



Synthese und Evaluierung von (Radio)Liganden für den Free Fatty Acid Rezeptor 1

Dissertation

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

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

Dominikus Zimmermann

Geboren in Fürth

Mainz, Dezember 2014

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Der Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, welcher neben einer hohen Expression im Gehirn auch eine verstärkte Expressionsrate auf den β -Zellen des Pankreas aufweist. Diese Expressionsmuster machen ihn zu einem idealen Target für die Visualisierung der sogenannten β -Zell-Masse mittels molekularer bildgebender Verfahren wie der PET. Eine Entwicklung geeigneter Radiotracer für die β -Zell-Bildgebung würde sowohl für die Diagnostik als auch für die Therapie von Typ-1- und Typ-2-Diabetes ein wertvolles Hilfsmittel darstellen.

Aufbauend auf einem von Sasaki *et al.* publiziertem Agonisten mit einem vielversprechendem EC_{50} -Wert von 5,7 nM wurden dieser Agonist und zwei weitere darauf basierende ^{19}F -substituierte Moleküle als Referenzverbindungen synthetisiert (**DZ 1-3**)^[1]. Für die ^{18}F -Markierung der Moleküle **DZ 2** und **DZ 3** wurden die entsprechenden Markierungsvorläufer (**MV 1-3**) synthetisiert und anschließend die Reaktionsparameter hinsichtlich Temperatur, Lösungsmittel, Basensystem und Reaktionszeit für die nukleophile n.c.a. ^{18}F -Fluorierung optimiert. Die abschließende Entschützung zum fertigen Radiotracer wurde mit NaOH-Lösung durchgeführt und die Tracer injektionsfertig in isotonischer NaCl-Lösung mit radiochemischen Ausbeuten von 26,9 % ($[^{18}F]$ **DZ 2**) und 39 % ($[^{18}F]$ **DZ 3**) erhalten.

Zusätzlich wurde ein Chelator zur ^{68}Ga -Markierung an den Liganden gekoppelt (Verb. **46**) und die Markierungsparameter optimiert. Nach erfolgter Markierung mit 95 % radiochemischer Ausbeute, wurde der Tracer abgetrennt und *in vitro* Stabilitätsstudien durchgeführt. Diese zeigten eine Stabilität von mehr als 90 % über 120 min in sowohl humanem Serum (37 °C) als auch isotonischer NaCl-Lösung.

Mit einem ebenfalls synthetisierten fluoreszenzmarkierten Derivat des Liganden (Verb. **43**) wurden erste LSM-Bilder an sowohl Langerhans'schen Inseln als auch FFAR1-tragenden RIN-M Zellen durchgeführt, welche einen vielversprechenden Uptake des neuen Liganden in die Zellen zeigen. Weitere Untersuchungen und biologische Evaluierungen stehen noch aus. Mit den Referenzsubstanzen wurden zusätzlich Vitalitätsstudien an Langerhans'schen Inseln durchgeführt, um einen negativen toxischen Einfluss auszuschließen.

Abstract

The free fatty acid receptor (FFAR1), which is a G-protein coupled receptor, is highly expressed in the brain as well as in the β -cells of the pancreas. These expression patterns make FFAR1 an ideal target for visualisation of the β -cell-mass which is conducted by imaging techniques such as positron emission tomography (PET). The development of a suitable radiotracer for β -cell imaging would provide a valuable tool for diagnostics and therapy of type-1 and type-2 diabetes.

Based on a FFAR1 agonist with a promising EC_{50} -value of 5.7 nM, published by Sasaki *et al.*, three similar ^{19}F -substituted molecules as reference compounds (**DZ 1-3**) were synthesized^[1]. For ^{18}F -labeling of **DZ 2** and **DZ 3** the respective labeling precursors (**MV 1-3**) were synthesized. Further the reaction parameters were optimized concerning temperature, solvent, base system and reaction time of the nucleophilic n.c.a. ^{18}F -fluorination. NaOH solution was used for final deprotection of the radiotracer. Subsequently the tracers were prepared ready to use in isotonic NaCl solution with radiochemical yields of 26.9 % (**[^{18}F]DZ 2**) and 39 % (**[^{18}F]DZ 3**).

Additionally, for ^{68}Ga -labeling a chelator was coupled to the ligand (Verb. **46**) and labeling conditions were further optimized. After successful labeling with a radiochemical yield of 95 % the tracer was separated and *in vitro* stability assays were performed. Stability in human serum as well as in isotonic NaCl solution proved to be greater than 90% over 120 min.

By help of another synthesized fluorescence labeled derivat (Verb. **43**) of the ligand first LSM images of Langerhan`s islets as well as FFAR1 expressing RIN-M cells could be obtained. A promising cellular uptake of the ligand could be shown. Further investigation as well as biological evaluations are to be undertaken. The reference substance was used on Langerhan`s islets for additional toxicity studies to exclude a negative impact on the cells.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Die Positronenemissionstomographie (PET).....	6
1.2 Auswahl der verwendeten PET-Nuklide.....	9
1.3 Kernchemische und kinetische Aspekte in der Radiochemie.....	12
1.4 Fluor-18 als Positronemitter.....	14
1.4.1 Produktion von Fluor-18.....	15
1.4.2 Markierungsmethoden organischer Moleküle mit Fluor-18.....	16
1.5 Gallium-68 als Positronemitter.....	26
1.5.1 Komplexchemie des Galliums.....	27
1.6 Diabetes Mellitus.....	29
1.6.1 Klassifikation des Diabetes mellitus.....	29
1.6.2 Bildgebung von β -Zellen.....	31
1.6.3 Der FFAR 1 als Target zur β -Zell Bildgebung mittels PET.....	35
2. Problemstellung und Zielsetzung	38
3. Ergebnisse und Diskussion	41
3.1 Organische Synthesen.....	41
3.1.1 Synthese der inaktiven Referenzverbindungen.....	41
3.1.2 Synthese der ^{18}F -Markierungsvorläufer.....	48
3.1.3 Synthese des Fluoreszenz-Farbstoffes.....	56
3.1.4 Synthese des ^{68}Ga -Markierungsvorläufers.....	63
3.2 Radioaktive Synthesen.....	65
3.2.1 Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{DZ 3}$	65
3.2.2 Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{DZ 2}$	71
3.2.3 ^{68}Ga -Radiomarkierung von Verbindung 46.....	75
3.3 Zelltests.....	79
3.3.1 Rezeptorstatus von Rin-M und Min-6 Zellen.....	79
3.3.2 Vitalitätstests.....	79
3.3.3 Fluoreszenzfärbungen von RIN-M Zellen mit Verbindung 43.....	80
4. Zusammenfassung und Ausblick	84
5. Experimentalteil	87

5.1	Verwendete Geräte und Chemikalien	87
5.2	Organische Synthesen.....	88
5.2.1	Synthese von 3-(4-((2',6'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorophenyl)propionsäure (DZ 1).....	88
5.2.2	Synthese von Methyl 3-(2-fluor-4-((4'-hydroxy-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat (11).....	94
5.2.3	Synthese von 3-(2-Fluor-4-((4'-(2-fluorethoxy)-2'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propionsäure (DZ 2).....	99
5.2.4	Synthese von 3-(2-Fluor-4-((4'-(2-(2-(2-fluorethoxy)ethoxy)ethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propionsäure (DZ 3).....	101
5.2.5	Synthese von 3-(2-Fluor-4-((4'-hydroxy-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propionsäure (MV 3) und Methyl 3-(2-fluor-4-((4'-(2-iodethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat (MV 1)	104
5.2.6	Synthese von tert-Butyl 3-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (36)	106
5.2.7	Synthese von 3-(2-(2-((3'-((3-Fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propionsäure (41).....	108
5.2.8	Synthese von 2,2',2''-(10-(15-((3'-((4-(2-Carboxyethyl)-3-fluorphenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)-2,7-dioxo-10,13-dioxa-3,6-diazapentadecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triessigsäure (46).....	113
5.2.9	Synthese von N-(9-(2-(4-(3-(2-(2-((3'-((4-(2-carboxyethyl)-3-fluorphenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminium (43).....	117
5.2.10	Synthese der geschützten Aldehyde (15a-d).....	122
5.2.11	Synthese von 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl 4-tosylat (31), 2-(2-(2-Iodethoxy)ethoxy)ethanol (32) und Methyl 3-(2-fluor-4-(2-(2-(2-hydroxy ethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)propanoat (30).....	126
5.2.12	Synthese von (E)-Methyl 3-(4-methoxy-2-nitrophenyl)acrylat (19) , (E)-Methyl 3-(2-iod-4-methoxyphenyl)acrylat (23) und 1-(2-Bromomethyl)-4-methoxy-2-nitrobenzol (29).....	128
5.3	Radiochemische Synthesen	137
5.3.1	Markierungen mittels Fluor-18.....	137
5.3.2	Markierungen mittels Gallium-68.....	139

6. Anhang	140
6.1 Abkürzungsverzeichnis	140
6.2 Quellenverzeichnis.....	143
6.3 Tabellenverzeichnis	147
6.4 Abbildungsverzeichnis.....	147

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

In der heutigen Medizin spielen bildgebende Verfahren wie das klassische Röntgen, die Computertomographie (CT) und die Kernspintomographie (MRT) eine wichtige Rolle bei der Untersuchung und der Aufklärung von Krankheiten. Durch sie werden genaue Informationen über Morphologie und die Strukturen einzelner Organe im Körper gewonnen. Aber erst durch den Einsatz von molekularen bildgebenden Methoden wird es ermöglicht, physiologische Prozesse auf molekularer Ebene nicht-invasiv *in vivo* bildlich darzustellen. Hierfür treten ins besonders die zwei nuklearmedizinischen Verfahren der Positronenemissionstomographie (PET) und der Single Photon Emission Computer Tomographie (SPECT) in den Vordergrund. Beiden gemein ist der Einsatz radioaktiv markierter, sehr gut zu detektierender Moleküle, welche an den zu untersuchenden Stoffwechselprozessen teilnehmen, ohne diese zu beeinflussen und hierdurch eine möglichst exakte und unverzerrte Darstellung dieser Prozesse ermöglichen.^[2]

Als wissenschaftliche Grundlage für diese zwei nuklearmedizinischen Verfahren können drei Meilensteine der wissenschaftlichen Geschichte des 20. Jahrhunderts angesehen werden. Neben Henri Becquerel, der 1896 erstmals das Phänomen der Radioaktivität beobachtete (Nobelpreis 1903, mit P. und M. Curie), sind hier auch die Pionierarbeiten der Wissenschaftler Frederic Joliot und Irene Joliot-Curie zu nennen, welche die Produktion künstlicher Radionuklide vorantrieben (Nobelpreis 1935), woraus unter anderem das Phosphorisotop ^{32}P hervorging. Dieses machte sich George de Hevesy für seine Untersuchungen biochemischer Stoffwechselprozesse zu nutzen, worauf das sogenannte Tracer-Prinzip (Nobelpreis 1943) beruht, welches als Grundlage der Verwendung radioaktiver Isotope bei modernen Bildgebungsmethoden in den Lebenswissenschaften dient. Das Prinzip zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass für die Untersuchung benötigte Stoffmengen an radioaktiv markierten Molekülen im pico- bis nanomolaren Bereich liegen und keinen Einfluss auf den Stoffwechselprozess selbst nehmen^{[3][4]}.

Durch Entwicklung erster PET-Tomographen und unter Verwendung, mit kurzlebigen Nukliden markierter Biomoleküle im Gebiet der radiopharmazeutischen

Chemie, wird heutzutage der Einsatz der PET zur nicht invasiven Bildgebung physiologischer Prozesse ermöglicht. Die PET bietet hierbei ein breites Anwendungsspektrum. So können insbesondere die Quantität und zeitliche Dynamik individueller Stoffwechselprozesse, wie die Perfusionsrate, der Energiestoffwechsel, neuronale Stoffwechselvorgänge oder auch die Rezeptorverfügbarkeit untersucht werden^[5]. Durch Anwendung dieser Techniken wird unter anderem die Validierung neuer molekularer Therapien, individuelles Therapiemonitoring, auf Patienten zugeschnittene Dosisoptimierung oder auch die Validierung neuer Arzneistoffe ermöglicht^[6]. Hierfür erforderlich ist jedoch eine stete Weiterentwicklung neuer Radiopharmazeutika, welche es erst ermöglichen die PET in solch einem breiten Spektrum einzusetzen und praktisch jeden Prozess, wie z.B. die Expression einzelner Gene bis hin zur Wirkung verschiedener Medikamente zu untersuchen^{[7][8]}.

Im Rahmen dieser Arbeit soll darauf Bezug genommen werden und sich mit der Entwicklung neuer Radiotracer zur Bildgebung von BETA-Zellen mittels PET beschäftigt werden.

1.1 Die Positronenemissionstomographie (PET)

Für PET-Untersuchungen werden Radiopharmaka benötigt, die aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften an ausgewählten Stoffwechselprozessen teilnehmen, an bestimmte Zielstrukturen binden oder sich in erwünschten Zellen oder Kompartimenten anreichern. Sie können wegen ihrer guten lokalen und kinetischen Nachweisbarkeit und aufgrund der hohen spezifischen Aktivität der zur Markierung verwendeten Radionuklide meist in Stoffmengen im niedrigem nanomolarem Bereich eingesetzt werden.

Das Prinzip der PET beruht darauf, dass zur Markierung neutronenarme bzw. protonenreiche Nuklide eingesetzt werden, welche sich durch Emission eines Positrons (β^+ -Teilchen) stabilisieren. Hierbei wandelt sich im Kern ein Proton durch die Emission des Positrons in ein Neutron um. Darüber hinaus wird aus Gründen der Spinerhaltung ein Elektronneutrino (ν_e) emittiert, wie in der folgenden Gleichung

verdeutlicht wird.

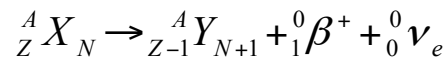


Abbildung 1: Schema des β^+ -Zerfalls

Das emittierte Positron wird durch Wechselwirkungen mit der umgebenden Materie wie z.B. Streuung, Ionisierung oder auch unelastischer bzw. elastischer Stöße soweit abgebremst, bis seine Gesamtenergie in etwa der seiner Ruhemasse entspricht. Die hierbei zurückgelegte Strecke korreliert mit der Energie des Positrons und ist charakteristisch für das jeweils verwendete Radioisotop. Nach Abgabe seiner kinetischen Energie rekombiniert das Positron mit einem Elektron aus der Umgebung, seinem Antiteilchen und es erfolgt die Bildung eines intermediären Zustands des sog. Positroniums, welches als Analogon des Wasserstoffatoms aufgefasst werden kann. Dieses wird in einer als Annihilation bezeichneten Reaktion vernichtet, wobei seine Gesamtenergie von 1022 Kiloelektronenvolt (keV), welche nach $E=mc^2$ der Ruhemasse von Positron und Elektron entspricht auf zwei oder drei γ -Quanten verteilt wird. Ausschlaggebend für den 2 oder 3- γ -Quanten-Zerfall ist der Spinzustand des Positroniums. Liegt es im Singulettzustand mit antiparallelen Spins, dem sogenannten *para*-Positronium vor, erfolgt eine gleiche Verteilung der Energie auf zwei γ -Quanten. Diese werden aufgrund der Auswahlregeln für die Erhaltung von Energie, Impuls und Parität mit jeweils 511 keV in einem Winkel von $\sim 180^\circ$ emittiert. Im Triplettzustand mit parallelen Spins, beim sogenannten *ortho*-Positronium, erfolgt die Annihilation unter Aussendung dreier γ -Quanten mit willkürlicher Energie- und Winkelverteilung. Vergleicht man den Zwei-Quantenzerfall mit dem Drei-Quantenzerfall, so liegen diese in einem Verhältnis von 3 zu 1 vor, wobei sich das *ortho*-Positron jedoch in kondensierter Materie aufgrund seiner längeren Lebensdauer in die *para*-Form umwandelt und schlussendlich ein Verhältnis der Drei- zur Zwei-Quantenvernichtung von etwa 10^{-3} eintritt^[9].

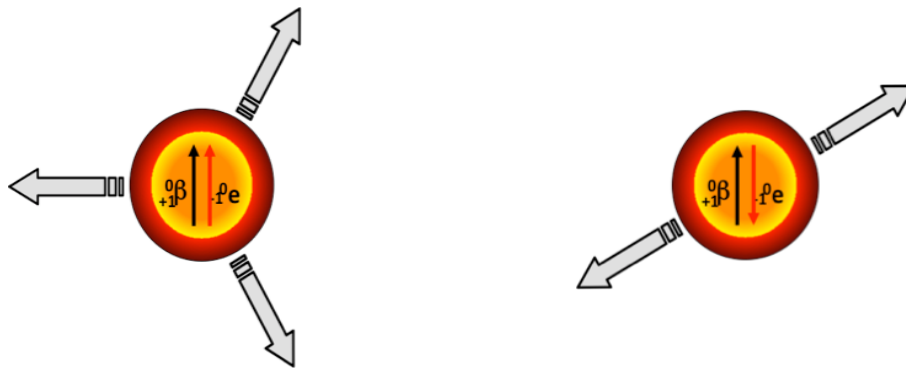


Abbildung 2: Schema von 3- und 2-Quantenzerfall

Um die zwei γ -Quanten eines *para*-Positroniums zu detektieren verwendet man Szintillations-Detektoren, welche aus ca. 10.000 einzelnen Detektorkristallen bestehen, die zu mehreren Blöcken zusammengefasst und ringförmig um den Patienten angeordnet sind. Hierbei wird ein Zerfall nur dann registriert, wenn eine Koinzidenz detektiert wird, also die zwei Quanten annähernd zeitgleich (innerhalb von ≈ 10 ns) von gegenüberliegenden Detektoren erfasst werden. Da man aufgrund der Geometrie des β^+ -Zerfalls davon ausgeht, dass der Annihilationsprozess auf der Verbindungslinie zwischen den beiden gemessenen Quanten der sog. *line of response* (LOR) stattfindet, kann man bei genügend gemessenen Ereignissen eine sehr genaue Aussage über den Anreicherungsort des Pharmakons treffen. Als Detektormaterial werden heutzutage vor allem Bismutgermanat (BGO) und Lutetiumoxyorthosilikat (LSO) verwendet, die das früher eingesetzte Thallium-dotierte Natriumiodid wegen ihrer höheren *stopping power* und der damit verbundenen höheren Sensitivität und Effizienz verdrängt haben. Da neben der β^+ -Energie der Positronen die maximale Ortsauflösung der PET auch durch die Größe der einzelnen Kristalle limitiert wird, liegt diese im Falle heutzutage verwendeter humaner Scanner bei 3-5 mm^[10].

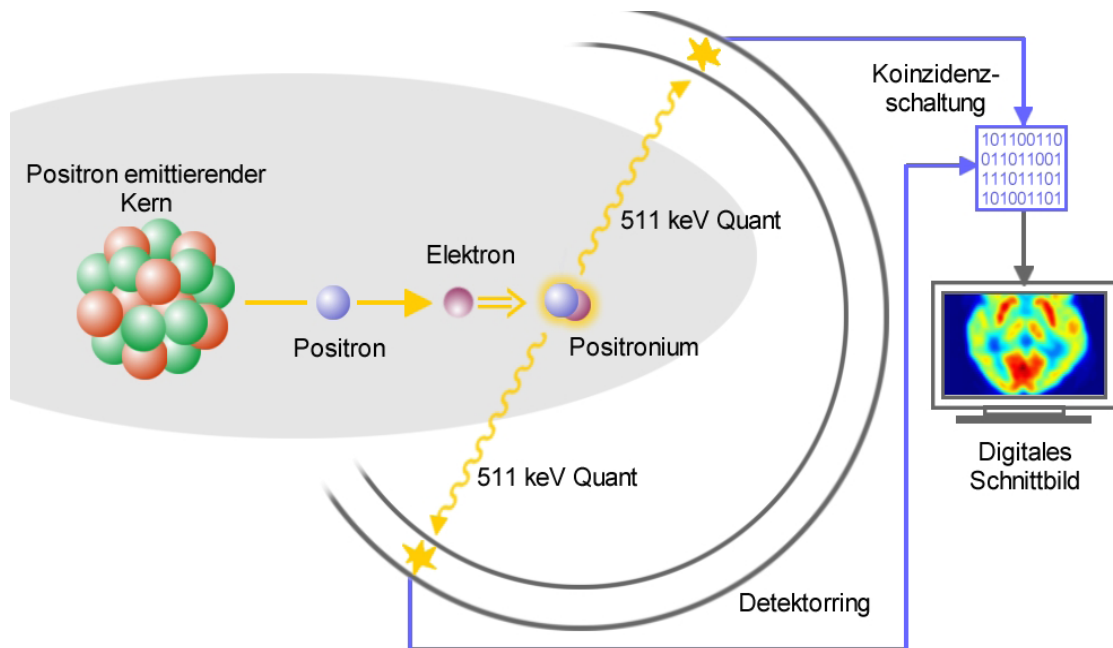


Abbildung 3: Messprinzip der PET^[11]

Neuste Entwicklungen im Bereich der Tomographentechnik erlauben eine flugzeitabhängige (TOF, *time of light*) Detektion beider γ -Quanten, sodass schon bei einer Koinzidenz-Detektion der Ursprung der Annihilation definiert ist. Weitere Optimierungen der Software ermöglichen heutzutage zusätzlich eine rechnerische Korrektur der intrinsischen Unschärfe zwischen Zerfall und Annihilation (\rightarrow Positronenenergie). Die neuen Entwicklungen verbessern noch einmal die Ortsauflösung und erlauben noch kürzere Scanzeiten.

1.2 Auswahl der verwendeten PET-Nuklide

Um das richtige Nuklid bei PET-Untersuchungen einzusetzen, sind verschiedene Faktoren zu beachten. Zum einen die bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnte Positronenenergie, welche die theoretisch mögliche Bildauflösung limitiert und zum anderen die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) als auch die Verfügbarkeit des gewählten Nuklids.

Bei der Halbwertszeit muss ein geeigneter Kompromiss zwischen Dauer der Synthese des Radiopharmakons bzw. Dauer der PET-Messung auf der einen Seite

Einleitung

und Strahlenbelastung des Patienten gefunden werden. So eignen sich kurzlebige Nuklide wie ^{15}O oder ^{13}N vor allem für einfache Radiosynthesen und die Darstellung schneller Bioprozesse im Körper wie z.B. für Perfusionsuntersuchungen mit ^{15}O -Wasser. Mit Nukliden wie Fluor-18 ist hingegen schon die Möglichkeit mehrstufiger Synthesen und anschließender Untersuchung komplexer biochemischer Prozesse wie z.B. der Bindung diverser Liganden an ihre entsprechenden Rezeptoren gegeben. Für die Darstellung langwieriger Prozesse wie der Verteilung radioaktiv markierter DNA-Moleküle greift man hingegen auf langlebige Isotope wie beispielsweise Iod-124 zurück.

Tabelle 1: Zerfallseigenschaften wichtiger Positronenemitter

Nuklid	$t_{1/2}$	β^+ -Häufigkeit / %	$E_{\beta^+,\text{max}}$	max. Reichweite (in H_2O)
^{11}C	20,30 min	99,8	0,96 MeV	3,8 mm
^{13}N	9,96 min	100	1,19 MeV	5,0 mm
^{15}O	2,03 min	99,9	1,73 MeV	7,6 mm
^{18}F	109,65 min	96,9	0,63 MeV	2,4 mm
^{68}Ga	67,71 min	89,1	1,90 MeV	13,6 mm
^{72}As	1,1 d	87,8	1,12 MeV	4,8 mm
^{76}Br	16,7 h	66,5	3,60 MeV	15,5 mm
^{86}Y	14,7 h	31,4	1,18 MeV	5,3 mm
^{124}I	4,17 d	23,0	2,14 MeV	9,7 mm

Bei der Verfügbarkeit bestimmter Nuklide treten öfter lokale Schwierigkeiten auf. So wird für die Herstellung kurzlebiger gängiger Radionuklide (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F etc.) ein Zyklotron benötigt. An diesem Teilchenbeschleuniger werden, wie 1930 erstmals von Lawrence *et al.* beschrieben, geladene Teilchen wie Protonen,

Deuteronen oder Alpha-Teilchen in einem starken Magnetfeld beschleunigt und damit ein Target bestrahlt^[12]. Die dort ausgelöste Kernreaktion führt dann zu den gewünschten Nukliden, welche aber nur eine verhältnismäßig geringe Halbwertszeit besitzen. Zur Verwendung dieser Nuklide muss deshalb ein Zyklotron in unmittelbarer Nähe zum Synthese- und Anwendungsort vorhanden sein (*in house*-Produktion). Fluor-18 kann hier als Ausnahmefall betrachtet werden, da dessen Halbwertszeit von 109,7 min es ermöglicht, über längere Strecken transportiert zu werden und es somit über ein sogenanntes „Satellitensystem“ auch Einrichtungen ohne Zyklotron dieses Nuklid zur Verfügung gestellt werden kann.

Neben am Zyklotron hergestellten Nukliden erhält man durch Radionuklid-Generatorsysteme noch eine weitere Möglichkeit Isotope wie z.B. Gallium-68 oder Scandium-44 für Markierungen bereit zu stellen, wobei hier das Vorhandensein eines Zyklotrons nicht von Nöten ist und eine Anwendung überall und zu geringen Kosten ermöglicht wird^{[13][14]}. Grundlage für diese Generatorsysteme bieten einige seltenen Nuklidkonstellationen, bei denen das Mutternuklid eine längere Halbwertszeit besitzt als das Tochternuklid, folglich kann das zuvor hergestellte Mutternuklid vor Ort das Tochternuklid generieren, dieses in hoher Reinheit abgetrennt und in weiteren Radiosynthesen angewandt werden.

Tabelle 2: Produktion häufig verwendeter PET-Nuklide^{[15][16]}

Radionuklid	Produktion	Kernreaktion	Targetfüllung
¹¹ C	Zyklotron	¹⁴ N(p,a) ¹¹ C	¹⁴ N ₂ (O ₂)
¹⁵ O	Zyklotron	¹⁴ N(d,n) ¹⁵ O	¹⁴ N ₂ (O ₂)
¹³ N	Zyklotron	¹⁶ O(p,α) ¹³ N	H ₂ ¹⁶ O
¹⁸ F	Zyklotron	¹⁸ O(p,n) ¹⁸ F	H ₂ ¹⁸ O
⁶⁸ Ga	Generator	⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga	

Als zusätzliches Auswahlkriterium für PET-Nuklide ist die Häufigkeit des β⁺-Zerfalls zu nennen. Diese sollte möglichst hoch sein, da der neben der Positronemission zweite Weg eines neutronenarmen Isotops sich zu stabilisieren, der sogenannte

Elektroneneinfang (EC), bei PET-Messungen nicht detektiert wird. Ein erhöhter Anteil an EC würde folglich zur Verwendung höherer Aktivitätsmengen führen, einhergehend mit einer höheren Strahlenbelastung des Patienten. Betrachtet man die vorkommenden Häufigkeiten des β^+ -Zerfalls bei den in Tabelle 1 gezeigten Isotopen, so ist zu erkennen, dass der Anteil der Positronemission mit steigender Ordnungszahl abnimmt und die Stabilisierung über EC zunehmend wahrscheinlicher wird.

1.3 Kernchemische und kinetische Aspekte in der Radiochemie

Als Grundlage für radiochemische Synthesen sollten, um gute Ergebnisse bzw. aussagekräftige PET-Bilder zu erhalten, einige Kriterien, welche im Folgenden kurz erläutert werden, beachtet und eingehalten werden.

Wie in 1.1 bereits erwähnt, kommen in der Nuklearmedizin meist sehr geringe Stoffmengen an Radiotracer zum Einsatz, um bestimmte biologische Vorgänge zwar zu untersuchen aber pharmakologisch nicht zu beeinflussen. Hierbei kommt dem Begriff der spezifischen Aktivität (A_s) besondere Bedeutung zu, da sie als ein Kriterium für die Reinheit oder auch Qualität eines Isotops bzw. Radioliganden aufgefasst werden kann. Sie wird definiert als Radioaktivität bezogen auf die Gesamtmenge der Probe und wird typischerweise in GBq/ng angegeben. In der Praxis der radiopharmazeutischen Chemie wird die spezifische Aktivität als molare Aktivität verwendet und definiert die Radioaktivität bezogen auf die Gesamtstoffmenge, bestehend aus radioaktiv markiertem und inaktivem Molekül, was zu einer Einheit von GBq/nmol führt. Um die eingesetzte Stoffmenge an Radiopharmakon bei PET-Untersuchungen möglichst gering zu halten, wird folglich immer eine möglichst hohe spezifische Aktivität angestrebt, was z.B. auch eine Verwendung hoch wirksamer oder sogar toxischer Substanzen als Radiotracer ermöglicht. Einen weiteren Begriff in Bezug auf die spezifische Aktivität stellt der isotope Träger dar, als welcher die Verunreinigung des Radioliganden mit seiner inaktiven Form bezeichnet wird. Hierbei wird im Allgemeinen in drei

unterschiedliche Formen unterschieden: trägerfrei (*carrier free; c.f.*), geträgert (*carrier added, c.a.*) und kein Träger zugesetzt (*no carrier added, n.c.a.*).

Der Zustand der absoluten Trägerfreiheit kann allerdings nur bei künstlich erzeugten Elementen wie z.B. ^{99m}Tc erlangt werden, da hiervon keinerlei natürliche Vorkommen existieren und somit keine ubiquitären Verunreinigungen wie bei natürlichen Isotopen erfolgen können. Isotope wie ^{18}F werden hingegen als „ohne zugesetzten Träger bezeichnet“ und im Regelfall liegt bei Radiosynthesen mit ^{18}F ein Isotopenverhältnis von $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$ von ca. 10^{-1} - 10^{-3} vor. Der geträgerte Zustand sollte normalerweise vermieden werden, kann jedoch in speziellen Fällen wie bei der elektrophilen ^{18}F -Markierung mittels $^{18}\text{F}]\text{F}_2$ nicht umgangen werden.

Auch der radiochemischen Ausbeute kommt eine wichtige Rolle zu, sie hängt sowohl von Reaktionskinetiken als auch von Reaktionseffizienz ab und wird meistens auf den Startzeitpunkt der Synthese (start of sythesis, SOS) bzw. dem Ende der Nuklidherstellung (end of bombardment, EOB) zurück gerechnet. Um auf die kinetischen Gesichtspunkte einzugehen, betrachtet man zunächst die allgemeine Zerfallsgleichung:

$$A = \frac{dN}{dt} = N \cdot \lambda = N \cdot \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

mit A = Aktivität in Bq, N = Teilchenzahl, λ = Zerfallskonstante und $T_{1/2}$ = der Halbwertszeit

Da es sich aufgrund der gewählten Reaktionsbedingungen bei nukleophilen Fluorierungen um bimolekulare Reaktionen handelt, welche einer Reaktionskinetik 2. Ordnung folgen, kann man dies durch folgende Gleichung ausdrücken:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [MV] \cdot [A]$$

mit [A] = Konzentration des freien Radionuklids; [MV] = Konzentration des Markierungsvorläufers; k = Geschwindigkeitskonstante der Reaktion

Allerdings liegt bei n.c.a.-Markierungen der Precursor in solch einem großen Überschuss gegenüber dem Radionuklid vor, dass man die Konzentrationsänderung des Vorläufers vernachlässigen kann und eine Reaktionskinetik pseudo 1. Ordnung erhält:

$$-\frac{dA}{dt} = k' \cdot [A]$$

mit $k' = k \cdot [MV]$

Um nun die zerfallskorrigierte Aktivität zum Zeitpunkt t anzugeben, erhält man folgende Gleichung:

$$[A_t] = [A_0] \cdot e^{-k' \cdot t}$$

mit A_t = Aktivität zum Zeitpunkt t ; A_0 = Aktivität zum Zeitpunkt $t = 0$

Daraus ergibt sich mit $[P] = [A_0] - [A_t]$ für die Konzentration des Produktes zum Zeitpunkt t folgende Beziehung:

$$[P] = [A_0] \cdot (1 - e^{-k' \cdot t})$$

Somit erkennt man, dass die Konzentration des Produktes exponentiell bis zu einem Grenzwert, welcher der maximalen radiochemischen Ausbeute entspricht, ansteigt.

1.4 Fluor-18 als Positronemitter

Bei der Markierung von Molekülen mittels radioaktiver Nuklide kann man zwei Klassen von Radioliganden unterscheiden. Auf der einen Seite die sogenannten isotopen Tracer und auf der anderen die Analogtracer. Isotope Tracer beschreiben radioaktiv markierte Moleküle, die sich weder in Struktur noch im chemischen Verhalten vom nicht aktiven Originalmolekül unterscheiden. Dies wird aufgrund der fast ausschließlichen Zusammensetzung organischer Moleküle aus Elementen wie Wasserstoff, Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel oder Phosphor jedoch meist nur durch Markierungen mittels ^{11}C , ^{13}N oder auch ^{15}O erreicht. Analogtracer hingegen unterscheiden sich durch die Einführung von Radioisotopen wie z.B. ^{18}F zwangsläufig in ihrer Struktur vom Originalmolekül, wodurch unbekannte Auswirkungen auf dessen Eigenschaften, sowohl in chemischer als auch pharmakologischer Sicht zu erwarten sind. So können solche Strukturveränderungen Einfluss auf Verteilung, Affinität und Selektivität des Liganden mit sich führen^[17]. Dies führt dazu, dass man bei Markierungsreaktionen

mit Fluor-18 einige wichtige chemische Aspekte beachten muss, um die Eigenschaften des Originalmoleküls möglichst beizubehalten. Grundvoraussetzung hierfür ist, dass für die pharmakologische Wirksamkeit unabdingbare Strukturelemente, die sog. Pharmakophore erhalten bleiben. Auch für andere wichtige (bio)chemische Wechselwirkungen wie die Lipophilie verantwortliche Merkmale sollten möglichst nicht verändert werden, wobei hier jedoch eine gewisse Toleranz herrscht. Fluor offeriert aufgrund seines zu Wasserstoff vergleichbaren Van-der-Waals-Radius ($r(\text{F}) = 1,35 \text{ \AA}$; $r(\text{H}) = 1,20 \text{ \AA}$) diese gegeneinander auszutauschen. Weiterhin besteht wegen der geringen Bindungslängenunterschiede zwischen C-F und C-OH ($\text{C-F} = 1,39 \text{ \AA}$; $\text{C-OH} = 1,42 \text{ \AA}$) und ihrer elektronischen Eigenschaften (isoelektronisch) auch hier eine Möglichkeit die Hydroxygruppe durch Fluor zu ersetzen. Oft ist auch der Austausch einer Alkylgruppe gegen einen Fluoralkylsubstituenten wegen der chemisch ähnlichen Eigenschaften eine gute Alternative.

1.4.1 Produktion von Fluor-18

Für die Markierung relevanter Moleküle stehen zwei verschiedene Arten Fluor-18 zur Verfügung, die auf unterschiedliche Arten produziert werden und sich auch in ihrem Trägergehalt deutlich unterscheiden.

Zur Markierung elektronenreicher Verbindungen wird elektrophiles $^{18}\text{F}]\text{F}_2$ benötigt, welches man durch Bestrahlung eines gasförmigen Neon-20 Targets erhält. Dies verläuft über eine Bestrahlung mittels Deuteronen, was in einer (d,α) -Kernreaktion zum gewünschten Produkt führt. Ein Problem hierbei stellt das zunächst gebildete Fluor-18 dar, das an der Targetwand adsorbiert wird. Um dies zu vermeiden werden dem Targetgas bis zu 0,5 % inaktives F_2 -Gas als isotoper Träger zugesetzt was zur Bildung von $^{18}\text{F}]\text{F}_2$ führt. Allerdings ist hiermit eine dramatische Erniedrigung der spezifischen Aktivität verbunden, wodurch die Verwendung elektrophilen Fluorids deutlich limitiert wird. Um diese Erniedrigung der spezifischen Aktivität etwas zu vermindern, besteht noch die Möglichkeit das elektrophile Fluorid aus $^{18}\text{F}]\text{F}^-_{\text{aq}}$ herzustellen^[18]. Nukleophiles Fluor-18 wird in der Regel durch Bestrahlung eines $^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ -Targets mit Protonen und einer darauf

folgenden $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Kernreaktion erhalten und besitzt in seiner Form als $^{18}\text{F}^{-\text{aq}}$ eine wesentlich höhere spezifische Aktivität als elektrophiles Fluor. Um eine möglichst hohe Ausbeute bei der Kernreaktion zu erzielen, ist es wichtig, genaue Kenntnisse über die Anregungsfunktion zu besitzen, um die Energie der eingestrahlenen Protonen anzupassen. In Tabelle 3 wird ein Überblick verschiedener Produktionswege für Fluor-18 am Zyklotron aufgezeigt.

Tabelle 3: Produktionswege von Fluor-18 am Zyklotron

Kernreaktion	Target	Chemische Form des Fluor-18	Spezifische Aktivität GBq/mmol
$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	$[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$	$^{18}\text{F}^{-\text{aq}}$	bis zu $37 \cdot 10^5$
$^{16}\text{O}(^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$	$[^{\text{nat}}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$	$^{18}\text{F}^{-\text{aq}}$	bis zu $37 \cdot 10^5$
$^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$	^{20}Ne (0,1-0,2% F_2), 18 bar	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	37-370
$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	$[^{18}\text{O}]\text{O}_2$, Kr (1% F_2), 20 bar	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	37-1850

1.4.2 Markierungsmethoden organischer Moleküle mit Fluor-18

Wie in 1.4.1 bereits erwähnt, stehen zur Markierung geeigneter organischer Moleküle zwei verschiedenen Spezies von Fluor-18 zur Verfügung. Allerdings muss man aufgrund der chemischen Eigenschaften und wegen der extrem geringen eingesetzten Stoffmengen an Radionuklid unter speziellen Reaktionsbedingungen arbeiten. Ausgehend von der Struktur des zu markierenden Moleküls kann das Fluorid über eine direkte elektrophile oder nukleophile Fluorierung eingeführt werden. In anderen Fällen ist es notwendig eine mehrstufige Synthese zum Erhalt des gewünschten Produkts durchzuführen. Allen Möglichkeiten liegt das Prinzip zugrunde, das ^{18}F so spät wie möglich einzuführen um ein Abklingen des Nuklids aufgrund der Halbwertszeit in Grenzen zu halten. Als Faustregel gilt, dass die Radiosynthese eines ^{18}F -Liganden die Reaktionsdauer von 3-4 Stunden nicht überschreiten sollte, wobei einstufige Synthesen prinzipiell in einer Zeit von 60-120

min durchführbar sind. Auch sollte man die Anzahl der Reaktionsschritte so gering wie möglich halten, um einer Verminderung der spezifischen Aktivität durch verunreinigte Lösungsmittel, Chemikalien und dergleichen vorzubeugen. Beachtet man all diese Kriterien, so bieten sich generell folgende Möglichkeiten zur ^{18}F -Markierung:

- Elektrophile Fluorierung
- Nukleophile Fluorierung
- Fluorierung mittels prosthetischer Gruppe
- Mehrstufige Radiosynthesen

Elektrophile Fluorierung

Für die elektrophile Fluorierung wird geträgertes $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -Gas verwendet, womit eine relativ niedrige spezifische Aktivität der fluorierten Radiotracer einhergeht. Ein zusätzlich limitierendes Kriterium ist, dass die $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ -Kernreaktion deutlich weniger Fluor-18 liefert als die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Reaktion (400 anstatt 2200 MBq/ μAh), wodurch elektrophile Fluorierungen deutlich seltener Anwendung finden. Des Weiteren führt die Tatsache, dass im ^{18}F - ^{19}F -Molekül beide Isotope die gleiche Reaktivität besitzen, dazu, dass die maximale Reaktionsausbeute nur 50 % betragen kann. Beruhend auf der hohen Reaktivität und geringen Selektivität des $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ müssen Radiomarkierungen bei niedrigen Temperaturen und mit inerten Lösungsmitteln durchgeführt werden. Eine Möglichkeit der Selektivitätserhöhung bietet der Einsatz elektrophiler Reagenzien wie z.B. $[^{18}\text{F}]\text{XeF}_2$ oder $[^{18}\text{F}]\text{AcOF}$. Zusätzlich lässt sich die Regioselektivität durch Verwendung geeigneter Markierungsvorläufer (z.B. Stannyl- oder Silylvorläufer) in Demetallierungsreaktionen erhöhen^[19]. Somit findet die elektrophile Fluorierung ihren Anwendungsbereich eher bei Synthesen nicht toxischer, meist metabolischer Tracer wie z.B. aromatischer Aminosäuren. Populärstes Beispiel ist hier das 6- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor-L-Dopa}$, welches Stand 2010 das am zweithäufigsten verwendete ^{18}F -Radiopharmakon in der klinischen Routine darstellte.

Einleitung

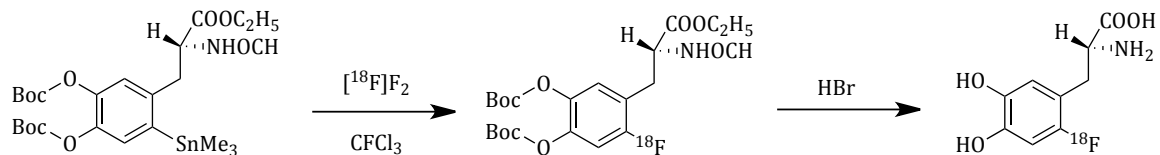


Abbildung 4: Selektive elektrophile Fluorierung von 6-[¹⁸F]Fluor-L-Dopa^[19]

Nukleophile Fluorierung

Bei der nukleophilen Fluorierung, der gebräuchlichsten Methode, wird [¹⁸F]F⁻ über eine nukleophile Substitution in Aromaten(S_NAr) oder Alkylresten(S_N2) eingeführt. Hierfür werden geeignete Abgangsgruppen (z.B. Halogene (Br,I), Sulfonsäureester (Triflate, Mesylate, Tosylate) oder Nitroreste) am zu markierenden Molekül benötigt und man sollte bei Einführung des Fluorids an einem chiralen C-Atom auf die korrekte Stereochemie des Vorläufers achten, da solche Reaktionen einem S_N2-Mechanismus mit Waldenumkehr folgen. Da [¹⁸F]F⁻ in Wasser produziert und geliefert wird, besitzt es aufgrund seiner hohen Ladungsdichte eine ausgeprägte Hydrathülle, wodurch seine Nukleophilie drastisch sinkt. Deshalb muss die Hydrathülle zunächst in einem Trocknungsverfahren entfernt werden. Hierfür wird in den meisten Fällen das Fluorid-Ion auf einer Anionenaustauscherkartusche fixiert und anschließend mit einer Lösung, bestehend aus Acetonitril, einer nicht nukleophilen Base und einem Phasentransferkatalysator eluiert. Nach abschließender azeotroper Trocknung unter mehrmaliger Zugabe von Acetonitril kann es dann in das für die Markierungsreaktion gewünschte Lösungsmittel aufgenommen werden^[20].

Prinzipiell sollten bei der nukleophilen Fluorierung einige Aspekte, welche der hohen Elektronegativität und dem extrem nukleophilen Charakter des Fluoridanions Rechnung tragen, beachtet werden:

- Die Markierung sollte generell in aprotischen dipolaren Lösungsmitteln wie z.B. Acetonitril (MeCN), Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Dimethylformamid (DMF) stattfinden. Diese gewährleisten aufgrund ihrer hohen Dielektrizitätskonstante, dass sowohl Salze als auch lipophile Moleküle gelöst

werden und enthalten zusätzlich keine aciden Protonen welche zur Bildung von Flusssäure mit $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ führen würden.

- Dieser HF-Bildung kann ebenfalls durch den Einsatz nicht nukleophiler Basen, welche dann als Protonenfänger dienen, vorgebeugt werden. Hierdurch wird die Nukleophilie des Fluorids erhöht und man erhält stark basische Markierungsbedingungen. Ein weiterer günstiger Nebeneffekt ist hier, dass die Base als nicht-isotoper Träger fungiert und somit gleichzeitig eine Verhinderung der Adsorption des Fluor-18 an die Gefäßwand des Reaktionsvials ermöglicht. Beispiele für häufig eingesetzte Verbindungen sind Basen mit Carbonationen oder auch Oxalate.
- Des Weiteren ist neben dem Einsatz der geeigneten Base die Verwendung eines Phasentransferkatalysators von Nöten. Dieser formt durch Komplexierung des Gegenions des Fluorids ein großes weiches Kation, wodurch die Solvatisierung von $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ weiter herabgesenkt und durch Verschiebung des Gleichgewichts Richtung Gegenion-Kryptand-Komplex und „nacktem“ $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ die Basizität erhöht wird. Als Phasentransferkatalysatoren werden in der Regel der Kryptand Kryptofix[®]222 oder auch Tetraalkylammoniumsalze der entsprechenden Basen verwendet. Ausnahmen stellen hier Basen mit Cäsium oder Rubidium als Kationen dar, bei welchen kein Katalysatorzusatz nötig ist, da diese nur eine sehr schwache Bindung zum Fluoridanion ausbilden.

Bei der Wahl des Markierungsvorläufers ist darauf zu achten, dass aufgrund der besonderen Reaktionsbedingungen im Molekül keine aziden Protonen wie Thiole, Alkohole, Säuren oder Amine vorhanden sind. Sollte dies der Fall sein, gilt es sie mit entsprechenden Schutzgruppen während der Markierungsreaktion zu schützen und anschließend wieder zu entschützen. Des Weiteren sollte, wie bereits obenstehend erwähnt, auf geeignete elektronenziehende Abgangsgruppen am zu markierenden Kohlenstoff-Atom geachtet werden. Ein Paradebeispiel für die (aliphatische) nukleophile ^{18}F -Fluorierung stellt die Synthese von 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$ - 2-deoxy-D-Glukose (2- $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$) dar. Hier findet ausgehend von α -1,3,4,6-Tetraacetyl-2-trifluoroacetylmannose während der $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion eine Walden-Umkehr statt und

Einleitung

man erhält nach abschließender Entschützung der Hydroxy-Gruppen das gewünschte Reaktionsprodukt.

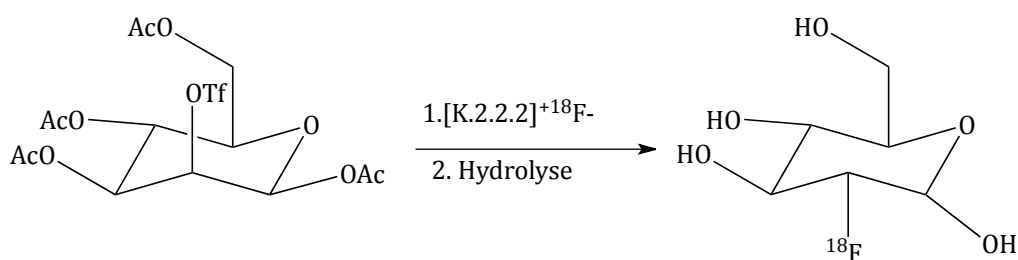


Abbildung 5: Syntheschema von 2-[¹⁸F]FDG

Am Beispiel der von Shen *et al.* beschriebenen Synthese von fluoriertem Benzol zeigt sich, dass neben der obligatorischen Abgangsgruppe bei nukleophilen aromatischen Fluorierungen (z.B. Nitro-, Trimethylammonium- oder Cyano-Gruppen) auch Hilfs-Substituenten in *ortho* oder *para*-Stellung zur Abgangsgruppe für gute Ausbeuten notwendig sind. Hierfür eignen sich elektronenziehende Gruppen (z.B. Ketogruppen), die den Aromaten für nukleophile Substitutionen aktivieren. Shen zeigte am Nitrobenzol, welches sich durch eine S_NAr in maximal 1%iger Ausbeute ¹⁸F-fluorieren ließ, welchen Einfluss eine Aldehydgruppe als elektronenziehender Substituent in *ortho*-Position erwirken kann, indem er die Reaktionsausbeute an markiertem Produkt auf 84 % an hob^[21].

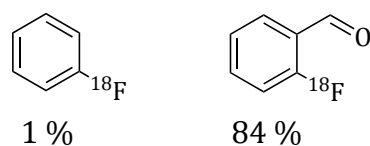


Abbildung 6: Radiochemische Ausbeuten nach Shen *et al.* an fluoriertem Benzol^[21]

Da wie zuvor schon erwähnt zur Markierung elektronenreicher Aromaten eigentlich nur die elektrophile Markierung mittels [¹⁸F]F₂-Gas zur Verfügung steht, trat mit der Veröffentlichung von Pike und Aigbirhio 1995^[22] immer mehr die Verwendung von Diaryliodoniumsalzen in den Mittelpunkt. Diese Iod(III)-Verbindungen als Markierungsvorläufer verwendet, ermöglichen eine einstufige n.c.a. nukleophile ¹⁸F-

Fluorierung elektronenreicher aromatischer Systeme, wo sonst nur mehrstufige Syntheserouten möglich wären. Hierdurch wird die elektrophile Fluorierung umgangen und man erhält Radiotracer mit guten Ausbeuten und wesentlich höheren spezifischen Aktivitäten. Durch die ^{18}F -Fluorierung entstehen bei symmetrischen Diaryliodoniumsalzen markierte ^{18}F Fluoroarene und nicht radioaktive Iodarene (Abbildung 7).

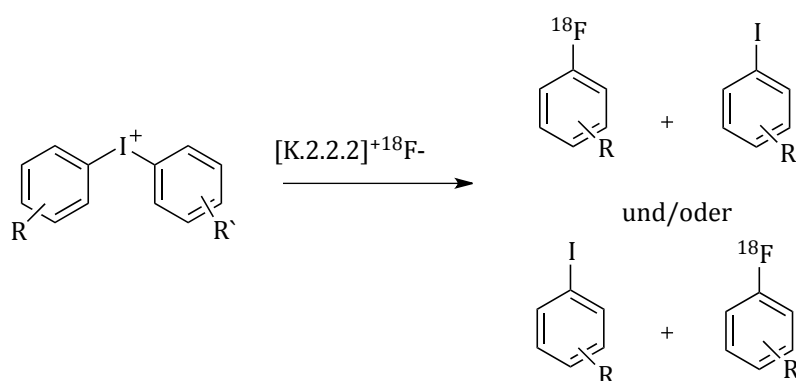


Abbildung 7: Schema der nukleophilen Fluorierung eines Diaryliodoniumsalzes

Werden asymmetrische Iodoniumsalze als Markierungsvorläufer verwendet, so wird der Ring geringerer Elektronendichte durch das nukleophile ^{18}F Fluorid bevorzugt. Hierdurch wird eine selektive Steuerung der ^{18}F -Fluorierung ermöglicht, indem man die Elektronendichte des „Gegenaromaten“ durch Variation seiner Substituenten erhöht und somit das Markierungsgleichgewicht in Richtung der Markierung des gewünschten Moleküls verschiebt, während der Gegenaromat wie in Abbildung 8 gezeigt zum Iodaren umgesetzt wird^[23].

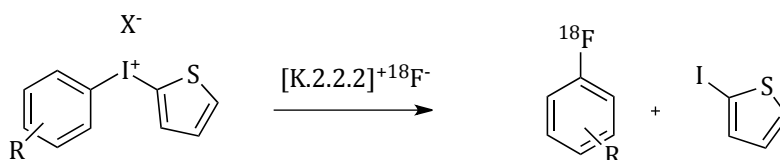


Abbildung 8: Selektive ^{18}F -Fluorierung des elektronenärmeren Aromaten in Diaryliodoniumsalzen^[23]

Neben der Wahl der Substituenten am Gegenaromaten bietet sich noch eine weitere Möglichkeit zur sterischen Einflussnahme auf die Markierungsausbeuten, der sogenannte *ortho*-Effekt. Betrachtet man die normale nukleophile aromatische Substitution mechanistisch, so begünstigen sowohl *para*- als auch *ortho*-Substituenten mit elektronenziehender Wirkung im Gegensatz zu *meta*-Substituenten die Reaktion. Dies ist auf eine Stabilisierung der negativen Ladung des intermediär entstehenden Meisenheimer-Komplexes zurückzuführen. Überträgt man diese Annahmen auf symmetrische Diaryliodoniumsalze, welche sich nur in der Stellung der Substituenten der beiden Aromaten unterscheiden (*ortho* oder *para*), so wäre eine identische Substitution beider Aromaten zu erwarten. Jedoch ergaben Untersuchungen von Gail *et al.*, dass mit steigender Anzahl von Methylgruppen an einem der beiden Aromaten trotz steigender Elektronendichte an selbigem eine stärkere Substitution verglichen mit dem unsubstituierten Aromaten zu beobachten ist^[24]. Des Weiteren wird gezeigt, dass mit steigender Anzahl an *ortho*-Substituenten auch eine stärkere Markierung einhergeht, während *meta* und *para* substituierte keinerlei Unterschiede aufweisen.

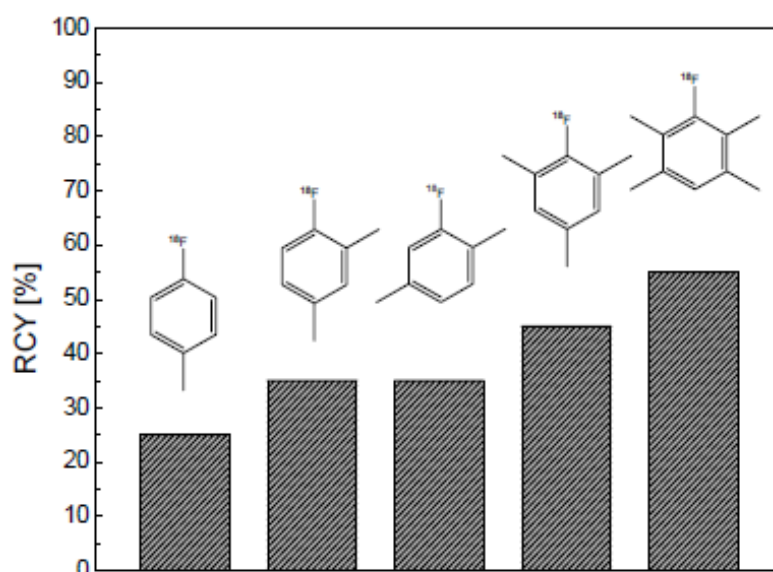


Abbildung 9: Mit steigender Anzahl an Methylsubstituenten verbundene höhere radiochemische Ausbeute des substituierten Aromaten^[24]

Dieser Widerspruch zu den Regeln der S_NAr ist auf den oben bereits genannten *ortho*-Effekt zurückzuführen. Hierbei wird durch Einführung eines Substituenten

(z.B. Methylgruppe) in *ortho*-Position an einem der beiden Aromaten die Markierung deselbigen begünstigt. Zurückzuführen ist dies auf den von Yamada *et al.* 1972 postulierten trigonal bipyramidalen Übergangszustand, in welchem der *ortho*-substituierte Ring in die Ebene gedrückt wird und dadurch in *syn*-Position zum Nukleophil (hier Fluorid) steht und somit dessen Angriff erleichtert^[25].

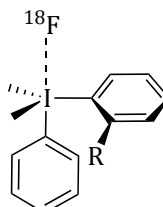


Abbildung 10: Intermediärer Komplex zwischen Iodoniumsalz und Fluorid während des nukleophilen Angriffs^[25]

¹⁸F-Fluorierung mittels prosthetischer Gruppe

Sind direkte elektrophile oder nukleophile Direktsubstitutionen z.B. aufgrund von Basenlabilität des Markierungsvorläufers nicht einsetzbar, so bietet sich die Möglichkeit der Verwendung einer prosthetischen Gruppe zur ¹⁸F-Fluorierung an. Dabei handelt es sich um eine indirekte Art der Markierung, wobei zunächst ein kleines, gut zu fluorierendes Molekül mit n.c.a. [¹⁸F]F⁻ markiert wird und anschließend in einem zweiten Schritt mit dem Markierungsvorläufer gekoppelt wird. Der Vorteil dieser Verfahrensweise ist, dass für den zweiten Schritt die limitierenden Reaktionsbedingungen der oben genannten ¹⁸F-Fluorierungsmethoden entfallen. Das primäre Markierungsvorläufermolekül sollte hierfür geeignete gute Abgangsgruppen, wie z.B. Brom, Iod, Tosylate oder Triflate tragen, wodurch eine hohe radiochemische Ausbeute bei der Fluorierung gewährleistet wird. Ein populäres Beispiel hierfür stellt das bei der ¹⁸F-Fluorethylierung verwendete 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat (2-[¹⁸F]FETos) dar, das ausgehend vom Ethylenditosylat nach folgendem Reaktionsschema entsteht und anschließend zur Markierung von Molekülen, welche funktionelle Gruppen wie z.B. Alkohole, Thiole oder Amine tragen, verwendet wird.

Einleitung

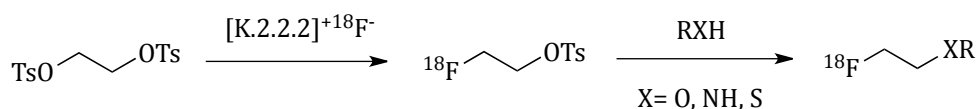


Abbildung 11: Herstellung und Verwendung von 2-[¹⁸F]FETos

Neben dem 2-[¹⁸F]FETos bestehen noch weitere Möglichkeiten wie z.B. die ¹⁸F-Fluoramidierung^[26], ¹⁸F-Fluoracylierung^[27]. Aber auch die sog. Click-Reaktionen sind in den letzten Jahren immer mehr zur Markierung relevanter Moleküle mittels prosthetischer Gruppen in den Vordergrund gerückt. Sie zeichnen sich durch sehr gute Effizienz, hohe Selektivität und große Vielseitigkeit aus^[28]. Hierbei werden mit [¹⁸F]Fluor markierte Azide oder Alkine verwendet, die sich in einer Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolaren Huisgen Cycloaddition terminaler Azide oder Alkine mit ihren entsprechenden Reaktionspartnern umsetzen lassen^[29]. Ein schönes Beispiel hierfür zeigt die Umsetzung eines ¹⁸F-Fluoralkins mit einer azid-substituierten Folsäure (Abbildung 12).

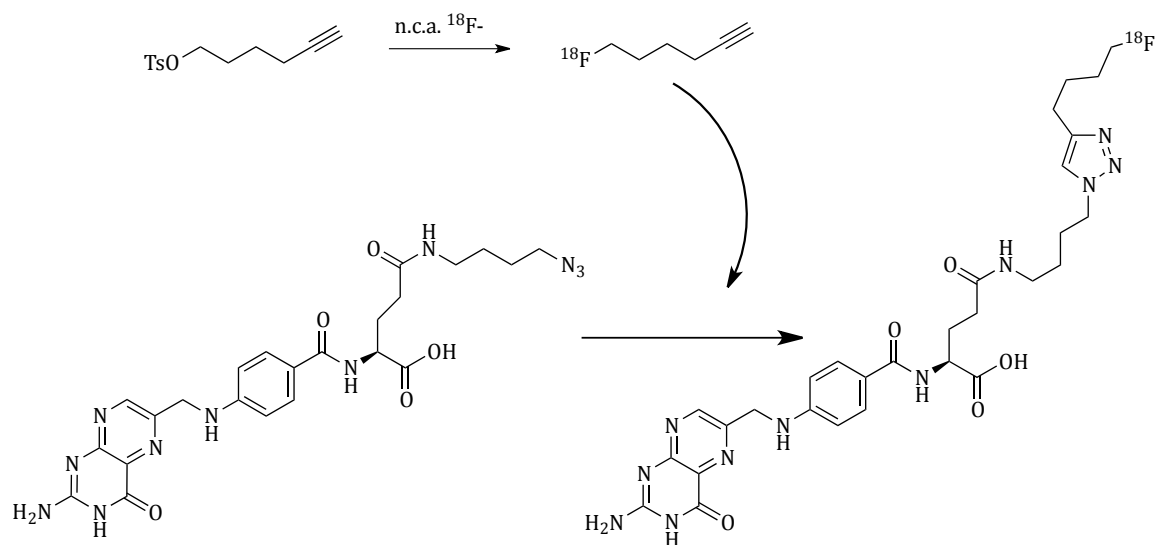


Abbildung 12: ¹⁸F-Markierung eines Folsäurederivates mittels Click-Reaktion^[30]

Obwohl in den letzten Jahren etliche solcher Clickreaktionen zur Darstellung diverser Radiotracer verwendet wurden, wird bis heute mit der Ausnahme von ¹⁸F-RGD-K5 keine dieser Verbindungen in der klinischen Routine angewandt. Das Problem ist die Verwendung von toxischem Kupfer als Katalysator zur Cycloaddition

während der Synthese. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren verstärkt an kupferfreien Click-Markierungs-Ansätzen, wie zum Beispiel der prosthetischen Gruppe [^{18}F]Dibenzylcyclooctin ([^{18}F]DBCO) geforscht^[31].

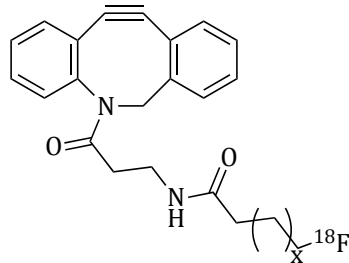


Abbildung 13: [^{18}F]DBCO zur kupferfreien Click-Reaktion

Mehrstufige Radiosynthesen

Da manche Radioliganden aufgrund ihrer chemischen Strukturen nicht immer nur durch einen Reaktionsschritt, wie in den vorhergezeigten Beispielen, synthetisiert werden können, müssen nach der Einführung von $^{18}\text{F}^-$ über eine n.c.a. nukleophile Substitution weitere Reaktionsschritte durchgeführt werden, um das gewünschte Produkt zu erhalten. Vor allem bei der Markierung nicht aktivierter elektronenarmer Aromaten wurden neben der Verwendung von Diaryliodoniumsalzen weitere Methoden entwickelt, wobei nach der erfolgten ^{18}F -Markierung des aktivierten Aromaten, die aktivierende Gruppe wieder entfernt wird. Bekannte Beispiele für diesen sekundären Schritt der Markierungsreaktion stellen die Rhodium-katalysierte Decarbonylierung^[32], die Bayer Villiger Oxidation^[33] oder auch Reduktionen von Carbonyl- oder Nitro-Gruppen^[34] dar.

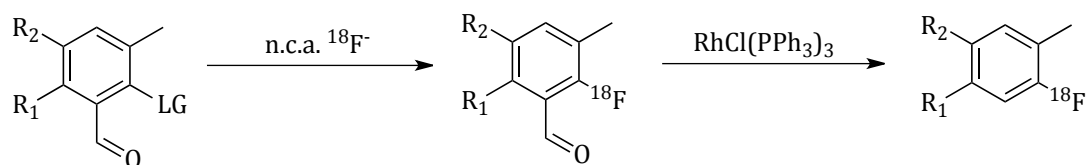


Abbildung 14: Beispiel für nukleophile ^{18}F -Markierung mit anschließender Rhodium katalysierter Decarbonylierung

1.5 Gallium-68 als Positronemitter

Wie in Abschnitt 1.2 bereits erwähnt, bieten sich neben den Zyklotron-produzierten β^+ -Emittern noch Nuklide an, welche über einen Radionuklidgenerator verfügbar sind. Prominentestes Beispiel hierfür in der PET ist das $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatorsystem, das seit über 50 Jahren bekannt ist und zunehmend breite Anwendung in der Nuklearmedizin findet. Der Generator enthält, auf einer Festphase fixiert, als langlebiges Mutternuklid Germanium-68 ($t_{1/2} = 270,95 \text{ d}$). Dieses wird hauptsächlich durch eine (p,2n)-Reaktion an ^{69}Ga -targets hergestellt^[35]. Die lange Halbwertszeit des Mutternuklids bietet den Vorteil, dass der Generator somit über einen längeren Zeitraum von etwa einem Jahr verwendet werden kann. Somit liegen Mutter- und Tochter-Nuklid in einem säkularen Gleichgewicht vor und das Germanium wandelt sich durch Elektroneneinfang in Gallium-68 mit einer Halbwertszeit von 67,71 min um. Dieses wird schließlich per β^+ -Zerfall in das stabile Zink-68 umgewandelt. Durch die chemische Diversität der beiden gelingt anschließend eine selektive Elution des Galliums.



Bei den Generatoren werden als stationäre Phase meist anorganische Verbindungen wie TiO_2 oder SnO_2 verwendet, auf welche das aufgereinigte ^{68}Ge aufgebracht wird und anschließend die trägerfreie Elution von ^{68}Ga , je nach Generatortyp, mit verdünnter Salzsäure variierender Konzentration erfolgt. Ein Problem dieser Eluierungen stellt der Durchbruch von geringen Anteilen (ca. 0,01 – 0,001 %) an ^{68}Ge dar, die mit ansteigender Anzahl an Elutionen immer mehr zunimmt. Auch Verunreinigungen wie inaktives $^{68}\text{Zn}^{2+}$, oder Ti^{4+} sind meist im Eluat enthalten und machen somit dessen Aufreinigung erforderlich. Hierfür haben sich besonders 2 Varianten etabliert:

- Anionen-Austauscher: Durch Elution mit stärker konzentrierter HCl erhält man $[\text{}^{68}\text{GaCl}_4]^-$, welches auf einem Anionenaustauscher selektiv fixiert und anschließend mit Wasser eluiert werden kann^[36].

- Kationen-Austauscher: Das Eluat wird über ein Kationenaustauscherharz gegeben, dort wird das $^{68}\text{Ga}^{3+}$ fixiert und nach einigen Waschschritten wieder selektiv mit wässrigen oder organischen Lösungen eluiert^{[14][37]}.

Durch diese einfachen Schritte des Post-Processings des Primäreluats gewährleistet man stets reproduzierbare spezifische Aktivitäten ohne erheblichen Zeitaufwand und somit auch eine verlässliche Produktion der gewünschten Gallium-68 Radiopharmaka.

1.5.1 Komplexchemie des Galliums

Gallium kann im Gegensatz zu ^{18}F oder ^{11}C keine kovalenten Bindungen zu organischen Molekülen eingehen und man benötigt daher geeignete Strukturen um es stabil zu komplexieren. Beruhend auf seiner hohen Ladungsdichte bei vergleichsweise kleinem Ionenradius (0,63 Å) fällt es in die Gruppe der harten Lewis-Säuren und bildet daher stabile Komplexe mit harten Lewis-Basen, wie z.B. Sauerstoff oder Stickstoff aus. Zur Komplexierung des Galliums werden in der Radiopharmazie sogenannte bifunktionelle Chelatoren verwendet, die zusätzlich zu den für die stabile Koordination des Galliums nötigen sechs Koordinationsstellen über weitere funktionelle Gruppen verfügen, um an einen Targetingvektor gekoppelt zu werden. Zusätzlich zu der direkten Bindung zwischen Chelator und Targetingvektor besteht die Möglichkeit einen Linker zwischen beiden einzubauen und somit sowohl den Abstand als auch in manchen Fällen die Pharmakokinetik zu variieren^[38].

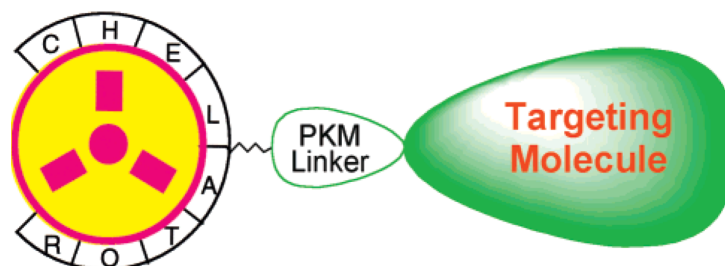


Abbildung 15: Schematischer Aufbau eines bifunktionellen Chelators gekoppelt mit Targetingvektor^[38]

Einleitung

Für die radiopharmazeutische Verwendung ist es von großer Wichtigkeit, dass die gebildeten Komplexe eine hohe thermodynamische und kinetische Stabilität aufweisen, wodurch eine Transchelatierung mit dem im Blut vorhandenen Glykoprotein Transferrin, das eine hohe Affinität zu Ga^{3+} besitzt, verhindert wird. Häufigste Anwendung finden die makrozyklischen bifunktionellen Chelatoren DOTA, NOTA und NODAGA (Abbildung 16). Vergleicht man die Triazachelatoren mit dem DOTA so bieten sie durch ihren Hohlraum die ideale Größe zur Koordination des Ga(III)-Kations, was sich in ihrer höheren Stabilitätskonstante ($\text{Ga}[\text{NOTA}]$: $\log K = 30,98$ im Vergleich zu $\text{Ga}[\text{DOTA}]$: $\log K = 26,1$) widerspiegelt. Auch benötigen sie aufgrund ihrer guten Markierungseffizienz niedrigere Temperaturen zur Chelatisierung. Aber auch der zwölfzählige Ligand DOTA weist kinetisch extrem stabile Komplexe auf^{[39][40]}.

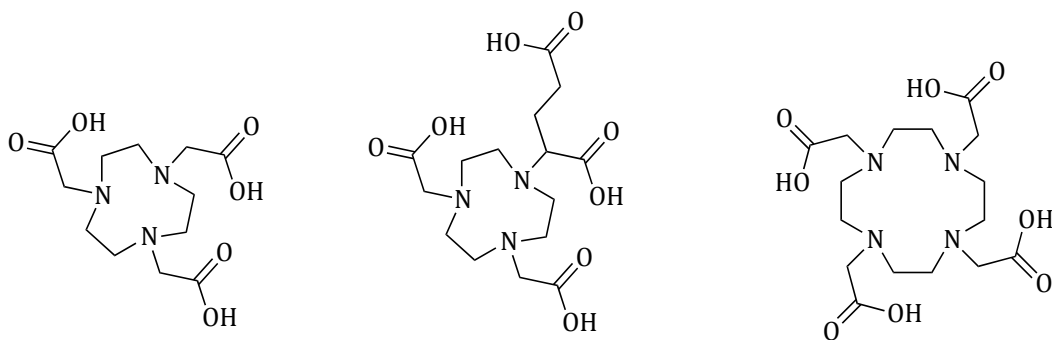


Abbildung 16: Strukturen von NOTA, NODAGA und DOTA

1.6 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus umgangssprachlich auch als die „Zucker-Krankheit“ bezeichnet, umschließt eine Gruppe verschiedener Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels, die durch erhöhte Blutzuckerwerte (Hyperglykämie) gekennzeichnet sind. Dies kann aus einer defekten Insulin-Sekretion, fehlender Insulinwirkung oder einer Kombination aus beidem resultieren. Eine chronische Hyperglykämie kann zu Langzeitschäden und Dysfunktionen verschiedener Organe, wie den Nieren, Augen, des Herzens oder auch der Blutgefäße führen. Ursache für das Auftreten von Diabetes können verschiedene pathogene Prozesse sein. Diese reichen von der autoimmunen Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen im Pankreas bis zu verschiedenen Faktoren welche zur Insulinresistenz führen (Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2006). Weltweit leiden mittlerweile rund fünf Prozent der Bevölkerung, also rund 370 Millionen Menschen an Diabetes, wobei bis zum Jahr 2030 ein Anstieg der Erkrankten auf bis zu über einer halben Milliarde Menschen prognostiziert wird^[42].

1.6.1 Klassifikation des Diabetes mellitus

Diabetes lässt sich in vier Hauptgruppen einteilen, welche im Folgenden aufgelistet werden:

Typ-1-Diabetes mellitus

Der Typ1-Diabetes beruht auf einem absoluten Insulinmangel infolge einer autoimmunen Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas. Bis zu 10 % aller Diabetespatienten leiden daran, wobei die Hauptzahl der Neuerkrankungen bei Kindern und Jugendlichen zwischen 11 und 14 Jahren zu beobachten ist. Aber auch im höheren Alter kann sich dieser Typ der Diabetes-Erkrankung als sogenannter „latent immune diabetes in adults“ (LADA) manifestieren^{[43][44]}. Beim ersten Auftreten klinischer Symptome sind hier schon 80 % aller β -Zellen zerstört, wohingegen die autoimmune β -Zell-Zerstörung schon Jahre vorher beginnt. Diese Phase zwischen beginnender Zellzerstörung und klinischer Manifestation wird als sog. Prädiabetes bezeichnet^[45].

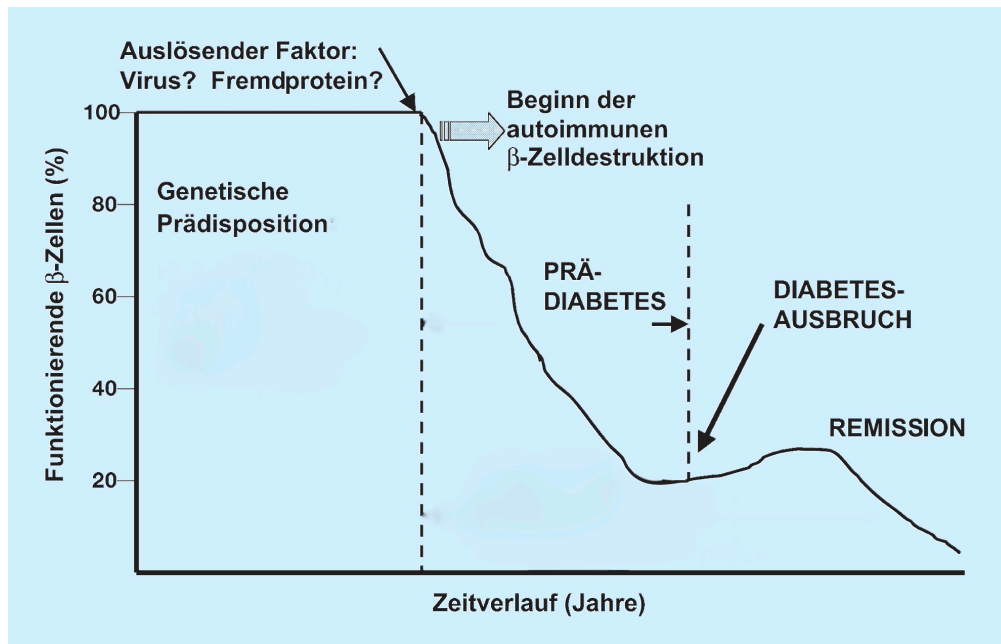


Abbildung 17: Natürlicher Verlauf des Typ-1-Diabetes^[45]

Typ-2-Diabetes mellitus

Etwa 90 % aller Diabetiker leiden an Typ-2-Diabetes, welcher durch Insulinresistenz, sprich einem verminderten Ansprechen der Zellen auf Insulin und einem relativen Insulinmangel gekennzeichnet ist^[43]. Er manifestiert sich meist im höheren Lebensalter (ab ca. 40 Lebensjahren), tritt aber zunehmend auch in jüngeren Lebensjahren auf. Auslösende Faktoren sind hier eine Wechselwirkung zwischen genetischer Veranlagung und umweltbedingten Faktoren wie z.B. fettreicher Ernährung, Bewegungsmangel und damit im Zusammenhang stehendem Übergewicht^[44].

Andere spezifische Diabetestypen (Typ3)

Unter dieser Bezeichnung vereint man Formen des Diabetes, die weder Typ 1 noch Typ 2 zugeordnet werden können. Er umschließt Diabetes-Erkrankungen die durch Erkrankungen des exokrinen Pankreas, genetische Defekte der β -Zellen, genetische Defekte der Insulinsekretion und Insulinwirkung, Chemikalien oder Medikamente, Endokrinopathie oder auch Infektionen ausgelöst werden.

Gestationsdiabetes

Als Gestationsdiabetes bezeichnet man eine erstmals während der Schwangerschaft auftretende Glukosetoleranzstörung, welche die Erstmanifestation von Typ 1, Typ 2 oder anderer Diabetestypen mit einschließt.

Gemeinsames Merkmal aller vier Hauptgruppen von Diabetes ist die chronische Erhöhung des Blutzuckers bzw. des Glukoselevels im Blut, was mit einem Risiko für schwere Begleit- und Folgeerkrankungen verbunden ist.

1.6.2 Bildgebung von β -Zellen

Sowohl bei Typ-1-Diabetes als auch beim Typ-2-Diabetes ist neben der Verschlechterung der Betazellfunktion auch eine signifikante Abnahme der Betazellmasse zu beobachten (zwischen 30-50 % beim Typ-2-, etwa 99 % beim Typ-1-Diabetes^{[46][47]}), wie diverse systematische Analysen von Pankreaspräparaten belegen. Derzeit ist eine Quantifizierung der Betazellmasse beim Menschen nur durch indirekte klinische Parameter möglich, wie z. B. der Insulinsekretion nach intravenöser Gabe von Glukose, dem Proinsulin-Insulin-Verhältnis oder auch dem HOMA-Beta-Index möglich. Da die Menge der noch vorhandenen insulinherstellenden Betazellen wichtige Rückschlüsse auf das Stadium und den Verlauf einer Diabeteserkrankung erlauben würde, besteht die Notwendigkeit der Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung beziehungsweise bildlichen Darstellung der β -Zell-Masse *in vivo*.

Auch bei Typ-1-Diabetes stellt die Betazell-„Restmasse“ zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einen wichtigen Entscheidungsparameter dar, da sich der Erfolg immunomodulatorischer Strategien daran orientieren sollte. Des Weiteren könnte die Visualisierung transplantierte Langerhans-Inseln zur Beurteilung des Transplantatüberlebens, der endogenen Funktion der transplantierten β -Zellen und der rekurrenten Autoimmunität herangezogen werden^[48]. Man könnte mit solch einer nicht invasiven *in vivo* Darstellung der β -Zellen der Bauchspeicheldrüse nicht nur pathophysiologische Vorgänge bei Diabetes aufklären, sondern sie auch zur Beurteilung neuer therapeutischer Ansätze wie etwa Zellersatztherapien oder auch zur Entwicklung neuer Medikamente heranziehen.

Als Konsequenz wurde in den letzten Jahren vermehrt an verschiedenen Methoden der *in vivo* Bildgebung der β -Zell-Masse geforscht. Allerdings sind hier einige Herausforderungen zu lösen, so besitzen die Langerhans-Inseln einen extrem kleinen Durchmesser (ca. 150 μm) und auch die β -Zell-Dichte ist ein nicht zu unterschätzendes Problem, da endogene β -Zellen selbst in gesundem pankreatischem Gewebe nur einen sehr geringen Anteil von 2-3 % der gesamten Zellen ausmachen. Neben den limitierenden Faktoren der Größe und der Anzahl, muss noch die anatomische Anordnung des Pankreas beachtet werden, da dieser sowohl vom Gastrointestinaltrakt als auch von der Leber umgeben ist^{[49][50][51]}.

In den letzten Jahren wurde verstärkt an der Entwicklung verschiedener PET-Tracer zur Quantifizierung der β -Zell-Masse gearbeitet, wovon im Folgenden einige Ansätze erläutert werden.

Ein mögliches Target stellt der Sulfonylharnstoffrezeptor 1 (SUR1), welcher auf den β -Zellen exprimiert wird, dar. Es wurden verschiedene auf insulinotropen Antidiabetika basierende SUR1-affine ^{11}C - und ^{18}F -markierte Tracer vorgestellt. So wurde von Schmitz *et al.* ein ^{18}F -markiertes Glibenclamid-Derivat synthetisiert, wobei die Toleranz des SUR1 gegenüber strukturellen Veränderungen am Phenolring des Glibenclamids untersucht wurde. Sie zeigten, dass sowohl direkte Fluorierung des Phenolringes durch einen Halogenaustausch, als auch Modifizierungen an der Hydroxygruppe toleriert werden und markierten das Molekül mittels der prosthetischen Gruppe 2- ^{18}F Fluorethyltosylat^[52]. Ebenso wurden von Wängler *et al.* verschiedene mit ^{11}C und ^{18}F markierte Repaglinid-Derivate synthetisiert, die zwar keine Sulfonylharnstoffgruppe mehr tragen, aber dennoch eine hohe Affinität zum SUR1 besitzen^[53,54]. Der Vorteil dieser Moleküle lag, trotz verminderter SUR1-Affinität im Vergleich mit den Glibenclamid-Derivaten darin, dass sie ein besseres SUR1/SUR2- Verhältnis aufwiesen. Nachteil beider Stoffklassen war jedoch, dass sie u.a. aufgrund der hohen Lipophilie eine zu starke Aufnahme in die Leber aufwiesen und somit nicht für die Bildgebung der β -Zellen geeignet waren^[55].

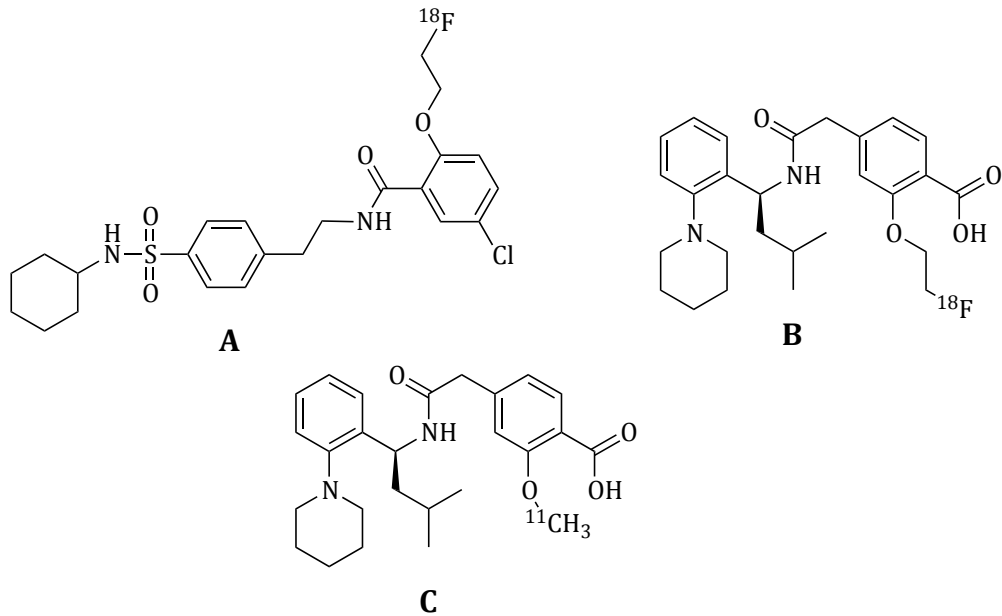


Abbildung 18: A: 2-[¹⁸F]Fluorethoxyglyburid^[52], B: [¹⁸F]Repaglinid^[53], C: [¹¹C]Methoxy-Repaglinid^[54]

Ein weiteres interessantes Target stellt der Vesikuläre Monoamin Transporter 2 (VMAT2) dar für den in den letzten Jahren einige ¹⁸F-markierte Liganden, wie z.B. das in Abbildung 19 dargestellte 9-[¹⁸F]Fluorpropyl-(+)-Dihydrotrabenazin (¹⁸F-FP-(+)-DTBZ) entwickelt wurden^[56]. Allerdings hat dieser Rezeptor den Nachteil, dass er nicht speziell an β -Zellen exprimiert wird und auch in anderen neuroendokrinen Zell-Typen detektiert werden kann^{[57][58]}.

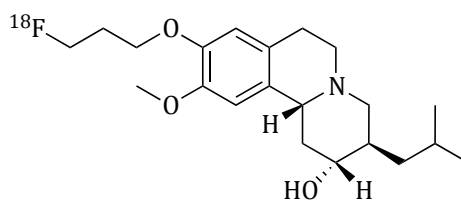


Abbildung 19: 9-[¹⁸F]Fluorpropyl-(+)-Dihydrotrabenazin^[56]

Auch wurden sowohl SPECT als auch PET-Tracer für den Glucagon-Like Peptid 1 Rezeptor (GLP-1R) entwickelt, deren Struktur auf dem Peptid Exendin-3, welches einen stabilen Agonisten des Rezeptors darstellt, beruht und mittels geeigneter Chelatoren die Markierung durch ¹¹¹In und ⁶⁸Ga ermöglichen^{[59][60]}.

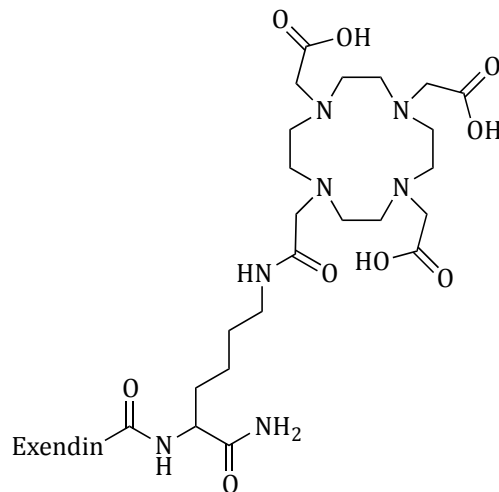


Abbildung 20: Struktur von [Lys⁴⁰(DOTA)]exendin-3^[61]

Neben solchen Rezeptormolekülen wurden viele weitere radioaktiv markierte Antikörper als PET-Tracer entwickelt. So benutzen *Moore et al.* einen ¹¹¹Indium-markierten Antikörper, der gegen das β -Zell-spezifische Oberflächenantigen (IC2) gerichtet war, zur Detektion der β -Zell-Masse in Mäusen^[62]. Antikörper stellen eine interessante Möglichkeit dar, da man neben der Möglichkeit zur Quantifizierung der β -Zell-Masse, durch Targeting von spezifischen Transkriptionsfaktoren oder anderen zytoplasmatischen bzw. nuklearen Proteinen ein besseres Verständnis über den Metabolismus der β -Zellen erreichen könnte. Obwohl neben den oben genannten Beispielen auch viele andere Stoffklassen wie L-DOPA, Tolbutamide, FDG oder auch insel-spezifische GAD oder K14D10 Antikörper als mögliche Tracer getestet wurden, konnte keiner alle im Folgenden aufgezählte erwünschten Kriterien erfüllen^[50]:

- Hohe Sensitivität und Affinität für spezifische Strukturen der β -Zellen
- Keine toxischen Effekte
- Effektive Markierung eines hohen Anteils aller vorhandenen β -Zellen^[58]

Es besteht also weiterhin großer Forschungsbedarf, um einen (Radio)tracer zu entwickeln, der die Quantifizierung von β -Zellen *in vivo* ermöglicht.

1.6.3 Der FFAR 1 als Target zur β -Zell Bildgebung mittels PET

Der Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1), vormals auch als GPCR40 (G-protein coupled receptor 40) bezeichnet, ist Mitglied einer Subfamilie von homologen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu welcher auch der GPR41 und GPR43 gehören^[63]. Er gehört zu einer Klasse von Rezeptoren für sowohl gesättigte als auch ungesättigte mittel(C6-C12)- bis langkettige(C14-C24) freie Fettsäuren. ^{[64][65] [66]} Der Mechanismus zwischen Aktivierung des FFAR 1 und der Glukose induzierten Insulinsekretion ist zum heutigen Zeitpunkt nur teilweise geklärt. Der Rezeptor ist mit der G-Protein-Untereinheit $G\alpha_{q/11}$ gekoppelt und durch Aktivierung wird mittels eines GTP-GDP-Austausches an der α -Untereinheit des $G\alpha_{q/11}$ -Heterotrimer diese mobilisiert. Infolgedessen wird das Enzym Phospholipase C (PLC) aktiviert, das wiederum Phospholipid Phosphatidylinositol Bisphosphonat (PIP_2) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP3) hydrolysiert. IP3 führt dann zu einer Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum^{[67][68]}. In früheren Studien wurde angenommen, dass DAG das Enzym Proteinkinase C (PKC) aktiviere, welche durch Phosphorylierung spezifischer Proteine zur Initiation exozytotischer Prozesse beiträgt. Neuere Forschungsergebnisse jedoch geben Grund zur Annahme, dass exogenes DAG zu einer Aktivierung der Proteinkinase D1 (PKD1) führt, welche die Phosphorylierung bisher noch unbekannter Targets bewirkt. Es wird vermutet, dass diese ins filamentöse F-Aktin-Remodelling eingebunden sind, welches eine zentrale Rolle in der 2. Phase der Glukose induzierten Insulinfreisetzung durch die β -Zellen im Pankreas einnimmt. Neben diesen Effekten wird davon ausgegangen, dass die fettsäure-basierte Aktivierung des FFAR1 auch zu einer Verstärkung des Einflusses von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen führt und es somit zu einer Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels kommt, wodurch die Exozytose von Insulin durch Fusion der Insulingranula mit der β -Zell-Plasma-Membran vorangetrieben wird^{[69][70]}.

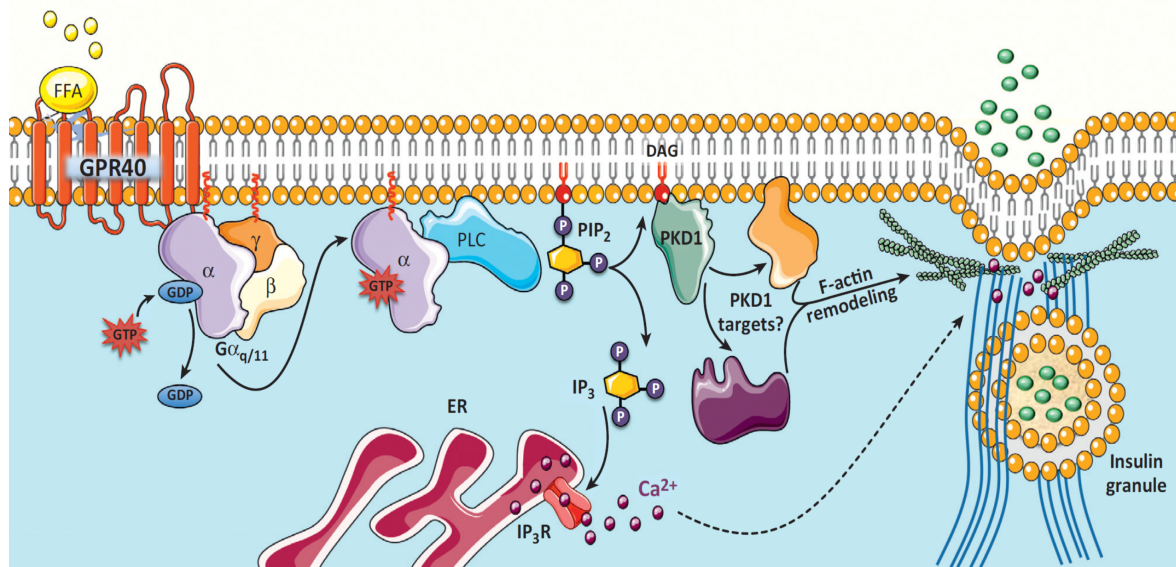


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Glukose induzierten Insulinfreisetzung [70]

Aufgrund dieser oben gezeigten entscheidenden Rolle des FFAR 1 in der Insulinfreisetzung werden FFAR1-Agonisten zurzeit in der Forschung als hochinteressante Substanzen für die Behandlung des Typ-2 Diabetes diskutiert. Neben dieser zentralen Rolle, die der FFAR1 im Insulinstoffwechsel aufweist, wurde zudem eine starke Expression auf den pankreatischen β -Zellen und im Gehirn, mit höchster Expressionsrate in der Substantia Nigra und der Medulla Oblongata, aber nur ein äußerst limitiertes Vorkommen im restlichen Körper nachgewiesen^[63].

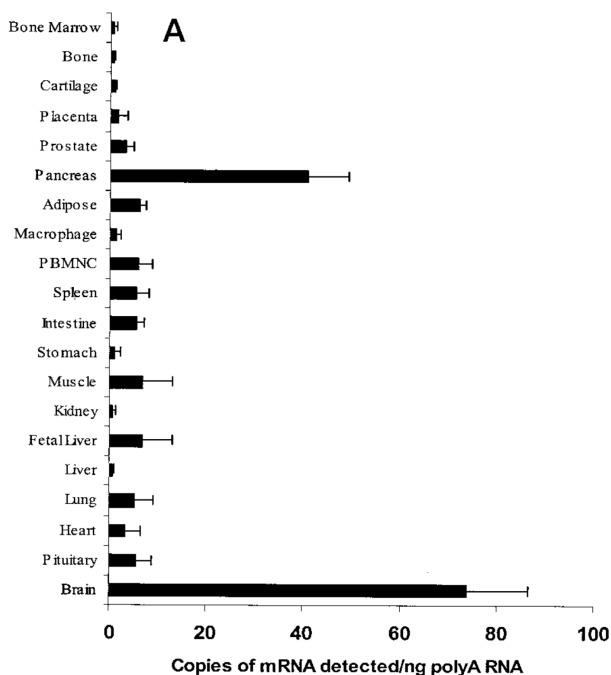


Abbildung 22: Expression des FFAR 1 in humanem Gewebe^[63]

Aus diesen Gründen stellt der FFAR1 ein vielversprechendes Target für die Visualisierung von β -Zellen mittels molekularer Bildgebungsmethoden wie der Positronen-Emissions-Tomographie dar. In den letzten Jahren sind immer mehr nicht-fettsäurebasierende Liganden, sowohl Agonisten als auch Antagonisten, für den FFAR1 identifiziert worden. Einige dieser vorgestellten Agonisten weisen attraktive EC_{50} -Werte im unteren nanomolaren Bereich auf und bieten zudem Möglichkeiten zur radioaktiven Markierung mittels Fluor-18. Als vielversprechendes Molekül hat sich hierbei ein von Sasaki *et al.* publizierter Agonist herauskristallisiert, welcher zusätzlich zu seiner hohen Affinität im nanomolaren Bereich ($EC_{50} = 5,7$ nM) auch ein Fluor im Molekül beinhaltet und eine authentische radioaktive Markierung mittels Fluor-18 erlaubt, so dass keinerlei Veränderungen seiner Biochemie zu erwarten wären^[1].

2. Problemstellung und Zielsetzung

Der Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) stellt einen zur Subfamilie von homologen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehörenden durch gesättigte als auch ungesättigte mittel(C6-C12)- bis langkettige(C14-C24) freie Fettsäuren aktivierten Rezeptor dar.^{[64][65] [66]}. Seine Aktivierung führt zur Stimulierung verschiedener in 1.6.3 genauer beschriebener Signalwege und schlussendlich zu einer Verstärkung der Glukose induzierten Insulinsekretion^{[69][70]}. Da der Rezeptor neben dieser Rolle in der Insulinsekretion eine hohe Expression auf den β -Zellen des Pankreas und nahezu keine Expression im restlichen Körper aufweist, stellt er ein hoch interessantes Target zur Visualisierung der β -Zellen durch molekulare Bildgebungs-Methoden wie der Positronen-Emissions-Tomographie dar^[63].

Durch Bildgebung der β -Zell-Masse mittels PET würde sich die bisher noch nicht vorhandene Möglichkeit der *in vivo* Aufklärung des β -Zell-Status ergeben, was sowohl in therapeutischer als auch diagnostischer Hinsicht eine große Hilfe in der Diabetes-Forschung wäre. In den letzten Jahren wurden an diversen Targets und den entsprechenden Radiotracer geforscht. So wurden unter anderem der SUR 1, der VMAT2 oder auch der GLP-1R auf ihre Eignung zur Bildgebung hin untersucht. Jedoch steht zum jetzigen Zeitpunkt noch kein Tracer zur klinischen Anwendung zur Verfügung.

Aufgrund der Rolle des FFAR1 in der Glukose induzierten Insulinsekretion wurde in den letzten Jahren verstärkt an Agonisten des Rezeptors zur Behandlung von Typ-2 Diabetes geforscht und hier einige Liganden mit extrem attraktiven EC_{50} -Werten im unteren nanomolaren Bereich identifiziert, die zudem die Möglichkeit zur radioaktiven Markierung mittels Fluor-18 bieten. Abbildung 23 zeigt den von Sasaki *et al.* synthetisierten Agonisten mit einem EC_{50} -Wert = 5,7 nM und den von Mikami *et al.* publizierten Agonisten mit einem EC_{50} -Wert = 29,5 nM.

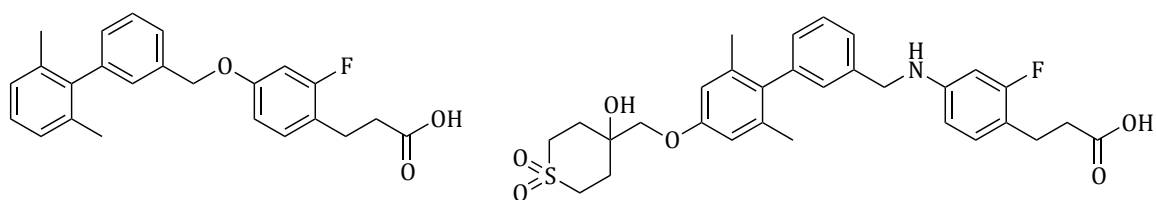


Abbildung 23: FFAR1 Liganden (Agonisten) nach Sasaki et al. (links, EC_{50} :5,7 nM)^[1] und Mikami et al. (rechts, EC_{50} :29,5 nM)^[71]

Aufbauend auf diesen zwei Agonisten sollten in der vorliegenden Arbeit drei kalte Referenzsubstanzen synthetisiert werden. In einer 7-stufigen Synthese sollte der Sasaki-Ligand hergestellt und zwei weitere Fluor beinhaltende Derivate an das Mikami-Molekül angelehnte Verbindungen dargestellt werden. Dieses bietet an der Biphenyl-4'-Position die Möglichkeit zur Funktionalisierung und sollte einerseits mit einer Fluorethyl- und andererseits mit einer Fluor tragenden Triethylenglykol-Einheit versehen werden. Weiterhin sollte anstatt der Amin-Brücke zwischen Biphenyl und Propionsäure-Einheit bei beiden Molekülen eine Ether-Brücke eingeführt werden (s. Abbildung 24).

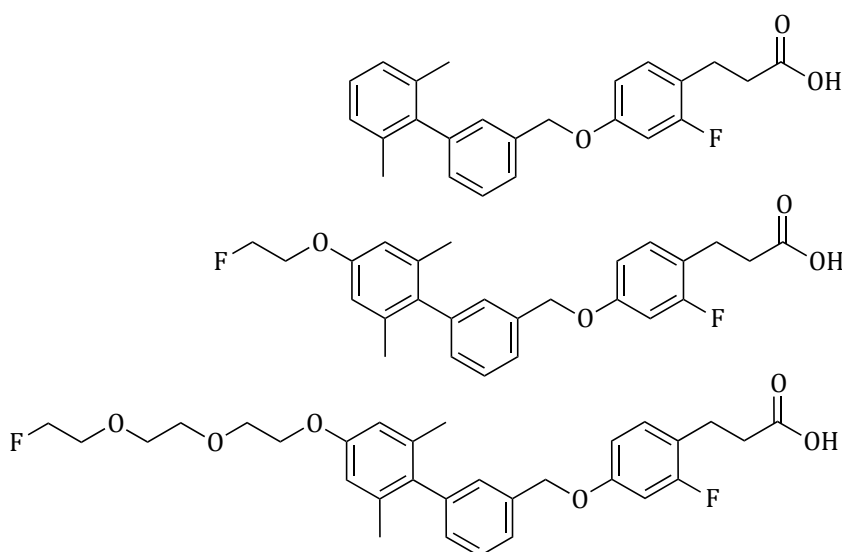


Abbildung 24: Geplante fluorierte Referenzverbindungen

An diese drei Strukturen angelehnt sollten die zur Markierung mit Fluor-18 geeigneten Markierungsvorläufer synthetisiert werden. Für das Sasaki-Molekül wurde hier ein Diaryliodoniumsalz gewählt während das radioaktive Fluorethylderivat sowohl mittels eines Vorläufers zur Einführung des Fluor-18

durch die prosthetische Gruppe [^{18}F]FETos als auch durch Direkt-Markierung dargestellt werden sollte. Somit war geplant einerseits den Markierungsvorläufer mit freier phenolischer Hydroxy-Funktion an der Biphenyl-4'-Position darzustellen und für die direkte Markierung einen Vorläufer zu synthetisieren, welcher bereits die Ethylen-Einheit, mit einer geeigneten Abgangsgruppe versehen, tragen sollte. Die Markierung des Triethylenglykol-funktionalisierten Moleküls sollte ebenfalls direkt durch Substitution einer Tosylgruppe erfolgen.

Die anschließenden Radiomarkierungen sollten auf ihre Reaktionsparameter hin optimiert und im Anschluss an die Radiosynthesen geeignete Verfahren für Folgereaktionen wie die Entschützung der Propionsäurekomponente entwickelt werden. Abschließend sollten Methoden zur Abtrennung des Radioliganden in hoher radiochemischer Reinheit und zur injektionsfertigen Formulierung in physiologischer NaCl-Lösung gefunden werden.

Neben den mit Fluor-18 markierten Verbindungen sollte noch ein zur Markierung mit Gallium-68 geeigneter Chelator an die Zielstruktur gekoppelt werden, diese Verbindung anschließend radiomarkiert und die Stabilitäten des fertigen Radiotracers in humanem Serum und physiologischer NaCl-Lösung untersucht werden.

Zusätzlich sollte zur Bildgebung von FFAR1-tragenden Zellen ein geeigneter Fluoreszenzfarbstoff an den Liganden gekoppelt werden. Hiermit könnte z.B. analog der von Fottner und Mettner *et al.* beschriebenen *in vivo* Bildgebung pankreatischer Inselzellen mittels eines miniaturisierten Laser-Scanning Fluoreszenz Mikroskops die Visualisierung der β -Zellen *in vivo* bzw. *in vitro* ermöglicht werden^[72].

Anschließend sollten verschiedene Zelllinien mittels eines FACS-Assay auf das Vorhanden-sein an FFAR1 auf ihrer Oberfläche untersucht werden. Mit den kalten Referenzverbindungen sollten zunächst Vitalitätsstudien an frisch isolierten Langerhans'schen Inseln durchgeführt werden. Des Weiteren war geplant mit dem synthetisierten Fluoreszenzfarbstoff erste *in vitro* Aufnahmen von sowohl Langerhans'schen Inseln als auch den als FFAR1-tragenden identifizierten Zelllinien mittels eines Laser-Scanning Fluoreszenz Mikroskops zu erstellen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Organische Synthesen

3.1.1 Synthese der inaktiven Referenzverbindungen

Zunächst sollten die drei inaktiven Referenzverbindungen (siehe Abbildung 25) synthetisiert werden, welche sich in der Funktionalisierung an der Biphenyl-4'-Position unterscheiden. Hierfür wurde die von Sasaki *et al.* beschriebene 3-(4-((2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorophenyl)propionsäure (**DZ 1**) nach der in der Literatur angegebenen Synthesevorschrift hergestellt, während das Fluorethyl- und das Fluor-triethylenglykol-Derivat (**DZ 2** und **DZ 3**) zunächst auf der von Mikami *et al.* beschriebenen Syntheseroute beruhen und anschließend unterschiedlich funktionalisiert wurden^{[1][71]}.

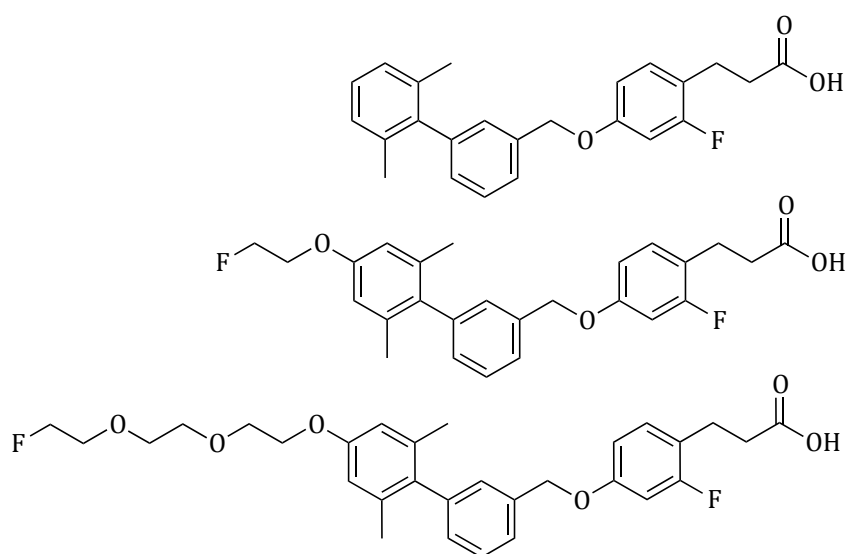


Abbildung 25: Geplante Referenzverbindungen (DZ 1,2 und 3 von oben nach unten)

Zu diesem Zweck musste zunächst in einer dreistufigen Synthese das Methyl 3-(2-fluoro-4-hydroxyphenyl)propanoat **3** ausgehend vom kommerziell erwerblichen 2-Fluoro-4-methoxybenzaldehyd hergestellt werden. Hierfür wurde das Aldehyd, abweichend von der Literaturvorschrift, anstatt mit Ethyl- mit Methyl-

diethylphosphonoacetat und Natriumhydrid mittels einer Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion umgesetzt und man erhielt das gewünschte Olefin **1** mit einer Ausbeute von 88 %. Anschließende Platin-katalysierte Hydrierung der Doppelbindung ergab das entsprechende 4-Methoxyphenylpropanat **2** in befriedigenden Ausbeuten von 78 %. Die abschließende Entschützung des Phenols erfolgte durch Abspalten des Methylethers mittels der Lewissäure Aluminium(III)-chlorid in Gegenwart von Oktanthiol mit Ausbeuten von 94 %. Dies entspricht einer Steigerung der Literaturausbeuten um 11 %, wobei man hier beachten muss, dass das in der Literatur erhaltene Produkt in flüssiger Form vorlag und wahrscheinlich noch Lösungsmittelreste zu einer erhöhten verfälschten Masse an Produkt führten.

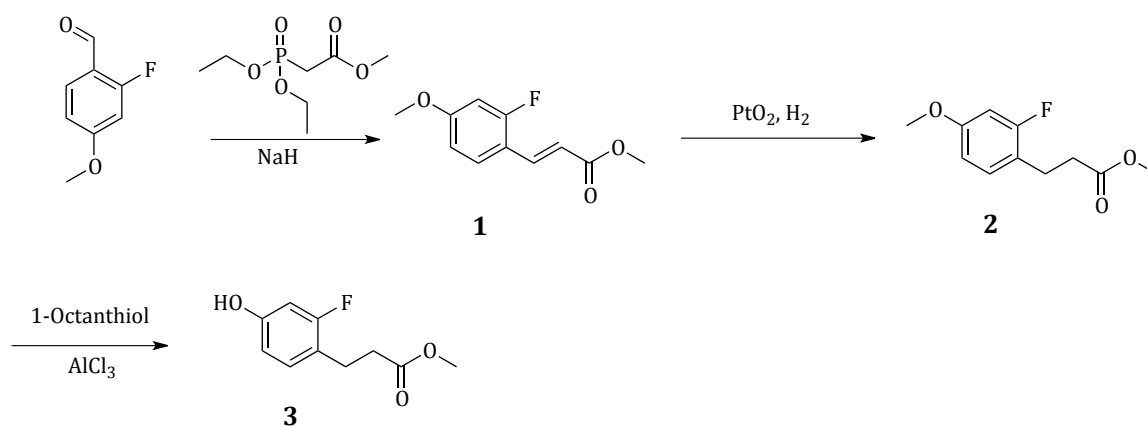


Abbildung 26: Synthese von Methyl 3-(2-fluoro-4-hydroxyphenyl)propanoat 3

Für die Darstellung von **DZ 1** wurde anschließend in einer zweistufigen Synthese die Biphenylkomponente **5** ausgehend vom 3-Brom-benzaldehyd hergestellt. Zur Darstellung des Biphenyls **4** wurde die Palladium-katalysierte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung zur C-C-Knüpfung zwischen dem Aldehyd und (2,6-Dimethyl)borsäure angewandt, wobei eine maximale Reaktionsausbeute von 91 % erzielt werden konnte. Anschließende Reduktion der Aldehydgruppe am Biphenyl zum entsprechenden Alkohol erfolgte mittels Einsatz von Natriumborhydrid in THF bei 0 °C und es wurde die gewünschte Verbindung **5** mit einer 56%igen Ausbeute erhalten.

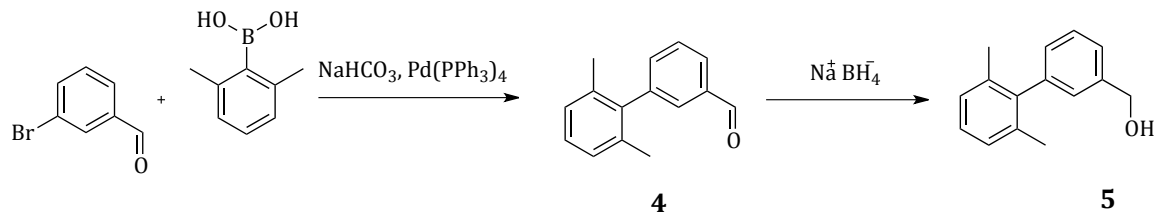


Abbildung 27: Suzuki-Kupplung und anschließende Reduktion

Anschließend erfolgte die Kopplung der Verbindungen **3** und **5** mittels einer Mitsunobu-Reaktion.

Im Folgenden wird der Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion kurz erläutert, da diese in den in dieser Arbeit vorgestellten Synthesen eine breite Anwendung gefunden hat. Sie dient zur Synthese von Estern, Phenylethern, Thioethern und weiteren Verbindungen aus primären und sekundären Alkoholen. Als Ausgangsverbindungen werden zusätzlich zum Alkohol Triphenylphosphin, DEAD (Diethylazodicarboxylat) und die zu koppelnde Säure benötigt.

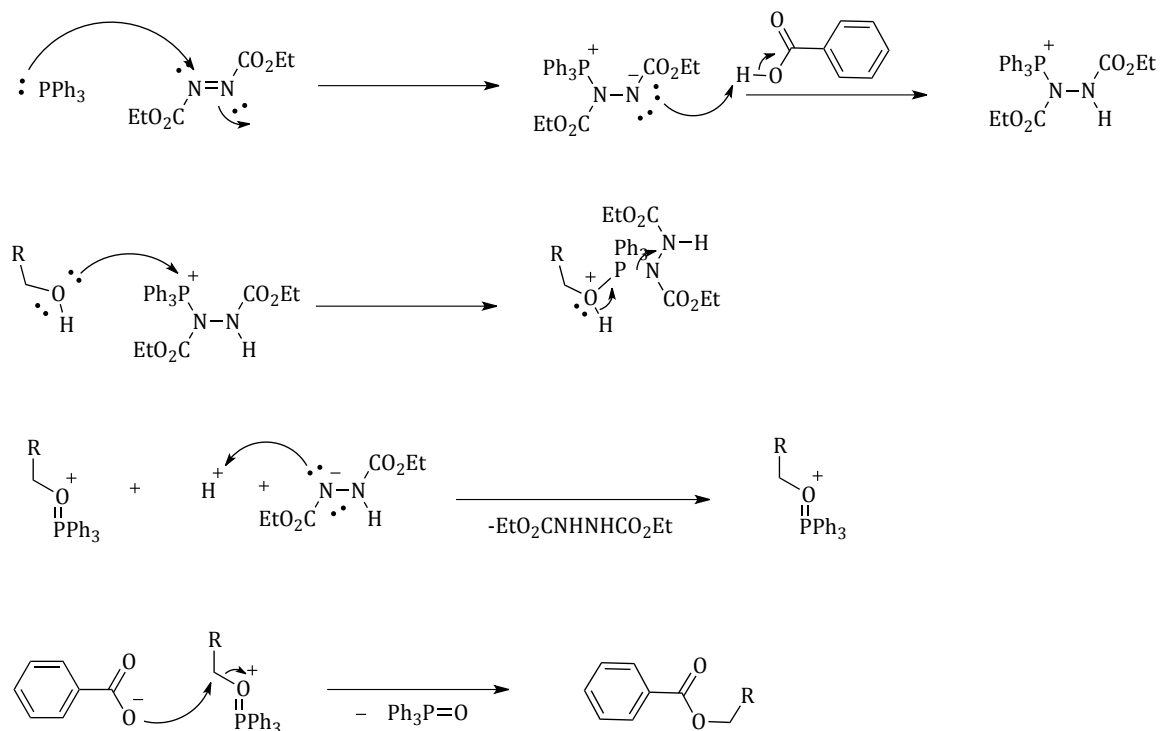


Abbildung 28: Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion.

Im ersten Schritt bilden das Triphenylphosphin und DEAD ein sogenanntes Betain, das anschließend von der Säure, welche einen pK_a kleiner 11 besitzen muss im zweiten Schritt protoniert wird. Die nächsten zwei Schritte beinhalten die Oxidation des Phosphors durch den Alkohol und die Reduktion des DEADs. Da Triphenylphosphinoxid eine gute Abgangsgruppe ist, bietet sich anschließend der im 2. Schritt deprotonierten Säure die Möglichkeit zum nukleophilen Angriff und es entsteht mittels einer S_N2 -Reaktion der gewünschte Ether. Wird als protonierendes Reagenz eine weniger H-acide Verbindung verwendet, so kann diese Problem durch Verwendung von 1,1'-(Azodicarbonyl)dipiperidin in Kombination mit Tributylphosphin umgangen werden. Im Fall der in dieser Arbeit durchgeführten Mitsunobu-Synthese wurde immer ein Phenol ($pK_a \sim 10$) als protonierende Spezies verwendet, wodurch der Einsatz der vorher genannten Verbindungen von Nöten war. So wurden das Biphenyl **5** (Alkohol-Komponente) und das Phenol **3** (H-acide Komponente) mittels dieser Mitsunobu-Bedingungen mit 76%iger Reaktionsausbeute an Ether **6** gekoppelt. Anschließend erfolgte die basenkatalysierte Entschützung des Methylesters zur Carbonsäure **DZ 1**. Mit dem in der Literatur angegebenen Lithiumhydroxidmonohydrat gelang dies nicht, es konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Deshalb schien es ratsam, das System auf Lithiumhydroxid im 3-fachen oder Natriumhydroxid im 2,3-fachen Überschuss gegenüber dem Edukt **6** umzustellen. Hierbei erhielt man Ausbeuten von 88 % für die Entschützung mittels Lithiumhydroxid und 59 % für die Darstellung der Carbonsäure **DZ 1** durch Esterspaltung mit NaOH. Dies entspricht einer Steigerung der in der Literatur beschriebenen Ausbeuten um 37 % und 8 % (Abbildung 29).

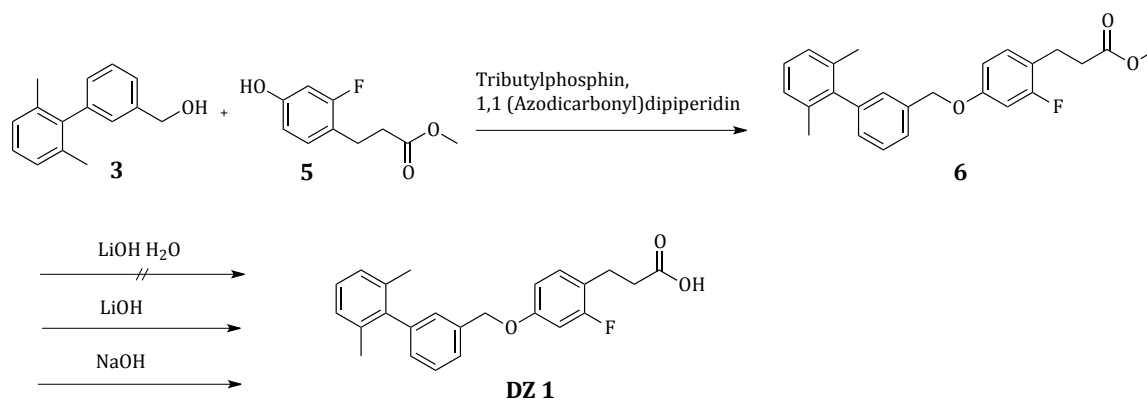


Abbildung 29: Mitsunobu-Reaktion zwischen Verbindung 3 und 5 und anschließende Esterspaltung

Für die Synthesen der an der Biphenyl-4`-Position funktionalisierten Derivate **DZ 2** und **DZ 3** musste zunächst die Biphenylkomponente neu aufgebaut werden. Um die Funktionalisierung mittels Fluorethyl und Fluortriethylenglykol zu ermöglichen, musste eine Hydroxyfunktion eingefügt werden, welche während der gesamten Synthese des Grundkörpers zunächst geschützt und dann selektiv vor der Funktionalisierung entschützt werden konnte. Hierfür wurde nach der Vorschrift von Mikami *et al.* verfahren. Als geeignete Schutzgruppe wurde die Tetrahydropyranyl-Schutzgruppe (THP) gewählt. Sie zeigt sich als besonders geeignet, da der Schützungsprozess der Phenol-Funktion im leicht sauren Milieu abläuft und sie unter basischen Bedingungen stabil ist. Zur Darstellung des geschützten Phenols **7** wurde kommerziell erwerbliches 4-Brom-3,5-dimethylphenol mit Pyridinium-p-toluensulfonat und 3,4-Dihydro-2H-pyran umgesetzt, wobei das Sulfonat den β -Enol-Ether-Kohlenstoff protoniert und hierdurch ein extrem elektrophiles Oxonium-Ion entsteht, an welchem das Phenol angreifen kann. Man erhielt das geschützte Phenol mit einer gegenüber der Literatur um 6 % erhöhten Ausbeute von 83 % (Abbildung 30).

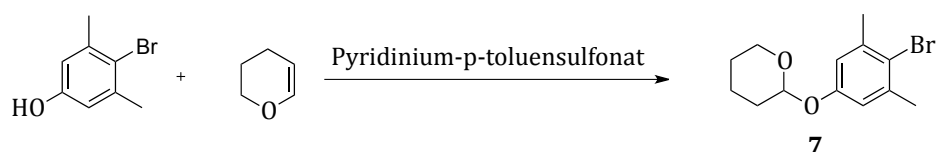


Abbildung 30: THP-Schätzung des Phenols 7

Die Umsetzung des geschützten Phenols **7** zum Biphenyl **8** erfolgte mittels einer palladiumkatalysierten Suzuki-Reaktion mit 3-Formylphenyl-boronsäure und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) unter Erhalt des Produkts in 70%iger Ausbeute. Anschließende Reduktion der Carbonylgruppe zum Alkohol durch Natriumborhydrid lieferte den entsprechenden Alkohol **9** mit einer Ausbeute von 94 % (Abbildung 31).

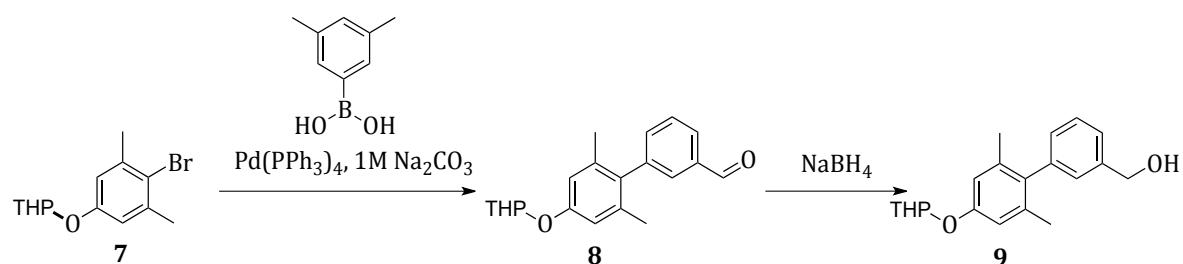


Abbildung 31: Bildung des Biphenyls 8 und anschließende Reduktion

Die Kopplung zum Phenolether **10** wurde unter den bereits oben beschriebenen Mitsunobu-Bedingungen durchgeführt, wobei zunächst keinerlei Produktbildung zu beobachten war. Evaluierung der Reaktion im kleinen Maßstab führte zu der Erkenntnis, immer frisches Tributylphosphin zu verwenden, da Reaktionen mit älterem Reagenz minimale oder gar keine Ausbeuten an gekoppeltem Phenolether **10** zeigten. Hierfür wurden kleine Bördelfläschchen von 10 mL gefüllt und unter Argon verwahrt. Unter Verwendung von frischem Tributylphosphin konnte dann der Ether in Ausbeuten von 64 % erhalten werden. Die Entschützung des Methylesters erfolgte unter mild sauren Bedingungen mit 0,1 Äquivalenten an p-Toluolsulfonsäure in Methanol. Dabei erhielt man nach 24 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur das gewünschte Produkt **11** mit 70 % Reaktionsausbeute (Abbildung 32).

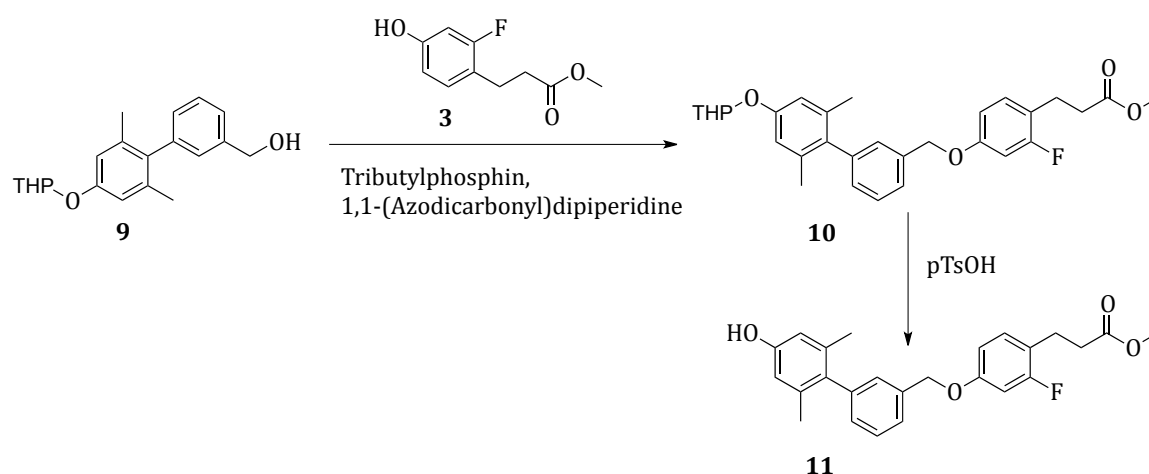


Abbildung 32: Kopplung des Biphenyls 9 und des Phenols 3 zum Phenolether 10 mit anschließende Entschützung

Ausgehend von Verbindung **11** wurde zunächst der Fluorethylether **12** synthetisiert. Dazu wurden mehrere Basensysteme zur Deprotonierung der phenolischen OH-Gruppe im kleinen Maßstab getestet (K_2CO_3 , NaH, NaOH, Cs_2CO_3 , jeweils 1 Äquivalent), wobei nur das Cs_2CO_3 -System Produktbildung zeigte. *Upscaling* des Reaktionsansatzes ergab dann bei Umsetzung mit 1-Brom-2-Fluorethan das gewünschte Produkt **12** mit einer Ausbeute von 67 %. Zur Synthetisierung der kalten Referenzverbindung **DZ 2** musste anschließend der Methylester basenkatalysiert mit NaOH gespalten werden. Die in Abbildung 33 dargestellte Synthese ergab eine Ausbeute von 84 %.

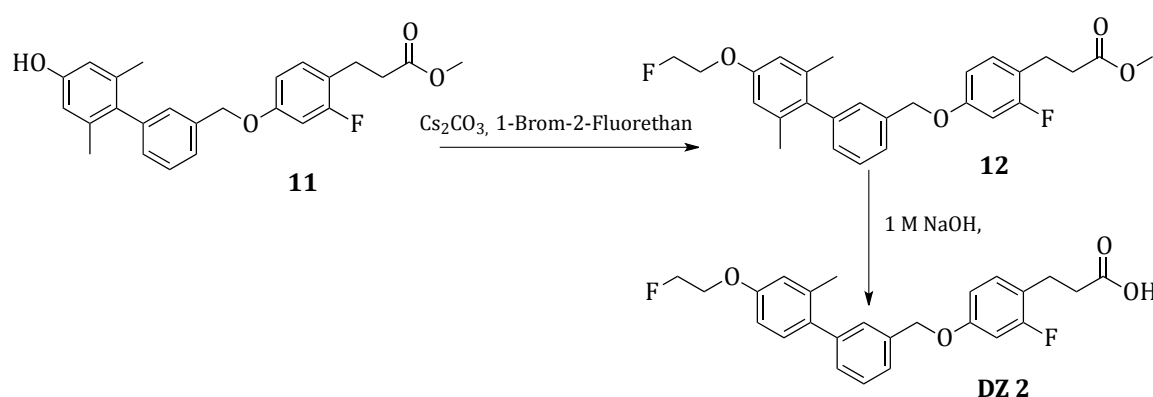


Abbildung 33: Synthese von DZ 2

Für die Synthese des Fluorethylenglykolderivates **DZ 3** wurde zunächst K_2CO_3 als Base zur Deprotonierung der phenolischen OH-Funktion eingesetzt. Nachdem aber nach 24 h Reaktionszeit nur geringe Produktbildung zu beobachten war, wurde auf das bei der Synthese von Verbindung **11** bewährte Cs_2CO_3 -System zurückgegriffen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die sinkende Löslichkeit von Carbonaten mit ansteigender Ordnungszahl ihrer Kationen in polaren Lösungsmitteln. Somit würde sich Kaliumcarbonat schlechter in Aceton lösen als Cäsiumcarbonat und folglich weniger Carbonat-Anionen zur Deprotonierung zur Verfügung stehen. Mit Hilfe des Cäsiumcarbonats (1,5 Äquivalente) wurde ein Umsatz des Phenols **11** mit Triethylenglykol-ditosylat von 76 % beobachtet. Die anschließende Fluorierung erfolgte mittels Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (1M in THF) bei 55 °C in THF mit 73 % Produktausbeute an Verbindung **14**. Abschließende Entschützung mit

NaOH führte mit nahezu quantitativem Umsatz (97 %) zur kalten Referenzsubstanz **DZ 3** (s. Abbildung 34).

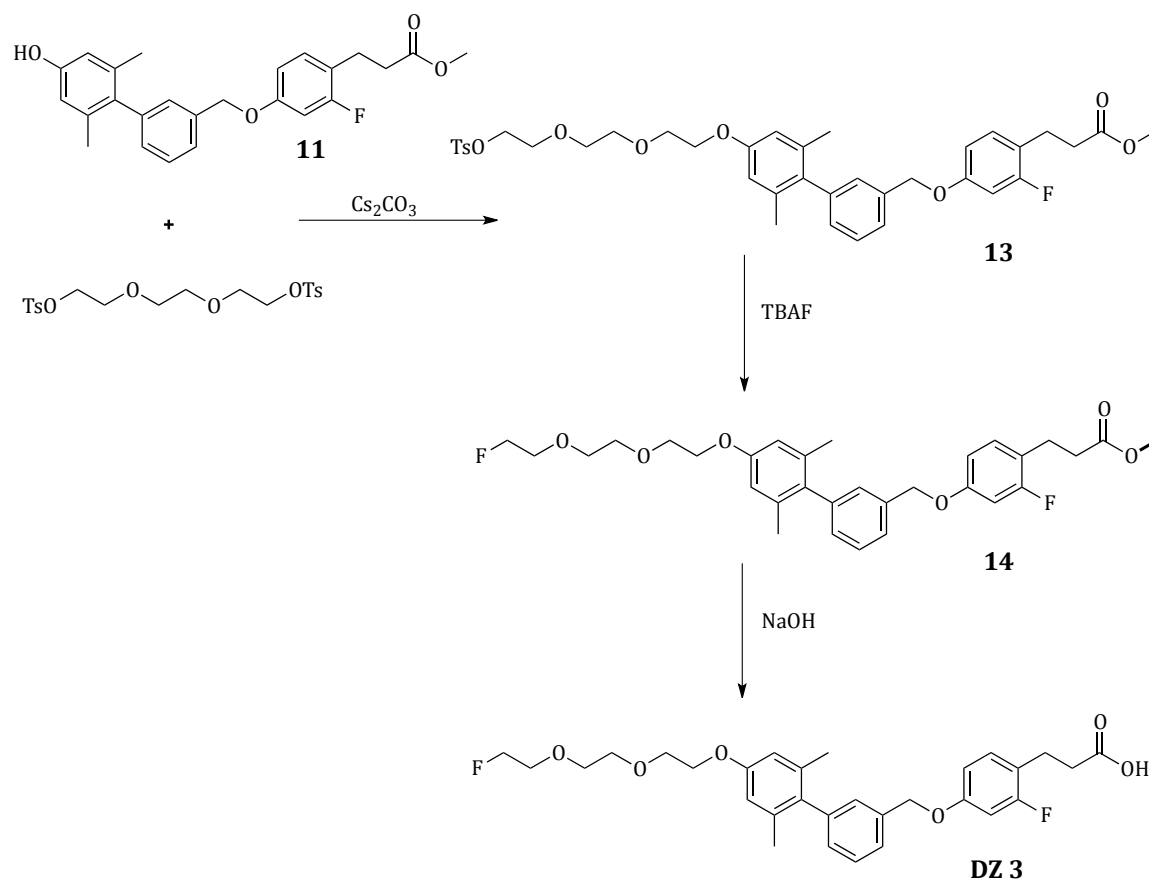


Abbildung 34: Synthese von **DZ 3**

3.1.2 Synthese der ^{18}F -Markierungsvorläufer

Für die Radiosynthese der ^{18}F -markierten in Abbildung 25 gezeigten Liganden sollten drei geeignete Markierungsvorläufer synthetisiert werden, wobei sowohl Markierungsvorläufer zur direkten nukleophilen ^{18}F -Markierung (für die aktiven Liganden **DZ 2** und **DZ 3**), zur Einführung des Fluorlabels über eine prosthetische Gruppe (**DZ 2**) und zur Markierung mittels eines Diaryl-iodoniumsalzes (**DZ 1**) hergestellt werden sollten.

Für die direkte Markierung von **DZ 2** sollte ausgehend von der Verbindung **11** das entsprechende mit einer geeigneten Abgangsgruppe funktionalisierte Derivat synthetisiert werden. Als Abgangsgruppe schienen die Tosyl-Gruppen geeignet und

demzufolge Ethylen-1,2-bistosylat mit Verbindung **11** und Cäsiumcarbonat umgesetzt. Jedoch konnte nach 24 h Rühren unter Rückfluss in Aceton keinerlei Produktbildung beobachtet werden und deshalb wurde eine kleine Menge an Kaliumiodid zugegeben. Das Kaliumiodid generiert *in situ* durch nukleophile Substitution einer Tosyl-Gruppe eine hochwertigere Abgangsgruppe, wodurch der Angriff des Phenolats der Biphenylkomponente erleichtert wird. Nach dieser Zugabe und weiteren 24 h Rühren unter Rückfluss konnte nach Aufarbeitung erfolgreich ein neu entstandener Produktpot mittels Dünnschichtchromatographie zunächst identifiziert um dann säulenchromatographisch isoliert zu werden. Jedoch stellte sich nach massenspektrometrischer Untersuchung und $^1\text{H-NMR}$ -Daten Auswertung heraus, dass nicht die tosylierte Version dargestellt wurde, sondern das entsprechende Iodderivat **MV 1**. Erklären lässt sich dies über eine wahrscheinlich zu große Menge an Kaliumiodid, wodurch nach erfolgtem Angriff des Phenols das wieder als Anion vorliegende Iod in großen Mengen vorhanden war und so mit dem bereits entstandenem Ethyltosylat-derivat nochmals eine Reaktion eingehen und die Tosyl-Gruppe substituieren konnte (s. Abbildung 35). Da sich in weiteren Ansätzen mit weniger Kaliumiodid in katalytischen Mengen kein Produkt generieren ließ, wurde diese durch Zufall entstandene Verbindung nachgezogen und als Direktmarkierungsvorläufer **MV 1** verwendet.

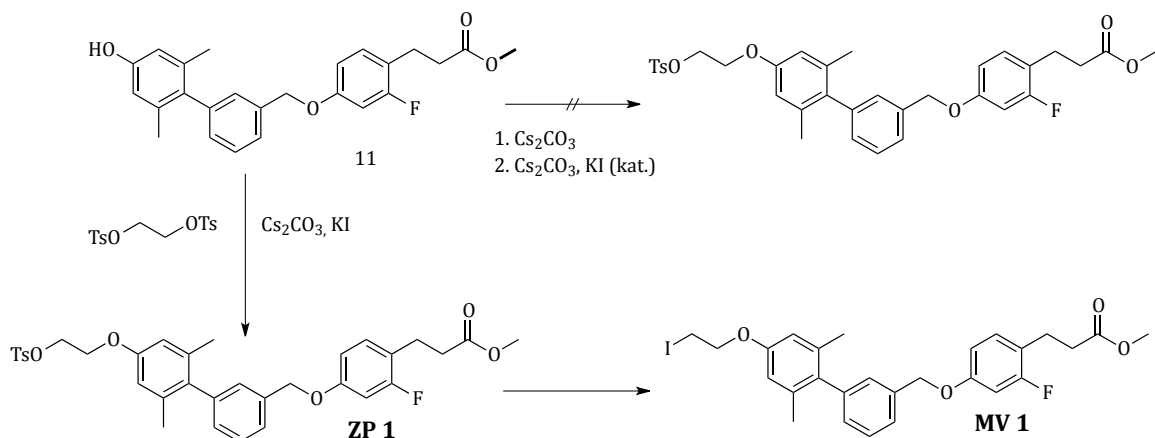


Abbildung 35: Darstellung von MV 1 mit Zwischenprodukt ZP 1

Als Direktmarkierungsvorläufer für das radioaktive Pendant zu **DZ 3** konnte Verbindung **13** (= **MV 2**) verwendet werden. Auch für die Markierung mittels der prosthetischen Gruppe Fluorethyltosylat kam ein bereits in anderen Synthesen als

Zwischenprodukt erhaltenes Molekül (**11**) in Frage. So wurde der Ester der Verbindung **11** mittels NaOH gespalten und man erhielt die entsprechende Säure **MV 3** mit einer Ausbeute von 71 %. Im Gegensatz zu den vorher synthetisierten Carbonsäuren (z.B. **DZ 2**) traten hier allerdings Probleme bei der Aufreinigung auf, da die Verbindung aufgrund ihrer hohen Polarität nicht in reinen organischen Lösungsmitteln zum Laufen gebracht werden konnte. Die Isolierung des Produkts gelang erst durch Zugabe von Ameisensäure, die zu einer Anhebung des R_f -Wertes führt. Die Ameisensäure musste dann in einer langwierigen Prozedur an der Hochvakuumlinie entfernt werden.

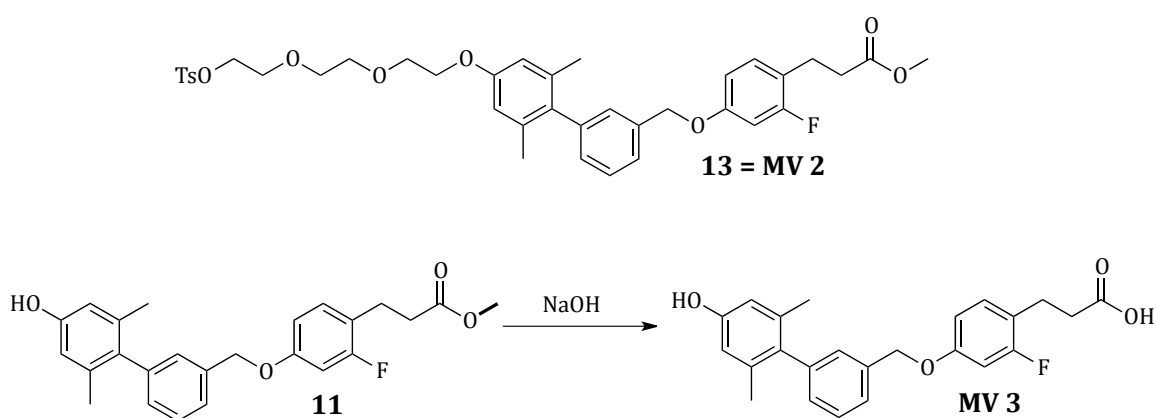


Abbildung 36: Markierungsvorläufer MV 2 und Synthese von MV 3

Für die Markierung von **DZ 1** wurde ein Diaryliodoniumsalz als geeigneter Markierungsvorläufer zur Darstellung des entsprechenden Isotopentracers gewählt. Zunächst sollte die in Abbildung 37 dargestellte Iodverbindung synthetisiert werden und anschließend nach Ross *et al.* in das dreiwertige Iodoniumsalz überführt werden^[23].

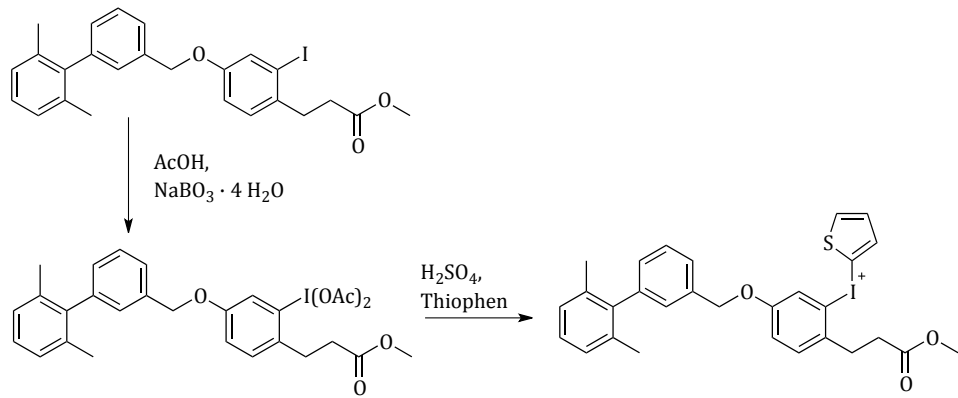


Abbildung 37: Geplante Synthese des Iodoniumsalzes

Als erster Ansatz war hierfür gedacht, *p*-Anisaldehyd an der Carbonylfunktion zu schützen bzw. dieser dadurch einen ortho-dirigierenden Effekt für nachfolgende selektive Metallierungsreaktion mittels *n*-Butyllithium zu verschaffen. Nach Iodierung in ortho-Position sollte das Carbonyl wieder entschützt und der Reaktionsführung von Verbindung **1** entsprechend, in einer Horner-Reaktion das gewünschte Olefin dargestellt werden. Reduktion der Doppelbindung und Entschützung der phenolischen Hydroxyfunktion sollten dann zum kopplungsbereiten Alkohol **16** führen.

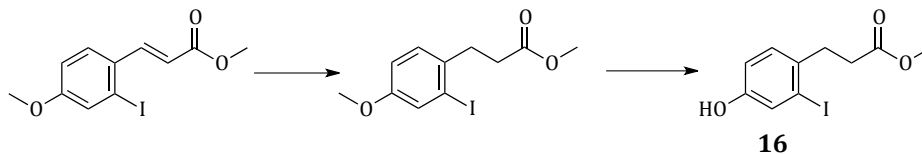


Abbildung 38: Geplante Synthese von Verbindung 16

Zunächst wurden die in Abbildung 39 dargestellten geschützten Anisaldehyde synthetisiert, wobei die beiden zyklischen Acetale **15a** und **15b** nach Gopinath *et al.* durch Umsatz des Anisaldehyds mit Tetrabutylammoniumtribromid (TBATB), Triethylorthoformiat und 1,3-Propandiol bzw. Ethylenglycol mit Ausbeuten von 93 bzw. 84 % erhalten werden konnten^[73]. Das Oxazolin **15c** wurde nach Karade *et al.* mit 2-Aminoethanol und Diacetoxyiodobenzonat umgesetzt, wobei sich zunächst intermediär das Oxazolidin bildet, welches dann durch die oxidierende Wirkung der Iod-Verbindung in das Oxazolin mit 35 % Reaktionsausbeute überführt wurde^[74].

Das azyklische Acetal **15d** wurde ebenfalls nach Gopinath *et al.* mit TBATB, Triethylorthoformiat und Methanol als Lösungsmittel mit 90 % erhalten^[73]. Jedoch konnte mit keiner der Verbindungen **15a-d** eine erfolgreiche Iodierung durchgeführt werden. Gründe hierfür könnten neben Verunreinigung der Geräte die ungenügende Trocknung der verwendeten Chemikalien, Wasserrückstände in den Lösungsmitteln oder auch bereits hydrolysiertes n-Butyllithium darstellen.

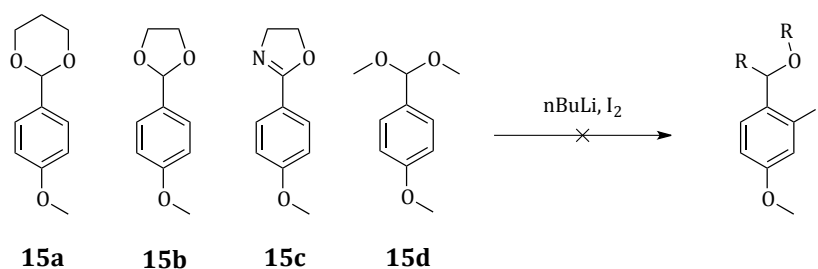


Abbildung 39: Verbindungen 15a-d mit fehlgeschlagener Iodierung

Nachdem der oben gezeigte Weg erfolglos verlaufen war, wurde als Alternative der in Abbildung 40 gezeigte Syntheseweg gewählt.

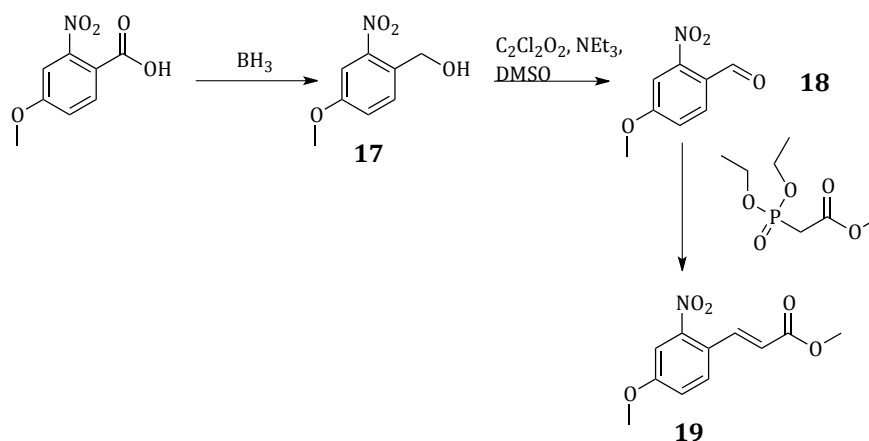


Abbildung 40: Synthese von Verbindung 19

In einer Reduktion der Carboxylfunktion der 2-Nitro-4-methoxybenzoesäure durch Boran, wurde der entsprechende Alkohol **17** mit 97 % Reaktionsausbeute erhalten. Dieser wurde anschließend unter den milden Bedingungen der Swern-Reaktion mit Oxalylchlorid, Triethylamin und DMSO in Dichlormethan mit 95%iger Ausbeute zum

Aldehyd **18** oxidiert. Ausgehend von diesem Aldehyd erhielt man mit Hilfe der Horner-Reaktion das Olefin **19** (s. Abbildung 40).

Neben diesem Reaktionsweg kann als Alternative das gewünschte Iod schon im Vorhinein in die Verbindung eingeführt werden. Als Ausgangssubstanz wurde 2-Amino-4-methoxybenzoesäure gewählt und dieses unter Sandmeyer-ähnlichen Bedingungen mittels Natriumnitrit und HCl bei 0 °C in das intermediäre Diazoniumion umgewandelt. Durch Zugabe von Kaliumiodid im 10-fachen Überschuss erhielt man die 2-Iod-4-methoxybenzoesäure **20** mit einer Ausbeute von 68 %. Diese Iodverbindung wurde unter den bereits oben beschriebenen Reaktionsbedingungen zunächst in den Alkohol **21** (67 %), dann in das Aldehyd **22** (85 %) und abschließend in das Olefin **23** (47 %) überführt (s. Abbildung 41).

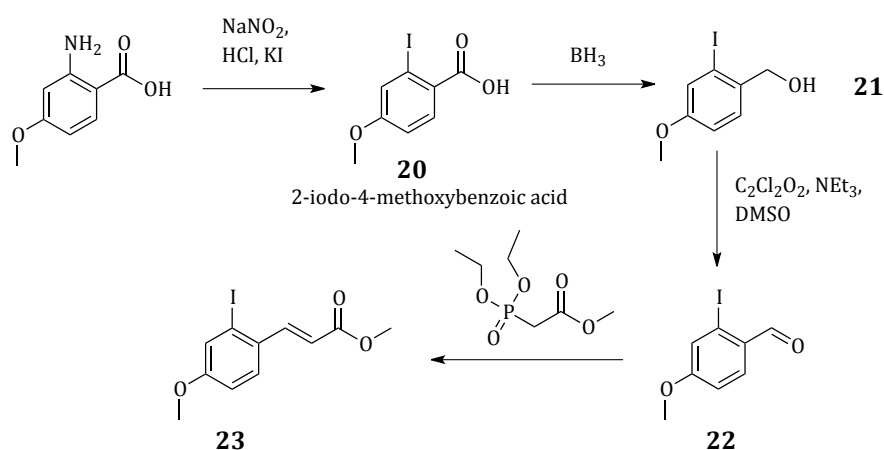


Abbildung 41: Synthese von Verbindung 23

Die Moleküle **19** und **23** sollten nun mittels einer Reduktion der Doppelbindung in die entsprechenden Propanoate umgewandelt werden. Hierfür wurden zunächst die Reduktionsbedingungen der Synthese des Propanoats **2** gewählt. Jedoch konnten nicht die gewünschten Produkte erhalten werden. Im Falle der Nitroverbindung **19** entstand nur das in Abbildung 42 gezeigte Amin **24**, wo neben der gewünschten Reduktion der Doppelbindung auch die Nitro-Gruppe zum Amin und der Carbonsäureester zum Aldehyd reduziert worden waren. Gleiches galt für die Iodverbindung **23**, bei der ebenfalls neben der gewünschten Doppelbindungsreduktion der Ester reduziert und der Aldehyd **25** erhalten wurde.

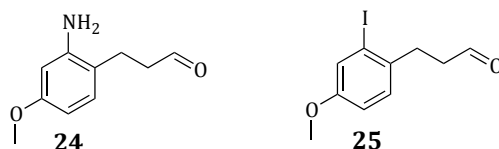


Abbildung 42: Verbindungen 24 und 25

Auf diesem Ergebnis aufbauend, wurde zunächst die Reaktionszeit der Reduktion per DC-Monitoring untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass trotz verkürzter Reaktionsdauer nur die bereits beschriebenen Produkte **24** und **25** entstehen. Anschließend wurde das Hydrierungskatalysatorsystem umgestellt und anstatt auf den aktiveren Platinkatalysator auf die milderen Varianten Palladium auf Aktivkohle und Raney-Nickel zurückgegriffen. Während bei der palladiumkatalysierten Reduktion weder unter atmosphärischem Wasserstoffdruck noch bei Durchleitung im Zeitraum von 1-24 Stunden ein Produkt zu beobachten war, zeigte sich mit Raney-Nickel schon nach 3 Stunden die Bildung der unerwünschten Produkte **24** und **25**. Auch die Reduktionsvariante mit Magnesium in Methanol führte nicht zu dem gewünschten Produkt.

Tabelle 4: Durchgeführte Hydrierungsreaktionen mit den Edukten 19 und 23

Reduktions- methode / Edukt	PtO ₂ , H ₂ - Atm. (12 h)	PtO ₂ , H ₂ - Atm. (24h)	PtO ₂ , H ₂ - Durchfl. (12 h)	PtO ₂ , H ₂ - Durchfl. (24h)	Pd/C, H ₂ - Atm.	Pd/C, H ₂ - Durchfl.	Mg, MeOH	Raney- Nickel, H ₂ - Atm. (4 h)	Raney- Nickel, H ₂ - Atm. (12 h)
Verb. 19	Verb. 24	Verb. 24	Verb. 24	Verb. 24	-	-	-	Verb. 24	Verb. 24
Verb. 23	Verb. 25	Verb. 25	Verb. 25	Verb. 25	-	-	-	Verb. 25	Verb. 25

Als möglicher Grund für die gravierenden Unterschiede zwischen den Hydrierungen der Verbindung **2** und der Verbindungen **19** und **23** kann die Aktivierung des Aromaten durch seine Substituenten angesehen werden. Vergleicht man die beiden

Halogene Fluor und Iod miteinander, so erkennt man, dass beide zwar durch ihre Elektronegativität die Basizität im Aromaten erniedrigen, Fluor jedoch eine wesentlich stärkere Anziehungskraft auf Elektronen ausübt. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die beobachteten Ergebnisse, da die stärker verminderte Elektronendichte bei Fluor als Substituent zwar noch zur Reduktion der Doppelbindung führt, die Esterfunktion im Gegensatz zum Iod jedoch nicht mehr davon betroffen ist. Betrachtet man Verbindung **19** so muss man zunächst feststellen, dass die Nitrofunktion einen stärkeren Elektronenzug generieren müsste als das Fluor, unsere Ergebnisse jedoch nahe legen, dass die Nitro-Gruppe zunächst zum Amin reduziert wird. Durch den schwächeren -I- und einen nun vorhandenen +M-Effekt des Amins wird die Elektronendichte im Ring stark erhöht und somit eine Hydrierung des Esters zum Aldehyd begünstigt.

Nachdem die zwei beschriebenen Ansätze ebenfalls nicht zum gewünschten Ergebnis geführt hatten, wurde als nächste Alternative mit der Synthese eines an der Seitenkette bromierten Aromaten begonnen, bei welchem die Reduktion nicht mehr von Nöten ist und die Carboxylgruppe mittels einer Grignard-Reaktion eingeführt werden kann. Als Ausgangsverbindung wurde kommerziell erwerbliches 1-Chloro-4-methoxy-nitrobenzol verwendet, das mit Malonsäurediethylester, Natriumhydrid und Cäsiumfluorid in einer nukleophilen Substitutionsreaktion reagiert. Cäsiumfluorid wird hier in katalytischen Mengen eingesetzt um *in situ* mit dem Chlor des Aromaten zu substituieren und eine reaktivere Abgangsgruppe für den nukleophilen Angriff des deprotonierten Malonats zu generieren. Man erhielt das gewünschte Diethylmalonat **26** mit einer Ausbeute von 19 %. Dieses Malonat wurde anschließend mit NaOH in Ethanol unter quantitativem Umsatz in die Carbonsäure **27** umgewandelt. Nachfolgende Reduktion durch Boran ergab den entsprechenden Alkohol **28** mit 60 % Ausbeute. Das bromierte Reagenz **29** erhielt man durch Umsatz mit Phosphortribromid in Dichlormethan bei RT (s. Abbildung 43). Jedoch bewegten sich die erreichten Ausbeuten im Bereich von 23 %. Durch Einsatz eines weniger polaren Lösungsmittels wie z.B. Cyclohexan und Arbeiten unter Rückfluss ließen sich diese eventuell noch um mehrerer Prozent anheben. Das bromierte Molekül **29** könnte nun in weiteren Stufen zunächst in einer Grignard-Reaktion mit CO₂ in die entsprechende Säure umgewandelt werden, diese kann mit einem Ester

geschützt und anschließend die phenolische Hydroxidgruppe selektiv entschützt werden. Eine Kopplung mittels der Mitsunobu-Reaktion mit Komponente 5 ergäbe dann die als Vorstufe zu der in Abbildung 37 gezeigten Iodverbindung dienende Nitroverbindung, welche durch Reduktion zum Amin und anschließende Sandmeyer-Reaktion in ebendiese überführt werden kann.

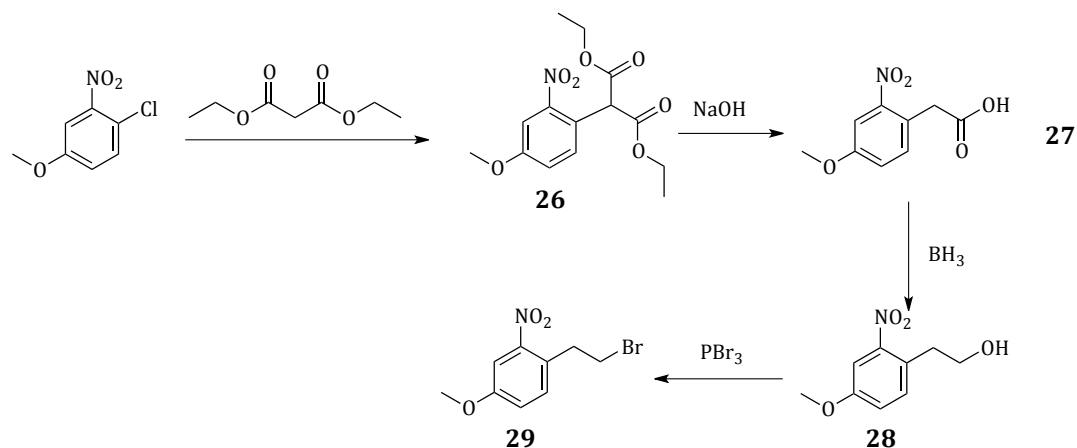


Abbildung 43: Synthese von Verbindung 29

3.1.3 Synthese des Fluoreszenz-Farbstoffes

Für die Synthese eines an den Liganden gekoppelten Farbstoffes musste zunächst ein geeigneter Fluoreszenz-Farbstoff gewählt werden. Die Entscheidung fiel auf den Xanthen-basierten Farbstoff Rhodamin B (s. Abbildung 44), welcher bereits 1887 von BASF entwickelt wurde^[75]. Der metallisch-grüne Kristalle bildende Farbstoff löst sich in Lösungsmitteln mit einer rötlich-violetten Farbe und starker orangefarbener Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 553 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 627 \text{ nm}$ in Methanol)^[76]. Er wird aus Phthalsäure und 3-(Diethylamin)-phenol dargestellt und dient als Laserfarbstoff oder auch Fluoreszenzmarker in biologischen Anwendungen.

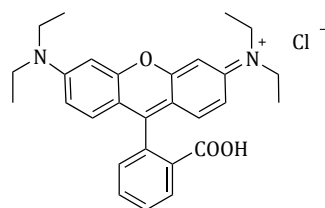


Abbildung 44: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin B

Da das Rhodamin B eine freie Säure-Gruppe aufweist, sollte es mittels der milden Mitsunobu-Bedingungen über einen mit einer endständigen Alkoholgruppe versehenen Linker zunächst an Verbindung **30** gekoppelt werden. Durch Entschützung der Säurekomponente erhält man dann den fertigen Fluoreszenz-Farbstoff (s. Abbildung 45).

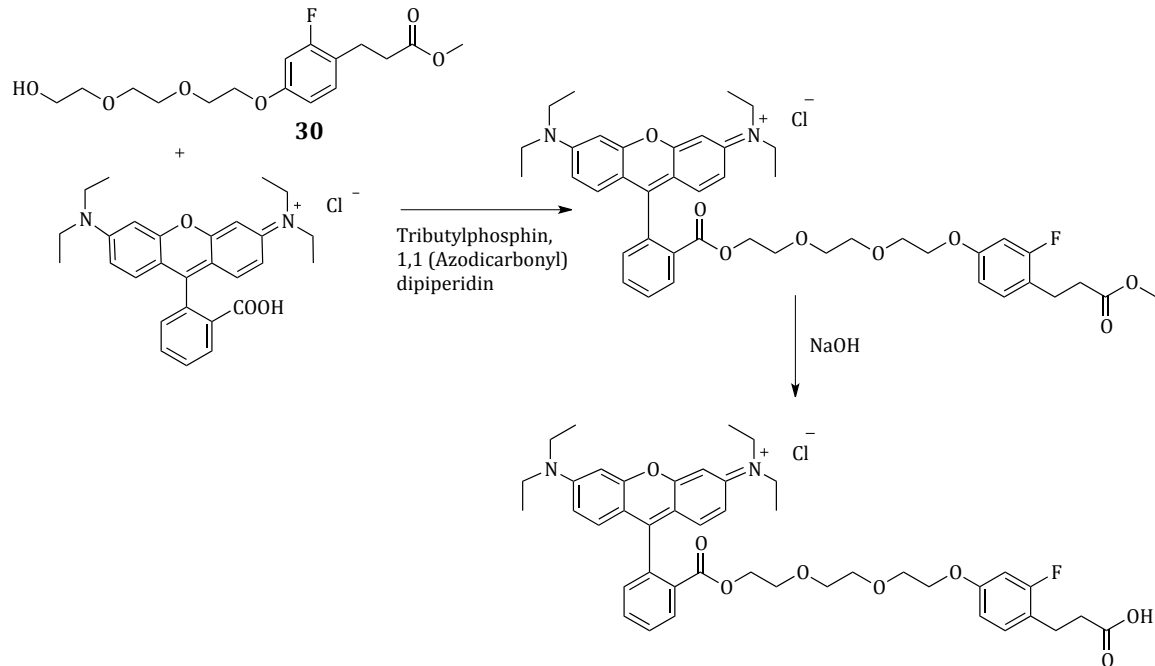


Abbildung 45: Synthese des Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Liganden

Als Linker wurde ein Triethylenglykolderivat gewählt und folglich musste zunächst der Ether **30** synthetisiert werden. Hierfür benötigt man einen mit einer Abgangsgruppe versehenen Linker, um diesen dann in einer S_N2-Reaktion an das Phenol **3** zu koppeln. Als Ausgangssubstanz diente Ethylentriglykol, aus welchem nach Moreau *et al.* mit Ag₂O, KI und Tosylchlorid das entsprechende monotosylierte PEG₃-Derivat **31** mit 89 % Ausbeute gewonnen wurde. Anschließend wurden die Bedingungen für die nukleophile Substitution der Tosylgruppe durch das Phenol **3** *gescreent*. Hierfür kamen verschiedene Basensysteme (NaH, NaOH, Cs₂CO₃, K₂CO₃) bei unterschiedlichen Temperaturen (0 °C, RT, 40 °C, 60 °C, 80 °C) in Frage. Jedoch konnte in keinem dieser Testansätze Produktbildung beobachtet werden, was wahrscheinlich auf eine zu geringe Aktivierung der Abgangsgruppe zurückzuführen war. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Linker mit Chlor- und Iod-

Abgangsgruppen getestet. Zunächst erfolgte in einer nukleophilen Substitution am kommerziell erwerblichen Monochlortriethylenglykol durch Umsatz mit NaI in siedendem Aceton der Austausch des Chlors gegen das elektronenaffinere Iod mit einer Reaktionsausbeute an Verbindung **32** von 7,4 %. Anschließend wurden sowohl für den Chlor- als auch für den Iod-Spacer die gleichen Reaktionsbedingungen wie bereits oben aufgezählt getestet. Jedoch konnte nur bei Verbindung **32** unter Einsatz von 5 Äquivalenten K_2CO_3 und 2 Äquivalenten des Spacers in DMF bei 70 °C die Bildung des gewünschten Produkts **30** mit 63 % Ausbeute beobachtet werden (s. Abbildung 46).

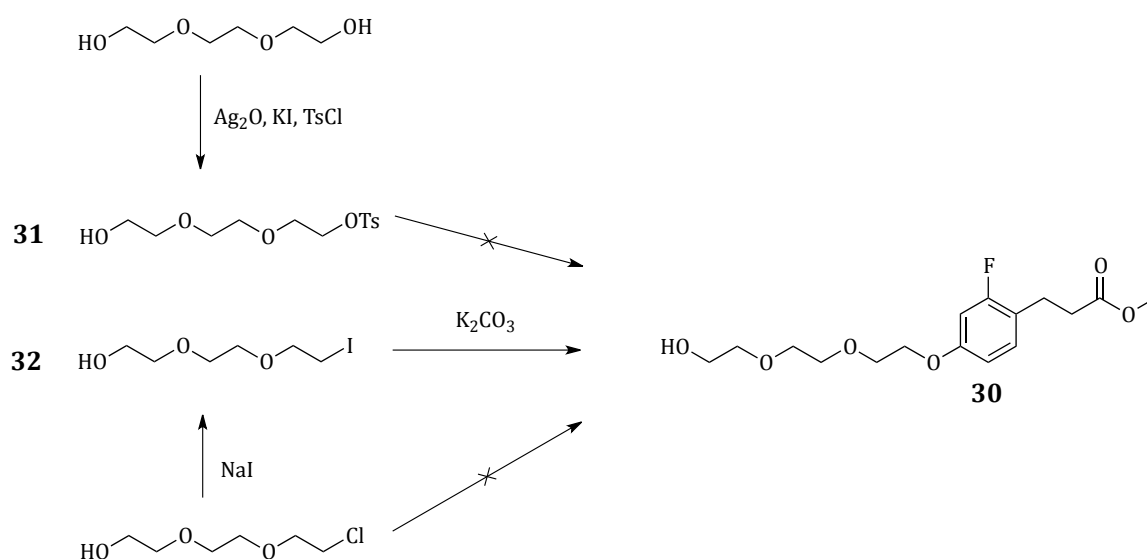


Abbildung 46: Synthese von Verbindung 30

Nach erfolgreicher Synthese von Verbindung **30** sollte diese, wie in Abbildung 45 gezeigt, mittels der bereits zuvor angewandten Mitsunobu-Reaktion an das Rhodamin B gekoppelt werden. Dabei konnte jedoch trotz mehrmaliger Synthese und Variation der Reaktandenverhältnisse kein Produkt gewonnen werden. Als mögliche Ursachen hierfür lassen sich zwei Gesichtspunkte aufführen. Zum einen könnte die zur Protonierung der Diazo-Komponente benötigte Säuregruppe des Rhodamins nicht C-H-acide genug sein und somit schon der zweite Schritt des in Abbildung 28 gezeigten Mechanismus scheitern, zum anderen besteht die Möglichkeit einer sterischen Hinderung durch das Xanthen-Grundgerüst des Rhodamins. Dies könnte bewirken, dass zwar die Säurestärke noch zur Protonierung ausreicht und anschließend die weiteren Stufen des Mitsunobu-Mechanismus

durchlaufen werden, der abschließende nukleophile Angriff des deprotonierten Rhodamins unter Abspaltung des Triphenylphosphinoxids jedoch aus sterischen Gründen nicht stattfinden könnte.

Somit wurde als Alternative zur Mitsunobu-Kopplung eine Kopplung des Spacers mittels einer Amid-Bindung an die Säure-Gruppe des Rhodamins in Betracht gezogen. Jedoch konnte hier kein mit einem Amin funktionalisierter Spacer eingesetzt werden, da Untersuchungen an sekundären Amiden des Rhodamins, wie in Abbildung 47 dargestellt, zeigen, dass diese rasch zu einer Zyklisierung zu nicht mehr fluoreszenzaktiven Laktamen neigen^[77].

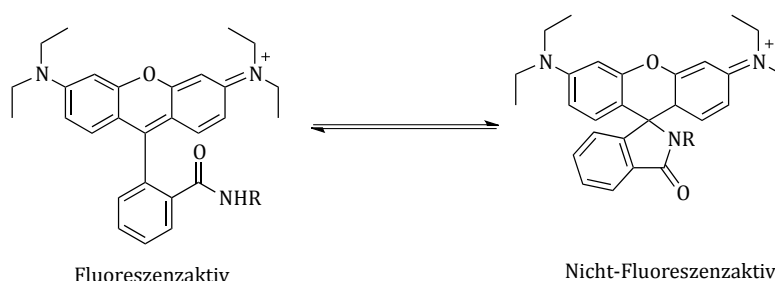


Abbildung 47: Zyklisierung von primären Rhodamin-Amiden^[77]

Um dieses Problem zu umgehen, wurde der Weg über ein tertiäres Amid am Rhodamin und anschließende Kopplung mit einem säure-funktionalisierten Spacer gewählt. Zunächst musste hierfür das Rhodamin B nach Kierat *et al.* mittels KOH in das entsprechende Lacton **33** überführt werden, was mit 87 % Reaktionsausbeute gelang^[75]. Anschließend wurde aus diesem mit 4 Äquivalenten Piperazin und zwei Äquivalenten Trimethylaluminium in DCM unter Rückfluss das tertiäre Amid **34** gewonnen. Nach Quenchen des Ammoniumsalzes konnte das Produkt, begünstigt durch seine Wasserlöslichkeit im basischen Milieu, von dem Lacton durch Ausschütteln mit Ethylacetat getrennt werden. Im anschließenden Schritt erfolgte, nach Ansäuern der Reaktionslösung und Absättigen mit NaCl, mit einem Propanol/DCM-Gemisch (2:1) die Extraktion des Rohprodukts^[77]. Allerdings wurde im Gegensatz zur Literaturvorschrift noch eine säulenchromatographische Aufreinigung vorgenommen und man erhielt das Amid **34** mit einer Ausbeute von 39 % (s. Abbildung 48).

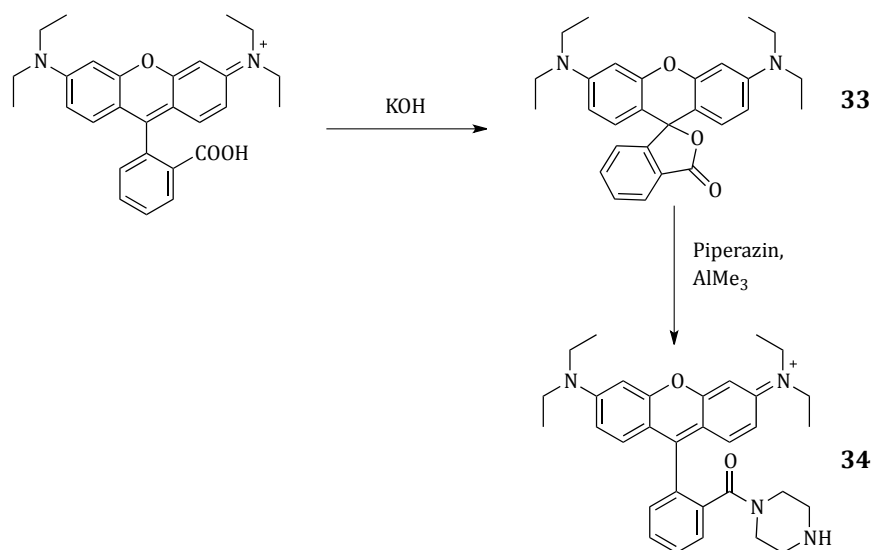


Abbildung 48: Synthese des Rhodaminpiperazinamids 34

Der Spacer **36** wurde nach Wosnick *et al.* ausgehend von Diethylenglykol in einer 2-stufigen Synthese hergestellt. Im ersten Schritt wurde Diethylenglykol zunächst mit *tert*-Butylacrylat und Natriumspänen in THF zur geschützten Säure **35** umgesetzt (92 %) und im zweiten mittels Triethylamin und Tosylchlorid mit der Tosylabgangsgruppe versehen (43 %)^[78].

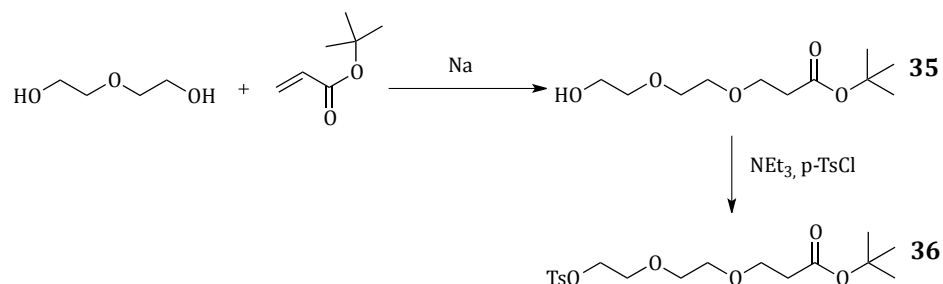


Abbildung 49: Synthese des Spacers 36

Anstatt der Kopplung des Farbstoffes mittels Verbindung **36** an das Phenol **3**, sollte die direkte Kopplung mit dem kompletten Liganden angestrebt werden. Hierfür wurde versucht, Verbindung **11** an der Biphenyl-4'-Position über einen durch nukleophile Substitution dargestellten Ether zu funktionalisieren. Dies konnte trotz Verwendung diverser Basen und Lösungsmittel bei unterschiedlichen Temperaturen jedoch nicht erreicht werden. Als Alternative wurde nun ausgehend

von Linker **36** die Ligand-Linker-Verbindung in 5 Stufen sukzessive aufgebaut. Zunächst erfolgte die Umsetzung von 4-Brom-3,5-dimethylphenol mittels Cs_2CO_3 in Aceton mit Linker **36** zu Phenolether **37**, wobei man 89 % Reaktionsausbeute erzielen konnte. Die anschließende Suzuki-Kopplung mit 3-Formylphenylboronsäure zum Biphenyl **38** verlief unter bereits oben beschriebenen Bedingungen und man erhielt 69 % an Produkt. Daraufhin erfolgte die Reduktion der Aldehydfunktion des Biphenyls mit Natriumborhydrid bei $0\text{ }^\circ\text{C}$, die 83 % des entsprechenden Alkohols **39** ergab. Dieser wurde in der 4. Stufe unter bereits bekannten Mitsunobu-Bedingungen mit 70 % Reaktionsausbeute an das Phenol **3** gekoppelt und man erhielt die, sowohl an der Linkersäure, als auch an der Propionsäure geschützte Ligand-Linker-Verbindung **40**. Mittels TFA konnte nun selektiv die *tert*-Butyl-Schutzgruppe am Triethylglykollinker abgespalten werden und man erhielt mit 92 % Ausbeute Verbindung **41**, welche nun zur Kopplung mit dem Piperazin **34** bereitstand (s. Abbildung 50).

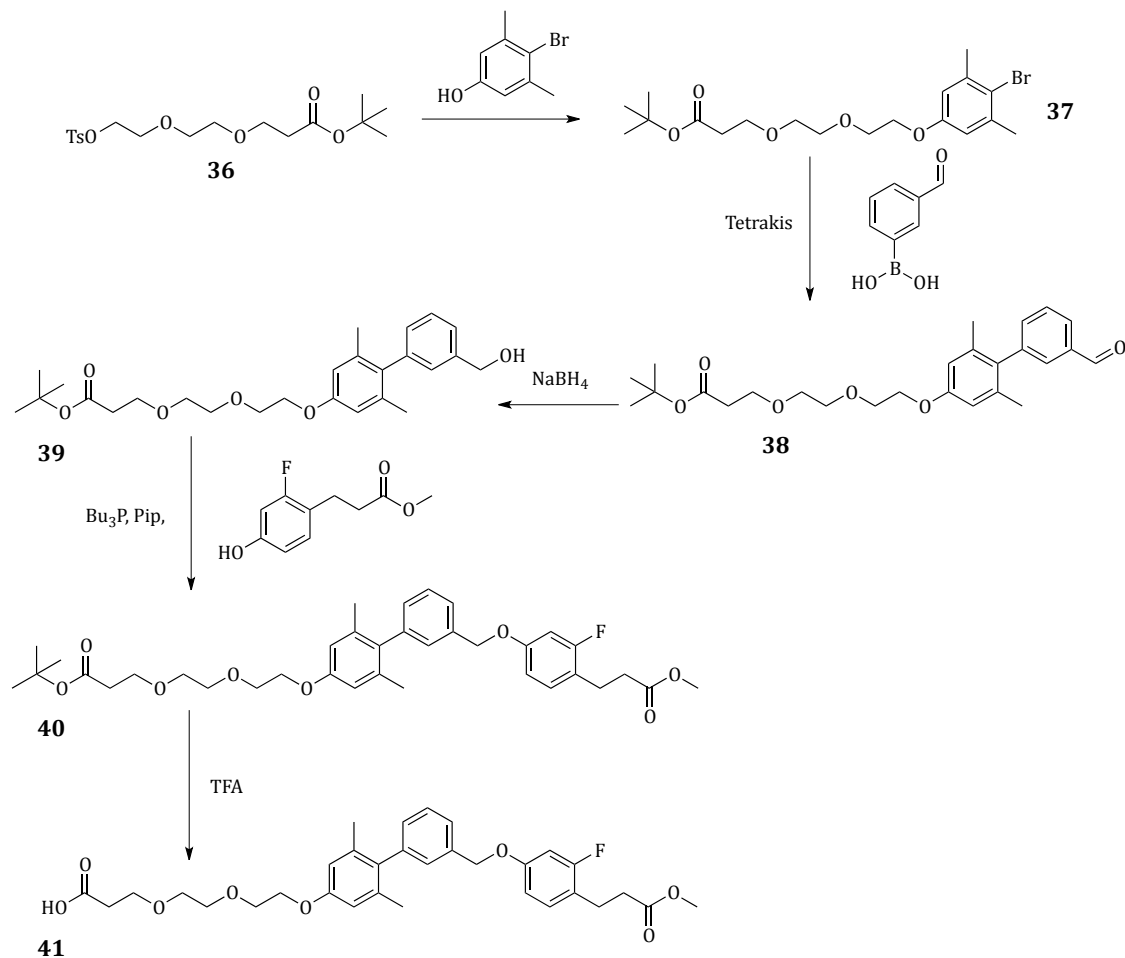


Abbildung 50: Synthese von Verbindung **41**

Für die Kopplung zwischen Verbindung **41** und Rhodaminpiperazinamid **34** wurde, wie in Abbildung 51 gezeigt, das gängige Amidkopplungs-System HBTU/DIPEA gewählt. Man erhielt durch Reaktion aller eingesetzten Substanzen im gleichen Verhältnis 91 % an Produkt **42**. Um den fertigen Farbstoff **43** darzustellen, wurde zuletzt die Ligand-Carbonsäuregruppe mittels NaOH entschützt. Auch hier musste zur Aufreinigung mittels Säulenchromatographie ein kleiner Anteil an Ameisensäure in das Laufmittelgemisch gegeben werden und nach Abziehen letzter Säurereste am Hochvakuum, konnte das Produkt mit 64 % Reaktionsausbeute isoliert werden.

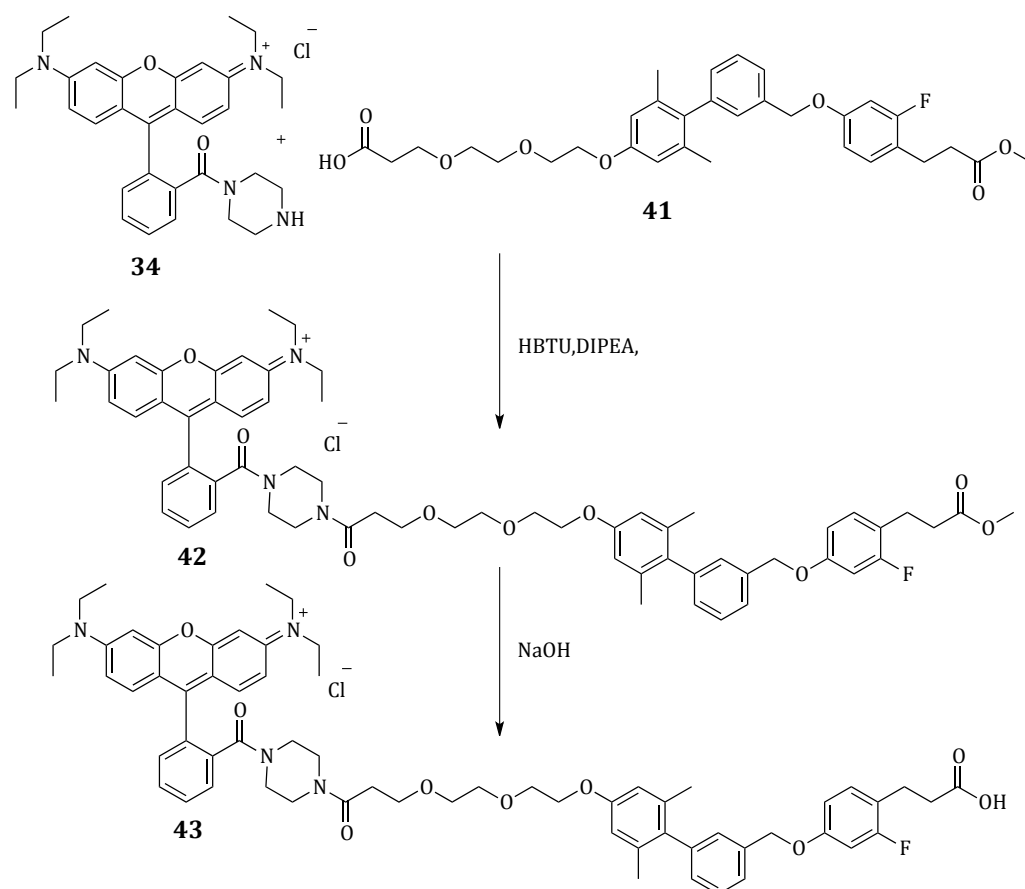


Abbildung 51: Synthese des Fluoreszenzfarbstoffes **43**

3.1.4 Synthese des ^{68}Ga -Markierungsvorläufers

Da aus der Synthese des Fluoreszenzfarbstoffes bereits ein fertiger Ligand mit Linker zur Verfügung stand, wurde als geeigneter Chelator das an den Säuregruppen *tert*-Butyl geschützte und mit einer zur Kopplung benötigten Amineinheit versehene tris-*tert*-Butyl-DOTA-ethylamin verwendet. Dieser kommerziell erwerbliche Chelator wurde unter den bereits in 3.1.3 beschriebenen Bedingungen mit dem Ligand/Linker-Molekül **41** mit einer Ausbeute von 93 % gekoppelt. Anschließend mussten die Säuregruppen des Liganden und des Chelators entschützt werden. Zur Spaltung des Methylesters wurde NaOH eingesetzt und man erhielt nach säulenchromatographischer Aufreinigung 76 % an Produkt. Für die Abspaltung der *tert*-Butylschutzgruppen wurde der Chelator **45** in einer Mischung aus TFA, Wasser und TIPS (95:2,5:2,5) gelöst und anschließend 24 h in einem Eppendorfgemäß auf dem Schüttler zur Reaktion gebracht. Quenchen mit der 5-fachen Menge an Wasser und anschließendes Abziehen des TFA/Wasser/TIPS-Gemisches ergab das komplett entschützte Produkt **46** mit einer Ausbeute von 92 % (s. Abbildung 52).

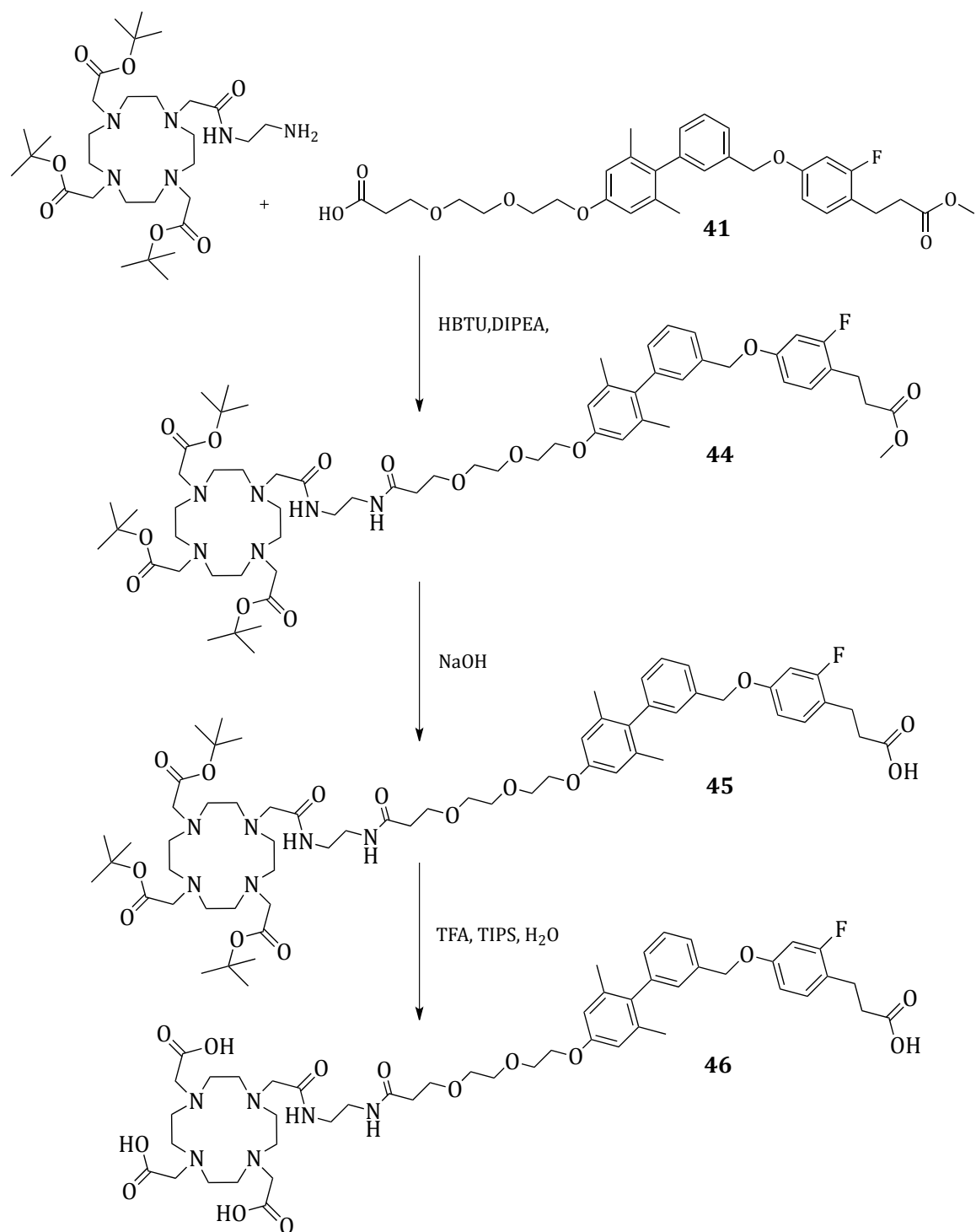


Abbildung 52: Synthese des bifunktionellen Chelators 46

3.2 Radioaktive Synthesen

Die in Abschnitt 3.1 besprochenen Markierungsvorläufer sollten nun mit den entsprechenden Radionukliden markiert werden. Im Folgenden wird die Evaluierung der ^{18}F -Markierungen von **MV 1-3** und der ^{68}Ga -Markierung des Moleküls **46** diskutiert.

3.2.1 Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{DZ 3}$

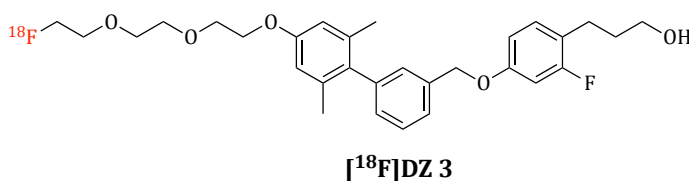


Abbildung 53: Struktur des Radioliganden $[^{18}\text{F}]\text{DZ 3}$ mit einer aliphatischen ^{18}F -Markierung

Für die radioaktive Form der Referenzverbindung **DZ 3** wurde zur Synthese der Markierungsvorläufer **MV 2** herangezogen. Die direkte nukleophile Markierung mittels $^{18}\text{F}^-$ gelingt über die Substitution mit der am Triethylglykol endständigen Tosylgruppe. Für diese Substitution mussten zunächst die richtigen Reaktionsparameter evaluiert werden. Im Verlauf der Evaluierung wurden verschiedene Lösungsmittel, Basen-Systeme und Temperaturen getestet.

Zunächst wurde als Basensystem standardmäßig das Kaliumcarbonat/Kryptofix 2.2.2-System verwendet um die Reaktionskinetik der Markierungsreaktion in unterschiedlichen Lösungsmitteln zu testen. Hierfür gab man $3\ \mu\text{mol}$ Markierungsvorläufer **MV 2** für 20 min bei $90\ ^\circ\text{C}$ in 1 mL des jeweiligen Lösungsmittels. Es wurden Aliquote bei 2, 5, 10, 15 und 20 min gezogen und in $100\ \mu\text{L}$ Methanol gequenchet. Anschließend erfolgte die Bestimmung der radiochemischen Ausbeuten an Produkt mit einem R_f -Wert von 0,74 zum jeweiligen Zeitpunkt mittels DC (Hexan/Ethylacetat, 1:1).

Es wurden die drei aprotisch-polaren Lösungsmittel Acetonitril, Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid sowie das aprotisch-unpolare Lösungsmittel 1,4-Dioxan getestet. Betrachtet man die in Abbildung 54 dargestellten radiochemischen

Ausbeuten nach 20 min, so ergibt sich, dass die höchste Ausbeute in Acetonitril, dem Lösungsmittel mit der geringsten Donorzahl (14,1) der vier Lösungsmittel erhalten wurde. Vergleicht man die drei aprotisch-polaren LM, so zeigt sich, dass die Reaktionsausbeuten mit ansteigender Donorzahl des verwendeten Lösungsmittels sinken (MeCN: 14,1; DMF: 24; DMSO: 29)^[79]. Dies könnte auf die steigende Solvatisierung des [¹⁸F]Fluorid-Anions durch das LM zurückzuführen sein, wodurch dessen Reaktivität herabgesenkt würde. Zwar besitzt auch Dioxan eine relativ geringe Donorzahl (14,8), jedoch ist es auch das mit Abstand unpolareste der vier Lösungsmittel und erreicht somit nicht das gute Lösungsverhalten für den Markierungsvorläufer und das [¹⁸F]Fluorid.

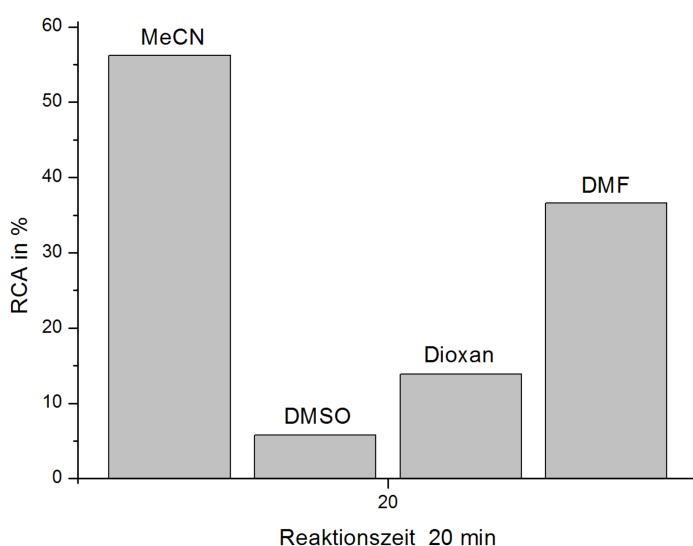


Abbildung 54: Radiochemische Ausbeute der ¹⁸F-Markierung von MV 2 in verschiedenen Lösungsmitteln. Markierungsbedingungen: 3 μ mol MV 2, 90 °C, 1 mL Lösungsmittel, 20 min.

Die Evaluierung des Basensystems erfolgte anschließend in Acetonitril, wobei 7 μ mol (5 mg) **MV 2** eingesetzt wurden. Zur Erstellung der Reaktionskinetik mittels Bestimmung der Reaktionsausbeuten nach 2, 5, 10, 15 und 20 min kam ebenfalls das bereits obenstehende Verfahren zur Anwendung. Als Basen wurden Kaliumcarbonat (15 μ mol) und *tert*-Butylammoniumhydroxid (54 μ mol) (TBA) bei einer Reaktionstemperatur von 90 °C getestet. Wie in Abbildung 55 gezeigt, war die radiochemische Ausbeute bei der Verwendung von K₂CO₃ zu jedem Zeitpunkt

deutlich höher als mit TBA. Deshalb wurde dieses System für die folgenden Markierungen etabliert.

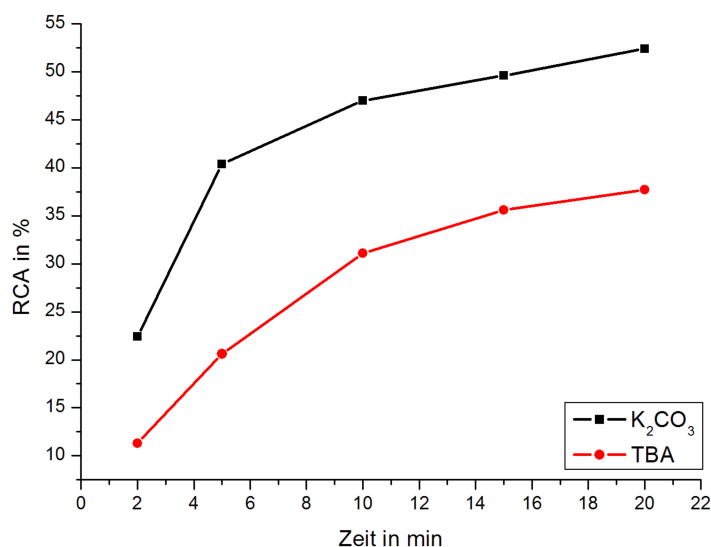


Abbildung 55: Radiochemische Ausbeute der ¹⁸F-Markierung von MV 2 mit den Basen K₂CO₃ und TBA. Markierungsbedingungen: 7 μmol MV 2, 90 °C, 1 mL Lösungsmittel, 20 min.

Basierend auf den Ergebnissen der Lösungsmittel- und Basenabhängigkeit sollte abschließend die Temperaturabhängigkeit der Markierung untersucht werden. Dazu dienten jeweils drei Reaktionen bei 80, 90 und 100 °C. Es wurde wiederum nach 2, 5, 10, 15 und 20 min ein Aliquot entnommen und mit Methanol gequencht. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Markierungsausbeuten mittels Radio-DC. In Abbildung 56 wird die Abhängigkeit der Reaktionsausbeuten gezeigt. Wie zu erwarten, konnten mit steigender Temperatur auch höhere Ausbeuten erhalten werden. Bei 100°C erhielt man nach 20 min Reaktionszeit maximale Ausbeuten von über 75 % an Produkt. Eine Untersuchung von höheren Temperaturbereichen als 100 °C ist beim Lösungsmittel Acetonitril (Sdp. 82 °C) wenig sinnvoll. Die Reaktionsgefäße sind zwar durch ein Septum verschlossen, doch erfahrungsgemäß bei der Verwendung von Acetonitril nicht ausreichend druckstabil/-dicht bei höheren Temperaturen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Markierungsreaktionen an **MV 2** mit 7 μmol Markierungsvorläufer in Acetonitril bei 100 °C mit dem Basensystem Kaliumcarbonat/Kryptofix durchgeführt.

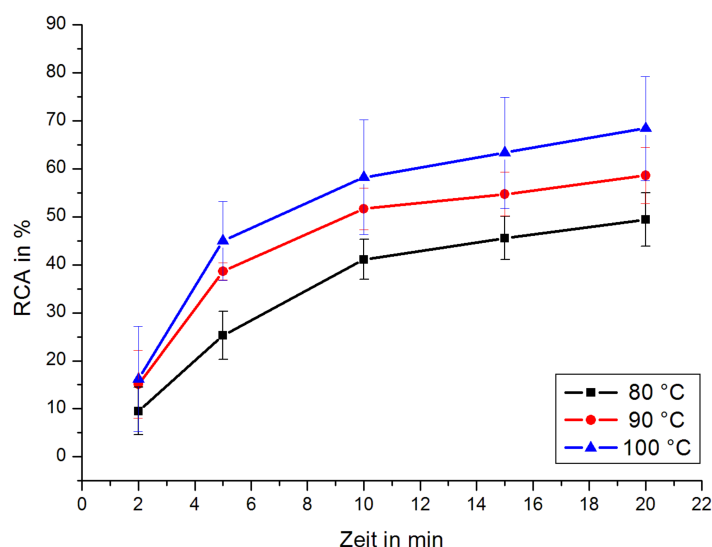


Abbildung 56: RCA in Abhängigkeit von der Temperatur für die ^{18}F -Markierung von **MV 2**.
Markierungsbedingungen: 7 μmol **MV 2**, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$, 1 mL Lösungsmittel, 20 min.

Um nach erfolgter Markierung von **MV 2** den fertigen Radiotracer [^{18}F]**DZ 3** zu erhalten, musste, um die freie Säure zu generieren, abschließend noch der Methylester gespalten werden.

Anfängliche Versuche, direkt nach der Markierung in einer „one-pot“-Synthese zu entschütten, liefen mit 3,3M NaOH-Lösung zwar mit annähernd quantitativer Entschüttung ab, jedoch konnte nach erfolgter Entschüttung nicht über ein HPLC-System aufgereinigt werden. Dies lag daran, dass nach der Entschüttung und anschließendem Neutralisieren des pH-Werts mit 3,3M HCl der Precursor in der Reaktionslösung ausfiel. So wurde die Syntheseführung umgestellt, um zunächst zu markieren, anschließend das markierte Zwischenprodukt abzutrennen, dieses zu entschütten und nochmals mittels eines semipräparativen HPLC-Systems aufzureinigen. Dies kostet in der Radiosynthese wichtige Zeit (ca. 10-15 min), aber

führt zu einer wesentlich höheren radiochemischen Reinheit und einer praktikableren Syntheseführung.

Nunmehr erfolgte die Markierung des Markierungsvorläufers unter Verwendung höherer Aktivitätsmengen an Fluor-18 mit mehr als 90 % radiochemischer Ausbeute. Für die Abtrennung wurde die Markierungsreaktion mit 1 mL eines MeCN/H₂O-Gemisches (1:1), welches vorher leicht angewärmt wurde, gequench und anschließend in die HPLC injiziert. Wie in Abbildung 57 gezeigt, konnte das markierte Produkt mit einer Retentionszeit von 27 min isoliert werden.

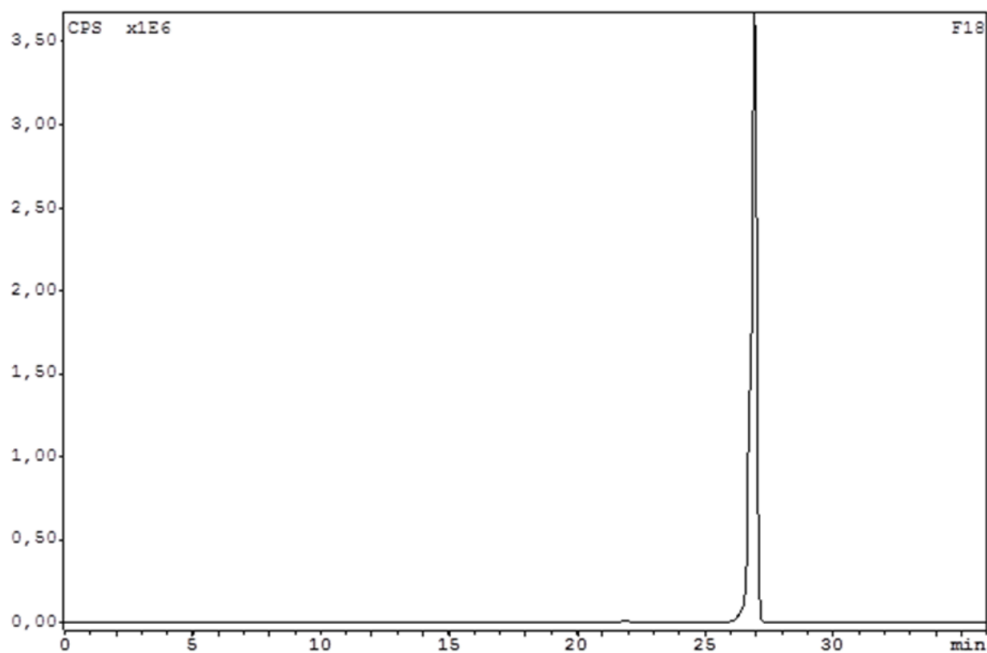


Abbildung 57: HPLC-Chromatogramm der semipräparativen Abtrennung des markierten Zwischenprodukts

Nach der Abtrennung wurde die gesammelte Fraktion mit dem doppelten Volumen an Wasser verdünnt und über eine C-18-Kartusche gegeben. Daraus konnte man anschließend das isolierte markierte Zwischenprodukt mit 0,5 mL MeCN eluieren und mit 250 μ L einer 3,3M NaOH-Lösung bei 60 °C für 15 min entschützen. Nach Neutralisieren mit 250 μ L 3,3M HCl und Verdünnen mit 1 mL MeCN/H₂O-Gemisch (1:1) wurde mit der, der Aufreinigung des Zwischenprodukts entsprechenden HPLC-Methode, abgetrennt und man erhielt das entschützte [¹⁸F]DZ 3 nach einer Retentionszeit von 20-23 min. Die erhaltene HPLC-Fraktion wurde, analog der oben

beschriebenen Methode, auf einer C-18-Kartusche fixiert und das Produkt mit Acetonitril eluiert. Um den Radioligand als injektionsfertige Lösung zu erhalten, wurde das Acetonitril im Vakuum entfernt und der Rückstand in 1 mL isotonischer NaCl-Lösung aufgenommen. Radio-DC der Markierungs und Entschützungsreaktion ergaben eine RCA an markiertem Zwischenprodukt von 93 % und eine Ausbeute an entschütztem Produkt von 86 %. Da nach einer kompletten Reaktionszeit von Zugabe von 400 MBq an Fluorid bis zur injektionsfertigen Formulierung des Tracers in NaCl von 217 min 39,7 MBq erhalten wurden, erhielt man zeitkorrigiert eine radiochemische Ausbeute von 39 % an **[¹⁸F]DZ 3**. Der in Abbildung 58 dargestellte Produkt-Peak der Entschützung lässt sich durch die Verwendung TFA-freier Lösungsmittel erklären, wodurch verschiedene Protonierungsstufen des Produkts **[¹⁸F]DZ 3** möglich sind.

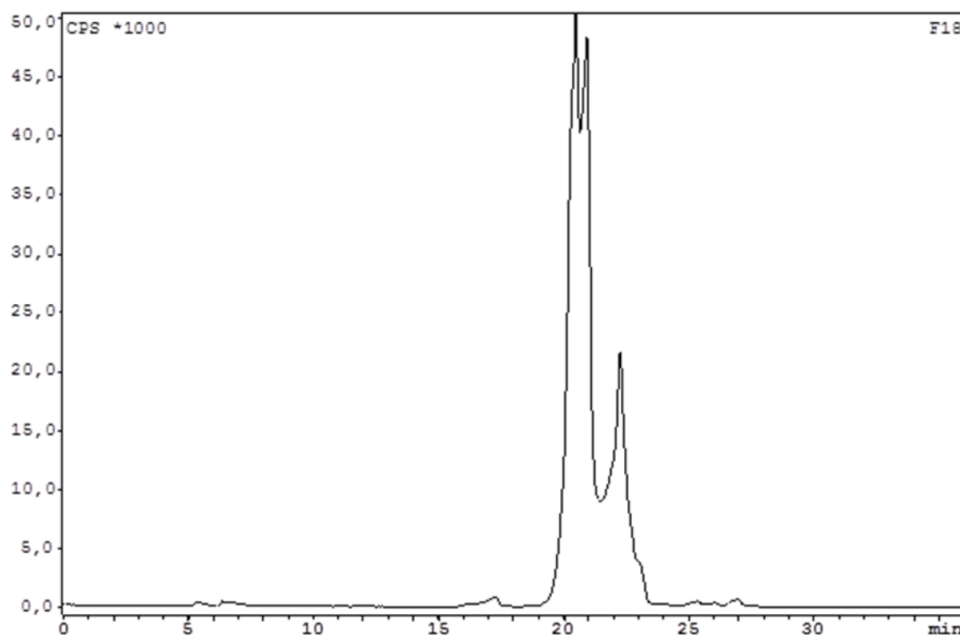


Abbildung 58: HPLC-Chromatogramm der semipräparativen Abtrennung des markierten und entschützten Produkts [¹⁸F]DZ 3

3.2.2 Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{DZ 2}$

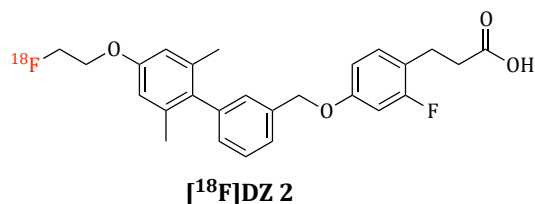


Abbildung 59: Struktur des Radioliganden $[^{18}\text{F}]\text{DZ 2}$

Für die Synthese der radioaktiven Form von $[^{18}\text{F}]\text{DZ 2}$ standen zwei Markierungsstrategien zur Auswahl. Zum einen die Markierung von **MV 3** mittels der prosthetischen Gruppe $[^{18}\text{F}]\text{Fluorethyltosylat}$ und zum anderen die direkte nukleophile Markierung von **MV 1** durch $^{18}\text{F}^-$. Zunächst soll hier die Markierung durch $[^{18}\text{F}]\text{Fluorethyltosylat}$ besprochen werden.

Für die Radiosynthese musste das Markierungssyntheton $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ dargestellt werden. Die Synthese wurde schon in früheren Publikationen beschrieben und ist sehr gut reproduzierbar. Deshalb kam hierfür ein vollautomatisiertes Synthesemodul zur Anwendung^[80]. Es ermöglicht eine enorme Vereinfachung der Radiosynthese und bringt gleichzeitig eine Reduktion der Strahlenbelastung mit sich. Das $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ wurde mittels einer n.c.a. nukleophilen Substitution von Ethylen-1,2-ditosylat mit $^{18}\text{F}^-$ in einer radiochemischen Ausbeute von 53 % nach 58 min erhalten.

Anschließend sollte die Synthese von $[^{18}\text{F}]\text{DZ 2}$ durch $[^{18}\text{F}]\text{Fluorethylierung}$ des Markierungsvorläufers **MV 3** mit dem zuvor dargestellten $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ erreicht werden. Hierfür wurden 6 μmol Vorläufer mit zwei Äquivalenten NaOH und dem $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ in 1 mL DMSO zur Reaktion gebracht. Die Reaktionskinetik bei 100, 110 und 120 °C wurde durch Entnahme von Aliquots bei 2, 5, 10, 15 und 20 min, welche mit Wasser gequench wurden, per Radio-DC (Hx/EtAc/Ameisensäure, 2:1:0,05) bestimmt. Wie in Abbildung 60 gezeigt, waren die Reaktionsausbeuten sowohl bei 110 als auch bei 120 °C sehr vielversprechend, jedoch wurde nach Co-Auftragung des kalten Standards ersichtlich, dass nicht das gewünschte Produkt vorlag. Als Ursache hierfür kann eine $[^{18}\text{F}]\text{Fluorethylierung}$ des Markierungsvorläufers, sowohl

an der phenolischen OH-Funktion, aber auch an der freien Säureeinheit angenommen werden. Letztere bedingt das unerwünschte ^{18}F -Markierungsprodukt.

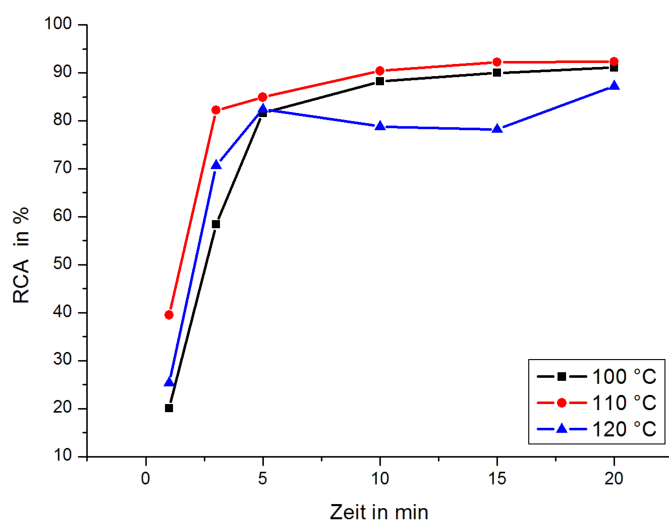


Abbildung 60: Radiochemische Ausbeute der Markierung von MV 3 mit ^{18}F]FETos bei verschiedenen Temperaturen

Um diese Vermutungen zu bestätigen müsste ein noch säuregeschütztes Derivat des Markierungsvorläufers mit ^{18}F]FETos umgesetzt werden, um dann die Ergebnisse zu vergleichen. Durch Schützung der Säure stände nur noch die phenolische OH-Funktion zur Deprotonierung durch NaOH zur Verfügung und könnte somit selektiv mit dem Markierungssyntheton umgesetzt werden. Da jedoch nach der zeitintensiven Herstellung von ^{18}F]FETos, der eigentlichen Markierungsreaktion noch die Entschützung der Säure als dritter Reaktionsschritt von Nöten wäre und gleichzeitig ein zweiter Vorläufer zur Darstellung von ^{18}F]DZ 2 zur Verfügung stand, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt und sich auf die Direktmarkierung des Vorläufers **MV 1** konzentriert.

Für die Markierung des Iodvorläufers **MV 1** wurde, auf den vielversprechenden Ergebnissen der Markierung von **MV 2** aufbauend, das Basensystem Kaliumcarbonat/Kryptofix2.2.2 in Acetonitril gewählt und die ersten Versuche zur Temperaturabhängigkeit der Markierungsreaktion durchgeführt. Diese in Abbildung 61 dargestellten Reaktionskinetiken wurden durch Entnahme von Aliquots nach 2, 5, 10, 15 und 20 min, Quenchen derselben mit Acetonitril/Wasser (1:1) und

anschließender Radio-DC (Hx/EtAc, 1:1) erhalten. Wie sich zeigte, verlief die Reaktion bei 90 °C mit einer radiochemischen Ausbeute von ca. 55 % nach 20 min am besten.

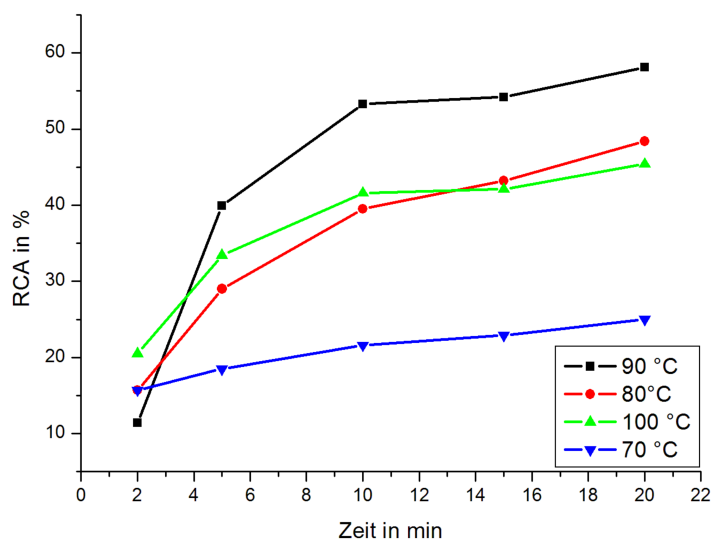


Abbildung 61: Temperaturscreening der ^{18}F -Markierung von MV 1. Markierungsbedingungen: 3 μmol MV 1, 1 mL Acetonitril, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}222$, 20 min.

Anschließend wurden die Einwaagen an Precursor untersucht (1,5, 3, 5 μmol), wobei sich die besten radiochemischen Ausbeuten von bis zu 70 % bei 90 °C Reaktionstemperatur nach 20 min mit 5 μmol ($n = 3$) Vorläufer erzielen ließen (s. Abbildung 62).

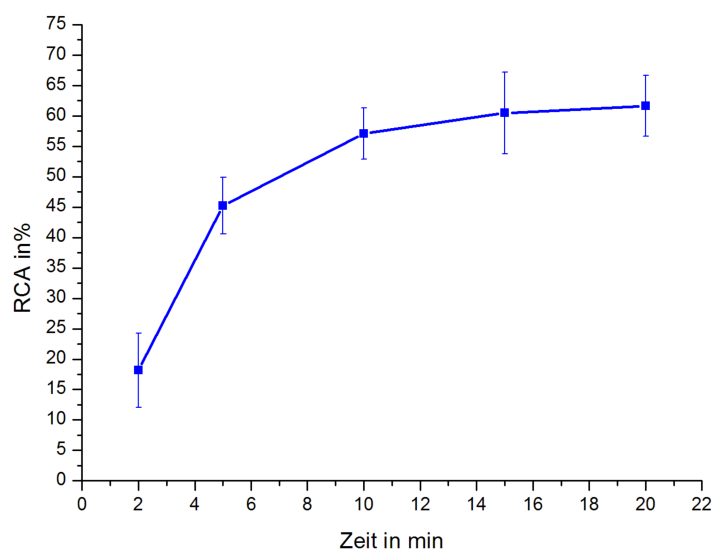


Abbildung 62: ^{18}F -Markierung von MV 1 ($n(\text{MV } 1) = 5 \mu\text{mol}$, $90 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$, MeCN)

Nach der erfolgreichen Markierung musste noch die Säurefunktion entschützt werden. Zunächst wurde das Lösungsmittel auf ca. 0,5 mL eingedampft und anschließend nach Zugabe von 250 μL 3,3M NaOH-Lösung die Entschützungsreaktion für 15 min bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion erfolgte die Neutralisierung der Reaktionslösung mit 250 μL 3,3M HCl, dann die Zugabe von 1 mL leicht angewärmten $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (1:1) und schließlich die Abtrennung des Produkts mittels semipräparativer HPLC. Die Auswertung des HPLC-Diagramms ergab eine RCA an entschütztem **[^{18}F]DZ 2** von 23,6 %. Anschließend wurde das Produkt, der Formulierung von **[^{18}F]DZ 3** entsprechend, über eine C-18-Kartusche gegeben, mit Acetonitril eluiert und in NaCl-Lösung aufgenommen. Zeitkorrektur mit einer kompletten Reaktionszeit von 223 min und 435 MBq an Fluorid zu Beginn, ergab mit 28,7 MBq an fertig formuliertem **[^{18}F]DZ 2** 26,9 % radiochemische Ausbeute. Abbildung 63 zeigt die Radio-DC (Hx/EtAc , 1:1) der Markierung (links) und der nachfolgenden Entschätzung (rechts). Das zunächst markierte Zwischenprodukt ist hier sehr schön mit einem $R_f = 0,82$ zu erkennen (RCA = 68 %) während nicht umgesetztes $^{18}\text{F}^-$ auf der Startlinie liegen bleibt. Nach der Entschätzung ist das Zwischenprodukt fast vollständig verschwunden und mit einem $R_f = 0,38$ der Spot des entschützten Produkts **[^{18}F]DZ 2** zu beobachten.

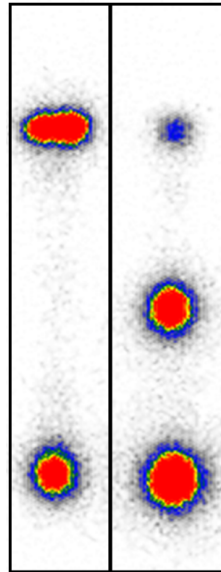


Abbildung 63: Radio-DC der ^{18}F -Markierung von MV 1 (links) und nachfolgende Entschützung zu $[^{18}\text{F}]\text{DZ 2}$ (rechts). Bedingungen: 5 μmol MV 1, 1 mL Acetonitril, 90 °C, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$, 20 min; Entschützung: 500 μL Acetonitril, 250 μL 3,3M NaOH-Lösung, 60 °C, 15 min.

3.2.3 ^{68}Ga -Radiomarkierung von Verbindung 46

Für die Markierung des Chelators **46** kamen zwei Ansätze zur Anwendung. Zum einen wurden 30 nmol Precursor **46** in Wasser und zum anderen 15 nmol **46** in Natriumacetat-Puffer radiomarkiert.

Der Elution des Generators mit 0,1 M HCl folgte das Kationen-Austauscher-basierte Post-Prozessing zur Abtrennung von Fremdmetallen. Bei der Markierung in Wasser wurde das ^{68}Ga durch das Kationenaustauscher-basierte Post-Prozessing nach Zhernosekov *et al.* aufgereinigt^[81]. Zur Entfernung aller störenden Fremdmetalle wurde der Austauscher zunächst mit 1 mL N1-Lösung (80 % Aceton/ 0,15M HCl) gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution des ^{68}Ga mit 400 μL N2-Lösung (97,6 % Aceton/0,05M HCl). Die Markierung wurde dann konventionell in 1 mL Wasser und 400 μL N2 mit einem pH = 3,8 bei 95 °C durchgeführt. Die Markierungskinetik wurde durch Entnahme von Aliquots nach 1, 3, 5, 10, 15 und 20 min aufgenommen und die radiochemischen Ausbeuten zum jeweiligen Zeitpunkt mittels Radio-DC (0,1M Citratpuffer pH = 4) bestimmt. Hier blieb der ^{68}Ga -

Produkt-Komplex mit einem $R_f = 0$ auf der Startlinie liegen, während das freie Gallium als ^{68}Ga -Citrat-Komplex mit der Laufmittelfront lief.

Bei der Markierung in Natriumacetat-Puffer erfolgte die Aufreinigung nach dem Ethanol-basierten Postprocessing von Eppard *et al.*^[82]. Zunächst wurde der Kationenaustauscher mit 1 mL N4-Lösung (80 % Ethanol/ 0,15M HCl) gewaschen und anschließend das Gallium mit 1 mL N5-Lösung (90 % Ethanol/ 0,9M HCl) eluiert. Die Markierungsreaktion wurde in 1 mL Natriumacetat-Puffer und 1 mL N5-Lösung bei pH = 4 und 95 °C durchgeführt. Die Reaktionskinetiken, wie in Abbildung 64 dargestellt, wurden nach dem bereits oben beschriebenen Verfahren aufgenommen.

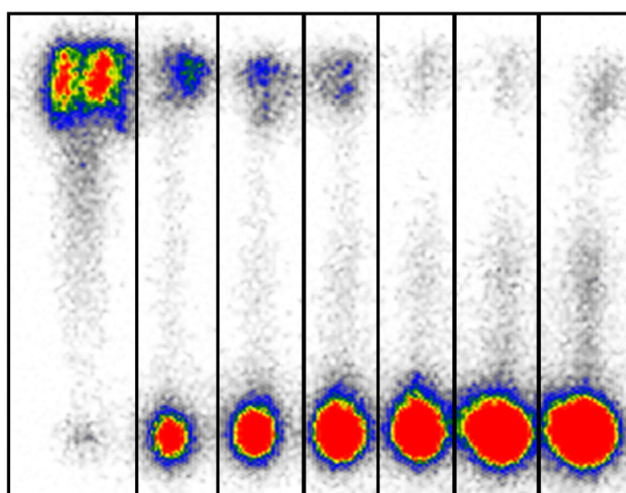


Abbildung 64: Radio-DC (0,1 M Citrat-Puffer) der Reaktionskinetik der ^{68}Ga -Markierung von 46 in Natriumacetat-Puffer: freies Gallium, 1, 3, 5, 10, 15, 20 min

Die in Abbildung 65 aufgetragenen Kinetiken zeigen klar eine wesentlich höhere Ausbeute an radioaktiv markiertem Produkt im Fall der Markierung in Natriumacetat-Puffer, verglichen mit den Ergebnissen der Markierung in Wasser. So erhielt man bereits nach 10 min Reaktionszeit beinahe quantitative radiochemische Ausbeuten, während man bei der Markierung in Wasser maximal 80 % und dies nach einer Reaktionszeit von 20 min erreichte. Aufgrund der extrem vielversprechenden Markierungsergebnisse in der Puffer-Lösung wurde nach der Markierung über eine C-18-Kartusche das restliche freie Gallium-68 abgetrennt und man erhielt den Radiotracer in 0,5 mL Ethanol.

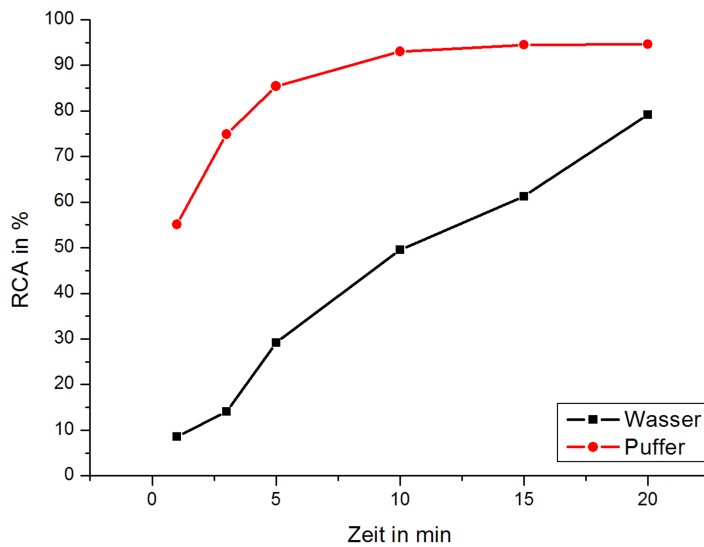


Abbildung 65: ^{68}Ga -Markierung von Verbindung 46 in Wasser (30 nmol) und Natriumacetat-Puffer (15 nmol)

Abbildung 66 zeigt die DC der nebeneinander aufgetragenen Waschlösung bestehend aus freiem Gallium und etwas markiertem Produkt (links), und auf der anderen Seite das Ethanol-Eluat, welches nur noch den Großteil des markierten Produkts enthält (rechts).

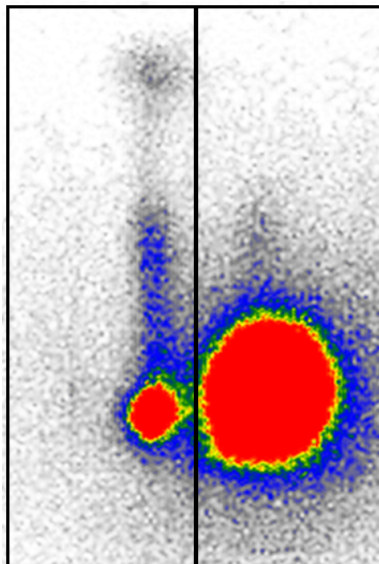


Abbildung 66: Radio-DC nach Aufreinigung des markierten Chelators über eine C-18-Kartusche: Waschlösung (links), Eluat (rechts)

Da es vor *in vivo*-Evaluierungen nötig ist, die Stabilität der radiomarkierten Verbindung in den relevanten Medien zu testen, um eine sichere Anwendung

garantieren zu können wurden mit diesem Eluat anschließend die Stabilitäten des Radiotracers in zwei unterschiedlichen Medien bestimmt. Untersucht wurden humanes Serum und 0,9%ige NaCl-Lösung. Da das Radiopharmakon intravenös appliziert wird, kommt es in Kontakt mit Blut und den darin enthaltenen Plasmaproteinen, hier insbesondere Transferrin und somit sollte sichergestellt sein, dass es zu keinerlei großen Stabilitätsverlusten des Komplexes kommt. Physiologische NaCl-Lösung hingegen wird zur Formulierung des Komplexes nach erfolgter Radiosynthese benutzt und sollte somit auch nicht zur Destabilisierung führen. Untersucht wurden jeweils 500 µL Serum oder NaCl mit 50 µL Ethanoleluat nach Kartuschen-Abtrennung. Es wurden nach 15, 30, 45, 60 und 120 min 5 µL Aliquote gezogen und anschließend das Verhältnis von noch stabilem Radiokomplex zu freiem Gallium mittels Radio-DC bestimmt (0,1M Citrat-Puffer). Wie in Abbildung 67 zu erkennen ist, blieb der Komplex in NaCl mit über 95 % beständig und es konnte fast kein Verlust an radiochemischer Ausbeute (RCA) festgestellt werden. In humanem Serum war hingegen nach 45 Minuten ein Abfall auf ca. 90 % stabilen Komplex zu beobachten, was sich aber im Verlauf der nächsten 75 min nicht mehr dramatisch verschlechterte. Damit war geklärt, dass in beiden Medien kein eklatantes Absinken der Stabilitäten zu beobachten ist.

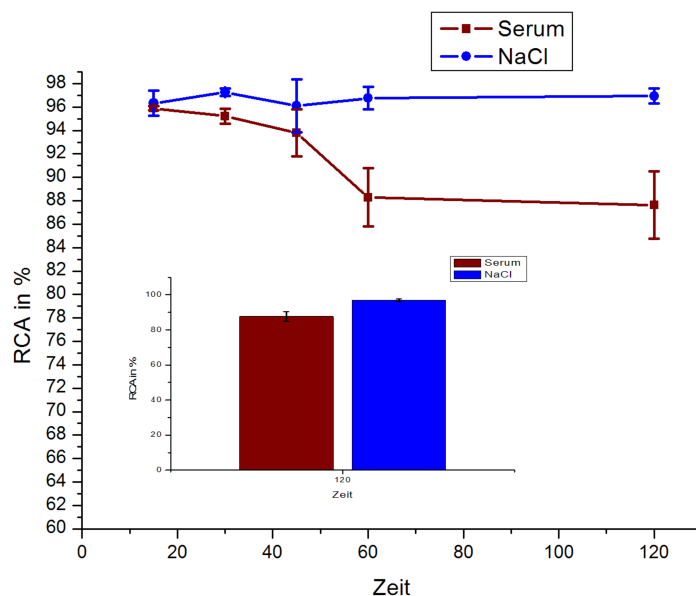


Abbildung 67: Stabilitäten der mit ⁶⁸Ga-markierten Verbindung 46 in humanem Serum (rot-braun) und 0,9 %iger NaCl-Lösung (blau)

3.3 Zelltests

Um das Verhalten der kalten Referenzverbindungen *in vitro* zu untersuchen, wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Weber in der Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg - Universität in Mainz verschiedenen Zelltests an FFAR1-tragenden Zellen durchgeführt. Diese sollen im Folgenden besprochen werden.

3.3.1 Rezeptorstatus von Rin-M und Min-6 Zellen

Zunächst sollten die zwei insulinproduzierenden Zelllinien MIN-6 und RIN-M auf ihre Rezeptorverfügbarkeit an FFAR1 untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen mit einem FFAR 1 spezifischen Antikörper (GPR40 antibody [EP4632]) der Firma Gene Tex inkubiert. Anschließend sollten die rezeptorpositiven Zellen mittels eines weiteren fluoreszierenden, gegen den FFAR 1-Antikörper gerichteten Antikörper fluoreszenz-markiert und mittels eines FACS-Gerätes (fluorescence-activated cell sorting) ausgezählt werden. Da der FFAR1-Antikörper ein monoklonaler Hasen-Antikörper war, konnte als geeigneter fluoreszierender Antikörper das Produkt der Firma abcam (Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) preadsorbed) verwendet werden. Dieser gegen den Hasen-AK gerichtete Antikörper war mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor® 488 markiert und ermöglichte somit die Markierung FFAR1-tragender Zellen. Hierbei zeigte sich, dass 19,9 % aller gemessenen RIN-M Zellen und 7,7 % der MIN-6 Zellen den Rezeptor exprimierten.

3.3.2 Vitalitätstests

Um den Einfluss der Liganden auf die Vitalität von FFAR-1 tragenden Langerhans'sche Inseln (LHI) zu untersuchen, wurden in einem Vitalitätsassay frisch aus Ratten isolierte LHI's mit jeweils 1 µmol der Referenzverbindungen DZ 1, DZ 2 und DZ 3 für 24 h inkubiert. Anschließend wurden sie mit NaCl-Lösung gewaschen und mit einer Fluoreszenzlösung angefärbt. Auswertung der angefärbten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte, dass bei allen drei Liganden noch 90 % oder mehr Prozent aller Zellen vital/lebendig waren. Somit wurde

sichergestellt, dass die Liganden für weitere Versuche keine toxische Wirkung auf Langerhans'sche Inseln besitzen. Abbildung 68 zeigt die einzelnen Vitalitäten der Inselzellen mit einem dazugehörigem Fluoreszenzmikroskopbild.

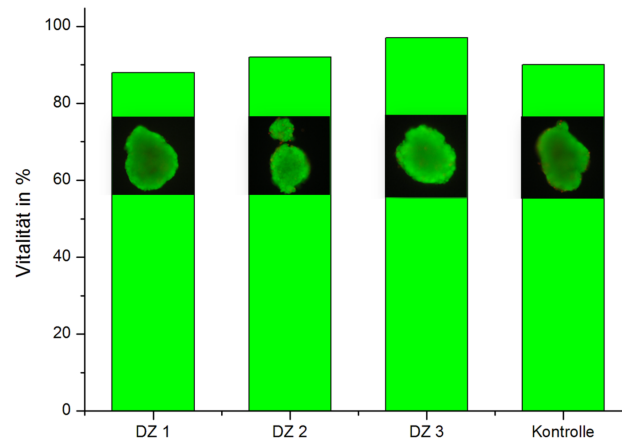


Abbildung 68: Vitalitäten von Langerhans'schen Inseln nach Inkubation für 24 h mit DZ 1, DZ 2 und DZ 3, sowie eine Kontrolle ohne Ligand

3.3.3 Fluoreszenzfärbungen von RIN-M Zellen mit Verbindung 43

Mit dem Fluoreszenz-markiertem Liganden **43** sollten an frisch isolierten Langerhans'schen Inseln erste Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskopie Aufnahmen erstellt werden um die spezifische Aufnahme des Farbstoffes durch die Zellen zu zeigen. Hierfür wurden die Inseln mit 1 μmol des Farbstoffs für 24 h inkubiert, mit NaCl-Lösung gewaschen und anschließend unter dem Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskop ausgelesen. Die erhaltenen Bilder, wovon ein Image in Abbildung 69 gezeigt ist, ließen die Vermutung zu, dass eine spezifische Aufnahme des fluoreszenz-markierten Liganden **43 über den FFAR1** stattfand. Dies sollte in weiteren Vergleichstests bestätigt werden.

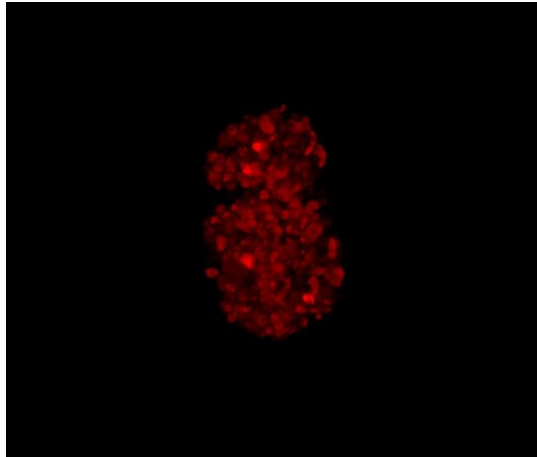


Abbildung 69: LSM-Aufnahme von für 24 h mit Verb. 43 inkubierten Langerhans'schen Inseln

Für diese Vergleichstests wurden die in den Rezeptorstatus-Studien als FFAR1-tragenden Zellen identifizierten RIN-M Zellen verwendet. Es wurden jeweils 100.000 Zellen mit 1 μ mol an Verbindung **43** und zur Bestätigung der spezifischen Aufnahme mit ebenfalls 1 μ mol purem Rhodamin B für 15, 30, 60 und 120 min inkubiert, anschließend mit NaCl-Lösung nicht aufgenommenen Farbstoff ausgewaschen und die Proben mit einem Fluorometer (Glomax) bei 525 nm ausgemessen. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse dargestellt in Abbildung 70 entsprachen den Erwartungen der ersten LSM-Aufnahmen an Inselzellen, da nach 15, 30 und 60 min Inkubationszeit eine 1 $\frac{1}{2}$ mal so hohe Intensität und nach 120 min sogar eine etwa 3mal so hohe Fluoreszenzintensität an den mit Verbindung **43** inkubierten Zellen in Vergleich zu den mit Rhodamin B und den zur Kontrolle nicht angefärbten Zellen zu detektieren war. Da die Fluoreszenzintensität der Kontrollzellen sich nur minimal von denen der mit Rhodamin B inkubierten Zellen unterschied deuten die Ergebnisse auf eine spezifische Anfärbung der mit Verbindung **43** inkubierten Zellen hin.

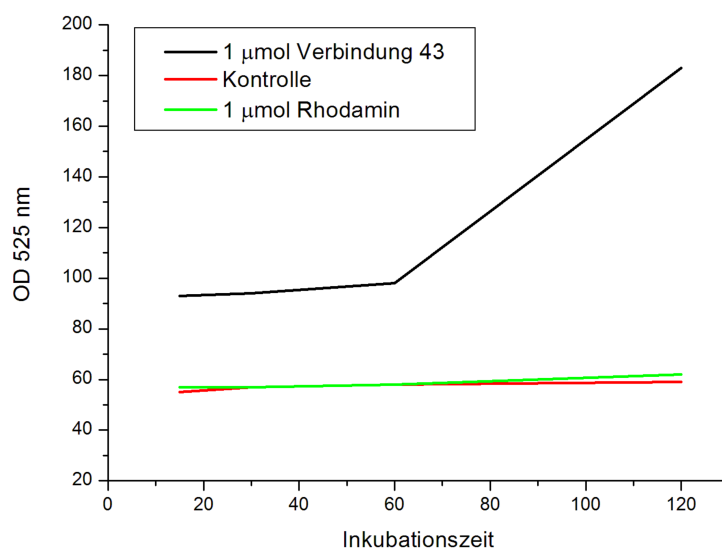


Abbildung 70: Fluoreszenzintensitäten von mit Verbindung 43 (schwarz) und Rhodamin B (grün) inkubierten sowie zur Kontrolle farbstofffreien (rot) Rin-M Zellen

Anschließend nach 120 min Inkubationszeit von mit Verbindung **43** und Rhodamin B inkubierten Zellen aufgenommene LSM-Bilder widersprechen dieser Vermutung jedoch, da unter dem Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskop deutlich eine Anfärbung der Zellen mit beiden Stoffe erkennbar war (s. Abbildung 71). Die visuelle Auswertung der LSM-Bilder ist, im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem Fluorometer, jedoch nicht quantitativ.

Für eine genauere Einschätzung dieser Ergebnisse müssten in nachfolgenden Studien Verdrängungsversuche des Farbstoffes **43** mit natürlichen Liganden des FFAR1 wie z.B. der Linolsäure durchgeführt werden. Damit könnte gezeigt werden, dass zwar eventuell ein Teil des Farbstoffes unspezifisch durch den Rhodamin-Rest aufgenommen wird, der andere Teil jedoch aufgrund des durch die Linolsäure geblockten Rezeptors nicht mehr gebunden wird und somit eine schwächere Anfärbung der Zellen stattfindet.

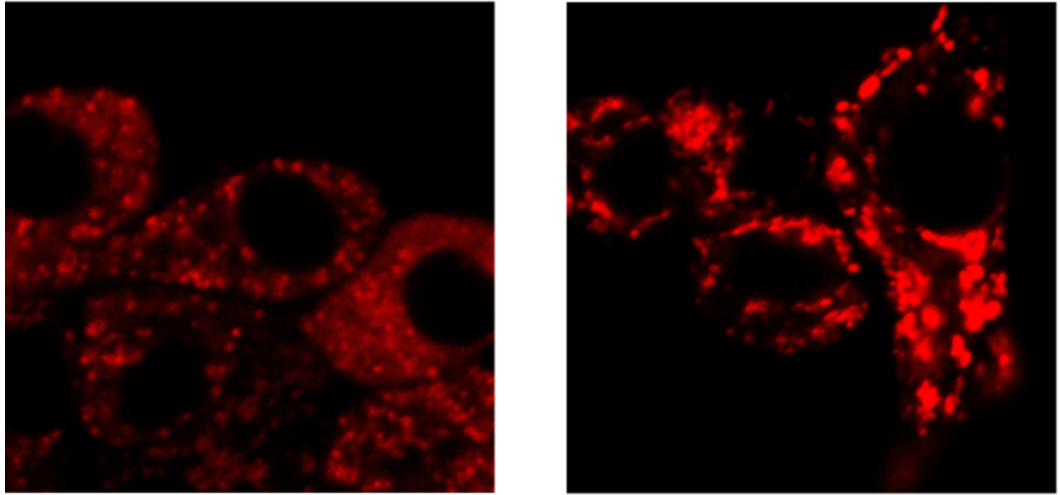


Abbildung 71: LSM-Aufnahmen von für 120 min mit Verbindung 43 (links) und Rhodamin B (rechts) inkubierten RIN-M Zellen

4. Zusammenfassung und Ausblick

Der FFAR1 stellt aufgrund seiner hohen Expressionsrate auf den β -Zellen des Pankreas und im Gehirn aber eines äußerst limitierten Vorkommens im restlichen Körper ein interessantes Target zur Visualisierung der β -Zellmasse mittels PET dar. Da bis zum heutigen Zeitpunkt keine geeigneten Liganden für diesen Rezeptor für die Bildgebung zur Verfügung stehen wurden im Rahmen dieser Arbeit drei vielversprechende fluorierte Derivate synthetisiert.

In Anlehnung an die Synthesevorschrift von Sasaki *et al.* wurde zunächst die von dieser Arbeitsgruppe bereits als Agonist des FFAR 1 mit einem EC_{50} von 5,7 nM publizierte 3-(4-((2',6'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propionsäure (**DZ 1**) dargestellt^[1]. Des Weiteren wurden zwei an der Biphenyl 4'-Position funktionalisierte kalte Referenzverbindungen synthetisiert, wovon die eine (**DZ 2**) eine Fluorethyl und die andere (**DZ 3**) eine Triethylenglykol-Einheit mit endständiger Fluor-Gruppe trug. Die zwei zuletzt genannten Verbindungen basieren auf einer von Mikami *et al.* publizierten Agonist-Struktur, unterscheiden sich aber im Tragen einer Ether- anstatt Amin-Brücke zwischen Biphenyl- und Propionsäure-Einheit und in der Funktionalisierung an der Biphenyl-Einheit. ^[71].

Um die radioaktiv markierten Pendante zu synthetisieren sollte zur radioaktiven Markierung von **DZ 1** ein entsprechendes Diaryliodoniumsalz hergestellt werden. Dies scheiterte jedoch aus den in angegeben Gründen. Jedoch wurden bereits erste Verbindungen eines neuen vielversprechenden Synthesewegs mit dem gewünschten Iodoniumsalz als Endprodukt dargestellt. Eine Weiterverfolgung der in 3.1.2 beschriebenen Synthesestrategie sollte zur erfolgreichen Darstellung des Markierungsvorläufers führen. Für die Markierung von **DZ 2** wurden einerseits der Markierungsvorläufer **MV 3** welcher die radioaktive Fluorierung mittels der prosthetischen Gruppe [¹⁸F]FETos ermöglicht und andererseits der Vorläufer **MV 1** hergestellt. Durch Letzteren ist die Möglichkeit der direkten nukleophilen ¹⁸F-Fluorierung gegeben. Zur Markierung von **DZ 3** wurde ein mit einer Tosyl-Gruppe versehener Markierungsvorläufer **MV 2** synthetisiert, durch den ebenfalls die direkte nukleophile Fluorierung ermöglicht wird. Neben den zur Fluor-18

Markierung geeigneten Vorläufern wurde ein zur Gallium-68 verwendbarer Vorläufer (Verbindung **46**) synthetisiert. Hierfür wurde ein kommerziell erworbenes DOTA-Derivat mittels einer Amid-Brücke an den Liganden gekoppelt. Über einen ähnlichen Syntheseweg wurde der Fluoreszenz-Farbstoff Rhodamin B an den Liganden gekoppelt. Mit der fertigen Verbindung **43** sollte die Visualisierung FFAR-1 tragender Zellen mittels Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskopie möglich sein.

Anschließend wurden die radioaktiven Markierungen der Vorläufer **MV 1-3** mittels Fluor-18 und des Chelators **46** mit Gallium-68 evaluiert.

Für die Darstellung der radioaktiven Verbindung [**¹⁸F**]DZ **3** wurden zunächst die geeigneten Reaktionsparameter für die n.c.a. nukleophile ¹⁸F-Fluorierung des Markierungsvorläufers **MV 2** optimiert. Durch Verwendung von 7 µmol in 1 mL Acetonitril, unter Einsatz des Kaliumcarbonat/Kryptofix2.2.2-Systems und einer Reaktionstemperatur von 100 °C konnten exzellente radiochemische Ausbeuten von bis zu 90 % an markiertem Produkt erhalten werden. Nach semipräparativer Abtrennung des radioaktiven Zwischenproduktes gelang die Entschützung der Säurekomponente mittels 3,3M NaOH-Lösung und man erhielt [**¹⁸F**]DZ **3** als injektionsfertigen Radiotracer in isotonischer NaCl-Lösung mit einer hervorragenden radiochemischen Ausbeute von 39 %.

Die ¹⁸F-Fluorethylierung von **MV 3** mit [**¹⁸F**]FETos lieferte zwar zunächst vielversprechende Ergebnisse, jedoch konnte das Markierungsprodukt als das an der freien Säure ¹⁸F-fluorethylertes Produkt identifiziert werden. Aufgrund der einfacheren Synthesestrategie bei der direkten ¹⁸F-Fluorierung von **MV 1** wurde die ¹⁸F-Fluorethylierung nicht weiterverfolgt und sich auf die Markierung von **MV 1** konzentriert. Hier konnte mit denen der Markierung von **MV 2** ähnlichen Bedingungen, ohne semipräparative HPLC-Abtrennung des Zwischenproduktes der fertig formulierte Radiotracer [**¹⁸F**]DZ **2** mit einer guten radiochemischen Ausbeute von 26,9 % erhalten werden.

Für die Markierung von Verbindung **46** mit Gallium-68 wurden 15 nm Vorläufer verwendet und man erhielt nach 20 min bei einer Reaktionstemperatur von 95 °C eine maximale Ausbeute von 95 %. Nach Aufreinigung des markierten Liganden

über eine Kartusche wurden erste Stabilitätsstudien in humanem Serum und isotonischer NaCl-Lösung durchgeführt, wobei sich zeigte, dass der Tracer in beiden Medien über einen Zeitraum von 120 min mit über 90 % stabil blieb. Die hergestellten Radioliganden müssten nun sowohl in *in vitro* Studien an FFAR1 tragenden Zellen als auch in *in vivo* PET und *ex vivo* Biodistributions-Studien auf ihre Spezifität hin und ihre damit verbundene Eignung zur Bildgebung untersucht werden. Auch hinsichtlich der Stabilität der ^{18}F -fluorierten Radiotracer sind weitere Tests notwendig.

In ersten Untersuchungen an insulinproduzierenden Zelllinien wurde gezeigt, dass für weitere Zellstudien die Verwendung von RIN-M Zellen von Vorteil wäre, da diese in Vergleich zu MIN-6 Zellen einen deutlich höheren Anteil an FFAR1 tragen. Des Weiteren wurden die Referenzverbindungen **DZ 1-3** auf ihre Toxizität in Bezug auf Langerhans'sche Inseln untersucht und sichergestellt dass die synthetisierten Liganden keine unerwünschten toxischen Nebeneffekte besitzen. Erste LSM-Aufnahmen mit Verbindung **43** an Langerhans'schen Inseln zeigten vielversprechende Ergebnisse, jedoch wurden diese in weiterführenden Untersuchungen an RIN-M-Zellen mit dem Farbstoff **43** und purem Rhodamin noch nicht bestätigt. Um die Spezifität des Farbstoffs zu zeigen, müssten weiterführende Tests an Zellen mit einem natürlichem oder synthetischem Liganden des FFAR1 als Verdrängungssubstanz durchgeführt werden. Außerdem besteht die Möglichkeit anstatt Rhodamin Fluoreszin als Fluoreszenzfarbstoff an den Liganden zu koppeln und somit eventuell die unspezifische Färbung der Zellen durch Rhodamin B zu umgehen.

5. Experimentalteil

5.1 *Verwendete Geräte und Chemikalien*

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

Messungen der ^1H -Spektren erfolgten an einem Bruker 300, Ultrashield TM sowie an einem Bruker 300 Advance III HD (Bruker, Billerica). Chemische Verschiebungen sind im Vergleich zu Tetramethylsilan ($\delta = 0$) als Standard angegeben und wurden auf den jeweiligen Lösungsmittelpeak normiert. Die Spektrenauswertung wurde mittels MestReNova 7 und Mest-Rec 2.3 durchgeführt.

ESI-Massenspektren wurden mit einer QTOF Ultima 3-Micromass (Waters) bestimmt. Zusätzlich erfolgten Messungen an einer 6130 Quadropole LC/MS in Kombination mit 1220 Infinity LC (Agilent Technologies). FD-Massenspektren wurden mit einem MAT95-Spektrometer (Finnigan) aufgenommen.

Zur Reaktionskontrolle wurden DC-Fertigfolien der Firma Merck, Darmstadt, Kieselgel 60, F254 mit der angegebenen Laufmittelzusammensetzung (v/v) verwendet. Die Detektion inaktiver Substanzen fand unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) statt. Bei radioaktiven Verbindungen wurde ein Instant Imager (Canberra Packard) benutzt. Säulenchromatographische Trennungen erfolgten unter Normaldruck. Kieselgel 60 der Partikelgröße 0,04 - 0,063 mm von Merck und VWR wurde als stationäre Phase eingesetzt.

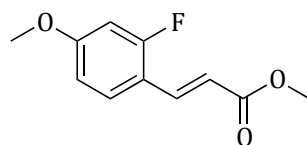
HPLC-Chromatographische Trennungen der markierten Verbindungen erfolgte unter Verwendung eines HPLC-Systems der Firma Dionex, Pumpe P680, Hochdruckinjektionsventil S 9010 mit einem UV Detektor UVD170U und einem Aktivitätsdetektor Gabi Star 11/02 der Firma Raytest mit den entsprechend beschriebenen Säulen und Laufmittelsystemen. Die Detektion der verschiedenen Substanzen erfolgte UV-spektroskopisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Die Aktivitäten wurden mit einem Isomed 2000-Aktimeter (MED Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH) ermittelt.

5.2 Organische Synthesen

5.2.1 Synthese von 3-(4-((2',6'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorophenyl)propionsäure (DZ 1)

- (E)-Methyl 3-(2-fluor-4-methoxyphenyl)acrylat (1)



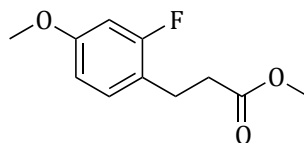
Zu einer eisgekühlten Lösung von 4,225 g (21,05 mmol) Methyl-diethylphosphonacetat in 25 mL THF wurden 0,77 g (19,25 mmol) NaH (60 % auf Mineralöl) gegeben und die entstandene Suspension für 30 min gerührt. Anschließend wurden tropfenweise 2,5 g (16,02 mmol) 2-Fluor-4-methoxybenzaldehyd in 20 ml THF zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde für 2 h bei RT gerührt und anschließend mit 40 mL Wasser gequencht. Die Mischung wurde mit Ethylacetat extrahiert und die erhaltene organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration und Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde säulenchromatographisch (Hx:EtAc, 4:1) aufgereinigt und man erhielt 2,75 g (13,1 mmol, 81 %) (E)-Methyl 3-(2-fluor-4-methoxyphenyl)acrylat als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.80 (d, 1H), 7.47 (t, 1H), 6.7597 (dd, 1H), 6.68 (dd, 1H), 6.46 (d, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.82(s, 3H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 212,3

R_f: 0,45 (Hx:EtAc, 4:1):

- **Methyl 3-(2-fluor-4-methoxyphenyl)propanoat (2)**



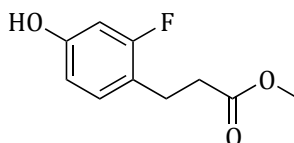
Eine Mischung aus 2,75 g (13,1 mmol) (E)-Methyl 3-(2-fluor-4-methoxyphenyl)acrylat und 150 mg (0,79 mmol) Platin(IV)-oxid wurde in 25 mL THF und 2,5 mL Ethanol gelöst und unter H₂-Atmosphäre bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hx:EtAc, 4:1) erhielt man 2,17 g (78 %, 10,22 mmol) Methyl 3-(2-fluor-4-methoxyphenyl)propanoat als farbloses Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.12 (t, 1H), 6.63 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.93 (t, 2H), 2.62 (t, 2H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 210,2

R_f: 0,51 (Hx:EtAc, 4:1):

- **Methyl 3-(2-fluor-4-hydroxyphenyl)propanoat (3)**



Zu einer Lösung aus 365 mg (1,72 mmol) Methyl 3-(2-fluor-4-methoxyphenyl)propanoat und 642 mg (4,82 mmol) Aluminium(III)-chlorid in 2,5 mL Dichlormethan wurden 472 mg (3,23 mmol, 556 µL) Octanthiol tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung auf Eiswasser gegossen und für weitere 30 min gerührt. Nach Extrahieren mit DCM und Waschen der organischen Phase mit ges. NaCl-Lösung wurde diese über Magnesiumsulfat getrocknet

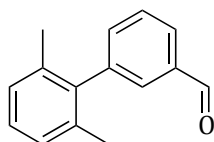
und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 3:1) ergab 312 mg (94 %, 1,62 mmol) Methyl 3-(2-fluor-4-hydroxyphenyl)propanoat als farblosen kristallinen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.05 (t, 1H), 6.54 (m, 2H), 5.59 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.92 (t, 2H), 2.63 (t, 2H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 198,4

R_f: 0,31 (Hx:EtAc, 3:1):

- **2',6'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-carbaldehyd (4)**



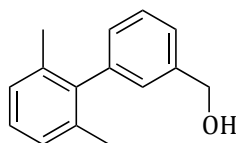
Zu 9,25 g (5 mmol) 3-Brom-benzaldehyd in 10 mL 1M Na_2CO_3 -Lösung, 5 mL Ethanol und 10 mL Toluol wurden 1,05 g (7 mmol) (2,6-Dimethyl)borsäure zugegeben und unter Argonatmosphäre für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 300 mg (0,25 mmol) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) zugegeben und für 20 h bei 80 °C gerührt. Nach Quenchen mit Wasser, wurde mit EtAc extrahiert und die organische Phase mit NaCl-Lösung gewaschen. Die Lösung wurde über MgSO_4 getrocknet und die Lösemittel im Vakuum entfernt. Anschließende säulenchromatographische Aufreinigung (Hx: EtAc, 2:5) ergaben 0,95 g (91 %, 4,52 mmol) 2',6'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methanol als leicht gelbliches Öl.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 10,04 (s, 1H, CHO), 7.87-7,85 (dt, 1H, H-Ar), 7.67 (t, 1H, H-Ar), 7.59 (t, 1H, H-Ar), 7.44-7.41 (dt, 1H, H-Ar), 7.16-7.12 (m, 2H, H-Ar), 2.01 (s, 6H, - CH_3)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 210,5

R_f: 0,61 (Hx:EtAc, 2:5)

- **(2',6'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methanol (5)**



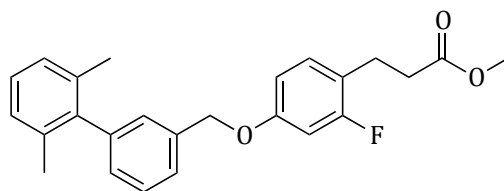
600 mg (2,81 mmol) 2',6'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-carbaldehyd wurden in 4 mL THF und 4 mL Diethylether gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 90 mg (2,4 mmol) Natriumborhydrid zugegeben und für weitere 3 h bei 0 °C gerührt. Nach Quenchen der Reaktion mit 1M HCl wurde mit ETAc extrahiert und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum und säulenchromatographischer Aufreinigung (Hx:EtAc, 3:1), erhielt man 330 mg (56 %, 1,57 mmol) (2',6'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methanol als farbloses zähes Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.44-7.35 (m, 2H, *H*-Ar), 7.18-7.06 (m, 5H, *H*-Ar), 4.72 (s, 2H, -CH₂O), 2.01 (s, 6H, -CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 212,5

R_f: 0,46 (Hx:EtAc, 3:1)

- **Methyl 3-(4-((2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorophenyl) propanoat (6)**



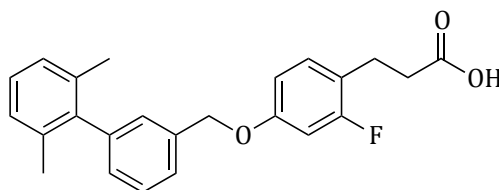
Zu einer Lösung von 100 mg (0,47 mmol) (2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methanol und 87,5 mg (0,45 mmol) Methyl 3-(2-fluoro-4-hydroxyphenyl)propanoat und 167,5 mg (0,73 mmol) Tributylphosphin in 7 mL THF unter Argon wurden bei 0 °C 184 mg (0,73 mmol) 1,1'(Azodicarbonyl)dipiperidin) portionsweise zugegeben und die Reaktionslösung für 24 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Hexan wurden die unlöslichen Stoffe abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 3:1) ergab 133 mg (76 %, 0,33 mmol) Methyl 3-(4-((2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorophenyl) propanoat als farbloses Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.50-7.40 (m, 2H, *H*-Ar), 7.22-7.11 (m, 6H, *H*-Ar), 6.73-6.66 (m, 2H, *H*-Ar), 5.10 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 3.69 (s, 3H, O-CH₃), 2.93 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.62 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.04 (s, 6H, -CH₃)

MS (FD) *m/z* (% rel Int.): 392,4

R_f: 0.65 (Hx:EtAc, 3:1)

- **3-(4-((2',6'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propionsäure (DZ 1)**



Ansatz 1: 100 mg (0,26 mmol) Methyl 3-(4-((2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propanoat wurden in einer Mischung aus 2,5 mL THF, 1,6 mL MeOH und 1,6 mL Wasser gelöst. Anschließend wurden 19,2 mg (0,8 mmol) Lithiumhydroxid hinzugegeben und für 3 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit Wasser gequench und mit 1M HCl leicht sauer gestellt. Die Lösung wurde mit EtAc extrahiert, die vereinigten organischen Fraktionen über MgSO₄ getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Man erhielt 84,7 mg (88 %, 0,22 mmol) 3-(4-((2',6'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propionsäure als farblosen kristallinen Feststoff.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.50-7.40 (m, 2H, *H*-Ar), 7.21-7.11 (m, 6H, *H*-Ar), 6.73-6.68 (m, 2H, *H*-Ar), 5.10 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 2.93 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.67 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.03 (s, 6H, -CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 378,5

Ansatz 2: In einer Mischung aus 9,86 mL THF und 5,2 mL MeOH wurden 250 mg (0,637 mmol) Methyl 3-(4-((2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propanoat gelöst und anschließend 1,48 mL 1M NaOH-Lösung zugegeben. Nach Rühren über 24 h bei RT wurde der pH-Wert der Reaktionslösung mit 1M HCl auf pH = 3 eingestellt und mit EtAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Durch säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 1:1) erhielt man 144 mg (59 %, 0,38 mmol) 3-(4-

((2',6'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propionsäure
als farblosen kristallinen Feststoff.

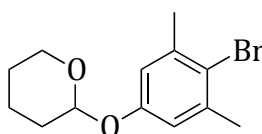
$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.50-7.40 (m, 2H, *H-Ar*), 7.21-7.11 (m, 6H, *H-Ar*), 6.73-6.68 (m, 2H, *H-Ar*), 5.10 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$), 2.93 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.67 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.03 (s, 6H, $-\text{CH}_3$)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 378,5

R_f: 0,94 (Hx:EtAc, 1:1)

5.2.2 Synthese von Methyl 3-(2-fluor-4-((4'-hydroxy-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat (11)

- 2-(4-Brom-3,5-dimethylphenoxy)tetrahydro-2H-pyran (7)



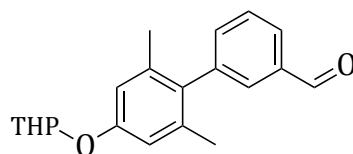
5,25 g (26,1 mmol) 4-Brom-3,5dimethylphenol und 4,415 g (52,5 mmol) 3,4-Dihydro-2H-pyran wurden in 80 mL Dichlormethan gelöst und nach 30 min Rühren bei RT 1,32 g (5,25 mmol) Pyridinium-p-toluensulfonat dazugegeben. Nach weiteren 90 h Rühren bei RT wurde die Reaktion beendet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 4:1) ergaben 6,16 g (0,022 mmol, 83 %) 2-(4-Brom-3,5-dimethylphenoxy)tetrahydro-2H-pyran als farblose viskose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 6.83 (s, 2H, *H-Ar*), 5.40 (t, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH-O}$), 3.94-3.61 (m, 2H, O- CH_2), 2.37 (s, 6H, $-\text{CH}_3$), 2.07-1.60 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$),

MS (FD) m/z (% rel Int.): 285,4

R_f: 0,73 (Hx:EtAc, 4:1)

- **2',6'-Dimethyl-4'-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-3-carbaldehyd (8)**



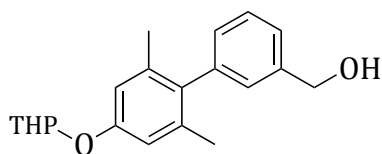
Zu 1 g (3,5 mmol) 2-(4-Brom-3,5-dimethylphenoxy)tetrahydro-2H-pyran und 0,526 g (3,51 mmol) 3-Formylphenyl-boronsäure in einer Mischung aus 10,3 mL 1M Na₂CO₃-Lösung, 10,3 mL Toluol und 3,2 mL Ethanol unter Argon wurden 202 mg (0,175 mmol) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) gegeben und für 24 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen wurde die kolloidale Lösung über Celite filtriert und der Rückstand mehrmals mit Toluol gewaschen. Das Filtrat wurde mit NaCl-Lösung ausgeschüttelt und die organische Phase mit MgSO₄ getrocknet. Nach entfernen der Lösemittel im Vakuum erhielt man durch säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 9:2) 750 mg (70 %, 2,42 mmol) an 2',6'-dimethyl-4'-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-3-carbaldehyd als farblose sehr viskose Flüssigkeit.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 10.07 (s, 1H, -CHO), 7.90-7.86 (dd, 1H, H-Ar), 7.68 (t, 1H, H-Ar), 7.61(t, 1H, H-Ar), 7.45-7.44 (dd, 1H, H-Ar), 6.86 (s, 2H, H-Ar), 5.49 (t, 1H, CH₂-CH-O), 4.18-3.65 (m, 2H, O-CH₂), 2.01 (s, 6H, -CH₃), 1.92-1.26 (m, 6H, CH₂-CH₂-CH₂),

MS (FD) m/z (% rel Int.): 310,6

R_f: 0,48 (Hx:EtAc, 4:1)

- **2',6'-Dimethyl-4'-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methanol (9)**



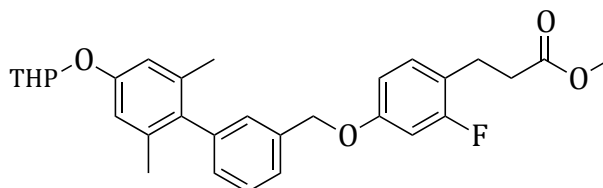
Zu einer Lösung von 723 mg (2,33 mmol) 2',6'-dimethyl-4'-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-3-carbaldehyd in 5 ml THF und 5 mL Methanol bei 0 °C wurden langsam 55 mg (1,44 mmol) Natriumborhydrid zugegeben und anschließend für 3 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde mit NH₄Cl-Lösung gequencht und anschließend mit EtAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 4:1) ergab 680 mg (94 %, 2,17 mmol) 2',6'-Dimethyl-4'-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methanol als farblose stark viskose Flüssigkeit.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.45-7.34 (m, 2H, *H*-Ar), 7.15-7.08 (m, 2H, *H*-Ar), 6.84 (s, 2H, *H*-Ar), 5.48 (t, 1H, CH₂-CH-O), 4.75 (s, 2H, -CH₂-O), 4.18-3.65 (m, 2H, O-CH₂), 2.01 (s, 6H, -CH₃), 1.92-1.26 (m, 6H, CH₂-CH₂-CH₂),

MS (FD) m/z (% rel Int.): 312,4

R_f: 0,32 (Hx:EtAc, 4:1)

- **Methyl 3-(4-((2',6'-dimethyl-4'-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propanoat (10)**



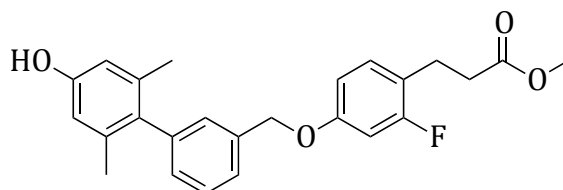
Zu einer Lösung von 2,14 g (6,9 mmol) (2',6'-dimethyl-4'-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methanol und 1,36 g (6,9 mmol) Methyl 3-(2-fluoro-4-hydroxyphenyl)propanoat und 2,31 g (11,3 mmol) Tributylphosphin in 125 mL THF unter Argon wurden bei 0 °C 2,85 g (11,3 mmol) 1,1'(azodicarbonyl)dipiperidin portionsweise zugegeben und die Reaktionslösung für 16 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Hexan wurden die unlöslichen Stoffe abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 4:1) ergab 2,07 g (64 %, 4,42 mmol) Methyl 3-(4-((2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propanoat als farbloses klares Öl.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.42-7.32 (m, 2H, *H*-Ar), 7.14 (s, 1H, *H*-Ar), 7.09-7.03 (m, 2H, *H*-Ar), 6.79 (s, 2H, *H*-Ar), 6.70-6.62 (m, 2H, *H*-Ar), 5.43 (t, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH-O}$), 5.04 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O}$), 4.14-3.93 (m, 2H, O-CH_2), 3.64 (s, 3H, O-CH_3), 2.87 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.57 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.96 (s, 6H, $-\text{CH}_3$), 2.02-1.56 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 492,7

R_f : 0,37 (Hx:EtAc, 4:1)

- **Methyl-3-(2-fluor-4-((4'-hydroxy-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat (11)**



Zu einer Lösung von 600 mg (1,38 mmol) Methyl 3-(4-((2',6'-dimethyl-4'-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propanoat in 18 mL MeOH wurden 24 mg (0,13 mmol) p-Toluolsulfonsäure gegeben und 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und man erhielt nach säulenchromatographischer (Hx:EtAc, 4:1) Aufreinigung 336 mg (70 %, 0,822 mmol) Methyl-3-(2-fluor-4-((4'-hydroxy-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat als klare farblose Flüssigkeit.

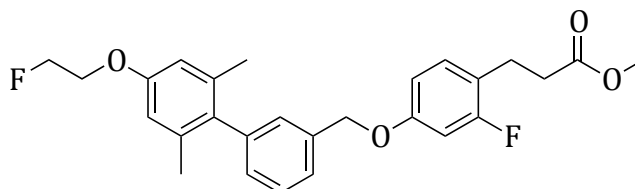
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.48-7.38 (m, 2H, *H*-Ar), 7.19 (s, 1H, *H*-Ar), 7.14-7.08 (m, 2H, *H*-Ar), 6.73-6.66 (m, 2H, *H*-Ar), 6.62 (s, 2H, *H*-Ar), 5.08 (s, 2H, -CH₂-O), 3.69 (s, 3H, O-CH₃), 2.93 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.62 (t, 2H, CH₂-CH₂), 1.98 (s, 6H, -CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 408,5

R_f: 0,32 (Hx:EtAc, 4:1)

5.2.3 Synthese von 3-(2-Fluor-4-((4'-(2-fluorethoxy)-2'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propionsäure (DZ 2)

- Methyl 3-(2-fluor-4-((4'-(2-fluorethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat (12)



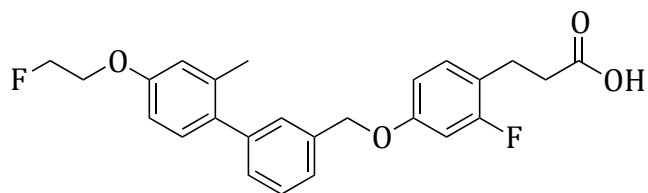
Zu einer Lösung von 140 mg (0,34 mmol) Methyl-3-(2-fluor-4-((4'-hydroxy-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy) phenyl)propanoat in 15 mL Aceton wurden 110 mg (0,34 mmol) Cs_2CO_3 gegeben und die Reaktionsmischung für 45 min bei RT unter Argon rühren gelassen. Anschließend wurden 44 mg (0,34 mmol) 1-Brom-2-fluorethan hinzugefügt und die Reaktion für 24 h bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlen wurde der weiße Niederschlag abfiltriert, mit Aceton gewaschen und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc., 2:1) ergab 103 mg (67 %, 0,23 mmol) Methyl 3-(2-fluor-4-((4'-(2-fluorethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat als farblose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.43-7.34 (m, 2H, *H*-Ar), 7.18 (s, 1H, *H*-Ar), 7.09-7.07 (m, 2H, *H*-Ar), 6.69 (s, 2H, *H*-Ar), 6.66-6.60 (m, 2H, *H*-Ar), 5.01 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O}$), 4.85-4.96 (dt, 2H, $\text{F-CH}_2\text{-CH}_2$), 4.28-4.18 (dt, 2H, $\text{F-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.71 (s, 3H, O-CH_3), 2.87 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.63 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.98 (s, 6H, $-\text{CH}_3$)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 454,6

R_f : 0,69 (Hx:EtAc, 2:1)

- **3-(2-Fluor-4-((4'-(2-fluorethoxy)-2'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propionsäure (DZ 2)**



103 mg (2,3 mmol) Methyl 3-(2-fluor-4-((4'-(2-fluorethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat wurden in 3,5 mL THF und 1,9 mL MeOH gelöst und 0,6 mL 1M NaOH-Lösung zugegeben. Nach Rühren ÜN bei RT wurde der pH-Wert der Lösung mit 1M HCL auf pH = 3 eingestellt und mit EtAc extrahiert. Nach Waschen der organischen Fraktion mit NaCl-Lösung wurde diese über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Durch anschließende säulenchromatographische Aufreinigung (DCM:MeOH, 9:1) wurden 85 mg (87 %, 0,2 mmol) 3-(2-Fluor-4-((4'-(2-fluorethoxy)-2'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propionsäure als farblose Kristalle erhalten.

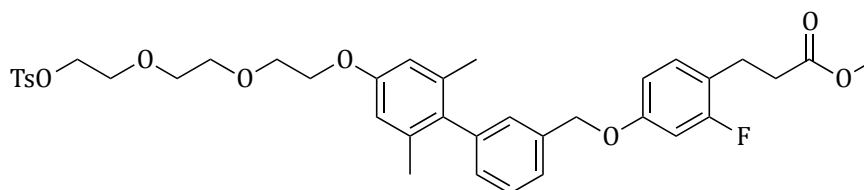
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.43-7.34 (m, 2H, *H*-Ar), 7.18 (s, 1H, *H*-Ar), 7.09-7.07 (m, 2H, *H*-Ar), 6.69 (s, 2H, *H*-Ar), 6.66-6.60 (m, 2H, *H*-Ar), 5.01 (s, 2H, -CH₂-O), 4.85-4.96 (dt, 2H, F-CH₂-CH₂), 4.28-4.18 (dt, 2H, F-CH₂-CH₂), 2.87 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.63 (t, 2H, CH₂-CH₂), 1.98 (s, 6H, -CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 426,4

R_f: 0,6 (DCM:MeOH, 9:1)

5.2.4 Synthese von 3-(2-Fluor-4-((4'-(2-(2-(2-fluorethoxy)ethoxy)ethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propionsäure (DZ 3)

- **Methyl 3-(4-((2',6'-dimethyl-4'-(2-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propanoat (13 = MV 2)**



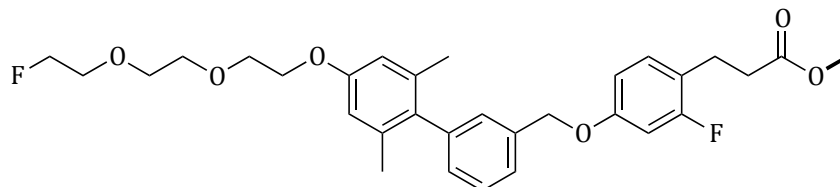
Zu 140 mg (0,34 mmol) Methyl-3-(2-fluor-4-((4'-hydroxy-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat in 15 mL Aceton wurden 166 mg (0,51 mmol) Cäsiumcarbonat gegeben und die Reaktionsmischung für 30 min gerührt. Anschließend wurden 624 mg (1,36 mmol) Triethylenglycolditosylat hinzu gegeben und 12 h bei RF gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurde die Reaktionsmischung filtriert, der Rückstand mit Aceton gewaschen und anschließend das Lösemittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Durch säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 1:1) erhielt man 180 mg (76 %, 0,26 mmol) Methyl 3-(4-((2',6'-dimethyl-4'-(2-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propanoat als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.81 (d, 2H, *H*-Ar), 7.47-7.34 (m, 4H, *H*-Ar), 7.18 (s, 1H, *H*-Ar), 7.13-7.07 (m, 2H, *H*-Ar), 6.72-6.65 (m, 4H, *H*-Ar), 5.08 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O}$), 4.19-4.11 (m, 7H, TEG), 3.85-3.63 (m, 5H, TEG), 3.68 (s, 3H, $-\text{O}-\text{CH}_3$), 2.92 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.61 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.07 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.00 (s, 6H, $-\text{CH}_3$)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 694,8

R_f : 0,56 (Hx:EtAc, 1:1)

- **Methyl 3-(2-fluor-4-((4'-(2-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)ethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat (14)**



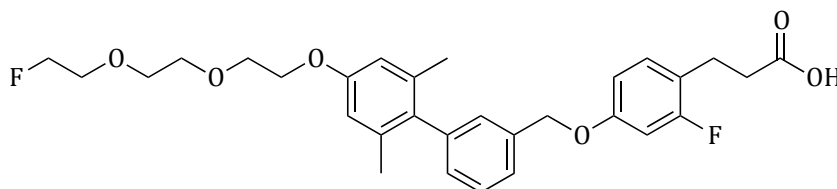
300 mg (0,432 mmol) Methyl 3-(4-((2',6'-dimethyl-4'-(2-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propanoat wurden in 10 mL THF gelöst und 0,42 mL Tetrabutylammoniumfluorid (1M in THF) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 55 °C 12 h gerührt und anschließend das Lösemittel im Vakuum entfernt. Durch säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 2:1) erhielt man 170 mg (73 %, 0,313 mmol) Methyl 3-(2-fluor-4-((4'-(2-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)ethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat als farbloses Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.47-7.37 (m, 2H, *H*-Ar), 7.18 (s, 1H, *H*-Ar), 7.14-7.09 (m, 2H, *H*-Ar), 6.72-6.66 (m, 4H, *H*-Ar), 5.08 (s, 2H, -CH₂-O), 4.169-4.51(dt, 2H, TEG), 4.18 (t, 2H, TEG), 3.92-3.33 (m, 8H, TEG), 3.69 (s, 3H, O-CH₃) 2.92 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.61 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.00 (s, 6H, -CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 542,7

R_f: 0,46 (Hx:EtAc, 2:1)

- **3-(2-Fluor-4-((4'-(2-(2-(2-fluorethoxy)ethoxy)ethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propionsäure (DZ 3)**



Zu 140 mg (0,26 mmol) Methyl 3-(2-fluor-4-((4'-(2-(2-(2-fluorethoxy)ethoxy)ethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat in 4 mL THF und 2,1 ml MeOH wurden 0,6 mL einer 1M NaOH-Lösung gegeben und die Reaktionslösung 12 h bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der pH-Wert mit 1M HCL auf pH = 3 eingestellt und die Lösung mit EtAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung gewaschen und anschließend mit MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen der Lösemittel im Vakuum erhielt man durch säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 2:1) 132 mg (97 %, 0,25 mmol) 3-(2-Fluor-4-((4'-(2-(2-(2-fluorethoxy)ethoxy)ethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propionsäure als farbloses Öl.

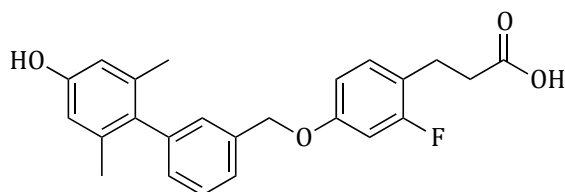
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.47-7.37 (m, 2H, *H*-Ar), 7.18 (s, 1H, *H*-Ar), 7.14-7.09 (m, 2H, *H*-Ar), 6.73-6.66 (m, 4H, *H*-Ar), 5.08 (s, 2H, -CH₂-O), 4.68-4.51(dt, 2H, TEG), 4.17 (t, 2H, TEG), 3.91-3.73 (m, 8H, TEG), 2.92 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.61 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.00 (s, 6H, -CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 528,5

R_f: 0,21 (Hx:EtAc, 2:1)

5.2.5 Synthese von 3-(2-Fluor-4-((4'-hydroxy-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propionsäure (MV 3) und Methyl 3-(2-fluor-4-((4'-(2-iodethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat (MV 1)

- **3-(2-Fluor-4-((4'-hydroxy-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propionsäure (MV 3)**



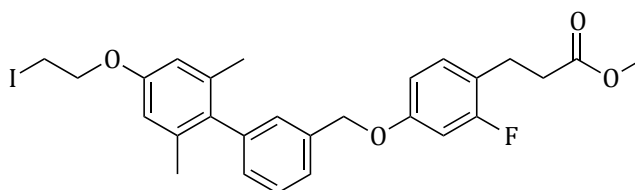
56 mg (0,137 mmol) Methyl-3-(2-fluor-4-((4'-hydroxy-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat wurden in 2,1 mL THF, 1,1 mL MeOH gelöst und 0,3 mL 1M NaOH-Lösung zugegeben. Nach Rühren für 24 h bei RT wurde der pH-Wert mit 1M HCl auf 3 gestellt und mit EtAc extrahiert. Nach Waschen der vereinigten organischen Fraktionen mit NaCl, Trocknen mit MgSO₄, Entfernen des Lösungsmittels und säulenchromatographischer Aufreinigung (Hx/EtAc/Ameisensäure, 2:1:0,05) erhielt man 38 mg (71 %, 0,097 mmol) 3-(2-Fluor-4-((4'-hydroxy-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propionsäure als farblosen Feststoff

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.48-7.38 (m, 2H, *H*-Ar), 7.19 (s, 1H, *H*-Ar), 7.15-7.09 (m, 2H, *H*-Ar), 6.73-6.66 (m, 2H, *H*-Ar), 6.62 (s, 2H, *H*-Ar), 5.09 (s, 2H, -CH₂-O), 2.93 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.67 (t, 2H, CH₂-CH₂), 1.98 (s, 6H, -CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 394,5

R_f: 0,29 (Hx/EtAc/Ameisensäure, 2:1:0,05)

- **Methyl 3-(2-fluor-4-((4'-(2-iodethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat (MV 1)**



Zu 100 mg (0,245 mmol) Methyl-3-(2-fluor-4-((4'-hydroxy-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat in 7 mL Aceton wurden 160 mg (0,49 mmol) Cs_2CO_3 gegeben und für 45 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 182 mg (0,49 mmol) 1,2-Bistosyloxyethan und 50 mg Kaliumiodid gegeben. Nach Rühren für 24 h bei RF wurde die Reaktion beendet, der entstandene Niederschlag über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hx/EtAc, 3:1) ergab 52,6 mg (38,5 %, 0,094 mmol) Methyl 3-(2-fluor-4-((4'-(2-iodethoxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)phenyl)propanoat als dickflüssiges klares Öl.

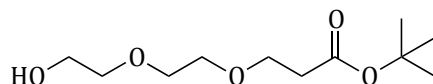
$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.48-7.37 (m, 2H, *H-Ar*), 7.28 (s, 1H, *H-Ar*), 7.19-7.14 (m, 2H, *H-Ar*), 6.75-6.65 (m, 4H, *H-Ar*), 5.09 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{O}$), 4.29 (t, 2H, $\text{I-CH}_2-\text{CH}_2$), 3.69 (s, 3H, O-CH_3), 3.46 (t, 2H, $\text{I-CH}_2-\text{CH}_2$), 2.93 (t, 2H, CH_2-CH_2), 2.61 (t, 2H, CH_2-CH_2), 2.01 (s, 6H, $-\text{CH}_3$)

MS (ESI) m/z : 563,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

R_f : 0,57 (Hx/EtAc, 3:1)

5.2.6 Synthese von *tert*-Butyl 3-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (36)

- *tert*-Butyl 3-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)propanoat (35)

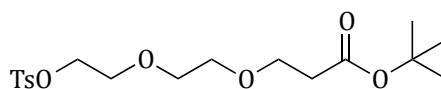


Zu 6,7 g (63 mmol) Diethylenglykol gelöst in 175 mL trockenem THF wurden 0,1 g Natriumspäne gegeben und die Reaktionsmischung unter Argon bei RT für 12 h rühren gelassen. Anschließend wurden 3,1 mL (21 mmol) *tert*-Butylacrylat hinzugegeben und für weitere 24 h bei RT gerührt. Nach Quenchen der Reaktion mit 8 mL 1M HCl wurde die Reaktionsmischung auf 200 mL ges. NaCl-Lösung gegeben und 3-mal mit je 100 mL EtAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nochmals mit NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen der Lösemittel erhielt man 4,5 g (92 %, 19,21 mmol) *tert*-Butyl 3-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)propanoat als leicht gelbes Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 3.72-3.57 (m, 10H, TEG), 2.46 (t, 2H, -CH₂-COOtBu), 1.39 (s, 9H, tBu)

MS (FD) m/z (% rel Int.):234,5

- ***tert*-Butyl 3-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (36)**



2 g (8,54 mmol) *tert*-Butyl 3-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)propanoat wurden in 62 mL DCM und 3 mL Triethylamin gelöst und unter Eiskühlung für 45 min gerührt. Anschließend wurden 1,85 g (9,7 mmol) *para*-Toluolsulfonsäurechlorid gelöst in 21 mL DCM langsam zu getropft. Nach Rühren für 12 h bei RT wurde die Reaktionslösung in 80 mL 1M HCL gegeben. Nach Abtrennen der organischen Phase und Extrahieren der wässrigen Phase mit DCM wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaHCO₃-Lösung und NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 5:2) ergaben 1,47 g (43 %, 3,57 mmol) *tert*-Butyl 3-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)propanoat als farbloses Öl.

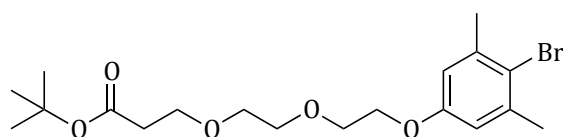
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.79-7.73 (d, 2H, *H*-Ar), 7.33-7.30 (d, 2H, *H*-Ar) 4.14-3.49 (m, 10H, TEG), 2.47 (t, 2H, -CH₂-COOtBu), 2.42 (s, 3H, -CH₃), 1.42 (s, 9H, tBu)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 390,1

R_f: 0,29 (Hx:EtAc, 5:2)

5.2.7 Synthese von 3-(2-(2-((3'-((3-Fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propionsäure (41)

- ***tert*-Butyl 3-(2-(2-(4-brom-3,5-dimethylphenoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (37)**



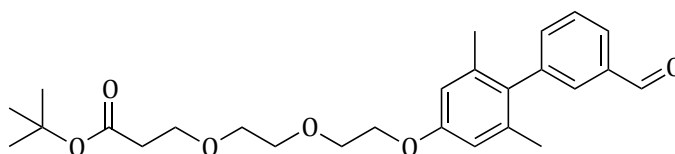
Zu einer Lösung von 0,9 g (4,5 mmol) 4-Brom-3,5-dimethylphenol in 45 mL Aceton wurden in kleinen Portionen 2,6 g (8,01 mmol) Cäsiumcarbonat gegeben und für 45 min bei RT gerührt. Anschließend wurden langsam 1,75 g (4,5 mmol) *tert*-Butyl 3-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)propanoat gelöst in 10 mL Aceton zu getropft und für 24 h bei 60 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionsmischung filtriert und der Rückstand mit Aceton gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Durch säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 3:1) erhielt man 1,66 g (89 %, 3,99 mmol) *tert*-Butyl 3-(2-(2-(4-brom-3,5-dimethylphenoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoat als farbloses Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 6.68 (s, 2H, *H*-Ar), 4.11-3.64 (m, 10H, TEG), 2.53 (t, 2H, -CH₂-COOtBu), 2.39 (s, 6H, -CH₃), 1.47 (s, 9H, tBu)

MS (FD) *m/z* (% rel Int.): 417,7

R_f: 0,49 (Hx:EtAc, 3:1)

- ***tert*-Butyl 3-(2-(2-((3'-formyl-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (38)**



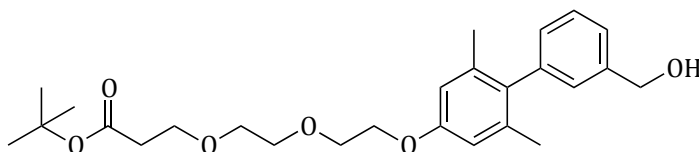
150 mg (0,36 mmol) *tert*-Butyl 3-(2-(2-(4-brom-3,5-dimethylphenoxy)ethoxy)ethoxy)propanoat und 54,6 mg (0,36 mmol) 3-Formylphenylboronsäure wurden in 1,1 mL 1M Na₂CO₃-Lösung, 1,1 mL Toluol und 0,4 mL Ethanol gelöst. Unter Argon-Atmosphäre wurden anschließend 20,8 mg (0,018 mmol) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) zu gegeben und für 20 h bei 80 °C gerührt. Nach Filtration der erkalteten Reaktionsmischung über Celite und mehrmaligem Waschen mit Toluol wurde das Filtrat mit NaCl-Lösung gewaschen und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Durch säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 2:1) erhielt man 110 mg (69 %, 0,248 mmol) *tert*-Butyl 3-(2-(2-((3'-formyl-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoat als farbloses Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 10.07 (s, 1H, -CHO), 7.90-7.85 (dt, 1H, *H*-Ar), 7.58 (t, 1H, *H*-Ar), 7.61 (t, 1H, *H*-Ar), 7.46-7.42 (dt, 1H, *H*-Ar) 7.28 (s, 2H, *H*-Ar), 4.17 (t, 2H, TEG), 3,89 (t, 2H, TEG), 4.78-3.66 (m, 6H, TEG), 2.54 (t, 2H, -CH₂-COOtBu), 2.01 (s, 6H, -CH₃), 1.47 (s, 9H, tBu)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 442,6

R_f: 0,27 (Hx:EtAc, 2:1)

- ***tert*-Butyl 3-(2-(2-((3'-(hydroxymethyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (39)**



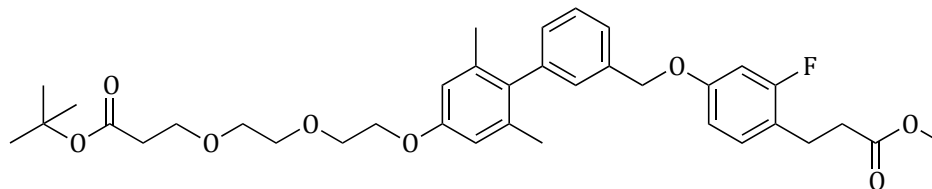
In 16 mL einer Mischung aus THF und MeOH (1:1) wurden 586 mg (1,32 mmol) *tert*-Butyl 3-(2-(2-((3'-formyl-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoat gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden in kleinen Portionen 31 mg (0,816 mmol) Natriumborhydrid zugegeben und die Reaktion für weitere 3 h bei 0 °C gerührt. Nach Quenchen mit NH₄Cl-Lösung wurde mit EtAc ausgeschüttelt und die organische Fraktion über MgSO₄ getrocknet. Durch säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 1:1) erhielt man 489 mg (83 %, 1,09 mmol) *tert*-Butyl 3-(2-(2-((3'-(hydroxymethyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoat als farbloses Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.45-7.34 (m, 2H, *H*-Ar), 7.15 (t, 1H, *H*-Ar), 7.07 (dt, 1H, *H*-Ar), 6.69 (s, 2H, *H*-Ar), 4.75 (s, 2H, -CH₂OH), 4.16 (t, 2H, TEG), 3,86 (t, 2H, TEG), 4.78-3.65 (m, 6H, TEG), 2.55 (t, 2H, -CH₂-COOtBu), 2.02 (s, 6H, -CH₃), 1.47 (s, 9H, tBu)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 444,5

R_f: 0,42 (Hx:EtAc, 1:1)

- ***tert*-Butyl 3-(2-(2-((3'-((3-fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (40)**



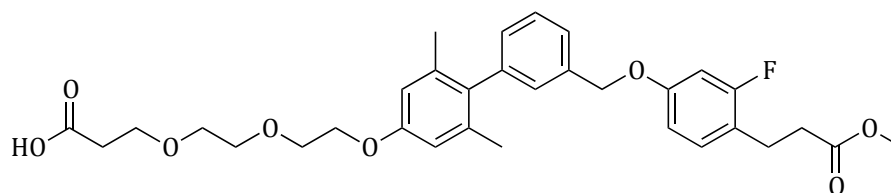
Zu 150 mg (0,36 mmol) *tert*-Butyl 3-(2-(2-((3'-(hydroxymethyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoat, 72 mg (0,36 mmol) Methyl 3-(2-fluor-4-hydroxyphenyl)propanoat und 0,294 mL (1,18 mmol) Tributylphosphin in 7 mL Toluol bei 0 °C wurden portionsweise 300 mg (1,18 mmol) 1,1'(Azodicarbonyl)dipiperidin zugegeben und die Reaktionslösung für 2 d bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Hexan aufgenommen. Die nicht löslichen Rückstände wurden abfiltriert und das Hexan in Vakuum entfernt. Durch säulenchromatographische (Hx:EtAc, 2:1) Aufreinigung erhielt man 156 mg (70 %, 0,25 mmol) *tert*-Butyl 3-(2-(2-((3'-((3-fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoat als klares Öl.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.47-7.37 (m, 2H, *H*-Ar), 7.19 (t, 1H, *H*-Ar), 7.13-7.08 (m, 2H, *H*-Ar), 6.72-6.66 (m, 4H, *H*-Ar), 5.08 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4.16 (t, 2H, TEG), 3,88 (t, 2H, TEG), 3.78-3.74 (m, 4H, TEG), 3.67-3.66 (m, 2H, TEG), 3.68 (s, 3H, $\text{O}-\text{CH}_3$), 2.92 (t, 2H, CH_2-CH_2), 2.61 (t, 2H, CH_2-CH_2), 2.54 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{COOtBu}$), 2.00 (s, 6H, $-\text{CH}_3$), 1.47 (s, 9H, tBu)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 624,8

R_f: 0,42 (Hx:EtAc, 1:1)

- **3-(2-(2-((3'-((3-Fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propionsäure (41)**



150 mg (0,25 mmol) *tert*-Butyl 3-(2-(2-((3'-((3-fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoat wurden in 2,5 ml DCM gelöst und 2,1 mL TFA zugegeben. Nach 2 h Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung in Toluol aufgenommen und mehrmals mit jeweils 5 mL Toluol codestilliert. Anschließende säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc:Ameisensäure, 3:3:0,11) ergab 130 mg (91 %, 0,23 mmol) 3-(2-(2-((3'-((3-Fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propionsäure als viskoses klares Öl.

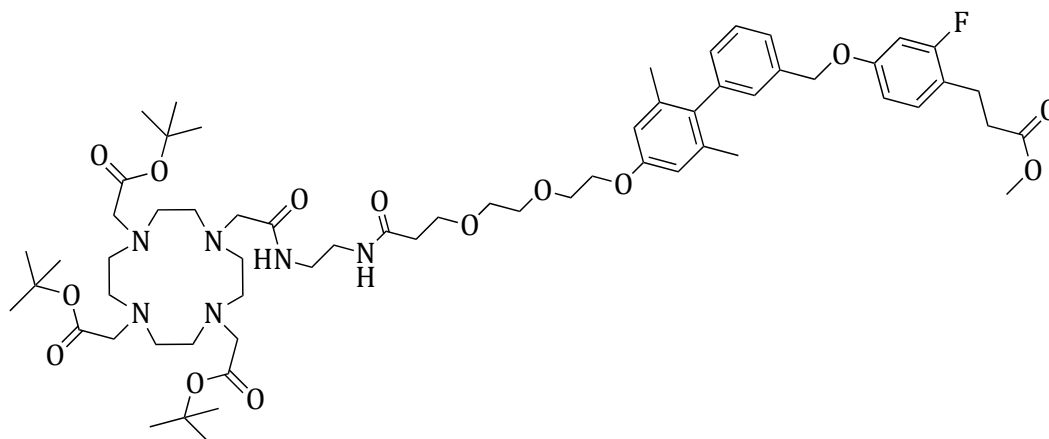
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.47-7.38 (m, 2H, *H*-Ar), 7.18 (t, 1H, *H*-Ar), 7.13-7.08 (m, 2H, *H*-Ar), 6.72-6.66 (m, 4H, *H*-Ar), 5.08 (s, 2H, -CH₂O-), 4.16 (t, 2H, TEG), 3.88 (t, 2H, TEG), 3.78-3.70 (m, 4H, TEG), 3.67-3.66 (m, 2H, TEG), 3.69 (s, 3H, O-CH₃), 2.89 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.66 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.61 (t, 2H, -CH₂-COOH), 2.00 (s, 6H, -CH₃)

MS (FD) *m/z* (% rel Int.): 568,6

R_f: 0,36 (Hx:EtAc:Ameisensäure, 3:3:0,11)

5.2.8 Synthese von 2,2',2''-(10-(15-((3'-((4-(2-Carboxyethyl)-3-fluorphenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)-2,7-dioxo-10,13-dioxa-3,6-diazapentadecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triessigsäure (46)

- **tri-*tert*-Butyl 2,2',2''-(10-(15-((3'-((3-fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)-2,7-dioxo-10,13-dioxa-3,6-diazapentadecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triacetat (44)**



Zu 88 mg (0,152 mmol) 3-(2-(2-((3'-((3-Fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propionsäure in 15 mL DMF wurden unter Argonatmosphäre 59 mg (0,152 mmol) HBTU und 26,5 μ L (0,152 mmol) DIPEA gegeben und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 94 mg (0,252 mmol) tris-*tert*-Butyl-DOTA-ethylamin hinzugegeben und für weitere 24 h bei RT gerührt. Nach Quenchen der Reaktion mit Wasser wurde mit CHCl_3 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum erhielt man durch säulenchromatographische Aufreinigung (CHCl_3 :MeOH, 4:1) 165 mg (93 %, 0,142 mmol) tri-*tert*-Butyl 2,2',2''-(10-(15-((3'-((3-fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)-2,7-dioxo-10,13-dioxa-3,6-

Experimentalteil

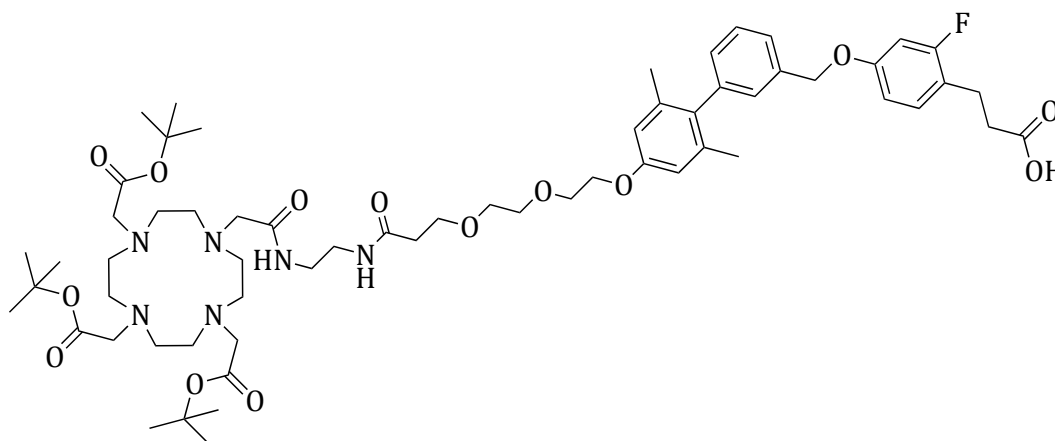
diazapentadecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triacetat als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.47-7.34 (m, 2H, *H-Ar*), 7.16 (s, 1H, *H-Ar*), 7.13-7.05 (m, 2H, *H-Ar*), 6.72-6.65 (m, 4H, *H-Ar*), 5.08 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O}-$), 4.14 (t, 2H, $\text{CH}_2(\text{TEG})$), 3.88 (t, 2H, $\text{CH}_2(\text{TEG})$), 3.81-3.75 (m, 4H, $\text{CH}_2(\text{TEG})$), 3.74-3.69 (m, 4H, $\text{CH}_2(\text{TEG})$), 3.68 (s, 3H, O-CH_3), 3.55-3.51 (m, 4H, $n\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 3.48-3.25 (bs, 8H, N-CH-CO-R), 3.20-3.11 (bs, 2H, CH_2), 3.04-3.01 (m, 2H, CH_2), 3.00-2.97 (m, 4H, CH_2), 2.94 (t, 2H, CH_2), 2.91-2.82 (m, 6H, CH_2), 2.61 (t, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOME}$), 2.53 (t, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOME}$), 1.99 (s, 6H, $-\text{CH}_3$), 1.46 (s, 27H, *t-But*)

MS (ESI) m/z : 1187,5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

R_f: 0,45 (CHCl_3 :MeOH, 4:1)

- **3-(4-((4'-((2,7-Dioxo-1-(4,7,10-tris(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)-10,13-dioxa-3,6-diazapentadecan-15-yl)oxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propionsäure (45)**

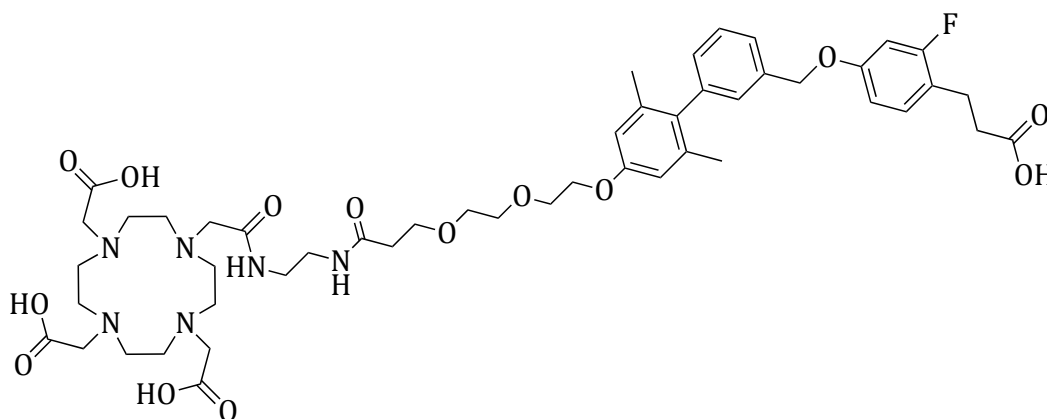


In einer Mischung aus 0,65 mL THF und 0,34 mL MeOH wurden 37,5 mg (0,032 mmol) tri-*tert*-Butyl-2,2',2''-(10-(15-((3'-((3-fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)-2,7-dioxo-10,13-dioxa-3,6-diazapentadecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triacetat gelöst und mit 0,066 mL 1M NaOH-Lösung versetzt. Nach Rühren bei RT über 24 h wurde die Reaktion mit NaCl-Lösung gequench und mit EtAc ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und die Lösemittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (CHCl₃:MeOH, 4:1) ergab 28 mg (76 %, 0,024 mmol) 3-(4-((4'-((2,7-Dioxo-1-(4,7,10-tris(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)-10,13-dioxa-3,6-diazapentadecan-15-yl)oxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propion-säure als farbloses Öl.

MS (ESI) m/z: 576,5 [M+2H]⁺

R_f: 0,73 (CHCl₃:MeOH, 4:1)

- **2,2',2''-(10-(15-((3'-((4-(2-Carboxyethyl)-3-fluorphenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)-2,7-dioxo-10,13-dioxa-3,6-diazapentadecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triessigsäure (46)**

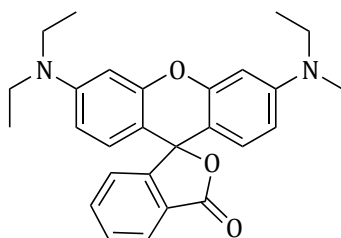


9 mg (7,8 µmol) 3-(4-((4'-((2,7-Dioxo-1-(4,7,10-tris(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)-10,13-dioxa-3,6-diazapentadecan-15-yl)oxy)-2',6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methoxy)-2-fluorphenyl)propionsäure wurden in einem Gemisch von 1 mL TFA, 26,3 µL Wasser und 26,3 µL Triisopropylsilan aufgenommen und für 24 h in einem Eppendorfgefäß auf dem Schüttler zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden 5 mL Wasser hinzugegeben die Reaktionsmischung eingefroren lyophilisiert. Man erhielt 7 mg (92 %, 7,12 µmol) 2,2',2''-(10-(15-((3'-((4-(2-Carboxyethyl)-3-fluorphenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)-2,7-dioxo-10,13-dioxa-3,6-diazapentadecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triessigsäure als farbloses Pulver.

MS (ESI) m/z: 984,4 [M+H]⁺

5.2.9 Synthese von *N*-(9-(2-(4-(3-(2-(2-((3'-((4-(2-carboxyethyl)-3-fluorphenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminium (43)

- **3',6'-bis(diethylamino)-3*H*-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-3-on (33)**

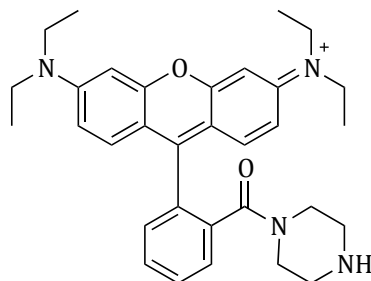


2,1 g Kaliumhydroxid wurden in 25 mL Wasser gelöst und 1 g (2,09 mmol) Rhodamin B hinzugegeben. Nach Zugabe von 25 mL EtAc wurde für 2 d bei RT gerührt. Anschließend wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase 2-mal mit EtAc ausgeschüttelt. Nach Waschen der vereinigten organischen Phasen mit 1M KOH-Lösung und NaCl-Lösung wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Man erhielt 800 mg (87 %, 1,8 mmol) 3',6'-bis(diethylamino)-3*H*-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-3-on als violette Pulver.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.99 (d, 1H, *H*-Ar), 7.63-7.52 (m, 2H, *H*-Ar), 7.20 (d, 1H, *H*-Ar), 6.57 (d, 2H, *H*-Ar), 6.43 (d, 2H, *H*-Ar), 6.34 (dd, 2H, *H*-Ar), 3.35 (q, 8H, N-CH₂-CH₃), 1.17 (t, 12H, N-CH₂-CH₃)

MS (ESI) m/z: 443,25 [M+H]⁺

- ***N*-(6-(diethylamino)-9-(2-(piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminium (34)**



Zu einer Lösung von 390 mg (4,55 mmol) Piperazin in 2 mL DCM wurden 1,15 mL Trimethylaluminium (2M in Toluol) zugetropft und die Reaktionslösung 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 500 mg (1,13 mmol) *N*-(6-(diethylamino)-9-(2-(piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminium gelöst in 1 mL DCM unter Argon-Atmosphäre tropfenweise zugegeben und die Reaktionslösung für 24 h unter RF gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurde 1M HCL zu getropft bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Die entstandene Mischung wurde filtriert und der Rückstand mit DCM und einem Gemisch aus DCM und MeOH (4:1) gewaschen.

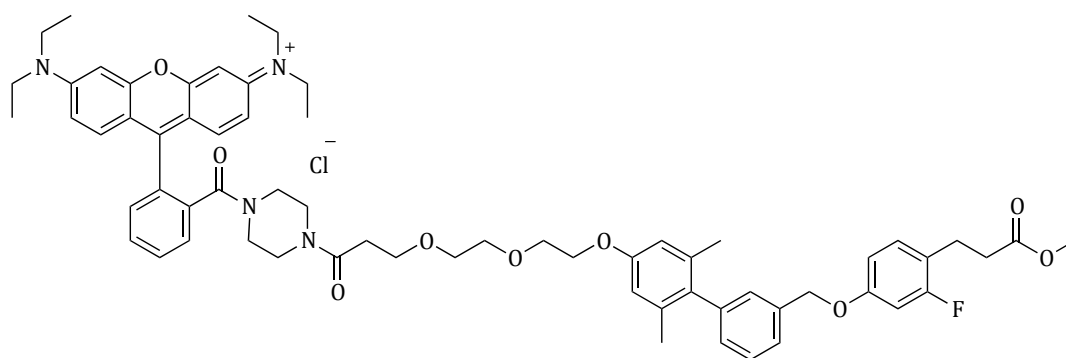
Die erhaltenen organischen Fraktionen wurden vereinigt und die Lösemittel im Vakuum entfernt. Anschließend wurde der hierdurch erhaltene Rückstand wieder in DCM aufgenommen und abermals filtriert und eingengt. Der entstandene violette Schaum wurde in NaHCO₃-Lösung aufgenommen und mehrmals mit EtAc gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit NaCl gesättigt und mit 1M HCl angesäuert. Anschließend wurde mit einem Gemisch aus Propanol und Dichlormethan (2:1) extrahiert, die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und die Lösemittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM:MeOH, 3:1) ergab 236 mg (39 %, 0,44mmol) *N*-(6-(diethylamino)-9-(2-(piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminium als violett-bronze glänzenden Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.79 (m, 2H, *H*-Ar), 7.71 (dd, 1H, *H*-Ar), 7.51 (d, 1H, *H*-Ar), 7.26 (d, 2H, *H*-Ar), 7.05 (d, 2H, *H*-Ar), 6.94 (d, 2H, *H*-Ar), 3.65 (q, 8H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 3.49 (t, 4H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) 2.86 (t, 4H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 1.17 (t, 12H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$)

MS (ESI) m/z : 511,31 [M-Cl] $^+$

R_f: 0,57 (Hx:EtAc, 1:1)

- ***N*-(6-(diethylamino)-9-(2-(4-(3-(2-(2-((3'-((3-fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminium (42)**



Unter Argon wurden 90 mg (0,156 mmol) 3-(2-(2-((3'-((3-Fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propionsäure in 15 mL DMF gelöst, 60 mg (0,156 mmol) HBTU und 27 μL (0,156 mmol) DIPEA hinzugefügt und die Reaktionslösung für 20 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 86 mg (0,16 mmol) *N*-(6-(diethylamino)-9-(2-(piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminium zugegeben und für 12 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit Wasser gequenchet, mit CHCl_3 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und die Lösemittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (CHCl_3 :MeOH, 4:1) ergab 160 mg (94 %, 0,146 mmol) *N*-(6-(diethylamino)-9-(2-(4-(3-(2-(2-

Experimentalteil

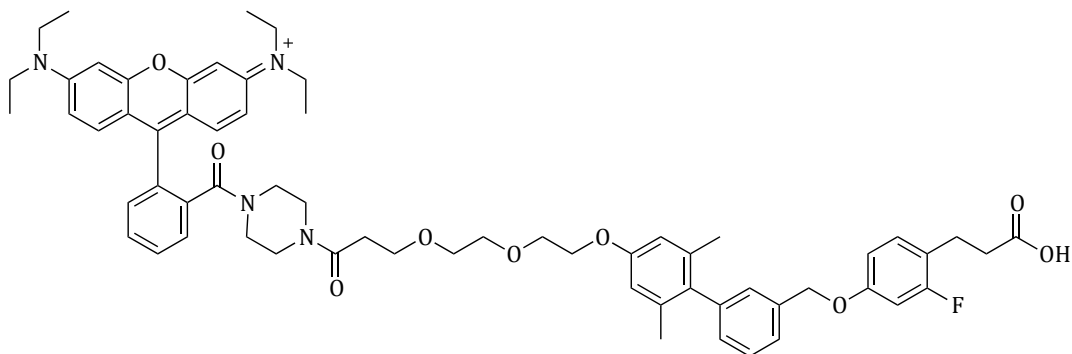
((3'-((3-fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoyl)piperazin-1-carbonyl phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethyl ethanaminium als violetten Feststoff.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 8.04 (s, 1H, *H*-Ar), 7.71 (dd, 1H, *H*-Ar), 7.68-65 (m, 3H, *H*-Ar), 7.53 (m, 2H, *H*-Ar), 7.51 (m, 1H, *H*-Ar), 7.47-7.38 (m, 2H, *H*-Ar), 7.18 (s, 1H, *H*-Ar), 7.13-7.06 (m, 2H, *H*-Ar), 6.72-6.67 (m, 4H, *H*-Ar), 6.99-6.83 (m, 2H, *H*-Ar), 5.07 (s, 2H, -CH₂O-), 4.16 (t, 2H, TEG), 3.88 (t, 2H, TEG), 3.85-3.70 (m, 6H, TEG), 3.69 (s, 3H, O-CH₃), 3.67 (t, 4H, N-CH₂-CH₂-N), 3.65 (q, 8H, N-CH₂-CH₃), 3.60 (t, 4H, N-CH₂-CH₂-N), 2.90 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.59 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.51 (s, 6H, -CH₃), 2.35 (t, 2H, -CH₂-CONH), 1.40 (t, 12H, N-CH₂-CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 1061,9

R_f: 0,66 (CHCl₃:MeOH, 4:1)

- ***N*-(9-(2-(4-(3-(2-(2-((3'-((4-(2-carboxyethyl)-3-fluorphenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminium (43)**



100 mg (0,091 mmol) *N*-(6-(diethylamino)-9-(2-(4-(3-(2-(2-((3'-((3-fluor-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)phenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminium wurden in 1,3 mL THF und 0,68 mL MeOH gelöst. Es wurden 0,184 mL 1M NaOH-Lösung zugegeben und für 12 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit NaCl-Lösung gequench und mit EtAc ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und die Lösemittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (CHCl₃:MeOH:Ameisensäure, 14:1:0,05) ergab 63 mg (64 %, 0,0058 mmol) *N*-(9-(2-(4-(3-(2-(2-((3'-((4-(2-carboxyethyl)-3-fluorphenoxy)methyl)-2,6-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)propanoyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminium als braun-violetten Feststoff.

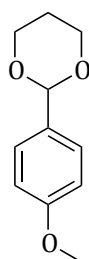
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 8.04 (s, 1H, *H*-Ar), 7.71 (dd, 1H, *H*-Ar), 7.68-6.5 (m, 3H, *H*-Ar), 7.53 (m, 2H, *H*-Ar), 7.51 (m, 1H, *H*-Ar), 7.47-7.38 (m, 2H, *H*-Ar), 7.18 (s, 1H, *H*-Ar), 7.13-7.06 (m, 2H, *H*-Ar), 6.72-6.67 (m, 4H, *H*-Ar), 6.99-6.83 (m, 2H, *H*-Ar), 5.07 (s, 2H, -CH₂O-), 4.16 (t, 2H, TEG), 3.88 (t, 2H, TEG), 3.85-3.70 (m, 6H, TEG), , 3.67 (t, 4H, N-CH₂-CH₂-N), 3.65 (q, 8H, N-CH₂-CH₃), 3.60 (t, 4H, N-CH₂-CH₂-N), 2.90 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.59 (t, 2H, CH₂-CH₂), 2.51 (s, 6H, -CH₃), 2.35 (t, 2H, -CH₂-CONH), 1.40 (t, 12H, N-CH₂-CH₃)

MS (ESI) m/z): 1047,4 [M-Cl]⁺

R_f: 0,15 (CHCl₃:MeOH:Ameisensäure, 14:1:0,05)

5.2.10 Synthese der geschützten Aldehyde (15a-d)

- 2-(4-Methoxyphenyl)-1,3-dioxan (15a)



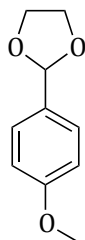
Zu einer Mischung aus 1,36 g (10 mmol) p-Anisaldehyd, 1,63 g (11 mmol) Triethylorthoformiat und 3,04 g (40 mmol) 1,3-Propandiol wurden 48,2 mg (0,1 mmol) Tetrabutylammoniumtribromid gegeben und die Mischung 20 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurden 20 mL ges. NaHCO₃-Lösung zugegeben und mit EtAc ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hx/THF, 7:3) ergab 1,8 g (93 %, 9,3 mmol) 2-(4-Methoxyphenyl)-1,3-dioxan als farblosen wachsartigen Feststoff.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.39 (d, 2H, *H*-Ar), 6.78 (d, 2H, *H*-Ar), 5.43 (t, 1H, Ar-CH-), 4.26-4.20 (m, 2H, CH₂) 4.00-3.91 (m, 2H, CH₂), 3.77 (s, 3H, O-CH₃), 1.85-1.76 (m, 2H, CH₂)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 194,2

R_f: 0,71 (Hx/THF, 7:3)

- **2-(4-Methoxyphenyl)-1,3-dioxolan (15b)**



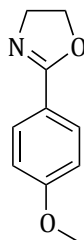
Zu einer Mischung aus 1,36 g (10 mmol) p-Anisaldehyd, 1,63 g (11 mmol) Triethylorthoformiat und 2,48 g (40 mmol) Ethylenglykol wurden 48,2 mg (0,1 mmol Tetrabutylammoniumtribromid gegeben und die Mischung 20 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurden 20 mL ges. NaHCO₃-Lösung zugegeben und mit EtAc ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hx/Et₂O/MeOH, 1:1:0,1) ergab 1,5 g (84 %, 8,4 mmol) 2-(4-Methoxyphenyl)-1,3-dioxolan als gelbliches Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.40 (d, 2H, *H*-Ar), 6.87 (d, 2H, *H*-Ar), 5.74 (t, 1H, Ar-CH-), 4.14-4.09 (m, 2H, CH₂) 4.02-3.97 (m, 2H, CH₂), 3.79 (s, 3H, O-CH₃), 2.26-2.13 (m, 2H, CH₂), 1.85-1.76 (m, 2H, CH₂)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 180,4

R_f: 0,61 (Hx/Et₂O/MeOH, 1:1:0,1)

- **2-(4-Methoxyphenyl)-4,5-dihydrooxazol (15c)**



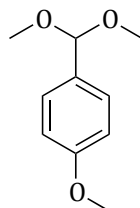
Zu 272 mg (2 mmol) p-Anisaldehyd in 10 mL MeCN wurden einige Molsiebe gegeben und anschließend 122 mg (2 mmol) 2-Aminoethanol hinzugefügt. Nach 4 h Rühren bei RT wurden 773 mg (2,4 mmol) Diacetoxyiodbenzol hinzugefügt und für 24 h bei RT gerührt. Nach Quenchen mit 15 mL Wasser wurde mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Fraktionen über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum erhielt man durch säulenchromatographische Aufreinigung (Hx: Et₂O:MeOH, 5:7:0,5) 130 mg (36 %, 0,72 mmol) 2-(4-Methoxyphenyl)-4,5-dihydrooxazol als farbloses Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.82 (d, 2H, *H*-Ar), 6.89 (d, 2H, *H*-Ar), 4.37 (t, 2H, CH₂) 3.99 (t, 2H, CH₂), 3.80 (s, 3H, O-CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 177,2

R_f: 0,12 (Hx: Et₂O:MeOH, 5:7:0,5)

- **1-(Dimethoxymethyl)-4-methoxybenzol (15d)**



Zu einer Mischung aus 1,36 g (10 mmol) p-Anisaldehyd und 1,63 g (11 mmol) Triethylorthoformiat in 10 mL MeOH wurden 48,2 mg (0,1 mmol) Tetrabutylammoniumtribromid gegeben und die Mischung 20 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurden 20 mL ges. NaHCO₃-Lösung zugegeben und mit EtAc ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hx/Et₂O/MeOH, 1:1:0,1) ergab 1,27 g (90 %, 9 mmol) 1-(Dimethoxymethyl)-4-methoxybenzol als farbloses Öl.

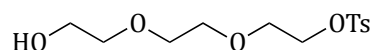
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.36 (d, 2H, *H*-Ar), 6.88 (d, 2H, *H*-Ar), 5.33 (t, 1H, Ar-CH-), 3.79 (s, 3H, O-CH₃), 3.29 (s, 6H, O-CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 182,4

R_f: 0,31Hx: Et₂O:MeOH, 5:7:0,5)

5.2.11 Synthese von 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl 4-tosylat (31), 2-(2-(2-Iodethoxy)ethoxy)ethanol (32) und Methyl 3-(2-fluor-4-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)propanoat (30)

- **2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl 4-tosylat (31)**



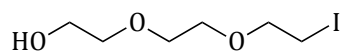
Zu einer Lösung von 1,7 g (11,3 mmol) Triethylenglykol in 50 mL DCM wurden 3,1 g (13,6 mmol) Silberoxid, 15 mg (1,13 mmol) Kaliumiodid und 2,1 g (11,3 mmol) Tosylchlorid gegeben und die Reaktion bei RT für 24 h gerührt. Anschließend wurde über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/Aceton, 7:3) ergab 3,06 g (89 %, 10,1 mmol) 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl 4-tosylat als farbloses Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.78 (d, 2H, *H*-Ar), 7.32 (d, 2H, *H*-Ar), 4.14-4.11 (m, 2H, CH₂), 3.69-3.65 (m, 4H, CH₂), 3.57-3.52 (m, 6H, CH₂), 2.41 (s, 3H, O-CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 304,3

R_f: 0,65 (DCM/Aceton, 7:3)

- **2-(2-(2-Iodethoxy)ethoxy)ethanol (32)**



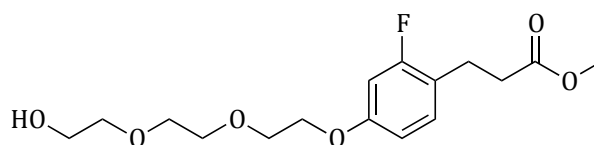
5 g (29,6 mmol) 2-(2-(2-Chlorethoxy)ethoxy)ethanol wurden in 150 mL Aceton gelöst und 9,6 g (48 mmol) Natriumiodid zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 4 h unter RF gerührt. Nach Filtrieren über

Celiten wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und man erhielt 570 mg (7 %, 2,2 mmol) 2-(2-(2-Iodethoxy)ethoxy)ethanol als leicht orange Flüssigkeit

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 3.96-3.89 (m, 2H, CH_2), 3.58-3.54 (m, 6H, CH_2), 3.41-3.39 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.32-3.29 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-I}$)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 304,3

- **Methyl 3-(2-fluor-4-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)propanoat (30)**



Zu einer Lösung von 700 mg (5 mmol) Kaliumcarbonat in 13 mL DMF wurden 200 mg (1 mmol) Methyl 3-(2-fluoro-4-hydroxyphenyl)propanoat gegeben und für 30 min bei 70 °C gerührt. Anschließend wurden 502 mg (2 mmol) 2-(2-(2-Iodethoxy)ethoxy)ethanol in 3 mL DMF zugegeben und für 24 h bei 100 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Wasser/DCM-Gemisch (1:1) aufgenommen. Die organische Phase wurde mehrmals mit Wasser gewaschen und anschließend über MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man durch säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH, 11:1) 207 mg (63 %, 0,63 mmol) Methyl 3-(2-fluor-4-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)propanoat als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.09-7.03 (m, 1H, $H\text{-Ar}$), 6.63-6.57 (m, 2H, $H\text{-Ar}$), 4.06 (t, 2H, $\text{CH}_2(\text{TEG})$), 3.83 (t, 2H, $\text{CH}_2(\text{TEG})$), 3.72-3.65 (m, 6H,

Experimentalteil

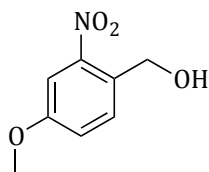
$\text{CH}_2(\text{TEG})$ 3.63 (s, 3H, O- CH_3), 3.60-3.57 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{TEG})$), 2.87 (t, 2H, - CH_2 - CH_2 -COOH), 2.56 (t, 2H, CH_2 - CH_2 -COOH)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 330,3

R_f: 0,27 (DCM/MeOH, 11:1)

5.2.12 Synthese von (*E*)-Methyl 3-(4-methoxy-2-nitrophenyl)acrylat (19), (*E*)-Methyl 3-(2-iod-4-methoxyphenyl)acrylat (23) und 1-(2-Bromethyl)-4-methoxy-2-nitrobenzol (29)

- **(4-Methoxy-2-nitrophenyl)methanol (17)**

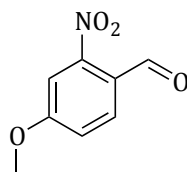


6,6 mL einer Boran-Dimethylsulfid-Komplex-Lösung wurden zu einer Lösung aus 2 g (10,1 mmol) 4-Methoxy-2-nitrobenzoesäure in 10 mL THF gegeben und für 3 h unter RF gerührt. Anschließend wurde mit DCM extrahiert, die organische Phase über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt ohne weitere Aufreinigungsschritte 1,82 g (97 %, 9,94 mmol) (4-Methoxy-2-nitrophenyl)methanol als leicht gelblichen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.57-7.54 (m, 2H, *H*-Ar), 7.184-7.14 (dd, 1H, *H*-Ar), 4.83 (s, 2H, - CH_2 -OH) 3.85 (s, 3H, O- CH_3)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 183,2

- **4-Methoxy-2-nitrobenzaldehyd (18)**

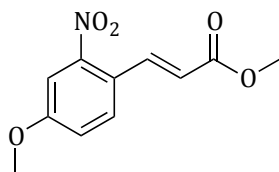


Zu einer Lösung von 1,2 mL (13,6 mmol) Oxalylchlorid in 12 mL DCM unter Argon-Atmosphäre bei -78 °C wurden tropfenweise 2 mL DMSO (27 mmol) in 12 mL DCM zugegeben und anschließend für 15 min gerührt. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe von 700 mg (3,8 mmol) (4-Methoxy-2-nitrophenyl)methanol in 12 mL DCM und es wurde für weitere 15 min bei -65 bis -60 °C gerührt. Nach Zugabe von 5,4 mL Triethylamin auf einmal wurde die Reaktionslösung über Nacht ohne Kühlung für 16 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zum Quenchen in Wasser gegossen und mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Extraktionsfraktionen wurden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt 650 mg (95 %, 3,6 mmol) 4-Methoxy-2-nitrobenzaldehyd als farbloses Pulver.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 10.26 (s, 1H, CHO) 7.97 (d, 1H, H-Ar), 7.484 (d, 1H, H-Ar), 7.23(m, 1H, H-Ar) 3.94 (s, 3H, O-CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 181,2

- **(E)-Methyl 3-(4-methoxy-2-nitrophenyl)acrylat (19)**



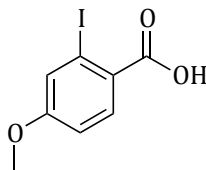
Zu einer Lösung von 468 mg (2,2 mmol) Methyl-diethylphosphonoacetat in 2,6 mL THF bei 0 °C wurden 80,6 mg (1,98 mmol) NaH (60 % auf Mineralöl) gegeben und die entstandene Suspension für 30 min gerührt. Anschließend wurden tropfenweise 300 mg (1,65 mmol) 4-Methoxy-2-nitrobenzaldehyd in 20 ml THF zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde für 3 ½ h bei RT gerührt und anschließend mit 4 mL Wasser gequenchet. Die Mischung wurde mit Ethylacetat extrahiert und die erhaltene organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde säulenchromatographisch (CHCl₃:MeOH, 15:0,5) aufgereinigt und man erhielt 309 mg (84 %, 1,4 mmol) (E)-Methyl 3-(4-methoxy-2-nitrophenyl)acrylat als farbloses Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 8.04 (d, 1H, CH=CH), 7.57 (d, 1H, H-Ar), 7.48 (d, 1H, H-Ar), 7.16 (dd 1H, H-Ar), 6.31 (d, 1H, CH=CH) 3.88 (s, 3H, O-CH₃), 3.79 (s, 3H, O-CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 237.3

R_f: 0,76 (CHCl₃:MeOH, 15:0,5)

- **2-Iod-4-methoxybenzoesäure (20)**



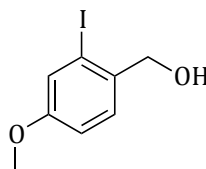
Zu einer Lösung von 112 mg (1,6 mmol) NaNO_2 in 0,75 mL H_2O wurde ein Gemisch aus 250 mg (1,5 mmol) 2-Amino-3-methoxybenzoesäure, 2 ml 25 %iger HCl und 2,5 g Eis gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 min gerührt und anschließend langsam eine Lösung aus 8,82 g KI in 8,75 mL H_2O bei 0 °C zugetropft. Anschließend wurde für weitere 12 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 35 mL 1M NaHCO_3 -Lösung gequencht und mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Durch säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:Etac:Ameisensäure, 1:1:0,05) ergab 170 mg (40 %, 0,61 mmol) an 2-Iod-4-methoxybenzoesäure als orangen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.79 (d, 1H, *H-Ar*), 7.51 (d, 1H, *H-Ar*), 7.04 (dd, 1H, *H-Ar*) 3.80 (s, 3H, O- CH_3)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 278,3

R_f : 0,66 (Hx:Etac:Ameisensäure, 1:1:0,05)

- **(2-Iod-4-methoxyphenyl)methanol (21)**



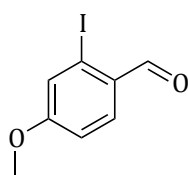
Zu einer Lösung von 170 mg (0,61 mmol) 2-Iod-4-methoxybenzoesäure in 1 mL THF wurden 0,4 mL Boran-Dimethylsulfid-Komplex-Lösung gegeben und die Reaktionslösung für 3 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen wurde zu der Lösung ein Gemisch aus Wasser und DCM (1:1) gegeben und mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4

getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt 107 mg (67 %, 0,41 mmol) (2-Iod-4-methoxyphenyl)methanol als orangenes Öl.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.35 (d, 1H, *H-Ar*), 7.32 (d, 1H, *H-Ar*), 6.90 (dd, 1H, *H-Ar*) 4.61 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$) 3.77 (s, 3H, O-CH_3)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 264,4

- **2-Iod-4-methoxybenzaldehyd (22)**

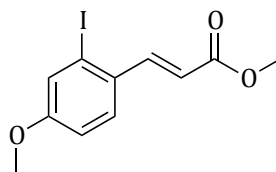


Zu einer Lösung von 0,13 mL (2,1 mmol) Oxalylchlorid in 2 mL DCM unter Argon-Atmosphäre bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ wurden tropfenweise 0,21 mL DMSO in 2 mL DCM zugegeben und anschließend für 15 min gerührt. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe von 108 mg (0,41 mmol) (2-Iod-4-methoxyphenyl)methanol in 1,5 mL DCM und es wurde für weitere 15 min bei -65 bis $-60\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Nach Zugabe von 5,4 mL Triethylamin auf einmal wurde die Reaktionslösung über Nacht ohne Kühlung für 16 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zum Quenchen in Wasser gegossen und mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Extraktionsfraktionen wurden mit Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt 90 mg (85 %, 0,35 mmol) 2-Iod-4-methoxybenzaldehyd als leicht gelblichen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 9.91 (s, 1H, CHO), 7.84 (d, 1H, *H-Ar*), 7.42 (d, 1H, *H-Ar*), 6.95 (dd, 1H, *H-Ar*), 3.87 (s, 3H, O-CH_3)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 262,3

- **(E)-Methyl 3-(2-iod-4-methoxyphenyl)acrylat (23)**



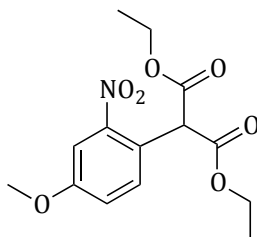
Zu einer Lösung von 94 mg (0,44 mmol) Methyl-diethylphosphonoacetat in 1 mL THF bei 0 °C wurden 16,4 mg (0,41 mmol) NaH (60 % auf Mineralöl) gegeben und die entstandene Suspension für 30 min gerührt. Anschließend wurden tropfenweise 90 mg (0,34 mmol) 2-Iod-4-methoxybenzaldehyd in 6 ml THF zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde für 3 h bei RT gerührt und anschließend mit 4 mL Wasser gequencht. Die Mischung wurde mit Ethylacetat extrahiert, die erhaltene organische Phase mit NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde säulenchromatographisch (Hx:EtAc, 4:1) aufgereinigt und man erhielt 51,5 mg (47 %, 1,4 mmol) (E)-Methyl 3-(2-iod-4-methoxyphenyl)acrylat als leicht gelbliches Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.83(d, 1H, CH=CH), 7.77 (d, 1H, H-Ar), 7.48 (d, 1H, H-Ar), 7.01 (dd 1H, H-Ar), 6.51 (d, 1H, CH=CH) 3.77 (s, 3H, O-CH₃), 3.72 (s, 3H, O-CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 318,4

R_f: 0,53 (Hx:EtAc, 4:1)

• **Diethyl 2-(4-methoxy-2-nitrophenyl)malonat (26)**



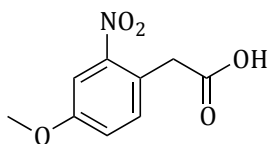
Zu einer Suspension aus 1,4 g (58,6 mmol) Natriumhydrid (60 % auf Mineralöl) in 17,5 mL DMF bei 0 °C wurden langsam 8,9 mL (58,6 mmol) Diethylmalonat zu getropft. Anschließend wurden 203 mg (1,335 mmol) Cäsiumfluorid und 5 g (26,6 mmol) 1-Chloro-4-methoxy-2-nitrobenzol zugegeben und für 45 min bei RT gerührt. Nach Rühren der Reaktionsmischung bei 105 °C für 12 h wurde mit Wasser gequencht und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in EtAc aufgenommen und mit 1M NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 4:1) ergab 1,73 g (19,1 %, 5,1 mmol) Diethyl 2-(4-methoxy-2-nitrophenyl)malonat als leicht rötliches Öl.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.59 (d, 1H, *H*-Ar), 7.46 (d, 1H, *H*-Ar), 7.21(dd, 1H, *H*-Ar), 5.24 (s, 1H, CH), 4.32-4.24 (q, 4H, O-CH₂-CH₃), 3.90 (s, 3H O-CH₃), 1.30 (t, 6H, O-CH₂-CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 311,45

Rf: 0,33 (Hx:EtAc, 4:1)

- **2-(4-Methoxy-2-nitrophenyl)essigsäure (27)**

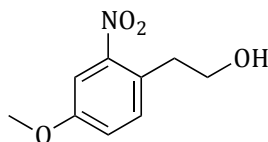


1,16 g (3,73 mmol) 2-(4-methoxy-2-nitrophenyl)malonat wurden in einer Mischung aus 25 mL EtOH und 25 ml 1M NaOH-Lösung gelöst und die Reaktionsmischung für 60 min bei 90 °C gerührt. Anschließend wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und man erhielt einen orange-gelben Feststoff. Dieser wurde in 20 mL THF gelöst, auf 0 °C herunter gekühlt und langsam 20 mL 5M HCl zugegeben. Nach anschließendem Rühren für 60 min bei 85 °C wurde die Reaktionslösung mit EtAc extrahiert und die vereinigten organischen Fraktionen über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man 782 mg (99 %, 3,7 mmol) 2-(4-Methoxy-2-nitrophenyl)essigsäure als braunen kristallinen Feststoff.

¹H-NMR: (300 MHz, MeOH-d₄) δ [ppm] = 7.62 (d, 1H, *H*-Ar), 7.35 (d, 1H, *H*-Ar), 7.23 (dd, 1H, *H*-Ar), 3.96 (s 2H, CH₂), 3.90 (s, 3H O-CH₃)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 211,2

- **2-(4-Methoxy-2-nitrophenyl)ethanol (28)**



772 mg (3,65 mmol)-2-(4-Methoxy-2-nitrophenyl)essigsäure wurden in 8 mL THF gelöst, anschließend 2,5 mL Boran-Dimethylsulfid-Komplex-Lösung und für 4 h unter RF gerührt. Nach Quenchen der Reaktion mit Wasser wurde mit EtAc extrahiert, die vereinigten organischen Fraktionen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

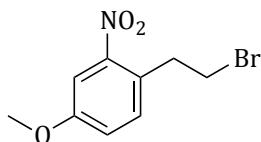
Säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 1:1) ergab 416 mg (60 %, 2,1 mmol) an 2-(4-Methoxy-2-nitrophenyl)ethanol als farblosen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.47 (d, 1H, *H-Ar*), 7.35 (d, 1H, *H-Ar*), 7.13 (dd, 1H, *H-Ar*), 3.92 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), 3.87 (s, 3H O- CH_3), 3.11 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 197,2

R_f: 0,46 (Hx:EtAc, 1:1)

- **1-(2-Bromomethyl)-4-methoxy-2-nitrobenzol (29)**



In 7 mL DCM wurden 404 mg (2,05 mmol) 2-(4-Methoxy-2-nitrophenyl)ethanol gelöst und unter Eiskühlung 0,237 mL (2,5 mmol) Phosphortribromid langsam zugetropft. Anschließend wurde die Reaktion 12 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit Wasser gequench und mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließende säulenchromatographische Aufreinigung (Hx:EtAc, 1:1) ergab 122 mg (23 %, 0,47 mmol) 1-(2-Bromomethyl)-4-methoxy-2-nitrobenzols als bräunlich-grünen wachsartigen Feststoff

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 7.523 (d, 1H, *H-Ar*), 7.32 (d, 1H, *H-Ar*), 7.14(dd, 1H, *H-Ar*), 3.89 (s, 3H O- CH_3), 3.67 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Br}$), 3.41 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Br}$)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 259,0

R_f: 0,91 (Hx:EtAc, 1:1)

5.3 Radiochemische Synthesen

5.3.1 Markierungen mittels Fluor-18

Allgemeines

Zur Analyse der Radiosynthesen wurden Reaktionskinetiken bzw. Ausbeuten mittels Radio-DC und/oder Radio-HPLC bestimmt. Zur Aufnahme der Reaktionskinetiken wurden nach 2, 5, 10, 15 und 20 min Aliquote a 100 μ L entnommen und in 100 μ L Wasser/Acetonitril (1:1), purem Wasser bzw. Methanol gequencht. Die anschließende Analyse mittels Radio-DC erfolgte durch Auftragung von ca. 1 μ L Probe und anschließender Entwicklung in den jeweils angegebenen Laufmitteln. Die Auswertung der DCs wurde an einem Instant Imager der Firma Packard Canberra durchgeführt.

Für die direkten nukleophilen ^{18}F -Fluorierungsreaktionen wurde durch eine $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion gewonnenes $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ in Form vom $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ (aq.) zunächst auf einer Sep Pak Light QMA Kartusche (konditioniert mit 10 mL einer 1M K_2CO_3 -Lösung und 15 mL Wasser) der Firma Waters fixiert und mit einer Lösung von Kryptofix (15 mg) und K_2CO_3 (15 μ L, 1M) in Acetonitril (1 mL) eluiert. Nach der Elution wurde das wässrige Acetonitril einer azeotropen Trocknung bei 85 $^\circ\text{C}$ unter einem Heliumstrom und einem Druck von 200 mbar für 16 min unterzogen. Während dieser Zeit wurde alle 4 min 1 mL trockenes Acetonitril in das Reaktionsgefäß gegeben und abschließend ein minimaler Druck von ca. 60 mbar angelegt. Der trockene Rückstand wurde anschließend in die gewünschten Lösungsmittel aufgenommen und für die direkten ^{18}F -Fluorierungen verwendet.

Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{DZ 3}$

Für die Synthese von $[^{18}\text{F}]\text{DZ 3}$ wurde das getrocknete $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ in 0,5 mL trockenem Acetonitril aufgenommen und in einen Wheaton-Reaktor, welcher **MV 2** (7 μ mol) in 0,5 mL Acetonitril enthielt gegeben und die Reaktion für 20 min bei 100 $^\circ\text{C}$ gerührt. Anschließend wurden 1 mL Acetonitril-Wasser-Gemisch (1:1),

welches bei 40 °C vorgewärmt wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch über ein semipräparatives HPLC-System mit einem Flow von 2,4 mL/min aufgereinigt. Als stationäre Phase diente eine Säule der Firma Phenomenex (Luna 5uC18 250x10.00 mm) und als mobile Phase wurde folgender Gradient verwendet, wobei **A** = Acetonitril und **B** = Wasser: 0-5 min 95 % B(isokratisch), 5-15 min 25 % B (Gradient), 15-20 min 95 % A (Gradient), 20-30 min 95 % A (isokratisch), 30-35 min 95 % B (Gradient). Der Produktpeak welcher nach 27 min erhalten wurde, wurde mit 10 mL Wasser verdünnt und auf einer Sep Pak Light+ C18 Kartusche der Firma Waters, welche mit 5 mL Acetonitril und 15 mL Wasser konditioniert worden war, fixiert. Die Elution in einen Wheatonreaktor, erfolgte mit 0,5 mL Acetonitril. Zur Entschützung des Zwischenprodukts wurden 250 µL 3,3M NaOH-Lösung zugegeben und für 15 min bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde mit 250 µL 3,3M HCl neutralisiert und das Reaktionsgemisch mit 1 mL Acetonitril-Wasser-Gemisch (1:1) verdünnt. Aufreinigung des gewünschten Radiotracers [**¹⁸F**]DZ 3 erfolgte mit dem bereits beschriebenen HPLC-System und der nach 20-23 min erhaltenen Produktpeak wurde mit 30 mL Wasser verdünnt. Nach Fixierung auf einer Sep Pak Light+C18 Kartusche wurde das Produkt mit 0,5 mL Acetonitril eluiert, dieses im Vakuum abgezogen und der Radiotracer in isotonischer NaCl-Lösung aufgenommen.

Radiosynthese von [¹⁸F**]DZ 2**

Für die Synthese von [**¹⁸F**]DZ 2 wurde das in 0,5 mL Acetonitril gelöste getrocknete [**¹⁸F**]Fluorid in einen Wheaton-Reaktor, welcher 5 µmol **MV 1** in 0,5 mL Acetonitril enthielt gegeben und die Markierungsreaktion für 20 min bei 90 °C durchgeführt. Nach Abkühlen wurden ca. 0,5 mL des Acetonitrils im Vakuum entfernt und die Entschützung durch Zugabe von 250 µL 3,3M NaOH-Lösung eingeleitet. Nach einer Reaktionszeit von 15 min bei 60 °C wurde mit 250 µL 3,3M HCl neutralisiert und 1 mL Acetonitril-Wasser-Gemisch (1:1) zugegeben. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mittels des bereit für die Synthese von [**¹⁸F**]DZ 3 beschriebenen HPLC-Systems und der nach 21-23 min erhaltene Produktpeak wurde mit 10 mL Wasser verdünnt. Nach Fixierung auf einer Sep Pak Light+ C18 Kartusche wurde der fertige

Radiotracer mit 0,5 mL Acetonitril eluiert, dieses im Vakuum entfernt und [¹⁸F]DZ 2 in isotonischer NaCl-Lösung aufgenommen.

5.3.2 Markierungen mittels Gallium-68

Für die radioaktive Markierung der Verbindung **46** mit ⁶⁸Ga wurde dieses aus der Elution nach dem Standardverfahren des ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-Generators gewonnen. Anschließende Entfernung störender Fremdmetalle erfolgte durch das Kationenaustauscher-basierte Post-Processing nach Eppard *et al.*^[82], wobei der Austauscher zunächst mit 1 mL N4-Lösung (80 % Ethanol/ 0,15M HCl) gewaschen und anschließend das Gallium mit 1 mL N5-Lösung (90 % Ethanol/ 0,9M HCl) eluiert wurde. Für die Markierungsreaktion wurden in einem Reaktionsgefäß auf dem Thermoschüttler zunächst 1 mL Natriumacetat-Puffer und 1 mL N5-Lösung bei pH = 4 und 95 °C vortemperiert und die Markierungsreaktion durch Zugabe von 15 µL (1 mmol/mL) Chelator in Ethanol gestartet. Nach 20 min Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung mit 3 mL Wasser verdünnt. Diese Mischung wurde über eine zuvor mit 1 mL EtOH und 1 mL Wasser konditionierte Sep Pak Light C18 der Firma Waters gegeben und die markierte Verbindung **46** fixiert. Anschließend wurde das freie Gallium mit 1 mL Wasser heruntergewaschen, Luft nachgedrückt und das radioaktive Produkt mit 0,5 mL EtOH eluiert.

6. Anhang

6.1 *Abkürzungsverzeichnis*

2-[¹⁸ F]FDG	2-[¹⁸ F]Fluor-D-desoxy-Glukose
A _s	spezifische Aktivität
Å	Angström
β ⁺	Positron
β-Zellen	Beta-Zellen
BASF	Badische Anilin- und Sodafabrik
BGO	Bismutgermanat
γ	Gamma-Quant
c.a.	carrier added
c.f.	carrier free
CT	Computertomographie
DAG	Diacylglycerol
DBCO	Dibenzylcyclooctin
DC	Dünnschichtchromatografie
DCM	Dichlormethan
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DZ 1,2,3	geplante Referenzverbindungen 1,2,3
EC	Elektroneneinfang
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EtAc	Ethylacetat
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol

FACS	fluorescence-activated cell sorting
FDG	Fluordesoxyglukose
FETos	Fluorethyltosylat
FFAR1	Free Fatty Acid Receptor 1
FP-(+)DTBZ	9-Fluorpropyl-(+)-Dihydrotetrabenazin
G $\alpha_{q/11}$	G-Protein-Untereinheit
GBq	Gigabecquerel
GLP-1R	Glucagon-Like Peptid 1 Rezeptor
GPR40	G-protein coupled receptor 40
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorphosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>)
Hx	Hexan
IP3	Inositoltriphosphat
keV	Kiloelektronenvolt
LADA	latent immune diabetes in adults
λ_{ex}	Wellenlänge Anregung
λ_{em}	emittierte Wellenlänge
LM	Lösungsmittel
LOR	line of response
LSO	Lutetiumoxyorthosilikat
LSM	Laser Scanning Miskroskopie
3M	3 molar
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
μ L	Mikroliter
μ mol	Mikromol
min	Minuten
mg	Milligramm
mL	Milliliter
MRT	Kernspintomographie

Anhang

MV 1,2,3	Markierungsvorläufer 1,2,3
n.c.a.	no carrier added
ng	Nanogramm
nmol	Nanomol
NMR	Kernspinresonanz
NODAGA	1,4,7-Triazacyclononan-1-glutarsäure-4,7-diessigsäure
NOTA	1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure
ns	Nanosekunden
PET	Positronen Emissions Tomographie
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
pK _a	Säureexponent
PKC	Proteinkinase C
PKD1	Proteinkinase D1
PLC	Phospholipase C
r	Radius
RCA	radiochemische Ausbeute
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
RF	Rückfluss
S _N 2	Nukleophile Substitution 2. Ordnung
S _N Ar	Nukleophile Substitution am Aromaten
SOB	start of bombardment
SPECT	Single Photon Emission Tomographie
SUR1	Sulfonharnstoffrezeptor 1
t _{1/2}	Halbwertszeit
TBA	tert-Butylammoniumhydroxid
TBATB	Tetrabutylammoniumtribromid
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran

TIPS	Triisopropylsilan
VMAT2	Vesikulärer Monoamin Transporter 2
ZP	Zwischenprodukt

6.2 Quellenverzeichnis

- [1] S. Sasaki, S. Kitamura, N. Negoro, M. Suzuki, Y. Tsujihata, N. Suzuki, T. Santou, N. Kanzaki, M. Harada, Y. Tanaka, et al., *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1365–78.
- [2] H. Lundqvist, M. Lubberink, V. Tolmachev, *Eur. J. Phys.* **1998**, *19*, 537–552.
- [3] G. DE HEVESY, *Nobel Lect.* **1944**.
- [4] B. Y. G. Hevesy, **1923**.
- [5] P. Jager, W. Vaalburg, *J. Nucl. Med.* **2001**, 432–445.
- [6] C. C. Cyran, C. Rist, P. M. Paprottka, M. Ingrisich, D. a. Clevert, A. Haug, M. F. Reiser, K. Nikolaou, *Wiener Klin. Mag.* **2011**, *14*, 16–21.
- [7] J. Czernin, M. Phelps, *Annu. Rev. Med.* **2002**, 89–112.
- [8] M. E. Phelps, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 9226–9233.
- [9] H. J. Ache, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1972**, *11*, 179–199.
- [10] H. Herzog, F. Rösch, *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, *34*, 468–473.
- [11] F. Zoller, Radiosynthese Und Evaluierung 68-Gallium-Markierten Porphirin-Derivaten Für Die PET, **2008**.
- [12] Ernest O. Lawrence, *Phys. Rev.* **1932**, *40*, 19–37.
- [13] M. Pruszyński, N. S. Loktionova, D. V Filosofov, F. Rösch, *Appl. Radiat. Isot.* **2010**, *68*, 1636–41.
- [14] K. P. Zhernosekov, D. V Filosofov, R. P. Baum, P. Aschoff, H. Bihl, A. a Razbash, M. Jahn, M. Jennewein, F. Rösch, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1741–8.
- [15] P. W. Miller, N. J. Long, R. Vilar, A. D. Gee, *Angew. Chemie* **2008**, *120*, 9136–9172.
- [16] Kabalka G. W.; Lambrecht R. M.; Fowler J. S.; Kunda S., *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1985**, *36*, 853–855.
- [17] B. K. Park, N. R. Kitteringham, P. M. O. Neill, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 443–470.

- [18] J. Bergman, O. Solin, *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24*, 677–683.
- [19] E. F. J. De Vries, G. Luurtsema, M. Bru, P. H. Elsinga, W. Vaalburg, *Appl. Radiat. Isot.* **1999**, *51*, 389–395.
- [20] B. Hamacher, Nebeling, *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part A. Appl. Radiat. Isot.* **1990**, *41*, 49–55.
- [21] B. Shen, D. Löffler, G. Reischl, H.-J. Machulla, K.-P. Zeller, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2010**, *53*, 113–119.
- [22] V. W. Pike, F. I. Aigbirhio, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 2215.
- [23] T. Ross, J. Ermert, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8018–8025.
- [24] R. Gail, C. Hocke, H. H. Coenen, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1997**, *40*, 50–52.
- [25] Y. Yamada, M. Okawara, *Bull. Chem. Soc. Og Japan* **1972**, *45*, 1860–1863.
- [26] K. L. Kirk, M. A. Channing, B. B. Dunn, I. I. M. A. Lesniak, R. C. Eastman, D. F. Ronald, R. Jesse, K. A. Jacobson, Y. Shai, *Biochemistry* **1989**, *28*, 4801–4806.
- [27] D. Block, H. H. Coenen, G. Stiscklin, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1988**, *25*, 185–200Ross.
- [28] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [29] V. V Rostovtsev, L. G. Green, V. V Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, 2596–2599.
- [30] T. L. Ross, M. Honer, P. Y. H. Lam, T. L. Mindt, V. Groehn, R. Schibli, P. A. Schubiger, S. M. Ametamey, *Bioconjugated Chem.* **2008**, *19*, 2462–2470.
- [31] K. Kettenbach, H. Schieferstein, T. L. Ross, *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–16.
- [32] B. Shen, D. Löffler, K.-P. Zeller, M. Ubele, G. Reischl, H.-J. Machulla, *Appl. Radiat. Isot.* **2007**, *65*, 1227–31.
- [33] I. Ekaeva, L. Barre, M.-C. Lasne, F. Gourand, *Appl. Radiat. Isot.* **1995**, *46*, 777–782.
- [34] J. Welch, J. Gong, C. S. Dence, D. Hwang, *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part A. Appl. Radiat. Isot.* **1991**, *42*, 1043–1047.
- [35] H. R. Maecke, J. P. Andre, *Ernst Scher. Res. Found. Work.* **2007**, 215–242.
- [36] G.-J. Meyer, H. Mäcke, J. Schuhmacher, W. H. Knapp, M. Hofmann, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2004**, *31*, 1097–104.
- [37] D. Mueller, I. Klette, R. P. Baum, M. Gottschaldt, M. K. Schultz, W. A. P. Breeman, *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 1712–1717.
- [38] S. Liu, S. Edwards, *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 7–34.

- [39] M. Fani, J. P. André, H. R. Maecke, *Contrast Media Mol. Imaging* **2008**, *3*, 67–77.
- [40] A. Majkowska-Pilip, A. Bilewicz, *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 313–20.
- [41] *Diabetes Care* **2006**, *29*, 43–48.
- [42] D. R. Whiting, L. Guariguata, C. Weil, J. Shaw, *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2011**, *94*, 311–21.
- [43] K. Badenhop, P. Weyrich, E. Ramos-Lopez, *Diabetologie in Klinik Und Praxis*, **2003**.
- [44] C. Heidemann, Y. Du, C. Scheidt-Nave, *GBE Kompakt Zahl. und Trends aus der Gesundheitsberichtserstattung des Bundes* **2011**, 2003.
- [45] G. A. Spinaz, R. Lehmann, *Schweiz Med Forum* **2001**, 519–525.
- [46] C. J. Rhodes, *Science* **2005**, *307*, 380–4.
- [47] J. J. Meier, *Diabetologia* **2008**, *51*, 703–13.
- [48] L. Leoni, B. B. Roman, *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 1582–1594.
- [49] D. R. Arifin, J. W. M. Bulte, *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **2011**, *27*, 761–766.
- [50] F. Saudek, C.-H. Brogren, S. Manohar, *Reviwe Diabet. Stud.* **2008**, 6–12.
- [51] I. A. N. R. Sweet, D. L. Cook, C. J. Greenbaum, K. A. Krohn, **2004**, *6*, 652–659.
- [52] a Schmitz, C.-Y. Shiue, Q. Feng, G. G. Shiue, S. Deng, M. T. Pourdehnad, R. Schirmacher, M. Vatamaniuk, N. Doliba, F. Matschinsky, et al., *Nucl. Med. Biol.* **2004**, *31*, 483–91.
- [53] B. Wängler, S. Schneider, O. Thews, E. Schirmacher, S. Comagic, P. Feilen, C. Schwanstecher, M. Schwanstecher, C.-Y. Shiue, a Alavi, et al., *Nucl. Med. Biol.* **2004**, *31*, 639–47.
- [54] B. Wängler, C. Beck, C. Y. Shiue, S. Schneider, C. Schwanstecher, M. Schwanstecher, P. J. Feilen, A. Alavi, F. Rösch, R. Schirmacher, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5205–9.
- [55] S. Schneider, P. J. Feilen, M. Schreckenberger, M. Schwanstecher, C. Schwanstecher, H. G. Buchholz, O. Thews, K. Oberholzer, a Korobeynikov, a Bauman, et al., *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2005**, *113*, 388–95.
- [56] M.-P. Kung, C. Hou, B. P. Lieberman, S. Oya, D. E. Ponde, E. Blankemeyer, D. Skovronsky, M. R. Kilbourn, H. F. Kung, *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 1171–6.
- [57] M. Freeby, M. Ichise, P. E. Harris, *Islets* **2012**, *2*, 393–397.
- [58] M. Tiedge, *Diabetologia* **2014**, *57*, 856–9.
- [59] M. Brom, W. Woliner-van der Weg, L. Joosten, C. Frielink, T. Bouckenooghe, P. Rijken, K. Andralojc, B. J. Göke, M. de Jong, D. L. Eizirik, et al., *Diabetologia* **2014**, *57*, 950–9.

- [60] M. Gotthardt, D. L. Eizirik, M. Cnop, M. Brom, *Trends Endocrinol. Metab.* **2014**, *25*, 375–7.
- [61] M. Brom, W. J. G. Oyen, L. Joosten, M. Gotthardt, O. C. Boerman, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37*, 1345–55.
- [62] A. Moore, *Eur. J. Radiol.* **2009**, *70*, 254–7.
- [63] C. P. Briscoe, M. Tadayyon, J. L. Andrews, W. G. Benson, J. K. Chambers, M. M. Eilert, C. Ellis, N. a Elshourbagy, A. S. Goetz, D. T. Minnick, et al., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11303–11.
- [64] S. B. Bharate, K. V. S. Nemmani, R. a Vishwakarma, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, *19*, 237–64.
- [65] Y. Itoh, Y. Kawamata, M. Harada, M. Kobayashi, Y. Tonaka, S. Fukusumi, H. Tanaka, M. Maruyama, R. Satoh, S. Okubo, et al., *Nature* **2003**, *422*, 173–176.
- [66] C. P. Briscoe, A. J. Peat, S. C. McKeown, D. F. Corbett, A. S. Goetz, T. R. Littleton, D. C. McCoy, T. P. Kenakin, J. L. Andrews, C. Ammala, et al., *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 619–28.
- [67] B. Ahrén, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 369–85.
- [68] J. Gromada, *Endocrinology* **2006**, *147*, 672–673.
- [69] M. Ferdaoussi, V. Bergeron, B. Zarrouki, J. Kolic, J. Cantley, J. Fielitz, E. N. Olson, M. Prentki, T. Biden, P. E. MacDonald, et al., *Diabetologia* **2012**, *55*, 2682–92.
- [70] A. D. Mancini, V. Poitout, *Trends Endocrinol. Metab.* **2013**, *24*, 398–407.
- [71] S. Mikami, S. Kitamura, N. Negoro, S. Sasaki, M. Suzuki, Y. Tsujihata, T. Miyazaki, R. Ito, N. Suzuki, J. Miyazaki, et al., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3756–76.
- [72] C. Fottner, E. Mettler, M. Goetz, E. Schirmmacher, M. Anlauf, D. Strand, R. Schirmmacher, G. Klöppel, P. Delaney, M. Schreckenberger, et al., *Endocrinology* **2010**, *151*, 2179–88.
- [73] R. Gopinath, S. J. Haque, B. K. Patel, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5842–5845.
- [74] N. Karade, G. Tiwari, S. Gampawar, *Synlett* **2007**, *2007*, 1921–1924.
- [75] R. M. Kierat, *Synthese , Modifikation Und Biologische Anwendung Fluoreszierender Xanthenfarbstoffe*, **2008**.
- [76] Sigma-Aldrich, *Datenblatt: Rhodamine B*, **2014**.
- [77] T. Nguyen, M. B. Francis, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3245–3248.
- [78] J. H. Wosnick, C. M. Mello, T. M. Swager, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3400–5.
- [79] J. E. Huheey, E. A. Keiter, R. L. Keiter, *Anorganische Chemie: Prinzipien von Struktur Und Reaktivität*, **2003**.

- [80] M. M. Herth, M. Piel, F. Debus, U. Schmitt, H. Lüddens, F. Rösch, *Nucl. Med. Biol.* **2009**, 36, 447–54.
- [81] K. P. Zhernosekov, D. V. Filosofov, R. P. Baum, P. Aschoff, H. Bihl, A. a Razbash, M. Jahn, M. Jennewein, F. Rösch, *J. Nucl. Med.* **2007**, 48, 1741–8.
- [82] E. Eppard, M. Wuttke, P. L. Nicodemus, F. Rösch, *J. Nucl. Med.* **2014**, 55, 1023–1028.

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zerfallseigenschaften wichtiger Positronenemitter	10
Tabelle 2: Produktion häufig verwendeter PET-Nuklide(Miller, Long, Vilar, & Gee, 2008)(Kabalka G. W.; Lambrecht R. M.; Fowler J. S.; Kunda S., 1985)	11
Tabelle 3: Produktionswege von Fluor-18 am Zyklotron	16
Tabelle 4: Durchgeführte Hydrierungsreaktionen mit den Edukten 19 und 23	54

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des β^+ -Zerfalls.....	7
Abbildung 2: Schema von 3- und 2-Quantenzerfall	8
Abbildung 3: Messprinzip der PET ^[11]	9
Abbildung 4: Selektive elektrophile Fluorierung von 6-[¹⁸ F]Fluor-L-Dopa ^[19]	18
Abbildung 5: Syntheschema von 2-[¹⁸ F]FDG.....	20
Abbildung 6: Radiochemische Ausbeuten nach Shen et al. an fluoriertem Benzol ^[21]	20
Abbildung 7: Schema der nukleophilen Fluorierung eines Diaryliodoniums Salzes.....	21
Abbildung 8: Selektive ¹⁸ F-Fluorierung des elektronenärmeren Aromaten in Diaryliodoniums Salzen ^[23]	21
Abbildung 9: Mit steigender Anzahl an Methylsubstituenten verbundene höhere radiochemische Ausbeute des substituierten Aromaten ^[24]	22
Abbildung 10: Intermediärer Komplex zwischen Iodoniumsalz und Fluorid während des nukleophilen Angriffs ^[25]	23
Abbildung 11: Herstellung und Verwendung von 2-[¹⁸ F]FETos	24
Abbildung 12: ¹⁸ F-Markierung eines Folsäurederivates mittels Click-Reaktion ^[30]	24
Abbildung 13: [¹⁸ F]DBCO zur kupferfreien Click-Reaktion	25
Abbildung 14: Beispiel für nukleophile ¹⁸ F-Markierung mit anschließender Rhodium katalysierter Decarbonylierung	25

Abbildung 15: Schematischer Aufbau eines bifunktionellen Chelators gekoppelt mit Targeting Vektor ^[38]	27
Abbildung 16: Strukturen von NOTA, NODAGA und DOTA.....	28
Abbildung 17: Natürlicher Verlauf des Typ-1-Diabetes ^[45]	30
Abbildung 18: A: 2-[¹⁸ F]Fluorethoxyglyburid ^[52] , B: [¹⁸ F]Repaglinid ^[53] , C: [¹¹ C]Methoxy-Repaglinid ^[54]	33
Abbildung 19: 9-[¹⁸ F]Fluorpropyl-(+)-Dihydrotetrabenazin ^[56]	33
Abbildung 20: Struktur von [Lys ⁴⁰ (DOTA)]exendin-3 ^[61]	34
Abbildung 21: Schematische Darstellung der Glukose induzierten Insulinfreisetzung ^[70]	36
Abbildung 22: Expression des FFAR 1 in humanem Gewebe ^[63]	36
Abbildung 23: FFAR1 Liganden (Agonisten) nach Sasaki et al. (links, EC ₅₀ :5,7 nM) ^[1] und Mikami et al. (rechts, EC ₅₀ :29,5 nM) ^[71]	39
Abbildung 24: Geplante fluoridierte Referenzverbindungen.....	39
Abbildung 25: Geplante Referenzverbindungen (DZ 1,2 und 3 von oben nach unten)	41
Abbildung 26: Synthese von Methyl 3-(2-fluoro-4-hydroxyphenyl)propanoat 3	42
Abbildung 27: Suzuki-Kupplung und anschließende Reduktion	43
Abbildung 28: Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion.....	43
Abbildung 29: Mitsunobu-Reaktion zwischen Verbindung 3 und 5 und anschließende Esterspaltung	44
Abbildung 30: THP-Schützung des Phenols 7	45
Abbildung 31: Bildung des Biphenyls 8 und anschließende Reduktion.....	46
Abbildung 32: Kopplung des Biphenyls 9 und des Phenols 3 zum Phenoether 10 mit anschließende Entschützung.....	46
Abbildung 33: Synthese von DZ 2	47
Abbildung 34: Synthese von DZ 3	48
Abbildung 35: Darstellung von MV 1 mit Zwischenprodukt ZP 1	49
Abbildung 36: Markierungsvorläufer MV 2 und Synthese von MV 3.....	50
Abbildung 37: Geplante Synthese des Iodoniumsalzes.....	51
Abbildung 38: Geplante Synthese von Verbindung 16	51
Abbildung 39: Verbindungen 15a-d mit fehlgeschlagener Iodierung	52
Abbildung 40: Synthese von Verbindung 19	52
Abbildung 41: Synthese von Verbindung 23	53
Abbildung 42: Verbindungen 24 und 25	54
Abbildung 43: Synthese von Verbindung 29	56
Abbildung 44: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin B.....	56
Abbildung 45: Synthese des Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Liganden	57

Abbildung 46: Synthese von Verbindung 30	58
Abbildung 47: Zyklisierung von primären Rhodamin-Amiden ^[77]	59
Abbildung 48: Synthese des Rhodaminpiperazinamids 34.....	60
Abbildung 49: Synthese des Spacers 36	60
Abbildung 50: Synthese von Verbindung 41	61
Abbildung 51: Synthese des Fluoreszenzfarbstoffes 43	62
Abbildung 52: Synthese des bifunktionellen Chelators 46.....	64
Abbildung 53: Struktur des Radioliganden [¹⁸ F]DZ 3 mit einer aliphatischen ¹⁸ F-Markierung	65
Abbildung 54: Radiochemische Ausbeute der ¹⁸ F-Markierung von MV 2 in verschiedenen Lösungsmitteln. Markierungsbedingungen: 3 µmol MV 2, 90 °C, 1 mL Lösungsmittel, 20 min.....	66
Abbildung 55: Radiochemische Ausbeute der ¹⁸ F-Markierung von MV 2 mit den Basen K ₂ CO ₃ und TBA. Markierungsbedingungen: 7 µmol MV 2, 90 °C, 1 mL Lösungsmittel, 20 min.....	67
Abbildung 56: RCA in Abhängigkeit von der Temperatur für die ¹⁸ F-Markierung von MV 2. Markierungsbedingungen: 7 µmol MV 2, K ₂ CO ₃ /K222, 1 mL Lösungsmittel, 20 min.	68
Abbildung 57: HPLC-Chromatogramm der semipräparativen Abtrennung des markierten Zwischenprodukts.....	69
Abbildung 58: HPLC-Chromatogramm der semipräparativen Abtrennung des markierten und entschützten Produkts [¹⁸ F]DZ 3.....	70
Abbildung 59: Struktur des Radioliganden [¹⁸ F]DZ 2.....	71
Abbildung 60: Radiochemische Ausbeute der Markierung von MV 3 mit [¹⁸ F]FETos bei verschiedenen Temperaturen.....	72
Abbildung 61: Temperaturscreening der ¹⁸ F-Markierung von MV 1. Markierungsbedingungen: 3 µmol MV 1, 1 mL Acetonitril, K ₂ CO ₃ /K222, 20 min.....	73
Abbildung 62: ¹⁸ F-Markierung von MV 1 (n(MV 1) =5 µmol, 90 °C, K ₂ CO ₃ /K222, MeCN)	74
Abbildung 63: Radio-DC der ¹⁸ F-Markierung von MV 1 (links) und nachfolgende Entschützung zu [¹⁸ F]DZ 2 (rechts). Bedingungen: 5 µmol MV 1, 1 mL Acetonitril, 90 °C, K ₂ CO ₃ /K222, 20 min; Entschützung: 500 µL Acetonitril, 250 µL 3,3M NaOH-Lösung, 60 °C, 15 min.	75
Abbildung 64: Radio-DC (0,1 M Citrat-Puffer) der Reaktionskinetik der ⁶⁸ Ga-Markierung von 46 in Natriumacetat-Puffer: freies Gallium, 1, 3, 5, 10, 15, 20 min	76

Anhang

Abbildung 65: ^{68}Ga -Markierung von Verbindung 46 in Wasser (30 nmol) und Natriumacetat-Puffer (15 nmol).....	77
Abbildung 66: Radio-DC nach Aufreinigung des markierten Chelators über eine C-18-Kartusche: Waschlösung (links), Eluat (rechts).....	77
Abbildung 67: Stabilitäten der mit ^{68}Ga -markierten Verbindung 46 in humanem Serum (rot-braun) und 0,9 %iger NaCl-Lösung (blau)	78
Abbildung 68: Vitalitäten von Langerhans'schen Inseln nach Inkubation für 24 h mit DZ 1, DZ 2 und DZ 3, sowie eine Kontrolle ohne Ligand	80
Abbildung 69: LSM-Aufnahme von für 24 h mit Verb. 43 inkubierten Langerhans'schen Inseln	81
Abbildung 70: Fluoreszenzintensitäten von mit Verbindung 43 (schwarz) und Rhodamin B (grün) inkubierten sowie zur Kontrolle farbstofffreien (rot) Rin-M Zellen	82
Abbildung 71: LSM-Aufnahmen von für 120 min mit Verbindung 43 (links) und Rhodamin B (rechts) inkubierten RIN-M Zellen.....	83

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. T. Ross in der Zeit vom 01.01.2011 bis zum 17.12.2014 am Institut für Kernchemie der Johannes Gutenberg-Universität durchgeführt. Ich versichere, dass ich die Arbeit selbst durchgeführt und keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Dominikus Zimmermann

Mainz, Dezember 2014