

Die ^{18}F -Fluorierung verschiedener Aminosäuren als Tracer für
die Tumor-Diagnostik mittels
Positronen-Emissions-Tomographie

Dissertation
zur Erlangung des Grades
“Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Boris Wolf

Mainz 2005

1 Abstract

Cancer is one of the main causes of death in western countries, next to cardiovascular diseases. The success of treatment is highest, if cancer is diagnosed in the early stages. Amongst Magnetic Resonance Tomography (MRT) and Computer Tomography (CT), Positron Emission Tomography (PET) is employed to detect smallest tumors and metastasis.

Two new PET-tumor-tracers, 2-amino-N¹-(2-[¹⁸F]fluoro-ethyl)-succinamide and 2-amino-4-[¹⁸F]-fluorobutanoic acid, were developed, the synthesis was optimized and in *in vitro*- and *in vivo*-tests were carried out.

The labelling of 2-amino-N¹-(2-[¹⁸F]fluoro-ethyl)-succinamide is realized with the precursor 2-[¹⁸F]fluoroethylamine. 2-[¹⁸F]fluoroethylamine was synthesised from N,N-dibenzyl-(2-bromoethyl)-amine with n.c.a. ¹⁸F-fluorid in acetonitril by 80 °C in 5 min. The benzylgroups of N,N-dibenzyl-2-[¹⁸F]fluoroethylamine were removed by hydrogenation. For the removal of acetonitril, 2-[¹⁸F]fluoro-ethylamine (bp. 63 °C) is transformed into the trifluoro-acetic acid salt. After the removal of the solvent, 2-[¹⁸F]fluoroethylamine was treated with triethylamine to destroy the salt.

The labelling of 2-amino-N¹-(2-[¹⁸F]fluoro-ethyl)-succinamide with 2-[¹⁸F]fluoroethylamine was carried out in DMF by 60 °C. Optimal yield is obtained after 4 min reaction time. The purification is a multistep process including HPLC. 2-amino-N¹-(2-[¹⁸F]fluoro-ethyl)-succinamide was finally available in an isotonic NaCl solution.

In vitro-tests with 2-amino-N¹-(2-[¹⁸F]fluoro-ethyl)-succinamide was performed on 5 different tumor cell types (3 epithelial and 2 melanomic cell lines). 2-amino-N¹-(2-[¹⁸F]fluoro-ethyl)-succinamide accumulated in the cells. The concentration of 2-amino-N¹-(2-[¹⁸F]fluoro-ethyl)-succinamide levelled off after 20 min. In a blocking-experiment the cells were treated with saturated asparagin solution before they incubated with 2-amino-N¹-(2-[¹⁸F]fluoro-ethyl)-succinamide. 2-amino-N¹-(2-[¹⁸F]fluoro-ethyl)-succinamide was still transported into the cells. The melanomic cells shows a little less uptake of 2-amino-N¹-(2-[¹⁸F]fluoro-ethyl)-succinamide, but the epithelial cells shows no change. Compared to FDG under identical conditions 2-amino-N¹-(2-[¹⁸F]fluoro-ethyl)-succinamide showed a higher uptake. *In vivo*-tests with 2-amino-N¹-(2-[¹⁸F]fluoro-ethyl)-succinamide in Sprague Dawley rats shows no significant uptake of 2-amino-N¹-(2-[¹⁸F]fluoro-ethyl)-succinamide in the tumors and high uptake in kidneys.

The synthesis of 2-amino-4-[¹⁸F]-fluorobutanoic acid realized with a stereodirecting helping agent (auxiliary). The auxiliary (1R,2R,5R)-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidene-amino) acetic acid *tert*-butylester was found to be the best auxiliary for the synthesis of 2-amino-4-[¹⁸F]-fluorobutanoic acid.

The enantiomeric excess of 2-amino-4-[¹⁸F]-fluorobutanoic acid out of (1R,2R,5R)-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidene-amino) acetic acid *tert*-butylester is calculated as > 93 % ee. The labelling of (1R,2R,5R)-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidene-amino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butanoic acid *tert*-butylester (MA) was carried out with n.c.a. ¹⁸F-fluorid. As MA is pH- and temperature sensitive, 4-toluol-4-sulfonyloxy was chosen as a leaving group, because it could be inserted into the molecule under mild conditions.

For the ¹⁸F-fluorination of MA the choice of the base system proved to be crucial. The maximum yield of 55 % rcy was obtained with potassium oxalic acid as base at 80 °C after a reaction time of 15 min. The removal of the protection groups and the purification of the product required multiple steps including a HPLC-purification. After 150 min 2-amino-4-[¹⁸F]-fluorobutanoic acid was obtained in isotonic NaCl solution with a yield of > 10 % rcy.

In *in vivo*-tests with 2-amino-4-[¹⁸F]-fluorobutanoic acid in Sprague Dawley rats showed that less than 0.5 % of the injected dose of 2-amino-4-[¹⁸F]-fluorobutanoic acid is found in the tumors. The fraction of the activity was found in the kidneys. The uptake of 2-amino-4-[¹⁸F]-fluorobutanoic acid in the tumors reached a constant value after 10 min. The relation of tumor to non-tumor uptake was found to be 2.2. This value is within the range of other clinically used tracers e.g. O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosin with 1.5.

2 Zusammenfassung

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen neben Herz-Kreislaufkrankungen in den Industrienationen. Die Heilungschancen von Krebs sind umso größer, je früher er erkannt wird. Neben der Kernspintomographie (MRT) und der Computertomographie (CT), dienen insbesondere die Positronen-Emissions-Tomographen (PET) zur Diagnose kleinster Tumore.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Synthese und Markierung, sowie die *in vitro*- und *in vivo*-Evaluierung zweier markierter Aminosäuren. Es wurden die PET-Tumor-Tracer C^{14} -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin und S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure synthetisiert.

Die Markierung zum C^{14} -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin wurde mit 2-[^{18}F]Fluorethylamin als Precursor durchgeführt. Ausgehend von N,N-Dibenzyl-(2-bromomethyl)-amin wurde zunächst N,N-Dibenzyl-(2-[^{18}F]fluorethyl)-amin in einer nukleophilen Substitution mit [^{18}F]Fluorid in Acetonitril bei 80 °C mit einer Reaktionsdauer von 5 min dargestellt. Zur Abtrennung überschüssigen [^{18}F]Fluorids wurde das Roh-Produkt auf einer Sep-Pak Plus Kartusche (C_{18}) fixiert und mit Acetonitril eluiert. Die Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen erfolgte durch die Zugabe von Pd/C zu dem eluierten N,N-Dibenzyl-(2-[^{18}F]fluorethyl)-amin und Behandlung der Lösung im leichten Wasserstoffstrom. Im finalen Aufreinigungsschritt wird der Katalysator Pd/C mittels eines Membranfilters abgetrennt. Das 2-[^{18}F]Fluorethylamin wird im Säuren in das Amino-Salz überführt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Die Markierung zum C^{14} -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin wurde in DMF durchgeführt. Die höchsten Ausbeuten werden nach 4 min bei 60 °C erhalten. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgt durch Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur in 8 min. Die Aufreinigung des C^{14} -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin mittels HPLC und Festphasenextraktion liegt das Produkt in einer isotonischen Kochsalzlösung vor.

Die *in vitro*-Versuche wurden mit C^{14} -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin an 5 verschiedenen Zelllinien durchgeführt, 3 Plattenepithel- und 2 Melanome. Hierbei konnte eine erhöhte Akkumulation von C^{14} -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin beobachtet werden, die innerhalb von 20 min einen konstanten Wert erreicht. Ein Blockade-Experiment zeigte, dass sich die Aufnahme von C^{14} -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin durch gesättigte Asparagin-Lösung bei den Plattenepithelen gar nicht und bei den Melanomen nur leicht vermindern ließ. Da die Aufnahme von C^{14} -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin in die Zellen höher war als bei FDG bei dem gleichen Versuchsaufbau, wurden *in vivo*-Versuche angesetzt.

Die *in vivo*-Versuche an Sprague Dawley Ratten mit C^{14} -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin zeigten keine messbare Anreicherung von C^{14} -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin in Tumoren. Fast die komplette Aktivität wurde in der Niere und Blase wiedergefunden.

Die Synthese von S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure wurde über stereodirigierende Auxilliare realisiert. Dazu wurden die geeignetsten Auxillare ausgewählt und auf ihre Eignung verglichen. Der Vergleich der stereodirigierenden Auxillare zeigte, dass das (1R,2R,5R)-2-Hydroxy-2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino)-essigsäure *tert.*-butylester (Laue-Auxillar) am geeignetsten ist.

Die ^{18}F -Markierung von S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure wurde so optimiert, dass eine möglichst hohe stereochemische Reinheit des Produktes erzielt wird. Die optische Reinheit von S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure wurde mit > 93 % ee berechnet.

Die Synthese des Markierungsvorläufers wurde ausgehend vom Laue-Auxillar aufgebaut. Als Abgangsgruppe hat sich die Tosylgruppe besonders bewährt. Sie lässt sich unter besonders schonenden Bedingungen in den säurelabilen (1R,2R,5R)-4-Hydroxy-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino) butansäure *tert.*-butylester einführen.

Bei der ^{18}F -Markierung von S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure mittels n.c.a. [^{18}F]Fluorid hat sich die Wahl des Basensystems als besonders wichtig erwiesen. Die maximale Ausbeuten von 55 % wurde mit Oxalat als Basensystem in Acetonitril bei 80 °C und einer Reaktionszeit von 15 min erzielt. Die Abspaltung der Schutzgruppen und die Abtrennung des Produktes wird in mehreren Schritten durchgeführt einschließlich einer HPLC-Abtrennung. Es wird nach 150 min Synthesedauer das gereinigte S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure in isotonischer Kochsalzlösung mit einer Ausbeute

von > 10 % RCA erhalten.

Bei *in vivo*-Versuchen an Sprague Dawley Ratten reicherte sich der Hauptteil der Aktivität in der Niere an und nur weniger als ein halbes Prozent der applizierten Aktivität fand sich in den Tumoren wieder. Nach 10 min wurde ein maximaler Wert erreicht, der sich bis zum Ende der Messung nicht verändert. Das Verhältnis von Tumoraktivität zu unspezifisch-gebundener Aktivität betrug 2,2. Damit liegt das Verhältnis im Bereich der meisten klinisch eingesetzten PET-Tumor-Tracer wie dem des O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-tyrosin mit 1,5.

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	II
2	Zusammenfassung	III
3	Einleitung	1
3.1	Kurzlebige Positronenstrahler in der Nuklearchemie	1
3.2	Produktion von [¹⁸ F]Fluor	5
3.3	Kernchemische Aspekte von ¹⁸ F-Fluorierungen	6
3.4	¹⁸ F-Fluorierungen	6
3.4.1	Elektrophile ¹⁸ F-Fluorierungen	6
3.4.2	Nukleophile ¹⁸ F-Fluorierungen	7
3.5	¹⁸ F-fluorierte Aminosäuren für die Tumordiagnostik mittels PET	9
3.5.1	Aminosäuren	13
3.5.2	Aminosäuren als PET-Tracer	18
3.5.3	Aminosäuretransporter	20
3.5.4	¹⁸ F-Fluorite Aminosäuren	22
3.5.5	Asparagin	27
4	Problemstellung	29
5	Ergebnisse und Diskussion	30
5.1	Synthese der Markierungsvorläufer und der inaktiven Referenzverbindungen	30
5.1.1	3-Fluor-Asparagin	30
5.1.2	2-Amino-N ¹ -(2-fluorethyl)-succinamid	34
5.1.3	S-2-Amino-4-fluor-butansäure	36
5.2	Radiochemischer Teil	46
5.2.1	C ¹ -(2-[¹⁸ F]Fluorethylamino)-asparagin	46
5.2.2	S-2-Amino-4-[¹⁸ F]fluor-butansäure	51
5.3	Pharmakologischer Teil	65
5.3.1	<i>In vitro</i> -Uptake-Versuche mit C ¹ -(2-[¹⁸ F]Fluorethylamino)-asparagin	65
5.3.2	<i>In vivo</i> -Verteilungsstudien mit C ¹ -(2-[¹⁸ F]Fluorethylamino)-asparagin	68
5.3.3	<i>In vivo</i> -Verteilungsstudien mit S-2-Amino-4-[¹⁸ F]fluor-butansäure	69
6	Experimenteller Teil	74
6.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	74
6.2	Organische Synthesen	76
6.2.1	(2-Fluorethyl)-carbaminsäure <i>tert.</i> -butylester	76
6.2.2	(2-Hydroxyethyl)-carbaminsäure <i>tert.</i> -butylester	76
6.2.3	Toluol-4-sulfonsäure 2- <i>tert.</i> -butoxycarbonylamino ethylester	76
6.2.4	N,N-Dibenzyl-2-fluorethylamin	77
6.2.5	2-Dibenzylamino-ethanol	77
6.2.6	N,N-Dibenzyl-(2-bromethyl)-amin	78
6.2.7	[2-Carbamoyl-1-(2-fluor-ethylcarbamoyl)-ethyl]-carbaminsäure <i>tert.</i> -butylester	78
6.2.8	2-Amino-N ¹ -(2-fluorethyl)-succinamid	79
6.2.9	Di-Natrium-cis-succinepoxid	79
6.2.10	threo-3-Hydroxy-aparaginsäure	80
6.2.11	threo-3-Hydroxy-aparaginsäure-4-benzylester	80
6.2.12	threo-3-Hydroxy-aparagin	81
6.2.13	N1-Cbz-threo-3-Hydroxy-aparaginsäure	81

6.2.14	N ¹ -Cbz-N ² -4,4'-Dimethoxybenzhydrol-threo-3-hydroxy-asparagin	82
6.2.15	N ¹ -Cbz-N ² -4,4'-Dimethoxybenzhydrol-threo-3-hydroxy-asparagin-methylester	83
6.2.16	(R)-3-Isopropyl-2,5-diketopiperazin	83
6.2.17	3,6-Bisethoxy-2R-iso-isopropyl-2H-dihydropyrazin (Bislactimether)	84
6.2.18	(1R,2R,5R)-2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino)-essigsäure <i>tert.</i> -butylester	85
6.2.19	(1R,2R,5R)-4-Hydroxy-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino) butansäure <i>tert.</i> -butylester	85
6.2.20	(1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure <i>tert.</i> -butylester	86
6.2.21	(1R,2R,5R)-4-Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidene-amino)butansäure <i>tert.</i> -butylester	87
6.2.22	2-Amino-4-fluor-butansäure <i>tert.</i> -Butylester	87
6.2.23	2-Amino-4-fluor-butansäure	88
6.3	Radiochemische Synthesen	89
6.3.1	[¹⁸ F]Fluorid	89
6.3.2	2-[¹⁸ F]Flourethylamin aus N-Boc-2-Amino-O-tosyl-ethylester	89
6.3.3	2-[¹⁸ F]Flourethylamin aus N,N-Dibenzyl-(2-bromethyl)-amin	89
6.3.4	C ¹ -[¹⁸ F]Flourethylamino-asparagin mittels 'one-pot-synthesis'	89
6.3.5	C ¹ -[¹⁸ F]Flourethylamino-asparagin durch gereinigtes 2-[¹⁸ F]Flourethylamin	89
6.3.6	S-2-Amino-4-[¹⁸ F]fluor-butansäure	90
7	Literatur	91
8	Anhang	96
A	Abkürzungen	96

3 Einleitung

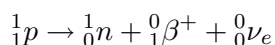
Als erster erkannte der ungarische Chemiker Georg von Hevesy (1885 - 1966) die fundamentale Bedeutung von Radionukliden zur Aufklärung physiologischer und chemischer Prozesse. Er verwendete radioaktive Isotope wie ^{32}P und ^{212}Pb , um den Metabolismus von Pflanzen und Tieren *in vivo* zu verfolgen, ohne ihn dabei zu beeinflussen [3]. Für seine Arbeiten über die Verwendung von Isotopen als Indikatoren bei der Erforschung chemischer Prozesse wurde er 1943 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Heute gilt das auf von Hevesy zurückgehende Tracerkonzept als Fundament für die nuklearmedizinische Funktions-Diagnostik.

3.1 Kurzlebige Positronenstrahler in der Nuklearchemie

In der nuklearmedizinischen Anwendung von Radionukliden werden heute moderne computergestützte diagnostische Verfahren, wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder die Einzel-Photonen-Emissions-Computer-Tomographie (SPECT) [6], genutzt, um durch Einsatz kurzlebiger, radioaktiv markierter Verbindungen biochemischer Stoffwechselvorgänge *in vivo* zu verfolgen. Im Vergleich zu anderen bildgebenden diagnostischen Verfahren, wie der Kernspintomographie (NMR) und der Röntgen-Computer-Tomographie (CT), die primär morphologische Zustände erfassen, nehmen die PET und die SPECT eine herausragende Stellung ein, da sie in der Lage sind, biochemische Prozesse auf nichtinvasive Weise *in vivo* darzustellen.

Bei der SPECT werden Nuklide verwendet, die in Folge des Kernzerfalls ein einzelnes Photon emittieren. Das Photon wird mit gleicher Wahrscheinlichkeit in alle Raumrichtungen abgestrahlt. Daher ist bei diesem Verfahren eine Bestimmung des Zerfallsortes auf einige Zentimeter beschränkt.

Bei der PET hingegen werden Positronenstrahler (β^+ -Strahler) genutzt, deren spezielle Zerfallscharakteristik je nach der kinetischen Energie des emittierten Positrons eine Ortsauflösung von 2-5 mm ermöglicht. Bei einem Positronenstrahler handelt es sich um einen neutronenarmen, instabilen Atomkern. Durch Konvertierung eines Protons (p) in ein Neutron (n) wird dessen Mangel an Neutronen behoben und gleichzeitig ein Positron (β^+) und ein Elektronneutrino (ν_e) emittiert:



Die emittierten Positronen besitzen eine hohe kinetische Energie, verlieren diese aber durch Abbremsvorgänge im umgebenden Gewebe innerhalb weniger Millimeter. Dann rekombiniert das Positron mit seinem Antiteilchen, dem Elektron, unter Emission zweier 511 keV γ -Quanten, die aus den Ruhemassen der beiden Teilchen resultieren und die aufgrund von Impuls- und Energieerhaltung in einem Winkel von nahezu 180° abgestrahlt werden [7], also in entgegengesetzte Raumrichtungen.

Die γ -Strahlung durchdringt das Körpergewebe leicht und kann von außen durch zwei gegenüberliegende, in Koinzidenz geschaltete Detektoren nachgewiesen werden. Dadurch ist ein ortsabhängiger Nachweis möglich, denn die zwei gegenüberliegenden Detektoren registrieren nur dann ein Zerfallsereignis, wenn sie gleichzeitig, also innerhalb der Koinzidenzauflösungszeit von wenigen Nanosekunden, getroffen werden (Abb. 1).

Moderne PET-Kameras bestehen aus 6 bis 8 ringförmig angeordneten Detektorsystemen mit hunderten Einzeldetektoren. Mehrere solcher Detektorsysteme, in denen jeder Detektor mit gegenüberliegenden Detektoren im gleichen und im benachbarten Ring in Koinzidenz geschaltet ist, erlauben es, Aktivitäten mit einer hohen Ortsauflösung zu erfassen. Durch eine vorangehende Transmissionsmessung zur Schwächungskorrektur können Aktivitäten quantitativ erfasst und regionale Aktivitätskonzentrationen im piko- bis nanomolaren Bereich in sehr kleinen Volumina als Funktion der Zeit gemessen und dreidimensional bildlich dargestellt werden. Die computerunterstützte Datenerfassung ermöglicht es, Schnittbilder von Organen oder Tumorgewebe zu erstellen.

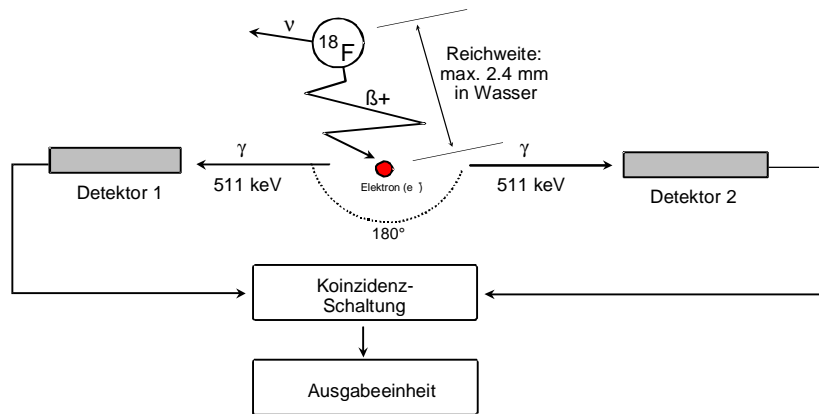
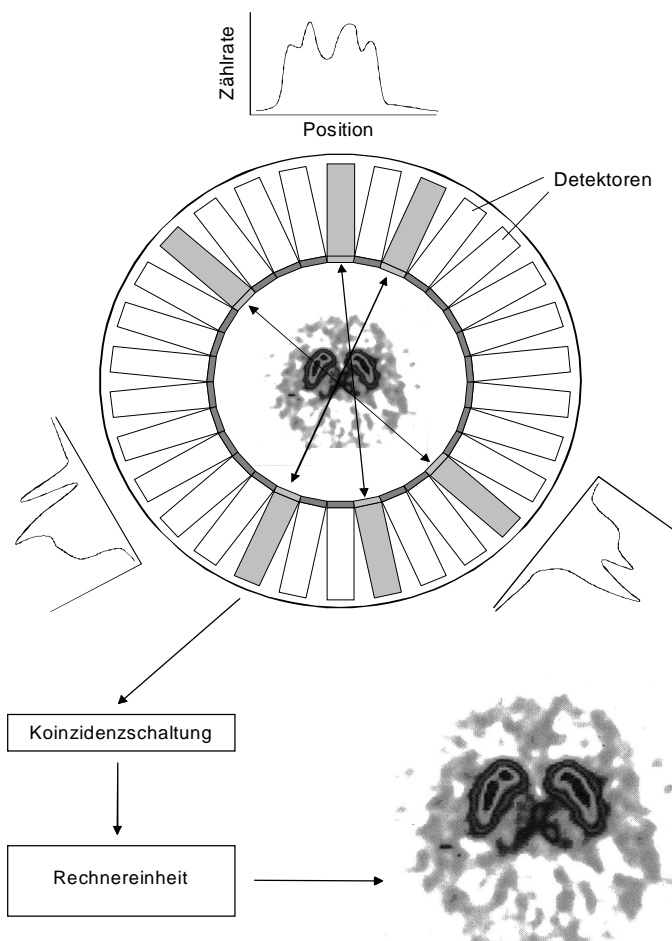
Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Positronenvernichtung und der γ - γ -Koinzidenz

Abbildung 2: Messprinzip eines Positronenemissionstomographen

Neben ihrer geeigneten Zerfallsstrahlung bieten die kurzlebigen Positronenstrahler für diagnostische Zwecke *in vivo* noch einige weitere Vorteile. Bei Verwendung geeigneter Kernreaktionen und Teilchenenergien bei der Produktion im Zyklotron lassen sich, wie auch bei der SPECT, Nuklide mit ho-

her radionuklidischer Reinheit produzieren und hohe spezifische Aktivitäten erzielen. Dadurch wird die Markierung von Verbindungen im subnanomolaren Bereich ermöglicht, so dass auch toxische oder zentralwirksame Substanzen in der PET angewendet werden können. Desweiteren ermöglichen die kurzen Halbwertszeiten der Positronenstrahler wiederholte Anwendungen in relativ kurzen Zeitintervallen bei geringer Strahlenbelastung für den Patienten. Die kurzen Halbwertszeiten bringen aber auch einige Nachteile im Umgang mit diesen Radionukliden mit sich: es sind sehr hohe Anfangsaktivitäten nötig, die Markierungen nur in abgeschirmten, vollautomatischen Syntheseapparaturen zulassen. Äußerst kurzlebige Positronenstrahler müssen am Einsatzort hergestellt und weiterverarbeitet werden.

Da bei zunehmender Massenzahl neutronenarmer Kerne eine Konkurrenzreaktion zur Positronenemission, der Elektroneneinfang (EC), existiert, ist die Zahl der Nuklide, die sich für die PET eignen, stark limitiert. Die wichtigsten Positronenstrahler für die PET sind in Tabelle 1 [5] zusammengestellt.

Tabelle 1: Wichtige Positronenemitter für die PET [5]

Nuklid	Halbwertszeit $t_{1/2}$ / min	Zerfallsart (% Häufigkeit)	$E_{\beta, max}$ / MeV	Reichweite in H_2O / mm
^{11}C	20,3	β^+ (99,8) EC (0,2)	0,96	4,1
^{13}N	9,96	β^+ (100) EC (0)	1,19	5,4
^{15}O	2,03	β^+ (99,9) EC (0,1)	1,70	8,2
^{18}F	109,7	β^+ (96,9) EC (3,1)	0,63	2,4
^{76}Br	16,7 h	β^+ (66,5) EC (33,5)	3,60	15,5
^{86}Y	14,7 h	β^+ (31,4) EC (68,6)	1,18	5,3

Das Tracerkonzept in der Nuklearmedizin bedient sich biochemisch relevanter Moleküle, bei denen stabile Atome durch Radioisotope ersetzt werden. Es werden zwei unterschiedliche Konzepte benutzt, das des Isotopentracers und das des Analogtracers.

Beim Isotopentracer wird ein stabiles Isotop in einem Molekül gegen ein Radioisotop desselben Elements ausgetauscht. Da sich Isotope nicht in ihren chemischen Eigenschaften und kaum in den physikalischen Eigenschaften unterscheiden, ändern sich durch diese Art der radioaktiven Markierung die pharmakodynamischen Eigenschaften des Moleküls nicht [4]. Die meisten in biologischen Systemen vorkommenden Moleküle enthalten Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff, weswegen die Isotope ^{11}C , ^{15}O und ^{13}N als Isotopentracer besonders geeignet scheinen. Eine Auswahl des auszutauschenden Atoms hängt aber auch von anderen Gesichtspunkten, wie der Synthesestrategie der Markierung und dem Metabolismus des Moleküls am Einsatzort, der maximalen Energie des emittierten Positrons und der Halbwertszeit des Radionuklides ab. Von der maximalen Energie des emittierten Positrons hängt die Ortsauflösung ab: Je kleiner die Energie des emittierten Positrons desto geringer ist die Reichweite des Positrons vor der Rekombination mit dem Elektron und desto höher ist die Ortsauflösung. Außerdem bedingt eine geringere β^+ -Energie auch eine geringere Strahlenbelastung des Patienten.

Da die Halbwertszeiten der genannten Nuklide recht gering sind, sind die markierten Moleküle zur Untersuchung von langsamen Stoffwechselprozessen ungeeignet. Insbesondere sollten auch die Synthese sowie die Qualitätskontrolle innerhalb von ca. drei Halbwertszeiten abgeschlossen sein, was bei komplizierten, mehrstufigen Synthesen nur im Falle des ^{11}C möglich scheint.

Längerlebige Positronenemitter, wie zum Beispiel das ^{18}F , eignen sich als Analogtracer, da nur

wenige relevante Biomoleküle Fluor enthalten. Durch geeignete chemische Reaktionen wird an die inaktive Verbindung ein „fremdes“ Radionuklid oder eine das Radionuklid enthaltende „fremde“ Molekülgruppe gebunden. Da sich so die chemischen Eigenschaften der markierten Verbindung in der Regel ändern, muss untersucht werden, ob derart markierte Moleküle noch die im Wesentlichen gleichen pharmakologischen Eigenschaften besitzen wie das Originalmolekül. Voraussetzung hierfür sind entweder ähnlicher sterischer Raumbedarf oder vergleichbare elektronische Parameter und Lipophilie.

Mit einem van-der-Waals-Radius von 1,35 Å ist Fluor Wasserstoff mit einem van-der-Waals-Radius von 1,20 Å sterisch ähnlich, worauf die Entwicklung der meisten ^{18}F -markierten Radiopharmaka beruht. Die ähnlichen Bindungslängen einer C-F-Bindung (1,39 Å) und einer C-OH-Bindung (1,42 Å), sowie die Ähnlichkeiten in den Ladungsdichten der Bindungen und im Bindungsverhalten ermöglichen eine Substitution von Hydroxylgruppen durch Fluor. Da F und OH jedoch sehr unterschiedliche Elektronegativitäten besitzen, werden die chemischen Eigenschaften des Moleküls durch die Substitution verändert. Das muss jedoch nicht von Nachteil sein, was am Beispiel der 2- ^{18}F Fluordesoxy-D-glucose gezeigt werden soll. Hier wird die Hydroxylgruppe in 2-Position gegen ^{18}F Fluor substituiert (Abb. 3).

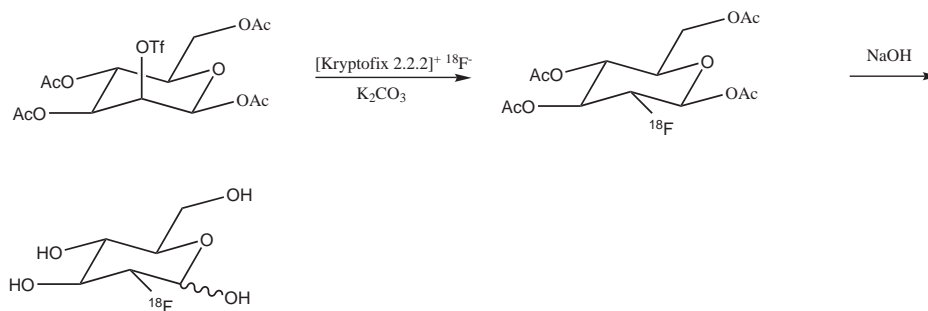


Abbildung 3: Synthese von 2- ^{18}F Fluordesoxy-D-glucose (2- ^{18}F FDG)

Dadurch wird das Molekül zwar in die Zellen aufgenommen und phosphoryliert, kann aber aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe nicht weiter metabolisiert werden. Da durch die Phosphorylierung ein Verlassen des 2-FDG-6-phosphats aus der Zelle erschwert wird, ist das Molekül in der Zelle gefangen („getrappt“) [12], es kommt zu einer Aktivitätsakkumulation.

Bei biochemischen Wechselwirkungen spielen oft Wasserstoffbrückenbindungen, die auch Fluor ausbilden kann, eine Rolle. Zudem gibt es noch weitere Vorteile, die ^{18}F Fluor zu einem hervorragenden PET-Nuklid machen: Die C-F-Bindung ist sehr stabil (444 kJ/mol), weswegen die ^{18}F -Radiopharmaka mit hoher Wahrscheinlichkeit ohne Abspaltung des ^{18}F Fluors an den Zielort gelangen. Außerdem sind mit einer Halbwertszeit von 109,7 Minuten sowohl mehrstufige Synthesen als auch eine effektive Qualitätskontrolle möglich. Ein weiterer Vorteil ist die relativ niedrige maximale β^+ -Energie von 0,63 MeV. ^{18}F Fluor ist aus den genannten Gründen eines der beliebtesten Radionuklide in der PET-Radiopharmazie bzw. der nuklearmedizinischen Diagnostik.

Dennoch existieren auch Nachteile beim Umgang mit kurzlebigen β^+ -Strahlern in der PET. Einerseits sind es die hohen Investitionskosten für das eigentliche PET-Gerät, andererseits müssen in unmittelbarer Nähe ein Zyklotron zur Produktion der PET-Nuklide und eine leistungsfähige Radiochemie für die Herstellung der Radiopharmaka verfügbar sein. Bei Positronenemittern mit einer mittleren Halbwertszeit wie ^{18}F Fluor kann das Nuklid auch dezentral produziert werden, so dass ein Zyklotronbetreiber mehrere PET-Zentren beliefern kann, was die Investitionskosten erheblich verringert („Satellitenkonzept“) [11].

3.2 Produktion von [¹⁸F]Fluor

Zur Produktion von [¹⁸F]Fluor gibt es verschiedene Kernreaktionen. In der Anfangszeit wurden häufig Kernreaktoren benutzt, die [¹⁸F]Fluor über die Kernreaktionen ${}^6\text{Li}(n,\alpha){}^3\text{H}$ / ${}^{16}\text{O}({}^3\text{H},n){}^{18}\text{F}$ herstellen. Seit den 80er Jahren wird die Produktion an modernen Teilchenbeschleunigern durchgeführt, die in der Lage sind, hohe Aktivitätsmengen an [¹⁸F]Fluor in unterschiedlichen chemischen Formen darzustellen, entweder als elektrophiles geträgertes [¹⁸F]F₂ oder in ungeträgerter Form als nukleophiles [¹⁸F]F_{aq}⁻. Die heutzutage zur Produktion wichtigsten Kernreaktionen sind in Tabelle 2 zusammengestellt [8].

Tabelle 2: Kernreaktionen zur ¹⁸F-Produktion im Zyklotron

Kernreaktion	Target	Chemische Form des Fluors	Spezifische Aktivität GBq/mol
${}^{18}\text{O}(p,n){}^{18}\text{F}$	H ₂ ¹⁸ O	[¹⁸ F]F _{aq} ⁻	bis 37×10^8
${}^{16}\text{O}({}^3\text{He},p){}^{18}\text{F}$	H ₂ O	[¹⁸ F]F _{aq} ⁻	bis 37×10^8
${}^{20}\text{Ne}(d,\alpha){}^{18}\text{F}$	Ne (0,1-0,2 % F ₂) 18 bar	[¹⁸ F]F ₂	$(37 - 370) \times 10^3$
${}^{18}\text{O}(p,n){}^{18}\text{F}$	¹⁸ O ₂ , Kr (1 % F ₂) 20 bar	[¹⁸ F]F ₂	$(37 - 1850) \times 10^3$

Nukleophiles [¹⁸F]F_{aq}⁻ wird meistens über die ${}^{18}\text{O}(p,n){}^{18}\text{F}$ -Reaktion dargestellt, da sie einen höheren Wirkungsquerschnitt besitzt als die ${}^{16}\text{O}({}^3\text{He},p){}^{18}\text{F}$ -Reaktion (Abb. 4).

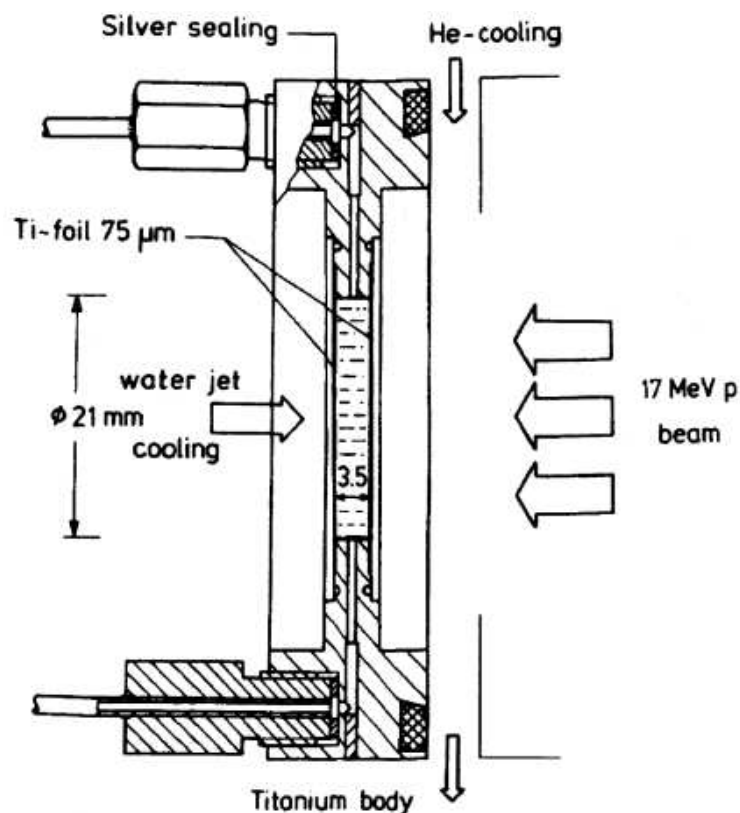


Abbildung 4: Aufbau eines Wassertargets zur [¹⁸F]F_{aq}⁻-Darstellung („Jülich“)

Außerdem können die hohen Kosten für das H_2^{18}O -Target relativiert werden, wenn dieses nach der Abtrennung des ^{18}F Fluorids photochemisch oder destillativ gereinigt und erneut als Targetmaterial verwendet wird. Zur eigentlichen Abtrennung des ^{18}F Fluorids wird dieses nach der Bestrahlung an einen Anionentauscher gebunden und mit Hilfe wässriger Kaliumcarbonatlösung wieder eluiert.

Elektrophiles, geträgertes ^{18}F F_2 wird in einem Gastarget gewonnen, entweder über die Reaktion $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ - oder $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$. Da sich das so gebildete ^{18}F Fluor an der Targetwand abscheidet, ist seine Desorption nur durch Zugabe von kaltem F_2 -Träger möglich. Daher sind die spezifischen Aktivitäten wesentlich geringer als bei der Produktion von nukleophilem $^{18}\text{F}\text{F}_{\text{aq}}^-$.

3.3 Kernchemische Aspekte von ^{18}F -Fluorierungen

Es ist in den meisten Fällen sehr wichtig, dass in der PET-Diagnostik hohe spezifische Aktivitäten erreicht werden. Die spezifische Aktivität wird als Aktivität bezogen auf die gesamte Stoffmenge isotoper Atome definiert. Sie kann durch hohe Nuklidreinheit erreicht werden, die grundsätzlich in drei Klassen eingeteilt ist. Dabei wird zwischen folgenden Zuständen unterschieden:

- trägerfrei („carrier free“, c.f.)
- ohne zugesetzten Träger („no carrier added“, n.c.a.)
- geträgert („carrier added“, c.a.)

Nur solche Zustände werden als trägerfrei bezeichnet, bei denen die radioaktiven Isotope weder durch gewollt zugegebene noch ungewollt eingeschleppte nichtradioaktive Isotope verdünnt vorliegen. Dieser Zustand kann nur erreicht werden, wenn das betreffende Element in der Natur nicht vorkommt, da sonst eine Einschleppung nichtradioaktiver Isotope nicht zu verhindern ist. Das Ausmaß der Verdünnung hängt von der Häufigkeit des betreffenden Elements in der Umgebung ab. So wird beim Kohlenstoff das bis zu 10^4 -fache der aktiven Isotope eingeschleppt, beim verhältnismässig seltenen Fluor hingegen nur das 10^2 -fache [6].

Deshalb wird bei kernchemischen Synthesen häufig der Begriff „n.c.a.“ verwendet, um deutlich zu machen, dass zwar kein Träger zugesetzt wurde, das Einschleppen aus der Umgebung aber nicht verhindert werden konnte. Bei manchen Synthesen, wie zum Beispiel der Darstellung von elektrophilem $^{18}\text{F}\text{F}_2$, ist ein Trägerzusatz erforderlich, so dass diese dann als „geträgert“ bezeichnet werden. Dieser Trägerzusatz erniedrigt die spezifische Aktivität stark, ist also meist unerwünscht, da bei zunehmender Verdünnung höhere Stoffmengen der zu verabreichenden Substanz benötigt werden, um die gleiche Aktivitätsmenge zu injizieren. Hierdurch können Probleme hinsichtlich der Toxizität und der pharmakodynamischen Wirkung auftreten.

3.4 ^{18}F -Fluorierungen

Die Verfahren, die für die radioaktive ^{18}F -Markierung organischer Moleküle benutzt werden, hängen von der chemischen Form des Nuklides ab. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen der nukleophilen Fluorierung mit n.c.a. $^{18}\text{F}\text{F}_{\text{aq}}^-$ und der elektrophilen Fluorierung mit c.a. $^{18}\text{F}\text{F}_2$.

3.4.1 Elektrophile ^{18}F -Fluorierungen

Der Anwendungsbereich dieser Methode ist wegen der geträgerten Form des ^{18}F Fluors sehr eingeschränkt. Die elektrophile Direktfluorierung mit $^{18}\text{F}\text{F}_2$ am Aromaten hat außerdem den chemische Nachteil, wenig regiospezifisch zu sein, weswegen Isomerenmischungen entstehen (siehe Abb. 5). Außerdem kann die Verwendung von elementarem $^{18}\text{F}\text{F}_2$ wegen seiner hohen Reaktivität nur unter speziellen Bedingungen und nach Verdünnung mit Inertgas erfolgen oder über Zwischenstufen wie z.B. Acetylhypofluorid.

Daher wird die elektrophile Fluorierung meist nur angewendet, wenn es für die Darstellung keine Alternative mittels nukleophiler Substitution gibt. Ein weiterer Anwendungsbereich sind Verbindungen, bei denen es nicht auf eine hohe spezifische Aktivität ankommt, beispielsweise weil bereits hohe Konzentrationen an analogen nichtradioaktiven endogenen Verbindungen im Organismus vorhanden sind. Ein Beispiel hierfür ist die aromatische Fluorierung von L-DOPA mit $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$, bei der ein Isomerenmisch entsteht (Abb. 5) [9].

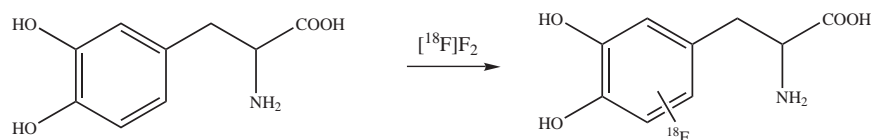


Abbildung 5: Nichtregiospezifische Synthese von $[^{18}\text{F}]$ Fluor-L-DOPA mit $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$

Um die Regioselektivität zu erhöhen, können mildere Fluorierungsmittel eingesetzt werden. Hierfür eignen sich sekundäre Markierungsvorläufer wie zum Beispiel Acetylhypofluorid ($[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{COOF}$) in einer Demetallierungsreaktion (Abb. 6).

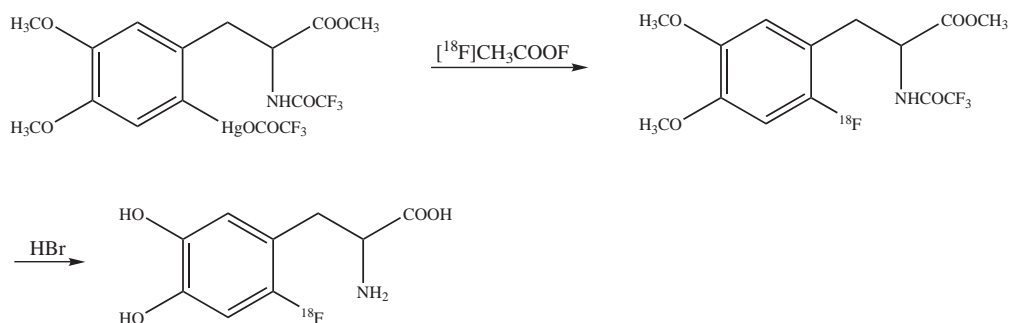


Abbildung 6: Demercurierungsreaktion mit Acetylhypofluorid zur regiospezifischen Synthese von 6- $[^{18}\text{F}]$ Fluor-L-DOPA

3.4.2 Nukleophile ^{18}F -Fluorierungen

Auch hier kann die Markierung entweder direkt oder über sekundäre Markierungsvorläufer erfolgen. Bei direkten nukleophilen ^{18}F -Fluorierungen ist auf eine sorgfältige Trocknung des $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ zu achten, da protische Lösungsmittel dazu führen, dass die Nukleophilie des Fluorids stark herabgesetzt wird. In dipolar aprotischen Lösungsmitteln verläuft die Direktfluorierung über einen bimolekularen Mechanismus, der eine stereospezifische Synthese ermöglicht, da das $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ immer in anti-Stellung zur Abgangsgruppe eintritt (Walden-Umkehr). Als Abgangsgruppen werden zumeist Halogene oder Sulfonsäureester genutzt. Ein weiterer Vorteil stark dipolar aprotischer Lösungsmittel ist ihre Fähigkeit, Salze zu lösen. Sie stabilisieren Kationen sehr gut, während Anionen wegen der fehlenden ausreichend aciden Wasserstoffatome nur durch wesentlich schwächere Dispersionskräfte stabilisiert werden, also besonders reaktiv („nackt“) vorliegen [19]. Um die Freisetzung von Fluorwasserstoff zu verhindern, werden Direktfluorierungen unter basischen Bedingungen durchgeführt, meist unter Zugabe von Kaliumcarbonat oder Kaliumoxalat. Durch den Zusatz von Phasentransferkatalysatoren wie Kryptofix®2.2.2 wird die Löslichkeit des ^{18}F -Kaliumfluorids erhöht.

Falls eine Direktfluorierung nicht oder nur mit schlechten Ausbeuten möglich ist, kann die Fluorierung über sekundäre Markierungsvorläufer erfolgen. Hierfür wählt man kleine, gut ^{18}F -fluorierbare Moleküle, die an das zu markierende Molekül angekoppelt werden. Die Auswahl des sekundären Markierungsvorläufers hängt stark von den Eigenschaften, speziell den funktionellen Gruppen der zu markierenden Verbindung ab. Häufige Verwendung finden Fluorethylierungen zum Beispiel mit

^{18}F Fluor markierten Sulfonsäurederivaten wie Toluol-4-sulfonsäure-2- ^{18}F fluorethylester (^{18}F FETos) [16].

3.5 ^{18}F -fluorierte Aminosäuren für die Tumordiagnostik mittels PET

In der onkologischen Diagnostik spielt die PET eine wichtige Rolle, da sie essentielle Informationen über maligne Stoffwechselstörungen bieten kann. Eine zuverlässige und sensible Diagnostik ist in der Onkologie besonders wichtig, da der Erfolg einer Therapie umso größer ist, je früher der Tumor erkannt wird. Ein Problem der Diagnostik ist, dass Tumore nicht spontan entstehen, sondern mehrere Phasen des Wachstums durchlaufen (Abb. 7) [30].

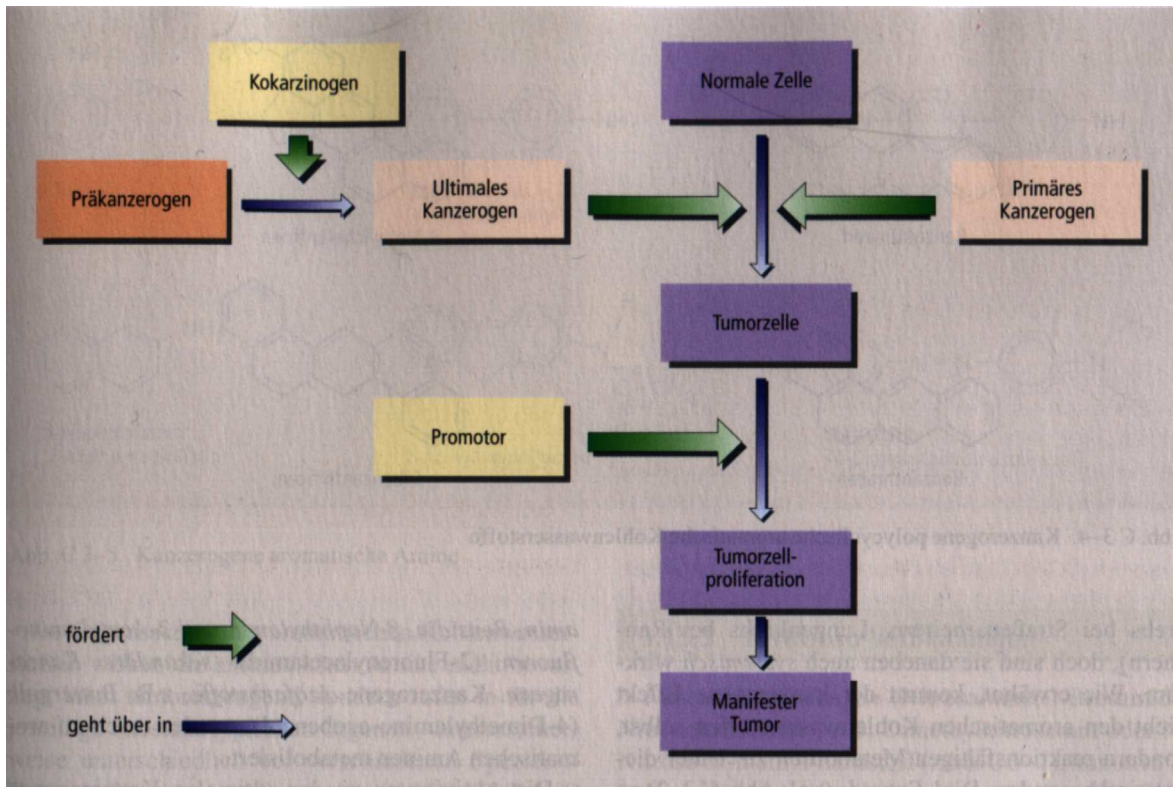


Abbildung 7: Die Stufen der Tumorentstehung

Es gibt Wachstums- und Stagnationsphasen bei der Tumorbildung. In den ersten Phasen der Tumorbildung besitzt der Körper eigene Schutzmechanismen, um eine Tumorbildung zu verhindern.

Die erste Phase der Tumorbildung beginnt mit einer Mutation, die durch ein chemisches oder physikalisches Karzinogen ausgelöst wird. In dieser Phase kann die Tumorbildung durch DNA-Reparation oder durch Apoptose der Zelle verhindert werden.

Beginnt eine unkontrollierte Zellproliferation der mutierten Zelle, so nennt man dies den Primärtumor. Das Wachstum des Primärtumors kann durch bestimmte Promotoren wie Hormone oder Umweltgifte beschleunigt werden. Hat der Primärtumor eine gewisse Größe erreicht, kommt es zu einer Verlangsamung des Wachstums, da er nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt wird. In der Phase der Minderversorgung kann der Tumor absterben, wenn es ihm nicht gelingt, die Bildung von Gefäßen zu seiner Versorgung anzuregen. Sollte es dem Tumor nicht gelingen, die Gefäßbildung anzuregen, muss er aber nicht absterben, sondern kann in dem augenblicklichen Zustand verharren.

Ist die Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen gesichert, kann dieser unkontrolliert weiterwachsen. Über die Blutgefäße können sich auch Tumorzellen, die sich aus dem Tumor gelöst haben, im Gefäßsystem verteilen und zu einer Metastasierung des Tumors führen. Die Metastasen durchlaufen wieder die beschriebenen Wachstumsphasen.

Primärtumore werden heute meist chirurgisch mit einer hohen Zuverlässigkeit entfernt. Deswegen ist es wichtig, den Tumor so früh wie möglich zu entfernen, bevor die Gefäßbildungsphase zu weit fortgeschritten ist. Ist es jedoch schon zu einer Metastasierung gekommen, reicht ein chirurgischer

Eingriff jedoch nicht aus.

Ein nicht-invasive Prüfung, ob die Entfernung des Primärtumors vollständig ist, oder noch weitere Metastasen vorhanden sind, kann auch mit PET oder am SPECT durchgeführt werden. Diese Verfahren können auch eingesetzt werden, eine Früherkennung auf Tumore durchzuführen. Da die PET durch ihre kleinere Ortsauflösung kleinere Tumore abbilden kann als die SPECT, eignet sie sich für die Tumordiagnostik besser.

Da die PET Stoffwechselprozesse abbildet, ist es notwendig einen Tracer für die Verfolgung eines Stoffwechselprozesses, der sich bei Tumorzellen im Gegensatz zu normalen Zellen unterscheidet, zu haben. Mögliche biochemische Unterschiede zwischen Tumorzellen und gesunden Zellen sind in Abb. 8 dargestellt. Ebenso sind in der Abbildung die wichtigsten PET-Tracer PET für diesen Stoffwechselprozess dargestellt.

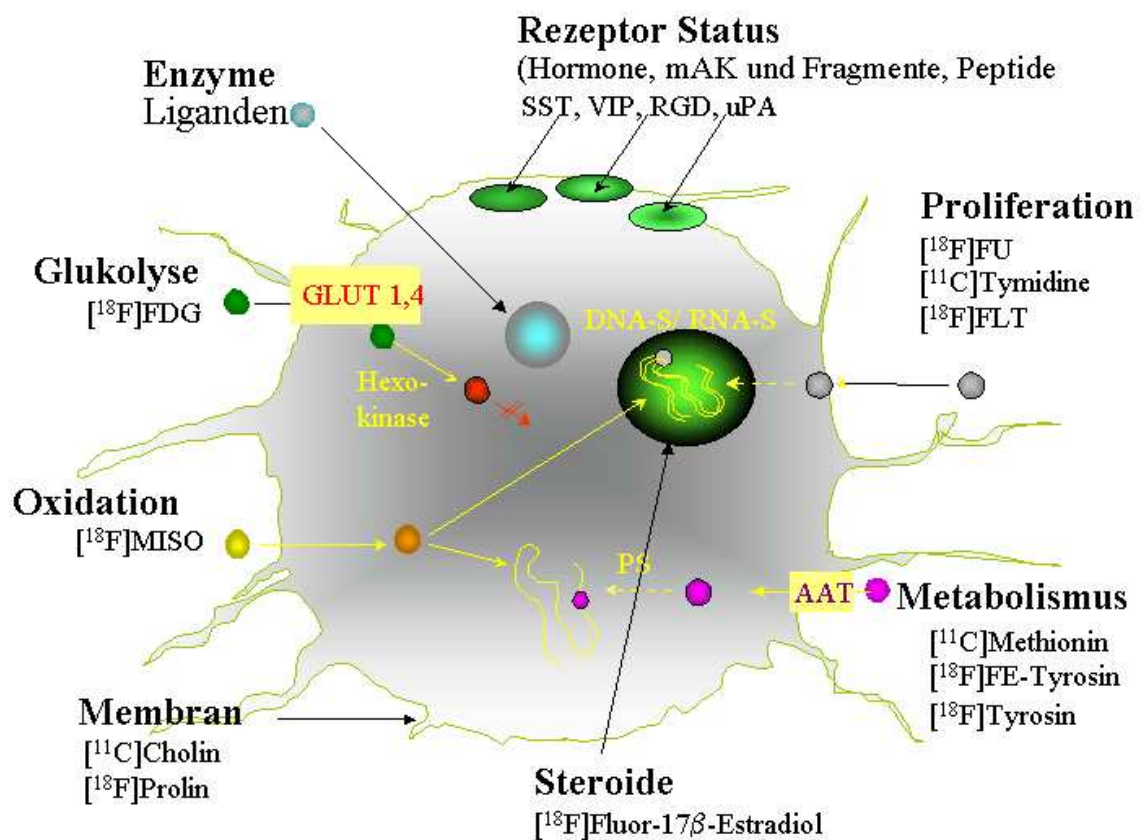
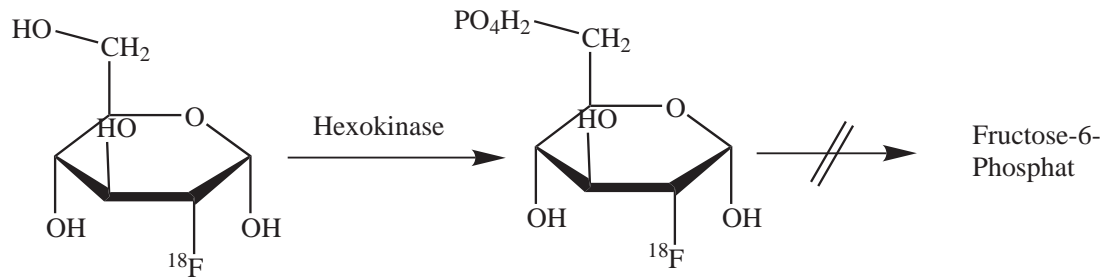


Abbildung 8: Mögliche Strategien zur Markierung von Tumorzellen und Tracer zur Bestimmung des Status eines Tumors

Eine Tumorzelle muss sich nicht in allen in Abbildung 8 möglichen Angriffspunkten von gesunden Zellen unterscheiden, sondern kann sich auch nur in einem Punkt unterscheiden, je nach Art des Tumors. So muss je nach Art des Tumors ein entsprechender Ansatz gewählt werden.

- **Glukolyse:**

Die Anreicherung der Aktivität im Tumor gegenüber dem normalen Gewebe beruht auf dem erhöhtem Glukosestoffwechsel in Tumorzellen. Die 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor-2-desoxy-D-glukose}$ (FDG) wird in den Zellen 'getrappt', indem es zu FDG-6-Phosphat umgewandelt wird (Abb. 9) und in dieser Form die Zelle nicht mehr verlassen kann, aber auch nicht weiter abgebaut wird [50].

Abbildung 9: Trapping von 2-[^{18}F]Fluor-2-desoxy-D-glukose

Das FDG reichert sich nicht ausschließlich in Tumorzellen an, sondern auch in Regionen mit hohem Glukoseverbrauch wie z.B. im Gehirn, aber auch in Entzündungen. Dies kann zu einer Missdeutung des Untersuchungsergebnisses führen, wenn z.B. ein Entzündungsherd für eine Metastase gehalten wird.

- **Rezeptorstatus:**

Es gibt bestimmte Tumore, die gewisse Rezeptoren überexprimieren. Ein Beispiel dafür ist der Somatostatin-Rezeptor. Für diesen Rezeptor ist ein 'Bindungsmolekül', das Octreotid, entwickelt worden. Bindet man an das Octreotid eine radioaktive Gruppe, kann man die Anreicherung verfolgen. Bindet man an das Octreotid ein Partikelemittler, besitzt man eine Verbindung für die Endo-Radio-Therapie (ERT).

- **Proliferation:**

Bei schnell proliferierenden Zellen muss auch die DNA der Zellen entsprechend schnell verdoppelt werden. Hierzu werden zwei Tracer vorgestellt, die über unterschiedliche Mechanismen in den Tumorzellen getrappt werden. 3'-Deoxy-3'-[^{18}F]Fluorthymidin (FLT) ist ein PET-Tumor-Tracer, der sich in allen Tumorarten anreichern kann. FLT wird selektiver in schnellproliferierenden Zellen aufgenommen als z.B. FDG, das sich auch in anderen Zellen anreichert [77]. Die Anreicherung von FLT in Tumorzellen beruht auf einem Trappingeffekt in den Zellen. Sobald das FLT in die Tumorzelle aufgenommen wird, wird es durch die Thymidinkinase 1 phosphoryliert, so dass es die Zellmembran nicht mehr passieren kann [104]. 5-[^{18}F]Fluoruracil (5-FU) wird als Derivat eines DNA-Bausteins im Gegensatz zum FLT in die DNA eingebaut. Die Markierung von 5-FU ist deswegen so wichtig, da nicht-markiertes 5-Fluoruracil als Chemotherapeutikum eingesetzt wird. Ist das 5-Fluoruracil in die DNA eingebaut, verhindert es die Replikation der DNA. Darauf beruht die zytostatische Wirkung von 5-Fluoruracil.

- **Metabolismus:**

Die Anreicherung dieser Tracer-Klasse beruht auf dem erhöhten Bedarf an Aminosäuren, bei schnellwachsenden Zellen, wie es bei Tumorzellen im Allgemeinen der Fall ist. Diese Tracer-Klasse wird einem gesondertem Kapitel (Kap. 3.5.2) behandelt.

- **Steroide:**

Steroidrezeptoren befinden sich im Nukleus der Zelle. Bei schnellproliferierenden Zellen werden die Anzahl der Steroidrezeptoren hochreguliert. Die erhöhte Anzahl an Steroidrezeptoren in Tumorgewebe bietet ein Target für Steroide. Der wichtigste Steroidrezeptor-Tracer ist das [^{18}F]Fluor-17 β -Estradiol [77].

- **Membran:**

Da Tumorzellen schnell proliferieren, müssen nicht nur DNA und Proteine schnell verdoppelt werden, sondern es muss auch die Zellmembranen entsprechend schnell aufgebaut werden. In der Zellmembran ist ein wichtiger Bestandteil das Kollagen, das die Zellmembran stabilisiert. Tracer, die diesen Stoffwechselprozess mittels PET abbilden können, sind: [^{11}C]Cholin, cis-[^{18}F]-L-Prolin

- Enzyme:

Es ist wichtig für manche Therapien zu wissen, wieviel von einem bestimmtem Enzym in einem Tumor zur Verfügung steht. Derivatisierte O^6 -Benzylguanine werden dazu benutzt, um den Status der Methyl-Guanin-Methyl-Transferase (MGMT) zu bestimmen. Dies ist notwendig, um zu testen, ob eine Therapie mit DNA-methylierenden Chemotherapeutika bei diesen Tumoren zum Erfolg führen kann. Das MGMT-Enzym bildet einen Teil des DNA-Reperatorsystems. Es demethyliert die DNA wieder, die deaktivierte DNA ist wieder replizierbar und die Therapie somit unwirksam. Das MGMT-Enzym ist ein sogenanntes 'Selbstmordenzym'. Das bedeutet, es kann nur eine Demethylierung durchführen und ist dann deaktiviert. Durch die Bestimmung des MGMT-Status kann man vor der Therapie bestimmen, ob das Chemotherapeutikum unwirksam gemacht wird. Es muss dann die Dosis des Chemotherapeutikums angepasst werden oder der Tumor mit einem MGMT-deaktivierendem Mittel, das weniger Nebenwirkungen hat, vorbehandelt werden, bevor man das richtige Chemotherapeutika verabreicht [57]. Das Detektionsprinzip besteht hier im Einsatz radioaktiver O^6 -Benzylguanin-Derivate, welche ebenfalls Substrate der MGMT sind.

- Oxidation:

Ob im Tumorgewebe eine Hypoxie vorliegt, wird mit [^{18}F]Fluormisonidazol ([^{18}F]MISO) getestet. Die Minderversorgung mit Sauerstoff in Tumoren kann durch das unkontrollierte Wachstum des Tumors ausgelöst werden. Die Gefäße werden nicht schnell genug gebildet, dass sie alle Regionen des Tumors ausreichend mit Sauerstoff versorgen können. Das Prinzip der Anreicherung in einer Tumorzelle von [^{18}F]MISO beruht darauf, dass [^{18}F]MISO, sobald es in eine Zelle transportiert wurde, reduziert wird. In der reduzierten Form kann das [^{18}F]MISO die Zelle nicht mehr verlassen. Ist ein ausreichend hoher Sauerstoffspiegel in der Zelle vorhanden, wird das reduzierte [^{18}F]MISO wieder zum 'Original' oxidiert. Die Originalform des [^{18}F]MISO kann die Zelle wieder verlassen. Somit findet eine Anreicherung von [^{18}F]MISO nur in hypoxischer Zellen statt [56]. Wenn nicht alle Regionen mit Sauerstoff versorgt werden können, ist die externe Bestrahlungs-Therapie nicht empfehlenswert, denn die gewebeschädigende Eigenschaft von ionisierender Strahlung beruht primär auf der Bildung von Sauerstoffradikalen. Wird ein Gewebe mit einer Konzentration kleiner 1000 ppm Sauerstoff bestrahlt, reicht die Bildung der Sauerstoffradikale nicht aus, um diese Zellen zu zerstören.

In der radiopharmazeutischen Routine-Diagnose für Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wird heute fast ausschließlich FDG verwendet [52]. Ein Problem ist, dass der Kontrast zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe nicht ausreichend ist, wenn das gesunde Gewebe einen hohen Glukoseumsatz (Gehirn) hat. Bei Hirn-Tumoren bekommt man dann häufig sogar ein negativ Bild (10).

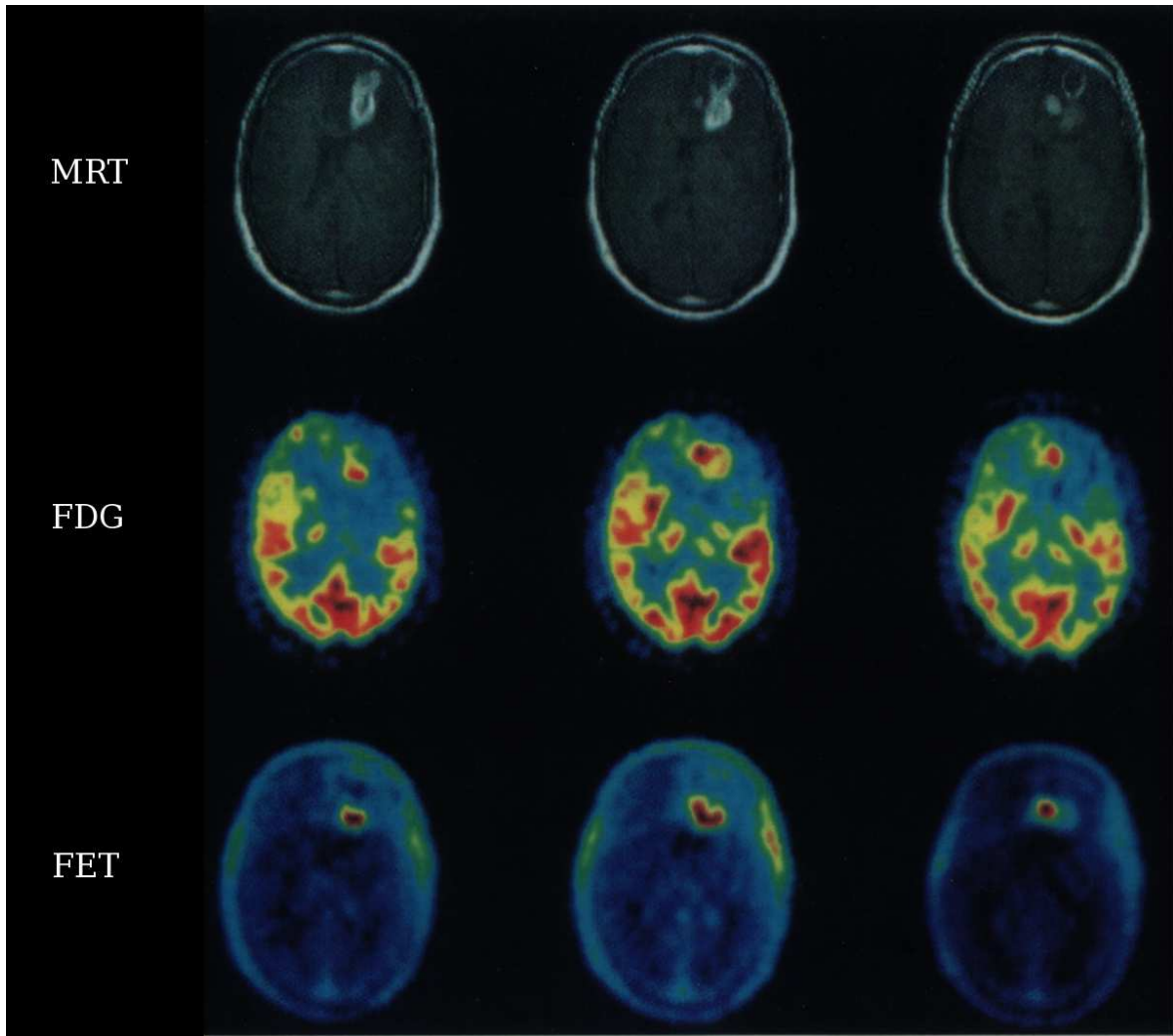


Abbildung 10: Tomographische Aufnahmen des selben Patienten mit Gehirntumor
MRT: Aufnahme mit Magnet-Resonanz-Tomographen
FDG: PET-Aufnahme mit 2-[^{18}F]Fluor-2-desoxy-D-glukose als Tracer
FET: PET-Aufnahme mit O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin als Tracer

Diese Erkenntnisse motivierten die Arbeit, PET-Tumor-Tracer auf Basis von Aminosäuren zu entwickeln.

3.5.1 Aminosäuren

Aminosäuren sind die Bausteine der Eiweiße und Enzyme. Sie bilden also einen zentralen Baustein jeder lebenden Zelle. Aminosäuren sind Moleküle, die eine Carboxygruppe und eine Aminogruppe in α -Stellung tragen. Alle Aminosäuren, die in den meisten Lebewesen verstoffwechselt werden können, tragen eine L-Konfiguration am C-Atom in α -Stellung. Die D-Konfiguration der Aminosäuren ist für Menschen nicht verwendbar und wird ausgeschieden.

Es gibt 20 Aminosäuren, die in der DNA ihre entsprechende Codierung haben. Diese Aminosäuren werden auch die 'Standard-Aminosäuren' genannt. Der menschliche Organismus kennt eine Vielzahl von Aminosäuren und verwendet diese z.B. als Botenstoffe. Das Ornitin, eine Aminosäure, die nicht zu den Standardamino-säuren gehört, fördert die Entgiftung des Körpers vom Ammoniak in der Leber. Ornitin in Kombination mit Asparaginsäure als Ornitin-Aspartat wird bei Leberinsuffizienz zur Senkung des Ammoniakspiegels im Blut gegeben [30].

Man unterteilt die Aminosäuren in die zwei Klassen:

- essentiell
- nicht-essentiell

Essentiell bedeutet, dass die Aminosäure durch die Nahrung aufgenommen werden muss. Sie können nicht von Körper synthetisiert werden. Nicht-essentielle Aminosäuren sind Aminosäuren, die der Körper in ein- oder mehrstufigen Synthesen selbst aufbauen oder aus anderen Aminosäuren umbauen kann. Eine Sonderstellung nehmen die Aminosäuren Tyrosin, Cystein und Arginin ein. Sie können zwar aus anderen Aminosäuren aufgebaut werden, jedoch nur aus essentiellen Aminosäuren. Somit gehören sie nach der Definition der Gruppe der nicht-essentiellen Aminosäuren an, sind aber eng von der Zufuhr an einer essentiellen Aminosäure abhängig. Deswegen wurden sie lange Zeit zu den essentiellen Aminosäuren gerechnet.

Die Standardaminoäuren unterteilt man in vier Gruppen. Diese vier Gruppen leiten sich von der Polarität der Seitenketten der Aminosäuren ab [28].

- Neutrale Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe)
- Neutrale Aminosäuren mit schwach polarer Seitenkette (Ser, Thr, Cys, Met, Trp, Tyr, Asn, Gln)
- Saure Aminosäuren (Asp, Glu)
- Basische Aminosäuren (His, Lys, Arg)

Diese Einteilung in Gruppen ist eine reine Einteilung nach dem isoelektrischen Punkt der einzelnen Aminosäuren. Sie sagt nichts über die biochemischen Eigenschaften der Aminosäuren aus. Dies ist an den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin zu erkennen. Sie sind biochemisch sehr ähnlich und werden auch mittels des selben Aminosäuretransporters in die Zellen transportiert, aber Phenylalanin gehört zu der Gruppe der neutralen Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette, während das Tyrosin zu der Gruppe der neutralen Aminosäuren mit schwach polarer Seitenkette gezählt wird. Auf die Transportmechanismen wird in Kapitel 3.5.3 eingegangen.

Aminosäuren werden in den Zellen zum Aufbau vieler Zellbestandteile wie Enzyme und Transporter benötigt. Die Information, welche Reihenfolge die Aminosäuren in den Proteinen haben, trägt die DNA. Jeweils drei Basenpaare der DNA ergeben die Information für eine Aminosäure. Die Proteinbiosynthese ist in mehrer Phasen unterteilt, die in den Abbildungen 11 - 14 dargestellt ist [28].

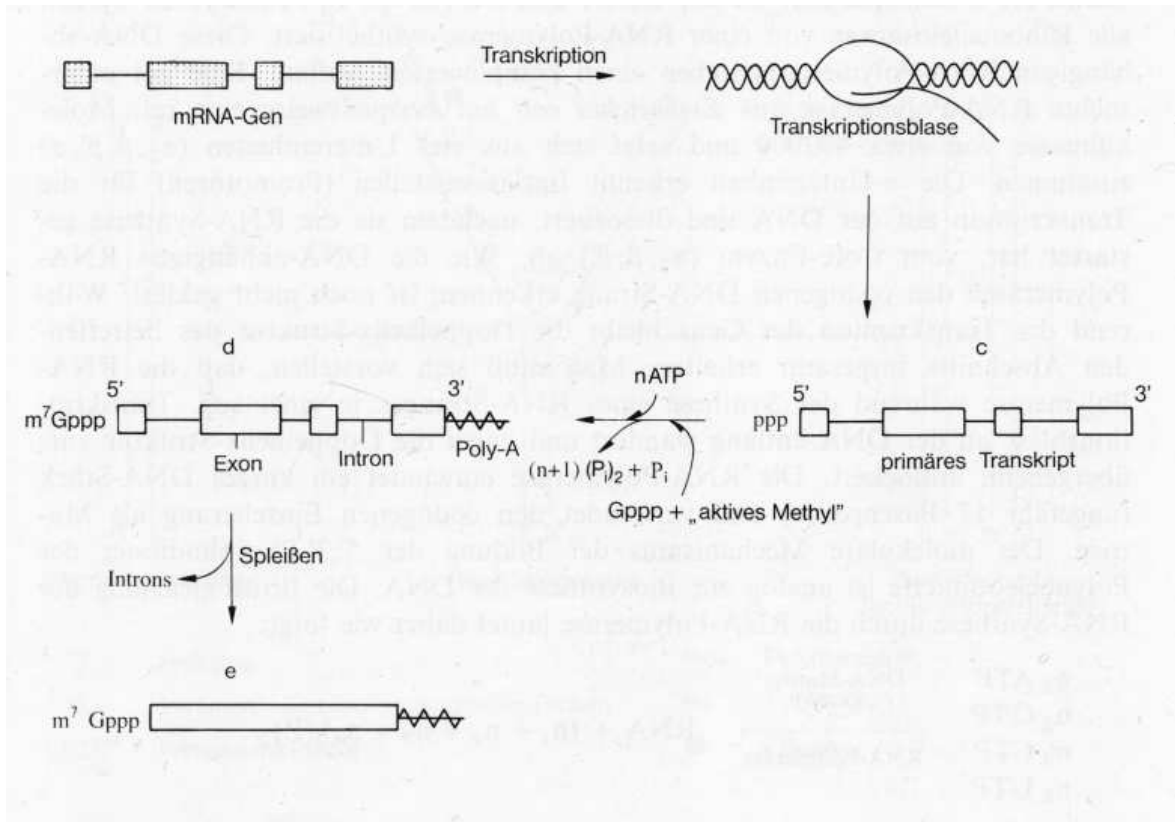


Abbildung 11: Transkription und Spleißen der m-RNA

Im ersten Schritt der Peptidbiosynthese muss das entsprechende Gen auf der DNA transkribiert werden. Dies geschieht in einer Transkriptionsblase. Dazu wird die DNA ein wenig aufgeweitet. Bei der DNA-Replikation findet eine deutlich größere Aufweitung statt, und das primäre Transkript von der RNA-Polymerase gebildet. Das primäre Transkript wird nun am 5'-Ende mit einer sogenannten Cap-Gruppe (7-Methyl-Guanylsäure, die über Triphosphatbrücke bindet) und am 3'-Ende mit einer Polyadenylsäure-Gruppe verlängert. Die fertige m-RNA erhält man durch das sogenannte Spleißen, indem alle Teile aus der RNA herausgeschnitten werden, die nicht codiert sind. Die nun fertige m-RNA wird aus dem Zellkern ins Cytosol transportiert. Die Bildung der t-RNA funktioniert nach dem selben Prinzip.

Die Übersetzung der Information der m-RNA in die Peptide geschieht an einem Ribosom. Dieses Ribosom besteht aus zwei Teilen, zwischen denen die m-RNA durchläuft und in das Peptid übersetzt wird. Das Ribosom umschließt 6 Basen der m-RNA, also zwei Bindungsstellen für Aminosäuren. An der einen Stelle sitzt das bisher synthetisierte Peptid, an die andere Stelle wird die nächste Aminosäure angelagert. Die Aminosäuren werden, bevor sie im Ribosom miteinander verbunden werden können, an ihre t-RNA gebunden werden. Die t-RNA bindet dann im Ribosom an die richtige Stelle der m-RNA.

Die Initiation des Peptids beginnt mit der Öffnung des Ribosoms, damit die m-RNA eingelagert werden kann. Bevor sich das Ribosom wieder schließt, wird noch die erste Aminosäure an ihre Position gebracht. Nun kann das Peptid aufgebaut werden. Diese Phase der Proteinbiosynthese nennt man Elongation (Abb. 12).

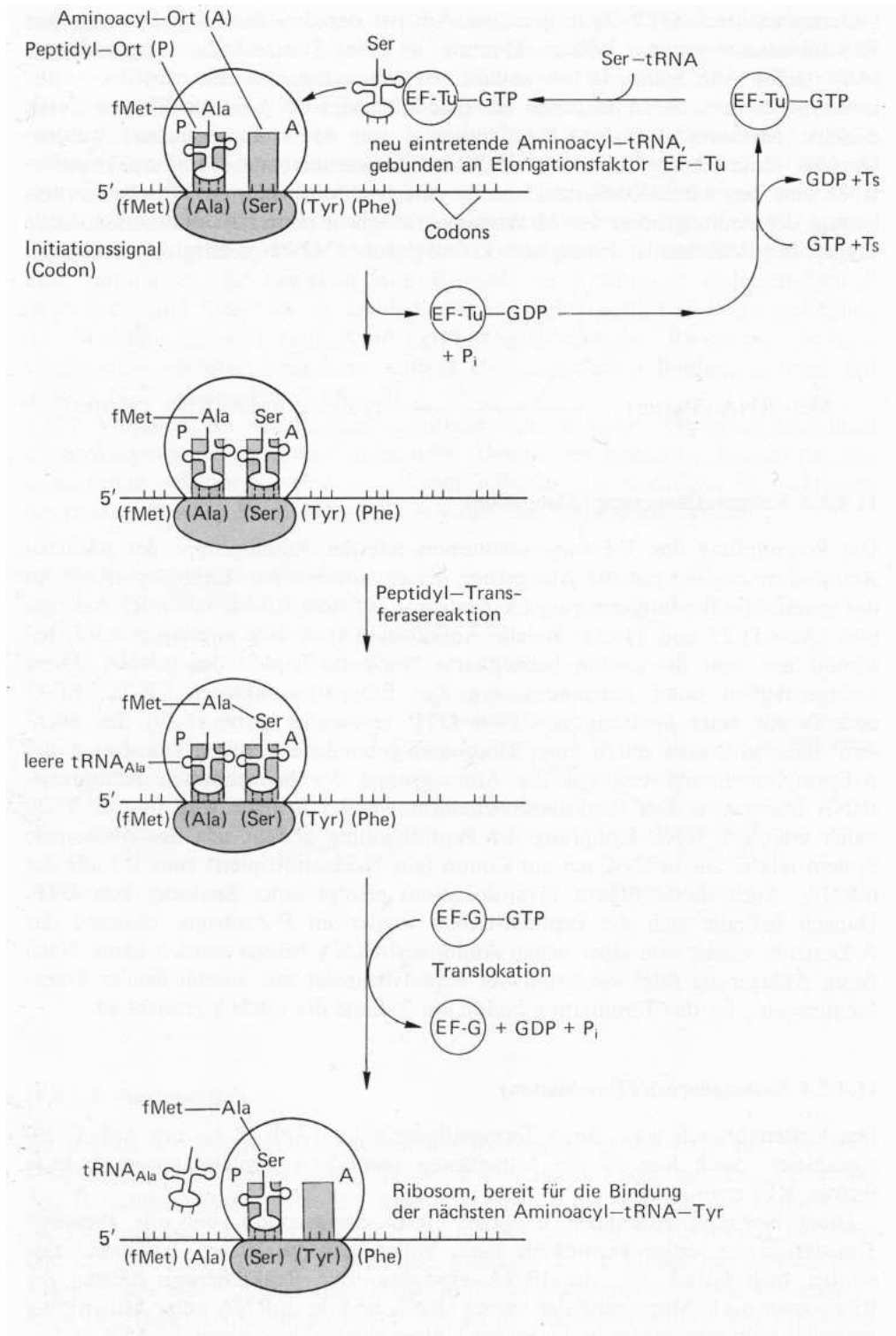


Abbildung 12: Elongationphase der Proteinbiosynthese

Die für die Elongation benötigten Aminosäuren werden dazu nach dem Transport in die Zelle mit der entsprechenden t-RNA verknüpft und mit den Elongationsfaktoren versehen. So kann die Aminosäure über die t-RNA im Ribosom an die m-RNA gebunden werden. Die Bindung der Aminosäuren findet nach folgendem Mechanismus ab (Abb. 13).

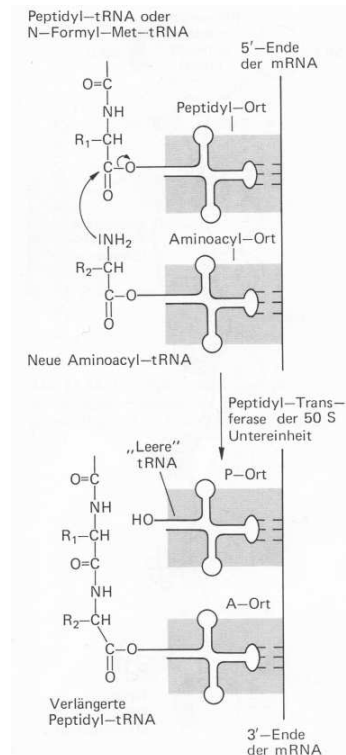


Abbildung 13: Mechanismus der Elongation der Proteinbiosynthese

Die Bindung von der Amino-Gruppe der nächsten Aminosäure an die Carbonyl-Gruppe des bestehenden Peptids kann nun stattfinden. Dabei geht die Bindung des Peptids zu seiner 'alten' t-RNA verloren und ist nur noch über die t-RNA der nächsten Aminosäure mit der m-RNA verbunden. Das Ribosom wandert auf der m-RNA eine Position (3 Basen) weiter, so dass die Bindungsstelle für die nächste Aminosäure frei wird. Die 'alte' t-RNA ist nicht mehr im Ribosom und kann von der m-RNA abdissoziieren. Nun ist das System wieder bereit, eine neue Aminosäure aufzunehmen und die nächste Aminosäure kann in das Peptid eingebaut werden.

Ist das Peptid fertig, findet die Terminierung der Proteinbiosynthese statt (Abb. 14). Das Ende des Peptidsstranges wird durch ein Terminationscodon auf der m-RNA ausgelöst. Kommt das Terminationscodon auf die Bindungsstelle für die nächste Aminosäure im Ribosom, wird, anstatt eine weitere Aminosäure in das Peptid einzubauen, das fertige Peptid von der t-RNA durch Hydrolyse getrennt. Das Ribosom gibt die m-RNA und die t-RNA wieder frei und steht für eine weitere Peptidsynthese bereit.

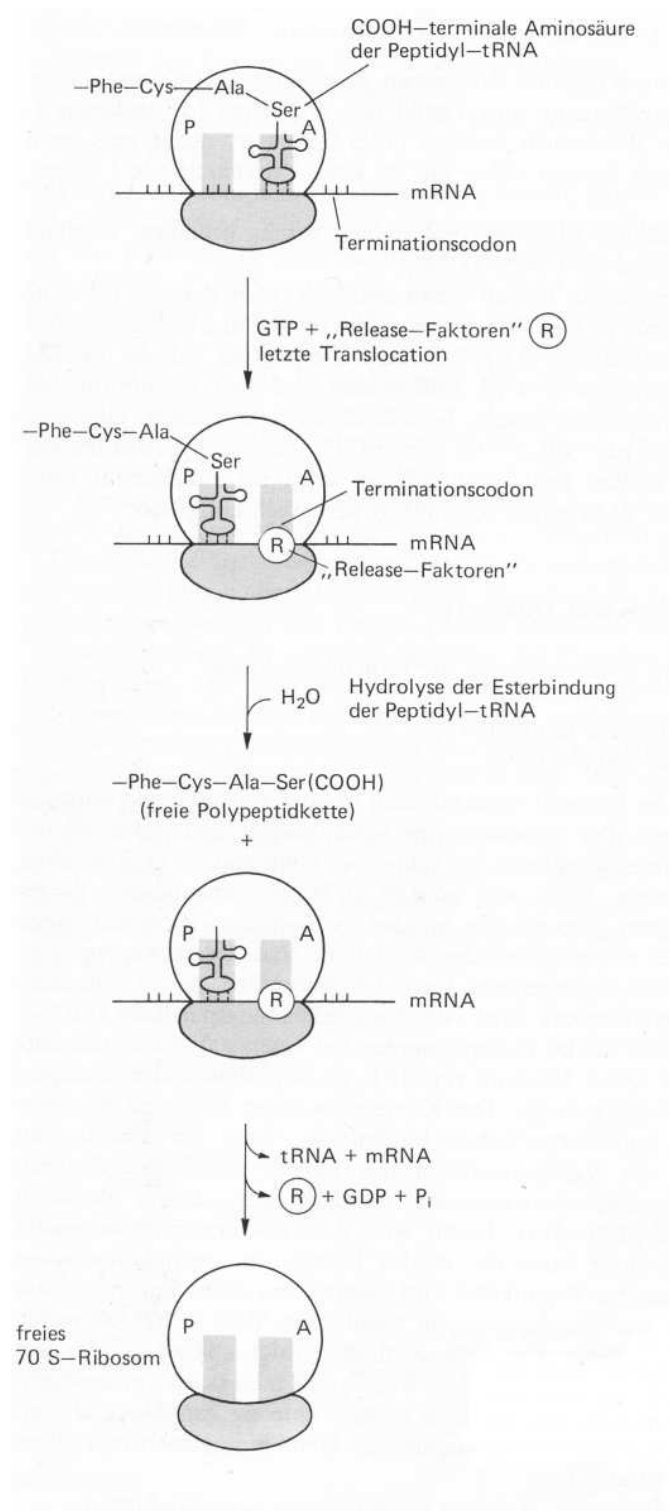


Abbildung 14: Terminierung der Proteinbiosynthese

3.5.2 Aminosäuren als PET-Tracer

Seit etwa 40 Jahren ist bekannt, dass Aminosäuren eine entscheidende Rolle beim Wachstum von Zellen haben [53]. Der Bedarf an Proteinen ist erhöht, wenn eine Zelle schnell proliferiert. Diese Eigenschaft macht man sich bei der PET-Tumor-Tracerentwicklung zu Nutze.

Der Verbrauch von Aminosäuren steht in einem engen Zusammenhang mit der Proliferationsrate

der Zellen. Diese Eigenschaft legt nahe, Aminosäuren radioaktiv zu markieren. Mit der Positronen-Emissions-Tomographie wurde die Möglichkeit geschaffen, den Aminosäurestoffwechsel quantitativ *in vivo* zu messen. Dazu kommt, dass die PET die beste räumliche Auflösung aller bildgebenden nuklear-diagnostischen Apparaturen besitzt.

Zuerst wurden Aminosäuren bevorzugt mit ^{11}C markiert, da man die Aminosäure underivatisiert einsetzen konnte. Besonders hervorzuheben ist das L- ^{11}C Methyl-Methionin. Es ist die einzige ^{11}C -markierte Aminosäure, die regelmäßig zur PET-Tumordiagnostik eingesetzt wird. ^{11}C Methyl-Methionin wird zur PET-Tumor-Diagnostik im Hals-, Kopf- und Gehirnbereich verwendet. Es eignet sich auch für die Diagnose von Lungen- und Brustcarcinomen [86]. Methionin wurde an zwei Stellen mit ^{11}C -Kohlenstoff markiert: der Carbonyl-Gruppe und der Methyl-Gruppe am Schwefel-Atom. Beide ^{11}C -markierte Methionine werden in die Proteine eingebaut. L- $^{11}\text{COOH}$ Methionin besitzt jedoch den Nachteil gegenüber dem $^{11}\text{CH}_3$ Methionin, dass hierbei als Metabolit ^{11}C -Kohlendioxid entsteht. ^{11}C -Kohlendioxid kann die Zelle verlassen und sich wieder im Körper verteilen.

Parallel dazu wurden Aminosäuren mit ^{18}F Fluor markiert, um eine längere Mess- und Syntheszeit durch die längere Halbwertszeit des ^{18}F Fluors zu erreichen. Besonders gute Messergebnisse liefert hierbei das 2- ^{18}F Fluortyrosin [60]. Auf diese und andere ^{18}F -markierte Aminosäuren als PET-Tumor-Tracer wird genauer in Kap. 3.5.4 eingegangen.

Die PET-Tumortracer, die sich von Aminosäuren ableiten, kann man in zwei Klassen einteilen.

- Proteinsynthesemarker
- Aminosäuren-Transporter-Aktivitätsmarker

Die Proteinsynthesemarker sind markierte Aminosäuren, die in die Proteinbiosynthese aufgenommen werden. Aminosäuren-Transporter-Aktivitätsmarker (AS-Transportermarker) wechselwirken nur mit dem Transporter und werden nicht in die Peptide eingebaut. Man kann dann mit einem Tracer nur die Aktivität des Aminosäuretransporters abbilden und nicht die Proteinbiosynthese der Zellen. In der Klasse der AS-Transportermarker kann noch in weitere Untergruppen unterteilt werden. Ob der Tracer nur an den Transporter bindet oder auch in die Zelle transportiert wird. Da aber Proteinbiosynthese und Aminosäuretransporteraktivität (AST-Aktivität) direkt miteinander verknüpft sind, kann von der AST-Aktivität auf die Proteinbiosyntheserate der Zellen geschlossen werden. Dies wurde in vergleichenden Studien mit O-(2- ^{18}F Fluorethyl)-L-tyrosin, ein PET-Tumor-Tracer, der nicht in die Peptide eingebaut wird, und $^{11}\text{CH}_3$ Methionin, ein PET-Tracer der in die Peptide eingebaut wird, demonstriert [67]. Die Verhältnisse zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe waren bei beiden Tracern nahezu identisch.

Somit ergeben sich für die zwei Klassen folgende prinzipielle Kompartimentmodelle, wobei die Metabolisierung der Aminosäuren vernachlässigt ist (Abb. 15). Das Kompartimentmodell für die AS-Transportermarker zeigt auch die Schwäche dieser Aminosäuren. Wird die Aminosäure in der Zelle nicht verstoffwechselt, kann dieser wieder aus der Zelle ausgeschleust werden. Ein Proteinsynthesemarker wird dagegen in Proteine eingebaut und kann somit die Zelle nicht mehr verlassen.

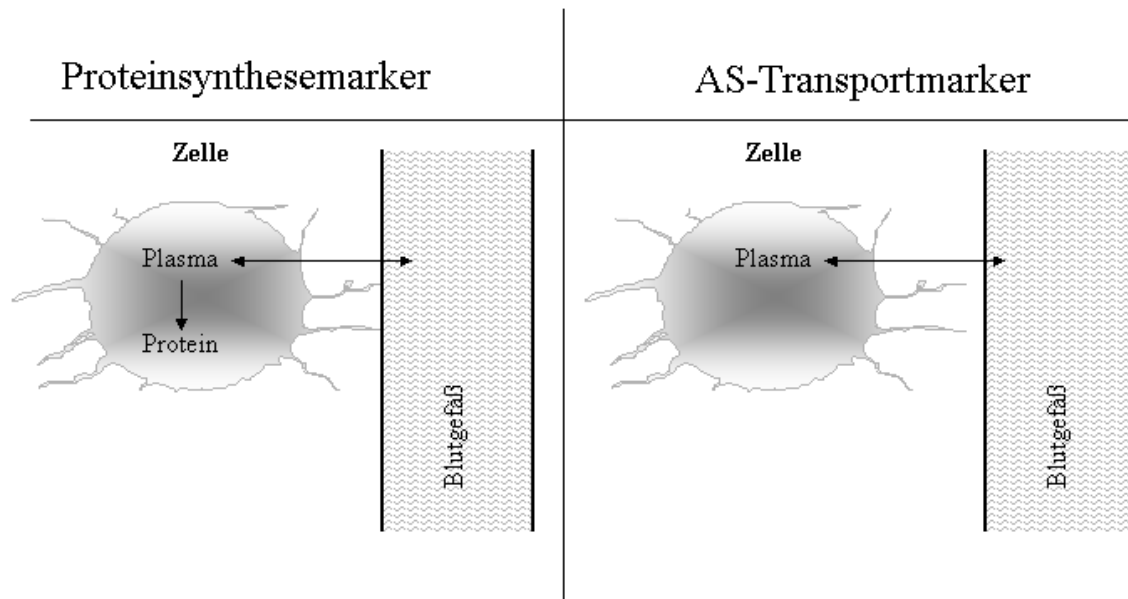


Abbildung 15: Kompartiment-Modelle von Aminosäuren: Die Pfeile stellen die möglichen Aufnahme- bzw. Abgabewege dar

Die Kompartimentmodelle zeigen nicht die großen Geschwindigkeitsunterschiede zwischen den einzelnen Schritten. Der Transport in die Zelle ist um ein Vielfaches schneller als der Einbau in die Proteine der Aminosäuren. Ein schneller initialer Uptake beruht ausschließlich auf der AST-Aktivität der Zellen. Bei [^{11}C]Methionin, der wichtigsten ^{11}C -markierte Aminosäure für die PET, obwohl es in die Proteine eingebaut wird, beruht der Hauptteil der Anreicherung auf der AST-Aktivität und nicht auf der Proteinbiosynthese einer Zelle [87].

Für viele Fragestellungen reicht es aus, die AST-Aktivität darzustellen. Somit hat man eine größere Freiheit in der Derivatisierung der Aminosäure, die man markieren will, da sie sich deutlicher vom 'Original' unterscheiden darf. Da die Aminosäuretransporter ganze Gruppen von Aminosäuren in die Zellen transportieren und wie oben erwähnt auch nicht nur die 20 'Standardamino-säuren', sind diese nicht so anfällig für Derivatisierungen.

Eine *in vivo*-Studie an Ratten zeigte, dass auch 'Nicht-Standardamino-säuren' aktiv in Hirnzellen transportiert werden und sich dort anreichern [55]. In der Studie wurde die Aufnahme in Gehirnzellen von Amino-Cyclopentan-Carbonsäure (ACPC) als nicht metabolisierbare Aminosäure, also aus der Klasse der AS-Transportermarker, mit ^{67}Ga -DTPA verglichen. Ga-DTPA ist ein Tracer für die vasculäre Permeabilität der Zellmembran. Die Ergebnisse der Studie zeigten, daß ACPC 200 mal mehr als ^{67}Ga -DTPA aufgenommen wurde. Dies Experiment belegt, dass auch nicht native Aminosäuren aktiv in die Zellen transportiert werden können und nicht nur durch ein Konzentrationsgefälle in die Zellen kommen. So können auch rein künstliche Aminosäure als Basis für PET-Tumor-Tracer dienen (Abb. 19).

3.5.3 Aminosäuretransporter

Aminosäuren werden aktiv in die Zellen transportiert. Dieser Transport in die Zellen hängt von verschiedenen physiologischen Faktoren von nichtphysiologischen Parametern wie Temperatur, pH-Wert und Konzentration der beteiligten Stoffe ab. Die nichtphysiologischen Parametern werden so gewählt, dass sie möglichst nahe an den *in vivo*-Bedingungen liegen.

Die wichtigsten physiologischen Parameter für die Aufnahme von Aminosäuren in eine Zelle sind folgende:

- Transport von den Aminosäuren zu den Zellen
- Intrinsische Aktivität des Aminosäuretransporters in der Zellmembran
- Intrazellulärer Aminosäuremetabolismus

Die Aminosäuren können nur in eine Zelle transportiert werden, wenn sie im extrazellulären Raum zur Verfügung stehen. Wird ein Gewebe schlecht mit Aminosäuren versorgt, kann dieses Gewebe auch nur schlecht Aminosäuren in die Zellen aufnehmen. Dies ist im Inneren von größeren Tumoren der Fall. Durch den Mangel an Blutgefäßen werden diese Zellen nicht ausreichend versorgt.

Die Aminosäuren können nur so schnell in eine Zelle transportiert werden, wie 'aktiv' der entsprechende Aminosäuretransporter ist. Die Transporteraktivität ist teilweise noch von anderen Faktoren abhängig, z. B. gibt es Transporter, die mit der Aminosäure gleichzeitig andere Ionen (Na^+) mit in die Zelle transportieren müssen, um zu funktionieren.

Die Aufnahme der Aminosäuren in die Zelle findet nur in dem Maße statt, wie die Zelle die Aminosäuren auch verbraucht. Wenn die Zelle nicht aktiv ist, benötigt sie auch keine Aminosäuren und nimmt deswegen keine Aminosäure auf.

Aminosäuren sind zu polar, um die Zellmembran passiv passieren zu können. Die hohe Polarität der Aminosäuren ist verantwortlich dafür, dass die Aminosäuren die Blut-Hirn-Schranke nur mittels eines aktiven Transports passieren können.

Es gibt vier wesentliche Typen von Aminosäuretransportern, die in allen Zelltypen gefunden wurden. Die natriumabhängigen A-, ASC-, Gly-Transportsysteme und das natriumunabhängige Transportsystem L. Es sind zur Zeit ca. 20 Aminosäuretransporter bekannt, aber die anderen sind auf bestimmte Zelltypen beschränkt [53]. Die natriumabhängigen Aminosäuretransporter gehören zu der Klasse der Cotransporter. Sie transportieren neben der Aminosäure auch immer ein Natriumion mit in die Zelle, während bei dem natriumunabhängigen System L die Aminosäure alleine in die Zelle transportiert wird.

Das Aminosäuretransportsystem A transportiert die meisten neutralen Aminosäuren in die Zelle. Dieser Transporter ist transständig blockiert. Das heißt, dass der intrazelluläre Ausgang des Transporters für die weitere Aufnahme von Molekülen blockiert wird, wenn die Konzentration der durch diesen Transporter aufgenommenen Aminosäure in der Zelle ausreichend hoch ist. Die Aminosäure wird also noch extrazellulär an den Transporter gebunden, kann aber dann nicht mehr durch den Kanal in das Innere der Zelle gelangen.

Das Aminosäuretransportsystem ASC transportiert ebenfalls die meisten neutralen Aminosäuren in die Zelle. Dieser Transporter wird im Gegensatz zum System A transständig stimuliert. Das bedeutet, dass das Vorhandensein von Aminosäuren in der Zelle diesen Transporter dazu anregt, weitere Aminosäuren in die Zelle zu transportieren. Da es sich bei dem ASC-System ebenfalls um einen natriumabhängigen Transport handelt, wird mit jeder Aminosäure auch Natrium in die Zelle transportiert. Da im extrazellulären Raum eine hohe Konzentration an Natriumionen im Verhältnis zum intrazellulären Raum herrscht, wird dieses Konzentrationsgefälle zur treibenden Kraft für die Aufnahme der Aminosäure.

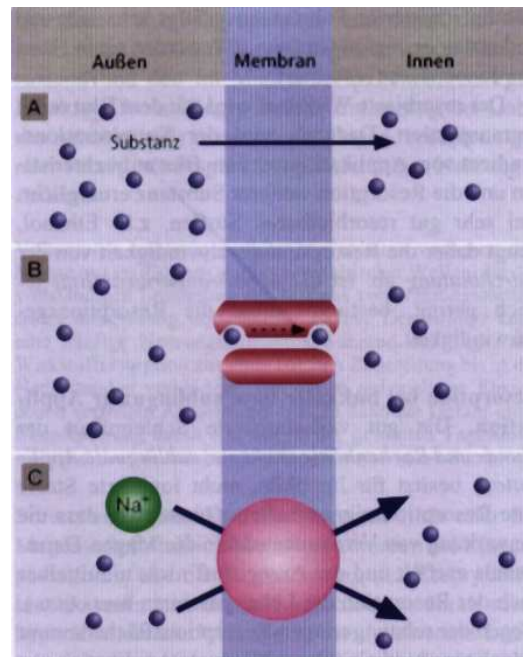


Abbildung 16: Prinzipien des Aminosäuretransports in die Zelle

A: Konzentrationsabhängiger Transport (System L)

B: transständig aktivierter oder passivierter Transport (System A, ASC)

C: natriumabhängiger Cotransport (System A, ASC, Gly)

Das Aminosäuretransportsystem L transportiert aromatische und verzweigte neutrale Aminosäuren in die Zelle. Die treibende Kraft für diesen Transport ist das Konzentrationsgefälle der Aminosäure im extrazellulären und intrazellulären Raum.

Das Gly-Transportsystem ist für den Transport fluorierter Aminosäuren nicht von Bedeutung, da sie keine fluorierter Aminosäuren transportieren können und soll deswegen nicht diskutiert werden. Die Transportmechanismen sind in Abbildung 16 dargestellt.

3.5.4 ^{18}F -Fluorierte Aminosäuren

Um die Proteinbiosynthese der Peptide und die Transportaktivität der Aminosäuretransportern zu beobachten, wurden bis jetzt einige Aminosäuren mit ^{18}F Fluor markiert. Das große Potenzial von ^{18}F -markierten Aminosäuren führte dazu, dass ihre Anzahl in den letzten 15 Jahren stetig anstieg. Eine Übersicht der bis jetzt erfolgreich mit ^{18}F -fluorierten Aminosäuren zeigen die Abbildungen 17 - 19. In Abbildung 17 sind die Tracer auf Basis der Aminosäure Tyrosin dargestellt, in Abbildung 18 andere Tracer auf Basis unterschiedlicher natürlicher Aminosäuren und in Abbildung 19 künstliche Aminosäuren.

Die aromatische Aminosäure Tyrosin war lange Zeit im Mittelpunkt des Interesses. Das wichtige Derivat für Tumor-Diagnostik ist das 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin. 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin (a) wird durch eine elektrophile ^{18}F -Fluorierung mittels O-Acetyl-Tyrosin in Trifluoressigsäure hergestellt und mit einer radiochemischen Ausbeute von 17 % mit einer spezifischen Aktivität von 10-20 GBq/mmol erhalten. Zellversuche mit Mäusegehirnzellen zeigten eine schnelle Aufnahme von 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin in die Zelle. Der höchste Uptake von 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin zeigt sich nach 5-10 min. Nach 10 min beginnt eine Phase der Auswaschung von 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin aus der Zelle, die 2 Stunden beobachtet werden konnte parallel findet ein Einbau von 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin in die Zellproteine statt [88]. Im Tierversuch zeigte sich ein ähnliches Bild. Das 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin ist 60 min nach Injektion zu 84 % , bezogen auf die Gesamtaktivität im Gehirn, in die Zellproteine eingebaut worden. Dieser Wert steigt dann nur noch schwach an auf 89 % nach 120 min. Die Aufnahme von

2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin im Tumorgewebe ist um 27 % höher als im umgebende Gewebe. Die Aminosäure wird leicht metabolisiert. 40 min nach Injektion wird 23 % des ^{18}F Fluors als ^{18}F Fluorid im Plasma gemessen [89].

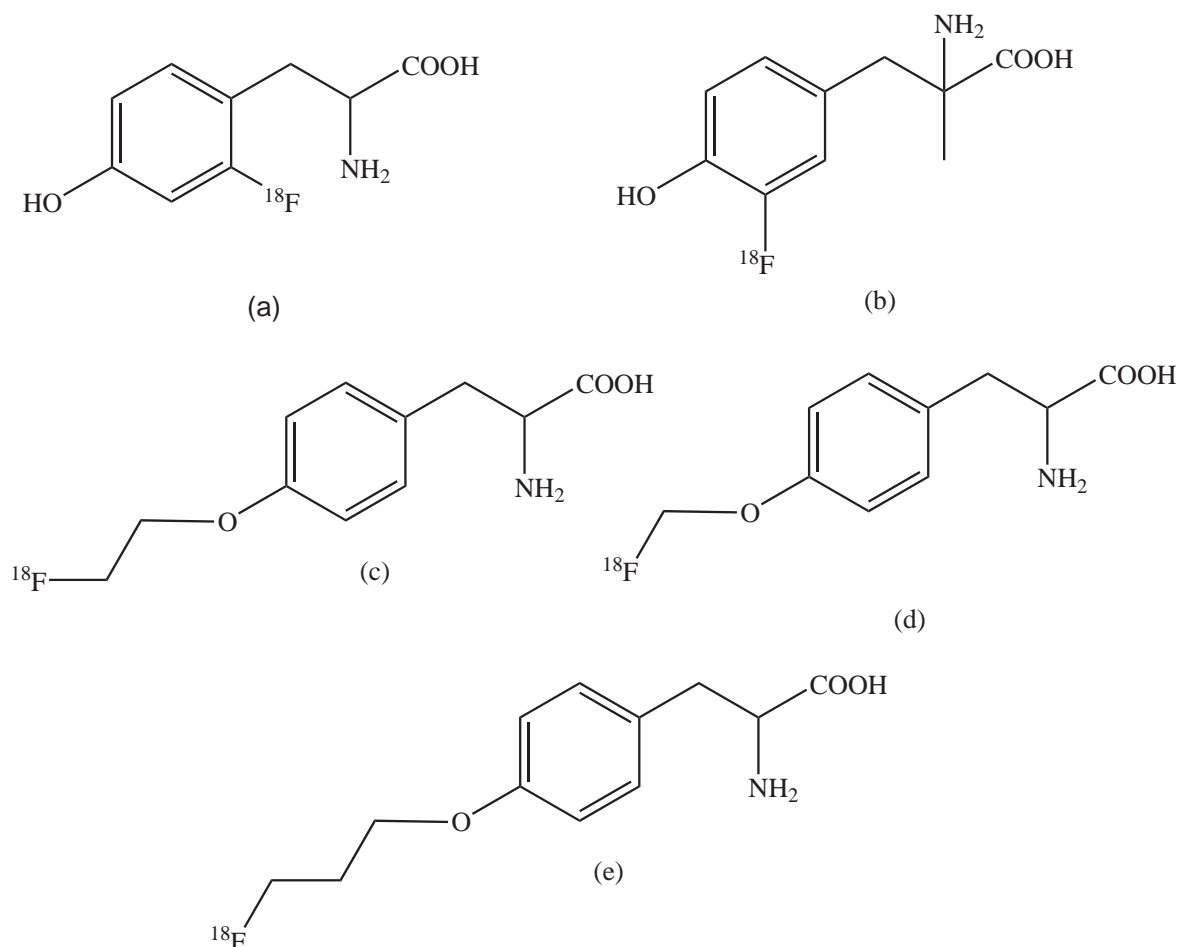


Abbildung 17: ^{18}F -fluorierte Tyrosin-Derivate für die PET-Tumor-Diagnose:

- (a): 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin;
- (b): 3- ^{18}F Fluor- α -methyl-L-tyrosin;
- (c): O-(2- ^{18}F Fluorethyl)-L-tyrosin;
- (d): O-(2- ^{18}F Fluormethyl)-L-tyrosin;
- (e): O-(2- ^{18}F Fluorpropyl)-L-tyrosin;

3- ^{18}F Fluor- α -Methyl-L-tyrosin (FMT) (b) wurde als PET-Alternative zum SPECT-Tumor-Tracer ^{123}I Iod- α -Methyltyrosin entwickelt [90]. FMT wird mit einer radiochemischen Ausbeute (RCA) von 15 % erhalten. In Mäusen zeigt FMT eine schnelle Blutclearance und einen hohen Uptake in Bauchspeicheldrüse und Nieren. In einer vergleichenden Studie mit FDG konnte festgestellt werden, dass FMT einen höheren Uptake in bestimmte Tumorarten wie Darmkrebs und Brustkrebs hat. Die Aufnahme von FMT kann man noch steigern, wenn man den Versuchstier das 50000-fache an Anilin verabreicht, bevor man es mit FMT behandelt. Bei der Vorbehandlung mit Anilin läßt sich die Anreicherung von FMT in Darmtumoren noch einmal um den Faktor 2 bis 3 steigern. Metabolisch ist FMT stabil. Untersuchungen des Tumors zeigten, dass 89 % des FMT unmetabolisiert waren. Es wird nicht in die Proteine eingebaut, sondern befindet sich im Zellplasma [91]. In einer Studie wurde untersucht, wie sich die Aufnahme von FMT mit dem Alter des Tumors ändert. Es konnte keine Veränderungen festgestellt werden. Dies ist besonders wichtig, da sich Primärtumor und Metastasen stark im Wachstumsgrad unterscheiden können [92].

Neben dem 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin ist das O-(2- ^{18}F Fluorethyl)-L-tyrosin inzwischen klinisch die wichtigste ^{18}F -markierte Aminosäure für die PET-Tumor-Diagnose. Das O-(2- ^{18}F Fluorethyl)-L-Tyrosin (FET) (c) wird mittels 2- ^{18}F Fluorethyltosylat mit einer RCA von 40 % hergestellt [49]. Eine verbesserte Methode zur Herstellung von FET konnte eine Ausbeute von 60 % nach 80 min erzielen. Dabei wurde von O-(2-tosyloxyethyl)-N-trityl-L-tyrosin *tert.* Butylester ausgegangen und FET in einer Direktmarkierung gewonnen [66]. Das FET besitzt eine lange Halbwertszeit im Blut von 96 min [49]. Der Uptake in den Tumor erfolgt relativ rasch und erreicht 60 min nach Injektion seinen maximalen Wert [94]. Eine Organverteilungstudie zeigte den höchsten Uptake im Pankreas. Es zeigte aber im Gegensatz dazu keinen Uptake in den Nieren, wie die anderen ^{18}F -fluorierten Tyrosinderivate. FET wird ebenfalls nicht in die Proteine eingebaut [49]. Es wird auch nicht metabolisiert. Es konnten bis 60 min nach Injektion keine Metaboliten nachgewiesen werden [93]. Die Aufnahme-mechanismen von FET in die Zellen wurde ebenfalls untersucht. Die Aufnahme erfolgt über den L-Aminosäuretransporter. Die Aufnahme von FET ließ sich mit den Aminosäuretransportblocker BCH um 80 % verringern. Die Blockade der A- und ASC-Transporter brachte keine Verringerung des Uptakes von FET [49]. Die Anreicherung von FET in Entzündungen wurde ebenfalls untersucht. Dies geschah, da bekannt ist, dass sowohl FDG als auch ^{11}C Methionin sich in Entzündungen anreichern. Dies kann bei einer PET-Untersuchung zu Missdeutungen führen. FET reichert sich im Gegensatz zu den anderen Tracern nicht in Entzündungen an [69].

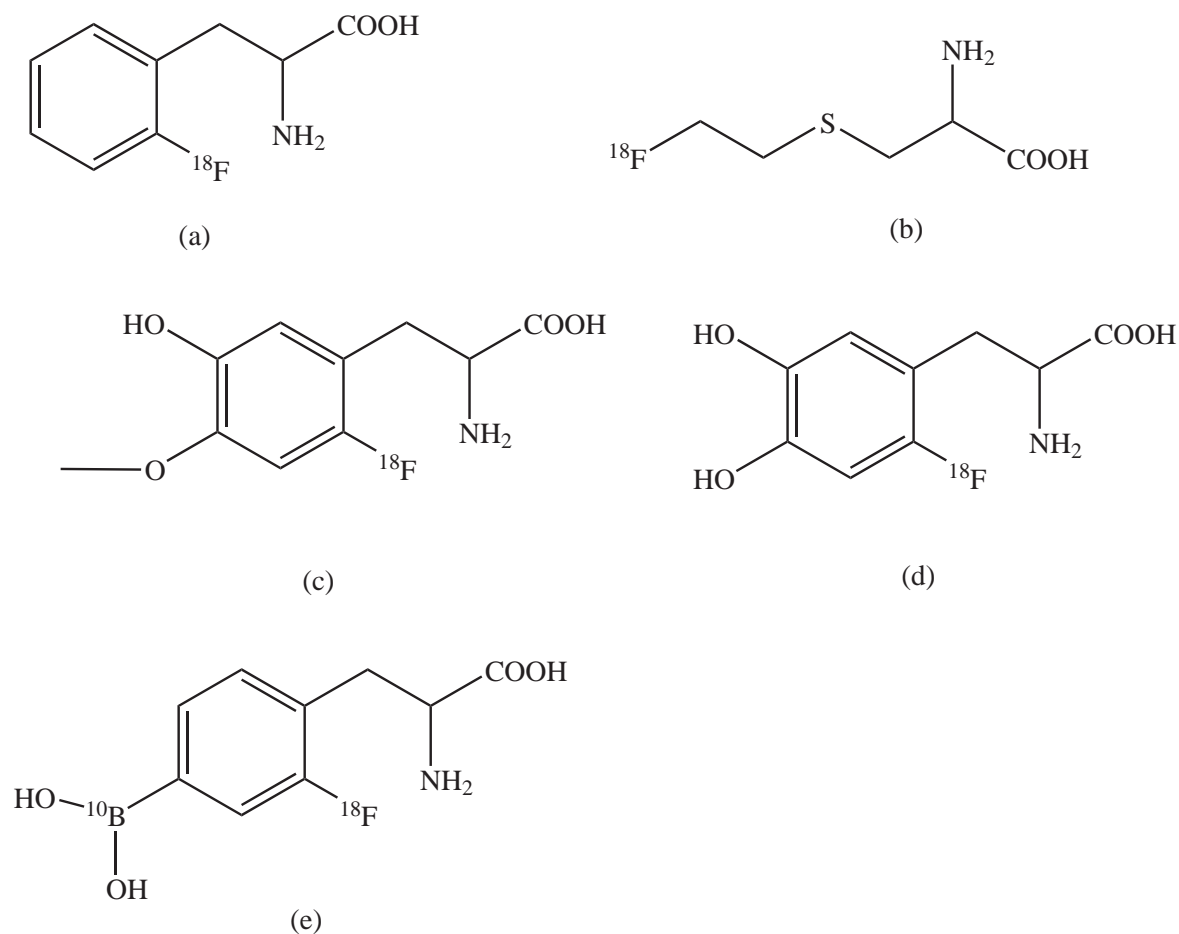
O-(2- ^{18}F Fluormethyl)-L-tyrosin (d) und O-(2- ^{18}F Fluorpropyl)-L-tyrosin (e) werden in einer zweistufigen Synthese markiert. Dazu wird erst der sekundäre Markierungsvorläufer Brom-2- ^{18}F Fluormethan bzw. 3-(^{18}F Fluor-tosyloxy)-propan synthetisiert und anschließend mit dem Di-Natriumsalz des Tyrosins umgesetzt [65], [105]. Biologisch verhalten sich diese beide Tracer dem FET gleich [65], [105].

In Abbildung 18 sind andere ^{18}F -fluorierte Aminosäuren dargestellt, die auch auf natürlichen Aminosäuren beruhen, aber einen anderen Ansatz wählen. Auf der Suche, um das ^{11}C Methionin durch einer ^{18}F -fluorierte Verbindung zu ersetzen, wurde auch das 2- ^{18}F Fluor-L-phenylalanin (FPA) (a) entwickelt [86]. FPA wird mittels des sekundären Markierungsvorläufer ^{18}F -Hypofluorit mit einer RCA von fast 70 % hergestellt. Die spezifische Aktivität beträgt 23-28 GBq/mmol [95]. Im Vergleich mit ^{14}C -Methionin ist der Uptake von FPA in Tumorzellen ähnlich. Beide Tracer werden innerhalb von 30 min aufgenommen und dieser Wert bleibt bis zum Ende des Versuches nach 120 min konstant. In der Organverteilungsstudie zeigte der Pankreas den höchsten Uptake von FPA. Die hohe Aufnahme von Methionin (diese Studie wurde mit ^{14}C -Methionin durchgeführt) in die Leber ist bei FPA deutlich verringert [86]. FPA wird nicht in die Proteine eingebaut.

2- ^{18}F Fluorethyl-L-cystein (b) wird von dem bekannten Tracer ^{11}C Methionin abgeleitet, um die längere Halbwertszeit des ^{18}F -Fluors zu nutzen. 2- ^{18}F Fluorethyl-L-cystein wird aus 2- ^{18}F Fluorethyltosylat und dem Di-Kaliumsalz des Cystein in DMSO mit einer Ausbeute von 95 % gewonnen [62]. Die Anreicherung in Hirn und Tumor zeigt Ähnlichkeit mit Methionin (^3H Methionin Vergleichssubstanz). 2- ^{18}F Fluorethyl-L-cystein ist stabil gegenüber *in vivo*-Defluorierung [62].

3-O-Methyl-6- ^{18}F fluor-dihydroxy-L-phenylalanin (OMFD) (c) ist der Hauptmetabolit von 6- ^{18}F Fluor-dihydroxy-L-phenylalanin (6-FDOPA). 6-FDOPA ist bekannt als Hirn-Tracer für das dopaminerge System. Da das OMFD eine Aminosäure ist kann man prinzipiell auch den Tumoruptake messen. OMFD wird durch eine elektrophile ^{18}F -Fluorierung markiert. In Verteilungsstudien mittels PET an Menschen zeigte sich der höchste Uptake im Zeitraum von 15-30 min p.i. mit einem Verhältnis Tumor zu gesundem Gewebe von ca. 2. OMFD wird über die Niere ausgeschieden [64].

Es wurde auch Untersuchungen an Tumorzellen mit 6-FDOPA (d) durchgeführt. Die Sensitivität von 6-FDOPA für die Tumorerkennung ist ähnlich der von FDG. Der Uptake von 6-FDOPA ist unabhängig von der lokalen Perfusion des Tumors. Es wurde eine vergleichende Studie mit 6-FDOPA und ^{15}O H₂O durchgeführt und keine Übereinstimmung der Ergebnisse gefunden. Bei der Organverteilungsstudie zeigte sich eine beträchtliche Aufnahme von 6-FDOPA in der Leber [92]. 6-FDOPA wird in Melanome besonders gut aufgenommen [92].

Abbildung 18: ^{18}F -fluorierte natürliche Aminosäuren für die PET-Tumor-Diagnose:

- (a): 2- ^{18}F Fluor-L-phenylalanin;
- (b): 2- ^{18}F Fluorethyl-L-cystein;
- (c): 3-O-Methyl-6- ^{18}F fluor-dihydroxy-L-phenylalanin;
- (d): 6- ^{18}F Fluor-dihydroxy-L-phenylalanin;
- (e): 4-Boron-2- ^{18}F fluor-L-phenylalanin;

4-Boron-2- ^{18}F Fluor-L-phenylalanin (e) ist ein Tracer, der testen soll, ob eine Therapie mit Bor-Neutronen-Einfang-Therapie sinnvoll ist. Die Bor-Neutronen-Einfang-Therapie beruht auf folgender Kernreaktion: $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$

Man verabreicht dem Patienten eine Bor-Verbindung, die sich in Tumoren anreichert und besteht den Patienten mit Neutronen. Die durch die Kernreaktion $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ entstehenden α -Teilchen zerstören das Tumorgewebe. Mit 4-Boron-2- ^{18}F fluor-L-phenylalanin kann man die Anreicherung einer Bor-Verbindung in einem Tumor mittels PET messen. 4-Boron-2- ^{18}F fluor-L-phenylalanin wird aus 4-Boron-L-phenylalanin mittels ^{18}F -Acetyl-hypofluorit, das mit $^{18}\text{F}^{19}\text{F}$ Fluorgas hergestellt wird, in Trifluoressigsäure markiert [71]. Bei *in vivo*-Versuchen an Ratten zeigte sich ein Uptake-Verhältnis Tumor zu gesundem Gewebe von ca. 2. Um den Uptake in die Tumorzelle zu erhöhen, wurde 4-Boron-2- ^{18}F fluor-L-phenylalanin an Fructose gekoppelt. Diese Verbindung läßt sich mit einer Ausbeute von >20 % gewinnen. Das Verhältnis der Aufnahmen von 4-Boron-2- ^{18}F fluor-L-phenylalanin von Gehirn-Tumor zu gesundem Hirngewebe wird mit ca. 3,5 angegeben [73].

Aus der Erkenntnis, dass Aminosäuretransporter nicht nur natürliche Aminosäuren sondern auch künstliche in die Zelle transportieren, wurden auch künstliche Aminosäuren ^{18}F -fluoriert und untersucht. Die in Abbildung 19 dargestellten künstlichen Aminosäuren werden als Racemate eingesetzt. Wenn die L-Form mit der D-Form verglichen wurde, zeigte das L-Enantiomer immer das bessere Uptake Verhalten. Obwohl das Racemat bei den meisten Untersuchungen verwendet wurde, zeigten

die Aminosäuren ein großes Verhältnis Tumor zu gesundem Gewebe.

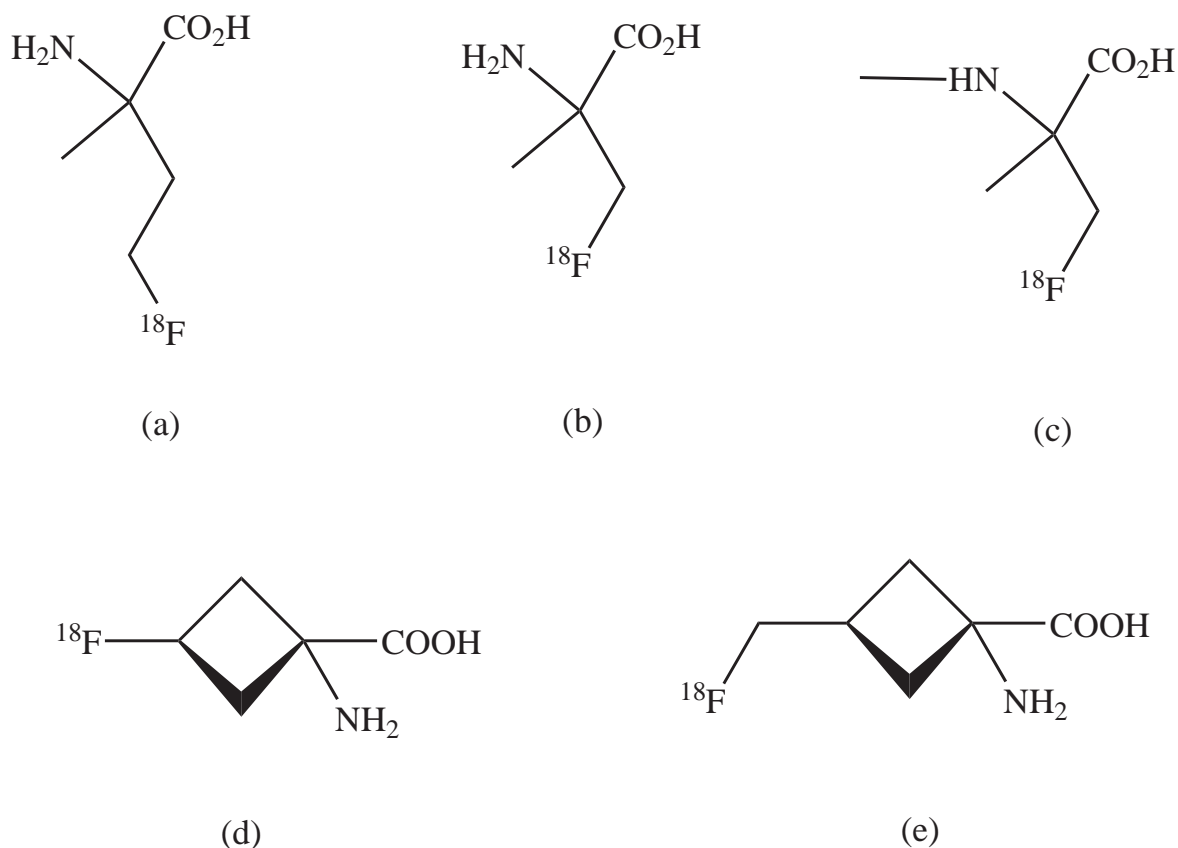


Abbildung 19: ^{18}F -fluorierte künstliche Aminosäure für die PET-Tumor-Diagnose:

- (a): 2-Amino-4- ^{18}F fluor-2-methylbutansäure;
- (b): 2-Amino-3- ^{18}F fluor-2-methylpropansäure;
- (c): 3- ^{18}F Fluor-2-methylamino-2-methylpropansäure;
- (d): 1-Amino-1-carboxy-3- ^{18}F fluor-cyclobutan;
- (e): 1-Amino-1-carboxy-3- ^{18}F fluormethyl-cyclobutan;

2-Amino-4- ^{18}F fluor-2-methylbutansäure (a) (FMAB), 2-Amino-3- ^{18}F fluor-2-methylpropansäure (b) (FMAP) und 3- ^{18}F Fluor-2-methylamino-2-methylpropansäure (c) (NMe-FMAP) werden durch Direktmarkierung mit n.c.a. ^{18}F -Fluorid aus den entsprechendem tosylierten Vorläufer in Acetonitril hergestellt. Die Ausbeuten liegen für FMAB bei 36 % zerfallskorrigiert und für die Propansäuren über 70 % zerfallskorrigiert. FMAB unterscheidet sich in der Aufnahmemechanismus gegenüber FMAP und NMe-FMAP. FMAB wird über den Aminosäuretransporter L in die Zelle transportiert, während die Propansäuren über den den Aminosäuretransporter A in die Zelle transportiert wird. FMAB zeigt seinen höchsten Uptake in den Tumor 5 min p.i. mit einem Tumor zu gesundem Gewebe Verhältnis von 15. Dieser Wert veränderte sich bis zum Versuchende nach 120 min kaum auf ein Verhältnis von 13. FMAP und NMe-FMAP erreichen ihren maximalen Uptake nach 120 min mit einen Verhältnis Tumor zu gesundem Gewebe von 31 bzw 104 [60] ,[61] .

1-Amino-1-carboxy-3- ^{18}F fluor-cyclobutan (FACBC) (d) wird mit einer Ausbeute von 12 % mittels einer Direktmarkierung gewonnen. Die Organverteilungsstudie zeigte einen hohen Uptake in der Leber. Die höchste Anreicherung im Tumor wurde nach 60 min mit einem Verhältnis Tumor zu gesundem Gewebe von ca. 7 erreicht [48].

1-Amino-1-carboxy-3- ^{18}F fluormethyl-cyclobutan (FMACBC) (e) wird mit einer Ausbeute von 30 % mittels einer Direktmarkierung gewonnen. Die Organverteilung ist dem von FACBC ähnlich. Auch hier wird die maximale Anreicherung im Tumor nach 60 min erreicht mit einem Verhältnis

Tumor zu gesundem Gewebe von ca. 9 [61].

Unter den ^{18}F -markierten Aminosäuren haben in der klinischen Anwendung für onkologischen Fragestellungen derzeit nur das 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin und das O-(2- ^{18}F Fluorethyl)-L-tyrosin eine Bedeutung [52].

3.5.5 Asparagin

Asparagin (Asn) ist eine Aminosäure mit schwach polarer Seitenkette, die die Strukturformel, wie in Abb. 20 dargestellt, besitzt. In Abb. 20 ist ebenfalls die Nummerierung der C- und N-Atome aufgeführt, wie sie in der IUPAC-Nomenklatur festgelegt werden.

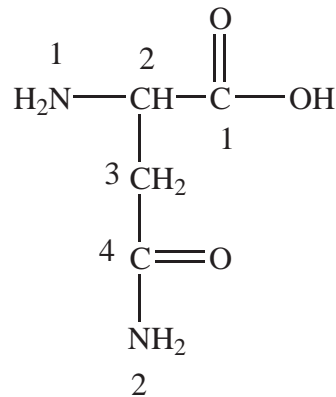


Abbildung 20: Struktur und Nummerierung der C- und N-Atome von Asparagin

Asparagin kommt häufig in folgenden Nahrungsmitteln vor: Kartoffelprotein: 21 g/100 g Protein; Kokosprotein 17 g/100 g Protein. Ebenfalls kommt freies Asparagin in Fruchtsäften vor (1,5 g/l). Die hohe Konzentration von Asparagin in Kartoffelprotein ist leicht zu erklären, denn Asparagin bildet meist die Verknüpfungsstelle zwischen Glukose- und Peptid-Teilen in Biomolekülen. Dazu wird die zweite NH_2 -Gruppe als Verknüpfungsstelle verwendet.

Asparagin gehört zu den 'Standardamino-säuren', deren DNA-Kodierung der Basen AAA oder AAG ist. Asparagin ist eine nicht-essenzielle Aminosäure und kann in gesunden Zellen aus Oxalacetat über Asparaginsäure aufgebaut werden (Abb. 21).

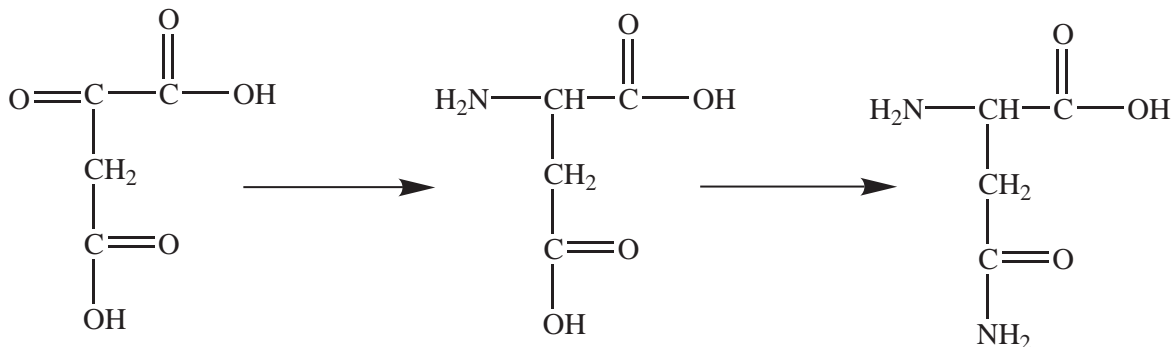


Abbildung 21: Biosynthese von Asparagin

Asparagin kann nicht nur aufgebaut werden, sondern wird bei Glukosemangel auch abgebaut. Wird Asparagin vollständig abgebaut, gewinnt der Körper 18 ATP-Äquivalente an Energie pro Molekül. Da Asparagin sowohl auf- als auch abgebaut werden kann, sind keine Mangelerscheinungen oder Symptome der Überdosierung von Asparagin bekannt.

Asparagin ist eine wichtige Komponente der Ammoniakentgiftung in der Leber. Um das Ammoniak aus der Blutbahn zu entfernen, wird Asparaginsäure zu Asparagin aufgebaut.

Interessant ist das Vorkommen von Asparagin in Enzymen, besonders in solchen, die die Replikation der DNA steuern. Fast alle Proteine, die die Proliferation der DNA steuern, haben die Aminosäuresequenz Asn-X-Ser/Thr (X steht für eine beliebige Aminosäure) gemeinsam.

Die Targetzelle für das ^{18}F -markierte Asparagin soll eine schnell-proliferierende Tumorzelle sein. Asparagin ist eine Aminosäure, die die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, während die Asparaginsäure nicht durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert wird. Dies ist von Bedeutung, um auch Gehirntumore zu erfassen.

Die Asparaginase wird als Zytostatika für die Behandlung gewisser Tumorarten eingesetzt. Tumore, die mit Asparaginase behandelt werden, sind vor allem Leukämiearten und Lymphome.

Die Wirkungsweise der Asparaginase ist Asparagin in Asparaginsäure abzubauen. Den oben erwähnten Arten von Tumoren fehlt aber das Enzym Asparaginsynthetase, das aus Asparaginsäure Asparagin aufbauen kann. Somit muss die Tumorzelle ihren ganzen Bedarf an Asparagin dadurch decken, dass sie das Asparagin aus der Blutbahn aufnimmt. Verabreicht man nun Asparaginase, verarmt man das Blut an Asparagin und hemmt das Wachstum des Tumors, während gesunde Zellen in der Lage sein sollten, ihren Bedarf an Asparagin durch die Biosynthese mittels der Asparaginsynthetase decken zu können.

Bekannte Nebenwirkungen bei Gabe von Asparaginase sind Erbrechen, Fieber, Leberfunktionsstörungen, Abnahme der Leukozyten und Trombozyten und Allergische Reaktionen (20 -30 % aller Menschen) [30]. Als besonders bedenklich ist die Abnahme von Leukozyten und Trombozyten bei der Leukämie zu betrachten. Ein durch Leukämie geschwächtes Immunsystem wird durch die Verringerung wichtiger Bestandteile weiter geschwächt.

Somit wäre es von Vorteil, vor einer Therapie mit Asparaginase zu wissen, ob sich der Tumor auf diese Weise therapieren lässt. Dies könnte durch einen PET-Tracer, der ein Derivat des Asparagin ist, erfüllt werden.

Da einige fluorierte Aminosäuren zytotoxisch sind, wurde auch Asparagin mit ^{19}F derivatisiert [32]. Das 3-Fluor-Derivat des Asparagins zeigte dabei Eigenschaften, die es für die Markierung mit [^{18}F]Fluorid besonders interessant machen. Das 3-Fluor-Asparagin wird in die Proteine eingebaut, deaktiviert aber damit das Protein. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Deaktivierung der Säureamidgruppe des Asparagins eventuell durch die hohe Elektronegativität des Fluors hervorgerufen wird. Das ^{18}F -markierte 3-Fluor-Asparagin wäre als Proteinsynthesemarker einsetzbar.

4 Problemstellung

Krebs ist in den Industrieländern neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine der häufigsten Todesursachen. Da die Behandlung von Krebs umso erfolgreicher ist, je früher die Krankheit erkannt wird, ist eine zuverlässige Diagnose von Krebs im Frühstadium erforderlich. Eine diagnostische Methode, die auch kleine Tumore und Metastasen sichtbar machen kann, ist die PET. Voraussetzung dafür ist die Existenz eines geeigneten Tumor-Tracers, der sich möglichst selektiv in den Tumoren anreichert. Viele bislang existierenden Tumor-Tracer nützen die aufgrund der verstärkten Proliferation erhöhte Stoffwechselrate von Tumorzellen. Am häufigsten wird der Tracer 2-[^{18}F]Fluor-2-deoxyglucose (FDG) eingesetzt, der als Marker für die Glukose-Stoffwechselrate einer Zelle dient. FDG hat allerdings den Nachteil, dass Hirntumore nicht oder nur schlecht dargestellt werden können, da der Glukoseverbrauch des Gehirns sehr hoch ist.

Aus diesem Grund wurden andere Tumor-Tracer, die z.B. auf den Aminosäurestoffwechsel als Marker für den Protein-Stoffwechsel abzielen, entwickelt. Hierzu gehören eine Vielzahl ^{11}C -markierter Aminosäuren [86], die jedoch verschiedene Nachteile aufweisen. Zum einen sind viele dieser Aminosäuren an der Carboxyl-Funktion mit C-11 markiert worden, was jedoch bei einer rasch erfolgenden metabolischen Decarboxylierung zu ^{11}C -Kohlendioxid als Metabolit führt. ^{11}C -Kohlendioxid kann eine Zelle wieder verlassen und wird wieder über das Blutsystem verteilt. Zum anderen ist die Halbwertszeit des C-11 mit 20 Minuten relativ kurz, was zu Problemen logistischer Art für die Synthese des Tracers führt. ^{11}C -markierte Tracer müssen in unmittelbarer Nähe zum PET-Scanner synthetisiert werden, da sonst der Verlust durch den radioaktiven Zerfall zu groß wäre. Einige Aminosäuren wurden deshalb mit Fluor-18 markiert. Diese Aminosäuren haben jedoch den Nachteil einer zu starken Anreicherung in Leber und Niere, was die Bildqualität im Rumpfbereich einschränkt.

Außerdem führt die Einführung der Fluor zu einer chemischen Veränderung der Aminosäure, die man nun nur noch als biologisches Analogon ansehen kann. Die wichtigste der ^{18}F -markierten Aminosäuren für die direkte Bestimmung der Proteinsyntheserate ist das 2-[^{18}F]Fluor-L-tyrosin. Verabreichtes 2-[^{18}F]Fluor-L-tyrosin wird nach einer gewissen Zeit in den Proteinen der Zellen nachgewiesen. Vergleichende Studien zeigten, dass die Proteinbiosynthese proportional zu der Aktivität des Aminosäuretransportes ist und es nicht notwendig ist, dass markierte Aminosäuren in die Proteine eingebaut werden müssen und eine aktive Zelle zu markieren. Dies Erkenntnis machte man sich zu nutze, um weitere Aminosäuren als PET-Tracer zu markieren, da 2-[^{18}F]Fluor-L-tyrosin über eine elektrophile Substitution mittels [$^{18}\text{F}^{19}\text{F}$]-Fluorgas hergestellt werden muss.

Ziel dieser Arbeit war die Synthese neuer ^{18}F -markierter Aminosäuren, die sich in Tumorzellen anreichern sollen. Da einige bekannte fluorierte Aminosäuren cytotoxisch sind [32], sollte eine nukleophile Fluorierung mit [^{18}F]F $^-$ durchgeführt werden, um als Produkt eine n.c.a. ^{18}F -Aminosäure zu erhalten. Bei einer elektrophilen Fluorierung wäre die spezifische Aktivität aufgrund des Einsatzes von [$^{18}\text{F}^{19}\text{F}$]F, deutlich schlechter, so dass unter Umständen bereits mit pharmakodynamischen Prozessen gerechnet werden müsste. Als geeignete Aminosäure wurde Asparagin gewählt, da bekannt ist, dass einige Tumorzellen diese normalerweise nicht-essentielle Aminosäure nicht synthetisieren können und deshalb eine selektivere Anreicherung im Tumor erhofft wird. Weiterhin ist bekannt, dass das 3-Fluor-Asparagin in Tumorzellen aufgenommen wird und in die Proteine eingebaut wird. Es soll deshalb versucht werden, eine Synthese für das 3-[^{18}F]Fluorasparagin zu entwickeln.

PET-Tracer auf Basis von künstliche Aminosäuren zeigen genau so gutes bzw. sogar bessere Uptake-Verhalten wie die auf Basis von natürlichen Aminosäuren. In dieser Arbeit soll eine synthetische Aminosäure mit ^{18}F -Fluor markiert, die eine definierte Stereochemie besitzt, denn L-Aminosäuren zeigen einen höheren Uptake als Racemate [71]. Hierzu sollten zwei verschiedene, aus der Literatur bekannte Auxilliare auf ihre Eignung untersucht und die Reaktionsparameter optimiert werden. Anschließend sollten die so erhaltenen ^{18}F -markierten Aminosäuren in *in vivo*-Tests evaluiert werden. Dazu müssen sie in einer isotonischen Kochsalzlösung mit einer ausreichender Konzentration vorliegen.

interessanteste Abgangsgruppe, da sie im Vergleich zu anderen geeigneten Abgangsgruppen wie den Sulfonaten sterisch relativ anspruchslos ist.

Als erstes wurde versucht, Brom in das 3-Hydroxy-Asparagin mittels konz. HBr-Lösung einzuführen. Diese Versuche führten nicht zu dem gewünschten Ergebnis, sondern zu einer Zersetzung des 3-Hydroxy-Asparagin zur 3-Hydroxy-Asparaginsäure (Abb 24).

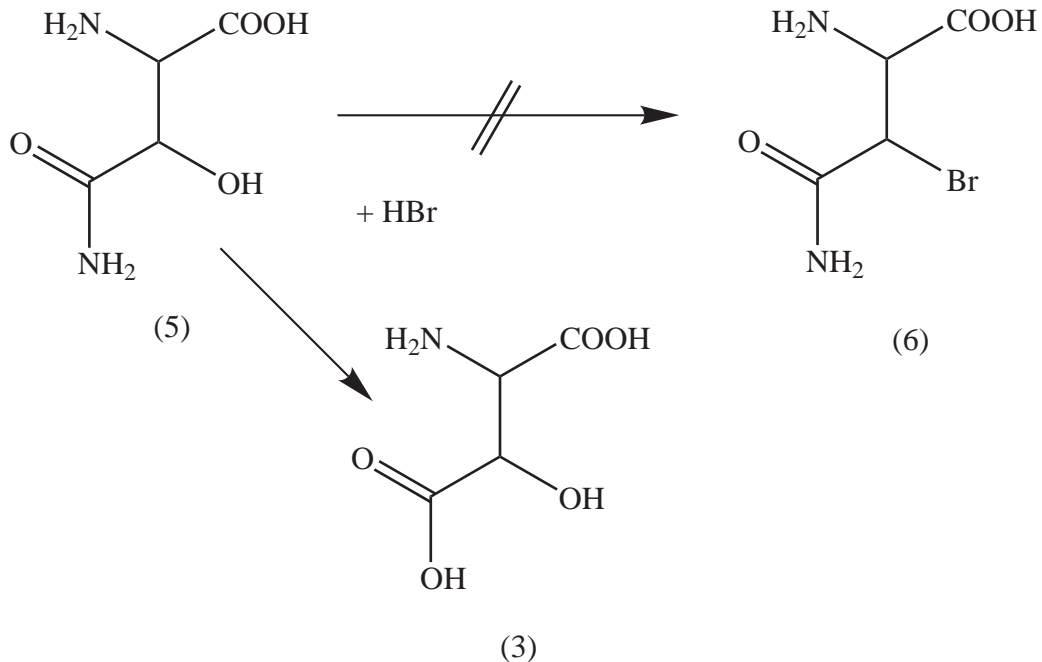


Abbildung 24: Umsetzung von 3-OH-Asparagin mit konz. HBr

Da sich die Säureamidgruppe nicht als stabil unter den gewählten Reaktionsbedingungen zeigte, wurde ein milderes Bromierungsmittel ausgewählt. Auch die Reaktion mit PBr₅ führte nicht zu dem gewünschten Ergebnis (Abb. 25).

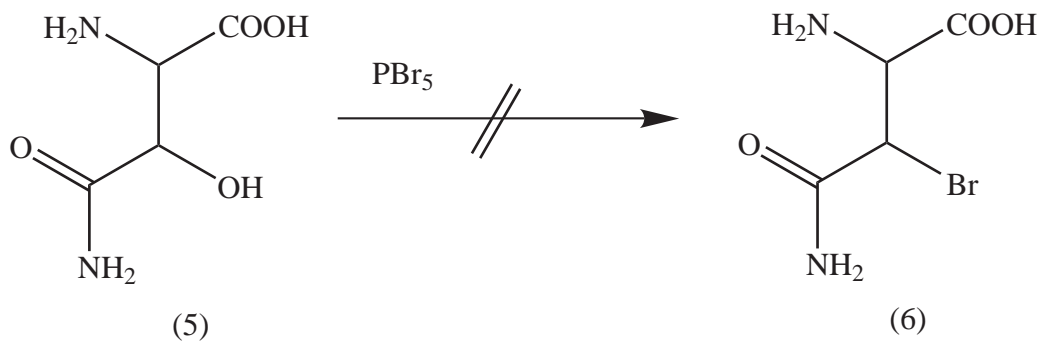


Abbildung 25: Syntheserversuche zum 3-Brom-Asparagin (6)

Da sich das 3-Hydroxy-Asparagin als nicht stabil erwies, wurde nun als Ausgangssubstanz die stabilere 3-Hydroxy-Asparaginsäure genutzt. Da die 3-Hydroxy-Asparaginsäure ein Produkt ist, bei Versuchen 3-Hydroxy-Asparagin mit Bromierungsmitteln umzusetzen, sollte sich die 3-Hydroxy-Asparaginsäure bei der Bromierung nicht zersetzen wie das 3-Hydroxy-Asparagin.

Die Versuche die 3-Hydroxy-Asparaginsäure zu bromieren sind in Abb. 26 zusammengefasst.

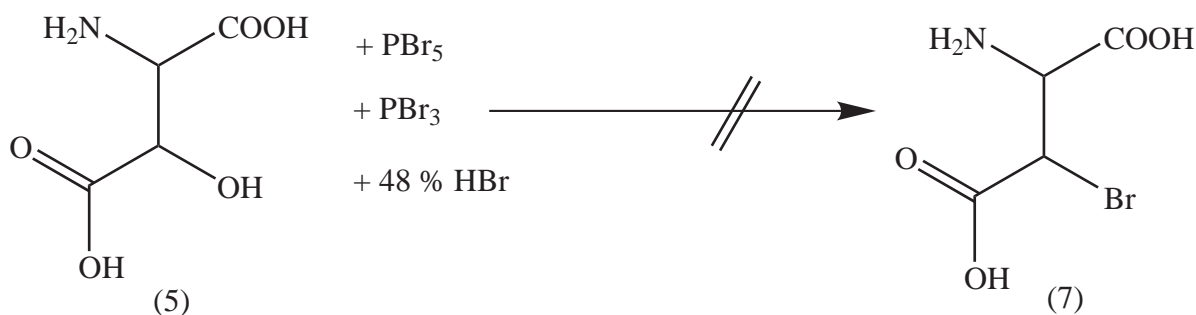


Abbildung 26: Syntheserversuche zum 3-Brom-Asparaginsäure (7)

Die Bromierungsversuche der 3-Hydroxy-Asparaginsäure wurden vom mildesten Phosphorpentabromid über das Phosphortribromid zum stärksten Bromierungsmittel konz. Bromwasserstoffsäure durchgeführt. Keiner der Versuche führten zu dem gewünschten Produkt. Die Reaktionspartner konnten nicht zur Reaktion gebracht werden. Es konnte das Edukt (5) zum Teil reisoliert werden, je nach verwendetem Bromierungsmittel. Wurde Phosphorpentabromid als Bromierungsmittel verwendet, konnte fast alles an 3-Hydroxy-asparaginsäure zurückgewonnen werden, während bei konz. Bromwasserstoffsäure als Bromierungsmittel keine 3-Hydroxy-asparaginsäure reisoliert werden konnte. Da alle Versuche die 3-Hydroxy-asparaginsäure zu bromieren scheiterten, wurden die Versuche zur Bromierung der 3-Hydroxy-asparaginsäure eingestellt.

Als nächste potenzielle Substanz zur Bromierung in 3-Position des Hydroxy-substituierten Asparagins ist das N¹-(Benzyloxycarbonyl)-N²-(4,4-dimethoxybenzhydrol)-3-hydroxy-asparagin Methylester (10) (Abb. 27). Die mehrstufige Synthese von (10) ausgehend vom 3-Hydroxy-Asparagin ist in Abb. 27 dargestellt. In dieser Verbindung (10) sind alle anderen reaktiven Gruppen außer der OH-Gruppe in 3-Position durch Schutzgruppen geschützt.

Als erstes wird die N¹-Aminogruppe durch eine Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Cbz-) geschützt. Dies geschieht nach den Standardbedingungen im wässrigen Medium mit Benzylchloro-Carbonat. Die Cbz-Schutzgruppe wurde ausgewählt, da sie sich zwar im Säuren spalten lässt, aber deutlich pH-stabiler ist als zum Beispiel eine *tert.*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc-). Eine basenlabile Schutzgruppe kam nicht in Betracht, da die finale ¹⁸F-Markierung noch die Aminoschutzgruppe schützen soll und die [¹⁸F]Fluor-Markierung im basischen durchgeführt wird. Die Säurestabilität ist von Nöten, da sich die Einführung der 4,4'-Dimethoxybenzhydrol und Methylester-Schutzgruppen im Säuren vollzieht.

Die Säureamid-Gruppe wird durch 4,4'-Dimethoxybenzhydrol geschützt. Die Synthese erfolgt in Eisessig mit konz. Schwefelsäure als Katalysator. Die Schützung der Säuregruppe am C¹-Atom wird mit trockenem Methanol und konz. Schwefelsäure als Katalysator durchgeführt. Nach dem Aufarbeiten bleibt eine hochviskose Flüssigkeit von N¹-(Benzyloxycarbonyl)-N²-(4,4-dimethoxybenzhydrol)-3-hydroxy-asparagin Methylester (10) zurück, mit der die weiteren Substitutionsversuche durchgeführt wurden.

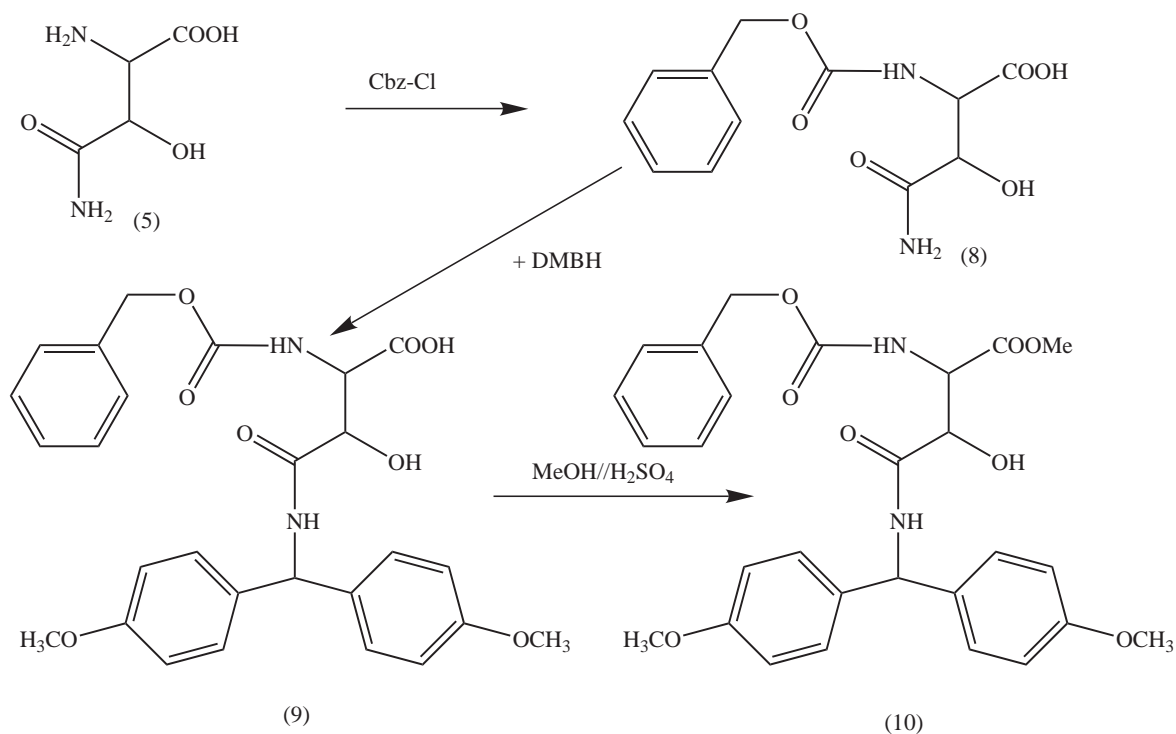


Abbildung 27: Synthese von N¹-(Benzyloxycarbonyl)-N²-(4,4-dimethoxybenzhydrol)-3-hydroxy-asparagin Methyl ester (10)

Als erstes wurde versucht, wieder Brom als Abgangsgruppe einzuführen. Als Reaktant wurde PBr₅ verwendet. Die Ausgangsverbindung (10) zersetzte sich bei diesem Bromierungsmittel vollständig, somit waren die anderen Bromierungsmittel PBr₃ und Bromwasserstoffsäure ebenfalls nicht einsetzbar (Abb. 28).

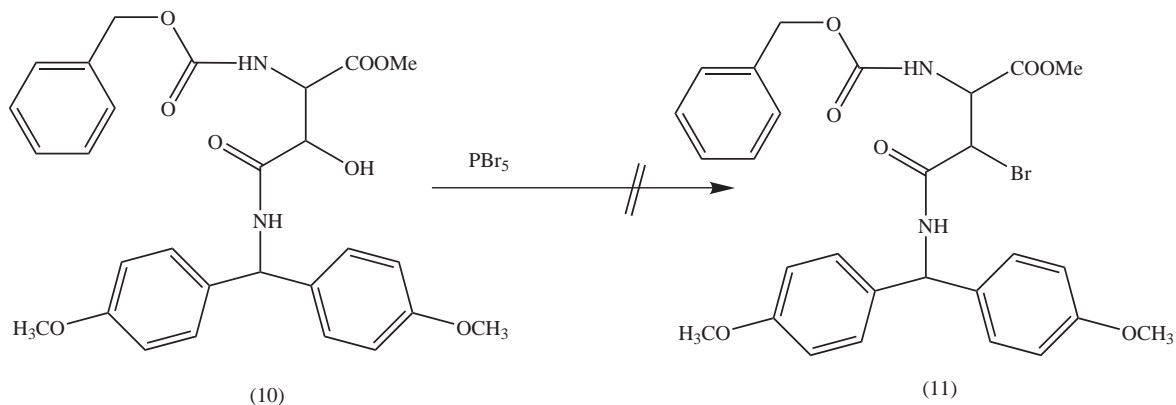


Abbildung 28: Syntheserversuch des Brommarkierungsvorläufer (11) mittels PBr₅

Nach diesem erfolglosen Bromierungsversuch wurde die Abgangsgruppe Brom aufgegeben, da sich in die geschützte Verbindung (10) Brom nur unter Bedingungen einführen lässt, unter dem sie sich zersetzt.

Es wurde nun versucht, andere Abgangsgruppen unter milderer Bedingungen einzuführen. Es wurden die Abgangsgruppen Methylsulfonat und Trifluorsulfonat ausgewählt. Diese Abgangsgruppen wurden ausgewählt, da sie sterisch nicht so gehindert sind wie das p-Toluol-Sulfonsäure, aber sich unter milderer Bedingungen einführen lassen sollten.

Hierbei wurde das Augenmerk auf die besonders schonende Synthese mit Ytterbium(III)-Triflat

als Katalysator gelegt. Diese Synthesemethode erreicht unter neutralen pH-Bedingungen bei Raumtemperatur eine hohe Ausbeute bei Alkoholen, wie Versuche in unserem Arbeitskreis zeigten. Dieselbe Synthese wurde erfolgreich verwandt, um den Markierungsvorläufer für die S-2-Amino-4-fluorbutansäure, die sich schon im leicht Sauren zersetzt, herzustellen (siehe Kap.: 5.1.3).

Keiner der Reaktionsversuche nach dem Schema in Abb. 29 führte zu einer verwendbaren Ausbeute.

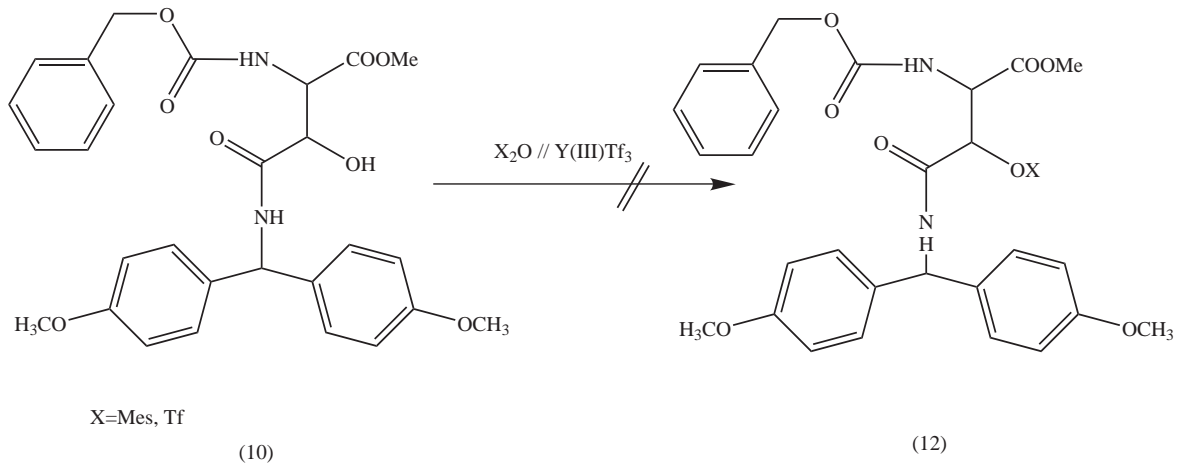


Abbildung 29: Syntheseveruche eines Markierungsvorläufers mit Methylsulfonat oder Trifluorsulfonat als Abgangsgruppe

Die Stabilität der Seitenkette der Aminosäuren wurde nicht nur beim Asparagin beobachtet, sondern auch bei der Aminosäure Arginin [103]. Es ist auch nicht gelungen, an der C⁵-Position des Arginins eine Abgangsgruppe einzuführen.

Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass sich an der 3-Position des Asparagins keine Abgangsgruppe so einführen lässt, dass sich das Molekül anschließend noch für eine Markierung mit n.c.a. [¹⁸F]Fluorid eignet. Diese Erkenntnisse führten dazu, dass dieser Teil des Projektes eingestellt wurde und sich darauf konzentriert wurde, andere Aminosäuren als PET-Tumor-Tracer zu untersuchen.

5.1.2 2-Amino-N¹-(2-fluorethyl)-succinamid

Die Synthese von 2-Amino-N¹-(2-fluorethyl)-succinamid wurde bewusst einfach angelegt, da das 2-Amino-N¹-(2-fluorethyl)-succinamid primär als Vorabtestverbindung für das 3-Fluor-Apsaragin dienen soll. So wurde die Einführung von Fluor über eine Peptid-Bindung realisiert, eine Reaktion, die sehr gut untersucht ist. Die Einführung von Fluor geschieht mittels 2-Fluorethylamin.

Die Synthese der Referenzverbindungen des 2-Amino-N¹-(2-fluorethyl)-succinamid wurde ausgehend vom N¹-*tert.* Butyloxy-carbonyl-asparagin p-Nitrophenolester realisiert. Der Ester wurde mit 2-Fluorethylamin Hydrochlorid umgesetzt. Das 2-Fluorethylamin wurde durch die Zugabe von Triethylamin freigesetzt, so dass sich die Peptidbindung bilden kann (Abb.: 5.1.2). Die Peptidbindung bildete sich mit einer Ausbeute von 90 % .

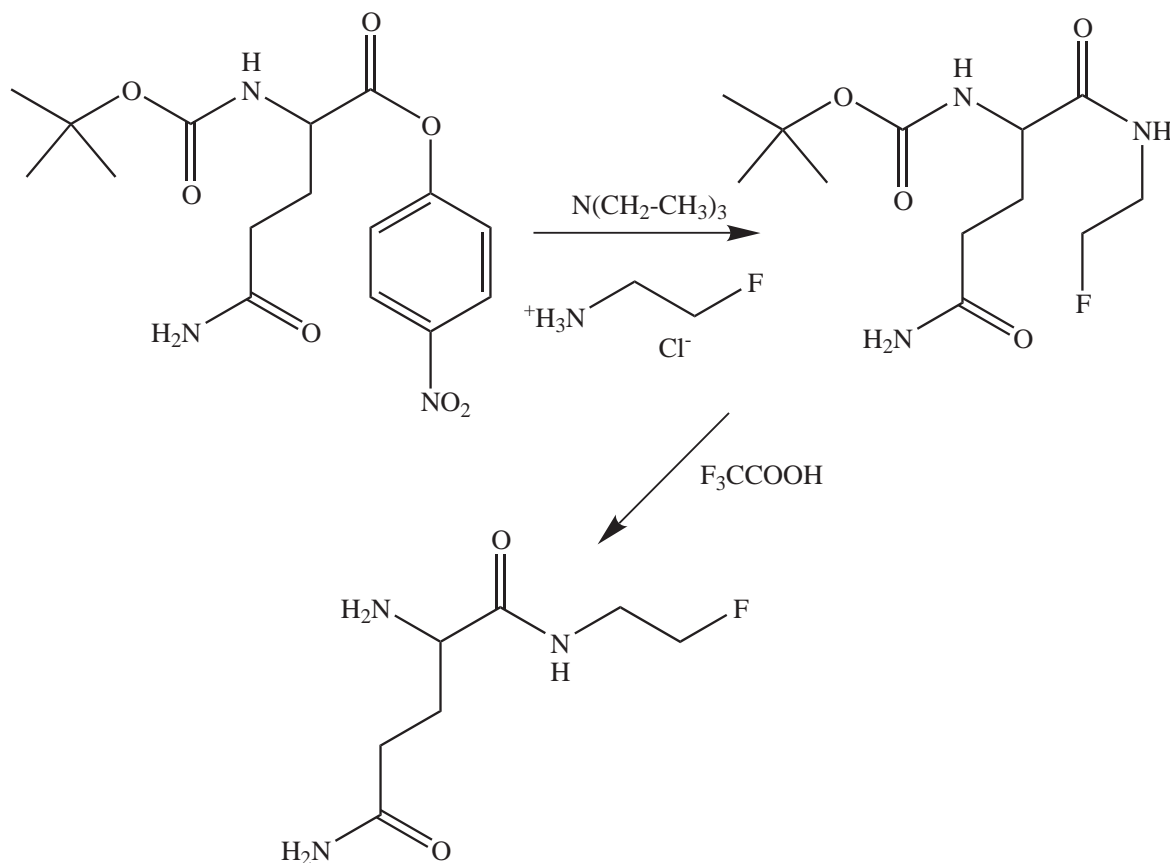
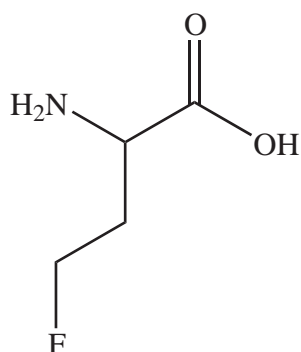


Abbildung 30: Synthese der Referenzverbindungen die Verbindung 2-Amino-N¹-(2-fluorethyl)-succinamid

Die Boc-Schutzgruppe lässt sich vollständig durch Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur abspalten. Nach 5 h bei Raumtemperatur ist die Schutzgruppe abgespalten (Ausbeute: 70 %).

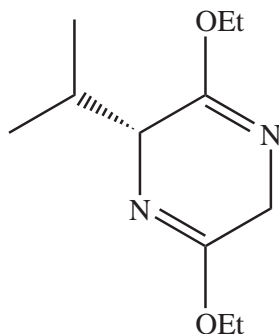
5.1.3 S-2-Amino-4-fluor-butansäure



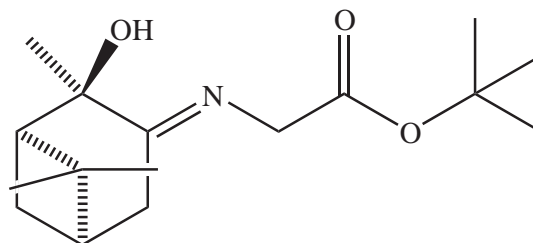
Das Ziel, eine stereochemisch definierte Aminosäure, die nicht durch eine prostetische Gruppe mit Fluor markiert wird, zu synthetisieren, ist am einfachsten zu erreichen, indem man ein chirales Auxilliar verwendet.

Als Beispielverbindung wurde die synthetische Aminosäure S-2-Amino-4-fluor-butansäure ausgewählt, da sie sich leicht synthetisieren lässt und keine weiteren funktionellen Gruppen trägt, die bei einer radioaktiven Markierung mit $[^{18}\text{F}]$ Fluorid geschützt werden müssten.

Als die geeignetsten chiralen Auxilliar für die Synthese von S-2-Amino-4-fluor-butansäure erschienen der von Schöllkopf entwickelte Bislactimether 3,6-Bisethoxy-2*R*-iso-isopropyl-2*H*-dihydropyrazin (13) [82] und der von Yamada et al. [101] entwickelte und von Laue weiterentwickelte (1*R*,2*R*,5*R*)-2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino)-essigsäure *tert.*-butylester (14) [78] (Abb. 31).



(13)



(14)

Abbildung 31: Vergleich der chiralen Auxilliar Schöllkopf-Auxliar (13) und Laue-Auxilliar (14)

Die Stereochemie wird durch die Übergangskomplexe mit den Lithiumbasen bestimmt (Abb. 32 - 33). Wie in Abbildung 32 zu erkennen ist, kommt es beim Schöllkopf-Auxilliar deswegen hauptsächlich zur Bildung des S-Produkts, da der re-seitige Angriff durch den Isopropyl-Rest gehindert ist.

Nach der Deprotonierung des Schöllkopf-Auxilliar mittels Butyl-Lithium-Lösung tritt eine Konformationsänderung des Rings ein, da der Ring im deprotonierten Zustand eben ist. Diese Konformationsänderung kommt durch die Ausbildung eines aromatischen Systems zustande.

schließenden Hydrolysieren des Auxiliars keine Reaktion am α -Kohlenstoff der Aminosäure stattfindet, kann man aus der Diastereomerenzusammensetzung auf die Enantiomerenreinheit der fluorierten Aminosäure schließen [99].

5.1.3.1 3,6-Bisethoxy-2R-iso-isopropyl-2H-dihydropyrazin (13)

Das Schöllkopf-Auxilliar wurde ausgewählt, da es ein häufig verwendetes chirale Auxilliar für die Synthese künstlicher Aminosäuren ist. Das Auxilliar liefert die gewünschte Aminosäure in hohen Ausbeuten und mit einem Enantiomerenüberschuß von größer 80 % ee.

Die Synthese des Bislactimethers erfolgte nach der abgewandelten Synthesevorschrift nach B. Löhr [81] (Abb. 34).

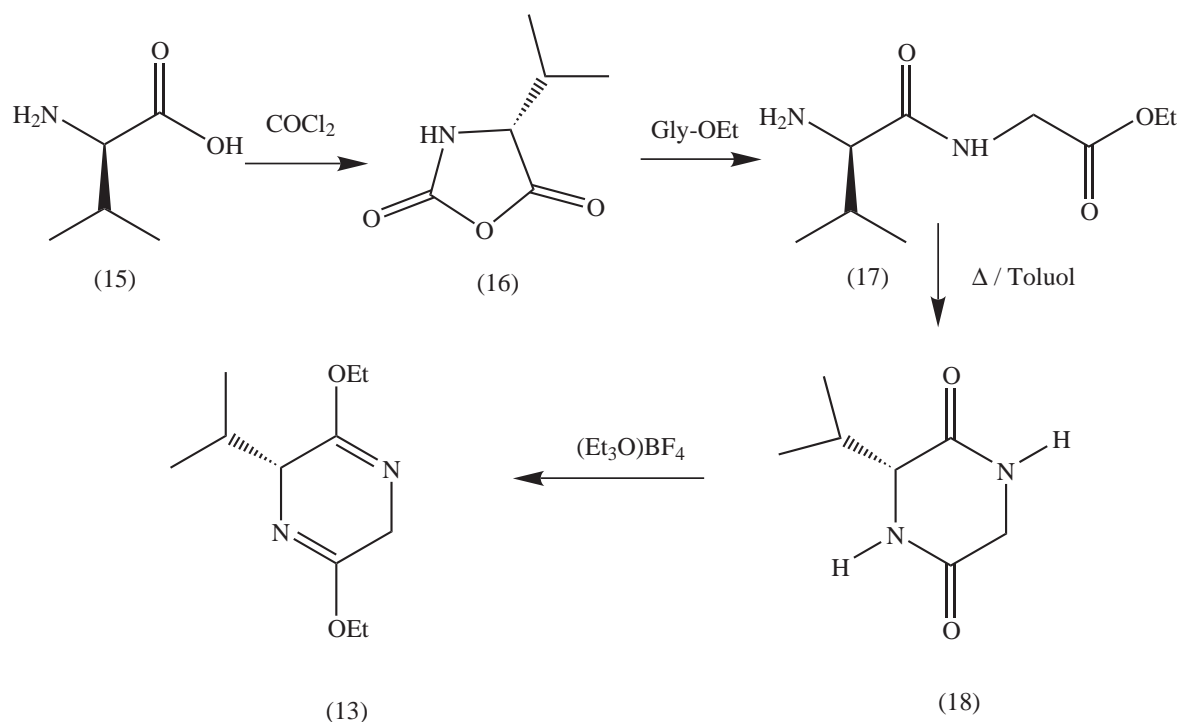


Abbildung 34: Synthese des Bislactimethers

Diese Vorschrift verwendet im Gegensatz zur Original-Vorschrift von Schöllkopf [82] an Stelle von Phosgen gas eine 20 % -ige Phosgenlösung in Toluol. Diese Änderung wurde vorgenommen, um eine bessere Handhabbarkeit der Synthese zu erreichen. Um das Schöllkopf-Auxilliar zu synthetisieren, wird D-Valin (15) mit Phosgen zum N-Carboxyanhydrid (16) umgesetzt. Für diesen Reaktionsschritt darf das Produkt (16) nicht durch HCl verunreinigt sein. Dazu wird nach dem Entfernen des Lösungsmittels nochmals Lösungsmittel zugegeben und abdestilliert.

Das N-Carboxyanhydrid (16) wird mit Glycin-Ethylester Hydrochlorid zum Dipeptid (17) umgesetzt, ohne das Edukt (16) vorher weiter aufzureinigen. Die Reaktion findet in einem Gemisch aus THF und Chloroform bei -70 °C mit Triethylamin als Base statt.

Beim Kochen des Dipeptids in Toluol unter Rückfluß kommt es unter Abspaltung von Ethanol zur Cyclisierung. Das so gewonnene Cyclodipeptid (R)-3-Isopropyl-2,5-diketopiperazin (18) muss sehr trocken sein für die anschließende Meerwein-Umlagerung zum Auxilliar. Die Trocknung wird bei 100 °C im Hochvakuum durchgeführt. Unter diesen Bedingungen beginnt das (R)-3-Isopropyl-2,5-diketopiperazin (18) sublimieren.

Die Meerwein-Umlagerung des Cyclodipeptid (18) zum Bislactimether (13) wird durch Triethylxoniumtetrafluoroborat und nicht mit Trimethylxoniumtetrafluoroborat erreicht, wie in der Originalvorschrift von Schöllkopf beschrieben. Das Produkt wird durch Kugelrohrdestillation gereinigt,

wobei zu beachten ist, dass die Temperatur nicht über 180 °C steigt. Eine Verkohlung des Produktes tritt oberhalb dieser Temperatur auf. Die optimalen Einstellungen für die Destillation ergeben eine Badtemperatur von 165 °C bei einem Druck von 20 mbar.

5.1.3.2 Synthese der Standardverbindungen mittels Schöllkopf-Auxillars (13)

Um die kalten Standards zu synthetisieren, wurde das deprotonierte Schöllkopf-Auxilliar mit 2-Brom-1-fluorethan, O-(p-Toluol-sulfonyl)-2-fluorethanol oder O-(Trifluormethyl-sulfonyl)-2-fluorethanol umgesetzt (Abb. 35).

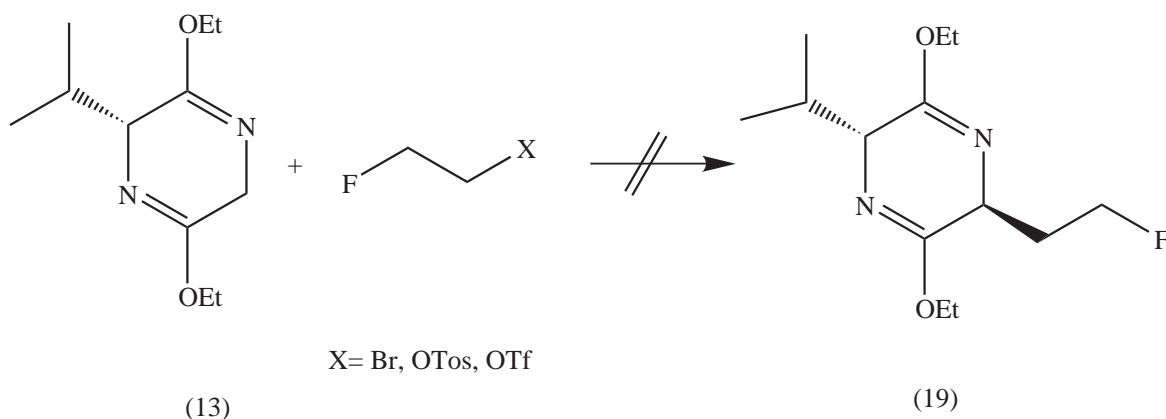


Abbildung 35: Syntheseversuche des kalten Standards mittels des Schöllkopf-Auxillars

Keines der Fluorethylsubstrate reagierte mit dem Schöllkopf-Auxilar. Da selbst O-(Trifluormethyl-sulfonyl)-2-fluorethanol, eine sehr gute Abgangsgruppe, nicht mit dem deprotonierten Schöllkopf-Auxilliar reagierte, ist es so nicht möglich, das gewünschte Fluorethyl-Derivat (19) des Schöllkopf-Auxillars herzustellen.

Es wurde in der Literatur beschrieben, dass das Ethyl-Derivat (21) (Abb. 36) synthetisiert werden kann [84]. Ebenso ist beschrieben, dass das 2-Fluor-2-Methylpropyl-Derivat (20) des Schöllkopf-Auxillars (Abb. 37) synthetisiert wurde [76].

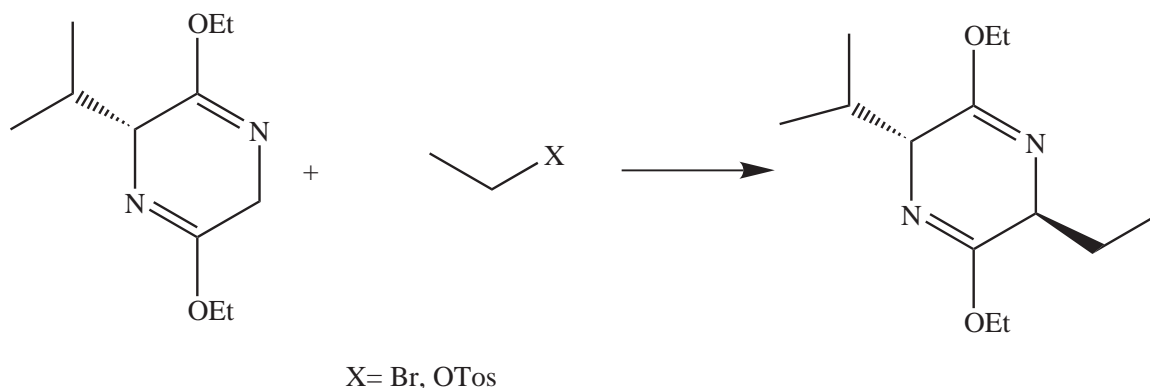


Abbildung 36: Synthese des Ethyl-Derivates des Schöllkopf-Auxillars

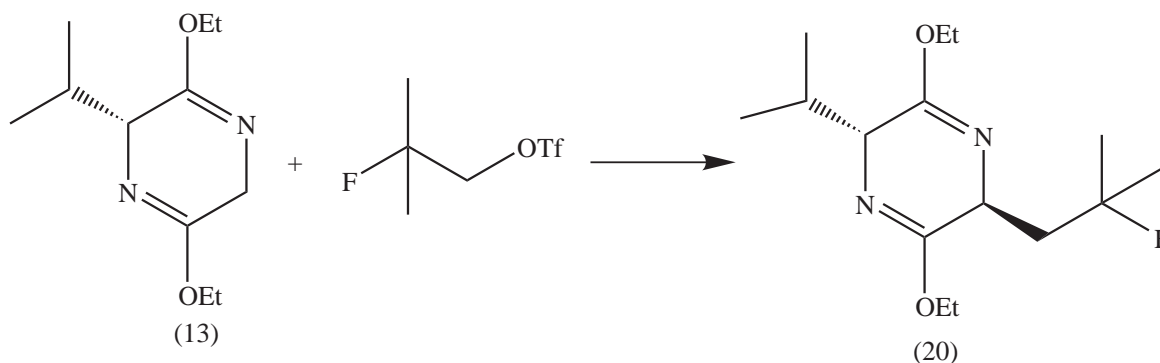


Abbildung 37: Synthese des 2-Fluor-2-Methylpropyl-Derivates des Schöllkopf-Auxilliars

Da durch die Verwendung von O-(p-Toluol-sulfonyl)-2-fluorethanol oder O-(Trifluormethyl-sulfonyl)-2-fluorethanol die Abgangsgruppen-Eigenschaften von p-Toluol-sulfonat oder Trifluormethyl-sulfonat günstig beeinflusst werden, wäre zu erwarten gewesen, dass die Synthese des Fluorethyl-Derivates des Schöllkopf-Auxilliars (19) einfach realisiert werden kann. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass sich zwar der Übergangskomplex bildet, aber dann die Konformationsänderung zum gefalteten Ring des Produktes nicht mehr stattfinden kann. Bei einer Literaturrecherche wurde festgestellt, dass die in Abb. 37 beschriebenen Reaktionen die kleinsten fluorierten Reste beschrieben, die erfolgreich an das Schöllkopf-Auxilliars gekoppelt wurden. In keiner in der Literatur beschriebenen Synthese befand sich in α - oder β -Stellung zur Kopplungsstelle eine Gruppe mit einem -I-Effekt [76], [80] - [60].

Damit war die direkte Synthese des ^{19}F -Standards nicht durchzuführen. Es wurde nun versucht, die Synthese der Standardverbindungen über den Markierungsvorläufer, dem O-(p-Toluol-sulfonyl)-ethyl-Derivat des Schöllkopf-Auxilliars, durchzuführen.

Die Synthesestrategie ist in Abb. 38 dargestellt.

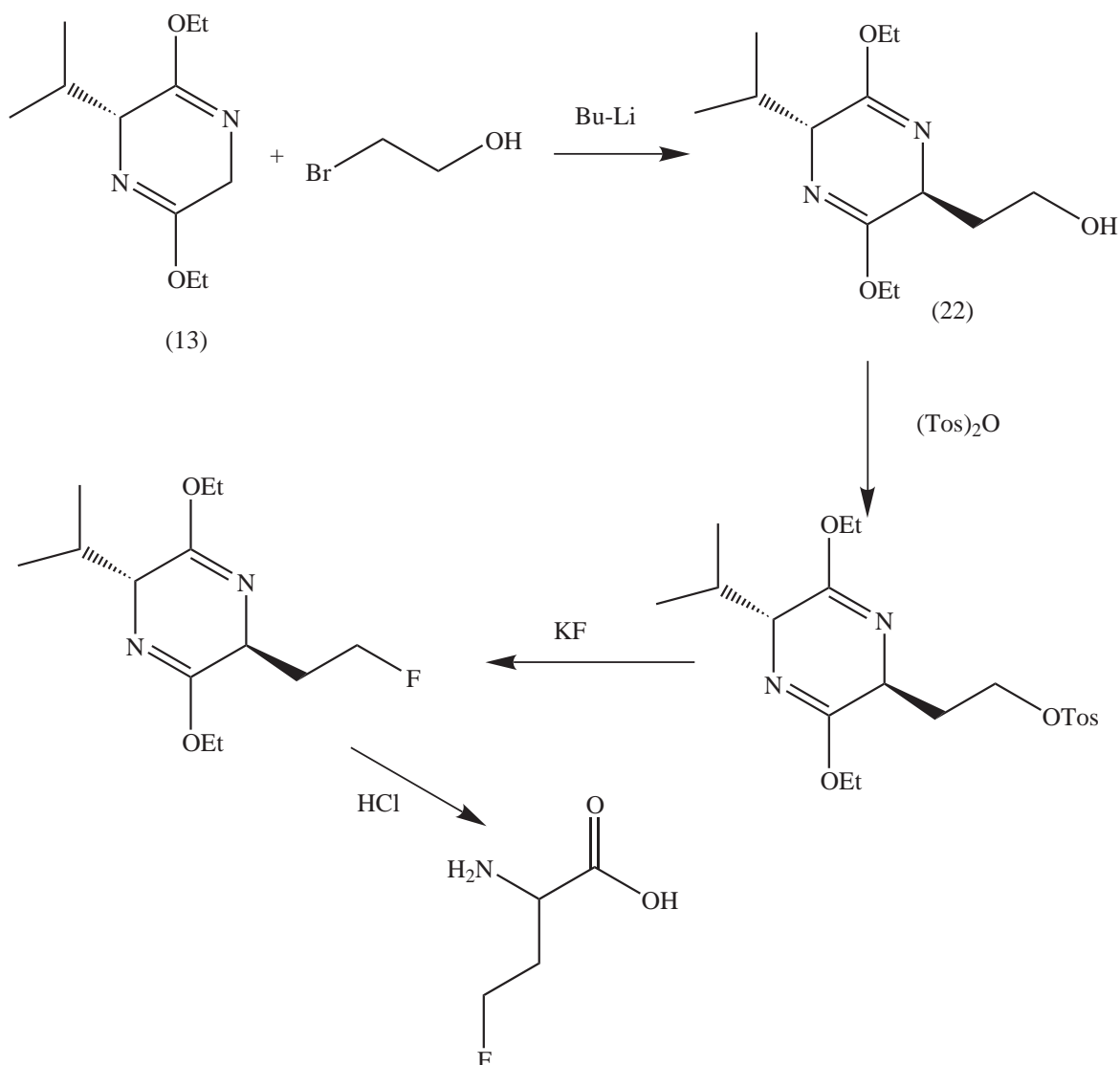


Abbildung 38: Syntheseversuche des Markierungsvorläufers und der Standardverbindungen mittels des Schöllkopf-Auxilliaris

Die Umsetzung des Schöllkopf-Auxilliaris mit 2-Bromethanol war nicht möglich. Somit ist davon auszugehen, dass die Hydroxylgruppe wie das des Fluor noch zu elektronegativer ist, um die Reaktion erfolgreich durchführen zu können. Damit ist das Schöllkopf-Auxilliar für die Synthese von S-2-Amino-4-fluor-butansäure nicht geeignet.

5.1.3.3 (1R,2R,5R)-2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino)-essigsäure -*tert.*-butylester (14)

Die Herstellung von (1R,2R,5R)-2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino)-essigsäure *tert.*-butylester (Laue-Auxilliar) ist weniger aufwendig als die des Schöllkopf-Auxilliaris. Das Laue-Auxilliar kann in einer einstufigen Synthese gewonnen werden.

Die Synthese dieses Auxilliaris geschieht über die Kondensation von (1R, 2R, 5R)-2-Hydroxy-3-Pinanon an Glycin-*tert.*-Butylester (Abb. 39). Die Synthese wird in Benzol als Lösungsmittel unter Rückfluß durchgeführt. Will man die Toxizität von Benzol vermeiden, kann die Reaktion auch mit Toluol als Lösungsmittel durchgeführt werden. Die Reaktion muss mit Toluol bei vermindertem Druck von 236 mbar in einer Cope-Apparatur durchgeführt werden, damit keine Zersetzung des Produktes

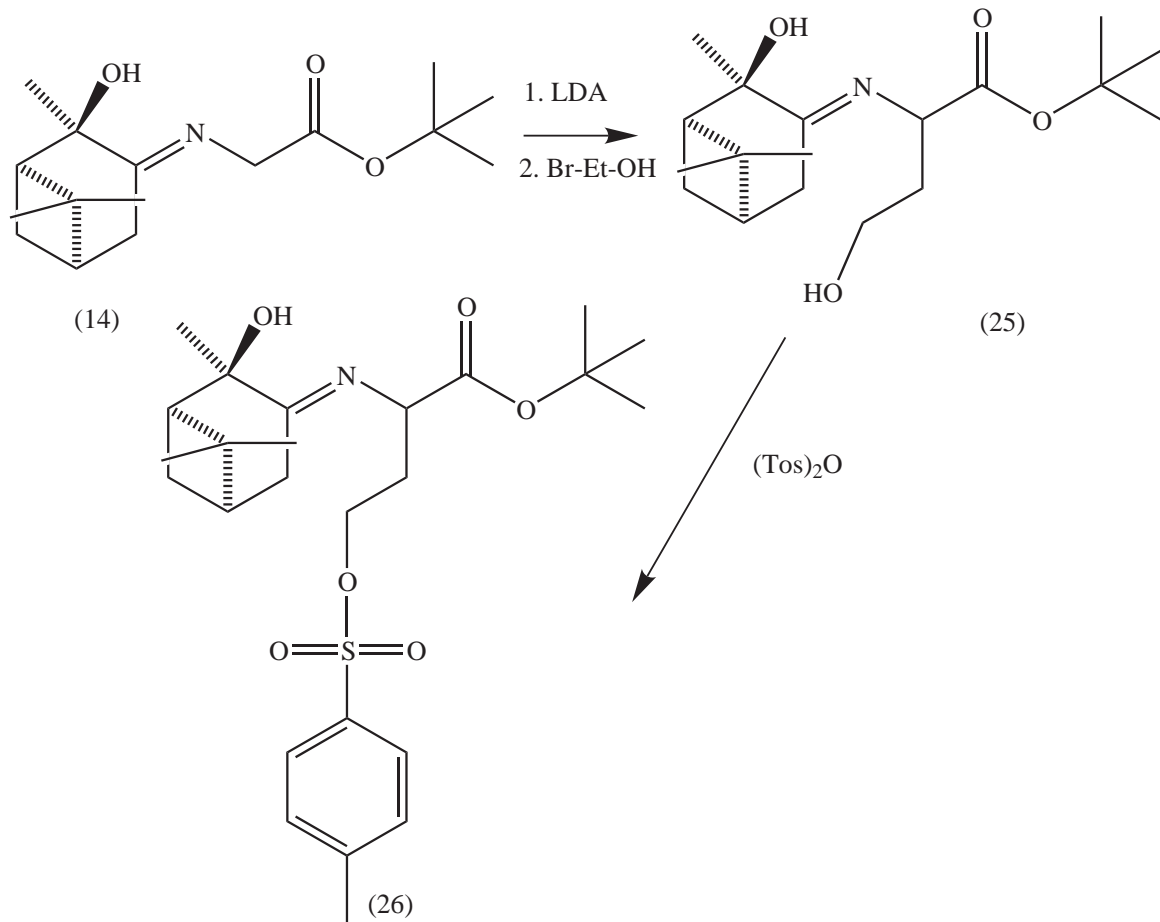


Abbildung 40: Synthese des Markierungsvorläufers (1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure *tert.*-butylester

Bei der Synthese des Laue-Auxilliar mit 2-Bromethanol ist zu beachten, dass 3 Äquivalente LDA-Base benötigt werden. 2 Äquivalente werden benötigt, um das Laue-Auxilliar zu deprotonieren. Das dritte Äquivalent wird benötigt, um das H-Atom der Hydroxylgruppe des 2-Bromethanol zu entfernen. Die Deprotonierung des Laue-Auxilliar benötigt ca. 90 min, die Deprotonierung des 2-Brom-Ethanol nur 5 min. Es empfiehlt sich, die beiden Substrate getrennt zu deprotonieren und erst anschließend miteinander zur Reaktion zu bringen.

Bei der Dosierung der Base ist zu beachten, dass die LDA-Lösung, die eine dunkelrote Farbe besitzt, sich nicht nach gelb verfärbt. Ist sie abreagiert, färben die Rückstände der LDA-Lösung die Reaktionslösung gelb. Wird die Reaktionslösung noch während der Zugabe des deprotonierten 2-Brom-Ethanol in THF gelb, muss weitere Base zugesetzt werden. Die Base ist richtig dosiert, wenn sich die Reaktionslösung am Ende der Reaktion von rot nach gelb verfärbt hat.

Die Umsetzung zum Markierungsvorläufer (16), also die Tosylierung der primären Alkoholgruppe, geschieht mittels p-Toluolsulfonsäureanhydrid mit Ytterbium(III)-Trifluorsulfonat als Katalysator. Dieses Tosylierungsverfahren ist besonders schonend, da es bei Raumtemperatur durchgeführt wird und keine starksauren Reaktionsprodukte entstehen. Im Reaktionsprodukt sind sowohl die N-C-Doppelbindung zum Pinanon als auch der *tert.*-Butylester säurelabil. Senkt man den pH-Wert, spaltet sich zuerst die N-C-Doppelbindung, die durch 20 % ige wässrige Citrat-Lösung spaltbar ist.

Am (1R,2R,5R)-4-Hydroxy-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino) butansäure *tert.*-butylester wird ausschließlich die primäre OH-Gruppe, wie gewünscht, tosyliert. Das doppelt tosylierte Produkt, bei dem sowohl die primäre als auch die *tert.*-OH-Gruppe tosyliert sind, konnte nicht nachgewiesen werden. Dies kann damit erklärt werden, dass das p-Toluolsulfonsäureanhydrid equimolar zum Alkohol eingesetzt wird und die Reaktivität der primären Alkoholgruppe deut-

lich höher ist als die der tertiären.

Der Markierungsvorläufer ist thermisch nicht stabil und muss dahingehend entsprechend behandelt werden. Selbst bei einer Lagerung bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ist er nur ca. 8 Wochen einsetzbar. Nach dieser Zeit muss eine erneute Reinigung mittels Säulenchromatographie durchgeführt werden; ansonsten beginnt die finale Markierungsausbeute mit $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ stark zu fallen.

Die Synthese der ^{19}F -Standardverbindungen erfolgte analog der Synthese des Markierungsvorläufers (Abb. 41). Das Laue-Auxilliar (14) wird mittels 2 Äquivalenten LDA deprotoniert und mit 1-Brom-2-fluorethan umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel.

Die Stereochemie des (1R,2R,5R)-4-Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylesters (27) wurde mittels ^{19}F -NMR bestimmt. Es wurde ein Diastereomerenüberschuß von $>97\%$ ds bestimmt.

Die Entschützung der Aminosäure erfolgte nicht, wie in der Literatur beschrieben, stufenweise, sondern in einem Schritt, ausgehend von (1R,2R,5R)-4-Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester. (In der Literatur erfolgt die Abspaltung der Schutzgruppen in einer zweistufigen Synthese. Im ersten Schritt wird der Pinanonrest mittels 20 %-iger Zitronensäure, in einem weiteren Schritt wurde der *tert.*-Butylester (28) mit 6 N HCl gespalten.)

Es wurde eine einstufige Entschützung des Produktes gesucht, da die Entschützung mit der ^{18}F -fluorierten Verbindung analog durchgeführt werden sollte. Beim Umgang mit kurzlebigen Isotopen ist der Zeitfaktor bei der Synthese ein entscheidender Punkt. Die vollständige Abspaltung beider Schutzgruppen läßt sich mit 6 N HCl erzielen.

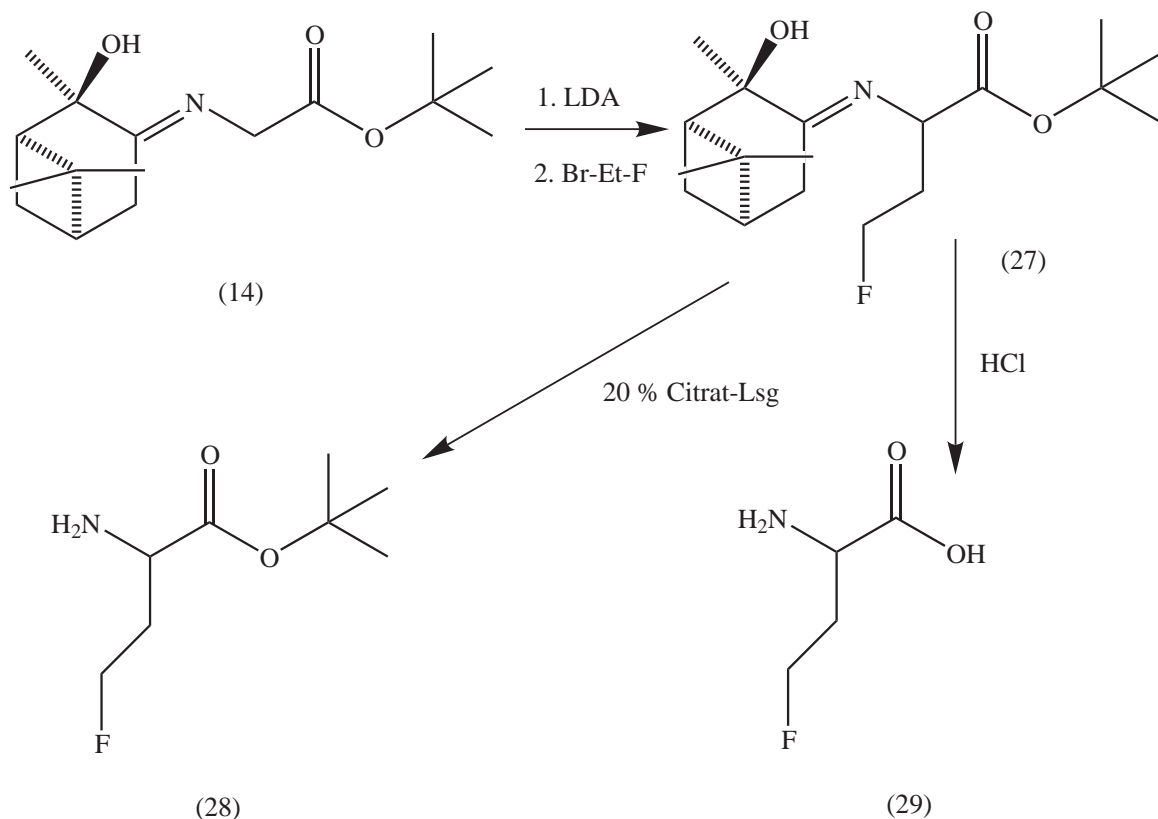


Abbildung 41: Syntheschema der ^{19}F -fluorierten Referenz-Verbindung 2-Amino-4-fluorbutansäure

Der *tert.*-Butylester (28) wird als ^{19}F -Standard benötigt, um eine Optimierung der Entschützung des $[^{18}\text{F}]$ fluorierten Zwischenproduktes durchführen zu können. Die Abspaltung des Pinanonrestes im Vergleich zum *tert.*-Butylester (28) funktioniert rasch, was die Spaltung des *tert.*-Butylester zum ge-

schwingkeitsbestimmenden Schritt macht. Eine optimale Ausbeute von S-2-Amino-4-fluor-butansäure ist erst gewährleistet, wenn man keinen *tert.*-Butylester mehr nachweisen kann.

5.2 Radiochemischer Teil

5.2.1 C¹-(2-[¹⁸F]Fluorethylamino)-asparagin

Die Markierung von C¹-(2-[¹⁸F]Fluorethylamino)-asparagin sollte über den Precursor 2-[¹⁸F]Fluorethylamin gesehen. Die Synthese von 2-[¹⁸F]Fluorethylamin erfolgte angelehnt an die Vorschrift von J. Kirsten [102] (Abb. 42). Ausgehend von N,N-Dibenzyl-2-brom-ethylamin (30) wird das N,N-Dibenzyl-2-[¹⁸F]fluor-ethylamin (31) hergestellt und auf einer C18-Kartusche fixiert, um das nicht umgesetzte [¹⁸F]Fluorid und das Kryptofix 2.2.2 zu entfernen.

Das Zwischenprodukt (31) wurde mit Ethanol von der Kartusche eluiert. Die Hydrolyse des geschützten Zwischenproduktes (31) zum 2-[¹⁸F]Fluorethylamin (32) mit Wasserstoff und Pd-Kohlenstoff als Katalysator kann sowohl in Acetonitril als auch in Ethanol durchgeführt werden. Die Reaktion ist in Ethanol zuverlässiger. Der Katalysator braucht nur noch mittels eines Filters abgetrennt werden, um eine einsatzfertige Lösung von 2-[¹⁸F]Fluorethylamin zu erhalten.

Da die Bildung von C¹-(2-[¹⁸F]Fluorethylamino)-asparagin weder in Acetonitril noch in Ethanol im gewünschtem Maße möglich ist, mußte von der Original-Vorschrift abgewichen werden. Nach der Hydrolyse des Zwischenproduktes (31) in Ethanol wurde der Katalysator (Pd/C 10 % Pd) mittels eines Membranfilters (Milipore 2,5 µm) abgetrennt, die Lösung mittels Trifluoressigsäure angesäuert und das Lösungsmittel abgedampft, so dass das 2-[¹⁸F]Fluorethylamin lösungsmittelfrei und als Ammoniumsalz der Trifluoressigsäure vorliegt. Das Ansäuern mit Trifluoressigsäure ist notwendig, da der Siedepunkt von 2-[¹⁸F]Fluorethylamin bei 63 °C liegt und mit dem Ethanol verdampfen würde.

Das 2-[¹⁸F]Fluorethylammonium-trifluoracetat wird mit DMF aufgenommen und mit Triethylamin neutralisiert.

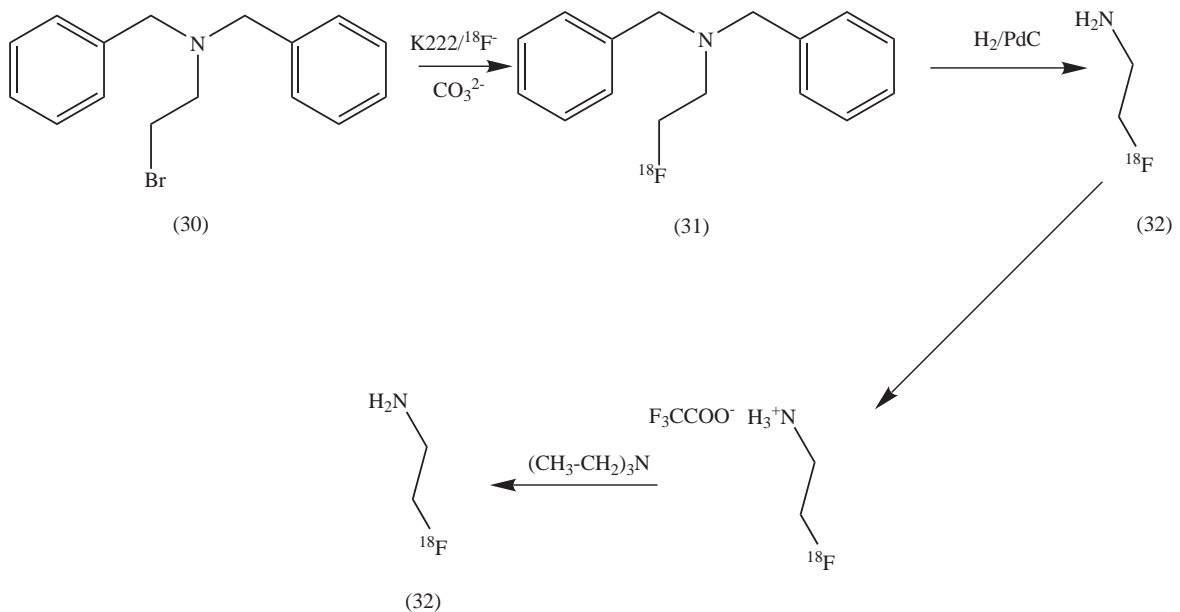


Abbildung 42: Synthese von 2-[¹⁸F]Fluorethylamin

Die Markierung mittels 2-[¹⁸F]Fluorethylamin (32) zum C¹-(2-[¹⁸F]Fluorethylamino)-asparagin (35) wird in Abb. 43 dargestellt. Die optimalen Ausbeuten lassen sich in DMF bei 80 °C erzielen. Der Versuch, das Lösungsmittel DMF durch Acetonitril zu ersetzen, um sich den Eindampfschritt zu sparen, führte zu einem Ausbeuteverlust von 15 Prozentpunkten R.C.A..

Bei der Umsetzung zum geschützten Produkt (34) entstehen Protonen, die mittels Triethylamin neutralisiert werden müssen. Somit ergibt sich die Menge an Triethylamin für diese Reaktion aus der Menge, die man benötigt, um das 2-[¹⁸F]Fluorethylamin (32) aus dem 2-[¹⁸F]Fluorethylammonium-trifluoracetat freizusetzen und der Menge, um die bei Reaktion freiwerdenden Protonen abzufangen.

Das Triethylamin wird der DMF-Lösung, die das 2-[^{18}F]fluorethylammonium-trifluoacetat enthält, zugesetzt, bevor der Markierungsvorläufer (33) zu der Reaktionslösungen gegeben wird. Dies ist wichtig, da der Markierungsvorläufer (33) die säurelabile Schutzgruppe Butyloxycarbonyl-Gruppe trägt.

Als optimale Markierungsbedingung haben sich 4 min Reaktionszeit bei 60 °C herausgestellt. Die Reaktionsbedingungen sind mittels dieses Herstellungsverfahrens im Gegensatz zum Herstellungsverfahren des 2-[^{18}F]fluorethylamin aus N-Boc-2-tosyl-ethylamin [51] schohnder.

Um das Produkt (35) zu erhalten, muss die Boc-Schutzgruppe noch abgespalten werden. Dies geschieht mittels Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur in 3 min.

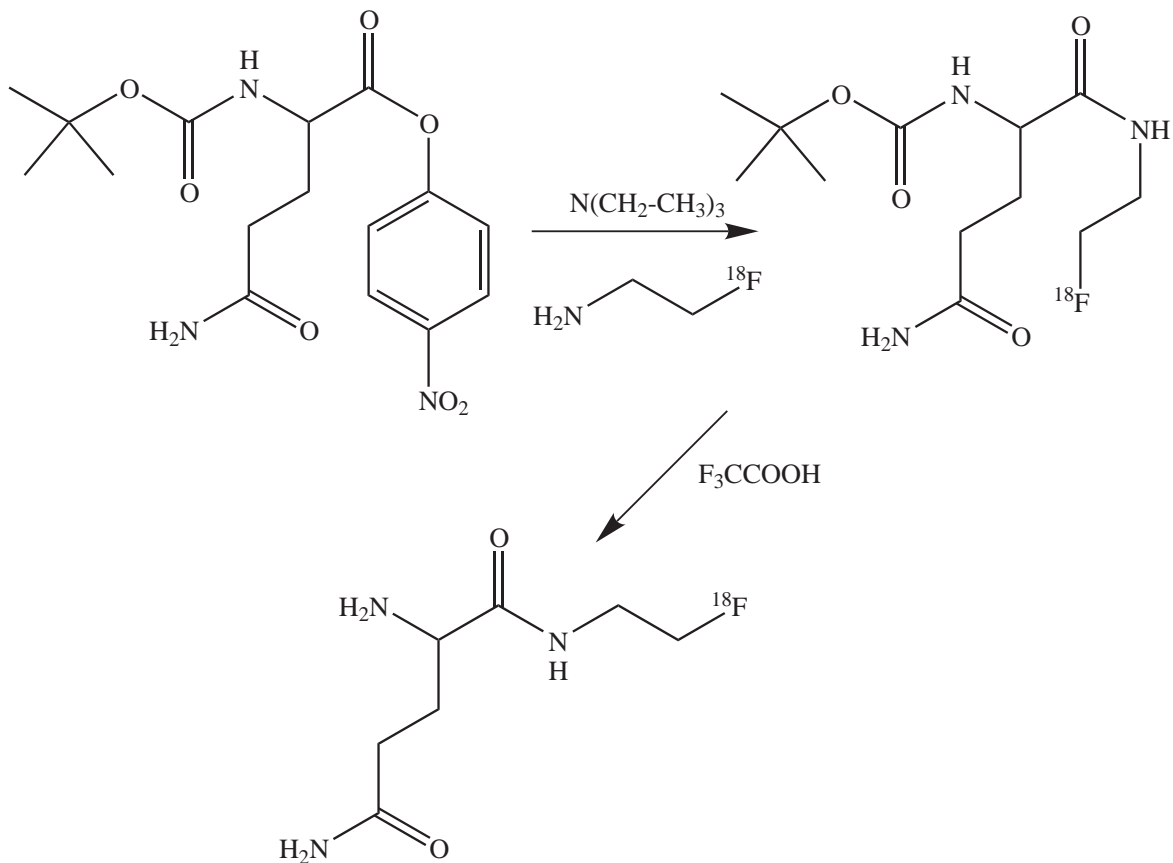


Abbildung 43: Synthese von C¹-(2-[^{18}F]fluorethylamino)-asparagin mit 2-[^{18}F]fluorethylamin in DMF

Die Abtrennung des Produktes (35) erfolgt mittels Radio-HPLC. Als HPLC-Säule wurde eine Pyrospher-Säule RP-18 HC, 5 μm , 250-4 mm, gewählt. Die Retentionszeit von C¹-(2-[^{18}F]fluorethylamino)-asparagin beträgt bei einem Laufmittelgemisch von 20 Wasser : 80 Acetonitril + 0,1 % Trifluoressigsäure $R_f = 5,5$ min. Das System reagiert mit deutlichen Verschiebungen der Retentionszeiten, wenn das Laufmittelgemisch nicht frisch angesetzt wird. Das nicht hydrolysierte N,N-Dibenzyl-2-[^{18}F]fluorethylamin hat unter diesen Bedingungen eine Retentionszeit von $R_f = 20,4$ min. Wählt man ein Laufmittelgemisch von 30 Acetonitril : 70 Wasser + 0,1 Trifluoressigsäure, beträgt die Retentionszeit nur noch $R_f = 7,9$ min.

Ein typisches Radio-HPLC-Chromatogramm ist in Abb. 44 dargestellt. Bei dem Peak 1 bei 3 min handelt es sich um nicht umgesetztes 2-[^{18}F]fluorethylamin (32), Peak 2 bei etwa 5 min ist das Produkt (35) und bei Peak 3 handelt es sich um N,N-Dibenzyl-2-[^{18}F]fluorethylamin (31).

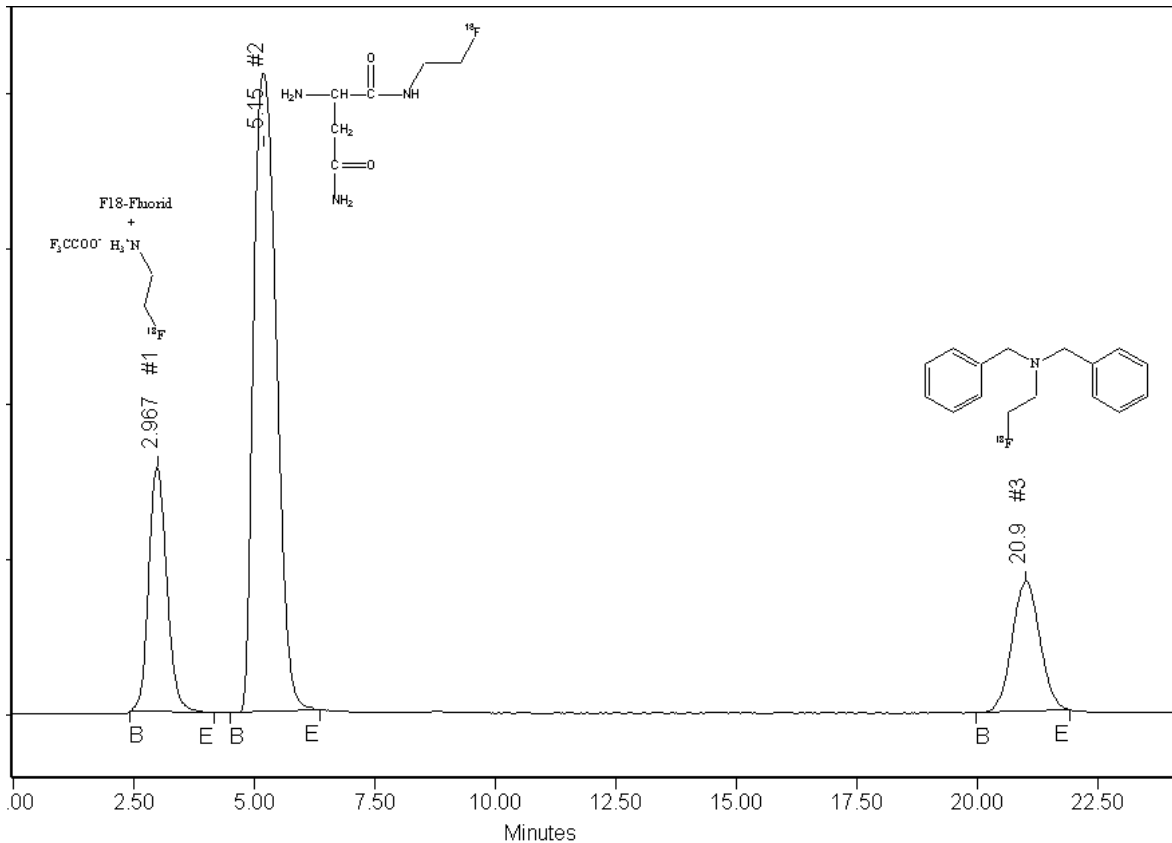


Abbildung 44: HPLC-Aktivitätschromatogramm der Abtrennung von C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin
 (Pyrospher RP-18 HC, 5 μ m, 250-4 mm, Flow 1 ml/min; Eluens: 20 H_2O : 80 MeCN + 0,1 TFA) (Reaktionsbedingungen: DMF; 4 min Reaktionszeit; 60 $^{\circ}C$; + 3 min RT Abspaltung der Boc-Gruppe mit TFA)

Das Produkt (35) muss noch aus dem toxischem Laufmittel in eine injektionsfertige Lösung überführt werden. Dies geschieht, indem das C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin auf einer EN-Kartusche fixiert und anschließend mittels Ethanol wieder eluiert wird. Das Ethanol wird im Vakuum verdampft und das 'trockene' n.c.a. Produkt mittels isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen. Beim Verdampfen des Lösungsmittels ist zu beachten, dass die Temperatur in dem Vail nicht über 80 $^{\circ}C$ steigt, da sonst eine Zersetzung des Produktes eintritt. Dies ist besonders problematisch, da das radioaktive Zersetzungsprodukt gasförmig ist und somit leicht zu Kontaminationen führt.

Die isotonische Kochsalzlösung, die das C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin enthält, wird noch einer Qualitätskontrolle unterzogen. Dies geschieht mittels HPLC. Es wurden die selben HPLC-Bedingungen gewählt wie bei der Abtrennung des Produktes. Abb. 45 zeigt ein HPLC-Chromatogram der Qualitätskontrolle.

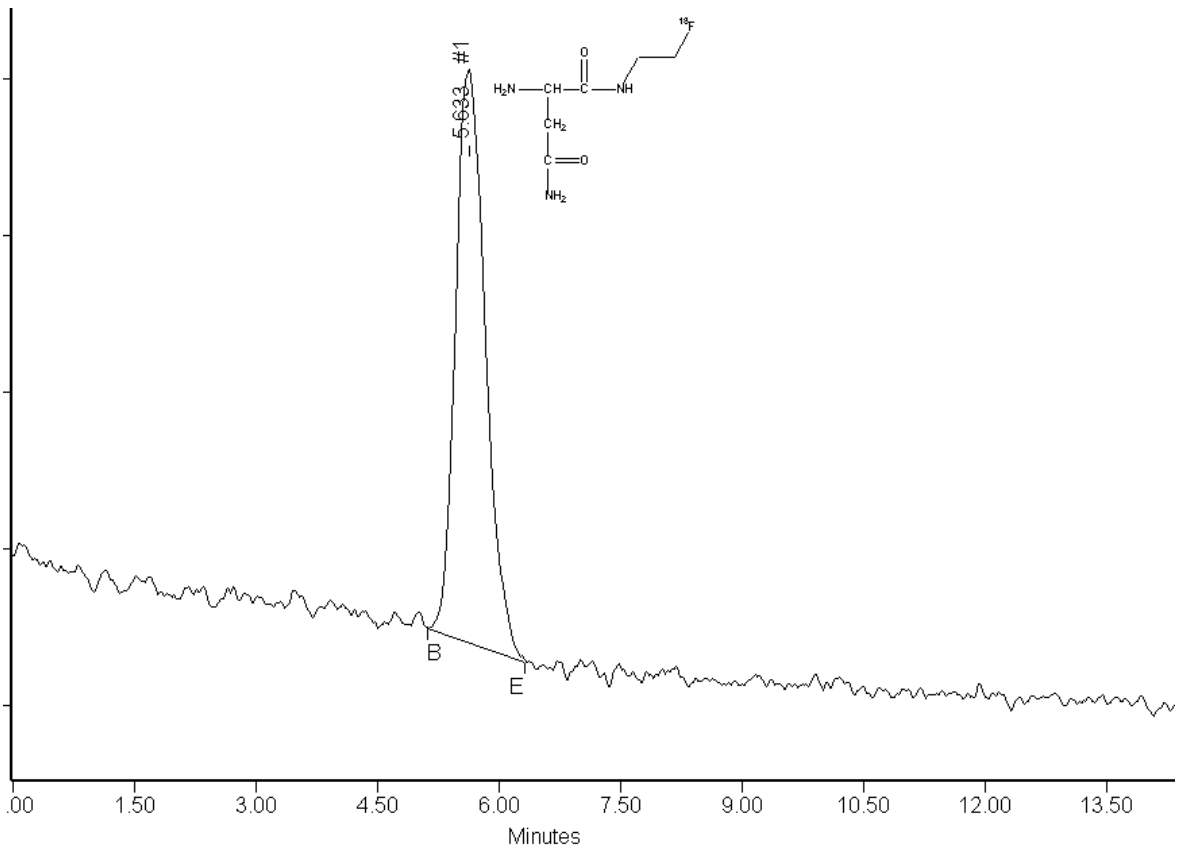


Abbildung 45: HPLC-Aktivitätschromatogramm zur Qualitätskontrolle von C¹-(2-[¹⁸F]Fluorethylamino)-asparagin
(Pyrospher RP-18 HC, 5 μm, 250-4 mm, Flow 1 ml/min; Eluens: 20 H₂O : 80 MeCN + 0,1 TFA)

So ergibt sich die folgende optimierte Synthese für das C¹-(2-[¹⁸F]Fluorethylamino)-asparagin wie folgt:

- **Synthese von 2-[¹⁸F]Fluorethylamin:**
3 mg N,N-Dibenzyl-(2-Bromethyl)-Amin werden in Acetonitril mit [¹⁸F]Fluorid für 5 min bei 80 °C zur Reaktion gebracht.
- **Aufreinigung von 2-[¹⁸F]Fluorethylamin:**
Die Lösung wird mit Wasser verdünnt und das N,N-Dibenzyl-2-[¹⁸F]fluorethylamin auf einer EN-Kartusche fixiert und mit 1,5 ml Ethanol eluiert. Die Benzylgruppen von N,N-Dibenzyl-2-[¹⁸F]fluorethylamin werden im Wasserstoffstrom bei Raumtemperatur mit 6 mg Pd/C innerhalb von 15 min abgespalten. Das Pd/C wird mittels Filter abgetrennt und das 2-[¹⁸F]Fluorethylamin mit Trifluoressigsäure in das Ammoniumsalz überführt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgedampft. Das Ammoniumsalz wird mit Triethylamin nach dem Vertreiben des Ethanols wieder zerstört.
- **Markierung von [2-Carbamoyl-1-(4-hydroxy-phenylcarbamoyl)-ethyl]-carbamidsäure *tert.*-butylester :**
15 mg [2-Carbamoyl-1-(4-hydroxy-phenylcarbamoyl)-ethyl]-carbamidsäure *tert.*-butylester werden mit dem so hergestelltem 2-[¹⁸F]Fluorethylamin in DMF für 4 min bei 60 °C zur Reaktion gebraucht.
- **Aufreinigung von C¹-(2-[¹⁸F]Fluorethylamino)-asparagin:**
Die vollständige Abspaltung der Boc-Schutzgruppe geschieht mit Trifluoressigsäure ohne Er-

wärmen in 8 min. Die Aufreinigung geschieht mittels HPLC (Eluens: Acetonitril:H₂O 20:80 + 0,1 Trifluoressigsäure; Säule: Pyrospher RP 18 HC, 5 μ m; R_t= 5,5 min). Um das C¹-(2-[¹⁸F]Fluorethylamino)-asparagin in eine isotonische Kochsalzlösung zu überführen, wird es auf einer EN-Kartusche fixiert, wieder mit Ethanol eluiert, der im Vakuum abgedampft wird. Das 'trockene' C¹-(2-[¹⁸F]Fluorethylamino)-asparagin wird mit isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen und kann eingesetzt werden.

Das C¹-(2-[¹⁸F]Fluorethylamino)-asparagin wird in einer Ausbeute von ca. 10 % RCA nach einer 110 minütigen Synthese gewonnen und kann für *in vitro*- und *in vivo*-Versuche eingesetzt werden.

5.2.2 S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure

Die radioaktive Markierung mit n.c.a. [¹⁸F]Fluorid zu S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure erfolgt in einer mehrstufigen Synthese (Abb. 46).

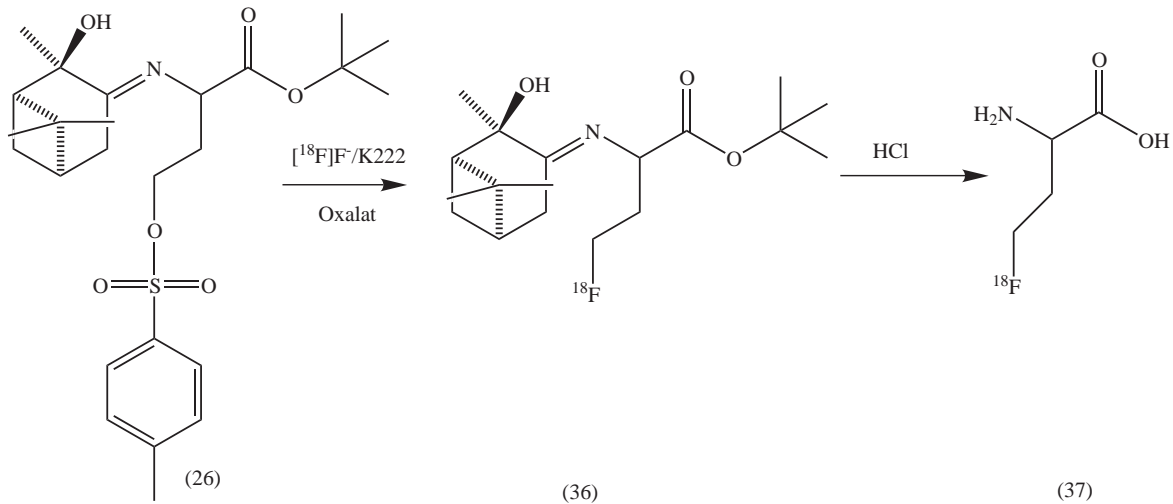


Abbildung 46: Schema der Radiosynthese von S-2-Amino-4-[¹⁸F]Fluor-butansäure

Das Produkt hat einen berechneten Enanzomenenüberschuss von >93 % ee. Dieser wird folgendermaßen berechnet:

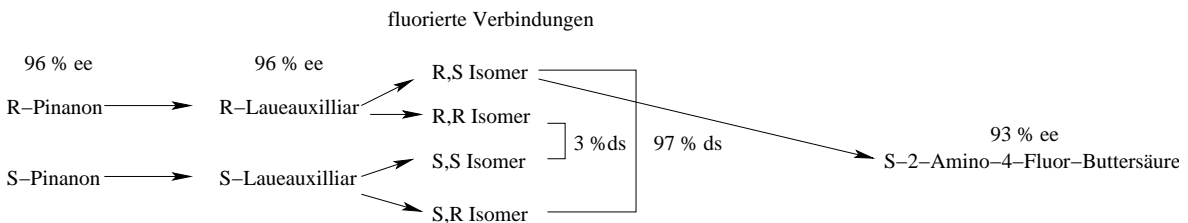


Abbildung 47: Schema der Enantiomeren-Verteilung über die Synthese von S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure

Zur vereinfachten Darstellung wurde das (1R,2R,5R)-Enantiomer des Pinanons mit R und das des (1S,2S,5S)-Enantiomer mit S abgekürzt.

Das Laue-Auxilliar lässt sich mit einer Reinheit von 96 % ee synthetisieren, da das Ausgangsprodukt (1R,2R,5R)-(+)-2-Hydroxy-pinane-3-on nur in dieser Reihenfolge beziehen lässt. Die Kopplung mit der Ethylgruppe geschieht mit einem Diastereomerenüberschuss von >97 % ds. Diesen Diastereomerenüberschuss lässt sich durch eine ¹⁹F-NMR-Untersuchung bestimmen.

Da keine Reaktionen mehr an dem betrachteten C-Atom stattfinden, entspricht dieser Wert der Enantiomerenreinheit nach der Entschützung der Aminosäure. Der Diastereomerenüberschuss des Markierungsvorläufers muss mit der Enantiomerenreinheit des Laue-Auxilliar multipliziert werden, um zu berücksichtigen, dass bei der Diastereomerenbestimmung die Enantiomere (R,S) und (S,R) zusammen bestimmt werden, aber nur das (R,S)-Enantiomere zum sterisch gewünschtem Produkt führt. Das (S,R)-Enantiomere führt zur R-Aminosäure. Zur Vereinfachung wurde das (1R,2R,5R)-Enantiomer des Pinanons mit R und das des (1S,2S,5S)-Enantiomer mit S abgekürzt (Abb. 47).

Die radiochemischen Ausbeuten wurden mittels Dünnschichtchromatographie am Instand-Imager bestimmt. Unter den gewählten Laufmittelbedingungen (Ethylacetat) besitzt das nicht umgesetzte [¹⁸F]Fluorid einen R_f-Wert von 0 und das geschützte Produkt (36) einen Wert von R_f = 0,75. Weitere

Produkte entstehen unter optimierten Bedingungen nicht, wie in Abb. 48 zu sehen ist.

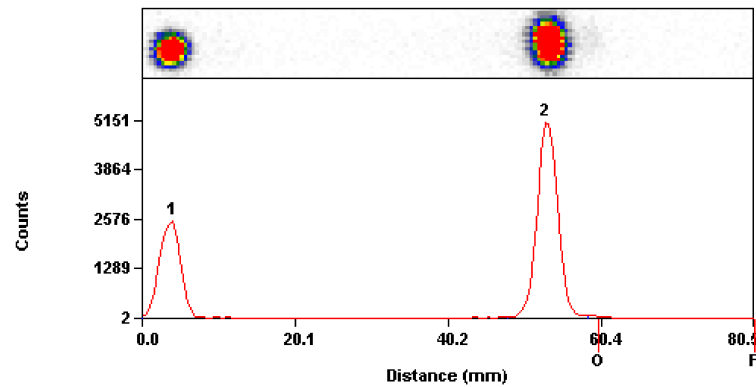


Abbildung 48: Radiodünnschicht-Chromatogramm nach der Synthese von (1R,2R,5R)-4-[^{18}F]Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (Laufmittel: Ethylacetat)

Die radiochemische Ausbeute wurde nach folgenden Parametern optimiert: Lösungsmittel, Temperatur, Basenart, Basenmenge, Fremdbasenzusatz, Markierungsvorläuferkonzentration. Bis die Optimierung der Base und der Markierungsvorläuferkonzentration durchgeführt wurde, wurden als Startbedingungen 15 μmol Markierungsvorläufer und 15 μmol Kaliumcarbonat als Base verwendet.

Die Ausbeute-Kinetik der Reaktion in DMSO als Lösungsmittel ist in Abb. 49 dargestellt. Untersucht wurde der Temperaturbereich von 80 - 120 $^{\circ}\text{C}$.

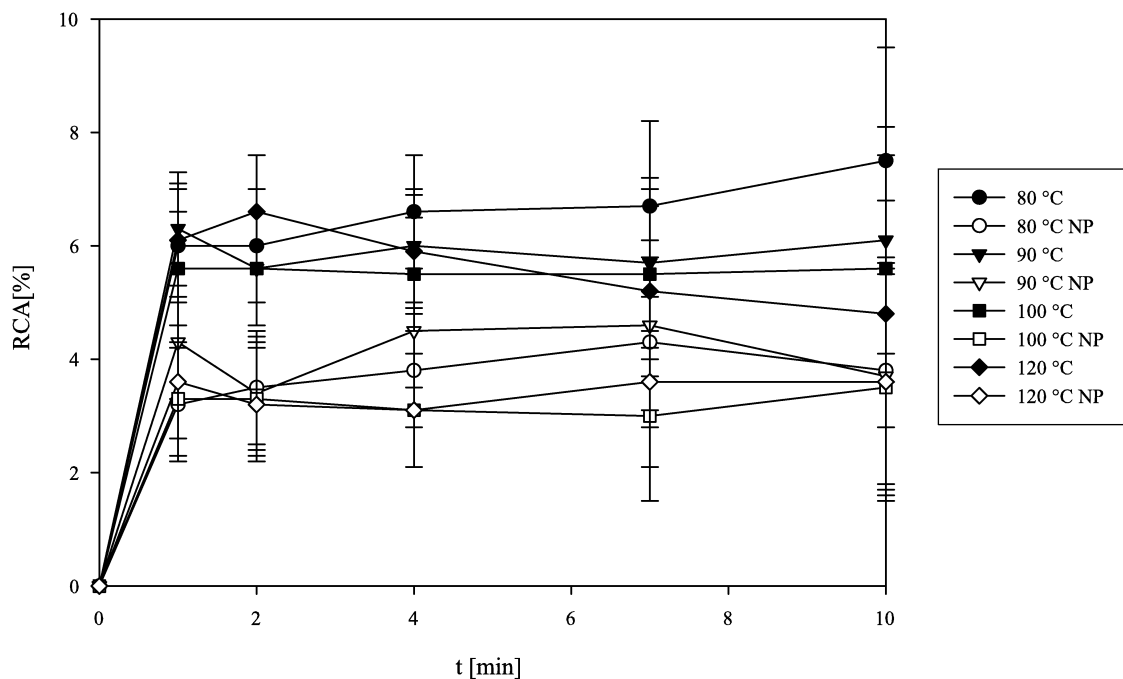


Abbildung 49: Radiochemische Ausbeutekinetik von (1R,2R,5R)-4-[^{18}F]Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (36) im Lösungsmittel DMSO bei verschiedenen Temperaturen
15 μmol Carbonat; 15 μmol (1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure *tert.*-butylester

Als erstes ist zu bemerken, dass die radiochemische Ausbeute in allen Versuchen in DMSO nicht

größer als 8 % ist. Ebenso ist zu beobachten, dass die R.C.A bereits nach 1 min ihr Maximum erreicht. Die radiochemischen Ausbeuten steigen anschließend bis zum Ende des Versuches nicht mehr an. Dies kann auf die Temperaturempfindlichkeit des Markierungsvorläufers zurückgeführt werden.

Es wird in DMSO ein polares Nebenprodukt in erheblichen Mengen (4 % RCA) gebildet. Das Nebenprodukt hat einen R_f -Wert von 0,2 auf einer Silica-DC-Folie mit dem Laufmittel Ethylacetat. DMSO ist somit als Lösungsmittel ungeeignet. Da sowohl das Produkt als auch das Nebenprodukt nach 1 min nicht mehr mit steigendem Anteilen gebildet werden, zeigt, dass der Markierungsvorläufer zu diesem Zeitpunkt fast vollständig zersetzt ist.

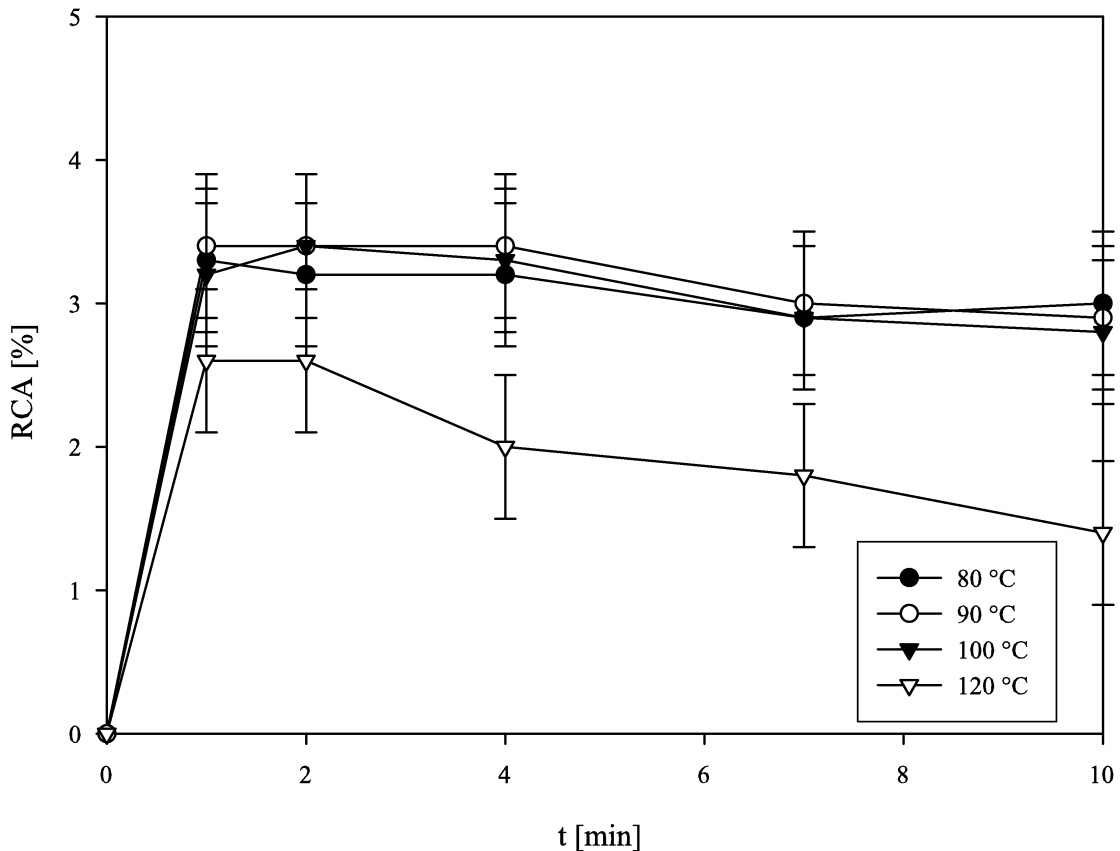


Abbildung 50: Radiochemische Ausbeutekinetik von (1R,2R,5R)-4-[^{18}F]Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (36) im Lösungsmittel DMF bei verschiedenen Temperaturen
15 μmol Carbonat; 15 μmol (1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure *tert.*-butylester

Die Ausbeutekinetik in DMF als Lösungsmittel ist in Abb. 50 dargestellt. In diesem Lösungsmittel bildet sich kein weiteres Produkt, sondern nur der gewünschte (1R,2R,5R)-4-[^{18}F]Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester. Die Ausbeuten sind in DMF noch geringer als in DMSO und überschritten 4 % in keinem Versuch.

Aus dem Verlauf der Ausbeutekurven lassen sich die selben Erkenntnisse ziehen, wie schon bei den Versuchen mit DMSO als Lösungsmittel ausgeführt. Die Ausbeuten im Temperaturbereich von 80 bis 100 °C sind vergleichbar. Bei höheren Temperaturen sanken die radiochemischen Ausbeuten. Die Ergebnisse aus den DMSO-Versuchen wurde bestätigt. Der Markierungsvorläufer zersetzt sich, bevor er mit dem [^{18}F]Fluorid reagiert. Die Zersetzung des Markierungsvorläufers ist auch bereits optisch zu erkennen. Die Reaktionslösung, die im Normalfall leicht gelb gefärbt ist, verfärbt sich bei Zersetzung des Markierungsvorläufers dunkelgelb bis dunkelrot. Diese Farbveränderung ist bei

hohen Temperaturen in DMSO als Lösungsmittel auch zu beobachten.

Der auffälligste Unterschied zu den DMSO-Versuchen ist, dass die Ausbeuten in DMF bei 120 °C nach einem Maximalwert wieder abfallen. Unter den gewählten Bedingungen ist nicht nur der Markierungsvorläufer sondern auch das Produkt instabil. In DMSO zersetzt sich nur der Markierungsvorläufer. Das Produkt (36) zersetzt sich in polare Bruchstücke. In der DC-Analyse lassen sich die Bruchstücke nicht von $[^{18}\text{F}]$ Fluorid unterscheiden und bilden einen gemeinsamen Spot auf der DC-Platte.

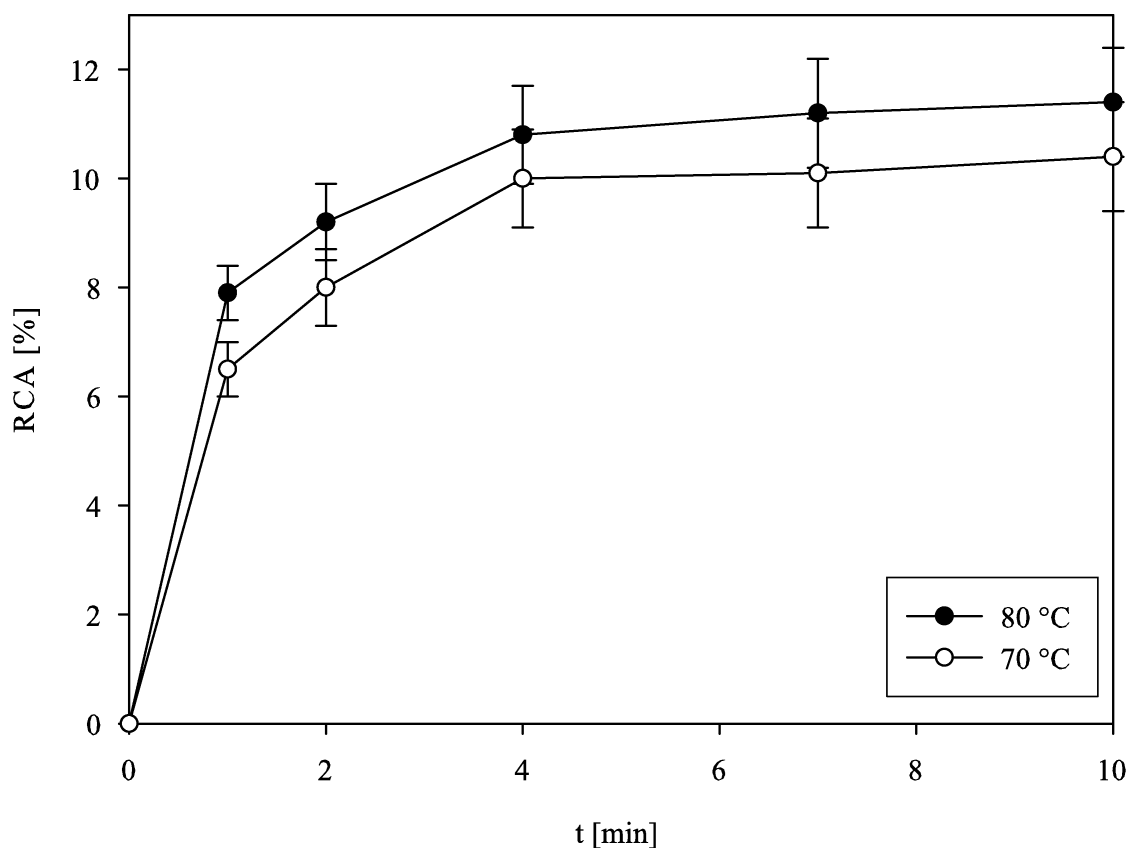


Abbildung 51: Radiochemische Ausbeutenkinetik von (1R,2R,5R)-4- $[^{18}\text{F}]$ Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (36) im Lösungsmittel Acetonitril bei verschiedenen Temperaturen
15 μmol Carbonat; 15 μmol (1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure *tert.*-butylester

Die maximale Ausbeute in Acetonitril (mit Carbonat als Base) erreichte 12 % (Abb. 51). Hierbei wurden weder die Zersetzung des Produktes noch des Markierungsvorläufers festgestellt. Die Ausbeutekurve zeigt den erwarteten Verlauf einer Kinetik pseudo-erster Ordnung. Somit wurde Acetonitril als Lösungsmittel ausgewählt. Von diesen Erkenntnissen ausgehend wurde eine weitere Optimierung der anderen Parameter durchgeführt.

Um die Ausbeute weiter zu steigern, wurden Basenart und -menge variiert und die Reaktionszeiten auf die neuen Bedingungen angepasst. Als erstes wurde getestet, ob sich die Ausbeuten steigern lassen, indem eine Fremdbase zusetzt. Als Fremdbase wurde Triethylamin gewählt. Die Zugabe von 15 μmol Triethylamin zu der Reaktionslösung brachte keine Veränderung der Ausbeuten, weder eine Erhöhung noch eine Verringerung.

Nachdem die Erhöhung des pH-Wertes keine Erhöhung der Ausbeuten zur Folge hatte, wurde eine Erniedrigung des pH-Wertes in Betracht gezogen. Dazu wurde auf die Base Oxalat und Kombinationsgemische mit Carbonat zurückgegriffen. Die Ausbeutekurven mit den Carbonat/Oxalat-Gemischen sind in Abb. 52 dargestellt.

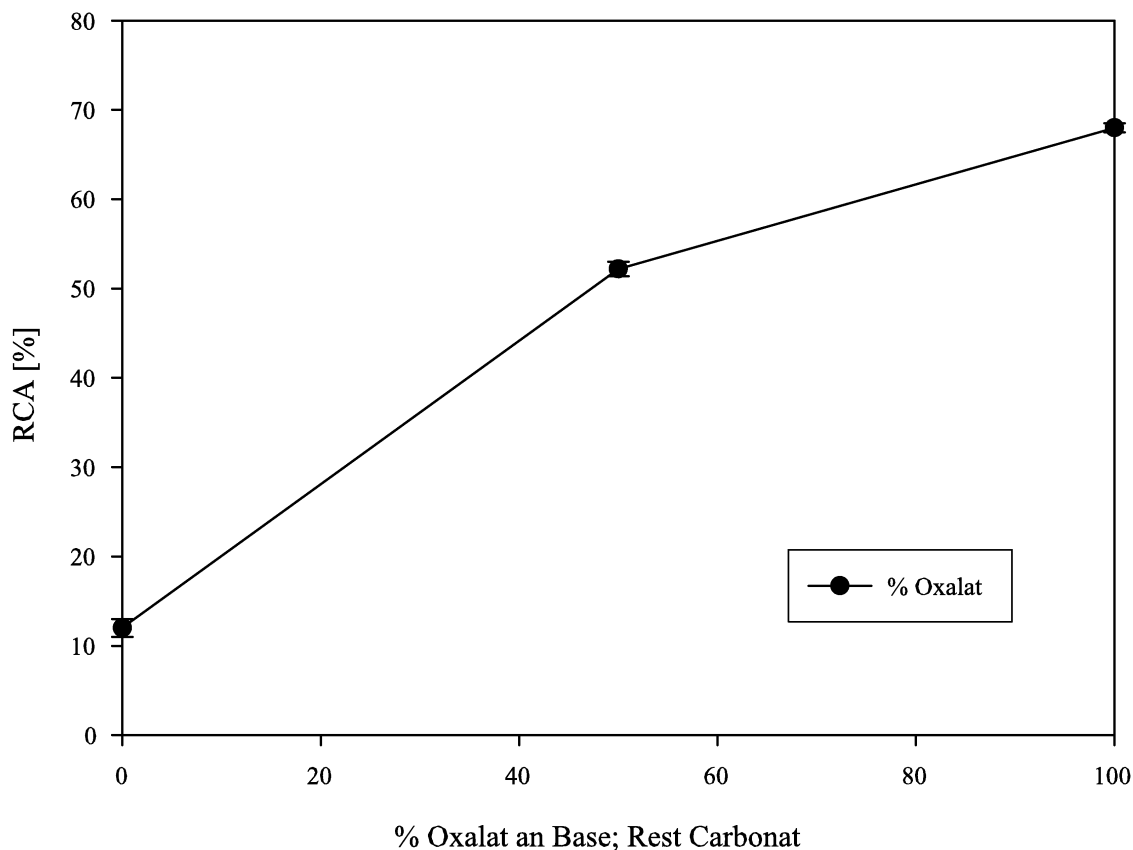


Abbildung 52: Radiochemische Ausbeuten von (1R,2R,5R)-4- ^{18}F Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (36) bei unterschiedlichen Basenzusammensetzungen von Oxalat und Carbonat im Lösungsmittel Acetonitril
10 min; 80 °C; 15 μmol (1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure *tert.*-butylester

Die Ausbeuten steigen mit zunehmendem Oxalat-Anteil stark an. Die maximalen Ausbeuten wurden mit reinem Oxalat als Base erzielt. Die experimentellen Abweichungen der Ausbeuten sind sehr gering, was auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Reaktion schließen läßt.

Die Änderung des Basensystems brachte eine entscheidende Ausbeuteerhöhung. Während das System auf Änderungen der Temperatur unter 90 °C nur mit einer geringen Ausbeuteveränderung reagiert und die Variation des Lösungsmittels nur eine Ausbeuteänderung um 6 % erzielt, ist das System sehr anfällig auf Veränderung der Basenart und -menge. Nach Optimierung des Basensystems ließ sich die Ausbeute um ca. 50 Prozentpunkte steigern. Die optimale Base ist daher reines Oxalat.

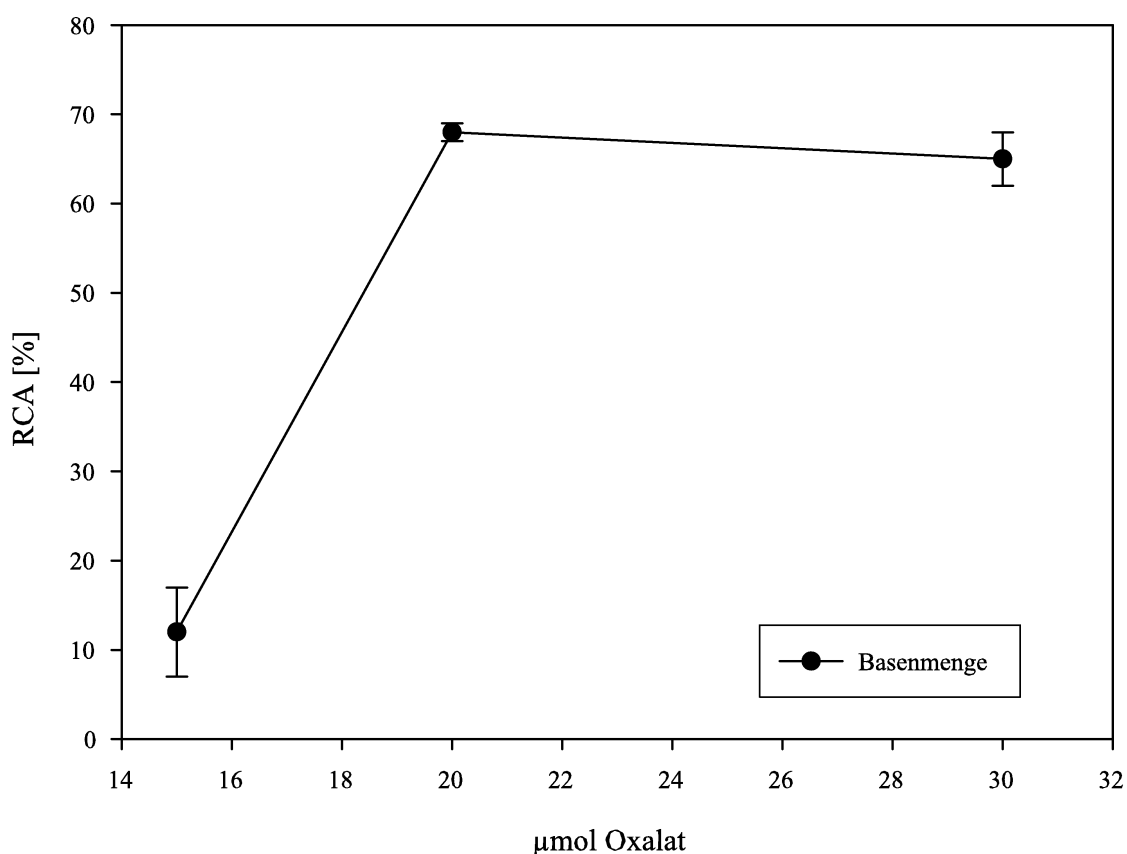


Abbildung 53: Radiochemische Ausbeuten von (1R,2R,5R)-4- ^{18}F Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (36) bei unterschiedlichen zugesetzten Mengen Base Oxalat im Lösungsmittel Acetonitril 10 min; 80 °C; 15 µmol (1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure *tert.*-butylester

Die optimale Menge an Oxalat wurde mit 20 µmol bestimmt. Während sich die Ausbeuten mit Carbonat als Base nicht durch Erhöhung der Menge an Base steigern ließen, war die Erhöhung der Menge an Oxalat auf 20 µmol entscheidend für eine Ausbeuteerhöhung. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass Oxalat eine schwächere Base als Carbonat ist und deswegen eine größere Menge an Base benötigt wird.

Die radiochemische Ausbeute aufgetragen gegen die Menge des eingesetzten Markierungsvorläufers ist in Abb. 54 dargestellt. Die dargestellten Werte beziehen sich auf eine Reaktionszeit von 15 min. Das verwendete Lösungsmittel ist Acetonitril, als Base wurde Oxalat verwendet. Die Versuche wurden bei einer Reaktionstemperatur von 80 °C durchgeführt.

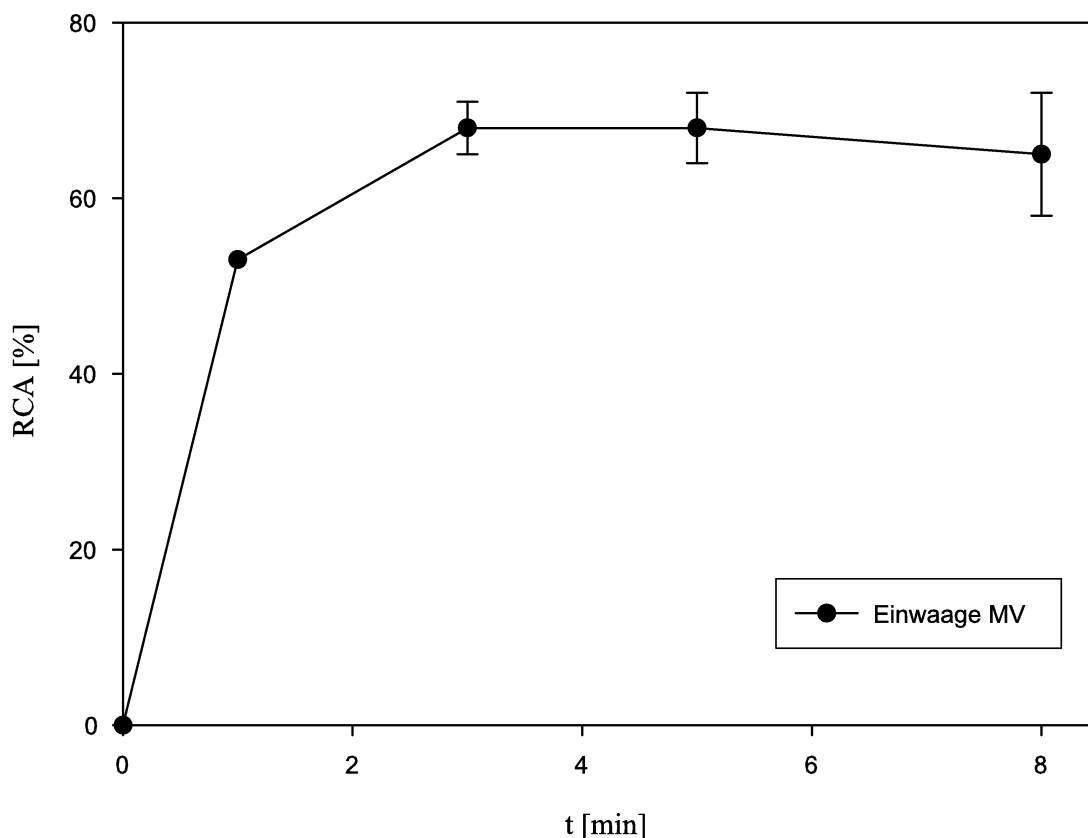


Abbildung 54: Ausbeuten von (1R,2R,5R)-4-[^{18}F]Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (36) in Abhängigkeit der Markierungsvorläuferkonzentration (1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure *tert.*-butylester in Acetonitril
10 min; 80 °C; 20 μmol Oxalat

Der Verlauf der Ausbeutekurve in Abb. 54 ist typisch für die Bestimmung der minimalen Markierungsvorläuferkonzentration. Die Kurve steigt steil an bis eine Sättigung erreicht wird. Die optimale Markierungsvorläufermenge pro Synthese ist 3,5 mg (10 μmol) (1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure *tert.*-butylester.

In Abb. 55 sind die Ergebnisse unter optimalen Bedingungen zusammengefasst. Es wurde nochmals eine Optimierung der Temperatur und der Reaktionszeit mit dem neuen Basensystem durchgeführt.

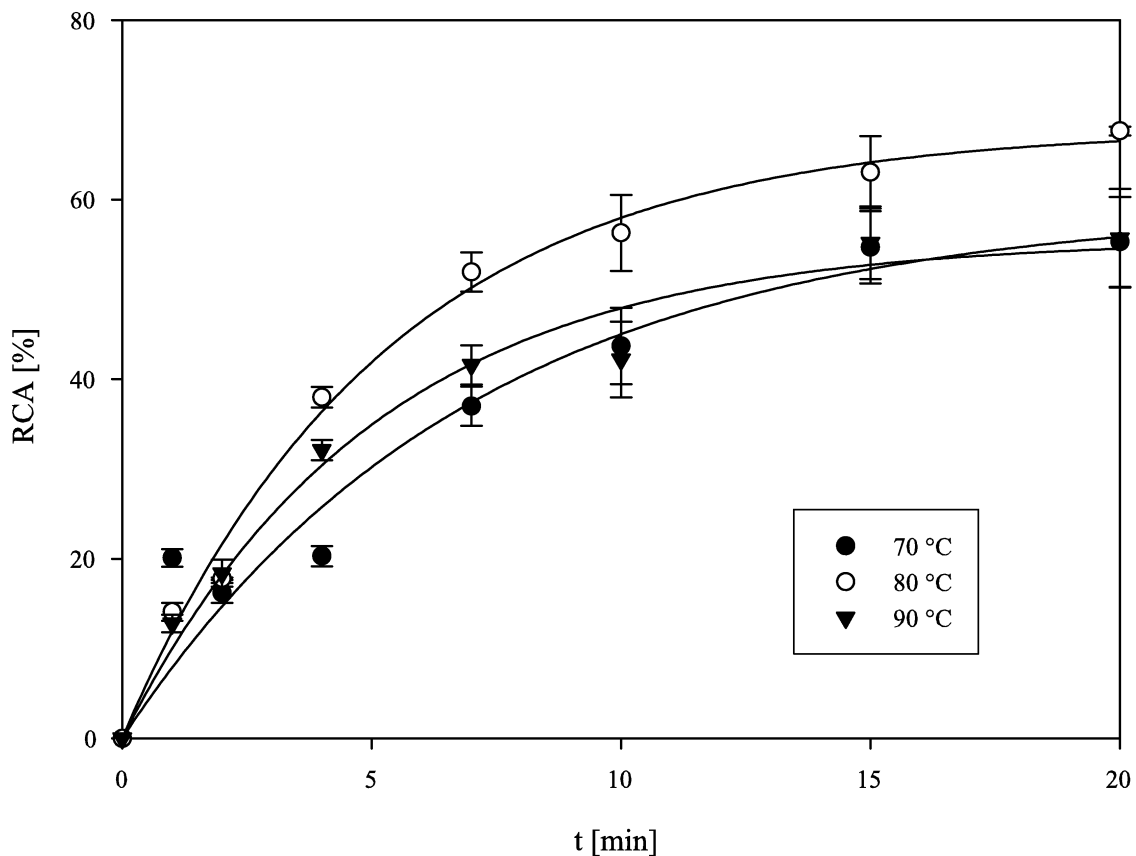


Abbildung 55: Optimierte Ausbeutenkinetiken von (1R,2R,5R)-4-[^{18}F]Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (36)
Acetonitril; 80 °C; 20 μmol Oxalat; 10 μmol (1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure *tert.*-butylester

Es ist in Abb. 55 zu erkennen, dass die Reaktionszeit nach Ersetzung der Base von Carbonat durch Oxalat und bei einer Temperatur von 80 °C von 10 min auf 15 min verlängert werden mußte, um eine optimale Ausbeute zu erreichen. Die Reaktion verlangsamt sich mit Oxalat als Base. Dieser Verlangsamung der Reaktion kann nicht durch eine Temperaturerhöhung entgegengewirkt werden, da der Markierungsvorläufer temperaturlabil ist. Die einzige Lösung ist die Verlängerung der Syntheszeit, um eine optimale Ausbeute zu erreichen. Insgesamt lassen sich damit unter optimierten Bedingungen (Acetonitril; 80 °C; 20 μmol Oxalat; 15 min Reaktionszeit; 10 μmol (1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure *tert.*-butylester) Ausbeuten von bis zu 55 % RCA von (1R,2R,5R)-4-[^{18}F]Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (36) erzielen.

Die Aufarbeitung von (1R,2R,5R)-4-[^{18}F]Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (36) beginnt mit der n.c.a. Abtrennung des geschützten Produktes. Die Reaktionslösung wird mit Wasser verdünnt und auf einer C18-Kartusche fixiert, um das nicht umgesetzte [^{18}F]Fluorid und das Kryptofix 2.2 abzutrennen. Um eine vollständige Entfernung des [^{18}F]Fluorids zu erreichen, muss die Kartusche mit Wasser gewaschen werden. Die Elution von der C18-Kartusche erfolgt mittels Ethanol. Diese Kartuschenreinigung ist notwendig, um eine bessere Trennwirkung des folgenden HPLC-Trennungsschrittes zu erhalten. Unterlässt man die Kartuschenvorabtrennung, muss mit sehr großen HPLC-Säulen oder mit langen Retentionszeiten gearbeitet werden, um eine saubere Trennung von den anderen Substanzen zu erreichen. Große HPLC-Säulen

führen zu großen Lösungsmittelvolumina, in denen das Produkt aufgefangen wird. Das Lösungsmittel muss anschließend für die weitere Synthese wieder eliminiert werden. Deswegen ist es wichtig, mit kleinen Volumina zu arbeiten.

Das für die n.c.a. Abtrennung gewählte HPLC-System ist eine Licosphere 100 RP 18 5 EC HPLC-Säule mit einem Fluss von 4 ml/min mit einem Eluens von 65 % Acetonitril 35 % Wasser. Ein typisches HPLC-Chromatogramm für die Abtrennung ist in Abb. 56 abgebildet.

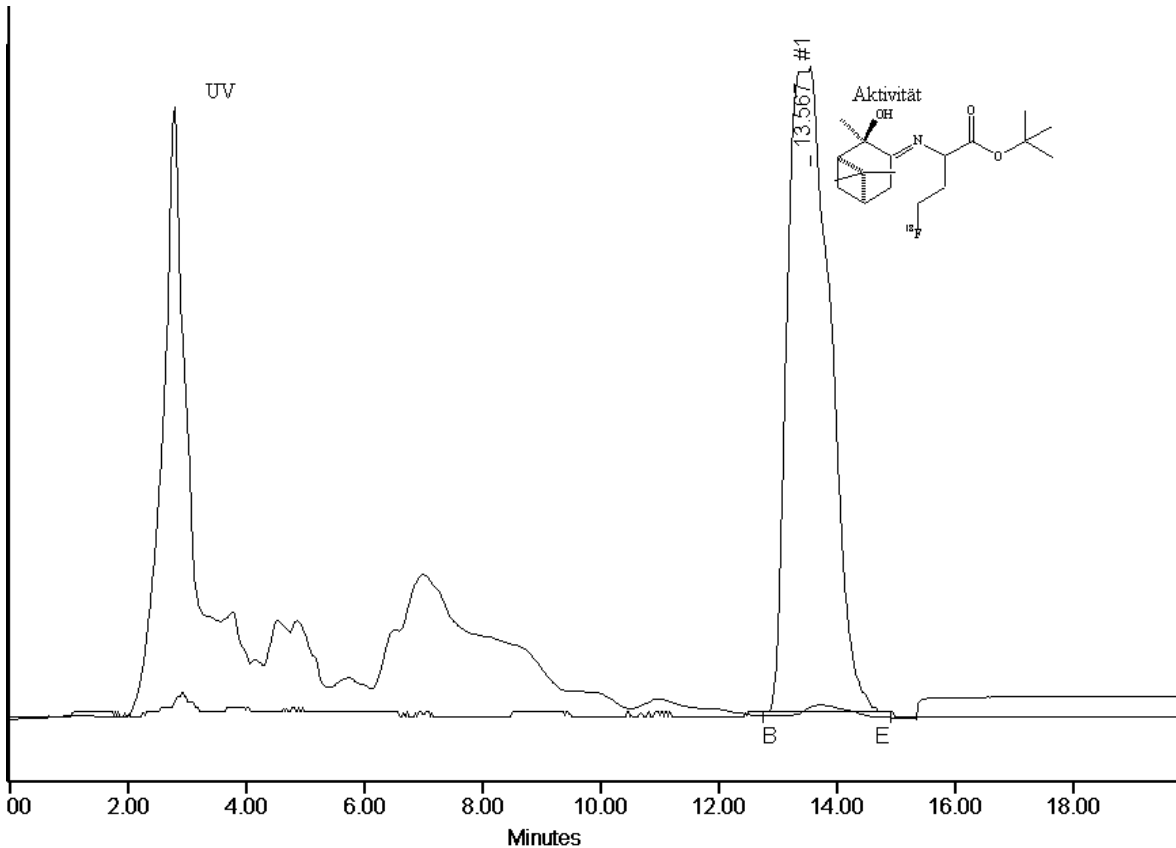


Abbildung 56: HPLC-Chromatogramm (Aktivität und UV) der Synthese (MeCN; 15 min; 80 °C) von (1R,2R,5R)-4-[¹⁸F]Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (36)
Eluens: 65 MeCN : 35 H₂O; Licospher 100 RP 18 5 EC; Fluss 4 ml/min; UV bei 254 nm

Das geschützte Produkt (36) wird in dem Zeitraum von 13-15 min aufgefangen. Bei dieser Retentionszeit sind bereits alle UV-aktiven-Verunreinigungen von der HPLC-Säule gekommen. Die aktiven Verunreinigungen können sehr gut mittels der vorherigen Kartuscentrennungen eliminiert werden. Dies ist daran zu erkennen, dass in dem HPLC-Chromatogramm für die Aktivität (Abb. 56) nur kleine Peaks neben dem Produktpeak zu finden sind.

Um die Abspaltung der Schutzgruppen durchführen zu können, muss das HPLC-Eluens von dem Produkt getrennt werden. Dies geschieht mit einer C18-Kartusche. Damit sich das Produkt auf der C18-Kartusche fixieren lässt, muss das HPLC-Eluens mit Wasser verdünnt werden. Das Lösungsmittelgemisch darf, wenn es über die Kartusche gedrückt wird, nicht aus mehr als 20 % Acetonitril bestehen, damit das Produkt (1R,2R,5R)-4-[¹⁸F]Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester vollständig auf der Kartusche fixiert wird. Das geschützte Produkt (36) wird dann mit 1 ml Ethanol von der Kartusche eluiert.

Bevor die Entschützung des geschützte Produktes (36) durchgeführt wird, wird noch eine Qualitätskontrolle vorgenommen. Dies ist notwendig, um sicher zu stellen, dass die Reinheit des Produktes an dieser Stelle gegeben ist, da keine weitere HPLC-Abtrennung mehr stattfinden soll. Die Qualitätskontrolle wird mittels Radio-DC durchgeführt. Als Laufmittel wird Ethylacetat gewählt. Ist die Abtrennung vollständig, erhält man am Instant-Imager folgendes Bild (Abb. 57).

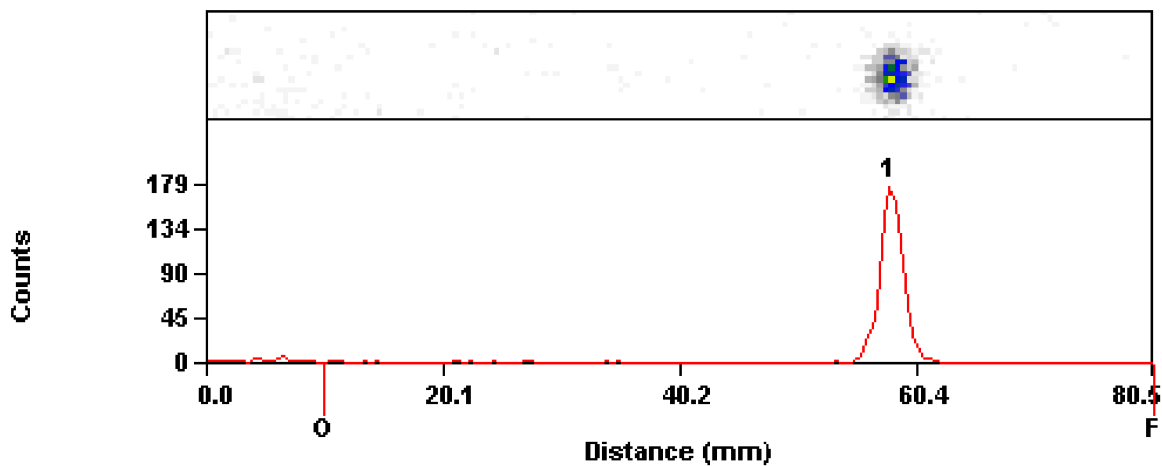


Abbildung 57: Qualitätskontrolle des geschützten, abgetrennten Produktes (1R,2R,5R)-4-[¹⁸F]Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (36) mittels Radio-DC
Eluens: Ethylacetat

Existiert ein weiterer Spot bei einem R_f -Wert von $R_f=0,25$ auf der DC-Platte, ist dies ein Zeichen dafür, dass der Markierungsvorläufer (35) sich begonnen hat zu zersetzen. Dieser Spot bildet sich, wenn der Markierungsvorläufer länger als ca. 8 Wochen gelagert wurde.

Um die gewünschte finale Aminosäure (37) zu erhalten, müssen die Schutzgruppen abgespalten werden. Die Abspaltung des Pinanonrestes von der Aminogruppe der Aminosäure und die Spaltung des *tert.*-Butylesters geschieht im stark sauren Milieu in einem Syntheseschritt. Bei der Entschützung ist zu beobachten, dass über die gesamte Reaktionszeit sich nie mehr als 5 % der Gesamtaktivität der *tert.*-Butylesters (28) bildet. Dies war nicht erwartet worden, da die Doppelbindung zwischen der Aminogruppe und dem Pinanonrest makroskopisch deutlich säurelabiler ist als die Esterbindung. Die Doppelbindung zwischen der Aminogruppe und Pinanonrest lässt sich schon mit 20 % iger Zitronensäure bei Raumtemperatur spalten, während sich der *tert.*-Butylester erst unter Erwärmen mit 6 N HCl spalten lässt. Damit beide Entschützungsschritte in einen Schritt geschehen, wurden nur starke Säuren untersucht. Als erstes wurde Trifluoressigsäure untersucht (Abb. 58). Trifluoressigsäure bietet sich als starke Säure an, da man mit kleinen Volumina arbeiten kann.

Häufig können Abspaltungen von Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur durchgeführt werden [35]. In Vorversuchen stellte sich heraus, dass auf jeden Fall während der Entschützung erwärmt werden muss, da sonst die Reaktion zu langsam abläuft. Aus diesem Grund wurde der Temperaturbereich beim Siedepunkt des Lösungsmittel besonders untersucht.

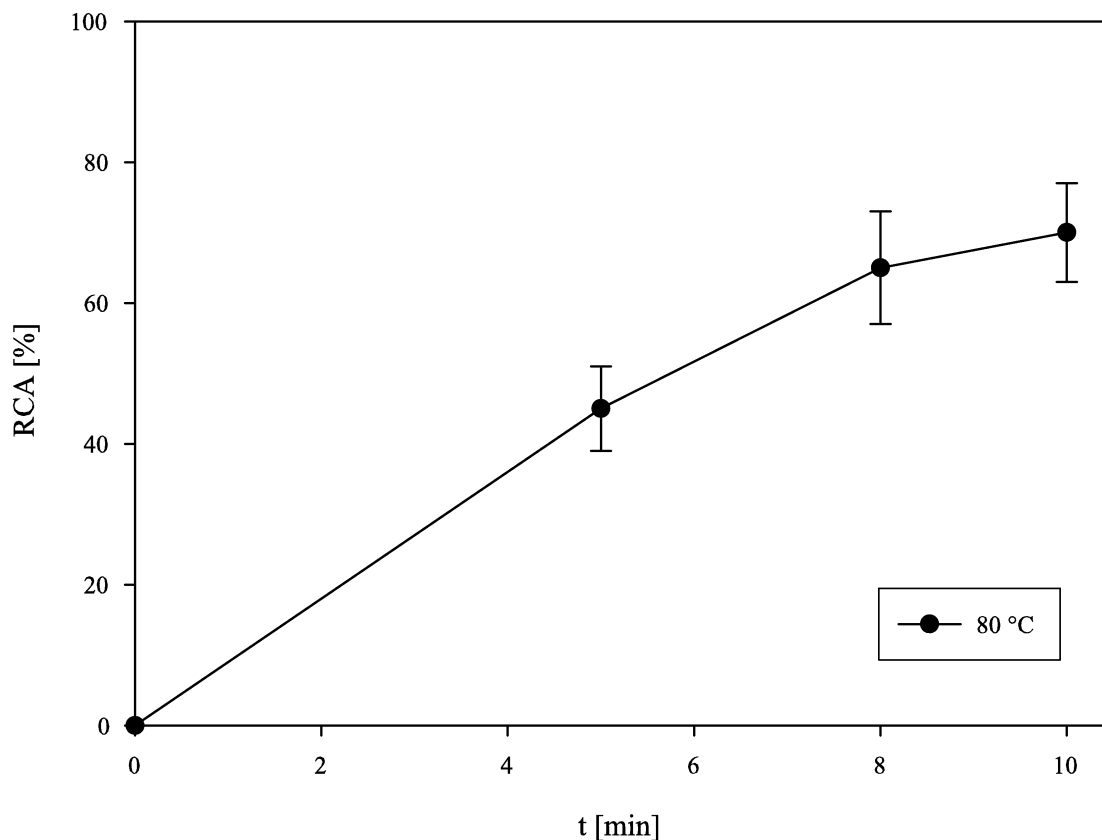


Abbildung 58: R.C.A. der Entschützung von (1R,2R,5R)-4-[^{18}F]Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (36) mit Trifluoressigsäure zu S-2-Amino-4-[^{18}F]Fluor-butansäure (37)
Acetonitril; 30 ml Trifluoressigsäure; 80 °C

Die Entschützung mit Trifluoressigsäure brachte nicht die gewünschten Resultate. Die Entschützung verläuft selbst bei Siedetemperatur des Lösungsmittels nicht ausreichend schnell. Nach 10 min sind erst 70 % des Produktes (37) entschützt und die Geschwindigkeit der Entschützung nimmt schon deutlich ab.

Da Trifluoressigsäure nicht die gewünschten optimalen Ergebnisse zeigte, wurde die Entschützung mittels konz. Salzsäure durchgeführt. Konz. HCl wurde ausgewählt, da im Macroscopischen die Entschützung ebenfalls mittels HCl mit hohen Ausbeuten durchgeführt wird. Die radiochemischen Ausbeuten der Entschützung mittels konzentrierter Salzsäure bei den verschiedenen Temperaturen wird in Abb. 59 dargestellt.

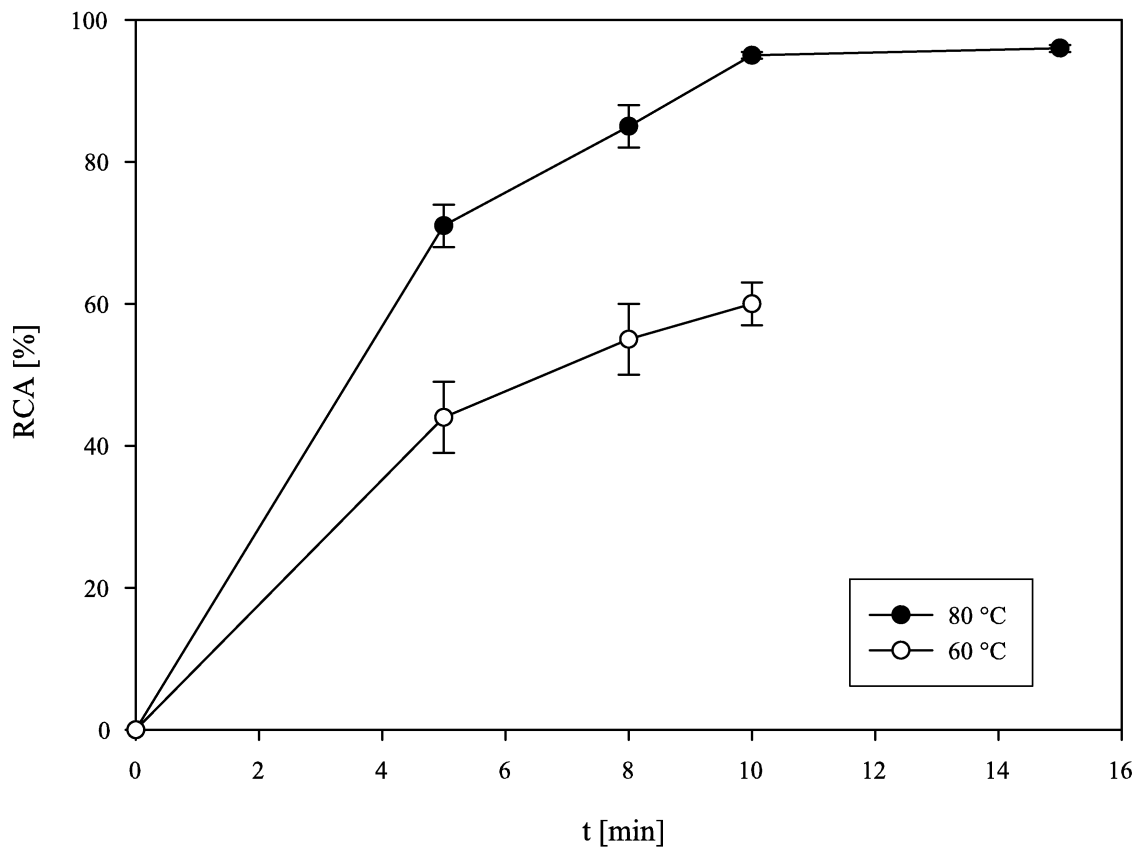


Abbildung 59: R.C.A. der Entschützung von (1R,2R,5R)-4-[^{18}F]Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester (36) mit konz. Salzsäure zu S-2-Amino-4-[^{18}F]Fluor-butansäure (37)
Acetonitril; 0,2 ml konz. HCl; 80 °C

Die Abspaltung der Schutzgruppen wurde in einem Temperaturbereich von 60 - 80 °C untersucht. Die Hydrolysierung der Schutzgruppen erfolgte umso schneller, je höher die Temperatur gewählt wurde, bis zum Siedepunkt des Lösungsmittels (Ethanol oder Acetonitril) von 80 °C. Ein Unterschied in den Ausbeuten zwischen diesen beiden Lösungsmitteln war nicht festzustellen. Die Entschützung von (1R,2R,5R)-4-Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester verläuft nahezu quantitativ (>97 %) innerhalb von 15 min bei einer Temperatur von 80 °C. Es entstanden bei der Entschützung keine weiteren radioaktiven Produkte, sondern es bildete sich nur die gewünschte Aminosäure.

Damit die S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure in *in vitro*- und *in vivo*-Tests eingesetzt werden kann, muss sie noch in eine isotonische Kochsalzlösung überführt werden. Dies geschieht durch das Vertreiben des Lösungsmittels bei vermindertem Druck im Heliumstrom. Beim Abdampfen des Lösungsmittels kann die Badtemperatur langsam von 80 °C auf 100 °C gesteigert werden. Das Vertreiben der Lösungsmittel dauert ca. 15 min. Ist das Lösungsmittel verdampft, wird das S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure-hydrochlorid mittels isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen. Der pH-Wertes muss an dieser Stelle kontrolliert werden. Es ist wichtig, dass das Eindampfen bis zur Trockene vollständig durchgeführt wird, denn sonst ist der pH-Wert zu niedrig, um die Kochsalzlösung injizieren zu können. War das Eindampfen nicht vollständig, hat die Kochsalzlösung einen pH-Wert von 1-2, während bei vollständigem Eindampfen der pH-Wert im neutralen Bereich ist. Die Lösung von S-2-Amino-4-[^{18}F]Fluor-butansäure in isotonischer Kochsalzlösung ist farblos.

Die abschließende Qualitätskontrolle der injektionsfertigen Lösung wird mittels HPLC durch-

geführt. Als Säule wurde eine Biosil SEC 250 gewählt. Bei einem Laufmittel von 87,5 Wasser 10 Ethanol 2,5 Essigsäure + 2,5 g/l Ammoniumacetat und einem Flow von 0,5 ml/min beträgt die Retentionszeit des Produktes $R_f = 21,3$ min. In Abb. 60 ist das HPLC-Chromatogramm einer erfolgreichen Qualitätskontrolle dargestellt.

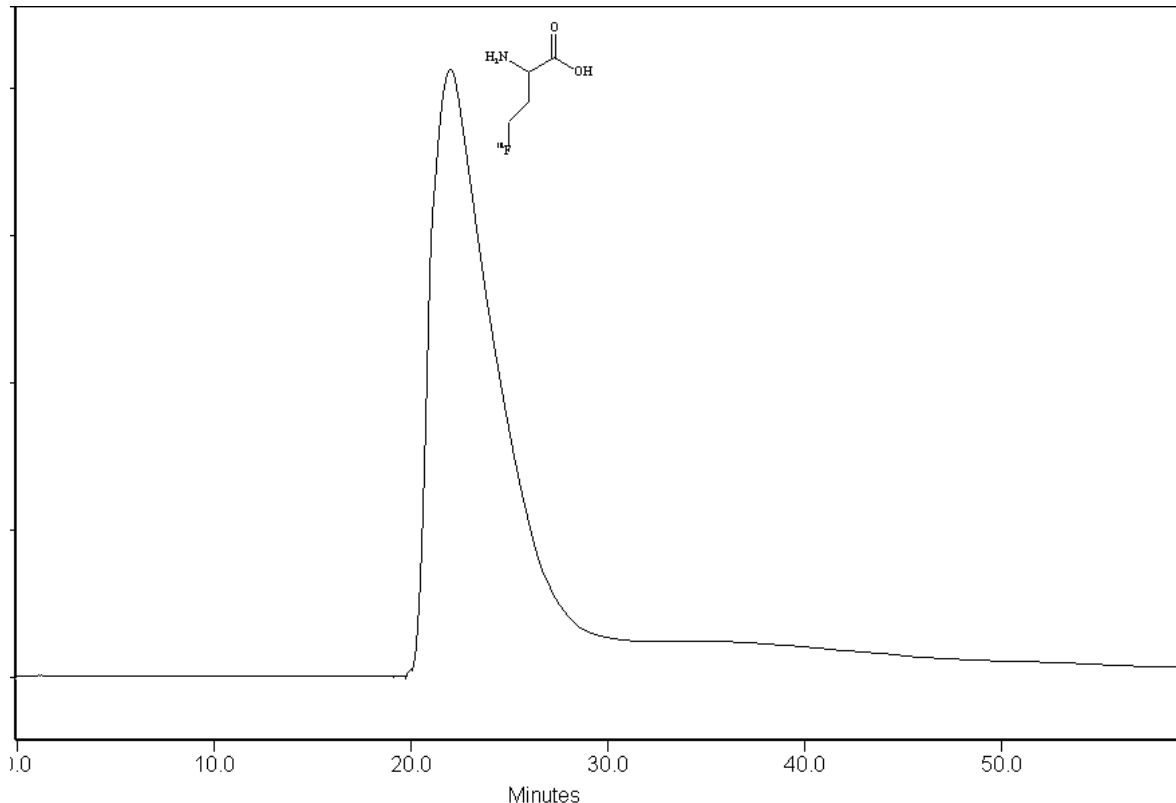


Abbildung 60: Qualitätskontrolle von S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure mittels Radio-HPLC Biosil SEC 250; Eluens: 87,5 Wasser 10 Ethanol 2,5 Essigsäure + 2,5 g/l Ammoniumacetat; Flow 0,5 ml/min

Die Synthesedauer beträgt 2,3 h inklusive der Trocknung des [^{18}F]Fluorids und Qualitätskontrolle der injektionsfertigen Lösung. Die Synthese wurde nach Zeit optimiert. Bei dieser Optimierung wurde der größte Zeitgewinn erreicht, indem die Qualitätskontrolle des geschützten Produktes von Radio-HPLC durch Instand-Imager ersetzt wurde. Diese Qualitätskontrolle kann parallel zur Enschtzung des Produktes laufen.

Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich die folgende optimierte Synthesevorschrift für S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure:

- Markierungsreaktion:

Es werden 3,5 mg (10 μmol) (1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure *tert.*-butylester in 700 μl Acetonitril gelöst. Das [^{18}F]Fluorid wird mit 20 μmol Oxalat, 15 mg Kryptofix 2.2.2 getrocknet. Die Markierungsreaktion erreicht bei 80 °C nach 15 min die optimale Ausbeute von 55 % RCA.

- n.c.a. Abtrennung des geschützten Produktes:

Die Reaktionslösung wird mit Wasser verdünnt und das Produkt (37) auf einer C18-Kartusche fixiert. Mit 1,5 ml Ethanol eluiert. Angeschlossen wird eine HPLC-Abtrennung (Biosil SEC 250; Eluens: 87,5 Wasser 10 Ethanol 2,5 Essigsäure + 2,5 g/l Ammoniumacetat; Fluss 0,5 ml/min; $R_t = 13,5$ min)

- Qualitätskontrolle des n.c.a. abgetrennten geschützten Produktes:
Die Qualitätskontrolle wird am Instand-Imager durchgeführt (Eluens: Ethylacetat; $R_f = 0,75$).
- Entschützung und Herstellung einer injektionsfertigen Lösung:
Das geschützte Produkt (36) im HPLC-Eluens wird 1:3 mit Wasser verdünnt und das geschützte Produkt (36) auf einer C18-Kartusche fixiert. Die Elution wird mit 1 ml Ethanol durchgeführt. Die Schutzgruppen wird mit 200 μ l konz. HCl bei 80 °C innerhalb von 15 min abgespalten. Das Lösungsmittel wird im Heliumstrom bei vermindertem Druck entfernt. Die S-2-Amino-4-[18 F]Fluor-butansäure wird mit der gewünschten Menge an isotonische Kochsalzlösung aufgenommen.
- Qualitätskontrolle von S-2-Amino-4-[18 F]fluor-butansäure:
Die Qualitätskontrolle wird an der HPLC durchgeführt ($R_t = 21,3$ min; Biosil SEC 250; Eluens: 87,5 Wasser, 10 Ethanol, 2,5 Essigsäure + 2,5 g/l Ammoniumacetat; Fluss 0,5 ml/min)

5.3 Pharmakologischer Teil

5.3.1 *In vitro*-Uptake-Versuche mit C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin

Die *in vitro*-Tests für das C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin wurden an fünf verschiedenen Zellkulturen durchgeführt. Das C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin wurde nach der Vorschrift in Kapitel 6.3.4 hergestellt.

Als Zellkulturen für die Uptake-Studien wurden drei Plattenepitele (PCI 13, A 549, RPMI 2650) und zwei Melanom-Zelllinien (Mel 398, Mz 7 Mel) ausgewählt. Diese Zellkulturen wurden als Monolayer von Zellen eingesetzt. Die Bestimmung der Aktivität geschieht über einen γ -Counter. Um die Zählrate des γ -Counters in Absolutwerte umrechnen zu können, wurde der Bohrlochfaktor dieses Versuchsaufbaus bestimmt. Dazu wurde eine definierte Aktivität an C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin in einen leeren Probenbehälter gegeben und die Zählrate bestimmt.

Die Zellkulturen wurden mit 1 MBq (entspricht 1 ml Lösung) der C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin-Lösung bei 37 °C inkubiert und jeweils mit Phoshat-Pufferlösung nach 5, 10, 20, 30, 60 min gewaschen, um das nicht in die Zellen aufgenommene oder an den Zellmembranen gebundene C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin zu entfernen. Nach dem Waschschrift wurde die Radioaktivität der Zellproben über einen Zeitraum von 1,2 min bestimmt. Nach Beendigung des Experiments wurden die Zellen homogenisiert und deren Gehalt an Proteinen mittels UV-Absorption bestimmt. Die Aktivität der Zellproben wurde auf die Menge an Protein in den Zellkulturen bezogen. Die Aktivität in der Proteinfraction wurde nicht bestimmt, da C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin nicht in die Proteine eingebaut werden kann, denn die Carbonylbindungsstelle ist mit dem 2-[^{18}F]Fluorethylamin besetzt.

Die Ergebnisse von 2 oder 3 Einzelexperimenten sind in Abbildung 61 dargestellt.

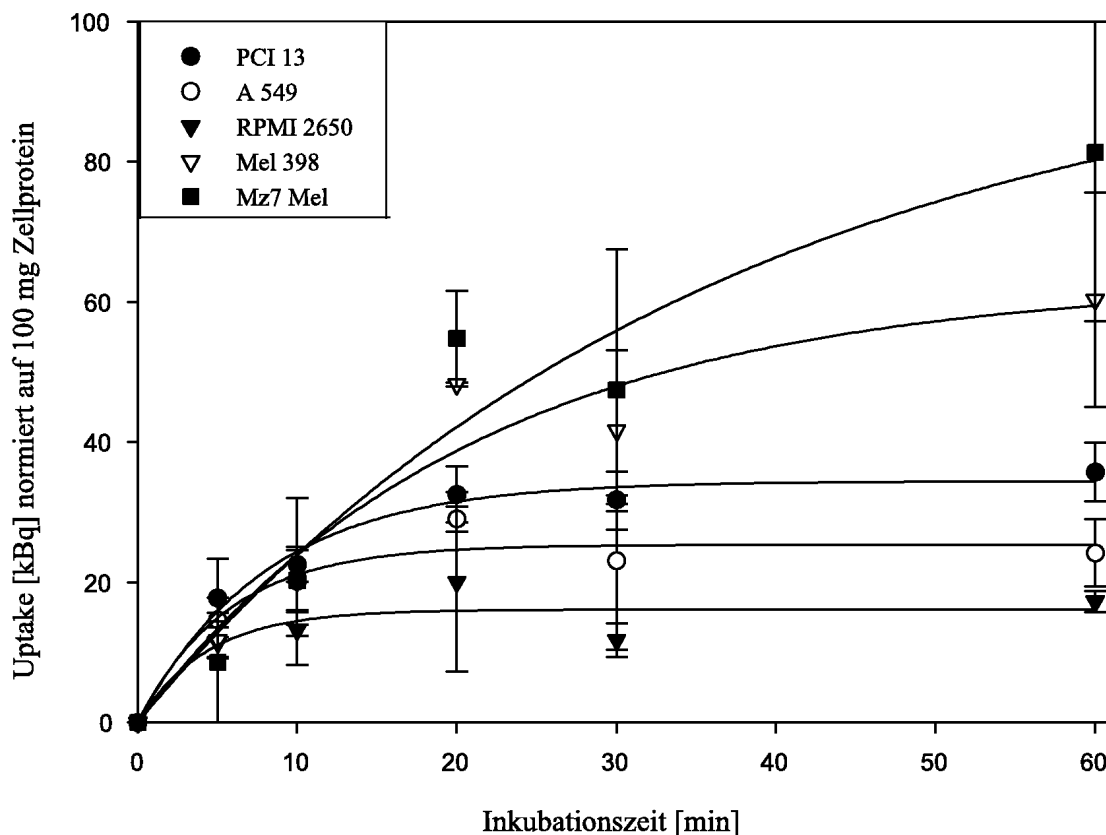


Abbildung 61: Uptake-Kinetik von C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin in verschiedenen Tumorzelllinien

In Abbildung 61 ist zu erkennen, dass C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin eine schnelle Aufnahme in die Zellen hat. Nach 20 min wird bei den Plattenepithelen ein maximaler Wert von C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin erreicht, der sich bis zum Ende des Experimentes nach 60 min nicht mehr verändert. Die Aufnahmekinetik der RPMI 2650-Tumorzellen zeigt keine weitere Aufnahme von C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin nach 5 min. Sie schwanken nur noch um einen Wert vom 17 kBq/100 mg Protein. Diese Zellkultur ist ein langsam wachsendes Plattenepithel mit wenigen Proteinen. Die geringe Menge an Proteinen bedingt die Bestimmung der Proteinmenge der Zellen mit einem großen Fehler.

Die Melanomzelllinien zeigen ein anderes Verhalten als die Plattenepithelzellen. Während die Plattenepithelzellen ihren maximalen Wert der Anreicherung schon nach 20 min erreichen, reichert sich C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin in Melanomzelllinien bis zum Versuchsende nach 1 h weiter an. Der Uptake von C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin ist 2-3 mal größer in Melanomzelllinien als in Plattenepithelen.

Mit denselben Zellkulturen wurde versucht, ein Blocking-Experiment durchzuführen. Dazu wurden die Zellkulturen, bevor sie mit C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin inkubiert wurden, mit einer gesättigten Lösung an natürlichem Asparagin versetzt. Das C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin wurde zu dem an 'kaltem' Asparagin gesättigtem Zellmedium hinzugegeben. Nach 60 min wurde nun die Zellen mit Phosphatpuffer gewaschen und die Aktivität der Zellproben bestimmt. Anschließend wurden auch diese Zellen homogenisiert und deren Proteingehalt mittels UV-Absorption bestimmt. Die gemessene Aktivität der Zellproben wurde auf die Proteinmenge der Zellen bezogen (Abb. 62). In Abb. 62 ist die Aufnahme von C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin aus dem Blocking-Experiment und die unblockierte Aufnahme nach 60 min gegenübergestellt.

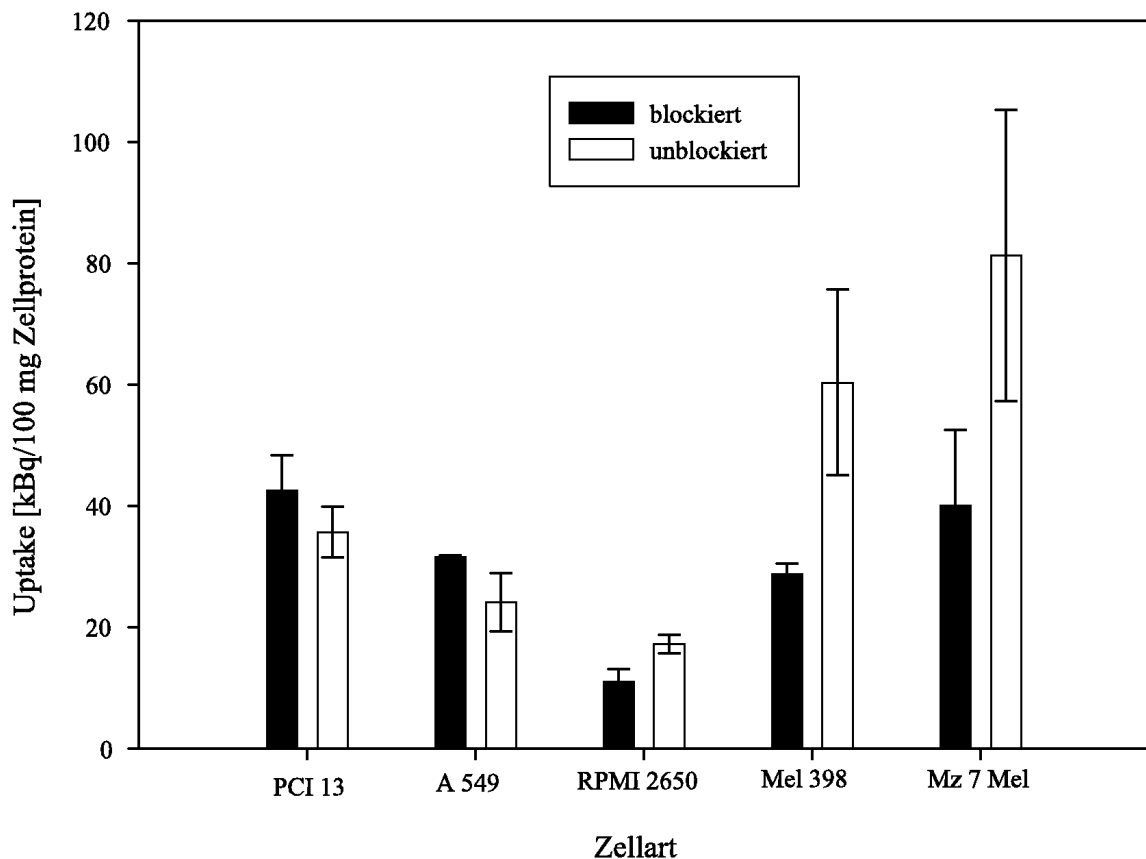


Abbildung 62: Uptake von C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin in bestimmte Tumorzellen im Blockingexperiment nach 60 min Inkubationszeit

Plattenepitel- und Melanomzelllinien zeigen ein unterschiedliches Verhalten. Der Uptake von C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin in die Plattenepitelzelllinien ist blockiert und unblockiert genauso hoch. Der Uptake von C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin kann nicht durch eine gesättigte Lösung von natürlichem Asparagin geblockt werden. Das selbe Verhalten zeigte auch O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin und 'kaltes' Tyrosin bei dem selben Versuchsaufbau [106].

Die Melanomzelllinien zeigten eine Verringerung der Aufnahme von C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin in diesem Blockingexperiment. Es wird eine Verringerung der Aufnahme von ca. 40 % durch 'kaltes' Asparagin erreicht. Da bei keinem der Zelllinien der Uptake im Blocking-Experiment auf fast Null zurückging, ist die keine eindeutige Interpretation der Daten möglich.

Der Vergleich der Ergebnisse aus Abbildung 61 mit anderen PET-Tumortracern ist in Abbildung 63 zusammengefasst. Der Uptake der Tracer wurde nach 60 min Inkubationszeit verglichen. Für den Vergleich wurde eine Plattenepitelzelllinie (PCI 13) und eine Melanomzelllinie (Mel 624 oder Mel 398) verwendet. Die beiden Melanom-Zelllinien sind ähnlich, so dass man das Uptakeverhalten von Aminosäuren in Zellen vergleichen kann.

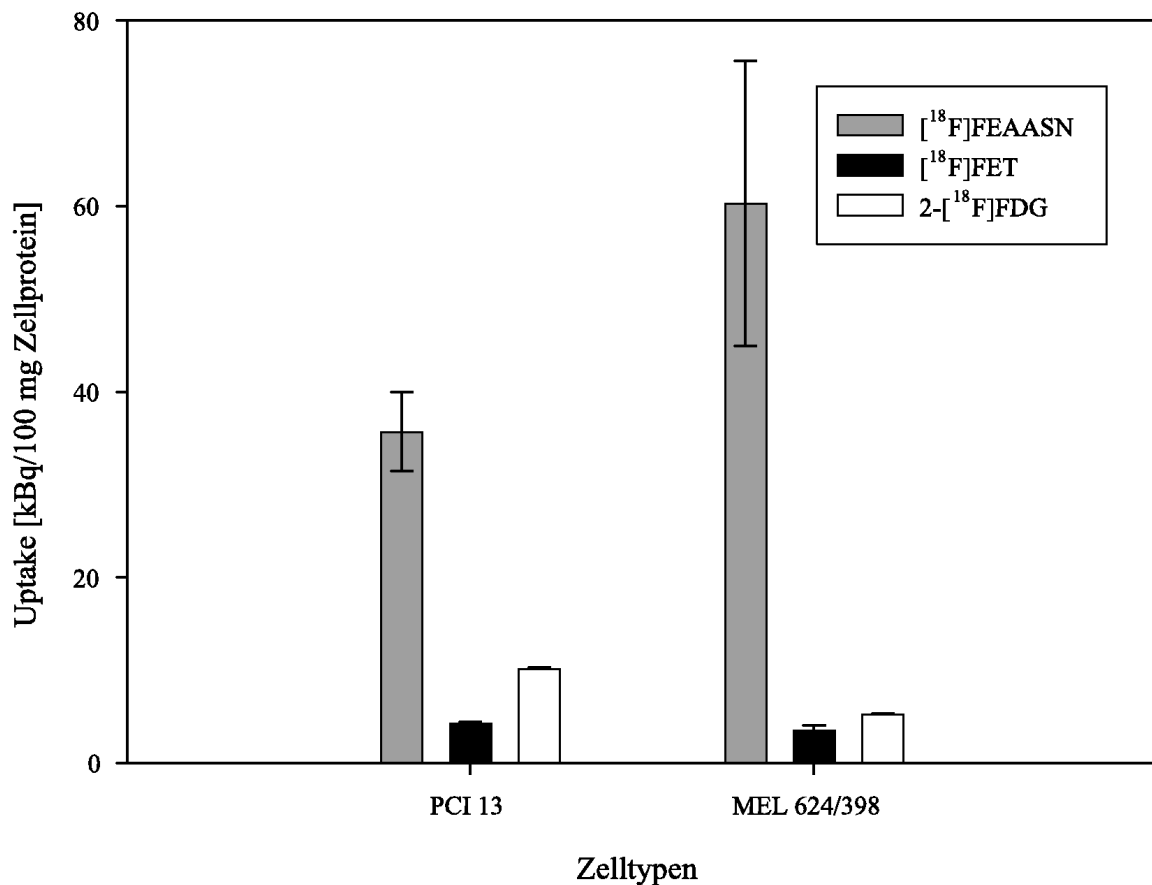


Abbildung 63: Uptake-Vergleich von unterschiedlichen PET-Tumortracern in verschiedenen Tumorzellen;

[^{18}F]FEAASN: C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin ;

[^{18}F]FET: O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin;

2-[^{18}F]FDG: 2-[^{18}F]Fluor-2-desoxy-D-glukose

Die Aufnahme von C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin in die Tumorzellen ist 4-5 mal höher als bei den anderen PET-Tumortracern. Aufgrund dieser guten Ergebnisse aus den *in vitro*-Versuchen wurden *in vivo*-Versuche an Ratten durchgeführt.

5.3.2 *In vivo* -Verteilungsstudien mit C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin

Die *in vivo* -Verteilungsstudien mit C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin wurden in zwei Serien mit jeweils vier männlichen Sprague Dawley Ratten, die je einen Tumor (9L-Tumortyp) am Hinterbein, also insgesamt zwei, trugen, durchgeführt. Die Untersuchung einer Serien mit vier Ratten wurde gleichzeitig in einem PET-Scanner (ECAT EXACT PET-Scanner der Firma Siemens im 2D Mode) durchgeführt. Die Ratten befanden sich in einem Meßgestell, das in zwei Ebenen jeweils zwei Tiere aufnehmen kann. Die Untersuchungsdauer betrug 90 min. Die Ratten wurden über den Versuchszeitraum sediert gehalten. Jedem Tier wurden bei Untersuchungsbeginn 7 MBq C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin in 0,5 ml isotonischer Kochsalzlösung als Bolus über einen Katheter i.v. verabreicht. Das C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin wurde nach der Vorschrift in Kapitel 6.3.5 hergestellt.

Dargestellt sind zwei PET-Aufnahmen: Eine nach 1 min (Abb. 64) und eine Summenaufnahme von 30-60 min (Abb. 65). In den Abb. 64 und 65 sind die Positionen der Tumore an den Hinterläufen durch Pfeile gekennzeichnet. Die unspezifische Anreicherung wurde über dem Schwanz der Ratte bestimmt.

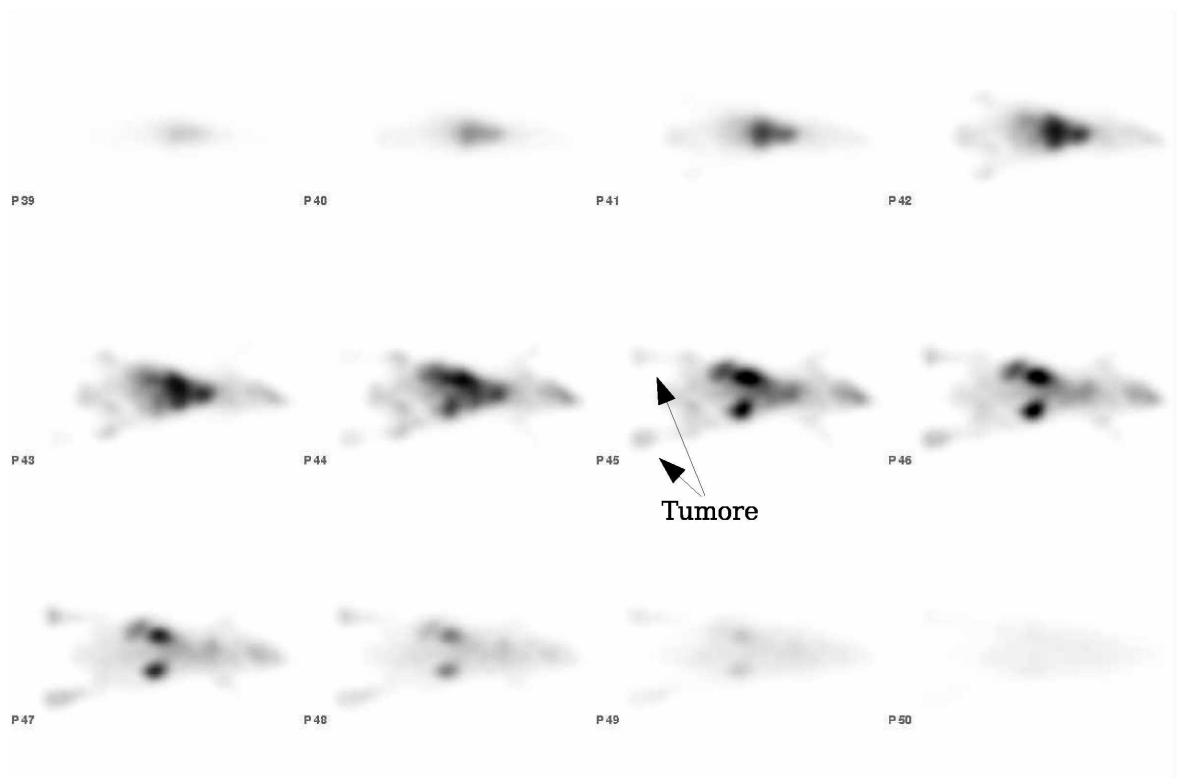


Abbildung 64: Verteilung von C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin in einer Ratte nach 1 min

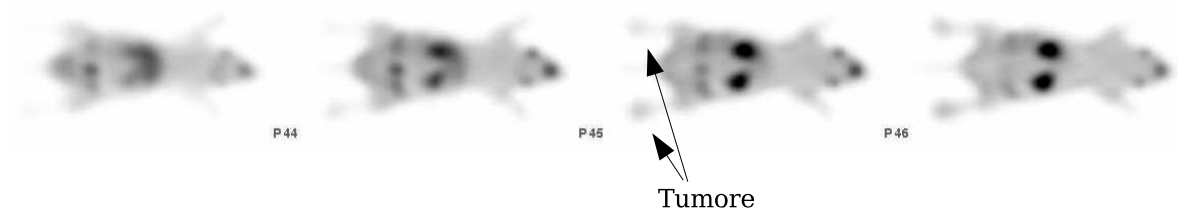


Abbildung 65: Verteilung von C^1 -(2-[^{18}F]Fluorethylamino)-asparagin in Tumor-tragenden Ratten, aufsummiert über 30-60 min

Der Hauptteil der Aktivität reichert sich in der Niere an (> 90 %). Das C¹-(2-[¹⁸F]Fluorethylamino)-asparagin wird praktisch vollständig beim ersten Durchgang durch die Niere ausgeschieden. Eine Anreicherung der Aktivität im Tumor im Verhältnis zum Untergrund war nicht festzustellen. Das Verhältnis zwischen Tumor und unspezifischer Bindung war annähernd 1.

Trotz der guten Ergebnisse der *in vitro*-Versuche zeigt sich keine Anreicherung in den Tumoren in den *in vivo*-Versuchen. Ebenso ist ein Nachteil, dass C¹-(2-[¹⁸F]Fluorethylamino)-asparagin so schnell von der Niere ausgeschieden wird. Somit eignet sich C¹-(2-[¹⁸F]Fluorethylamino)-asparagin nicht für den Einsatz als PET-Tumor-Tracer.

5.3.3 *In vivo*-Verteilungsstudien mit S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure

Die *in vivo*-Aufnahme- und Organverteilungsstudien mit S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure wurden an vier männlichen Sprague Dawley Ratten, die je einen Tumor (SW 707 Tumor-Typ) am jedem Hinterlauf trugen, durchgeführt. Die Herstellung von S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure erfolgte nach der Vorschrift in Kap. 6.3.6. Die Untersuchung der vier Ratten wurde gleichzeitig in einem PET-Scanner (ECAT EXACT PET-Scanner der Firma Siemens im 2D Mode) durchgeführt. Die Ratten befanden sich in einem Meßgestell, das in zwei Ebenen jeweils zwei Tiere aufnehmen kann. Die Untersuchungsdauer betrug 90 min. Die Ratten wurden über den Versuchszeitraum sediert gehalten. Jedem Tier wurden bei Untersuchungsbeginn 10 MBq S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure in 0,3 ml isotonischer Kochsalzlösung als Bolus über einen Katheter i.v. verabreicht. Die Abweichung der applizierten Aktivität der einzelnen Tiere war kleiner als 5 %. Somit ist eine hohe Vergleichbarkeit der Meßdaten gegeben. Die Tumorgößen variieren von 0,7 - 2,1 ml. Die transaxiale Auflösung des benutzten PET-Scanners beträgt 6 mm. Daraus ergibt sich eine Auflösung des PET-Scanners von ca. 1 ml.

Abb. 66 zeigt eine PET-Aufnahme einer Ratte 10 min nach Injektion (p.i.) von S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure. Die drei Schnitte durch die Ratte sind so gewählt, dass sie durch die Leber (Schnitt 1), durch die Nieren (Schnitt 2) und durch die Tumore am Hinterlauf und der Niere (Schnitt 3) verlaufen. Der Schnitt 1 zeigt eine Anreicherung der Substanz in der Leber. Der Schnitt 1 läuft auch durch die Blase, die eine deutlich höhere Anreicherung als die Leber zeigt.

Die S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure wird sehr gut über die Niere ausgeschieden. Der Hauptteil von S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure ist schon nach 10 min p.i. über die Niere ausgeschieden, wie in der dargestellten PET-Aufnahme (Abb. 66) zu erkennen ist. Schnitt 2 läuft durch Nieren und Blasen und zeigt, dass dies die Organe mit der höchsten Anreicherung von S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure sind.

In Schnitt 3 ist das Verhältnis der Aufnahmen von S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure in Niere und Tumor dargestellt. Gut zu erkennen ist, dass die Aufnahme in den Tumor im Verhältnis zur Aufnahme in die Nieren deutlich kleiner ist (ca. 1/10). So ergab die Auswertung, dass sich nur ca. 0,4 % der gesamt applizierten Aktivität in den Tumoren anreichert.

S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure zeigt ein ähnliches Verteilungsmuster wie alle künstlichen ¹⁸F-fluorierten Aminosäuren (vergl. Kap 3.5.4). Diese Aminosäuren werden sehr gut von Leber und Niere ausgeschieden.

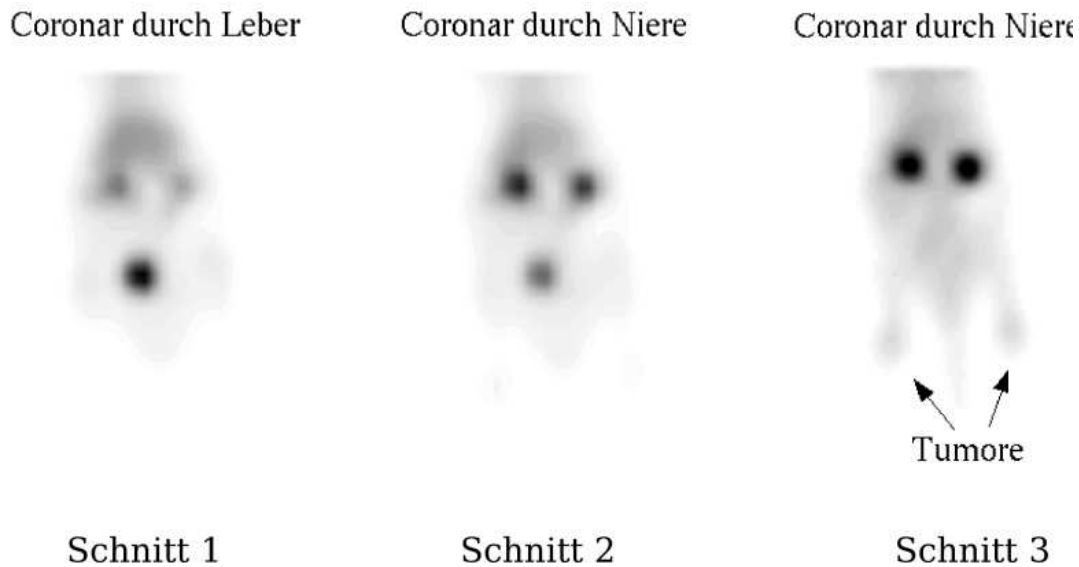


Abbildung 66: PET-Aufnahmen nach 10 min p.i., Schnitte durch Leber (Schnitt 1), Nieren (Schnitt 2), Nieren und Tumoren (Schnitt 3)

Die in den Graphiken (Abb. 67 - 70) dargestellten Ergebnisse zeigen die Auswertung der Versuche mit drei Ratten. Die vierte Ratte konnte nicht in die Ergebnisse mit einbezogen werden, da sie sich im Meszeitraum bewegt hatte und somit ihre Daten verfälscht wurden. Alle dargestellten Werte sind zerfallskorrigiert.

In Abb. 67 und 68 sind die *region of interest* (ROI) über dem Tumor und eine ROI über dem Schwanz der Ratte als unspezifische Anreicherung gegenübergestellt. Das Volumen der ROI's betrug 1 ml.

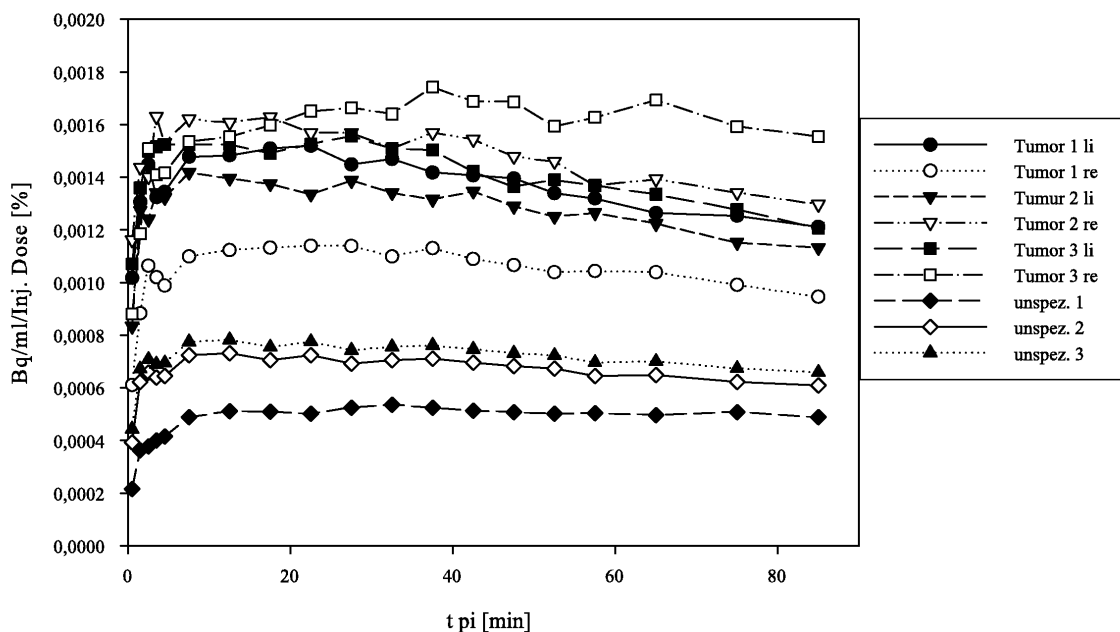


Abbildung 67: Anreicherung der Aktivität in Tumor und unspezifisch in den untersuchten Ratten bei einem konstantem Volumen von 1 ml der *region of interest* (ROI)

Die Auswertung der Daten führte zu der Gegenüberstellung von Tumorregionen und einer Region über der Rattenschwanz (unspezifisch) in Abb. 68.

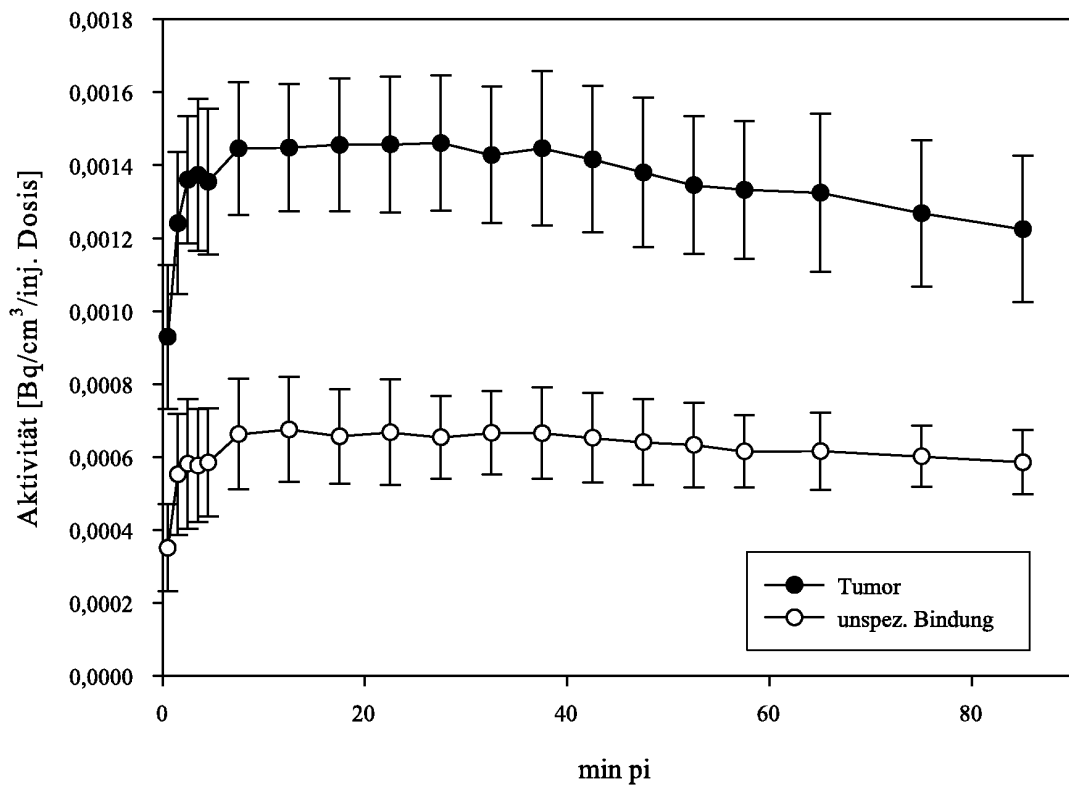


Abbildung 68: Durchschnittliche Anreicherung der Aktivität in Tumor und unspezifisch in den untersuchten Ratten bei einem konstantem Volumen von 1 ml der *region of interest* (ROI)

In Abb. 68 ist zu beobachten, dass sowohl die unspezifische als auch die Anreicherung im Tumor den selben Verlauf zeigen. Daraus lässt sich schließen, dass für die Anreicherung von S-2-Amino-4- ^{18}F Fluor-butansäure in den Tumor eine erhöhte Transporteraktivität ist. Mehr lässt sich erkennen, wenn man Tumor und unspezifische Anreicherung miteinander ins Verhältnis setzt (Abb. 69).

Das Verhältnis Tumor zu Untergrund ist praktisch über die ganze Versuchsdauer konstant bei einem Verhältnis von 2,2. Die kleinen Abweichungen am Anfang des Versuchs kommen dadurch zustande, dass das S-2-Amino-4- ^{18}F Fluor-butansäure als Bolus verabreicht wurde. Die hohe Anreicherung im Tumor am Anfang der Untersuchung ist dadurch zu erklären, dass Tumore in der Regel besser durchblutet werden als normales Gewebe und somit den Tracer schneller angeboten bekommen.

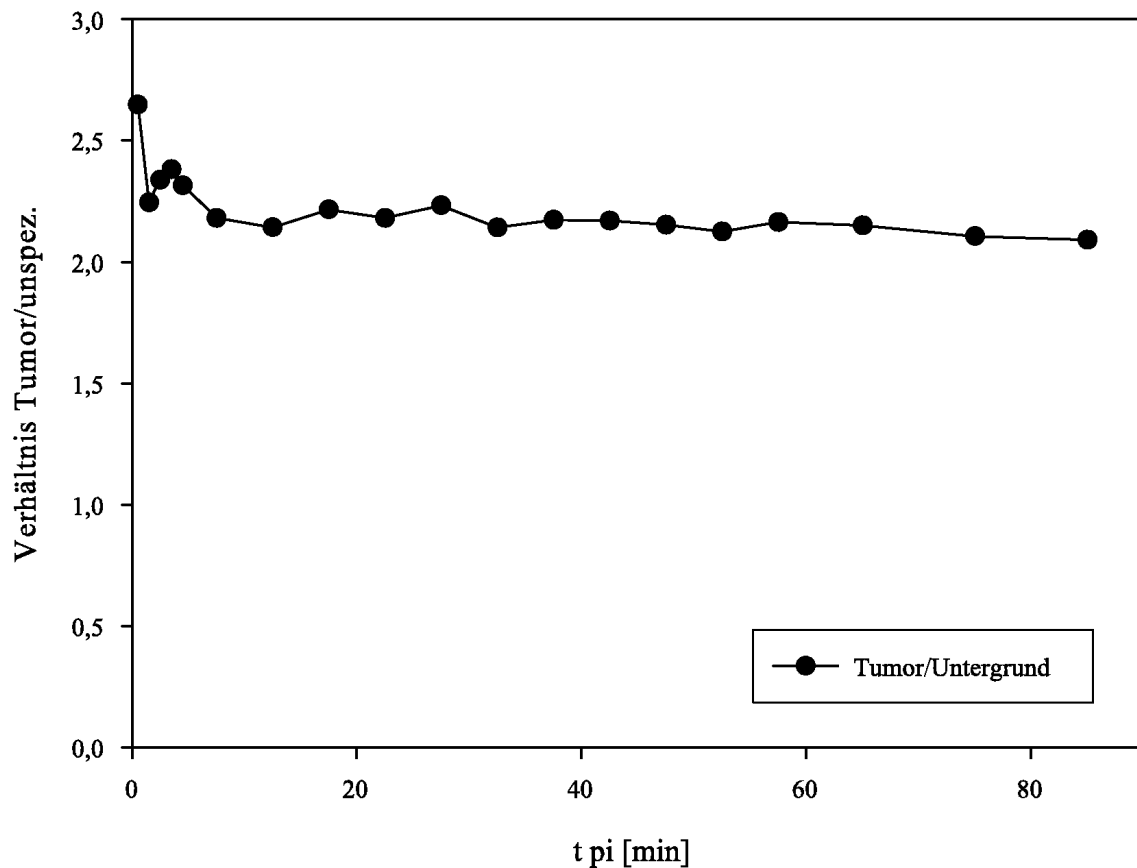


Abbildung 69: Verhältnis der Aktivität im Tumor zum Untergrund über die Versuchszeit in einer *region of interest* von 1 ml

Mit einem Verhältnis Tumor zu unspezifischer Anreicherung von 2,2 liegt der PET-Tumor-Tracer S-2-Amino-4- ^{18}F fluor-butansäure in dem Bereich von dem klinisch eingesetztem O-(2- ^{18}F Fluorethyl)-L-tyrosin (1,5). Alle ^{18}F -fluorierten Tyrosin-Derivate für die PET-Tumor-Diagnose liegen in diesem Bereich bis ca. 3,5. S-2-Amino-4- ^{18}F fluor-butansäure liegt mit seiner Tumor-unspezifische Bindungs-Verhältnis von 2,2 in dem Bereich der derivatisierten natürlichen Aminosäuren, aber die künstlichen Aminosäuren wie 1-Amino-1-carboxy-3- ^{18}F fluor-cyclobutan und 2-Amino-3- ^{18}F fluor-2-methylpropansäure erreichen ein Verhältnis von 9 bzw. sogar 104. Die unterschiedlichen Verhältnisse Tumor zu unspezifischer Bindung lassen sich nur begrenzt vergleichen, da die Tracer an verschiedenen Tumorzelllinien untersucht wurde, aber geben einen ungefähren Aufschluß über die Uptake-Eigenschaften.

Es ist davon auszugehen, dass S-2-Amino-4- ^{18}F fluor-butansäure nicht in die Proteinbiosynthese eingeht, da alle anderen bekannten künstlichen Aminosäuren, die mit ^{18}F -Fluor markiert worden sind, ebenfalls nicht in die Proteinbiosynthese eingeht (vgl. 3.5.4), aber dies ist für eine Anreicherung in Tumoren nicht von Nöten [67].

Die künstlichen Aminosäuren 1-Amino-1-carboxy-3- ^{18}F fluor-cyclobutan und 2-Amino-3- ^{18}F fluor-2-methylpropansäure werden als Racemate eingesetzt und zeigen eine hohe Anreicherung in den Ausscheidungsorganen Leber und Niere. Es ist bekannt, dass Aminosäuren der L-Form besser in Zellen aufgenommen werden als die der R-Form [71]. Die R-Form wird, da alle natürlichen Aminosäuren die L-Form besitzen, als Fremdstoff erkannt. Die Realisierung der Synthese von S-2-Amino-4- ^{18}F fluor-butansäure über ein Auxilliar, um eine definierte Stereochemie zu bekommen, sollte den Uptake in die Ausscheidungsorgane senken. Die Hoffnung, die Belastung für die Ausscheidungsorgane zu senken, indem man einen PET-Tumor-Tracer entwickelt, der nur aus der L-Form besteht, hat sich im Fall des S-2-Amino-4- ^{18}F fluor-butansäure nicht erfüllt.

Die große Anreicherung von S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure in den Nieren machte eine Auswertung einer ROI über den Nieren interessant (Abb. 70).

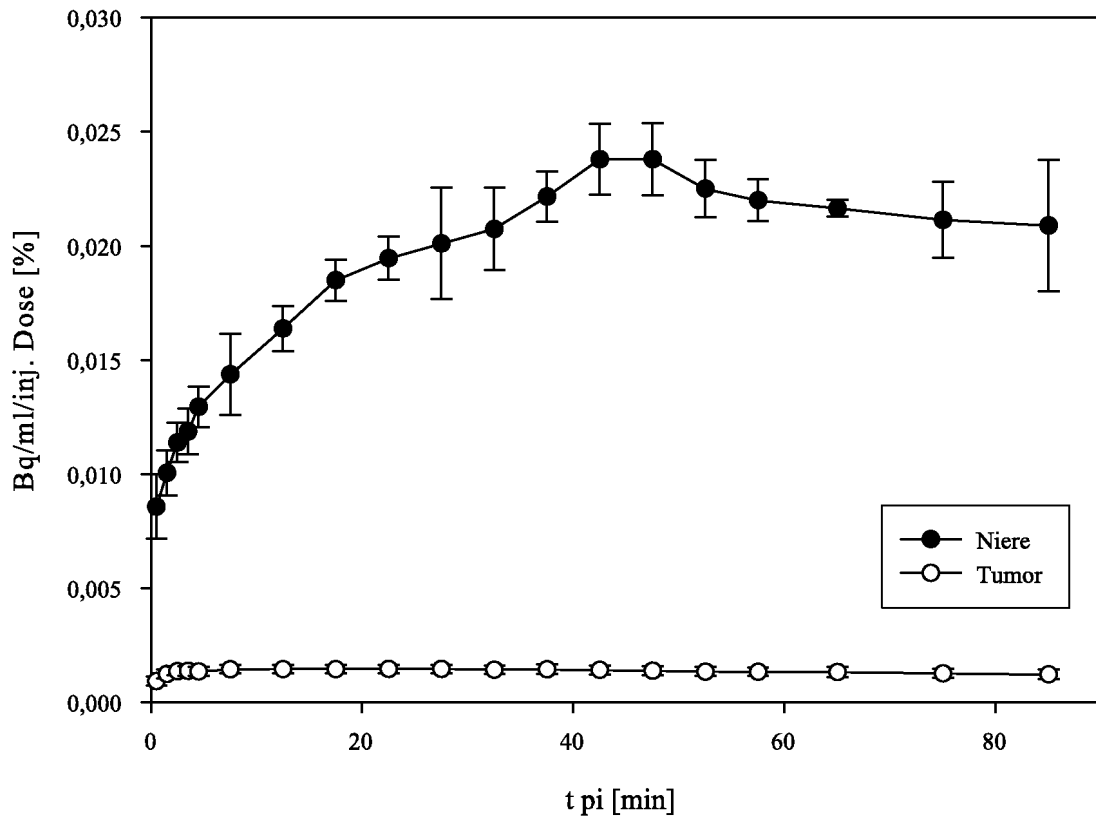


Abbildung 70: Vergleich der Anreicherung der Aktivität in Tumor und Nieren

In Abbildung 70 ist der zeitliche Verlauf der Anreicherung in einer ROI über der Niere einer ROI über dem Tumor gegenübergestellt. Da die hohe Anreicherung in der Niere den ganzen Bauchraum überstrahlt, können in diesem Bereich keine eventuellen Tumore entdeckt werden. Mit der Gegenüberstellung von Niere gegen Tumor sollte untersucht werden, ob es einen Zeitpunkt gibt, indem die Aktivität schon aus der Niere ausgewaschen ist, aber sich noch im Tumor befindet. Die Aktivität in der Niere steigt bis einem maximal Wert nach 45 min p.i. an und beginnt dann langsam zu sinken. In Gegensatz dazu bleibt die Aktivität in dem Tumor konstant. Somit wäre folgendes Szenario denkbar. S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure wird verabreicht, man wartet bis die Aktivität in der Niere soweit abgefallen ist und in dem Tumor nicht, bevor man die Messung startet. Dies kann in dem Fall von S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure nicht gemacht werden, da selbst nach 90 min die Anreicherung in der Niere die des Tumors noch um das 10-fache übersteigt.

S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure zeigt eine Anreicherung in Tumoren in der selben Größenordnung wie die klinisch eingesetzten PET-Tumor-Tracer. Durch seine hohe Anreicherung in Ausscheidungsorganen, besonders den Nieren, eignet sie sich allerdings nur als PET-Tumor-Tracer für den Hals-Kopf-Bereich. Es gibt allerdings andere PET-Tumor-Tracer, bei denen ein ähnlichen Ansatz gewählt wurde, und einen deutlich größeren Verhältnis Tumor zu unspezifischer Bindung zeigen. Diese anderen PET-Tumor-Tracer befinden sich im gleichen Entwicklungsstatus wie das S-2-Amino-4-[^{18}F]fluor-butansäure.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros, Aldrich, Fluka, Lancaster, Merck und Sigma bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Wenn eine Reinigung stattfand, ist dies explizit in den Vorschriften erwähnt. Alle nicht-trockenen Lösungsmittel wurden von der Firma Acros in der Reinheit 95+% verwendet. Alle trockenen Lösungsmittel wurden von der Firma Fluka in der Reinheit puriss bezogen und über Molsieb gelagert. Alle deuterierten Lösungsmittel wurden von Deutero GmbH in der Reinheit >98 % bezogen. Die wichtigsten Chemikalien, Hersteller und Reinheitsgrade sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Reinheit
2-Aminoethanol	Lancaster	>98 %
2-Brom-Ethanol	Fluka	>95 %
2-Brom-Fluorethan	Lancaster	97+%
2-Fluorethylamin	Aldrich	90 %
Ammoniak-Lösung 25 %	Fluka	
D-Valin	Lancaster	98+ %
4,4'-Dimethoxybenzhydrol	Merck	99+ %
Benzylbromid	Aldrich	>98 %
Benzylchloroformiat	Lancaster	zur Synthese
N ¹ -Boc-Asparagin-p-Nitrophenolester	Sigma	95-98 %
Bortrifluorid-Etherat	Fluka	>97 %
Di- <i>tert</i> -butyl-Dicarbonat	Lancaster	99+ %
Glycin- <i>tert</i> -Buthyester	Lancaster	>97 %
Glycin-Ethylester Hydrochlorid	Lancaster	99 %
(1R,2R,5R)-(+)-2-Hydroxy-pinane-3-on	Fluka	>99 %
Kaliumcarbonat	Merck	p.a.
Kaliumiodid	Merck	p.a.
KH ₂ PO ₄	Merck	p.a.
Kryptofix®2.2.2	Merck	>99 %
LDA-Lösung 2M	Arcos	
Maleinsäure	Lancaster	98+ %
Na ₂ HPO ₄	Merck	p.a.
Natriumsulfat wasserfrei	Acros	p.a.
Natriumwolframat	Lancaster	99 %
Phosgenlösung 20 %	Acros	
Phosphortribromid	Merck	>98 %
Salzsäure 37 %	Merck	
Schwefelsäure 95-97 %	Merck	
p-Toluolsulfonsäureanhydrid	Aldrich	97 %
4-Toluolsulfonsäurechlorid	Merck	>98 %
Triethylamin	Fluka	purum
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck	p.a.
Yterbium(III)-Trifluormethansulfonsäure	Sigma	97 %
Zitronensäure	Fluka	p.a.

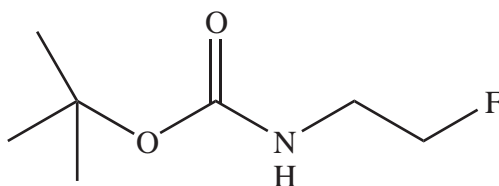
Die dünnenschichtchromatographischen Analysen wurden auf kieselgelbeschichteten Aluminiumfolien 60 F₂₅₄ der Firma Merck durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 254 nm. Säulenchromatographische Trennungen wurden mit Kieselgel 60 (Korngröße 0,040-0,063 nm) der Firma Merck durchgeführt. Die Produkte wurden mittels ¹H-NMR-Spektroskopie, ¹³C-NMR-Spektroskopie und FD-Massenspektroskopie charakterisiert. Dazu wurden folgende Geräte verwendet (Tab.: 4).

Tabelle 4: Verwendete Geräte

¹ H-NMR-Spektroskopie	200 MHz-FD-NMR-Spektrometer AC 200 der Firma Bruker
¹³ C-NMR-Spektroskopie	100,6 MHz-FD-NMR-Spektrometer AM 400 der Firma Bruker
FD-Massenspektroskopie	MAT90-Spektrometer der Firma Finnigan
Radio-Dünnschichtchromatographie	Instant Imager der Firma Packard Canberra
HPLC-Systeme	HPLC-System der Firma Sykam, Pumpen S 1100, UV-Detektor S 3200, Hochdruckinjektionsventil S 9010, Pumpe (Gynkotech Model 300), Probenaufgabeeventil (Rheodyne Typ 8125) mit Injektionsschleife (20 µl), UV-Detektor mit variabler Wellenlänge (Gynkotech SP-6), NaI-Radiodetektor (Durchmesser 1 Zoll) Hochspannungsversorgung (Firma Canberra Packard)

6.2 Organische Synthesen

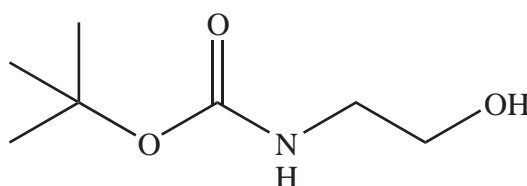
6.2.1 (2-Fluorethyl)-carbamidsäure *tert.*-butylester



400 mg (4 mmol) 2-Fluorethylamin Hydrochlorid und 2 g (10 mmol) Triethylamin werden in 6 ml Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es werden 700 mg (4 mmol) Dicarbonat Di-*tert.*-Butylester in 1 ml Dichlormethan gelöst und zugetropft. Man rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Die Lösung wird mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockene eingengt. (2-Fluorethyl)-carbamidsäure *tert.*-butylester ist ein weißer Feststoff. Ausbeute: 490 mg (3 mmol) (65 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 4.5 (dt, 2H, F- CH_2 -), 3.4 (dq, 2H, O- CH_2 -), 3.35 (s, 9H, 3c CH_3)

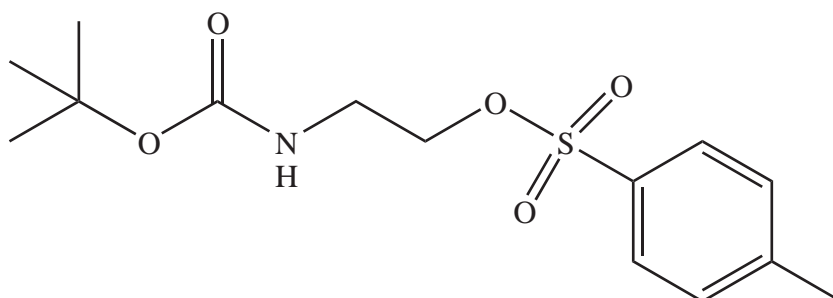
6.2.2 (2-Hydroxyethyl)-carbamidsäure *tert.*-butylester



6,1 g (100 mmol) Aminoethanol werden in 150 ml Dichlormethan gelöst und 15,25 ml (110 mmol) Triethylamin zugegeben und auf 0 °C gekühlt. 21,8 g (100 mmol) Dicarbonat Di-*tert.*-Butylester, gelöst in 20 ml Dichlormethan, werden zugetropft. Man rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Die Lösung wird mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockene eingedampft. Das Produkt ist ein farbloses Öl. Ausbeute: 12,1 g (75,2 mmol) (71 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 4.05 (t, 2H, O- CH_2 -); 3.35 (t, 2H, N- CH_2 -), 3.35 (s, 9H, 3c CH_3)

6.2.3 Toluol-4-sulfonsäure 2-*tert.*-butoxycarbonylamino ethylester

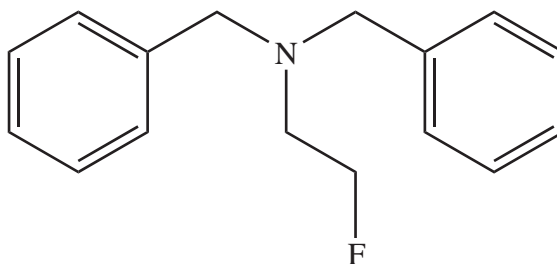


Eine Lösung aus 5 g (31 mmol) (2-Hydroxyethyl)-carbamidsäure *tert.*-butylester in 50 ml Dichlormethan wird auf 0 °C gekühlt und mit 4,75 ml (34 mmol) Triethylamin versetzt. Nach Zugabe von

5,9 g (31 mmol) p-Toluolsulfonsäurechlorid rührt man über Nacht. Die Lösung wird mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockene eingedampft. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Eluens: Ethylacetat:n-Hexan 1:1). Toluol-4-sulfonsäure 2-*tert.*-butoxycarbonylamino ethylester ist ein weißer Feststoff. Ausbeute: 3,3 g (10,5 mmol) (34 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.75 (d, 2H, m-ArH), 7.3 (d, 2H, oArH), 4.05 (t, 2H, O- CH_2 -), 3.35 (t, 2H, N- CH_2 -), 2.4 (s, 3H, CH_3), 3.35 (s, 9H, 3c CH_3)

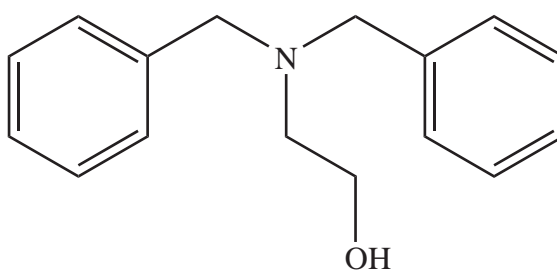
6.2.4 N,N-Dibenzyl-2-fluorethylamin



In einen Kolben mit Rückflusskühler gibt man 2 g (10 mmol) Dibenzylamin, 1,52 g (12 mmol) 2-Brom-1-fluorethan, 3,72 g K_2CO_3 (0,03 mol) und katalytische Mengen von KI in 10 ml Dioxan gelöst. Man kocht die Lösung für 36 h unter Rückfluss. Danach wird mit Wasser verdünnt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Das organische Lösungsmittel wird *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (Eluens: n-Hexan: CHCl_3 1:1). N,N-Dibenzyl-2-Fluorethylamin ist ein gelbes Öl. Ausbeute: 400 mg (1,65 mmol) (16 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 2.7-2.9 (d, 2H, N- CH_2 -), 3.65 (s, 4H, 2x Ph- CH_2 -), 4.3-4.8 (d, 2H, F- CH_2 -), 7.1-7.5 (m, 10H, 2x Ph-)

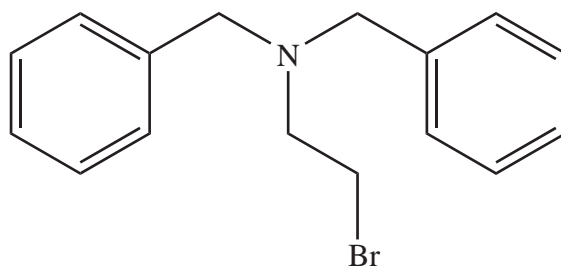
6.2.5 2-Dibenzylamino-ethanol



8,6 g (50 mmol) Benzylbromid werden mit 1,5 g (25 mmol) 2-Aminoethanol und 13,8 g (100 mmol) Kaliumcarbonat in 22 ml Wasser gelöst und für 3 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen schüttelt man 3 mal mit 50 ml Diethylether aus. Die organische Phase wird 2 mal mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es bleibt ein Öl zurück. Um das 2-Dibenzylamino-ethanol zu fällen, wird es in 30 ml n-Hexan gelöst und über Nacht bei 4 °C stengelassen. Der weiße Feststoff wird abgesaugt. Ausbeute: 3,9 g (16,2 mmol) (64 %)

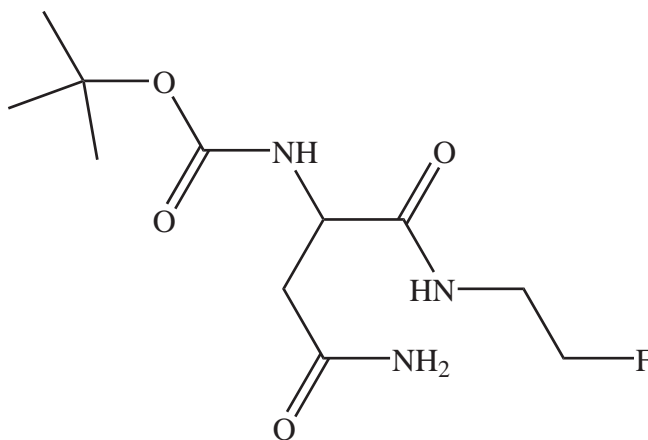
$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.2-7.4 (m, 10H, ArH), 3.7 (s, 4H, 2x Ph- CH_2 -), 3.6 (t, 2H, CH_2 -O), 2.7 (t, 2H, CH_2 -C-O)

6.2.6 N,N-Dibenzyl-(2-bromomethyl)-amin



3,9 g (16 mmol) N,N-Dibenzylaminoethanol werden in 15 ml Dichlormethan gelöst und auf 80 °C temperiert. Man gibt nun über 1 Stunde 5 g (19 mmol) Phosphortribromid hinzu. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt, bis kein Edukt mehr nachgewiesen wird. Man gießt nun die Lösung in Eis und extrahiert 3 mal mit Diethylether. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und in Vakuum zur Trockene eingedampft. N,N-Dibenzyl-(2-bromomethyl)-amin ist eine gelbe viskose Flüssigkeit. Ausbeute: 1,4 g (4,6 mmol) (28 %)

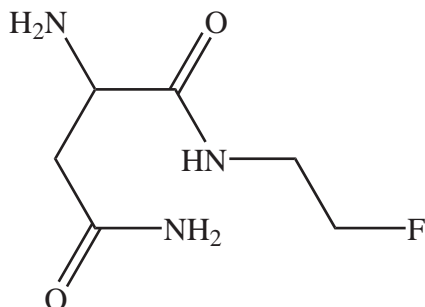
$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.2-7.6 (m, 10H, ArH), 3.7 (s, 4H, 2x Ph- CH_2 -), 3.4 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 2.9 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-C-O}$)

6.2.7 [2-Carbamoyl-1-(2-fluor-ethylcarbamoyl)-ethyl]-carbamidsäure *tert.*-butylester

340 mg (3 mmol) 2-Fluorethylamin Hydrochlorid und 300 mg (3 mmol) Triethylamin werden in 30 ml Ethylacetat gelöst. Anschließend werdem 1 g (3 mmol) [2-Carbamoyl-1-(4-hydroxy-phenylcarbamoyl)-ethyl]-carbamidsäure *tert.*-butylester hinzugegeben. Man lässt die Lösung für 2 Tage bei Raumtemperatur rühren. Anschließend wird das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mit Eiswasser versetzt, worauf das Produkt ausfällt und abgesaugt wird. [2-Carbamoyl-1-(2-fluor-ethylcarbamoyl)-ethyl]-carbamidsäure *tert.*-butylester ist ein weißer Feststoff. Ausbeute: 770 mg (2,8 mmol) (93 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O), δ [ppm]: 4.5 (dt, 2H, F- CH_2 -), 4.2 (t, 1H, N-C-H), 3.45 (dq, 2H, F-C- CH_2 -), 2.55 (d, 2H, N-C- CH_2 -), 1.35 (s, 9H, -C(CH_3))

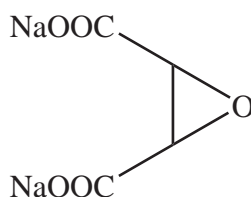
6.2.8 2-Amino-N¹-(2-fluorethyl)-succinamid



700 mg (2,5 mmol) [2-Carbamoyl-1-(2-fluor-ethylcarbamoyl)-ethyl]-carbamidsäure *tert.*-butylester werden in 22,5 ml Trifluoressigsäure gelöst und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man dampft im Vakuum bis zur Trockene ein, schlämmt in Diethylether auf und saugt das ausgefallene Produkt ab. [2-Carbamoyl-1-(2-fluor-ethylcarbamoyl)-ethyl]-carbamidsäure *tert.*-butylester ist ein weißer Feststoff. Ausbeute: 350 mg (2 mmol) (80 %)

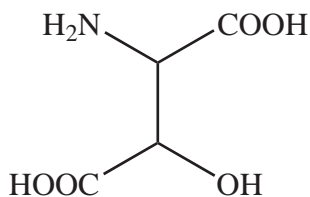
¹H-NMR (200 MHz, D₂O) δ [ppm]: 4.5 (dt, 2H, F-CH₂-), 4.2 (t, 1H, N-C-H), 3.45 (dq, 2H, F-C-CH₂-), 2.55 (d, 2H, N-C-CH₂-)

6.2.9 Di-Natrium-cis-succinepoxid



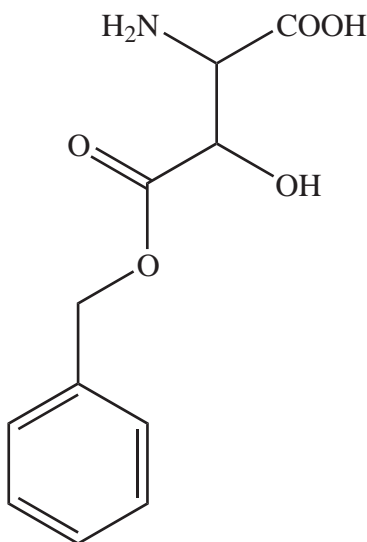
In einem Dreihalskolben mit Rührer, Thermometer und Tropftrichter wird eine Lösung aus 88 g (0,76 mol) Maleinsäure in 230 ml Wasser vorgelegt. Dazu gibt man eine Lösung aus 45 g (1,13 mol) NaOH und 100 ml Wasser. Die Lösung erwärmt sich durch die exotherme Reaktion auf ca. 70 °C. Die warme Lösung wird mit 5 g Natriumwolframat versetzt. Die Lösung wird mit einem Eisbad auf 63-65 °C gekühlt. Es werden 120 ml (1,05 mol) 30 % iges Wasserstoffperoxid so hinzugegeben, dass die Temperatur nicht ansteigt. Man hält die Lösung bei einem pH-Wert von über 4, indem man eine Lösung aus 15 g NaOH in 75 ml Wasser so hinzugibt, dass der pH-Wert nicht unter diesen Wert sinkt. Die Lösung wird noch für eine Stunde auf 65 °C gehalten. Der Rest der Natronlauge wird hinzu gegeben und auf 40 °C gekühlt. Man engt die Lösung auf ca. 40 % des Volumens im Vakuum ein. Die viskose Lösung wird in 1 l Aceton gegossen worauf das Di-Natrium-cis-Succinepoxid ausfällt. Das weiße Salz wird abgesaugt. Ausbeute: 133 g (0,76 mol) (99%)

¹H-NMR (200 MHz, D₂O), δ [ppm]: 3,5 ppm (s, 2H, 2xCH)

6.2.10 threo-3-Hydroxy-aparaginsäure

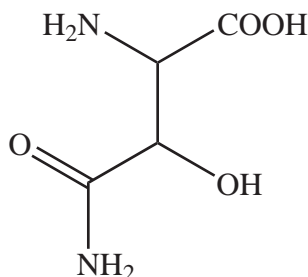
133 g (0,75 mol) Di-Natrium-cis-Succinepoxid werden in 2,6 l konz. Ammoniaklösung gelöst und für 10 h auf 40-50 °C erwärmt. Die Lösung wird anschließend im Vakuum zu einem zähem Sirup eingedickt. Man verdünnt wieder mit 525 ml Wasser und stellt den pH-Wert auf 3 mittel konz. HCl ein. Die warme Lösung stellt man für 12 Stunden in den Kühlschrank. Das Produkt fällt aus und wird abgesaugt. Das Filtrat wird nochmals eingedampft und gekühlt. Weitere 3-Hydroxyasparaginsäure fällt aus und wird abgesaugt. Beide Produktfraktionen werden vereinigt und aus Wasser umkristallisiert. threo-3-Hydroxy-Aparaginsäure ist ein weißer Feststoff. Ausbeute: 50 g (336 mmol) (44 %)

¹H-NMR(200 MHz, D₂O) δ [ppm]: 4.6 (d, 1H, O-C-H), 4.05 (d, 1H, N-C-H)

6.2.11 threo-3-Hydroxy-aparaginsäure-4-benzylester

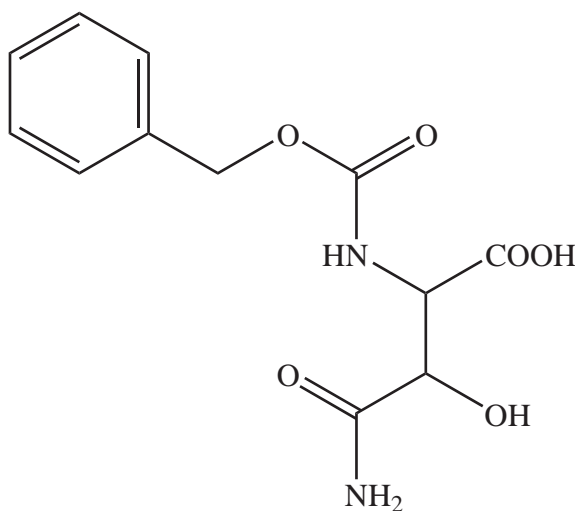
23 g (150 mmol) threo-3-Hydroxy-Aparaginsäure und 200 ml Benzylalkohol werden mit 27 ml konz. HCl für 2 Stunden bei 70 °C gerührt. Dann wird das Wasser im Vakuum entfernt, man gibt nochmals 13 ml konz. HCl hinzu und entfernt das Wasser wieder im Vakuum. Der pH-Wert wird auf 6 mit einer 20 % igen Kaliumcarbonatlösung eingestellt. Die zähflüssige Lösung wird mit 1 l Methanol versetzt. Das Produkt fällt aus. Man saugt den Ester ab und wäscht ihn mehrmals mit Methanol, um den Rest an Benzylalkohol zu entfernen. threo-3-Hydroxy-Aparaginsäure-4-Benzylester ist ein weißer Feststoff. Ausbeute: 25,8 g (108 mmol) (72 %)

¹H-NMR(200 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]: 7.3 (m, 5H, PhH), 5.1 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.5 (d, 1H, O-C-H), 3.5 (d, 1H, N-C-H)

6.2.12 threo-3-Hydroxy-aparagin

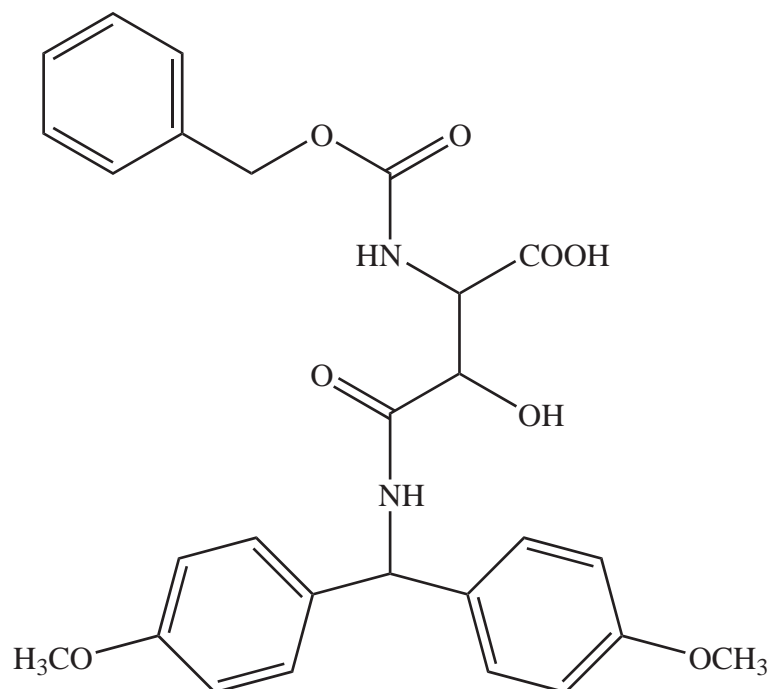
10 g (21 mmol) threo-3-Hydroxy-Aparaginsäure-4-Benzylester werden in 100 ml 25 %iger Ammoniaklösung gelöst und für 5 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösung wird im Vakuum bis zu Trockene eingedunstet, dann in möglichst wenig Wasser gelöst, und der pH-Wert auf 5 mit konz. HCl eingestellt. Das Rohprodukt wird aus Wasser umkristallisiert. threo-3-Hydroxy-Aparagin ist ein weißer Feststoff. Ausbeute: 1,2 g (8,1 mmol) (38 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O), δ [ppm]: 4.5 (d, 1H, O-C-H), 3.55 (d, 1H, N-C-H)

6.2.13 N¹-Cbz-threo-3-Hydroxy-aparaginsäure

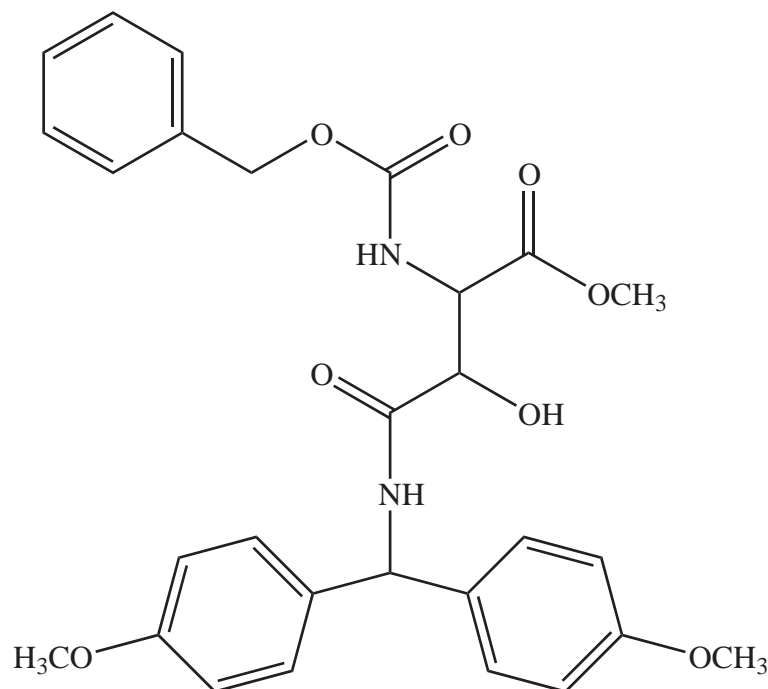
2 g (13,5 mmol) threo-3-Hydroxy-Aparagin werden in 150 ml kochendem Wasser gelöst. Man lässt die Lösung auf 60 °C abkühlen und versetzt sie unter intensivem Rühren mit 2,8 g NaHCO_3 und 2,8 g (16,5 mmol; 2,4 ml) Benzyl-Chlorocarbonat hinzu. Man lässt die Lösung unter starkem Rühren auf Raumtemperatur abkühlen und rührt noch weitere 3 Stunden. Die Lösung wird 2 mal mit Diethylether gewaschen. Der pH-Wert wird mittels konz. HCl auf 3 eingestellt. Das Volumen der Lösung wird auf 25 % seines Volumens im Vakuum eingedunstet. Man stellt die Lösung über Nacht in den Kühlschrank und saugt das Produkt ab. N¹-Cbz-threo-3-Hydroxy-Aparaginsäure ist ein weißer Feststoff. Ausbeute: 2,8 g (10 mmol) (75 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O), δ [ppm]: 7.3 (s, 5H, PhH), 5.0 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.55 (d, 1H, O-C-H), 4.35 (d, 1H, N-C-H)

6.2.14 N¹-Cbz-N²-4,4'-Dimethoxybenzhydrol-threo-3-hydroxy-aparagin

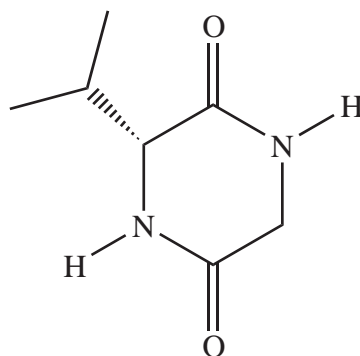
1,5 g (5 mmol) N¹-Cbz-3-threo-3-Hydroxy-Aparagin und 1,31 g (6 mmol) 4,4'-Dimethoxybenzhydrol werden in 14 ml Eisessig unter Erwärmen gelöst. Es werden 27 μ l konz. Schwefelsäure hinzugegeben und über Nacht gerührt. Die Lösung wird in 40 ml Wasser gegossen, gekühlt und 3 mal mit Ethylacetat asextrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. N¹-Cbz-N²-4,4'-Dimethoxybenzhydrol-threo-3-Hydroxy-Aparagin ist ein gelbes Öl. Ausbeute: 1,78 g (3,5 mmol) (70 %)

¹H-NMR(200 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]: 8.4 (s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, NH), 7.3 (s, 5 H, PhH(Cbz)), 7.2 (dd, 4H, m-PhH), 6.8 (dd, 4H, o-PhH), 5.9 (d, 1H, Ph-CH-PH), 5.1 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.5 (m, 1H, O-C-H), 4.3 (s, 1H, N-C-H), 3.7 (s, 3H, OCH₃), 3.8 (s, 3H, OCH₃)

6.2.15 N¹-Cbz-N²-4,4'-Dimethoxybenzhydrol-threo-3-hydroxy-asparagin-methylester


2,7 g (5,3 mmol) N¹-Cbz-N²-4,4'-Dimethoxybenzhydrol-threo-3-hydroxy-asparagin-methylester werden mit 25 ml Methanol aufgeschlämmt und mit 55 μ l konz. Schwefelsäure versetzt. Man kocht diese Lösung unter Rückfluss für 5 Stunden. Man engt im Vakuum auf die Hälfte des Volumens ein und verdünnt mit Wasser. Diese Lösung wird 3 mal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingedampft. Die Endreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Eluens: Ethylacetat). N¹-Cbz-N²-4,4'-Dimethoxybenzhydrol-threo-3-hydroxy-asparagin-methylester ist ein gelbes Öl. Ausbeute: 2,3 g (4,4 mmol) (85 %)

¹H-NMR(200 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.75 (s, 1H, NH), 7.7 (s, 1H, NH), 7.3 (s, 5 H, PhH(Cbz)), 7.0 (dd, 4H, mPhH), 6.8 (dd, 4H, oArH), 6.0 (d, 1H, Ph-CH-PH), 5.1 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.7 (m, 1H, O-C-H), 4.55 (d, 1H, N-C-H), 3.7-3.8 (m, 9H, 3x OCH₃, Ester+Phenyl-Methoxy-Gruppen)

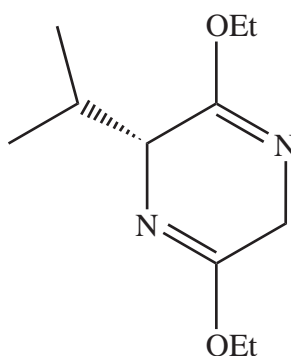
6.2.16 (R)-3-Isopropyl-2,5-diketopiperazin


Man suspendiert 25 g (0,214 mol) D-Valin in 300 ml abs. THF und erhitzt auf 40 °C. Zu dieser Lösung gibt man innerhalb von 2 h 210 ml 20 %ige Phosgenlösung in Toluol hinzu und rührt die nun

klare Lösung über Nacht bei Raumtemperatur. Abschließend wird für 2 h Stickstoff durch die Lösung geleitet, um die Reste an Phosgen zu vertreiben. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Man nimmt den Rückstand nochmals mit 85 ml THF auf, um den Rest an HCl zu entfernen, wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die geschützte Aminosäure wird 1 h im Hochvakuum getrocknet und dann in 210 ml trockenem THF aufgenommen. Diese Lösung wird zu einer Lösung aus 29,8 g Glycin-Ethylester Hydrochlorid und 67 ml Triethylamin in 250 ml CHCl_3 bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ bis $-60\text{ }^\circ\text{C}$ getropft. Man rührt bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ für 3 h und bei Raumtemperatur für 30 min. Das Triethylaminhydrochlorid wird abfiltriert und mit CHCl_3 gewaschen. Das Chloroform wird nun im Vakuum entfernt. Dieser Rückstand wird in 840 ml Toluol gelöst und für 12 h unter Rückfluss gekocht (Das Produkt fällt teilweise aus). Man kühlt auf $0\text{ }^\circ\text{C}$, saugt das Produkt ab und wäscht es mit Diethylether. Die Trocknung erfolgt im Hochvakuum bei $100\text{ }^\circ\text{C}$. (R)-3-Isopropyl-2,5-diketopiperazin ist ein weißer Feststoff. Ausbeute: 40,2 g (257,7 mmol) (46 %)

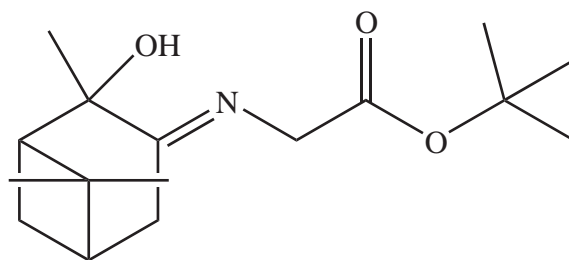
$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6), δ [ppm]: 8.2 (s, 1H, NH-Gly), 8.0 (s, 1H, NH-Val), 3.9-3.5 (m, 3H, $\alpha\text{H-Val}$, $\alpha\text{CH}_2\text{-Gly}$), 2.1 (m, 1H, $\beta\text{CH-Val}$), 0.9 (m, 6H, $2\times\text{CH}_3\text{-Val}$)

6.2.17 3,6-Bisethoxy-2R-iso-isopropyl-2H-dihydropyrazin (Bislactimether)



Das (R)-3-Isopropyl-2,5-diketopiperazin wird für 3 d bei $100\text{ }^\circ\text{C}$ im Hochvakuum getrocknet. Davon werden 2,1 g (13,3 mmol) (R)-3-Isopropyl-2,5-diketopiperazin unter Argon in 45 ml CH_2Cl_2 suspendiert. Man gibt unter Argon 7,7 g (40 mmol) Triethylxoniumtetrafluoroborat hinzu und rührt 24 h bei Raumtemperatur. Man gibt nochmals 2,6 g (13 mmol) Triethylxoniumtetrafluoroborat hinzu und rührt für weitere 2 d. Die Lösung wird mit 113 ml Phosphatpuffer (113 ml H_2O , 23,95 g Na_2HPO_4 , 5,6 g KH_2PO_4) verdünnt und die wässrige Phase 3 mal mit 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Endreinigung erfolgt mittels Kugelrohrdestillation (Sdp: $165\text{ }^\circ\text{C}$ bei 20 mbar). Der Bislactimether ist eine farblose Flüssigkeit. Ausbeute: 2,1 g (74 %)

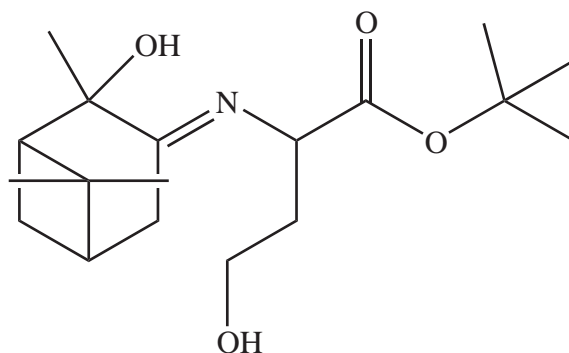
$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 4.2 (m, 1 H, $\alpha\text{H-Val}$), 4.1-3.9 (m, 6 H, $\alpha\text{CH}_2\text{-Gly}$, $2\times\text{CH}_2\text{-Et}$), 2.2 (m, 1 H, $\beta\text{CH-Val}$), 1.25 (t, 6 H, $2\times\text{CH}_3\text{-Et}$), 1.0 (d, 3 H, $\text{CH}_3\text{-Val}$), 0.7 (d, 3 H, $\text{CH}_3\text{-Val}$)

6.2.18 (1R,2R,5R)-2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino)-essigsäure tert.-butylester


4,15 g (24,7 mmol) (1R,2R,5R)-(+)-2-Hydroxy-pinan-3-on und 5 g (45,9 mmol) Glycin-*tert.*-Butylester werden in 40 ml abs. Benzol gelöst. Man versetzt diese Lösung noch mit katalytischen Mengen an Bortriflorid-Etherat und kocht unter Rückfluss bis die DC-Kontrolle vollständigen Umsatz anzeigt. Das Benzol wird im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel (Eluens: Ethylacetat : Cyclohexan 1:1). (1R,2R,5R)-2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino)-essigsäure *tert.*-butylester ist ein gelbes viskoses Öl. Ausbeute: 4,85 g (17,3 mmol) (70 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 4.1 (m, 2 H, =N- CH_2), 2.9 (br. s, 1 H, OH), 2.5 (m, 2 H, N=C- CH_2), 2.35 (m, 1 H, CH^* -syn), 2.1 (m, 2H, 2x CH), 1.6 (d, 1 H, CH^* -anti), 1.5 (s, 3 H, CH_3), 1.45 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.35 (s, 3 H, CH_3), 0.8 (s, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 179.4 (COO), 169.1 (C=N), 81.0 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 76.3 (*tert*-COH), 53.3 (N-C, C^*H_2) 50.3 (CH), 38.4 (CH), 38.2 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2(\text{CH})_2$), 33.4 (CH_2), 28.1 + 27.2 (2x CH_3), 28.0 ($(\text{CH}_3)_3$), 27.0 ($(\underline{\text{C}}\text{H}_3)\text{-C-OH}$)

6.2.19 (1R,2R,5R)-4-Hydroxy-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino)butansäure tert.-butylester


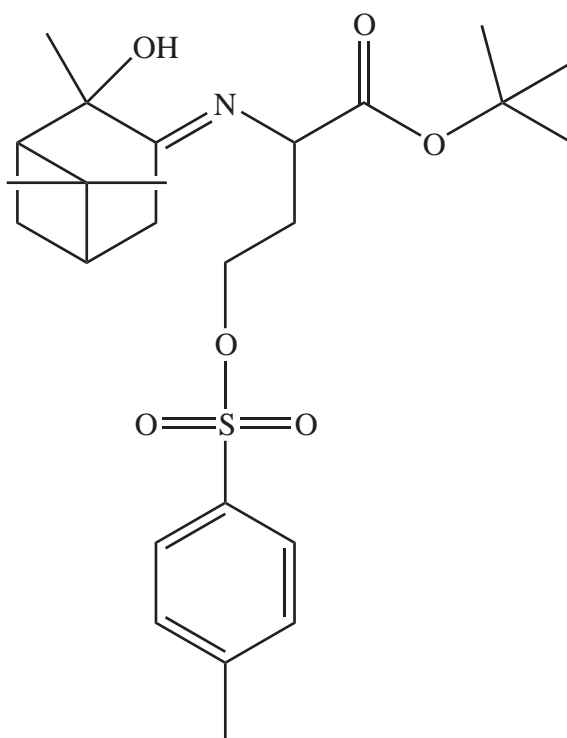
3,38 g (12,5 mmol) (1R,2R,5R)-2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino)-essigsäure *tert.*-butylester werden in 15 ml trockenen THF bei -78°C in einer Schlenk-Apparatur mit 12,5 ml 2 M LDA-Lösung versetzt. Man hält die Temperatur für 90 min bei dieser Temperatur, gibt dann eine vorgekühlte Lösung aus 1,6 g (12 mmol) 2-Brom-Ethanol, 6 ml trockenen THF und 6 ml 2 M LDA-Lösung hinzu. Für 2 h wird bei -78°C gerührt. Man läßt sich die Lösung über 12 h auf Raumtemperatur erwärmen. Man versetzt die Lösung mit 15 ml gesättigter Natriumchloridlösung und schüttelt mit Ethylacetat aus. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Die Aufreinigung erfolgt an Kieselgel (Eluens: Ethylacetat : Methanol 3:1; $R_f = 0,75$). (1R,2R,5R)-4-Hydroxy-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino)butansäure *tert.*-butylester ist eine gelbes Öl. Ausbeute: 900 mg (2,8 mmol) (25 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 4.3 (t, 1 H, NCH), 3.7 (m, 2 H, O- CH_2), 2.6-2.2 (m, 2 H, 2x CH), 2.1-1.9 (m, 5 H, $\text{CH}_2\text{-C-O}$, $\text{CH}_2\text{-C-N}$, CH^* syn), 1.5 (d, 1 H, CH^* anti), 1.45 (s, 3 H, CH_3), 1.4 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.3 (s, 3 H, CH_3), 0.8 (s, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 179.4 (COO), 169.1 (C=N), 81.0 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 76.3 (*tert*-COH), 61.5 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 53.3 (N-C, C^*H_2), 50.3 (CH), 38.4 (CH), 38.2 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)$), 34.8 ($\underline{\text{C}}\text{-CH}_2\text{-OH}$), 33.4 (CH_2), 28.1+27.2 (2x CH_3), 28.0 ($(\text{CH}_3)_3$), 22.7 ($(\underline{\text{C}}\text{H}_3)\text{-C-OH}$)

FD-MS: 326,2 M+1

6.2.20 (1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure *tert.*-butylester



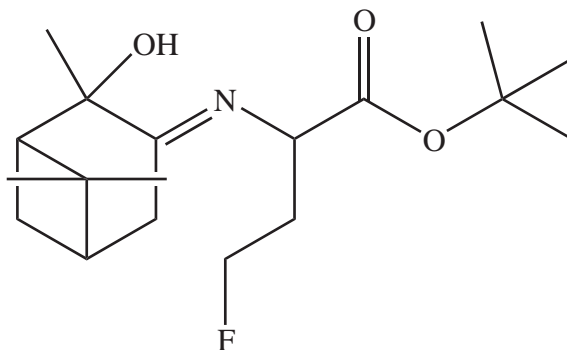
Es werden 500 mg (1,8 mmol) Tert-Butyl-3-aza-3-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-yliden)-2-ethylpropanol, 652 mg (2 mmol) p-Toluolsulfonsäureanhydrid und eine Spatelspitze Ytterbium(III)-Trifluormethansulfonat in 5 ml trockenem CH_2Cl_2 gelöst. Man rührt unter Argon bei Raumtemperatur über Nacht. Das Reaktionsgemisch wird mit Wasser verdünnt, die org. Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird 3 mal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten org. Phasen werden mit Na_2SO_4 getrocknet und dann eingedampft. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: Ethylacetat; $R_f = 0,75$). (1R,2R,5R)-2-(2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino) 4-(toluol-4-sulfonyloxy)-butansäure *tert.*-butylester ist ein hellgelbes Öl. Ausbeute: 500 mg (1,1 mmol) (58 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.7 (d, 2 H, m-PhH), 7.3 (d, 2 H, oPhH), 4.2 (m, 1 H, NCH), 4.0 (m, 2 H, O- CH_2), 2.5-2.4 (m, 3 H, O-C- CH_2 , CH), 2.4 (s, 3H, Aromat- CH_3), 2.3 (m, 2 H, CH_2), 2.0 (m, 1 H, CH), 1.4 (m, 5 H, CH_2 , CH_3), 1.35 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.25 (s, 3 H, CH_3), 0.8 (s, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 179.4 (COO), 169.1 (C=N), 144.7 (para-C), 133 (Ph-C1), 129.7 (meta-C), 127.7 (o-C), 81.0 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 76.3 (*tert*-COH), 61.5 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 53.3 (N-C, C^*H_2)

50.3 (CH), 38.4 (CH), 38.2 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2(\text{CH})_2$), 34.8 ($\underline{\text{C}}\text{-CH}_2\text{-OH}$), 33.4 (CH_2), 28.1+27.2 (2x CH_3), 28.0 ($(\text{CH}_3)_3$), 22.7 ($(\underline{\text{C}}\text{H}_3)\text{-C-OH}$), 13.9 (Ph-CH_3)
 MS(FD): 478,9 M

6.2.21 (1R,2R,5R)-4-Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester



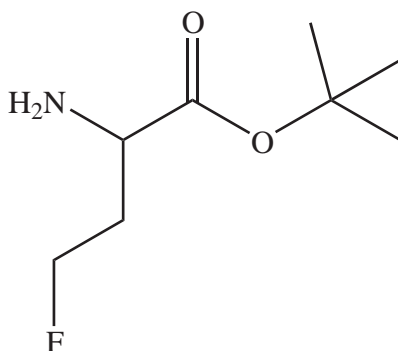
1,8 g (6,4 mmol) (1R,2R,5R)-2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)-essigsäure *tert.*-butylester werden in 5 ml trockenem THF bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ in einer Schlenk-Apparatur gelöst und mit 6,5 ml 2 M LDA-Lösung versetzt. Man hält die Lösung für 90 min bei dieser Temperatur, gibt dann eine vorgekühlten Lösung aus 830 mg (6,5 mmol) 2-Brom-Fluorethan und 5 ml trockenem THF hinzu. Man hält diese Lösung für 2 h bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ und lässt dann die Lösung sich über 12 h auf Raumtemperatur erwärmen. Die Lösung wird mit 10 ml einer gesättigten Natriumchloridlösung versetzt und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Die Aufreinigung erfolgt an Kieselgel (Eluens: Ethylacetat:Cyclohexan 1:1; $R_f = 0,56$). (1R,2R,5R)-4-Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylideneamino)butansäure *tert.*-butylester ist ein hellgelbes Öl. Ausbeute: 700 mg (2,1 mmol) (33,6 %); >97 % ds (Bestimmt durch $^{19}\text{F-NMR}$)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 4.6-4.3 (m, 3 H, $\text{CH}_2\text{-F}$, NCH), 2.6-2.0 (m, 8 H, 5x CH, $\text{CH}_2\text{-C-F}$, OH), 1.5 (d, 1 H, CH^*), 1.42 (s, 3 H, CH_3), 1.4 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.3 (s, 3 H, CH_3), 0.8 (s, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 179.4 (COO), 169.1 (C=N), 81.0 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 80.5 ($\text{CH}_2\text{-F}$), 76.3 (*tert*-COH), 53.3 (N-C, C^*H_2) 50.3 (CH), 38.4 (CH), 38.2 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2(\text{CH})_2$), 34.8 ($\underline{\text{C}}\text{-CH}_2\text{-OH}$), 33.4 (CH_2), 28.1+27.2 (2x CH_3), 28.0 ($(\text{CH}_3)_3$), 22.7 ($(\underline{\text{C}}\text{H}_3)\text{-C-OH}$)

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3)[ppm]: -221.8 (ddt, R-Diastereomer), -223.6 (ddt, S-Diastereomer)

6.2.22 2-Amino-4-fluor-butansäure *tert.*-Butylester

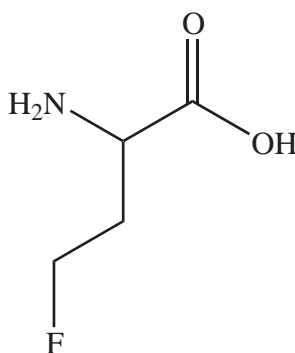


100 mg (0,3 mmol) (1R,2R,5R)-4-Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidene-amino)butansäure *tert.*-butylester werden in 2 ml THF und 1,4 ml 15 %ige Zitronensäure bei 0 °C gelöst. Man rührt für 72 h bei Raumtemperatur. Man dampft das THF ab und schüttelt mit 3x Diethylether aus. Die Etherphase wird mit Natriumsulfat getrocknet und zur Trockene eingedampft. Die Aufreinigung erfolgt am Kieselgel (Eluens: Ethylacetat; $R_f = 0,27$). 2-Amino-4-Fluor-Butansäure *tert.*-Butylester ist ein gelbliches Öl. Ausbeute: 24 mg (0,13 mmol) (44 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O), δ [ppm]: 4.0 (dt, 2H, F- CH_2 -), 2.2 (m, 2H, F-C- CH_2 -), 1.4 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.1 (t, 1H, N-C-H)

MS: 178,9 (M+1)

6.2.23 2-Amino-4-fluor-butansäure



350 mg (1,1 mmol) (1R,2R,5R)-4-Fluor-2-(2-hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidene-amino)butansäure *tert.*-butylester werden in 10 ml 6 N HCl und 10 ml Ethylacetat gelöst. Man kocht bei 90 °C für 12 h. Man schüttelt mit Ethylacetat aus und dampft die wässrige Phase im Vakuum zur Trockene ein. Man löst in wenig Wasser auf und neutralisiert mit NaHCO_3 (pH=5). Man engt zur Trockene ein und reinigt an Kieselgel auf (Eluens: Methanol $R_f = 0,66$). Das Produkt ist ein weißer Feststoff. Ausbeute: 94 mg (0,8 mmol) (72 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O), δ [ppm]: 4.0 (dt, 2H, F- CH_2 -), 2.2 (m, 2H, F-C- CH_2 -), 1.1 (t, 1H, N-C-H)

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, D_2O), δ [ppm]: -219.5 (ddt)

6.3 Radiochemische Synthesen

6.3.1 [¹⁸F]Fluorid

Das in [¹⁸O]H₂O gelöste [¹⁸F]Fluorid wird auf einer QMA-Kartusche fixiert, um das [¹⁸O]H₂O abzutrennen. Das [¹⁸F]Fluorid wird eluiert mittels 15 mg Kryptofix®2.2.2 und 15 µl 1 M Kaliumcarbonatlösung in 1 ml Acetonitril. Man dampft diese Lösung bei 80 °C in einem Heliumstrom von 400 ml/min bei 80 mbar ein. Ist das Lösungsmittel entfernt, wird das eventuell verbliebene Wasser noch 2 mal mit je 1 ml Acetonitril azeotrop abdestilliert. Danach wird für 3 min bei maximalem Vakuum weitergetrocknet.

6.3.2 2-[¹⁸F]Fluorethylamin aus N-Boc-2-Amino-O-tosyl-ethylester

8 mg N-Boc-2-Amino-O-Tosyl-Ethylester werden in 700 µl DMF gelöst und mit getrocknetem [¹⁸F]Fluorid bei 95 °C für 8 min zur Reaktion gebracht. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgt durch Zugabe von 65 µl Trifluoressigsäure. Die Entschützung des 2-[¹⁸F]Fluorethylamin ist nach 8 min bei Raumtemperatur vollständig. Das 2-[¹⁸F]Fluorethylamin wird ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Ausbeute: 25 % RCA; Synthesedauer: 20 min

6.3.3 2-[¹⁸F]Fluorethylamin aus N,N-Dibenzyl-(2-bromethyl)-amin

Es werden 3 mg N,N-Dibenzyl-(2-Bromethyl)-Amin in 800 µl Acetonitril gelöst und zu getrocknetem [¹⁸F]Fluorid gegeben. Die Reaktionszeit beträgt bei 80 °C 5 min. Man verdünnt die Lösung mit 9 ml Wasser. Um das restliche [¹⁸F]Fluorid zu entfernen, wird diese Lösung langsam über eine C18-Kartusche gegeben und die Kartusche mit 4 ml Wasser gewaschen. Das N,N-Dibenzyl-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-amin wird dabei auf der Kartusche fixiert. Zur Eluation des N,N-Dibenzyl-2-[¹⁸F]Fluorethylamin werden 1,5 ml Ethanol verwendet. Die Entschützung des 2-[¹⁸F]Fluorethylamin erfolgt durch eine Hydrierung mittels eines schwachen H₂-Stroms innerhalb von 15 min. Als Katalysator werden 6 mg Pd/C (10 % Pd) verwendet. Man entfernt den Katalysator nach der Reaktion mittels eines Filters (Millipore, Membranfilter, 2,5 µm). Diese Lösung wird mit 60 µl Trifluoressigsäure versetzt und bis zur Trockene eingedampft (400 ml/min He-Strom 80 mbar; 80 °C; ca. 8 min). Das 2-[¹⁸F]Fluorethylamin kann so ohne weitere Reinigung in jedem beliebigen Lösungsmittel eingesetzt werden. Ausbeute: 38 % RCA; Synthesedauer: 70 min

6.3.4 C¹-[¹⁸F]Fluorethylamino-asparagin mittels 'one-pot-synthesis'

Die saure DMF-Lösung des 2-[¹⁸F]Fluorethylamin wird mit 135 µl Triethylamin (113 µl zur Neutralisation, 27 µl für die Reaktion) versetzt. 15 mg N¹-Boc-C¹-p-Nitrophenol-Asparagin werden in 700 µl gelöst und zu dem 2-[¹⁸F]Fluorethylamin gegeben. Die Reaktion dauert 6 min bei 80 °C. Die Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgt durch Zugabe von 75 µl Trifluoressigsäure innerhalb von 8 min bei Raumtemperatur. Die Abtrennung des C¹-[¹⁸F]Fluorethylamino-Asparagin erfolgt durch HPLC (Säule: Lichrospher 100 RP 18 EC5 250x10 mm; Eluens: H₂O:Ethanol 64:36; Flow: 4 ml/min; R_t= 7,5 min). Das Ethanol wird anschließend im Heliumstrom (400 ml/min) unter Vakuum (100 mbar) bei 60 °C entfernt. Ausbeute: 4 % RCA; Synthesedauer: 90 min

6.3.5 C¹-[¹⁸F]Fluorethylamino-asparagin durch gereinigtes 2-[¹⁸F]Fluorethylamin

Das trockene 2-[¹⁸F]Fluorethylamin wird mit einer Lösung aus 15 mg N¹-Boc-C¹-p-Nitrophenol-Asparagin und 135 µl Triethylamin in 500 µl DMF aufgenommen. Maximale Ausbeuten sind nach 4 min bei 60 °C zu erzielen. Um die Boc-Schutzgruppe zu entfernen, versetzt man diese Lösung mit 90 µl Trifluoressigsäure. Die Entschützung ist nach 8 min bei Raumtemperatur vollständig. Die Aufreinigung erfolgt mittels HPLC (Eluens: Acetonitril:H₂O 20:80 + 0,1 Trifluoressigsäure; Säule: Purospher RP 18 HC, 5 µm; R_t= 5,5 min). Die HPLC-Fraktion mit dem Produkt wird mit Wasser verdünnt und

über eine EN-Kartusche gegeben. Die Eluierung erfolgt durch 1,5 ml Ethanol, das unter Vakuum im Heliumstrom bei 80 °C entfernt wird (8 min). Das getrocknete C¹-[¹⁸F]Fluorethylamino-Asparagin kann mit isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen werden. Ausbeute: 10 % RCA; Synthesedauer: 110 min

6.3.6 S-2-Amino-4-[¹⁸F]fluor-butansäure

Das in [¹⁸O]H₂O gelöste [¹⁸F]Fluorid wird über eine QMA-Kartusche gegeben, wobei das [¹⁸F]Fluorid auf der Kartusche fixiert wird. Die Eluierung erfolgt mit einer Lösung aus 15 mg Kryptofix@2.2.2 und 20 µl 1 M Natriumoxalatlösung in 1 ml Acetonitril. Man dampft diese Lösung bei 80 °C in einem Heliumstrom von 400 ml/min bei 500 mbar ein. Ist das Lösungsmittel entfernt, wird das eventuell verbliebene Wasser noch 2 mal mit je 1 ml Acetonitril azeotrop abdestilliert. Danach wird für 3 min bei maximalem Vakuum weitergetrocknet. Man gibt nun 3,5 mg (1R,2R,5R)-2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylidenamino)-essigsäure *tert.*-butylester in 700 µl Acetonitril hinzu. Die Reaktionsparameter für die Fluorierung sind 15 min Reaktionszeit bei 80 °C. Die Reaktionslösung wird mit 10 ml Wasser gequench und das Produkt auf einer C18-Kartusche fixiert. Die Kartusche wird nochmals mit 5 ml Wasser gewaschen, um möglichst viel [¹⁸F]Fluorid zu entfernen. Das geschützte Produkt wird nun durch 1 ml Ethanol von der C18-Kartusche eluiert. Aus der ethanolischen Lösung wird mittels HPLC das geschützte Produkt abgetrennt ($R_t = 13,5$ min; HPLC-Säule: Licosphar 100 RP18 5 EC; Laufmittel: Acetonitril:Wasser 65:35; Flow 4 ml/min). Das geschützte Produkt wird mit 20 ml Wasser verdünnt und auf einer C18-Kartusche fixiert. Das geschützte Produkt wird nun mittels 1 ml Ethanol von der C18-Kartusche eluiert. Um das Produkt zu entschützen, versetzt man diese Lösung mit 200 µl 37 % HCl und erwärmt für 10 min auf 80 °C. Die Lösung wird bis zur Trockene eingedampft und mit isotonischer Kochsalz-Lösung wieder aufgenommen. Die Qualitätskontrolle erfolgt mittels HPLC ($R_t = 21,3$ min; HPLC-Säule: Biosil SEC 250; Laufmittel: 87,5 Wasser : 10 EtOH : 2,5 Essigsäure + 2,5 g/l NH₄CH₃COO ; Flow 0,5 ml/min). Ausbeute: 56 % RCA zerfallskorrigiert; Synthesedauer: 2,5 h

7 Literatur

Literatur

- [1] H.J. Wester, “ ^{18}F :Labeling chemistry and labeled Compounds“ in F. Rösch (Volumeeditor), “Handbook of Nuclear Chemistry“ Vol. 4 (2003)
- [2] G. Stöcklin, S. M. Qaim, F. Rösch, *Radiochim. Acta*, **70**, 249 (1995)
- [3] C. Keller, *Radiochemie*, Studienbücher Chemie, 2 Auflage (1981)
- [4] K. H. Lieser, Einführung in die Kernchemie, 3. neubearb. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 53, (1991)
- [5] W. Seelmann-Eggebert, G. Pfenning, H. Münzle, H. Klewe-Nebenius, Karlsruher Nuklidkarte, 5. Auflage, Karlsruhe (1981)
- [6] G. Stöcklin in: *Handbuch der medizinischen Radiologie*, Band 15/1 B, Emissions-Comutertomographie mit kurzlebigen zyklotronproduzierten Radioisotopen, Springer Verlag (1989), S. 211
- [7] H. J. Ache, *Angew. Chemie*, **84**, 234 (1972)
- [8] S. M. Qaim, G. Stöcklin, *Radiochim. Acta*, **34**, 25 (1983)
- [9] H. H. Coenen, K. Franken, P. Kling, G. Stöcklin, *Appl. Radiat. Isot.* **39**, 1243-1250, (1988)
- [10] T. Ruth, A. P. Wolf, *Radiochim. Acta*, **26**, 26 (1979)
- [11] G. Stöcklin, *Eur. J. Nucl. Med.*, **19**, 527 (1992)
- [12] M. Reivich, D. Kuhl, A. Wolf et al., *Circ. Res.* **44**, 127-137 (1979)
- [13] H. J. Wester, Dissertation: *Zur praktischen trägerfreien ^{18}F -Fluorierungen von Proteinen, Peptiden und Tyrosin*, Universität zu Köln (1995)
- [14] D. Block, Diplomarbeit: *Zur praktischen trägerfreien ^{18}F -Fluoralkylierungen und ^{18}F -Fluoracylierung*, Universität zu Köln (1979)
- [15] D. Block, H. H. Coenen, G. Stöcklin, *J. Label. Compds. Radiopharm.*, **24**, 1032 (1987)
- [16] D. Block, H. H. Coenen, G. Stöcklin, *J. Label. Compds. Radiopharm.*, **25**, 201 (1987)
- [17] D. Block, H. H. Coenen, G. Stöcklin, *J. Label. Compds. Radiopharm.*, **25**, 185 (1988)
- [18] R. Gail, H. H. Coenen, G. Stöcklin, *J. Label. Compds. Radiopharm.*, **35**, 197 (1994)
- [19] *Organikum*, Organisch-chemisches Grundpraktikum, 17. Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1988)
- [20] D. P. Cox, J. Terpinzki, W. Lawrynowicz, *J. Org. Chem.*, **49**, 3216 (1984)
- [21] Beyer/Walter, *Lehrbuch der organischen Chemie*, 22. Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart (1991)
- [22] K. Hamacher, H. H. Coenen, G. Stöcklin, *J. Label. Compds. Radiopharm.*, **23**, 1047 (1986)
- [23] A. Luxen, M. Monclus, C. Masson, J. van Naemen, E. Ledent, P. Luybaert, *J. Label. Compds. Radiopharm.*, **35**, 163 (1994)

- [24] L. Barre, L. Barbier, M. C. Lasne, *J. Label. Compds. Radiopharm.*, **35**, 167 (1994)
- [25] H.H. Coenen, P. Kling, G. Stöcklin, *J. Nucl. Med.*, **30**, 1367 (1989)
- [26] K. Arndt, *Leitungssteigerung durch Aminosäuren*, Novagenics-Verlag Arnsberg (1996)
- [27] E. Mindell, *Die Vitamin Bibel*, Wilhelm Heyne Verlag München (1985)
- [28] K. Dose, *Biochemie*, 4. Auflage, Springer Verlag Berlin (1994)
- [29] O. Schmidt, G. Thews, *Die Physiologie des Menschen*, 25. Auflage, Springer Lehrbuch Verlag Berlin (1993)
- [30] F. Mutschler, *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (1994)
- [31] C. Jones, *Biochemistry*, **35**, 1857 (1992)
- [32] A. Stern, B. Foxman, A. Tashjian, R. Abeles, *J. Med. Chem.* **25**, 544 (1982)
- [33] M. Wanner, J. Hagemann, G. Koomen, U. Pandit, *J. Med. Chem.*, **23**, 85 (1980)
- [34] M. Bodanszky, A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, 2nd Edition, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1994
- [35] M. Bodanszky, *The Principles of Peptide Synthesis*, 2nd Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994
- [36] C. Gilissen, G. Bormans, T. de Groot, A. Verbruggen, *J. Label. Compds. Radiopharm.*, **41**, 491 (1998)
- [37] G. Payne, P. Williams, *J. org. Chem.* **24**, 54 (1959)
- [38] C. Jones, *Can. J. Chem.* **47**, 4363 (1969)
- [39] Y. Liwshitz and A. Singerman, *J. Chem. Soc. (C)* (1967), 1696
- [40] P. Garner, J. Park, *Org. Synthesis*, 18-26
- [41] C. Still, *J. Org. Chem.*, **51**, 2386 (1986)
- [42] J. Hartung, *Synthesis* (1997), 1433
- [43] I. Galynker, *Tetrahedron Letters* **23**, 4461 (1982)
- [44] T. G. Murali et al., *J. med. Chem.*, **37**, 2334 (1994)
- [45] M. Piel, Diplomarbeit, *Synthese und nukleophile n.c.a. ¹⁸F-Markierung von Benzamidderivaten*, Universität Mainz, 1997
- [46] M. Jelinski, K. Hamacher, H.H. Coenen *Nuklearmedizin*, **38**, S. A22, V18 (1999)
- [47] W. Hamkens, F. Rösch, *FDG: Biochemisches Konzept und radiochemische Synthese*, in H. Wieler (Herausgeber), *PET in der klinischen Onkologie*, Steinkopff Verlag Darmstadt (1999), S.59
- [48] T. Shoup, J. Olson, J. Hoffman, J. Votaw, D. Eshima, L. Eshima, V. Camp, M. Stabin, D. Votwa, M. Godman, *J. Nucl. Med.*, **40** (1999), 331

- [49] H.-J. Wester, M. Herz, W. Weber, P. Heiss, R. Senekowitsch-schmidtke, M. Schweiger, G. Stöcklin, *J. Nucl. Med.*, **40**, 205 (1999)
- [50] F. Rösch, Aktuelle Entwicklungen [¹⁸F]-markierter onkologischer PET-Tracer, in H. Wieler (Herausgeber), *PET in der klinischen Onkologie*, Steinkopff Verlag Darmstadt; 71 (1999);
- [51] B. Wolf, Diplomarbeit, Universität Mainz (1999)
- [52] P. Laverman, O. C. Boerman, F. Corstens, W. Oyen, *Eur. J. Nucl. Med.* **29**: 681-690 (2002)
- [53] R. M. Johnstone, P. G. Scholefield, *Adv. Cancer Res.* /bf 9 ; 143-226 (1965)
- [54] A. L. Lehninger, *Biochemistry* 2nd end. New York; Worth (1976)
- [55] T. Miyagawa, T. Oku, H. Uehara, R. Desai, B. Beattie, J. Tjuvajev, R. Blasberg, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 500 (1998)
- [56] R. Gatenby et. al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **14**, 831 (1988)
- [57] B. Wängler, *Wissenschaftliche Prüfungsarbeit*, Universität Mainz (2002)
- [58] V. Stollorz, *Ein Etappensieg gegen den Tumor*, Frankfurter Allgemeine Sontagszeitung, 08.06.2003, 57
- [59] P. L. Jager, W. Vaalburg, J. Puruim, E. deVries, K.-J. Langen, D. A. Piers, *J. nucl. Med.*, **42**, 432 (2001)
- [60] J. McConathy, L. Martarello, E. Malveaux, V. Camp, N. Simpson, C. Simpson, G. Bowers, J. Olson, M. Goodman, *J. med. Chem.*, **45**, 2240 (2002)
- [61] J. McConathy, L. Martarello, E. Malveaux, V. Camp, N. Simpson, C. Simpson, G. Bowers, Z. Zhang, J. Olson, M. Goodman, *Nucl. Med. Biol.*, **30**, 477 (2003)
- [62] M. Herz, P. Heiss, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Scheiger, G. Stöcklin, *Nuklearmedizin*, Abstract P136, A 100 (2003)
- [63] A. Becherer, G. Karanikas, M. Szabo, G. Zettiing, S. Asenbaum,, C. Marosi, C. Henk, P. Wunderbaldinger, T. Czech, W. Wadsak, K. Kletter, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **30**, 1561 (2003)
- [64] B. Beuthien-Baumann, J. Bredow, W. Burchert, F. Fächter, R. Bergmann, H.-D. Alheit, G. Reiss, R. Hliscs, R. Steinmeier, W.-G. Franke, B. Johannsen, J. Kotzerke, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **30**, 1004 (2003)
- [65] G. Tang, X. Tang, M. Wang, L. Luo, M. Gan, *Appl. Radiat. Isot.*, **60**, 27 (2004)
- [66] K. Hamacher, H. H. Coenen, *Appl. Radiat. Isot.*, **57**, 853 (2002)
- [67] W. Weber, H.-J. Wester, L. A. Grosu, M. Herz, B. Dzewas, H.-J- Feldmann, M. Molls, G. Stöcklin, M. Schweiger, *Eur. J. Nucl. Med.*, **27**, 542 (2000)
- [68] A. Kaim, B. Weber, M. Kurrer, G. Westera, A. Schweitzer, J. Gottschalk, G. von Schulthess, A. Buck, *Eur. J. Nucl. Med.*, **29**, 648 (2002)
- [69] F. Rau, W. Weber, H.-J. Wester, M. Herz, I. Becker, A. Krüger, M. Schweiger, R. Senekowitsch-Schmidtke, *Eur. J. Nucl. Med.*, **29**, 1039 (2002)
- [70] P. Heiss, S. Mayer, M. Herz, H.-J. Wester, M. Schweiger, R. Senekowitsch-Schmidtke, *J. Nucl. Med.* **39**, 325 (1998)

- [71] Y. Imahori, S. Ueda, Y. Ohmori, T. Kusuki, K. Ono, R. Fujii, T. Ido, *J. Nucl. Med.* **40**, 1367 (1999)
- [72] H.-J. Wester, M. Herz, W. Weber, P. Heiss, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Sschweiger, G. Stöcklin, *J. Nucl. Med.*, **40**, 205 (1999)
- [73] H.-E. Wang, A.-H. Liao, W.-P. Deng, P.-F. Chang, J.-C. Chen, F.-D. Chen, R.-S. Liu, J.-S. Lee, J.-J. Hwang, *J. Nucl. Med.*, **45**, 302 (2004)
- [74] D. Kiesewetter, M. Sassamann, J. Robbins, E. Jagoda, R. Carson, N. Appel, E. Suttkowski, P. Herscivitch, A. Braun, W. Eckelman, *Journal of fluorine Chemistry*, **101**, 297 (2000)
- [75] K. W. Laue, *Dissertation*, Universität Münster (1998)
- [76] C. Papageorgiou, X. Borer, R. French, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **4**, 267 (1994)
- [77] L. Varagnolo, M. Stekkel, U. Mazzi, E. Pauwels, *Nuclear Medicine and Biology*, **27**, 103 (2000)
- [78] K. Laue, S. Kröger, E. Wegelius, G. Haufe, *Eur. J. Org. Chem.*, 3737 (2000)
- [79] K. Laue, G. Haufe, *Synthesis*, 1453 (1998)
- [80] B. Löhr, H. Kunz, *Dissertation*, Universität Mainz, (1998)
- [81] B. Löhr, S. Orlich, H. Kunz, *Synlett*, **7**, 1139 (1999)
- [82] U. Schöllkopf, U. Groth, C. Deng, *Angew. Chem.* , **93**, 793 (1981)
- [83] U. Schöllkopf, H. Neubauer, *Synthesis Communications*, 861 (1982)
- [84] C. Ma, X. He, X. Liu, S. Yu, S. Zhao, J. Cook, *Tetrahedron Letters*, **40**, 2917 (1999)
- [85] G. Haufe, S. Kröger, *Aminoacids*, **11**, 409 (1996)
- [86] K. Kubota, K. Ishiwata, R. Kubota, S. Yamada, J. Takahashi, Y. Abe, H. Fukama, T. Ido, *J. med. Chem.* , **37**, 320 (1996)
- [87] K. Ishiwata, K. Kubota, M. Murakami, R. Kubota, T. Sasaki, S. Ishii, M. Senda, *J. med. Chem.* , **34**, 1936 (1993)
- [88] H.H. Coenen, P. Kling, G. Stöcklin, *J. Nucl. Med.* , **30**, 1367 (1989)
- [89] K. Wienhard, K. Herholz, H.H. Coenen, J. Rudolf, P. Kling, G. Stöcklin, W. D. Heiss, *J. med. Chem.* , **32**, 1338 (1991)
- [90] S. Amano, T. Inoue, K. Tomiyoshi, T. Ando, K. Endo, *J. med. Chem.* , **39**, 1424 (1998)
- [91] K.L. Langen, H.H. Coenen, N. Roosen, P. Kling, O. Muzik, H. Herzog, T. Kuwert, G. Stöcklin, *J. med. Chem.* , **31**, 281 (1990)
- [92] H. Watanabe, T. Inoue, T. Shinizaki, T. Yanagawa, A.R. Ahmed, K. Tomiyoshi, N. Oriuchi, M. Tokunaga, J. Aoki, K. Endo, K. Takagishi, *Eur. J. Nucl. Med.* , **27**, 1509 (2000)
- [93] M. Schreckenberger, C. Kandalie, A. Enk, H.G. Buchholz, T. Siessmeier, S. Both, J. Brockmann, F. Rösch, P. Bartenstein, *J. med. Chem.* , **42**, 30 (2001)
- [94] P. Heiss, S. Mayer, M. Herz, H.J. Wester, M. Schweiger, R. Senekowitsch-Schmidtke, *J. med. Chem.* , **40**, 1367 (1999)

- [95] J. R. Barrio, S. C. Hunag, M. E. Phelps, *Biochem Pharmacol*, **54**, 341 (1997)
- [96] M.M. Graham, *J Nucl Med*, **42**, 257 (2001)
- [97] M. Murakami, K. Takahashi, Y. Kondo, S. Mizusawa, H. Nakamitchi, H. Sasaki, E. Hagami, H. Iida, I. Kanno, S. Mirura, K. Uemura, *J Labelled Cpd Radiopharm*, **25**, 573 (1988)
- [98] H. J. Wester, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Schweiger, G. Stöcklin, K. Hamacher, *Nucl Med Biol*, **26**, 259 (1999)
- [99] S. Kröger, G. Haufe, *Liebigs Ann./Recueil*, 1201 (1997)
- [100] W. H. Kruizinga, J. Bolster, R. M. Kellog, J. Kamphuis, W. H. J. Boesten, E. M. Meijer, H. E. Schoemaker, *J. Org. Chem.*, **53**, 1826 (1988)
- [101] S. Yamada, T. Oguri, T. Shioiri, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 136 (1976)
- [102] J.Kirsten, M. Piel, F. Rösch, Diplomarbeit, Universität Mainz (2002)
- [103] Hocke, H. H. Coenen, Dissatation, Köln (2001)
- [104] J. H. Sherley, T. L. Kelly, *J. Biol. Chem.*, **263**, 8350 (1988)
- [105] K. Ishiwata, K. Kawamura, W.-F. Wang, S. Furumoto, K. Kubota, C. Pasali, A. Bogni, R. Iwata, *Nucl. Med. Biol.*, **31**, 191 (2004)
- [106] G. Förster, T. Held, P. Bartenstein, Jahresbericht der IAK-PET Mainz (2001)

8 Anhang

A Abkürzungen

5-FU	5-[¹⁸ F]Fluoruracil
A	Adenosin
ACPC	Amino-cyclopentan-carbonsäure
Boc	Butyloxycarbonyl
Cbz	Kohlensäurebenzylester
cis-FP	cis-[¹⁸ F]Fluor-L-Prolin
DMBH	Dimethoxybenzhydrol
F-DHF	11 β -Fluor-5 α -Dihydrotestosteron
FDG	2-[¹⁸ F]Fluor-2-desoxy-D-glukose
FET	O-(2-[¹⁸ F]Fluorethyl)-L-tyrosin
FLT	3'-Deoxy-3'-[¹⁸ F]Fluorthymidin
FMISO	[¹⁸ F]Fluormisonidazol
FMT	L-3-[¹⁸ F]Fluor- α -methyltyrosin
FPA	L-2-[¹⁸ F]Fluorphenylalanin
G	Guanosin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LDA	Lithium-Diisopropylamind
Mes	Mesylat
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RCA	Radiochemische Ausbeute
ROI	Region of Interest
Tf	Trifluormethansulfonsäure
Tos	p-Toluolmethansulfonsäure
VEGF	vascular endothelial growth factor