

**Synthese,  $^{11}\text{C}$ - und  $^{18}\text{F}$ -Markierung und Evaluierung  
von Repaglinid-Derivaten zur Quantifizierung der  
pankreatischen  $\beta$ -Zell-Masse *in vivo* mittels PET**

Dissertation zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von  
Björn Wängler  
geb. in Worms

Mainz, 2004

## Abstract

Diabetes mellitus comprises a heterogeneous group of disorders characterized by high blood glucose levels. Two major types of diabetes mellitus have been defined: type 1- and type 2 diabetes. Repaglinide is a novel fast acting prandial glucose regulator with a short plasma half-life (< 1 h) being the first member of the carbamoylmethylbenzoic acid chemical family to be used in a clinical setting. The  $^{18}\text{F}$ - and  $^{11}\text{C}$ -labeled repaglinide derivatives (S)-2-(2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroethoxy)-4-((3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl)-methyl)-benzoic acid ([ $^{18}\text{F}$ ]fluoroethoxy-repaglinide) and (S)-2-([ $^{11}\text{C}$ ]methoxy)-4-([3-methyl-1-(2-piperidine-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl]-benzoic acid ([ $^{11}\text{C}$ ]methoxy-repaglinide) were synthesized as potential tracers for the non-invasive investigation of the sulfonylurea 1 receptor status of pancreatic beta-cells by positron emission tomography (PET). [ $^{18}\text{F}$ ]Fluoroethoxy-repaglinide could be obtained in an overall radiochemical yield (RCY) of 20% after 135 min with a radiochemical purity higher than 98% applying the secondary labeling precursor 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroethyltosylate. Specific activity was in the range of 50-60 GBq/ $\mu\text{mol}$ . For radioactive synthesis of [ $^{11}\text{C}$ ]methoxy-repaglinide the labeling precursor [ $^{11}\text{C}$ ]methyl iodide was used. The  $^{11}\text{C}$ -radiotracer was obtained in an overall radiochemical yield of 35% (referring to [ $^{11}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub>) with a specific activity of 40-70 GBq/ $\mu\text{mol}$ .

To characterize the properties of fluorinated as well as methoxylated repaglinide, the affinity of both compounds for binding to the human SUR1 isoform was assessed. [ $^{19}\text{F}$ ]Fluoroethoxy-repaglinide and methoxy-repaglinide induced a complete monophasic inhibition curve with a Hill coefficient close to 1 yielding dissociation constants ( $K_D$ ) of 142 nM and 83 nM respectively, comparatively minor losses relative to original repaglinide. Biological activity was proven via insulin secretion experiments on isolated rat islets and was comparable to that of repaglinide. Finally, biodistribution of [ $^{18}\text{F}$ ]fluoroethoxy-repaglinide was investigated in rats by measuring the concentration of the compound in different organs after i.v. injection. Pancreatic tissue showed a stable accumulation of  $\approx 0.12\%$  of the injected dose from 10 min to 30 min p.i.. 50 % of the this tracer accumulation could be displaced by additional injection of unlabeled repaglinide, indicating that [ $^{18}\text{F}$ ]fluoroethoxy-repaglinide might be suitable for *in vivo* investigation with PET. However, a preliminary human PET study revealed only a minor but stable accumulation of [ $^{18}\text{F}$ ]fluoroethoxy-repaglinide in the pancreas in contrast to an exceptional high liver uptake. The administered radioactivity displayed a rapid clearance from the blood pool, falling below the radioactivity level in the pancreas.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Kurzlebige Positronenemitter in der Nuklearchemie	1
1.2	Zur Chemie und Kinetik trägerarmer Radionuklide	5
1.2.1	Chemische Aspekte	5
1.2.1	Kinetische Aspekte	6
1.3	Produktion von [ <sup>18</sup> F]Fluor	7
1.4	Verfahren zur Markierung organischer Moleküle mit [ <sup>18</sup> F]Fluor	9
1.4.1	Elektrophile Fluorierung	9
1.4.2	Nukleophile Fluorierung	11
1.4.3	Markierung mittels sekundärer Markierungsvorläufer	13
1.5	Produktion von Kohlenstoff-11	14
1.6	Darstellung sekundärer <sup>11</sup> C-Markierungsvorläufer	15
1.7	Diabetes Mellitus	17
1.8	Stand der Forschung zur Visualisierung der β-Zell-Masse	20
<b>2</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>25</b>
3.1	Darstellung der Markierungsvorläufer und der nicht-radioaktiven Standardverbindungen	25
3.1.1	Darstellung des Markierungsvorläufers 2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester <b>7</b>	25
3.1.2	Darstellung des Markierungsvorläufers (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure <b>10</b>	28
3.1.3	Darstellung des Direktmarkierungsvorläufers (S)-4-{{3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-2-[2-(toluene-4-sulfonyloxy)-ethoxy]-benzoesäure-methylester <b>9</b>	29
3.1.4	Darstellung der nicht-radioaktiven Standardverbindungen (S)-2-(2-Fluorethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) <b>2</b> und (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) <b>3</b> und Repaglinid <b>1</b>	30
3.2	Radiosynthesen mit [ <sup>18</sup> F]Fluor	31
3.2.1	Markierungen des Direktmarkierungsvorläufers (S)-4-{{3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-2-[2-(toluene-4-sulfonyloxy)-ethoxy]-benzoesäure-methylester <b>9</b> mit [ <sup>18</sup> F]Fluorid	31
3.2.2	Verwendung der sekundären Markierungsvorläufer 1-Brom-2-[ <sup>18</sup> F]fluorethan und 2-[ <sup>18</sup> F]Fluorethyltosylat	33

3.2.3	Markierung von (S)-2-Hydroxy-4-{{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure <b>10</b> mit 1-Brom-2- <sup>[18F]</sup> fluorethan und 2- <sup>[18F]</sup> Fluorethyltosylat	33
3.2.4	Radioaktive Markierungen von (S)-2-Hydroxy-4-{{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure-methylester <b>7</b> mit 2- <sup>[18F]</sup> Fluorethyltosylat und 1-Brom-2- <sup>[18F]</sup> fluorethan	34
3.2.4.1	Darstellung des Intermediates (S)-2-(2- <sup>[18F]</sup> Fluor-ethoxy)-4-{{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure-methylester <sup>[18F]</sup> <b>-5</b>	34
3.2.4.2	Darstellung von <sup>[18F]</sup> <b>-2</b> durch Verseifung von <sup>[18F]</sup> <b>-5</b> : Optimierte Parameter der Methylester-Spaltung	43
3.3	Radiosynthesen mit <sup>[11C]</sup> Kohlenstoff	45
3.3.1	Darstellung des Intermediates (S)-2-(2- <sup>[11C]</sup> Methoxy)-4-{{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure-methylester <sup>[11C]</sup> <b>-6</b>	45
3.3.2	Darstellung von (S)-2- <sup>[11C]</sup> Methoxy-4-{{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure <sup>[11C]</sup> <b>-3</b> durch basische Verseifung von <sup>[11C]</sup> <b>-6</b>	50
<b>4</b>	<b>Evaluierungen</b>	<b>51</b>
4.1	Bestimmung der Lipophilie	51
4.2	<i>In vitro</i> -Evaluierungen	56
4.2.1	Insulinsekretionstest	56
4.2.2	Bindungsaffinität	59
4.3	<i>In vivo</i> -Evaluierungen	61
4.3.1	Tierexperimente	61
4.3.2	<i>In vivo</i> -PET-Studie am Menschen	64
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>67</b>
5.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	67
5.2	Darstellung des Markierungsvorläufers und der nicht-radioaktiven Referenzverbindungen der Repaglinid-Derivate	70
5.2.1	Markierungsvorläufer 2-Hydroxy-4-{{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure-methylester <b>7</b>	70
5.2.1.1	4-Carboxymethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester <b>14</b>	70
5.2.1.1.1	2-Hydroxy-4-methyl-benzoesäure-methylester <b>18</b>	70
5.2.1.1.2	4-Brommethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester <b>17</b>	71
5.2.1.1.3	4-Cyanomethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester <b>16</b>	72
5.2.1.1.4	2-Hydroxy-4-methoxycarbonylmethyl-benzoesäure-methylester <b>15</b>	72
5.2.1.1.5	4-Carboxymethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester <b>14</b>	73
5.2.1.2	(S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin ( <b>S</b> )- <b>11</b>	74

5.2.1.2.1	2-Piperidin-1-yl-benzonitril <b>13</b>	74
5.2.1.2.2	3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylidenamin <b>12</b>	75
5.2.1.2.3	3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin <b>11</b>	76
5.2.1.2.4	(S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin ( <b>S</b> )- <b>11</b>	77
5.2.1.3	(S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester <b>7</b>	78
5.2.2	Referenzverbindung (S)-2-Ethoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Repaglinid) <b>1</b>	79
5.2.2.1	(S)-2-Ethoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester <b>4</b>	79
5.2.2.2	(S)-2-Ethoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Repaglinid) <b>1</b>	80
5.2.3	Referenzverbindung (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) <b>3</b>	81
5.2.3.1	2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester <b>6</b>	81
5.2.3.2	(S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) <b>3</b>	82
5.2.4	Referenzverbindung (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) <b>2</b>	83
5.2.4.1	(S)-2-(2-Fluorethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester <b>5</b>	83
5.2.4.2	(S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) <b>2</b>	84
5.2.5	Direktmarkierungsvorläufer (S)-4-{{3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-2-[2-(toluene-4-sulfonyloxy)-ethoxy]-benzoesäure-methylester <b>9</b>	85
5.2.5.1	(S)-2-(2-Hydroxy-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester <b>8</b>	86
5.2.5.2	Direktmarkierungsvorläufer (S)-4-{{3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-2-[2-(toluene-4-sulfonyloxy)-ethoxy]-benzoesäure-methylester <b>9</b>	87
5.2.6	Markierungsvorläufer (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure <b>10</b>	88
5.3	Radiosynthesen	89
5.3.1	Radiosynthesen mit [ <sup>18</sup> F]Fluorid	89
5.3.1.1	Allgemeine Vorschrift für die Direktmarkierungen mit [ <sup>18</sup> F]Fluorid	89
5.3.1.2	Darstellung von 2-[ <sup>18</sup> F]Fluorethyltosylat	91
5.3.1.3	Darstellung von 1-Brom-2-[ <sup>18</sup> F]fluorethan	93

5.3.1.4	Allgemeine Vorschrift für die Markierungen mit den sekundären Markierungsvorläufern 2-[ <sup>18</sup> F]Fluorethyltosylat und 1-Brom-2-[ <sup>18</sup> F]fluorethan	93
5.3.1.5	Vorschrift zur Radiosynthese von (S)-2-(2-[ <sup>18</sup> F]Fluorethoxy)-4-{{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure [ <sup>18</sup> F]-2 für <i>in vivo</i> -Evaluierungen	94
5.3.2	Radiosynthesen mit [ <sup>11</sup> C]Kohlenstoff	95
5.3.2.1	Darstellung von [ <sup>11</sup> C]Methyliodid	95
5.3.2.2	Allgemeine Vorschrift zu Markierungen mit [ <sup>11</sup> C]Methyliodid	96
5.3.2.3	Vorschrift zur Radiosynthese von (S)-2-([ <sup>11</sup> C]Methoxy)-4-{{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure [ <sup>11</sup> C]-3 für <i>in vivo</i> -Evaluierungen	97
5.3.3	Analytische Verfahren	98
5.3.3.1	Radio-HPLC	98
5.3.3.2	Radiodünnschichtchromatographie (Radio-DC)	98
5.3.3.3	Bestimmung der radiochemischen Ausbeute	99
5.3.3.4	Bestimmung der radiochemischen Reinheit und der spezifischen Aktivität	99
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>110</b>
<b>Anhang:</b>	<b>Publikationen</b>	<b>115</b>

# 1 Einleitung

Nachdem Henry Becquerel im Jahr 1896 die Radioaktivität entdeckt hatte, war es 1920 der ungarische Chemiker Georg von Hevesy, der als erstes natürliche radioaktive Isotope für die Untersuchung biochemischer Vorgänge *in vivo* verwendete, indem er den Metabolismus von Pflanzen mit  $^{212}\text{Pb}$  studierte (Stöcklin, 1995). Damit legte er den Grundstein für die diagnostische und therapeutische Nuklearmedizin. Diese beruht auf der Verwendung von „Radiotracer“ hoher spezifischer Aktivität, bei denen es sich um radioaktiv markierte Verbindungen handelt, die es erlauben, einen biochemischen Vorgang *in vivo* zu verfolgen, ohne ihn dabei zu beeinflussen.

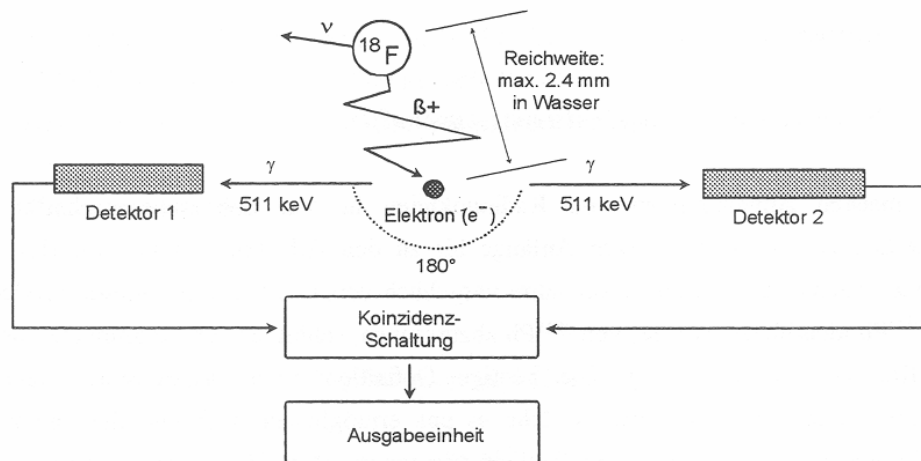
## 1.1 Kurzlebige Positronenemitter in der Nuklearchemie

Im Gegensatz zu tomographischen Verfahren, wie zum Beispiel der Computertomographie oder der Kernspintomographie, die primär morphologische Zustände erfassen können, ermöglicht die Verwendung von Radionukliden solche bildgebende Verfahren, die eine Untersuchung von dynamischen Stoffwechselfvorgängen erlauben. Die beiden wichtigsten Verfahren, die in den späten siebziger Jahren zu diesem Zweck entwickelt wurden, stellen die „Positronen-Emissions-Tomographie“ (aus dem Englischen: positron emission tomography, PET) und die „Einzelphotonen-Emissions-Tomographie“ (aus dem Englischen: single photon emission computer tomography, SPECT) dar.

Während bei der SPECT bevorzugt Radionuklide zum Einsatz kommen, die eine dominante  $\gamma$ -Linie von 100 bis 300 keV aufweisen, werden beim PET-Verfahren kurzlebige Positronenemitter ( $\beta^+$ -Strahler) verwendet. Die PET besitzt gegenüber der SPECT den erheblichen Vorteil, dass es sich dabei um ein Verfahren handelt, das es erlaubt, biochemische Prozesse auch quantitativ zu erfassen.

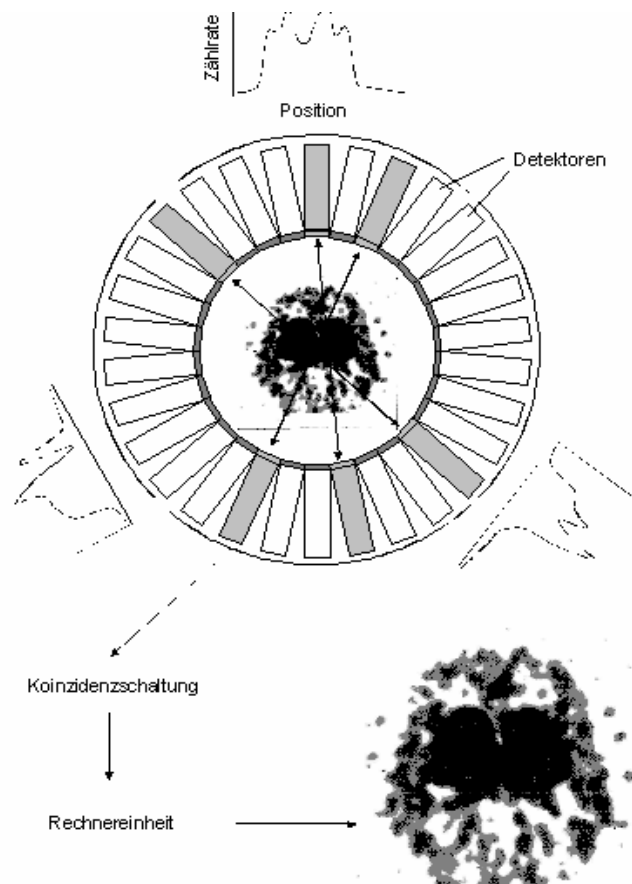
Positronenemitter sind Radionuklide mit einem Neutronenunterschuss, die unter Konvertierung eines Protons in ein Neutron zerfallen und dabei ein Positron ( $\beta^+$ ) und ein Elektronneutrino ( $\nu_e$ ) emittieren. Das emittierte Positron verliert seine hohe kinetische Energie von einigen MeV durch Wechselwirkung mit dem umliegenden Gewebe, wobei der von dem Positron zurückgelegte Weg von seiner kinetischen Energie abhängt. Nach Verlust seiner kinetischen Energie kombiniert das Positron mit seinem Antiteilchen, dem Elektron, zum Positronium. Dieses wasserstoffähnliche System besitzt nur eine sehr geringe Lebensdauer – in der Größenordnung von  $10^{-10}$  bis  $10^{-7}$  s – und annihiliert unter Aussendung von zwei Photonen. Hierbei werden die Ruhmassen der beiden Teilchen bevorzugt in Form von zwei 511 keV  $\gamma$ -Quanten frei, die aufgrund von Impuls- und Energieerhaltung unter einem Winkel von nahezu  $180^\circ$  emittiert werden (Ache, 1972).

Diese relativ hochenergetische  $\gamma$ -Strahlung durchdringt Körpergewebe leicht und kann extern durch zwei gegenüberliegende in Koinzidenz geschaltete Detektoren ortsabhängig nachgewiesen werden. Dabei wird ein Zerfallsereignis nur dann registriert, wenn die beiden  $\gamma$ -Quanten innerhalb der Koinzidenzauflösungszeit von wenigen Nanosekunden gleichzeitig an beiden Detektoren registriert werden (Abb. 1). Darauf beruht die PET-Messtechnik.



**Abb. 1:** Schema der Positronenvernichtung und der  $\gamma,\gamma$ -Koinzidenz am Beispiel von  $^{18}\text{F}$

Das Bauprinzip moderner PET-Kameras beruht auf der kreisförmigen Anordnung vieler Detektorpaare zu Detektorringen, von denen mehrere nebeneinander angeordnet sind (Abb. 2).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Messprinzips einer PET-Kamera



Die einzelnen Detektoren sind mit gegenüberliegenden Detektoren im gleichen und benachbarten Ring in Koinzidenz geschaltet. Dadurch wird es möglich, Projektionen der Aktivitätsverteilung unter verschiedenen Winkeln aufzunehmen. Durch computergestützte Datenerfassung und -verarbeitung ist es dann möglich, Schnittbilder von Organen aufzunehmen und die regionale Aktivitätsverteilung in Zeitintervallen von Sekunden bis Minuten als Funktion der Zeit zu messen und dreidimensional darzustellen (Abb. 2).

Dabei können auch sehr geringe Aktivitätsmengen von weniger als  $0.1 \mu\text{Ci}/\text{cm}^3$  erfasst und damit die Konzentrationen markierter Verbindungen im Gewebe im pikomolaren bis nanomolaren Bereich bestimmt werden.

Somit können physiologische oder biochemische Prozesse sowohl qualitativ als auch nicht-invasiv erfasst werden, indem die Verteilung und die Kinetik einer mit einem Positronenemitter markierten pharmazeutisch interessanten Verbindung im Gewebe verfolgt wird (Wienhard, 1989).

Um die Strahlendosis für den Patienten möglichst niedrig zu halten, benötigt man Radionuklide, welche zu einem hohen Prozentsatz durch Positronenemission und mit kurzer Halbwertszeit zerfallen. Allerdings darf die Halbwertszeit des PET-Nuklides auch nicht zu kurz sein, da sonst zum einen keine anspruchsvolle Markierungs- und Synthesechemie des Radiopharmakons möglich ist und zum anderen nur Stoffwechselprozesse untersucht werden können, die sehr schnell – innerhalb von 4 bis 5 physikalischen Halbwertszeiten des Nuklides – ablaufen. Weitere Kriterien für die Wahl des geeigneten Radionuklides sind neben der Halbwertszeit und der Verfügbarkeit des Nuklides auch die maximale  $\beta^+$ -Energie des entstehenden Positrons, die direkt mit seiner maximalen Reichweite in Gewebe korreliert.

Die Wahrscheinlichkeit des Positronenzerfalls ist ebenfalls ein wichtiges Kriterium, da mit steigender Ordnungszahl bei neutronenarmen Kernen der Elektroneneinfang (EC) dominiert, bei dem es sich um die Konkurrenzreaktion zum Positronenzerfall handelt.

In Tabelle 1 sind wichtige Positronenemitter für die PET und ihre Zerfallsdaten aufgelistet (Qaim, 1983; Browne, 1986; Qaim, 2004; Rösch, 2004).

Biochemisch relevante Moleküle setzen sich meist aus den Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel zusammen, so dass  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$  und  $^{15}\text{O}$  besonders geeignet sein sollten, um sogenannte Isotopentracer darzustellen. Bei Isotopentracern handelt es sich um Verbindungen, die sich nur durch das radioaktive Isotop vom Original-Molekül unterscheiden. Diese Tracer besitzen den Vorteil, dass ihre biochemischen und physiologischen Eigenschaften nicht von denen des nicht markierten Moleküls abweichen. Allerdings besitzt von den oben genannten Radionukliden nur das  $^{11}\text{C}$  eine genügend lange Halbwertszeit für anspruchsvollere Synthesen mit anschließender Aufreinigung und Untersuchung von langsameren Stoffwechselprozessen.  $^{13}\text{N}$  und  $^{15}\text{O}$  finden deshalb in der Regel nur in leicht zu synthetisierenden und zu reinigenden Molekülen wie zum Beispiel  $[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$ ,  $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$  oder  $[^{15}\text{O}]\text{CO}_2$  Anwendung.

**Tabelle 1:** Zerfallsdaten wichtiger Positronenemitter

Nuklid	Halbwertszeit $T_{1/2}$ [min]	$\beta^+$ Zerfallswahrscheinlichkeit [%]	max. $\beta^+$ -Energie ( $E_{\beta^+,max}$ ) [MeV]
$^{11}\text{C}$	20.4	99.8	0.96
$^{13}\text{N}$	10.0	100	1.19
$^{15}\text{O}$	2.0	99.9	1.70
$^{18}\text{F}$	109.6	97.0	0.63
$^{62}\text{Cu}$	9.7	97.0	1.28
$^{64}\text{Cu}$	762	18.0	0.66
$^{68}\text{Ga}$	68.1	89.0	0.74
$^{76}\text{Br}$	1002	54.0	3.60
$^{82}\text{Rb}$	1.3	95.0	1.41
$^{86}\text{Y}$	882	33.0	1.96

Positronenemitter mit längerer Halbwertszeit wie  $^{18}\text{F}$ ,  $^{73}\text{Se}$  und  $^{76}\text{Br}$  sind hingegen für die Synthese von Analogtracern interessant. Hierbei entstehen durch die eingeführten radioaktiven Nuklide zumeist chemisch modifizierte Biomoleküle. Dies bedeutet, dass ein solcher Tracer vor seiner nuklearmedizinischen Anwendung neu evaluiert werden muss, um sicher zu stellen, dass das physiologische Verhalten des Radiopharmakons weitgehend unbeeinflusst geblieben ist. Voraussetzung hierfür ist entweder ein ähnlicher sterischer Raumbedarf des eingeführten radioaktiven Atoms, so zum Beispiel bei  $^{76}\text{Br}$ , das eine ähnliche Ausdehnung besitzt wie eine Methylgruppe oder  $^{18}\text{F}$ , welches einen ähnlichen Raumbedarf ausweist wie Wasserstoff. Zum anderen kann aber auch eine Homologie der chemischen Elemente wie bei  $^{73}\text{Se}$  und Schwefel zu einer wenig veränderten physiologischen Wirkung und Bindungsaffinität des Analogtracers führen.

Vor allem  $^{18}\text{F}$  bietet gute Voraussetzungen für die Synthese von Analogtracern, da es nicht nur einen ähnlichen sterischen Raumbedarf wie Wasserstoff aufweist – der Van-der-Waals-Radius von Fluor beträgt 1.35 Å und derjenige von Wasserstoff 1.2 Å – sondern auch als Substitut für eine Hydroxylgruppe fungieren kann. Dies beruht zum einen auf der ähnlichen Bindungslänge der Kohlenstoff-Fluor- und der Kohlenstoff-Hydroxyl-Bindung von 1.30 Å und zum anderen auch auf der ähnlichen Ladungsdichte der beiden Gruppen. Außerdem sind sowohl der Sauerstoff als auch das Fluor in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, was bei biochemischen Wechselwirkungen von großer Bedeutung sein kann. Weiterhin beträgt die Bindungsenergie der Kohlenstoff-Fluor-Bindung 443 kJ/mol, womit diese Bindung die stabilste Kohlenstoff-Halogen-Bindung darstellt.

Allerdings führt jede Veränderung des Original-Moleküls zu einer Änderung der chemischen Eigenschaften der Verbindung, die sich bei einer Substitution von Wasserstoff gegen Fluor schon allein aus der erheblich unterschiedlichen Elektronegativität – die Elektronegativität des Fluors beträgt  $E_{N \text{ Fluor}}$ : 4.10, die des Wasserstoffs  $E_{N \text{ Wasserstoff}}$ : 2.20 – ergibt. Daher muss bei jeder markierten Verbindung vor ihrer Anwendung durch *in vitro*- und *in vivo*-Tests verifiziert werden, ob ihr physiologisches Verhalten innerhalb bestimmter Vorgaben unverändert geblieben ist.

Da  $^{11}\text{C}$ - und  $^{18}\text{F}$ -Radiopharmaka in der PET-Diagnostik eine wesentliche Rolle spielen, sollen hier noch einmal die wichtigsten Vor- und Nachteile der beiden Nuklide zusammengefasst werden:

Beim  $^{11}\text{C}$  erlaubt die Halbwertszeit von 20.4 Minuten in gewissen Grenzen eine aufwendigere Synthese. Vor allem bleibt bei  $^{12}\text{C}$  /  $^{11}\text{C}$ -Substitutionen das biochemisch interessante Molekül in seiner Struktur unverändert. Dies bedeutet auch, dass langwierige und kostspielige Evaluierungen, wie sie bei der Anwendung von Analogtracern vor ihrem Einsatz in der Nuklearmedizin nötig sind, entfallen. Allerdings ist die maximale Positronenenergie des  $^{11}\text{C}$  mit 960 keV relativ hoch, so dass die Ortsauflösung der PET-Messungen schlechter ist als zum Beispiel bei  $^{18}\text{F}$  mit einer maximalen Positronenenergie von 635 keV. Zum anderen bedingt die physikalische Halbwertszeit des  $^{11}\text{C}$  ein relativ kleines Zeitfenster bei der Betrachtung physiologisch interessanter Vorgänge *in vivo*.

Beim  $^{18}\text{F}$  erlaubt die Halbwertszeit von 109.7 Minuten auch komplizierte mehrstufige Synthesen mit anschließender Aufreinigung und Qualitätskontrolle. Die geringe maximale Positronenenergie von 635 keV ermöglicht bei PET-Experimenten, im Vergleich mit den anderen oben aufgeführten Nukliden, die beste Ortsauflösung.

## 1.2 Zur Chemie und Kinetik trägerarmer Radionuklide

### 1.2.1 Chemische Aspekte

Ein wichtiger Aspekt bei der Arbeit mit Radionukliden ist die spezifische Aktivität. Dabei handelt es sich um die Aktivität bezogen auf die Masse beziehungsweise die Stoffmenge aller isotoper (inaktiver und aktiver) Moleküle. Ihre Angabe erfolgt in GBq/g oder Ci/g beziehungsweise in GBq/ $\mu\text{mol}$  oder Ci/ $\mu\text{mol}$ .

Man unterscheidet in diesem Zusammenhang grundsätzlich drei Begriffe:

- trägerfrei (carrier free, c.f.)
- ohne Trägerzusatz (no carrier added, n.c.a.)
- mit Trägerzusatz (carrier added, c.a.)

Trägerfreie Nuklide sind frei von isotonen Beimengungen. Dies ist jedoch nur bei künstlichen Elementen wie Technetium erreichbar, denn aufgrund der Allgegenwärtigkeit der natürlichen Elemente zum Beispiel in Gefäßen, Targetmaterialien, Synthesechemikalien oder der Luft ist immer eine gewissen Verunreinigung des Radionuklides mit isotopem Träger gegeben. Der Grad der Verunreinigung hängt dabei unter anderem von der Häufigkeit des Elements in der Umwelt ab. So kann bei  $^{11}\text{C}$  die Verunreinigung mit natürlichem Kohlenstoff das 10-10.000fache betragen (Stöcklin, 1989), bei den weniger häufigen Halogeniden beträgt sie, zum Beispiel im Fall des  $^{18}\text{F}$ , das 10-100fache (Stöcklin, 1989).

Da die Trägerfreiheit natürlicher Elemente nicht zu erreichen ist, verwendet man für Markierungssynthesen nicht den Begriff „Trägerfrei“ (c.f.), sondern „ohne Trägerzusatz“ (n.c.a.). Wird hingegen ein isotoper Träger absichtlich zugesetzt, so spricht man von geträgerten Substanzen, die dann eine geringe spezifische Aktivität aufweisen.

Für die Markierung von hochwirksamen Stoffen wie Enzyminhibitoren, Toxinen, Rezeptorliganden oder zentral wirksamen Radiopharmaka ist eine möglichst hohe spezifische Aktivität notwendig, da diese Substanzen häufig nur im Nanogramm-Maßstab eingesetzt werden können, da keine pharmakodynamische Wirkung erwünscht ist. Liegt ein solches Radiopharmakon in n.c.a.-Mengen vor, so ist eine solche pharmakodynamische Wirkung nicht zu erwarten.

## 1.2.2 Kinetische Aspekte

Kinetiken von Reaktionen mit trägerarmen Radionukliden folgen in der Regel einem Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung, da alle weiteren, inaktiven Reaktionspartner in so großem Überschuss vorliegen, dass ihre Konzentrationen über den Reaktionsverlauf als konstant angesehen werden können.

Für eine solche Reaktion ergibt sich folgendes Geschwindigkeitsgesetz:

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

Wobei:  $k$ : Geschwindigkeitskonstante  
 $[A]$ : Eingesetzte Konzentration des Radionuklids

Damit ergibt sich für die Aktivität zum Zeitpunkt  $t$ :

$$\ln \frac{[A_t]}{[A_0]} = -k * t$$

Wobei:  $[A_t]$ : Aktivität zum Zeitpunkt  $t$   
 $[A_0]$ : Aktivität zum Beginn

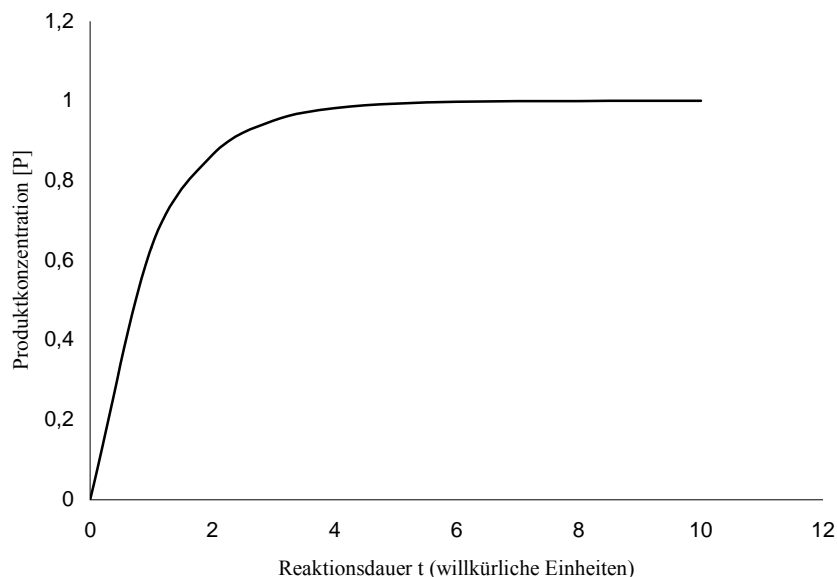
Daraus ergibt sich weiterhin:

$$[A_t] = [A_0] \cdot e^{(-k \cdot t)} \quad \text{und:}$$
$$[P] = [A_0] \cdot (1 - e^{(-k \cdot t)})$$

Wobei:  $[P]$ : Konzentration des Produktes

Die Produktkonzentration verändert sich also mit einem exponentiellen Verlauf und strebt bei steigenden Reaktionszeiten  $t$  einem Sättigungswert entgegen, was einem kompletten Umsatz des Radionuklides entspricht.

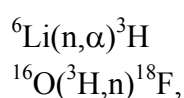
Trägt man die Produktkonzentration gegen die Zeit auf, erhält man folgenden typischen Kurvenverlauf:



**Abb. 3:** Produktkonzentration  $[P]$  in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer  $t$

### 1.3 Produktion von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluor

Das Nuklid kann in Kernreaktoren oder Teilchenbeschleunigern, wie zum Beispiel Zyklotronen, hergestellt werden. Die Herstellung am Kernreaktor über die Reaktionen



für die  ${}^6\text{Li}$ -angereichertes Lithiumcarbonat verwendet wird, wird mittlerweile nur noch selten angewendet. Sie wurde weitgehend durch die bequeme Produktion des  ${}^{18}\text{F}$  am Zyklotron

abgelöst. Die heute meist verwendeten Minizyklotrone beschleunigen Protonen auf etwa 11-19.5 MeV und Deuteronen auf etwa 10 MeV mit Teilchenströmen von bis zu 100  $\mu\text{A}$  (Qaim, 1983). Hierbei erhält man das  $[^{18}\text{F}]$ Fluor je nach Kernreaktion in zwei unterschiedlichen chemischen Formen: in einer nukleophilen, ungeträgerten Form – als  $^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$  oder  $[^{18}\text{F}]\text{HF}_g$  – oder als elektrophiles, geträgertes  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ .

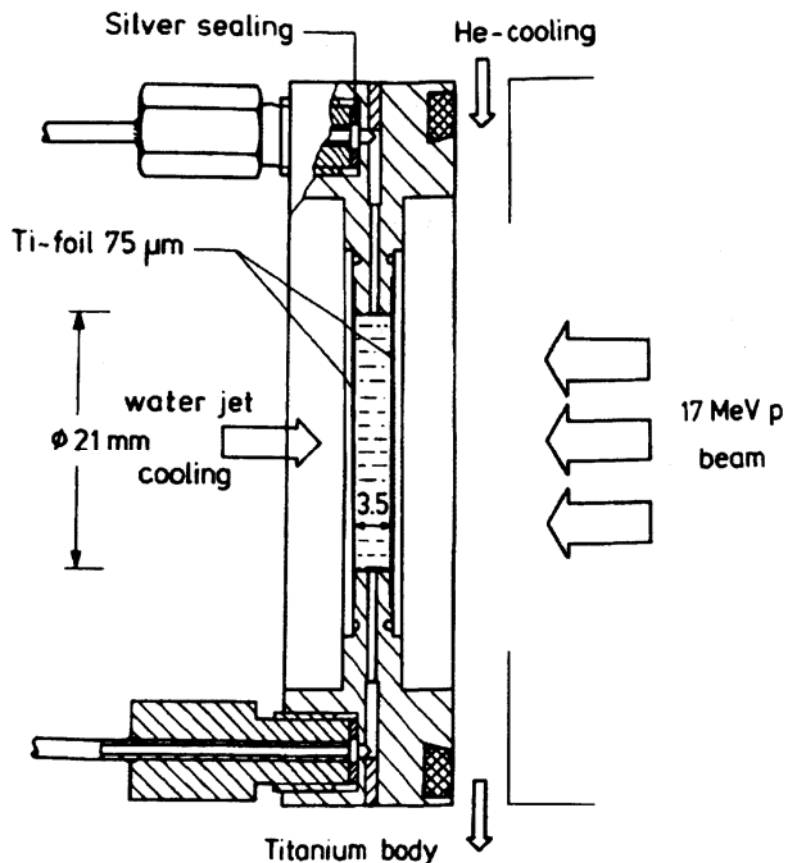
In Tabelle 2 sind die wichtigsten heute verwendeten Kernreaktionen zur Erzeugung des  $[^{18}\text{F}]$ Fluor im Zyklotron zusammengestellt.

**Tabelle 2:** Kernreaktionen zur Herstellung von  $[^{18}\text{F}]$ Fluor (Qaim, 1983, Kilbourn, 1984; Qaim, 2004).

Kernreaktion	Target	Chemische Form des $[^{18}\text{F}]$ Fluor	Spezifische Aktivität [GBq/ $\mu\text{mol}$ ]
$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	$\text{H}_2^{18}\text{O}$	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$	bis zu $37 \cdot 10^2$
$^{16}\text{O}(^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$	$\text{H}_2\text{O}$	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$	bis zu $37 \cdot 10^2$
$^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$	Ne (0.1-0.2% $\text{F}_2$ ), 18 bar	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	0.037-0.37
$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}_2$ , Kr (1% $\text{F}_2$ ), 20 bar	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	0.037-1.85

Zur Produktion des nukleophilen Fluorides verwendet man heute zumeist die  $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Kernreaktion, da diese einen wesentlich höheren Wirkungsquerschnitt als die  $^{16}\text{O}(^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$ -Reaktion aufweist und geringere Protonenenergien von etwa 11 MeV nötig sind (Ruth, 1979). Der schematische Aufbau eines Wassertargets für die  $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Kernreaktion ist in Abb. 4 gezeigt. Aufgrund der hohen Kosten für das für diese Kernreaktion nötige  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  ist seine Rückgewinnung von besonderer Bedeutung. Sie kann erreicht werden, indem das erzeugte  $[^{18}\text{F}]$ Fluorid nach der Bestrahlung an einen Anionenaustauscher gebunden und mit wässriger Kaliumcarbonatlösung eluiert wird. Das so abgetrennte  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  kann nach photochemischer und destillativer Aufreinigung erneut als Targetmaterial verwendet werden (Hamacher, 1990).

Elektrophiles  $[^{18}\text{F}]$ Fluor in Form von  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  kann zum einen in Neon-Gastargets über die Kernreaktion  $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$  erzeugt werden oder aber mittels Protonenbestrahlung von  $^{18}\text{O}_2$  über die Reaktion  $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$  (Casella, 1980). Dem jeweiligen Target muss allerdings zur Vermeidung von Adsorptionsverlusten an den Targetwänden  $\text{F}_2$  als Träger zugesetzt werden, wodurch die spezifische Aktivität des erhaltenen  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  deutlich begrenzt wird (siehe Tabelle 2).



**Abb. 4:** Schematischer Aufbau eines Wasser-Targets-Systems für die Produktion von  $^{18}\text{F}_{\text{aq}}^-$  aus  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (Qaim, 2004)

## 1.4 Verfahren zur Markierung organischer Moleküle mit $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$

Für die gezielte radiochemische  $^{18}\text{F}$ -Markierung organischer Verbindungen gibt es zwei grundlegende Möglichkeiten, die darauf beruhen, dass das  $^{18}\text{F}$  nach der Produktion in zwei verschiedenen chemischen Formen vorliegen kann. Je nach Produktionsprozess des  $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$  steht entweder geträgertes  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  für elektrophile Fluorierungen oder das nicht geträgerte  $[^{18}\text{F}]\text{Fluoridion}$  für nukleophile Markierungsreaktionen zur Verfügung (siehe 1.3).

### 1.4.1 Elektrophile Fluorierung

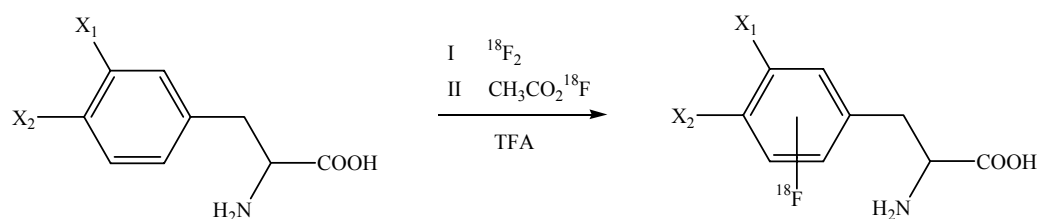
Alle elektrophilen Fluorierungsspezies – mit Ausnahme der  $^{18}\text{F}$ -Interhalogene – liegen aufgrund des Produktionsprozesses in geträgerter Form vor, was zu einer geringen spezifischen Aktivität führt. Weitere Nachteile elektrophiler Fluorierungen können die Toxizität – aufgrund niedriger spezifischer Aktivität –, die um 50% verminderte Ausbeute und die hohe Reaktivität der Markierungsreagenzien, die zu geringer Regioselektivität führt, sein. Diese geringe Selektivität kann sich zum einen in Mehrfachfluorierungen, radikalischen

Seitenreaktionen, der Bildung von Isomergemischen oder Reaktionen mit dem Lösungsmittel äußern und bedingt aufwendige Reinigungsschritte.

Sind Trägerfreiheit und hohe spezifische Aktivität nicht erforderlich, können elektrophile Fluorierungsreagenzien wie beispielsweise  $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{Acetylhypofluorid}$  oder in geringem Umfang auch  $[^{18}\text{F}]\text{Xenondifluorid}$  verwendet werden.

Dabei wird  $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$  wegen seiner hohen Reaktivität und seiner oxidativen Wirkung kaum direkt für organische Markierungsreaktionen verwendet. Erst durch Verdünnung mit Inertgas oder bei Temperaturen im Bereich von  $-78^\circ\text{C}$  bis  $0^\circ\text{C}$  lassen sich die Eigenschaften so weit moderieren, dass auch empfindlichere Substanzen in guten Ausbeuten markiert werden können.

Meist wird allerdings das mildere Fluorierungsreagenz  $[^{18}\text{F}]\text{Acetylhypofluorid}$  verwendet, da es in einigen Fällen, beispielsweise bei der direkten Fluorierung aromatischer Aminosäuren (Abb. 5), zu selektiveren Reaktionen und etwas besseren Ausbeuten führt (Coenen, 1988) und darüber hinaus leichter zu handhaben ist.



Phenylalanin:  $X_1 = X_2 = \text{H}$   
 Tyrosin:  $X_1 = \text{H}, X_2 = \text{OH}$   
 Dopa:  $X_1 = X_2 = \text{OH}$

	RCA [%]	Isomerenverteilung [%]		
Phenylalanin		ortho	meta	para
a	28	72.5	13.9	13.6
b	43	81.7	11.0	7.3
Tyrosin		ortho	meta	
a	31	7.4	92.6	
b	44	5.4	94.6	
Dopa		ortho	meta	para
a	10	75.2	24.0	0.8
b	15	88.9	9.7	1.4

**Abb. 5:** Vergleich der Ausbeuten und Produktverteilungen bei direkter elektrophiler Fluorierung aromatischer Aminosäuren mit  $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$  (a) und  $[^{18}\text{F}]\text{Acetylhypofluorid}$  (b) in TFA (Coenen, 1988)



Eine andere Möglichkeit, die Regioselektivität von elektrophilen Substitutionen zu erhöhen, stellt in vielen Fällen die Methode der Demetallierung dar. Dabei setzt man entweder bei  $-78^{\circ}\text{C}$   $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$  oder aber bei  $0^{\circ}\text{C}$   $[^{18}\text{F}]\text{Acetylhypofluorid}$  beziehungsweise  $[^{18}\text{F}]\text{Xenondifluorid}$  ein. Für Demetallierungsreaktionen eignen sich insbesondere Organosilicium-, Organogermanium- und vor allem Organozinnverbindungen, wobei die Substituierbarkeit der Abgangsgruppen in dieser Reihe vom Silicium zum Zinn zunimmt, so dass man bei der Destannylierung die höchsten radiochemischen Ausbeuten erhält.

Auch die Fluorierung über Organoquecksilbverbindungen bietet eine selektive Alternative zur Einführung von  $^{18}\text{F}$ . Dieses Verfahren wurde zum Beispiel für die selektive Synthese von 6- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor-L-dopa}$  genutzt (Luxen, 1990), wohingegen man sich heute der Destannylierung von 6-(Trimethylstannyl)-L-Dopa bedient, um dieses Produkt zu erhalten.

Da es bei Demetallierungen in komplexen Molekülen oftmals erforderlich ist, die funktionellen Gruppen zu schützen, sind nach der Fluorierungssynthese in der Regel weitere Syntheseschritte – so zum Beispiel Hydrolysen – erforderlich. Bei ähnlichen Ausbeuten der direkten aromatischen Substitution und der Demetallierung müssen demnach der Aufwand der Isomerentrennung und der weitere Syntheseaufwand miteinander verglichen werden.

## 1.4.2 Nukleophile Fluorierung

Bei der Herstellung von Radiopharmaka stellt die nukleophile Fluorierung heute die gebräuchlichste Methode der  $^{18}\text{F}$ -Fluorierung dar. Ein Grund hierfür ist die hohe spezifische Aktivität des n.c.a.  $^{18}\text{F}$ , die es ermöglicht, Rezeptorliganden radioaktiv zu markieren. Hierbei werden hohe spezifische Aktivitäten benötigt, um auch kleine Rezeptordichten im Bereich von Pikomol pro  $\text{cm}^3$  mit der PET darstellen zu können.

Die nukleophile Fluorierung erfolgt entweder direkt unter Verwendung des  $[^{18}\text{F}]\text{Fluoridions}$  oder aber eines sekundären Markierungsvorläufers (Bloch, 1979; Bloch, 1987; Bloch, 1988; Gail, 1994). Solche sekundären Markierungsvorläufer sind zum Beispiel  $^{18}\text{F}$ -markierte Alkyltosylate für Fluoralkylierungen,  $^{18}\text{F}$ -markierte Amide für Fluoramidierungen oder  $^{18}\text{F}$ -markierte Carbonsäure-Derivate für Fluoracylierungen. Dabei werden nukleofuge Abgangsgruppen wie zum Beispiel Halogene (Brom und Iod), Sulfonsäureester (Tosylate, Triflate und Mesylate), Sulfamate und cyclische Schwefelsäureester durch das  $[^{18}\text{F}]\text{Fluoridion}$  substituiert.

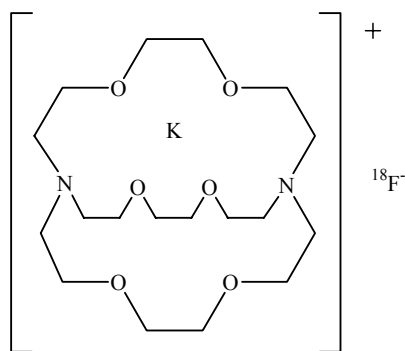
Wegen der hohen Ladungsdichte des Fluoridions und der hohen Bindungsenergie von Fluorwasserstoff von  $565 \text{ kJ/mol}$  (Holleman, 1985) wird das Fluoridion von aciden Wasserstoffatomen leicht protoniert und verliert damit seine nukleophilen Eigenschaften. Zur direkten nukleophilen Fluorierung sind daher nur Reaktionen in dipolar aprotischen Lösungsmitteln wie Acetonitril (MeCN), N,N-Dimethylformamid (DMF), N,N-Dimethylacetamid (DMAA) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) geeignet und des weiteren darf

auch das zu markierende Substrat keine aciden Protonen enthalten. Entsprechende Funktionen müssen im zu markierenden Molekül durch geeignete Schutzgruppen maskiert werden.

Außerdem kann das [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid durch Adsorption an Gefäßwänden oder durch Bildung von Niederschlägen dem Reaktionsgemisch entzogen werden, was sich im n.c.a.-Zustand besonders drastisch auf die tatsächlich verfügbare Fluorid-Aktivität auswirken kann.

Zur Anionenaktivierung eignen sich Phasentransferkatalysatoren – zum Beispiel Tetraalkylammoniumcarbonate und -hydroxide – oder Aminopolyether – zum Beispiel Kryptofix<sup>®</sup>2.2.2. von Merck, Abb. 6 – in Verbindung mit Kaliumcarbonat als basische Matrix, welche eine Löslichkeitssteigerung der Ionen in dem dipolar aprotischen Lösungsmitteln bewirken und zu praktisch „nackten“ Fluoridionen hoher Nukleophilie in Lösung führen.

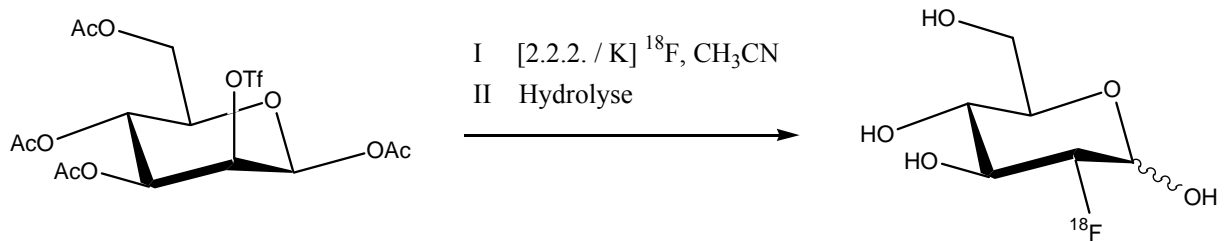
Das Carbonat wird zugesetzt, um eine Freisetzung des Fluorides aus eventuell gebildetem [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorwasserstoff zu gewährleisten, wobei bei sehr basenlabilen Substanzen allerdings Oxalat gewählt werden muss.



**Abb. 6:** Aminopolyether Kryptofix<sup>®</sup>2.2.2./K<sup>+</sup>/[ $^{18}\text{F}$ ]-Komplex ([2.2.2./K]<sup>+</sup>/[ $^{18}\text{F}$ ]-Komplex)

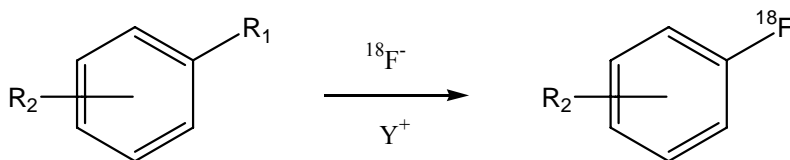
Aliphatische nukleophile Substitutionen mit [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid können in dipolar aprotischen Lösungsmitteln mechanistisch als S<sub>N</sub>2-Reaktionen betrachtet werden, wobei Halogene (Brom und Iod), Sulfonsäureester (Tosylate, Triflate und Mesylate), Sulfamate und cyclische Schwefelsäureester als Abgangsgruppen fungieren (Coenen, 1989).

Ein Beispiel für diesen Sachverhalt stellt die Synthese der 2-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluor-2-desoxy-D-Glukose ([ $^{18}\text{F}$ ]FDG), des zur Zeit meist verwendeten Radiopharmakons für die PET-Diagnostik zur Messung des regionalen Glukosestoffwechsels, dar. Das [ $^{18}\text{F}$ ]FDG wird aus einem 1,3,4,6-tetraacetylierten Mannosevorläufer mittels Substitution einer Trifluoroacetatgruppe gegen [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid dargestellt, wobei eine Walden-Umkehr zur Bildung eines stereospezifischen Produktes führt (Abb. 7)



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Synthese

Aromatische nukleophile Substitutionen besitzen für die Herstellung  $^{18}\text{F}$ -markierter Radiopharmaka ebenfalls eine große Bedeutung, da die gebildeten fluorierten aromatischen Verbindungen eine hohe metabolische Stabilität aufweisen. Für die entsprechenden Substitutionsreaktionen werden meist Aromaten verwendet, die in ortho- oder para-Stellung zur Abgangsgruppe einen elektronenziehenden Substituenten – beispielsweise Nitro-, Cyano- oder Carbonylgruppen – enthalten. Der Substitution (sog. HALEX-Reaktion) liegt dabei im Allgemeinen der in Abbildung 8 gezeigte Ablauf zugrunde:



$\text{R}_1$ :  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+(\text{TfO}^-, \text{Tos}^-, \text{Br}^-, \text{I}^-)$ ,  $\text{Cl}$ ,  $\text{Br}$ ,  $\text{I}$

$\text{R}_2$ :  $\text{CN}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CHO}$ ,  $\text{CRO}$ ,  $\text{COOR}$

$\text{Y}^+$ :  $[\text{2.2.2./K}]_2^+\text{CO}_3^{2-}$ ,  $[\text{2.2.2./K}]_2^+\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ,  $\text{R}_4\text{N}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$

**Abb. 8:** Allgemeiner Ablauf einer nukleophilen aromatischen Substitution (HALEX-Reaktion)

### 1.4.3 Markierung mittels sekundärer Markierungsvorläufer

Ist eine direkte nukleophile  $^{18}\text{F}$ -Markierung wegen Basenlabilität, thermischer Instabilität oder mangelnder Reaktivität der zu markierenden Substanz nicht möglich, so stellt die Markierung über sogenannte sekundären Markierungsvorläufer eine praktikable Alternative dar. Bei diesen handelt es sich um kleine Moleküle, die ohne größeren Aufwand mit [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid markiert werden können und anschließend an das zu markierende Molekül gekoppelt werden. Hierbei sind  $^{18}\text{F}$ -Fluoracylierungen,  $^{18}\text{F}$ -Fluoramidierungen und vor allem  $^{18}\text{F}$ -Fluoralkylierungen von besonderer Bedeutung. Folgende Markierungsvorläufer haben in der  $^{18}\text{F}$ -Markierungschemie eine besondere Bedeutung erlangt: Toluol-4-sulfonsäure-2- [ $^{18}\text{F}$ ]fluorethylester (2- [ $^{18}\text{F}$ ]fluorethyltosylat), Trifluormethansulfonsäure-2- [ $^{18}\text{F}$ ]fluorethyl-

ester, 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethylamin, [<sup>18</sup>F]Fluorphenyllithium und 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan ([<sup>18</sup>F]BFE).

Bei den Fluoralkylierungen werden Fluoralkylreste mit nukleophilen Gruppen wie zum Beispiel Amino-, Thio- oder Hydroxylgruppen unter teilweise basischen Bedingungen zur Reaktion gebracht, wobei die Methode durch die unterschiedliche Nukleophilie der funktionellen Gruppen sehr selektiv ist. Angewendet wird dieses Verfahren zum Beispiel bei der Markierung von dopaminergen und serotonergen Rezeptorliganden (Moerlein, 1991) oder der <sup>18</sup>F-Fluorethylierung von Tyrosin (Wester, 1999).

Im Gegensatz zur <sup>18</sup>F-Fluoralkylierung sind die <sup>18</sup>F-Fluoracylierung und die <sup>18</sup>F-Fluoramidierung auch im wässrigen Medium anwendbar, weswegen sie sich auch zur Markierung von Peptiden und Proteinen eignen (Guhlke, 1991, 1994).

## 1.5 Produktion von Kohlenstoff-11

Das Isotop Kohlenstoff-11 kann ebenso wie das [<sup>18</sup>F]Fluor in Teilchenbeschleunigern durch eine Vielzahl an Kernreaktionen hergestellt werden. In Tabelle 3 sind einige Kernreaktionen zur Herstellung des Kohlenstoff-11 zusammengestellt, bei denen das produzierte <sup>11</sup>C-Isotop in hohen spezifischen Aktivitäten erhalten wird.

**Tabelle 3:** Kernreaktionen zur Produktion von Kohlenstoff-11 im Zyklotron (Stöcklin, 1993)

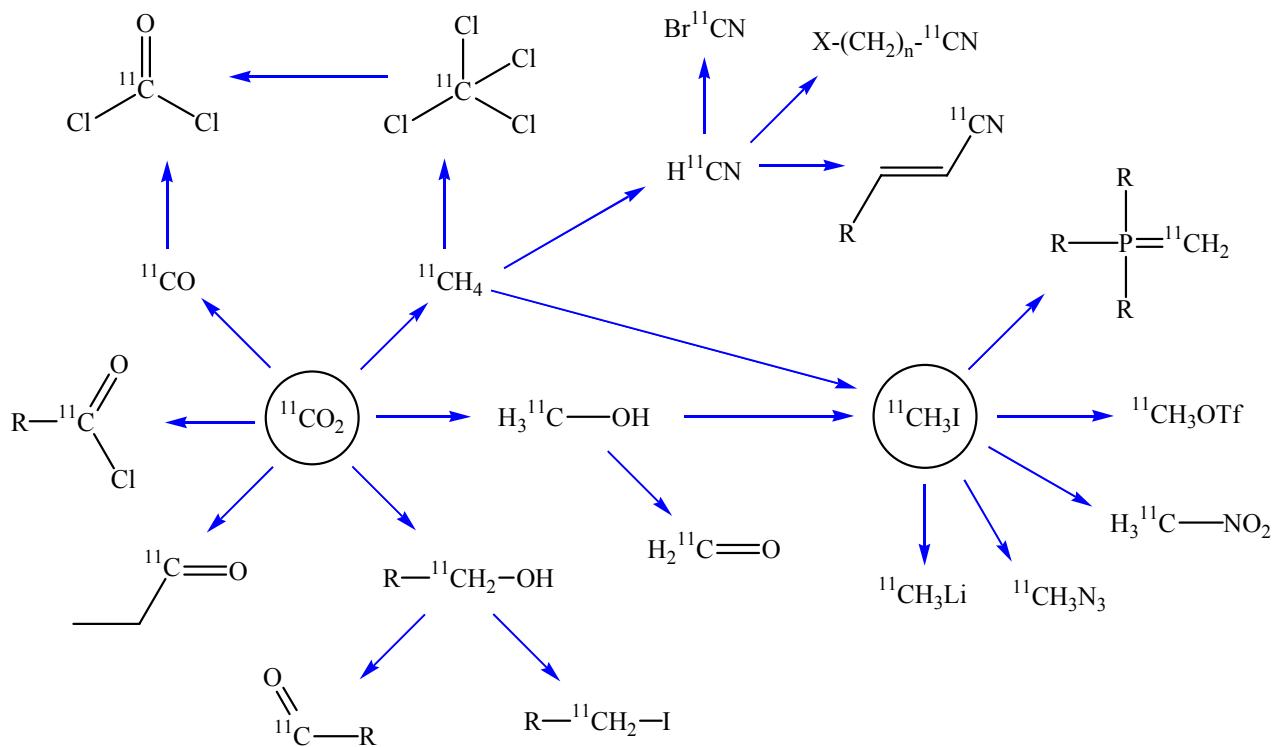
Kernreaktion	Energiebereich [MeV]	Maximaler Wirkungsquerschnitt $\sigma_{\max}$ [mb]	Integrale Ausbeute [MBq/ $\mu$ Ah]
<sup>10</sup> B(d,n) <sup>11</sup> C	10 → 0	≈ 200	2479
<sup>11</sup> B(p,n) <sup>11</sup> C	10 → 0	≈ 360	3400
<sup>14</sup> N(p, $\alpha$ ) <sup>11</sup> C	13 → 3	≈ 290	3820

Zur Produktion des Kohlenstoff-11 verwendet man heute zumeist die <sup>14</sup>N(p,  $\alpha$ )<sup>11</sup>C-Reaktion, da der Wirkungsquerschnitt dieser Kernreaktion sehr hoch ist, das Targetmaterial Stickstoff kostengünstig ist und das Kohlenstoff-11 in sehr hohen Aktivitäten von mehreren GBq erhalten werden kann (Crouzel, 1987). Normalerweise werden hierbei Druckgas-Targets eingesetzt, wobei die Produktaktivität durch Expansion aus dem Target entfernt wird. Das Target ist im allgemeinen so aufgebaut, dass bereits mit der Nuklidentzeugung im Target durch hochenergetische und strahlenchemische Prozesse *in situ* markierte Synthesevorläufer entstehen. Dabei weisen die bei der Kernreaktion entstandenen <sup>11</sup>C-Atome sehr hohe Rückstoßenergien von mehreren MeV auf, die sie durch Stoßprozesse bis auf einige eV verlieren. Anschließend können sie chemische Reaktionen eingehen (Stöcklin, 1993) (vergleiche Abschnitt 1.6).

## 1.6 Darstellung sekundärer $^{11}\text{C}$ -Markierungsvorläufer

Durch die Verwendung verschiedener Zusätze zum Targetmaterial lässt sich die chemische Form der  $^{11}\text{C}$ -Verbindungen schon im Target-Gas des Teilchenbeschleunigers beeinflussen. So entstehen zum Beispiel  $[^{11}\text{C}]\text{CN}$ -Radikale durch Reaktion des Kohlenstoffs mit dem Targetstickstoff oder schon bei einem Zusatz von 1-10 ppm  $\text{O}_2$  zum Targetgas  $[^{11}\text{C}]\text{CO}$  und  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ . Ebenso können  $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$  oder auch  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$  in einem Stickstoff/Wasserstoff-Target produziert werden, wobei das  $[^{11}\text{C}]\text{Methan}$  durch Radiolyse des  $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$  gewonnen wird (Ache, 1988).

Viele  $^{11}\text{C}$ -Radiopharmaka-Synthesen gehen von  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  und  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$  als primären Markierungsvorläufern aus. Vor allem über das  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  ist eine Vielzahl von sekundären Markierungsvorläufern zugänglich (Abb. 9), so dass viele Möglichkeiten für die Markierung mit Kohlenstoff-11 zur Verfügung stehen.



**Abb. 9:** Sekundäre, über  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  zugängliche Markierungsvorläufer (Schoeps, 1992)

Beispielsweise lassen sich ausgehend von  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$   $^{11}\text{C}$ -markierte Aminosäuren erhalten, indem man das  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  mit  $\alpha$ -Lithioisonitrilen umsetzt (Vaalburg, 1976). Weiterhin lassen sich auch Carbonsäuren, Aminosäuren, Aldehyde und Ketone mit markierter  $^{11}\text{C}$ -Carbonylfunktion durch Carboxylierung metallorganischer Verbindungen erhalten (Prenant, 1990, 1995; Tada, 1991).

$[^{11}\text{C}]\text{Methyljodid}$ , bei dem es sich um das heute wichtigste  $^{11}\text{C}$ -Markierungsagens handelt, wurde früher mittels einer in-Targetsynthese über eine Gasmischung von 85% Stickstoff und

15% Iodwasserstoff hergestellt (Wagner, 1981), wobei sich diese Methode wegen der starken Dosisabhängigkeit und der geringen radiochemischen Ausbeute von 25% nicht gegen die ex-target Produktion in Synthesemodulen durchsetzen konnte. [<sup>11</sup>C]Methyliodid ermöglicht eine simple Markierung an nukleophilen Heteroatomen – Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel – wie sie in vielen pharmakologisch und biochemisch relevanten Molekülen vorkommen.

Ex-target wurde [<sup>11</sup>C]Methyliodid früher durch Reduktion von [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> mit Lithiumaluminiumhydrid in THF und anschließender Umsetzung mit konzentrierter Iodwasserstoffsäure gewonnen (Marazano, 1977; Crouzel, 1987). Diese Methode wurde allerdings von der „on-line“-Umsetzung von [<sup>11</sup>C]Methanol mit Triphenylphosphindiodid abgelöst (Holschbach, 1993). Heute wird das [<sup>11</sup>C]Methyliodid meist durch katalytische Reduktion von [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> mit Wasserstoff und nachfolgender Umsetzung mit elementarem Iod in automatisierten Apparaturen hergestellt (Larsen, 1997; Antoni, 2004).

Ausgehend von [<sup>11</sup>C]Methyliodid lässt sich über Umsetzung desselben mit Silbertrifluormethansulfonat Trifluormethansäure-[<sup>11</sup>C]methylester ([<sup>11</sup>C]Methyltriflat) herstellen, welches ein sehr viel stärkeres Methylierungsmittel als das [<sup>11</sup>C]Methyliodid darstellt (Holschbach, 1993; Ferrieri, 1983), sich allerdings nur bei Reaktionen anwenden lässt, die Chloroform oder 1,2-Dichlorethan als inerte Lösungsmittel zulassen.

## 1.7 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die in 2 Haupttypen eingeteilt wird: Zum einen den durch absoluten Insulinmangel gekennzeichneten Typ 1 Diabetes, zum anderen den durch relativen Insulinmangel gekennzeichneten Typ 2 Diabetes. Für beide Erkrankungsformen ist eine weltweit zunehmende Prävalenz zu beobachten.

In den letzten Jahren ist es – besonders bei Kindern unter 5 Jahren – zu einem starken Anstieg der Erkrankungsrate des Typ 1 Diabetes gekommen (EURODIAB ACE Study Group, 2000). Besonders gefährdet sind dabei Verwandte 1. Grades von Typ 1 Diabetikern, die ein 20fach höheres Risiko haben, Diabetes Typ 1 zu entwickeln. Bei Diabetes Typ 1 handelt es sich um eine immunologische Erkrankung. Diese werden im Allgemeinen entweder durch zelluläre Immunreaktionen (Th1-mediert) oder durch humorale Immunreaktionen (Th2-mediert) ausgelöst. Diabetes Typ 1 wird durch die Th1-Immunezellen verursacht (Kallmann, 1997). Der Immun-Prozess beim Typ 1 Diabetes beginnt bereits in den ersten beiden Lebensjahren (Ziegler, 1999). Spezifische Autoantikörper, die gegen bestimmte Antigene der Inselzellen gerichtet sind (Tyrosinphosphatase (IA-2), Glutamatdecarboxylase (GAD), Inselzell-Antikörper (ICA), Insulinautoantikörper), können unter Umständen eine Prädiktion des Diabetes Typ 1 ermöglichen. Allerdings schwankt die Latenzzeit von der ersten Detektion der Antikörper bis zum Auftreten klinischer Symptome zwischen Jahren bis Dekaden. Es ist bekannt, dass Th1-medierte Erkrankungen durch eine Förderung der Th2-Immunität in eine weniger aggressive Krankheitsentwicklung gezwungen werden können. Daher wird davon ausgegangen, dass bei Patienten mit einer späten Manifestation des Typ-1 Diabetes zunächst eine Th2-medierte Insulinitis vorherrschend ist. Bei diesen Patienten böte sich über eine nicht-invasive Quantifizierung des  $\beta$ -Zell-Status mittels PET die Möglichkeit, den Krankheitsverlauf verfolgen zu können.

Die weitaus höchste Prävalenz zeigt der Diabetes Typ 2. Es gilt heute als gesichert, dass das gleichzeitige Vorliegen einer gestörten Insulinsekretion und einer peripheren Insulinresistenz in Wechselwirkung mit Umweltfaktoren zur Entstehung des manifesten Diabetes Typ 2 führen (Ferrannini, 1998; Gerich 1998). Dabei zeigen Studien mit ethnischen Gruppen und Zwillingen, dass auch Typ 2 Diabetes eine erhebliche erbliche Komponente besitzt. Zwar wurde der Einfluss einiger Kandidatengene untersucht, als gesichert kann jedoch bisher nur angesehen werden, dass es sich beim Diabetes um eine polygenetische Erkrankung handelt, die sich erst durch Kombination von mehreren genetischen Mutationen und/oder sekundären Faktoren manifestiert. Als sekundäre Insulinresistenzfaktoren werden Adipositas und Bewegungsmangel gesehen. Es wird davon ausgegangen, dass der Grad der Adipositas die Wechselwirkungen zwischen dem Fettgewebe und anderen Insulinzielgeweben erheblich beeinflusst. Freie Fettsäuren wurden als Mediatoren dieses Effekts identifiziert (Boden, 1997). Zwar kann häufig lange vor der klinischen Manifestation des Diabetes eine gestörte Insulinsekretionskinetik festgestellt werden, ohne dass erhöhte Blutzuckerwerte gemessen werden, diese lässt jedoch keinen direkten Rückschluss auf den Status der  $\beta$ -Zellen zu. Zur Bestimmung des Insulinsekretionskinetik wird bei allen Diabetesformen der intravenöse orale

Glukosetoleranztest (ivGTT) verwendet, der jedoch selbst bei optimaler Standardisierung eine nur geringe Sensitivität besitzt (Mrena, 1999).

Zum Zeitpunkt des Auftretens erster klinischer Symptome besitzt das Pankreas nur noch einen sehr geringen Teil seiner ursprünglichen  $\beta$ -Zellmasse. Es ist bekannt, dass der Erhalt selbst eines geringen Teils der  $\beta$ -Zellmasse erhebliche klinische Vorteile mit sich bringt und den Einsatz unterschiedlicher Interventionsstrategien rechtfertigt (Kolb, 2001). Durch die "Diabetes Control and Complication" Studie wurde eindeutig belegt, dass eine residuale Insulin-Sekretion mit einer besseren Glukosekontrolle, weniger Hypoglykämien und weniger Folgeerkrankungen einhergeht (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1998).

Da also eine frühzeitige Intervention dringend notwendig erscheint, wäre ein nicht-invasives Verfahren zur Quantifizierung der  $\beta$ -Zellmasse von hoher diagnostischer und wissenschaftlicher Relevanz und würde einen herausragenden Beitrag unter dem Gesichtspunkt laufender Interventionsstudien leisten (z.B. European-Canadian Nicotinamide Diabetes Intervention Trial, DPT-1 oral-insulin trial).

Während die Bauchspeicheldrüse als Gesamtorgan mit bildgebenden Verfahren wie Sonographie, MRT und Spiral-CT dargestellt werden kann, entzieht sich der endokrine Anteil des Pankreas bislang komplett der bildgebenden Diagnostik, weswegen neue Verfahren zur Visualisierung der  $\beta$ -Zellmasse und Erkennung der prädiabetischen Vorlaufphase benötigt werden. In diesem Zusammenhang könnte die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eine diagnostische Möglichkeit bieten, wenn es gelänge, eine spezifische Markierung der die  $\beta$ -Zellen enthaltenden Langerhansschen Inseln mit einem PET-Tracer zu erreichen.

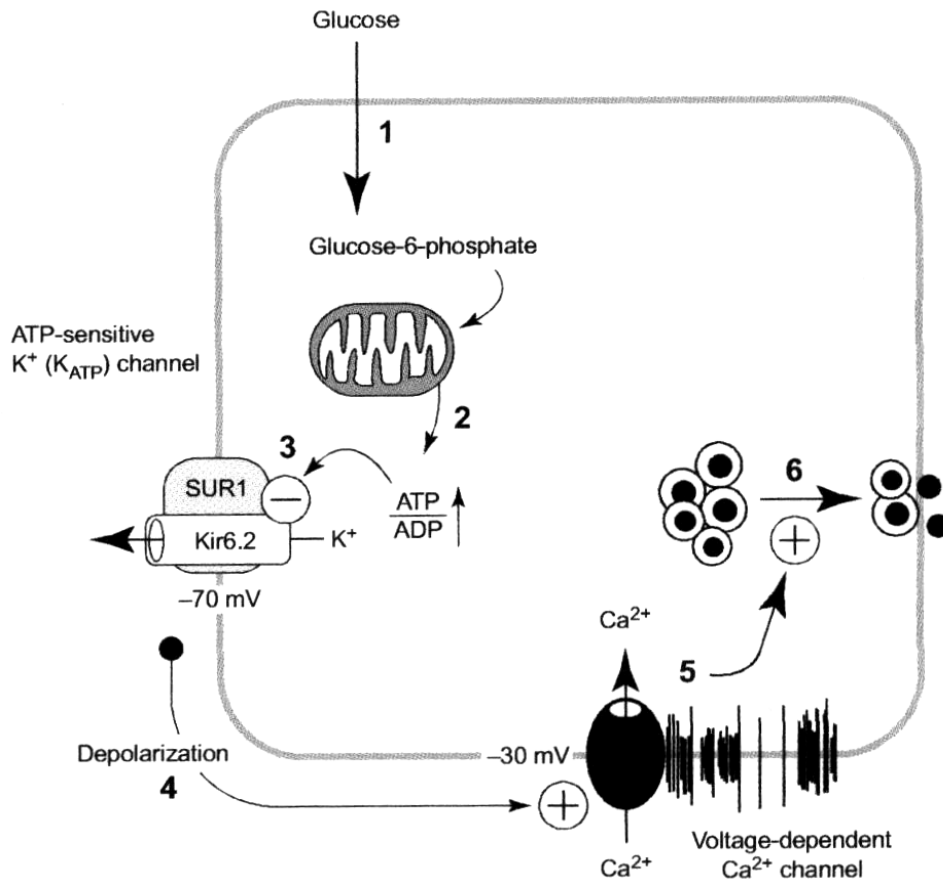
Somit könnte sowohl der Therapieeffekt einer spezifischen Interventionsstrategie zur Erhaltung einer residualen  $\beta$ -Zell-Masse, als auch der Verlauf der Inselzellzerstörung in einer prämanifesten Phase des Diabetes, sowie unter Umständen der Erfolg einer Inselzelltransplantation direkt und nicht-invasiv über radioaktiv markierte,  $\beta$ -Zell-spezifische Marker mittels PET nachvollzogen werden.

Um eine spezifische Markierung der die  $\beta$ -Zellen enthaltenden Langerhansschen Inseln zu erreichen, musste zunächst der Mechanismus der Insulinfreisetzung auf molekularer Ebene verstanden werden. Der nächste Schritt ist dann die Entwicklung eines Moleküls, das die Insulinfreisetzung stimuliert und sich somit als Tracer für ein bildgebendes Verfahren wie die PET eignen würde, indem es selektiv an die  $\beta$ -Zellen bindet. Bei diesem Tracer muss es sich um ein Molekül handeln, das gleichzeitig nicht nur spezifische Plasmamembran-Proteine der  $\beta$ -Zellen mit einer hohen Affinität erkennt, sondern auch weiterhin nur eine minimale Bindung an andere Gewebe aufweist.

Die Insulintropika Tolbutamid, Glibenclamid und die neueren Wirkstoffe Repaglinid und Nateglinid sind orale Antidiabetika, die an eine Klasse von Molekülen, die als ATP-sensitive Kaliumkanäle bekannt sind (Ronner, 1993), binden. Diese Kanäle bestehen aus zwei Untereinheiten: einer Kir6.X-Einheit, die zu den inwärtigen rektifizierenden Kaliumkanälen



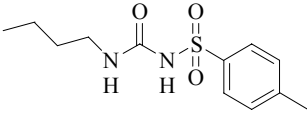
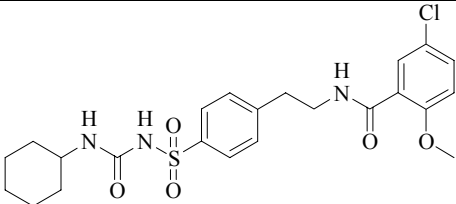
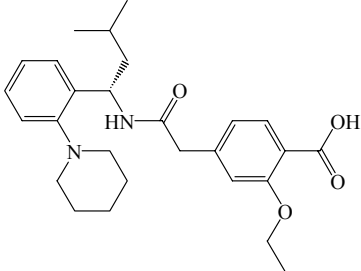
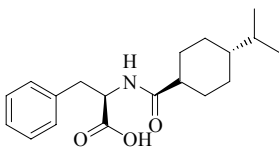
zählt, und einer Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheit (SUR), die ein Mitglied der ATP-bindenden Protein-Superfamilie ist (Seino, 1999). In den  $\beta$ -Zellen spielt dieser ATP-sensitive Kaliumkanal eine bedeutende Rolle bei der Insulinsekretion. Die  $\beta$ -Zelle exprimiert SUR1 und Kir6.2. Nach Transport der Glukose in die  $\beta$ -Zelle (1) löst die Glukosemetabolisierung (2) durch Veränderung des ATP/ADP-Verhältnisses das Schließen des ATP-sensitiven Kanals aus, woraus eine Depolarisation der  $\beta$ -Zelle resultiert (4). Dies führt mittelbar zum Einstrom von Calciumionen (5), die die Sekretion des granulär gespeicherten Insulins bewirken (6) (Cook, 1988) (Abb. 10).



**Abb. 10:** Schema der Insulinfreisetzung (1 - 6) in den  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas

Im klinischen Bereich werden Insulintropika (Insulin-Sekretion stimulierende Verbindungen), wie beispielsweise der Sulfonylharnstoff Glibenclamid und die Glinide Repaglinid und Nateglinid (Tabelle 3), die beide zur Gruppe der Nicht-Sulfonylharnstoffe gehören, als orale Antidiabetika eingesetzt. Sie entfalten ihre insulintrope Wirkung durch eine Bindung an den SUR1 und sind daher viel versprechende Kandidaten zur Entwicklung  $\beta$ -Zell-spezifischer Tracer für bildgebende Verfahren. In geringerem Umfang exprimieren auch nicht-pankreatische Gewebe wie Cardiomyozyten und Mesangiumzellen Sulfonylharnstoffrezeptoren auf den Zelloberflächen (Ashcroft, 2000).

**Tabelle 4:** Strukturformeln ausgewählter oraler Antidiabetika

Name	Strukturformel
Tolbutamid	
Glibenclamid	
Repaglinid	
Nateglinid	

## 1.8 Stand der Forschung zur Visualisierung $\beta$ -Zell-Masse

Bisherige Versuche die  $\beta$ -Zell-Masse bildlich darzustellen, scheiterten an der geringen Dichte der  $\beta$ -Zellen im endokrinen Pankreas. In der Literatur wurden verschiedene Ansätze beschrieben, die auf die Visualisierung der  $\beta$ -Zellen abzielen. Als mögliche neue Verfahren neben der Bildgebung mittels SPECT oder PET wird beispielsweise die Kernspintomographie (MRT) diskutiert (Shiue, 2004).

Im Zusammenhang mit der MRT wird, neben der zukünftig möglichen Entwicklung neuer funktionalisierter und damit spezifischer ultrakleiner superparamagnetischer Eisenoxid-Partikel (USPIO), die Möglichkeit diskutiert, Mangan-Ionen als  $\beta$ -Zell-spezifische Kontrastmittel zu verwenden. Innerhalb des Insulinfreisetzungsmechanismus der  $\beta$ -Zellen (vergleiche Abschnitt 1.7) fungiert  $Mn^{2+}$  als Analogon zum  $Ca^{2+}$  (Gimi, 2003).

Innerhalb der möglichen Verwendung radioaktiv markierter  $\beta$ -Zell-Tracer für PET und SPECT werden verschiedene Ansätze verfolgt:

Neben der Verwendung von  $^{65}\text{Zn}$  wurden auch mit Chelatoren wie DTPA funktionalisierte monoklonale Antikörper, die mit Radionukliden (u.a.  $^{111}\text{In}$ ) markiert wurden, getestet. Im Gegensatz zu den *in vitro*-Studien, die zum Teil viel versprechend waren, zeigten sich bei den *in vivo*-Versuchen keine signifikanten Unterschiede in den Radioaktivitätsakkumulationen der Pankreata diabetischer und nicht-diabetischer Tiere (Figlewicz 1980; Ladriere, 2000; Moore, 2001).

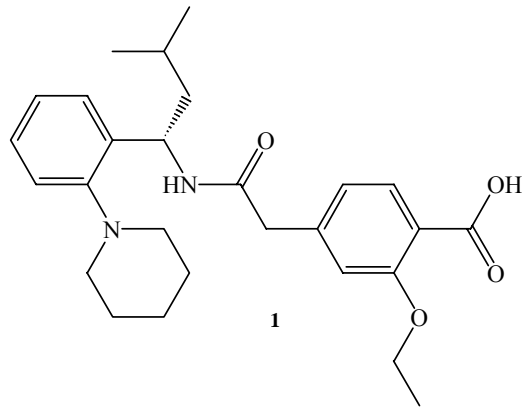
Ein anderer Ansatz verfolgt die Bildgebung mittels radioaktiv markierter Monosaccharide, die über Glukosetransporter in die Zelle transportiert werden sollen. Hier wurden D-Mannoheptulose-Derivate als potentieller Kandidaten diskutiert. Das in der klinische PET-Diagnostik zur Zeit meist verwendete Radiopharmakon [ $^{18}\text{F}$ ]FDG zeigte in einer Studie praktisch keinen Uptake im Pankreas (Malaise, 2001).

Zur möglichen Visualisierung der  $\beta$ -Zell-Masse mittels radioaktiv markierter SUR1-Liganden wurden zahlreiche Ergebnisse publiziert. Neben den als Insulinotropika in der Diabetes-Therapie verwendeten Sulfonylharnstoffen Tolbutamid und Glibenclamid wurde auch das aus der Gruppe der Glinide stammende Nateglinid derivatisiert und radioaktiv markiert (Comagic, 2004). Das fluorethylierte Tolbutamid-Derivat zeigte jedoch nur eine geringe *in vitro*-Affinität zum SUR1 (Schirmacher, 2002). Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich bei dem Nateglinid-Derivat. Hier wurde, um eine Markierung mit [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid zu ermöglichen, die D-Phenylalanin-Gruppe zu D-Tyrosin derivatisiert (vgl. Tabelle 4). Die dargestellte Verbindung zeigte allerdings nur noch einen  $K_D$  von  $>22 \mu\text{M}$  am SUR1. Glibenclamid wurde sowohl mit [ $^{11}\text{C}$ ] als auch verschiedene Derivate des Glibenclamids mit [ $^{18}\text{F}$ ]Fluor markiert. Bei allen untersuchten Derivaten blieben die Bindungseigenschaften erhalten oder verbesserten sich im Vergleich zum Original-Glibenclamid sogar leicht (Schmitz, 2004). Dennoch zeigten sich bei den *in vivo* getesteten Verbindungen  $^{11}\text{C}$ -Glibenclamid sowie  $^{18}\text{F}$ -Glibenclamid nur äußerst geringe Mengen an Radioaktivität im Pankreas (Hwang, 2003; Schneider et al., nicht-veröffentlichte Daten). Eine weitere interessante Option könnte ein mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  markiertes Glibenclamid-Derivat sein, das trotz seiner gravierenden Strukturveränderung mit Original-Glibenclamid vergleichbare *in vitro*-Eigenschaften besitzt (Comagic, 2004).

## 2 Problemstellung

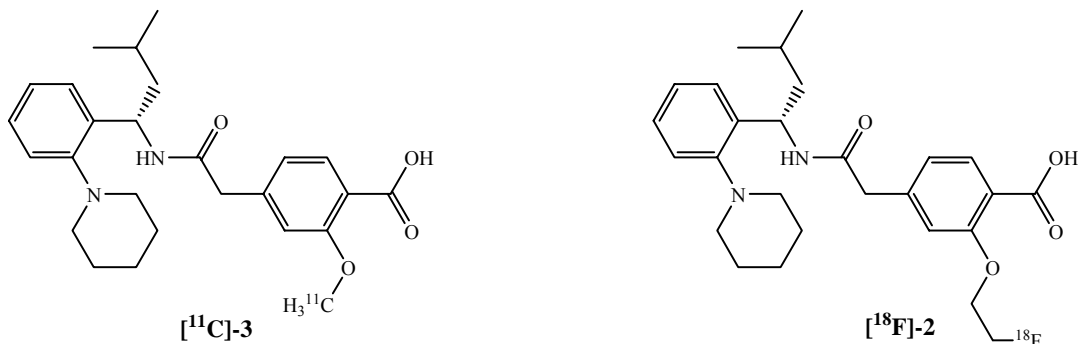
Das Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ 2 ist sowohl durch Insulinresistenz, als auch den Verlust der Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen in den Langerhanschen Inseln des Pankreas charakterisiert. Zur Zeit ist es der nicht invasiven, bildgebenden Diagnostik wie der PET nicht möglich, die gesunden  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas zu visualisieren und quantifizieren. Dazu würde ein Ligand benötigt, der - mit einem Positronen emittierenden Nuklid markiert - noch eine hinreichend hohe spezifische Bindung an die  $\beta$ -Zellen aufweist. Die Bindung an umliegende Gewebe, wie den A-Zellen des Pankreas, aber auch dem Lebergewebe sollte nur sehr schwach ausgeprägt sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Vertreter der sogenannten 2. Generation der Sulfonylharnstoffe, wie z.B. das Glibenclamid, keine genügend spezifische Bindung zum Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SUR) der  $\beta$ -Zelle aufweisen (Sweet, 2004). Ein Grund für die Schwierigkeiten, die  $\beta$ -Zellen zu visualisieren, ist die geringe Dichte dieser Zellen im endokrinen Pankreas. Diese beträgt ungefähr 1% der Gesamtmasse. Für die bildgebende Diagnostik wird somit ein Tracer mit einem besonders hohen Verhältnis zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung benötigt. Als Target für eine spezifische Akkumulation in den  $\beta$ -Zellen soll der auf der Oberfläche der  $\beta$ -Zellen exprimierte SUR1 Rezeptor dienen.

Da Glibenclamid eine sehr lange Plasmahalbwertszeit hat und eine hohe Radioaktivitätsakkumulation im Blut die Visualisierung des Pankreas behindert, sollte eine Verbindung mit einer schnellen Akkumulation im Pankreas vorzuziehen sein. Repaglinid ((S)-2-Ethoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure) **1** (Abb. 11) ist ein Vertreter der sogenannten 3. Generation der Insulintropika, der sich im Vergleich mit den Sulfonylharnstoffen, wie Glibenclamid und Glicazid, durch ein schnelleres Wirkprofil auszeichnet. Repaglinid war der erste Vertreter der sogenannten Glinide, der durch systematische Derivatisierung des Meglitinid entwickelt und in klinischen Studien getestet wurde (Grell, 1998). Die Wirkung des Repaglinids **1** tritt wesentlich schneller ein als die der Sulfonylharnstoffen, was auf ein schnelleres Anfluten der Verbindung im Pankreas hindeutet. Die geringe Plasmahalbwertszeit des Repaglinids **1** – in diabetischen Patienten 1.0 – 1.4 Stunden - minimiert das Risiko einer verzögerten Anreicherung im Pankreas. Die Wirksamkeit des Repaglinids **1** ist signifikant vom Blutzuckerspiegel abhängig. In klinischen Studien zeigten Applikationen bis zum 100fachen der therapeutischen Dosis keinerlei oder kaum toxikologische Effekte (Owens, 1998). Repaglinid **1** wird in der Leber von CYP450 (CYP2C8 und CYP3A4) (Bidstrup, 2003) in 7 Hauptmetabolite abgebaut, die alle keinerlei insulinsekretierende Wirkung zeigen und daher nicht um die SUR1 Bindungsstelle der  $\beta$ -Zellen konkurrieren.



**Abb. 11:** Strukturformel von (S)-2-Ethoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Repaglinid) **1**

Als potentielle Substanz zur Visualisierung des  $\beta$ -Zell Status im Menschen bietet Repaglinid **1** im Vergleich zu den Sulfonylharnstoffen einige Vorteile. Zum einen besitzt Repaglinid **1** eine 16fach höhere Selektivität für die Bindung an die  $\beta$ -Zelle im Vergleich zur Bindung an cardiovaskuläre Zellen *in vivo* (Hu, 1999; Dabrowski, 2001) und zum anderen ist das Verhältnis der  $K_D$ -Werte der Bindungen an SUR1/SUR2 wesentlich größer als das des Glibenclamids (Shiue, 2004) (Repaglinid = 153, Glibenclamid = 2). Besonders diese Faktoren waren ausschlaggebend für das Konzept, Repaglinid **1** mit den Positronen-Emittern [ $^{18}\text{F}$ ]Fluor und [ $^{11}\text{C}$ ]Kohlenstoff zu markieren, da im Hinblick auf eine mögliche Anwendung am Menschen die Radioaktivitätsanreicherung in umliegenden Geweben - wie dem Herzen und der Leber - minimiert werden muss. Die wesentlich geringere Plasmahalbwertszeit deutet auf eine stark erniedrigte Plasma-Protein-Bindung - beim Glibenclamid nahezu 100% - hin. Die verhältnismäßig schnelle Blutclearance des Repaglinids **1** würde den generellen Hintergrund an radioaktiver Strahlung verringern und somit eine kontrastreichere Visualisierung der pankreatischen Inselzellen ermöglichen.



**Abb. 12:** Zielstrukturen für die radioaktive Synthese von Repaglinid-Derivaten zur Visualisierung des  $\beta$ -Zell-Status mittels PET: ((S)-2-[ $^{11}\text{C}$ ]Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [ $^{11}\text{C}$ ]-**3** und (S)-2-(2-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [ $^{18}\text{F}$ ]-**2**)

Zudem ermöglicht Repaglinid **1** ohne gravierende Derivatisierung eine Markierung mit etablierten sekundären Markierungsvorläufern wie 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat oder [<sup>11</sup>C]Methylodid, was auf eine im Vergleich zum originalen Repaglinid **1** im wesentlichen unverminderte Wirksamkeit der Derivate (Abb. 12) hoffen lässt.

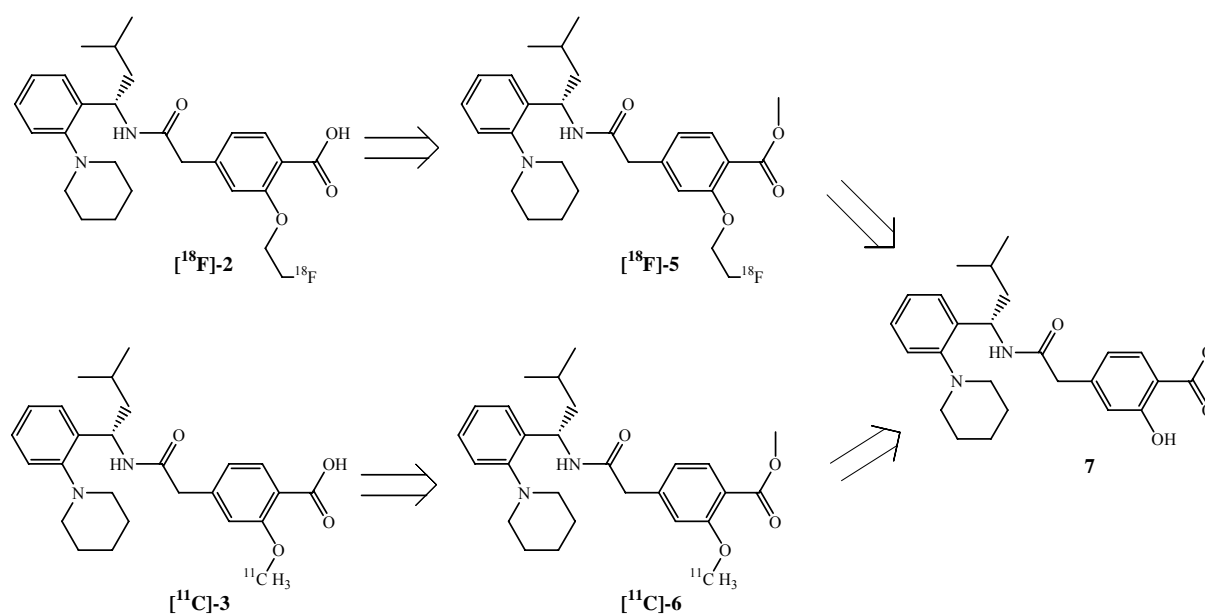
Zur Bestätigung sollen nach der Evaluierung der Bindungseigenschaften und physiologischen Wirksamkeit der zu synthetisierenden korrespondierenden nicht radioaktiven Standardverbindungen und der Bestimmung ihrer Lipophilie, bei Eignung der Derivate *in vivo*-Experimente mit den radioaktiv markierten Verbindungen.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Darstellung der Markierungsvorläufer und der nicht-radioaktiven Standardverbindungen

##### 3.1.1 Darstellung des Markierungsvorläufers 2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7**

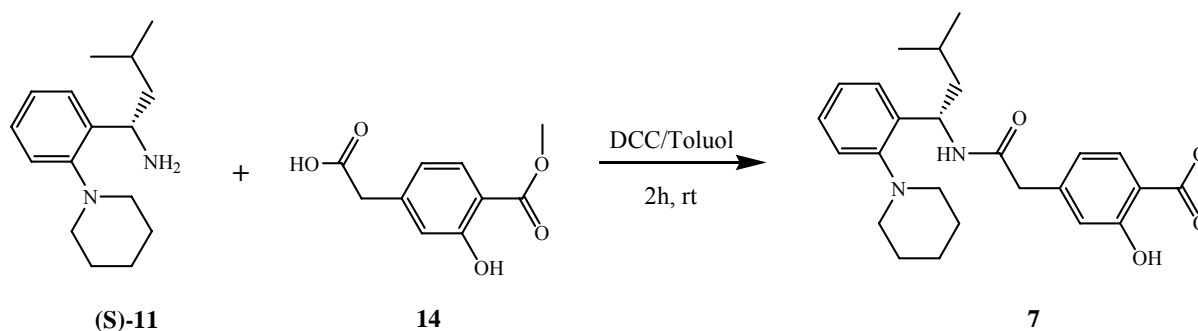
Ziel war es, ein Ester-geschütztes Repaglinid-Derivat (**7**) mit einer freien phenolischen Hydroxy-Funktion zu synthetisieren, um eine 2stufige radioaktive Synthese der Zielverbindungen mit den sekundären Markierungsvorläufern 2- $^{18}\text{F}$ Fluorethyltosylat, 1-Brom-2- $^{18}\text{F}$ fluorethan oder  $^{11}\text{C}$ Methyliodid zu ermöglichen (Abb. 13).



**Abb. 13:** Radiosyntheseplan ausgehend vom Markierungsvorläufer 2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7**

Der Markierungsvorläufer 2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** konnte über die Kopplung der Synthons 4-Carboxymethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester **14** und (S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin (**S**)-**11** mittels Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Toluol in einer Ausbeute von 65% erhalten werden (Abb. 14).

(S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin (**S-11**) wurde ausgehend vom kommerziell erhältlichen 2-Chlor-benzonitril **19** (Abb. 15), 4-Carboxymethyl-2-hydroxy-benzoessäure-methylester **14** ausgehend von 4-Methyl-salicylsäure dargestellt (Abb. 16).

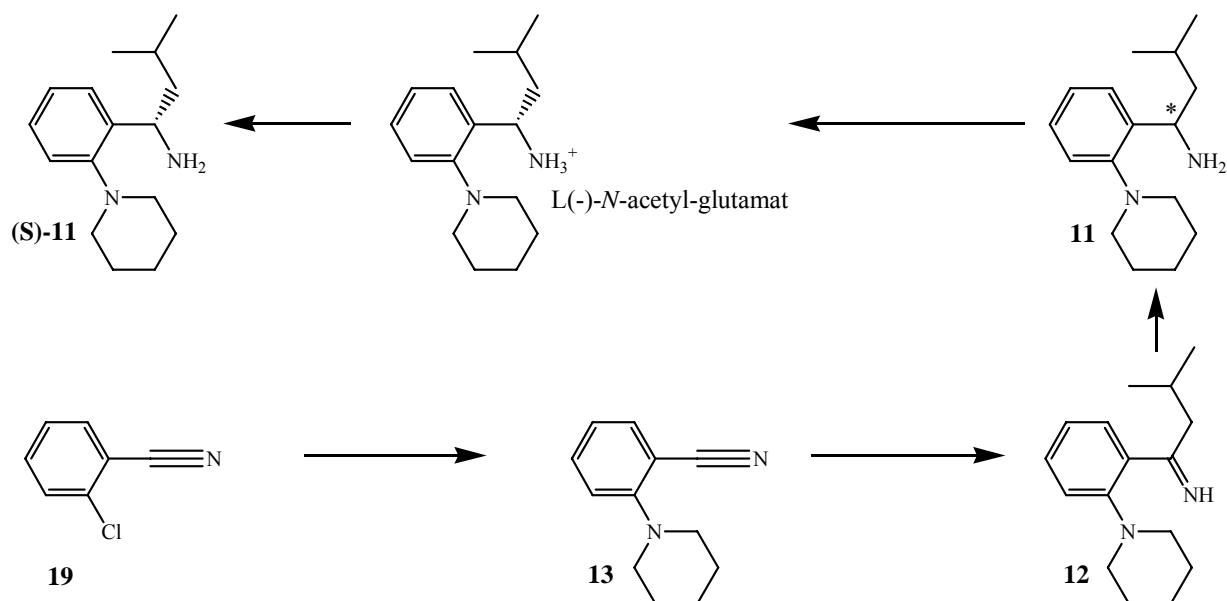


**Abb. 14:** Darstellung von 2-Hydroxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoessäure-methylester **7** aus 4-Carboxymethyl-2-hydroxy-benzoessäure-methylester **14** und (S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin (**S-11**)

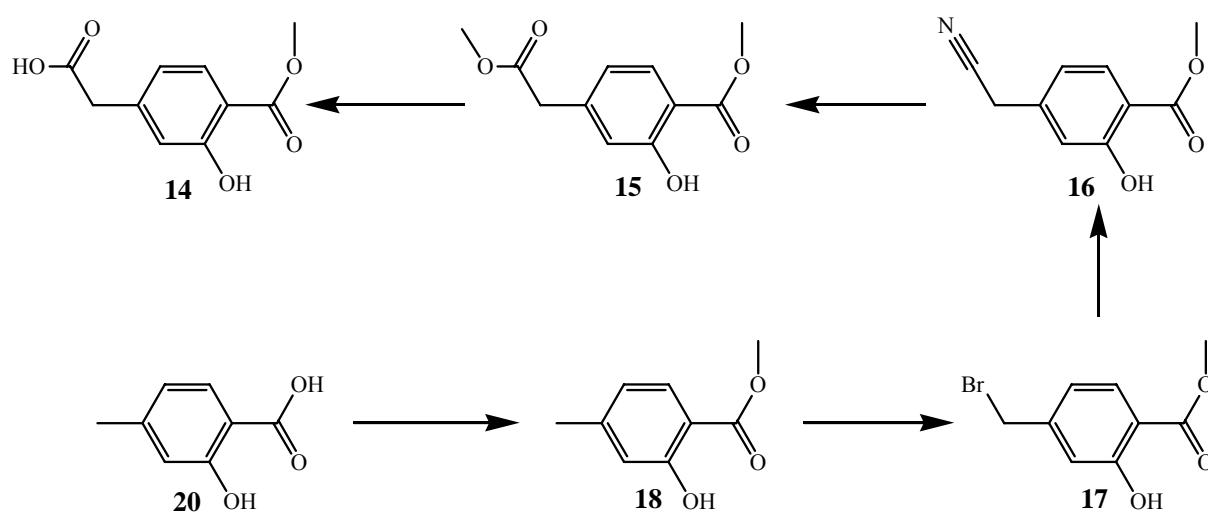
Zur Synthese von (S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin (**S-11**) (Grell, 1998) wurde zunächst 2-Chlorbenzonitril **19** in einem ersten Reaktionsschritt mit Piperidin und Pyridin in N-Formyl-piperidin zu 2-Piperidin-1-yl-benzonitril **13** umgesetzt. Das entstandene Produkt wurde durch eine Grignard-Reaktion mit *i*-BuMgBr (Becker, 1999) zum Ketimin 3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylidenamin **12** und dann in einer weiteren Reaktion mit  $\text{LiAlH}_4$  zum racemischen Amin 3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin **11** reduziert. Das Amin wurde mit L(-)-N-Acetylglutaminsäure in Aceton zum diastereomeren Salzpaar (S,S) und (R,S) umgesetzt. Durch mehrfache fraktionierte Kristallisation konnte die (S,S)-Verbindung isoliert werden und dann durch Reaktion mit Ammoniak das enantiomerenreine (S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin (**S-11**) erhalten werden. Die Überprüfung der Enantiomerenreinheit mittels chiraler HPLC (Grell, 1998) ergab einen Enantiomerenüberschuss von  $ee > 97\%$ .

Zur Darstellung von 4-Carboxymethyl-2-hydroxy-benzoessäure-methylester **14** wurde im ersten Schritt 4-Methyl-salicylsäure **20** unter Schwefelsäurekatalyse in Methanol verestert und dann durch Reaktion mit N-Bromsuccinimid (NBS) mit einer katalytischen Menge N,N-Azobisisobutyronitril (AIBN) in die Seitenkette bromiert. In einem weiteren Schritt wurde durch Umsetzung des entstandenen 4-Brommethyl-2-hydroxy-benzoessäure-methylesters **20** mit Natriumcyanid unter Phasentransferkatalyse 4-Cyanomethyl-2-hydroxy-benzoessäure-methylester **16** synthetisiert. Durch Einleiten von Chlorwasserstoffgas in methanolische Lösung wurde diese Verbindung in den entsprechenden Dimethylester, 2-Hydroxy-4-methoxycarbonylmethyl-benzoessäure-methylester **15**, umgesetzt, der durch Reaktion mit Natronlauge in wässriger Lösung selektiv zur Carbonsäure 4-Carboxymethyl-2-hydroxy-benzoessäure-methylester **14** verseift werden konnte.





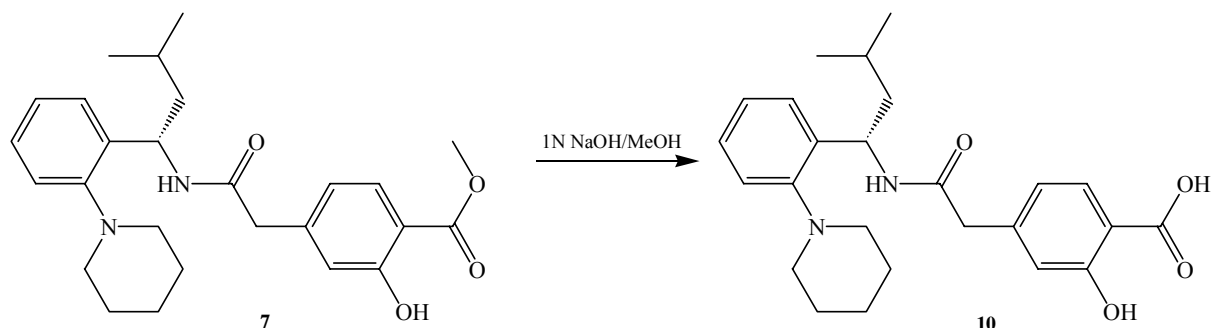
**Abb. 15:** Syntheschema zur Darstellung von (S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin (S)-11 aus 2-Chlorbenzonitril 19



**Abb. 16:** Syntheschema zur Darstellung von 4-Carboxymethyl-2-hydroxybenzoesäure-methylester 14 aus 4-Methyl-salicylsäure 20

Durch Kopplung der Synthons 4-Carboxymethyl-2-hydroxybenzoesäure-methylester 14 und (S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin (S)-11 mittels Dicyclohexylcarbodiimid konnte der Markierungsvorläufer 7 in einer Ausbeute von 65% dargestellt werden. 7 konnte nun mit den sekundären Markierungsvorläufern 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat, 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan und [<sup>11</sup>C]Methyliodid zu den korrespondierenden radioaktiv markierten Produkten umgesetzt werden.

### 3.1.2 Darstellung des Markierungsvorläufers (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **10**

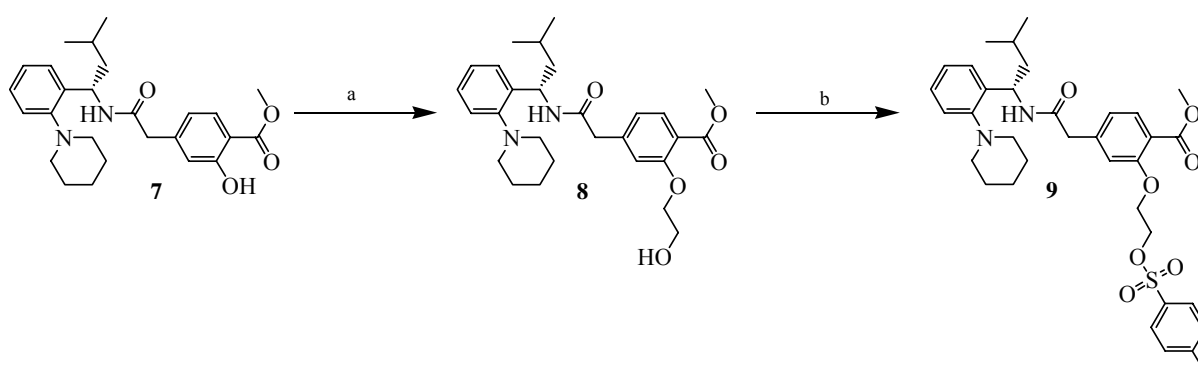


**Abb. 17:** Darstellung des Markierungsvorläufers (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **10** aus **7**

Zur Einführung von  $[^{18}\text{F}]$ Fluor in Radiopharmaka ist 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat ein in der Radiochemie oft verwendeter sog. sekundärer Markierungsvorläufer. Sie wurde bei einer Vielzahl verschiedener Verbindungen, die nukleophile Gruppen wie NH-, OH- oder SH-Funktionen aufweisen, erfolgreich zur Synthese  $^{18}\text{F}$ -markierter Radiopharmaka eingesetzt (Block, 1986, 1987; Wester, 2004). Oft ist es möglich, mit 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat selektiv die nukleophilste Funktion im Molekül zu  $^{18}\text{F}$ -fluorethylieren, so dass zumeist keine Schutzgruppen für die geringer nukleophilen Gruppen im Molekül benötigt werden. Phenolische Hydroxy-Funktionen können im allgemeinen selektiv in Anwesenheit einer Carbonsäure-Gruppe mit 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat zu den entsprechenden Ethern umgesetzt werden, ohne dass eine Bildung der radioaktiv markierten Ester zu beobachten ist. Durch Verwendung eines nicht-Ester-geschützten Markierungsvorläufers würde sich die Möglichkeit bieten, die Synthese der radioaktiv markierten Zielverbindungen  $[^{11}\text{C}]$ -**3** und  $[^{18}\text{F}]$ -**2** in einem Reaktionsschritt durchzuführen und so die Syntheszeit drastisch zu reduzieren. Daher wurde der nicht-Methylester geschützte Markierungsvorläufer (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **10** durch Verseifung von (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäuremethylester **7** mit Natronlauge dargestellt. Bei dieser Reaktion wurde ein drastischer Reaktivitätsunterschied des (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäuremethylester **7** im Vergleich mit den Esterspaltungen zur Synthese der nicht-radioaktiven Standardverbindungen Repaglinid **1**, (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Fluor-ethoxy-desethoxy-Repaglinid) **2** und (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) **3** (vergleiche Abschnitt 3.1.4) festgestellt. Innerhalb der Reaktionszeit von bis zu 72 Stunden konnten erhebliche Mengen an nicht zu charakterisierenden Zersetzungsprodukten isoliert werden. Versuche, den Methylester unter milderem Bedingungen zu spalten, zeigten keinen

Erfolg. Der Einsatz von starken Säuren führte innerhalb eines kurzen Zeitraumes (30 Minuten) zur vollständigen Zersetzung des Edukts. Insgesamt konnte (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** durch Reaktion mit drei Äquivalenten Natronlauge nur mit einer mittleren Ausbeute von 27% zur gewünschten (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **10** verseift werden (Abb. 17).

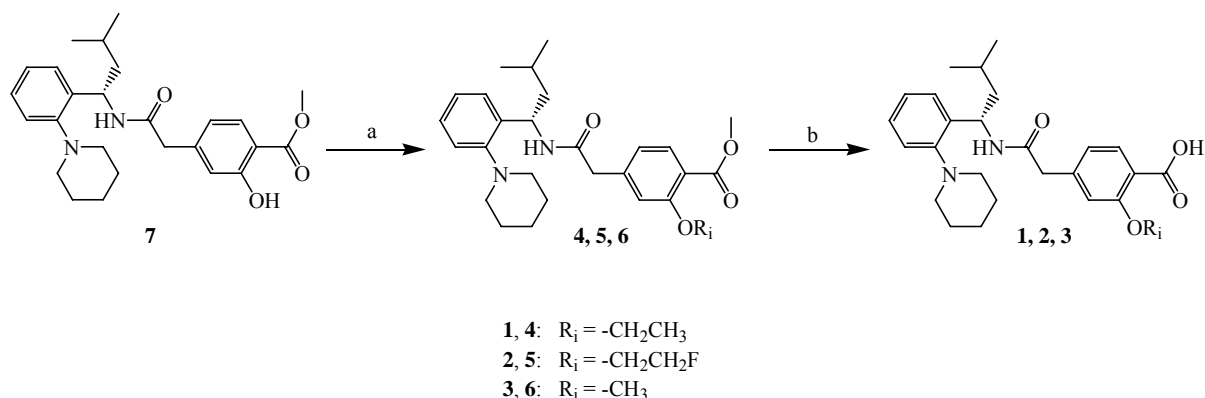
### 3.1.3 Darstellung des Direktmarkierungsvorläufers (S)-4-{{3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-2-[2-(toluene-4-sulfonyloxy)-ethoxy]-benzoesäure-methylester **9**



**Abb. 18:** Syntheschema zur Darstellung des Direktmarkierungsvorläufers (S)-4-{{3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-2-[2-(toluene-4-sulfonyloxy)-ethoxy]-benzoesäure-methylester **9** ausgehend vom Markierungsvorläufer (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7**

Um einen Direktmarkierungsvorläufer zu erhalten, der direkt durch nukleophile  $^{18}\text{F}$ -Fluorierung mit  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-_{\text{aq}}$  in die gewünschte Zielverbindung umgesetzt werden kann, wurde 2-Bromethanol an (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** ankondensiert. Anschließend konnte die Hydroxy-Funktion durch Reaktion mit Toluolsulfonsäurechlorid in das korrespondierende Toluolsulfonat (Tosylat) umgewandelt werden. Da alle sauren Funktionen im Molekül geschützt werden müssen, bleibt die Carbonsäure-Funktion als Methylester geschützt. Die Verbindung (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** konnte mit 2-Bromethanol in DMF unter Verwendung von Kaliumcarbonat als Base zum korrespondierenden Phenylether (S)-2-(2-Hydroxyethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **8** in einer Ausbeute von 52% umgesetzt werden. Zur Synthese des Tosylats wurde (S)-2-(2-Hydroxyethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **8** im System Toluolsulfonsäurechlorid/ Pyridin (Beyer, 1998) in einer Ausbeute von 52% tosyliert (Abb. 18).

### 3.1.4 Darstellung der nicht-radioaktiven Standardverbindungen (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) **2** und (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) **3** und Repaglinid **1**



**Abb. 19:** Syntheschema der Darstellung der nicht-radioaktiven Standardverbindungen **2**, **3** und Repaglinid **1**

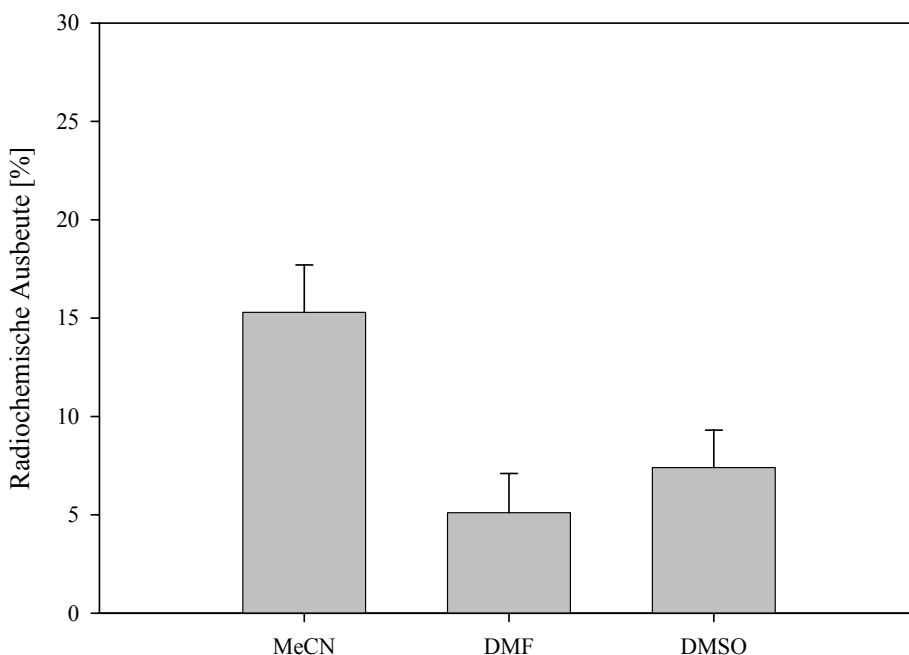
Zur Evaluierung von (S)-2-(2-[ $^{18}F$ ]Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [ $^{18}F$ ]-**2** und (S)-2-[ $^{11}C$ ]Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [ $^{11}C$ ]-**3** wurden die analogen nicht-radioaktiven Standardverbindungen dargestellt, mit denen die Lipophilie (logD), die Insulin-sekretierende Wirkung und die Bindungsaffinität zum SUR1-Rezeptor ( $K_D$ ) bestimmt wurden. Zusätzlich wurden mit diesen Verbindungen die optimalen HPLC-Bedingungen zur Abtrennung der analogen radioaktiven Verbindungen [ $^{18}F$ ]-**2** und [ $^{11}C$ ]-**3** ermittelt. Zur Synthese wurde (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** mit 1-Brom-2-fluorethan bzw. Iodmethan (bzw. im Falle der Darstellung des original-Repaglinids mit Bromethan) und Kaliumcarbonat in Aceton unter Rückfluss zur Reaktion gebracht (Abb. 19). Eine zufriedenstellende Ausbeute des Intermediates (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **5** konnte nur unter Zusatz einer katalytischen Menge NaI erhalten werden. Die Methylester der resultierenden Intermediate, d.h. (S)-2-Ethoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **4**, (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **5** und 2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **6**, wurden dann durch Reaktion mit 2 Äquivalenten Natronlauge in Ausbeuten von >90% gespalten (vergleiche Abschnitt 3.1.2). Die Reinigung der Zwischenstufen und der Produkte erfolgte über Säulenchromatographie an Kieselgel.

## 3.2 Radiosynthesen mit [ $^{18}\text{F}$ ]Fluor

### 3.2.1 Markierungen des Direktmarkierungsvorläufers (S)-4-[[3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-2-[2-(toluene-4-sulfonyloxy)-ethoxy]-benzoesäure-methylester **9** mit [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid

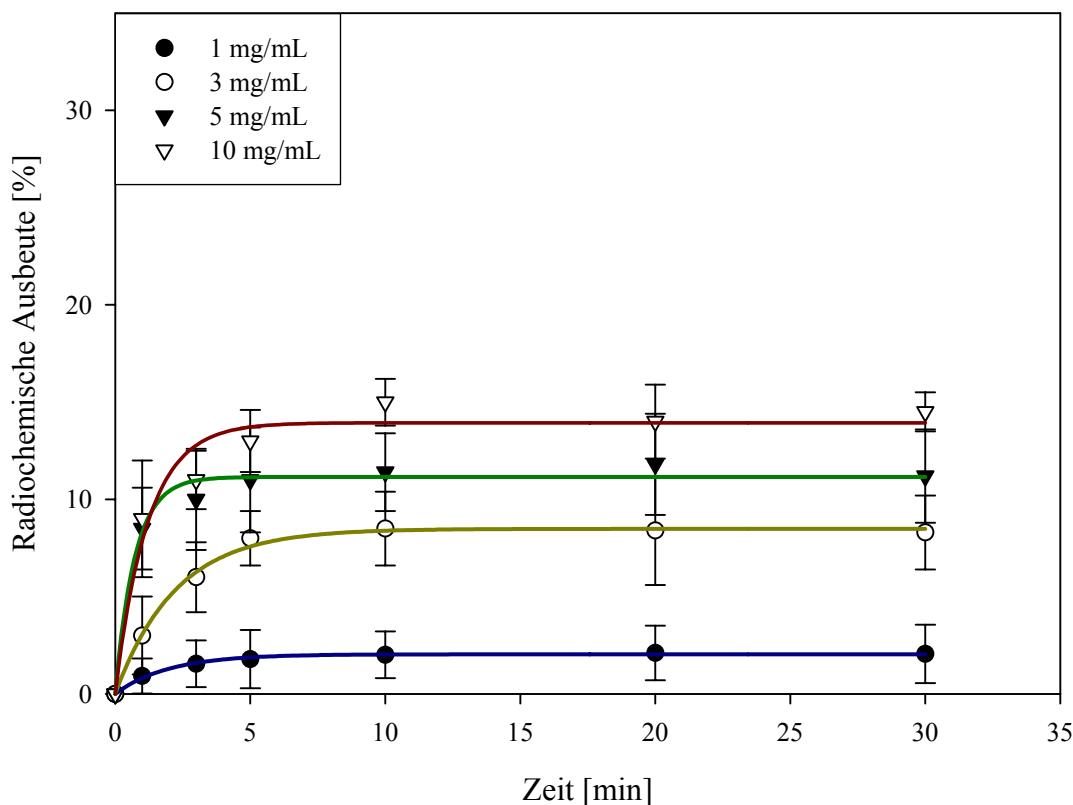
Die radioaktive Direktfluorierung erfolgte im  $([2.2.2/\text{K}]^+ / [^{18}\text{F}]^- \text{-Komplex}) / \text{K}_2\text{CO}_3$ -System in Acetonitril bei einer Temperatur von  $100^\circ\text{C}$  im verschlossenen Reaktionsgefäß nur mit sehr geringen radiochemischen Gesamtausbeuten (RCA) von  $10 \pm 3\%$  zur Zielverbindung [ $^{18}\text{F}$ ]-**2** nach der finalen Spaltung der Methylester-Schutzgruppe mit Natronlauge (vergleiche Abschnitt 3.2.4.2). Unterhalb von  $100^\circ\text{C}$  und bei Verwendung von anderen dipolaraprotischen Lösungsmitteln wie DMF und DMSO kam es zu einer signifikanten Verschlechterung der Gesamtmarkierungsausbeute auf unter 3%.

In Acetonitril bei  $100^\circ\text{C}$  konnten maximale radiochemische Ausbeuten (RCA) des Intermediates (S)-2-(2-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluor-ethoxy)-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure-methylester [ $^{18}\text{F}$ ]-**5** von 15% nach 10 Minuten erreicht werden, wobei die Markierungsausbeute in DMF bei gleicher Temperatur nur 5% und in DMSO 7% betrug (Abb. 20). Die Tatsache, dass gerade Acetonitril als Lösungsmittel noch am geeignetsten für die direkte  $^{18}\text{F}$ -Fluorierung war, kann durch eine besondere Stabilisierung des  $\text{S}_{\text{N}}2$ -artigen Übergangszustandes bei der Direktmarkierung erklärt werden (Reichert, 1988).



**Abb. 20:** Abhängigkeit der RCA an [ $^{18}\text{F}$ ]-**5** vom Lösungsmittels (Lösungsmittel DMF, DMSO, Acetonitril (MeCN); Temperatur =  $100^\circ\text{C}$ ; Reaktionszeit = 10 Minuten, Markierungsvorläuferkonzentration (MVK) = 10 mg/mL (16.1 mmol/L))

Eine Verlängerung der Reaktionsdauer führte, aufgrund einer sehr raschen Zersetzung des Markierungsvorläufers, in keinem Fall zu einer Erhöhung der RCA. Daher musste auch eine verhältnismäßig hohe Markierungsvorläuferkonzentration (MVK) von 16.1 mmol/L gewählt werden (Abb. 21), die bei der Isolierung des Intermediates  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  mittels HPLC zu Auftrennungsproblemen führte. Bei einer Vorläuferkonzentration von 10 mg/mL (16.1 mmol/L) im Lösungsmittel Acetonitril sind RCA an  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  von maximal 15% nach 10 min realisierbar.



**Abb. 21:** Abhängigkeit der RCA an  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  von der Markierungsvorläuferkonzentration (Lösungsmittel = MeCN; Temperatur = 100°C, MVK = 1.6 – 16.1 mmol/L)

Aufgrund der extrem geringen radiochemischen Ausbeute bei der  $^{18}\text{F}$ -Direktfluorierung, die auf die Instabilität des Markierungsvorläufers zurückzuführen war, wurde zur Synthese der Zielverbindung  $[^{18}\text{F}]\text{-2}$  die in der radiopharmazeutischen Chemie gebräuchliche  $^{18}\text{F}$ -Fluorethylierung phenolischer Hydroxy-Funktionen angewendet.

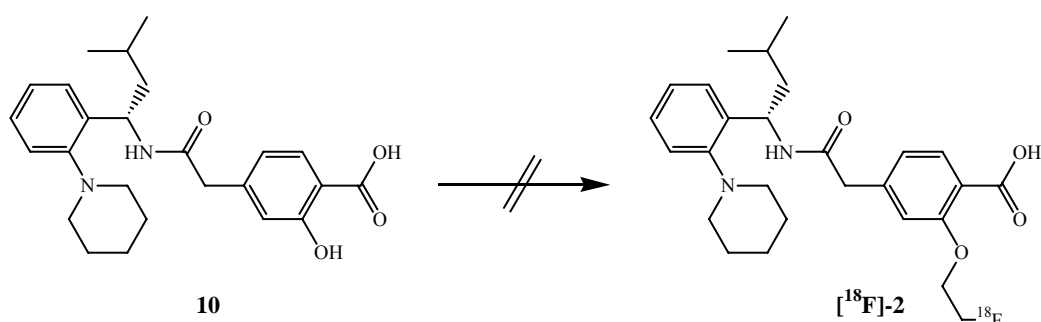
### 3.2.2 Verwendung der sekundären Markierungsvorläufer 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan und 2-[<sup>18</sup>F]fluorethyltosylat

Die sogenannten sekundären Markierungsvorläufer 2-[<sup>18</sup>F]fluorethyltosylat und 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan sind in der Radiochemie gängige Reagenzien zur <sup>18</sup>F-Fluorethylierung von Radiopharmaka.

Im Falle des 2-[<sup>18</sup>F]fluorethyltosylat wurde nach der manuellen Synthese des 2-[<sup>18</sup>F]fluorethyltosylats eine finale HPLC-Reinigung angeschlossen. Hierbei wird die Reaktionslösung bestehend aus Etylenglycol-1,2-ditosylat, [2.2.2./K<sup>+</sup>]/[<sup>18</sup>F]<sup>-</sup>-Komplex und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in Acetonitril direkt in ein HPLC-System injiziert und das Produkt 2-[<sup>18</sup>F]fluorethyltosylat abgetrennt. Eine anschließende Fixierung auf einer Festphasenkartusche (RP-18) und Elution mit dipolar aprotischen Lösungsmitteln (Acetonitril, DMF, DMSO) liefert das Markierungssyntheton 2-[<sup>18</sup>F]fluorethyltosylat in einer RCA von 50 - 60%.

Die zweite Markierungsspezies, 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan, wurde nur vereinzelt eingesetzt, wenn sich mit 2-[<sup>18</sup>F]fluorethyltosylat keine zufriedenstellenden Ausbeuten erzielen ließen, oder um zu überprüfen, ob sich mit den - hinsichtlich Basenzusatz und Markierungsvorläuferkonzentration - für 2-[<sup>18</sup>F]fluorethyltosylat optimierten Reaktionsbedingungen mit 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan höhere Ausbeuten erzielen ließen. Die Synthese des 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan wurde analog einer publizierten Vorschrift dargestellt (Comagic, 2002). Die RCA lag bei 50 - 60%.

### 3.2.3 Markierung von (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **10** mit 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan und 2-[<sup>18</sup>F]fluorethyltosylat



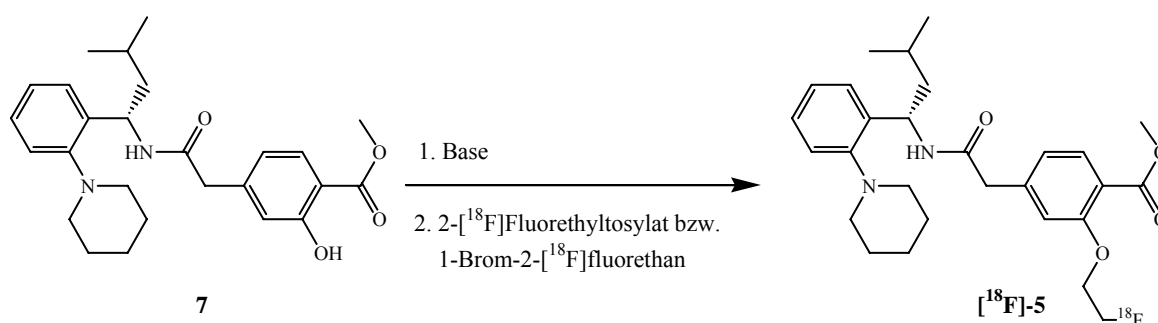
**Abb. 22:** Schema der <sup>18</sup>F-Fluorethylierung von (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **10** zu [<sup>18</sup>F]-**2**

Bekanntermaßen werden bei einer <sup>18</sup>F-Fluorethylierung oft keine Schutzgruppen für Carbonsäure-Funktionen im Molekül benötigt, da es meist möglich ist, selektiv die nukleophilste Funktion im Molekül zu alkylieren (vergleiche Abschnitt 3.1.2).

Daher wurde versucht, (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **10** unter Verwendung von 1-Brom-2- $^{18}\text{F}$ fluorethan und 2- $^{18}\text{F}$ Fluorethyltosylat in einer 1stufigen Radiosynthese zur Zielverbindung (S)-2-(2- $^{18}\text{F}$ Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure  $^{18}\text{F}$ -**2** umzusetzen. Es stellte sich jedoch bei der Verwendung von Natronlauge zur Deprotonierung sowohl der Carbonsäure als auch der phenolischen Hydroxyfunktion (0.5 – 2 Äquivalente) direkt nach der Zugabe eine Braunfärbung ein, die auf eine Zersetzung des Eduktes hindeutet. Auch bei Verwendung verhältnismäßig hoher Markierungsvorläuferkonzentrationen von 11.8 mmol/L, die zudem dadurch limitiert waren, dass **10** ausschließlich in DMSO und mit maximal 5 mg/mL löslich war, ließen sich bei keiner gewählten Reaktionstemperatur detektierbare Ausbeuten von  $^{18}\text{F}$ -**2** erzielen. Die Verwendung anderer Hilfsbasen (LiOH, NaH, Pyridin, Triethylamin, Ethyldiisopropylamin) in verschiedenen Konzentrationen führte insbesondere im Falle des LiOH und des NaH zu einer raschen, über HPLC detektierbaren Zersetzung des Eduktes und in keinem Fall zur Bildung von  $^{18}\text{F}$ -**2**.

### 3.2.4 Radioaktive Markierungen von (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** mit 2- $^{18}\text{F}$ Fluorethyltosylat und 1-Brom-2- $^{18}\text{F}$ fluorethan

#### 3.2.4.1 Darstellung des Intermediates (S)-2-(2- $^{18}\text{F}$ Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester $^{18}\text{F}$ -**5**

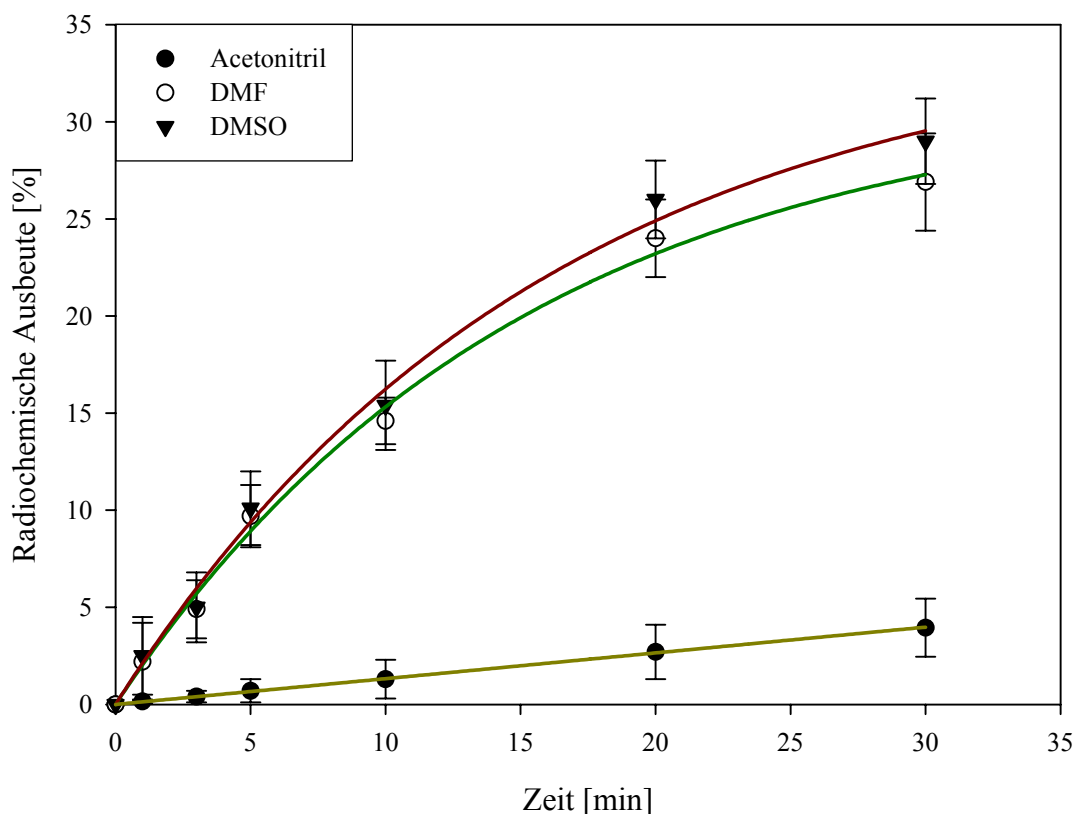


**Abb. 23:**  $^{18}\text{F}$ -Fluorethylierung von (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** zu  $^{18}\text{F}$ -**5**



### Abhängigkeit der RCA an $[^{18}\text{F}]\text{-5}$ bei Verwendung von 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat vom verwendeten Lösungsmittel:

Bei den Markierungsreaktionen mit 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat und 1-Brom-2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethan handelt es sich aufgrund der Reaktionsbedingungen um bimolekulare nukleophile Substitutionsreaktionen ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ), die bekanntermaßen in polar aprotischen Lösungsmitteln häufig bereitwilliger ablaufen als in protischen Solventien. Dieser Effekt ist durch die starke Solvatisierung der Kationen in Lösungsmitteln wie Acetonitril, DMF oder DMSO erklärbar, die die Nukleophilie der Anionen drastisch erhöht. Diese Solventien haben sich wegen ihrer stark polarisierenden Eigenschaften (Dielektrizitätskonstanten:  $\epsilon = 38$  (Acetonitril),  $\epsilon = 37$  (DMF),  $\epsilon = 47$  (DMSO); Dipolmomente:  $\mu = 13 \times 10^{-30}$  CM (DMF);  $\mu = 14 \times 10^{-30}$  CM (DMSO)) und ihrer hohen Siedepunkte bewährt. Weiterhin wird beschrieben, dass  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Übergangszustände in polar aprotischen Lösungsmitteln im Vergleich zu protischen Solventien besser stabilisiert sind (Reichert, 1988). Bei der  $^{18}\text{F}$ -Fluorethylierung der phenolischen Hydroxyfunktion von **7** unter Verwendung einer Hilfsbase zur Deprotonierung steigt die radiochemische Ausbeute erwartungsgemäß mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels an (Abb. 24).

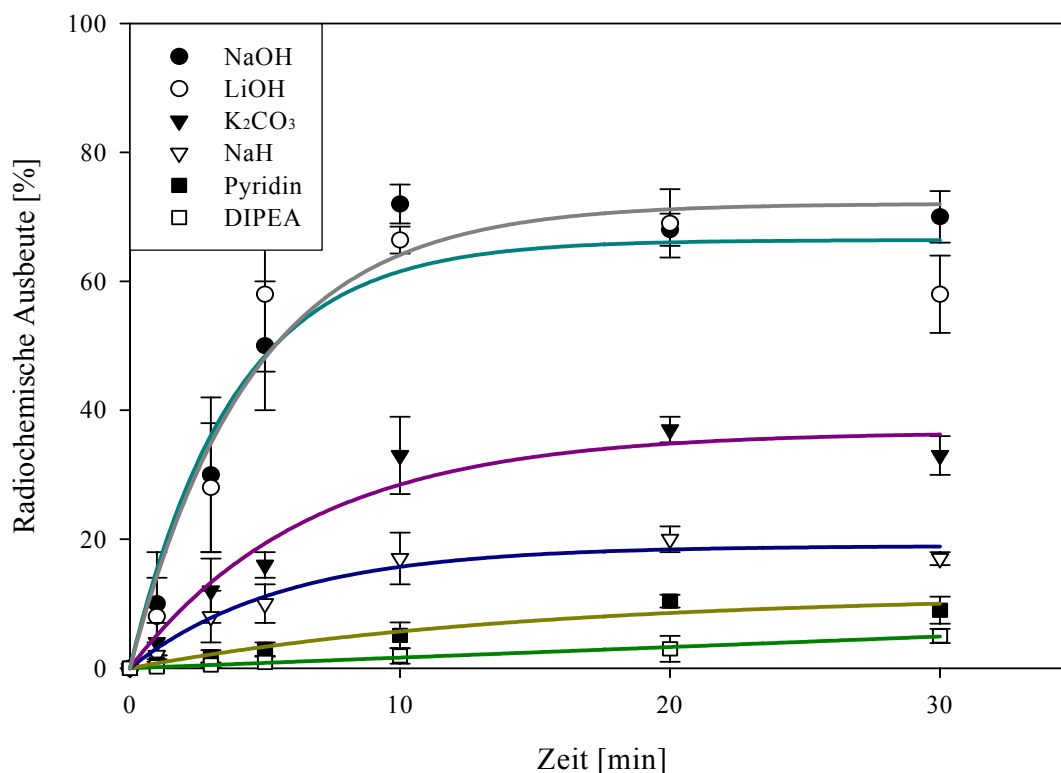


**Abb. 24:** Abhängigkeit der RCA an  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  vom verwendeten Lösungsmittel bei Verwendung von 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat (Temperatur =  $100^\circ\text{C}$ ; 1 eq. 1N NaOH, MVK = 10 mg/mL (22.8 mmol/L))

Allerdings lässt sich die Beobachtung, dass in Acetonitril nur geringe, in DMF und DMSO aber vergleichbar hohe Ausbeuten erhalten wurden, nicht befriedigend durch Vergleich der Dielektrizitätskonstanten erklären und erfordert daher eine andere theoretische Betrachtung der erhaltenen Ausbeutecharakteristiken, was mit der Theorie des Übergangszustandes und der Donorzahlen möglich ist. Hier steht die Fähigkeit der Lösungsmittel im Vordergrund, einen S<sub>N</sub>2-Übergangszustand zu stabilisieren. Die Elektronenpaar-Donor-Solventien DMF und DMSO sind in der Lage, durch Donor-Akzeptor Wechselwirkungen mit der Spezies im Übergangszustand die Aktivierungsenergie abzusenken, was zu einer schnelleren Kinetik führt. Die Donorzahlen für die drei verwendeten Lösungsmittel (11.9 (Acetonitril); 23.7 (DMF) und 29.8 (DMSO)) erklären die experimentell erhaltenen Bildungskinetiken. Aufgrund der drastischen Unterschiede der maximal erzielbaren Ausbeuten in den verschiedenen Lösungsmitteln wurden nur DMF und DMSO für die weitere Optimierung der RCA verwendet.

#### **Abhängigkeit der RCA an [<sup>18</sup>F]-5 bei Verwendung von 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat von der verwendeten Hilfsbase:**

Zur Synthese von [<sup>18</sup>F]-5 durch <sup>18</sup>F-Fluorethylierung von (S)-2-Hydroxy-4-{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure-methylester **7** mit 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat und 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan an der phenolischen Hydroxyfunktion ist die Verwendung einer Hilfsbase erforderlich. Diese führt durch die Bildung des Phenolats zu wesentlichen Erhöhung der Nucleophilie. Daher sollte die zum Zwecke der <sup>18</sup>F-Fluorethylierung geeignetste Base ermittelt werden. Dazu wurden alle Basen bei einer Temperatur von 140°C in DMSO äquimolar zum Markierungsvorläufer eingesetzt. Die hohe Temperatur wurde gewählt, da aus Vorversuchen bekannt war, dass in einem Temperaturbereich von 140°C- 160°C die höchsten radiochemischen Ausbeuten erzielt werden konnten.

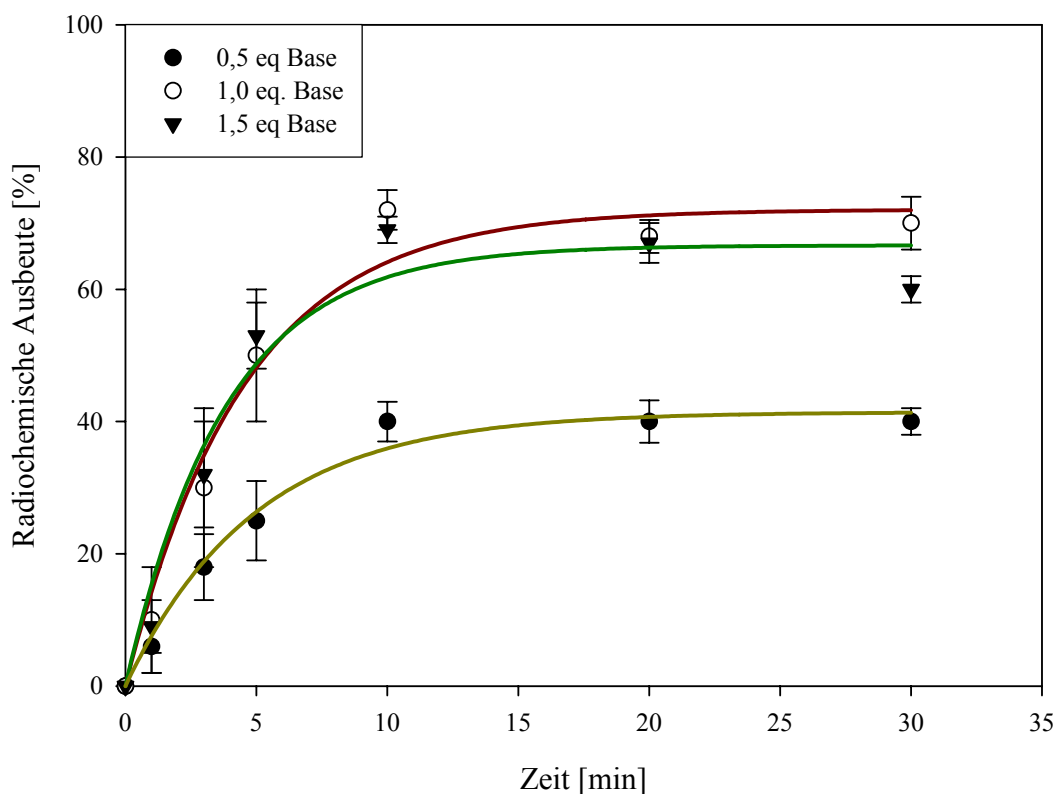


**Abb. 25:** Abhängigkeit der RCA an  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  von der verwendeten Base bei Verwendung von 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat (Temperatur = 140°C; 1 eq. Base, MVK = 10 mg/mL (22.8 mmol/L))

Die höchsten radiochemischen Ausbeuten von etwa 65 – 70% ergaben sich bei Verwendung sehr starker Basen wie 1 N LiOH und 1 N NaOH. Die geringen radiochemischen Ausbeuten von 20% bei der Verwendung von NaH ging mit der Bildung einer Vielzahl von radioaktiven und nicht-radioaktiven Nebenprodukten einher, so dass unter diesen Reaktionsbedingungen von einer Zersetzung sowohl des Markierungsvorläufer als auch des  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  ausgegangen werden muss. Die Verwendung der organischen Basen Ethyldiisopropylamin (DIPEA) und Pyridin lieferte nur geringe radiochemische Ausbeuten von maximal 7%. Offensichtlich reicht deren Basenstärke nicht aus, die phenolische Hydroxy-Funktion zu deprotonieren. Daher wurde im folgenden nur noch Natronlauge (1 N) als Hilfsbase verwendet.

### Abhängigkeit der RCA an $[^{18}\text{F}]\text{-5}$ bei Verwendung von 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat von der NaOH-Konzentration in DMSO:

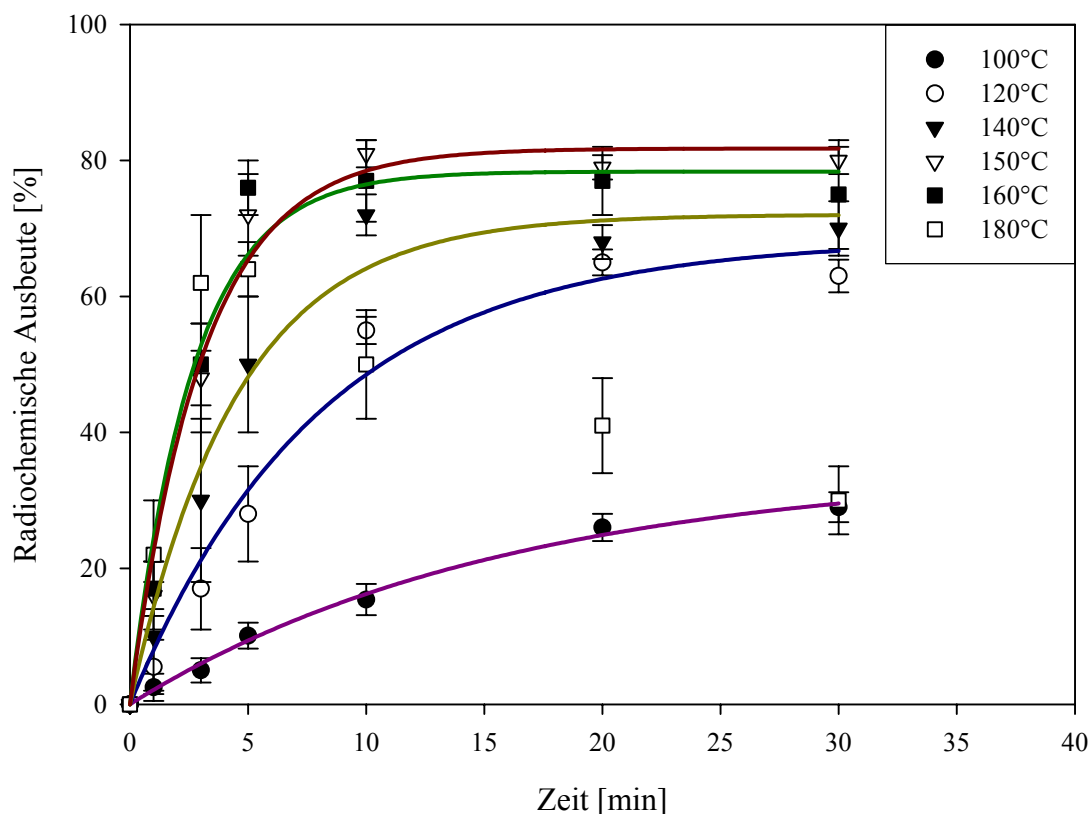
Zur Optimierung der Radiosynthese wurde ebenfalls die Menge an zugesetzter Base in DMSO variiert. Die höchsten radiochemischen Ausbeuten ließen sich bei einem Basenzusatz von 1.0 – 1.5 Äquivalenten 1 N Natronlauge erzielen. Bei höherem Basenzusatz kam es zu einer Zersetzung des gebildeten  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  und auch des 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylats, was ansatzweise auch schon an der geringeren RCA bei Verwendung von 1.5 Äquivalenten und einer Reaktionszeit von 30 Minuten erkennbar war.



**Abb. 26:** Abhängigkeit der RCA an  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  von der Hilfsbasenmenge bei Verwendung von 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat (Temperatur = 140°C; 1 N NaOH, MVK = 10 mg/mL (22.8 mmol/L))

### Abhängigkeit der RCA an [ $^{18}\text{F}$ ]-5 bei Verwendung von 2- $^{18}\text{F}$ Fluorethyltosylat von der Temperatur in DMSO:

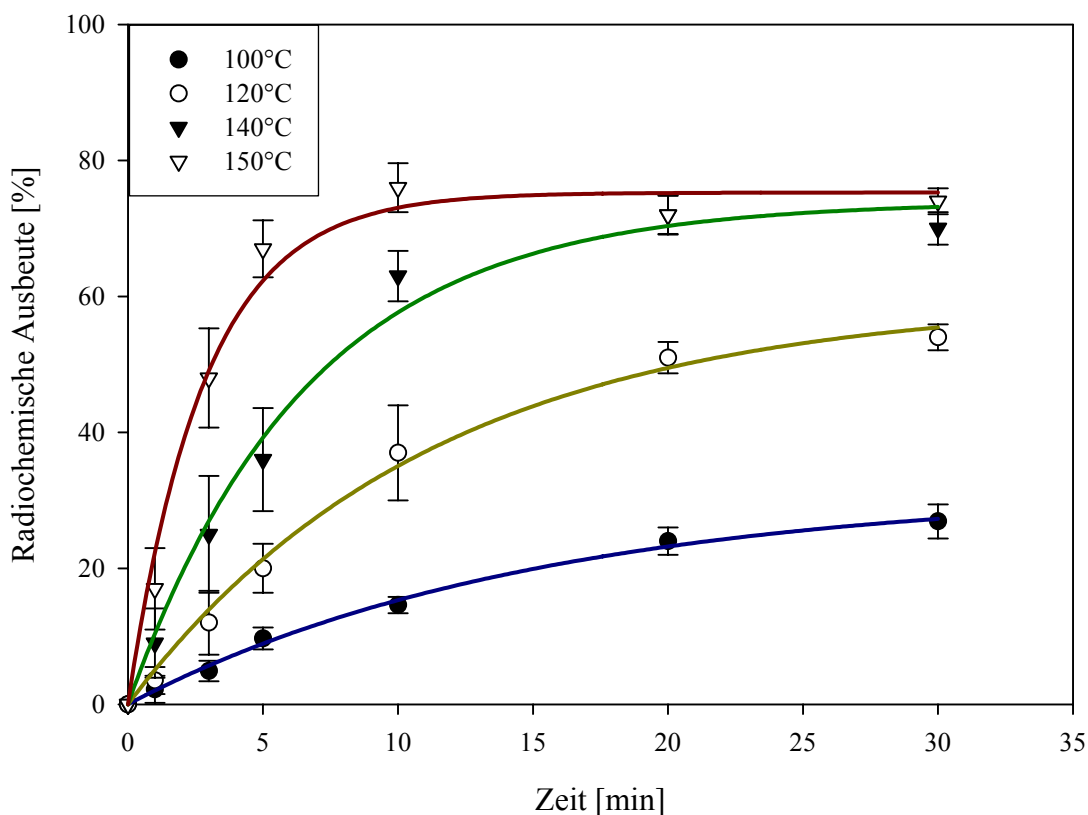
Bereits durch Vergleich der erzielten radiochemischen Ausbeuten in Acetonitril, DMF und DMSO bei Verwendung von 1 N NaOH als Hilfsbase ließ sich erkennen, dass ein Ausbeutemaximum bei 100°C noch nicht erreicht war. Daher wurden ausschließlich hohe Temperaturen untersucht.



**Abb. 27:** Abhängigkeit der RCA an [ $^{18}\text{F}$ ]-5 von der Temperatur bei Verwendung von 2- $^{18}\text{F}$ Fluorethyltosylat (Lösungsmittel DMSO; 1.0 eq. 1 N NaOH, MVK = 10 mg/mL (22.8 mmol/L))

Wie zu erwarten zeigten alle Kinetiken einen Verlauf pseudo-erster Ordnung. Das Ausbeutemaximum war 80% nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten bei einer Temperatur von 150°C. Erst bei einer Temperatur von 180°C ist eine signifikante Zersetzung des Produktes über HPLC und Dünnschichtchromatographie (DC) detektierbar. Im Temperaturbereich von 150 – 160°C haben Temperaturveränderungen offenbar – im Rahmen der experimentellen Schwankungen – keinen signifikanten Einfluss auf die radiochemische Ausbeute.

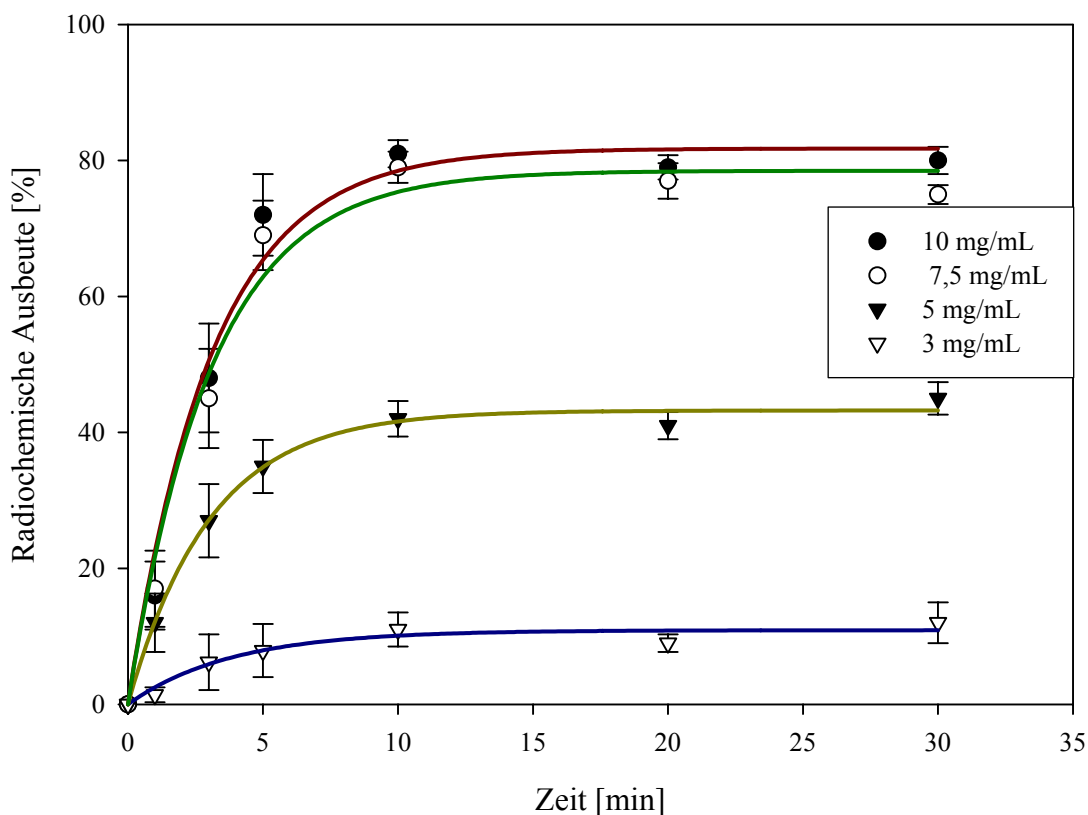
**Abhängigkeit der RCA an  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  bei Verwendung von 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorethyltosylat}$  von der Temperatur in DMF:**



**Abb. 28:** Abhängigkeit der RCA an  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  von der Temperatur bei der Verwendung von 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorethyltosylat}$  (Lösungsmittel DMF; 1.0 eq. 1 N NaOH, MVK = 10 mg/mL (22.8 mmol/L))

Im Lösungsmittel DMF zeigt sich der im wesentlichen gleiche Befund wie im Lösungsmittel DMSO. Die maximal erzielbare RCA lag bei 75% nach 10 Minuten bei einer Temperatur von 150°C. Da die Temperaturabhängigkeit der RCA im Temperaturbereich 140-150°C im Vergleich mit dem Lösungsmittel DMSO stärker ausgeprägt war, wurde für die Radiosynthesen im weiteren nur noch DMSO verwendet.

**Abhängigkeit der RCA an  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  bei Verwendung von 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat von der Markierungsvorläuferkonzentration:**

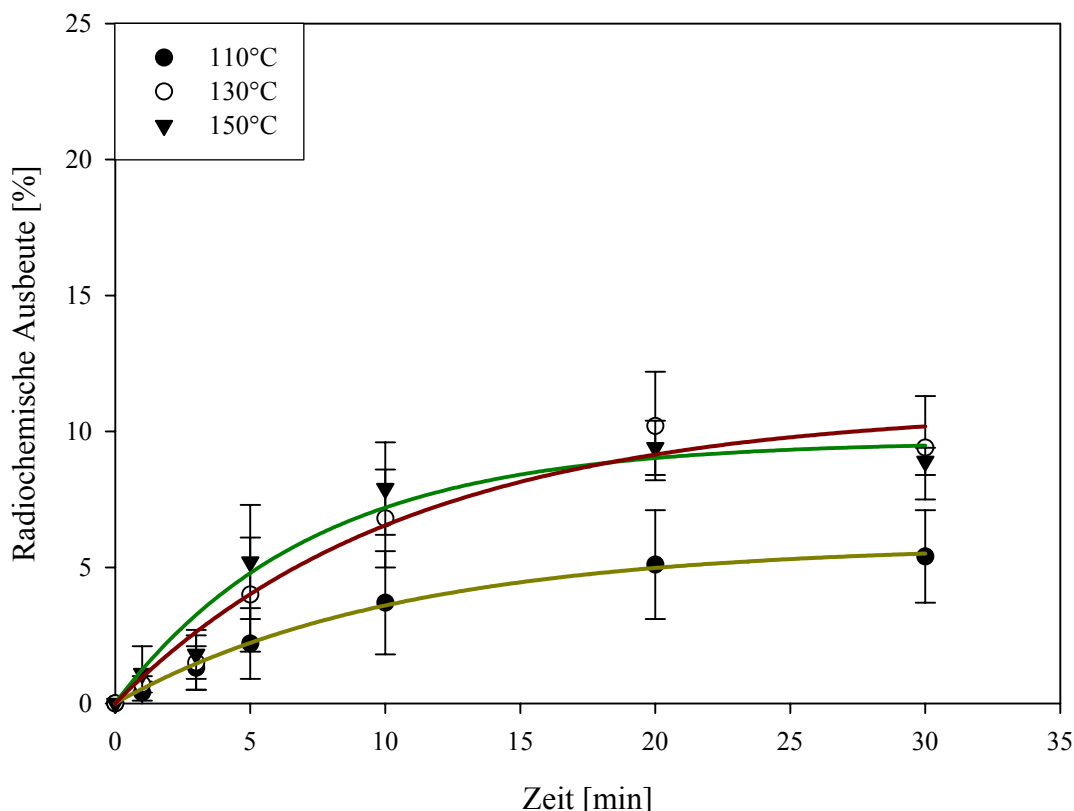


**Abb. 29:** Abhängigkeit der RCA an  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  von der MVK (6.8 mmol/L - 22.8 mmol/L) bei der Verwendung von 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat (Temperatur = 150°C; 1 eq. 1N NaOH, Lösungsmittel DMSO)

Abbildung 29 zeigt, dass die radiochemischen Ausbeuten im Bereich unter 5 mg/mL (11.4 mmol/L) drastisch verringert sind. Dies ist mit der Zersetzung des Markierungsvorläufers bei der gewählten Temperatur von 150°C zu erklären. Oberhalb einer Konzentration von etwa 7 mg/mL (16 mmol/mL) ließen sich stabile Ausbeuten zwischen 75 – 80% erreichen. Zwar führt die Verwendung von noch höheren Konzentrationen (22.8 mmol/L) zu einer weiteren leichten Erhöhung der RCA auf etwa 85%. Eine derart hohe Vorläuferkonzentration führt aber zu Schwierigkeiten bei der Abtrennung des Intermediates  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  mittels HPLC, so dass letztlich eine Markierungsvorläuferkonzentration von 7.0 – 7.5 mg/mL (16.0 mmol/L – 17.1 mmol/L) als optimal angesehen werden kann.

### Abhängigkeit der RCA an $[^{18}\text{F}]\text{-5}$ bei Verwendung von 1-Brom-2- $[^{18}\text{F}]\text{fluorethan}$ von der Temperatur in DMSO:

Für die Markierungsreaktionen mit 1-Brom-2- $[^{18}\text{F}]\text{fluorethan}$  wurden hinsichtlich der verwendeten Hilfsbase und der Hilfsbasenkonzentration die aus Abschnitt 3.2.4.1 optimierten Parameter übernommen.



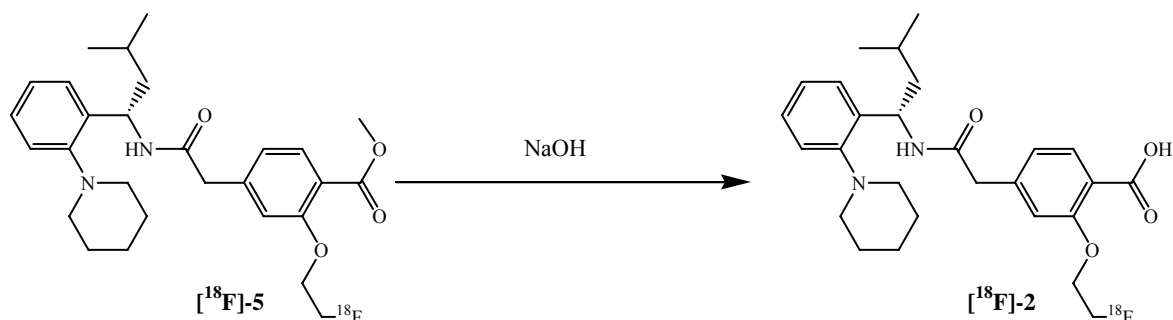
**Abb. 30:** Abhängigkeit der RCA an  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  von der Temperatur bei Verwendung von 1-Brom-2- $[^{18}\text{F}]\text{fluorethan}$  (Lösungsmittel DMSO; 1.0 eq. 1 N NaOH, MVK = 10 mg/mL (22.8 mmol/L))

Vergleicht man die maximal erzielbare radiochemische Ausbeute bei der Verwendung von 1-Brom-2- $[^{18}\text{F}]\text{fluorethan}$  mit der Ausbeute bei Einsatz von 2- $[^{18}\text{F}]\text{fluorethyltosylat}$  (vergleiche 3.2.4.1) so zeigt sich ein signifikanter Unterschied. Bei einer Temperatur von 130°C ließ sich bei Verwendung von 1-Brom-2- $[^{18}\text{F}]\text{fluorethan}$  nur eine maximale Ausbeute von 10% erreichen.

Dieses Ergebnis lässt sich anhand der unterschiedlichen Abgangsgruppenqualität von Brom und Tosylat erklären. So ist die Gleichgewichtskonstante für die Solvolyse eines p-Toluolsulfonates im Vergleich zu der analogen Bromverbindung um drei Größenordnungen höher, woraus eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit resultiert (Carey, 1995; Noyce, 1992).

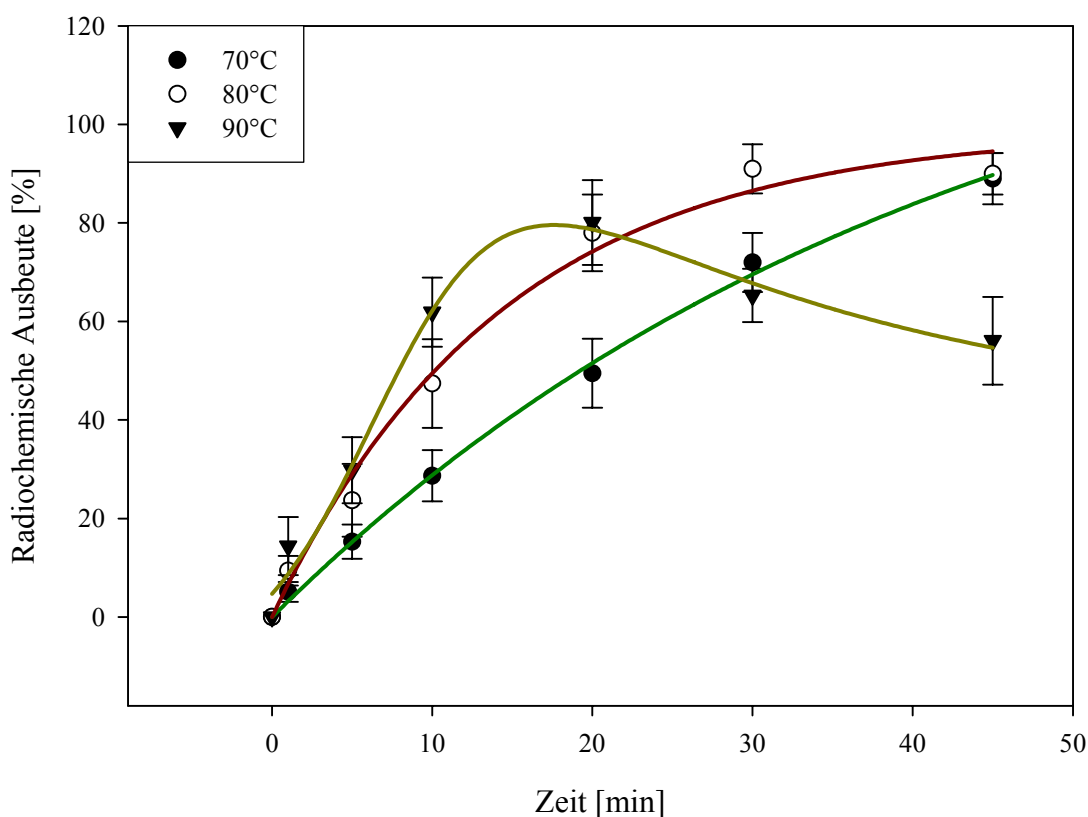


### 3.2.4.2 Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]-2 durch Verseifung von [ $^{18}\text{F}$ ]-5: Optimierte Parameter der Methylester-Spaltung

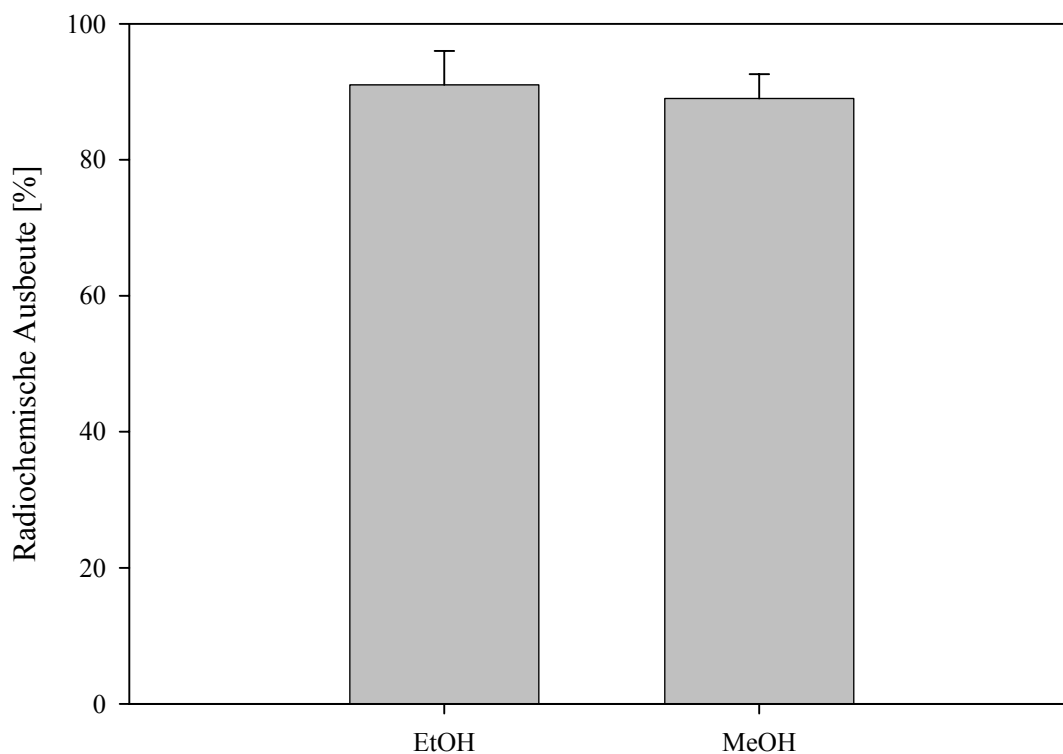


**Abb. 31:** Darstellung der Zielverbindung [ $^{18}\text{F}$ ]-2 aus [ $^{18}\text{F}$ ]-5 durch Verseifung des Methylesters mit 1 N NaOH

Zur Synthese des Endproduktes [ $^{18}\text{F}$ ]-2 wurde das erhaltene Intermediat [ $^{18}\text{F}$ ]-5 mittels HPLC aufgereinigt und durch Festphasenextraktion (RP-18) isoliert (vergleiche Abschnitt 5.3.1.1). Von der verwendeten Festphasen-Kartusche wurde [ $^{18}\text{F}$ ]-5 mit 1.5 mL vorgewärmten Methanol bzw. Ethanol eluiert.



**Abb. 32:** Abhängigkeit der RCA an [ $^{18}\text{F}$ ]-2 durch basische Hydrolyse von [ $^{18}\text{F}$ ]-5 von der Temperatur (Lösungsmittel Ethanol (1.5 mL); 100  $\mu\text{L}$  1 N NaOH)



**Abb. 33:** Abhängigkeit der RCA an  $[^{18}\text{F}]\text{-2}$  durch basische Hydrolyse von  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  vom verwendeten Lösungsmittel (Temperatur  $80^\circ\text{C}$ ,  $100\ \mu\text{L}$   $1\ \text{N}$   $\text{NaOH}$ , Reaktionszeit 35 Minuten)

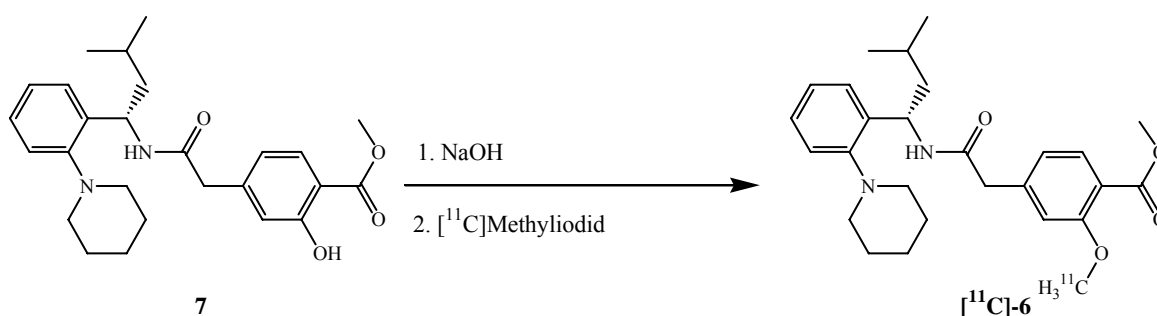
Mit dieser Lösung wurden nach Zugabe von  $100\ \mu\text{L}$   $1\ \text{N}$   $\text{NaOH}$  die optimalen Reaktionsparameter zur Entschützung des Methylester entwickelt. Dazu wurden die Reaktionstemperatur, das Lösungsmittel und die Reaktionszeit variiert. In den verwendeten Lösungsmitteln Methanol und Ethanol ließen sich bei einer Temperatur von  $80^\circ\text{C}$  keine signifikanten Unterschiede in der Ausbeute nach einer Reaktionszeit von 35 Minuten feststellen (Abb. 33).

Allerdings zeigte sich, wie aus Abbildung 32 ersichtlich, oberhalb von  $80^\circ\text{C}$  nach einer Reaktionszeit von 20 min eine Verringerung der RCA, die auf eine Zersetzung des Produktes zurückzuführen war. Eine fast vollständige Entschützung des Intermediates  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$  bei  $80^\circ\text{C}$  konnte erst nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten erreicht werden. Da es auch bei dieser Temperatur schon zu einer – allerdings nur geringen – Zersetzung des Produktes kam, musste das Endprodukt  $[^{18}\text{F}]\text{-2}$  nochmals mittels HPLC gereinigt werden, um hohe radiochemische Reinheiten zu gewährleisten.

### 3.3 Radiosynthesen mit [ $^{11}\text{C}$ ]Kohlenstoff

Zur radioaktiven Markierung mit [ $^{11}\text{C}$ ]Kohlenstoff wurde [ $^{11}\text{C}$ ]Methyliodid verwendet, das in einem automatischen Synthesemodul (vergleiche Abschnitt 5.3.2.1) dargestellt wurde.

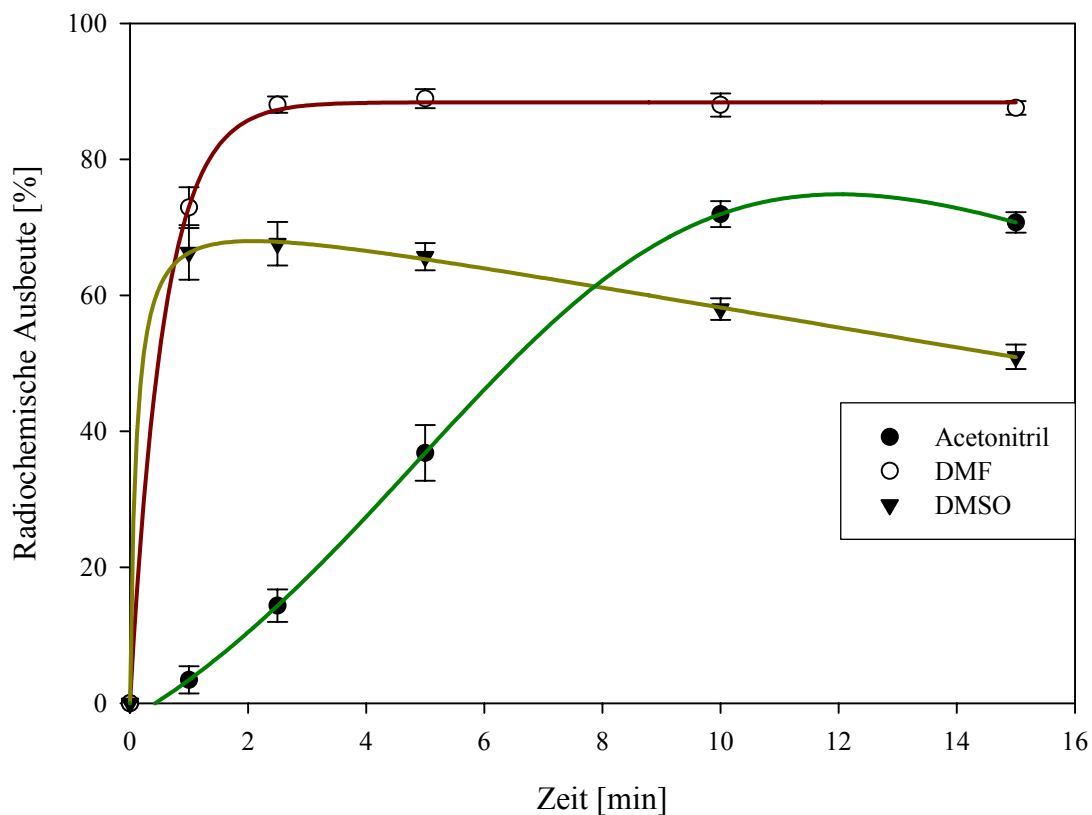
#### 3.3.1 Darstellung des Intermediates (S)-2-(2-[ $^{11}\text{C}$ ]Methoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester [ $^{11}\text{C}$ ]-6



**Abb. 34:**  $^{11}\text{C}$ -Methylierung von (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** mit [ $^{11}\text{C}$ ]Methyliodid zu [ $^{11}\text{C}$ ]-**6**

Als Markierungsvorläufer zur radioaktiven Markierung mit [ $^{11}\text{C}$ ]Kohlenstoff wurde **7** verwendet. Da es sich bei der Reaktion mit [ $^{11}\text{C}$ ]Methyliodid ebenso wie bei Verwendung von 2-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethyltosylat um eine Alkylierungsreaktion handelt, konnten teilweise die optimierten Reaktionsparameter aus Abschnitt 3.2.4.1 verwendet werden. Daher wurde auf die Variation der Hilfsbase verzichtet und ausschließlich die Auswirkungen der Reaktionsparameter: Temperatur, Reaktionszeit, Lösungsmittel, und Markierungsvorläuferkonzentration untersucht.

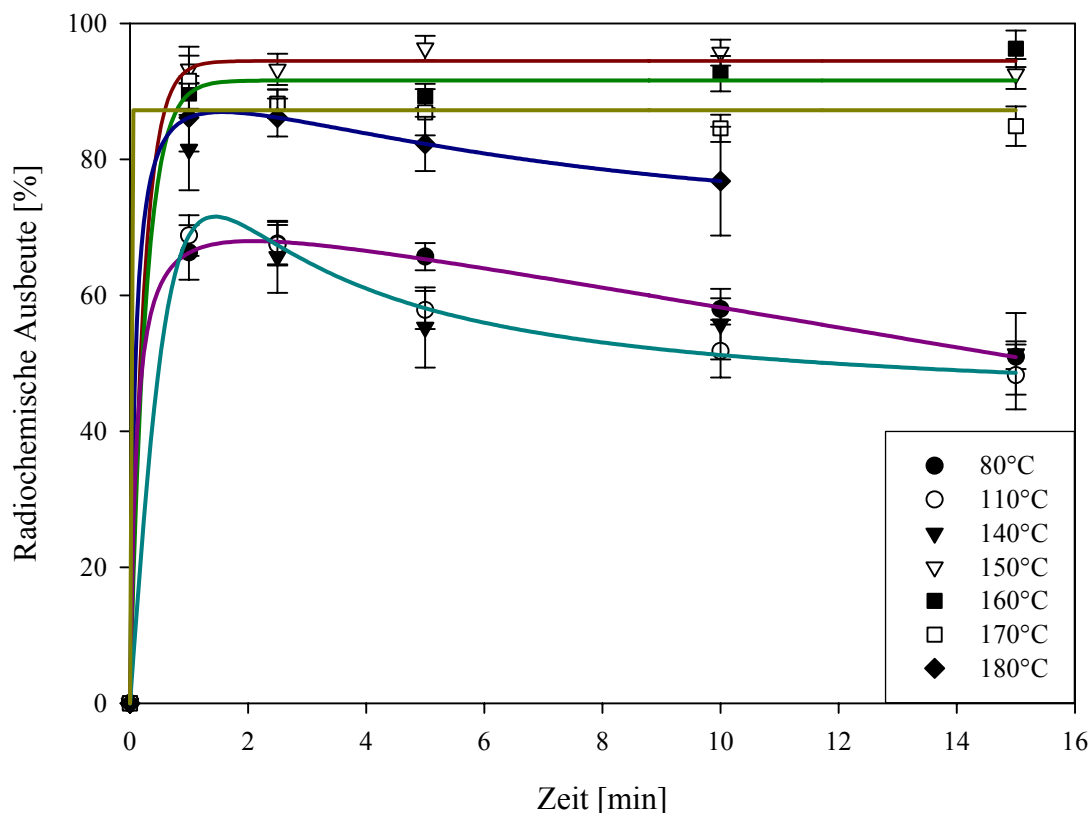
### Abhängigkeit der RCA an $[^{11}\text{C}]\text{-6}$ vom Solvens:



**Abb. 35:** Abhängigkeit der RCA an  $[^{11}\text{C}]\text{-6}$  vom verwendeten Lösungsmittel (Temperatur =  $80^\circ\text{C}$ ; 1 eq. 1N NaOH, MVK = 10 mg/mL (22.8 mmol/L))

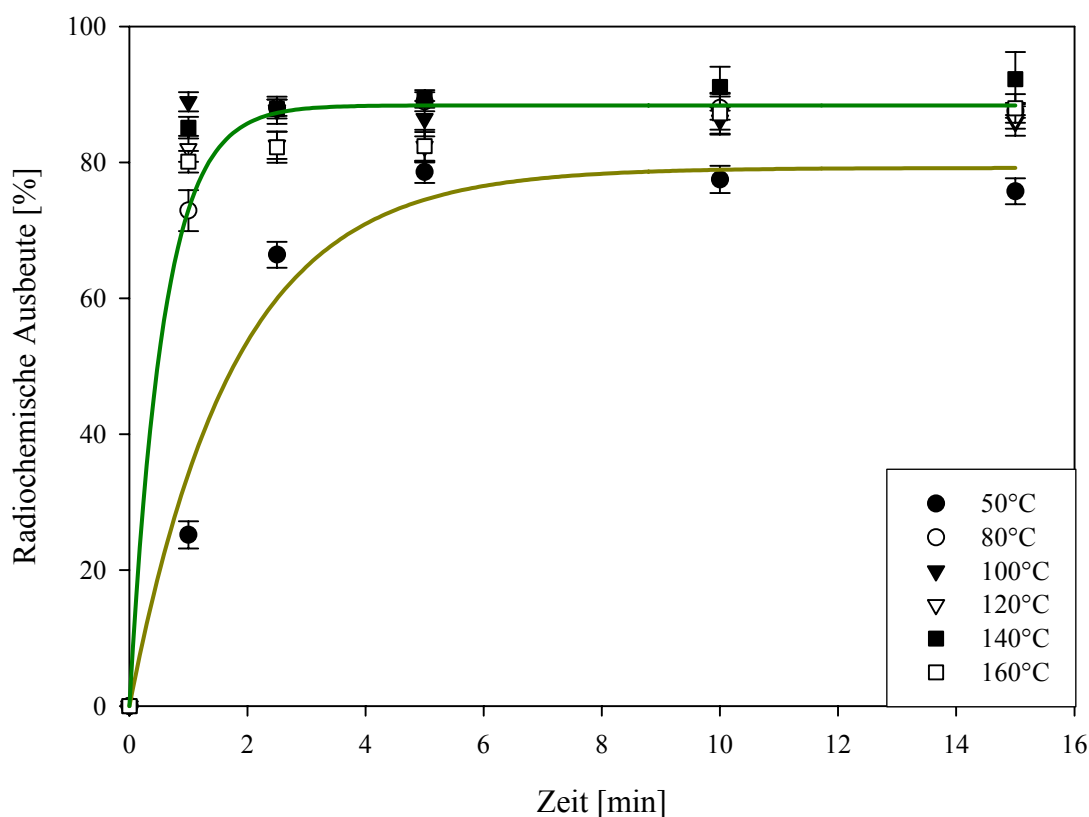
Im wesentlichen ergibt sich der gleiche Effekt wie schon bei der Synthese des  $[^{18}\text{F}]\text{-5}$ , jedoch stellt sich schon bei einer verhältnismäßig niedrigen Reaktionstemperatur von  $80^\circ\text{C}$  eine im Vergleich zur  $^{18}\text{F}$ -Fluorethylierung wesentlich höhere Ausbeute der  $^{11}\text{C}$ -Methylierung von 85% in DMF ein.

### Abhängigkeit der RCA an [<sup>18</sup>F]-5 von der Temperatur in DMSO und DMF:



**Abb. 36:** Abhängigkeit der RCA an [<sup>11</sup>C]-6 von der Temperatur im Lösungsmittel DMSO (1.0 eq. 1 N NaOH, MVK = 10 mg/mL (22.8 mmol/L))

Für beide verwendeten Lösungsmittel DMF und DMSO war die maximal erzielbare radiochemische Ausbeute bei allen Temperaturen (mit Ausnahme des 50°C-Wertes in DMF) bereits nach 2.5 Minuten Reaktionszeit erreicht. Die maximale radiochemische Ausbeute in DMSO waren 92% bei einer Temperatur von 150°C und 89% bei 100°C in DMF (Abb. 36 und Abb. 37). Für Reaktionszeiten von mehr als 10 Minuten im Lösungsmittel DMSO ergab sich in der Regel eine Verschlechterung der RCA, die auf eine Zersetzung des Intermediats [<sup>11</sup>C]-6 zurückzuführen ist. Dieser Effekt war in der gleichen Ausprägung nicht im Lösungsmittel DMF beobachtbar, hier zeigten die Kinetiken einen Verlauf pseudo-erster Ordnung (Abb. 37).



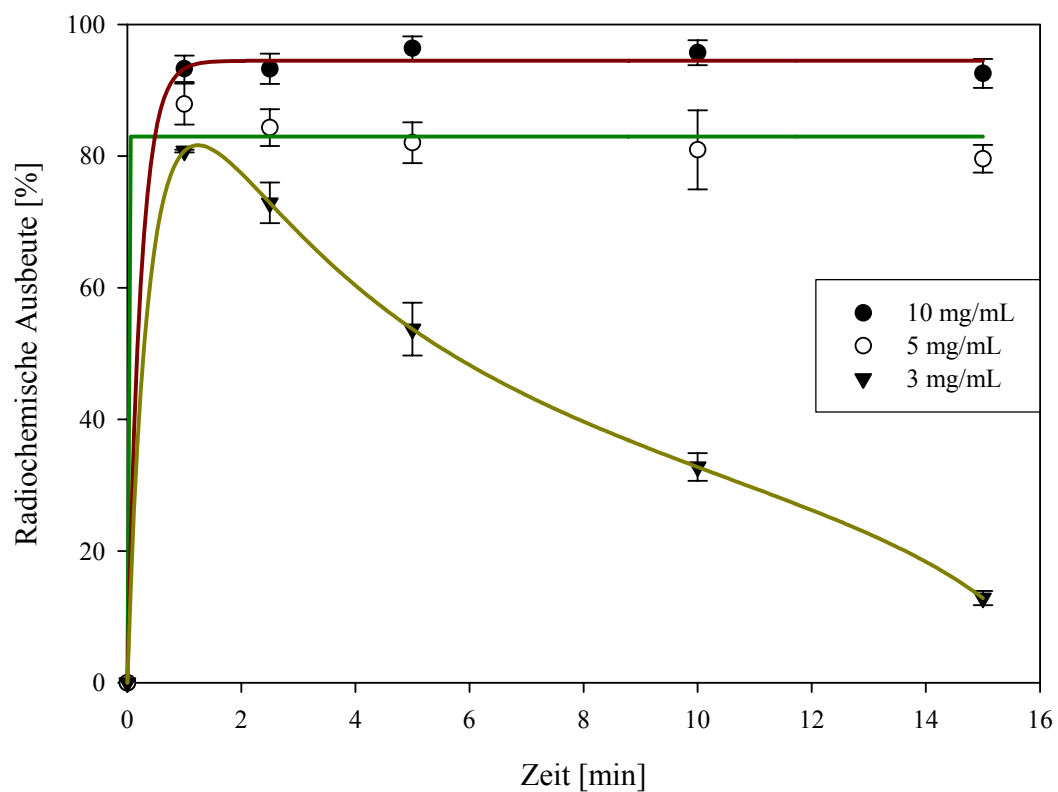
**Abb. 37:** Abhängigkeit RCA an  $[^{11}\text{C}]\text{-6}$  von der Temperatur im Lösungsmittel DMF (1.0 eq. 1 N NaOH, MVK = 10 mg/mL (22.8 mmol/L))

#### Abhängigkeit der RCA an $[^{11}\text{C}]\text{-6}$ von der Markierungsvorläuferkonzentration:

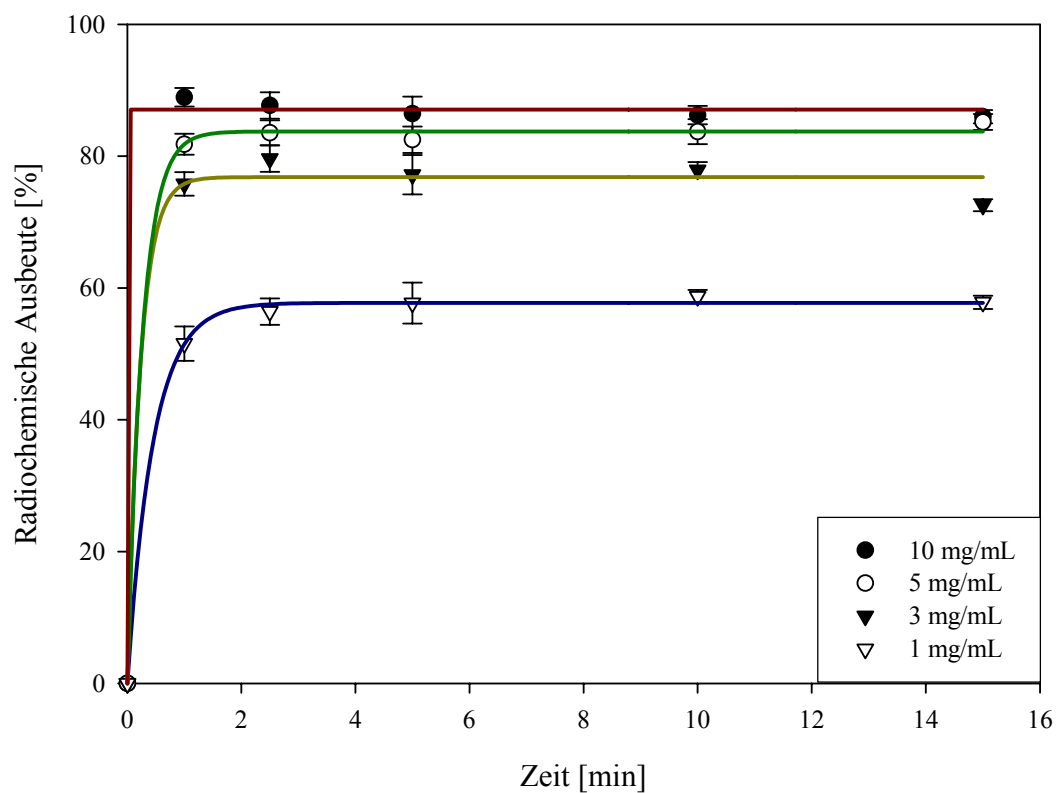
Da sich in beiden getesteten Lösungsmitteln DMF und DMSO vergleichbare Ausbeuten des Intermediats  $[^{11}\text{C}]\text{-6}$  erzielen ließen, wurde auch zur Ermittlung der optimalen Markierungsvorläuferkonzentration in beiden Lösungsmitteln gearbeitet. Es wurden die für beide Lösungsmittel als optimal ermittelten Reaktionstemperaturen gewählt: Für DMSO 150°C, für DMF 100°C.

Im Lösungsmittel DMSO bei einer Temperatur von 150°C zeigte sich eine wesentlich stärkere Abhängigkeit der RCA von der Markierungsvorläuferkonzentration. Schon bei einer Konzentration von 3 mg/mL zeigten sich nach 2 min Reaktionszeit Zersetzungsreaktionen, sowohl des Markierungsvorläufers **7** als auch des gebildeten Intermediates  $[^{11}\text{C}]\text{-6}$ .

Im Vergleich dazu waren bei Verwendung von DMF auch bei einer Markierungsvorläuferkonzentration von unter 3 mg/mL (6.8 mmol/mL) keine Zersetzungseffekte des  $[^{11}\text{C}]\text{-6}$  erkennbar. Eine signifikante Verschlechterung der maximal erzielbaren RCA zeigte sich in diesem Solvens erst bei einer Markierungsvorläuferkonzentration von 1 mg/mL (Abb. 39).

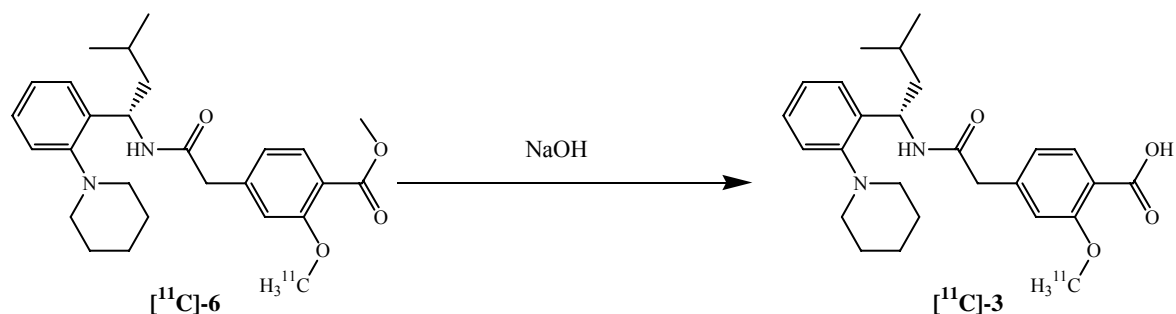


**Abb. 38:** Abhängigkeit der RCA an  $[^{11}\text{C}]\text{-6}$  im Lösungsmittel DMSO von der MVK (MVK = 6.8 mmol/L - 22.8 mmol/L, 1.0 eq. 1 N NaOH, Temperatur = 150°C)



**Abb. 39:** Abhängigkeit der RCA an  $[^{11}\text{C}]\text{-6}$  im Lösungsmittel DMF von der MVK (MVK = 2.3 mmol/L - 22.8 mmol/L, 1.0 eq. 1 N NaOH, Temperatur = 100°C)

### 3.3.2 Darstellung von (S)-2-[<sup>11</sup>C]Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>11</sup>C]-3 durch basische Verseifung von [<sup>11</sup>C]-6



**Abb. 40:** Darstellung der Zielverbindung (S)-2-[<sup>11</sup>C]Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>11</sup>C]-3 aus [<sup>11</sup>C]-6

Die Spaltung des Methylesters musste aufgrund der geringen Halbwertszeit des [<sup>11</sup>C]Kohlenstoff von 20.3 Minuten im Vergleich zu den 35 Minuten, die zur Spaltung von [<sup>18</sup>F]-5 zu [<sup>18</sup>F]-2 notwendig waren, verkürzt werden. Daher wurde das radioaktive Intermediat [<sup>11</sup>C]-6 zur Isolierung des Endproduktes mittels HPLC aufgereinigt und durch Festphasenextraktion isoliert (analog Abschnitt 3.2.4.2; vergleiche Abschnitt 5.3.1.1). Von der verwendeten Kartusche wurde [<sup>11</sup>C]-6 mit 1.5 mL vorgewärmten Ethanol eluiert, mit 100 µL 1 N NaOH versetzt und 10 Minuten bei 100°C in einem verschlossenen Reaktionsgefäß gerührt.

Interessanterweise zeigte sich einerseits eine vollständige Entschützung des radioaktiven Intermediates [<sup>11</sup>C]-6, andererseits aber auch eine sehr hohe radiochemische Reinheit des erhaltenen Zielproduktes [<sup>11</sup>C]-3 von >98%, so dass nach Neutralisation der Reaktionslösung mit HCl auf eine weitere Aufreinigung mittels HPLC verzichtet werden konnte. Das erhaltene Produkt wurde durch Festphasenextraktion gereinigt und von dieser Kartusche mit 1.5 mL vorgewärmten Ethanol eluiert. Offensichtlich hat die Anwesenheit von Fluor einen klaren Einfluss auf die Stabilität der Verbindung.



## 4            **Evaluierungen**

### 4.1           **Bestimmung der Lipophilie**

Ein wichtiger Faktor zur Abschätzung der pharmakologischen Wirkung eines potentiellen Pharmakons ist seine Fähigkeit an den Wirkort zu gelangen und dort mit den Rezeptoren zu wechselwirken. Eine wichtige Rolle hierbei spielt die Lipophilie dieser Substanz, die Einfluss auf die Pharmakologie des Wirkstoffes hat. Hinsichtlich der Pharmakokinetik hat die Lipophilie u.a. Einfluss auf die Plasma-Protein-Bindung und auch auf den Mechanismus der Biotransformation. Gerade diese beiden Eigenschaften können von entscheidender Wichtigkeit für die Entwicklung eines PET-Tracers zur Visualisierung des Pankreas sein, da sowohl eine zu hohe Plasma-Protein-Bindung, als auch eine zu starke Akkumulation von Radioaktivität in der Leber die Visualisierung des Pankreas erschweren oder sogar verhindern können. Hier kann ein Vergleich der Lipophilie des Original-Pharmakons und des synthetisierten Analogtracers für die PET einen Hinweis auf eventuelle Veränderungen im Wechselwirkungsverhalten geben.

Die Bestimmung der Lipophilie einer chemischen Substanz erfolgt durch die Ermittlung ihres logP-Wertes. Beim logP handelt es sich um den dekadischen Logarithmus der Verteilung einer Substanz in einem definierten Octanol/Wasser-System.

Für die mathematische Definition des logP gilt:

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

Zur besseren Unterscheidung, ob bzw. in welchem geladenen Zustand sich ein Molekül bei der Ermittlung des Verteilungskoeffizienten befunden hat, wird oft die Bezeichnung logP<sub>n</sub> für die Lipophilie des ungeladenen Moleküls und logP<sub>i</sub> für die Lipophilie einer geladenen Spezies verwendet.

Da für die Wechselwirkungen eines Moleküls in einem lebenden Organismus nicht die Verteilungskoeffizienten einer Molekülspezies, sondern die Verteilung aller bei dem physiologischen pH-Wert von 7.4 vorliegenden Molekülspezies entscheidend ist, wurde anstatt des logP-Wertes der wesentlich aussagekräftigere logD-Wert eingeführt.

Beim logD-Wert wird der Verteilungskoeffizient eines Moleküls bei einem bestimmten pH-Wert erfasst. Da bei ionisierbaren Molekülen die vorliegenden – geladenen oder ungeladenen – Ladungszustände eines Moleküls stark vom pH-Wert abhängig sind, stellt der logD-Wert bei einem pH-Wert von 7.4 einen für die Ermittlung der oben genannten Wechselwirkungen des Moleküls wesentlich aussagekräftigeren Wert dar. Der logP-Wert ionisierbarer

Verbindungen ist aufgrund der immer im Gleichgewicht vorhandenen anderen Molekül-spezies ohnehin nur auf rechnerischem Wege zu erhalten. Für die mathematische Definition des logD gilt:

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

In der Literatur sind drei verschiedene experimentelle Verfahren beschrieben, die Lipophilie einer chemischen Verbindung zu ermitteln: Die HPLC-Methode, die Scheidetrichtermethode und die Titrationsmethode. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die HPLC-Methode und die Scheidetrichtermethode zur Bestimmung der Lipophilien verwendet.

### I. HPLC-Methode (Eadsforth, 1983, 1986)

Werden chemische Substanzen über eine Reverse Phase-HPLC eluiert, so bewegen diese sich unter Wechselwirkung mit der stationären Phase in der mobilen Phase entlang der HPLC-Säule. Die Retentionszeiten der einzelnen Substanzen sind daher vom Verteilungskoeffizienten Eluens/stationäre Phase abhängig, wobei bei der Verwendung einer RP-Phase hydrophile Substanzen zuerst und lipophile Substanzen zuletzt eluiert werden. Dieser Sachverhalt ermöglicht es, mathematische Beziehungen zwischen der Retentionszeit auf einer RP-HPLC-Säule und dem Verteilungskoeffizienten in einem Octanol/Wasser-System herzustellen. Der Verteilungskoeffizient lässt sich durch die Ermittlung eines Kapazitätsfaktors  $k$  bestimmen, wobei gilt:

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

Bei der praktischen Durchführung wurden von Substanzen mit bekanntem logP die Retentionszeiten ermittelt. Durch Verwendung einer sehr hydrophilen Substanz wurde die Totzeit  $t_0$  bestimmt und aus diesen Werten die Kapazitäten berechnet. Durch Auftragung von logk gegen logP mit anschließender linearer Regression lässt sich eine Eichgerade erstellen.

Die notwendige Kalibrierung und die Untersuchung der Lipophilien der Referenzverbindungen erfolgte mit dem in Abschnitt 5.1 beschriebenen HPLC-System A mit einer analytischen RP-Säule (LiChrospher RP18-EC, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm, Eluens: Sörensen-Puffer (pH = 7.4)). Zur Bestimmung der Retentionszeiten der Substanzen wurde ein aus 3 Einzelmessungen gemittelter Wert verwendet. Da zur Eichung nur Substanzen verwendet wurden, die bei pH = 7.4 praktisch undissoziiert vorliegen, gilt:  $\log P = \log D_{7.4}$ .

Als Eichsubstanzen wurden Benzaldehyd, Anisol, Toluol, 4-Bromanisol, 4-Iodanisol und Ascorbinsäure zur Bestimmung der Totzeit verwendet. Daraus ließen sich die in Tabelle 5 zusammengestellten Kapazitäten ermitteln. Die lineare Regression ergab:  $\log P = 2.465 \log k + 1.727$ ;  $r = 0.987$ .

**Tabelle 5:** Verwendete Eichsubstanzen zur Bestimmung der Kalibriergeraden

Eichsubstanz	LogP	t <sub>r</sub> [min]	logk
Benzaldehyd	1.48	3.35	-0.1264
Anisol	2.11	4.93	0.1968
Toluol	2.73	7.37	0.4538
4-Bromanisol	3.05	7.93	0.4967
4-Iodanisol	3.24	9.42	0.5924
Ascorbinsäure (t <sub>0</sub> )	-1.67	1.92	————

Durch Bestimmung der Retentionszeiten der Referenzsubstanz (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **2** ließ sich mit Hilfe einer Kalibriergeraden die Lipophilie des potentiellen PET-Tracers 2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>18</sup>F]-**2** zu  $\log D_{7,4} = 2.39 \pm 0.09$ , der des (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **3** zu  $2.15 \pm 0.11$  ermitteln (Tabelle 6).

## II. Scheidetrichtermethode

Zur Bestimmung der Lipophilie mittels Scheidetrichtermethode werden die zu testenden Substanzen in ein Zweiphasengemisch aus Octanol und Wasser überführt und beide Phasen durchmischt, um die Einstellung des Verteilungsgleichgewichts zu gewährleisten. Die beiden Phasen werden schließlich getrennt und jeweils auf ihren Gehalt an der Testsubstanz untersucht.

Im Falle radioaktiv markierter Substanzen kann die Auswertung der Verteilung elegant durch Quantifizierung und Vergleich der in den beiden Phasen vorhandenen Radioaktivität erfolgen. Durch Anwendung dieses Verfahrens wurde die Lipophilie von (S)-2-[<sup>11</sup>C]Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>11</sup>C]-**3** bestimmt. Hierzu wurde (S)-2-[<sup>11</sup>C]Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>11</sup>C]-**3** isoliert, in 1 mL Ethanol (siehe Abschnitt 5.3.1.1)

zunächst im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Dann wurde ein Gemisch aus 500  $\mu\text{L}$  Octanol (mit Wasser gesättigt) und 500  $\mu\text{L}$  Phosphatpuffer ( $\text{pH} = 7.4$ ; mit Octanol gesättigt) zugegeben. Das Gemisch wurde dann 5 Minuten durchmischt und anschließend die Phasen getrennt. Dann wurde aus den Phasen 5  $\mu\text{L}$  Aliquots entnommen und deren Radioaktivität in einem  $\gamma$ -Counter bestimmt.

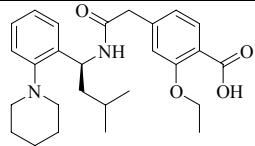
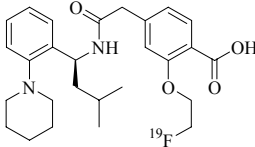
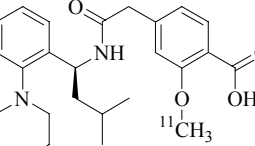
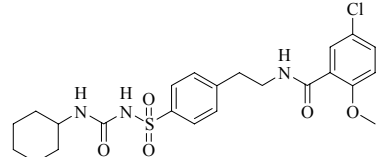
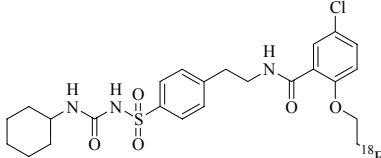
Aus den so erhaltenen Werten ergibt sich der  $\log D_{7.4}$  von (S)-2-[ $^{11}\text{C}$ ]Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure [ $^{11}\text{C}$ ]-**3** zu  $\log D = 1.85 \pm 0.07$ .

Tabelle 6 fasst die erhaltenen  $\log D$ -Werte zusammen. Zum Vergleich sind die Daten des Glibenclamids und seines fluorierten Derivates angegeben. Die Auswertung der ermittelten  $\log D_{7.4}$ -Werte von (S)-2-[ $^{11}\text{C}$ ]Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure [ $^{11}\text{C}$ ]-**3** bzw. (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure **3** und (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure **2** im Vergleich mit dem  $\log D_{7.4}$  – Wert des originalen Repaglinids **1** zeigt für den Fall des fluorierten Repaglinid-Derivates einen nur leicht veränderten Wert. Die Substanz ist etwas hydrophiler als Repaglinid **1**, was durch die Einführung des Fluors zu erklären ist. Die Verkürzung der Seitenkette des original Repaglinids **1** zum Methoxy-desethoxy-Repaglinid **3** führt zu einem nochmals leicht verringerten  $\log D$ -Wert.

Allerdings zeigt das methylierte Repaglinid-Derivat **3** bei der Bestimmung der Lipophilie mittels Scheidetrichtermethode einen wesentlich hydrophileren Charakter (Tabelle 6). Dies muss durch die Eigenschaften der unterschiedlichen Bestimmungsmethoden erklärt werden. Da die Standardabweichung der zur Bestimmung durchgeführten Experimente nur bei  $1.85 \pm 0.07$  (bzw.  $2.15 \pm 0.11$ ) liegt muss ein systematischer Fehler, möglicherweise durch eine unvollständige Phasentrennung – die gerade bei betragsmäßig hohen tatsächlichen  $\log D$ -Werten einen erheblichen Einfluss auf den experimentell bestimmten  $\log D$ -Wert hat – vorgelegen haben.

Im Vergleich zu den Glibenclamid-Derivaten zeigt sich insgesamt ein etwas lipophilerer Charakter der Repaglinid-Derivate.

**Tabelle 6:** Lipophiliewerte ausgewählter Verbindungen im Vergleich

Name	Strukturformel	logD <sub>7.4</sub>
Repaglinid <b>1</b>		2.54 <sup>a</sup> ± 0.15
[ <sup>18</sup> F]Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid <b>2</b>		2.39 <sup>a</sup> ± 0.09
[ <sup>11</sup> C]Methoxy-desethoxy-Repaglinid <b>3</b>		1.85 <sup>b</sup> ± 0.07; 2.15 <sup>a</sup> ± 0.11
Glibenclamid		1.74 <sup>a</sup> ± 0.14
[ <sup>18</sup> F]Glibenclamid		1.52 <sup>b</sup> ± 0.05
a HPLC-Methode b Scheidetrichtermethode		

## 4.2 *In vitro*-Evaluierungen

### 4.2.1 Insulinsekretionstest<sup>1</sup>

Zur Überprüfung der *in vitro*-Funktion der synthetisierten Repaglinid-Derivate (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) **2** und (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) **3** wurden Insulinsekretionstests an isolierten Ratten-Inselzellen mittels Insulin-ELISAs durchgeführt. Die Isolation und Aufreinigung der adulten Ratteninseln erfolgte nach einem im Labor etablierten Protokoll (Schneider, 2003). Die Vitalität der Inseln wurde mit der dualen Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid-Färbemethode bestimmt (London, 1990; Gröhn 1994).

Zur Messung der Insulinsekretionskapazität, d.h. der Funktionalität der Inseln, wurde ein statischer Glukosestimulationstest durchgeführt. Die Proben der Stimulationstests wurden dann mit dem High Range Rat Insulin Elisa Kit (Fa. Mercodia, Uppsala, Schweden) auf ihren Insulingehalt untersucht. 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 Stunden umgesetzt wurden. Der Stimulationsindex wird als Quotient aus der stimulierten Insulinsekretion zur basalen, nicht stimulierten Insulinfreisetzung bestimmt ([stimul. Insulinsekretion] / [basale Insulinfreisetzung] = [Stim-Index]).

Dieser Stimulationsindex ist ein Maß der Funktion, d.h. der spezifischen, physiologischen Leistungsfähigkeit der untersuchten Inseln (Schneider, Feilen, 2003).

---

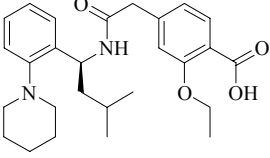
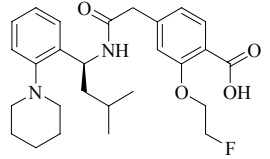
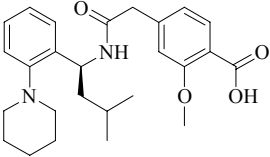
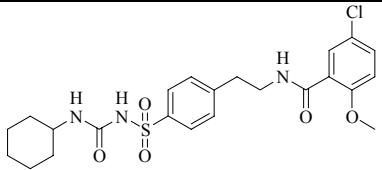
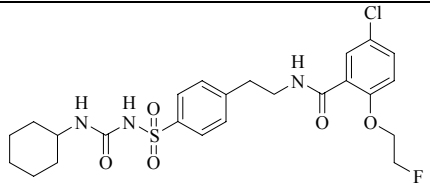
<sup>1</sup> Die Insulinsekretionstests wurden von Diplom-Biologe Peter Feilen, 1. Medizinische Klinik, Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen des Universitätsklinikums Mainz durchgeführt.

**Tabelle 7:** Experimentelle Daten der Insulinsekretionsbestimmungen von Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid **2** und Methoxy-desethoxy-Repaglinid **3** im Vergleich mit Repaglinid **1**

	<b>Insulin- freisetzung<sup>a</sup></b> [ng/Islet/1h]	<b>Insulin- freisetzung<sup>b</sup></b> [ng/Islet/1h]	<b>Insulin- freisetzung<sup>c</sup></b> [ng/Islet/1h]	<b>Stimulations- -index</b> [%]	<b>Relativer Stimulations- index [%]</b>
Positiv-Kontrolle	0.9 ± 0.2	-	3.7 ± 0.6	4.2 ± 0.5	100
Repaglinid <b>1</b> , n = 8	0.7 ± 0.2	1.6 ± 0.2	-	2.4 ± 0.4	59
Fluorethoxy- desethoxy-Repaglinid <b>2</b> , n = 8	0.8 ± 0.2	1.8 ± 0.4	-	2.3 ± 0.1	54
<sup>a</sup> 1 g/L (5.55 mM) Glukose <sup>b</sup> 1 g/L (5.55 mM) Glukose + 0.1 µM Repaglinid <b>1</b> bzw. Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid <b>2</b> <sup>c</sup> 3 g/L (16.7 mM) Glukose n = Zahl der Experimente					
	<b>Insulin- freisetzung<sup>d</sup></b> [ng/Islet/1h]	<b>Insulin- freisetzung<sup>e</sup></b> [ng/Islet/1h]	<b>Insulin- freisetzung<sup>f</sup></b> [ng/Islet/1h]	<b>Stimulations- -index</b> [%]	<b>Relativer Stimulations- index [%]</b>
Positiv-Kontrolle	2.3 ± 1.0	-	7.5 ± 3.3	3.2 ± 0.7	100
Repaglinid <b>1</b> , n = 8	2.1 ± 0.7	4.0 ± 1.4	-	1.9 ± 0.4	63
Methoxy-desethoxy- Repaglinid <b>3</b> , n = 8	2.0 ± 0.6	4.0 ± 1.5	-	2.0 ± 0.4	64
<sup>d</sup> 5 mM Glukose <sup>e</sup> 5 mM Glukose + 0.1 µM Repaglinid <b>1</b> bzw. Methoxy-desethoxy-Repaglinid <b>3</b> <sup>f</sup> 15 mM Glukose n = Zahl der Experimente					

Tabelle 8 zeigt die relativen Stimulationsindizes der für diese Arbeiten synthetisierten Repaglinid-Analoga und des Repaglinids **1** im Vergleich zu Glibenclamid und [<sup>19</sup>F]Glibenclamid. Alle zeigen eine vergleichbare Insulin-stimulierende Wirkung.

**Tabelle 8:** Insulinsekretionswerte verschiedener SUR1-Rezeptorliganden im Vergleich

Formelname	Formel	Relativer Stimulationsindex [%]
Repaglinid <b>1</b>		59 <sup>I</sup> / 63 <sup>II</sup>
Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid <b>2</b>		54 <sup>I</sup>
Methoxy-desethoxy-Repaglinid <b>3</b>		64 <sup>II</sup>
Glibenclamid		54 <sup>III</sup>
[ <sup>19</sup> F]Glibenclamid		56 <sup>III</sup>
<sup>I</sup> , <sup>II</sup> , <sup>III</sup> : Experimentelle Bedingungen zur Bestimmung des relativen Stimulationsindex (vergleiche auch Tabelle 7)		

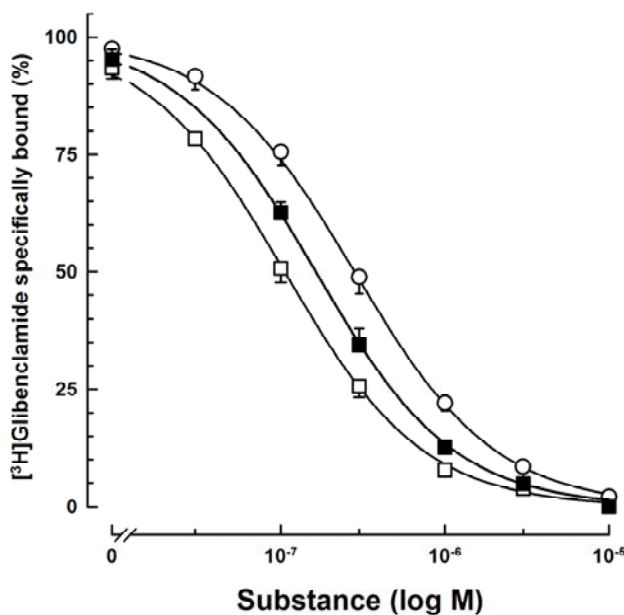
Die synthetisierten Verbindungen (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl)-phenyl]-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) **2** und (S)-2-Methoxy-4-{{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl)-phenyl]-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) **3** wurden in separaten Experimenten getestet (Tabelle 7).



## 4.2.2 Bindungsaffinität<sup>2</sup>

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten der Repaglinid-Derivate (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) **2** und (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) **3** sowie des Repaglinids **1** an den menschlichen SUR1 wurden Verdrängungsstudien mit [<sup>3</sup>H]Glibenclamid an COS1-Zellmembranen, die den menschlichen SUR1 exprimieren, durchgeführt (Schwanstecher, 1992, 1998).

Aus den erhaltenen Daten wurden die halb-maximale inhibitorische Substanzkonzentrationen (IC<sub>50</sub>) und Hill-Koeffizienten (n) bestimmt, indem die Funktion  $B = 1 / [(1 + [\text{Substanz}] / \text{IC}_{50})^n]$  an die Daten jedes einzelnen Verdrängungsexperimentes angepasst wurde. K<sub>D</sub>-Werte wurden aus den IC<sub>50</sub>-Werten berechnet (Schwanstecher, 1992).



**Abb. 41:** Bindungsaffinitäten von Repaglinid **1** (□), (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) **3** (■) und (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) **2** (○) zum menschlichen SUR1.

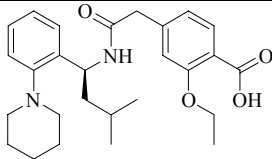
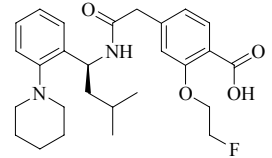
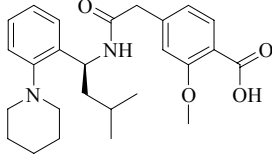
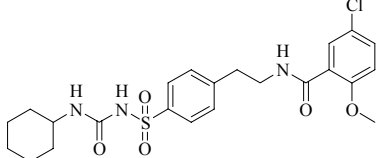
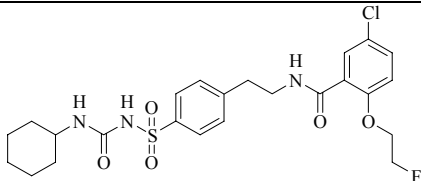
Die durch die Experimente bestimmten IC<sub>50</sub>-Werte und Hill-Koeffizienten waren: 106 ± 7 nM, 1.03 (Repaglinid **1**); 163 ± 9 nM, 1.03 ((S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) **3**); 281 ± 11 nM, 1.01 ((S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-

<sup>2</sup> Die K<sub>D</sub>-Wert-Bestimmungen wurden im Labor von Professor Dr. M. Schwanstecher, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Braunschweig, durchgeführt.

methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) **2**). Zur Kontrolle wurde auf gleiche Weise eine Verdrängung mit Glibenclamid durchgeführt ( $IC_{50} = 0.61 \pm 0.03$  nM, Hill-Koeffizient = 1.00).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9:** Dissoziationskonstanten verschiedener SUR1-Rezeptorliganden im Vergleich

Formelname	Formel	Affinität ( $K_D$ ) [nM]
Repaglinid <b>1</b>		$50 \pm 4$
Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid <b>2</b>		$142 \pm 6$
Methoxy-desethoxy-Repaglinid <b>3</b>		$83 \pm 5$
Glibenclamid		$0.33 \pm 0.01$
[ $^{19}F$ ]Glibenclamid		$0.22 \pm 0.01$

Der  $K_D$ -Wert des (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) **2** (142 nM) zeigt eine Erhöhung im Vergleich zu dem des Repaglinids **1** (50 nM) um etwa den Faktor 2.5. Im Falle des (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) **3** (83 nM) findet sich ein um den Faktor 1.5 erhöhter  $K_D$ -Wert (Abb. 41 und Tabelle 9). Diese Verschlechterungen in der Bindungsaffinität lassen den Schluss zu, dass es sich bei der Ethoxy-Funktion des Repaglinid um keine entscheidende pharmakophore Struktur handelt, da die vorgenommenen Strukturänderungen des Moleküls an dieser Stelle zu einem vergleichsweise geringen Verlust der Affinität geführt haben. Dies bestätigt das Konzept des Analogtracers.

## 4.3 *In vivo*-Evaluierungen

### 4.3.1 Tierexperimente<sup>3</sup>

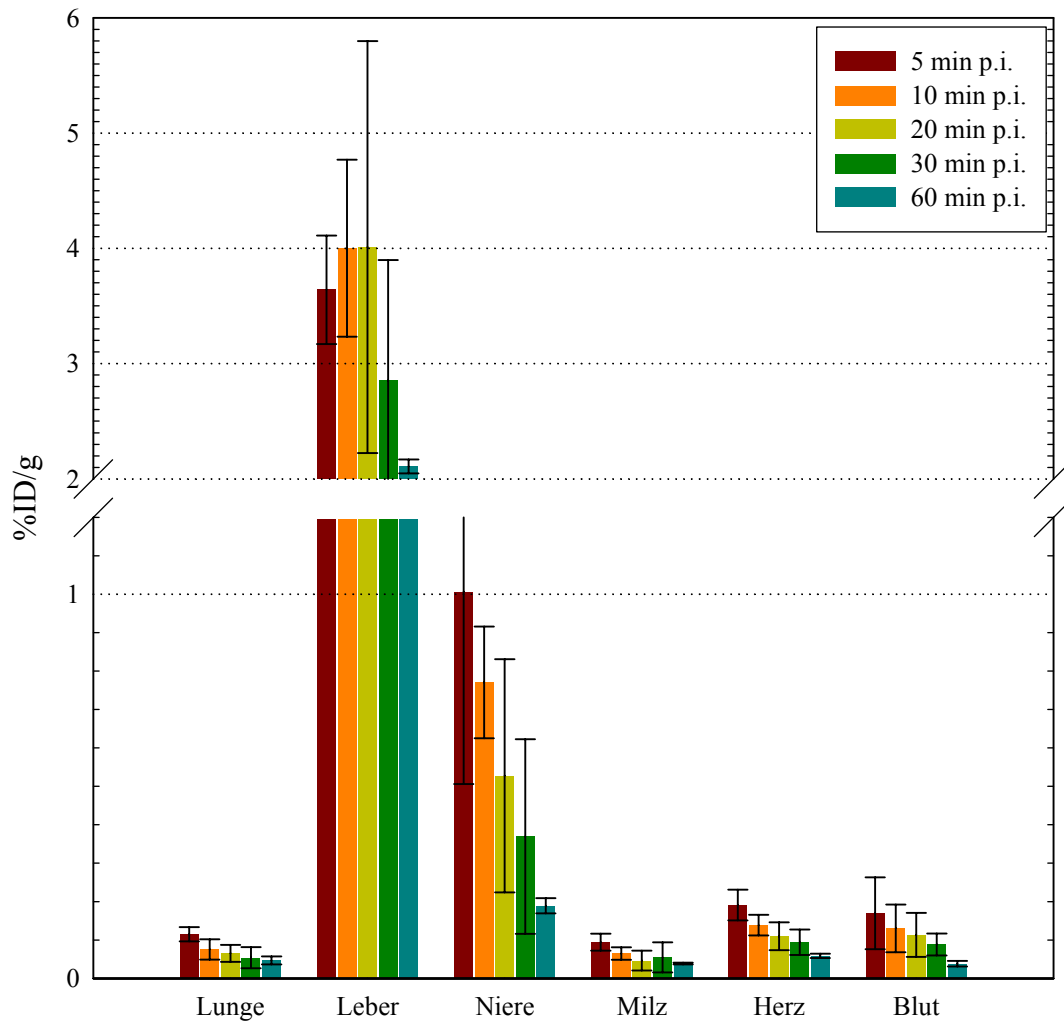
Zur Bestimmung der Eignung von (S)-2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbonyl}-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) [<sup>18</sup>F]-**2** zur Evaluierung und Quantifizierung des  $\beta$ -Zell Status im Menschen mittels PET wurden erste Tierexperimente mit nicht-diabetischen „Sprague Dawley“-Ratten durchgeführt.

Die Tiere (Fa. Charles River Wiga, Gewicht: 220-340 g; unter Standard-Diät-Bedingungen mit Wasser *ad libitum*) wurden mit Pentobarbital (40 mg/kg, Narcoren<sup>®</sup>, Fa. Merial) anästhesiert und Katheter in die *Ateria carotis* sowie die *Vena jugularis* gelegt. Die Tiere atmeten während des gesamten Experiments spontan durch einen Tracheal-Tubus. Die (S)-2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbonyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>18</sup>F]-**2** lag in isotonischer Kochsalzlösung mit 5% Ethanol vor. 15-25 MBq dieser Lösung wurden rasch in die *Vena jugularis* injiziert. An den zuvor festgelegten Zeitpunkten (5, 10, 20, 30 und 60 Minuten „post injection“ (p.i.)) wurden je 4 Tiere aus dem Experiment genommen. Nach der Entnahme einer Blutprobe aus dem arteriellen Katheter wurden diese Tiere durch Genickbruch getötet. Verschiedene Organe wurden entnommen, gewogen, in 4 N KOH gelöst (4 mL, 75°C, 30 Minuten) und in einem  $\gamma$ -counter (Fa. Wallac) ausgemessen.

Um die spezifische Bindung des Repaglinid-Derivates zu beweisen, wurden Verdrängungsexperimente mit Original-Repaglinid **1** durchgeführt. Für die Verdrängungsstudie wurden 4 Tieren zuerst je 25-30 MBq [<sup>18</sup>F]-**2** und nach 10 Minuten (p.i.) Repaglinid **1** (0.1 mg / kg Körpergewicht) injiziert. 20 Minuten nach der Injektion des [<sup>18</sup>F]-**2** wurden die Tiere getötet, dann die Organe entnommen, gewogen und in KOH gelöst. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem  $\gamma$ -Counter. Die Anreicherung des [<sup>18</sup>F]Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinids [<sup>18</sup>F]-**2** in den Organen Pankreas, Lunge, Gehirn, Leber, Nieren, Milz, Herz und im Blut wurde in % der injizierten Dosis / Gramm Organgewicht (% ID/g) bestimmt (Abb. 42 und 43). Diese Ergebnisse wurden mit den Aktivitätsanreicherungen in den Organen der entsprechenden 20 Minuten-Werte ohne Verdrängung verglichen.

---

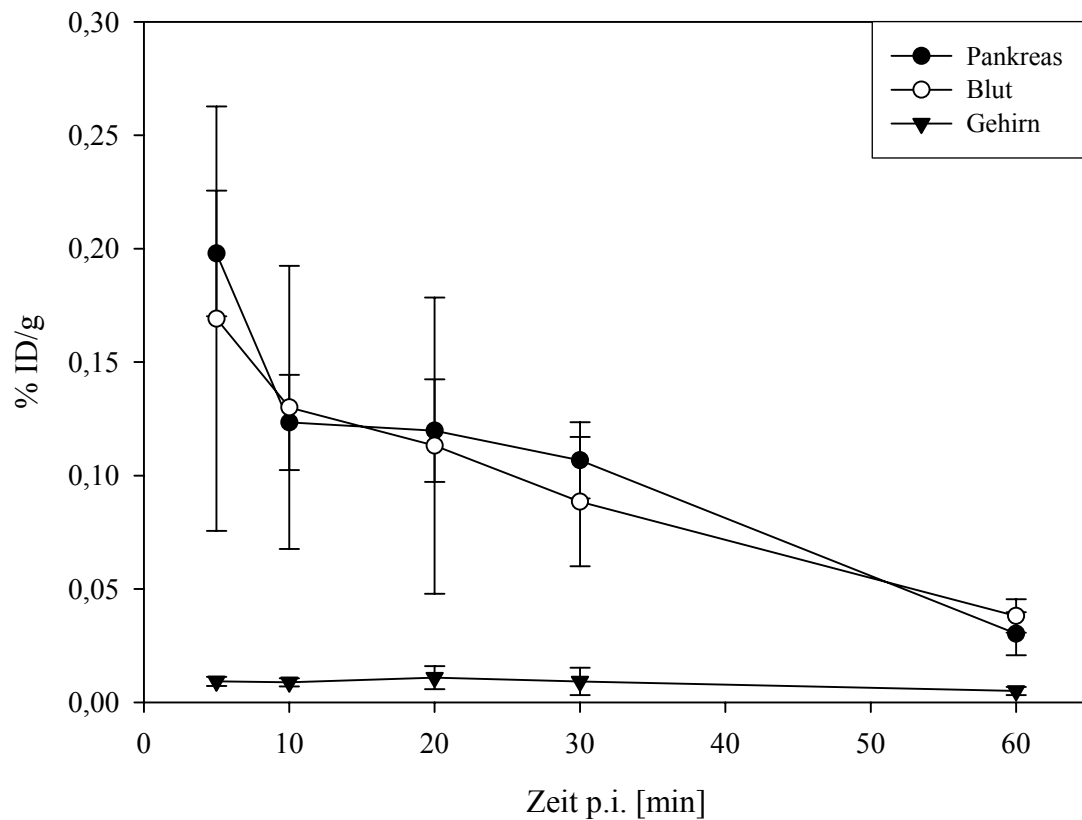
<sup>3</sup> Die Tierexperimente wurden im Arbeitskreis von Professor Dr. O. Thews, Institut für Physiologie and Pathophysiologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, im Einklang mit den Richtlinien der Ethikkommission für Tierversuche durchgeführt.



**Abb. 42:** Radioaktivitätsakkumulation des [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinids [ $^{18}\text{F}$ ]-2 in ausgewählten Organen zu verschiedenen Injektionszeitpunkten

Abbildung 43 zeigt, dass im Gehirn, wo ebenfalls SUR-Rezeptoren exprimiert werden, im gesamten Messzeitraum nur eine Aktivitätsakkumulation von unter 0.02% ID/g auftritt. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Substanz die Blut-Hirn-Schranke nicht passiert. Im Pankreas trat im Bereich zwischen 10 und 30 Minuten p.i. eine relativ konstante Radioaktivitätsakkumulation von  $\approx 0.12\%$  ID/g (Abb. 43) auf. 50 % dieser Aktivität konnte durch zusätzliche Injektion von Repaglinid **1** (0.1 mg / kg Körpergewicht) 10 Minuten p.i. verdrängt werden. Dies deutet auf eine spezifische Bindung des [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid [ $^{18}\text{F}$ ]-2 am SUR1 hin.

Aus Abbildung 43 lässt sich erkennen, dass bei den Tierexperimenten vergleichbar hohe Radioaktivitätsanreicherungen von [ $^{18}\text{F}$ ]-2 im Blut und im Pankreas auftraten.

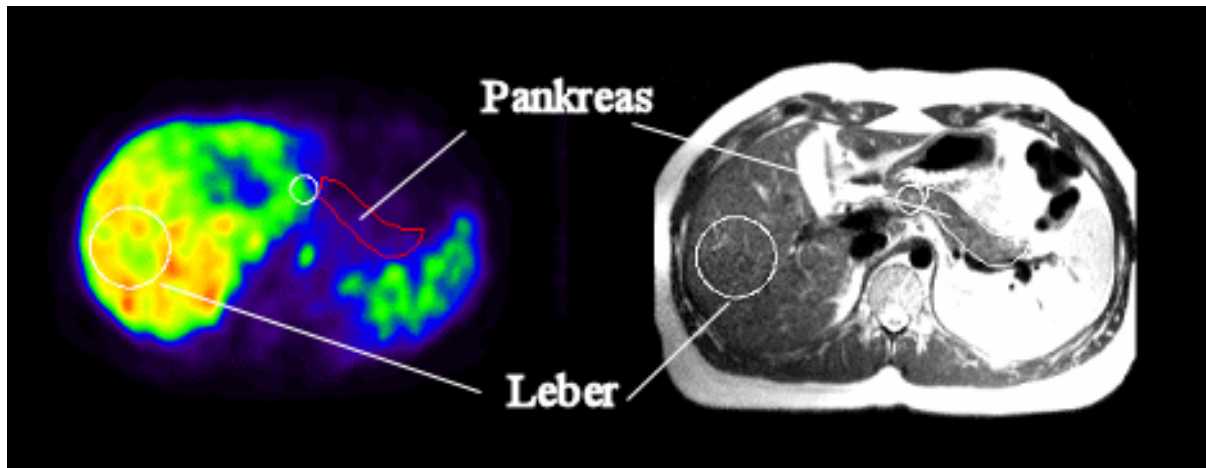


**Abb. 43:** Zeit/Radioaktivitäts-Kurven zum Vergleich der Radioaktivitätsakkumulation des [ $^{18}\text{F}$ ]-2 in Pankreas, Gehirn und Blut

Zur Bestimmung der Eignung von (S)-2-([ $^{11}\text{C}$ ]Methoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) [ $^{11}\text{C}$ ]-3 zur Evaluierung und Quantifizierung des  $\beta$ -Zell-Status im Menschen mittels PET werden in Kürze unter Leitung von C.-Y. Shiue, Department of Radiology des Hospital of the University of Pennsylvania, Tierexperimente durchgeführt werden.

### 4.3.2 *In vivo*-PET-Studie am Menschen<sup>4</sup>

Es wurden zwei Probanden 250-300 MBq [<sup>18</sup>F]Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid [<sup>18</sup>F]-2 in die Armvene injiziert. Die Aufnahme der PET-Bilder wurde an einem Ecad Exact (Fa. Siemens) PET-Scanner im 2D-Modus durchgeführt. Im Anschluss an die Injektion des [<sup>18</sup>F]Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid [<sup>18</sup>F]-2 wurden beiden Probanden Glukose-Lösung (1g/kg Körpergewicht) in die Armvene injiziert, da bekannt ist, dass die Wirkung des original Repaglinids stark vom Blutzuckerspiegel abhängig ist. Während des gesamten Experiments wurde der Blutzuckerspiegel der Probanden aufgenommen. Zur exakteren Lokalisation des Pankreas wurden Teilkörper-MRT-Aufnahmen des Abdomens gemacht und die Lage des Pankreas bestimmt. Diese wurde mit den PET-Aufnahmen morphologisch korreliert (Abb. 44).



**Abb. 44:** PET-Scan (links) und MRT (rechts) von Proband I

In Proband I zeigte sich zu Beginn des Messzeitraumes im Pankreas eine Aktivität von 6000 Bq/mL. Die entsprechende Startaktivität im Blut lag bei 10000 Bq/mL. In beiden Geweben nahm die Aktivitätsakkumulation exponentiell ab, wobei die Abnahme im Blut stärker war. Daher sank die Aktivität im Blut nach drei Minuten unter die des Pankreas, was darauf schließen lässt, dass die beobachtete Akkumulation im Pankreas nicht ausschließlich ein Perfusionphänomen war (Abb. 45).

In den Nieren war das Maximum der Aktivitätsanreicherung nach etwa drei Minuten mit ca. 12000 Bq/mL erreicht, wohingegen das Maximum der Akkumulation in der Leber erst nach 10 – 30 Minuten der Messung mit einem Wert von etwa 95000 Bq/mL erreicht wurde (Abb. 45 und 46). Diese Akkumulation in der Leber ist auf die Metabolisierung der Substanz zurückzuführen und erschwerte die Auswertung der PET-Bilder.

<sup>4</sup> Die ersten *in vivo* PET-Studien an zwei Probanden wurden von der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Mainz durchgeführt.

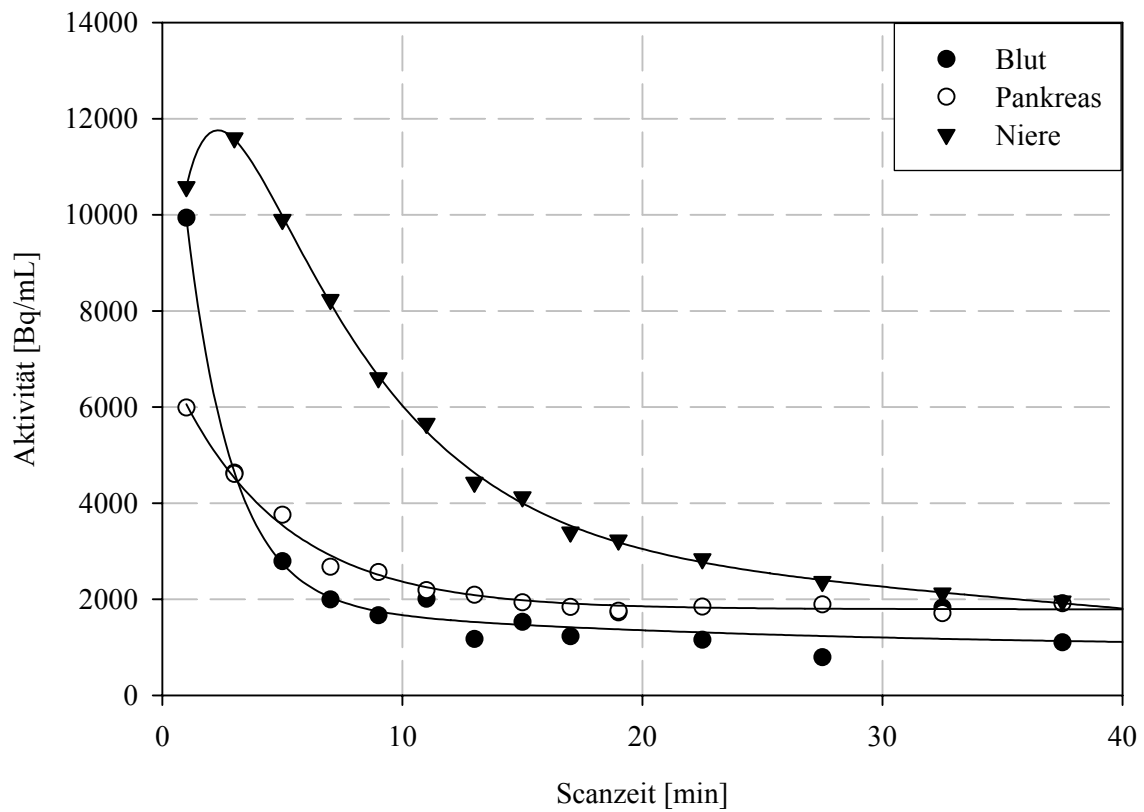


Abb. 45:  $[^{18}\text{F}]\text{-2}$  Zeit-Aktivitäts-Kurven von Blut, Pankreas und Niere des Probanden I

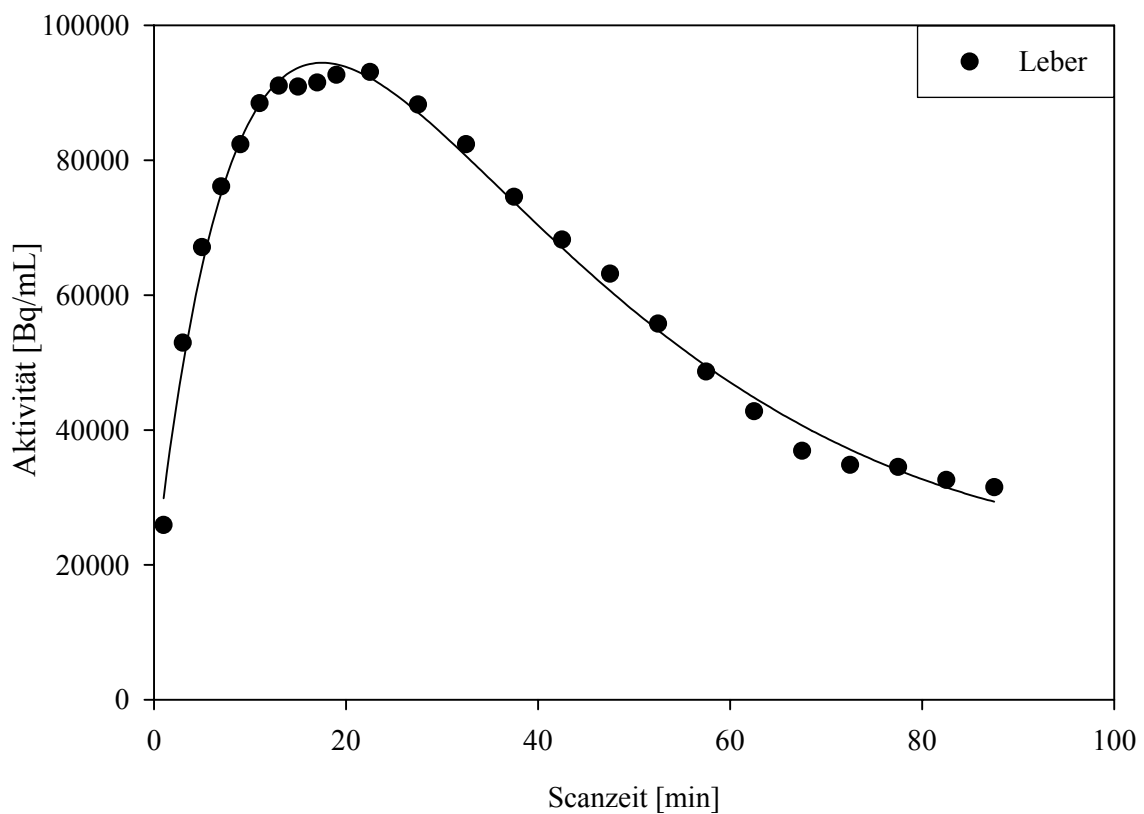
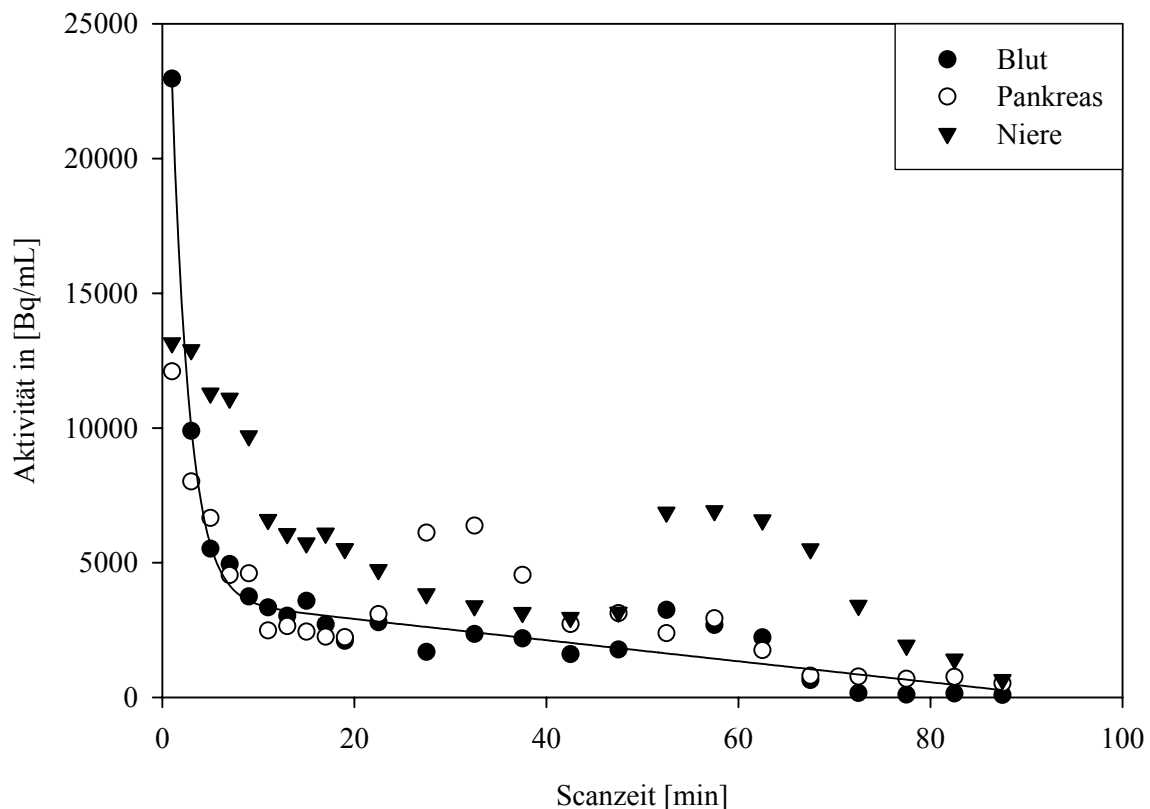


Abb. 46:  $[^{18}\text{F}]\text{-2}$  Zeit-Aktivitäts-Kurve der Leber des Probanden I

Die Zeit-Aktivitäts-Kurve des Probanden II zeigt keinen einheitlichen Verlauf für die Aktivitätsakkumulation im Pankreas und im Blut. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte zum einen eine leichte Lageveränderung des Probanden – und damit einer Verschiebung der „Region of Interest“ (ROI) – sein, zum anderen wäre es möglich, dass im Messzeitraum von 60 Minuten das Repaglinidderivat in der Leber verstoffwechselt und über die Galle in den Darm ausgeschüttet wurde (Abb. 47).

Zur Evaluierung der Eignung von [ $^{18}\text{F}$ ]-2 als PET-Tracer zur nicht-invasiven Bestimmung des  $\beta$ -Zell-Status im endokrinen Pankreas sind daher weitere *in vivo*-Studien indiziert.



**Abb. 47:** [ $^{18}\text{F}$ ]-2 Zeit-Aktivitäts-Kurven von Blut, Pankreas und Niere des Probanden II



## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros, Aldrich, Avocado, Deutero, Fisher, Fluka, Merck, Lancaster, Linde und Riedel de Haën bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Getrocknete Lösungsmittel wurden über Molekularsieb gelagert. Die wichtigsten Chemikalien sind in Tabelle 10 aufgeführt:

**Tabelle 10:** Lieferant und Reinheitsgrad der wichtigsten Chemikalien

Reagenz / Lösungsmittel	Qualität	Hersteller
Aceton	min. 99.5%	Merck
Aceton-d <sub>6</sub>	min. 99.8%	Deutero
Acetonitril	puriss. über Molsieb	Fluka
Acetonitril (HPLC)	min. 99.99%	Fisher
N-Acetyl-L-Glutaminsäure	≥ 99.0%	Fluka
Ammoniaklösung	32%	Merck
Ammoniumchlorid	min. 98.9%	Merck
α,α'-Azo-isobutyronitril	≥ 98%	Fluka
Benzyltributylammoniumchlorid	98+%	Aldrich
1-Brom-2-fluorethan	99% +	Avocado
N-Bromsuccinimid	99%	Aldrich
2-Chlorbenzonitril	98%	Aldrich
Chloroform	p.a., > 99%	Merck
Chlorwasserstoff	99.8%	Linde
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid 1M in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		Aldrich
Diethylether	zur Analyse	Riedel de Haën
N,N-Dimethylformamid	puriss. über Molsieb	Fluka
Dimethylsulfoxid	puriss. über Molsieb	Fluka
Dimethylsulfoxid-d <sub>6</sub>	min. 99.8%	Deutero
Essigsäureethylester	puriss. über Molsieb	Fluka
Ethanol	min. 99.8%	Merck
Ethylbromid	98%	Aldrich
N-Formylpiperidin	99%	Aldrich

n-Hexan	zur Analyse	Merck
2-Hydroxy-4-methylbenzoesäure	99%	Aldrich
Isobutylbromid	99%	Aldrich
Kaliumcarbonat	min. 99.0%	Merck
Kaliumhydrogencarbonat	zur Analyse	Merck
Kieselgur DG für Dünnschichtchromatographie		Fluka
Kryptofix <sup>®</sup> 2.2.2.	zur Synthese	Merck
Magnesium	>99%	Merck
Methanol	puriss. über Molsieb	Fluka
Methanol	min. 99.8%	Merck
Methanol-d <sub>4</sub>	min. 99.8%	Deutero
Methylenchlorid	≥ 99.5%	Fluka
Natriumborhydrid	98%	Acros
Natriumchlorid	zur Analyse	Merck
Natriumcyanid	≥ 97%	Fluka
Natriumhydrogencarbonat	zur Analyse	Merck
Natriumhydroxid	zur Analyse	Merck
Natriumsulfat	reinst	Merck
n-Octanol	reinst	Merck
Petrolether zur Vergällung		Merck
Piperidin	99%	Aldrich
Tetrachlorkohlenstoff	min. 99.8%	Merck
Tetrahydrofuran	puriss. über Molsieb	Fluka
Tetrahydrofuran	≥ 99.5%	Fluka
Toluol	≥ 99.5%	Fluka
Toluolsulfonsäurechlorid	≥ 99%	Fluka
Salzsäure 37%	p.a.	Riedel de Haën
Schwefelsäure	97%	Merck

Die für Festphasenextraktionen benötigten C<sub>18</sub>-Kartuschen wurden von der Firma Waters (Sep-Pak<sup>®</sup>-C<sub>18</sub>) bezogen.

Die dünnschichtchromatographischen Analysen wurden mit Kieselgel-beschichteten Aluminiumfolien 60 F<sub>254</sub> der Firma Merck durchgeführt. Die Detektion erfolgte im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten mit Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma Merck.

Die Charakterisierung der synthetisierten Substanzen erfolgte mittels  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und gegebenenfalls mit  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie, mit Massenspektrometrie und in einigen Fällen mit Elementaranalyse.

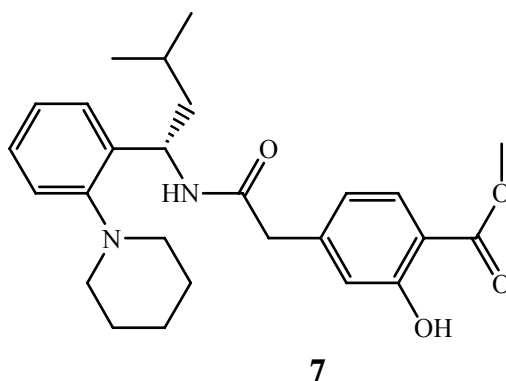
Die Enantiomerenreinheit der Verbindung (S)-11 wurde mittels chiraler HPLC überprüft (Grell, 1998).

Folgende Geräte wurden verwendet:

$^1\text{H}$ -, $^{13}\text{C}$ -, $^{19}\text{F}$ - Spektroskopie:	400-MHz-FT-NMR Spektrometer DRX 400 (Bruker Analytik GmbH)
Massenspektrometrie:	Finnigan MAT 90-Spektrometer (FD, Fa. Thermo Electron) ThermoQuest Navigator Instrument (ESI, Fa. Thermo Electron)
Elementaranalytik:	EL2 system (Elementar vario)
Radioaktivitätsdetektion:	Instant Imager (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  C: Pumpe: Hewlett Packard G 1310A UV: Hewlett Packard G 1314A Aktivitätsdetektor: Canberra Typ 2007 Probenaufgabeeventil: Rheodyne Typ 7725i

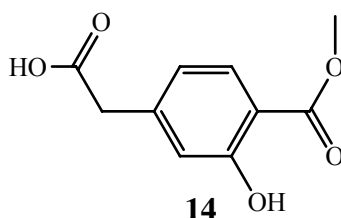
## 5.2 Darstellung des Markierungsvorläufers und der nicht-radioaktiven Referenzverbindungen der Repaglinid-Derivate

### 5.2.1 Markierungsvorläufer 2-Hydroxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure-methylester 7

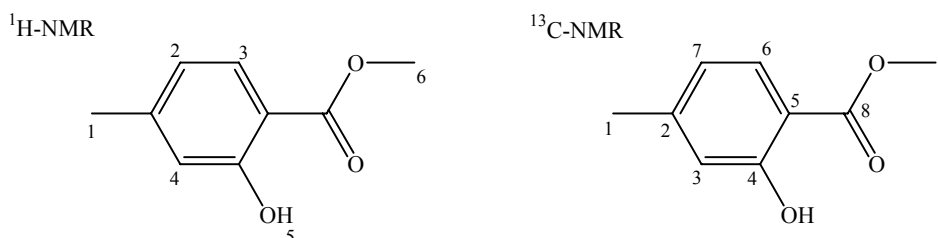


Der Markierungsvorläufer wurde durch Kopplung der Synthons 4-Carboxymethyl-2-hydroxybenzoesäure-methylester **14** und (S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin (**S**)-**11** dargestellt.

#### 5.2.1.1 4-Carboxymethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester 14



##### 5.2.1.1.1 2-Hydroxy-4-methyl-benzoesäure-methylester 18



Zu einer Lösung von 2-Hydroxy-4-methyl-benzoesäure (52.6 g, 350 mmol) in Methanol (500 mL) wurde konzentrierte Schwefelsäure (16 mL) gegeben und 16 Stunden im Rückfluss erhitzt. Nach Aufkonzentrieren der Mischung wurde mit Diethylether (3 x 150 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im

Vakuum entfernt. Man erhielt das Produkt in Form von farblosen Nadeln in einer Ausbeute von 60% (34.9 g, 210 mmol).

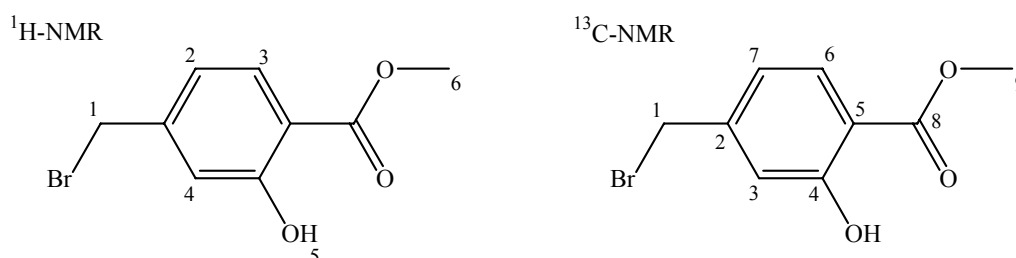
$^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 10.5 (s, 1H, H-5), 7.7 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}_3,\text{H}_2}=8.1\text{Hz}$ , H-3), 6.7 (s, 1H, H-4), 6.6 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}_2,\text{H}_3}=8.1\text{Hz}$ , H-2), 3.9 (s, 3H, H-6), 2.2 (s, 3H, H-1).

$^{13}\text{C-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 169.6 (C-8), 160.7 (C-4), 147.1 (C-2), 129.9 (C-6), 120.8 (C-7), 117.7 (C-3), 110.2 (C-5), 52.5 (C-9), 21.5 (C-1).

FD-MS:  $m/z$  (%) = 166.2 (100%).

Anal.  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$  (berechnet): C 64.88%, H 6.12% (C 65.05%, H 6.07%).

### 5.2.1.1.2 4-Brommethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester 17



Zu einer Lösung von 2-Hydroxy-4-methyl-benzoesäure-methylester **18** (10 g, 60 mmol) in Tetrachlorkohlenstoff (50 mL) wurden N-Bromsuccinimid (NBS) (9.8 g, 55 mmol) und  $\alpha$ - $\alpha'$ -Azobisisobutyronitril (AIBN) (0.8 g, 5 mmol) gegeben. Die Mischung wurde über Nacht im Rückfluss erhitzt, filtriert und der Rückstand mit Tetrachlorkohlenstoff gewaschen (3 x 10 mL). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt aus Petrolether umkristallisiert. Das Produkt kristallisierte als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 59% (8.6 g, 35.4 mmol).

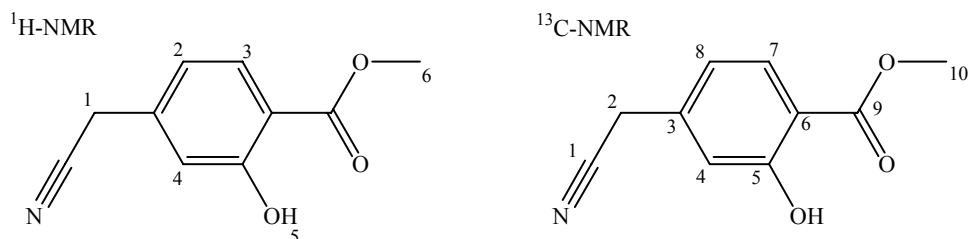
$^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 10.5 (s, 1H, H-5), 7.6 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}_3,\text{H}_2}=8.1\text{ Hz}$ , H-3), 7.0 (d, 1H,  $J^4_{\text{H}_4,\text{H}_2}=1.6\text{Hz}$ , H-4), 6.9 (dd, 1H,  $J^4_{\text{H}_2,\text{H}_4}=1.6\text{Hz}$ ,  $J^3_{\text{H}_2,\text{H}_3}=8.1\text{ Hz}$ , H-2), 4.6 (s, 2H, H-1), 3.8 (s, 3H, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 168.9 (C-8), 160.1 (C-4), 145.8 (C-2), 130.7 (C-6), 120.5 (C-7), 118.1 (C-3), 113.1 (C-5), 52.7 (C-9), 33.1 (C-1).

FD MS:  $m/z$  (%) = 244.2 (44.6%), 246.2 (48.0%).

Anal.  $\text{C}_9\text{H}_9\text{BrO}_3$  (berechnet): C 44.23%, H 3.61% (C 44.11%, H 3.70%).

### 5.2.1.1.3 4-Cyanomethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester **16**



Zu einer Lösung von Natriumcyanid (2.95 g, 60 mmol) und N-Benzyl-N-tri-butylammoniumchlorid (0.72 g, 2.3 mmol) in Wasser wurde tropfenweise eine Lösung von 4-Bromomethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester **17** in Dichlormethan (50 mL) bei 20°C zugegeben. Nach 48 Stunden wurde die organische Phase abgetrennt, mit Wasser gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Petrolether verrieben, wobei man das Produkt in Form eines gelben Feststoffes mit einer Ausbeute von 85% (373 mg, 2.0 mmol) erhielt.

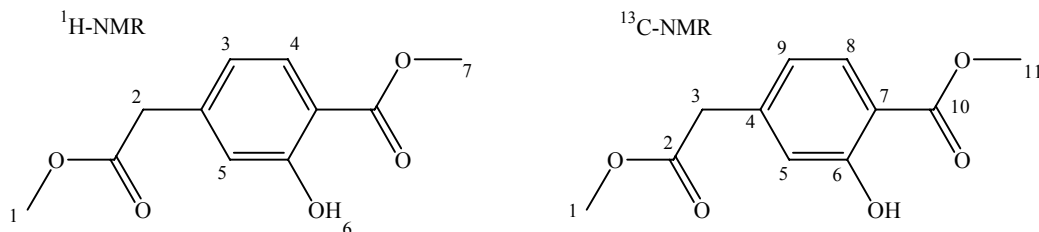
<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 10.5 (s, 1H, H-5), 7.7 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H<sub>3</sub>,H<sub>2</sub></sub>=8.1Hz, H-3), 6.9 (d, 1H, J<sup>4</sup><sub>H<sub>4</sub>,H<sub>2</sub></sub>=1.6Hz, H-4), 6.8 (dd, 1H, J<sup>4</sup><sub>H<sub>2</sub>,H<sub>4</sub></sub>=1.6Hz, J<sup>3</sup><sub>H<sub>2</sub>,H<sub>3</sub></sub>=8.1 Hz, H-2), 4.0 (s, 2H, H-1), 3.8 (s, 3H, H-6).

<sup>13</sup>C-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) = 168.9 (C-9), 160.3 (C-5), 139.3 (C-3), 130.9 (C-7), 119.3 (C-8), 118.7 (C-4), 117.0 (C-1), 112.7 (C-6), 52.6 (C-10), 22.7 (C-2).

FD MS: m/z (%) = 191.2 (100%).

Anal. C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub> (berechnet): C 62.59%, H 4.62%, N 7.24% (C 62.82%, H 4.74%, N 7.33%).

### 5.2.1.1.4 2-Hydroxy-4-methoxycarbonylmethyl-benzoesäure-methylester **15**



In eine im Rückfluss erhitzte Lösung von 4-Cyanomethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester **16** (9.6 g, 50 mmol) in Methanol wurde eine Stunde lang Chlorwasserstoffgas eingeleitet. Anschließend wurde 2 N HCl zugegeben und dreimal mit Toluol (jeweils 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der 2-Hydroxy-4-methoxycarbonylmethyl-benzoesäure-methylester **15** wurde in Form eines gelben Öls mit einer Ausbeute von 90% (10.1 g, 45 mmol) isoliert.

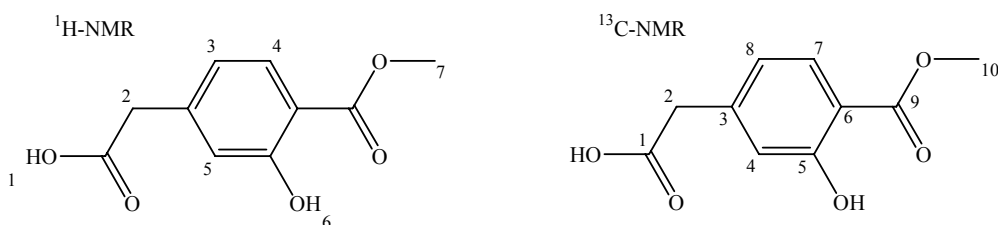
$^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 10.5 (s, 1H, H-6), 7.7 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}_4, \text{H}_3}=8.1\text{Hz}$ , H-4), 6.9 (d, 1H,  $J^4_{\text{H}_5, \text{H}_3}=1.6\text{Hz}$ , H-5), 6.8 (dd, 1H,  $J^4_{\text{H}_3, \text{H}_5}=1.6\text{Hz}$ ,  $J^3_{\text{H}_3, \text{H}_4}=8.1\text{Hz}$ , H-3), 3.8 (s, 3H, H-7), 3.7 (s, 2H, H-2), 3.6 (s, 3H, H-1).

$^{13}\text{C-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 171.1 (C-2), 169.2 (C-10), 160.1 (C-6), 142.6 (C-4), 130.1 (C-8), 120.9 (C-9), 118.4 (C-5), 111.9 (C-7), 52.6 (C-11), 52.1 (C-1), 39.3 (C-3).

FD MS:  $m/z$  (%) = 224.1 (100%).

Anal.  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$  (berechnet): C 59.17%, H 5.41% (C 58.93%, H 5.39%).

### 5.2.1.1.5 4-Carboxymethyl-2-hydroxy-benzoessäure-methylester 14



Zu einer Lösung von 2-Hydroxy-4-methoxycarbonylmethyl-benzoessäure-methylester **15** (4.0 g, 18 mmol) in Methanol (40 mL) wurde 2 N Natronlauge (18.9 mL) gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Methanol im Vakuum bei 40°C entfernt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Toluol (40 mL) extrahiert und mit 2 N HCl auf pH 2 angesäuert. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Man erhielt das Produkt als gelblichen Feststoff mit einer Ausbeute von 64% (2.4 g, 11.5 mmol).

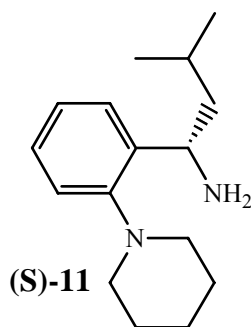
$^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 12.5 (br, 1H, H-1), 10.4 (s, 1H, H-6), 7.7 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}_4, \text{H}_3}=8.1\text{Hz}$ , H-4), 6.8 (d, 1H,  $J^4_{\text{H}_5, \text{H}_3}=1.4\text{Hz}$ , H-5), 6.75 (dd, 1H,  $J^4_{\text{H}_3, \text{H}_5}=1.6\text{Hz}$ ,  $J^3_{\text{H}_3, \text{H}_4}=8.1\text{Hz}$ , H-3), 3.8 (s, 3H, H-7), 3.5 (s, 2H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 172.1 (C-1), 169.4 (C-9), 160.1 (C-5), 143.5 (C-3), 130.0 (C-7), 121.0 (C-8), 118.4 (C-4), 111.5 (C-6), 50.6 (C-10), 40.8 (C-2).

FD MS:  $m/z$  (%) = 210.8 (100%).

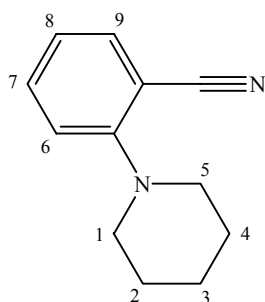
Anal.  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$  (berechnet): C 57.37%, H 4.94% (C 57.14%, H 4.80%).

## 5.2.1.2 (S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin (S)-11

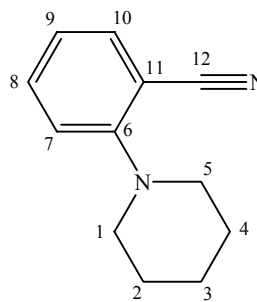


### 5.2.1.2.1 2-Piperidin-1-yl-benzonitril 13

<sup>1</sup>H-NMR



<sup>13</sup>C-NMR



Eine Lösung aus 2-Chlorbenzonitril (68.9 g, 0.5 mol), N-Formylpiperidin (113.2 g, 1 mol) und Piperidin (127.7 g, 1.5 mol) wurde für 64 Stunden bei 160-170°C im Rückfluss erhitzt. Die Mischung wurde in Toluol aufgenommen und mit Wasser gewaschen (3 x 200 mL). Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und die flüchtigen Komponenten im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Toluol aufgenommen (500 mL), eine Stunde mit 130 g Silicagel gerührt und nach nochmaliger Zugabe von 130 g Silicagel noch eine weitere Stunde rühren gelassen. Das Silicagel wurde abfiltriert und mit Toluol gewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeeengt und anschließend mit einer Ausbeute von 84% (78.6 g, 0.4 mol) destillativ (bp<sub>0,6</sub> 108-110°C) aufgereinigt.

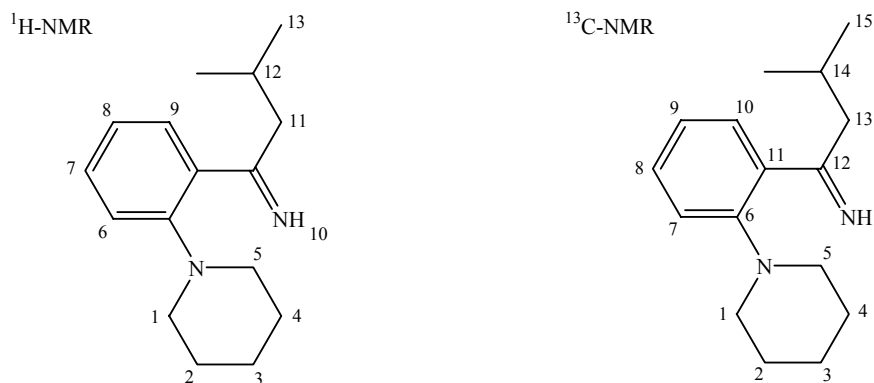
<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 7.65 (dd, 1H, J<sup>3</sup><sub>H<sub>7</sub>,H<sub>6</sub>,H<sub>8</sub></sub>=7.7Hz+1.6Hz, H-7), 7.55 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H<sub>9</sub>,H<sub>8</sub></sub>=7.7Hz, H-9), 7.1 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H<sub>6</sub>,H<sub>7</sub></sub>=8.3Hz, H-6), 7.0 (dd, 1H, J<sup>3</sup><sub>H<sub>8</sub>,H<sub>7</sub>,H<sub>9</sub></sub>=7.7Hz+0.7Hz, H-8), 3.1 (t, 4H, J<sup>3</sup><sub>H<sub>1</sub>,5;H<sub>2</sub>,4</sub>=4.8 Hz, H-1+H-5), 1.7 (m, 4H, H-2+H-4), 1.5 (m, 2H, H-3).

<sup>13</sup>C-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 156.6 (C-6), 134.4 (C-8), 134.3 (C-10), 121.7 (C-9), 119.3 (C-12), 118.6 (C-7), 105.1 (C-11), 52.8 (C-1+C-5), 25.9 (C-3), 23.7 (C-2+C-4).

FD MS: m/z (%) = 187.2 (100%).



### 5.2.1.2.2 3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylidenamin **12**



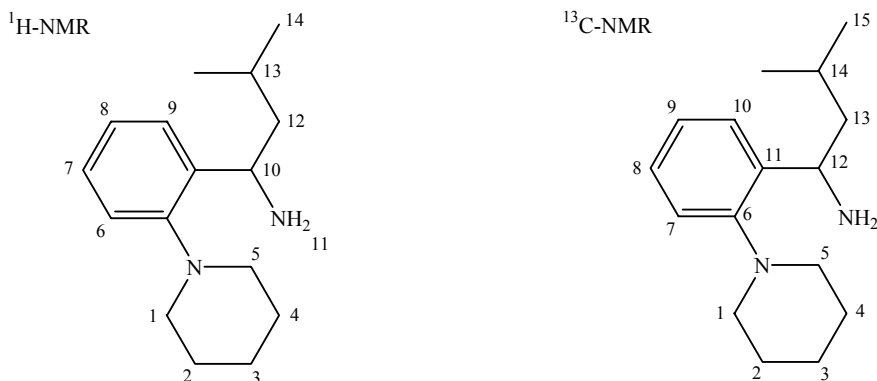
Zu einer Lösung von iso-Butyl-magnesium-bromid (43.2 g, 268 mmol) in Toluol/THF 4:1 (135 mL) wurde eine Lösung von 2-Piperidin-1-yl-benzonitril **13** (20g, 107 mmol) in Toluol/THF 4:1 (135 mL) gegeben und drei Stunden im Rückfluss erhitzt. Nach 12 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Mischung zu einer -15°C kalten Lösung aus Ammoniak (300 mL) und gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (300 mL) gegeben und 10 Minuten lang gerührt. Anschließend wurde über Kieselgur filtriert, die organische Phase abgetrennt, getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde in Form eines gelben Öls mit einer Ausbeute von 100% (26.2 g, 107 mmol) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 10.0 (s, 0.6H, H-10), 9.8 (s, 0.4H, H-10), 7.3 – 6.9 (m, 4H, H-6+H-7+H-8+H-9), 2.8 (m, 4H, H-1+H-5), 2.7 (d, 2H, J<sup>3</sup><sub>H11,H12</sub>=7.0Hz, H-11), 1.8 (m, 1H, H-12), 1.5 (m, 4H, H-2+H-4), 1.4 (m, 2H, H-3), 0.7 (m, 6H, H-13).

<sup>13</sup>C-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 151.7 (C-12), 143.7 (C-6), 128.6 (C-8), 126.8 (C-10), 124.1 (C-9), 120.1 (C-7), 116.2 (C-11), 54.5 (C-1+C-5), 46.8 (C-13), 26.5 (C-3), 24.0 (C-15), 23.3 (C-2+C-4), 22.6 (C-14).

FD MS: m/z (%) = 245.2 (100%).

### 5.2.1.2.3 3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin 11



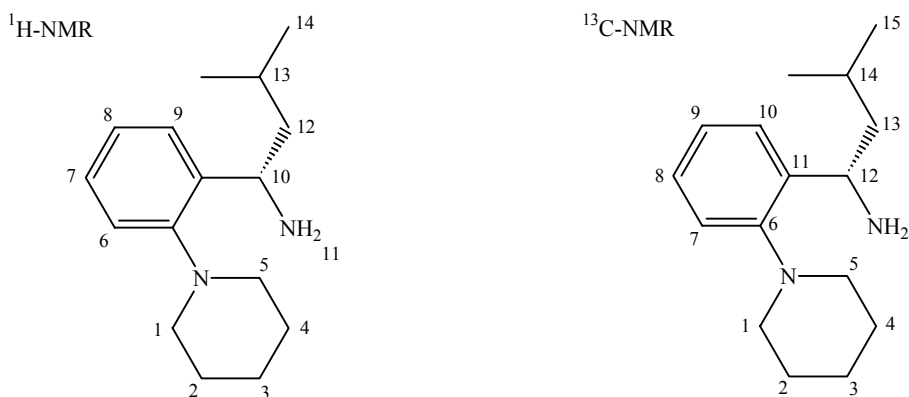
Zu einer 0°C kalten Lösung von 3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylidenamin **12** (19.7 g, 80.5 mmol) in Methanol (160 mL) wurde über einen Zeitraum von einer Stunde Natriumborhydrid (6.1 g, 161 mmol) zugegeben und die Mischung anschließend weitere zwei Stunden bei 15°C reagieren gelassen. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand unter Eiskühlung mit 10%iger wässriger HCl (100 mL) versetzt und die entstandene Mischung mit Dichlormethan (4 x 40 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde dann mit 50%iger NaOH neutralisiert und nochmals mit Dichlormethan (2 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen (40 mL), über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethanol (25 mL) gelöst und gekühlt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat eingeeengt. Das Produkt wurde in Form eines gelben Öles mit einer Ausbeute von 65% (12.9 g, 52 mmol) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 7.3–6.9 (m, 4H, H-6+H-7+H-8+H-9), 4.3 (m, 1H, H-10), 2.8 (s, 2H, H-11), 2.6 (s, 2H, H-12), 1.8 (m, 1H, H-13), 1.6–1.4 (m, 10H, H-1+H-2+H-3+H-4+H-5), 0.7 (m, 6H, H-14).

<sup>13</sup>C-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 148.7 (C-12), 143.7 (C-6), 128.6 (C-8), 126.8 (C-10), 124.1 (C-9), 120.1 (C-7), 116.2 (C-11), 54.5 (C-1+C-5), 46.8 (C-13), 26.5 (C-3), 24.0 (C-15), 23.3 (C-2+C-4), 22.6 (C-14).

FD MS: m/z (%) = 247.3 (100%).

#### 5.2.1.2.4 (S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin (S)-11



Eine Mischung von 3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin **11** (122 g, 495 mmol) und L(-)-N-Acetylglutaminsäure (93.7 g, 495 mmol) in Aceton (1 L) und Methanol (80 mL) wurde so lange im Rückfluss erhitzt, bis sich die Feststoffe gelöst hatten. Anschließend wurde noch über Nacht bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit  $-15^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton gewaschen, wobei 98.9 g Rohprodukt erhalten wurden. Dieses wurde dreimal aus Aceton:Methanol 4:1 umkristallisiert. Anschließend wurde das Rohprodukt für eine Stunde mit konzentriertem Ammoniak (250 mL) im Rückfluss erhitzt und das Produkt durch Ausschütteln mit Toluol (3 x 100 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden getrocknet und bis zur Trockene eingedampft. Man erhielt das Produkt in Form eines farblosen Öls mit einer Ausbeute von 20% (24.5 g, 99 mmol).

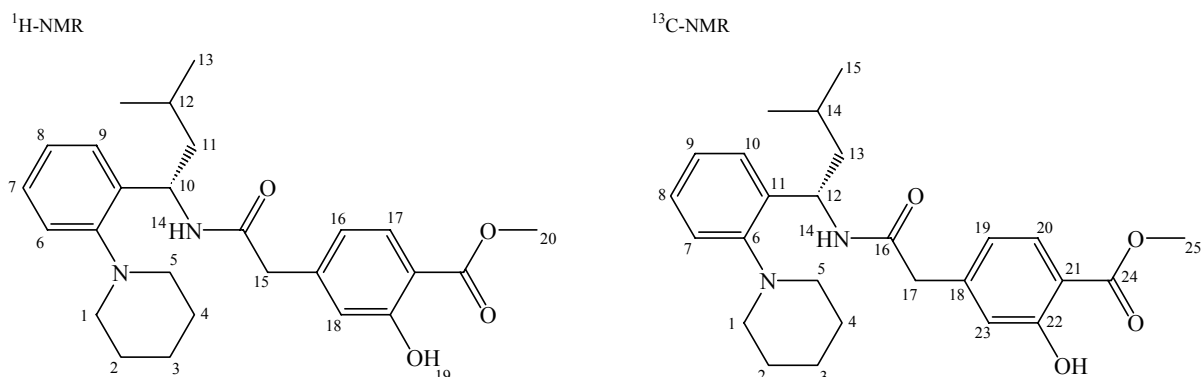
Enantiomerenreinheit: ee >97%.

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.3 (d, 1H,  $J_{\text{H}_9, \text{H}_8}^3 = 7.9\text{Hz}$ , H-9), 7.1–6.9 (m, 3H, H-6+H-7+H-8), 4.3 (m, 1H, H-10), 2.5 (s, 2H, H-11), 2.45 (s, 2H, H-12), 1.8 (m, 1H, H-13), 1.6–1.3 (m, 10H, H-1+H-2+H-3+H-4+H-5), 0.8 (m, 6H, H-14).

<sup>13</sup>C-NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 148.7 (C-12), 143.7 (C-6), 128.6 (C-8), 126.8 (C-10), 124.1 (C-9), 120.1 (C-7), 116.2 (C-11), 54.5 (C-1+C-5), 46.8 (C-13), 26.5 (C-3), 24.0 (C-15), 23.3 (C-2+C-4), 22.6 (C-14).

FD MS: m/z (%) = 247.3 (100%).

### 5.2.1.3 (S)-2-Hydroxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl]-methyl]-benzoesäure-methylester **7**



Zu einer Lösung von (S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin (**S**)-**11** (246 mg, 1 mmol) in Toluol (30 mL) wurde 4-Carboxymethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester (232 mg, 1.1 mmol) **14** gegeben und bei Raumtemperatur so lange reagieren gelassen, bis die Mischung klar wurde. Darauf folgte die Zugabe von N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (0.272 g, 1.1 mmol). Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie (n-Hexan/Ethylacetat 1:1) verfolgt und nach Vollständigkeit der Reaktion wurde die Mischung filtriert und das Lösungsmittel des Filtrates im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt (n-Hexan/Ethylacetat 1:1). Das Produkt wurde in Form eines weißen Feststoffes mit einer Ausbeute von 65% (285 mg, 650 nmol) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 10.4 (s, 1H, H-19), 8.3 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H14,H10</sub>=8.1Hz, H-14), 7.6 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H17,H16</sub>=8.1Hz, H-17), 7.2 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H9,H8</sub>=7.5Hz, H-9), 7.0 (dd, 1H, J<sup>3</sup><sub>H7,H6,H8</sub>=7.5Hz+4.4Hz, H-7), 7.0 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H6,H7</sub>=7.5Hz, H-6), 6.9 (dd, 1H, J<sup>3</sup><sub>H8,H7,H9</sub>=7.5Hz+4.4Hz, H-8), 6.8 (s, 1H, H-18), 6.7 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H16,H17</sub>=8.1 Hz, H-16), 5.3 (dt, 1H, J<sup>3</sup><sub>H10,H11,H14</sub>=8.9Hz+4.8Hz, H-10), 3.8 (s, 3H, H-20), 3.4 (s, 2H, H-15), 3.0 (m, 2H, H-5), 2.5 (m, 2H, H-1), 1.7– 1.1 (m, 9H, H-2+H-3+H-4+H-11+H-12), 0.84 (d, 3H, J<sup>3</sup><sub>H13,H12</sub>=3.1Hz, H-13), 0.82 (d, 3H, J<sup>3</sup><sub>H13,H12</sub>=3.1Hz, H-13).

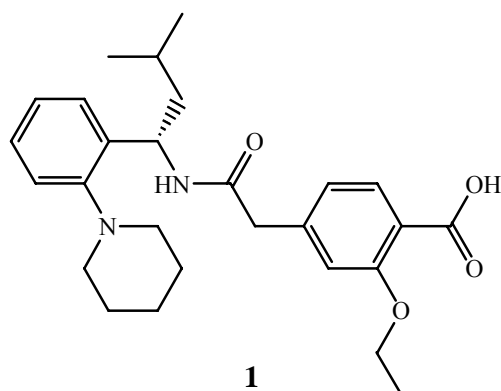
<sup>13</sup>C-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 169.5 (C-16), 168.6 (C-24), 160.2 (C-22), 151.7 (C-6), 145.3 (C-18), 140.5 (C-20), 129.9 (C-10), 127.4 (C-8), 126.2 (C-11), 124.2 (C-19), 120.7 (C-9), 120.6 (C-23), 117.9 (C-21), 111.1 (C-7), 54.2 (C-1+C-5), 52.5 (C-25), 46.7 (C-13), 46.2 (C-12), 42.6 (C-17), 25.1 (C-3), 24.0 (C-2+C-4), 23.3 (C-14), 22.0 (C-15).

FD MS: m/z (%) = 439.0 (100%).

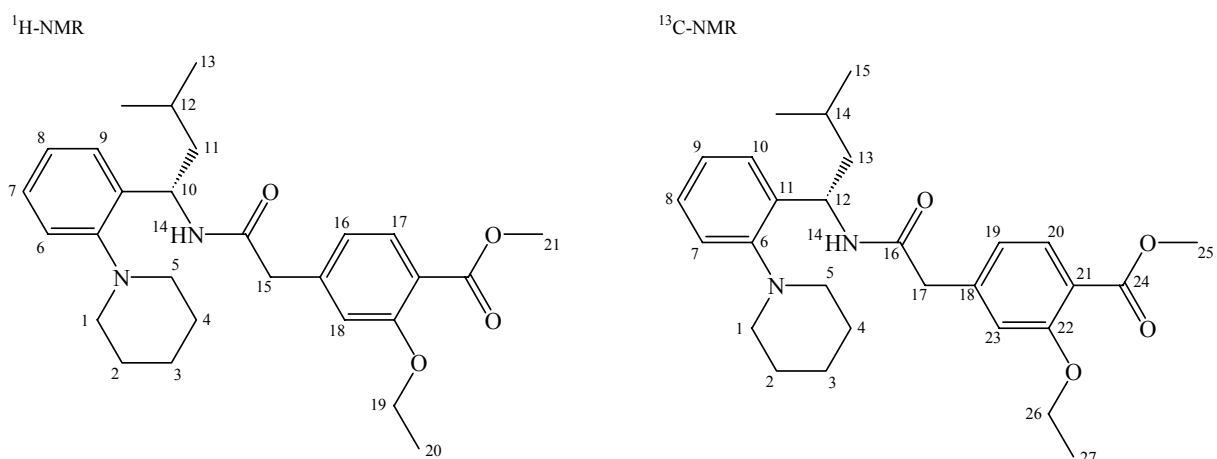
ESI MS m/z(%) = 439 (M<sup>+</sup>), 461.1 (M<sup>+</sup>Na), 502 (M<sup>+</sup>Na+CH<sub>3</sub>CN).

Anal. C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (berechnet): C 70.82%, H 7.77%, N 6.52% (C 71.21%, H 7.81%, N 6.39%).

## 5.2.2 Referenzverbindung (S)-2-Ethoxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure (Repaglinid) 1



### 5.2.2.1 (S)-2-Ethoxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure-methylester 4



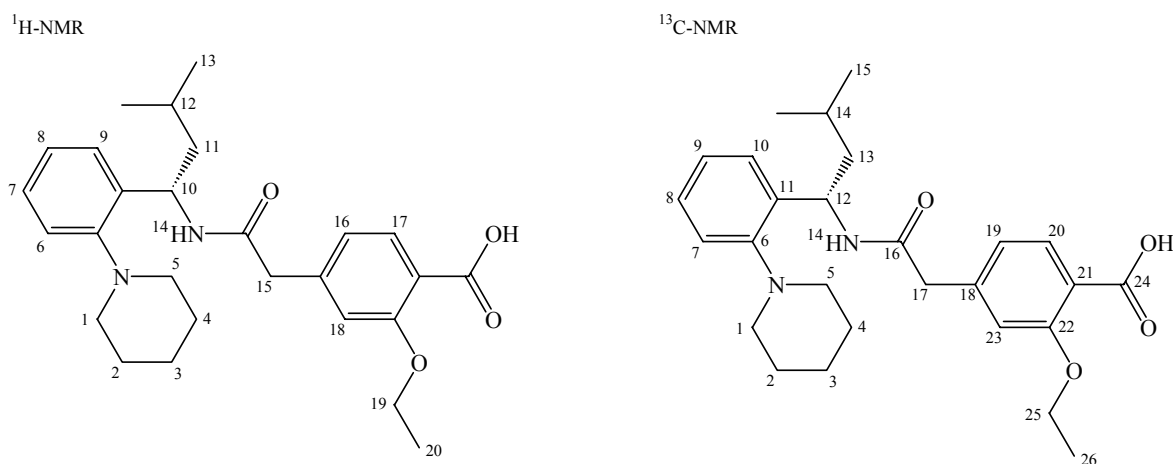
Zu einer Lösung von (S)-2-Hydroxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure-methylester **7** (860 mg, 1.96 mmol) und  $K_2CO_3$  (630 mg, 4.5 mmol) in Aceton (5 mL) wurden Bromethan (327 mg, 3 mmol) und NaI (10 mg, 66.7  $\mu$ mol) gegeben und 20 Stunden im Rückfluss erhitzt, bis die dünnschichtchromatographische Kontrolle (n-Hexan/Ethylacetat 1:1) vollständigen Umsatz anzeigte. Die Mischung wurde filtriert und das Lösungsmittel des Filtrates im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (n-Hexan/Ethylacetat 1:1) aufgereinigt, wonach man das Produkt in Form eines weißen Feststoffes mit einer Ausbeute von 65% (596 mg, 1.27 mmol) erhielt.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.6 (d, 1H,  $J^3_{H_{14},H_{10}}=7.8$  Hz, H-14), 7.3 (d, 1H,  $J^3_{H_{17},H_{16}}=8.1$ Hz, H-17 ), 7.1 (m, 2H, H-7+H-9), 7.0 (m, 2H, H-6+H-8), 6.9 (s, 1H, H-18), 6.8 (d, 1H,  $J^3_{H_{16},H_{17}}=8.1$  Hz, H-16), 5.6 (m, 1H, H-10), 4.0 (q, 2H,  $J^3_{H_{19},H_{20}}=7.0$ Hz, H-19), 3.7 (s, 3H, H-21), 3.5 (s, 2H, H-15), 3.1 (m, 2H, H-5), 2.6 (m, 2H, H-1), 1.8-1.4 (m, 9H, H-2+H-3+H-4+H-11+H-12), 1.4 (t, 3H,  $J^3_{H_{20},H_{19}}=7.0$ Hz, H-20), 0.9 (m, 6H, H-13).

$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz, Aceton- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 168.3 (C-16), 165.9 (C-24), 158.0 (C-22), 152.0 (C-6), 142.3 (C-18), 140.1 (C-20), 130.8 (C-10), 127.1 (C-8), 126.1 (C-11), 124.0 (C-19), 120.6 (C-9), 119.6 (C-23), 118.9 (C-21), 114.0 (C-7), 64.0 (C-26), 54.4 (C-1+C-5), 50.7 (C-25), 46.5 (C-13), 46.4 (C-12), 42.9 (C-17), 25.0 (C-3), 23.9 (C-2+C-4), 22.4 (C-14), 21.4 (C-15), 14.0 (C-27).

FD MS:  $m/z$  (%) = 468.0 (100%).

### 5.2.2.2 (S)-2-Ethoxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl]-methyl]-benzoesäure (Repaglinid) 1



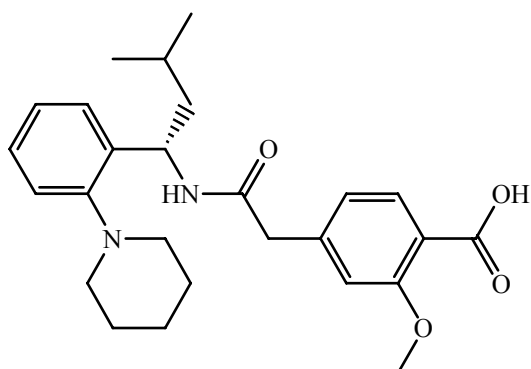
Eine Lösung von (S)-2-Ethoxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure-methylester **4** (467 mg, 1 mmol) in Methanol (10 mL) wurde mit 1 N Natronlauge (2.1 mL) im Rückfluss erhitzt, bis die dünnschichtchromatographische Kontrolle (Methanol/Ethylacetat 1:9) vollständigen Umsatz anzeigte. Die Mischung wurde mit 1 N HCl (2.1 mL) neutralisiert, filtriert und der abfiltrierte Feststoff mit kaltem Wasser gewaschen. Sofern nötig, wurde das erhaltene Produkt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Methanol/Ethylacetat 1:9) aufgereinigt. Man erhielt das Produkt in Form eines weißen Feststoffes mit einer Ausbeute von 95% (432 mg, 0.95 mmol).

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.7 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}14,\text{H}10}=7.8$  Hz, H-14), 7.2 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}17,\text{H}16}=8.1$  Hz, H-17), 7.1 (m, 2H, H-7+H-9), 7.0 (t, 1H,  $J^3_{\text{H}8,\text{H}7,\text{H}9}=8.1$  Hz, H-8), 6.95 (s, 1H, H-18), 6.9 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}6,\text{H}7}=8.1$  Hz, H-6), 6.8 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}16,\text{H}17}=8.1$  Hz, H-16), 5.5 (m, 1H, H-10), 4.0 (q, 2H,  $J^3_{\text{H}19,\text{H}20}=7.0$  Hz, H-19), 3.5 (s, 2H, H-15), 3.0 (m, 2H, H-5), 2.6 (m, 2H, H-1), 1.8-1.45 (m, 9H, H-2+H-3+H-4+H-11+H-12), 1.4 (t, 3H,  $J^3_{\text{H}20,\text{H}19}=7.0$  Hz, H-20), 0.9 (m, 6H, H-13).

$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz, MeOH- $\text{d}_4$ ):  $\delta$  (ppm) = 172.1 (C-24), 170.7 (C-16), 158.0 (C-22), 151.6 (C-6), 142.4 (C-18), 138.9 (C-20), 130.8 (C-10), 127.3 (C-8), 125.8 (C-11), 124.1 (C-19), 120.7 (C-9), 120.6 (C-23), 118.2 (C-21), 113.3 (C-7), 64.5 (C-25), 54.3 (C-1+C-5), 46.5 (C-13), 45.8 (C-12), 42.4 (C-17), 25.0 (C-3), 23.7 (C-2+C-4), 21.9 (C-14), 21.0 (C-15), 13.3 (C-26).

FD MS:  $m/z$  (%) = 454.9 (100%).

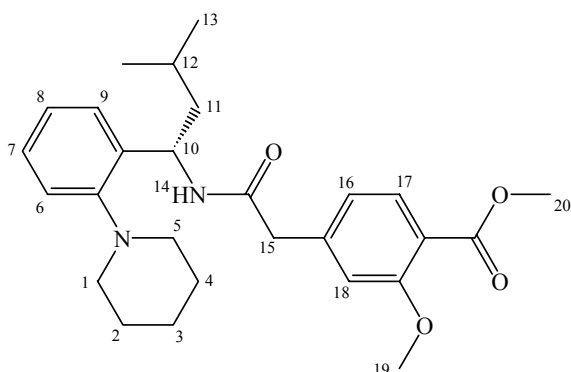
### 5.2.3 Referenzverbindung (S)-2-Methoxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) 3



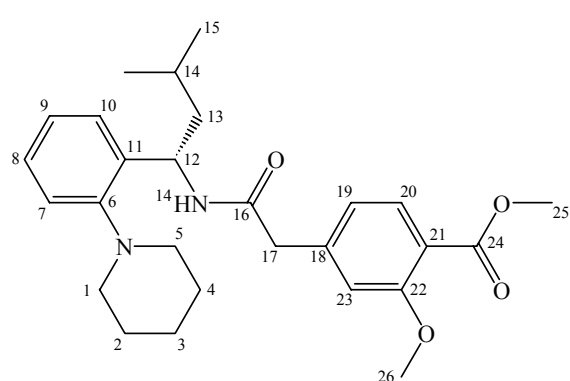
3

#### 5.2.3.1 2-Methoxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure-methylester 6

<sup>1</sup>H-NMR



<sup>13</sup>C-NMR



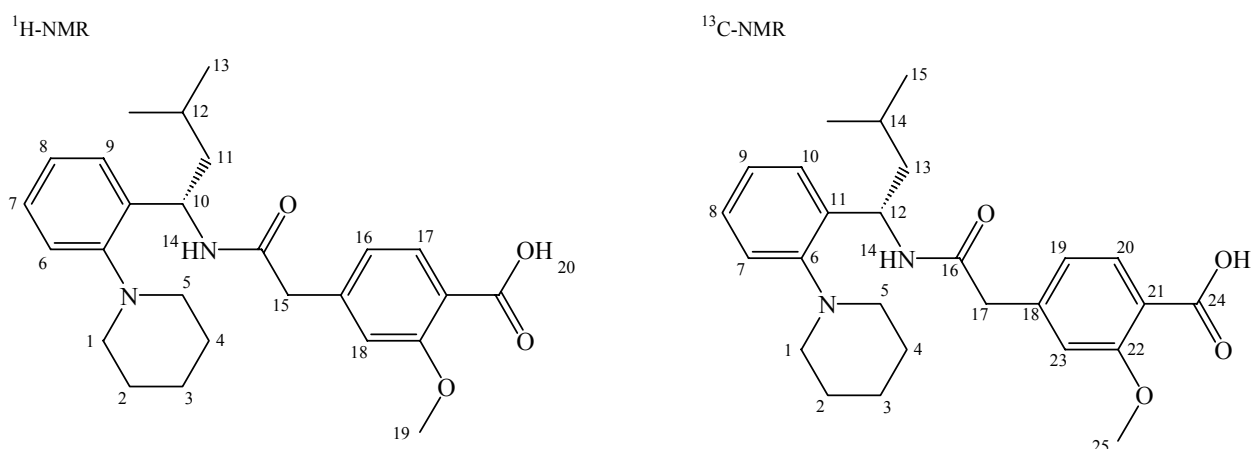
Zu einer Lösung von (S)-2-Hydroxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure-methylester **7** (860 mg, 1.96 mmol) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (630 mg, 4.5 mmol) in Aceton (5 mL) wurde Methyljodid (1.4 g, 10 mmol) gegeben und 20 Stunden im Rückfluss erhitzt, bis die dünnschichtchromatographische Kontrolle (n-Hexan/Ethylacetat 1:1) vollständigen Umsatz anzeigte. Die Mischung wurde filtriert und das Lösungsmittel des Filtrates im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (n-Hexan/Ethylacetat 1:1) aufgereinigt, wonach man das Produkt in Form eines weißen Feststoffes mit einer Ausbeute von 70% (623 mg, 1.37 mmol) erhielt.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 7.6 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H14,H10</sub>=7.8 Hz, H-14), 7.3 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H17,H16</sub>=8.1 Hz, H-17), 7.1 (m, 2H, H-7+H-9), 7.0 (m, 2H, H-6+H-8), 6.9 (s, 1H, H-18), 6.8 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H16,H17</sub>=8.1 Hz, H-16), 5.6 (m, 1H, H-10), 3.75 (s, 3H, H-19), 3.74 (s, 3H, H-20), 3.5 (s, 2H, H-15), 3.1 (m, 2H, H-5), 2.6 (m, 2H, H-1), 1.8-1.1 (m, 9H, H-2+H-3+H-4+H-11+H-12), 0.9 (m, 6H, H-13).

$^{13}\text{C}$ -NMR (400MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 168.3 (C-16), 165.9 (C-24), 158.7 (C-22), 152.0 (C-6), 142.5 (C-18), 140.1 (C-20), 130.9 (C-10), 127.1 (C-8), 126.1 (C-11), 124.0 (C-19), 120.6 (C-9), 119.6 (C-23), 118.5 (C-21), 112.9 (C-7), 59.4 (C-26), 54.3 (C-1+C-5), 50.8 (C-25), 46.6 (C-13), 46.5 (C-12), 43.0 (C-17), 25.0 (C-3), 23.9 (C-2+C-4), 22.4 (C-14), 21.4 (C-15).

FD MS:  $m/z$  (%) = 453.9 (100%).

### 5.2.3.2 (S)-2-Methoxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl]-methyl]-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) 3



Eine Lösung von (S)-2-Methoxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure-methylester **6** (467 mg, 1 mmol) in Methanol (10 mL) wurde mit 1 N Natronlauge (2.1 mL) im Rückfluss erhitzt, bis die dünnschichtchromatographische Kontrolle (Methanol/Ethylacetat 1:9) vollständigen Umsatz anzeigte. Die Mischung wurde mit 1 N HCl (2.1 mL) neutralisiert, gekühlt, filtriert und der abfiltrierte Feststoff mit kaltem Wasser gewaschen. Sofern nötig, wurde das erhaltene Produkt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Methanol/Ethylacetat 1:9) aufgereinigt. Man erhielt das Produkt in Form eines weißen Feststoffes mit einer Ausbeute von 90% (395 mg, 0.9 mmol).

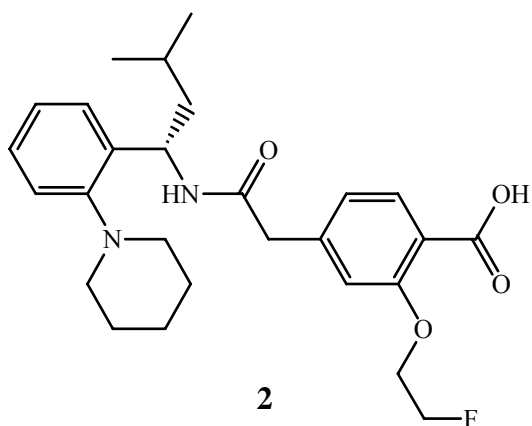
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.5 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}14,\text{H}10}=7.8$  Hz, H-14), 7.2 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}17,\text{H}16}=8.1\text{Hz}$ , H-17), 7.1 (m, 2H, H-7+H-9), 7.0 (t, 1H,  $J^3_{\text{H}8,\text{H}7, \text{H}9}=8.1\text{Hz}$ , H-8), 6.9 (s, 1H, H-18), 6.8 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}6,\text{H}7}=8.1\text{Hz}$ , H-6), 6.8 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}16,\text{H}17}=8.1$  Hz, H-16), 5.5 (m, 1H, H-10), 3.7 (s, 3H, H-19), 3.5 (s, 2H, H-15), 3.0 (m, 2H, H-5), 2.6 (m, 2H, H-1), 1.8-1.1 (m, 9H, H-2+H-3+H-4+H-11+H-12), 0.9 (m, 6H, H-13).

$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm) = 171.9 (C-24), 171.0 (C-16), 157.5 (C-22), 151.9 (C-6), 139.5 (C-18), 139.1 (C-20), 129.7 (C-10), 127.1 (C-8), 125.7 (C-11), 124.0 (C-19), 123.7 (C-21), 120.6 (C-9), 120.3 (C-23), 111.7 (C-7), 59.5 (C-25), 54.6 (C-1+C-5), 48.8 (C-12), 46.0 (C-13), 42.5 (C-17), 24.9 (C-3), 23.8 (C-2+C-4), 22.0 (C-14), 21.1 (C-15).

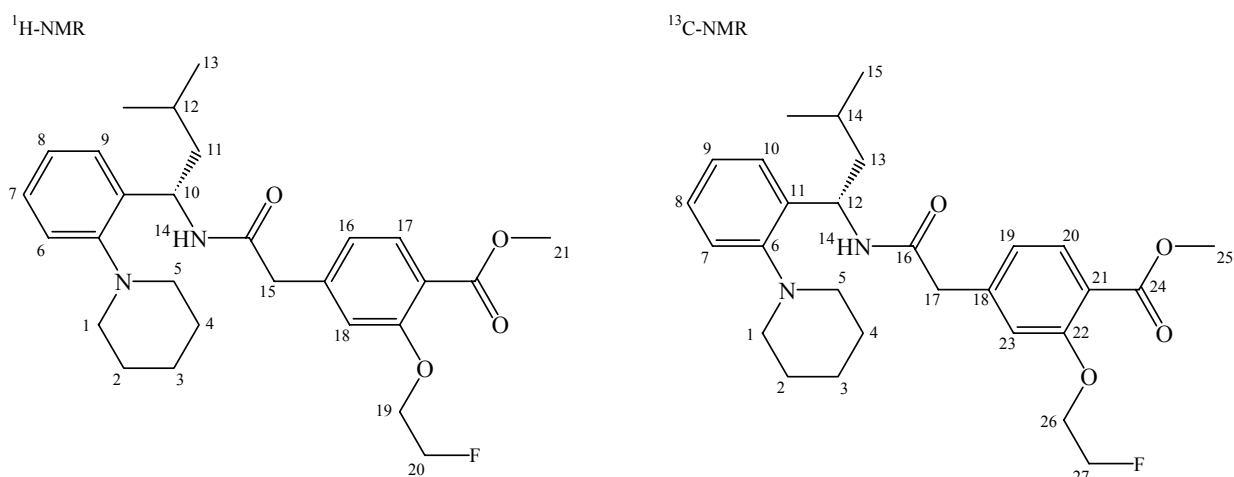
FD MS:  $m/z$  (%) = 439.3 (100%).



## 5.2.4 Referenzverbindung (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) 2



### 5.2.4.1 (S)-2-(2-Fluorethoxy)-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure-methylester 5



Zu einer Lösung von (S)-2-Hydroxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure-methylester **7** (860 mg, 1.96 mmol) und  $K_2CO_3$  (630 mg, 4.5 mmol) in Aceton (5 mL) wurden 1-Brom-2-Fluorethan (501 mg, 3 mmol) und NaI (10 mg, 66.7  $\mu$ mol) gegeben und 20 Stunden im Rückfluss erhitzt, bis die dünnschichtchromatographische Kontrolle (n-Hexan/Ethylacetat 1:1) vollständigen Umsatz anzeigte. Die Mischung wurde filtriert und das Lösungsmittel des Filtrates im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (n-Hexan/Ethylacetat 1:1) aufgereinigt, wonach man das Produkt in Form eines weißen Feststoffes mit einer Ausbeute von 54% (513 mg, 1.06 mmol) erhielt.

$^1H$ -NMR (400MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.6 (d, 1H,  $J^3_{H14,H10}=7.8$  Hz, H-14), 7.5 (d, 1H,  $J^3_{H17,H16}=8.1$ Hz, H-17), 7.2 (m, 1H, H-6), 7.1 (m, 2H, H-7+H-9), 7.0 (s, 1H, H-18), 6.9 (t, 1H,  $J^3_{H8,H7,H9}=8.1$ Hz, H-8), 6.9 (d, 1H,  $J^3_{H16,H17}=8.1$  Hz, H-16), 5.5 (m, 1H, H-10), 4.7 (dt, 2H,  $J^3_{H20,H19}=3.9$ Hz,  $J^3_{H20,F}=48$ Hz, H-20), 4.2 (dt, 2H,  $J^3_{H19,H20}=3.9$ Hz,  $J^3_{H19,F}=29$ Hz, H-19), 3.7 (s,

3H, H-21), 3.5 (s, 2H, H-15), 3.1 (m, 2H, H-5), 2.6 (m, 2H, H-1), 1.8 – 1.1 (m, 9H, H-2+H-3+H-4+H-11+H-12), 0.9 (d, 3H,  $J_{H13,H12}^3=3.1\text{Hz}$ , H-13).

$^{13}\text{C}$ -NMR (400MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 168.2 (C-16), 165.7 (C-24), 157.7 (C-22), 151.9 (C-6), 142.4 (C-18), 140.0 (C-20), 130.9 (C-10), 127.1 (C-8), 126.0 (C-11), 124.0 (C-19), 121.4 (C-9), 120.6 (C-23), 119.3 (C-21), 114.9 (C-7), 82.5 (C-27), 80.4 (C-27), 68.5 (C-26), 53.9 (C-1+C-5), 50.8 (C-25), 46.5 (C-13), 46.4 (C-12), 42.8 (C-17), 26.4, 24.9 (C-3), 23.9 (C-2+C-4), 22.4 (C-14), 21.4 (C-15).

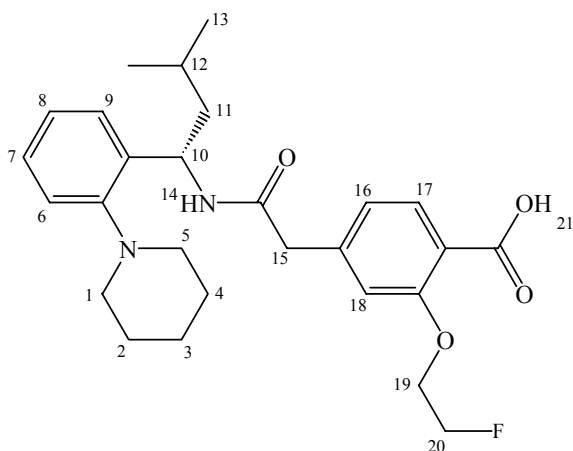
$^{19}\text{F}$ -NMR (400MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) =  $-224.4$  (tt, 1F,  $J_{F,H19}^3=29\text{Hz}$ ,  $J_{F,H20}^2=48\text{Hz}$ ).

FD MS:  $m/z$  (%) = 485.0 (100%).

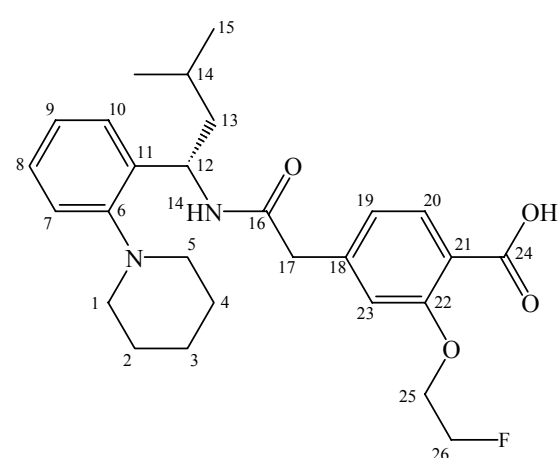
Anal.  $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{FN}_2\text{O}_4$  (berechnet): C 69.25%, H 7.86%, N 5.80% (C 69.40%, H 7.70%, N 5.78%).

#### 5.2.4.2 (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) 2

$^1\text{H}$ -NMR



$^{13}\text{C}$ -NMR



Eine Lösung von (S)-2-Ethoxy-4-{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure-methylester **5** (485 mg, 1 mmol) in Methanol (10 mL) wurde mit 1 N Natronlauge (2.1 mL) im Rückfluss erhitzt, bis die dünnschichtchromatographische Kontrolle (Methanol/Ethylacetat 1:9) vollständigen Umsatz anzeigte. Die Mischung wurde mit 1 N HCl (2.1 mL) neutralisiert, gekühlt, filtriert und der abfiltrierte Feststoff mit kaltem Wasser gewaschen. Sofern nötig, wurde das erhaltene Produkt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Methanol/Ethylacetat 1:9) aufgereinigt. Man erhielt das Produkt in Form eines weißen Feststoffes mit einer Ausbeute von 93% (438 mg, 0.93 mmol).

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.4 (d, 1H), 7.7 (d, 1H,  $J_{H14,H10}^3=7.8\text{ Hz}$ , H-14), 7.2 (d, 1H,  $J_{H17,H16}^3=8.1\text{Hz}$ , H-17), 7.1 (m, 2H, H-7+H-9), 7.0 (t, 1H,  $J_{H8,H7, H9}^3=8.1\text{Hz}$ , H-8), 6.97 (s, 1H, H-18), 6.92 (d, 1H,  $J_{H6,H7}^3=8.1\text{Hz}$ , H-6), 6.8 (d, 1H,  $J_{H16,H17}^3=8.1\text{ Hz}$ , H-16), 5.5 (m, 1H, H-10), 4.7 (dt, 2H,  $J_{H20,H19}^3=3.9\text{Hz}$ ,  $J_{H20,F}^3=48\text{Hz}$ , H-20), 4.2 (dt, 2H,  $J_{H19,H20}^3=3.9\text{Hz}$ ,

$J^3_{\text{H19,F}}=29\text{Hz}$ , H-19), 3.5 (s, 2H, H-15), 3.0 (m, 2H, H-5), 2.6 (m, 2H, H-1), 1.8 – 1.2 (m, 9H, H-2+H-3+H-4+H-11+H-12), 0.9 (d, 3H, H-13), 0.89 (d, 3H,  $J^3_{\text{H13,H12}}=3.1\text{Hz}$ , H-13).

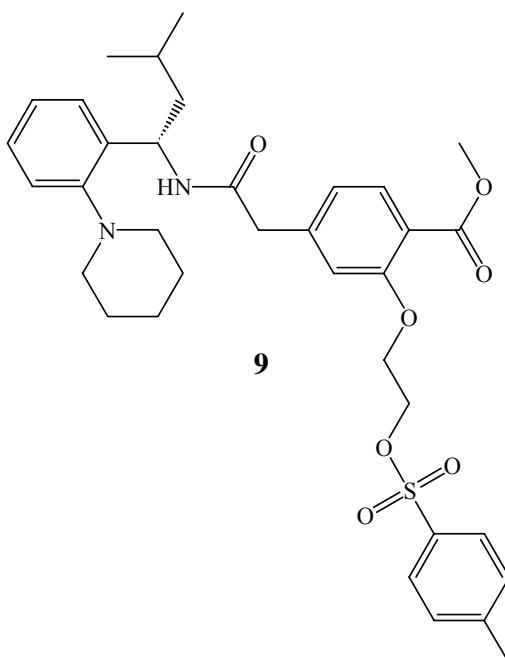
$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm) = 170.7 (C-24), 167.9 (C-16), 157.7 (C-22), 151.8 (C-6), 142.1 (C-18), 138.8 (C-20), 131.4 (C-10), 127.3 (C-8), 125.8 (C-11), 124.3 (C-19), 121.3 (C-9), 120.6 (C-23), 118.8 (C-21), 113.9 (C-7), 82.1 (C-26), 80.4 (C-26), 68.4 (C-25), 68.2, 54.4 (C-1+C-5), 46.6 (C-13), 45.6 (C-12), 42.3 (C-17), 24.9 (C-3), 23.6 (C-2+C-4), 21.9 (C-14), 21.0 (C-15).

$^{19}\text{F-NMR}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm) = -225.6 (tt, 1F,  $J^3_{\text{F,H19}}=28\text{Hz}$ ,  $J^2_{\text{F,H20}}=48\text{Hz}$ ).

FD MS:  $m/z$  (%) = 470.9 (100%).

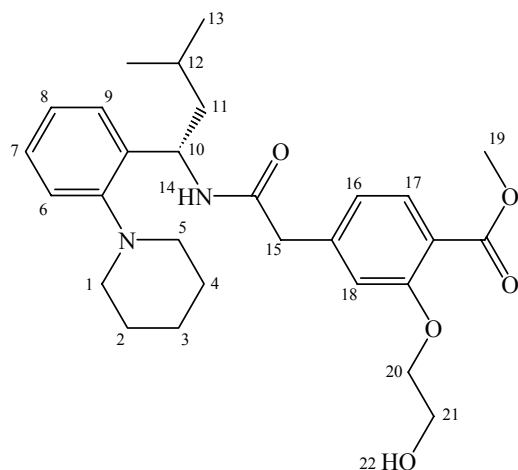
Anal.  $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{FN}_2\text{O}_4$  (berechnet): C 68.99%, H 7.33%, N 6.04% (C 68.91%, H 7.50%, N 5.95%).

### 5.2.5 Direktmarkierungsvorläufer (S)-4-{[3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-2-[2-(toluene-4-sulfonyloxy)-ethoxy]-benzoesäure-methylester **9**

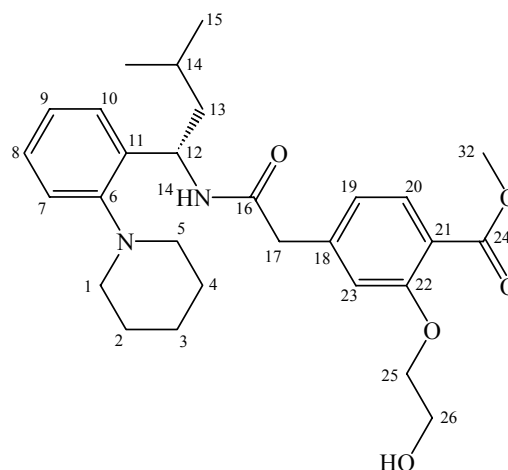


### 5.2.5.1 (S)-2-(2-Hydroxy-ethoxy)-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure-methylester 8

<sup>1</sup>H-NMR



<sup>13</sup>C-NMR



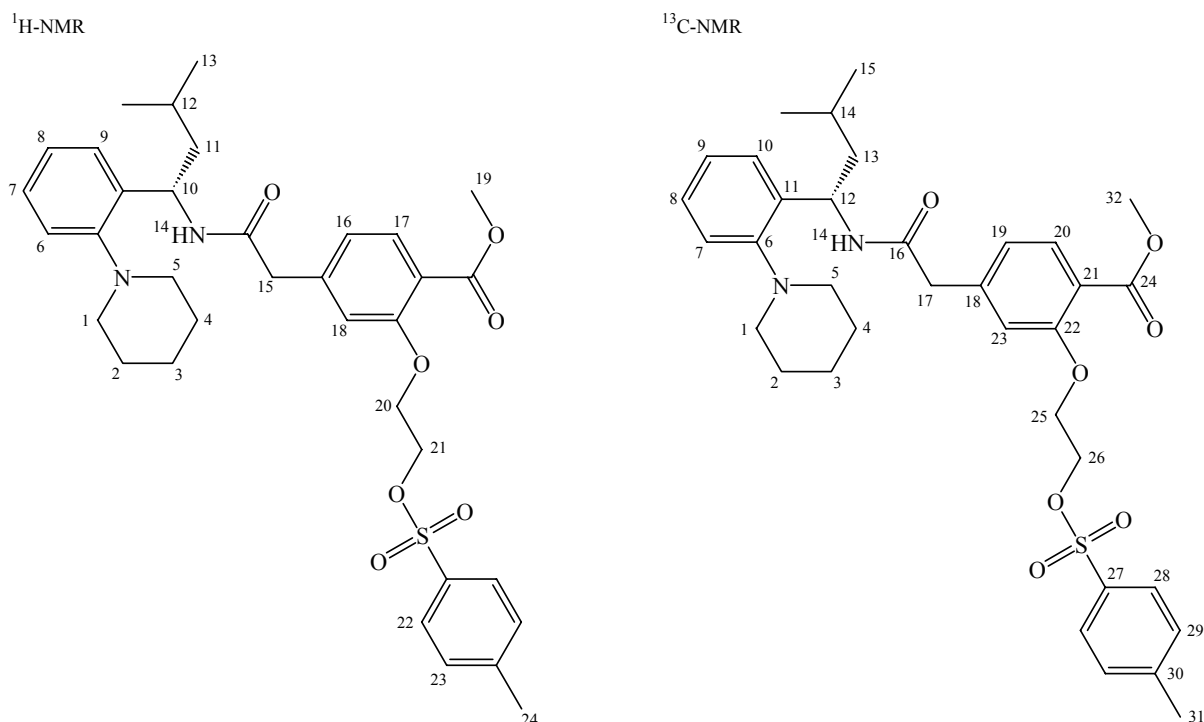
Zu einer Lösung von (S)-2-Hydroxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure-methylester (482 mg, 1.1 mmol) **7** in DMF (5 mL) und Kaliumcarbonat (140 mg, 1 mmol) wurde eine Spatelspitze Natriumiodid und 2-Bromethanol (136 mg, 1.1 mmol) gegeben und 24 Stunden bei 100°C rühren gelassen. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser aufgenommen und mit Diethylether (3 x 20 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und das erhaltene Produkt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (n-Hexan/Ethylacetat 5:2) aufgereinigt. Man erhielt das Produkt in Form eines weißen Feststoffes (275 mg, 0.57 mmol) mit einer Ausbeute von 52%.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8.2 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H14,H10</sub>=7.8Hz, H-14), 7.6 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H17,H16</sub>=8.1Hz, H-17), 7.2 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H9,H8</sub>=8.1Hz, H-9), 7.1 (m, 1H, H-7), 7.0 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H6,H7</sub>=8.1Hz, H-6), 6.9 (t, 1H, J<sup>3</sup><sub>H8,H7,H9</sub>=8.1Hz, H-8), 6.8 (s, 1H, H-18), 6.7 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H16,H17</sub>=8.1 Hz, H-16), 5.4 (m, 1H, H-10), 4.34 (t, 2H, J<sup>3</sup><sub>H20,H21</sub>=5.7Hz, H-20), 4.11 (t, 2H, J<sup>3</sup><sub>H21,H20</sub>=5.7Hz, H-21), 3.7 (s, 3H, H19), 3.4 (s, 2H, H-15), 3.0 (m, 2H, H-5), 2.5 (m, 2H, H-1), 1.8 – 1.1 (m, 9H, H-2+H-3+H-4+H-11+H-12), 0.84 (d, 3H, J<sup>3</sup><sub>H13,H12</sub>=3.1Hz, H-13), 0.82 (d, 3H, J<sup>3</sup><sub>H13,H12</sub>=3.1Hz, H-13).

<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 171.2 (C-24), 169.5 (C-16), 160.2 (C-22), 151.7 (C-6), 145.3 (C-18), 140.5 (C-20), 129.9 (C-10), 127.4 (C-8), 126.2 (C-11), 124.2 (C-19), 120.7 (C-9), 120.6 (C-23), 118.5 (C-21), 111.1 (C-7), 78.1 (C-25), 63.9 (C-26), 54.2 (C-1+C-5), 52.5 (C-25), 52.1 (C-32), 46.7 (C-13), 46.2 (C-12), 42.6 (C-17), 25.1 (C-3), 24.0 (C-2+C-4), 23.3 (C-14), 22.0 (C-15).

FD MS: m/z (%) = 483.2 (100%).

### 5.2.5.2 Direktmarkierungsvorläufer (S)-4-{{3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-2-[2-(toluene-4-sulfonyloxy)-ethoxy]-benzoesäure-methylester **9**



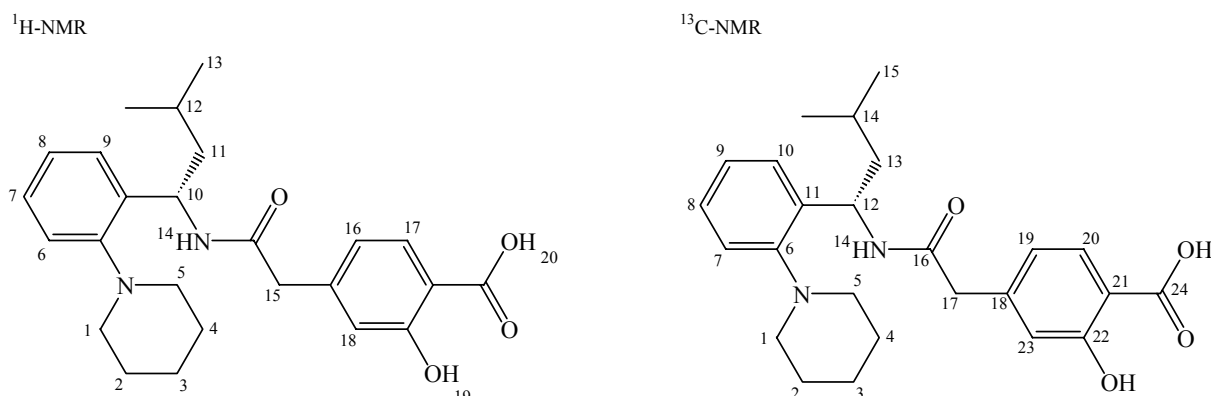
Zu einer Lösung von Toluolsulfonsäurechlorid (190 mg, 1mmol) und (S)-2-(2-Hydroxyethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäuremethylester **8** (483 mg, 1 mmol) in Chloroform (10 mL) wurde bei 0°C und unter Schutzgas absolutes Piperidin (158 mg, 2 mmol, 161 µL) zugesetzt und eine Stunde reagieren gelassen. Anschließend wurde eine Mischung aus Eis (5 g) und konzentrierter Schwefelsäure (2 mL) zugegeben, die organische Phase abgetrennt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt das Produkt in Form eines weißen Feststoffes in einer Ausbeute von 55% (343 mg, 0.55 mmol).

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8.2 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H14,H10</sub>=7.8Hz, H-14), 7.9 (d, 2H, J<sup>3</sup><sub>H22,H23</sub>=7.8Hz, H-22), 7.6 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H17,H16</sub>=8.1Hz, H-17), 7.5 (d, 2H, J<sup>3</sup><sub>H23,H22</sub>=7.8Hz, H-23), 7.2 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H9,H8</sub>=8.1Hz, H-9), 7.1 (m, 1H, H-7), 7.0 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H6,H7</sub>=8.1Hz, H-6), 6.9 (t, 1H, J<sup>3</sup><sub>H8,H7,H9</sub>=8.1Hz, H-8), 6.8 (s, 1H, H-18), 6.7 (d, 1H, J<sup>3</sup><sub>H16,H17</sub>=8.1 Hz, H-16), 5.4 (m, 1H, H-10), 4.34 (t, 2H, J<sup>3</sup><sub>H20,H21</sub>=5.7Hz, H-20), 4.11 (t, 2H, J<sup>3</sup><sub>H21,H20</sub>=5.7Hz, H-21), 3.7 (s, 3H, H19), 3.4 (s, 2H, H-15), 3.0 (m, 2H, H-5), 2.5 (m, 2H, H-1), 2.32 (s, 3H, H-24), 1.8 – 1.1 (m, 9H, H-2+H-3+H-4+H-11+H-12), 0.84 (d, 3H, J<sup>3</sup><sub>H13,H12</sub>=3.1Hz, H-13), 0.82 (d, 3H, J<sup>3</sup><sub>H13,H12</sub>=3.1Hz, H-13).

<sup>13</sup>C-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 171.2 (C-24), 169.5 (C-16), 160.2 (C-22), 151.7 (C-6), 145.3 (C-18), 142.9 (C-30), 140.5 (C-20), 132.4 (C-27), 130.7 (C-29), 129.9 (C-10), 127.4 (C-8), 127.1 (C-28), 126.2 (C-11), 124.2 (C-19), 120.7 (C-9), 120.6 (C-23), 118.5 (C-21), 111.1 (C-7), 72.3 (C-25), 63.1 (C-26), 54.2 (C-1+C-5), 52.5 (C-25), 52.1 (C-32), 46.7 (C-13), 46.2 (C-12), 42.6 (C-17), 25.1 (C-3), 24.0 (C-2+C-4), 23.3 (C-14), 22.0 (C-15), 21.3 (C-31).

FD MS: m/z (%) = 622.9 (100%).

## 5.2.6 Markierungsvorläufer (S)-2-Hydroxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure 10



Eine Lösung von (S)-2-Hydroxy-4-[[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl]-benzoesäure-methylester **7** (467 mg, 1 mmol) in Methanol (10 mL) wurde mit 1 N Natronlauge (3.1 mL) im Rückfluss erhitzt, bis die dünnschichtchromatographische Kontrolle (Methanol/Ethylacetat 1:9) vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Mischung wurde mit 1 N HCl (3.1 mL) neutralisiert, gekühlt, filtriert und der abfiltrierte Feststoff mit kaltem Wasser gewaschen. Das erhaltene Produkt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Methanol/Ethylacetat 1:9) aufgereinigt. Man erhielt das Produkt in Form eines weißen Feststoffes mit einer Ausbeute von 27% (114 mg, 0.27 mmol).

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 10.3 (s, 1H, H-19), 8.2 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}14,\text{H}10}=7.8\text{Hz}$ , H-14), 7.6 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}17,\text{H}16}=8.1\text{Hz}$ , H-17), 7.2 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}9,\text{H}8}=8.1\text{Hz}$ , H-9), 7.1 (m, 1H, H-7), 7.0 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}6,\text{H}7}=7.5\text{Hz}$ , H-6), 6.9 (t, 1H,  $J^3_{\text{H}8,\text{H}7,\text{H}9}=8.1\text{Hz}$ , H-8), 6.8 (s, 1H, H-18), 6.7 (d, 1H,  $J^3_{\text{H}16,\text{H}17}=8.1\text{Hz}$ , H-16), 5.4 (m, 1H, H-10), 3.4 (s, 2H, H-15), 3.0 (m, 2H, H-5), 2.5 (m, 2H, H-1), 1.8 – 1.1 (m, 9H, H-2+H-3+H-4+H-11+H-12), 0.84 (d, 3H,  $J^3_{\text{H}13,\text{H}12}=3.1\text{Hz}$ , H-13), 0.82 (d, 3H,  $J^3_{\text{H}13,\text{H}12}=3.1\text{Hz}$ , H-13).

$^{13}\text{C-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 171.2 (C-24), 169.5 (C-16), 160.2 (C-22), 151.7 (C-6), 145.3 (C-18), 140.5 (C-20), 129.9 (C-10), 127.4 (C-8), 126.2 (C-11), 124.2 (C-19), 120.7 (C-9), 120.6 (C-23), 118.5 (C-21), 111.1 (C-7), 54.2 (C-1+C-5), 52.5 (C-25), 46.7 (C-13), 46.2 (C-12), 42.6 (C-17), 25.1 (C-3), 24.0 (C-2+C-4), 23.3 (C-14), 22.0 (C-15).

FD MS:  $m/z$  (%) = 424.3 (100%).

## 5.3 Radiosynthesen

### 5.3.1 Radiosynthesen mit [<sup>18</sup>F]Fluorid

Das für die Radiosynthesen mit Fluor-18 benötigte [<sup>18</sup>F]Fluorid wurde von der EURO-PET GmbH Freiburg oder vom Interdisziplinären PET-Zentrum der Universitätskliniken Tübingen bezogen. Dieses wird mittels der <sup>18</sup>O(p,n)<sup>18</sup>F-Kernreaktion hergestellt und fällt daher in Sauerstoff-18 angereichertem Wasser an.

Zu dessen Wiedergewinnung wurde die [<sup>18</sup>F]Fluorid-haltige Lösung auf einer QMA-Kartusche der Firma Waters fixiert. Dafür musste die Kartusche zunächst mit 1 M Kaliumcarbonatlösung (5 mL) und Wasser (10 mL) konditioniert werden. Zur Elution des [<sup>18</sup>F]Fluorids wurde eine Lösung von Kryptofix<sup>®</sup>2.2.2. (15 mg) und 1 M Kaliumcarbonatlösung (15 µL) in Acetonitril (800 µL) verwendet. Die wässrige n.c.a. [<sup>18</sup>F]Fluorid-Lösung wurde dabei in ein Wheaton-Reaktionsgefäß (5 mL) eluiert, welches einen mit Teflon beschichteten Magnetrührkern enthielt. Das Gefäß wurde im Anschluss mit einem Silicoseptum verschlossen und mit zwei Kanülen – für Stickstoffzufuhr und Vakuumanschluss – ausgestattet.

Da bei nukleophilen n.c.a. Markierungen mit [<sup>18</sup>F]Fluorid auf Wasserfreiheit des Systems geachtet werden muss, musste die wie oben beschrieben erhaltene Lösung des [<sup>18</sup>F]Fluorids in Acetonitril mehrmals getrocknet werden. Da sich das Kryptofix<sup>®</sup>2.2.2. bei Temperaturen von über 90°C zersetzt, musste bei niedrigeren Temperaturen gearbeitet werden. Daher wurde die Lösung bei einer Temperatur von 80°C zur Trockene eingeeengt, indem ein Druck von 700 mbar und ein schwacher Stickstoffstrom von etwa 400 mL/Minute angelegt wurden. Dieser Vorgang dauerte etwa drei Minuten und wurde nach Zugabe von 1 mL Acetonitril noch zweimal wiederholt.

Abschließend wurde ein Vakuum von etwa 100 mbar angelegt, um auch letzte Feuchtigkeitsspuren zu beseitigen.

Schließlich wurde das Gefäß mit Stickstoff begast, 800 bis 1000 µL des zur Synthese benötigten Lösungsmittels zugegeben und 2 Minuten rühren gelassen.

#### 5.3.1.1 Allgemeine Vorschrift für die Direktmarkierungen mit [<sup>18</sup>F]Fluorid

In einem 5 mL Wheaton-Reaktionsgefäß wurde eine Lösung von (S)-4-{{3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-2-[2-(toluol-4-sulfonyloxy)-ethoxy]-benzoesäure-methylester **9** (1.0 – 10.0 mg, 1.6 µmol – 15.7 µmol) in dem gewählten Lösungsmittel – Acetonitril, DMSO, DMF – (600 µL) vorgelegt, ein mit Teflon beschichteter Magnetrührkern zugegeben und das Gefäß durch einen Schraubverschluss mit Silikonseptum verschlossen. Die Lösung wurde 2 Minuten bei der gewählten Temperatur vortemperiert und der analog der

in Abschnitt 5.3.1 beschriebenen Vorgehensweise erhaltene Kryptofix<sup>®</sup>2.2.2./K<sup>+</sup>/[<sup>18</sup>F]-Komplex (400 µL, 100 bis 800 MBq), zugegeben. Zur Bestimmung der radiochemischen Ausbeute wurden nach bestimmten Zeiten je 100 µL der Reaktionslösung als Aliquot entnommen und durch Zugabe von 100 µL Wasser in einem Eppendorfgemäß gequenchet. Die erhaltenen Aliquotlösungen wurden radioanalytisch mittels Radio-DC oder Radio-HPLC (siehe Abschnitte 5.3.1.5.3 – 5.3.1.5.4) untersucht.

**Radio-DC:** Kieselgel 60 F<sub>254</sub>  
Laufmittel: Ethylacetat/ n-Hexan (v/v), 1:1  
R<sub>f</sub> (Intermediat [<sup>18</sup>F]-5) = 0.40

Laufmittel: Ethylacetat/ Methanol (v/v), 9:1  
R<sub>f</sub> (Endprodukt [<sup>18</sup>F]-2) = 0.60

**Radio-HPLC:** HPLC-System A und B:  
Säule: LiChrospher RP18 5µ EC (250 x 10 mm)  
Eluens: 80% MeCN, 20% Puffer (NaAc/HAc 0.1 mol/L, pH = 6)  
Flussrate: 4 mL/Minute  
Retentionszeiten: R<sub>t</sub> = 12.8 Minuten Direktmarkierungs-  
vorläufer 9  
R<sub>t</sub> = 10.2 Minuten Intermediat [<sup>18</sup>F]-5  
R<sub>t</sub> = 4.5 Minuten Endprodukt [<sup>18</sup>F]-2

Zur Isolierung des Intermediates (S)-2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester [<sup>18</sup>F]-5 wurde nach der gewählten Reaktionszeit die Reaktionsmischung aus dem Reaktionsgefäß mit einer Spritze entnommen und über Radio-HPLC aufgereinigt. Dazu wurde die Mischung bei einem Fluss von 4 mL/Minute in dem oben beschriebenen HPLC-System aufgereinigt. Das radioaktive Intermediat [<sup>18</sup>F]-5 (R<sub>t</sub> = 10.2 Minuten) wurde in einem Becherglas aufgefangen und mit 20 mL Wasser verdünnt. Es wurde dann auf einer zuvor mit 5 mL Methanol und 10 mL Wasser konditionierten C<sub>18</sub>-Kartusche fixiert, mit Stickstoff getrocknet und mit 1.5 mL warmen Methanol in ein mit Magnetührkern ausgestattetes Reaktionsgefäß eluiert. Nach Zugabe von 100 µL 1 N Natronlauge wurde das Gefäß verschlossen und bei Temperaturen zwischen 50-80°C 5-45 Minuten gerührt. Die Reaktionsmischung wurde dann auf Raumtemperatur abgekühlt, durch Zugabe von 100 µL 1 N Salzsäure neutralisiert und erneut über HPLC aufgereinigt. Die erhaltene HPLC-Fraktion mit dem Endprodukt (S)-2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>18</sup>F]-2 (R<sub>t</sub> = 4.5 Minuten) wurde mit 20 mL Wasser verdünnt, erneut auf einer wie oben beschrieben vorkonditionierten C<sub>18</sub>-Kartusche fixiert, mit Stickstoff getrocknet und mit 1.0 mL warmen Ethanol eluiert. Von der so erhaltenen (S)-2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluorethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>18</sup>F]-2 wurde die radio-



chemische Ausbeute, die radiochemische Reinheit und die spezifische Aktivität radioanalytisch bestimmt (siehe Abschnitte 5.3.1.5.3 – 5.3.1.5.4).

### 5.3.1.2 Darstellung von 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat

Bei der manuellen Herstellung des 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylats wurde die analog 5.3.1 erhaltene wässrige n.c.a. [<sup>18</sup>F]Fluorid-Lösung (18000 MBq) in 1 mL Acetonitril aufgenommen und mit Ethylenglycol-1,2-ditosylat (4 mg, 10 µmol) bei 80°C 3 Minuten in einem verschlossenen Vial umgesetzt. Das 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat wurde mit einer durchschnittlichen radiochemischen Ausbeute von 80-90% (13000-14000 MBq) erhalten und entweder mittels Festphasenextraktion oder HPLC aufgereinigt, wobei die HPLC-Aufreinigung zwar zeitintensiver ist, das Produkt aber in höherer chemischer Reinheit liefert.

#### HPLC-Reinigung:

Zur Aufreinigung wurde dem Reaktionsgemisch (13000-14000 MBq) 1 mL Wasser zugesetzt und mittels Radio-HPLC (LiChrospher RP18 10µ EC (250 x 10 mm), Flussrate 5 mL/Minute, Acetonitril/Wasser 50/50 (v/v), R<sub>t</sub> = 8 Minuten) gereinigt.

Die bei der Auftrennung erhaltene Fraktion, die das Produkt enthielt, wurde mit Wasser auf das fünffache Volumen verdünnt und auf einer C<sub>18</sub>-Kartusche, die zuvor mit Ethanol (5 mL) und Wasser (10 mL) vorkonditioniert worden war, fixiert und sieben Minuten im Stickstoffstrom getrocknet. Das auf der Kartusche fixierte 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat wurde anschließend mit auf 60°C vortemperiertem Lösungsmittel (1.2 mL; Acetonitril, DMSO, DMF) eluiert.

Es wurden durchschnittliche radiochemische Gesamtausbeuten von 60% (45 Minuten, 8000 MBq) erhalten (Radiochemische Reinheit > 98%, Dauer der Reinigung: 22 Minuten).

#### Festphasenextraktion:

Zur Aufreinigung wurde dem Reaktionsgemisch (13000-14000 MBq) 4 mL Wasser zugesetzt und auf einer C<sub>18</sub>-Kartusche, die zuvor mit Ethanol (5 mL) und Wasser (10 mL) vorkonditioniert worden war, fixiert und sieben Minuten im Stickstoffstrom getrocknet. Das auf der Kartusche fixierte 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat wurde anschließend wie oben beschrieben mit auf 60°C vortemperiertem Lösungsmittel (1.2 mL; Acetonitril, DMSO, DMF) eluiert.

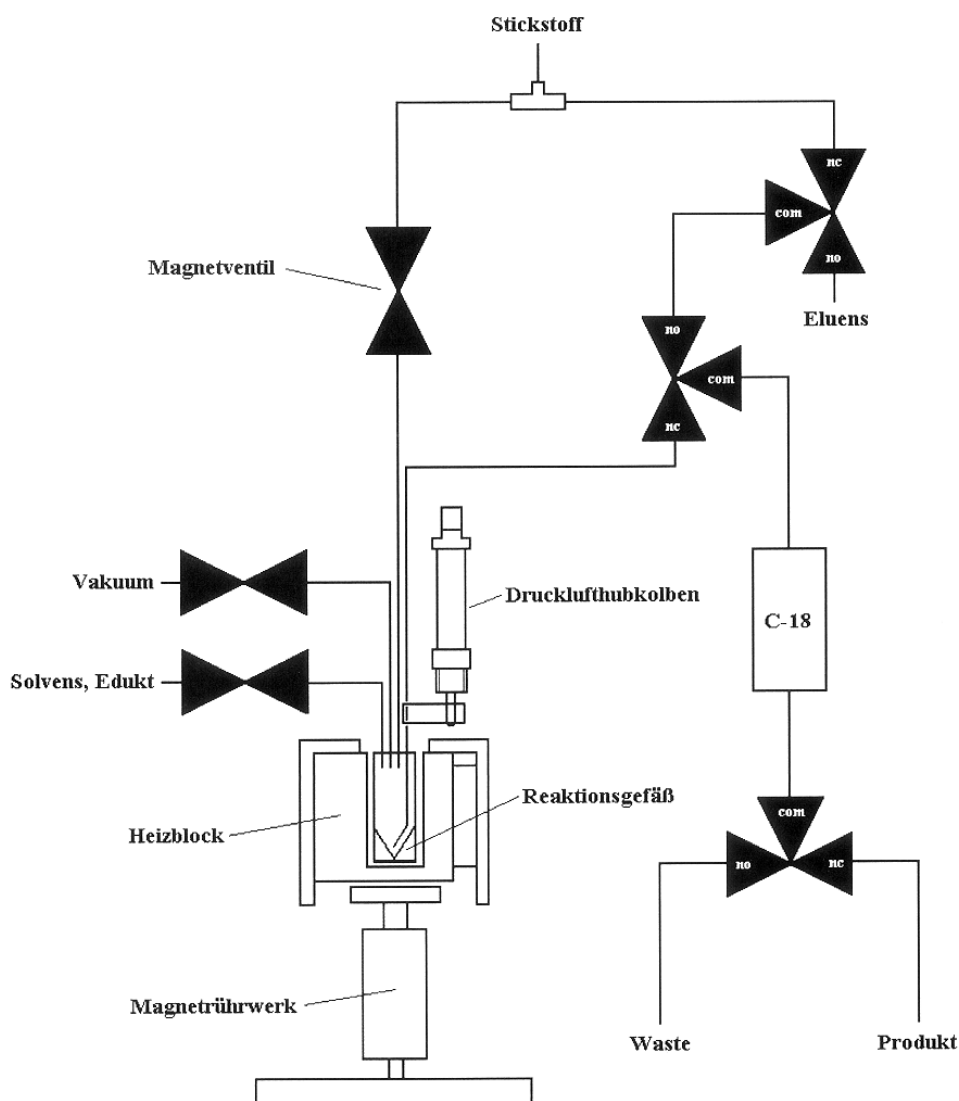
Es wurden radiochemische Gesamtausbeuten von 50-60% erreicht (8800 MBq) (Radiochemische Reinheit > 92%, Gesamtdauer der Reinigung: 9 Minuten).

Bei der semi-automatischen Synthese des 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylats wurde eine am Institut für Kernchemie in Mainz gebaute Apparatur verwendet (Abb. 48). In dieser Apparatur wurde zunächst die wässrige Fluoridlösung (800-1000 MBq) analog der in 5.3.1 beschriebenen Weise getrocknet. Dazu wurde das zur azeotropen Trocknung verwendete Acetonitril in einer

Spritze aufgenommen und dann durch leichten Unterdruck in den Reaktor der Apparatur geblasen.

Im Anschluss an die azeotropen Trocknungsschritte wurden Ethylenglycol-1,2-ditosylat (4 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ) in 1 mL Acetonitril gelöst und über das Zugabeventil in den Reaktor gegeben. Nach einer Reaktionszeit von ebenfalls 3 Minuten wurden 4 mL Wasser zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde zur Aufreinigung mittels Festphasenextraktion im Stickstoffstrom aus dem Reaktionsgefäß auf eine vorkonditionierte Kartusche, wie bei der manuellen Synthese beschrieben, überführt. Die radiochemischen Ausbeuten lagen bei 50-60%.

Abbildung 48 zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten semi-automatischen Apparatur zur Darstellung von 2-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethyltosylat.



**Abb. 48:** schematische Darstellung der semi-automatischen Apparatur zur Darstellung von 2-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethyltosylat

### 5.3.1.3 Darstellung von 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan

Ausgangspunkt der Darstellung von 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan ist die Umsetzung des in 5.3.1 beschriebenen Kryptofix<sup>®</sup>2.2.2./K<sup>+</sup>/[<sup>18</sup>F]-Komplexes mit kommerziell erhältlichem 1,2-Dibromethan. Die Umsetzung wurde in mit Silikonsepten verschlossenen Wheaton-Reaktionsgefäßen, die Trocknung des Fluorids wie in 5.3.1 beschrieben durchgeführt.

Zur n.c.a. Synthese von 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan wurde der getrocknete Kryptofix<sup>®</sup>2.2.2./K<sup>+</sup>/[<sup>18</sup>F]-Komplex in 1 mL Acetonitril gelöst und 2 Minuten bei 75°C mit 1,2-Dibromethan (2 mg, 10.6 µmol) umgesetzt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wurde dieses durch Zugabe von 20 mL Wasser verdünnt und auf einer Kartusche (LiChrolut EN, Fa. Merck) fixiert. Die beladene Kartusche wurde mit Stickstoff getrocknet und anschließend mit einer weiteren Kartusche (Sep-Pak Light, Alumina B, Fa. Waters) verbunden. Das 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan wurde mit 2.5 mL vorgewärmtem Solvens (Acetonitril, DMF, DMSO) eluiert (Comagic, 2002).

### 5.3.1.4 Allgemeine Vorschrift für die Markierungen mit den sekundären Markierungsvorläufern 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat und 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan

1.0 mg – 10.0 mg (2.28 µmol – 22.80 µmol) (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** bzw. 1.0 mg – 5.0 mg (2.36 µmol – 11.8 µmol) (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **10** wurden in einem 5 mL Wheaton-Reaktionsgefäß vorgelegt und in 600 µL des gewählten Lösungsmittels (Acetonitril, DMF, DMSO) gelöst. Dann wurde ein teflonbeschichteter Magnetührkern zugegeben und nach Zugabe von 1 N Natronlauge oder anderer Hilfsbasen (vergleiche Abschnitt 3.2.3) das Gefäß durch einen Schraubverschluss mit Silikonseptum verschlossen. Die Lösung wurde 2 Minuten bei der gewählten Temperatur (25°C-180°C) vortemperiert und die Reaktion durch Injektion von 400 µL der Lösung des gewählten sekundären Markierungsvorläufers 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat oder 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan in dem gewünschten Lösungsmittel gestartet. Zu vorgegebenen Zeiten wurden 100 µL der Reaktionslösung als Aliquot mit einer Spritze entnommen und durch Zugabe in einem mit 100 µL Wasser gefülltes Eppendorfgefäß gequenchet. Die resultierenden Aliquotlösungen wurden anschließend radioanalytisch untersucht (siehe Abschnitte 5.3.1.5.3 – 5.3.1.5.4).

Im Falle der Reaktionen ausgehend vom Markierungsvorläufer (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** mit dem sekundären Markierungsvorläufer 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat wurde die weitere Aufarbeitung und Isolierung des Intermediates (S)-2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluorethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester [<sup>18</sup>F]-**5**, sowie die Synthese und Isolierung des gewünschten Endproduktes (S)-2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-

(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure [<sup>18</sup>F]-**2** wie in Abschnitt 5.3.1.1 beschrieben durchgeführt.

Die Radiosynthesen ausgehend von (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure **10** wurden nur durch die Verwendung von Radio-DC im Laufmittel Ethylacetat/ Methanol (v/v) 9:1 analysiert.

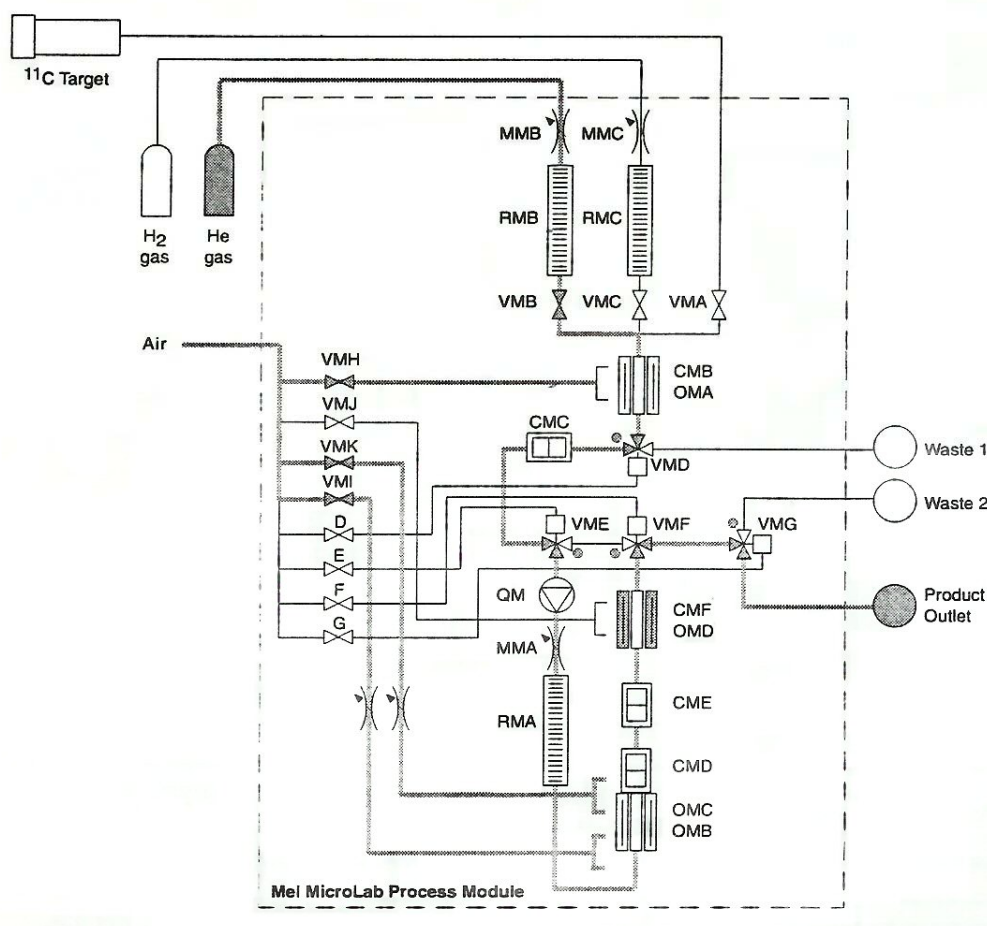
### **5.3.1.5      Vorschrift zur Radiosynthese von (S)-2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluorethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure [<sup>18</sup>F]-**2** für *in vivo*-Evaluierungen**

Zu einer Lösung von (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure-methylester **7** (2.1 mg, 4.8 µmol) in DMSO (250 µL) wurde eine 1 N Natronlauge (6.8 µL) gegeben und die Mischung für zwei Minuten auf 150°C erhitzt. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung von 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat (8000 MBq) in DMSO (150-200 µL) gegeben und für 10 Minuten in einem verschlossenen Reaktionsgefäß auf 150°C erhitzt. Das Zwischenprodukt [<sup>18</sup>F]-**5** wurde mittels HPLC (Acetonitril/0.1 M Essigsäure/Natriumacetat-Puffer (pH = 6) 8:2, Flussrate 4 mL/min, R<sub>t</sub> = 10.2 Minuten) aufgereinigt. Die das Zwischenprodukt enthaltende HPLC Fraktion wurde mit Wasser (20 mL) verdünnt, auf einer C<sub>18</sub>-Kartusche fixiert, im Stickstoffstrom getrocknet und mit Methanol (1.5 mL) eluiert, wobei man den (S)-2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluorethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure-methylester [<sup>18</sup>F]-**5** erhielt. Hierzu wurde 1 N Natronlauge (100 µL, 100 µmol) gegeben und für 35 Minuten in einem verschlossenen Reaktionsgefäß auf 80°C erhitzt. Die Mischung wurde mit 1 N HCl (100µL) neutralisiert und mittels HPLC (Acetonitril/0.1 M Essigsäure/Natriumacetat-Puffer (pH = 6) 8:2, Flussrate 4 mL/min, R<sub>t</sub> = 4.5 Minuten) aufgereinigt. Die das Produkt enthaltende HPLC-Fraktion wurde zur Isolierung von [<sup>18</sup>F]-**5** zunächst mit 20 mL Wasser verdünnt, auf einer C<sub>18</sub>-Kartusche fixiert, im Stickstoffstrom getrocknet und mit warmem Ethanol (1 mL) eluiert, wobei man das Produkt (S)-2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure [<sup>18</sup>F]-**2** (1500 MBq) erhielt. Um eine injizierbare Lösung für *in vivo*-Experimente zu erhalten, wurde die Lösung mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und anschließend eine Sterilfiltration durchgeführt. Analysen mittels HPLC zeigte eine radiochemische Reinheit von >98%. Eine Radio-DC Analyse (Ethylacetat/Methanol 9:1, R<sub>f</sub> = 0.6) bestätigte die Ergebnisse. Die spezifische Aktivität von [<sup>18</sup>F]-**2** wurde mittels UV-Kalibrierung festgestellt und lag zwischen 50 und 60 GBq/µmol. Die radiochemische Ausbeute lag bei 20 ± 2% nach 135 Minuten (vergleiche Abschnitt 5.3.1.6).

## 5.3.2 Radiosynthesen mit [<sup>11</sup>C]Kohlenstoff<sup>5</sup>

### 5.3.2.1 Darstellung von [<sup>11</sup>C]Methyliodid

Die Darstellung des [<sup>11</sup>C]Methyliodids erfolgt durch katalytische Reduktion des im Zyklotron durch die Nukleareaktion  $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$  produzierten [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> mit Wasserstoff an Nickel und anschließender Umsetzung mit elementarem Iod in einer automatisierten Apparatur (PETtrace MeI MicroLab, GE Medical Systems) (Abb. 49).



**Abb. 49:** schematische Darstellung der zur Synthese des [<sup>11</sup>C]Methyliodid verwendeten Apparatur (PETtrace MeI MicroLab, GE Medical Systems)

Zum Trappen des aus der Apparatur mittels eines Stickstoffstroms herausgeblasenen [<sup>11</sup>C]Methyliodids wurde dieses über eine Kanüle in ein mit 500 µL des für die Reaktion gewählten Lösungsmittels (Acetonitril, DMF, DMSO) gefüllten 3 mL Wheaton-Reaktionsgefäß geleitet. Dieses Reaktionsgefäß war durch einen Schraubverschluss mit Silikonseptum verschlossen. Zur Vermeidung eines Überdrucks wurde das Reaktionsgefäß mit einer

<sup>5</sup> Die radioaktiven Markierungssynthesen mit [<sup>11</sup>C]Kohlenstoff wurden an der Cyclotron Facility der University of Pennsylvania (UPenn) durchgeführt.

weiteren Kanüle ausgestattet. An diese wurde zum Auffangen eventuell entweichender Aktivität ein Aktivkohlefilter angekoppelt. Im Falle des Acetonitrils und des DMF als Lösungsmittel wurde zur Erhöhung des Trapping-Effektes des [<sup>11</sup>C]Methyliodids die Vorlage auf 0°C gekühlt.

Durch Gegenmessen des Aktivkohlefilters zum Reaktionsgefäß ergab sich, dass durchschnittlich 95% der Aktivität im DMF und Acetonitril gelöst vorlagen (DMSO 85%). Verluste im Leitungssystem konnten nicht berücksichtigt werden.

### 5.3.2.2 Allgemeine Vorschrift zu Markierungen mit [<sup>11</sup>C]Methyliodid

Zu 1.0 mg – 10.0 mg (2.28 µmol – 22.80 µmol) des Markierungsvorläufers (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** gelöst in 250-350 µL des gewünschten Lösungsmittels (Acetonitril, DMF, DMSO) wurde 1 N Natronlauge gegeben und die Mischung in einem mit einem Silikonseptum verschlossenen 3 mL Reaktionsgefäß eine Minute bei der gewählten Reaktionstemperatur vorgewärmt. Dann wurde eine Lösung von [<sup>11</sup>C]Methyliodid (1.9 – 2.2 GBq) in 350 – 450 µL des gewünschten Lösungsmittels zugegeben und die Lösung 15 Minuten bei der gewählten Reaktionstemperatur gerührt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 50 µL Aliquots entnommen und mit 50 µL Wasser gefüllten 500 µL-Schraubdeckelgläschen gequencht. Die resultierenden Aliquotlösungen wurden anschließend radioanalytisch untersucht (siehe Abschnitt 5.3.2.4).

**Radio-HPLC:** HPLC-System C  
Säule: Phenomenex Luna 5µm C-18 (250 x 10)  
Eluens: 80% MeCN, 20% Puffer (NaAc/HAc 0.1 mol/L, pH = 6)  
Flussrate: 4 mL/Minute  
Retentionszeiten: R<sub>t</sub> = 16.1 Minuten Markierungsvorläufer **7**  
R<sub>t</sub> = 10.5 Minuten Intermediat [<sup>11</sup>C]-**6**  
R<sub>t</sub> = 4.6 Minuten Endprodukt [<sup>11</sup>C]-**3**

Zur Isolierung des Endprodukts (S)-2-([<sup>11</sup>C]Methoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>11</sup>C]-**3** wurde das Intermediat (S)-2-([<sup>11</sup>C]Methoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester [<sup>11</sup>C]-**6** durch Radio-HPLC aufgereinigt. Nach dem Verdünnen der Intermediat [<sup>11</sup>C]-**6** enthaltenden HPLC-Fraktion wurde diese auf einer mit 5 mL Methanol und 10 mL Wasser konditionierten C<sub>18</sub>-Kartusche fixiert. Die Kartusche wurde im Stickstoffstrom getrocknet und das Intermediat [<sup>11</sup>C]-**6** mit 1.5 mL warmen (60°C) Ethanol in ein 3 mL Reaktionsgefäß eluiert. Nach Zugabe von 100 µL 1 N Natronlauge wurde dieses versiegelt und bei 80-100°C 5-20 Minuten erhitzt. Das Reaktionsgefäß wurde dann auf Raumtemperatur abgekühlt und die Lösung durch Zugabe von 100 µL 1 N HCl neutralisiert.

Die Reinigung des Endproduktes [ $^{11}\text{C}$ ]-**3** wurde durch Festphasenextraktion durchgeführt. Dazu wurde die Reaktionsmischung auf eine zuvor mit 5 mL Ethanol und 10 mL Wasser konditionierten  $\text{C}_{18}$ -Kartusche geladen. Nach Trocknen der Kartusche im Stickstoffstrom wurde das Produkt (S)-2-([ $^{11}\text{C}$ ]Methoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl]-methyl}-benzoesäure [ $^{11}\text{C}$ ]-**3** mit 1 mL warmen Ethanol eluiert.

### 5.3.2.3 **Vorschrift zur Radiosynthese von (S)-2-([ $^{11}\text{C}$ ]Methoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure [ $^{11}\text{C}$ ]-**3** für *in vivo*-Evaluierungen**

Zu einer Lösung von (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl]-methyl}-benzoesäure-methylester **7** (2.1 mg, 4.8  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (250-350  $\mu\text{L}$ ) wurde eine 1 N Natronlauge (4.8  $\mu\text{L}$ ) gegeben und die Mischung für eine Minute auf 100°C erhitzt. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung von [ $^{11}\text{C}$ ]Methyliodid (1.9 – 2.2 GBq) in DMF (350–450  $\mu\text{L}$ ) gegeben und für zweieinhalb Minuten in einem verschlossenen Reaktionsgefäß auf 100°C erhitzt. Das Zwischenprodukt wurde mittels HPLC (Acetonitril/0.1 M Essigsäure/Natriumacetat-Puffer (pH = 5) 8:2, Flussrate 4 mL/min,  $R_t$  = 10.5 Minuten) aufgereinigt. Die das Zwischenprodukt [ $^{11}\text{C}$ ]-**6** enthaltende HPLC Fraktion wurde mit 15 mL Wasser verdünnt, auf einer  $\text{C}_{18}$ -Kartusche fixiert, im Stickstoffstrom getrocknet und mit Ethanol (1.5 mL) eluiert, wobei man das Zwischenprodukt (S)-2-([ $^{11}\text{C}$ ]methoxy)-4-([3-methyl-1-(2-piperidine-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl]-benzoesäure-methylester [ $^{11}\text{C}$ ]-**6** erhielt. Hierzu wurde 1 N Natronlauge (100  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{mol}$ ) gegeben und für 10 Minuten in einem verschlossenen Reaktionsgefäß auf 100°C erhitzt. Die Mischung wurde mit 1 N HCl (100 $\mu\text{L}$ ) neutralisiert und zur Aufreinigung zunächst mit 15 mL Wasser verdünnt, das Produkt auf einer  $\text{C}_{18}$ -Kartusche fixiert, im Stickstoffstrom getrocknet und mit warmem Ethanol (1 mL) eluiert, wobei man das Produkt (220-250 MBq) erhielt. Um eine injizierbare Lösung für *in vivo*-Experimente zu erhalten, wurde die Lösung mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und anschließend eine Sterilfiltration durchgeführt. Eine Analyse mittels HPLC zeigte eine radiochemische Reinheit von >99%. Die radiochemische Ausbeute lag bei 35  $\pm$  4% nach 55 Minuten (vergleiche Abschnitt 5.3.2.4).

### 5.3.3 Analytische Verfahren

#### 5.3.3.1 Radio-HPLC

Zur Analyse der Markierungsausbeuten und zur Qualitätskontrolle der Markierungen mit [<sup>18</sup>F]Fluorid wurden die in Abschnitt 5.1 beschriebenen HPLC-Systeme A und B verwendet. Die Auftrennung der Reaktionsgemische erfolgte mit einer halbpräparativen RP18-Säule (LiChrospher RP18 5 $\mu$  EC (250 x 10 mm)) bei einer Flussrate von 4 mL/Minute. Als Eluens wurde dabei 80% MeCN, 20%ige Pufferlösung (NaAc/HAc 0.1 mol/L, pH = 6) verwendet. Die aus der Auftrennung der Reaktionsgemische ermittelten Retentionszeiten wurden mit den Retentionszeiten der nicht-radioaktiven Standardverbindungen unter identischen Bedingungen verglichen. Diese wurden durch Analysen bei veränderten Laufmittelgemischen verifiziert. Zur Qualitätskontrolle wurde eine analytische HPLC-Säule verwendet (LiChrospher RP18 5 $\mu$  EC (250 x 4.6 mm), Fluss: 1 mL/Minute, Eluens: 80% MeCN, 20% Puffer (NaAc/HAc 0.1 mol/L, pH = 6),  $t_r$  Endprodukt [<sup>18</sup>F]-2 = 4.0 Minuten).

Zur Analyse der Ausbeuten der Markierungen mit [<sup>11</sup>C]Methyliodid wurde das in Abschnitt 5.1 beschriebenen HPLC-System C verwendet. Die präperative Auftrennung der Reaktionsgemische erfolgte mit einer halbpräparativen RP18-Säule (Phenomenex Luna 5 $\mu$ m C-18 250 x 10 mm) bei einer Flussrate von 4 mL/Minute. Als Eluens wurde dabei 80% MeCN, 20%ige Pufferlösung (NaAc/HAc 0.1 mol/L, pH = 5) verwendet. Zur Qualitätskontrolle wurde eine analytische RP18 Säule (Phenomenex Luna 5 $\mu$ m C-18 (250 x 4.6 mm), Flussrate: 1 mL/Minute, Eluens: 80% MeCN, 20% Puffer (NaAc/HAc 0.1 mol/L, pH = 5)) benutzt. Es ergaben sich in diesem HPLC-System folgende Retentionszeiten:  $R_t$  Markierungsvorläufer 7 = 13.0 Minuten,  $R_t$  Endprodukt [<sup>11</sup>C]-3 = 3.9 Minuten,  $R_t$  Intermediat [<sup>11</sup>C]-6 = 9.6 Minuten). Die aus der Auftrennung der Reaktionsgemische ermittelten Retentionszeiten wurden wie oben beschrieben mit den Retentionszeiten der nicht-radioaktiven Standardverbindungen unter identischen Bedingungen verglichen. Diese wurden ebenfalls durch Analysen bei veränderten Laufmittelgemischen verifiziert.

#### 5.3.3.2 Radiodünnschichtchromatographie (Radio-DC)

Bei den Markierungen mit [<sup>18</sup>F]Fluorid wurden zur Bestimmung der radiochemischen Ausbeute und der radiochemischen Reinheit 2  $\mu$ L-Aliquots der Reaktionsgemische auf eine Kieselgel-DC-Folie (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 5 x 7.5 cm Merck) aufgetragen und über eine Laufstrecke von 6 cm im entsprechenden Laufmittel entwickelt. Die am Instant Imager der Firma Packard Canberra erhaltenen  $R_f$ -Werte der in den untersuchten Reaktionsgemischen enthaltenen Verbindungen wurden dann mit den unter identischen Bedingungen erhaltenen  $R_f$ -Werten der <sup>19</sup>F-Referenzverbindungen verglichen. Diese Ergebnisse wurden durch Benutzung von Laufmittelgemischen mit veränderter Volumenzusammensetzung verifiziert.



Im Falle der Markierungen mit [<sup>11</sup>C]Methyliodid wurde Radio-DC aufgrund des niedrigen Siedepunktes des [<sup>11</sup>C]Methyliodid nur für die Bestimmung der radiochemischen Reinheit verwendet. Dazu wurden 2 µL Aliquots des in Ethanol vorliegenden Endproduktes [<sup>11</sup>C]-**3** auf eine Kieselgel-DC-folie (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 5 x 7.5 cm Merck) aufgetragen und über eine Laufstrecke von 6 cm im Laufmittel Ethylacetat/n-Hexan (v/v) 4:1 (R<sub>f</sub> = 0.6) entwickelt. Zur Auswertung der Radio-DCs in einen Linearscanner (Miniscan B-MS-1000, Fa. Bioscan) wurden die Aktivpeakflächen über eine HPLC-Software analysiert. Die erhaltenen Aktivpeakflächen wurden zerfallskorrigiert und dann wie in Abschnitt 5.3.1.6.2 beschrieben ausgewertet.

### 5.3.3.3 Bestimmung der radiochemischen Ausbeute

Bei den Markierungen mit [<sup>18</sup>F]Fluorid wurde die radiochemische Ausbeute der einzelnen Reaktionsschritte sowohl über Radio-DC als auch über Radio-HPLC bestimmt. Im Falle der Darstellung der [<sup>11</sup>C]-markierten Verbindungen wurden die Ausbeuten ausschließlich mittels Radio-HPLC bestimmt. Die Abweichung der Ergebnisse beider Methoden lag zwischen 1 und 5%.

Zur Bestimmung mittels Radio-DC wurden die Ausbeuten durch Vergleich der einzelnen Aktiv-Peakflächen mit der Summe aller Aktiv-Peakflächen der Gesamtprobe bestimmt. Im Falle der Bestimmung über Radio-HPLC mussten die Aktiv-Peakflächen zunächst aufgrund des radioaktiven Zerfalls des [<sup>18</sup>F]Fluorids zerfallskorrigiert werden.

Nach Isolierung des jeweiligen radiochemischen Endproduktes mittels Radio-HPLC wurde die radiochemische Gesamtausbeute (RCA) der Markierungsreaktionen mit Hilfe eines geeichten Curiometers bestimmt und zerfallskorrigiert in Bezug auf die eingesetzte Menge [<sup>18</sup>F]Fluorid beziehungsweise [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> angegeben. Die Aktivitätsmenge des eingesetzten [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> wurde hierfür aus den exakten Produktionsparametern des Zyklotrons berechnet. Bei Bezugnahme der Berechnung der RCA auf die eingesetzte Menge an [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I würden sich um den Faktor 5/3 höhere Ausbeuten ergeben (RCA ([<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I) ≈ 60%).

Die angegebenen Fehler ergeben sich aus den Standardabweichungen der so bestimmten Ausbeuten in den durchgeführten Markierungsexperimenten (n = 3 – 5).

Gasphasenverluste und Verluste durch Adsorption am Reaktionsgefäß können mit dieser Methode nicht berücksichtigt werden.

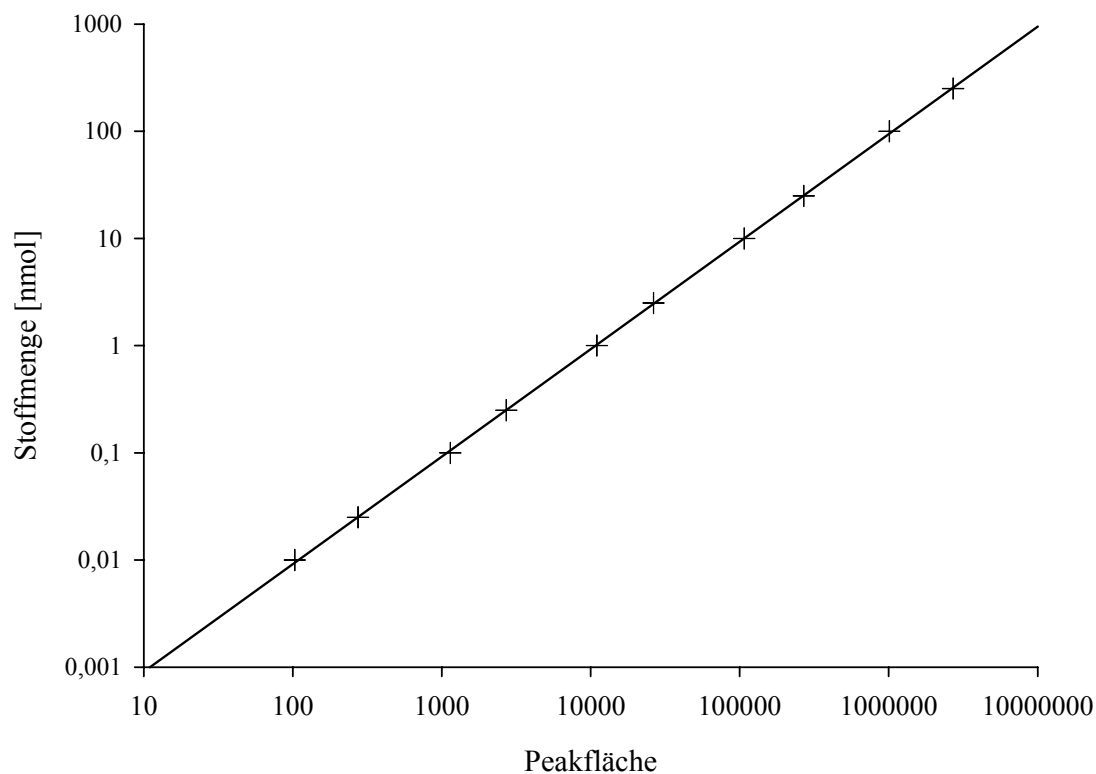
### 5.3.3.4 Bestimmung der radiochemischen Reinheit und der spezifischen Aktivität

Die radiochemische Reinheit der Zielverbindungen (S)-2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluorethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>18</sup>F]-**2** und (S)-2-([<sup>11</sup>C]Methoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>11</sup>C]-**3** wurde durch die Verwendung von Radio HPLC und Radio-DC bestimmt.

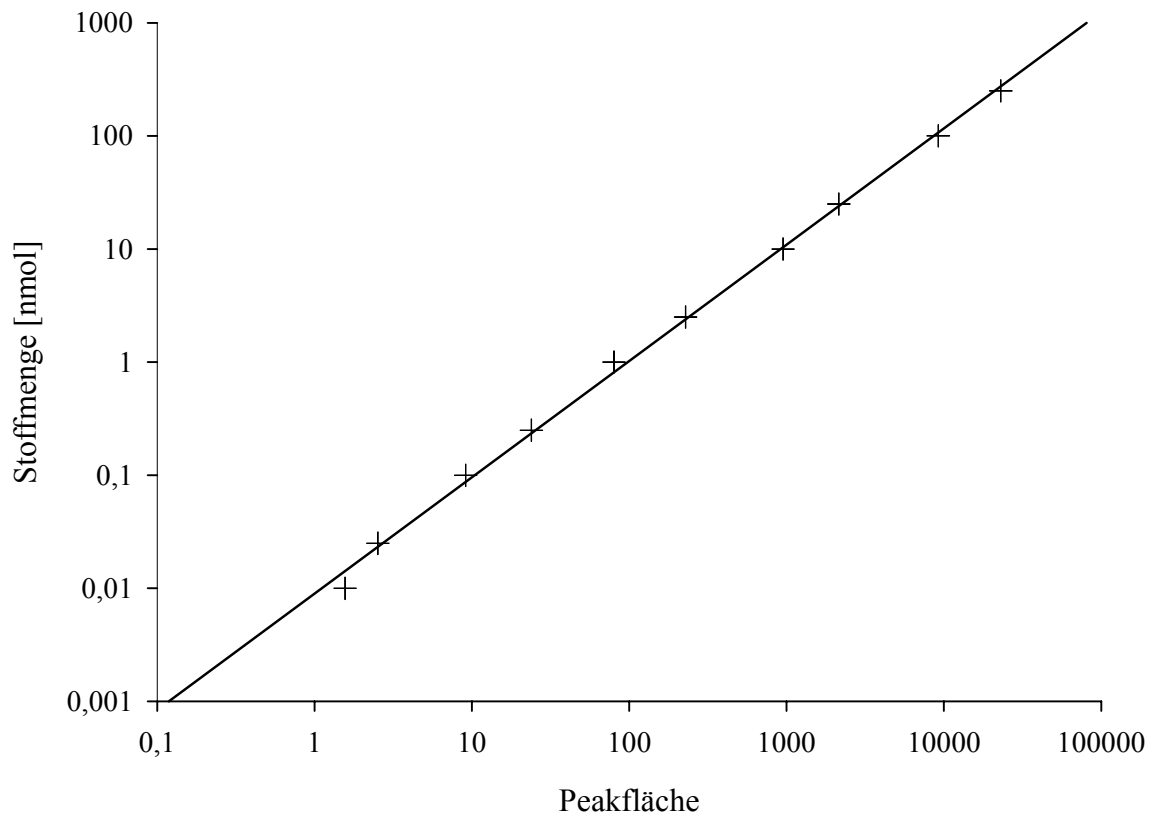
Hierzu wurden Aliquots von 2  $\mu\text{L}$  (Radio-DC) bzw. 50  $\mu\text{L}$  (Radio-HPLC) analysiert. Als Laufmittel der Radio-DC-Analysen und Eluens der Radio-HPLC-Analysen wurden die unter Abschnitt 5.3.1.1 beziehungsweise 5.3.2.2 beschriebenen Bedingungen verwendet. Analog dem in Abschnitt 5.3.3.2 beschriebenen Verfahren wurden im Falle der Bestimmung mittels Radio-DC die Ausbeuten durch Vergleich der einzelnen Aktiv-Peakflächen mit der Summe aller Aktiv-Peakflächen der Gesamtprobe bestimmt. Im Falle der Auswertung mittels Radio-HPLC wurden die Aktiv-Peakflächen zerfallskorrigiert.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden zunächst Eichgeraden der Referenzsubstanzen (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **2** und (S)-2-(Methoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **3** für die Massenbestimmung mittels HPLC aufgenommen (Abb. 50 und 51). Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der Referenzsubstanzen erstellt und Aliquots von 10  $\mu\text{L}$  dieser verschiedenen Konzentrationen auf die in 5.3.1.1 beziehungsweise 5.3.2.2 beschriebenen HPLC-Systeme aufgegeben und die detektierten UV-Peakflächen integriert. Anhand der ermittelten UV-Peakflächen von Aliquots der Zielverbindungen konnten so im Vergleich mit der injizierten Aktivitätsmenge die spezifischen Aktivitäten bestimmt werden. Die injizierte Aktivitätsmenge wurde durch Differenzmessung der zum Injizieren verwendeten 100  $\mu\text{L}$  Hamilton-Spritze vor und nach der Injektion bestimmt.

Die so ermittelten Werte wurden in den Abschnitten 5.3.1.4 bzw. 5.3.2.3 zusammengefasst.



**Abb. 50:** Eichgerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von (S)-2-(2- $^{18}\text{F}$ Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [ $^{18}\text{F}$ ]-**2** (HPLC-System: A)



**Abb. 51:** Eichgerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von (S)-2-([<sup>11</sup>C]Methoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>11</sup>C]-**3** (HPLC-System: C)

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein  $^{18}\text{F}$ - und ein  $^{11}\text{C}$ -markiertes Derivat des Repaglinids zu synthetisieren und diese Verbindungen auf ihre Eignung als potentielle Liganden zur Visualisierung und Quantifizierung des  $\beta$ -Zellstatus des endokrinen Pankreas mittels der Positronen Emissions Tomographie (PET) zu evaluieren. Hierbei handelt es sich um ein bildgebendes Verfahren, mit dem 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 (SUR1), einem Plasmamembranprotein der Insulin-sezernierenden  $\beta$ -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  $\beta$ -Zellmasse quantitativ erfasst werden. Darüber hinaus wäre die Möglichkeit einer Therapiekontrolle bei Inselzelltransplantationen gegeben.

Vor der Synthese der radioaktiv markierten Derivate des Repaglinids wurden die nicht-radioaktiven Analoga synthetisiert, ihre Lipophile bestimmt und in Bindungsstudien ihre Affinität zum SUR1 evaluiert. Um weiter die physiologische Wirksamkeit zu überprüfen, wurde ihre Insulin-sekretierende Wirkung an isolierten Inselzellen bestimmt. Im Falle des  $^{18}\text{F}$ -markierten Repaglinid Derivates wurde eine *in vivo*-Studie an nicht-diabetischen Ratten und eine PET-Studie mit 2 Probanden durchgeführt.

### Standardverbindungen zur *in vitro*-Evaluierung:

Tabelle 10 fasst die Ausbeuten der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten nicht-radioaktiven Standardverbindungen zusammen. Die Darstellung von (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbonyl}-methyl}-benzoesäure (Fluor-ethoxy-desethoxy-Repaglinid) **2** und (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbonyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) **3** und des Repaglinids **1** konnte durch konvergente organisch-chemische Synthesen ausgehend vom 2-Chlorbenzonnitril **19** und von 4-Methylsalicylsäure **20** in Gesamtausbeuten zwischen 3.6 - 4.4% (Tabelle 11) realisiert werden.

Dazu wurde das 2-Chlorbenzonnitril **19** in einem ersten Reaktionsschritt mit Piperidin und Pyridin in N-Formyl-piperidin zu 2-Piperidin-1-yl-benzonnitril **13** umgesetzt. Das entstandene Produkt wurde durch eine Grignard-Reaktion mit *i*-BuMgBr zum Ketimin 3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylidenamin **12** und dann in einer weiteren Reaktion mit  $\text{LiAlH}_4$  zum racemischen Amin 3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin **11** reduziert. Das Amin wurde mit L(-)-N-Acetylglutaminsäure in Aceton zum diastereomeren Salzpaar (S,S)-(11) und (R,S)-(11) umgesetzt. Durch mehrfache fraktionierte Kristallisation und

anschließender Freisetzung mit Ammoniak konnte das durch HPLC charakterisierte enantiomerenreine Synthone (S)-3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylamin (**S-11**) erhalten werden.

**Tabelle 11:** Gesamtausbeuten der Synthesen der Standardverbindungen (S)-2-(2-Fluorethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbonyl}-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) **2** und (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbonyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) **3** und des Repaglinids **1** (bezogen auf 2-Chlorbenzonnitril **19**)

Standardverbindung	Strukturformel	Kurzformel	Ausbeute [%]
<b>2</b>			3.6
<b>3</b>			4.5
<b>1</b>			4.4

4-Methylsalicylsäure **20** wurde unter Schwefelsäurekatalyse in Methanol verestert und dann durch Reaktion mit N-Bromsuccinimid (NBS) mit einer katalytischen Menge N,N-Azobisisobutyronitril (AIBN) in der Seitenkette bromiert. In einem weiteren Schritt wurde durch Umsetzung des entstandenen 4-Brommethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester mit Natriumcyanid unter Phasentransferkatalyse der 4-Cyanomethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester **16** synthetisiert. Durch Einleiten von Chlorwasserstoffgas in Methanol wurde diese Verbindung zum korrespondierenden Dimethylester, 2-Hydroxy-4-methoxycarbonyl-

methyl-benzoesäure-methylester **15**, umgesetzt. Durch Reaktion mit Natronlauge konnte selektiv der mono-Carbonsäureester 4-Carboxymethyl-2-hydroxy-benzoesäure-methylester **14** erhalten werden.

Die so dargestellten Synthons (**S**)-**11** und **14** konnten unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kopplungsmittels zu 2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** gekoppelt werden. Verbindung **7** bildete den Ausgangspunkt für die Synthesen der nicht-radioaktiven Standardverbindungen (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) **2** und (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) **3** und des Repaglinids **1**, die durch Reaktion von **7** mit Bromethanol, 1-Brom-2-fluorethan und Methyljodid und anschließender Methylesterspaltung durch Reaktion mit Natronlauge synthetisiert wurden.

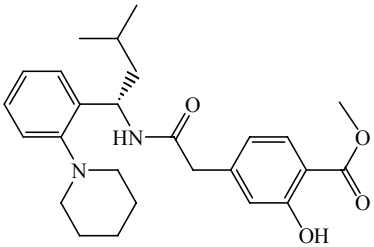
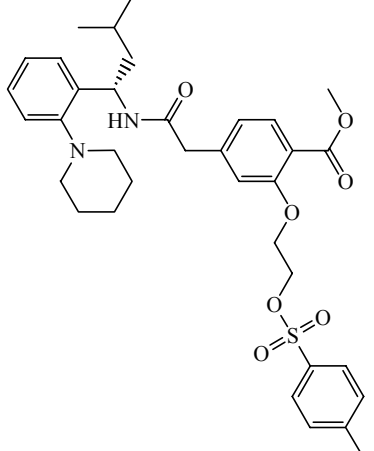
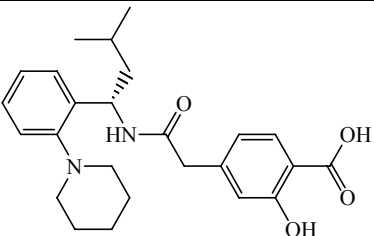
Die Isolierung der Standardverbindungen (S)-2-(2-Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) **2** und (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) **3** und des Repaglinids **1** konnte durch Säulenchromatographie erreicht werden.

### Synthese der Markierungsvorläufer:

Neben dem Markierungsvorläufer 2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** zur Umsetzung mit 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat, 1-Brom-2[<sup>18</sup>F]fluorethan und [<sup>11</sup>C]Methyljodid wurde zusätzlich der Markierungsvorläufer (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **10** mit ungeschützter Carbonsäurefunktion durch Reaktion von **7** mit wässriger Natronlauge dargestellt. Zur Darstellung der Zielverbindung [<sup>18</sup>F]-**2** in einer Istufigen Radiosynthese mit [<sup>18</sup>F]Fluorid wurde **7** zunächst mit 2-Bromethanol und anschließend mit Toluolsulfonsäurechlorid zum Direktmarkierungsvorläufer (S)-4-{{3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-2-[2-(toluene-4-sulfonyloxy)-ethoxy]-benzoesäure-methylester **9** umgesetzt. Diese tosylierte Verbindung konnte direkt mit [<sup>18</sup>F]Fluorid radioaktiv markiert werden. Final wurde nach erfolgreicher Isolierung des Zwischenproduktes der verbliebene Methylester basisch verseift.

Tabelle 12 fasst die Gesamtausbeuten der synthetisierten Markierungsvorläufer zusammen.

**Tabelle 12:** Gesamtausbeuten der Synthesen der Markierungsvorläufer (bezogen auf 2-Chlorbenzonitril **19**) zur radioaktiven Markierung mit 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat, [<sup>18</sup>F]Fluorid, 1-Brom-2-[<sup>18</sup>F]fluorethan und [<sup>11</sup>C]Methyliodid

Markierungsvorläufer	Strukturformel	Ausbeute [%]
<b>7</b>		7.1
<b>9</b>		2.0
<b>10</b>		2.0

### Radioaktive Markierungen:

Für die Radiosynthese der Verbindung (S)-2-(2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluor-ethoxy)-4-{[3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl)phenyl]butylcarbamoyl}-methyl)-benzoesäure [<sup>18</sup>F]-**2** wurde die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute (RCA) vom Markierungsvorläufer (MV), der Markierungsvorläuferkonzentration (MVK), der Reaktionstemperatur, der Reaktionszeit, der zugesetzten Basenart und der Basenkonzentration sowie dem verwendeten sekundären Markierungsvorläufer bestimmt. Im Falle der Markierungsvorläufer **7** und **9** wurde das in der ersten Stufe der Radiosynthese dargestellte Methylester-geschützte Intermediat [<sup>18</sup>F]-**5** isoliert und anschließend durch Variation der Bedingungen zur Esterspaltung die Darstellung des Endproduktes [<sup>18</sup>F]-**2** optimiert.

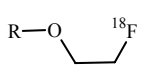
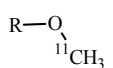
Ausgehend vom Markierungsvorläufers (S)-2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure **10** mit ungeschützter Carbonsäurefunktion konnte selbst durch intensive Variation der Reaktionsparameter das Zielprodukt nicht synthetisiert werden.

Die Umsetzung des Direktmarkierungsvorläufers (S)-4-{{3-Methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-2-[2-(toluene-4-sulfonyloxy)-ethoxy]-benzoesäure-methylester **9** mit [<sup>18</sup>F]Fluorid lieferte in Acetonitril bei 100°C eine RCA des Produktes (S)-2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>18</sup>F]-**2** von 10%. Dagegen konnte die radioaktive <sup>18</sup>F-Fluorierung des Repaglinids durch Reaktion von 2-Hydroxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester **7** mit 2-[<sup>18</sup>F]Fluorethyltosylat im Lösungsmittel DMSO bei einer Reaktionstemperatur von 150°C nach 10 Minuten mit einer radiochemischen Ausbeute (RCA) von 80% dargestellt werden. Nach Abtrennung des Intermediates (S)-2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluor-ethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure-methylester [<sup>18</sup>F]-**5** mittels HPLC und anschließender Spaltung des Methylesters bei 80°C mit 100 µL 1N NaOH in Methanol (35 Minuten) konnte das Endprodukt [<sup>18</sup>F]-**2** durch eine weitere HPLC-Abtrennung isoliert und das steril filtrierte injektionsfertige Produkt mit einer Gesamtausbeute von 20 ± 2% erhalten werden.

Zur Darstellung der markierten Zielverbindung (S)-2-([<sup>11</sup>C]Methoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-methyl}-benzoesäure [<sup>11</sup>C]-**3** wurde aufgrund der Ergebnisse der <sup>18</sup>F-Fluorethylierung ausschließlich der Markierungsvorläufer **7** verwendet. Das Intermediat (S)-2-([<sup>11</sup>C]Methoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidine-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyl}-benzoesäure-methylester [<sup>11</sup>C]-**6** konnte durch Reaktion von **7** mit [<sup>11</sup>C]Methyliodid bei 100°C in DMF nach 2.5 Minuten in einer Ausbeute von 89% synthetisiert werden. Dieses wurde durch HPLC gereinigt und anschließend der Methylester durch Reaktion mit 100 µL 1 N NaOH bei 100°C in Ethanol gespalten. Nach Neutralisation und Festphasenreinigung mit anschließender Sterilfiltration konnte das Endprodukt als injektionsfertige Lösung in einer radiochemischen Gesamtausbeute (RCA) von 35 ± 4% dargestellt werden. Tabelle 13 fasst die Ausbeuten und optimierten Reaktionsparameter der zur Verfügung stehenden Radioliganden zusammen.



**Tabelle 13:** Synthesedaten der zur Verfügung stehenden Radioliganden bei optimierten Reaktionsparametern

Radioaktive Verbindung	MV	MVK [μmol/mL]	Lösungsmittel	Temperatur [°C]	Synthesezeit [min]	RCA <sup>1</sup> [%]
 <b>[<sup>18</sup>F]-2</b>	<b>7</b>	10.6	DMSO <sup>3</sup> / Methanol <sup>4</sup>	150 <sup>3</sup> / 80 <sup>4</sup>	135	20 ± 2
	<b>9</b>	16.1	Acetonitril <sup>3</sup> / Methanol <sup>4</sup>	100 <sup>3</sup> / 80 <sup>4</sup>	130	10 ± 3
	<b>10</b>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
 <b>[<sup>11</sup>C]-3</b>	<b>7</b>	6.8	DMF <sup>3</sup> / Ethanol <sup>4</sup>	100 <sup>3</sup> / 100 <sup>4</sup>	55	35 ± 4

<sup>1</sup> bezogen auf die Startaktivität an [<sup>18</sup>F] bzw. [<sup>11</sup>C]  
<sup>2</sup> es konnte kein Produkt detektiert werden  
<sup>3</sup> Lösungsmittel und Temperatur für die Darstellung der radioaktiven Intermediate [<sup>18</sup>F]-5 und [<sup>11</sup>C]-6  
<sup>4</sup> Lösungsmittel und Temperatur für die Darstellung der radioaktiven Endprodukte [<sup>18</sup>F]-2 und [<sup>11</sup>C]-3

### ***In vitro*-Evaluierung der Standardverbindungen:**

Zur Bestimmung der physiologischen Wirkung der synthetisierten Derivate (S)-2-(2-Fluorethoxy)-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyle}-methyl}-benzoesäure (Fluorethoxy-desethoxy-Repaglinid) **2** und (S)-2-Methoxy-4-{{3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butylcarbamoyle}-methyl}-benzoesäure (Methoxy-desethoxy-Repaglinid) **3** wurde die Insulin-sezernierende Wirkung mittels standardisierter Insulinsekretionsanalysen durchgeführt. Der Insulingehalt wurde mit Hilfe eines Ratten-Insulin-ELISAs bestimmt. Die stimulierten Insulinsekretionen der Derivate **2** und **3** entsprachen der des originalen Repaglinids **1**.

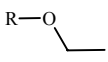
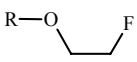

IC<sub>50</sub>- und K<sub>D</sub>-Werte der Verbindungen wurden an isolierten COS-1 Zellen durch Verdrängung von [<sup>3</sup>H]Glibenclamid bestimmt. Beide Derivate zeigten im Vergleich mit dem Repaglinid **1** nur leicht verschlechterte K<sub>D</sub>-Werte und somit eine ausreichend hohe Bindungsaffinität zum humanen SUR1-Rezeptor. Die gemessenen Änderungen der K<sub>D</sub>-Werte korrelieren offensichtlich direkt mit dem Ausmaß der strukturellen Veränderung des Repaglinid-Moleküls, wobei sich die Verkürzung der Ethoxy-Gruppe des Repaglinids in eine Methoxy-Gruppe bei **2** weniger stark auf die Bindungsaffinität auswirkt als die Einführung von Fluor in diese Ethoxy-Funktion bei der Standardverbindung **3**.

Die dargestellten Standardverbindungen **2** und **3** zeigten im Vergleich mit dem originalen Repaglinid **1** kaum veränderte logD<sub>7,4</sub>-Werte. Die Änderung der Lipophilie des fluorierten

Derivates **2** war leicht geringer als die des Methoxy-Derivates **3**. Insgesamt lässt sich aus den im Rahmen der Messungenauigkeiten kaum veränderten logD-Werten auf eine praktisch unveränderte Pharmakologie der Derivate im Vergleich zum Repaglinid **1** schließen.

Tabelle 14 fasst die Ergebnisse der durchgeführten *in vitro*-Studien zusammen.

**Tabelle 14:** Ergebnisse der *in vitro*-Evaluierungen der synthetisierten Repaglinid-Derivate

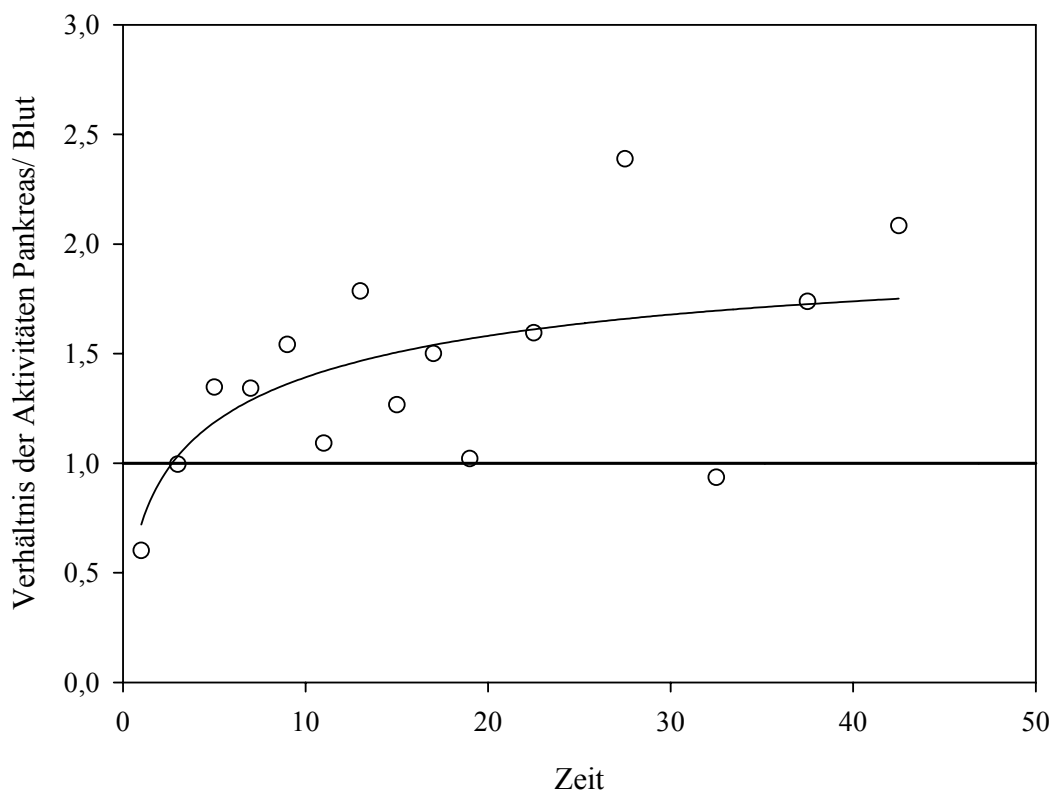
Verbindung	Relativer Stimulationsindex [%]	K <sub>D</sub> -Werte [nM]	logD <sub>7.4</sub> <sup>a</sup>
 <b>1</b>	59 <sup>b</sup> / 63 <sup>c</sup>	50 ± 4	2.54 ± 0.15
 <b>2</b>	54 <sup>b</sup>	142 ± 6	2.39 ± 0.09
 <b>3</b>	64 <sup>c</sup>	83 ± 5	2.15 ± 0.11
a Die Bestimmung der Lipophilien erfolgte nach der HPLC-Methode b,c Experimentelle Bedingungen zur Bestimmung der Insulin-sezernierenden Wirkung b: 5.55 mM Glukose c: 5.0 mM Glukose			

### ***In vivo*-Evaluierung:**

Mit [<sup>18</sup>F]-**2** wurden *in vivo*-Experimente mit nicht-diabetischen Sprague Dawley Ratten durchgeführt. Dabei wurde die Bioverteilung in den Organen Pankreas, Gehirn, Leber, Milz, Niere, Herz, Lunge und Blut *ex vivo* untersucht. Zwischen 10 und 30 Minuten nach Injektion des [<sup>18</sup>F]-**2** konnte eine relativ konstante Radioaktivitätsakkumulation von 0.10 - 0.13% der injizierten Dosis im Pankreas festgestellt werden. Dieser Radioaktivitätsuptake war durch Injektion von Repaglinid **1** verdrängbar, was für eine spezifische Bindung von [<sup>18</sup>F]-**2** spricht. Die Aktivitätsanreicherung in der Leber überstieg die Anreicherung im Pankreas zwar immer noch um den Faktor 40, wurde aber im Vergleich zu den Vorstudien mit [<sup>18</sup>F]fluorethylierten Glibenclamid-Derivaten deutlich reduziert (ca. 50%). Das Verhältnis der Aktivitätsakkumulationen Pankreas/Blut lag über den gesamten Messzeitraum von 60 Minuten bei ca. 1. Dies stellt einen sehr guten Fortschritt gegenüber den in vergleichbaren Studien getesteten, markierten [<sup>18</sup>F]fluorethylierten Glibenclamid-Derivaten dar, bei denen das Pankreas/Blut-Verhältnis bei ca. 0.1 lag (Schneider et al., nicht-veröffentlichte Daten).

Aus diesem Grund wurde die Eignung von [ $^{18}\text{F}$ ]-2 als potentieller Tracer zur Visualisierung des Inselzellstatus mittels PET durch eine *in vivo*-Studie mit 2 Probanden evaluiert.

In einem Probanden sank die Radioaktivitätsanreicherung im Blut unter die des Pankreas, was darauf schließen lässt, dass die beobachtete Akkumulation nicht ausschließlich ein Perfusionphänomen war (Abb. 52). Dies könnte für die Eignung von [ $^{18}\text{F}$ ]-2 als Tracer zur Visualisierung des Inselzellstatus sprechen. Allerdings zeigte sich wie bei den Tierexperimenten ein recht hoher Leberuptake, der die Visualisierung des  $\beta$ -Zell-Status erschwerte. Der Uptake in der Leber war in der PET-Studie im Mittel ungefähr um den Faktor 25 größer als im Pankreas. Von 10 bis 30 Minuten nach Beginn der Messung zeigte sich ein Maximum der Radioaktivitätsanreicherung in der Leber; diese überstieg die Anreicherung im Pankreas bis um das 45fache.



**Abb. 52:** Verhältnis der Radioaktivitätsakkumulation Pankreas zu Blut im ersten Probanden

Die Zeit-Aktivitäts-Kurven des zweiten Probanden waren nicht auswertbar, was sowohl auf verfahrenstechnische als auch auf physiologische Ursachen zurückzuführen sein könnte.

Zur Evaluierung der Eignung von [ $^{18}\text{F}$ ]-2 als PET-Tracer zur nicht-invasiven Bestimmung des  $\beta$ -Zell Status im endokrinen Pankreas sind daher weitere *in vivo*-Studien indiziert. Da es bislang weder über die Verwendung radioaktiv markierter SUR1-Liganden wie Glibenclamid, noch über den Einsatz von  $\beta$ -Zell spezifischen Antikörpern und markierten Zuckerderivaten gelungen ist, die Inselzellmasse zu quantifizieren, könnte möglicherweise die Verbindung [ $^{11}\text{C}$ ]-3 aufgrund ihrer verbesserten Bindungsaffinität zum SUR1-Rezeptor in geplanten Studien erfolgreicher sein.

## 7 Literatur

Ache H.J., Wolf A.P., *J. Phys. Chem.*, **72**, (1968), 1988.

Ache, H.J., *Angew. Chem.*, **84**, (1972), 234.

Antoni G., Kihlberg T., Långström B. in: Vértes A., Nagy S., Klencsár Z. (Eds.), Rösch F. (Vol.-Ed.), *Handbook of Nuclear Chemistry Vol. 4: Radiochemistry and radiopharmaceutical chemistry in life sciences*, *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, (2004), 119.

Becker H.G.O.: *Organisch-chemisches Grundpraktikum*, *VCH Weinheim*, (1999).

Beyer H.: *Lehrbuch der organischen Chemie*, *Hirzel Stuttgart*, (1998).

Bidstrup T.B., Bjørnsdottir I., Sidelmann U.G., Tomsen M.S., Hansen K.T, *J. Clin. Pharmacol.*, **56**, (2003), 305.

Block D., *Diplomarbeit*, *Universität zu Köln* (1979).

Block D., Coenen H. H., Laufer P., Stöcklin G., *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, **23**, (1986), 1042.

Block, D.; Coenen, H.H.; Stöcklin, G., *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, **25**, (1987), 201.

Block D., Coenen H.H., Stöcklin G.J., *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, **24**, (1987), 1032.

Block D., Coenen H.H., Stöcklin G.J., *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, **25**, (1988), 185.

Browne E., Firestone R.B.: *Table of radioactive isotopes*, *John Wiley & Sons, New York*, (1986).

Carey F.A., Sundberg R.J.: *Organische Chemie*, *VCH Weinheim*, (1995).

Casella V., Ido T., Fowler J.S., McGregor R.R., Ruth T.J., *J. Nucl. Med.*, **21**, (1980), 750.

Coenen H.H., Franken K., Kling P., Stöcklin G., *Int. J. Rad. Appl. Instrum.*, [A] **39**, (1988), 1243.

Coenen H.H., in: Baillie T.A., Jones J.R. (Eds.), *Synthesis and application of isotopically labelled compounds*, *Elsevier Publ. Amsterdam*, (1989).

Comagic S., Piel M., Schirmacher R., Höhnemann S., Rösch F., *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, **56**, (2002), 847.

Comagic S., *Dissertation*, *Johannes Gutenberg-Universität Mainz* 2004.

- Crouzel C., Langström B., Pike V.W., Coenen H.H., *Appl. Radiat. Isot.*, **38**, (1987), 601.
- Dabrowski M., Wahl P., Holmes W.E., Ashcroft F.M., *Diabetologia*, **44**, (2001), 747.
- Eadsforth CV., Moser P., *Chemosphere*, **12**, (1983), 1459.
- Eadsforth CV., *Pestic. Sci.*, **17**, (1986), 311.
- EURODIAB ACE Study Group, *Lancet*, **355**, (2000), 873.
- Ferieri A., Wolf A.P., *Radiochim. Acta*, **34**, (1983), 69.
- Figlewicz D.P., Formby B., Hodgson A.T., Schmid F.G., Grodsky G.M., *Diabetes*, **29**, (1980), 767.
- Fuhlendorff J., Rorsman P., Kofod H., Brandt C.L., Rolin B., *Diabetes*, **47**, (1998), 345.
- Gail R., Coenen H.H., Stöcklin G.J., *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, **35**, (1994), 197.
- Gimi B., Leoni L., Eroglu S., Braun, M., Desai T., Magin R., Roman B., “*Imaging the Pancreatic Beta Cell*” workshop, 21.-22. April, 2003, Bethesda, USA.
- Grell W., Hurnaus R., Griss G., Sauter R., Rupprecht E., Mark M., Luger P., Nar H., Wittneben H., Müller P., *J. Med. Chem.* **41**, (1998), 5219.
- Gröhn P., Klock G., Schmitt J., Zimmermann U., Horcher A., Bretzel D., Brandhorst H., Zekorn T., *Experimental clinical endocrinology and diabetes*, **102**, (1994), 380.
- Guhlke S., Coenen H.H., Stöcklin G., *J. Nuc. Med.*, **32**, (1991), 1009.
- Guhlke S., Wester H.-J., Bruhns, C., Stöcklin G., *Nucl. Med. Biol.*, **21**, (1994), 819.
- Hamacher K., Blessing G., Nebeling B., *Int. J. Rad. Appl. Instrum.*, [A] **41**, (1990), 49.
- van Heinigen P.N.M., Hartop V., Kramer-Nielsen K., Hansen K.T., van Lier J.J., van De Merbel N.C., Oosterhuis B., Jonkman, J.H.G., *Eur. J. Pharmacol.*, **55**, (1999), 521.
- Holleman A.F., Wiberg E.: Lehrbuch der anorganischen Chemie, 91.-100. Auflage, *Walter de Gruyter, Berlin*, (1985).
- Holschbach M., Schüller M., *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **44**, (1993), 779.
- Holschbach M., Schüller M., *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **44**, (1993), 897.
- Hu S., Wang S., Dunning B.E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **291**, (1999), 1372.
- Hwang D.R., Pham V., Huang Y., Laruelle M., Jerabek P., Fox P., DeFranzo R., *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, **46**, (2003), 352.

- Kallmann B., Hüther M., Tubes M., Feldkamp J., Bertrams J., Gries F.A., Lampeter E.F., Kolb H., *Diabetes*, **46**, (1997), 237.
- Kilbourn M.R., Welch M.J., Dence C.S., Tewson T.J., Saji H., Maeda M., *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **35**, (1984), 591.
- Ladriere L., Malaisse-Legae F., Fuhlendorff J., Malaisse W.J., *Eur. J. Pharmacol.*, **335**, (1997), 227.
- Ladriere L., Malaisse-Legae F., Malaisse W.J., *Med. Sci Res.*, **28**, (2000), 43.
- Larsen P., Ulin J., Dahlström K., Jensen M., *J. Appl. Radiat. Isot.*, **48**, (1997), 153.
- Lins L., Brasseur R., Malaisse W.J., *Biochem. Pharmacol.*, **50**, (1995), 1879.
- Lohmann T., Seissler J., Verlohren H.J., Schröder S., Rotger J., Dahn K., Morgenthaler N., Scherbaum W.A., *Diabetes Care*, **20**, (1997), 524.
- London N.J., Contractor H., Lake S.P., Aucott G.C., Bell P.R., James R.F., *Horm. Metab. Res. Suppl.*, **25**, (1990), 82.
- Luxen A., Perlmutter M., Bida G.T., van Moffaert G., Cook J.S., Satyamurthy N., Phelps M.E., Barrio J.R., *Appl. Rad. Isot.*, **41**, (1990), 275.
- Malaisse W.J., *Diabetologia*, **44**, (2001), 393.
- Marazano C., Maziere M., Berger G., Comar D., *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **28**, (1977), 49.
- Mark M., Grell W., *Brit. J. Pharmacol.*, **121**, (1997), 1597.
- Moerlein S.M., Perlmutter J.S., *Neurosci. Lett.*, **123**, (1991), 23.
- Moore A., Bonner-Weir S., Weissleder R., *Diabetes*, **50**, (2001), 2231.
- Noyce D.S., Virgilio J.A., *J. Org. Chem.*, **37**, (1992), 2643.
- Owens D.R., *Diabet. Med.*, **15**, Suppl. 4, (1998), 28.
- Prenant C., Crouzel C., *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, **28**, (1990), 645.
- Prenant C., Himmen F., *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, **33**, (1995), 277.
- Qaim S.M., Stöcklin G., *Radiochim. Acta*, **34**, (1983), 25.
- Qaim S.M. in: Vértes A., Nagy S., Klencsár Z. (Eds.), Rösch F. (Vol.-Ed.), Handbook of Nuclear Chemistry Vol. 4: Radiochemistry and radiopharmaceutical chemistry in life sciences, *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, (2004), 47.
- Reichert C.: Solvents and solvent effects in Organic Chemistry, *VCH Weinheim* (1988).

- Rösch F., Knapp F.F. in: Vértés A., Nagy S., Klencsár Z. (Eds.), Rösch F. (Vol.-Ed.), Handbook of Nuclear Chemistry Vol. 4: Radiochemistry and radiopharmaceutical chemistry in life sciences, *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, (2004), 81.
- Ruth T., Wolf A.P., *Radiochim. Acta*, **26**, (1979), 21.
- Schirmacher R., Weber M., Schmitz A., Shiue C.-Y., Alavi A., Feilen P., Schneider S., Kann P., Rösch F., *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, **45**, (2002), 760.
- Schmitz A., Shiue C.-Y., Feng Q., Shiue G.G., Deng S., Pourdehnad M.T., Schirmacher R., Vatamaniuk M., Doliba N., Matschinsky F., Wolf B., Rösch F., Naji A., Alavi A., *Nucl. Med. Biol.*, **31**, (2004), 483.
- Schneider S., Feilen P. J., Cramer H., Hillgärtner M., Brunmeier F., Zimmermann H., Weber M. M., Zimmermann U., *J. of Microencapsulation*, **20**, (2003), 627.
- Schneider S., v Mach M.A., Kraus O., Kann P., Feilen P., *Artif. Organs.*, **27**, (2003), 1053.
- Schneider S., Schirmacher E., Schreckenberger M., Schwanstecher M., Schwanstecher C., Feilen P., Bucholz H., Thews O., Oberholzer K., Shiue C.-Y., Alavi A., Rösch F., Weber M.M., Schirmacher R., *unveröffentlichte Ergebnisse*.
- Schoeps K.O., Dissertation, Universität Stockholm 1992.
- Schwanstecher M., Brandt C., Behrends S., Schaupp U., Panten U., *Br. J. Pharmacol.*, **106**, (1992), 295.
- Schwanstecher M., Sieverding C., Dörschner H., Gross I., Aguilar-Bryan L., Schwanstecher C., Bryan J. *EMBO J.*, **17**, (1998), 5529.
- Shiue C.-Y., Schmitz A., Schirmacher R., Shiue G.G., Alavi A.A., *Curr. Med. Chem.-Immun., Endoc. & Metabol.*, **4**, (2004), 271.
- Stöcklin G., in: Handbuch der medizinischen Radiologie, Band 15/1B, *Springer Berlin*, (1989).
- Stöcklin G., Pike V.W. (Eds.): Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography. Methodological Aspects, *Kluwer Academic Publishers*, (1993).
- Stöcklin G., Qaim S.M., Rösch F., *Radiochim. Acta*, **70/71**, (1995), 249.
- Sweet I.R., Cook D.L., Lernmark Å., Greenbaum C.J., Wallen A.R., Marcum E.S., Stekhova S.A., Krohn K.A., *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, **314**, (2004), 976.
- Tada M., *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, **29**, (1991), 949.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, *Ann. Intern. Med.*, **128**, (1998), 517.

- Townsend J. D., Williams A. R., Angel A. J., Finefrock A. E., Beam C. F., *Synth. Commun.*, **30**, (2000), 689.
- Vaalburg W., Beerling-van der Molen H.D., Reiffers S., Rijskamp A., Woldring M.G., Wynberg H., *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **27**, (1976), 153.
- Wagner R., Stöcklin G., Schaak W., *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, **18**, (1981), 1557.
- Wester H.-J., Willoch F., Tölle T.R., Munz F., Herz M., Øye I., Schadrack J., Schwaiger M., Bartenstein P., *J. Nucl. Med.*, **41**, (2000), 1279.
- Wester H.J. in: Vértes A., Nagy S., Klencsár Z. (Eds.), Rösch F. (Vol.-Ed.), Handbook of Nuclear Chemistry Vol. **4**: Radiochemistry and radiopharmaceutical chemistry in life sciences, *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, (2004), 167.
- Wienhard K., Wagner R., Heiss W.-D.: PET-Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie, *Springer Verlag, Berlin* (1989).
- Ziegler A.G., Hummel M., Schenker M., Bonifacio E., *Diabetes*, **48**, (1999), 468.



## **Anhang: Publikationen**

Wängler B., Schneider S., Thews O., Schirmacher E., Comagic S., Feilen P., Schwanstecher C., Schwanstecher M., Shiue C.-Y., A. Alavi, Höhnemann S., Piel M., Rösch F., Schirmacher R.: Synthesis and Evaluation of 2-(2-[<sup>18</sup>F]Fluoroethoxy)-4-([3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl]-methyl)-benzoic acid ([<sup>18</sup>F]repaglinide): a promising radioligand for quantification of pancreatic  $\beta$ -cell mass with Positron Emission Tomography (PET), *Nuclear Medicine and Biology*, **31**, (2004), 639.

Wängler B., Beck C., Shiue C.-Y., Schneider S., Schwanstecher C., Schwanstecher M., Feilen P., Alavi A., Rösch F., Schirmacher R.: Synthesis and in vitro evaluation of (S)- 2-([<sup>11</sup>C]methoxy)-4-([3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl]-methyl)-benzoic acid ([<sup>11</sup>C]methoxy-repaglinide): a potential  $\beta$ -cell imaging agent, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **14 (20)**, (2004), 5205.

Björn Wängler  
Hindemithstraße 39  
55127 Mainz



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

geb. am 30.04.1975 in Worms

ledig

### Schulbildung

20.06.1995           Abitur am Gauß-Gymnasium Worms

### Wehrdienst

07/1995 – 06/1996   Grundwehrdienst 3./Feldjägerbataillon 740 in Mainz

### Studium

10/1996 – 12/2002   Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Studium der Chemie und  
Mathematik für das Lehramt an Gymnasien

29.09.1998           Zwischenprüfung in Chemie

04.05.2000           Zwischenprüfung in Mathematik

05/2001 – 03/2002   Staatsexamensarbeit in Kernchemie unter Anleitung von Prof. Dr. F.  
Rösch: „<sup>18</sup>F-Markierung und Darstellung von zuckerkonjugierten O<sup>6</sup>-  
Heteroaryl-Guanin Derivaten zur Visualisierung des Methyl-Guanin-  
Methyl-Transferase (MGMT) Status *in vivo*“

05.12.2002           1. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien

### Promotion

12/2002 – heute     Dissertation an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für  
Kernchemie unter der Anleitung von Prof. Dr. F. Rösch mit dem Titel:  
„Synthese, <sup>11</sup>C- und <sup>18</sup>F-Markierung und Evaluierung von Repaglinid-  
Derivaten zur Quantifizierung der pankreatischen  $\beta$ -Zell-Masse *in vivo*  
mittels PET“