

**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**

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von

Markus Piel

geb. in Wiesbaden

Mainz, 2001

ABSTRACT

The glutamergic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor is a major ionotropic receptor type which mediates excitatory synaptic transmission in the mammalian central nervous system. It seems likely that the NMDA receptor is involved in a huge number of neurodegenerative disorders, such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease and schizophrenia. Additionally, the NMDA receptor has been shown to be essential for neuronal and behavioural plasticity and hence has effects on learning and memory. Thus, there has been a great interest in the development of radioligands for imaging the NMDA receptor complex by positron emission tomography. Therefore new ^{18}F -labelled NMDA receptor ligands were developed which may potentially allow the *in vivo* visualization of glutamergic neurotransmission.

The ^{19}F -analogues cADTC1, tADTC1 and tADTC3 - 5 and the non-fluorinated ^{12}C -analogue tADTC2 were synthesized and their *in vitro* binding affinity and lipophilicity were determined. With the exception of cADTC1 and tADTC5, which have micromolar affinities, the ligands exhibit low nanomolar affinities for the glycine binding site in [^3H]MDL-105,519 assays using pig cortical membranes. The lipophilicity was determined using HPLC, shake flask and a pH metric determination method and gave $\log D_{7,4}$ values of about 1 for cADTC1 and tADTC1 - 4. The ligand tADTC5 showed a low lipophilicity of $\log D_{7,4} = -1,15$, due to the nearly quantitative formation of a deprotonated and two-charged anion at this pH.

The radio synthesis of the ^{18}F -ligands were examined and optimised by labelling the precursors with 2- [^{18}F]fluoroethyl tosylate or [^{18}F]fluoride. The highest radiochemical yields of about 90% were achieved by labelling the precursors of t [^{18}F]ADTC4 and t [^{18}F]ADTC5 using 2- [^{18}F]fluoroethyl tosylate and NaOH as base. The preparation of c/t [^{18}F]ADTC1 and t [^{18}F]ADTC3 could be realized in RCY of 60% and 20% respectively. In the case of c/t [^{18}F]ADTC1 and t [^{18}F]ADTC3 the labelling reaction has to be followed by the cleavage of a protecting ester moiety. Using a 1N LiOH solution this cleavage was performed quantitatively after a reaction time of 5 minutes.

To determine the *in vivo* potency of t [^{18}F]ADTC1, the pharmacokinetics of this ligand were examined. The biodistribution kinetics were determined with Sprague Dawley rats *ex vivo* for brain, liver, kidney, and bone. t [^{18}F]ADTC1 showed a maximum brain uptake after 10 min. p.i. of about 0.03% ID/g.

In conclusion five new fluorinated kynurenic acid derivatives, with potential for application as NMDA PET ligands, are now available for systematic *in vitro* and *in vivo* evaluation.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Radionuklide in den Naturwissenschaften	1
1.2	Positronenemissionstomographie in der Nuklearmedizin	1
1.3	Fluor-18 als Positronenemitter	5
1.3.1	Radiopharmazeutische Aspekte von ¹⁸ F-Fluorierungen	5
1.3.2	Herstellung von Fluor-18	8
1.3.3	Grundlegende Verfahren zur ¹⁸ F-Markierung organischer Verbindungen.....	9
1.3.3.1	Elektrophile Fluorierung	10
1.3.3.2	Nukleophile Direktfluorierung.....	11
1.3.3.3	Fluorierung über prothetische Gruppen	13
1.4	Exzitatorische Aminosäuren	15
1.4.1	Exzitatorische Synapsen.....	15
1.4.2	Glutamatrezeptoren	17
1.4.3	Der NMDA-Rezeptorkomplex.....	18
1.4.4	Liganden des NMDA-Rezeptorkomplexes	22
1.4.4.1	Liganden der Glutamatbindungsstelle	22
1.4.4.2	Liganden der Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle.....	23
1.4.4.3	Liganden der Polyaminbindungsstelle.....	24
1.4.4.4	Liganden der Bindungsstelle im Ionenkanal	25
1.4.5	Struktur-Wirkungsbeziehungen der Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle.....	26
1.4.6	Bedeutung der exzitatorischen Neurotransmission für die PET	28
2	PROBLEMSTELLUNG	31
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	33
3.1	Synthetisierte Antagonisten der Glycinbindungsstelle	33
3.2	Synthese des 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters	34
3.3	Synthese der inaktiven Referenzverbindungen	37
3.3.1	Synthese der cis-/trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure.....	37
3.3.2	Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	40
3.3.3	Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	42
3.3.4	Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure.....	45
3.3.5	Synthese der trans- 5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	46

3.3.6	Synthese des 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-benzensulfonamids	49
3.4	Synthese der Markierungsvorläufer	50
3.4.1	Synthese der cis/trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure zur Markierung mit 2-[¹⁸ F]Fluorethyltosylat	52
3.4.2	Synthese des trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters zur Markierung mit 2-[¹⁸ F]Fluorethyltosylat	54
3.4.3	Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure zur Markierung mit 2-[¹⁸ F]Fluorethyltosylat	55
3.4.4	Synthese des trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-brom-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters zur Markierung mit [¹⁸ F]Fluorid	57
3.4.5	Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure zur Markierung mit 2-[¹⁸ F]Fluorethyltosylat	58
3.4.6	Synthese des 4-(4-Sulfamoyl-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylesters	60
3.4.7	Synthese des Toluol-4-sulfonsäure 2-[4-(4-nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]-ethylesters	60
3.4.8	Synthese des 4-[4-(2-Brom-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin-hydrochlorids	61
3.5	Stereokonfiguration der Derivate der 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	62
4	RADIOAKTIVE MARKIERUNGEN	67
4.1	Synthese von t[¹⁸F]ADTC1	67
4.1.1	Synthese von t[¹⁸ F]ADTC1 durch ¹⁸ F-Fluorethylierung von MV-tADTC1	67
4.1.2	Synthese von t[¹⁸ F]ADTC1 durch ¹⁸ F-Fluorethylierung von Methyl-MV-tADTC1 und anschließende Verseifung des Methylesters	69
4.1.2.1	Abhängigkeit der RCA von Methyl-t[¹⁸ F]ADTC1 von der Reaktionstemperatur und vom verwendeten Lösungsmittel	69
4.1.2.2	Abhängigkeit der RCA von Methyl-t[¹⁸ F]ADTC1 von der verwendeten Hilfsbase	72
4.1.2.3	Abhängigkeit der RCA von Methyl-t[¹⁸ F]ADTC1 von der Markierungsvorläuferkonzentration	73
4.1.2.4	Synthese von t[¹⁸ F]ADTC1 durch Esterspaltung von Methyl-t[¹⁸ F]ADTC1	74
4.2	Synthese von Methyl-c[¹⁸F]ADTC1	74
4.2.1	Synthese von Methyl-c[¹⁸ F]ADTC1 durch ¹⁸ F-Fluorethylierung von Methyl-MV-cADTC1	74
4.3	Synthese von t[¹⁸F]ADTC3	75
4.3.1	Synthese von t[¹⁸ F]ADTC3 durch ¹⁸ F-Fluorethylierung von Methyl-MV-tADTC3 und anschließende Verseifung des Methylesters	76
4.3.1.1	Abhängigkeit der RCA von Methyl-t[¹⁸ F]ADTC3 von der Reaktionstemperatur und vom verwendeten Lösungsmittel	76
4.3.1.2	Abhängigkeit der RCA von Methyl-t[¹⁸ F]ADTC3 von der Markierungsvorläuferkonzentration	78
4.3.1.3	Synthese von t[¹⁸ F]ADTC3 durch Esterspaltung von Methyl-t[¹⁸ F]ADTC3	79
4.4	Synthese von t[¹⁸F]ADTC4	79

4.4.1	Synthese von Methyl-t[¹⁸ F]ADTC4 durch ¹⁸ F-Fluorethylierung von Methyl-MV-tADTC4.....	80
4.4.2	Synthese von t[¹⁸ F]ADTC4 durch ¹⁸ F-Fluorethylierung von MV-tADTC4	82
4.4.2.1	Abhängigkeit der RCA von t[¹⁸ F]ADTC4 von der Reaktionstemperatur und vom verwendeten Lösungsmittel	82
4.4.2.2	Abhängigkeit der RCA von t[¹⁸ F]ADTC4 von der zugegebenen Hilfsbase	86
4.4.2.3	Abhängigkeit der RCA von t[¹⁸ F]ADTC4 von der Markierungsvorläuferkonzentration	88
4.4.3	Synthese von t[¹⁸ F]ADTC4 durch ¹⁸ F-Fluorierung von DMV-tADTC4	89
4.4.3.1	Abhängigkeit der RCA von Methyl-t[¹⁸ F]ADTC4 von der Reaktionstemperatur und vom verwendeten Lösungsmittel	90
4.4.3.2	Abhängigkeit der RCA von Methyl-t[¹⁸ F]ADTC4 von der Markierungsvorläuferkonzentration	92
4.5	Synthese von t[¹⁸F]ADTC5.....	93
4.5.1	Synthese von t[¹⁸ F]ADTC5 durch ¹⁸ F-Fluorethylierung von MV-tADTC5	93
4.5.1.1	Abhängigkeit der RCA von t[¹⁸ F]ADTC5 von der Reaktionstemperatur	93
4.5.1.2	Abhängigkeit der RCA von t[¹⁸ F]ADTC5 von der zugegebenen Hilfsbase	94
4.5.1.3	Abhängigkeit der RCA von t[¹⁸ F]ADTC5 von der Markierungsvorläuferkonzentration	95
4.6	Optimierte Reaktionsbedingungen der ¹⁸F-Markierungsreaktionen	96
5	BESTIMMUNG DER LIPOPHILIE.....	97
5.1	Bestimmung der Lipophilie mittels der HPLC-Methode.....	98
5.2	Bestimmung der Lipophilie mittels Titration	99
5.3	Bestimmung der Lipophilie mittels der Scheidetrichter-Methode	104
5.4	Vergleich der Methoden und Ergebnisse zur Bestimmung der Lipophilie der Referenzverbindungen.....	105
6	EXPERIMENTELLER TEIL	107
6.1	Verwendete Chemikalien und Geräte.....	107
6.2	Synthese der Referenzverbindungen und Markierungsvorläufer	110
6.2.1	4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester.....	110
6.2.1.1	Glyoxalsäuremethylester (1)	110
6.2.1.2	N-Benzyloxycarbonyl-N-vinylamin (2)	110
6.2.1.3	4-Benzyloxycarbonylamino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure-methylester (3).....	111
6.2.1.4	Epimerisierung des cis-4-Benzyloxycarbonylamino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters	112
6.2.1.5	4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4)	113
6.2.1.6	4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (5).....	114
6.2.2	Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	115

6.2.2.1	1-(2-Fluor-ethyl)-4-(4-nitro-phenyl)-piperazin (6).....	115
6.2.2.2	4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin (7).....	115
6.2.2.3	Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (8).....	116
6.2.2.4	Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (9).....	117
6.2.3	Trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure.....	118
6.2.3.1	4-(4-Amino-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (10).....	118
6.2.3.2	Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (11).....	119
6.2.3.3	Trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (12).....	121
6.2.3.4	Trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (13).....	122
6.2.4	Cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure.....	123
6.2.4.1	Cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (14).....	123
6.2.4.2	Cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (15).....	124
6.2.5	Cis-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure.....	125
6.2.5.1	Cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (16).....	125
6.2.5.2	Cis-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (17).....	127
6.2.5.3	Cis-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (18).....	128
6.2.6	Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure.....	129
6.2.6.1	1-Methyl-4-(4-nitro-phenyl)-piperazin (19).....	129
6.2.6.2	4-(4-Methyl-piperazin-1-yl)-phenylamin (20).....	129
6.2.6.3	Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (21).....	130
6.2.6.4	Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (22).....	131
6.2.7	Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure.....	132
6.2.7.1	(2-Fluor-ethyl)-(4-nitro-phenyl)-amin (23).....	132
6.2.7.2	N-(2-Fluor-ethyl)-benzen-1,4-diamin (24).....	132
6.2.7.3	(2-Fluor-ethyl)-(4-nitro-phenyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (25).....	133
6.2.7.4	(4-Amino-phenyl)-(2-fluor-ethyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethylesterhydrochlorid (26).....	134
6.2.7.5	Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-(2-fluor-ethyl)-amino]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (27).....	135
6.2.7.6	Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (28).....	136

6.2.7.7	Trans-5,7-Dichlor-4- {3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (29).....	137
6.2.8	Trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester	138
6.2.8.1	1,4-Phenylendiamin (30).....	138
6.2.8.2	(4-Amino-phenyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (31).....	138
6.2.8.3	Trans-5,7-Dichlor-4- {3-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (32).....	139
6.2.8.4	Trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (33)	140
6.2.9	Trans-5,7-Dichlor-4- {3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	141
6.2.9.1	1-(2-Fluor-ethoxy)-4-nitro-benzen (34).....	141
6.2.9.2	4-(2-Fluor-ethoxy)-phenylamin (35)	141
6.2.9.3	Trans-5,7-Dichlor-4- {3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (36).....	142
6.2.9.4	Trans-5,7-Dichlor-4- {3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (37)	143
6.2.10	Trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-hydroxy-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	144
6.2.10.1	Carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester 4-nitro-phenylester (38).....	144
6.2.10.2	Carbonsäure 4-amino-phenylester 9H-fluoren-9-ylmethylester (39)	144
6.2.10.3	Trans-5,7-Dichlor-4- {3-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (40).....	145
6.2.10.4	Trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-hydroxy-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (41)	146
6.2.10.5	Trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-hydroxy-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (42)	147
6.2.11	Trans-5,7-Dichlor-4- {3-[4-(2-brom-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester	148
6.2.11.1	1-(2-Brom-ethoxy)-4-nitro-benzen (43)	148
6.2.11.2	4-(2-Brom-ethoxy)-phenylamin-hydrochlorid (44)	148
6.2.11.3	Trans-5,7-Dichlor-4- {3-[4-(2-brom-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (45).....	149
6.2.12	Trans- 5,7-Dichlor-4-(3- {[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure.....	150
6.2.12.1	4-Hydroxy-benzensulfonamid (46).....	150
6.2.12.2	4-(2-Fluor-ethoxy)-benzonsulfonamid (47).....	151
6.2.12.3	Trans-5,7-Dichlor-4-(3- {[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (48).....	151
6.2.12.4	Trans-5,7-Dichlor-4-(3- {[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (49).....	152
6.2.13	Trans-5,7-Dichlor-4- {3-[(4-hydroxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure.....	153
6.2.13.1	Carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester 4-sulfamoyl-phenylester (50)	153
6.2.13.2	Trans-5,7-Dichlor-4- {3-[(4-hydroxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (51)	154
6.2.13.3	Essigsäure 4-sulfamoyl-phenylester (52).....	155
6.2.13.4	Trans-4- {3-[(4-Acetoxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (53).....	155

6.2.13.5	Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[(4-hydroxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro- chinolin-2-carbonsäure (54)	156
6.2.14	4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-benzensulfonamid	157
6.2.14.1	4-Piperazin-1-yl-benzensulfonamid-hydrochlorid (55)	157
6.2.14.2	4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-benzensulfonamid (56)	157
6.2.15	4-(4-Sulfamoyl-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester	158
6.2.15.1	4-Piperazin-1-yl-benzensulfonamid (57)	158
6.2.15.2	4-(4-Sulfamoyl-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (58)	159
6.2.16	Toluen-4-sulfonsäure 2-[4-(4-nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]-ethylester	159
6.2.16.1	2-[4-(4-Nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]-ethanol (59)	159
6.2.16.2	Toluen-4-sulfonsäure 2-[4-(4-nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]-ethylester (60)	160
6.2.17	4-[4-(2-Brom-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin-hydrochlorid	161
6.2.17.1	1-(2-Brom-ethyl)-4-(4-nitro-phenyl)-piperazin (61)	161
6.2.17.2	4-[4-(2-Brom-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin-hydrochlorid (62)	161
6.3	Radiosynthesen	163
6.3.1	Radioanalytische Verfahren	163
6.3.1.1	Radio-HPLC	163
6.3.1.2	Radio-Dünnschichtchromatographie	163
6.3.2	Markierungssynthesen mit [¹⁸ F]Fluorid	163
6.3.2.1	Herstellung der [¹⁸ F]Fluorid-Lösung	163
6.3.2.2	Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-[¹⁸ F]fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4- tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester; Methyl-t[¹⁸ F]ADTC4 (63)	164
6.3.3	Markierungssynthesen mit 2-[¹⁸ F]Fluorethyltosylat	164
6.3.3.1	Herstellung der 2-[¹⁸ F]Fluorethyltosylat-Lösung	165
6.3.3.2	Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-[¹⁸ F]fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)- 1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester; Methyl-t[¹⁸ F]ADTC1 (64)	165
6.3.3.3	Cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-[¹⁸ F]fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)- 1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester; Methyl-c[¹⁸ F]ADTC1 (65)	166
6.3.3.4	Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-[¹⁸ F]fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4- tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester; Methyl-t[¹⁸ F]ADTC3 (66)	166
6.3.3.5	Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-[¹⁸ F]fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4- tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester; Methyl-t[¹⁸ F]ADTC4 (63)	166
6.3.3.6	Trans-5,7-dichlor-4-{3-[4-(2-[¹⁸ F]fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4- tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure; t[¹⁸ F]ADTC4 (67)	167
6.3.3.7	Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-(2-[¹⁸ F]fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)- 1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure; t[¹⁸ F]ADTC5 (68)	167
6.3.4	Verseifung der ¹⁸ F-markierten Esterverbindungen	168
6.3.4.1	Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-[¹⁸ F]fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)- 1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure; t[¹⁸ F]ADTC1 (69)	168
6.3.4.2	Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-[¹⁸ F]fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4- tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure; t[¹⁸ F]ADTC3 (70)	168
7	ZUSAMMENFASSUNG	169
8	ANHANG	173
8.1	In vitro-Testung	173
8.1.1	Membranpräparation	173
8.1.2	Durchführung des [³ H]MDL-105,519-Rezeptorbindungsassays	175

8.1.3	Auswertung.....	176
8.1.4	In vitro-Affinitäten der Referenzverbindungen.....	177
8.2	In vivo-Testung	179
8.2.1	Stabilität der Injektionslösung.....	179
8.2.2	Biodistributionsstudien von t ^[18F] ADTC1	180
8.2.3	Biodistributionsstudien von Methyl-t ^[18F] ADTC1	181
9	VERZEICHNISSE	183
9.1	Abkürzungen.....	183
9.2	Literatur	186

1 Einleitung

1.1 Radionuklide in den Naturwissenschaften

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Methoden erarbeitet, die auf der Nutzung von Radionukliden in den Naturwissenschaften beruhen. Diese Entwicklung lässt sich vor allem auf 2 Eigenschaften der Radioisotope zurückführen.

Zum einen besteht eine hohe Nachweisempfindlichkeit geringster Mengen über die radioaktive Strahlung. Die Nachweisempfindlichkeit für Radioisotope ist in der Regel höher als jede andere analytische Methode. Dieser Aspekt bekommt eine um so größere Bedeutung, je höher der apparative Aufwand wird um immer niedrigere Nachweisgrenzen zu erzielen. Daher haben sich radioanalytische Verfahren einen festen Platz im Bereich der Analytik gesichert.

Das zweite Merkmal radiochemischer Methoden ist die Möglichkeit der Markierung identischer oder analoger Verbindungen. Hierbei wird ein Element durch ein entsprechendes radioaktives Isotop oder eine Verbindung durch eine entsprechend radioaktiv markierte Verbindung ersetzt. Dadurch ist es möglich, die Reaktionsmechanismen bzw. den Metabolismus des Radioisotops oder der markierten Verbindung zu verfolgen. Mit Hilfe dieses Verfahrens, welches sich auf Georg de Hevesy (Chemiker, 1885-1966) zurückführen lässt, werden heute vielfältige Prozesse untersucht, wie z. B. chemische Reaktionen, Transportprozesse oder physiologische Abläufe. Man bezeichnet diese Methode als Indikator- oder „tracer“-Methode und das entsprechende Radioisotop, oder die entsprechende radioaktiv markierte Verbindung, als Indikator oder „tracer“.

Aufgrund dieser Eigenschaften besitzen Radionuklide sehr vielseitige Anwendungsgebiete in den Natur- und Lebenswissenschaften:

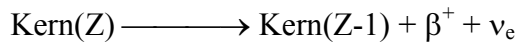
- In den *Geowissenschaften* nutzt man den Zerfall natürlicher Isotope zur Altersbestimmung [1].
- In der *organischen Chemie* nutzt man radioaktiv markierte Verbindungen, um komplizierte Reaktionsmechanismen zu untersuchen [2].
- In der *Analytik* zur Bestimmung von Spurenelementen (AA) [3].
- In der *Biochemie* wird durch die Markierung von Substraten die Aufklärung ihres Metabolismus ermöglicht [4].
- In der *Pharmazie* werden die Wirksamkeiten neuer ZNS-aktiver Substanzen mit Hilfe radioaktiv markierter Substanzen bestimmt [5].
- In der *Nuklearmedizin* können pathophysiologische Prozesse mittels der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) diagnostiziert [6], quantifiziert [7] und therapiert [8] werden.
- In den *Lebenswissenschaften* werden eine Vielzahl radioanalytischer Methoden verwendet (Autoradiographie [9], Radioimmunoassay [10], etc.).

1.2 Positronenemissionstomographie in der Nuklearmedizin

Beginnend mit den Pionierarbeiten von Rankowitz et al. [11] und Robertson et al. [12] aus dem Jahre 1962 erlangten Positronenstrahler in der Nuklearmedizin eine völlig neue Bedeutung. In diesen Arbeiten wurden erste Versuche unternommen, mit Hilfe von Positronenstrahlern tomographische Bilder zu erzeugen. Es dauerte allerdings noch bis zum Jahre 1975 bis der erste industriereife Po-

sitronenemissionstomograph vorgestellt wurde [13]. Mit Hilfe der Positronenemissionstomographie (PET) war es nun erstmals möglich, physiologische und dynamische Prozesse nicht-invasiv darzustellen. Aufgrund der speziellen Möglichkeit, Aktivitätskonzentrationen in vivo exakt quantifizieren zu können, nimmt die PET unter den anderen bildgebenden Verfahren (z. B. „Single-Photon-Emission-Tomography“ (SPET), Computer-Tomographie (CT), invasive Autoradiographie oder Ultraschalluntersuchung) eine Sonderstellung ein. Ermöglicht wird diese Quantifizierung durch die charakteristische Zerfallsart der verwendeten Radionuklide.

Bei den in der PET verwendeten Radionukliden handelt es sich um instabile neutronenarme Kerne, die sich durch Positronenemission stabilisieren:



Das emittierte Positron gibt seine hohe kinetische Energie in Form von Anregungs- und Ionisationsprozessen an die umgebende Materie ab und rekombiniert nach Abschluss der Thermalisierung mit seinem Antiteilchen, dem Elektron, intermediär zu einem Positronium. Dieses Positronium besitzt nur eine sehr kurze Lebensdauer ($\approx 10^{-10}$ s), die mit der Umwandlung der Ruhemassen der Antiteilchen in Energie endet. Bei diesem Annihilationsprozess werden zwei 511 keV γ -Quanten gebildet, die aufgrund des Energie- und Impulserhaltungssatzes unter einem Winkel von 180° emittiert werden [14]. Der Nachweis dieser Annihilations- oder Vernichtungsstrahlung erfolgt durch zwei gegenüberliegende Detektoren, die nur dann ein Zerfallsereignis registrieren, wenn innerhalb einer Koinzidenzzeit von 15-20 ns auf beide Detektoren ein γ -Quant trifft (Abb.1).

Bei diesem Messverfahren wird daher nicht der Entstehungsort des Positrons, sondern der Ort der Vernichtung detektiert. Da mit steigender maximaler Positronenergie des verwendeten Nuklids sich die mittlere Wegstrecke vergrößert, die das Positron zur Thermalisierung benötigt, führt dies automatisch zu einer bestimmten Unschärfe der Ortsbestimmung des eigentlichen Zerfalls.

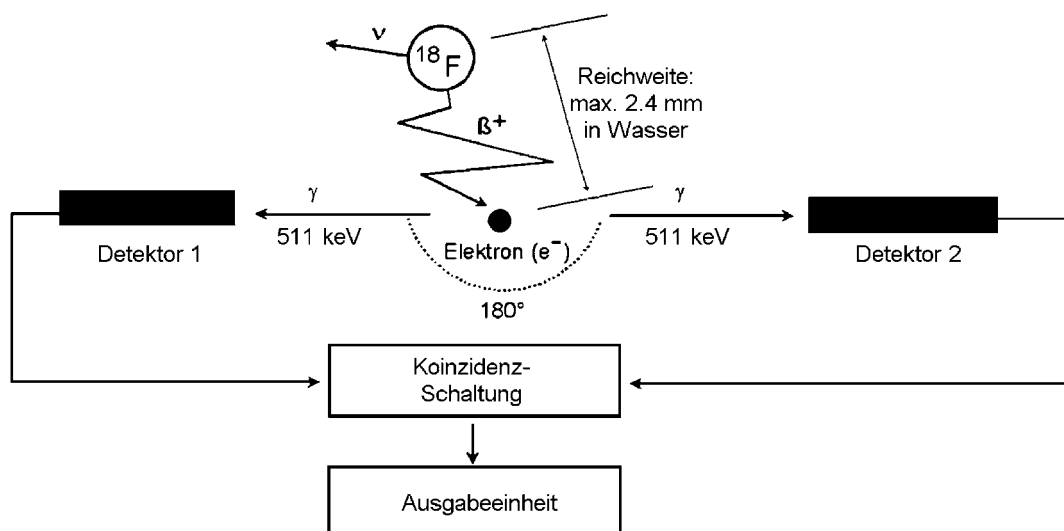


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Positronenemission und der Koinzidenzdetektion

Seit Einführung des ersten Positronenemissionstomographen wurden die Auflösung und Sensitivität der Geräte deutlich verbessert [15]. Bei heutigen PET-Kameras handelt es sich zumeist um Voll-

ringtomographen aus BGO-Blockdetektoren, die gegenüber den klassischen Thallium-dotierten Natriumiodid-Kristallen eine wesentlich verbesserte Nachweiswahrscheinlichkeit für 511 keV Photonen besitzen [16]. Diese Kameras bestehen aus mehreren Lagen ringförmig angeordneter BGO-Detektoren, die eine Ortsauflösung von 4-6 mm und die gleichzeitige Aufnahme mehrerer Schichten ermöglichen (Abb.2).

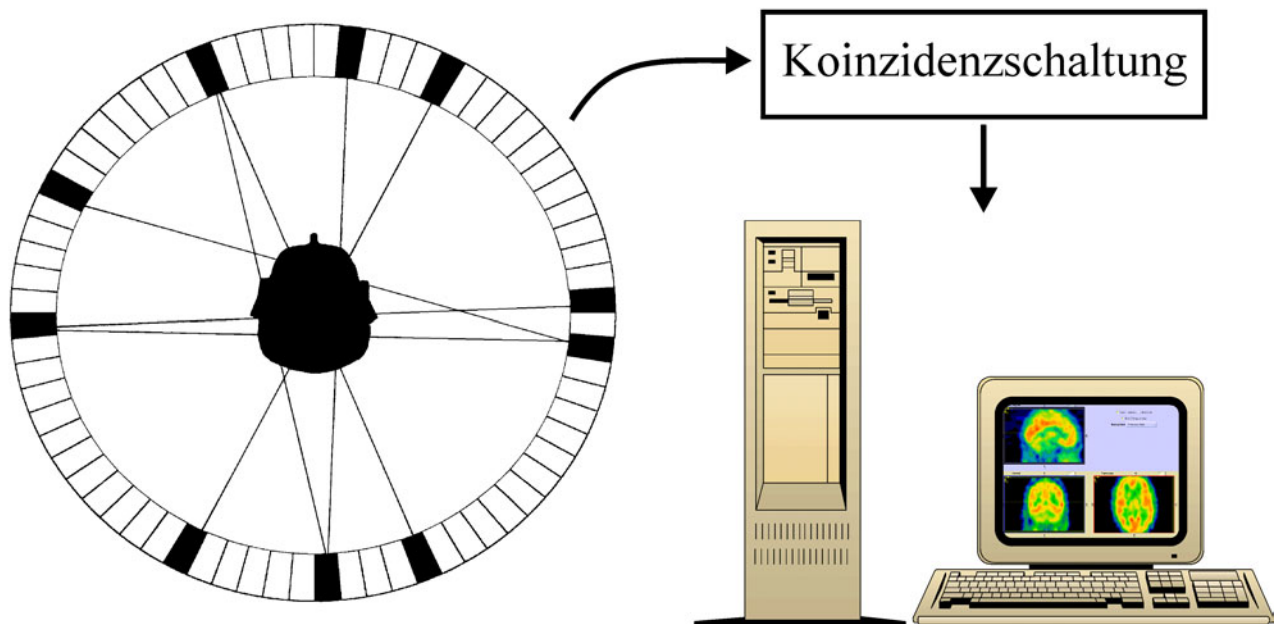


Abbildung 2: Messprinzip eines Positronenemissionstomographen

Vorraussetzung für eine gute Visualisierung eines biochemischen Prozesses mit Hilfe dieses Verfahrens ist das Vorhandensein eines geeigneten Biomoleküls und die Wahl des richtigen Positronenemitters, mit dem das Biomolekül markiert wird. Im Hinblick auf die Wahl des Radionuklids sind insbesondere folgende Eigenschaften des Isotops von Bedeutung:

- Halbwertszeit
- Häufigkeit des Positronenzerfalls
- Energie der Positronen
- Isotop- oder Analogtracer-Eigenschaften
- Syntheseweg und Verfügbarkeit

Ein besonders zu beachtendes Kriterium ist die Halbwertszeit des verwendeten Isotops, weil diese mit der biologischen Halbwertszeit des jeweils zu markierenden Moleküls korrelieren muss: Isotope mit kurzen Halbwertszeiten sind zur Untersuchung von Prozessen mit langer Reaktionsdauer (z.B. Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen) ungeeignet. Außerdem limitieren kurze Halbwertszeiten auch die chemischen Synthesestrategien. Mit kurzlebigen Nukliden werden daher nur sehr einfache Biomoleküle markiert, wie zum Beispiel [^{15}O]Wasser, [^{15}O]Butanol oder [^{13}N]Ammoniak.

Neben der schon erläuterten Positronenemission existiert ein weiterer Zerfallsweg für neutronendefizitäre Nuklide, der sogenannte Elektroneneinfang. Hierbei fängt der Kern ein Elektron (zumeist aus der K-Schale) ein, um seinen Protonenüberschuss zu kompensieren. Die nach dem Elektroneneinfang vorhandene Lücke in der Elektronenschale wird dann durch ein Elektron aus der nächst höheren Schale, bei gleichzeitiger Emission von K-Strahlung oder eines „Auger“-Elektrons, aufge-

füllt. Die Wahrscheinlichkeit für diesen Zerfallsweg steigt im allgemeinen mit sinkender Zerfallsenergie und mit steigender Ordnungszahl des Nuklids. Da der Anteil des Elektroneneinfangs nicht für die Positronenemissionstomographie zur Verfügung steht, sind Nuklide mit einer sehr geringen Häufigkeit des Elektroneneinfangs wünschenswert.

Die Positronenenergie des Nuklids ist zu beachten, da eine hohe Positronenenergie sowohl zu einer Verschlechterung der Ortsauflösung (siehe oben) als auch zu einer erhöhten Strahlenbelastung für den Patienten führt.

Die meisten physiologisch interessanten Moleküle bestehen aus Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff, weshalb sich insbesondere die Positronenemitter ^{11}C , ^{15}O und ^{13}N zu deren Markierung eignen. Bei derartig markierten Verbindungen, die als „Isotopentracer“ bezeichnet werden, handelt es sich um den Idealfall, da sich die Eigenschaften der isotope markierten Verbindungen normalerweise nicht von denen der Referenzverbindungen unterscheiden. Die auftretenden Isotopeneffekte (^{16}O vs. ^{15}O , ^{14}N vs. ^{13}N , ^{12}C vs. ^{11}C) sind für markierte Verbindungen vernachlässigbar. Im Gegensatz dazu bezeichnet man markierte Verbindungen, die gegenüber der Referenzverbindung chemisch verändert wurden, als Analogtracer. Es handelt sich hierbei um Markierungen mit solchen Positronenemittern die nicht oder nur selten in Biomolekülen vorkommen, wie zum Beispiel ^{18}F , ^{73}Se und ^{76}Br . Bei Markierungen mit diesen Positronenemittern macht man sich chemische Analogien zunutze, ohne jedoch dabei die physiologischen Eigenschaften des Moleküls gravierend zu verändern. Üblicherweise werden in diesem Fall Analogien im Bindungsverhalten ($\text{OH} \rightarrow ^{18}\text{F}$), sterische Analogien ($\text{CH}_3 \rightarrow ^{75}\text{Br}$) oder chemische Analogien ($\text{S} \rightarrow ^{73}\text{Se}$) benutzt, um das Nuklid einzuführen. Im Falle des ^{18}F existieren allerdings eine Reihe von geeigneten Isotopenträgern, da einige wichtige Arzneimittel fluorhaltige Moleküle sind.

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

Aufgrund der benötigten Eigenschaften ist daher die Auswahl an geeigneten Positronenemittern recht klein. Einen Überblick über die zur Zeit wichtigsten Nuklide gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Wichtige Positronenemitter in der Positronenemissionstomographie

Nuklid	$T_{1/2}$	Zerfallsart [Häufigkeit %]	$E_{\beta^+, \max}$	Reichweite (H_2O)
^{11}C	20,30 min	β^+ 99,8 EC 0,2	0,96 MeV	4,1 mm
^{13}N	9,96 min	β^+ 100	1,19 MeV	5,4 mm
^{15}O	2,03 min	β^+ 99,9 EC 0,1	1,70 MeV	8,2 mm
^{18}F	109,70 min	β^+ 96,9 EC 3,1	0,63 MeV	2,4 mm
^{76}Br	16,7 h	β^+ 66,5 EC 33,5	3,60 MeV	15,5 mm
^{86}Y	14,7 h	β^+ 31,4 EC 68,6	1,18 MeV	5,3 mm
^{124}I	4,17 d	β^+ 23,0 EC 67,0	2,14 MeV	9,8 mm

1.3 Fluor-18 als Positronenemitter

Obwohl ^{18}F meist als Analogtracer eingesetzt werden muss, gehört es zusammen mit ^{11}C -Kohlenstoff zu den wichtigsten PET-Radionukliden. Diese herausragende Stellung liegt in den Vorteilen begründet, die es gegenüber den „organischen“ Nukliden ^{11}C , ^{13}N und ^{15}O besitzt:

- Aufgrund der verwendeten Kernreaktionen für die Synthese des ^{18}F -Fluor sind sehr hohe spezifische Aktivitäten erreichbar. Dieser Aspekt ist insbesondere bei toxischen Radiopharmaka und bei Radioliganden zur Untersuchung von Rezeptorsystemen wichtig.
- Seine Halbwertszeit von 109,7 min ermöglicht auch mehrstufige Synthesen komplizierter Moleküle, mit anschließender Reinigung und Qualitätskontrolle vor der Injektion.
- ^{18}F -Fluor besitzt die niedrigste Positronenenergie und ermöglicht damit die theoretisch beste Ortsauflösung bei gleichzeitig niedriger Strahlenbelastung.
- Im Vergleich mit den anderen Halogenen besitzt die Fluor-Kohlenstoff-Bindung die höchste Stabilität. Daher haben ^{18}F -markierte Verbindungen die besten Voraussetzungen an ihren Wirkungsort zu gelangen, ohne dass es vorher zu einer Dehydrohalogenierung im Organismus kommt.

1.3.1 Radiopharmazeutische Aspekte von ^{18}F -Fluorierungen

Bei radiopharmazeutischen Untersuchungen von ^{18}F -Fluorierungen sind insbesondere die spezifischen Aktivitäten der markierten Verbindungen und die Reaktionskinetiken von n.c.a.-Markierungen zu beachten:

Spezifische Aktivität

Bei vielen ^{18}F -Fluorierungen ist eine hohe spezifische Aktivität, definiert als die Aktivität bezogen auf die Gesamtstoffmenge isotoper Moleküle (in [GBq/mmol] oder [Ci/mmol]), von außerordentli-

cher Bedeutung (wie z. B. bei Rezeptoraffinitätsstudien). Sie wird in der Radiochemie in drei verschiedene Klassen unterteilt:

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

Als trägerfrei bezeichnet man einen Zustand, bei dem nur das radioaktive Isotop vorkommt, ohne Verdünnung durch die jeweiligen inaktiven Isotope. Für trägerfreies Fluor-18 ergibt sich dabei eine theoretische maximale Aktivität von $6,34 \cdot 10^{10}$ GBq/mol. Dieser Zustand ist bei natürlichen Elementen allerdings nicht zu erreichen, da es aufgrund der Allgegenwärtigkeit der Elemente immer zu einer Kontamination des Radionuklids mit inaktivem Träger kommt. Der Grad dieser Verdünnung ist jedoch stark von der Häufigkeit des Elements abhängig, weshalb es beim Kohlenstoff zu einer Verdünnung des Radionuklids um den Faktor 10-10.000 kommt, beim relativ selten vorkommenden Fluor dagegen nur um den Faktor 10-100. Diese Kontamination erfolgt zum Teil schon während der Herstellung der radioaktiven Nuklide, aber hauptsächlich während der darauffolgenden Synthesen. Daher verwendet man für Markierungssynthesen mit diesen radioaktiven Isotopen den Begriff „ohne Trägerzusatz (n.c.a.)“, da kein weiterer Träger zugesetzt wurde, aber eine Verdünnung nicht vermieden werden kann. Bei manchen Reaktionen ist es allerdings unumgänglich, weiteren inaktiven Träger hinzuzusetzen (siehe auch 1.3.3.1 elektrophile Fluorierung), so dass man diese Reaktionen als „geträgert (c.a.)“ bezeichnet. Im allgemeinen jedoch ist ein Trägerzusatz unerwünscht, da er die maximal erreichbare spezifische Aktivität stark erniedrigt und somit zu Problemen hinsichtlich Toxizität und pharmakodynamischer Wirkung führen kann. Radiopharmaka aus n.c.a.-Radionukliden werden normalerweise im Subnanogrammbereich dosiert, weshalb keinerlei pharmakodynamische Wirkung zu erwarten ist.

Reaktionskinetiken radiochemischer n.c.a.-Markierungen:

Da bei diesen ^{18}F -Markierungsreaktionen zwischen den Edukten große Konzentrationsunterschiede vorliegen (pro Reaktion ca. $5 - 30 \text{ MBq} \Rightarrow 7,9 \cdot 10^{-14} - 4,7 \cdot 10^{-13} \text{ mol } ^{18}\text{F}$ und ca. $1 - 20 \mu\text{mol}$ Markierungsvorläufer), weichen die Reaktionskinetiken deutlich von denen der normalen präparativen nukleophilen Substitution ab. Aufgrund der gewählten Reaktionsbedingungen (siehe auch 1.3.3.2) handelt es sich stets um eine bimolekulare, nukleophile Substitution ($\text{S}_{\text{N}2}$), die einem Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung gehorcht:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [\text{MV}] \cdot [A] \quad \text{mit } -d[A] = d[\text{P}], \quad (1)$$

wobei $[A]$ die eingesetzte Aktivität, $[\text{MV}]$ die Konzentration des Markierungsvorläufers und $[\text{P}]$ die Konzentration des Produktes ist. Da der Markierungsvorläufer gegenüber der Aktivität im großen Überschuss vorliegt, kann man dessen Konzentration während der Reaktion als konstant betrachten, womit aus Gleichung (1) folgt:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k' [A] \quad \text{mit } k' = k \cdot [\text{MV}] \quad (2)$$

Daraus ergibt sich:

$$\ln \frac{[A_t]}{[A_0]} = -k' \cdot t \quad \text{bzw.} \quad (3)$$

$$[A_t] = [A_0] \cdot \exp(-k' \cdot t) \quad (4)$$

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

$$[P] = [A_0] \cdot (1 - \exp(-k' \cdot t)) \quad (5)$$

Aus dieser Gleichung folgt, dass es sich bei n.c.a. Markierungen immer um Reaktionen pseudoerster Ordnung handelt. Dabei setzt sich die beobachtbare Geschwindigkeitskonstante k' aus der realen Geschwindigkeitskonstanten k und der Ausgangskonzentration des Markierungsvorläufers $[MV]$ zusammen. Wenn man die Kinetik einer solchen pseudo S_N1 -Substitution ermittelt und in Form eines Graphen, bei dem man die Reaktionsdauer gegen die radiochemische Ausbeute aufträgt, auswertet, sollte die erhaltene Kurve sich exponentiell einer Asymptote nähern (siehe Abb. 3). Diese Asymptote stellt die maximal erhältliche radiochemische Ausbeute RCA_{\max} dar. Da sich außerdem die Geschwindigkeitskonstante k' aus der eigentlichen Geschwindigkeitskonstanten k als auch aus der Markierungsvorläuferkonzentration $[MV]$ zusammensetzt, ist bei gleichbleibender Konzentration $[MV]$ der anfängliche Teil der Kurve um so steiler, je größer k , also je reaktiver das Substrat MV , ist.

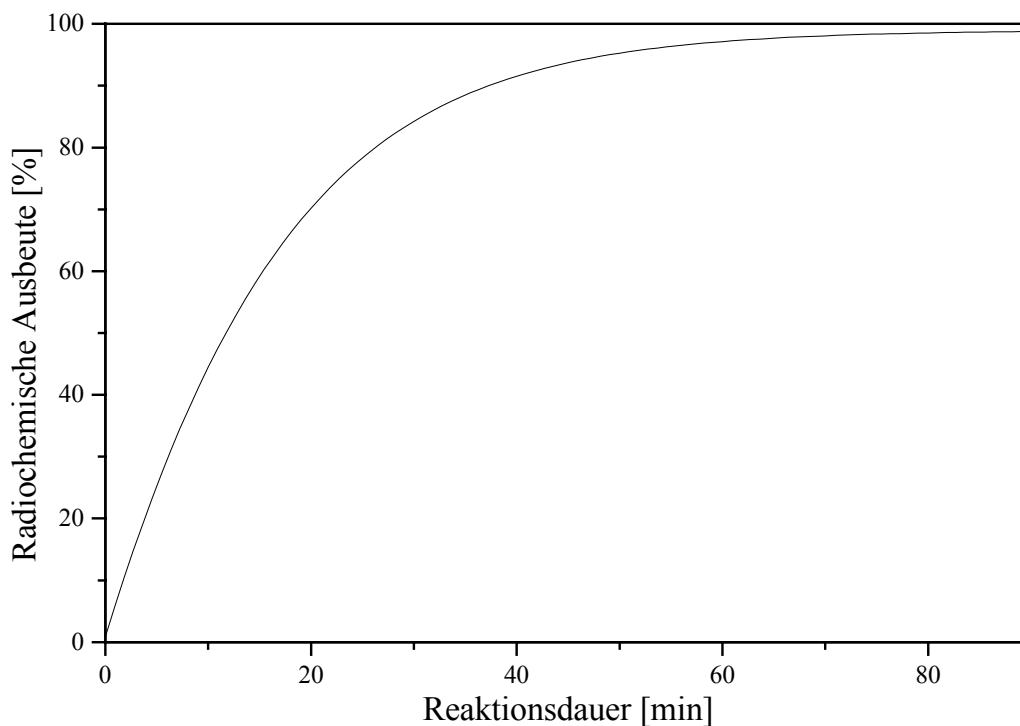


Abbildung 3: Verlauf einer n.c.a. Markierung bei gewähltem $k' = 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Ermittelt man die radiochemische Ausbeute bei einer konstanten Reaktionszeit t und variiert dagegen die Konzentration des Markierungsvorläufers $[MV]$, so lässt sich t in die Geschwindigkeitskonstante miteinbeziehen und man erhält einen der Zeitabhängigkeit (Abb. 3) analogen Verlauf der Kurve. Diese zeigt die Abhängigkeit der Reaktion von der Konzentration des Markierungsvorläufers. Mit Hilfe der erhaltenen Kurve lässt sich die optimale Konzentration des Markierungsvorläufers bestimmen.

1.3.2 Herstellung von Fluor-18

Die Herstellung von ^{18}F erfolgt heute an kleinen, stromstarken Zyklotronen. Dabei ist ^{18}F -Fluor je nach Kernreaktion in 2 verschiedenen chemischen Spezies verfügbar: in einer nukleophilen, ungeträgerten Form als $[^{18}\text{F}]\text{F}_{\text{aq}}^-$, oder als elektrophiles, geträgertes $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$. Von den vielen Möglichkeiten, ^{18}F zu produzieren [17], sollen hier die vier wichtigsten aufgeführt werden (Tab. 2).

Tabelle 2: Wichtige ^{18}F -Produktionsprozesse [18]

Kernreaktion	Target	Chemische Form des Fluors	Spezifische Aktivität [GBq/mmol]
$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	H_2^{18}O	$[^{18}\text{F}]\text{F}_{\text{aq}}^-$	$37 \cdot 10^5$
$^{16}\text{O}({}^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$	H_2O	$[^{18}\text{F}]\text{F}_{\text{aq}}^-$	$37 \cdot 10^5$
$^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$	$\text{Ne}(\sim 0,2\% \text{F}_2) / 18 \text{ bar}$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	37-370
$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}_2, \text{Kr} (1\% \text{F}_2) / 20 \text{ bar}^*$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	37-1850

* zweistufige Bestrahlungsmethode

Die Produktion des elektrophilen $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ geschieht entweder über eine $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ - oder eine $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Reaktion jeweils in einem Gastarget (Abb. 4). Das so gebildete $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ adsorbiert an der Targetwand und kann nur nach einem Isotopenaustausch als $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ aus dem Target ausgeschleust werden. Da deshalb zwingend F_2 als Träger zugesetzt werden muss, sind die spezifischen Aktivitäten deutlich geringer als bei der Herstellung von $[^{18}\text{F}]\text{F}_{\text{aq}}^-$.

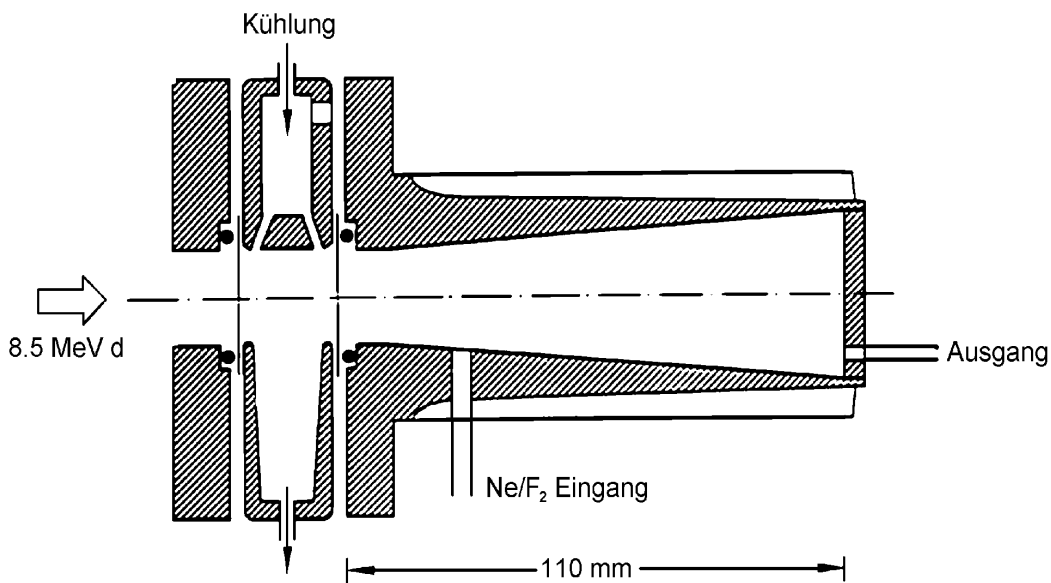


Abbildung 4: Aufbau eines Gastargets zur Produktion von $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$

Die Darstellung des nukleophilen Fluorids erfolgt zumeist nach der $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Kernreaktion, da sie einen wesentlich höheren Wirkungsquerschnitt als die $^{16}\text{O}({}^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$ -Kernreaktion besitzt [19]. Die Protonen haben hierbei eine Energie von $E_p=16 \rightarrow 3 \text{ MeV}$. Das $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ gibt man nach der Be-

strahlung über einen Anionenaustauscher und eluiert anschließend mit wässriger Kaliumcarbonatlösung. Dabei kann das $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ wiedergewonnen werden, was aufgrund der hohen Kosten für das ^{18}O -angereicherte Wasser für die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens wichtig ist. Nach anschließender photochemischer und destillativer Reinigung steht es für die nächste Bestrahlung wieder als Targetmaterial zur Verfügung. Der schematische Aufbau eines solchen Targets ist Abbildung 5 zu entnehmen.

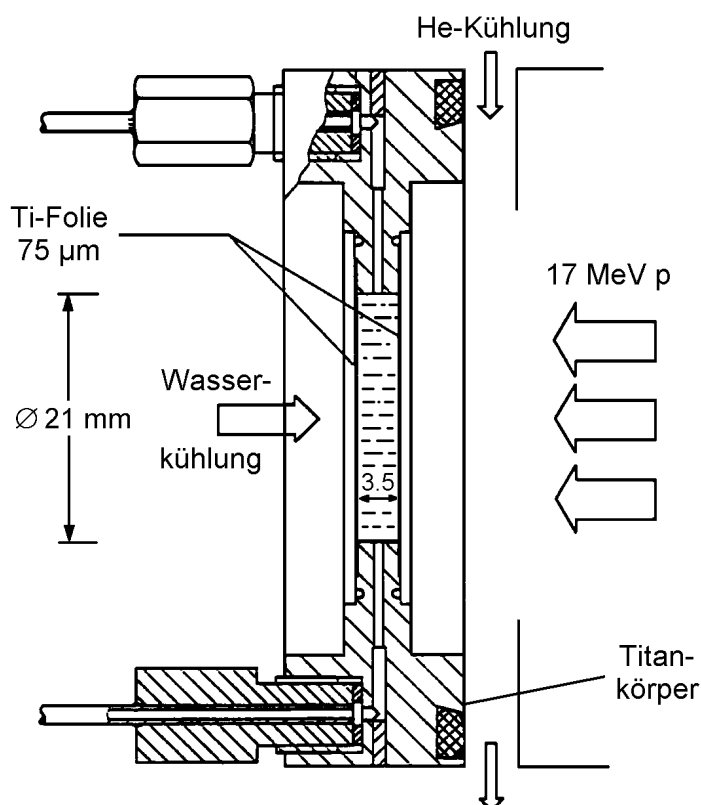


Abbildung 5: Aufbau eines Wassertargets zur Produktion von $[^{18}\text{F}]\text{F}_{\text{aq}}^-$

1.3.3 Grundlegende Verfahren zur ^{18}F -Markierung organischer Verbindungen

Da ^{18}F meist als Analogtracer eingesetzt wird, muss das zu markierende Molekül modifiziert werden. Dabei macht man sich folgende Analogien zunutze:

$\text{H} \rightarrow ^{18}\text{F}$: Da der Van-der-Waals-Radius von Fluor (1,35 Å) dem Atomradius von Wasserstoff (1,20 Å) ähnelt, wird diese sterische Analogie häufig zum Einführen des Fluors verwendet. Es ist jedoch zu beachten, dass aufgrund der starken Elektronegativitätsunterschiede zwischen Wasserstoff ($E_{\text{N}}=2,2$) und Fluor ($E_{\text{N}}=4,1$) mit einer Änderung der Polarität und der Ladungsverteilung im Molekül zu rechnen ist.

$\text{OH} \rightarrow ^{18}\text{F}$: Da sich sowohl Fluor als auch Hydroxyfunktionen als Elektronenpaardonatoren bei der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beteiligen und zudem ähnliche Bindungslängen besitzen (C-F: 1,39 Å; C-OH: 1,43 Å), wird auch diese Analogie zur Einföhrung des Fluors verwendet. Ein typisches Beispiel für diese Art der Substitution ist die

2-[¹⁸F]Fluor-2-deoxy-D-glucose (Abb.9), das weltweit meistgenutzte Radiopharmakon, zu nennen.

Neben diesen häufig angewendeten Analogieprinzipien werden aber auch andere Modifikationen zur Einführung des ¹⁸F-Fluors durchgeführt. Eine in diesem Zusammenhang oft benutzte Verfahrensweise ist die Substitution von ¹¹C-Methylgruppen durch zu ¹⁸F-Fluorethylgruppen. Als Beispiele für dieses Vorgehen seien hier das 3-N-[¹¹C]Methylspiperon (→ 3-N-(ω-[¹⁸F]Fluorethyl)spiperon [20]) und das 5-([¹¹C]Methyl)flumazenil (→ 5-(2'-[¹⁸F]Fluorethyl)flumazenil [21]) genannt.

Die eigentliche Einführung des ¹⁸F-Fluorids in die jeweiligen organischen Markierungsvorläufer lässt sich in drei grundlegende Verfahren unterteilen:

- die elektrophile Fluorierung mit c.a. ¹⁸F[F₂]
- die nukleophile Fluorierung mit n.c.a. [¹⁸F]F_{aq}⁻
- Einführung des ¹⁸F-Fluors über eine prosthetische Gruppe

Im allgemeinen wird die nukleophile Fluorierung bevorzugt, da es sich hierbei um eine n.c.a Markierung handelt.

1.3.3.1 Elektrophile Fluorierung

Als Fluorierungsmittel bei elektrophilen Fluorierungen dienen [¹⁸F]F₂, [¹⁸F]XeF₂ und [¹⁸F]Acetylhypofluorit, von denen die letzteren beiden mildere Fluorierungsmittel als [¹⁸F]F₂ sind. Ein Nachteil dieser Fluorierungsmittel ist allerdings die fehlende Regiospezifität, weshalb es bei solchen Markierungen zu Isomergemischen kommt.

Außerdem liegen die elektrophilen Fluorierungsmittel aufgrund des Syntheseweges im Gegensatz zu den nukleophilen Markierungsreagenzien nur geträgert vor (siehe auch Abschnitt 1.3.2), weshalb die radiochemische Ausbeute maximal 50% betragen kann (da beide Fluorisotope im ¹⁸F-¹⁹F-Molekül nahezu die gleiche Reaktivität besitzen und ein Fluoratom als HF „verloren geht“). Daher werden sie nur zur Markierung von Substanzen angewendet, bei denen es nicht auf eine hohe spezifische Aktivität ankommt (zumeist bei metabolischen Tracern wie Aminosäuren, Kohlenhydraten oder Fettsäuren [22]).

Die Anwendung der elektrophilen Fluorierung betrifft heute deshalb hauptsächlich die Darstellung einiger aromatische Aminosäuren, wie 2-[¹⁸F]Fluor-L-tyrosin, 4-[¹⁸F]Fluor-L-phenylalanin oder 6-[¹⁸F]Fluor-L-dopa (Abb. 6).

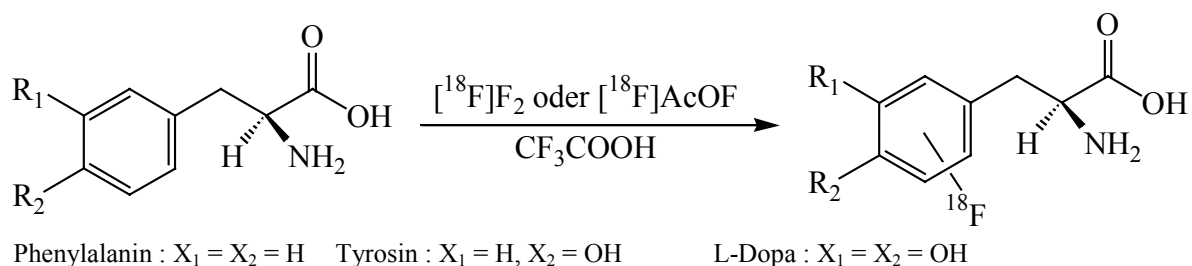


Abbildung 6: Elektrophile ¹⁸F-Fluorierung aromatischer Aminosäuren

Eine Möglichkeit, die Regioselektivität der elektrophilen ^{18}F -Fluorierungsagentien zu erhöhen, besteht in einer Demetallierungsreaktion. Man verwendet Aryltrimethylmetallverbindungen als Markierungsvorläufer, in welche sich $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ oder $[^{18}\text{F}]\text{AcOF}$ durch Substitution der Trimethylmetallgruppe sehr selektiv einführen lassen (Abb. 7).

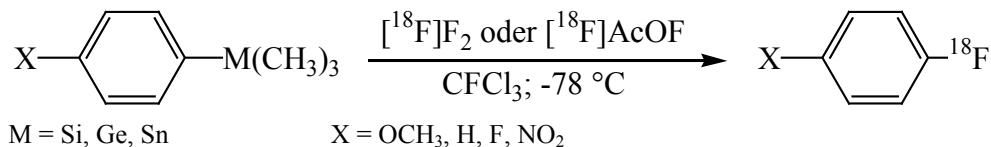


Abbildung 7: Fluordemetallierungsreaktionen

1.3.3.2 Nukleophile Direktfluorierung

Die nukleophile Direktfluorierung ist die wichtigste Methode, ^{18}F in ein Molekül einzuführen. Da das Fluorid wegen seiner großen Ladungsdichte in wässriger Lösung sehr große Solvathüllen ausbildet und durch acide Protonen sehr leicht zum Fluorwasserstoff protoniert wird, müssen sehr spezifische Reaktionsbedingungen gewählt werden, die verhindern, dass die große Nukleophilie des Fluors durch die oben genannten Prozesse maskiert wird:

- Lösungsmittel

Man verwendet dipolar aprotische Lösungsmittel mit einer Dielektrizitätskonstante $\epsilon > 20$, die zwar dissoziierend auf Salze wirken, das ^{18}F -Fluorid aber nicht protonieren. Besonders häufig werden Acetonitril (MeCN; $\epsilon = 37$), Dimethylformamid (DMF; $\epsilon = 37$), Dimethylsulfoxid (DMSO; $\epsilon = 47$) und Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPTA; $\epsilon = 30$) als Lösungsmittel eingesetzt [23].

- Phasentransferkatalysatoren

Um die Löslichkeit des $[^{18}\text{F}]\text{Kaliumfluorids}$ in Acetonitril zu erhöhen und seine übermäßige Adsorption an den Gefäßwänden zu verhindern, gibt man der Lösung Phasentransferkatalysatoren zu. Besonders bewährt haben sich Aminopolyether wie zum Beispiel Kryptofix[®] 2.2.2 oder Tetraalkylammoniumhydroxide bzw. -carbonate [24]. Im Falle des Kryptofix[®] 2.2.2 sind die Effekte der Anionenaktivierung besonders drastisch, da die Komplexbildung des Kaliums durch den Kryptanden praktisch zu einem nackten Anion mit sehr ausgeprägter Nukleophilie führt.

- Basen

Durch Zugabe nicht nukleophiler, basischer Anionen wie Oxalat oder Carbonat werden basische Reaktionsbedingungen herbeigeführt, die eine Bildung von ^{18}F -Fluorwasserstoff verhindern. Sehr häufig wird dabei das Carbonatsystem verwendet. Für den Fall, dass der Markierungsvorläufer in stark basischen Bedingungen instabil ist, greift man auf das weniger basische Oxalat oder ein Mischsystem Oxalat/Carbonat zurück.

Um optimale Ergebnisse bei der nukleophilen Fluorierung zu erreichen, muss die Trocknung des $[^{18}\text{F}]\text{Fluorids}$ sehr sorgfältig durchgeführt werden. Dazu wird die wässrige $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ -Lösung mit der geeigneten Hilfsbase und einer Lösung des Phasentransferkatalysators in Acetonitril versetzt und unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingedampft. Diese azeotrope Destillation dient neben der Entfernung des Wassers auch der Bildung des anionenaktivierenden Komplexes (z. B.:

$[K^+ \cdot 2.2.2]_2CO_3^{2-}$). Bei der Verwendung von Kryptofix[®] 2.2.2 ist auf die Trocknungstemperaturen zu achten, da es bei Temperaturen über 90 °C zu einer Thermolyse des Katalysators kommt. Zumeist wird bei aliphatischen, nukleophilen Fluorierungen auf das System Kryptofix[®] 2.2.2./ Kaliumcarbonat zurückgegriffen, da es im allgemeinen die höchsten radiochemischen Ausbeuten erbracht hat.

Als Abgangsgruppen dienen Halogene, Mesylate, Tosylate und Triflate (Abb. 8).

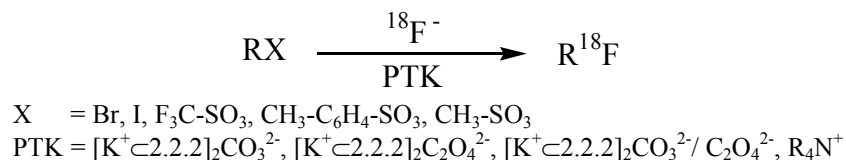


Abbildung 8: Allgemeines Schema einer aliphatischen, nukleophilen ¹⁸F-Fluorierung

Aufgrund der Reaktionsbedingungen folgen ¹⁸F-Markierungen einem S_N2-Mechanismus. Dadurch sind bei geeigneten Markierungsvorläufern auch stereospezifische Substitutionen möglich, da das ¹⁸F-Fluorid in anti-Stellung zur Abgangsgruppe eintritt (Walden-Umkehr [25]). Das bekannteste Beispiel für diese Art der Reaktionsführung ist die 2-[¹⁸F]Fluor-2-deoxy-D-glucose, welche ausgehend von dem vollständig acetylierten Mannosevorläufer durch Substitution der Triflatgruppierung gegen ¹⁸F-Fluor und anschließender Abspaltung der Acetylreste synthetisiert wird (Abb.9).

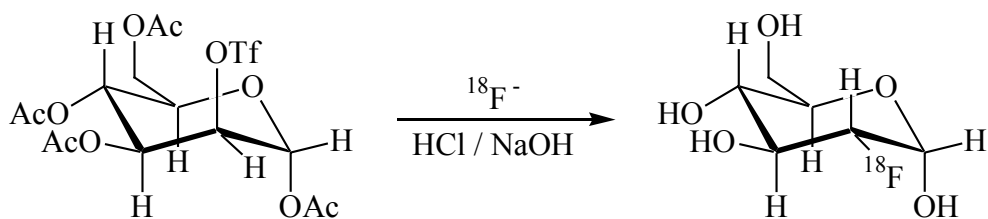


Abbildung 9: Synthese der 2-[¹⁸F]Fluor-2-deoxy-D-glucose

Eine weitere wichtige Methode ¹⁸F einzuführen, ist die nukleophile aromatische Substitution, da die so dargestellten fluorierten aromatischen Verbindungen eine hohe metabolische Stabilität aufweisen. Zur Durchführung der nukleophilen aromatischen Fluorierung benötigt man zur Aktivierung des Aromaten einen stark elektronenziehenden Substituenten in ortho- oder para-Stellung zu einer geeigneten Abgangsgruppe. Als aktivierende Substituenten finden vor allem Nitro-, Carbonyl- oder Cyanogruppen Verwendung, als Abgangsgruppen zumeist Nitrofunktionen und Trimethylammoniumsalze (mit Gegenionen wie Triflat, Tosylat, Perchlorat oder Iodid) aber auch Chlor, Brom und Iod. Neben Kaliumcarbonat fanden bei diesen Substitutionen auch häufiger Oxalat oder Natriumhydrogencarbonat als Basen Verwendung, da es ansonsten bei den meist hohen Reaktionstemperaturen dieses Reaktionstypus zu Zersetzungsreaktionen kam. Ein klassisches Beispiel für die nukleophile aromatische Substitution ist die ¹⁸F-für-NO₂-Substitution zur Darstellung des [¹⁸F]N-Methylspiperons [26] in einer einstufigen Synthese (Abb. 10).

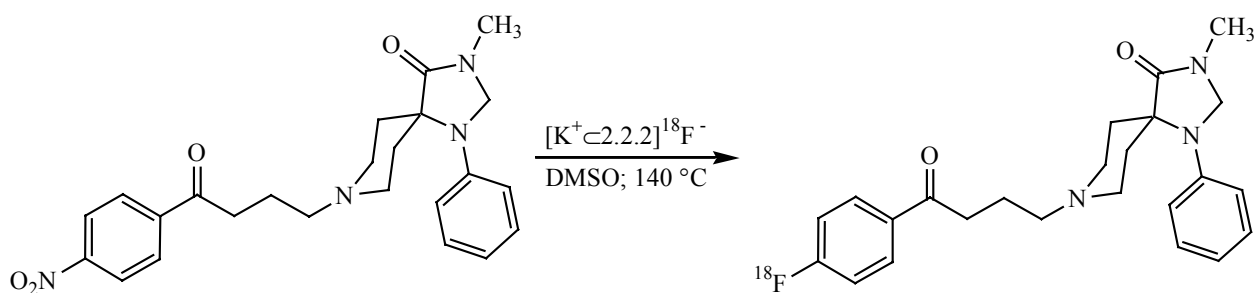


Abbildung 10: Nukleophile ^{18}F -Markierung des [^{18}F]N-Methylpiperons [26]

1.3.3.3 Fluorierung über prosthetische Gruppen

Ein Verfahren, das zunehmend an Bedeutung gewinnt, ist das Einführen des ^{18}F über eine prosthetische Gruppe. Dabei wird das ^{18}F zuerst in ein kleines, gut zu fluorierendes Molekül eingeführt und anschließend mit dem zu markierenden Molekül umgesetzt. Diese Methode bietet den Vorteil, dass bei der Kopplung der prosthetischen Gruppe mit dem Markierungsvorläufer nicht mehr die speziellen Reaktionsbedingungen eingehalten werden müssen, die es bei einer Direktfluorierung zu beachten gilt. So lassen sich zum Beispiel Markierungen unter wässrigen Bedingungen oder in Anwesenheit acider Protonen durchführen.

Von den evaluierten prosthetischen Gruppen haben sich insbesondere ^{18}F -markierte Alkyltosylate [27-29], -triflate [30] und -bromide [31] zur Fluoralkylierung und ^{18}F -markierte Carbonsäurederivate zur Fluoracylierung [27, 32] etabliert. Als wichtigster Vertreter dieser Markierungsagencien ist das 2- ^{18}F Fluorethyltosylat zu nennen (Abb. 11).

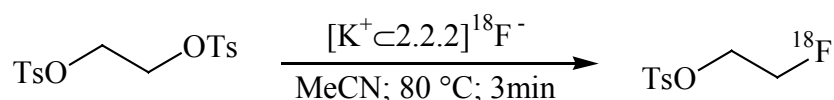


Abbildung 11: Synthese des 2- ^{18}F Fluorethyltosylats [27]

Die Reinigung des 2- ^{18}F Fluorethyltosylats erfolgt mittels Festphasenextraktion oder HPLC, wodurch die Verbindung nach einer Gesamtsynthesedauer von 30-40 Minuten und einer radiochemischen Ausbeute von 60-80% zur Verfügung steht. Durch Umsetzung des 2- ^{18}F Fluorethyltosylats mit nukleophilen Gruppen, wie Amino-, Hydroxy- und Thiolgruppen, lassen sich diese meist in hohen radiochemischen Ausbeuten ^{18}F -fluorethylieren (Abb. 12).

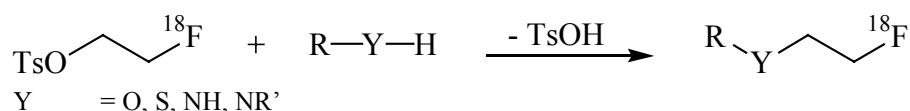


Abbildung 12: Allgemeines Schema einer ^{18}F -Fluorethylierung mit 2- ^{18}F Fluorethyltosylat

Anwendung findet diese Methode zum Beispiel bei der Synthese des 3-N-(ω - ^{18}F Fluorethyl)piperons, des 5-(2'- ^{18}F Fluorethyl)flumazenils (siehe Abschnitt 1.3.3) und des O-(2- ^{18}F Fluorethyl)-L-tyrosins [33].

Eine weitere interessante prosthetische Gruppe ist das 2-[^{18}F]Fluorethyltriflat, welches ein wesentlich stärker alkylierendes Agens als das 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat ist. Dennoch hat dieses Molekül aufgrund seiner komplizierteren Synthese und Handhabung keine weitere Verbreitung gefunden. In jüngster Zeit wurde jedoch eine einfache Syntheseroute zur in situ-Darstellung (Abb. 13) des 2-[^{18}F]Fluorethyltriflats erarbeitet [34]:

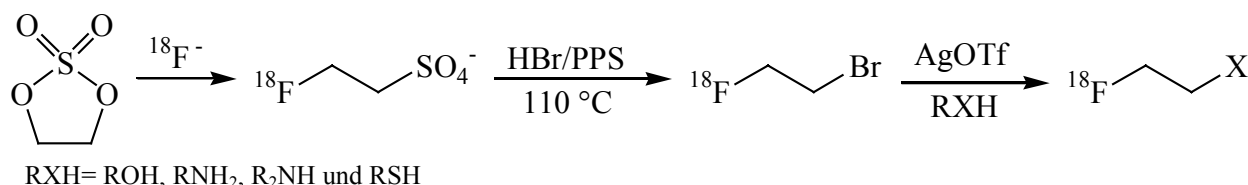


Abbildung 13: In situ-Synthese des 2-[^{18}F]Fluorethyltriflats [34]

Ausgehend von [1,3,2]Dioxathiolan-2,2-dioxid wird eine ^{18}F -Direkfluorierung zum 2-[^{18}F]Fluorethylsulfat durchgeführt, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mit Bromwasserstoff in Polyphosphorsäure versetzt. Das entstehende 1,2-[^{18}F]Fluorbromethan wird dann direkt in eine Lösung aus dem Markierungsvorläufer und Silbertriflat destilliert, wodurch das in situ entstehende 2-[^{18}F]Fluorethyltriflat sofort abreagieren kann. Der Vorteil dieser prosthetischen Gruppe liegt in ihrer hohen Reaktivität, so dass sich selbst unter milden Reaktionsbedingungen noch hohe radiochemische Ausbeuten erzielen lassen.

Eine Möglichkeit der Fluorarylierung von Markierungsvorläufern bietet die Synthese des 4-[^{18}F]Fluorphenyllithiums [35]. Als Ausgangsverbindung wird ein halogenierter Aromat verwendet, der in para-Stellung ein Trimethylammoniumsalz als Abgangsgruppe besitzt. Aufgrund der hohen Nukleofugie der Trimethylammoniumgruppe [36] lässt sich dieser Aromat, trotz der nur schwach aktivierenden Eigenschaften der Halogene, in radiochemischen Ausbeuten von 12% markieren [37, 38]. Durch Umsetzen des 1-[^{18}F]Fluor-haloarens mit Butyllithium lässt sich das 4-[^{18}F]Fluor-phenyllithium in einer radiochemischen Ausbeute von 45% darstellen (Abb. 14).

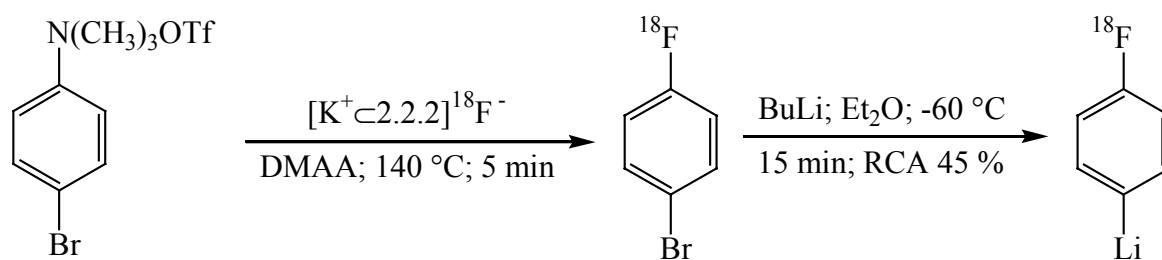


Abbildung 14: Darstellung von 4-[^{18}F]Fluor-phenyllithium [35]

1.4 Exzitatorische Aminosäuren

Die exzitatorische Aktivität einiger Aminosäuren wurde im Jahre 1952 von Hayashi [39] entdeckt. Er konnte zeigen, dass Glutamat und Aspartat nach Injektion in den Cortex heftige Konvulsionen auslösten. Fünf Jahre später berichteten Lucas und Newhouse [40] über die toxische Wirkung des Glutamats, die sie im Tierversuch, nach subkutaner Injektion des Glutamats, anhand starker Schädigungen an den inneren Schichten der Retina nachweisen konnten. Es folgten weitere Untersuchungen von Curtis und Watkins [41-43] und Shinozaki und Konishi [44], in denen exzitatorische und inhibitorische Wirkungen verschiedener Aminosäuren untersucht und erste Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt wurden.

Natriumglutamat wurde lange Zeit als unbedenklicher Geschmacksverstärker eingesetzt, bis erste Untersuchungen [45] einen Zusammenhang mit dem sogenannten „China-Restaurant-Syndrom“ nahe legten (Aufreten von Symptomen wie Herzklopfen, Abgeschlagenheit und Taubheit im Nacken). Weitere Untersuchungen von Olney zeigten, dass die subkutane Injektion von Natriumglutamat bei Mäusen in verschiedenen Hirnregionen Nekrosen hervorrief [46] und führten zur Prägung des Begriffs der „Exzitotoxizität“ [47].

Von den exzitatorischen Aminosäuren (EAAs) ist L-Glutamat der wichtigste Neurotransmitter im Zentralnervensystem von Säugetieren. Dahingegen ist die Bedeutung von L-Aspartat noch nicht vollständig geklärt, da es zwar mit L-Glutamat um den Plasmtransport konkurriert, aber nicht in synaptische Vesikel transportiert wird (siehe Abschn. 1.4.1). Neben diesen beiden Aminosäuren kommen auch deren schwefelhaltige Analoga (Abb. 15) als Neurotransmitter in Betracht, die als SAAs bezeichnet werden. Die SAAs konnten zwar im Hirngewebe von Säugern nachgewiesen werden, allerdings ist ihre genaue Funktion noch ungeklärt [48].

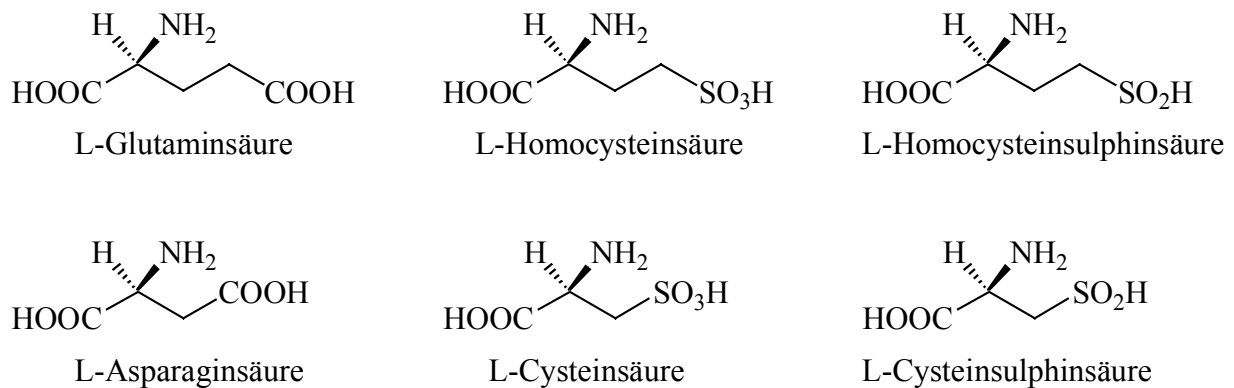


Abbildung 15: Strukturen der EAAs und SAAs

1.4.1 Exzitatorische Synapsen

Die Erforschung des Aufbaus und der Signalübertragung von exzitatorischen Synapsen gestaltete sich im Vergleich zu anderen Neurotransmittern schwierig, da die EAAs neben ihren Transmittereigenschaften auch wichtige Metaboliten im Zellstoffwechsel sind (als Aminosäurebausteine in der Proteinbiosynthese; Glutamat ist wichtigste Vorstufe der γ -Amino-buttersäure und bedeutendster Überträger von Aminofunktionen). Da der Hauptteil des Glutamats im Gehirn keine Transmitter-

funktion besitzt [49] und die Glutamatkonzentration sehr hoch [50] und im Vergleich zu anderen Transmittern sehr gleichmäßig verteilt ist [51], dauerte es sehr lange, bis glutamaterge Neuronen lokalisiert und untersucht werden konnten. Der Aufbau einer solchen glutamatergen Synapse und ihre Signalübertragungswege sind in Abbildung 16 dargestellt:

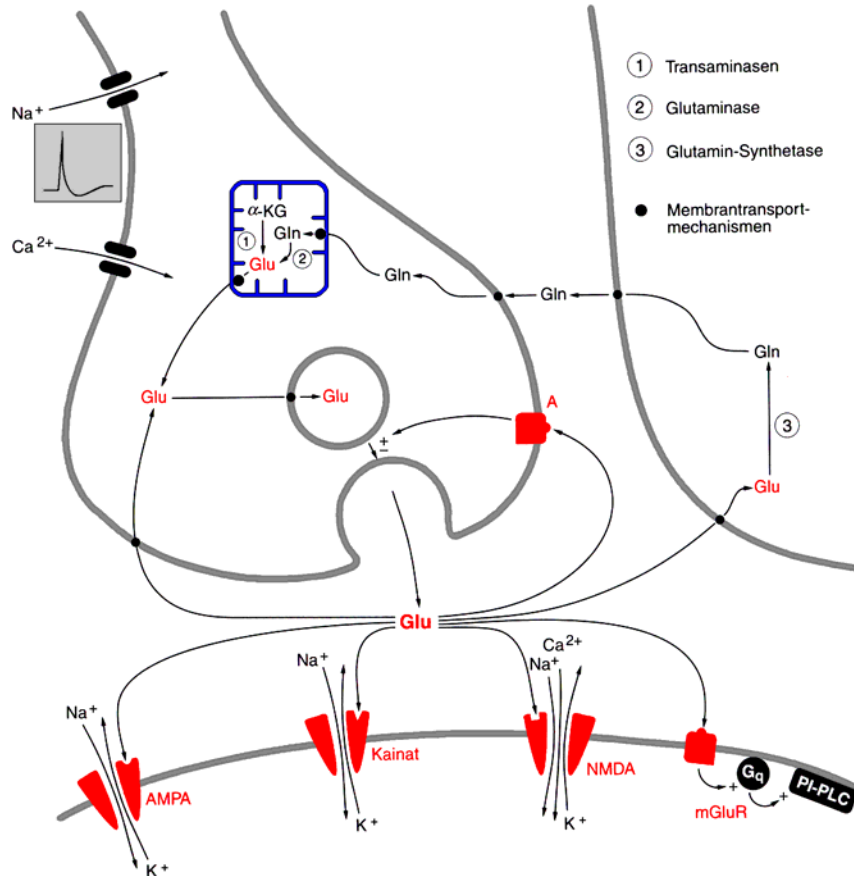


Abbildung 16: Schematische Darstellung einer glutamatergen Synapse

Empfängt ein glutamaterges Neuron durch eine benachbarte Nervenzelle einen Reiz, so kommt es zur Ausbildung eines Aktionspotentials, welches sich durch Öffnen und Schließen von Natriumkanälen das Axon entlang bewegt. Erreicht dieses Aktionspotential das Axonende, öffnen sich dort spannungsgesteuerte Calciumkanäle, so dass Calcium in das präsynaptische Neuron einfließen kann. Der entstehende Anstieg der Calciumkonzentration bewirkt ein Verschmelzen der sekretorischen Vesikel, welche das Glutamat enthalten, mit der Zellwand und nachfolgend die Freisetzung des Glutamats in den synaptischen Spalt (Exocytose). Das freigesetzte Glutamat diffundiert durch den synaptischen Spalt und lagert sich an die postsynaptischen Glutamatrezeptoren (AMPA-, Kainat-, NMDA- und metabotrope Glutamatrezeptoren) an, wo es durch sekundäre Botenstoffe zur Weiterleitung des Signals kommt. Ein Teil des Glutamats stimuliert aber auch präsynaptische Rezeptoren, die je nach Besetzungsgrad die Exocytose der sekretorischen Vesikel hemmen oder aktivieren.

Ein großer Teil des Glutamats wird nach der Exocytose durch Transportmechanismen wieder aus dem synaptischen Spalt entfernt, um eine Dauerreizung des postsynaptischen Neurons zu vermeiden. Dabei wird das Glutamat entweder von benachbarten Gliazellen aufgenommen und durch die

Glutamin-Synthetase zum Glutamin umgesetzt, oder es wird vom präsynaptischen Neuron aufgenommen und wieder in sekretorischen Vesikeln gespeichert.

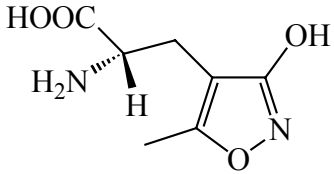
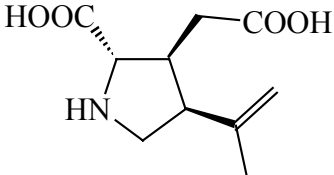
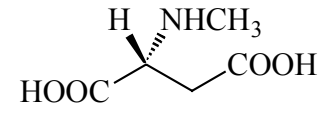
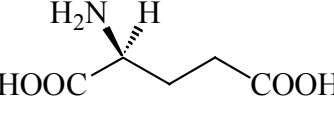
1.4.2 Glutamatrezeptoren

Glutamatrezeptoren sind die wichtigsten exzitatorischen Rezeptoren im ZNS von Säugetieren und besitzen große Bedeutung bei der Neurogenese [52] und Lern- bzw. Gedächtnisprozessen [53, 54]. Insbesondere die NMDA-, aber auch die metabotropen Glutamatrezeptoren spielen bei diesen Prozessen eine entscheidende Rolle, da sie eine langsame Adaption vermitteln, die unmittelbar mit der EAA-Neurotransmission assoziiert ist. In diesem Zusammenhang wurden die Prozesse der post-tetanischen Potenzierung oder Kurzzeitpotenzierung (PTP oder STP), der Langzeitpotenzierung (LTP) und der Langzeitdepression (LTD) besonders intensiv erforscht [55, 56], da sie als biochemisches Modell für das Lernen und das Gedächtnis gelten. Während STP und LTP nach wiederholter synaptischer Aktivität in einer erhöhten synaptischen Neurotransmission resultieren, bewirkt LTD eine erniedrigte synaptische Neurotransmission. LTD lässt sich somit als Gegenspieler der STP und LTP betrachten [57]. Die besondere Rolle des NMDA-Rezeptors bei diesen Vorgängen beruht auf den speziellen Eigenschaften seines Ionenkanals. Dieser öffnet sich erst dann, wenn die den Rezeptor umgebende Membran depolarisiert ist und sich auch Glutamat und Glycin an den Rezeptor angelagert haben (siehe auch Abschnitt 1.4.3). Man bezeichnet den NMDA-Rezeptor daher auch als „molekularen Koinzidenz-Detektor“, da zwei Ereignisse eintreten müssen, bis der Ionenkanal sich öffnet [58, 59].

Dagegen vermitteln AMPA- und Kainat-Rezeptoren eine schnelle Neurotransmission und werden daher auch als „workhorses of neurotransmission“ bezeichnet [60].

Nach molekularbiologischen Kriterien werden die Glutamatrezeptoren in vier Gruppen unterteilt: AMPA-, Kainat-, NMDA- und metabotrope Rezeptoren. Während es sich bei den ersten drei Gruppen um ionotrope, also ionenkanalgekoppelte Rezeptoren handelt, sind metabotrope Glutamatrezeptoren G-Protein-gekoppelt. Während die ionotropen Rezeptoren nach ihrem jeweils selektivsten Agonisten benannt wurden, bezeichnet man die metabotropen Rezeptoren nach ihrem physiologischen Agonisten, dem L-Glutamat. Historisch bedingt existieren neben diesen aktuellen Bezeichnungen noch weitere Benennungen für die einzelnen Rezeptoren, die in Tabelle 3 ebenfalls aufgeführt werden.

Tabelle 3: Übersicht der Glutamatrezeptorsubtypen und ihrer Agonisten

Rezeptorsubtyp		Agonist	
Aktuelle Bezeichnung	Weitere Bezeichnungen	Name	Struktur
AMPA	AA ₂ Quisqualat	(S)-2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)-propionsäure	
Kainat	AA ₃ Quisqualat	Kainsäure	
NMDA	AA ₁	N-Methyl-D-asparaginsäure	
Glu _G	Q _p	L-Glutaminsäure	

1.4.3 Der NMDA-Rezeptorkomplex

Der NMDA-Rezeptor setzt sich aus 2 Proteinuntereinheiten zusammen: NMDAR₁ und NMDAR₂. Bislang konnten 7 Splice-Varianten der NMDAR₁-Untereinheit und 4 verschiedene Gene, auf denen die zweite Proteinuntereinheit kodiert ist (NMDAR_{2A}, B, C, D), gefunden werden [61, 62]. Während ein aus NMDAR₁-, bzw. ein aus NMDAR₁- und NMDAR₂-Untereinheiten bestehender Rezeptor einen funktionsfähigen Ionenkanal bildet, ist dies bei einem homomeren Rezeptor aus NMDAR₂-Untereinheiten nicht der Fall. Nach jüngsten Untersuchungen scheint der Rezeptor eine tetramere Struktur zu besitzen [63-65], obwohl dieser Umstand noch kontrovers diskutiert wird [66]. Unter Berücksichtigung dieser Annahme wurde auch versucht, mittels Molecular Modelling neue strukturelle Einsichten bezüglich des Rezeptors zu gewinnen [67]. Dabei wurde auf der Basis von Kristallstrukturdaten der Aufbau eines heteromeren NMDA-Rezeptors berechnet (Abb.17):

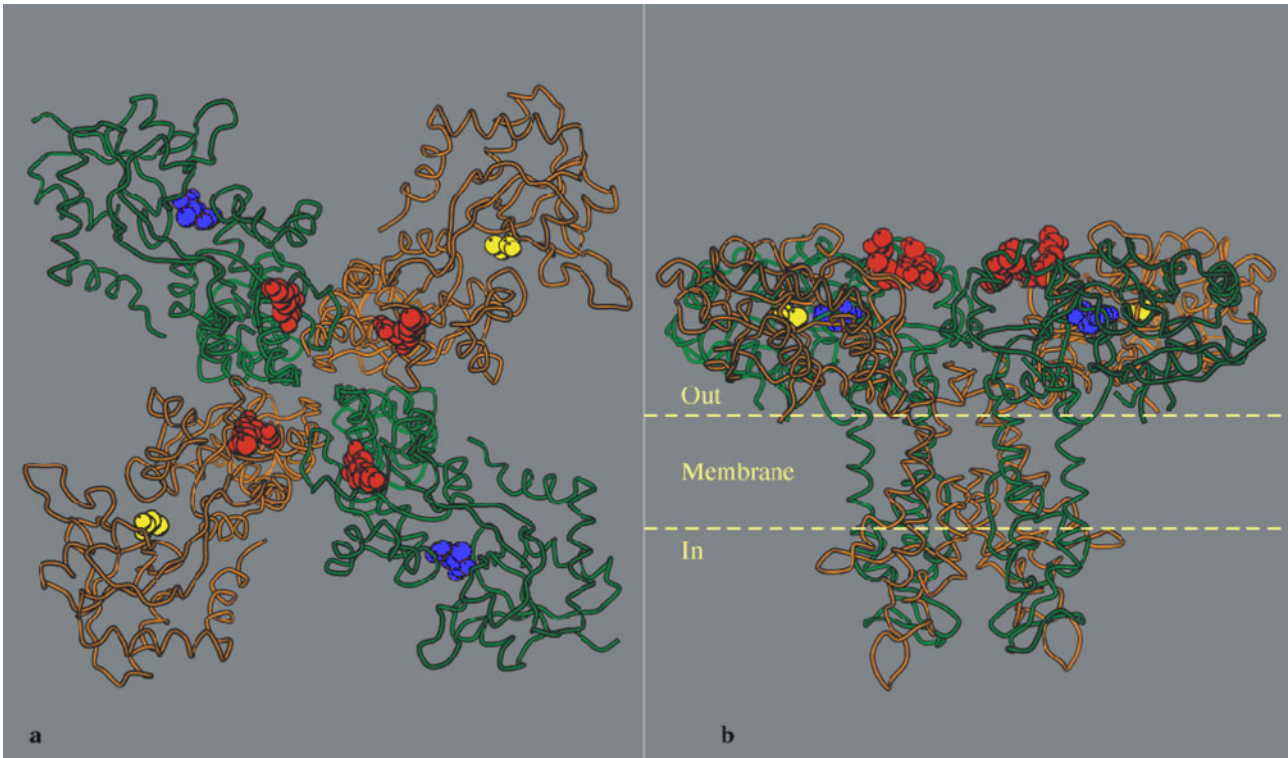


Abbildung 17: Schematische Darstellung der berechneten tetrameren Struktur des NMDA-Rezeptors aus 2 NMDAR₁- und 2 NMDAR₂-Untereinheiten. Der Rezeptor ist dabei in einer Aufsicht (a) und einmal im Querschnitt (b) dargestellt. NMDAR₁-Untereinheiten sind orange, NMDAR₂-Untereinheiten grün, die Glycinliganden gelb, die Glutamatliganden blau und konservierte Aminosäuren rot gefärbt. Aufgrund von Unsicherheiten in der Berechnung wurden Teile der Aminosäuresequenzen des Rezeptors nicht dargestellt [67].

Auch aus funktioneller Hinsicht ist der NMDA-Rezeptor sehr gut untersucht. Es handelt sich um einen ionotropen Rezeptor, dessen Ionenkanal im geschlossenen Zustand zusätzlich durch Magnesiumionen blockiert ist. Kommt es nun zu einer deutlichen Depolarisierung der Membran, zum Beispiel durch die Wirkung einer benachbarten Synapse, so wird die Magnesiumblockade aufgehoben. Erst in diesem Zustand kann sich Glutamat an den Rezeptor anlagern, wodurch es zu einer Öffnung des Ionenkanals kommt. Die Funktionsweise des NMDA-Rezeptors entspricht somit einer logischen UND-Verknüpfung, da das post- und das präsynaptische Neuron gleichzeitig aktiv sein müssen [68]. Der so geöffnete Ionenkanal ist neben Natrium und Kalium auch für Calcium permeabel (Abb. 18), welches als sekundärer Botenstoff dient. Die Depolarisierung der Membran bewirkt daher auch die Aktivierung bzw. Inaktivierung verschiedener Enzyme.

Neben den schon erläuterten Strukturmerkmalen besitzt der Rezeptor weitere vier regulatorische Bindungsstellen, die ebenfalls in Abbildung 18 dargestellt sind.

Da die große Anzahl an Bindungsstellen eine äußerst komplexe Regulation des NMDA-Rezeptorkomplexes ermöglicht, sollen die Eigenschaften der einzelnen Bindungsstellen im folgenden genauer erläutert werden.

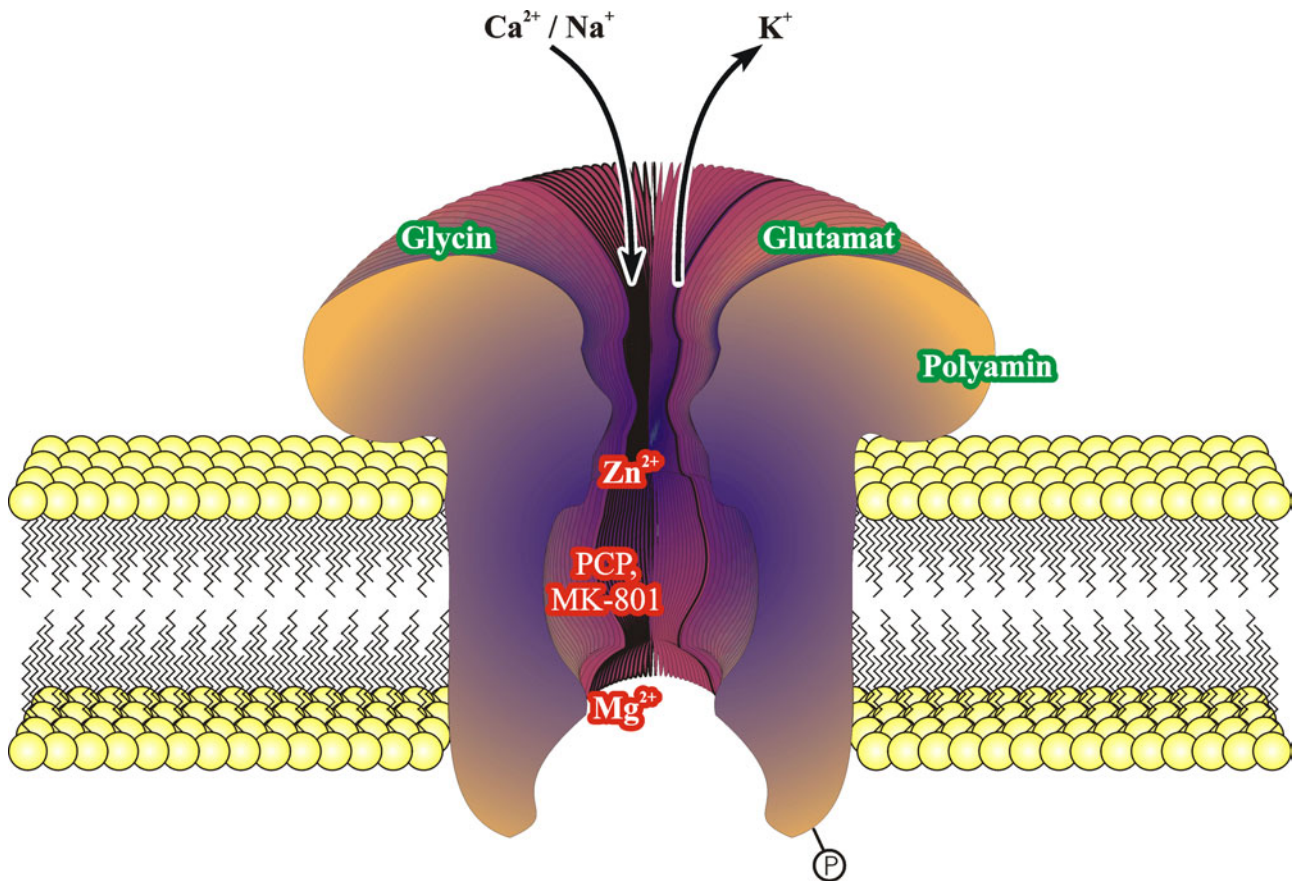


Abbildung 18: Darstellung des NMDA-Rezeptors und seiner Bindungsstellen

Glutamatbindungsstelle:

Die Glutamatbindungsstelle ist die wichtigste regulatorische Domäne des NMDA-Komplexes. Als physiologische Agonisten können sich L-Glutamat und L-Aspartat nur dann anlagern, wenn sie sich in einer gefalteten Konformation befinden und zuvor die Magnesiumblockade aufgehoben wurde (siehe oben). Vergleiche zwischen diesen beiden Liganden haben gezeigt, dass L-Glutamat circa siebenmal potenter als L-Aspartat ist. Detaillierte Untersuchungen zeigten außerdem, dass Mutationen der NMDAR_{2B}-Untereinheit die Bindungsaffinität des L-Glutamats stark veränderten, woraus nach dem heutigen Stand der Forschung zu folgern ist, dass dessen Bindungsstelle auf dieser Untereinheit liegt [69].

Damit ein Ligand als Agonist wirkt, benötigt er 2 Carboxylgruppen, die durch eine oder zwei Methylengruppen voneinander separiert sind, und eine Aminofunktion, welche sich in α -Stellung zu eine der beiden Carboxylgruppen befindet [70].

Strychnin-insensitive Glycinbindungsstelle

Glycin ist ein wichtiger inhibitorischer Neurotransmitter im Rückenmark und im Hirnstamm von Säugetieren, dessen Neurotransmission über die Strychnin-sensitiven ionotropen Glycin_A-Rezeptoren vermittelt wird [71]. Glycin beeinflusst auch die Modulation des NMDA-Rezeptors und zwar durch Strychnin-insensitive Glycinbindungsstellen (Glycin_B-Bindungsstellen) [72]. Da Glycin sowohl in vitro als auch in vivo benötigt wird, um den NMDA-Rezeptorkomplex zu aktivieren, ist Glycin ein „Co-Agonist“ [73, 74]. In Anwesenheit von Glycin kommt es zu einer Erhöhung der

Bindungsfähigkeit des L-Glutamats und somit zu einer Regulation des Rezeptors [75, 76]. Diese Modulation kann allerdings auch von anderen kleinen neutralen Aminosäuren, wie R-Alanin und R-Serin (R-Serin kommt auch im Gehirn von Säugern vor) bewirkt werden, da sie ebenfalls an die Strychnin-insensitive Glycinbindungsstelle binden [77]. Aus der Gruppe der möglichen endogenen Glycinantagonisten ist insbesondere die Kynurensäure zu erwähnen, welche durch Abbau des Tryptophans entsteht und im menschlichen Hirngewebe nachgewiesen werden kann [78]. Sie besitzt zwar in vitro antagonistische Eigenschaften in Bezug auf die Glycinbindungsstelle, jedoch konnte noch nicht endgültig geklärt werden, für welche physiologischen Funktionen das von Bedeutung ist. Auch im Falle der Glycinbindungsstelle wurden Studien durchgeführt, die belegten, dass Mutationen der NMDAR₁-Untereinheit die Bindungsaffinität des Glycins stark veränderten, woraus zu folgern ist, dass diese Bindungsstelle auf der NMDAR₁-Untereinheit liegt [79].

Polyaminbindungsstelle:

Im Jahre 1988 konnte dargelegt werden, dass Polyamine die Bindungsaffinität von [³H]MK-801 (siehe unten) zum NMDA-Rezeptor durch Modulation der Glutamat- und der Glycinbindungsstelle erhöhen [80]. In Folgestudien wurden weitere Polyamine untersucht, wobei Spermin und Spermidin als Agonisten und Arcain und Putrescin als Antagonisten wirkten [81, 82].

Zinkbindungsstelle:

Erste Untersuchungen aus dem Jahre 1987 zeigten, dass Zink in der Lage ist, die NMDA-Rezeptoraktivität zu hemmen [83, 84]. Später stellte sich heraus, dass diese Hemmung des NMDA-Rezeptors auf der Bindung von Zink an eine im Ionenkanal liegende Bindungsstelle beruhte, was eine nicht-kompetitive Hemmung der Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle zur Folge hatte [85]. Aufgrund der relativ hohen Konzentrationen von Zink im ZNS und seiner Freisetzung bei exzitatorischen Aktivitäten vermutet man, dass diese Bindungsstelle eine tonische Aktivierung des Rezeptors durch Glycin vermeiden soll [86, 87].

Bindungsstelle im Ionenkanal:

Im Jahre 1988 wurde entdeckt, dass bestimmte Moleküle (Ketamin, PCP und MK-801) in der Lage sind, den Ionenkanal des NMDA-Rezeptorkomplexes zu blockieren [88, 89]. Da die Bindungsstelle dieser Verbindungen im Ionenkanal liegt, muss der Ionenkanal des Rezeptorkomplexes geöffnet sein, damit sich diese Verbindungen anlagern können. Aufgrund ihrer meist lipophilen Struktur können sie die Blut-Hirn-Schranke zumeist problemlos passieren, was sie zu häufig verwendeten „Werkzeugen“ zur Erforschung des NMDA-Rezeptorkomplexes machte [90-92].

Magnesiumbindungsstelle:

Die Bindungsstelle des Magnesiums liegt ebenfalls im Ionenkanal. Im nicht-aktivierten Zustand ist sie durch Magnesium besetzt, wodurch eine Anlagerung von Liganden an die Glutamatbindungsstelle verhindert wird.

1.4.4 Liganden des NMDA-Rezeptorkomplexes

Aufgrund der großen neurologischen Bedeutung und der vielfältigen Krankheitsbilder, die mit dem NMDA-Rezeptorkomplex in Verbindung stehen, wurde eine Vielzahl von Liganden synthetisiert, die mit dem Rezeptor interagieren. Allerdings passieren viele der Substanzen die Blut-Hirn-Schranke nicht oder sind nur schlecht in physiologischen Medien löslich. Im Folgenden soll eine Übersicht über die wichtigsten Vertreter der einzelnen Substanzklassen gegeben werden.

1.4.4.1 Liganden der Glutamatbindungsstelle

Damit ein Ligand agonistische Aktivität besitzt, benötigt er zwei Carboxylgruppen, welche durch eine oder zwei Methylengruppen voneinander separiert sind. Substituiert man eine dieser Carboxylatfunktionen durch einen Sulfonsäure- oder Phosphonsäurerest, so erhält man Liganden mit antagonistischer Aktivität, von denen die Phosphonsäurederivate die deutlich höhere Affinität zum Rezeptor besitzen. Untersuchungen des Stereozentrums haben außerdem gezeigt, dass die R-Konfiguration um den Faktor 10-50 potenter ist als die S-Konfiguration. Die wichtigsten Vertreter dieser Substanzklasse sind in Abbildung 19 dargestellt:

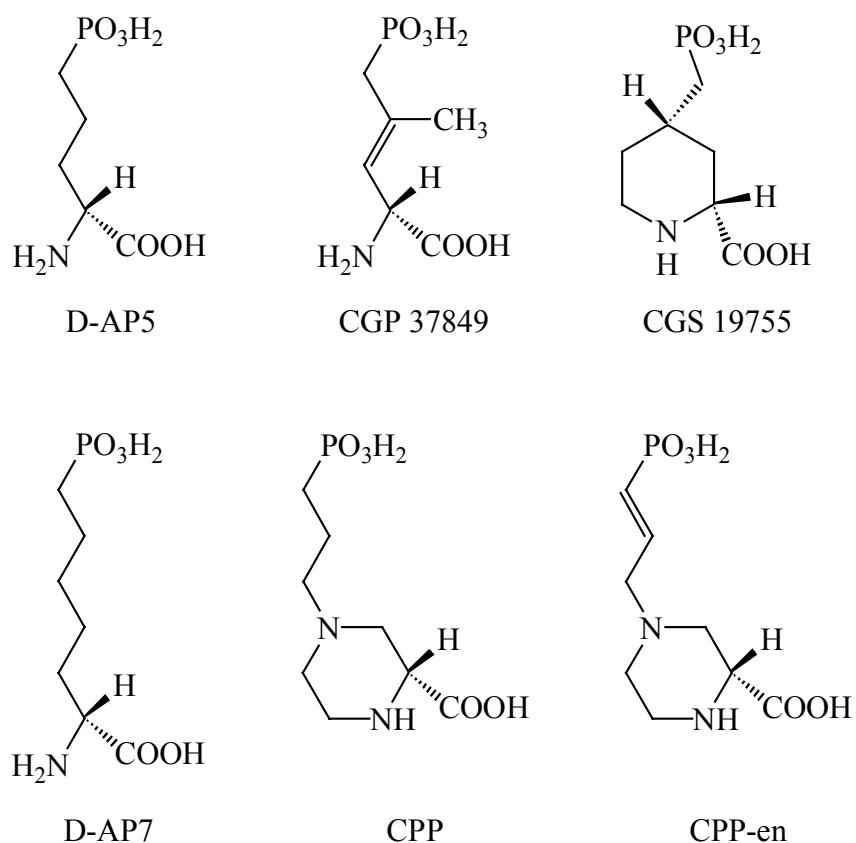


Abbildung 19: Übersicht über die wichtigsten Glutamatantagonisten

Es handelt sich um die linearen Verbindungen D-AP5, D-AP7 und CGP 37849 und um die zyklischen Derivate CGS 19755, CPP und CPP-en. Die Verbindungen CPP-en und CGP 37849 stellen die potentesten Verbindungen dieser Klasse dar [93].

1.4.4.2 Liganden der Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle

Für die Strychnin-insensitive Glycinbindungsstelle wurde eine große Anzahl von Antagonisten synthetisiert, die sich in vier Substanzklassen unterteilen lassen: Kynurensäure-, Chinoxalin-2,3-dion-, 2-Chinolon- und Indol-Derivate. Eine Übersicht der wichtigsten Verbindungen dieser Klasse gibt Abbildung 20.

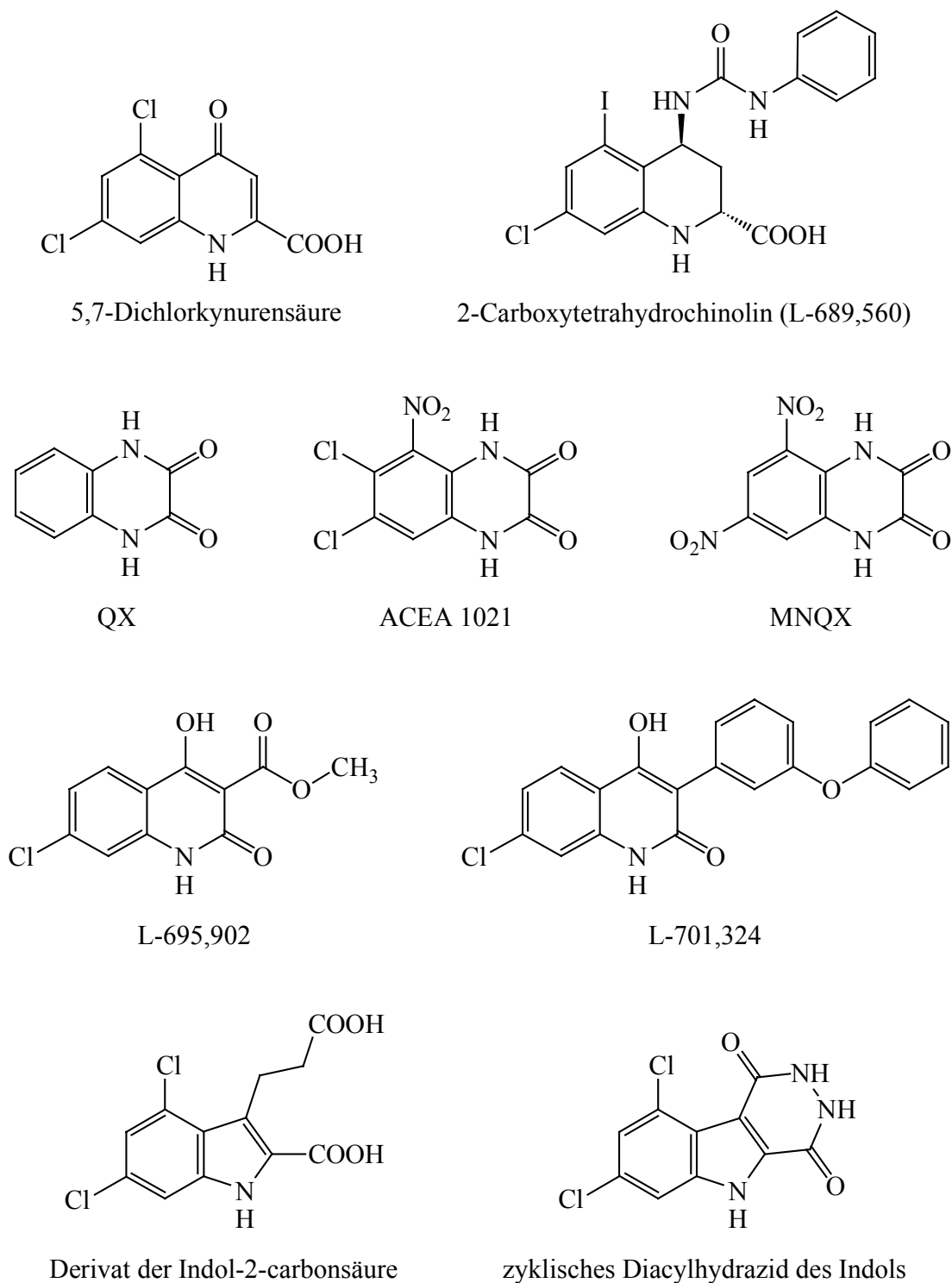


Abbildung 20: Wichtige Antagonisten der Glycinbindungsstelle auf der Basis der Kynurensäure, des Chinoxalin-2,3-dions, des 2-Chinolons und des Indols

Kurz nach Entdeckung der Glycinbindungsstelle wurden auch die antagonistischen Eigenschaften der Kynurensäure ($IC_{50} = 41 \mu\text{M}$ vs. [^3H]Glycin) und der 5,7-Dichlorkynurensäure ($IC_{50} = 0,2 \mu\text{M}$ vs. [^3H]Glycin) entdeckt [94, 95]. Insbesondere die 5,7-Dichlorkynurensäure diente als Grundstruktur für weitere Antagonisten. So gelangt man durch Hydrierung des heterozyklischen Rings zu den Dihydrokynurenaten, welche allerdings deutlich weniger affin sind als die Ausgangsverbindungen [96], und zu den hochpotenten trans-4-substituierten-2-Carboxytetrahydrochinolinen (L-689,560: $IC_{50} = 7,8 \text{ nM}$ vs. [^3H]Glycin) [97].

Zwar wurden Chinoxalin-2,3-dione (z. B. QX) ursprünglich als Antagonisten des AMPA-Rezeptors eingeführt [98], es zeigte sich jedoch, dass sie auch vergleichbare Affinitäten zur Glycinbindungsstelle besitzen [99]. Daher wurde neben der Verbesserung der Affinität auch an der Optimierung der Selektivität zugunsten der Glycinbindungsstelle geforscht. Durch Disubstitution an den Positionen 5-7 des aromatischen Ringes mit elektronenziehenden Gruppen konnte zwar die Affinität der Verbindungen deutlich gesteigert werden (MNQX), allerdings ohne die Selektivität zu verbessern [100]. Durch weitere Modifikation des Aromaten wurde mit ACEA 1021 schließlich ein Ligand gefunden, der sowohl eine hohe Affinität zum Rezeptor ($IC_{50} = 4 \text{ nM}$ vs. [^3H]DCKA), als auch eine sehr hohe Selektivität (NMDA-/Nicht-NMDA-Rezeptor ≈ 250) besitzt [101].

Basierend auf den bekannten Antagonisten wurde eine Reihe von 2-Chinolonen mit dem Ziel synthetisiert, die strukturellen Eigenschaften der Kynurensäuren und der Chinoxalin-2,3-dione zu kombinieren [102]. Untersuchungen dieser Verbindungen zeigten, dass eine Carbonsäurefunktion keine notwendige Voraussetzung für eine hohe Affinität des Liganden ist. Durch Synthese der 4-Hydroxy-2-chinolone (wie zum Beispiel L-695,902) wurden erstmals Antagonisten der Glycinbindungsstelle dargestellt, die sowohl eine hohe in vitro-Affinität als auch antikonvulsive Aktivitäten besaßen (L-695,902: $IC_{50} = 6.4 \mu\text{M}$ vs. [^3H]L-689,560; $ED_{50} = 12,5 \text{ mg/kg}$) [103]. Durch weitere Modifikationen des Grundkörpers, welche zeigten, dass die in vitro-Affinität stark vom Substituenten in Position 3 abhängt, gelangte man zu den 3-Aryl-4-hydroxy-2-chinolonen.

Diese stellten einen Durchbruch in der Verbesserung der systemischen Aktivität dar. Verbindung L-701,324 beispielweise ist einer der potentesten Glycin-Antagonisten sowohl in vitro als auch in vivo ($IC_{50} = 2.0 \text{ nM}$ vs. [^3H]L-689,560; $ED_{50} = 0,9 \text{ mg/kg}$) [104].

Da die essentielle pharmakophore Einheit der Kynurensäure auch in der Indol-2-carbonsäure enthalten ist, wurden auch Antagonisten dieser Grundstruktur untersucht. Durch Einführen von Wasserstoffbrücken-Akzeptoren in 3-Position konnte eine deutliche Erhöhung der in vitro-Affinität bewirkt werden [105]. Die 3-(2-Carboxy-ethyl)-4,6-dichlor-1H-indol-2-carbonsäure ist ein typischer Vertreter dieser Substanzklasse, mit einer Affinität die der 5,7-Dichlorkynurensäure entspricht ($IC_{50} = 0,14 \mu\text{M}$ vs. [^3H]Glycin) [106]. Auch das zyklische Diacylhydrazidderivat der Indol-2-carbonsäure bindet an die Glycinbindungsstelle, allerdings mit verschlechterter Affinität ($IC_{50} = 0,80 \mu\text{M}$ vs. [^3H]Glycin) [107].

1.4.4.3 Liganden der Polyaminbindungsstelle

Polyamine kommen als Metaboliten in pro- und eukaryotischen Zellen ubiquitär vor [108]. Spermin und Spermidin beispielsweise werden ausgehend vom Methionin und Ornithin aufgebaut und zur

Verpackung der DNA verwendet [109]. Daneben spielen Polyamine aber auch in vielen anderen Prozessen wie Zellwachstum, Zellteilung und Endocytose eine Rolle [110].

Im Hinblick auf den NMDA-Rezeptor erhöhen Polyamine die Bindungsaffinität von Liganden der Glutamatbindungsstelle. In einigen Fällen wurde bei hohen Polyaminkonzentrationen, z. B. beim Spermin, auch eine Erhöhung der Bindungsaffinität von Liganden der Glycinbindungsstelle festgestellt [111]. Während Spermin und Spermidin als Agonisten der Polyaminbindungsstelle wirken, zeigt Arcain antagonistische Eigenschaften. Ebenfalls antagonistisch wirkt das Ifenprodil, welches in einer ersten Untersuchung seine starken neuroprotektiven Eigenschaften demonstrierte, indem es eine NMDA-induzierte Freisetzung von [³H]Acetylcholin hemmte [112]. Eine Anwendung als Neuroprotektivum kommt allerdings aufgrund seiner hohen Affinitäten zu anderen ZNS-Rezeptoren nicht in Betracht. Basierend auf dieser Leitstruktur wurden aber Antagonisten wie z. B. das Eliprodil entwickelt [113]. Eine Übersicht über die wichtigsten Liganden dieser Bindungsstelle ist in Abbildung 21 gegeben.

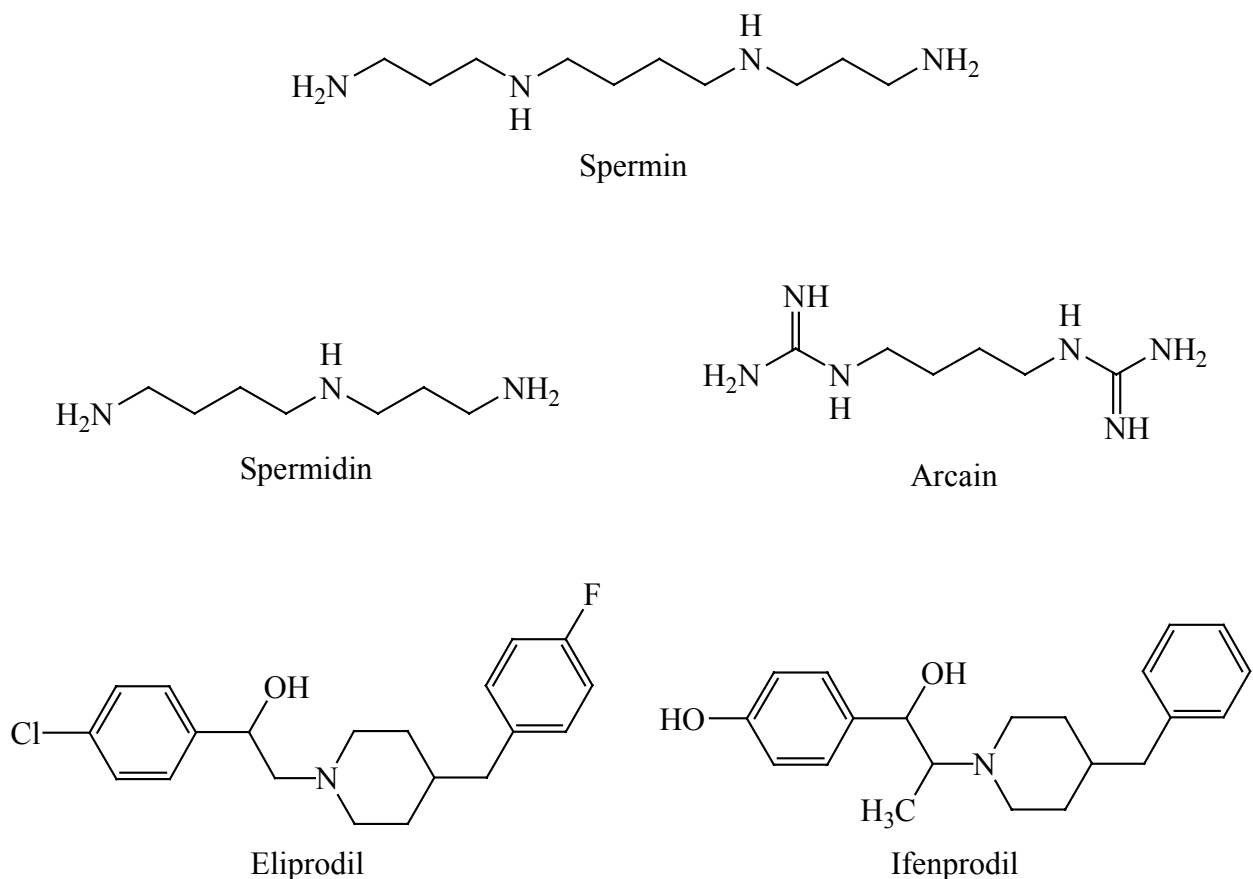


Abbildung 21: Agonisten und Antagonisten der Polyaminbindungsstelle

1.4.4.4 Liganden der Bindungsstelle im Ionenkanal

Erste Untersuchungen aus dem Jahre 1988 zeigten, dass Phencyclidin (PCP) und Ketamin in der Lage waren, NMDA-induzierte Effekte zu antagonisieren [114, 115]. Es stellte sich heraus, dass sich diese Substanzen an einer speziellen Bindungsstelle im Ionenkanal anlagerten und ihn so blockier-

ten. Da Phencyclidin eine relativ unselektive Substanz ist und auch hohe Affinitäten für σ -, Nikotinrezeptoren und Kaliumkanäle besaß, wurde versucht, die Selektivität der Verbindung zu verbessern, was in der Entwicklung des Thiophen-Analogons TCP resultierte [116]. Dieser Ligand zeigt zwar immer noch hohe Affinitäten für weitere Rezeptoren, besaß allerdings eine deutlich höhere Affinität zum NMDA-Rezeptor. Ein entscheidender Durchbruch auf dem Gebiet der Selektivität gelang mit der Entdeckung des Dizocilpins, da diese Verbindung eine 1000-fach höhere Selektivität zu NMDA-Rezeptoren als zu nicht-NMDA-Rezeptoren besitzt [117]. Neben diesen Verbindungen wurde viele weitere Substanzen entdeckt, die den Ionenkanal blockieren, wie z. B. das Desipramin und das Memantin. Eine Übersicht über die wichtigsten Liganden dieser Bindungsstelle gibt Abbildung 22.

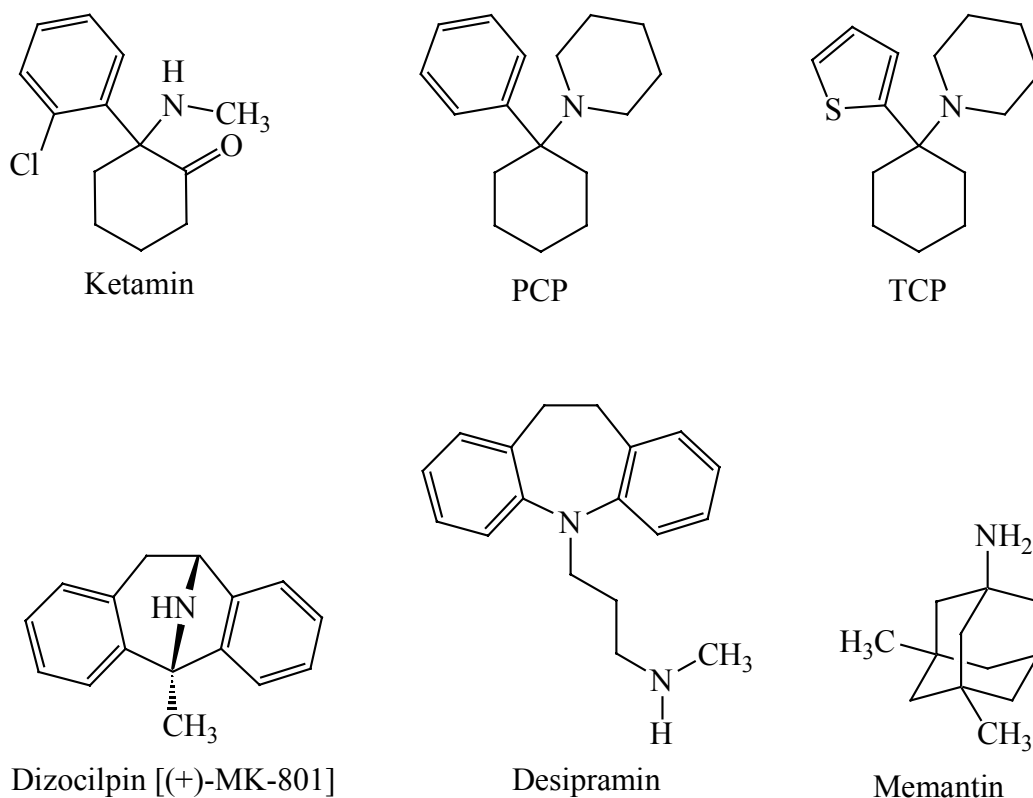


Abbildung 22: Wichtige Liganden der Bindungsstelle im Ionenkanal

1.4.5 Struktur-Wirkungsbeziehungen der Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle

Seit der Entdeckung, dass 4-substituierte 5,7-Dihalogen-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuren sehr potente Antagonisten der Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle sind, wurde eine große Anzahl an Verbindungen dieser Substanzklasse dargestellt. Aus dem Kollektiv der Verbindungen ließen sich wichtige Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungsbeziehungen dieser Verbindungen zur Glycinbindungsstelle ableiten. Es handelt sich dabei insbesondere um die Konfiguration der Stereozentren, die Substitutionen des Aromaten und der 4- bzw. 2-Position (Abb. 23).

Eine Untersuchung der Stereozentren bezüglich ihrer optimalen Konfiguration zeigte, dass die trans-Diastereomeren (2R,4S, 2S,4R), mit wachsender Größe des Substituenten in 4-Position, ge-

gegenüber den cis-Diastereomeren (2S,4S, 2R,4R) bevorzugt werden [118]. Da die trans-Diastereomeren hierbei bis zu 80fach höhere Affinitäten als die cis-Diastereomeren besitzen, ist die trans-Konfiguration eine stereochemische Voraussetzung für hochaffine Liganden. Eine Trennung und nachfolgende Untersuchung der trans-Enantiomeren zeigte, dass nur das Enantiomer mit der 2R,4S-Konfiguration eine hohe Affinität zur Glycinbindungsstelle besitzt. Die Konfiguration an 2-Position entspricht dabei der unnatürlichen Konfiguration am α -Aminocarbonsäurezentrum, die auch beim R-Serin, dem endogenen Agonisten der Glycinbindungsstelle, vorhanden ist.

Eine Optimierung des Substitutionsmusters am Aromaten zeigte, dass kleine lipophile Substituenten in 5- und 7-Position eine deutliche Affinitätssteigerung gegenüber dem unsubstituierten Aromaten bewirken. Als geeignete Substituenten haben sich hierbei die Halogene und insbesondere die 5-Iod,7-Chlor-Substitution bewährt.

Eine entscheidende Rolle für eine hohe Affinität des Liganden kommt dem Substituenten in 4-Position zu. Als geeignete Gruppe hat sich die Harnstoffgruppierung, welche mit großen lipophilen Resten verknüpft ist, erwiesen. Ein Vergleich des Phenylharnstoffderivates ($IC_{50} = 7,8$ nM vs. [3H]Glycin) mit dem Phenylthioharnstoffderivat ($IC_{50} = 90$ nM vs. [3H]Glycin) zeigt die zentrale Bedeutung des Carbonylsauerstoffs, welcher über Wasserstoffbrücken mit der Bindungsstelle interagiert und somit zu einer Stabilisierung des Ligand-Rezeptorkomplexes beiträgt [118].

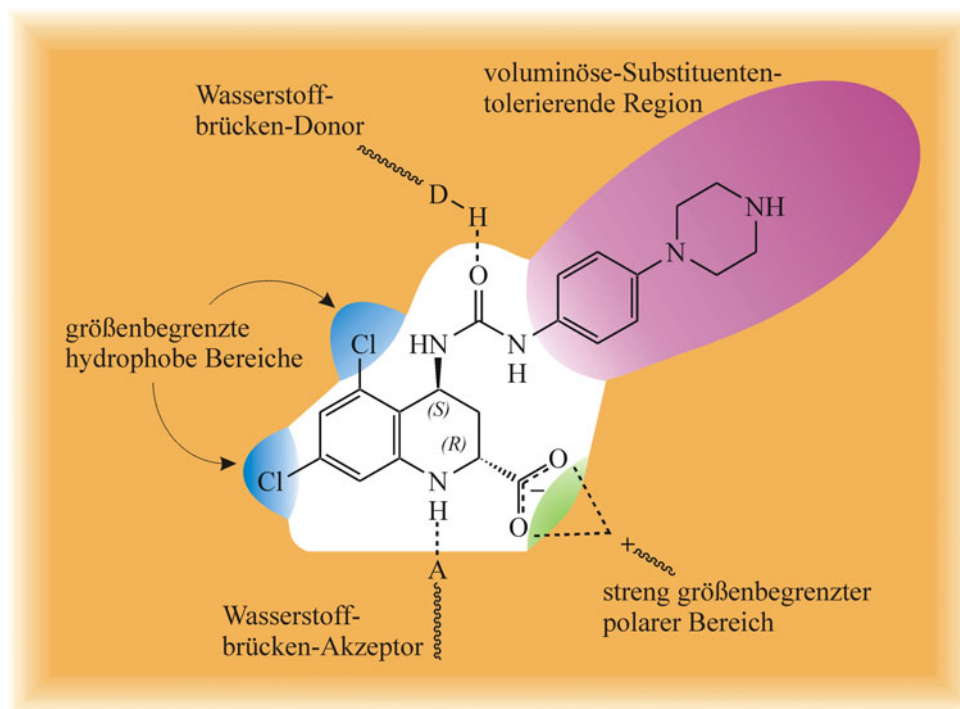


Abbildung 23: Struktur-Wirkungsbeziehung von Liganden der Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle [119]

1.4.6 Bedeutung der exzitatorischen Neurotransmission für die PET

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS von Säugetieren und in einer großen Anzahl neurologischer Prozesse involviert. Daher wird eine Störung der Glutamat-Rezeptor-Wechselwirkung in Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen, wie z. B. der fokalen cerebralen Ischämie, dem Morbus Parkinson, dem Morbus Huntington, dem Morbus Alzheimer, der Schizophrenie, der Epilepsie und der Amyotrophischen Lateralsklerose, diskutiert [120]. Der NMDA-Rezeptor, als wichtigster Glutamatrezeptortyp, steht dabei aufgrund seiner besonderen Eigenschaften im Zentrum der Wirkstoffforschung. Parallel dazu wurden einige Versuche unternommen, geeignete Rezeptorliganden mit kurzlebigen Positronenemittern zu markieren, um diese neurodegenerativen Erkrankungen nicht-invasiv visualisieren zu können. Dieser Ansatz könnte es ermöglichen, die Krankheiten besser zu untersuchen und eventuell neue Therapiestrategien aufzuzeigen.

Der wichtigste der bis jetzt markierten Liganden ist das S-[N-Methyl- ^{11}C]ketamin [121], mit dem auch erste PET-Mesungen durchgeführt wurden. Dort zeigte man anhand von Probanden, dass es im Falle experimentell induzierter ischämischer Schmerzen gegenüber dem Normalzustand zu einer verstärkten Anreicherung des Liganden im Gehirn kommt (Abb. 24).

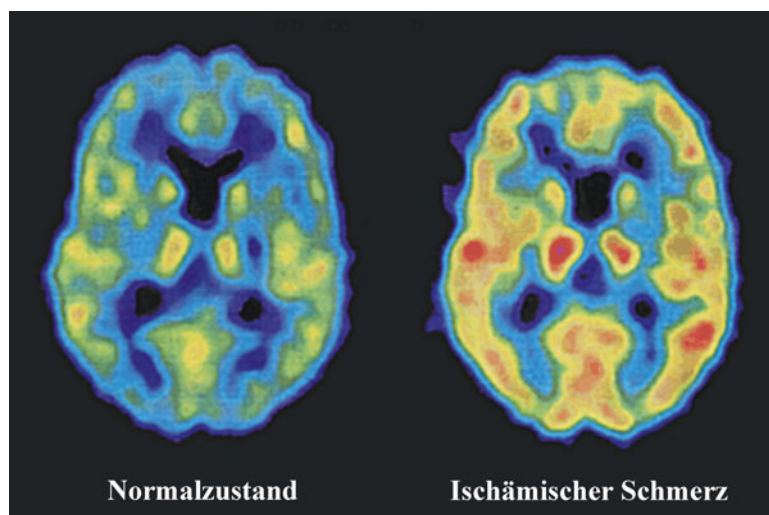
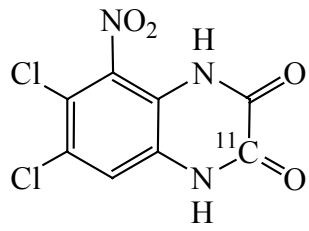


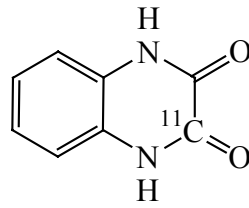
Abbildung 24: PET-Untersuchung mit S-[N-Methyl- ^{11}C]ketamin (links: Normalzustand/ rechts: nach experimentell induziertem Schmerz) [121]

Neben diesem Liganden wurden weitere Verbindungen markiert, bei denen es sich entweder um Antagonisten der Glycinbindungsstelle oder um Kanalblocker handelte (Abb. 25). NMDA-Rezeptorliganden dieser beiden Bindungsstellen besitzen grundsätzlich die besten Voraussetzungen für den Einsatz als PET-Liganden.

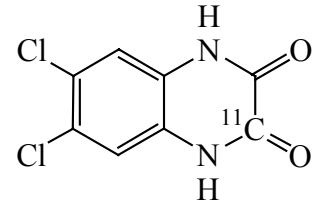
Dennoch konnte sich keine der bisher synthetisierten Verbindungen als routinemäßig anwendbares Radiopharmazeutikum zur Visualisierung des NMDA-Rezeptorsystems durchsetzen. Während die Glycinantagonisten zumeist eine zu geringe Hirnaufnahme aufweisen, besitzen Kanalblocker entweder eine zu geringe Selektivität oder eine zu hohe Lipophilie, welche in einer hohen unspezifischen Bindung resultiert.



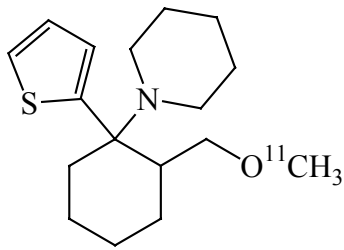
[¹¹C]ACEA 1021



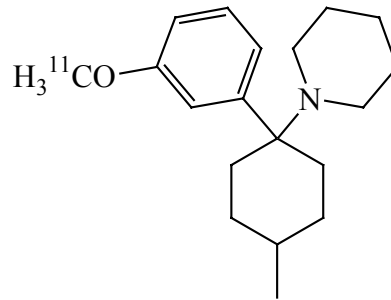
[2-¹¹C]QX



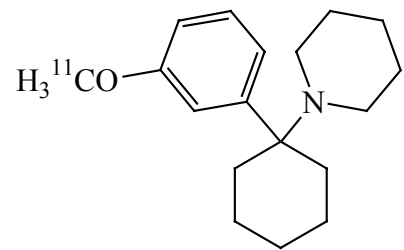
[2-¹¹C]DCQX



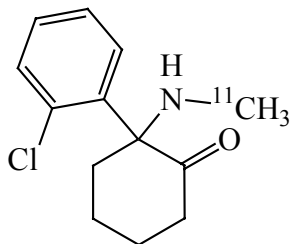
[¹¹C]TCP Derivat



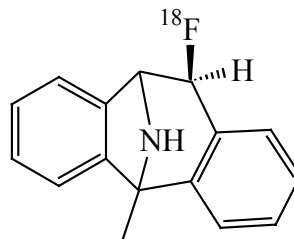
[¹¹C]PCP-Derivat



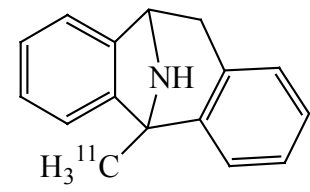
[¹¹C]PCP-Derivat



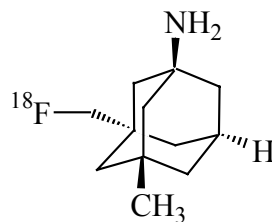
S-[N-Methyl-¹¹C]ketamin



[¹⁸F]MK-801



[¹¹C]MK-801



[¹⁸F]MEM

Abbildung 25: Mit kurzlebigen Positronenemittern markierte Liganden des NMDA-Rezeptors (Glycinantagonisten: ACEA 1021, QX, DCQX [122]; Kanalblocker: [¹¹C]TCP- und [¹¹C]PCP-Derivate [123], S-[N-Methyl-¹¹C]ketamin [121], [¹⁸F]MK-801 [124], [¹¹C]MK-801 [125], [¹⁸F]MEM [126])

Bei der Auswahl geeigneter PET-Liganden sind insbesondere die in vitro- und in vivo-Affinität, die Toxizität, die Selektivität, die Lipophilie und die Eignung der Substanz hinsichtlich einer Markierung zu berücksichtigen. Betrachtet man nun die Liganden der einzelnen Bindungsstellen bezüglich ihrer Eignung als PET-Liganden, so zeigt sich das die Glycinantagonisten und die Kanalblocker die besten Voraussetzungen für die PET besitzen (Tab. 4). Da die NMDA-Rezeptorliganden im Hinblick auf eine pharmazeutische Anwendung optimiert wurden, sind jedoch nicht alle der synthetisierten Verbindungen für Markierungen mit Positronenemittern tauglich.

Tabelle 4: Eignung der NMDA-Rezeptorliganden bezüglich einer Markierung mit kurzlebigen Positronenemittern

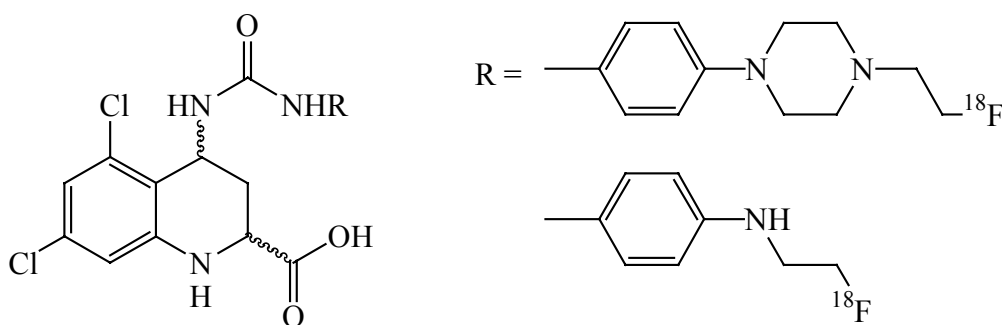
Bindungsstelle	Vorteile der Liganden	Nachteile der Liganden
Glutamat	- hohe in vitro-Affinität	- niedrige in vivo-Aktivität - stärkere Nebenwirkungen
Glycin	- hohe in vitro-Affinität - gute Kenntnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen - geringe Nebenwirkungen	- niedrige in vivo-Aktivität
Kanal	- hohe in vitro-Affinität - hohe in vivo-Aktivität - gute Passage der Blut-Hirn-Schranke	- meist geringe Selektivität - stärkere Nebenwirkungen
Polyamin	- hohe in vitro-Affinität	- geringe Kenntnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen

2 Problemstellung

Die glutamaterge Neurotransmission wird in Zusammenhang mit einer Reihe von wichtigen neurologischen Erkrankungen diskutiert, deren molekularbiologische Grundlagen und Verlauf jedoch noch nicht in allen Einzelheiten geklärt sind. Durch eine nicht-invasive Visualisierung dieser Krankheitsbilder mittels PET könnte man neue Einsichten über deren Charakterisierung und Therapiemöglichkeiten gewinnen. Dabei ist der NMDA-Rezeptor aufgrund seiner Beteiligung bei diesen Krankheitsbildern besonders interessant.

Als geeignete PET-Liganden bieten sich hierbei die Antagonisten der Glycinbindungsstelle und Kanalblocker an, da sie die besten Voraussetzungen für eine erfolgreiche Visualisierung des glutamatergen Systems besitzen (Abschnitt 1.4.6). Während im Falle der Kanalblocker schon das S-[N-Methyl- ^{11}C]ketamin markiert und in ersten PET-Untersuchungen eingesetzt wurde, konnte für die Glycinbindungsstelle noch kein geeigneter Ligand radioaktiv markiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Liganden auf der Basis der 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (ADTC) zu synthetisieren, radioaktiv zu markieren und ihre pharmakologischen Eigenschaften zu untersuchen. Basierend auf vorausgehenden Forschungsergebnissen [119, 127-129] sollten zuerst folgende Liganden dargestellt werden:



Diese Verbindungen wurden ausgewählt, weil die entsprechenden nicht-fluorethylierten Liganden bereits synthetisiert wurden und Affinitäten im nanomolaren Bereich besitzen [119]. Für beide Verbindungen mussten die Synthesen der inaktiven Referenzverbindungen und der entsprechenden Markierungsvorläufer erarbeitet werden. Die Struktur der Markierungsvorläufer sollte dabei eine einfache und effiziente Markierung mit 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat oder [^{18}F]Fluorid ermöglichen.

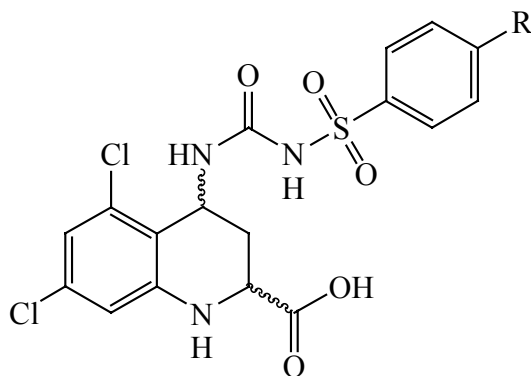
Im Rahmen der Markierungsoptimierung sollte der Einfluss von verschiedenen Reaktionsparametern wie Reaktionsdauer, Reaktionstemperatur, Lösungsmittel, Basensystem und Markierungsvorläuferkonzentration untersucht werden. Bei der Untersuchung von ^{18}F -Fluorethylierungsreaktionen sollten auch die Markierungsausbeuten zwischen einem Markierungsvorläufer mit freier Carbonsäure und einer Methylester-geschützten Carbonsäure verglichen werden.

Mit Hilfe der inaktiven Referenzverbindungen sollten die pharmakologischen Eigenschaften der Liganden untersucht werden. Hierbei sollten insbesondere die *in vitro*-Affinitäten und die Lipophilie der Verbindungen charakterisiert werden.

In Abhängigkeit von den Ergebnissen dieser Untersuchungen sollten weitere Liganden der Glycinbindungsstelle dargestellt und charakterisiert werden. Die Modifikation der Liganden sollte dabei

im Bereich der „voluminöse-Substituenten-tolerierenden Region“ (Abschnitt 1.4.5) vorgenommen und einer Verbesserung der ^{18}F -Markierungsausbeute, der Lipophilie oder der in vitro-Affinität dienen. Auch diese Verbindungen sollten pharmakologisch charakterisiert und ihre ^{18}F -Markierungsreaktion optimiert werden.

Außerdem war die Synthese eines Sulfonylharnstoffderivats geplant, da dieses gegenüber dem entsprechenden Harnstoffderivat eine wesentlich höhere Affinitäten besitzen sollte [127]:



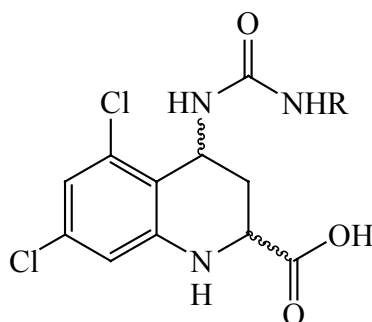
Dazu sollte aus der Gruppe der zuvor synthetisierten Harnstoffderivate die geeignetste Verbindung, hinsichtlich ihrer pharmakologischen und chemischen Eigenschaften, ausgewählt und von dieser die analoge Sulfonylharnstoffverbindung hergestellt werden. Dieses Derivat sollte dann ebenfalls hinsichtlich der ^{18}F -Markierung optimiert und pharmakologisch charakterisiert werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthetisierte Antagonisten der Glycinbindungsstelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Antagonisten der Glycinbindungsstelle dargestellt:

Tabelle 5: Synthetisierte Referenzverbindungen für Untersuchungen an der Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle



R	IUPAC-Name	Abkürzung
	trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	tADTC1
	cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	cADTC1
	trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	tADTC2
	trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	tADTC3
	trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	tADTC4
	trans-5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	tADTC5

Aufgrund des hohen präparativen Aufwandes, der für eine Trennung der Enantiomeren nötig ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nur eine Trennung der Diastereomeren durchgeführt. Mit Ausnahme von cADTC1 handelt es sich bei den Liganden stets um die trans-Enantiomeren bezüglich 4- und 2-Position. In den folgenden Formelbildern wurde aus Gründen der Übersicht das 2R,4S-Enantiomer stellvertretend für die trans-Enantiomeren und das 2R,4R-Enantiomer stellvertretend für die cis-Enantiomeren abgebildet.

3.2 Synthese des 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters

Zur Synthese der entsprechenden Liganden wurde zuerst der 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester dargestellt (Abb. 26). Die Herstellung dieser Verbindung erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Stevenson et al. [130].

In einem ersten Schritt wurde der Glyoxalsäuremethylester (**1**), der sehr schnell zu einer farblosen, viskosen Masse polymerisiert, durch Reaktion von Dimethoxyessigsäure-methylester mit Glyoxalsäure hergestellt und destillativ gereinigt [131]. Dieser wurde anschließend mit 3,5-Dichlor-anilin, unter Verwendung von Magnesiumsulfat als wasserentziehendes Mittel, zur entsprechenden Schiffschen Base umgesetzt. Nach Filtration des Magnesiumsulfats wurde die Schiffsche Base unter Lewisäurekatalyse durch Zusatz von N-Benzyloxycarbonyl-N-vinylamin (**2**) in den 4-Benzyloxycarbonylamino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**3**) überführt. Das benötigte N-Benzyloxycarbonyl-N-vinylamin wurde zuvor frisch hergestellt. Dazu wurde frisch destilliertes Acrylsäurechlorid mit Natriumazid in das entsprechende Säureazid überführt, durch Erhitzen auf 120 °C nach Curtius umgelagert und anschließend durch Zusatz von Benzylalkohol zum N-Benzyloxycarbonyl-N-vinylamin umgesetzt [132-134]. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Destillation im Hochvakuum, wodurch sich das Produkt in guten Ausbeuten isolieren ließ.

Da bei der Zyklisierung kein chirales Auxiliar verwendet wurde und die Reaktion auch nicht stereospezifisch verlief, entstand ein Gemisch der vier möglichen Stereoisomere bezüglich 2- und 4-Position. Dabei wurden die cis-Diastereomeren (2R,4R / 2S,4S) gegenüber den trans-Diastereomeren (2R,4S / 2S,4R) in einem Überschuss von 2:1 gebildet und durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 9/1 als Eluens voneinander separiert.

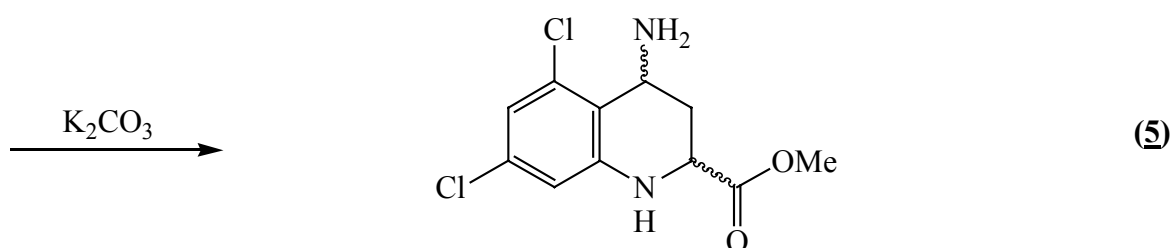
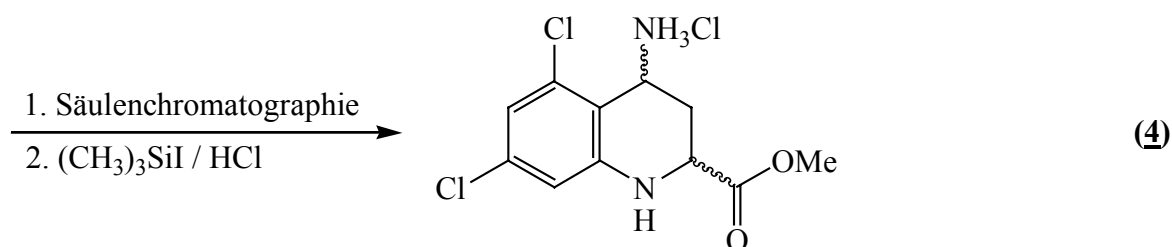
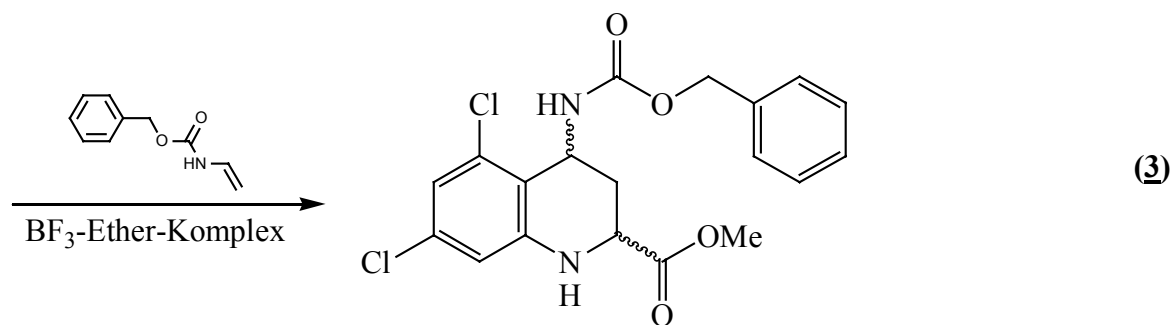
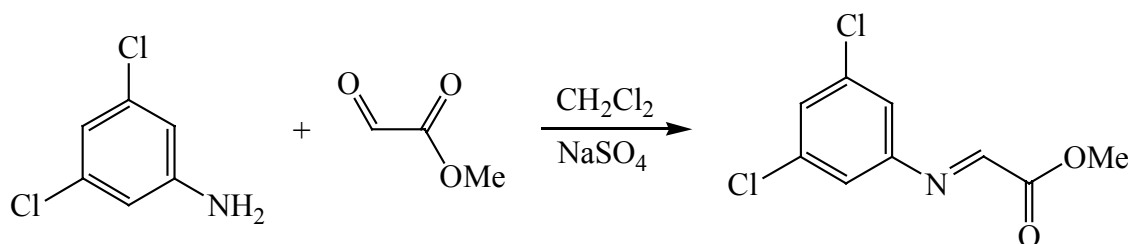
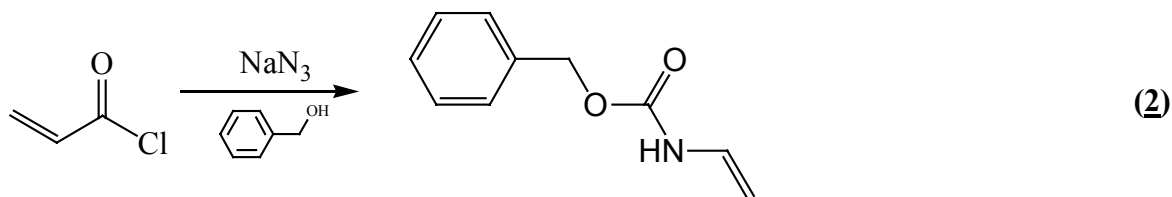
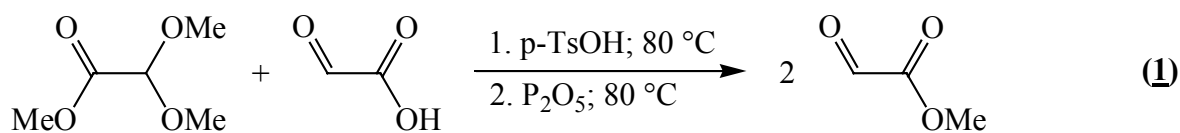


Abbildung 26: Syntheschema des 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters

Die Epimerisierung der cis- in die trans-Diastereomeren wurde nach einem in der Literatur beschriebenen Verfahren durchgeführt [114]. Hierzu wurden die cis-Diastereomeren in Methanol gelöst, mit katalytischen Mengen Natriummethylat versetzt und unter Rückfluss bis zur Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts erhitzt, wodurch die thermodynamisch stabileren trans-Diastereomeren in einem Überschuss von 2:1 gebildet wurden. Das in der Literatur angegebene

Isomerenverhältnis von 20:1 zugunsten der trans-Diastereomeren konnte allerdings nicht erzielt werden, was aber durch die Tatsache, dass dort der entsprechende sterisch anspruchsvollere Ethylester epimerisiert wurde, zu erklären ist.

Die Charakterisierung und Identifizierung der Diastereomeren wurde mittels der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durchgeführt, in der beide Stereoisomere sehr gut zu unterscheiden waren (Abb. 27). Besonders charakteristisch für die Unterscheidung der Verbindungen waren hierbei die Protonen der Positionen 1-4 und die Methylestergruppe.

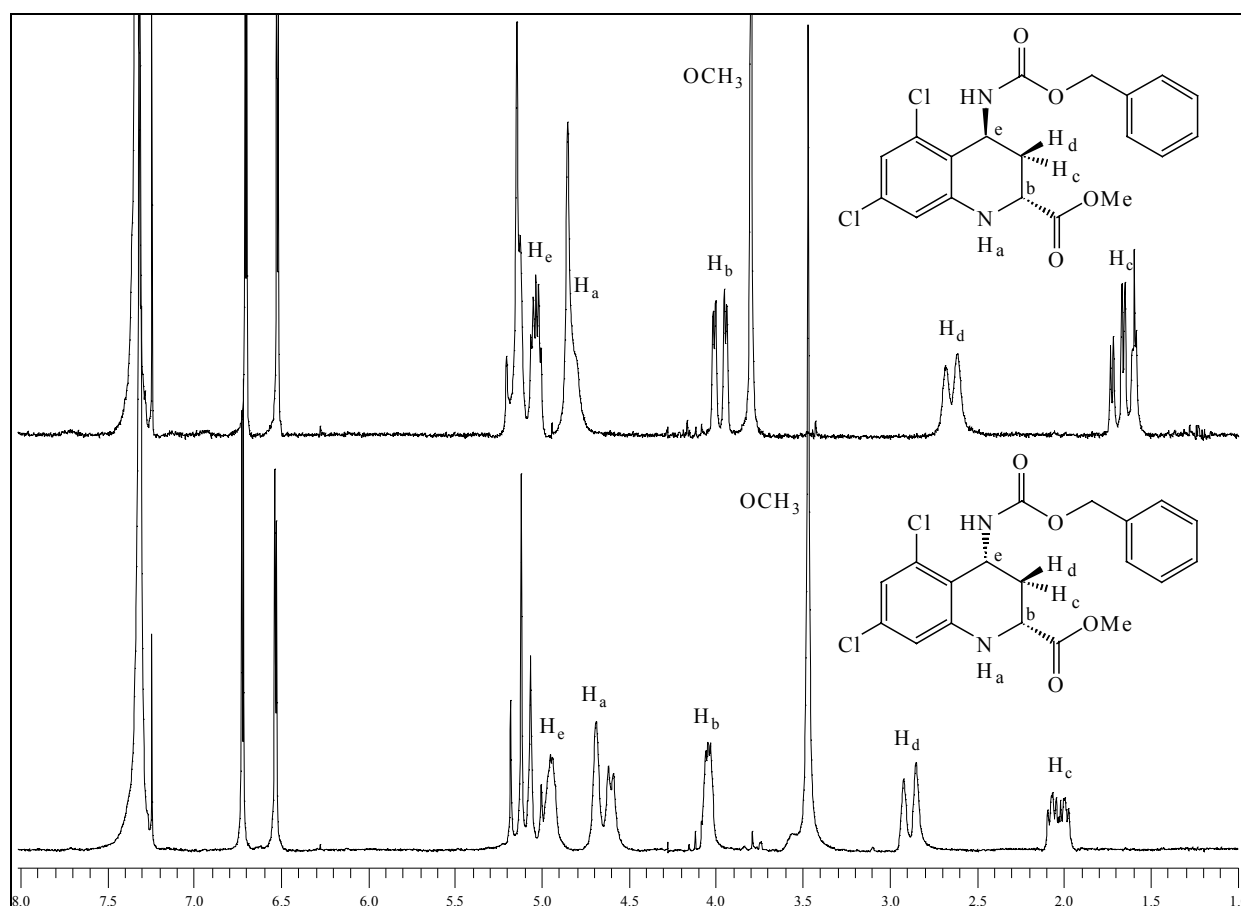


Abbildung 27: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des cis- und des trans-4-Benzyloxycarbonylamino-5,7-dichloro-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters (oben trans; unten cis)

Die anschließende Abspaltung der Benzyloxycarbonylschutzgruppe wurde mittels des Iodtrimethylsilanverfahren durchgeführt [135]. Dabei wurde die Schutzgruppe intermediär durch einen Trimethylsilylester substituiert und dieser direkt durch Methanol verseift. Da das entstehende freie Amin zu intramolekularen Zyklisierungsreaktionen neigt, wurde es durch Behandlung mit Chlorwasserstoff in Ethylacetat in das stabile 4-Amino-5,7-dichloro-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (**4**) überführt.

Durch erschöpfende Extraktion des Hydrochlorids im Alkalischen ließ sich der 4-Amino-5,7-dichloro-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**5**) wieder freisetzen.

3.3 Synthese der inaktiven Referenzverbindungen

Im Hinblick auf die geplanten ^{18}F -Markierungen wurden zuerst die jeweiligen Referenzverbindungen synthetisiert, die der Etablierung der Radioanalytik (Bestimmung der R_f - und t_r -Werte) und der pharmakologischen Untersuchung der Liganden dienen.

3.3.1 Synthese der cis-/trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

Zur Darstellung der 5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure wurde in ersten Reaktionsfolge das 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin hergestellt (Abb. 28), welches anschließend unter Verwendung eines Kopplungsreagenz mit dem 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethyl-ester (5) zum entsprechenden Harnstoff umgesetzt wurde.

Ausgehend vom N-(4-Nitrophenyl)-piperazin wurde nach einer modifizierten Literaturvorschrift eine Fluorethylierung zum 1-(2-Fluor-ethyl)-4-(4-nitro-phenyl)-piperazin (6) durchgeführt [136]. Eine anschließende katalytische Hydrierung mit Palladium/Kohlenstoff lieferte das 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin (7) in hohen Ausbeuten.

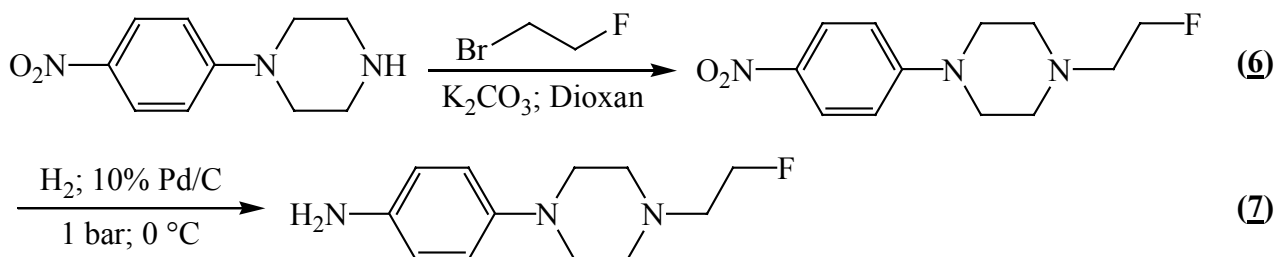


Abbildung 28: Synthese des 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamins

Für die anschließende Kopplung der Aminkomponenten (5) und (7) zum unsymmetrischen Harnstoff wurden zwei Reagenzien verwendet: 1,1'-Carbonyldiimidazol und Triphosgen.

1,1'-Carbonyldiimidazol wurde erstmals von Staab als geeignetes Reagenz zur Bildung von unsymmetrischen Harnstoffen beschrieben [137]. Dazu setzt man das 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin (7) langsam bei 0°C mit 1,1'-Carbonyldiimidazol zum Imidazol-1-carbonsäure-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-amid um (Abb. 29). Nach beendeter Aminzugabe wurde noch eine Stunde bis zur Vervollständigung der Reaktion gerührt und anschließend der cis- oder trans- 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (5) rasch zugegeben. Die Lösung wurde weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und der cis- bzw. trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester durch Umkristallisieren oder Säulenchromatographie in 20-25 %iger Ausbeute isoliert.

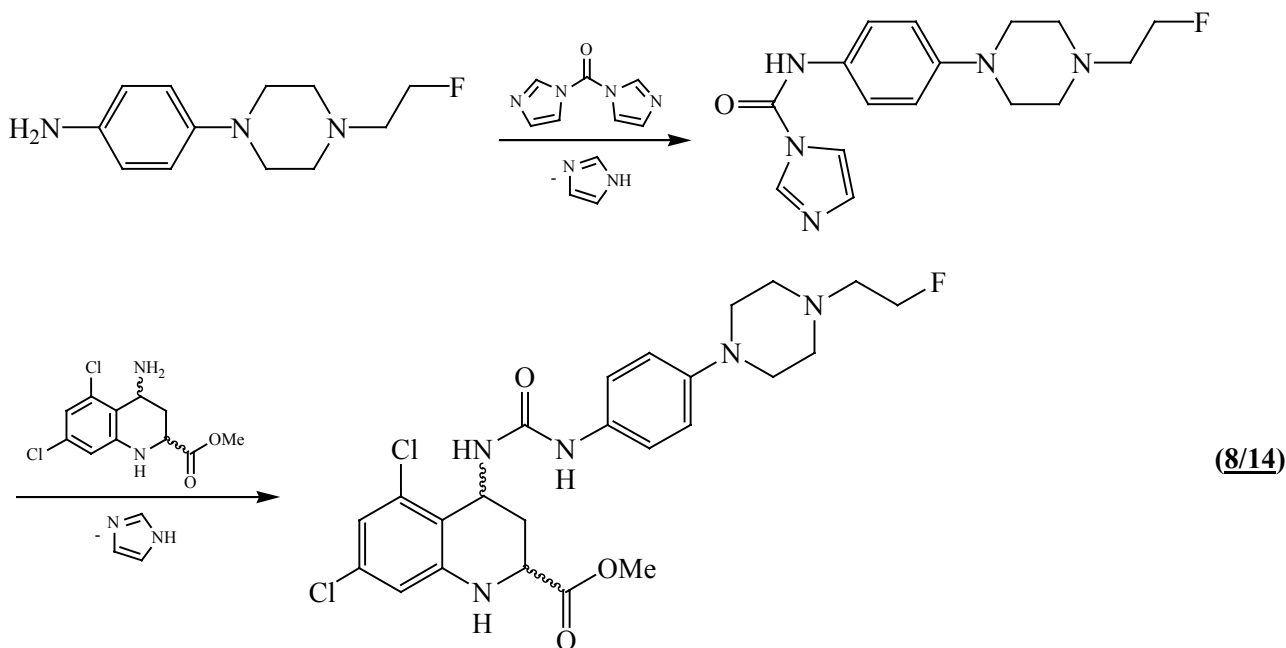


Abbildung 29: 1,1'-Carbonyldiimidazol als Kopplungsreagenz zur Bildung unsymmetrischer Harnstoffe

Bei der Reaktionsführung ist auf eine langsame Zugabe des ersten Amins und auf eine konstante Reaktionstemperatur zu achten. Insbesondere im Falle höherer Reaktionstemperaturen kommt es unter Imidazolabspaltung zur verstärkten Bildung des entsprechenden Isocyanats und unter Anlage eines weiteren 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamins zur Bildung des symmetrischen Harnstoffs [138]:

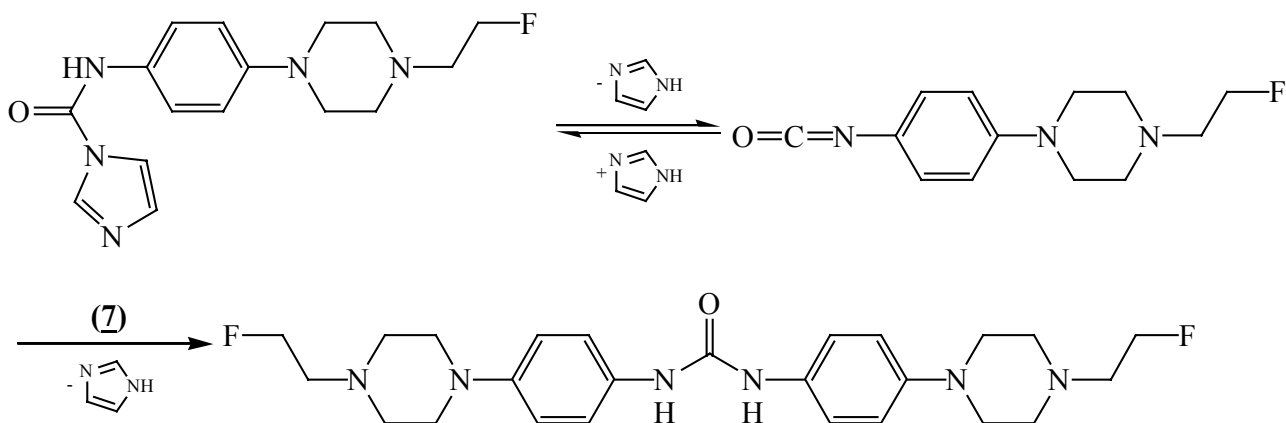
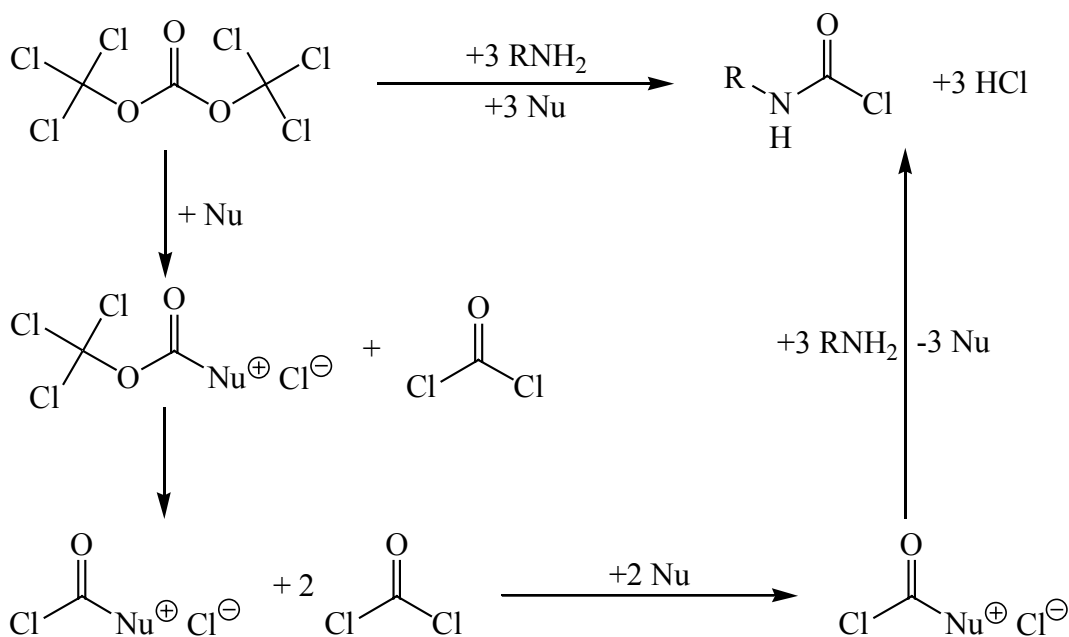


Abbildung 30: Nebenreaktionsweg zur Bildung symmetrischer Harnstoffe

Neben 1,1'-Carbonyldiimidazol wurde auch Triphosgen (Bis(trichlormethyl)carbonat) als Kopplungsreagenz untersucht [139]. Triphosgen ist ein kristalliner Phosgenersatz, der unter Einwirkung von Nucleophilen wie 3 Äquivalente Phosgen reagiert. Der Reaktionsmechanismus des Triphosgens wurde von Eckert et al. untersucht [140], der auch die Einflüsse von Hilfsnucleophilen (Nu) analysierte und seine Ergebnisse in dem sogenannten „Eckert-Schema“ zusammenfasste (Abb. 31).



Nu = Hilfsnukleophil (DIEA, Pyridin, Triethylamin) / RNH₂ = Nukleophil (Amine, Alkohole, Carbonsäuren, etc.)

Abbildung 31: Reaktionsmechanismus des Triphosgens

Die eigentliche Reaktionsführung bei der Verwendung von Triphosgen, die nach einer modifizierten Literaturvorschrift durchgeführt wurde, entspricht der des 1,1'-Carbonyldiimidazols [141]. Auch hier ist auf eine strikte Temperaturkontrolle und gleichmäßige Zugabe des Amins zu achten, da es sonst über die Bildung des Isocyanats zur Synthese des symmetrischen Harnstoffs kommt. Das 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin wurde langsam bei 0 °C zu einer Lösung des Triphosgens gegeben, nach beendeter Zugabe für weitere 15 Minuten gerührt und anschließend das cis- oder trans- 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (**4**) rasch zugegeben. Als Hilfsnukleophil und Protonenfänger für den bei dieser Reaktion entstehenden Chlorwasserstoff wurde N-Ethyl-diisopropylamin verwendet. Die Lösung wurde für weitere 30 Minuten gerührt und durch Aufarbeitung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie an Kieselgel der cis- bzw. trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**8/14**) in hohen Ausbeuten von 80-90% erhalten (Abb. 32).

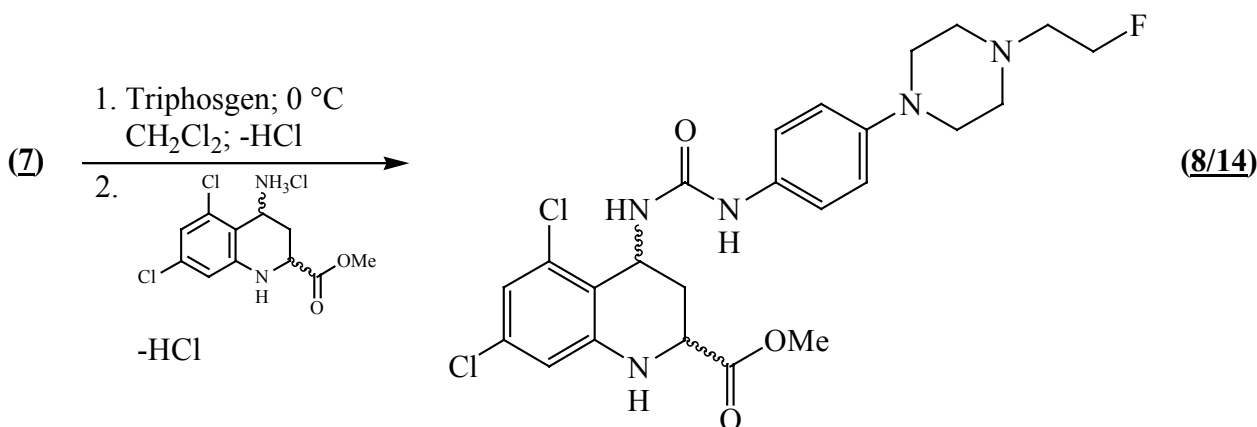


Abbildung 32: Triphosgen als Kopplungsreagenz zur Bildung unsymmetrischer Harnstoffe

Vergleicht man experimentell beide Kopplungsreagenzien für diese Art der unsymmetrischen Harnstoffbildung, so zeigt sich die deutliche Überlegenheit des Triphosgens. Es besitzt nicht nur den Vorteil der höheren Reaktivität, was sich in einer kürzeren Reaktionszeit und deutlich höheren Ausbeuten niederschlägt. Man kann auch, im Gegensatz zum 1,1'-Carbonyldiimidazol, das 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (**4**) in die Reaktion einsetzen und muss nicht erst das freie Amin bilden. Allerdings muss Verbindung (**4**) immer als zweites Amin eingesetzt werden, da es aufgrund des sekundären Anilinstickstoffs ein zweites nukleophiles Zentrum besitzt, dessen Nukleophilie zwar gering, aber bei der Verwendung des Triphosgens ausreichend ist, um es zur Bildung von Nebenprodukten kommen zu lassen.

Eine anschließende Verseifung des Methylesters (**8/14**) mit 1N LiOH-Lösung ergab die gesuchte Referenzverbindung cis-/trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (c/tADTC1) in ≈ 70 %iger Ausbeute (Abb. 33).

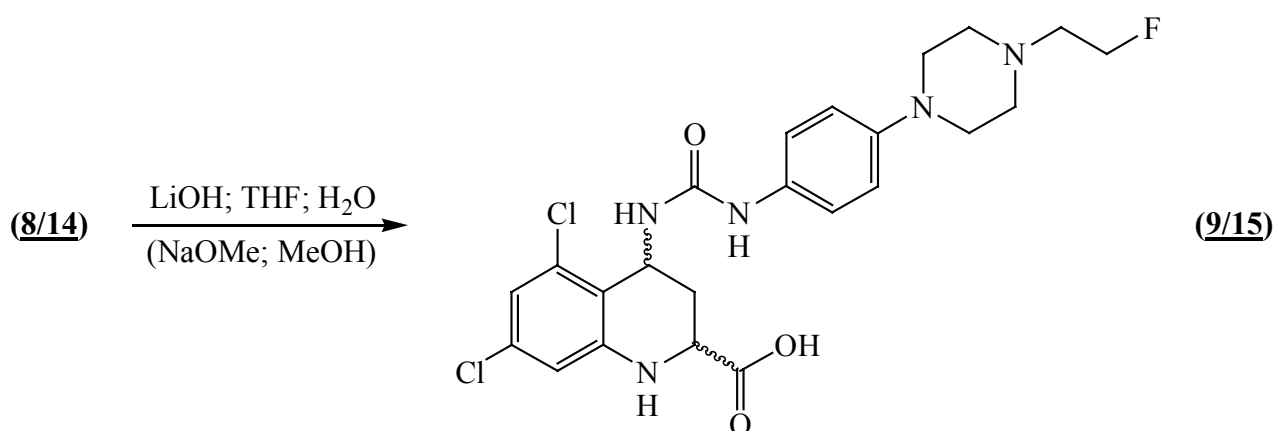


Abbildung 33: Verseifung des Methylesters zur Darstellung der cis-/trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

Für den Fall des cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters (**14**) ist in der Literatur ein Verfahren zur Verseifung des Esters unter gleichzeitiger Konfigurationsumkehr zum trans-Isomer beschrieben [119]. Im Gegensatz zu dem beschriebenen Verfahren, bei dem allerdings statt des Methylesters ein Ethylester verseift wurde, lief die Epimerisierung jedoch nicht vollständig ab, sondern nur zu ca. 80-90%. Das dort erhaltene Rohprodukt musste daher mehrfach aus Methanol umkristallisiert oder mittels semipräparativer HPLC gereinigt werden.

3.3.2 Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

Im Hinblick auf geplante ^{11}C -Markierungen wurde auch eine entsprechende Referenzverbindung synthetisiert. Die Synthese wurde in Analogie zur trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (**9**) durchgeführt und ist in Abbildung 34 zusammengefasst.

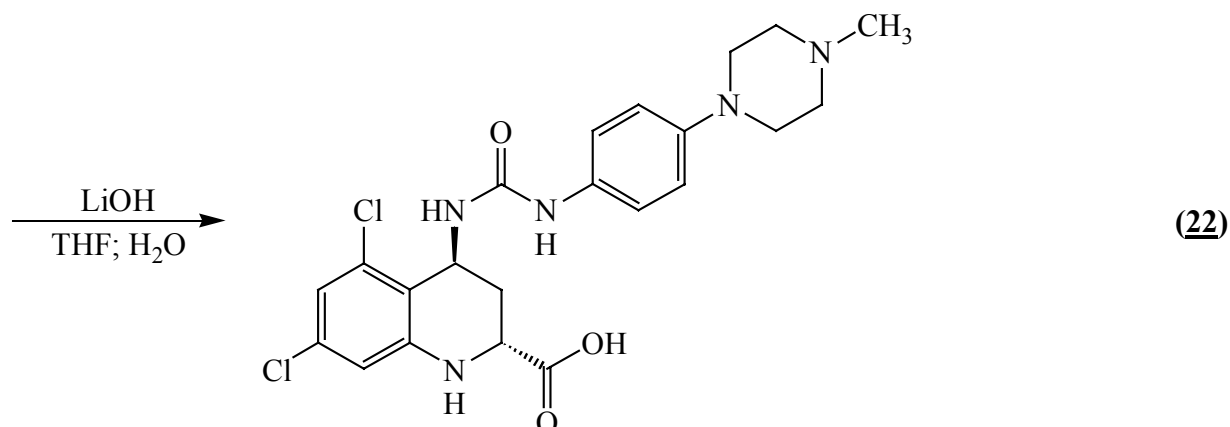
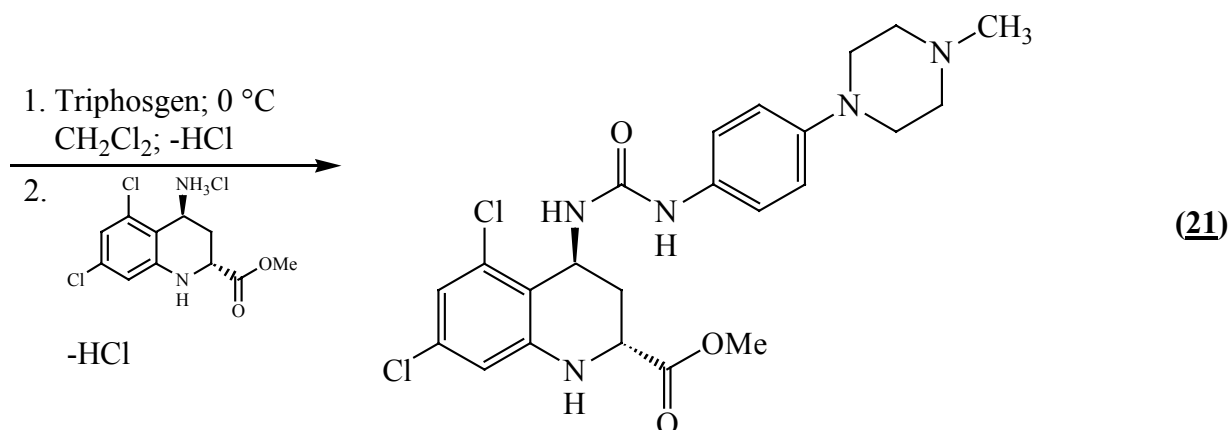
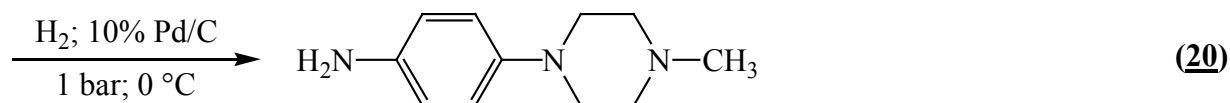
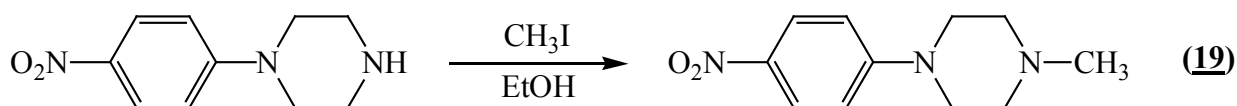


Abbildung 34: Syntheschema der Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

Ausgehend vom N-(4-Nitrophenyl)-piperazin wurde eine Methylierung mit Iodmethan zum 1-Methyl-4-(4-nitro-phenyl)-piperazin (19) durchgeführt [142]. Eine anschließende katalytische Hydrierung mit einem Palladium/Kohlenstoff-Katalysator erbrachte das 4-(4-Methyl-piperazin-1-yl)-phenylamin (20) in 92 %iger Ausbeute.

Aufgrund der in Abschnitt 3.3.1 genannten Gründe wurde die folgende Synthese des unsymmetrischen Harnstoffs mit Triphosgen als Kopplungsreagenz durchgeführt. Hierzu wird das 4-(4-Methyl-piperazin-1-yl)-phenylamin (20) langsam mit Triphosgen in das entsprechende Carbaminsäurechlorid überführt und durch Zugabe des trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorids (4) in den trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (21) überführt. Durch Verseifung des Methylesters mit 1N LiOH-Lösung wurde die freie trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (22) erhalten.

Mit Hilfe dieser Referenzverbindung wurden die pharmakologischen Eigenschaften des Liganden untersucht, bei der eine sehr hohe in vitro-Affinität festgestellt wurde (siehe Abschnitt 8.1). Jedoch wurden noch keine Markierungen durchgeführt. Diese könnten ausgehend von Verbindung (12) oder (13) als Markierungsvorläufer und [^{11}C]Methyliodid, welches in einer Untersuchung bei einem Piperazinderivat radiochemische Ausbeuten von ca. 90% erbrachte, durchgeführt werden [143].

3.3.3 Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

Die Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure sollte in Analogie zur Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (9) durchgeführt werden.

Ausgehend von 4-Nitroanilin wurde versucht, eine Fluorethylierung mit 1,2-Bromfluorethan und Kaliumcarbonat in Dioxan durchzuführen, was jedoch aufgrund der Deaktivierung der Anilinfunktion durch die in para-Position sitzende Nitrofunktion erfolglos war. Daher wurde in einem zweiten Ansatz die Anilingrouppe des 4-Nitroanilins in einem ersten Schritt mit Natriumhydrid deprotoniert um seine Nukleophilie zu erhöhen. Eine anschließende Umsetzung mit 1,2-Bromfluorethan erbrachte das gewünschte (2-Fluor-ethyl)-(4-nitro-phenyl)-amin (23) in einer Ausbeute von 32% (Abb. 35).

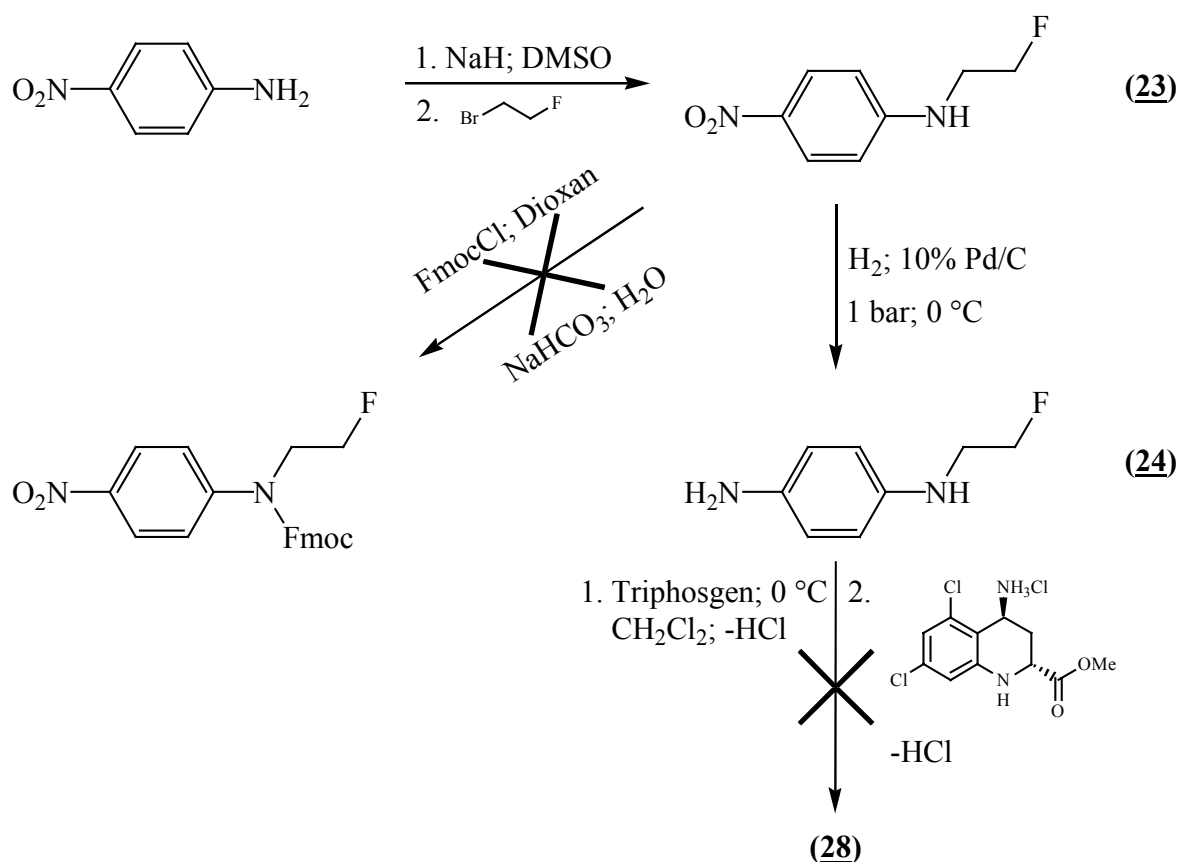


Abbildung 35: Versuchte Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

Da nach der nun geplanten katalytischen Hydrierung mit einer deutlich erhöhten Nucleophilie der sekundären Anilinfunktion zu rechnen war, was zu Nebenprodukten bei der Harnstoffkopplung führen würde, sollte diese Funktion mittels einer geeigneten Schutzgruppe geschützt werden. In einer früheren Untersuchung hatte sich die 9-Fluorenylmethoxycarbonylschutzgruppe (Fmoc) bei ähnlichen Verbindungen als ideale Schutzgruppe bewährt [119]. Jedoch gelang es nicht, diese Schutzgruppe unter den üblichen Bedingungen einzuführen [144], so dass bei der Aufarbeitung nur das Edukt reisoliert werden konnte. Auch Modifikationen der Reaktionsbedingungen führten nicht zum Erfolg.

Da eine Einführung der Fmoc-Schutzgruppe aufgrund der geringen Nucleophilie der Anilinfunktion nicht möglich schien, wurde das (2-Fluor-ethyl)-(4-nitro-phenyl)-amin (23) durch katalytische Hydrierung in das N-(2-Fluor-ethyl)-benzen-1,4-diamin (24) überführt. Bei der nun durchgeführten Harnstoffkopplung zwischen dem N-(2-Fluor-ethyl)-benzen-1,4-diamin (24) und dem trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4) mittels Triphosgen kam es zur Bildung von vier Produkten, die sich nicht durch Säulenchromatographie voneinander trennen ließen. Eine Schützung der sekundären Aminofunktion war daher für die Vermeidung von Nebenprodukten bei der Harnstoffkopplung unerlässlich.

Von Carpino et al. wurden auch Methoden zur Einführung der Fmoc-Schutzgruppe in nichtwässrigen Lösungsmittelsystemen wie Dichlormethan, Benzol und Diethylether beschrieben [145]. Während die Umsetzungen in Benzol und Dichlormethan erfolglos waren, erbrachte die Verwendung von Diethylether als Lösungsmittel das gesuchte (4-Amino-phenyl)-(2-fluor-ethyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester-hydrochlorid (26) in 62 %iger Ausbeute (Abb. 36). Eine anschließende Kopplung der Verbindung zum Harnstoff, unter Verwendung von Triphosgen und trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4) lieferte den trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-(2-fluor-ethyl)-amino]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (27) in hohen Ausbeuten.

In der folgenden Reaktion wurde die 9-Fluorenylmethoxycarbonylschutzgruppe entfernt, bei der es sich um eine sehr säurestabile, aber basenlabile Schutzgruppe handelt. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgt normalerweise mit organischen Basen, die eine höhere Basizität als Pyridin besitzen, nach einem E1cB-Mechanismus. Hierbei wird durch die Base das Proton in 9-Position des Fluorenmoleküls abstrahiert, wodurch das freiwerdende Elektronenpaar unter Ausbildung einer Doppelbindung das Dibenzofulven freisetzt (Abb. 37). Die entstehende Carbaminsäure decarboxyliert spontan und setzt so das Amin wieder frei. Als Basen werden häufig Piperidin und Morpholin angewendet, falls sehr schonende Bedingungen erforderlich sind auch Ammoniak [146].

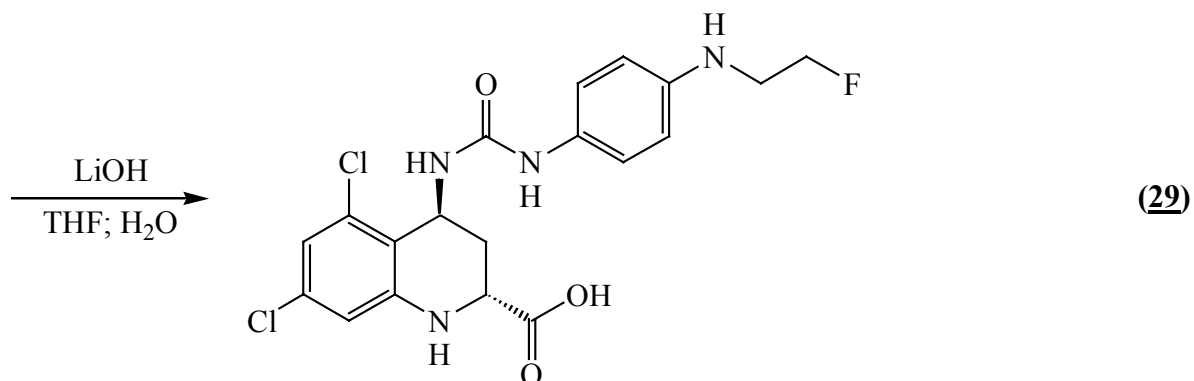
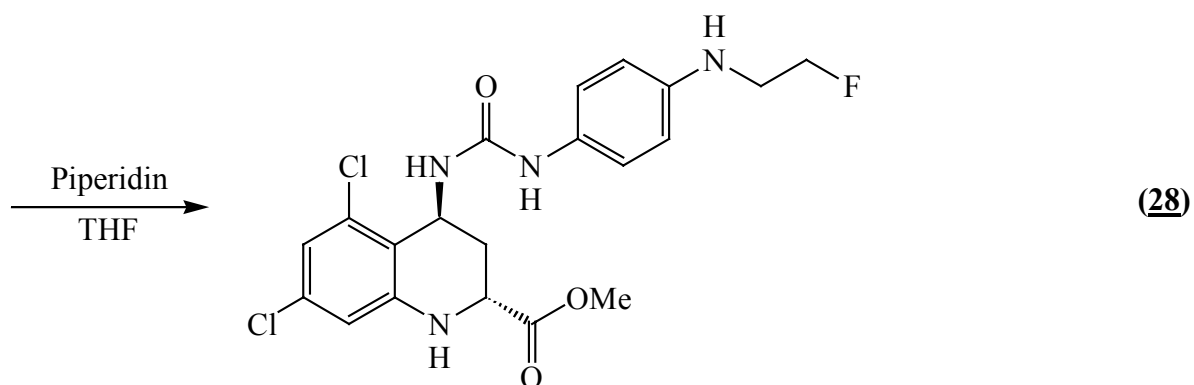
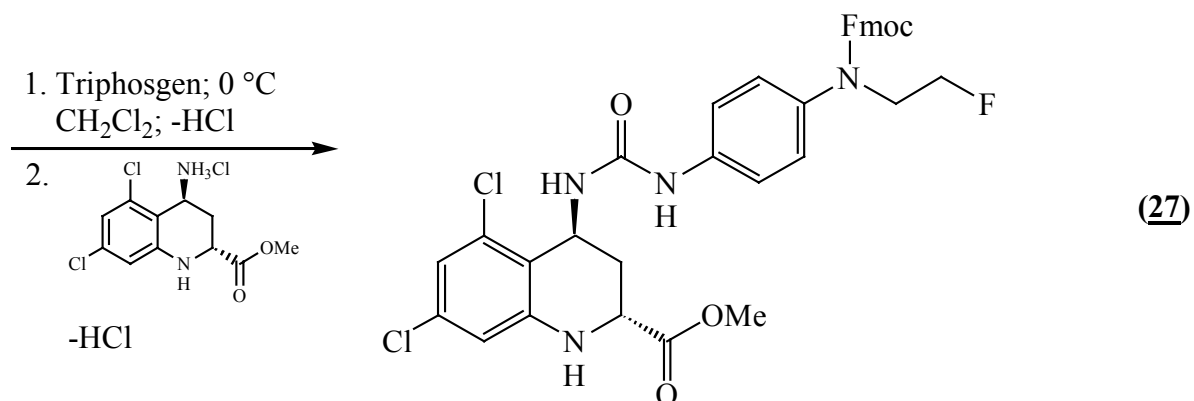
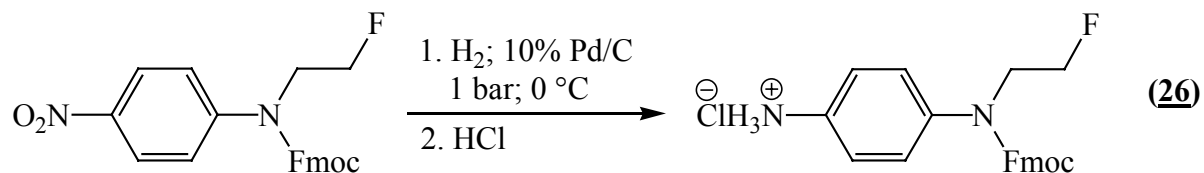
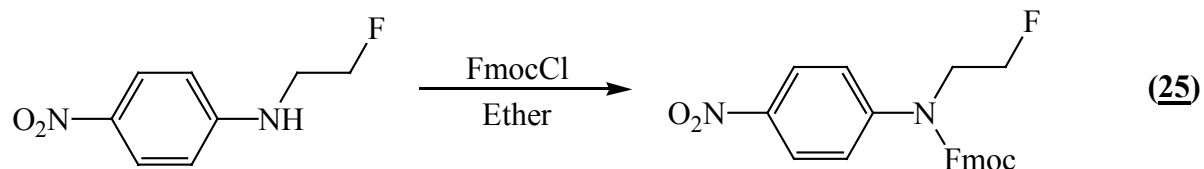


Abbildung 36: Syntheschema der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

Aufgrund der kurzen Reaktionszeit wurde in diesem Fall Piperidin als Base verwendet, um aus Verbindung (27) den trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (28) freizusetzen.

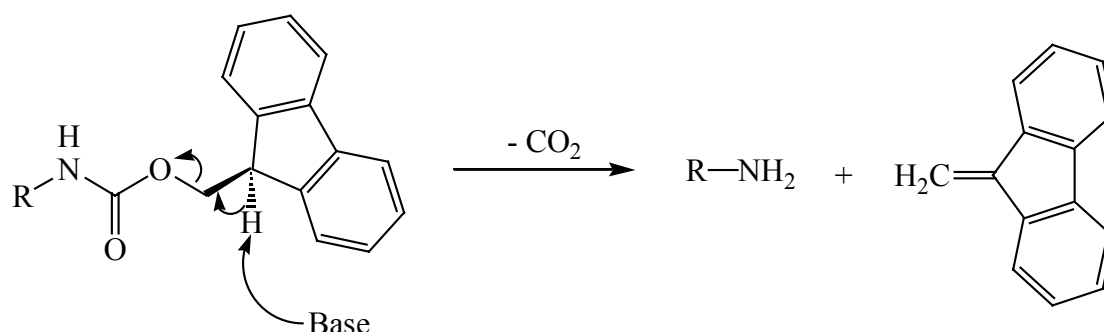


Abbildung 37: Reaktionsmechanismus der Fmoc-Abspaltung unter Baseneinwirkung

Eine anschließende Verseifung des Methylesters mit 1N LiOH-Lösung lieferte die freie trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (29) in 70 %iger Ausbeute.

3.3.4 Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

Da die in vitro-Testergebnisse von ADTC1, ADTC2 und ADTC3 (Abschnitt 8.1.4) und die in vivo-Biodistributionsstudie von tADTC1 (Abschnitt 8.2.2) eine relativ geringe Lipophilie der Liganden aufzeigten, wurde die Synthese eines Liganden mit höherer Lipophilie geplant. Durch die Substitution des 1-(2-Fluor-ethyl)-piperazin- bzw. des 2-Fluorethylaminrestes durch eine 2-Fluorethoxygruppe sollte eine Verbindung mit deutlich erhöhter Lipophilie erhalten werden (Abb. 38).

Ausgehend von p-Nitrophenol wurde nach einer modifizierten Literaturvorschrift durch Fluorethylierung mit 1,2-Bromfluorethan das entsprechende 1-(2-Fluor-ethoxy)-4-nitro-benzen (34) hergestellt [147]. Durch eine katalytische Hydrierung mit Palladium/Kohlenstoff wurde das 4-(2-Fluorethoxy)-phenylamin (35) erhalten, welches unter Verwendung von Triphosgen und trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4) zum trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (36) umgesetzt wurde. Eine abschließende Verseifung des Esters mit 1N LiOH-Lösung ergab die trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (37) in 78 %iger Ausbeute.

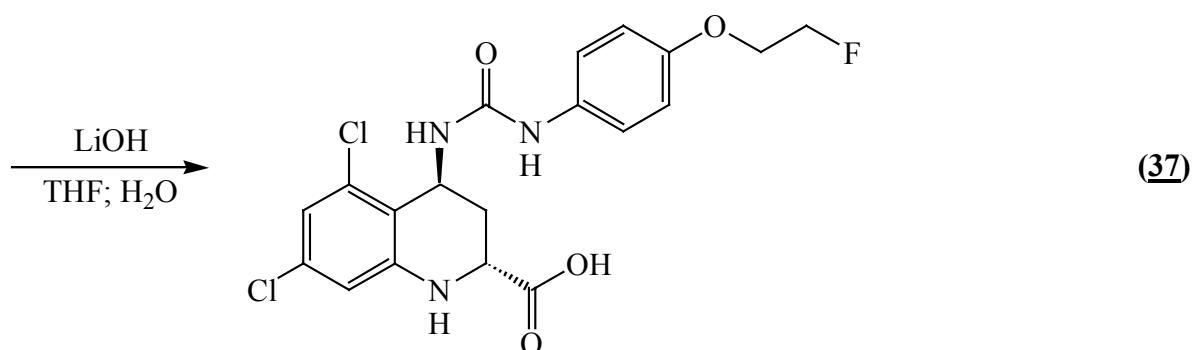
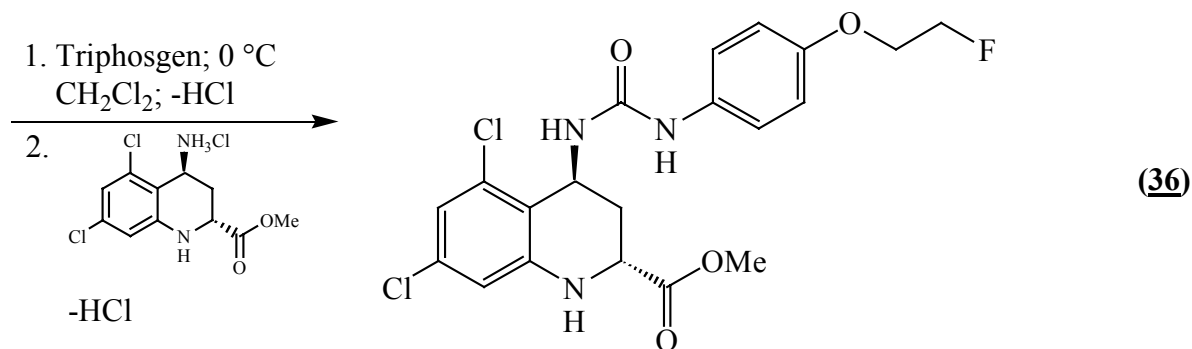
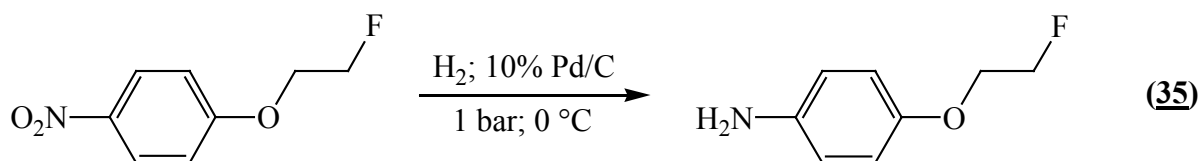
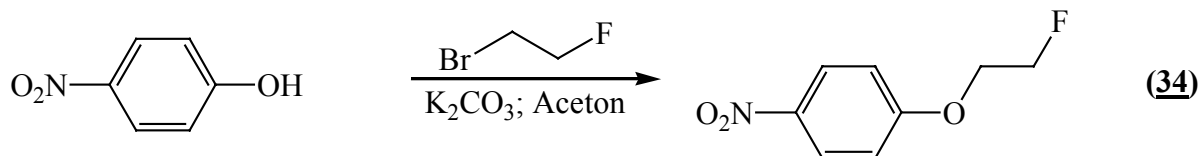


Abbildung 38: Syntheschema der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

3.3.5 Synthese der trans- 5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Sulfonylharnstoffligand dargestellt werden, da Vertreter dieser Verbindungsklasse sehr hohe Affinitäten zum NMDA-Rezeptor gezeigt haben [127]. Hierbei sollte aus der Gruppe der synthetisierten Harnstoffverbindungen (ADTC1 – 4) der Ligand mit den günstigsten Eigenschaften hinsichtlich Pharmakologie und ^{18}F -Markierung auch als analoges Sulfonylharnstoffderivat dargestellt werden. Aufgrund der Ergebnisse aus der Bestimmung der in vitro-Affinitäten und der ^{18}F -Markierung wurde daher der Ligand ADTC4 (Abschnitt 3.3.4) als analoge Sulfonylharnstoffverbindung synthetisiert.

In Analogie zu den Harnstoffverbindungen war auch hier die Bildung der Sulfonylharnstoffgruppierung der entscheidende Syntheseschritt. Von den in der Literatur beschriebenen Synthesewegen zur Bildung eines Sulfonylharnstoffs erschien die Umsetzung eines Sulfonylisocyanats mit einem Amin die geeignetste Synthesevariante zu sein [148-150]. Da Sulfonylisocyanate allerdings

präparativ nur schwer zugänglich sind, sollte die Isocyanatfunktion durch Reaktion mit Chlorsulfonyl-isocyanat eingebracht werden [151, 152]. Hierbei wird das Chlorsulfonyl-isocyanat in einer einstufigen Synthese zuerst mit dem Amin zum Chlorsulfonyl-harnstoff und dieser in einer Friedel-Crafts-Acylierung mit einem entsprechenden substituierten Aromaten zum gewünschten Sulfonylharnstoff umgesetzt [153]. Versuche, diese Reaktionsfolge an einer einfachen Modellverbindung (Tolbutamid) durchzuführen, blieben jedoch erfolglos (Abb. 39)

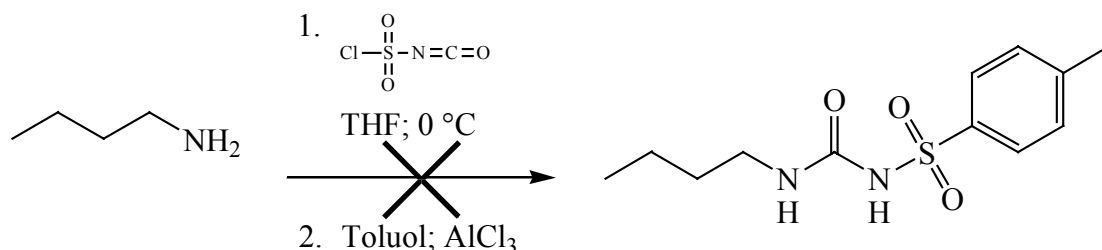


Abbildung 39: Geplante Synthese des Tolbutamids mittels Chlorsulfonyl-isocyanat

Daher wurde die Synthese des Sulfonylharnstoffs in Analogie zur Synthese der Harnstoffverbindungen durchgeführt. Ausgehend vom Sulfanilamid wurde durch Diazotierung bei 0 °C und anschließender Verkochung das 4-Hydroxy-benzensulfonamid (46) hergestellt [154]. Dieses wurde durch Deprotonierung mit Natriumhydrid und Reaktion mit 1,2-Bromfluorethan in das 4-(2-Fluor-ethoxy)-benzonsulfonamid (47) überführt (Abb. 40).

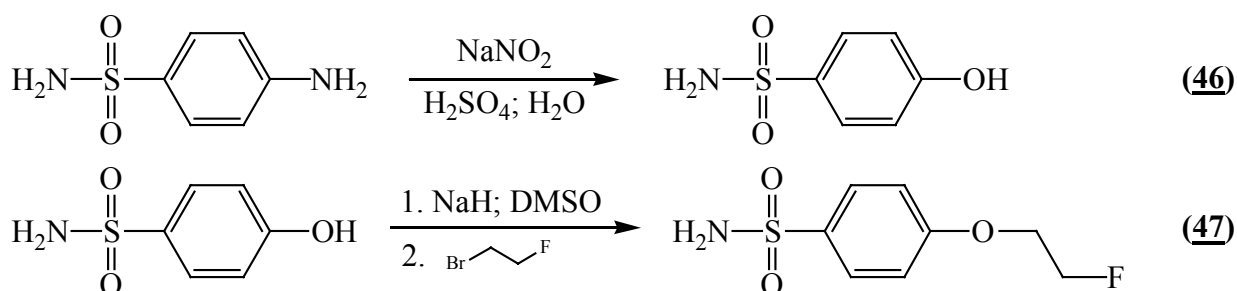


Abbildung 40: Syntheschema des 4-(2-Fluor-ethoxy)-benzonsulfonamids

Im Hinblick auf die geplante Kopplung wurden die bisher verwendeten Kopplungsreagenzien Triphosgen und 1,1'-Carbonyldiimidazol auf ihre Eignung für diese Reaktion untersucht, da mit einem Sulfonamid eine deutlich reaktionsträgere Substanz als die bereits untersuchten Amine umgesetzt werden sollte. Trotz der stark deaktivierenden Eigenschaften der Sulfonylgruppe besitzen die Sulfonamide noch eine gewisse Nukleophilie, was sich auch in den Resonanzstrukturen I und II zeigt (Abb. 41).

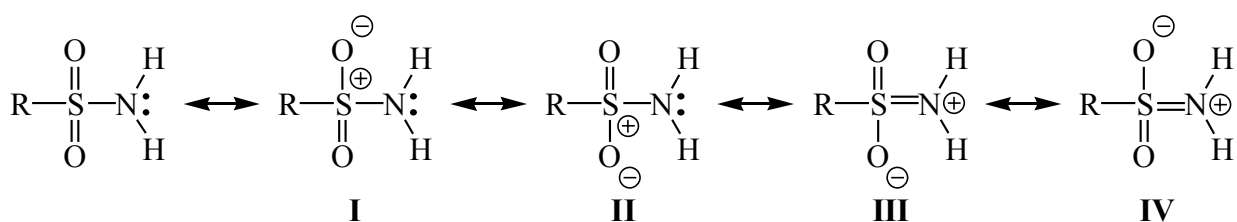


Abbildung 41: Resonanzstrukturen der Sulfonamide

Außerdem wird im Verlauf der Reaktion ein relativ acids Proton ($pK_a \approx 5-6$) gebildet, was insbesondere bei der Verwendung von Hilfsbasen während der Synthese zu berücksichtigen ist (Abb. 42).

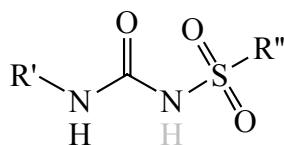


Abbildung 42: Allgemeine Struktur der Sulfonylharnstoffe (grau unterlegt: acids Proton)

Daher wurde für beide Kopplungsreagenzien eine Optimierung der Reaktionsbedingungen am Modell der Synthese des Tolbutamids durchgeführt. Hierbei ergaben sich für das 1,1'-Carbonyldiimidazol Ausbeuten von 40-50%, während im Falle des Triphosgens die Synthese erfolglos blieb. Durch Übertragung der Reaktionsbedingungen ließ sich der *trans*-5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**48**) unter Verwendung von 1,1'-Carbonyldiimidazol und *trans*-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (**4**) in einer Ausbeute von 28% darstellen (Abb. 43). Die Verseifung des Esters mit 1N LiOH-Lösung lieferte die *trans*-5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (**49**) in 57 %iger Ausbeute.

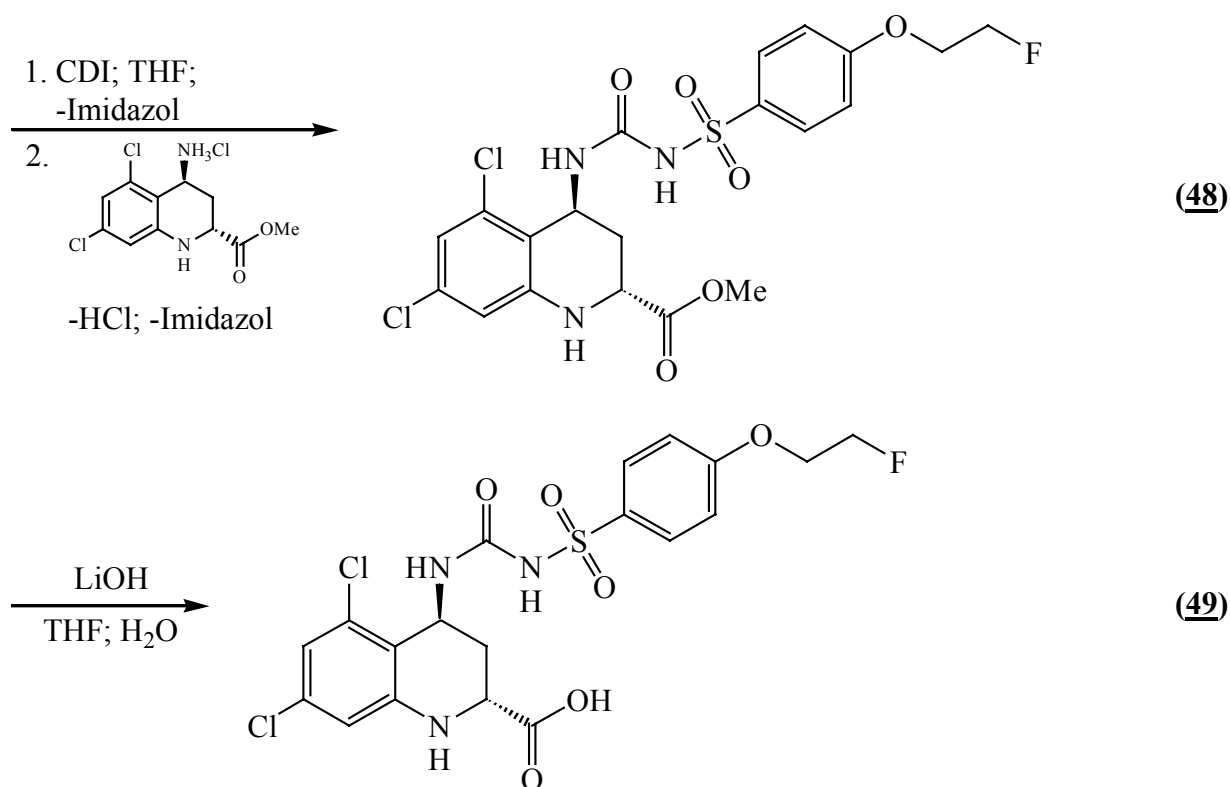


Abbildung 43: Syntheschema der *trans*-5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

3.3.6 Synthese des 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-benzensulfonamids

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch die *trans*-5,7-Dichlor-4-[3-({4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-sulfonyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (Abb. 44) dargestellt werden. Nachdem erste Stufen zur Darstellung des Liganden bereits synthetisiert waren, wurden die weiteren Reaktionsschritte aufgrund der ungünstigen *in vitro*-Eigenschaften von ADTC5 nicht mehr durchgeführt.

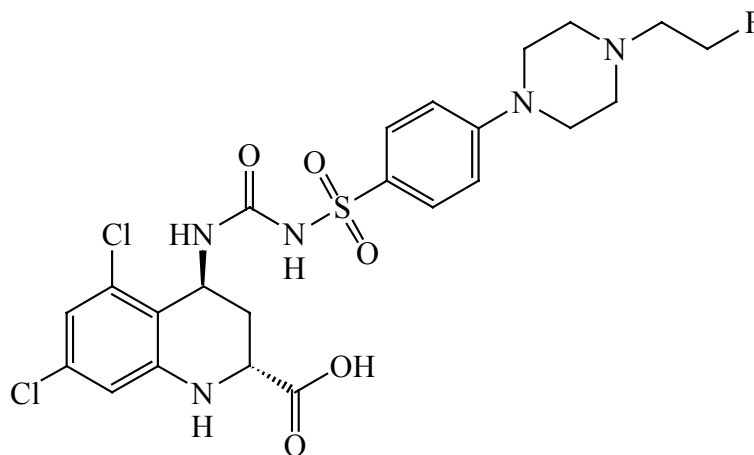


Abbildung 44: Struktur der *trans*-5,7-Dichlor-4-[3-({4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-sulfonyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

In der ersten Syntheseplanung sollte, ausgehend vom Diethanolamin unter Verwendung von Natriumhydrid, eine selektive Tosylierung der Hydroxyfunktionen durchgeführt und diese Verbindung anschließend mit Sulfanilamid zum 4-Piperazin-1-yl-benzensulfonamid umgesetzt werden [155, 156]. Die Darstellung des selektiv tosylierten Moleküls blieb jedoch erfolglos (Abb. 45).

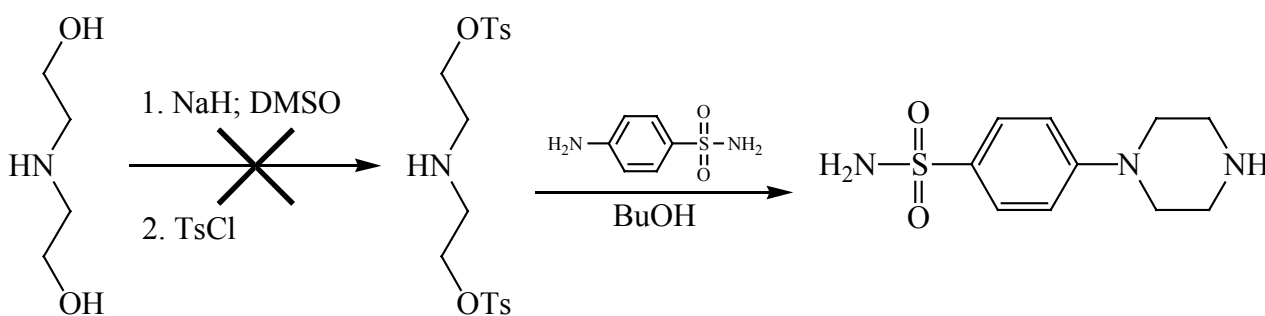


Abbildung 45: Geplante Synthese des 4-Piperazin-1-yl-benzensulfonamids

Daher wurde die Ringschlussreaktion mit dem kommerziell erhältlichen Bis(2-chlorethyl)aminhydrochlorid und Sulfanilamid durchgeführt (Abb. 46), um das 4-Piperazin-1-yl-benzensulfonamidhydrochlorid (55) zu erhalten [157, 158]:

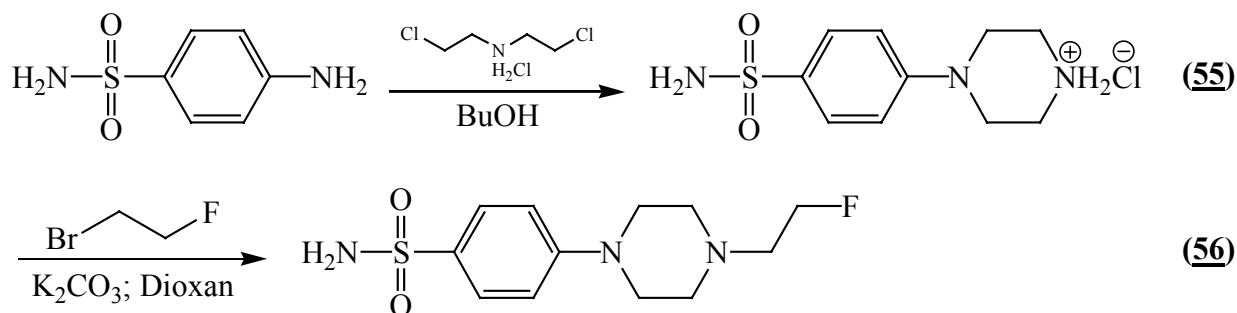


Abbildung 46: Syntheschema des 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-benzensulfonamids

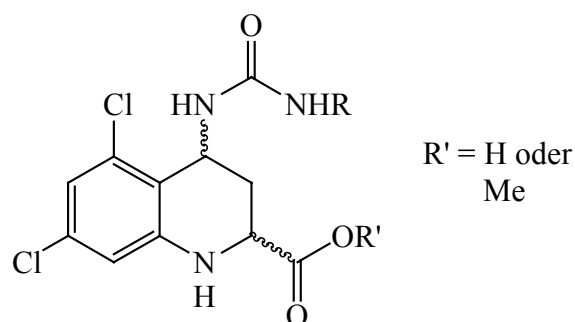
Durch Umsetzung von Verbindung (55) mit 1,2-Bromfluorethan wurde das 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-benzensulfonamid (56) erhalten. Durch Kopplung des Sulfonamids mit (4) und anschließender Verseifung des Methylesters sollte die *trans*-5,7-Dichlor-4-[3-(4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl)-sulfonyl]-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure in moderaten Ausbeuten darzustellen sein.

3.4 Synthese der Markierungsvorläufer

Bei der Synthese der Markierungsvorläufer wurden Verbindungen angestrebt, die sich in hohen radiochemischen Ausbeuten mit den etablierten Markierungsagencien 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat und [^{18}F]Fluorid zu den jeweiligen Referenzverbindungen umsetzen lassen. Das radioaktive Isotop sollte dabei möglichst in der letzten Stufe eingeführt werden. Daher war in Bezug auf die zu markierenden Derivate der 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure im Einzelfall zu prüfen, ob sich der Markierungsvorläufer mit freier Carbonsäure ohne Nebenprodukte markieren ließ, oder ob der Methylester-geschützte Markierungsvorläufer verwendet werden musste. Im letzteren Fall musste bei der ^{18}F -markierten Verbindung dann neben der HPLC-Reinigung auch noch eine Verseifung des Methylesters durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Markierungsvorläufer für ^{18}F -markierte Antagonisten der Glycinbindungsstelle dargestellt (Tab. 7).

Tabelle 6: Synthetisierte Markierungsvorläufer zur Darstellung der ^{18}F -markierten Liganden



R	IUPAC-Name	Abkürzung
	trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (-methylester)	<i>(Methyl-)</i> MV-tADTC1
	cis-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester	Methyl- MV-cADTC1
	trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester	Methyl- MV-tADTC3
	trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-hydroxy-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (-methylester)	<i>(Methyl-)</i> MV-tADTC4
	trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-brom-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester	DMV-tADTC4
	trans-5,7-Dichlor-4-{3-[(4-hydroxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure	MV-tADTC5

Da bei der Synthese von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$ und $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ sowohl die Methylester-geschützten Verbindungen als auch die freien Carbonsäuren als Markierungsvorläufer untersucht wurden, wurden die entsprechenden Namen und Abkürzungen der Methylester-geschützten Verbindungen kursiv aufgeführt.

3.4.1 Synthese der cis/trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure zur Markierung mit 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat

Zur Darstellung von c/t-[¹⁸F]ADTC1 wurden entsprechende Markierungsvorläufer mit freier sekundärer Aminfunktion am Piperazinrest generiert (Abb. 47). Da diese Funktion während der Synthese geschützt werden musste, wurde sie durch eine Fmoc-Schutzgruppe blockiert.

Durch Umsetzung von N-(4-Nitrophenyl)-piperazin mit (9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat und anschließender katalytischer Hydrierung der Nitrofunktion wurde der 4-(4-Amino-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (10) erhalten. Bei der Kopplung zum Harnstoff wurden wieder beide Kopplungsreagenzien untersucht, bei der sich Triphosgen als geeigneter erwies. Durch die Umsetzung von (10) mit dem 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4) unter Verwendung von Triphosgen wurde der 5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (11/16) in 70-80 %iger Ausbeute erhalten. Die anschließende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit Piperidin als Base durchgeführt, wodurch der 5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (12/17) in ca. 90 %iger Ausbeute isoliert wurde. Eine Verseifung des Methylesters mit 1N LiOH-Lösung ergab die freie 5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (13/18) in 62 bzw. 84 %iger Ausbeute. Im Falle des cis-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters (17) wurde auch eine Verseifung mit Natriummethylat unter Konfigurationsumkehr durchgeführt, wobei es in Analogie zur Referenzverbindung nur zu einer 80-90 %igen Epimerisierung (Nachweis mittels ¹H-NMR-Spektroskopie) zum trans-Isomer kam.

Mit Hilfe der Verbindungen 5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (Methyl-MV-ADTC1) und 5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (MV-ADTC1) wurde anschließend die ¹⁸F-Markierung mit 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat zur Synthese von [¹⁸F]ADTC1 untersucht. Daneben können diese Verbindungen auch zur Darstellung von t-[¹¹C]ADTC2 mittels [¹¹C]Methyliodid verwendet werden.

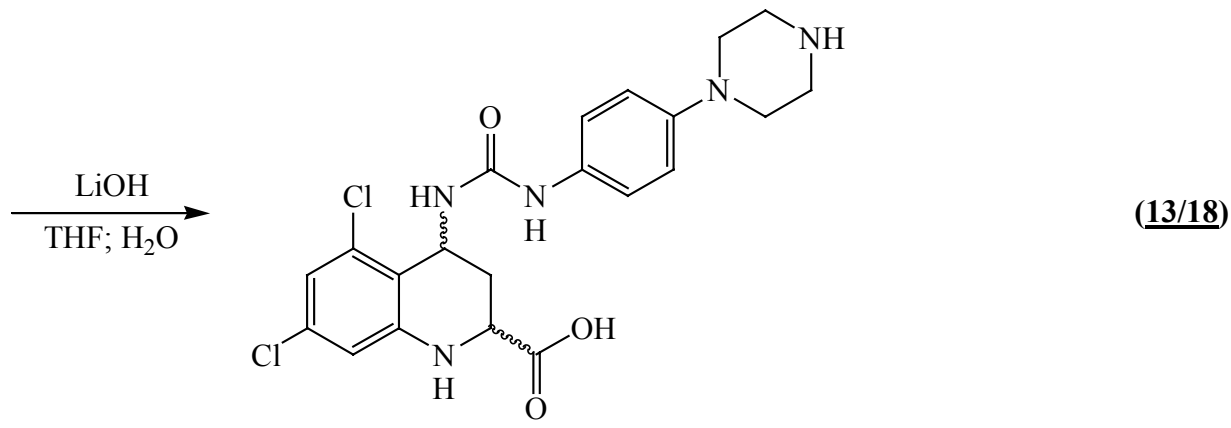
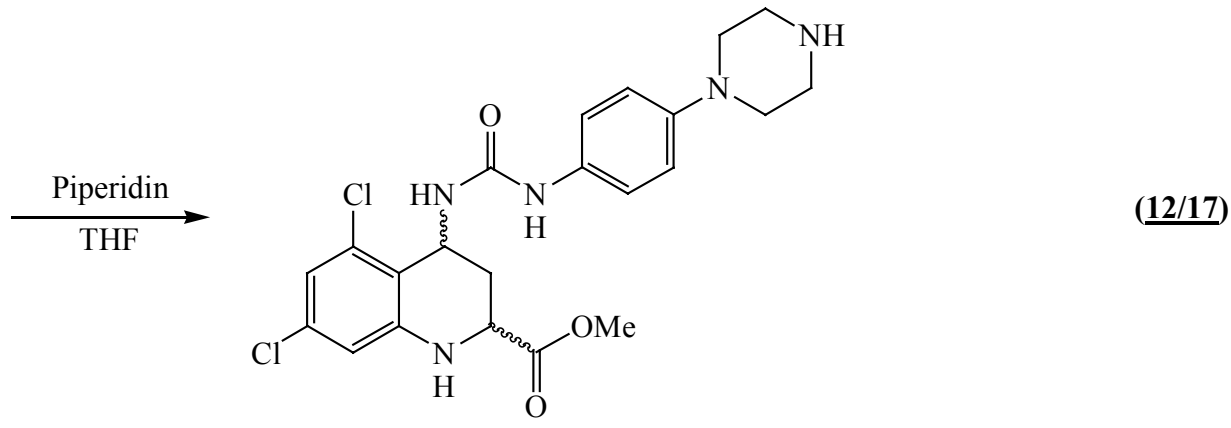
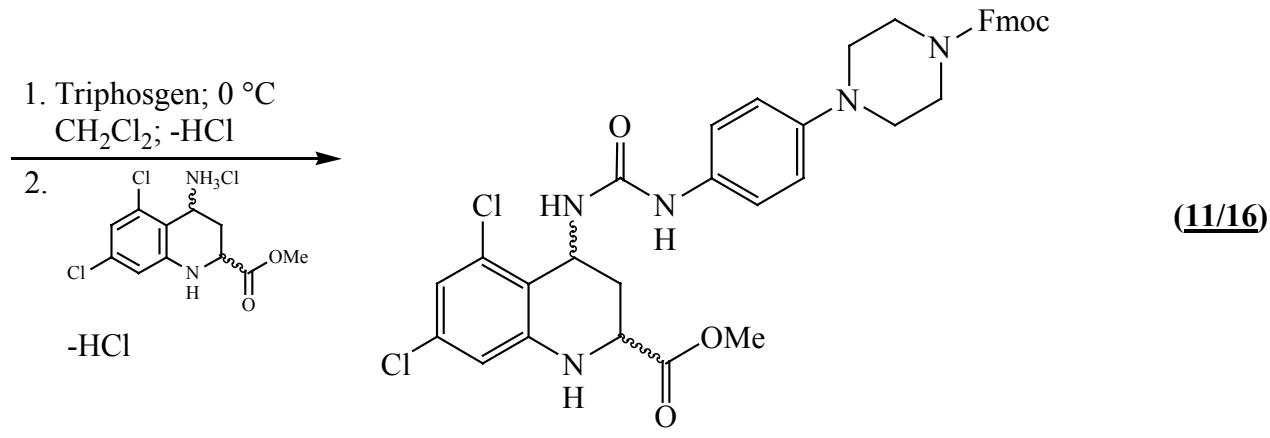
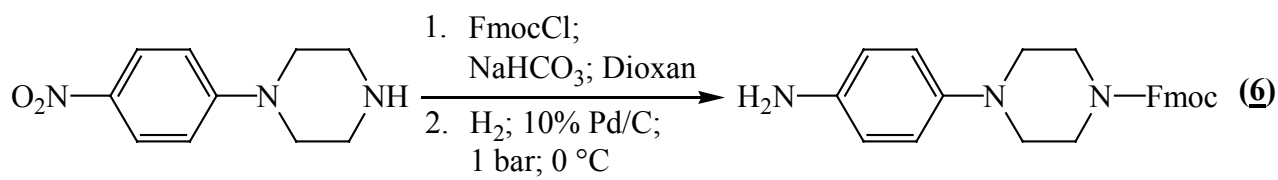


Abbildung 47: Syntheschema der 5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

3.4.2 Synthese des trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters zur Markierung mit 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat

Zur Darstellung von [¹⁸F]ADTC3 wurde ein Markierungsvorläufer mit freier aromatischer Aminofunktion synthetisiert. Aufgrund der niedrigen radiochemischen Ausbeute bei der ¹⁸F-Fluorethylierung von MV-ADTC1 wurde nur ein Methylester-geschützter Markierungsvorläufer synthetisiert und auf die Darstellung eines Markierungsvorläufers mit freier Carbonsäurefunktion verzichtet (Abschnitt 4.3).

Der Markierungsvorläufer sollte ausgehend vom 4-Nitroanilin mittels eines Fmoc-Schutzgruppe an der Anilinfunktion blockiert, anschließend die Nitrofunktion reduziert und das erhaltene Amin zum gewünschten Harnstoff umgesetzt werden. Jedoch blieben Versuche, die Aminofunktion durch Umsetzung mit (9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat zu schützen, erfolglos, was auf die stark deaktivierenden Eigenschaften der Nitrogruppe zurückzuführen war (Abb. 48).

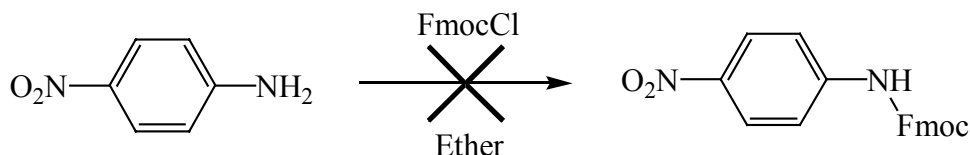


Abbildung 48: Versuchte Umsetzung des 4-Nitroanilins mit (9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat

Daher wurde 1,4-Phenyldiamin (30) durch katalytische Hydrierung des 4-Nitroanilins hergestellt und durch Reaktion mit (9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat zum (4-Amino-phenyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (31) umgesetzt (Abb. 49). Die anschließende Kopplung mit Triphosgen und trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4) lieferte allerdings ein Gemisch aus trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (32) und dem symmetrischen Harnstoff aus Verbindung (31), das sich aufgrund seiner schlechten Löslichkeit durch Säulenchromatographie nicht trennen ließ. Die Identifizierung der Produkte und die Bestimmung der Ausbeute wurde anhand der ¹H-NMR-Spektroskopie vorgenommen. Durch die Behandlung dieses Gemisches mit Piperidin in THF wurden die Fmoc-Schutzgruppen abgespalten, wodurch sich die Löslichkeit beider Verbindungen deutlich verbesserte und sich der trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (33) durch Säulenchromatographie in 76 %iger Ausbeute isolieren ließ.

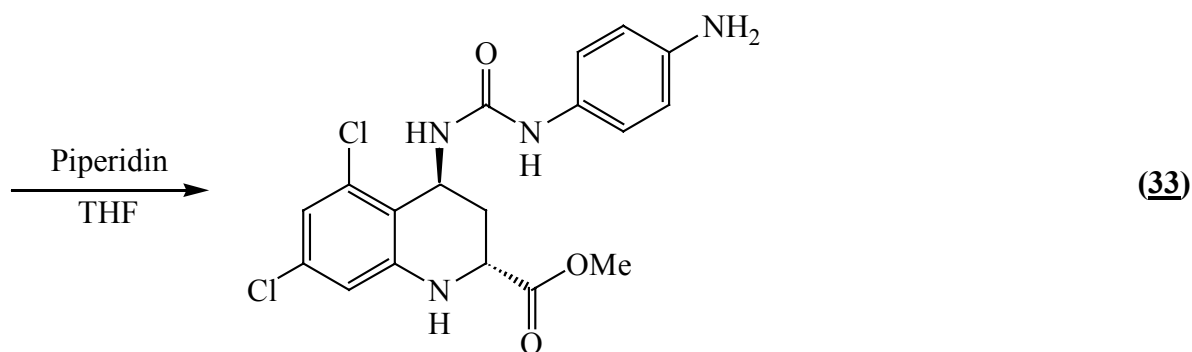
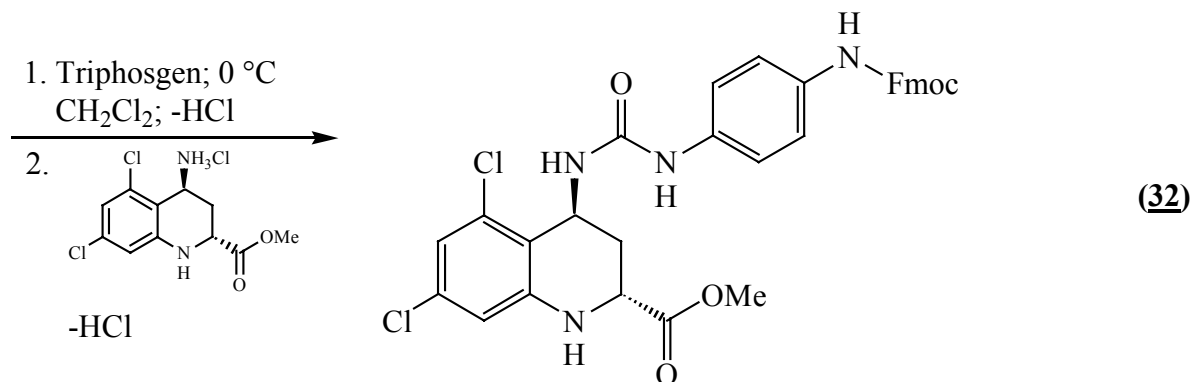
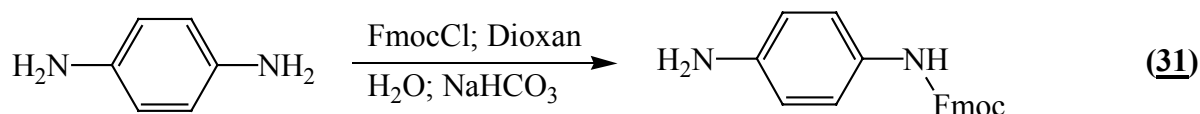
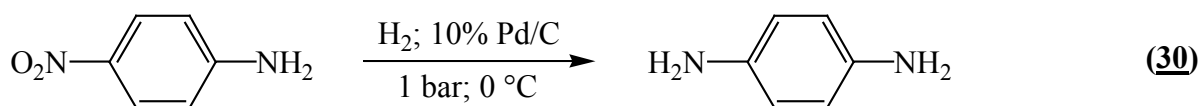


Abbildung 49: Syntheschema des trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters

3.4.3 Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure zur Markierung mit 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat

Zur Synthese von [¹⁸F]ADTC4 wurde ein Markierungsvorläufer mit freier phenolischer Hydroxyfunktion synthetisiert. Da phenolische Hydroxyfunktionen durch Deprotonierung mit Hilfsbasen in eine sehr nukleophile Spezies überführt werden können, war bei einer ¹⁸F-Fluorethylierung auch in Gegenwart der freien Carbonsäure in 2-Position nicht mit Nebenprodukten zu rechnen. Daher sollte bei dieser Markierung insbesondere der Markierungsvorläufer mit freier Carbonsäure untersucht werden.

Durch Reaktion von 4-Nitrophenol mit (9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat wurde der Carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester 4-nitro-phenylester (38) erhalten, welcher durch katalytische Hydrierung mit Palladium weiter zum Carbonsäure 4-amino-phenylester 9H-fluoren-9-ylmethylester (39) umgesetzt wurde (Abb. 50). Die anschließende Kopplung mit Triphosgen und (4) lieferte den trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-

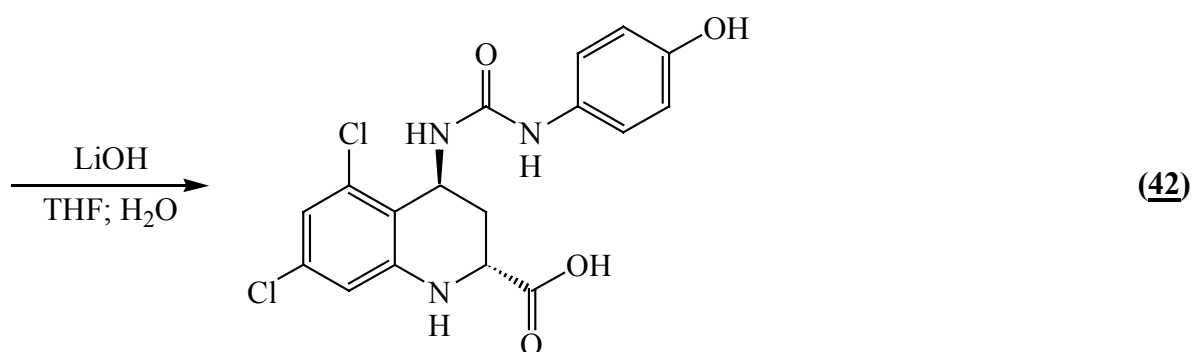
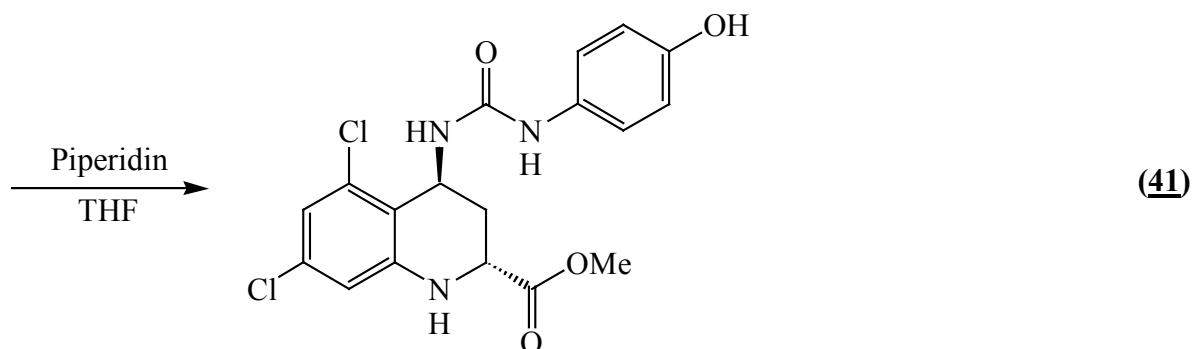
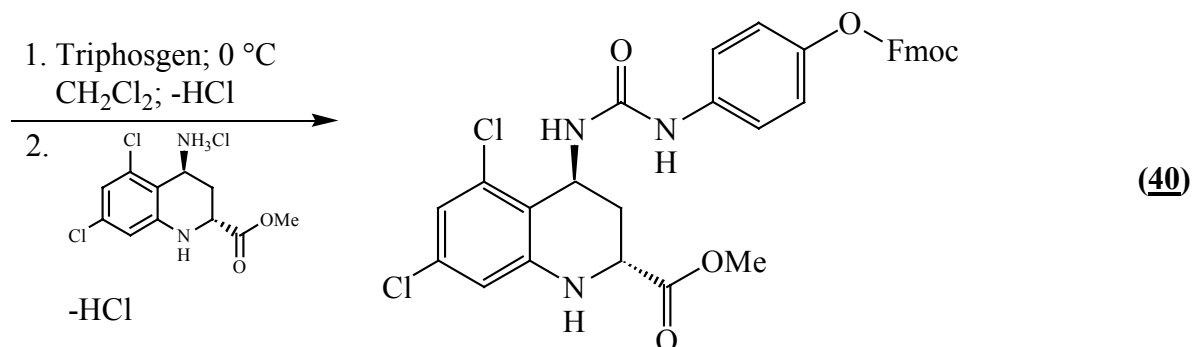
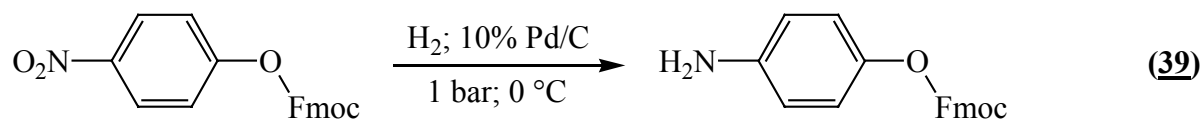
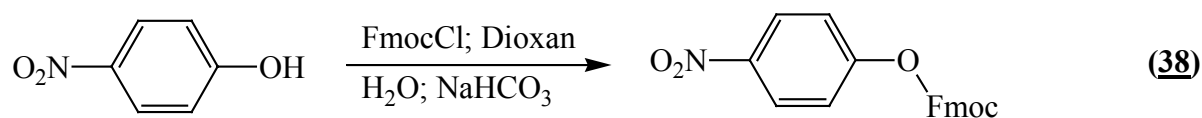


Abbildung 50: Syntheschema der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

chinolin-2-carbonsäuremethyl ester (40) in 71 %iger Ausbeute. Durch Behandlung der Verbindung mit Piperidin wurde der trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-hydroxy-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethyl ester (41) dargestellt (86% d. Th.) und die anschließende Verseifung des Methyl esters lieferte die trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-hydroxy-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (42).

3.4.4 Synthese des trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-brom-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters zur Markierung mit [¹⁸F]Fluorid

Neben den Markierungsvorläufern, die mittels einer ¹⁸F-Fluorethylierung zu [¹⁸F]ADTC4 umgesetzt werden sollten, wurde auch ein Direktmarkierungsvorläufer für eine ¹⁸F-Markierung mit [¹⁸F]Fluorid synthetisiert (Abb. 51). Da der Markierungsvorläufer im Falle einer ¹⁸F-Direktfluorierung keine aciden Protonen besitzen darf, musste die Carbonsäurefunktion als Methylester vorliegen:

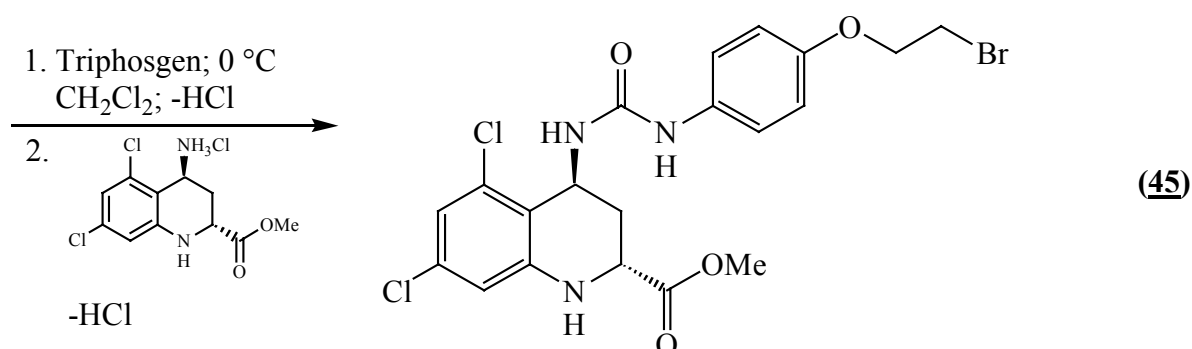
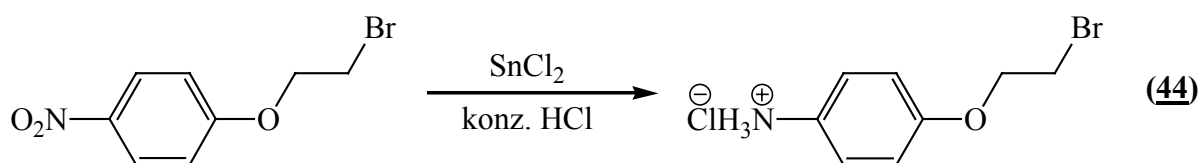
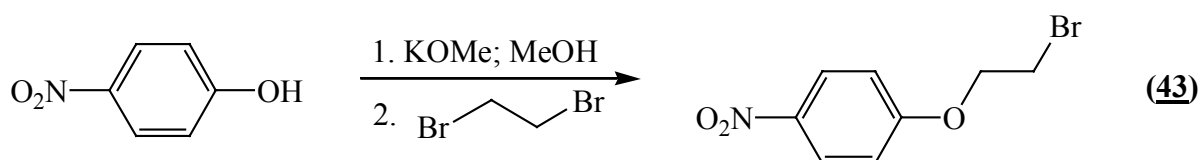


Abbildung 51: Syntheschema des trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-brom-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters

Durch Deprotonierung des Nitrophenols mit Kaliummethylat und Bromethylierung mit 1,2-Dibromethan wurde das 1-(2-Brom-ethoxy)-4-nitro-benzen (43) erhalten. Die anschließende Reduktion der Nitrofunktion mit Zinn(II)-chlorid in konz. HCl ergab das 4-(2-Brom-ethoxy)-phenylaminhydrochlorid (44) [159]. Durch Umsetzung dieser Verbindung mit Triphosgen und dem trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesterhydrochlorid (4) wurde der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-brom-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (45) in einer Ausbeute von 87% dargestellt.

3.4.5 Synthese der trans-5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure zur Markierung mit 2-[¹⁸F]Fluorethyl-tosylat

Die Synthese dieses Markierungsvorläufers sollte in Analogie zu Verbindung (42) durchgeführt werden (Abb. 52). Dazu wurde das 4-Hydroxy-benzensulfonamid (46) an der phenolischen Hydroxyfunktion mit einer Fmoc-Gruppe geschützt, um den Carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester 4-sulfamoyl-phenylester (50) zu erhalten. Dieser wurde mit CDI und trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4) zum entsprechenden Sulfonylharnstoff umgesetzt. Die während der Synthese routinemäßig durchgeführte DC-Kontrolle zeigte jedoch, dass die Fmoc-Gruppe teilweise abgespalten worden war, was die Entstehung von Nebenprodukten zur Folge hatte. Obwohl der Fmoc-Rest im allgemeinen nur sehr langsam durch N-Ethyl-diisopropylamin, das als Hilfsbase verwendet wurde, abgespalten wird [146], lief diese Reaktion aufgrund der Reaktionstemperatur von 50 °C wesentlich schneller als erwartet ab. Daher wurde durch Zugabe von Piperidin auch der verbliebene Teil der Fmoc-Schutzgruppen abgespalten und durch Aufarbeitung des Reaktionsgemisches der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[(4-hydroxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (51) isoliert. Durch die entstandenen Nebenprodukte wurde der Sulfonylharnstoff (51) allerdings nur in einer Ausbeute von 10% erhalten.

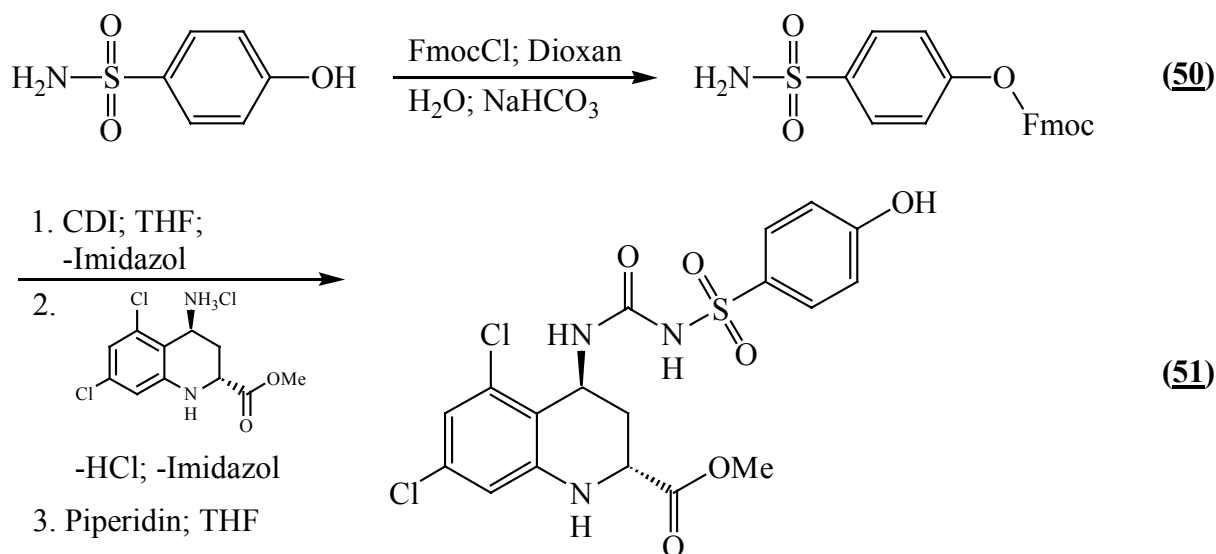


Abbildung 52: Syntheschema des Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[(4-hydroxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters

Da diese Ausbeute zu gering war, um die folgende Stufe durchzuführen, wurde die Synthese mit einem Acetyl-geschützten Derivat wiederholt (Abb. 53). Die Reaktion von 4-Hydroxy-benzensulfonamid (46) mit Essigsäureanhydrid erbrachte den Essigsäure 4-sulfamoyl-phenylester (52), der unter den oben beschriebenen Bedingungen zum trans-4-{3-[(4-Acetoxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (53) umgesetzt wurde, ohne dass eine Abspaltung des Acetylrestes festzustellen war. Durch die anschließende Behandlung der Verbin-

ung mit 1N LiOH-Lösung wurden gleichzeitig die Acetylschutzgruppe und der Methyl ester ver- seift und so die trans-5,7-Dichlor-4-{3-[(4-hydroxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro- chinolin-2-carbonsäure (54) in 76 %iger Ausbeute isoliert.

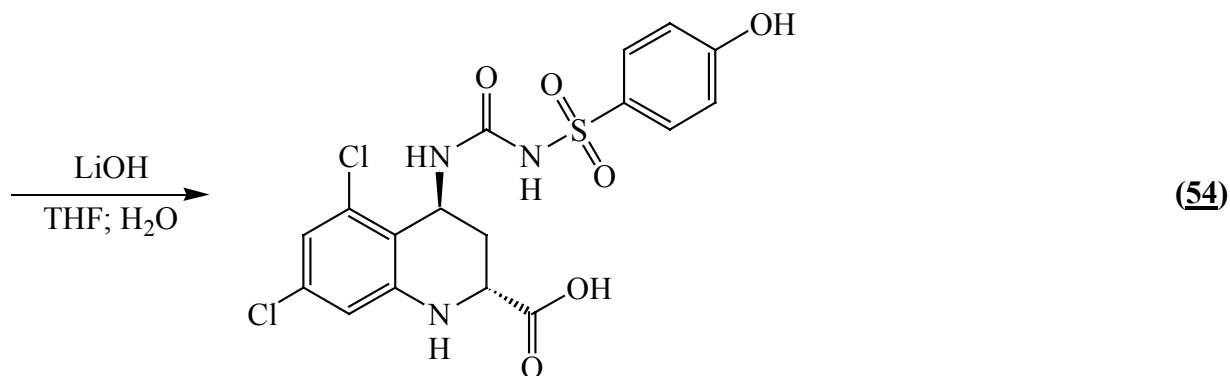
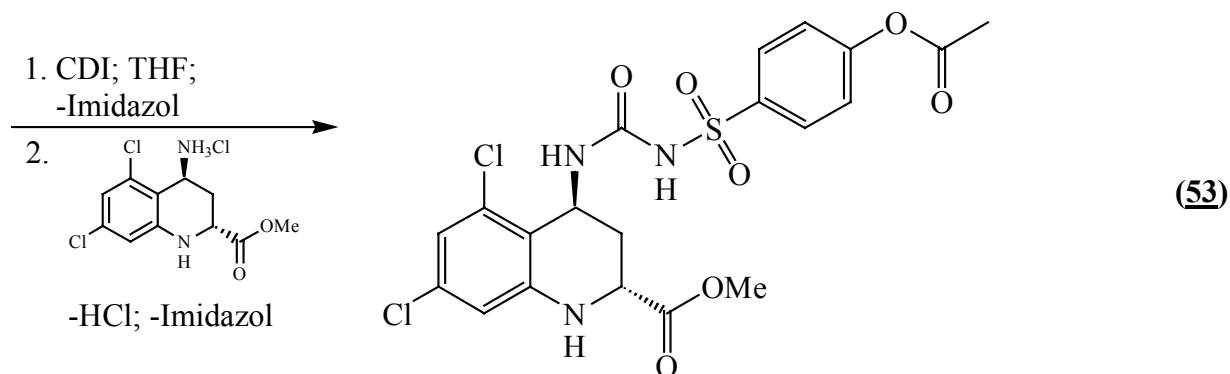
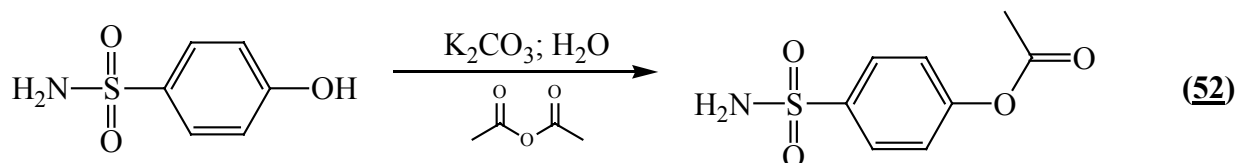


Abbildung 53: Syntheschema der Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[(4-hydroxy-phenyl)-sulfonyl]- ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

3.4.6 Synthese des 4-(4-Sulfamoyl-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-yl-methylesters

Für die in Abschnitt 3.3.6 beschriebene Referenzverbindung wurde auch die Synthese eines Markierungsvorläufers mit freier sekundärer Aminofunktion im Piperazinring geplant (Abb. 54).

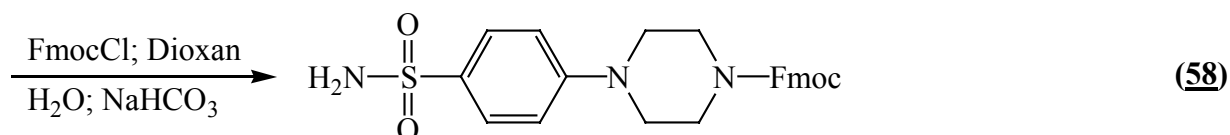
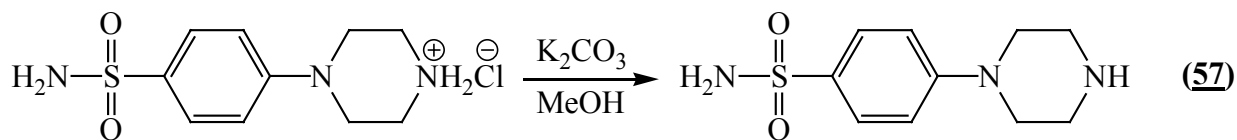


Abbildung 54: Syntheschema des 4-(4-Sulfamoyl-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylesters

Das durch Deprotonierung des Hydrochlorids mit Kaliumcarbonat erhaltene 4-Piperazin-1-ylbenzensulfonamid (57) wurde durch Reaktion mit (9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat in 89 %iger Ausbeute zum 4-(4-Sulfamoyl-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (58) umgesetzt. Durch Kopplung dieser Verbindung mit (4) zum entsprechenden Sulfonylharnstoff und anschließender Entschützung der Amino- bzw. Carbonsäurefunktion sollte sich der Markierungsvorläufer in moderaten Ausbeuten darstellen lassen. Aus den in Abschnitt 3.3.6 genannten Gründen wurde die Synthese jedoch nicht weiter fortgeführt.

3.4.7 Synthese des Toluol-4-sulfonsäure 2-[4-(4-nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]-ethylesters

Neben dem Markierungsvorläufer für ^{18}F -Fluorethylierungsreaktionen wurde auch versucht, einen Direktmarkierungsvorläufer zur Darstellung von tADTC1 zu synthetisieren. Dieser sollte an der sekundären Aminofunktion des Piperazinringes einen Ethylrest mit geeigneter Abgangsgruppe (Brom, Iod, Tosylat, etc.) besitzen. In einem ersten Ansatz wurde N-(4-Nitrophenyl)-piperazin mit 2-Bromethanol zum 2-[4-(4-Nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]-ethanol (59) umgesetzt (Abb. 55).

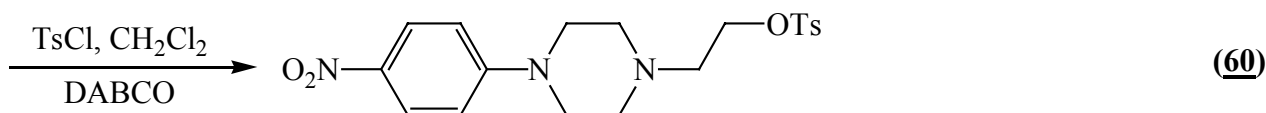
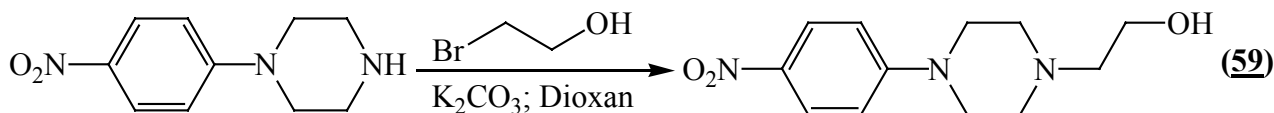


Abbildung 55: Syntheschema des Toluol-4-sulfonsäure 2-[4-(4-nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]-ethylesters

Dieser sollte an der Hydroxyfunktion tosyliert und anschließend reduziert werden, um ein für die Harnstoffkopplung geeignetes Amin zu erhalten. Der Versuch, das Tosylat über die konventionelle Methode einzuführen, blieb allerdings erfolglos [160]. Daher wurden neuere Verfahren angewendet, um die Tosylgruppe einzuführen: über das Zinktosylat [161], über das p-Toluensulfonsäureanhydrid [162], über das 1-(p-Toluensulfonyl)-3-methylimidazolium-triflat [163] und unter Verwendung von DABCO als Hilfsbase [164]. Außer bei der Verwendung von DABCO erbrachten aber auch diese Verfahren nicht das gewünschte Produkt. Bei der Tosylierung mit DABCO als Hilfsbase ließ sich zwar durch DC-Kontrolle ein lipophiles Produkt detektieren, welches aber bei der säulenchromatographischen Aufarbeitung in eine extrem unlösliche Verbindung überführt wurde und nicht isoliert werden konnte. Daher wurde bei einer erneuten Synthese das Rohprodukt, mit auf 4 °C gekühltem Eluens, flashchromatographiert und das Lösungsmittel bei Raumtemperatur im Hochvakuum entfernt. Eine Charakterisierung der Verbindung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und FD-Massenspektrometrie zeigte, dass es sich um den gesuchten Toluen-4-sulfonsäure 2-[4-(4-nitrophenyl)-piperazin-1-yl]-ethylester (**60**) handelte. Bei längerer Lagerung, sowohl als Feststoff als auch in Lösung, bildete sich wieder die sehr polare und unlösliche Verbindung, bei der es sich wahrscheinlich um das Aziridinderivat von Verbindung (**60**) handelt (Abb. 56).

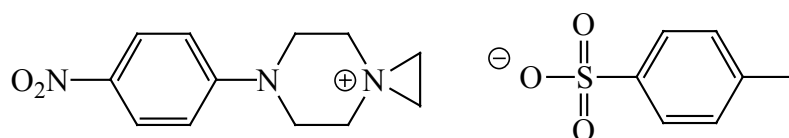


Abbildung 56: 6-(4-Nitro-phenyl)-6-aza-3-azonia-spiro[2.5]octan-tosylat

Da auch Versuche, die Nitrofunktion selektiv zu reduzieren, ohne dass es zu einer Abspaltung des Tosylats kommt, erfolglos waren, wurden keine weiteren Versuche mehr unternommen, einen Direktmarkierungsvorläufer mit einer Tosylatabgangsgruppe zu synthetisieren.

3.4.8 Synthese des 4-[4-(2-Brom-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin-hydrochlorids

Da es nicht gelungen war, einen Direktmarkierungsvorläufer mit einer Tosylatabgangsgruppe für tADTC1 herzustellen, wurde versucht, einen analogen Liganden mit Brom als Abgangsgruppe zu synthetisieren (Abb. 57).

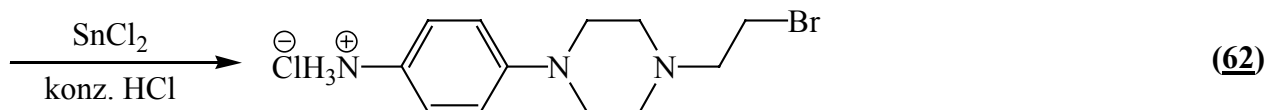
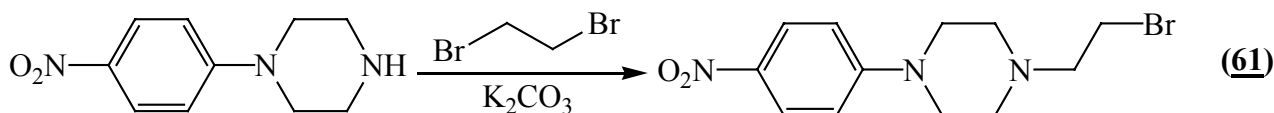


Abbildung 57: Syntheschema des 4-[4-(2-Brom-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin-hydrochlorids

Durch Umsetzung von N-(4-Nitrophenyl)-piperazin mit 1,2-Dibromethan wurde das 1-(2-Brom-ethyl)-4-(4-nitro-phenyl)-piperazin (**61**) synthetisiert. Allerdings war bei dieser Synthese trotz des großen Überschusses an 1,2-Dibromethan stets das 1,2-Bis{2-[4-(4-nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]}-ethan das Hauptprodukt (Abb. 58).

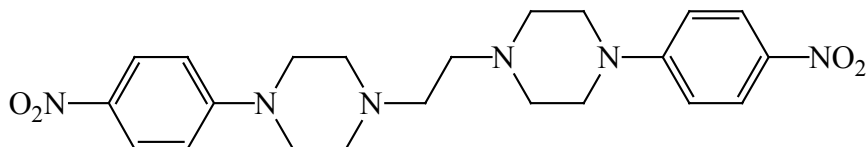


Abbildung 58: Struktur des 1,2-Bis{2-[4-(4-nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]}-ethans

Durch Reduktion des 1-(2-Brom-ethyl)-4-(4-nitro-phenyl)-piperazins mit Zinn(II)-chlorid in konz. HCl wurde das 4-[4-(2-Brom-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin-hydrochlorid (**62**) in 10 %iger Ausbeute erhalten. Aufgrund der schlechten Ausbeute und der Instabilität des Produkts, welches sich ebenfalls in Lösung schnell zersetzte, wurde auch dieser Syntheseweg aufgegeben.

3.5 Stereokonfiguration der Derivate der 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, wurden bei der Zyklisierung zum 4-Benzyloxycarbonylamino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester vier Stereoisomere, 2 trans-Isomere und 2 cis-Isomere, gebildet. Da Konfiguration und Konformation von entscheidender Bedeutung für eine hohe Affinität der Liganden sind, wurden diese mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie untersucht und die Daten mit Literaturangaben verglichen.

Die Untersuchung der Stereokonfiguration der trans-Enantiomeren wurde anhand der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (**29**) durchgeführt (Abb. 59).

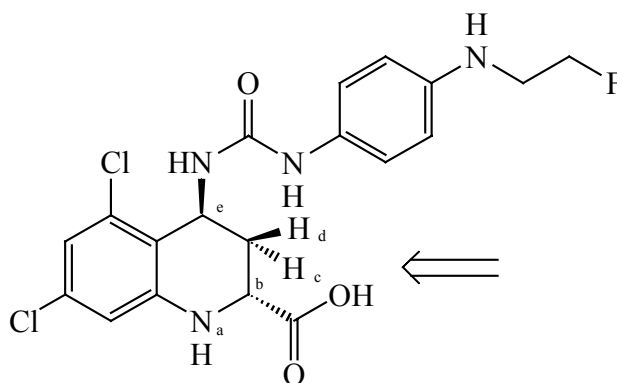


Abbildung 59: Struktur der trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (tADTC3)

Von entscheidender Bedeutung für die Struktur dieser Derivate ist der Tetrahydro-pyridinring, da dieser in Analogie zum Cyclohexenring in einer Halbsessel-Konformation vorliegt [165, 166]. Die

Substituenten an Position 1 und 4 des Halbsessels liegen dabei nur annähernd in einer äquatorialen oder axialen Position vor, weshalb diese Bindungen auch als pseudoäquatorial (e') oder pseudoaxial (a') bezeichnet werden. Da der Halbsessel in 2 verschiedenen Konformationen vorliegen kann, existieren für beide trans-Enantiomeren zusammen 4 mögliche Strukturen. Betrachtet man sich den Tetrahydro-pyridinring aus Abbildung 59 in Pfeilrichtung blickend, so ergeben sich folgende Strukturmöglichkeiten:

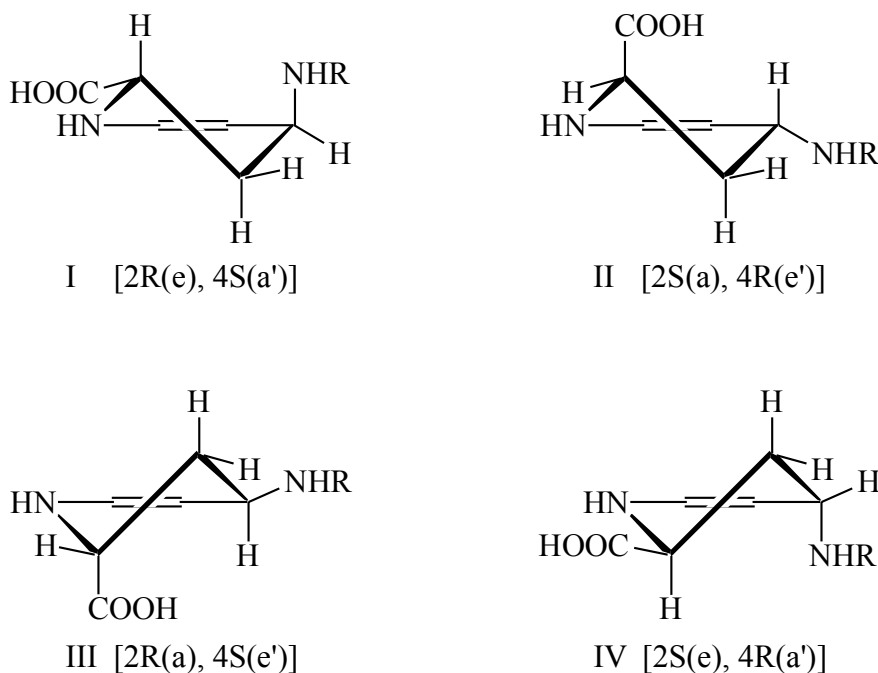


Abbildung 60: Mögliche Konformationen der trans-Enantiomeren (2R,4S: I + III / 2S,4R: II + IV)

Aus der Literatur war aufgrund von Röntgenstrukturdaten eines 2S,4R-Enantiomers bekannt, dass sich die Carboxylfunktion stets in äquatorialer Stellung befindet [118].

Daher wurden mit tADTC3 ¹H-NMR-Untersuchungen durchgeführt, um die Konformation der Liganden zu bestimmen. In Abbildung 61 sind die Signale der für die Konformationsbestimmung relevanten Protonen, zusammen mit den dazu gehörigen Kopplungsschemata, vergrößert dargestellt.

Durch Auswertung ergaben sich folgende Kopplungskonstanten:

- H_b: ³J_{bc} = 12,5 Hz, ³J_{bd} = ~3 Hz
- H_c: ³J_{cb} = 12,5 Hz, ²J_{cd} = 13 Hz, ³J_{ce} = 3 Hz
- H_d: ³J_{db} = ~3 Hz, ²J_{dc} = 13 Hz, ³J_{de} = ~3 Hz
- H_e: ³J_{ec} = ~3 Hz, ³J_{ed} = ~3 Hz, ³J_{eh} = 6,2 Hz

Da das Proton H_b eine Kopplungskonstante von 12,5 Hz aufweist, muss es eine axiale Position im Ring einnehmen, da nur axiale Substituenten derartig große Kopplungskonstanten besitzen [167]. Analoge Betrachtungen gelten für das Proton H_c, welches neben einer großen geminalen Kopplungskonstante eine zweite große Kopplung aufweist, die ebenfalls auf seiner axialen Stellung beruht. Daher herrscht für jedes der beiden trans Enantiomeren nur eine Ringkonformation vor, und zwar Konformation I für das 2R,4S-Enantiomer und Konformation IV für das 2S,4R-Enantiomer.

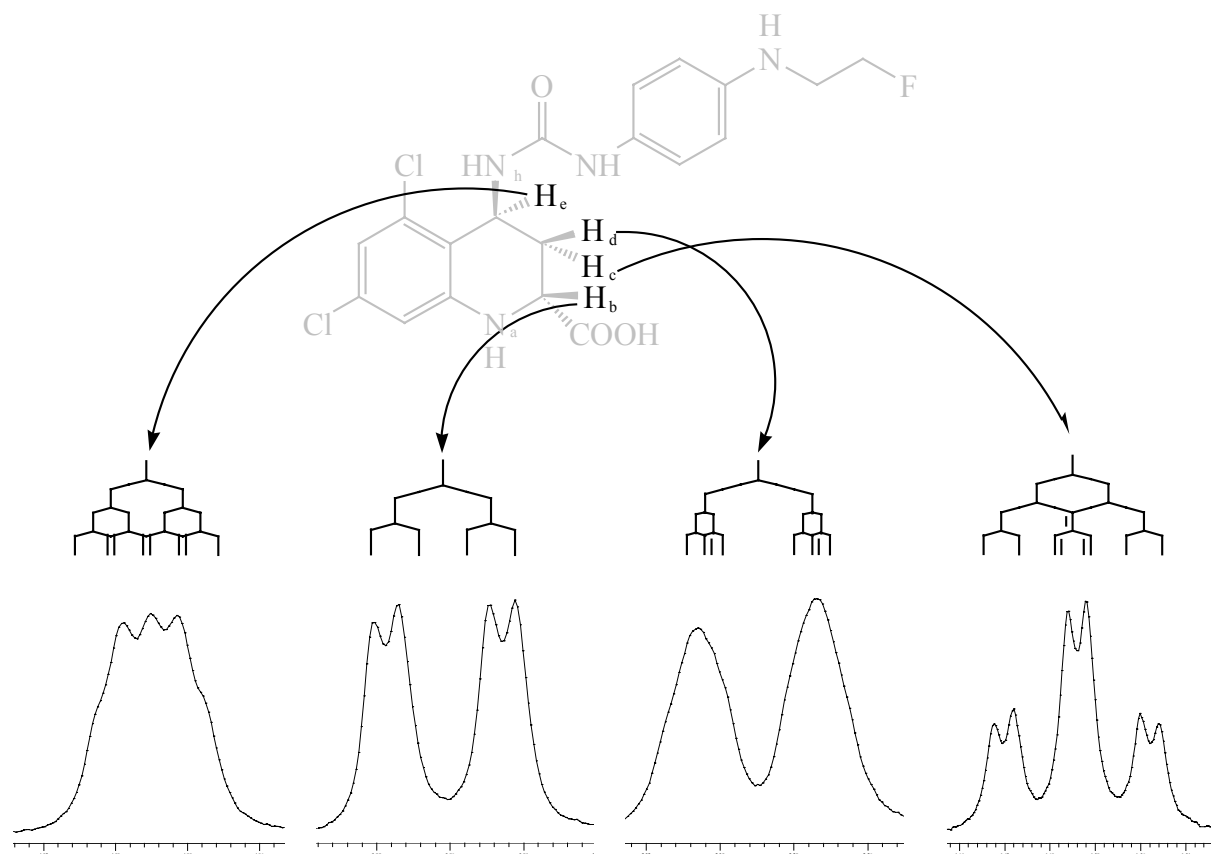


Abbildung 61: ^1H -NMR-Signale und Kopplungsschemata der für die Konformationsuntersuchung von tADTC3 entscheidenden Protonen

In einem weiteren ^1H -NMR-Experiment wurde versucht, die Signale der beiden trans-Enantiomeren durch Zugabe eines chiralen Verschiebungsreagenz voneinander zu separieren. Diese chiralen Verschiebungsreagenzien besitzen die Eigenschaft, mit chiralen Verbindungen gelöste, diastereomere Komplexe zu bilden, wodurch es zu einer Aufspaltung der Signale kommt. Zur Untersuchung wurden 10 mg tADTC3 in 0,7 ml DMSO- d_6 gelöst und portionsweise mit S-(+)-Pirkle's Reagenz bis zu einer Gesamtmenge von 14 mg versetzt. Nach jeder Zugabe wurde ein ^1H -NMR-Spektrum des Substanzgemisches aufgenommen und mit dem der Reinsubstanz verglichen. Wie Abbildung 61 zeigt, wurde durch die Zugabe des chiralen Verschiebungsreagenzes zwar eine Tieffeldverschiebung der Protonen des Tetrahydro-pyridinringes bewirkt; es kam jedoch nicht zu einer Aufspaltung der enantiomeren Signale. Dieses Ergebnis deutet auf eine zu geringe Wechselwirkung zwischen den Stereozentren von tADTC3 und Pirkle's Reagenz, so dass die Bildung der diastereomeren Komplexe und somit die Aufspaltung der Signale nicht stattfand. Daher konnte die Enantiomerenverteilung nicht bestimmt werden.

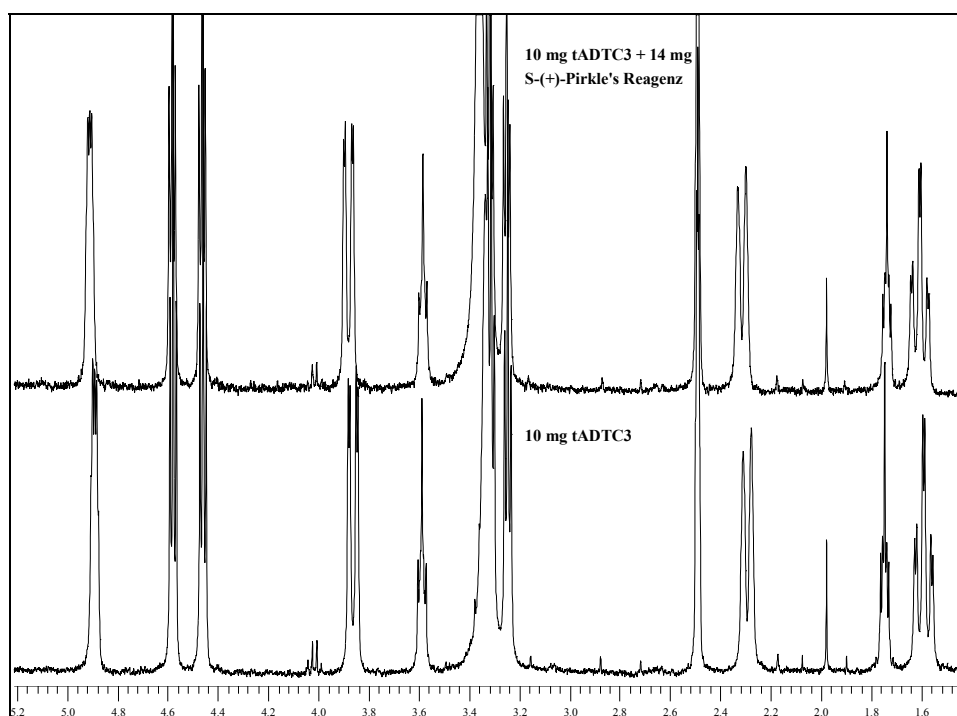


Abbildung 62: ^1H -NMR-Spektrum von tADTC3 (unten) und von tADTC3 mit Pirkle's Reagenz (oben)

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die energieminierten Strukturen der 2R,4S-Enantiomeren der Liganden tADTC1, tADTC3, tADTC4 und tADTC5 berechnet. Die Strukturen wurden hierzu mit den in CS Chem3D Pro[®] enthaltenen MM2-Routinen vorminimiert und anschließend mit MOPAC 97 durchminimiert (Parametersatz PM3). Während die Verbindungen tADTC1, tADTC3 und tADTC4 eine große konformative Identität zeigen, unterscheidet sich die Konformation von tADTC5 deutlich von der der Harnstoffderivate (Abb. 63). Durch das Einfügen der Sulfonylgruppierung ordnet sich der hydrophobe Rest des Moleküls in einer Position über dem Aromaten an, während er bei den Harnstoffderivaten eine Anordnung in den freien Raum bevorzugt. Es muss jedoch angemerkt werden, dass bedingt durch die freie Drehbarkeit des Substituenten in 4-Position um die Harnstofffunktion mehrere Anordnungen existieren, die energetisch nahezu gleichwertig sind. Daher ist eine eindeutige Vorhersage über die absolute Anordnung dieser Gruppierung nicht möglich.

Die Carbonsäurefunktion ordnet sich stets äquatorial an und zwar in einer Höhe, welche leicht über der Ringebene des Aromaten liegt. Dagegen liegt der Kohlenstoff an Position 3 des Tetrahydropyridinringes deutlich unter der Ringebene des Aromaten. Außerdem stehen bei allen Liganden die Protonen H_e und H_h in einem Torsionswinkel von ca. 170° zueinander, was das Auftreten der Kopplungskonstante von ca. 6 Hz zwischen diesen Protonen in ^1H -NMR-Untersuchungen bestätigt.

Da aus der Literatur aufgrund von in vitro-Affinitätsuntersuchungen bekannt war, dass das 2R,4S-Enantiomer die hochaffine Verbindung darstellt [118], wurden beide trans-Enantiomeren des Liganden ADTC4 energieminiert und miteinander verglichen (Abb. 64). Bei der Betrachtung der Enantiomeren ist zu erkennen, dass sich die Lage der Carbonsäurefunktion aufgrund ihrer äquatorialen Position nicht wesentlich verändert, was aber in Abhängigkeit von der Größe der polaren Region am Rezeptor dennoch zu einer drastischen Affinitätsveränderung führen kann. Die deutlichsten

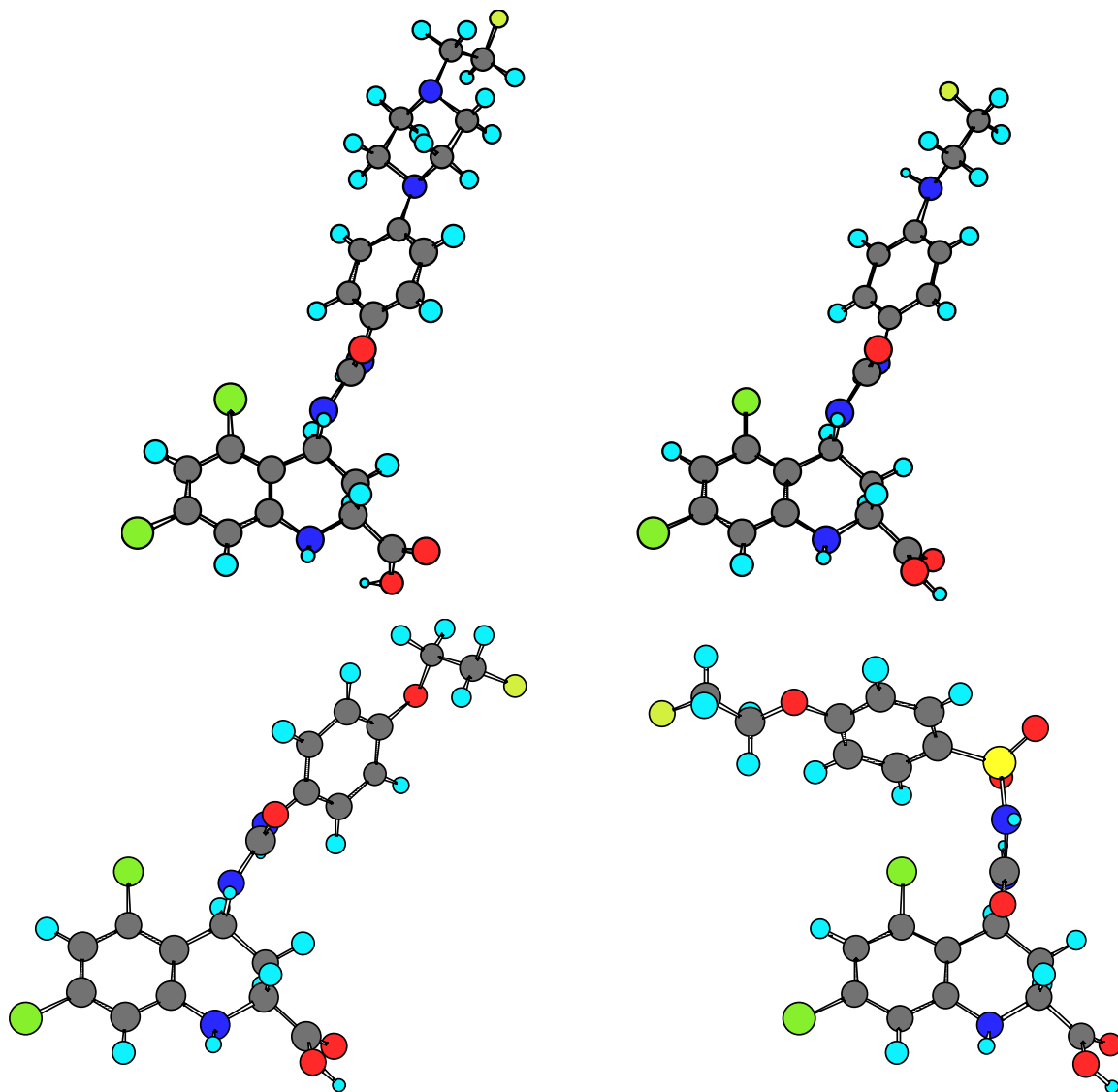


Abbildung 63: Energieminimierte Strukturen des 2R,4S-Enantiomers von tADTC1 (oben links), tADTC3 (oben rechts), tADTC4 (unten links) und tADTC5 (unten rechts)

Unterschiede bezüglich ihrer Positionen sind jedoch bei der Harnstoffgruppe und der (2-Fluor-ethoxy)-phenylgruppe festzustellen. Daher scheint auch die Konfiguration an 4-Position des Liganden eine entscheidende Rolle für die Affinität der Verbindung zu spielen, insbesondere da Substitutionen an Position 4 gegenüber der unsubstituierten Verbindung zu einer Affinitätserhöhung führen.

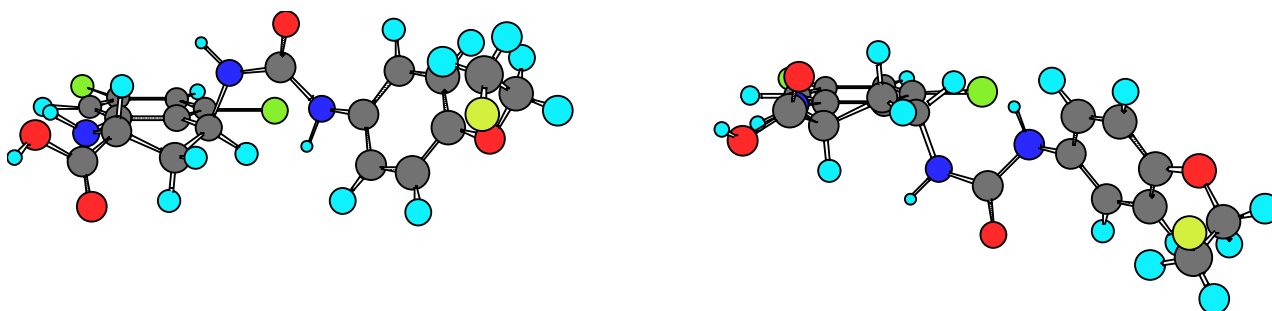


Abbildung 64: Energieminimierte Strukturen des 2R,4S-Enantiomers (links) und des 2S,4R-Enantiomers (rechts) von tADTC4

4 Radioaktive Markierungen

Im Rahmen der durchgeführten ^{18}F -Markierungen wurden die radiochemischen Ausbeuten bei der Umsetzung der Markierungsvorläufer mit ^{18}F -Fluorid und 2- ^{18}F -Fluorethyltosylat untersucht und optimiert. Bei der Optimierung wurden als Reaktionsparameter die Reaktionstemperatur, Reaktionsdauer, Hilfsbasen, Lösungsmittel und Markierungsvorläuferkonzentration untersucht. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Fragestellung, ob es bei den jeweiligen Markierungsvorläufern möglich war, selektiv am Substituenten in 4-Position in Anwesenheit der freien Carbonsäure zu markieren, oder ob der Methylester-geschützte Markierungsvorläufer eingesetzt werden musste. Für den Fall des Methylester-geschützten Markierungsvorläufers war nach der Markierung noch eine Verseifung des Esters erforderlich. Dies hätte eine aufwendigere Aufarbeitung der Verbindung zur Folge, welche für Routineanwendungen ungünstig wäre.

Bei den hier untersuchten ^{18}F -Markierungsreaktionen handelt es sich aufgrund der Reaktionsbedingungen stets um bimolekulare nukleophile Substitutionen ($\text{S}_{\text{N}}2$). Während diese Reaktionsbedingungen bei der ^{18}F -Direktfluorierung unbedingt notwendig sind, um eine hohe Nukleophilie des ^{18}F -Fluorids zu gewährleisten, bieten sie auch beim Einsatz prosthetischer Gruppen wie dem 2- ^{18}F -Fluorethyltosylat Vorteile gegenüber der $\text{S}_{\text{N}}1$ -Substitution [168]. Durch geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen lassen sich Eliminierungs- und Umlagerungsreaktionen vermeiden, was im Hinblick auf die mögliche Bildung von leichtflüchtigen ^{18}F -markierten Verbindungen von Bedeutung ist. Durch die Verwendung von dipolar aprotischen Lösungsmitteln, welche einen $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus fördern, werden Nukleophile nur unspezifisch solvatisiert und ihre Nukleophilie nicht durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken erniedrigt. Daher steigt die Reaktivität von Nukleophilen in diesen Lösungsmitteln parallel zu ihrer Basizität. Außerdem deuten experimentelle Befunde darauf hin, dass dipolar aprotische Lösungsmittel $\text{S}_{\text{N}}2$ -Übergangszustände besser stabilisieren als protische Lösungsmittel [169].

4.1 Synthese von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$

4.1.1 Synthese von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$ durch ^{18}F -Fluorethylierung von MV- $t\text{ADTC1}$

Da die trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (MV- $t\text{ADTC1}$) in Lösung nahezu vollständig als Zwitterion vorliegt (Abb. 65), musste die Aminofunktion des Piperazinrestes durch Anwendung einer Hilfsbase deprotoniert werden. Nur unter diesen Bedingungen war mit einer ^{18}F -Fluorethylierung an der Aminofunktion als primären Reaktionskanal zu rechnen, da das Carbonsäureanion trotz seiner mesomeren Eigenschaften eine ausreichende Nukleophilie zur Umsetzung mit 2- ^{18}F -Fluorethyltosylat besitzt [170].

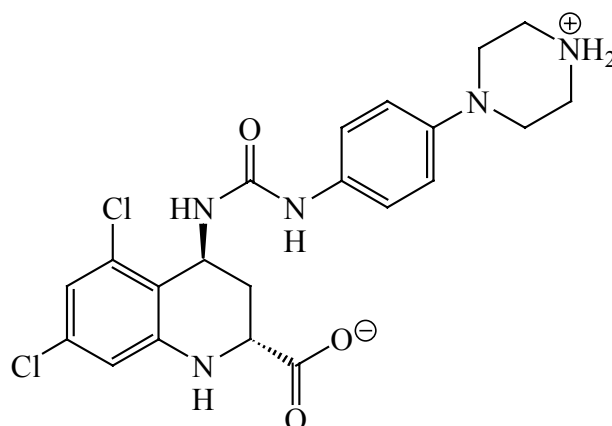


Abbildung 65: Zwitterionische Form von MV-tADTC1

Zur Durchführung der ^{18}F -Markierungssynthesen wurden jeweils 4 mg Markierungsvorläufer in DMSO gelöst, mit 0,95 äq. wässrigem K_2CO_3 versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 2- ^{18}F Fluorethyltosylat in DMSO gestartet. Mit Hilfe der Radio-Dünnschichtchromatographie wurden dabei folgende radiochemische Ausbeuten analysiert:

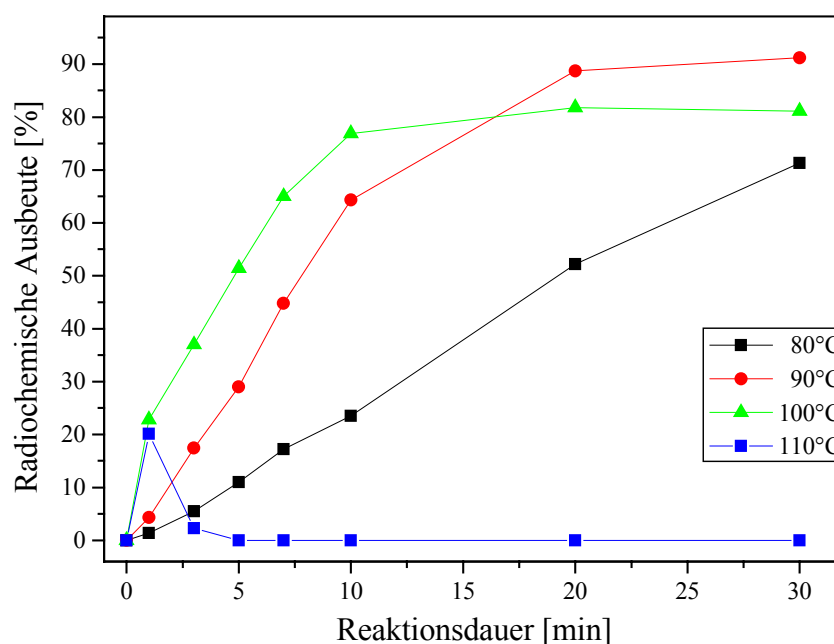


Abbildung 66: ^{18}F -Fluorethylierung von MV-tADTC1 mit 2- ^{18}F Fluorethyltosylat im System DMSO / Kaliumcarbonat

Eine Verifizierung dieser Ergebnisse durch die Radio-HPLC zeigte allerdings, dass sich die radiochemische Ausbeute aus zwei Produkten zusammensetzte, die sich nur auf der Radio-HPLC trennen ließen. Während sich der Hauptanteil der RCA von ca. 75-80% auf ein unidentifiziertes Nebenprodukt zurückführen ließ, stellte die gewünschte Verbindung $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$ mit 15-20% nur ein Nebenprodukt dar. Bei dem unidentifizierten Produkt handelt es sich wahrscheinlich um den an der Carbonsäurefunktion ^{18}F -fluorethylierten Markierungsvorläufer (Abb. 67), da das Carbonsäureanion unter aprotischen Lösungsmittelbedingungen eine ausreichende Nukleophilie zur Reaktion mit Alkylhalogeniden oder -tosylaten besitzt.

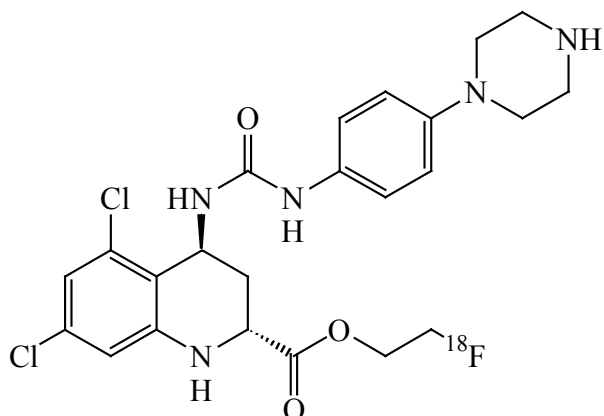


Abbildung 67: Hypothetische Struktur des unidentifizierten Nebenprodukts

Da auch Modifikationen der Reaktionsbedingungen keine Erhöhung der radiochemischen Ausbeute von MV-tADTC1 erbrachten, wurde diese Reaktion aufgrund der schlechten Ausbeuten und der problematischen Analytik nicht weiter untersucht.

4.1.2 **Synthese von t[¹⁸F]ADTC1 durch ¹⁸F-Fluorethylierung von Methyl-MV-tADTC1 und anschließende Verseifung des Methylesters**

4.1.2.1 **Abhängigkeit der RCA von Methyl-t[¹⁸F]ADTC1 von der Reaktionstemperatur und vom verwendeten Lösungsmittel**

Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Markierungsvorläufers in vielen Lösungsmitteln, welche primär auf die Harnstoffgruppierung zurückzuführen ist, konnten nur dipolar aprotische Lösungsmittel mit hohen Dielektrizitätskonstanten als Reaktionsmedien verwendet werden. Da sich selbst in Acetonitril keine ausreichenden Mengen des Markierungsvorläufers lösen ließen, wurde nur DMSO und DMF als Reaktionsmedien untersucht. Die Synthese des trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-[¹⁸F]fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters (Methyl-t[¹⁸F]ADTC1, [64](#)) durch Umsetzung des trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters (Methyl-MV-tADTC1) mit 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat ([¹⁸F]FETos) wurde zuerst in DMSO in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur untersucht (Abb. 68).

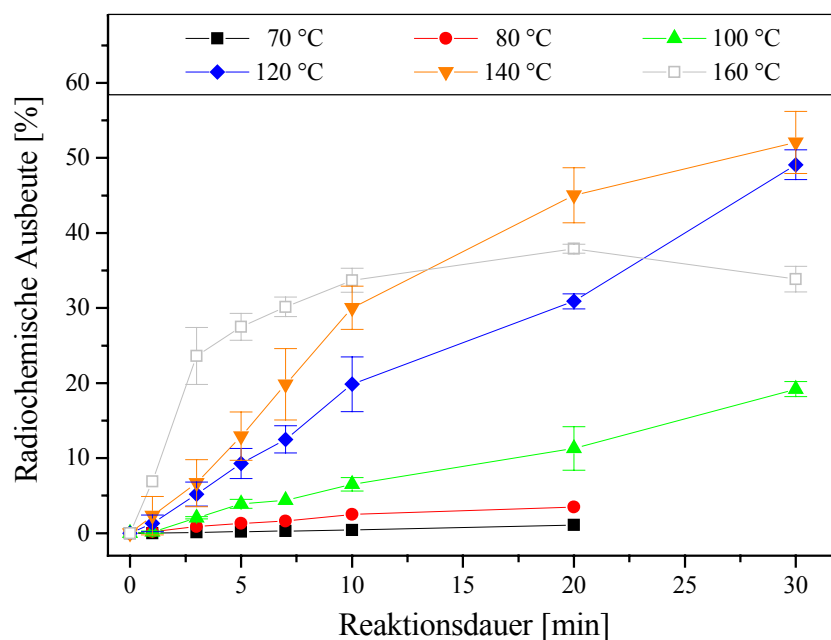


Abbildung 68: Abhängigkeit der RCA an Methyl-t¹⁸F]ADTC1 in DMSO von der Reaktionstemperatur (8,6 μmol/ml Methyl-MV-tADTC1)

Die höchsten radiochemischen Ausbeuten von ca. 50% wurden bei einer Reaktionstemperatur von 140 °C erzielt. Höhere radiochemische Ausbeuten wurden durch das Auftreten von Zersetzungsreaktionen ab einer Reaktionstemperatur von 140 °C verhindert, die bei 160 °C zur Hauptreaktion wurden. In Abbildung 69 sind die Bildungskinetiken von Methyl-t¹⁸F]ADTC1 und des ¹⁸F]Nebenproduktes dargestellt.

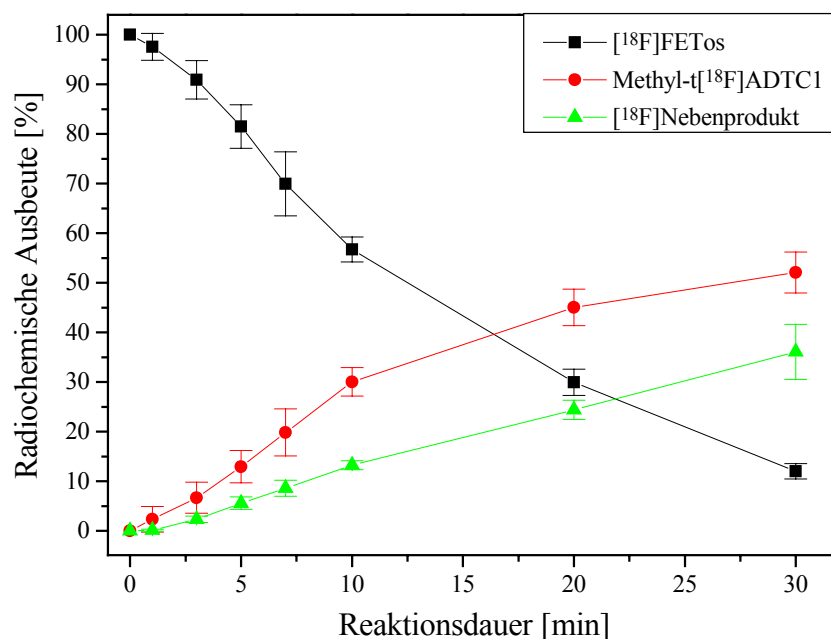


Abbildung 69: Bildungskinetiken von Methyl-t¹⁸F]ADTC1 und des ¹⁸F]Nebenproduktes in DMSO bei 140 °C

Die in der Literatur beschriebenen hohen radiochemischen Ausbeuten von 93% bei der ^{11}C -Methylierung von Piperazinderivaten (DMSO, Reaktionsdauer 5 min, Raumtemperatur, 22 $\mu\text{mol/ml}$ MV) [143] ließen sich bei der ^{18}F -Fluorethylierung von Methyl-MV-tADTC1 nicht erreichen. Dies lässt sich durch die unter diesen Reaktionsbedingungen wesentlich höhere Nukleofugie des Iods gegenüber dem Tosylat und die geringere sterische Hinderung des [^{11}C]Methyliodids erklären. Durch die Verwendung von 2- ^{18}F Fluorethyltosylat als alkylierendem Agens werden höhere sterische Ansprüche (Abb. 70) gestellt. Der daraus resultierende, geordnetere $\text{S}_{\text{N}}2$ -Übergangszustand bedingt eine höhere Aktivierungsenergie, welche über entsprechende Reaktionstemperaturen zugeführt werden muss. Diese Annahme lässt sich auch durch experimentelle Befunde bestätigen. So besitzt die Solvolyse von Brommethan durch Ethanol eine mehr als 10fach größere Reaktionsgeschwindigkeitskonstante als die Solvolyse von Bromethan [168].

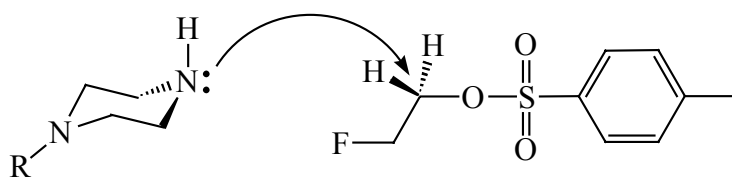


Abbildung 70: Sterische Verhältnisse beim nukleophilen Angriff des Stickstoffs des Piperazinrestes zur Bildung des $\text{S}_{\text{N}}2$ -Übergangszustandes

Aufgrund der obigen Ergebnisse und des niedrigeren Siedepunktes von DMF wurde die Reaktion in einem Temperaturintervall von 100 - 140 °C untersucht (Abb.71).

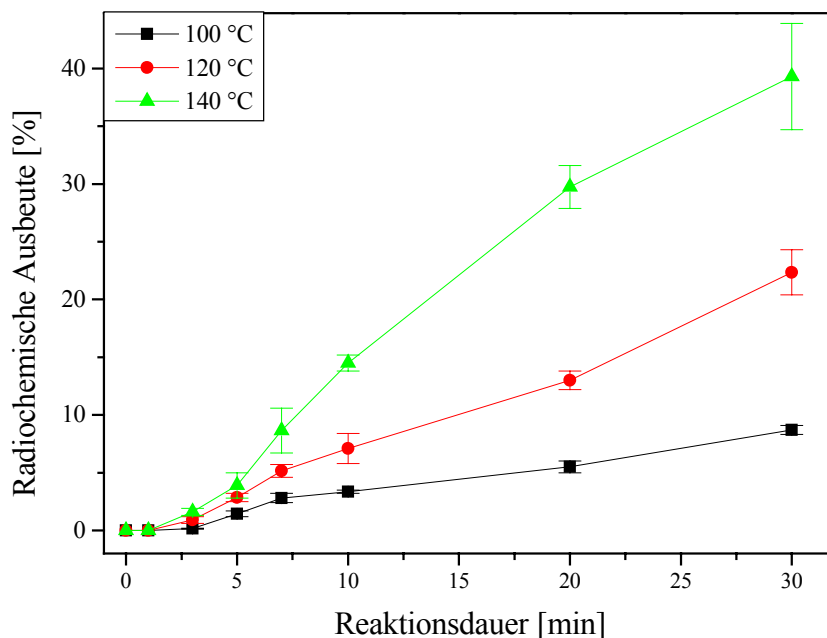


Abbildung 71: Abhängigkeit der RCA an Methyl-t ^{18}F ADTC1 in DMF von der Reaktionstemperatur (8,6 $\mu\text{mol/ml}$ Methyl-MV-tADTC1)

Die höchsten radiochemischen Ausbeuten von 40% wurden bei einer Temperatur von 140 °C erzielt und lagen damit 10% unter der Ausbeute in DMSO. Dieses Ergebnis lässt sich durch die etwas geringere Fähigkeit des DMF, den $\text{S}_{\text{N}}2$ -Übergangszustand zu stabilisieren, erklären [169]. In Analogie

zu DMSO als Lösungsmittel wurde auch in DMF ab einer Temperatur von 120 °C die Bildung eines ^{18}F -markierten Nebenprodukts festgestellt (Tab. 7).

Tabelle 7: Reaktionsprodukte der Bildungskinetiken von Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1 bei 120 und 140 °C (DMF; 30 min)

Verbindung	$[^{18}\text{F}]$ FETos	Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1	$[^{18}\text{F}]$ Nebenprodukt
RCA _{120 °C} [%]	78,6	24,3	7,1
RCA _{140 °C} [%]	27,9	41,6	30,5

Ein direkter Vergleich zwischen den Lösungsmitteln wird in Abbildung 72 gegeben. Hierzu wurde die radiochemische Ausbeute nach einer Reaktionsdauer von 20 Minuten ermittelt und in Abhängigkeit vom Lösungsmittel gegen die Reaktionstemperatur aufgetragen.

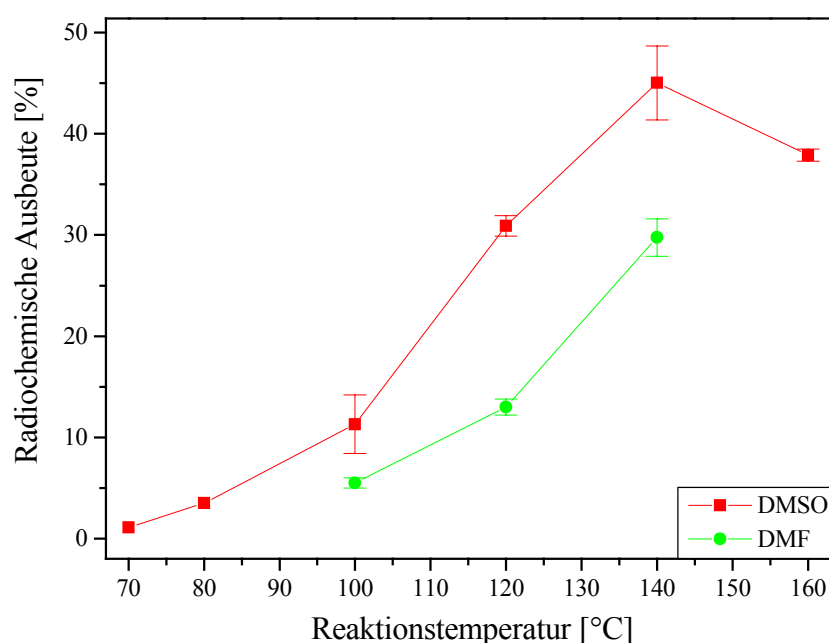


Abbildung 72: Abhängigkeit der RCA an Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1 vom verwendeten Lösungsmittel und der Reaktionstemperatur nach einer Reaktionsdauer von 20 Minuten

Aufgrund der höheren radiochemischen Ausbeuten wurden die weiteren Untersuchungen in DMSO als Lösungsmittel durchgeführt.

4.1.2.2 Abhängigkeit der RCA von Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1 von der verwendeten Hilfsbase

Durch die Verwendung von nicht-nukleophilen Hilfsbasen wurde versucht, eine vollständige Deprotonierung des Nukleophils zum sekundären Amin zu gewährleisten. Während der Einsatz von einer sterisch gehinderten Phosphazenen-Base und Kaliumcarbonat zu Zersetzungsreaktionen führte, konnte durch den Zusatz von 3 Äquivalenten an N-Ethyl-diisopropylamin (DIEA) eine leichte Steigerung der RCA bewirkt werden (Abb. 73).

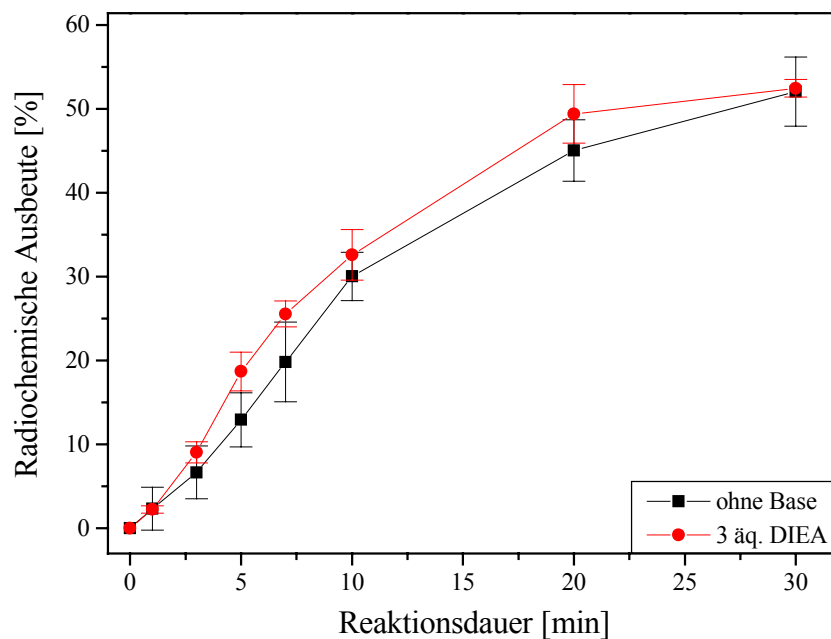


Abbildung 73: Abhängigkeit der RCA an Methyl-t[¹⁸F]ADTC1 von der zugesetzten Hilfsbase (8,6 µmol/ml Methyl-MV-tADTC1; DMSO; 140 °C)

4.1.2.3 Abhängigkeit der RCA von Methyl-t[¹⁸F]ADTC1 von der Markierungsvorläuferkonzentration

Die Untersuchung der Eduktsättigungskonzentration diente der Ermittlung der optimalen Einwaage an Markierungsvorläufer. Während eine zu geringe Einwaage an Markierungsvorläufer eine Erniedrigung der RCA bewirkt, führt eine zu hohe Einwaage zu präparativen Trennungsproblemen bei der Reinigung des Produkts mittels Radio-HPLC. Letzterer Aspekt ist insbesondere bei der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel zu beachten, da es zu einem sogenannten „Peaktailing“ kommen kann. Zur Bestimmung der optimalen Konzentration des Markierungsvorläufers wurde dieser über einen Konzentrationsbereich von 2,1 – 12,9 µmol/ml variiert und die radiochemischen Ausbeuten in DMSO bei einer Reaktionstemperatur von 140 °C untersucht (Abb. 74).

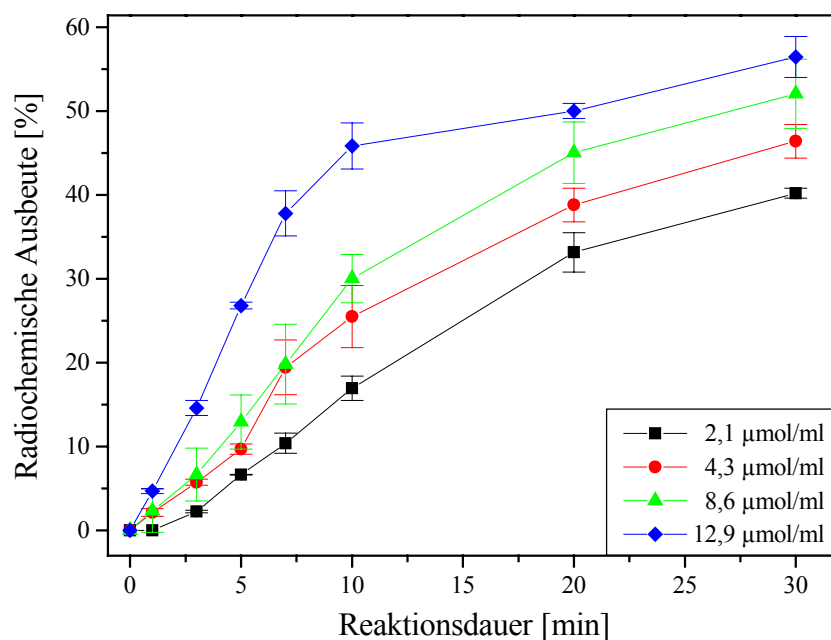


Abbildung 74: Abhängigkeit der RCA an Methyl-t[¹⁸F]ADTC1 von der Markierungsvorläuferkonzentration (DMSO; 140 °C)

Die höchsten radiochemischen Ausbeuten von 56% wurden bei einer Markierungsvorläuferkonzentration von 12,9 µmol/ml erzielt. Obwohl es sich bei dieser Konzentration noch nicht um die optimale Sättigungskonzentration des Markierungsvorläufers handelt, wurde sie nicht weiter erhöht, da aufgrund der schlechten Löslichkeit des Edukts eine semipräparative HPLC-Reinigung nicht mehr durchführbar gewesen wäre (siehe oben).

4.1.2.4 Synthese von t[¹⁸F]ADTC1 durch Esterspaltung von Methyl-t[¹⁸F]ADTC1

Die Esterspaltung von Methyl-t[¹⁸F]ADTC1 wurde wie Abschnitt 6.3.4.1 beschrieben durchgeführt. Da der Ester nach einer Reaktionsdauer von 5 Minuten quantitativ gespalten war, wurden keine weiteren Untersuchungen der Reaktionskinetik durchgeführt.

4.2 Synthese von Methyl-c[¹⁸F]ADTC1

4.2.1 Synthese von Methyl-c[¹⁸F]ADTC1 durch ¹⁸F-Fluorethylierung von Methyl-MV-cADTC1

Mit den in Abschnitt 4.1.2 ermittelten optimierten Reaktionsbedingungen wurde auch eine ¹⁸F-Fluorethylierung des cis-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters (Methyl-MV-cADTC1, 17) durchgeführt (Abb. 75).

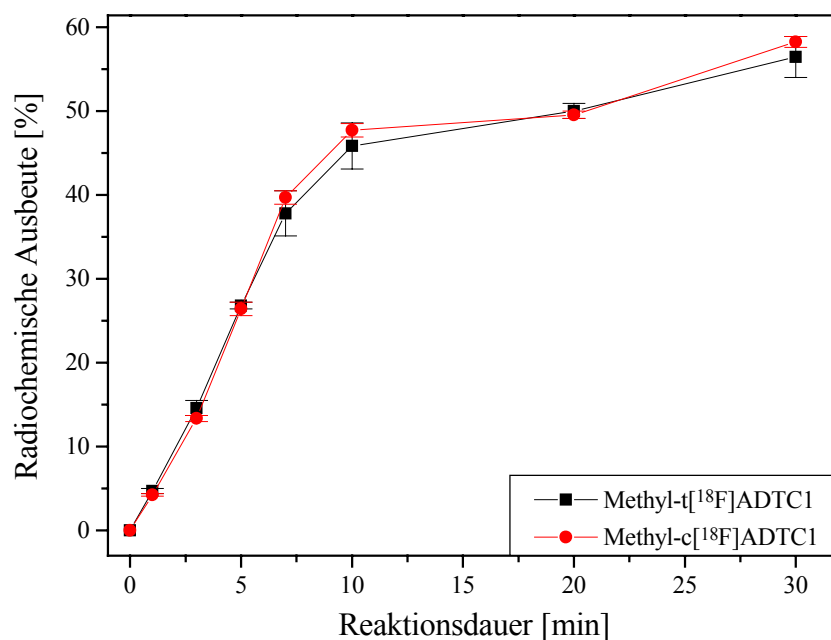


Abbildung 75: Durchführung der Synthese von Methyl-c[¹⁸F]ADTC1 unter den optimierten Bedingungen von Methyl-t[¹⁸F]ADTC1 (12,9 µmol/ml Methyl-MV-cADTC1; DMSO; 140 °C)

Wie anhand von Abbildung 75 zu erkennen, verhalten sich die beiden Diastereomeren in Bezug auf die ¹⁸F-Markierung identisch. Die hierbei erzielten radiochemischen Ausbeuten von 58% für Methyl-c[¹⁸F]ADTC1 lagen im Bereich der Fehlergrenzen von Methyl-t[¹⁸F]ADTC1. Eine Ester-spaltung von Methyl-c[¹⁸F]ADTC1 wurde nicht durchgeführt, sollte aber in Analogie zur Ester-spaltung von Methyl-t[¹⁸F]ADTC1 möglich sein.

4.3 Synthese von t[¹⁸F]ADTC3

Da aromatische Amine im Vergleich zu sekundären aliphatischen Aminen eine deutlich geringere Nucleophilie besitzen, wurde aufgrund der Ergebnisse aus Abschnitt 4.1.1 nicht versucht, eine selektive ¹⁸F-Fluorethylierung an der aromatischen Aminofunktion der trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure zu erarbeiten.

Die trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-[¹⁸F]fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (t[¹⁸F]ADTC3, 71) wurde daher durch ¹⁸F-Fluorethylierung des trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters (Methyl-MV-tADTC3) und anschließende Verseifung des gebildeten trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-[¹⁸F]fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters (Methyl-t[¹⁸F]ADTC3, 66) dargestellt.

4.3.1 Synthese von t[¹⁸F]ADTC3 durch ¹⁸F-Fluorethylierung von Methyl-MV-tADTC3 und anschließende Verseifung des Methylesters

4.3.1.1 Abhängigkeit der RCA von Methyl-t[¹⁸F]ADTC3 von der Reaktionstemperatur und vom verwendeten Lösungsmittel

Aufgrund der extrem schlechten Löslichkeit von Methyl-MV-tADTC3, die sich schon während der präparativen Synthese als problematisch erwies (siehe Abschnitt 3.4.2), standen auch hier nur DMF und DMSO als geeignete Lösungsmittel zur Verfügung. Als erstes wurde die ¹⁸F-Fluorethylierung in DMSO untersucht (Abb. 76).

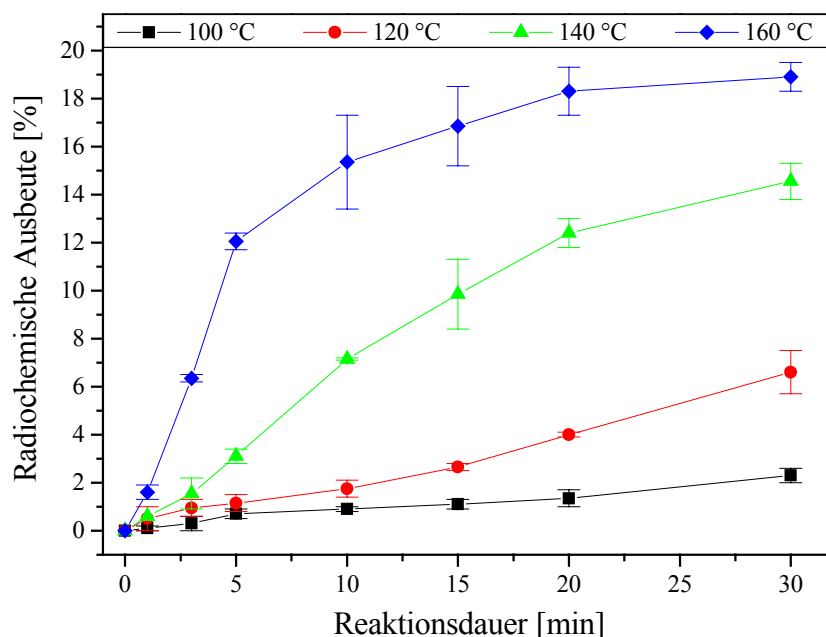


Abbildung 76: Abhängigkeit der RCA an Methyl-t[¹⁸F]ADTC3 in DMSO von der Reaktionstemperatur (7,3 μmol/ml Methyl-MV-tADTC3)

Die höchsten radiochemischen Ausbeuten von 18% wurden bei einer Reaktionstemperatur von 160 °C erzielt. Ab einer Reaktionstemperatur von 120 °C war die Bildung von Zersetzungsprodukten festzustellen, die bei höheren Temperaturen zu den Hauptprodukten wurden. So ergab die radioanalytische Auswertung der Reaktionsprodukte nach 30 Minuten bei 140 und 160 °C folgende Zusammensetzung:

Tabelle 8: Reaktionsprodukte der Bildungskinetiken von Methyl-t[¹⁸F]ADTC3 bei 140 und 160 °C (DMSO; 30 min)

Verbindung	[¹⁸ F]FETos	Methyl-t[¹⁸ F]ADTC3	[¹⁸ F]Nebenprodukt 1	[¹⁸ F]Nebenprodukt 2
RCA _{140 °C} [%]	3,4	15,3	20,5	60,8
RCA _{160 °C} [%]	4,3	19,5	15,2	61,1

Da unter den Reaktionsbedingungen, bei denen die höchsten radiochemischen Ausbeuten erzielt wurden, das $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ innerhalb von 30 Minuten nahezu komplett umgesetzt wurde, konnte die radiochemische Ausbeute auch nicht durch eine Verlängerung der Reaktionszeit erhöht werden. Auch durch die Verwendung von DMF als Lösungsmittel, welches im Temperaturintervall von 100 – 140 °C untersucht wurde, ließen sich die radiochemischen Ausbeuten nicht steigern (Abb. 77).

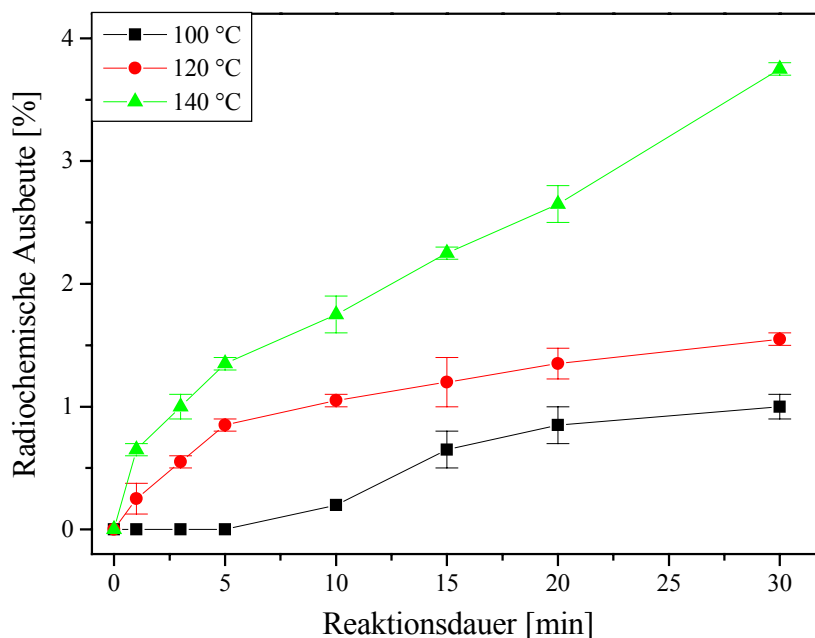


Abbildung 77: Abhängigkeit der RCA an Methyl- $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC3}$ in DMF von der Reaktionstemperatur (7,3 $\mu\text{mol/ml}$ Methyl-MV- $t\text{ADTC3}$)

Die sehr niedrigen radiochemischen Ausbeuten von ca. 4% in DMF (gegenüber 18% in DMSO) belegen die geringere Fähigkeit des DMF, den $\text{S}_{\text{N}}2$ -Übergangszustand dieser Reaktion zu stabilisieren.

Dass es allerdings in DMF selbst bei Temperaturen von 140 °C nicht zur Bildung radioaktiv markierter Zersetzungsprodukte kam, deutet darauf hin, dass es sich bei den in DMSO entstandenen Nebenprodukten um ^{18}F -markierte Zersetzungsprodukte des Markierungsvorläufers und nicht etwa des 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorethyltosylats}$ handelte. Diese Vermutung wurde durch im Rahmen der Markierung von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC3}$ durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen bestätigt. Bei diesen Untersuchungen wurde $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ in DMSO für 30 Minuten auf 140 °C erhitzt und dann auf Zersetzungsprodukte hin untersucht. Durch Radio-DC und Radio-HPLC ließ sich zeigen, dass noch ca. 95% des $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ intakt waren.

Zum direkten Vergleich der beiden Lösungsmittel wurde die radiochemische Ausbeute nach einer Reaktionsdauer von 30 Minuten ermittelt und gegen die Reaktionstemperatur aufgetragen (Abb. 78).

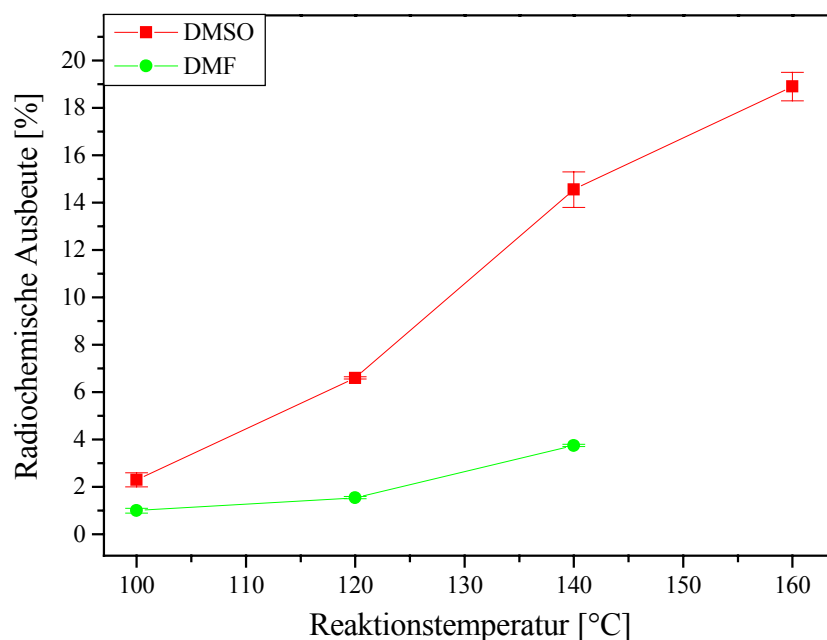


Abbildung 78: Abhängigkeit der RCA an Methyl-t[¹⁸F]ADTC3 vom verwendeten Lösungsmittel und der Reaktionstemperatur nach einer Reaktionsdauer von 30 Minuten

4.3.1.2 Abhängigkeit der RCA von Methyl-t[¹⁸F]ADTC3 von der Markierungsvorläuferkonzentration

Um die optimale Einwaage an Markierungsvorläufer zu bestimmen, wurde dessen Konzentration über einen Bereich von 2,4 – 12,2 µmol/ml variiert. Aufgrund der problematischeren Analytik bei 160 °C, bedingt durch die Entstehung von Zersetzungsprodukten, wurde diese Untersuchung bei 140 °C durchgeführt (Abb. 79).

Die höchsten radiochemischen Ausbeuten von ca. 16% wurden bei einer Konzentration von 12,2 µmol/ml erreicht. Wie anhand der konzentrationsabhängigen Zuwachsraten der RCA zu erkennen ist (Abb. 79, oben links), wurde die Eduktsättigungskonzentration nahezu erreicht.

Die insgesamt geringen radiochemischen Ausbeuten bei der ¹⁸F-Fluorethylierung von Methyl-MV-tADTC3 lassen sich durch die geringe Nukleophilie der aromatischen Aminofunktion begründen. Zur Aufbringung der daraus resultierenden hohen Aktivierungsenergien der ¹⁸F-Fluorethylierung waren einerseits hohe Reaktionstemperaturen notwendig, welche andererseits zur Bildung von Zersetzungsprodukten führten. Um diese Verbindung in hohen radiochemischen Ausbeuten zu markieren, würde man deshalb ein stärker alkylierendes Agens wie z.B. das 2-[¹⁸F]Fluorethyltriflat benötigen.

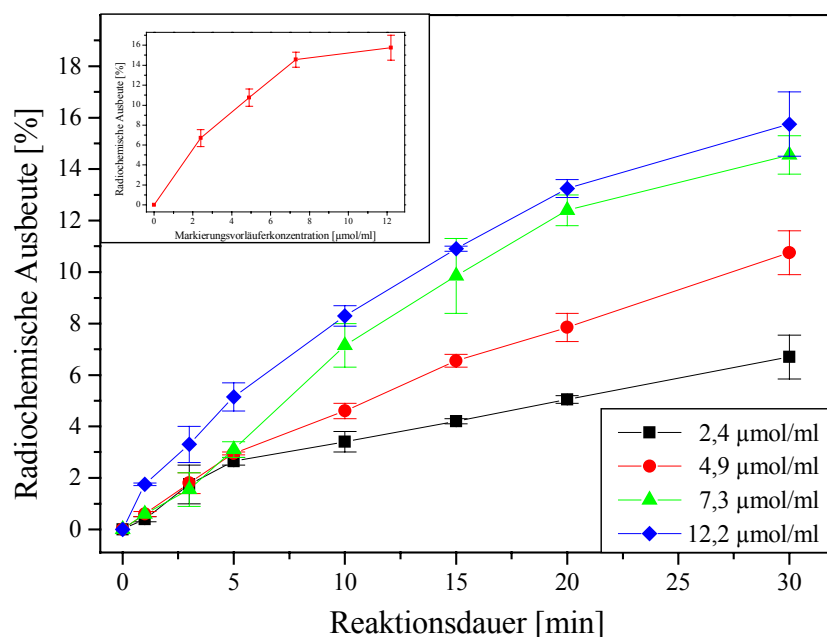


Abbildung 79: Abhängigkeit der RCA an Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC3 von der Markierungsvorläuferkonzentration (DMSO; 140 °C)

4.3.1.3 Synthese von $t[^{18}\text{F}]$ ADTC3 durch Esterspaltung von Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC3

Die Esterspaltung von Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC3 wurde wie Abschnitt 6.3.4.2 beschrieben durchgeführt. Der Ester war, in Analogie zu Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1, nach einer Reaktionsdauer von 5 Minuten quantitativ gespalten.

4.4 Synthese von $t[^{18}\text{F}]$ ADTC4

Die Synthese von $t[^{18}\text{F}]$ ADTC4 durch ^{18}F -Fluorethylierung wurde sowohl von Methyl-MV- t ADTC4 als auch von MV- t ADTC4 ausgehend untersucht. Dazu wurde die phenolische Hydroxyfunktion des Markierungsvorläufers durch Deprotonierung mittels einer Hilfsbase in ein äußerst nukleophiles Zentrum überführt, welches sich in hohen radiochemischen Ausbeuten markieren lassen sollte (Abb. 80).

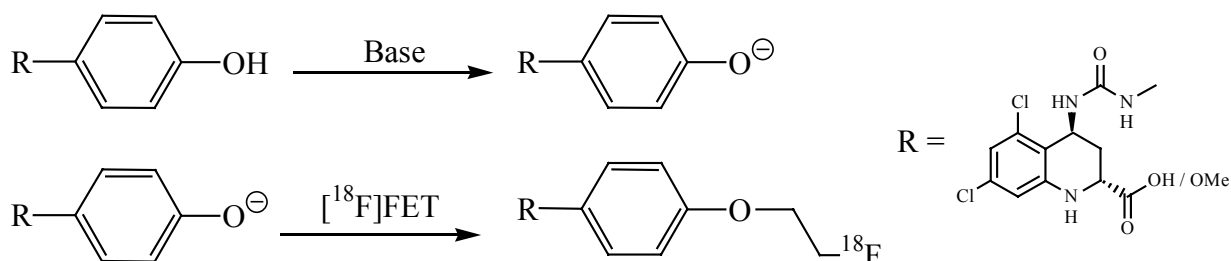


Abbildung 80: Syntheschema der ^{18}F -Fluorethylierung von Methyl-MV- t ADTC4 bzw. MV- t ADTC4 unter Verwendung einer Hilfsbase

4.4.1 Synthese von Methyl-t[¹⁸F]ADTC4 durch ¹⁸F-Fluorethylierung von Methyl-MV-tADTC4

Zunächst sollte die Synthese t[¹⁸F]ADTC4 durch ¹⁸F-Fluorethylierung von Methyl-MV-tADTC4 und anschließende Verseifung des Methylesters untersucht werden.

Dazu wurde der Markierungsvorläufer mit 0,95 Äquivalenten einer Hilfsbase versetzt, 3 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und dann 5 Minuten bei der geplanten Reaktionstemperatur vortemperiert. Die Vorgehensweise nach Zugabe der Base hat sich bei anderen Untersuchungen bewährt und sollte eine Einstellung des Säure-Base-Gleichgewichts gewährleisten, um Nebenreaktionen durch die Hilfsbase zu vermeiden [171]. Auch der Unterschuss an Base sollte einer Verhinderung von Nebenreaktionen dienen. Nach Ablauf der Temperierzeit wurde die Reaktion durch Zugabe der 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat-Lösung gestartet.

In einer ersten Untersuchung dieser ¹⁸F-Fluorethylierung wurde 5N NaOH-Lösung als Hilfsbase verwendet und die Reaktion bei 90 °C in DMSO durchgeführt (Abb. 81).

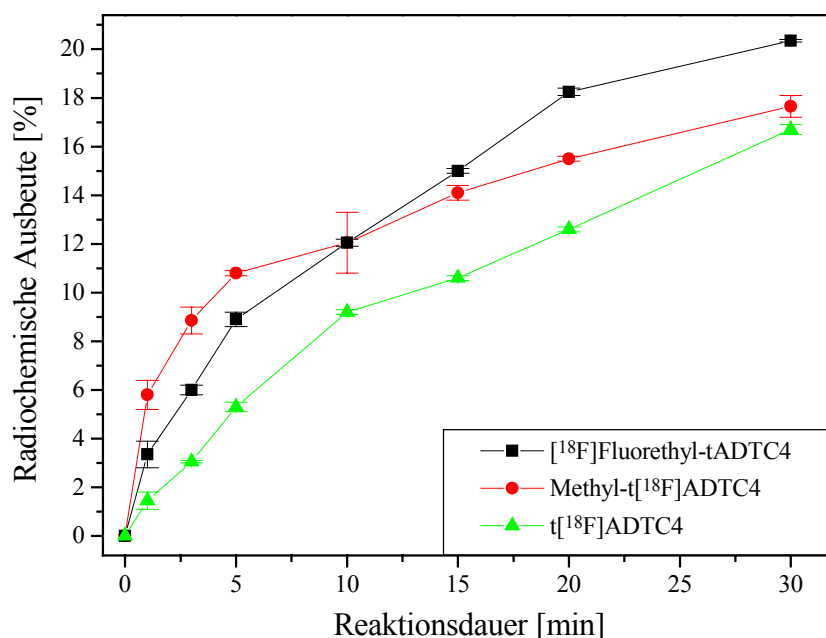


Abbildung 81: Synthese von Methyl-t[¹⁸F]ADTC4 (7,3 µmol/ml Methyl-MV-tADTC4; 1,4 µl 5N NaOH; DMSO; 90 °C)

Wie anhand von Abbildung 81 zu sehen ist, kam es neben der Synthese von Methyl-t[¹⁸F]ADTC4 auch zur Bildung von Nebenprodukten, von denen eines als t[¹⁸F]ADTC4 identifiziert konnte. Daher musste es durch das in geringen Mengen vorhandene Wasser (~ 76 µmol), welches durch die NaOH-Lösung eingebracht wurde, zu einer Spaltung des Esters gekommen sein. Eine Untersuchung der Reaktionslösung mit Hilfe der HPLC, bei der sich die Zersetzung des Methyl-ester-geschützten Markierungsvorläufers zur freien Carbonsäure nachweisen ließ, bestätigte diese Annahme. Da es im Verlauf der Reaktion mit zunehmender Esterverseifung auch zur Freisetzung von Carbonsäureprotonen kam, wurden die Phenolationen aufgrund ihrer höheren Basizität im Vergleich zur Carbonsäure wieder protoniert und somit ihre Nukleophilie gesenkt. Dabei kam es gleichzeitig zur Ausbildung des Carbonsäureanions als nukleophilstem Zentrum, weshalb es sich bei dem zweiten Nebenprodukt sehr wahrscheinlich um den an der Carbonsäure ¹⁸F-fluorethylierten Markierungsvorläufer

($[^{18}\text{F}]$ Fluorethyl-tADTC4) handelt. Ein mögliches Syntheschema zur Entstehung dieser ^{18}F -markierten Produkte ist in Abbildung 82 dargestellt:

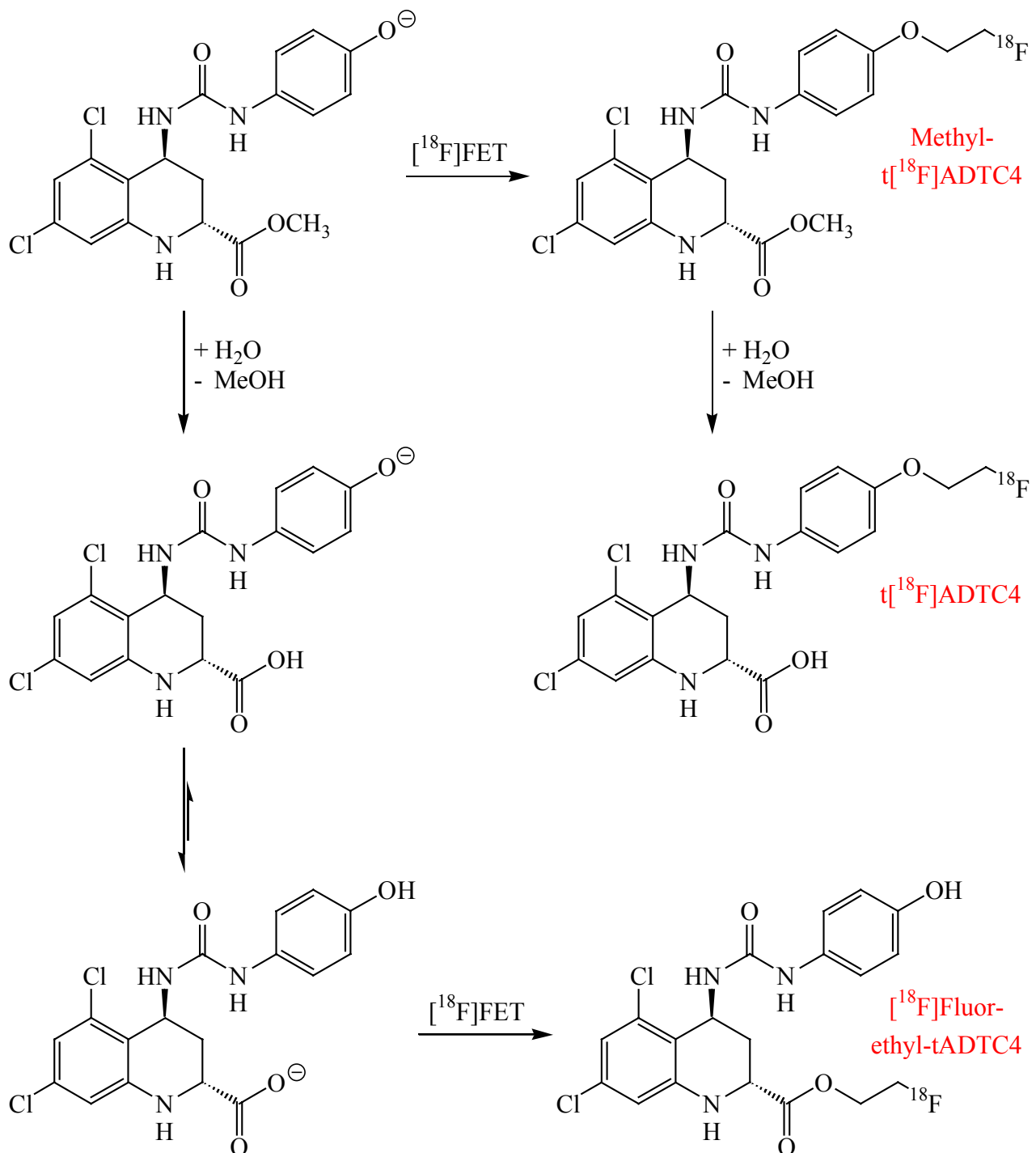


Abbildung 82: Hypothetisches Syntheschema zur Entstehung von $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyl- t ADTC4, Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC4 und $t[^{18}\text{F}]$ ADTC4

Diese Vermutung wird sowohl durch die bei der Radio-Dünnschichtchromatographie ermittelten R_f -Werte als auch durch die Bildungskinetik der ^{18}F -markierten Produkte untermauert. Die Radio-Dünnschichtchromatographie ergab dabei für das zweite Nebenprodukt einen R_f -Wert, der zwi-

schen den R_f -Werten von Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC4 und $t[^{18}\text{F}]$ ADTC4 lag, was für das $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyl-tADTC4 auch zu erwarten wäre (Tab. 9).

Tabelle 9: R_f -Werte der Reaktionsprodukte der ^{18}F -Markierung von Methyl-MV-tADTC4 (DC-Bedingungen: Acetonitril/0,05M Dinatriumhydrogenphosphat 60/40; RP 18 F₂₅₄)

Verbindung	Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC4	$[^{18}\text{F}]$ Fluorethyl-tADTC4	$t[^{18}\text{F}]$ ADTC4
R_f	0,39	0,60	0,76

Unter Berücksichtigung der Esterspaltung würde man für das Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC4 anfänglich eine hohe Bildungsrate erwarten, die dann aber schnell geringer werden sollte, da es im Verlauf der Reaktion zu einer zunehmenden Protonierung des Phenolations von Methyl-MV- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC4 kommt. Bei der Bildung des $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyl-tADTC4 dagegen würde man anfangs geringere Bildungsraten erwarten, die im Verlauf der Reaktion aber größer als die des Methyl-MV- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC4 werden sollten, da sich die Konzentration der Carbonsäureanionen während der Reaktion zunehmend erhöht. Genau diesen Verlauf belegen die experimentellen Befunde in Abbildung 81.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die Untersuchungen an dieser Verbindung eingestellt und stattdessen versucht, eine selektive ^{18}F -Fluorethylierung mittels 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat an der phenolischen Hydroxyfunktion bei entschützter Carbonsäure zu erarbeiten.

4.4.2 Synthese von $t[^{18}\text{F}]$ ADTC4 durch ^{18}F -Fluorethylierung von MV-tADTC4

Die Zugabe der Hilfsbase wurde wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben durchgeführt. Allerdings mussten zur Deprotonierung von MV-tADTC4 1,9 Äquivalente der Hilfsbase zugegeben werden, da sowohl die phenolische Hydroxyfunktion als auch die Carbonsäure deprotoniert werden mussten.

4.4.2.1 Abhängigkeit der RCA von $t[^{18}\text{F}]$ ADTC4 von der Reaktionstemperatur und vom verwendeten Lösungsmittel

Die Temperaturabhängigkeit der Umsetzung von MV-tADTC4 zu $t[^{18}\text{F}]$ ADTC4 mittels $[^{18}\text{F}]$ FETos wurde zuerst in DMSO unter Verwendung von 5N NaOH-Lösung als Hilfsbase untersucht (Abb. 83).

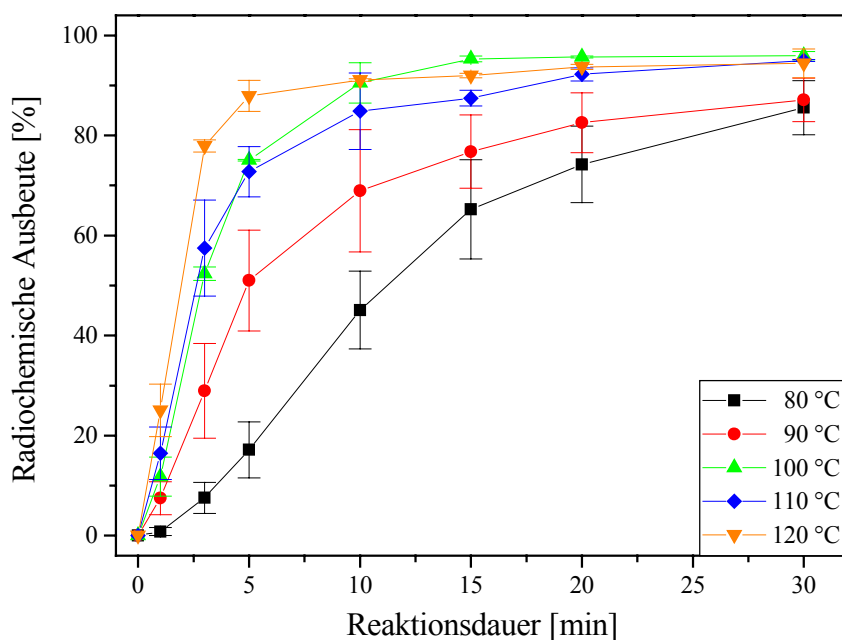


Abbildung 83: Abhängigkeit der RCA an $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ in DMSO von der Reaktionstemperatur (7,5 $\mu\text{mol/ml}$ MV-tADTC4; 1,9 äq. 5N NaOH)

Die höchsten radiochemischen Ausbeuten von 96% wurden nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei einer Reaktionstemperatur von 100 °C erzielt. Eine Erhöhung der Temperatur erbrachte zwar keine wesentliche Erhöhung der finalen RCA, jedoch einen größeren Zuwachs in den ersten Reaktionsminuten. Unter Berücksichtigung des radioaktiven Zerfalls ergeben sich die besten radiochemischen Ausbeuten von ca. 85% nach einer Reaktionsdauer von 10 Minuten bei einer Reaktionstemperatur von 100 – 120 °C.

Diese hohen radiochemischen Ausbeuten bei der Alkylierung eines geladenen Nucleophils lassen sich durch die Verwendung von nucleophilen, aprotischen Lösungsmitteln (wie z. B. DMSO, DMF, HMPTA, etc.) begründen. Aufgrund ihrer Nucleophilie solvatisieren diese Lösungsmittel Kationen (wie H^+ , Na^+ oder K^+) sehr gut, nicht aber Anionen, die nur unspezifisch solvatisiert werden. Daher kommt es zur Bildung nackter, sehr reaktiver Anionen in derartigen Lösungsmitteln. Ein Ansatz, diese Elektronenpaar-Donor-Eigenschaften der Lösungsmittel mit einem Parameter zu umschreiben, waren die von Gutmann eingeführten Donorzahlen DN [172]. Unter Berücksichtigung der Donorzahlen DN [173] und Dielektrizitätskonstanten ϵ der Lösungsmittel sollten daher die radiochemischen Ausbeuten bei der Alkylierung von geladenen Nucleophilen in der Reihenfolge DMSO ($\text{DN} = 29,8 / \epsilon = 47$) > DMF ($\text{DN} = 26,6 / \epsilon = 37$) > Acetonitril ($\text{DN} = 14,1 / \epsilon = 38$) sinken. Diese Vermutung wird durch die experimentellen Befunde auch bestätigt (siehe unten).

Die Untersuchung der Reaktion in DMF in einem Temperaturintervall von 90 – 120 °C mit 5N NaOH-Lösung als Hilfsbase ist in Abbildung 84 dargestellt:

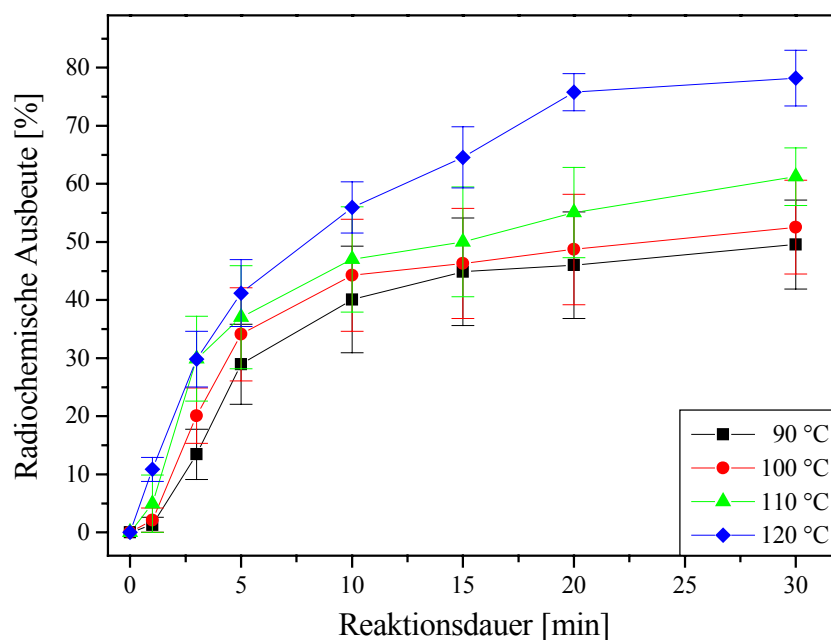


Abbildung 84: Abhängigkeit der RCA an $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ in DMF von der Reaktionstemperatur (7,5 $\mu\text{mol/ml}$ MV-tADTC4; 1,9 äq. 5N NaOH)

In DMF ließen sich maximale radiochemische Ausbeuten von ca. 80% bei 120 °C erzielen. Beim Vergleich von Abbildung 83 und 84 zeigt sich außerdem, dass die Bildungsraten von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ in DMF deutlich geringer sind. Eine weitere Erhöhung der Reaktionstemperatur in DMF wurde nicht durchgeführt, da es in DMF stets zur Bildung eines unbekanntes polaren Nebenproduktes kam (R_f (Chloroform/Methanol 4/1 + 2% DIEA): 0,0), dessen radiochemischen Ausbeuten mit der Erhöhung der Reaktionstemperatur anstiegen und somit eine Erhöhung der Ausbeute von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ verhinderten. Die Bildung dieses Nebenproduktes war in DMSO nur in sehr geringen Ausbeuten feststellbar. Als Beispiel ist in Tabelle 10 die radioanalytische Auswertung einer Bildungskinetik nach 30 Minuten bei 120 °C angeführt:

Tabelle 10: Reaktionsprodukte der Bildungskinetiken von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ bei 100 und 120 °C (DMF; 30 min)

Verbindung	$[^{18}\text{F}]\text{FETos}$	$t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$	$[^{18}\text{F}]\text{Nebenprodukt}$
RCA _{100 °C} [%]	34,6	46,3	19,1
RCA _{120 °C} [%]	0,1	73,4	26,5

Die Untersuchung dieser ^{18}F -Fluorethylierungsreaktion wurde auch mit dem Lösungsmittel Acetonitril, ebenfalls unter Verwendung von 5N NaOH-Lösung, als Lösungsmittel untersucht. Bei der Verwendung von Acetonitril waren jedoch aufgrund der obigen Überlegungen keine hohen radiochemischen Ausbeuten zu erwarten. Außerdem besitzen DMF und DMSO mit steigender Polarität des Edukts die wesentlich besseren Lösungseigenschaften. Diese Annahme wurde durch die experimentellen Befunde bestätigt, bei denen in Acetonitril eine maximal radiochemische Ausbeute von ca. 8% erzielt wurde (Abb. 85).

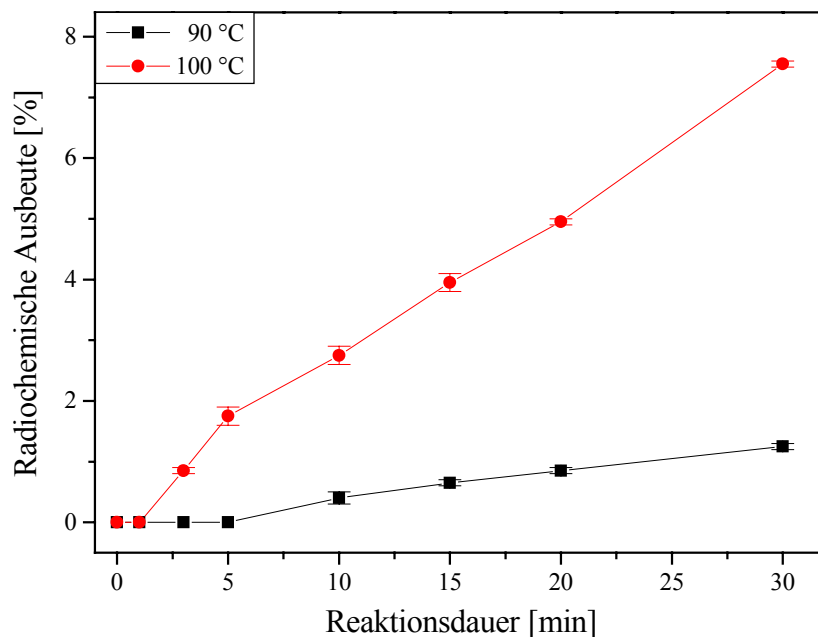


Abbildung 85: Abhängigkeit der RCA an $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ in MeCN von der Reaktionstemperatur (7,5 $\mu\text{mol/ml}$ MV-tADTC4; 1,9 äq. 5N NaOH)

Zum direkten Vergleich der Lösungsmittel wurde auch hier die radiochemische Ausbeute nach einer Reaktionsdauer von 30 Minuten ermittelt und gegen die Reaktionstemperatur aufgetragen (Abb. 86).

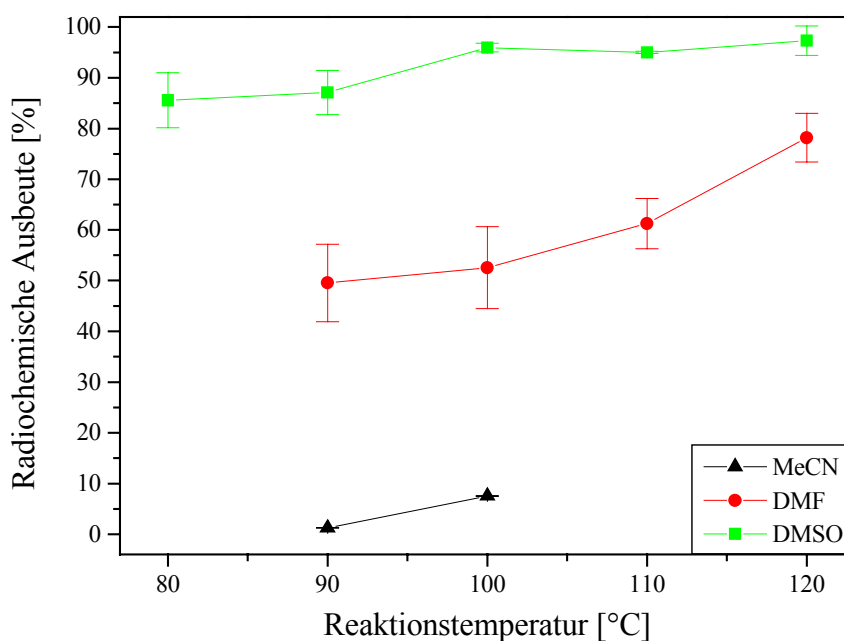


Abbildung 86: Abhängigkeit der RCA an $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ vom verwendeten Lösungsmittel und der Reaktionstemperatur nach einer Reaktionsdauer von 30 Minuten

Aufgrund der deutlich höheren radiochemischen Ausbeuten wurden für die weiteren Untersuchungen DMSO als Lösungsmittel und als Reaktionstemperatur 100 °C gewählt.

4.4.2.2 Abhängigkeit der RCA von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ von der zugegebenen Hilfsbase

Da die quantitative Bildung des Phenolatanions für die radiochemische Ausbeute der ^{18}F -Fluorethylierungsreaktion von entscheidender Bedeutung war, wurden neben 5N NaOH-Lösung weitere Hilfsbasen untersucht. Die verwendeten Hilfsbasen sollten dabei folgenden Verwendungskriterien genügen: Die Einstellung des Säure-Base-Gleichgewichts sollte möglichst schnell erfolgen und quantitativ auf der Seite des Phenolatanions liegen und die Basen selbst sollten nur eine geringe Nukleophilie besitzen, um die Bildung von Nebenprodukten zu verhindern. Daher wurden eine Vielzahl von Basen untersucht, deren Ergebnisse in den Abbildungen 86 und 87 zu sehen sind:

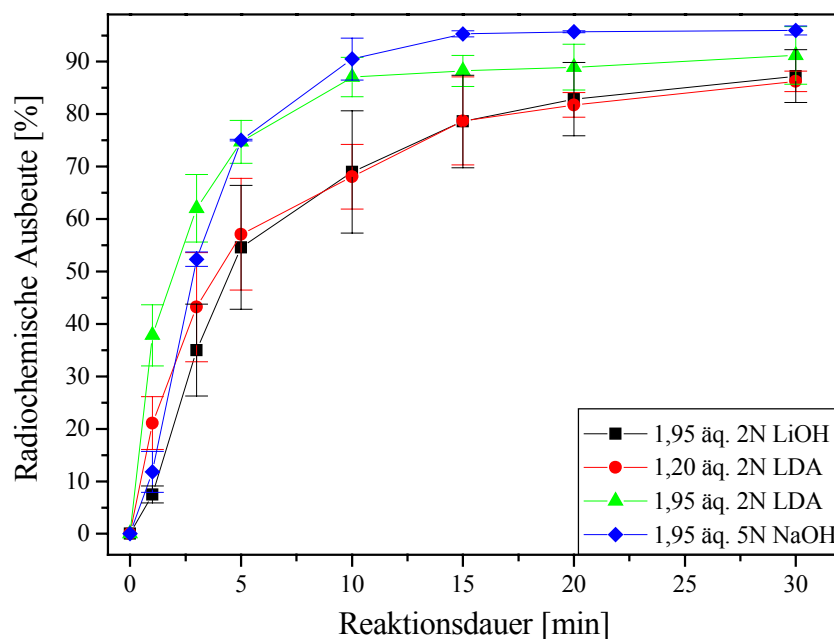


Abbildung 87: Abhängigkeit der RCA $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ von der zugesetzten Hilfsbase ($7,5 \mu\text{mol/ml}$ MV-tADTC4; DMSO; 100°C)

Die höchsten radiochemischen Ausbeuten ergaben sich bei der Verwendung starker Basen wie Natriumhydroxid, Lithiumhydroxid und Lithium-diisopropylamid (LDA), da hier das Säure-Base-Gleichgewicht sehr weit zur Seite des Phenolations verschoben ist. Im Falle des LDA wurde neben einer Zugabe von 1,95 Äquivalenten an Base auch eine Zugabe von 1,20 Äquivalenten untersucht, die interessanterweise immer noch radiochemische Ausbeuten von 86% lieferte. Allerdings wurde hierbei eine deutlich langsamere Bildungskinetik als bei der höheren Basenkonzentration festgestellt.

Bei der Verwendung starker Basen ist allerdings die leichte Metallierbarkeit des DMSO (Abb. 88) zu berücksichtigen, die insbesondere bei der Verwendung von Natriumhydrid zu Nebenreaktionen führt [174]:

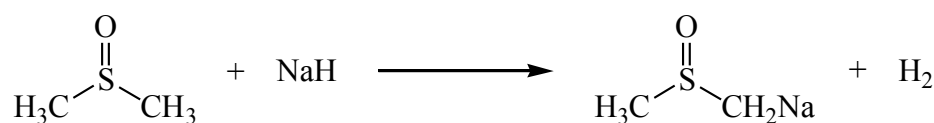


Abbildung 88: Bildung des Methylsulfinylcarbanions durch Metallierung von DMSO

Das gebildete Methylsulfinylcarbanion ist ein sehr nukleophiles Reagenz und kann z. B. Carbonsäureester unter Verdrängung der Alkoholat-Gruppe angreifen. Obwohl bei der Verwendung von LDA Nebenreaktionen dieser Art nicht festzustellen waren, wurde dennoch auf die Verwendung von Natriumhydrid verzichtet, da bei anderen Untersuchungen zur ^{18}F -Fluorethylierung von Phenolaten die Ergebnisse auf Bildung des Methylsulfinylcarbanions hindeuten [171].

Neben NaOH, LiOH und LDA wurden weitere Hilfsbasen untersucht, bei denen allerdings deutlich niedrigere radiochemische Ausbeuten erzielt wurden (Abb. 89).

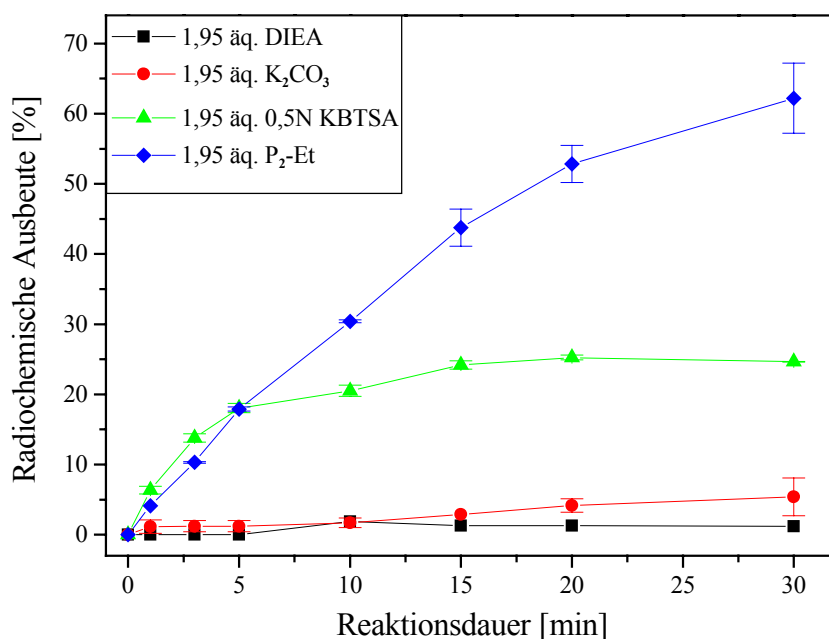


Abbildung 89: Abhängigkeit der RCA $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ von der zugesetzten Hilfsbase ($7,5 \mu\text{mol/ml}$ MV-tADTC4; DMSO; 100°C)

Die geringen radiochemischen Ausbeuten von 1% bei der Verwendung von N-Ethyldiisopropylamin (DIEA) sind durch die unzureichende Basizität der Verbindung zu erklären. Das Phenol-Phenolat-Gleichgewicht liegt in diesem Fall zu weit auf der Seite des Phenols. Die sehr niedrigen radiochemischen Ausbeuten bei der Benutzung von Kaliumcarbonat lassen sich durch die Bildung eines unbekanntes Produkts erklären, das sich unter diesen Reaktionsbedingungen in einer RCA von ca. 40% bildete.

Bei der Anwendung von Kalium-bis-(trimethylsilyl)-amid (KBTSA) und der Phosphazenen-Base P₂-Et (Struktur siehe Abb. 90) wurde das Auftreten mehrerer Nebenprodukte festgestellt, was unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich um starke, sterisch sehr anspruchsvolle Basen handelt,

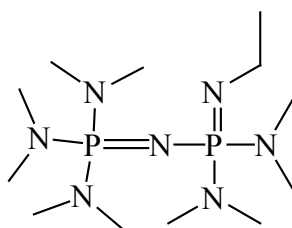


Abbildung 90: Struktur der Phosphazenen-Base P₂-Et

eine unzureichende Vortemperierzeit zur Einstellung des Säure-Base-Gleichgewichts oder die Bildung des oben beschriebenen Methylsulfinylcarbanions vermuten lässt. Diese Vermutung wird durch andere Untersuchungen zur ^{18}F -Fluorethylierung phenolischer Hydroxyfunktionen bestätigt, bei denen mit KBTSA in DMF die höchsten radiochemischen Ausbeuten erzielt wurden [171]. Im Falle der Phosphazen-Base waren die Nebenreaktionen in geringerem Maße festzustellen, weshalb sich radiochemische Ausbeuten von 62% realisieren ließen.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist 5N NaOH-Lösung die geeignetste Hilfsbase zur Deprotonierung der phenolischen Hydroxyfunktion.

4.4.2.3 Abhängigkeit der RCA von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ von der Markierungsvorläuferkonzentration

Zur Bestimmung der optimalen Einwaage an Markierungsvorläufer wurde dessen Konzentration über einen Bereich von 2,5 – 7,5 $\mu\text{mol/ml}$ variiert (Abb. 91).

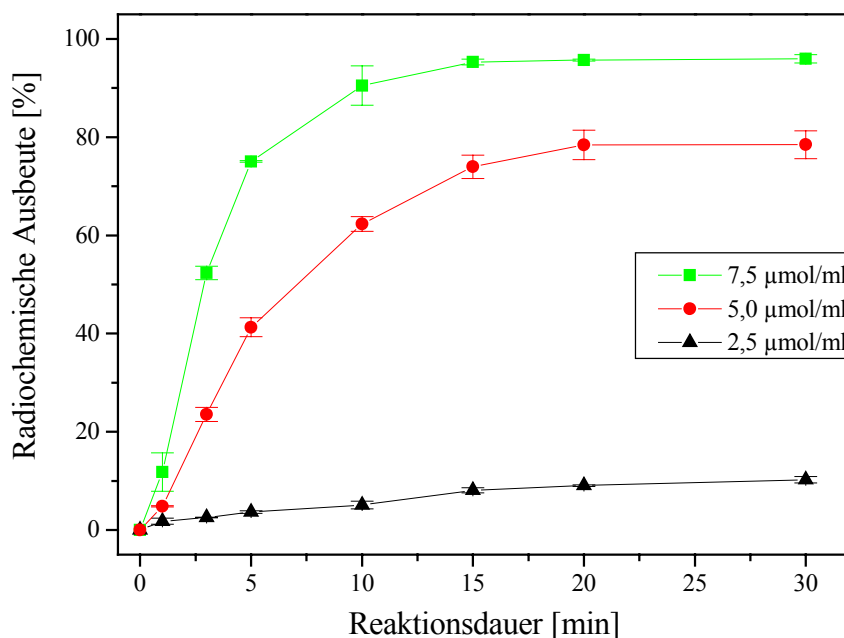


Abbildung 91: Abhängigkeit der RCA an $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ von der Markierungsvorläuferkonzentration (1,9 äq. 5N NaOH; DMSO; 100 °C)

Wie in der Abbildung zu erkennen, führte eine Absenkung der Markierungsvorläuferkonzentration auf 5 bzw. 2,5 $\mu\text{mol/ml}$ sofort zu einer deutlich niedrigeren RCA von 78 bzw. 10%. Daher handelt es sich bei der bis dahin verwendeten Konzentration von 7,5 $\mu\text{mol/ml}$ mit 95% RCA um die optimale Eduktsättigungskonzentration.

4.4.3 Synthese von t[¹⁸F]ADTC4 durch ¹⁸F-Fluorierung von DMV-tADTC4

Zur Darstellung von t[¹⁸F]ADTC4 wurde auch eine Synthesevariante über die ¹⁸F-Direktfluorierung von DMV-tADTC4 untersucht (Abb. 92).

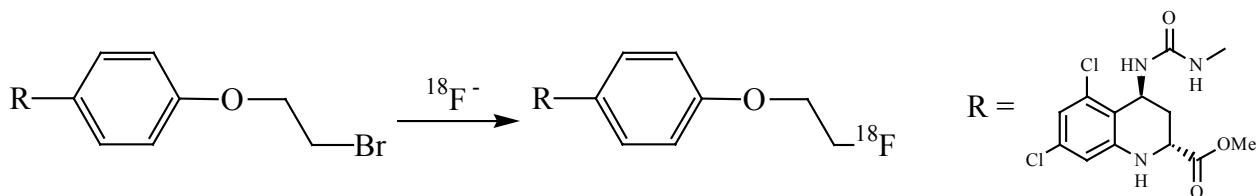


Abbildung 92: ¹⁸F-Fluorierung von DMV-tADTC4

Dieser Syntheseweg bietet den Vorteil, dass [¹⁸F]Fluorid direkt in das Molekül eingeführt wird, ohne dass zuvor eine prosthetische Gruppe, wie z. B. das 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat, synthetisiert werden muss. Das [¹⁸F]Fluorid wird hierbei gegen geeignete Abgangsgruppen (Tosylate, Triflate, Halogene, etc.) ausgetauscht, wobei in diesem Fall Brom als Abgangsgruppe gewählt wurde. Um eine ausreichende Aktivierung des [¹⁸F]Fluorids zu gewährleisten, verwendet man Kryptanden, die das Gegenion, normalerweise Kalium, komplexieren und somit ein nacktes Fluorid-Ion mit hoher Nukleophilie erzeugen. Als Kryptand hat sich besonders das Kryptofix[®] 2.2.2 bewährt, welches Kationen dreidimensional umschließen kann und einen ideal auf den Ionenradius des Kaliums abgestimmten Hohlraum ausbildet (Abb. 93).

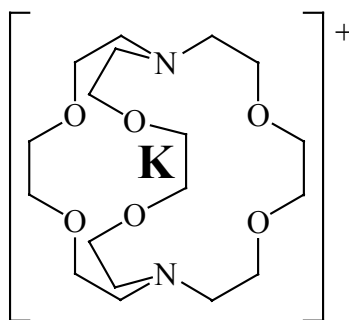


Abbildung 93: Struktur des [K ⊂ 2.2.2]⁺-Komplexes

Bei der Durchführung von ¹⁸F-Direktfluorierungen gilt es aber zu berücksichtigen, dass die Markierungsvorläufer eine ausreichende Stabilität gegenüber basischen Bedingungen besitzen müssen, da das [¹⁸F]Fluorid nach der Trocknung in einem basischen Karbonat-System vorliegt.

Außerdem muss die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum [¹⁸F]Fluorid verhindert werden, da diese die Nukleophilie des [¹⁸F]Fluorids deutlich senken. Neben einer Vermeidung von protischen Lösungsmitteln müssen daher auch NH- und OH-Funktionen im Markierungsvorläufermolekül berücksichtigt werden. Diese werden deshalb häufig vor einer ¹⁸F-Direktfluorierung durch Umsetzung mit geeigneten Schutzgruppen blockiert. Im Falle des DMV-tADTC4 waren dabei die NH-Funktionen des Harnstoffs und des Tetrahydro-pyridinringes zu berücksichtigen. Aufgrund ihrer geringen Nukleophilie waren diese Funktionen jedoch schwer zu schützen, weshalb der ungeschützte Markierungsvorläufer eingesetzt wurde.

4.4.3.1 Abhängigkeit der RCA von Methyl-t[¹⁸F]ADTC4 von der Reaktionstemperatur und vom verwendeten Lösungsmittel

Die Temperaturabhängigkeit der Synthese von Methyl-t[¹⁸F]ADTC4 durch ¹⁸F-Direktfluorierung von DMV-tADTC4 wurde zuerst in DMSO untersucht (Abb. 94).

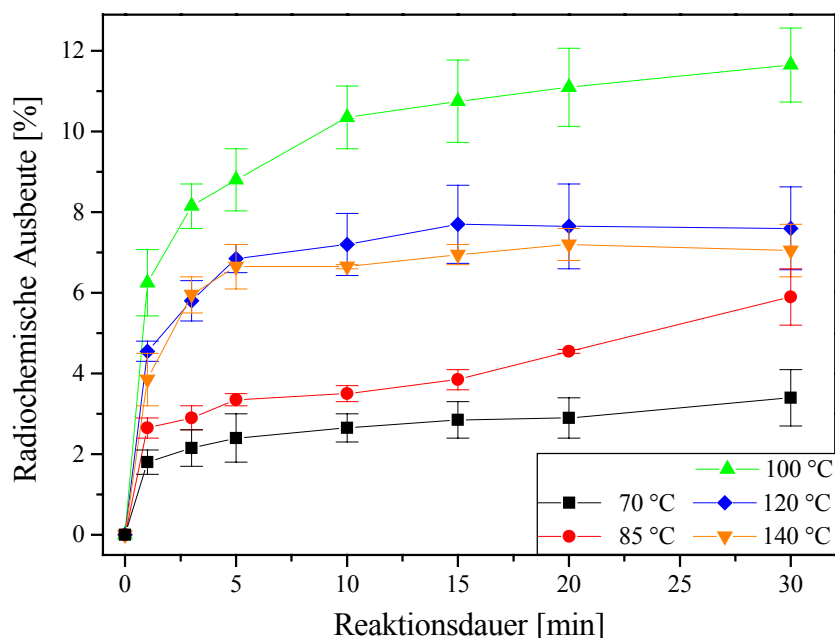


Abbildung 94: Abhängigkeit der RCA an Methyl-t[¹⁸F]ADTC4 in DMSO von der Reaktionstemperatur (5,8 µmol/ml DMV-tADTC4)

Die höchsten radiochemischen Ausbeuten von ca. 12% wurden bei einer Reaktionstemperatur von 100 °C erzielt. Die niedrigeren radiochemischen Ausbeuten auch bei höheren Temperaturen sind auf die verstärkte Bildung von Zersetzungsprodukten zurückzuführen, welche durch die basischen Reaktionsbedingungen bei der ¹⁸F-Direktfluorierung hervorgerufen werden. Außerdem lässt sich ab 100 °C eine anfangs sehr hohe Bildungsrate an Methyl-t[¹⁸F]ADTC4 feststellen, die sich jedoch nicht fortsetzt. Diese Beobachtung ist durch eine mögliche Thermolyse des Kalium-Kryptand-Komplexes bei Reaktionstemperaturen von über 80 °C zu erklären, da hierdurch die Solvatisierung des Kaliums verringert wird und es somit zu einer deutlichen Senkung der Nukleophilie des [¹⁸F]Fluorids kommt.

Durch die Verwendung von DMF als Lösungsmittel ließen sich die radiochemischen Ausbeuten auf 20% steigern, jedoch führten auch hier Zersetzungsreaktionen ab 100 °C zu einer Erniedrigung der RCA (Abb. 95).

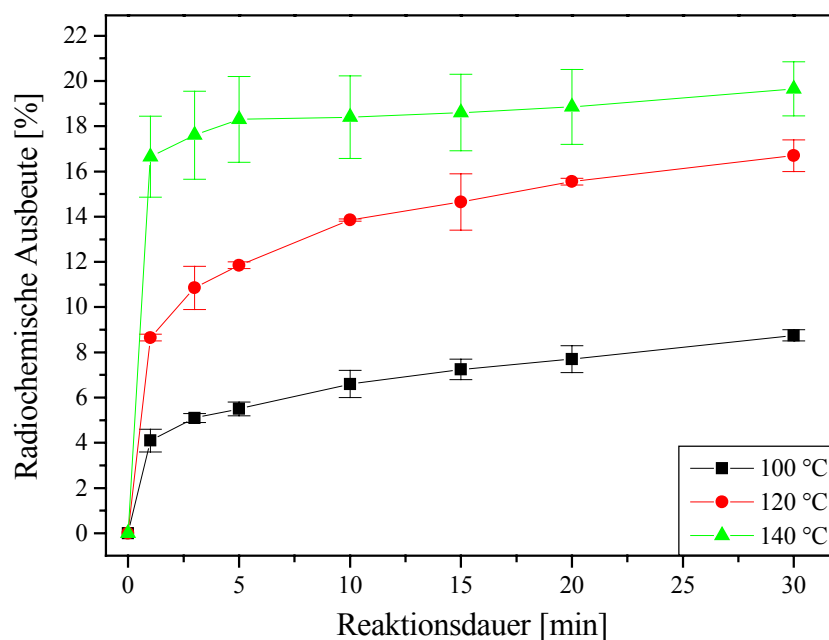


Abbildung 95: Abhängigkeit der RCA an Methyl-t[¹⁸F]ADTC4 in DMF von der Reaktionstemperatur (5,8 µmol/ml DMV-tADTC4)

Die Untersuchung der ¹⁸F-Fluorierung in Acetonitril im Temperaturbereich von 80 – 90 °C ist in Abbildung 96 dargestellt:

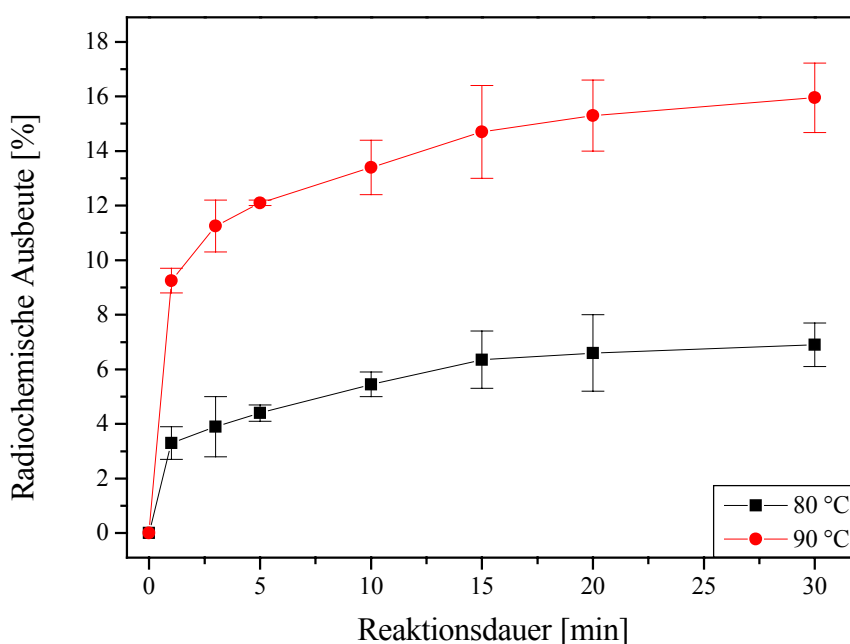


Abbildung 96: Abhängigkeit der RCA an Methyl-t[¹⁸F]ADTC4 in Acetonitril von der Reaktionstemperatur (5,8 µmol/ml DMV-tADTC4)

Die höchste RCA von 16% wurde in Acetonitril bei 90 °C erzielt. Wie anhand der Abbildungen 94 – 96 zu sehen ist, liefert Acetonitril bei gleichen Reaktionstemperaturen zwar die wesentlich höheren radiochemischen Ausbeuten; aufgrund der starken Temperaturabhängigkeit der Reaktion lässt sich die höchste RCA allerdings in DMF bei 140 °C erzielen.

4.4.3.2 Abhängigkeit der RCA von Methyl-t[¹⁸F]ADTC4 von der Markierungsvorläuferkonzentration

Aufgrund der verstärkten Bildung von Zersetzungsprodukten bei 140 °C wurde die Abhängigkeit der RCA von der Markierungsvorläuferkonzentration in DMF bei 120 °C untersucht. Dabei wurde Einwaage des Edukts über einen Konzentrationsbereich von 1,9 – 9,7 µmol/ml variiert (Abb. 97).

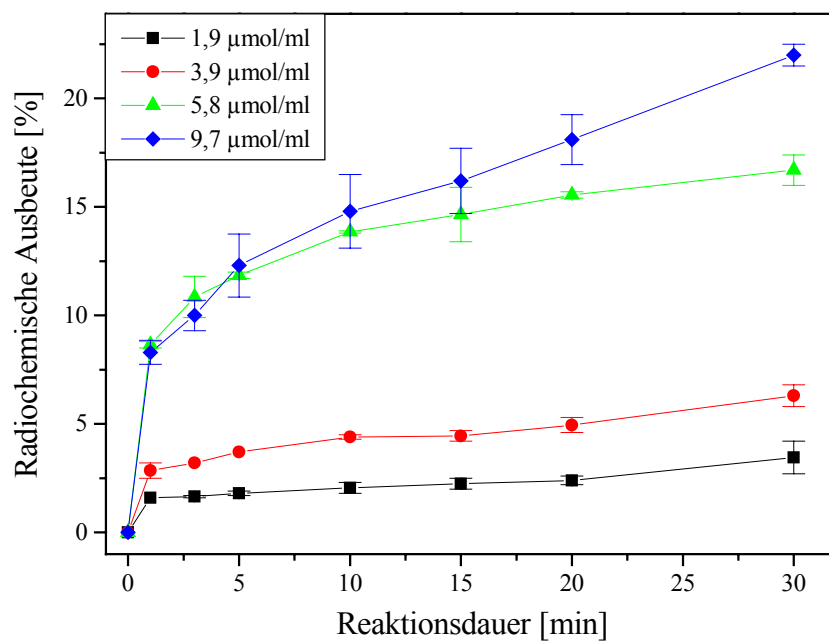


Abbildung 97: Abhängigkeit der RCA an Methyl-t[¹⁸F]ADTC4 von der Markierungsvorläuferkonzentration (DMF; 120 °C)

Durch die Erhöhung der Eduktkonzentration auf 9,7 µmol/ml ließ sich die RCA auf 22% steigern. Eine weitere Erhöhung der Eduktkonzentration wurde auch hier wegen der schlechten Lösungseigenschaften von DMV-tADTC4 nicht durchgeführt.

Die insgesamt jedoch niedrigen radiochemischen Ausbeuten lassen sich wahrscheinlich auf die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der NH-Funktion des Tetrahydro-pyridinringes und dem [¹⁸F]Fluorid, welche eine Erniedrigung der Nukleophilie des [¹⁸F]Fluorids bewirkten, zurückführen. Ein störender Einfluss der Harnstoffgruppierung auf die RCA kann nahezu ausgeschlossen werden, da sich in einer anderen Untersuchung Benzamidderivate in hohen radiochemischen Ausbeuten ¹⁸F-fluorieren ließen, ohne das sich die Amidstruktur negativ auswirkte [160]. Ein Versuch, die NH-Funktion des Tetrahydro-pyridinringes zu schützen, wurde aufgrund des hohen präparativen Aufwandes nach der ¹⁸F-Markierung nicht unternommen. Man müsste eine basenstabile Schutzgruppe einführen (z. B. eine Boc-Schutzgruppe) und nach Beendigung der ¹⁸F-Markierung zuerst die NH-Schutzgruppe entfernen und dann den Ester verseifen. Bedingt durch diesen Arbeitsaufwand wäre die ¹⁸F-Direktmarkierung, selbst bei hoher RCA, stets der ¹⁸F-Fluorethylierung von tADTC4 unterlegen.

Aufgrund der niedrigen RCA wurde eine Esterspaltung von Methyl-t[¹⁸F]ADTC4 nicht durchgeführt, sollte aber in Analogie zur Esterspaltung von Methyl-t[¹⁸F]ADTC3 möglich sein.

4.5 Synthese von t[¹⁸F]ADTC5

Aufgrund der Markierungsergebnisse von t[¹⁸F]ADTC4 wurde auf eine Untersuchung der ¹⁸F-Fluorethylierung des Methylester-geschützten Markierungsvorläufers verzichtet und nur die ¹⁸F-Markierung von MV-tADTC5 untersucht.

4.5.1 Synthese von t[¹⁸F]ADTC5 durch ¹⁸F-Fluorethylierung von MV-tADTC5

Da sowohl die Sulfonyl-NH- als auch die Carbonsäurefunktion acider als die phenolische Hydroxyfunktion sind, mussten dem Markierungsvorläufer 2,85 Äquivalente an Base zugesetzt werden, um eine selektive ¹⁸F-Fluorethylierung an der Hydroxyfunktion zu gewährleisten (Abb. 98).

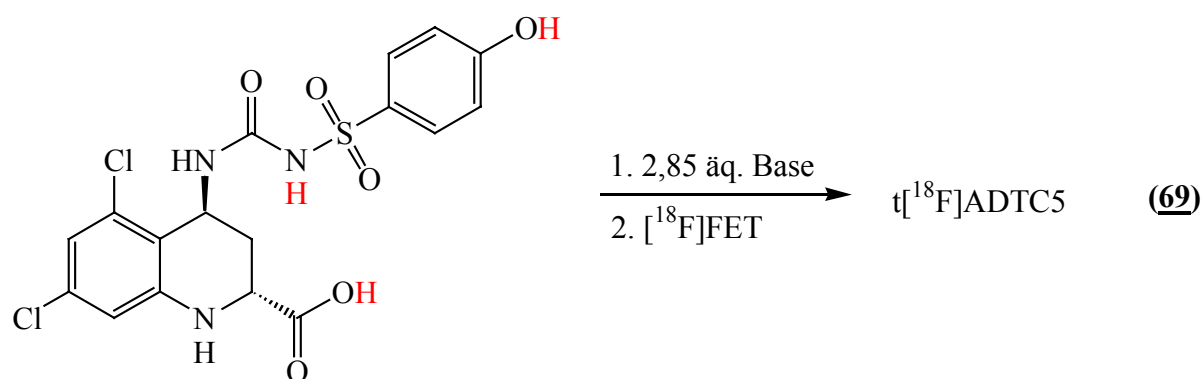


Abbildung 98: Schema der ¹⁸F-Fluorethylierung von MV-tADTC5 (rot unterlegt: acide Protonen)

Die Zugabe der Base, die Vortemperierung und die Zugabe des 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylats wurden dabei gemäß Abschnitt 4.4.1 durchgeführt.

4.5.1.1 Abhängigkeit der RCA von t[¹⁸F]ADTC5 von der Reaktionstemperatur

Da durch die Deprotonierung des Markierungsvorläufers ein dreiwertiges Anion hoher Polarität gebildet wurde, welches sich selbst in DMF nur schlecht löste, wurde die Abhängigkeit der RCA von der Reaktionstemperatur nur in DMSO untersucht. Dabei wurde 5N NaOH-Lösung als Hilfsbase verwendet (Abb. 99).

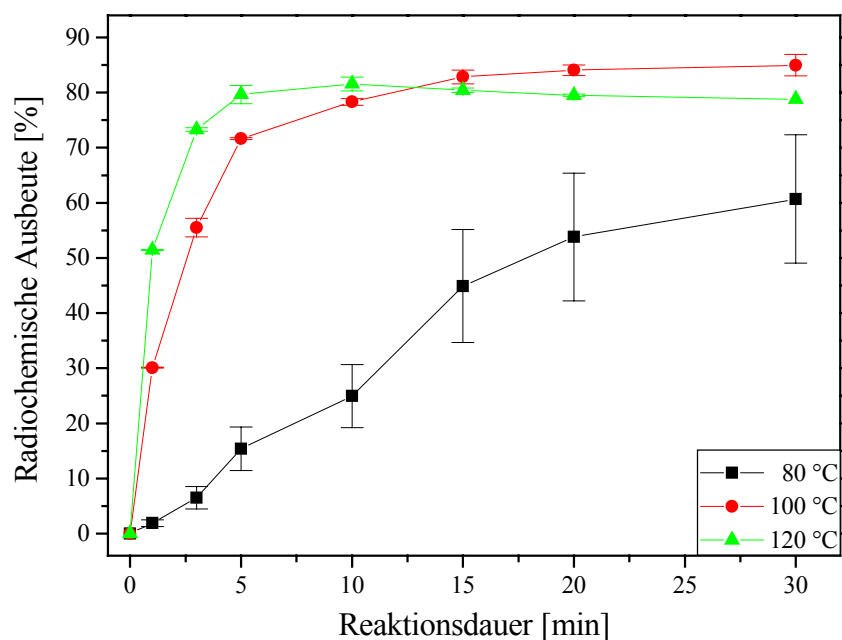


Abbildung 99: Abhängigkeit der RCA an $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC5}$ in DMSO von der Reaktionstemperatur (6,3 $\mu\text{mol/ml}$ MV-tADTC5; 2,85 äq. 5N NaOH)

Die höchsten radiochemischen Ausbeuten von 85% wurden bei einer Reaktionstemperatur von 100 °C erzielt. Eine Erhöhung der Temperatur auf 120 °C erbrachte zwar bis 10 Minuten eine höhere RCA, die sich jedoch durch das Auftreten von Zersetzungsreaktionen wieder erniedrigte. Bei der Berücksichtigung des ^{18}F -Zerfalls ergeben sich für 120 °C (5 min) und 100 °C (15 min) nahezu identische Ausbeuten von ca. 75%, weshalb die folgenden Untersuchungen aufgrund der geringeren Zersetzungsreaktionen bei 100 °C durchgeführt wurden.

4.5.1.2 Abhängigkeit der RCA von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC5}$ von der zugegebenen Hilfsbase

Die Abhängigkeit der RCA von der verwendeten Hilfsbase wurde neben 5N NaOH-Lösung auch mit 2N LDA-Lösung und 2N LiOH-Lösung untersucht, da sich diese Basen auch schon bei der Deprotonierung von MV-tADTC4 bewährt hatten (Abb. 100).

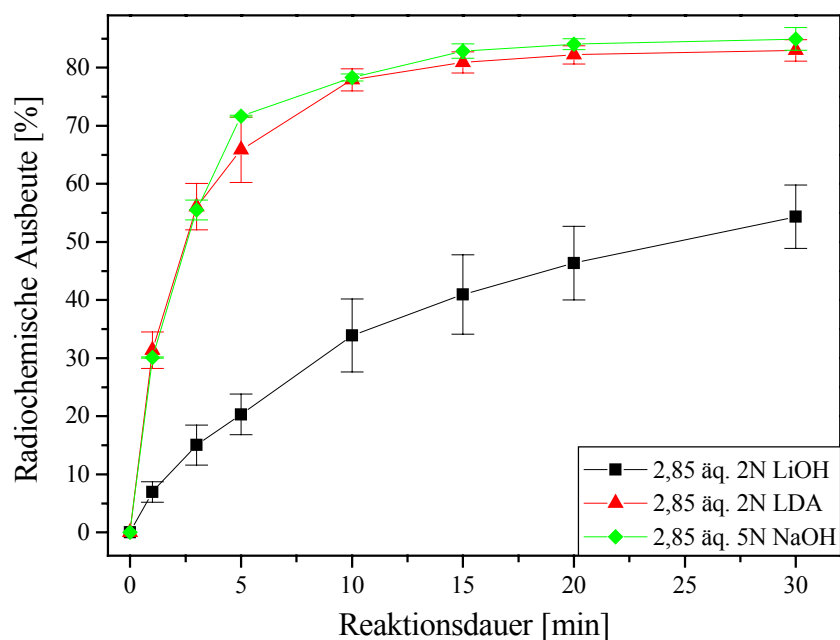


Abbildung 100: Abhängigkeit der RCA $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC5}$ von der zugesetzten Hilfsbase ($6,3 \mu\text{mol/ml}$ MV-tADTC5; DMSO; $100 \text{ }^\circ\text{C}$)

Die Eignung der Hilfsbasen entsprach hierbei den Ergebnissen aus der ^{18}F -Markierung von MV-ADTC4: Die höchste radiochemische Ausbeute wurde mit 5N NaOH- (85%) und 2N LDA-Lösung (83%) erzielt, gefolgt von 2N-LiOH-Lösung (54%).

4.5.1.3 Abhängigkeit der RCA von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC5}$ von der Markierungsvorläuferkonzentration

Auch in diesem Fall wurde die Eduktsättigungskonzentration untersucht, wobei die Konzentration des Markierungsvorläufers über einen Bereich von $2,1 - 10,5 \mu\text{mol/ml}$ variiert wurde (Abb. 101). Während eine Erniedrigung der Markierungsvorläuferkonzentration auf $2,1 - 4,2 \mu\text{mol/ml}$ auch eine deutliche Erniedrigung der RCA nach sich zog, führte eine Erhöhung der Konzentration auf $10,5 \mu\text{mol/ml}$ zu den gleichen radiochemischen Ausbeuten wie bei den in vorhergehenden Untersuchungen verwendeten Konzentrationen von $6,3 \mu\text{mol/ml}$. Daher ist die Markierungsvorläuferkonzentration von $6,3 \mu\text{mol/ml}$ als Eduktsättigungskonzentration anzusehen.

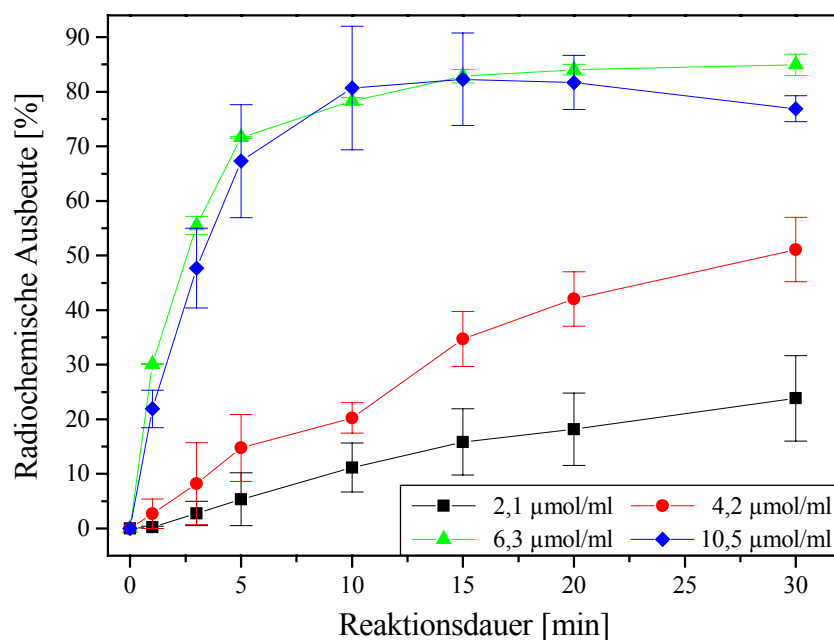


Abbildung 101: Abhängigkeit der RCA an t[¹⁸F]ADTC5 von der Markierungsvorläuferkonzentration (2,85 äq. 5N NaOH; DMSO; 100 °C)

4.6 Optimierte Reaktionsbedingungen der ¹⁸F-Markierungsreaktionen

Nach Optimierung der untersuchten ¹⁸F-Markierungen ergaben sich für die Synthese der Liganden folgende Reaktionsbedingungen:

Tabelle 11: Optimierte Reaktionsbedingungen der untersuchten ¹⁸F-Markierungen

Produkt	Reaktionsbedingungen	RCA
Methyl-t[¹⁸ F]ADTC1	12,9 µmol/ml Methyl-MV-tADTC1; DMSO; 140 °C; 30 min	~ 60 %
Methyl-c[¹⁸ F]ADTC1	12,9 µmol/ml Methyl-MV-tADTC1; DMSO; 140 °C; 30 min	~ 60 %
Methyl-t[¹⁸ F]ADTC3	12,2 µmol/ml Methyl-MV-tADTC3; DMSO; 160 °C; 20 min	~ 20 %
t[¹⁸ F]ADTC4	7,5 µmol/ml MV-tADTC4; DMSO; 100 °C; 1,9 äq 5N NaOH; 15 min	~ 95 %
Methyl-t[¹⁸ F]ADTC4	9,7 µmol/ml DMV-tADTC4; DMF; 140 °C; 30 min	~ 25 %
t[¹⁸ F]ADTC5	6,3 µmol/ml MV-tADTC5; DMSO; 100 °C; 2,85 äq. 5N NaOH; 15 min	~ 85 %

5 Bestimmung der Lipophilie

Im Rahmen dieser Untersuchung sollte eine erste Abschätzung der Eignung der Referenzverbindungen als PET-Liganden vorgenommen werden. Ein wichtiges Kriterium ist die Fähigkeit der Referenzsubstanzen, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, um zu ihrem Wirkungsort zu gelangen.

Im Allgemeinen müssen Substanzen durch passiven Transport oder Diffusion biologische Lipidmembranen durchqueren, um in das Gehirn zu gelangen. Die Effizienz dieses Transportsprozesses wird 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 von den Lipidmembranen absorbiert und gelangen ebenfalls nicht zu ihrem Wirkungsort. Daher ist die Kenntnis der Lipophilie eines Moleküls ein wichtiger Hinweis, um seine Fähigkeit zur Passage der Blut-Hirn-Schranke abschätzen zu können.

Die experimentelle Bestimmung der Lipophilie einer Verbindung erfolgt durch Bestimmung ihres $\log P$. Es handelt sich hierbei um den Logarithmus des Verteilungskoeffizienten (engl.: **p**artition coefficient) der Verbindung in einem Octanol/Wasser-System.

Für die Definition des $\log P$ gilt:

$$\log P = \log \frac{[\text{Molekül}]_{\text{Octanol}}}{[\text{Molekül}]_{\text{Wasser}}} \quad (6)$$

Bei $[\text{Molekül}]$ handelt es sich im Falle saurer oder basischer Verbindungen um die Konzentration einer Spezies des Moleküls. Daher wird zum besseren Verständnis oft die Bezeichnung $\log P_n$ für die Lipophilie des ungeladenen Moleküls und $\log P_i$ für die Lipophilie einer geladenen Spezies verwendet.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die optimale Lipophilie für eine gute Hirngängigkeit bei einem $\log P \sim 2$ liegt [175, 176]. Da für die Hirngängigkeit einer Verbindung insbesondere die Lipophilie bei einem pH-Wert von 7,4 von hohem Interesse ist und die zu untersuchenden Referenzverbindungen in diesem pH-Bereich in mehreren Ladungszuständen vorliegen können, wurde anstatt des $\log P$ der $\log D$ bei einem pH-Wert von 7,4 bestimmt. Der $\log D$ (engl.: **d**istribution coefficient) stellt im Gegensatz zum $\log P$ nicht den Logarithmus des Verteilungskoeffizienten über eine Molekülspezies dar, sondern über alle vorkommenden Spezies. Da der $\log D$ bei ionisierbaren Molekülen stark vom pH abhängig ist und das Vorkommen mehrerer Ladungszustände bei einem pH-Wert berücksichtigt, stellt er im Falle der zu untersuchenden Referenzsubstanzen einen wesentlich aussagekräftigeren Wert dar, als der für diese Substanzen nur rechnerisch zu bestimmende $\log P$.

Für die Definition des $\log D$ gilt:

$$\log D = \log \frac{\sum_1^N [\text{Molekül}]_{\text{Octanol}}^x}{\sum_1^N [\text{Molekül}]_{\text{Wasser}}^x} \quad \text{mit } x = \text{Ladung und } N = \text{Anzahl der Spezies} \quad (7)$$

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die Lipophilie der Referenzsubstanzen mit Hilfe von drei Verfahren untersucht: Der HPLC-Methode, der Titrationsmethode und der Scheidetrichter-Methode.

5.1 Bestimmung der Lipophilie mittels der HPLC-Methode

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

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad \text{mit } t_r = \text{Retentionszeit und } t_0 = \text{Totzeit} \quad (8)$$

Zur praktischen Durchführung wurden von Substanzen mit bekanntem $\log P$ die Retentionszeiten ermittelt und unter Verwendung einer sehr hydrophilen Substanz zur Bestimmung von t_0 die Kapazitäten bestimmt. Durch Auftragung des $\log k$ gegen $\log P$ und anschließender linearer Regression lässt sich eine Kalibriergerade erstellen.

Die Untersuchung der Lipophilien der Referenzverbindungen erfolgte mit dem in Abschnitt 6.1 beschriebenen HPLC-System, einer analytischen RP-Säule (LiChrospher RP18-EC, 5 μm , 250 \times 4,6 mm) und Sörensen-Puffer (pH 7,4) als Eluens. Zur Bestimmung der Retentionszeiten sämtlicher Substanzen wurde ein aus 3 Einzelmessungen gemittelter Wert verwendet. Da zur Eichung nur Substanzen verwendet wurden, die bei pH 7,4 undissoziiert vorlagen, gilt: $\log P = \log D_{7,4}$.

Durch Verwendung von Phenol, Benzol, Anisol, Toluol und Brombenzol als Eichsubstanzen und Ascorbinsäure zur Bestimmung der Totzeit ergaben sich die in Tabelle 12 zusammengefassten Kapazitäten:

Tabelle 12: Verwendete Eichsubstanzen zur Bestimmung der Kalibriergeraden

Eichsubstanz	$\log P$	t_r [min]	$\log k$
Ascorbinsäure	-2,77	1,67	—
Phenol	1,46	2,38	-0,3696
Benzol	2,10	3,72	0,0905
Anisol	2,10	3,96	0,1387
Toluol	2,70	5,77	0,3901
Brombenzol	3,00	6,94	0,4994

Die lineare Regression ergab:

$$\log P = 1,809 \cdot \log k + 2,001 \quad r = 0,982 \quad (9)$$

Durch Bestimmung der Retentionszeiten der Referenzsubstanzen ließen sich mit Hilfe der Kalibriergeraden die Lipophilien der Liganden ermitteln (Tab. 13).

Tabelle 13: Ermittelte Lipophilien der Referenzverbindungen nach der HPLC-Methode

Referenzverbindung	t_r [min]	k	logD
tADTC1	2,33	-0,4032	1,27
cADTC1	2,32	-0,4098	1,26
tADTC2	2,32	-0,4098	1,26
tADTC3	2,16	-0,5325	1,04
tADTC4	2,34	-0,3966	1,28
tADTC5	1,70	-1,7456	-1,16

5.2 Bestimmung der Lipophilie mittels Titration

Basierend auf den Arbeiten von Dyrssen et al. [177-179] und Rydberg [180] wurde ein Verfahren entwickelt, die Lipophilie ionisierbarer Moleküle durch Titration zu bestimmen. Diese Vorgehensweise wird durch eine Beziehung zwischen der Lipophilie und dem pK-Wert einer Substanz ermöglicht, die am Beispiel einer einprotonigen, schwachen Säure aufgezeigt werden soll. Titriert man diese schwache Säure von einem niedrigen zu einem hohen pH-Wert, gibt dann ein der wässrigen Phase äquivalentes Volumen Octanol hinzu und titriert dieses Zweiphasensystem wieder auf den niedrigen pH-Wert zurück, so unterscheiden sich die beiden Titrationskurven am deutlichsten im Pufferbereich der Säure, falls die protonierte Säure in Octanol löslich ist. Abbildung 102 zeigt diesen Sachverhalt, wobei die Anzahl der pro Säuremolekül gebundenen Protonen gegen den pH-Wert aufgetragen wurde (Bjerrum-Differenz-Auftragung).

Man erhält für beide Titrations unterschiedliche pK_a-Werte für die Säure, den pK_a-Wert im wässrigen System und einen „scheinbaren“ pK-Wert, genannt p₀K_a, für die Titration im Zweiphasensystem. Die Differenz zwischen beiden Werten ist ein Maß für die Lipophilie der Säure, denn je höher diese Differenz, desto lipophiler ist die Verbindung.

Für den Verteilungskoeffizienten dieser Säure gilt:

$$P_{\text{HA}} = \frac{[\text{HA}]_{\text{Octanol}}}{[\text{HA}]_{\text{Wasser}}} \quad \text{mit } [\text{HA}] = \text{Konzentration der Säure} \quad (10)$$

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

$$P_{\text{HA}} = (10^{(p_0K_a - pK_a)} - 1)/r \quad \text{mit } r = \frac{\text{Volumen organische Phase}}{\text{Volumen wässrige Phase}} \quad (11)$$

Somit lässt sich durch Titration einer Verbindung im wässrigen und anschließend in einem Zweiphasensystem Octanol/Wasser die Lipophilie der Verbindung ermitteln.

Analoge Beziehungen gelten auch für Basen und mehrfach ionisierbare Substanzen. Dabei gilt, dass der p₀K_a-Wert einer Säure stets höher und der p₀K_a-Wert einer Base stets niedriger ist als der pK_a-Wert. Es kommt also im Zweiphasensystem zu einer Verminderung der sauren bzw. basischen Eigenschaften der Verbindung.

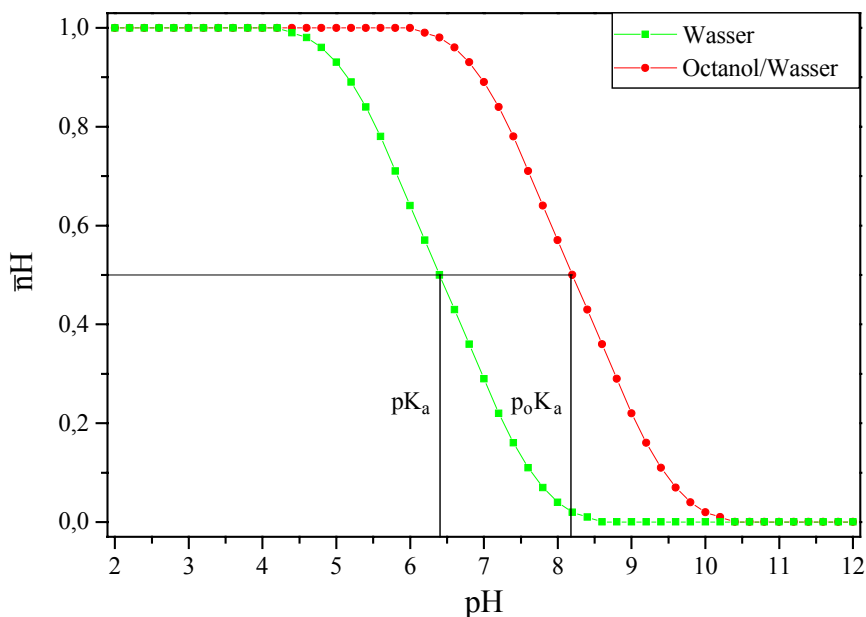


Abbildung 102: Differenzkurve einer schwachen Säure in Wasser und in einem Octanol/Wasser-System

Da die untersuchten Referenzsubstanzen eine schlechte Löslichkeit in Wasser besaßen, musste die Bestimmung ihrer pK_a -Werte in einem DMSO/Wasser-System durchgeführt werden. Dadurch handelt es sich bei den so bestimmten pK -Werten ebenfalls um „scheinbare“ pK -Werte, genannt p_sK_a . Um aus diesen p_sK_a -Werten die pK -Werte der Substanz zu ermitteln, wurde ein in der Literatur beschriebenes Verfahren verwendet [181]. Nach Yasuda [182] und Shedlovsky [183] gilt für Lösungsmittelsysteme mit einer Dielektrizitätskonstanten $\epsilon > 50$ folgende annähernd lineare Beziehung:

$$p_sK_a + \log[H_2O] = \frac{A}{\epsilon} + B \quad (12)$$

Bei Kenntnis der p_sK_a -Werte in verschiedenen Lösungsmittelgemischen lässt sich durch Auftragung von $(p_sK_a + \log [H_2O])$ gegen $1/\epsilon$ der pK_a -Wert in reinem Wasser extrapolieren, wobei A die Steigung der Geraden und B den Ordinatenabschnitt darstellt (Yasuda-Shedlovsky-Auftragung).

Die nun folgenden Untersuchungen wurden mit Hilfe der Titrationsapparatur PCA 200 der Fa. Sirius Analytical Instruments Ltd. und des zugehörigen Softwarepakets Refine 200 und Control 200, ebenfalls Fa. Sirius Analytical Instruments Ltd. durchgeführt.

Dazu wurde eine ca. 1 mM Lösung der Referenzsubstanz bei 3 verschiedenen Konzentrationen an Cosolvens (DMSO, $w \sim 20, 30$ und 40%) über einen pH-Bereich von 2 – 11 titriert, um die entsprechenden p_sK_a -Werte zu ermitteln. Mit Hilfe einer Yasuda-Shedlovsky-Auftragung wurden dann aus den p_sK_a -Werten die korrespondierenden pK_a -Werte bestimmt (Abb. 103). Bei dieser und den folgenden Abbildungen sind beispielhaft die Untersuchungsergebnisse von tADTC3 dargestellt, wobei die Vorgehensweise bei den anderen Referenzverbindungen entsprechend war.

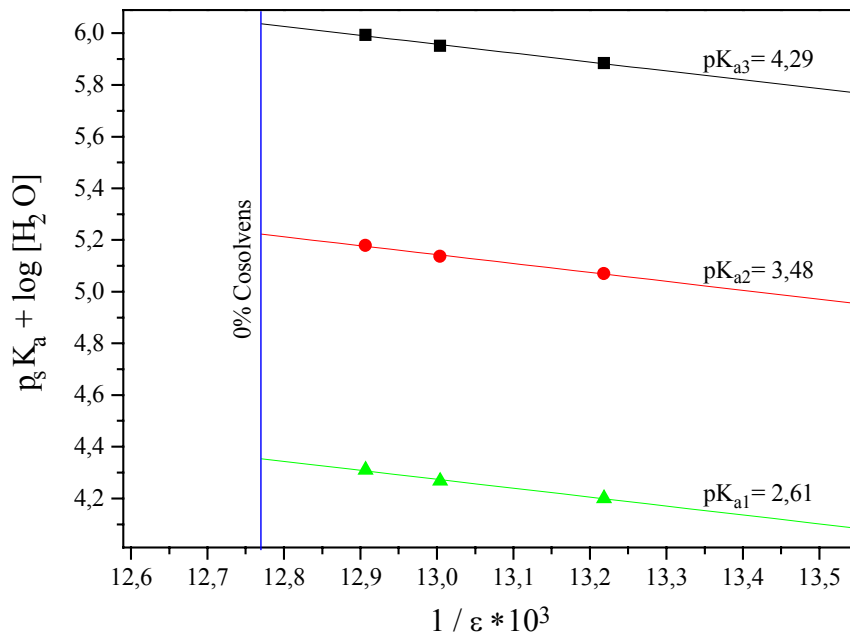


Abbildung 103: Yasuda-Shedlovsky-Auftragung von tADTC3

Anschließend wurden die Titrationskurven in einer Bjerrum-Differenz-Auftragung dargestellt und rechnerisch eine gemittelte Differenzkurve bestimmt (Abb. 104).

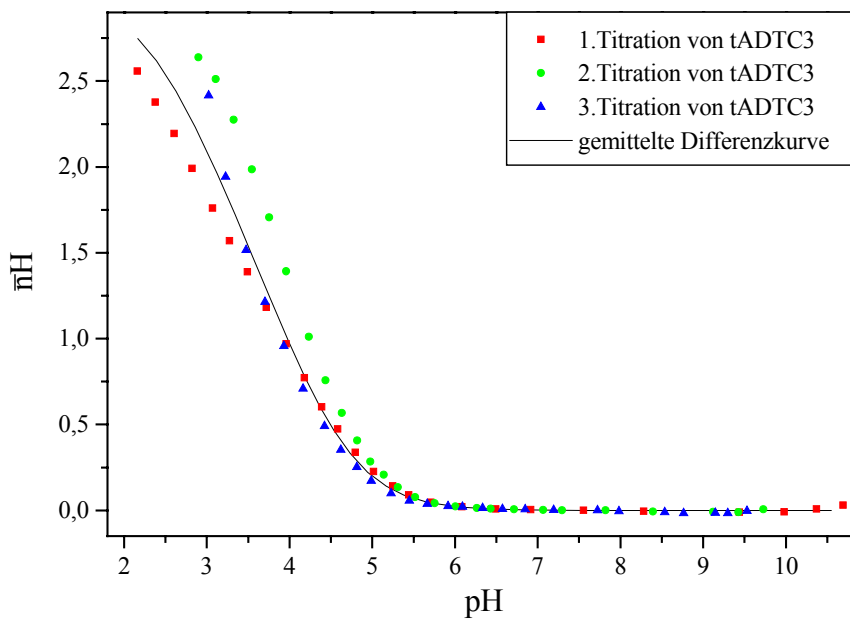


Abbildung 104: Bjerrum-Differenz-Auftragung der, auf den pK_a -Wert extrapolierten, Titrationskurven von tADTC3

Aus dieser Differenzkurve lassen sich die Verteilungen der Molekülspezies in Abhängigkeit vom pH-Wert berechnen, mit denen man erste Aussagen über das Lipophilieprofil der Verbindung machen kann (Abb. 105).

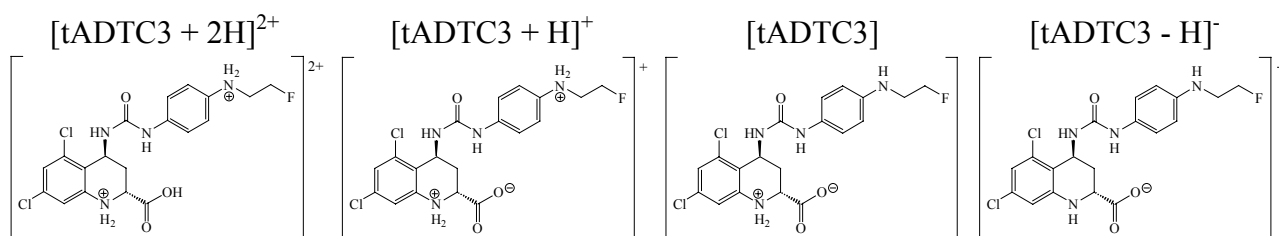
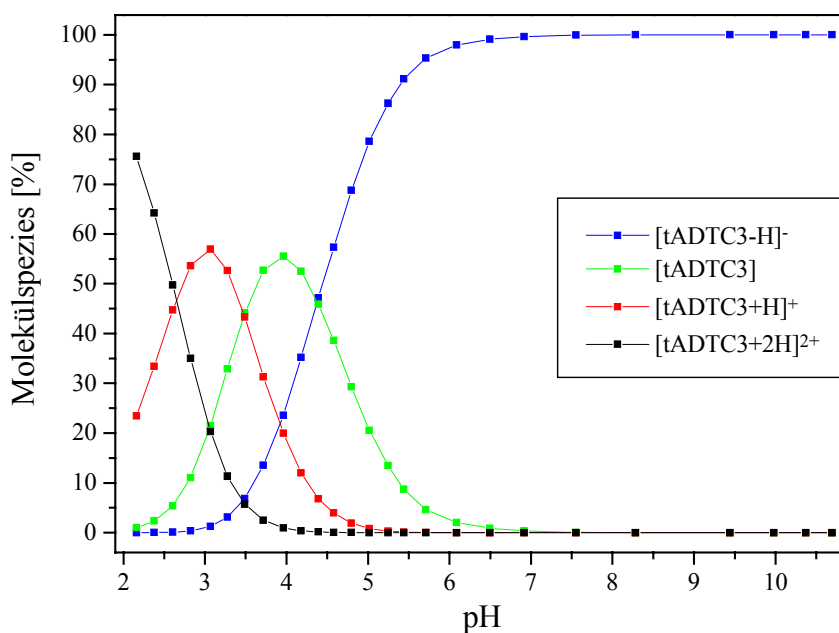


Abbildung 105: Verteilung der Molekülspezies von tADTC3 in Abhängigkeit vom pH-Wert

Da das Zwitterion [tADTC3] die geringste Ladungsdichte und somit die höchste Lipophilie besitzt, muss das Lipophilieprofil unter Berücksichtigung der Verschiebung der p_oK_a -Werte von tADTC3 ein Maximum bei einem pH-Wert von über 3,9 haben.

Durch die Untersuchung der Referenzverbindungen ergaben sich die in Tabelle 14 zusammengefassten pK_a -Werte:

Tabelle 14: pK_a -Werte der Referenzverbindungen nach der Titrationsmethode

Referenzsubstanz	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a4}
tADTC1	1,83	2,31	4,42	6,42
cADTC1	1,91	2,28	4,85	6,30
tADTC2	1,60	2,59	4,14	7,61
tADTC3	2,61	3,48	4,29	—
tADTC4	2,58	4,19	—	—
tADTC5	2,34	4,00	5,50	—

In Analogie zur Ermittlung der p_sK_a -Werte wurde auch bei der Lipophilieuntersuchung eine ca. 1 mM Lösung der Referenzsubstanz bei 3 verschiedenen Volumina an Octanol ($V_{\text{Octanol}}/V_{\text{Wasser}} \sim 1,45, 0,33$ und $0,08$) über einen pH-Bereich von 2 – 11 titriert.

Damit mit diesem Verfahren korrekte Messergebnisse erzielt werden, sollte die Testsubstanz während der gesamten Titration gelöst bleiben. Im Falle der Referenzverbindungen tADTC1, cADTC1 und tADTC2 löste sich die Substanz zwar bei den anfänglich sauren pH-Werten, mit der Annäherung des pH-Wertes an den zwitterionischen Zustand der Verbindungen trübte sich jedoch die Lösung und die Substanz fiel aus. Eine Unterbrechung der Titration zeigte nach der Phasentrennung, dass die Substanzen in der organischen Phase suspendiert waren. Daher war eine sinnvolle Auswertung der Titrationskurven dieser Verbindungen nicht mehr möglich. Versuche, Dichlorethan als organische Phase einzusetzen, blieben ebenfalls erfolglos. Bei den Verbindungen tADTC3 und tADTC5 war ebenfalls eine leichte Trübung der Lösung festzustellen, jedoch war der Anteil der ausgefallenen Substanz wesentlich geringer, so dass in diesen Fällen eine Auswertung möglich war. Durch die Auswertung der Titrationskurven von tADTC3 – 5 wurden die in Abbildung 106 dargestellten Lipophilieprofile erhalten:

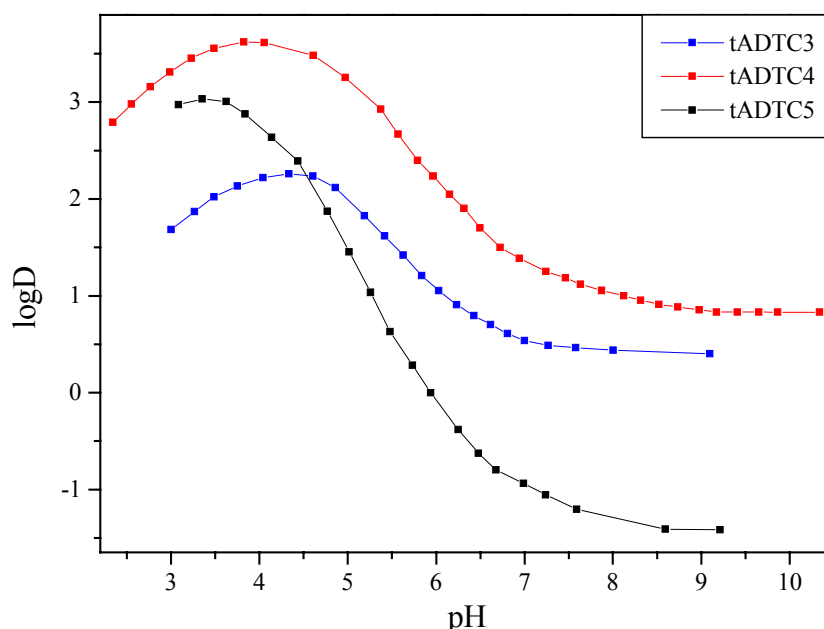


Abbildung 106: Lipophilieprofile von tADTC3 - 5

Wie anhand von Abbildung 106 zu erkennen ist, besitzen die Referenzverbindungen (bedingt durch ihre pK-Werte) ihre höchste Lipophilie im sauren pH-Bereich; bei höheren pH-Werten wird sie durch die Bildung von Anionen, insbesondere bei tADTC5 (da sich hier auch ein zweiwertiges Anion bildet), stark erniedrigt.

Für die Referenzverbindungen tADTC3 – 5 ergaben sich folgende logP- und logD_{7,4}-Werte (Tab. 15):

Tabelle 15: Aus Abb. 106 ermittelte logP- und logD_{7,4}-Werte von tADTC3 – 5 nach der Titrationsmethode

Referenzverbindung	tADTC3	tADTC4	tADTC5
logD _{7,4}	0,47	1,18	-1,15
logP _n	2,25	3,84	3,36

5.3 Bestimmung der Lipophilie mittels der Scheidetrichter-Methode

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

Da durch Voruntersuchungen, für die *in vivo*-Testung von Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1 und $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1, die n.c.a. ^{18}F -markierten und gereinigten Substanzen zur Verfügung standen, wurden die Lipophilien der beiden Verbindungen mit Hilfe dieses Verfahrens bestimmt. Hierzu wurden Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1 und $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1 durch das in Abschnitt 6.3.4.1 beschriebene Verfahren hergestellt und isoliert. Die gereinigten Verbindungen wurden jeweils in 16 verschiedene Zweiphasensysteme aus 150 μl Octanol und 1,5 ml Phosphatpuffer bzw. Phosphat/Natriumhydroxid-Puffer überführt, wobei der pH-Wert der Puffer über einen Bereich von 5 - 12,6 variiert wurde. Die Lösungen wurden 3 Minuten bei Raumtemperatur durchmischt und die Phasen durch Zentrifugation voneinander getrennt. Anschließend wurde aus jeder Phase ein Aliquot von 3 μl entnommen und dessen Radioaktivität mittels Radio-DC bestimmt. In Abbildung 107 sind die gemittelten Ergebnisse aus jeweils 3 Messreihen dargestellt.

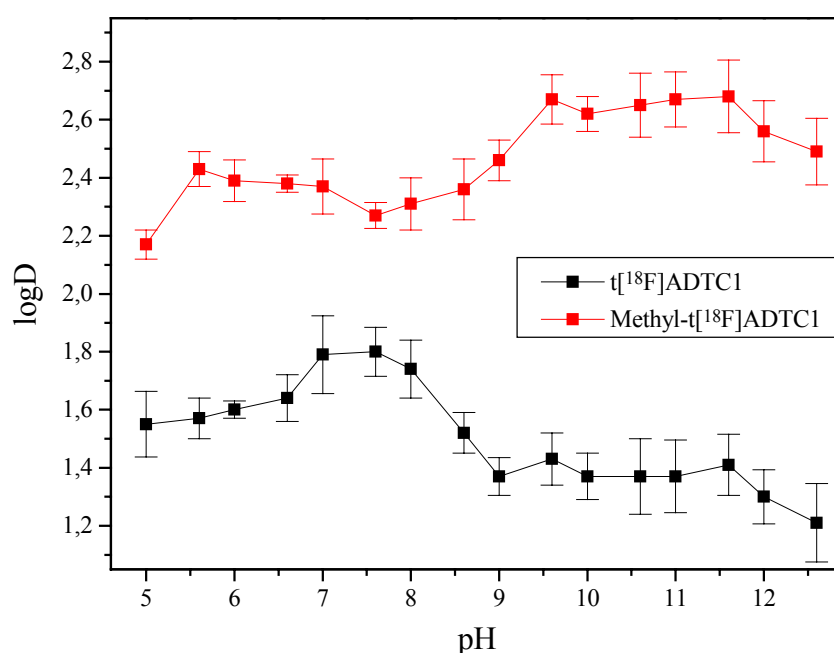


Abbildung 107: Lipophilie von Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1 und $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1 in Abhängigkeit vom pH nach der Scheidetrichtermethode

Das so ermittelte Lipophilieprofil besitzt unter Berücksichtigung der in Abschnitt 5.2 ermittelten pK_a -Werte den erwarteten Verlauf. Bei Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1 wurde ein mit dem pH-Wert steigender logD erwartet, dessen Maximum bei einem pH-Wert über 6,5 zu finden sein sollte. Ab diesem pH-Wert sollte Methyl- $t[^{18}\text{F}]$ ADTC1 nämlich als komplett deprotoniertes, neutrales Molekül vorliegen und somit seine höchste Lipophilie besitzen. Das Abfallen der Lipophilie bei sehr hohen pH-Werten ist sehr wahrscheinlich auf eine Verseifung des Esters zurückzuführen, welche ein Absinken der Lipophilie zur Folge hat.

Bei $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$ dagegen war eine anfänglich mit dem pH-Wert steigende Lipophilie zu erwarten, die ihr Maximum bei einem pH-Wert haben sollte, an dem das Molekül hauptsächlich als Zwitterion vorliegt, um sich dann mit weiter steigenden pH wieder zu verringern. Genau dieser Verlauf der Kurve findet sich in der Abbildung wieder.

Für den physiologischen wichtigen pH-Wert von 7.4 ergaben sich aus der Untersuchung folgende

logD-Werte: Methyl- $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$: $\log D_{7,4} = 2,3$
 $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$: $\log D_{7,4} = 1,8$

5.4 Vergleich der Methoden und Ergebnisse zur Bestimmung der Lipophilie der Referenzverbindungen

In Abhängigkeit von der verwendeten Untersuchungsmethode ergaben sich folgende logD-Werte:

Tabelle 16: Ermittelte Lipophilien der Referenzverbindungen

Referenzverbindung	$\log D_{7,4}$ (HPLC)	$\log D_{7,4}$ (Titration)	$\log D_{7,4}$ (Scheidetrichter)
tADTC1	1,27	—	1,80
Methyl-tADTC1	—	—	2,30
cADTC1	1,26	—	—
tADTC2	1,26	—	—
tADTC3	1,04	0,47	—
tADTC4	1,28	1,18	—
tADTC5	-1,16	-1,15	—

Aus Untersuchungen ist bekannt, dass sich die mit HPLC- und Scheidetrichtermethode ermittelten Werte normalerweise um bis zu $\pm 0,5$ Einheiten unterscheiden [184]. Wie anhand von Tabelle 16 zu sehen, liefern die verschiedenen Methoden unter Berücksichtigung dieser Tatsache vergleichbare Werte, soweit diese begrenzte Untersuchung eine Vergleichbarkeit der Methoden zulässt.

Während die HPLC-Methode dabei eine schnelle Bestimmung mehrerer Lipophilien ermöglicht, sind jedoch auch deren Nachteile zu erwähnen. Da diese Methode auf der Erstellung einer Kalibriergeraden mittels literaturbekannter Eichsubstanzen beruht, sind hier systematische Fehler durch andere Untersuchungsbedingungen bei den Eichsubstanzen möglich. So sollten Anisol und Benzol jeweils einen logP von 2,1 besitzen, zeigten jedoch bei dieser Untersuchung unterschiedliche Kapazitäten k . Außerdem werden bei dieser Methode falsche Lipophilien ermittelt, falls die Testsubstanz intramolekulare Wasserstoffbrücken ausbildet. Dadurch kann sich der logP bzw. logD um 0,6 – 1,0 Einheiten verschieben.

Im Vergleich dazu ist die Titrationsmethode zwar wesentlich aufwendiger, liefert jedoch auch wesentlich mehr Informationen über die Testsubstanz. So werden hier parallel die pK_a -Werte der Substanz bestimmt, welche weitere Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Verbindung wie z. B. die

Nukleophilie der ionisierten Funktion zulassen. Außerdem wird die Lipophilie nicht punktuell bei einem pH-Wert ermittelt, sondern ein gesamtes Lipophilieprofil erstellt. Allerdings ist bei diesem System zu berücksichtigen, dass bei der Bestimmung der Lipophilie die Substanz eine ausreichende Löslichkeit sowohl in der wässrigen, als auch in der organischen Phase besitzen muss, da es ansonsten zu einer Ausfällung der Substanz kommt und somit eine sinnvolle Auswertung der Titrationskurven nicht mehr möglich ist.

Bei der Scheidetrichtermethode wurde dieses makroskopische Löslichkeitsproblem durch die Verwendung ^{18}F -markierter Referenzverbindungen vermieden. Allerdings wurde, um eine ausreichende Stabilität des pH-Wertes zu gewährleisten, ein ca. 0,07 – 0,09 M Puffersystem verwendet, welches unter Umständen zu einer Überschätzung des logD führt. Aus der Literatur sind Untersuchungen bekannt, dass sich die Lipophilie geladener Molekülspezies durch Salze drastisch erhöhen kann [185, 186]. Hierbei kommt es zur Ausbildung eines Komplexes zwischen einer geladenen Molekülspezies der Testsubstanz und dem Kation oder Anion des Salzes, der dann eine deutlich höhere Lipophilie als die ursprüngliche Molekülspezies besitzen kann. In der Literatur wurden dabei Änderungen des logD um mehr als eine Einheit beobachtet. Dieser Effekt könnte eine Erklärung für die höheren logD-Werte von tADTC1 bei der Scheidetrichtermethode erklären.

Aufgrund der Ergebnisse sollten die Referenzverbindungen c/tADTC1, tADTC2 und tADTC4 die besten in vivo-Aktivitäten aufweisen, gefolgt von tADTC3. Die Referenzverbindung tADTC5 dagegen besitzt bei einem pH von 7,4 eher hydrophile Eigenschaften und ist daher für eine Verwendung als hirngängiger Ligand wahrscheinlich ungeeignet.

Allerdings stellte sich bei einer ersten in vivo-Testung von tADTC1 (Abschnitt 8.2) heraus, dass der Ligand trotz einer ausreichenden Lipophilie nur eine sehr geringe Hirnaufnahme zeigte. Dieses Ergebnis lässt sich durch die nicht immer gegebene Korrelation zwischen hoher Lipophilie und guter Hirnaufnahme erklären. Daher wurde von Testa et al. eine alternative Variable $\Delta\log P$ vorgeschlagen, welche die Hirnaufnahme besser beschreiben soll [187, 188]:

$$\Delta\log P = \log P_{\text{Octanol/Wasser}} - \log P_{\text{Alkan/Wasser}} \quad (13)$$

Da in $\Delta\log P$ Informationen über die Fähigkeit einer Verbindung, Wasserstoffbrücken auszubilden, enthalten sind, sollten Substanzen mit einem hohen logP (hohe Lipophilie) und einem niedrigen $\Delta\log P$ (geringe Fähigkeit zur Ausbildung von H-Brücken) eine gute Hirnaufnahme besitzen. Diese Annahme beruht darauf, dass Moleküle zum Durchqueren der Blut-Hirn-Schranke ihre H-Brücken auf die hydrophilen Teile der Lipidmembran übertragen müssen und diese daher umso leichter passieren können, je weniger H-Brücken sie ausgebildet haben.

Daher sollten insbesondere tADTC4, aber auch tADTC3 höhere in vivo-Aktivitäten als tADTC1 besitzen, da ihre Substituenten in 4-Position gegenüber dem Phenylpiperazinrest von tADTC1 eine geringere Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken besitzen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Fluka, Lancaster, Merck und Riedel-de-Haen bezogen. Falls erforderlich wurden die Lösungsmittel nach Standardmethoden gereinigt, getrocknet [189, 190] oder über Molekularsieb gelagert. Die wichtigsten verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 17 aufgeführt. Nicht aufgeführte Lösungsmittel und Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad „zur Synthese“ von der Firma Merck bezogen.

Tabelle 17: Bezugsquelle und Reinheitsgrad der wichtigsten Chemikalien

Chemikalie	Qualität/Gehalt	Lieferant
Acetonitril	zur DNA-Synthese	Merck
Acetanhydrid	reinst/>98%	Merck
Acrylsäurechlorid	zur Synthese/>96%	Merck
1,2-Bromfluorethan	—/97%	Lancaster
Benzylalkohol	zur Analyse/>99.5%	Merck
Bis(2-chlorethyl)amin-hydrochlorid	—/>98%	Lancaster
Bortrifluorid-Etherkomplex	zur Synthese/~50%	Merck
2-Bromethanol	zur Synthese/>97%	Merck
1,1'-Carbonyldiimidazol	zur Synthese/>98%	Merck
Chlorwasserstoff (1N in Diethylether)	—/1N	Aldrich
Diazabicyclo[2.2.2]octan	zur Synthese/98%	Merck
1,2-Dibromethan	zur Synthese/>99%	Merck
3,5-Dichlor-anilin	purum/>97%	Fluka
Dichlorethan (absolut, über Molekularsieb)	puriss/>99.5%	Fluka
Dichlormethan (absolut, über Molekularsieb)	puriss/>99.5%	Fluka
Dimethoxyessigsäure-methylester	purum/~97%	Fluka
Dimethylformamid (absolut, über Molekularsieb)	puriss/>99.5%	Fluka
Dimethylsulfoxid (absolut, über Molekularsieb)	puriss/>99.5%	Fluka
Ethylen-ditosylat	purum/~98%	Fluka
N-Ethyldiisopropylamin	zur Synthese/>97%	Merck
(9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat	zur Synthese/>99%	Merck
Glyoxalsäure-Monohydrat	zur Synthese/>97%	Merck
Hydrochinon	zur Synthese/>99,5%	Merck

Chemikalie	Qualität/Gehalt	Lieferant
Iodmethan	zur Synthese/>99%	Merck
Iodtrimethylsilan	zur Synthese/>95%	Merck
Kaliumcarbonat (wasserfrei)	p.p.a./>99%	Fluka
Kaliumfluorid	p.p.a./>99%	Fluka
Kaliummethylat	zur Synthese/>97%	Merck
Kryptofix [®] 2.2.2	zur Synthese/>99%	Merck
Natriumazid	reinst/>99%	Merck
Natriumhydrid (60 %ige Suspension in Paraffinöl)	zur Synthese/~60%	Merck
Natriumiodid	zur Analyse/>99,5%	Merck
Natriummethylat	zur Synthese/~97%	Merck
4-Nitroanilin	zur Synthese/>98%	Merck
4-Nitrophenol	zur Synthese/>99%	Merck
N-(4-Nitrophenyl)-piperazin	—/>97%	Aldrich
Palladium (10% auf Aktivkohle)	zur Synthese/~10%	Merck
Phosphorpentoxid	zur Analyse/>98%	Merck
Sulfanilamid	zur Analyse/>99%	Merck
Tetrahydrofuran (absolut, über Molekularsieb)	puriss/>99.5%	Fluka
Toluol (absolut, über Molekularsieb)	puriss/>99.5%	Fluka
Toluol-4-sulfonylchlorid	zur Synthese/>98%	Merck
Triphosgen (Bis(trichlormethyl)-carbonat)	zur Synthese/>96%	Merck
Zinn(II)-chlorid-Dihydrat	zur Analyse/>98%	Merck

Für die dünnschichtchromatographischen Analysen (DC) wurden die kieselgelbeschichteten Aluminiumfolien 60 F₂₅₄ der Firma Merck benutzt. Die Detektion der Chromatographiezonen erfolgte durch Frequenzlöschung bei 254 nm. Die Säulenchromatographie wurde mit dem Kieselgel der Firma Fluka (Kieselgel 60) durchgeführt, der verwendete Sand stammte von der Firma Merck.

Zur Charakterisierung der einzelnen Zwischenstufen, Referenzverbindungen sowie der Markierungsvorläufer dienten die ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie die Massenspektrometrie. Von einigen Verbindungen wurde der Schmelzpunkt bestimmt.

Folgende Geräte wurden verwendet:

^1H -NMR-Spektroskopie: 200-MHz-FT-NMR-Spektrometer AC 200 der Firma Bruker, 300-MHz-FT-NMR-Spektrometer AC 300 der Firma Bruker, 400-MHz-FT-NMR-Spektrometer AM 400 der Firma Bruker, 400-MHz-FT-NMR-Spektrometer ARX 400 der Firma Bruker (Als Lösungsmittel standen Chloroform- d_1 , Methanol- d_4 und Dimethylsulfoxid- d_6 zur Verfügung).

Massenspektrometrie: MAT90-Spektrometer für FD-Spektren der Firma Finnigan.

Schmelzpunktbestimmung: Elektrothermaler digitaler Schmelzpunktbestimmer A9100 der Firma Kleinfeld GmbH

Radio-Dünnschichtchromatographie: Instant Imager der Fa. Packard Canberra

Radio-HPLC-System: HPLC-System der Fa. Sykam bestehend aus einer Pumpe S1121, einem UV-Detektor S3200 und einem Hochdruck-Injektionsventil S5111. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte mit einem NaI-Szintillationsdetektor M 2720.20 (Mess-elektronik Dresden GmbH). Zur Auswertung und Integration der UV- und Aktivitätssignale wurde das Axxiom Chromatographie Datensystem Pyramid (Sykam GmbH) verwendet.

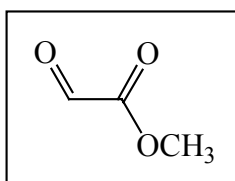
HPLC-System: HPLC-System der Fa. Sykam bestehend aus einer Pumpe S1100, einem UV-Detektor S3200 und einem Hochdruck-Injektionsventil S9010. Zur Auswertung und Integration der UV-Signale wurde das Axxiom Chromatographie Datensystem Pyramid (Sykam GmbH) verwendet.

6.2 Synthese der Referenzverbindungen und Markierungsvorläufer

Die Namen der synthetisierten Verbindungen wurden mit dem Programm „AutoNom 2.1“ (Beilstein Institut für Literatur der Organischen Chemie, Frankfurt/Main) bestimmt und direkt ins Deutsche übersetzt.

6.2.1 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester

6.2.1.1 Glyoxalsäuremethylester (1)



25,7 g (0,19 mol) Dimethoxyessigsäure-methylester, 17,1 g (0,19 mol) Glyoxalsäure-monohydrat und 130 mg p-Toluensulfonsäure-monohydrat wurden 18 Stunden bei 80 °C gerührt. Der resultierende Sirup wurde mit einer Eis-Methanol-Mischung gekühlt, portionsweise mit 19,6 g Phosphor-pentoxid behandelt und weitere 4 Stunden bei 80 °C gerührt. Eine anschließende Vakuumdestillation lieferte 27,3 g (83% d. Th.) einer zitronengelben Flüssigkeit, die beim Stehen an der Luft farblos wurde.

Charakterisierung:

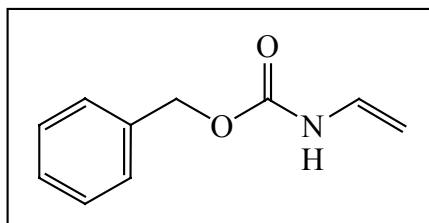
Summenformel: C₃H₄O₃ (MG: 88,06)

Gelbe Flüssigkeit

Kp.: 49-54 °C (35 mbar)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 9.37 (s, 1H, CH), 3.90 (s, 3H, OCH₃)

6.2.1.2 N-Benzyloxycarbonyl-N-vinylamin (2)



65 g (1 mol) Natriumazid wurden in 100 ml Wasser gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden tropfenweise innerhalb einer Stunde und unter kräftigem Rühren 90,5 g (1 mol) Acrylsäurechlorid in 100 ml trockenem Toluol zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde 5 Stunden bei 0 °C gerührt. Die beiden Phasen wurden getrennt, die organische Phase mit 60 ml einer 10 %igen Natriumhydrogencarbonatlösung neutral und mehrmals mit destilliertem Wasser azidfrei gewaschen (Keine Trübung des Waschwassers durch Zugabe von Silbernitratlösung!). Die organische Phase

wurde getrocknet und tropfenweise zu einer auf 100 °C erhitzten Mischung von 124 ml (1,2 mol) Benzylalkohol, 1,32 g (12 mmol) Hydrochinon und 0,94 g (12 mmol) trockenem Pyridin gegeben, wobei heftige Stickstoffentwicklung beobachtet wurde. Nach beendeter Zugabe wurde noch 30 Minuten unter Rückfluß gekocht und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das zurückbleibende Öl wurde über eine 15 cm lange Vigreuxkolonne fraktioniert, wobei 80,82 g (45% d. Th.) des N-Benzoyloxycarbonyl-N-vinylamins isoliert wurden.

Charakterisierung:

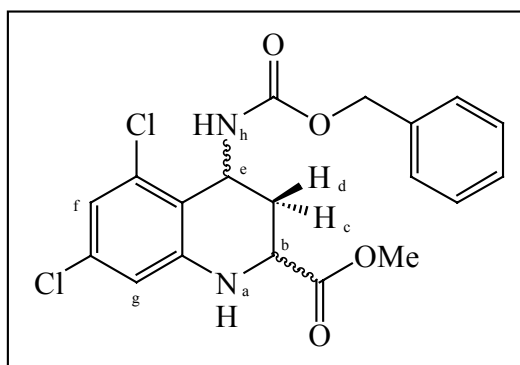
Summenformel: C₁₀H₁₁NO₂ (MG: 177,20)

farblose Flüssigkeit

Kp.: 114 °C (1,2×10⁻² mbar)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.35 (m, 5H, ArH), 5.18 (m, 1H, CH), 5.12 (s, 2H, ArCH₂O) 4.47(m, 2H, CH₂)

6.2.1.3 4-Benzoyloxycarbonylamino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**3**)



44,1 g (0,27 mol) 3,5-Dichlor-anilin wurden in 1 l trockenem Dichlormethan gelöst, mit 44 g Natriumsulfat versetzt und die resultierende Suspension bei Raumtemperatur gerührt. 27,3 g (0,31 mol) Glyoxalsäuremethylester (**1**) wurden anschließend rasch zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Vom Natriumsulfat wurde dann über eine Glasfritte abgesaugt und das Filtrat mit 55 g (0,31 mol) N-Benzoyloxycarbonyl-N-vinylamin (**2**) versetzt. Die Mischung wurde dann unter eine Argonatmosphäre gebracht und auf 10 °C gekühlt. Durch ein Gummiseptum wurden dann unter kräftigem Rühren 4,5 ml (0,042 mol) Bortrifluorid-Etherkomplex zugetropft, wobei sich die Mischung langsam orange verfärbte. Die Kühlung wurde abgebrochen, der Reaktionsansatz noch eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das entstandene rotorange Öl wurde mit 600 ml Diethylether versetzt und kurz aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Lösung kristallisierte ein unbekanntes Nebenprodukt aus, welches abfiltriert und verworfen wurde. Anschließend wurde die Lösung im Vakuum eingedampft und mit 300 ml Diethylether versetzt, wodurch beide Diastereomeren auskristallisierten. Durch Einengen der Mutterlauge konnte die Ausbeute weiter gesteigert werden. Der Feststoff wurde abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und anschließend mit Dichlormethan/Ethylacetat als Eluens säulenchromatographisch auf-

gearbeitet. Es wurden 34,1 g (30,8% d. Th.) der cis- und 17,2 g (18,3% d. Th.) der trans-Verbindungen isoliert.

Charakterisierung:

cis-4-Benzoyloxycarbonylamino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester

Summenformel: C₁₉H₁₈Cl₂N₂O₄ (MG: 409,26)

weißer Feststoff

Fp.: 152-154 °C

R_f (Ethylacetat/Dichlormethan 1/9): 0,68

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 407.9 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.31 (s, 5H, ArH), 6.72 (d, 1H, ArH_f), 6.52 (d, 1H, ArH_g), 5.15 (t, 2H, OCH₂), 4.95 (m, 1H, CH_e), 4.69 (br s, 1H, NH_a), 4.60 (d, 1H, NH_h), 4.04 (m, 1H, CH_b), 3.47 (s, 3H, OCH₃), 2.88 (br d, 1H, CH_{c/d}), 2.03 (dq, 1H, CH_{c/d})

trans-4-Benzoyloxycarbonylamino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester

Summenformel: C₁₉H₁₈Cl₂N₂O₄ (MG: 409,26)

weißer Feststoff

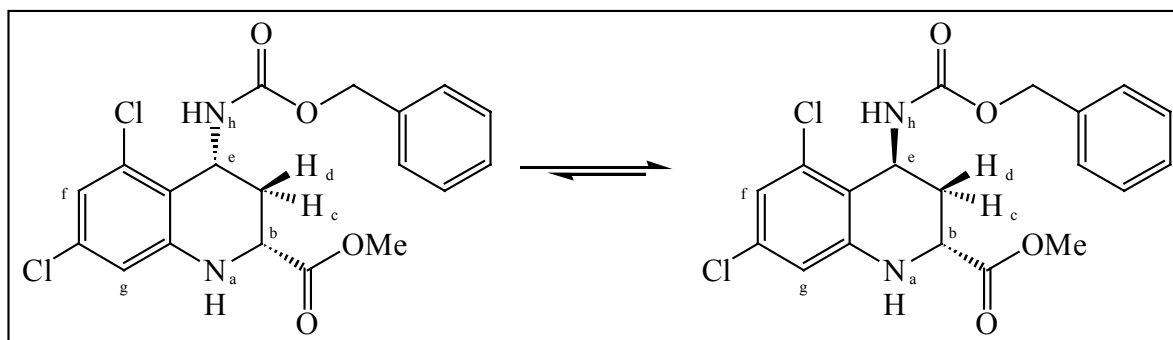
Fp.: 155-157 °C

R_f (Ethylacetat/Dichlormethan 1/9): 0,81

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 407.9 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.34 (s, 5H, ArH), 6.71 (d, 1H, ArH_f), 6.53 (d, 1H, ArH_g), 5.15 (t, 2H, OCH₂), 5.12 (d, 1H, NH_a), 5.03 (m, 1H, CH_e), 4.83 (br s, 1H, NH_h), 3.98 (dd, 1H, CH_b), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 2.65 (br d, 1H, CH_{c/d}), 1.66 (dt, 1H, CH_{c/d})

6.2.1.4 Epimerisierung des *cis*-4-Benzoyloxycarbonylamino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesters



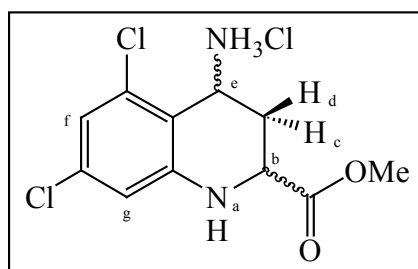
4g (9,8 mmol) *cis*-4-Benzoyloxycarbonylamino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**3**) wurden in 300 ml absolutem Methanol gelöst, mit einer Spatelspitze Natriummethylat versetzt und für 36 Stunden bei 85°C gerührt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gekühlt, eine Spatelspitze Natriumhydrogencarbonat zugegeben, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der zurückbleibende Feststoff säulenchromatographisch mit Ethylace-

tat/Dichlormethan 1/9 aufgearbeitet. Es wurden 1,39g (34,8%) der cis- und 2,39 g (59,8%) der trans-Diastereomeren isoliert.

Charakterisierung:

Siehe Abschnitt 5.2.1.3

6.2.1.5 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4)



4,23 g (10 mmol) 4-Benzyloxycarbonylamino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (3) wurden unter Argonatmosphäre in 150 ml trockenem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden durch ein Gummiseptum 2,2 g (11 mmol) Iodtrimethylsilan zugetropft, wodurch sich die Lösung trübte. Die Kühlung wurde entfernt und der Ansatz 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 10 ml Methanol bis zur Klärung der Lösung versetzt, weitere 15 Minuten gerührt und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mit 150 ml gasförmigem Chlorwasserstoff gesättigtem Ethylacetat versetzt, 10 Minuten gerührt, wiederum zur Trockene eingengt und der Rückstand mit 75 ml Ethylacetat aufgenommen. Es wurde kräftig geschüttelt, 1 Stunde stehen gelassen und der entstandene Niederschlag abgesaugt, welcher das entsprechende cis- oder trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid darstellte. Nach Trocknung des Feststoffes wurden 3,09 g (96% d. Th.) der cis- und 2,38 g (74% d. Th.) der trans-Verbindung erhalten.

Charakterisierung:

cis-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid

Summenformel: C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₂·HCl (MG: 311,59)

weißes kristallines Pulver

Fp.: 199-202 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8.00 (s, 3H, NH₃), 7.40 (d, 1H, ArH_f), 6.80 (d, 1H, ArH_g), 6.80 (s, 1H, NH_a), 4.64 (m, 1H, CH_e), 4.31 (m, 1H, CH_b), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 2.58 (br d, 1H, CH_{c/d}), 2.25 (dt, 1H, CH_{c/d})

¹H-NMR (200 MHz, Methanol-d₄) δ [ppm]: 6.87 (d, 1H, ArH_f), 6.80 (d, 1H, ArH_g), 4.87 (m, 1H, CH_e), 4.23 (dd, 1H, CH_b), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 2.65 (dt, 1H, CH_{c/d}), 2.09 (dt, 1H, CH_{c/d})

trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid

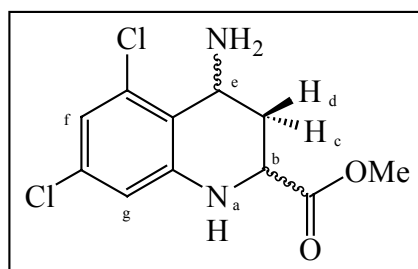
Summenformel: C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₂·HCl (MG: 311,59)

weißes kristallines Pulver

Fp.: 192-195 °C (Zersetzung)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8.43 (s, 3H, NH₃), 7.22 (s, 1H, NH_a), 6.91 (s, 1H, ArH_f), 6.78 (s, 1H, ArH_g), 4.61 (m, 1H, CH_e), 4.34 (dd, 1H, CH_b), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 2.53 (br d, 1H, CH_{c/d}), 1.93 (dt, 1H, CH_{c/d})

6.2.1.6 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (5)



1,56 g (5 mmol) 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4) wurden in 50 ml Wasser gelöst, mit Kaliumcarbonat auf pH 12 gebracht und erschöpfend mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurden 1,0 g (75% d. Th.) der cis- und 1,1 g (80% d. Th.) der trans-Verbindung isoliert.

Charakterisierung:

cis-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester

Summenformel: C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₂ (MG: 275,13)

klares viskoses Öl

trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester

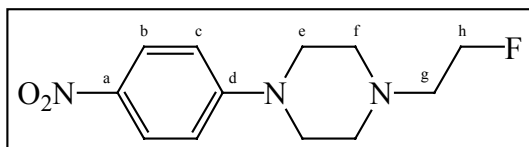
Summenformel: C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₂ (MG: 275,13)

weißer Feststoff

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 6.68 (d, 1H, ArH_f), 6.53 (d, 1H, ArH_g), 4.82 (s, 1H, NH_a), 4.35 (t, 1H, CH_e), 4.26 (dd, 1H, CH_b), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 2.25 (br d, 1H, CH_{c/d}), 1.67 (dt, 1H, CH_{c/d}), 1.56 (s, 2H, NH₂)

6.2.2 Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

6.2.2.1 1-(2-Fluor-ethyl)-4-(4-nitro-phenyl)-piperazin (6)



Eine Mischung aus 3,1 g (24 mmol) 1,2-Bromfluorethan, 5 g (24 mmol) N-(4-Nitrophenyl)-piperazin, 9,95 g (72 mmol) Kaliumcarbonat und 45 mg Natriumiodid in 30 ml Dioxan wurde über Nacht unter Rückfluß erhitzt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der zurückbleibende Feststoff wurde säulenchromatographisch, mit Chloroform/Methanol 1/1 als Eluens, aufgearbeitet. Es wurden 4,0 g (65% d. Th.) 1-(2-Fluor-ethyl)-4-(4-nitro-phenyl)-piperazin isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₂H₁₆FN₃O₂ (MG: 253,27)

Gelber Feststoff

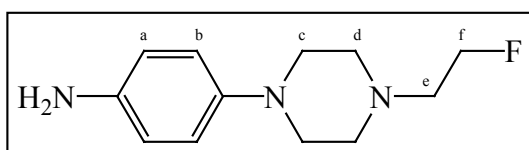
Fp.: 101 °C

R_f (Chloroform/Methanol 1/1): 0,85

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 8.10 (dd, 2H, ArH_b), 6.80 (dd, 2H, ArH_c), 4.60 (dt, 2H, CH_h, 48 Hz), 3.43 (t, 4H, CH_e), 2.74 (dt, 2H, CH_g, 29 Hz), 2.68 (t, 4H, CH_f)

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 154.9 (s, 1C, C_d), 138.7 (s, 1C, C_a), 125.9 (s, 2C, C_b), 112.7 (s, 2C, C_c), 82.0 (d, 1C, C_h), 58.1 (d, 1C, C_g), 53.0 (s, 2C, C_f), 47.1 (s, 2C, C_e)

6.2.2.2 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin (7)



4,0 g (15,7 mmol) 1-(2-Fluor-ethyl)-4-(4-nitro-phenyl)-piperazin (6) wurden in 80 ml Methanol gelöst, mit 400 mg Palladium (10 % auf Aktivkohle) versetzt und bis zur Entfärbung der Lösung bei 0 °C und 1 bar Wasserstoffdruck hydriert. Anschließend wurde vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingengt. Durch säulenchromatographische Aufarbeitung des Feststoffes, mit Ethylacetat als Eluens, wurde das Produkt (2,7 g, 77% d. Th.) abgetrennt.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₂H₁₈FN₃ (MG: 223,29)

Weißer Feststoff

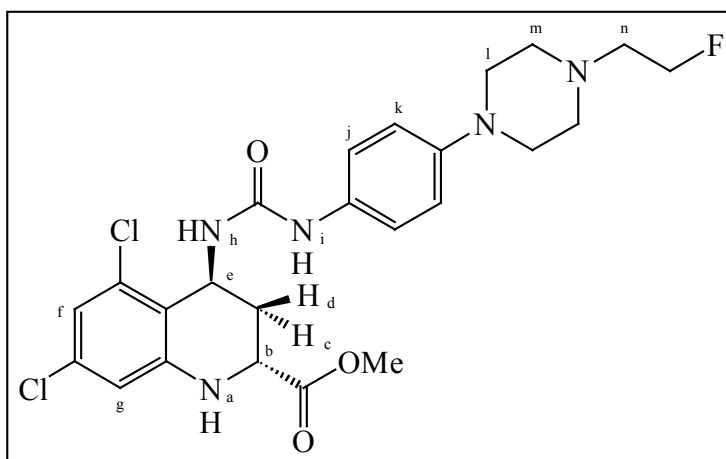
Fp.: 52 °C

R_f (Chloroform/Methanol 1/2): 0,78

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 222.8 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 6.80 (dd, 2H, ArH_b), 6.63 (dd, 2H, ArH_a), 4.60 (dt, 2H, CH_f, 48 Hz), 3.64 (br, 2H, NH₂), 3.07 (t, 4H, CH_c), 2.75 (dt, 2H, CH_e, 29 Hz), 2.69 (t, 4H, CH_d)

6.2.2.3 Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (8)



a) 1,1'-Carbonyldiimidazol als Kopplungsreagenz

325 mg (2 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol wurden unter Argonatmosphäre in 20 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden durch ein Gummiseptum 447 mg (2 mmol) 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin (7), in 5 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, zugetropft (Tropfgeschwindigkeit: max. 5ml/30min). Die Mischung wurde so lange bei 0 °C gerührt, bis das 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin nicht mehr nachweisbar war (DC-Kontrolle). Nach vollständiger Umsetzung wurde die Kühlung entfernt und 580 mg (2 mmol) trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (5), gelöst in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran, rasch zugesetzt. Die resultierende Mischung wurde dann über Nacht gerührt und anschließend zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 30 ml Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit 3 %iger Salzsäure, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und durch Zusatz von 10 ml Diethylether das Produkt (220 mg, 21% d. Th.) ausgefällt.

b) Triphosgen als Kopplungsreagenz

110 mg (0,37 mmol) Triphosgen wurden unter Argonatmosphäre in 4 ml absolutem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde innerhalb einer halben Stunde eine Lösung

von 223 mg (1 mmol) 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin (**7**) und 189 μ l (1,1 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 3,5 ml absolutem Dichlormethan langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 15 Minuten gerührt und dann eine Lösung von 312 mg (1 mmol) trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (**4**) und 378 μ l (2,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 2 ml absolutem Dichlormethan schnell zugegeben. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 20 Minuten gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 ml Wasser aufgenommen und die wässrige Phase zweimal mit jeweils 30 ml Ethylacetat extrahiert und verworfen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch, mit Methanol/Chloroform 1/9 als Eluens aufgereinigt, wodurch 460 mg (88% d. Th.) des Produktes isoliert wurden.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₄H₂₈Cl₂FN₅O₃ (MG: 524,41)

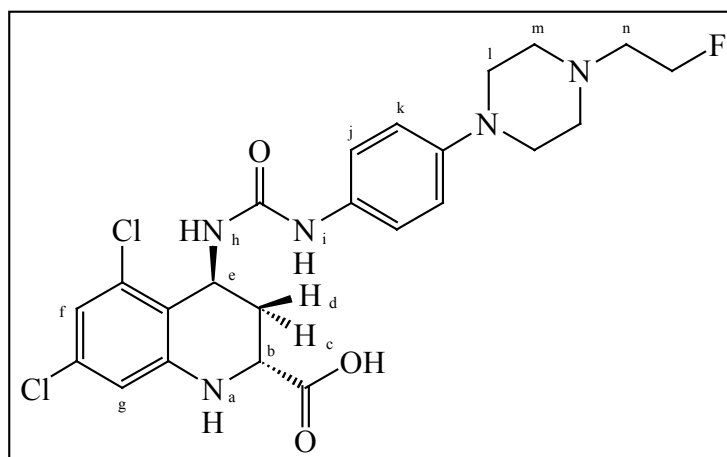
Weißer Feststoff

R_f (Methanol/Chloroform 1/9): 0,46

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 523.2 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.89 (s, 1H, NH_i), 7.23 (d, 2H, ArH_j), 6.92 (s, 1H, NH_a), 6.88 (d, 1H, ArH_f), 6.83 (d, 2H, ArH_k), 6.72 (d, 1H, ArH_g), 6.42 (d, 1H, NH_h), 4.90 (m, 1H, CH_e), 4.56 (dt, 2H, CH₂F, 48 Hz), 3.98 (dd, 1H, CH_b), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.02 (t, 4H, CH_l), 2.65 (dt, 2H, CH_n, 28 Hz), 2.58 (t, 4H, CH_m), 2.32 (br d, 1H, CH_d), 1.65 (dt, 1H, CH_c)

6.2.2.4 Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (9**)**



a) Verseifung mit Lithiumhydroxidlösung

100 mg (0,19 mmol) trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**8**) wurden in 2 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 500 μ l Wasser verdünnt und mit 200 μ l einer wässrigen 1N Lithiumhydroxidlösung versetzt. Die Mischung wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, nach beendeter Umsetzung (DC-Kontrolle) mit 5

ml Ethylacetat und 5 ml Wasser verdünnt und die beiden Phasen getrennt. Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase filtriert und mit 2N Salzsäure bis zur vollständigen Ausfällung des Produktes angesäuert. Der Niederschlag wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und durch Umkristallisieren aus Methanol gereinigt. Es wurden 65 mg (67% d. Th.) der freien Säure isoliert.

b) Verseifung mit Natriummethylat

100 mg (0,19 mmol) cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (14) wurden mit 1,2 ml einer 5 %igen Natriummethylatlösung versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung (DC-Kontrolle) wurde die Lösung unter Vakuum bis fast zur Trockene eingeeengt, mit 5 ml Ethylacetat verdünnt und dann zweimal mit 4 ml Wasser extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt, filtriert, und mit 2N Salzsäure bis zur vollständigen Ausfällung des Produktes angesäuert. Der Niederschlag wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und durch Umkristallisieren aus Methanol gereinigt. Es wurden 50 mg (52% d. Th.) der freien Säure isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₃H₂₆Cl₂FN₅O₃ (MG: 510,39)

Weißer Feststoff

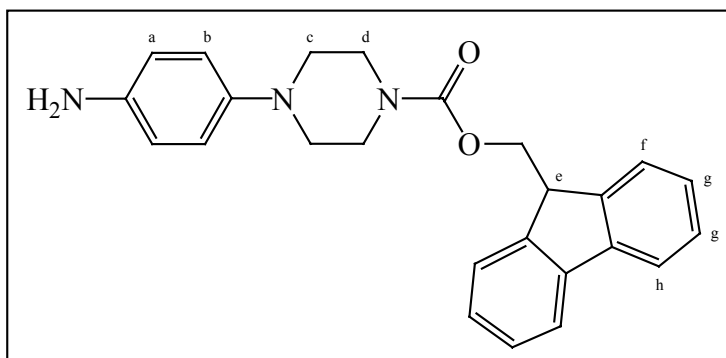
R_f (Methanol/Chloroform 1/1): 0,39

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 509.9 (28.8, [M]⁺), 465.9 (18.0, [M-CO₂]⁺), 266.7 (100.0, [M-C₁₀H₇NO₂Cl₂]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.93 (s, 1H, NH_i), 7.23 (d, 2H, ArH_j), 6.87 (d, 1H, ArH_f), 6.83 (d, 2H, ArH_k), 6.67 (d, 1H, ArH_g), 6.41 (d, 1H, NH_h), 6.37 (s, 1H, NH_a), 4.92 (m, 1H, CH_e), 4.56 (dt, 2H, CH₂F, 48 Hz), 3.85 (dd, 1H, CH_b), 3.03(t, 4H, CH_i), 2.64 (dt, 2H, CH_n, 28 Hz), 2.58 (t, 4H, CH_m), 2.30 (br d, 1H, CH_d), 1.59 (dt, 1H, CH_c)

6.2.3 Trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

6.2.3.1 4-(4-Amino-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (10)



4,0 g (21,7 mmol) N-(4-Nitrophenyl)-piperazin wurden in 80 ml Dioxan gelöst und mit 40 ml einer 10 %igen Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt. Die Mischung wurde heftig gerührt und auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung von 5,0 g (19,3 mmol) (9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat in 40 ml abso-

lutem Dioxan wurde langsam zugetropft, nach beendeter Zugabe die Kühlung entfernt und 10 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf 80 ml gesättigte Natriumchloridlösung gegossen und mehrfach mit jeweils 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde dann in 160 ml Methanol aufgenommen, mit 800 mg Palladium (10% auf Aktivkohle) versetzt und bis zur Entfärbung der gelben Reaktionslösung bei 0 °C und 1 bar Wasserstoffdruck hydriert. Anschließend wurde vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingeeengt. Durch säulenchromatographische Aufreinigung des Rückstandes, mit Ethylacetat als Eluens, wurden 5,9 g (76% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₅H₂₅N₃O₂ (MG: 399,49)

Rosafarbener Feststoff

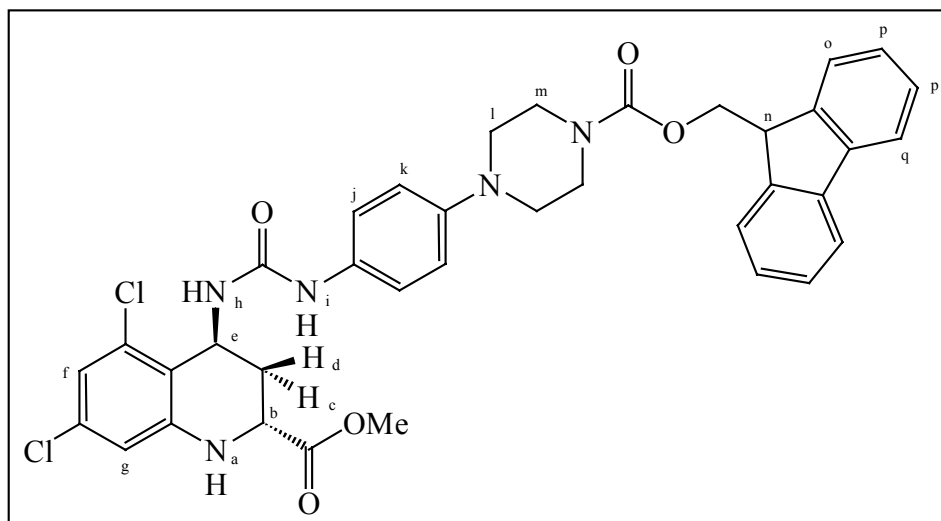
Fp.: 126-127 °C (Zersetzung)

R_f (Ethylacetat): 0,75

FD-MS: m/z (% rel. Int.): 399.0 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.76 (d, 2H, ArH_h), 7.58 (d, 2H, ArH_f), 7.34 (m, 4H, ArH_g), 6.80 (d, 2H, ArH_b), 6.65 (d, 2H, ArH_a), 4.45 (d, 2H, OCH₂), 4.25 (t, 1H, CH_e), 3.60 (t, 4H, CH_c), 3.47 (s, 2H, NH₂), 2.94 (t, 4H, CH_d)

6.2.3.2 **Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (11)**



a) 1,1'-Carbonyldiimidazol als Kopplungsreagenz

325 mg (2 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol wurden unter Argonatmosphäre in 20 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden durch ein Gummiseptum 800 mg (2 mmol) 4-(4-Amino-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (10), in 5 ml absolutem THF gelöst zugetropft (Tropfgeschwindigkeit: max. 5ml/30min). Die Mischung wurde

dann noch so lange bei 0 °C gerührt, bis der 4-(4-Amino-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester nicht mehr nachweisbar war (DC-Kontrolle). Nach vollständiger Umsetzung wurde die Kühlung entfernt und 580 mg (2 mmol) trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (5), gelöst in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran, rasch zugesetzt. Die resultierende Mischung wurde dann über Nacht gerührt und anschließend zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 30 ml Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit 3 %iger Salzsäure, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt (550 mg, 39% d. Th.) durch Zusatz von 10 ml Diethylether ausgefällt.

b) Triphosgen als Kopplungsreagenz

110 mg (0,37 mmol) Triphosgen wurden unter Argonatmosphäre in 4 ml absolutem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde innerhalb einer halben Stunde eine Lösung von 400 mg (1 mmol) 4-(4-Amino-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (10) und 189 µl (1,1 mmol) N-Ethyldiisopropylamin in 3,5 ml absolutem Dichlormethan langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurden weitere 15 Minuten gerührt und dann eine Lösung von 312 mg (1 mmol) trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesterhydrochlorid (4) und 378 µl (2,2 mmol) N-Ethyldiisopropylamin in 2 ml absolutem Dichlormethan schnell zugegeben. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 20 Minuten gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 ml Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit 3 %iger Salzsäure, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt und durch Zusatz von 10 ml Diethylether das Produkt ausgefällt. Nach Abfiltrieren des Niederschlages und Waschen mit wenig trockenem Dichlormethan wurden 570 mg (81% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₃₇H₃₅Cl₂N₅O₅ (MG: 700,61)

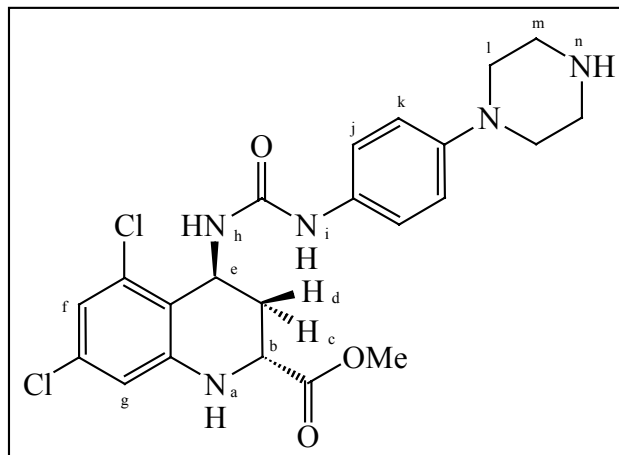
Weißer Feststoff

R_f (Ethylacetat/Chloroform 1/1): 0,41

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 477.0 (100.0, [M-Fmoc]⁺), 699.3 (31.4, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.94 (s, 1H, NH_i), 7.90 (d, 2H, ArH_q), 7.64 (d, 2H, ArH_o), 7.37 (m, 4H, ArH_p), 7.25 (d, 2H, ArH_j), 6.91 (s, 1H, NH_a), 6.88 (d, 1H, ArH_f), 6.85 (d, 2H, ArH_k), 6.72 (d, 1H, ArH_g), 6.45 (d, 1H, NH_h), 4.93 (m, 1H, CH_e), 4.42 (s, 2H, OCH₂), 4.28 (t, 1H, CH_n), 3.98 (dd, 1H, CH_b), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3,43 (t, 4H, CH_l), 2,91 (t, 4H, CH_m), 2.32 (br d, 1H, CH_d), 1.65 (dt, 1H, CH_c)

6.2.3.3 Trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (12)



350 mg (0,5 mmol) trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (11) wurden mit 3 ml einer 10 %igen Lösung von Piperidin in absolutem Tetrahydrofuran versetzt, wobei rasche Kohlendioxidentwicklung festzustellen war. Die Lösung wurde eine weitere ½ Stunde gerührt und anschließend Lösungsmittel und Piperidin im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 10 ml absolutem Diethylether versetzt und die resultierende Suspension 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, wodurch das entstandene Dibenzofulven quantitativ in Lösung ging, während das Produkt als unlöslicher Rückstand zurückblieb. Der Feststoff wurde abgesaugt und mit 5 ml Diethylether gewaschen (Im Falle von Verunreinigungen wurde eine säulenchromatographische Reinigung mit Methanol + 3% DIEA als Eluens durchgeführt). Es wurden 220 mg (92% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₂H₂₅Cl₂N₅O₃ (MG: 478,37)

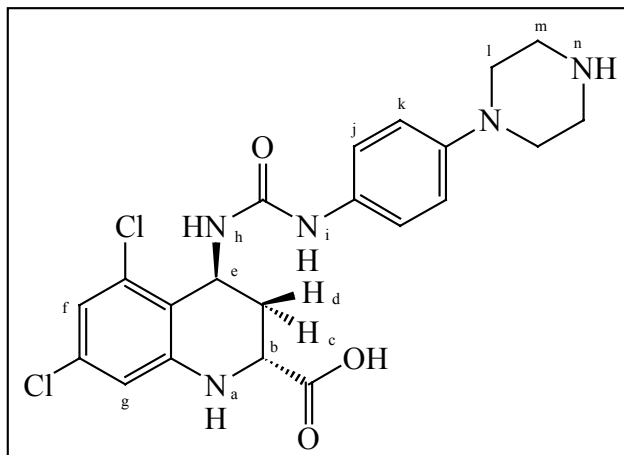
Weißer Feststoff

R_f (Methanol + 3% DIEA): 0,27

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 477.0 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.90 (s, 1H, NH_i), 7.22 (d, 2H, ArH_j), 6.92 (s, 1H, NH_a), 6.87 (d, 2H, ArH_k), 6.81 (d, 1H, ArH_f), 6.72 (d, 1H, ArH_g), 6.43 (d, 1H, NH_h), 4.90 (m, 1H, CH_e), 3.99 (dd, 1H, CH_b), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 2.91 (t, 4H, CH_l), 2.82 (t, 4H, CH_m), 2.51 (s, 1H, NH_n), 2.32 (br d, 1H, CH_d), 1.65 (dt, 1H, CH_c)

6.2.3.4 Trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (**13**)



c) Verseifung mit Lithiumhydroxidlösung

100 mg (0,21 mmol) trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäuremethylester (**12**) wurden in 2 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 500 µl Wasser verdünnt und mit 200 µl einer wässrigen 1N Lithiumhydroxidlösung versetzt. Die Mischung wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, nach beendeter Umsetzung (DC-Kontrolle) mit 5 ml Ethylacetat und 5 ml Wasser verdünnt und die beiden Phasen getrennt. Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase filtriert und mit 2N Salzsäure bis zur vollständigen Ausfällung des Produktes angesäuert. Der Niederschlag wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und durch Umkristallisieren aus Methanol gereinigt. Es wurden 60 mg (62% d. Th.) der freien Säure isoliert.

d) Verseifung mit Natriummethylat

100 mg (0,21 mmol) cis-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäuremethylester (**17**) wurden mit 1,2 ml einer 5 %igen Natriummethylatlösung versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung (DC-Kontrolle) wurde die Lösung unter Vakuum bis fast zur Trockene eingeeengt, mit 5 ml Ethylacetat verdünnt und dann zweimal mit wenig Wasser extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt, filtriert und mit 2N Salzsäure bis zur vollständigen Ausfällung des Produktes angesäuert. Der Niederschlag wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und durch Umkristallisieren aus Methanol gereinigt. Es wurden 65 mg (67% d. Th.) der freien Säure isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₁H₂₃Cl₂N₅O₃ (MG: 464,34)

Weißer Feststoff

R_f (Methanol + 2% DIEA 1/1): 0,22

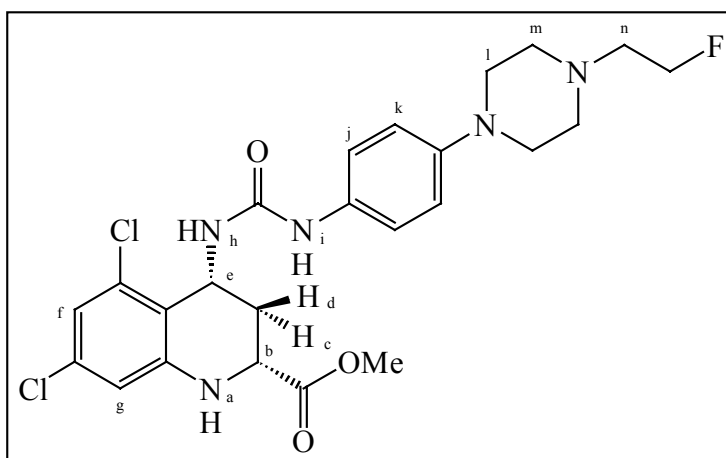
FD-MS: m/z (% rel. Int.) 463.1 (10.7, [M]⁺), 244.7 (18.4, [C₁₀H₈NO₂Cl₂]⁺), 219.9 (13.4, [C₁₁H₁₅N₄O]⁺), 203.8 (100.0, [C₁₁H₁₄N₃O]⁺), 176.8 (30.0, [C₁₀H₁₄N₃]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8.65 (s, 1H, NH_i), 7.26 (d, 2H, ArH_j), 6.81 (s, 1H, NH_a), 6.81 (d, 1H, ArH_f), 6.78 (d, 2H, ArH_k), 6.50 (d, 1H, ArH_g), 6.35 (br s, 1H, NH_h), 4.90

(m, 1H, CH_e), 3.46 (dd, 1H, CH_b), 2.91 (t, 4H, CH_l), 2.84 (t, 4H, CH_m), 2.29 (br d, 1H, CH_d), 1.26 (dt, 1H, CH_c)

6.2.4 Cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

6.2.4.1 Cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**14**)



a) 1,1'-Carbonyldiimidazol als Kopplungsreagenz

325 mg (2 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol wurden unter Argonatmosphäre in 20 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden durch ein Gummiseptum 447 mg (2 mmol) 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin (**7**), in 5 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, zugetropft (Tropfgeschwindigkeit: max. 5ml/30min). Die Mischung wurde dann noch so lange bei 0 °C gerührt, bis das 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin nicht mehr nachweisbar war (DC-Kontrolle). Nach vollständiger Umsetzung wurde die Kühlung entfernt und 580 mg (2 mmol) cis-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**5**), gelöst in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran, rasch zugesetzt. Die resultierende Mischung wurde dann über Nacht gerührt und anschließend zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 30 ml Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit 3 %iger Salzsäure, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und durch Zusatz von 10 ml Diethylether das Produkt (260 mg, 25% d. Th.) ausgefällt.

b) Triphosgen als Kopplungsreagenz

110 mg (0,37 mmol) Triphosgen wurden unter Argonatmosphäre in 4 ml absolutem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde innerhalb einer halben Stunde eine Lösung von 223 mg (1 mmol) 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin (**7**) und 189 µl (1,1 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 3,5 ml absolutem Dichlormethan langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 15 Minuten gerührt und dann eine Lösung von 312 mg (1 mmol) cis-4-

Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (**4**) und 378 μl (2,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 2 ml absolutem Dichlormethan schnell zugegeben. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 20 Minuten gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 ml Wasser aufgenommen, zweimal mit jeweils 30 ml Ethylacetat gewaschen und die wässrige Phase verworfen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch, mit Methanol/Chloroform 1/9 als Eluens aufgereinigt, wodurch 440 mg (84% d. Th.) des gesuchten Produktes isoliert wurden.

Charakterisierung:

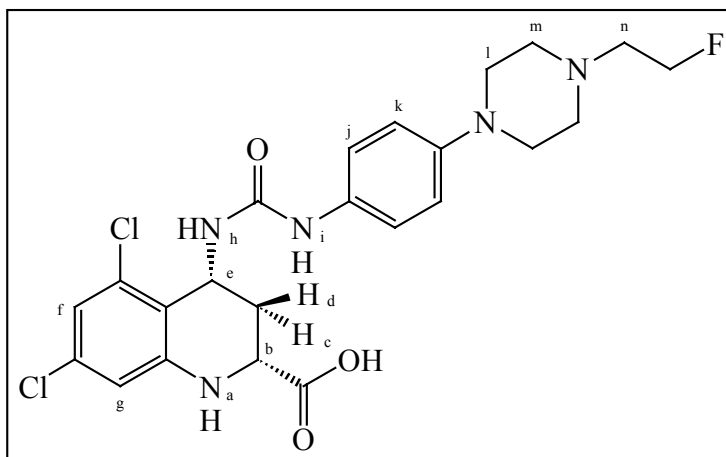
Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{FN}_5\text{O}_3$ (MG: 524,41)

Weißer Feststoff

R_f (Aceton/ CHCl_3 1/1): 0,39

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.10 (s, 1H, NH_i), 7.17 (d, 2H, ArH_j), 7.10 (d, 1H, NH_a), 6.81 (d, 2H, ArH_k), 6.74 (d, 1H, ArH_f), 6.72 (d, 1H, ArH_g), 5.56 (d, 1H, NH_h), 4.76 (m, 1H, CH_e), 4.56 (dt, 2H, CH_2F , 48 Hz), 4.17 (m, 1H, CH_b), 3.53 (s, 3H, OCH_3), 3.01 (t, 4H, CH_l), 2.76 (br d, 1H, CH_d), 2.64 (dt, 2H, CH_n , 28 Hz), 2.57 (t, 4H, CH_m), 1.91 (ddd, 1H, CH_c)

6.2.4.2 Cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (15**)**



100 mg (0,19 mmol) cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**14**) wurden in 2 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 500 μl Wasser verdünnt und mit 200 μl einer wässrigen 1N Lithiumhydroxidlösung versetzt. Die Mischung wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, nach beendeter Umsetzung (DC-Kontrolle) mit 5 ml Ethylacetat und 5 ml Wasser verdünnt und die beiden Phasen getrennt. Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase filtriert und mit 2N Salzsäure bis zur vollständigen Ausfällung des Produktes angesäuert. Der Niederschlag wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und durch Umkristallisieren aus Methanol gereinigt. Es wurden 77 mg (79% d. Th.) der freien Säure isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₃H₂₆Cl₂FN₅O₃ (MG: 510,39)

Weißer Feststoff

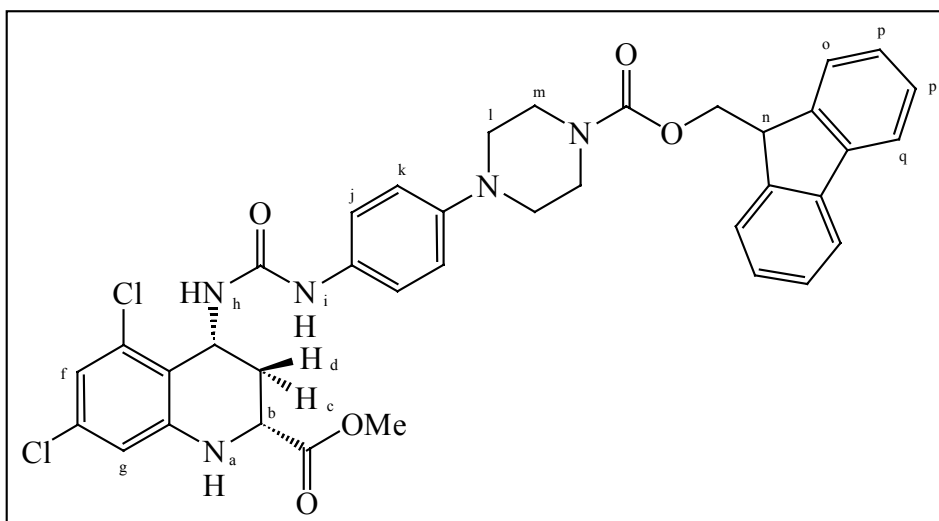
R_f (Methanol/Chloroform 1/1): 0,39

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 509.7 (12.9, [M]⁺), 465.7 (13.4, [M-CO₂]⁺), 266.6 (42.2, [M-C₁₀H₇NO₂Cl₂]⁺), 242.3 (100.0, [C₁₀H₈NO₂Cl₂]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8.12 (s, 1H, NH_i), 7.18 (d, 2H, ArH_j), 7.00 (d, 1H, NH_a), 6.80 (d, 2H, ArH_k), 6.69 (d, 1H, ArH_f), 6.66 (d, 1H, ArH_g), 5.58 (d, 1H, NH_h), 4.80 (m, 1H, CH_e), 4.52 (dt, 2H, CH₂F, 48 Hz), 4.00 (m, 1H, CH_b), 3,00 (t, 4H, CH_l), 2,67 (br d, 1H, CH_d), 2,65 (dt, 2H, CH_n, 28 Hz), 2,57 (t, 4H, CH_m), 1,89 (ddd, 1H, CH_c)

6.2.5 Cis-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

6.2.5.1 Cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**16**)



a) 1,1'-Carbonyldiimidazol als Kopplungsreagenz

325 mg (2 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol wurden unter Argonatmosphäre in 20 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden durch ein Gummiseptum 800 mg (2 mmol) 4-(4-Amino-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (**10**), in 5 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst zugetropft (Tropfgeschwindigkeit: max. 5ml/30min). Die Mischung wurde dann noch so lange bei 0 °C gerührt, bis der 4-(4-Amino-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester nicht mehr nachweisbar war (DC-Kontrolle). Nach vollständiger Umsetzung wurde die Kühlung entfernt und 580 mg (2 mmol) cis-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**5**), gelöst in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran rasch zugesetzt. Die resultierende Mischung wurde dann über Nacht gerührt und anschließend zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 30 ml Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit 3 %iger Salzsäure, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und ein-

mal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und durch Zusatz von 10 ml Diethylether das Produkt (630 mg, 45% d. Th.) ausgefällt.

b) Triphosgen als Kopplungsreagenz

110 mg (0,37 mmol) Triphosgen wurden unter Argonatmosphäre in 4 ml absolutem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde innerhalb einer halben Stunde eine Lösung von 400 mg (1 mmol) 4-(4-Amino-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (10) und 189 µl (1,1 mmol) N-Ethyldiisopropylamin in 3,5 ml absolutem Dichlormethan langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 15 Minuten gerührt und dann eine Lösung von 312 mg (1 mmol) cis-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesterhydrochlorid (4) und 378 µl (2,2 mmol) N-Ethyldiisopropylamin in 2 ml absolutem Dichlormethan schnell zugegeben. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 20 Minuten gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 ml Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit 3 %iger Salzsäure, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde im Vakuum bis zur Trockene eingengt und durch Zusatz von 10 ml Diethylether das Produkt ausgefällt. Nach Abfiltrieren des Niederschlages und Waschen mit wenig trockenem Dichlormethan wurden 530 mg (76% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

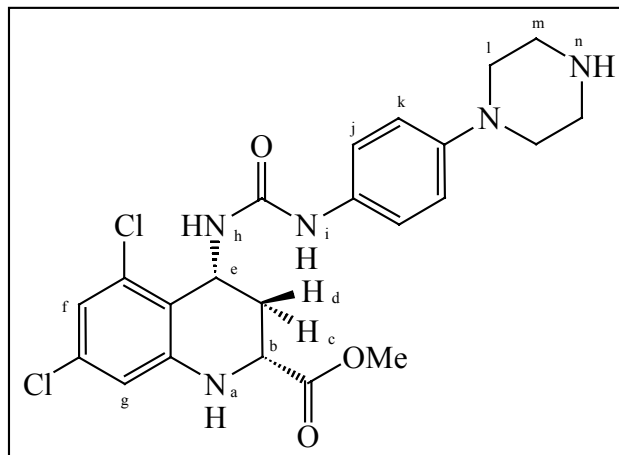
Summenformel: C₃₇H₃₅Cl₂N₅O₅ (MG: 700,61)

Weißer Feststoff

R_f (Methanol/Dichlormethan 1/1 +2% DIEA): 0,32

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8.14 (s, 1H, NH_i), 7.89 (d, 2H, ArH_q), 7.63 (d, 2H, ArH_o), 7.36 (m, 4H, ArH_p), 7.20 (d, 2H, ArH_j), 7.08 (d, 1H, NH_a), 6.82 (d, 2H, ArH_k), 6.74 (d, 1H, ArH_f), 6.73 (d, 1H, ArH_g), 5.56 (d, 1H, NH_h), 4.77 (m, 1H, CH_e), 4.41 (d, 2H, OCH₂), 4.27 (t, 1H, CH_n), 4.18 (m, 1H, CH_b), 3.53 (s, 3H, OCH₃), 3.41 (t, 4H, CH_l), 2.89 (t, 4H, CH_m), 2.75 (br d, 1H, CH_d), 1.90 (ddd, 1H, CH_c)

6.2.5.2 Cis-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**17**)



350 mg (0,5 mmol) cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**16**) wurden mit 3 ml einer 10 %igen Lösung von Piperidin in absolutem Tetrahydrofuran versetzt, wobei rasche Kohlendioxidentwicklung festzustellen war. Die Lösung wurde eine weitere ½ Stunde gerührt und anschließend Lösungsmittel und Piperidin im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 10 ml absolutem Diethylether versetzt und die resultierende Suspension 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, wodurch das entstandene Dibenzofulven quantitativ in Lösung ging, während das Produkt als unlöslicher Rückstand zurückblieb. Der Feststoff wurde abgesaugt und mit 5 ml Diethylether gewaschen (Im Falle von Verunreinigungen wurde eine säulenchromatographische Reinigung mit Methanol + 3% DIEA als Eluens durchgeführt). Es wurden 210 mg (88% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₂H₂₅Cl₂N₅O₃ (MG: 478,37)

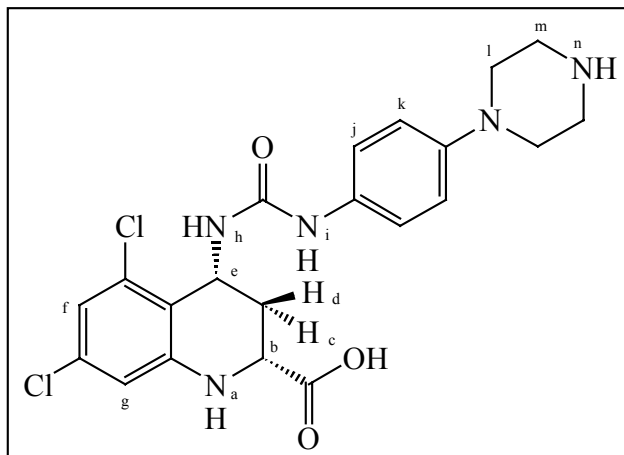
Weißer Feststoff

R_f (Methanol + 3% DIEA): 0,26

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 477.0 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8.13 (s, 1H, NH_i), 7.18 (d, 2H, ArH_j), 7.10 (d, 1H, NH_a), 6.80 (d, 2H, ArH_k), 6.74 (d, 1H, ArH_f), 6.71 (d, 1H, ArH_g), 5.57 (d, 1H, NH_h), 4.76 (m, 1H, CH_e), 4.17 (m, 1H, CH_b), 3.53 (s, 3H, OCH₃), 2.95 (t, 4H, CH_l), 2.86 (t, 4H, CH_m), 2.75 (br d, 1H, CH_d), 2.50 (s, 1H, NH_n), 1.84 (ddd, 1H, CH_c)

6.2.5.3 Cis-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (18)



100 mg (0,21 mmol) cis-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (17) wurden in 2 ml THF gelöst, mit 500 μ l Wasser verdünnt und mit 200 μ l einer wässrigen 1N Lithiumhydroxidlösung versetzt. Die Mischung wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, nach beendeter Umsetzung (DC-Kontrolle) mit 5 ml Ethylacetat und 5 ml Wasser verdünnt und die beiden Phasen getrennt. Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase filtriert und mit 2N Salzsäure bis zur vollständigen Ausfällung des Produktes angesäuert. Der Niederschlag wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und durch Umkristallisieren aus Methanol gereinigt. Es wurden 82 mg (84% d. Th.) der freien Säure isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₁H₂₃Cl₂N₅O₃ (MG: 464,34)

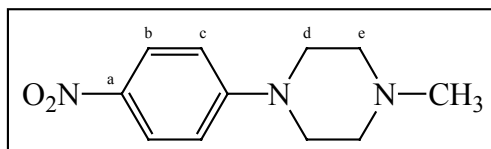
Weißer Feststoff

R_f (Methanol/Chloroform 1/1): 0,39

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8.09 (s, 1H, NH_i), 7.19 (d, 2H, ArH_j), 7.02 (d, 1H, NH_a), 6.81 (d, 2H, ArH_k), 6.69 (d, 1H, ArH_f), 6.68 (d, 1H, ArH_g), 5.50 (d, 1H, NH_h), 4.80 (m, 1H, CH_e), 4.00 (m, 1H, CH_b), 2.92 (t, 4H, CH_l), 2.86 (t, 4H, CH_m), 2.65 (br d, 1H, CH_d), 1.82 (ddd, 1H, CH_c).

6.2.6 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

6.2.6.1 1-Methyl-4-(4-nitro-phenyl)-piperazin (19)



5,2 g (25 mmol) N-(4-Nitrophenyl)-piperazin und 3,6 g (25 mmol) Iodmethan wurden mit 25 ml Ethanol versetzt und für 24 Stunden auf 60 °C erwärmt. Die Reaktionslösung wurde mit 100 ml Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit 100 ml 10 %iger Natriumhydroxidlösung, zweimal mit 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und anschließend mit einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Durch säulenchromatographische Aufarbeitung des Rückstandes mit Ethylacetat als Eluens wurden 1,42 g (26% d. Th.) des Produkts isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₁H₁₅N₃O₂ (MG: 221,26)

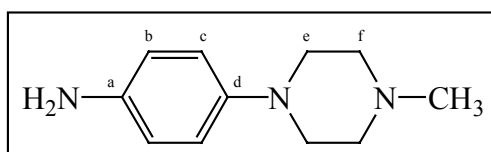
Gelber Feststoff

Fp.: 64-66 °C (Zersetzung)

R_f (Ethylacetat): 0,76

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 8.10 (dd, 2H, ArH_b), 6.80 (dd, 2H, ArH_c), 3.41(t, 4H, CH_d), 2.53 (t, 4H, CH_e), 2.33 (s, 3H, CH₃)

6.2.6.2 4-(4-Methyl-piperazin-1-yl)-phenylamin (20)



1,42 g (6,4 mmol) 1-Methyl-4-(4-nitro-phenyl)-piperazin (19) wurden in 80 ml Methanol gelöst, mit 300 mg Palladium (10% auf Aktivkohle) versetzt und bis zum Entfärben der gelben Nitroverbindung bei 0° C und 1 bar Wasserstoffdruck hydriert. Anschließend wurde vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingengt und durch Säulenchromatographie, mit Methanol als Eluens, 1,13 g (92% d. Th.) des Produkts isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₁H₁₇N₃ (MG: 191,27)

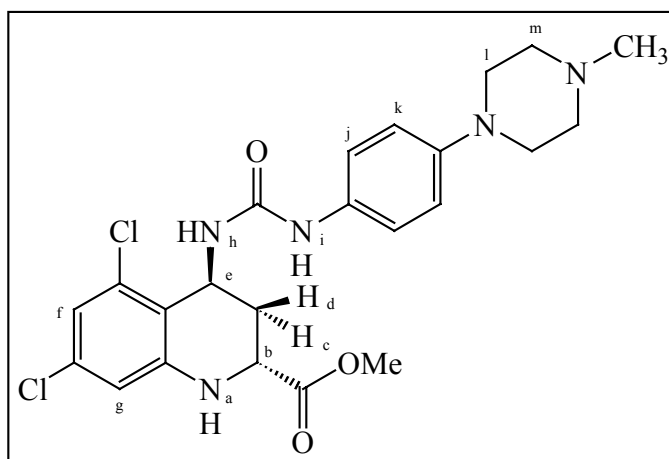
Weißer Feststoff

Fp.: 75 °C

R_f (Methanol): 0,36

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 6.80 (dd, 2H, ArH_b), 6.63 (dd, 2H, ArH_a), 3.15 (br, 2H, NH₂), 3.05 (t, 4H, CH_c), 2.56 (t, 4H, CH_d), 2.33 (s, 3H, CH₃)

6.2.6.3 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**21**)



110 mg (0,37 mmol) Triphosgen wurden unter Argonatmosphäre in 4 ml absolutem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde innerhalb einer halben Stunde eine Lösung von 192 mg (1 mmol) 4-(4-Methyl-piperazin-1-yl)-phenylamin (**20**) und 189 µl (1,1 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 3,5 ml absolutem Dichlormethan langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 15 Minuten gerührt und dann eine Lösung von 312 mg (1 mmol) trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (**4**) und 378 µl (2,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 2 ml absolutem Dichlormethan schnell zugegeben. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 20 Minuten gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 ml Wasser aufgenommen und die wässrige Phase zweimal mit jeweils 30 ml Ethylacetat extrahiert und verworfen. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in 5 ml absolutem Diethylether aufgenommen, 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt und der Rückstand, welcher das Produkt darstellte, abfiltriert und mit wenig trockenem Dichlormethan gewaschen. Durch Umkristallisieren aus Methanol wurden letzte Verunreinigungen entfernt und 370 mg (76% d. Th.) des gesuchten Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₃H₂₇Cl₂N₅O₃ (MG: 492,40)

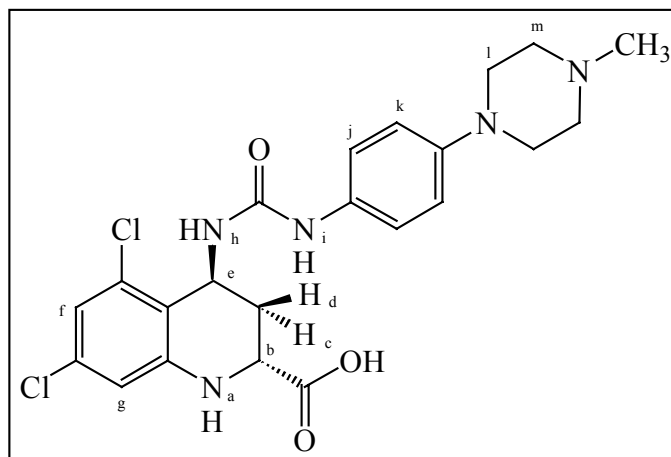
Weißer Feststoff

R_f (Methanol/Chloroform 1/1): 0,55

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.94 (s, 1H, NH_i), 7.23 (d, 2H, ArH_j), 6.91 (s, 1H, NH_a), 6.86 (d, 1H, ArH_f), 6.82 (d, 2H, ArH_k), 6.71 (d, 1H, ArH_g), 6.43 (d, 1H, NH_h), 4.92 (m, 1H, CH_e),

3.98 (dd, 1H, CH_b), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3,03 (t, 4H, CH_l), 2.49 (t, 4H, CH_m), 2.31 (br d, 1H, CH_d), 2.24 (s, 3H, NCH₃), 1.64 (dt, 1H, CH_c)

6.2.6.4 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (**22**)



100 mg (0,20 mmol) trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**21**) wurden in 2 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 500 µl Wasser verdünnt und mit 200 µl einer wässrigen 1N Lithiumhydroxidlösung versetzt. Die Mischung wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, nach beendeter Umsetzung (DC-Kontrolle) mit 5 ml Ethylacetat und 5 ml Wasser verdünnt und die beiden Phasen getrennt. Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase filtriert und mit 2N Salzsäure bis zur vollständigen Ausfällung des Produktes angesäuert. Der Niederschlag wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und durch Umkristallisieren aus Methanol gereinigt. Es wurden 45 mg (46% d. Th.) der freien Säure isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₂H₂₅Cl₂N₅O₃ (MG: 478,37)

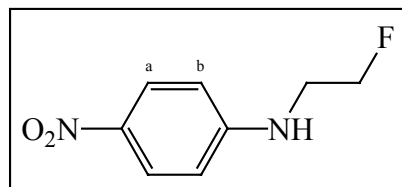
Weißer Feststoff

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 477.9 (100.0, [M]⁺), 234.7 (10.3, [C₁₂H₁₈N₄O]⁺), 217.7 (22.8, [C₁₂H₁₆N₃O]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.98 (s, 1H, NH_i), 7.23 (d, 2H, ArH_j), 6.86 (d, 1H, ArH_f), 6.82 (d, 2H, ArH_k), 6.65 (s, 1H, NH_a), 6.62 (d, 1H, ArH_g), 6.42 (d, 1H, NH_h), 4.87 (m, 1H, CH_e), 3.74 (dd, 1H, CH_b), 3,03(t, 4H, CH_l), 2.49 (t, 4H, CH_m), 2.31 (br d, 1H, CH_d), 2.25 (s, 3H, NCH₃), 1.50 (dt, 1H, CH_c)

6.2.7 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäure

6.2.7.1 (2-Fluor-ethyl)-(4-nitro-phenyl)-amin (23)



Eine Mischung aus 5,52 g (40 mmol) 4-Nitroanilin in 50 ml Dimethylsulfoxid wurde portionsweise mit 1,60 g (40 mmol) Natriumhydrid (ca. 60 %ig in Paraffin) behandelt. Nach beendeter Zugabe wurde eine weitere halbe Stunde bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur gekühlt, 5,71 g (45 mmol) 1,2-Bromfluorethan und 16,6 g (120 mmol) Kaliumcarbonat zugefügt und die Suspension für weitere 2 Stunden auf 90 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde abgekühlt, mit 200 ml Ethylacetat versetzt und zweimal mit jeweils 100 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend wurde der gelbe Rückstand mittels Säulenchromatographie, mit Chloroform als Laufmittel aufgearbeitet. Dabei wurden 2,35 g (32% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₈H₉FN₂O₂ (MG: 184,17)

Gelber Feststoff

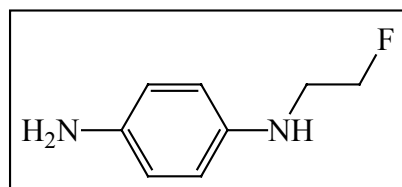
Fp.: 66 °C

R_f (Chloroform): 0,64

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 184.4 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 8.08 (d, 2H, ArH_a), 6.57 (d, 2H, ArH_b), 4.63 (dt, 2H, CH₂F, 48Hz), 4.53 (br, 1H, NH), 3.54 (dt, 2H, NCH₂, 29 Hz)

6.2.7.2 N-(2-Fluor-ethyl)-benzen-1,4-diamin (24)



1,5 g (8,2 mmol) (2-Fluor-ethyl)-(4-nitro-phenyl)-amin (23) wurden in 30 ml Methanol gelöst, mit 150 mg Palladium (10% auf Aktivkohle) versetzt und bis zum Entfärben der gelben Reaktionslösung bei 0 °C und 1 bar Wasserstoffdruck hydriert. Anschließend wurde vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingengt. Durch Säulenchromatographie, mit Chloroform/Ethylacetat 1/1+ 2% DIEA als Eluens wurden 1,0 g (82% d. Th.) des Produkts abgetrennt.

Charakterisierung:

Summenformel: C₈H₁₁N₂ (MG: 154,18)

Weißer Feststoff

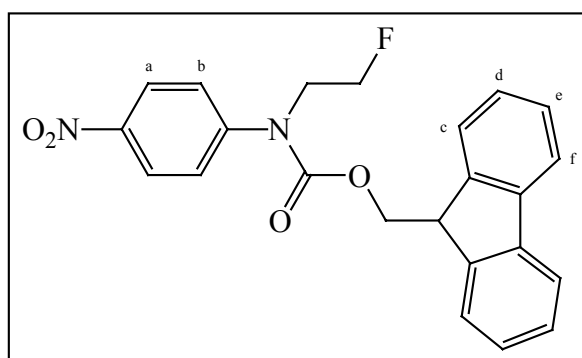
Fp.: 215 °C

R_f (Chloroform/Ethylacetat 1/1+ 2% DIEA): 0,33

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 154.3 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 6.41 (s, 4H, ArH), 4.59 (dt, 2H, CH₂F, 48 Hz), 4.51 (br, 2H, NH₂), 3.33 (br, 1H, NH), 3.20 (dt, 2H, NCH₂, 28 Hz)

6.2.7.3 (2-Fluor-ethyl)-(4-nitro-phenyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (25)



2 g (7,7 mmol) (9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat wurden in 10 ml absolutem Diethylether gelöst und auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung von 1,42 g (7,7 mmol) (2-Fluor-ethyl)-(4-nitro-phenyl)-amin (23) in 10 ml absolutem Diethylether wurde langsam zugetropft, nach beendeter Zugabe die Kühlung entfernt und 10 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch, mit Chloroform als Eluens aufgearbeitet. Dabei wurden 1,76 g (56% d. Th.) des Produkts abgetrennt.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₃H₁₉FN₂O₄ (MG: 406,41)

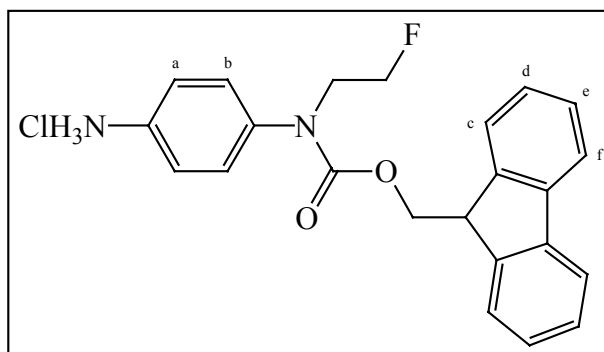
Gelber Feststoff

Fp.: 133 °C

R_f (Chloroform): 0,61

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 8.04 (d, 2H, ArH_a), 7.68 (dd, 2H, ArH_f), 7.37 (m, 4H, ArH_{c/e}), 7.24 (d, 2H, ArH_d), 7.12 (d, 2H, ArH_b), 4.64 (d, 2H, OCH₂), 4.40 (dt, 2H, CH₂F, 47 Hz), 4.12 (t, 1H, CH), 3.77 (dt, 2H, NCH₂, 28 Hz)

6.2.7.4 (4-Amino-phenyl)-(2-fluor-ethyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethylesterhydrochlorid (26)



1,45 g (3,57 mmol) (2-Fluor-ethyl)-(4-nitro-phenyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (25) wurden in 30 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 80 mg Palladium (10 % auf Aktivkohle) versetzt und bis zum Entfärben der gelben Reaktionslösung bei 0 °C und 1 bar Wasserstoffdruck hydriert. Anschließend wurde vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingeeengt und durch Säulenchromatographie, mit Chloroform als Eluens gereinigt. Zur Entfernung eines unbekanntes Nebenproduktes, welches sich nicht durch Säulenchromatographie abtrennen ließ, wurde das Rohprodukt in 20 ml absolutem Diethylether aufgenommen und mittels 1N etherischer HCl das Produkt als (4-Amino-phenyl)-(2-fluor-ethyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethylesterhydrochlorid (MW: 412,88) ausgefällt, während die Verunreinigung in der Lösung blieb. Der ausgefallene rosafarbene Niederschlag wurde abfiltriert, mit 10 ml Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 920 mg (62% d. Th.) des Hydrochlorids isoliert.

Charakterisierung:

(4-Amino-phenyl)-(2-fluor-ethyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester

Summenformel: C₂₃H₂₁FN₂O₂ (MG: 376,42)

Weißer Feststoff

R_f (Chloroform): 0,20

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.69 (d, 2H, ArH_f), 7.25 (br m, 6H, ArH_{c/d/e}), 7.02 (d, 2H, ArH_b), 6.69 (d, 2H, ArH_a), 4.56 (dt, 2H, CH₂F, 48 Hz), 4.27 (d, 2H, OCH₂), 4.02 (t, 1H, CH), 3.89 (dt; 2H, NCH₂, 28 Hz), 3.74 (br, 2H, NH₂)

(4-Amino-phenyl)-(2-fluor-ethyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethylesterhydrochlorid

Summenformel: C₂₃H₂₁FN₂O₂·HCl (MG: 412,88)

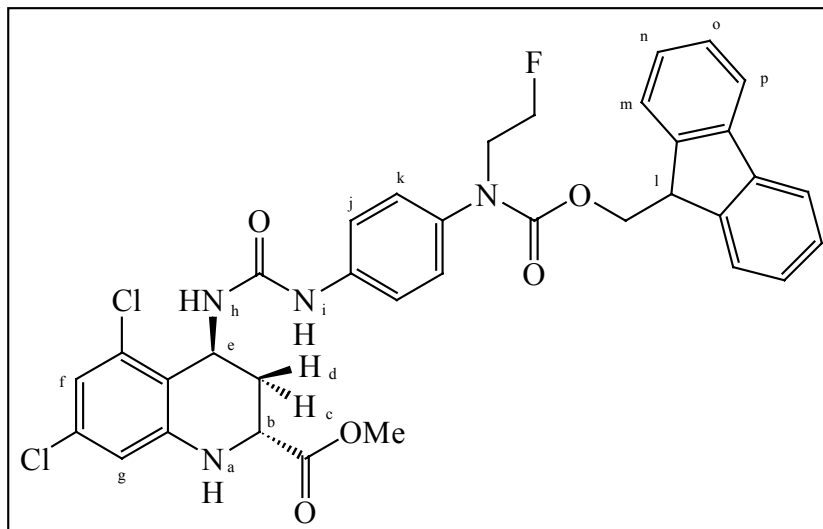
Rosafarbener Feststoff

Fp.: 209 °C

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 376.7 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 10.14 (br, 3H, NH₃⁺), 7.85 (d, 2H, ArH_a), 7.29 (m, 10H, ArH_{b,c,f}), 4.36 (dt; 2H, CH₂F, 48 Hz), 4.39 (d, 2H, OCH₂), 4.15 (t, 1H, CH), 3.80 (dt, 2H, NCH₂, 28 Hz)

6.2.7.5 Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-(2-fluor-ethyl)-amino]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (27)



110 mg (0,37 mmol) Triphosgen wurden unter Argonatmosphäre in 4 ml absolutem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde innerhalb einer halben Stunde eine Lösung von 413 mg (1 mmol) (4-Amino-phenyl)-(2-fluor-ethyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethyl-ester-hydrochlorid (26) und 378 µl (2,2 mmol) N-Ethyldiisopropylamin in 3,5 ml absolutem Dichlormethan langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde 15 Minuten gerührt und dann eine Lösung von 312 mg (1 mmol) trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4) und 378 µl (2,2 mmol) N-Ethyldiisopropylamin in 2 ml absolutem Dichlormethan schnell zugegeben. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmt, 20 Minuten gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 ml Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit 3 %iger Salzsäure, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung 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. Es wurden 474 mg (70% d. Th.) des Produktes erhalten.

Charakterisierung:

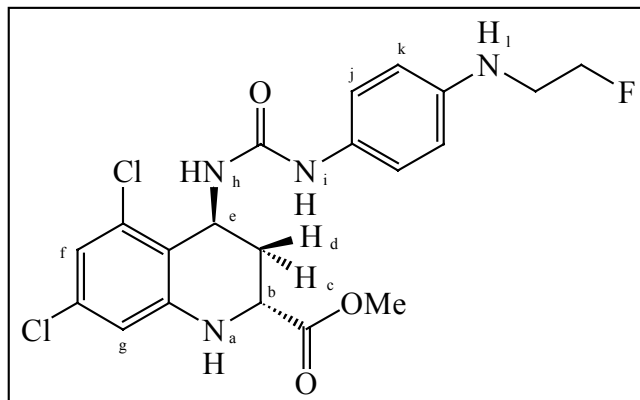
Summenformel: C₃₅H₃₁Cl₂FN₄O₅ (MG: 677,55)

Weißer Feststoff

R_f (Methanol/Chloroform 1/9): 0,84

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8.29 (s, 1H, NH_i), 7.83 (d, 2H, ArH_j), 7.39 (m, 6H, ArH_{m/o/p}), 7.24 (m, 2H, ArH_n), 7.07 (d, 2H, ArH_k), 6.94 (s, 1H, NH_a), 6.89 (d, 1H, ArH_f), 6.73 (d, 1H, ArH_g), 6.61 (d, 1H, NH_h), 4.96 (m, 1H, CH_e), 4.42 (dt, 2H, CH₂F, 48Hz), 4.28 (d, 2H, OCH₂), 4.11 (t, 1H, CH_l), 3.99 (dd, 1H, CH_b), 3.79 (dt, 2H, NCH₂, 30Hz), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 2.34 (br d, 1H, CH_d), 1.68 (dt, 1H, CH_c)

6.2.7.6 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (28)



422 mg (0,62 mmol) trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-(2-fluor-ethyl)-amino]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (27) wurden mit 4 ml einer 10 %igen Lösung von Piperidin in absolutem Tetrahydrofuran versetzt, wobei rasche Kohlendioxidentwicklung festzustellen war. Die Lösung wurde eine weitere ½ Stunde gerührt und anschließend im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mit 10 ml absolutem Diethylether versetzt und die resultierende Suspension 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, wodurch das entstandene Dibenzofulven quantitativ in Lösung ging, während das Produkt als unlöslicher Rückstand zurückblieb. Das Produkt wurde abfiltriert, erneut in 10 ml absolutem Diethylether aufgenommen, 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt, abfiltriert, mit weiteren 5 ml absolutem Diethylether gewaschen und getrocknet. Es wurden 245 mg (86% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₀H₂₁Cl₂FN₄O₃ (MG: 455,31)

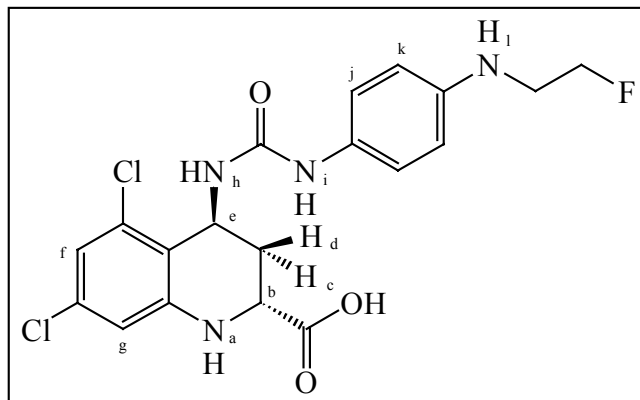
Weißer Feststoff

R_f (Methanol/Chloroform 1/9): 0,68

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 454.7 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.70 (s, 1H, NH_i), 7.09 (d, 2H, ArH_j), 6.90 (s, 1H, NH_a), 6.87 (d, 1H, ArH_f), 6.71 (d, 1H, ArH_g), 6.52 (d, 2H, ArH_k), 6.32 (d, 1H, NH_h), 5.54 (t, 1H, NH_i), 4.89 (m, 1H, CH_e), 4.52 (dt, 2H, CH₂F, 48Hz), 3.98 (dd, 1H, CH_b), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.28 (dt, 2H, NCH₂, 30Hz), 2.31 (br d, 1H, CH_d), 1.63 (dt, 1H, CH_c)

6.2.7.7 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (**29**)



180 mg (0,40 mmol) trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**28**) wurden in 3 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 400 µl Wasser verdünnt und mit 300 µl einer wässrigen 1N Lithiumhydroxidlösung versetzt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur bis zur Bildung einer klaren Lösung gerührt, nach beendeter Umsetzung mit 5 ml Ethylacetat und 5 ml Wasser verdünnt und die beiden Phasen getrennt. Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase filtriert und anschließend mit 2N Salzsäure bis zur vollständigen Ausfällung des Niederschlages versetzt. Die ausgefallene Säure wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Es wurden 121 mg (70% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₀H₁₉Cl₂FN₄O₃ (MG: 441,28)

Weißer Feststoff

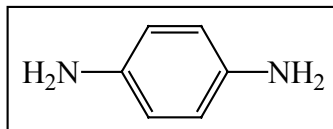
R_f (Chloroform/Methanol 1/1): 0,78

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 440.8 (100.0, [M]⁺), 243.5 (16.7, [C₁₀H₈NO₂Cl₂]⁺), 197.6 (46.6, [C₉H₁₁N₃OF]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.75 (s, 1H, NH_i), 7.10 (d, 2H, ArH_j), 6.87 (d, 1H, ArH_f), 6.80 (s, 1H, NH_a), 6.67 (d, 1H, ArH_g), 6.53 (d, 2H, ArH_k), 6.32 (d, 1H, NH_h), 4.89 (m, 1H, CH_e), 4.52 (dt, 2H, CH₂F, 48Hz), 3.68 (dd, 1H, CH_b), 3.59 (t, 1H, NH_l), 3.28 (dt, 2H, NCH₂, 27Hz), 2.29 (br d, 1H, CH_d), 1.59 (dt, 1H, CH_c)

6.2.8 Trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester

6.2.8.1 1,4-Phenylendiamin (30)



5 g (0,036 mol) 4-Nitroanilin wurden in 40 ml Methanol gelöst, mit 0,5 g Palladium (10% auf Aktivkohle) versetzt und bis zum Entfärben der gelben Nitroverbindung bei 0° C und 1 bar Wasserstoffdruck hydriert. Anschließend wurde vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingengt und durch Umkristallisieren in Chloroform gereinigt. Es wurden 3,66 g (94% d. Th.) des Produkts isoliert.

Charakterisierung:

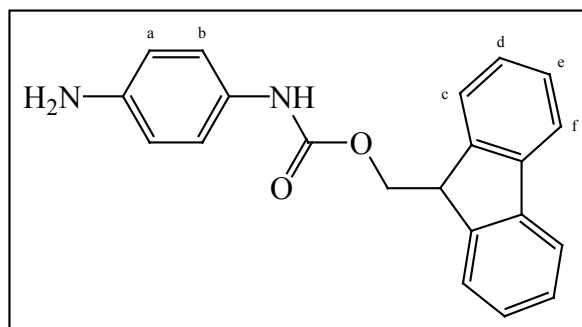
Summenformel: C₆H₈N₂ (MG: 108,14)

Weißer Feststoff

Fp.: 61 °C (Th.: 61-63 °C)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 6.34 (s, 4H, ArH), 4.12 (br, 4H, H₂N)

6.2.8.2 (4-Amino-phenyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (31)



1,35g (10 mmol) 1,4-Phenylendiamin (30) wurden in 40 ml Dioxan gelöst, mit 20 ml einer 10 %igen Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt und auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung von 2,60 g (10 mmol) (9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat in 20 ml absolutem Dioxan wurde langsam zugetropft, nach beendeter Zugabe die Kühlung entfernt und 10 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das zurückbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch, mit Ethylacetat als Eluens, aufgearbeitet. Es wurden 1,2 g (34% d. Th.) des Produkts isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₁H₁₈N₂O₂ (MG: 330,38)

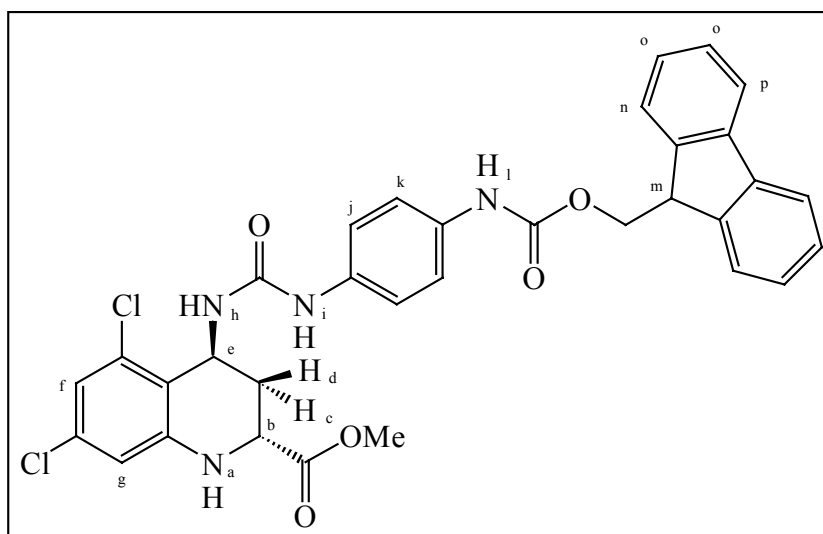
Gelber Feststoff

Fp.: 191 °C

R_f (Ethylacetat): 0,84

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 9.20 (br, 1H, NH), 7.89 (d, 2H, ArH_f), 7.73 (d, 2H, ArH_c), 7.37 (m, 4H, ArH_{d/e}), 7.07 (s, 4H, ArH_b), 6.47 (s, 4H, ArH_a), 4.78 (br, 2H, NH₂), 4.39 (d, 2H, OCH₂), 4.26 (t, 1H, CH)

6.2.8.3 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**32**)



110 mg (0,37 mmol) Triphosgen wurden unter Argonatmosphäre in 4 ml absolutem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde innerhalb einer halben Stunde eine Lösung von 330 mg (1 mmol) (4-Amino-phenyl)-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (**31**) und 189 µl (2,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 3,5 ml absolutem Dichlormethan langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde 15 Minuten gerührt und dann eine Lösung von 312 mg (1 mmol) trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (**4**) und 378 µl (2,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 2 ml absolutem Dichlormethan schnell zugegeben. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 20 Minuten gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 ml Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit 3 %iger Salzsäure, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Feststoff in 15 ml Diethylether aufgenommen. Die entstehende Suspension wurde für 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt, der Rückstand abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Es wurden 489 mg eines weißen Feststoffes isoliert, der 379 mg (60% d. Th.) des trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäuremethylesters (**32**) enthielt und 120 mg des symmetrischen Harnstoffes von (**31**).

Charakterisierung:

Summenformel: C₃₃H₂₈Cl₂N₄O₅ (MG: 631,50)

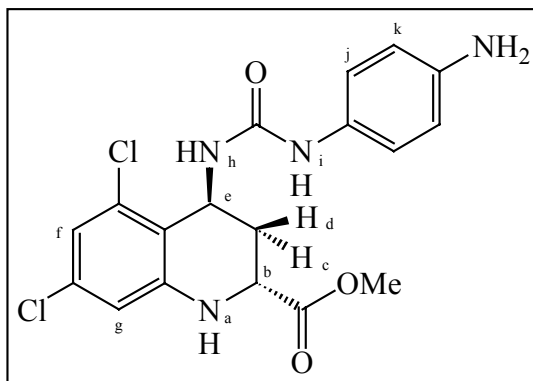
Weißer Feststoff

R_f (Methanol/Chloroform 1/9): 0,70

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 687.3 (10.4, [M]⁺ sym. Harnstoff (31)), 631.1 (1.5, [M]⁺), 465.0 (61.5, [C₂₈H₂₃N₄O₃]⁺ sym. Harnstoff (31)), 408.8 (63.2, [C₁₈H₁₇N₄O₃Cl₂]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 9.54 (br s, 1H, NH_l), 8.06 (s, 1H, NH_i), 7.91 (d, 2H, ArH_p), 7.55 (d, 2H, ArH_n), 7.39 (m, 8H, ArH_{j/k/o}), 6.92 (s, 1H, NH_a), 6.88 (d, 1H, ArH_f), 6.72 (d, 1H, ArH_g), 6.49 (d, 1H, NH_h), 4.91 (m, 1H, CH_e), 4.45 (d, 2H, OCH₂), 4.29 (t, 1H, CH_m), 3.98 (dd, 1H, CH_b), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 2.32 (br d, 1H, CH_d), 1.65 (dt, 1H, CH_c)

6.2.8.4 Trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (33)



379 mg (0,6 mmol) trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (32) (499 mg des Rohproduktes von 5.2.8.3) wurden mit 4 ml einer 10 %igen Lösung von Piperidin in absolutem Tetrahydrofuran versetzt, wobei rasche Kohlendioxidentwicklung festzustellen war. Die Lösung wurde eine weitere ½ Stunde gerührt und anschließend im Vakuum zur Trockene eingedunstet. Der Rückstand wurde mit 10 ml absolutem Diethylether versetzt und die resultierende Suspension 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, wodurch das entstandene Dibenzofulven quantitativ in Lösung ging während das Produkt als unlöslicher Rückstand zurückblieb. Der Feststoff wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und säulenchromatographisch mit Aceton/Chloroform 1/2 als Eluens aufgereinigt. Es wurden 185 mg (76% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₈H₁₈Cl₂N₄O₃ (MG: 409,27)

Weißer Feststoff

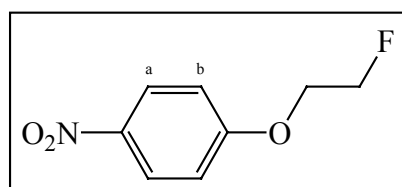
R_f (Aceton/Chloroform 1/2): 0,41

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 408.8 (100.0, [M]⁺)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.65 (s, 1H, NH_i), 7.01 (d, 2H, ArH_j), 6.91 (s, 1H, NH_a), 6.87 (d, 1H, ArH_f), 6.71 (d, 1H, ArH_g), 6.48 (d, 2H, ArH_k), 6.30 (d, 1H, NH_h), 4.88 (m, 1H, CH_e), 4.70 (s, 2H, NH_2), 3.98 (dd, 1H, CH_b), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 2.31 (br d, 1H, CH_d), 1.62 (dt, 1H, CH_c)

6.2.9 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäure

6.2.9.1 1-(2-Fluor-ethoxy)-4-nitro-benzen (**34**)



5,56 g (40 mmol) 4-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 gekocht. 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 im Vakuum erhielt man 6,21 g (84% d. Th.) des Produktes.

Charakterisierung:

Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_8\text{FNO}_3$ (MG: 185,15)

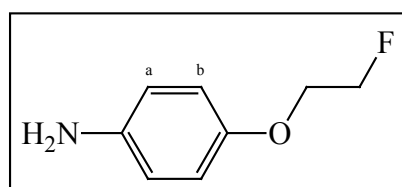
Gelbe Kristalle

Fp.: 74 °C

R_f (Chloroform/Ethylacetat 1/1 + 2% DIEA): 0,77

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 8.20 (d, 2H, ArH_a), 6.98 (d, 2H, ArH_b), 4.78 (dt, 2H, CH_2F , 48Hz), 4.30 (dt, 2H, OCH_2 , 28 Hz)

6.2.9.2 4-(2-Fluor-ethoxy)-phenylamin (**35**)



3,0 g (16 mmol) 1-(2-Fluor-ethoxy)-4-nitro-benzen (**34**) wurden in 80 ml Methanol gelöst, mit 400 mg Palladium (10% auf Aktivkohle) versetzt und bis zum Entfärben der gelben Nitroverbindung bei 0 °C und 1 bar Wasserstoffdruck hydriert. Anschließend wurde vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingengt und durch Säulenchromatographie, mit Ethylace-

tat/Chloroform 1/1 + 3% DIEA als Eluens, gereinigt. Es wurden 2,32 g (93% d. Th.) des Produkts isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₈H₁₀FNO (MG: 155,17)

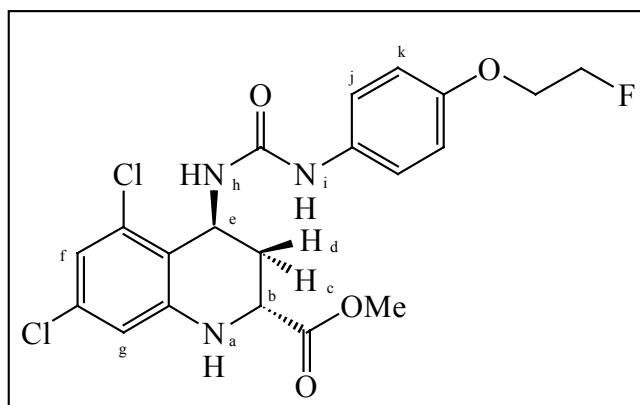
Brauner Feststoff

Fp.: 49 °C

R_f (Chloroform/Ethylacetat 1/1+ 2% DIEA): 0,50

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 6.61 (d, 2H, ArH_a), 6.49 (d, 2H, ArH_b), 4.56 (dt, 2H, CH₂F, 48 Hz), 3.98 (dt, 2H, OCH₂, 28 Hz), 3.43 (br s, 2H, NH₂)

6.2.9.3 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (36)



110 mg (0,37 mmol) Triphosgen wurden, unter Argonatmosphäre, in 4 ml absolutem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde innerhalb einer halben Stunde eine Lösung von 155 mg (1 mmol) 4-(2-Fluor-ethoxy)-phenylamin (35) und 189 µl (1,1 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 3,5 ml absolutem Dichlormethan langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 15 Minuten gerührt und dann eine Lösung von 312 mg (1 mmol) trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4) und 378 µl (2,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 2 ml absolutem Dichlormethan schnell zugegeben. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmt, 20 Minuten gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 ml Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit 3 %iger Salzsäure, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Chloroform 1/1 + 2% DIEA als Eluens aufgearbeitet. Es wurden 313 mg (69% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₀H₂₀Cl₂FN₃O₄ (MG: 456,29)

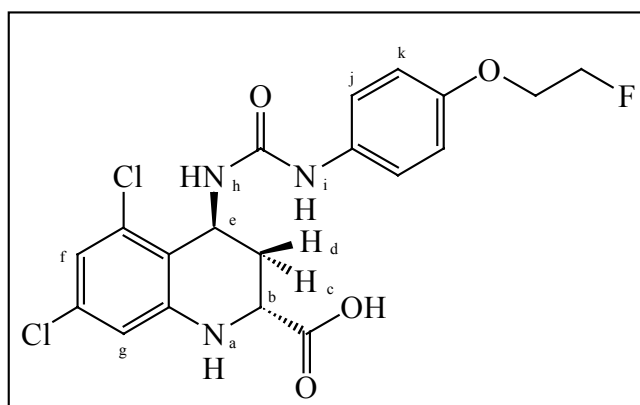
Weißer Feststoff

R_f (Ethylacetat/Chloroform 1/1 + 2% DIEA): 0,76

FD: m/z (% rel. Int.) 455.4 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8.00 (s, 1H, NH_i), 7.30 (d, 2H, ArH_j), 6.92 (s, 1H, NH_a), 6.87 (d, 1H, ArH_f), 6.83 (d, 2H, ArH_k), 6.72 (d, 1H, ArH_g), 6.46 (d, 1H, NH_h), 4.91 (m, 1H, CH_e), 4.71 (dt, 2H, CH₂F, 48Hz), 4.16 (dt, 2H, OCH₂, 30Hz), 4.00 (dd, 1H, CH_b), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 2.32 (br d, 1H, CH_d), 1.65 (dt, 1H, CH_c)

6.2.9.4 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (**37**)



120 mg (0,27 mmol) trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**36**) wurden in 1,25 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 250 µl Wasser verdünnt und mit 125 µl einer wässrigen 1N Lithiumhydroxidlösung versetzt. Die Mischung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit 5 ml Ethylacetat und 5 ml Wasser verdünnt und die beiden Phasen getrennt. Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase filtriert und mit 2N Salzsäure bis zur vollständigen Ausfällung des Produktes angesäuert. Die ausgefallene Säure wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und säulenchromatographisch mit Chloroform/Methanol 9/1 + 3% DIEA aufgereinigt. Es wurden 93 mg (78% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₉H₁₈Cl₂FN₃O₄ (MG: 442,27)

Weißer Feststoff

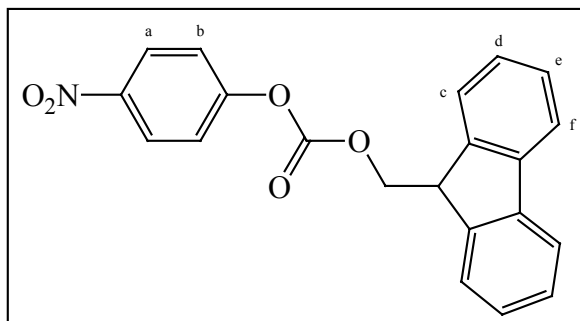
R_f (Chloroform/Methanol 9/1 + 3% DIEA): 0,34

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 441.8 (100.0, [M]⁺), 243.5 (10.2, [C₁₀H₈NO₂Cl₂]⁺), 198.6 (27.8, [C₉H₁₀N₂O₂F]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8.19 (s, 1H, NH_i), 7.31 (d, 2H, ArH_j), 6.87 (d, 1H, ArH_f), 6.84 (d, 2H, ArH_k), 6.60 (d, 1H, ArH_g), 6.53 (s, 1H, NH_a), 6.52 (d, 1H, NH_h), 4.89 (m, 1H, CH_e), 4.70 (dt, 2H, CH₂F, 48Hz), 4.15 (dt, 2H, OCH₂, 30Hz), 3.65 (dd, 1H, CH_b), 2.28 (br d, 1H, CH_d), 1.43 (dt, 1H, CH_c)

6.2.10 Trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-hydroxy-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

6.2.10.1 Carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester 4-nitro-phenylester (38)



2,68 g (19,3 mmol) Nitrophenol wurden in 80 ml Dioxan gelöst und mit 40 ml einer 10 %igen Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt. Die Mischung wurde heftig gerührt und auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung von 5,0 g (19,3 mmol) (9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat in 40 ml absolutem Dioxan wurde langsam zugetropft, nach beendeter Zugabe die Kühlung entfernt und 10 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf 80 ml gesättigte Natriumchloridlösung gegossen und mehrfach mit jeweils 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurden 6,71 g (96% d. Th.) eines gelben Rückstandes isoliert, welcher das Produkt in ausreichender Reinheit darstellte.

Charakterisierung:

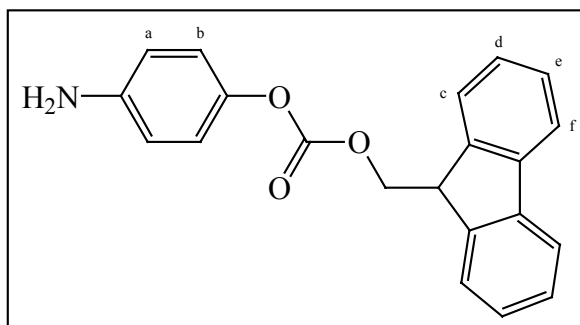
Summenformel: C₂₁H₁₅NO₅ (MG: 361,35)

Gelber Feststoff

Fp.: 94 °C

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 8.25 (d, 2H, ArH_a), 7.78 (d, 2H, ArH_f), 7.63 (d, 2H, ArH_c), 7.37 (m, 4H, ArH_{d/e}), 7.33 (d, 2H, ArH_b), 4.59 (d, 2H, OCH₂), 4.32 (t, 1H, CH)

6.2.10.2 Carbonsäure 4-amino-phenylester 9H-fluoren-9-ylmethylester (39)



3,0 g (8,3 mmol) Carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester 4-nitro-phenylester (38) wurden in 80 ml Methanol gelöst, mit 200 mg Palladium (10 % auf Aktivkohle) versetzt und bis zum Entfärben der gelben Reaktionslösung bei 0 °C und 1 bar Wasserstoffdruck hydriert. Anschließend wurde der

Katalysator abfiltriert, das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand durch Säulenchromatographie, mit Chloroform/Ethylacetat 1/1 + 2% DIEA als Eluens, gereinigt. Es wurden 2,25 g (82% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₁H₁₇NO₃ (MG: 331,36)

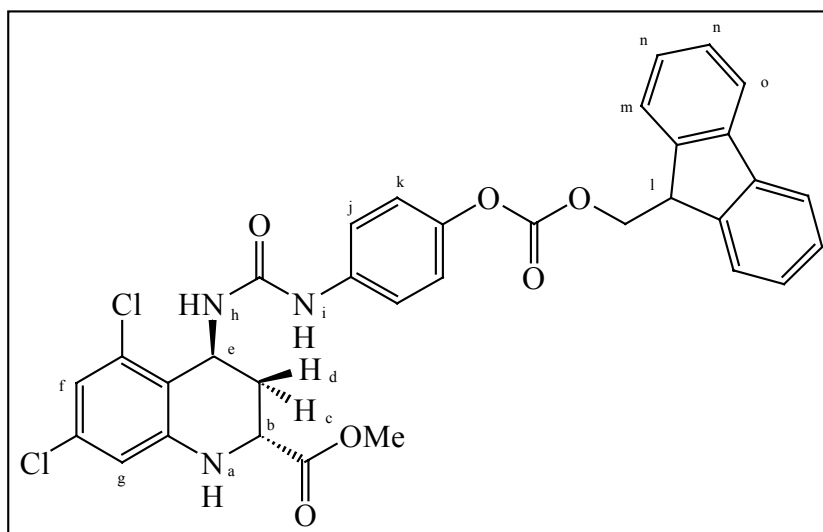
Brauner Feststoff

Fp.: 104 °C

R_f (Chloroform/Ethylacetat 1/1 + 2% DIEA): 0,66

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 7.78 (d, 2H, ArH_f), 7.64 (d, 2H, ArH_c), 7.38 (m, 4H, ArH_{d/e}), 6.96 (d, 2H, ArH_b), 6.65 (d, 2H, ArH_a), 4.50 (d, 2H, OCH₂), 4.31 (t, 1H, CH), 3.45 (br, 2H, NH₂)

6.2.10.3 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (40)



110 mg (0,37 mmol) Triphosgen wurden unter Argonatmosphäre in 4 ml absolutem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde innerhalb einer halben Stunde eine Lösung von 332 mg (1 mmol) Carbonsäure 4-amino-phenylester 9H-fluoren-9-ylmethylester (39) und 189 µl (1,1 mmol) N-Ethyldiisopropylamin in 3,5 ml absolutem Dichlormethan langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 15 Minuten gerührt und dann eine Lösung von 312 mg (1 mmol) trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4) und 378 µl (2,2 mmol) N-Ethyldiisopropylamin in 2 ml absolutem Dichlormethan schnell zugegeben. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 20 Minuten gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 ml Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit 3 %iger Salzsäure, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und durch Zusatz von 10 ml Diethylether das Produkt ausgefällt. Nach Abfilt-

rieren des Rückstandes wurde dieser säulenchromatographisch, mit Chloroform/Ethylacetat 3/1 als Eluens, gereinigt. Es wurden 450 mg (71% d. Th.) des Produktes abgetrennt.

Charakterisierung:

Summenformel: $C_{33}H_{27}Cl_2N_3O_6$ (MG: 632,49)

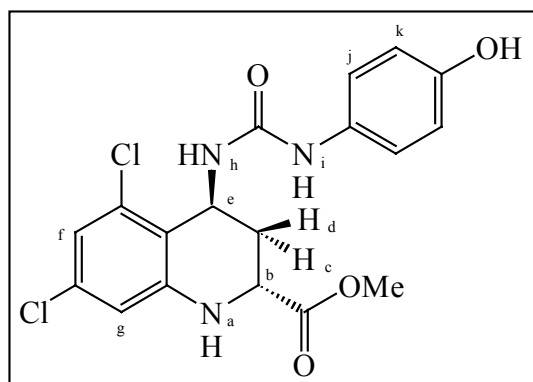
Weißer Feststoff

R_f (Chloroform/Ethylacetat 3/1): 0,71

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 631.7 (15.2, $[M]^+$), 357.5 (19.0, $[C_{22}H_{16}NO_4]^+$), 178.5 (100.0, $[C_{14}H_{11}]^+$)

1H -NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 8.26 (s, 1H, NH_i), 7.92 (d, 2H, ArH_o), 7.68 (d, 2H, ArH_m), 7.40 (m, 6H, $ArH_{j/n}$), 7.02 (d, 2H, ArH_k), 6.93 (s, 1H, NH_a), 6.89 (d, 1H, ArH_f), 6.73 (d, 1H, ArH_g), 6.61 (d, 1H, NH_h), 4.92 (m, 1H, CH_e), 4.65 (d, 2H, OCH_2), 4.37 (t, 1H, CH_l), 4.00 (dd, 1H, CH_b), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 2.31 (br d, 1H, CH_d), 1.67 (dt, 1H, CH_c)

6.2.10.4 Trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-hydroxy-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (41)



300 mg (0,5 mmol) trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (40) wurden mit 3 ml einer 10 %igen Lösung von Piperidin in absolutem Tetrahydrofuran versetzt, wobei rasche Kohlendioxidentwicklung festzustellen war. Die Lösung wurde eine weitere ½ Stunde gerührt und anschließend im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mit 10 ml absolutem Diethylether versetzt und die resultierende Suspension 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, wodurch das entstandene Dibenzofulven quantitativ in Lösung ging während das Produkt als unlöslicher Rückstand zurückblieb. Der Feststoff wurde abfiltriert, mit 5 ml Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 168 mg (86% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: $C_{18}H_{17}Cl_2N_3O_4$ (MG: 410,25)

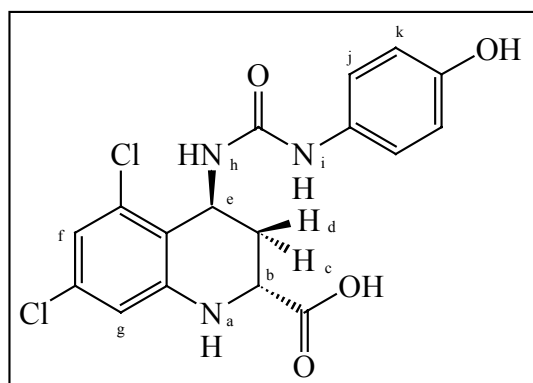
Weißer Feststoff

R_f (Ethylacetat/Chloroform 1/3): 0,16

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 409.5 (100.0, $[M]^+$)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8.97 (s, 1H, OH), 7.84 (s, 1H, NH_i), 7.16 (d, 2H, ArH_j), 6.91 (s, 1H, NH_a), 6.88 (d, 1H, ArH_f), 6.72 (d, 1H, ArH_g), 6.64 (d, 2H, ArH_k), 6.39 (d, 1H, NH_h), 4.90 (m, 1H, CH_e), 3.99 (dd, 1H, CH_b), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 2.32 (br d, 1H, CH_d), 1.64 (dt, 1H, CH_c)

6.2.10.5 Trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-hydroxy-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (42)



150 mg (0,37 mmol) trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-hydroxy-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäuremethylester (41) wurden in 3 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 750 µl Wasser verdünnt und mit 300 µl einer wässrigen 1N Lithiumhydroxidlösung versetzt. Die Mischung wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt, nach beendeter Umsetzung mit 8 ml Ethylacetat und 8 ml Wasser verdünnt und die beiden Phasen getrennt. Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase filtriert und mit 2N Salzsäure bis zur vollständigen Ausfällung des Produktes angesäuert. Die ausgefallene Säure wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und säulenchromatographisch, mit Methanol/Chloroform 1/3 als Eluens, gereinigt. Es wurden 114 mg (79% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₇H₁₅Cl₂N₃O₄ (MG: 396,22)

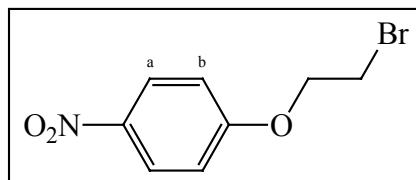
Weißer Feststoff

R_f (Methanol/Chloroform 1/3): 0,16

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 9.03 (s, 1H, OH), 8.00 (s, 1H, NH_i), 7.16 (d, 2H, ArH_j), 6.85 (d, 1H, ArH_f), 6.62 (d, 2H, ArH_k), 6.55 (d, 1H, ArH_g), 6.41 (d, 1H, NH_h), 6.39 (s, 1H, NH_a), 4.90 (m, 1H, CH_e), 3.53 (dd, 1H, CH_b), 2.34 (br d, 1H, CH_d), 1.35 (dt, 1H, CH_c)

6.2.11 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-brom-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäuremethylester

6.2.11.1 1-(2-Brom-ethoxy)-4-nitro-benzen (43)



1,39 g (10 mmol) 4-Nitrophenol wurden in 30 ml Methanol gelöst, mit 0,70 g (20 mmol) Kalium-methylat versetzt, 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 15 ml Dioxan und 15 ml 1,2-Dibromethan gelöst und über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde im Vakuum zur Trockene eingeeengt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Chloroform als Eluens aufgearbeitet. Es wurden 2,11 g (86% d. Th.) des Produktes abgetrennt.

Charakterisierung:

Summenformel: $C_8H_8BrNO_3$ (MG: 246,06)

Gelber Feststoff

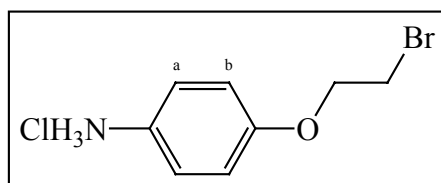
Fp.: 66 °C

R_f (Chloroform): 0,16

FD: m/z (% rel. Int.) 245.4 (100.0, $[M]^+$)

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.19 (d, 2H, ArH_a), 6.96 (d, 2H, ArH_b), 4.37 (t, 2H, OCH_2), 3.66 (t, 2H, CH_2Br)

6.2.11.2 4-(2-Brom-ethoxy)-phenylamin-hydrochlorid (44)



2,8 g (14,7 mmol) Zinn(II)-chlorid-Dihydrat wurden unter Rühren in 3,6 ml konz. HCl gelöst und nach vollständiger Auflösung 1,0 g (4 mmol) 1-(2-Brom-ethoxy)-4-nitro-benzen (43) hinzugefügt. Ein langsames Ansteigen der Temperatur wurde festgestellt, mit einer einhergehenden Gelbfärbung der Lösung. Sobald die Reaktionstemperatur zu sinken begann, wurde der Kolben in einem Eisbad gekühlt und mit 5 ml Wasser und 12,5 ml Diethylether versetzt. Anschließend wurde die Lösung mit 6M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 11-12 eingestellt und die beiden Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde erneut mit 7,5 ml Diethylether extrahiert, die Diethyletherphasen vereinigt und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im leichten Vakuum entfernt und der zurückbleibende gelbe Feststoff mit Ethylacetat/n-Hexan 1/1 säulenchromatographisch

aufgereinigt. Die Fraktionen, welche das Produkt enthielten, wurden vereinigt, unter schonenden Bedingungen im Vakuum stark eingeengt und das Produkt aus der restlichen Lösung durch Versetzen mit 1N HCl in Diethylether als Hydrochlorid ausgefällt. Durch Filtration des Feststoffes wurden 820 mg (81% d. Th.) des Produkts isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₈H₁₀BrNO·HCl (MG: 252,54)

Gelber Feststoff

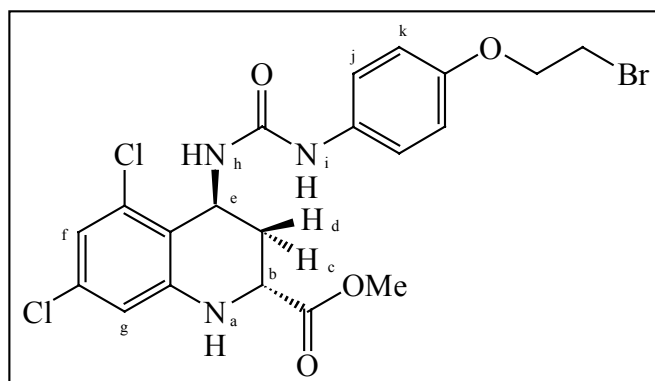
Fp.: 200 °C (Zersetzung)

R_f (Ethylacetat/n-Hexan 1/1): 0,50

FD: m/z (% rel. Int.) 215.5 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 10.32 (br s, 3H, NH₃⁺), 7.33 (d, 2H, ArH_a), 7.05 (d, 2H, ArH_b), 4.32 (t, 2H, OCH₂), 3.80 (t, 2H, CH₂Br)

6.2.11.3 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-brom-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (45)



110 mg (0,37 mmol) Triphosgen wurden, unter Argonatmosphäre, in 4 ml absolutem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde innerhalb einer halben Stunde eine Lösung von 253 mg (1 mmol) 4-(2-Brom-ethoxy)-phenylamin-hydrochlorid (44) und 378 µl (2,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 3,5 ml absolutem Dichlormethan langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 15 Minuten gerührt und dann eine Lösung von 312 mg (1 mmol) trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4) und 378 µl (2,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 2 ml absolutem Dichlormethan schnell zugegeben. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmt, 20 Minuten gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 50 ml Ethylacetat aufgenommen, zweimal mit 3 %iger Salzsäure, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde bis zur Trockene eingeengt, mit 20 ml Ethylacetat versetzt, 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt, der Rückstand abfiltriert und in analoger Weise mit 10 ml Acetonitril behandelt. Der so erhaltene Rückstand wurde im Vakuum getrocknet und stellte das Produkt in einer Ausbeute von 450 mg (87% d. Th.) dar.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₀H₂₀Cl₂BrN₃O₄ (MG: 517,20)

Weißer Feststoff

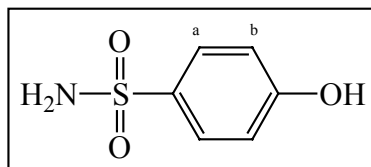
R_f (Ethylacetat): 0,92

FD: m/z (% rel. Int.) 515.6 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8.13 (s, 1H, NH_i), 7.23 (d, 2H, ArH_j), 6.84 (s, 1H, NH_a), 6.80 (d, 1H, ArH_f), 6.78 (d, 2H, ArH_k), 6.64 (d, 1H, ArH_g), 6.49 (d, 1H, NH_h), 4.85 (m, 1H, CH_e), 4.17 (t, 2H, OCH₂), 3.93 (dd, 1H, CH_b), 3.69 (t, 2H, CH₂Br), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 2.23 (br d, 1H, CH_d), 1.57 (dt, 1H, CH_c)

6.2.12 Trans- 5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure

6.2.12.1 4-Hydroxy-benzensulfonamid (46)



10 g (58 mmol) Sulfanilamid wurden in einer Mischung aus 40 ml konz. Schwefelsäure und 80 ml Wasser gelöst und bei 0 °C mit 4 g (58 mmol) Natriumnitrit in 40 ml Wasser diazotiert. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 2 Stunden bei 0 °C gerührt und anschließend bis zur Beendigung der Stickstoffentwicklung im Wasserbad erhitzt. Die Lösung wurde abgekühlt, über Nacht bei 0 °C gelagert und das ausgefallene 4-Hydroxy-benzensulfonamid abfiltriert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch Säulenchromatographie unter Verwendung von Ethylacetat als Eluens. Es wurden 7,20 g (72% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₆H₇NO₃S (MG: 173,19)

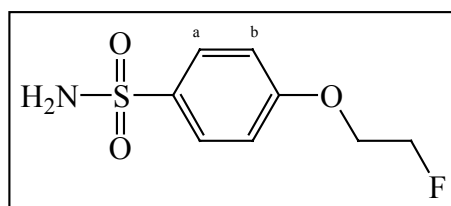
Weißer Feststoff

Fp.: 177 °C

R_f (Ethylacetat): 0,86

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 10.23 (s, 1H, OH), 7.64 (d, 2H, ArH_a), 7.09 (s, 2H, NH₂), 6.87 (d, 2H, ArH_b)

6.2.12.2 4-(2-Fluor-ethoxy)-benzensulfonamid (47)



1,7 g 4-Hydroxy-benzensulfonamid (46) wurden in 30 ml Methanol gelöst, mit 0,69 g Kalium-methylat versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 30 ml absolutem Dimethylformamid aufgenommen. Nach Zugabe einer Spatelspitze Natriumiodid und 1,26 g 1,2-Bromfluoethan und wurde unter Rühren für 14 Stunden auf 80 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde bis zur Trockene eingengt und der Rückstand durch Säulenchromatographie mit Chloroform/Ethylacetat 1/1 als Eluens aufgetrennt. Es wurden 1,46 g (68% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₈H₁₀FNO₃S (MG: 219,23)

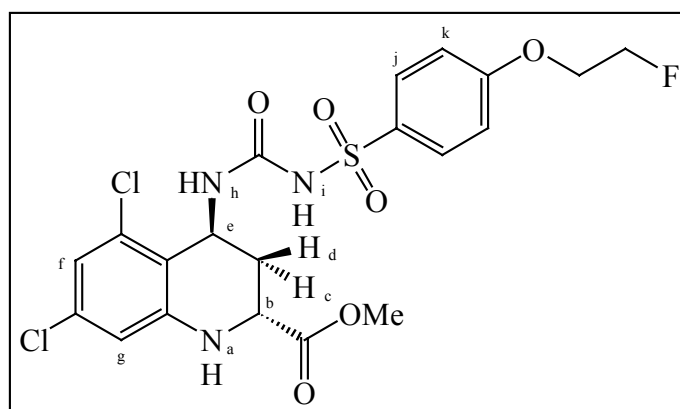
Weißer Feststoff

Fp.: 148 °C

R_f (Chloroform/Ethylacetat 1/1): 0,44

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.68 (d, 2H, ArH_a), 7.14 (s, 2H, NH₂), 7.05 (d, 2H, ArH_b), 4.68 (dt, 2H, CH₂F, 48 Hz), 4.24 (dt, 2H, OCH₂, 30 Hz)

6.2.12.3 Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (48)



330 mg (1,50 mmol) 4-(2-Fluor-ethoxy)-benzensulfonamid (47) und 245 mg (1,50 mmol) 1,1'-Carbonyl-diimidazol wurden unter Argonatmosphäre in 5,2 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zu dieser Lösung wurden 470 mg (1,50 mmol) trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4) und 570 µl (3,3 mmol) N-Ethyldiisopropylamin in 3 ml Tetrahydrofuran schnell zugegeben das Reaktions-

gemisch für 4 Stunden auf 50 °C erhitzt und anschließend im Vakuum zur Trockene eingengt. Der viskose Rückstand wurde mit 5 ml Ethylacetat versetzt, der entstandene Niederschlag abfiltriert und verworfen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Produktes wurde mittels Säulenchromatographie unter Verwendung von Chloroform/Ethylacetat 3/1 + 3% HAc als Eluens durchgeführt. Es wurden 220 mg (28% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₀H₂₀Cl₂FN₃O₆S (MG: 520,36)

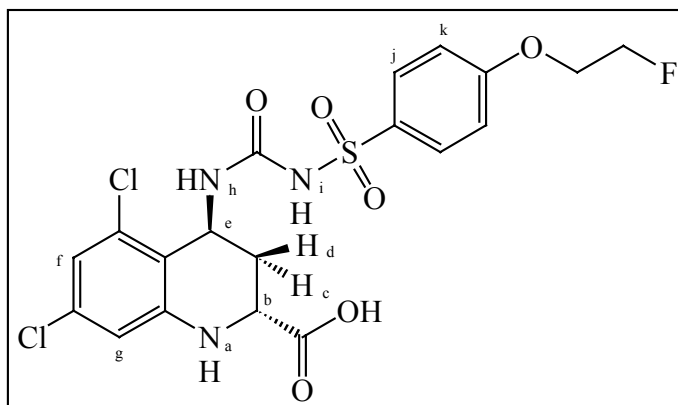
Weißer Feststoff

R_f (Chloroform/Ethylacetat 3/1 + 3% HAc): 0,60

FD: m/z (% rel. Int.) 519.9 (100.0, [M]⁺), 274.6 (8.3, [C₁₁H₁₁Cl₂N₂O₂]⁺), 245.6 (77.1, [C₉H₉FNO₄S]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 10.14 (br, 1H, NH_i), 7.85 (d, 2H, ArH_j), 7.16 (d, 2H, ArH_k), 6.90 (s, 1H, NH_a), 6.87 (d, 1H, ArH_f), 6.82 (d, 1H, NH_h), 6.68 (d, 1H, ArH_g), 4.78 (dt, 2H, CH₂F, 48Hz), 4.74 (m, 1H, CH_e), 4.36 (dt, 2H, OCH₂, 28Hz), 3.89 (dd, 1H, CH_b), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 2.11 (br d, 1H, CH_d), 1.63 (dt, 1H, CH_c)

6.2.12.4 Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (49)



100 mg (0,19 mmol) trans-5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (48) wurden in 2 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 500 µl Wasser verdünnt und mit 400 µl einer wässrigen 1N Lithiumhydroxidlösung versetzt. Die Mischung wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, nach beendeter Umsetzung mit 5 ml Ethylacetat und 5 ml Wasser verdünnt und die beiden Phasen getrennt. Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase filtriert und mit 2N Salzsäure bis zur vollständigen Ausfällung des Produktes versetzt. Die ausgefallene Säure wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und mittels Säulenchromatographie (Ethylacetat + 3% HAc) aufgearbeitet. Es wurden 55 mg (57% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₉H₁₈Cl₂FN₃O₆S (MG: 506,33)

Weißer Feststoff

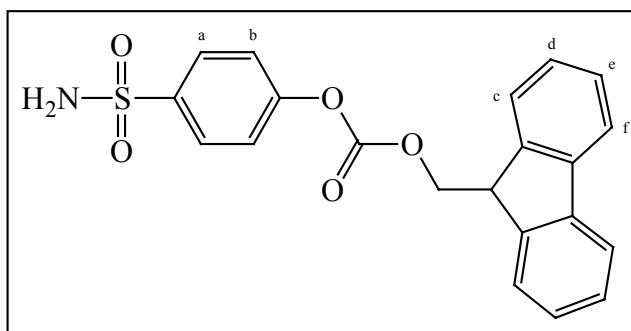
R_f (Ethylacetat + 3% HAc): 0,60

FD: m/z (% rel. Int.) 505.8 (17.4, [M]⁺), 245.6 (100.0, [C₉H₉FNO₄S]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 10.20 (s, 1H, NH_i), 7.84 (d, 2H, ArH_j), 7.15 (d, 2H, ArH_k), 6.87 (d, 1H, ArH_f), 6.80 (d, 1H, NH_h), 6.79 (s, 1H, NH_a), 6.64 (d, 1H, ArH_g), 4.78 (dt, 2H, CH₂F, 48Hz), 4.74 (m, 1H, CH_e), 4.35 (dt, 2H, OCH₂, 30Hz), 3.78 (dd, 1H, CH_b), 2.11 (br d, 1H, CH_d), 1.59 (dt, 1H, CH_c)

6.2.13 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[(4-hydroxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäure

6.2.13.1 Carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester 4-sulfamoyl-phenylester (50)



500 mg (2,89 mmol) 4-Hydroxy-benzensulfonamid (46) wurden in 12 ml Dioxan gelöst und mit 6 ml einer 10 %igen Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt. Die Mischung wurde heftig gerührt und auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung von 750 mg (2,89 mmol) (9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat in 6 ml absolutem Dioxan wurde langsam zugetropft, nach beendeter Zugabe die Kühlung entfernt und 10 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf 12 ml gesättigte Natriumchloridlösung gegossen und mehrfach mit jeweils 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der weiße Rückstand, welcher das Produkt darstellt, wurde in einer Ausbeute von 960 mg (85% d. Th.) erhalten.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₁H₁₇NO₅S (MG: 395,43)

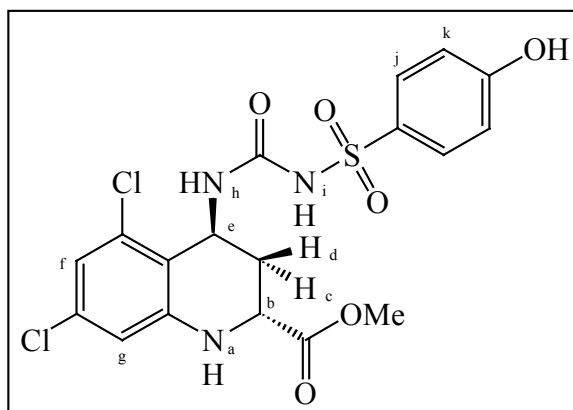
Weißer Feststoff

Fp.: 160 °C

R_f (Ethylacetat/Chloroform 1/1): 0,75

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.92 (d, 2H, ArH_a), 7.86 (d, 2H, ArH_f), 7.69 (d, 2H, ArH_c), 7.42 (m, 8H, ArH_{b/d/e}, NH₂), 4.72 (d, 2H, OCH₂), 4.39 (t, 1H, CH)

6.2.13.2 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[(4-hydroxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**51**)



790 mg (2 mmol) Carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester 4-sulfamoyl-phenylester (**50**) und 325 mg (2 mmol) 1,1'-Carbonyl-diimidazol wurden unter Argonatmosphäre in 7 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zu dieser Lösung wurden 625 mg (2 mmol) trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylesterhydrochlorid (**4**) und 760 μ l (4,4 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 4 ml Tetrahydrofuran schnell zugegeben, für 4 Stunden auf 50 °C erhitzt und anschließend im Vakuum zur Trockene eingengt. Der viskose Rückstand wurde mit 10 ml einer 10 %igen Piperidinlösung in Tetrahydrofuran versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 20 ml absolutem Diethylether im Ultraschallbad behandelt und anschließend vom Lösungsmittel abfiltriert. Die Reinigung des Produktes wurde mittels Säulenchromatographie unter Verwendung von Chloroform/Ethylacetat 3/1 + 3% HAc als Eluens durchgeführt. Es wurden 99 mg (10% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

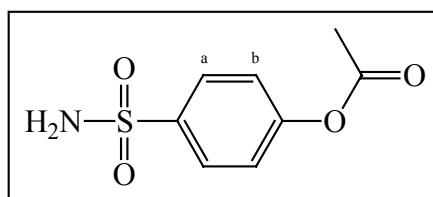
Summenformel: C₁₈H₁₇Cl₂N₃O₆S (MG: 474,32)

Weißer Feststoff

R_f (Chloroform/Ethylacetat 3/1 + 3% HAc): 0,48

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 10.53 (br s, 1H, ArOH), 10.02 (br, 1H, NH_i), 7.73 (d, 2H, ArH_j), 6.91 (d, 2H, ArH_k), 6.86 (d, 1H, ArH_f), 6.84 (s, 1H, NH_a), 6.75 (d, 1H, NH_h), 6.69 (d, 1H, ArH_g), 4.75 (m, 1H, CH_e), 3.88 (dd, 1H, CH_b), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 2.11 (br d, 1H, CH_d), 1.63 (dt, 1H, CH_c)

6.2.13.3 Essigsäure 4-sulfamoyl-phenylester (52)



865 mg (5 mmol) 4-Hydroxy-benzensulfonamid (46) wurden zu einer Lösung aus 695 mg (5 mmol) Kaliumcarbonat und 8 ml Wasser gegeben und anschließend langsam mit 475 μ l (5 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt. Nach kurzer Zeit begann der Essigsäure 4-sulfamoyl-phenylester als weißer Niederschlag auszufallen. Es wurde weitere 30 Minuten bei 0 °C gerührt, der Niederschlag abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und im Vakuum vom restlichen Lösungsmittel befreit. Es wurden 925 mg (86% d. Th.) des Produktes abgetrennt.

Charakterisierung:

Summenformel: C₈H₉NO₄S (MG: 215,23)

Weißer Feststoff

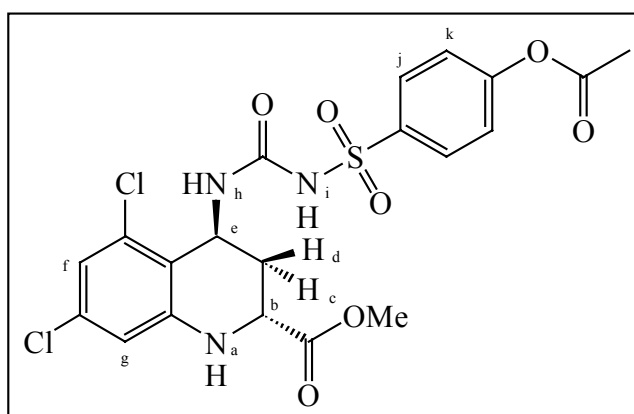
Fp.: 163 °C

R_f (Chloroform/Ethylacetat 1/1): 0,61

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 215.6 (100.0, [M]⁺), 172.5 (74.0, [C₆H₆NO₃S]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.86 (d, 2H, ArH_a), 7.40 (s, 2H, NH₂), 7.33 (d, 2H, ArH_b), 2.29 (s, 3H, CH₃)

6.2.13.4 Trans-4-{3-[(4-Acetoxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäuremethylester (53)



435 mg (2 mmol) Essigsäure 4-sulfamoyl-phenylester (52) und 325 mg (2 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol wurden unter Argonatmosphäre in 7 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zu dieser Lösung wurden 625 mg (2 mmol) trans-4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (4) und 760 μ l (4,4 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin in 4 ml Tetrahydrofuran schnell zugegeben, für 4 Stunden

auf 50 °C erhitzt und anschließend im Vakuum zur Trockene eingengt. Der zurückbleibende Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie unter Verwendung von Chloroform/Ethylacetat 3/1 + 3% HAc als Eluens gereinigt. Es wurden 213 mg (21% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

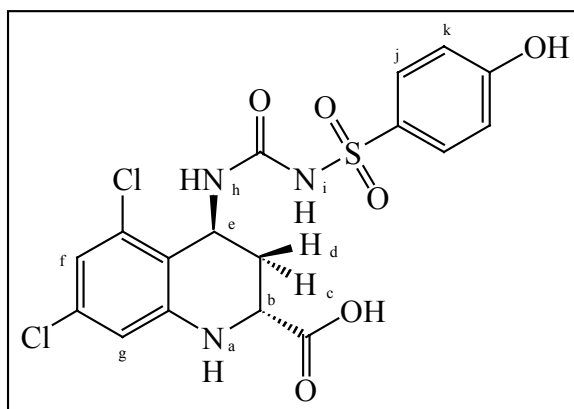
Summenformel: C₂₀H₁₉Cl₂N₃O₇S (MG: 516,35)

Weißer Feststoff

R_f (Chloroform/Ethylacetat 3/1 + 3% HAc): 0,50

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 10.35 (s, 1H, NH_i), 7.95 (d, 2H, ArH_j), 7.38 (d, 2H, ArH_k), 6.91 (s, 1H, NH_a), 6.87 (d, 1H, ArH_f), 6.82 (d, 1H, NH_h), 6.67 (d, 1H, ArH_g), 4.73 (m, 1H, CH_e), 3.88 (dd, 1H, CH_b), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.10 (br d, 1H, CH_d), 1.62 (dt, 1H, CH_c)

6.2.13.5 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[(4-hydroxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (54)



160 mg (0,31 mmol) trans-4-{3-[(4-Acetoxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-5,7-dichloro-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (53) wurden in 3 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 750 µl Wasser verdünnt und mit 600 µl einer wässrigen 1N Lithiumhydroxidlösung versetzt. Die Mischung wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, nach beendeter Umsetzung mit 8 ml Ethylacetat und 8 ml Wasser verdünnt und die beiden Phasen getrennt. Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase filtriert und bis zur vollständigen Ausfällung der freien Säure mit 2N Salzsäure versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und durch Säulenchromatographie mit Ethylacetat + 3% HAc gereinigt. Es wurden 105 mg (76% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₇H₁₅Cl₂N₃O₆S (MG: 474,32)

Weißer Feststoff

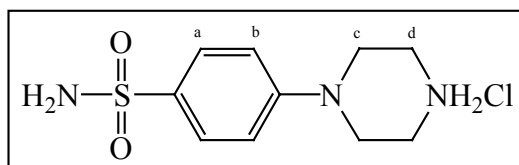
R_f (Ethylacetat + 3% HAc): 0,57

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 459.7 (7.7, [M]⁺), 243.5 (34.6, [C₁₀H₈NO₂Cl₂]⁺), 199.5 (100.0, [C₇H₆NO₄S]⁺), 173.5 (29.6, [C₆H₆NO₃S]⁺)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 13.15 (br, 1H, COOH), 10.54 (br, 1H, ArOH), 10.02 (br, 1H, NH_i), 7.73 (d, 2H, ArH_j), 6.90 (d, 2H, ArH_k), 6.87 (d, 1H, ArH_f), 6.79 (s, 1H, NH_a), 6.74 (d, 1H, NH_h), 6.65 (d, 1H, ArH_g), 4.75 (m, 1H, CH_e), 3.78 (dd, 1H, CH_b), 2.12 (br d, 1H, CH_d), 1.60 (dt, 1H, CH_c)

6.2.14 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-benzensulfonamid

6.2.14.1 4-Piperazin-1-yl-benzensulfonamid-hydrochlorid (**55**)



22 g (128 mmol) Sulfanilamid und 25 g (140 mmol) Bis(2-chlorethyl)amin-hydrochlorid wurden in 250 ml Butanol gelöst und unter Rückfluss für 66 Stunden bei 130 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand mehrfach aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Es wurden 11,1 g (28% d. Th.) des Produkts isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$ (MG: 277,77)

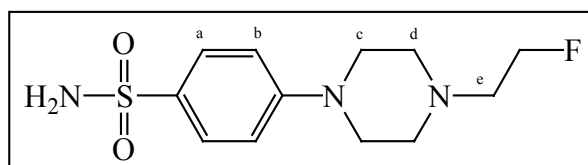
Weißer Feststoff

Fp.: 291 °C (Zersetzung)

R_f (Methanol/Dichlormethan 1/1 +2% DIEA): 0,26

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 9.46 (br s, 2H, NH_2^+), 7.65 (d, 2H, ArH_a), 7.13 (s, 2H, H_2NSO_2), 7.08 (d, 2H, ArH_b), 3.52 (t, 4H, CH_c), 3.15 (t, 4H, CH_d)

6.2.14.2 4-[4-(2-Fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-benzensulfonamid (**56**)



2,8 g (9 mmol) 4-Piperazin-1-yl-benzensulfonamid-hydrochlorid (**55**), 1,3 g (10 mmol) 1,2-Bromfluorethan, 4,2 g (30 mmol) Kaliumcarbonat und 20 mg Natriumiodid wurden in 15 ml Dioxan gelöst und 16 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch, mit Methanol/Dichlormethan 1/1 +2% DIEA als Eluens, aufgearbeitet. Es wurden 1,23 g (48% d. Th.) des Produkts isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₂H₁₈FN₃O₂S (MG: 287,35)

Weißer Feststoff

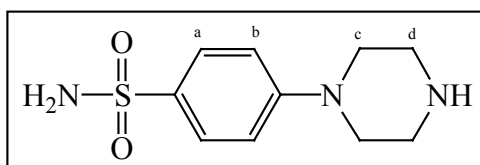
Fp.: 203 °C

R_f (Methanol/Dichlormethan 1/1 +2% DIEA): 0,82

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.61 (d, 2H, ArH_a), 7.06 (s, 2H, H₂N), 7.02 (d, 2H, ArH_b), 4.58 (dt, 2H, CH₂F, 48 Hz), 3.28 (t, 4H, CH_c), 2.71 (dt, 2H, H_e, 28 Hz), 2.61 (t, 4H, CH_d)

6.2.15 4-(4-Sulfamoyl-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester

6.2.15.1 4-Piperazin-1-yl-benzensulfonamid (57)



2,5 g (8 mmol) 4-Piperazin-1-yl-benzensulfonamid-hydrochlorid (55) und 4,4 g (32 mmol) Kaliumcarbonat wurden in 100 ml Methanol suspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene weiße Feststoff wurde anschließend über eine kurze Säule (Eluens: Methanol/Dichlormethan 1/1 +2% DIEA) gegeben, um das überschüssige Kaliumcarbonat abzutrennen. Es wurden 2,0 g (92% d. Th.) des Produkts isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₀H₁₅N₃O₂S (MG: 241,31)

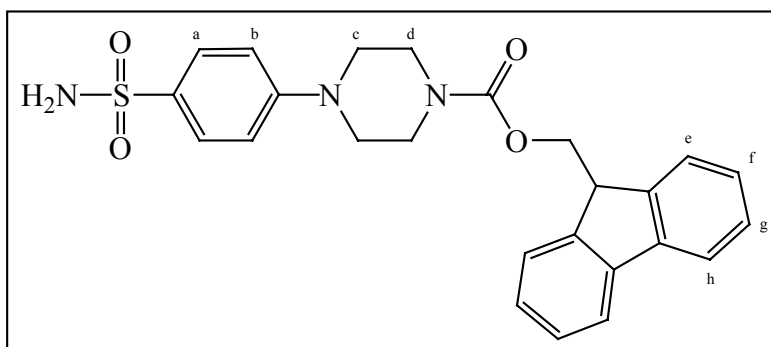
Weißer Feststoff

Fp.: 219 °C

R_f (Methanol/Dichlormethan 1/1 +2% DIEA): 0,27

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.60 (d, 2H, ArH_a), 7.06 (br, 2H, H₂N), 6.99 (d, 2H, ArH_b), 3.26 (br s, 1H, NH), 3.18 (t, 4H, CH_c), 2.81 (t, 4H, CH_d)

6.2.15.2 4-(4-Sulfamoyl-phenyl)-piperazin-1-carbonsäure 9H-fluoren-9-ylmethylester (58)



1 g (3,2 mmol) 4-Piperazin-1-yl-benzensulfonamid (57) wurden in 20 ml Dioxan gelöst und mit 10 ml einer 10 %igen Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt. Die Mischung wurde heftig gerührt und auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung 0,83 g (3,2 mmol) (9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat in 40 ml absolutem Dioxan wurde langsam zugetropft, nach beendeter Zugabe die Kühlung entfernt und 10 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf 20 ml gesättigte Natriumchloridlösung gegossen und mehrfach mit jeweils 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde dann säulenchromatographisch, mit Ethylacetat als Eluens, gereinigt. Es wurden 1,32 g (89% d. Th.) des Produkts isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₅H₂₅N₃O₄S (MG: 463,55)

Weißer Feststoff

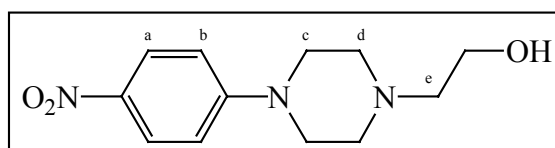
Fp.: 178 °C (Zersetzung)

R_f (Ethylacetat): 0,90

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 7.89 (d, 2H, ArH_h), 7.63 (d, 2H, ArH_a), 7.63 (d, 2H, ArH_e), 7.37 (m, 4H, ArH_{f/g}), 7.08 (s, 2H, H₂N), 7.02 (d, 2H, ArH_b), 4.43 (d, 2H, OCH₂), 4.29 (t, 1H, CH), 3.43(t, 4H, CH_d), 3.19 (t, 4H, CH_c)

6.2.16 Toluol-4-sulfonsäure 2-[4-(4-nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]-ethylester

6.2.16.1 2-[4-(4-Nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]-ethanol (59)



Eine Mischung aus 6,6 g (48 mmol) 2-Bromethanol, 10 g (48 mmol) N-(4-Nitrophenyl)-piperazin, 19,9 g (144 mmol) Kaliumcarbonat und 90 mg Natriumiodid in 60 ml Dioxan wurde über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde die Suspension filtriert, der Rückstand mit 40 ml Dioxan

gewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der isolierte gelbe Feststoff stellte das Produkt in einer Ausbeute von 7,85 g (65% d. Th.) dar.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₂H₁₇N₃O₃ (MG: 251,28)

Gelber Feststoff

Fp.: 94 °C

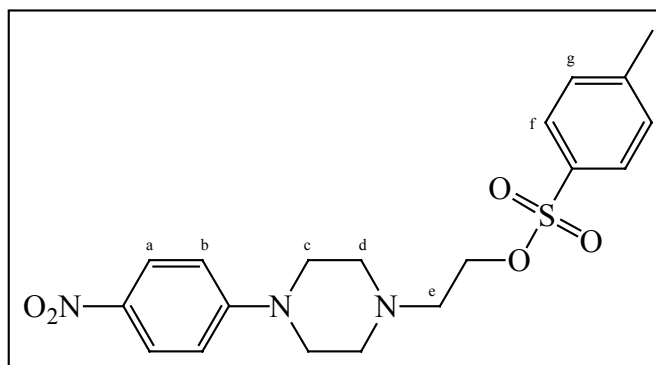
R_f (Chloroform/Methanol 1/1): 0,71

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 251.2 (100.0, [M]⁺)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8.03 (d, 2H, ArH_a), 7.01 (d, 2H, ArH_b), 4.48 (br s, 1H, OH), 3.54 (t, 2H, OCH₂), 3.44 (t, 4H, H_c), 1.88 (t, 4H, H_d), 1.79 (t, 2H, H_e)

¹H-NMR (200 MHz, Methanol-d₄) δ [ppm]: 7.27 (d, 2H, ArH_a), 6.15 (d, 2H, ArH_b), 2.91 (t, 2H, OCH₂), 2.66 (t, 4H, CH_c), 2.55 (t, 4H, CH_d), 2.45 (t, 2H, CH_e)

6.2.16.2 Toluol-4-sulfonsäure 2-[4-(4-nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]-ethylester (60)



0,5 g (2 mmol) 2-[4-(4-Nitro-phenyl)-piperazin-1-yl]-ethanol (59) und 0,45 g (4 mmol) 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan wurden in 6 ml trockenem Dichlormethan gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden innerhalb einer halben Stunde unter Rühren portionsweise 0,38 g (2 mmol) Toluol-4-sulfonylchlorid zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt und anschließend das Lösungsmittel bei Raumtemperatur im Vakuum vorsichtig entfernt. Der erhaltene gelbe Feststoff wurde anschließend mittels Flashchromatographie mit gekühltem (~ 4 °C) Chloroform + 3% DIEA als Eluens aufgearbeitet. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und bei Raumtemperatur im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Es wurden 0,5 g (62% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₉H₂₃N₃O₅S (MG: 405,47)

Gelber Feststoff

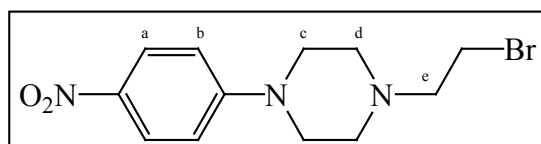
R_f (Chloroform + 3% DIEA): 0,50

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 405.3 (69.2, [M]⁺), 172.1 (100.0, [C₇H₈O₃S]⁺)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 8.10 (d, 2H, ArH_a), 7.79 (d, 2H, ArH_f), 7.34 (d, 2H, ArH_g), 6.78 (d, 2H, ArH_b), 4.15 (t, 2H, OCH_2), 3.35 (t, 4H, CH_c), 2.70 (t, 2H, CH_e), 2.58 (t, 4H, CH_d), 2.43 (s, 3H, CH_3)

6.2.17 4-[4-(2-Brom-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin-hydrochlorid

6.2.17.1 1-(2-Brom-ethyl)-4-(4-nitro-phenyl)-piperazin (61)



5 g (24 mmol) N-(4-Nitrophenyl)-piperazin und 9 g (65 mmol) Kaliumcarbonat wurden mit 53 g (292 mmol) 1,2-Dibromethan versetzt, über Nacht bei 60 °C gerührt und anschließend das Dibromethan im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 80 ml Chloroform aufgenommen, die resultierende Suspension filtriert und das Filtrat im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Durch eine flashchromatographische Reinigung des Rückstandes, mit Chloroform/Ethylacetat 1:1 +3 % DIEA als Eluens wurden 1,7 g (22% d. Th.) des Produktes isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{BrN}_3\text{O}_2$ (MG: 314,18)

Weißer Feststoff

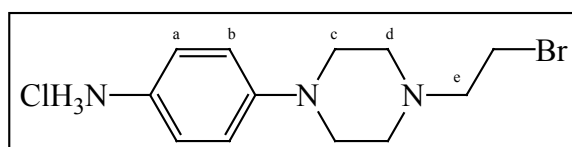
Fp.: 122 °C (Zersetzung)

R_f (Chloroform/Ethylacetat 1:1 +3 % DIEA): 0,78

FD-MS: m/z (% rel. Int.) 313.4 (100.0, $[\text{M}]^+$)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 8.10 (d, 2H, ArH_a), 6.80 (d, 2H, ArH_b), 3.45 (t, 4H, CH_c), 3.43 (t, 2H, CH_2Br), 2.84 (t, 2H, CH_e), 2.66 (t, 4H, CH_d)

6.2.17.2 4-[4-(2-Brom-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenylamin-hydrochlorid (62)



2,8 g (14,7 mmol) Zinn(II)-chlorid-Dihydrat wurden unter Rühren in 3,6 ml konz. HCl gelöst und nach vollständiger Auflösung 1,26 g (4 mmol) 1-(2-Brom-ethyl)-4-(4-nitro-phenyl)-piperazin (61) hinzugefügt. Ein langsames Ansteigen der Temperatur wurde festgestellt, mit einer einhergehenden Gelbfärbung der Lösung. Sobald die Reaktionstemperatur zu sinken begann, wurde der Kolben in einem Eisbad gekühlt und mit 5 ml Wasser und 12,5 ml Diethylether versetzt. Anschließend wurde die Lösung mit 6M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 11-12 eingestellt und die beiden Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde erneut mit 7,5 ml Diethylether extrahiert, die Diethyletherpha-

sen vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und durch Versetzen mit 1N HCl in Diethylether das Produkt als Hydrochlorid ausgefällt. Es wurden 130 mg (10% d. Th.) des Produkts isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: $C_{12}H_{18}BrN_3 \cdot HCl$ (MG: 320,66)

Brauner Feststoff

1H -NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 10.18 (br s, 3H, NH_3^+), 7.79 (d, 2H, ArH_a), 7.02 (d, 2H, ArH_b), 3.56 (t, 4H, CH_c), 3.45 (t, 2H, CH₂Br), 2.56 (t, 4H, CH_d), 2.42 (t, 2H, CH_e)

6.3 Radiosynthesen

6.3.1 Radioanalytische Verfahren

Die Trennung und Identifizierung der ^{18}F -markierten Produkte erfolgte mit Hilfe der Radio-HPLC und der Radio-Dünnschichtchromatographie. Um eine Vergleichbarkeit dieser beiden Verfahren zu gewährleisten, wurden ^{18}F -Markierungen durchgeführt, die sowohl mittels Radio-HPLC als auch mit Radio-Dünnschichtchromatographie analysiert wurden. Dabei wichen die Messergebnisse dieser beiden Verfahren im Mittel 5-10 % voneinander ab, also deutlich innerhalb der allgemeinen Fehlergrenzen.

Bei den angegebenen radiochemischen Ausbeuten handelt es sich immer um zerfallskorrigierte Ausbeuten bezogen auf das eingesetzte [^{18}F]Fluorid oder 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat.

6.3.1.1 Radio-HPLC

Zur Analyse der Markierungsausbeute wurde das in Abschnitt 5.1 beschriebene HPLC-System der Fa. Sykam verwendet. Die Auftrennung der Aliquotlösungen erfolgte mit einer analytischen RP-Säule (LiChrospher RP18-EC, 5 μm , 250×4,6 mm) bei einer Flussrate von 1 ml/min. Als Eluens wurde das bei den jeweiligen Markierungssynthesen beschriebene Lösungsmittelgemisch verwendet. Die Retentionszeit t_r des gesuchten Produkts wurde zuvor mit Hilfe der ^{19}F -Referenzverbindungen unter reaktionsidentischen Bedingungen bestimmt.

Um eventuelle Radioaktivitätsverluste auf der Säule ausschließen zu können, wurde die Wiederfindungsrate des Systems untersucht, welche bei ca. 90 % lag.

6.3.1.2 Radio-Dünnschichtchromatographie

Die Auswertung der Markierungsausbeute mittels Dünnschichtchromatographie erfolgte mit dem Instant Imager der Fa. Packard Canberra. Dazu wurden 3 μl des Aliquots auf eine DC-Alufolie (Kieselgel 60 F₂₅₄ oder RP 18 F₂₅₄, 5×7,5 cm, Fa. Merck) aufgetragen und über eine Laufstrecke von 5,7 cm entwickelt. Als Eluens wurde das bei den jeweiligen Markierungssynthesen beschriebene Lösungsmittelgemisch verwendet. Der R_f -Wert des gesuchten Produkts wurde mit Hilfe der ^{19}F -Referenzverbindungen zuvor unter reaktionsidentischen Bedingungen bestimmt.

6.3.2 Markierungssynthesen mit [^{18}F]Fluorid

6.3.2.1 Herstellung der [^{18}F]Fluorid-Lösung

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

Zur Trocknung wurden 0,5-2 mCi (\approx 20-75 MBq) einer wässrigen n.c.a [^{18}F]Fluorid-Lösung auf einer konditionierten Kartusche (Sep-Pak[®] Accell[™] Plus QMA; Fa. Waters) fixiert und mit einer Lösung aus 15 mg Kryptofix[®] 2.2.2, 15 μl 1 M Kaliumcarbonatlösung in 800 μl absolutem Acetonitril in einen 5 ml Wheaton-Reaktor eluiert. Die Lösung wurde bei einer Temperatur von 80 °C und einem Vakuum von 700 mbar im schwachen Stickstoffstrom 3 Minuten lang eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 1 ml absolutem Acetonitril versetzt, erneut für 3 Minuten eingeeengt und dieser Trocknungsschritt zwei Mal wiederholt. Danach wurde die Stickstoffzufuhr gestoppt und für 3 Minuten ein Membranpumpenvakuum angelegt, um letzte Feuchtigkeitsspuren zu entfernen. Das getrocknete ^{18}F -Fluorid wurde mit 600-1000 μl des für die Markierungssynthesen benötigten Lösungsmittels (DMF, DMSO, Acetonitril) versetzt und ca. 1 Minute gerührt. Die resultierende Lösung wurde in einer 1 ml Tuberkulinspritze aufgenommen und jeweils 200 μl in die entsprechenden Reaktionsansätze injiziert.

6.3.2.2 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2- ^{18}F fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäuremethylester; Methyl-t ^{18}F ADTC4 (**63**)

1-5 mg (1,9-9,7 μmol) trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-brom-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäuremethylester (**45**) wurden in ein 5 ml Wheaton-Reaktionsgefäß, welches durch eine Schraubkappe mit Septum verschlossen wurde, überführt und in 800 μl des entsprechenden absoluten Lösungsmittels (DMF, DMSO, MeCN) gelöst. Die Lösung wurde unter Rühren fünf Minuten bei der gewählten Reaktionstemperatur im Ölbad temperiert und die Reaktion durch Injektion von 200 μl der [^{18}F]Fluorid-Lösung gestartet. Zu vorgegebenen Zeiten wurden jeweils 100 μl der Reaktionslösung als Aliquot entnommen und in einem Eppendorfgefäß mit 400 μl Acetonitril versetzt. Die resultierenden Aliquotlösungen wurden anschließend radioanalytisch untersucht.

Radio-DC: R_f (Acetonitril/Ethylacetat 1/3 + 3% HAc; Kieselgel 60 F₂₅₄): 0,96

Radio-HPLC: t_r (Acetonitril/0,05M Dinatriumhydrogenphosphat 50/50) 11,7 min

6.3.3 Markierungssynthesen mit 2- ^{18}F Fluorethyltosylat

Zur Herstellung des 2- ^{18}F Fluorethyltosylats wurde die wässrige n.c.a [^{18}F]Fluorid-Lösung wie in Abschnitt 5.3.2.1 beschrieben getrocknet und anschließend für 3 Minuten bei 80 °C mit Ethylen-ditosylat umgesetzt, um das Produkt in radiochemischen Ausbeuten von 80-90 % zu erhalten. Die Reinigung des 2- ^{18}F Fluorethyltosylats wurde mit Hilfe zweier Verfahren durchgeführt, durch HPLC oder durch Festphasenextraktion. Während die Reinigung durch HPLC den Vorteil der größeren radiochemischen und chemischen Reinheit aufwies, war die Festphasenextraktion deutlich kürzer und einfacher. Da im Verlaufe der Markierungssynthesen beide Reinigungsverfahren Anwendung fanden, wurde bei den einzelnen ^{18}F -Fluorethylierungsreaktionen aufgeführt, welches Verfahren benutzt wurde.

6.3.3.1 Herstellung der 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat-Lösung

0,5-2 mCi (≈ 19-74 MBq) einer wässrigen n.c.a ¹⁸F-Fluoridlösung wurden auf einer konditionierten Kartusche (Sep-Pak[®] Accell[™] Plus QMA; Fa. Waters) fixiert und mit einer Lösung aus 15 mg Kryptofix[®] 2.2.2, 15 µl 1 M Kaliumcarbonatlösung in 800 µl absolutem Acetonitril in einen 5 ml Wheaton-Reaktor eluiert. Die Lösung wurde bei einer Temperatur von 80 °C und einem Vakuum von 700 mbar im schwachen Stickstoffstrom 3 Minuten lang eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 1 ml absolutem Acetonitril versetzt, erneut für 3 Minuten eingeeengt und dieser Trocknungsschritt weitere zwei Mal wiederholt. Danach wurde die Stickstoffzufuhr gestoppt und für 3 Minuten ein Membranpumpenvakuum angelegt, um letzte Feuchtigkeitsspuren zu entfernen. Das getrocknete ¹⁸F-Fluorid wurde mit einer Lösung aus 4 mg Ethylen-ditosylat in 1 ml absolutem Acetonitril versetzt und für 3 Minuten bei 80 °C gerührt. Die Reinigung des Rohprodukts wurde mittels folgender Verfahren durchgeführt:

HPLC-Reinigung (Verfahren A):

Die Reaktionslösung wurde mit 1 ml Wasser versetzt und das Produkt durch HPLC mit einer semipräparativen Säule (LiChrospher RP18-EC, 10 µm, 250×10 mm, Flussrate: 5 ml/min, Acetonitril/Wasser 50/50, t_r 8 min) isoliert. 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 (Acetonitril, DMF, DMSO mit einer Temperatur von 60 °C!) lieferte das Produkt in radiochemischen Ausbeuten von 70-90 % (Radiochemische Reinheit: >97%; chemische Reinheit: >99%; Reinigungsdauer: ≈ 22 min).

Festphasenextraktion (Verfahren B):

Die Reaktionslösung wurde mit 4 ml Wasser versetzt, 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 (Acetonitril, DMF, DMSO mit einer Temperatur von 60 °C!) lieferte das Produkt in radiochemischen Ausbeuten von 80-90 % (Radiochemische Reinheit: >90%; Ethylen-ditosylat: 0,25-1 mg/ml; Reinigungsdauer: ≈ 9 min).

6.3.3.2 Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-[¹⁸F]fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester; Methyl-t[¹⁸F]ADTC1 (**64**)

1-6 mg (2,1-12,5 µmol) trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (**12**) wurden in ein 5 ml Wheaton-Reaktionsgefäß, welches durch eine Schraubkappe mit Septum verschlossen wurde, überführt und in 800 µl des entsprechenden absoluten Lösungsmittels (DMF, DMSO, MeCN) gelöst. Die Lösung wurde unter Rühren fünf Minuten bei der gewählten Reaktionstemperatur im Ölbad temperiert und die Reaktion durch Injektion von 200 µl der 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat-Lösung (Verfahren A) gestartet. Zu vorgegebenen Zeiten wurden jeweils 100 µl der Reaktionslösung als Aliquot entnommen und in einem Eppen-

dorfgefäß mit 100 µl Wasser versetzt. Die resultierenden Aliquotlösungen wurden anschließend radioanalytisch untersucht.

Radio-DC: R_f (Chloroform + 3% DIEA; Kieselgel 60 F₂₅₄): 0,56

Radio-HPLC: t_r (Acetonitril/0,01%ige Trifluoressigsäure in Wasser 35/65) 15,7 min

6.3.3.3 Cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-[¹⁸F]fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester; Methyl-c[¹⁸F]ADTC1 (65)

6 mg (12,5 µmol) cis-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (17) wurden in ein 5 ml Wheaton-Reaktionsgefäß, welches durch eine Schraubkappe mit Septum verschlossen wurde, überführt und in 800 µl DMSO gelöst. Die Lösung wurde unter Rühren fünf Minuten bei 140 °C im Ölbad temperiert und die Reaktion durch Injektion von 200 µl der 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat-Lösung (Verfahren A) gestartet. Zu vorgegebenen Zeiten wurden jeweils 100 µl der Reaktionslösung als Aliquot entnommen und in einem Eppendorfgefäß mit 100 µl Wasser versetzt. Die resultierenden Aliquotlösungen wurden anschließend radioanalytisch untersucht.

Radio-DC: R_f (Chloroform + 3% DIEA; Kieselgel 60 F₂₅₄): 0,56

6.3.3.4 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-[¹⁸F]fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester; Methyl-t[¹⁸F]ADTC3 (66)

1-5 mg (2,4-12,2 µmol) trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (33) wurden in ein 5 ml Wheaton-Reaktionsgefäß, welches durch eine Schraubkappe mit Septum verschlossen wurde, überführt und in 800 µl des entsprechenden absoluten Lösungsmittels (DMF, DMSO) gelöst. Die Lösung wurde unter Rühren fünf Minuten bei der gewählten Reaktionstemperatur im Ölbad temperiert und die Reaktion durch Injektion von 200 µl der 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat-Lösung (Verfahren B) gestartet. Zu vorgegebenen Zeiten wurden jeweils 100 µl der Reaktionslösung als Aliquot entnommen und in einem Eppendorfgefäß mit 400 µl Acetonitril versetzt. Die resultierenden Aliquotlösungen wurden anschließend radioanalytisch untersucht.

Radio-DC: R_f (Chloroform/Methanol 19/1 + 3% DIEA; Kieselgel 60 F₂₅₄): 0,64

Radio-HPLC: t_r (Acetonitril/0,05M Dinatriumhydrogenphosphat 50/50) 8,4 min

6.3.3.5 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-[¹⁸F]fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester; Methyl-t[¹⁸F]ADTC4 (63)

3 mg (7,3 µmol) trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-hydroxy-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (41) wurden in ein 5 ml Wheaton-Reaktionsgefäß, welches durch eine Schraubkappe mit Septum verschlossen wurde, überführt und in 800 µl DMSO gelöst. Die Lösung

wurde mit 1,4 µl 5N NaOH-Lösung versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung fünf Minuten bei 90 °C im Ölbad temperiert und die Reaktion durch Injektion von 200 µl der 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat-Lösung (Verfahren B) gestartet. Zu vorgegebenen Zeiten wurden jeweils 100 µl der Reaktionslösung als Aliquot entnommen und in einem Eppendorfgefäß mit 400 µl Acetonitril versetzt. Die resultierenden Aliquotlösungen wurden anschließend radioanalytisch untersucht.

Radio-DC: R_f (Chloroform/Ethylacetat 1/1 + 3% DIEA; Kieselgel 60 F₂₅₄): 0,73

Radio-HPLC: t_r (Acetonitril/0,05M Dinatriumhydrogenphosphat 50/50) 11,7 min

6.3.3.6 Trans-5,7-dichlor-4-{3-[4-(2-[¹⁸F]fluor-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäure; t[¹⁸F]ADTC4 (67)

1-3 mg (2,5-7,5 µmol) trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-hydroxy-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäure (42) wurden in ein 5 ml Wheaton-Reaktionsgefäß, welches durch eine Schraubkappe mit Septum verschlossen wurde, überführt und in 800 µl des entsprechenden absoluten Lösungsmittels (DMF, DMSO, MeCN) gelöst. Die Lösung wurde mit 1,95 eq. der jeweiligen Base versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung fünf Minuten bei der gewählten Reaktionstemperatur im Ölbad temperiert und die Reaktion durch Injektion von 200 µl der 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat-Lösung (Verfahren B) gestartet. Zu vorgegebenen Zeiten wurden jeweils 100 µl der Reaktionslösung als Aliquot entnommen und in einem Eppendorfgefäß mit 400 µl Acetonitril versetzt. Die resultierenden Aliquotlösungen wurden anschließend radioanalytisch untersucht.

Radio-DC: R_f (Chloroform/Methanol 4/1 + 2% DIEA; Kieselgel 60 F₂₅₄): 0,60

Radio-HPLC: t_r (Acetonitril/0,05M Dinatriumhydrogenphosphat 35/65) 5,8 min

6.3.3.7 Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-[¹⁸F]fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäure; t[¹⁸F]ADTC5 (68)

1-5 mg (2,2-10,9 µmol) trans-5,7-Dichlor-4-{3-[(4-hydroxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäure (54) wurden in ein 5 ml Wheaton-Reaktionsgefäß, welches durch eine Schraubkappe mit Septum verschlossen wurde, überführt und in 800 µl DMSO gelöst. Die Lösung wurde mit 2,85 eq. der jeweiligen Base versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung fünf Minuten bei der gewählten Reaktionstemperatur im Ölbad temperiert und die Reaktion durch Injektion von 200 µl der 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat-Lösung (Verfahren B) gestartet. Zu vorgegebenen Zeiten wurden jeweils 100 µl der Reaktionslösung als Aliquot entnommen und in einem Eppendorfgefäß mit 400 µl Acetonitril versetzt. Die resultierenden Aliquotlösungen wurden anschließend radioanalytisch untersucht.

Radio-DC: R_f (Aceton/Ethylacetat 1/1 + 3% HAc; Kieselgel 60 F₂₅₄): 0,45

Radio-HPLC: t_r (Acetonitril/0,01%ige Trifluoressigsäure in Wasser 50/50) 6,1 min

6.3.4 Verseifung der ¹⁸F-markierten Esterverbindungen

Da einige der markierten Verbindungen (Verbindung (64) und (66)) nach der ¹⁸F-Fluorethylierungsreaktion als Ester vorlagen, welcher keine Rezeptoraffinität besitzt, wurde ein schnelles und quantitatives Reaktionssystem zur Verseifung dieser Methylester erarbeitet. Dazu wurden die Markierungsvorläufer unter den zuvor ermittelten optimierten Reaktionsbedingungen umgesetzt, das Produkt mittels HPLC isoliert und anschließend mit wässriger LiOH-Lösung verseift.

6.3.4.1 Trans-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-[¹⁸F]fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure; t[¹⁸F]ADTC1 (69)

6 mg (12,9 µmol) trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (12) wurden in einem 5 ml Wheaton-Reaktionsgefäß in 500 µl DMSO gelöst und unter Rühren fünf Minuten bei 140 °C im Ölbad temperiert. Anschließend wurden 500 µl der 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat-Lösung (Verfahren A) injiziert und für 30 Minuten gerührt. Die Lösung wurde mit 1 ml 1 %iger Trifluoressigsäure in Wasser verdünnt und mittels semipräparativer HPLC (LiChrospher RP18-EC, 10 µm, 250×10 mm, Flussrate: 5 ml/min, Acetonitril/0,01 %ige wässrige Trifluoressigsäure 35/65, t_r 23 min) das Produkt isoliert. Die Produktfraktion wurde mit Wasser auf das fünffache Volumen verdünnt, auf einer Festphasenkartusche (Sep-Pak[®]-C₁₈, Fa. Waters) fixiert und 7 Minuten im Stickstoffstrom getrocknet. Die Festphasenkartusche wurde mit 2 ml Methanol eluiert, das Eluat mit 200 µl einer 1,25N LiOH-Lösung versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 18 ml Wasser verdünnt, erneut auf einer Festphasenkartusche (LiChrolut EN, Fa. Merck) fixiert, im Stickstoffstrom getrocknet und mit 1,5 ml Ethanol die freie Säure eluiert. Das Produkt wurde in einer radiochemischen Ausbeute von 35-45 % isoliert.

6.3.4.2 Trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-[¹⁸F]fluor-ethylamino)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure; t[¹⁸F]ADTC3 (70)

5 mg (12,2 µmol) trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester (33) wurden in einem 5 ml Wheaton-Reaktionsgefäß in 500 µl DMSO gelöst und unter Rühren fünf Minuten bei 160 °C im Ölbad temperiert. Anschließend wurden 500 µl der 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat-Lösung (Verfahren A) injiziert und für 30 Minuten gerührt. Die Lösung wurde mit 1 ml Wasser verdünnt und mittels semipräparativer HPLC (LiChrospher RP18-EC, 10 µm, 250×10 mm, Flussrate: 5 ml/min, Acetonitril/0,05M Dinatriumhydrogenphosphat 50/50, t_r 12 min) das Produkt isoliert. Die folgende Esterverseifung wurde analog zu Abschnitt 5.3.4.1 durchgeführt, wodurch das Produkt in einer radiochemischen Ausbeute von ca. 15 % erhalten wurde.

7 Zusammenfassung

L-Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem von Säugetieren. Die entsprechenden Glutamatrezeptoren werden in 4 Rezeptorsubtypen eingeteilt, AMPA-, Kainat-, NMDA- und metabotrope Rezeptoren. Der NMDA-Rezeptor nimmt unter den Glutamatrezeptoren dabei eine Sonderstellung ein, da er neben seiner großen Bedeutung bei der Neurogenese, Lern- und Gedächtnisprozessen, auch mit einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson, dem Morbus Huntington, dem Morbus Alzheimer, der Schizophrenie und der Epilepsie in Zusammenhang gebracht wird. Daher besteht ein großes Interesse in der Entwicklung geeigneter Radioliganden, um den NMDA-Rezeptor mit Hilfe nicht-invasiver Untersuchungsmethoden, wie zum Beispiel der PET, visualisieren zu können.

Aus der Literatur war bekannt, dass Harnstoffderivate der 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäure *in vitro* potente Antagonisten der Strychnin-unempfindlichen Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors darstellen. Basierend auf weiterführenden Arbeiten, die im Institut für Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität durchgeführt wurden, sollten für die PET geeignete Liganden dieses Grundkörpers als Harnstoff- und Sulfonylharnstoffderivate synthetisiert werden.

Der für die Synthese der Referenzverbindungen und Markierungsvorläufer benötigte 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäuremethylester wurde nach einer modifizierten Literaturvorschrift dargestellt. Die im Rahmen der Synthese entstehenden Diastereomerenpaare wurden mit Hilfe der Säulenchromatographie getrennt, um die wesentlich affineren *trans*-Enantiomeren darzustellen.

Zur Synthese der Referenzverbindungen wurden geeignete Amine mit dem 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäuremethylester gekoppelt. Zur Synthese der Harnstoffverbindungen wurde Triphosgen als Kopplungsreagenz etabliert, welches gegenüber CDI höhere Ausbeuten erbrachte und kürzere Reaktionszeiten erforderte. Für die Synthese des Sulfonylharnstoffs wurde eine geeignete Kopplungsreaktion mittels CDI erarbeitet. Durch diese Synthese wurden fünf geeignete Referenzverbindungen dargestellt: cADTC1 sowie tADTC1, tADTC2, tADTC3, tADTC4 und tADTC5. Bis auf tADTC2, welche als Referenzverbindung für ^{11}C -Markierungen eingesetzt werden kann, handelt es sich um Referenzverbindungen für ^{18}F -Markierungen.

Die Synthese der Markierungsvorläufer erfolgte ebenfalls durch Kopplung geeigneter Amine mit dem 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-carbonsäuremethylester. Dabei wurden die für die ^{18}F -Fluoralkylierungsreaktionen benötigten funktionellen Gruppen intermediär durch eine Fmoc- oder eine Acetyl-Schutzgruppe blockiert. Da im Rahmen der geplanten ^{18}F -Markierungsreaktionen zu untersuchen war, ob die Carbonsäure in 2-Position geschützt werden musste oder nicht, wurden sowohl Markierungsvorläufer mit freier als auch mit Methylester-geschützter Carbonsäurefunktion zur Verfügung gestellt. Für die Darstellung von t[^{18}F]ADTC4 wurde auch ein geeigneter Markierungsvorläufer für [^{18}F]Direktfluorierungen synthetisiert. Als Abgangsgruppe wurde dabei Brom verwendet.

Für die ^{18}F -Markierungsreaktionen wurden 2- ^{18}F Fluorethyltosylat und ^{18}F Fluorid mit den Markierungsvorläufern umgesetzt. Dabei wurden als Reaktionsparameter Temperatur, Lösungsmittel, Reaktionsdauer, Hilfsbasen und Markierungsvorläuferkonzentration untersucht und optimiert. Die höchsten radiochemischen Ausbeuten von ca. 95% und 90% wurden bei der Synthese von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ bzw. $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC5}$ erzielt. Bei der Synthese von Methyl- $c/t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$ und Methyl- $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC3}$ ließen sich RCA von 60% und 20% realisieren. Da bei diesen ^{18}F -Markierungen die Methylester-geschützten Markierungsvorläufer eingesetzt wurden, musste nach der Reaktion noch eine Esterspaltung durchgeführt werden. Diese wurde unter Verwendung 1N LiOH-Lösung durchgeführt und verlief nach einer Reaktionsdauer von 5 Minuten bei Raumtemperatur quantitativ.

Die ^{18}F -Direktfluorierung von DMV- $t\text{ADTC4}$ lieferte maximale radiochemische Ausbeuten von 25%. Diese relativ niedrigen Ausbeuten sind wahrscheinlich auf die Ausbildung von H-Brücken zwischen der NH-Funktion an Position-1 und dem ^{18}F Fluorid zurückzuführen. Daher bietet diese Grundstruktur prinzipiell keine guten Voraussetzungen für eine ^{18}F -Direktfluorierung.

Mit Hilfe der Referenzverbindungen wurden erste pharmakologische Untersuchungen durchgeführt. Die *in vitro*-Affinitäten wurden mit einem etablierten $[^3\text{H}]\text{MDL-105,519}$ -Rezeptorbindungsassays bestimmt. Mit Ausnahme von $c\text{ADTC1}$ und $t\text{ADTC5}$, welche einen IC_{50} von 7,6 μM bzw. 0,3 μM hatten, besaßen alle untersuchten Referenzverbindungen Affinitäten im niedrigen nanomolaren Bereich. Die höchste *in vitro*-Affinität wies hierbei $t\text{ADTC2}$ mit einem IC_{50} von 1,2 nM auf, gefolgt von $t\text{ADTC4}$ ($\text{IC}_{50} = 4,4$ nM), $t\text{ADTC3}$ ($\text{IC}_{50} = 6,7$ nM) und $t\text{ADTC1}$ ($\text{IC}_{50} = 18,3$ nM).

Während der IC_{50} von $c\text{ADTC1}$ im erwarteten Bereich lag, da die *cis*-Isomere stets eine geringere Affinität als die *trans*-Isomere besitzen, so stellte die geringe Affinität von $t\text{ADTC5}$ ein überraschendes Ergebnis dar. Dieses Ergebnis lässt sich nur durch eine starke Abhängigkeit der Affinität der Sulfonylharnstoffe von der Kettenlänge in *p*-Position des Aromaten erklären.

Die Lipophilie der Referenzverbindungen wurde mit Hilfe dreier unterschiedlicher Verfahren untersucht, der HPLC-, der Titrations- und der Scheidetrichtermethode. Ein Vergleich der Methoden zeigte eine relativ gute Übereinstimmung, wobei die Referenzverbindungen $c/t\text{ADTC1}$, $t\text{ADTC2}$ und $t\text{ADTC4}$ mit $\log D_{7,4}$ -Werten von 1,26 – 1,28 nahezu identische Lipophilien besaßen. Während $t\text{ADTC3}$ mit einem $\log D_{7,4}$ von ca. 0,8 eine geringere Lipophilie aufwies, wurde bei $t\text{ADTC5}$ ein sehr niedriger $\log D_{7,4}$ von -1,15 ermittelt, der auf die Bildung des zweiwertigen Anions des Liganden zurückzuführen war. Aufgrund dieser Ergebnisse ist bei den Liganden $c/t\text{ADTC1}$, $t\text{ADTC2}$ und $t\text{ADTC4}$ mit einer ausreichenden Hirnaufnahme zu rechnen.

Eine mit $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$ durchgeführte *ex vivo*-Biodistributionsstudie an Ratten ergab allerdings nur eine maximale Hirnaufnahme von 0,033 % ID/g. Bei der *ex vivo*-Biodistributionsstudie mit Methyl- $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$ wurde mit 0,09 % ID/g eine höhere Hirnaufnahme erzielt; jedoch kam es nicht zur Verseifung des Methylesters im Gehirn und somit auch nicht zur Freisetzung des affinen Liganden.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint die Referenzverbindung $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC4}$ (Abb. 108) die besten Voraussetzungen für einen *in vivo*-Einsatz in der PET-Forschung aufzuweisen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass der Substituent in 4-Position von $t\text{ADTC4}$ gegenüber dem Phenylpipera-

zinrest von tADTC1 eine wesentlich geringere Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken besitzen sollte, ist bei diesem Liganden mit einer wesentlich besseren Hirnaufnahme zu rechnen. Auch aus Sicht der in vitro-Affinität und der ^{18}F -Markierung betrachtet, bietet diese Verbindung die besten Voraussetzungen. Sie besitzt mit einem IC_{50} von 4,4 nM nach tADTC2 die zweithöchste Affinität der untersuchten Referenzverbindungen. Mit einer RCA von 95% nach einer Reaktionsdauer von 15 Minuten weist t ^{18}F]ADTC4 sowohl sehr gute Ausbeuten bei der ^{18}F -Fluorethylierung als auch optimale technische Parameter für eine Routineproduktion auf.

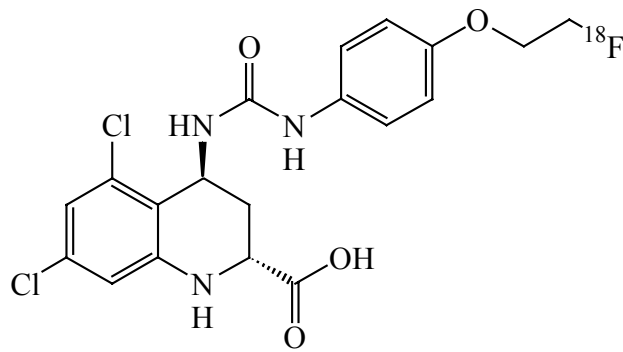


Abbildung 108: Struktur von t ^{18}F]ADTC4

8 Anhang

8.1 In vitro-Testung

Mit Hilfe des im Folgenden beschriebenen [³H]MDL-105,519-Rezeptorbindungsassays wurden die Bindungsaffinitäten der synthetisierten Liganden zur Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle ermittelt, um so Aussagen über die Eignung der Verbindung als PET-Ligand machen zu können.

Als Radioligand wurde [³H]MDL-105,519 verwendet, ein hochaffiner ($K_d = 3,77$ nM) kompetitiver Inhibitor der Glycinbindungsstelle (Abb. 109). Durch Zugabe dieses Liganden zu einer präparierten Membran wurde anhand der vorhandenen Radioaktivität nach Verdrängung des Radioliganden durch die Testsubstanz deren Bindungsaffinität zur Strychnin-insensitiven Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors bestimmt. Zusätzlich wurde eine Bestimmung Gesamtbindung sowie eine Überprüfung der unspezifischen Bindung mittels Glycin durchgeführt. Als Testsubstanzen fanden die zuvor dargestellten Referenzsubstanzen (tADTC1 – tADTC5 & cADTC1) Verwendung.

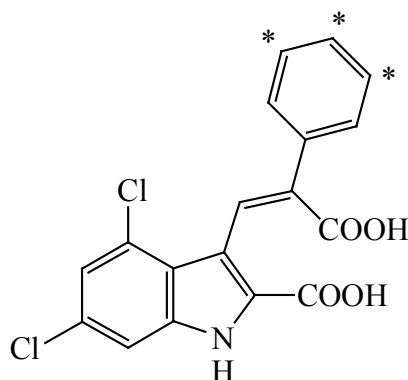


Abbildung 109: Struktur von [³H]MDL-105,519
(die Positionen des Tritiums sind mit einem * gekennzeichnet)

8.1.1 Membranpräparation

Die Membranpräparation wurde unter leicht veränderten Bedingungen nach einem Verfahren von Höfner und Wanner durchgeführt [191].

Aus frischen Schweinehirnen wurde die gräuliche Hirnhaut herauspräpariert, während der weiße innere Bereich verworfen wurde. Die so aus 2 Hirnhälften erhaltenen 3 g an Hirnrinde wurden in einem vorbereiteten Becherglas mit 20 g eisgekühltem Sucrose-Tris-Puffer versetzt, anschließend in ein Pottergefäß überführt, mit Sucrose-Tris-Puffer auf 33 g aufgefüllt und mit 10 Schlägen gepottert. Die Suspension wurde in ein Becherglas überführt, mit Sucrose-Tris-Puffer auf 150 g Gesamtsuspension ergänzt und mittels Turrax erneut homogenisiert. Das resultierende Homogenisat wurde gleichmäßig auf acht Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bei 4200 rpm 8 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert. Diese und alle darauf folgenden Zentrifugationen wurden unter Vakuum durchgeführt. Der Überstand wurde großzügig in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und das resultie-

Die Untersuchung der in vitro-Affinitäten wurde im Institut für Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

rende Pellet verworfen. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (16000 rpm, 4 °C, 30 Minuten), das Pellet mit 15 ml Ampuwa versetzt und 30 Sekunden im Turrax verrührt. Nach einer weiteren Zentrifugation (10000 rpm, 4 °C, 30 Minuten) folgte die Buffy Coat Methode: Aus dem vorangegangenen Zentrifugationsschritt wurde sowohl der Überstand als auch der zart gelbliche Anteil des Pellets („buffy coat“) durch mehrmaliges Dekantieren isoliert und das feste Pellet verworfen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 25000 rpm (30 Minuten, 4 °C) wurde der Zentrifugationsrückstand in 15 ml 5 mM Tris-Puffer resuspendiert und 30 min lang bei 30000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der zuletzt genannte Zentrifugationsschritt wurde sechsmal wiederholt und der Rückstand erneut in 15 ml 5 mM Tris-Puffer suspendiert. Die erhaltenen Membransuspensionen wurden vereinigt und in gleichen Anteilen auf acht Zentrifugationsröhrchen verteilt, um eine homogene Charge zu gewährleisten.

War es aus praktischen Gründen notwendig, die Präparation an dieser Stelle zu unterbrechen, wurden die Membransuspensionen in nur 5 ml 5 mM Tris-Puffer resuspendiert, vereinigt, gleichmäßig verteilt und bei -78 °C eingefroren. In diesem Fall wurde die Membranpräparation vor dem geplanten Assay im Schüttelwasserbad (37 °C) aufgetaut und mit 10 ml der 5 mM Tris-Puffer-Lösung versetzt.

Unmittelbar vor dem Assay wurde in jedem Fall 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 so erhaltene Suspension war ausreichend für die Testung von 3 Substanzen.

Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Hirn-Chargen gewährleisten zu können, wurde bei jeder Charge eine Protein-Bestimmung durchgeführt bzw. der Proteingehalt eingestellt. Dabei wurde nach der Standardmethode von Bradford [192] verfahren. Zu den einzelnen Proteinlösungen der Verdünnungsreihe wurden 5 ml des Proteinreagenzes gegeben und die Lösung durchmischt. Die Absorption bei 595 nm wurde dann 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. Nach Erstellung einer Kalibrierungsgeraden durch Messung einer Verdünnungsreihe mit bekannten Proteingehalt wurde der Proteingehalt der Hirnrinden-Charge bestimmt.

Für den [³H]MDL-105,519-Rezeptorbindungsassay waren unter den gegebenen Bedingungen 50 µg Protein pro Inkubationsröhrchen erforderlich [193], 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 wie oben angeführt vermessen. Mit Hilfe des gemessenen Proteingehaltes ließ sich anschließend die gesamte Schweinehirncharge auf den gewünschten Proteingehalt von 4000 µg Protein pro Zentrifugationsröhrchen einstellen.

8.1.2 Durchführung des [³H]MDL-105,519-Rezeptorbindungsassays

Zur Herstellung der Stammlösungen der Testverbindungen wurden 0,01 mmol der jeweiligen Verbindung in 1 ml DMSO/Ampuwa® (1/1 V/V) gelöst. Bei schwer löslichen Verbindungen konnte auch reines DMSO verwendet werden, wobei die Eigenwirkung des DMSO zu berücksichtigen war. 100 µl der 10⁻² M Stammlösung wurden mit 900 µl 50 mM Tris-Puffer aufgefüllt und homogenisiert, so dass eine 10⁻³ M Testsubstanzlösung erhalten wurde. Ausgehend von dieser Lösung wurden dabei für die verschiedenen Testsubstanzen Verdünnungsreihen folgender Konzentrationen hergestellt:

<u>cADTC1:</u>	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
<u>tADTC1-5:</u>	3 · 10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁷ M	3 · 10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁸ M	3 · 10 ⁻⁹ M
	10 ⁻⁹ M	3 · 10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻¹⁰ M	3 · 10 ⁻¹¹ M	10 ⁻¹¹ 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 24 Inkubationsröhrchen 400 µl Membranlösung (eisgekühlt) zugegeben. Hierbei kam es zu einer weiteren Verdünnung der Testsubstanz um den Faktor 10 im Gesamtkubationsmedium. Somit ergab sich für die Inkubation folgendes Pipettierschema:

Tabelle 18: Pipettierschema zur Durchführung des [³H]MDL-105,519-Rezeptorbindungsassays

Pipettierschema	Gesamtbindung	Nicht-spezifische Bindung	Testsubstanz
Zugabe	50 µl Puffer	50 µl Glycin-Stammlösung	50 µl der Verdünnung der Testsubstanz
[³H]MDL-105,519	50 µl	50 µl	50 µl
Membran	400 µl	400 µl	400 µl

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 (Ultima Gold) versetzt. Sobald die Filter transparent waren, wurde die auf ihnen zurückgehaltene

Radioaktivität mit einem Szintillationszähler (Wallac Liquid Scintillation Counter 1409 der Fa. Wallac) bestimmt.

8.1.3 Auswertung

Mit Hilfe der aus dem Testverfahren erhaltenen Werte lässt sich durch Auftragung der spezifischen Bindung von [³H]MDL-105,519 gegen die Konzentration der Testsubstanz die entsprechende kompetitive Bindungskurve erhalten. Als Beispiel sei hier die Bindungskurve von tADTC3 angeführt (Abb. 110). Nach Durchführung einer nicht-linearen Regression lässt sich rechnerisch der IC₅₀ ermitteln.

Mit Hilfe des IC₅₀ kann man dann nach Cheng und Prusoff den K_i ermitteln [194]:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{c([^3H]MDL-105,519)}{K_d}} \quad \text{mit } c([^3H]MDL-105,519) = 2 \text{ nM} \quad (14)$$

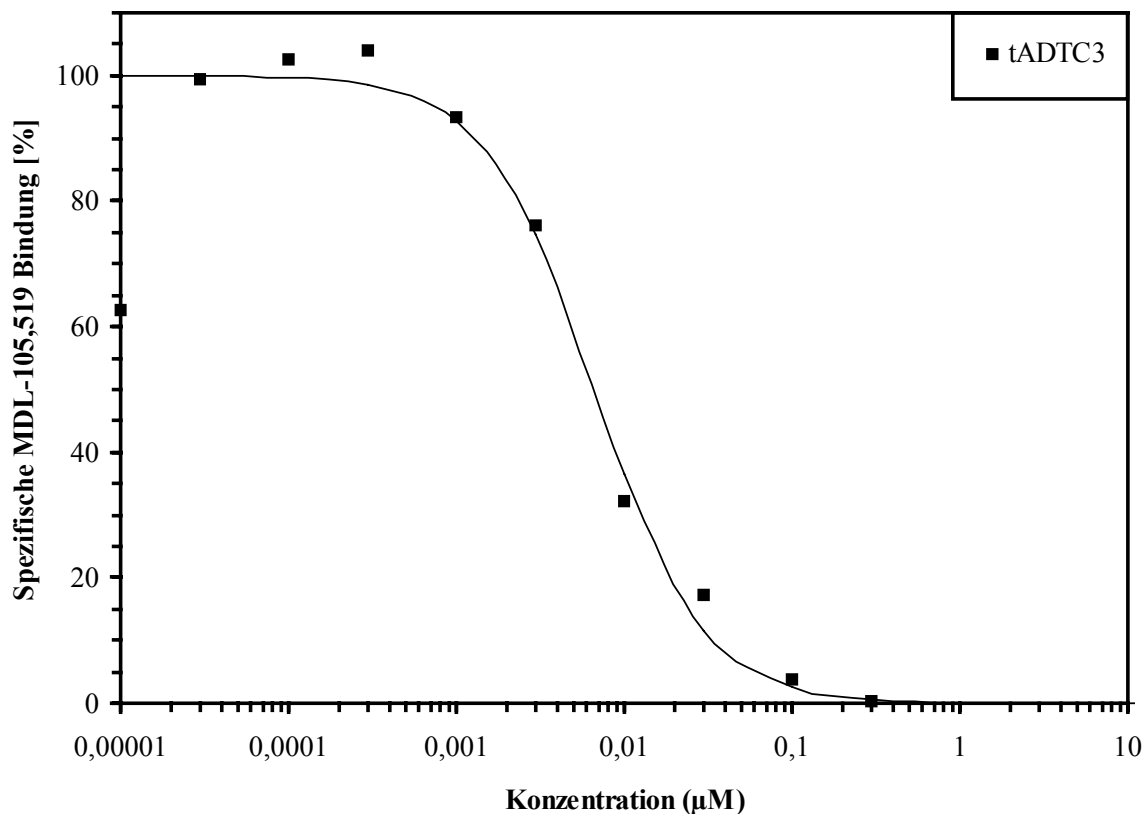
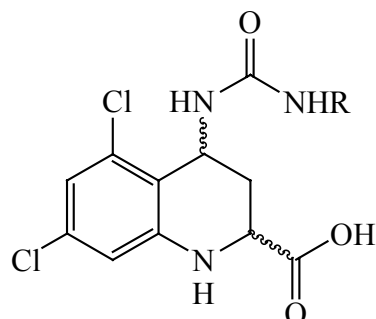


Abbildung 110: kompetitive Bindungskurve von tADTC3 ([³H]MDL-105,519 2 nM; Nichtspez. Bindung: 1 mM Glycin; Tris-Puffer (pH 8,0) 50 mM)

8.1.4 In vitro-Affinitäten der Referenzverbindungen

Für die Referenzverbindungen ergaben sich folgende Testergebnisse (Tab. 19):

Tabelle 19: In vitro-Affinitäten der Referenzverbindungen cADTC1 & tADTC1 - 5



R	Abkürzung	IC ₅₀ [nM]	K _i [nM]
	cADTC1	7640	4870
	tADTC1	18,3	12,0
	tADTC2	1,2	0,8
	tADTC3	6,7	4,3
	tADTC4	4,4	2,9
	tADTC5	292	191

Mit Ausnahme der Verbindungen cADTC1 und tADTC5 zeigten allen Verbindungen Affinitäten im niedrigen nanomolaren Bereich. Die geringe Affinität von cADTC1 im Vergleich zu tADTC1 steht in Einklang mit Angaben in der Literatur, nach denen die trans-Enantiomeren stets die höhere Affinität besitzen und der Affinitätsunterschied zwischen den Diastereomeren mit steigender Größe

des Substituenten in 4-Position zunimmt [118, 119]. So besitzen die Diastereomeren von Verbindung 95a einen Affinitätsunterschied um den Faktor 1,6, der beim Übergang zu Verbindung 106a auf den Faktor 200 ansteigt (Abb. 111). So lagen die bei der Verbindung ADTC1 erzielten Affinitätsunterschiede um den Faktor 400 in Einklang mit der Literatur. Dieser Anstieg des Affinitätsunterschieds lässt sich mit Hilfe der voluminöse-Substituenten-tolerierenden Region der Glycinbindungsstelle erklären (Abb. 23). Mit steigender Größe des Substituenten in 4-Position wird dessen Anlagerung an die voluminöse-Substituenten-tolerierende Region des Rezeptors bei den cis-Diastereomeren gegenüber den trans-Diastereomeren benachteiligt.

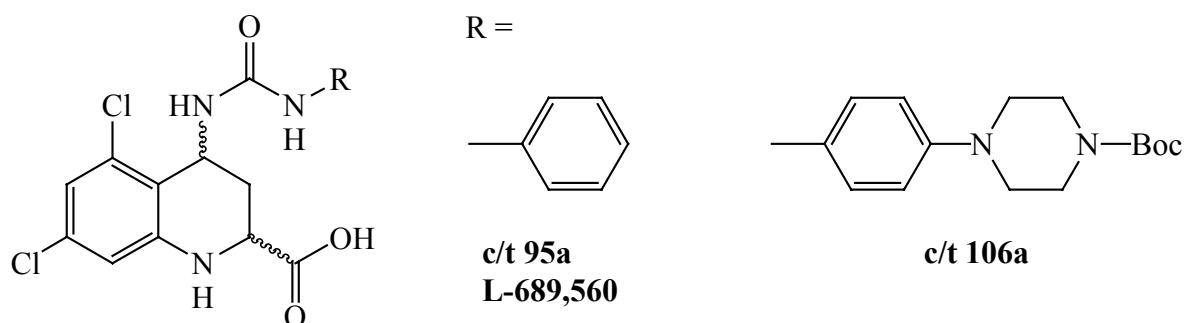


Abbildung 111: Strukturen der Verbindungen c/t 95a (L-689,560) und c/t 106a [119]

Während die Affinitäten der Referenzsubstanzen tADTC1 – 4 im erwarteten niedrigen nanomolaren Bereich lagen, ist die relativ niedrige Affinität von tADTC5 mit einem IC_{50} von 292 nM im Vergleich zu tADTC4 überraschend. In einer anderen Untersuchung [127] bewirkte die Einführung einer Sulfonylgruppe nämlich stets eine Affinitätserrhöhung (Abb. 112).

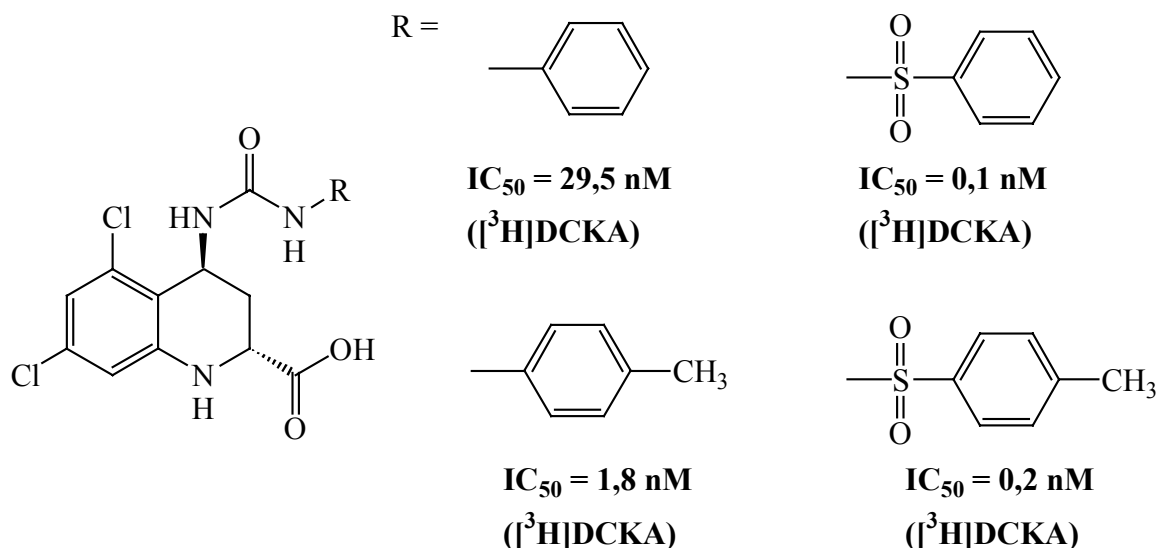


Abbildung 112: Vergleich zwischen den Affinitäten von Harnstoffderivaten der 4-Amino-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure und den korrespondierenden Sulfonylharnstoffen [127]

Betrachtet man sich jedoch die tendenzielle Veränderung der Affinitätsunterschiede zwischen den Harnstoff- und Sulfonylharnstoffverbindungen in Abhängigkeit vom Substituenten in para-Position des Aromaten, so findet sich eine mögliche Erklärung für die niedrige Affinität von tADTC5. Be-

wirkt die Einführung der Phenylsulfonylgruppe noch eine Erhöhung der Affinität um den Faktor 295 relativ zum Phenylharnstoff, so steigert sich die Affinität in der entsprechenden Tolyreihe nur noch um den Faktor 9. Beim [p-(2-Fluor-ethoxy)-phenyl]-harnstoffderivat dagegen bewirkt die Einführung der Sulfonylgruppe eine Affinitätsenkung um den Faktor 66, d.h. der Fluorethoxy-Rest verstärkt die Tendenz zur Affinitätsabnahme, die bereits beim Übergang Phenylsulfonyl/Tolylsulfonyl-Rest zu erkennen ist (s. Abb. 112).

Eine mögliche Begründung für dieses Verhalten lässt sich, unter Berücksichtigung der Struktur-Wirkungsbeziehungen, mittels der energieminierten Strukturen geben. Betrachtet man die Harnstoff- und Sulfonylharnstoffderivate in Abbildung 64, so ordnet sich der Substituent in 4-Position bei den Harnstoffderivaten stets in Richtung des freien Raums an. Durch Einführung der Sulfonylgruppe jedoch ändert dieser seine Anordnung und bevorzugt eine Position über dem Aromaten der 5,7-Dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolingruppierung. Sperrige Substituenten an Position 4 des Aromaten könnten sich, unter der Annahme dieser Raumanordnung bei Wechselwirkungen mit dem Rezeptor unter physiologischen Bedingungen – was nicht bekannt ist – als nachteilig erweisen.

8.2 In vivo-Testung [#]

Im Tiermodell sollte die ex vivo-Biodistribution von t[¹⁸F]ADTC1 untersucht werden. Vorab wurde die Stabilität der Injektionslösung bestimmt. Da bei t[¹⁸F]ADTC1, aufgrund der freien Carbonsäurefunktion, mit einer geringen Passage der Blut-Hirn-Schranke zu rechnen war, wurde auch Methyl-t[¹⁸F]ADTC1 untersucht. Methyl-t[¹⁸F]ADTC1 sollte eine bessere Hirnaufnahme zeigen, muss jedoch im Gehirn zur entsprechenden freien Carbonsäure verseift werden, da die Methylestergeschützte Carbonsäure keine Affinität zum Rezeptor besitzt. Daher sollte im Rahmen dieser Untersuchung auch überprüft werden, ob es im Falle des Methyl-t[¹⁸F]ADTC1 im Gehirn durch geeignete Esterasen zu einer Esterspaltung und somit zu einer Anreicherung des Liganden in den NMDA-reichen Hirnregionen (Hippocampus und Striatum) kommt.

8.2.1 Stabilität der Injektionslösung

Die Stabilität von Methyl-t[¹⁸F]ADTC1 und t[¹⁸F]ADTC1 in der injizierten ethanolischen Lösung wurde durch Radio-DC getestet. Nach 8 Stunden waren noch 76% des Methyl-t[¹⁸F]ADTC1 und 97% des t[¹⁸F]ADTC1 intakt.

[#] Diese Tierversuche wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmazie und der Psychiatrischen Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

8.2.2 Biodistributionsstudien von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$

Jeweils 10-15 MBq $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$ wurden 12 Sprague-Dawley Ratten in die Schwanzvene injiziert ($n = 3$). Nach 5, 15, 30 und 60 Minuten (p.i.) wurden die Ratten mittels Fluothane (Fa. Zeneca GmbH) betäubt und dekapitiert. Den Tieren wurden die für die Untersuchung relevanten Organe (Hirn, Leber, Niere) und eine Knochen-Probe entnommen. Die Organe und Knochen wurden gewogen, ihre Aktivität im γ -Counter gemessen und hieraus die relative Organverteilung in Prozent der injizierten Dosis pro Gramm (% ID/g) errechnet (Abb. 113).

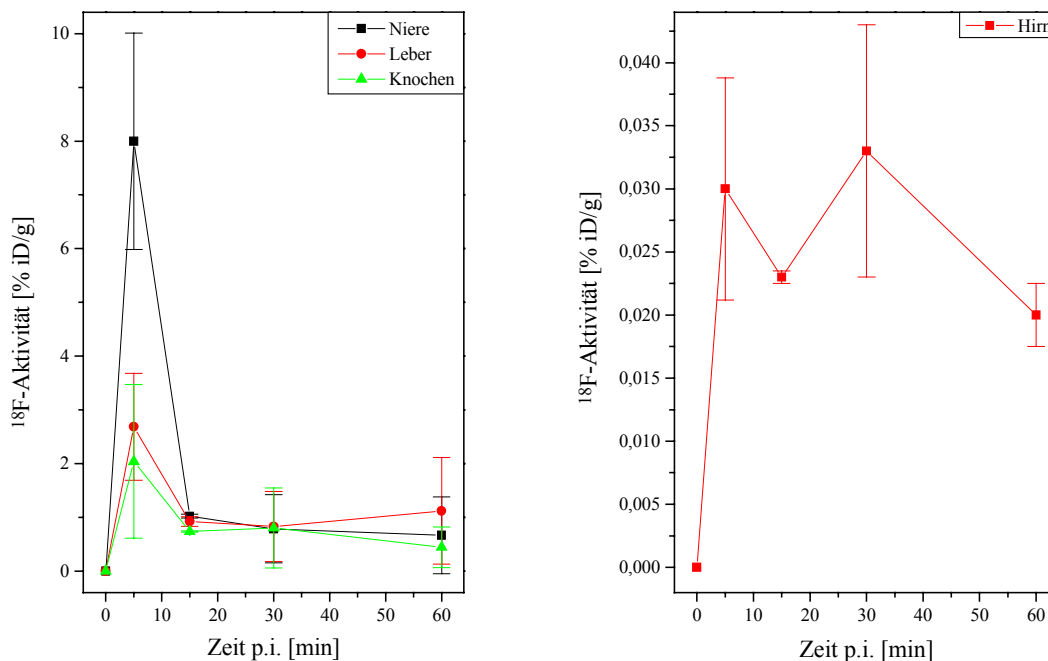


Abbildung 113: Aufnahmekinetiken von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$ für Sprague-Dawley Ratten ($n = 3$)

Ein relativ hoher Anteil von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$ ist in den ersten Minuten in der Niere (8 % ID/g) zu finden. Dies deutet auf einen hauptsächlich renalen Ausscheidungsweg und eine hohe Hydrophilie des Liganden hin. Die Aufnahme des Liganden in die Leber ist dagegen mit ca. 3 % ID/g deutlich geringer, was auf eine geringe Lipophilie hinweist. Die geringe Anreicherung der ^{18}F -Aktivität in den Knochen deutet auf eine untergeordnete Metabolisierung unter Abspaltung von $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ hin.

Die maximale Hirnaufnahme des $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$ von 0,033 % ID/g ist allerdings relativ gering für einen geeigneten PET-Liganden und dürfte in der zu hydrophilen Struktur begründet liegen.

Jeweils eines der nach 15 und 60 Minuten entnommenen Gehirne wurde eingefroren (Trockeneis), am Microtom in 30 μm dicke Scheiben geschnitten und diese mittels Autoradiographie untersucht um die Anreicherung von $t[^{18}\text{F}]\text{ADTC1}$ in den verschiedenen Hirnregionen zu bestimmen. Allerdings war die ^{18}F -Aktivität in den Gehirnen zu gering, um eindeutige Aussagen über die Verteilung zu machen.

8.2.3 Biodistributionsstudien von Methyl-t¹⁸F]ADTC1

Die Biodistributionsstudien von Methyl-t¹⁸F]ADTC1 wurden in Analogie zu t¹⁸F]ADTC1 durchgeführt, wobei sich die in Abbildung 114 dargestellten Organverteilungen ergaben:

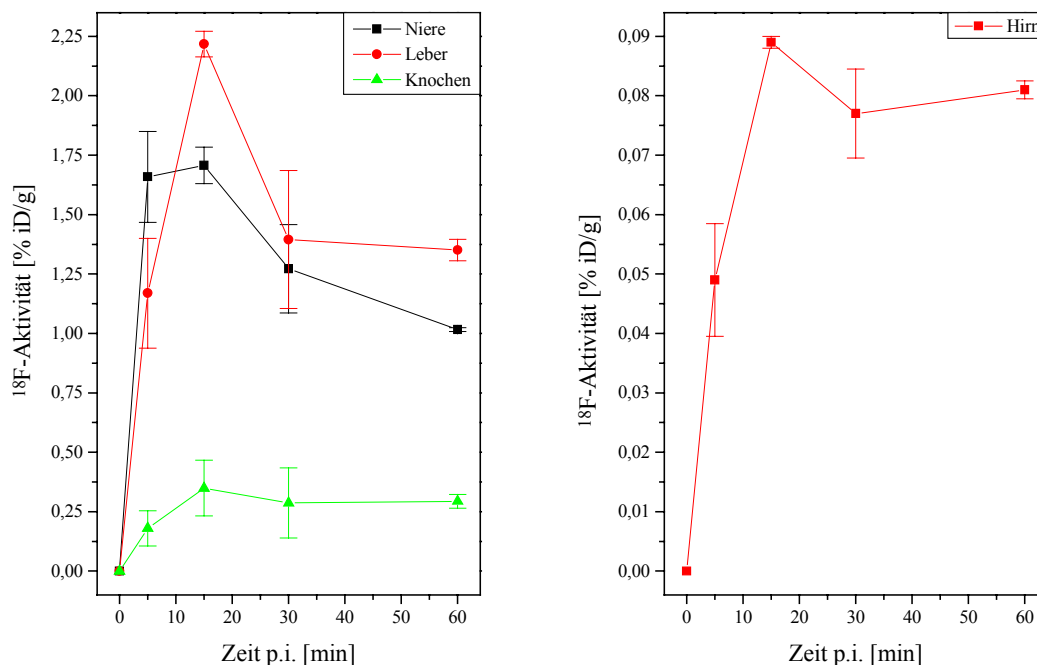


Abbildung 114: Aufnahmekinetiken von Methyl-t¹⁸F]ADTC1 für Sprague-Dawley Ratten (n = 3)

Gegenüber t¹⁸F]ADTC1 war beim Methyl-t¹⁸F]ADTC1 das Verhältnis Niere- zu Leberaufnahme deutlich zugunsten der Leberaufnahme verschoben, was auf eine wesentlich höhere Lipophilie von Methyl-t¹⁸F]ADTC1 hinweist. Auch die ¹⁸F-Aktivität in den Knochen war etwas geringer, was für eine geringere Metabolisierung der Substanz unter Freisetzung von [¹⁸F]Fluorid spricht.

Die Anreicherung von Methyl-t¹⁸F]ADTC1 im Gehirn war mit 0,09 % ID/g nahezu dreimal so hoch wie die des t¹⁸F]ADTC1.

Auch bei dieser Untersuchung wurde nach 15 und 60 Minuten jeweils ein Gehirn autoradiographisch untersucht, wobei eine gleichmäßige Verteilung des Liganden in allen Hirnregionen festgestellt wurde. Daraus ließ sich folgern, dass es nicht zur gewünschten Esterspaltung durch eine Esterase und somit zur Freisetzung der rezeptoraffinen Verbindung t¹⁸F]ADTC1 gekommen war.

9 Verzeichnisse

9.1 Abkürzungen

$\Delta\log P$	$\equiv \log P_{\text{Octanol/Wasser}} - \log P_{\text{Alkan/Wasser}}$; Variable, die die Fähigkeit einer lipophilen Substanz zur Ausbildung von H-Brücken beschreibt
ϵ	Dielektrizitätskonstante; beschreibt die elektrostatischen Wechselwirkungen eines Lösungsmittels mit polaren Substanzen
%iD/g	Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe
(1/1 V/V)	Volumenanteile eines Lösungsmittelgemisches
$[\text{K}^+ \text{ c.2.2.2}]_2\text{CO}_3^{2-}$	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
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
Bq	Bequerel (Zerfälle/s)
c.a.	carrier added (geträgert)
cADTC1	cis-5,7-Dichlor-4-(3-{4-[4-(2-fluor-ethyl)-piperazin-1-yl]-phenyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
Ci	Curie ($3,7 \cdot 10^{10}$ Bq)
DABCO	Diazabicyclo[2.2.2]octan
DIEA	Diisopropyl-ethylamin, N-Ethyldiisopropylamin
DMAA	Dimethylacetamid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMV	Direktmarkierungsvorläufer; Markierungsvorläufer zur Umsetzung mit [^{18}F]Fluorid
DMV-tADTC4	trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(2-brom-ethoxy)-phenyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester
EAA	Excitatory amino acids; Exzitatorische Aminosäuren
E_N	Elektronegativität
FD	field desorption; Feld-Desorption; schonende Massenspektrometrie zur Bestimmung der Molekülmassen polarer Verbindungen
FETos	2-Fluorethyltosylat
Fmoc	9-Fluorenylmethyl-oxycarbonyl-
Fp.	Schmelzpunkt
HAc	Essigsäure
HMPTA	Hexamethylphosphorsäuretriamid

HPLC	high performance liquid chromatography
i.v.	intravenös
IC ₅₀	Halb-maximale Hemmdosis; Dosis bei der eine 50 %ige Inhibition auftritt
k	Kapazitätsfaktor einer HPLC-Säule
KBTSA	Kalium-bis-(trimethylsilyl)-amid
K _d	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante zwischen einem Radioliganden und einem Rezeptor
K _i	Gleichgewichts-Inhibitionskonstante zwischen einem Liganden und einem Rezeptor
K _p .	Siedepunkt
Kryptofix [®] 2.2.2	4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[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
Methyl-MV-cADTC1	cis-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester
(Methyl-)MV-tADTC1	trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (<i>methylester</i>)
Methyl-MV-tADTC3	trans-4-[3-(4-Amino-phenyl)-ureido]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäuremethylester
(Methyl-)MV-tADTC4	trans-5,7-Dichlor-4-[3-(4-hydroxy-phenyl)-ureido]-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure (<i>methylester</i>)
MV	Markierungsvorläufer
MV-tADTC5	trans-5,7-Dichlor-4-{3-[(4-hydroxy-phenyl)-sulfonyl]-ureido}-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure
n.c.a.	no carrier added (nicht geträgert)
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
p.i.	post injectionem
PET	Positronenemissionstomographie
Pirkle's Reagenz	S-(+)-1-(9-Anthranyl)-2,2,2-trifluorethanol
RCA	Radiochemische Ausbeute (per Definition immer zerfallskorrigiert)
R _d	Reaktionsdauer
R _f	ratio of fronts; Laufstrecke einer Substanz auf einem DC, definiert durch $R_f = (\text{Laufstrecke-Substanz}/\text{Laufstrecke-Eluens})$

RP	reversed phase
SAA	Schwefelhaltige Homologe der EAA's
S _N 1	Nukleophile Substitution erster Ordnung
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)
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
tADTC2	trans-5,7-Dichlor-4-{3-[4-(4-methyl-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
tADTC5	trans-5,7-Dichlor-4-(3-{[4-(2-fluor-ethoxy)-phenyl]-sulfonyl}-ureido)-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin-2-carbonsäure
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
Triphosgen	Bis(trichlormethyl)-carbonat
w	Gewichtsprozent
ZNS	Zentrales Nervensystem

9.2 Literatur

- [1] I. Wendt, Radiometrische Methoden in der Geochronologie, Clausthaler Tektonische Hefte, Ellen Pilger Verlag, Clausthal-Zellerfeld 1971
- [2] H. Schütte, Medizinische Isotope in der organischen Chemie und Biochemie, Verlag Chemie, Weinheim 1966
- [3] R.C. Koch, Activation analysis handbook, Academic press, New York 1960
- [4] T.G. Cooper, The tools of biochemistry, Kap.3, Wiley-Interscience 1977
- [5] H.I. Yamamura, S.J. Enna and M.J. Kuhar, Neurotransmitter receptor binding, 57, Raven Press, New York (1978)
- [6] H. J. Wieler, PET in der klinischen Onkologie, Steinkopff Verlag, Darmstadt 1999
- [7] G. Stöcklin, Tracers for metabolic imaging of brain and heart. Radiochemistry and Radiopharmacology, Eur. J. Nucl. Med. **19**, 527-551 (1992)
- [8] Radionuclide therapy: From palliation to cure. EANM task Group Radionuclidic Therapy 1994
- [9] J. L. Lear, Autoradiography. In: Principles of Nuclear Medicine, Ed.: H. N. Wagner, Z. Szabo and J. W. Buchanan, Second Edition, W. B. Saunder Company, Philadelphia 1995
- [10] T. Chard, An introduction to radioimmunoassays and related techniques. In: Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Ed.: T. S. Work und E. Work, Vol.6, Part II, North Holland 1978
- [11] S. Rankowitz, J.S. Robertson, W.A. Higinbotham and A.M. Niell, IRE Cour. Re. **9**, 49 (1962)
- [12] J.S. Robertson and A.M. Niell, Proc. 4th IBM medical symposium, 77 (1962)
- [13] M.E. Phelps, E.J. Hoffmann, N.A. Mullani and M.M. Ter-Pogossian, J. Nucl. Med. **16**, 210 (1975)
- [14] H.J. Ache, Angew. Chem. **84**, 234 (1972)
- [15] M. Phelps, S. Cherry, Clin. Pos. Imag. **1**, 31-45 (1998)
- [16] M. Casey, R. Nutt, IEEE Trans. Nucl. Sci. **33**, 460-463 (1986)
- [17] S.M. Qaim, G. Stöcklin, Radiochim. Acta **34**, 25 (1983)
- [18] H. N. Wagner, Z. Szabo and J. W. Buchanan, Principles of Nuclear Medicine, Second Edition, 179, W. B. Saunder Company, Philadelphia 1995
- [19] T. Ruth, A.P. Wolf, Radiochim. Acta **26**, 26 (1979)
- [20] H.H. Coenen, P. Laufer, G. Stöcklin, K. Wienhard, G. Pawlik, H.G. Böcker-Schwarz und H.-D. Heiss, Life Sci. **40**, 81 (1987)

- [21] S.M. Moerlein, J.S. Permuter and D. Parkinson, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **32**, 516 (1993)
- [22] G. Stöcklin and H.J. Wester, in B. Gulyas and H.W. Müller-Gärtner, *Positron Emission Tomography: A Critical assessment of recent trends*, 57-90, Kluwer Academic Publishers, Netherlands 1998
- [23] *Organikum, Organisch-chemisches Grundpraktikum*, 17 Auflage, 136, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1988
- [24] D.P. Cox, J. Terpinski, W. Lawrynowicz, *J. Org. Chem.* **49**, 3216 (1984).
- [25] Beyer / Walter, *Lehrbuch der organischen Chemie*, 22. Auflage, 132, S. Hirzel Verlag, Stuttgart 1991
- [26] K. Hamacher, H.H. Coenen, G. Stöcklin, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **23**, 1047 (1986)
- [27] D. Block, Diplomarbeit: Zur praktisch trägerfreien ^{18}F -Fluoralkylierung und ^{18}F -Fluoracylierung, Universität zu Köln, 1987.
- [28] D. Block, H.H. Coenen, G. Stöcklin, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **24**, 1032 (1987)
- [29] D. Block, H.H. Coenen, G. Stöcklin, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **25**, 201 (1987)
- [30] T.J. Tewson, *J. Org. Chem.* **48**, 3507 (1983)
- [31] A.A. Wilson, J.N. Dasilva and S. Houle, *Appl. Radiat. Isot.* **46**, 765 (1995)
- [32] D. Block, H.H. Coenen, G. Stöcklin, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **25**, 185 (1988)
- [33] H.J. Wester, C. Dittmar, M. Herz, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Schwaiger, G. Stöcklin, *J. Nucl. Med.* **38**, 175P (1997)
- [34] G.K. Mulholland, B.H. Mock, Q-H Zheng and M.T. Vavrek, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **42** Suppl.1, 318 (1999)
- [35] R. Gail, H.H. Coenen, G. Stöcklin, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **35**, 197 (1994)
- [36] J.R. Beck, *Tetrahedron* **34**, 2057 (1978)
- [37] R. Gail, H.H. Coenen, *Appl. Radiat. Isot.* **45**, 105 (1993)
- [38] J. Ermert, R. Gail, H.H. Coenen, *J. Lab. Compds. Radiopharm.* **38**, 581 (1995)
- [39] T. Hayashi, *Jpn. J. Physiol.* **3**, 46 (1952)
- [40] D.R. Lucas, J.P. Newhouse, *AMA Arch. Ophthalmol.* **58**, 193 (1957)
- [41] D.R. Curtis and J.C. Watkins, *J. Neurochem.* **6**, 117 (1960)
- [42] D.R. Curtis and J.C. Watkins, *Pharmacol. Rev.* **17**, 347 (1965)

- [43] D.R. Curtis, A.W. Duggan, D. Felix, G.A. Johnston, A.K. Teb-ecis and J.C. Watkins, *Brain Res.* **41**, 283 (1972)
- [44] H. Shinozaki, S. Konishi, *Brain Res.* **24**, 386 (1970)
- [45] R.H.M. Kwok, *N. Engl. J. Med.* **278**, 796 (1968)
- [46] J.W. Olney, *Science* **164**, 719 (1969)
- [47] L.M. Pullan, J.W. Olney, M.T. Price, R.P. Compton, W.F. Hood, J. Michael and J.B. Monahan, *J. Neurochem.* **49**, 1301 (1987)
- [48] A.G. Thompson and I.C. Kilpatrick, *Pharmacol. Ther.* **72**, 25 (1996)
- [49] F. Fonnum, *J. Neurochem.* **42**, 1 (1984)
- [50] G.J. Balcom, R.H. Lennox and J.L. Meyerhoff, *J. Neurochem.* **26**, 423 (1976)
- [51] D.R. Curtis and J.C. Watkins, *J. Neurochem.* **6**, 117 (1960)
- [52] R.G. Kalb, *Development* **120**, 3063 (1994)
- [53] S. Nakanishi, *Science* **258**, 597 (1992)
- [54] C.W. Cotman, D.T. Monaghan and A.H. Ganong, *Annu. Rev. Neurosci.* **11**, 61 (1988)
- [55] J.J. Wagner und B.E. Alger, *Hippocampus* **6**, 24 (1996)
- [56] M. Baudry and G. Massicotte, *Concepts in Neuroscience* **3**, 79 (1992)
- [57] P.K. Stanton, *Hippocampus* **6**, 35 (1996)
- [58] T.V.P. Bliss and G.L. Collingridge, *Nature* **361**, 31 (1993)
- [59] R.C. Malenka and R.A. Nicoll, *Trends in Neurosciences* **16**, 521 (1993)
- [60] D.W. Brann, V.B. Mahesh, *Excitatory Amino Acids / Their Role in Neuroendocrine Function*, CRC Press 1996
- [61] K. Moriyoshi, M. Masu, T. Ishii, R. Shigemoto, N. Mizuno and S. Nakanishi, *Nature* **354**, 31 (1991)
- [62] T. Ishii, K. Moriyoshi, H. Sugihara, K. Sakurada, H. Kadotani, M. Yokoi, C. Akazawa, R. Shigemoto, N. Mizuno, M. Masu and S. Nakanishi, *J. Biol. Chem.* **268**, 2836 (1993)
- [63] C. Rosenmund, Y. Stern-Bach and C.F. Stevens, *Science* **280**, 1596 (1998)
- [64] I. Mano and V.I. Teichberg, *Neuroreport* **9**, 327 (1998)
- [65] B. Laube, J. Kuhse and H. Betz, *J. Neurosci.* **18**, 2954 (1998)
- [66] L.S. Premkumar and A. Auerbach, *J. Gen. Physiol.* **110**, 485 (1997)

- [67] K.K. Chohan, Z.G. Wo, R.E. Oswald and M.J. Sutcliffe, *J. Mol. Model.* 2000 **6**, 16
- [68] S.A. Siegelbaum, E.R. Kandel, *Curr. Opin. in Neurobiol.* **1**, 113 (1991)
- [69] B. Laube, H. Hirai, M. Sturgess, H. Betz and J. Kuhse, *Neuron* **18**, 493 (1997)
- [70] H.J. Olverman, A.W. Jones, K.N. Mewett and J.C. Watkins, *Neuroscience* **26**, 17 (1988)
- [71] F.A. Stephenson and A.J. Turner, *Amino Acid Neurotransmission*, Portland Press, London 1998
- [72] C.J. McBain and M.L. Mayer, *Physiol. Rev.* **74**, 723 (1994)
- [73] J. Lerma, R.S. Zukin and M.K.L. Bennet, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 2354 (1990)
- [74] L. Vyklicky, M. Benveniste and M.L. Mayer, *J. Physiol.* **428**, 313 (1990)
- [75] D.T. Monaghan, H.J. Olverman, L. Nguyen, J.C. Watkins and C.W. Cotman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 1183 (1988)
- [76] J.W. Johnson and P. Asher, *Nature* **325**, 529 (1987)
- [77] E. Fadda, W. Danysz, J.T. Wroblewski and E. Costa, *Neuropharmacology* **27**, 1183 (1988)
- [78] K.J. Swartz, M.J. During, A. Freese and M.F. Beal, *J. Neurosci* **10**, 2965 (1990)
- [79] A. Kuryatov, B. Laube, H. Betz and J. Kuhse, *Neuron* **12**, 1291 (1994)
- [80] R.W. Ransom and N.L. Deschenes, *Synapse* **5**, 294 (1990)
- [81] K. Williams, C. Romano and P.B. Molinoff, *Mol. Pharmacol.* **36**, 575 (1989)
- [82] I.J. Reynolds, *Eur. J. of Pharmacol.* **177**, 215 (1990)
- [83] G.L. Westbrook and M.L. Mayer, *Nature* **328**, 640 (1987)
- [84] S. Peters, J. Koh and D.W. Choi, *Science* **236**, 589 (1987)
- [85] G.-C. Yeh, D.W. Bonhaus and J.O. McNamara, *Mol. Pharmacol.* **38**, 14 (1990)
- [86] G.A. Howell, M.G. Welch and C.J. Frederickson, *Nature* **308**, 736 (1984)
- [87] S.Y. Asaaf and S.-H. Chung, *Nature* **308**, 734 (1984)
- [88] J. Church, S. Zeman and D. Lodge, *Anesthesiol.* **69**, 702 (1988)
- [89] D. Martin and D. Lodge, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **31**, 279 (1988)
- [90] G. Dannhardt, M. von Gruchalla and U. Elben, *Pharm. Pharmacol. Lett.*, **4**, 12 (1994)
- [91] G. Dannhardt, M. von Gruchalla and M. Herkert, *Pharm. Pharmacol. Lett.*, **4**, 16 (1994)

- [92] G. Dannhardt, M. von Gruchalla, U. Elben and M. Herkert, *Pharm. Pharmacol. Lett.*, **8**, 11 (1998)
- [93] J.C. Watkins and G.L. Collingridge, *The NMDA Receptor*, 19, Oxford University Press, Oxford 1989
- [94] P.J. Birch, C.J. Grossman and A.G. Hayes, *Eur. J. Pharmacol.* **154**, 85 (1988)
- [95] P.D. Leeson, R. Baker, R.W. Carling, N.R. Curtis, K.W. Moore, B.J. Williams, A.C. Foster, A.E. Donald, J.A. Kemp and G.R. Marshall, *J. Med. Chem.* **34**, 1243 (1991)
- [96] P.D. Leeson, R.W. Carling, J.D. Smith, R. Baker, A.C. Foster and J.A. Kemp, *Med. Chem. Res.* **1**, 64 (1991)
- [97] R.W. Carling, P.D. Leeson, A.M. Moseley, R. Baker, A.C. Foster, S. Grimwood, J.A. Kemp and G.R. Marshall, *J. Med. Chem.* **35**, 1942 (1992)
- [98] T. Honore, S.N. Davies, J. Dreher, E.J. Fletcher, P. Jacobsen, D. Lodge and F.E. Nielsen, *Science* **214**, 701 (1988)
- [99] M. Kessler, M. Baudry and G. Lynch, *Brain Res.* **489**, 377 (1989)
- [100] M.J. Sheardown, J. Drejer, L.H. Jensen, C.E. Stidsen and T.A. Honore, *Eur. J. Pharmacol.* **174**, 197 (1989)
- [101] J.F.W. Keana, S.M. Kher, S.X. Cai, C.M. Dinsmore, A.G. Glenn, J. Guastella, J.C. Huang, V. Ilyin, Y. Lü, P.L. Mouser, R.M. Woodward and E.-J. Weber, *J. Med. Chem.* **38**, 4367 (1995)
- [102] P.D. Leeson, R. Baker, R.W. Carling, J.J. Kulagowski, I.M. Mawer, M.P. Ridgill, M. Rowley, J.D. Smith, I. Stansfield, G.I. Stevenson, A.C. Foster and J.A. Kemp, *BioMed. Chem. Lett.* **3**, 299 (1993)
- [103] M. Rowley, P.D. Leeson, G.I. Stevenson, A. Moseley, I. Stansfield, I. Sanderson, L. Robinson, R. Baker, J.A. Kemp, G.R. Marshall, A.C. Foster, S. Grimwood, M.D. Tricklebank and K.L. Saywell, *J. Med. Chem.* **36**, 3386 (1993)
- [104] M. Rowley, P.D. Leeson, G.I. Stevenson, A. Moseley, I. Stansfield, I. Sanderson, L. Robinson, R. Baker, J.A. Kemp, G.R. Marshall, A.C. Foster, S. Grimwood, M.D. Tricklebank and K.L. Saywell, *J. Med. Chem.* **36**, 3386 (1993)
- [105] M. Rowley, P.D. Leeson, S. Grimwood, A.C. Foster, M.D. Tricklebank and K.L. Saywell, *BioMed. Chem. Lett.* **2**, 1627 (1992)
- [106] F.G. Salituro, B.L. Harrison, B.M. Baron, P.L. Nyce, K.T. Stewart, J.H. Kehne, H.S. White and I.A. McDonald, *J. Med. Chem.* **35**, 1791 (1992)
- [107] P. Jackson, T.W. Davenport, L.M. Pullan and J.B. Patel, 205th National Meeting of the American Chemical Society, Denver 1993, Abstract 80
- [108] F. Schuber, *Biochem. J.* **260**, 1 (1989)

- [109] A. L. Lehninger, D.L. Nelson und M.M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, 820, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin 1994
- [110] Z.N. Canellakis, L.L. Marsh and P.K. Bondy, *Yale J. Biol. Med.* **62**, 481 (1989)
- [111] A.I. Sacaan and K.M. Johnson, *Mol. Pharmacol.* **37**, 572 (1990)
- [112] C. Carter, J. Benavides, P. Legendre, J.D. Vincent, F. Noel, F. Thuret, K.G. Lloyd, S. Arbilla, B. Zivkovic, E.T. MacKenzie, B. Scatton and S.L. Langer, *J. Pharmacol.* **247**, 1222 (1988)
- [113] Eliprodil Hydrochloride, *Drugs Fut.* **20**, 1058 (1995)
- [114] D. Martin and D. Lodge, *Pharmacol. Biochem. Beh.* **31**, 279 (1988)
- [115] C.T. O'Shaughnessy and D. Lodge, *Eur. J. Pharmacol.* **153**, 201 (1988)
- [116] J. Hamon, J. Vignon and J.M. Kamenka, *Eur. J. Med. Chem.* **31**, 489 (1996)
- [117] B.V. Clineschmidt, G.E. Martin and P.R. Bunting, *Drug Develop. Res.* **2**, 123 (1982)
- [118] P.D. Leeson, R.W. Carling, K.W. Moore, A.M. Moseley, J.D. Smith, G. Stevenson, T. Chan, R. Baker, A.C. Foster, S. Grimwood, J.A. Kemp, G.R. Marshall and K. Hoogsteen, *J. Med. Chem.* **35**, 1954 (1992)
- [119] M. von Gruchalla-Wesierski., *Dissertation: Modellsubstanzen zur Markierung und Charakterisierung der NMDA-/Glycin-Bindungsstellen*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 1996
- [120] G. Dannhardt, B.K. Kohl, *Curr. Med. Chem.* **5**, 253 (1998)
- [121] F.X. Vollenweider, K.L. Leenders, I.Oye, D. Hell and J. Angst, *Eur. Neuropsychopharmacology* **7**, 25 (1997)
- [122] J.-O. Thorell, S. Stone-Elander, T. Duelfer, S.X. Cai, L. Jones, H. Pfeufferkorn and G. Ciszevska, *J. Labelled Cpd. Radopharm.* **41**, 345 (1998)
- [123] T. Haradahira, S. Sasaki, M. Maeda, K. Kobayashi; Osamu Inoue, U. Tomita, T. Nishikawa and K. Suzuki, *J. Labelled Cpd. Radopharm.* **41**, 843 (1998)
- [124] X. Ouyang, Z.-Y. Yang and J. Mukherjee, *J. Nucl. Med.* **36**, 150P (1995)
- [125] D.O. Kiesewtter, R.D. Finn, K.C. Rice and J.A. Monn, *Appl. Radiat. Isot.* **41**, 139 (1990)
- [126] S. Samnick, S. Ametamey, K.L. Leenders, P. Vontobel, G. Quack, C.G. Parsons, H. Neu and P.A. Schubiger, *Nucl. Med. Biol.* **25**, 323 (1998)
- [127] B.K. Kohl, *Dissertation: Antagonisten der Glycinbindungsstelle am NMDA-Rezeptor: Synthese, Analytik, pharmakologische Testung und Struktur-Wirkungsbeziehungen*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 1999
- [128] G. Dannhardt, M. von Gruchalla, *Pharm. Ztg.*, **142**, 1359 (1997)

- [129] G. Dannhardt, M. von Gruchalla, B.K. Kohl and C.G. Parsons, Arch. Pharm. Med. Chem., **333**, 267 (2000)
- [130] G.I. Stevenson, P.D. Leeson and M. Rowley, Bioorg. & Med. Chem. Lett. **2**, 371 (1992)
- [131] J.M. Hook, Synth. Comm. **14**, 83 (1984)
- [132] R. Hart, Chim. Belge **20**, 403 (1955)
- [133] R. Hart, Chim. Belge **23**, 251 (1958)
- [134] M.L. Wolfrom, G.H. Mc Fadden and A. Chaney, J. Org. Chem. **26**, 2597 (1961)
- [135] R.S. Lott, V.S. Chauhan and C.H. Stammer, J. Chem. Soc., Chem. Comm., 495 (1979)
- [136] T.G.M. Dhar, L.A. Borden, T. Sriram, K.E. Smith, T.A. Branchek, R.L. Weinshank and C. Gluchowski, J. Med. Chem. **37**, 2334 (1994)
- [137] H.A. Staab, Angew. Chem. **74**, 407 (1962)
- [138] H.A. Staab, W. Benz, Liebigs Ann. Chem. **648**, 72 (1961)
- [139] L. Cotarca, P. Delogu, A. Nardelli and V. Šunjić, Synthesis **1996**, 553
- [140] H. Eckert und B. Forster, Angew. Chem. **99**, 922 (1987)
- [141] P. Majer and R.S. Randad, J. Org. Chem. **59**, 1937 (1994)
- [142] Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Bd. E11/1, 24, Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1985
- [143] R. Schirmacher, Diplomarbeit: Vergleich dreier ¹¹C-Methylierungsagentien zur selektiven n.c.a Markierung polyfunktioneller Moleküle mit Kohlenstoff-11, Universität zu Köln, 1996
- [144] L.A. Carpino and G.Y. Han, J. Org. Chem. **92**, 5748 (1970)
- [145] L.A. Carpino and G.Y. Han, J. Org. Chem. **37**, 3404 (1972)
- [146] S. Udenfried and J. Meienhofer, The Peptides , Vol. 9, Academic Press, Orlanda 1987
- [147] J.H. Babler, S.J. Sarussi, Synth. Commun. **11**, 925 (1981)
- [148] F. Kurzer, Chem. Rev. **50**, 1 (1952)
- [149] N. Kharash, Organic Sulfur Compounds, Vol. 1, 491, Pergamon Press, New York 1961
- [150] Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Bd. 9, 629, Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1985
- [151] J.K. Rasmussen and A. Hassner, Chem. Rev. **76**, 389 (1976)
- [152] R. Graf, Angew. Chem. **80**, 179 (1968)

- [153] Patent US 5017212, Takeda Chemicals Industries Ltd, 1991
- [154] D.V. Parke and R.T. Williams, *J. Chem. Soc.* **1950**, 1757
- [155] L. Qian, Z. Sun, M.P. Mertes and K. Bowman Mertes, *J. Org. Chem.* **56**, 4904 (1991)
- [156] E. Juaristi and D. Madrigal, *Tetrahedron* **45**, 629 (1989)
- [157] M. Collins, M.-C. Lasne and L. Barré, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1992**, 3185
- [158] Patent EP 0189612, Duphar Int. Res., 1986
- [159] P.T. Litak and J.M. Kauffman, *J. Heterocyclic Chem.* **31**, 457 (1994)
- [160] *Organikum, Organisch-chemisches Grundpraktikum*, 17 Auflage, 559, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1988
- [161] I. Galynker and W.C. Still, *Tetrahedron Lett.* **23**, 4461 (1982)
- [162] A.S. Pepito and D.C. Dittmer, *J. Org. Chem.* **59**, 4311 (1994)
- [163] J. F. O'Connell and H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **57**, 4775 (1992)
- [164] J. Hartung, S. Hünig, R. Kneuer, M. Schwarz and H. Wenner, *Synthesis* **1997**, 1433
- [165] G. Quinkert, E. Egert und C. Griesinger, *Aspekte der organischen Chemie*, 112 Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel 1995
- [166] D.H.R. Barton, R.C. Cookson, W. Klyne and C.W. Shoppee, *Chem. Ind.* **1954**, 21
- [167] M. Hesse, H. Meier, B. ZeeH, *Spektroskopische Konstanten in der organischen Chemie*, 4. Auflage, 105, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1991
- [168] *Organikum, Organisch-chemisches Grundpraktikum*, 17 Auflage, 172, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1988
- [169] *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, Second Edition, VCH, Weinheim
- [170] J. March, *Advanced Organic Chemistry*, Third Edition, 353, Wiley-Interscience, New York 1985
- [171] R. Schirrmacher, Dissertation: Zur trägerarmen Markierung von GABA-Transporterliganden mit [¹⁸F]Fluor, [¹¹C]Kohlenstoff und [³H]Tritium, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 1999
- [172] V. Gutmann and E. Wychera, *Inorg. Nucl. Chem. Lett.* **2**, 257 (1966)
- [173] Y. Marcus, *Chem. Soc. Rev.* **22**, 409 (1993)
- [174] Beyer Walter, *Lehrbuch der organischen Chemie*, 22. Auflage, 151, S. Hirzel Verlag, Stuttgart 1991

- [175] D.D. Dischino, M.J. Welch, M.R. Kilbourn and M.E. Raichle, *J. Nucl. Med.* **24**, 1030 (1983)
- [176] N.H. Greig, *Cancer Treat. Rev.* **14**, 1 (1987)
- [177] D. Dyrssen, *Sv. Kem. Tidskr.* **64**, 213 (1952)
- [178] D. Dyrssen, M. Dyrssen and E. Johannson, *Acta Chem. Scand.* **10**, 341 (1956)
- [179] D. Dyrssen, *Acta Chem. Scand.* **10**, 353 (1957)
- [180] J. Rydberg, *Sv. Kem. Tidskr.* **65**, 37 (1953)
- [181] A. Avdeef, K.J. Box, J.E.A. Comer, M. Gilges, M. Hadley, C. Hibbert, W. Patterson and K.Y. Tam, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **20**, 631 (1999)
- [182] M. Yasuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **32**, 429 (1959)
- [183] T. Shedlovsky, in: P. Esce, *Electrolytes*, Pergamon, New York 1962
- [184] W. Klein, W. Kördel, M. Weisz and H.J. Koremski, *Chemosphere* **17**, 361 (1988)
- [185] K.S. Murthy and G. Zografi, *J. Pharm. Sci.* **59**, 1281 (1970)
- [186] M. Akamatsu, Y. Yoshida, H. Nakamura, M. Asao, H. Iwamura and t. Fujita, *Quant. Struct.-Act. Relat.* **8**, 195 (1989)
- [187] N. El Tayar, R.-S. Tsai, B. Testa, P.-A. Carrupt and A. Leo, *J. Pharm. Sci.* **80**, 590 (1991)
- [188] N. El Tayar, R.-S. Tsai, B. Testa, P.-A. Carrupt, C. Hansch and A. Leo, *J. Pharm. Sci.* **80**, 744 (1991)
- [189] *Organikum, Organisch-chemisches Grundpraktikum*, 17. Auflage, 638, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1988
- [190] J. Leonard, B. Lygo, G. Procter, *Praxis der organischen Chemie*, 58, VCH, Weinheim 1996
- [191] G. Höfner, K.T. Wanner, *J. of receptor signal transduction research* **16**, 297 (1996)
- [192] M.M. Bradford, *Analytical Biochemistry* **72**, 248 (1976)
- [193] 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)
- [194] Y. Cheng and W.H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099 (1973)