barber, H. J.; Ewins, A. J.; Newbery, G.; Self, A. D. H.
Chemotherapeutic comparison of the trypanocidal action of some aromatic diamidines, *Journal of the Chemical Society* **1942**, 103-116.
- Baker, N.; de Koning, H. P.; Mäser, P.; Horn, D.
Drug resistance in African trypanosomiasis: the melarsoprol and pentamidine story, *Trends in Parasitology* **2013**, *Artikel im Druck*.
- Baker, N.; Glover, L.; Munday, J. C.; Andrés, D. A.; Barrett, M. P.; de Koning, H. P.; Horn, D.
Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109*, 10996-11001.
- Barrett, M. P.; Fairlamb, A. H.
The biochemical basis of arsenical-diamidine crossresistance in African trypanosomes, *Parasitology Today* **1999**, *15*, 136-140.
- Barrett, M. P.; Vincent, I. M.; Burchmore, R. J. S.; Kazibwe, A. J. N.; Matovu, E.
Drug resistance in human African trypanosomiasis, *Future Microbiology* **2011**, *6*, 1037-1047.
- Berg, S. S.; Newbery, G.
The search for chemotherapeutic amidines. Part X. Substituted 4,4'-diamidino- α,ω -diphenoxyalkanes and -diphenyl ethers, *Journal of the Chemical Society* **1949**, 642-648.
- Berger, B. J.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R.
The distribution of multiple doses of pentamidine in rats, *Pharmacology & Toxicology* **1990a**, *66*, 234-236.
- Berger, B. J.; Lombardy, R. J.; Marbury, C. A.; Dykstra, C. C.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R.
Metabolic N-hydroxylation of pentamidine in vitro, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1990b**, *34*, 1678-1684.
- Berger, B. J.; Reddy, V. V.; Le, S. T.; Lombardy, R. J.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R.
Hydroxylation of pentamidine by rat liver microsomes, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1991**, *256*, 883-889.

Berger, B. J.; Naiman, N. A.; Hall, J. E.; Peggins, J.; Brewer, T. G.; Tidwell, R. R.
Primary and secondary metabolism of pentamidine by rats, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1992**, *36*, 1825-1831.

Bethke, M.
Untersuchungen zur Überwindung der Blut-Hirn Schranke von Pentamidin und Pentamidinderivaten gegen Trypanosomeninfektionen, *Diplomarbeit*, Kiel/Wien, **2007**.

Blower, P. J.; Smith, C. M.; Smith, R. J.; Moores, G. E.; O'Doherty, M. J.
Preparation and stability of a radioiodinated pentamidine isethionate analog, *Applied Radiation and Isotopes* **1992**, *43*, 1189-1195.

Bouteille, B.; Oukem, O.; Bisser, S.; Dumas, M.
Treatment perspectives for human African trypanosomiasis, *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2003**, *17*, 171-181.

Bray, P. G.; Barrett, M. P.; Ward, S. A.; de Koning, H. P.
Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future, *Trends in Parasitology* **2003**, *19*, 232-239.

Bridges, D. J.; Matthew, K. G.; Nerima, B.; Mäser, P.; Burchmore, R. J. S.; de Koning, H. P.
Loss of the high-affinity pentamidine transporter is responsible for high levels of cross-resistance between arsenicals and diamidine drugs in African trypanosomes, *Molecular Pharmacology* **2007**, *71*, 1098-1108.

Bronner, U.; Ericsson, Ö.; Nordin, J.; Wikström, I.; Abi, Y. A.; Hall, J. E.; Tidwell, R.; Gustafsson, L. L.
Metabolism is an important route of pentamidine elimination in the rat: Disposition of ¹⁴C-pentamidine and identification of metabolites in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Pharmacology & Toxicology* **1995**, *77*, 114-120.

Bürenheide, A.
Pharmakokinetik des Pentoximesters, *Dissertation*, Kiel, **2006**.

Burri, C.
Chemotherapy against human African trypanosomiasis: Is there a road to success?, *Parasitology* **2010**, *137*, 1987-1994.

Butt, A. M.; Jones H. C.; Abbott N. J.
Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study, *Journal of Physiology* **1990**, *429*, 47- 62.

Carter, N. S.; Barrett, M. P.; de Koning, H. P.
A drug resistance determinant in *Trypanosoma brucei*, *Trends in Microbiology* **1999**, *7*, 469-471.

Chinnappan, J.; Velan, L. P. T.
High-throughput virtual screening for novel DHFR inhibitors of *P. jiroveci* from the ZINC database, *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* **2012**, *3*, 425-438.

Chrastina, A.; Schnitzer, J. E.

Iodine-125 radiolabeling of silver nanoparticles for *in vivo* SPECT imaging, *International Journal of Nanomedicine* **2010**, *5*, 653-659.

Clement, B.

Verbindungen zur Behandlung von Trypanosomeninfektionen, *Pharmazie in unserer Zeit* **1989**, *18*, 97-111.

Clement, B.

Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines, *Drug Metabolism Reviews* **2002**, *34*, 565-579.

Clement, B.; Bürenheide, A.; Rieckert, W.; Schwarz, J.

Diacetyldiamidoximeester of pentamidine, a prodrug for treatment of protozoal diseases: Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biotransformation, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1260-1267.

Clement, B.; Immel, M.; Raether, W.

Metabolic *N*-Hydroxylation of diminazene *in vitro*, *Arzneimittel-Forschung* **1992a**, *42*, 1497-1504.

Clement, B.; Immel, M.; Terlinden, R.; Wingen, F. J.

Reduction of amidoxime derivatives to pentamidine *in vivo*, *Archiv der Pharmazie (Weinheim)* **1992b**, *325*, 61-62.

Clement, B.; Jung, F.

N-Hydroxylation of the antiprotozoal drug pentamidine catalyzed by rabbit liver cytochrome P-450 2C3 or human liver microsomes, microsomal retroreduction, and further oxidative transformation of the formed amidoximes, *Drug Metabolism and Disposition* **1994**, *22*, 486-497.

Clement, B.; Mau, S.; Deters, S.; Havemeyer, A.

Hepatic, extrahepatic, microsomal and mitochondrial activation of the *N*-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz and RO-48-3656 ([1-[(2S)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyl]-oxy]-acetic acid), *Drug Metabolism and Disposition* **2005**, *33*, 1740-1747.

Clement, B.; Raether, W.

Amidoximes of pentamidine: synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity, *Arzneimittel-Forschung* **1985**, *35*, 1009-1014.

Clement, B.; Schmitt, S.; Zimmermann, M.

Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine, *Archiv der Pharmazie (Weinheim)* **1988**, *321*, 955-956.

Colin-Barenque, L.; Zepeda-Rodriguez, A.; Jimenez-Martinez, R.; Gonzalez-Villalva, A.; Rojas-Lemus, M.; Bizarro-Nevaras, P.; Rodriguez-Lara, V.; Pasos-Najera, F.; Guerner-Lans, V.; Santamaria, A.; Fortoul, T. I.

Blood-Brain Barrier (BBB): Morphology and Disease in: The Blood-Brain Barrier: New Research (Hrsg. Montenegro, P. A. & Juárez, S. M.). Nova Sciences Publishers Inc., New York, **2012**.

Conte, J. E.; Upton, R. A.; Lin, E. T.

Pentamidine pharmacokinetics in patients with AIDS and impaired renal function, *The Journal of Infectious Diseases* **1987**, *156*, 885-890.

Conte, J. E.; Upton, R. A.; Phelps, R. T.; Wofsy, C. B.; Zurlinden, E. Lin, E. T.

Use of a specific and sensitive assay to determine pentamidine pharmacokinetics in patients with AIDS, *Journal of Infectious Diseases* **1986**, *154*, 923-929.

Coyle, P. V.; McCaughey, C.; Nager, A.; McKenna, J.; O'Neill, H.; Feeney, S. A.; Fairley, D.; Watt, A.; Cox, C.; Curran, T.

Rising incidence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia suggests iatrogenic exposure of immune-compromised patients may be becoming a significant problem, *Journal of Medical Microbiology* **2012**, *61*, 1009-1015.

Crone, C.; Olesen, S. P.

Electrical resistance of brain microvascular endothelium, *Brain Research* **1982**, *241*, 49-55.

De Koning, H. P.

Transporters in African trypanosomes: role in drug action and resistance, *International Journal for Parasitology* **2001**, *31*, 512-522.

De Koning, H. P.; Jarvis, S. M.

Adenosine transporters in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*: Substrate recognition motifs and affinity for trypanocidal drugs, *Molecular Pharmacology* **1999**, *56*, 1162-1170.

De Koning, H. P.; Jarvis, S. M.

Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter, *Acta Tropica* **2001**, *80*, 245-250.

De Koning, H. P.; MacLeod, A.; Barrett, M. P.; Cover, B.; Jarvis, S. M.

Further evidence for a link between melarsoprol resistance and P2 transporter function in African trypanosomes resistance, *Molecular and Biochemical Parasitology* **2000**, *106*, 181-185.

Denise, H.; Barrett, M. P.

Uptake and mode of action of drugs used against sleeping sickness, *Biochemical Pharmacology* **2001**, *61*, 1-5.

Derendorf, H.; Gramatté, T.; Schäfer, H. G.; Staab, A.

Pharmakokinetik kompakt. Grundlagen und Praxisrelevanz. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2011.

Dermietzel, R.; Krause, D.

Molecular anatomy of the blood-brain barrier as defined by immunocytochemistry, *International Review of Cytology* **1991**, *127*, 57-109.

Donkor, I. O.; Huang, T. L.; Tao, B.; Rattendi, D.; Lane, S.; Vargas, M.; Goldberg, B.; Bacchi, C.

Trypanocidal activity of conformationally restricted pentamidine congeners, *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 1041-1048.

- Doua, F.; Miezán, T. W.; Sanon Singaro, J. R.; Boa Yapo, F.; Baltz, T.
The efficacy of pentamidine in the treatment of early – late stage *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **1996**, *55*, 586-588.
- Drewes, L. R.
What is the blood-brain barrier? A molecular perspective cerebral vascular biology, *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1999**, *474*, 111-122.
- Duggan, A. J.; Hutchinson, M. P.
The efficacy of certain trypanocidal compounds against *Trypanosoma gambiense* infection in man, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1951**, *44*, 535-544.
- Dumas, M.; Bouteille, B.
Afrikanische Trypanosomen: Die Erreger der Schlafkrankheit, *Biologie in unserer Zeit* **1998**, *2*, 72-81.
- Dumas, M.; Bouteille, B.
Treatment of human African trypanosomiasis, *Bulletin of the World Health Organization* **2000**, *78*, 1474.
- Duszenko, M.
Afrikanische Trypanosomen: Die Erreger der Schlafkrankheit, *Biologie in unserer Zeit* **1998**, *2*, 72-81.
- Edwards, K. J.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.
Crystal structure of a pentamidine-oligonucleotide complex: implications for DNA-binding properties, *Biochemistry* **1992**, *31*, 7104-7109.
- Eersels, J. L. H.; Travis, M. J.; Herscheid, J. D. M.
Manufacturing I-123-labelled radiopharmaceuticals. Pitfalls and solutions, *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* **2005**, *48*, 241-257.
- Elschenbroich, C.; Salzer, A.
Organometallics. B. G. Teubner, Stuttgart, **1990**.
- Enanga, B.; Burchmore, R. J. S.; Stewart, M. L.; Barrett, M. P.
Sleeping sickness and the brain, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2002**, *59*, 845-858.
- Fachinformation zu Pentacarinat® 300 mg, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, **2010**.
- Farinotti, R.; Pascaud, M. B.; Girard, P. M.; Guillot, E.; Certain, A.; Trouvin, J. H.
Comparison of tissular disposition of pentamidine mesylate in the rat after aerosol or parenteral administration, *Journal of Infectious Diseases* **1989**, *160*, 507-512.

Finn, R.

Chemistry Applied to Iodine Radionuclides in: *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications* (Hrsg. Welch, M. J. & Redvanly, C. S.). John Wiley & Sons Ltd., New York, **2003**.

Fletcher, N. F.; Callanan, J. J.

Cell Culture Models of the Blood-Brain Barrier: New Research in: *The Blood-Brain Barrier: New Research* (Hrsg. Montenegro, P. A. & Juárez, S. M.). Nova Sciences Publishers Inc., New York, **2012**.

Frey, A.; Meckelein, B.; Weiler, B.; Möckel, R.; Flach, R.; Gassen, H. G.

Pericytes of the brain microvasculature express γ -glutamyl transpeptidase, *European Journal of Biochemistry* **1991**, *202*, 421-429.

Ghanadian, R.; Waters, S. L.; Thakur, M. L.; Chisholm, G. D.

Studies with radioactive iodine labelled oestrogens as prostate scanning agents, *International Journal of Applied Radiation and Isotopes* **1975**, *26*, 343-346.

Gibson, W.

Resolution of the species problem in African trypanosomes, *International Journal for Parasitology* **2007**, *37*, 829-838.

Göber, B.; Surmann, P.

Arzneimittelkontrolle – Drug Control. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2004**.

Gonzalez, U.; Pinart, M.; Rengifo-Pardo, M; Macaya, A.; Alvar, J; Tweed, J. A.

Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, *The Cochrane Library* **2009**, *2*, 1-175.

Gruenewald, S.; Wahl, B.; Bittner, F.; Hungeling, H.; Kanzow, S.; Kotthaus, J.; Schwering, U.; Mendel, R. R.; Clement, B.

The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and involvement in the activation of *N*-hydroxylated prodrugs, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 8173-8177.

Haen, M.; Heizmann, W.; Ehninger, G.

Häufigkeit, Klinik und Letalität der Pneumocystis carinii Pneumonien bei nicht HIV-induzierter Immundefizienz in: *Die Pneumocystis carinii Pneumonie* (Hrsg. Dietrich, M.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, **1989**.

Hall, J. E.; Kerrigan, J. E.; Ramachandran, K.; Bender, B. C.; Stanko, J. P.; Jones, S. K.; Patrick, D. A.; Tidwell, R. R.

Anti-*Pneumocystis* activities of aromatic diamidoxime prodrugs, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, *42*, 666-674.

Hasne, M. P.; Barrett, M. P.

Transport of methionine in *Trypanosoma brucei brucei*, *Molecular and Biochemical Parasitology* **2000a**, *111*, 299-307.

Hasne, M. P.; Barrett, M. P.

Drug uptake via nutrient transporters in *Trypanosoma brucei*, *Journal of Applied Microbiology* **2000b**, *89*, 697-701.

Havemeyer, A.; Gruenewald, S.; Wahl, B.; Bittner, F.; Mendel, R. R.; Erdelyi, P.; Fischer, J.; Clement, B. Reduction of *N*-hydroxy-sulfonamides, including *N*-hydroxy-valdecoxib, by the molybdenum-containing enzyme mARC, *Drug Metabolism and Disposition* **2010**, *38*, 1917-1921.

Havemeyer, A.; Lang, J.; Clement, B.

The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research, *Drug Metabolism Reviews* **2011**, *43*, 524-539.

Hellström, M.; Gerhardt, H.; Kalén, M.; Li, X.; Eriksson, U.; Wolburg, H.; Betsholtz, C.

Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis, *The Journal of Cell Biology* **2001**, *153*, 543-554.

Hellwig, D.; Ketter, R.; Romeike, B. F. M.; Sell, N.; Schaefer, A.; Moringlane, J. R.; Kirsch, C. M.; Samnick, S.

Validation of brain tumour imaging with *p*-[¹²³I]iodo-L-phenylalanine and SPECT, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2005**, *32*, 1041-1049.

Holleman, A. F.; Wiberg, E.; Wiberg, N.

Lehrbuch der Anorganischen Chemie. Walter de Gruyter & Co, Berlin, **1995**.

Houben, J.; Weyl, T.

Methoden der organischen Chemie – Halogenverbindungen Brom und Iod. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1960**.

Hungeling, H.

Neue Prodrugs von Diamidinen zur Therapie protozoischer Erkrankungen, *Dissertation*, Kiel, **2009**.

Hunter, W. M.; Greenwood, F. C.

Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity, *Nature* **1962**, *194*, 495-496.

Ismail, M. A.; Brun, R.; Wenzler, T.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D.; Boykin, D. W.

Dicationic biphenyl benzimidazole derivatives as antiprotozoal agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 5405-5413.

Kaminsky, R.; Mäser, P.

Drug resistance in African trypanosomes, *Current Opinion in Anti-Infective Investigational Drugs* **2000**, *2*, 76-82.

Kayser, O.; Croft, S. L.; Kolodziej, H.

Chemotherapie der Leishmaniose und Humanen Trypanosomose: Status und neue Entwicklungen, *Pharmazie in unserer Zeit* **1999**, *28*, 177-185.

- Kennedy, P. G. E.
Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges, *Journal of Clinical Investigation* **2004**, *113*, 496-504.
- Kennedy, P. G. E.
Diagnostic and neuropathogenesis issues in human African trypanosomiasis, *International Journal for Parasitology* **2006**, *36*, 505-512.
- Kinabo, L. D.
Pharmacology of existing drugs for animal trypanosomiasis, *Acta Tropica* **1993**, *54*, 169-183.
- Kotthaus, J.; Kotthaus, J.; Schade, D.; Schwering, U.; Hungeling, H.; Müller-Fielitz, H.; Raasch, W.; Clement, B.
New prodrugs of the antiprotozoal drug pentamidine, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2233-2242.
- Kovacs, J. A.; Masur, H.
Prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients infected with human immunodeficiency virus, *Clinical infectious diseases* **1992**, *14*, 1005-1009.
- Kwon, D.; Chae, J. B.; Park, C. W.; Kim, Y. S.; Lee, S. M.; Kim, E. J.; Huh, I. H.; Kim, D. Y.; Cho, K. D.
Effects of IY-81149, a newly developed proton pump inhibitor, on gastric acid secretion in vitro and in vivo, *Arzneimittel-Forschung* **2001**, *51*, 204-213.
- Langner, A.; Borchert, H. H.; Mehnert, W.
Biopharmazie. Pharmakokinetik – Bioverfügbarkeit – Biotransformation. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2011**.
- Lanteri, C. A.; Tidwell, R. R.; Meshnick, S. R.
The mitochondrion is a site of trypanocidal action of the aromatic diamidine DB75 in blood-stream forms of *Trypanosoma brucei*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2008**, *52*, 875-882.
- Laughton, C. A.; Tanious, F.; Nunn, C. M.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D.; Neidle, S.
A crystallographic and spectroscopic study of the complex between d(CGCGAATTCGCG)₂ and 2,5-bis(4-guanylphenyl)furan, an analogue of berenil. Structural origins of enhanced DNA-binding affinity, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5655-5661.
- Legros, D.; Evans, S.; Maiso, F.; Enyaru, J. C. K.; Mbulamberi, D.
Risk factors for treatment failure after melarsoprol for *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis in Uganda, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1999**, *93*, 439-442.
- Legros, D.; Ollivier, G.; Gastellu-Etchegorry, M.; Paquet, C.; Burri, C.; Jannin, J.; Buscher, P.
Treatment of human African trypanosomiasis – present situation and needs for research and development, *The Lancet infectious diseases* **2002**, *2*, 203-206.
- Lidman, C.; Bronner, U.; Gustafsson, L. L.; Rombo, L.
Plasma pentamidine concentrations vary between individuals with *Pneumocystis carinii* pneumonia and the drug is actively secreted by the kidney, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1994**, *33*, 803-810.

Lieser, K. H.

Einführung in die Kernchemie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1991**.

Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J.

Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3-26.

Lissner, J.; Fink, U.

Radiologie I. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, **1992**.

Lozán, J.; Kausch, H.

Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler. Wissenschaftliche Auswertungen, Hamburg, **2004**.

Mangner, T. J.; Wu, J.; Wieland, D. M.

Solid phase radioiodination of aryl iodides. Facilitation by ammonium sulfate, *Journal of Organic Chemistry* **1982**, *47*, 1484-1488.

Markwell, M. A.

A new solid-state reagent to iodinate proteins: conditions for the efficient labeling of antiserum, *Analytical Biochemistry* **1982**, *125*, 427-432.

Masocha, W.; Rottenberg, M. E.; Kristensson, K.

Migration of African trypanosomes across the blood-brain barrier, *Physiology & Behavior* **2007**, *92*, 110-114.

McConnell, E. L.; Basit, A. W.; Murdan, S.

Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2008**, *60*, 63-70.

Mennicke, E.; Holschbach, M. H.; Coenen, H. H.

Direct n.c.a. radioiodination of weakly activated arenes using metal salts, *Radiochimica Acta* **2000**, *88*, 221-227.

Meyer, C. G.

Tropenmedizin. Infektionskrankheiten. ecomed Medizin, Landsberg, **2007**.

Mier, W.; Nissen, F.

Radioiodine Chemistry in: Pharmaceutical Radiochemistry (I) (Hrsg. Wester, H. J.). Scintomics GmbH, Fürstenfeldbruck, **2010**.

Moerlein, S. M.

Regiospecific aromatic radioiodination via no-carrier-added copper(I) chloride-assisted iododebromination, *Radiochimica Acta* **1990**, *50*, 55-61.

Mohammed, A.; Nicholl, C.; Titsch, U.; Eisenhut, M.

Radioiodinated N-(alkylaminoalkyl)-substituted 4-methoxy, 4-hydroxy, and 4-aminobenzamides: Biological investigations for the improvement of melanoma-imaging agents, *Nuclear medicine & biology* **1997**, *24*, 373-380.

Moloo, S. K.; Kutuza, S. B.

Expression to resistance to isometamidium and diminazene in *Trypanosoma congolense* in boran cattle infected by *Glossina morsitans centralis*, *Acta Tropica* **1990**, *47*, 79-89.

Monk, J. P.; Benfield, P.

Inhaled pentamidine. An overview of its pharmacological properties and a review of its therapeutic use in *Pneumocystis carinii* pneumonia, *Drugs* **1990**, *39*, 741-756.

Mühlhausen, U.

Synthese, Radioiodierung und Evaluierung von neuen MGMT-Inhibitoren und ihren Glucose-Konjugaten, *Dissertation*, Mainz, **2009**.

Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Ruth, P.; Schäfer-Korting, M.

Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2008**.

Myler, P. J.; Fasel, N.

Leishmania - After the Genome. Caister Academic Press, Norfolk, **2008**.

Neidle, S.

DNA minor-groove recognition by small molecules, *Natural Product Reports* **2001**, *18*, 291-309.

Neuhaus, W.; Burek, M.; Wunder, C.; Förster, C. Y.

Novel Strategies to Restore Blood-Brain Barrier Integrity after Brain Injury in: The Blood-Brain Barrier: New Research (Hrsg. Montenegro, P. A. & Juárez, S. M.). Nova Sciences Publishers Inc., New York, **2012**.

O'Doherty, M. J.; Thomas, S. H. L.; Page, C. J.; Blower, P. J.; Bateman, N. T.; Nunan, T. O.

Disposition of nebulized pentamidine measured using the direct radiolabel ¹²³I-iodopentamidine, *Nuclear Medicine Communications* **1993**, *14*, 8-11.

Pardridge, W. M.

CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport, *Journal of Neurochemistry* **1998**, *70*, 1781-1792.

Pardridge, W. M.

Blood-brain barrier biology and methodology, *Journal of Neurovirology* **1999**, *5*, 556-569.

Pepin, J.; Milford, F.

The treatment of human African trypanosomiasis, *Advances in Parasitology* **1994**, *33*, 1-47.

Pepin, J.; Milford, F.; Mpia, B.; Meurice, F.; Ethier, L.; DeGroof, D.; Bruneel, H.

An open clinical trial of nifurtimox for arseno-resistant *Trypanosoma brucei* gambiense sleeping sickness in central Zaire, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1989**, *83*, 514-517.

Peregrine, A. S.; Mamman, M.

Pharmacology of diminazene: a review, *Acta Tropica* **1993**, *54*, 185-203.

Piekarski, G.

Medizinische Parasitologie in Tafeln, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, **1993**.

Pinner, A.

Conversion of nitrils into imides, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1883**, *16*, 1643-1655.

Porollo, A.; Meller, J.; Joshi, Y.; Jaiswal, V.; Smulian, A. G.; Cushion, M. T.

Analysis of current antifungal agents and their targets within the *Pneumocystis carinii* genome, *Current Drug Targets* **2012**, *13*, 1575-1585.

Rieckert, W.

In vivo und *in vitro* Biotransformation von Pentamidinderivaten, *Dissertation*, Kiel, **1999**.

Rubin, L. L.

Endothelial cells: adhesion and tight junctions, *Current Opinion in Cell Biology* **1992**, *4*, 830-833.

Sai, P.; Boillot, D.; Boitard, C.; Debray-Sachs, M.; Reach, G.; Assan, R.

Pentamidine, a new diabetogenic drug in laboratory rodents, *Diabetologia* **1983**, *25*, 418-423.

Sanderson, L.; Dogruel, M.; Rodgers, J.; de Koning, H. P.; Thomas, S. A.

Pentamidine movement across the murine blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers: Effect of trypanosome infection, combination therapy, P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2009**, *329*, 967-977.

Schirmacher, R.; Wängler, C.; Schirmacher, E.

Fluorine-18 Radiochemistry: Theory and Practice in: Pharmaceutical Radiochemistry (I) (Hrsg. Wester, H. J.). Scintomics GmbH, Fürstenfeldbruck, **2010**.

Schlitzer, M.

Wirkstoffe zur Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit, *Pharmazie in unserer Zeit* **2009**, *6*, 552-558.

Schnauffer, A.; Domingo, G. J.; Stuart, K.

Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids: how to live without mitochondrial DNA, *International Journal for Parasitology* **2002**, *32*, 1071-1084.

Scholar, E. M.; Pratt, W. B.

The Antimicrobial Drugs. Oxford University Press, Oxford, **2000**.

Schurgit, U.; Moll, H.

Behandlung und Prophylaxe der kutanen Leishmaniose, *Pharmazie in unserer Zeit* **2009**, *6*, 2-7.

Schwartländer, B; Koch, M. A..

Zur Epidemiologie in der Bundesrepublik Deutschland und West-Berlin unter besonderer Berücksichtigung der klinischen Manifestationen des Immundefekts in: Die Pneumocystis carinii Pneumonie (Hrsg. Dietrich, M.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, **1989**.

Schwarz, J.

Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Derivaten des Pentamidins, *Dissertation*, Kiel, **1996**.

Schwering, U.

Transport- und Biotransformationsstudien mit Amidinprodrugs, *Dissertation*, Kiel, **2010**.

Seevers, R. H.; Counsell, R. E.

Radioiodination techniques for small organic molecules, *Chemical Reviews* **1982**, *82*, 575-590.

Shriver, D. F.; Atkins, P. W.; Langford, C. H.

Anorganische Chemie. Wiley-VCH GmbH, Weinheim, **1997**.

Simarro, P. P.; Diarra, A.; Ruiz Postigo, J. A.; Franco, J. R.; Jannin, J. G.

The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the world health organization 2000-2009: The way forward, *PLoS neglected tropical diseases* **2011**, *5*, 1-7.

Sjoerdsma, A.; Schechter, P. J.

Eflornithine for African sleeping sickness, *Lancet* **1999**, *354*, 254.

Soeiro, M. N.; de Souza, E. M.; Stephens, C. E.; Boykin, D. W.

Aromatic diamidines as antiparasitic agents, *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2005**, *14*, 957-972.

Stemberger, H.

Protozoeninfektionen des Menschen. Verlag Wilhelm Maudrich, Wien-München-Bern, **1987**.

Steverding, D.

The development of drugs for treatment of sleeping sickness: a historical review, *Parasites & Vectors* **2010**, *3*, 1-9.

Stich, A.

Die afrikanische Schlafkrankheit, *Pharmazie in unserer Zeit* **2009**, *6*, 2-6.

Stich, A.; Abel, P.; Krishna, S.

Human African trypanosomiasis, *BMJ (British Medical Journal)* **2002**, *325*, 203-206.

Stich, A.; Steverding, D.

Die Rückkehr einer Seuche, *Biologie in unserer Zeit* **2002**, *5*, 294-302.

Stringer, J. R.; Beard, C. B.; Miller, R. F.; Wakefield, A. E.

A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans, *Emerging Infectious Diseases* **2002**, *8*, 891-896.

Stringer, J. R.; Beard, C. B.; Miller, R. F.

Spelling *Pneumocystis jirovecii*, *Emerging Infectious Diseases* **2009**, *15*, 506.

Suzuyama, N.; Katoh, M.; Takeuchi, T.; Yoshitomi, S.; Higuchi, T.; Asashi, S.; Yokoi, T.

Species differences of inhibitory effects on p-glycoprotein-mediated drug transport, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, *96*, 1609-1618.

Terlinden, R.; Römer, A.

Pharmacokinetics and toxicokinetics of pentamidine in the rat following intravenous and aerosol administration, *Medizinische Klinik* **1990**, *85*, 245-247.

Tešić, M.; Ratkovic, M.; Dondur, V.; Jankov, R.

Kinetics of isotope exchange between [3-(iodophenyl)methyl]guanidine (mIBG) and [¹³¹I]-iodide, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **1992**, *158*, 183-191.

Thakur, M.; Lentle, B. C.

Report of a summit on molecular imaging, *Nuclear medicine & biology* **2006**, *186*, 297-299.

Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P.

Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1999**.

Thöle, M.

Arzneistofftransport an der Blut-Hirn Schranke: Drug Targeting mit liposomalen Konjugaten, *Dissertation*, Heidelberg, **2000**.

Thomas, S. H. L.; Page, C. J.; Blower, P. J.; Chowienczyk, P.; Ward, A.; Kamali, F.; Bradbeer, C. S.; Bateman, N. T.; O'Doherty, M. J.

Disposition of intravenous ¹²³Iiodopentamidine in man, *Nuclear medicine & biology* **1997**, *24*, 327-332.

Tsuji, A.; Tamai, I.

Carrier mediated or specialized transport of drugs across the blood-brain barrier, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1999**, *36*, 277-290.

Waalkes, T. P.; Denham, C.; de Vita, V. T.

Pentamidine: Clinical pharmacologic correlations in man and mice, *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **1970**, *11*, 505-512.

Waalkes, T. P.; Makulu, D. R.

Pharmacologic aspects of pentamidine, *National Cancer Institute Monograph* **1976**, *43*, 171-177.

www.who.int/topics/trypanosomiasis_african/en/, **2012**.

www.who.int/topics/leishmaniasis/en/, **2012**.

Van Nieuwenhove, S.; Declercq, J.

Nifurtimox (Lampit) treatment in late stage of gambiense sleeping sickness, *Proceedings of the 17th meeting of ISCTRC* **1981**, 112, 206-208.

Vallabhajosula, S.

Molecular Imaging: Pharmaceuticals for PET and SPECT. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2009**.

Wagner, U.; Hohmann, C.

Reise- und Infektionskrankheiten. GOVI-Verlag, Eschborn, **2004**.

Werbovetz, K.

Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents, *Current Opinion on Investigational Drugs* **2006**, 7, 147-157.

Wingen, F. J.

Autoradiographische Untersuchung der Organverteilung von ¹⁴C-Pentamidin nach intravenöser und inhalativer Verabreichung an Ratten, *Medizinische Klinik* **1990**, 85, 236-244.

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AQP	Aquaglyceroporin
Aqua bidest	<i>Aqua bidestillata</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
BCS	Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem (<i>Biopharmaceutics Classification System</i>)
ber.	berechnet
BHS	Blut-Hirn Schranke
Bq	Becquerel
BSA	Bernsteinsäureanhydrid
ca.	<i>circa</i>
c.a.	<i>carrier added</i>
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
c.f.	<i>carrier free</i>
conc.	konzentriert
cpm	<i>counts per minute</i>
CYP450	Cytochrom P450
d	Tage (<i>days</i>)
DCM	Dichlormethan
DMSO- <i>d</i> 6	deuteriertes Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
ESI	Elektronensprayionisierung
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alia</i>)

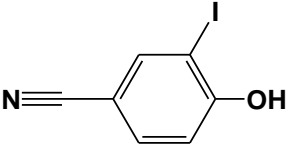
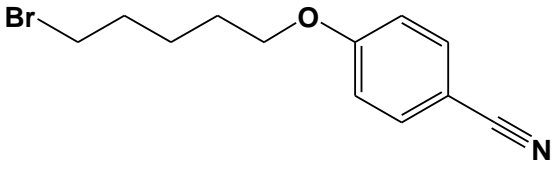
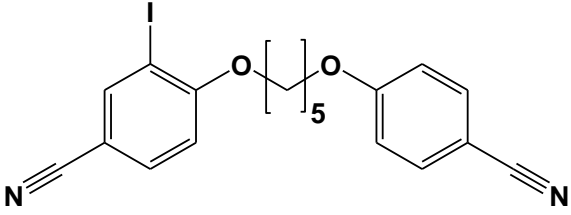
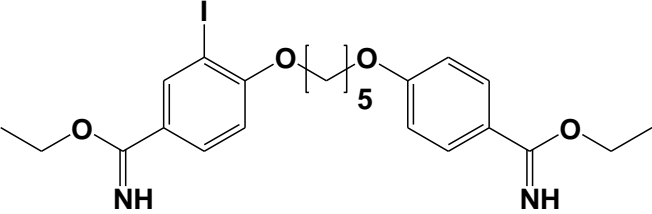
EtOH	Ethanol
g	Gramm
gef.	gefunden
ggf.	gegebenenfalls
glac.	<i>glacial</i>
h	Stunden (<i>hours</i>)
HFIP	Hexafluorisopropanol
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
Hz	Hertz
IC ₅₀	Halbmaximale Inhibitorische Konzentration (<i>half maximal inhibitory concentration</i>)
ID	<i>injected dose</i>
i. d. R.	in der Regel
I.E.	Internationale Einheiten
iv	intravenös
kBq	Kilobecquerel
kDNS	Desoxyribonucleinsäure des Kinetoplasten
keV	Kiloelektronenvolt
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
konz.	konzentriert
LC	Flüssigchromatographie (<i>Liquid Chromatography</i>)
M	molar (mol/L; m = milli, μ = micro, n = nano)
mARC	<i>mitochondrial amidoxime-reducing component</i>
max.	maximal
MBq	Megabecquerel
mCi	Millicurie
MeOH	Methanol
MeV	Megaelektronenvolt
mg	Milligramm

MI	<i>Molecular Imaging</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MRP	<i>Multidrug Resistance-Related Protein</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
N	normal
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
n.c.a.	<i>no carrier added</i>
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
OAT	<i>organic anion transporter</i>
OSEM	<i>Ordered Subset Expectation Maximization</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCP	<i>Pneumocystis</i> Pneumonie
PDA	Photo Dioden Array (Detektor)
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration mit -1 multipliziert)
ppm	<i>parts per million</i>
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
R _t	Retentionszeit (HPLC)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sp.	<i>species</i>
SPECT	Einzelphotonen Emissions Computertomographie (<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>)
Tab.	Tabelle
TEA	Triethylamin
TEER	<i>transendothelial electrical resistance</i>

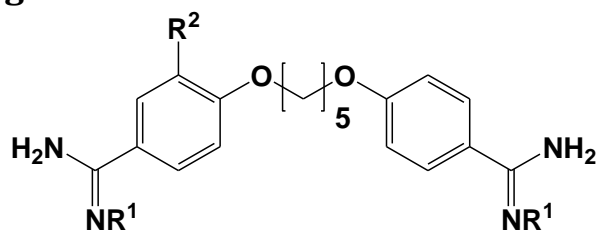
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Tetramethylsilan
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
VOI	<i>volume of interest</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNS	Zentralnervensystem
δ / ppm	chemische Verschiebung in ppm der Resonanzfrequenz der Referenzverbindung
λ	Wellenlänge

Strukturformelverzeichnis

Synthesestufen

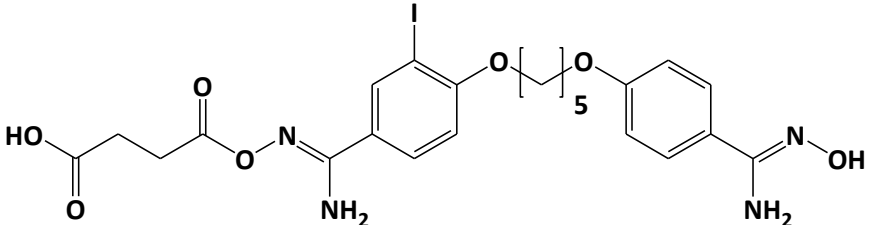
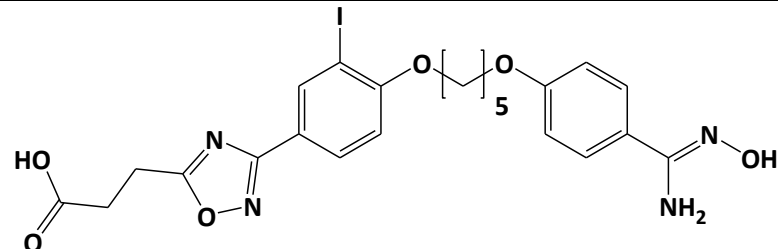
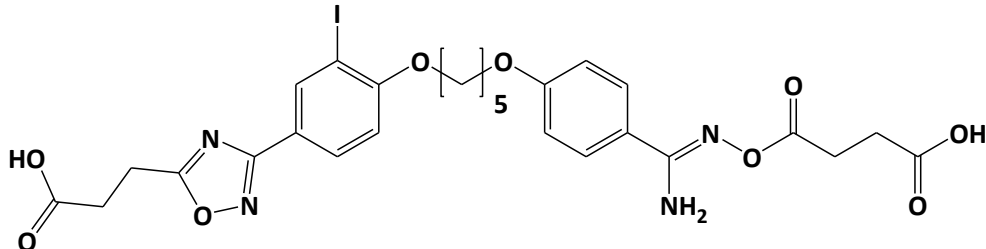
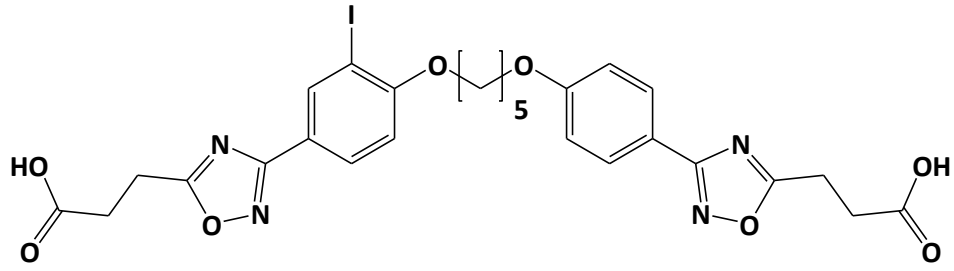
IUPAC-Bezeichnung	Strukturformel	Ziffer
4-Hydroxy-3-iodbenzonitril		5
1-Brom-5-(4-cyan)phenoxy-pentan		7
1-(4-Cyan-2-iod)phenoxy-5-(4-cyan)phenoxy-pentan		8
1-(4-Ethoxycarbimino-2-iod)phenoxy-5-(4-ethoxy-carbimino)phenoxy-pentan		9

Pentamidinverbindungen



IUPAC-Bezeichnung	R ¹	R ²	Ziffer
1,5-Bis(4-amidino)phenoxyptan	-H	-H	1
1,5-Bis[4-(<i>N,N'</i> -hydroxyamidino)]phenoxyptan	-OH	-H	2
1,5-Bis[4-(<i>N,N'</i> -succinyloxyamidino)]phenoxyptan		-H	3
1-(4-Amidino-2-iod)phenoxy-5-(4-amidino)phenoxyptan	-H	-I	1a
1-[4-(<i>N'</i> -hydroxyamidino-2-iod)]-phenoxy-5-[4-(<i>N</i> -hydroxyamidino)]-phenoxyptan	-OH	-I	2a
1-[2-Iod-4-(<i>N'</i> -succinyloxyamidino)]phenoxy-5-[4-(<i>N</i> -succinyloxyamidino)]phenoxyptan		-I	3a
[¹²³ I]-1-(4-Amidino-2-iod)phenoxy-5-(4-amidino)phenoxyptan	-H	- ¹²³ I	1b
[¹²³ I]-1-[4-(<i>N'</i> -hydroxyamidino)-2-iod]-phenoxy-5-[4-(<i>N</i> -hydroxyamidino)]-phenoxyptan	-OH	- ¹²³ I	2b
[¹²³ I]-1-[2-Iod-4-(<i>N'</i> -succinyloxyamidino)]phenoxy-5-[4-(<i>N</i> -succinyloxyamidino)]phenoxyptan		- ¹²³ I	3b

Nebenprodukte

Strukturformel	Ziffer
 <p data-bbox="414 694 1021 795">1-[2-Iod-4-(<i>N'</i>-succinyloxyamidino)]phenoxy- 5-[4-(<i>N</i>-hydroxyamidino)]phenoxy-pentan</p>	10
 <p data-bbox="311 1086 1133 1187">1-[4-((5-(2-carboxyethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl))-2-iod]phenoxy- 5-[4-(<i>N</i>-hydroxyamidino)]phenoxy-pentan</p>	11
 <p data-bbox="311 1478 1133 1579">1-[4-((5-(2-carboxyethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl))-2-iod]phenoxy- 5-[4-(<i>N</i>-succinyloxyamidino)]phenoxy-pentan</p>	12
 <p data-bbox="311 1892 1133 1993">1-[4-((5-(2-carboxyethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl))-2-iod]phenoxy- 5-[4-((5-(2-carboxyethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl))]phenoxy-pentan</p>	13

Erklärung zu §8 Abs. 1 der Promotionsordnung

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Kotthaus, J., Cohrs, B., Kotthaus, J., Schade, D., Hungeling, H., Clement, B.

New prodrugs of the antiprotozoal drug pentamidine

Poster, 9th International ISSX Meeting, ISSX 2010, Istanbul, Türkei

Cohrs, B., Zuhayra, M., Zhao, Y., Culman, J., Kötz, K., Henze, E., Clement, B.

***In vivo* SPECT-imaging of a newly developed and radiolabeled [¹²³I]-iodopentamidine prodrug for the treatment of African trypanosomiasis**

Poster, 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry, EFMC-ISMC 2012, Berlin, Deutschland

Cohrs, B., Zuhayra, M., Zhao, Y., Culman, J., Kötz, K., Henze, E., Clement, B.

Radiolabeling and *in vivo* imaging of a newly developed [¹²³I]-iodopentamidine prodrug for the treatment of African trypanosomiasis

Poster, 25th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, EANM 2012, Milano, Italien

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel im März 2013

Björn Cohrs

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bernd Clement für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des sehr interessanten Themas sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung bedanken.

Ebenso gilt ein großer Dank Herrn PD Dr. Maaz Zuhayra, der mich in der Klinik für Nuklearmedizin insbesondere bei den radiochemischen Arbeiten betreute und stets in allen Belangen ein offenes Ohr für mich hatte.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Kunze, Herrn Prof. Dr. Dieter Heber und Herrn Dr. Ulrich Girreser bedanke ich mich herzlich für die Hilfestellungen und guten Ideen vor allem bei den Themen Pharmakokinetik, Nomenklatur und Analytik.

Für die unermüdliche Hilfe und stundenlange Geduld bei den Tierversuchen bedanke ich mich ganz besonders bei Frau Dr. Yi Zhao und Herrn PD. Dr. Juraj Culman.

Inga Gehlsen und Jan Brdon danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft zur Pflege und Operation der Tiere.

Ein großer Dank geht an Kristin Kötz, die mir mit viel persönlichem Engagement bei der Durchführung des SPECT-Imagings mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei Melissa Zietz bedanke ich mich ebenso für ihr großes persönliches Engagement und die hervorragende Leistung bei der Durchführung der synthetischen Arbeiten, bei Sven Wichmann für seine Hilfe insbesondere bei der semipräparativen HPLC und bei meinen Hiwis Julia Holm-Bertelsen, Juliane Rossi und Arda Esici für die Geduld und ihre gute Arbeit bei der Synthese und den stundenlangen Aufarbeitungen.

Gudrun und Stefan danke ich für jeweils zwei Jahre nette und verständnisvolle Büronachbarschaft.

Ein sehr großes und herzliches Dankeschön geht an die besten Kollegen der Welt, die mir in Zukunft sehr fehlen werden. Für unzählige schöne, verrückte und unvergessliche Stunden bedanke ich mich besonders bei Birte, Carmen, Chris, Daniel, Dennis, Eugen, Franzi, Ina, Joscha, Jürke, Julia, Lars, Laura, Lena, Lukas, Philip, Rebecca, Swetlana und Tamara. Dynamo Eskalation!

Auch bei allen nicht namentlich erwähnten Kolleginnen und Kollegen möchte ich mich für die nette Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima bedanken, so dass mir die Promotionszeit in schöner Erinnerung bleiben wird.

Ein besonderer Dank gilt Martina, die in all den Jahren immer an meiner Seite war und mich jederzeit unterstützt hat.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie mir diesen Weg ermöglicht und mich stets auf ihm begleitet hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Björn Cohrs
Geburtsdatum	25. März 1982
Geburtsort	Soltau
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1988 bis 1992	Wilhelm-Busch-Grundschule Soltau
1992 bis 1994	Orientierungsstufe 1 Soltau
1994 bis 2001	Gymnasium Soltau
Juni 2001	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

Aug. 2001 bis Mai 2002	DRK-Rettungsdienst Soltau
Aug. 2001 bis Dez. 2001	Ausbildung zum Rettungssanitäter an der DRK-Rettungsschule Niedersachsen in Goslar während des Zivildienstes
Juni 2002 bis Sept. 2002	Anstellung als Rettungssanitäter im DRK-Rettungsdienst Soltau

Studium

Okt. 2002 bis Nov. 2006	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Jan. 2007 bis Jun. 2007	Diplomarbeit an der Universität Wien unter Leitung von Prof. Dr. C. R. Noe (Wien) und Prof. Dr. B. Clement (Kiel)
Jul. 2007 bis Dez. 2007	Pharmaziepraktikum in der Rathaus-Apotheke, Rosenheim (Oberbayern)
Jan. 2008	Erteilung der Approbation als Apotheker

Berufstätigkeit

Feb. 2008 bis Mär. 2009	Anstellung als Apotheker in der Heilig-Geist-Apotheke und Rathaus-Apotheke, Rosenheim (Oberbayern)
-------------------------	--

Promotion und Weiterbildung

seit April 2009	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement
seit April 2009	Weiterbildung zum Fachapotheker für Toxikologie und Ökologie

Kurzfassung

Die Afrikanische Schlafkrankheit ist eine durch Trypanosomen hervorgerufene Infektionskrankheit, in deren Verlauf die Erreger aus der Peripherie die Blut-Hirn Schranke überwinden und ins ZNS eindringen. Unbehandelt verläuft diese Erkrankung immer letal. Die Therapie ist aufgrund der begrenzten Auswahl an Arzneistoffen und der gravierenden Nebenwirkungen mit zum Teil Todesfolge schwierig. Die Anwendung des Antiprotozoikums Pentamidin ist durch die bei physiologischem pH-Wert protonierten, basischen Amidinfunktionen auf die intravenöse oder intramuskuläre Behandlung des ersten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit begrenzt. Daher sind verschiedene Pentamidin-Prodrugs mit dem Ziel entwickelt worden, einen oral verfügbaren und ZNS-gängigen Arzneistoff zur Verfügung zu stellen. Durch Hydroxylierung der Amidinfunktionen konnte die Basizität gesenkt und die Lipophilie erhöht werden. Eine weitere Steigerung der Lipophilie und der Wasserlöslichkeit wurde durch Veresterung der hydroxylierten Amidinfunktionen erreicht. Die metabolische Aktivierung des so geschaffenen, doppelten Prodrugs zur Wirkform Pentamidin konnte in vorangegangenen Arbeiten *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden.

In dieser Arbeit wurden Pentamidin sowie die Prodrugs *N,N'*-Dihydroxypentamidin und *N,N'*-Bis(succinyloxy)pentamidin mittels SPECT-Imaging hinsichtlich ihrer Distribution, oralen Bioverfügbarkeit und Blut-Hirn Schranken-Gängigkeit *in vivo* untersucht. Dafür wurden die drei Verbindungen mit dem γ -Strahler [^{123}I]-Iodid radioaktiv markiert.

Die Ergebnisse der durchgeführten Studien belegen die deutlich verbesserte orale Bioverfügbarkeit der Prodrugs. Die Hauptorgane der Distribution waren Leber und Nieren. Des Weiteren wurden die Prodrugs stärker biliär und deutlich weniger renal als [^{123}I]-Iodpentamidin eliminiert, was hinsichtlich der nephrotoxischen Eigenschaften von Pentamidin positiv zu bewerten ist. Nach intravenöser Applikation von [^{123}I]-*N,N'*-Dihydroxyiodpentamidin konnte eine signifikant höhere Akkumulation an Radioaktivität im Gehirn als nach intravenöser Injektion von [^{123}I]-Iodpentamidin beobachtet werden. Ob eine effektive Therapie des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit mit den hier untersuchten Prodrugs möglich ist, muss in weiteren *in vivo* Untersuchungen mit infizierten Tieren geklärt werden.

Abstract

African sleeping sickness is caused by trypanosome infection. During infection the parasites move from the periphery across the blood-brain barrier and enter the CNS. When untreated this disease is always fatal. The treatment of African trypanosomiasis is difficult owing to the limited choice of available drugs and their severe or sometimes lethal side effects. Due to the strong basic amidine moieties the antiprotozoal drug pentamidine suffers from poor oral bioavailability and lacks CNS delivery limiting its applicability for intravenous or intramuscular treatment of first stage African trypanosomiasis. For this reason, several new pentamidine prodrugs have been developed with the aim of providing an orally available and CNS penetrating drug. By means of hydroxylation of the amidine moieties basicity could be reduced and lipophilicity increased. A further increase in lipophilicity and water solubility was achieved by esterification of hydroxylated amidine moieties. The metabolic activation of this double prodrug to the active drug pentamidine could be shown previously *in vitro* and *in vivo*.

In this work, pentamidine and its prodrugs *N,N'*-dihydroxypentamidine and *N,N'*-bis(succinyloxy)pentamidine have been evaluated with regards to their distribution, oral bioavailability and ability to cross the blood-brain barrier using *in vivo* SPECT imaging. Therefore, the three substances were labeled with the radioactive γ -emitter [^{123}I]-iodide.

Results of these studies revealed a highly improved oral bioavailability of the prodrug candidates. All compounds mainly accumulated in the liver and kidneys. The data also showed, that [^{123}I]-iodopentamidine was mainly renally eliminated while the prodrugs were primarily metabolized in the liver and underwent biliary elimination. Considering pentamidine's nephrotoxicity this feature can be seen as an advantage of the prodrug principle. Moreover, a significantly higher concentration has been observed in the brain after intravenous injection of [^{123}I]-*N,N'*-dihydroxyiodopentamidine compared to intravenous administration of [^{123}I]-iodopentamidine. The feasibility of an effective treatment of second stage African trypanosomiasis with the herein investigated prodrugs remains to be clarified with infected animals in additional *in vivo* studies.