
Synthese ^{18}F -markierter Liganden zur Visualisierung der GABA-Bindungsstelle des GABA_A-Rezeptors mittels PET

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Vasko Kramer

geboren in Marburg a.d. Lahn

Mainz, Februar 2012

Zusammenfassung

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem und bindet vorrangig an ionotrope GABA_A-Rezeptoren. Diese sind an fast allen neuronalen Prozessen beteiligt und werden darüber hinaus mit neurologischen Erkrankungen wie Epilepsie, Angstzuständen, Schlafstörungen und Schizophrenie in Verbindung gebracht. Die PET bietet als molekulares bildgebendes Verfahren die Möglichkeit einzelne Stoffwechselvorgänge des GABAergen Systems zu visualisieren und zu quantifizieren. Durch den Einsatz eines ¹⁸F-markierten Radioliganden an die GABA-Bindungsstelle könnten so die Rezeptorverfügbarkeit des GABA_A-Rezeptors gemessen und die Ausschüttung des Neurotransmitters GABA quantifiziert werden.

4-(2-Naphthylmethyl)-5-(piperidin-4-yl)isothiazolole und -isoxazolole stellen aufgrund ihrer hohen Affinität gegenüber der GABA-Bindungsstelle und ihrer lipophilen Struktur vielversprechende Leitstrukturen für die Entwicklung eines PET-Tracers zur Visualisierung der GABA-Bindungsstelle dar. Daher wurden zunächst ¹⁹F-substituierte Referenzverbindungen synthetisiert, um diese hinsichtlich ihrer Eignung als Radioligand in *in vitro*-Studien zu evaluieren. Dazu wurde Fluor direkt sowie über eine Fluorethoxygruppe an Position 1 des Naphthalinrings eingeführt. Zusätzlich wurde ein Fluorethylether eines Isothiazolols als Referenz-verbindung synthetisiert. In anschließenden Verdrängungsstudien wurden die Affinitäten der synthetisierten Verbindungen mit [³H]Muscimol an Membranpräparaten aus Rattenhirnen, sowie transfizierten HEK293-Zellen bestimmt. Zusätzlich wurden die entsprechenden Log D-Werte bestimmt. Die Verbindung 5-(piperidin-4-yl)-4-(1-fluornaphth-2-ylmethyl)-isothiazol-3-ol **VK5** zeigte in den *in vitro*-Studien die vielversprechendsten Ergebnisse (IC₅₀ = 10 nM; Log D = 1,7) und wurde im Folgenden in einer dreistufigen Radiosynthese als ¹⁸F-Verbindung synthetisiert.

Zu diesem Zweck wurde ein geeigneter Markierungsvorläufer dargestellt und über eine n.c.a. S_NAr-Markierung mit [¹⁸F]F⁻ umgesetzt. Die Reaktionsparameter wurden hinsichtlich Reaktionszeit, -temperatur, Basenkonzentration und Lösungsmittel optimiert. Die zur Aktivierung einer S_NAr eingeführte Carbonylfunktion wurde in einem zweiten Schritt mit Triethylsilan/Trifluoressigsäure reduziert. Im finalen Schritt wurden zwei Schutzgruppen mit Bortrichlorid in DCM abgespalten und [¹⁸F]**VK5** als injektionsfertige Lösung in isotoner NaCl-Lösung erhalten. Es wurden radiochemische Ausbeuten von 0,7-1 % (EOS) nach einer durchschnittlichen Synthesedauer von 275 Minuten erhalten.

Der Radioligand [¹⁸F]**VK5** wurde anschließend in Autoradiographie-Versuchen an Hirnschnitten der Ratte hinsichtlich seiner Spezifität für die GABA-Bindungsstelle untersucht. Die unspezifische Bindung wurde durch die Zugabe von GABA bestimmt wonach kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Die hohe unspezifische Bindung kann möglicherweise auf die niedrigen spezifischen Aktivitäten zurückgeführt werden. Diese lagen, bedingt durch die drei Schritte der Radiosynthese, in einem Bereich von 0,1-0,6 GBq/μmol. Die erhaltenen Ergebnisse lassen für zukünftige Versuche noch einige Optimierungsmöglichkeiten offen. Aufgrund der bisher erhaltenen Daten lässt sich daher keine definitive Aussage über die Eignung des Liganden [¹⁸F]**VK5** als PET-Tracer treffen.

Abstract

γ -Aminobutyric acid (GABA) is the primary inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system and plays an important role in neuronal functions like cognition, learning and memory. Moreover, dysfunctions of the GABAergic system are involved in anxiety, schizophrenia, sleep disorders and epilepsy. Therefore PET ligands are valuable tools to study the pathophysiology of neuronal disorders, effects of pharmacotherapies and normal brain functions. Most radiotracers for PET and SPECT target the benzodiazepine binding site but till today there is no radioligand available for the imaging of the GABA recognition site of GABA_A receptors. Those would provide the possibility to measure receptor availabilities as well as the release of GABA from presynaptic neurons.

4-(2-Naphthylmethyl)-5-(piperidin-4-yl)isothiazololes and -isoxazololes seem to be promising lead structures for the development of PET-tracers for the GABA binding site, due to their high affinities and their lipophilic structures. Therefore new ¹⁹F-substituted reference compounds were synthesized to verify their suitability as PET-Tracers in *in vitro* assays. The fluorine label was introduced at position one of the naphthalene ring either directly or by a fluoroethoxy group. Additionally an isothiazolole was alkylated using fluoroethyltosylate. The affinities towards the GABA_A receptor were determined using a radioligand competition binding assay using rat brain membrane preparations and [³H]muscimol. Some of the reference compounds showed high affinity towards the GABA binding site in low nanomolar range. Furthermore log D values were determined by HPLC. The most promising candidate of this series 5-(piperidin-4-yl)-4-(1-fluoronaphth-2-ylmethyl)-isothiazol-3-ol **VK5** showed excellent binding properties (IC₅₀ = 10 nM) and was selected for subsequent radiolabeling.

Therefore a convenient labeling precursor was synthesized and labeled with ¹⁸F by direct n.c.a. nucleophilic aromatic substitution. The reaction conditions were optimized due to temperature, duration, solvent and amount of base. The carbonyl group, necessary for the activation of the naphthalene, ring was reduced with triethylsilane/trifluoroacetic acid afterwards. During the final step, two protective groups were removed by borontrichloride whereby [¹⁸F]**VK5** was obtained as injectable solution. Radiochemical yields of 0,7-1 % (EOS) were obtained after a synthesis time of about 275 minutes.

Autoradiographic studies of [¹⁸F]**VK5** on brain slices of rats were conducted to determine the specific binding to the GABA binding site. Unspecific binding was determined by addition of GABA but in any case no specific binding was observed. A possible explanation could be the low specific activity, resulting from the three radioactive steps. The obtained results indicate some possibilities for further improvements. Based upon the given results, there could be no definitive conclusion whether [¹⁸F]**VK5** would be a suitable PET-Tracer or not.

1	Einleitung	1
1.1	Die Positronen Emissions Tomographie	2
1.1.1	Auswahl der verwendeten Radioliganden	4
1.1.2	Auswahl der verwendeten Radioisotope	5
1.2	^{18}F als Positronenemitter.....	7
1.2.1	Kernchemische und kinetische Aspekte der ^{18}F -Chemie.....	7
1.2.2	Produktion von ^{18}F -Fluor	9
1.2.3	Fluorierungsmethoden organischer Moleküle.....	10
1.3	Das GABAerge System	16
1.3.1	Liganden der GABA-Bindungsstelle	18
1.3.2	Bildgebung des GABA _A -Rezeptors	19
2	Problemstellung	21
3	Ergebnisse und Diskussion	24
3.1	Synthese der Referenzverbindungen.....	24
3.1.1	Synthese der Isoxazole	24
3.1.2	Synthese der Isothiazole	30
3.1.3	Synthese der Markierungsvorläufer MV1 und MV2	40
3.2	<i>In vitro</i> -Evaluierung der Referenzverbindungen	46
3.2.1	Bestimmung der Affinitäten zum GABA _A -Rezeptor.....	46
3.2.2	Bestimmung der Lipophilie.....	49
3.3	Radioaktive Markierungen	52
3.3.1	Radiosynthese von [^{18}F]VK10	52
3.3.2	Radiosynthese von [^{18}F]VK5	57
3.4	Evaluierung der radioaktiven Verbindungen	69
3.4.1	Autoradiographien	69
3.4.2	Bestimmung der Plasmastabilität von [^{18}F]VK5	72
4	Experimenteller Teil.....	73
4.1	Verwendete Geräte und Chemikalien.....	73
4.2	Organische Synthesen	75
4.2.1	Synthese der Naphthol-Derivate.....	75

4.2.2	Synthese der Isooxazole	83
4.2.3	Synthese der Isothiazolole	91
4.3	Evaluierungen.....	103
4.3.1	Bestimmung der Affinitäten	103
4.3.2	Bestimmung der Lipophilien mittels HPLC	103
4.4	Radiosynthesen	105
4.4.1	Allgemeines	105
4.4.2	Synthese von [¹⁸ F]VK10	105
4.4.3	Synthese von [¹⁸ F]VK5	107
4.4.4	Durchführung der Autoradiographien	109
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	110
6	Anhang.....	116
6.1	Verwendete Abkürzungen	116
6.2	Tabellenverzeichnis	117
6.3	Abbildungsverzeichnis.....	117
6.4	Literaturverzeichnis.....	120

1 Einleitung

Bildgebende Verfahren spielen bei der Diagnose und Therapiekontrolle von Krankheiten sowie bei der Aufklärung physiologischer Stoffwechselprozesse eine wichtige Rolle. Verfahren wie klassisches Röntgen, die Computer-Tomographie (CT) und die Kernspin-Tomographie (MRT) liefern uns dabei genaue Informationen über die Morphologie einzelner Organe und Strukturen im lebenden Organismus. Die Molekulare Bildgebung hingegen ermöglicht es, physiologische Prozesse auf molekularer Ebene *in vivo* bildlich darzustellen und zu quantifizieren. Insbesondere den Nuklearmedizinischen Verfahren, wie der Positronen Emissions Tomographie (PET) oder der Single Photonen Emissions Tomographie (SPECT), kommen dabei eine besondere Bedeutung zu. Beide basieren auf dem Einsatz radioaktiv markierter Moleküle, welche an den zu untersuchenden Stoffwechselvorgängen teilnehmen, ohne diese zu beeinflussen, und die gut detektiert werden können^{[1],[2]}.

Die Entwicklung der PET und der SPECT wurde erst durch viele Entdeckungen des 20. Jahrhunderts ermöglicht, die uns heute als Grundlage für das Gebiet der Nuklearmedizin dienen und zu Recht als Meilensteine der Wissenschaft bezeichnet werden. Allem zu Grunde liegt das Phänomen der Radioaktivität, welches 1896 erstmals von Henri Bequerel beobachtet wurde^[3] (Nobelpreis 1903, zusammen mit P. und M. Curie). Einen weiteren wichtigen Beitrag lieferten Frederic Joliot und Irène Joliot-Curie durch die Produktion künstlicher Radionuklide (Nobelpreis 1935). Von großer Bedeutung war hierbei insbesondere das Phosphorisotop ^{32}P , welches sich G. de Hevesy für die Untersuchung biochemischer Stoffwechselprozesse zu Nutze machte. Hieraus ging das sogenannte Tracer-Konzept hervor, was uns heute als Grundlage für die Anwendung radioaktiver Isotope in den Lebenswissenschaften dient^[4] (Nobelpreis 1943). Auch die Entwicklung des ersten Zyklotrons 1930 durch Orlando Lawrence ist hier hervorzuheben, welche die Produktion wichtiger neutronen-defizitärer Radioisotope mit hoher spezifischer Aktivität ermöglichte^[5].

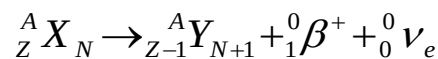
Die Entwicklung des ersten PET-Tomographen sowie die Verbindung kurzlebiger Radionuklide mit organischen Molekülen durch das Gebiet der Radiopharmazeutischen Chemie ermöglichen uns heute den Einsatz der PET zur nicht invasiven Bildgebung physiologischer Prozesse. Die PET findet daher neben der Tumordiagnostik insbesondere bei der Bildgebung neuronaler Stoffwechselvorgänge breite Anwendung, um das Zusammenspiel verschiedener Rezeptorsysteme zu untersuchen^{[6],[7]}. Dies setzt jedoch die stete Entwicklung neuer Radiopharmaka voraus, die es erst ermöglicht, die PET so vielseitig einzusetzen und praktisch jeden Prozess, von der Expression einzelner Gene bis hin zur Wirkung verschiedener Arzneistoffe, untersuchen zu können^{[8],[9]}.

Diese Arbeit soll hierzu einen Beitrag leisten und beschäftigt sich daher mit der Entwicklung neuer Radioliganden für die Bildgebung der GABA-Bindungsstelle des GABA_A-Rezeptors mittels PET.

1.1 Die Positronen Emissions Tomographie

Bei einer PET-Untersuchung werden Radiopharmaka eingesetzt, die aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften an den zu untersuchenden Stoffwechselprozessen teilnehmen oder an bestimmte Zielstrukturen binden. Durch die sehr gute lokale und kinetische Nachweisbarkeit und die hohe spezifische Aktivität der Radionuklide liegt die Stoffmenge der eingesetzten Radiotracer meist im sub-nanomolaren Bereich. Da hierdurch der biochemische Prozess nicht beeinflusst wird, können auch sehr wirksame oder sogar toxische Substanzen als Radioligand eingesetzt werden.

Das Prinzip der PET beruht auf der Verwendung kurzlebiger, neutronenarmer Isotope, welche sich durch einen Positronenzerfall (β^+ -Zerfall) stabilisieren. Im Kern wird dabei ein Proton in ein Neutron umgewandelt und, zum Erhalt der Ladung, ein Positron (β^+) und, zum Erhalt des Spins, ein Neutrino (ν_e) emittiert.



Das emittierte Positron gibt durch Wechselwirkung mit der umgebenden Materie seine kinetische Energie ab, bis seine Gesamtenergie in etwa der seiner Ruhemasse entspricht. Die dabei zurückgelegte Wegstrecke hängt von der Energie des Positrons ab und ist für das jeweils eingesetzte Radioisotop spezifisch. Das thermische Positron rekombiniert mit seinem Antiteilchen, einem Elektron aus der Umgebung, unter Bildung eines intermediären Positroniums, welches als Analogon eines Wasserstoffatoms aufgefasst werden kann. In einer als Annihilation bezeichneten Reaktion wird das Positronium vernichtet, wobei seine Gesamtenergie von 1022 keV (Ruhemasse von Positron und Elektron) auf zwei γ -Quanten verteilt wird. Eine solche zwei-Quanten Annihilation findet statt, wenn das Positronium im Singulett-Zustand mit antiparallelem Kernspin vorliegt. Liegt das Positronium im Triplett-Zustand mit parallelem Kernspin vor, tritt eine drei-Quanten Annihilation auf. Der Prozess der drei-Quantenannihilation kann jedoch vernachlässigt werden, da das beobachtete Verhältnis von drei- zu zwei-Quantenvernichtung etwa 10^{-3} entspricht^[10]. Wegen der Auswahlregeln für die Erhaltung von Energie, Impuls und Parität werden die beiden γ -Quanten in einem Winkel von 180° und mit einer Energie von jeweils 511 keV emittiert. Die zwei γ -Quanten können mittels Szintillations-Detektoren nachgewiesen werden, welche in der Regel aus Bismut-Germanat (BGO) oder Luthetium-Oxyorthosilikat (LSO) bestehen und ringförmig um den Patienten angeordnet sind (siehe Abb. 1).

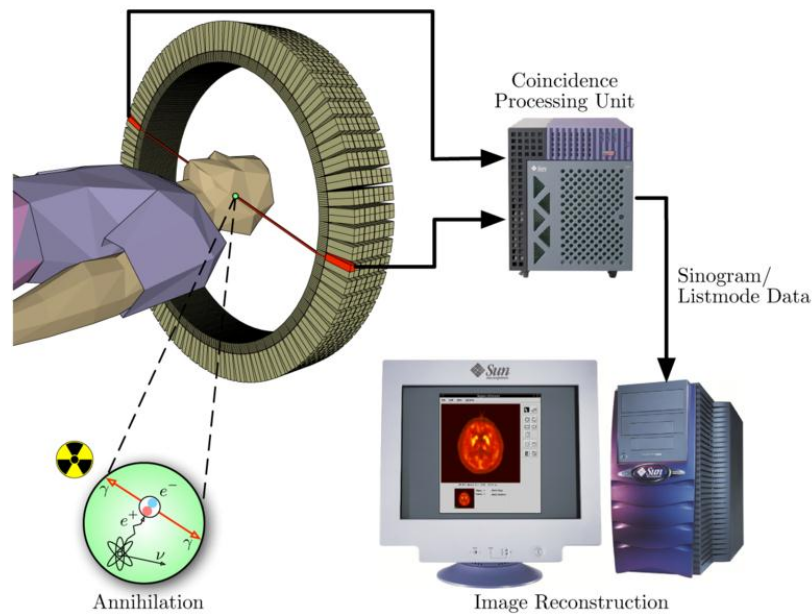


Abb. 1: Messprinzip der Positronen-Emissions-Tomographie^[10b]

Üblicherweise besteht eine PET-Kamera aus ca. 10.000 einzelnen Detektorkristallen, die zu mehreren Blöcken zusammengefasst und über eine sogenannte Koinzidenzschaltung miteinander verbunden sind. Ein Zerfall wird daher nur registriert, wenn beide γ -Quanten eines Zerfalls praktisch zeitgleich (innerhalb von $< 10^{-10}$ Sekunden) detektiert werden. Aufgrund des Emissionswinkels von 180° muss der Zerfall in etwa entlang der Verbindungslinie der zwei Detektorkristalle (der LOR: „Line of response“) stattgefunden haben. Neben der β^+ -Energie der Positronen bestimmt daher auch die Größe der einzelnen Kristalle die maximale Ortsauflösung der PET, welche im Falle heutiger PET-Tomographen bei etwa 3-5 mm liegt. Durch Überlagerung der LORs wird mit Hilfe von Rekonstruktionsalgorithmen ein Aktivitätsprofil errechnet, wodurch eine genaue Verteilung des Radiopharmakons im Organismus erhalten wird^[11].

Neben den funktionellen sind auch morphologische Informationen für klinische Fragestellungen sehr wichtig, weshalb PET-Messungen üblicherweise mit einer Computertomographie kombiniert werden. In PET/CT-Tomographen wird dazu im Anschluss an die PET-Messung eine Computertomographie durchgeführt und die beiden Bilder zu einem Fusionsbild überlagert^[12] (siehe Abb. 2).

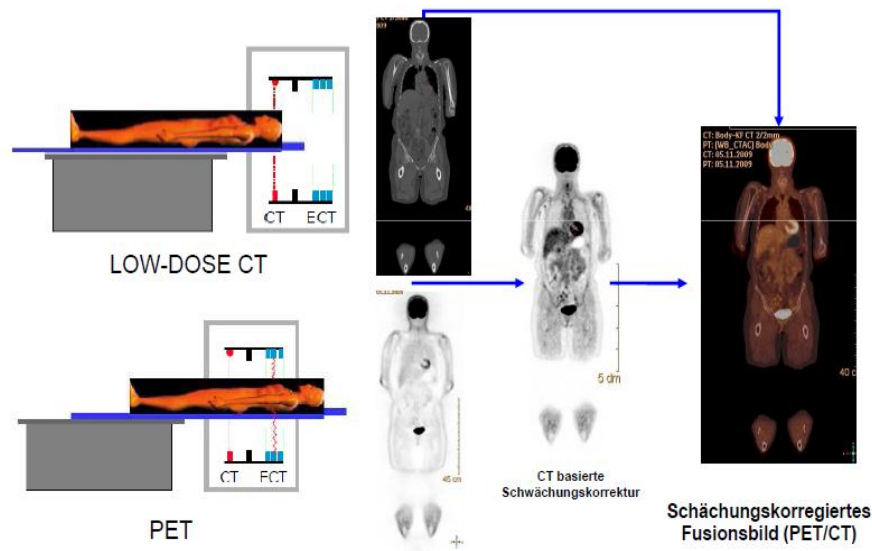


Abb.2: Fusionsbild einer PET/CT-Untersuchung^[12b]

1.1.1 Auswahl der verwendeten Radioliganden

Die Auswahl des bei der Untersuchung verwendeten Radioliganden hängt in erster Linie von dem zu untersuchenden biochemischen Prozess ab. Sollen beispielsweise schnelle, systemische Effekte untersucht werden, genügen oft sehr einfache Verbindungen wie $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ oder $[^{15}\text{O}]\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$ für Blutflussmessungen oder $[^{15}\text{O}]\text{CO}_2$ für Messungen der Lungenfunktion.

Für die Tumordiagnostik wird in der Regel ein radioaktiv markiertes Glukosederivat, die 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluordesoxy-D-glukose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$), verwendet. Hierbei werden die Tumorzellen indirekt über ihren erhöhten Glukosestoffwechsel visualisiert. $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ wird als Substrat für Glukosetransporter erkannt, in die Zellen aufgenommen und durch die Hexokinase phosphoryliert. Das gebildete $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -6-Phosphat ist kein Substrat der Hexoseisomerase und kann nicht weiter metabolisiert werden oder die Zelle verlassen, weshalb es sich in Zellen mit einer hohen Glykolyserate anreichert^[13](Trapping). Auch im Bereich der neurologischen Bildgebung findet $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ eine breite Anwendung, da sich aktive Hirnregionen ebenfalls über ihren erhöhten Glukosestoffwechsel visualisieren lassen^{[14],[15]}. Aufgrund der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten ist $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ bis heute der wichtigste und mit Abstand am häufigsten verwendete Radiotracer für die PET.

Neben der Tumordiagnostik wird die PET vor allem im Bereich der Früherkennung und Diagnostik neurologischer Erkrankungen herangezogen. Durch die Möglichkeit Funktionen einzelner Rezeptorsysteme exakt zu quantifizieren, können pathophysiologische Prozesse bereits frühzeitig erkannt und gezielt therapiert werden. So kann beispielsweise die verminderte Ausschüttung von Dopamin bei Morbus Parkinson mit Hilfe postsynaptischer D_2/D_3 -Rezeptorliganden, wie

[¹⁸F]Fallypride, untersucht werden^[16]. Auch die Ablagerung sogenannter Plaques im Falle der Alzheimer'schen Erkrankung kann mittels geeigneter Liganden frühzeitig erkannt werden^[17].

Radiopharmaka können generell anhand des Mechanismus ihrer Verteilung und Anreicherung im entsprechenden Zielorgan klassifiziert werden. Eine Einteilung hierzu wurde von Eckelman et al. vorgeschlagen^[18]:

- A) Nicht Substrat-spezifisch: Ligand bindet nicht an eine chemisch definierte Zielstruktur
 - A.1) Diffusion
 - A.2) Anreicherung in Kompartimenten
 - A.3) Zelluläre Sekretion
 - A.4) Phagozytose
- B) Substrat-spezifisch: Ligand bindet an eine chemisch definierte Zielstruktur oder nimmt an einem definierten Stoffwechselprozess teil
 - B.1) Isotope, endogene Radioliganden
 - B.2) Metabolische Radioliganden
 - B.3) Enzymsubstrate oder -inhibitoren
 - B.4) Rezeptorliganden
 - B.5) Radioaktiv markierte Antikörper

1.1.2 Auswahl der verwendeten Radioisotope

Neben den physiologischen Parametern sind kernchemische Aspekte bei der Auswahl der verwendeten Radioisotope von besonderer Bedeutung. Mit das wichtigste Kriterium ist hierbei die **Halbwertszeit ($t_{1/2}$)** des Radionuklids. Hier muss ein geeigneter Kompromiss zwischen Dauer der Radiosynthese und der PET-Messung auf der einen und der Strahlenbelastung des Patienten auf der anderen Seite gefunden werden. Wie bereits erwähnt, eignen sich sehr kurzlebige Positronenemitter wie ¹⁵O oder ¹³N nur für die Synthese einfacher Verbindungen und die Darstellung sehr schneller Prozesse. Im Vergleich dazu ermöglicht die Verwendung von ¹¹C ($t_{1/2}$ = 20 min.) und ¹⁸F ($t_{1/2}$ = 110 min.) bereits komplexe, mehrstufige Synthesen und die Visualisierung komplexer Prozesse, wie z.B. die Bindung von Liganden an Rezeptoren im zentralen Nervensystem (ZNS). Für die Visualisierung von biologischen Prozessen mit einer sehr langsamen Kinetik, wie im Falle der Bindung von

Antikörpern oder der Verteilung radioaktiv markierter DNA-Moleküle, ist man auf langlebigere Isotope wie beispielsweise ^{72}As ($t_{1/2} = 26 \text{ h}$) oder ^{124}I ($t_{1/2} = 4,2 \text{ d}$) angewiesen.

Da die von den Positronen zurückgelegte Wegstrecke mit steigender β^+ -Energie zunimmt, sollte diese möglichst niedrig sein, um eine hohe Ortsauflösung der Messung und die Visualisierung kleiner Strukturen zu ermöglichen.

Die **Häufigkeit des β^+ -Zerfalls** sollte möglichst hoch sein, da die Konkurrenzreaktion zur Positronenemission, der Elektroneneinfang (EC), nicht bei der PET-Messung detektiert wird. Bei einer geringen Häufigkeit der Positronenemission müssen daher größere Aktivitätsmengen verwendet werden, was zu einer erhöhten Strahlenbelastung des Patienten führt. Der Anteil des β^+ -Zerfalls nimmt meist mit zunehmender Ordnungszahl und steigender Halbwertszeit ab.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Auswahl der Radioisotope ist deren **Verfügbarkeit**. Die gängigsten Radionuklide für die PET (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F) werden durch Bestrahlung mit Protonen, Deuteronen oder Alphateilchen an einem Zyklotron hergestellt^[19]. Die geringe Halbwertszeit der Isotope ^{11}C , ^{13}N und ^{15}O setzt daher das Vorhandensein eines Zyklotrons vor Ort voraus, wohingegen ^{18}F auch über kürzere Strecken transportiert werden kann. Über ein sogenanntes „Satellitensystem“ können daher ^{18}F -markierte Radiopharmaka in den meisten nuklearmedizinischen Einrichtungen bereitgestellt werden.

Eine zusätzliche Option bieten metallische Radioisotope für die PET, wie beispielsweise ^{44}Sc , ^{62}Cu , ^{68}Ga und ^{82}Rb sind über Generatorsysteme verfügbar, was deren Anwendung überall und zu geringen Kosten ermöglicht^{[20],[21]}.

Tab.1: Zerfalleigenschaften wichtiger Positronenemitter

Nuklid	$t_{1/2}$	β^+ -Häufigkeit / %	$E_{\beta^+, \text{max}}$	max. Reichweite (in H_2O)
^{11}C	20,30 min	99,8	0,96 MeV	3,8 mm
^{13}N	9,96 min	100	1,19 MeV	5,0 mm
^{15}O	2,03 min	99,9	1,73 MeV	7,6 mm
^{18}F	109,65 min	96,9	0,63 MeV	2,2 mm
^{68}Ga	67,71 min	89,1	1,90 MeV	13,6 mm
^{72}As	1,1 d	87,8	1,12 MeV	4,8 mm
^{76}Br	16,7 h	66,5	3,60 MeV	15,5 mm
^{86}Y	14,7 h	31,4	1,18 MeV	5,3 mm
^{124}I	4,17 d	23	2,14 MeV	9,7 mm

1.2 ^{18}F als Positronenemitter

Eine weitere Möglichkeit der Klassifizierung von Radioliganden bietet die Unterteilung anhand ihrer chemischen Struktur in isotope Tracer und Analogtracer. Als isotope Tracer bezeichnet man radioaktiv markierte Biomoleküle, die sich in ihrer Struktur und ihrem chemischen Verhalten nicht von den Originalmolekülen unterscheiden. Da sich „organische“ Moleküle fast ausschließlich aus den Atomen H, C, N, O, S, und P zusammensetzen, sind isotope Tracer in der Regel nur über eine Markierung mit ^{11}C , ^{13}N und ^{15}O zugänglich.

Analogtracer unterscheiden sich durch die Einführung des Radioisotops strukturell zwangsläufig von ihren Originalmolekülen, wodurch sich auch ihre chemischen und pharmakologischen Eigenschaften verändern. Da dies wie im Falle der Markierung mit ^{18}F der Fall ist, müssen Analogtracer zunächst in *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten auf ihre physiologischen Eigenschaften hin untersucht werden. Um die Eigenschaften der Originalmoleküle möglichst weitgehend beizubehalten, müssen für Einführung von ^{18}F einige wichtige chemische Aspekte beachtet werden. Leitstrukturen, die für die Pharmakodynamik essentiell sind, müssen erhalten bleiben und die chemischen Eigenschaften flexibler Reste sollten sich durch die Markierung mit ^{18}F nur geringfügig ändern. Meist lässt sich Wasserstoff durch Fluor aufgrund der vergleichbaren Van-der-Waals-Radien ($r[\text{F}] = 1,35 \text{ \AA}$; $r[\text{H}] = 1,20 \text{ \AA}$) oder eine Hydroxygruppe durch Fluor wegen der vergleichbaren Bindungslängen ($\text{C-F} = 1,39 \text{ \AA}$; $\text{C-OH} = 1,42 \text{ \AA}$) und Elektronegativitäten ($\text{F} = 4,0$; $\text{O} = 3,6$) austauschen. Oft kann auch ein Alkylsubstituent durch eine Fluoralkylgruppe aufgrund ihrer ähnlichen chemischen Struktur substituiert werden^[22].

1.2.1 Kernchemische und kinetische Aspekte der ^{18}F -Chemie

Wie bereits erwähnt, werden in der Nuklearmedizin in der Regel sehr geringe Stoffmengen des Radioliganden eingesetzt. In den meisten Fällen liegen diese im sub-nanomolaren Bereich und sind oft kaum oder nur sehr schwer zu bestimmen. In diesem Zusammenhang ist die **spezifische Aktivität (A_s)** eine wichtige Größe und kann als Kriterium für die Qualität bzw. die Reinheit eines Radioliganden oder Isotops aufgefasst werden. Die A_s ist definiert als Aktivität, bezogen auf die Masse bzw. Stoffmenge des Liganden und wird üblicherweise in Bq/g oder Bq/mol angegeben. In Bezug auf die A_s wird die Verunreinigung des Radioliganden mit seiner inaktiven Verbindung als isotoper **Träger** bezeichnet. Hierbei können drei Fälle unterschieden werden:

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

Im Falle der Trägerfreiheit wäre für ein bestimmtes Radioisotop der Zustand der theoretisch maximalen A_s erreicht. Im Falle von ^{18}F ergibt sich diese aus folgender Gleichung:

$$A_s = N_A \frac{\ln 2}{t_{1/2}} = 6,3 \times 10^{10} \text{ GBq/mol}$$

Der Zustand der Trägerfreiheit (c.f.) tritt jedoch selten auf, da er aufgrund ubiquitärer Verunreinigungen stabiler Isotope nur im Falle künstlicher Isotope (z.B. $^{99\text{m}}\text{Tc}$) erreicht werden kann. Für das Isotop ^{18}F kann normalerweise von einer Verunreinigung mit ^{19}F um das bis zu eintausendfache ausgegangen werden, woraus sich eine maximale spezifische Aktivität von ca. 37×10^5 GBq/mmol ergibt. Dieser Zustand wird meist mit dem Begriff „ohne zugesetzten Träger“ (n.c.a.) bezeichnet. Der Zusatz eines Trägers (c.a.) ist aufgrund der schlechteren A_s in der Regel zu vermeiden, kann aber in einigen Fällen, wie bei der Produktion elektrophilen $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$, nicht umgangen werden.

Die **radiochemische Ausbeute (RCA)** einer Markierungsreaktion hängt von der Reaktionskinetik und der Reaktionsausbeute ab. Sie wird üblicherweise in % angegeben und auf den Zeitpunkt des Synthesebeginns (SOS) korrigiert.

Um die maximale RCA einer Markierungsreaktion zu bestimmen, müssen wichtige **kinetische Aspekte** beachtet werden. In der Regel liegt bei n.c.a.-Markierungen das zu markierende Molekül in sehr großem Überschuss vor, weshalb dessen Konzentration als konstant und die Reaktionskinetik als pseudo-erster-Ordnung aufgefasst werden kann. Geht man für die Reaktion $A + MV = P$ von den o.g. Annahmen aus, so ergibt sich mit:

$$-\frac{d[A]}{d[t]} = k' \times [A] \quad \text{mit} \quad k' = k \times [MV] \quad \text{und} \quad d[P] = -d[A]$$

und der Aktivität zum Zeitpunkt t:

$$[A_t] = [A_0] \times e^{(-k' \times t)}$$

für die Konzentration des Produktes [P] zum Zeitpunkt t:

$$[P] = [A_0] \times (1 - e^{(-k' \times t)}) \quad \text{mit} \quad [P] = [A_0] - [A_t]$$

Trägt man [P] gegen t auf, so erhält man eine Asymptote, mittels der man die maximale radiochemische Ausbeute bestimmen kann.

1.2.2 Produktion von ^{18}F -Fluor

Wie die meisten Positronenemitter für die PET, wird ^{18}F durch Bestrahlung eines Targets mit energiereichen, geladenen Teilchen an einem Zyklotron produziert und kann so in sehr hohen Aktivitätsmengen und sehr guten spezifischen Aktivitäten erhalten werden. Die chemische Form des ^{18}F hängt dabei von der Wahl des verwendeten Targets ab. In der Regel wird mit ^{18}O angereichertes Wasser in einem Titantarget mit Protonen bestrahlt, wodurch nach einer $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Kernreaktion nukleophiles, n.c.a. $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}_{\text{aq}}^-$ erhalten wird. Die Ausbeute der Kernreaktion hängt dabei von der Energie der eingestrahlten Protonen ab, was eine genaue Kenntnis der Anregungsfunktion voraussetzt.

Für bestimmte Markierungsreaktionen wird elektrophiles $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}_2$ benötigt, welches durch Bestrahlung eines Ne-Gastargets erhalten werden kann. Durch Bestrahlung von ^{20}Ne mit Deuteronen werden nach einer $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ Kernreaktion zunächst sehr reaktive Fluorradikale gebildet, welche an der Targetwand adsorbiert werden. Um die Wandadsorption zu vermeiden, wird dem Target bis zu 0,5 % inaktives F_2 -Gas als isotoper Träger zugesetzt (c.a.), was zu der Bildung von $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}_2$ führt. Durch die Zugabe von isotopem Träger ist die spezifische Aktivität des so produzierten $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}_2$ deutlich geringer, was die Verwendung elektrophilen Fluors deutlich limitiert. Um elektrophiles $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}_2$ mit hohen spezifischen Aktivitäten zu erhalten besteht jedoch die Möglichkeit dieses aus $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}_{\text{aq}}^-$ zu generieren^[23]. Ein Überblick über die wichtigsten Produktionswege von ^{18}F am Zyklotron bietet Tabelle 2.

Tab.2: Produktion von ^{18}F am Zyklotron^[19]

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

1.2.3 Fluorierungsmethoden organischer Moleküle

Die Markierung geeigneter Moleküle mit ^{18}F stellt aufgrund der chemischen Eigenschaften des Fluors und der geringen eingesetzten Stoffmenge besondere Herausforderungen an die gewählten Reaktionsbedingungen. Je nachdem, in welcher chemischen Form ^{18}F für die Markierung erhalten wird, kann es über eine elektrophile oder nukleophile Fluorierung direkt in das zu fluorierende Molekül eingeführt werden. In einigen Fällen sind, je nach Struktur des gewünschten Zielmoleküls, mehrstufige Radiosynthesen notwendig. Generell können Radiosynthesen mit ^{18}F folgendermaßen unterschieden werden:

- nukleophile Fluorierung
- elektrophile Fluorierung
- Fluorierung über prosthetische Gruppen
- mehrstufige Radiosynthesen

In jedem Fall ist jedoch darauf zu achten, das ^{18}F so spät wie möglich einzuführen, da lange Syntheszeiten, aufgrund der kurzen Halbwertszeit, zu vermeiden sind. Die Radiosynthese eines ^{18}F -Liganden sollte keinesfalls länger als 6 h dauern. In der Regel sind jedoch 60 – 120 min. für die meisten einstufigen Synthesen oder die Fluorierung über prosthetische Gruppen ausreichend. Darüber hinaus nimmt die spezifische Aktivität mit jeder zusätzlichen Reaktion deutlich ab, da durch Verunreinigungen der verwendeten Chemikalien, Lösungsmittel und Reaktionsgefäße der Radioligand zusätzlich mit Träger versetzt wird.

Nukleophile Fluorierung

$[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}^-$ kann über eine nukleophile Substitution in einen Aromaten ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) oder in Alkylreste ($\text{S}_{\text{N}}2$) eingeführt werden. Wird das Fluorid an einem chiralen Kohlenstoffatom in das Molekül eingeführt, ist auf die korrekte Stereochemie des Markierungsvorläufers zu achten, da die Reaktionen im Allgemeinen nach dem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus mit Waldenumkehr verlaufen. Da das $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}^-$ in wässrigem Medium von einer ausgeprägten Hydrathülle umgeben ist und nur eine geringe Nukleophilie besitzt, muss zunächst das Wasser durch azeotrope Destillation mit Acetonitril entfernt werden. In den meisten Fällen wird das $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}^-$ zuvor auf einem Anionentauscher fixiert und mit Acetonitril und einem System aus einer nicht nukleophilen Base und einem Phasentransferkatalysator eluiert^[24].

Der Zusatz einer **nichtnukleophilen Base** ist in zweierlei Hinsicht besonders wichtig. In erster Linie dient sie als Protonenfänger und beugt so der Bildung von $[\text{}^{18}\text{F}]\text{HF}$ vor, wodurch die Nukleophilie des Fluorids erhöht und stark basische Bedingungen erreicht werden. Darüber hinaus fungiert sie als

nichtisotoper Träger und reduziert so die Wandadsorption des Fluorids im Reaktionsgefäß. Häufige Verwendung als Basen finden Carbonate, Hydrogencarbonate und Oxalate.

Neben der Base sind **Phasentransferkatalysatoren (PTK)** von Bedeutung. Durch die Komplexbildung des Gegenions werden die Löslichkeit und die Nukleophilie des Fluoridanions erheblich gesteigert. Als PTKs werden in der Regel Kryptofix®222 oder Tetraalkylammoniumsalze der entsprechenden Basen verwendet. Wird für die Markierung Cs_2CO_3 oder Rb_2CO_3 als Base verwendet, wird kein weiterer Zusatz von PTKs erforderlich, da das Cs- bzw. Rb-Kation nur eine sehr schwache Bindung zu dem Fluoridanion ausbildet und selbst als solcher fungiert.

Als Lösungsmittel für nukleophile Fluorierungen mit $^{18}\text{F}^-$ werden **dipolare aprotische Lösungsmittel** wie Acetonitril (MeCN), Dimethylformamid (DMF) und Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Diese sind aufgrund ihrer hohen Dielektrizitätskonstante in der Lage, sowohl Salze als auch lipophile Moleküle zu lösen, und enthalten keine aziden Protonen.

Neben den Reaktionsbedingungen ist insbesondere die Wahl des richtigen **Markierungsvorläufers (MV)** entscheidend. Dieser sollte aufgrund der besonderen Reaktionsbedingungen keine aziden Protonen wie z.B. Alkohole, Thiole oder Amine enthalten. Sollte dies doch der Fall sein, müssen diese geschützt und nach der Fluorierung abgespalten werden. Als klassische Abgangsgruppen für die aliphatische Substitution werden in der Regel stark elektronenziehende Gruppen wie Halogene oder Sulfonsäureester wie Mesylate, Tosylate oder Triflate verwendet. Ein gutes Beispiel für eine gängige nukleophile Fluorierung mit ^{18}F stellt die Synthese von ^{18}F FDG ausgehend von α -1,3,4,6-Tetraacetylmannose-2-triflat (siehe Abb. 3) dar^{[25],[26]}.

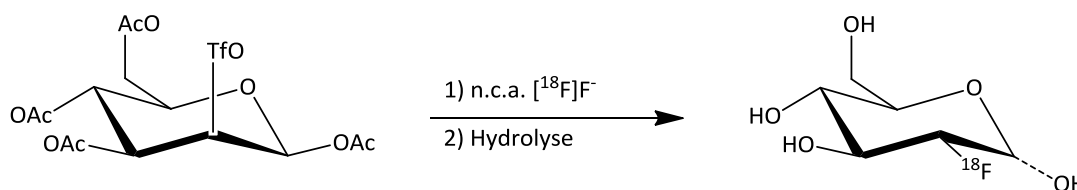


Abb.3: Reaktionsschema der Synthese von ^{18}F FDG

Bei der nukleophilen, aromatischen Substitution wird zusätzlich zu der Abgangsgruppe ein stark elektronenziehender, aktivierender -M-Substituent in ortho- oder para-Stellung zur Abgangsgruppe benötigt. In der Regel werden hierzu Keto-, Nitro-, Cyanogruppen oder Sulfoxide in den MV eingeführt. Als -M-Substituent kann jedoch auch ein Stickstoffatom im aromatischen Ring, wie im Falle des Pyridins, dienen. Als Abgangsgruppen werden klassischerweise Halogene, Trialkylammonium- oder Nitrogruppen verwendet^[27] (siehe Abb. 4).

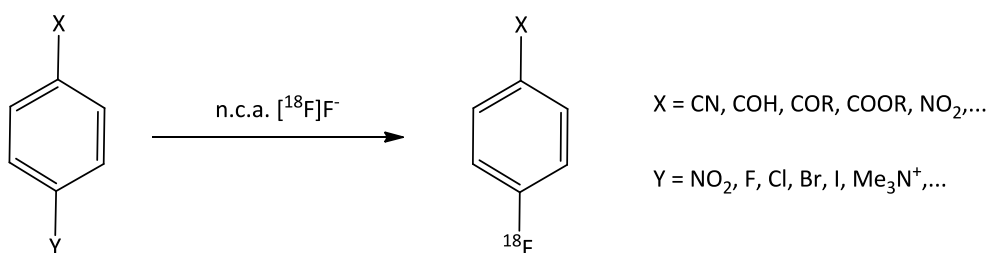


Abb. 4: Reaktionsschema einer nukleophilen ^{18}F -Fluorierung aktivierter Aromaten

Als Sonderfall der nukleophilen, aromatischen Substitution kann die Fluorierung elektronenreicher Aromate über Diaryliodoniumsalze als MV aufgefasst werden. Insbesondere in den letzten Jahren wurde die Entwicklung vieler Iodoniumsalze als MV stark vorangetrieben, um wichtige elektronenreiche Radioliganden in guten Ausbeuten und mit hohen spezifischen Aktivitäten zu synthetisieren. Vor allem für die Synthese ^{18}F -markierter Neuroliganden gewinnt diese Methode immer mehr an Bedeutung, da hierbei der Syntheseweg über eine elektrophile Fluorierung umgangen werden kann^{[28]. [29]} (siehe Abb. 5).

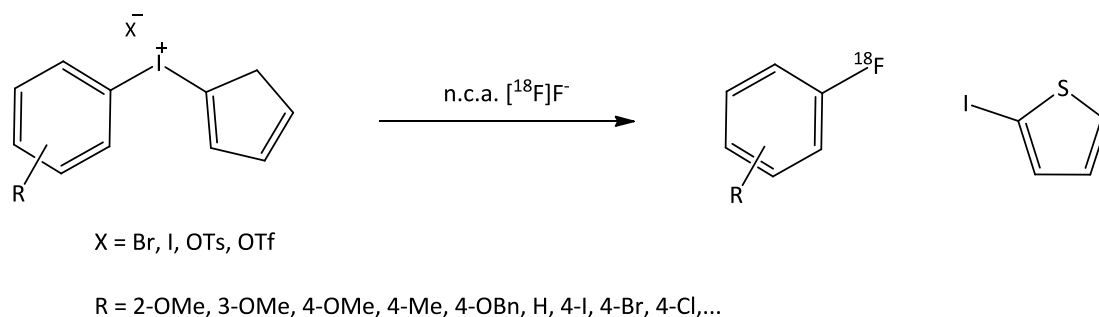


Abb. 5: Nukleophile ^{18}F -Fluorierung nichtaktivierter Aromaten über Iodoniumsalze

Elektrophile Fluorierung

Zur elektrophilen Fluorierung wird das bei der Produktion am Zyklotron erhaltene $^{18}\text{F}\text{F}_2$ verwendet, weshalb die auf diesem Wege dargestellten Radioliganden nur eine sehr niedrige spezifische Aktivität besitzen. Die elektrophile Fluorierung ist daher nur für die Synthese von nicht toxischen, meist metabolischen Tracern wie ^{18}F FDG oder 6- ^{18}F F-DOPA geeignet. Hinzu kommt die Tatsache, dass die maximale Reaktionsausbeute lediglich 50 % betragen kann, da im ^{18}F - ^{19}F Molekül beide Isotope gleichermaßen reaktiv sind.

Aufgrund der hohen Reaktivität des $^{18}\text{F}\text{F}_2$ müssen die Markierungsreaktionen bei sehr niedrigen Temperaturen und in inerten Lösungsmitteln (z.B. Fluorwasserstoffsäure, Trifluoressigsäure, Tetrachlorkohlenstoff) durchgeführt werden. Etwas mildere Reaktionsbedingungen ermöglicht der Einsatz elektrophiler Agenzien wie $^{18}\text{F}\text{XeF}_2$ oder $^{18}\text{F}\text{AcOF}$ ^[30]. Da elektrophile Fluorierungen

meistens nicht regioselektiv ablaufen, werden oft Silyl- oder Stannylverbindungen in Demetallierungsreaktionen eingesetzt, wie beispielsweise bei der Synthese von 6- ^{18}F -DOPA und 6- ^{18}F -Tyrosin^[31] (siehe Abb. 6).

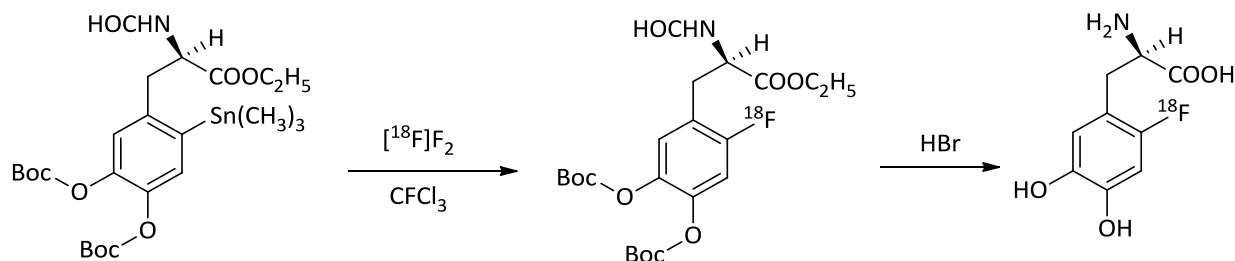


Abb. 6: Selektive elektrophile ^{18}F -Fluorierung von 6- ^{18}F -DOPA^[32]

Fluorierung über prosthetische Gruppen

Sind direkte Markierungen aufgrund der Reaktionsbedingungen nur eingeschränkt einsetzbar, z.B. bei der Verwendung basenlabiler Markierungsvorläufer oder mehrerer reaktiver Gruppen, kann auf eine Fluorierung mittels prosthetischer Gruppen zurückgegriffen werden. Dabei wird n.c.a. ^{18}F in ein kleines, gut zu fluorierendes Molekül eingeführt, welches in einem zweiten Schritt mit dem Markierungsvorläufer umgesetzt wird. Für den zweiten Schritt gelten dabei nicht mehr die limitierenden Bedingungen der o.g. Fluorierungsmethoden.

Die vielseitigen Möglichkeiten und hohen radiochemischen Ausbeuten, die durch Fluorierung mittels prosthetischer Gruppen erzielt werden, haben zur Entwicklung einer ganzen Reihe von Markierungssynthons geführt. Insbesondere durch die Verwendung von ^{18}F -Fluoralkyltosylaten, -triflaten und -bromiden können Alkohole, Thiole oder Amine in hohen Ausbeuten mit ^{18}F markiert werden.

Ein häufig verwendetes Markierungsreagenz ist das 2- ^{18}F -Fluorethyltosylat (^{18}F -FETos), welches sich in einer vollautomatisierten Synthese in guten Ausbeuten und kurzer Reaktionszeit darstellen lässt^{[33],[34]} (siehe auch Kapitel 3.4.1). Ein allgemeines Reaktionsschema der Fluorierung mittels ^{18}F -FETos ist in Abbildung 7 anhand der Synthese des 5HT_{2A}-Rezeptorliganden ^{18}F -MH.MZ gezeigt^{[35],[36]}.

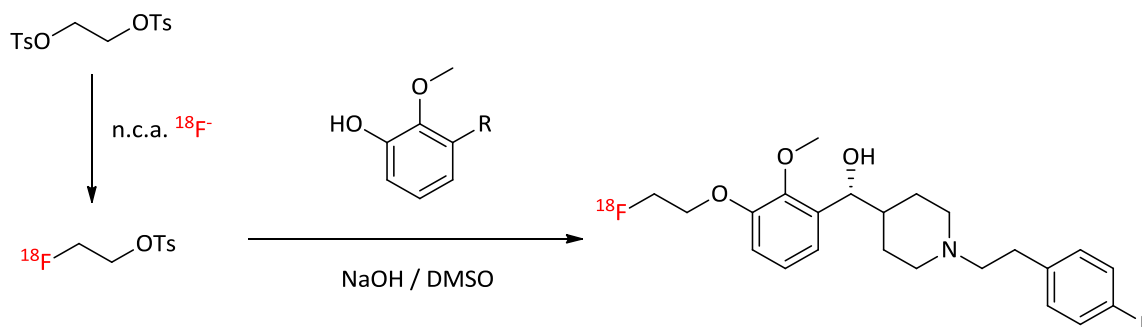


Abb. 7: Synthese von $[^{18}\text{F}]$ MH.MZ durch eine $[^{18}\text{F}]$ Fluorethylierung mit $[^{18}\text{F}]$ FETos

Eine weitere interessante Verwendung von prosthetischen Gruppen bietet der Einsatz von Fluoralkylaziden oder -alkinen in sogenannten „Klick-Reaktionen“, welche sich vor allem durch ihre hohen Ausbeuten, kurzen Reaktionszeiten und milden Reaktionsbedingungen auszeichnen. Insbesondere für die Synthese ^{18}F -markierter Polymere, Peptide oder komplexer organischer Moleküle haben Klick-Reaktionen breite Anwendung gefunden. So lassen sich beispielsweise azidsubstituierte Folsäurederivate in einer 1,4-Dipolaren Cycloaddition mit Fluoralkinen umsetzen^[37] (siehe Abb. 8).

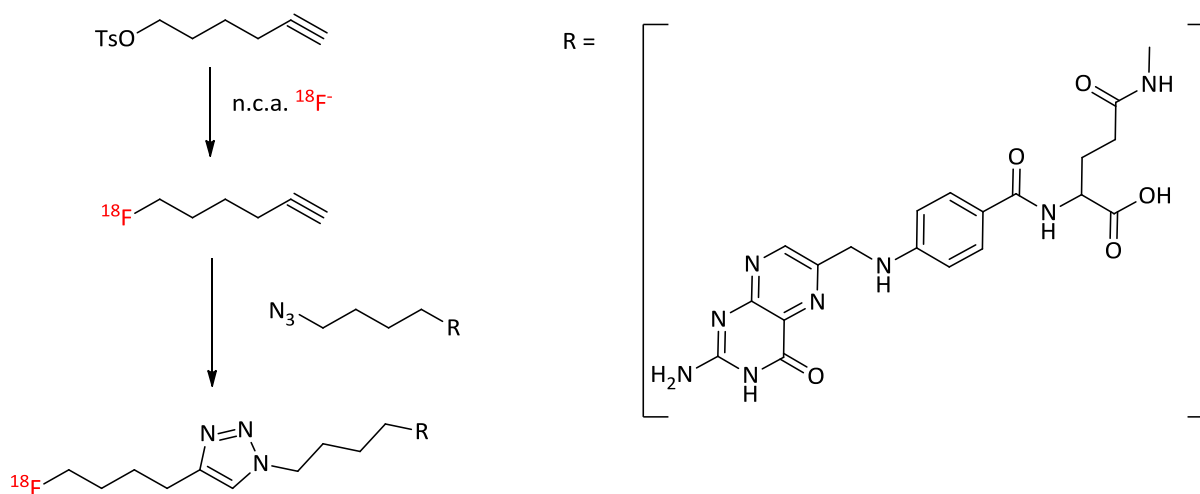


Abb. 8: Radiosynthese ^{18}F -markierter Folsäurederivate über eine Klick-Reaktion

Weiterhin stehen auch ^{18}F -markierte Carbonsäurederivate zur Fluoracylierung und nukleophile prosthetische Gruppen, wie z.B. 4- $[^{18}\text{F}]$ Fluorphenyllithium, 4- $[^{18}\text{F}]$ Fluorphenolat oder 4- $[^{18}\text{F}]$ Fluoranilin zur Verfügung^{[38],[39]}.

Mehrstufige Radiosynthesen

Je nach seiner chemischen Struktur kann der gewünschte Radioligand nicht immer in einem Reaktionsschritt durch die o.g. direkten Fluorierungen synthetisiert werden. In diesem Fall müssen nach der Einführung von ^{18}F über eine n.c.a. nukleophile Substitution weitere Reaktionsschritte durchgeführt werden. Speziell für die Markierung nichtaktivierter, elektronenreicher Aromaten wurden hierzu verschiedene Methoden entwickelt. Hierbei wird zunächst $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ in einen aktivierten Aromaten eingeführt und die aktivierende Gruppe anschließend entfernt (siehe Abb. 9). Beispiele hierfür sind:

- Rh-katalysierte Decarbonylierungsreaktionen^[40]
- Bayer-Villiger-Oxidationen^[41]
- Reduktionen von Carbonyl- oder Nitrogruppen^[42]

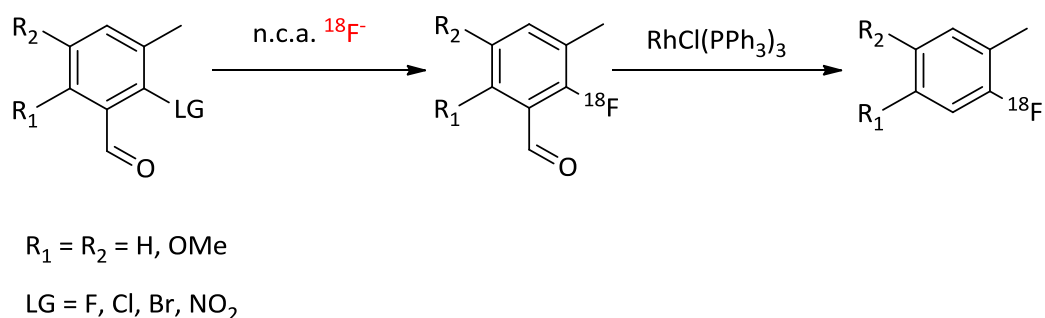


Abb. 9: Reaktionsschema zur nukleophilen n.c.a. Markierung von 6- $[^{18}\text{F}]\text{F-DOPA}$ ^[40]

1.3 Das GABAerge System

Γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem von Säugetieren und als solcher an bis zu 40 % aller Synapsen beteiligt. In GABAergen Neuronen wird GABA durch Decarboxylierung von L-Glutamat durch das Enzym Glutamat-Decarboxylase gebildet und in Vesikeln gespeichert. Durch ein ankommendes Aktionspotential im präsynaptischen Bereich kommt es zu der Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, was einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen zur Folge hat. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer Verschmelzung der Vesikel mit der präsynaptischen Membran und einer Freisetzung von GABA in den synaptischen Spalt. Die inhibitorische Wirkung von GABA wird dabei durch Aktivierung postsynaptischer GABA-Rezeptoren vermittelt, welche strukturell in GABA_A -Rezeptoren, GABA_C -Rezeptoren (ionotroph) und GABA_B -Rezeptoren (metabotroph) unterteilt werden^[43]. Die Beendigung der inhibitorischen Wirkung erfolgt durch Diffusion von GABA aus dem synaptischen Spalt oder durch Wiederaufnahme über spezifische GABA Transporter (siehe Abb. 10).

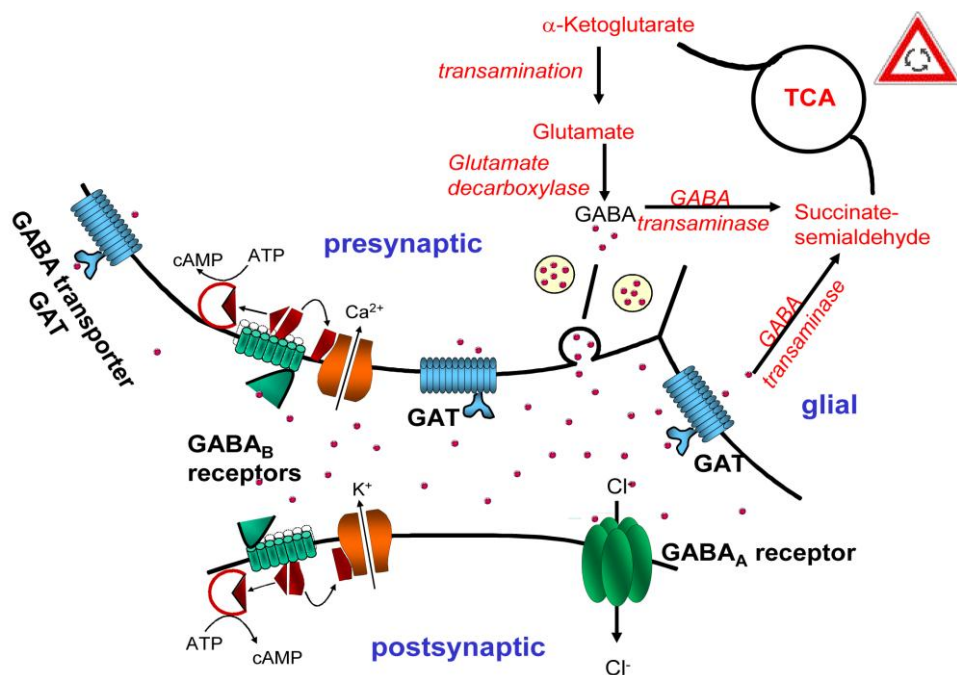


Abb. 10: Die GABAerge Synapse^[43b]

Die inhibitorische Wirkung des GABA_A -Rezeptors erfolgt nach seiner Aktivierung durch GABA durch die Öffnung einer für Cl^- -Ionen spezifischen Kanalpore, was einen Einstrom von Cl^- -Ionen und eine Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran zur Folge hat. Der GABA_A -Rezeptor wird daher der Familie der Cys-Loop-Ligand-gesteuerten Ionenkanäle zugeordnet und zeichnet sich durch seine heteropentamere Struktur aus. Diese resultiert aus der Kombination von jeweils fünf Untereinheiten, von denen bis heute 19 verschiedene identifiziert wurden (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , ρ 1-3, θ , und π) und welche sich ringförmig zu dem Rezeptor zusammenlagern (siehe Abb. 11). Die Kombination der

verschiedenen Untereinheiten ergibt so eine große Vielfalt an Rezeptorsubtypen, welche, je nach Expression in den verschiedenen Hirnregionen, unterschiedliche physiologische Effekte vermitteln^{[44],[45]}.

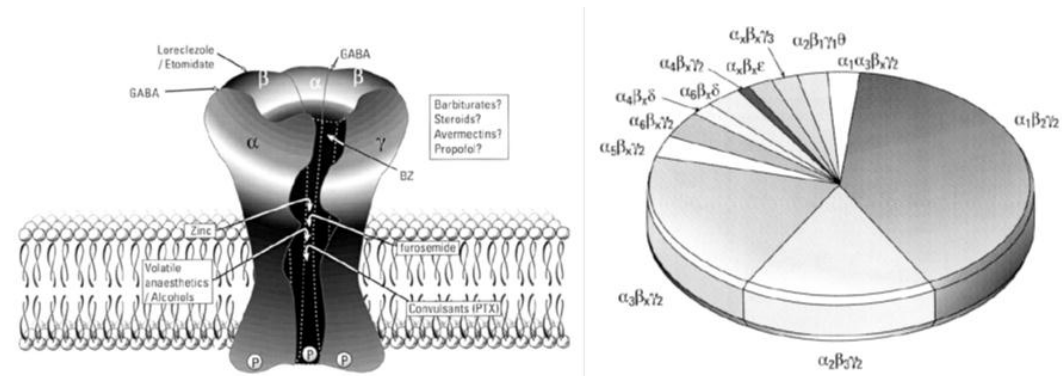


Abb. 11: Struktur des GABA_A-Rezeptors und die Diversität der Rezeptorsubtypen^[46]

Neben der Beteiligung an physiologischen Prozessen spielt der GABA_A-Rezeptor auch im Zusammenhang mit psychischen und neurologischen Erkrankungen eine wichtige Rolle. So wird beispielsweise eine verminderte GABAerge Inhibition mit Erkrankungen wie Epilepsie, Angstzuständen, Schlafstörungen oder Chorea Huntington in Verbindung gebracht. Auch eine Überfunktion des GABAergen Systems und damit eine gesteigerte Inhibition durch GABAerge Neurone werden in manchen Fällen als Grundlage einiger Formen der Schizophrenie diskutiert^[47].

Daher kommt dem GABA_A-Rezeptor auch aus pharmakologischer Sicht eine besondere Bedeutung zu, da er ein wichtiges Ziel vieler pharmakologisch wirksamer Substanzen darstellt. Neben der Bindungsstelle für den endogenen Neurotransmitter sind dabei vor allem die allosterischen Bindungsstellen für Benzodiazepine, Barbiturate, generelle Anästhetika oder Kanalblocker zu nennen (siehe Abb. 12). Beispielsweise verstärken Benzodiazepine über eine positive, allosterische Modifikation die Wirkung von GABA, indem sie die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals bei der Aktivierung erhöhen^{[48],[49]}. Allein bis heute wurden etwa 50 verschiedene Benzodiazepine auf den Markt gebracht und als Anxiolytika, Hypnotika, Anästhetika, Muskelrelaxanzen und Antiepileptika eingesetzt^[50].

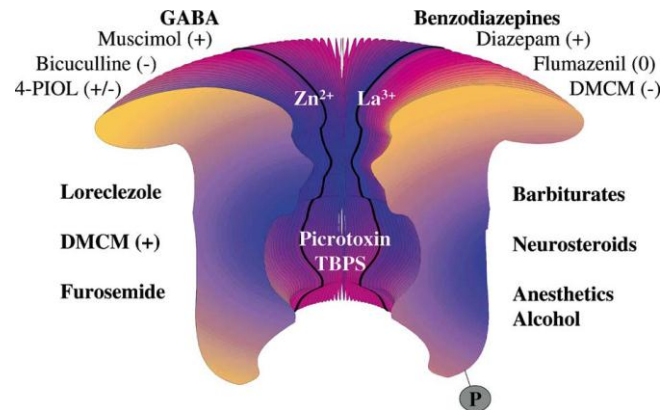


Abb. 12: Bindungsstellen des GABA_A-Rezeptors^[44]

1.3.1 Liganden der GABA-Bindungsstelle

Benzodiazepine verursachen jedoch in einigen Fällen unerwünschte Nebenwirkungen, beispielsweise wird bei der Langzeitgabe häufig eine Toleranzentwicklung beobachtet. Darüber hinaus besitzen Benzodiazepine ein hohes Suchtpotential sowie eine potenzierende Wirkung in Kombination mit Alkohol^[51]. Daher sind mittlerweile auch Liganden der GABA-Bindungsstelle in den Vordergrund des pharmakologischen Interesses gerückt.

Als wichtige Agonisten an die GABA-Bindungsstelle sind neben dem endogenen Neurotransmitter GABA die Isoxazole Muscimol und THIP (Gaboxadol) sowie Isoguvacine zu nennen^{[52],[53]}. Insbesondere THIP ist für die pharmazeutische Industrie von besonderem Interesse, da es als hochwirksamer Agonist an extrasynaptische $\alpha_4\beta_3\delta$ -Rezeptorsubtypen bindet, welche keine Sensitivität für Benzodiazepine zeigen. Klassische Antagonisten an die GABA-Bindungsstelle sind Gabazine und Bicuculline (siehe Abb. 13).

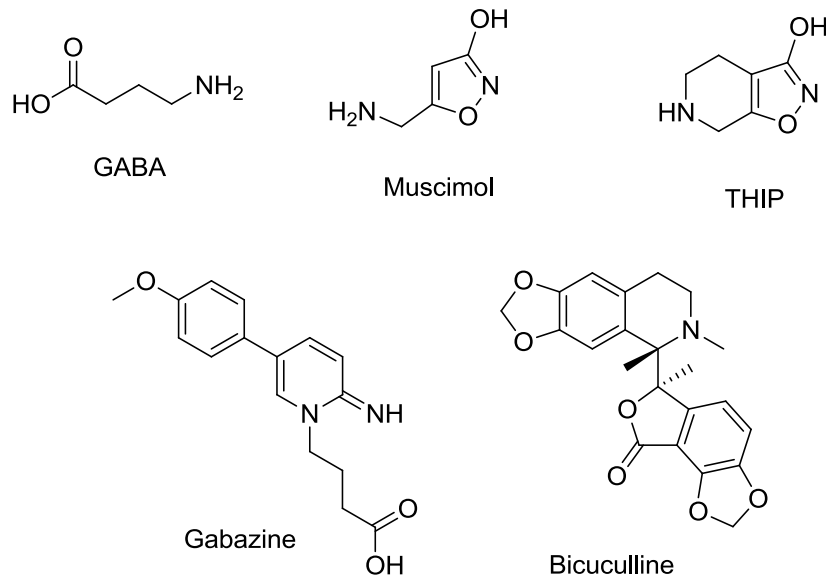


Abb. 13: Klassische Liganden der GABA-Bindungsstelle

Strukturell wird die GABA-Bindungsstelle von Aminosäureresten einer α - und einer β -Untereinheit gebildet. Innerhalb der Aminosäuresequenz beider Proteine finden sich stark konservierte Aminosäurereste, was auf eine wichtige Funktion schließen lässt. Diese Annahme konnte durch eine Vielzahl an Punktmutations-Experimenten bestätigt werden. So konnte für die Aminosäuren F64, Arginin66 und S68 der α -Untereinheit eine Beteiligung an der GABA-Bindungsstelle nachgewiesen werden. In der Struktur des β -Stranges wird hier von der Beteiligung der Aminosäuren Y97 sowie Y157-Y160, für die Bindung eines Agonisten und die Aktivierung des Rezeptors ausgegangen. Dabei kommt es zunächst zur Bindung des Agonisten, wodurch sich zwei Aminosäurereste einander annähern. In einem zweiten Schritt kommt es darauf zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch letztlich die Kanalpore geöffnet wird^[44].

1.3.2 Bildgebung des GABA_A-Rezeptors

Die wichtige Rolle des GABA_A-Rezeptors bei physiologischen Stoffwechselvorgängen und dessen Beteiligung an neuronalen Erkrankungen wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht und ist hinlänglich bekannt. Viele molekulare Grundlagen sowie die vielfältigen Interaktionen mit anderen Rezeptorsystemen sind dabei jedoch noch weitgehend ungeklärt und sind Gegenstand aktueller Forschung. Molekulare bildgebende Verfahren wie die PET bieten hierbei die Möglichkeit, einzelne Stoffwechselvorgänge zu visualisieren und quantitativ zu erfassen. Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit bereits einige radioaktiv markierte Liganden für die Bildgebung des GABA_A-Rezeptors entwickelt.

In erster Linie sind hier die Benzodiazepin-Liganden [¹¹C]Flumazenil und [¹²³I]Iomazenil zu nennen, die bereits breite klinische Anwendung gefunden haben. So lässt sich beispielsweise mit [¹¹C]Flumazenil die Rezeptorverfügbarkeit des GABA_A-Rezeptors bestimmen und zur Diagnostik epileptischer Foki

verwenden. Aufgrund der guten *in vivo*-Eigenschaften von Flumazenil wurde über die Jahre auch das ^{18}F -markierte Derivat [^{18}F]Flumazenil, sowie ein fluorethyliertes Derivat ([^{18}F]FE-Flumazenil) synthetisiert, um längere Messzeiten zu ermöglichen^[54]. Darüber hinaus können Interaktionen von Arzneistoffen mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle untersucht und so die Entwicklung neuer Arzneistoffe vorangetrieben werden. Einen wichtigen Stellenwert nimmt des Weiteren auch die Aufklärung verschiedener Funktionen des GABAergen Systems ein. Die Entwicklung neuer, Rezeptorsubtyp-spezifischer Radioliganden eröffnet dabei die Möglichkeit, die physiologische Bedeutung einzelner Rezeptorsubtypen an verschiedenen neuronalen Vorgängen zu untersuchen. Insbesondere für die α_1 -Untereinheit wurden bereits spezifische Radioliganden wie z.B. [^{11}C]Zolpidem oder [^{18}F]Indiplon synthetisiert^{[55],[56]}. Bisher zeigte jedoch keiner dieser Radioliganden geeignete *in vivo*-Eigenschaften^[57].

Darüber hinaus wurden verschiedene radioaktivmarkierte Liganden für den Wiederaufnahme-Transporter von GABA synthetisiert, zeigten sich jedoch als nicht geeignet für den Einsatz mittels PET^{[58],[59]}. Einen neuen Ansatz der Bildgebung von GABA_A-Rezeptoren bieten radioaktiv markierte Liganden der Picrotoxin-Bindungsstelle. Hierfür stehen seit einigen Jahren ^{18}F -markierte Dithiane zur Verfügung und werden in ersten Studien auf ihre Tauglichkeit als PET-Tracer untersucht^[60].

2 Problemstellung

Neurologische Vorgänge im zentralen Nervensystem stellen ein Gleichgewicht aus excitatorischen und inhibitorischen Signalen dar und sind so auf molekularer Ebene für die Funktion unseres Gehirns verantwortlich. Eine Störung dieses Gleichgewichts stellt dabei eine enorme Beeinträchtigung des Gehirns dar und kann zu neurologischen Erkrankungen führen. Aus diesem Grund ist eine genaue Kenntnis der neurologischen Stoffwechselvorgänge von immenser Bedeutung. In diesem Zusammenhang spielt γ -Aminobuttersäure (GABA) als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter eine besondere Rolle. Der GABA_A-Rezeptor stellt dabei das primäre Ziel für GABA dar und ist als solches an den meisten physiologischen Prozessen beteiligt. Darüber hinaus wird eine Beteiligung des GABAergen Systems mit neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Beispielsweise wird eine verminderte GABAerge Inhibition als Grundlage für Epilepsie, Angstzustände und Schlafstörungen diskutiert^[47].

Um die GABAerge Transmission untersuchen zu können, bietet die Positronen-Emissions-Tomographie hier die Möglichkeit einzelne neurologische Prozesse *in vivo* zu visualisieren und quantitativ zu erfassen. Durch die Wahl eines geeigneten Radiotracers können so beispielsweise Rezeptorverfügbarkeiten oder die Ausschüttung von Neurotransmittern bestimmt werden. Darüber hinaus kann auch die Wirkung von Arzneistoffen auf einzelne Rezeptorsysteme untersucht sowie Krankheiten frühzeitig diagnostiziert und eine entsprechende Therapiekontrolle gewährleistet werden^[61].

Bis heute stehen für die Diagnostik des GABAergen Systems lediglich Radioliganden der Benzodiazepin-Bindungsstelle für die klinische Anwendung zur Verfügung. Bisherige Ansätze, Radioliganden zu entwickeln, welche in Konkurrenz mit GABA stehen, sind bisher aufgrund der geringen Aufnahme ins ZNS gescheitert. Hier würde ein Radioligand an die GABA-Bindungsstellen des GABA_A-Rezeptors den Vorteil bieten, über die Konkurrenz mit dem endogenen Neurotransmitter, dessen Freisetzung zu visualisieren. Darüber hinaus wäre man in der Lage, auch nicht benzodiazepin-sensitive Rezeptoren (beispielsweise den Subtyp $\alpha_6\beta_3\delta$ im Cerebellum) quantitativ zu erfassen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ¹⁸F-markierte Radioliganden für die PET zur Bildgebung der GABA-Bindungsstelle zu synthetisieren und auf ihre Eignung als PET-Tracer hin zu untersuchen. Als Leitstruktur wurden dazu aufgrund der hohen Affinitäten und Lipophilien 4-Arylsubstituierte Isooxazolole und Isothiazolole ausgewählt^[62]. Hierbei zeichnen sich insbesondere die Derivate des 4-(2-Naphthylmethyl)-5-(piperidin-4-yl)isothiazolols durch ihre sehr hohe Affinität aus und weisen eine deutlich höhere Lipophilie als Derivate anderer Leitstrukturen auf^{[63],[64]}. Arbeiten der Gruppe von Krosgaard-Larsen zeigten, dass durch Variation der Substituenten in Position 1 des Naphthalinrings die hohe Affinität der Liganden in den meisten Fällen erhalten blieb^[65].

Daher sollten zunächst inaktive Referenzverbindungen synthetisiert werden, in denen der Fluorsubstituent an dieser Position eingeführt wurde. Dies sollte im Falle der Oxazolole durch die Einführung einer Fluorethylgruppe erreicht werden, da hier bereits gezeigt wurde, dass räumlich anspruchsvollere Substituenten die Affinität nicht maßgeblich beeinflussen (siehe Abb. 14).

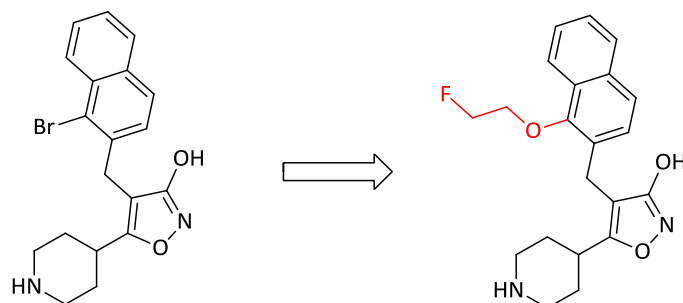


Abb. 14: Vorgesehenes Fluorethoxyderivat der Oxazololverbindungen

Aus der Reihe der Isothiazolole sollten Liganden synthetisiert werden, in denen der Fluorsubstituent direkt am Naphthalinring oder durch Fluoralkylierung des Isothiazolols eingeführt wurde. Der Einfluss einer Carbonylgruppe am Naphthalinring sollte ebenfalls untersucht werden, um die spätere Radiosynthese, durch die Aktivierung des Naphthalinrings für eine nukleophile, aromatische Substitution, zu erleichtern (siehe Abb. 15).

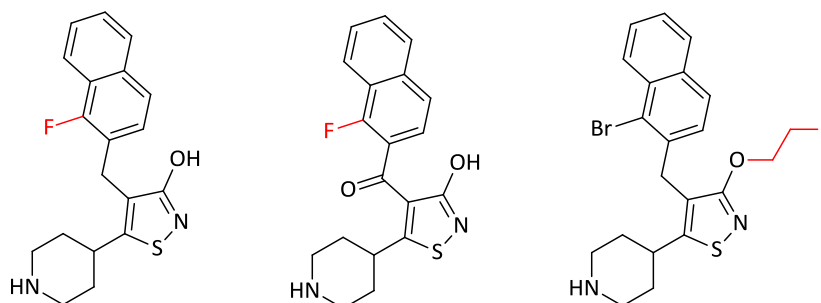


Abb. 15: Geplante Liganden basierend auf der 5-(piperidin-4-yl)isothiazolol-Leitstruktur

Im Anschluss an die Synthese der Referenzverbindungen sollten diese in Radioligand-Bindungsstudien mit dem tritiierten Agonisten [^3H]Muscimol auf ihre Rezeptoraffinität hin untersucht werden. Darüber hinaus sollten die Log D-Werte der Referenzverbindungen für die Abschätzung der Lipophilie, und somit einer möglichen Passage der Blut-Hirn-Schranke, bestimmt werden.

Aufgrund der Ergebnisse der *in vitro*-Evaluierungen sollten geeignete Liganden für die Radiosynthese ausgewählt und eine entsprechende Synthesestrategie erarbeitet werden. Das größte Problem stellt hierbei die Struktur dieser Substanzklasse dar. Die Leitstruktur der 5-(Piperidin-4-yl)isoxazolole und 5-(Piperidin-4-yl)isothiazolole, ist für die Bindung an die GABA-Bindungsstelle essentiell, macht

jedoch aufwendige, mehrstufige Radiosynthesen erforderlich. Dazu sollten zunächst geeignete Markierungsvorläufer synthetisiert und die anschließenden Radiosynthesen auf ihre Reaktionsparameter hin optimiert werden (siehe Abb. 16).

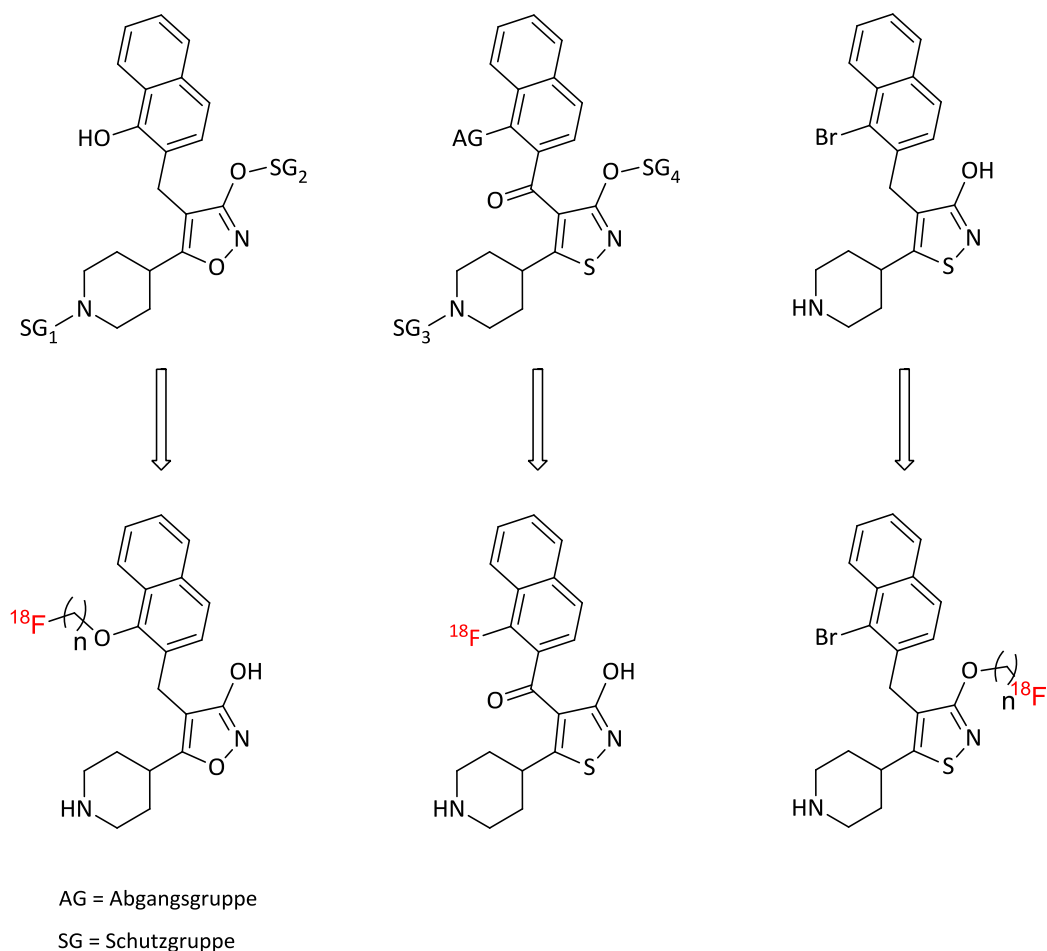


Abb. 16: Potentielle Markierungsvorläufer

Im Anschluss an die Radiosynthese sollte ein geeignetes Verfahren für die Abtrennung und Qualitätskontrolle etabliert werden, um die Radioliganden mit hoher chemischer und radiochemischer Reinheit darzustellen. Ebenfalls sollte hierbei die spezifische Aktivität bestimmt werden, um die Stoffmenge des Radioliganden für nachfolgende Evaluierungen optimieren zu können.

Darüber hinaus sollten die radioaktiv markierten Verbindungen in Autoradiographien an Hirnschnitten der Ratte auf ihre Spezifität gegenüber der GABA-Bindungsstelle hin untersucht werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese der Referenzverbindungen

3.1.1 Synthese der Isoxazole

Aus der Reihe der Isoxazole sollten zunächst die in Position 1 am Naphthalinring substituierten Fluorethoxy- und Methoxyderivate **VK1** und **VK3** als inaktive Referenzverbindungen und das von Frølund et al. beschriebene Bromderivat **VK2** als interne Referenz synthetisiert werden^[65] (siehe Abb. 17). Dazu sollten die 1-substituierten 2-Brommethylnaphthyl-Derivate an die entsprechenden β -Ketoester gekoppelt und nach erfolgtem Ringschluss entschützt werden.

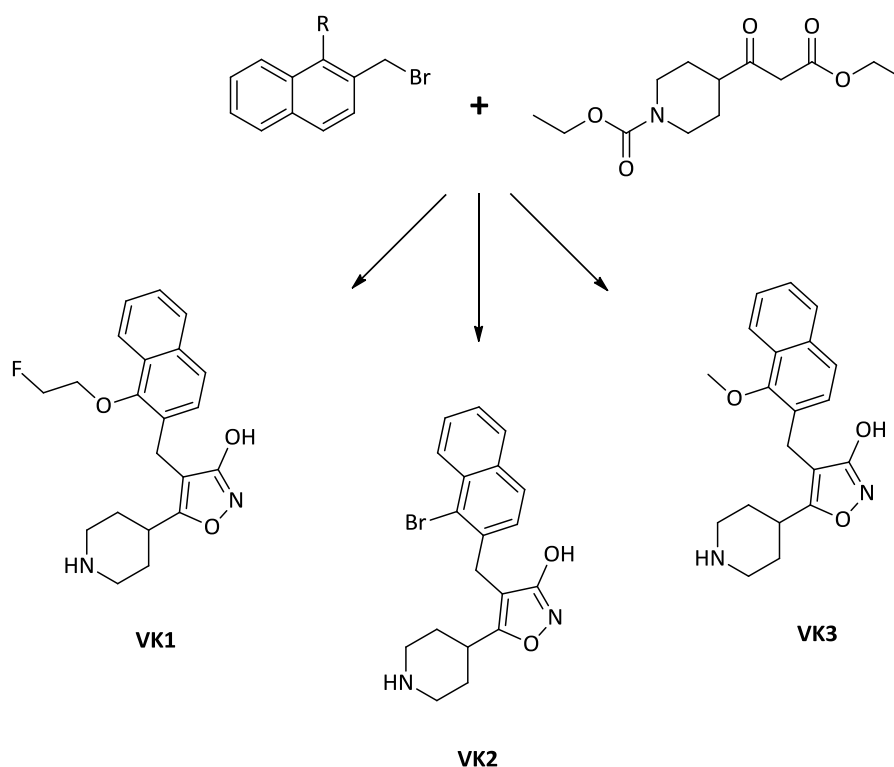
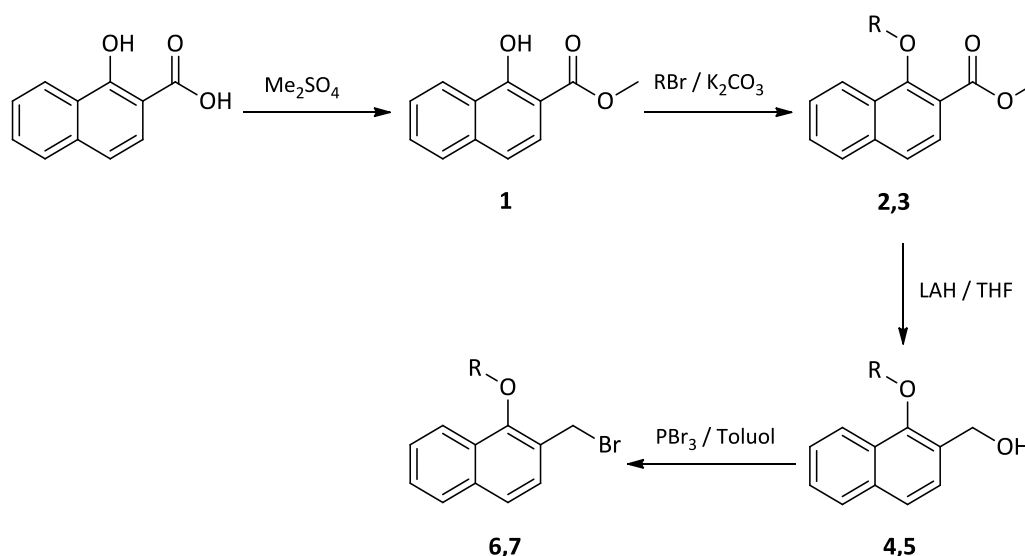


Abb. 17: Geplante Referenzverbindungen - Oxazole

Zu diesem Zweck wurden die 1-Alkoxy-2-brommethylnaphthaline **6** und **7**, ausgehend von kommerziell erhältlicher 1-Hydroxynaphthalin-2-carbonsäure, in 4 Stufen synthetisiert. Zunächst wurde die Carbonsäure mittels Dimethylsulfat in den entsprechenden Methylester **1** überführt, um anschließend selektiv in Position 1 alkylieren zu können. Das Naphthol wurde dazu mit 1,2-Bromfluorethan bzw. Methyljodid umgesetzt und so die entsprechenden Alkylether **2** und **3** erhalten. Um zu den entsprechenden Bromiden zu gelangen, wurde die Esterfunktion mit Lithiumaluminium-

hydrid reduziert und die erhaltenen Alkohole **4** und **5** mit Phosphortribromid zu 1-Fluorethoxy-2-brommethylnaphthalin **6** und 1-Methoxy-2-brommethylnaphthalin **7** umgesetzt (siehe Abb. 18).



Verbindung	R =	Ausbeute / %
2	FC ₂ H ₄	93
3	CH ₃	95
4	FC ₂ H ₄	90
5	CH ₃	94
6	FC ₂ H ₄	73
7	CH ₃	89

Abb. 18: Synthese der 1-Alkoxy-2-brommethylnaphthaline

Auf diesem Syntheseweg wurden für alle Stufen sehr gute Ausbeuten (70-95 %) erzielt und ausschließlich günstige Edukte verwendet. Ein weiterer großer Vorteil liegt in der Aufarbeitung der einzelnen Stufen, da die Produkte meist sauber extrahiert werden konnten. Lediglich die Bromide **6** und **7** mussten säulenchromatographisch aufgearbeitet werden, was die Synthese der gewünschten Kopplungskomponenten auf einfache Weise und in großen Mengen ermöglichte.

Die Synthese des entsprechenden 1-Brom-2-brommethylnaphthalins **8** wurde nach einer Literaturvorschrift mittels Bromierung von 1-Brom-2-methylnaphthalin mit NBS in Tetrachlorkohlenstoff durchgeführt (siehe Abb. 19). Auch hier konnte das Produkt sauber und in sehr guten Ausbeuten von 93 % erhalten werden.

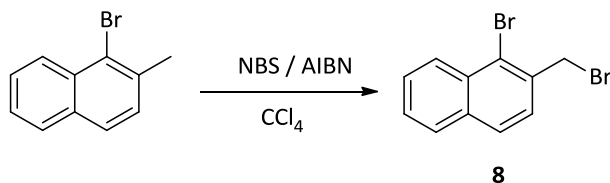
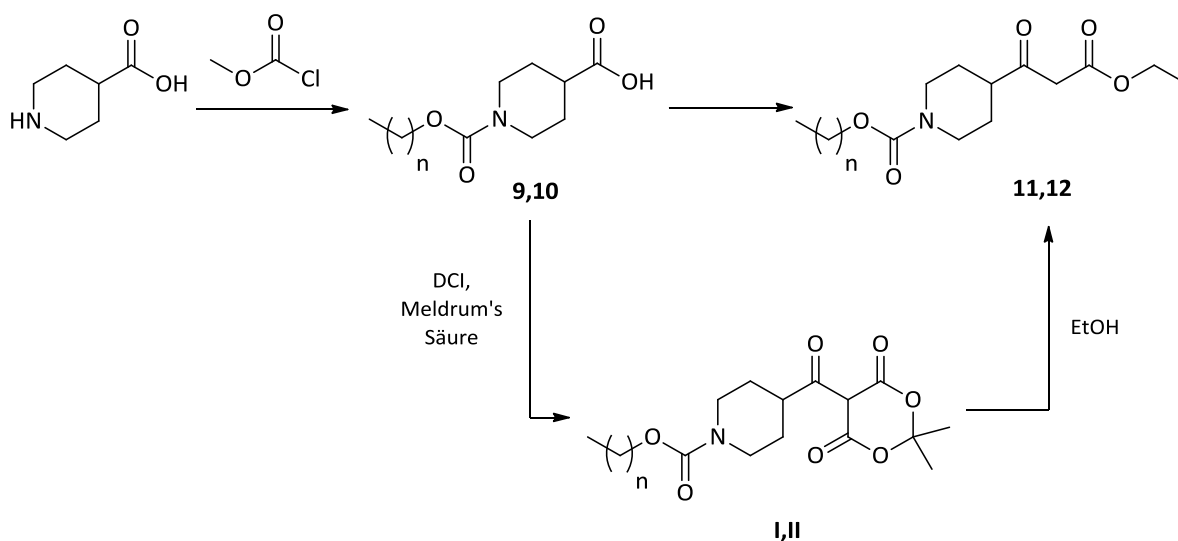


Abb. 19: Bromierung von 1-Brom-2-methylnaphthalin

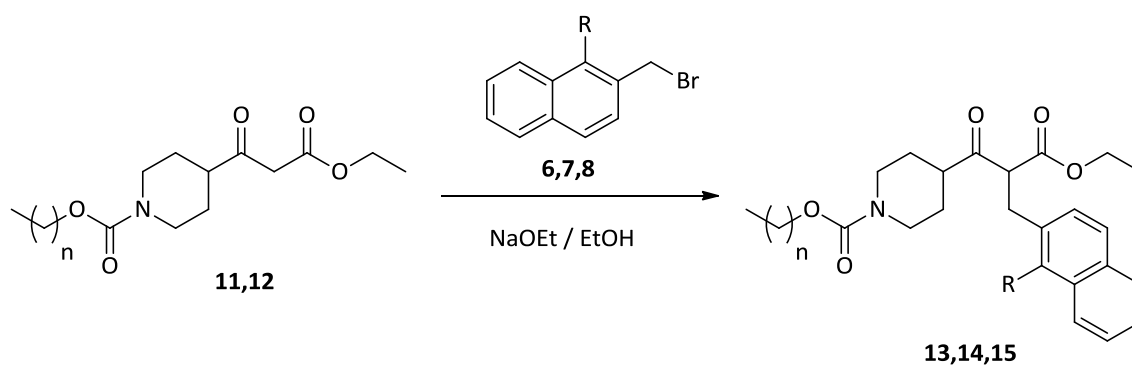
Für die Kopplung der Naphthylmethylbromide **6,7** und **8** an die entsprechenden β -Ketoester **11** und **12** wurden diese, ausgehend von Piperidin-4-carbonsäure, in zwei Stufen synthetisiert. Hierzu wurde zunächst das sekundäre Amin mit Methyl- bzw. Ethylchlorformat in die entsprechenden Carbaminsäurealkylester **9** und **10** überführt. In der Literatur wurde die Synthese der β -Ketoester durch Chlorierung der Piperidin-4-carbonsäure mit Sulfurylchlorid und anschließende Umsetzung mit Kaliummethylmalonat beschrieben^[62]. Diese zweistufige Synthese inklusive der aufwendigen Destillation des Säurechlorids konnte hier durch die Verwendung von Meldrums Säure umgangen werden. Hierbei wurden die Carbonsäuren **9** und **10** zunächst mit DCl aktiviert und mit Meldrum's Säure zu den Intermediaten **I** und **II** umgesetzt. Durch die anschließende Ethanolyse konnten daraus die entsprechenden β -Ketoester **11** und **12** synthetisiert werden^[66].



Verbindung	n =	Ausbeute / %
9	0	83
10	1	95
11	0	71
12	1	54

Abb. 20: Synthese der β -Ketoester **11** und **12**

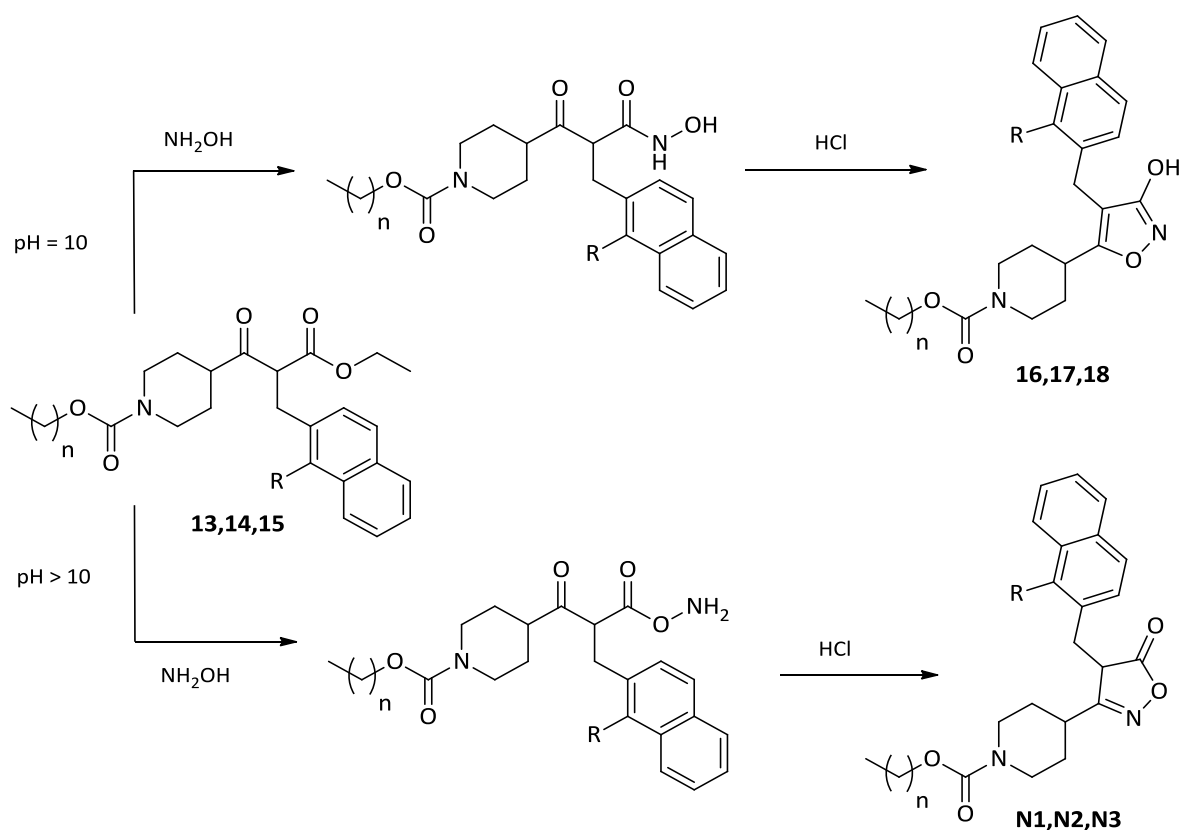
Die Kopplung der 2-Brommethylnaphthaline **6**, **7** und **8** an die β -Ketoester **11** und **12** wurde, wie in der Literatur beschrieben, unter Verwendung von NaOEt in Ethanol durchgeführt. Das eingesetzte NaOEt wurde stets vor Synthesebeginn frisch hergestellt und die entsprechenden α -Alkyl- β -ketoester **13**, **14** und **15** in ausreichenden Ausbeuten (40-50 %) erhalten. Hier wurde weiterhin versucht, die Reaktionsausbeute durch Einsatz verschiedener Basensysteme (K_2CO_3 -MeCN / Et_3N -DCM / NaH-THF) zu verbessern, jedoch lieferte weiterhin die Kopplung mit NaOEt / EtOH die höchsten Ausbeuten.



Verbindung	R =	n =	Ausbeute / %
13	FC ₂ H ₄ O	1	50
14	Br	1	65
15	CH ₃	0	42

Abb. 21: Kopplung der 2-Brommethylnaphthaline **6**, **7** und **8** an die β -Ketoester **11** und **12**

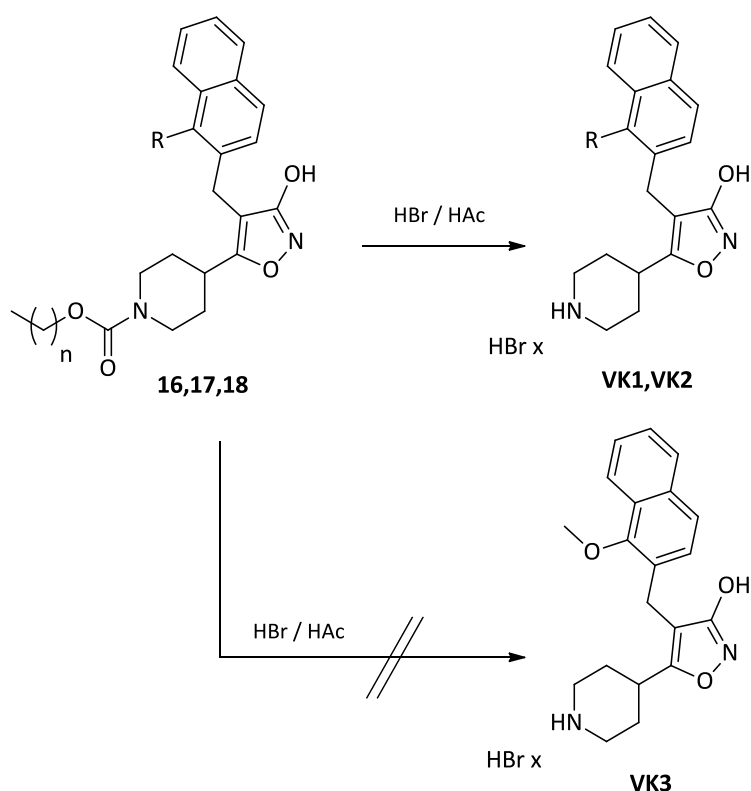
Ausgehend von den zuvor dargestellten α -Alkyl- β -ketoestern **13**, **14** und **15** gelang der Ringschluss zu den entsprechenden Isoxazolen **16**, **17** und **18** durch Umsetzung mit Hydroxylamin und anschließender Kondensation in konzentrierter Salzsäure. Ein besonderes Augenmerk musste bei dieser Reaktion auf den pH-Wert gelegt werden, der für die Umsetzung mit Hydroxylamin zu den entsprechenden Hydroxyamiden **I**, **II** und **III** ungefähr bei 10 liegen sollte. In diesem Bereich liegt Hydroxylamin ungeladen vor, wodurch die benötigte Nukleophilie des Amins gewährleistet wird. Bei basischeren pH-Werten tritt vermehrt eine Deprotonierung der Hydroxyfunktion des Hydroxylamins auf, was zu der Bildung der Nebenprodukte **N1**, **N2** und **N3** führt^[67] (siehe Abb. 22).



Verbindung	R =	n =	Ausbeute / %
16	$\text{FC}_2\text{H}_4\text{O}$	1	43
17	Br	1	29
18	CH_3O	0	21

Abb. 22: Ringschluss zu den Isoxazolen

Um die Referenzverbindungen für die Bestimmung der Affinitäten an die GABA Bindungsstelle zu erhalten, musste in einem letzten Schritt die Schutzgruppe am Piperidin-Stickstoff abgespalten werden. Dies gelang durch saure Hydrolyse der Carbaminsäureester mit Bromwasserstoffsäure in Eisessig, wonach die Referenzverbindungen **VK1** und **VK2** als HBr-Salz in sehr guten Ausbeuten von 73-97 % erhalten wurden (siehe Abb. 23). Im Falle des methoxy-substituierten Isoxazols **18** wurde unter diesen Bedingungen jedoch auch der Methylether gespalten, weshalb auf diesem Wege das gewünschte Produkt nicht dargestellt werden konnte. Daher wurde der Versuch unternommen, den Carbaminsäureester unter basischen Bedingungen mit 2 M Natronlauge zu spalten. Mittels DC konnte hier auch eine Umsetzung des Edukts **18** beobachtet werden, jedoch konnte die Referenzverbindung **VK3** anschließend nicht sauber aus der Reaktionsmischung isoliert werden.

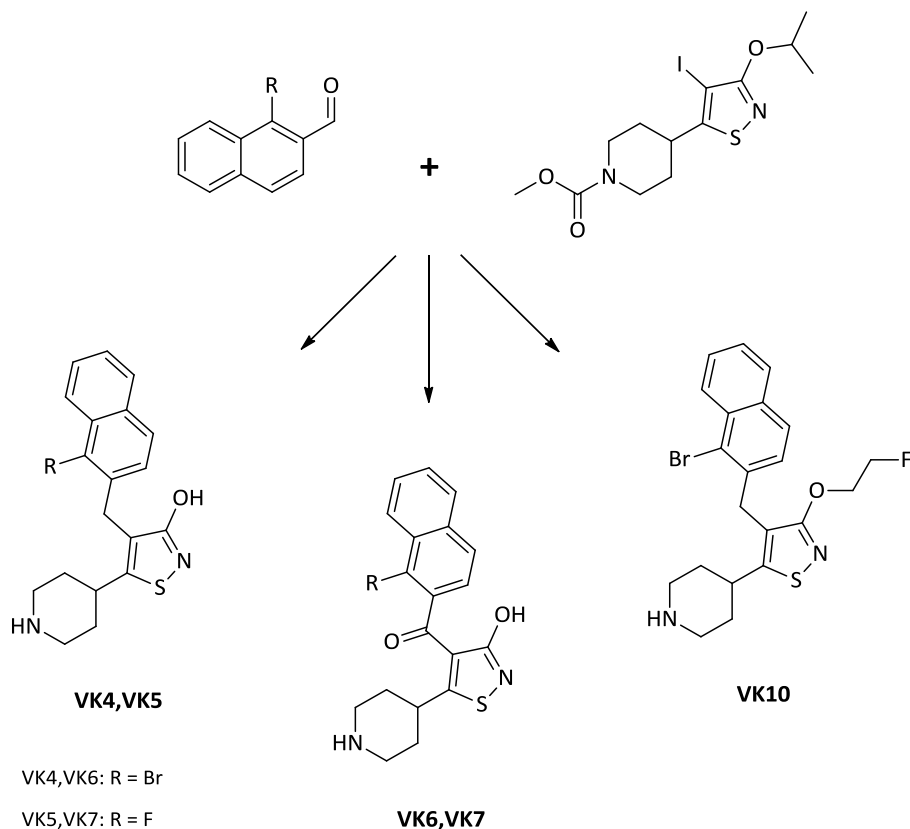


Verbindung	R =	Ausbeute / %
VK1	FC ₂ H ₄ O	97
VK2	Br	73
VK3	CH ₃ O	/

Abb. 23: Entschützung der Referenzverbindungen **VK1**, **VK2** und **VK3**

3.1.2 Synthese der Isothiazole

Neben den Isoxazolen sollten auch fluorierte Liganden, basierend auf einer Thiazol-Grundstruktur synthetisiert werden. Dazu sollten zunächst die unterschiedlich substituierten 2-Formylnaphthaline synthetisiert und anschließend, wie von Krehan et al. beschrieben, an das iodierte Isothiazol gekoppelt werden^[64] (siehe Abb. 24).



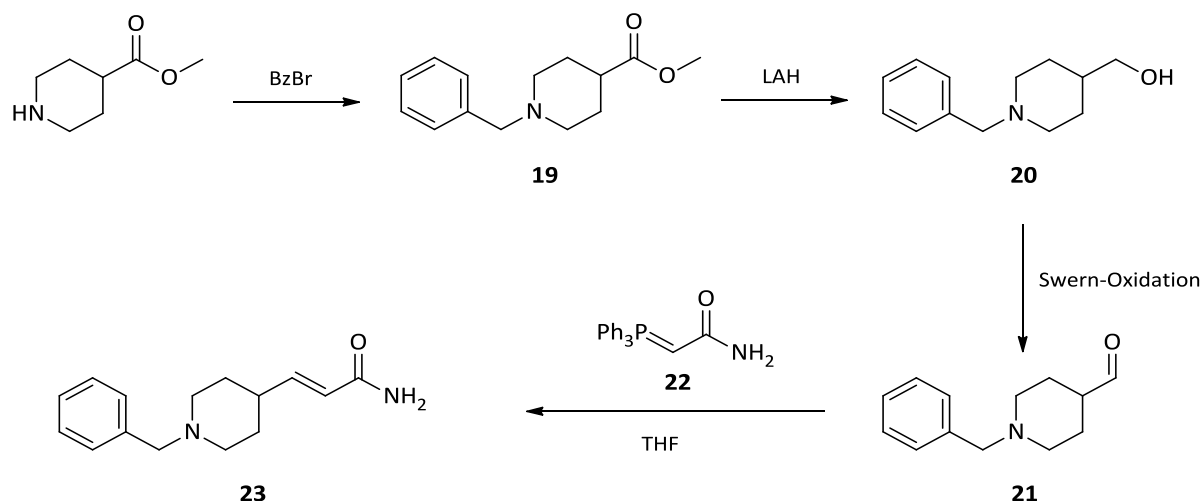


Abb. 25: Synthese von 3-(N-Benzylpiperidin-4-yl)propenamid **23**

Im Laufe der Synthese des Propenamids **23** wurde zunächst versucht, den Ester **19** unter Verwendung von DIBAL-H oder Red-Al direkt in den Aldehyd **21** zu überführen^[68]. Hierbei wurde jedoch in den meisten Fällen ein Produktgemisch aus Ester **19**, Alkohol **20** und Aldehyd **21** isoliert, welches schwer zu trennen war, sodass Aldehyd in nur geringen Ausbeuten erhalten wurde. Aus diesem Grund wurde auf die oben beschriebene Reduktion und anschließende Swern-Oxidation zum Aldehyd zurückgegriffen und das Propenamid **23** in einer Ausbeute von 60 % über 4 Stufen erhalten.

An dieser Stelle soll der Reaktionsmechanismus der Swern-Oxidation kurz näher erläutert werden, da diese Reaktion in den hier beschriebenen Arbeiten eine breite Anwendung gefunden hat. Dies liegt hauptsächlich an den milden Reaktionsbedingungen und den sehr guten Ausbeuten, in denen sich aus Alkoholen Ketone und Aldehyde darstellen lassen. Insbesondere bei sehr kleinen Stoffmengen im mg-Bereich treten, selbst bei 100 – 1000fachem Überschuss des Oxidationsmittels, kaum Nebenreaktionen auf. Wie in Abbildung 26 gezeigt, wird dabei zunächst aus Oxalylchlorid und Dimethylsulfoxid das intermediäre Chlordimethylsulfonium-Ion **A** gebildet, welches mit dem Alkohol **B** unter Bildung des Alkoxydimethylsulfonium-Ions **C** reagiert. Durch Deprotonierung mit einer Aminbase wird daraus die entsprechende Carbonylverbindung **D** und Dimethylsulfid gebildet.

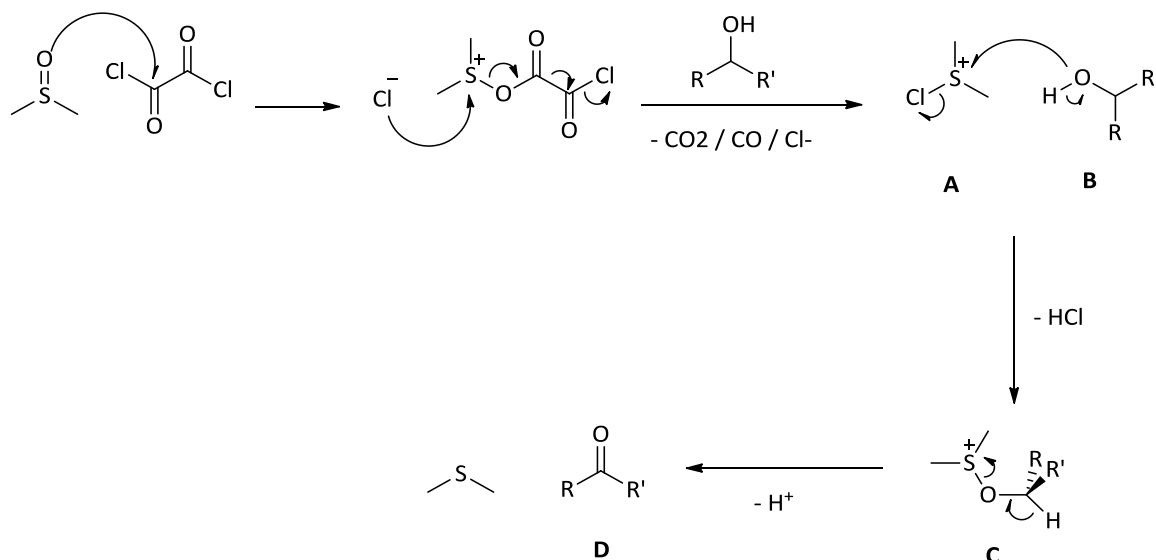


Abb. 26: Mechanismus der Swern-Oxidation

Für die weiteren Syntheseschritte musste das Propenamid **23** umgeschützt werden, wozu es durch Umsetzung mit Methylchlorformiat in den entsprechenden Carbaminsäureester **24** überführt wurde. Der im Isothiazol enthaltene Schwefel wurde, wie in Abbildung 27 gezeigt, durch Addition von Thioessigsäure an die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung **24** eingeführt. Der Thioester **25** wurde so in einer Ausbeute von 56 % in 2 Stufen synthetisiert.

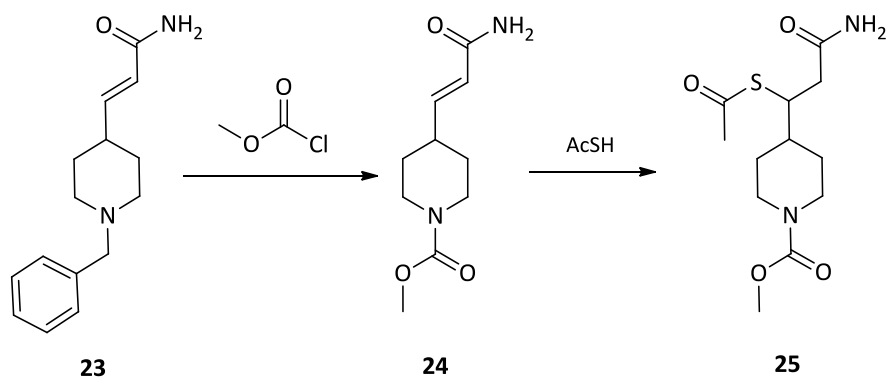


Abb. 27: Synthese des acetylthiol-substituierten Propanamids **25**

Um den zusätzlichen Reaktionsschritt der Umschüttung zu vermeiden, wurde versucht, die Methoxycarbonyl-Schutzgruppe des Propenamids **24** bereits zu Beginn der Synthese einzuführen, wodurch **24** in nur 4 Stufen, ausgehend von Piperidin-4-carbonsäuremethylester, synthetisiert werden konnte. Dabei wurden jedoch geringere Ausbeuten (32 % über 4 Stufen) als bei Verwendung der 5-stufigen Route (45 % über 5 Stufen) über die benzylgeschützten Derivate erzielt, was vor allem an der notwendigen, säulenchromatographischen Aufreinigung der Wittig-Reaktion lag. Die Syntheseroute über das entsprechende benzylgeschützte Derivat bietet den Vorteil, dass hier das Propenamid **23** extraktiv aufgereinigt werden konnte.

Den vielleicht kritischsten Schritt der Synthese der Isothiazole stellt der Ringschluss dar, welcher in einer dreistufigen „One-Pott“-Reaktion durchgeführt wurde. Dazu wurde zunächst das Acetylthiol **25** mit Natriumhydroxid in das freie Thiol **26a** überführt, welches anschließend mit Wasserstoffperoxid zu dem entsprechenden Disulfid **26b** oxidiert wurde. Durch Zugabe von Sulfurylchlorid (SO_2Cl_2) wurde letztlich aus dem Disulfid durch einen oxidativen Ringschluss das Isothiazol **26** gebildet (siehe Abb. 28). Für diesen Reaktionsschritt war es sehr wichtig, das Disulfid nach der Oxidation wasserfrei zu isolieren, da sonst bei der Umsetzung mit SO_2Cl_2 vermehrt Nebenprodukte gebildet wurden. Weiter wurde beobachtet, dass bei Zugabe zu großer Mengen an SO_2Cl_2 das gebildete Isothiazol in Position 4 chloriert wird. Aus diesem Grund wurden im Vergleich zur Literatur (1 äq) nur 0,75 Äquivalente SO_2Cl_2 zugesetzt, wodurch die Ausbeute von 42 % auf 64 % gesteigert werden konnte^[64].

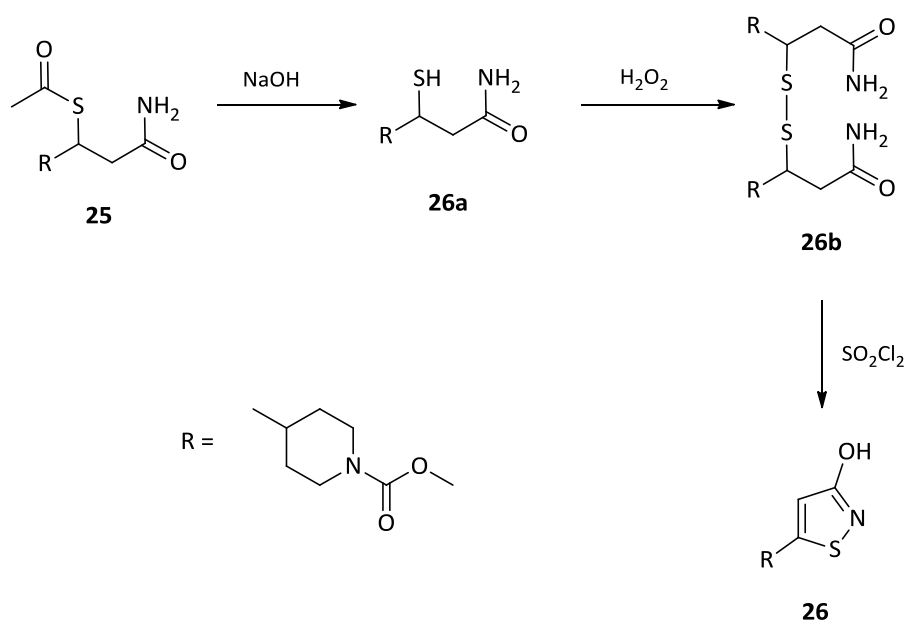


Abb. 28: Ringschluss zum Isothiazol **26**

Ausgehend von dem Isothiazol **26** wurde der für die Kupplung an die Naphthylaldehyde benötigte, iodierte Grundkörper **28** in zwei Stufen synthetisiert. Dazu wurde in einem ersten Schritt eine Isopropyl-Schutzgruppe in das Molekül eingeführt und das geschützte Isothiazol **27** anschließend mit Iodmonochlorid in Wasser-Eisessig iodiert. Beide Reaktionen lieferten sehr gute Ausbeuten (80 – 85 %). Problematisch war jedoch die Iodierung von **27** in größeren Maßstäben, da bei der Reaktionstemperatur von 85 °C Iodmonochlorid aus der Reaktionslösung sublimierte. Daher wurde die Reaktion in kleineren Ansätzen und geschlossenen Systemen ohne Gasraum durchgeführt.

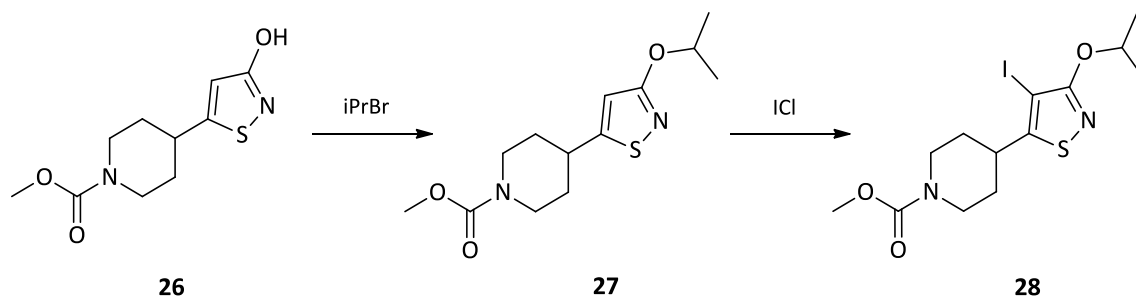


Abb. 29: Synthese des kopplungsfähigen Grundkörpers 28

3.1.2.2 Synthese der 2-Formylnaphthaline

Für die Synthese der Referenzverbindungen mussten im Folgenden die für die Kopplung an den Grundkörper **28** benötigten Aldehyde **32** und **33** dargestellt werden. Zur Synthese der 1-Fluornaphthyl-Derivate wurde zunächst 1-Fluor-2-methylnaphthalin **29**, ausgehend von 1-Brom-2-methylnaphthalin, synthetisiert^[65]. Dies gelang durch Lithiierung des Naphthalinrings mit *n*-Butyllithium und anschließende Umsetzung mit *N*-Fluor-bis(phenylsulfonyl)amid in sehr guten Ausbeuten von 85 % (siehe Abb. 30).

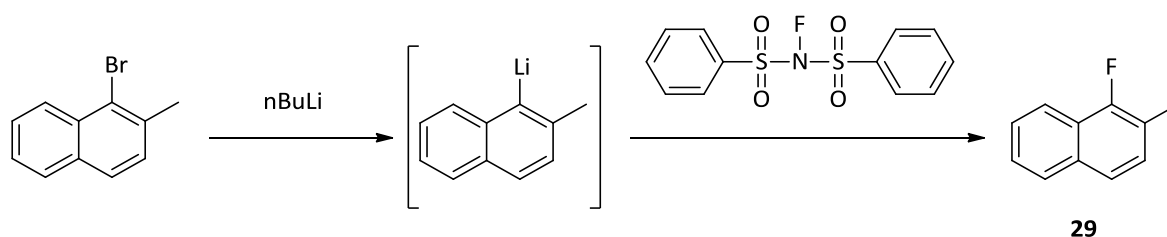
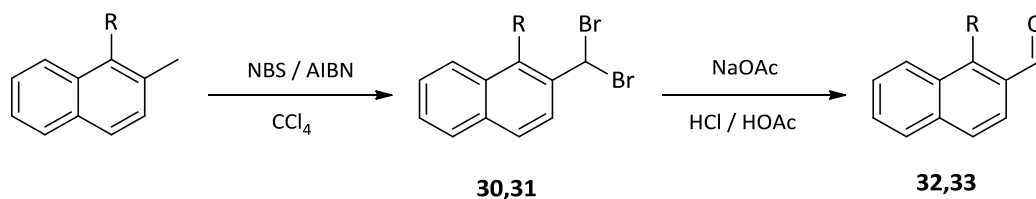


Abb. 30: Synthese von 1-Fluor-2-methylnaphthalin 29

Aus den 1-substituierten 2-Methylnaphthalinen wurden durch Bromierung mit NBS die Dibromide **30** und **31** synthetisiert (siehe Abb. 31). Diese wurden anschließend durch Hydrolyse in Eisessig und 2 M HCl zu den entsprechenden Aldehyden **32** und **33** umgesetzt^[69].

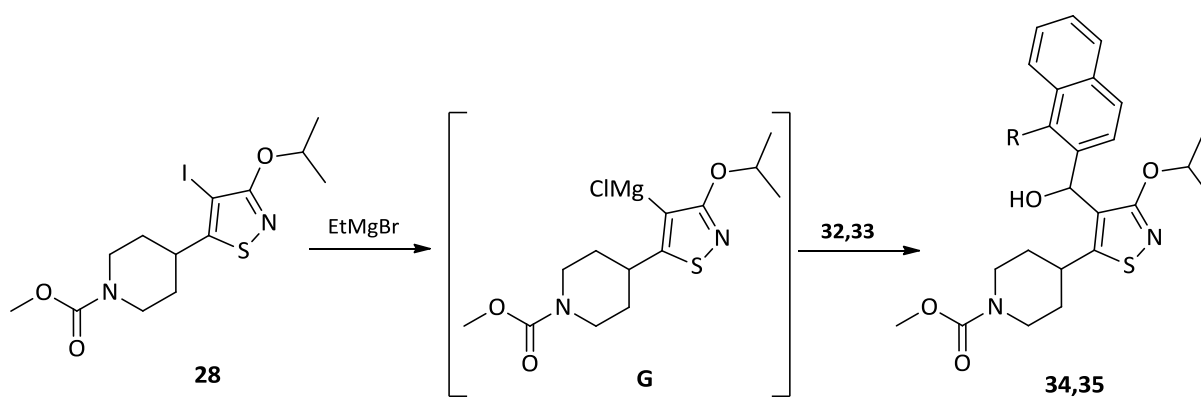


Verbindung	R =	Ausbeute / %
30	Br	97
31	F	61
32	Br	98
33	F	87

Abb. 31: Synthese der 2-Formylnaphthaline über die Dibromide

3.1.2.3 Synthese der Isothiazole

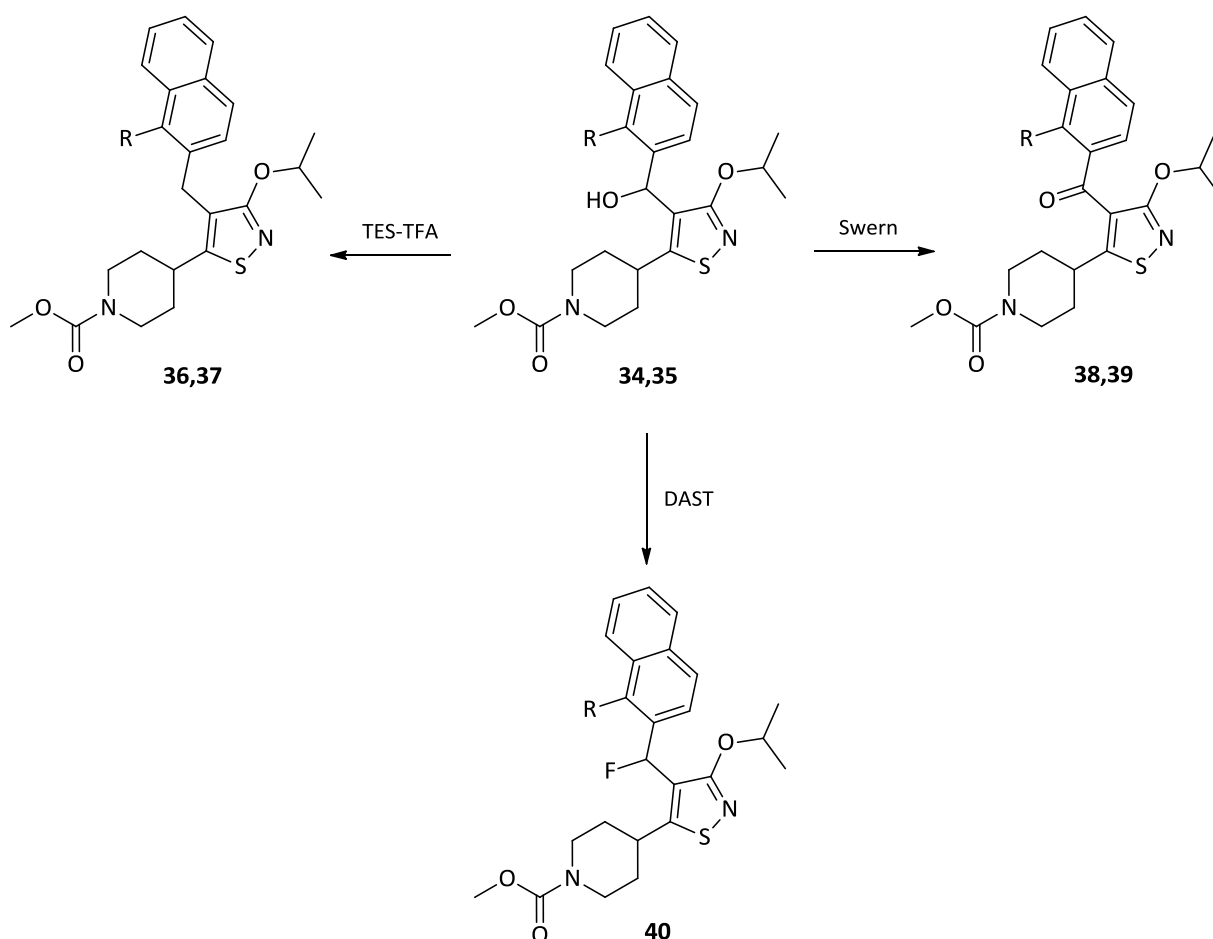
Für die Kopplung der Aldehyde an den iodierten Grundkörper **28** wurde das Isothiazol zunächst mit Ethylmagnesiumchlorid in die Grignard-Verbindung **G** überführt und diese mit den verschiedenen Aldehyden umgesetzt^[64]. Hierbei musste die Reaktionstemperatur von -30 °C konstant gehalten werden, um die Bildung von Nebenprodukten (Protonierung, Alkylierung) zu vermeiden. Um eine optimale Reaktionsausbeute zu gewährleisten, wurde hierbei der Reaktionsfortschritt mittels DC kontrolliert.



Verbindung	R =	Ausbeute / %
34	Br	35
35	F	89

Abb. 32: Syntheschema der geschützten Diarylalkohole 34 und 35

Um den Einfluss von Substituenten im Bereich der Methylenbrücke auf die Affinität der Liganden hin zu untersuchen, sollten, ausgehend von den zuvor dargestellten Diarylalkoholen **34** und **35**, verschiedene Derivate synthetisiert werden. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Ketone **38** und **39** durch Swern-Oxidation synthetisiert, sowie die Alkohole **34** und **34** mit Triethylsilan und Trifluoressigsäure zu den Naphthylmethylderivaten **36** und **37** reduziert (siehe Abb. 33). Ferner wurde der Alkohol **34** mit Dimethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) in das Fluor-Derivat **40** überführt.

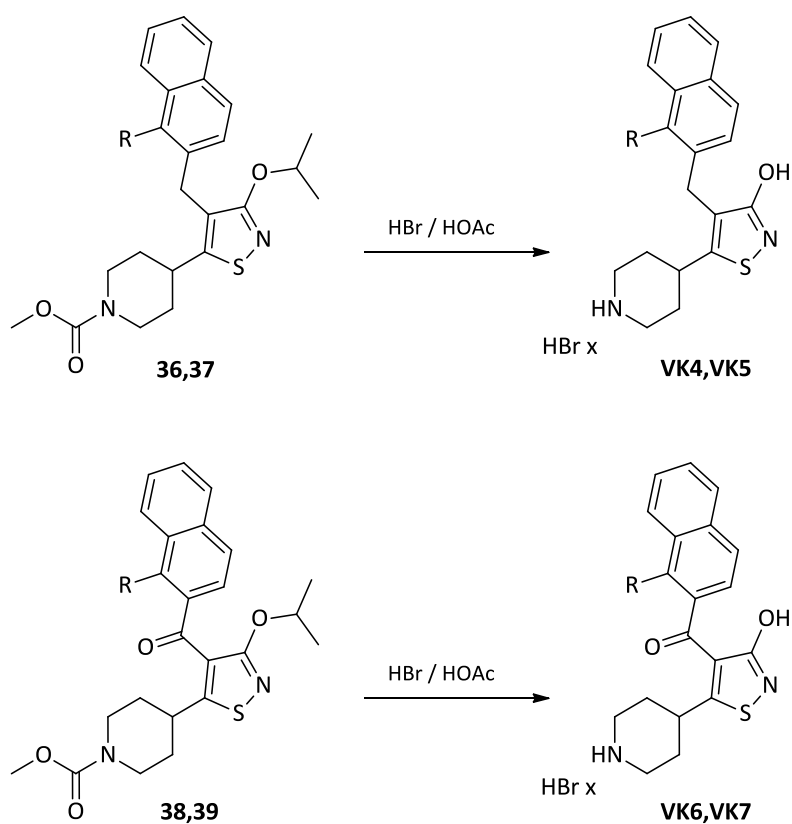


Verbindung	R =	Ausbeute / %
36	Br	99
37	F	97
38	Br	49
39	F	83
40	F	81

Abb. 33: Syntheschema für die Variation im Bereich der Methylenbrücke der Isothiazole

Um die finalen Referenzverbindungen zu erhalten, mussten in einem letzten Reaktionsschritt die Methoxycarbonyl- und die Isopropyl-Schutzgruppe entfernt werden. Dies gelang, wie bereits für die Oxazole beschrieben, durch die sauerkatalysierte Spaltung in HBr-Eisessig. Unter diesen Bedingungen stellt der Isopropylrest die stabilere der beiden Schutzgruppen dar, konnte jedoch vollständig unter drastischeren Reaktionsbedingungen (Erhitzen für mehrere Tage auf 65 °C) entfernt werden.

Im Falle der beiden Ketone **38** und **39** und der Methylen-Derivate **36** und **37** stellten diese harschen Reaktionsbedingungen keine weiteren Probleme dar, sodass die entschützten Referenzverbindungen **VK4**, **VK5**, **VK6** und **VK7** nach einfachem Umkristallisieren in meist guten Ausbeuten (29-99 %) erhalten werden konnten (siehe Abb. 34).



Verbindung	R =	Ausbeute / %
VK4	Br	29
VK5	F	99
VK6	Br	79
VK7	F	81

Abb. 34: Entschützung der Isothiazole

Ausgehend von dem hydroxy- bzw. fluorsubstituierten Isothiazol **34** bzw. **40**, konnten die Referenzverbindungen **VK8** und **VK9** jedoch nicht in HBr-Essigsäure entschützt werden. Grund hierfür war die Bildung des intermediären Carbokations, welches durch die beiden aromatischen Reste Mesomerie-stabilisiert wurde und nach der Aufarbeitung ein vielfältiges Produktgemisch ergab (siehe Abb. 35). Da insbesondere die Spaltung der Isopropyl-Schutzgruppe diese drastischen Reaktionsbedingungen voraussetzt, konnten auch durch mildere Reaktionsführung die geplanten Referenzverbindungen nicht dargestellt werden.

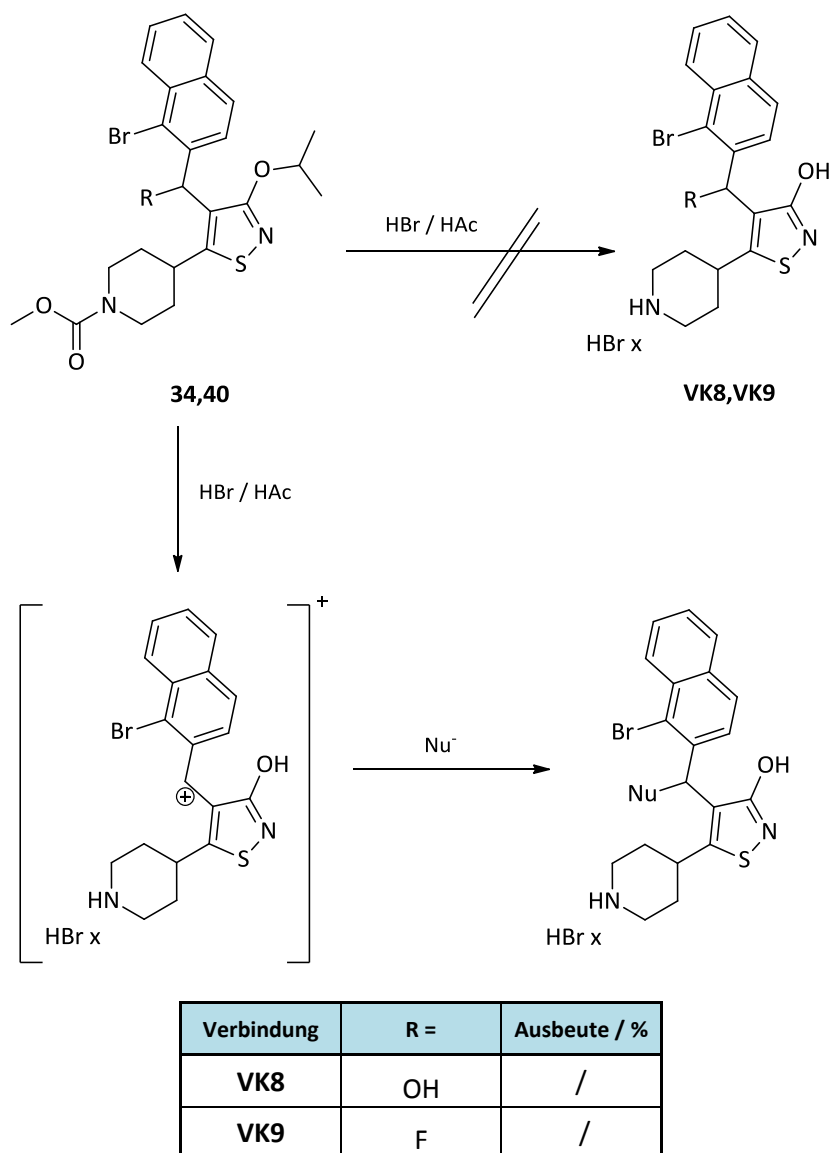


Abb. 35: Versuchte Entschützung der Diarylalkohole und -fluoride **34** und **40**

Zuletzt sollte noch der Einfluss eines Substituenten in Position 3 des Isothiazolrings untersucht werden, wozu in diesem Fall von dem Isothiazol **VK4**, der Verbindung mit der bisher höchsten Affinität, ausgegangen wurde. Zu diesem Zweck wurde **VK4** mit 2-Fluorethyltosylat umgesetzt und nach Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (HPLC-System 1) die O-alkylierte Referenzverbindung **VK10** erhalten.

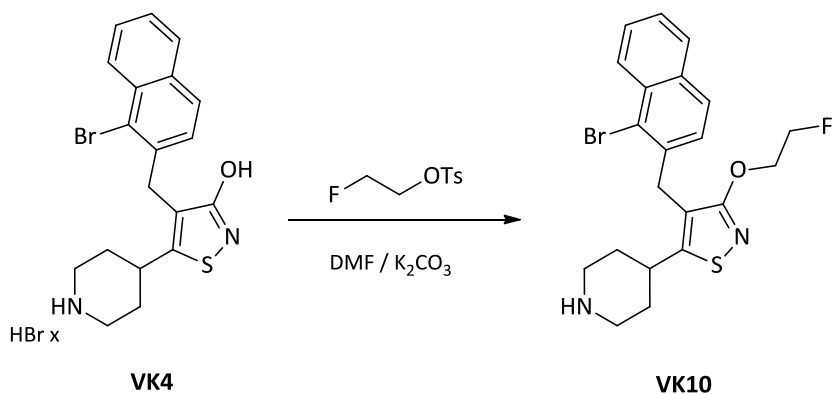


Abb. 36: Synthese der Referenzverbindung **VK10**

3.1.3 Synthese der Markierungsvorläufer MV1 und MV2

Im Folgenden sollten zwei geeignete Markierungsvorläufer für die Radiosynthese ^{18}F -markierter Liganden synthetisiert werden. Um das Fluorlabel über eine Fluoralkylierung in Position 1 am Naphthalinring einzuführen, sollte ein entsprechendes Naphthol-Derivat **MV1** mit geeigneten Schutzgruppen dargestellt werden. Hier galt es, eine Synthesestrategie zu entwickeln, durch die sich die Hydroxyfunktion am Naphthalinring selektiv entschützen ließ, ohne dabei gleichzeitig die Schutzgruppen des Piperidinrings und des Isoxazolols zu entfernen.

Des Weiteren sollte ein Markierungsvorläufer **MV2** für die Direktmarkierung mit $^{18}\text{F}^-$ am Naphthalinring synthetisiert werden. Dazu musste zunächst eine aktivierende, elektronenziehende Gruppe in ortho- oder para-Stellung zu der Abgangsgruppe eingeführt werden. Auch hier sollte versucht werden, geeignete Schutzgruppen für die Synthese des Grundkörpers zu verwenden, die nach der erfolgten Radiosynthese einfach wieder abgespalten werden können (siehe Abb. 37).

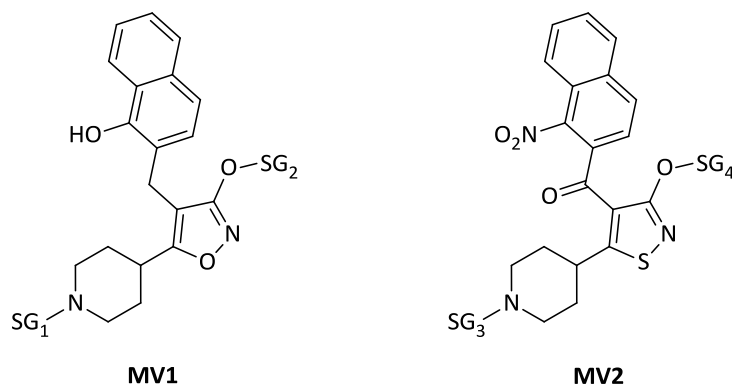


Abb. 37: Strukturen der geplanten Markierungsvorläufer MV1 und MV2

3.1.3.1 Synthese des Markierungsvorläufers **MV1**

Um die Hydroxyfunktion später selektiv entschützen zu können, wurde der bereits dargestellte 1-Hydroxynaphthalin-2-carbonsäuremethylester **1** mit Allylbromid zunächst in den entsprechenden Allylether **41** überführt. Dieser wurde anschließend mit LAH zu dem Alkohol **42** reduziert, aus dem durch eine Appel-Halogenierung das entsprechende Bromid **43** synthetisiert werden konnte. Auf diesem Wege konnte 1-Allyloxy-2-brommethyl-naphthalin **43** in einer Gesamtausbeute von 72 % über 3 Stufen erhalten werden. Das Bromid wurde, wie bei der Synthese der Referenzverbindungen beschrieben, an den β -Ketoester **11** gekoppelt und das dadurch erhaltene Produkt **44** durch Ringschluss mit Hydroxylamin und HCl zu dem entsprechenden Isoxazolol **45** umgesetzt (siehe Abb. 38).

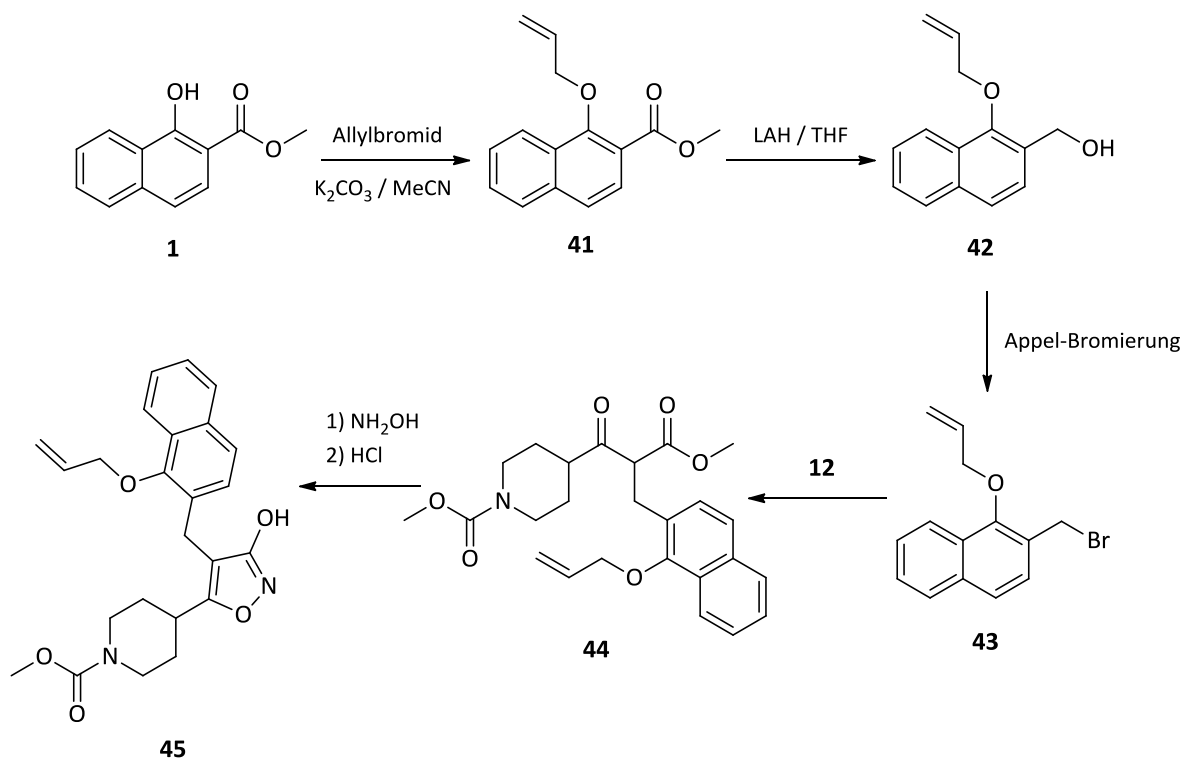


Abb. 38: Synthese des allylgeschützten Isoxazols 45

Im Anschluss daran wurde versucht, das freie Isoxazolol **45** mit *tert*-Butylchlorid zu schützen, da *tert*-Butylschutzgruppen nach der Radiosynthese unter relativ milden Bedingungen abgespalten werden können. Der entsprechende *tert*-Butylether **46** konnte jedoch in dieser Weise nicht synthetisiert werden. Der Grund hierfür ist vermutlich die Eliminierung von HCl aus *tert*-Butylchlorid unter den basischen Reaktionsbedingungen. Auch durch Variation der eingesetzten Base (K_2CO_3 , $KHCO_3$, NaH, TEA) sowie des Lösungsmittels (MeCN, DMF, DCM) konnten keine ausreichenden Mengen des Produktes erhalten werden (siehe Abb. 39).

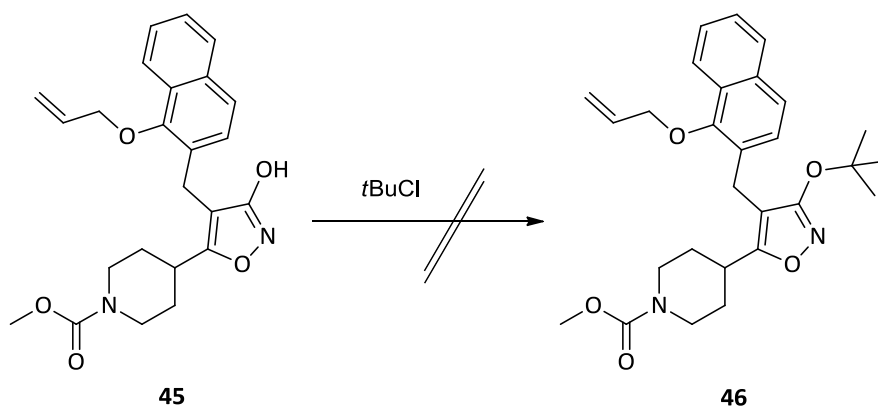


Abb. 39: Versuchte Synthese eines *tert*-butylgeschützten MV

Da die Methoxycarbonylschutzgruppe des Piperidinrings auch unter basischen Bedingungen gespalten werden kann, wurde im Folgenden versucht, das Isoxazolol **45** über eine Esterfunktion zu

schützen. Die Einführung einer Acetylschutzgruppe gelang hierbei durch die Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in THF in fast quantitativen Ausbeuten. Im Anschluss daran wurde versucht, den acetylgeschützten Allylether **47** Pd-katalysiert zu entschützen (siehe Abb. 40). Zu diesem Zweck wurden verschiedenste Reaktionsbedingungen und Nukleophile getestet (Morpholin in THF, I_2 in DMSO, $NaBH_4$ in THF, K_2CO_3 in MeOH, TsOH in MeOH), jedoch konnte das Naphthol **48** in keinem Fall sauber isoliert werden. Da in den meisten Fällen eine Zersetzung des Edukts sowie die Abspaltung der Acetylschutzgruppe beobachtet werden konnte, wurde die Synthese eines acetylgeschützten Vorläufers hier nicht weiter verfolgt.

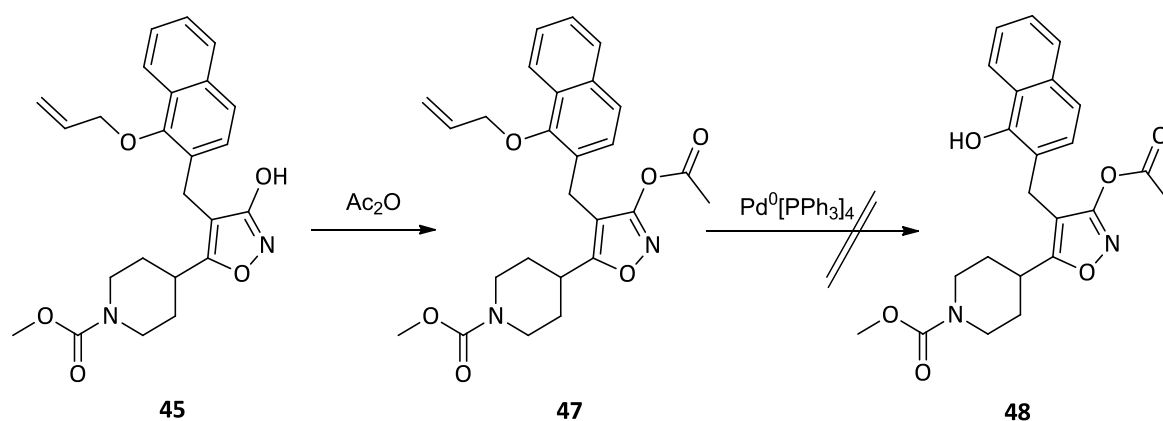


Abb. 40: Versuchte Synthese eines acetylgeschützten MV

Da die bisherigen Versuche nicht erfolgreich waren, wurde im folgenden Ansatz versucht, zur Synthese des Markierungsvorläufers **MV1** eine Schutzgruppe auf einer Polyetherbasis zu verwenden. Da für die Abspaltung der MOM-Schutzgruppe teilweise längere Reaktionszeiten benötigt werden, wurde hier auf die säurelabilere Methoxyethoxymethyl-Schutzgruppe (MEM) zurückgegriffen. Der MEM-geschützte Ether **49** konnte durch Umsetzung des Isoxazolols **45** mit MEM-Chlorid in ausreichenden Ausbeuten (32 %) synthetisiert werden. Mittels DC konnte zwar ein vollständiger Umsatz beobachtet werden, allerdings konnte im Verlauf der Aufarbeitung nicht das gesamte Produkt isoliert werden. Die Entschützung des Naphthols gelang anschließend unter Verwendung von Tetrakis(triphenylphosphin)palladium⁽⁰⁾ und K_2CO_3 in Methanol. Der Markierungsvorläufer **MV1** konnte in einer Gesamtausbeute von 7 % über 7 Stufen erfolgreich synthetisiert werden und stand so für die spätere Markierung mit $[^{18}F]$ Fluoraktyltosylaten zur Verfügung (siehe Abb. 41).

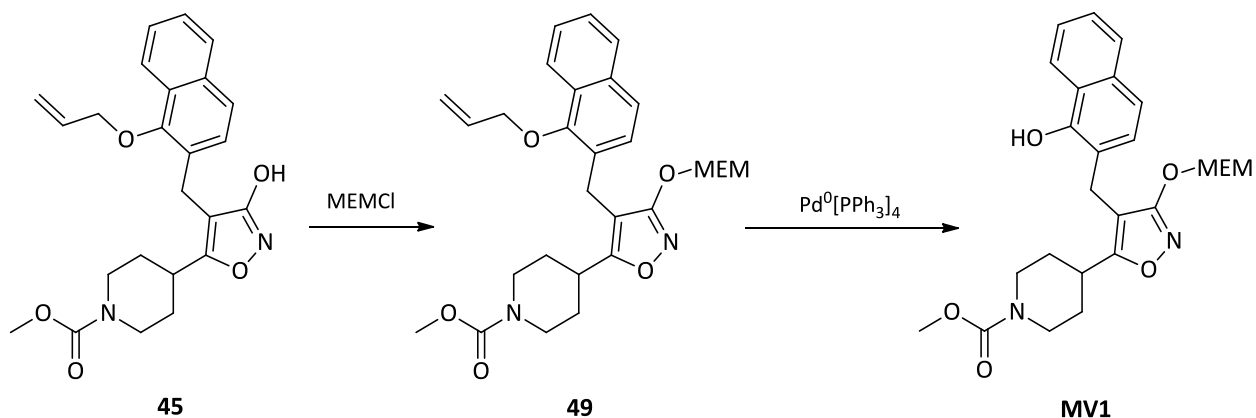


Abb. 41: Synthese des MEM-geschützten Markierungsvorläufers MV1

3.1.3.2 Synthese des Markierungsvorläufers **MV2**

Für die Markierung der Isothiazole mit $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ musste ebenfalls die Hydroxygruppe sowie das sekundäre Amin des Markierungsvorläufers mit geeigneten Schutzgruppen geschützt werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst versucht, die Methoxycarbonyl-Schutzgruppe des Piperidinrings durch eine Boc-Schutzgruppe zu ersetzen. In einer analogen Reaktionsfolge wurde dazu Piperidin-4-carbonsäuremethylester mit Boc-Anhydrid in das *tert*-Butylcarbamat **50** überführt und der Isothiazol-Grundkörper analog aufgebaut. Auf diesem Wege konnte das Boc-geschützte Acetylthiol **54** in guten Ausbeuten (25 % über 5 Stufen) synthetisiert werden. Dieses ließ sich jedoch im Folgenden nicht weiter zu dem gewünschten Isothiazolol **55** umsetzen (siehe Abb. 42). Grund hierfür ist die Bildung von HCl bei der Zugabe von Sulfurylchlorid, was eine Abspaltung der Boc-Schutzgruppe nach sich zog.

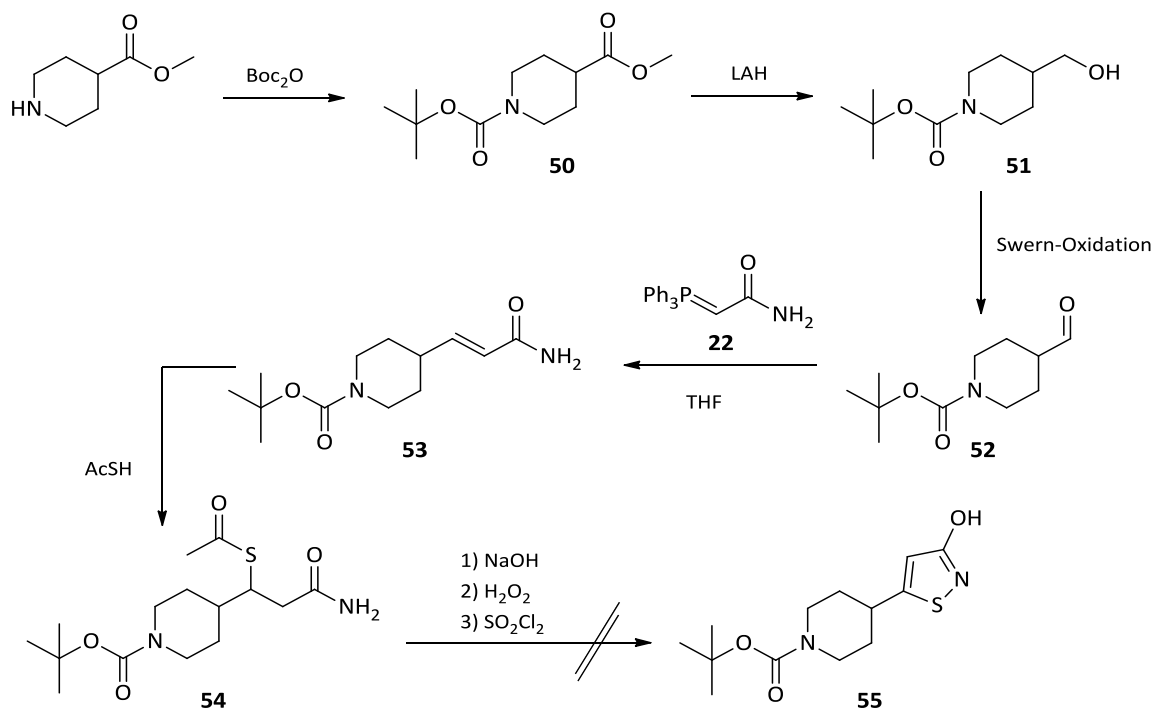


Abb. 42: Versuchte Synthese des Boc-geschützten Markierungsvorläufers MV2'

Weiter schränkten die Reaktionsbedingungen bei der Synthese des Markierungsvorläufers sowie der Radiosynthese den Einsatz alternativer Schutzgruppen für die Hydroxyfunktion des Isothiazolols stark ein. So konnte weder auf Silylschutzgruppen (Reaktion mit $^{18}\text{F}]\text{F}$) noch auf basenlabile (Reaktion mit EtMgCl) oder sehr säurelabile Schutzgruppen zurückgegriffen werden.

Daher wurde für die Synthese des Markierungsvorläufers der bereits dargestellte Grundkörper **28** verwendet. Für die Kopplungsreaktion mit dem iodierten Isothiazol **28** musste zunächst das entsprechende 1-Nitro-2-formylnaphthalin synthetisiert werden. Dazu wurde zunächst versucht, 1-Nitro-2-methylnaphthalin durch Bromierung mit NBS in das Dibromid **56** zu überführen und anschließend zu hydrolysieren (siehe Abb. 43). Das gewünschte Produkt konnte jedoch, auch unter Verwendung frisch getrockneter Lösungsmittel und neuer Chemikalien nicht dargestellt werden, da der deaktivierende Einfluss der Nitrogruppe zu stark ist.

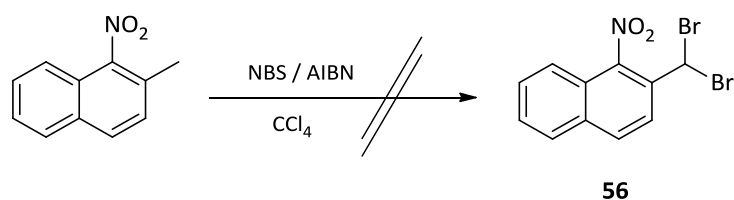


Abb. 43: Versuchte Synthese von 1-Nitro-2-formylnaphthalin über das Dibromid

Aus diesem Grund wurde in einem alternativen Syntheseweg, ausgehend von 1-Nitro-2-methylnaphthalin mit Dimethylformamid(dimethylacetal), das Ethen **57** synthetisiert. In einer

anschließenden Reaktion wurde mit Natriumperiodat die darin enthaltene Doppelbindung oxidativ gespalten und so der benötigte Aldehyd **58** in sehr guten Ausbeuten (60 % über 2 Stufen) erhalten^[70]. Dieser wurde, wie bereits beschrieben, mit Ethylmagnesiumchlorid an den Grundkörper gekoppelt. Aus dem dargestellten Alkohol **59** wurde letztlich mittels Swern-Oxidation der Markierungsvorläufer **MV2** in einer Ausbeute von 80 % synthetisiert.

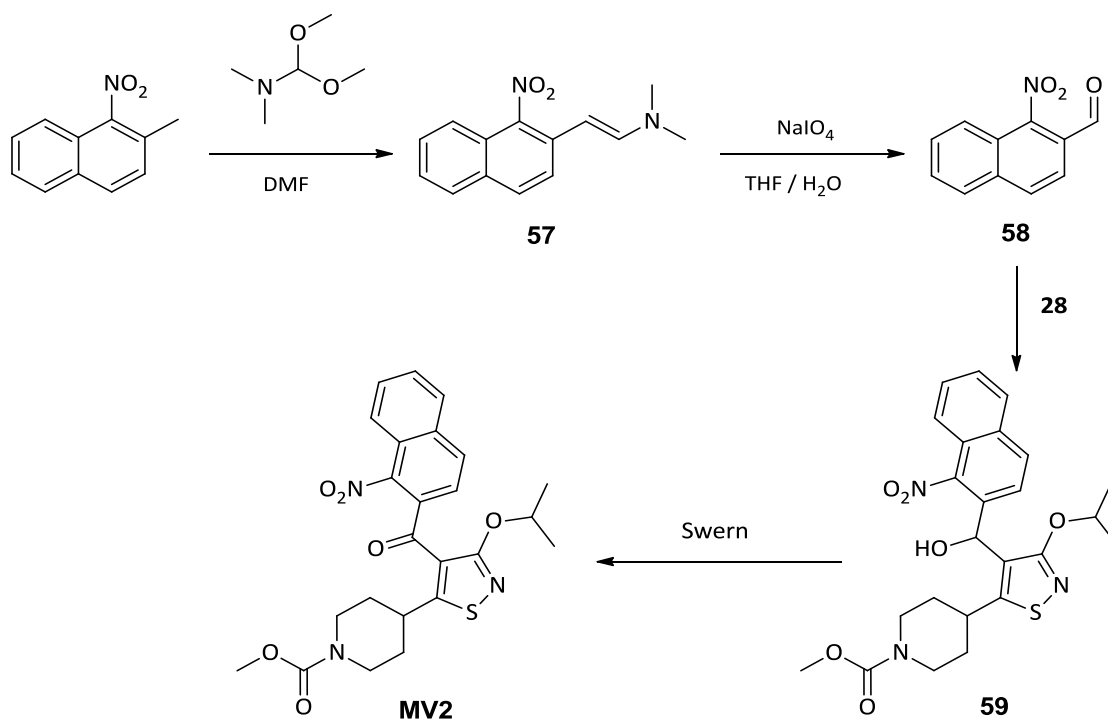


Abb. 44: Finale Synthese des Markierungsvorläufers **MV2**

3.2 In vitro-Evaluierung der Referenzverbindungen

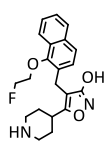
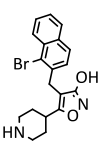
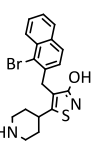
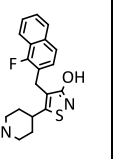
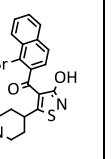
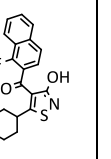
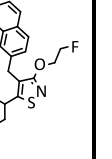
3.2.1 Bestimmung der Affinitäten zum GABA_A-Rezeptor

Eine hohe Affinität und Selektivität gegenüber dem biologischen Target ist eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung eines neuen Radioliganden. Dies gilt insbesondere für Radioliganden, die zur Bildgebung im zentralen Nervensystem eingesetzt werden sollen. Durch die Einführung der Fluorsubstituenten wurden die chemischen und biologischen Eigenschaften der von Krehan et al. und Frølund et al. veröffentlichten Liganden verändert. Aus diesem Grund mussten im Folgenden die Affinitäten der synthetisierten Referenzliganden an die GABA-Bindungsstelle des GABA_A-Rezeptors bestimmt werden.

Die Evaluierungen dazu wurden in Kooperation mit der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsmedizin Mainz von Frau Vanessa Bockhart aus dem Arbeitskreis von Prof. Hartmut Lüddens durchgeführt.

Zunächst wurden die Affinitäten der Referenzverbindungen in Kompetitionsstudien mit dem tritiierten, kompetitiven Agonisten [³H]Muscimol an präparierten Membranen aus Cortex und Cerebellum der Ratte bestimmt. Unter Verwendung der Graphpad Prism Software wurde aus den Messwerten eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt und die entsprechenden IC₅₀-Werte anhand des Kurvenverlaufs berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt und wurden in nmol/L (nM) angegeben.

Tab. 3: IC₅₀-Werte (nM) der Referenzverbindungen durch Competition an Membranpräparationen.

Struktur							
Ligand	VK1	VK2	VK4	VK5	VK6	VK7	VK10
Cortex	2144 ± 1	299 ± 1	10 ± 1	10 ± 1	26 ± 1	917 ± 1	6338 ± 2
Cerebellum	11843 ± 35	3028 ± 1	38 ± 1	30	195 ± 1	2521 ± 1	4507

Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass die beiden fluorethyl-substituierten Liganden **VK1** und **VK10** nur eine sehr geringe Affinität aufweisen, die im niedrigen mikromolaren Bereich liegt. Im Vergleich dazu besitzen die Isothiazole **VK4**, **VK5** und **VK6** eine sehr hohe Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich. Die beiden Referenzverbindungen **VK2** und **VK7** können als mittelaaffine Liganden aufgefasst

werden. Da die Affinität von **VK7** jedoch im hohen zweistelligen Bereich liegt, kann ein Einsatz dieser Verbindungen als Radioligand ausgeschlossen werden. Für die genaue Betrachtung der Affinitäten werden im folgenden Abschnitt die Affinitäten zu den Membranpräparaten aus dem Cortex zugrunde gelegt.

Die Bindungsverhältnisse für einige 4-naphthylmethyl-substituierte Isoxazole und Isothiazole wurden bereits durch Arbeiten von Krogsgaard-Larsen et al. beschrieben. Dabei wird davon ausgegangen, dass der lipophile Naphthylrest in einer hydrophoben Bindungstasche bindet, die von den im GABA_A-Rezeptor enthaltenen α - und β -Untereinheiten gebildet wird. Dabei begrenzt die räumliche Ausdehnung der Bindungstasche die Substituenten, welche in den Naphthylring eingeführt werden können^{[62] [71]}. Für die Liganden der Isoxazolreihe wurde gezeigt, dass in Position 1 am Naphthalinring eine Phenyl- (21 nM), eine Methylthiol- (28 nM), eine Cyanogruppe (28 nM) sowie ein Bromsubstituent (10 nM) unter Erhalt der Affinität toleriert wird^[65]. Daher wurde davon ausgegangen, dass der Ligand **VK1** vergleichbar gute Affinitäten besitzen sollte. Da dies jedoch nicht der Fall ist, muss davon ausgegangen werden, dass der Raumbedarf der Fluorethylgruppe zu groß ist.

Die sehr niedrigen Affinitäten der Referenzverbindung **VK10** waren hingegen nicht besonders überraschend. Vorangegangenen Arbeiten von Jansen et al. konnte entnommen werden, dass durch O-Alkylierung strukturell ähnlicher Derivate die Affinität sehr stark abnimmt^[72]. Dies kann möglicherweise durch die Annahme erklärt werden, dass der aromatische Alkoholrest in räumlicher Nähe zu einem Argininrest bindet und zu diesem eine starke Wasserstoff-Brückenbindung ausbildet. Wird in dieser Position ein Alkylrest eingeführt, geht diese attraktive Wechselwirkung verloren.

Der Ligand **VK4** wurde in der Literatur bereits mit sehr guten Affinitäten ($K_i = 2$ nM) beschrieben, welche in diesem Bindungsassay bestätigt werden konnten^[64] ($IC_{50} = 10$ nM). Im Bereich der Methylenbrücke von **VK4** wurde eine Ketogruppe eingeführt, wodurch der Ligand **VK6** ($IC_{50} = 26$ nM) erhalten wurde. Dadurch wurden auch der Bindungswinkel und die räumliche Anordnung der beiden aromatischen Ringe verändert, was jedoch nur einen sehr geringen Einfluss auf die Affinität hatte. Interessanter Weise trifft dies nicht auf die fluorsubstituierten Verbindungen **VK5** ($IC_{50} = 10$ nM) und **VK7** ($IC_{50} = 917$ nM) zu. Diese Beobachtung ist, wenn überhaupt, nur durch die geringe Elektronendichte des Naphthalinrings in **VK7** zu erklären. Durch π - π -Wechselwirkungen im Bereich der hydrophoben Bindungstasche können elektronenreiche Aromaten wie der Naphthylring in **VK5** einen positiven Beitrag in Bezug auf die Affinität bewirken. Bei dem fluorsubstituierten Liganden sind diese aufgrund der hohen Elektronegativität des Fluors geringer.

Vergleicht man für Ligand **VK4** die Affinitäten für Cortex und Cerebellum, so fällt auf, dass diese in der gleichen Größenordnung liegen, was für die übrigen Referenzverbindungen nicht der Fall ist. Im Cerebellum liegen überwiegend GABA_A-Rezeptoren vor, die eine α_4 oder α_6 -Untereinheit enthalten, welche oft in Kombination mit einer δ -Untereinheit vorliegen. Aufgrund des unterschiedlichen

Bindungsverhaltens im Bereich des Cerebellums wurden in weiteren Evaluierungen die Affinitäten gegenüber einzelnen Rezeptorsubtypen bestimmt. Dazu wurden zunächst verschiedene α -Untereinheiten in Kombination mit $\beta_3\gamma_2$ exprimiert und untersucht (siehe Tab. 4).

Tab. 4: IC₅₀-Werte (nM) an GABA_A-Rezeptoren mit verschiedenen α -Untereinheiten

Ligand	$\alpha_1\beta_3\gamma_2$	$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	$\alpha_4\beta_3\gamma_2$	$\alpha_5\beta_3\gamma_2$	$\alpha_6\beta_3\gamma_2$
VK1	583 ± 3	100 ± 5	34 ± 4	467 ± 1	4078 ± 2	5812 ± 1
VK2	13 ± 1	25 ± 1	77 ± 1	15 ± 1	33 ± 1	103 ± 1
VK4	2 ± 1	6	7 ± 1	1 ± 1	4 ± 1	3 ± 1
VK5	97	40	28	3,5 ± 1	1,2 ± 1	7,3
VK6	2 ± 1	12 ± 1	19 ± 2	2 ± 1	4 ± 1	23 ± 2
VK7	95 ± 2	±	383 ± 3	58 ± 1	251 ± 2	413 ± 2
VK10	/	/	/	/	/	/

In Tabelle 4 sind die Affinitäten der Referenzliganden als IC₅₀-Werte in nmol/L (nM) angegeben. Im Wesentlichen konnten dabei die Affinitäten aus den Kompetitionsstudien an Membranen bestätigt werden. Die Affinitäten aus den Bindungsstudien an transformierten Zellen waren dabei jedoch um den Faktor 2-5 besser. Für die meisten Liganden lagen die Affinitäten zu den einzelnen Subtypen in der gleichen Größenordnung. Lediglich für die Liganden **VK2** und **VK6** wurde eine geringere Affinität gegenüber den Rezeptorkombinationen $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ und $\alpha_6\beta_3\gamma_2$ gemessen.

Wie zuvor erwähnt, sind im Cerebellum besonders viele δ -enthaltende Rezeptoren vorhanden. Daher sollte zuletzt noch der Einfluss dieser Untereinheit bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden jeweils die Affinitäten von **VK2** und **VK4** an die Rezeptorkombination $\alpha_4\beta_3$ und $\alpha_6\beta_3$ sowohl mit als auch ohne δ -Untereinheit bestimmt (siehe Tab. 5).

Tab. 5: IC₅₀-Werte (nM) an GABA_A-Rezeptoren mit und ohne δ -Untereinheiten

Ligand	$\alpha_4\beta_3$	$\alpha_4\beta_3\delta$	$\alpha_6\beta_3$	$\alpha_6\beta_3\delta$
VK2	155	139 ± 1	214 ± 1	1510 ± 1
VK4	3 ± 1	4 ± 1	10 ± 1	10 ± 1

Vergleicht man die Ergebnisse für das Isoxazol **VK2** und das Isothiazol **VK4**, lässt sich ein deutlicher Unterschied in dem Bindungsverhalten dieser Liganden erkennen. Das Oxazol **VK2** weist nur eine sehr geringe Affinität (1510 nM) gegenüber dem Rezeptorsubtyp $\alpha_6\beta_3\delta$ auf. Im Vergleich dazu weist **VK2** eine 8-200 mal höhere Affinität an alle anderen Subtypen (vergleiche Tabellen 4 und 5). Da δ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren im ZNS fast ausschließlich in Kombination mit $\alpha_6\beta_3$ gebildet werden, kann der Ligand **VK2** als γ -selektiv bezeichnet werden^[44]. Das Isothiazol **VK4** besitzt hingegen keine dementsprechende Selektivität. Sollte dies einen generellen Trend für die Unterschiede zwischen Isoxazolen und Isothiazolen darstellen, ergäbe sich daraus eine interessante Fragestellung zur Bildung dieser Rezeptorsubtypen.

Für die Auswahl eines geeigneten Radioliganden zur Bildgebung mittels PET sollte seine Affinität mindestens im niedrigen nanomolaren Bereich liegen, je nach Verbreitung des Targets. Da der GABA_A-Rezeptor an ca. 30 – 40 % aller Synapsen beteiligt ist und ubiquitär im ZNS vorkommt, stehen dem Liganden sehr viele Bindungsstellen zur Verfügung. Unter dieser Voraussetzung kann hier eventuell eine etwas geringere Affinität in Kauf genommen werden. Von den dargestellten, fluorierten Liganden eignet sich in Bezug auf die Affinität jedoch lediglich **VK5** als Radioligand für die PET.

3.2.2 Bestimmung der Lipophilie

Eine weitere Grundvoraussetzung für den Einsatz eines Radioliganden zur bildgebenden Diagnostik im zentralen Nervensystem ist, neben seiner Affinität zum Rezeptor, seine Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke (BBB) zu überwinden. Diese stellt eine Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem zentralen Nervensystem dar und dient diesem so als Schutzmechanismus. Grob betrachtet besteht sie aus über „tight junctions“ miteinander verbundenen Epithelzellen, welche sowohl Transportproteine für die Aufnahme und Ausscheidung als auch Enzyme für den Abbau kleiner organischer Moleküle enthalten. So können einerseits stoffwechselrelevante Moleküle wie Kohlenhydrate, Aminosäuren usw. aufgenommen als auch schädliche Verbindungen und Arzneistoffe ausgeschieden werden. Für die Passage der BBB bestehen für Radiopharmaka prinzipiell zwei Möglichkeiten. Entweder werden sie aktiv über Transportproteine transportiert (z.B.: 6-^[18]F-F-DOPA) oder sie sind in der Lage, durch passive Diffusion die BBB zu überwinden^[73].

Da die meisten Arzneistoffe jedoch nicht aktiv transportiert werden können, müssen diese durch Diffusion in das ZNS gelangen, was eine ausreichende Lipophilie voraussetzt. Aus diesem Grund wird die Lipophilie für neue Liganden des ZNS vorab als Maß für ihre Hirngängigkeit bestimmt. Experimentell wird dazu der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten D des Liganden zwischen Octanol und Wasser bei physiologischem pH-Wert (pH = 7,4) bestimmt.

$$\text{Log D} = \log \left(\frac{[\text{Ligand}]_{\text{Octanol}}}{[\text{Ligand}]_{\text{Wasser}}} \right)$$

Sehr polare, hydrophile Substanzen ($\text{Log D} = -1$ bis 1) sollten demnach nicht in der Lage sein, die BBB zu überwinden, jedoch auch zu hohe Lipophilien ($\text{Log D} > 5$) können nachteilig sein, da sie oft zu einer hohen unspezifischen Bindung an Plasmaproteinen führen. Als grober Richtwert sollte der Log D-Wert für eine ausreichende Passage der BBB ungefähr zwischen 2 und 3 liegen^[74].

Für die Bestimmung des Log D-Wertes gibt es verschiedene Methoden, von denen die Extraktion mit Octanol / Wasser sicher die verlässlichsten Werte liefert. Da die meisten Referenzliganden jedoch nur inaktiv synthetisiert wurden, konnte die Extraktion in diesem Falle nicht verwendet werden. Alternativ wurde hier zur Bestimmung der Lipophilie auf ein HPLC-Verfahren zurückgegriffen. Die hierbei bestimmte Größe ist der Kapazitätsfaktor k , welcher sich proportional zur Lipophilie verhält und sich aus den Retentionszeiten wie folgt ergibt:

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

Dabei bezeichnet t_R die Retentionszeit der zu untersuchenden Substanz und t_0 die Totzeit, welche über die Retentionszeit von Ascorbinsäure ermittelt wurde. Zunächst wurden die Retentionszeiten von Eichsubstanzen mit bekanntem Log D-Wert bestimmt und daraus die entsprechenden Log k -Werte berechnet (für die einzelnen Retentionszeiten und Log k -Werte siehe auch Kapitel 4.3.2). Durch graphische Auftragung von Log D gegen Log k wurde eine Eichgrade bestimmt, mit der die Lipophilien der Referenzverbindung aus deren Retentionszeit errechnet wurden (siehe Abb. 45).

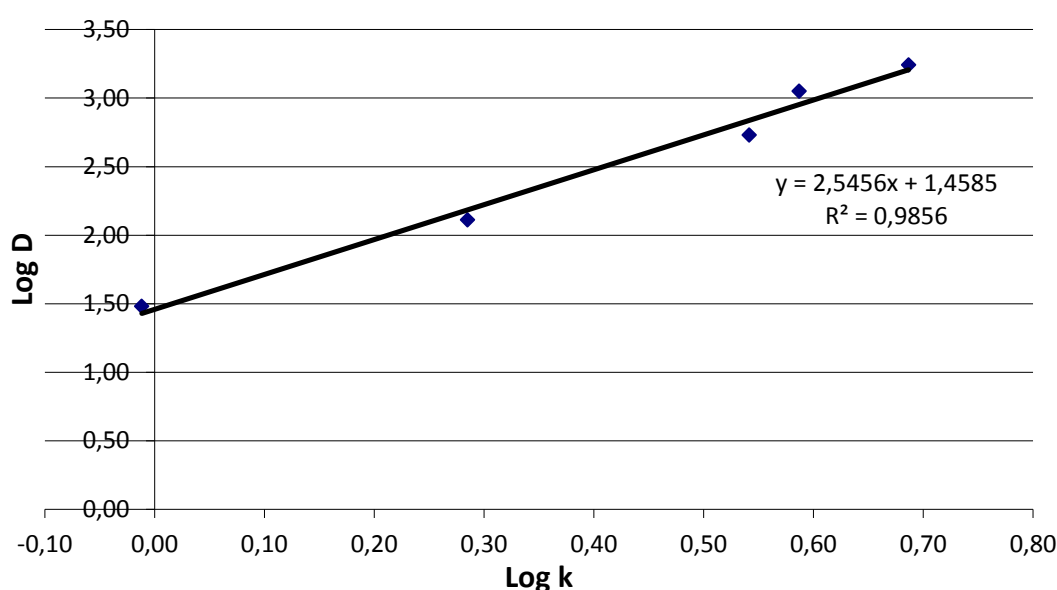


Abb. 45: Regressionsgerade zur Lipophiliebestimmung

Die auf diesem Wege bestimmten Log D-Werte für die synthetisierten Referenzverbindungen reichen von 0,7 bis 2,4 und sind in Abbildung 46 dargestellt. Alle Verbindungen besitzen in ihrer Struktur einen sehr unpolaren, lipophilen Naphthylrest, der, je nach Substituent, einen positiven Beitrag zur Lipophilie leistet. Der aromatische Alkohol der Oxazole und Thiazole sowie das sekundäre Amin im Piperidinring stellen recht polare, hydrophile Gruppen dar, was wiederum einen negativen Beitrag im Hinblick auf die Log D-Werte liefert. Generell lassen sich jedoch einige Trends erkennen.

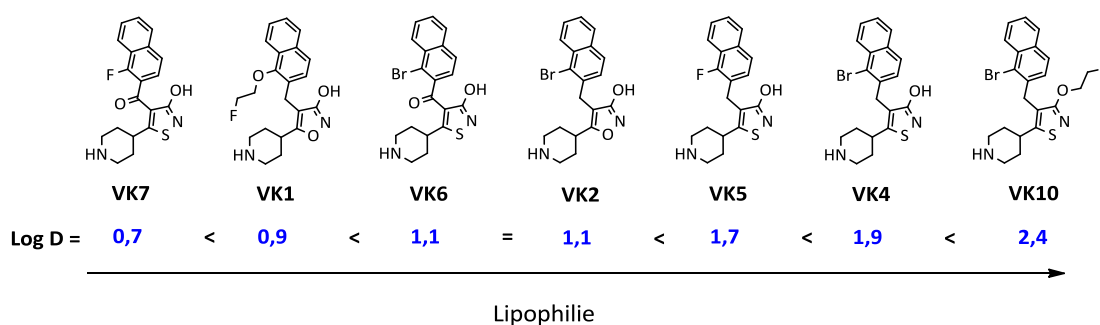


Abb. 46: Lipophilien der synthetisierten Referenzverbindungen

- 1) Die schwefelsubstituierten Isothiazole sind lipophiler als die entsprechenden Oxazole (Vergleiche Isoxazol **VK2** und Isothiazol **VK4**)
- 2) Die Alkylverbindungen sind lipophiler als die entsprechenden Ketone. Vergleiche (**VK4**, **VK5**) und (**VK6**, **VK7**)
- 3) Die 1-Bromnaphthaline sind lipophiler als die 1-Fluornaphthaline. Vergleiche (**VK4**, **VK6**) und (**VK5**, **VK7**)
- 4) Durch N-Alkylierung des aromatischen Alkohols werden Liganden mit einer höheren Lipophilie erhalten. Vergleiche (**VK4** und **VK10**)

Diesen Ergebnissen ist zu entnehmen, dass die beiden Referenzverbindungen **VK5** und **VK10** hinsichtlich ihrer lipophilen Eigenschaften am ehesten in der Lage sein sollten, die BBB zu überwinden. Die entsprechenden Log D-Werte liegen jedoch deutlich unter dem optimalen Bereich zwischen 2 und 3, was unter Umständen eine unzureichende Aufnahme in das ZNS zur Folge haben könnte.

3.3 Radioaktive Markierungen

Anhand der Ergebnisse der *in vitro*-Evaluierungen bezüglich Affinität und Lipophilie wurden die Referenzverbindungen **VK5** und **VK10** für die Markierung mit ^{18}F und nachfolgende Evaluierungen ausgewählt.

3.3.1 Radiosynthese von [^{18}F]VK10

Die Referenzverbindung **VK10** zeigte in den *in vitro*-Evaluierungen nur eine geringe Affinität zu dem GABA_A-Rezeptor ($\text{IC}_{50} = 6 \mu\text{M}$), sollte jedoch aufgrund der verhältnismäßig guten lipophilen Eigenschaften ($\text{Log } D = 2,4$) am ehesten in der Lage sein, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Darüber hinaus sollte sich die Synthese des radioaktiv markierten Liganden [^{18}F]VK10 durch die [^{18}F]Fluorethylierung der Referenzverbindung **VK4** erreichen lassen. Daher sollte [^{18}F]VK10 durch eine zweistufige Radiosynthese synthetisiert und die Reaktionsparameter für die [^{18}F]Fluorethylierung optimiert werden (siehe Abb. 47). Anschließend sollte ein geeignetes Verfahren für die Abtrennung und die Qualitätskontrolle etabliert werden, um den Radioligand für zukünftige Evaluierungen darstellen zu können.

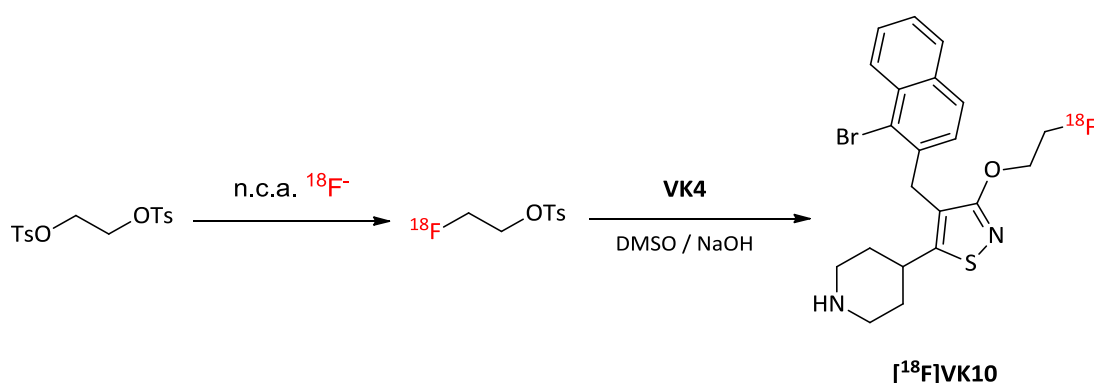


Abb. 47: Synthese von [^{18}F]VK10

3.3.1.1 Synthese von [^{18}F]Fluorethyltosylat

Für die Radiosynthese von [^{18}F]VK10 musste zunächst das Markierungssynthon [^{18}F]Fluorethyltosylat ([^{18}F]FETos) synthetisiert werden. Da [^{18}F]FETos routinemäßig für viele Radiosynthesen verwendet wird und die Synthese in hohem Maße reproduzierbar ist, wurde hierzu ein vollautomatisiertes Synthesemodul verwendet^[34]. Dadurch wurde die Radiosynthese enorm vereinfacht und darüber hinaus die Strahlenbelastung deutlich verringert. Die einzelnen Schritte der Synthese (Trocknung des Fluorids, Reaktion, Aufreinigung) sind im Programmablauf festgelegt und werden in Kapitel 4.4.2

genauer beschrieben. [^{18}F]FETos wurde durch eine n.c.a. nukleophile Substitution von Ethylen-1,2-ditosylat mit [^{18}F]F $^-$ in einer radiochemischen Ausbeute von 56 % (EOS, n = 7) und nach einer Synthesezeit von 57 min. (n = 7) erhalten (siehe Abb. 48).

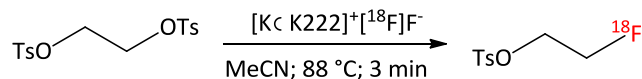


Abb. 48: Radiosynthese von [^{18}F]FETos

3.3.1.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Fluorethylierung

Die Synthese von [^{18}F]VK10 sollte anschließend durch [^{18}F]Fluorethylierung der Referenzverbindung **VK4** mit dem zuvor dargestellten [^{18}F]FETos erreicht werden. In der Struktur von **VK4** können sowohl der aromatische Alkohol als auch das sekundäre Amin als nukleophile Gruppe mit [^{18}F]FETos reagieren, was möglicherweise die Bildung des unerwünschten, N-alkylierten Nebenproduktes mit sich führt.

Daher wurde versucht, durch unterschiedliche Baseneinwaagen selektiv den Alkohol zu deprotonieren und so die Markierungsausbeute für das gewünschte, O-alkylierte Produkt zu erhöhen. Als Reaktionsbedingungen wurden zunächst Standardbedingungen für die Fluorethylierung mit [^{18}F]FETos gewählt (120 °C, DMSO, 7.5 μmol MV) und unterschiedliche Mengen an Base (NaOH) zugesetzt. Die Bestimmung der Reaktionsausbeute erfolgte durch die Analyse Reaktionslösung mittels Radio-DC. Das Produkt konnte dabei über den R_f -Wert ($R_f = 0,3$ in EtOAc/n-Hexan 1:1) nachgewiesen werden. Nicht umgesetztes Fluorid sowie die Zersetzungsprodukte blieben auf der Startlinie liegen ($R_f = 0$). Die N-alkylierte Verbindung konnte ebenfalls über den R_f -Wert ($R_f = 0,7$) nachgewiesen werden. In Abbildung 49 wurde die radiochemische Ausbeute (RCA) für die Bildung des Produktes [^{18}F]VK10 graphisch gegen die Reaktionszeit aufgetragen.

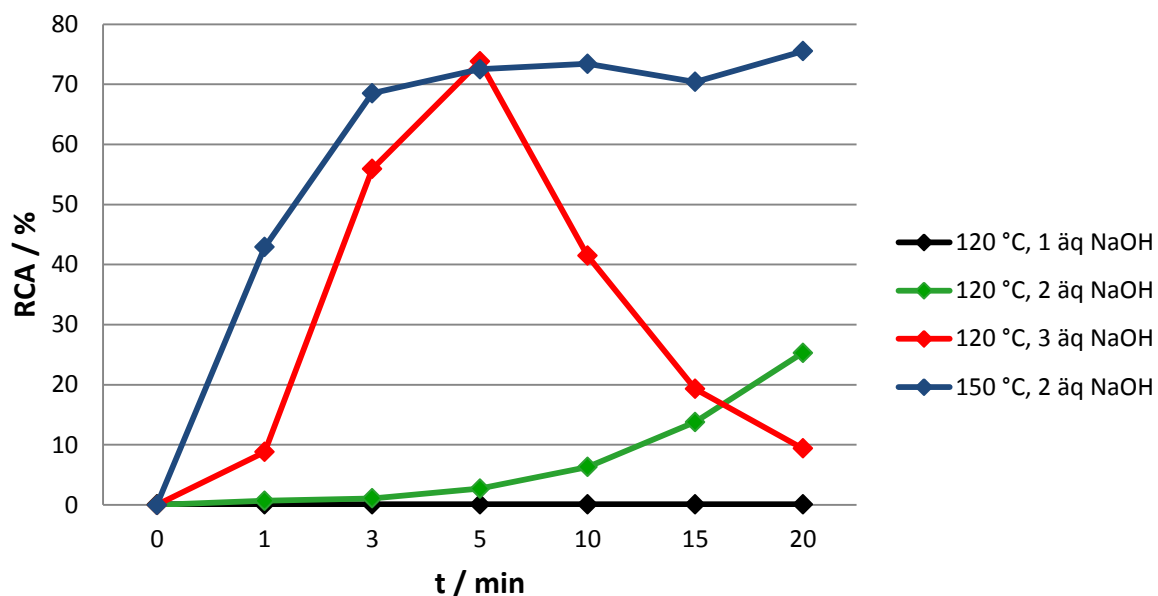


Abb. 49: Reaktionskinetik der Synthese von [^{18}F]VK10

Unter Verwendung von 1 Äquivalent (äq) NaOH konnte nur die Bildung geringer Mengen des N-alkylierten Nebenproduktes nachgewiesen werden. Wurden 2 äq NaOH zugesetzt, wurden die N- und O-alkylierte Verbindung in gleichem Maße gebildet. Erst durch den Zusatz von 3 äq NaOH konnte die RCA für [^{18}F]VK10 erheblich gesteigert werden. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass in DMSO zunächst das protonierte Amin des Piperidinrings deprotoniert wird und erst im zweiten, darauf folgenden Schritt der aromatische Alkohol (siehe Abb. 50).

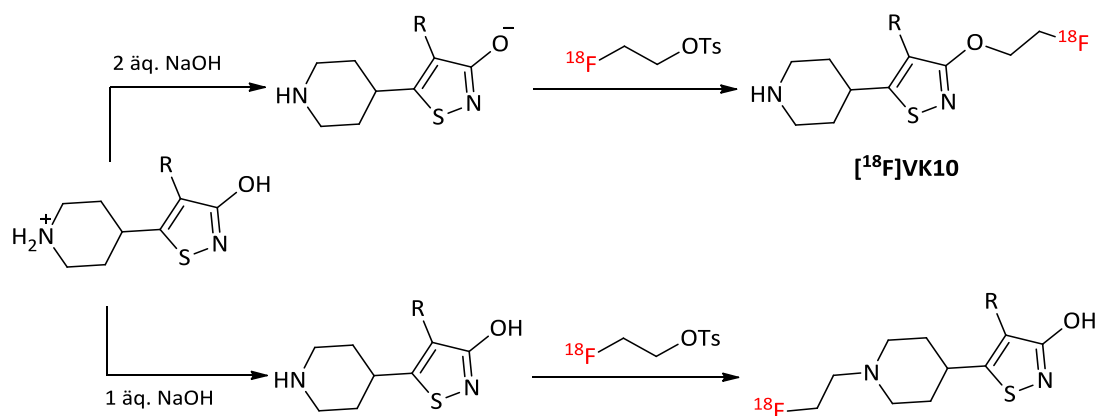


Abb. 50: Basenabhängigkeit der [^{18}F]Fluorethylierung von VK4

Die Verwendung von 3 äq NaOH führte jedoch nach kurzer Zeit zu Defluorierung des gebildeten Produktes, was durch die Abnahme der RCA und die Zunahme an gebildetem Fluorid beobachtet werden konnte. Daher wurde versucht, die RCA mit kleineren Mengen an Base durch höhere Temperaturen zu steigern. So konnten bei 150 °C mit 2 äq NaOH ebenfalls Reaktionsausbeuten von

72 % nach 5 Minuten erreicht werden. Darüber hinaus wurde bei diesen Bedingungen keine Zersetzung des radioaktiven Produktes mehr beobachtet.

3.3.1.3 Abtrennung und Qualitätskontrolle von [^{18}F]VK10

Für die Abtrennung der radioaktiv markierten Verbindung wurde [^{18}F]VK10 zunächst unter den optimierten Reaktionsbedingungen synthetisiert (DMSO, 150 °C, 7,5 μmol VK4, 2 äq NaOH, 5 min). Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Reaktionsgemisch mit 1 mL Wasser gequencht und über ein semipräparatives HPLC-System (HPLC-System 1) getrennt. Als stationäre Phase wurde dabei eine Säule der Firma Phenomenex (Synergy Max-RP, 4 μm , 10 x 250 mm) und als mobile Phase 0,05 M Ammoniumformiat-Puffer/MeCN verwendet. Der verwendete Gradient und die Retentionszeiten sind in Kapitel 4.4.2.1 ausführlich beschrieben.

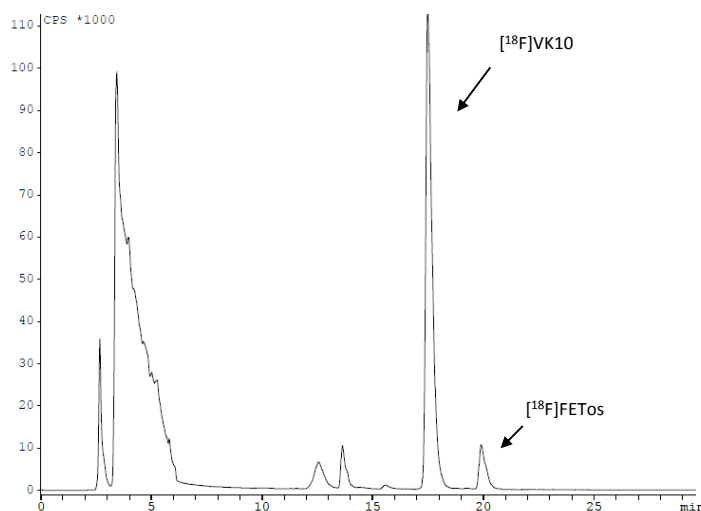


Abb. 51: Chromatogramm der semipräparativen Abtrennung von [^{18}F]VK10

Abbildung 51 zeigt das Radio- und UV-Chromatogramm der semipräparativen Trennung. Der Produktpeak (17,5 min.) wurde abgetrennt und im Verhältnis 1:4 mit Wasser verdünnt, um die Elutionskraft des Lösungsmittels zu reduzieren. Anschließend konnte [^{18}F]VK10 auf einer C18-Kartusche fixiert, mit 5 mL Wasser gewaschen und mit 2 mL Ethanol eluiert werden. Um das Produkt als injizierbare Lösung zu erhalten, wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 1 mL isotoner NaCl-Lösung aufgenommen. [^{18}F]VK10 konnte so in radiochemischen Ausbeuten von 19-26 % nach einer durchschnittlichen Synthesedauer von 51-65 Minuten erhalten werden ($n = 3$). Tabelle 6 zeigt eine typische Aktivitätsbilanz der Radiosynthese von [^{18}F]VK10.

Tab. 6: Aktivitätsbilanz der Synthese von [^{18}F]VK10

Messung	Zeit / min	Aktivität / MBq	RCA / % (EOS)
Synthesebeginn	0	80,5	100,0
Spritze vor HPLC	9	65,3	85,9
Spritze leer	13	2,8	3,8
Reaktionsvial leer	14	1,66	2,3
Produktpeak	33	28,7	43,9
Produkt auf C18	46	18,7	31,0
Durchbruch C18	47	7,2	12,0
Produkt eluiert	49	17,7	29,9
Produkt in NaCl-Lsg.	61	14,1	25,7

Um die chemische und radiochemische Reinheit von [^{18}F]VK10 zu bestimmen, wurde eine Probe von der Produktlösung in ein analytisches HPLC-System (HPLC-System 2) injiziert. Die Bestimmung der radiochemischen Reinheit erfolgte anschließend über die Integration der Radiopeaks im Chromatogramm.

Für die Bestimmung der Stoffmenge des gelösten Radioliganden wurde zuvor eine Eichgerade erstellt. Dazu wurden definierte Mengen des inaktiven Radioliganden in das HPLC-System injiziert und die Peakflächen im UV-Chromatogramm integriert. Durch graphische Auftragung der Stoffmengen gegen die Peakflächen wurde eine Regressionsgerade erhalten, mit der anschließend die Stoffmenge des Radioliganden berechnet wurde (siehe Abb. 52). Die Aktivität des Radioliganden wurde durch die gelöste Stoffmenge geteilt, um die spezifische Aktivität in GBq/ μmol zu erhalten. Diese lag für [^{18}F]VK10 im Bereich von 3,2-5,6 GBq/ μmol und die radiochemische Reinheit betrug > 96 % (n = 3).

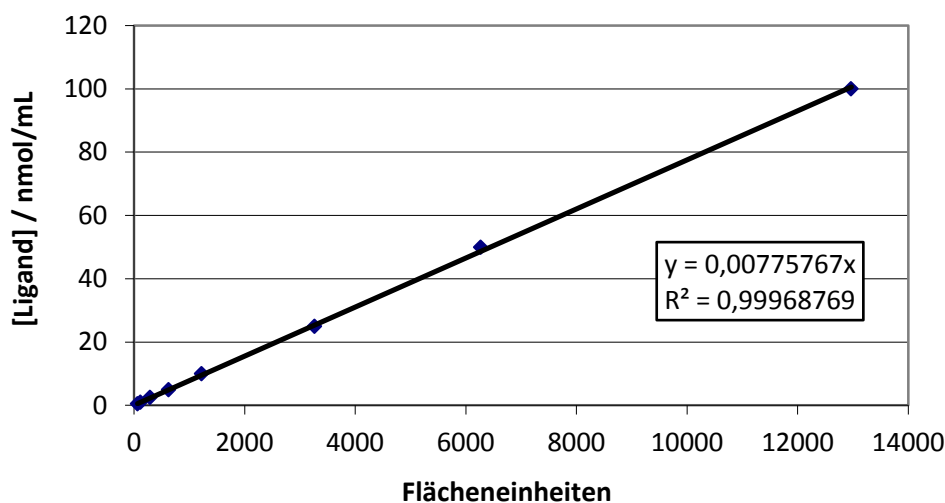


Abb. 52: Eichgerade zur Bestimmung der Stoffmenge von [^{18}F]VK10

3.3.2 Radiosynthese von [^{18}F]VK5

Die Referenzverbindung **VK5** zeigte in den *in vitro*-Evaluierungen von den Fluor-enthaltenden Liganden die besten Affinitäten für die Entwicklung eines PET-Tracers und sollte daher für *in vivo*-Evaluierungen mit ^{18}F markiert werden.

Die Synthese der Verbindung [^{18}F]VK5 stellte jedoch anhand ihrer Struktur eine enorme Herausforderung an die Radiochemie dar. Aufgrund der biologischen Fragestellung und dem geplanten Einsatz als Neurotracer musste hier auf eine n.c.a. nukleophile, aromatische Substitution zurückgegriffen werden, um den Radioligand mit hohen spezifischen Aktivitäten synthetisieren zu können.

Für die Einführung des [^{18}F]F $^-$ ergaben sich in diesem Fall drei verschiedene Möglichkeiten:

- Aktivierung des Aromaten durch eine Formylgruppe in para-Position zur Abgangsgruppe und anschließende Decarbonylierung
- Markierung über ein Iodonium-Salz
- Aktivierung über eine Ketogruppe in ortho-Stellung und anschließende Reduktion

Von diesen Möglichkeiten wurde die Synthesestrategie über eine Ketogruppe in ortho-Stellung aus zweierlei Gründen weiter verfolgt. Erstens konnte der Markierungsvorläufer 4-((1-Nitro-2-naphthoyl)-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-piperidin-4-yl)-isothiazol **MV1** auf einfache Weise analog zu den Referenzverbindungen synthetisiert werden. Zweitens wurde eine Reduktion mit Triethylsilan-TFA von strukturell ähnlichen Verbindungen bereits mit hohen Ausbeuten und kurzen Reaktionszeiten durchgeführt. Des Weiteren sprachen die meist sehr hohen Reaktionstemperaturen ($> 150\text{ }^{\circ}\text{C}$) der Decarbonylierungsreaktionen sowie der erheblich größere präparative Aufwand für die Synthese eines Iodonium-Salzes gegen die beiden anderen Alternativen.

Die auf diesem Wege durchgeführte Radiosynthese von [^{18}F]**VK5** gliedert sich in drei Teilbereiche, welche im folgenden Abschnitt getrennt voneinander diskutiert werden (siehe Abb. 53).

- 1) Synthese von [^{18}F]**39** durch n.c.a. $\text{N}_{\text{Ar}}\text{S}$
- 2) Reduktion von [^{18}F]**39** mit TES-TFA
- 3) Entschützung von [^{18}F]**37** mit BCl_3

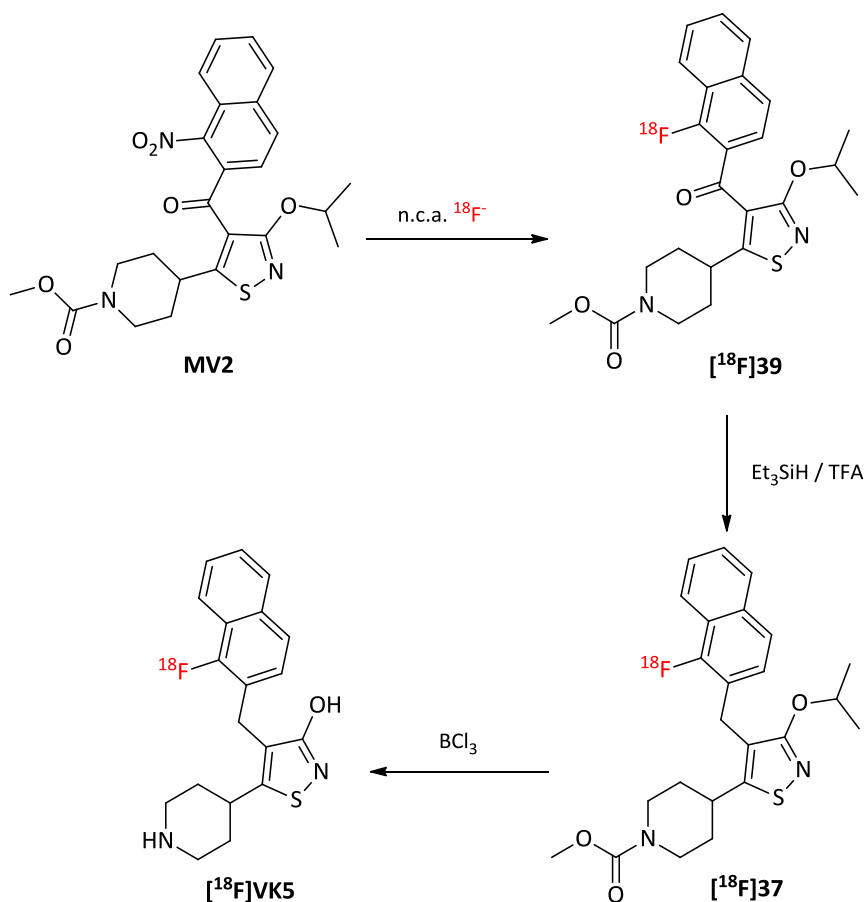


Abb. 53: Reaktionsschema der Radiosynthese von [^{18}F]**VK5**

3.3.2.1 Synthese von [^{18}F]39

Wie aus der Literatur hervorgeht, muss bei n.c.a. nukleophilen, aromatischen Substitutionen der Markierungsvorläufer oft in hohen Konzentrationen eingesetzt werden^[75]. Um den Verbrauch des Markierungsvorläufers **MV2** in Grenzen zu halten, wurde [^{18}F]39 zunächst in Vorversuchen über die [^{18}F]Fluorierung der inaktiven Referenzverbindung **39** synthetisiert. Dies diente lediglich dem Zweck, vorab einige Reaktionsparameter zu optimieren. Dazu wurde der Markierungsvorläufer **39** in einer Konzentration von 56 $\mu\text{mol/mL}$ ($\approx 12,5$ mg in 500 μL) mit verschiedenen Basenkonzentrationen für die Markierung mit [^{18}F]F $^-$ eingesetzt (siehe Abb. 54).

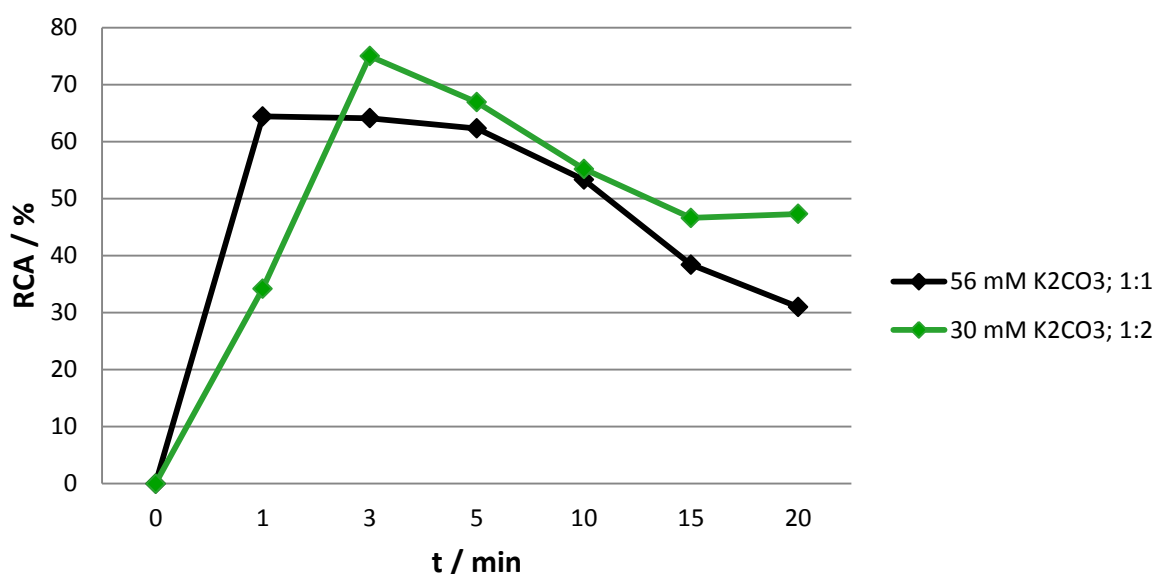


Abb. 54: Synthese von [^{18}F]39 über $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$ -Austausch: DMSO, 150 °C

Wie in Abbildung 50 zu erkennen ist, wurden bereits nach sehr kurzen Reaktionszeiten (3 Minuten) sehr hohe Ausbeuten (RCA: 65-75 %) erreicht. Dabei zeigte die Konzentration der eingesetzten Base keinen wesentlichen Einfluss auf die RCA. Nach dem Erreichen der maximalen RCA konnte jedoch eine Zersetzung des radioaktiven Liganden [^{18}F]39 beobachtet werden. Hierbei wurde ein sehr polares Nebenprodukt gebildet, was sehr wahrscheinlich auf die Abspaltung der Methoxycarbonyl-Schutzgruppe zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse sollten im Folgenden auf die Markierung des entsprechenden Nitro-Markierungsvorläufers **MV2** übertragen werden (siehe Abb. 55).

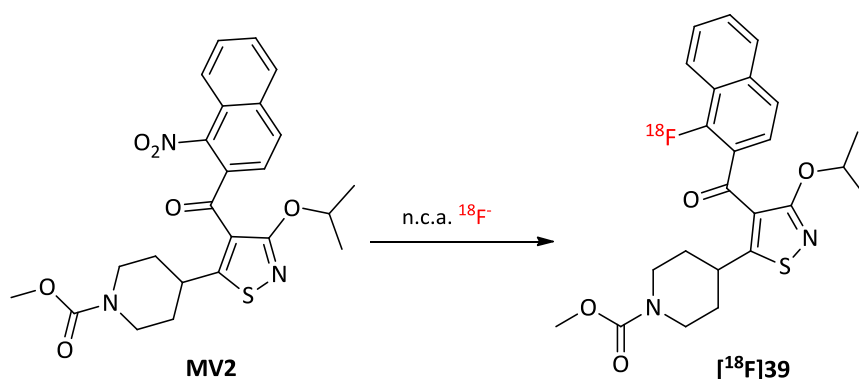


Abb. 55: Radiosynthese von [¹⁸F]39 durch Markierung des Nitro-Markierungsvorläufers MV2

Um auch in diesem Fall den Einfluss der Basenkonzentration zu untersuchen, wurde **MV2** (50 µmol/mL) mit jeweils 0,5 und 1 Äquivalent K₂CO₃/Kryptofix (25 bzw. 50 µmol/mL) in DMSO bei 130 °C mit [¹⁸F]F⁻ umgesetzt. Interessanterweise wurden in diesem Fall höhere Reaktionsausbeuten durch eine größere Baseneinwaage erreicht (siehe Abb. 56). Die Reaktionsausbeute für den Nitro-Fluor-Austausch lag jedoch in allen Fällen deutlich unter den für den Fluor-Fluor-Austausch erhaltenen Reaktionsausbeuten.

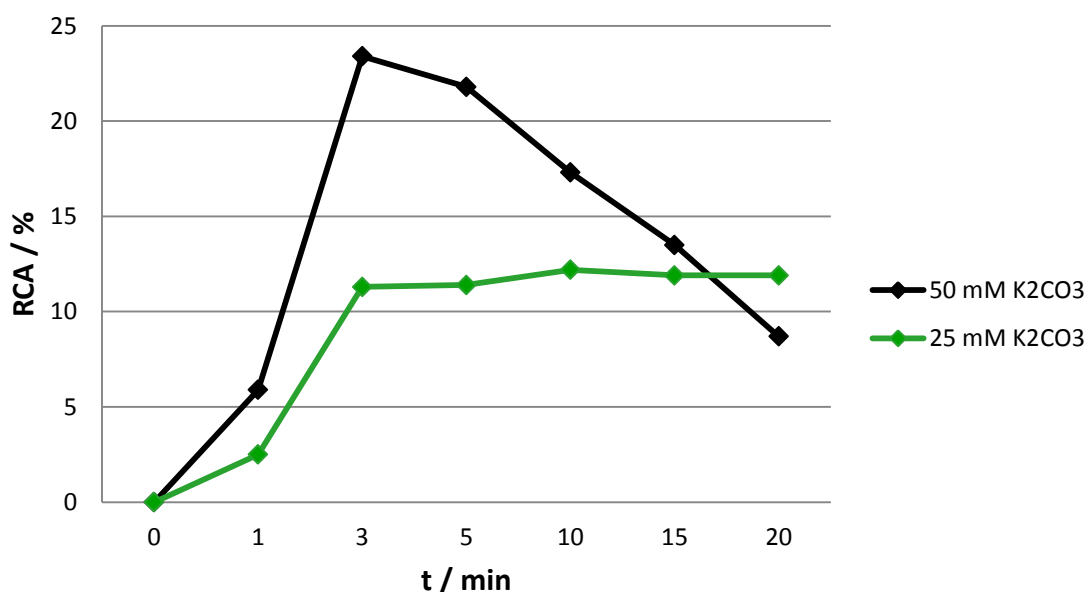


Abb. 56: Reaktionskinetik für die Synthese von [¹⁸F]39 in DMSO bei 130 °C

Um den Einfluss des Lösungsmittels und der Temperatur zu bestimmen, wurde die Radiosynthese von [¹⁸F]39 mit 1 Äquivalent Base bei verschiedenen Reaktionsbedingungen wiederholt. Daraus ging hervor, dass DMSO als Lösungsmittel im Vergleich zu DMF deutlich höhere Reaktionsausbeuten liefert. Darüber hinaus wurde bei höheren Temperaturen eine schnellere Zersetzung des gebildeten Produktes beobachtet (siehe Abb. 57).

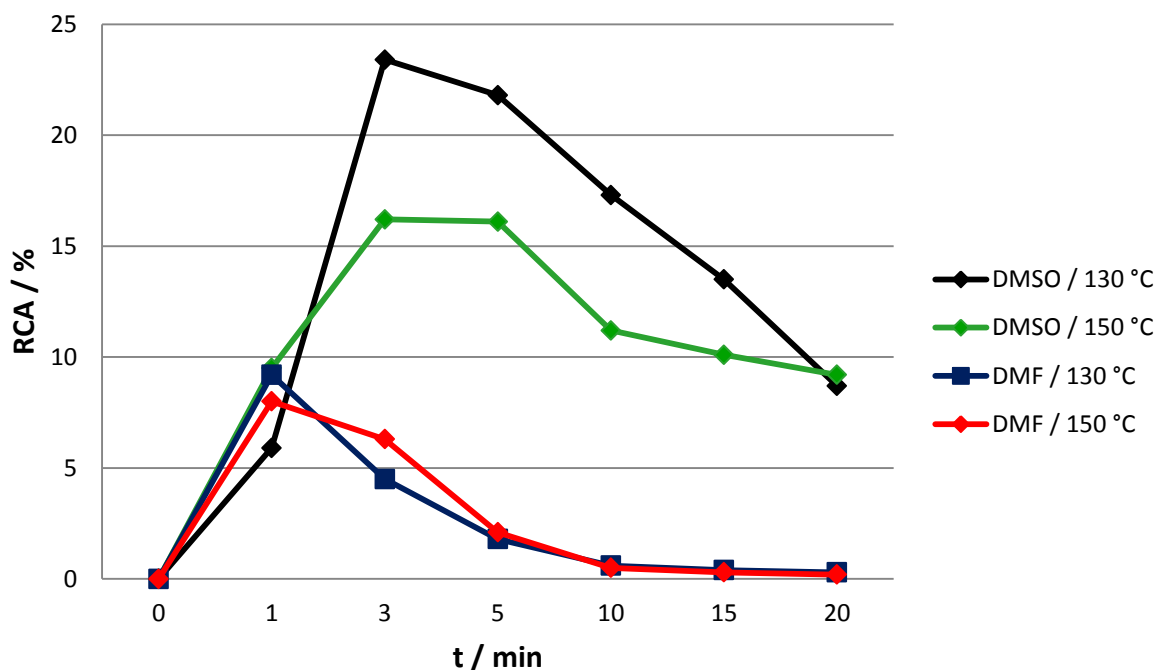


Abb. 57: Reaktionskinetik der Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\mathbf{39}$ (1 Äquivalent Base)

Unter den optimierten Reaktionsbedingungen konnte $[^{18}\text{F}]\mathbf{39}$ durch konventionelle Markierungsmethoden in einer Reaktionsausbeute von 24 % nach einer Reaktionszeit von 3 Minuten synthetisiert werden. Da sich an die Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\mathbf{39}$ noch zwei weitere Radiosynthesen anschließen, wurde versucht, die Reaktionsausbeute in einer mikrowellengestützten Synthese weiter zu verbessern. Bei den Markierungen in der Mikrowelle wurde zunächst DMF und DMSO als Lösungsmittel verwendet. Die Reaktionsausbeute lag dabei jedoch immer deutlich unter 5 %. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen Acetonitril als Lösungsmittel verwendet, da es bei Markierungen in der Mikrowelle auch deutlich über seinen Siedepunkt erhitzt werden kann. Bereits erste Markierungen in Acetonitril lieferten deutlich höhere Reaktionsausbeuten als die Markierungen in DMF und DMSO. Aus diesem Grund wurde die Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\mathbf{39}$ in der Mikrowelle hinsichtlich der Reaktionstemperatur und der Reaktionszeit für Acetonitril optimiert (siehe Abb. 58).

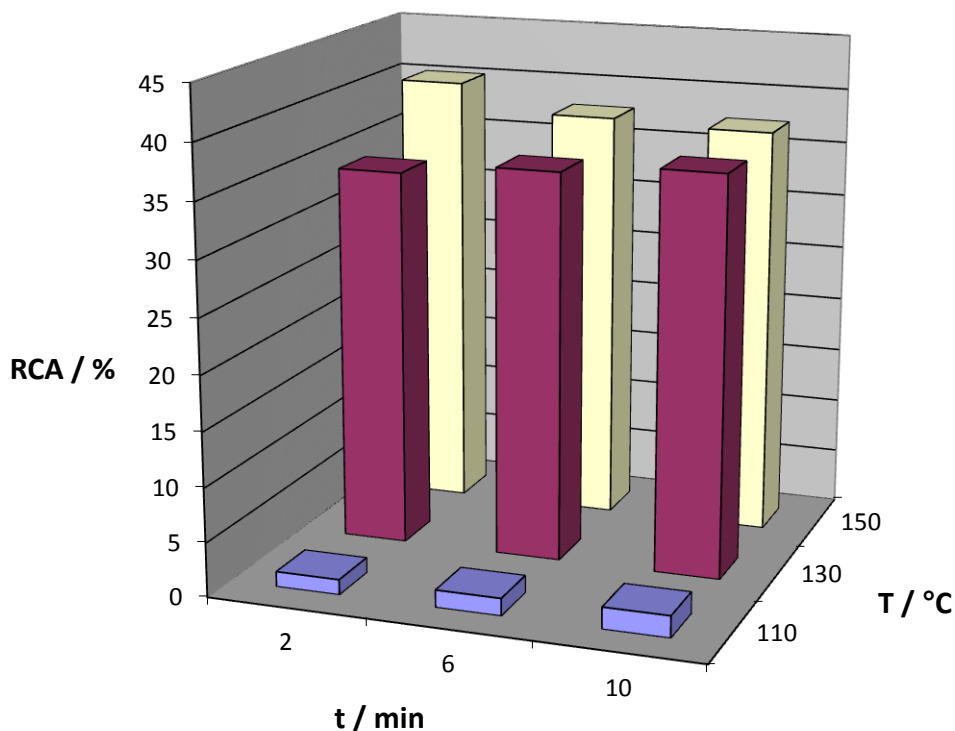


Abb. 58: Reaktionskinetik der mikrowellengestützten Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\mathbf{39}$

Wie Abbildung 54 deutlich erkennen lässt, ist die Reaktionsausbeute der Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\mathbf{39}$ in extremen Maße temperaturabhängig und erreicht mit 40 % ihr Maximum bei 150 °C nach 2 Minuten. Längere Reaktionszeiten erhöhten darüber hinaus nur im Falle niedriger Temperaturen die Ausbeute. Ein weiterer, wichtiger Vorteil der Radiosynthese in der Mikrowelle liegt in der deutlich geringeren Zersetzung des markierten Produkts. Sowohl mittels Radio-DC als auch durch Analyse der Reaktion mittels Radio-HPLC konnte nach längeren Reaktionszeiten nur eine geringe Zersetzung des Produkts beobachtet werden. Möglicherweise ist dieser Effekt auf die Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel zurückzuführen. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen (Reaktionsraum: 10 mL, Reaktionsvolumen: 400 μL , 150 °C, 8 bar) kann außerdem von einer Gasphasen-Reaktion ausgegangen werden, was ebenfalls einen positiven Einfluss auf die RCA und die Vermeidung von Nebenprodukten haben könnte.

3.3.2.2 Abtrennung von [^{18}F]39

Für die Abtrennung wurde [^{18}F]39 unter den optimierten Reaktionsbedingungen synthetisiert und mit 1,5 mL Wasser/MeCN 1:3 gequencht. Der hohe Anteil an Acetonitril war beim Quenchen der Reaktion besonders wichtig, da bei einem Anteil von unter 50 % der Markierungsvorläufer ausfällt.

Das Reaktionsgemisch wurde über ein semipräparatives HPLC-System (HPLC-System 1) isokratisch getrennt und der Produktpeak nach 14,5 min isoliert. Als stationäre Phase wurde dabei eine Säule der Firma CS-Chromatographie (Licrospher 100 RP-18, EC-5 μm , 10 x 250 mm) und als mobile Phase Wasser/MeCN (25:75) verwendet. Unter diesen Bedingungen konnte das Produkt sauber von dem Markierungsvorläufer und radioaktiven Nebenprodukten abgetrennt werden (siehe Abb. 59).

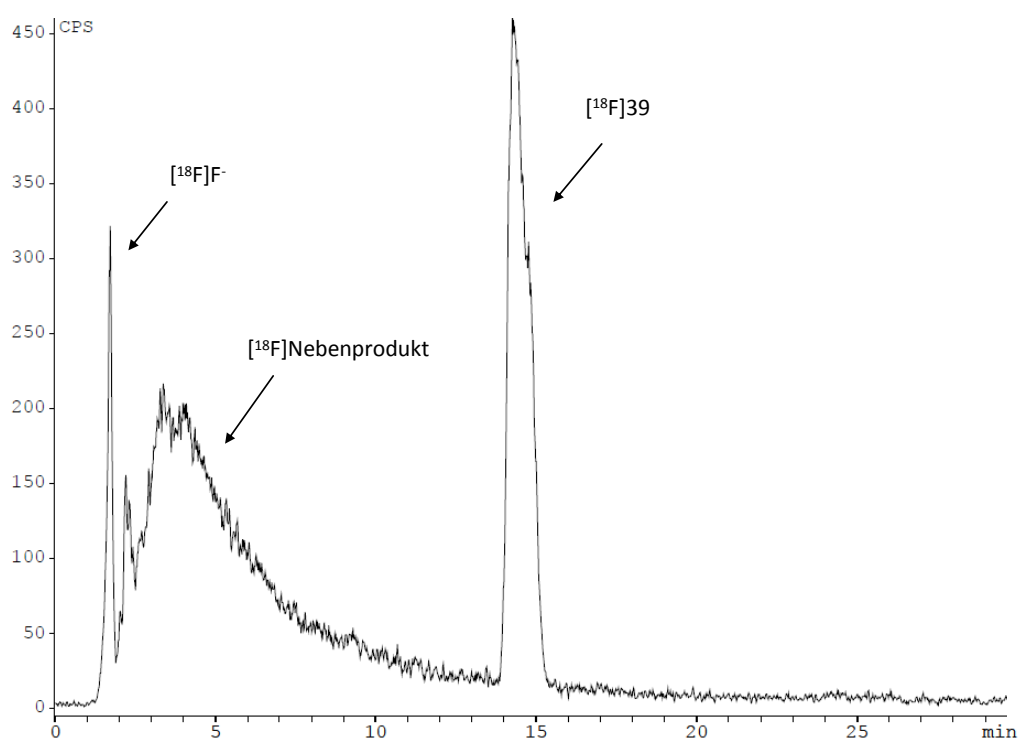


Abb. 59: Chromatogramm der semipräparativen Abtrennung von [^{18}F]39

Der Produktpeak wurde anschließend im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt, auf einer EN-Kartusche fixiert und im Heliumstrom getrocknet. Dieser Trocknungsschritt ist für die nachfolgende Reduktion sehr wichtig, da hierfür wasserfreie Reaktionsbedingungen benötigt werden. Aus diesem Grund wurde die EN-Kartusche zusätzlich mit einem Föhn für ca. 5 min auf 60 °C erhitzt. In einem letzten Schritt wurde [^{18}F]39 mit 2-5 mL Diethylether in ein neues Vial eluiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

3.3.2.3 Synthese von [^{18}F]37

Die Reduktion ^{18}F -markierter Aldehyde und Ketone mittels Triethylsilan und Trifluoressigsäure wurde in der Literatur bereits erfolgreich beschrieben^{[42] [76]}. Für die Reduktion von [^{18}F] 39 wurden hier zunächst die von Hwang et al. für die Reduktion von p- ^{18}F Fluoracetophenon optimierten Reaktionsbedingungen verwendet (siehe Abb. 60).

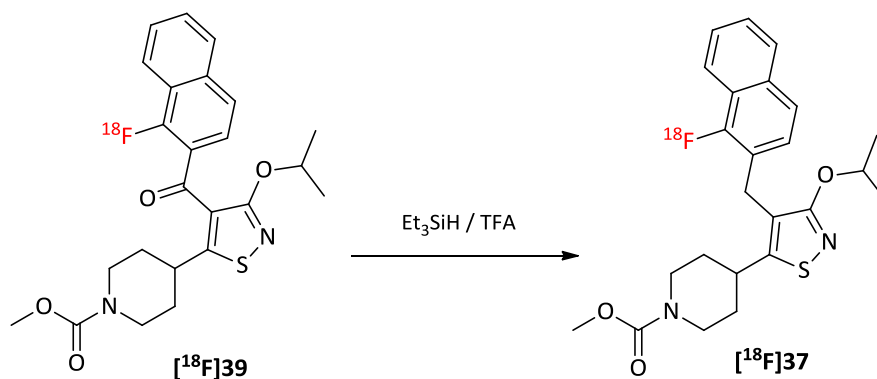


Abb. 60: Reaktionsschema der Reduktion von [^{18}F]39 mit Triethylsilan / TFA

An dieser Stelle wurde lediglich versucht die Reaktionszeit zu optimieren, um die Gesamtsynthesedauer möglichst kurz zu halten. Dazu wurde [^{18}F]39 in einem Gemisch aus 50 μL Triethylsilan und 500 μL Trifluoressigsäure aufgenommen und für jeweils 30, 45 und 60 Minuten auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurde die TFA im Vakuum und Heliumstrom entfernt, der Rückstand in 2 mL Wasser/MeCN 1:3 aufgenommen und das Reaktionsgemisch mittels semipräparativer HPLC getrennt. Hierbei wurden die identischen HPLC-Bedingungen wie zur Abtrennung von [^{18}F]39 verwendet, wobei [^{18}F]37 mit einer Retentionszeit von 21 Minuten eluiert wurde. Die Reaktionsausbeute wurde durch Integration der Peakflächen sowie durch Ausmessen der Fraktionen bestimmt und ist in Abbildung 61 gegen die Zeit aufgetragen.

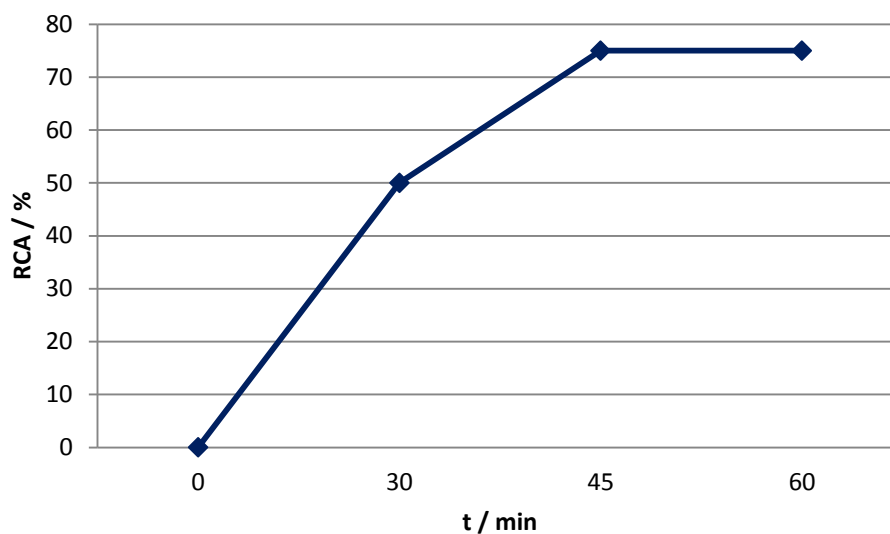


Abb. 61: Reaktionskinetik der Reduktion von $[^{18}\text{F}]\mathbf{39}$ mit Triethylsilan / TFA

Wie in Abbildung 57 zu sehen ist wurde nach 45 Minuten die maximale Reaktionsausbeute erreicht. Für die Abtrennung von $[^{18}\text{F}]\mathbf{37}$ wurde das Reaktionsgemisch daher nach 45 Minuten, wie bereits beschrieben, aufgearbeitet und mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt (siehe Abb. 62). Die weiteren Schritte konnten ebenfalls analog der Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\mathbf{39}$ durchgeführt werden. Auch in diesem Fall war die Trocknung des Produkts auf der EN-Kartusche für die nachfolgende Entschützung essentiell.

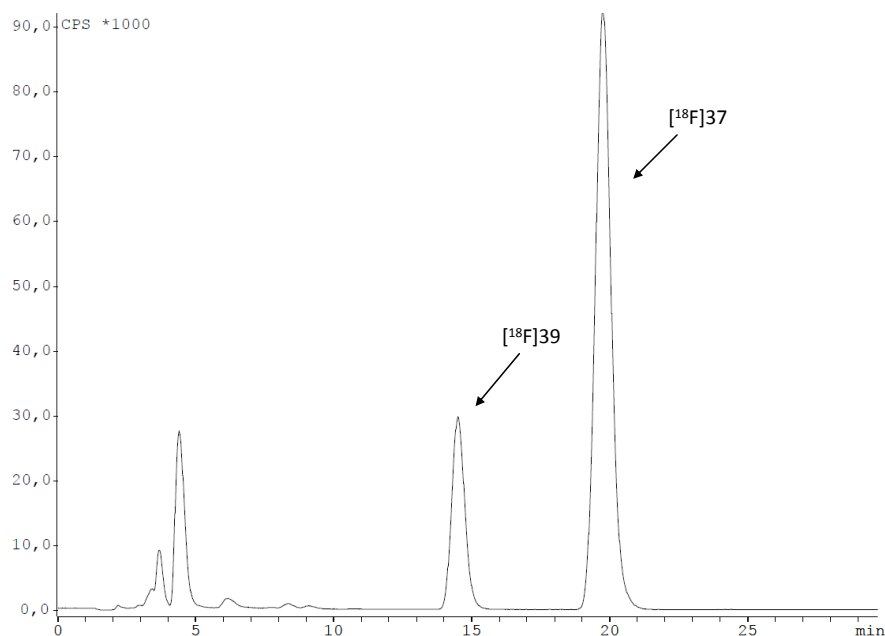


Abb. 62: Chromatogramm der semipräparativen Abtrennung von $[^{18}\text{F}]\mathbf{37}$

3.3.2.4 Synthese von [^{18}F]VK5

Die Reaktionsbedingungen für die Entschützung der inaktiven Referenzverbindung (HBr/Essigsäure) konnten aufgrund der langen Reaktionszeiten nicht für die Radiosynthese von [^{18}F]37 verwendet werden. In der Literatur wurden viele alternative Synthesevorschriften für die Spaltung von Isopropylethern und Methylcarbamaten beschrieben. Die Spaltung mit Bortrichlorid verläuft dabei mit am schnellsten und gelingt in den meisten Fällen schon bei 0 °C. Daher sollte versucht werden, die Reaktionsbedingungen für die Radiosynthese von [^{18}F]VK5 aus [^{18}F]37 zu übertragen (siehe Abb. 63).

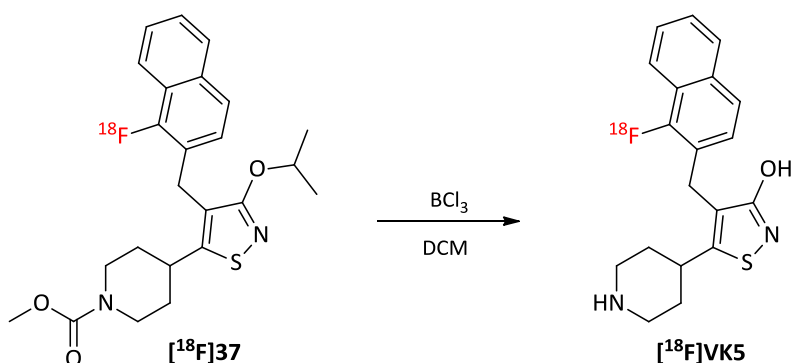


Abb. 63: Reaktionsschema der Entschützung von [^{18}F]37 mit BCl_3

Der geschützte Ligand [^{18}F]37 wurde wie zuvor beschrieben synthetisiert, mit Diethylether von der EN-Kartusche eluiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 500 μL einer 1 M Lösung aus Bortrichlorid in Dichlormethan aufgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Da bei diesen Reaktionsbedingungen das Aufnehmen einer Kinetik einen sehr großen Aufwand darstellt, wurde auf eine Optimierung der Reaktionsbedingungen hier verzichtet. Vielmehr wurde von der Annahme ausgegangen, dass bei den geringen verwendeten Stoffmengen die Entschützung bereits nach kurzer Zeit vollständig ist.

Die Reaktion wurde im Heliumstrom evaporiert, der Rückstand in 2 mL Wasser/MeCN 1:3 aufgenommen und das Reaktionsgemisch mittels semipräparativer HPLC getrennt. Auch hier konnten die identischen HPLC-Bedingungen wie zuvor verwendet werden. Das Produkt [^{18}F]VK5 konnte nach einer Retentionszeit von 4 Minuten in reiner Form abgetrennt werden (siehe Abb. 64). Um den Radioligand als injektionsfertige Lösung zu erhalten, wurde der HPLC-Peak im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand in 1 mL isotonischer NaCl-Lösung aufgenommen.

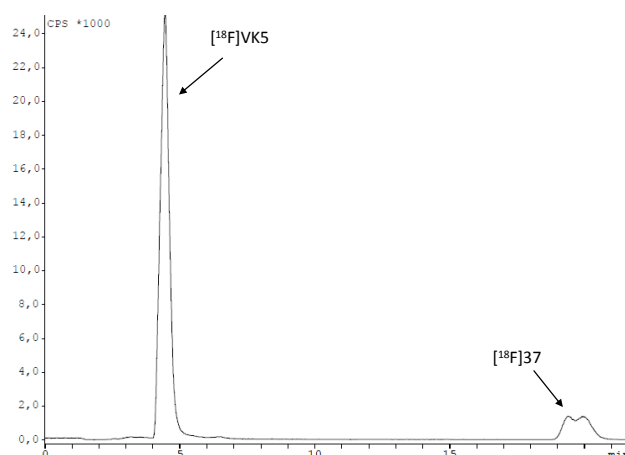


Abb. 64: Chromatogramm der semipräparativen Abtrennung von $[^{18}\text{F}]\text{VK5}$

Für die Bestimmung der chemischen und radiochemischen Reinheit sowie der Stoffmenge des Radioliganden wurden 20 μL der injektionsfertigen Lösung in ein analytisches HPLC-System (HPLC-System 2) injiziert (siehe auch Kapitel 4.4.3.3). Über eine zuvor bestimmte Eichgerade wurde, wie unter 3.3.1 beschrieben, die Stoffmenge aus der integrierten Peakfläche des UV-Chromatogramms errechnet (siehe Abb. 65). Der Radioligand $[^{18}\text{F}]\text{VK5}$ konnte nach den drei aufeinander folgenden Syntheseschritten nach einer Synthesedauer von 4 Stunden 20 Minuten in einer radiochemischen Reinheit von $>97\%$ und einer chemischen Reinheit von $>95\%$ als injektionsfertige Lösung erhalten werden. Es wurden radiochemische Ausbeuten von $0,7 - 1\%$ (EOS) erreicht und die spezifische Aktivität lag dabei im Bereich von $0,1 - 0,6\text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ($n = 2$).

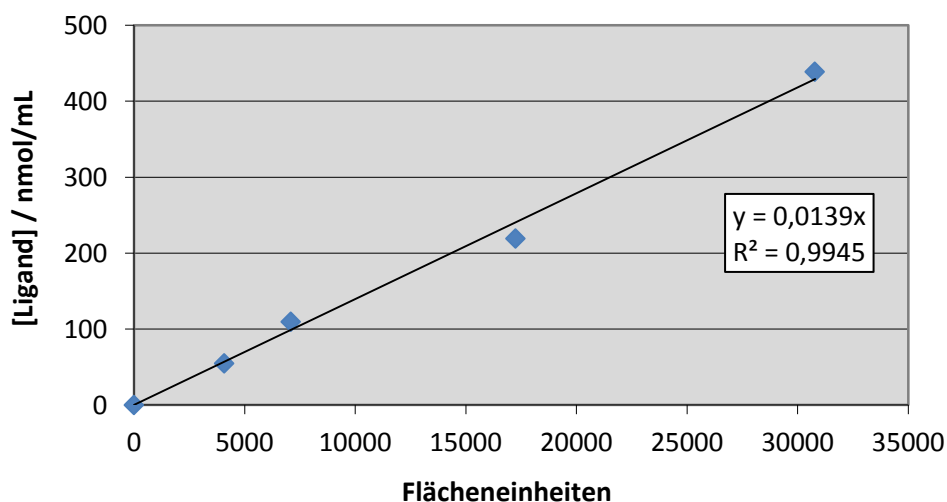


Abb. 65: Eichgerade zur Bestimmung der Stoffmenge von $[^{18}\text{F}]\text{VK5}$

Die Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Aktivitätsbilanz der Radiosynthese von [^{18}F]VK5. Die einzelnen radiochemischen Synthesen sind dabei unterschiedlich hervorgehoben.

Tab. 7: Aktivitätsbilanz der Synthese von [^{18}F]VK5

	Messung	Zeit / min	Aktivität / MBq	RCA / % (EOS)
Trocknung	Synthesebeginn	0	5290	100,0
	Fluorid auf QMA	2	5010	95,9
	Fluorid eluiert	6	4890	96,0
	Ende Trocknung	38	3924	94,2
n.c.a. $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$	Start Synthese [^{18}F]39	43	3317	82,2
	Spritze vor HPLC	54	2382	63,3
	Spritze leer	56	121	3,3
	Produktpeak	70	376	11,0
	[^{18}F]39 auf EN-Kartusche	102	151	5,4
	[^{18}F]39 eluiert	122	112	4,6
Reduktion TES/TFA	Start Synthese [^{18}F]37	126	109	4,6
	Spritze vor HPLC	165	82,2	4,4
	Spritze leer	170	6,31	0,3
	Reaktionsvial leer	165	5,15	0,3
	Produktpeak	190	31,8	2,0
	[^{18}F]37 auf EN-Kartusche	200	26	1,7
	[^{18}F]37 eluiert	218	23,3	1,7
Entschützung BCl_3	Start Synthese [^{18}F]VK5	223	22,6	1,7
	Spritze vor HPLC	258	16,4	1,6
	Produktpeak	264	12,7	1,3
	[^{18}F]VK5 evaporiert	279	10,8	1,2
	Produkt in NaCl-Lsg.	282	6,1	0,7

Die Radiosynthese von [^{18}F]VK5 muss anhand der Ergebnisse in dieser Form als „Proof of Principle“ aufgefasst, und insbesondere hinsichtlich der Syntheszeit und der spezifischen Aktivität weiter verbessert werden. Der Radioligand [^{18}F]VK5 konnte jedoch auf diesem Wege erstmals synthetisiert und für die nachfolgenden Evaluierungen bereitgestellt werden.

3.4 Evaluierung der radioaktiven Verbindungen

3.4.1 Autoradiographien

3.4.1.1 Autoradiographie der Bindung von [^{18}F]VK10

Im Anschluss an die Radiosynthese sollten die Affinität und die Spezifität von [^{18}F]VK10 gegenüber der GABA-Bindungsstelle in Autoradiographien bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden 14 μm dicke Transversalschnitte eines Gehirns der Ratte verwendet und mit verschiedenen Konzentrationen des Liganden (100 nM, 1 μM und 10 μM) in Puffer (50 mM Tris/Citrat, pH = 7,4, 120 mM NaCl) für 60 Minuten inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden GABA und inaktive Referenzverbindung (je 100 μM) zugesetzt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Puffer gewaschen und mit Kaltluft getrocknet. Zur Auswertung wurde eine Imaging-Platte (Fujifilm, BAS IP SR 2040 E) mit den Schnitten belichtet und mit einem Scanner (Fujifilm FLA-7000) ausgelesen (siehe Abb. 66).

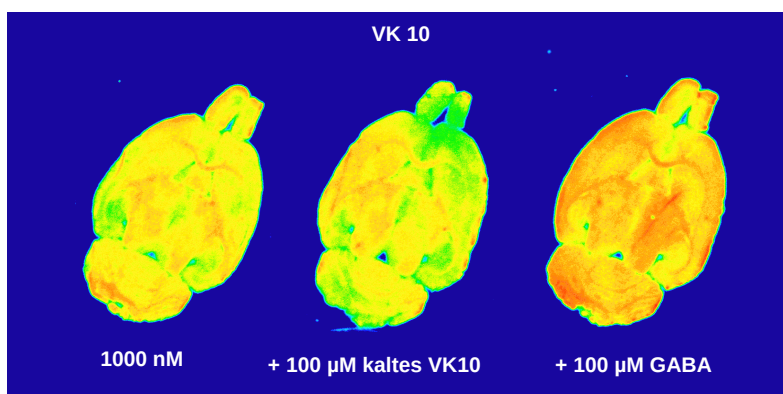


Abb. 66: Autoradiographie von [^{18}F]VK10 an transversalen Hirnschnitten der Ratte

Wie aus Abbildung 66 hervorgeht weist der Ligand [^{18}F]VK10 eine sehr hohe unspezifische Bindung auf. Auch nach Zugabe von GABA bzw. der inaktiven Referenzverbindung konnte keine Verdrängung von spezifisch gebundenem Ligand beobachtet werden. Eine niedrige spezifische Bindung war in diesem Fall jedoch aufgrund der niedrigen Affinität des Liganden zu erwarten. Hinzu kommt die geringe spezifische Aktivität, in der [^{18}F]VK10 erhalten wurde. Hierdurch konkurriert [^{18}F]VK10 mit seiner inaktiven Referenzverbindung um die gleichen Bindungsstellen und wird von dieser verdrängt. Aufgrund der hohen unspezifischen Bindung und der niedrigen Affinität von [^{18}F]VK10 wurden hier keine weiteren Evaluierungen angestrebt.

3.4.1.2 Autoradiographie mit [^{18}F]VK5

Wie bereits für [^{18}F]VK10, so sollten auch für [^{18}F]VK5 die Affinität und die Spezifität des Liganden in Autoradiographien untersucht werden. Dabei wurde im Wesentlichen, wie für [^{18}F]VK10 beschrieben, vorgegangen. Der Ligand [^{18}F]VK5 wurde dabei in drei verschiedenen Konzentrationen (10 nM, 50 nM

und 100 nM) für die Inkubation der Hirnschnitte verwendet und die unspezifische Bindung durch Zugabe von GABA und inaktiver Referenzverbindung (je 100 μ M) bestimmt. Nach der Inkubation wurden außerdem verschiedene Waschzeiten verwendet, um diese hinsichtlich des Liganden [^{18} F]VK5 zu optimieren. In Abbildung 67 sind jeweils drei repräsentative Schnitte zu unterschiedlichen Waschzeiten dargestellt.

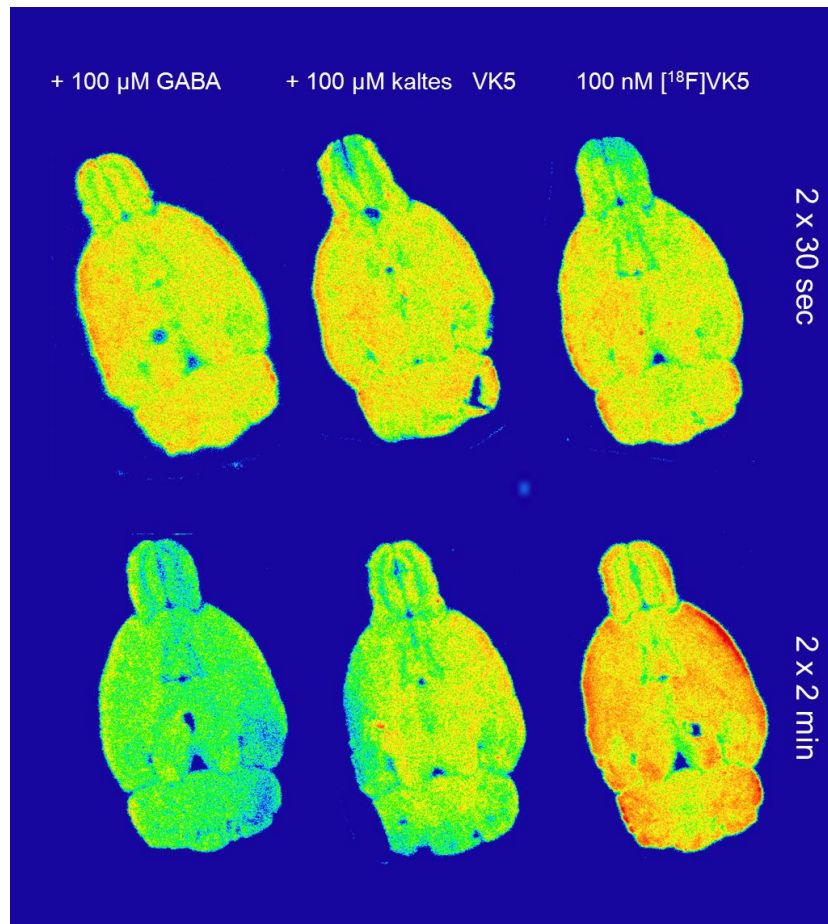


Abb. 67: Transversale Autoradiographien von [^{18} F]VK5 an Hirnschnitten der Ratte

Bei einer Konzentration des Liganden von 10 nM wurde insgesamt zu wenig Aktivität auf den Schnitten gebunden, weshalb diese nicht ausgewertet werden konnten. Bei einer Konzentration von 50 nM Ligand konnte bereits eine deutliche Bindung beobachtet werden, die aussagekräftigsten Ergebnisse lieferten jedoch die hohen Konzentrationen mit 100 nM [^{18} F]VK5. In den Autoradiographien mit den kurzen Waschzeiten wurde der Ligand [^{18} F]VK5 nicht durch GABA bzw. seine inaktive Referenzverbindung verdrängt und zeigte somit keine spezifische Bindung. Im Falle der längeren Waschzeiten konnte hingegen rein optisch eine leichte Abnahme der Bindung nach Verdrängung durch GABA und VK5 beobachtet werden. Um die Ergebnisse quantitativ zu erfassen, wurde bei der Durchführung der Autoradiographien eine Eichgerade erstellt mittels der die Stoffmengen an gebundenem Ligand bestimmt wurden. In Abbildung 68 sind die Mittelwerte

verschiedener Schnitte für die absolute und die unspezifische Bindung bei verschiedenen Waschzeiten angegeben.

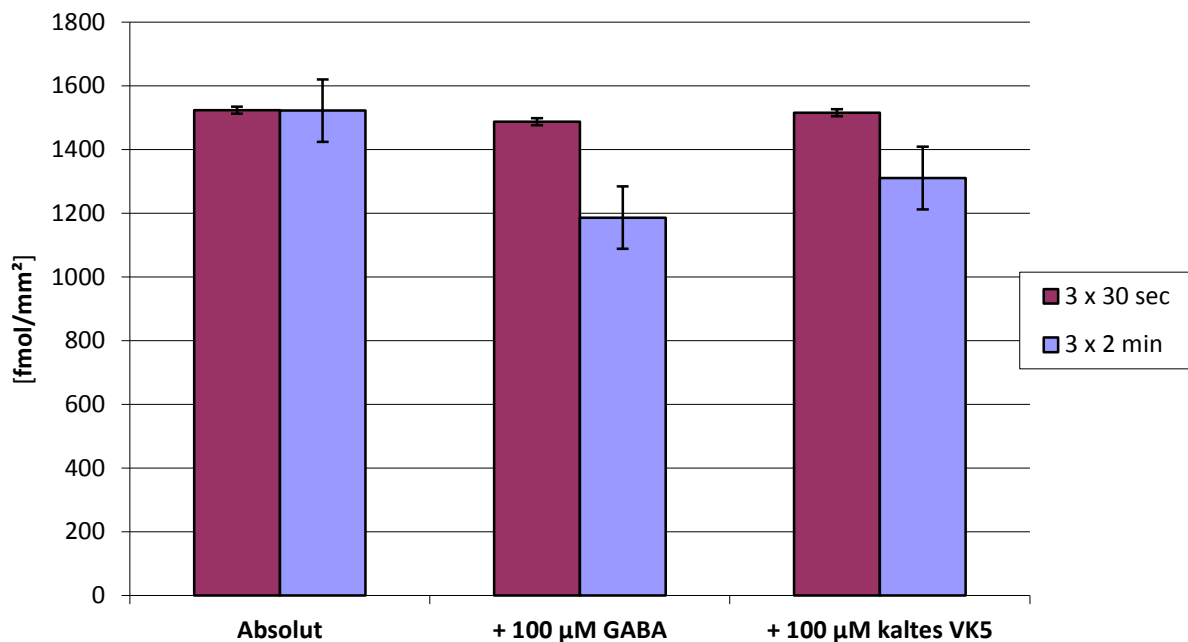


Abb. 68: Bestimmung der spezifischen Bindung von [^{18}F]VK5

Abbildung 68 bestätigt dabei den ersten optisch gewonnenen Eindruck. Bei den längeren Waschzeiten konnte leichte Abnahme der Bindung des Radioliganden [^{18}F]VK5 nachgewiesen werden. Diese muss jedoch aufgrund der Bindungsverteilung auf dem Hirnschnitt als unspezifisch betrachtet werden. Anhand des Bindungsprofils von VK5 wäre zumindest eine gewisse Anreicherung in α_5 -reichen Regionen wie dem Hippocampus zu erwarten gewesen. Auch die Bindung im Bereich des Cortex ist nicht gleichmäßig verteilt und muss als unspezifisch erachtet werden. Die hohe unspezifische Bindung kann möglicherweise auch in diesem Fall auf die niedrige spezifische Aktivität zurückgeführt werden. So könnte sich in zukünftigen Versuchen, durch die Synthese des Radioliganden mit höheren spezifischen Aktivitäten, auch die spezifische Bindung verbessern lassen. Darüber hinaus eröffnet die Abhängigkeit der unspezifischen Bindung von der Waschzeit die Möglichkeit, durch längere Waschzeiten und die Verwendung des Detergens Triton-X-100, die unspezifische Bindung zu reduzieren.

3.4.2 Bestimmung der Plasmastabilität von [^{18}F]VK5

Die Stabilität eines Radioliganden unter physiologischen Bedingungen ist ein weiteres, wichtiges Kriterium für dessen Einsatz als PET-Tracer. Im Blut jedes Organismus gibt es eine Vielzahl metabolisierender Enzyme, die in der Lage sind verschiedene Arzneistoffe abzubauen. Um die Stabilität des Radioliganden [^{18}F]VK5 in der Blutbahn abschätzen zu können, wurden die Plasmastabilitäten in fetalem Kälberserum (FCS) bestimmt. Dazu wurde jeweils eine Probe des Radioliganden (50 μL) in PBS-Puffer (350 μL) aufgenommen und zusammen mit FCS-Serum (500 μL) bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (15, 30 und 60 Minuten) wurden die Proteine mit Acetonitril (350 μL) gefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und über ein analytisches HPLC-System (HPLC-System 1) analysiert. Als stationäre Phase wurde eine LiChrospher 100 RP-18 HPLC-Säule (EC-5 μ , 8,0 x250 mm, CS-Chromatographie GmbH) verwendet. Als mobile Phase wurde Methanol/Sörensenpuffer im Verhältnis 75/25 bei einer Flussrate von 1 mL/min gewählt (Sörensen-Puffer: 910 mg KH_2PO_4 , 2,047 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ in 1000 mL H_2O). Die Retentionszeit des Produktes lag bei 3,3 Minuten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 69 dargestellt.

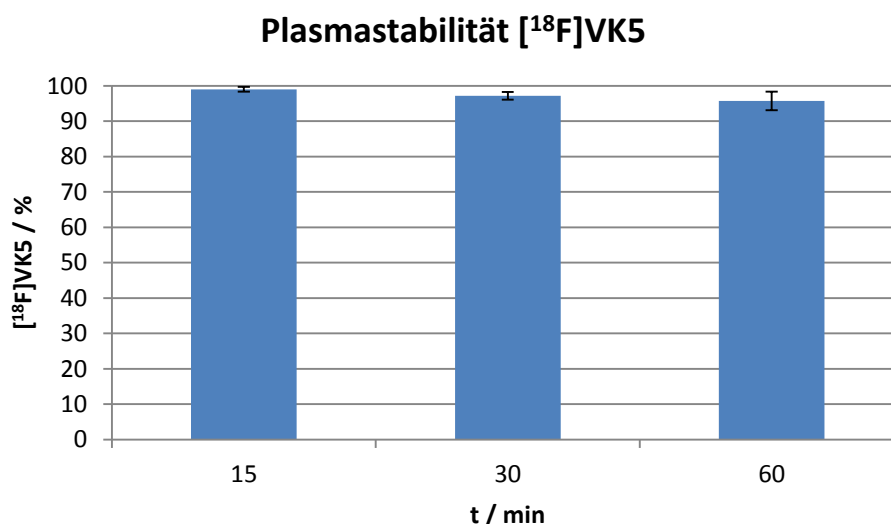


Abb. 69: Bestimmung der Plasmastabilität von [^{18}F]VK5 in FCS-Serum bei 37 °C

Den Ergebnissen aus Abbildung ... ist zu entnehmen, dass der Radioligand [^{18}F]VK5 in Serum nur sehr langsam metabolisiert wird und eine hohe Stabilität besitzt. Da die meisten PET-Messungen in der Regel nicht länger als 60 Minuten dauern, sollte die Stabilität des Radioliganden [^{18}F]VK5 für die Anwendung als PET-Tracer ausreichen. Dies gilt jedoch nur als erster Anhaltspunkt, da die meisten metabolisierenden Enzyme in Organen wie beispielsweise Leber, Niere,... lokalisiert sind.

4 Experimenteller Teil

4.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

Chemikalien:

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, Acros Organics, Alfa Aesar, Aldrich, Fisher Scientific, Fluka, Merck und Riedel-de Haën bezogen. Für den Großteil der Synthesen wurden getrocknete Lösungsmittel in Septenflaschen über Molsieb gelagert der Firma Fluka verwendet (Acetonitril, Benzol, Diethylether, Dioxan, 1,2-Dichlorethan, Dichlormethan, DMF und THF). Die Lösungsmittel zur Extraktion/Umkristallisation wie Aceton, Chloroform, Dichlormethan, Diethylether, Ethylacetat, Isopropanol, Methanol und n-Hexan wurden von der Firma Fisher Scientific bezogen. Dabei wurden die Lösungsmittel Chloroform, Dichlormethan, Ethylacetat und Petrolether vor Gebrauch destilliert. Die verwendeten HPLC-Lösungsmittel Acetonitril und Methanol wurden von der Firma Fisher Scientific bezogen. Für die NMR-Spektroskopie wurden deuterierte Lösungsmittel (CDCl_3 , DMSO-d_6) der Firmen Deutero und Sigma-Aldrich verwendet. Für die Festphasenabtrennung wurden strata-X Kartuschen (200 mg) der Firma Phenomenex, LichrolutEN Kartuschen (200 mg) der Firma Merk und QMA Kartuschen (30 mg) der Firma Waters verwendet.

Chromatographische Methoden:

Zur Dünnschichtchromatographie wurden DC-Platten der Firma Merk (DC-Folien 20x20 cm, Kieselgel 60 F254, Merk, Darmstadt) sowie die jeweils angegebenen Laufmittel verwendet. Die Substanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda=254$ nm detektiert.

Säulenchromatographische Trennverfahren wurden unter Verwendung von Kieselgel der Firma Acros Organics (Kieselgel 60, Korngröße 0.040-0.063 mm) und den jeweiligen Laufmitteln bei Normaldruck durchgeführt.

HPLC-Chromatographische Trennungen wurden unter Verwendung der nachstehend aufgelisteten HPLC-Systeme und HPLC-Säulen durchgeführt. Die Detektion der verschiedenen Substanzen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, UV-spektroskopisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=254$ nm.

HPLC-System 1:

HPLC-System der Firma Dionex, Pumpe P680, Hochdruckinjektionsventil S 9010, UV Detektor UVD170U, Aktivitätsdetektor Raytest Gabi Star 11/02

HPLC-System 2:

HPLC-System der Firma Sykam, Pumpen S 1100, Hochdruckinjektionsventil S 9010, UV Detektor K-2501 von Knauer, Aktivitätsdetektor und Zelle Berthold Flowstar LB 513

Spektroskopische Methoden:

^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an einem AC-300-Spektrometer (300 MHz für ^1H -Spektren, 75,5 MHz für ^{13}C -Spektren) der Firma Bruker durchgeführt. Für die Verschiebung der Signale wurde Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm) als Standard verwendet.

FD-Massenspektren wurden an einem MAT 95-Spektrometer der Firma Finnigan am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gemessen.

ESI-Massenspektren wurden an einem ThermoQuest Navigator Instrument der Firma Thermo Electron am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gemessen.

Mikrowelle:

Synthesen in der Mikrowelle wurden in einer Discover single-mode Mikrowellenkavität der Firma CEM durchgeführt. Die Temperaturregulierung erfolgte durch einen Infrarotsensor, die Druckregulierung durch eine Piezo-Druckzelle.

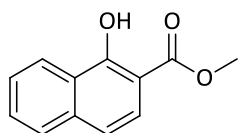
Phosphor-Imager:

Zur Auswertung der Autoradiographien wurde ein Fujifilm FLA-7000 verwendet. Zur Reaktivierung der Filme (Fujifilm, BAS IP SR 2040 E) wurde ein IP Eraser 3 der Firma Fujifilm verwendet.

4.2 Organische Synthesen

4.2.1 Synthese der Naphthol-Derivate

4.2.1.1 1-Hydroxynaphthalin-2-carbonsäure methylester 1

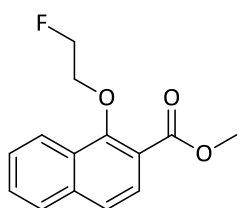


1-Hydroxynaphthalin-2-carbonsäure (50 g; 0,27 mol) wurde in 250 ml THF gelöst und nach Zugabe von LiOH (6,1 g; 0,25 mol) und H₂O (4,6 mL) 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde Dimethylsulfat (16,22 g; 12,2 ml; 0,128 mol) zugegeben, 3 h unter Rückfluss erhitzt und nach erneuter Zugabe von Dimethylsulfat (8 g; 6 ml; 0,064 mol) noch etwa zwei Stunden erhitzt. Nach Abziehen des LM im Vakuum wurde der Rückstand in ges. NaHCO₃-Lsg. aufgenommen und mit Diethylether ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das LM im Vakuum entfernt um, das Produkt (45,95 g; 0,23 mol; 85 %) als braunen Feststoff zu erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm] = 11.974 (1H, s), 8.389 (1H, d), 7.748 (2H, d), 7.547 (2H, dt), 7.250 (1H, d), 3.977 (3H, s)

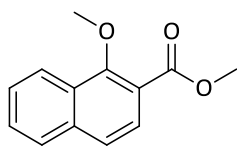
4.2.1.2 Alkylierung von 1-Hydroxy-naphthalin-2-carbonsäure methylester

1-Fluorethoxy-naphthalin-2-carbonsäure methylester 2



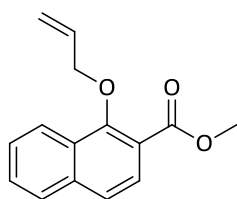
1-Hydroxynaphthalin-2-carbonsäure methylester **1** (5 g; 24,7 mmol) und K₂CO₃ (5,11 g; 37 mmol) wurden in trockenem DMF (50 mL) gelöst und unter Argon 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Bromfluorethan (3,1 g; 24,7 mmol) langsam zugegeben und 20 h auf 65 °C erhitzt. Nach Abziehen des LM im Vakuum wurde der Rückstand in Wasser (50 mL) aufgenommen und mit Chloroform (3 x 75 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit wenig ges. NaCl-Lsg gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das LM im Vakuum entfernt, um **2** (5,7 g; 22,8 mmol; 93 %) als braunes Öl zu erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm] = 8.356 (1H, d), 7.849 (1H, d), 7.830 (1H, d), 7.620 (1H, d), 7.546 - 7.587 (2H, m), 4.841 (2H, abx, $J_1 = 4.044$ Hz, $J_2 = 47.799$ Hz), 4.309 (2H, abx, $J_1 = 4.044$ Hz, $J_2 = 29.782$ Hz), 3.943 (3H, s)

1-Methoxy-naphthalin-2-carbonsäure methylester 3

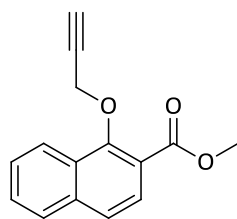
1-Hydroxynaphthalin-2-carbonsäure methylester **1** (5 g; 24,7 mmol) und K_2CO_3 (5,11 g; 37 mmol) wurden in trockenem DMF (50 mL) gelöst und unter Argon 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Methyljodid (3,5 g; 24,7 mmol) langsam zugegeben und 20 h auf 65 °C erhitzt. Nach Abziehen des LM im Vakuum wurde der Rückstand in Wasser (70 mL) aufgenommen und mit Chloroform (3 x 70 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit wenig ges. NaCl-Lsg gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt, um **3** (5,1 g; 23,5 mmol; 95 %) als braunes Öl zu erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm] = 8.265 (1H, d), 7.848 (1H, d), 7.829 (1H, d), 7.518 – 7.612 (3H, m), 4.048 (3H, s), 3.965 (3H, s)

1-Allyloxy-naphthalin-2-carbonsäure methylester 41

1-Hydroxynaphthalin-2-carbonsäure methylester **1** (1 g; 5 mmol) und K_2CO_3 (1 g; 7,5 mmol) wurden in trockenem DMF (20 mL) gelöst und unter Argon 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Allylbromid (605 mg; 5 mmol) langsam zugegeben und 20 h auf 65 °C erhitzt. Nach Abziehen des LM im Vakuum wurde der Rückstand in Wasser (20 mL) aufgenommen und mit Chloroform (3 x 20 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit wenig ges. NaCl-Lsg gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt, um **41** (1,15 g; 4,75 mmol; 95 %) als braunes Öl zu erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm] = 8.261 (1H, m), 7.844 (1H, d), 7.828 (1H, d), 7.599 (1H, d), 7.497-7.559 (2H, m), 6.141-6.287 (1H, m), 5.470 (1H, dq), 5.303 (1H, dq), 4.639 (2H, dt), 3.948 (3H, s)

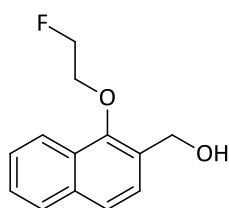
1-Propoxy-naphthalin-2-carbonsäure methylester (22) MV8A

1-Hydroxy-naphthalin-2-carbonsäure methylester **1** (1 g; 5 mmol) und K_2CO_3 (1 g; 7,5 mmol) werden in trockenem Acetonitril (25 mL) gelöst und unter Argon 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Propargylbromid (550 μ L 80 % in Toluol; 5 mmol) zugetropft und die Lösung 20 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit Chloroform ausgeschüttelt, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (DCM / nHexan / Methanol 20 : 20 : 1) aufgereinigt, um das Produkt (560 mg; 2,33 mmol; 47 %) als braunes Öl zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm] = 8.369 (1H, m), 7.867 (1H, d), 7.830 (1H, m), 7.640 (1H, d), 7.531-7.603 (2H, m), 4.852 (2H, d), 3.965 (3H, s), 2.543 (1H, t)

4.2.1.3 Reduktion der 1-Alkoxynaphthalin-2-carbonsäure methylester

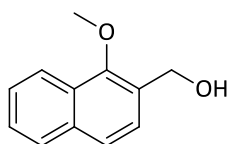
1-Fluorethoxy-2-hydroxymethyl-naphthalin 4



1-Fluorethoxynaphthalin-2-carbonsäuremethylester **2** (5,6 g; 22,6 mmol) wurden in trockenem THF (75 mL) gelöst und bei 0 °C unter Argon langsam mit LiAlH_4 (610 mg; 16,9 mmol) versetzt. Es wurde 6 h bei RT gerührt, unter Kühlung mit Wasser gequencht und mit 3 M HCl pH 3-4 eingestellt. Die Lösung wurde mit Chloroform extrahiert, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum abgezogen, um **4** (4,46; 20,3 mmol; 90 %) als braunen Feststoff zu erhalten.

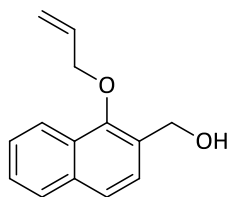
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm] = 8.111 (1H, d), 7.819 (1H, d), 7.633 (1H, d), 7.430 – 7.527 (3H, m), 4.886 (2H, s), 4.798 (2H, abx, $J_1 = 4.044$ Hz, $J_2 = 47.799$ Hz), 4.296 (2H, abx, $J_1 = 4.044$ Hz, $J_2 = 29.782$ Hz), 2.260 (1H, s)

1-Methoxy-2-hydroxymethyl-naphthalin 5



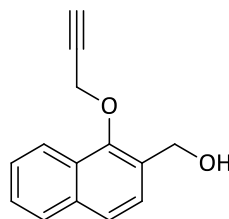
1-Methoxynaphthalin-2-carbonsäure methylester **3** (5 g; 23 mmol) wurden in trockenem THF (50 mL) gelöst und bei 0 °C unter Argon langsam mit LiAlH_4 (610 mg; 16,9 mmol) versetzt. Es wurde 8 h bei RT gerührt, unter Kühlung mit Wasser gequencht und mit 3 M HCl pH 3-4 eingestellt. Die Lösung wurde mit Chloroform extrahiert, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum abgezogen, um **5** als braunen Feststoff (4,1; 21,6 mmol; 94 %) zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm] = 8.101 (1H, d), 7.827 (1H, d), 7.621 (1H, d), 7.429-7.545 (3H, m), 4.886 (2H, s), 3.968 (3H, s)

1-Allyloxy-2-hydroxymethyl-naphthalin 42

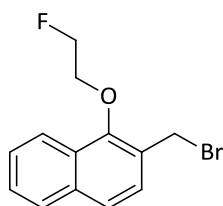
1-Allyloxynaphthalin-2-carbonsäure methylester **41** (1,1 g; 4,5 mmol) wurden in trockenem THF (30 mL) gelöst und bei 0 °C unter Argon langsam mit LiAlH₄ (120 mg; 3,3 mmol) versetzt. Es wurde 4 h bei RT gerührt, unter Kühlung mit Wasser gequencht und mit 3 M HCl pH 3-4 eingestellt. Die Lösung wurde mit Chloroform extrahiert, die organische Phase mit Na₂SO₄ getrocknet und das LM im Vakuum abgezogen, um **42** als braunen Feststoff (946 mg; 4,41 mmol; 98 %) zu erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm] = 8.076 (1H, m), 7.819 (1H, m), 7.626 (1H, d), 7.399-7.540 (3H, m), 6.114-6.270 (1H, m), 5.483 (1H, dq), 5.333 (1H, dq), 4.879 (2H, s), 4.561 (2H, dt), 2.037 (1H, bs)

1-Propinoxy-2-hydroxymethyl-naphthalin (23) MV8B

1-Propinoxy-naphthalin-2-carbonsäure-methylester (**22**) (480 mg; 2 mmol) wurde in trockenem THF (30 mL) gelöst und bei 0 °C unter Argon langsam mit LiAlH₄ (60 mg; 1,5 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 1 h bei RT gerührt, anschließend unter Kühlung mit Wasser (25 mL) gequencht und mit 1 M HCl pH 4 eingestellt. Die Lösung wurde mit Chloroform extrahiert, die organische Phase mit Na₂SO₄ getrocknet und das LM im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (DCM/nHexan 1:1) aufgereinigt, um das Produkt (137 mg; 0,65 mmol; 33 %) als braunen Feststoff zu erhalten.

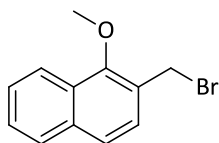
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm] = 8.078 (1H, d), 7.839 (1H, d), 7.667 (1H, d), 7.448-7.545 (3H, m), 4.933 (2H, s), 4.781 (2H, d), 2.576 (1H, t)

4.2.1.4 Bromierung der 2-Naphthylmethylalkohole**1-Fluorethoxy-2-bromomethyl-naphthalin 6**

1-Fluorethoxy-2-hydroxymethyl-naphthalin **4** (4,2 g; 19,1 mmol) wurden in trockenem Toluol (50 mL) gelöst und unter Schutzgas vorsichtig mit PBr₃ (5,18 g; 19,1 mmol) und zwei Tropfen Pyridin versetzt. Die entstandene Lösung wird UN auf 60 °C erhitzt und anschließend auf 50 g Eis gegossen. Die wässrige Phase wird mit Et₂O extrahiert, mit Na₂SO₄ getrocknet und des LM im Vakuum entfernt, um **6** als braunen Feststoff (4,67 g; 13,9 mmol; 73 %) zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm] = 8.144 (1H, d), 7.810 (1H, d), 7.632 (1H, d), 7.512 (1H, dt), 7.421 – 7.545 (2H, m), 4.853 (2H, abx, $J_1 = 4.044$ Hz, $J_2 = 47.799$ Hz), 4.786 (2H, s), 4.406 (2H, abx, $J_1 = 4.044$ Hz, $J_2 = 29.782$ Hz)

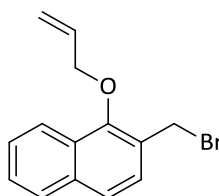
1-Methoxy-2-brommethyl-naphthalin **7**



1-Methoxy-2-hydroxymethyl-naphthalin **5** (4 g; 21 mmol) wurden in trockenem Toluol (50 mL) gelöst und unter Schutzgas vorsichtig mit PBr_3 (5,7 g; 21 mmol) und zwei Tropfen Pyridin versetzt. Die entstandene Lösung wird ÜN auf 60 °C erhitzt und anschließend auf 50 g Eis gegossen. Die wässrige Phase wird mit Et_2O extrahiert, mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt, um **7** als braunen Feststoff (4,67 g; 18,6 mmol; 89 %) zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm] = 8.096 (1H, dd), 7.808 (1H, dd), 7.610 (1H, d), 7.418 – 7.551 (3H, m), 4.764 (2H, s), 4.060 (3H, s)

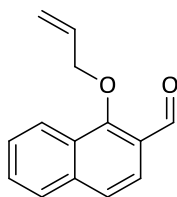
1-Allyloxy-2-brommethyl-naphthalin **43**



Eine Lösung von **42** (3 g; 14 mmol) und Triphenylphosphin (3,9 g; 15 mmol) in trockenem DCM (100 mL) wurde unter Argon als Schutzgas auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurde Tetrabromkohlenstoff (5 g; 15 mmol) zugegeben und 2 h bei RT gerührt. Das LM wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Chloroform / Methanol 20:1) aufgereinigt, um das Produkt **43** (3,04 g; 10,92 mmol; 78 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm] = 8.086 (1H, m), 7.808 (1H, m), 7.606 (1H, d), 7.437-7.536 (3H, m), 6.159-6.303 (1H, m), 5.556 (1H, dq), 5.351 (1H, dq), 4.760 (2H, s), 4.654 (2H, dt)

1-Allyloxy-2-formylnaphthalin MV8F

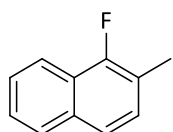


Eine Lösung von Oxalylchlorid (1,4 g; 11 mmol) in Dichlormethan (10 mL) unter Argon als Schutzgas wurde auf -78 °C gekühlt. Unter Rühren wurde eine Lösung aus Dimethylsulfoxid (1,7 g; 1,56 mL; 22 mmol) in Dichlormethan (10 mL) tropfenweise zugegeben und für weitere 15 min bei -78 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus 1-Allyloxy-2-hydroxymethylnaphthalin (**19**) (928 mg; 4,33 mmol) in Dichlormethan (10 mL) tropfenweise zugegeben und 15 min bei -60 bis -65 °C gerührt. Bei -78 °C wurde Triethylamin (4,5 mL; 32 mmol) in einem Mal zugegeben und das Reaktionsgemisch bei RT über Nacht gerührt und in

Wasser gegossen. Es wurde mit DCM extrahiert, mit wenig Wasser gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt, um das Produkt (788 mg; 3,71 mmol; 86 %) als ... zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6), δ [ppm] = 10.557 (1H, s), 8.207 (1H, d), 7.861 (1H, d), 7.844 (1H, d), 7.527-7.655 (3H, m), 6.096-6.246 (1H, m), 5.466 (1H, dq), 5.352 (1H, dq), 4.697 (2H, dt)

4.2.1.5 1-Fluor-2-methylnaphthalin 29

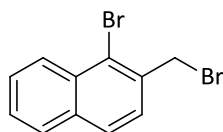


1-Brom-2-methylnaphthalin (1g; 4,5 mmol) wurde in trockenem THF (10 mL) gelöst und unter Argon auf -78°C gekühlt. Unter Rühren wurde n-Butyllithium (4,5 mmol) tropfenweise zugegeben und die Lösung 15 min. bei -78°C gerührt. Diese Lösung wurde zu einer -78°C kalten Lösung aus N-Fluorobis(phenylsulfonyl)amin (1,425 g; 4,5 mmol) in THF (5 mL) gegeben und innerhalb von 2 h auf 0°C erwärmt. Es wurde vorsichtig Wasser (50 mL) zugegeben, mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert, mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt, um das Produkt **29** (610 mg; 3,81 mmol; 85 %) als braunes Öl zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), [ppm] = 8.032 (1H, d), 7.774 (1H, d), 7.401-7.517 (3H, m), 7.259 (1H, d), 2.426 (3H, s)

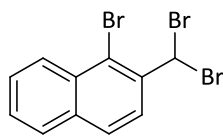
4.2.1.6 Radikalische Bromierung der 2-Methylnaphthaline

1-Brom-2-brommethyl-naphthalin 8Z



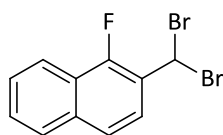
Eine Suspension aus 1-Brom-2-methylnaphthalin (10 g; 45 mmol), NBS (8,5 g; 47,5 mmol); und AIBN (500mg) in trockenem CCl_4 (100 mL) wurde unter Argon als Schutzgas 24 h unter Rückfluss erhitzt. Die abgekühlte Suspension wurde filtriert, mit NaHSO_3 -Lsg. (50 mL) und Wasser (50 mL) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert, um **8** (12,5 g; 41,9 mmol; 93 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 8.33 (1H, d, $J = 8.82$ Hz), 7.79 (2H, m), 7.47-7.63 (3H, m), 4.85 (2H, s)

1-Brom-2-dibromomethyl-naphthalin 30

Eine Suspension aus 1-Brom-2-methylnaphthalin (5 g; 22,6 mmol), NBS (9,3 g; 56 mmol); und AIBN (500mg) in trockenem CCl_4 (100 mL) wurde unter Argon als Schutzgas 24 h unter Rückfluss erhitzt. Die abgekühlte Suspension wurde filtriert, mit NaHSO_3 -Lsg. (50 mL) und Wasser (50 mL) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert, um **30** (8,3 g; 21,9 mmol; 97 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

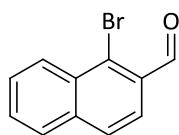
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 8.276 (1H, d), 8.048 (1H, d), 7.879 (1H, d), 7.828 (1H, d), 7.625 (1H, dt), 7.555 (1H, dt), 7.477 (1H, s)

1-Fluor-2-dibromomethyl-naphthalin 31

Eine Suspension aus 1-Fluor-2-methylnaphthalin (2,11 g; 13,2 mmol), NBS (5,4 g; 30 mmol); und AIBN (500mg) in trockenem CCl_4 (50 mL) wurde unter Argon als Schutzgas 24 h unter Rückfluss erhitzt. Die abgekühlte Suspension wurde filtriert, mit NaHSO_3 -Lsg. (20 mL) und Wasser (20 mL) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (EA / nHexan 40:1) aufgereinigt, um das Produkt **31** (2,54 g; 7,98 mmol; 61 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 8.089 (1H, d), 7.840 (1H, d), 7.823 (1H, d), 7.697 (1H, d), 7.525-7.590 (2H, m), 7.219 (1H, s)

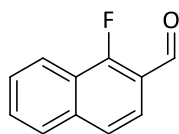
MS (FD) m/z (% rel. Int.): 318.2 (100 $[\text{M}]^+$); 319.2 (10 $[\text{M}+1]^+$); 320.2 (45 $[\text{M}+2]^+$)

4.2.1.7 Hydrolyse der Dibromide**1-Brom-2-formyl-naphthalin 32**

1-Brom-2-dibromomethyl-naphthalin **30** (5 g; 13,2 mmol) wurde zu einer Lösung aus Natriumacetat (5 g; 36,4 mmol) in Essigsäure (65 mL) gegeben und 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von 2 N HCl (25 mL) wurde weitere 24 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 2 M HCl (50 mL) aufgenommen und mit EtOAc (3 x 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert, um **32** (3,04 g; 12,9 mmol; Ausbeute: 98 %) als gelben Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 10.651 (1H, s), 8.447-8.512 (1H, m), 7.815-7.943 (3H, m), 7.622-7.706 (2H, m)

1-Fluor-2-formylnaphthalin 33



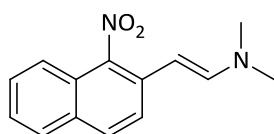
1-Fluor-2-dibromomethyl-naphthalin **31** (700mg; 2,2 mmol) wurde zu einer Lösung aus Natriumacetat (300 mg; 2,2 mmol) in Essigsäure (20 mL) gegeben und 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von 2 N HCl (10 mL) wurde weitere 24 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 2 M HCl (25 mL) aufgenommen und mit EtOAc (3 x 25 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, einrotiert und säulenchromatographisch (DCM / nHexan 1:1) aufgereinigt, um **33** (333mg; 1,91 mmol; Ausbeute: 87 %) als braunen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 10.572 (1H, s), 8.231 (1H, d), 7.780-7.911 (2H, m), 7.599-7.705 (3H, m),

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 174.3 (100 $[\text{M}]^+$); 175.3 (13 $[\text{M}+1]^+$)

4.2.1.8 1-Nitro-2-formyl-naphthalin 58

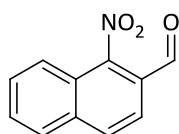
2-[β -trans-(N,N-dimethylamino)ethenyl]-1-nitronaphthalin 57



1-Nitro-2-methylnaphthalin (3,5 g; 18,7 mmol) und DMFDMA (3,4 g; 28,5 mmol) werden in trockenem DMF (40 mL) unter Argon 6 h auf 140 °C erhitzt und weitere 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das LM im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Hexan (50 mL) gewaschen, abgesaugt und getrocknet, um **57** (3,89 g; 16 mmol; 85 %) als roten Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), [ppm] = 7.690 (2H, t), 7.426-7.593 (3H, m), 7.335 (1H, t), 7.000 (1H, d), 5.113 (1H, d), 2.874 (6H, s)

1-Nitro-2-formyl-naphthalin 58



Das Alken **57** (3,58 g; 14,8 mmol) und Natriumperiodat (9,5 g; 44,3 mmol) wurden in Wasser / THF (170 mL, 1:1) gelöst und 2 h bei RT gerührt. Die Suspension wurde filtriert, der Rückstand mit EtOAc (50 mL) gewaschen und die organischen Phasen

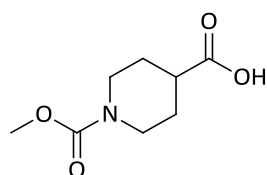
vereinigt. Anschließend wurde mit NaHCO_3 -Lsg. (50 mL) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (DCM / nHexan 1:1) aufgereinigt, um **58** (2,1 g; 10,5 mmol; 71 %) als gelben Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), [ppm] = 10.153 (1H, s), 8.091 (1H, d), 7.948-8.001 (2H, m), 7.878-7.928 (1H, m), 7.698-7.763 (2H, m)

4.2.2 Synthese der Isooxazole

4.2.2.1 Synthese der β -Keto-Ester 11 und 12

1-Methoxycarbonyl-piperidin-4-carbonsäure **9**

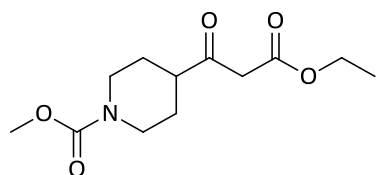


Piperidin-4-carbonsäure (10 g; 77,5mmol) und Na_2CO_3 (10 g; 95mmol) wurden in Wasser / THF (70/20 mL) gelöst und 30 min. bei RT gerührt. Methylchlorformat (8,97 g; 7,34 ml; 95mmol) wurde langsam zutropft und die Reaktion 1 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf

RT wurde pH 1 (3 M HCl) eingestellt, mit Chloroform ausgeschüttelt (3 x 150 ml), die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und evaporiert, um **9** (12,1 g; 65 mmol; 83 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), [ppm] = 4.035 (2H, bs), 3.671 (3H, s), 2.901 (2H, t), 2.511 (1H, tt), 1.822-1.964 (2H, m), 1.536-1.714 (2H, m)

3-(1-Methoxycarbonyl-piperidinyl)-3-oxo-propansäure ethylester **11**



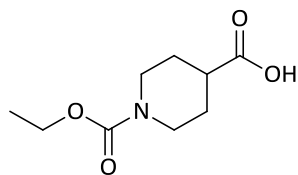
4-Methoxycarbonyl-piperidin-1-carbonsäure **9** (9,36 g; 50 mmol) werden in trockenem Dichlormethan (100 mL) gelöst, unter Argon mit DIC (6,3 g; 49,7 mmol) und DMAP (500 mg) versetzt und 2 h bei RT gerührt. Anschließend werden Meldrums Säure (7,17 g; 52,3

mmol) zugegeben und die entstandene Suspension über Nacht bei RT gerührt. Die Suspension wurde filtriert, der Rückstand mit Dichlormethan gewaschen, das LM im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethanol (200 mL) 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer

Aufreinigung (EtOAc / nHexan 2:1) wurde das Produkt (9,12 g; 35,5 mmol; Ausbeute: 71 %) als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm] = 4.147 (2H, q), 4.119 (2H, bs), 3.654 (3H, s), 3.462 (2H, s), 2.724-2.899 (2H, m), 2.614 (1H, tt), 1.739-1.905 (2H, m), 1.439-1.607 (2H, m), 1.242 (3H, t)

1-Ethoxycarbonyl-piperidin-4-carbonsäure **10**

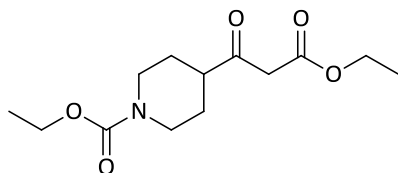


Piperidin-4-carbonsäure (10 g; 77,5 mmol) und Na_2CO_3 (10 g; 95 mmol) wurden in Wasser / THF (70/20 mL) gelöst und 30 min. bei RT gerührt. Ethylchlorformat (10,3 g; 9 ml; 85mmol) wurde langsam zugetropft und die Reaktion 1 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde pH

1 (3 M HCl) eingestellt, mit Chloroform ausgeschüttelt (3 x 150 ml), die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und evaporiert, um **10** (14,78 g; 73,6 mmol; 95 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm] = 9.97 (1H, bs), 4.09 (2H, q, J = Hz), 3.94-4.11 (2H, m), 2.73-2.95 (2H, m), 2.37-2.49 (1H, m), 1.81-1.92 (2H, m), 1.51-1.66 (2H, m), 1.23 (3H, t, J = 6.97 Hz)

3-(1-Ethoxycarbonyl-piperidinyl)-3-oxo-propansäure ethylester **12**

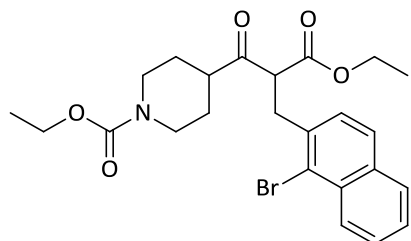


4-Ethoxycarbonyl-piperidin-1-carbonsäure **10** (10 g; 49,7 mmol) wurden in 100 ml trockenem DCM gelöst, unter Argon mit DIC (6,3 g; 49,7 mmol) und DMAP (500 mg) versetzt und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Meldrums Säure (7,17 g; 52,3

mmol) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Suspension wurde filtriert, der Rückstand mit DCM gewaschen, das LM im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethanol (70 mL) 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in Wasser (200 mL) aufgenommen, mit Chloroform (3 x 150 mL) ausgeschüttelt, mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (EtOAc / nHexan 2:1) aufgereinigt, um **12** (7,2 g; 26,2 mmol; 54 %) des reinen Produktes als farbloses Öl zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm] = 4.11 (2H, q, J = Hz), 4.09 (2H, q, J = Hz), 3.97-4.13 (2H, m), 3.38 (2H, s), 2.82-2.93 (2H, m), 2.37-2.47 (1H, m), 1.80-1.94 (2H, m), 1.53-1.68 (2H, m), 1.27 (3H, t, J = 6.97 Hz), 1.23 (3H, t, J = 6.97 Hz)

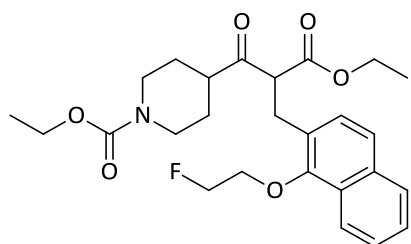
MS (FD) m/z (% rel. Int.): 271.4 (100 [M] $^+$); 272.4 (41 [$M+1$] $^+$); 273.4 (7 [$M+2$] $^+$)

4.2.2.2 Alkylierung der β -Ketoester**3-(1-Ethoxycarbonyl-piperidiny)-2-(1-bromnaphth-2-ylmethyl)-3-oxo-propansäure ethylester 14**

3-(1-Ethoxycarbonyl-4-piperidiny)-3-oxopropansäureethylester **12** (4,59 g; 17 mmol) wurde in trockenem Ethanol (25 mL) gelöst, mit NaOEt (18 mL; 1 M in Ethanol) versetzt und unter Argon 1 h auf 80 °C erhitzt. 1-Brom-2-brommethyl-naphthalin **8** (5,1 g; 18,7 mmol) wurden als Feststoff langsam zugetropft und weitere 16 h

unter Rückfluss erhitzt. Das LM im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (EtOAc / nHexan 1:2) aufgereinigt, um **14** (5,46 g; 11,1 mmol; 65 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

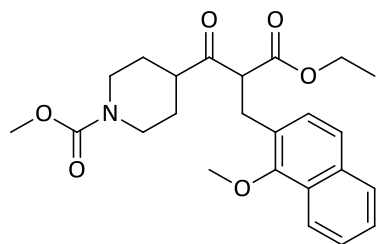
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 8.25 (1H, d, J = 8.46 Hz), 7.75 (1H, d, J = 6.62 Hz), 7.66 (1H, d, J = 8.09 Hz), 7.51-7.59 (1H, m), 7.44-7.51 (1H, m), 7.29 (1H, d, J = 8.46 Hz), 4.26 (1H, t, J = 7.35 Hz), 4.11 (2H, q, J = ... Hz), 4.05 (2H, q, J = Hz), 4.00-4.13 (2H, m), 3.47 (2H, d, J = 7.72), 2.62-2.92 (2H, m), 2.50-2.60 (1H, m), 1.68-1.97 (2H, m), 1.50-1.67 (2H, m), 1.22 (3H, t, J = 6.99 Hz), 1.17 (3H, t, J = 6.99 Hz)

3-(1-Ethoxycarbonyl-piperidiny)-2-(1-fluorethoxynaphth-2-ylmethyl)-3-oxo-propansäure ethylester 13

3-(1-Ethoxycarbonyl-4-piperidiny)-3-oxopropansäure ethylester **12** (890 mg; 3,3 mmol) wurde in trockenem Ethanol (30 mL) gelöst, mit NaOEt (3,3 mL; 1 M in Ethanol) versetzt und unter Argon 1 h auf 80 °C erhitzt. 1-Fluorethoxy-2-brommethyl-naphthalin **6** (1,4 g; 4,95 mmol) wurden in wenig Ethanol gelöst,

langsam zugetropft und weitere 16 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das LM im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (EtOAc / nHexan 1:2) aufgereinigt um **13** (780 mg; 1,65 mmol; 50 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6), δ [ppm] = 8.039 (1H, d), 7.794 (1H, d), 7.530 (1H, d), 7.393 - 7.530 (2H, m), 7.241 (1H, d), 4.801 (2H, abx, J_1 = 4.044 Hz, J_2 = 47.799 Hz), 4.241 (2H, abx, J_1 = 4.044 Hz, J_2 = 30.150 Hz), 4.231 (1H, t), 4.096 (2H, q), 4.062 (2H, q), 3.997 - 4.121 (2H, m), 3.317 (2H, d), 2.604 - 2.838 (2H, m), 2.551 (1H, tt), 1.738 (2H, bd), 1.479 - 1.695 (2H, m), 1.195 (3H, t), 1.152 (3H, t)

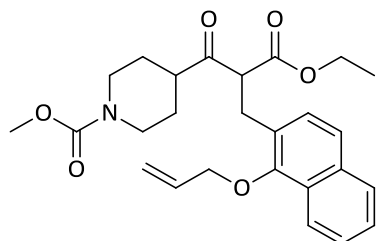
**3-(1-Methoxycarbonyl-piperidinyl)-2-(1-methoxynaphth-2-ylmethyl)-3-oxo-propansäure ethylester
15**

3-(1-Methoxycarbonyl-piperidinyl)-3-oxo-propansäure ethylester

11 (1 g; 3,8 mmol) wurde in trockenem Ethanol (25 mL) gelöst, mit NaOEt (3,8 mmol) versetzt und unter Argon 30 min auf 80 °C erhitzt. 1-Methoxy-2-brommethyl-naphthalin **7** (956mg; 3,9 mmol) wurde in Ethanol gelöst, langsam zugetropft und weitere 16 h auf

80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das LM im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (EtOAc / nHexan 1:3) aufgereinigt, um **15** (690mg; 1,61 mmol; 42 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), [ppm] = 8.038 (1H, d), 7.779 (1H, d), 7.391-7.550 (3H, m), 7.216 (1H, d), 4.186 (1H, t), 4.065 (2H, q), 4.041 (2H, bs), 3.921 (3H, s), 3.666 (3H, s), 3.312 (2H, d), 2.565-2.768 (2H, m), 2.461 (1H, tt), 1.417-1.624 (2H, m), 1.117-1.227 (2H, m), 1.188 (3H, t)

**3-(1-Methoxycarbonyl-piperidinyl)-2-(1-allyloxynaphth-2-ylmethyl)-3-oxo-propansäure ethylester
44**

3-(1-Methoxycarbonyl-piperidinyl)-3-oxo-propansäure ethylester

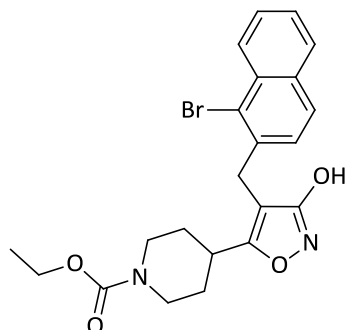
11 (2 g; 7,7 mmol) wurde in trockenem Ethanol (25 mL) gelöst, mit NaOEt (7,7 mmol) versetzt und unter Argon 30 min auf 80 °C erhitzt. 1-Allyloxy-2-brommethyl-naphthalin **43** (2,15 g; 7,7 mmol) wurde in Ethanol gelöst, langsam zugetropft und weitere 16 h auf

80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Rückstand säulenchromatographisch (EA / nHexan 1:1) aufgereinigt, um **44** (2,08 g; 4,58 mmol; 59 %) als farbloses Öl zu erhalten.

¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃) δ (ppm) = 8.004 (1H, d), 7.775 (1H, d), 7.394-7.545 (3H, m), 7.234 (1H, d), 6.186 (1H, m), 5.492 (1H, dq), 5.321 (1H, dq), 4.509 (2H, dt), 4.199 (1H, t), 4.088 (2H, q), 3.798-4.112 (2H, bs), 3.618 (3H, s), 3.280 (2H, d), 2.576-2.806 (2H, m), 2.506 (1H, tt), 1.624-1.814 (2H, m), 1.441-1.592 (2H, m), 1.157 (3H, t)

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 453.7 (100 [M]⁺); 454.7 (29 [M+1]⁺); 455.7 (5 [M+2]⁺)

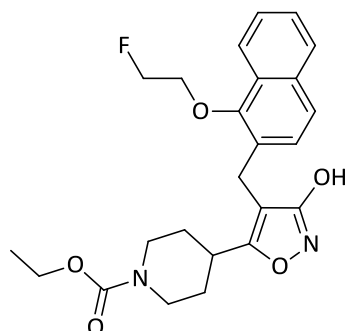
4.2.2.3 Ringschluss zu den Isoxazolen

5-(1-Ethoxycarbonyl-4-piperidinyl)-4-(1-bromnaphth-2-ylmethyl)-isoxazol-3-ol 17

NaOH (64 mg; 1,7 mmol) wurde in Methanol / Wasser (7/0,5 mL) gelöst und auf -30 °C gekühlt. 3-(1-Ethoxycarbonyl-4-piperidinyl)-(1-Brom-2-naphthylmethyl)-3-oxopropansäure ethylester **14** (784 mg; 1,6 mmol) wurde in wenig Methanol gelöst, langsam zugetropft und 15 min. bei -30 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von Hydroxylamin-hydrochlorid (222 mg; 3,2 mmol) und NaOH (128 mg; 3,2 mmol) in Methanol / Wasser (7/0,5 mL) zugetropft und 2 h bei -30

°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde bei 80 °C in konz. HCl (2 mL) gegossen, 2 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend das LM im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (30 mL) aufgenommen, mit Et₂O (3 x 40 mL) extrahiert, mit Na₂SO₄ getrocknet und evaporiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EtOAc / PE 1:1) wurde **17** (214 mg; 0,47 mmol; 29 %) als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm] = 8.22 (1H, d, J = 8.82 Hz), 7.94 (1H, d, J = 8.09 Hz), 7.90 (1H, d, J = 8.46 Hz), 7.64-7.70 (1H, m), 7.54-7.60 (1H, m), 7.38 (1H, d, J = 8.46 Hz), 5.75 (1H, s), 3.96 (2H, q), 3.90-3.98 (2H, m), 3.86 (2H, s), 2.88-3.02 (1H, m), 2.63-2.83 (2H, m), 1.57-1.67 (2H, m), 1.36-1.50 (2H, m), 1.14 (3H, t, J = 6.97 Hz)

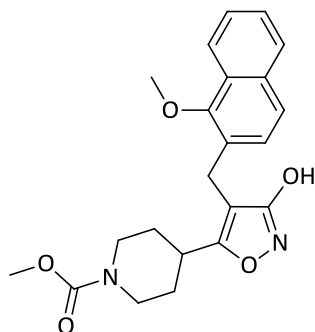
5-(1-Ethoxycarbonyl-4-piperidinyl)-4-(1-fluorethoxynaphth-2-ylmethyl)-isoxazol-3-ol 16

NaOH (64 mg; 1,7 mmol) wurde in Methanol / Wasser (7/0,5 mL) gelöst und auf -30 °C gekühlt. 3-(1-Ethoxycarbonyl-4-piperidinyl)-(1-Fluorethoxy-2-naphthylmethyl)-3-oxopropansäure ethylester **13** (760 mg; 1,6 mmol) wurde in wenig Methanol gelöst, langsam zugetropft und 15 min. bei -30 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von Hydroxylamin-hydrochlorid (222 mg; 3,2 mmol) und NaOH (128 mg; 3,2 mmol) in Methanol / Wasser (7/0,5 mL) zugetropft und 2 h bei -30

°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde bei 80 °C in konz. HCl (2 mL) gegossen, 2 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend das LM im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (30 mL) aufgenommen, mit Et₂O (3 x 40 mL) extrahiert, mit Na₂SO₄ getrocknet und evaporiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde **16** (EtOAc / PE 2:1) (305 mg; 0,69 mmol; 43 %) als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm] = 8.022 (1H, d), 7.817 (1H, dd), 7.623 (1H, d), 7.399 – 7.569 (2H, m), 7.311 (1H, d), 4.812 (2H, abx, $J_1 = 4.044$ Hz, $J_2 = 47.799$ Hz), 4.271 (2H, abx, $J_1 = 4.044$ Hz, $J_2 = 30.150$ Hz), 3.960 – 4.147 (2H, m), 4.058 (2H, q), 3.865 (2H, m), 2.573 – 2.739 (2H, m), 2.509 (1H, tt), 1.510 – 1.787 (2H, m), 1.310 – 1.510 (2H, m), 1.186 (3H, t)

5-(1-Methoxycarbonyl-4-piperidinyl)-4-(1-methoxynaphth-2-ylmethyl)-isoxazol-3-ol **18**

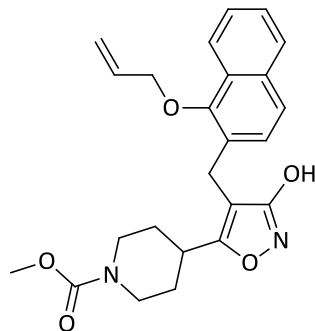


NaOH (64 mg; 1,7 mmol) wurde in Methanol / Wasser (7/0,5 mL) gelöst und auf -30 °C gekühlt. 3-(1-Methoxycarbonyl-4-piperidinyl)-(1-methoxy-2-naphthylmethyl)-3-oxopropansäure ethylester **15** (673 mg; 1,57 mmol) wurde in wenig Methanol gelöst, langsam zugetropft und 15 min. bei -30 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von Hydroxylaminhydrochlorid (243 mg; 3,5 mmol) und NaOH (140 mg; 3,5 mmol) in Methanol / Wasser (7/0,5 mL) zugetropft und 2 h bei -30 °C gerührt. Die

Reaktionslösung wurde bei 80 °C in konz. HCl (1,5 mL) gegossen, 2 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend das LM im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (30 mL) aufgenommen, mit Et_2O (3 x 40 mL) extrahiert, mit Na_2SO_4 getrocknet und evaporiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EtOAc / PE 2:1) wurde **18** (135 mg; 0,33 mmol; 21 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), [ppm] = 8.052 (1H, d), 7.811 (1H, d), 7.430-7.657 (3H, m), 7.302 (1H, d), 4.033 (2H, bs), 3.938 (3H, s), 3.728 (3H, s), 3.170 (2H, s), 2.470-2.644 (2H, m), 2.257 (1H, tt), 1.510-1.714 (2H, m), 1.101-1.276 (2H, m)

5-(1-Methoxycarbonyl-4-piperidinyl)-4-(1-allyloxynaphth-2-ylmethyl)-isoxazol-3-ol **46**



NaOH (190 mg; 4,75 mmol) wurde in Methanol / Wasser (7/0,5 mL) gelöst und auf -30 °C gekühlt. 3-(1-Methoxycarbonyl-4-piperidinyl)-(1-allyloxy-2-naphthylmethyl)-3-oxopropansäure ethylester **45** (2,05 g; 4,5 mmol) wurde in wenig Methanol gelöst, langsam zugetropft und 15 min. bei -30 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von Hydroxylaminhydrochlorid (630 mg; 9 mmol) und NaOH (360 mg; 9 mmol) in Methanol / Wasser (7/0,5 mL) zugetropft und 2 h bei -30 °C gerührt. Die

Reaktionslösung wurde bei 80 °C in konz. HCl (3 mL) gegossen, 2 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend das LM im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (50 mL) aufgenommen, mit Et_2O (3 x 50 mL) extrahiert, mit Na_2SO_4 getrocknet und evaporiert. Nach

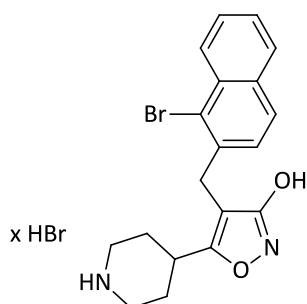
säulenchromatographischer Aufreinigung (CHCl_3 / MeOH 5:1) wurde **46** (1,61 g; 3,8 mmol; 85 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), [ppm] = 7.996-8.051 (1H, m), 7.764-7.840 (1H, m), 7.384-7.557 (3H, m), 7.281 (1H, d), 6.108-6.274 (1H, m), 5.434-5.570 (1H, m), 5.351 (1H, dq), 4.555 (1H, dd), 4.069 (2H, bs), 3.694 (2H, d), 3.592 (3H, d), 2.520-2.775 (2H, m), 2.369 (1H, tt), 1.476-1.668 (2H, m), 1.035-1.354 (2H, m)

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 422.6 (100 $[\text{M}]^+$); 423.6 (26 $[\text{M}+1]^+$); 424.6 (5 $[\text{M}+2]^+$)

4.2.2.4 Entschützung der Isooxazole mit HBr-Essigsäure

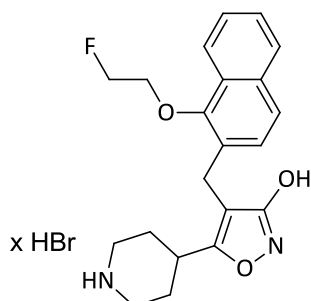
5-(piperidin-4-yl)-4-(1-bromnaphth-2-ylmethyl)-isoxazol-3-ol VK2



Das geschützte Isooxazolol **17** (150 mg; 0,33 mmol) wurde in HBr-Essigsäure (10 mL; 33 %) gelöst und 18 h bei RT gerührt. Das LM wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand 2 - 3 mal mit MeOH coevaporiert. Der Rückstand wurde in MeOH (1 mL) gelöst und das Produkt mit Et_2O (5 mL) ausgefällt. **VK2** (110 mg; 0,24 mmol; 73 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6), δ [ppm] = 8.67 (1H, bs), 8.40 (1H, bs), 8.22 (1H, d, $J = \text{Hz}$), 7.94 (2H, m), 7.68 (1H, m), 7.57 (1H, m), 7.31 (1H, d, $J =$), 3.87 (2H, s), 3.22-3.34 (2H, m), 3.02-3.15 (1H, m), 2.82-3.00 (2H, m), 1.67-1.91 (4H, m)

5-(piperidin-4-yl)-4-(1-fluorethoxynaphth-2-ylmethyl)-isoxazol-3-ol VK1



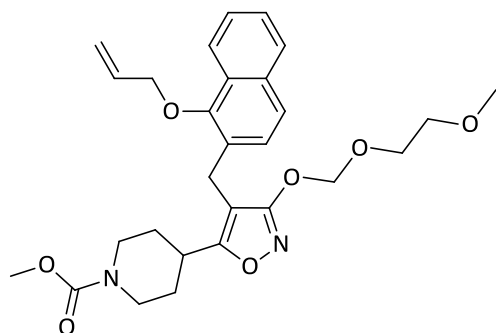
Das geschützte Isooxazolol **16** (132 mg; 0,30 mmol) wurde in HBr-Essigsäure (10 mL; 33 %) gelöst und 18 h bei RT gerührt. Das LM wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand 2 - 3 mal mit MeOH coevaporiert. Der Rückstand wurde in MeOH (1 mL) gelöst und das Produkt mit Et_2O (5 mL) ausgefällt. **VK1** (131 mg; 0,29 mmol; 97 %) wurde als brauner Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6), δ [ppm] = 8.463 (1H, bd), 8.079 (1H, d), 7.898 (1H, d), 7.659 (1H, d), 7.442-7.591 (2H, m), 7.268 (1H, dd), 4.883 (2H, abx), 4.280 (2H, abx), 3.904-4.046 (2H, m), 3.725 (2H, d), 3.305 (2H, bd), 2.662-2.945 (1H, m), 1.568-1.888 (2H, m), 1.305-1.500 (2H, m)

MS (ESI) m/z (% rel. Int.): 371,2 (100,00 $[M+1]^+$); 372,2 (27,55 $[M+2]^+$); 741,36 (4,35 $[2M+1]^+$)

4.2.2.5 Synthese des Markierungsvorläufers MV1

5-(1-Methoxycarbonyl-4-piperidiny)-4-(1-allyloxynaphth-2-ylmethyl)-3-isoxazoyl methoxyethoxymethylether **49**



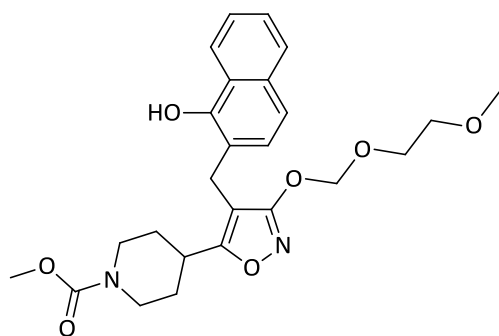
Das Isooxazolol **45** (578 mg; 1,36 mmol) und K_2CO_3 (208 mg; 1,5 mmol) wurden in trockenem Acetonitril (20 mL) gelöst und unter Argon 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde MEMCl (186 mg; 170 μ L; 1,5 mmol) zugegeben und weitere 90 min bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser (20 mL) gequencht, mit Et_2O (2 x 25 mL) extrahiert, mit Na_2SO_4 getrocknet

und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Et_2O) aufgereinigt, um das Produkt **49** (226 mg; 0,44 mmol; 32 %) als farbloses Öl zu erhalten.

^1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = 8.054 (1H, d), 7.764 (1H, d), 7.512 (1H, d), 7.394-7.512 (2H, m), 7.160 (1H, d), 6.119-6.265 (1H, m), 5.506 (1H, abx), 5.398 (2H, s), 5.326 (1H, abx), 4.501 (2H, dt), 4.013 (2H, bs), 3.802 (2H, s), 3.745-3.775 (2H, m), 3.613 (3H, s), 3.435-3.474 (2H, m), 3.312 (3H, s), 2.684 (2H, bt), 2.598 (1H, tt), 1.487-1.687 (4H, m)

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 510.7 (100 $[M]^+$); 511.7 (34 $[M+1]^+$); 512.8 (6 $[M+2]^+$)

5-(1-Methoxycarbonyl-4-piperidiny)-4-(1-hydroxynaphth-2-ylmethyl)-3-isoxazoyl methoxyethoxymethylether **MV1**



Das geschützte Isooxazol **49** (50 mg; 97 μ mol), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium⁽⁰⁾ (5 mg; 5 mol-%) und K_2CO_3 (40 mg; 290 μ mol) wurden in trockenem Methanol (2 mL) suspendiert und unter Argon 60 min bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Wasser (5 mL) gequencht, mit Chloroform (2 x 15 mL) extrahiert, die org. Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und

das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Et_2O) aufgereinigt, um das Produkt **MV1** (26 mg; 55 μ mol; 57 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

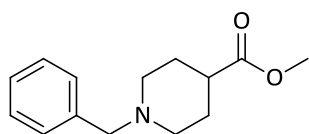
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 8.076 (1H, d), 7.758 (1H, d), 7.421-7.492 (2H, m), 7.361 (1H, d), 7.175 (1H, d), 6.261 (1H, s), 5.411 (2H, s), 4.044 (2H, bs), 3.810-3.840 (2H, m), 3.770 (2H, s), 3.637 (3H, s), 3.503-3.533 (2H, m), 3.322 (3H, s), 2.640-2.776 (2H, m), 2.605 (1H, tt), 1.550-1.684 (4H, m)

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 470.7 (100 $[\text{M}]^+$); 471.7 (29 $[\text{M}+1]^+$); 472.7 (5,7 $[\text{M}+2]^+$)

4.2.3 Synthese der Isothiazolole

4.2.3.1 Synthese des Isothiazol-Grundkörper 28

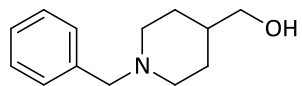
1-Benzylpiperidin-4-carbonsäure methylester 19



4-Methoxycarbonylpiperidin (25 g; 0,175 mol) und K_2CO_3 (17,5 g; 0,125 mol) werden in Aceton (300 mL) gelöst. Unter starkem Rühren wurde Benzylbromid (29,96 g; 0,175 mol) zugetropft und 4 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das LM im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser (150 mL) aufgenommen und mit Chloroform extrahiert (3 x 150 mL). Es wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt, um das Produkt **19** (40 g; 171 mmol; 98 %) als gelbes Öl zu erhalten.

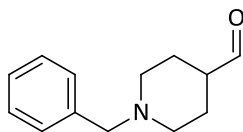
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3) δ (ppm) = 7.194-7.300 (5H, m), 3.650 (3H, s), 3.468 (2H, s), 2.800-2.861 (2H, dt, $J_1 = 12.13$ Hz, $J_2 = 3.67$ Hz), 2.226-2.339 (1H, tt, $J_1 = 4.04$ Hz, $J_2 = 11.03$ Hz), 1.958-2.044 (2H, dt, $J_1 = 2.94$ Hz, $J_2 = 11.40$ Hz), 1.677-1.894 (4H, m)

1-Benzyl-4-hydroxymethyl-piperidin 20



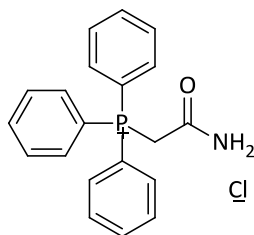
1-Benzylpiperidin-4-carbonsäuremethylester **19** (40 g; 171 mmol) werden in trockenem THF (200 mL) gelöst und unter Argon und Eisbadkühlung mit LiAlH_4 (3,5 g; 92 mmol) versetzt. Es wurde 4 h bei RT gerührt, unter Kühlung mit Wasser gequencht und mit Chloroform extrahiert (4 x 200 mL). Die organische Phase wurde mit wenig Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt, um das Produkt **20** (32,26 g; 157 mmol; Ausbeute: 92 %) als gelbes Öl zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3) δ (ppm) = 7.178-7.393 (5H, m), 3.475 (2H, s), 3.443 (2H, d), 2.875 (2H, dt), 1.930 (2H, td), 1.820 (1H, m), 1.682 (2H, bd), 1.474 (1H, tt), 1.178-1.322 (2H, m)

1-Benzyl-4-formyl-piperidin 21

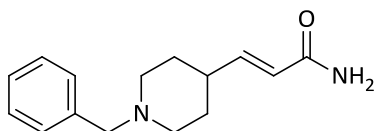
Oxalylchlorid (15 g; 10,5 mL; 118 mmol) wurde in DCM (100 mL) gelöst und unter Argon als Schutzgas auf -78 °C gekühlt. Unter Rühren wurde eine Lösung aus Dimethylsulfoxid (18,5 g; 16,8 mL; 235 mmol) in DCM (100 mL) tropfenweise zugegeben und für 15 min bei -78 °C gerührt. Anschließend wird eine Lösung aus 1-Benzyl-4-hydroxymethylpiperidin **20** (15 g; 73 mmol) in DCM (60 mL) tropfenweise zugegeben und 15 min bei -60 bis -65 °C gerührt. Bei -78 °C wird Triethylamin (34 g; 47 mL; 335 mmol) in einem Mal zugegeben, über Nacht bei RT gerührt und anschließend in Wasser (250 mL) gegossen. Es wird mit DCM (2 x 150 mL) extrahiert, mit wenig Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet und das LM im Vakuum entfernt um **21** (12,03 g; 59 mmol; Ausbeute: 80 %) als braunes Öl zu erhalten.

¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃) δ (ppm) = 9.625 (1H, s), 7.282 (5H, s), 3.478 (2H, s), 2.793 (2H, dt), 2.221 (1H, tt), 2.078 (2H, td), 1.798-1.898 (2H, m), 1.588-1.727 (2H, m)

2-(Triphenylphosphonium)-acetamid bromid 22

Chloracetamid (18,7 g; 0,2 mol) und Triphenylphosphin (52,5 g; 0,2 mol) wurden in EtOAc (250 mL) gelöst und 48 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde der NS abgesaugt, mit wenig EtOAc gewaschen und im Vakuum getrocknet, um **22** (65,2 g; 18,3 mmol; Ausbeute: 92 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

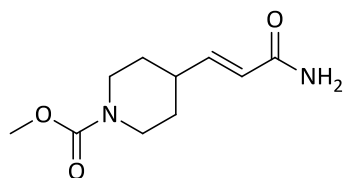
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7,34 (15H, m), 4.02 (2H, s)

3-(1-Benzyl-piperidin-4-yl)-propenamid 23

Das Wittig-Salz **22** (40 g; 111 mmol) wurde in THF (500 mL) suspendiert und unter Argon auf -10 °C gekühlt. Unter Rühren wurde langsam Kalium-*tert*-butylat (14,9 g; 133 mmol) zugegeben und weitere 60 min. bei -10 °C gerührt. Das Aldehyd **21** (22,6 g; 111 mmol) wurde in THF (100 mL) gelöst, langsam zugetropft und weitere 20 h bei RT gerührt. Das LM wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 1 M HCl (300 mL) aufgenommen und mit EtOAc (3 x 150 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 3 M NaOH basisch gestellt (pH 12), mit EtOAc (3 x 200 mL) extrahiert, die organische Phase mit Na₂SO₄ getrocknet und das LM im Vakuum entfernt, um **23** (23.15 g; 94,7 mmol; 85 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3) δ (ppm) = 7.177-7.360 (5H, m), 6.774 (1H, dd), 5.772 (1H, dd), 5.684 (2H, bd), 3.477 (3H, s), 2.859 (2H, dt), 2.104 (1H, tt), 1.977 (2H, td), 1.659 (2H, bd), 1.376-1.574 (2H, m)

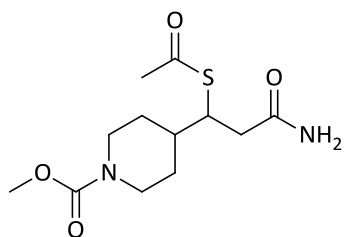
3-(1-Methoxycarbonyl-piperidin-4-yl)-propenamid **24**



3-(1-Benzyl-4-piperidinyl)-2-propenamid **23** (18,15 g; 74,3 mmol) wurde als Feststoff in einem 250 mL Zweihalskolben mit Rückflusskühler und Tropftrichter unter Argon vorgelegt. Unter Rühren wurde Methylchlorformat (11 mL; 141 mmol) schnell zugegeben und für 24 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit Wasser (100 mL) gequencht, mit Chloroform (3 x 150 mL) extrahiert, mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde nach 24 h im Hochvakuum in wenig EtOAc suspendiert und abgesaugt, um **24** (11,6 g; 55 mmol; 74 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3) δ (ppm) = 6.763 (1H, dd), 5.798 (1H, dd), 5.562-5.577 (2H, m), 4.123 (2H, bs), 3.660 (3H, s), 2.779 (2H, bt), 2.257 (1H, tt), 1.680 (2H, bd), 1.184-1.380 (2H, m)

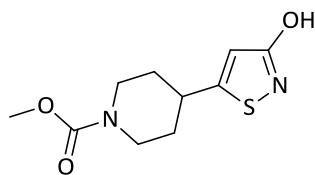
3-Acetylsulfanyl-3-(1-methoxycarbonyl-naphth-4-yl)-propanamid **25**



Das Propanamid **24** (11,6 g; 54,6 mmol) wurde in EtOAc (60 mL) suspendiert, mit Thioschwefelsäure (4,5 mL; 62 mmol) versetzt und 3 d bei RT gerührt. Anschließend wurde das LM im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Chloroform / MeOH 6:1) aufgereinigt, um **25** (11,9 g; 41,4 mmol; 76 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3) δ (ppm) = 5.889 (2H, bd), 4.112 (2H, bs), 3.780 (1H, q), 3.628 (3H, s), 2.559-2.774 (2H, m), 2.511 (2H, t), 2.296 (3H, s), 1.837 (1H, tt), 1.559-1.786 (2H, m), 1.041-1.345 (2H, m)

5-(1-Methoxycarbonyl-naphth-4-yl)-isothiazol-3-ol **26**



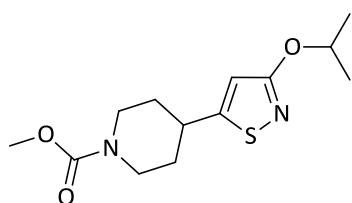
Das Propanamid **25** (15,23 g; 52,8 mmol) wurde in einer Lösung aus NaOH (5,17 g; 130 mmol) in Wasser (90 mL) suspendiert und 6 h bei RT gerührt. Es wurde mit 3 M HCl pH 5 eingestellt, mit DCM (3 x 150 mL) extrahiert, mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Der Feststoff (10,1 g) wurde erneut in Wasser (100 mL) suspendiert, auf 45 °C erhitzt und tropfenweise

mit H_2O_2 (35 %; 2,49 mL; 29,4 mmol) versetzt. Es wurde für 24 h bei 45 °C gerührt, anschließend das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in DCM (250 mL) aufgenommen, mit Na_2SO_4 getrocknet und erneut evaporiert. Der entstandene Feststoff wurde in Dichlorethan (100 mL) gelöst, SO_2Cl_2 (2,14 mL; 26,4 mmol) langsam zugetropft und 16 h bei RT gerührt. Nach erneuter Zugabe von SO_2Cl_2 (1,07 mL; 13,2 mmol) wurde erneut 16 h gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser (100 mL) aufgenommen, mit DCM (4 x 100 mL) extrahiert und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, um **26** (8,24 g; 34 mmol; 64 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

^1H -NMR (300 MHz; CDCl_3) δ (ppm) = 6.295 (1H, s), 4.202 (2H, bs), 3.682 (3H, s), 2.957 (1H, tt), 2.873 (2H, bt), 1.948 (2H, bd), 1.484-1.682 (2H, m)

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 242.4 (100 $[\text{M}]^+$); 243.3 (8 $[\text{M}+1]^+$)

3-Isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-naphth-4-yl)-isothiazol 27

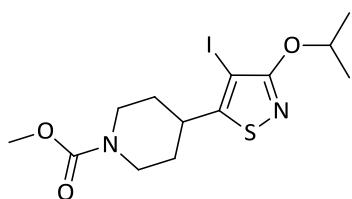


Das Isothiazolol **26** (3,17 g; 13,1 mmol) und K_2CO_3 (2 g; 14,4 mmol) wurden in trockenem Acetonitril (80 mL) gelöst und unter Argon 30 min bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde Isopropylbromid (1,85 mL; 19,7 mmol) zugegeben und weitere 20 h auf 60 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum evaporiert, der Rückstand in Wasser (80 mL) aufgenommen und mit Chloroform (2 x 100 mL) extrahiert. Es wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, evaporiert und der Rückstand säulenchromatographisch (EtOAc / n-Hexan 1:2) aufgereinigt, um **27** (3,14 g; 11,1 mmol; 85 %) als farbloses Öl zu erhalten.

^1H -NMR (300 MHz; CDCl_3) δ (ppm) = 6.278 (1H, s), 5.107 (1H, hept), 4.183 (2H, bs), 3.679 (3H, s), 2.946 (1H, tt), 2.870 (2H, bt), 1.937 (2H, bd), 1.493-1.670 (2H, m), 1.340 (3H, s), 1.319 (3H, s)

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 510.7 (100 $[\text{M}]^+$); 511.7 (34 $[\text{M}+1]^+$); 512.8 (6 $[\text{M}+2]^+$)

4-Iod-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-naphth-4-yl)-isothiazol 28



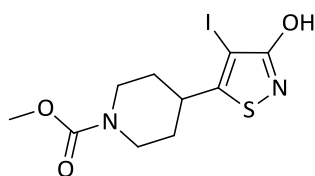
Das geschützte Isothiazol **27** (1,2 g; 4,2 mmol) wurde in Essigsäure (10 mL) gelöst und eine Lösung von Iodmonochlorid (1,2 g; 7,4 mmol) in Essigsäure (6 mL) langsam zugetropft. Der Reaktionskolben (25 mL) wurde mit Wasser (10 mL) aufgefüllt und 16 h auf 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ bis zur Entfärbung zugegeben, das LM im Vakuum entfernt, der Rückstand in 30 mL Wasser aufgenommen und mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organische Phase

wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, evaporiert und der Rückstand säulenchromatographisch (EtOAc / nHexan 1:2) aufgereinigt, um **28** (1,43 g; 3,4 mmol; 81 %) als farbloses Öl zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3) δ (ppm) = 5.121 (1H, hept), 4.242 (2H, bs), 3.692 (3H, s), 3.051 (1H, tt), 2.877 (2H, bt), 1.982 (2H, bd), 1.410-1.640 (2H, m), 1.382 (3H, s), 1.361 (3H, s)

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 410.4 (100 $[\text{M}]^+$); 411.4 (8 $[\text{M}+1]^+$); 412.4 (1 $[\text{M}+2]^+$)

4-Iod-5-(1-methoxycarbonyl-naphth-4-yl)-isothiazol-3-ol MV8G



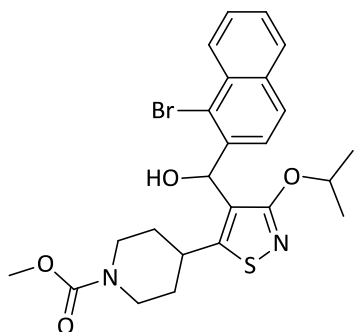
Das Isothiazol **26** (1,43 g; 6 mmol) wurde in Essigsäure (6 mL) gelöst und eine Lösung von Iodmonochlorid (1,44 g; 8,9 mmol) in Essigsäure (6 mL) langsam zugetropft. Das Reaktionsvial (20 mL) wurde mit Wasser aufgefüllt und 16 h auf 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

bis zur Entfärbung zugegeben, das Reaktionsgemisch im Scheidetrichter mit 30 mL Wasser verdünnt und mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert, um das Produkt (1,172 g; 3,2 mmol; 54 %) als orangenen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3) δ (ppm) = 4.257 (2H, bs), 3.695 (3H, s), 3.071 (1H, tt), 2.790-2.964 (2H, bt), 1.913-2.063 (2H, bt), 1.433-1.670 (2H, m)

4.2.3.2 Kopplung der 2-Formylnaphthaline an Grundkörper 28

4-((1-Bromnaphth-2-yl)hydroxymethyl)-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-piperidin-4-yl)-isothiazol 34

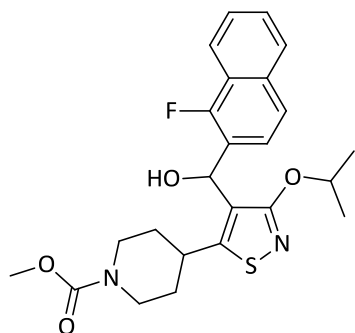


4-Iod-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-naphth-4-yl)-isothiazol **28** (1,22 g; 3 mmol) wurden in trockenem THF (30 mL) gelöst, auf -30 °C gekühlt, EtMgBr (3 mmol; 3 M in Et_2O) langsam zugetropft und 2,5 h bei 0 °C gerührt. 1-Brom-2-formylnaphthalin **32** (700 mg; 3 mmol) wurden in THF (2 mL) gelöst, langsam zugetropft und die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit Wasser (50 mL) gequencht, mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert, mit Na_2SO_4 getrocknet

und evaporiert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (EtOAc / nHexan 1:2) aufgereinigt, um **34** (545 mg; 1,05 mmol; 35 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3) δ (ppm) = 8.292 (1H, d), 7.723-7.820 (3H, m), 7.587 (1H, t), 7.520 (1H, t), 6.380 (1H, d), 5.210 (1H, h), 4.062 (bs), 3.631 (3H, s), 3.408 (1H, d), 2.962 (1H, tt), 2.402-2.686 (2H, m), 1.586-1.771 (2H, m), 1.340-1.486 (2H, m), 1.320 (3H, d), 1.290 (3H, d)

4-((1-Fluornaphth-2-yl)hydroxymethyl)-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-piperidin-4-yl)-isothiazol 35



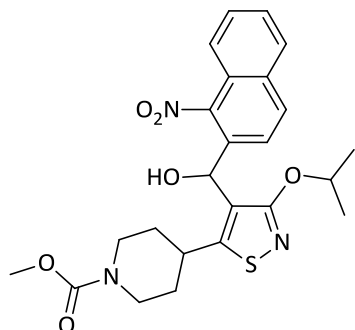
4-Iod-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-naphth-4-yl)-isothiazol **28** (556 mg; 1,36 mmol) wurden in trockenem THF (20 mL) gelöst, auf -30 °C gekühlt, EtMgBr (1,4 mmol; 3 M in Et_2O) langsam zugetropft und 2,5 h bei 0 °C gerührt. 1-Fluor-2-formylnaphthalin **34** (236 mg; 1,36 mmol) wurden in THF (2 mL) gelöst, langsam zugetropft und die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit Wasser (20 mL) gequencht, mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert, mit Na_2SO_4

getrocknet und evaporiert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (EtOAc / $n\text{Hexan}$ 1:2) aufgereinigt, um **35** (551 mg; 1,2 mmol; 89 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), [ppm] = 8.036 (1H, d), 7.778-7.835 (1H, m), 7.583-7.671 (2H, m), 7.471-7.529 (2H, m), 6.292 (1H, d), 5.185 (1H, h), 4.191 (2H, bs), 3.670 (3H, s), 3.605 (1H, d), 3.250 (1H, tt), 2.684-2.888 (2H, m), 1.849 (2H, bt), 1.401-1.559 (2H, m), 1.369 (3H, d), 1.286 (3H, d)

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 458.5 (100 $[\text{M}]^+$); 459.5 (28 $[\text{M}+1]^+$); 460.5 (7 $[\text{M}+2]^+$)

4-((1-Nitronaphth-2-yl)hydroxymethyl)-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-piperidin-4-yl)-isothiazol 59



4-Iod-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-naphth-4-yl)-isothiazol **28** (810 mg; 1,98 mmol) wurden in trockenem THF (20 mL) gelöst, auf -30 °C gekühlt, EtMgBr (2,05 mmol; 3 M in Et_2O) langsam zugetropft und 2,5 h bei 0 °C gerührt. 1-Nitro-2-formylnaphthalin **58** (362 mg; 1,8 mmol) wurden in THF (2 mL) gelöst, langsam zugetropft und die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit Wasser (20 mL) gequencht, mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert, mit Na_2SO_4

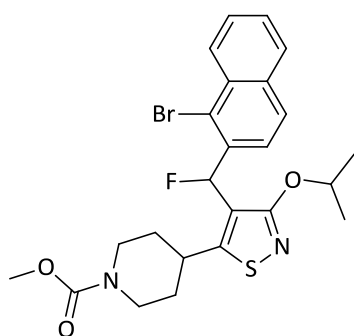
getrocknet und evaporiert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (EtOAc / $n\text{Hexan}$ 1:1) aufgereinigt, um **59** (355 mg; 0,73 mmol; 41 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), [ppm] = 7.909 (1H, d), 7.877 (1H, d), 7.710 (1H, d), 7.550-7.652 (2H, m), 7.518 (1H, d), 6.151 (1H, s), 5.110 (1H, h), 4.161 (2H, bs), 3.664 (3H, s), 3.159 (1H, tt), 2.665-2.860 (2H, m), 1.872 (2H, bt), 1.395-1.613 (2H, m), 1.211 (3H, d), 1.119 (3H, d)

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 485.7 (100 $[\text{M}]^+$); 486.7 (24 $[\text{M}+1]^+$); 487.7 (6 $[\text{M}+2]^+$)

4.2.3.3 Fluorierung des Alkohols 34 mittels DAST

4-(1-Bromnaphth-2-yl)fluormethyl-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonylpiperidin-4-yl)isothiazol 40

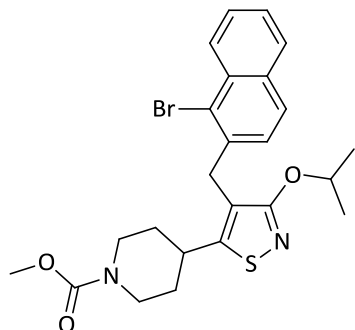


Diethylaminoschwefeltrifluorid (85 mg; 0,43 mmol) wird in trockenem DCM (10 mL) unter Argon als Schutzgas vorgelegt und auf $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Der Alkohol VK4J (200 mg; 0,39 mmol) wird in trockenem DCM (10 mL) gelöst und langsam zugetropft. Es wird 15 min bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 60 min bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$, 60 min bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ und 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird unter Kühlung 5 % Na_2CO_3 -Lösung (15 mL) zugegeben. Die Phasen werden getrennt, die

wässrige Phase mit Diethylether extrahiert, die organischen Phasen mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet um **40** (185 mg; 0,35 mmol; 81 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

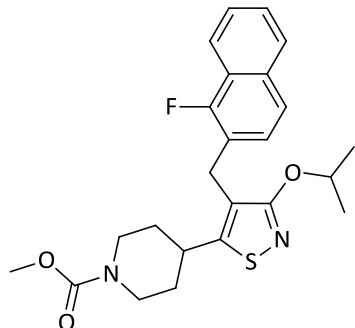
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3) δ (ppm) = 8.253 (1H, d, $J = 7.73\text{ Hz}$), 7.727-7.889 (3H, m), 7.509-7.609 (2H, m), 6.890 (1H, s), 5.061 (1H, h), 4.111 (2H, bd), 3.652 (3H, s), 3.033 (1H, tt, $J_1 = 11.77\text{ Hz}$, $J_2 = 4.04\text{ Hz}$), 2.731 (1H, bt), 2.445 (1H, bt), 2.022 (1H, bd), 1.410-1.624 (3H, m), 1.237 (3H, d, $J = 6.251\text{ Hz}$), 1.106 (3H, d, $J = 6.251\text{ Hz}$)

4.2.3.4 Reduktion zu den Diarylmethanen

4-((1-Bromnaphth-2-ylmethyl)-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-piperidin-4-yl)isothiazol 36

Das Edukt **34** (374 mg; 0,72 mmol) wurde unter Argon in trockenem DCM (8 mL) gelöst und mit Triethylsilan (180 μ L; 1,14 mmol) versetzt. Trifluoressigsäure (1,3 mL; 18 mmol) wurde tropfenweise zugegeben und anschließend 2 h unter Rückfluss erhitzt. Es wurde mit Wasser (30 mL) gequench, mit Et₂O (3 x 30 mL) extrahiert, mit Na₂SO₄ getrocknet und das LM im Vakuum entfernt, um **36** (379 mg; 0,71,5 mmol; 99 %) als farbloses Öl zu erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), [ppm] = 8.317 (1H, d), 7.768 (1H, d), 7.656 (1H, d), 7.586 (1H, t), 7.485 (1H, t), 7.086 (1H, t), 5.158 (1H, h), 4.164 (2H, s), 4.103 (2H, bs), 3.662 (3H, s), 3.022 (1H, tt), 2.704 (2H, bt), 1.685 (2H, bd), 1.378-1.548 (2H, m), 1.305 (6H, d)

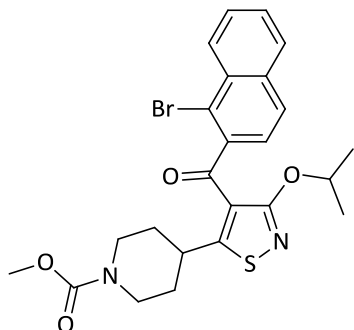
4-((1-Fluornaphth-2-ylmethyl)-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-piperidin-4-yl)isothiazol 37

Der Alkohol **35** (165,4 mg; 0,36 mmol) wurde unter Argon in trockenem DCM (5 mL) gelöst und mit Triethylsilan (67 mg; 93 μ L; 0,58 mmol) versetzt. Trifluoressigsäure (680 μ L; 8,8 mmol) wurde tropfenweise zugegeben und anschließend 2 h unter Rückfluss erhitzt. Es wurde mit Wasser (10 mL) gequench, mit Et₂O (3 x 20 mL) extrahiert, mit Na₂SO₄ getrocknet und das LM im Vakuum entfernt, um **37** (155 mg; 0,35 mmol; 97 %) als farbloses Öl zu erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), [ppm] = 8.027 (1H, d), 7.777 (1H, d), 7.493 (2H, d), 7.436-7.598 (2H, m), 5.138 (1H, tt), 4.170 (2H, bs), 3.959 (2H, s), 3.681 (3H, s), 3.157 (1H, tt), 2.804 (2H, bt), 1.776 (2H, bd), 1.423-1.601 (2H, m), 1.309 (6H, d)

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 442.5 (100 [M]⁺); 443.5 (25 [M+1]⁺); 444.5 (5 [M+2]⁺)

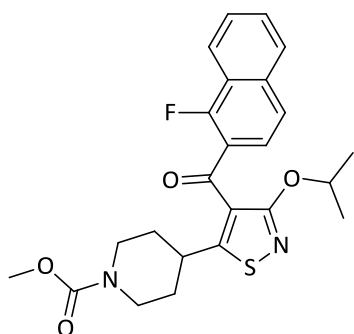
4.2.3.5 Oxidation zu den Diarylketonen

4-((1-Bromnaphth-2-oyl)-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-piperidin-4-yl)isothiazol 38

Eine Lösung von Oxalylchlorid (150 mg; 102 μ L; 1,18 mmol) in Dichlormethan (1 mL) wurde unter Argon als Schutzgas auf -78°C gekühlt. Unter Rühren wurde eine Lösung aus Dimethylsulfoxid (185 mg; 168 μ L; 2,35 mmol) in Dichlormethan (1 mL) tropfenweise zugegeben und für weitere 15 min gerührt. Anschließend wurde **34** (200mg; 0,39 mmol) in Dichlormethan (1 mL) gelöst, tropfenweise zugegeben und 15 min bei -60 bis -65°C gerührt. Bei -78°C wurde

Triethylamin (340mg; 470 μ L; 3,35 mmol) in einem Mal zugegeben und das Reaktionsgemisch bei RT über Nacht gerührt und in Wasser gegossen. Es wurde mit Chloroform extrahiert, mit wenig Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt, um **38** (96 mg; 0,19 mmol; 49 %) als gelben Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), [ppm] = 8.314 (1H, d), 7.772 (1H, d), 7.656 (1H, d), 7.586 (1H, t), 7.485 (1H, t), 7.086 (1H, d), 5.158 (1H, h), 4.164 (2H, s), 4.098 (2H, bs), 3.662 (3H, s), 3.022 (1H, tt), 2.700 (2H, bt), 1.708 (2H, bd), 1.378-1.548 (2H, m), 1.286 (6H, d)

4-((1-Fluornaphth-2-oyl)-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-piperidin-4-yl)isothiazol 39

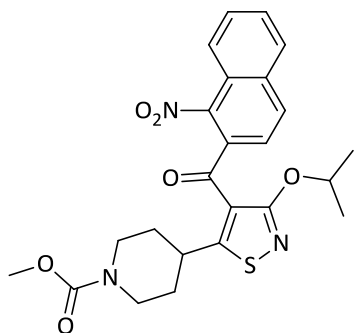
Eine Lösung von Oxalylchlorid (124 μ L; 1,4 mmol) in Dichlormethan (2 mL) wurde unter Argon als Schutzgas auf -78°C gekühlt. Unter Rühren wurde eine Lösung aus Dimethylsulfoxid (200 μ L; 2,8 mmol) in Dichlormethan (2 mL) tropfenweise zugegeben und für weitere 15 min gerührt. Anschließend wurde **35** (245mg; 0,53 mmol) in Dichlormethan (1 mL) gelöst, tropfenweise zugegeben und 15 min bei -60 bis -65°C gerührt. Bei -78°C wurde Triethylamin (588 μ L; 4,2

mmol) in einem Mal zugegeben und das Reaktionsgemisch bei RT über Nacht gerührt und in Wasser gegossen. Es wurde mit Chloroform extrahiert, mit wenig Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (EtOAc / nHexan 1:1) aufgereinigt, um **39** (200 mg; 0,44 mmol; 83 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), [ppm] = 8.087 (1H, d), 7.861 (1H, d), 7.632-7.659 (2H, m), 7.526-7.627 (2H, m), 5.005 (1H, tt), 4.239 (2H, bs), 3.690 (3H, s), 3.619 (1H, tt), 2.871 (2H, bt), 2.120 (2H, bd), 1.497-1.673 (2H, m), 0.881 (6H, d)

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 456.5 (100 [M]⁺); 457.5 (28 [M+1]⁺); 458.5 (10 [M+2]⁺)

4-((1-Nitronaphth-2-oyl)-3-isopropoxy-5-(1-methoxycarbonyl-piperidin-4-yl)isothiazol MV2



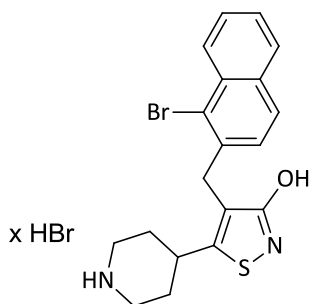
Eine Lösung von Oxalylchlorid (124 μ L; 1,46 mmol) in Dichlormethan (1 mL) wurde unter Argon als Schutzgas auf -78 °C gekühlt. Unter Rühren wurde eine Lösung aus Dimethylsulfoxid (200 μ L; 2,8 mmol) in Dichlormethan (1 mL) tropfenweise zugegeben und für weitere 15 min gerührt. Anschließend wurde **59** (259mg; 0,53 mmol) in Dichlormethan (1 mL) gelöst, tropfenweise zugegeben und 15 min bei -60 bis -65 °C gerührt. Bei -78 °C wurde Triethylamin (588 μ L; 4,2 mmol) in einem Mal zugegeben und das Reaktionsgemisch bei RT über Nacht gerührt und in Wasser gegossen. Es wurde mit Chloroform extrahiert, mit wenig Wasser gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (EtOAc / nHexan 1:1) aufgereinigt, um **MV2** (207 mg; 0,43 mmol; 80 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), [ppm] = 8.172 (1H, d), 8.070 (1H, d), 7.949 (1H, d), 7.625-7.745 (2H, m), 7.400 (1H, d), 4.840 (1H, h), 4.277 (2H, bs), 3.800 (1H, tt), 3.701 (3H, s), 2.924 (2H, bt), 2.165 (2H, bd), 1.493-1.656 (2H, m), 0.731 (6H, d)

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 483.7 (100 [M]⁺); 484.7 (37 [M+1]⁺); 485.7 (7 [M+2]⁺)

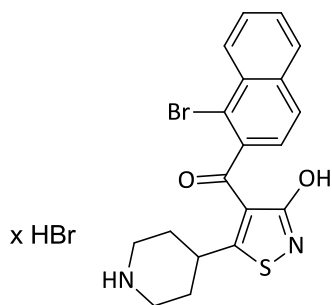
4.2.3.6 Entschützung mit HBr-Essigsäure

5-(piperidin-4-yl)-4-(1-bromnaphth-2-ylmethyl)-isothiazol-3-ol VK4



Das geschützte Isothiazolol **36** (172 mg; 0,34 mmol) wurde in HBr-Essigsäure (15 mL; 33 %) gelöst und 48 h auf 65 °C erhitzt. Das LM wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand 2 - 3 mal mit MeOH coevaporiert. Der Rückstand wurde in MeOH (1 mL) gelöst und das Produkt mit Et₂O (5 mL) ausgefällt. **VK4** (43 mg; 0,1 mmol; 29 %) wurde als brauner Feststoff erhalten.

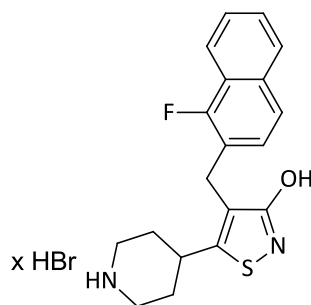
¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆) δ (ppm) = 8.630 (1H, bs), 8.360 (1H, bs), 8.236 (1H, d, J = 8.089 Hz), 7.921 (1H, d, J = 7.72 Hz), 7.861 (1H, d, J = 8.457 Hz), 7.668 (1H, t, J = 7.354 Hz), 7.562 (1H, t, J = 7.354 Hz), 6.944-7.146 (1H, m), 4.102 (2H, s), 3.367 (1H, m), 3.283 (2H, bd), 2.829-3.008 (2H, m), 1.919 (2H, bd), 1.566-1.806 (2H, m)

5-(piperidin-4-yl)-4-(1-bromnaphth-2-oyl)-isothiazol-3-ol VK6

Das geschützte Isothiazolol **38** (85 mg; 16,4 mmol) wurde in HBr-Essigsäure (10 mL; 33 %) gelöst und 48 h auf 65 °C erhitzt. Das LM wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand 2 - 3 mal mit MeOH coevaporiert. Der Rückstand wurde in MeOH (1 mL) gelöst und das Produkt mit Et₂O (5 mL) ausgefällt. **VK6** (64 mg; 0,13 mmol; 79 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

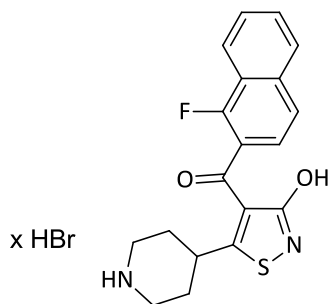
¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆) δ (ppm) = 8.714 (1H, bs), 8.424 (1H, bs), 8.222 (1H, d, J = 8.089 Hz), 8.025 (2H, d, J = 8.457 Hz), 7.636-7.789 (2H, m), 7.446 (1H, bd), 2.988-3.193 (2H, m), 2.191-2.329 (2H, m), 1.606 (1H, m), 1.704-1.906 (2H, m), 0.944-1.207 (2H, m)

MS (ESI) m/z (% rel. Int.): 417.0 (100 [M]⁺); 418.0 (17 [M+1]⁺); 419.0 (98 [M+2]⁺)

5-(piperidin-4-yl)-4-(1-fluornaphth-2-ylmethyl)-isothiazol-3-ol VK5

Das geschützte Isothiazolol **37** (130 mg; 0,29 mmol) wurde in HBr-Essigsäure (10 mL; 33 %) gelöst und 48 h auf 65 °C erhitzt. Das LM wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand 2 - 3 mal mit MeOH coevaporiert. Der Rückstand wurde in MeOH (1 mL) gelöst und das Produkt mit Et₂O (5 mL) ausgefällt. **VK5** (125 mg; 29 mmol; 99 %) wurde als brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), [ppm] = 8.576 (2H, bd), 8.014 (1H, d), 7.916 (1H, d), 7.668 (1H, d), 7.568 (2H, t), 7.238 (1H, t), 3.980 (2H, s), 3.405-3.570 (1H, m), 3.323 (2H, bd), 3.009 (2H, bt), 1.870-2.047 (2H, m), 1.647-1.849 (2H, m)

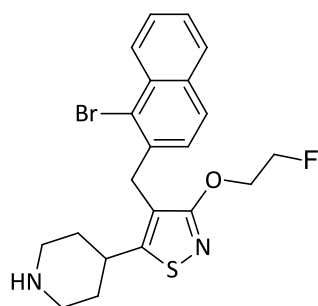
5-(piperidin-4-yl)-4-(1-fluoronaphth-2-oyl)-isothiazol-3-ol VK7

Das geschützte Isothiazolol **39** (150 mg; 0,33 mmol) wurde in HBr-Essigsäure (10; 33 %) gelöst und 48 h auf 65 °C erhitzt. Das LM wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand 2 - 3 mal mit MeOH coevaporiert. Der Rückstand wurde in MeOH (1 mL) gelöst und das Produkt mit Et₂O (5 mL) ausgefällt. **VK7** (116 mg; 0,26 mmol; 81 %) wurde als brauner Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), [ppm] = 8.572 (1H, bs), 8.314 (1H, bs), 8.039 (1H, d), 7.941 (2H, d), 7.488-7.648 (2H, m), 7.386 (1H, bd), 2.988-3.193 (2H, m), 2.191-2.329 (2H, m), 1.516 (1H, t), 1.681-1.844 (2H, m), 0.953-1.187 (2H, m)

MS (FD) m/z (% rel. Int.): 356.0 (100 $[\text{M}]^+$); 357.0 (51 $[\text{M}+1]^+$); 358.0 (6 $[\text{M}+2]^+$)

5-(piperidin-4-yl)-4-(1-bromnaphth-2-ylmethyl)-3-(1-fluorethoxy)isothiazol VK10



Das Isothiazolol **VK4** (40 mg; 86 μmol) und K_2CO_3 (24 mg; 172 μmol) wurden in DMF (5 mL) gelöst und 15 min. bei RT gerührt. Anschließend wurde Fluorethyltosylat (20 mg; 43 μmol) in DMF (1 mL) gelöst, zugegeben und die Reaktionslösung 2 h auf 85 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit einem semipräparativen HPLC-System (HPLC-System 1) aufgereinigt. Als stationäre Phase wurde dabei eine Säule der Firma Phenomenex

(Synergy Max-RP, 4 μm , 10 x 250 mm) und als mobile Phase 0,05 M Ammoniumformiat-Puffer/MeCN verwendet. Gradient: 0-5 min 70/30, 5-15 min 70/30>30/70, 15-20 min 30/70, 20-23 min 30/70>70/30, 23-25 min 70/30 Retentionszeit: 17,5 min. **VK10** (23 mg; 51 μmol ; 60 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; DMSO-d_6) δ (ppm) = 8.324 (1H, s), 8.227 (1H, d), 7.923 (1H, d), 7.865 (1H, d), 7.683 (1H, t), 7.566 (1H, t), 7.150 (1H, d), 4.687 (1H, m), 4.512 (2H, m), 4.170 (1H, m), 4.170 (2H, s), 3.228 (1H, tt), 3.102 (2H, bd), 2.701 (2H, t), 1.800 (2H, bd), 1.481-1.662 (2H, m)

4.3 Evaluierungen

4.3.1 Bestimmung der Affinitäten

Zur Evaluierung der synthetisierten ^{19}F -Verbindungen wurden Radioliganden-Bindungsstudien durchgeführt, um die Affinitäten zum GABA_A-Rezeptor generell und dessen unterschiedlichen Zusammensetzungen zu bestimmen. Es handelte sich hierbei um Kompetitionsbindungsstudien mit dem tritiierten GABA-Agonisten [^3H]Muscimol (20-30 Ci/mmol, Perkin Elmer). Es wurden Ratten-gehirnmembranpräparationen und heterolog transfizierte HEK293-Zellmembranpräparationen eingesetzt. Die Transfektion erfolgte nach der Kalzium-Phosphat-Methode wie bei Lüddens (Lüddens et al., 1997) beschrieben. Eine bestimmte Menge an Rezeptor enthaltenden Membran (100-200 μg) und [^3H]Muscimol (6 nM) wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz im gleichen Ansatz 1 Stunde lang auf Eis in Puffer (Tris/Citrat pH 7,4) inkubiert. Falls eine Spezifität für die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor vorhanden war, fand eine Verdrängung statt. Anschließend wurde durch schnelles Waschen und Filtrieren unter Vakuum (Cell Harvester, Brandel) nicht gebundener Ligand entfernt und die Menge von gebundenem [^3H]Muscimol mittels Messung der Radioaktivität des Filterpapiers in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Beckman Coulther LS 6500) bestimmt. Zur Berechnung der IC_{50} -Werte wurde mit Hilfe der Graphpad Prism Software eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt (siehe Abb. 70).

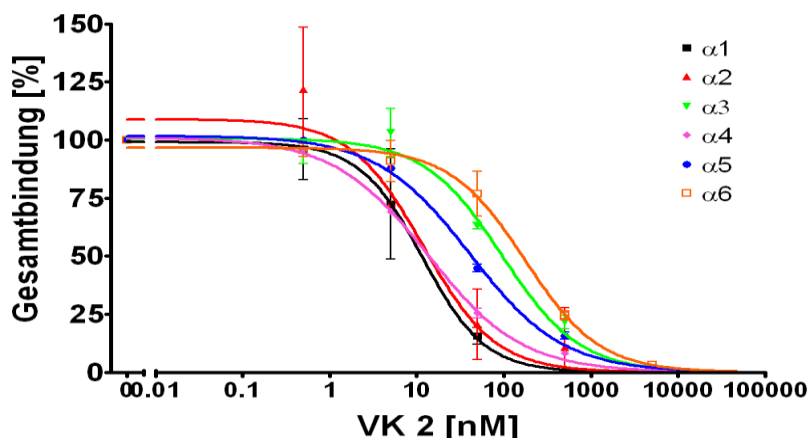


Abb. 70: Dosis-Wirkungs-Kurve einer Kompetitionsstudie mit VK2

4.3.2 Bestimmung der Lipophilien mittels HPLC

Zur Bestimmung der Lipophilien wurden die Retentionszeiten von Eichsubstanzen mit bekannten Log D-Werten bestimmt und daraus die entsprechenden Kapazitätsfaktoren errechnet. Durch graphische Auftragung von Log D gegen Log k wurde eine Regressionsgerade bestimmt mit der die Log k-Werte der Referenzverbindungen aus deren Retentionszeiten errechnet wurden (siehe Tab. 9).

Dazu wurden jeweils 1 mg Benzaldehyd, Anisol, Toluol, 4-Bromanisol und 4-Iodanisol in 1 mL Laufmittel gelöst und als Injektionsvolumen 10 µL der jeweiligen Lösung in HPLC-System 2 injiziert. Die Retentionszeiten der zu untersuchenden Substanzen werden auf dem gleichen Weg ermittelt. Die Kapazität der Säule wird anhand der Retentionszeit von Ascorbat bestimmt.

Als stationäre Phase wurde eine LiChrospher 100 RP-18 HPLC-Säule (EC-5 µ, 8,0 x 250 mm, CS-Chromatographie GmbH) verwendet. Als mobile Phase wurde Methanol/Sörensenpuffer im Verhältnis 75/25 bei einer Flussrate von 1 mL/min gewählt (Sörensen-Puffer: 910 mg KH_2PO_4 , 2,047 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ in 1000 mL H_2O).

Tab. 9: Log D-Werte und Retentionszeiten der Eichsubstanzen zur Lipophiliebestimmung

Eichsubstanz	t_R / min	Log k	Log D
Ascorbat	1,536	/	/
Benzaldehyd	2,971	-0,029	1,48
Anisol	4,486	0,284	2,11
Toluol	6,749	0,531	2,73
4-Bromanisol	7,286	0,573	3,05
4-Iodanisol	8,706	0,669	3,24
Referenzverbindung			
VK1	2,434	-0,233	0,87
VK2	2,614	-0,153	1,07
VK4	3,778	0,164	1,88
VK5	3,381	0,081	1,66
VK6	2,616	-0,153	1,07
VK7	2,284	-0,312	0,66
VK10	5,314	0,370	2,39

4.4 Radiosynthesen

4.4.1 Allgemeines

Für die Analyse der Radiosynthesen wurden die Proben mittels Radio-DC und/oder Radio-HPLC bestimmt. Zur Aufnahme einer Reaktionskinetik wurde jeweils zu den Zeitpunkten 1, 3, 5, 10, 15, 20 und 30 ein Aliquot der Reaktionslösung in 200-300 µL Wasser/Acetonitril 1:1 gequencht. Die Analyse mittels Radio-DC erfolgte durch die Auftragung von 1 µL Probe. Nach der Entwicklung in den angegebenen Laufmittel erfolgte die Auswertung mittels eines Instant Imager der Firma Packard Canberra.

Für die Bestimmung der Reaktionsausbeute mittels HPLC wurde eine Probe von 20 µL in das HPLC-System 1 injiziert. Bei einer Flussrate von 1 mL/min wurden die entsprechend angegebenen Laufmittel und stationären Phasen verwendet.

4.4.2 Synthese von [¹⁸F]VK10

4.4.2.1 Synthese von [¹⁸F]FETos

Die Synthese des zur radiochemischen Markierung verwendeten 2-[¹⁸F]FETos wurde mit einem computergesteuerten, automatisierten Synthesemodul durchgeführt. Ein Fließschema des Synthesemoduls ist in Abbildung 71 zu sehen. Dazu wurden die entsprechenden Vorratsgefäße mit den unten angegebenen Lösungen befüllt, die konditionierten Kartuschen in die Syntheseapparatur eingebaut und die wässrige ¹⁸F-Fluoridlösung in einem Wheatonreaktor zwischen Ventil 4 und 12 in die Apparatur eingebracht. Alle weiteren Prozesse liefen automatisiert ab, wobei die verschiedenen Ventilstellungen, Flussraten, Drücke und Reaktionsbedingungen zuvor in einem Syntheseprotokoll erfasst wurden.

Lösung „Kryptofix“: 17 mg Kryptofix K222 und 15 µL 1 M K₂CO₃-Lösung, gelöst in 1 mL MeCN

Lösung „Vorläufer“: 12 mg Ethylen-1,2-ditosylat in 1 mL MeCN

Lösung „Säure“: 1 mL H₂O/MeCN 1:1

HPLC-Vorlage „S2“: 40 mL H₂O

Kartusche „QMA“: 1 Sep-Pak light QMA (Kondit.: 10 mL 1 M K₂CO₃-Lösung, 20 mL Wasser)

Kartusche „C18“: Lichrolut EN (Kondit.: 15 mL Acetonitril, 20 mL Wasser)

HPLC: LiChrospher RP18 Säule (5 µm; 250 mm x 10 mm), 5mL*min⁻¹

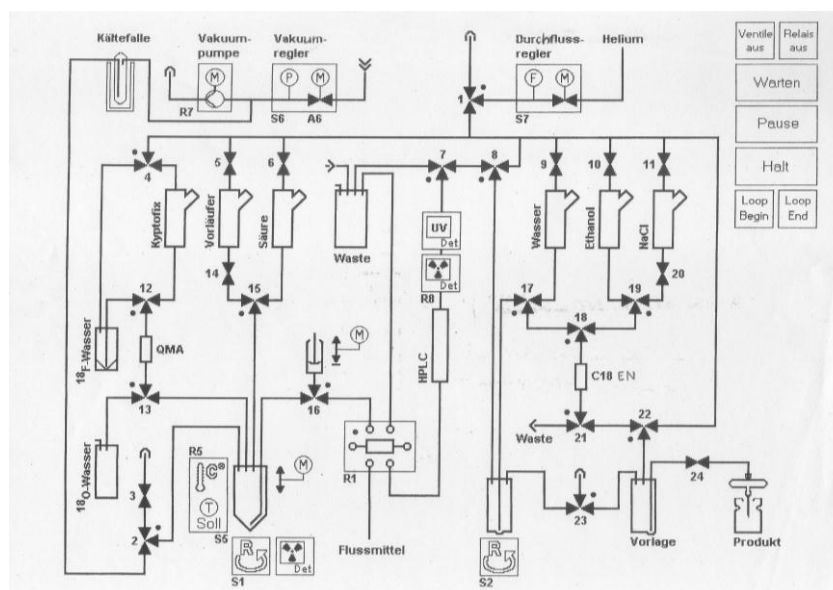


Abb. 71: Fließschema der 2-[^{18}F]FETos-Syntheseapparatur

Bei der Synthese wird zunächst das [^{18}F]Fluorid auf einer QMA-Kartusche der Firma Waters fixiert und mit Lösung „Kryptofix“ in den Reaktor (Sigradur) eluiert. Die Trocknung des [^{18}F]Fluorids erfolgt durch azeotrope Destillation mit Acetonitril bei 80 °C und durch schrittweise Reduktion des Heliumstroms und des Vakuums. Nach dem Ende der Trocknung wird das in Lösung „Vorläufer“ enthaltene Ethylenditosylat in den Reaktor eluiert und 3 min auf 88 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf 25 °C wird das Reaktionsgemisch mit Lösung „Säure“ verdünnt und mittels HPLC aufgereinigt. Die Trennung erfolgt dabei über eine LiChrospher RP18 Säule (5 μm ; 250 mm x 10 mm) mit Wasser/Acetonitril 50:50 als mobile Phase und einer Flussrate von 5 mL/min. Der das Produkt enthaltende Radioaktivitätspeak ($t_{\text{R}} = 8\text{--}10$ min.) wird mit 40 mL Wasser verdünnt, auf einer konditionierten Lichrolut EN-Kartusche der Firma Merk fixiert und diese für 5 min mit einem Heliumstrom von 250 mL/min getrocknet. Das auf der EN-Kartusche fixierte 2-[^{18}F]FETos wird an einem Aktivitätsdetektor gemessen und kann mit dem für die nachfolgende Markierungsreaktion benötigten Lösungsmittel eluiert werden. Die durchschnittliche RCA nach Ausmessen der EN-Kartusche beträgt $50 \pm 5 \%$ nach einer Synthesedauer von 52 ± 5 min ($n = 7$).

4.4.2.2 Fluorethylierung von [^{18}F]VK10

Für die Synthese von [^{18}F]VK10 wurde das [^{18}F]FETos mit DMSO (1 mL) von der Kartusche in einen Wheatonreaktor eluiert, der den Markierungsvorläufer **MV1** (3,3 mg, 7,5 μmol) und NaOH (3 μL , 5 M) enthielt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Minuten auf 150 °C erhitzt und nach Abkühlen auf RT mit Wasser (1 mL) gequencht. Die Reaktionslösung wurde über ein semipräparatives HPLC-System (HPLC-System 1) aufgereinigt und der Produktpeak nach 17,5 min abgetrennt. Als stationäre Phase wurde dazu eine Säule der Firma Phenomenex (Synergy Max-RP, 4 μm , 10 x 250 mm) und als mobile Phase 0,05 M Ammoniumformiat-Puffer/MeCN verwendet. Gradient: 0-5 min 70/30, 5-15 min 70/30>30/70, 15-20 min 30/70, 20-23 min 30/70>70/30, 23-25 min 70/30. Der Produktpeak wurde mit Wasser (40 mL) verdünnt, das Produkt auf einer plusC18 Kartusche (200 mg) fixiert und mit Ethanol (2 mL) eluiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen.

Zur Qualitätskontrolle wurden 20 μL dieser Lösung in ein analytisches HPLC-System (HPLC-System 2) injiziert. Als stationäre Phase wurde eine LiChrospher 100 RP-18 HPLC-Säule (EC-5 μm , 8,0 x 250 mm, CS-Chromatographie GmbH) verwendet. Als mobile Phase wurde Methanol/Sörensenpuffer im Verhältnis 75/25 bei einer Flussrate von 1 mL/min gewählt (Sörensen-Puffer: 910 mg KH_2PO_4 , 2,047 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1000 mL H_2O). Die Retentionszeit des Produktes lag bei 5,6 Minuten. Die Stoffmenge wurde anschließend anhand einer Eichgerade über die integrierte Peakfläche bestimmt.

4.4.3 Synthese von [^{18}F]VK5

4.4.3.1 Synthese von [^{18}F]39

Für die Synthese von [^{18}F]39 wurde das [^{18}F]F $^-$ auf einer lightQMA Kartusche der Firma Waters fixiert und mit einer Lösung von Kryptofix (15 mg) und K_2CO_2 (15 μL , 1 M) in Acetonitril (1 mL) eluiert. [^{18}F]F $^-$ wurde durch azeotrope Destillation mit Acetonitril (3 x 1 mL) getrocknet, in Acetonitril (400 μL) aufgenommen und in einen Mikrowellenreaktor mit dem Markierungsvorläufer **MV2** (12 mg, 25 μmol) überführt. Die Reaktion in der Mikrowelle wurde anschließend bei 150 °C (1 min. Rampzeit, 2 min. Reaktionszeit) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser/Acetonitril 1:3 (1,5 mL) gequencht und über ein semipräparatives HPLC-System (HPLC-System 1) isokratisch aufgereinigt. Der Produktpeak wurde nach 14,5 min abgetrennt. Als stationäre Phase wurde dabei eine Säule der Firma CS-Chromatographie (LiChrospher 100 RP-18, EC-5 μm , 10 x 250 mm) und als mobile Phase Wasser/MeCN (25:75) verwendet. Der Produktpeak wurde mit Wasser (40 mL) verdünnt und das Produkt auf einer LichrolutEN Kartusche (200 mg) fixiert. Diese wurde bei 60 °C für 15 Minuten in einem Heliumstrom getrocknet, das Produkt anschließend mit Diethylether (5 mL) eluiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

4.4.3.2 Synthese von [^{18}F]37

Für die Synthese von [^{18}F]37 wurden Triethylsilan (50 μL) und Trifluoressigsäure (500 μL) zu dem zuvor dargestellten Radioliganden [^{18}F]39 gegeben und die Lösung für 45 Minuten auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurde die Trifluoressigsäure im Vakuum mit einem Heliumstrom bei 90 °C evaporiert, der Rückstand nach Abkühlen auf RT in Wasser/Acetonitril 1:3 (2 mL) aufgenommen und über ein semipräparatives HPLC-System (HPLC-System 1) isokratisch aufgereinigt. Der Produktpeak wurde nach 20 min abgetrennt. Als stationäre Phase wurde dabei eine Säule der Firma CS-Chromatographie (Licrospher 100 RP-18, EC-5 μm , 10 x 250 mm) und als mobile Phase Wasser/MeCN (25:75) verwendet. Der Produktpeak wurde mit Wasser (40 mL) verdünnt und das Produkt auf einer Strata-X Kartusche (30 mg) fixiert. Diese wurde bei 60 °C für 10 Minuten in einem Heliumstrom getrocknet, das Produkt anschließend mit Diethylether (2 mL) eluiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

4.4.3.3 Synthese von [^{18}F]VK5

Zur Synthese von [^{18}F]VK5 wurde das zuvor dargestellte [^{18}F]37 mit einer Lösung von Bortrichlorid in Dichlormethan (1 M) aufgenommen und 30 Minuten bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung im Vakuum (600 mbar) mit einem Heliumstrom (200 mL/min) bei 40 °C evaporiert, der Rückstand in Wasser/Acetonitril 1:3 (2 mL) aufgenommen und über ein semipräparatives HPLC-System (HPLC-System 1) isokratisch aufgereinigt. Der Produktpeak wurde nach 4 min abgetrennt. Als stationäre Phase wurde dabei eine Säule der Firma CS-Chromatographie (Licrospher 100 RP-18, EC-5 μm , 10 x 250 mm) und als mobile Phase Wasser/MeCN (25:75) verwendet. Das Lösungsmittel des Produktpeaks (5 mL) wurde an einem Minirotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen.

Zur Qualitätskontrolle wurden 20 μL dieser Lösung in ein analytisches HPLC-System (HPLC-System 2) injiziert. Als stationäre Phase wurde eine LiChrospher 100 RP-18 HPLC-Säule (EC-5 μm , 8,0 x 250 mm, CS-Chromatographie GmbH) verwendet. Als mobile Phase wurde Methanol/Sörensenpuffer im Verhältnis 75/25 bei einer Flussrate von 1 mL/min gewählt (Sörensen-Puffer: 910 mg KH_2PO_4 , 2,047 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1000 mL H_2O). Die Retentionszeit des Produktes lag bei 3,5 Minuten. Die Stoffmenge wurde anschließend anhand einer Eichgerade über die integrierte Peakfläche bestimmt.

4.4.4 Durchführung der Autoradiographien

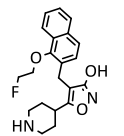
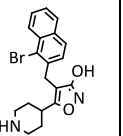
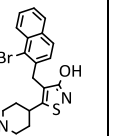
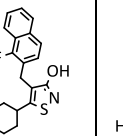
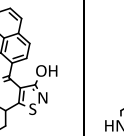
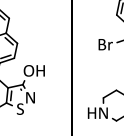
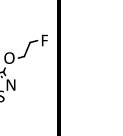
8 Wochen alte männliche Sprague-Dawley Ratten wurden durch Dekapitation mit einer Kleintier-Guillotine getötet. Die Gehirne wurden herauspräpariert und sofort in Trockeneis eingefroren. Es wurden transversale Gefrierschnitte mit einer Schnittdicke von 14 µm mit einem Kryostaten (Leica) bei -20°C angefertigt, auf Superfrost Objektträger (Menzel) angeschmolzen und luftgetrocknet. Die Gehirnschnitte wurden in Tris/Citrate pH 7,4 Puffer 15 min präinkubiert. Abhängig von der zur Verfügung stehenden Aktivität wurden drei verschiedene Konzentrationen des radioaktiven Liganden für 1 h bei RT auf den Schnitten inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden parallel GABA und „kalter“ Ligand in einem mindestens 100-fachen Überschuss hinzugegeben. Anschließend wurde mit unterschiedlichen Bedingungen gewaschen (2 x 30 sec, 2 x 2 min, jeweils einmal ohne oder mit 0,01% Triton X) und die Schnitte unter einem kalten Luftstrom getrocknet. Die Detektion erfolgte durch die Exposition einer Phosphorimager-Platte (Fuji), deren Länge von der verbleibenden Aktivität abhängig war, die dann mit einem Biomolecular Imagers (GE Healthcare) gescannt wurde.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Bis heute stehen für die Visualisierung der GABA-Bindungsstelle keine geeigneten Liganden für die PET zur Verfügung. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit vier aussichtsreiche, fluorierte Derivate, basierend auf 4-(2-Naphthylmethyl)-5-(piperidin-4-yl)isoxazolol bzw. -isothiazolol als Leitstruktur, als potentielle Liganden für die PET synthetisiert. In Anlehnung an eine Synthesevorschrift von Frølund et al. wurde zunächst das Fluorethyl-Derivat 5-(Piperidin-4-yl)-4-(1-Fluorethoxynaphth-2-ylmethyl)isoxazol-3-ol **VK1** dargestellt. Aus der Reihe der Isothiazolole wurden zwei Referenzverbindungen **VK5** und **VK7** synthetisiert, bei denen der Fluorsubstituent in Position 1 des Naphthalinrings eingeführt wurde. Darüber hinaus wurde durch Fluorethylierung des Isothiazolrings 5-(Piperidin-4-yl)-4-(1-bromnaphth-2-ylmethyl)-3-(1-Fluorethoxy)-isothiazol **VK10** als ein weiterer potentieller Radioligand dargestellt. Neben den fluorierten Derivaten wurden drei weitere Referenzverbindungen (**VK2**, **VK4** und **VK6**) synthetisiert, um genauere Struktur-Affinitäts-Beziehungen dieser Strukturklasse untersuchen zu können.

Im Folgenden wurden die Affinitäten an die GABA-Bindungsstelle und die Lipophilien der Referenzverbindungen bestimmt, wodurch eine Aussage über ihre Eignung als Radioligand für die PET getroffen werden sollte (siehe Tab. 10).

Tab. 10: IC₅₀ und Log D-Werte der synthetisierten Referenzverbindungen (nM)

Struktur							
Ligand	VK1	VK2	VK4	VK5	VK6	VK7	VK10
IC ₅₀ / nM (Cortex)	2144 ± 1	299 ± 1	10 ± 1	10 ± 1	26 ± 1	917 ± 1	6338 ± 2
IC ₅₀ / nM (Cerebellum)	11843 ± 35	3028 ± 1	38 ± 1	30	195 ± 1	2521 ± 1	4507
Log D-Werte	0,9	1,1	1,9	1,7	1,1	0,7	

Die in Tabelle ... dargestellten Log D-Werte wurden als Maß für die Lipophilie experimentell über eine HPLC-Methode bestimmt. Hier zeigten insbesondere die Verbindungen **VK4**, **VK5** und **VK10** gute Ergebnisse, was eine Passage der Blut-Hirn-Schranke dieser Verbindungen prinzipiell ermöglichen sollte.

Die entsprechenden Affinitäten der Referenzverbindungen wurden in Kooperation mit der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsmedizin Mainz von Frau Vanessa Bockhart bestimmt. Die Affinitäten der Liganden aus Tabelle 11 wurden dazu in Radioligand-Bindungsstudien mit [^3H]Muscimol an Hirnmembranen der Ratte aus Cortex und Cerebellum ermittelt. Hierbei wiesen insbesondere die Verbindungen **VK4**, **VK5** und **VK6** sehr hohe Affinitäten auf. Um ein genaues Bindungsprofil der Referenzverbindungen zu erhalten, wurden im Folgenden die Affinitäten zu verschiedenen Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors bestimmt (siehe Tab. 11).

Tab. 11: IC₅₀-Werte (nM) der Liganden an einzelne Rezeptorsubtypen

Ligand	$\alpha_1\beta_3\gamma_2$	$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	$\alpha_4\beta_3\gamma_2$	$\alpha_5\beta_3\gamma_2$	$\alpha_6\beta_3\gamma_2$	$\alpha_4\beta_3$	$\alpha_4\beta_3\delta$	$\alpha_6\beta_3$	$\alpha_6\beta_3\delta$
VK1	583 ± 3	100 ± 5	34 ± 4	467 ± 1	4078 ± 2	5812 ± 1	/	/	/	/
VK2	13 ± 1	25 ± 1	77 ± 1	15 ± 1	33 ± 1	103 ± 1	155	139 ± 1	214 ± 1	1510 ± 1
VK4	2 ± 1	6	7 ± 1	1 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	10 ± 1	10 ± 1
VK5	97	40	28	3,5 ± 1	1,2 ± 1	7,3	/	/	/	/
VK6	2 ± 1	12 ± 1	19 ± 2	2 ± 1	4 ± 1	23 ± 2	/	/	/	/
VK7	95 ± 2	±	383 ± 3	58 ± 1	251 ± 2	413 ± 2	/	/	/	/
VK10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Die fluorethylierte Verbindung **VK1** wies dabei, entgegen den Erwartungen, nur eine sehr geringe Affinität auf. Für die Verbindungen **VK4**, **VK5** und **VK6** konnten hingegen die vielversprechenden Resultate aus den vorangegangenen Bindungsstudien bestätigt werden. Insbesondere **VK4** und **VK6** weisen eine sehr hohe Affinität gegenüber allen Rezeptorsubtypen auf. Die Affinitäten von **VK2** zu γ -enthaltenden Rezeptorsubtypen liegen, verglichen mit der Kombination $\alpha_6\beta_3\delta$, um den Faktor 15-100 höher. Da die δ -Untereinheit jedoch fast ausschließlich in Kombination mit $\alpha_6\beta_3$ vorliegt, kann **VK2** als γ -spezifischer Ligand bezeichnet werden. Auch für **VK5** zeigte eine gewisse Spezifität gegenüber den Untereinheiten α_4 , α_5 , und α_6 .

VK10 zeigte zwar nur eine geringe Affinität zu dem GABA_A-Rezeptor, sollte jedoch aufgrund der guten lipophilen Eigenschaften das größte Potential besitzen die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und sollte daher mit ^{18}F radioaktiv markiert werden. Der radioaktive Ligand [^{18}F]**VK10** wurde dazu in einer zweistufigen Radiosynthese durch eine [^{18}F]Fluorethylierung der Referenzverbindung **VK4** mit [^{18}F]Fluorethyltosylat synthetisiert, welches zuvor mittels eines vollautomatisierten Synthesemoduls dargestellt und anschließend mit dem Markierungsvorläufer umgesetzt wurde (siehe Abb. 72).

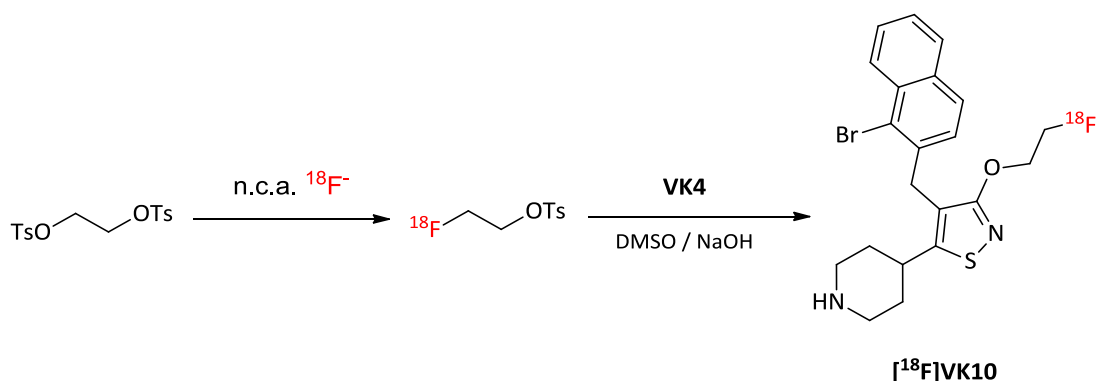


Abb. 72: Reaktionsschema der Radiosynthese von [¹⁸F]VK10

Die Reaktionsbedingungen für die [¹⁸F]Fluorethylierung wurden hinsichtlich der Reaktionszeit, Reaktionstemperatur und Baseneinwaage optimiert und ein geeignetes Abtrennverfahren entwickelt. Hierdurch konnte [¹⁸F]VK10 in radiochemischen Ausbeuten von 19-26 % nach 51-65 Minuten mit einer spezifischen Aktivität im Bereich von 3,2-5,6 GBq/μmol erhalten werden.

Der radioaktive Ligand wurde anschließend in Autoradiographien auf seine spezifische Bindung hin untersucht. Dazu wurden die einzelnen Inkubations- und Waschschrte optimiert und, zur Bestimmung der unspezifischen Bindung, GABA bzw. die inaktive Referenzverbindung zugesetzt. Für den Ligand [¹⁸F]VK10 konnte auf diesem Wege jedoch keine spezifische Bindung beobachtet werden. Hierfür könnte in erster Linie die niedrige Affinität des Liganden verantwortlich sein, wodurch die Menge an rezeptorgebundenem Ligand sehr gering ist. Darüber hinaus ist die Dissoziationsgeschwindigkeit des Rezeptor-Ligand-Komplexes aufgrund der geringen Affinität sehr groß. Dies könnte dazu führen, dass spezifisch gebundener Ligand bei den entsprechenden Waschzeiten wieder abdissoziiert. Aufgrund der unspezifischen Bindung von [¹⁸F]VK10 wurde die Evaluierung dieses Liganden nicht weiter verfolgt.

Im Folgenden wurde daher eine Synthesestrategie des Radioliganden [¹⁸F]VK5 entwickelt, der von den fluorhaltigen Liganden die beste Affinität aufwies. Dazu wurde zunächst ein geeigneter Markierungsvorläufer synthetisiert. Hierbei wurde versucht, leicht abspaltbare Schutzgruppen zu verwenden, was jedoch aufgrund der Reaktionsbedingungen der beschrittenen Syntheseroute nicht realisiert werden konnte. Daher wurden in diesem Fall die stabilere Methoxycarbonyl- und Isopropylschutzgruppe verwendet und die Reaktionsbedingungen der Entschützung für die Radiosynthese angepasst. Ausgehend von dem Markierungsvorläufer **MV2** wurde [¹⁸F]VK5 in einer dreistufigen Radiosynthese dargestellt (siehe Abb. 73).

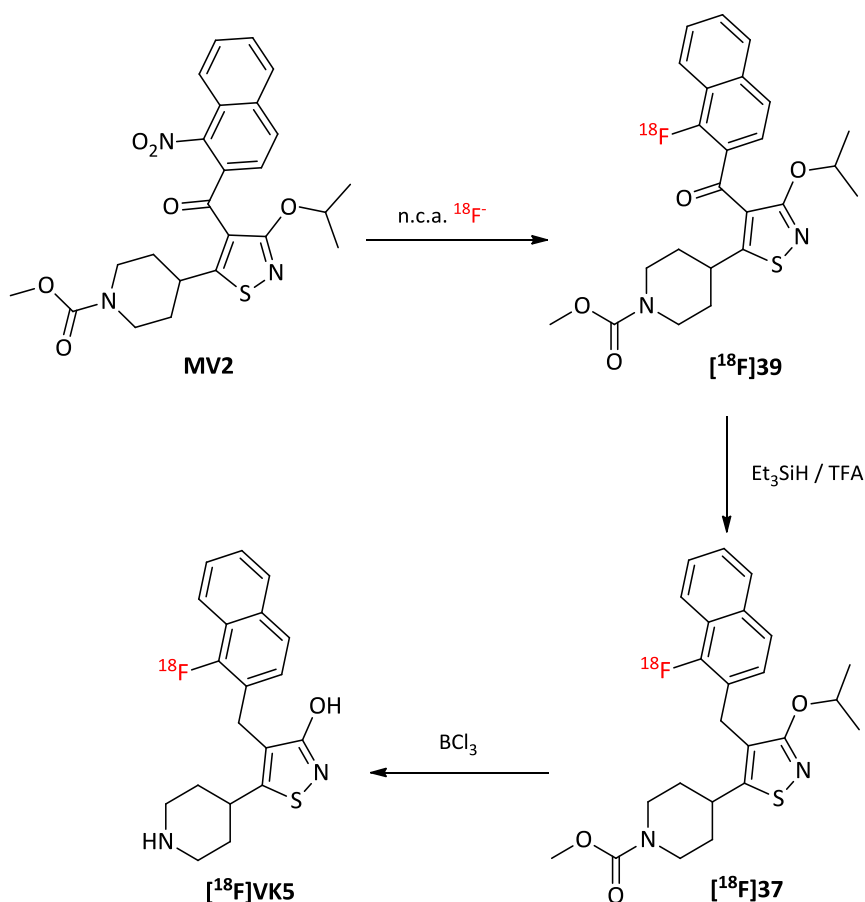


Abb. 73: Reaktionsschema der Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{VK5}$

Dabei wurden zunächst die Reaktionsbedingungen für die n.c.a. nukleophile ^{18}F -Fluorierung optimiert. Durch eine mikrowellen-gestützte Synthese konnte hier die radiochemische Ausbeute von konventionell 24 % auf 40 % gesteigert werden. Die anschließende Reduktion mit Triethylsilan in Trifluoressigsäure und die Entschützung mit Bortrichlorid konnten im Anschluss daran in sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden. Durch ein geeignetes Abtrennverfahren konnte auch in diesem Fall der ^{18}F -markierte Ligand als injektionsfertige Lösung in isotoner Kochsalzlösung erhalten werden. Die radiochemische Ausbeute betrug nach einer Synthesezeit von 4,5 Stunden 0,7-1 % und die spezifische Aktivität lag dabei im Bereich von 0,1 – 0,6 GBq/ μmol . Um den Radioligand auf seine Stabilität unter physiologischen Bedingungen hin zu untersuchen wurde die Plasmastabilität in FCS-Serum bei 37 °C bestimmt. Nach einer Stunde konnten dabei noch 96 % intakter Ligand nachgewiesen werden.

Wie bereits für $[^{18}\text{F}]\text{VK10}$ wurde auch für $[^{18}\text{F}]\text{VK5}$ im Anschluss an die Radiosynthese die spezifische Bindung in Autoradiographien untersucht. Hier konnte nach längeren Waschzeiten eine leichte Abnahme der Bindung des Liganden beobachtet werden. Diese muss jedoch aufgrund der homogenen Bindungsverteilung als unspezifisch erachtet werden. Die hohe unspezifische Bindung ist insofern überraschend, da **VK5** in den Bindungsstudien sehr hohe Affinitäten aufwies und die

verhältnismäßig geringe Lipophilie gegen eine hohe unspezifische Bindung spricht. Auch eine Cross-Affinität zu anderen Rezeptoren scheint hier sehr unwahrscheinlich, da die Bindung des Liganden in allen Hirnregionen gleich stark ist. Eine mögliche Erklärung bietet hier unter Umständen die sehr geringe spezifische Aktivität des Liganden, die durch die Zahl der radioaktiven Stufen enorm abnimmt. Die große Menge an isotopem Träger konkurriert hierbei mit dem Radioliganden um freie Bindungsstellen, was möglicherweise für die geringe spezifische Bindung verantwortlich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten vier potentielle Radioliganden für die PET synthetisiert werden, von denen das Isothiazolol **VK5** in den in vitro-Evaluierungen sehr vielversprechende Ergebnisse zeigte. Sowohl die sehr hohe Affinität des Liganden als auch dessen Log D-Wert von 1,7 sprachen für seine Weiterentwicklung für den Einsatz als PET-Tracer. Durch die Radiosynthese von [^{18}F]**VK5** konnte ein Radioligand für die GABA-Bindungsstelle synthetisiert und für weitere Evaluierungen eingesetzt werden. Da die Ergebnisse der Autoradiographien die hervorragenden Ergebnisse der Bindungsstudien jedoch nicht bestätigen konnten, kann der Radioligand [^{18}F]**VK5** in dieser Form nicht für die Anwendung in der PET eingesetzt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse bieten jedoch die Möglichkeit, die Synthese dieses Radioliganden in Zukunft weiter zu optimieren. Dabei sollte in erster Linie eine Verbesserung der spezifischen Aktivität sowie der radiochemischen Ausbeute im angestrebt werden. Einen möglichen Ansatz hierfür würde die radioaktive Markierung eines entsprechenden Iodoniumsalzes bieten. Hierdurch ließe sich der radioaktive Ligand in nur zwei Stufen darstellen, was vielversprechendere Ergebnisse im Bereich der Radiosynthese ermöglichen sollte (siehe Abb. 74).

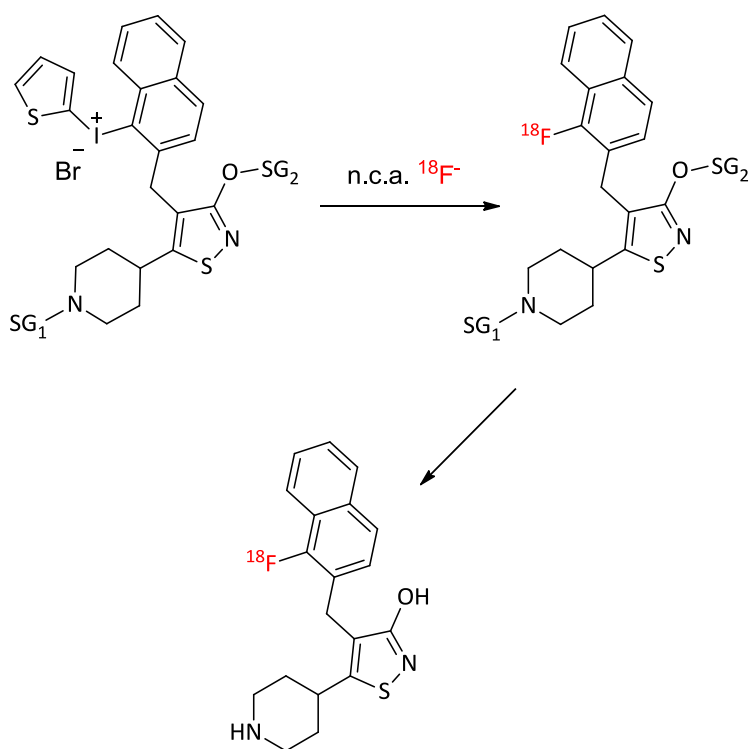


Abb. 74: Alternative Syntheseroute über ein Iodoniumsalz als Markierungsvorläufer

Darüber hinaus bestünde die Möglichkeit durch den Einsatz alternativer Schutzgruppen die Dauer der Radiosynthese weiter zu verkürzen, da die Abspaltung der Schutzgruppen nicht mehr wasserfrei erfolgen müsste.

Im Folgenden müsste die spezifische Bindung des Liganden mit hoher spezifischer Aktivität erneut bestimmt werden sowie in weiterführenden Versuchen das Potential dieser Liganden die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden untersucht werden.

6 Anhang

6.1 Verwendete Abkürzungen

Abb	Abbildung
bs	breites Singulett
Bq	Bequerell
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
dd	Dublett vom Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtOH	Ethanol
[¹⁸ F]FETos	2-[¹⁸ F]Fluorethyltosylat
ges.	gesättigt
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kap	Kapitel
Lit.	Literatur
LM	Lösungsmittel
m	Multiplett
M	mol/L
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minuten
MS	Massenspektrum
N	normale
n.c.a.	ohne zugesetzten Träger
NMR	magnetische Kernresonanz
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
q	Quartett
RCA	Radiochemische Ausbeute
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
t	Triplett
Tab.	Tabelle
tert.	tertiär

THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab.1: Zerfallseigenschaften wichtiger Positronenemitter.....	6
Tab.2: Produktion von ^{18}F am Zyklotron ^[19]	9
Tab. 3: IC_{50} -Werte (nM) der Referenzverbindungen durch Konkurrenz an Membranpräparationen. 46	
Tab. 4: IC_{50} -Werte (nM) an GABA_A -Rezeptoren mit verschiedenen α -Untereinheiten.....	48
Tab. 5: IC_{50} -Werte (nM) an GABA_A -Rezeptoren mit und ohne δ -Untereinheiten	48
Tab. 6: Aktivitätsbilanz der Synthese von $[^{18}\text{F}]\text{VK10}$	56
Tab. 7: Aktivitätsbilanz der Synthese von $[^{18}\text{F}]\text{VK5}$	68
Tab. 9: Log D-Werte und Retentionszeiten der Eichsubstanzen zur Lipophiliebestimmung	104
Tab. 10: IC_{50} und Log D-Werte der synthetisierten Referenzverbindungen (nM).....	110
Tab. 11: IC_{50} -Werte (nM) der Liganden an einzelne Rezeptorsubtypen	111

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Messprinzip der Positronen-Emissions-Tomographie ^[10b]	3
Abb.2: Fusionsbild einer PET/CT-Untersuchung ^[12b]	4
Abb.3: Reaktionsschema der Synthese von $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$	11
Abb. 4: Reaktionsschema einer nukleophilen ^{18}F -Fluorierung aktivierter Aromaten	12
Abb. 5: Nukleophile ^{18}F -Fluorierung nichtaktivierter Aromaten über Iodoniumsalze	12
Abb. 6: Selektive elektrophile ^{18}F -Fluorierung von 6- $[^{18}\text{F}]\text{F-DOPA}$ ^[32]	13
Abb. 7: Synthese von $[^{18}\text{F}]\text{MH.MZ}$ durch eine $[^{18}\text{F}]\text{Fluorethylierung}$ mit $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$	14
Abb. 8: Radiosynthese ^{18}F -markierter Folsäurederivate über eine Klick-Reaktion.....	14
Abb. 9: Reaktionsschema zur nukleophilen n.c.a. Markierung von 6- $[^{18}\text{F}]\text{F-DOPA}$ ^[40]	15
Abb. 10: Die GABAerge Synapse ^[43b]	16
Abb. 11: Struktur des GABA_A -Rezeptors und die Diversität der Rezeptorsubtypen ^[46]	17

Abb. 12: Bindungsstellen des GABA _A -Rezeptors ^[44]	18
Abb. 13: Klassische Liganden der GABA-Bindungsstelle	19
Abb. 14: Vorgesehenes Fluorethoxyderivat der Oxazololverbindungen	22
Abb. 15: Geplante Liganden basierend auf der 5-(piperidin-4-yl)isothiazolol-Leitstruktur	22
Abb. 16: Potentielle Markierungsvorläufer	23
Abb. 17: Geplante Referenzverbindungen - Oxazole	24
Abb. 18: Synthese der 1-Alkoxy-2-brommethylnaphthaline	25
Abb. 19: Bromierung von 1-Brom-2-methylnaphthalin	26
Abb. 20: Synthese der β -Ketoester 11 und 12	26
Abb. 21: Kopplung der 2-Brommethylnaphthaline 6, 7 und 8 an die β -Ketoester 11 und 12	27
Abb. 22: Ringschluss zu den Isoxazolen	28
Abb. 23: Entschützung der Referenzverbindungen VK1, VK2 und VK3	29
Abb. 24: Geplante Referenzverbindungen - Isothiazole	30
Abb. 25: Synthese von 3-(N-Benzylpiperidin-4-yl)propenamid 23	31
Abb. 26: Mechanismus der Swern-Oxidation	32
Abb. 27: Synthese des acetylthiol-substituierten Propanamids 25	32
Abb. 28: Ringschluss zum Isothiazol 26	33
Abb. 29: Synthese des kopplungsfähigen Grundkörpers 28	34
Abb. 30: Synthese von 1-Fluor-2-methylnaphthalin 29	34
Abb. 31: Synthese der 2-Formylnaphthaline über die Dibromide	35
Abb. 32: Syntheseschema der geschützten Diarylalkohole 34 und 35	35
Abb. 33: Syntheseschema für die Variation im Bereich der Methylenbrücke der Isothiazole	36
Abb. 34: Entschützung der Isothiazole	37
Abb. 35: Versuchte Entschützung der Diarylalkohole und -fluoride 34 und 40	38
Abb. 36: Synthese der Referenzverbindung VK10	39
Abb. 37: Strukturen der geplanten Markierungsvorläufer MV1 und MV2	40
Abb. 38: Synthese des allylgeschützten Isoxazolols 45	41

Abb. 39: Versuchte Synthese eines <i>tert</i> -butylgeschützten MV.....	41
Abb. 40: Versuchte Synthese eines acetylgeschützten MV	42
Abb. 41: Synthese des MEM-geschützten Markierungsvorläufers MV1	43
Abb. 42: Versuchte Synthese des Boc-geschützten Markierungsvorläufers MV2'	44
Abb. 43: Versuchte Synthese von 1-Nitro-2-formylnaphthalin über das Dibromid.....	44
Abb. 44: Finale Synthese des Markierungsvorläufers MV2	45
Abb. 45: Regressionsgerade zur Lipophiliebestimmung	50
Abb. 46: Lipophilien der synthetisierten Referenzverbindungen	51
Abb. 47: Synthese von [^{18}F]VK10.....	52
Abb. 48: Radiosynthese von [^{18}F]FETos.....	53
Abb. 49: Reaktionskinetik der Synthese von [^{18}F]VK10.....	54
Abb. 50: Basenabhängigkeit der [^{18}F]Fluorethylierung von VK4.....	54
Abb. 51: Chromatogramm der semipräparativen Abtrennung von [^{18}F]VK10.....	55
Abb. 52: Eichgerade zur Bestimmung der Stoffmenge von [^{18}F]VK10	57
Abb. 53: Reaktionsschema der Radiosynthese von [^{18}F]VK5	58
Abb. 54: Synthese von [^{18}F]39 über $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$ -Austausch: DMSO, 150 °C.....	59
Abb. 55: Radiosynthese von [^{18}F]39 durch Markierung des Nitro-Markierungsvorläufers MV2.....	60
Abb. 56: Reaktionskinetik für die Synthese von [^{18}F]39 in DMSO bei 130 °C.....	60
Abb. 57: Reaktionskinetik der Radiosynthese von [^{18}F]39 (1 Äquivalent Base).....	61
Abb. 58: Reaktionskinetik der mikrowellengestützten Radiosynthese von [^{18}F]39.....	62
Abb. 59: Chromatogramm der semipräparativen Abtrennung von [^{18}F]39	63
Abb. 60: Reaktionsschema der Reduktion von [^{18}F]39 mit Triethylsilan / TFA	64
Abb. 61: Reaktionskinetik der Reduktion von [^{18}F]39 mit Triethylsilan / TFA.....	65
Abb. 62: Chromatogramm der semipräparativen Abtrennung von [^{18}F]37	65
Abb. 63: Reaktionsschema der Entschützung von [^{18}F]37 mit BCl_3	66
Abb. 64: Chromatogramm der semipräparativen Abtrennung von [^{18}F]VK5.....	67
Abb. 65: Eichgerade zur Bestimmung der Stoffmenge von [^{18}F]VK5	67

Abb. 66: Autoradiographie von [^{18}F]VK10 an transversalen Hirnschnitten der Ratte	69
Abb. 67: Transversale Autoradiographien von [^{18}F]VK5 an Hirnschnitten der Ratte.....	70
Abb. 68: Bestimmung der spezifischen Bindung von [^{18}F]VK5	71
Abb. 69: Bestimmung der Plasmastabilität von [^{18}F]VK5 in FCS-Serum bei 37 °C.....	72
Abb. 70: Dosis-Wirkungs-Kurve einer Kompetitionsstudie mit VK2.....	103
Abb. 71: Fließschema der 2-[^{18}F]FETos-Syntheseapparatur.....	106
Abb. 72: Reaktionsschema der Radiosynthese von [^{18}F]VK5	112
Abb. 73: Reaktionsschema der Radiosynthese von [^{18}F]VK5	113
Abb. 74: Alternative Syntheseroute über ein Iodoniumsalz als Markierungsvorläufer.....	115

6.4 Literaturverzeichnis

- [1] Stöcklin G., *Radiochim Acta* 1995, 70/71, 249–272.
- [2] Lundquist T., *Eur J Phys* 1998, 19, 537–552.
- [3] Becquerel A. H. 1903.
- [4] Hevesey G., *Nobel Lecture*.
- [5] Lawrence E. O., *Phys. Rev.* 1932, 40, 19–37.
- [6] Jager P. L., *J Nuc Med* 2001, 42, 432–445.
- [7] Coenen H. H., Elsinga P., Iwata R., Kilbourn M., Pillai M., Rajan M., Wagner H., Zaknun J., *Nucl Med Biol* 2010, 37, 727–740.
- [8] Czernin J., Phelps M. E., *Annu Rev Med* 2002, 53, 89–112.
- [9] Phelps M. E., *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 9226–9233.
- [10] Ache H. J., *Angew. Chem. internat. Edit.* 1972, 11, 179–199.
- [10b] upload.wikimedia.org/.../220px-PET-schema.png
- [11] Herzog H., Rösch F., *Pharmazie in unserer Zeit* 2005, 34, 468–473.
- [12] Pichler B., *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2008.
- [12b] www.nuklearmedizin.med.uni-goettingen.de/medien/lehre/orthopaedie.pdf

- [13] Gallagher B.M., *J Nuc Med* 1978, 19, 1154ff.
- [14] Leon M. J., *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 2001, 98, 10966–10971.
- [15] Jang D. P., Lee S. H., Park C. W., Lee S. Y., Kim Y. B., Cho Z. H., *Neuro Lett* 2009, 451, 60–64.
- [16] Mukherjee J., Christian B. T., Dunigan K. A., Shi B., Narayanan T. K., Satter M., Mantil J., *Synapse* 2002, 46, 170–188.
- [17] Rowe C. C., Ackerman U., Browne W., Mulligan R., Pike K. L., O'Keefe G., Tochon-Danguy H., Chan G., Berlangieri S. U., Jones G., *The Lancet Neurology* 2008, 7, 129–135.
- [18] Eckelman W. C., *J Nuc Med* 1978, 19, 1179–1181.
- [19] Qaim S. M., *Handbook of Nuclear Chemistry, Vol. 4: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Science* 2003.
- [20] Pruszyński M., *Appl Rad Isotop* 2010, 68, 1636–1641.
- [21] Zhernosekov K. P., *J Nuc Med* 2007, 48, 1741–1748.
- [22] Smart B. E., *J Flu Chem* 2001, 109, 3–11.
- [23] Bergman J., Solin O., *Nucl Med Biol* 1997, 24, 677–683.
- [24] Hamacher K., Blessing G., Nebeling B., *Int J Rad Appl Instr Part A. Appl Rad Isotop* 1990, 41, 49–55.
- [25] Yu S., *Biomed Imaging Interv J* 2006, 2.
- [26] Hamacher K., *J Nuc Med* 1986, 27, 235–238.
- [27] Rengan R., *J Label Compd Radiopharm* 1993, 33, 563–572.
- [28] Ross T. L., Ermert J., Hocke C., Coenen H. H., *J Am Chem Soc* 2007, 129, 8018–8025.
- [29] Zhang M. R., Kumata K., Suzuki K., *Tetrahedron Lett* 2007, 48, 8632–8635.
- [30] Shiue C. Y., *J Nuc Med* 1982, 23, 899–903.
- [31] Hess E., *Appl Rad Isotop* 2002, 57, 185–191.
- [32] Hess E., *Appl Rad Isotop* 2002, 57, 185–191.
- [33] Block D., *J Label Compd Radiopharm* 1987, 24, 1031.

- [34] Bauman A., Piel M., Schirmacher R., Rösch F., *Tetrahedron Lett* 2003, 44, 9165–9167.
- [35] Herth M. M., Piel M., Debus F., Schmitt U., Lüddens H., Rösch F., *Nucl Med Biol* 2009, 36, 447–454.
- [36] Debus F., Herth M. M., Piel M., Buchholz H.-G., Bausbacher N., Kramer V., Lüddens H., Rösch F., *Nucl Med Biol* 2010, 37, 487–495.
- [37] Ross T. L., Honer M., Lam P. Y. H., Mindt T. L., Groehn V., Schibli R., Schubiger P. A., Ametamey S. M., *Bioconjugate Chem* 2008, 19, 2462–2470.
- [38] Gail R., *J Labell Compd Radiopharm* 1994, 35, 197ff.
- [39] Block D., *J Labell Compd Radiopharm* 1988, 25, 185–200.
- [40] Shen B., Loffler D., Zeller K., Ubele M., Reischl G., Machulla H., *Appl Rad Isotop* 2007, 65, 1227–1231.
- [41] Ekaeva I., *Appl Rad Isotop* 1995, 46, 777–782.
- [42] Hwang D., Dence C., Gong J., Welch M., *Int J Rad Appl Instr Part A. Appl Rad Isotop* 1991, 42, 1043–1047.
- [43] Chebib M., *Clinical Exp Pharm & Phys* 1999, 26, 937–940.
- [43b] Bohme I., *Curr Med Chem* 2001, 8, 1257–1274
- [44] Korpi E. R., Gründer G., Lüddens H., *Progress in Neurobiology* 2002, 67, 113–159.
- [45] Möhler H., *J Neurochem* 2007, 102, 1–12.
- [46] Whiting P J, *Ann N Y Acad Sci*, 645–653.
- [47] Sander, Frølund B., Bruun A. T., Ivanov I., McCammon J. A., Balle T., *Proteins* 2011, 79, 1458–1477.
- [48] Möhler H., *Neuropharmacology* 2011, 60, 1042–1049.
- [49] Costa E., *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1979, 531–545.
- [50] Froestl W., *Biotr Rev* 2011.
- [51] Bateson A. N., *Curr Pharm Des* 2002, 8, 5–21.
- [52] Frølund B., *J Med Chem* 1995, 38, 3287–3296.

- [53] Krogsgaard-Larsen P., Frølund B., Kristiansen U., Frydenvang K., Ebert B., *Eur J Pharm Sci* 1997, 5, 355–384.
- [54] Massaweh G., Schirmacher E., La Fougere C., Kovacevic M., Wängler C., Jolly D., Gravel P., Reader A. J., Thiel A., Schirmacher R., *Nucl Med Biol* 2009, 36, 721–727.
- [55] Dumont F., Waterhouse R. N., Montoya J. A., Mattner F., Katsifis A., Kegeles L. S., Laruelle M., *Nucl Med Biol* 2003, 30, 435–439.
- [56] Hoepping A., Scheunemann M., Fischer S., Deuther-Conrad W., Hiller A., Wegner F., Diekers M., Steinbach J., Brust P., *Nucl Med Biol* 2007, 34, 559–570.
- [57] Kida T., Noguchi J., Zhang M.-R., Suhara T., Suzuki K., *Nucl Med Biol* 2003, 30, 779–784.
- [58] Kilbourn M., Pavia M., Gregor V., *Int J Rad Appl Instr Part A. Appl Rad Isotop* 1990, 41, 823–828.
- [59] Schirmacher R., Hamkens W., Piel M., Schmitt U., Lüddens H., Hiemke C., Rösch F., *J Labell Compd Radiopharm* 2001, 44, 627–642.
- [60] Li X., Jung Y.-W., Snyder S. E., Blair J., Sherman P. S., Desmond T., Frey K. A., Kilbourn M. R., *Nucl Med Biol* 2008, 35, 549–559.
- [61] Gatley S. J., Volkow N. D., Fowler J. S., Ding Y.-S., Logan J., Wang G.-J., Gifford A. N., *Drug Dev Res* 2003, 59, 194–207.
- [62] Frølund B., Jørgensen A. T., Tagmose L., Stensbøl T. B., Vestergaard H. T., Engblom C., Kristiansen U., Sanchez C., Krogsgaard-Larsen P., Liljefors T., *J Med Chem* 2002, 45, 2454–2468.
- [63] Mortensen M., Frølund B., Jørgensen A. T., Liljefors T., Krogsgaard-Larsen P., Ebert B., *Eur J Pharm* 2002, 451, 125–132.
- [64] Krehan D., í Storustovu S., Liljefors T., Ebert B., Nielsen B., Krogsgaard-Larsen P., Frølund B., *J Med Chem* 2006, 49, 1388–1396.
- [65] Frølund B., Jensen L. S., Guandalini L., Canillo C., Vestergaard H. T., Kristiansen U., Nielsen B., Stensbøl T. B., Madsen C., Krogsgaard-Larsen P., *J Med Chem* 2005, 48, 427–439.

- [66] Bashford K. E., Burton M. B., Cameron S., Cooper A. L., Hogg R. D., Kane P. D., MacManus D. A., Matrunola C. A., Moody C. J., Robertson A. A., *Tetrahedron Lett* 2003, *44*, 1627–1629.
- [67] Jacobsen N., *Can J Chem* 1984, *62*, 1940–1944.
- [68] Abe T., *Tetrahedron* 2001, *57*, 2701–2710.
- [69] Bongui J. B., *Chem Pharm Bull* 2005, *53*, 1540–1546.
- [70] Riesgo E. C., *J Org Chem* 1996, *61*, 3017–3022.
- [71] Frølund B., Jensen L. S., Storustovu S. I., Stensbøl T. B., Ebert B., Kehler J., Krogsgaard-Larsen P., Liljefors T., *J Med Chem* 2007, *50*, 1988–1992.
- [72] Jansen M., Rabe H., Strehle A., Dieler S., Debus F., Dannhardt G., Akabas M. H., Lüddens H., *J Med Chem* 2008, *51*, 4430–4448.
- [73] Hitchcock S. A., *Curr Op Chem Biol* 2008, *12*, 318–323.
- [74] Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J., *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, *46*, 3–26.
- [75] Blom E., Karimi F., Langstrom B., *J Label Compd Radiopharm* 2009, *52*, 504–511.
- [76] Mühlhausen U., Ermert J., Herth M. M., Coenen H. H., *J Label Compd Radiopharm* 2009, *52*, 6–12.

Curriculum vitae

Personal details:

Vasko Kramer

Wölfenbach 4a

55743 Idar-Oberstein

Phone: +49 (0)176 / 62428197

E-Mail: vaskokramer@web.de

Nationality: German

Date of birth: 15.06.1982

Place of birth: Marburg a.d. Lahn, Germany

Gender: Male

Education:

- | | |
|-------------|---|
| 2008 – 2011 | PhD Thesis at the Nuclear Institute of the Johannes Gutenberg University about 18F labeling of antagonists to the GABA binding site in the group of Frank Rösch |
| 2008 | Diploma in chemistry at the Johannes Gutenberg University in Mainz |
| 2007 – 2008 | Diploma Thesis at the Nuclear Institute of the Johannes Gutenberg University about 18F labeling of serotonergic ligands for PET in the group of Frank Rösch |
| 2004 | Preliminary diploma in chemistry at the Johannes Gutenberg University in Mainz |
| 2002 – 2008 | studying Biomedical Chemistry at the Johannes Gutenberg University in Mainz |
| 2001 | A-Level at Gymnasium an der Heizenwies in Idar-Oberstein |
| 1992 – 2001 | secondary school at Gymnasium an der Heizenwies in Idar-Oberstein |
| 1991 – 1992 | primary school at Idarbachtal Schule in Idar-Oberstein |
| 1988 – 1991 | primary school in Friedrichshafen |

Languages:

English: fluently

Spanish: basics

Publications:

2011

in preparation: Nucl med Biology, Head to Head Comparison of [18F]MH.MZ and [18F]Altanserin in Danish Landrace Pigs, Matthias M. Hertha,[†], Hanne D. Hansena,[†], Anders Ettrup, Vasko Kramerb, Nic Gillingsc, Frank Röschb and Gitte M. Knudsen

2010

Chemical Biology and Drug Design, Structural Combination of Established 5-HT_{2A} Receptor Ligands: New Aspects of the Binding Mode, Vasko Kramer, Matthias M. Herth, Martin A. Santini, Mikael Palner, Gitte M. Knudsen and Frank Rösch

Nuclear Medicine and Biology, 18F-Labeling and evaluation of novel MDL 100907 derivatives as potential 5-HT_{2A} antagonists for molecular imaging, Fabian Debus, Matthias M. Herth, Markus Piel, Hans-Georg Buchholz, Nicole Bausbacher, Vasko Kramer, Hartmut Lüddens, Frank Rösch

2009

Labelled compounds and radiopharmaceuticals, Synthesis of novel WAY 100635 derivatives containing a norbornene group and radiofluorination of [18F]AH1.MZ as a serotonin 5-HT_{1A} receptor antagonist for molecular imaging, Matthias M. Herth, Vasko Kramer, and Frank Rösch

Bioorganic and medicinal Chemistry, Synthesis and in vitro affinities of various MDL 100907 derivatives as potential 18F-radioligands for 5-HT_{2A} receptor imaging with PET, Matthias M. Herth, Vasko Kramer, Markus Piel, Mikael Palner, Patrick J. Riss, Gitte M. Knudsen, Frank Rösch

Attendance at international symposia:

2011

19th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences 2011; Amsterdam (Netherlands)

Synthesis and evaluation of fluorine-18 labeled 5-(4-piperidinyl)-isothazoles: Imaging the GABA binding site of GABA_A receptors

2009

18th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences 2009; Edmonton (Canada)

Radiolabeling and evaluation of MDL 100,907 derivatives as potential 18F-radioligands to determine changes in endogenous serotonin; Kramer V, Herth MM, Debus F, Palner M, Lüddens H, Rösch F

Structure-affinity-relationships of new 5-HT_{2A} receptor antagonists combining the structure of MH.MH, altanserin and SR 46349B; Kramer V, Herth MM, Palner M, Knudsen GM, Rösch F

Mainz, 10th of June 2011

Vasko Kramer