

**Synthese und radioaktive Markierung potentieller
PET- bzw. SPECT-Liganden zur Quantifizierung und
Visualisierung der pankreatischen β -Zell-Masse**

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

vorgelegt von
Slobodan Comagic, geb. in Eltville

Mainz, 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Radionuklide in den Lebenswissenschaften	1
1.2	PET	2
1.2.1	β^+ -Zerfall/ Isotope/ Detektoren	2
1.2.2	Produktion von ^{18}F	6
1.2.2.1	Kernchemische und kinetische Aspekte von [^{18}F]Fluorierungen	8
1.2.3	Verfahren zur ^{18}F -Markierung organischer Moleküle	11
1.2.3.1	Elektrophile Fluorierung mit ^{18}F	11
1.2.3.2	Nukleophile Fluorierung mit ^{18}F	13
1.2.3.3	Fluorierung über prosthetische Gruppen	15
1.3	SPECT	17
1.3.1	γ -Zerfall/ Isotope/ Detektoren	17
1.3.2	Produktion/ Generatorsystem $^{99}\text{Mo}/ ^{99\text{m}}\text{Tc}$	18
1.3.3	Technetiummarkierungen in der radiopharmazeutischen Chemie	19
1.3.4	$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Komplexe	22
1.4	Diabetes Mellitus (SUR1-Rezeptor, klinische Aspekte und SUR1-Liganden)	24
2	Problemstellung	30
3	Ergebnisse und Diskussion	33
3.1	Radioaktive Markierung und Evaluierung eines ^{18}F -markierten Nateglinid-Derivates	33
3.1.2	Synthese des Markierungsvorläufers 3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-propionsäure	33
3.1.3	Synthese von N-(trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-tosylethyl)-D-tyrosin-benzylester zur direkten radioaktiven Markierung mit [^{18}F]Fluorid	35
3.1.3.1	Ytterbium(III)-katalysierte Tosylierung von ausgewählten Alkoholen	36

3.1.4	Synthese der nicht-radioaktiven Standardverbindung N-(trans-4-iso-propyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin zur <i>in vitro</i> -Evaluierung	40
3.1.5	¹⁸ F-Fluorierungen	41
3.1.5.1	Radioaktive ¹⁸ F-Direktfluorierung des Markierungsvorläufers (9)	41
3.1.5.2	Markierung von 3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-propionsäure (8) mittels 2-[¹⁸ F]Fluor-ethyl-tosylat	42
3.2	Markierungen mit ^{99m} Tc	47
3.2.1	N-{4-[^{99m} Tc(I)-tricarbonyl-N,N-bis(carboxymethyl)aminoethyl]-5-chlorbenzol-carboxamidoethyl]-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexylharnstoff-Natriumsalz (^{99m} Tc-Glibenclamid-Natriumsalz)	47
3.2.1.1	Synthese des Chelators N,N-Bis[tert.-butoxycarbonyl)methyl]-2-bromethylamin (14) zur Konjugation an das Glibenclamid und Komplexierung mit ^{99m} Tc(CO) ₃	48
3.2.1.2	Synthese des Markierungsvorläufers N-{4-[N,N-bis-(carboxymethyl)-aminoethyl]-5-chlorbenzol carboxamido]-ethyl}-benzol-sulfonyl-N'-cyclohexylharnstoff-tri-Natriumsalz	48
3.2.1.3	Synthese des nicht-radioaktiven Re-Analogons N-{4-[Re(I)-tri-carbonyl-N,N-bis(carboxymethyl)-aminoethyl]-5-chlor-benzol-carboxamido-ethyl]-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexylharnstoff-Natriumsalz (23)	50
3.2.1.4	Radioaktive Markierung von N-{4-[N,N-bis-(carboxymethyl)-amino-ethyl]-5-chlorbenzol-carboxamido]ethyl}-benzol-sulfonyl-N'-cyclo-hexylharnstoff-tri-Natriumsalz (13) mittels des <i>fac</i> -[^{99m} Tc(I)(OH ₂) ₃ (CO) ₃] ⁺ -Komplexes	51
3.3.	Evaluierungen	54
3.3.1	Affinitäten	54
3.3.2	Lipophilien	57
3.3.3	<i>in vitro</i> -Evaluierungen	59
3.3.4	<i>in vivo</i> -Untersuchungen	61

4	Experimenteller Teil	63
4.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	63
4.2	Standardverbindungen und Markierungsvorläufer	68
4.2.1	Darstellung der inaktiven Fluor-Verbindungen	68
4.2.1.1	2-[(4-Isopropyl-cyclohexancarboxyl)-amino]-3-phenyl-propion- säure (1)	68
4.2.1.2	4-Isopropyl-cyclohexan-carbonsäure (3)	69
4.2.1.3	cis-4-Isopropyl-cyclohexan-carbonsäure-methylester (4)	69
4.2.1.4	trans-4-Isopropyl-cyclohexan-carbonsäure (5)	70
4.2.1.5	2-Benzoyloxy-1-(4-hydroxy-benzyl)-2-oxo-ethyl-ammonium-toluol -4-sulfonat (6)	71
4.2.1.6	3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(trans-isopropyl-cyclohexan-carboxyl)- amino]-propionsäure-benzylester (7)	72
4.2.1.7	3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(4-isopropyl-cyclohexan-carboxyl)- amino]-propionsäure (8)	73
4.2.1.8	N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexan-carboxyl)-O-(2-tosylethyl)-D-tyrosin- benzylester (9)	74
4.2.1.9	3-[4-(2-Hydroxy-ethoxy)-phenyl]-2-[(4-isopropyl-cyclohexan- carboxyl)-amino]-propionsäure-benzylester (10)	75
4.2.1.10	3-[4-(2-Fluor-ethoxy)-phenyl]-2-[(4-isopropyl-cyclohexan- carboxyl)-amino]-propionsäure-benzylester (11)	76
4.2.1.11	3-[4-(2-Fluor-ethoxy)-phenyl]-2-[(4-isopropyl-cyclohexan- carboxyl)-amino]-propionsäure (12)	77
4.2.2	Darstellung der inaktiven Rhenium-Verbindungen	78
4.2.2.1	[(2-Brom-ethyl)-tert.-butoxycarbonylmethyl-amino]-essigsäure- tert.-butylester (14)	78
4.2.2.2	5-Chlor-2-hydroxy-benzoesäure-benzylester (15)	79
4.2.2.3	2-[2-(Bis-tert.-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethoxy]-5-chlor-ben- zoesäure (17)	80
4.2.2.4	[tert.-Butoxycarbonylmethyl-(2-{4-chlor-2-[2-(4-sulfamoyl-phenyl)- ethylcarbamoyl]-phenoxy}-ethyl)-amino]-essigsäure-tert.- butylester (18)	81

4.2.2.5	[tert.-Butoxycarbonylmethyl-(2-{4-chlor-2-[2-(4-benzolsulfonyl-N'-cyclohexylharnstoff)-ethylcarbamoyl]-phenoxy}-ethyl)-amino]-essigsäure-tert.-butylester (19)	82
4.2.2.6	N-{4-[N,N-bis-(carboxymethyl)-aminoethyl]-5-chlorbenzol-carbox-amidoethyl}-benzol-sulfonyl-N'-cyclohexylharnstoff-tri-Natriumsalz (21)	83
4.2.2.7	N-{4-[Re(I)-tricarbonyl-N,N-bis(carboxymethyl)amino-ethyl]-5-chlor-benzol-carbox-amidoethyl}-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexyl-harnstoff-Natriumsalz (23)	84
4.3	Radiosynthesen	85
4.3.1	Herstellung einer [¹⁸ F]Fluoridlösung	85
4.3.2	Direktsynthesen mit [¹⁸ F]Fluorid	86
4.3.3	Synthese von 2-[¹⁸ F]Fluorethyltosylat	87
4.3.4	Radiosynthesen mit 2-[¹⁸ F]Fluorethyltosylat	88
4.3.5	Synthese des <i>fac</i> -[^{99m} Tc(I)(CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺ -Komplexes	89
4.3.6	Radiosynthesen mit dem <i>fac</i> - ^{99m} Tc(I)(CO) ₃ (H ₂ O) ₃ ⁺ -Komplex	90
4.4	Affinitäten	91
4.5	Bestimmung der Lipophilien	91
4.5.1	N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin	93
4.5.2	N-{4-[^{99m} Tc-(I)-tricarbonyl-N,N-bis-(carboxymethyl)-amino-ethyl]-5-chlorbenzol-carbox-amido-ethyl}-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexyl-harnstoff-Natriumsalz	95
4.6	<i>in vitro</i> -Evaluierungen	95
4.6.1	N-(trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin	95
4.6.2	N-{4-[Re-(I)-tricarbonyl-N,N-bis-(carboxymethyl)-amino-ethyl]-5-chlorbenzol-carbox-amido-ethyl}-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexyl-harnstoff-Natriumsalz	96
4.7	Tierexperimente	96
5	Zusammenfassung	98
6	Literatur	105
Anhang		

Abstract

Due to the ongoing efforts in transplanting β -cell mass there is also a great medical interest in specific β -cell imaging agents to quantify the acceptance of transplanted islets in humans *in vivo*. Additionally, in the context of type 1 diabetes mellitus the chronic and progressive loss of β -cells caused by autoimmune destruction has led to concerted efforts to prevent further loss of β -cells by autoantigen-specific immunotherapy of pre-diabetic patients. nateglinide and glibenclamide are SUR1 ligands used to stimulate insulin secretion in type 2 diabetic patients. They bind to a class of molecules known as the ATP-sensitive potassium channels, located on the insulin producing β -cells of the islets of Langerhans and are therefore excellent candidates as β -cell specific tracers. To obtain a precursor for a direct labelling of nateglinide with [^{18}F]fluoride, the aromatic system of the phenylalanine structure element was derivatised to obtain a phenolic OH-group in 4-position which is capable of further derivatisation. The formed phenylether N-(trans-4-isopropylcyclohexanecarbonyl)-O-(2-hydroxyethyl)-D-tyrosin benzylester was tried to be tosylated according to several literature procedures but none of them was applicable. The catalytic influence of ytterbium(III)triflate in the reaction of toluenesulfonic acid anhydride and the alcohol was investigated. It was found that Yb(III) facilitates the tosylation of the alcohol under non-basic conditions and was extended to the tosylation of a great variety of different alcohols to prove its applicability in general. The radioactive labelling of N-(trans-4-isopropyl-cyclohexanecarbonyl)-O-(2-[^{18}F]fluoroethyl)-D-tyrosine with [^{18}F]F $^-$ / Kryptofix $^{\text{®}}$ 222/ K_2CO_3 -system was achieved in radiochemical yields (RCY) of 10 % after deprotection with Pd/ C and H_2 . In addition to the direct labelling approach, a labelling procedure applying 2[^{18}F]fluoroethyltosylate and N-(trans-4-isopropyl-cyclohexanecarbonyl)-D-tyrosin was performed in 40 % RCY. Unfortunately the determination of the K_D value of N-(trans-4-isopropylcyclohexanecarbonyl)-O-(2-fluoroethyl)-D-tyrosine revealed a significant decrease in affinity compared to original nateglinide.

The *in vivo* evaluation of some ^{18}F -labelled glibenclamide derivatives in humans and animals revealed that longer measuring times are warranted because a high liver uptake spoils the data acquisition and the activity washout proceeds very slowly. Therefore glibenclamide was labelled with a radioisotope with a longer half life such as $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($t_{1/2} = 6 \text{ h}$) to lengthen the possible time frame for image acquisition. The synthesis of a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ labelled hydrophilic glibenclamide derivative was performed. It is hoped that glibenclamide is internalised into the β -cell and there binds to the 95 % of intracellular SUR-1 receptors with eventual metabolisation and thus trapping in the cell. The K_D -value of the corresponding Re-compound was determined to be 0.5 nM and the insulin secretion properties were similar to those of original glibenclamide. The labelling precursor N-{4-[N,N-bis-(carboxy-methyl)-aminoethyl]-5-chlorobenzene-carboxamido]-ethyl}-benzene-sulfonyl-N'-cyclohexyl urea tris sodium salt was reacted with [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3$] Cl to yield the final N-{4-[$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ -tricarbonyl-N,N-bis-(carboxymethyl)-aminoethyl]-5-chlorobenzene-carboxamidoethyl]-benzene-sulfonyl}-N'-cyclo-hexyl-urea sodium salt in 70% RCY.

1 Einleitung

1.1 Radionuklide in den Lebenswissenschaften

Den meisten Anwendungen von Radionukliden in den Naturwissenschaften liegt das Tracerkonzept zugrunde, welches auf Erkenntnissen des ungarischen Chemikers Georg de Hevesy (1885-1966) basiert, der 1943 dafür den Nobelpreis verliehen bekam. Er untersuchte u. a. den Metabolismus von Pflanzen mit radioaktivem ^{212}Pb , indem er deren Nährlösung mit dem Radioisotop versetzte. Weitere Versuche wurden an Hasen mit Blei- und Wismut-Isotopen durchgeführt [1].

De Hevesy erkannte als erster die Bedeutung radioaktiver Isotope als Indikatoren für die Aufklärung physiologischer Prozesse, welche es ermöglichen, einen chemischen und biochemischen Vorgang *in vivo* zu verfolgen, ohne ihn dabei zu beeinflussen. Auf diesem Tracerkonzept beruhend ist heute der Einsatz künstlich erzeugter Radionuklide zur Grundlage verschiedener analytischer, diagnostischer und therapeutischer Verfahren geworden.

Auch finden sich Anwendungen in der Organischen Chemie (Aufklärung komplexer Reaktionsabläufe mit ^{14}C - und ^3H -Markierungen) [2], und speziell in der Biochemie, wo durch die Markierung endogener oder exogener Substrate eine Aufklärung des Metabolismus möglich ist [3].

Mittels verschiedener moderner diagnostischer Verfahren, wie z.B. Einzel-Photonen-Emissions-Tomographie (SPECT) oder Positronen-Emissions-Tomographie (PET), können durch Einsatz entsprechender radioaktiver Verbindungen komplexe Stoffwechselprozesse *in vivo* verfolgt und quantifiziert werden [4].

1.2 PET

1.2.1 β^+ -Zerfall/ Detektoren/ Isotope

Die Nuklearmedizin verfügt über computergesteuerte bildgebende Verfahren, die auf der Verwendung von Positronen- und Photonen-emittierenden Radionukliden beruhen: die Positronen-Emissions-Tomographie (englisch: positron emission tomography, PET) und die Einzel-Photonen-Emissions-Tomographie (englisch: single photon emission computer tomography, SPECT).

Die PET erlaubt es aufgrund der Verwendung von (kurzlebigen) Positronenstrahlern, biochemische Prozesse regional *in vivo* auch quantitativ zu erfassen [5]. Hieraus erklärt sich die Sonderstellung der PET im Vergleich zu anderen bildgebenden Verfahren in der Medizin (z.B. invasive Audioradiographie, Kernspintomographie (MR), Röntgen-Computer-Tomographie (CT) oder die bereits erwähnte SPECT). Möglich wird dies durch die Zerfallscharakteristik eines Positronenstrahlers. Der Zerfallsprozess eines Positronenstrahlers und der ortsabhängige Nachweis der Vernichtungsstrahlung durch γ - γ -Koinzidenz sind in Abbildung 1 dargestellt [6].

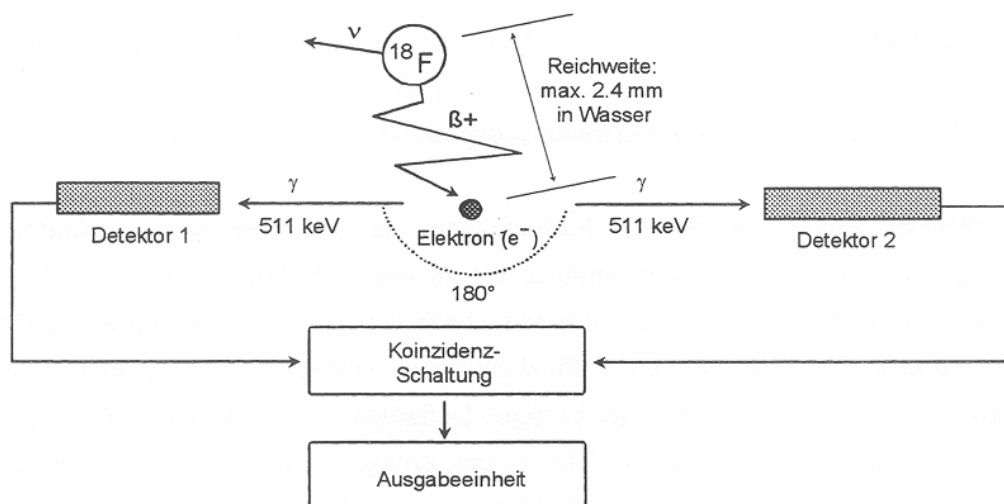


Abbildung 1: Schema der Positronenvernichtung und der γ - γ -Koinzidenz

Bei Positronenstrahlern zerfällt ein Proton in ein Neutron, wobei gleichzeitig ein Positron (β^+) und ein Elektronenneutrino (ν_e) emittiert werden. Das Positron verliert auf sehr kurzem Wege durch elastische Stöße mit seiner Umgebung Energie und recombiniert dann mit seinem Antiteilchen, dem Elektron, zu einem Positronium [7].

Hier wird die Ruhemasse der beiden Teilchen in zwei 511 keV γ -Quanten umgewandelt, welche unter einem Winkel von 180° emittiert werden. Diese Zwei-Quanten-Vernichtungsstrahlung macht man sich aufgrund ihres festen Emissionswinkels zur ortsabhängigen Aktivitätsdetektion zu Nutze. Die Detektion erfolgt mittels gegenüberliegender Detektoren, die nur dann ein Zerfallsereignis registrieren, wenn auf beide Detektoreinheiten während eines Zeitintervalls von ca. 10 ns ein γ -Quant trifft (Koinzidenzschaltung).

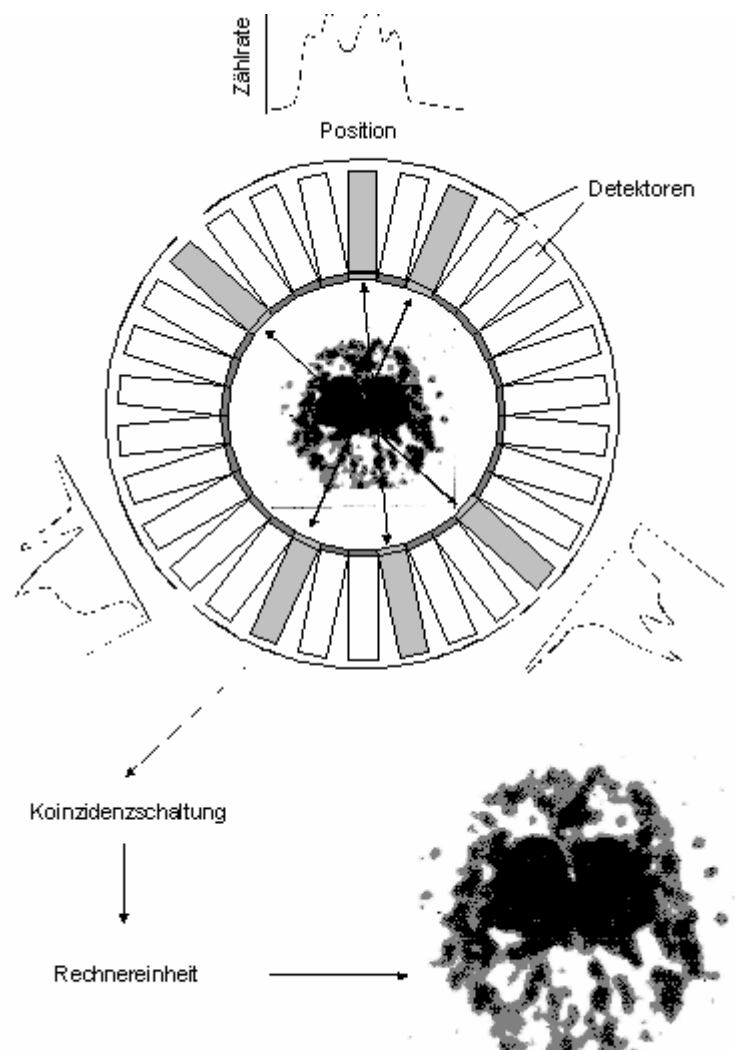


Abbildung 2: Schema des Messprinzips eines PET

In modernen PET-Kameras sind die Detektoren (LSO, BGO) ringförmig und in mehreren Lagen angeordnet. Diese Detektorsysteme erlauben es, Projektionen der Aktivitätsverteilung unter verschiedenen Winkeln darzustellen.

Durch die rechnergestützte Datenerfassung und Datenverarbeitung ist es möglich, Schnittbilder von Organen darzustellen und die regionale Aktivitätsverteilung mit der Zeit zu bestimmen. So können physiologische oder biochemische Prozesse nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ nicht-invasiv erfasst werden [8].

Um die Strahlendosis für den Patienten möglichst niedrig halten zu können, benötigt man Isotope, welche zu einem hohen Prozentsatz durch Positronenemission und mit kurzer Halbwertszeit zerfallen. Bei schweren Kernen existiert neben der Positronenemission eine Konkurrenzreaktion, der Elektroneneinfang (englisch: electron capture, EC). Dieser dominiert mit zunehmender Ordnungszahl, so dass die Zahl der geeigneten Positronenemitter für PET recht gering ist. In Tabelle 1 werden die wichtigsten Positronenstrahler für PET aufgelistet.

Tabelle 1: Wichtige Positronenemitter für PET [9]

Nuklid	Halbwertszeit (HWZ)	Zerfallsart (%)	$E_{\beta^+_{max}}$	Reichweite (H ₂ O)	Vorteile	Nachteile
¹¹ C	20,3 min	β^+ 99,8 EC 0,2	0,96 MeV	4,1 mm	Isotopentracer, hoher β^+ -Anteil	kurze HWZ
¹³ N	9,96 min	β^+ 100	1,19 MeV	5,4 mm	Isotopentracer, hoher β^+ -Anteil	sehr kurze HWZ
¹⁵ O	2,03 min	β^+ 99,9 EC 0,1	1,70 MeV	8,2 mm	Isotopentracer, hoher β^+ -Anteil	sehr kurze HWZ
¹⁸ F	109,7 min	β^+ 96,9 EC 3,1	0,63 MeV	2,4 mm	niedrige β^+ -Energie, hoher β^+ -Anteil ausreichende HWZ	nur selten Isotopentracer, meist Analogtracer
⁶⁴ Cu	12,7 h	β^+ 20 β^- 39 EC 41	0,57 MeV	2,4 mm	niedrige β^+ -Energie	geringer β^+ -Anteil
⁷⁶ Br	16,7 h	β^+ 66,5 EC 33,5	3,60 MeV	15,5 mm	HWZ für Tiermodelle geeignet	aufwendige Produktion, lange HWZ

Für nuklearmedizinische Anwendungen müssen die Radionuklide in biochemisch relevante Moleküle eingeführt werden, wodurch sogenannte Tracerverbindungen entstehen. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten von Tracern, Isotopentracer und Analogtracer.

Physiologisch relevante Moleküle bestehen in der Regel aus C, N, und O, so dass die entsprechenden Radionuklide ¹¹C, ¹³N und ¹⁵O für die Synthetisierung sogenann-

ter Isotopentracer besonders geeignet scheinen, da ihre biochemischen Eigenschaften identisch mit den nicht-radioaktiven Molekülen sind.

Bei den Analogtracern entstehen durch die Substitution mit Radionukliden wie ^{18}F in der Regel chemisch nicht-identische Moleküle. Bei dem Einsatz von ^{18}F wird durch Modifikation des ursprünglichen Moleküls die Verbindung chemisch verändert. Sie kann somit nur dann nuklearmedizinische Anwendung finden, wenn das biochemische Verhalten des Radiopharmakons dem des Originalmoleküls weitgehend entspricht (Analogtracer).

Für die Auswahl eines PET-Radionuklids sind primär verschiedene kernphysikalische Parameter relevant wie z. B. die Halbwertszeit, die maximale Positronenenergie ($E_{\beta^+ \text{max.}}$) sowie die eventuelle Zerfallscharakteristik des Tochternuklids. Weitere Kriterien für die zu verwendenden Radionuklide sind Isotopenreinheit, schnelle Verfügbarkeit und die Wirtschaftlichkeit in Form von Herstellungs- und Transportkosten.

Hervorgehoben werden muss die Bedeutung der Halbwertszeit, da nur solche Stoffwechselprozesse mittels eines bestimmten PET-Nuklids untersucht werden können, die in der Größenordnung von ca. 4-5 physikalischen Halbwertszeiten ablaufen. Isotope mit sehr kurzer Halbwertszeit können nur für die Untersuchung sehr schneller Stoffwechselprozesse eingesetzt werden. Deshalb verwendet man beispielsweise ^{15}O und ^{13}N in der Regel nur zur Darstellung leicht synthetisierbarer und zu reinigender Moleküle wie $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ oder $[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$ [10], welche dann auch eine sehr schnelle Bioverfügbarkeit erzielen.

Das Kohlenstoffisotop ^{11}C ist das erste Positronen-emittierende Radionuklid, mit dem komplexe organische Synthesen durchgeführt werden können. Der Vorteil der so radioaktiv markierten Tracer ist, dass sie mit den nicht-radioaktiv markierten Molekülen absolut identisch sind und somit die gleichen pharmakologischen Parameter besitzen. Obwohl prinzipiell Analogtracer führend sind, bietet ^{18}F insofern gute Voraussetzungen, da es einen ähnlichen sterischen Raumbedarf wie Wasserstoff bzw. eine Hydroxylgruppe hat (Fluor besitzt mit einem van-de-Waals-Radius von 1,35 Å einen dem Wasserstoff (1,20 Å) ähnlichen Atomradius, aus der sich die sterische Analogie von F und H erklärt). Auf dieser Tatsache beruht die Entwicklung der meisten ^{18}F -markierten aromatischen Verbindungen.

Durch diese F-Substitution werden dennoch die chemischen Eigenschaften der Verbindung verändert, was durch die sehr unterschiedlichen Elektronegativitäten (E_N) der beiden Atome (für Fluor E_N 4,1 und für Wasserstoff E_N 2,2) bedingt ist.

Ein weiteres Analogieprinzip für die Einführung von Fluor in ein Molekül besteht in der Substitution von Hydroxylgruppen. Das Prinzip dieser Methode liegt in der ähnlichen Bindungslänge zwischen der C-F-Bindung und der C-OH-Bindung von 1.30 Å begründet. Auch ähneln sich diese beiden Gruppen in der Ladungsdichte sowie in der bereits erwähnten Analogie des Bindungsverhaltens, z.B. bildet Fluor eine Wasserstoffbrückenbindung aus. Dies ist insofern bedeutsam, als in biochemischen Prozessen solche Wechselwirkungen oft eine entscheidende Rolle spielen.

Obwohl es die genannten Gemeinsamkeiten gibt, kann es bei Substitutionen zu Veränderungen im Metabolismus einer Substanz kommen, welche jedoch nicht immer nachteilig sein müssen. Dies wird am Beispiel der 2-[¹⁸F]Fluordesoxy-D-glukose (2-[¹⁸F]FDG) deutlich. Hier wird die Hydroxylgruppe in 2-Position gegen Fluor substituiert (Abbildung 3), was zur Folge hat, dass das Molekül von den Zellen zwar aufgenommen und phosphoryliert, aber aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe nicht weiter metabolisiert wird. Da das 2-[¹⁸F]FDG-6-Phosphat die Zelle nicht mehr verlassen kann, ist das ¹⁸F-markierte Molekül in der Zelle „getrappt“, es kommt zu einer Aktivitätsakkumulation.

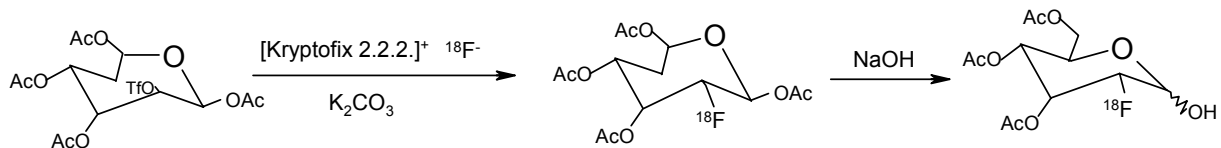


Abbildung 3: Schema der 2-[¹⁸F]FDG-Synthese

1.2.2 Produktion von ¹⁸F

Die anfängliche Herstellung von [¹⁸F]Fluor an einem Kernreaktor über die ⁶Li(n,α)³H und ¹⁶O(³H,n)¹⁸F ist seit 1980 überholt und wurde durch die Herstellung am Teilchenbeschleuniger abgelöst. Hierbei ist je nach Kernreaktion das [¹⁸F]Fluor in zwei unterschiedlichen chemischen Formen erhältlich: in einer nukleophilen ungeträgerten Form, als [¹⁸F]⁻Fluorid_{aq}, oder als elektrophiles, geträgertes [¹⁸F]F₂. Von den vielen verschiedenen Möglichkeiten ¹⁸F darzustellen, sind in Tabelle 2 die heute vier Bedeutendsten aufgeführt.

Tabelle 2: Kernreaktionen zur Produktion von [¹⁸F]Fluor im Zyklotron [11]

Kernreaktion	Target	Chemische Form des Fluors	Spezifische Aktivität [GBq/mmol]
$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	$\text{H}_2\text{}^{18}\text{O}$	$[^{18}\text{F}^-]\text{F}^-_{\text{aq}}$	bis zu 37×10^5
$^{16}\text{O}(^3\text{He},p)^{18}\text{F}$	H_2O	$[^{18}\text{F}^-]\text{F}^-_{\text{aq}}$	bis zu 37×10^5
$^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$	Ne (0,1-0,2% F_2), 18 bar	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	37-370
$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}_2$, Kr (1% F_2), 20 bar	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	37-1850

Die Darstellung des nukleophilen Fluorides erfolgt im Wesentlichen über die $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ -Kernreaktion. Diese Kernreaktion besitzt einen höheren Wirkungsquerschnitt als die $^{16}\text{O}(^3\text{He},p)^{18}\text{F}$ -Reaktion [12].

Das hergestellte [¹⁸F]Fluorid wird nach der Bestrahlung an einem Anionenaustauscher gebunden und anschliessend mit einer wässrigen Kaliumcarbonatlösung eluiert.

Der schematische Aufbau eines Targets für die $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ -Reaktion kann aus der Abbildung 4 entnommen werden. Das [¹⁸O]H₂O wird nach der Bestrahlung photochemisch und destillativ gereinigt und zyklisch genutzt werden [13].

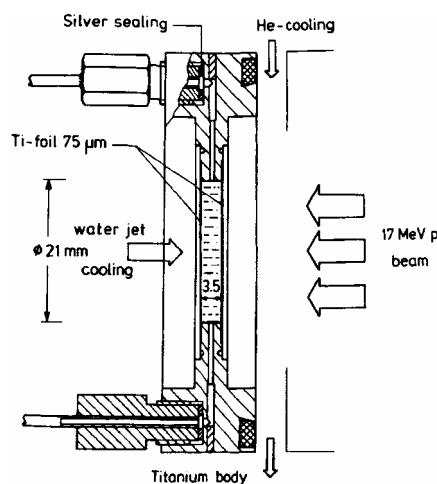


Abbildung 4: Aufbau eines Wasser-Target-Systems zur Produktion von [¹⁸F]Fluorid

Die Produktion des elektrophilen $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ verläuft entweder über die $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ - oder die $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ -Reaktion an Gastargets [14]. Das so gebildete ^{18}F lagert sich leicht an der Targetwand an, weshalb ^{18}F nur durch F_2 -Trägerzusatz als $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ aus dem Target gewonnen werden kann. Die spezifischen Aktivitäten sind deshalb deutlich geringer als bei der Herstellung von $[^{18}\text{F}]\text{F}^-_{\text{aq}}$ (siehe Tabelle 2).

1.2.2.1 Kernchemische und kinetische Aspekte von $[^{18}\text{F}]$ Fluorierungen

Kernchemische Aspekte

Im Zusammenhang mit dem Tracerprinzip ist besonders der Begriff der Trägerfreiheit von Bedeutung. Hierzu ist es erforderlich, den Begriff der spezifischen Aktivität zu definieren. Die spezifische Aktivität ist die Radioaktivität bezogen auf die Gesamtstoffmenge, die Angabe erfolgt in $[\text{GBq}/\text{mmol}]$, $[\text{Bq}/\text{g}]$ oder $[\text{Bq}/\text{ml}]$. Praktisch sind drei verschiedene Fälle zu unterscheiden:

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

Dieser Zustand der Trägerfreiheit ist nur bei künstlichen Elementen wie z.B. Astat-211 erreichbar, denn aufgrund der Allgegenwärtigkeit der natürlichen Elemente ist sonst immer eine gewisse Verunreinigung des Radioisotops mit stabilen Isotopen des selben Elementes gegeben. Wie stark diese Verunreinigung ist, hängt unter anderem von der Häufigkeit des Elements in der Umwelt ab.

Während die Verunreinigung von radioaktivem Kohlenstoff ^{14}C mit natürlichem Kohlenstoff das 10.000 fache übersteigen kann, liegt sie beim ^{18}F etwa nur um das 100 fache [15]. Da eine Aufnahme an isotopem Träger in der Praxis nicht völlig auszuschließen ist (bei der Synthese oder der Reinigung durch Gefäße, Targetmaterialien oder Luft), wird der Zustand der Trägerfreiheit (englisch: carrier-free, c.f.) hier nicht erreicht. Der gebräuchliche Begriff für Markierungssynthesen ist: „ohne zugesetzten Träger“ (englisch: no-carrier-added, n.c.a.). Bei manchen Reaktionen wird Träger absichtlich zugesetzt, um bestimmte Reaktionen durchzuführen oder um Nebenreaktionen zu vermeiden. Hier wird von einem geträgerten Zustand (englisch: carrier-added, c.a.) gesprochen.

Im Allgemeinen ist ein Trägerzusatz nicht erwünscht, da er die spezifische Aktivität stark erniedrigt. Einer hohe spezifische Aktivität ist besonders dann notwendig, wenn toxische bzw. zentral wirksame Radiopharmaka bearbeitet werden, da diese unterhalb ihrer wirksamen Dosis-Konzentration eingesetzt werden müssen.

Liegt ein Radiopharmakon in n.c.a.-Mengen vor, ist eine pharmakodynamische Wirkung nicht zu erwarten.

Kinetische Aspekte

Die allgemeine Formel für den Zerfall eines Isotops lautet:

$$A = \frac{dN}{dt} = N \times \lambda = \frac{N \ln 2}{T_{1/2}}$$

A: Aktivität

N: Teilchenanzahl

λ : Zerfallskonstante

$T_{1/2}$: Halbwertszeit

Bei einer radioaktiven Markierung handelt es sich um eine bimolekulare Reaktion, also um eine Reaktion 2. Ordnung:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [MV] \cdot [A] \quad \text{mit } -d[A] = d[P]$$

[A]: Eingesetzte Konzentration des Radionuklids

[P]: Konzentration des Produktes

[MV]: Konzentration des Markierungsvorläufers

Bei n.c.a.-Markierungen wird der Markierungsvorläufer im ca. 10^{10} fachen Überschuss gegenüber der Konzentration des Radionuklids eingesetzt. Somit kann man die Veränderung der Konzentration des Markierungsvorläufers vernachlässigen. Dies führt zu einem Reaktionsgesetz pseudo-erster Ordnung.

$$-\frac{dA}{dt} = k'[A] \quad \text{mit } k' = k \cdot [MV]$$

Damit ergibt sich für die Aktivität zum Zeitpunkt t:

$$\ln \frac{[A_t]}{[A_0]} = -k' \cdot t$$

$$[A_t] = [A_0] \cdot \exp(-k' \cdot t)$$

Mit $[A_0] = [P] + [A_t]$

$$[P] = [A_0] \cdot (1 - \exp(-k' \cdot t))$$

Trägt man die radiochemische Ausbeute gegen die Zeit auf, erhält man folgenden typischen Kurvenverlauf:

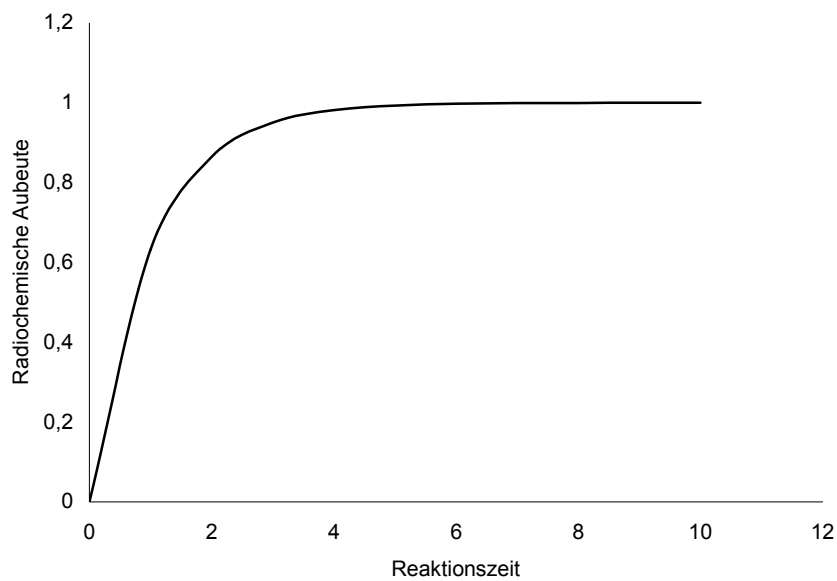


Abbildung 5: Theoretische radiochemische Ausbeutekurve von n.c.a.-Markierungen

k' bestimmt, wie groß die Anfangssteigung ist. k' setzt sich aus der Vorläuferkonzentration und der eigentlichen Geschwindigkeitskonstanten k zusammen. Je reaktiver der Markierungsvorläufer ist, um so größer ist die Anfangssteigung.

1.2.3 Verfahren zur ^{18}F -Markierung organischer Moleküle

Die Radiochemie der ^{18}F -Markierung organischer Verbindungen mit dem Ziel der Radiopharmakasynthese kennt zwei grundlegende Ansätze: je nach Produktionsprozess des ^{18}F Fluors (vergleiche Abschnitt 1.2.2) steht initial entweder c.a. $^{18}\text{F}\text{F}_2$ für elektrophile Fluorierungen oder das aus wässriger Lösung isolierte n.c.a. ^{18}F Fluoridion für nukleophile Substitutionen zur Verfügung.

1.2.3.1 Elektrophile Fluorierung mit ^{18}F

Das Problem der elektrophilen Fluorierung ist, dass aufgrund der ^{18}F -Produktion (vergleiche Abschnitt 1.2.2) ausschließlich geträgertes $^{18}\text{F}\text{F}_2$ vorliegt. Diese Tatsache schränkt die Anwendungsmöglichkeiten stark ein, so dass sie nur dann bevorzugt wird, wenn keine sinnvolle nukleophile Synthesestrategie vorhanden ist. Selbst dann bleibt sie auf die Markierung von Verbindungen reduziert, bei denen es nicht auf eine hohe spezifische Aktivität ankommt (wie z.B. bei Fettsäuren, Zucker oder Aminosäuren [16]).

Weitere Nachteile der elektrophilen Fluorierung können in der Toxizität (da geträgert), der um 50 % verminderten Markierungs-Ausbeute und in der unter Umständen fehlenden spezifischen Regioselektivität der radioaktiven Markierung an Aromaten gesehen werden. Die fehlende Selektivität führt bei solchen Markierungen entweder zu aufwendigeren Syntheseschritten oder zu unerwünschten Nebenreaktionen (Bildung von Isomergemischen bzw. Reaktionen mit dem Lösungsmittel).

Historisch betrachtet, war die 2- ^{18}F FDG das erste erfolgreiche Beispiel der elektrophilen Strategie, bis eine nukleophile Alternative verfügbar wurde [17]. Die Hauptanwendungen der elektrophilen Fluorierung beschränken sich heute auf die Darstellung einiger aromatischer Aminosäuren, wie z. B. (2- ^{18}F)Fluor-L-Tyrosin, ^{18}F Fluor-L-phenylalanin oder 6- ^{18}F Fluor-L-Dopa [18].

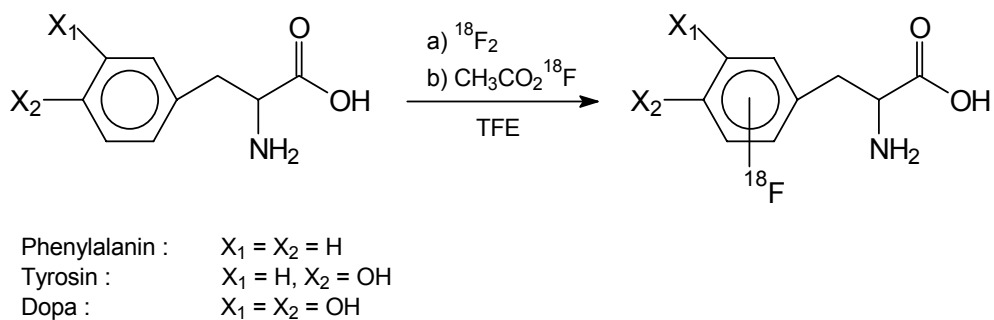


Abbildung 6: Elektrophile ^{18}F -Fluorierung aromatischer Aminosäuren

Die Problematik dieser Reaktionsführung liegt in der nicht regioselektiven Darstellung des gewünschten Produktes. Bei der elektrophilen Fluorierung von Aminosäuren kann es zu unerwünschten Isomergemischen kommen. Durch die Auswahl geeigneter sekundärer Markierungsvorläufer wie dem $[^{18}\text{F}]$ Acetylhypofluorid, das wesentlich milde Fluorierungseigenschaften besitzt, kann dieses Problem partiell umgangen werden, wie zum Beispiel die Synthese des 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluor-L-Tyrosin zeigt (Abbildung 7).

Bei dieser Darstellungsmethode wird der Vorläufer an der phenolischen OH-Gruppe acetyliert, um die Substitution in meta-Stellung zum Acetylrest, welcher später basisch abgespalten wird, zu bevorzugen. Dadurch erhält man 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluor-L-Tyrosin in hohen Ausbeuten.

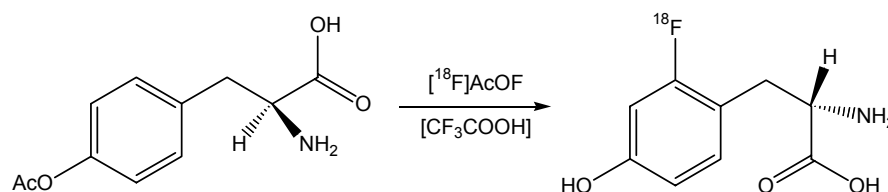


Abbildung 7: Fluorierung von O-Acetyl-L-Tyrosin

Eine Verbesserung der Regioselektivität von elektrophilen Substitutionen wird in speziellen Fällen durch Fluordemetalierungsreaktionen (6- $[^{18}\text{F}]$ Fluor-L-Dopa-Synthese heute über Destannylierung von 6-(Trimethylstannyl)-L-Dopa) erreicht, jedoch erfordern diese Reaktionen oft weitere Syntheseschritte (z. B. Schutz der reaktiven Gruppen im Molekül).

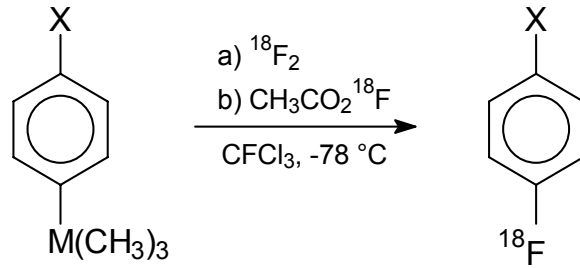
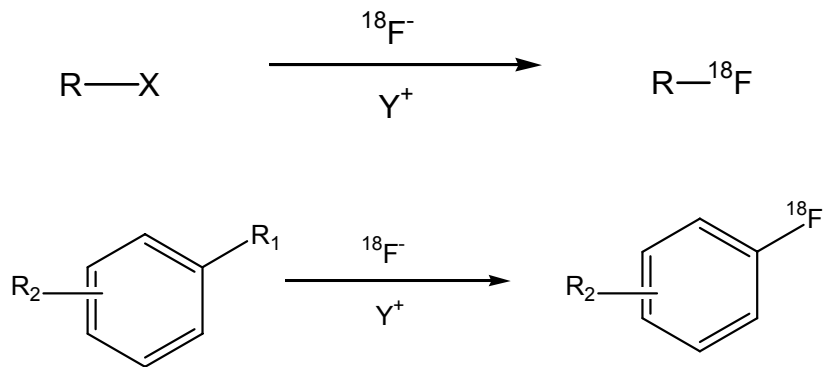


Abbildung 8: Fluordemetalierungsreaktionen (M= Si, Ge, Sn und X= OCH₃, CH₃, H, F, CF₃, NO₂) [19].

1.2.3.2 Nukleophile Fluorierung mit ¹⁸F

Die nukleophile Substitution ist die gebräuchlichste Methode zur Darstellung n.c.a. ¹⁸F-fluormarkierter Radiopharmaka. Bei dieser Art der Reaktionsführung handelt es sich im Allgemeinen um eine Substitution von nukleofugen Gruppen wie z.B. Halogenen (Brom und Iod), verschiedenen Sulfonsäureestern R-SO₃ (Tosylate, Triflate und Mesylate), cyclischen Schwefelsäureestern sowie Sulfamaten. Als Lösungsmittel werden Acetonitril (MeCN), N,N-Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt. Die allgemeine Form der nukleophilen Substitution wird in Abbildung 9 dargestellt.



X= Br, I, R-SO₃, R-OSO₃
 R₁= NO₂, N(CH₃)₃⁺ (TfO⁻, Tos⁻, Br⁻, I⁻), Cl, Br, I
 R₂= CN, NO₂, CHO, CRO, COOR
 Y⁺= [K⁺ c 2.2.2]₂CO₃²⁻, [K⁺ c 2.2.2]₂C₂O₄²⁻, CO₃²⁻, R₄N⁺, Cs⁺, Rb⁺

Abbildung 9: Allgemeine nukleophile aliphatische und aromatische Substitution

Das bekannteste Beispiel ist die Darstellung von 2-[¹⁸F]Fluordesoxy-D-Glukose ([¹⁸F]FDG), des wichtigsten Radiopharmakons für die PET-Diagnostik [17].

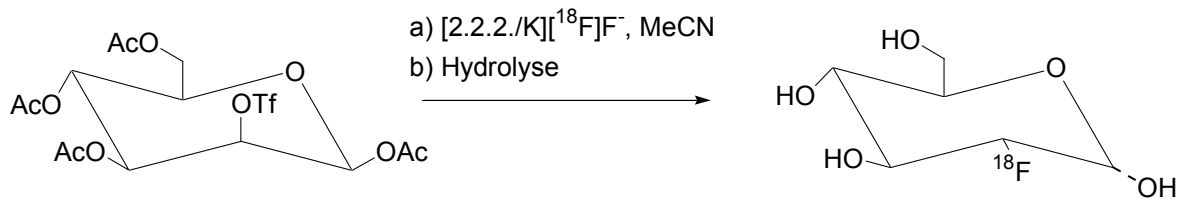


Abbildung 10: Schematische Darstellung von 2-[¹⁸F]FDG

Die Direktfluorierung erfordert bestimmte Reaktionsbedingungen bzw. Voraussetzungen. Das verwendete Fluorid besitzt eine hohe Ladungsdichte und eine hohe Affinität zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Deshalb kann es eine grosse Solvathülle ausbilden, welche die Nukleophilie herabsetzt. Weiter ist Fluorid eine starke Base, die mit freien Protonen HF bildet und sich aus dem Reaktionsansatz verflüchtigt. Deshalb muss bei der ¹⁸F-Direktfluorierung auf absolute Wasserfreiheit sowie auf das Fehlen von aciden Protonen geachtet werden. Auch müssen bei der direkten ¹⁸F-Fluorierung noch folgende Bedingungen berücksichtigt werden:

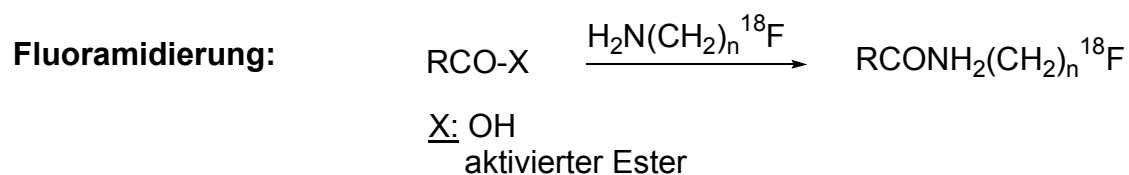
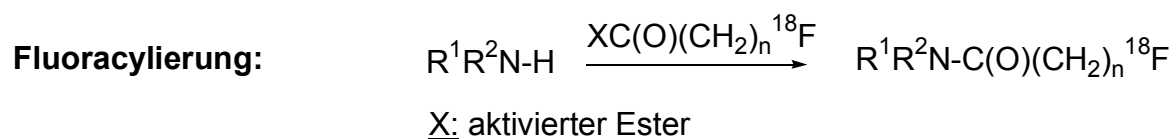
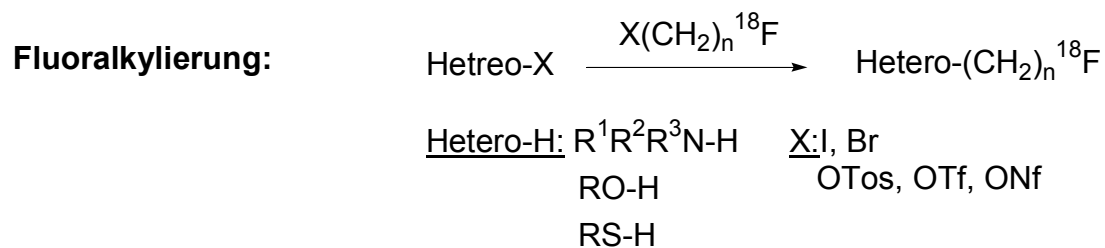
- Lösungsmittel: Die Markierungen müssen in dipolar aprotischen Lösungsmitteln durchgeführt werden.
- Basensystem: Die Fluorierungen werden unter Zugabe von Basensystemen durchgeführt, um die Konzentration von Protonen weiter herabzusetzen. In der Regel verwendet man Kaliumcarbonat. Weiterhin dient das zugesetzte Carbonat als sogenannter nicht-isotoper Träger, der eine Adsorption an der Glaswand verhindert. Bei Markierungsvorläufern, welche unter basischen Bedingungen nicht stabil sind, kann auf Kaliumoxalat als Base zurückgegriffen werden.
- Phasentransferkatalyse: Um die Löslichkeit des Fluorids zu erhöhen, werden Phasentransferkatalysatoren verwendet. Besonders bewährt hat sich dabei der Aminopolyether Kryptofix[®]222, welcher das Gegenion Kalium komplexiert. Dadurch wird die Nukleophilie des Fluorids drastisch erhöht, weil es als „nacktes“ Ion vorliegt [20].
- Schutzgruppen: Alle reaktiven Gruppen, besonders solche mit aciden Protonen, müssen geschützt werden.

1.2.3.3 Fluorierung über prosthetische Gruppen:

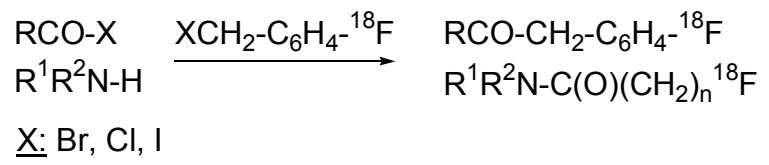
Neben der Direktfluorierung existiert noch die indirekte Methode, die Fluorierung mittels eines sekundären Markierungsvorläufers. Ist eine Direktfluorierung nicht möglich oder nur auf Umwegen zu erreichen, greift man auf sogenannte sekundäre Markierungsvorläufer zurück. Diese prosthetischen Gruppen sind kleine, gut fluorierbare Moleküle, welche zuerst mit [¹⁸F]Fluorid umgesetzt und diese anschließend an das zu markierende Molekül gekoppelt werden [21], [22], [23], [24] (bei denen die direkte nukleophile Fluorierung versagt).

Eine besondere Rolle spielen in diesem Zusammenhang die Fluoralkylierung (Fluormethylierung, Fluorethylierung), Fluoracylierung, Fluoramidierung und Fluorbenzylierung [25].

Als relevante sekundäre Markierungsvorläufer werden z.B. ¹⁸F-markierte Sulfonsäurederivate verwendet, wie Toluol-4-sulfonsäure-2-[¹⁸F]fluorethylester ([¹⁸F]FETos, 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat) [21], das ¹⁸F-markierte Halogenalkan 2-Brom-1-[¹⁸F]fluorethan ([¹⁸F]BFE) [26], 2-[¹⁸F]Fluorpropionsäuremethylester [27], 2-[¹⁸F]Fluorethylamin [28] oder die 4-[¹⁸F]Fluorbenzylhalogenide [29].



Fluorbenzylierung:



1.3 SPECT

1.3.1 γ -Emission/ Isotope/ Detektoren

Im Fall der SPECT-Nuklide tritt die γ -Emission als Folgeprozess einer vorangegangenen radioaktiven Umwandlung auf. Der energetisch angeregte Zustand des Produktkerns regt sich ab, wobei ein oder mehrere γ -Quanten ausgesendet werden. Für das wichtige ^{99m}Tc ist das Zerfallsschema in Abbildung 11 dargestellt.

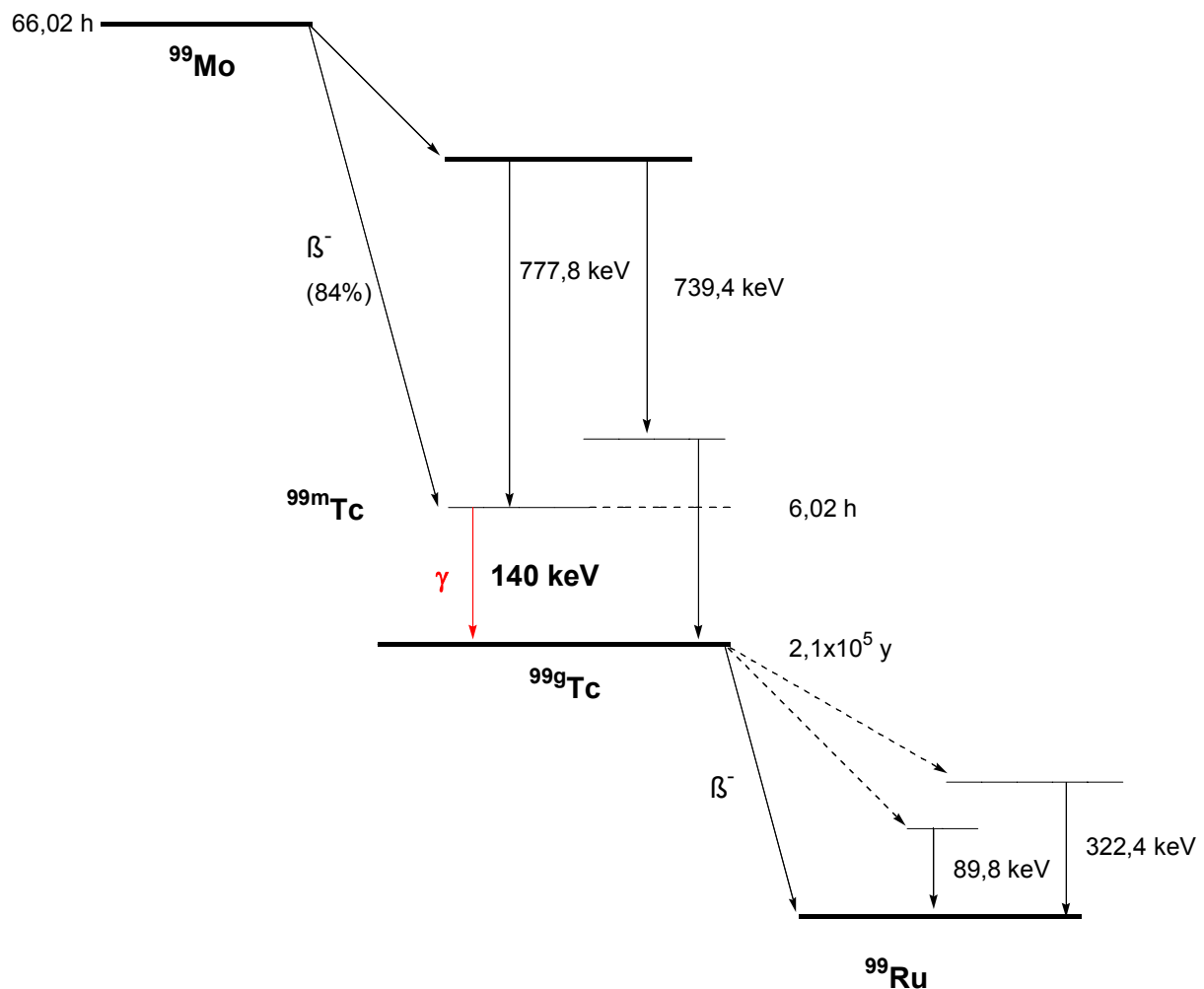


Abbildung 11: vereinfachtes Zerfallsschema von ^{99m}Tc [30]

Der Nachweis der radioaktiven γ -Strahlung erfolgt mit Szintillations (SCD)- und Halbleiterdetektoren. Obwohl Halbleiterdetektoren wie Ge(Li)- und reinst-Ge-Detektoren (HPGe) eine bessere Energieauflösung als die Szintillationsdetektoren haben, hat sich aufgrund der höheren Nachweiswahrscheinlichkeit für niederenergetische γ -Quanten der SCD in der SPECT durchgesetzt.

Neben diesem Vorteil ist natürlich auch der weitaus geringere Preis und die relativ einfache Handhabbarkeit moderner SCDs zu nennen. Das in SPECT-Scannern wichtigste Detektormaterial ist Thallium dotiertes NaI. Ein großer Vorteil dieses Materials ist seine hohe Lichtausbeute sowie die gute Nachweiswahrscheinlichkeit für γ -Quanten im Bereich zwischen 100-200 keV. Mit einer γ -Energie von 140 KeV ist ^{99m}Tc bezüglich der Lichtausbeute ideal.

1.3.2 Produktion/ Generatorsystem $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$

Das am häufigsten in der radiopharmazeutischen Chemie angewandte Generatorsystem ist das $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -System. Bei ca. 95 % aller angewendeten Radiopharmaka handelt es sich um ^{99m}Tc -markierte Verbindungen. Dieser Generator existiert in verschiedenen kommerziell erhältlichen Ausführungen, wobei man drei verschiedene Typen charakterisieren kann, die sich hauptsächlich in ihrer Herstellerspezifikation unterscheiden. Allen gemeinsam ist die Tatsache, dass ^{99m}Tc als Pertechnetat vom Generator eluiert wird, wobei die Konzentration zwischen 10^{-7} - 10^{-10} Mol schwankt. Historisch betrachtet stammen alle heute erhältlichen Generatoren vom sog. Brookhaven-Generator ab, dessen prinzipieller Aufbau schon 1958 bzw. 1960 beschrieben wurde [31]. Der Brookhaven-Generator besteht prinzipiell aus einer mit aktiviertem Aluminiumoxid gefüllten Säule als stationäre Phase, auf die eine saure [^{99}Mo]Molybdat-Lösung aufgebracht wird. In leicht saurer Lösung polymerisiert das Molybdat-Anion zu einem stabilen Heteropolymer $\text{Al}[\text{Mo}_6\text{O}_{24}]^{9-}$, das dauerhaft an die Aluminiumoxidmatrix absorbiert wird [32]. Das auf der stationären Phase gebundene ^{99}Mo ist das sog. Mutternuklid des ^{99m}Tc . Eine denkbare Alternative besteht in der Neutronenaktivierung von ^{98}Mo angereicherten Targets in einem Kernreaktor mit thermischen Neutronen. Der Nachteil dieser Methode ist der geringe Wirkungsquerschnitt für den erforderlichen Neutroneneinfang von 0,13 barn, womit die spezifische Aktivität naturgemäß sehr gering bleibt. Diese offensichtlichen Nachteile favorisieren bis heute die Verwendung von reaktorproduziertem ^{99}Mo .

Bei Verwendung von reaktorproduziertem ^{99}Mo über die Uranspaltung ist die Menge an ^{99}Mo sehr gering sowie die spezifische Aktivität relativ hoch: spez. Aktivität $\approx 10^4$ Ci/ g (370 TBq/ g). Die trägerfreie Abtrennung von ^{99}Mo aus den Spaltprodukten der ^{235}U -Spaltung ist sehr aufwendig und erfordert eine Vielzahl an Reinigungsschritten, um eine absolute Abtrennung von anderen Spaltprodukten zu gewährleisten.

Das Mutternuklid ^{99}Mo zerfällt mit einer Halbwertszeit von 66 h zu $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Der radioaktive Zerfall führt zu 87 % zum angeregten Zustand $^{99\text{m}}\text{Tc}$ und zu 13 % direkt zum Grundzustand des $^{99\text{g}}\text{Tc}$. Etwa 10 % der emittierten Photonen gehen über innere Konversion verloren. Das $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generatorsystem kann als klassisches transientes radiochemisches Gleichgewicht betrachtet werden. Das entstehende $^{99\text{m}}\text{Tc}$ bleibt zunächst nach seiner Bildung an der Oberfläche des Aluminium-adsorbers in Form seines Pertechnetats $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ adsorbiert. Im Gegensatz zum Molybdän neigt Technetium nicht zur Ausbildung von polymeren Strukturen und kann effizient mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung eluiert werden. Neben dem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ beinhaltet das Eluat $^{99\text{g}}\text{Tc}$. Je länger die Zeit zwischen zwei getrennten Elutionen, desto höher ist daher der Anteil an "kaltem" $[\text{}^{99\text{g}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$. Der Gehalt an $^{99\text{g}}\text{Tc}$ ist somit nicht vermeidbar. Dieser kann Einfluss auf die Synthesechemie haben (geringere spezifische Aktivität).

1.3.3 Technetiummarkierungen in der radiopharmazeutischen Chemie

Die Chemie fast aller $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -basierter Radiopharmaka beginnt mit einer wässrigen Lösung von $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$, welche bei Verwendung eines kommerziellen Generators zur Verfügung steht. Das Pertechnetat mit dem Technetium in der Oxidationsstufe +7 ist nicht in der Lage, Komplexe mit geeigneten Donorliganden oder Chelatoren zu bilden. Dieser Umstand macht eine Reduktion des Tc in niedrigere Oxidationsstufen erforderlich. (Ausnahmen bilden hierbei das Tc_2S_7 , das für spezielle Leber, Nieren und Knochenuntersuchungen verwendet wird und das $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ selbst, das für die Schilddrüsenszintigraphie eingesetzt wird).

Die Reduktion des Pertechnetats kann mit einer Vielzahl an Reduktionsmitteln durchgeführt werden. Hierzu gehört Natriumdithionit, Natriumborhydrid, Ascorbinsäure, SnCl_2 , Hydrazin sowie tertiäre Phosphine. Die möglichen erreichbaren Oxidationsstufen des Tc hängen nicht nur vom verwendeten Reduktionsmittel ab, sondern ebenso vom anwesenden Liganden- bzw. Chelatorsystem die die intermediäre Oxidationsstufen koordinativ stabilisieren. Diese Variationsmöglichkeiten an chemischen Parametern haben zur Synthese einer großen Anzahl an Tc-Komplexen geführt [33]. Es wurden schon sehr früh $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Radiopharmaka für verschiedene nuklearmedizinische Applikationen entwickelt: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA für Untersuchungen der Nierentätigkeit [34], $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pyrophosphat für die Knochenszintigraphie [35], $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierte rote

Blutkörperchen zur Bestimmung des Blutvolumens und der Herzsintigraphie [36], ^{99m}Tc -HIDA zur Untersuchung der Leberfunktion [37] und das sehr bekannte MAG_3 für Untersuchungen bezüglich einer seitengetrenten Beurteilung der Nierendurchblutung, der Harnausscheidung und des Harnabflusses (Nierenfunktionsszintigraphie) [38]. Einige dieser frühen Radiopharmaka (I. Generation) sind heute noch in der nuklearmedizinischen Diagnostik in Verwendung und können so als die Vorreiter zur Etablierung effizienter ^{99m}Tc -Markierungen betrachtet werden.

Heutzutage ist eine Vielzahl von unterschiedlichen ^{99m}Tc -Radiopharmaka in nuklearmedizinischer Routineanwendung (II. Generation). Hierzu gehören Verbindungen zur Hirnfunktionsuntersuchung, wie z.B. ^{99m}Tc -Propylenamin-oxim (PNAO)-Komplexe als Perfusionstracer [39]. Basierend auf der Beobachtung, dass Tc(V) eine hohe Affinität zu Thiolen als Donorliganden hat, wurden weitere tetradentate Chelatoren von verschiedenen Arbeitsgruppen synthetisiert, was zur Etablierung neuer N_2S_2 -Liganden führte [40]. Aufgrund dieser Arbeiten wurden die heute kommerzialisierten Radiopharmaka NeurolitTM, ein mono-Oxotechnetium(V)-Komplex und sein Ethylcystein-Dimer-Derivat (ECD) entwickelt [41]. Der Ligand selbst besitzt zwei chirale Zentren und existiert sowohl als L,L-ECD oder als D,D-ECD, wobei der L,L-TcO-ECD Komplex eine höhere Hirnaufnahme zeigt. Weitere Hirnperfusionstracer wie beispielsweise die Tc-Borsäure-Addukte mit Dioximen (Tc-BATO) [42] und insbesondere deren 2-Methylpropyl-derivate, und der oxo-Tc(V) Komplex MRP-12 finden häufige Anwendung in der Nuklearmedizin [43].

Wie das Gehirn ist insbesondere das Herz Ziel nuklearmedizinischer Untersuchungen. Für das myokardiale Perfusionsimaging sind schon 1980 erste kationische Spezies wie Tc(III)bis-arsin $[\text{TcBr}(\text{diars})_2]^+$ und Tc(III)bis-phosphin $[\text{TcCl}_2(\text{dmpe})_2]^+$ beschrieben worden, die in Hunden und Hasen befriedigende Bilder produzierten, jedoch im Menschen keine Akkumulation im Myocard zeigten [44]. Der erste Komplex, der erfolgreich im menschlichen Herzgewebe akkumuliert wurde, war der Hexakis-tert.-butylisonitril-Technetium-(I)-Komplex $[\text{Tc}(\text{TBI})_6]^+$, der sich durch eine einfache Synthese und eine hohe Aufnahme ins Myokardgewebe auszeichnet [45]. Die hohe Lipophilie des Komplexes, bedingt durch die tert.-Butyl-Gruppen, führte jedoch zu einer außerordentlich hohen Radioaktivitätsaufnahme in der Lunge und der Leber, was wiederum in der Darstellung optimierter Komplexe resultierte. Die Entwicklung von Hexakis(2-methoxy-isobutylisonitril)Tc(I) $[\text{Tc}(\text{I})(\text{MIBI})_6]^+$ (CardioliteTM bzw. Sestamibi), einem Komplex mit guten *in vivo*-Eigenschaften (schnelle Blutclearance und geringe

Bindung an Serumproteine) kann als Meilenstein in der Entwicklung von Tc-Radiopharmaka angesehen werden [46] und führte zur Synthese neuer Komplexe wie z.B. dem Tc-Tetrofosmin (MyoviewTM) [47] und dem Schiff-Base Biphosphin-Komplex Tc-Q₁₂ [48]. ^{99m}Tc-Teboroxime (CardiotecTM) war der erste neutrale Tc-Komplex, der als myokardialer Perfusionstracer evaluiert wurde [49]. Neben diesen ^{99m}Tc-markierten Radiotracern ist für diverse nuklearmedizinische Anwendungen eine große Anzahl weiterer markierter Verbindungen eingesetzt worden. Hierzu gehören Hypoxietracer wie BMS-181321, BRU-59-2 sowie HL-91 [50] und eine Vielzahl an Tracern zur Untersuchung von Lunge, Leber, Milz, des Knochenmarks und des Lymphsystems [51].

Ein neuer Trend in der ^{99m}Tc-Chemie ist die Synthese Tc-markierter Liganden für die nicht-invasive Untersuchung von Neurorezeptor- und Neurotransportersystemen. Da die Modifikation von "kleinen" Rezeptorliganden mit den bekannten, sterisch anspruchsvollen Chelatoren pharmakologisch betrachtet problematisch sein kann, muss im jeweiligen Einzelfall auf eine unveränderte Affinität und die Blut-Hirn-Schranke-Gängigkeit geprüft werden. Die vielversprechendsten ^{99m}Tc-modifizierten Liganden wie TROTEC, ^{99m}Tc-TRODAT, ^{99m}Tc-Technepine (0861T bzw. 01505T) gehören zur Gruppe der Dopamintransporter-Liganden (DAT) und zeigen vor allem *in vitro* eine moderate bis hohe Affinität [52]. Obwohl fast alle Verbindungen eine nur geringe Hirngängigkeit aufweisen, sind die Verbindungen ^{99m}Tc-TRODAT und ^{99m}Tc-Technepine in der Lage, *in vivo* die Verteilung von DAT im Primaten- und menschlichem Hirn zu visualisieren [53]. Auch für die Serotonin-5HT_{1a}- und 5HT_{2a}-Rezeptoren sind im Zusammenhang mit der Alzheimer Erkrankung Tc-markierte Liganden beschrieben worden. Eine Reihe von Derivaten, die von der Grundstruktur des 5HT_{1a} Rezeptorliganden WAY 000636 abstammen, sind synthetisiert und charakterisiert worden [54]. Alle bislang validierten Derivate zeigten eine nur geringe Hirnaufnahme. Einen ebenfalls niedrigen Hirnuptake zeigten die von Johannsen et al. entwickelten *in vitro* hochaffinen Ketanserin-Derivate zur Darstellung des 5HT_{2a}-Rezeptorsubtyps [55].

Einen hohen Stellenwert in der ^{99m}Tc-Markierungschemie nimmt die sog. HYNIC-Methode ein. Ursprünglich zur Markierung von polyklonalen Antikörpern entwickelt [56], wurde die HYNIC-Gruppe (2-Hydrazino-nicotinsäure) auch zur Markierung kleinerer Peptide verwendet [57]. Die HYNIC-Gruppe wird über die Carbonsäure an die Aminofunktion des Peptids gekoppelt. Interessanterweise ist eine genaue Bestim-

mung der Koordination des Tc mit HYNIC bis heute nicht möglich. Obwohl davon auszugehen ist, dass die Komplexierung des Tc über eine Tc=N Bindung erfolgt, ließen Kristallstrukturbestimmungen von Komplexen keine eindeutige Koordination erkennen [58].

1.3.4 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Komplexe

Ein neuer, von Alberto et al. entwickelter Markierungsansatz, basiert auf der Synthese von stabilen $^{99m}\text{Tc}(\text{I})(\text{CO})_3$ -Carbonylkomplexen [59]. Diese Methode beinhaltet die Verknüpfung von drei- bzw. zweizähligen Liganden mit Biomolekülen zur Markierung mit dem einfach zu synthetisierenden Vorläufer *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$. Dieser Vorläufer kann leicht und in hohen Ausbeuten über einen kommerziell erhältlichen Markierungskit (Isolink[®], Mallinckrodt) dargestellt werden. Die Synthese orientiert sich an der von Alberto et al. entwickelten Methode der *in situ*-Generierung von Kohlenmonoxid mittels $\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$, das durch Einleiten von CO in eine auf -78°C gekühlte KOH-Lösung dargestellt wird. Dieses Borancarbonat entwickelt im sauren Milieu unter Wärmeeinwirkung CO und fungiert gleichzeitig als Reduktionsmittel. Die drei Wasser-Liganden können durch geeignete mono-, bis- und tridentate Liganden substituiert werden, die mit dem entsprechenden Biomolekül verknüpft sind (Abbildung 12) [60]. Diese Komplexe zeichnen sich durch eine hohe thermodynamische und kinetische Stabilität aus, was sie zur *in vivo*-Anwendung prädestiniert. Dieses neue Markierungskonzept hat sich als wertvolle Methode zur ^{99m}Tc -Markierung von potentiellen Radiopharmaka bewährt und eine große Anzahl von Verbindungen konnte in hohen Ausbeuten dargestellt werden.

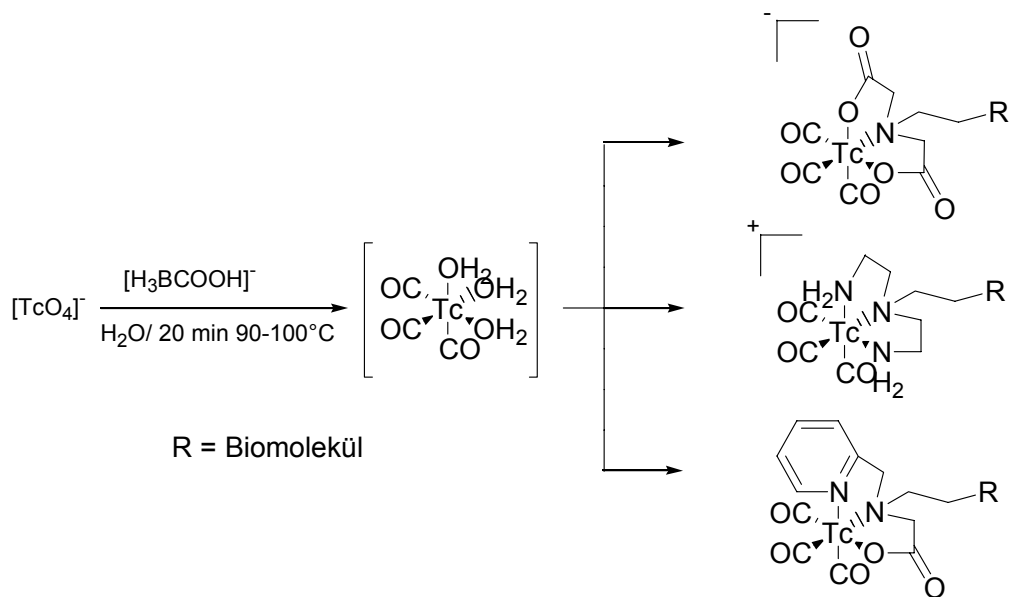


Abbildung 12: Synthese von $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ ausgehend von $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ und Umsetzung mit Chelator-Biomolekülkonjugaten

Ein weiterer Ligand zur Komplexierung des $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ ist die carbonylaktivierte Cyclopentadienyl-Gruppe. Die Natriumsalze entsprechender Modellverbindungen und Biomoleküle konnten erfolgreich in hohen Ausbeuten mit ^{99m}Tc markiert werden (Abbildung 13) [61].

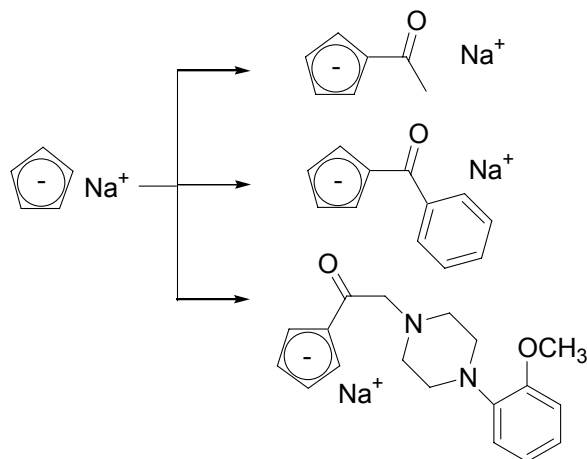


Abbildung 13: Synthese von Cyclopentadienyl-konjugierten Molekülen zur radioaktiven Markierung mit $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

Die Synthese startet ausgehend von Cyclopentadienyl-Natrium, das mit Carbonsäureestern unter Spaltung der Ester zu den korrespondierenden Cyclopentadienyl-Keto Verbindungen reagiert. Diese Art der Darstellung ist nicht unproblematisch und eignet sich nicht zur Synthese komplexerer Verbindungen.

1.4 Diabetes Mellitus (SUR1-Rezeptor, klinische Aspekte und SUR1-Liganden)

Der Diabetes Mellitus Typ 1 ist eine sich weltweit entwickelnde Erkrankung. So ist es in den letzten Jahren zu einem starken Anstieg der Inzidenz des Typ 1 Diabetes gekommen, besonders bei Kindern unter 5 Jahren [62]. Der Immun-Prozess beim Typ 1 Diabetes wird direkt nach der Geburt initiiert, wenn nicht sogar pränatal [63]. Spezifische Autoantikörper, die gegen bestimmte Antigene der Inselzellen gerichtet sind (IA-2, GAD, Inselzell AK), treten gewöhnlicherweise vor dem 5. Lebensjahr auf. Die Latenz von der ersten Detektion der Antikörper bis zum Auftreten klinischer Symptome schwankt aber zwischen Jahren bis Dekaden. In der zeitlich stark schwankenden prädiabetischen Phase nimmt die Insulinsekretionskapazität der Pankreas ab, ohne dass erhöhte Blutzuckerwerte gemessen werden können. Zur Frühdiagnose des Typ 1 Diabetes in der prädiabetischen Phase existiert bislang nur der intravenöse orale Glucosetoleranztest (ivGTT), der eine veränderte Insulinfreisetzungskinetik nachweist und selbst bei optimaler Standardisierung eine nur geringe Sensitivität besitzt [64]. Zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation besitzt das Pankreas in der Regel nur noch 10 % seiner ursprünglichen β -Zell-Masse. In der Literatur gibt es gute Evidenz, dass der Erhalt dieser residualen β -Zell-Masse erhebliche klinische Vorteile mit sich bringt und den Einsatz unterschiedlicher Interventionsstrategien rechtfertigt [65]. Untersuchungen konnten zeigen, dass Patienten mit einem absoluten Insulinmangel zusätzlich durch schwere Hypoglykämien im Rahmen der notwendigen Insulintherapie gefährdet sind [66]. Die "Diabetes Control and Complication"-Studie belegt eindeutig, dass eine residuale Insulin-Sekretion mit einer besseren Glukosekontrolle, weniger Hypoglykämien und weniger Folgeerkrankungen einhergeht [67]. Zusätzlich zeigen Untersuchungen, dass eine residuale C-Peptid-Sekretion einen positiven Einfluss auf rheologische Parameter der Patienten hat, wie z.B. die Erythrozytenverformbarkeit und den mikrovaskulären Blutfluss [68], [69]. Obwohl also eine frühzeitige Intervention bzw. der Versuch der Toleranzinduktion dringend notwendig erscheinen, bleibt der Prädiabetes eine diagnostische Grauzone. Während die Bauchspeicheldrüse als Gesamtorgan in bildgebenden Verfahren wie Sonographie, MRT und Spiral-CT dargestellt werden kann, entzieht sich der endokrine Anteil des Pankreas bislang komplett der bildgebenden Diagnostik. Neue Verfahren zur Visualisierung der β -Zell-Masse und Erkennung der prädiabetischen Vorlaufphase werden daher dringend

benötigt. Die nicht-invasive Darstellung der β -Zellen wäre somit von hoher wissenschaftlicher und diagnostisch-klinischer Relevanz und würde letztendlich für den klinischen Alltag einen erheblichen Beitrag leisten. Unter dem Gesichtspunkt laufender Interventionsstudien (z.B. European–Canadian Nicotinamide Diabetes Intervention Trial, DPT-1 oral-insulin trial). Mit diesem Bildgebungsverfahren würde es erstmals möglich werden, den Therapieeffekt einer spezifischen Interventionsstrategie direkt und nicht-invasiv zu quantifizieren. Dieses wichtige Ziel scheiterte bisher an der Nichtverfügbarkeit eines spezifischen β -Zell-Tracers für die molekulare Bildgebung. Um eine spezifische Markierung der Langerhans'schen Inseln mit einem PET-Tracer zu erreichen, muss der Tracer ein Molekül sein, das gleichzeitig spezifische Plasmamembran-Proteine der β -Zellen mit einer hohen Affinität erkennt, und das eine nahezu minimale Bindung an andere Gewebe aufweist.

Tolbutamid, Glibenclamid (1. und 2. Generation) und die neueren Wirkstoffe Repaglinid und Nateglinid (3. Generation) sind typische Repräsentanten von Antidiabetika, die die Insulin-Sekretion stimulieren. Sie binden an eine Klasse von Molekülen, die als ATP-sensitive Kaliumkanäle bekannt sind [70]. Diese Kanäle der β -Zelle bestehen aus zwei Untereinheiten: eine Kir6.0-Untereinheit, die ein Mitglied der inwärtigen rektifizierenden Kaliumkanäle-Familie ist, und eine Sulfonylharnstoff-Untereinheit (SUR), die ein Mitglied der ATP-bindenden Protein-Superfamilie ist [71]. In den β -Zellen spielt dieser ATP-sensitive Kaliumkanal eine bedeutende Rolle bei der Insulinsekretion. Das Schliessen dieses Kanals, nachdem die Glukose metabolisiert ist, resultiert in einer Depolarisation der β -Zelle und anschließender Insulinsekretion [72]. Die β -Zelle exprimiert Kir6.2 und SUR1 (Abbildung 14).

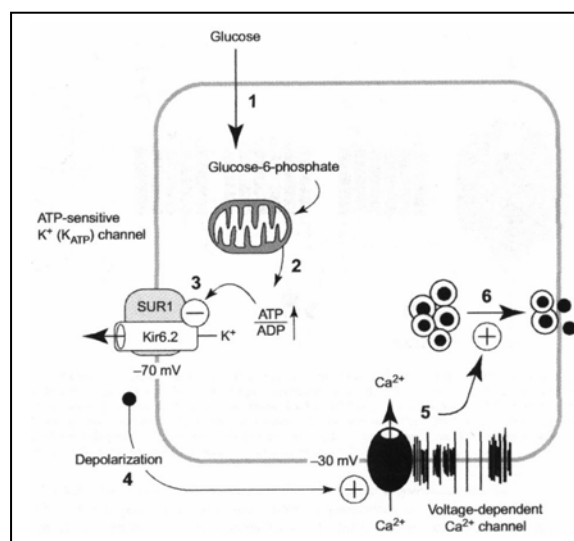


Abbildung 14:

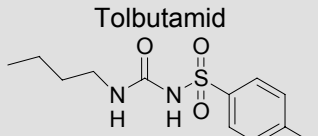
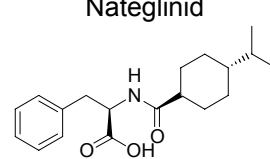
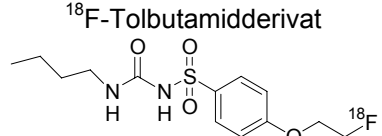
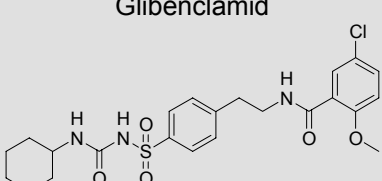
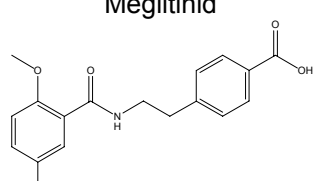
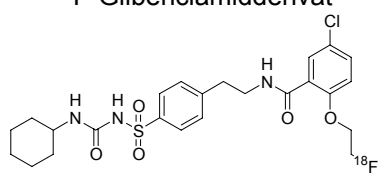

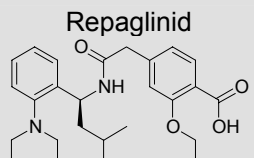
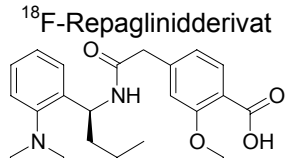
Schema und Funktion einer β -Zelle hinsichtlich der Insulinsekretion

Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid, Tolbutamid und Glimepirid, als auch Repaglinid, Nateglinid und Mitiglinid, die zur Gruppe der Nicht-Sulfonylharnstoffe gehören, binden an SUR1-Rezeptor und sind so potentielle Leitstrukturen β -Zell-spezifischer Tracer für bildgebende Verfahren. Aufgrund seiner höheren Affinität zum Sulfonylharnstoff-Rezeptor ist das Glibenclamid dem Tolbutamid allerdings vorzuziehen [73]. Glibenclamid, Repaglinid und Nateglinid sind im klinischen Bereich als orale Antidiabetika eingesetzte Insulinotropika, die die insulinotrope Wirkung über die Bindung an den oben genannten Rezeptor der β -Zelle entfalten. Ein Vorteil der neuesten oralen Antidiabetika, insbesondere beim Nateglinid, besteht darin, dass es ein neues schnell wirksames Insulinotropikum ist, mit einer vom Glibenclamid völlig verschiedenen Pharmakokinetik. Aufgrund seiner schnellen Wirksamkeit reduziert es die Gefahr einer postprandialen Hyperglykämie [74]. Die Verbindung ist in der Lage, den Blutglukosespiegel in nicht-diabetischen und diabetischen Ratten zu senken, wobei sowohl eine schnellere Wirkungseintritt- als auch eine schnellere Abklingphase der insulinotropen Effekte im Vergleich zu den Sulfonylharnstoffen zu beobachten ist. Dieses pharmakologische Profil senkt deutlich das Risiko einer verzögerten Hypoglykämie, wie sie oftmals bei Glibenclamid und Gliclazid auftritt. Es konnte gezeigt werden, dass es in pankreatischen β -Zellen des Typs AY4166 bei Anwendung von Nateglinid zu einer Zunahme des cytosolischen Kalziumeinstroms kam, der auf die Regulation von ATP-sensitiven Kaliumkanälen zurückzuführen war [75].

Die Selektivität von Nateglinid bezüglich einer Bindung zum endokrinen SUR-1 Rezeptor im Vergleich zur Koronararterie ist um den Faktor 100 größer als beim Glibenclamid. Besonders dieser Faktor wäre ausschlaggebend dafür, Nateglinid mit einem Positronen-Emitter zu markieren, da im Hinblick auf eine Anwendung am Menschen die Radioaktivitätsanreicherung in umliegenden Geweben wie z.B. dem Herzen und der Leber minimiert werden muss. Auch zeigt die schnelle Wirkungskinetik, dass die Bindung des Nateglinids an Plasmaproteine [76], die z.B. beim Glibenclamid nahezu 100 % beträgt, erniedrigt ist. Dieser Umstand würde auf eine verhältnismäßig schnelle Blutclearance hinweisen, was den generellen Hintergrund an radioaktiver Strahlung verringern und somit eine bessere Visualisierung der pankreatischen Inselzellen ermöglichen würde. Neben den β -Zellen des Pankreas besitzen in geringerer Anzahl auch extrapancreatische Gewebe Sulfonylharnstoffrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche (z.B. Cardiomyozyten, Mesangiumzellen) [77].

Hydrophile Derivate wie z.B. geladene (^{99m}Tc -markierte) Glibenclamid-Derivate sind dabei eventuell wünschenswert, da das Pankreas nahe der Leber lokalisiert ist und Substanzen mit zu hoher Lipophilie vornehmlich in der Leber metabolisiert werden (siehe Abbildung 15, 16). Dies würde eine Differenzierung der Pankreas-Radioaktivitätsaufnahme zur Leber-Radioaktivitätsaufnahme deutlich verschlechtern. Ein weiteres wichtiges klinisches Anwendungsgebiet der ^{18}F -markierten Insulintropika könnte in der Lokalisationsdiagnostik von Inselzelltumoren liegen. Die zur Zeit verfügbaren bildgebenden Verfahren in Abhängigkeit von der Lokalisation des Insulinoms bzw. Inselzellkarzinoms besitzen eine nur eingeschränkte Sensitivität (z.B. Magnetresonanztomographie 30-60 %, endoskopische Ultraschalldiagnostik 40-60 %, Octreotid-Szintigraphie um 30 % u.s.w.) [78]. Besonders Insulinome entziehen sich aufgrund ihrer bei klinischer Manifestation geringen Größe (meist <1,5 cm) häufig der präoperativen Lokalisationsdiagnostik. Da insulinsezernierende Tumore einerseits schwere Gesundheitsschäden durch protrahierte Unterzuckerungen nach sich ziehen können, andererseits in den meisten Fällen mit kurativem Ansatz operiert werden können, muss durch Kombination verschiedener bildgebender Verfahren ein größtmögliches Mass an diagnostischer Sensitivität angestrebt werden. Im Zuge zunehmender minimal-invasiver Therapieoptionen (z.B. pankreaserhaltende Chirurgie mittels laparoskopischer Exstirpation oberflächlich gelegener Insulinome) bedeutet darüber hinaus jede Möglichkeit einer genaueren präoperativen Lokalisierung der Tumore eine potentielle Verringerung von Morbidität, Mortalität und Therapiekosten. In zahlreichen tierexperimentellen und molekularbiologischen Studien seit Ende der 80er Jahre konnte die Existenz von Sulfonylharnstoffrezeptoren auf Zellmembranen von sowohl malignen als auch benignen Inselzelltumoren gezeigt werden. Die hohe Bindungsaffinität von Glibenclamid und die hohe Rezeptordichte im Tumorzellgewebe sind vielversprechende Voraussetzungen für die Darstellbarkeit auch kleinerer Inselzelltumore und hepatischer Filiae [79], [80]. Damit könnte es endlich gelingen, bisher okkulte Metastasen zu detektieren um damit die Prognose der Patienten deutlich zu verbessern.

Tabelle 3: Formeln ausgewählter oraler Antidiabetika und bereits synthetisierter ^{18}F -Analoge

Sulfonylharnstoffe	Nicht-Sulfonylharnstoffe	bisherige ^{18}F -Derivate
<p>Tolbutamid</p> 	<p>Nateglinid</p> 	<p>^{18}F-Tolbutamidderivat</p> 
<p>Glibenclamid</p> 	<p>Meglitinid</p> 	<p>^{18}F-Glibenclamidderivat</p> 
<p>Glimepirid</p> 	<p>Repaglinid</p> 	<p>^{18}F-Repaglinidderivat</p> 

Wie anhand der Tabelle 3 ersichtlich ist, sind im Arbeitskreis verschiedene Sulfonylharnstoffe der 1. und 2. Generation (1. Generation: Tolbutamid [81], 2. Generation: Glibenclamid [82]) sowie das Repaglinid der 3. Generation [83] und ihre ^{18}F -Analoge synthetisiert und evaluiert worden. Trotz sehr positiver Evaluierungsdaten bezüglich der Affinität, Insulinsekretion und der Lipophilie für alle dargestellten Verbindungen konnte keines der markierten Derivate für *in vivo*-Studien verwendet werden. Sogar die sehr viel versprechenden ^{18}F -Glibenclamid- und ^{18}F -Repaglinidderivate konnten in den *in vivo*-Tests am Menschen kein zufriedenstellendes Ergebnis bezüglich der Visualisierung der β -Zelle der Pankreas liefern (siehe Abbildung 15, 16).

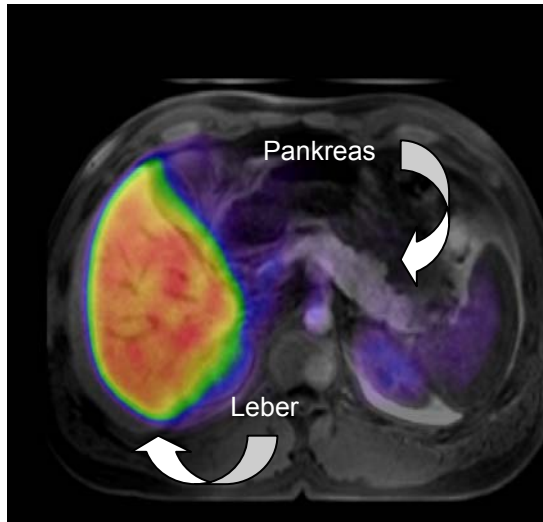


Abbildung 15: PET-Bild (transaxialer Schnitt in der Lebermitte) eines gesunden Probanden mit ^{18}F -Glibenclamid-Derivat

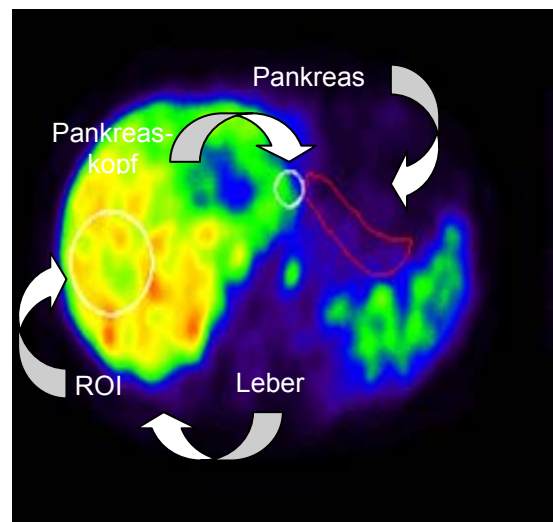


Abbildung 16: PET-Bild (transaxialer Schnitt in der Lebermitte) eines gesunden Probanden mit ^{18}F -Repaglinid

Auf beiden Abbildungen ist eindeutig zu erkennen, dass eine Visualisierung der Pankreas nicht gegeben ist. Die Hauptaktivität findet sich in beiden Fällen in der Leber wieder. Diese Ergebnisse konnten im Experiment an Mäusen bestätigt werden [84]. Auch erschwert der hohe Leberuptake erheblich die Quantifizierung der pankreatischen Aktivitätsaufnahme [85].

Neben dem Ansatz, die spezifische Akkumulation der ^{18}F -markierten Liganden in der Leber zu reduzieren, erscheint es auch sinnvoll durch eventuell längere Messzeiten den Leberuptake zu senken, da die Anreicherung in der Leber bereits ausgeschlossen sein könnte (längere Halbwertszeit des $^{99\text{m}}\text{Tc}$ von 6 h).

2 Problemstellung

Die Insulin-produzierenden Zellen des Pankreas entziehen sich bis heute komplett der bildgebenden Diagnostik. Der Grund für die Unfähigkeit, die β -Zellen bildlich darzustellen, liegt in der Nichtverfügbarkeit eines spezifischen radioaktiv markierten β -Zell-Tracers. Um eine spezifische Darstellung der Insulin-produzierenden Zellen mit einem PET- oder einen SPECT-Tracer zu erreichen, muss die markierte Verbindung ein Molekül sein, das spezifische Membran-Proteine der β -Zellen mit einer hohen Affinität erkennt, aber eine minimale Bindung an andere Gewebe, speziell aber in der Leber, aufweist.

Zuvor synthetisierte ^{18}F -Derivate der 1. Generation (Tolbutamid) und der 2. Generation (Glibenclamid) haben trotz guter pharmakologischer *in vitro*-Parameter nicht den gewünschten Effekt bezüglich der Visualisierung der β -Zell-Masse erbracht. Zu dem war die Bindung an Plasmaproteine höher [86], die Selektivität der Bindung an die Koronararterie unspezifisch, die lange Wirkungszeit und der Leberuptake zu hoch [87], [88]. Diese genannten Nachteile der oralen Antidiabetika der ersten beiden Generationen veranlasst zu der Überlegung, ein radioaktiv markiertes ^{18}F -Derivate des Nateglinids, eines neuen nicht-Sulfonylharnstoff-artigen Liganden der sog. 3. Generation von Insulintropika, zu synthetisieren, das eine von den klinisch verwendeten Sulfonylharnstoffen verschiedene Pharmakokinetik im menschlichen Körper aufweist.

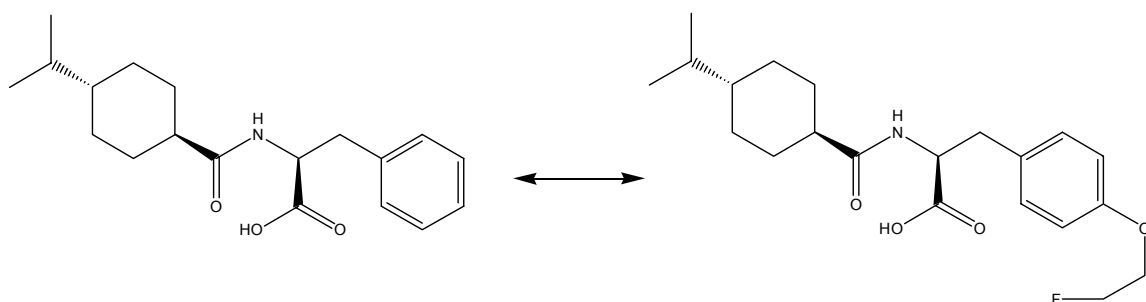


Abbildung 17: Struktur des originalen Nateglinids und des ^{18}F -Derivats

Nateglinid ist ein im klinischen Bereich als orales Antidiabetikum eingesetzter nicht-Sulfonylharnstoff, der seine insulinotrope Wirkung über die Bindung an spezifische Rezeptoren der β -Zelle entfaltet und nur geringe extrapankreatische Angriffspunkte aufweist. Der Sulfonylharnstoff-Rezeptorsubtyp 1 (SUR-1) ist abgesehen von bestimmten Hirnarealen ausschliesslich auf der Oberfläche der Plasmamembran und

innerhalb der β -Zelle zu finden. Weitere Rezeptorsubtypen wie SUR-2A und SUR-2B finden sich im Herzen und der glatten Skelettmuskulatur. Es ist im Gegensatz zum Glibenclamid kurz (≤ 2 h) wirksam und –im Unterschied zu Glibenclamid wohl besonders relevant- seine Bindung an Plasmaproteine ist geringer [89], [90]. Weiterhin ist das Nateglinid hinsichtlich seiner Bindung an die Koronararterie um den Faktor 300 selektiver als z.B. das Glibenclamid. Dieser Umstand könnte eine selektivere Radioaktivitätsaufnahme in den β -Zellen und somit ein kontrastreicheres imaging bedingen.

Nach Bestimmung der pharmakologischen Parameter der makroskopischen Referenzverbindung (^{nat}F -Nateglinid-Derivat) wie Bindungsaffinität, Insulin-sezernierende Wirkung und Lipophilie sollen sich *in vivo*-Experimente mit der radioaktiv markierten Verbindung an Ratten anschliessen.

Radioaktiv makierte und SUR-1 selektive Nateglinid-Derivate bieten sich deshalb an, die Insulin-produzierenden Zellen des Pankreas mittels Emissions-Tomographien darzustellen. Im Falle einer erfolgreichen Anwendung in der PET wäre es eventuell sogar möglich, eine Quantifizierung des β -Zellstatus vorzunehmen und somit die vorhandene β -Zell-Masse zur Radioaktivitätsaufnahme in Relation zu setzen. Im Kontext des Typ 1 Diabetes bestünde somit erstmals die Möglichkeit, die Rarifizierung der β -Zell-Masse *in vivo* im Verlauf des Immunprozesses zu quantifizieren, wohingegen beim Typ 2 Diabetes die sog. „silent-phase of pre-diabetes“ vor Manifestation erster klinischer Symptome diagnostizierbar würde.

Parallel zum Nateglinid/ Nateglinid-Derivat ist es Ziel dieser Arbeit, die hochaffinen Eigenschaften von Glibenclamid-Derivaten auch weiterhin zu nutzen. Es soll ein neues ^{99m}Tc -markiertes, hydrophiles Derivat des Glibenclamids dargestellt werden, da aus der Literatur bekannt ist, dass z.B. die ^{18}F -markierten aber lipophilen Derivate des Glibenclamids eine für die PET zu hohe Akkumulation in der Leber aufweisen. Dieser hohe Leberuptake verhindert die artefaktfreie Visualisierung der Aktivitätsaufnahme im Pankreas und somit auch eine Quantifizierung. Das Konzept besteht darin, bei gleichbleibender hoher Bindungsaffinität zum SUR-1 eine niedrigere Lipophilie zu erzeugen, was die Wahrscheinlichkeit einer hepatischen Verstoffwechslung minimiert. Gleichzeitig ist bekannt, dass die Affinität substituierter Glibenclamide zum SUR-1 mit ihrer Lipophilie korreliert.

^{99m}Tc hat eine Halbwertszeit von 6 h, was eine Messzeit von mehreren Stunden an einer SPECT-Kamera ermöglicht. Weiterhin ist es denkbar, dass nach Aufnahme des ^{99m}Tc -markierten Glibenclamids in die β -Zelle eine Bindung an die 95 % intrazellulären SUR1-Rezeptoren erfolgt und im günstigsten Fall ein sog. "Trapping" eintritt.

Der experimentelle Ansatz zur Erzeugung hoher Hydrophilie besteht darin, einen anionischen Komplex darzustellen. Dazu eignen sich die Tricarbonylderivate des [^{99m}Tc]Technetiums bzw. des Rhenium-Analogons, welche über ein Linkersystem zum gewünschten Komplex reagieren. Da die SPECT nur ein semi-quantitatives Verfahren ist, muss berücksichtigt werden, dass eine Quantifizierung der β -Zell-Masse unter Umständen nur über einen Vergleich gesunder Personen zu β -Zell-defizitären Patienten bewerkstelligt werden kann.

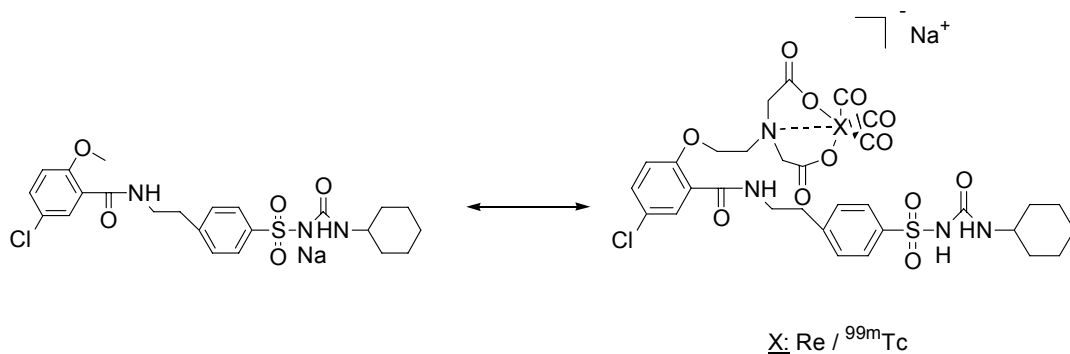


Abbildung 18: Struktur des originalen Glibenclamids und des Re/ ^{99m}Tc -Derivats

Neben dem ^{99m}Tc -markierten Derivat des Glibenclamids für *in vivo*-Studien soll das nicht-radioaktive Re-substituierte Analogon für *in vitro*-Versuche hinsichtlich seiner Insulin-sezernierenden Wirkung, seiner Lipophilie sowie seiner Bindungsaffinität zum Sulfonylharnstoffrezeptor dargestellt werden. Da in der Natur kein natürliches Technetium existiert, wird das Rhenium als Analogon zum Technetium herangezogen. Es weist vergleichbare Daten bezüglich Atomradius, chemischen Verhaltens und Ladungseigenschaften wie das künstliche Element Technetium auf. Falls die Ergebnisse der *in vitro*-Evaluierung des Re-Analogons positiv ausfallen, soll im Tierversuch die Pharmakokinetik und Organspezifität (Pankreas vs. andere Organe) mit dem ^{99m}Tc -Glibenclamid-Derivat *ex vivo* bestimmt werden. Hierzu sollen sowohl diabetische als auch nicht-diabetische Ratten verwendet werden, um einen direkten Vergleich der Radioaktivitätsaufnahme in Inselzell-defizitären als auch normalen Ratten ziehen zu können.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Radioaktive Markierung und Evaluierung eines ^{18}F -markierten Nateglinid-Derivates

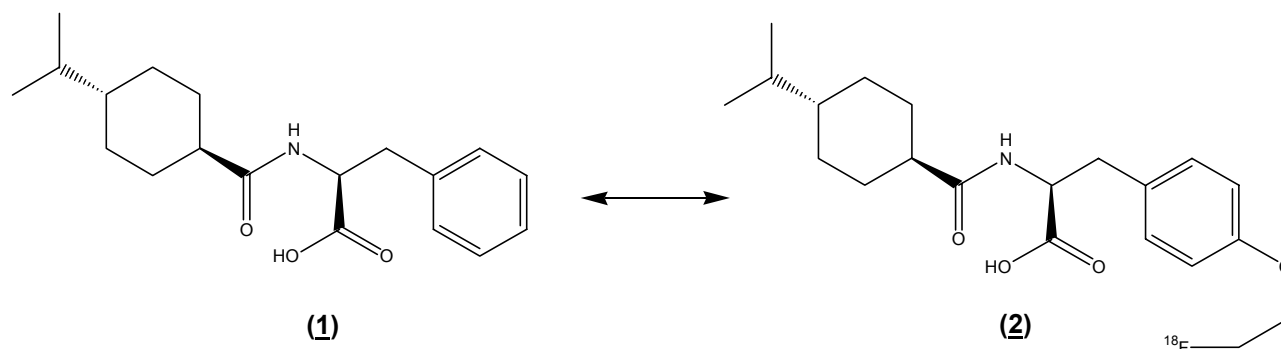


Abbildung 19: Struktur des originalen Nateglinids **(1)** und des ^{18}F -Derivates **(2)**

Eine genaue Untersuchung der Struktur des Nateglinids zeigt, dass eine simple ^{18}F -Fluorierung aufgrund des Fehlens notwendiger Strukturelemente wie z.B. eines aktivierten aromatischen Systems, welches essentiell für eine nukleophile aromatische Substitution ist, nicht funktioniert. Eine Derivatisierung am substituierten Cyclohexanring ist ebenfalls schwer zu realisieren, da der Einbau einer sekundären Hydroxyfunktion zur nachfolgenden Tosylierung nicht applikabel ist. Weiter ist auch bekannt, dass gerade sekundäre Abgangsgruppen nur mit relativ geringen radiochemischen Ausbeuten ^{18}F -fluorierbar sind. Somit gibt es zwei Strategien das ^{18}F -Nateglinid-Derivat zu synthetisieren: zum einen über eine direkte Fluorierung eines 2-Tosylethylsynthons des D-Tyrosins und zum anderen eine ^{18}F -Fluorierung des D-Tyrosins mit der prosthetischen Gruppe Toluol-4-sulfonsäure-2- ^{18}F fluorethylester.

3.1.2 Synthese des Markierungsvorläufers 3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-propionsäure

Die Synthese des Markierungsvorläufers 3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-propionsäure startet von kommerziell erhältlicher p-Isopropyl-benzoesäure, die in einem ersten Reaktionsschritt mit PtO_2/H_2 zur cis-Isopropyl-cyclohexansäure **(3)** in einer Ausbeute von 79 % reduziert wird. Das ent-

standene cis-Produkt wird nach Shinkai et al. [91] zum trans-Isomer (**5**) überführt. Nachfolgend wird das trans-Isomer mit dem zuvor nach Zervas et al. [92] synthetisierten D-Tyrosin-benzyl-ester-p-toluolsulfonsäuresalz (**6**) zum entsprechenden Säureamid in einer mittleren Ausbeute von 76 % umgesetzt. Die Aktivierung der Carboxylfunktion erfolgt mittels Ethyl-chlorformiat [93].

Im Anschluss wird der Benzylester mittels Pd/ C/ H₂ zur Carbonsäure reduziert. Die Reduktion erfolgt mit einer mittleren Ausbeute von 60 %. Dieser Markierungsvorläufer kann nun mit dem 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat zum markierten Produkt umgesetzt werden (Abbildung 26).

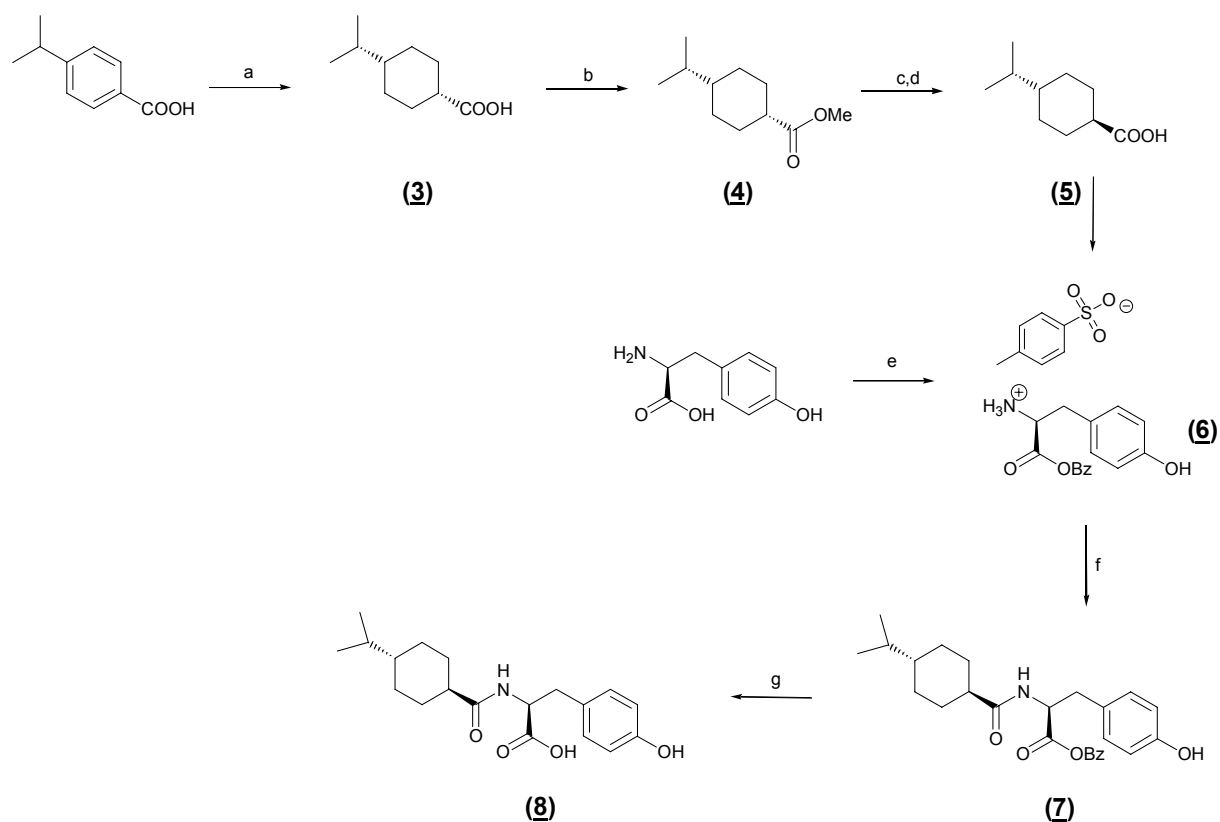


Abbildung 20: Synthese des Markierungsvorläufers (**8**) zur radioaktiven Markierung mit 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat a) PtO₂, HAc; b) MeOH, SOCl₂; c) NaH; d) NaOH 2N, MeOH; e) p-Toluolsulfonsäure, Benzylalkohol, Benzol; f) Ethylchlorformiat, CH₂Cl₂; g) Dioxan, Pd/ C

3.1.3 Synthese von N-(trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-tosyl-ethyl)-D-tyrosin-benzylester zur direkten radioaktiven Markierung mit [^{18}F]Fluorid

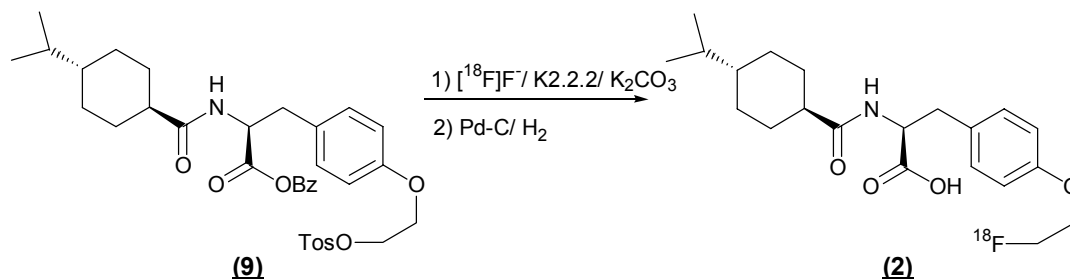


Abbildung 21: Direkte nukleophile ^{18}F -Markierung mittel [^{18}F]F $^-$ und dem tosylierten, Benzylester-geschützten Markierungsvorläufer: Radioaktive Markierung und finale Spaltung des Benzylesters

Um einen Markierungsvorläufer zu erhalten, der direkt nukleophil ^{18}F -fluoriert werden kann, muss die Phenylgruppe derivatisiert werden. Die einfachste Möglichkeit ist hierbei die Einführung einer phenolischen, substituierbaren Hydroxy-Funktion, an die eine 2-Hydroxyethyl-Struktureinheit mittels 2-Bromethanol ankondensiert wird. Nachfolgend kann die primäre Hydroxy-Funktion in eine gute Abgangsgruppe, das Tosylat umgewandelt werden. Da alle sauren Funktionen im Molekül geschützt werden müssen, wird die Carbonsäure-Funktion als Benzylester geschützt. Die Verbindung N-(trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-D-tyrosin-benzylester kann nach einer Vorschrift von Takesada et al. synthetisiert [94] und mit 2-Bromethanol in DMF unter Verwendung von TEA als Base zum korrespondierenden Phenylether N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-hydroxyethyl)-D-tyrosin-benzylester umgesetzt werden. Zur Durchführung der nachfolgenden Tosylierung wurden die gängigsten Literaturverfahren [95] angewendet. Überraschenderweise war keine der untersuchten Methoden erfolgreich. Die Ausbeuten an tosyliertem Produkt waren nur gering und es kam z.B. bei Verwendung des klassischen Systems Toluolsulfonsäurechlorid/ Pyridin (10 eq.) zu einer Basen-induzierten Zersetzung. Auch beim DABCO/ Toluolsulfonsäure-System wurde die Bildung des entsprechenden Chlorids zur Hauptreaktion. Auf der Suche nach einem schonenden Verfahren zur Tosylierung von Alkoholen unter neutralen Bedingungen wurde der katalytische Einfluss von Ytterbium-(III)-trifluormethansulfonat (Yb(III)(OTf) $_3$) auf die Reaktion von **(10)** und Toluolsulfonsäureanhydrid untersucht. Bei Verwendung von 1,2 eq. Toluolsulfonsäurean-

hydrid und 1 eq. **(10)** in 2 ml Dichlormethan konnte das korrespondierende Tosylat **(9)** in Ausbeuten von 80 % erhalten werden.

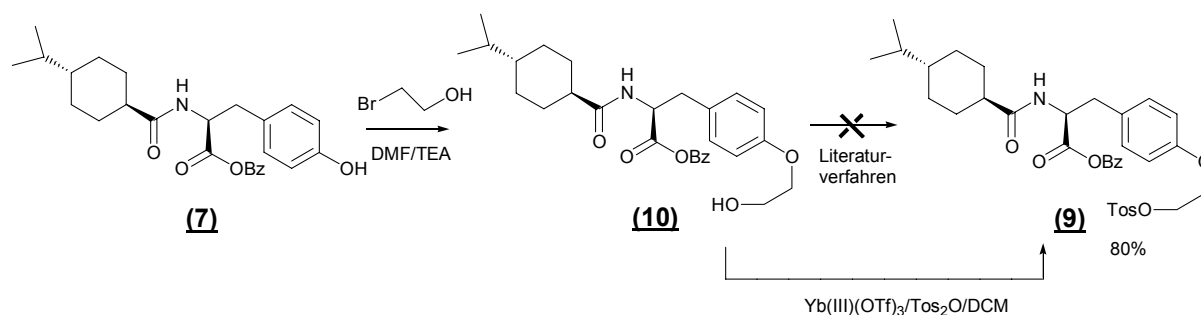


Abbildung 22: Synthese von **(10)** und anschliessende Tosylierung mittels Yb(III)(OTf)₃

Da diese Methode der Darstellung von Tosylaten aus Alkoholen in der Literatur bisher nicht erwähnt war, wurden zur generellen Überprüfung dieser Methode noch weitere verschiedene Substrate mittels Yb(III)(OTf)₃ und Toluolsulfonsäureanhydrid tosyliert.

3.1.3.1 Ytterbium(III)-katalysierte Tosylierung von ausgewählten Alkoholen

Die Entwicklung milder und effizienter Methoden zur Tosylierung von Alkoholen ist von großer Bedeutung, da die korrespondierenden Tosylate aliphatischer Alkohole zu den in der organischen Synthesechemie gebräuchlichsten Abgangsgruppen gehören. Standard-Methoden benutzen Triethylamin oder Pyridin als Base bei der Reaktion von Alkoholen mit tosylierenden Agentien wie Toluolsulfonsäurechlorid [96]. Andere Methoden zur Tosylierung benutzen wässrige Natriumhydroxid-Lösungen [97], Ringöffnungsreaktionen von Dibutylstannylen Acetalen [98], Tetramethylalkyldiamin als Base [99], Silberoxid [100], DMAP [101], Zinktosylat in einer Mizunobu-artigen Reaktion [102], 1-(p-Toluolsulfonyl)-3-methylimidazolium-triflat [103], und DABCO [104]. Kürzlich wurde eine Methode zur chemoselektiven Tosylierung von sekundären Alkoholen in Gegenwart von primären Hydroxy-Funktionen unter Verwendung katalytischer Mengen an Co(II)-Salzen und p-Toluolsulfonsäure beschrieben [105]. Bei der Tosylierungsreaktion kann es insbesondere dann Probleme geben, wenn die Kombination Toluolsulfonsäurechlorid/ Pyridin verwendet wird, da Pyridin in einem Überschuss von 10 eq. eingesetzt wird. Es kommt zu Zersetzungsreaktionen des Alkohols bzw. zur Abspaltung basenlabiler Strukturen im Molekül. Dieses Problem

kann teilweise durch Verwendung von DABCO als Katalysator minimiert werden, da hierbei ein nur geringer Überschuss von 1-2 eq. Pyridin verwendet werden muss. Eine oft beobachtete Nebenreaktion bei der Verwendung von Toluolsulfonsäurechlorid ist die direkte Umwandlung des gebildeten Tosylates in das korrespondierende Chlorid aufgrund der Bildung eines Pyridin-HCl Komplexes, der als Quelle des nukleophilen Chlorids fungiert. Diese unerwünschte Nebenreaktion konnte sowohl bei der Tosylierung des Nateglinid-Derivates (**10**) als auch bei der Tosylierung eines D₂-Rezeptorliganden [106] beobachtet werden. Die Bildung der chlorierten Verbindung wurde in beiden Fällen zur Hauptreaktion und die Ausbeute an gewünschtem Tosylat war gering.

Auf der Suche nach neuen Ansätzen zur Bildung des tosylierten Derivates des Nateglinids wurde die katalytische Wirkung von Ytterbium(III)trifluormethansulfonat auf die Umsetzung von Alkoholen mit Toluolsulfonsäureanhydrid untersucht (Abbildung 23 und Tabelle 4).

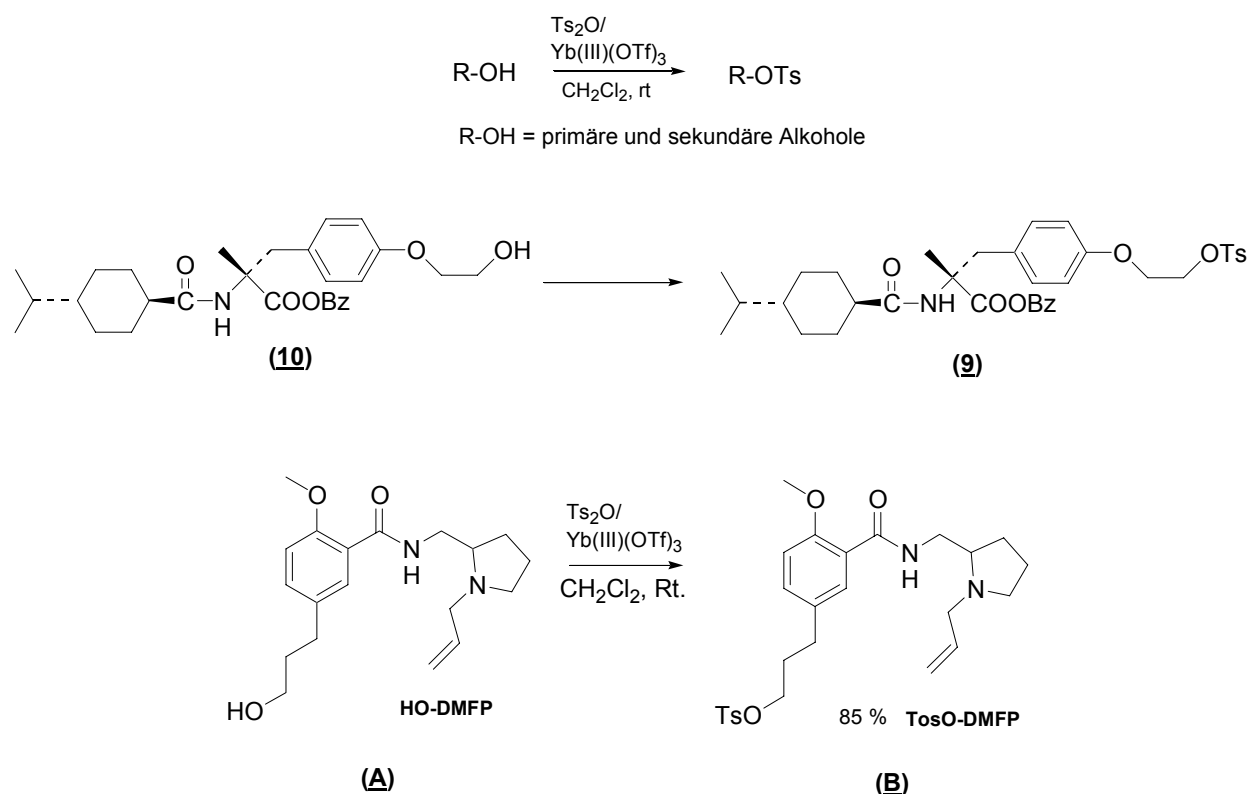
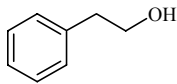
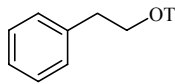
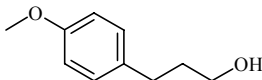
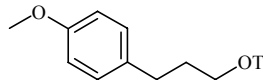
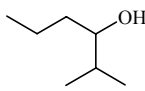
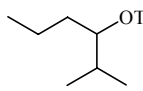
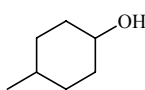
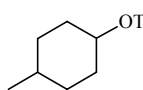
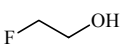
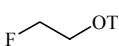
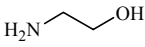
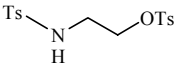
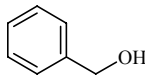
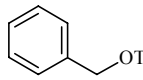
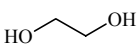
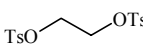


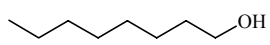
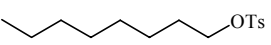
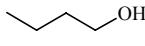
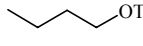
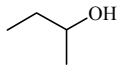

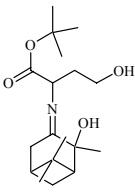
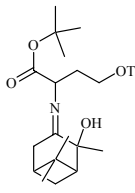


Abbildung 23: Yb(III) katalysierte Tosylierung des Nateglinid-Derivates (**10**) sowie der Hydroxyform des D₂-Rezeptorliganden (N-(1-Allyl-pyrrolidin-2-ylmethyl)-5-(3-hydroxy-propyl)-2-methoxy-benzamide) (**A**) und von primären und sekundären Alkoholen

Tabelle 4: Übersicht einiger im Rahmen dieser Arbeit tosylierter Alkohole

Ein-gang	Alkohole	Tosylierte Produkte	Zeit	Ausbeute [%]	Literatur Ausbeuten [%] ^d
1	(A)	(B)	12 h	85	70 ^a
2			10 min	82	74.4
3			24 h	84	81
4 ^b			24 h	75	- ^c
5			20 h	76	79
6			12 h	83	52,92
7			12 h	85	68
8			20 h	80	38, 80, 91
9			20 h	83	92, 80, 77
10			24 h	87	66, 94
11			5 h	89	38, 87, 90, 98
12			20 h	88	86, 80
13 ^b			24 h	86	99
14 ^b			18 h	79	-

^a bisherige maximale Ausbeute betrug 50 %

^b racemisches Edukt

^c Synthese in der Literatur beschrieben, jedoch keine Angaben zur Ausbeute

^d Literaturausbeute siehe Comagic et al. [107]

Dieser wieder verwendbare Lewissäure-Katalysator findet bei einer Vielzahl von Reaktionen als katalytische Komponente Verwendung [108]. Der synthetische Nutzen dieser Katalysators konnte weiterhin bei der milden Aminolyse von Epoxiden und Oxetanen demonstriert werden [109,110]. Diese Applikationen zeigen eindrucksvoll die polarisierenden Eigenschaften des Yb(III)-Kations auf Ether, was auf die ausgeprägte Oxophilie des Yb(III) zurückgeführt werden kann. Offensichtlich wird die Sauerstoff-Schwefel-Bindung im Tosylat stark polarisiert, sodass der nukleophile Angriff eines Alkohols selbst bei Raumtemperatur effizient erfolgt.

Selbst sterisch anspruchsvollere Alkohole wurden getestet und erfolgreich tosyliert. In fast jedem Fall konnten Tosylierungsausbeuten von nahezu 80 % erreicht werden und obwohl die Reaktionszeiten generell als lang bezeichnet werden konnten, (5-24 h) war im Fall der Verbindung 2 (Eingangsnummer aus der Tabelle 4) die Reaktion schon nach 10 min beendet. Eine interessante Beobachtung konnte bei Verwendung von Diphenylmethanol als Edukt gemacht werden. In diesem Fall bildete sich exklusiv und in hohen Ausbeuten der Bis-(diphenylmethyl)-ether. Der nukleophile Charakter der Hydroxy-Funktion bzw. des intermediär gebildeten hochreaktiven elektrophilen Tosylats könnte für die selektive Bildung des Ethers verantwortlich sein. Dünnschichtchromatographisch konnte allerdings nur der Ethers charakterisiert werden, was eine zweite möglich Erklärung offeriert, nämlich eine Yb(III) katalysierte Bildung von Ethern und Alkenen ausgehend von Alkoholen. Eine ähnliche Reaktion wurde bei Verwendung von Bismuth-(III)-halogenen beschrieben [111]. Um im Falle des Yb(III) einen analogen Reaktionsverlauf zu validieren, wurde Diphenylmethanol mit Yb(III) in Dichlormethan unter Wärmezufuhr 10 h unter Rückfluss erhitzt. Innerhalb dieser Zeit konnte über dünnschichtchromatographisch keine Bildung des Bis-(diphenylmethyl)-ethers nachgewiesen werden.

Aminofunktionen müssen in Anwesenheit von Alkoholen mit einer Schutzgruppe versehen werden, da die Amino-Funktion sonst ebenfalls tosyliert wird (z.B. Verbindung 7 (aus der Tabelle 4)). Bei der Tosylierung von Benzylalkohol ergaben sich bei Verwendung von Toluolsulfonsäurechlorid und Pyridin nur geringe Ausbeuten von 38 %. Unter Co(II)-Katalyse konnte das Tosylat zwar mit Ausbeuten von 91 % dargestellt werden, doch die Reaktion fand bei hohen Temperaturen von 80°C statt, was ein Nachteil bei thermisch labilen Verbindungen sein kann. Die Tosylierung des Benzylalkohols mittels Yb(III) Katalyse ergab bei Raumtemperatur Ausbeuten von 80 %. Abgesehen von einfachen primären und sekundären Alkoholen wurde die Yb(III) ka-

talysierte Tosylierung auf komplexere Alkohole wie z.B. die säurelabile Verbindung 14 (aus der Tabelle 4) und die Hydroxyform eines D₂-Rezeptorliganden (**A**) (Abbildung 23 und Tabelle 4) ausgedehnt. Die Tosylierung des tert.-Butylesterimins (14 aus Tabelle 4), das zwei säurelabile Gruppen trägt, die tert.-Butylester-Gruppe und die vom korrespondierenden Pinanon abgeleitete extrem säurelabile Schiff'sche Base, konnte in Ausbeuten von 79% tosyliert werden. Es wurde weder eine Spaltung der säueempfindlichen Funktionen, noch eine Tosylierung der sterisch gehinderten 2-Hydroxy-Funktion beobachtet. Die Tosylierung des hydroxyethylierten Nateglinid-Derivates (**10**) unter Verwendung von Yb(III) und Toluolsulfonsäureanhydrid, in Dichlormethan als Lösungsmittel, gelang in einer guten Ausbeute von 80 % bei Raumtemperatur.

3.1.4 Synthese der nicht-radioaktiven Standardverbindung N-(trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin zur *in vitro*-Evaluierung

N-(trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-D-tyrosin-benzylester (**7**) wurde mit 1-Brom-2-fluorethan bei 40°C in DMF/ TEA zur Reaktion gebracht. Der gebildete N-(trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin-benzylester konnte mit einer Ausbeute von 30 % isoliert werden. Die nachfolgende Spaltung des Benzyl-esters zu N-(Trans-4-isopropylcyclohexancarboxyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin erfolgte mit Pd/ C 10 % als Katalysator und Wasserstoff in Dioxan mit einer Ausbeute von 60 %.

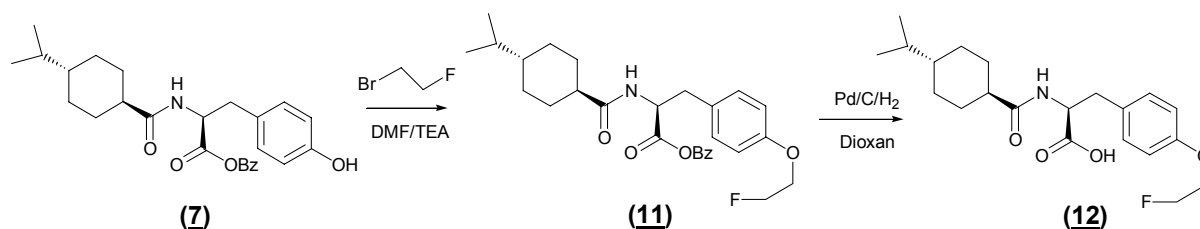


Abbildung 24: Synthese der nicht-radioaktiven Standardverbindung (**12**) zur *in vitro* Evaluierung

Die Reinigung des Produktes und der Zwischenstufen erfolgte über Säulenchromatographie an Kieselgel.

3.1.5 ^{18}F -Fluorierungen

3.1.5.1 Radioaktive ^{18}F -Direktfluorierung des Markierungsvorläufers (9)

Die radioaktive Direktfluorierung erfolgt laut Abbildung 21 im $[^{18}\text{F}]\text{F}^-/\text{Kryptofix}^{\text{®}}222/\text{K}_2\text{CO}_3$ -System in Acetonitril bei einer Temperatur von 120°C mit einer Ausbeute von 40 % nach finaler Spaltung der Benzylester-Schutzgruppe mit Pd/H_2 in Dioxan. Unterhalb von 120°C und bei Verwendung von anderen dipolar-aprotischen Lösungsmitteln wie DMF und DMSO kam es zu einer signifikanten Verschlechterung der Markierungsausbeute. Die Ergebnisse der radioaktiven ^{18}F -Direktfluorierung bei verschiedenen Lösungsmitteln sind in Abbildung 25 aufgezeigt. In Acetonitril bei 120°C konnten maximale RCA von 60 % nach 10 min erreicht werden, wobei z.B. die Markierungsausbeute in DMF bei gleicher Temperatur nur 20 % betrug. Eine Verlängerung der Reaktionsdauer führte in allen Fällen zu einer Verringerung der Radiochemischen Ausbeute (RCA) aufgrund von Zersetzungsreaktionen sowohl des markierten Produktes als auch des Markierungsvorläufers. Aufgrund der Verwendung von Palladium als Katalysator kam es bei der Aufreinigung des radioaktiven Produktes zu Problemen. Die Isolierung mittels Festphasenextraktion und auch die Abtrennung über HPLC führten zu Komplikationen, sodass das Produkt (2) nur mit sehr geringen radiochemischen Ausbeuten von 5-10 % isoliert werden konnte.

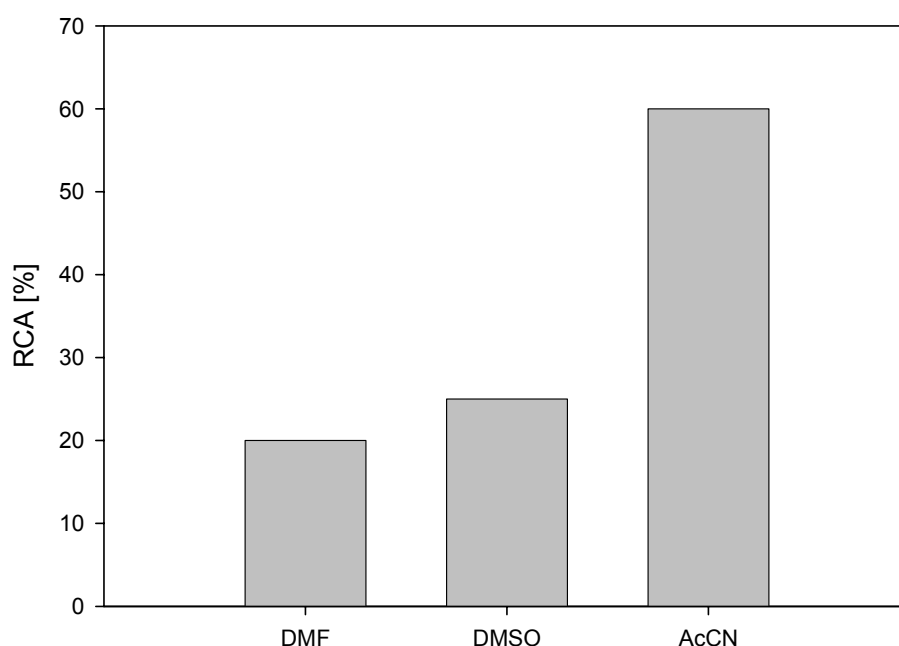


Abbildung 25: RCA an $[^{18}\text{F}]$ (2) in Abhängigkeit des Lösungsmittels bei einer optimierten Temperatur von 120°C (Lösungsmittel DMF, DMSO, AcCN; Temperatur= 120°C ; Reaktionszeit=10 min)

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Isolierung des Produktes, die auf die Verwendung von Palladium zurückzuführen waren, wurde eine in der radiopharmazeutischen Chemie gebräuchliche alternative Methode der radioaktiven Markierung, nämlich die ^{18}F -Fluorethylierung von phenolischen Hydroxy-Gruppen verwendet.

3.1.5.2 Radioaktive Markierung von 3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-propion-säure (**8**) mittels 2- ^{18}F Fluorethyltosylat

Als Markierungsvorläufer diente hier 3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(4-isopropyl-cyclohexancarboxyl)-amino]-propion-säure. Die Markierungsexperimente wurden ausschließlich mit 2- ^{18}F Fluorethyltosylat durchgeführt. Die Darstellung des Markierungsvorläufers (**8**) ist im Detail in den Abschnitten 3.1.2 und 4.2.1 beschrieben. Eine allgemeine Durchführungsvorschrift der Markierungsexperimente findet sich im Abschnitt 4.3.

Zunächst wird der Markierungsvorläufer mittels einer Hilfsbase (1 N NaOH) deprotoniert und anschliessend mit dem sekundären Markierungsvorläufer 2- ^{18}F Fluorethyltosylat bei bestimmten Reaktionsbedingungen umgesetzt.

Das optimale Medium für eine hinreichende radiochemische Ausbeute wird experimentell bestimmt. Die Parameter, welche es zu untersuchen gilt, sind die Reaktionsdauer, Lösemittelabhängigkeit, Temperaturabhängigkeit sowie eine Markierungsvorläuferabhängigkeit. Eine Variation der Hilfsbase und deren Konzentration kann vorgenommen werden.

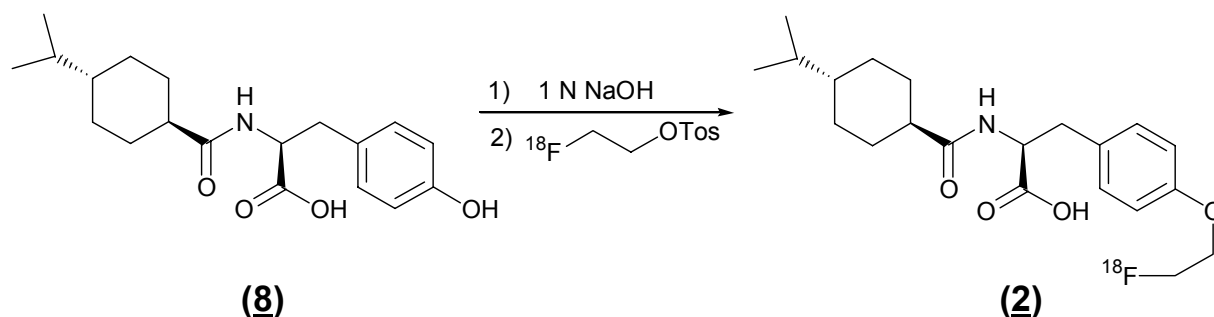


Abbildung 26: ^{18}F -Fluorethylierung von (**8**) mittels 2- ^{18}F Fluorethyltosylat zu (**2**)

Bei Untersuchung des Lösemiteleinflusses auf die RCA wurden die Lösungsmittelsysteme Acetonitril, DMF und DMSO untersucht. Die Wahl des geeigneten Lö-

lungsmittels ist von großer Bedeutung, da die nukleophile Substitution stark vom Lösungsmittel beeinflusst wird [112].

Auch ist die Temperatúrauswahl von großer Bedeutung, da mit einer steigenden Reaktionstemperatur eine schnellere Kinetik zu beobachten ist. Jedoch ist zu beachten, dass eine zu hohe Temperatur gewisse Zersetzungsreaktionen hervorrufen und dadurch die RCA niedriger ausfallen kann. Die Auswertung der Reaktionen erfolgt mit Hilfe der Radiodünnschichtchromatographie. Dabei wurden die in Abbildung 27 dargestellten radiochemischen Ausbeuten erzielt:

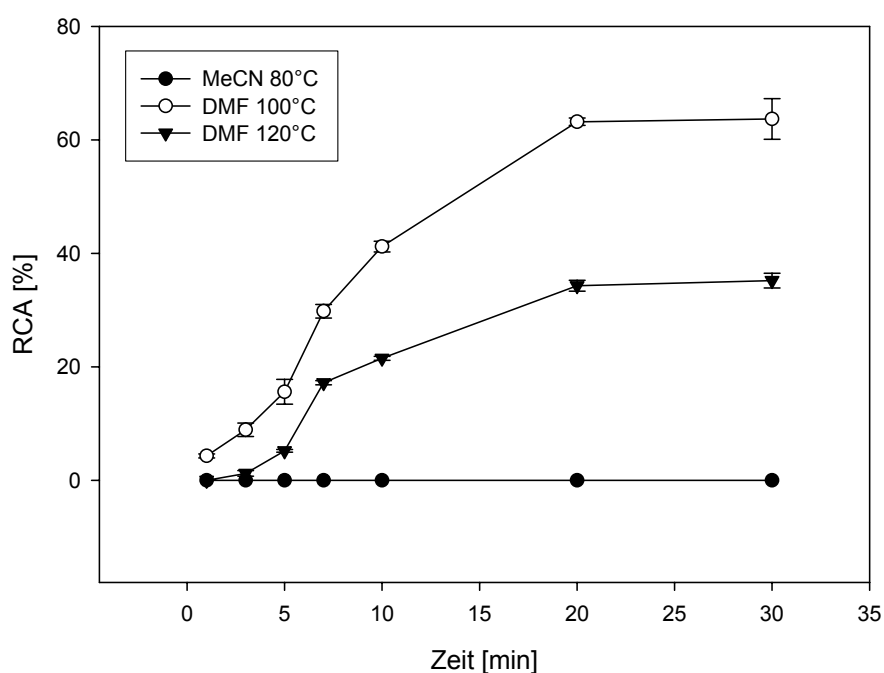


Abbildung 27: Radioaktive Markierung von (**8**) mit 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat: Abhängigkeit der RCA vom Lösungsmittel und Reaktionstemperatur (Reaktionszeit 1-30 min, $C_{\text{Markierungsvorläufer}}$ 2 mg/ml (6,0 $\mu\text{mol}/\text{ml}$), 1,95 eq. 1 N NaOH)

Die höchsten radiochemischen Ausbeuten (60-65 %, Abbildung 27) ließen sich im Medium DMF bei einer Temperatur von 100°C erzielen. Eine Erhöhung der Temperatur auf 120°C zeigte keine Verbesserung der RCA. Das Lösungsmittel Acetonitril eignet sich nicht für eine Markierung mittels 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat, da eine gewisse Aktivierung mittels der Temperatur gegeben sein muss, um eine Substitution zu beobachten.

Die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute in DMSO als Lösungsmittel wird in der Abbildung 28 aufgezeigt und anschließend diskutiert.

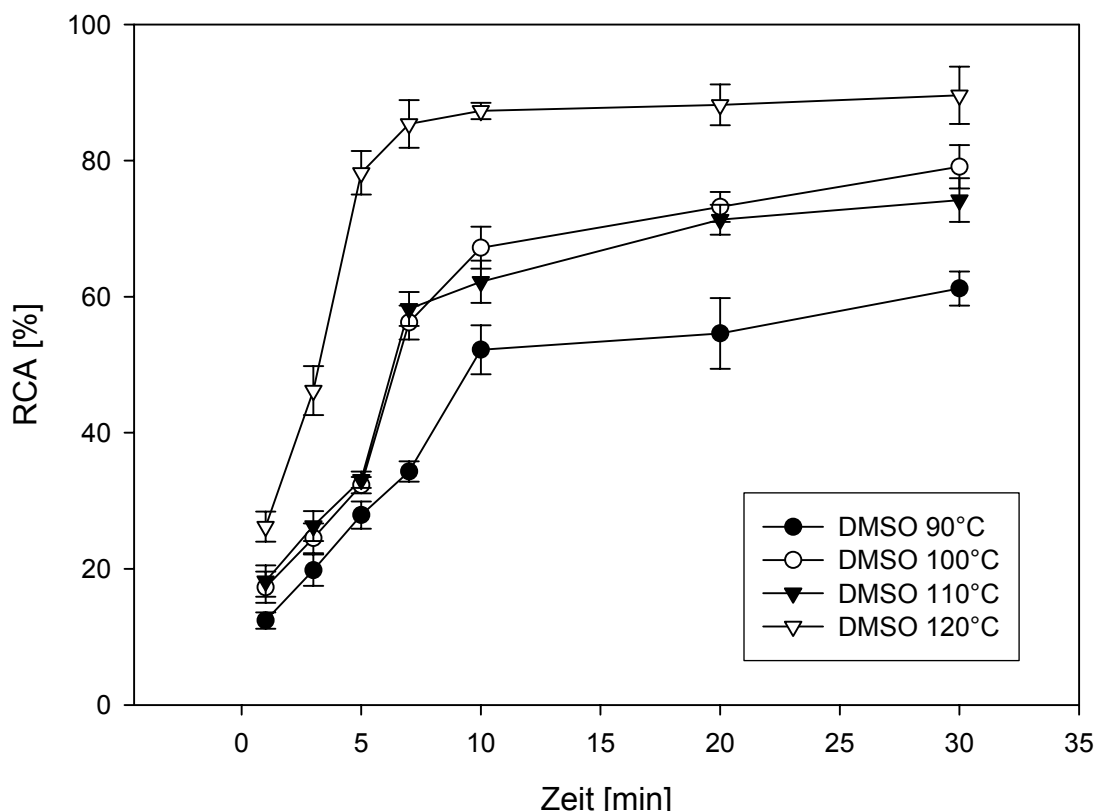


Abbildung 28: Radioaktive Markierung von **(8)** mit 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat: Abhängigkeit der RCA in DMSO von der Temperatur (Reaktionszeit 1-30 min, $c_{\text{Markierungsvorläufer}}$ 2 mg/ ml (6,0 $\mu\text{mol/ ml}$), 1,95 eq. 1 N NaOH)

Die höchsten radiochemischen Ausbeuten von 85-90 % liessen sich im Lösungsmittel DMSO bei einer Temperatur von 120°C erzielen. Anhand der Graphik ist eindeutig ersichtlich, dass mit steigender Temperatur die RCA von 50 % bis auf 85 % zunimmt.

Im Vergleich zu den Lösungsmitteln MeCN und DMF konnte gezeigt werden, dass DMSO das Lösungsmittel der Wahl darstellt, da die RCA (bei 120°C) um bis zu 20 % höher ist.

Die Untersuchung der Eduktsättigungskonzentration diente der Ermittlung der optimalen Einwaage an Markierungsvorläufer. Während eine zu geringe Einwaage an Markierungsvorläufer eine Erniedrigung der RCA bewirkt, führt eine zu hohe Einwaage zu präparativen Trennungsproblemen bei der Reinigung des Produktes mittels Radio-HPLC. Dieser Aspekt ist insbesondere bei der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel zu beachten, da es zu einem sogenannten „Peaktailing“ kommen kann.

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration an Markierungsvorläufer wurde dieser über einen Konzentrationsbereich von 3,0- 30,0 $\mu\text{mol/ ml}$ variiert und die radiochemischen Ausbeuten in DMSO bei einer Temperatur von 120°C untersucht.

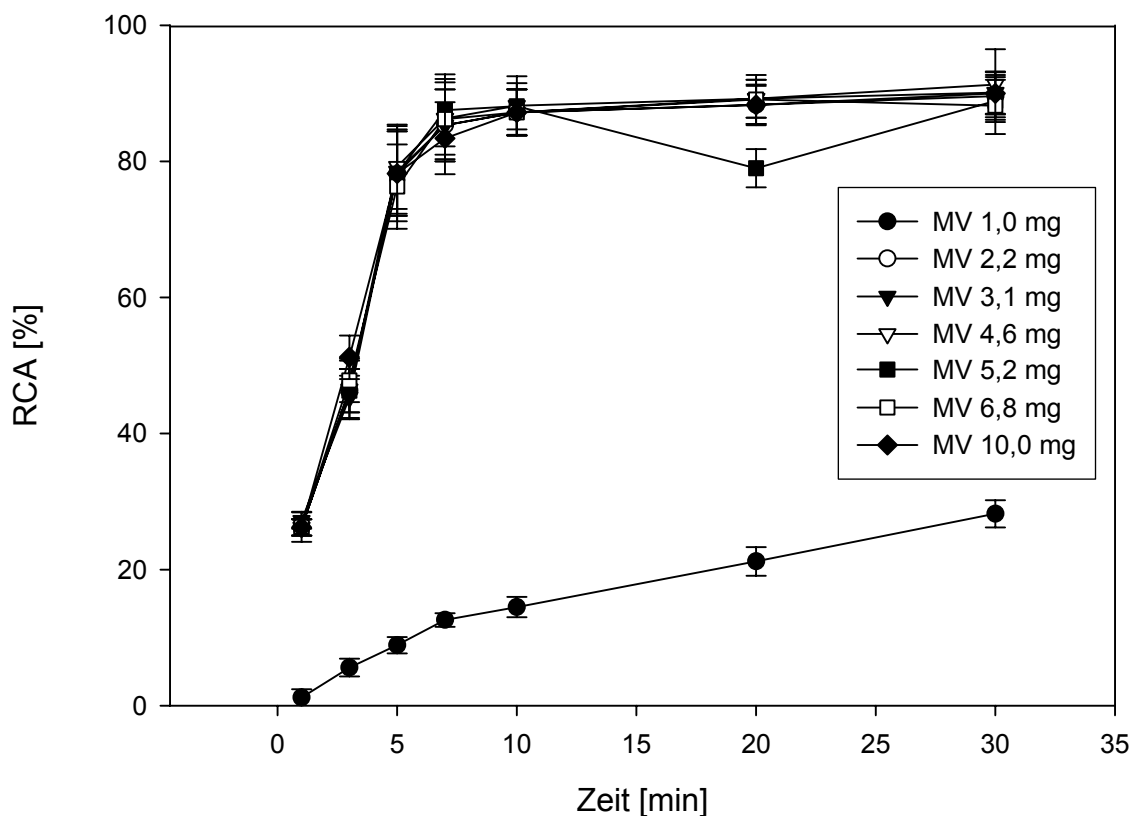


Abbildung 29: Radioaktive Markierung von **(8)** mit 2- ^{18}F Fluorethyltosylat: Abhängigkeit der RCA von der Markierungsvorläuferkonzentration im Lösungsmittel DMSO bei einer Reaktionstemperatur von 120°C (Reaktionszeit 1-30 min, 1,95 eq. 1 N NaOH)

Die höchsten radiochemischen Ausbeuten von 85-90 % ließen sich oberhalb der Markierungsvorläuferkonzentration von 2,2 mg (6,6 $\mu\text{mol/ ml}$) erzielen. Erst ab einer Verringerung der Markierungsvorläuferkonzentration unterhalb 2,0 mg (6,0 $\mu\text{mol/ ml}$) ist eine signifikante Verschlechterung der RCA auf < 20 % zu beobachten.

Daher ist festzustellen, dass eine Reaktionstemperatur von 120°C im Lösemittel DMSO bei 1,95 eq. Hilfsbase 1 N NaOH schon nach 5 min Reaktionszeit bei einer Markierungsvorläuferkonzentration von 2,2 mg (6,6 $\mu\text{mol/ ml}$) eine Ausbeute von über 85 % an radioaktiv markiertem Produkt **(2)** liefert.

Für die präparative Abtrennung wurde eine Konzentration von 2,2 mg/ ml (6,6 $\mu\text{mol/ ml}$) und 200 MBq 2- ^{18}F Fluorethyltosylat verwendet. Nach der Reaktionszeit von 10 min wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser verdünnt und ohne vorherige Fest-

phasenextraktion mittels semipräparativer HPLC (RP18-Säule, 80 % Puffer (NaAc/HAc 0,1 mol/l, pH 5) 20 % MeCN) aufgereinigt.

Die wiederum in Wasser verdünnte HPLC-Produktfraktion wurde auf einer Festphasenkartusche (Sep-Pak[®]-C₁₈, Fa. Waters) fixiert, getrocknet und mit warmem Ethanol eluiert. Das Produkt konnte in einer radiochemischen Ausbeute von 55 % und einer radiochemischen Reinheit > 98,5 % isoliert werden (Abbildung 30).

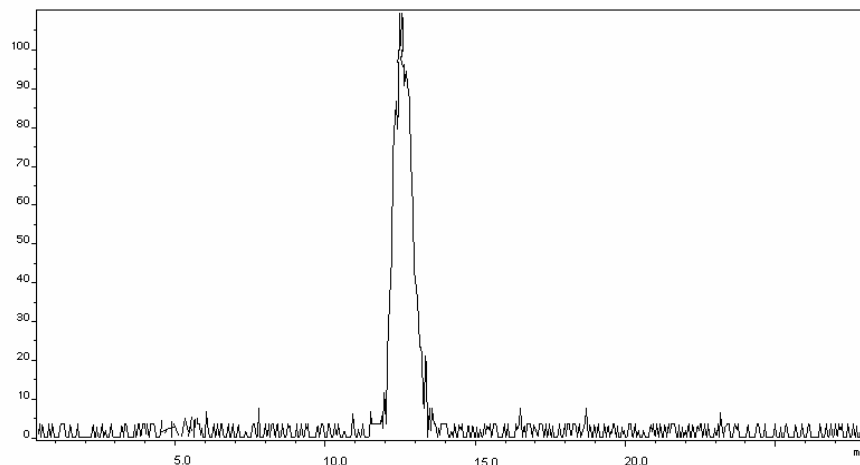


Abbildung 30:

Chromatogramm der radiochemische Reinheit von N-(trans-4-isopropylcyclohexan-carbonyl)-O-(2-[¹⁸F]fluorethyl)-D-tyrosin (**2**) (Reaktionsbedingungen: 2 mg/ml (6,6 μmol/ml) 3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-propion-säure, 1,95 eq. 1 N NaOH, 120°C, DMSO, Reaktionszeit 10 min), Retentionszeit: 12,8 min, RP18-Säule, 80 % Puffer (NaAc/HAc 0,1 mol/l, pH 5) 20 % MeCN)

3.2 Markierungen mit ^{99m}Tc

3.2.1 N-{4-[^{99m}Tc (I)-tricarbonyl-N,N-bis(carboxymethyl)aminoethyl]-5-chlorbenzol-carboxamidoethyl]-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexyl-harnstoff-Natriumsalz (^{99m}Tc -Glibenclamid-Natriumsalz)

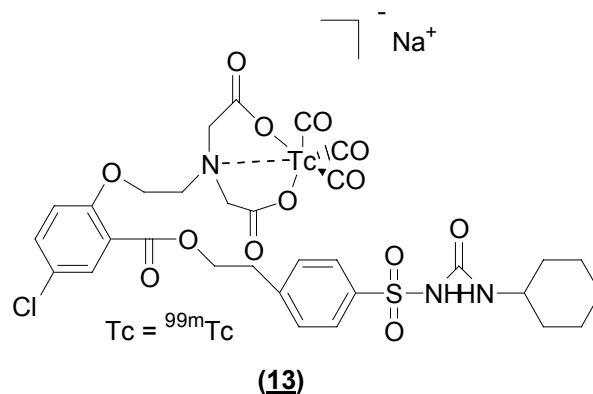


Abbildung 31: Struktur von ^{99m}Tc -Glibenclamid-Natriumsalz **(13)**

Die *in vivo*-Evaluierung von ^{18}F -markierten Glibenclamid-Derivaten im Menschen lässt vermuten, dass längere Messzeiten nötig sind, um die hohe Radioaktivitätskonzentration in der Leber zu reduzieren (Abbildung 15/ 16). Dieser hohe Leberuptake stört erheblich die Quantifizierung der pankreatischen Aktivitätsaufnahme [113,114]. Die radioaktive Markierung des Glibenclamids mit längerlebigen Radionukliden wie beispielsweise ^{123}I ($T_{1/2}=13,02\text{ h}$) oder ^{99m}Tc ($T_{1/2}=6,02\text{ h}$) könnte die Möglichkeit schaffen, längere Messzeiten zu realisieren. Dies hätte den Vorteil, dass die erste Metabolisierungsphase in der Leber abgewartet werden könnte und anschliessend nur noch das am Rezeptor gebundene Radiomolekül gemessen wird. Eine ^{123}I -Markierung des Glibenclamids würde zu einer weiteren Zunahme der Lipophilie führen und daher die spezifische Aufnahme des Glibenclamids in die Leber begünstigen [115]. Die Markierung des Glibenclamids mit einem anionischen ^{99m}Tc -Komplex hingegen sollte zu einer Erhöhung der Hydrophilie und zu einer verstärkten Ausscheidung über die Niere führen. Eine Derivatisierung der Glibenclamid-Grundstruktur sollte aufgrund der Erfahrungen mit Fluor-alkylierten Glibenclamiden aus sterischen Gesichtspunkten keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität zum SUR1 haben [116]. Eine Verminderung der Bindungsaffinität könnte allerdings durch die erniedrigte Lipophilie eintreten, was in der Literatur postuliert wird. Daher ist neben der Synthese der

^{99m}Tc-markierten Verbindung auch die Darstellung des nicht-radioaktiven Re-Standards notwendig, um Auswirkungen der doch erheblichen Derivatisierung auf die SUR1 Affinität bzw. der physiologischen Insulin-stimulierenden Wirkung zu bestimmen.

3.2.1.1 Synthese des Chelators N,N-Bis[tert.-butoxycarbonyl)methyl]-2-bromethylamin (**14**) zur Konjugation an das Glibenclamid und Komplexierung mit ^{99m}Tc(CO)₃

Die Synthese von N,N-Bis[tert.-butoxycarbonyl)methyl]-2-bromethylamin erfolgt nach Williams und Rapoport ausgehend von 2-Aminoethanol und Bromessigsäure tert.-butylester unter Zuhilfenahme von Diisopropylethylamin als Base und nachfolgender Bromierung mittels NBS (Abbildung 32) [117]. Die Substanz konnte nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel in Ausbeuten von 90 % erhalten werden.

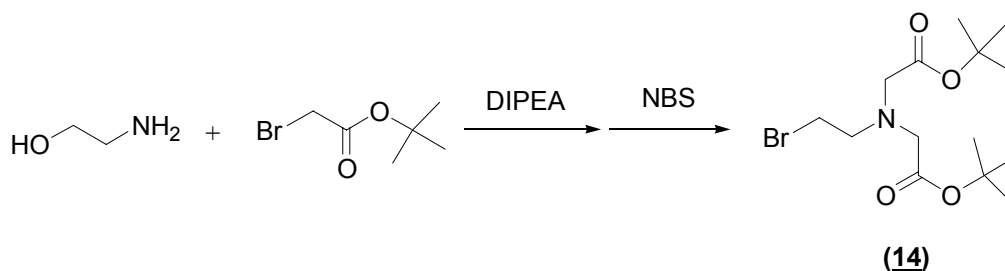


Abbildung 32: Synthese von N,N-Bis[tert.-butoxycarbonyl)methyl]-2-bromethylamin

3.2.1.2 Synthese des Markierungsvorläufers N-{4-[N,N-bis-(carboxy-methyl)-aminoethyl]-5-chlorbenzol carboxamido]-ethyl}-benzol-sulfonyl-N'-cyclohexylharnstoff-tri-Natriumsalz

Die Synthese des Markierungsvorläufers N-{4-[N,N-bis(carboxymethyl)-aminoethyl]-5-chlorbenzol carboxamido]-ethyl}-benzolsulfonyl-N'-cyclohexylharnstoff-tri-Natriumsalz (**21**) startet von kommerziell erhältlicher 5-Chlorsalicylsäure, die in einem ersten Reaktionsschritt mit Benzylbromid und NaOH zum korrespondierenden Benzylester in einer Ausbeute von 95 % umgesetzt wird. Nachfolgend kann der zuvor synthetisierte Chelator N,N-Bis[tert.-butoxycarbonyl)methyl]-2-bromethylamin (**14**) im Aceton/K₂CO₃-System an die phenolische OH-Funktion angekoppelt und der Benzylester

mittels Pd/ C/ H₂ zur Carbonsäure reduziert werden. Die Reduktion erfolgt mit einer mittleren Ausbeute von 50 %. Das Chelator-konjugierte Salicylsäurederivat wird mit Methylchloroformiat/ TEA in Aceton zum Aktivester umgesetzt und mit 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonamid zur Reaktion gebracht. Die Bildung des Sulfonylharnstoffs wird mittels Kopplung von Cyclohexylisocyanat unter Verwendung von Cu(I)Cl als Katalysator erreicht [118]. Die tert.-Butylgruppen des Chelators können mit HCl (6 N) innerhalb von 20 h bei Raumtemperatur gespalten werden. Die Verwendung von Trifluoressigsäure, die üblicherweise zur Entschützung benutzt wird, führte in diesem Fall selbst nach Reaktionszeiten von 24 h nicht zur Spaltung der tert.-Butylester. Das Zwischenprodukt wird lyophilisiert, in Wasser gelöst und mit 4 eq. NaOH (1 N) zum finalen Tri-Natriumsalz des Markierungsvorläufers (**21**) umgesetzt. Dieser Markierungsvorläufer kann nun mit dem *fac*-[^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺ zum markierten Produkt umgesetzt werden (Abbildung 33).

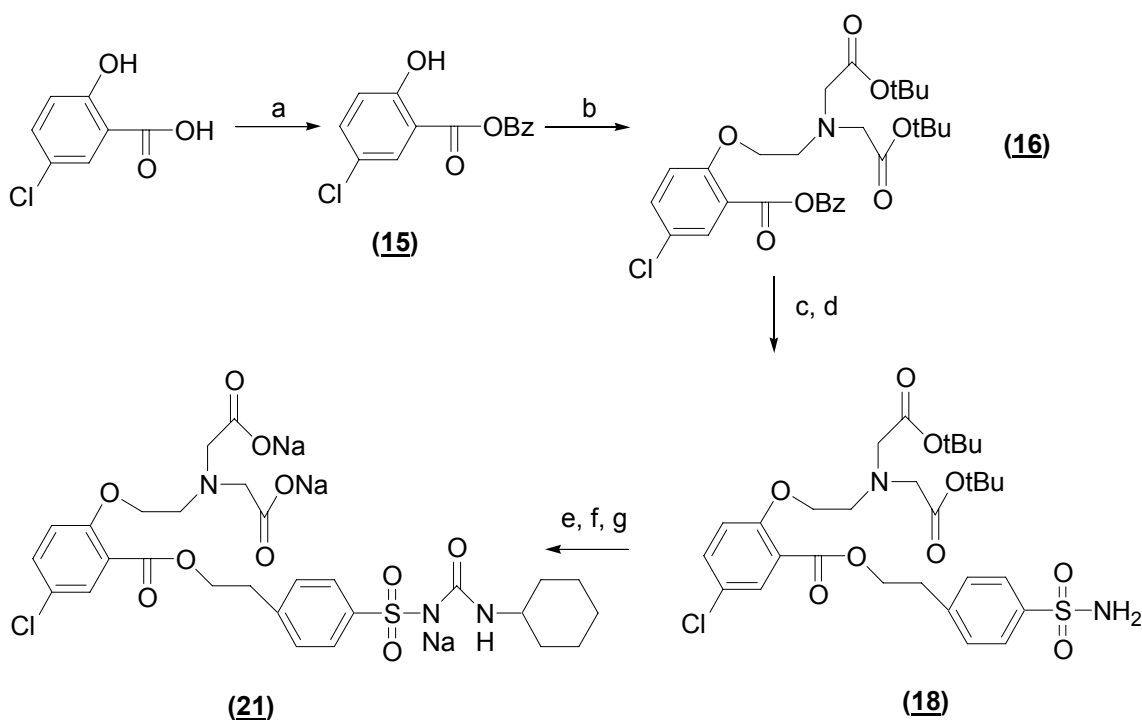


Abbildung 33.

Synthese des Markierungsvorläufers (**21**) zur radioaktiven Markierung mit *fac*-[^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺
a) Benzylbromid, NaOH, Rückfluss; b) N,N-Bis [(tert.-butoxycarbonyl)methyl]-2-bromethyl-amin, K₂CO₃, Aceton, Rückfluss; c) Pd/ C, H₂, Methanol; d) Methylchloroformiat, Trimethylamin, Aceton, 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonamid, -20°C; e) Cyclohexylisocyanat, Cu(I)Cl, Acetonitril f) HCl, Rt.; g) 4 eq. 1 N NaOH, Lyophilisation

3.2.1.3 Synthese des nicht-radioaktiven Re-Analogons N-{4-[Re(I)-tricarboxyl-N,N-bis(carboxymethyl)-aminoethyl]-5-chlor-benzol-carboxamido-ethyl]-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexylharnstoff-Na-triumsalz (23)

Da Rhenium und Technetium chemisch sehr ähnlich sind, ist die Synthese des Re-Analogons zur ^{99m}Tc -markierten Verbindung eine wichtige Voraussetzung zur Etablierung einer effizienten Abtrennung mittels präparativer HPLC (Analytik: DC). Diese beiden Trennverfahren sind zur Ermittlung der radiochemischen Markierungsausbeute notwendig und speziell die HPLC-Methode ist zur Abtrennung der radioaktiven Verbindung unverzichtbar. Weiterhin muss natürlich überprüft werden, ob die doch erhebliche Derivatisierung der Glibenclamid-Grundstruktur durch die ^{99m}Tc -Chelat- bzw. Re-Chelat-Substitution einen Einfluss auf die Bindungsaffinität und makroskopische Insulinsekretion hat. Es ist allgemein üblich, die analogen Re-Verbindungen zur Evaluierung biologischer Parameter wie z.B. K_D - und IC_{50} -Werte heranzuziehen. Die Re-Verbindung kann ausgehend vom Tri-Natriumsalz des Markierungsvorläufer und unter Verwendung von $[\text{Net}_4]_2[\text{ReCl}_3(\text{CO})_3]$ [119] in Methanol mit moderaten Ausbeuten von 46 % dargestellt werden. Die Verbindung wurde vollständig über ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, FD-Massenspektroskopie und IR-Spektroskopie charakterisiert. Es wurden HPLC- sowie DC-Laufmittelbedingungen erarbeitet, um für die analoge ^{99m}Tc -Verbindung eine eindeutige Bestimmung der radiochemischen Ausbeute zu gewährleisten und ihre präparative Abtrennung zu ermöglichen.

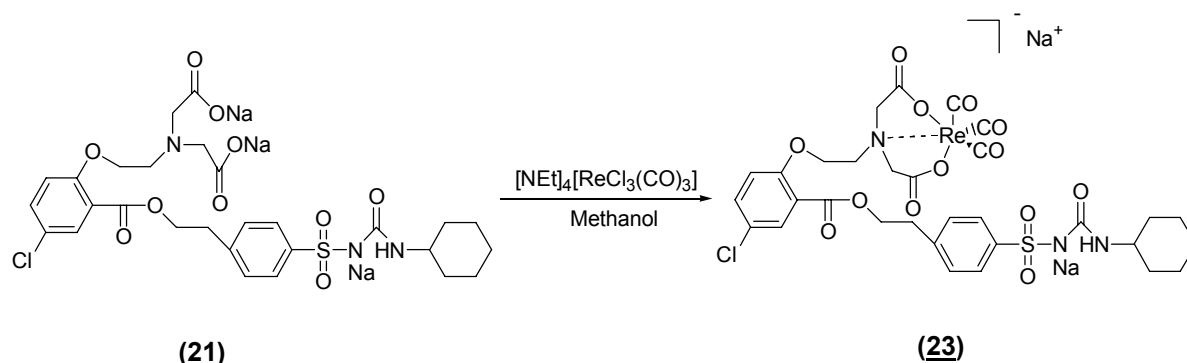


Abbildung 34:

Synthese von N-{4-[Re(I)-tricarboxyl-N,N-bis-(carboxymethyl)-amino-ethyl]-5-chlorbenzol-carboxamido-ethyl]-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexylharnstoff-Natriumsalz zur Bestimmung der Bindungsaffinität und Insulin-stimulierenden Wirkung

3.2.1.4. Radioaktive Markierung von N-{4-[N,N-bis-(carboxy-methyl)-aminoethyl]-5-chlorbenzol-carboxamido]ethyl}-benzol-sulfonyl-N'-cyclohexylharnstoff-tri-Natriumsalz mittels des *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{I})(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ -Komplexes

Die radioaktive Markierung des Chelator-konjugierten Glibenclamid-Derivates erfolgt in hohen Ausbeuten mittels Anwendung des *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{I})(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ -Komplexes in wässriger Lösung bei 100°C innerhalb von 35 min. Die drei Wasser-Liganden werden hierbei durch den Stickstoff und die beiden Carboxyl-Gruppen substituiert und führen so zur Ausbildung eines thermodynamisch sehr stabilen Komplexes, der allen Anforderungen einer *in vivo*-Anwendung genügt [120]. Die Synthese des *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{I})(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ -Komplexes (**24**) erfolgt mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (Isolink® Mallinckrodt), der auf einer Entwicklung von Alberto et al. basiert [121]. Es handelt sich um eine *in situ*-Bildung von Kohlenmonoxid über die thermische Zersetzung von Kaliumborancarbonat ($\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$) [122] im sauren Milieu, wobei das sich bildende Borancarbonyl gleichzeitig als Reduktionsmittel für das Generatorproduzierte ^{99m}Tc -Pertechetat dient (Abbildung 35).

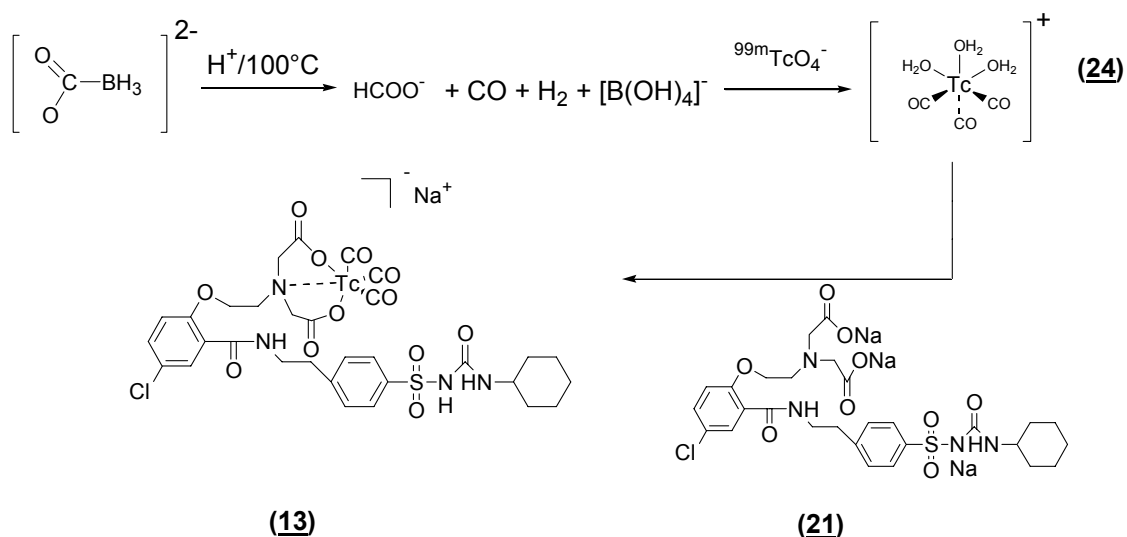


Abbildung 35: Synthese von *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{I})(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (**24**) ausgehend von $^{99m}\text{Tc}[\text{TcO}_4]^-$ über thermische Zersetzung von $\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$ und Umsetzung zu (**13**)

Auf diesem Prinzip beruht der bereits lyophilisierte Kit, zu dem man lediglich noch die wässrige $^{99m}\text{Tc}[\text{TcO}_4]^-$ -Lösung (0,9 % NaCl) zugeben muss und bei 100°C 20 min lang erhitzt. Der Markierungsvorläufer-Komplex *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{I})(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ bildet sich

stabil in einer mittleren Ausbeute von 95 % und kann nun entweder als neutrale, saure oder basische Lösung dem zu markierenden Edukt zugegeben werden. Die ursprüngliche Lösung ist basisch und muss zur Einstellung eines neutralen pH-Wertes mit 1 N HCl versetzt werden. Saure Markierungsbedingungen können durch Zugabe eines Überschusses an 1 N HCl erreicht werden. Es hängt von der jeweils zu markierenden Substanz ab, bei welchem pH-Wert radioaktiv markiert wird. Es wurden daher in einem Versuch bei einer Reaktionstemperatur von 100°C, einer Markierungsvorläufermenge von 2 mg/ ml (2,8 µmol/ ml) und einer Reaktionszeit von 30 min Markierungsversuche bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Es zeigte sich eindeutig, dass eine Umsetzung des Markierungsvorläufers mit $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{I})(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ ausschließlich in neutralisierter Lösung stattfindet. Sowohl in basischer (pH 10) als auch in leicht saurer (pH 4) Lösung kommt es zu keiner Bildung des Zielmoleküls. Ausgehend von diesen ersten grundlegenden Experimenten wurden sowohl die Reaktionstemperatur, die Menge an eingesetztem Markierungsvorläufer, als auch die Reaktionszeit der erwünschten Komplexbildung eingehender untersucht. Bei Untersuchung des Temperatureinflusses auf die RCA wurde die Menge an Markierungsvorläufer mit 2 mg/ ml (2,8 µmol/ ml) konstant gehalten und die Kinetik der Bildung des finalen Produktes im Zeitraum von 5-30 Minuten mittels DC und HPLC bestimmt (Abbildung 36).

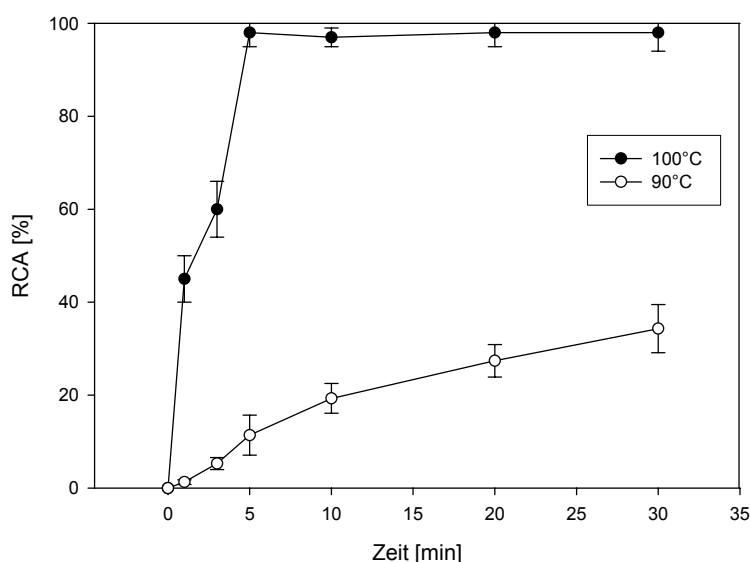


Abbildung 36:

Radioaktive Markierung von **(21)** mit $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{I})(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$: Abhängigkeit der RCA von der Reaktionstemperatur. (Reaktionszeit 1-30 min, $C_{\text{Präcursor}}$ 2 mg/ ml (2,8 µmol / ml), pH 7)

Die Reaktion wurde zunächst bei 100°C durchgeführt, da diese Temperatur nach ersten Experimenten zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit schon hohe RCA lieferte. Schon eine Erniedrigung der Temperatur auf 90°C zeigte eine deutliche Verschlechterung der RCA auf 33 % nach 30 min. Eine Erhöhung der Temperatur brachte keine Vorteile, da nur eine geringfügig schnellere Kinetik beobachtet wurde. Daher ist festzustellen, dass eine Reaktionstemperatur von 100°C als optimale Temperatur zur Markierung betrachtet werden kann, was einen apparativen Vorteil bietet, da die fertige Lösung an $fac-[^{99m}Tc(I)(OH_2)_3(CO)_3]^+$ für die nachfolgende Markierung weder abgekühlt noch aufgeheizt werden muss. Dies ist für eine schnelle Präparation ein deutlicher Vorteil. Eine Bestimmung der Markierungsvorläuferabhängigkeit der RCA zeigte, dass unterhalb einer notwendigen Konzentration von 0,3 mg/ ml (0,4 µmol/ ml) die RCA von 98 % auf unter 80 % sinkt. Für die präparative Abtrennung wurde eine Konzentration von 0,6 mg/ ml (0,85 µmol/ ml) und 200-900 MBq $[^{99m}Tc]TcO_4^-$ verwendet. Zur Aufreinigung und Isolierung des Rohproduktes wurde das Reaktionsgemisch ohne vorherige Festphasenextraktion direkt über eine RP18-HPLC-Säule unter Verwendung eines Gradientensystems aufgetrennt (65 % Puffer (NH₄Ac/ HAc 0,25 mol/ l, pH 4,5) 35 % MeCN). Das Produkt wurde aufgefangen, mit Wasser verdünnt und auf einer StrataX-Festphasenextraktionskartusche fixiert. Nach Spülen der Kartusche mit Wasser konnte das Produkt mit warmem Ethanol eluiert, mit physiologischer NaCl-Lösung versetzt und sterilfiltriert werden. Die finale RCA über alle Synthese- und Trennungsschritte betrug 70 % nach einer Synthesezeit von 80 min. Abschliessend wurde von der injektionsfertigen Lösung eine Qualitätskontrolle durchgeführt, wobei eine radiochemische Reinheit von 99,9 % festgestellt wurde.

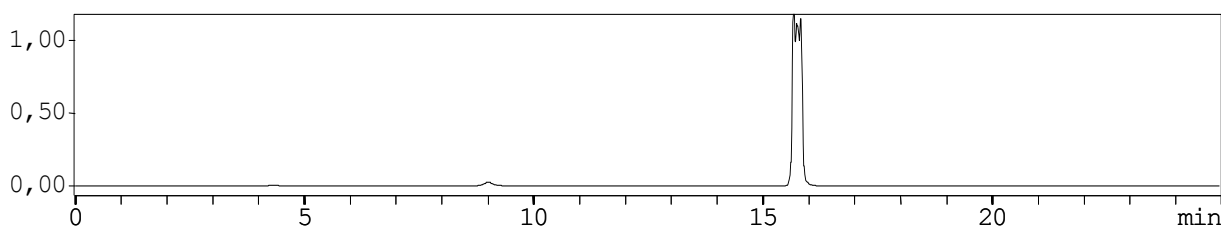


Abbildung 37: HPLC-Chromatogramm der radiochemische Reinheit von N-{4-[$^{99m}Tc(I)$ -tricarbonyl-N,N-bis(carboxymethyl)-aminoethyl]-5-chlorbenzol-carboxamidoethyl]-benzolsulfonyl}-N'-cyclohexyl-harnstoff-Natriumsalz (^{99m}Tc -Glibenclamid Natriumsalz) (**13**) (Reaktionsbedingungen: 0,6 mg/ ml (0,85 µmol/ ml) N-{4-[N,N-bis-(carboxy-methyl)-aminoethyl]-5-chlorbenzol carboxamido]ethyl}-benzol-sulfonyl-N'-cyclohexylharnstoff-tri-Natriumsalz, 100°C, Reaktionszeit 30 min, Retentionszeit: 15,5 min, RP18-Säule, Gradientensystem 65 % Puffer (NH₄Ac/ HAc 0,25 mol/ l, pH 4,5) 35 % MeCN

3.3 Evaluierungen

3.3.1 Affinitäten

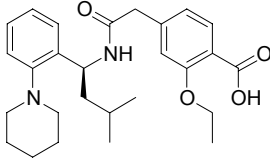
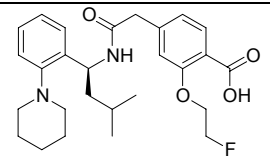
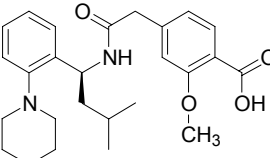
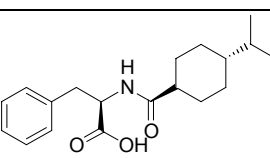
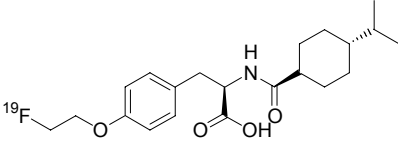
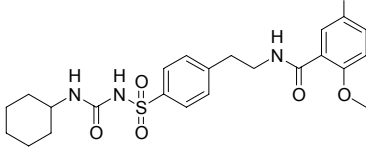
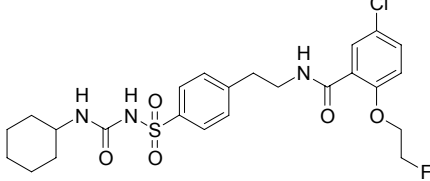
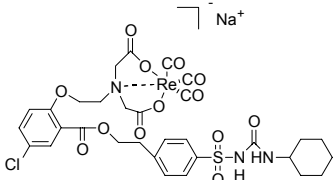
Um die Bindungsaffinitäten (K_D -Wert) von Nateglinid und Glibenclamid an den menschlichen SUR1 zu untersuchen, wurden Verdrängungsstudien mit [^3H]Glibenclamid an COS1-Zellmembranen, die den menschlichen SUR1 exprimieren, durchgeführt [123, 124] (für Details siehe Kapitel 4.4).

Der K_D -Wert des N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin (**12**) (27,8 μM , Hill-Koeffizient 1,10) zeigte eine deutliche Verschlechterung gegenüber dem original Nateglinid (0,55 μM , Hill-Koeffizient 1,10). Der K_D -Wert verschlechterte sich fast um den Faktor 50. Die Modifikation am aromatischen Ring der Aminosäure hat wahrscheinlich einen wesentlichen Einfluss auf die pharmakophore Gruppe, deren Modifikation zu der beobachteten Verschlechterung führt.

Der K_D -Wert vom N-{4-[Re(I)-tricarboxyl-N,N-bis-(carboxymethyl)-amino-ethyl]-5-chlorbenzol-carbox-amido-ethyl]-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexylharnstoff-Natriumsalz (**23**) (0,50 nM, Hill-Koeffizient 1,10) zeigte trotz der erheblichen Änderung an der phenolischen Hydroxyfunktion keine Verschlechterung des K_D -wertes gegenüber des original Glibenclamids (0,33 nM, Hill-Koeffizient 1,00).

Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass das hydrophile Glibenclamid-Derivat trotz dieser geringen Lipophilie einen niedrigen K_D -Wert aufweist.

Tabelle 5: Affinitäten/ K_D -Werte ausgewählter SUR1-Liganden im Vergleich

Formelname	Formel	Evaluierungswert (K_D)
Repaglinid		$50,3 \pm 6,2$ nM
[^{19}F]Fluorethoxy-Repaglinid		$134 \pm 18,9$ nM
[^{12}C]Fluormethoxy-Repaglinid		$83 \pm 6,4$ nM
Nateglinid		$0,55 \pm 7,8$ μM
[^{19}F]Fluorethoxy-Nateglinid (12)		$27,8 \pm 3,5$ μM
Glibenclamid		$0,33 \pm 0,02$ nM
[^{19}F]Glibenclamid		$0,22 \pm 0,07$ nM
Re-Glibenclamid (23)		$0,50 \pm 0,04$ nM

Anhand der Tabelle 5 ist eindeutig ersichtlich, dass fast alle in unserem Arbeitskreis hergestellten Ligand-Derivate eine Verschlechterung der Affinitätswerte im Vergleich zu den original Molekülen besitzen. Das von uns hergestellte ^{99m}Tc -Glibenclamid-Derivat hat dagegen einen sehr zufrieden stellenden K_D -Wert von $0,50 \mu\text{M}$.

Das [^{19}F]Fluorethoxy-Nateglinid-Derivat hat einen K_D -Wert von $27,8 \mu\text{M}$. Dies scheint für eine *in vivo*-Anwendung eindeutig zu gering. Dieser Tatbestand ist aus der Modifikation zum originalen Nateglinid zurückzuführen. Die Änderung vom Phenylderivat zum Tyrosinderivat war aber nötig um die gewünschte Zielverbindung zu synthetisieren. Aufgrund des hohen Affinitätswertes wurden somit keine weiteren Untersuchungen mit dem Nateglinid-Derivat durchgeführt.

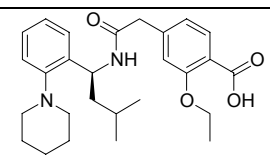
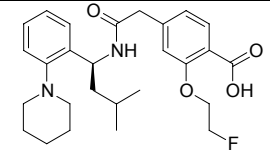
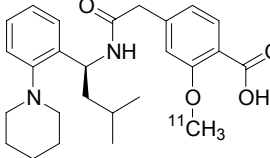
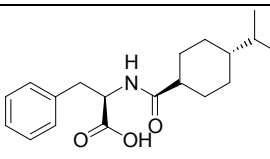
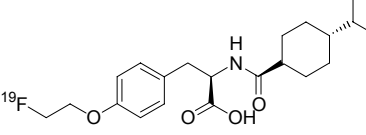
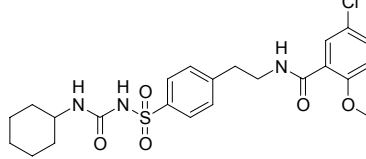
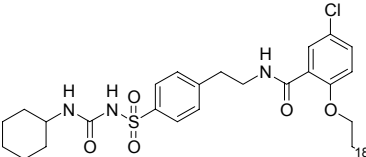
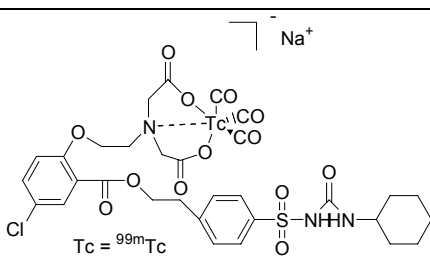
3.3.2 Lipophilien

Einer der entscheidenden Faktoren für die Wirkung einer Substanz ist ihre Fähigkeit an den Zielort zu gelangen. Von wesentlicher Bedeutung ist hierbei die Lipophilie, die zum einen ein Hinweis auf eventuelle Plasmaproteinbindung ist, und zum anderen entscheidend ist für die Fähigkeit der Verbindung die Zellmembran zu passieren. Die Lipophilie ist deshalb ein wesentlicher Faktor für die beiden synthetisierten Verbindungen. Daher ist die Kenntnis der Lipophilie eines Moleküls ein wichtiger Hinweis, um seine Fähigkeit zur Passage abschätzen zu können.

Die experimentelle Bestimmung der Lipophilie einer Verbindung erfolgt durch Bestimmung ihres logP-Wertes. Es handelt sich hierbei um den Logarithmus des Verteilungskoeffizienten (engl.: partition coefficient) der Verbindung in einem Octanol/Wasser-System (für Details siehe Kapitel 4.5).

Anhand der Tabelle 6 ist eindeutig zu erkennen, dass alle bisher synthetisierten Verbindungen einschließlich des im Rahmen dieser Arbeit hergestellten [¹⁹F]Fluorethoxy-Nateglinid-Derivates alle Lipophiliewerte im positiven Bereich liegen. Diese Tatsache findet sich auch immer wieder in der Literatur [124, 125]. Die einzige Verbindung, welche ausserhalb der Tendenz liegt, ist das innerhalb dieser Arbeit hergestellte ^{99m}Tc-Glibenclamidderivat. Es weist einen negativen logD_{7,4}-Wert (siehe Kapitel 4.5) von -0,21 auf. Diese Tatsache bestätigt das vorgesehene pharmakologische Konzept. Es ist dadurch die Hoffnung gegeben, dass eine Lebergängigkeit der Substanz deutlich verringert werden kann. Auch wird es interessant sein, diesen Wert genauer zu untersuchen, da bisherige Annahmen zur Rezeptorbindung einen Liganden mit einer hohen Lipophilie voraussetzten. In der allgemeinen Literatur findet sich der Zusammenhang wieder, dass eine gewisse Lipophilie vorhanden sein muss, um eine Bindung des Pharmakons an den Rezeptor zu gewährleisten [124, 125].

Tabelle 6 : Lipophiliewerte ausgewählter Verbindungen im Vergleich

Formelname	Formel	Lipophilien (logD _{7,4})	Methode a, b
Repaglinid		2,54	a
[¹⁹ F]Fluorethoxy-Repaglinid		2,39	a
[¹¹ C]Fluormethoxy-Repaglinid		1,85	b
Nateglinid		1,60	a
[¹⁹ F]Fluorethoxy-Nateglinid (12)		1,40	a
Glibenclamid		1,74	a
[¹⁸ F]Glibenclamid		1,52	b
^{99m} Tc-Glibenclamid (13)		-0,21	b

a: HPLC-Methode

b: Scheidetrichtermethode

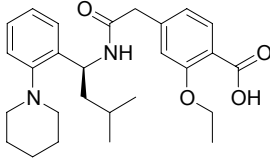
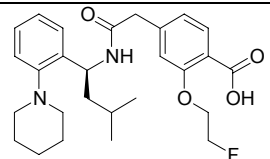
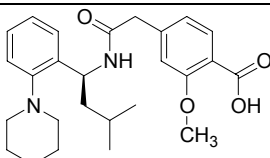
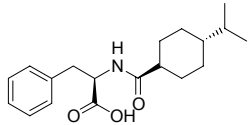
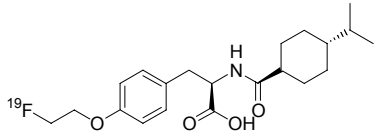
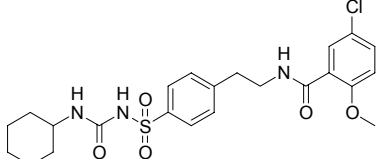
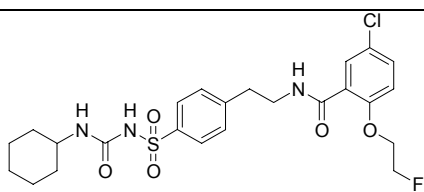
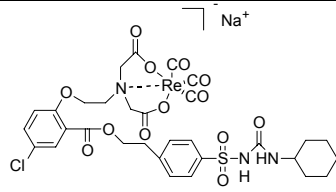
3.3.3 *in vitro*-Evaluierungen

Um die *in vitro*-Funktion des Re-Glibenclamidderivates: N-{4-[Re(I)-tricarboxyl-N,N-bis-(carboxymethyl)-amino-ethyl]-5-chlorbenzol-carbox-amido-ethyl}-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexylharnstoff-Natriumsalz (**23**) zu überprüfen, wurden Insulinsekretionstests an isolierten Inselzellen von Ratten mit Hilfe von Elisass durchgeführt (Details siehe Kapitel 4.6). Die Insulinsekretion ist ein Mass für die Stimulanz der Substanz, Insulin auszuschütten.

Die Insulinsekretion des N-{4-[Re(I)-tricarboxyl-N,N-bis-(carboxymethyl)-amino-ethyl]-5-chlorbenzol-carbox-amido-ethyl}-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexylharnstoff-Natriumsalz (**23**) (57 %) zeigte trotz der erheblichen Veränderung an der phenolischen Hydroxyfunktion keine Verschlechterung gegenüber dem originalen Glibenclamid (57 %). Auch hier stimuliert das synthetisierte Molekül Insulin und ist somit für weitere Untersuchungen geeignet.

Anhand der Tabelle 7 ist eindeutig ersichtlich, dass alle in unserem Arbeitskreis hergestellten Verbindungen eine ausreichende Insulinsekretion aufweisen. Die Insulinsekretion des N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexancarboxyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin (**12**) wurde aufgrund der schlechten Affinität nicht bestimmt, da eine Korrelation mit der Stimulierung der Insulinsekretion gegeben ist.

Tabelle 7: Insulinsekretionswerte ausgewählter Verbindungen im Vergleich

Formelname	Formel	Evaluierungswert (Insulinsekretion%)
Repaglinid		59
[¹⁹ F]Fluorethoxy-Repaglinid		54
[¹² C]Fluorethoxy-Repaglinid		59
Nateglinid		/*
[¹⁹ F]Fluorethoxy-Nateglinid (12)		/*
Glibenclamid		54
[¹⁹ F]Glibenclamid		56
Re-Glibenclamid (23)		57

* wegen unzureichender Affinität (K_D) nicht bestimmt

3.3.4 *in vivo*-Untersuchungen

Das ^{99m}Tc -markierte Glibenclamid-Derivat (**13**) wurde aufgrund seiner positiven *in vitro*-Daten sowohl diabetischen als auch nicht-diabetischen Ratten injiziert und die Bioverteilung der Substanz *ex vivo* nach 2, 4, 6 (jeweils $n=3$) und 24 h ($n=1$) in ausgewählten Organen wie Pankreas, Gehirn, Leber, Milz, Niere, Herz, Lunge und Vollblut bestimmt (vergleiche Kapitel 4.7). Der experimentell zu ermittelnde Parameter ist die Aktivität pro Organ, normiert als % ID / g.

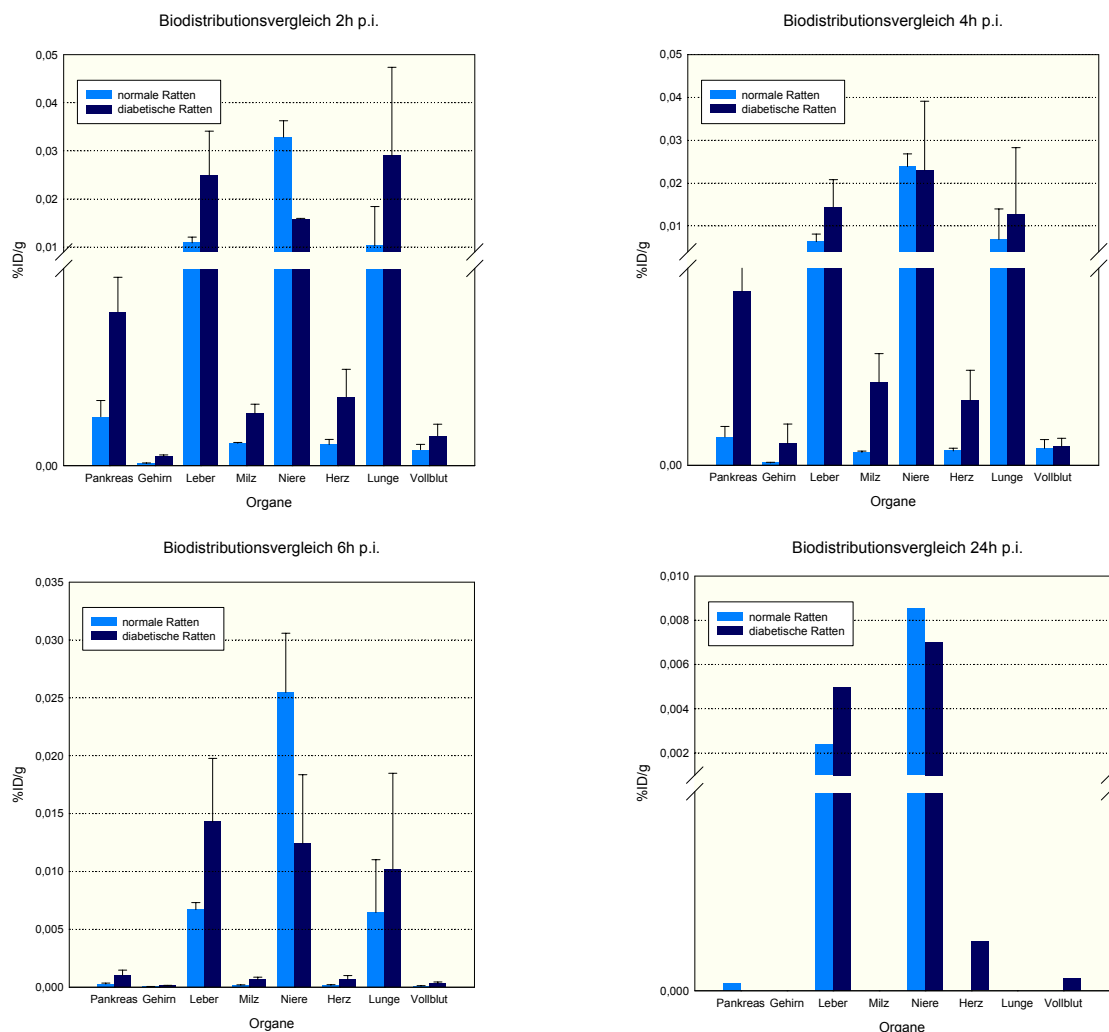


Abbildung 38: Biodistributionsvergleich von verschiedenen Organen nach 2, 4, 6 und 24 h

Nach 2, 4, 6 und 24 h konnte jeweils nur eine sehr geringe Aktivität in allen untersuchten Organen festgestellt werden. Im Pankreas konnte zu allen drei Zeitpunkten nur eine Aktivitätsakkumulation von unter 0,01 % ID/ g nachgewiesen werden. Nach 24 h konnte zwar im Pankreas der nicht-diabetischen Ratte im direkten Vergleich zur

diabetischen Ratte noch eine geringe Akkumulation von 0,000019 % ID/g gemessen werden, was aber durchaus auch auf eine zu geringe Statistik (n=1 für den 24 h Wert) zurückzuführen sein könnte. Dass die diabetischen Ratten einen höheren Uptake aufweisen, liegt darin begründet, dass wahrscheinlich eine höhere Durchblutung in den geschädigten Organen vorliegt. In der Leber konnte zu allen Zeitpunkten eine Aktivitätsakkumulation von unter 0,012 % ID/ g nachgewiesen werden (auch hier führt die höhere Durchblutung bei den diabetischen Ratten zu einem höheren Uptake). Damit konnte erreicht werden, dass die Leberaktivität im Vergleich zum ^{18}F -markierten Glibenclamid-Derivat (**13**) nach 2 h auf einen Wert von unter 0,03 % ID/ g gegenüber fast 10 % ID/ g gesenkt werden konnte.

Die Wiederfindungsrate bezüglich der injizierten Gesamtaktivität in den untersuchten Organen lag jeweils unter 1 %, was auf eine schnelle Exkretion und Verstoffwechslung innerhalb der ersten 2 h hinweist. So konnte dann auch 60 % der Gesamtaktivität im Darm wiedergefunden werden. Diese Tatsache ist ein direkter Hinweis darauf, dass die Ausscheidung entgegen der ursprünglichen Annahme nicht renal, sondern hepatobilär verläuft. Dies ist aufgrund des negativen $\log D_{7,4}$ Wertes von -0,21 bemerkenswert und unerwartet.

In einem weiteren geplanten Experiment soll der Fokus auf den Zeitraum von 0-2 h gelegt werden.

Eine *in vivo*-Evaluierung des ^{18}F -markierten Nateglinids (**2**) wurde aufgrund der unzureichenden Bindungsaffinität nicht durchgeführt.

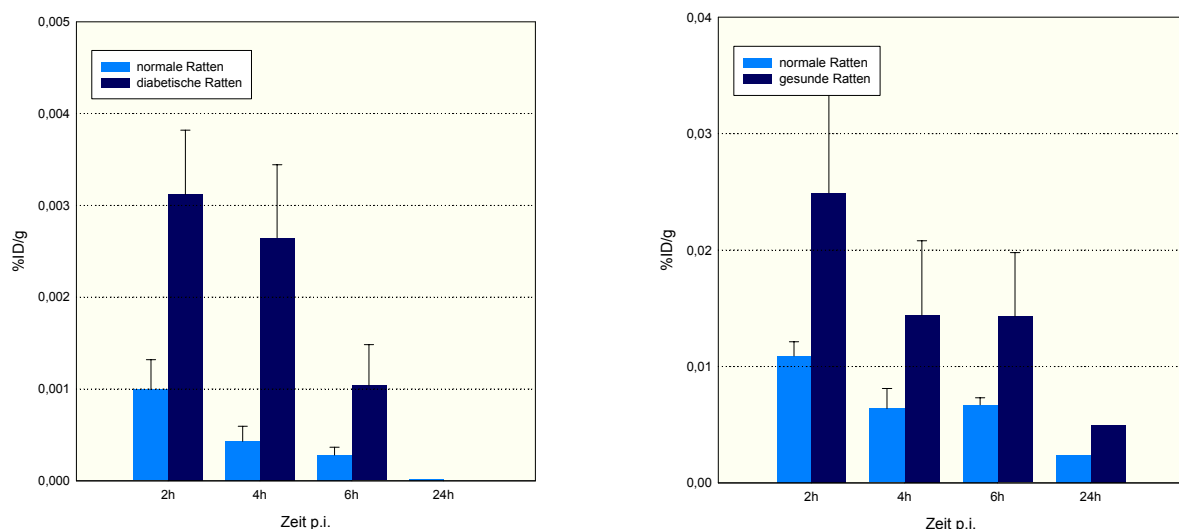


Abbildung 39: Einzelvergleich der Aktivitätsakkumulation im Pankreas und der Leber zu verschiedenen Zeitpunkten

4 Experimenteller Teil

4.1 Chemikalien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien konnten kommerziell erworben werden. Soweit nicht anders in den Versuchsvorschriften vermerkt, wurden diese ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Falls erforderlich, erfolgten Reinigung und Trocknung nach standardisierten Methoden [125, 126].

Die wichtigsten eingesetzten Chemikalien sind in der Tabelle 8 aufgeführt. Nicht aufgeführte Lösemittel und chemische Substanzen wurden mit dem Reinheitsgrad „zur Synthese“ von der Firma Merck bezogen.

Für dünnenschichtchromatographische Untersuchungen wurden Kieselgel-beschichtete Aluminiumfolien des Typs 60 F₂₅₄ bzw. chemisch modifizierte Schichten RP-18 F_{254S} oder Aluminiumoxid-Fertigschichten vom Typ 60 F₂₅₄ neutral der Firma Merck verwendet. Die Detektion der chromatographischen Zonen erfolgte durch Frequenzlöschung bei der Wellenlänge 254 nm. Säulenchromatographische Trennungen erfolgten mit Kieselgel 60 (Partikellgröße 0,040-0,063 nm) der Firma Merck.

Die Charakterisierung der dargestellten nicht-radioaktiven Verbindungen erfolgte über ¹H-, ¹³C- und ¹⁹F-NMR-Spektroskopie, Elementaranalyse, massenspektroskopische Untersuchungen (Ionisierungsverfahren: FD (Feldesorption), EI (Elektronenstoßionisation) und ESI (Elektrospray-Ionisation) sowie in Einzelfällen über IR- und UV/ VIS-Spektroskopie. Von optisch aktiven Substanzen wurde in der Regel der Drehwert bestimmt. Schmelzpunkte wurden nach der Kapillarmethode bestimmt.

Folgende Geräte wurden für diese Zwecke verwendet:

NMR-Spektroskopie: 200-MHz FT-NMR Spektrometer AC 200 der Firma Bruker
 400-MHz-FT-NMR Spektrometer ARX 200 der Firma Bruker

Massenspektrometer: MAT 90 Spektrometer für FD Spektren der Firma Finnigan

IR-Spektrometer: FT-IR Spektrometer 1760X der Firma Perkin Elmer

Polarimeter: Polarimeter Model 241 der Firma Perkin Elmer

Schmelzpunktbestimmung: Elektrothermal A 9100 der Firma Kleinfeld GmbH

Radioaktivitätsdetektion: Instant Imager der Firma Packard Canberra

HPLC-Systeme: A: Pumpe: Sykam Solvent Delivery System S1121
UV: Knauer UV Detektor K-2501
Aktivitätsdetektor: BertholdLB 506 C-1
Probenaufgabeeventil: Rheodyne, Typ 8125

B: Pumpe: Dionex P 680
UV:Dionex UVD 170U
Aktivitätsdetektor: raytest Gabi NaI
Probenaufgabeeventil: Rheodyne, Typ 8125

Tabelle 8: Reinheitsgrad und Bezugsquelle der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Gehalt/ Qualität	Firma
Aceton	puriss. über Molsieb	Fluka
Acetonitril	puriss. über Molsieb	Fluka
Acetonitril-d ₃	99,8 Atom %	Deutero
Ameisensäure	zur Synthese	Merck
4-(2-Aminoethyl)- benzolsulfonsäureamid	99 %	Merck
Benzylalkohol	99 %	Acros
Benzylbromid	zur Synthese	Merck
Boran-THF-Komplex	1,0 M in THF	Aldrich
2-Bromethanol	97 %	Lancaster
1-Brom-2-Fluorethan	99 % +	Avocado
1-Butanol	zur Analyse	Merck
C-18	Sep-Pak Light	Waters
Chloroform	puriss. über Molsieb	Fluka
Chloroform-d	99,8 Atom %	Deutero
5-Chlorsalicylsäure	purum ≥ 98 %	Fluka
cis-1,2,3,6-Tetrahydrophthalimid	96 %	Acros
cis-1,2-Cyclohexan- dicarbonsäureanhydrid	zur Synthese	Merck
Cyclohexylisocyanat	zur Synthese	Merck
Dichlormethan	puriss. über Molsieb	Fluka
Diethylether	p. A.	Riedel de Haën
Diethylsuccinat	zur Synthese	Merck
Dimethylsulfoxid	puriss. über Molsieb	Fluka
Dimethylsulfoxid-d ₆	100,0 Atom %	Aldrich
Dioxan	puriss. über Molsieb	Fluka
D-Tyrosin	99 %	Lancaster

Essigsäure 100 %	zur Analyse	Merck
Essigsäureethylester	puriss. über Molsieb	Fluka
Ethanol	p.A.	Merck
Ethanolamin	purum \geq 99 %	Fluka
2-Ethoxyethylether, wasserfrei	99,5 %	Aldrich
Ethyl-chlorformiat	zur Synthese	Merck
Ethylen-ditosylat	purum/ 98,5 %	Fluka
1-Fluorethanol	95,5 %	Aldrich
Glykol	zur Analyse	Merck
Harnstoff	zur Analyse	Merck
4-Hydroxybenzaldehyd	zur Analyse	Merck
Isobutanol	zur Analyse	Merck
Isopropanol	p. A.	Riedel de Haën
4-Isopropylbenzoesäure	99 %	Aldrich
Kaliumcarbonat	zur Analyse	Merck
Kaliumhydrogencarbonat	zur Analyse	Merck
Kryptofix [®] 222	zur Synthese	Merck
Kupfer(I)chlorid	puriss. p.a. \geq 97 %	Fluka
Lithiumaluminiumhydrid	zur Synthese	Merck
Methanol	puriss. über Molsieb	Fluka
Methanol	p. A.	Riedel de Haën
4-Methoxybenzaldehyd	zur Synthese	Merck
3-(4-Methoxyphenyl)-1-propanol	99 %	Aldrich
4-Methylcyclohexanol	99 %	Aldrich
2-Methyl-3-hexanol	97 %	Lancaster
N,N-Diisopropylethylamin	98+ %	Aldrich
N,N-Dimethylformamid	puriss. über Molsieb	Fluka
Natriumhydroxid	zur Analyse	Merck
Natriumchlorid	zur Analyse	Merck

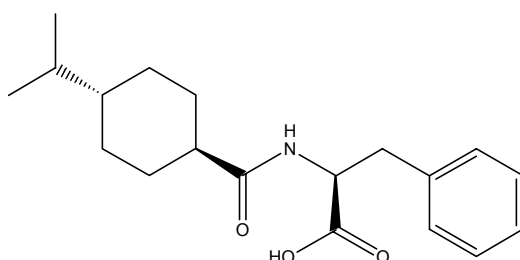
Natriumethylat	pract. ≥ 95 %	Fluka
Natriumhydrogencarbonat	zur Analyse	Merck
Natriumsulfat	reinst	Merck
N-Bromsuccinamid	99 %	Aldrich
n-Hexan	zur Analyse	Merck
N-Hydroxysuccinimid	zur Synthese	Merck
n-Octanol	reinst	Merck
Palladium/ Kohlenstoff	10 % zur Synthese	Merck
2-Phenylethanol	zur Synthese	Merck
(R)-(+)-Phenylethylamin	zur Synthese	Merck
Platin(IV)oxid	99,5 %	Aldrich
Platin/ Kohlenstoff	5 % zur Synthese	Merck
p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat	zur Analyse	Merck
p-Toluolsulfonsäure-anhydrid	97 %	Aldrich
Salzsäure 37 %	zur Analyse	Riedel de Haën
Schwefelsäure 95-97 %	zur Analyse	Riedel de Haën
tert.-Butylbromacetat	purum ≥ 97 %	Fluka
Tetrabutylammonium-chlorid	purum ≥ 95 %	Fluka
Tetrabutylammonium-perrhenat	98 %	Aldrich
Tetraethylammonium-chlorid	purum ≥ 98 %	Fluka
Tetrahydrofuran	puriss. über Molsieb	Fluka
Thionylchlorid	zur Synthese	Merck
Triethylamin	puriss. über Molsieb	Fluka
Trifluoressigsäure	Uvasol	Merck
Trimethylsilyldiazomethan	2,0 M Lösung in Hexangemisch	Aldrich
Triphenylphosphin	purum ≥ 95 %	Fluka
WSC*HCl	99 %	Lancaster
Ytterbiumtrifluormethan-sulfonat	99,99 %	Aldrich

4.2 Standardverbindungen und Markierungsvorläufer

Die experimentelle Beschreibung der Herstellungen der Reaktionssynthons, der Referenzverbindungen und der Markierungsvorläufer erfolgt in numerischer Erscheinungsform der jeweiligen Verbindungen analog den Kapiteln 3.1 und 3.2. Es gilt jedoch zu beachten, dass nur die relevanten Syntheseschritte dokumentiert werden.

4.2.1 Darstellung der inaktiven Fluor-Verbindungen

4.2.1.1 2-[(4-Isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-3-phenyl-propionsäure (1)



1,00 g (2,45 mmol) D-Phenylalanin-benzylester werden in 30 ml Dioxan mit 350 mg 10 % Pd/ C und 10 μ l Essigsäure versetzt und unter H₂-Strom bei Normaldruck (1 bar) 3 Stunden gerührt. Nach der Filtration des Katalysators und der Entfernung des Lösungsmittels wurde das gelbliche Rohprodukt säulenchromatographisch in einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester/ n-Hexan 8,5/ 1,5 (v/v) gereinigt.

Ausbeute:

500 mg weiße Kristalle (64,3 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
 Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 1/ 1 (v/v)
 R_F-Wert: 0,68 angefärbt mit Iod

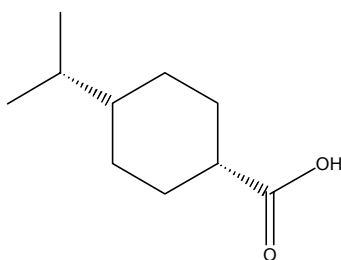
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

¹H-NMR: 12,5 (s, 1H); 7,89 (d, 2 H, J= 8,22); 7,19 (m, 5 H); 4,35 (m, 1 H); 2,99 (m, 1 H); 2,80 (m, 1 H); 1,97 (m, 1 H); 1,61 (m, 4 H); 0,88 (m, 3 H); 0,79 (s, 3 H); 0,77 (m, 3 H)

¹³C-NMR 175,4; 173,5; 138,1; 129,4, 128,4; 126,6; 53,3; 44,1; 43,2; 37,0, 32,6, 29,5, 28,8, 19,9

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 317,2 (100,[M+1]⁺)

4.2.1.2 4-Isopropyl-cyclohexan-carbonsäure (3)



5,0 g (30 mmol) p-Isopropyl-benzoesäure wurden in 30 ml Essigsäure gelöst und mit 0,25 mg Platin-IV-oxid versetzt. Die Reduktion wurde bei Normaldruck (1 bar) mit H₂-Gas, welches durchströmte, für 24 h gerührt. Nachdem keine UV-Absorption mehr zu beobachten war, konnte das Produkt nach der Entfernung der Essigsäure destillativ (10⁻³ bar, 80°C) isoliert werden.

Ausbeute:

4,1 g klares Öl (79,2 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 9/ 1 (v/v)
R_f-Wert: 0,4 angefärbt mit Iod

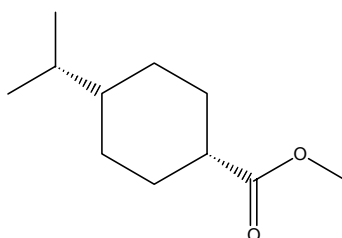
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

¹H-NMR: 11,32 (s, 1 H); 2,44 (m, 1H); 1,92 (m, 2 H); 1,40 (m, 4 H); 1,07 (m, 3 H); 0,77 (m, 3 H); 0,75 (s, 3 H)

¹³C-NMR 176,3; 43,1; 32,5; 31,5; 29,2; 28,7; 26,8; 26,3; 20,0; 19,9

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 171,3 (100,[M+1]⁺)

4.2.1.3 cis-4-Isopropyl-cyclohexan-carbonsäure-methylester (4)



Zu einer Suspension aus 22,7 g (0,133 mol) Isopropylcyclohexansäure und 170,0 ml Methanol werden bei -30 °C 30,0 ml (0,410 mmol) Thionylchlorid zugetropft. Anschließend wird die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt und 24 h unter Rückfluss

gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der Vorschrift aus dem Organikum, 20. Auflage, Seite 443.

Eine Aufreinigung des isolierten Rohproduktes war nicht erforderlich.

Ausbeute:

22,3 g klares Öl (90,2 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
 Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 1/ 1 (v/v)
 R_f-Wert: 0,4 angefärbt mit Iod

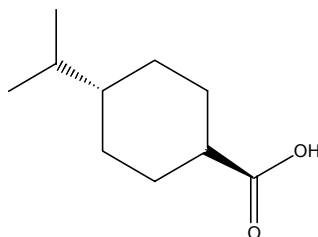
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

¹H-NMR: 3,63 (s, 2 H); 3,61 (s, 1H); 2,52 (q, 1 H); 1,99 (m, 2H); 1,74 (m, 1 H); 1,14-1,50 (m, 6 H); 1,00 (m, 1 H); 0,82 (m, 2 H); 0,81 (s, 1 H); 0,80 (m, 2 H); 0,79 (s, 1 H)

¹³C-NMR 176,5; 51,2; 43,1; 42,8; 39,8; 32,6; 31,2; 29,0; 28,2; 26,7; 26,3

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 185,3 (100,[M+1]⁺)

4.2.1.4 trans-4-Isopropyl-cyclohexan-carbonsäure (5)



22,30 g (0,121 mmol) des unter 4.2.1.2 beschriebenen cis-Carbonsäuremethylesters werden mit 0,50 g NaH (60 %) 2 h bei 150°C gerührt. Das gewünschte Zwischenprodukt wird destillativ ($2,0 \times 10^{-2}$ bar, 43°C) isoliert.

Die anschließende Verseifung mit 105 ml 2 N NaOH-Lösung in 105 ml Methanol 12 h bei 70 °C führt zum gewünschten Roh-Endprodukt. Die Reinigung erfolgt über eine Umkristallisation aus wässriger Methanollösung.

Ausbeute:

16,6 g weißes Pulver (91,2 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
 Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 9/ 1 (v/v)
 R_f-Wert: 0,4 angefärbt mit Iod

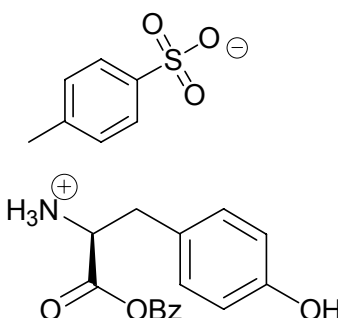
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

¹H-NMR: 2,20 (m, 1H); 2,0 (d, 2H); 1,76 (d, 2H); 1,40 (m, 3H); 1,00 (m, 3H); 0,83 (s, 3H); 0,82 (s, 3H)

¹³C-NMR 176,3; 43,1; 32,5; 31,5; 29,2; 28,7; 26,8; 26,3; 20,0; 19,9

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 171,3 (100,[M+1]⁺)

4.2.1.5 2-Benzoyloxy-1-(4-hydroxy-benzyl)-2-oxo-ethyl-ammonium-toluol-4-sulfonat (**6**)



5,00 g (27,6 mmol) D-Tyrosin, 5,35 g p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (28,1 mmol) werden in einem Lösemittelgemisch von 110 ml Benzylalkohol und 55 ml Benzol vorgelegt und unter Rückfluss über Nacht gerührt. Nach 24 h Lagerung in 250 ml Benzol/ 400 ml Diethylether konnten weiße Kristalle isoliert werden. Die Reinigung erfolgte durch eine Umkristallisation aus Ether/ Methanol 1/ 1 (v/v).

Ausbeute:

4,92 g weißes Pulver (40,2 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 9/ 1 (v/v)
R_f-Wert: 0,52 angefärbt mit Iod

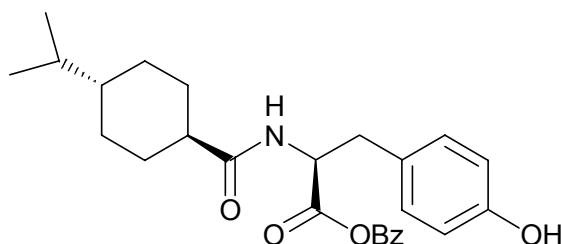
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

¹H-NMR: 9,39 (s, 1H); 8,31 (s, 3H); 7,49 (d; 2H, J=7,82); 7,34 (m, 3H); 7,30 (m, 2H); 7,12 (d, 2H, J=7,82); 6,96 (d, 2H, J=8,61); 6,68 (d, 2H, J=8,22); 5,16, (d; 2H, J=3,13); 4,23 (t; 1H, J=6,65); 3,00, (m, 2H); 2,30 (s, 3H);

¹³C-NMR 167,1; 154,7; 143,7, 135,2, 132,6; 128,7; 126,1, 123,6, 122,3, 122,2, 113,5, 65,1; 51,2, 33,6, 18,8

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 273,13 (100,[M+1]⁺)

4.2.1.6 3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(trans-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-propionsäure-benzylester (7)



1,5 g (8,81 mmol) Trans-Isopropyl-cyclohexancarbonsäure werden mit 1,56 ml Triethylamin in 62,5 ml Methylenchlorid vorgelegt und auf 0°C temperiert. Zu dieser Lösung werden 1,05 ml (11,0 mmol) Ethylchloroformiat) in 20 ml Methylenchlorid (gelöst) zugegeben.

Zu dem gebildeten Mischanhydrid wird ein Gemisch aus 4,0 g (9,01 mmol) 2-Benzoyloxy-1-(4-hydroxy-benzyl)-2-oxo-ethyl-ammonium-toluol-4-sulfonat, 42,5 ml Methylenchlorid und 2,88 ml Triethylamin bei 0°C zugegeben. Die Reaktionslösung wird 90 min weitergerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels und der Ausetherung mit Essigester wird das entstandene Rohprodukt säulenchromatographisch in einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester/ n-Hexan 3/ 7 (v/v) aufgereinigt.

Ausbeute:

2,82 g weißes Pulver (75,6 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 3/ 7 (v/v)
R_f-Wert: 0,40 angefärbt mit Iod

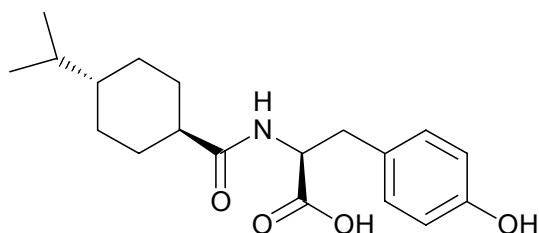
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

¹H-NMR: 9,15 (s, 1H); 8,01 (d, 1H, j=7,83); 7,28 (m; 5H); 6,94 (d, 2H, J=8,61); 6,59 (d, 2H, J=8,61) 5,01 (s, 2H); 4,34 (m, 1H); 2,83 (m, 2H); 1,99 (m, 1H); 1,61, (m, 4H); 1,21 (m, 4H); 0,89, (m, 3H); 0,78 (s, 3H); 0,76 (s, 3 H)

¹³C-NMR 175,6; 172,0; 156,1; 136,2; 130,5; 128,9; 128,2, 128,1; 127,5; 115,2; 66,1, 54,1, 43,9, 43,1, 32,6, 29,4; 28,7; 19,9

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 424,2 (100,[M+1]⁺)

4.2.1.7 3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-propionsäure (**8**)



1,50 g (3,5 mmol) D-Tyrosin-benzylester werden in 35 ml Dioxan mit 395 mg 10 % Pd/ C und 10 μ l Essigsäure versetzt und unter H₂-Strom bei Normaldruck (1 bar) 3 h gerührt. Nach der Filtration des Katalysators und der Entfernung des Lösungsmittels wurde das gelbliche Rohprodukt säulenchromatographisch in einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester/ n-Hexan 8,5/ 1,5 (v/v) gereinigt.

Ausbeute:

780 mg weiße Kristalle (66,1 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
 Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 9/ 1 (v/v)
 R_f-Wert: 0,67 angefärbt mit Iod

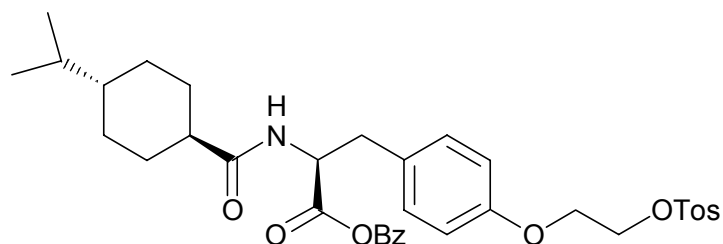
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

¹H-NMR: 12,51 (s, 1 H) 9,15 (s, 1H); 7,81 (d, 1H, J=7,82); 6,93 (d, 2H, J=8,61); 6,57 (d, 2H, J=8,61); 4,24 (m, 1H); 2,87, (m, 1H); 2,68 (m, 1H); 1,99 (m, 1H); 1,62, (m, 4H); 1,231 (m, 4H); 0,89, (m, 3H); 0,78 (s, 3H); 0,76 (s, 3 H)

¹³C-NMR 175,1; 174,7; 138,7, 129,2, 128,6; 126,7;53,3 ; 44,2, 43,6, 37,1; 32,6; 29,5; 28,8; 19,8

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 333,3 (100,[M+1]⁺)

4.2.1.8 N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-tosylethyl)-D-tyrosin-benzylester (9)



482 mg (1,0 mmol) 3-[4-(2-Hydroxy-ethoxy)-phenyl]-2-[(4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-propionsäure-benzylester werden zu einer Mischung aus 392 mg (1,20 mmol) p-Toluolsulfonsäureanhydrid gelöst in 2 ml CH₂Cl₂ und 10 mg Yb(III)(OTf)₃ zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt und nach Entfernen des Lösungsmittels säulenchromatographisch in einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester/ n-Hexan 1/ 1 (v/v) gereinigt.

Ausbeute:

509 mg klares Öl (80,6 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 1/ 1 (v/v)
R_f-Wert: 0,39 angefärbt mit Iod

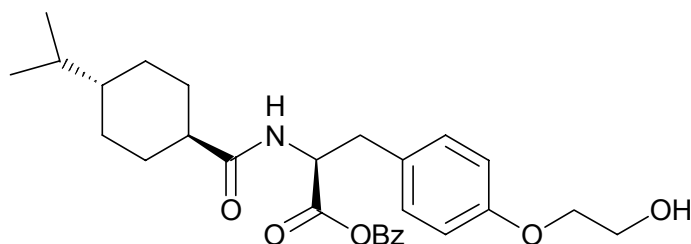
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

¹H-NMR: 9,30 (s, 1H); 8,15 (d, 1H, J=7,82); 7,67 (d, 2 H, J=8,46); 7,41 (d, 2H, J=8,46); 7,31 (m; 5H); 7,10 (d, 2H, J=8,61); 6,82 (d, 2H, J=8,61) 5,10 (s, 2H); 4,42 (m, 1H); 4,10 (t, 2H); 3,95 (t, 2 H); 2,83 (m, 2H); 2,41 (s, 3 H); 1,99 (m, 1H); 1,61, (m; 4H); 1,21 (m; 4H); 0,90, (m, 3H); 0,77 (s, 3H); 0,75 (s, 3H)

¹³C-NMR 178,6; 172,0; 156,1; 144,6; 140,2; 140,6; 132,2; 130,5; 128,9; 128,2, 128,1; 127,5; 114,2; 72,6; 63,1, 57,1; 40,9; 38,1; 37,6; 25,7; 25,4; 20,9; 19,9

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 636,2 (100,[M+1]⁺)

4.2.1.9 3-[4-(2-Hydroxy-ethoxy)-phenyl]-2-[(4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-propionsäure-benzylester (10)



875 mg (2 mmol) 3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(trans-isopropylcyclohexan-carbonyl)-amino]-propionsäure-benzylester werden in 6 ml DMF gelöst und mit 0,585 ml Triethylamin versetzt. Zu dieser Reaktionsmischung werden 225 mg (1,8 mmol) Bromethanol zugetropft und die entstandene Lösung 20 h bei einer Temperatur von 40°C gerührt und nach dem Entfernen des Lösungsmittels säulenchromatographisch in einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester/ n-Hexan 7/ 3 (v/v) gereinigt.

Ausbeute:

300 mg klares Öl (62,6 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 7/ 3 (v/v)
R_f-Wert: 0,60 angefärbt mit Iod

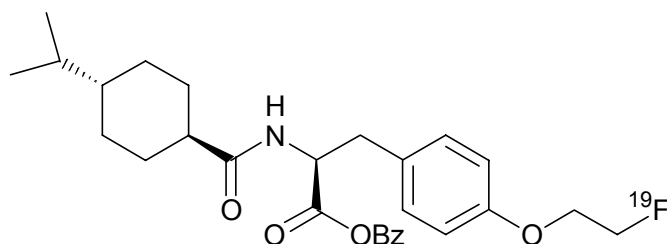
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

¹H-NMR: 9,30 (s, 1H); 8,15 (d, 1H, J=7,82); 7,31 (m; 5H); 7,10 (d, 2H, J=8,61); 6,82 (d, 2H, J=8,61) 5,10 (s, 2H); 4,42 (m, 1H); 4,10 (t, 2H); 3,95 (t, 2 H); 2,83 (m, 2H); 1,99 (m, 1H); 1,61, (m; 4H); 1,21 (m; 4H); 0,90, (m, 3H); 0,77 (s, 3H); 0,75 (s, 3H)

¹³C-NMR 178,6; 172,0; 156,1; 140,2; 140,6; 128,1; 127,5; 114,2; 72,6; 63,1, 57,1; 40,9; 38,1; 37,6; 25,7; 25,4; 19,9

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 482,6 (100,[M+1]⁺)

4.2.1.10 3-[4-(2-Fluor-ethoxy)-phenyl]-2-[(4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-propionsäure-benzylester (**11**)



875 mg (2 mmol) 3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(trans-isopropylcyclohexan-carbonyl)-amino]-propionsäure-benzylester werden in 6 ml DMF gelöst und mit 0,585 ml Triethylamin versetzt. Zu dieser Reaktionsmischung werden 229 mg (1,8 mmol) Bromfluorethanol zugetropft und die entstandene Lösung 20 h bei 40 °C gerührt und nach dem Entfernen des Lösungsmittels säulenchromatographisch in einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester/ n-Hexan 2/ 1 (v/v) gereinigt.

Ausbeute:

310 mg gelbliche Kristalle (42,3 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 2/ 1 (v/v)
R_f-Wert: 0,30 angefärbt mit Iod

Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

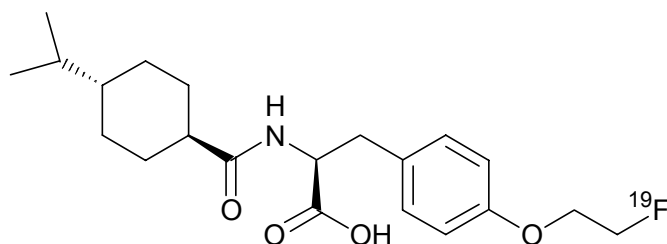
¹H-NMR: 8,13 (d, 1H, J=7,72); 7,31 (m; 5H); 7,10 (d, 2H, J=8,61); 6,82 (d, 2H, J=8,61) 5,05 (s, 2H); 4,80 (t, 1H, J=3,68); 4,63 (t, 1 H, J=3,68); 4,42 (m, 1H); 4,22 (t, 1H, J=3,68); 4,12 (t, 1H, J=3,68); 2,90 (m, 2H); 1,99 (m, 1H); 1,61, (m; 4H); 1,21 (m; 4H); 0,90, (m, 3H); 0,77 (s, 3H); 0,75 (s, 3 H)

¹³C-NMR 178,6; 172,0; 156,1; 140,2; 131,6; 128,1; 127,5; 127,4; 114,2; 84,4; 72,6; 57,1; 40,9; 38,1; 37,6; 30,6; 25,7; 25,4; 19,9

¹⁹F-NMR: -225,8 (m)

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 471,0 (100,[M+1]⁺)

4.2.1.11 3-[4-(2-Fluor-ethoxy)-phenyl]-2-[(4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-propionsäure (12)



0,23 g (0,5 mmol) 3-[4-(2-Fluor-ethoxy)-phenyl]-2-[(4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-amino]-propionsäure-benzylester werden in 10 ml Dioxan mit 60 mg 10 % Pd/ C und 10 μ l Essigsäure versetzt und unter H_2 -Strom bei Normaldruck (1 bar) 3 h gerührt. Nach der Filtration des Katalysators und der Entfernung des Lösungsmittels wurde das gelbliche Rohprodukt säulenchromatographisch in einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester/ n-Hexan 8,5/ 1,5 (v/v) gereinigt.

Ausbeute:

110 mg gelbliche Kristalle (60,0 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 8,5/ 1,5 (v/v)
 R_f -Wert: 0,67 angefärbt mit Iod

Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO- d_6 ; Aufnahmetemperatur 298 K:

1H -NMR: 7,10 (d, 2H, J=8,61); 6,83 (d, 2H, J=8,61) 4,71 (t, 1H, J=3,91); ; 4,60 (m, 2H); 4,16 (t, 1 H, J=3,91); 4,10 (t, 1H, J=3,91); 3,12 (m, 1H; 2,86 (m, 1H); 2,07 (m, 1H); 1,72, (m; 4H); 1,31 (m; 4H); 0,97, (m, 3H); 0,83 (s, 3H); 0,82 (s, 3 H)

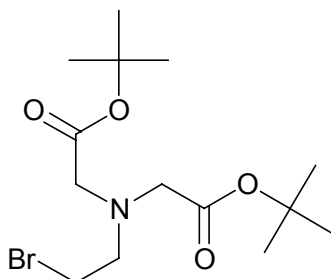
^{13}C -NMR 178,6; 175,0; 159,1; 131,8; 131,6; 115,1; 84,1; 82,4; 68,1, 57,1; 46,3; 44,9; 37,1; 34,6; 30,7; 30,4; 30,2; 19,9

^{19}F -NMR: -225,4 (m)

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 382,3 (100,[M+1] $^+$)

4.2.2 Darstellung der inaktiven Rhenium-Verbindungen

4.2.2.1 [(2-Brom-ethyl)-tert.-butoxycarbonylmethyl-amino]-essigsäure-tert.-butylester (14)



13,5 g (69,2 mmol) tert.-Butylbromacetat, 7,68 g KHCO_3 (76,8 mmol) und 50 ml DMF werden vorgelegt und auf 0°C temperiert. Zu dieser Lösung werden 1,85 ml (30,7 mmol) Ethanolamin zugegeben und die Reaktionsmischung zuerst noch 30 min bei 0°C und anschließend 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die rote Lösung in einem Gemisch aus 150 ml Diethylether/ 100 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung aufgenommen und gegen Diethylether ausgeschüttelt wurde, werden nach dem Entfernen des Lösungsmittels 6,0 g NBS (33,8 mmol), 8,87 g (33,8 mmol) Triphenylphosphin und 100 ml CH_2Cl_2 zugegeben und bei 0°C 90 min gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung in 200 ml Ether aufgenommen, über Kieselgel filtriert und anschließend säulenchromatographisch in einem Lösungsmittelgemisch aus Ether/ n-Hexan 2/ 1 (v/v) gereinigt.

Ausbeute:

8,2 g gelbliches viskoses Öl (75,9 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 1,5/ 8,5 (v/v)
 R_f -Wert: 0,72 angefärbt mit Iod

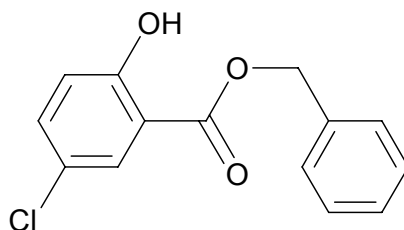
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d_6 ; Aufnahmetemperatur 298 K:

$^1\text{H-NMR}$: 3,48 (s, 4H); 3,42 (t, 2H, $J=7,71$); 3,14 (t, 2H; $J=7,71$); 1,41 (s; 18H))

$^{13}\text{C-NMR}$ 170,1; 80,3; 56,2; 55,8; 29,7; 27,6

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 353,3 (100,[$\text{M}+1$] $^+$)

4.2.2.2 5-Chlor-2-hydroxy-benzoessäure-benzylester (15)



17,2 g (0,1 mol) 5-Chlor-Salicylsäure, 150 ml Ethanol 95 %, 100 ml 1 N NaOH und 18,81 g (0,11 mol) Benzylbromid werden vorgelegt und unter Rückfluss (115°C) 20 h reagieren gelassen. Die Aufarbeitung erfolgt, indem das Reaktionsgemisch in kaltem Wasser eingerührt und dann gegen Ether ausgeschüttelt wird. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch in einem Lösungsmittelgemisch aus Ether/ n-Hexan 1/ 9 (v/v)

Ausbeute:

6,3 g klares Öl (24 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 1/ 9 (v/v)
R_F-Wert: 0,30 angefärbt mit Iod

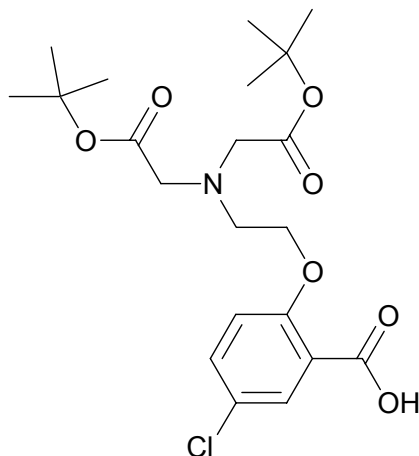
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

¹H-NMR: 10,51 (s, 1H); 7,68 (d, 1H, J=2,94); 7,42 (m, 6H); 7,01 (d, 1H, J=8,82); 5,36 (s, 2H)

¹³C-NMR 168,6; 156,0; 140,1; 134,8; 131,6; 128,2; 128,1; 127,6; 119,1; 117,5; 72,6

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 262,3 (100,[M+1]⁺)

4.2.2.3 2-[2-(Bis-tert.-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethoxy]-5-chlorbenzoesäure (17)



2,2 g (8,38 mmol) 5-Chlor-Salicylsäure-benzylester, 6,3 g (29,4 mmol) K_2CO_3 , 4,2 g (11,92 mmol) [(2-Brom-ethyl)-tert.-butoxycarbonylmethyl-amino]-essigsäure-tert.-butylester und 75 ml Aceton werden unter Rückfluss 15 h erhitzt. Anschließend wird das K_2CO_3 abfiltriert und das Reaktionsgemisch eingeengt. Der gekoppelte Benzylester wird direkt zur freien Säure umgesetzt. Dazu werden die 4,5 g (8,43 mmol) Rohprodukt in 65 ml Dioxan gelöst mit 700 mg 10 % Pd/C und 30 μ l Essigsäure versetzt und unter H_2 -Strom bei Normaldruck (1 bar) 4 h gerührt. Nach der Filtration des Katalysators und der Entfernung des Lösungsmittels wurde das gelbliche Rohprodukt säulenchromatographisch in einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester/ n-Hexan 1,5/ 8,5 (v/v) gereinigt.

Ausbeute:

1,88 g weiße Kristalle (50,5 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 3/ 7 (v/v)
 R_f -Wert: 0,50 angefärbt mit Iod

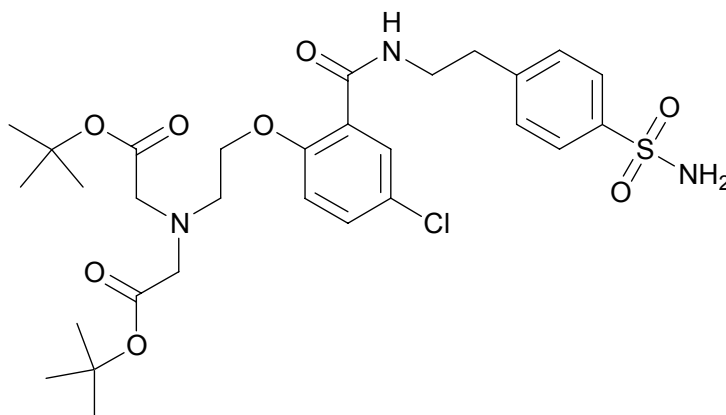
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO- d_6 ; Aufnahmetemperatur 298 K:

1H -NMR: 12,82 (s, 1H); 7,62 (d, 1H, $J=2,94$); 7,51 (d, 1H, $J=2,57$); 7,14 (t, 1H, $J=8,82$); 4,10 (t, 2H, $J=5,52$); 3,48 (s, 4H); 3,02 (t, 2H, $J=5,52$); 1,41 (s, 18H)

^{13}C -NMR 170,6; 165,0; 154,1; 131,8; 130,6; 123,8; 122,9; 115,1; 80,1; 68,1, 56,1; 52,3; 27,9

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 443,7 (100, $[M+1]^+$)

4.2.2.4 [tert.-Butoxycarbonylmethyl-(2-{4-chlor-2-[2-(4-sulfamoyl-phenyl)-ethylcarbamoyl]-phenoxy}-ethyl)-amino]-essigsäure-tert.-butyl-ester (18)



1,88 g (4,2 mmol) 2-[2-(Bis-tert.-butoxycarbonylmethyl-amino)-ethoxy]-5-chlorbenzoesäure, 0,822 g (4,2 mmol) 4-(2-Aminoethyl)-benzol-sulfonsäureamid, 14 ml Aceton, 1,2 ml Triethylamin und 0,411 ml Ethyl-chloroformiat werden bei -20°C zusammengegeben und anschließend für 2 h bei 0°C und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das entstandene Rohprodukt wird nach dem Entfernen des Lösungsmittels mit 50 ml kalter 0,2 N HCl versetzt und gegen Wasser sowie Methylenechlorid ausgeschüttelt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch in einem Lösungsmittelgemisch aus Ether/ n-Hexan 1/ 1 (v/v).

Ausbeute:

2,09 g weiße Kristalle (80,5 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
 Laufmittel: Essigester/ n-Hexan 1/ 1 (v/v)
 R_f-Wert: 0,30 angefärbt mit Iod

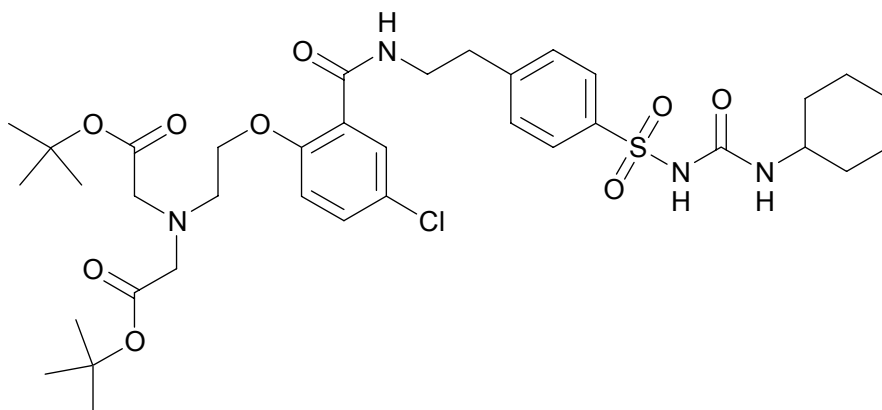
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

¹H-NMR: 8,60 (t, 1H); 7,73 (m, 3H); 7,47 (d, 1 H); 7,40 (d, 2H, J=8,09); 7,28 (s, 2H); 7,16 (d, 1H, J=9,19) 4,16 (t, 2H, J=5,20); 3,54 (m, 2H); 3,45 (s, 4H); 3,04 (t, 2H, J=4,78); 2,90 (t, 2H, J=6,99); 1,40 (s, 18H)

¹³C-NMR 170,3; 166,5; 155,3; 143,5; 142,2; 131,0; 130,0; 128,7, 125,4; 124,3; 124,1; 115,4; 80,5, 66,9; 55,6; 52,4; 35,1; 27,4, 20,9, 14,2

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 626,9 (100,[M+1]⁺)

4.2.2.5 [tert.-Butoxycarbonylmethyl-(2-{4-chlor-2-[2-(4-benzolsulfonyl-N'-cyclohexylharnstoff)-ethylcarbamoyl]-phenoxy}-ethyl)-amino]-essigsäure-tert.-butylester (19)



1,5 g (2,4 mmol) [tert.-Butoxycarbonylmethyl-(2-{4-chlor-2-[2-(4-sulfamoyl-phenyl)-ethylcarbamoyl]-phenoxy}-ethyl)-amino]-essigsäure-tert.-butylester, 24 mg (0,24 mmol) CuCl, 0,36 ml (2,82 mmol) Isocyanat werden in 9 ml DMF gelöst und die grüne Lösung 36 h bei Raumtemperatur gerührt. Da die Umsetzung noch nicht vollständig war, wurden 20 % Isocyanat und 5 mg Cu(I)Cl zugegeben und die Reaktionszeit um 24 h verlängert. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionslösung in Eiswasser eingetropft. Das ausgefallene Rohprodukt filtriert, mit kaltem Wasser gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch in einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester/ Chloroform 1/ 10 (v/v).

Ausbeute:

400 mg weiße Kristalle (22,2 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
 Laufmittel: Essigester/ Tetra 1/ 1,75 (v/v)
 R_f-Wert: 0,70 angefärbt mit Iod

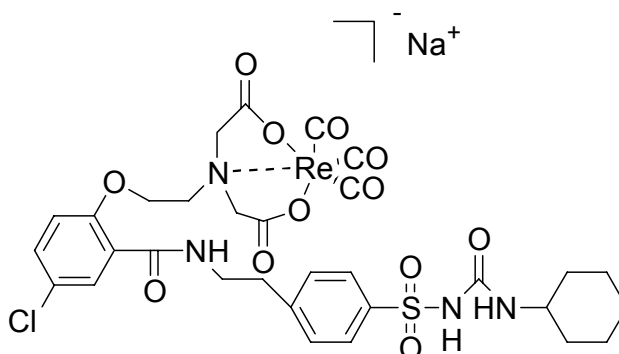
Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

¹H-NMR: 8,10 (m, 1H); 7,73 (m, 3H); 7,50 (d, 1H); 7,15 (d, 1H, J=9,20); 4,16 (s, 2H); 3,54 (m, 2H); 3,43 (s, 4H); 3,16 (t, 2H, J=4,78); 3,00 (t, 2H, J=4,40); 2,95 (t, 2H, J=7,35); 1,55 (m, 8H); 1,34 (s, 18H)

¹³C-NMR 170,3; 163,5; 153,3; 155,6; 150,2; 145,5; 138,2; 131,0; 130,0; 129,4; 128,7; 125,4; 124,3; 115,4; 80,5; 66,9; 55,6; 52,4; 48,6; 47,6; 35,1; 33,5; 32,8; 27,8; 25,4; 25,1; 24,9; 24,2

Massenspektroskopie (FD): m/z (% rel. Int) 752,0 (100,[M+1]⁺)

4.2.2.7 N-{4-[Re(I)-tricarbonyl-N,N-bis(carboxymethyl)aminoethyl]-5-chlor-benzol-carbox-amidoethyl}-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexylharnstoff-Natriumsalz (23**)**



33,2 mg (0,047 mmol) N-{4-[N,N-bis(carboxymethyl)-aminoethyl]-5-chlor-benzol-carbox-amido]-ethyl}-benzolsulfonyl-N'-cyclohexylharnstoff-tri-Natriumsalz (**21**) werden in 1 ml Methanol gelöst und mit 30 mg (0,047 mmol) $[\text{Net}_4]_2[\text{ReCl}_3(\text{CO})_3]$ versetzt. Die Reaktionslösung wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschliessend nach dem Entfernen des Lösungsmittels säulenchromatographisch in einem Lösemittelgemisch aus MeCN/ Wasser 970/ 30 (v/v) gereinigt.

Ausbeute:

20 mg weißes voluminöses Kristalle 46 % der Theorie)

Identifizierung des Produktes:

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel,
 Laufmittel: MeCN/ Wasser 970/ 30 (v/v)
 R_f -Wert: 0,66 angefärbt mit Iod

Chemische Verschiebung in ppm (Kopplungskonstanten Hz), Messfrequenz 400 MHz, Solvens DMSO-d₆; Aufnahmetemperatur 298 K:

¹H-NMR: 10,67 (s, 1H); 8,47 (t, 1H, J=5,52); 7,80 (m, 2H, J=8,09); 7,50 (m, 4H); 7,16 (d, 1H, J=8,82); 6,89 (d, 1H, J=7,72) 4,42 (s, 2H); 4,20 (s, 4H); 3,68 (s, 2H); 3,52 (m, 3H); 3,15 (s, 2H); 2,93 (t, 2H, J=6,62); 1,60 (m, 5H); 1,18 (m, 5H)

¹³C-NMR 178,3; 164,5; 154,5; 131,0; 129,7; 127,3; 124,8, 124,7; 115,4; 67,9; 65,8; 63,5; 51,4; 48,1; 35,1; 32,8; 25,4, 24,9, 14,2

IR-Spektroskopie (FT-IR): CO-Banden: 2024,4, 1908,4, 1649,0

4.3 Radiosynthesen

Die Trennung und Identifizierung der ^{18}F - bzw. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierten Produkte erfolgte mit Hilfe der Radio-HPLC und der Radio-DC. Um Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden ^{18}F -Markierungen und die $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Markierungen mit beiden erwähnten Methoden analysiert. Dabei wichen die Messergebnisse beider Verfahren im Mittel 5-9 % voneinander ab, deutlich innerhalb der allgemeinen Fehlergrenzen.

Zur Analyse der Markierungsausbeuten wurden die in Abschnitt 4.1 beschriebenen HPLC-Systeme verwendet. Die Auftrennung der Aliquotlösungen erfolgte mit einer analytischen RP18-Säule (LiChrospher RP18-EC, 5 μm , 250x4,6 mm) bei einer Flussrate von 1-4 ml/ min. Als Eluens wurde das bei den jeweiligen Markierungssynthesen beschriebene Lösungsmittelsystem verwendet. Mit den ^{19}F - und Re-Referenzverbindungen wurden die Retentionszeiten (t_r) unter reaktionsidentischen Bedingungen ermittelt. Die Wiederfindungsrate der Systeme betrug ca. 90 %, so dass die Verluste innerhalb der Fehlergrenzen lagen.

Die Auswertung der Markierungsausbeuten mittels Radio-DC erfolgte mit dem Instant Imager der Firma Packard Canberra. Dazu wurden 3 μl des Aliquots auf eine DC-Alufolie (Kieselgel 60 F_{254} , 5x 7,5 cm der Firma Merck) aufgetragen und über eine Laufstrecke von 5,7 cm im entsprechenden Laufmittel entwickelt. Die R_f -Werte der gesuchten Produkte wurden mit Hilfe der ^{19}F - und Re-Referenzverbindungen unter reaktionsidentischen Bedingungen ermittelt.

4.3.1 Herstellung einer [^{18}F]Fluoridlösung

Das für die ^{18}F -Markierungen verwendete [^{18}F]Fluorid wurde von der EURO-PET GmbH Freiburg oder dem Interdisziplinären PET-Zentrum der Universitätskliniken Tübingen bezogen.

Das [^{18}F]Fluorid fällt an der (p,n)-Kernreaktion im angereicherten [^{18}O]Wasser ($\geq 98\%$ ^{18}O) an. Zur Abtrennung des kostspieligen, angereicherten Wassers wird die [^{18}F]Fluorid-haltige Lösung auf einer QMA-Kartusche fixiert und das [^{18}F]Fluorid mittels einer Lösung von 15 mg Kryptofix[®]222, 15 μl 1 M Kaliumcarbonatlösung sowie

800 µl Acetonitril eluiert. Durch die Zugabe des Kaliumcarbonates wird die Bildung des flüchtigen [^{18}F]HF vermieden, durch die Zugabe des Komplexbildners Kryptofix[®]222 die Löslichkeit des [^{18}F]Fluorids in dipolar aprotischen Lösemitteln erhöht.

Da nukleophile ^{18}F -Fluorierungen unter wasserfreien Bedingungen durchgeführt werden müssen, erfolgt zunächst mehrfach eine azeotrope Trocknung der radioaktiven Fluoridlösung mittels Acetonitril bei 80°C. Da es bei der Verwendung von Kryptofix[®]222 bei Temperaturen von über 90°C zu thermolytischen Zersetzungen kommen kann, ist diese Trocknungstemperatur verwendet worden.

Zur Trocknung werden 30-100 MBq einer wässrigen n.c.a. [^{18}F]Fluorid-Lösung auf einer zuvor konditionierten QMA-Kartusche fixiert und mit der zuvor beschriebenen Lösung in ein 5 ml Wheaton-Reaktor eluiert. Die Lösung wird bei einer Temperatur von 80°C und einem Vakuum von 700 mbar im schwachen Stickstoffstrom 3 min eingengt. Der Rückstand wird mit 1 ml Acetonitril versetzt und erneut bis zur Trockne eingengt. Dieser Prozess wird einmal wiederholt. Anschließend wird der Stickstoffstrom gestoppt und ein Membranpumpenvakuum angelegt, um letzte verbliebene Feuchtigkeitsspuren zu beseitigen. Das getrocknete [^{18}F]Fluorid wird mit 500-1000 µl des für die jeweilige Synthese benötigten Lösungsmittel (DMSO, DMF, MeCN) versetzt und ca. 1 min gerührt. Die resultierende Lösung wird in einer 1 ml Spritze aufgenommen und jeweils 200-500 µl in die entsprechenden Reaktionsansätze injiziert.

4.3.2 Direktsynthesen mit [^{18}F]Fluorid

2,0- 10,0 mg/ ml (3,1- 15,7 µmol/ ml) N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-tosylethyl)-D-tyrosin-benzylester (**9**) wurden im 5 ml Wheaton-Reaktionsgefäß, welches durch einen Schraubverschluss mit Septum verschlossen wurde, überführt und in 800 µl des entsprechenden Lösungsmittels (MeCN, DMF, DMSO) gelöst. Die Lösung wurde 3 min bei der gewählten Temperatur (80°C-140°C) vortemperiert und durch Injektion von 200 µl der [^{18}F]Fluorid-Lösung gestartet. Zu vorgegeben Zeiten werden 100 µl der Reaktionslösung als Aliquot entnommen und in einem Eppendorfgefäß mit 200 µl Wasser gequenchet. Die resultierenden Aliquotlösungen werden anschließend radioanalytisch untersucht.

Radio-DC: R_f (Essigester/ n-Hexan 7/ 3 (v/v), Kieselgel 60 F₂₅₄): 0,40
Radio-HPLC: t_r ((RP18-Säule, 80 % Puffer (NaAc/ HAc 0,1 mol/ l, pH 5) 20 % MeCN, Flussrate 2 ml/ min): 12,3 min

Um die freie Säure und damit das Endprodukt N-(Trans-4-isopropylhexancarboxyl)-O-(2-[¹⁸F]fluorethyl)-D-tyrosin (**2**) herzustellen, wird die Reaktionslösung mit einer Spatelspitze Palladium auf Kohlenstoff (10 %) versetzt und 5 min mit Wasserstoff bei 1 bar durchperlt. Anschliessend wird das Reaktionsgemisch mit 5 ml Wasser verdünnt, durch einen Spritzenfilter der Porengröße 1 μ m (aus PFTE) gegeben und ohne vorherige Festphasenextraktion direkt in ein HPLC-System eingebracht und mittels semipräparativer HPLC (RP18-Säule, 80 % Puffer (NaAc/ HAc 0,1 mol/ l, pH 5) 20 % MeCN) aufgereingt.

Die wiederum in Wasser verdünnte Produktfraktion wird auf einer Festphasenkartusche (Sep-Pak[®]-C₁₈, Fa. Waters) fixiert, getrocknet und mit warmem Ethanol eluiert. Das Produkt konnte in einer radiochemischen Ausbeute von 10 % und einer radiochemischen Reinheit > 98,5 % isoliert werden.

Radio-DC: R_f (Essigester/ n-Hexan 8,5/ 1,5 (v/v), Kieselgel 60 F₂₅₄): 0,47
Radio-HPLC: t_r ((RP18-Säule, 80 % Puffer (NaAc/ HAc 0,1 mol/ l, pH 5) 20 % MeCN, Flussrate 2 ml/ min): 12,8 min

4.3.3 Synthese von 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat

Zur Herstellung des 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylats wird die wässrige n.c.a. [¹⁸F]Fluoridlösung wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben getrocknet und anschliessend für 3 min bei 80°C mit Ethylenditosylat umgesetzt. Es wird eine radiochemische Ausbeute von 80-90 % erhalten. Die Reinigung des 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylats wird mit Hilfe zweier Verfahren durchgeführt: mittels HPLC und mittels Festphasenextraktion. Das Verfahren mit der HPLC hat den Vorteil eines Produktes, dass ein höhere radiochemische wie chemische Reinheit aufweist, jedoch ist dieses Verfahren zeitintensiver. Die Zeitersparnis ist wiederum der große Vorteil der Festphasenkartuschenextraktion.

Die Herstellung des [¹⁸F]Fluorid erfolgt analog dem beschriebenen Verfahren in Kapitel 4.3.1. Zu dem getrockneten [¹⁸F]Fluoridlösung werden 4 mg Ethylen-ditosylat in 1 ml absoluten Acetonitril zugegeben und für 3 min bei 80°C reagieren gelassen. An-

schließlich wird das Rohprodukt über HPLC- oder Festphasenextraktionsverfahren gereinigt und isoliert.

HPLC-Reinigung:

Die Reaktionslösung wird mit 1 ml Wasser versetzt und das Produkt durch HPLC mit einer semipräparativen Säule (LiChrospher RP18-EC, 10 µm, 250x10 mm, Flussrate 5ml/min, Acetonitril/Wasser 50/50 (v/v), t_r : 8 min) isoliert. Die Produktfraktion wird mit dem 4-fachen Volumen Wasser verdünnt, das 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat auf einer Festphasenkartusche Sep-Pak[®]-C₁₈ der Firma Waters fixiert und 7 min im Stickstoffstrom getrocknet. Die Eluierung erfolgt mit 1,2 ml des für die anschließende Reaktion gewünschten Lösungsmittels (DMSO, DMF oder MeCN, 60°C vorgewärmt). Es werden radiochemischen Ausbeuten von 70-90 % erreicht (radiochemische Reinheit > 97 %, chemische Reinheit > 99 %, Reinigungsgesamtdauer 22 min).

Festphasenextraktion:

Die Reaktionslösung wird mit 4 ml Wasser versetzt, das 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat auf einer Festphasenkartusche Sep-Pak[®]-C₁₈ der Firma Waters fixiert und 7 min im Stickstoffstrom getrocknet. Die Eluierung erfolgt mit 1,2 ml des für die anschließende Reaktion gewünschten Lösungsmittels (DMSO, DMF oder MeCN, 60°C vorgewärmt). Es werden radiochemischen Ausbeuten von 80-90 % erreicht (radiochemische Reinheit > 90 %, chemische Reinheit > 95 %, Reinigungsgesamtdauer 9 min).

4.3.4 Radiosynthesen mit 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat

1,0 - 10,0 mg / ml (3,0 - 30,0 µmol / ml) 3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-[(4-isopropyl-cyclohexancarboxyl)-amino]-propionsäure (**8**) werden in ein 5 ml Wheaton-Reaktionsgefäß, welches durch einen Schraubverschluss mit Septum verschlossen war, überführt und in 800 µl des entsprechenden Lösungsmittels (DMSO, DMF, MeCN) gelöst. Die Lösung wird 3 min bei der gewählten Temperatur (80°C-140°C) vortemperiert und durch Injektion von 200 µl der 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat-Lösung gestartet. Zu vorgegebenen Zeiten werden 100 µl der Reaktionslösung als Aliquot entnommen und in einem Eppendorfggefäß mit 200 µl Wasser gequenchet. Die resultierenden Aliquotlösungen werden anschliessend radioanalytisch untersucht.

Radio-DC: R_f (Essigester/ n-Hexan 8,5/ 1,5 (v/v), Kieselgel 60 F₂₅₄): 0,47

Radio-HPLC: t_r ((RP18-Säule, 80 % Puffer (NaAc/ HAc 0,1 mol/ l, pH 5) 20 % MeCN, Flussrate 2 ml/ min): 12,8 min

Für die präparative Abtrennung werden eine Konzentration von 2,2 mg/ ml (6,6 μ mol / ml) und 200 MBq 2-[18 F]Fluorethyltosylat verwendet. Nach der Reaktionszeit von 10 min wird das Reaktionsgemisch mit Wasser verdünnt und ohne vorherige Festphasenextraktion mittels semipräparativer HPLC (RP18-Säule, 80 % Puffer (NaAc/ HAc 0,1 mol/ l, pH 5) 20 % MeCN) aufgereinigt.

Die wiederum in Wasser verdünnte Produktfraktion N-(Trans-4-iso-propylhexanocarbonyl)-O-(2-[18 F]fluorethyl)-D-tyrosin (**2**) wird auf einer Festphasenkartusche (Sep-Pak[®]-C₁₈, Fa. Waters) fixiert, getrocknet und einmal mit warmem Ethanol eluiert. Das Produkt kann in einer radiochemischen Ausbeute von 55 % und einer radiochemischen Reinheit > 98,5 % isoliert werden.

4.3.5 Synthese des fac -[99m Tc(I)(CO)₃(H₂O)₃]⁺-Komplexes

Die Synthese des fac -[99m Tc(I)(CO)₃(H₂O)₃]⁺-Komplexes erfolgt sehr schnell und einfach. Es wird ein Kit-System (Isolink[®] der Firma Mallinckrodt) bei 100°C temperiert. Zu dieser Lösung wird anschließend 1 ml einer [99m Tc]TcO₄⁻-Lösung (0,9 % NaCl, 200-900 MBq) injiziert und 20 min im 100°C warmen Ölbad reagieren gelassen. Nach der Reaktion wird die basische Reaktionslösung mit 1 ml 0,1N HCl-Lösung neutralisiert. Wenn mehrere Versuch über den Tag geplant sind, sollte der Komplex im basischen Medium aufbewahrt werden und nur die entsprechende Menge für die Umsetzungen neutralisiert werden. Anschliessend kann das fertige Produkt, der fac -[99m Tc(I)(CO)₃(H₂O)₃]⁺-Komplex, als Markierungssynthone für radioaktive Umsetzungen verwendet werden. Es werden radiochemischen Ausbeuten von 95 % an fac -[99m Tc(I)(CO)₃(H₂O)₃]⁺-Komplex erreicht (radiochemische Reinheit > 97,5 %, chemische Reinheit > 99 %, Reinigungsgesamtdauer 21 min).

4.3.6 Radiosynthesen mit dem fac -[99m Tc(I)(CO)₃(H₂O)₃]⁺-Komplex

0,3- 2,1 mg/ ml (0,4- 2,1 μ mol/ ml) N-{4-[99m Tc(I)-tricarbonyl-N,N-bis(carboxy-methyl)-aminoethyl]-5-chlor-benzol-carboxamido-ethyl]-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexyl-harnstoff-Natriumsalz (**21**) werden in einem 5 ml Wheaton-Reaktionsgefäß, welches

durch einen Schraubverschluss mit Septum verschlossen war, überführt und in 400 µl des entsprechenden Lösungsmittels (DMSO, DMF, MeCN) gelöst. Die Lösung wird 3 min bei der gewählten Temperatur (90°C-100°C) vortemperiert und durch Injektion von 200 µl der *fac*-[^{99m}Tc(I)(CO)₃(H₂O)₃]⁺-Komplexes-Lösung gestartet. Zu vorgegebenen Zeiten werden 3 µl der Reaktionslösung als Aliquot entnommen und radioanalytisch untersucht.

Radio-DC: R_f (Wasser/ MeCN 30/ 970 (v/v), Kieselgel 60 F₂₅₄): 0,80

Radio-HPLC: t_r ((Lichrospher RP18-Säule 250x10 mm, Gradientensystem 65 % Puffer (NH₄Ac/ HAc 0,25 mol/ l, pH 4,5) 35 % MeCN, Flussrate 4 ml/ min): 15,5 min

Für die präperative Abtrennung wird eine Konzentration von 0,6 mg/ ml (0,8 µmol/ ml) und 200 MBq an *fac*-[^{99m}Tc(I)(CO)₃(H₂O)₃]⁺ verwendet. Nach der Reaktionszeit von 35 min wird das Reaktionsgemisch ohne vorherige Festphasenextraktion direkt mittels semipräperativer HPLC (Lichrospher RP18-Säule 250x10 mm, Gradientensystem 65 % Puffer (NH₄Ac/ HAc 0,25 mol/ l, pH 4,5) 35 % MeCN, Flussrate 4 ml/ min, t_r: 15,5 min) aufgereinigt.

Die wiederum in 15 ml Wasser verdünnte Produktfraktion N-{4-[^{99m}Tc(I)-tricarboxyl-N,N-bis(carboxymethyl)-aminoethyl]-5-chlor-benzol-carboxamidoethyl]-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexyl-harnstoff-Natriumsalz (**13**) wird auf einer StrataX-Festphasenextraktionskartusche fixiert. Nach Spülen der Kartusche mit 5 ml Wasser wird das Produkt mit 1 ml warmem Ethanol eluiert, mit 0,9 % NaCl-Lösung versetzt und sterilfiltriert. Das Produkt kann in einer radiochemischen Ausbeute von 70 % und einer radiochemischen Reinheit > 99,5 % isoliert werden.

4.4 Affinitäten

Die K_D -Wert-Bestimmungen wurden von Professor M. und C. Schwanstecher, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Braunschweig für a) N-(trans-4-isopropyl-cyclohexancarboxyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin und b) N-{4-[Re-(I)-tricarboxyl-N,N-bis-(carboxymethyl)-amino-ethyl]-5-chlorbenzol-carbox-amido-ethyl}-benzol-sulfonyl}-N'-cyclo-hexyl-harnstoff-Natriumsalz durchgeführt.

Um die Bindungsaffinitäten (K_D -Wert) von Nateglinid und Glibenclamid sowie deren Derivaten (a,b) an den menschlichen SUR1 zu untersuchen, wurden Verdrängungsstudien mit [3 H]Glibenclamid an COS1-Zellmembranen, die den menschlichen SUR1 exprimieren, durchgeführt [124, 125]. Halb-maximale inhibitorische Substanzkonzentrationen (IC_{50} -Wert) und Hill-Koeffizienten (n) wurden bestimmt, indem die Funktion $B=1/(1+[Substanz]/IC_{50})^n$ an die Daten jedes einzelnen Verdrängungsexperimentes angepasst wurde. Die K_D -Werte wurden aus den IC_{50} -Werten berechnet [124].

4.5 Bestimmung der Lipophilien

Die experimentelle Bestimmung der Lipophilie einer Verbindung erfolgt durch Bestimmung ihres logP-Wertes. Es handelt sich hierbei um den Logarithmus des Verteilungskoeffizienten (engl.: partition coefficient) der Verbindung in einem Octanol/Wasser-System.

Für die Definition des logP-Wertes gilt:

$$\log P = \log \frac{[\text{Molekül}]_{\text{Octanol}}}{[\text{Molekül}]_{\text{Wasser}}}$$

Bei geladenen Molekülen wird oft die Bezeichnung $\log P_n$ für die Lipophilie des ungeladenen Moleküls und $\log P_i$ für die Lipophilie einer geladenen Spezies verwendet. Da die Lipophilie bei dem physiologischen pH-Wert von 7,4 von hohem Interesse ist, und die zu untersuchenden Referenzverbindungen in diesem pH-Bereich in mehreren Ladungszuständen vorliegen können, wurde anstatt des logP der logD bei einem pH-Wert von 7,4 bestimmt. Der logD (engl.: distribution coefficient) stellt im Gegensatz zum logP nicht den Logarithmus des Verteilungskoeffizienten über eine Molekülspezies dar, sondern über alle vorkommenden Spezies. Da der $\log D_{7,4}$ bei ionisierbaren

Molekülen stark vom pH-Wert abhängig ist und das Vorkommen mehrerer Ladungszustände bei einem pH-Wert berücksichtigt, stellt er im Falle der zu untersuchenden Referenzsubstanzen einen wesentlich aussagekräftigeren Wert dar.

Für die Definition des logD gilt:

$$\log D = \log \frac{\sum_1^N [\text{Molekül}]_{\text{Octanol}}^x}{\sum_1^N [\text{Molekül}]_{\text{Wasser}}^x} \quad \text{mit } x = \text{Ladung und } N = \text{Anzahl der Spezies}$$

Aus der Literatur sind drei Verfahren bekannt, um die Lipophilie zu bestimmen.

HPLC-Methode: Eluiert man Substanzen mittels einer HPLC über eine RP-Phase, so bewegen sich diese durch Verteilung zwischen der mobilen (wässrigen) Phase und der stationären Phase entlang der HPLC-Säule. Die Elution der Substanzen erfolgt dabei in Abhängigkeit von dem Verteilungskoeffizienten Wasser/ RP-Phase, wobei wasserlösliche Verbindungen zuerst und lipophile Substanzen zuletzt eluiert werden. Dieser Sachverhalt ermöglicht es, Beziehungen zwischen der Retentionszeit t_r auf einer RP-Säule und dem Octanol/ Wasser-Verteilungskoeffizienten herzustellen. Der Verteilungskoeffizient lässt sich durch die Bestimmung des Kapazitätsfaktors k ermitteln, wobei für k gilt:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad \text{mit } t_r = \text{Retentionszeit und } t_0 = \text{Totzeit}$$

Scheidetrichtermethode: Bei dieser Methode werden die Testsubstanzen in ein Zweiphasengemisch aus Octanol und Wasser überführt und die beiden Phasen ausreichend durchmischt, um eine Einstellung des Gleichgewichts zu gewährleisten. Die beiden Phasen werden anschliessend getrennt und jeweils auf ihren Gehalt an der Testsubstanz untersucht.

Titrationmethode: Die Titrationmethode kam nicht zum Einsatz, soll aber um die verschiedenen Verfahren zu vervollständigen, erwähnt werden. Basierend auf den Arbeiten von Dyrssen et al. [127] und Rydberg [128] wurde ein Verfahren entwickelt, die Lipophilie ionisierbarer Moleküle durch Titration zu bestimmen. Diese Vorgehensweise wird durch eine Beziehung zwischen der Lipophilie und dem pK-Wert einer Substanz ermöglicht, die am Beispiel einer einprotonigen, schwachen Säure auf-

gezeigt werden soll. Titriert man diese schwache Säure von einem niedrigen zu einem hohen pH-Wert, gibt dann ein der wässrigen Phase äquivalentes Volumen Octanol hinzu und titriert dieses Zweiphasensystem wieder auf den niedrigen pH-Wert zurück, so unterscheiden sich die beiden Titrationskurven am deutlichsten im Pufferbereich der Säure, falls die protonierte Säure in Octanol löslich ist.

Man erhält für beide Titrations unterschiedliche pK_a -Werte für die Säure, den pK_a -Wert im wässrigen System und einen „scheinbaren“ pK -Wert, genannt p_oK_a , für die Titration im Zweiphasensystem. Die Differenz zwischen beiden Werten ist ein Maß für die Lipophilie der Säure, denn je höher diese Differenz, desto lipophiler ist die Verbindung.

Für den Verteilungskoeffizienten dieser Säure gilt:

$$P_{HA} = \frac{[HA]_{\text{Octanol}}}{[HA]_{\text{Wasser}}} \quad \text{mit } [HA] = \text{Konzentration der Säure}$$

Daraus folgt für die Beziehung zwischen P und den beiden pK -Werten:

$$P_{HA} = (10^{(p_oK_a - pK_a)} - 1)/r \quad \text{mit } r = \frac{\text{Volumen organische Phase}}{\text{Volumen wässrige Phase}}$$

Somit lässt sich durch Titration einer Verbindung im wässrigen und anschließend in einem Zweiphasensystem Octanol/ Wasser die Lipophilie der Verbindung ermitteln. Analoge Beziehungen gelten auch für Basen und mehrfach ionisierbare Substanzen. Dabei gilt, dass der p_oK_a -Wert einer Säure stets höher und der p_oK_a -Wert einer Base stets niedriger ist als der pK_a -Wert. Es kommt also im Zweiphasensystem zu einer Verminderung der sauren bzw. basischen Eigenschaften der Verbindung.

4.5.1 N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin

Die Bestimmung der Lipophilie von N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin erfolgt nach der HPLC-Methode:

Zur praktischen Durchführung wurden von Substanzen mit bekanntem $\log P$ die Retentionszeiten ermittelt und unter Verwendung einer sehr hydrophilen Substanz zur Bestimmung von t_0 die Kapazitäten bestimmt. Durch Auftragung des $\log k$ gegen $\log P$ und anschließender linearer Regression lässt sich eine Kalibriergerade erstellen. Die Untersuchung der Lipophilien der Referenzverbindungen erfolgte mit dem in Abschnitt 4.1 beschriebenen HPLC-System, einer analytischen RP-Säule (LiChrospher RP18-EC, 5 μm , 250×4,6 mm) und Sörensen-Puffer (pH 7,4) als Eluens. Zur Bestimmung der Retentionszeiten sämtlicher Substanzen wurde ein aus 3 Einzelmessun-

gen gemittelter Wert verwendet. Da zur Kalibrierung nur Substanzen verwendet wurden, die bei pH 7,4 undissoziiert vorlagen, gilt: $\log P = \log D_{7,4}$. Durch Verwendung von Benzaldehyd, Anisol, Toluol, 4-Bromanisol und 4-Iodanisol als Kalibriersubstanzen und Ascorbinsäure zur Bestimmung der Totzeit ergaben sich die in Tabelle 9 zusammengefassten Kapazitäten:

Tabelle 9: Verwendete Kalibriersubstanzen zur Bestimmung der Kalibriergerade

Eichsubstanz	logP	t _r [min]	logk
Benzaldehyd	1,48	3,35	-0,1264
Anisol	2,11	4,933	0,1968
Toluol	2,73	7,367	0,4538
4-Bromanisol	3,05	7,933	0,4967
4-Iodanisol	3,24	9,417	0,5924
Ascorbinsäure (t ₀)	-1,67	1,917	—

Die lineare Regression ergab: $\log P = 2,465 \log k + 1,727$ $r = 0,987$. Durch Bestimmung der Retentionszeiten der Referenzsubstanzen liessen sich mit Hilfe der Kalibriergeraden die Lipophilie des Liganden ermitteln. Für das Nateglinid-Derivat N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin (**12**) wurde ein $\log P / \log D_{7,4}$ von 1,40 ermittelt (tr 3,333, logk -0,1316).

4.5.2 N-{4-[^{99m}Tc-(I)-tricarbonyl-N,N-bis-(carboxymethyl)-amino-ethyl]-5-chlorbenzol-carbox-amido-ethyl]-benzol-sulfonyl}-N'-cyclo-hexyl-harnstoff-Natriumsalz

Die Bestimmung der Lipophilie von N-{4-[^{99m}Tc-(I)-tricarbonyl-N,N-bis-(carboxymethyl)-amino-ethyl]-5-chlor-benzol-carbox-amido-ethyl]benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexyl-harnstoff-Natriumsalz erfolgt nach der Scheidetrichtermethode:

Hierzu wurde N-{4-[^{99m}Tc(I)-tricarbonyl-N,N-bis(carboxymethyl)-amino-ethyl]-5-chlor-benzolcarbox-amido-ethyl]-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexyl-harnstoff-Natriumsalz durch das in Abschnitt 3.2.1.4 beschriebene Verfahren hergestellt und isoliert. Die gereinigte Verbindung wurde in ein Zweiphasensysteme aus 500 µl Octanol (mit Wasser gesättigt) und 500 µl Phosphatpuffer überführt, wobei der pH-Wert des Puffers 7,4 betrug. Die Lösungen wurden 3 min bei Raumtemperatur durchmischt und die Phasen durch Zentrifugation voneinander getrennt. Anschließend wurde aus jeder Phase ein Aliquot von 3 µl entnommen und deren Radioaktivitätsverteilung mittels Radio-DC am Instant Imager bestimmt.

4.6 *in vitro*-Evaluierungen

Die Insulinsekretionstests wurden von Dipl. Biol. P. J. Feilen, 1. Medizinische Klinik, Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen der Universitätsklinik Mainz durchgeführt.

4.6.1 N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin

Die Insulinsekretion des N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-fluorethyl)-D-tyrosin (**12**) wurde aufgrund der schlechten Affinität nicht bestimmt, da eine Korrelation mit der Stimulierung der Insulinsekretion gegeben ist.

4.6.2 N-{4-[Re(I)-tricarbonyl-N,N-bis-(carboxymethyl)-amino-ethyl]-5-chlorbenzol-carbox-amido-ethyl]-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexyl-harnstoff-Natriumsalz

Um die *in vitro* Funktion des Glibenclamid-Derivates N-{4-[Re(I)-tricarbonyl-N,N-bis-(carboxymethyl)-amino-ethyl]-5-chlorbenzol-carbox-amido-ethyl]-benzol-sulfonyl}-N'-cyclohexyl-harnstoff-Natriumsalz (**23**) zu überprüfen, wurden Insulinsekretionstests an isolierten Inselzellen von Ratten mit Hilfe von Elisa durchgeführt. Die Isolation und Aufreinigung von adulten Ratteninselzellen erfolgte nach einem im Labor etablierten Protokoll [129]. Die Vitalität der Inselzellen wurde mit der dualen Fluoresceindiaceetat/Propidiumjodid-Färbemethode bestimmt [130]. Zur Messung der Insulinsekretionskapazität, d.h. der Funktionalität der Inseln, wurde ein statischer Glukosestimulationstests durchgeführt. Die Proben der Stimulationstests wurden dann mit dem High Range Rat Insulin Elisa Kit (Firma Mercodia, Uppsala, Schweden) auf ihren Insulingehalt bestimmt. Mit Hilfe der Software des ELISA READERS wurde aus diesen Daten zuerst die Standard-Kurve errechnet, mit deren Hilfe die gemessenen Extinktionswerte der Einzelproben automatisch in den Insulingehalt der Proben in ng/ 600 µl/ 1,5 h umgesetzt wurden. Der Stimationsindex wird als Quotient aus der stimulierten Insulinsekretion zur basalen, nicht stimulierten Insulinfreisetzung bestimmt ([stimul. Insulinsekretion] / [basale Insulinfreisetzung] = [Stim-Index]). Dieser Stimationsindex ist ein Mass der Funktion, d.h. der spezifischen, physiologischen Leistungsfähigkeit der untersuchten Inseln [131].

4.7 Tierexperimente

Das ^{99m}Tc-markierte Glibenclamid-Derivat (**13**) wurde aufgrund seiner positiven *in vitro*-Daten sowohl diabetischen als auch nicht-diabetischen Ratten injiziert und die Bioverteilung der Substanz *ex vivo* nach 2, 4, 6 (jeweils n=3) und 24 h (n=1) in ausgewählten Organen wie Pankreas, Gehirn, Leber, Milz, Niere, Herz, Lunge und Vollblut bestimmt.

Die Tierexperimente erfolgten mit zehn nicht-diabetischen und zehn diabetischen Sprague-Dawley Ratten (Charles River Wiga, Suzfeld, Deutschland, Körpergewicht 220-340 g, unter Standardbedingungen gehalten).

Der Diabetes Mellitus wurde durch intravenös injiziertes Streptozotocin in die Schwanzvene induziert (durch Dipl. Biol. P. J. Feilen, 1. Medizinische Klinik, Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen der Universitätsklinik Mainz). Alle Experimente wurden unter Aufsicht und in Einklang mit den Richtlinien der Ethikkommission für Tierversuche vorgenommen. Die Tiere wurden mit Phentobarbital (40 mg/kg, Narcoren[®], Merial, Hallbergmoos, Deutschland), welches injiziert wurde, anästhetisiert, durch Genickbruch getötet und sezirt. Es wurde das Vollblut (0,5 ml) und verschiedene Organe (Pankreas, Gehirn, Milz, Leber, Niere, Herz und Lunge) entnommen und diese (ausgewogenen) Organe in 4,0 ml 4 N KOH) bei 75°C für 30 min aufgelöst. Die solvatisierten Proben wurden in einem γ -Counter der Firma Wallac 1840 Wizard 3'' vermessen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein ^{18}F -markiertes Derivat des Nateglinids und ein $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markiertes Derivat des Glibenclamids zu synthetisieren und diese Verbindungen auf ihre Eignung als potentielle Liganden zur Visualisierung und Quantifizierung des β -Zellstatus des endokrinen Pankreas mittels der Positronen Emissions Tomographie (PET) und Single Photon Emissions Tomographie (SPECT) zu evaluieren. Hierbei handelt es sich um bildgebende Verfahren, mit denen die Bioverteilung radioaktiv markierter Verbindungen im menschlichen Körper nicht-invasiv verfolgt werden kann. Im Kontext des Typ 1 und Typ 2 Diabetes könnten eine Vielzahl medizinisch relevanter Fragestellungen über die Quantifizierung des Sulfonylharnstoff-Rezeptor-Subtyps 1 (SUR-1), einem Plasmamembranprotein der Insulin-sezernierenden β -Zelle, unter Verwendung spezifisch bindender Liganden geklärt werden. Beispielsweise könnte im Kontext des Typ 2 Diabetes vor Manifestation klinischer Symptome (Hyperglykämie) der schleichende Verlust der β -Zell-Masse erfasst werden. Darüber hinaus wäre die Möglichkeit einer Therapiekontrolle bei Inselzelltransplantationen und unter Umständen auch die Möglichkeit einer frühzeitigen Erkennung einer malignen Entartung der spezifischen Zellen des Pankreas gegeben.

Vor der Synthese der radioaktiv markierten Verbindungen des Nateglinids und Glibenclamids wurden die nicht-radioaktiven Analoga synthetisiert und in Bindungsstudien hinsichtlich ihrer Affinität zum SUR-1 evaluiert. Um die physiologische Wirksamkeit zu überprüfen, wurde ihre Lipophilie und ihre Insulin-sezernierende Wirkung an isolierten Inselzellen bestimmt. Im Falle des $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierten Glibenclamid-Derivates wurde eine *in vivo*-Studie an diabetischen und nicht-diabetischen Ratten durchgeführt.

Standardverbindungen zur *in vitro*-Evaluierung

Die Synthese der nicht-radioaktiven Standardverbindung des Nateglinids O-(2-Fluorethyl)-N-(trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-D-tyrosin (**12**) konnte durch selektive Fluorethylierung von N-(trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-D-tyrosinbenzylester und nachfolgender reduktiver Spaltung des Benzylesters mit Wasserstoff am Palladium-Katalysator in einer Gesamtausbeute von 24 % realisiert werden.

Das ^{99m}Tc -analoge Re-substituierte Glibenclamid (**23**) wurde ausgehend von 5-Chlorsalicylsäure dargestellt. In einem ersten Reaktionsschritt wurde die Carbonsäure-Funktion mit Benzylbromid verestert und mit der Chelatorkomponente N,N-Bis-[(tert.-butoxycarbonylmethyl)-2-bromoethyl-amin zum korrespondierenden 2-[3-(Bis-tert.-butoxycarbonylmethyl-amino)-propoxy]-5-chloro-benzoesäure-benzylester mit einer Ausbeute von 90 % umgesetzt. Nach Spaltung des Benzylesters mit Wasserstoff am Palladium-Katalysator wurde mit Ethylchloroformiat der Aktivester gebildet und mit 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonamid zum tert.-Butoxycarbonylmethyl-(2-(4-chloro-2-[4-sulfamoyl-phenyl)-ethylcarbamoyl]-phenoxy)-ethyl)-amino)-essigsäuremethyl-ester umgesetzt. Die nachfolgende Reaktion zum korrespondierenden tert.-butylgeschützten Sulfonylharnstoff mit Cyclohexylisocyanat am Cu(I)Cl-Katalysator erfolgte mit Ausbeuten von 60 %. Um die tert.-Butylester zu spalten war ein Verkochen mit 6 N Salzsäure über einen Zeitraum von 20 h notwendig, da eine Behandlung mit Trifluoressigsäure selbst nach 24 h nicht zur Spaltung des Esters führte. Nach quantitativer Isolierung wurde die Verbindung mit drei eq. 1 N Natriumhydroxid zum entsprechenden tri-Natriumsalz umgesetzt und mit $[\text{NEt}_4]_2[\text{ReCl}_3(\text{CO})_3]$ in Methanol zur Reaktion gebracht.

Die Isolierung der Standardverbindungen (**12**), (**23**) konnte über Säulenchromatographie realisiert werden.

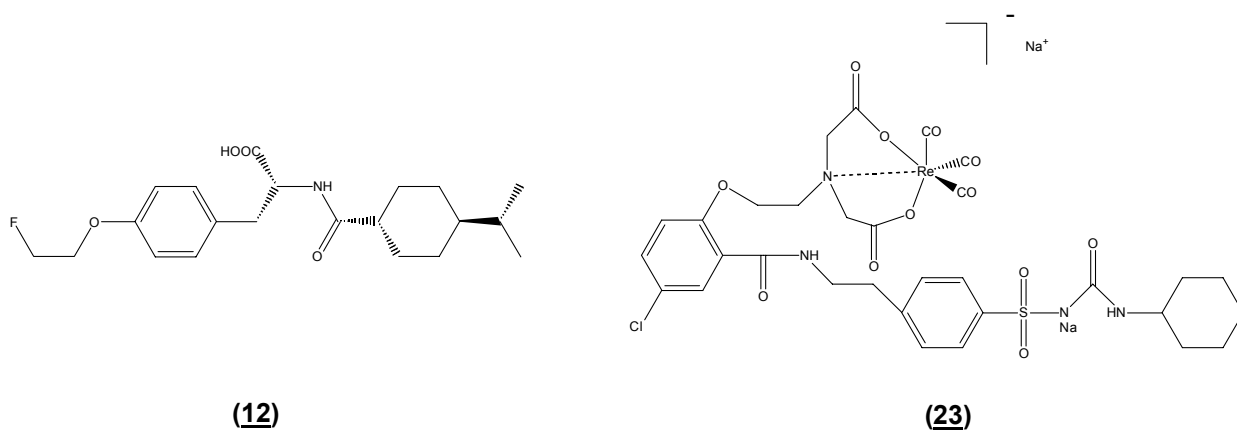


Abbildung 40: Standardverbindungen des Nateglinid-Derivats (**12**) und des Glibenclamid-Derivats (**23**) zur *in vitro* Evaluierung und zur Bestimmung der Analytikdaten für die radioaktive Markierung

Synthese der Markierungsvorläufer

Der Markierungsvorläufer N-(trans-4-isopropylcyclohexanecarbonyl)-D-tyrosin (**8**) zur Umsetzung mit 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat konnte gemäß einer publizierten Darstellung synthetisiert werden (Shinkai et al. [94]).

Hinsichtlich einer direkten ¹⁸F-Markierung wurde an die phenolische Hydroxy-Funktion des korrespondierenden N-(trans-4-isopropylcyclohexanecarbonyl)-D-tyrosin-benzylester eine 2-Hydroxyethyl-Gruppe mittels 2-Bromethanol ankondensiert und mittels einer neuen Übergangsmetall-katalysierten Methode tosyliert. Die Tosylierung verlief in einer Ausbeute von 80 % unter Verwendung von Toluolsulfonsäureanhydrid und Ytterbium (III)-trifluormethansulfonat unter neutralen Reaktionsbedingungen. Die tosylierte Verbindung kann direkt mit [¹⁸F]Fluorid radioaktiv markiert werden.

Der Markierungsvorläufer (**21**) zur radioaktiven Markierung mit *fac*-[^{99m}Tc(I)(CO)₃(OH₂)₃]⁺ ist ebenso für die Darstellung des nicht-radioaktiven analogen Re-Standards notwendig.

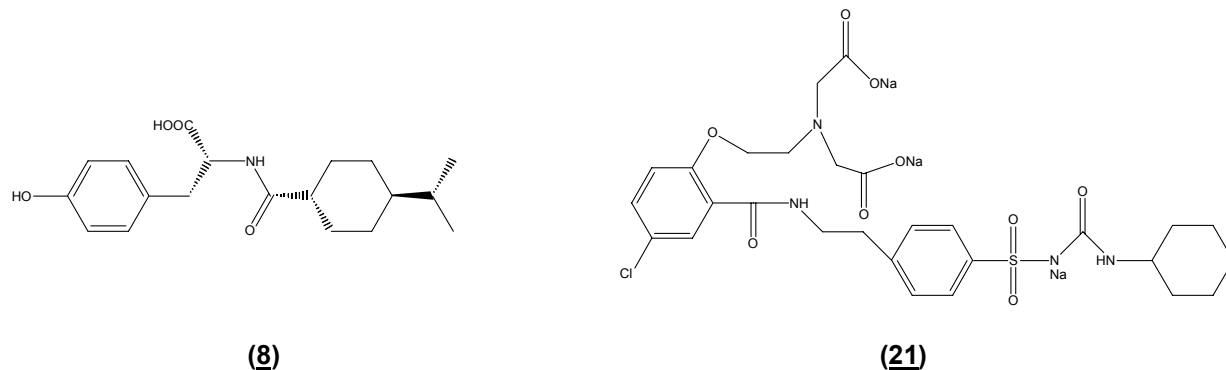


Abbildung 41: Dargestellte Markierungsvorläufer zur radioaktiven Markierung mit 2-[¹⁸F]-Fluorethyltosylat/ [¹⁸F]F⁻ (**8**) und *fac*-[^{99m}Tc(I)(CO)₃(OH₂)₃]⁺ (**21**)

Radioaktive Markierungen

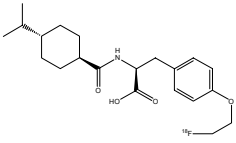
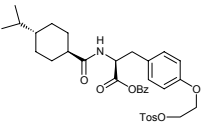
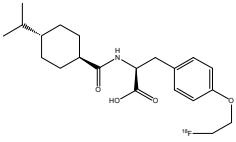
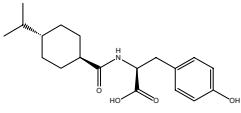
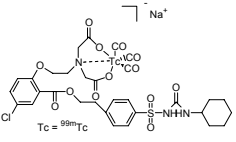
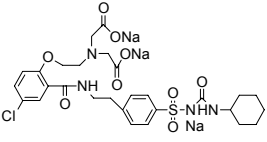
Die radioaktive ¹⁸F-Fluorethylierung des Nateglinids konnte durch Reaktion von N-(trans-4-isopropylcyclohexanecarbonyl)-D-tyrosin (**8**) mit 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat im Lösungsmittel DMSO bei einer Reaktionstemperatur von 120°C nach 7 min mit einer radiochemischen Ausbeute (RCA) von 85 % dargestellt werden. Nach Abtrennung mittels HPLC konnte das sterilfiltrierte injektionsfertige Produkt mit einer Gesamtausbeute von 40 % erhalten werden. Weiter wurde auch die RCA in Abhängigkeit vom

Lösungsmittel und von der Markierungsvorläufer-Konzentration bestimmt, wobei sich eine relativ niedrige Konzentration von 7,6 µmol / ml als optimal erwies.

Die direkte Umsetzung des Markierungsvorläufers N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2-tosylethyl)-D-tyrosin-benzylester (**9**) mit [¹⁸F]Fluorid im Kryptofix[®]222/ K₂CO₃ System konnte nach finaler reduktiver Spaltung des Benzylesters in einer Gesamtausbeute von 10 % erhalten werden. Aufgrund der im Vergleich zur ¹⁸F-Fluorethylierung mittels 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat von 30 % geringeren RCA wurde keine sterile injektionsfertige Lösung hergestellt. Die Problematik der deutlich geringeren radiochemischen Ausbeute liegt zum einen in den festgestellten Zersetzungsreaktionen und in der Schwierigkeit bei der Aufreinigung der mit Katalysator verunreinigten Reaktionslösung.

Die radioaktive Markierung des Glibenclamidvorläufers (**21**) mit ^{99m}Tc erfolgte unter Verwendung von N-{4-[N,N-bis-(carboxy-methyl)-aminoethyl]-5-chlorbenzol-carbox-amido]-ethyl}-benzol-sulfonyl-N'-cyclohexyl-harnstoff-tri-Natriumsalz (**21**) und dem Markierungssynthon *fac*-[^{99m}Tc(I)(CO)₃(OH₂)₃]⁺. Die Synthese von *fac*-[^{99m}Tc(I)(CO)₃(OH₂)₃]⁺ ist ausgehend vom Generator-produzierten [^{99m}Tc]TcO₄⁻ unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Markierungskits (Isolink[®]) in hohen radiochemischen Ausbeuten von 98 % realisierbar. Das Markierungssynthon liegt in basischer, wässriger Lösung vor und wurde zur Umsetzung mit dem Markierungsvorläufer (**21**) mit 1 N Salzsäure angesäuert. Es wurden 0,3- 1 mg N-{4-[N,N-bis-(carboxy-methyl)-aminoethyl]-5-chlorbenzol-carbox-amido]-ethyl}-benzol-sulfonyl-N'-cyclohexylharnstoff-tri-Natriumsalz zur Lösung des ^{99m}Tc-Komplexes (100- 350 MBq) zugegeben und 35 min auf 100°C erhitzt. Die Isolierung des ^{99m}Tc-markierten Glibenclamids erfolgte mittels HPLC, wobei die Produktfraktion über Festphasenextraktion (StrataX-Kartusche) und nachfolgender Sterilfiltration als sterile, injezierbare Lösung vorlag. Die Gesamtausbeute nach einer Syntheszeit von 80 min betrug 70 %.

Tabelle 10: Synthesedaten der zur Verfügung stehenden Radioliganden

Radioaktive Verbindung	Markierungsvorläufer	Synthesezeit [min]	RCA ¹ [%]
¹⁸ F] (2) 	(9) 	55	10
¹⁸ F] (2) 	(8) 	70	40
^{99m} Tc (13) 	(21) 	70	70
¹ bezogen auf die Startaktivität an ¹⁸ F bzw. ^{99m} Tc			

Yb(III)-katalysierte Umsetzung von Alkoholen mit Toluolsulfonsäureanhydrid

Die Yb(III)-katalysierte Tosylierung von primären und sekundären Alkoholen wurde initial zur Darstellung des Markierungsvorläufers N-(Trans-4-isopropyl-cyclohexanecarbonyl)-O-(2-tosylethyl)-D-tyrosin-benzylester (**9**) zur Synthese des ¹⁸F-markierten Nateglinid-Derivates verwendet. Um den generellen Nutzen dieser neuen neutralen Tosylierungsmethode zu evaluieren, wurden 14 weitere Alkohole im System Yb(III)/Tos₂O umgesetzt. Die Alkohole waren strukturell verschieden, um insbesondere sterische Einflüsse der Tosylierungsreaktion zu untersuchen. Primäre sowie sekundäre Alkohole konnten in mittleren Ausbeuten von 80 % bei 25°C in Dichlormethan tosyliert werden. Die Reaktionsdauer variierte in Abhängigkeit vom Alkohol von 10 min bis zu 20 h. Die Isolierung der korrespondierenden Tosylate erfolgte über eine kurze Säulenchromatographie an Kieselgel. Sowohl säure- als auch basenlabile

Alkohole waren ohne erkennbare Zersetzung tosylierbar. Das Yb(III)-Kation polarisiert aufgrund seiner Oxophilie die C-O-Bindung des Toluolsulfonsäureanhydrids und erleichtert somit einen nukleophilen Angriff des Alkohols.

in vitro-Evaluierung der nicht-radioaktiven Standardverbindungen

Im Falle des ^{19}F -fluorethylierten (**12**) ergab die Bestimmung der Affinität (K_D -Wert) eine zum originalen Nateglinid deutlich verschlechterte Bindungsaffinität von 27,8 μM . Aus diesem Grund wurde keine Bestimmung der Insulinsekretion durchgeführt. Die Bestimmung der Lipophilie ergab einen $\log P$ -Wert von 1,40 für das ^{19}F -fluorethylierte Nateglinid-Derivat (**12**).

Das Re-substituierte Glibenclamid-Derivat (**23**) zeigte eine hohe Bindungsaffinität zum humanen SUR-1 Rezeptor. Der IC_{50} -und K_D -Wert der Verbindung wurden an isolierten COS-1 Zellen durch Verdrängung von [^3H]Glibenclamid bestimmt. Aus dem IC_{50} -Wert von (**23**) ergab sich ein K_D -Wert von 0,50 nM. Der Lipophilie-Wert ($\log D_{7,4}$) von -0,21 zeigte den hydrophilen Charakter der Verbindung. Zur Bestimmung der physiologischen Wirkung des Re-Derivates wurde die Insulin-sezernierende Wirkung mittels einer standardisierten Insulinsekretionsanalyse durchgeführt. Der Insulingehalt wurde mit Hilfe eines Ratten-Insulin-Elisas bestimmt. Die stimulierte Insulinsekretion des Re-Derivates entsprach der des originalen Glibenclamids (56 %).

ex vivo-Organverteilung

Eine *ex vivo*-Evaluierung des ^{18}F -markierten Nateglinids (**2**) wurde aufgrund der negativen *in vitro*-Daten nicht durchgeführt.

Das $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierte Glibenclamid Derivat (**13**) wurde aufgrund seiner positiven *in vitro*-Daten sowohl diabetischen als auch nicht-diabetischen Ratten injiziert und die Bioverteilung der Substanz *ex vivo* nach 2, 4, 6 (jeweils $n=3$) und 24 h ($n=1$) in ausgewählten Organen wie Pankreas, Gehirn, Leber, Milz, Niere, Herz, Lunge und Vollblut bestimmt. Nach 2, 4 und 6 h konnte jeweils nur eine sehr geringe Aktivität in allen untersuchten Organen festgestellt werden. So konnte im Pankreas zu allen drei Zeitpunkten nur eine Aktivitätsakkumulation von unter 0,001 % ID/ g nachgewiesen werden. Nach 24 h konnte zwar im Pankreas der nicht-diabetischen Ratte im direkten Vergleich zur diabetischen Ratte noch eine geringe Radioaktivität von 0,000019 %

ID/ g gemessen werden, was aber durchaus auf eine zu geringe Statistik (n=1 für den 24 h Wert) zurückzuführen sein könnte. Die Wiederfindungsrate bezüglich der injizierten Gesamtaktivität in den untersuchten Organe lag jeweils unter 1 % ID/ g, was auf eine schnelle Exkretion und Verstoffwechslung innerhalb der ersten 2 h hinweist. Diese Tatsache ist ein direkter Hinweis darauf, dass die Metabolisierung entgegen der ursprünglichen Annahme nicht renal, sondern hepatobilär verläuft. Dies ist aufgrund des negativen $\log D_{7,4}$ -Wertes von -0,21 bemerkenswert und unerwartet. Es konnte erreicht werden, dass die Leberaktivität im Vergleich zum ^{18}F -markierten Glibenclamid-Derivat nach 2 h auf einen Wert von unter 0,03 % ID/ g gegenüber fast 10 % ID/ g gesenkt werden konnte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass zwei neue Radioliganden für die potentielle molekulare Bildgebung des SUR1-Status der Inselzellen hergestellt werden konnten. Gleichzeitig konnten die nicht-radioaktiven Testverbindungen zur *in vitro*-Evaluierung hergestellt werden. Sowohl die n.c.a. Radioliganden als auch die makroskopischen Standardverbindungen wurden systematisch *in vivo* bzw. *in vitro* evaluiert.

Leider erwiesen sich die *in vitro*-Affinitäts-Daten für das orale Antidiabetikum, das Natglinid-Derivat, als nicht selektiv genug, um weitere Versuchsreihen, zum Beispiel, zur Organverteilung des N-(Trans-4-iso-propyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2- ^{18}F fluorethyl)-D-tyrosins (**2**) an Ratten zu verfolgen. Bei dem Technetium-markierten Glibenclamid-Derivat führten die positiven *in vitro*-Daten zu ersten Tierversuchen, in deren Verlauf aber keine Visualisierung und Quantifizierung über SUR1-Rezeptoren der Pankreas erzielt werden konnte. Ein neuer Ansatz mit Messzeiten zwischen 0 und 120 min ist in Vorbereitung.

Damit zeigt sich, dass neben allen bisher evaluierten SUR1-Radioliganden auch die beiden neuen Derivate N-(Trans-4-iso-propyl-cyclohexan-carbonyl)-O-(2- ^{18}F fluorethyl)-D-tyrosin (**2**) und N-{4- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (I)-tricarboxyl-N,N-bis-(carboxymethyl)-aminoethyl)-5-chlor-benzol-carbox-amido-ethyl]-benzol-sulfon-yl}-N'-cyclohexyl-harnstoff-Natriumsalz (**13**) nicht für die emissionstomographische Darstellung des Pankreas geeignet sind. Für weitere Untersuchungen sind neue pharmakologische Strategien erforderlich. Diese Ansätze könnten sich in ^{11}C -markierten Zuckerderivaten der SUR1-Liganden oder in radioaktiv-markierten monoklonalen Antikörpern finden.

6 Literatur

- 1 de Hevesy, G. Adventures in Radioisotope Research, Volume one, Pergamon Press (1962), 146
- 2 Schütte, H. Medizinische Isotope in der organischen Chemie und Biochemie, Verlag Chemie Weinheim, Weinheim (1966)
- 3 Copper, T. G. The tolls of biochemistry, Kap. 3, Wiley-Interscience (1977)
- 4 Stöcklin, G. PET in der Neuropharmakologie, Labor 2000, 2 Auflage (1991)
- 5 Wienhard, K.; Wagner, R.; Heiss, W.-D. PET-Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie, Springer Verlag, Berlin (1989)
- 6 Ache, H. J. Chemie des Positrons und Positroniums, Angew. Chem.84, (1972), 234
- 7 Wester, H.-J. Dissertation: Zur praktischen trägerfreien ^{18}F -Fluorierung von Proteinen, Peptiden und Tyrosin, Berichte des Forschungszentrums Jülich, 3206, ISSN 0944-2952, Inst. für Nuklearchemie Jül-3206, D 38 (Diss. Universität Köln)
- 8 Wienhard, K.; Wagner, R.; Heiss, W.-D.; PET-Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie, Springer Verlag, Berlin (1989)
- 9 Lederer, C. M.; Shirley, V. S. Tables of Isotopes, 7th Edition, John Wiley, New York
- 10 Kabalka, G.; Lambrecht, R. M.; Sajjad, M.; Fowler, J. S.; Kunda, S. A.; McCollum, G. W.; McGregor, R. Int. J. Appl. Radiat. Isot. 36, (1985), 853
- 11 Qaim, S. M., Cyclotron Production of Medical Radionuclides, in: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences, Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z.; Rösch, F. (eds); Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z. Handbook of Nuclear Chemistry, Kluwer Academic Publishers (2003) Vol. 4, 47
- 12 Ruth, T.; Wolf, A. Radiochim. Acta. 26, (1979), 26
- 13 Hamacher, K.; Blessing, G.; Nebeling, B. Appl. Radiat. Isot. 41 (1990), 49-55
- 14 Casella, V.; Ido, T.; Fowler, J. S.; McGregor, R. R.; Ruth, T. J. Anhydrous ^{18}F -labeled elemental fluorine for pharmaceutical preparation, J. Nucl. Med. 21, (1980), 750
- 15 Stöcklin, G. in Handbuch der medizinischen Radiologie, Band 15/1B, Emissions-Computertomographie mit kurzlebigen Zyclotron-produzierten Radionukliden, Springer Verlag, Berlin (1989)

-
- 16 Wester, H. J., ¹⁸F: Labeling Chemistry and Labelled Compounds, in: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences, Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z.; Rösch, F. (eds); Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z. Handbook of Nuclear Chemistry, Kluwer Academic Publishers (2003) Vol. 4, 167
 - 17 Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Stöcklin, G. J. Nucl. Med. 27, (1986), 235-238
 - 18 Wester, H. J., ¹⁸F: Labeling Chemistry and Labelled Compounds, in: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences, Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z.; Rösch, F. (eds); Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z. Handbook of Nuclear Chemistry, Kluwer Academic Publishers (2003) Vol. 4, 176
 - 19 Coenen, H. H.; Moerlein, S. M. Regiospecific Aromatic Fluorodemetalation of Group Ivb Metalloarenes using Elemental Fluorine or Acetyl Hypofluorite, J. Fluorine Chemistry 36, (1986), 63-75
 - 20 Cox, D. P.; Terpinzki, J; Lawrynowicz, W; J. Org. Chem. 49, (1984), 3216
 - 21 Block, D.; Diplomarbeit: Zur praktisch trägerfreien ¹⁸F-Fluoralkylierungen und ¹⁸F-Fluoralcylierung, Universität zu Köln (1979)
 - 22 Block, D.; Coenen, H. H.; Stöcklin, G. J. Label. Compd. Radiopharm. 24, (1987), 1032
 - 23 Block, D.; Coenen, H. H.; Stöcklin, G. J. Label. Compd. Radiopharm. 25, (1988), 201
 - 24 Gail, R.; Coenen, H. H.; Stöcklin, G. J. Label. Compd. Radiopharm. 35, (1994), 197
 - 25 Wester, H. J., ¹⁸F: Labeling Chemistry and Labelled Compounds, in: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences, Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z.; Rösch, F. (eds); Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z. Handbook of Nuclear Chemistry, Kluwer Academic Publishers (2003) Vol. 4, 190
 - 26 Comagic, S.; Piel, M.; Schirmacher, R.; Höhnemann, S.; Rösch, F. (2002), Appl. Radiat. Isot. 56 (6), 847-851
 - 27 Kilbourn, M. R.; Welch, M. J.; Dence, C. S.; Tewson, T. J.; Saji, H.; Maeda, M.; Int. J. Appl. Radiat. Isot. 35, (1984), 591
 - 28 Shai, Y; Kirk, K. L.; Channing, M. A.; Dunn, B. B.; Lesniak, M. A.; Eastman R. C.; Finn, R. D.; Roth, J.; Jacobsen, K. A., Biochemistry, 28 (1986), 4801
 - 29 Hwang, D.-R.; Dence, C. S.; McKinnon, Z. A.; Mathias, C. J.; Welch, M. J. Nucl. Med. Biol. 18, (1991), 247

-
- 30 Lederer, C. M.; Shirley, V. S. Tables of Isotopes, 7th Edition, John Wiley, New York
- 31 A) Rösch, F.; Knapp (Russ), F. F., Radionuclide Generators, in: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences, Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z.; Rösch, F. (eds); Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z. Handbook of Nuclear Chemistry, Kluwer Academic Publishers (2003) Vol. 4, 81
B) Tucker, D.; Greene, M. W.; Weiss, A. J.; Murrenhoff, A. P. (1958), Trans. Am.Nucl. Soc., 1, 160
C) Richards, P. 5th Nuclear Congress, 7th Int. Electronic Nuclear Symposium. Rome, (1960), 255
- 32 Cotton, F. A.; Wilkinson, G. In Advanced Inorganic Chemistry, 5th ed., Wiley-Interscience: New York, (1988), 817
- 33 A) Alberto, R.; Abram, U., ^{99m}Tc: Labeling Chemistry and Labeled Compounds, in: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences, Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z.; Rösch, F. (eds); Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z. Handbook of Nuclear Chemistry, Kluwer Academic Publishers (2003) Vol. 4, 214
B) Hom, R. K.; Katzenellenbogen, J. A. 1997. Nucl. Med. Biol. 24, 485
C) Liu, S.; Edwards, D. S. (1999), Chem. Rev. 99, 2235
D) Jurisson, S. S.; Lydon, J. D., (1999), Chem. Rev. 99, 2205
- 34 Eckelman, W.; Richards, P. (1970), J. Nuc. Med. 11, 761
- 35 Subramanian, G.; McAfee, J. G.; Blair, R. J.; Kallfelz, F. A.; Thomas, F. D. (1975), J.Nuc. Med. 16, 744
- 36 Smith, T. D.; Richards, P. (1976), J. Nucl. Med. 17, 126
- 37 Loberg, M. D.; Cooper, M.; Harvey, E.; Callery, P.; Faith, W. (1976), J. Nucl. Med. 17, 633
- 38 Alberto, R.; Abram, U., ^{99m}Tc: Labeling Chemistry and Labeled Compounds, , in: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences, Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z.; Rösch, F. (eds); Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z. Handbook of Nuclear Chemistry, Kluwer Academic Publishers (2003) Vol. 4, 225
- 39 Troutner, D. E.; Volkert, W. A.; Hoffman, T. J.; Holmes, R. A. (1984), Int. J. Appl.Radiat. Isot., 35, 467
- 40 A) Burns, H. D.; Dannals, R. F.; Dannals, T. E.; Kramer, A. V.; Marzilli, L. G. (1981), J. Label. Compd. Radiopharm., 18, 54
B) Davison, A.; Jones, A. G.; Orvig, C.; Sohn, M. 1981, Inorg. Chem., 20, 1629
C) Kung, H. F.; Molnar, M.; Billings, J.; Wicks, R.; Blau, M. (1984), J. Nucl. Med., 25, 326

-
- 41 Cheesman, E. H.; Blanchette, M. A.; Ganey, M. V.; Maheu, L. J.; Miller, S. J.; Watson, A. D. (1988), *J. Nucl. Med.*, 29, 788
- 42 Narra, R. K.; Nunn, A. D.; Kuczynski, B. L.; DiRocco, R. J.; Feld, T.; Silva, D. A.; Eckelman, W. C. (1990), *J. Nucl. Med.*, 31, 1370
- 43 Bossuyt, A.; Morgan, G. F.; Deblaton, M.; Pirotte, R.; Chirico, A.; Clemens, P.; Vandebroek, P.; Thornback, J. R. (1991), *J. Nucl. Med.*, 32, 399
- 44 Deutsch, E.; Bushong, W.; Glavan, K. A.; Elder, R. C.; Sodd, V. J.; Scholz, K. L.; Fortman, D. L.; Lukes, S. J. (1981), *Science*, 214, 85
- 45 Abrams, M. J.; Davison, A.; Jones, A. G.; Costello, C. E.; Pang, H. (1983), *Inorg. Chem.*, 22, 2798
- 46 Taillefer, R.; Laflamme, L.; Dupras, G.; Picard, M.; Phaneuf, D. C.; Leveille, J. (1988), *Eur. J. Nucl. Med.*, 13, 515
- 47 Higley, B.; Smith, F. W.; Smith, T.; Gemmell, H. G.; Das Gupta, P.; Gvozdanovic, D. V.; Graham, D.; Hinge, D.; Davidson, J.; Lahiri, A. (1993), *J. Nucl. Med.* 34, 30
- 48 Rossetti, J. D.; Vanoli, G.; Paganelli, G.; Kwiatkowski, M.; Zito, F.; Colombo, F.; Bonino, C.; Carpinelli, A.; Casati, R.; Deutsch, K.; Marmion, M.; Woulfe, S. R.; Lunghi, F.; Deutsch, E.; Fazio, F. (1994), *J. Nucl. Med.*, 35, 1571
- 49 Stewart, R. E.; Schwaiger, M.; Hutchins, G. D.; Chiao, P. C.; Gallagher, K. P.; Nguyen, N.; Petry, N. A.; Rogers, W. L. (1990), *J. Nucl. Med.*, 31, 1183
- 50 DiRocco, R. J.; Bauer, A. A.; Pirro, J. P.; Kuczynski, B. L.; Belnavis, L.; Chan, Y. W.; Linder, K. E.; Narra, R. K.; Nowotnik, D. P.; Nunn, A. D. (1997), *Nucl. Med. Biol.*, 24, 201
- 51 A) Mahmood, A.; Jones, A. G. Technetium Radiopharmaceuticals, in *Handbook of Radiopharmaceuticals, Radiochemistry and Applications*. Welch, M. J.; Redvanly, C. S. (eds), Wiley (2003).
B) Alberto, R.; Abram, U. ^{99m}Tc: Labeling chemistry and labeled compounds, in: *Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences*, Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z.; Rösch, F. (eds); Vertes, A.; Nagy, S.; Klenscar, Z. *Handbook of Nuclear Chemistry*, Kluwer Academic Publishers (2003) Vol. 4, 211
- 52 Hom, R. K.; Katzenellenbogen, J. A. (1997), *Nucl. Med. Biol.*, 24, 485
- 53 Kung, H. F.; Kim, H. J.; Kung, M. P.; Meegalla, S. K.; Plössl, K.; Lee, H. K. (1996), *Eur. J. Nucl. Med.*, 23, 1527

-
- 54 Baidoo, K. E.; Scheffel, U.; Lever, S. Z.; Stathis, M.; Wagner, H. N. Jr. (1995), *J.Nucl. Med.*, 36 (5, suppl.), 28
- 55 Johannsen, B.; Scheunemann, M.; Spies, H.; Brust, P.; Wober, J.; Syhre, R.; Pietzsch, H. J. (1996), *Nucl. Med. Biol.*, 23, 429
- 56 Abrams, M. J.; Juweid, M.; Tenkate, M.; Schwartz, D. A.; Hauser, M. M.; Gaul, F. E.; Fucello, A. J.; Rubin, R. H.; Srauss, H. W.; Fischmann, A. J. (1990), *J. Nucl. Med.*, 31, 2022
- 57 Liue, S.; Edwards, D. S. (1999), *Chem. Rev.*, 99, 2235
- 58 Nicholson, T.; Cook, J.; Davison, A.; Rose, D. J.; Maresca, K. P., Zubieta, J. A.; Jones, A. G.; (1996), *Inorg. Chim. Acta.*, 152, 427
- 59 Alberto, R.; Schibli, R.; Waibel, R.; Abram, U.; Schubiger, A. P. (1999), *Coordination Chemistry Reviews*, 190-192, 901
- 60 Schibli, R.; LaBella, R.; Alberto, R.; Garcia-Garayoa, E.; Ortner, K.; Abram, U.; Schubiger, P. A. (2000), *Bioconjugate Chem.*, 11, 345
- 61 Wald, J.; Alberto, R.; Ortner, K.; Candraia, L. (2001), *Angew. Chem.*, 113, 3152
- 62 EURODIAB ACE Study Group. (2000), *Lancet*, 355, 873
- 63 Pfützner, A.; Forst, T.; Beyer, J. Immunology of type1-diabetes: The autoimmune destruction of the β -cell. *The Microbiologist*, Vol 6, I/ (1995)
- 64 Mrena, S.; Savola, K.; Kulmala, P.; Akerblom, H. K.; Knip, M.; (1999), *Pediatrics*, 104, 925
- 65 Kolb H, Gale EAM. (2001), *Diabetologia* 44, 1349
- 66 Schneider, S.; Beyer, J.; Sarnighausen, H. E.; Burchert, D.; Kann, P.; Kustner, E.; Kunt, T. (2000), *Dtsch. Med. Wochenschr.* 125, 177
- 67 The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Effect of intensive therapy on residual beta-cell function in patients with type 1 diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* (1998);128:517-523
- 68 Schneider, S.; Kunt, T.; Pfützner, A.; Goitom, K.; Engelbach, M.; Schauf, B.; Beyer, J.; Forst, T. (1999), *Diabetologia*, 42, 465

-
- 69 Forst, T.; De La Tour, D. D.; Kunt, T.; Pfutzner, A.; Goitom, K.; Pohlmann, T.; Johansson, B. L.; Schneider, S.; Wahren, J.; Lobig, M.; Engelbach, M.; Beyer, J.; Vague, P. (2000), *Clin.Sci.(Colch.)*, 98, 28
- 70 Ronner, P.; Matschinsky, F. M.; Hang, T. L. (1993), *Diabetes* 42, 1760
- 71 Seino, S. (1999), *Ann. Rev. Physiol.*, 61, 337
- 72 Cook, D. L.; Satin, L. S.; Ashford, M. L.; Hales, C. N. (1988), *Diabetes* 37, 495
- 73 Dorschner, H.; Brekardin, E.; Uhde, I.; Schwanstecher, C.; Schwanstecher, M. (1999), *Mol Pharmacol.* 55, 1060
- 74 A) Shinkai, H.; Toi, K.; Kumashiro, I.; Sato, Y.; Fukuma, M.; Dan, K.; Toyoshima, S. *J. Med. Chem.* (1988), 31, 2092
B) Shinkai, H.; Nishikawa, M.; Sato, Y.; Toi, Y.; Kumashiro, I.; Seto, Y.; Fukuma, M.; Dan, K.; Toyoshima, S. *J. Med. Chem.* (1989), 32, 1436
- 75 A) Fujitani, S.; Yada, T. *Endocrinology* (1994), 134, 1395
B) Akiyoshi, M.; Kakei, M.; Nakazeki, M.; Tanaka, H. *Am. J. Physiol.* (1995), 268 (Endocrinol. Metab. 31)
- 76 Keilsen, L.; Mather, S.; Walter, Y. H.; Subramanian, S.; McLeod, J. F. (2000), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 1081
- 77 Ashcroft, F. M.; Gribble, F. M. (2000), *J. Diabetes Complications.* 14, 192
- 78 Beyer, J.; Pies, U.; Schneider, S. *Klinik und Diagnostik des Insulinoms. In: Endokrine Chirurgie (Band III)*, J.R. Siewert, F. Harder, M. Rothmund. Springer Verlag (2000)
- 79 Kramer, W.; Okomonopoulos, R.; Summ, H. D. (1988), *FEBS Lett*, 229, 335
- 80 Aguilar-Bryan, L.; Nichols, C. G.; Rajan, A. S.; Parker, C.; Bryan, J. (1992), *J. Biol Chem*, 267, 14934
- 81 Schirmacher, R.; Weber, M.; Schmitz, A.; Shiue, C.-Y.; Alavi, A. A.; Feilen, P.; Schneider, S.; Kann, P.; Rösch, F. (2002), *J. Label Comp. Radiopharm.*, 45, 763
- 82 Shiue, G. G.; Schirmacher, R.; Shiue, C.-Y.; Alavi, A. (2001), *J. Label Comp. Radiopharm.*, 44, 127
- 83 Wängler, B.; Schneider, S.; Thews, O.; Schirmacher, E.; Comagic, S.; Feilen, P.; Schwanstecher, C.; Schwanstecher, M.; Shiue, C.-Y.; Alavi, A.; Höhne-mann, S.; Piel, M.; Rösch, F.; Schirmacher, R. (2004), *Nucl. Med. Biol.*, in press

-
- 84 Schmitz, A.; Shiue, S. Y.; Feng, Q.; Shiue, G. G.; Deng, S.; Pourdehnad, M. T.; Schirmacher, R.; Vatamaniuk, M.; Dolibas, N.; Matschinsky, F.; Wolf, B.; Rösch, F.; Najj, A.; Alavi, A. (2004), *Nucl. Med. Biol.*, 31, 483
- 85 Schirmacher, R.; Schneider, S. (2004), unveröffentlichte Ergebnisse
- 86 Keilsen, L.; Mather, S.; Walter, Y. H.; Subramanian, S.; McLeod, J. F. (2000), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 1081
- 87 Schirmacher, R.; Schneider, S. (2004), unveröffentlichte Ergebnisse
- 88 Schmitz, A.; Shiue, S. Y.; Feng, Q.; Shiue, G. G.; Deng, S.; Pourdehnad, M. T.; Schirmacher, R.; Vatamaniuk, M.; Dolibas, N.; Matschinsky, F.; Wolf, B.; Rösch, F.; Najj, A.; Alavi, A. (2004), *Nucl. Med. Biol.*, 31, 483
- 89 Levine, M.; Burns, M. J. (2001), *Int. J. Med. Toxicol.*; 4(4), 25
- 90 Hu, S.; Want, S.; Fanelli, B.; Bell, P. A.; Dunning, B. E.; Geisse, S.; Schmitz, R. (2000); *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 293, 444
- 91 Shinkai, H.; Nishikawa, M.; Sato, Y.; Toi, K.; Kumashiro, I.; Seto, Y.; Fukuma, M.; Dan, K.; Toyoshima, S. *J. Med. Chem.* (1989), 32, 143641
- 92 Zervas, L.; Winitz, M.; Greenstein, P. *J. Org. Chem.* (1957), 22, 1515
- 93 Chumpradit, S.; Kung, M. P.; Billings, J.; Mach, R. and Kung, H. F. *J. Med. Chem.* (1993), 36, 221
- 94 Takesada, H.; Matsuda, K.; Ohtake, R.; Mihara, R.; Ono, I.; Tanaka, K.; Naito, M.; Yatagai, M.; Susuki, E.; *Bioorg. Med. Chem.* (1996), 10, 1771
- 95 Comagic, S.; Schirmacher, R. (2004) *Synthesis*, 6, 885
- 96 A) Wagner, R. B.; Zokk, H. D. In *Synthetic Organic Chemistry*, Vol.3; Horning, E. C., Eds.; Wiley: New York, (1955)
B) Fieser, L. F.; Fieser, M. *Reagents for Organic Synthesis*, Vol. 1; Wiley: New York, (1967)
C) Sandler, S. R.; Karo, Q. *Organic Functional Group Preparations*, Vol. 1; Academic: New York, (1983)
D) Yoshida, Y.; Sakakura, Y.; Aso, N.; Okada, S.; Tanabe, Y. *Tetrahedron* (1999), 55, 2183 (e) Kabalka, G. W.; Varma, M.; Varma, S. *J. Org. Chem.* (1986), 51, 2386
- 97 A) Ouchi, M.; Inoue, Y.; Liu, Y.; Nagamune, S.; Nakamura, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (1990), 63, 1260
B) Fenton, D. E.; Parkin, D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* (1981), 449
C) Cornforth, J. W.; Morgan, E. D.; Potts, K. T.; Rees, R. J. W. *Tetrahedron* (1973), 29, 1659

-
- 98 A) Boons, G.-J.; Castle, G. H.; Clase, J. A.; Grice, P.; Ley, S. V.; Pinel, C. *Synlett* (1993), 913
B) Purdie, T.; Martinelli, M. J.; Nayyar, K. N.; Moher, E. D.; Dhokt, U. P.; Pawlak, J. M.; Vaidyanathan, R. *Org. Lett.* (1999), 1, 447
- 99 Yoshida, Y.; Shimonishi, K.; Sakakura, Y.; Okada, S.; Aso, N.; Tanabe, Y. *Synthesis* (1999), 9, 1633
- 100 Bouzide, A.; LeBerre, N.; Sauvé, G. *Tetrahedron Lett.* (2001), 42, 8781
- 101 A) Pepito, A. S.; Dittmer, D. C. *J. Org. Chem.* (1994), 59, 4311
B) Deng, Y.; Salomon, R. G. *J. Org. Chem.* (1998), 63, 3504
C) Kuehne, M. E.; Qin, Y.; Huot, A. E. *J. Org. Chem.* (2001), 66, 5317
D) Brooks, D. A.; Etgen, G. J.; Rito, C. J.; Shuker, A. J.; Dominianni, S. J.; Warshawsky, A. M.; Ardecky, R.; Paterniti, J. R.; Tyhonas, J.; Karanewsky, D. S.; Kauffman, R. F.; Broderick, C. L.; Oldham, B. A. *J. Med. Chem.* (2001), 44, 2061
- 102 Galynker, I.; Still, W. C. *Tetrahedron Lett.* (1982), 43, 4461
- 103 O'Connell, J. F.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* (1992), 57, 4775
- 104 Hartung, J.; Hünig, S.; Kneuer, R.; Schwarz, M.; Wenner, H. *Synthesis* (1997), 1433
- 105 Velusamy, S.; Kumar, K.; Punniyamurthy, T. *Tetrahedron Lett.* (2004), 45, 203
- 106 Gründer, G.; Siessmeier, T.; Piel, M.; Vernaleken, I.; Buchholz, H. G.; Zhou, Y.; Hiemke, C.; Wong, D. F.; Rösch, F.; Bartenstein, P. (2003), *J. Nucl. Med.*, 44, No.1, 109
- 107 Comagic, S.; Schirmacher, R. (2004) *Synthesis*, 6, 885
- 108 Kobayashi, S. *Synlett* (1994), 689
- 109 Chini, M.; Crotti, P.; Favero, L.; Maccia, F.; Pineschi, M. *Tetrahedron Lett.* (1994), 35, 433
- 110 Crotti, P.; Favero, L.; Maccia, F.; Pineschi, M. *Tetrahedron Lett.* (1994), 38, 7089
- 111 Keramane, E. M.; Boyer, B.; Roque, J.-P. *Tetrahedron* (2001), 57, 1909
- 112 *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, Second Edition*, VCH Weinheim
- 113 Schirmacher, R.; Schneider, S. (2004), unveröffentlichte Ergebnisse

-
- 114 Schmitz, A.; Shiue, S. Y.; Feng, Q.; Shiue, G. G.; Deng, S.; Pourdehnad, M. T.; Schirmacher, R.; Vatamaniuk, M.; Dolibas, N.; Matschinsky, F.; Wolf, B.; Rösch, F.; Najji, A.; Alavi, A. (2004), *Nucl. Med. Biol.*, 31, 483
- 115 Nelson, D. A.; Aguilar-Bryan, L.; Bryan, J. (1992), *J. Biol. Chem.*, 25, (21):14928
- 116 Schirmacher, R.; Schneider, S.; (2004), unveröffentlichte Ergebnisse
- 117 Williams, M. A.; Rapoport, H. (1993), *J. Org. Chem.*, 58, 1151
- 118 Cervello, J.; Sastre, T. (1990), *Synthesis*, 3, 221
- 119 Alberto, R.; Schibli, R.; Egli, A.; Schubiger, P. A.; Herrmann, W. A.; Artus, G.; Abram, U.; Kaden, T. A. (1995), *J. Organomet. Chem.* 493, 119
- 120 Alberto, R.; Schibli, R.; Abram, U.; Egli, A.; (Russ) Knapp, F. F.; Schubiger, P. A. (1997), *Radiochimica Acta*, 79, 99
- 121 Alberto, R.; Schibli, R.; Egli, A.; Schubiger, P. A. (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 7987
- 122 Malone, L. J.; Parry, R. W. (1967), *Inorg. Chem.*, 6, 817
- 123 Schwanstecher, M.; Brandt, C.; Behrends, S.; Schaupp, U.; Panten, U. (1992), *Br. J. Pharmacol* 106, 295-301
- 124 Schwanstecher, M.; Sieverding, C.; Dörschner, H.; Gross, I.; Aguilar-Bryan, L.; Schwanstecher, C.; Bryan, J. (1998), *EMBO J.* 17, 5529-5535
- 125 Becker, H. G.O.; Beckert, R.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Habischer, W. D.; Metz, P.; Pavel, D.; Schwetlick, K. (2001), *Organikum*, 21. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- 126 Leonard, J.; Lygo, B.; Procter, G. (1996), *Praxis der organischen Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim
- 127 Dyrssen, D. (1952), *Sv. Kem. Tidskr.* 64, 213
- 128 Rydberg, J. (1953), *Sv. Kem. Tidskr.* 65, 37
- 129 Schneider, S.; v Mach, M., A.; Kraus, O.; Kann, P.; Feilen, P., J. (2003), *Artif. Organs.* 27(11), 1053-1056
- 130 Schneider, S.; v Mach, M., A.; Kraus, O.; Kann, P.; Feilen, P., J. (2003), *Artif. Organs.* 27(11), 1053-1056
- 131 Schneider, S.; Feilen, P. J.; Cramer, H.; Hillgärtner, M.; Brunmeier, F.; Zimmermann, H.; Weber, M. M.; Zimmermann, U. (2003), *J. of Microencapsulation* 20, 627-636

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (z.B. Literatur, Geräte) in der Arbeit angegeben habe. Die aus anderen Quellen übernommenen Daten wurden unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich habe weder diese Arbeit noch Teile davon bei einer anderen Stelle im In- und Ausland als Dissertation eingereicht.

Mainz,

Slobodan Comagic