

**Synthese, ^{18}F -Markierung, ^{11}C -Markierung und Evaluierung
Hydantoin-substituierter Indolcarbonsäuren zur
Visualisierung des NMDA-Rezeptorstatus mittels der
Positronen-Emissions-Tomographie (PET)**

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
vorgelegt von

Andreas Bauman
geboren in Lampertheim

Mainz 2006

Abstract

The N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) as a part of ionotropic glutamergic receptors is essential for physiological processes such as learning, memory and synaptic plasticity. A glutamate induced overactivation of these receptors, accompanied by increased intracellular calcium concentration, causes cell injury and leads to a large number of acute or chronic neurological disorders, such as stroke and trauma or Parkinson's and Alzheimer's disease. This kind of glutamate-type receptor is unique due to a voltage dependent Mg^{2+} -ion block and the corequisite presence of the endogenous amino acids glutamate and glycine for receptor activation. In addition to this the receptor offers the possibility of modulation by allosteric binding sites, which makes this receptor complex an interesting molecular target to get an insight into these complex processes. Ligands, acting at the glycine-binding site of the receptor, show promising properties for a successful interaction.

In this work novel fluoroethoxy-substituted and methoxy-substituted reference compounds based on the lead structure of a hydantoin-substituted indole-2-carboxylic acid were synthesised for visualising neurological disorders with positronemissiontomography (PET). These compounds were used to determine the affinity towards the NMDA-receptor by using a [3H]MDL-105,519 assay and to determine the lipophilicity as a parameter for penetration of the blood-brain barrier. Based on these results, precursor compounds were synthesized containing a phenolic hydroxy moiety for labelling with the secondary labelling agents 2- [^{18}F]fluoroethyl tosylate ([^{18}F]FETos) and [^{11}C]methyl iodide ([^{11}C]CH $_3$ I).

Using 4,6-dichloro-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indole-2-carboxylic acid for one-step labelling with [^{18}F]FETos resulted in radiochemical yields (RCY) of 6 % for 4,6-dichloro-3-((3-(4-(2-[^{18}F]fluoroethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indole-2-carboxylic acid. Therefore the radiolabeling with [^{18}F]FETos and [^{11}C]CH $_3$ I was optimised for labelling the ethylester protected derivative ethyl 4,6-dichloro-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indole-2-carboxylate in two steps. Using this strategy, ethyl 4,6-dichloro-3-((3-(4-(2-[^{18}F]fluoroethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indole-2-carboxylate and ethyl 4,6-dichloro-3-((3-(4-[^{11}C]methoxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)-methyl)-indole-2-carboxylate were obtained in a RCY of 27 – 38 % under optimised conditions. The following cleavage of the protecting group was not sufficient and could not be performed without decomposition of the radiolabelled product, resulting in all overall radiochemical yield of 5 - 7 % for 4,6-dichloro-3-((3-(4-(2-[^{18}F]fluoroethoxy)-phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indole-2-carboxylic acid and 4,6-dichloro-3-((3-(4-[^{11}C]methoxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indole-2-carboxylic acid.

Subsequent *in vivo*-studies of these radiolabelled compounds with μ -PET and autoradiographic experiments with rat brain slices indicated no sufficient *in vivo*-activity due to insufficient blood-brain barrier penetration.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kurzlebige Radionuklide in den Lebenswissenschaften	1
1.2	Bildgebende Verfahren in den Lebenswissenschaften	2
1.3	Grundlagen der Positronen-Emissions-Tomographie	4
1.4	Chemische und kinetische Aspekte trägerarmer Radionuklide	7
1.5	¹⁸F-Fluor	9
1.5.1	Produktion von ¹⁸ F-Fluor	9
1.5.2	Mechanistische Aspekte von ¹⁸ F-Markierungen.....	10
1.5.2.1	Elektrophile Fluorierung	10
1.5.2.2	Nukleophile ¹⁸ F-Fluorierung.....	11
1.5.2.3	Fluorierung über prosthetische Gruppen.....	13
1.6	¹¹C-Kohlenstoff	15
1.6.1	Produktion von ¹¹ C-Kohlenstoff	15
1.6.2	Primäre Markierungsvorläufer	15
1.6.3	Sekundäre Markierungsvorläufer.....	16
1.7	Glutamatrezeptoren	18
1.7.1	Aufbau und Funktionsweise des NMDA-Rezeptorkomplexes.....	19
1.7.2	Räumliche Verteilung von NMDA-Rezeptoren	20
1.7.3	Liganden des NMDA-Rezeptorkomplex	21
1.7.3.1	Liganden der Glutamat-Bindungsstelle	21
1.7.3.2	Liganden der Glycin-Bindungsstelle	22
1.7.3.3	Liganden des offenen Ionenkanals („Open Channel Blocker“)......	24
1.7.3.4	Liganden der Polyamin-Bindungsstelle	25
1.7.4	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	26
1.7.5	Markierte NMDA-Liganden für die PET.....	27
2	Problemstellung	29
3	Experimente und Ergebnisse	31
3.1	Synthese der Referenzverbindungen	31
3.1.1	Synthese von 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)-methyl) - indol-2-carbonsäureethylester	33

3.1.2	Synthese fluorethyl-substituierter Aminophenole	38
3.1.3	Kopplungsreaktionen	39
3.1.3.1	Umsetzung mit Bis-(trichlormethyl)carbonat (Triphosgen)	39
3.1.3.2	Cyclisierungsreaktionen.....	41
3.1.3.3	Verseifungsreaktionen	43
3.2	Synthese der Markierungsvorläufer	47
3.2.1	Synthese benzylgeschützter Aminophenole.....	48
3.2.2	Kopplungsreaktionen	50
3.2.2.1	Umsetzung mit Bis-(trichlormethyl)carbonat (Triphosgen)	50
3.2.2.2	Cyclisierungsreaktionen.....	51
3.2.2.3	Verseifungsreaktion und Entschützung	52
4	Radioaktive Markierungen	54
4.1	Synthese von 4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-[¹⁸F]fluorethoxy)-phenyl) -2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure [¹⁸F]DDIC1 ausgehend von MV0-DDIC1	54
4.2	Synthese von 4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-[¹⁸F]fluorethoxy)-phenyl) -2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure [¹⁸F]DDIC1 ausgehend von MV-DDIC1	57
4.2.1	Abhängigkeit der RCA von Ethyl[¹⁸ F]DDIC1 bei Zusatz von Lithiumiodid	57
4.2.2	Abhängigkeit der RCA von Ethyl[¹⁸ F]DDIC1 vom Lösungsmittel	58
4.2.3	Abhängigkeit der RCA von Ethyl[¹⁸ F]DDIC-1 vom verwendeten Basensystem	59
4.2.4	Abhängigkeit der RCA von Ethyl[¹⁸ F]DDIC-1 von der Eduktkonzentration.....	62
4.2.5	Abhängigkeit der RCA von Ethyl[¹⁸ F]DDIC1 von der Reaktions-temperatur	63
4.2.6	Abhängigkeit der RCA von Ethyl[¹⁸ F]DDIC1 von der Äquivalenzmenge an Base	63
4.2.7	Verseifungsreaktionen von Ethyl[¹⁸ F]DDIC1 zu [¹⁸ F]DDIC1	64
4.3	Synthese von 4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-[¹⁸F]fluorethoxy)-phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbon-säureethylester (Ethyl[¹⁸F]DDIC3).....	65
4.4	Synthese von 4,6-Dichlor-3-((3-(4-[¹¹C]methoxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure [¹¹C]DDIC5.....	65
4.4.1	Optimierung der Reaktionsparameter zur Synthese des Zwischenproduktes Ethyl[¹¹ C]DDIC5	66
4.4.1.1	Untersuchung der Temperaturabhängigkeit.....	66

4.4.1.2	Untersuchung der Reaktionsdauer	67
4.4.1.3	Untersuchung verschiedener Basen	67
4.4.1.4	Untersuchung der Äquivalenzmenge zugesetzter Base	68
4.4.2	Verseifungsreaktionen von Ethyl[¹¹ C]DDIC5 zu [¹¹ C]DDIC5	68
5	Evaluierungen	70
5.1	Bestimmung der <i>in vitro</i>-Affinitäten	70
5.1.1	Membranpräparation	71
5.1.2	Durchführung des [³ H]MDL-105,519-Rezeptorbindungsassay	72
5.1.3	Auswertung	73
5.2	Bestimmung der Lipophilie	75
5.3	Autoradiographische Hirnschnitte	79
5.4	<i>In vivo</i>-Experimente	81
6	Experimenteller Teil	83
6.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	83
6.2	Synthese der Referenzverbindungen und Markierungs vorläufer	85
6.2.1	Synthese von 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl) -indol-2-carbonsäureethylester (5)	85
6.2.1.1	2-(E/Z)-2-(3,5-Dichlorphenyl)hydrazono)propionsäureethyl-ester (2)	85
6.2.1.2	4,6-Dichlorindol-2-carbonsäureethylester (3)	85
6.2.1.3	4,6-Dichlor-3-formyl-indol-2-carbonsäureethylester (4)	86
6.2.1.4	4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (5)	87
6.2.2	Darstellung fluorethylsubstituierter Aminophenole	88
6.2.2.1	1-(2-Fluorethoxy)-4-nitrobenzol (6a)	88
6.2.2.2	4-(2-Fluorethoxy)anilin (7a)	88
6.2.2.3	2-Chlor-1-(2-fluorethoxy)-4-nitrobenzol (6b)	89
6.2.2.4	3-Chlor-4-(2-fluorethoxy)anilin (7b)	89
6.2.2.5	1-(2-Fluorethoxy)-3-nitrobenzol (6c)	89
6.2.2.6	3-(2-Fluorethoxy)anilin (7c)	90
6.2.2.7	1-(2-Fluorethoxy)-2-nitrobenzol (6d)	90
6.2.2.8	2-(2-Fluorethoxy)anilin (7d)	90
6.2.3	Darstellung benzylgeschützter Aminophenole	91
6.2.3.1	4-(Benzyloxy)anilin (13a)	91
6.2.3.2	4-(Benzyloxy)-3-chlor-anilin (13b)	92

6.2.3.3	3-(Benzyloxy)anilin (13c).....	92
6.2.3.4	2-(Benzyloxy)anilin (13d)	92
6.2.4	4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (DDIC1, 11a).....	93
6.2.4.1	4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (9a)	93
6.2.4.2	4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (10a).....	94
6.2.4.3	4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (11a).....	95
6.2.5	4,6-Dichlor-3-((3-(3-chlor-4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (DDIC2, 11b).....	96
6.2.5.1	4,6-Dichlor-3-((3-(3-chlor-4-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäure-ethylester (9b)	96
6.2.5.2	4,6-Dichlor-3-((3-(3-chlor-4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure-ethylester (10b)	97
6.2.5.3	4,6-Dichlor-3-((3-(3-chlor-4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (11b).....	97
6.2.6	4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (DDIC3, 11c)	98
6.2.6.1	4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (9c).....	98
6.2.6.2	4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (10c)	99
6.2.6.3	4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (11c).....	99
6.2.7	4,6-Dichlor-3-((3-(2-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (DDIC4, 11d)	100
6.2.7.1	4,6-Dichlor-3-((3-(2-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (9d).....	100
6.2.7.2	4,6-Dichlor-3-((3-(2-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (10d).....	101
6.2.7.3	4,6-Dichlor-3-((3-(2-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (11d).....	101
6.2.8	4,6-Dichlor-3-((3-(4-methoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (DDIC5, 11e)	102
6.2.8.1	4,6-Dichlor-3-((1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-(4-methoxy-phenyl)-ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (9e).....	102
6.2.8.2	4,6-Dichlor-3-((3-(4-methoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (10e).....	103

6.2.8.3	4,6-Dichlor-3-((3-(4-methoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäure (11e)	103
6.2.9	4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäure (MV0-DDIC1, 18)	104
6.2.9.1	3-((3-(4-(Benzyloxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-ureido)-methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester (14a).....	104
6.2.9.2	3-((3-(4-(Benzyloxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester (15a).....	105
6.2.9.3	3-((3-(4-(Benzyloxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäure (17)	105
6.2.9.4	4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäure (18)	106
6.2.10	4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (MV-DDIC1, 16a)	107
6.2.11	4,6-Dichlor-3-((3-(3-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäureethylester	108
6.2.11.1	3-((3-(3-(Benzyloxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-ureido)-methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester (14b)	108
6.2.11.2	3-((3-(3-(Benzyloxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester (15b).....	109
6.2.11.3	4,6-Dichlor-3-((3-(3-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (16b).....	110
6.3	Radioaktive Markierungssynthesen	111
6.3.1	Radioanalytische Verfahren	111
6.3.2	Radiosynthesen mit Fluor-18	112
6.3.2.1	Azeotropes Trocknen einer wässrigen [¹⁸ F]Fluorid-Lösung	112
6.3.2.2	Synthese von 2-[¹⁸ F]Fluorethyltosylat	112
6.3.2.3	4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-[¹⁸ F]fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure ([¹⁸ F]DDIC1, 20)	113
6.3.2.4	4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-[¹⁸ F]fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (Ethyl[¹⁸ F]DDIC1, 19).....	113
6.3.2.5	4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-[¹⁸ F]fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (Ethyl[¹⁸ F]DDIC3, 21)	113
6.3.2.6	Präparative Synthese von 4,6-Dichlor-3-(3-(4-(2-[¹⁸ F]fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure ([¹⁸ F]DDIC1, 20).....	114
6.3.3	Radiosynthesen mit ¹¹ C-Kohlenstoff	115
6.3.3.1	Synthese von [¹¹ C]Methyliodid	115

6.3.3.2	4,6-Dichlor-3-((3-(4-[¹¹ C]methoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (Ethyl[¹¹ C]DDIC5, 22).....	116
6.3.3.3	Präparative Synthese von 4,6-Dichlor-3-((3-(4-[¹¹ C]methoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure ([¹¹ C]DDIC5, 23)	116
7	Zusammenfassung.....	118
8	Anhang	122
8.1	Abkürzungen.....	122
8.2	Literatur	125

1 Einleitung

1.1 Kurzlebige Radionuklide in den Lebenswissenschaften

Seit der Entdeckung der Radioaktivität durch Henri Becquerel vor etwas mehr als 100 Jahren, für die er gemeinsam mit Marie und Pierre Curie im Jahr 1903 den Nobelpreis in Physik erhalten hat, sind eine Reihe bedeutender Arbeitsmethoden und technische Anwendungen entstanden, die sich die charakteristische Strahlung der Radionuklide zu Nutze machen.

Herausragende Beispiele dafür sind radioanalytische Verfahren wie die Isotopenverdünnungsanalyse und Neutronenaktivierungsanalyse, die eine sehr präzise Quantifizierung der Elementzusammensetzung in Umweltproben ermöglichen. Auch im technisch-naturwissenschaftlichen und insbesondere im lebenswissenschaftlichen Bereich haben in den vergangenen Jahren Methoden zur Altersdatierung, zur Aufklärung von Transport- und Mischvorgängen, zur Klärung chemischer Reaktionsmechanismen und biochemischer Metabolisierungspfade eine immer größere Bedeutung erlangt.

Als Vater der Tracertechnik in den Lebenswissenschaften gilt der ungarische Chemiker Georg de Hevesy (1885-1966), der Transportvorgänge in Pflanzen mit Hilfe des Bleisotops ^{212}Pb verfolgte und für seine Arbeiten im Jahr 1943 mit dem Nobelpreis in Chemie ausgezeichnet wurde.

Dieses Konzept macht sich die nicht-invasive molekulare Bildgebung mittels PET und SPECT zu Nutze. Durch Markierung biochemisch relevanter Moleküle und Applikation von Stoffmengen im subnanomolaren Bereich, können biochemische Prozesse ohne pharmakologische Beeinflussung des physiologischen Systems durch die charakteristische Zerfallsstrahlung sehr empfindlich quantifiziert und qualifiziert werden. Damit eröffnen sich völlig neue Einsichten in die Funktion der Stoffwechselprozesse im Menschen, was die Methode auch für die pharmazeutische Wirkstoffforschung und die medizinische Grundlagenforschung sehr interessant macht.

1.2 Bildgebende Verfahren in den Lebenswissenschaften

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) hat neben der Einzel-Photonenemissionstomographie (Single Photon Emission Computed Tomographie (SPECT)) in den letzten Jahren eine stetig größer werdende Bedeutung bei einer Reihe von neurologischen, kardiologischen und onkologischen Fragestellungen erlangt.

Während man bei den klassischen tomographischen Verfahren Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) primär sehr hoch aufgelöste, anatomisch-morphologische Informationen erhält, liegt der Fokus einer PET- bzw. SPECT-Untersuchung auf dem Erhalt einer funktionsorientiert-biochemischen Information. So kann man beispielsweise mittels PET dynamische Stoffwechselfvorgänge quantitativ erfassen, Tumordiagnostik und Rezidivüberwachung betreiben, aber auch eine Reihe von Fragestellungen klären, die im Zusammenhang mit ZNS-Erkrankungen stehen. Ein Nachteil dieser Messmethode besteht allerdings in der Schwierigkeit der exakten Zuordnung des erhaltenen Bildmaterials zu entsprechenden anatomischen Strukturen. Eine Kombination aus PET und CT wurde 2001 durch Townsend und Cherry erstmals klinisch verfügbar [1]. Damit ist es möglich, beide tomographischen Verfahren in einem Arbeitsgang durchzuführen. Aufgrund der fast gleichzeitigen Untersuchung ist die Positionierung des Patienten, inklusive aller flexiblen (z. B. Wirbelsäule) und lageverschiebbaren (z. B. Lunge, Herz, Darm) Strukturen in beiden Teiluntersuchungen nahezu gleich [2].

Bei der SPECT werden Radionuklide verwendet, die durch Elektroneneinfang oder Isomerenübergang unter Emission von γ -Strahlung zerfallen. Idealerweise sollte die Energie der Strahlung in einem Bereich zwischen 70 und 250 keV liegen, da in diesem Bereich die Ansprechwahrscheinlichkeit des in der γ -Kamera verwendeten NaI-Detektormaterials am größten ist. Mittels einer Anordnung aus ein bis drei γ -Kameras, die um die Körperachse des Patienten rotieren, werden Schichtaufnahmen des Zielorgans aufgenommen. Da der genaue Herkunftsort des emittierten γ -Quants nicht genau bestimmt ist, erfolgt die räumliche Zuordnung mittels an der Kamera befindlicher Kollimatoren. Sie reduzieren die Streustrahlung und ermöglichen durch Rechner-gestützte Auswertung die Darstellung dreidimensionaler Körper aus den zweidimensionalen Projektionsdaten. Mit einer Auflösung von etwa 8 mm erhält man jedoch eine deutlich schlechtere Bildqualität im Vergleich zur PET, welche eine räumliche Auflösung von 4 - 5 mm ermöglicht [3]. Trotzdem hat die Methode eine breite Akzeptanz in der nuklearmedizinischen Praxis gefunden, sei es aus Kostengründen bei der Anschaffung der Kamera oder aber aus praktischen Erwägungen hinsichtlich der leichten Handhabbarkeit und sehr guten Verfügbarkeit der Radionuklide.

Eine Übersicht der Vor- und Nachteile der vier bildgebenden Verfahren gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Gegenüberstellung relevanter bildgebender Verfahren [4]

<i>Bildgebendes Verfahren</i>	<i>Positronen-Emissions-Tomographie (PET)</i>	<i>Single Photon-Emissionscomputertomographie (SPECT)</i>	<i>Computertomographie (CT)</i>	<i>Magnetresonanztomographie (MRT)</i>
Medium	γ -Strahlen	γ -Strahlen	Röntgenstrahlen	Funkwellen
Räumliche Auflösung	4-5 mm	7-8 mm	50-200 μ m	25-100 μ m
Zeitliche Auflösung	10 sec bis Minuten	Minuten	Minuten	Minuten bis Stunden
Kontrastmittelmenge	Nanogramm-bereich	Nanogramm-bereich	-	Mikrogramm-Milligramm
Hauptnutzung	Metabolisch, Reporter /Gen-expresssio, Rezeptor/Ligand, Enzymtargeting	Reporter/Gen-expression, Rezeptor/Ligand	Morphologische Darstellung	Morphologische Darstellung, Reporter/Gen-expression Rezeptor/Ligand
Vorteile	Hohe Sensitivität	Relativ kostengünstig, gleichzeitige Darstellung unterschiedlicher Nuklide	Anatomische Darstellung, Knochen und Tumorbildgebung	Hohe räumliche Auflösung, Kombination aus morphologischer und funktioneller Bildgebung
Nachteile	Genaue Zuordnung anatomischer Strukturen schwierig	Genaue Zuordnung anatomischer Strukturen schwierig	Eingeschränkte Weichteildarstellung	Relativ niedrige Sensitivität, lange Aufnahme- und Bildbearbeitungszeit

1.3 Grundlagen der Positronen-Emissions-Tomographie

Bei den in der PET verwendeten Radionukliden handelt es sich um instabile, neutronenarme Kerne, die durch Positronenemission stabilisiert werden. Bei der Umwandlung eines instabilen neutronenarmen Kerns konvertiert ein Proton in ein Neutron, wobei zum Ladungsausgleich ein Positron (β^+) und zum Erhalt des Spins ein Neutrino (ν_e) emittiert werden.



Nach der Thermalisierung durch Ionisation und Anregung der umgebenden Materie entlang eines Bremsweges von wenigen Millimetern wird das Positron vernichtet, indem es auf sein Antiteilchen, das Elektron (e^-), trifft. Hierbei wird eine der doppelten Ruhemasse des Elektrons entsprechende Energie in Form von zwei 511 keV γ -Quanten unter einem Winkel von 180° emittiert [5]. Diese Zwei-Quanten-Vernichtungsstrahlung macht man sich aufgrund ihres festen Emissionswinkels zur ortsabhängigen Aktivitätsdetektion zu Nutze, welche mit Hilfe koinzidenzgeschalteter Detektoren erfolgt, die nur dann ein Zerfallsereignis registrieren, wenn innerhalb eines Zeitintervalls von einigen Nanosekunden jeweils ein γ -Quant auftrifft (Abb. 1).

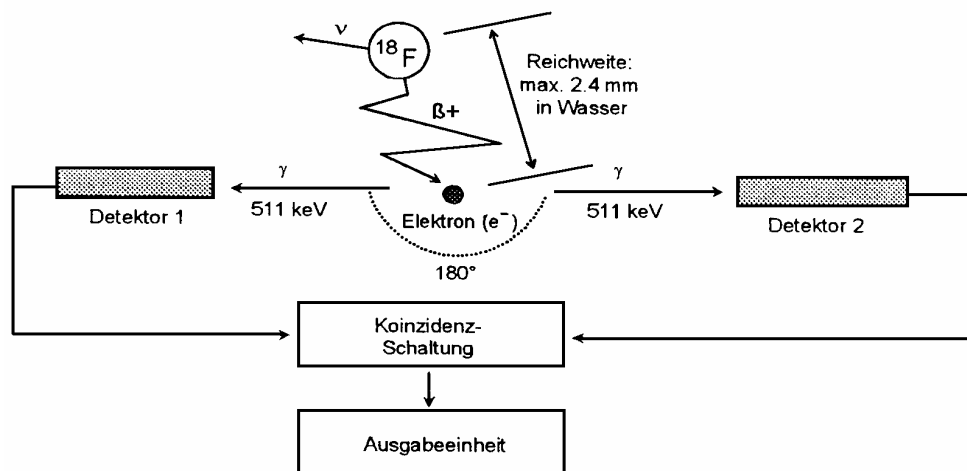


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der Positronenvernichtung und der-Koinzidenzmessung [6]

Nach Anwendung mathematischer Modelle können mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung quantitative Aussagen über metabolische Prozesse getroffen werden aber auch Daten zur Pharmakokinetik von Arzneimitteln bestimmt werden.

Um dieses Messverfahren anwenden zu können, müssen geeignete Positronenemitter zur Verfügung stehen, die einige Grundvoraussetzungen im Hinblick auf die physikalischen, als auch die kernchemischen Parameter besitzen müssen.

Generell kann eine Unterscheidung getroffen werden in radioaktiv markierte Verbindungen, die sich in ihrem biochemischen Verhalten in keinsten Weise von der inaktiven Originalverbindung unterscheiden, sogenannte Isotoptracer (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O) und in Analogtracer (^{18}F , ^{76}Br), welche aufgrund chemischer und sterischer Analogien keine gravierende Veränderung der physiologischen Eigenschaften durch die Markierung erfahren. Bei Fluor, dem wichtigsten Element zur Herstellung von Analogtracern, bestehen Ähnlichkeiten zu Wasserstoff hinsichtlich sterischer Anforderungen, sowie ähnliche Bindungsenergien der C-F- bzw. C-H- Bindung. Eine weitere Analogie besteht in der Ähnlichkeit der C-F- und der C-OH- Bindung in ihrer Bindungslänge und der Tendenz, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden.

So wird beispielsweise das 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin [7] als Substrat von den Aminosäuretransportern erkannt und auch im Rahmen der Proteinbiosynthese als Baustein akzeptiert.

Andererseits macht man sich aber auch eine Änderung des biochemischen Verhaltens, wie bei der 2- ^{18}F Fluor-2-deoxy-D-glukose (2- ^{18}F FDG) zu Nutze [8]. 2- ^{18}F FDG wird von den Glukose-Transportern (GLUT 1-6) aufgenommen und auch durch das Enzym Hexokinase phosphoryliert, kann dann jedoch nicht weiter metabolisiert werden, da 6-Phosphat-2- ^{18}F FDG kein Substrat des Enzyms 6-Phosphat-Glukose-Isomerase ist. Damit ist das modifizierte Molekül in der Zelle „gefangen“ und es erfolgt eine Akkumulation von Aktivität, die der Glykolyserate der Zelle entspricht.

Von zentraler Bedeutung ist die Halbwertszeit des Radionuklids. So sollte die physikalische Halbwertszeit unbedingt mit der biologischen Halbwertszeit des zu beobachtenden Prozesses in Korrelation stehen. Weiterhin muss die Synthesestrategie in Beziehung zur Halbwertszeit des Nuklides stehen.

Betrachtet man in Tabelle 2 die dafür zur Verfügung stehenden Positronenemitter ^{11}C , ^{13}N und ^{15}O so wird ersichtlich, dass ^{13}N und ^{15}O wegen ihrer kurzen Halbwertszeit lediglich zur Markierung einfacher Moleküle und zur Visualisierung schneller Prozesse (Perfusionstracer) geeignet sind (z.B. ^{15}O H₂O, ^{13}N NH₃) [9]. Hingegen lassen sich mit ^{11}C , das eine Halbwertszeit von 20,4 min besitzt, auch komplexere Radiotracer inklusive der dazugehörigen Qualitätskontrolle realisieren.

Tabelle 2: Wichtige Radionuklide und ihre Zerfallcharakteristika [10]

<i>Nuklid</i>	<i>T_{1/2}</i>	<i>Zerfallsart [Häufigkeit %]</i>		<i>E_{β⁺ max}</i>	<i>Reichweite (H₂O)</i>
¹¹ C	20,4 min	β ⁺	99,8	0,96 MeV	4,1 mm
		EC	0,2		
¹³ N	9,96 min	β ⁺	100	1,19 MeV	5,4 mm
¹⁵ O	2,03 min	β ⁺	99,9	1,70 MeV	8,2 mm
		EC	0,1		
¹⁸ F	109,70 min	β ⁺	96,9	0,63 MeV	2,4 mm
		EC	3,1		
⁷⁶ Br	16,7 h	β ⁺	66,5	3,60 MeV	15,5 mm
		EC	33,5		

Ein weiterer Aspekt ist die Positronenenergie, die in enger Beziehung zur Reichweite der Positronenstrahlung steht. Es gilt, dass mit zunehmender Energie die Reichweite des Positrons ansteigt. Eine hohe Positronenenergie führt somit zu einer schlechteren Ortsauflösung und zu einer erhöhten Strahlungsbelastung für den Patienten.

Von großer Bedeutung ist außerdem die Produktion des Nuklids selbst, da über die verwendete Kernreaktion die Isotopenreinheit und die maximal erzielbare Ausbeute des Nuklids festgelegt werden. Insbesondere für die Routineproduktion sind aber auch Faktoren wie Arbeitsaufwand und Komplexität der Reinigung entscheidend.

1.4 Chemische und kinetische Aspekte trägerarmer Radionuklide

Das Ziel einer PET-Untersuchung besteht darin, einen biochemischen Prozess mittels eines geeigneten Radiotracers zu beobachten, ohne ihn aber pharmakologisch zu beeinflussen. Um dies zu erreichen, werden Substanzmengen im Nanogramm-Bereich verabreicht, bei denen zwar eine pharmakologische Information erhalten wird, aber von keiner pharmakologischen Wirkung auszugehen ist. In diesem Zusammenhang ist der Begriff der spezifischen Aktivität von zentraler Bedeutung. Die spezifische Aktivität ist die Aktivität bezogen auf die Gesamtstoffmenge und wird in der Dimension [GBq/mmol] oder [GBq/g] angegeben.

Praktisch lassen sich drei verschiedene Zustände unterscheiden:

trägerfrei (carrier-free, c.f.)

ohne zugesetzten Träger (no-carrier-added, n.c.a.)

geträgert (carrier-added, c.a.)

Der Zustand der Trägerfreiheit liegt im Fall absoluter Nuklidreinheit vor und lässt sich nur bei künstlichen Elementen wie z.B. Astat und Technetium erreichen, da aufgrund der Allgegenwärtigkeit der natürlichen Elemente immer eine gewisse Verunreinigung des Radionuklids mit isotopem Träger vorhanden ist. Die Größenordnung der Isotopenreinheit hängt dabei im wesentlichen von der Häufigkeit des betreffenden Elements in der Umwelt ab. Insbesondere für ^{11}C -Syntheseprodukte ist das Erreichen einer hohen spezifischen Aktivität besonders schwierig, da der Grad an kohlenstoffhaltigen Verunreinigungen das bis zu 10^4 -fache der aktiven Isotope betragen kann. Bei den in der Natur weniger häufig vorkommenden Halogenen, wie etwa dem ^{18}F , beträgt der Grad an Verunreinigung nur etwa das 10^3 -fache [11]. Eine Aufnahme an isotopem Träger lässt sich jedoch nie völlig vermeiden, sei es durch die Bedingungen der Synthese, der Verwendung der Targetmaterialien oder aber auch der Anwesenheit der inaktiven Nuklide in der Umgebungsluft oder an den verwendeten Glasgeräten. Der gebräuchliche Begriff für Markierungssynthesen ist daher „ohne zugesetzten Träger“ (no-carrier-added, n.c.a.). Bei manchen Reaktionen wird Träger absichtlich zugesetzt, um beispielsweise Adsorptionseffekte zu verhindern oder um Nebenreaktionen zu vermeiden. Hier wird von einem geträgerten Zustand (carrier-added, c.a.) gesprochen. Im allgemeinen ist aber ein Trägerzusatz nicht erwünscht, da er die spezifische Aktivität stark erniedrigt. Eine hohe spezifische Aktivität ist besonders dann notwendig, wenn toxische bzw. zentral wirksame Radiopharmaka eingesetzt werden, da diese unterhalb ihrer wirksamen Dosis-Konzentration eingesetzt werden müssen.

Bei Markierungssynthesen mit trägerarmen Radionukliden wird das Edukt in Konzentrationen eingesetzt, die etwa das 10^{10} -fache des Radionuklids betragen. Damit kann die Konzentration des Edukts als konstant angesehen werden und die formale Geschwindigkeitsgleichung für eine bimolekulare Reaktion 2. Ordnung vereinfacht sich zu einer Reaktionskinetik pseudo-erster Ordnung.

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

[A]: Eingesetzte Konzentration des Radionuklids

[P]: Produktkonzentration

[E]: Eduktkonzentration

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

$$k' = k \cdot [E]$$

Die Geschwindigkeitskonstante k' setzt sich aus der tatsächlichen Geschwindigkeitskonstanten k und der Konzentration $[E]$ des Eduktes zusammen.

Für die Aktivität zum Zeitpunkt t gilt:

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

bzw.:

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

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

Die Reaktionskurve für die Produktbildung $[P]$ nimmt mit steigender Reaktionszeit einen exponentiellen Verlauf gegen einen Sättigungswert an. Die Anfangssteigung wird durch k' bestimmt.

1.5 ^{18}F -Fluor

1.5.1 Produktion von ^{18}F -Fluor

Für die Darstellung von ^{18}F -Fluor werden meist kleine, kompakte Zyklotrone (sog. „Mini-Zyklotrone“) verwendet, die mit Teilchenströmen von etwa 100 μA Protonen auf 11 – 20 MeV und Deuteronen auf etwa 10 MeV beschleunigen [12]. Die Wahl der Kernreaktion und des Targetmaterials sind dabei entscheidend für die chemische Form, die erreichbare Produktionsausbeute und die erzielte spezifische Aktivität.

Die Darstellung von trägerarmen (n.c.a.), nukleophilem Fluorid erfolgt im wesentlichen über die $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ -Kernreaktion ausgehend von ^{18}O -angereichertem Wasser. Bei relativ niedrigen Protonenenergien wird im Vergleich zur $^{16}\text{O}(^3\text{He},p)^{18}\text{F}$ -Kernreaktion ausgehend von Wasser mit dieser Kernreaktion ein wesentlich größerer Wirkungsquerschnitt und damit eine viel höhere Targetausbeute erzielt [13]. Zur Abtrennung von kationischen Metallverunreinigungen aus dem Bestrahlungstarget wird das hergestellte ^{18}F -Fluorid nach der Bestrahlung an einen Anionenaustauscher gebunden und mit einer wässrigen Kaliumcarbonatlösung eluiert. Das $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ kann durch photochemische und destillative Aufreinigung zurückgewonnen und wiederverwendet werden [14].

Die Produktion des elektrophilen ^{18}F -Fluor erfolgt über die $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ - oder die $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ -Reaktion an einem Gastarget [15, 16]. Das gebildete $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ lagert sich leicht an der Targetwand ab, weshalb man das $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ durch F_2 -Trägerzusatz aus dem Target extrahiert. Dadurch bedingt resultieren nur geringe spezifische Aktivitäten von 0,04 - 2 GBq/ μmol .

Einen Überblick über die vier wichtigsten Kernreaktionen zur Darstellung von ^{18}F -Fluor gibt Tabelle 3:

Tabelle 3: Kernreaktionen zur Produktion von ^{18}F -Fluor im Zyklotron [17]

<i>Kernreaktion</i>	$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	$^{16}\text{O}(^3\text{He},p)^{18}\text{F}$	$^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$
Targetmaterial	H_2O^{18}	H_2O	Ne (0,1 – 0,2 F_2 , 18 atm)	$^{18}\text{O}_2$
Teilchenenergie [MeV]	16 \rightarrow 0	36 \rightarrow 0	11,2 \rightarrow 0	10 \rightarrow 0
Chemische Form	$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$	$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$
Targetausbeute MBq/$\mu\text{A}\cdot\text{h}$	2200	250	350-450	\sim 350
Spezifische Aktivität GBq/μmol	$40\cdot 10^3$	$40\cdot 10^3$	0,04 -0,4	0,04 -2

1.5.2 Mechanistische Aspekte von ^{18}F -Markierungen

^{18}F -Fluor bietet wegen seiner nuklearchemischen Eigenschaften sehr gute Voraussetzungen zur Verwendung als PET-Nuklid (Tab. 2). Die Halbwertszeit des ^{18}F -Fluor von 109,7 min stellt einen idealen Kompromiss bezüglich Synthese, Reinigung und Qualitätskontrolle dar. Mit einer maximalen Positronenenergie von $E_{\beta^+ \text{max.}} = 635 \text{ keV}$, der niedrigsten innerhalb der relevanten Positronenemitter, erreicht man beim ^{18}F -Fluor eine gute Ortsauflösung und eine geringe Strahlenbelastung des Patienten. Mit einer maximalen Reichweite von 2,2 mm und einer durchschnittlichen Reichweite von 0,5 mm im menschlichen Gewebe werden weiterhin die gerätespezifischen Limitierungen der Ortsauflösung klinischer PET-Geräte (human $> 4 \text{ mm}$, $\mu\text{-PET} > 1 \text{ mm}$) unterschritten [18].

Hinsichtlich der Einführung von ^{18}F -Fluor in organische Verbindungen kann man eine Klassifizierung treffen in Direktmarkierungsreaktionen (elektrophile bzw. nukleophile ^{18}F -Fluorierungen) und Markierungsreaktion mittels prosthetischer Gruppen.

1.5.2.1 Elektrophile Fluorierung

Bei elektrophilen ^{18}F -Fluorierungen erfolgt die Reaktion zwischen sehr stark polarisiertem Fluor und elektronenreichen Substraten wie z.B. Aromaten, Alkenen und Carbanionen. Das Fluorierungsmittel kann als $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ direkt aus dem Produktionsprozess verwendet werden oder aber durch nachfolgende Reaktion in Form der milderen, sekundären Markierungsvorläufer $[^{18}\text{F}]\text{Xenondifluorid}$ $[^{18}\text{F}]\text{XeF}_2$ und $[^{18}\text{F}]\text{Acetylhypofluorid}$ $[^{18}\text{F}]\text{AcOF}$ [19]. Neben der Berücksichtigung sicherheitstechnischer Aspekte im Umgang mit elementarem Fluor, stellen die maximal erreichbare radiochemische Ausbeute von 50 % und die schlechte spezifische Aktivität Nachteile dar. Bedingt durch die hohe Reaktivität der ^{18}F -Fluorierungsmittel muss außerdem mit einer schlechten Regioselektivität, Mehrfachfluorierungen und Nebenreaktionen mit Lösungsmitteln und apparativen Materialien gerechnet werden.

Die Anwendung dieser Methode ist daher auf Verbindungen wie Fettsäuren, Zucker und Aminosäuren beschränkt, die zur Untersuchung physiologischer Vorgänge eingesetzt werden und bei denen eine hohe spezifische Aktivität nicht erforderlich ist.

Im wesentlichen betrifft dies die Darstellung einiger Aminosäuren und ihrer Derivate wie beispielsweise das 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor-L-tyrosin}$, das 4- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor-L-phenylalanin}$ und das 6- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor-L-dopa}$, welche sich auf alternativem Wege über die nukleophile ^{18}F -Fluorierung nur mit größerem synthetischen und zeitlichen Aufwand und in der Regel unbefriedigenden Ausbeuten darstellen lassen [20, 21].

Eine Verbesserung der Regioselektivität wird durch ^{18}F -Demetallierungsreaktionen an organometallischen Markierungsvorläufern wie Aryltrimethylzinn-, -germanium- oder -silizium-Verbindungen bei tiefen Temperaturen in perhalogenierten Lösungsmitteln (CFCl_3) erreicht (Abb. 2). Dabei werden mit Zinnvorläufern die höchsten radiochemi-

schen Ausbeuten erzielt [22]. Auf diese Weise konnten 2-[¹⁸F]Fluor-L-tyrosin [23] und 6-[¹⁸F]Fluor-L-dopa [24] durch Destannylierung mit verbesserten radiochemischen Ausbeuten hergestellt werden.

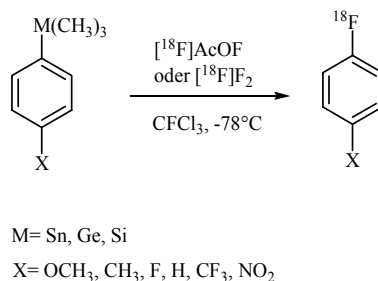


Abbildung 2: ¹⁸F-Fluordemetallierung

1.5.2.2 Nukleophile ¹⁸F-Fluorierung

Den derzeit wichtigsten Weg zur Darstellung von ¹⁸F-Fluor-markierten, organischen Verbindungen in hohen spezifischen Aktivitäten stellt die nukleophile Fluorierung mit n.c.a. [¹⁸F]Fluorid dar. Das [¹⁸F]Fluorid-Anion, das aus dem Produktionsprozess in wässriger Lösung gewonnen wird, liegt bedingt durch seine große Ladungsdichte stark solvatisiert vor und verfügt damit über keine ausreichende Nukleophilie. Außerdem wird in Anwesenheit acider Protonen sehr leicht das stark elektronegative Fluor unter Bildung von [¹⁸F]Fluorwasserstoff protoniert und steht somit für weitere Umsetzungen ebenfalls nicht mehr zur Verfügung.

Um diese Prozesse zu vermeiden ist es daher von großer Bedeutung, die Reaktionsbedingungen an die speziellen Eigenschaften des Fluoridanions anzupassen. Im wesentlichen betrifft dies die Wahl des Lösungsmittels, des Basensystems und des Phasentransferkatalysators.

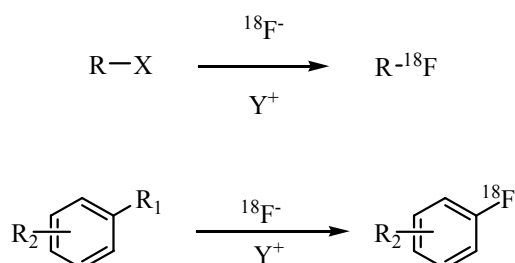
¹⁸F-Fluorierungen werden daher in dipolar aprotischen Lösungsmitteln, wie Acetonitril (MeCN), Dimethylformamid (DMF) und Dimethylsulfoxid (DMSO) durchgeführt.

Diese Lösungsmittel verfügen über eine hohe Dielektrizitätskonstante ϵ ($\epsilon > 20$) und wirken auf Salze dissoziierend, ohne jedoch das Fluoridanion zu protonieren. Zur Anionenaktivierung des [¹⁸F]F⁻ und zur Verhinderung der Entstehung von [¹⁸F]Fluorwasserstoff werden Phasentransferkatalysatoren wie der Aminopolyether Kryptofix[®] 2.2.2 und nicht nukleophile Hilfsbasen wie das System Oxalat/Carbonat oder Kaliumcarbonat verwendet. Durch die Komplexbildung des Kaliumkations durch den Kryptanden unter Bildung des Kryptatkomplexes [K⁺2.2.2]¹⁸F erfährt das Fluoridanion eine weitere Aktivierung, indem es nahezu unsolvatisiert vorliegt und so seine volle Nukleophilie entfalten kann. Indem die Base als nicht-isotoper Träger fungiert, werden weiterhin Adsorptionsphänomene des ¹⁸F-Fluors an der Gefäßwand vermieden.

Um optimale Ergebnisse bei der nukleophilen ^{18}F -Fluorierung zu erreichen, muss die Trocknung des ^{18}F -Fluorids sehr sorgfältig durchgeführt werden. Dazu wird die wässrige ^{18}F -Fluorid-Lösung mit einer geeigneten Hilfsbase und einer Lösung des Phasentransferkatalysators in Acetonitril versetzt und unter einem Heliumstrom bis zur Trockne eingedampft. Diese azeotrope Destillation dient neben der Entfernung des Wassers auch zur Bildung des anionenaktivierenden Komplexes (z. B. $[\text{K} \subset 2.2.2]_2\text{CO}_3$). Bei der Verwendung von Kryptofix[®] 2.2.2 ist auf die Trocknungstemperatur zu achten, da es bei Temperaturen über 90 °C zu einer Thermolyse des Aminopolyethers kommt.

Reaktionen vom Typ der nukleophilen aliphatischen Substitution können mechanistisch als $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion angesehen werden, wobei Halogene oder Sulfonsäureester wie Mesylat, Tosylat oder Triflat als Abgangsgruppen dienen [25].

Die allgemeine Form der nukleophilen aliphatischen bzw. aromatischen Substitution wird in Abbildung 3 dargestellt.



X= Br, I, R-SO₃, R-OSO₃

R₁= NO₂, N(CH₃)₃⁺ (TfO⁻, Tos⁻, Br⁻, I⁻), Cl, Br, I

R₂= CN, NO₂, CHO, CRO, COOR

Y⁺= $[\text{K}^+ \subset 2.2.2]_2\text{CO}_3^{2-}$, $[\text{K}^+ \subset 2.2.2]_2\text{C}_2\text{O}_4^{2-}/\text{CO}_3^{2-}$, R₄N⁺, Cs⁺, Rb⁺

Abbildung 3: Allgemeines Schema der nukleophilen ^{18}F -Fluorierung

Werden Substitutionen dieses Typs an chiralen C-Atomen durchgeführt, findet eine Walden-Umkehr statt [26]. So wird beispielsweise die Synthese der 2- ^{18}F Fluor-2-deoxy-D-glukose (^{18}F FDG) aus einem vollständig acetylierten Mannosevorläufer durch Austausch von Triflat gegen ^{18}F Fluorid und anschließender Hydrolyse [27] durchgeführt (Abb. 4)

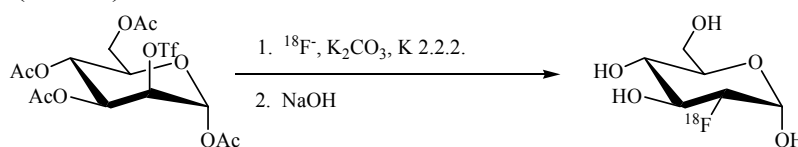


Abbildung 4: Syntheschema der 2- ^{18}F Fluor-2-deoxy-D-glukose

Die aromatische nukleophile Substitution spielt in der Radiopharmakadarstellung aufgrund der hohen metabolischen Stabilität fluorierter Aromaten eine wichtige Rolle. Hier findet die ^{18}F -Fluorierung in erster Linie an Positionen der Aromaten statt, die durch mesomer elektronenziehende Substituenten (R₂) in ortho- oder para-Stellung zur Abgangsgruppe (R₁) aktiviert sind. Hier haben sich besonders Nitro-, Cyano- und Carbo-

nylfunktionen mit hoher Hammett-Konstante bewährt [28]. Als Abgangsgruppen eignen sich die Nitrogruppe, die Halogene und besonders die Trimethylammoniumfunktion. Fluor ist ebenfalls als Abgangsgruppe geeignet, führt aber bei der Radiofluorierung zu geträgerten Produkten, was zu einer Verringerung der spezifischen Aktivität führt.

1.5.2.3 Fluorierung über prosthetische Gruppen

Die ^{18}F -Fluorierung über prosthetische Gruppen stellt eine Alternative dar, wenn der Syntheseweg einer Direktfluorierung durch strukturelle Gegebenheiten, wie die Anwesenheit mehrerer konkurrierender nukleophiler Abgangsgruppen oder aber acider Positionen erschwert ist. Unter den Bedingungen einer nukleophilen ^{18}F -Fluorierung wird im ersten Schritt eine gute ^{18}F -fluorierbare Verbindung mit n.c.a. $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ umgesetzt und in einem zweiten Reaktionsschritt an das zu markierende Molekül gekoppelt. Anders als bei der nukleophilen Direktfluorierung mit n.c.a. $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ sind jedoch teilweise deutliche strukturelle Veränderungen im Vergleich zur Originalverbindung gegeben und es kann zu Unterschieden in ihrem physiologischen Verhalten kommen. Außerdem muss unter den Bedingungen einer Mehrstufensynthese mit isotopen Kontaminationen gerechnet werden, was neben dem zeitbedingten Aktivitätsverlust zusätzlich zu einer Verringerung der spezifischen Aktivität führt

Es existiert eine Reihe prosthetischer Gruppen, die sich in der praktischen Anwendung bewährt haben. Hervorzuheben sind insbesondere ^{18}F -markierte Alkyltosylate [29 -31], -triflate [32] und -bromide [33] zur Fluoralkylierung und ^{18}F -markierte Carbonsäurederivate zur Fluoracylierung [34, 35]. Weitere Vertreter prosthetischer Gruppen sind ^{18}F -Fluorarylierungsagenzien wie 4- $[^{18}\text{F}]$ Fluorphenyllithium [36] und 4- $[^{18}\text{F}]$ Fluorphenylmagnesiumbromid [37].

Ein sehr häufig angewendetes Markierungsreagens stellt das 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat ($[^{18}\text{F}]\text{FETos}$) dar. Durch Umsetzung von $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ mit nukleophilen Gruppen wie Amino-, Hydroxy- und Thiolgruppen, lassen sich meist hohe radiochemische Ausbeuten erzielen (Abb. 5).

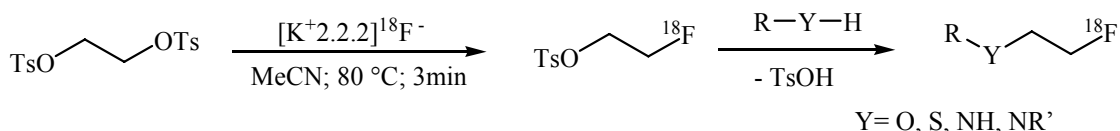


Abbildung 5: Allgemeines Schema einer ^{18}F -Fluorethylierung mit 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat

Aktuelle Beispiele einiger klinisch relevanter Radiotracer, die bei einer Reihe von onkologischen, neurologischen und Sucht-spezifischen Fragestellungen angewendet werden, sind die Proliferationstracer O-2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltyrosin [38] und $[^{18}\text{F}]$ Fluorethylcholin [39], sowie der μ -Opiatrezeptorligand $[^{18}\text{F}]$ Fluorethylidiprenorphin [40]. Eine andere interessante prosthetische Gruppe ist das 1-Brom-2- $[^{18}\text{F}]$ fluorethan ($[^{18}\text{F}]\text{BFE}$), das aus-

gehend von 1,2-Dibromethan mit $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ umgesetzt wird und durch eine abschließende Aufarbeitung über eine Kombination von Festphasenkartuschen in guten radiochemischen Reinheiten ($> 95\%$) und Ausbeuten (40 - 50 %) erhalten werden kann (Abb. 6) [41].

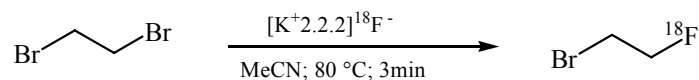


Abbildung 6: Synthese des 1-Brom-2- $[^{18}\text{F}]$ fluorethan

Eine Anwendungsmöglichkeit des $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$ besteht darin, es *in situ* in 2- $[^{18}\text{F}]$ fluorethyltriflat zu überführen, welches ein wesentlich stärker alkylierendes Agens als $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ ist. Der Vorteil dieser prosthetischen Gruppe liegt in einer hohen Reaktivität, so dass sich unter milden Reaktionsbedingungen hohe radiochemische Ausbeuten erzielen lassen.

Weiterhin kann in einer Art Finkelsteinaustausch aus $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$ oder $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ und Alkalimetalliodiden das ebenfalls reaktivere 2-Iod-1- $[^{18}\text{F}]$ fluorethan $[^{18}\text{F}]\text{IFE}$ generiert werden (Abb. 7) [42, 43]. In einer Eintopfreaktion erfolgt die direkte Umsetzung des *in situ* gebildeten $[^{18}\text{F}]\text{IFE}$ mit dem entsprechenden Markierungsvorläufer, wobei signifikante Steigerungen der radiochemischen Ausbeute um den Faktor 2 möglich sind [44].

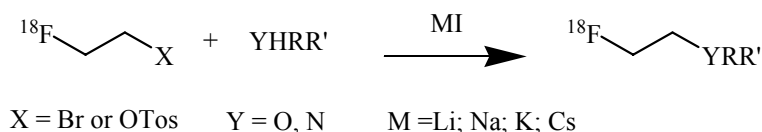


Abbildung 7: *in situ*-Generierung von 2-Iod-1- $[^{18}\text{F}]$ fluorethan

In Analogie zum meist verwendeten Markierungssyntheton in der ^{11}C -Chemie, dem $[^{11}\text{C}]\text{Methyliodid}$, wurden Bestrebungen unternommen die korrespondierende ^{18}F -markierte Fluormethylverbindung darzustellen. Das ähnlichste Analogon des $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, das $[^{18}\text{F}]\text{Fluormethyliodid}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{I}$), konnte durch Finkelsteinaustausch an Diiodmethan (CH_2I_2) dargestellt werden [45]. Chemisch eng verwandt und nur geringfügig weniger reaktiv, stellt das $[^{18}\text{F}]\text{Fluormethylbromid}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{Br}$) eine Alternative zum $[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{I}$ dar und bietet, wie sein länger-kettiges Pendant $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$, die Option zur Darstellung des deutlich reaktiveren $[^{18}\text{F}]\text{Fluormethyltriflat}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{OTf}$) [46].

Im Gegensatz zur breiten Anwendung des $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ bei Markierungssynthesen konnten allerdings die eben erwähnten Markierungssynthetons nie einen ebenbürtigen Status erlangen. Wie beim $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$ schränkt der finale destillative Aufreinigungsschritt die apparative Integration ein. Ferner besitzen ^{18}F -fluormethylierte Verbindungen eine geringe metabolische Stabilität und unterliegen in starkem Ausmaß Defluorierungsreaktionen. Eine Ausnahme stellt das von DeGrado eingeführte $[^{18}\text{F}]\text{Fluorcholin}$ dar, welches für die nicht-invasive onkologische Diagnostik von Prostataerkrankungen eingesetzt wird [47].

1.6 ^{11}C -Kohlenstoff

1.6.1 Produktion von ^{11}C -Kohlenstoff

Die Darstellung von ^{11}C -Kohlenstoff kann durch verschiedene Kernreaktion am Zyklotron erfolgen. Neben Kernreaktionen an ^{10}B und ^{11}B stellt der $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ -Prozess die am häufigsten angewendete Methode zur Produktion von trägerfreiem ^{11}C dar.

Tabelle 4: Kernreaktionen zur Herstellung von Kohlenstoff-11 [48]

<i>Kernreaktion</i>	$^{10}\text{B}(d,n)^{11}\text{C}$	$^{11}\text{B}(p,n)^{11}\text{C}$	$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$
Teilchenenergie [MeV]	10 → 0	10 → 0	13 → 0
Maximaler Wirkungsquerschnitt σ_{max} [mb]	~ 200	~ 360	~ 290
MBq/$\mu\text{A}\cdot\text{h}$			
Targetausbeute			
MBq/$\mu\text{A}\cdot\text{h}$	2479	3400	3820

1.6.2 Primäre Markierungsvorläufer

Wegen der kurzen Halbwertszeit des Kohlenstoff-11 ist es wichtig, einen geeigneten primären Markierungsvorläufer schon während der Bestrahlung als Rückstoßprodukt im Target zu erhalten. Tabelle 5 zeigt die theoretisch erzielbaren und praktisch erreichten spezifischen Aktivitäten einiger Markierungsvorläufer.

Tabelle 5: Spezifische Aktivitäten einiger ^{11}C -Markierungsvorläufer [49]

<i>Vorläufer</i>	$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$	$[^{11}\text{C}]\text{HCN}$
Kernreaktion	$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$	$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$	$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$
Target	N_2 (O_2)	N_2 (HI)	N_2 (H_2)
spezifische Aktivität [GBq/mmol]			
theoretisch (trägerfrei)	$3,4\cdot 10^8$	$3,4\cdot 10^8$	$3,4\cdot 10^8$
praktisch (n.c.a.)	$10^4 - 10^5$	$10^3 - 10^4$	10^4

Durch Zugabe geringer Mengen Sauerstoff (1-10 ppm) zum Targetgas Stickstoff lassen sich auf diesem Weg $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ und $[^{11}\text{C}]\text{CO}$ darstellen. Das Verhältnis der beiden Spezies ist von der Strahlendosis und Dosisleistung abhängig und kann in Richtung des $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ gesteuert werden [50].

($[^{11}\text{C}]\text{HCN}$), das in einer Platin-katalysierten Reaktion aus $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ und Ammoniak hergestellt wird [60]. Ausgehend von $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ als Nukleophil wurde $[^{11}\text{C}]\text{Licostinel}$, ein Antagonist der Glycin-Bindungsstelle dargestellt [61]. Eine weitere nützliche Anwendung von $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ besteht in der Darstellung von Aminosäuren durch Strecker-synthesen [62].

Das am häufigsten eingesetzte sekundäre ^{11}C -Markierungsreagens ist jedoch $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$. Mit ihm lassen sich durch Alkylierung von Aminen, Alkoholen oder Thiolen ^{11}C -methylierte Verbindungen in hohen radiochemischen Ausbeuten erhalten. Relevante Beispiele sind die markierte Aminosäure L-[methyl- ^{11}C]Methionin [63] sowie die beiden Dopaminrezeptorliganden [O-methyl- ^{11}C]-Racloprid [64] und N-[^{11}C]Methylspiperon [65].

$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ kann durch Reduktion von $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ mit LiAlH_4 in THF und nachfolgender Umsetzung des gebildeten $[^{11}\text{C}]\text{Methanolats}$ mit konzentrierter wässriger Iodwasserstoffsäure in guten Ausbeuten dargestellt werden (Abb.9) [66, 67].

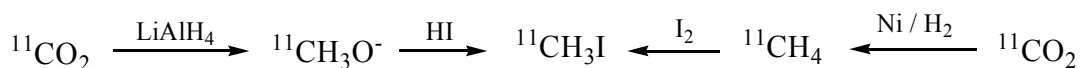


Abbildung 9: Synthesewege zur Darstellung von $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$

Die Nachteile liegen, bedingt durch die korrosiven Eigenschaften der Iodwasserstoffsäure, in einer starken Beanspruchung der konstruktiven Elemente der Syntheseapparatur. Weiterhin existiert eine Reihe möglicher Kontaminationswege, die allerdings in der Syntheseführung begründet liegen und sich nicht vermeiden lassen. In der Praxis kann es zu Verunreinigung des $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ mit Wasser oder Iodwasserstoff kommen und ferner zu isotypen Verunreinigungen durch die hohe Affinität des verwendeten LiAlH_4 zu Luft- CO_2 . Da schon geringe Verunreinigungen des ^{11}C Markierungsvorläufers zu drastischen Einbußen bei der radiochemischen Ausbeute führen können, wurden eine Reihe von Optimierungen und Weiterentwicklungen bestehender $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ -Synthesen auf Basis von Gas-Festphasenreaktion durchgeführt [68, 69].

Die modernste Methode zur Synthese von $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ basiert auf der radikalischen Umsetzung von I_2 mit $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ bei $720\text{ }^\circ\text{C}$ im Inertgasstrom [70, 71]. $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ wird dabei zuvor durch Reduktion des $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ durch H_2 am Ni-Katalysator bei $360\text{ }^\circ\text{C}$ erzeugt. Dieses Verfahren ist sehr zuverlässig und erlaubt vor allem die Herstellung von $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ in hohen spezifischen Aktivitäten mit sehr guter Reproduzierbarkeit.

Durch die Reaktion von $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ mit Silbertrifluormethansulfonat bei $250\text{ }^\circ\text{C}$ im Inertgasstrom lässt sich der Trifluormethansulfonsäure $[^{11}\text{C}]\text{methylester}$, $[^{11}\text{C}]\text{Methyltriflat}$ ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$) [72] darstellen. Im Vergleich zum $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ besitzt $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ eine deutlich höhere Reaktivität [73, 74], so dass damit schwer methylierbare Substanzen bzw. funktionelle Gruppen oftmals markierbar sind. Allerdings ist die hohe Reaktivität des $[^{11}\text{C}]\text{Methyltriflats}$ auch mit einer geringeren Selektivität verbunden und man ist auf die Anwendung inerten Lösungsmittel wie 1,2-Dichlorethan beschränkt.

1.7 Glutamatrezeptoren

Mit einer Konzentration von 10 mM ist Glutamat der am häufigsten vorkommende exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn. Der größte Anteil des Glutamats liegt dabei intrazellulär und nur eine sehr kleine Konzentration von geschätzten 0,6 μM extrazellulär vor [75]. Neben seiner Funktion als Baustein von Proteinen stellt Glutamat einen essentiellen Botenstoff in der Signaltransmission neuronaler Prozesse dar.

Die Klasse der Glutamatrezeptoren kann unterteilt werden in G-Protein gekoppelte, metabotrope Rezeptoren (mGluR I-III) und ligandengesteuerte, ionotrope Rezeptoren, welche nach ihren selektiven exogenen Agonisten als NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-, AMPA (2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionat)- und Kainat (2-[2-Carboxy-4-(2-propenyl)pyrrolidin-3-yl]acetat)-Rezeptor bezeichnet werden (Abb. 10, Abb. 11) [76]. Während der AMPA- und der Kainat-Rezeptor eine Signalweiterleitung im Mikrosekundenbereich vermitteln, verläuft die Rezeptorantwort beim NMDA-Rezeptor deutlich langsamer und länger anhaltend. Ein weiterer Unterschied besteht in der zusätzlichen Durchlässigkeit des NMDA-Rezeptors für Ca^{2+} -Ionen.

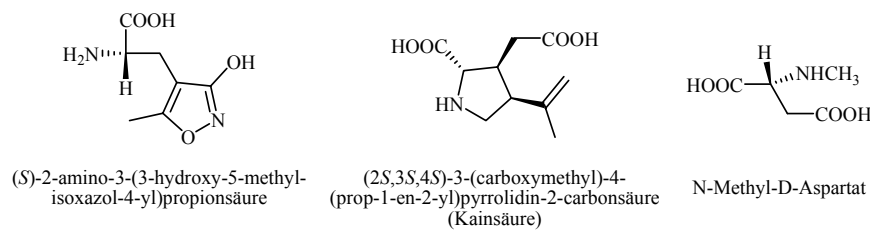


Abbildung 10: Namensgebende exogene Liganden des NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptors

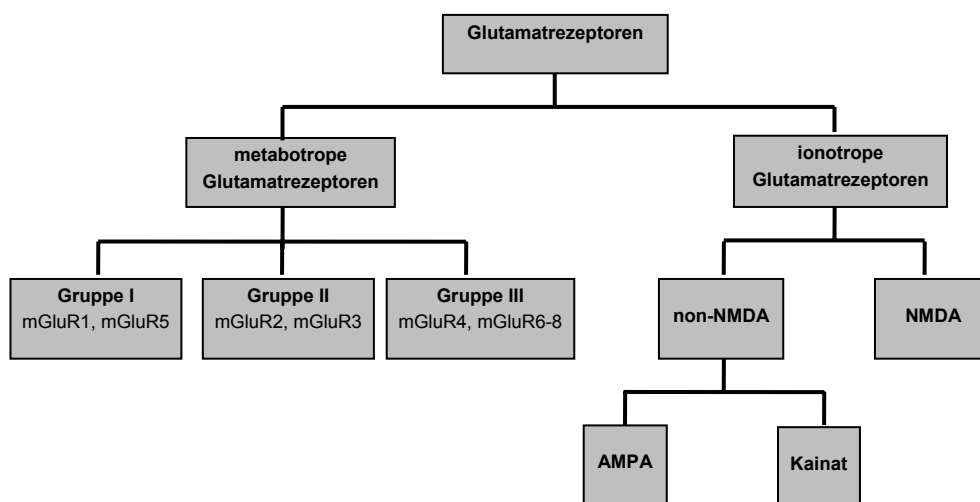


Abbildung 11: Klassifizierung exzitatorischer Glutamatrezeptoren

1.7.1 Aufbau und Funktionsweise des NMDA-Rezeptorkomplexes

Der NMDA-Rezeptorkomplex ist an der Signaltransmission im ZNS beteiligt und spielt insbesondere bei Lern- und Gedächtnisvorgängen eine entscheidende Rolle [77]. Er besteht aus ca. 1000 Aminosäuren umfassenden Proteinuntereinheiten, welche als NR1, bzw. NR2 bezeichnet werden. Von der NR1-Untereinheit sind 7 Isoformen (NR1 A-H) bekannt, während von der NR2-Untereinheit 4 Varianten entdeckt wurden (NR2 A-D), die durch 4 Gene kodiert werden [78, 79]. In jüngster Zeit wurde auch eine dritte Untereinheit NR3 A [80] und NR3 B [81] entdeckt, deren Funktion noch nicht ganz geklärt ist. Jede Rezeptoruntereinheit ist aufgebaut aus einem extrazellulären N-Terminus, drei transmembranären Domänen, einer membranären Domäne und einem intrazellulären C-Terminus (Abb. 12) [82].

Um seine Funktionalität zu erfüllen, ist der Proteinkomplex heteromer aus NR1- und NR2-Untereinheiten aufgebaut. Während in der Vergangenheit [83] von einer pentameren Zusammenstellung des Rezeptors ausgegangen wurde, wird in der neueren Literatur eine tetramere Zusammenstellung diskutiert [84]. Neueste Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass auch eine Beteiligung der NR3-Untereinheit am Aufbau des Rezeptorkomplex vorliegt. Man vermutet, dass diese Untereinheit eine weniger starke Blockade des Ionenkanals durch Mg^{2+} -Ionen bewirkt und somit schon bei Ruhepotential eine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit des Ionenkanals vorliegt [85, 86].

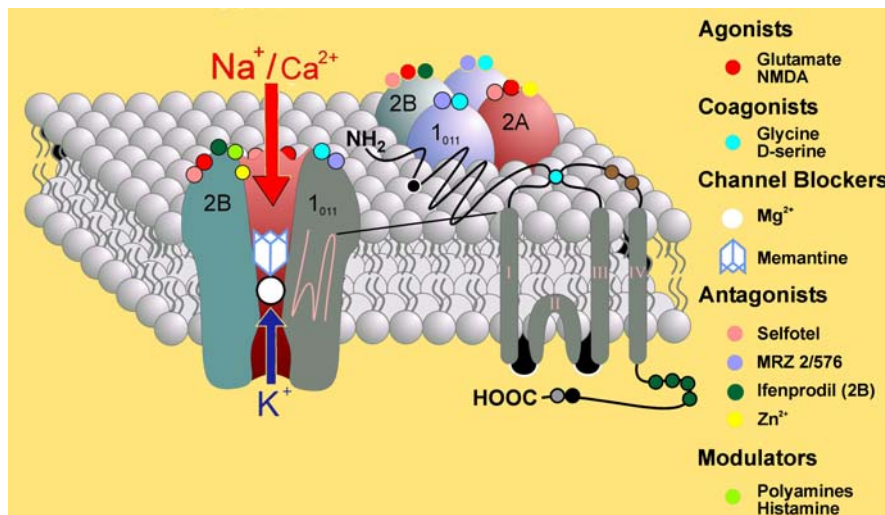


Abbildung 12: Struktur des NMDA-Rezeptors (modifiziert nach [77])

Der NMDA-Rezeptor ist für Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ionen durchlässig und bei normalem Ruhepotential durch ein Mg^{2+} -Ion verschlossen. Erst nach Teildepolarisation der umgebenden Membran und gleichzeitiger Anwesenheit der Ko-Agonisten Glutamat und Glycine wird der Kanal geöffnet. Nach Öffnung des Ionenkanals können Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen in die Zelle einströmen, während K^+ -Ionen die Zelle verlassen.

Von zentraler Bedeutung ist hierbei der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, über die andere *second messenger*-Systeme aktiviert werden. Ist der Ca-Einstrom infolge glutamatvermittelter Rezeptor Überstimulation erhöht, setzen Pathomechanismen ein, die zu akuten (Schlaganfall oder Traumata) bzw chronischen neurodegenerativen Krankheitsbildern (Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer) führen können [87].

In der Nähe der spannungsabhängigen Mg^{2+} -Bindungsstelle liegen weiterhin die MK-801- und die PCP-Bindungsstelle. Alle Liganden dieser Stoffklasse („open channel blockers“) besitzen antagonistische Wirkung und können nur binden, wenn der Rezeptorkanal in der für die Öffnung erforderlichen Konformation vorliegt.

Polyamine, wie Spermidin und Spermin, besitzen ebenfalls einen modulierenden Effekt auf den Ionentransport der Kanalpore. In niedrigen Konzentrationen führen sie zu einer positiven Modulation, während in hohen Konzentrationen eine Inhibition überwiegt.

1.7.2 Räumliche Verteilung von NMDA-Rezeptoren

Die einzelnen Untereinheiten des NMDA-Rezeptorkomplexes zeigen eine deutlich unterschiedliche Expression im zentralen Nervensystem (ZNS) von Nagetieren [88]. Während die NR1-Untereinheit ubiquitär im ZNS exprimiert vorliegt, zeigen die verschiedenen NR2-Untereinheiten diskrete und altersabhängige Verteilungsmuster in speziellen Hirnarealen [89]. Die NR2 A- und NR2 B-Untereinheiten treten mit hoher Dichte im Cortex und Hippocampus auf, während die NR2 C-Untereinheit bevorzugt im Cerebellum und Rückenmark lokalisiert ist. Die NR2 D-Untereinheit, als seltenste Form der NR2-Untereinheiten, lässt sich bevorzugt im Hirnstamm und Hypothalamus vorfinden. Neben der Expression im ZNS konnten NMDA-Rezeptoren auch in extraneuronalen Geweben wie Herz [90], Lunge [91] und pankreatischen β -Zellen [92] nachgewiesen werden [93].

1.7.3 Liganden des NMDA-Rezeptorkomplex

Wegen seiner Beteiligung an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge und der Möglichkeit der Modulierung über unterschiedliche Bindungsareale steht der NMDA-Rezeptorkomplex im Fokus moderner Arzneistoffentwicklung. Im Folgenden wird daher ein Überblick über die wichtigsten Substanzentwicklungen gegeben.

1.7.3.1 Liganden der Glutamat-Bindungsstelle

Als endogene Agonisten der Glutamat-Bindungsstelle wirken die Aminosäuren L-Asparagin, L-Glutamin, sowie das geringer affine, aber selektivere N-Methyl-D-aspartat. Strukturell eng verwandt, aber mit einer antagonistischen Wirkung am Rezeptor, sind die entsprechenden Phosphonsäure-Derivate D-AP5 und D-AP7. Üblicherweise sind diese zwischen α -Aminosäureterminus und Phosphonsäureterminus durch bis zu 6 Atome getrennt [94, 95,]. Untersuchungen der Stereokonfiguration haben ferner gezeigt, dass abgesehen von einigen wenigen Ausnahmen stets die (R)-Enantiomere für die antagonistische Wirkung verantwortlich sind [96]. Innerhalb der Gruppe der kompetitiven Liganden der Glutamat-Bindungsstelle stellen die Verbindungen D-CPPene und Selfotel die potentesten Verbindungen dar. Selfotel, das sich bereits in klinischen Studien befand, wurde allerdings wegen zu geringer klinischer Wirkung bei hohem Nebenwirkungspotential in der Entwicklung eingestellt [97].

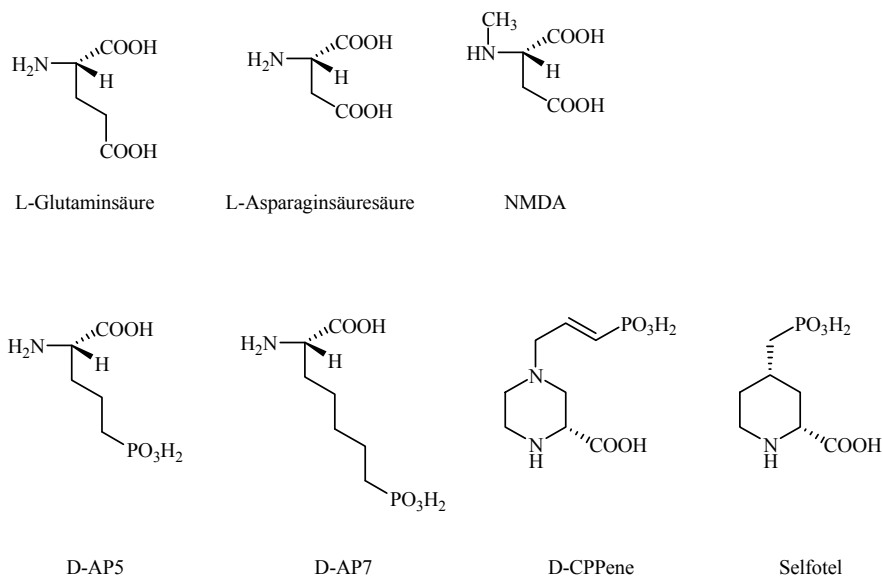


Abbildung 13: Kompetitive Liganden der Glutamat-Bindungsstelle

1.7.3.2 Liganden der Glycin-Bindungsstelle

Glycin kann im zentralen Nervensystem des Menschen durch Bindung am strychnin-sensitiven Glycin_A-Rezeptor neben einer inhibitorischen Wirkung auch eine exzitatorische Wirkung durch Beteiligung an der Regulation des NMDA-Rezeptors entfalten [98]. Man vermutet, dass Glutamat der eigentliche Neurotransmitter ist, während Glycin als Ko-Transmitter eine modulierende und sensibilisierende Wirkung auf dessen Bindungsstelle hat [82, 99]. Durch diesen Ko-Agonismus bedingt, stellt die Glycin-Bindungsstelle ein alternatives Ziel dar, in die neurochemischen Vorgänge am Rezeptor einzugreifen.

Kynurensäure, welche als natürliches Abbauprodukt im Tryptophan Metabolismus auftritt, zeigte in frühen Rezeptor-Bindungstudien eine antagonistische Wirkung an der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptorkomplex [100]. Jedoch ist die Kynurensäure sehr schwach potent ($IC_{50} = 43 \mu\text{M}$ vs. [³H]Glycin) und wenig selektiv. Neben der Bindung an NMDA-Rezeptoren kann ebenso eine Bindung an AMPA- und Kainat-Rezeptoren erfolgen [101]. Intensive Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung zeigten, dass die Einführung lipophiler, größenlimitierender Substituenten (Chlor, Iod, Methyl) in Position 5 und 7 des Phenylrings eine Steigerung der Affinität und eine Erhöhung der Selektivität zu Gunsten der NMDA-Rezeptoren zur Folge hat [102]. Als besonders potente Vertreter der Kynurensäure-Derivate gelten die 5,7-Dichlorkynurensäure ($IC_{50} = 0,2 \mu\text{M}$ vs. [³H]Glycin) sowie das iodierte Analogon L-683,334 ($IC_{50} = 0,032 \mu\text{M}$ vs. [³H]Glycin) [103].

Strukturell haben sich daraus Chinoxalin-2,3-dion-Derivate (ACEA 1021, ACEA 1416), sowie 2-Chinolon-Derivate (L-695,902, L-701,324) entwickelt. Diese beiden Verbindungsklassen bieten zwar sehr gute Affinität und Selektivität zum Rezeptor, haben aber schlechte Löslichkeiten und ein unzureichendes Penetrationsvermögen der Blut-Hirn-Schranke [104].

Mit den Indol-2-carbonsäuren wurde eine Verbindungsklasse eingeführt, welche im Hinblick auf Affinität, Lipophilie und Selektivität zur Glycin-Bindungsstelle über verbesserte pharmakologische Eigenschaften verfügt und zudem eine ausreichende *in vivo*-Aktivität besitzt [105]. Ein prominenter Vertreter der Indol-2-carbonsäuren ist GV150526 (Gavestinel), das von GlaxoWellcome entwickelt wurde und ein vielversprechender Kandidat für die Behandlung akuter Schlaganfälle war. Trotz sehr guter *in vitro*-Parameter und neuroprotektiver Wirkung im Tiermodell wurde die Weiterentwicklung jedoch wegen mangelhafter Wirksamkeit am Menschen eingestellt.

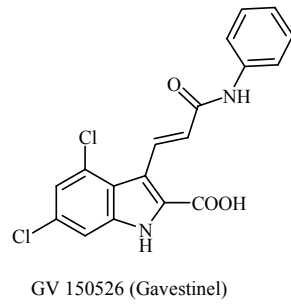
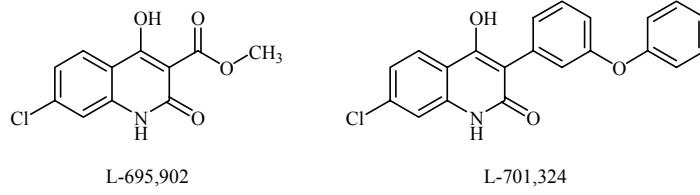
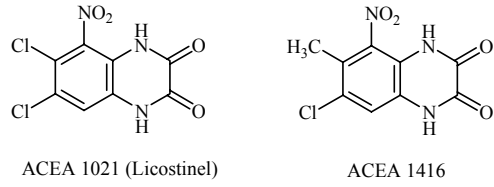
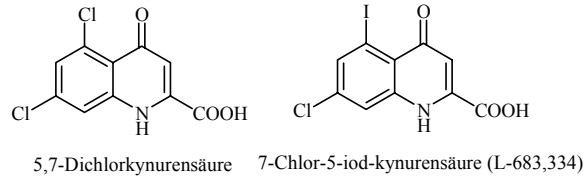


Abbildung 14: Antagonisten der Glycin-Bindungsstelle auf der Basis der Kynurensäure, des Chinoxalin-2,3-dions, des 2-Chinolons und des Indols

1.7.3.3 Liganden des offenen Ionenkanals („Open Channel Blocker“)

Die sogenannten „Open Channel Blocker“ binden nichtkompetitiv an einer Bindungsstelle im Ionenkanal des geöffneten Rezeptormoleküls, d.h. sie treten nicht in Konkurrenz zu den endogenen Liganden und der Rezeptor muss sich für eine erfolgreiche Bindung in einem aktivierten Zustand befinden. Während eines pathologischen Ereignisses ist dies der Fall, da dann statistisch gesehen eine erhöhte Anzahl an Rezeptoren im geöffneten Zustand vorliegt. Damit ist es möglich gezielt NMDA-Rezeptoren anzusprechen, die sich in einem aktivierten, krankhaftem Zustand befinden, während nichtaktivierte Rezeptormoleküle wegen der blockierten Bindungsstelle nicht erreicht werden können [106].

Zu den hochaffinen Kanalblockern zählen Dizocilpin (MK801, $K_i = 1,2 \text{ nM}$ vs. $[^3\text{H}]\text{MK-801}$), Phenylcyclidid (PCP, $K_i = 23 \text{ nM}$ vs. $[^3\text{H}]\text{MK-801}$) und Ketamin ($K_i = 0,42 \text{ nM}$ vs. $[^3\text{H}]\text{MK-801}$) [107]. Diese Substanzen wirken bedingt durch ihre sehr hohe Affinität und Lipophilie stark antagonistisch. Ferner besitzen diese Verbindungen eine langsame Deblockade-Kinetik vom Rezeptor, was eine starke Akkumulation im offenen Kanal bewirkt und sich nachteilig auf die vitale neuronale Transmission auswirkt [108]. Die daraus resultierende geringe therapeutische Bandbreite und das erhebliche Nebenwirkungspotential haben dazu geführt, dass diese Substanzen keine klinische Anwendung bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen finden. Zu den nieder-affinen Kanalblockern mit schnellerer Deblockade-Kinetik und guter therapeutischer Bandbreite zählen Memantin ($K_i = 1 \text{ }\mu\text{M}$ vs. $[^3\text{H}]\text{MK-801}$) [109], Adamantin ($K_i = 21 \text{ }\mu\text{M}$ vs. $[^3\text{H}]\text{MK-801}$) [110] und Budipin ($K_i = 12 \text{ }\mu\text{M}$ vs. $[^3\text{H}]\text{MK-801}$) [111].

Alle drei Substanzen finden Anwendung als Anti-Parkinsonmedikament.

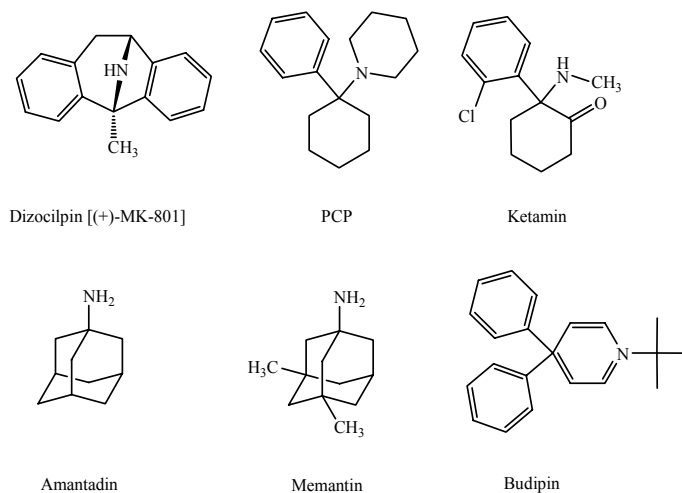


Abbildung 15: Liganden des offenen Ionenkanals („Open Channel Blocker“)

1.7.3.4 Liganden der Polyamin-Bindungsstelle

Endogene Polyamine wie Spermin und Spermidin sind natürliche Bestandteile von Zellen und haben auf vielfältige Weise einen Einfluss auf die NMDA-Rezeptoraktivierung und das Bindungsverhalten anderer Liganden [112]. In Anwesenheit von Spermin und Spermidin konnte festgestellt werden, dass bei niedrigen Konzentrationen bis 100 μmol die Affinität von [^3H]MK-801 zu dessen Bindungsstelle erhöht ist, während bei Konzentrationen über 100 μmol die Bindungsaffinität zum Rezeptor vermindert ist [113]. Hingegen ist im Falle der Glutamat-vermittelten Signaltransmission die Rezeptoraktivität bei kleinen Konzentrationen von Polyaminen vermindert, während hohe Konzentrationen die Rezeptoraktivität erhöhen [114].

Man geht daher davon aus, dass der NMDA-Rezeptor durch verschiedene Polyamin-Bindungsstellen, welche auf unterschiedlichen Untereinheiten sitzen, moduliert werden kann. Als selektiver Antagonist der Polyamin-Bindungsstelle gilt Ifenprodil. Es bindet selektiv an der NR2 B- Untereinheit, besitzt aber auch noch Bindungsaffinität zu anderen Rezeptorsystemen (α_1 -, 5-HT-, σ -Rezeptoren). Weiterentwicklungen dieser Substanzklasse mit verbesserter Selektivität und Affinität zum NMDA-Rezeptor sind Eliprodil, Ro 25-6981 und (+)-CP-101,606.

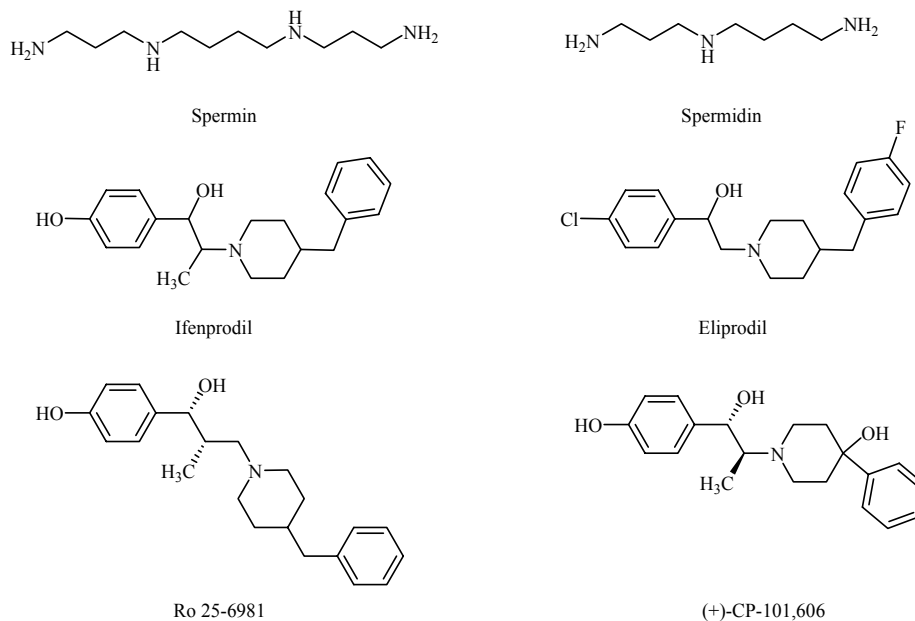


Abbildung 16: Liganden der Polyamin-Bindungsstelle

1.7.4 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Basierend auf dem Pharmakophormodell von Leeson et al. [103], das erstmalig am Beispiel des Kynurensäurederivats L-689,560 vorgestellt wurde, sind eine Reihe von Liganden der Glycin-Bindungsstelle dargestellt worden. Dabei handelte es sich um Chinoxalin-2,3-dione [115], Tetrahydrochinolin-2-carbonsäuren [116, 117] und Indol-2-carbonsäuren [118], die über gemeinsame Strukturmerkmale verfügen und daraus resultierend ähnliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen besitzen. Intensive Untersuchungen [119] dieser Leitverbindungen stellten bestimmte funktionelle Gruppen als essentiell hervor. Insbesondere die Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Eigenschaften der C=O-Gruppen bzw. Donor-Eigenschaften der NH-Gruppe und die unter physiologischen Bedingungen deprotonierte Carboxylfunktion sind für eine erfolgreiche Wechselwirkung mit dem Rezeptormolekül notwendig. Eine Affinitätssteigerung konnte weiterhin durch 4,6-Dichlorsubstitution bzw. durch lipophile Gruppen im nordöstlichen Teil des Moleküls („bulk tolerance“ Region) erreicht werden. In diesem Bereich sind vielfältige Derivatisierungen möglich, ohne dass es zu drastischen Affinitätsveränderungen kommt.

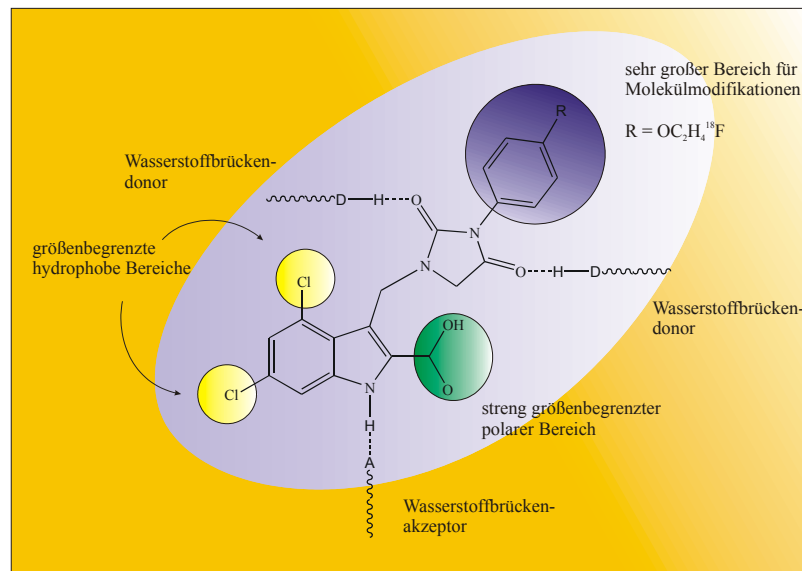


Abbildung 17: Struktur-Wirkungs-Beziehung (exemplarisch für das 2-Carboxyindol-Derivat) [118]

1.7.5 Markierte NMDA-Liganden für die PET

In der Vergangenheit sind einige wenige, potentiell aussichtsreiche Verbindungen im Hinblick auf die Verwendung als PET- bzw. SPECT-Liganden radioaktiv markiert worden [120].

Beispiele sind [^{11}C]Ketamin [121, 122, 123], ^{11}C -, ^{18}F - und ^{123}I -markierte MK801-Derivate [124, 125, 126] sowie ^{11}C - und ^{18}F -markierte Phenylcyclididin (PCP)-Derivate [127] und ^{18}F -markierte Memantinderivate [128, 129]. Hierbei handelte es sich in aller Regel um Liganden des Ionenkanals (Abb. 18), die bedingt durch ihre ausgeprägte Lipophilie eine hohe Tendenz zur Ausbildung unspezifischer Bindungen besitzen und damit keine eindeutigen pharmakologischen Informationen liefern [130, 131, 132]. Weiterhin ist bei dieser Substanzklasse deren psychostimulierendes und psychomimetisches Potential von Nachteil, da hierdurch sehr hohe Anforderungen an die spezifische Aktivität gestellt werden.

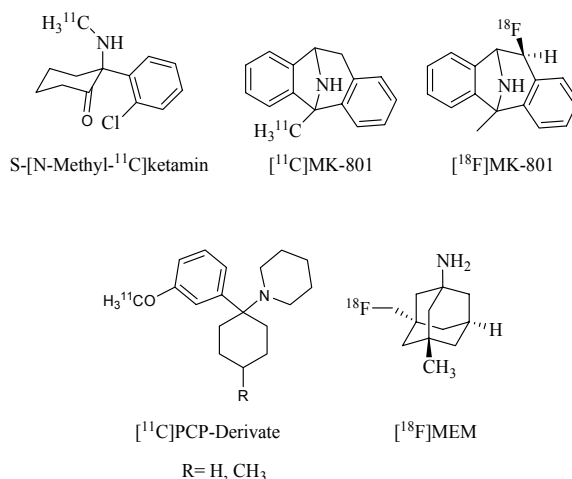


Abbildung 18: ^{18}F und ^{11}C markierte Liganden des offenen Ionenkanals

Neuere Ansätze, die viel versprechender erscheinen, gehen von PET-Liganden auf Basis von Liganden der Glycin-Bindungsstelle aus (Abb. 19). Verglichen mit den Liganden des Ionenkanals besitzen diese Verbindungen sehr gute Affinitäten bei gleichzeitig günstiger Lipophilie. In einer breit angelegten Untersuchung wurde eine Vielzahl von Glycin-Antagonisten hinsichtlich ihrer Lipophilie und *in vivo*-Aktivität untersucht. Als Resultat wurde eine optimale *in vivo*-Aktivität bei $\log P$ 2 - 3 ermittelt [133].

Die Verbindung tADTC4, ein hochaffines Tetrahydrochinolin-2-carbonsäure-Derivat ($K_i = 12$ nM) mit moderater Lipophilie ($\log D = 1,3$), besitzt grundsätzlich geeignete Voraussetzungen für eine ausreichende *in vivo*-Aktivität (Abb. 19). *Ex vivo*-Biodistributionsstudien an Ratten haben jedoch gezeigt, dass die Substanz nicht ausreichend die Blut-Hirn-Schranke penetriert [134]. Eine Verbesserung der Lipophilieeigenschaften konnte durch Einführung der hochaffinen 4,6-Dichlor-indol-2-carbonsäuren erreicht werden, dessen aussichtsreichster Vertreter Gavestinel ($K_i = 1$ nM, $\log P = 2,24$) darstellt

und im Tiermodell i.v. appliziert eine neuroprotektive Wirkung entfalten konnte. Das entsprechende ^{11}C -markierte Derivat [^{11}C]3MPICA ($K_i = 4,8 \text{ nM}$) konnte jedoch, trotz positiver *in vivo*-Daten, die Blut-Hirn-Schranke in Tierexperimenten nur schlecht passieren [135].

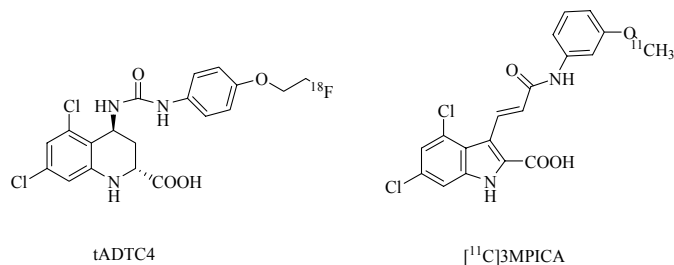


Abbildung 19: ^{18}F und ^{11}C markierte Liganden der Glycin Bindungsstelle

Die Visualisierung des NMDA-Rezeptorstatus mittels NR2 B-selektiver Liganden (Abb. 20) der Polyamin-Bindungsstelle stellt einen dritten Ansatzpunkt in der neuesten Literatur dar. Beispiel hierfür sind Benzoxazolone ([^{11}C]EMD-958854) [136], Derivate vom Ifenprodil-Typ ([^{11}C]CP-101,606) [137] und Verbindungen vom Benzamidin-Typ [138]. Letztere befinden sich noch im Stadium der pharmakologischen Prüfungen, während die beiden erstgenannten als *in vivo*-Tracer nicht geeignet scheinen. Obwohl sehr gute *in vitro*-Parameter vorliegen, wurde *in vivo* stets ein hohes Maß an unspezifischer Bindung bzw. hoher Plasmabindung festgestellt. Im Falle von [^{11}C]EMD-958854 kommt zu der schlechten Hirngängigkeit ein gewisses Bindungspotential zu σ -Rezeptoren erschwerend hinzu.

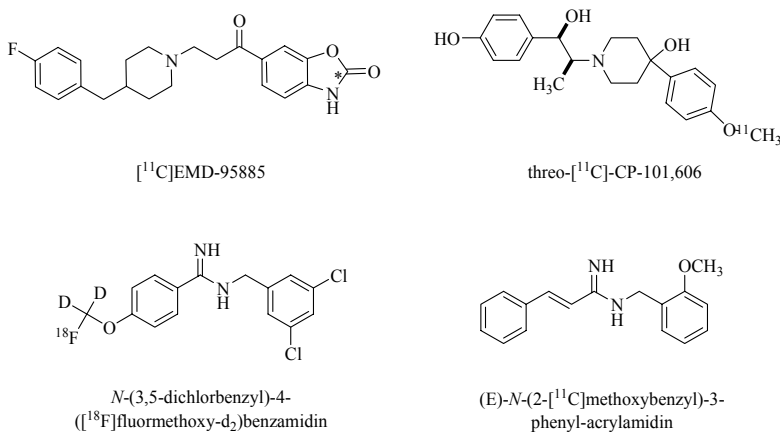


Abbildung 20: NR2 B subtypespezifische ^{18}F - und ^{11}C -markierte Liganden der Polyamin-Bindungsstelle

2 Problemstellung

In einer alternden Gesellschaft nimmt die Zahl der Betroffenen, die an einer chronisch-neurodegenerativen Veränderung des Gehirns, wie der Alzheimer'schen oder der Parkinson'schen Erkrankung leiden, in steigendem Maße zu. Diese Erkrankungen müssen aber nicht zwangsläufig nur auf ältere Menschen beschränkt sein. So kann die Parkinson'sche Erkrankung bereits in der ersten Lebenshälfte einsetzen, was für den Erkrankten und dessen Angehörige einen schweren sozialen Einschnitt bedeutet. Für diese Erkrankung gibt es derzeit keine medikamentöse Therapie, lediglich eine Verminderung der Symptome kann erreicht werden.

Als maßgeblich an diesen Krankheiten beteiligtes Rezeptorsystem und durch seine einzigartige Beteiligung an Lern- und Gedächtnisvorgängen, steht der NMDA-Rezeptor daher im Zentrum pharmazeutischer und radiochemischer Forschung.

Die „Open Channel Blocker“ Amantadin bzw. Memantin finden beispielsweise bereits Anwendung bei der Behandlung des Morbus Parkinson und der Alzheimer'schen Demenz. Auf Basis dieser Verbindungen wurden auch entsprechende ^{11}C - und ^{18}F -markierte Verbindungen evaluiert, die allerdings durch ihre hohe Lipophilie ein hohes Maß an unspezifischer Bindung zeigten und daher als ungeeignet erscheinen.

Als besonders vielversprechend gelten Antagonisten der Glycin-Bindungsstelle, die im Vergleich zu den Liganden des offenen Ionenkanals über ein günstigeres Nebenwirkungsprofil bei gleichzeitig nanomolaren Affinitäten und deutlich verringerten Lipophilien verfügen.

In Fortführung vorausgehender Arbeiten [118] sollen daher radioaktiv markierte Liganden auf Basis der 4,6-Dichlor-3-((2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (DDIC) zur nicht-invasiven Visualisierung des NMDA-Rezeptorstatus mittels der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) entwickelt werden (Abb. 21). Hierzu soll die Leitstruktur im lipophilen Teil des Moleküls im Hinblick auf eine [^{18}F]Fluorethylierung bzw. [^{11}C]Methylierung modifiziert werden.

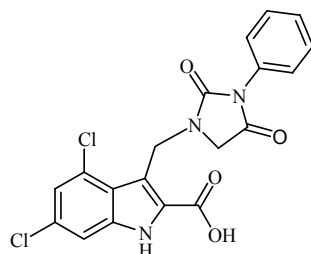


Abbildung 21: 4,6-Dichlor-3-((2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure

Zu diesem Zweck sollen in präparativ-organischen Synthesen verschiedene fluorethylsubstituierte Referenzverbindungen dargestellt werden, die im lipophilen Teil des Moleküls („bulk tolerance“ Region) systematisch modifiziert werden. Durch Variation des Fluorethoxy-Restes in den 3 möglichen ortho-, meta-, und para-Position soll der Einfluss des Substitutionsmusters untersucht werden und weiterhin auch ein Vergleich zu einem elektronenarmen Derivat gezogen werden. In Abhängigkeit von den Testbefunden soll ebenso ein Ligand für eine ^{11}C -Kohlenstoff Markierung ausgewählt werden.

Mit Hilfe der Referenzverbindungen soll in pharmakologischen Untersuchungen die *in vitro*-Affinität der Liganden zur Strychnin-insensitiven Glycin-Bindungsstelle über die Verdrängung des tritiierten Liganden [^3H]MDL-105,519 an präparierten Schweinehirnmembranen sowie die Lipophilie als wichtige Größe zur Abschätzung der Blut-Hirn-Passage bestimmt werden. Außerdem soll mit den Referenzverbindungen eine geeignete Radioanalytik für die Radio-DC und Radio-HPLC etabliert werden, um bei den späteren radioaktiven Markierungsreaktionen eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung zu gewährleisten.

Basierend auf den pharmakologischen Resultaten sollen Markierungsvorläufer dargestellt werden, die eine erfolgreiche Markierung mit den sekundären Markierungsvorläufern 2- ^{18}F Fluorethyltosylat und ^{11}C Methyliodid erlauben. Zur Optimierung der Markierungsausbeute soll der Einfluss verschiedener Reaktionsparameter wie Reaktionsdauer und -temperatur, Basensystem, Lösungsmittel und Markierungsvorläuferkonzentration untersucht werden. Zur Minimierung der Strahlenbelastung und um ausreichende Aktivitätsmengen zu erhalten, soll die Synthese im Anschluss auf ein automatisiertes Synthesemodul übertragen werden.

Abschließend soll das biochemische Konzept mit den ^{11}C -Kohlenstoff und ^{18}F -Fluormarkierten Verbindungen durch *in vivo*-PET-Studien an Tieren und durch autoradiographische Experimente an Hirnschnitten überprüft werden, um damit eine Aussage über die Eignung der Substanzen als Radiotracer treffen zu können.

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Synthese der Referenzverbindungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neuartige Liganden auf Basis der 4,6-Dichlor-3-((2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure hergestellt (Tab. 6).

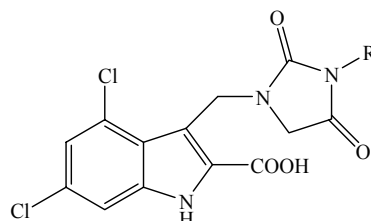


Tabelle 6: Synthetisierte Referenzverbindungen

<i>R</i>	<i>IUPAC-Name</i>	<i>Abkürzung</i>
	4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure	DDIC1
	4,6-Dichlor-3-((3-(3-chlor-4-(2-fluorethoxy) phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure	DDIC2
	4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure	DDIC3
	4,6-Dichlor-3-((3-(2-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure	DDIC4
	4,6-Dichlor-3-((3-(4-methoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure	DDIC5

Die Darstellung der inaktiven Referenzverbindungen wurde in drei Stufen ausgehend von dem Indol-Grundkörper 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester und vier fluorethylierten bzw. einem methylierten Aminophenol realisiert. Das in Abbildung 22 dargestellte Syntheschema beinhaltet im ersten Schritt eine Kopplung zu den unsymmetrischen Harnstoffen, welche nach anschließender Cyclisierung verseift wurden. Zuvor wurden jedoch die entsprechenden Kopplungsreagenzien hergestellt, deren Diskussion in den folgenden zwei Unterkapiteln erfolgt.

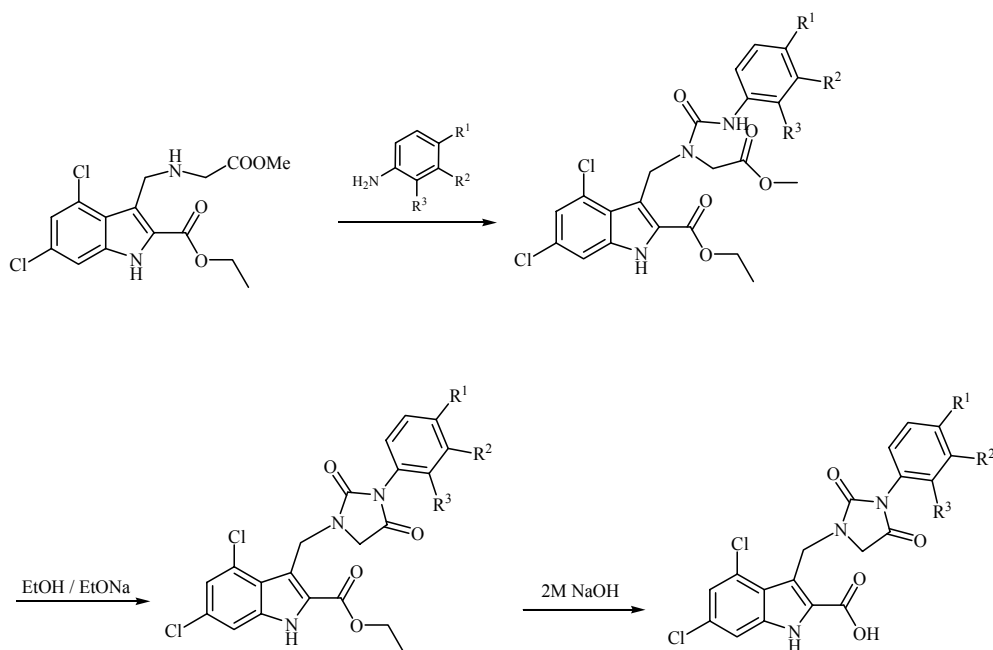


Abbildung 22: Synthetisierte Referenzverbindungen

3.1.1 Synthese von 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)-methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

Die Synthese des 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylesters (**5**) wurde ausgehend von 4,6-Dichlorphenylhydrazin (**1**) gestartet (Abb. 23).

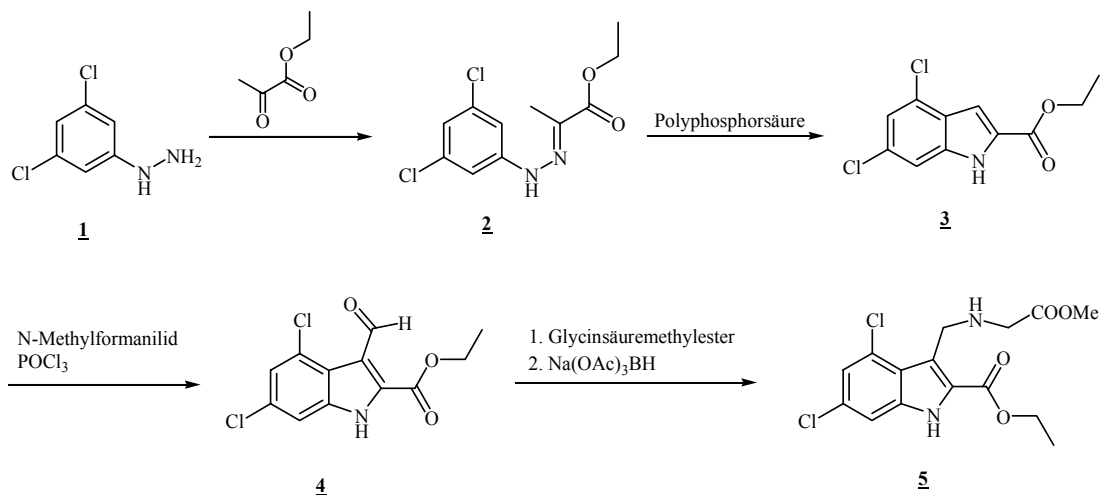


Abbildung 23: Syntheschema des 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylesters (**5**)

Im ersten Reaktionsschritt wurde in einer Reaktion mit Ethylpyruvat der entsprechende 2-(2-(3,5-Dichlorphenyl)-hydrazon)propansäureethylester (**2**) erhalten.

Nach Cahn-Ingold-Prelog (CIP) lassen sich E- und Z-Diastereomere unterscheiden (Abb. 24), die sich leicht durch Säulenchromatographie auftrennen lassen.

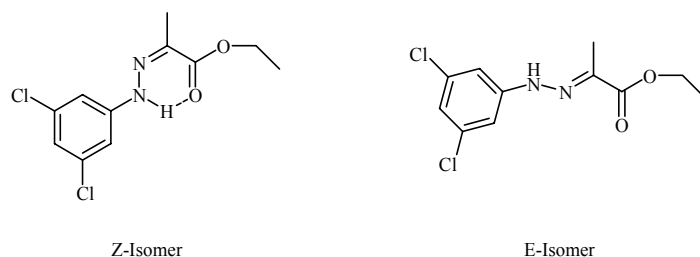


Abbildung 24: E/Z-Isomere von 2-(2-(3,5-Dichlorphenyl)-hydrazon)propansäureethylester

Eine NMR-spektroskopische Untersuchung der beiden Diastereomere zeigt im Falle des Z-Isomers eine deutliche Tieffeldverschiebung des NH-Protons von 10,1 ppm zu 11,8 ppm. Ferner wurde festgestellt, dass die zur Aminofunktion benachbarten, ortho-ständigen Protonen bei tieferem Feld erscheinen als das para-ständige Proton, das sich in zweifacher Nachbarschaft zu den Chlorsubstituenten befindet. Der Ethyl-Rest wurde den Quartett- und Triplet-Strukturen bei 4,20 bzw. 1,25 ppm zugeordnet, während der Methyl-Rest als Singulett bei 2,01 ppm erscheint (Abb. 25).

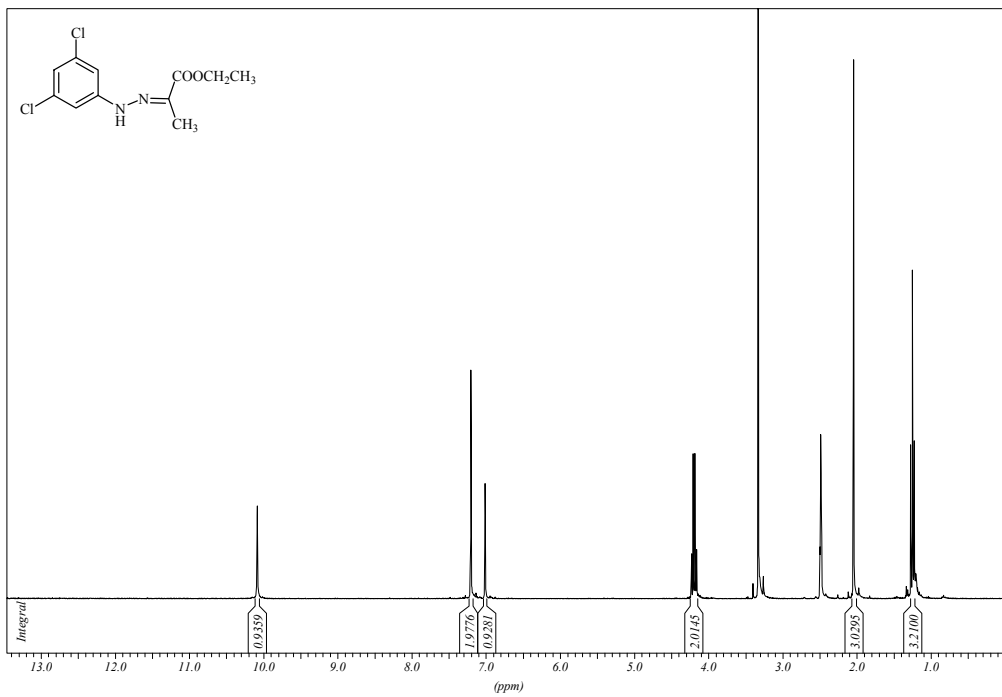
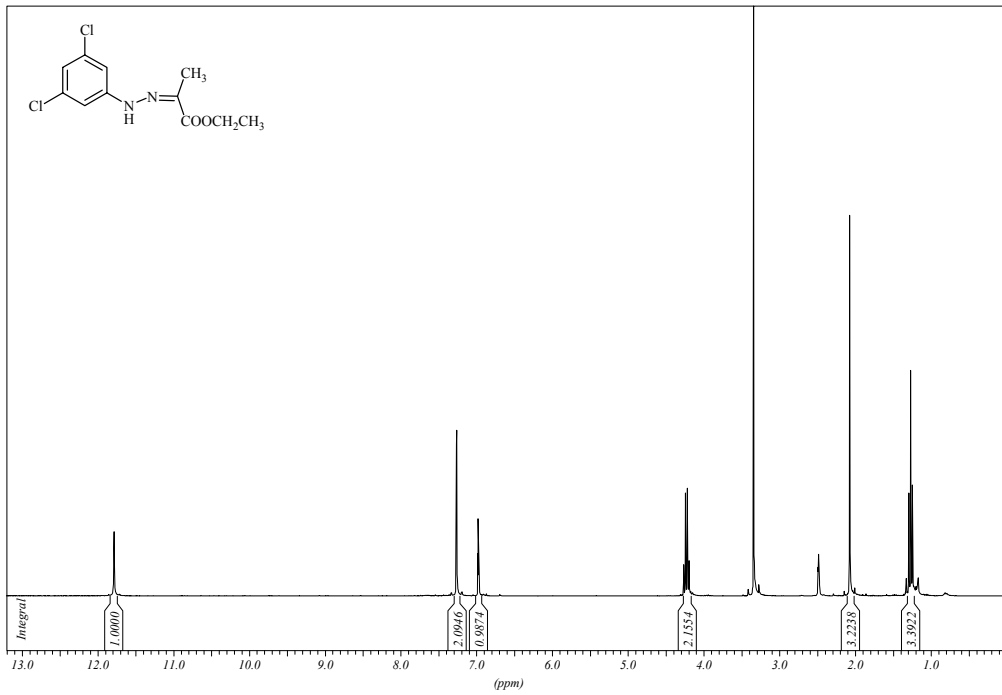


Abbildung 25: ¹H-NMR Spektren der isolierten Z/E-Isomere des 2-(2-(3,5-Dichlorphenyl)-hydrazon)propanoäureethylester (2) (Oben: Z-Isomer; Unten: E-Isomer)

Die Überführung des Hydrazons in das entsprechende Indol wurde in einer protonenkatalysierten Reaktion nach Fischer in Polyphosphorsäure durchgeführt. Zur Verminderung der Viskosität wurde die zähflüssige Säure zunächst auf ca. 70 °C erwärmt, gefolgt von einer portionsweisen Zugabe von **2** unter starkem Rühren und weiterer Temperaturerhöhung auf 120-130 °C. Die Temperatur wurde für etwa 10 min gehalten, bis ein einheitlicher hellbrauner Farbton vorliegt. Nach vorsichtiger Hydrolyse mit Eis und Verdünnen mit Ethylacetat wurde mit NaOH neutralisiert. Die organische Phase wurde separiert, getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Der 4,6-Dichlor-indol-2-carbonsäureethylester (**3**) wurde auf diese Weise in sehr hoher Ausbeute von 98 % erhalten und ohne weitere Aufreinigung für die Folgestufen weiterverwendet.

Im ersten Schritt des in Abbildung 26 dargestellten Mechanismus der Fischer-Indol-Synthese wurde durch Tautomerisierung des Hydrazons (**2**) das Enhydrazin (**2-I**) gebildet, das durch eine [3,3] sigmatrope Umlagerung unter Aufhebung des aromatischen Systems in das 1,4-Diimin (**2-II**) übergeht. Unter Wiederherstellung des aromatischen Systems und unter Abspaltung von Ammoniak (**2-III**, **2-IV**) wurde schließlich **3** gebildet.

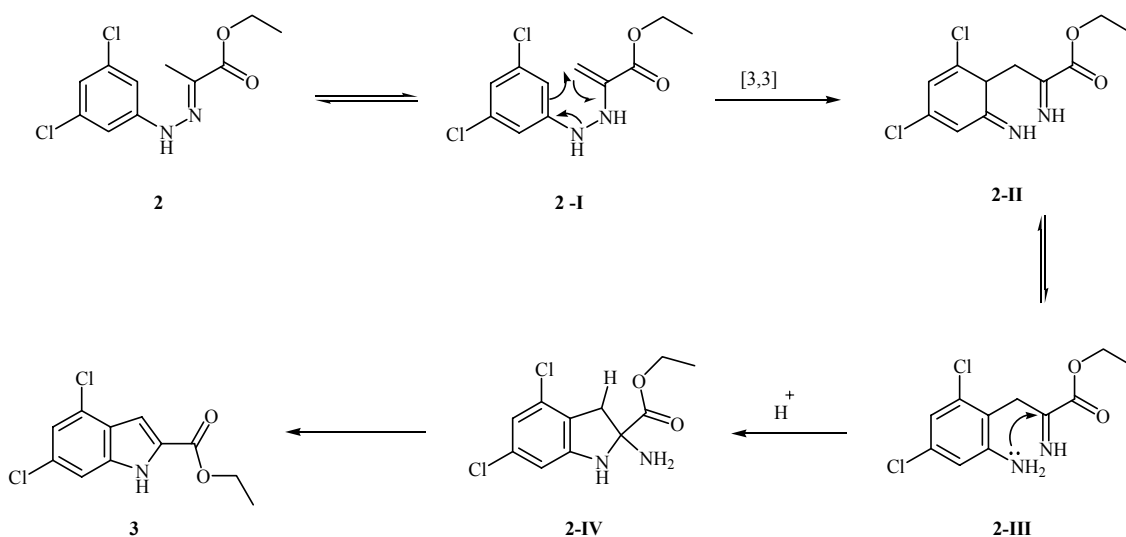


Abbildung 26: Mechanismus der Protonen-katalysierten Fischer Indol-Synthese

Die Einführung der Aldehydgruppe in Position 3 des Indolgrundkörpers wurde in einer Vilsmeier-Synthese unter Verwendung von 1,2-Dichlorethan und N-Methylformanilid (NMF) als Formylierungsreagenz durchgeführt. Unter Schutzgas wurden N-Methylformanilid und Phosphorylchlorid gerührt, woraufhin nach kurzer Zeit das aktive Agens, ein Chlormethyleniminium-Salz, als orange-farbener Feststoff gebildet wurde. Im Anschluss wurde **3** in 1,2-Dichlorethan gelöst hinzugegeben und mehrere Stunden unter Rückfluss erhitzt.

Im Sinne einer elektrophilen aromatischen Substitution wurde aus dem elektronenreichen Aromaten und dem Formiminium-Salz das Aldiminiumsalz (**3-I**) gebildet, das mit wässriger Natriumacetat-Lösung (pH 9) zum entsprechenden Aldehyd hydrolysiert wurde (Abb. 27).

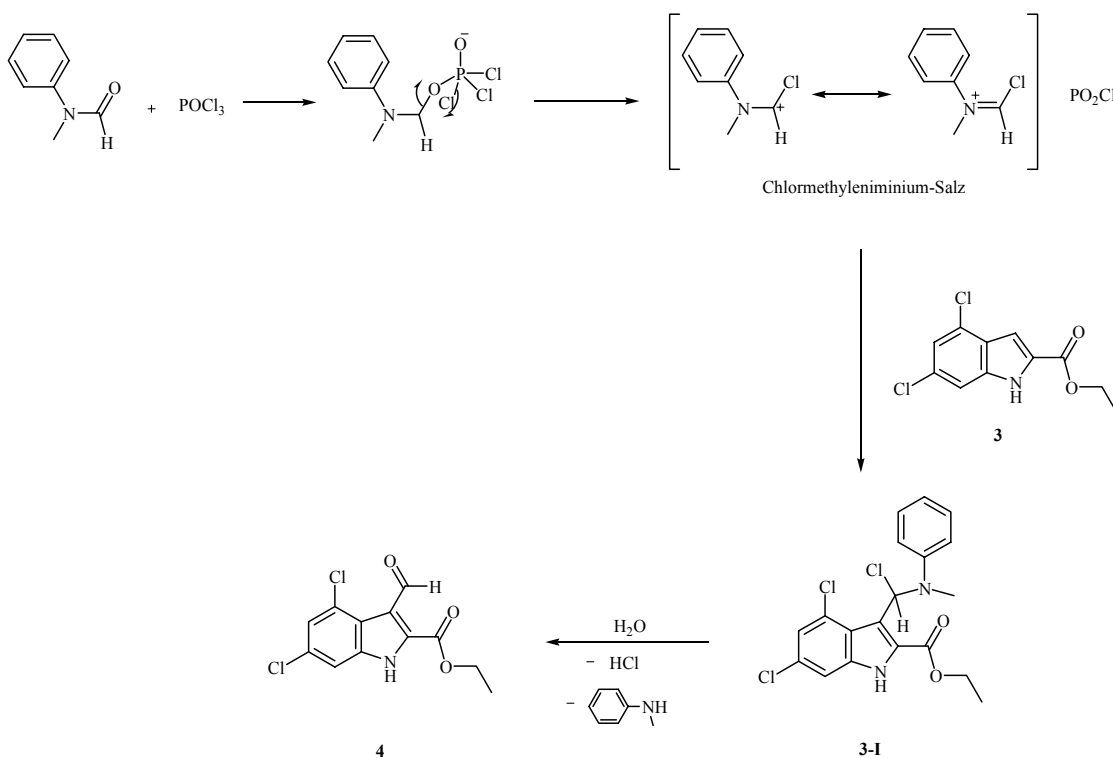


Abbildung 27: Mechanismus der Vilsmeier-Formylierung

Um den finalen Indolgrundkörper für die Kopplungssynthesen zu erhalten, wurde nach einer modifizierten Variante von Abdel-Magid et al. [139] eine reduktive Aminierung mittels Natriumtriacetoxyborhydrid ($\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$) durchgeführt.

Diese Methode bietet eine breite synthetische Anwendbarkeit bei der Knüpfung neuer C-N-Bindungen ausgehend von Carbonylverbindungen und Aminen als Reaktionspartner. Die Bandbreite der möglichen Ketonkomponenten umfasst hierbei aliphatische cyclische und acyclische Ketone, sowie aliphatische und aromatische Aldehyde, die mit einer Reihe von primären und sekundären Aminen in hohen Ausbeuten zur Reaktion gebracht wurden. Im Vergleich zu alternativ verwendbaren Reagenzien, wie Natriumcyanoborhydrid oder Boran-Pyridin, wurde in der Literatur damit eine mildere und selektivere Reaktionsführung beschrieben.

Unter einer Schutzgasatmosphäre aus Argon wurde fein gemahlenes Glycinmethylesterhydrochlorid in 1,2-Dichlorethan suspendiert, mit Triethylamin versetzt und zur Freisetzung des freien Aminosäureesters für etwa 15 min gerührt. Hierbei war es wichtig das Hydrochlorid gründlich in einem Mörser zu zermahlen. Andernfalls wurde aus den verbleibenden Klumpen in der Suspension keine freie Base freigesetzt, was bedingt

durch ein äquimolares Verhältnis von Aldehyd zu Amin im weiteren Verlauf der Reaktion zu drastischen Verlusten in der Ausbeute führte. Die Freisetzung der freien Base konnte dabei sehr gut durch ein kräftiges Ausflocken an Triethylaminhydrochlorid-Niederschlag verfolgt werden. Nach Anlagerung des Glycinsäuremethylesters wurde zunächst der 4,6-Dichlor-3-formyl-indol-2-carbonsäureethylester als Halbaminal (**4-I**) erhalten, das unter Protonenkatalyse reversibel Wasser abspaltet und in das entsprechende Imin (**4-II**) übergeht. Unter Aufnahme eines Hydridions aus dem Reduktionsmittel wurde schließlich (**4-II**) zum 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)-methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (**5**) reduziert (Abb. 28). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde **5** in guten Ausbeuten von 75 % erhalten.

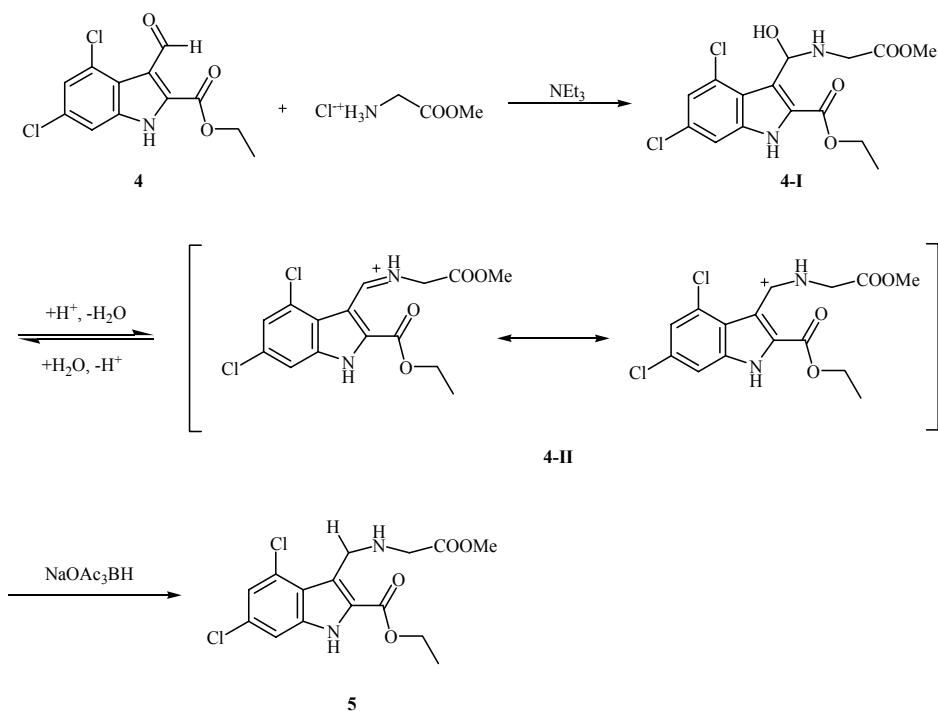


Abbildung 28: Mechanismus der reductiven Aminierung mittels Natriumtriacetoxyborhydrid

3.1.2 Synthese fluorethyl-substituierter Aminophenole

Die Darstellung fluorethyl-substituierter Aminophenole wurde in zwei Syntheseschritten durchgeführt, da sich der direkte Weg über das korrespondierende Aminophenol wegen des Vorhandenseins zweier nukleophiler Reaktionszentren als nicht praktikabel erweist.

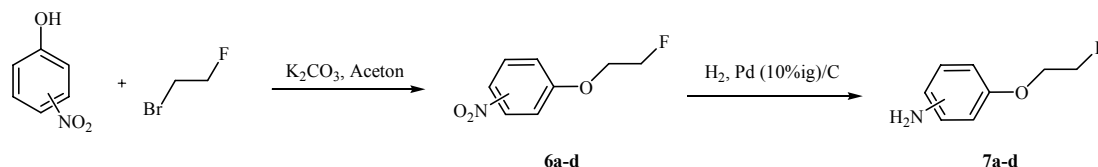


Abbildung 29: Syntheschema zur Darstellung fluorethyl-substituierter Aminophenole

Ausgehend von Nitrophenolen wurde mit Kaliumcarbonat als Base die phenolische OH-Funktion deprotoniert und mit 1-Brom-2-fluorethan in einer nukleophilen Substitutionsreaktion für 48 h unter Rückfluss erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde der eingeeengte Ansatz in Wasser aufgenommen und mit Toluol extrahiert. Dadurch verbleibt das Kaliumcarbonat in der wässrigen Phase, während alle organischen Bestandteile in der Toluolphase vorliegen. In einem weiteren Aufreinigungsschritt wurde die Toluolphase dreimal mit 10%iger Natriumhydroxidlösung (pH 12) erschöpfend extrahiert. Bei diesem pH-Wert liegt nicht umgesetztes Aminophenol quantitativ deprotoniert in der wässrigen Phase vor, so dass durch Separieren und Entfernen der organischen Phase ein hinreichend sauberes Produkt für den nächsten Reaktionsschritt erhalten wurde.

Auf diese Weise wurden vier fluorethylierte Nitrophenole (**6 a-d**) in Ausbeuten von etwa 80 % dargestellt, die im zweiten Syntheseschritt durch katalytische Hydrierung an Palladium auf Aktivkohle (10 %) zu den entsprechenden Aminoverbindungen (**7 a-d**) reduziert wurden (Abb. 30). Hierzu wurden die Nitroverbindungen in Methanol gelöst und unter DC-Kontrolle bei Raumtemperatur und 1 bar Wasserstoffdruck hydriert. Zur Entfernung des Katalysators wurde über Celite 545, das keine adsorbiven Eigenschaften besitzt, filtriert. Eine abschließende säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel diente neben der Produktisolierung weiterhin der vollständigen Entfernung letzter Katalysatorreste.

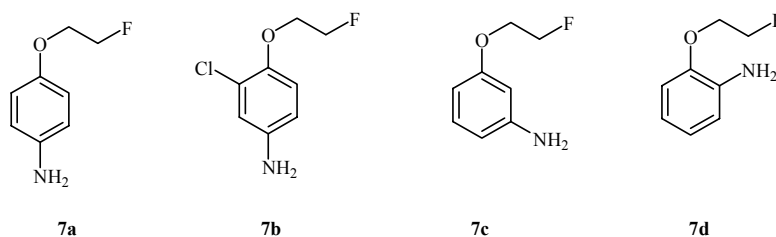


Abbildung 30: Dargestellte Kopplungspartner zur Synthese der Referenzverbindungen

3.1.3 Kopplungsreaktionen

3.1.3.1 Umsetzung mit Bis-(trichlormethyl)carbonat (Triphosgen)

Im ersten Reaktionsschritt der Kopplung wurde der Indol-Grundkörper **5** mit den einzelnen fluorethylierten Aminophenolen **7 a-d** zu den entsprechenden unsymmetrischen Harnstoffen gekoppelt. Im Fall der methylierten Referenzverbindung wurde kommerziell erhältliches 4-Methoxyanilin (**7 e**) verwendet (Abb. 31).

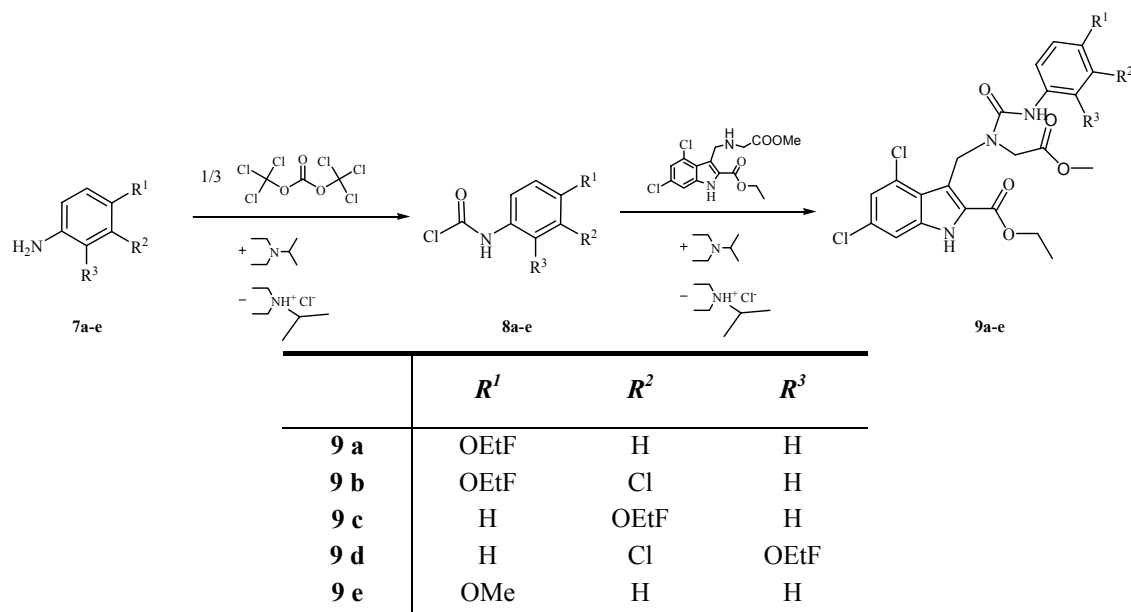


Abbildung 31: Synthese der fluorethoxy- bzw. methoxy-substituierten 4,6-Dichlor-3-((1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-phenylureido)methyl)indol-2-carbonsäureethylester (**9a-e**)

Als Kopplungsreagenz wurde das von Eckert et al. eingeführte und mechanistisch aufgeklärte Bis-(trichlormethyl)carbonat (Triphosgen) verwendet, das als kristalliner Feststoff deutlich einfacher und sicherer zu handhaben ist als gasförmiges oder in Lösung vorliegendes Phosgen [140]. Als vollwertiger Ersatzstoff reagiert es genauso wie Phosgen, jedoch entspricht ein Äquivalent Triphosgen drei Äquivalenten Phosgen. Der Mechanismus der Reaktion mit Nukleophilen unter der Einwirkung von Hilfsbasen (Hünig's Base, Triethylamin) ist in Abbildung 32 dargestellt.

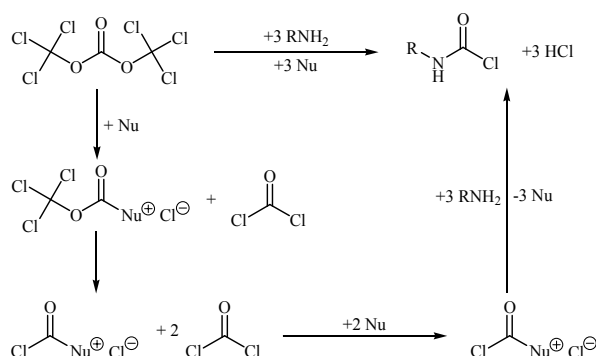


Abbildung 32: Reaktionsmechanismus des Triphosgens mit Nukleophilen (Eckert Schema)

Das jeweilige fluorethylsubstituierte Aminophenol wurde in Dichlormethan gelöst und langsam über einen Zeitraum von 30 min bei 0 °C zu einer Lösung des Triphosgens in Dichlormethan gegeben. Als Hilfsbase und Protonenfänger für den bei dieser Reaktion entstehenden Chlorwasserstoff wurde N-Ethyl-diisopropylamin verwendet. Unter Bildung eines Hydrochlorid-Niederschlags und unter fortschreitender Farbveränderung konnte der Reaktionsverlauf zur Bildung des Intermediates **8a-e** beobachtet werden. Bei der Reaktionsführung wurde auf eine konstante Tropfgeschwindigkeit bei der Zugabe des ersten Amins und auf eine konstante Reaktionstemperatur geachtet, da es sonst verstärkt zur Entstehung des entsprechenden Isocyanats und unter Anlagerung eines weiteren Amins zur Bildung des symmetrischen Harnstoffs **8-Ia-e** kommt (Abb. 33) [141]:

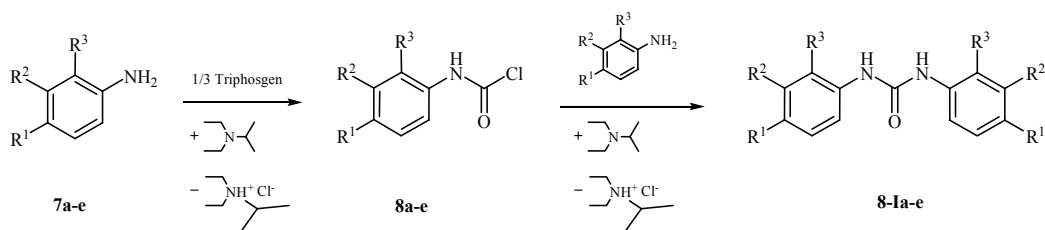


Abbildung 33: Bildung symmetrischer Harnstoffe

Nach beendeter Zugabe wurde für weitere 30 min gerührt und anschließend der 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (**5**) auf einmal zugegeben. Danach wurde noch eine Stunde bei Raumtemperatur unter DC-Kontrolle gerührt und zur Entfernung der Hydrochloride wässrig aufgearbeitet. Die organische Phase wurde abgetrennt, eingengt und das verbleibende Öl in Diethylether aufgenommen. Durch Behandeln im Ultraschallbad wurden die unsymmetrischen Harnstoffe **9 a-e** in Ausbeuten von 50-70 % erhalten.

Massen- bzw. NMR-Spektroskopische Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Produkte **9 a-e** nicht ausschließlich aus dem gewünschten Harnstoff bestanden, sondern unter den Basenbedingungen der Hydantoinringschluss zu den 4,6-Dichlor-3-((2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-carbonsäureethylestern (**10 a-e**) bereits zu etwa 20 % erfolgt war. Die so erhaltenen Verbindungen wurden ohne weitere Aufreinigung zur nächsten Stufe umgesetzt.

3.1.3.2 Cyclisierungsreaktionen

Der Ringschluss wurde mit frisch hergestelltem Natriumethanolat in ethanolischer Lösung durchgeführt (Abb. 34).

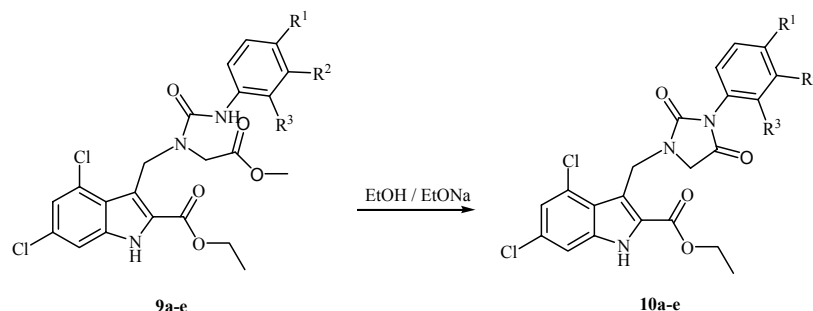


Abbildung 34: Cyclisierung der 4,6-Dichlor-3-((1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-phenylureido)-methyl)indol-2-carbonsäureethylestern (9 a-e) zu den 4,6-Dichlor-3-((2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl)indol-2-carbonsäureethylestern (10 a-e)

Nach Zugabe der Base zu einer Suspension von **9 a-e** in Ethanol wurde dabei eine rasche, fast vollständige Auflösung der Suspension unter erneutem Ausfallen eines sehr dichten, voluminösen Niederschlags beobachtet. Unter DC-Kontrolle wurde festgestellt, dass die Ringschlussreaktion nicht vollständig verläuft und nach einer Stunde keinen weiteren Umsatz zeigt. Daher wurde durch Ansäuern mit 10%iger HCl-Lösung abgebrochen, das Rohprodukt in 1,2-Dichlorethan aufgenommen, über Magnesiumsulfat getrocknet und bis zur Trockne eingeeengt.

Während die bisher synthetisierten Stufen stets ausreichende Löslichkeiten aufwiesen und damit eine gute Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel ermöglichten, scheiterten die anfänglichen Versuche die offene Harnstoffstruktur **9 a-e** von der geschlossenen Harnstoffstruktur **10 a-e** abzutrennen. Bedingt durch die sehr schlechten Löslichkeiten kristallisierte das Rohprodukt auf dem Säulenmaterial aus und wurde nicht von der Säule eluiert. Selbst durch große Elutionsvolumina der Laufmittel, die sich in dünnschichtchromatographischen Versuchen als geeignet erwiesen haben, wurde das Gemisch nur in Spuren, ohne jegliche Auftrennung, eluiert. Durch die strukturelle Ähnlichkeit der zu trennenden Strukturen wurden weiterhin nur bedingt geeignete Retentionswerte ermittelt.

Eine deutliche Verbesserung der Auftrennung wurde durch die Verwendung von basischem Aluminiumoxid als stationäre Phase und THF/Hexan- bzw. CHCl₃/Aceton-Gemischen als mobile Phase erzielt.

Auf diese Weise wurden die 4,6-Dichlor-3-((2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl)indol-carbonsäureethylester (**10 a-e**) in 70 - 88 % Ausbeute erhalten.

Durch NMR-spektroskopische Untersuchung wurde gezeigt, dass im Fall der ortho-fluorethylierten Verbindung **10 d** ein abweichendes Verhalten im Signalaufspaltungsmuster der Indol- und Hydantoin-Methyleneinheit auftritt (Abb. 35).

Während bei den restlichen Vertretern jeweils ein Singulett bei 3,8 ppm und 5,2 ppm für die CH₂-Einheit erhalten wurde, trat bei **10 d** ein Signal in Form eines breiten Quartetts auf.

Dies lässt darauf schließen, dass bei den Verbindungen **10 a, b, c, e** offenbar eine zufällige Isochronie der diastereotopen Protonen der Methyleneinheiten vorliegt, während bei Verbindung **10 d** die Protonen des AB-Systems chemisch und magnetisch nicht equivalent sind und daher aufspalten. Die übrigen Signale wurden von geringfügigen chemischen Verschiebungen abgesehen, sehr einheitlich zugeordnet. Die aromatischen Protonen des Indolrings und des Phenylsubstituenten wurden stets zwischen 7,0 - 7,5 ppm zugeordnet. Die beiden Methyleneinheiten des Fluorethylrestes, als charakteristische Formation von vier Multiplets, wurden zwischen 4,8 - 4,5 ppm und 4,3 - 4,0 ppm gefunden, während der Ethylrest typischerweise bei 4,4 und 1,3 ppm gefunden wurde.

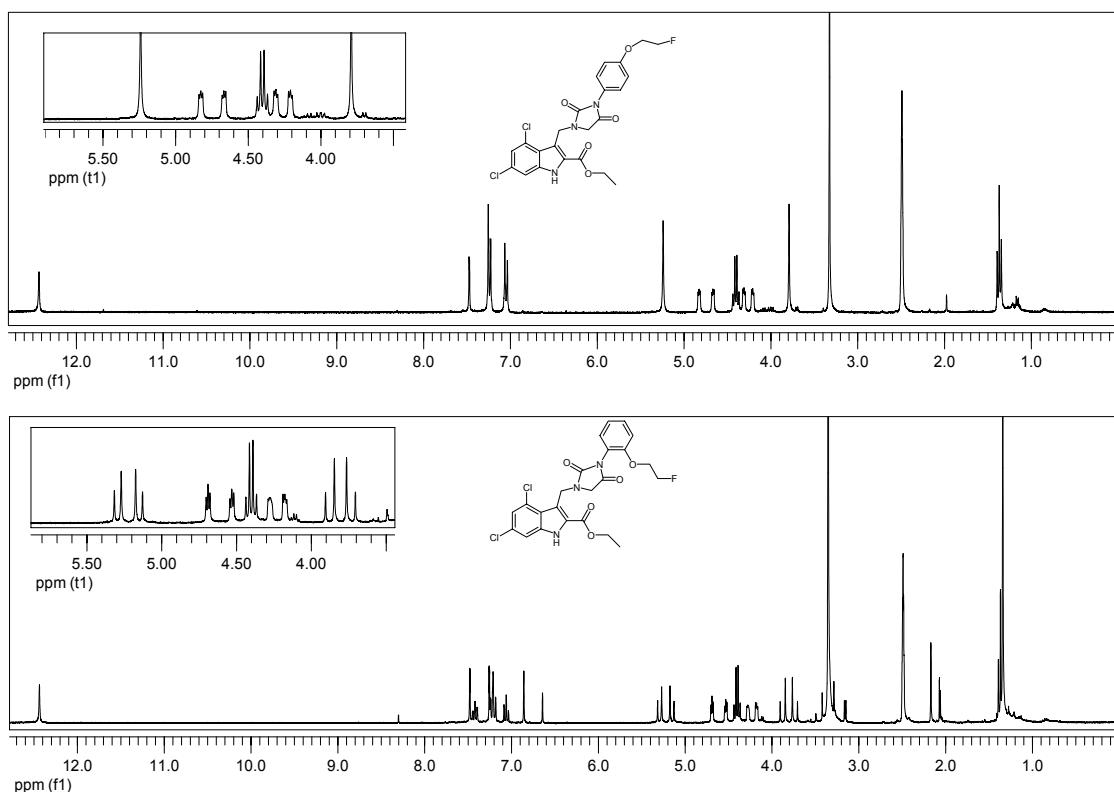


Abbildung 35: ¹H-NMR Spektrum des 4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylesters (**10a**) und des 4,6-Dichlor-3-((3-(2-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylesters (**10 d**)

3.1.3.3 Verseifungsreaktionen

In der letzten Stufe wurden schließlich die Indol-2-carbonsäureester **10 a-e** mit wässriger Natriumhydroxid Lösung in THF bei Raumtemperatur zu den inaktiven Referenzverbindungen **11 a-e** (DDIC1 – DDIC5) hydrolysiert (Abb. 36).

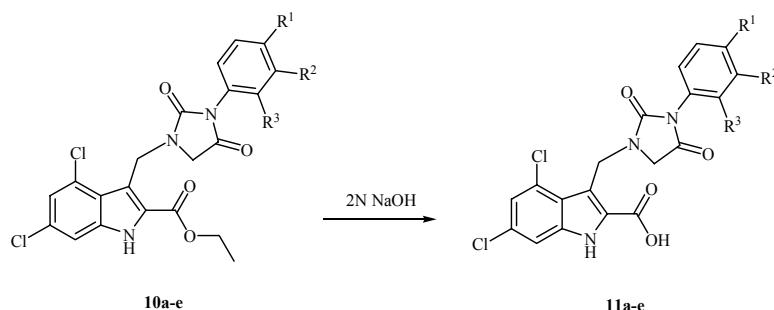


Abbildung 36: Verseifung der 4,6-Dichlor-3-((2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (10a-e) zu den 4,6-Dichlor-3-((2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäuren (11 a-e, DDIC1 – DDIC5)

Als eine Variante der Aufarbeitung wurde die Möglichkeit gewählt, den Reaktionsansatz bis zur Trockne einzuengen, den Rückstand mit Ethylacetat aufzunehmen und im Scheidetrichter gegen Wasser zu extrahieren. Die Phasen wurden separiert und die wässrige Phase, welche das Indolcarboxylatanion enthält mit 2 M HCl angesäuert bis kein Niederschlag mehr entstand. Die dabei ausfallenden Produkte wurden stets als sehr feiner Niederschlag bzw. als gelbes Öl abgeschieden. Für das Einleiten einer Kristallisation und zum Erhalt einer geeigneten Kristallgröße wurde daher die angesäuerte, wässrige Lösung über Nacht bei + 4 °C stehen gelassen und mit der Vakuumfiltration am nächsten Tag fortgefahren. Insgesamt wurde diese Aufarbeitung als nicht optimal erachtet, denn die schlechten Löslichkeitseigenschaften der Hydantoine erschwerten die extractive Aufarbeitung, was sich in den variierenden Ausbeuten von 46 - 88 % widerspiegelt.

Zur Optimierung wurde daher versucht zwei Verbindungen, DDIC-4 und DDIC-5, die nur in schlechten Ausbeuten von 39 % bzw. 54 % erhalten wurden, durch chromatographische Aufreinigung an Kieselgel in Reinform zu erhalten. Dazu wurde der Reaktionsansatz durch Entfernen des Lösungsmittels auf einer geringen Menge Kieselgel adsorbiert und zunächst mit Chloroform/Aceton-Gemischen aufgereinigt. Unter diesen Bedingungen wurde nur der Carbonsäureester eluiert, während die Carbonsäure immobilisiert vorlag. Anschließend wurde durch Änderung des Laufmittels auf Chloroform/Aceton-Gemische und 3 % Ameisensäure das Produkt eluiert.

Im Fall der ¹¹C-Referenzverbindung DDIC5 (**11 e**) wurde ein Produkt isoliert, das im NMR-Spektrum einige charakteristische Signale des tatsächlichen Produktes trägt, wie z.B. das Indol N-H, die beiden Methylenheiten und die Methoxyeinheit. Im Aromatenbereich wurden hingegen statt der erwarteten sechs Protonensignale lediglich 3 - 4 entdeckt (Abb. 37). Zu dem fehlt die charakteristische Dublettstruktur eines para-

substituierten Phenylrings. Diese Unstimmigkeiten wurden auch massenspektroskopisch bekräftigt. Statt des erwarteten Massesignals bei 447 wurden drei Signale vergleichbarer Intensität bei 149,2, 272,2 und 295,2 sowie ein schwächer ausgeprägtes Signal bei 123,2 gefunden.

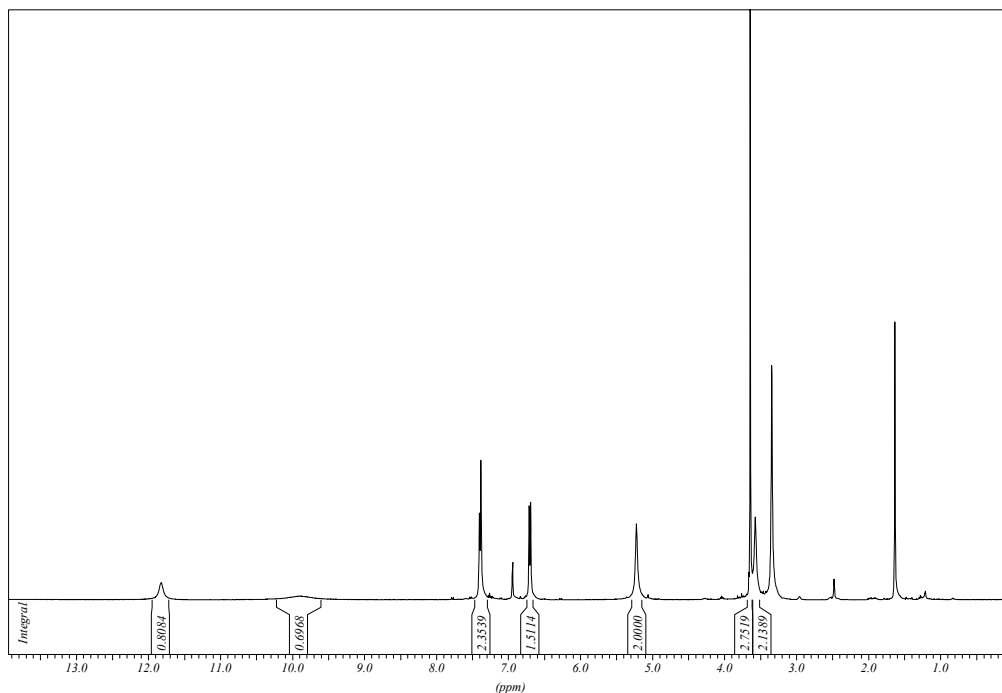


Abbildung 37: ¹H-NMR Spektrum des Versuchs der optimierten Aufarbeitung von 4,6-Dichlor-3-((3-(4-methoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure DDIC5 (11 e)

Die Fragmentierung der Verbindung deutet darauf hin, dass die untersuchte Probe eventuell einen salzartigen Charakter hatte und zur Erzeugung von detektierbaren Kationen hohe Temperaturen benötigt wurden, die eine Zersetzung zur Folge hatte. Ein möglicher Weg der Fragmentierung ist in Abbildung 38 dargestellt.

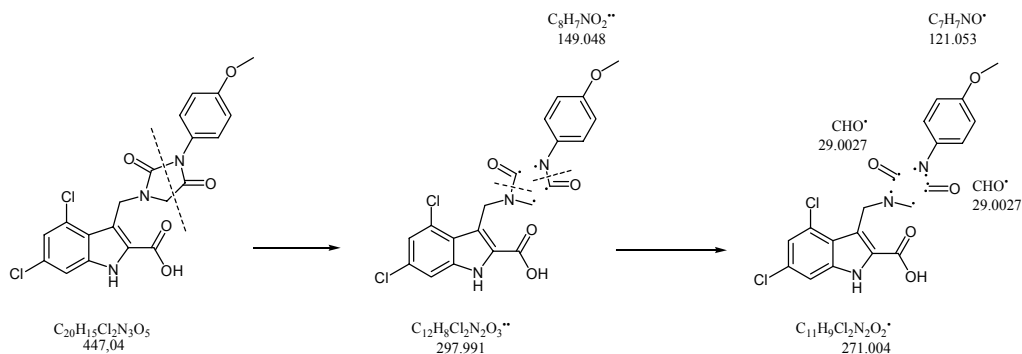


Abbildung 38: Signale im Massenspektrum von DDIC-5 (11 e) nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (Variante B)

Um diese Theorie zu bestätigen wurde versucht, durch nachträgliche Behandlung des erhaltenen Feststoffes mit Ameisensäure die freie Säure in einer Säure-Base-Reaktion aus dem Salz freizusetzen. Dazu wurde die Verbindung in THF gelöst und mit Ameisensäure versetzt Rühren gelassen. Für gewöhnlich laufen Säure-Base-Reaktionen sehr schnell ab, allerdings dauerte es einen Tag, bis nach zögerlichem Ausfallen eines Niederschlags die freie Carbonsäure erhalten wurde. Die Identität der Verbindung wurde durch NMR- und Massenspektroskopie eindeutig bestätigt (Abb. 39). Übereinstimmend mit den charakteristischen Signalen im NMR-Spektrum und einer para Aufspaltung der Protonen des Phenylrings wurde ein einziges Massesignal bei 447,0 gefunden.

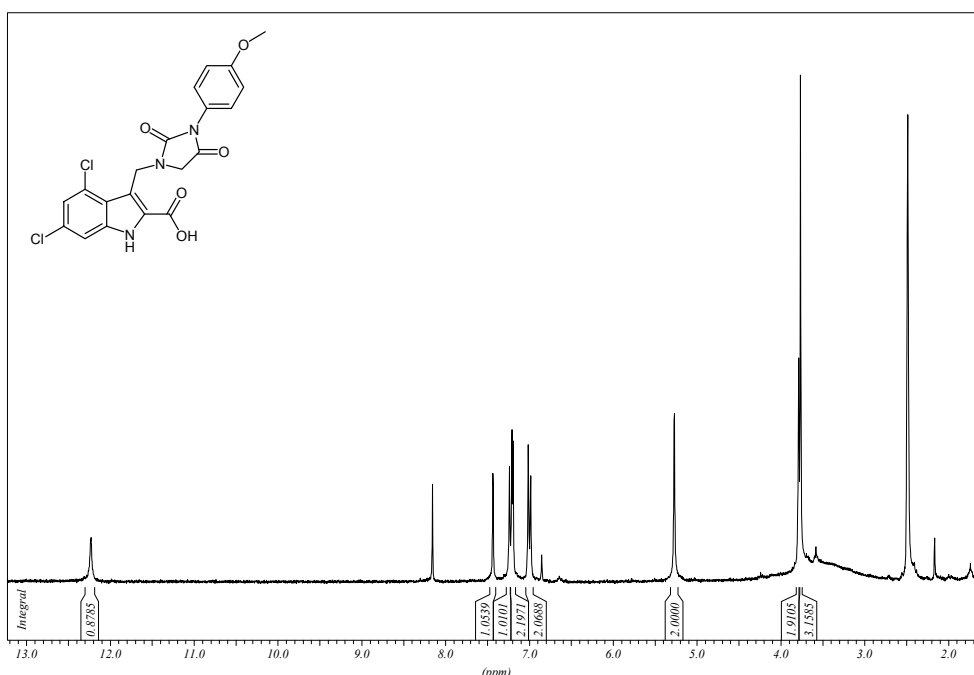


Abbildung 39: ¹H-NMR Spektrum von DDIC5 (11 e) nach Behandlung mit Ameisensäure

Da sich dieser Weg der Aufarbeitung als nicht überzeugend herausstellte, wurde für die Referenzverbindungen DDIC1 - DDIC4 (**11 a-d**) die extractive Aufarbeitung mit anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel bevorzugt. Auch hier wurde typischerweise die zu reinigende Substanz auf Kieselgel adsorbiert und anschließend mit Chloroform/Aceton-Gemischen eluiert, bis dünnschichtchromatographisch kein Carbonsäureethylester **10 a-d** mehr sichtbar war. Danach wurde das Laufmittelgemisch auf Chloroform/Aceton (3 % HCOOH) umgestellt und das gewünschte Produkt eluiert.

Auch hier wurden für alle Vertreter sehr ähnliche Spektren erhalten, die sich sowohl in der Signalaufspaltung als auch der chemischen Verschiebung gleichen. Die Diskussion der Signale soll hier deshalb am Beispiel von DDIC-1 (**11 a**) erfolgen (Abb. 40).

Als charakteristische Signale wurden die Indol-NH Funktion bei 11,9 ppm, die Methylenheiten des Indol- bzw. Hydantoinrings bei 5,2 und 3,8 ppm, sowie die 4 Protonen der Methylenheiten des Fluorethylrestes, welche als separate Triplettsignale bei 4,8, 4,6, 4,1 und 4,1 ppm erscheinen. Die Signale der aromatischen Protonen des Indolrings wurden als Dubletts mit kleiner Kopplungskonstanten ($^4J = 1,84$ Hz) bei 7,41 und 7,12 ppm identifiziert, während die vier Protonen des Phenylrings durch das para-Substitutionsmuster als Dublett ($^3J = 9,20$ Hz) bei 7,42 und 6,82 ppm auftreten.

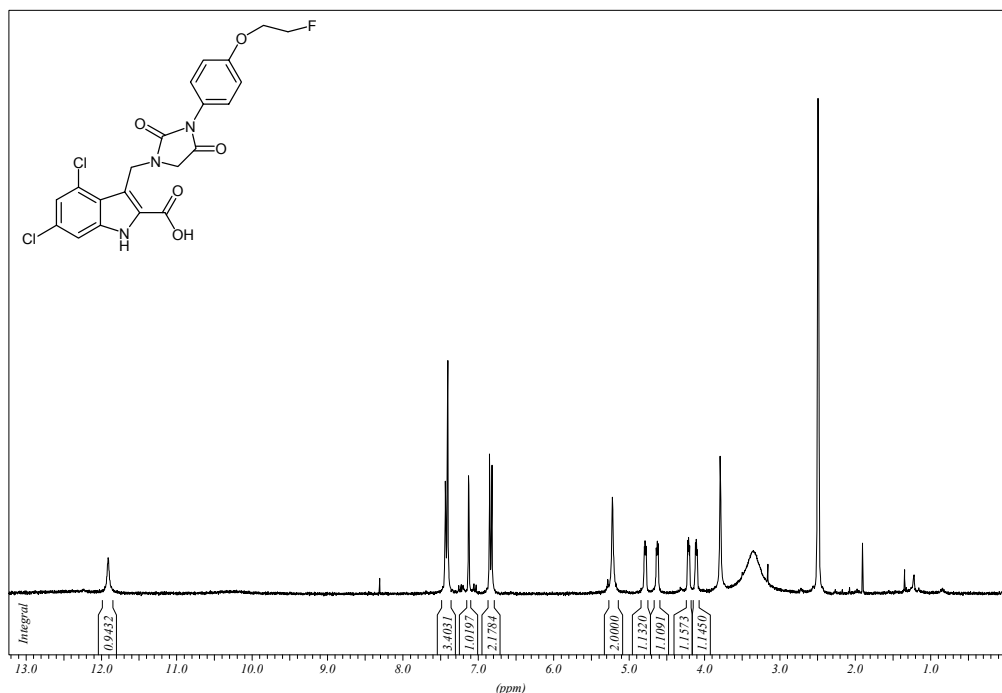
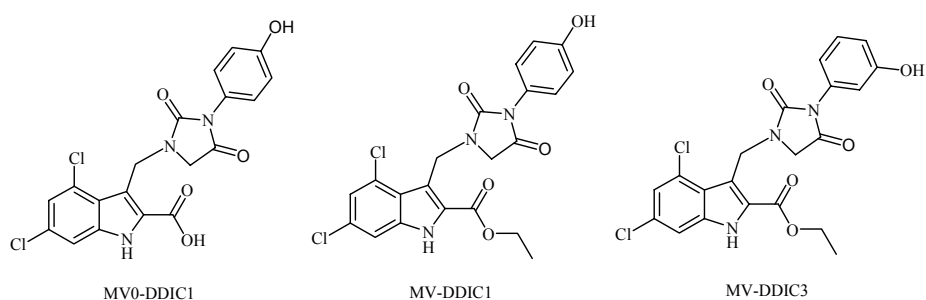


Abbildung 40: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der 4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure DDIC1 (11 a)

3.2 Synthese der Markierungsvorläufer

Basierend auf den pharmakologischen Testresultaten und aus Gründen der besseren Löslichkeitseigenschaften, die bei den späteren präparativen Abtrennungen der radioaktiv markierten Produkte auch eine große Rolle spielen, wurden Markierungsvorläufer auf Basis von DDIC1 und DDIC3 dargestellt.

Die in Abbildung 41 dargestellten synthetisierten Liganden ermöglichen die ^{18}F -Fluorethylierung und ^{11}C -Methylierung in 1- bzw. 2-Stufen Synthesen



<i>IUPAC-Name</i>	<i>Abkürzung</i>
4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure	MV0-DDIC1
4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester	MV-DDIC1
4,6-Dichlor-3-((3-(3-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester	MV-DDIC3

Abbildung 41: Synthetisierte Markierungsvorläufer

3.2.1 Synthese benzylgeschützter Aminophenole

Bei der Darstellung benzylgeschützter Aminophenole in direkter Weise durch refluxieren von 4-Aminophenol mit Benzylchlorid unter Verwendung von Kaliumcarbonat als Base, wurden ausschließlich die am Stickstoff mono- bzw. dibenzylierten Produkte (Abb. 42) erhalten.

Somit wurde nach einem alternativen Weg gesucht, der die zweite Gruppe an Koppelpartnern in schneller und einfacher Weise zugänglich macht. Die Durchführung der Synthese unter gleichen Bedingungen wie sie bei der ersten Gruppe an Koppelungsreagenzien gewählt wurde, erscheint jedoch auch nicht praktikabel, da im zweiten Reaktionsschritt unter den reduzierenden Bedingungen (Palladium auf Aktivkohle) neben der Reduktion der Nitro-Verbindung zur Amino-Verbindung ebenso eine Abspaltung der soeben eingeführten Benzylschutzgruppe stattfinden würde.

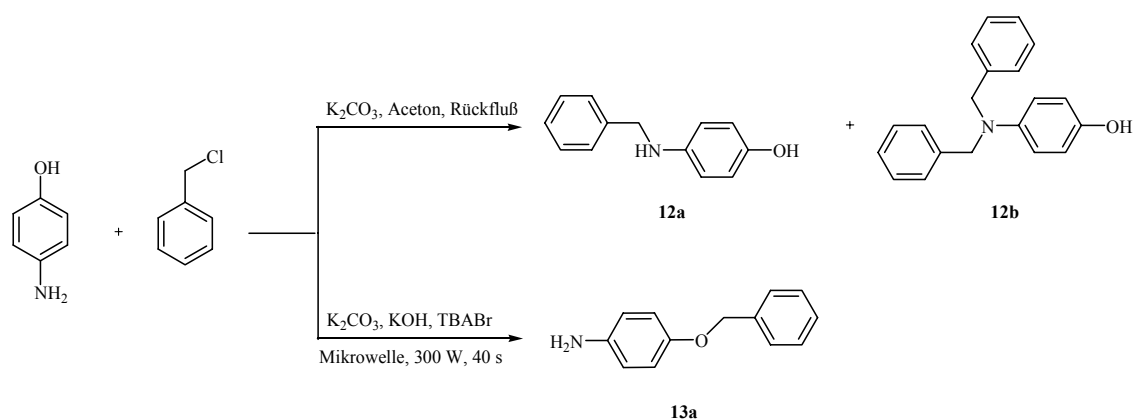


Abbildung 42: Darstellung benzylgeschützter Aminophenole durch nukleophile Substitution, bzw. durch mikrowellenunterstützte Reaktion

Daher wurde in diesem Fall eine Vorschrift nach Bogdal et al. verwendet, die in sehr einfacher Weise eine Darstellung der gewünschten Verbindungen in einem Schritt unter Verwendung kostengünstiger Standardchemikalien ermöglicht [142]. Ohne Einsatz jeglicher Lösungsmittel wurden in einer Haushaltsmikrowelle 4-Aminophenol und Benzylchlorid mit einem vierfachen molaren Überschuss an Kaliumcarbonat und Kaliumhydroxid sowie einer katalytischen Menge Tetrabutylammoniumbromid in einem 100 mL Erlenmeyerkolben vermischt und in 2 s-Intervallen für 40 s bei 300 Watt erhitzt. Dabei wurde versucht, diese Prozedur unter Vermeidung aufsteigender Dämpfe oder lokaler Überhitzungen durchzuführen. Nach einer kurzen Abkühlzeit wurde der Inhalt in Ethylacetat aufgenommen und dünnschichtchromatographisch ausgewertet.

Ein Vergleich des aufgetragenen Reaktionsgemisches mit den auf thermischem Reaktionsweg erhaltenen Produkten zeigte, dass die am Stickstoff mono- bzw. dibenzylierten Verbindungen **12 a** und **12 b** neben Zersetzungsprodukten nur in geringem Maße ent-

standen waren und als Hauptprodukt tatsächlich das O-benzylgeschützte Aminophenol **13 a** erhalten wurde.

Zur Aufarbeitung wurde die organische Phase zunächst von der hohen Salzfracht gereinigt, indem mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung (pH 12) und mit gesättigter Kochsalz-Lösung extrahiert wurde. Das verbleibende schwarze Öl wurde getrocknet und säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

Um zu überprüfen, ob die in der Literatur beschriebene Methode außer auf 4-Aminophenol auch auf andere Stellungsisomere übertragbar ist, wurde versucht die zu **13 a** analogen Verbindungen **13 b-d** herzustellen, welche als Kopplungspartner die zu DDIC1 - DDIC5 analogen Markierungsvorläufer ermöglichen.

Auf diese Weise wurden vier benzylgeschützte Aminophenole **13 a-d** in Ausbeuten von 24 - 61 % hergestellt.

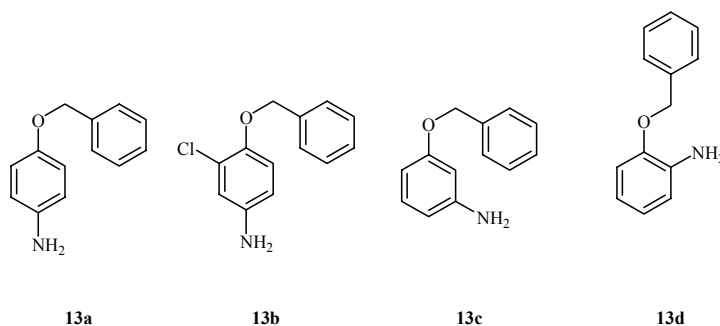


Abbildung 43: Kopplungspartner zur Synthese der Markierungsvorläufer

Eine Erklärung, warum durch mikrowellenunterstützte Synthese eine Umkehrung der Produktverhältnisse erhalten wurde ist nicht möglich, da die physikalischen Phänomene noch größtenteils ungeklärt sind [143].

3.2.2 Kopplungsreaktionen

3.2.2.1 Umsetzung mit Bis-(trichlormethyl)carbonat (Triphosgen)

Hinsichtlich der Kopplungsreaktionen zu den Markierungsvorläufern gelten die gleichen Überlegungen wie in 3.1.3 diskutiert. Eine Zusammenfassung der Syntheseroute gibt Abbildung 44.

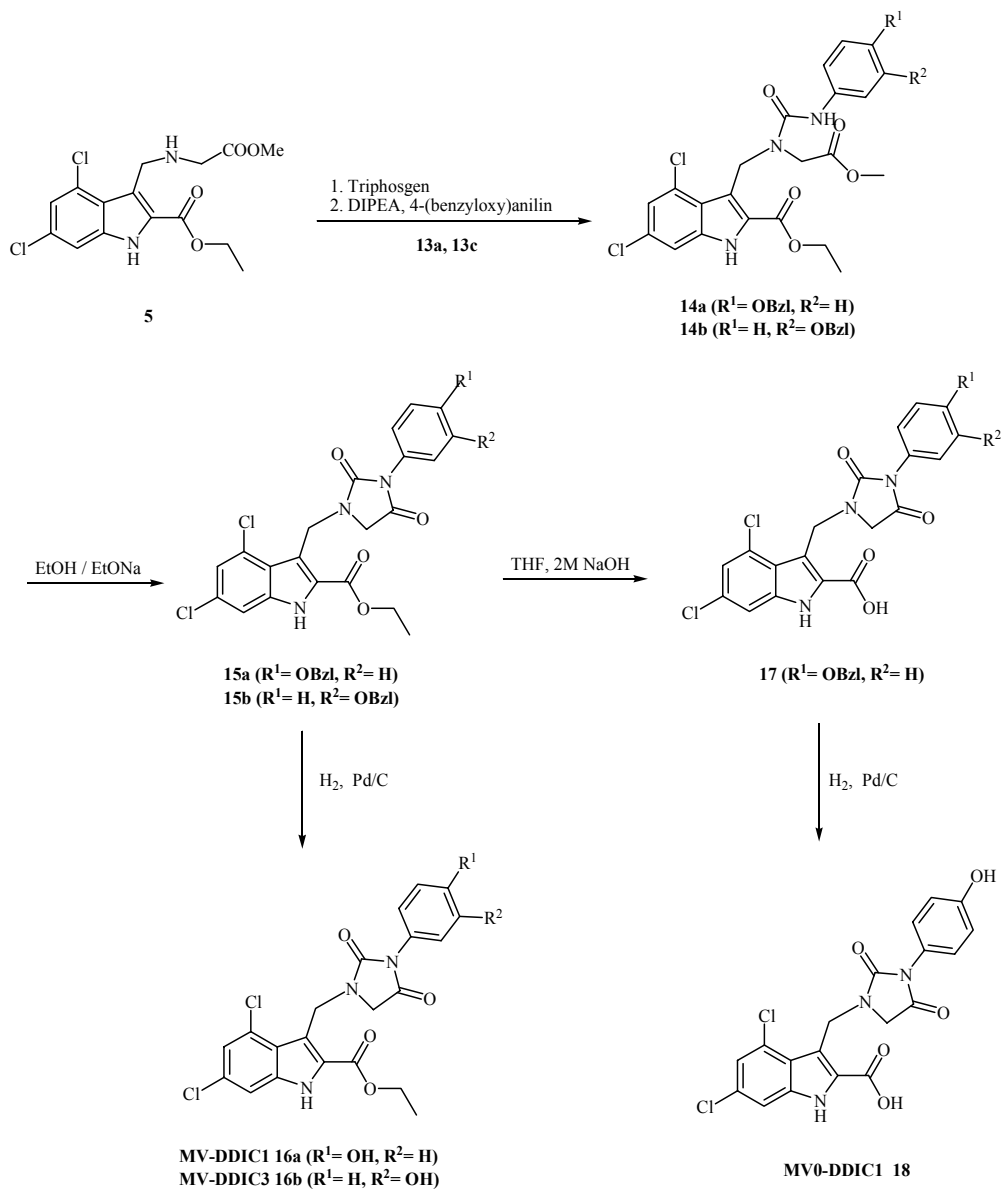


Abbildung 44: Syntheschema zur Darstellung der Markierungsvorläufer ausgehend von 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (**5**) und benzylgeschützten Aminophenolen (**13 a**) und (**13 c**)

Die Reaktion des Indolgrundkörpers **5** mit Triphosgen in Anwesenheit der Hilfsbase Diethylisopropylamin und anschließende Zugabe von 4- bzw 3-(Benzyloxy)-anilin (**13 a**) und (**13 c**) führte zu den unsymmetrischen Harnstoffderivaten 3-((3-(4-(Benzyloxy)-phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)-methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester (**14 a**) und 3-((3-(3-(Benzyloxy)-phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)-methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester (**14 b**). Auch hier wurde, wie in Experimenten zuvor, eine teilweise eingetretene Cyclisierung zum Hydantoin festgestellt. Die Ausbeuten der Kopplungsreaktion des para-Benzyloxy Derivates betrug 64 %, die des meta-Benzyloxy Derivates 46 %.

3.2.2.2 Cyclisierungsreaktionen

Der Hydantoin-Ringschluss wurde mit frisch hergestelltem Natriumethanolat in ethanolscher Lösung durchgeführt. Im Gegensatz zu den analogen Reaktionen der fluorethylierten Derivate bei denen stets eine unvollständige Cyclisierung erreicht wurde, konnte bei den benzylierten Derivaten eine nahezu vollständige Cyclisierung festgestellt werden. Wie im Falle der Synthese der Referenzverbindungen wurde bei der säulenchromatographischen Aufreinigung auf Aluminiumoxid als stationäre Phase zurückgegriffen. Eine Aufreinigung an Kieselgel war aus den bekannten Gründen nicht realisierbar. Die Hydantoin **15 a** und **15 b** wurden so in 81 % bzw. 60 % Ausbeute erhalten.

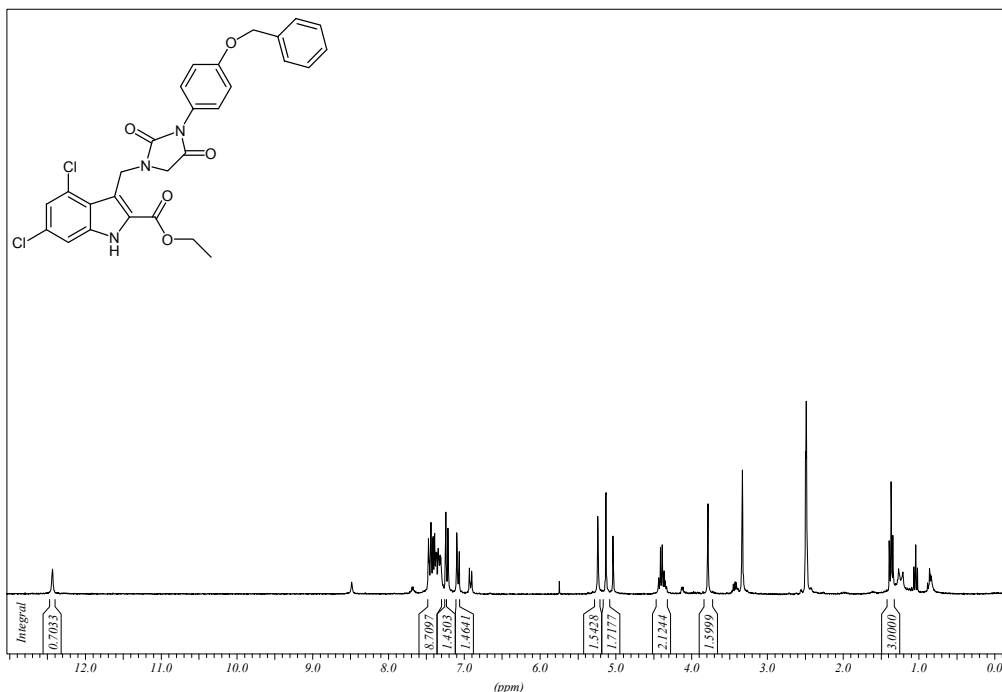


Abbildung 45: ¹H-NMR Spektrum des 3-((3-(4-(benzyloxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester (**15 a**)

Die gemessenen $^1\text{H-NMR}$ Spektren zeigten, bedingt durch die zusätzlich eingeführte Benzylschutzgruppe, eine Vielzahl aromatischer Signale im Bereich von 7,5 - 7,0 ppm, wodurch deren exakte Zuordnung zu den jeweiligen Protonen sehr erschwert wurde. Signifikant und eindeutig zuzuordnen sind jedoch die bekannten Singulettsignale des Indol-NH bei 12,27 ppm sowie die der Methylenheiten bei 5,18 (Indol- CH_2), 3,74 (Hydantoin- CH_2) und 5,04 ppm (OBzl) und weiterhin der Ethylrest bei 4,40 und 1,36 ppm.

3.2.2.3 Verseifungsreaktion und Entschützung

Zur finalen Darstellung der Markierungsvorläufer MV-DDIC1 (**16 a**) und MV-DDIC3 (**16 b**) wurde ausgehend von **15 a** und **15 b** die Benzylschutzgruppe katalytisch mit 10%igem Palladium auf Aktivkohle reduktiv entfernt. Die bekannten Löslichkeitsprobleme erforderten große Volumina Methanol und eine Bearbeitung im 50 °C warmen Wasserbad, um das Edukt zu lösen. Eine abschließende säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel wurde reibungslos durchgeführt und lieferte **16 a** und **16 b** in Ausbeuten von 89 % bzw. 53 %. Um den Markierungsvorläufer MV0-DDIC1 (**18**) zu erhalten, wurde **17** mit 2 M NaOH verseift und anschließend die Benzylschutzgruppe reduktiv entfernt. Durch säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel wurde **18** in einer Ausbeute von 62 % erhalten.

Die Interpretation der in Abb. 46 und Abb. 47 dargestellten $^1\text{H-NMR}$ Spektren von MV-DDIC1 und MV0-DDIC1 wurde durch das Fehlen der benzylichen Schutzgruppe erheblich vereinfacht. Dem Markierungsvorläufer MV-DDIC1 (MV0-DDIC1) wurden die Signale für das Indol-NH bei 12,46 (12,22) ppm, die sehr weit Tieffeld-verschobene phenolische OH-Funktion bei 9,73 (9,62) ppm und die Signale für die Methylenheiten bei 5,23 (5,21) ppm und 3,77 (3,73) ppm zugeordnet. Im Aromatenbereich wurden die Protonensignale des Indolrings als Dublettsignale mit kleinen ^4J -Kopplungen von 1,3 - 1,7 Hz bei 7,48 (7,40) ppm und 7,26 (7,17) ppm gefunden, während die vier Protonen des Phenylrings als Dublettsignale mit ^3J -Kopplungen von 8,5 - 8,8 Hz bei 7,17 (7,04) ppm und bei 7,04 (6,76) ppm erscheinen. Ferner wurden für MV-DDIC1 Signale des Ethylrestes bei 4,40 ppm und 1,37 ppm zugeordnet. Insgesamt wurde im Fall von MV0-DDIC1 der Signalpunkt der sonst identischen Aufspaltungsmuster stets etwas Hochfeld-verschoben vorgefunden.

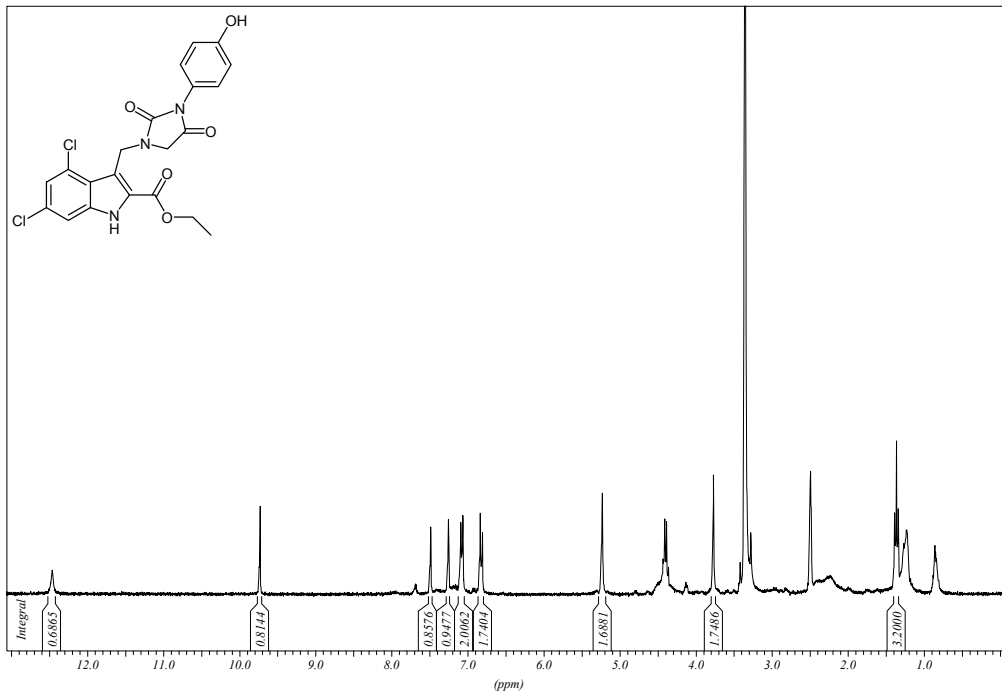


Abbildung 46: ¹H-NMR Spektrum des 4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester MV-DDIC1 (16 a)

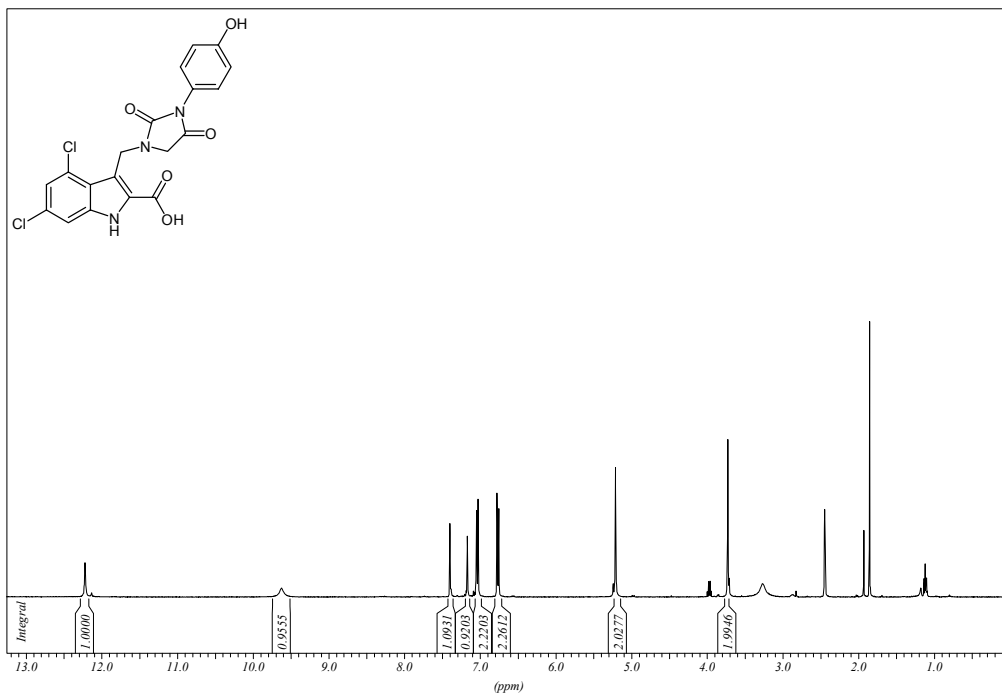


Abbildung 47: ¹H-NMR Spektrum des 4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure MV0-DDIC1 (18)

Ein typisches HPLC-Chromatogramm nach 20 min Reaktionszeit zeigt Abbildung 49:

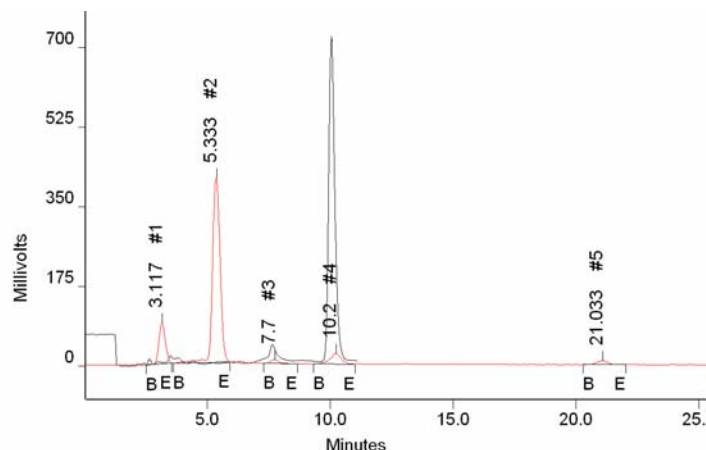


Abbildung 49: Radio-HPLC Chromatogramm der Markierung von MV0-DDIC1 (20) mit $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$, (100 °C, DMSO, 1,9 equiv. 5 M NaOH, 3 mg/mL MV, 20min Reaktionsdauer; Eluens: MeCN/0,25 M NH_4OAc (pH 5) 40/60; Flow: 1 mL/min; $t_r([^{18}\text{F}]\text{DDIC1}) = 10,2$ min, $t_r([^{18}\text{F}]\text{FETos}) = 20,9$ min) Rot (Aktivitäts-Signal), Schwarz (UV-Signal)

Die Verwendung von Alkaliiodiden wie LiI oder NaI stellt eine einfache und effiziente Methode zur Reaktivitätssteigerung fluorethylierender Agenzien wie $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ und $[^{18}\text{F}]\text{BFE}$ dar. Daher wurde versucht $[^{18}\text{F}]\text{DDIC1}$ unter Verwendung von 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorethyltosylat}$ und 20 mg (150 μmol) Lithiumiodid umzusetzen.

Auch bei diesen Versuchen wurde das Nebenprodukt in sehr hoher Ausbeute detektiert (Abb. 50). Zwar sank die Ausbeute des unbekanntes Nebenprodukt auf 32 %, jedoch wurde auch ein noch relativ großer Anteil (21 %) nicht umgesetztes $[^{18}\text{F}]\text{IFE}$ ($t_R = 11,7$ min) und eine Reihe von weiteren Nebenprodukten vorgefunden. Dies lässt auf ein reaktionsträges Substrat schließen, da für gewöhnlich $[^{18}\text{F}]\text{IFE}$ durch seine hohe Reaktivität vollständig umgesetzt wird. Hinsichtlich der Produktausbeute wurde die reaktivitätssteigernde Wirkung von Alkaliiodiden bestätigt. Die radiochemische Ausbeute wurde um das Dreifache gesteigert und betrug nach 20 min Reaktionszeit 21 %.

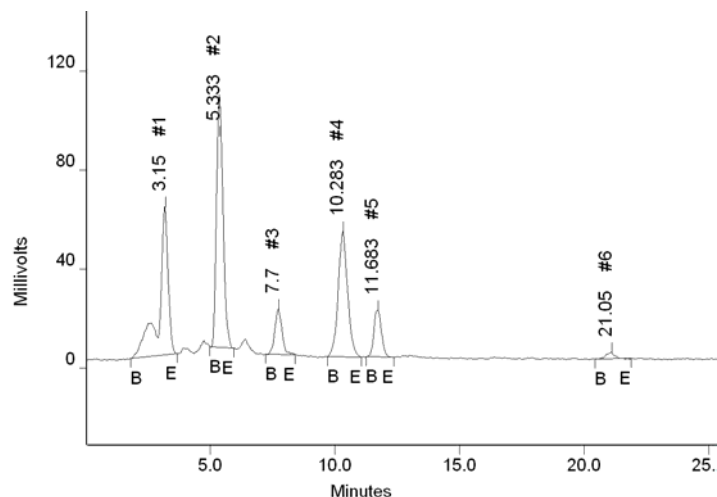


Abbildung 50: Radio-HPLC Chromatogramm der Markierung von MV0-DDIC1 (20) mit $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$, (100 °C, DMF, 1,9 equiv. 5 M NaOH, 3 mg MV, 20 mg Lithiumiodid, 20min Reaktionsdauer; Eluens: MeCN/0,25 M NH_4OAc (pH 5) 40/60; Flow: 1 mL/min; $t_r([^{18}\text{F}]\text{DDIC1})= 10,2$ min, $t_r([^{18}\text{F}]\text{IFE})=11,7$ min, $t_r([^{18}\text{F}]\text{FETos})= 20,9$ min)

Durch die dominierende Bildung des unbekanntes ^{18}F -Nebenproduktes wurde darauf geschlossen, dass eine andere funktionelle Gruppe im Molekül eine deutlich höhere Reaktivität haben muss als die phenolische OH-Funktion. Diese Vermutung wurde durch die Notwendigkeit der Zugabe von 1,9 Äquivalenten NaOH erhärtet. Bei Zugabe von 0,9 Äquivalenten 5 M NaOH konnte $[^{18}\text{F}]\text{DDIC1}$ nur in Spuren nachgewiesen werden.

Den Verlauf der Reaktionskinetiken für die Experimente mit bzw. ohne LiI stellt Abbildung 51 dar. Insbesondere bei Verwendung von $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ zeigte die Bildungskinetik des Nebenproduktes den idealen Verlauf einer Kinetik pseudoerster Ordnung, während die Bildungskinetik für $[^{18}\text{F}]\text{DDIC1}$ von einem linearen Verlauf geprägt wurde.

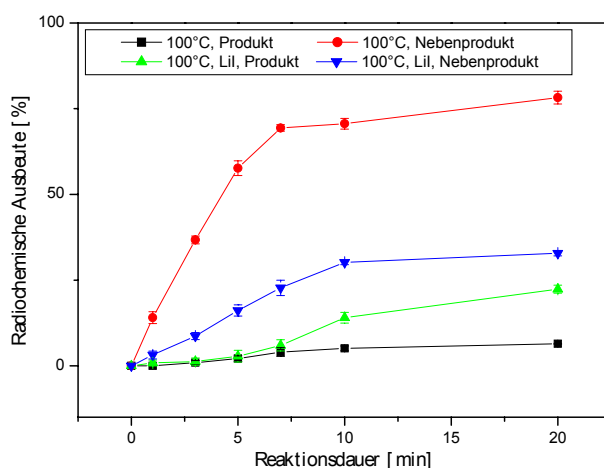


Abbildung 51: Bildungskinetik des ^{18}F -Nebenproduktes ($t_R= 5,3$ min) und der Zielverbindung $[^{18}\text{F}]\text{DDIC1}$ im System $[^{18}\text{F}]\text{FETos}/\text{DMSO}/100$ °C und $[^{18}\text{F}]\text{FETos}/150$ μmol LiI/ $\text{DMSO}/100$ °C

4.2 Synthese von 4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-[¹⁸F]fluorethoxy)-phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure [¹⁸F]DDIC1 ausgehend von MV-DDIC1

Da bei der Synthese von [¹⁸F]DDIC-1 auf direktem Wege keine befriedigenden Ausbeuten erzielt wurden, sollte in weiteren Experimenten die deprotonierte Carbonsäurefunktion als reaktive funktionelle Gruppe ausgeschlossen werden, indem versucht wurde ausgehend von dem Ethylester-geschützten Markierungsvorläufer MV-DDIC1 (**16 a**) in einer 2-Stufen Synthese die Zielverbindung [¹⁸F]DDIC1 (**20**) herzustellen (Abb. 52). Dazu wurden systematisch Reaktionsparameter wie Lösungsmittel, Temperatur, Basensystem, verwendete Äquivalente Base, Markierungsvorläuferkonzentration und Reaktionsdauer untersucht. Im Anschluss an den ersten Teilschritt der Synthese sollte eine Isolierung von Ethyl[¹⁸F]DDIC1 (**19**) durch HPLC und anschließender Verseifung mit 1 M Natriumhydroxid zum finalen Produkt [¹⁸F]DDIC1 (**20**) erfolgen.

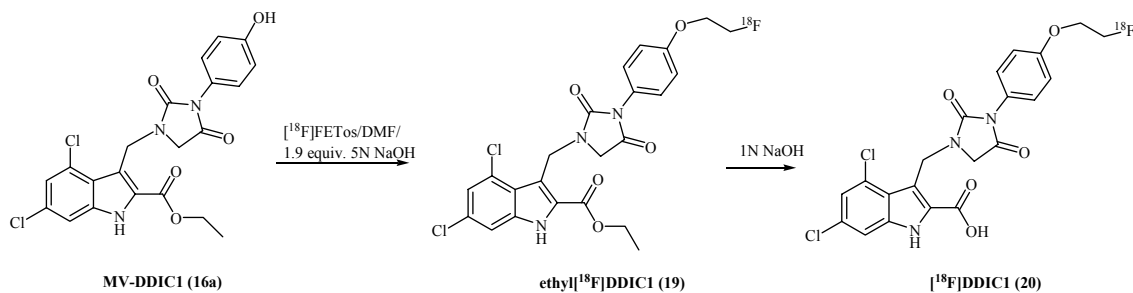


Abbildung 52: Zweistufige ¹⁸F-Fluorethylierung von MV-DDIC1 (**16a**) zu [¹⁸F]DDIC1 (**20**)

4.2.1 Abhängigkeit der RCA von Ethyl[¹⁸F]DDIC1 bei Zusatz von Lithiumiodid

Alle Versuche, in DMSO oder DMF durch Zugabe von 20 mg (150 μmol) LiI zu den Markierungsvorläuferlösungen das Intermediat Ethyl[¹⁸F]DDIC1 (**19**) herzustellen, schlugen fehl. In allen Fällen wurde ein hoher Grad an Zersetzung und nicht umgesetztes [¹⁸F]IFE registriert.

4.2.2 Abhängigkeit der RCA von Ethyl[¹⁸F]DDIC1 vom Lösungsmittel

Um bei den ¹⁸F-Fluorethylierungen eine ausreichende Nukleophilie der funktionellen Gruppe im Substrat zu gewährleisten, ist deren Deprotonierung durch eine Base oftmals erforderlich. Dabei treten anionische Spezies auf, die durch Solvataion einen Großteil ihrer Nukleophilie und damit ihrer Reaktivität einbüßen. Die Wahl des Lösungsmittels hat deshalb einen erheblichen Einfluss auf die Nukleophilie und die Reaktionsgeschwindigkeit einer Reaktion vom Typ der bimolekularen nukleophilen Substitution (S_N2).

Man verwendet daher polar-aprotische Lösungsmittel, welche als Elektronenpaar-Donoren effektiv in der Lage sind Kationen zu solvatisieren, während gleichzeitig die Nukleophilie des Anions stark erhöht wird. Dies wirkt sich günstig auf den Übergangszustand der S_N2-Reaktion aus und führt zu einer Absenkung der Aktivierungsenergie sowie einem schnelleren kinetischen Profil. Das Maß der Solvataion wird weitestgehend von der Dielektrizitätskonstanten und der Polarität des Lösungsmittels bestimmt. Besonders bewährt haben sich bei ¹⁸F-Fluorethylierungen daher Lösungsmittel mit hoher Dielektrizitätskonstanten, wie Acetonitril ($\epsilon= 37$), DMF ($\epsilon= 37$) und DMSO ($\epsilon= 46$) [144]. Innerhalb der Gruppe dieser Lösungsmittel lassen sich bei ¹⁸F-Fluorethylierungen erfahrungsgemäß in DMSO und DMF die besten radiochemischen Ausbeuten erzielen. Dieser Sachverhalt kann nicht ausschließlich in den Dielektrizitätskonstanten begründet liegen und verlangt eine erweiterte Sicht der charakteristischen Lösungsmiteleigenschaften.

Die Theorie der Donor- bzw. Akzeptorzahlen liefert eine plausible Erklärung für diese Erfahrungswerte, indem eine Klassifizierung nach der Fähigkeit, anionische bzw. kationische Spezies zu stabilisieren, erfolgt [145]. Ein Vergleich der Donor- und Akzeptorzahlen zeigt, dass DMSO (DZ= 29,8; AZ= 19,3) und DMF (DZ= 26,6; AZ= 16,0) deutlich stärker in der Lage sind Anionen zu aktivieren, als es Acetonitril (DZ= 14,1; AZ= 18,9) vermag.

Weitere Vorteile von DMSO und DMF sind die deutlich höheren Siedepunkte und die wesentlich besseren Lösungseigenschaften polarer Verbindungen. Außerdem ist bei Acetonitril mit einem Siedepunkt von 85 °C davon auszugehen, dass die der Reaktion zugeführte thermische Aktivierungsenergie für einen guten Produktumsatz nicht ausreichend sein wird. Aus diesen Gründen wurden die Lösungsmiteleinflüsse nur in DMF und DMSO untersucht.

Die in Abbildung 53 dargestellten Reaktionskinetiken bei 100 °C zeigen einen exponentiellen Verlauf mit einem Ausbeutemaximum von 27 - 38 % nach 5 min Reaktionsdauer. Danach tritt in Folge von Zersetzungs- und Nebenreaktionen eine rasche und drastische Verminderung der radiochemischen Ausbeute ein. In beiden Lösungsmitteln lassen sich nahezu identische Ausbeuten erzielen

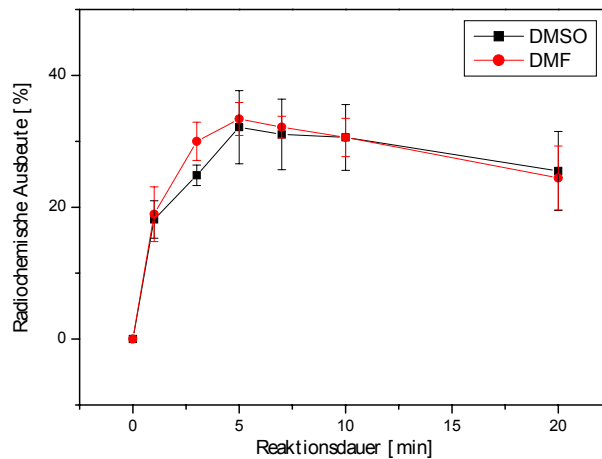


Abbildung 53: Abhängigkeit der RCA bei der Markierung von MV-DDIC1 in Abhängigkeit vom Lösungsmittel (^{18}F FETos, 100 °C, DMSO oder DMF, 1,9 eq. 5 M NaOH, 3 mg/mL MV)

4.2.3 Abhängigkeit der RCA von Ethyl ^{18}F DDIC-1 vom verwendeten Basensystem

Eine phenolische OH-Funktion stellt im protonierten Zustand ein äußerst schlechtes nukleophiles Zentrum dar und muss mittels Basen erst in das entsprechende Phenolat-anion überführt werden, damit eine für ^{18}F -Fluorethylierungen ausreichende Reaktivität vorliegt. Die schnelle und quantitative Verschiebung des Säure-Base-Gleichgewichts auf die Seite des Phenolatanions ist dafür eine Grundvoraussetzung.

Standardmäßig verwendet man für ^{18}F Fluorethylierungen als Base eine wässrige 5 M Natronlauge. Neben einer einfachen Handhabbarkeit und guten Lagerbarkeit, bietet diese Base in der Regel eine ausreichende Deprotonierungsstärke bei gleichzeitig akzeptabler niedriger Bildungsrate von Nebenprodukten. Es gilt jedoch unter den gegebenen strukturellen Bedingungen zu bedenken, dass eine fortschreitende Verseifung des Ethyl ^{18}F DDIC1 unvermeidbar ist.

Zur Minimierung dieser Nebenreaktion wurden daher auch noch alternative, nichtwässrige Basensysteme untersucht, wie z.B. die ähnlich starke Base Natriumethanolat (NaOEt) oder aber die sehr viel stärkeren Basen Lithium-diisopropylamid (LDA) und die Phosphazenenbase P_2Et . Aus der Literatur ist bekannt, dass sich Kaliumcarbonat unter makroskopischen Synthesebedingungen für eine O-Alkylierung von Phenolen und Carbonsäuren in dipolar aprotischen Lösemitteln eignet [146]. Daher wurde K_2CO_3 als Base ebenfalls untersucht, auch wenn diese Base für gewöhnlich bei ^{18}F -Fluorethylierungen phenolischer OH-Funktionen nicht zur Anwendung kommt.

Die besten radiochemischen Ausbeuten wurden bei Verwendung starker Basen wie Natriumhydroxid und Natriumethanolat erhalten. Während bei den Synthesen mit NaOH in den ersten 5 min eine rasche Produktbildung auf etwa 32 % erfolgte, die in

Folge der erwähnten Verseifungsreaktion wieder deutlich zurück ging, wurde bei Verwendung von Natriumethanolat eine deutlich langsamere Bildungskinetik festgestellt. Im Endresultat wurde mit beiden Basen nach 20 min eine radiochemische Ausbeute von 25 % erzielt. Interessanterweise war es von großer Wichtigkeit vor der Zugabe des sekundären Markierungsvorläufers $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$, die Reaktionslösung mit der Base bei 100 °C für 5 min zu temperieren. Obgleich sich Säure-Base-Gleichgewicht normalerweise sehr schnell einstellen, war dieser Zeitraum offenbar nötig, um das Phenolatanion zu bilden. Bei gleichzeitiger Zugabe von $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ und Base zu der bei 100 °C vortemperierten Reaktionslösung wurden hingegen deutliche Ausbeuteeinbußen verzeichnet. Bei Verwendung der sehr starken Base Lithium-diisopropylamid (LDA) wurden nur geringe Mengen von etwa 6 % Ethyl $[^{18}\text{F}]\text{DDIC-1}$ nachgewiesen. Auch bei Verwendung der sterisch gehinderten, sehr starken Phosphazenenbase P_2Et wurden nur marginale Ausbeuten von 1 - 2 % verzeichnet. Mit Kaliumcarbonat als Base konnten keine Ausbeuten erzielt werden.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Abbildung 54:

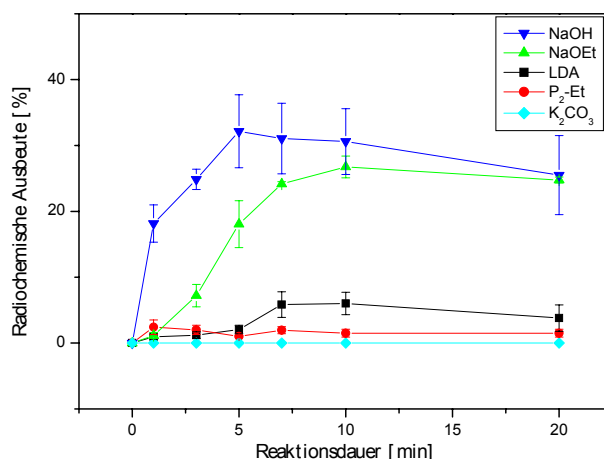


Abbildung 54: Abhängigkeit der RCA bei der Markierung von MV-DDIC1 in Abhängigkeit von der verwendeten Base ($[^{18}\text{F}]\text{FETos}$, 100 °C, DMSO, 1,9 eq. Base, 3 mg/mL MV)

Eine Erklärung für die moderaten radiochemischen Ausbeuten liefert eine Abschätzung der Reaktivität der weiteren funktionellen Gruppen des Moleküls (Abb. 55).

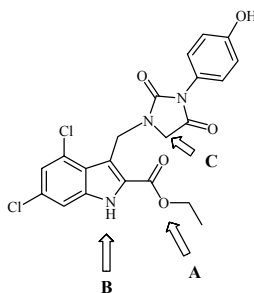


Abbildung 55: Weitere mögliche reaktive Zentren des Markierungsvorläufers MV-DDIC1

Theoretisch betrachtet kann eine ^{18}F -Fluorethylierung unter anderem an Position A, B und C des Moleküls stattfinden. Eine Markierung an Position A, nach vorausgegangener Verseifung des Carbonsäureesters, ist eher unwahrscheinlich. In dem Fall würde ein Carboxylatanion vorliegen, das eine delokalisierte Ladung trägt und bekannterweise über eine nur geringe Nukleophilie verfügt. Die Indol-NH Funktion (Position B) verfügt als sekundäres aromatisches Amin über eine geringe Nukleophilie. Die Säurekonstanten des Indol-NH liegt mit $\text{pK}_\text{A} = 21$ (DMSO) [147] recht hoch, so dass es für die Abstraktion des Protons recht harscher Bedingungen bedarf, welche unter den gewählten Basenbedingungen nicht erfüllt sind.

Sehr viel wahrscheinlicher ist jedoch eine Nebenreaktion an der deprotonierten Methyleneneinheit in Position 5 des Hydantoinrings (Position C). Durch die benachbarte Carbonylgruppe und das benachbarte Heterostickstoffatom wird auf die dazwischen liegende Methyleneneinheit ein starker Elektronenzug ausgeübt, was die Abspaltung eines Protons erleichtert und zu einer Spezies von hoher Nukleophilie führt.

Das in Abbildung 56 dargestellte Chromatogramm stellt die Problematik der Markierung in repräsentativer Weise dar. Neben dem Signal bei 14,6 min, welches das gewünschte Produkt Ethyl[^{18}F]DDIC1 darstellt, sind eine Reihe von Neben- und Zersetzungsprodukten entstanden. Für den Bereich zwischen 2 - 4 min kann durch Injektion der inaktiven Referenzverbindung DDIC1 mit großer Sicherheit auf das verseifte Endprodukt [^{18}F]DDIC1 geschlossen werden. Für die übrigen Signale in diesem Bereich ist eine genaue Zuordnung nicht möglich.

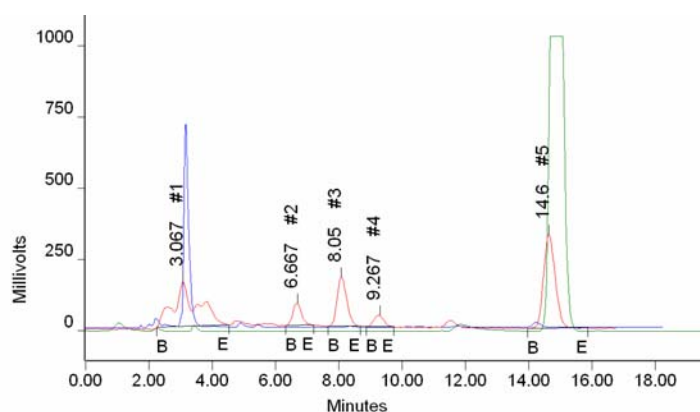


Abbildung 56: Radio-HPLC Chromatogramm der Markierung von MV-DDIC1 mit [^{18}F]FETos, (100 °C, DMSO, 1,9 equiv. 5 M NaOH, 3 mg/mL MV, 5 min Reaktionsdauer; Eluens: MeCN/0,25 M NH_4OAc (pH 5) 60/40; Flow: 1 mL/min; t_r ([^{18}F]DDIC1)= 10,2 min, t_r ([^{18}F]FETos)= 20,9 min, t_r ([^{18}F]IFE)= 11,7 min) Rot (Aktivitäts-Signal), Blau (UV-Signal [^{18}F]DDIC1), Grün (UV-Signal Ethyl[^{18}F]DDIC1)

4.2.4 Abhängigkeit der RCA von Ethyl[¹⁸F]DDIC-1 von der Edukttkonzentration

Die Edukttkonzentration des Markierungsvorläufers geht über die Definition der Geschwindigkeitskonstanten k' als exponentieller Faktor in die Gleichung der Produktbildung ein:

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

Die Reaktionskurve für die Produktbildung besitzt damit einen exponentiellen Verlauf, deren Anfangssteigung von k' bestimmt wird.

Zur Optimierung der Reaktionsparameter wurde daher die optimale Markierungsvorläuferkonzentration an MV-DDIC1 bei 100 °C in DMSO nach 5 min bestimmt.

Dabei wurde gezeigt, dass bei einer Einwaage von 1 mg (2,2 mmol/L) MVDDIC-1 eine RCA von etwa 15 % und mit 3 - 5 mg (6,5 - 11 mmol/L) Vorläufer bereits das Ausbeutemaximum von 30 - 38 % erreicht werden. Eine weitere Erhöhung der Markierungsvorläuferkonzentration auf 7 mg (15,1 mmol/L) führt wiederum zu tendenziell schlechteren Ausbeuten und ist auch im Hinblick auf eine spätere präparative Auftrennung nachteilig. Daher wurde für die weiteren Versuche 3 mg Markierungsvorläufer eingesetzt.

Den Verlauf der radiochemischen Ausbeuten an [¹⁸F]DDICF-1 in Abhängigkeit von der Edukttkonzentration zeigt Abbildung 57.

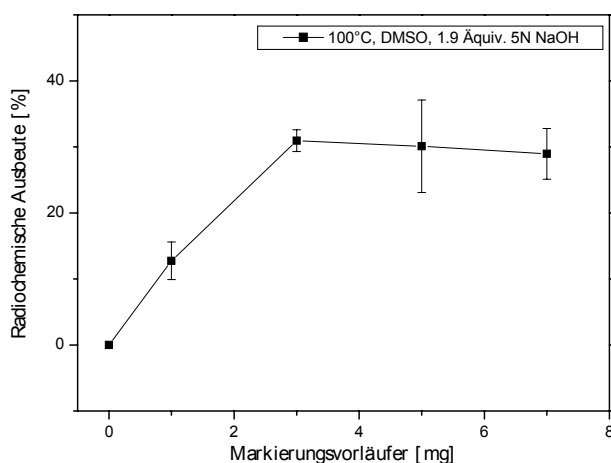


Abbildung 57: Abhängigkeit der RCA bei der Markierung von MV-DDIC1 in Abhängigkeit von der Markierungsvorläuferkonzentration ([¹⁸F]FETos, 100 °C, DMSO, 1,9 eq. 5 M NaOH)

4.2.5 Abhängigkeit der RCA von Ethyl¹⁸F]DDIC1 von der Reaktionstemperatur

Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute bei der Markierung von [¹⁸F]DDIC1 mit [¹⁸F]FETos wurde in DMSO bei verschiedenen Temperaturen (80 °C, 100 °C, 120 °C) und in Anwesenheit von 1,9 Äquivalenten 5 M NaOH durchgeführt (Abb. 58).

Dabei wurde festgestellt, dass bei 80 °C nur 6 - 8 % RCA erreicht wurden, was sich auf eine unzureichende Aktivierungsenergie bei der gewählten Temperatur zurückführen lässt. Bei einer Reaktionstemperatur von 120 °C wurde eine deutliche Steigerung der Ausbeute auf ca. 20 % nach 5 min festgestellt. Gleichzeitig wurden aber auch deutliche Zersetzungsreaktionen des Markierungsvorläufers und eine fortschreitende Verseifung des Carbonsäureethylesters zur freien Carbonsäure festgestellt. In Folge dessen wurde eine optimale Reaktionstemperatur von 100 °C ermittelt. Nach einer Reaktionszeit von 5 min wurden mit durchschnittlich 32 % die besten Ausbeuten erzielt und es herrschte eine gute Balance zwischen der Bildung des Zwischenprodukts und der Entstehung von Neben- bzw. Zersetzungsprodukten.

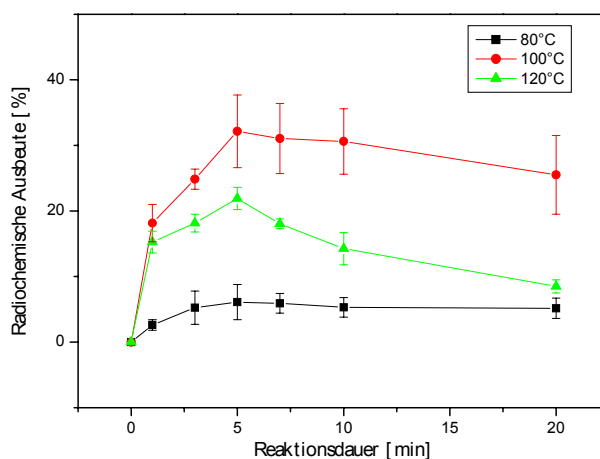


Abbildung 58: Abhängigkeit der RCA bei der Markierung von MV-DDIC1 in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur ([¹⁸F]FETos, DMSO, 1,9 eq. 5 M NaOH, 3 mg/mL MV)

4.2.6 Abhängigkeit der RCA von Ethyl¹⁸F]DDIC1 von der Äquivalenzmenge an Base

Zur Untersuchung der optimalen Äquivalenzmenge an 5 M NaOH wurden 0,9/ 1,9 und 2,9 Äquivalente der Base zur Reaktionslösung zugesetzt und unter den üblichen Reaktionsbedingungen untersucht. Während mit 0,9 Äquivalenten Base ein mäßiger Umsatz mit radiochemischen Ausbeuten von etwa 9 % verzeichnet wurde, konnten mit 2,9 Äquivalenten Base etwa 22 % erzielt werden, jedoch unter signifikanter, fortschreitender Verseifung zu [¹⁸F]DDIC1 (20). In weiteren Versuchen wurden deshalb 1,9 Äquivalente 5 M NaOH zur Deprotonierung verwendet.

4.2.7 Verseifungsreaktionen von Ethyl[¹⁸F]DDIC1 zu [¹⁸F]DDIC1

Zur Synthese des finalen Produktes [¹⁸F]DDIC1 (**20**) wurde das Intermediat Ethyl[¹⁸F]DDIC1 (**19**) mittels HPLC isoliert und auf einer C₁₈-Festphasenkartusche fixiert. Nach Waschen mit Wasser wurde das Ethyl[¹⁸F]DDIC1 mit Ethanol eluiert und durch Zugabe von 100 µL 1 M NaOH bei Raumtemperatur für 30 min verseift (Abb. 59).

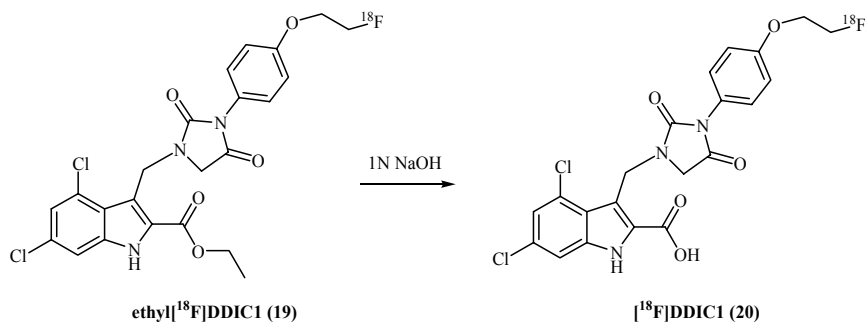


Abbildung 59: Verseifungsreaktion von Ethyl[¹⁸F]DDIC1 mit 1 M NaOH zu [¹⁸F]DDIC1

Da die Entschützung nicht vollständig war und auch Zersetzungs bzw. Nebenreaktionen beobachtet werden konnten, wurde im Anschluss an die Verseifung eine erneute Aufreinigung mittels HPLC durchgeführt. Nach der Aufreinigung wurde die HPLC-Produktfraktion auf einer RP₁₈-Festphasenkartusche fixiert und getrocknet. Da sich das Produkt mit isotonischer Kochsalzlösung nicht von der Kartusche eluieren ließ, wurde mit 1,5 mL EtOH/MeCN (1/1) eluiert und anschließend bei Raumtemperatur im Vakuum eingengt. Durch intensives Behandeln im Ultraschallbad wurde schließlich das verseifte Produkt [¹⁸F]DDIC1 in 1 mL isotonischer Kochsalzlösung erhalten (Abb 60).

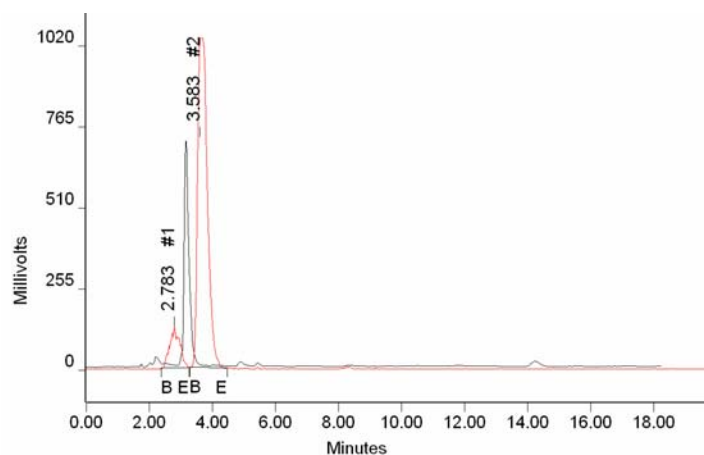


Abbildung 60: Radio-HPLC Chromatogramm der Markierung von MV-DDIC1 mit [¹⁸F]FETos, (100 °C, DMSO, 1,9 equiv. 5 M NaOH, 3 mg/mL MV, 5 min; Eluens: MeCN/0,25 M NH₄OAc (pH 5) 60/40; Flow: 1 mL/min)
Rot (Aktivitäts-Signal), Blau (UV-Signal [¹⁸F]DDIC1)

4.3 Synthese von 4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-[¹⁸F]fluorethoxy)-phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (Ethyl[¹⁸F]DDIC3)

Bei der Synthese von Ethyl[¹⁸F]DDIC3 (**21**), ausgehend von MV-DDIC3 (**16 b**), wurden unter den identischen Reaktionsbedingungen vergleichbare radiochemische Ausbeuten von etwa 25 - 30 % erhalten. Vor dem Hintergrund schlechterer radiochemischer Ausbeuten und der Tatsache noch schlechterer Löslichkeiten des Markierungsvorläufers und der Referenzverbindung, wurden keine weiteren Versuche mit MV-DDIC3 unternommen.

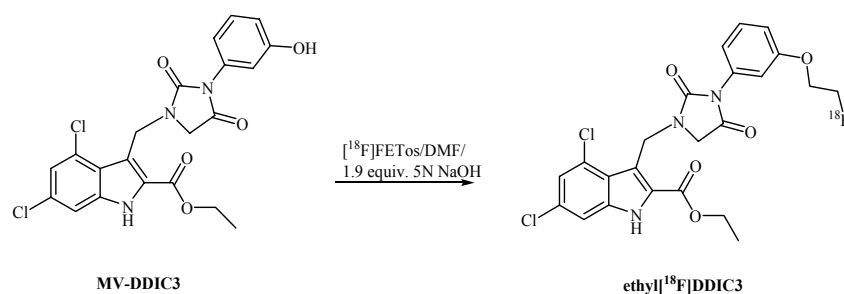


Abbildung 61: ¹⁸F-Fluorethylierung von MV-DDIC3 zu [¹⁸F]DDIC3 mit [¹⁸F]FETos

4.4 Synthese von 4,6-Dichlor-3-((3-(4-[¹¹C]methoxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure [¹¹C]DDIC5

Bei der radioaktiven Markierung von MV-DDIC1 (**16 b**) mit [¹¹C]CH₃I wurde eine analoge Markierungsstrategie wie bei den Versuchen mit [¹⁸F]FETos verfolgt (Kapitel 4.2). Im ersten Schritt wurde der geschützte Markierungsvorläufer an der phenolischen Hydroxyfunktion zu Ethyl[¹¹C]DDIC5 (**22**) ¹¹C-methyliert, um nach anschließender HPLC-Isolierung zu [¹¹C]DDIC5 (**23**) verseift zu werden (Abb. 62).

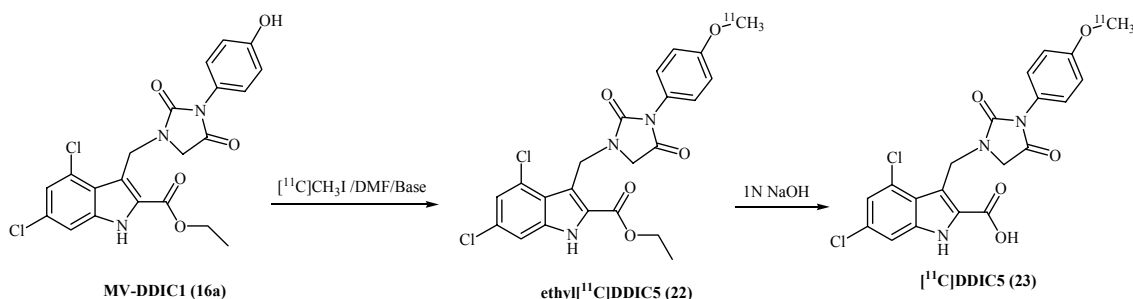


Abbildung 62: Zweistufige ¹¹C-Methylierung von MV-DDIC1 zu [¹¹C]DDIC5 mit [¹¹C]CH₃I

4.4.1 Optimierung der Reaktionsparameter zur Synthese des Zwischenproduktes Ethyl[¹¹C]DDIC5

Da es sich bei der Alkyllierungsreaktion mit [¹¹C]CH₃I ebenfalls um eine S_N2-Reaktion handelt, wurden größtenteils die optimierten Reaktionsparameter aus den Reaktionen mit [¹⁸F]FETos übernommen. Auch hier wurde der Markierungsvorläufer zwingend erforderlich bei der vorgewählten Temperatur für 5 min vorbehandelt, da sich sonst nur ein schlechter Umsatz zu Ethyl[¹¹C]DDIC5 verzeichnen ließ. Im Folgenden wurde der Einfluss der Reaktionsparameter Temperatur, Reaktionszeit, verwendete Base und Äquivalenzmenge zugesetzter Base untersucht.

Die Reaktionen wurden mit 1,5 mg Markierungsvorläufer in 450 µL DMSO durch Zugabe von 50 µL [¹¹C]CH₃I in DMSO gestartet.

4.4.1.1 Untersuchung der Temperaturabhängigkeit

Wegen der sehr hohen Reaktivität des Markierungsreagenzes [¹¹C]CH₃I können Reaktionen in akzeptablen radiochemischen Ausbeuten oftmals schon bei deutlich niedrigeren Temperaturen als vergleichbare Fluorethylierungsreaktionen erfolgen. Durch eine Untersuchung der Temperaturabhängigkeit bei drei verschiedenen Temperaturen (RT, 50 °C, 100 °C) mit 1,9 equiv. Base wurde jedoch gezeigt, dass das Produkt Ethyl[¹¹C]DDIC5 mit 0,4 - 1,3 % nur in vernachlässigbaren Mengen entsteht, während ein unbekanntes Nebenprodukt bei 100 °C in sehr hohen Ausbeuten von fast 50 % gebildet wurde (Abb. 63).

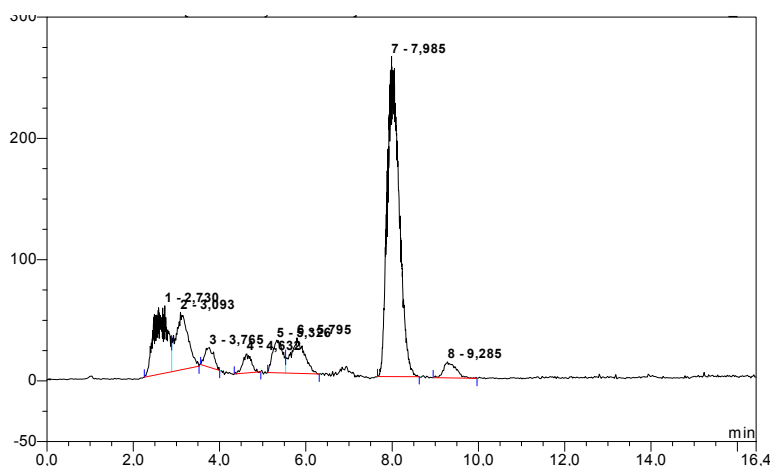


Abbildung 63: Radio-HPLC Chromatogramm der Markierung von MV-DDIC1 mit [¹¹C]CH₃I (100 °C, DMSO, 1,9 equiv. 5 M NaOH, 3 mg/mL MV, 2,5 min Reaktionsdauer; Eluens: MeCN/0,25 M NH₄OAc (pH 5) 70/30; Flow: 1 mL/min; t_r(Ethyl[¹¹C]DDIC5) = 9,3 min, t_r([¹¹C]NP) = 8,0 min, t_r([¹¹C]CH₃I) = 5,3 min)

4.4.1.2 Untersuchung der Reaktionsdauer

Beginnend mit einer Reaktionszeit von 10 min wurde festgestellt, dass eine Verkürzung der Reaktionszeit auf 5 min und wiederum um die Hälfte, auf 2,5 min, eine Steigerung der Ausbeute an Ethyl[¹¹C]DDIC5 und eine Minimierung an Neben- und Zersetzungsreaktionen bewirkt.

4.4.1.3 Untersuchung verschiedener Basen

Um den Einfluss verschiedener Basensysteme auf die radiochemischen Ausbeuten zu untersuchen und um zu überprüfen, ob eventuell eine regioselektive Steuerung der Deprotonierungsreaktion erzielt werden kann, wurden bei den Reaktionen in DMSO bei 100 °C neben Natriumhydroxid auch die vergleichbar starke Base Natriumethanolat und die sehr starken Basen Lithium- und Natriumhydrid verwendet. Ferner wurden die sterisch gehinderte Base Kalium-tert-butanolat und die vergleichsweise schwache Base Kaliumcarbonat untersucht.

Eine signifikante Veränderung der Produktverteilung wurde bei Verwendung von NaOEt festgestellt. Während mit NaOH als Base in den Versuchen zuvor schon bei Raumtemperatur mit ca. 18 % Ausbeute ein unbekanntes Nebenprodukt bei 7,9 min gebildet wurde, konnte dies durch Verwendung von NaOEt, selbst bei Temperaturen von 100 °C, nahezu unterdrückt werden. Stattdessen wurde Ethyl[¹¹C]DDIC-5 ($t_R = 9,3$ min), neben einer Vielzahl weiterer Nebenprodukte, als Hauptprodukt in Ausbeuten zwischen 25-35 % erhalten (Abb. 64)

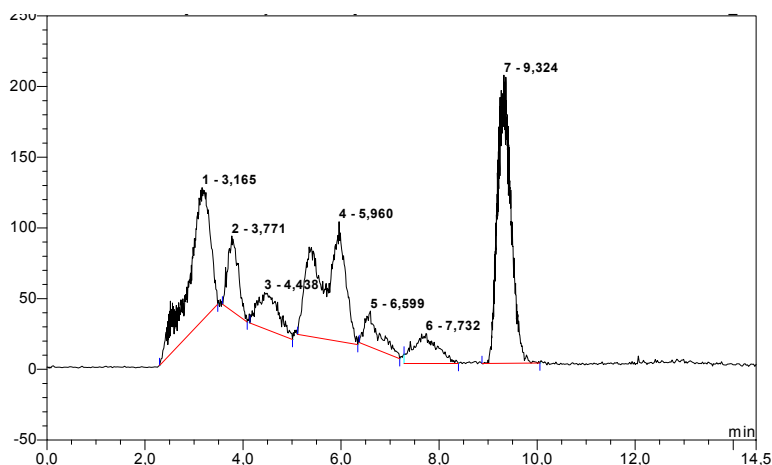


Abbildung 64: Radio-HPLC Chromatogramm der Markierung von MV-DDIC1 mit [¹¹C]CH₃I (100 °C, DMSO, 1,9 equiv. NaOEt, 3 mg/mL MV, 2,30 min Reaktionsdauer; Eluens: MeCN/0,25 M NH₄OAc (pH 5) 70/30; Flow: 1 mL/min; t_r (Ethyl[¹¹C]DDIC5) = 9,3 min, t_r ([¹¹C]NP) = 8,0 min, t_r ([¹¹C]) = 5,3 min)

Durch Verwendung von K₂CO₃, bzw. LiH und NaH als Base resultierte eine ähnliche Produktverteilung wie zuvor auch. Es wurde hauptsächlich das Nebenprodukt bei 7,9 min gebildet, während [¹¹C]DDIC5 in vernachlässigbarer Menge von ca. 2 % bzw.

überhaupt nicht (LiH, NaH) detektiert wurde. Bei Verwendung der sterisch anspruchsvollen Base KO_tBu wurden weder das übliche Nebenprodukt noch Ethyl[^{11}C]DDIC5 gefunden. Stattdessen wurden im Bereich zwischen 0 - 5 min diverse, nicht weiter charakterisierte Signale entdeckt.

4.4.1.4 Untersuchung der Äquivalenzmenge zugesetzter Base

Zur Untersuchung der optimalen Äquivalenzmenge an NaOEt, wurden 0,9 / 1,9 und 2,9 Äquivalente der in DMSO gelösten Base zu der Reaktionslösung des Markierungsvorläufers in DMSO gegeben und für 5 min bei 100 °C Rühren gelassen, bevor die Reaktion durch Zugabe von [^{11}C]CH₃I gestartet wurde.

Bei Verwendung von 0,9 Äquivalenten wurde ein vergleichbares Resultat wie bei Verwendung der 5 M NaOH-Lösung erhalten. In hohen Ausbeuten wurde das unbekannte Nebenprodukt ($t_{\text{R}} = 8,0$ min) gebildet, während Ethyl[^{11}C]DDIC-5 ($t_{\text{R}} = 9,3$ min) nur in schlechter Ausbeute von ca. 2 % erhalten wurde. Bei Verwendung von 2,9 Äquivalenten wurden immerhin noch zwischen 20 - 25 % Ausbeute erzielt, die damit um 10 - 15 % geringer sind als bei Zugabe von 1,9 Äquivalenten NaOEt.

4.4.2 Verseifungsreaktionen von Ethyl[^{11}C]DDIC5 zu [^{11}C]DDIC5

Zur Synthese des finalen Produktes [^{11}C]DDIC5 (**23**) wurde das Intermediat Ethyl-[^{11}C]DDIC5 (**22**) mittels HPLC isoliert und auf einer C₁₈-Festphasenkartusche fixiert. Nach Waschen mit Wasser wurde **22** mit Ethanol eluiert und durch Zugabe von 100 μL 1 M NaOH bei Raumtemperatur für 20 min verseift (Abb. 65).

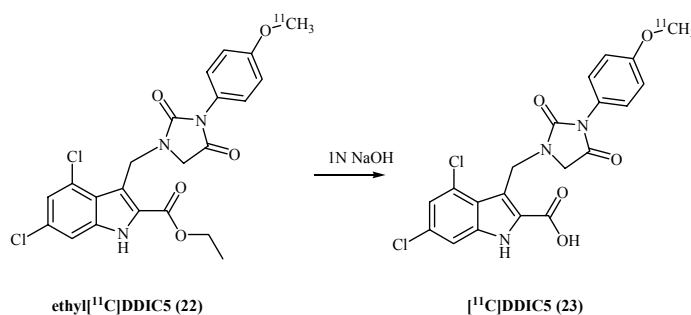


Abbildung 65: Verseifungsreaktion von Ethyl[^{11}C]DDIC5 mit 1 M NaOH zu [^{11}C]DDIC5

Dabei wurde festgestellt, dass nach 20 min Reaktionszeit eine nur unzureichende Verseifung zu **23** ($t_{\text{R}} = 4,0$ min) von etwa 50 % erreicht wurde und außerdem ein Nebenprodukt ($t_{\text{R}} = 2,8$ min) zu etwa 4 % entstanden ist (Abb. 66). Aufgrund der milden Reaktionsführung der Verseifung bei Raumtemperatur und unter Verwendung von 1 M NaOH wurde davon ausgegangen, dass keine unspezifische Zersetzung eingetreten ist, sondern zwei strukturell sehr ähnliche, definierte Verbindungen vorliegen. Beide Spezies wurden zu vergleichbaren Retentionszeiten detektiert, jedoch scheint das unbekannte Ne-

benprodukt etwas hydrophilere Struktureigenschaften zu besitzen. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang beispielsweise eine unter den basischen Bedingungen eintretende Deprotonierungsreaktion an einer anderen funktionellen Gruppe, unter Bildung eines hydrophilen Natriumsalzes.

Durch eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 30 min wurde zwar ein fast vollständiges Verschwinden von Ethyl[¹¹C]DDIC5 erreicht, allerdings begleitet von einer starken Zunahme des Nebenproduktes auf etwa 50 %. Nach 65 min wurde eine Produktverteilung von 79 % und nach 95 min von 99,5 % zu Gunsten des Nebenproduktes detektiert.

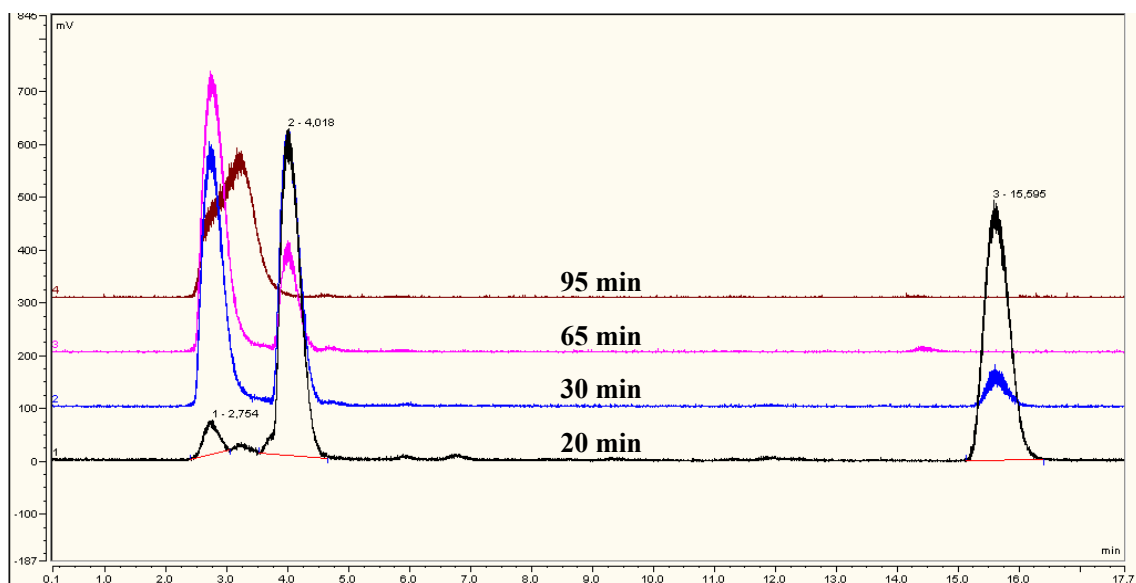


Abbildung 66: Radio-HPLC Chromatogramm der Verseifung von Ethyl[¹¹C]-DDIC5 (RT, 100 μ L 1 M NaOH, Eluens: MeCN/0,25 M NH₄OAc (pH 5) 60/40; Flow: 1 mL/min)

Eine Veränderung der Reaktionsparameter der Verseifung wie z.B. eine verkürzte Reaktionsdauer von 10 min bei erhöhten Temperaturen von 50 °C, führte zu keiner Verbesserung. Ebenso wenig konnte die Verseifung durch Verwendung anderer Basen wie 1 M Lithiumhydroxid, 10%ige Ammoniak-Lösung oder aber 2 M Kaliumcarbonat-Lösung optimiert werden. Aus diesen Gründen wurde die Verseifung bei Raumtemperatur mit 1 M NaOH durchgeführt, nach 30 min abgebrochen und einer erneuten Aufreinigung mittels HPLC unterzogen.

5 Evaluierungen

Liganden, die in radioaktiv markierter Form als PET-Tracer zur Darstellung von Hirnfunktionen dienen sollen, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllen. Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, hinreichende metabolische Stabilität, das Ausmaß der unspezifischen Bindung und die Bindung zum Rezeptor sind einige davon. Um die Eignung der Referenzverbindungen als Radioligand abzuschätzen, wurden daher zwei wichtige pharmakologische Parameter, die Lipophilie und die Affinität zum NMDA-Rezeptor, bestimmt. Auf Basis dieser Resultate wurden zwei Verbindungen für die radioaktiven ^{18}F - und ^{11}C -Markierungen ausgewählt und die geeigneten Markierungsvorläufer synthetisiert. Um eine Abschätzung der Eignung als *in vivo*-Radiotracer zu treffen, wurde im Anschluss das biochemische Konzept mittels Versuchen an autoradiographischen Hirnschnitten und durch μ -PET-Studien überprüft.

5.1 Bestimmung der *in vitro*-Affinitäten

Die Rezeptorbindungsuntersuchungen wurden freundlicherweise von Apothekerin Frau Angelika Krauss, Arbeitskreis Dannhardt, Institut für Pharmazie der Universität Mainz, durchgeführt.

Um die Affinität der synthetisierten Referenzverbindungen zur Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptorkomplex zu ermitteln, wurden die Bindungsaffinitäten mittels eines [^3H]MDL-105,519-Rezeptorbindungsassays bestimmt. Als Radioligand wurde [^3H]MDL-105,519 verwendet, ein hochaffiner ($K_d = 3,77 \text{ nM}$) kompetitiver Inhibitor der Glycinbindungsstelle (Abb. 67). Durch Zugabe dieses Liganden zu einer präparierten Membransuspension, wurden die Bindungsaffinitäten der Testsubstanzen zur Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors anhand der Verdrängung des Radioliganden bestimmt. Zusätzlich wurde eine Bestimmung der Gesamtbindung sowie eine Überprüfung der unspezifischen Bindung mittels Glycin durchgeführt.

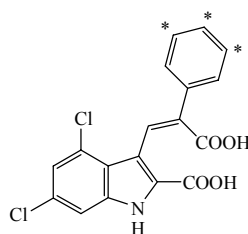


Abbildung 67: Struktur von [^3H]MDL-105,519

5.1.1 Membranpräparation

Die Membranpräparation erfolgte angelehnt an Vorschriften von Höfner und Wanner [148] sowie an eine Vorschrift von Merz & Co., Frankfurt.

Aus frischen Schweinehirnen wurden die Hirnhaut und Blutgefäße entfernt, der gräuliche Cortexanteil herauspräpariert und der verbleibende weiße innere Bereich verworfen. 4 g an Hirnrinde wurden in einem Pottergefäß mit eisgekühltem Sucrose-Tris-Puffer (pH 7,4) auf eine Gesamtmenge von 33 g aufgefüllt und anschließend mit einem Potter-Homogenisator zerkleinert. Die Suspension wurde in einem Becherglas mit Sucrose-Tris-Puffer auf 150 g Gesamtsuspension ergänzt und mittels Ultra-Turrax erneut homogenisiert. Die Zellen erfahren dabei unter Einwirkung des hypotonen Puffers einen osmotischen Schock, wobei es unter Desintegration der Zellen zur Freisetzung der Zellbestandteile kommt. Um die Membranpartikel von niedermolekularen Substanzen, wie beispielsweise den endogenen Liganden Glutaminsäure und Glycin zu reinigen, wurde das resultierende Homogenisat gleichmäßig auf acht Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bei + 4 °C nach folgendem Schema zentrifugiert.

Tabelle 7: Aufarbeitungsschema der Membranpräparation

<i>Schritt</i>	<i>Vorgang</i>	<i>Aufarbeitung</i>
Zentrifugation 1	4200 rpm, 8 min	Überstand in neues Zentrifugenröhrchen, Pellet verwerfen
Zentrifugation 2	16000 rpm, 30 min, Vakuum	Überstand verwerfen, Pellet mit 15 mL Ampuwa® 30 sec im Ultra-Turrax homogenisieren
Zentrifugation 3	10000 rpm, 30 min, Vakuum	Überstand und weicher Pellet-Anteil in neues Zentrifugenröhrchen, fester Pelletanteil wird verworfen („Buffy Coat“-Methode)
Zentrifugation 4	25000 rpm, 30 min, Vakuum	Überstand verwerfen, 15 mL 5 mM TRIS-Puffer zum Pellet geben und mit Ultra-Turrax homogenisieren
Zentrifugation 5	30000 rpm, 30 min, Vakuum	Überstand verwerfen, 15 mL 5 mM TRIS-Puffer zum Pellet geben und mit Ultra-Turrax homogenisieren. Zentrifugationsschritt 5 sechsmal wiederholen

Um eine homogene Charge zu gewährleisten wurden die erhaltenen Membransuspensionen vereinigt, mit Ultra-Turrax homogenisiert und zur Aufbewahrung in gleichen Anteilen auf acht Zentrifugationsröhrchen verteilt und bei -78 °C eingefroren. Vor dem geplanten Assay wurde die Membranpräparation im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und noch einmal 30 min lang bei 30000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet

eines Zentrifugationsröhrchens wurde anschließend in 32 mL 50 mM Tris-Puffer aufgenommen und homogenisiert.

Die Bestimmung des Proteingehalts der Membran-Suspension wurde nach einem Standardassay von Bradford durchgeführt [149]. Die Kalibriergerade wurde mit einer Proteinverdünnungsreihe aus einer Stammlösung des Bovinen Serum-Albumins erstellt. Zur Inkubation wurde den einzelnen Proteinlösungen der Verdünnungsreihe 5 mL Proteinreagenz (Coomasie-Lösung) gegeben und die Absorption bei 595 nm in einem Zeitraum von 2 – 60 Minuten nach Zugabe des Reagenzes gegen die Referenz aus 0,1 mL 5 mM Tris-Puffer und 5 mL Proteinreagenz gemessen. Für den [³H]MDL-105,519-Rezeptorbindungsassay waren unter den gegebenen Bedingungen 50 µg Protein pro Inkubationsröhrchen erforderlich [150], was einem theoretischen Endgehalt von 4000 µg Protein in den wie oben angeführt hergestellten 32 mL Membransuspension entsprach.

Um den tatsächlich vorhandenen Proteingehalt zu bestimmen, wurde der Zentrifugationsrückstand eines Röhrchens in 8 mL 5 mM Tris-Puffer suspendiert und 100 µL dieser Suspension (theoretischer Gehalt: 50 µg Protein) mit 5 mL Proteinreagenz versetzt und vermessen. Mit Hilfe des gemessenen Proteingehaltes ließ sich anschließend die gesamte Schweinehirncharge auf den gewünschten Proteingehalt von 4000 µg Protein pro Zentrifugationsröhrchen einstellen.

5.1.2 Durchführung des [³H]MDL-105,519-Rezeptorbindungsassay

Etwa 10⁻² mmol der jeweiligen Referenzverbindung wurden in 500 µL DMSO, 400 µL H₂O und 100 µL 0,1 M NaOH gelöst, so dass genau eine 10⁻² M Stammlösung vorliegt. Um eine 10⁻³ M bzw. 3·10⁻³ M Ausgangslösung zu erhalten, wurden 100 µL bzw. 300 µL der Stammlösung entnommen und mit 50 mM Tris-Puffer auf 1000 µL aufgefüllt. In analoger Weise wurde für die weiteren Verdünnungen verfahren, so dass schließlich ein Konzentrationsbereich von 10⁻⁴ - 3·10⁻⁹ M abgedeckt wurde (10⁻⁴ M, 3·10⁻⁵ M, 10⁻⁵ M, 3·10⁻⁶ M, 10⁻⁶ M, 3·10⁻⁷ M, 10⁻⁷ M, 3·10⁻⁸ M, 10⁻⁸ M, 3·10⁻⁹ M)

Für den Assay wurden die Inkubationsröhrchen mit 50 µL Testsubstanzverdünnung und 50 µL [³H]MDL-105,519-Lösung (2 nM) versetzt. Für die Bestimmung der Gesamtbindung wurde die Testsubstanzlösung durch 50 µL 50 mM Tris-Puffer-Lösung, für die unspezifische Bindung durch 50 µL einer 10⁻² M Glycin-Lösung ersetzt. Jede Bestimmung erfolgte in doppelter Ausführung. Im Abstand von 10 min wurden zu jeweils 20 Inkubationsröhrchen 400 µL eisgekühlte Membranlösung zugegeben. Die Lösungen wurden homogenisiert und auf Eis jeweils exakt 60 Minuten lang inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde über mit 50 mM Tris-Puffer angefeuchtete Glasfaserfilter (Fa. Schleicher & Schuell) mit Hilfe zweier Filtrieranlagen (FH 225 V Ten Place Filter Manifold and Collection Box der Fa. Pharmacia Biotech) durch Anlegen eines Vakuums filtriert. Anschließend wurde jeder Filter zweimal mit wenigen Millilitern 50 mM Tris-Puffer nachgespült. Danach wurden die Filter in Szintillationsröhrchen überführt und jeweils mit 5 mL Szintillationsflüssigkeit versetzt. Sobald die Filter transpa-

rent waren, wurde die auf ihnen zurückgehaltene Radioaktivität mit einem Szintillationszähler (Wallac Liquid Scintillation Counter 1409 der Fa. Wallac) bestimmt.

5.1.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte durch Auftragung der erhaltenen Werte der spezifischen Bindung von [³H]MDL-105,519 gegen die Konzentration der Testsubstanz. Die resultierende kompetitive Bindungskurve besitzt einen sigmoidalen Verlauf, deren Wendepunkt den IC₅₀-Wert als Maß für die Affinität zum Rezeptor darstellt (Abb. 68). Der IC₅₀-Wert entspricht der Konzentrationen an Testsubstanz, die nötig ist um 50 % des am Rezeptor gebundenen Radioliganden zu verdrängen.

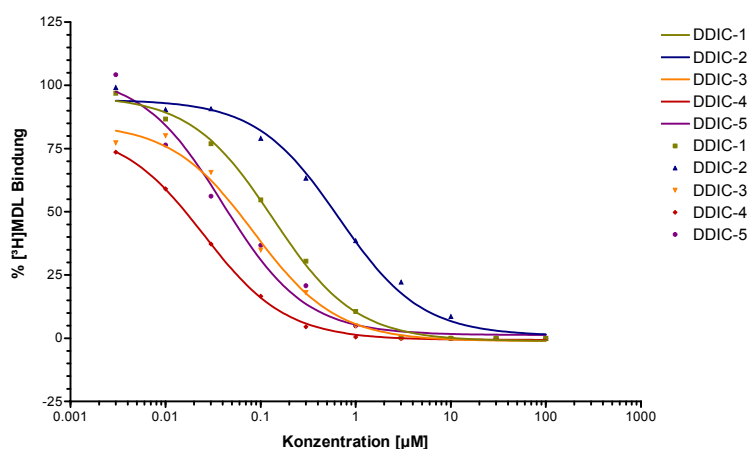


Abbildung 68: Inhibitionskurven der Referenzverbindungen DDIC1 - DDIC5

Mit Hilfe des IC₅₀ kann man nach Cheng und Prusoff den K_i ermitteln [151]:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{c([^3H]MDL-105,519)}{K_d}}$$

mit $c([^3H]MDL-105,519) = 2 \text{ nM}$

Abkürzung	IC ₅₀ [nM]	K _i
DDIC1	81 ± 24*	53 ± 16
DDIC2	493 ± 148	322 ± 97
DDIC3	43 ± 13	28 ± 8
DDIC4	17 ± 5	11 ± 3
DDIC5	47 ± 14	31 ± 9

Abbildung 69: Ermittelte Affinitäten der Substanzen DDIC1 - DDIC5

*: Mittelwert aus 2 Bestimmungen

Dabei wurde festgestellt, dass eine Variation des Fluorethoxy-Substituenten am Phenylring einen Einfluss auf die Affinität zum Rezeptor hat, wenn auch nicht ganz so signifikant im Vergleich zu einer zusätzlichen Chlor-Substitution in Nachbarstellung. Das ortho-Fluorethoxy-Derivat DDIC4, mit einem IC_{50} -Wert von 14 nM, wäre demnach 25 mal affiner als DDIC2 (493 nM), dessen Chlor-Substituent die Elektronendichte des Phenylrings reduziert.

Das para-Fluorethoxy-Derivat DDIC1 wurde in zwei verschiedenen Chargen zu 57 nM und 105 nM getestet, was gemittelt einen Inhibitionswert von 81 nM ergibt. Diese Diskrepanz der Ergebnisse kann schon durch geringfügige Qualitätsunterschiede der Testsubstanzen hervorgerufen werden und verdeutlicht die hohen Reinheitsanforderungen an die Referenzverbindungen. Der dabei ermittelte Fehler von etwa 30 % kann aber auch auf Unterschiede in der Qualität der Hirn-Charge oder in systematischen Fehlern während des Assays begründet liegen. Für die Verbindungen DDIC2 - DDIC5 wurde daher von ähnlichen Fehlerbereichen ausgegangen.

Die bereits erwähnten Löslichkeitsprobleme führten auch bei der Durchführung des Verdrängungsassays zu Schwierigkeiten. Besonders das ortho-Fluorethoxy-Derivat DDIC4, aber auch das para-Methoxy-Derivat DDIC5 waren bei hohen Konzentrationen ($> 3 \cdot 10^{-6}$ M) im Inkubationsmedium nicht mehr ausreichend löslich. Dies macht sich in dem Verlauf der Bindungskurven von DDIC4 und DDIC5 graphisch bemerkbar, da interpoliert werden musste.

5.2 Bestimmung der Lipophilie

Die Lipophilie einer Verbindung ist entscheidend für die Aufnahme eines Wirkstoffes in die Zelle. Sofern keine speziellen Transportsysteme für die Überwindung der Membranbarriere vorhanden sind, müssen Substanzen durch passiven Transport oder Diffusion an ihren Wirkort gelangen. Die Effizienz dieses Transportprozesses wird dabei wesentlich durch die Lipophilie des zu transportierenden Moleküls bestimmt. Während Moleküle mit zu geringer Lipophilie die Lipidmembranen in nur geringem Maße passieren können, werden Moleküle mit zu hoher Lipophilie sehr leicht unspezifisch gebunden. Es wurde festgestellt, dass innerhalb einer Reihe strukturell verwandter Liganden mit zunehmender Lipophilie die unspezifische Wechselwirkungen mit dem Gewebe zunehmen [152]. Gleichzeitig ist aber für eine Durchdringung der Blut-Hirn-Schranke eine gewisse Lipophilie notwendig, so dass die Bereiche, in denen wenig unspezifische Bindung auftritt, jedoch eine hohe Verfügbarkeit des Liganden im Gehirn besteht, oftmals schmal sein können [153, 154].

Zur Bestimmung der Lipophilie hat sich als Modell für Verteilungsvorgänge in biologischen Zellsystemen das Zweiphasensystem Octanol/Wasser etabliert [155]. Die experimentelle Bestimmung der Lipophilie erfolgt über den Logarithmus des Verteilungskoeffizienten P (Partition Coefficient) der Verbindung in einem Octanol/Wasser-System.

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

Als Alternative zur potentiometrischen Titration und zur aufwendigen Schütteltrichter Methode kann die Lipophilie einer Verbindung mit dem HPLC-Verfahren ermittelt werden. Der Vorteil liegt in einer schnellen, genauen und Substanz-sparenden Durchführung [156]. Die Grundlage dieser Methode ist der lineare Zusammenhang $\log k \sim \log P$ zwischen dem logarithmierten Kapazitätsfaktor ($\log k$) als säulenchromatographischer Parameter einer Verbindung und dem logarithmierten Verteilungskoeffizienten ($\log P$).

Die Untersuchung der Lipophilien der Referenzverbindungen erfolgte mit dem in Abschnitt 6.3.1 beschriebenen Sykam HPLC-System, einer analytischen RP-Säule (Phenomenex Gemini RP18-EC, 5 μm , 250 \times 4,6 mm) und Sörensen-Puffer (Phosphatpuffer (pH 7,4) / Methanol 25/75) als Eluens.

Zur Ermittlung der Verteilungskoeffizienten wurden von Substanzen mit bekanntem $\log P$ die Retentionszeiten t_R ermittelt und unter Verwendung von Ascorbinsäure die Totzeit t_0 des verwendeten Systems bestimmt. Zur Bestimmung der Retentionszeiten sämtlicher Substanzen wurde ein aus 3 Einzelmessungen gemittelter Wert verwendet (Tab. 8). Hieraus wurde der Kapazitätsfaktors k ermittelt, wobei für k gilt:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Tabelle 8: Experimentell bestimmte Retentionszeiten der Eichsubstanzen

<i>Eichsubstanz</i>	<i>logP</i>	<i>t_R</i>	<i>log k</i>
Ascorbinsäure	-1,67	2,600	-----
Benzaldehyd	1,48	4,1	-0,2389
Anisol	2,11	5,900	0,1035
Toluol	2,73	8,370	0,3462
4-Bromanisol	3,05	9,100	0,3979
4-Iodanisol	3,24	10,670	0,4919

Durch Auftragung des log k gegen logP und anschließender linearer Regression lässt sich eine Kalibriergerade erstellen (Abb. 70).

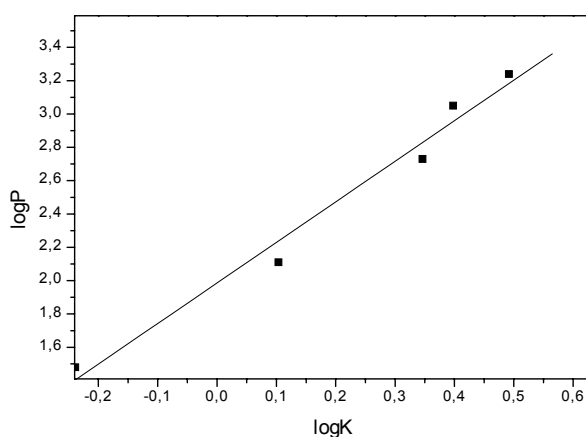


Abbildung 70: Regressionsgerade der Eichsubstanzen

Die lineare Regression ergab $\log P = 2,435 \cdot \log k + 1,986$.

Durch Bestimmung der Retentionszeiten der Referenzsubstanzen wurden mit Hilfe der Kalibriergeraden die Lipophilien der Liganden ermittelt (Tab. 9).

Tabelle 9: Experimentell bestimmte Lipophiliewerte

<i>Referenzverbindung</i>	<i>t_R</i>	<i>log k</i>	<i>logP</i>
DDIC1	5,410	0,0337	2,07
DDIC2	6,960	0,2245	2,53
DDIC3	5,550	0,0548	2,12
DDIC4	4,265	-0,1936	1,51
DDIC5	5,96	0,1114	2,26

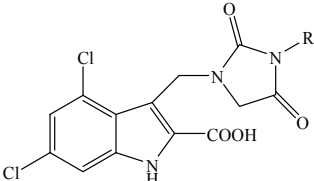
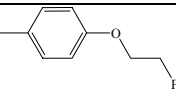
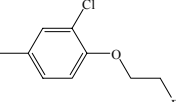
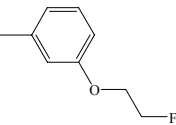
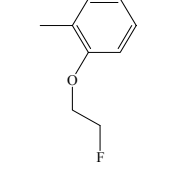
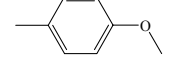
Die ermittelten Lipophiliewerte liegen nahezu alle in dem für eine optimale Hirngängigkeit beschriebenen Bereich von logP 2 - 3 [133]. Durch die Einführung eines elekt-

ronenziehenden Chlor-Substituenten wurde bei der sonst zu DDIC1 analogen Verbindung DDIC2 eine signifikante Erhöhung des logP von 2,07 auf 2,53 festgestellt.

Eine Variation der Position des Fluorethoxy-Restes in ortho-, meta- oder para-Position des hydantoin-substituierten Phenylrings führte im Falle von DDIC1 (para) und DDIC3 (meta) zu ähnlichen Lipophiliewerten, während bei DDIC4 (ortho) mit einem logP von 1,51 der niedrigste Wert innerhalb der gesamten Gruppe ermittelt wurde.

Vergleicht man die ermittelten Werte für die Affinität und die Lipophilie miteinander, so treten besonders die Resultate für DDIC2 und DDIC4 hervor (Tab. 10). Durch den Einfluss des Chlor-Substituenten erfährt die Verbindung DDIC2 zwar eine Verbesserung der lipophilen Eigenschaften, gleichzeitig wirkt sich aber eine Erniedrigung der Elektronendichte am Phenylring in negativer Weise auf die Affinität zum Rezeptor aus. Weiterhin wirkt sich eine Variation des Fluorethoxy-Restes in ortho Position ebenfalls auf diese zwei wichtigen Parameter aus. Bei einer deutlichen Steigerung der Affinität auf 17 nM wurde gleichzeitig eine signifikante Verminderung der Lipophilie auf logP= 1,51 festgestellt.

Tabelle 10: Affinität und Lipophilie von Liganden auf Basis der 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäure

	<i>R</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>IC₅₀ [nM]</i>	<i>logP</i>
		DDIC-1	81*	2,07
		DDIC-2	493	2,53
		DDIC-3	43	2,12
		DDIC-4	17	1,51
		DDIC-5	47	2,26

Im Rahmen einer Dissertation[117] wurden im Arbeitskreis Verbindungen auf Basis der 5,7-Dichlor-tetrahydrochinolin-2-carbonsäure im Hinblick auf ^{18}F -Markierungen modifiziert und eine Reihe von PET-Liganden dargestellt (Tab. 11)

Tabelle 11: Affinität und Lipophilie von Liganden auf Basis der 5,7-Dichlor-tetrahydrochinolin-2-carbonsäure

	<i>R</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>IC₅₀ [nM]</i>	<i>logP</i>
		tADTC1	18,3	1,26
		tADTC3	6,7	1,04
		tADTC4	4,4	1,28

Alle Verbindungen zeigten Affinitäten im niedrigen nanomolaren Bereich. Bei den Lipophilieuntersuchungen wurden logP-Werte von 1 - 1,3 ermittelt, welche auf ausreichende Permeation der Blut-Hirn-Schranke *in vivo* hindeuten. In einer ersten *ex vivo*-Biodistributionsstudie wurde die Organverteilung von $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1 untersucht, bei der sich jedoch nur eine geringe Hirnaufnahme zeigte.

Basierend auf den Erkenntnissen aus dieser Arbeit wurde daher der Schwerpunkt bei der Wahl einer geeigneten Referenzverbindung auf eine geeignete Lipophilie gelegt. Für die weiteren Versuche wurden somit die Verbindungen DDIC1, DDIC3 und DDIC5 ausgewählt, da diese Substanzen über gute Lipophilien bei gleichzeitig niedrigen nanomolaren Affinitäten verfügen.

5.3 Autoradiographische Hirnschnitte

Die Bereitstellung der Hirnschnitte und die Durchführung der Experimente wurde freundlicherweise von Herrn Dipl. Biol. Fabian Debus, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie der Universität Mainz, übernommen.

Um die Verteilung des NMDA-Rezeptors in diskreten Hirnarealen nachzuweisen, wurden autoradiographische Versuche mit dem Radioliganden [^{18}F]DDIC-1 (**20**) (IC_{50} = 81 nm, $\log P$ = 2,07) an Hirnschnitten ausgewachsener, gesunder männlicher Sprague-Dawley Ratten durchgeführt. Die gesunden Tiere wurden dekapitiert, die Gehirne sofort entnommen, in gekörntem Trockeneis eingefroren und bis zur Bearbeitung bei - 80 °C gelagert. Die Gehirne wurden seriell koronar (10 μm) mit einem Kryostat (Leica, Jung CM3000) bei -15 °C geschnitten, direkt auf Objektträger aufgezogen und bei - 80 °C aufbewahrt.

Die Schnitte, welche zuvor mit einer hydrophoben Markierung (PAP Pen) umrandet worden sind, wurden auf einer mit Eis gefüllten Kristallisierschale in Inkubationspuffer Tris-HCl + 120 mM NaCl (pH 7,5) für 20 min vorinkubiert. 125 μL des Radioliganden (680 kBq / 0,8 mL Puffer) wurden mit 125 μL Puffer verdünnt, auf die Hirnschnitte pipettiert und bei + 4 °C für 60 min inkubiert. Für die Verdrängungsexperimente wurden die endogenen Liganden Glycin und Kynurensäure verwendet, welche als 200 μM Glycin- bzw. 20 μM Kynurensäurelösung (125 μL) an Stelle der Pufferlösung zum Verdünnen der Radioligandlösung verwendet wurden. Die Schnitte wurden jeweils für 15 sec mit eiskaltem Inkubationspuffer gespült und kurz in destilliertes Wasser getaucht. Die Schnitte wurden für 20 sec vorsichtig trocken gefönt und anschließend auf einem Amersham General Purpose Phosphor Screen (Storm) bei RT für 17,5 h exponiert und ausgelesen. Die Auswertung der Bilddaten erfolgte mit ImageQuant (Molecular Dynamics, Version 5,2)

Die Resultate der autoradiographischen Versuche sind in Abbildung 71 dargestellt. Die Gesamtbindung ist oben dargestellt, die unspezifische Bindung gegen Kynurensäure (20 μM) links und gegen Glycin (200 μM) rechts. Die Bindungsareale mit den höchsten Anreicherungen des Radioliganden sind im Cortex, den vier Thalamuskernen und im Cerebellum. Zu einem geringeren Anteil wurde eine Bindung auch in dem für eine hohe Dichte an NMDA-Rezeptoren bekannten Hippocampus vorgefunden sowie im Striatum. Entsprechende Verdrängungsexperimente mit den endogenen Liganden Glycin und Glutamat resultierten in einer nur geringen spezifischen Bindung des Radioliganden [^{18}F]DDIC-1 (**20**).

Wie in Kapitel 1.7.1. erläutert, stellt der NMDA-Rezeptor einen heteromeren Komplex zusammengesetzt aus NR1- und NR2-Untereinheiten dar. Durch das ubiquitäre Vorhandensein der NR1-Untereinheit, welche die Glycin-Bindungsstelle trägt und für einen funktionstüchtigen Rezeptor notwendig ist, kann man damit sehr schwer eine definierte

Aussage über Subtyp-spezifische Verteilungen treffen. Man kann jedoch erkennen, dass die Areale verstärkter Anreicherung (Cortex und Cerebellum) jene sind, die eine hohe Dichte der häufig vorkommenden Untereinheiten NR2 A bzw. NR2 B aufweisen, was sich mit Daten aus der Literatur deckt.

Eine Subtyp-spezifische Visualisierung NR2 B -reicher Areale wäre beispielsweise mit Liganden der Polyamin-Bindungsstelle möglich, was aber bislang noch nicht gelungen ist.

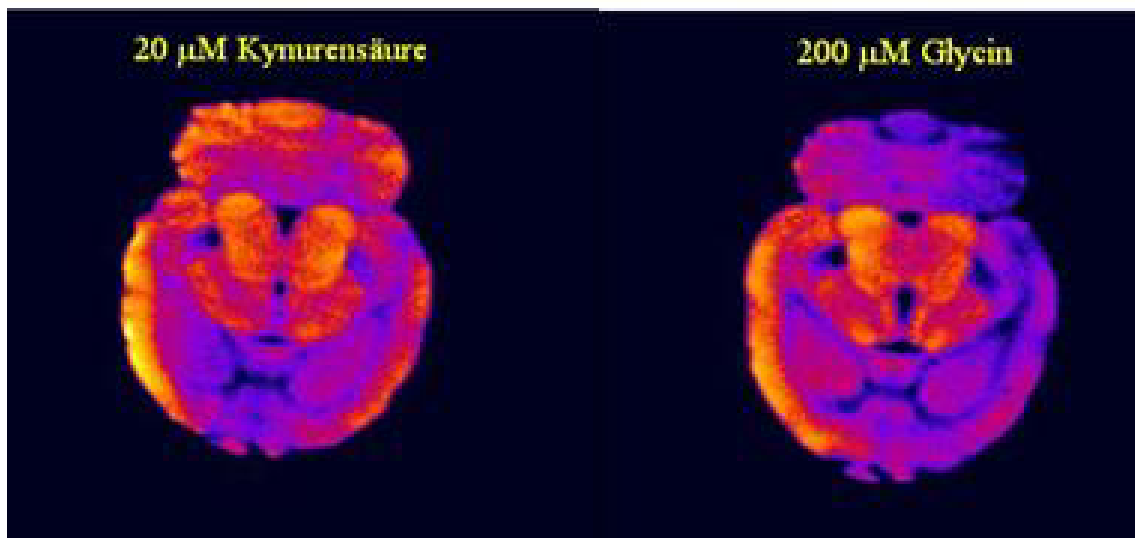
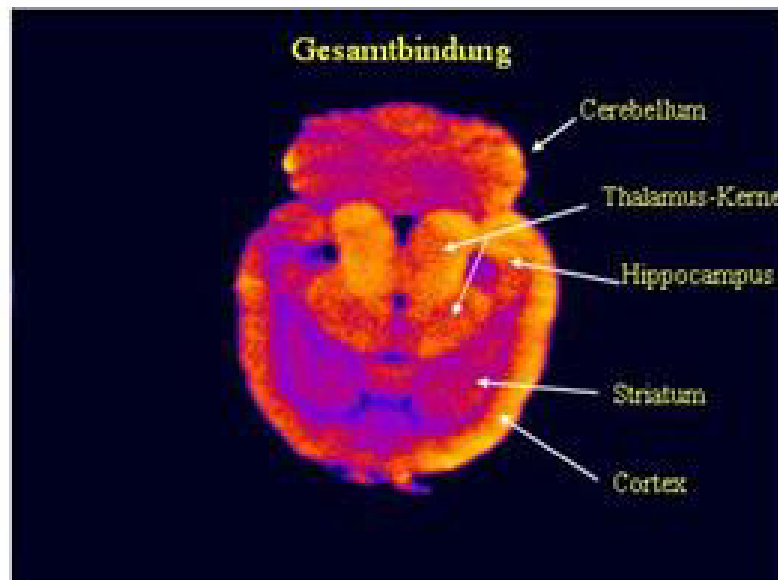


Abbildung 71: Autoradiographische Hirnschnitte mit dem Radioliganden [¹⁸F]DDIC1
Oben: Gesamtbindung, Links: Verdrängung mit 20 µM Kynurensäure,
Rechts: Verdrängung mit 200 µM Glycin

5.4 *In vivo*-Experimente

Zur Darstellung der dynamischen Aktivitätsanreicherung im lebenden Versuchstier wurden *in vivo*-Experimente mit den radioaktiv markierten Verbindungen [^{18}F]DDIC1 und [^{11}C]DDIC5 durchgeführt.

Im Fall der ^{18}F -fluorethylierten Verbindung wurde das Experiment an einem I.S.E YAP-(S)PET Scanner durchgeführt, der noch einen Prototyp darstellte. Der Scanner bestand aus 4 Detektorblöcken, dessen Oberfläche an einen ortsabhängigen Sekundärelektronen-Vervielfacher gekoppelt war, womit Ortsauflösungen von ca. 2 mm erreicht werden können.

Für die Durchführung des Experiments wurde eine gesunde, männliche Sprague-Dawley Ratte (400 g) mit 1,8 mL Chloralhydrat anästhesiert. 54 MBq [^{18}F]DDIC-1 (**20**) wurde in 300 μL isotonischer Kochsalzlösung i. v. über die Schwanzvene injiziert. Anschließend wurden Koinzidenzdaten über einen Zeitraum von 25 min gesammelt. Die Ratten wurden über den Versuchszeitraum sediert gehalten. Die erhaltenen Aufnahmen der Aktivitätsanreicherung von **20** sind als Montage in Abbildung 72 in Form von transversalen Schnittbildern dargestellt.

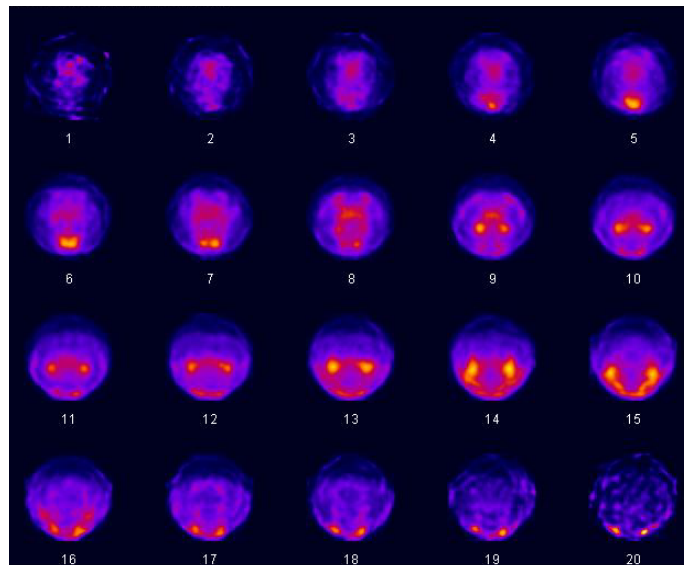


Abbildung 72: Transversale Darstellung der rekonstruierten Schnittbilder von [^{18}F]DDIC1 als Montage

Wegen des Fehlens einer ausgereiften Auswertesoftware und da nur Daten aus der Kopffregion des Versuchstieres gesammelt werden konnten, sind die erhaltenen Bilder nur bedingt geeignet, um anatomische Strukturen zuzuordnen. Bedenkt man, dass der Kopf einer Ratte eine Länge von etwa 4 cm erfasst, dann sind die zweite und dritte Bildreihe für eine Auswertung relevant. Von diesen Bildern wiederum sollte die Region des Hippocampus in Schnittbild 9 und 10 wiederzufinden sein. Eine einwandfreie Interpre-

tation fällt jedoch schwer und es ist tendentiell davon auszugehen, dass keine signifikante Anreicherung im NMDA-reichen Hippocampus stattgefunden hat.

Eine Klärung dieses Sachverhalts sollte eine Durchführung des Experiments mit der ^{11}C -methylierten Verbindung [^{11}C]DDIC5 (**23**) an einem in Serie hergestellten μ -PET-Scanner der Firma Siemens (μ -PET Focus 120) bringen. Der Scanner ist aus 4 Ringen aufgebaut, die jeweils 42 Detektorblöcke beherbergen und Ganzkörperaufnahmen mit einer Ortsauflösungen von ca. 1,5 mm ermöglichen.

Für die Durchführung des Experiments wurde eine gesunde, männliche Maus (30 g) mit Isofluran über ein Beatmungsgerät anästhesiert. Es wurden 31 MBq [^{11}C]DDIC5 (**23**) in 50 μL isotonischer Kochsalzlösung i.v. über die Schwanzvene injiziert und anschließend Koinzidenzdaten für einen Zeitraum von 30 min gesammelt.

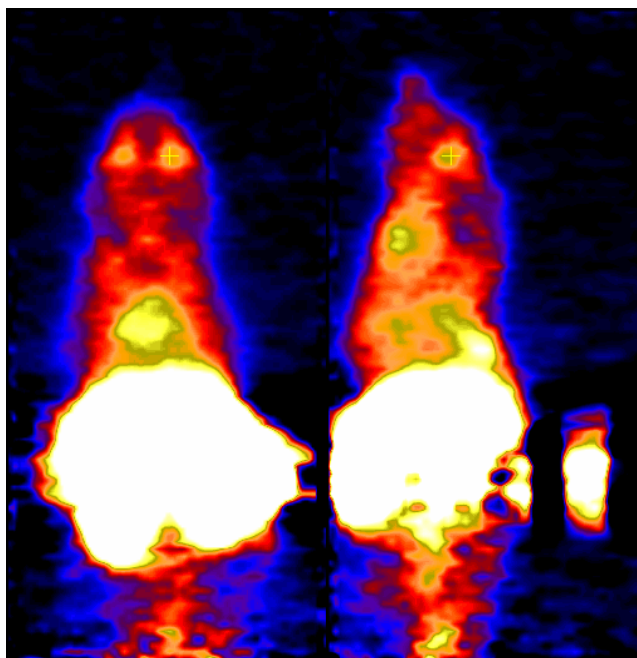


Abbildung 73: Koronare und sagittale Darstellung der rekonstruierten Schnittbilder von [^{11}C]DDIC5

Rein qualitativ kann aus den erhaltenen Bilddaten in Abbildung 73 darauf geschlossen werden, dass keine *in vivo*-Aktivität des markierten Liganden vorliegt. Die gesamte Aktivität wurde nahezu vollständig in den Verstoffwechslungsorganen vorgefunden. Ein Teil der Aktivität wurde unter anderem in den Hader'schen Drüsen vorgefunden, die sich hinter den Augen befinden und in denen auch bei anderen radioaktiv markierten Verbindungen eine Anreicherung stattfindet.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros, Alfa Aesar, Fisher Scientific, Fluka, Lancaster und Merck bezogen. Falls erforderlich, wurden Chemikalien und Lösungsmittel nach Standardmethoden gereinigt und getrocknet. Die wichtigsten Chemikalien sind in Tabelle 12 aufgeführt:

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Aceton	Puris., absolut	Fluka
Acetonitril	Puris., absolut	Fluka
	HPLC-Grade	Fisher Scientific
4-Aminophenol	Zur Synthese	Merck
3-Aminophenol	>98 %	Alfa Aesar
2-Aminophenol	99 %	Lancaster
2-Amino-4-chlorphenol	97 %	Alfa Aesar
Ammoniumacetat * 3 H ₂ O	Zur Analyse	Acros
4-Methoxyanilin	>98 %	Fluka
1-Brom-2-fluorethan	97 %	Lancaster
Benzylchlorid	Puris.	Fluka
2-Chlor-4-nitrophenol	97 %	Alfa Aesar
Chloroform	Puris., absolut	Acros
Dichlormethan	Puris., absolut	Fluka
1,2-Dichlorethan	Puris., absolut	Fluka
3,5-Dichlorphenylhydrazin	98 %	ABCR
Dimethylformamid	Puris., absolut	Fluka
Dimethylsulfoxid	Puris., absolut	Fluka
Dioxan	Zur Analyse	Fluka
Diethylether	Puris., absolut	Fluka
	Techn.	Acros
Eisessig	99,8 %	Riedel-de Haen
Essigsäureethylester	Puris., absolut	Acros
Ethanol	Absolut, reinst	Merck
Ethylen-1,2-ditosylat	Zur Synthese/>99 %	Merck
Ethylpyruvat	Zur Synthese	Merck

n-Hexan	Purum/>98 %	Acros
Kaliumcarbonat	p.p.a./>99 %	Fluka
Kaliumhydroxid	Zur Synthese	Merck
Kryptofix [®] 2.2.2.	Zur Synthese/>99 %	Merck
Lithiumiodid (wasserfrei)	purum	Fluka
Methylglycinathydrochlorid	Zur Synthese	Merck
Methanol	p.a., absolut	Merck
N-Methylformanilid	Zur Synthese	Merck
Natriumhydrid	Purum	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Zur Analyse	Merck
Natriumcarbonat	99 %	Lancaster
Natriumhydroxid	>98 %	Acros
Natriumiodid	reinst	Merck
Natriumsulfat	p.p.a./>99 %	Fluka
Natriumtriacetatborhydrdi	Techn., >90 %	Fluka
4-Nitrophenol	99 %	Acros
3-Nitrophenol	99 %	Acros
2-Nitrophenol	99 %	Acros
Phosphorylchlorid	Zur Synthese	Merck
Paladium/Kohlenstoff (10 %)	Zur Synthese	Merck

Für dünnenschichtchromatographische Untersuchungen wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien des Typs 60 F₂₅₄ bzw. chemisch modifizierte Schichten RP-18 F₂₅₄ oder Aluminiumoxid-Fertigschichten vom Typ 60 F₂₅₄ neutral der Fa. Merck verwendet. Säulenchromatographische Trennungen wurden mit Kieselgel 60 (Partikelgröße 0,040 - 0,063 mm) der Fa. Merck oder basischem Aluminiumoxid (Typ 507 C, Partikelgröße 0,05 - 0,15 mm) der Fa. Fluka durchgeführt. Die Detektion der Chromatographiezonen erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Die Festphasenabtrennung erfolgte an Sep-Pak[®]-Accell[™]plus-QMA-, Sep-Pak[®]-C₁₈-, und Alumina[®]B-Kartuschen der Fa. Waters sowie LiChrolute[®]EN-Kartuschen der Fa. Merck.

Die Charakterisierung der synthetisierten Substanzen erfolgte mit ¹H-NMR, ¹³C-NMR und durch Massenspektroskopie an folgenden Geräten:

NMR-Spektroskopie: 300 MHz FT-NMR Spektrometer (Bruker AC-300)
400 MHz FT-NMR Spektrometer (Bruker AM-400)

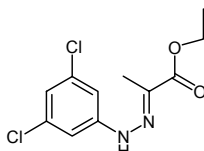
Massenspektroskopie: MAT 90-Spektrometer (FD) der Fa. Finnigan

Die ¹³C-NMR-Spektren wurden ¹H-Breitband-entkoppelt aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden CDCl₃ und DMSO-d₆ verwendet.

6.2 Synthese der Referenzverbindungen und Markierungs- vorläufer

6.2.1 Synthese von 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)- -indol-2-carbonsäureethylester (5)

6.2.1.1 2-(E/Z)-2-(3,5-Dichlorphenyl)hydrazono)propionsäureethyl-ester (2)



$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_2$ (M_r : 275,13)

5 g 3,5-Dichlorphenylhydrazin (28,2 mmol) wurden in 45 mL EtOH vorgelegt und unter Zutropfen mit 3,28 g (3,11 mL, 28,2 mmol) Ethylpyruvat in 10 mL EtOH versetzt. Nach Rühren über Nacht wurde der Ansatz zur Aufarbeitung bis zur Trockne eingengt.

Ausbeute: 7,6 g (27,6 mmol) orangefarbener Feststoff (98 %)

R_f (EE/n-Hexan 1/10): 0,68 (Z-Isomer)

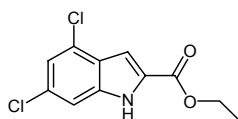
R_f (EE/n-Hexan 1/10): 0,20 (E-Isomer)

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 274.1 (100, $[M]^+$), 274.5 (14.7), 276.1 (61.2), 277.1 (13.4)

Z-Isomer: 1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]: 11.79 (s, 1H, In-NH), 7.27 (t, 1H, Ar-CH), 6.98 (t, 1H, Ar-CH), 4.23 (q, 2H, CH_2), 2.08 (s, 3H, CH_3), 1.27 (t, 3H, CH_3)

E-Isomer: 1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]: 10.08 (s, 1H, In-NH), 7.21 (t, 1H, Ar-CH), 7.02 (t, 1H, Ar-CH), 4.19 (q, 2H, CH_2), 2.05 (s, 3H, CH_3), 1.25 (t, 3H, CH_3)

6.2.1.2 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäureethylester (3)



$C_{11}H_9Cl_2NO_2$ (M_r : 258,10)

In einem offenem 250 mL Becherglas wurden 25 mL Polyphosphorsäure auf der Heizplatte eines Magnetrührers auf etwa 70 °C erwärmt. Die Temperaturkontrolle hierzu erfolgte mittels eines mit Siliconöl gefüllten Becherglases, das zusätzlich auf die Heizplatte gestellt und in das ein Thermometer eingebracht wurde, das an einem Stativ mittels Klammer fixiert wurde. 7,6 g (28 mmol) 2-(E/Z)-2-(3,5-Dichlorphenyl)hydrazono)propionsäureethylester wurden langsam portionsweise mit einem Glasstab eingerührt und für 10 min auf 120-130 °C erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde vorsichtig mit Eis hydrolysiert, dann mit Ethylacetat verdünnt bis sich der Niederschlag löst, und abschliessend mit NaOH-Plätzchen unter Rühren neutralisiert. Nach mehrmaligem Extra-

hieren mit Ethylacetat wurden die vereinigten organischen Phasen mit MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt.

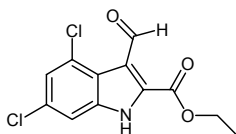
Ausbeute: 6,6 g (26 mmol) hellbrauner Feststoff (93 %)

$R_f(\text{EE}/n\text{-Hexan } 1/3)$: 0,77

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 257.0 (100, $[\text{M}]^+$), 258,1 (10.4), 259,1 (60.7), 260.1 (12.1), 261.1 (13.6)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6), δ [ppm]: 12.41 (s, 1H, In-NH), 7.43 (t, 1H, CH-Ar), 7.26 (d, 1H, CH-Ar), 7.10 (d, 1H, CH), 4.34 (q, 2H, CH_2), 1.36 (t, 3H, CH_3),

6.2.1.3 4,6-Dichlor-3-formyl-indol-2-carbonsäureethylester (4)



$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (M_r : 286,11)

Variante 1:

Unter einer Schutzgasatmosphäre aus Argon wurden 7,0 g (27 mmol) 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäureethylester und 3,65 g (27 mmol) N-Methylformanilid in 20 mL 1,2-Dichlorethan vorgelegt und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 30 mL 1,2-Dichlorethan und 4,1 g (27 mmol) Phosphorylchlorid wurde 8 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde der Ansatz auf eine eiskalte Lösung aus 8g Natriumacetat-Trihydrat und 13 g Eis gegeben und über Nacht im Kühlschrank auskristallisiert. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, im Hochvakuum getrocknet und aus Ethylacetat umkristallisiert.

Ausbeute: 4,6 g (16,0 mmol) gelber, kristalliner Feststoff (60 %)

$R_f(\text{EE}/n\text{-Hexan } 1/3)$: 0,38

Variante 2:

Unter einer Schutzgasatmosphäre aus Argon wurden 3,67 g (43,2 mmol) Phosphorylchlorid und 6,1 g N-Methylformanilid (45 mmol) vorgelegt und bei Raumtemperatur gerührt bis ein orangefarbener Feststoff auskristallisiert. Nach Zugabe von 30 mL 1,2-Dichlorethan und 7,0 g (27 mmol) 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäureethylester wurde 8 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung auf eine eiskalte Lösung aus 29,7 g Natriumacetat-Trihydrat und 58 g Eis gegeben und über Nacht im Kühlschrank auskristallisiert. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, im Hochvakuum getrocknet und aus Ethylacetat umkristallisiert.

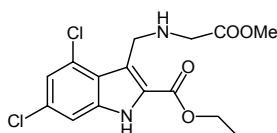
Ausbeute: 5,9 g (20,6 mmol) gelber, kristalliner Feststoff (76 %)

$R_f(\text{EE}/n\text{-Hexan } 1/3)$: 0,38

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 285.3 (100, [M]⁺), 286.3 (8.2), 287.3 (63.3), 288.3 (6.7), 289.3 (9.14)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 13.16 (s, 1H, In-NH), 10.64 (s, 1H, CHO), 7.53 (d, 1H, CH-Ar), 7.38 (d, 1H, CH-Ar), 4.43 (q, 2H, CH₂), 1.34 (t, 3H, CH₃),

6.2.1.4 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (5)



C₁₅H₁₆Cl₂N₂O₄ (M_r: 359,2)

Unter einer Schutzgasatmosphäre aus Argon wurden 878 mg (7 mmol) Glycinsäuremethylester in 20 mL Dichlormethan suspendiert und mit 1,06 g (1460 µL, 10,5 mmol) Triethylamin versetzt. Nach 10 Minuten wurden 2 g (7 mmol) 4,6-Dichlor-3-formylindol-2-carbonsäureethylester zugegeben und weitere 15 min gerührt. Anschließend wurden 2,4 g (11 mmol) Na(OAc)₃BH zugegeben und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur Rühren gelassen. Die Reaktion wird mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (20 mL) beendet, mit Ethylacetat verdünnt und über MgSO getrocknet.

Ausbeute: 1,9 g (5,2 mmol) hellbrauner Feststoff (75 %)

R_f(EE/n-Hexan 5/1): 0,44

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 358.5 (100, [M]⁺), 359.5 (26.4), 360.5 (60.52), 361.5 (16.1), 362.5 (9.9), 363.5 (1.81)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 12.14 (s, 1H, In-NH), 7.42 (d, 1H, CH-Ar), 7.20 (d, 1H, CH-Ar), 4.35 (q, 2H, CH₂), 3.48 (s, 3H, CH₃O), 3.33 (s, 2H, CH₂), 3.33 (s, 2H, CH₂), 1.98 (s, 1H, NH), 1.35 (t, 3H, CH₃),

6.2.2 Darstellung fluorethylsubstituierter Aminophenole

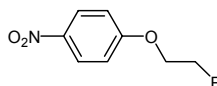
Allgemeine Vorschrift zur Darstellung Fluorethyl-substituierter Nitrophenole

40 mmol Nitrophenol wurden in 40 mL Aceton gelöst, mit 6,10 g (44 mmol) Kaliumcarbonat und 5,50 g (44 mmol) 1,2-Bromfluorethan versetzt und für 48 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 150 mL Wasser aufgenommen und die wässrige Phase zweimal mit jeweils 75 mL Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit jeweils 50 mL einer 10%igen Natriumhydroxidlösung gewaschen und getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das erhaltene Produkt ohne weitere Aufreinigung für die nächste Stufe eingesetzt.

Allgemeine Vorschrift zur katalytischen Reduktion Fluorethyl-substituierter Nitrophenole

3,0 g (16 mmol) 1-(2-Fluorethoxy)-nitrobenzol wurden in 80 mL Methanol gelöst, mit 400 mg Palladium (10 % auf Aktivkohle) versetzt und unter DC-Kontrolle bei Raumtemperatur und 1 bar Wasserstoffdruck hydriert. Anschließend wurde vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingengt und durch Säulenchromatographie gereinigt.

6.2.2.1 1-(2-Fluorethoxy)-4-nitrobenzol (6a)



$C_8H_8FNO_3$ (M_r : 185,15)

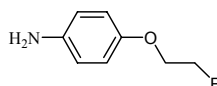
Ausbeute: 3,1 g (18 mmol) hellroter Feststoff (45 %)

R_f (EE/n-Hexan 1/1): 0,87

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 184.5 (100, $[M]^+$), 185.5 (12.4)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]= 8.23 (d, 2H, Ar- CH_a), 7.01 (d, 2H, Ar- CH_b), 4.77 (dt, 2H, CH_2), 4.28 (dt, 2H, CH_2)

6.2.2.2 4-(2-Fluorethoxy)anilin (7a)



$C_8H_{10}FNO$ (M_r : 155,17)

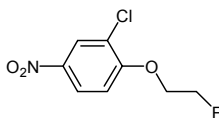
Ausbeute: 1,4 g (9,9 mmol) hellbrauner Feststoff (54 %)

R_f (EE/n-Hexan 1/1): 0,44

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 155.1 (100, $[M]^+$), 156.1 (10.7)

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]= 6.61 (d, 2H, Ar- CH_a), 6.49 (d, 2H, Ar- CH_b), 4.56 (dt, 2H, CH_2), 3.98 (dt, 2H, CH_2), 3.43 (br s, 2H, NH_2)

6.2.2.3 2-Chlor-1-(2-fluorethoxy)-4-nitrobenzol (6b)



$C_8H_7ClFNO_3$ (M_r : 219,6)

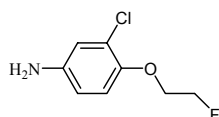
Ausbeute: 3,9 g (17,5 mmol) gelber Feststoff (46 %)

R_f (EE/n-Hexan 3/2): 0,85

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 219.2 (100, $[M]^+$), 220.2 (7.2), 221.2 (28.8)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]= 8.29 (d, 1H, Ar-CH), 8.13 (dd, 1H, Ar-CH), 6.99 (d, 1H, Ar-CH), 4.92-4.90 (m, 1H CH_2), 4.77-4.74 (m, 1H CH_2), 4.45-4.42 (m, 1H CH_2), 4.35-4.32 (m, 1H, CH_2)

6.2.2.4 3-Chlor-4-(2-fluorethoxy)anilin (7b)



C_8H_9ClFNO (M_r : 189,61)

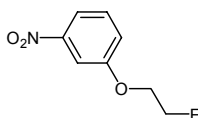
Ausbeute: 1,4 g (17,5 mmol) hellbrauner Feststoff (54 %)

R_f (EE/n-Hexan 3/2): 0,67

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 189.2 (100, $[M]^+$), 190.2 (7.8), 191.2 (32.8)

1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$), δ [ppm]= 6.85 (d, 1H, Ar-CH), 6.62 (d, 1H, Ar-CH), 6.46 (dd, 1H, Ar-CH), 4.94 (s, 2H, NH_2), 4.75-4.72 (m, 1H CH_2), 4.59-4.56 (m, 1H CH_2), 4.16-4.13 (m, 1H CH_2), 4.06-4.03 (m, 1H, CH_2)

6.2.2.5 1-(2-Fluorethoxy)-3-nitrobenzol (6c)



$C_8H_8FNO_3$ (M_r : 185,15)

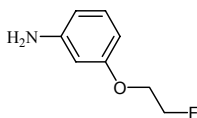
Ausbeute: 6,6 g (36 mmol) hellgelber Feststoff (81 %)

R_f (EE/n-Hexan 1/1): 0,93

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 184.5 (100, $[M]^+$), 185.5 (9.1)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]= 7.84 (dd, 1H, Ar-CH), 7.73 (t, 1H, Ar-CH), 7.43 (t, 1H, Ar-CH), 7.27 (d, 1H, Ar-CH), 4.86 (m, 1H CH_2), 4.70 (m, 1H CH_2), 4.33 (m, 1H CH_2), 4.24 (m, 1H CH_2)

6.2.2.6 3-(2-Fluorethoxy)anilin (7c)



$C_8H_{10}FNO$ (M_r : 155,17)

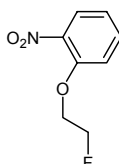
Ausbeute: 2,1 g (14 mmol) orangefarbener Feststoff (84 %)

R_f (EE/n-Hexan 1/1): 0,65

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 155.1 (100, $[M]^+$), 156.1 (10.7)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 6.88 (t, 1H, Ar-CH), 6.17-6.06 (m, 3H, Ar-CH), 5.05 (s, 2H, NH_2), 4.76 (t, 1H CH_2), 4.60 (t, 1H CH_2), 4.13 (t, 1H CH_2), 4.03 (t, 1H CH_2)

6.2.2.7 1-(2-Fluorethoxy)-2-nitrobenzol (6d)



$C_8H_8FNO_3$ (M_r : 185,15)

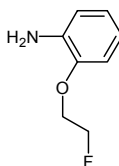
Ausbeute: 4,3 g (23 mmol) hellbrauner Feststoff (53 %)

R_f (EE/Chloroform 1/10): 0,91

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 184.5 (100, $[M]^+$), 185.5 (7.8)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]= 7.82 (dd, 1H, Ar-CH), 7.51 (dt, 1H, Ar-CH), 7.10-7.03 (m, 2H, Ar-CH), 4.87-4.84 (m, 1H CH_2), 4.71-4.68 (m, 1H CH_2), 4.42-4.38 (m, 1H CH_2), 4.32-4.29 (m, 1H CH_2)

6.2.2.8 2-(2-Fluorethoxy)anilin (7d)



$C_8H_{10}FNO$ (M_r : 155,17)

Ausbeute: 1,7 g (11 mmol) dunkelroter Feststoff (68 %)

R_f (EE/Chloroform 1/10): 0,69

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 155.1 (100, $[M]^+$), 156.1 (8.3)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 6.79 (d, 1H, Ar-CH), 6.74-6.62 (m, 2H, Ar-CH), 6.52-6.43 (m, 1H CH_2), 4.68 (s, 2H, NH_2), 4.65 (t, 1H CH_2), 4.21 (t, 1H CH_2), 4.11 (t, 1H CH_2)

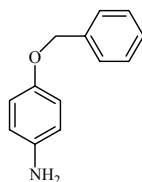
6.2.3 Darstellung benzylgeschützter Aminophenole

Die Darstellung benzylgeschützter Aminophenole wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Bogdal et al. [142] durchgeführt.

Allgemeine Synthesevorschrift:

Eine Mischung aus Aminophenol (5 mmol), 2,76 g (20 mmol) K_2CO_3 , 1,1 g fein pulverisiertem KOH (20 mmol) und 16 mg (0,5 mmol) Tributylammoniumbromid wurden in einem Porzellanmörser gründlich zerrieben und in einen 100 mL Erlenmeyerkolben überführt. Auf das möglichst großflächig verteilte Pulvergemisch wurde tropfenweise 760 mg (690 μ L, 6 mmol) Benzylchlorid verteilt. Der Erlenmeyerkolben wurde mit einem Becherglas lose bedeckt und in einer Mikrowelle bei 360 Watt Leistung in 2-3 Sekundenintervallen für 40 Sekunden derart erhitzt, dass möglichst keine Dämpfe aufsteigen. Der Ansatz wurde abkühlen gelassen und zweimal mit 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Das beschriebene Vorgehen wurde mit 4 Ansätzen hintereinander durchgeführt. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ wurde das Lösungsmittel entfernt und der verbleibende schwarze Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

6.2.3.1 4-(Benzyloxy)anilin (13a)



$C_{13}H_{13}NO$ (M_r : 199,25)

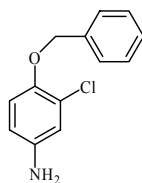
Ausbeute: 2,4 g (12,3 mmol) hellroter Feststoff (61 %)

R_f (EE): 0,75

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 199.5 (100, $[M]^+$), 200.5 (12.8)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 7.41-7.25 (m, 5H, CH-Ar), 6.70 (dt, 2H, CH-Ar), 6.48 (dt, 2H, CH-Ar), 4.92 (s, 2H, CH_2), 4.62 (s, 2H, NH_2)

6.2.3.2 4-(Benzyloxy)-3-chlor-anilin (13b)



$C_{13}H_{13}NO$ (M_r : 233,69)

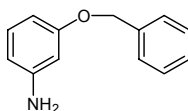
Ausbeute: 1,1 g (4,9 mmol) hellbrauner Feststoff (24 %)

R_f (EE/Hexan 1/4): 0,5

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 233.5 (100, $[M]^+$), 234.5 (13.8), 235.5 (31.5), 236.5 (3.9)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 7.45 (d, 2H, Ar-CH), 7.40-7.28 (m, 3H, Ar-CH), 6.81 (d, 1H, Ar-CH), 6.65 (d, 1H, Ar-CH), 6.45 (dd, 1H, Ar-CH), 5.06 (s, 2H, CH_2), 5.04 (s, 2H, NH_2)

6.2.3.3 3-(Benzyloxy)anilin (13c)



$C_{13}H_{13}NO$ (M_r : 199,25)

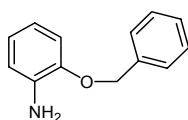
Ausbeute: 1,4 g (7,0 mmol) hellbrauner Feststoff (35 %)

R_f (EE/n-Hexan 1/3): 0,48

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 199.5 (100, $[M]^+$), 200.5 (14.9)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 7.41-7.27 (m, 5H, Ar-CH), 6.88 (t, 1H, Ar-CH), 6.19 (t, 1H, Ar-CH), 6.14 (dd, 2H, Ar-CH), 5.04 (s, 2H, CH_2), 4.97 (s, 2H, NH_2)

6.2.3.4 2-(Benzyloxy)anilin (13d)



$C_{13}H_{13}NO$ (M_r : 199,25)

Ausbeute: 2,1 g (10,6 mmol) hellbrauner Feststoff (53 %)

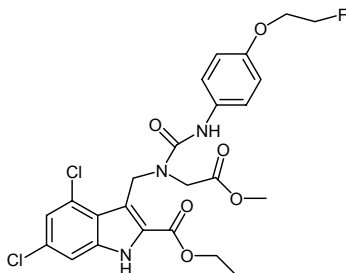
R_f (EE/n-Hexan 1/2): 0,64

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 199.5 (100, $[M]^+$), 200.5 (17.2)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]= 7.45-7.30 (m, 5H, Ar-CH), 6.86-6.70 (m, 4H, Ar-CH), 5.07 (s, 2H, CH_2), 4.40-3.00 (br.s, 2H, NH_2),

6.2.4 4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (DDIC1, 11a)

6.2.4.1 4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (9a)



$C_{24}H_{24}Cl_2FN_3O_6$ (M_r : 540,37)

110 mg (0,37 mmol) Triphosgen wurden unter Argonatmosphäre in 4 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde innerhalb einer halben Stunde eine Lösung von 155 mg (1 mmol) 4-(2-Fluorethoxy)anilin und 187 μ L (1,1 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 4 mL Dichlormethan langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde 30 Minuten gerührt und dann eine Lösung von 359 mg (1 mmol) 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester und 187 μ L (1,1 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 5 mL Dichlormethan schnell zugegeben. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmt, 60 Minuten gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 mL Ethylacetat aufgenommen und nacheinander mit 5%iger Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Feststoff in 15 mL Diethylether aufgenommen. Die resultierende Suspension wurde 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt und der Rückstand, welcher das Produkt darstellte, abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

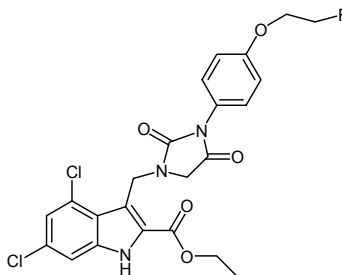
Ausbeute: 328 mg (0,63 mmol) weißer Feststoff (61 %)

R_f (Al_2O_3 , $CHCl_3$ /Aceton 4/1): 0,63

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 336.4 (36.8, $[C_{17}H_{18}F_2N_2O_3]^+$), 337.4 (6.6), 338.4 (0.6), 507.4 (82.9, $[C_{23}H_{20}Cl_2FN_3O_5]^+$), 508.4 (20.4), 509.4 (56.9), 510.4 (14.8), 511.4 (8.1), 512.4 (2.2), 539.4 (100, $[M]^+$), 540.4 (23.8), 541.4 (68.5), 542.4 (17.3), 543.4 (11.2)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 12.44 (s, 1H, In-NH), 8.55 (s, 1H, NH), 7.46 (d, 1H, CH-Ar), 7.26 (m, 2H, CH-Ar), 7.22 (d, 1H, CH-Ar), 6.87 (dd, 2H, CH-Ar), 5.19 (s, 2H, CH_2), 4.79 (m, 1H, CH_2), 4.62 (m, 1H, CH_3), 4.33 (q, 2H, CH_2), 4.23 (m, 1H, CH_2), 4.12 (m, 1H, CH_2), 3.49 (s, 2H, CH_2), 1.32 (t, 3H, CH_3)

6.2.4.2 4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (10a)



$C_{23}H_{20}Cl_2FN_3O_5$ (M_r : 508,33)

560 mg (1,00 mmol) 4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester wurden in 5 mL EtOH unter Argon suspendiert und mit einer Lösung von 35 mg (0,5 mmol) Natriumethanolat in 1 mL EtOH versetzt. Es wurde für 60 Minuten bei RT gerührt und im Anschluss mit 10%iger Salzsäure angesäuert. Der Ansatz wurde mit Dichlormethan verdünnt und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird der verbleibende Rückstand säulenchromatographisch an neutralem Aluminiumoxid mit Chloroform/Aceton (4/1) als Eluens aufgereinigt.

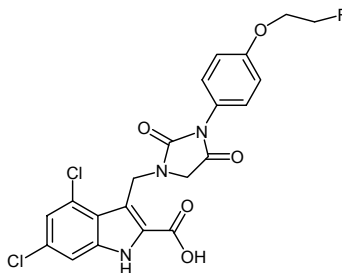
Ausbeute: 370 mg (0,72 mmol) weißer Feststoff (70 %)

$R_f(Al_2O_3, CHCl_3/Aceton\ 4/1)$: 0,87

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 507.4 (100, $[M]^+$), 508.4 (17.4), 509.4 (50.6), 510.4 (6.6), 511.4 (4.1)

1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$), δ [ppm]= 12.43 (s, 1H, In-NH), 7.48 (d, 1H, CH-Ar), 7.26 (s, 1H, CH-Ar), 7.23 (d, 2H, CH-Ar), 7.04 (d, 2H, CH-Ar), 5.24 (s, 2H, CH_2), 4.82 (t, 1H, CH_2), 4.66 (t, 2H, CH_2), 4.66 (t, 1H, CH_2), 4.40 (q, 2H, CH_2), 4.31 (t, 1H, CH_2), 4.21 (t, 1H, CH_2), 3.79 (s, 2H, CH_2), 1.37 (t, 3H, CH_3)

6.2.4.3 4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (11a)



C₂₁H₁₆Cl₂FN₃O₅ (M_r: 480,27)

140 mg (0,28 mmol) 4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester wurden in 4,5 mL Tetrahydrofuran gelöst, mit 500 µL Wasser verdünnt und mit 200 µL einer wässrigen 2 M Natriumhydroxid-Lösung versetzt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur unter DC-Kontrolle gerührt, nach beendeter Umsetzung mit 5 mL Ethylacetat und 5 mL Wasser verdünnt und die beiden Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit 2 M Salzsäure bis zur vollständigen Ausfällung des Niederschlages versetzt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Die ausgefallene Säure wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 104 mg (0,11 mmol) weißer Feststoff (79 %)

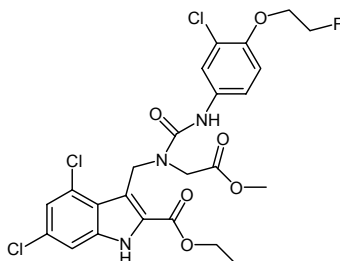
R_f(CHCl₃/Aceton 4/1 +3 % HCOOH): 0,49

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 480.0 (100, [M]⁺), 481.0 (24.1), 482.0 (60.5), 483.0 (12.3), 484.1 (6.0)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 11.91 (s, 1H, In-NH), 7.42 (d, 1H, CH-Ar), 7.40 (s, 1H, CH-Ar), 7.12 (s, 1H, CH-Ar), 6.82 (d, 2H, CH-Ar), 5.22 (s, 2H, CH₂), 4.78 (t, 1H, CH₂), 4.62 (t, 1H, CH₂), 4.20 (t, 1H, CH₂), 4.10 (t, 1H, CH₂), 3.79 (s, 2H, CH₂)

6.2.5 4,6-Dichlor-3-((3-(3-chlor-4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (DDIC2, 11b)

6.2.5.1 4,6-Dichlor-3-((3-(3-chlor-4-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäure-ethylester (9b)



$C_{24}H_{23}Cl_3FN_3O_6$ (M_r : 574,81)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.1

Ansatz:

110 mg (0,37 mmol) Triphosgen

155 mg (1 mmol) 3-Chlor-4-(2-fluorethoxy)anilin

359 mg (1 mmol) 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

384 μ L (2,2 mmol) N-Ethyldiisopropylamin

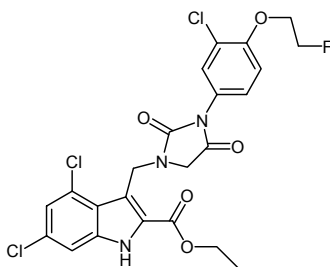
Ausbeute: 400 mg (0,70 mmol) weißer Feststoff (70 %)

R_f (Al_2O_3 , THF/n-Hexan 1/3): 0,22

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 541.1 (96.8), 542.1 (23.4), 543.1 (100, $[M]^+$), 544.1 (22.4), 545.1 (31.2), 546.1 (6.5), 547.1 (3.3), 548.1 (0.4) 573.1 (45.7), 574.1 (12.4), 575.1 (41.7), 576.1 (8.9), 577.1 (13.4), 578.1 (1.5), 579.1 (0.4)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 12.39 (s, 1H, In-NH), 7.65-7.61 (m, 1H, Ar-CH), 7.47-7.44 (m, 1H, Ar-CH) 7.27-7.22 (m, 2H, Ar-CH), 7.08 (d, 1H, Ar-CH), 5.18 (s, 2H, CH_2), 4.84-4.80 (m, 1H, CH_2), 4.68-4.64 (m, 1H, CH_2), 4.41-4.29 (m, 3H), 4.21-4.19 (m, 1H, CH_2), 3.82 (s, 2H, CH_2), 3.48 (s, 3H, OCH_3), 1.31 (t, 3H, CH_3)

6.2.5.2 4,6-Dichlor-3-((3-(3-chlor-4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure-ethylester (10b)



$C_{23}H_{19}Cl_3FN_3O_5$ (M_r : 542,77)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.2

Ansatz:

500 mg (0,87 mmol) 4,6-Dichlor-3-((3-(3-chlor-4-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

30 mg (0,43 mmol) Natriumethanolat

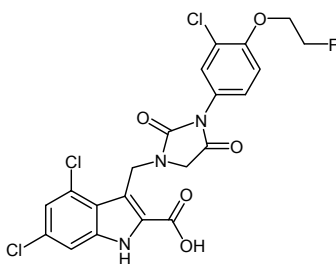
Ausbeute: 405 mg (0,75 mmol) weißer Feststoff (86 %)

$R_f(Al_2O_3, THF/n\text{-Hexan } 1/3)$: 0,82

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 541.1 (94.2), 542.1 (17.9), 543.1 (100, $[M]^+$), 544.1 (25.6), 545.1 (29.2), 546.1 (4.1), 547.1 (2.7)

1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$), δ [ppm]= 12.43 (s, 1H, In-NH), 7.45 (dd, 2H, Ar-CH), 7.26 (dd, 3H, Ar-CH), 5.24 (s, 2H, CH_2), 4.86-4.84 (m, 1H, CH_2), 4.70-4.68 (m, 1H, CH_2), 4.43-4.36 (m, 3H), 4.33-4.30 (m, 1H, CH_2), 3.79 (s, 2H, CH_2), 1.36 (t, 3H, CH_3)

6.2.5.3 4,6-Dichlor-3-((3-(3-chlor-4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (11b)



$C_{21}H_{15}Cl_3FN_3O_5$ (M_r : 514,72)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.3

Ansatz:

300 mg (0,55 mmol) 4,6-Dichlor-3-((3-(3-chlor-4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

300 μ L Natriumhydroxid-lösung

Ausbeute: 130 mg (0,25 mmol) weißer Feststoff (46 %)

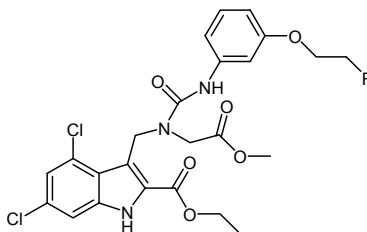
R_f(CHCl₃/Aceton 4/1 + 3 % HCOOH): 0,36

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 512.7 (79.7), 513.7 (15.6), 514.7 (100, [M]⁺), 515.6 (28.1), 517.7 (6.0)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 12.11 (s, 1H, In-NH), 7.44 (s, 2H, Ar-CH), 7.31-7.23 (m, 2H, Ar-CH), 7.15 (d, 1H, Ar-CH), 5.31 (s, 2H, CH₂), 4.87-4.82 (m, 1H, CH₂), 4.70-4.68 (m, 1H, CH₂), 4.44-4.38 (m, 1H, CH₂), 4.33-4.29 (m, 1H, CH₂), 3.82 (s, 2H, CH₂)

6.2.6 4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (DDIC3, 11c)

6.2.6.1 4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (9c)



C₂₄H₂₄Cl₂FN₃O₆ (M_r: 540,37)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.1

Ansatz:

110 mg (0,37 mmol) Triphosgen

155 mg (1 mmol) 3-(2-Fluorethoxy)anilin

359 mg (1 mmol) 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

384 μL (2,2 mmol) N-Ethyldiisopropylamin

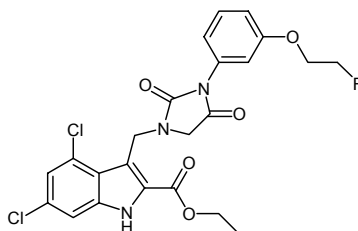
Ausbeute: 260 mg (0,48 mmol) weißer Feststoff (48 %)

R_f(Al₂O₃, CHCl₃/Aceton 10/1): 0,63

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 506.9 (41.1), 507.9 (6.4), 508.9 (28.7), 509.9 (3.2), 539.3 (100, [M]⁺), 540.3 (25.9), 541.3 (70.3), 542.3 (18.4), 543.4 (13.2), 544.3 (2.5), 545.4 (0.9)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 12.40 (s, 1H, In-NH), 8.69 (s, 1H, CH-Ar), 7.46 (d, 1H, CH-Ar), 7.22 (d, 1H, CH-Ar), 7.20-7.05 (m, 3H, CH-Ar), 6.55 (dd, 1H, CH-Ar), 5.20 (s, 2H, CH₂), 4.80 (t, 1H, CH₂), 4.64 (t, 1H, CH₂), 4.33 (q, 2H, CH₂), 4.22 (t, 1H, CH₂), 4.11 (t, 1H, CH₂), 3.85 (s, 2H, CH₂), 3.50 (s, 3H, OCH₃), 1.31 (t, 3H, CH₃)

6.2.6.2 4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (10c)



$C_{23}H_{20}Cl_2FN_3O_5$ (M_r : 508,33)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.2

Ansatz:

400 mg (0,74 mmol) 4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

25 mg (0,37 mmol) Natriumethanolat

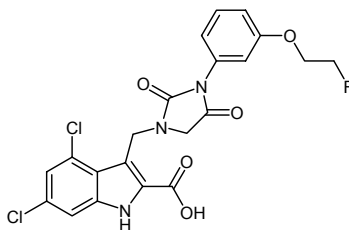
Ausbeute: 330 mg (0,65 mmol) weißer Feststoff (88 %)

$R_f(Al_2O_3, CHCl_3/Aceton 10/1)$: 0,88

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 507.2 (100, $[M]^+$), 508.2 (25.9), 509.3 (61.4), 510.4 (14.6), 511.3 (11.0), 512.5 (5.2)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 12.44 (s, 1H, In-NH), 7.47 (d, 1H, CH-Ar), 7.38 (t, 2H, Ar-CH), 7.25 (d, 1H, CH-Ar), 6.99 (dd, 1H, CH-Ar), 6.94 (m, 2H, CH-Ar), 5.25 (s, 2H, CH_2), 4.81 (t, 1H, CH_2), 4.66 (t, 1H, CH_2), 4.39 (q, 2H, CH_2), 4.28 (t, 1H, CH_2), 4.17 (t, 1H, CH_2), 3.80 (s, 2H, CH_2), 1.37 (t, 3H, CH_3)

6.2.6.3 4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (11c)



$C_{21}H_{16}Cl_2FN_3O_5$ (M_r : 480,27)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.3

Ansatz:

240 mg (0,47 mmol) 4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

250 μ L 2 M Natriumhydroxid-Lösung

Ausbeute: 175 mg (0,36 mmol) weißer Feststoff (77 %)

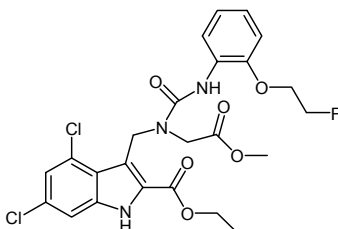
R_f(CHCl₃/Aceton 4/1 + 3 % HCOOH): 0,41

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 479.3 (100, [M]⁺), 480.3 (20.1), 481.3 (70.5), 482.3 (17.0), 483.3 (10.8)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 12.32 (s, 1H, In-NH), 7.44 (d, 1H, CH-Ar), 7.38 (t, 1H, Ar-CH), 7.21 (d, 1H, CH-Ar), 7.00-6.94 (m, 3H, CH-Ar), 5.27 (s, 2H, CH₂), 4.81 (t, 1H, CH₂), 4.65 (t, 1H, CH₂), 4.28 (t, 1H, CH₂), 4.17 (t, 1H, CH₂), 3.81 (s, 2H, CH₂)

6.2.7 4,6-Dichlor-3-((3-(2-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (DDIC4, 11d)

6.2.7.1 4,6-Dichlor-3-((3-(2-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (9d)



C₂₄H₂₄Cl₂FN₃O₆ (M_r: 540,37)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.1

Ansatz:

110 mg (0,37 mmol) Triphosgen

155 mg (1 mmol) 2-(2-Fluorethoxy)anilin

359 mg (1 mmol) 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

384 µL (2,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin

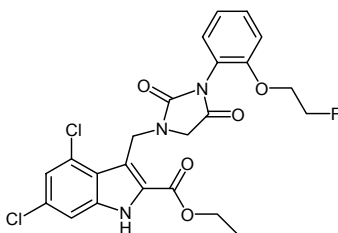
Ausbeute: 342 mg (0,63 mmol) weißer Feststoff (63 %)

R_f(Al₂O₃, CHCl₃/Aceton 10/1): 0,47

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 538.9 (100, [M]⁺), 539.9 (27.3), 540.9 (67.4), 541.9 (15.4), 542.9 (12.4), 543.9 (2.3)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 12.42 (s, 1H, In-NH), 7.88 (s, 1H, NH), 7.79 (dd, 1H, Ar-CH) 7.46 (dd, 1H, CH-Ar), 7.23 (dd, 1H, CH-Ar), 7.05-6.88 (m, 3H, CH-Ar), 5.19 (s, 2H, CH₂), 4.80 (t, 1H, CH₂), 4.64 (t, 1H, CH₂), 4.35 (q, 2H, CH₂), 4.21 (t, 1H, CH₂), 4.31 (t, 1H, CH₂), 3.87 (s, 2H, CH₂), 3.41 (s, 3H, OCH₃), 1.32 (t, 3H, CH₃)

6.2.7.2 4,6-Dichlor-3-((3-(2-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (10d)



$C_{23}H_{20}Cl_2FN_3O_5$ (M_r : 508,33)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.2

Ansatz:

385 mg (0,71 mmol) 4,6-Dichlor-3-((3-(2-(2-fluorethoxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

25 mg (0,36 mmol) Natriumethanolat

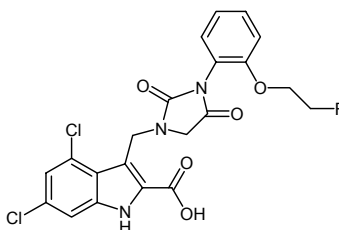
Ausbeute: 250 mg (0,49 mmol) weißer Feststoff (69 %)

$R_f(Al_2O_3, CHCl_3/Aceton 10/1)$: 0,54

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 507.2 (100, $[M]^+$), 508.2 (24.8), 509.2 (70.8), 510.2 (15.0), 511.2 (13.0), 512.2 (1.4)

1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$), δ [ppm]= 12.44 (s, 1H, In-NH), 7.48 (d, 1H, Ar-CH) 7.42 (dt, 1H, CH-Ar), 7.25 (d, 1H, CH-Ar), 7.21 (dt, 2H, Ar-CH), 7.06 (t, 1H, CH-Ar), 5.22 (q, 2H, CH_2), 4.69 (t, 1H, CH_2), 4.53 (t, 1H, CH_2), 4.40 (q, 2H, CH_2), 4.28 (m, 1H, CH_2) 4.18 (t, 1H, CH_2), 3.80 (q, 2H, CH_2), 1.35 (t, 3H, CH_3)

6.2.7.3 4,6-Dichlor-3-((3-(2-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (11d)



$C_{21}H_{16}Cl_2FN_3O_5$ (M_r : 480,27)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.3

Ansatz:

227 mg (0,25 mmol) 4,6-Dichlor-3-((3-(2-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

250 μ L Natriumhydroxid-Lösung

Ausbeute: 120 mg (25 mmol) weißer Feststoff (53 %)

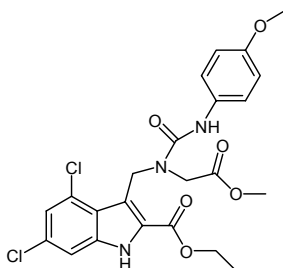
R_f(CHCl₃/Aceton 4/1 + 3 % HCOOH): 0,36

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 479.2 (100, [M]⁺), 480.2 (25.6), 481.2 (58.5), 482.2 (19.8), 483.2 (7.8), 484.2 (2.8)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 12.32 (s, 1H, In-NH), 7.44 (d, 1H, Ar-CH) 7.41-7.38 (m, 1H, CH-Ar), 7.26-7.17 (m, 3H, CH-Ar), 7.05 (dt, 1H, Ar-CH), 5.24 (q, 2H, CH₂), 4.69 (t, 1H, CH₂), 4.53 (t, 1H, CH₂), 4.28 (m, 1H, CH₂), 4.17 (m, 1H, CH₂), 3.80 (q, 2H, CH₂)

6.2.8 4,6-Dichlor-3-((3-(4-methoxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure (DDIC5, 11e)

6.2.8.1 4,6-Dichlor-3-((1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-(4-methoxy-phenyl)-ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (9e)



C₂₃H₂₃Cl₂N₃O₆ (M_r: 508,35)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.1

Ansatz:

110 mg (0,37 mmol) Triphosgen

123 mg (1 mmol) 4-Methoxy-anilin

359 mg (1 mmol) 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

384 µL (2,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin

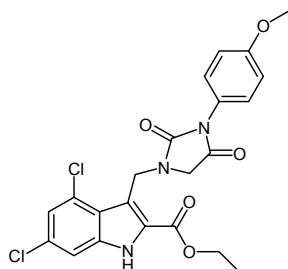
Ausbeute: 340 mg (0,67 mmol) weißer Feststoff (67 %)

R_f(Al₂O₃, CHCl₃/Aceton 10/1): 0,42

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 474.9 (20.4), 475.9 (4.5), 476.9 (11.5), 477.9 (3.1), 478.9 (2.1), 506.9 (100, [M]⁺), 507.9 (25.1), 508.9 (62.9), 509.9 (15.6), 510.9 (11.6), 511.9 (2.3)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 12.38 (s, 1H, In-NH), 7.46 (d, 1H, Ar-CH) 7.35-7.30 (m, 2H, Ar-CH), 7.22 (d, 1H, Ar-CH), 6.82 (d, 2H, Ar-CH), 5.18 (s, 2H, CH₂), 4.33 (q, 2H, CH₂), 3.82 (s, 2H, CH₂), 3.69 (s, 3H, CH₃), 3.48 (s, 3H, OCH₃), 1.31 (t, 3H, CH₃)

6.2.8.2 4,6-Dichlor-3-((3-(4-methoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (10e)



$C_{22}H_{19}Cl_2N_3O_5$ (M_r : 476,31)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.2

Ansatz:

200 mg (0,39 mmol) 4,6-Dichlor-3-((1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-(4-methoxyphenyl)ureido)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

13 mg (0,20 mmol) Natriumethanolat

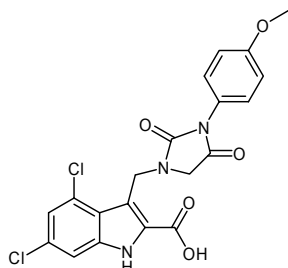
Ausbeute: 144 mg (0,30 mmol) weißer Feststoff (77 %)

$R_f(Al_2O_3, CHCl_3/Aceton 10/1)$: 0,85

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 475.9 (100, $[M]^+$), 476.9 (25.7), 477.9 (58.2), 478.9 (11.9), 479.9 (9.0), 480.9 (0.6)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 12.43 (s, 1H, In-NH), 7.47 (d, 1H, Ar-CH) 7.25 (d, 2H, Ar-CH), 7.21 (m, 1H, Ar-CH), 7.00 (d, 2H, Ar-CH), 5.24 (s, 2H, CH_2), 4.40 (q, 2H, CH_2), 4.53 (t, 1H, CH_2), 4.40 (q, 2H, CH_2), 3.78 (s, 2H, CH_2), 3.76 (s, 2H, CH_2), 1.37 (t, 3H, CH_3)

6.2.8.3 4,6-Dichlor-3-((3-(4-methoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäure (11e)



$C_{20}H_{15}Cl_2N_3O_5$ (M_r : 448,26)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.3

Ansatz:

102 mg (0,21 mmol) 4,6-Dichlor-3-((3-(4-methoxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

110 μ L (0,30 mmol) Natriumhydroxid-lösung

Ausbeute: 52 mg (0,12 mmol) weißer Feststoff (54 %)

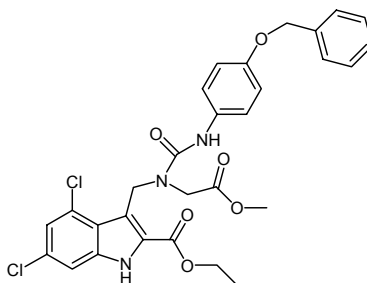
R_f(CHCl₃/Aceton 4/1 + 3 % HCOOH): 0,42

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 447.7 (100, [M]⁺), 448.7 (23.6), 449.7 (67.1), 450.7 (15.5), 451.7 (11.6), 452.7 (1.3)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 12.23 (s, 1H, In-NH), 7.44 (d, 1H, Ar-CH), 7.24-7.19 (m, 3H, CH-Ar), 7.00 (d, 1H, Ar-CH), 5.27 (s, 2H, CH₂), 3.78 (s, 2H, CH₂), 3.76 (s, 3H, CH₃)

6.2.9 4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäure (MV0-DDIC1, 18)

6.2.9.1 3-((3-(4-(Benzyloxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-ureido)-methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester (14a)



C₂₉H₂₇Cl₂N₃O₆ (M_r: 584,45)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.1

Ansatz:

110 mg (0,37 mmol) Triphosgen

199 mg (1 mmol) 4-(Benzyloxy)-anilin

359 mg (1 mmol) 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

384 μL (2,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin

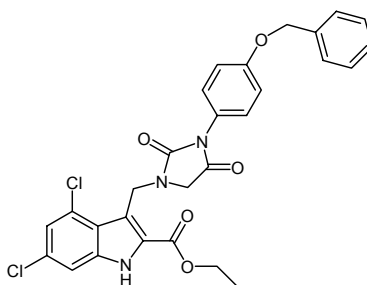
Ausbeute: 371 mg (0,63 mmol) weißer Feststoff (64 %)

R_f(EE/CHCl₃ 4/1/1): 0,75

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 551.8 (100, [M]⁺), 552.9.0 (30.9), 553.8 (73.3), 554.8 (20.8), 555.8 (14.8), 556.8 (2.7); 583.8 (34.3), 584.8 (9.95), 585.8 (25.3), 586.8 (6.5), 587.9 (3.8), 588.9 (1.1)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 12.37 (s, 1H, In-NH), 7.51-7.31 (m, 9H, Ar-CH), 6.91 (d, 2H, Ar-CH), 5.91 (s, 2H, CH₂), 5.05 (s, 2H, CH₂), 4.33 (q, 2H, CH₂), 3.82 (s, 2H, CH₂), 3.49 (s, 3H, OCH₃), 1.32 (t, 3H, CH₃)

6.2.9.2 3-((3-(4-(Benzyloxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester (15a)



$C_{28}H_{23}Cl_2N_3O_5$ (M_r : 552,40)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.2

Ansatz:

580 mg (0,99 mmol) 3-((3-(4-(Benzyloxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)ureido)-methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester

34 mg (0,50 mmol) Natriumethanolat

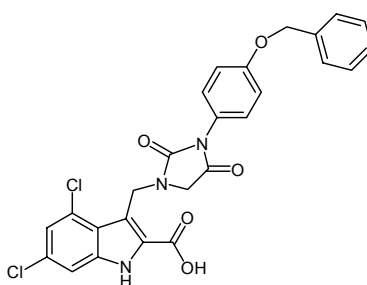
Ausbeute: 443 mg (0,80 mmol) weißer Feststoff (81 %)

R_f (EE/n-Hexan 2/1): 0,92

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 551.8 (100, $[M]^+$), 552.9.0 (27.0), 553.8 (76.4), 554.8 (10.8), 555.8 (6.1)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 12.43 (s, 1H, In-NH), 7.48-7.31 (m, 9H, Ar-CH), 7.23 (d, 1H, Ar-CH), 7.08 (d, 1H, Ar-CH), 5.24 (s, 2H, CH_2), 5.13 (s, 2H, CH_2), 4.40 (q, 2H, CH_2), 3.78 (s, 2H, CH_2), 1.36 (t, 3H, CH_3)

6.2.9.3 3-((3-(4-(Benzyloxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäure (17)



$C_{28}H_{23}Cl_2N_3O_5$ (M_r : 552,40)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.3

Ansatz:

663 mg (1,20 mmol) 3-((3-(4-(Benzyloxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester

760 μ L (1,52 mmol) Natriumhydroxid-lösung

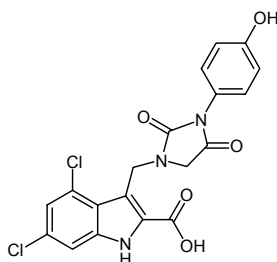
Ausbeute: 545 mg (1,04 mmol) weißer Feststoff (87 %)

R_f(CHCl₃/Aceton 1/1 +3 % HCOOH): 0,60

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 523.8 (100, [M]⁺), 524.8 (31.4), 525.8 (73.8), 526.8 (20.1), 527.8 (12.3), 528.8 (2.5)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 12.27 (s, 1H, In-NH), 7.48-7.31 (m, 8H, Ar-CH), 7.18 (d, 1H, Ar-CH), 6.90 (d, 2H, Ar-CH), 5.18 (s, 2H, CH₂), 5.04 (s, 2H, CH₂), 3.74 (s, 2H, CH₂)

6.2.9.4 4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäure (18)



C₁₉H₁₃Cl₂N₃O₅ (M_r: 434,23)

200 mg (31 mmol) 3-((3-(4-(Benzyloxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäure wurden im 60 °C warmen Wasserbad in 200 mL Methanol gelöst, mit 30 mg Palladium (10 % auf Aktivkohle) versetzt und unter DC-Kontrolle bei Raumtemperatur und 1 bar Wasserstoffdruck hydriert. Anschließend wurde vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingengt und durch Säulenchromatographie gereinigt.

Ausbeute: 90 mg (0,16 mmol) weißer Feststoff (52 %)

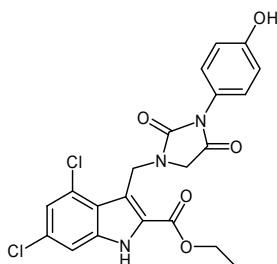
R_f(CHCl₃/Aceton 4/1 +3 %HCCOH): 0,31

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 192.3 (21.5), 365.6 (36.0), 366.7 (5.2), 433.7 (100, [M]⁺), 434.7 (11.0), 435.7 (48.3), 436.7 (7.9), 437.6 (0.6)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 12.22 (s, 1H, In-NH), 9.62 (s, 1H, OH), 7.40 (d, 1H, Ar-CH), 7.17 (d, 1H, Ar-CH), 7.04 (d, 2H, Ar-CH), 6.76 (d, 2H, Ar-CH), 5.21 (s, 2H, CH₂), 3.73 (s, 2H, CH₂)

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 169.7 (C=O), 162.8 (C=O), 157.2 (C-OH), 155.2 (C=O), 137.4 (C-quart.), 130.3 (C-quart.), 128.9 (C-quart.), 128.4 (2 CH.), 127.3 (C-quart.), 123.6 (C-quart.), 122.9 (C-quart.), 121.2 (CH), 115.5 (2 CH), 113.2 (C-quart), 111.6 (CH), 48.8 (CH₂), 36.3 (CH₂)

6.2.10 4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (MV-DDIC1, 16a)



C₂₁H₁₇Cl₂N₃O₅ (M_r: 462,3)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.9.4

Ansatz:

200 mg (0,36 mmol) 3-((3-(4-(Benzyloxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester

30 mg Pd/C (10 %)

Ausbeute: 107 mg (0,19 mmol) weißer Feststoff (63 %)

R_f(EE/n-Hexan 2/1): 0,75

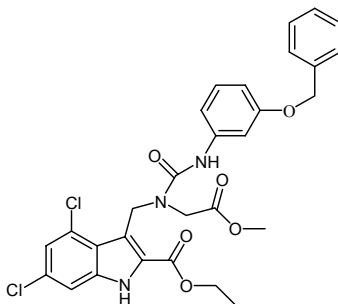
FD-MS= m/z (% rel. Int.) 461.0 (100, [M]⁺), 462.0 (18.1), 463.0 (61.2), 464.0 (15.6), 465.0 (3.2), 466.0 (0.9)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 12.46 (s, 1H, In-NH), 9.73 (s, 1H, OH), 7.48 (d, 1H, Ar-CH), 7.26 (d, 1H, Ar-CH), 7.08 (d, 2H, Ar-CH), 6.81 (d, 2H, Ar-CH) 5.23 (s, 2H, CH₂), 4.39 (q, 2H, CH₂), 3.77 (s, 2H, CH₂), 1.37 (t, 3H, CH₃)

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm]= 169.7 (C=O), 159.7 (C=O), 157.2 (C-OH) 155.2 (C=O), 137.7 (C-quart.), 129.4 (C-quart.), 128.4 (C-quart.), 128.3 (2 CH), 127.5 (C-quart.), 123.6 (C-quart.), 122.8 (C-quart.), 121.7 (CH), 115.6 (2 CH), 114.2 (C-quart), 111.8 (CH), 61.5 (CH₂), 48.8 (CH₂), 36.3 (CH₂), 14.5 (CH₃)

6.2.11 4,6-Dichlor-3-((3-(3-hydroxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

6.2.11.1 3-((3-(3-(Benzyloxy)phenyl)-1-(2-methoxy-2-oxoethyl)-ureido)-methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester (14b)



$C_{29}H_{27}Cl_2N_3O_6$ (M_r : 584,45)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.1

Ansatz:

110 mg (0,37 mmol) Triphosgen

199 mg (1 mmol) 3-(Benzyloxy)-anilin

359 mg (1 mmol) 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

384 μ L (2,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin

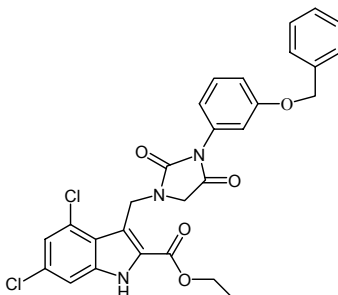
Ausbeute: 270 mg (0,46 mmol) weißer Feststoff (46 %)

R_f (Al_2O_3 , Chloroform/Aceton 8/1): 0,38

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 424.5 (83.5, $[C_{27}H_{24}N_2O_3]^+$), 425.5 (23.8), 426.5 (0.8), 551.5 (44.9, $[C_{28}H_{23}Cl_2N_3O_5]^+$), 552.5 (13.1), 553.5 (22.7), 554.5 (11.9), 555.5 (6.9), 556.4 (2.1), 581.4 (0.9), 583.4 (100, $[M]^+$), 584.4 (23.4), 585.4 (74.1), 586.4 (22.0), 587.4 (6.6)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 12.41 (s, 1H, In-NH), 7.46 (d, 1H, Ar-CH), 7.43-7.31 (m, 9H, Ar-CH), 7.23 (d, 1H, Ar-CH), 5.20 (s, 2H, CH_2), 5.06 (s, 2H, CH_2), 4.33 (q, 2H, CH_2), 3.85 (s, 2H, CH_2), 3.49 (s, 3H, OCH_3), 1.32 (t, 3H, CH_3)

6.2.11.2 3-((3-(3-(Benzyloxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester (15b)



$C_{28}H_{23}Cl_2N_3O_5$ (M_r : 552,40)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.2

Ansatz:

400 mg (0,68 mmol) 3-((3-(3-(Benzyloxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester

23 mg (0,34 mmol) Natriumethanolat

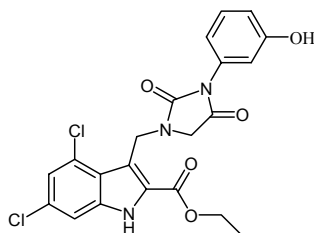
Ausbeute: 230 mg (0,42 mmol) weißer Feststoff (61 %)

R_f (Al_2O_3 , Chloroform/Aceton 8/1): 0,52

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 550.8 (100, $[M]^+$), 551.8 (32.7), 552.8 (67.9), 553.8 (19.4), 554.8 (11.8), 555.7 (3.1)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 12.44 (s, 1H, In-NH), 7.47-7.34 (m, 7H, Ar-CH), 7.25 (d, 1H, Ar-CH), 7.05-6.99 (m, 2H, Ar-CH), 6.93 (d, 1H, Ar-CH), 5.24 (s, 2H, CH_2), 5.09 (s, 2H, CH_2), 4.39 (q, 2H, CH_2), 3.80 (s, 2H, CH_2), 1.36 (t, 3H, CH_3)

6.2.11.3 4,6-Dichlor-3-((3-(3-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (16b)



$C_{21}H_{17}Cl_2N_3O_5$ (M_r : 462,30)

Die Synthese erfolgt analog zu 6.2.4.3

Ansatz:

170 mg (0,31 mmol) 3-((3-(4-(Benzyloxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-4,6-dichlor-indol-2-carbonsäureethylester

30 mg Pd/C (10 %)

Ausbeute: 75 mg (0,16 mmol) weißer Feststoff (53 %)

R_f (EE/n-Hexan 1/1): 0,63

FD-MS= m/z (% rel. Int.) 461.4 (100, $[M]^+$), 462.4 (14.0), 463.4 (55.9), 464.4 (6.3), 465.4 (8.4)

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 12.42 (s, 1H, In-NH), 9.69 (s, 1H, OH), 7.46 (d, 1H, Ar-CH), 7.23 (d, 1H, Ar-CH), 6.77-6.73 (m, 3H, Ar-CH), 5.23 (s, 2H, CH_2), 4.39 (q, 2H, CH_2), 3.78 (s, 2H, CH_2), 2.53 (s., 1H, OH), 1.37 (t, 3H, CH_3)

^{13}C -NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]= 169.3 (C=O), 161.1 (C=O), 157.8 (C-OH), 154.7 (C=O), 137.8 (C-quart.), 133.4 (C-quart.), 129.6 (C-quart.), 129.3 (CH), 128.6 (C-quart.), 127.4 (C-quart.), 122.8 (C-quart.), 121.6 (CH), 117.3 (CH), 115.0 (CH), 114.0 (CH), 113.9 (C-quart), 111.8 (CH), 61.5 (CH_2), 48.8 (CH_2), 36.3 (CH_2), 14.5 (CH_3)

6.3 Radioaktive Markierungssynthesen

6.3.1 Radioanalytische Verfahren

Zur Trennung, Identifizierung und Bestimmung der radiochemischen Ausbeute der ^{18}F - und ^{11}C -markierten Produkte wurde als analytisches Verfahren die Radio-HPLC angewendet. Die deutlich schnellere Methode der Auswertung von Reaktionskinetiken, die Radio-DC, lieferte wegen zu vieler Nebenprodukte keine verlässlichen Ergebnisse und wurde daher nicht verwendet.

Tabelle 13: Verwendete HPLC-Systeme

	<i>HPLC (inaktiv)</i>	<i>Radio-HPLC (^{18}F)</i>	<i>Radio-HPLC (^{11}C)</i>
analytisch	HPLC-System der Fa. Sykam (Pumpe S 1121, Auswertesoftware Axxiom Pyramid, Vers. 2,07). Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor (Knauer K 2501 (254nm))	HPLC-System der Fa. Sykam (Pumpe S 1121, Auswertesoftware Axxiom Pyramid, Vers. 2,07). Die Detektion der Radioaktivität erfolgte mit einem NaI(Tl) Bohrloch-Szintillationszähler Berthold LB 506, der an den Auslauf des UV-Detektors (Knauer K 2501 (254nm)) angeschlossen war.	HPLC-System der Fa. Dionex (Pumpe P680A, Auswertesoftware Dionex Chromeleon Vers. 6,6). Die Detektion der Radioaktivität erfolgte mit einem NaI Szintillationszähler der Fa. Raytest, Modell „Gabi“, der an den Auslauf des UV-Detektors (UVD170U (254 nm)) angeschlossen war.
präparativ	HPLC-System der Fa. Dionex (Pumpe P680A, UVD170U (254 nm), Auswertesoftware Dionex Chromeleon Vers. 6,6)	HPLC-Pumpe der Fa. Sykam (Pumpe S 1121). Die Detektion der Radioaktivität wurde mittels eines in der Syntheseapparatur integrierten Geiger-Müller Zählrohrs durchgeführt	HPLC-Pumpe der Fa. Sykam (Pumpe S 1121). Die Detektion der Radioaktivität wurde mittels eines in der Syntheseapparatur integrierten Geiger-Müller Zählrohrs durchgeführt

Für die analytische Radio-HPLC wurde als stationäre Phase eine analytische C_{18} -Säule der Firma Phenomenex verwendet (Gemini, 5 μm EC, 250 x 4,6 mm). Als Eluentien wurden Acetonitril / 0,25 M NH_4OAc (pH 5)-Gemische bei einer konstanten Flussrate von 1 mL/min verwendet.

Für die präparative Radio-HPLC wurde als stationäre Phase eine semipräparative C_{18} -Säule der Firma Phenomenex verwendet (Luna, 5 μm EC, 250 x 10 mm). Als Eluentien wurden Acetonitril / 0,25 M NH_4OAc (pH 5)-Gemische bei einer konstanten Flussrate von 6 mL/min verwendet.

6.3.2 Radiosynthesen mit Fluor-18

6.3.2.1 Azeotropes Trocknen einer wässrigen [¹⁸F]Fluorid-Lösung

400-1100 MBq einer wässrigen n.c.a [¹⁸F]Fluorid-Lösung wurden auf einer QMA-Kartusche fixiert und das [¹⁸F]F⁻ mittels einer Lösung von Kryptofix[®]2.2.2. (15 mg, 37,5 µmol)/Kaliumcarbonat (1 M, 15 µL) in 800 µL Acetonitril, von der Kartusche in einen Wheaton-Reaktor eluiert. Die Lösung wurde bei 80 °C in einem schwachen Heliumstrom (800 mL/min) und unter Anlegen eines schwachen Vakuums (700 mbar) bis zur Trockne eingedampft. Dieser Trocknungsschritt wurde dreimal durch Zugabe von je 1 mL Acetonitril wiederholt. Abschließend wurde zur vollständigen Trocknung für drei Minuten ein Vollvakuum angelegt.

6.3.2.2 Synthese von 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat

Variante 1: HPLC-Aufreinigung

Zu dem zuvor getrockneten und bei 75 °C temperierten [¹⁸F]Fluorid/Kryptofix[®]2.2.2./Kaliumcarbonat-Komplex wurde 4 mg (15 µmol) Ethylen-1,2-ditosylat gelöst in 1 mL Acetonitril, gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 3 Minuten wurde das Reaktionsgefäß aus dem Ölbad entfernt, die Reaktionslösung mit 1 mL Wasser verdünnt und mittels HPLC auf einer semipräparativen Säule (LiChrospher RP18-EC, 10 µm, 250×10 mm) aufgereinigt. Bei einer Flussrate von 5 mL/min und Acetonitril/Wasser 50/50 als Eluens, betrug die Retentionszeit 8 min. Die Produktfraktion wurde mit dem vierfachen Volumen Wasser verdünnt, das 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat auf einer Festphasenkartusche (Sep-Pak[®]-C₁₈, Fa. Waters) fixiert und 7 Minuten im Stickstoffstrom getrocknet. Die Elution mit 1,2 mL des gewünschten Lösungsmittels (MeCN, DMF, DMSO) lieferte das Produkt nach 25 min in radiochemischen Ausbeuten von 40 - 50 % mit einer radiochemischen Reinheit > 97 %.

Variante 2: Kartuschenaufreinigung

4 mg (15 µmol) Ethylen-1,2-ditosylat, gelöst in 1 mL Acetonitril wurden zum zuvor getrockneten und bei 75 °C temperierten [¹⁸F]Fluorid/Kryptofix[®]2.2.2./Kaliumcarbonat-Komplex gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 3 Minuten wurde das Reaktionsgefäß aus dem Ölbad entfernt, 4 mL Wasser hinzu gegeben und der Ansatz auf einer C₁₈-Kartusche fixiert. Die Kartusche wurde im schwachen Heliumstrom 10 Minuten getrocknet und anschließend das [¹⁸F]FETos mit 2 mL eines Lösungsmittel (MeCN, DMF, DMSO) von der Kartusche eluiert. Der Markierungsvorläufer wurde in einer Synthesedauer von etwa 35 Minuten, mit radiochemischen Reinheit von 94 - 98 % und einer radiochemischen Ausbeute von 50 % erhalten.

6.3.2.3 4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-[¹⁸F]fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazo-lidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure ([¹⁸F]DDIC1, 20)

3 mg (6,9 μmol) 4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäure MV0-DDIC1 (**18**) wurden in einem mit Schraubkappe und Silliconseptum verschlossenen 5 mL Wheaton Reaktor in 800 μL DMSO gelöst, mit 1,9 Äquivalenten 5 N wäss. NaOH versetzt und in einem Ölbad bei 100 °C für 5 min temperiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 μL [¹⁸F]FETos in DMSO gestartet und bei 100 °C gerührt. Es wurden zu definierten Zeitpunkten (1, 3, 5, 7, 10, 20 min) Aliquots von jeweils 100 μL entnommen, mit 400 μL Acetonitril versetzt und radioanalytisch ausgewertet.

$t_r([\text{¹⁸F}]FETos) = 20,9 \text{ min (MeCN/0,25 M NH}_4\text{OAc (pH 5) 40/60)}$

$t_r([\text{¹⁸F}]DDIC(20)) = 10,2 \text{ min (MeCN/0,25 M NH}_4\text{OAc (pH 5) 40/60)}$

6.3.2.4 4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-[¹⁸F]fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (Ethyl[¹⁸F]DDIC1, 19)

3-7 mg (6,5-15,1 μmol) 4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäureethylester MV-DDIC1 (**16a**) wurden in einem mit Schraubkappe und Silliconseptum verschlossenen 5 mL Wheaton Reaktor in 800 μL Lösungsmittel (DMSO, DMF) gelöst, mit 1,9 (0,9, 2,9) Äquivalenten einer Base versetzt und in einem Ölbad bei 100 °C (80 °C, 120 °C) für 5 min temperiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 μL [¹⁸F]FETos im entsprechenden Lösungsmittel gestartet und Rühren gelassen. Es wurden zu definierten Zeitpunkten (1, 3, 5, 7, 10, 20 min) Aliquots von jeweils 100 μL entnommen, mit 400 μL Acetonitril versetzt und radioanalytisch ausgewertet.

$t_r([\text{¹⁸F}]FETos) = 6,6 \text{ min (MeCN/0,25 M NH}_4\text{OAc (pH 5) 60/40)}$

$t_r(\text{Ethyl}[\text{¹⁸F}]DDIC1(19)) = 14,6 \text{ min (MeCN/0,25 M NH}_4\text{OAc (pH 5) 60/40)}$

6.3.2.5 4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-[¹⁸F]fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (Ethyl[¹⁸F]DDIC3, 21)

3 mg (6,5 μmol) 4,6-Dichlor-3-((3-(3-hydroxyphenyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäureethylester MV-DDIC3 (**16b**) wurden in einem mit Schraubkappe und Silliconseptum verschlossenen 5 mL Wheaton Reaktor in 800 μL Lösungsmittel (DMSO, DMF) gelöst, mit 1,9 Äquivalenten 5 M NaOH versetzt und in einem Ölbad bei 100 °C für 5 min temperiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 μL [¹⁸F]FETos im entsprechenden Lösungsmittel gestartet und bei 100 °C Rühren gelassen. Es wurden zu definierten Zeitpunkten (1, 3, 5, 7, 10, 20 min) Aliquots von jeweils 100 μL entnommen, mit 400 μL Acetonitril versetzt und radioanalytisch ausgewertet.

$t_r([\text{F}^{18}]\text{FETos}) = 14,6 \text{ min (MeCN/0,25 M NH}_4\text{OAc (pH 5) 40/60)}$

$t_r(\text{Ethyl}[\text{F}^{18}]\text{DDIC3 (21)}) = 6,6 \text{ min (MeCN/0,25 M NH}_4\text{OAc (pH 5) 40/60)}$

6.3.2.6 Präparative Synthese von 4,6-Dichlor-3-(3-(4-(2- $[\text{F}^{18}$]fluorethoxy)-phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure ($[\text{F}^{18}]\text{DDIC1, 20}$)

Die von $[\text{F}^{18}]\text{DDIC1 (20)}$ erfolgte in halbautomatisierter Weise an einem PET-trace Methylierungsmodul der Firma GE Medical Systems (früher: nuclear interface).

3 mg (6,5 μmol) MV-DDIC1 (**16a**) wurden in 1 mL DMSO vorgelegt, mit 2,55 μL einer 5 M NaOH-Lösung versetzt und für 5 min auf 100 °C temperiert. Nach Starten der Reaktion durch Zugabe von 1 mL $[\text{F}^{18}]\text{FETos}$ in DMSO wurde 5 min auf 100 °C erwärmt und die Reaktionslösung im Anschluss mit 4 mL HPLC-Eluens verdünnt. Die Aufreinigung des Rohproduktes wurde mittels präparativer Radio-HPLC durchgeführt. Nach Isolierung des Zwischenproduktes wurde die Produktfraktion mit 50 mL Wasser verdünnt auf einer Strata-X Kartusche fixiert, mit 10 mL Wasser gewaschen und im Argonstrom getrocknet.

$t_r(\text{Ethyl}[\text{F}^{18}]\text{DDIC1 (19)}) = 14,6 \text{ min (MeCN/0,25 M NH}_4\text{OAc (pH 5) 60/40)}$

Nach Elution der Kartusche mit 1 mL Ethanol in einen 5 mL Wheaton Reaktor wurde die Verseifung durch manuelle Zugabe von 100 μL 1 M NaOH eingeleitet. Durch Verdünnen der Reaktionslösung mit 4 mL Wasser wurde die Reaktion nach 30 min abgebrochen und mittels Radio-HPLC aufgereinigt. Die isolierte Produktfraktion wurde mit 50 mL Wasser verdünnt und über eine Strata-X Kartusche eluiert. Die Kartusche wurde mit 10 mL Wasser gewaschen und im Argonstrom getrocknet. Das Produkt wurde mit 1,5 mL EtOH/MeCN (V/V 1/1) von der Kartusche eluiert, das EtOH/MeCN-Gemisch destillativ entfernt und der verbleibende Rest in 1 mL isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen. Nach einer Gesamtsyntheszeit von 127 min wurden 55 MBq $[\text{F}^{18}]\text{DDIC1}$ in einer radiochemischen Ausbeute von 5 % erhalten.

$t_r([\text{F}^{18}]\text{DDIC1 (20)}) = 7,3 \text{ min (MeCN/0,25 M NH}_4\text{OAc (pH 5) 40/60)}$

6.3.3 Radiosynthesen mit ^{11}C -Kohlenstoff

Die radioaktiven Markierungssynthesen mit ^{11}C -Kohlenstoff wurden in der Sektion Radiopharmazie am PET-Zentrum Tübingen durchgeführt. ^{11}C -Kohlenstoff wurde am PETtrace Cyclotron (General Electric Medical Systems) in einer (p, α)-Kernreaktion durch Bestrahlung eines N_2 -targets (0,5 % O_2) mit 16,5 MeV Protonen in Form von $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ erhalten.

6.3.3.1 Synthese von $[^{11}\text{C}]\text{Methyliodid}$

$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, das aus dem In Target-Prozess als primärer Markierungsvorläufer erhalten wird, wurde auf der in Ofen (OMA) befindlichen Molekularsieb-Säule (CMB, Molekularsieb 5 Å, Ni-Katalysator) adsorbiert und bei einer Reaktionstemperatur von 360 °C mit H_2 katalytisch zu $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ reduziert. Das $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ wurde zur Entfernung von $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ durch eine Ascarit-Falle (CMC) in das Rezirkulationssystem überführt und mit He auf einen Enddruck von 1 MPa gebracht. Mittels einer Pumpe (QM) wurde $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ durch eine im Ofen (OMC, 760 °C) positionierte und mit elementarem Iod gefüllte Reaktionssäule (CMD), eine Ascarit-Falle (CME) und ein mit Porapak N gefülltes Quarzrohr (CMF) zirkuliert. Dabei reagiert $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ mit I_2 zu $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, das auf CMF adsorbiert wurde. CMF wurde auf 190 °C aufgeheizt und $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ mit einem He-Strom über die Produktauslassleitung in ein mit Lösungsmittel gefülltes Reaktionsgefäß eingeleitet.

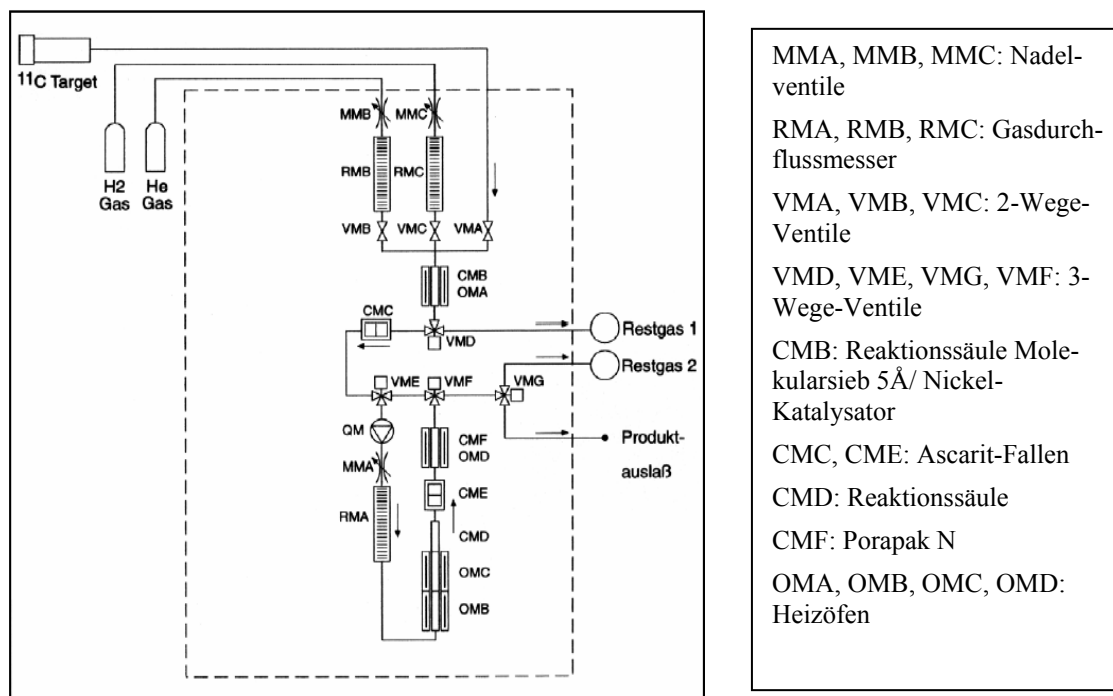


Abbildung 74: General Electric MicroLab-Apparatur zur Synthese von $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$

6.3.3.2 4,6-Dichlor-3-((3-(4-[¹¹C]methoxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (Ethyl[¹¹C]DDIC5, 22)

1,5 mg (3,46 µmol) MV-DDIC1 (**16a**) wurde in 450 µL Lösungsmittel (DMF, DMSO) gelöst, mit 1,9 Äquiv. Base versetzt und 5 Minuten im Ölbad auf 100 °C temperiert. Anschließend wurden 50 µL einer Lösung von [¹¹C]Methyliodid im entsprechenden Lösungsmittel zugegeben und bei 100 °C gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurde das Wheaton Reaktionsgefäß zu definierten Zeitpunkten in flüssigem Stickstoff ausgefroren und mittels Radio-HPLC analysiert.

$t_r([\text{}^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}) = 5,8 \text{ min (MeCN/NH}_4\text{OAc (pH 5) 70/30)}$

$t_r(\text{Ethyl}[\text{}^{11}\text{C}]\text{DDIC5 (22)}) = 9,1 \text{ min (MeCN/0,25 M NH}_4\text{OAc (pH 5) 70/30)}$

6.3.3.3 Präparative Synthese von 4,6-Dichlor-3-((3-(4-[¹¹C]methoxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure ([¹¹C]DDIC5, 23)

Die präparative Darstellung der 4,6-Dichlor-3-((3-(4-[¹¹C]methoxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure [¹¹C]DDIC5 (**23**) erfolgte halbautomatisiert an einem PET-trace Methylierungsmodul (Abb. 75) der Firma GE Medical Systems (früher: nuclear interface).

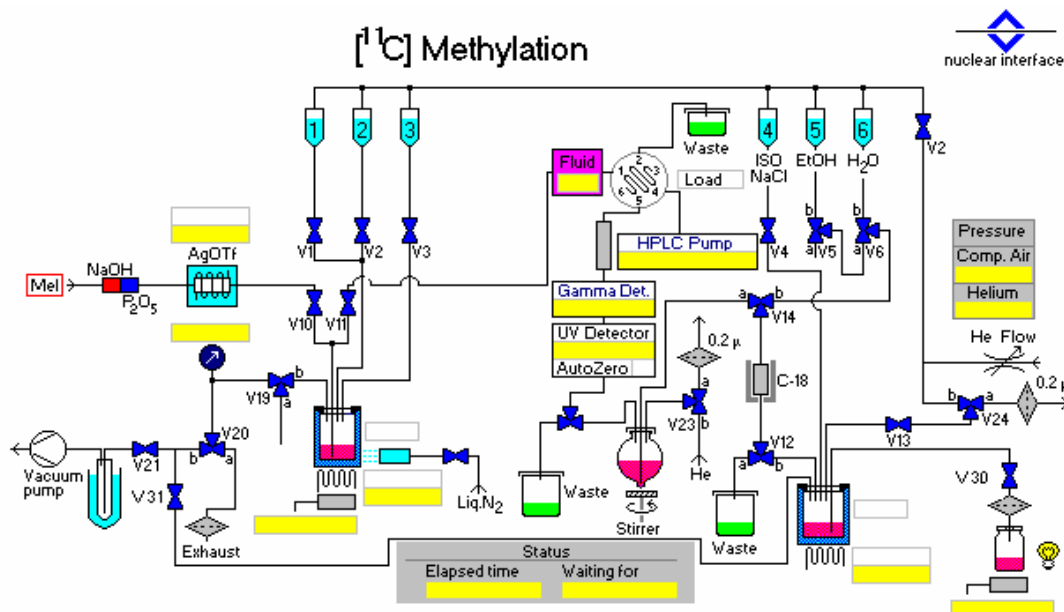


Abbildung 75: Diagramm der GE Methylierungsapparatur am PET-Zentrum Tübingen

1,5 mg (3,46 μmol) MV-DDIC1 (**16a**) wurden in 500 μL DMSO vorgelegt. Etwa 5 min vor Beginn des Trappings der $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ -Aktivität wurden 20 μL einer Stammlösung von NaOEt (0,33 M in DMSO) hinzugefügt, für 3 min auf 100 °C erwärmt und im Anschluss auf 20 °C abgekühlt. Nach Beendigung des Trappings wurde die Reaktionslösung für 2,5 min auf 100 °C erwärmt, danach mit 4 mL HPLC-Eluens verdünnt und mittels Radio-HPLC aufgereinigt. Nach Isolierung des Zwischenproduktes bei einer Retentionszeit von 7,1 min wurde die Produktfraktion mit 50 mL Wasser verdünnt auf einer Strata-X Kartusche fixiert, mit 10 mL Wasser gewaschen und im Argonstrom getrocknet.

$t_{\text{r}}(\text{Ethyl}[^{11}\text{C}]\text{DDIC5 (22)}) = 7,1 \text{ min (MeCN/0,25 M NH}_4\text{OAc (pH5) 70/30}$

Nach Elution der Kartusche mit 1,5 mL Ethanol in einen 5 mL Wheaton Reaktor wurde die Verseifung durch manuelle Zugabe von 100 μL 1 M NaOH eingeleitet. Nach 30 min wurde die Reaktionslösung in das Synthesemodul überführt, mit 4 mL HPLC-Eluens verdünnt und mittels Radio-HPLC aufgereinigt. Die isolierte Produktfraktion wurde mit 50 mL Wasser verdünnt und über eine Strata-X Kartusche eluiert. Die Kartusche wurde mit 10 mL Wasser gewaschen und im Argonstrom getrocknet. Das Produkt wurde mit 1,5 mL EtOH von der Kartusche eluiert, der Alkohol destillativ entfernt und der verbleibende Rest in 1 mL isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen. Nach einer Gesamtsynthesezeit von 83 min wurden 134 MBq $[^{11}\text{C}]\text{DDIC5}$ in einer radiochemischen Ausbeute von 6 % erhalten.

$t_{\text{r}}([^{11}\text{C}]\text{DDIC5 (23)}) = 7,3 \text{ min (MeCN/0,25 M NH}_4\text{OAc (pH5) 40/60}$

7 Zusammenfassung

Eine krankhafte Überaktivierung von NMDA-Rezeptoren wird als potentielle Ursache für eine Reihe von akuten und chronischen neurodegenerativen Erkrankungen angesehen. Hierbei sind für die akuten Erkrankungen vor allem der Schlaganfall, das Schädel-Hirn-Trauma und die Epilepsie, und für die chronischen Erkrankungen Morbus Parkinson und die Alzheimer'sche Demenz zu nennen. NMDA-Rezeptor-Antagonisten der Glycin-Bindungsstelle und der verschiedenen allosterischen Bindungsstellen könnten als Neuroprotectiva bei den verschiedenen Krankheiten eine symptomatische Verbesserung bewirken und zur Therapie eingesetzt werden. Eine visuelle Darstellung im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen ist jedoch derzeit nicht möglich.

Daher bestand in der Vergangenheit bereits ein großes Interesse in der Entwicklung geeigneter Radioliganden, um den NMDA-Rezeptor nicht-invasiv mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie zu visualisieren. Alle Ansätze waren bislang jedoch erfolglos, meistens aus Gründen unspezifischer Bindung, wie im Falle markierter Liganden des offenen Ionenkanals. Neben markierten Liganden der Polyamin-Bindungsstelle sind Liganden der Glycin-Bindungsstelle wegen ihrer guten Affinitäten und Lipophilien sehr vielversprechende Substanzen.

Auf Basis Hydantoin-substituierter Dichlorindol-2-carbonsäuren, welche in einer vorausgehenden Arbeit intensiv untersucht worden sind, wurden daher ^{12}C - bzw. ^{11}C - und ^{19}F - bzw. ^{18}F -markierte Derivate hergestellt und hinsichtlich ihrer Affinität und Spezifität zum NMDA-Rezeptor in pharmazeutischen und radiopharmazeutischen Studien evaluiert.

Die inaktiven ^{19}F -fluorethylierten Verbindungen und eine ^{12}C -methylierte Verbindung wurden nach einem einheitlichen, mehrstufigen Syntheschema hergestellt und dienten als Testsubstanzen für die pharmakologischen Versuche und als Referenzsubstanzen zur Ermittlung einer geeigneten Radioanalytik mittels Radio-DC und Radio-HPLC. Diese fünf Referenzverbindungen wurden ausgehend von 4,6-Dichlor-3-((2-methoxy-2-oxoethylamino)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester (**5**) und vier Fluorethyl-substituierten Aminophenolen **7a-d**, sowie kommerziell erhältlichem 4-Methoxy-anilin (**7e**) dargestellt.

Zur Synthese des Indolgrundkörpers **5** wurde 4,6-Dichlorphenylhydrazin (**1**) mit Ethylpyruvat in Ausbeuten von 98 % zum 2-(E/Z)-2-(3,5-Dichlorphenyl)hydrazono)propionsäureethylester (**2**) umgesetzt. Ohne weitere Aufreinigung wurde in der nächsten Stufe das Hydrazon **2** in einer Protonen-katalysierten Fischer Synthese mit 93 % Ausbeute zum 4,6-Dichlorindol-2-carbonsäureethylester (**3**) cyclisiert. Durch Behandlung mit N-Methylformanilid und Phosphorychlorid wurde in Position 3 des Indolgrundkörpers eine Aldehydfunktion in einer Synthese nach Vilsmeier in Ausbeuten von 60-76 % ein-

geführt. Danach wurde schließlich der finale Kopplungspartner **5** durch Anlagerung von Glycinsäuremethylester und reduktiver Aminierung mit Natriumacetoxyborhydrid in Ausbeuten von 75 % erhalten.

Die Darstellung Fluorethyl-substituierter Aminophenole **7a-d** wurde in zwei Stufen realisiert. Im ersten Reaktionsschritt wurden Regioisomere des Nitrophenols mit 1-Brom-2-fluorethan unter den Bedingungen einer bimolekularen Substitution zweiter Ordnung (S_N2), in Ausbeuten von 45-81 % zu den entsprechenden (2-Fluorethoxy)-nitrobenzolen **6 a-d** umgesetzt, um im zweiten Reaktionsschritt mit Wasserstoff und katalytischen Mengen Palladium auf Aktivkohle, in Ausbeuten von 54-84 % zu den (2-Fluorethoxy)-anilinen **7 a-d** reduziert zu werden.

Unter Verwendung von Triphosgen als Kopplungsreagenz wurden die Verbindungen **9 a-e** als unsymmetrische Harnstoffe in Ausbeuten von 50-70 % durch Reaktionen des Indolgrundkörpers **5** mit den Kopplungspartnern **7 a-e** erhalten. Eine unter den Bedingungen bereits eingetretene Cyclisierung wurde in der Folgestufe durch Behandlung mit Natriumethanolat in ethanolischer Lösung vervollständigt und lieferte nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Aluminiumoxid die Hydantoine **10 a-e** in 70-88 %iger Ausbeute. Die in der letzten Stufe durchgeführte Verseifung mit 1 M NaOH lieferte die inaktiven Referenzverbindungen **11 a-e** (DDIC1 – DDIC5) in Ausbeuten von 39 - 78 %. Dabei wurden die höchsten Ausbeuten von 78 % bei den am Phenylring para- bzw. meta-fluorethoxy substituierten 4,6-Dichlor-3-((2,4-dioxo-3-phenylimidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäuren **11 a** und **11 e** erreicht.

Um das Potential der synthetisierten Referenzverbindungen abschätzen zu können, wurde die *in vitro*-Affinität der 5 Referenzverbindungen DDIC-1 – DDIC-5 zur Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle über die Verdrängung des tritierten Liganden [3H]MDL-105,519 an präparierten Schweinehirnmembranen ermittelt. Neben der Affinität zur Rezeptorbindungsstelle stellt die Fähigkeit der Referenzverbindungen, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und an ihren Wirkort zu gelangen, ein wichtiges Kriterium dar. Daher wurde der logP als Maß für die Lipophilie über die HPLC-Methode ermittelt.

Innerhalb der Gruppe ähnlicher Verbindungen wurde für DDIC4 mit einem IC_{50} -Wert von 14 nM zwar die beste Affinität erzielt, aber gleichzeitig mit einem logP-Wert von 1,51 die geringste Lipophilie. Das genau entgegengesetzte Resultat wurde im Fall von DDIC2 mit einem IC_{50} -Wert von 493 nM und einem logP-Wert von 2,53 erhalten. Dadurch wurde gezeigt, dass die zusätzliche Einführung eines elektronenziehenden Chlor-Substituenten einen erheblichen Einfluss auf diese zwei wichtigen Parameter hat. Bei den drei verbleibenden Verbindungen DDIC1 (IC_{50} = 81 nM, logP= 2,07), DDIC3 (IC_{50} = 43 nM, logP= 2,12) und DDIC5 (IC_{50} = 47 nM, logP= 2,26) wurden ebenfalls gute Affinitäten im nanomolaren Bereich, sowie Lipophilien in dem für eine gute Hirngängigkeit optimalen Bereich von logP= 2 - 2,5 erzielt. Da für eine geeignete *in vivo*-

Aktivität bei dieser Substanzklasse hauptsächlich die Lipophilie als relevanter Parameter erachtet wurde und mittels der ermittelten Affinitäten mit jeder Verbindung (außer evtl. DDIC2) eine Visualisierung möglich sein sollte, wurden als geeignete Verbindungen für die ^{18}F -Fluorethylierungen DDIC1 und DDIC3 und für die ^{11}C -Methylierungen DDIC5 als potentiell geeignete Kandidaten für eine radioaktive Synthese ausgewählt.

Zur Darstellung geeigneter Markierungsvorläufer wurde in einer Mikrowellen-unterstützten Synthese eine weitere Gruppe an Kopplungspartnern hergestellt. Durch diese im trockenen Medium realisierte Reaktion wurden die zu der ersten Gruppe an Kopplungspartnern analogen Benzyloxy-aniline in guten Ausbeuten von 24 - 61 % hergestellt. Der Vorteil der Benzylschutzgruppe liegt in seiner Inertheit gegenüber sauren und basischen Reaktionsbedingungen und ermöglichte damit ein frühes Einführen einer Schutzgruppe und eine einfache Abspaltung am Ende der Aufbausynthese.

Auch hier wurden durch Reaktionen von Triphosgen mit dem Indolgrundkörper **5** und den Kopplungspartnern **13 a** und **13 c** die teilweise bereits zu den Hydantoinen cyclisierten Verbindungen EthylDDIC1 (**15a**) und EthylDDIC3 (**15b**) neben den unsymmetrischen Harnstoffen **14 a** (64 %) und **14 b** (46 %) erhalten. Eine nachträgliche Cyclisierung mit Natriumethanolat in ethanolischer Lösung, gefolgt von einer reduktiven Entfernung der Benzylschutzgruppe mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle, führte zu den Markierungsvorläufer MV-DDIC1 (**16 a**) (89 %) und MV-DDIC3 (**16 b**) (53 %) während für MV0-DDIC1 (**18**) eine vorausgehende Verseifung von **15 a** zu **17** und anschließende Debenzylierung zu **18** (62 %) durchgeführt wurde.

Die radioaktiven Markierungssynthesen wurden mit den kurzlebigen PET-Nukliden ^{11}C und ^{18}F durchgeführt.

Die Versuche, die gewünschte Verbindung [^{18}F]DDIC1 (**20**) ausgehend von MV0DDIC1 (**18**) und [^{18}F]FETos in einem Schritt zu erzielen, führten bei 100 °C in DMSO nach 20 min zu radiochemischen Ausbeuten von 7 % und zu einer nahezu quantitativen Bildung eines Nebenproduktes in 77 % Ausbeute. Durch Zusatz von 20 mg (150 μmol) LiI zu der Markierungsvorläuferlösung und Starten der Reaktion mit [^{18}F]FETos, wurde die Ausbeute an **20** um den Faktor 3 auf 22 % radiochemische Ausbeute nach 20 min Reaktionszeit erhöht. Auch hier war die Bildung des Nebenproduktes dominant. Um die freie Carbonsäurefunktion des Markierungsvorläufers als mögliche reaktive Position auszuschließen, wurde in weiteren Versuchen der ethylestergeschützte Markierungsvorläufer MV-DDIC1 (**16 a**) verwendet und unter Optimierung der Reaktionsparameter Temperatur, Lösungsmittel, Reaktionsdauer, Hilfsbasen und Markierungsvorläuferkonzentration untersucht. Dadurch wurden in DMSO und DMF radiochemische Ausbeuten von 27 - 38 % realisiert. Eine Zusatz von 20 mg (150 μmol) LiI zur Reaktivitätssteigerung des Markierungsreagens führte zur ausschließlichen Bildung von nicht umgesetzten [^{18}F]IFE.

Da die Verseifungsreaktion von Zersetzungsprodukten begleitet war wurde die Reaktion nach 30 min abgebrochen und eine erneute Aufreinigung mittels Radio-HPLC durchgeführt. Absorptionsphänomene an der Glaswand der Reaktionsgefäße und Elutionsverluste auf der RP-18-Festphase erschwerten die Formulierung des Radioliganden in isotonischer Kochsalzlösung. Unter optimierten Bedingungen ($[^{18}\text{F}]\text{FETos}$, 3 mg/mL MV, DMSO, 100 °C, 1,9 equiv. 5 M NaOH, 5 min Reaktionsdauer, 30 min Verseifung) wurden für tierexperimentelle Studien 55 MBq $[^{18}\text{F}]\text{DDIC1}$ (**20**) in einer radiochemischen Ausbeute von 5 %, nach einer Gesamtsynthesezeit von 127 min, erhalten.

Bei der Synthese von Ethyl $[^{18}\text{F}]\text{DDIC3}$ (**21**), ausgehend von MV-DDIC3 (**16 b**), wurden unter den identischen Reaktionsbedingungen vergleichbare radiochemische Ausbeuten von etwa 25-30 % erhalten. Vor dem Hintergrund schlechterer radiochemischer Ausbeuten und der Tatsache noch schlechterer Löslichkeiten des Markierungsvorläufers und der Referenzverbindung, wurden keine weiteren Versuche mit **16 b** unternommen.

Die Darstellung des Radioliganden $[^{11}\text{C}]\text{DDIC5}$ (**23**) wurde versucht, unter analogen Synthesebedingungen wie $[^{18}\text{F}]\text{DDIC1}$ (**20**) herzustellen. Allerdings wurde unter Verwendung von NaOH als Base neben einem unbekanntem Nebenprodukt nur eine geringe Menge des gewünschten Produktes identifiziert. Wurde stattdessen NaOEt als Base verwendet, konnte dieses Nebenprodukt nahezu vollständig unterdrückt werden. Unter optimierten Bedingungen ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, 3 mg/mL MV, DMSO, 100 °C, 1,9 equiv. NaOEt, 2,5 min Reaktionsdauer, 30 min Verseifung) wurden für tierexperimentelle Studien auf diese Weise 134 MBq $[^{11}\text{C}]\text{DDIC5}$ (**23**) in einer radiochemischen Ausbeute von 6 % nach einer Gesamtsynthesezeit von ca. 85 min erhalten. Auch hier wurden bei beiden Reaktionsschritten erhebliche Nebenreaktionen sowie eine unvollständige Verseifung unter Zersetzung von **23** festgestellt.

Die Überprüfung des biochemischen Konzepts mittels Autoradiographie und Verdrängungsexperimenten mit Lösungen der endogenen Liganden Glycin (200 μM) und Kynurensäure (20 μM), zeigte einen hohen Anteil an unspezifischer Bindung. Hauptanreicherungsareale waren der Cortex, das Cerebellum und die Thalamuskern. Im NMDA-reichen Hippocampus wurde jedoch nur eine geringfügige Anreicherung festgestellt.

Die durchgeführten $\mu\text{-PET}$ Experimente mit $[^{18}\text{F}]\text{DDIC1}$ (**20**) und $[^{11}\text{C}]\text{DDIC5}$ (**23**) zeigten, dass der Radioligand über keine ausreichende *in vivo*-Aktivität verfügt. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in einer unzureichenden Penetration der Blut-Hirn-Schranke aufgrund der polaren Carbonsäurefunktion der Verbindungen. Nahezu die gesamte Radioaktivität wurde in der Leber, dem Metabolisierungsorgan für lipophile Verbindungen wiedergefunden.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

AZ	Akzeptorzahl
logP	Maß für die Lipophilie
ϵ	Dielektrizitätskonstante
(1/1 V/V)	Volumenanteile eines Lösungsmittelgemisches
[K \subset 2.2.2] ₂ CO ₃	Kryptat des 4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo-[8.8.8]hexacosans mit Kaliumcarbonat
AMPA	(S)-2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)-propionsäure
Bq	Becquerel (Zerfälle/s)
c.a.	carrier added (geträgert)
CHCl ₃	Chloroform
Ci	Curie (3,7·10 ¹⁰ Bq)
CT	Computer-Tomographie
DDIC1	4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure
DDIC2	4,6-Dichlor-3-((3-(3-chlor-4-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure
DDIC3	4,6-Dichlor-3-((3-(3-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure
DDIC4	4,6-Dichlor-3-((3-(2-(2-fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure
DDIC5	4,6-Dichlor-3-((3-(4-methoxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäure
[¹⁸ F]DDIC1	4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-[¹⁸ F]fluorethoxy)-phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure
[¹¹ C]DDIC5	4,6-Dichlor-3-((3-(4-[¹¹ C]methoxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäure
DIEA	Diisopropyl-ethylamin, N-Ethyldiisopropylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Donorzahl
EAA	Excitatory amino acids; Exzitatorische Aminosäuren
EE	Essigsäureethylester
Ethyl[¹⁸ F]DDIC1	4,6-Dichlor-3-((3-(4-(2-[¹⁸ F]fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester

Ethyl[¹⁸ F]DDIC3	4,6-Dichlor-3-((3-3-(2-[¹⁸ F]fluorethoxy)phenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester
Ethyl[¹¹ C]DDIC5	4,6-Dichlor-3-((3-(4-[¹¹ C]methoxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester
FD	Feld-Desorption
HAc	Essigsäure
HCOOH	Ameisensäure
HPLC	high performance liquid chromatography
i.v.	intravenös
IC ₅₀	Dosis bei der eine 50%ige Inhibition auftritt
k	Kapazitätsfaktor einer HPLC-Säule
K _i	Gleichgewichts-Inhibitionskonstante zwischen einem Liganden und einem Rezeptor
Kp.	Siedepunkt
Kryptofix [®] 2.2.2	4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10diazabicyclo[8.8.8]-hexacosan
LDA	Lithium-diisopropylamid
logD	Logarithmus des Verteilungskoeffizienten aller Spezies eines Moleküls zwischen einer organischen und einer wässrigen Phase
logP	Logarithmus des Verteilungskoeffizienten einer Spezies eines Moleküls zwischen einer organischen und einer wässrigen Phase
MeCN	Acetonitril
MV	Markierungsvorläufer
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MV0-DDIC1	4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäure
MV-DDIC1	4,6-Dichlor-3-((3-(4-hydroxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)-methyl)-indol-2-carbonsäureethylester
MV-DDIC3	4,6-Dichlor-3-((3-(3-hydroxyphenyl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)-indol-2-carbonsäureethylester
NaH	Natriumhydrid
n.c.a.	no carrier added (nicht geträgert)
NEt ₃	Triethylamin

NH ₄ OAc	Ammoniumacetat
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
p.i.	post injectionem
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RCA	Radiochemische Ausbeute
RP	reversed phase
S _N 2	Nukleophile Substitution zweiter Ordnung
Sörensen-Puffer	Phosphatpuffer bei einem pH von 7,4 (250 mL H ₂ O + 62 mg KH ₂ PO ₄ + 450 mg Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O ; mit H ₃ PO ₄ auf pH 7,4 einstellen; + 750 mL Methanol + 100 µL Diethylamin)
t ₀	Totzeit; Zeit, die das Eluens zum Durchlaufen der HPLC-Säule benötigt
t _r	retention time; Retentionszeit = Verweilzeit der Substanz auf einer HPLC-Säule
tADTC1	trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure
tADTC3	trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure
tADTC4	trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure
Triphosgen	Bis(trichlormethyl)-carbonat
ZNS	Zentrales Nervensystem
[¹⁸ F]FETos	2-[¹⁸ F]Fluorethyltosylat
[¹⁸ F]BFE	1-Brom-2-[¹⁸ F]fluorethan
[¹⁸ F]IFE	2-Iod-1-[¹⁸ F]fluorethan

8.2 Literatur

- [1] D. W. Townsend, S. Cherry, *Eur. Radiol.* **11**, 1968-1974 (2001)
- [2] A. Bockisch, T. Beyer, G. Antoch, P. Veit, S. Müller, R. Pink, S. Rosenbaum, H. Köhl, *Radiologe* **44**, 1045-1054 (2004)
- [3] H. Herzog, F. Rösch, *Pharm. unserer Zeit* **34**, 468-473 (2005)
- [4] M. H. Brehm, P. M. Schlechtweg, J. MacKenzie, C. S. Winalski, P. Lang, *Radiologe* **46**, 394-402 (2006)
- [5] H. J. Ache, *Angewandte Chemie* **84**, 234 (1972)
- [6] H.-J. Wester, Dissertation: Zur praktischen trägerfreien ^{18}F -Fluorierung von Proteinen, Peptiden und Tyrosin, Berichte des Forschungszentrums Jülich, 3206, ISSN 0944-2952, Inst. für Nuklearchemie Jül-3206, D 38 (Diss. Universität Köln)
- [7] H. H. Coenen, P. Kling, G. Stöcklin, *J. Nucl. Med.* **30**, 1367-1372 (1989)
- [8] B. M. Gallagher, J. S. Fowler, N. I. Gutterson, R. R. McGregor, C. N. Wan, A. P. Wolf, *J. Nucl. Med.* **19**, 1154-1161 (1978)
- [9] G. Kabalka, R. M. Lambrecht, M. Sajjad, J. S. Fowler, S. A. Kunda, G. W. McCollum, R. McGregor, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **36**, 853 (1985)
- [10] C. M. Lederer, V. S. Shirley, *Tables of Isotopes*. John Wiley, New York (1982)
- [11] G. Stöcklin, in *Handbuch der medizinischen Radiologie*, Band 15/1B, Emissions-Computertomographie mit kurzlebigen Zyclotron-produzierten Radionukliden, Springer Verlag, Berlin (1989)
- [12] S. M. Qaim, *Radiochim. Acta* **89**, 223-232 (2001)
- [13] T. Ruth, A. Wolf, *Radiochim. Acta.* **26**, 26 (1979)
- [14] K. Hamacher, G. Blessing, B. Nebeling, *Appl. Radiat. Isot.* **41**, 49-55 (1990)
- [15] V. Casella, T. Ido, J. S. Fowler, R. R. McGregor, T. J. Ruth, *J. Nucl. Med.* **21**, 750 (1980)
- [16] E. Hess, G. Blessing, H. H. Coenen, S. M. Qaim, *Appl. Radiat. Isot.* **52**, 1431 (2000)
- [17] S. M. Qaim, G. Stöcklin, *Radiochim. Acta.* **34**, 26 (1983)
- [18] H. J. Wester, in *Handbook of Nuclear Chemistry*, Volume 4, Radiochemistry and Radiopharmaceutical chemistry in Life Sciences, Chapter 5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (2003)

- [19] C.-Y. Shiue, P.A. Salvadori, A. P. Wolf, J. S. Fowler, R. R. MacGregor, J. Nucl. Med. **23**, 899, (1982)
- [20] H. H. Coenen, K. Franken, P. Kling, G. Stöcklin, Appl. Radiat. Isot. **39**, 1243, (1988)
- [21] G. Stöcklin, in Handbuch der medizinischen Radiologie, Band 15/1B, Emissions-Computertomographie mit kurzlebigen Zyclotron-produzierten Radionukliden, Springer Verlag, Berlin, 75, (1989)
- [22] H. H. Coenen, S. M. Moerlein, J. Fluorine Chem. **36**, 63-75, (1987)
- [23] E. Hess, S. Sichler, A. Kluge, H. H. Coenen, Appl. Radiat. Isot. **57**, 185, (2002)
- [24] F. Dolle, S. Demphel, F. Hinnen, D. Fournier, F. Vaufrey, C. Crouzel, J. Label. Compds. Radiopharm. **41**, 105 (1998)
- [25] H. H. Coenen: No-carrier-added ^{18}F -chemistry of radiopharmaceuticals., in Synthesis and application of isotopically labelled compounds, (T.A. Baillie and J.R. Jones eds.) Elsevier Publ., Amsterdam; 433, (1989)
- [26] H. Beyer, W. Walter, Lehrbuch der organischen Chemie, 22. Auflage, S. Hirzel Verlag, 132, Stuttgart (1991)
- [27] K. Hamacher, H. H. Coenen, G. Stöcklin, J. Nucl. Med. **27**, 235-238, (1986)
- [28] G. Angelini, M. Speranza, A. P. Wolf, C. J. Shiue, J. S. Fowler, J. Label. Compds. Radiopharm. **21**, 1223-1226, (1984)
- [29] D. Block, Diplomarbeit: Zur praktisch trägerfreien ^{18}F -Fluoralkylierung und ^{18}F -Fluor-acylierung, Universität zu Köln, 1987.
- [30] D. Block, H.H. Coenen, G. Stöcklin, J. Label. Compds. Radiopharm. **24**, 1029-1042 (1987)
- [31] D. Block, H.H. Coenen, G. Stöcklin, J. Label. Compds. Radiopharm. **25**, 201-216 (1987)
- [32] T.J. Tewson, J. Org. Chem. **48**, 3507 (1983)
- [33] A.A. Wilson, J.N. Dasilva and S. Houle, Appl. Radiat. Isot. **46**, 765 (1995)
- [34] M. R. Kilbourn, C. S. Dence, M. J. Welch, C. J. Mathias, J. Nucl. Med. **28**, 462-470, (1987)
- [35] D. Block, H.H. Coenen, G. Stöcklin, J. Label. Compds. Radiopharm. **25**, 185-200 (1988)

- [36] R. Gail, H. H. Coenen, G. Stöcklin, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **35**, 197 (1994)
- [37] T. Ludwig, R. Gail, J. Ermert, H. H. Coenen, In: *Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds*. U. Pleiss, R. Voges (Eds.), Vol. 7, John Wiley & Sons, Chichester, 358 (2001)
- [38] H.-J. Wester, M. Dittmar, R. Herz, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Schwaiger, G. Stöcklin, *J. Nuc. Med.* **38**, 175 (2000)
- [39] T. Hara, N. Kosaka, H. Kishi, *J. Nucl. Med.* **43**, 187-199 (2002)
- [40] M. E. Spilker, T. Sprenger, M. Valet, G. Henriksen, K. Wagner, H.-J. Wester, T. R. Toelle, H. Boecker, *NeuroImage* **22**, 1523-1533 (2004)
- [41] S. Comagic, Diplomarbeit: Darstellung sekundärer Markierungsvorläufer zur ^{18}F -Fluorethylierung nukleophiler Gruppen, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (2001)
- [42] A. Bauman, Diplomarbeit: Vergleichende Untersuchung zur ^{18}F -Fluorethylierung mit den sekundären Markierungsvorläufern 2- ^{18}F fluorethyltosylat und 1-Brom-2- ^{18}F fluorethan, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (2002)
- [43] M.-R. Zhang, K. Furutsuka, Y. Yoshida, K. Suzuki, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **46**, 587-598 (2003)
- [44] A. Bauman, M. Piel, R. Schirmacher, F. Rösch, *Tetrahedron Letters* **44**, 9165-9167 (2003)
- [45] L. Zheng, M. S. Berridge, *Appl. Radiat. Isot.* **52**, 55 (2000)
- [46] R. Iwata, G. Horvath, C. Pascali, A. Bogni, K. Yanai, Z. Kovacs T. Ido, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **43**, 873 (2000)
- [47] DeGrado, T.; Coleman, R. E.; Wang, S; Baldwin, S. W.; Orr, M. D.; Robertson, C. N.; Polascik, T. J.; Price, D. T, *Cancer Res.* **61**, 110-117 (2000)
- [48] G. Stöcklin, V. W. Pike (eds.): *Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1993)
- [49] G. Stöcklin: Emission-Computertomographie mit kurzlebigen Zyklotron produzierten Radionukliden., in *Handbuch der medizinischen Radiologie*, Band 15/1 B, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1988)
- [50] H. J. Ache, A. P: Wolf, *J. Phys. Chem* **72**, 1988 (1968)

- [51] R. Wagner, G. Stöcklin, W. Schaack, J. Label. Compds. Radiopharm. **18**, 1557 (1981)
- [52] G. T. Bida, T. J. Ruth, A. P. Wolf, Radiochim. Acta **27**, 181, (1978)
- [53] D. R. Christman, E. J. Crawford, R. D. Finn, M. Friedkin, A. P. Wolf, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 988, (1971)
- [54] G. Antoni, T. Kihlberg, B. Langström, in Handbook of Nuclear Chemistry, Volume 4, Radiochemistry and Radiopharmaceutical chemistry in Life Sciences, Chapter 4, Kluwer Academic Publishers, Berlin, (2003)
- [55] C. Prenant, C. Crouzel, J. Label. Compds. Radiopharm **28**, 645 (1990)
- [56] S. Bonnot-Lours, C. Crouzel, C. Prenant, J. Label. Compds. Radiopharm **28**, 645 (1990)
- [57] D. M. Jewett, R. L. Ehrenkauf, S. Ram, Appl. Radiat. Isot. **36**, 672 (1985)
- [58] C. Crouzel, D. Roeda, M. Berridge, R. Knipper, D. Comar, . Int. J. Appl. Radiat. Isot. **34**, 1558 (1983)
- [59] P. Landais, C. Crouzel, Appl. Radiat. Isot. **38**, 297 (1987)
- [60] R. Iwata, T. Ido, T. Takahashi, H. Nakanishi, S. Lida, Appl. Radiat. Isot. **38**, 97 (1987)
- [61] J. O. Thorell, S. Stone-Elander, T. Duelfer, S. X. Cai, L. Jones, H. Pfefferkorn, G Ciszewska, J. Label. Compds. Radiopharm. **41**, 345-353 (1998)
- [62] R. Iwata, T. Ido, T. Takahashi, H. Nakanishi, S. Lida, Appl. Radiat. Isot. **38**, 277 (1993)
- [63] B. Langström, G. Antoni, P. Gullberg, C. Halldin, P. Malmberg, K. Nagren, A. Rimland, H. Svärd, J. Nucl. Med. **28**, 1037-1040 (1987)
- [64] E. Ehrin, L. Gawell, T. Högberg, T. de Paulis, P. Ström, J. Label. Compds. Radiopharm. **27**, 931-940 (1984)
- [65] K. Suzuki, O. Inoue, K. Tamate, F. Mikado, Appl. Radiat. Isot. **41**, 593-599 (1990)
- [66] B. Langström, H. Lundqvist, Int. J. Appl. Radiat. Isot. **27**, 357, (1976)
- [67] C. Marazano, M. Maziere, G. Berger, D. Comar, Appl. Radiat. Isot. **28**, 49 (1977)
- [68] F. Oberdorfer, M. Hanisch, F. Helus, W. Maier-Borst, Appl. Radiat. Isot. **36** 435, (1985)

- [69] M. Holschbach, M. Schüller, *Appl. Radiat. Isot.* **44**, 779 (1993)
- [70] J. M. Link, J. C. Clark, P. Larsen, A. K. Krohn, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **37**, 76 (1995)
- [71] P. Larsen, J. Ulin, K. Dahlstroem, M. Jensen, *Appl. Radiat. Isot.* **48**, 153 (1997)
- [72] M. Holschbach, M. Schüller, *Appl. Radiat. Isot.* **44**, 897 (1993)
- [73] O. Langer, K. Nagren, F. Dolle, C. Lundkvist, J. Sandell, C.-G. Swahn, F. Vaufrey, C. Crouzel, B. Maziere, C. Halldin, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **42**, 1183 (1999)
- [74] K. Nagren, C. Halldin, *J. Label. Compds. Radiopharm* **41**, 831 (1998)
- [75] S. A. Lipton, P. A. Rosenberg, *N. Engl. J. Med.* **330**, 613-622 (1994)
- [76] H. Stark, S. Graßmann, U. Reichert, *Pharmazie in unserer Zeit* **3**, 159-166 (2000)
- [77] W. Danysz, C. G. Parsons, *Pharm. Rev.* **50**, 597-664 (1998)
- [78] K. Moriyoshi, M. Masu, T. Ishii, R. Shigemoto, N. Mizuno, S. Nakanishi, *Nature* **354**, 31-37 (1991)
- [79] K. N. Kumar, N. Tilakarante, P. S. Johnson, A. E. Allen, E. K. Michaelis, *Nature* **354**, 70-73 (1991)
- [80] A. M. Ciabarra, J. M. Sullivan, L. G. Gahn, G. Pecht, S. Heinemann, K. A. Sevarino, *J. Neurosci.* **15**, 6498–6508 (1995)
- [81] M. Nishi, H. Hinds, H. P. Lu, M. Kawata and Y. Hayashi, *J. Neurosci.* **21**, 1-6 (2001)
- [82] N. W. Kleckner, R. Dingledine, *Science* **214**, 835-837 (1988)
- [83] R. J. Wenthold, N. Yokotani, K. Doi, K. Wada, *J. Biol. Chem.* **267**, 501-507 (1992)
- [84] B. Laube, J. Kuhse, H. Betz, *J. Neurosci.* **18**, 2954-2961 (1998)
- [85] S. Das, Y. F. Sasaki, T. Rothe, L. S. Premkumar, M. Takasu, J. E. Crandall, P. Dikkes, D. A. Conner, P. V. Rayudu, W. Cheung, H. S. Chen, S.A. Lipton N. Nakanishi, *Nature* **393**, 377–381 (1998)
- [86] Y. F. Sasaki, T. Rothe, L. S. Premkumar, S. Das, J. Cui, H. K. Wong, N. J. Sucher, D. Zhang, N. Nakanishi, S. A. Lipton, *J. Neurophysiol.* **87**, 2052-2063, (2002)

- [87] M. P. Mattson, B. Cheng, D. Davis, K. Bryant, I. Lieberburg, R. E. Rydel, J. Neurosci. **12**, 376-389 (1992)
- [88] C. J. McBain, M. L. Mayer, Physiol. Rev. **74**, 723-760 (1994)
- [89] D. J. Goebbel, M. S. Poosch, Mol. Brain Res **69**, 164-170 (1999)
- [90] S. Seeber, K. Becker, T. Rau, T. Eschenhagen, C. M. Becker, M. Herkert, J. Neurochem. **75**, 2472-2477 (2000)
- [91] S. I. Said, H. I. Berisha, H. Pakbash, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 4688-4692 (1996)
- [92] N. Inagaki, H. Kuromi, T. Gono, Y. Okamoto, H. Ishida, Y. Seino, T. Kaneko, T. Iwanaga, S. Seino, FASEB J. **9**, 686-691 (1995)
- [93] M. Jansen, G. Dannhardt, European Journal of Medicinal Chemistry **38**, 661-670 (2003)
- [94] J. Lehmann, J. Schneider, S. McPherson, D. E. Murphy, P. Bernard, C. Tsai, D. A. Bennett, G. Pastor, D. J. Steele, C. Boehm, D. L. Cheney, J. M. Liebermann, M. Williams, P. L. Wood, J. Pharmacol. Exp. Ther. **240**, 737-746 (1987)
- [95] A. J. Hutchison, M. Williams, C. Angst, R. de Jesus, L. Blanchard, R. H. Jackson, E. J. Wilusz, D. E. Murphy, P. S. Bernard, J. Schneider, T. Campbell, W. Guida, M. A. Sills, J. Med. Chem. **32**, 2171-2178 (1989)
- [96] P. L. Ornstein, V. J. Klimkowski, Competitive NMDA receptor antagonists. In: Excitatory Amino Acid Receptors: Design of Agonists and Antagonists, Ellis Horwood: Chichester, 183-200 (1992)
- [97] M. Schmutz, A. Arthur, H. Faleck, G. Karlsson, A. Kotake, L. Lantwickl, L. Larue, S. Markabi, D. Murphy, M. Powell, D. Sauer; In: P. L. Herling (Ed.): Excitatory Amino Acids-Clinical Results with Antagonists, Academic Press, San Diego, 1-6, (1997)
- [98] F. A. Stephenson, A. J. Turner, Eds., Amino Acid Neurotransmission, Portland Press, London (1998)
- [99] C. J. McBain, M. L. Mayer, Physiol. Rev. **74**, 723-760 (1994)
- [100] M. Kessler, T. Terramani, G. Lynch, M. Baudry, J. Neurochem. **52**, 1319-1328 (1989)
- [101] P. J. Birch, C. J. Grossman, A. G. Hayes. Eur. J. Pharmacol. **154**, 85-88 (1988)

- [102] P. D. Leeson, R. Baker, R. W. Carling, N. R. Curtis, W. K. Moore, B. J. Williams, A. C. Foster, A. E. Donald, J. A. Kemp, G. R. Marshall, *J. Med. Chem.* **34**, 1243-1252 (1991)
- [103] P. D. Leeson, L. L. Iversen, *J. Med. Chem.* **37**, 4053-4067, (1994)
- [104] M. J. Fray, D. J. Bull, C. L. Carr, E. C. L. Gautier, C. E. Mowbray, A Stobie, *J. Med. Chem.* **44**, 1951-1962 (2001)
- [105] R. di Fabio, A. M. Capelli, N. Conti, A. Cugola, D. Donati, A. Feriani, P. Gastaldi, G. Gaviraghi, C. T. Hewkin, F. Micheli, A. Missio, M. Mugnaini, A. Pecunioso, A. M. Quaglia, E. Ratti, L. Rossi, G. Tedesco, D. G. Trist, A. Reggiani, *J. Med. Chem.* **40**, 841-850 (1997)
- [106] P. A. Lapchack, *Brain Research* **1**, 141-147 (2006)
- [107] R. T. Kroemer, E. Koutsilieris, P. Hecht, K. R. Liedl, P. Riederer, J. Kornhuber, *J. Med Chem.* **41**, 393-400 (1998)
- [108] H-S. V. Chen, S. A. Lipton, *J. Neurochem.* **97**, 1611-1626 (2006)
- [109] J. Kornhuber, J. Bormann, W. Retz, M. Hubers, P. Riederer, *Eur. J. Pharmacol.* **166**, 589-590 (1989)
- [110] C. G. Parsons, G. Quack, I. Bresink, L. Baran, E. Przegalinsky, W. Kostowski, P. Krzascik, S. Hartmann, W. Danysz, *Neuropharmacology* **34**, 1239-1258 (1995)
- [111] J. Kornhuber, B. Herr, J. Thome, P. Riederer, *J. Neural. Transm. Suppl.* **46**, 131-137 (1995)
- [112] K. Williams, *Cell. Signal* **9**, 1-13 (1997)
- [113] P. Brackley, R. Goodnow, K. Nakanishi, H. L. Sudan, P. N. R. Usherwood, *Neuroscience Letters* **114**, 51-56 (1990)
- [114] A. K. Bence, D. T. Rogers, D. R. Worthen, M. Fu, J. M. Littleton, P. A. Crooks, *Bioorg. Med. Chem. Letters* **10**, 2621-2623 (2000)
- [115] M. J. Fray, D. J. Bull, C. L. Carr, E. C. L. Gautier, C. E. Mowbray, A Stobie, *J. Med. Chem.* **44**, 1951-1962 (2001)
- [116] G. Dannhardt, M. v. Gruchalla, B. K. Kohl, C. G. Parsons, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem* **333**, 267-264 (2000)
- [117] M. Piel, Dissertation: Synthese, n.c.a. ¹⁸F-Markierung und Evaluierung von Antagonisten der Strychnin-unempfindlichen-Glycinbindungsstelle auf Basis der 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

Johannes Gutenberg-Universität Mainz (2001)

- [118] M. Jansen, H. Potschka, C. Brandt, W. Löscher, G. Dannhardt, *J. Med. Chem.* **46**, 64-73 (2003)
- [119] B. K. Kohl, G. Dannhardt, *Curr. Med. Chem* **5**, 253-263 (1998)
- [120] R. N. Waterhouse, *Nuclear Medicine and Biology* **30**, 869-878, (2003)
- [121] P. Hartvig, J. Valtysson, G. Antoni, G. Westerberg, B. Langstrom, E. Rattimoberg, I. Oye, *Nuclear Medicine and Biology* **21**, 927-934 (2003)
- [122] E. Kumlien, P. Hartvig, S. Valind, I. Oye, J. Tedroff, B. Langstrom, *Epilepsia* **40**, 30-37 (1999)
- [123] C.-Y. Shiue, S. Vallabhahosula, A. P. Wolf, S. L. Dewey, J. S. Fowler, D. J. Schlyer, C. D. Arnett, Y. G. Zhou, *Nucl. Med. Biol.* **24**, 145-150 (1997)
- [124] J. Blin, A. Denis, T. Yamaguchi, C. Crouzel, E. T. MacKenzie, J. C. Baron, *Neurosci. Lett.* **121**, 183-186 (1991)
- [125] R. W. Ransom, W. S. Eng, H. D. Burns, R. E. Gibson, H. F. Solomon, *Life Sciences* **46**, 1103-1110 (1990)
- [126] S. Sihver, W. Sihver, Y. Andersson, T. Murata, M. Bergstrom, H. Onoe, K. Matsumura, H. Tsukada, L. Oreland, B. Langstrom, Y. Watanabe, *J. Neural. Transm.* **105**, 117-131 (1998)
- [127] K. Orita, S. Sasaki, M. Maeda, A. Hashimoto, T. Nishikawa, T. Yugami, K. Umezu, *Nucl. Med. Biol.* **20**, 865-873 (1993)
- [128] S. Samnick, *Nucl. Med. Biol.* **25**, 323 (1998)
- [129] S. Samnick, S. Ametamey, M. R. Gold, P. A. Schubiger, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **39**, 241-250 (1997)
- [130] S. M. Ametamey, M. Bruehlmeier, S. Kneifel, M. Kokic, M. Honer, M. Arigoni, A. Buck, C. Burger, S. Samnick, G. Quack, P. A. Schubiger, *Nucl. Med. Biol.* **29**, 227-231 (2002)
- [131] T. Haradira, S. Sasaki, M. Maeda, K. Kobayashi, O. Inoue, U. Tomita, T. Nishikawa, K. Suzuki; *J. Label. Compds. Radiopharm* **41**, 843 (1998)
- [132] T. Haradahira, T. Fuchigami, N. Fujimoto, T. Okauchi, J. Maeda, K. Suzuki, T. Suhara, F. Yamamoto, T. Mukai, M. Maeda; *J. Label. Compds. Radiopharm.* **48**, 92, (2005)
- [133] M. Rowley, J. J. Kulagowski, A. P. Watt, D. Rathbone, G. I. Stevenson, R. W. Carling, R. Baker, G. R. Marshall, J. A. Kemp, A. C. Foster, S. Grimwood, R.

- Hargreaves, C. Hurley, K. L. Saywell, M. D. Tricklebank, P. D. Leeson, J. Med. Chem **40**, 4053-4068 (1997)
- [134] M. Piel, R. Schirrmacher, S. Höhnemann, W. Hamkens, B. Kohl, M. Jansen, U. Schmitt, H. Lüddens, G. Dannhardt, F. Rösch, J. Label. Compd. Radiopharm. **46**, 645-659 (2003)
- [135] R. N. Waterhouse, A. Sultana, M. Laruelle, Nucl. Med. Biol. **29**, 791-794 (2002)
- [136] G. Roger, F. Dolle, B. de Bruin, X. Liu, L. Besret, Y. Bramouille, C. Coulon, M. Ottaviani, M. Bottlaender, H. Valette, M. Kassiou, Bioorg. Med. Chem. **12**, 3229-3237 (2004)
- [137] T. Haradahira, J. Maeda, T. Okauchi. M.-R. Zhang, J. Hojo, T. Kida, T. Arai, F. Yamamoto, S. Sasaki, M. Maeda, K. Suzuki, T. Suhara, Nucl. Med. Biol. **29**, 517-525 (2002)
- [138] T. G. Hamill, J. A. McCauley, H. D. Burns, J. Label. Compd. Radiopharm. **48**, 1-10 (2005)
- [139] A. F. Abdel-Magid, K. G. Carson, B. D. Harris, C. A. Maryanoff, R. D. Shah, J. Org. Chem. **61**, 3849-3862 (1996)
- [140] H. Eckert, B. Forster, Angew. Chem. **99**, 922 (1987)
- [141] H.A. Staab, W. Benz, Liebigs Ann. Chem. **648**, 72 (1961)
- [142] D. Bogdal, J. Pielichowski, A. Boron, Syn.. Commun. **28**, 3029-3039 (1998)
- [143] P. Lidström, J. Tierney, B. Wathey, J. Westman, Tetrahedron **57**, 9225-9283 (2001)
- [144] Organikum, 19. Auflage, Leipzig; Berlin; Heidelberg: Barth, Dt. Verl. der Wiss. (1993)
- [145] V. Gutmann, E. Wychera, Inorg. Nucl. Chem. Lett. **2**, 257 (1966)
- [146] M. Pailer, P. Bergthaller, Monatshefte für Chemie **99**, 103-111, (1968)
- [147] F. G. Bordwell, Acc. Chem. Res. **21**, 456 (1988)
- [148] G. Höfner, K.T. Wanner, J. of Receptor Signal Transduction Research **16**, 297 (1996)
- [149] M. M. Bradford, Analytical Biochemistry **72**, 248 (1976)
- [150] B. M. Baron, B. W. Siegel, B. L. Harrison, R. S. Gross, C. Hawes, P. Towers, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **279**, 62 (1996)

- [151] Y. Cheng and W.H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099 (1973)

- [152] V. W. Pike, *J. Psychopharmacol.* **7**, 139-158 ,(1993)
- [153] D. D. Dischino, M. J. Welch, M. R. Kilbourn, M. E. Raichle, *J. Nucl. Med.* **24**, 1030-1038 (1983)
- [154] S. M. Moerlein, P. Laufer, G. Stöcklin, *Int. J. Nucl. Med. Biol.* **12**, 353-356 (1985)
- [155] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1 **107**, Partition Coefficient (1995)
- [156] J. D. Krass, B. Jastorff, H. G. Genieser, *Anal. Chem* **69**, 2575-2581 (1997)