

„Neue ^{18}F -markierte Liganden zur Visualisierung des $\text{GABA}_\text{A}/\alpha_5$ - Rezeptorstatus mittels PET“

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

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

Tanja Capito
geb. am 08.08.1980 in Mainz

Mainz, im Januar 2009

Abstract

Today's availability of Molecular Imaging opens up miscellaneous possibilities to study functional, metabolic and pathophysiological processes and correlations *in vivo*. This provides a significant impact on diagnosis and therapy control for brain diseases e.g. associated to the GABA_A-receptor. The visualization and quantification of the α_5 -subunit of the GABA_A-receptor by PET studies may allow a better understanding of different neurological disorders, e.g. the Alzheimer's disease (AD) and the posttraumatic stress disorder (PTSD). α_5 -Subtype-selective GABA_A-receptor ligands also provide an opportunity to give a deeper comprehension of the important processes of learning and memory.

7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4-a]phthalazine seemed to be a promising lead structure for new ¹⁸F-labeled GABA_A/ α_5 -subtypeselective ligands for PET. To verify a novel series of structures as potent tracers, the ¹⁹F-derivatives TC07-TC12 were synthesized.

The reference substances were evaluated in competitive receptor binding assays and autoradiographies of [³H]Ro15-4513 binding against increasing concentrations of the synthesized derivatives. Both receptor binding assays and autoradiographies of [³H]Ro 15-4513 challenged with the reference compounds showed nanomolar K_i-values and a high GABA_A/ α_5 -subunit selectivity for some of the tested compounds. Autoradiographic data and an additional *in vivo*-experiment indicated the expected dose dependent selective displacement of the radioligand from α_5 -subtype containing GABA_A-Receptors. The experiments identified at least some of the tested substances as potent substrates for the GABA_A- α_5 -subtype.

According to these promising results the corresponding precursors for ¹⁸F-labeling reactions of the most relevant compound TC07 were synthesized. The subsequent ¹⁸F-labeling was achieved by direct ¹⁸F-fluorination via nucleophilic substitution using [¹⁸F]fluoride. The reactions were optimized in terms of temperature, reaction time, precursor concentration, base-dependency and different labeling methods. Thereby, [¹⁸F]TC07 was obtained in up to 45 % radiochemical yield and with a over-all radiochemical yield of 15 % for the formulation solution.

Based on the obtained results so far, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* small-animal-studies using μ PET were performed. *In vitro*- and *ex vivo*-autoradiographies pointed to a homogeneous regional activity distribution and showed an absence of regionally specific uptake at tracer dose. Similar results were observed in μ PET studies. Low radioactivity levels and a homogeneous distribution of the activity in the brain and no correspondence with the known distribution of the receptors could be found. The reasons for the disappointing low brain uptake of [¹⁸F]TC07 when administered at tracer doses compared to the former studies with the reference compound, are unknown. The rate of metabolism of [¹⁸F]TC07 was slow and the biodistribution showed no atypical accumulation in other organs. From these observations it can be concluded that [¹⁸F]TC07 is not a suitable tracer for *in vivo* visualization of the α_5 -subunit of the GABA_A-receptor so far.

Zusammenfassung

Die heutige Verfügbarkeit der molekularen Bildgebung ermöglicht einen signifikanten Einfluss auf die Diagnostik und die Therapiekontrolle von neurodegenerativen Erkrankungen, die unter anderem durch Fehlsteuerungen im GABAergen System auftreten können. Die Visualisierung und Quantifizierung des GABA_A- α_5 -Subtyps durch PET könnte dabei zu einem besseren Verständnis von Erkrankungen wie Alzheimer und traumatischen Neurosen (emotionales Langzeitgedächtnis) beitragen. Ferner eröffnen GABA_A/ α_5 -subtypselektive Liganden die Möglichkeit, wesentliche Grundlagen der elementaren Vorgänge von Lernen und Erinnern zu untersuchen.

7,8,9,10-Tetrahydro-(7,10-ethan)-1,2,4-triazol[3,4- α]phthalazine stellen sich als vielversprechende Leitstrukturen zur Entwicklung neuer ^{18}F -markierter α_5 -subtypselektiver GABA_A-Rezeptorliganden für die PET dar. Um diese neuartigen Substanzen hinsichtlich ihrer Potenz als GABA_A- α_5 -subtypselektive Radioliganden zu verifizieren, wurden zunächst die entsprechenden ^{19}F -Derivate TC07-TC12 synthetisiert. Diese Referenzverbindungen wurden in Rezeptorbindungsassays und in Autoradiographien mit [^3H]Ro 15-4513 als zu verdrängender Radioligand evaluiert. In beiden Experimenten als auch in *in vivo*-Verdrängungsexperimenten an Ratten konnte eine hohe Affinität im nanomolaren Bereich als auch eine hohe Selektivität bezüglich der GABA_A/ α_5 -Untereinheit für einige der dargestellten Referenzverbindungen nachgewiesen werden. Gemäß diesen vielversprechenden Ergebnissen wurden verschiedene Markierungsvorläufer für eine ^{18}F -Direktmarkierung der relevantesten Substanz TC07 in einer mehrstufigen organischen Synthese dargestellt. Die anschließende ^{18}F -Markierung erfolgte über eine nukleophile Substitution mit [^{18}F]Fluorid. Die Reaktionsparameter wurden hinsichtlich Reaktionstemperatur und -dauer, Markierungsvorläuferkonzentration, Basenabhängigkeit und verschiedenen Markierungsmethoden optimiert. Daraus resultierend konnte [^{18}F]TC07 mit bis zu 45 % radiochemischer Ausbeute erhalten werden. Die zerfallskorrigierte, gesamtradiochemische Ausbeute von nca [^{18}F]TC07 in isotonischer NaCl-Lösung betrug 15 %.

Basierend auf den bisher erhaltenen Ergebnissen wurde der Radioligand in *in vitro*-, *ex vivo*- und *in vivo* μPET -Experimenten evaluiert. Die zunächst durchgeführten *in vitro*-Experimente deuten auf eine homogene Verteilung der Aktivität hin und zeigten keine spezifische Anreicherung. Diese Ergebnisse wurden sowohl in *ex vivo*- als auch in *in vivo*- μPET -Studien bestätigt. Auch hier konnte nur eine niedrige Aktivitätsanreicherung, eine homogene Verteilung im gesamten Gehirn und keine Übereinstimmung mit der bekannten GABA_A/ α_5 -Subtypverteilung gefunden werden. Eine im Anschluss durchgeführte Metabolismusstudie zeigte eine langsame Metabolisierungsrate des [^{18}F]TC07 und auch eine Organverteilungsstudie zeigte keine außergewöhnlichen Anreicherungen. Aus den erhaltenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der Radioligand [^{18}F]TC07 kein geeigneter Tracer zur *in vivo*-Visualisierung der α_5 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors ist.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Molekulare Bildgebung in den Lebenswissenschaften	1
1.2	Bildgebende Verfahren in der medizinischen Diagnostik	1
1.3	Grundlagen der Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	5
1.4	Kernchemische und kinetische Aspekte trägerarmer Radionuklide	8
1.4.1	Produktion von ^{18}F -Fluor	10
1.4.2	^{18}F -Markierungsstrategien organischer Moleküle	12
1.4.2.1	Nukleophile ^{18}F -Fluorierung	12
1.4.2.2	Fluorierung über prosthetische Gruppen	14
1.4.2.3	Weitere Fluorierungsmethoden	15
1.5	Das GABAerge System	15
1.5.1	Die GABA _A -Rezeptorbindungsstelle	16
1.5.1.1	Aktueller Status der Entwicklung selektiver PET-Liganden für die Benzodiazepinbindungsstelle des GABA _A -Rezeptors	17
1.5.1.2	Verschiedene Subtypen der GABA _A -Bindungsstelle	25
1.5.1.3	Die GABA _A /α ₅ -Bindungsstelle und ihre Bedeutung für die PET	26
1.5.1.4	Aktueller Forschungsstand	26
2	PROBLEMSTELLUNG	28
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER ORGANISCHEN SYNTHESSEN	32
3.1	Darstellung des Grundkörpers A	33
3.2	Darstellung der Grundkörper B7 und B8	34
3.3	Darstellung der Grundkörper B9-B12	35
3.4	Darstellung des Grundkörpers C	37
3.5	Darstellung der inaktiven Referenzverbindungen TC07 - TC12	38
3.6	Darstellung der Strukturen mit nukleofugen Gruppen	39
3.7	6-Chlor-2-pyridinmethanol (29)	39

3.8	6-Brom-2-pyridinmethanol (31)	40
3.9	6-Nitro-2-pyridinmethanol (37)	41
3.10	6-Amino-2-pyridinmethanol	42
3.11	Darstellung verschiedener Markierungsvorläufer von TC07 zur ^{18}F-Direktmarkierung	44
3.12	Darstellung einer Modellverbindung TC14 zur ^{18}F-Direktmarkierung	45
3.13	Darstellung von geeigneten Markierungsvorläufern zur $[^{18}\text{F}]$FETos-Markierung und deren Referenzverbindungen	46
3.14	TC07BOH und FETC07B: 3-(2-Furyl)-6-(6-hydroxyphen-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4-a]phthalazin und 3-(2-Furyl)-6-(6-fluor-ethoxyphen-2-yl)methyl-oxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4-α] phthalazin	47
3.15	TC07POH und FETC07P: 3-(2-Furyl)-6-(6-hydroxypyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4-a]phthalazin und 3-(2-Furyl)-6-(6-fluor-ethoxypyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4-α] phthalazin	48
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER RADIOFLUORIERUNGEN	50
4.1	Radioaktive ^{18}F-Markierung der Modellverbindung TC14	50
4.2	Radioaktive ^{18}F-Markierung von TC07	52
4.2.1	^{18}F / ^{19}F -Isotopenaustausch an der Referenzverbindung TC07	52
4.2.2	^{18}F -Fluorierung des Chlor-Markierungsvorläufers von TC07	53
4.2.3	Abhängigkeit der RCA von $[^{18}\text{F}]$ TC07 von der Reaktionstemperatur	53
4.2.3.1	Abhängigkeit der RCA von $[^{18}\text{F}]$ TC07 von der Markierungsvorläuferkonzentration	54
4.2.3.2	Optimierte Reaktionsparameter zur Darstellung von $[^{18}\text{F}]$ TC07 über einen Chlor-Markierungsvorläufer	55
4.2.4	^{18}F -Fluorierung des Brom-Markierungsvorläufers von TC07	55
4.2.4.1	Abhängigkeit der RCA von $[^{18}\text{F}]$ TC07 von der Reaktionstemperatur	56
4.2.4.2	Abhängigkeit der RCA von $[^{18}\text{F}]$ TC07 vom verwendeten Lösungsmittel	56
4.2.4.3	Abhängigkeit der RCA von $[^{18}\text{F}]$ TC07 von der Markierungsvorläuferkonzentration	57

4.2.4.4	Abhängigkeit der RCA von [^{18}F]TC07 im Powertest-Modus der Mikrowelle	58
4.2.4.5	Optimierte Reaktionsparameter zur Darstellung von [^{18}F]TC07 über einen Brom-Markierungsvorläufer	59
4.2.5	^{18}F -Fluorierung des Nitro-Markierungsvorläufers von TC07	59
4.2.5.1	Abhängigkeit der RCA von [^{18}F]TC07 von der Reaktionstemperatur	60
4.2.5.2	Abhängigkeit der RCA von [^{18}F]TC07 vom verwendeten Lösungsmittel	61
4.2.5.3	Abhängigkeit der RCA von [^{18}F]TC07 von der Markierungsvorläuferkonzentration	61
4.2.5.4	Abhängigkeit der RCA von [^{18}F]TC07 von verschiedenen Basenzusätzen	62
4.2.5.5	Abhängigkeit der RCA von [^{18}F]TC07 im Powertest-Modus der Mikrowelle	64
4.2.5.6	Abhängigkeit der RCA von [^{18}F]TC07 im Standard-Modus der Mikrowelle	65
4.2.5.7	Optimierte Reaktionsparameter zur Darstellung von [^{18}F]TC07 über einen Nitro-Markierungs-vorläufer	67
4.2.5.8	Abtrennung und Qualitätskontrolle von [^{18}F]TC07	68
4.2.6	[^{18}F]FETos-Markierung des Markierungsvorläufers TC07BOH	69
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER EVALUIERUNGEN	71
5.1	Bestimmung der Lipophilie	71
5.2	Evaluierung der ^{18}F-markierten Verbindungen [^{18}F]TC07	72
5.2.1	Ergebnisse der Autoradiographien	72
5.2.2	Ergebnisse der Tier-PET-Studie	75
5.2.3	Metabolismus von [^{18}F]TC07 im Blut	77
5.2.4	Organverteilung	78
6	EXPERIMENTELLER TEIL	82
6.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	82
6.2	Synthese der Referenzverbindungen und Markierungsvorläufer	86
6.2.1	Darstellung des Grundkörpers A	86
6.2.1.1	4,5-Diazatricyclo[6.2.2.2,7]dodeca-2(7)-en-3,6-dion (1)	86
6.2.1.2	3,6-Dichlor-4,5-diazatricyclo[6.2.2.2,7]dodeca-2(7),3,5-trien (2)	86
6.2.1.3	3-Chlor-6-hydrazin-4,5-diazatricyclo[5.2.2,7]dodeca-2(7),3,5-trien (3)	87
6.2.2	Darstellung der Grundkörper B	88
6.2.2.1	6-Chlor-3-(2-furyl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]-phthalazin (7)	88
6.2.2.2	2-Methoxy-benzoylchlorid (9)	89

6.2.2.3	6-Chloro-3-(2-methoxyphenyl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]- phthalazin (10)	89
6.2.2.4	Isopropylcarboxamidoxim (12)	90
6.2.2.5	Ethyl-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)carboxylat (13)	90
6.2.2.6	6-Chlor-3-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (14)	91
6.2.2.7	Phenylcarboxamidoxime (16)	92
6.2.2.8	Ethyl-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)carboxylat (17)	92
6.2.2.9	6-Chlor-3-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (18)	93
6.2.2.10	3-Pyridylcarboxamidoxime (20)	94
6.2.2.11	Ethyl [3-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]carboxylat (21)	94
6.2.2.12	6-Chlor-3-[3-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4- triazolo[3,4- α]phthalazin (22)	95
6.2.2.13	4-Pyridylcarboxamidoxim (24)	96
6.2.2.14	Ethyl[3-(pyridin-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]carboxylat (25)	96
6.2.2.15	6-Chlor-3-[3-(pyridin-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (26)	97
6.2.3	Darstellung des Grundkörpers C	98
6.2.3.1	6-Fluorpyridin-2-carbonsäure (4)	98
6.2.3.2	6-Fluor-2-pyridinmethanol (5), I	98
6.2.3.3	6-Fluor-2-pyridinmethanol (5), II	99
6.2.4	Darstellung der inaktiven Referenzverbindungen	100
6.2.4.1	3-(2-Furyl)-6-(6-fluorpyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (8)	100
6.2.4.2	3-(2-Methoxyphenyl)-6-(6-fluorpyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (11)	101
6.2.4.3	3-(3-Isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-6-(6-fluorpyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (15)	102
6.2.4.4	3-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-6-(6-fluorpyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (19)	103
6.2.4.5	3-[3-(Pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-6-(6-fluorpyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (23)	104
6.2.4.6	3-[3-(Pyridin-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-6-(6-fluorpyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (27)	105
6.2.5	Darstellung der Strukturen mit nukleofuger Gruppe	106
6.2.5.1	6-Chlor-2-picolin-N-oxid (28)	106
6.2.5.2	6-Chlor-2-pyridinmethanol (29)	106

6.2.5.3	6-Brom-2-pyridinmethanol (31)	107
6.2.5.4	2-Acetamido-6-methylpyridin (33)	108
6.2.5.5	2-Acetamido-6-methylpyridin-N-oxid (34)	108
6.2.5.6	6-Nitro-2-picolin-N-oxid (35)	109
6.2.5.7	6-Nitro-2-Acetoxymethylpyridin (36)	109
6.2.5.8	6-Nitro-2-pyridinmethanol (37), I	110
6.2.5.9	2-Nitro-6-methylpyridin (38)	110
6.2.5.10	6-Nitro-2-pyridinmethanol (37), II	111
6.2.5.11	6-Aminopyridin-2-carbonsäure (40)	112
6.2.6	Darstellung verschiedener Markierungsvorläufer zur ^{18}F -Fluorierung von TC07	113
6.2.6.1	3-(2-Furyl)-6-(6-chlorpyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (30)	113
6.2.6.2	3-(2-Furyl)-6-(6-brompyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (32)	114
6.2.6.3	3-(2-Furyl)-6-(6-trimethylaminpyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (38)	115
6.2.6.4	3-(2-Furyl)-6-(6-nitropyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (39)	115
6.2.7	Darstellung einer Modellverbindung TC14 zur ^{18}F -Direktmarkierung	116
6.2.7.1	6-Chlor-2-[(1,1-dimethylethoxy)methyl]pyridin (42)	116
6.2.7.2	6-Chlor-2-(methoxymethyl)pyridin (43)	117
6.2.7.3	6-Chlor-2-(benzyloxymethyl)pyridin (44)	117
6.2.7.4	6-Fluor-2-(benzyloxymethyl)pyridin (45)	118
6.2.8	Darstellung von geeigneten Markierungsvorläufern zur [^{18}F]FETos-Markierung und dessen Referenzverbindungen	118
6.2.8.1	3-(tert.-Butyldiphenylsilyl)oxybenzylalkohol (46)	118
6.2.8.2	3-(2-Furyl)-6-(6-(tert.-butyldiphenylsilyl)oxybenz-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (47)	119
6.2.8.3	3-(2-Furyl)-6-(6-hydroxypyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (48)	120
6.2.8.4	3-(2-Furyl)-6-(6-fluorethoxybenz-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (49)	121
6.2.8.5	2-Brom-6-benzyloxypyridin (50)	122
6.2.8.6	6-Benzyloxy-2-pyridincarbaldehyd (51)	123
6.2.8.7	6-Benzyloxy-2-pyridinmethanol (52)	123
6.2.8.8	6-Hydroxy-2-pyridinmethanol (53)	124
6.2.8.9	6-[(tert.-Butyldiphenylsilyl)oxy]-2-pyridinmethanol (54)	124

6.2.8.10	3-(2-Furyl)-6-(6-(tert.-butyldiphenylsilyl)oxypyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (55)	125
6.3	Radiofluorierungen	126
6.3.1	Identifizierung der ^{18}F -fluorierten Verbindungen	126
6.3.2	Optimierung der ^{18}F -Fluorierung der Markierungsvorläufer von TC07	126
6.3.3	Abtrennung des radiofluorierten Produkts [^{18}F]TC07	127
6.3.4	Bestimmung der spezifischen Aktivität	127
6.4	Bestimmung der Lipophilie	128
6.5	Evaluierungen	129
6.5.1	Bestimmung der IC_{50} -Werte	129
6.5.2	Autoradiographien von [^{19}F]TC07 und nca [^{18}F]TC07	130
6.5.3	<i>Ex vivo</i> -Bindungsstudien mit der Referenzverbindung [^{19}F]TC07	130
6.5.4	<i>In vivo</i> -Bindungsstudien mit nca [^{18}F]TC07 mittels Kleintier-PET	131
6.5.5	Organverteilung von [^{18}F]TC07 in Mäusen	132
6.5.6	Metabolitenstudie von Rattenblut mit nca [^{18}F]TC07	133
7	ZUSAMMENFASSUNG	134
8	ANHANG	140
8.1	Anhang A: Strukturen der inaktiven Referenzverbindungen	140
8.2	Anhang B: Häufig verwendete Abkürzungen	141
8.3	Anhang C: Ergebnisse der Evaluierung der kalten Referenzverbindungen TC07-TC12	142
8.3.1	Bestimmung der Affinitäten und Selektivitäten zu den GABA_A -Untereinheiten	142
8.3.2	Ergebnisse der Autoradiographien der kalten Referenzverbindungen	145
8.3.3	Ergebnisse der <i>ex vivo</i> -Experimente der Referenzverbindung TC07	149
8.4	Anhang D: Abbildungsverzeichnis	151
8.5	Anhang E: Tabellenverzeichnis	155
8.6	Anhang F: Literaturverzeichnis	155

1 Einleitung

1.1 Molekulare Bildgebung in den Lebenswissenschaften

Aktuell basiert die Beurteilung zahlreicher Krankheiten meist auf anatomischen oder physiologischen Veränderungen. Viele Krankheiten existieren jedoch für eine beträchtliche Zeitspanne in einer asymptomatischen Phase. Biochemische Reserven, aber auch herabregelnde und kompensatorische Rückmeldungen innerhalb biologischer Prozesse der Organsysteme können die krankheitsauslösenden Fehler bis zu einem bestimmten Punkt so unterdrücken, dass es zu keiner veränderten Organfunktion kommt. Obwohl also der Organismus noch keine Symptome ausgebildet, sind bereits Veränderungen auf molekularer Ebene durch die Krankheit vorhanden. Ein direkter Nachweis dieser molekularen Veränderungen würde für den Patienten eine sehr viel frühere Diagnose der Krankheit bedeuten. In einem Stadium, in dem noch keine physiologischen Veränderungen erkannt werden können, könnte so durch rechtzeitige Behandlungsmaßnahmen der Verlauf der Krankheit positiv beeinflusst werden.

Durch diese Erkenntnisse wurde ein Gesamtkonzept geschaffen, in dem sich die Molekulare Bildgebung als Verfahren einordnet, um das Verständnis des Zusammenspiels von Molekülen, Zellen, Organen und des gesamten Organismus zu vertiefen. Das untersuchte System kann beispielsweise ein komplexes Organsystem wie das Gehirn sein, bei dem ein riesiges Kollektiv an Zellen und deren Funktion ein System ergeben, welches allein durch molekulare Mechanismen gesteuert wird und daraus intra- und interzelluläre Ereignisse resultieren.

Durch die direkte Visualisierung der durch die Krankheit hervorgerufenen biochemischen Veränderungen ist man potentiell in der Lage, Erkrankungen schon zu diagnostizieren, bevor sich erste physiologische Veränderungen zeigen. In Langzeitstudien konnte so gezeigt werden, dass durch bildgebende Verfahren wie die PET eine Alzheimer Erkrankung mit einer 93 %igen Sicherheit drei Jahre früher erkennbar wird als unter Anwendung konventioneller, klinischer Diagnostikmethoden¹. Ferner ist man durch direkte Visualisierung der durch die Krankheit hervorgerufenen Veränderungen in der Lage, den Effekt einer Therapie direkt zu überprüfen. Daraus folgend kann man den Therapieerfolg schon kurz nach Beginn der Therapie beurteilen, was auf konventionellem Weg erst Wochen bis Monate später ersichtlich ist.

1.2 Bildgebende Verfahren in der medizinischen Diagnostik

Die Technologie der bildgebenden Verfahren basiert auf der Verwendung außerhalb des Organismus messbarer Strahlung, die entweder den Organismus durchdringt oder in den Organismus

eingebraucht wird. Daraus resultierend entwickelten sich verschiedene Verfahren zur Visualisierung von Struktur und Funktion von Systemen, wobei jedes Verfahren seine eigenen Stärken und Schwächen beinhaltet. Als Beispiele seien hier Röntgen, Computertomographie (CT), Magnet-Resonanztomographie (MRT), Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) vorgestellt:

Klassisches Röntgen und Computertomographie (CT):

Das gängigste bildgebende Verfahren in der Medizin ist die Bildgebung durch Röntgenstrahlung. Dabei wird im einfachsten Fall, dem klassischen Röntgenbild, eine Projektion der Dichteverteilung erzeugt, in dem man das Objekt zwischen eine Röntgenquelle und eine Photoplatte bringt. Einen Schritt weiter geht man in der Computertomographie (CT), bei der eine rotierende Röntgenquelle das zu untersuchende Objekt bestrahlt; durch Messung mit geeigneten Detektoren wird so ein Querschnittsbild generiert. Auch bei dieser Methode wird die Dichteverteilung innerhalb des Objektes gemessen. Nachteilig ist jedoch sowohl beim Röntgen als auch bei der CT, dass beide Verfahren durch das breite Energiespektrum der eingestrahlten Röntgenstrahlen keine Analyse der genauen Dichte zulassen. Für diagnostische Zwecke ist dies jedoch völlig ausreichend, da der Dichteunterschied zwischen Knochen und Gewebe und zwischen verschiedenen Gewebearten ausreicht, um Knochen und Gewebegrenzen deutlich abbilden zu können. Kleinere Unterschiede in Geweben lassen sich jedoch nur schwer bestimmen. Hier kommen Kontrastmittel (Flüssigkeiten mit hoher Dichte und hoher Ordnungszahl, z.B. iodhaltige Kontrastmittel) zum Einsatz, die die Dichteverteilung und daraus folgend deren Interpretation verändern können. Die Methoden des Röntgens und der CT sind in ihrer Anwendung aufgrund ihrer diagnostischen Möglichkeiten sehr limitiert, jedoch aufgrund ihrer einfachen und kostengünstigen Anwendung immer noch am häufigsten verbreitet. Ein weiterer zu erwähnender Nachteil der CT ist die sehr hohe Strahlenexposition des Patienten. Diese ist um bis zu 1000-mal höher als bei einer klassischen Thorax-Röntgenaufnahme².

Magnet-Resonanztomographie (MRT):

Die der MRT (auch „Kernspintomographie“) zugrunde liegende Kernresonanzspektroskopie (NMR) beruht auf dem Vorhandensein des Eigendrehimpulses (Spin) eines Atomkerns. Damit verbunden ist die magnetische Wechselwirkung von Atomkernen mit äußeren Magnetfeldern, die Wechselwirkung der Kerne untereinander, die Wechselwirkung der Elektronenhülle eines Atoms und der Elektronen des gesamten Moleküls. Unterschiedliche Kernspin-Relaxationszeiten in verschiedenen biologischen Geweben bilden die Basis für die in der Medizin als bildgebendes diagnostisches Verfahren genutzte MRT. Hierbei wird ein homogenes magnetisches Feld von 2 Tesla verwendet, in das hochfrequente Wellen eingestrahlt werden. Die Stärke des erhaltenen Signals ist proportional zur Verteilung der spin-up und spin-down Zustände. Unter normalen Umständen ist diese Verteilung bei Raumtemperatur nahezu gleich, woraus sich ergibt, dass die MRT eigentlich relativ unempfindlich ist. Erfolgreiche Anwendung findet sie jedoch durch den

hohen Anteil von Wasser im menschlichen Gewebe und der Nutzung von paramagnetischen Kontrastmitteln wie Gd-DTPA zur Kontrastverstärkung. Limitierte Visualisierung findet sich in sehr kleinen Strukturen mit Molekülkonzentration unter 0,1 mM, besonders im Bereich des Gehirns, da Wasser und Fett hier nur in kleinen Konzentrationen vorliegen.

Sowohl die klassische Anwendung des Röntgens, die CT als auch die MRT stellen anatomische Informationen bereit, die man ohne direkten äußeren Einfluss auf den menschlichen Körper sonst nicht erhalten könnte.

SPECT und PET:

Einen vielversprechenden neuen Ansatz lieferte ab den 50ern die funktionelle Bildgebung der SPECT und der PET. Die beiden Verfahren unterscheiden sich durch das eingebrachte Radioisotop und das daraus resultierende Messprinzip. In der SPECT kommt es zur Verwendung einfacher Gammastrahler, hingegen werden in der PET Positronenemitter eingesetzt. Daraus folgt für das Messprinzip, dass bei der SPECT die räumliche Zuordnung der emittierten Gammastrahlung durch mechanische Kollimatoren (Bleisepten) erfolgt. Der Photonen-Registrierung in der PET geht dagegen voraus, dass die primär emittierten Positronen nach einer ihrer kinetischen Energie entsprechenden Reichweite im Gewebe mit Elektronen annihilieren. Positron und Elektron bilden das äußerst kurzlebige Positronium und wandeln dann ihre Masseenergien in zwei, sich mit einem Winkel von 180° auseinander bewegenden Photonen mit einer genau definierten Energie von je 511 keV um. Die räumliche Zuordnung dieser so genannten Vernichtungsstrahlung erfolgt durch eine Koinzidenzmessung.

Die Stärke von SPECT und PET liegt zum einen in der Möglichkeit, direkte quantitative Aussagen des Transportes und der biologischen Verfügbarkeit von Biomolekülen zu treffen (Pharmakokinetik), zum anderen ihre therapeutischen und toxischen Effekte auf ein biologisches System zu untersuchen (Pharmakodynamik).

Dabei wird das Radioisotop meist in die Blutbahn des Organismus eingebracht und reichert sich in spezifischen Regionen an. So werden zur Visualisierung des Knochengerüsts typischerweise die Radioisotope $^{99}\text{Sr}^{2+}$ und $^{18}\text{F}^-$ verwendet. Das Nuklid ^{123}I wird für Untersuchungen an der Schilddrüse genutzt und $^{201}\text{Tl}^+$ durch seine Ähnlichkeit zu K^+ wird über eine Natrium/Kalium-ATPase aktiv in Herzmuskelzellen angereichert. Eine weitere Möglichkeit ist das Verwenden eines Nuklid-Ligand-Komplexes. Die dominierende Anwendung von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Ligand-Komplexen in der klinischen Routine ist vor allem auf die kostengünstigen und leicht zu handhabenden $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Technetium-Kits zurückzuführen. Klinischen Anwendung finden dabei hauptsächlich die $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Komplexe $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI (Cardiolite[®]) und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tetrofosmin (Myoview[®]) in der Myocardszintigraphie, aber auch weitere Untersuchungen wie Knochen-, Nieren- und Schilddrüsenszintigraphien können mit verschiedenen $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Ligand-Komplexen durchgeführt werden. Immer weiter in den Mittelpunkt rückt das Prinzip des Einbringens eines geeigneten Radioisotops in ein aktives Biomolekül. Durch Injektion dieses Radiopharmakons in den Organismus, spezifische Anreicherung des radiomarkierten Biomoleküls (Targeting-Vektor) im

biologischen Ziel und durch gleichzeitigen Zerfall des Radioisotops unter Aussendung außerhalb des Organismus messbarer Strahlung kann durch ein computergestütztes Detektorsystem eine Aktivitätsverteilung ermittelt werden. Dadurch kann die Verteilung des Targeting-Vektors im Organismus sowohl qualitativ, im Fall der PET auch quantitativ, ermittelt werden. Das im diagnostischen Bereich meistverwendete radioaktiv markierte Biomolekül ist die 2- ^{18}F Fluordesoxy-D-glukose (2- ^{18}F FDG).

Beide bildgebenden Verfahren werden derzeit zur Diagnostik von onkologischen Erkrankungen, kardiovaskulären Erkrankungen und neurologisch auffälligen Krankheitsbildern klinisch genutzt.

Die Verwendung von radioaktiv markierten Biomolekülen birgt den Vorteil, dass diese Moleküle in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu penetrieren. Dadurch ist es möglich funktionale, metabolische und pathophysiologische Prozesse und Korrelationen im Gehirn *in vivo* zu untersuchen. Dabei sind besonders die folgenden Krankheitsbilder erwähnenswert:

- Neurodegenerative Erkrankungen, vor allem bei Bewegungsstörungen (Morbus Parkinson, Multisystem-Atrophie, Dystonien, hyperkinetischen Syndromen wie beispielsweise Huntington Chorea, Ataxien und andere neurodegenerative Störungen) und bei Demenzen (hier vor allem der Alzheimer-Erkrankung, Lewy-Körper-Demenzen, front-temporalen und vaskulären Demenzen, aber auch der Creutzfeldt-Jacob-Erkrankung)
- Zerebrovasuläre Erkrankungen (Ischämien)
- Epilepsien, speziell bezüglich der Lokalisierung epileptischer Foki, der Beurteilung der Progression epileptischer Läsionen und deren prä- und post-therapeutischen Charakterisierung
- Psychiatrische Erkrankungen, vor allem bei schizophrenen und affektiven Störungen, bei Alkohol- und anderen Substanzabhängigkeiten oder bei Persönlichkeits- bzw. Verhaltensstörungen.

Im größeren Rahmen klinisch etabliert haben sich Diagnosen von Hirntumoren, von M. Parkinson, Epilepsie und der Alzheimer Demenz.

Wegen der schlechten Sensitivität, der geringen räumlichen Auflösung und der fehlenden Möglichkeit einer Abschwächungskorrektur ist die SPECT gegenüber der PET jedoch deutlich im Nachteil.

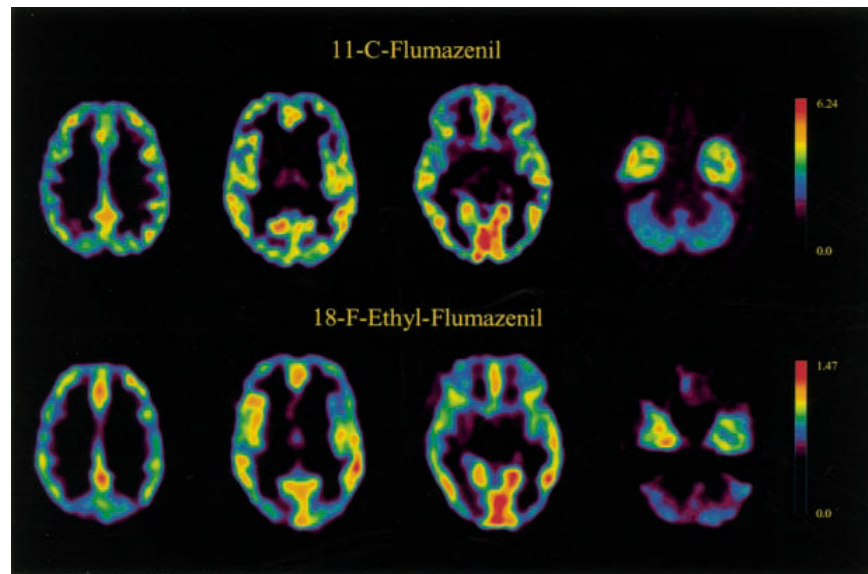
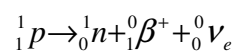


Abb. 1: PET-Aufnahme der benzodiazepinrezeptorselektiven Liganden [^{11}C]Flumazenil und [^{18}F]FEF im Menschen

1.3 Grundlagen der Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Bei den in der PET verwendeten Radionukliden handelt es sich um instabile, neutronenarme Kerne, die sich durch Positronenemission stabilisieren. Bei der radioaktiven Umwandlung dieses Kerns wird ein Proton in ein Neutron umgewandelt, wobei zum Ladungsausgleich ein Positron (β^+) und zum Erhalt des Spins ein Neutrino (ν_e) emittiert werden. Bei den meisten in der PET verwendeten Radioisotope sind die durch β^+ -Umwandlung entstehenden Nuklide stabil.



Das Positron verliert auf sehr kurzem Wege durch elastische Stöße mit seiner Umgebung kinetische Energie und rekombiniert dann mit seinem Antiteilchen (Elektron) eines nahe gelegenen Atoms. Die zurückgelegte Distanz des Positrons ist dabei abhängig von seiner Energie.

Kombiniert ein Positron mit dem Elektron eines Atoms, kommt es zur so genannten Annihilationsreaktion mit einem Positronium als instabilem Zwischenprodukt. Bei der Annihilation des Partikels wandelt sich dessen Ruhemasse vollständig in zwei 511 keV Gammastrahlen um, die in einem 180°-Winkel voneinander abstrahlen. Diese Photonen können den Körper ohne wesentliche Wechselwirkungen mit Materie verlassen und von externen Detektoren registriert werden. Diese Vernichtungsstrahlung oder Annihilationsstrahlung ist Grundlage der PET: Die beiden 511 keV-Photonen werden in jeweils gegenüberliegenden Detektoren dann als wahres Ereignis

registriert, wenn sie innerhalb einer kurzen Zeitspanne von < 10 ns gleichzeitig, d.h. koinzident, eintreffen.

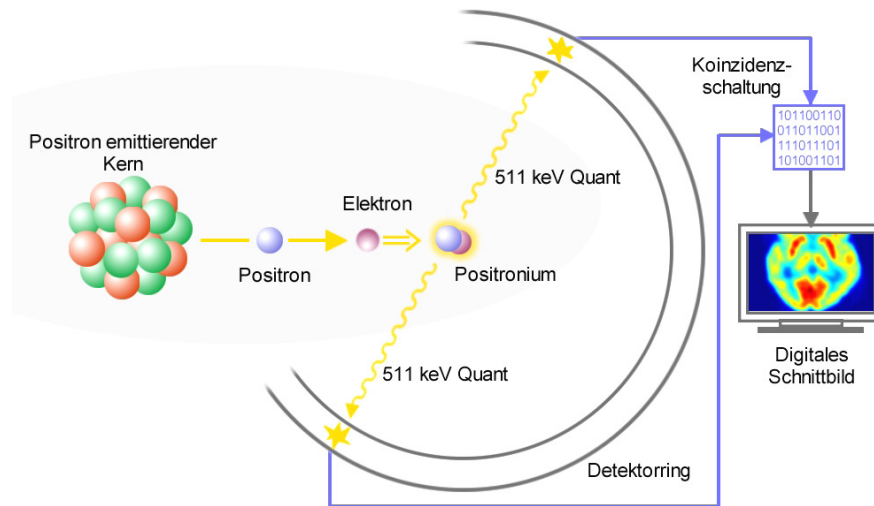


Abb. 2: Schema der Positronenvernichtung und der Detektion der Vernichtungsstrahlung

Bei einer PET-Untersuchung wird dem Patienten ein positronenemittierendes Radionuklid appliziert, welches in ionischer Form, als Nuklid-Ligand-Komplex oder als Teil eines Biomoleküls vorliegen kann. Durch Anreicherung dieses Radiopharmakons an den Zielstrukturen im Organismus kann in diesen Arealen vermehrt Annihilationsstrahlung detektiert werden. Zur Detektion werden sogenannte Positronenemissionskameras eingesetzt, die die erhaltenen Impulse an eine Computereinheit weiterleiten. Die Idee der PET konnte nur realisiert werden, nachdem anorganische Szintillationsdetektoren zur Detektion der γ -Strahlung, elektronische Bauteile zur Koinzidenzmessung und ausreichende Computerkapazität zur Bildrekonstruktion verfügbar wurden.

Eine aktuelle Positronenkamera ist ein komplexes Produkt der Strahlungsdetektortechnologie³. Der Basis-Detektor in einer modernen PET-Kamera ist ein Bismutgermanat-Blockdetektor (BGO-Blockdetektor) mit einer Unterteilung in 8×8 Unterdetektoren, die durch 4 Photomultiplerröhren (PMT) ausgelesen werden. Durch Addition und Subtraktion von individuellen Signalen der PMT's kann der szintillierende Unterdetektor im BGO-Block identifiziert werden. Die Detektorenblöcke formieren einen Ring, wobei bis zu vier dieser Ringe zusammen ein axiales Sichtfeld von ungefähr 15-16 cm ergeben. Auf diesem Weg können bis zu 63 Ebenen simultan mit einer spatialen Auflösung von 4-5 mm dargestellt werden. Für Kleintier-Forschung wurden speziell MicroPET-Kameras mit einer spatialen Auflösung von 2 mm und kleiner auf den Markt gebracht.

Ferner müssen vor der Rekonstruktion des Bildes Korrekturrechnungen (Absorptions- und Totzeitkorrektur, sowie Korrektur der Zufallskoinzidenz und der Streustrahlung) durchgeführt werden.

Voraussetzung für eine gute Visualisierung eines biochemischen Prozesses ist das Vorhandensein eines geeigneten Radiopharmakons und die Wahl eines günstigen Positronenemitters. Besonders im Hinblick auf die Wahl des Positronenemitters sind in der Regel folgende Kriterien von belang:

- Halbwertszeit
- Positronenenergie
- Häufigkeit des Positronenzerfalls
- Produktionsweg und Verfügbarkeit
- Markierungsstrategie

Die Bedeutung der Halbwertszeit liegt primär bei der Handhabung des Isotops und der Strahlenbelastung des Patienten. Hier muss ein Kompromiss zwischen Strahlenbelastung und der begrenzten Synthesezeit bei kurzlebigen Radioisotopen gefunden werden. Zwar sind prinzipiell auch ^{13}N und ^{15}O als PET-Isotope handhabbar und kommen auch in Patientenuntersuchungen zum Einsatz (z.B. Blutfluss-Bestimmung durch ^{15}O -Butanol), allerdings sind chemische Synthesen durch die kurze Halbwertszeit nur begrenzt möglich. Ferner können nur mit langlebigeren Radionukliden biochemische Vorgänge mit längerer biologischer Halbwertszeit untersucht werden. ^{11}C mit einer Halbwertszeit von 20 Minuten und ^{18}F mit einer Halbwertszeit von 110 Minuten werden hier vermehrt eingesetzt.

Die Positronenenergie steht in enger Beziehung zur Reichweite der Positronenstrahlung, wobei gilt, dass mit zunehmender kinetischer Energie die Reichweite des Positrons ansteigt. Eine hohe Positronenenergie führt somit zu einer schlechteren Ortsauflösung und damit zu einer schlechteren Bildqualität.

Hauptsächlich kommen in der PET kurzlebige Isotope zum Einsatz (^{11}C mit $t_{1/2} = 20$ min, ^{13}N mit $t_{1/2} = 10$ min, ^{15}O mit $t_{1/2} = 2$ min und ^{18}F mit $t_{1/2} = 110$ min). Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff sind die Elemente jedes lebenden Organismus und Bausteine nahezu jedes biochemisch relevanten Moleküls. Obwohl Fluor im Gegensatz zu den genannten Elementen nur verhältnismäßig selten in organischen Molekülen vorhanden ist, wird es aufgrund seiner guten Isotopeneigenschaften sehr häufig in der PET eingesetzt. In der nachfolgenden Tab. 1 sind einige wichtige Positronenstrahler angeführt.

Nuklid	$T_{1/2}$	Umwandlungsart [Häufigkeit %]	$E_{\beta^+, \max}$	max. Reichweite (in H_2O)
^{11}C	20,30 min	β^+ 99,8 EC 0,2	0,96 MeV	3,8 mm
^{13}N	9,96 min	β^+ 100	1,19 MeV	5,0 mm
^{15}O	2,03 min	β^+ 99,9 EC 0,1	1,73 MeV	7,6 mm
^{18}F	109,65 min	β^+ 96,9 EC 3,1	0,63 MeV	2,2 mm
^{68}Ga	67,71 min	β^+ 89,1 EC 10,9	1,90 MeV	13,6 mm
^{72}As	1,1 d	β^+ 87,8 EC 12,2	1,12 MeV	4,8 mm
^{76}Br	16,7 h	β^+ 66,5 EC 33,5	3,60 MeV	15,5 mm
^{86}Y	14,7 h	β^+ 31,4 EC 68,6	1,18 MeV	5,3 mm
^{124}I	4,17 d	β^+ 23,0 EC 67,0	2,14 MeV	9,7 mm

Tab. 1: Wichtige Positronenstrahler⁴

1.4 Kernchemische und kinetische Aspekte trägerarmer Radionuklide

Im Zusammenhang mit der PET ist besonders der Begriff der Trägerfreiheit von Bedeutung⁵. Praktisch sind drei verschiedene Fälle zu unterscheiden:

- trägerfrei (carrier-free; cf)
- ohne zugesetzten Träger (no-carrier-added; nca)
- geträgert (carrier-added; ca)

Der Zustand der absoluten Trägerfreiheit ist nur bei künstlichen Elementen wie zum Beispiel bei ^{211}At erreichbar, da nur hier eine Verunreinigung des Radionuklids mit stabilen Isotopen des Elements ausgeschlossen werden kann. Das Maß der Verunreinigung hängt unter anderem von der Häufigkeit des Elements in der Umwelt ab. Der Zustand der absoluten Trägerfreiheit kann bei natürlich vorkommenden Isotopen des entsprechenden Elements nicht erreicht werden, da eine Aufnahme an isotopem Träger nicht völlig auszuschließen ist (durch Synthese, Reinigung, Targetmaterial, Luft etc.). Während die Verunreinigung von radioaktivem ^{11}C -Kohlenstoff mit

natürlichem Kohlenstoff das 100-10.000fache übersteigen kann, ist sie bei den weniger häufig vorkommenden Halogenen geringer, kann aber immer noch das 10-1000fache betragen⁶. Der gebräuchliche Begriff für Markierungssynthesen ist daher „ohne zugesetzten Träger“. Bei manchen Reaktionen wird Träger jedoch absichtlich zugesetzt, es wird dann von einem geträgerten Zustand gesprochen.

Besondere Bedeutung erfährt hier auch der Begriff der spezifischen Aktivität. Dabei handelt es sich um Aktivität bezogen auf die Gesamtstoffmenge. Die Angabe der spezifischen Aktivität erfolgt in GBq/μmol. Im Allgemeinen ist ein Trägerzusatz nicht erwünscht, da er die spezifische Aktivität stark erniedrigt. Hohe spezifische Aktivität ist besonders bei Einsatz toxischer, beziehungsweise zentral wirksamer Radiopharmaka zur Unterschreitung der wirksamen Dosiskonzentration unabdingbar. Liegt ein Radiopharmazeutikum in nca-Mengen vor, kann eine pharmakodynamische Wirkung zumeist ausgeschlossen werden.

Zum besseren Verständnis der experimentellen Ergebnisse sollen zuvor einige Betrachtungen der kinetischen Aspekte bei nca-Markierungen diskutiert werden.

Die allgemeine Formel für den Zerfall eines Isotops lautet:

$$A = -\frac{dN}{dt} = N \cdot \lambda = \frac{N \cdot \ln 2}{t_{1/2}}$$

A: Aktivität; N: Teilchenanzahl; λ: Zerfallskonstante; t_{1/2}: Halbwertszeit

Aufgrund der gewählten Reaktionsbedingungen bei nukleophilen Fluorierungen handelt es sich um eine bimolekulare Reaktion, also um eine Reaktion 2. Ordnung:

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

[A]: Konzentration des Radionuklids; [P]: Konzentration des Produkts;
[MV]: Konzentration des Markierungsvorläufers

Bei nca-Markierungen wird der Markierungsvorläufer in ca. 10¹⁰fachen Überschuss gegenüber der Konzentration des Radionuklids eingesetzt. Somit kann man die Veränderung der Konzentration des Markierungsvorläufers vernachlässigen. Dies führt zu einem Reaktionsgesetz pseudoerster Ordnung.

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

Damit ergibt sich für die Aktivität zum Zeitpunkt t :

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

$$[A_t] = [A_0] \cdot \exp(-k' \cdot t) \quad , \quad \text{mit} \quad [A_0] = [P] + [A_t]$$

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

Trägt man nun die radiochemische Ausbeute gegen die Zeit auf, erhält man einen typischen Kurvenverlauf (Abb. 3).

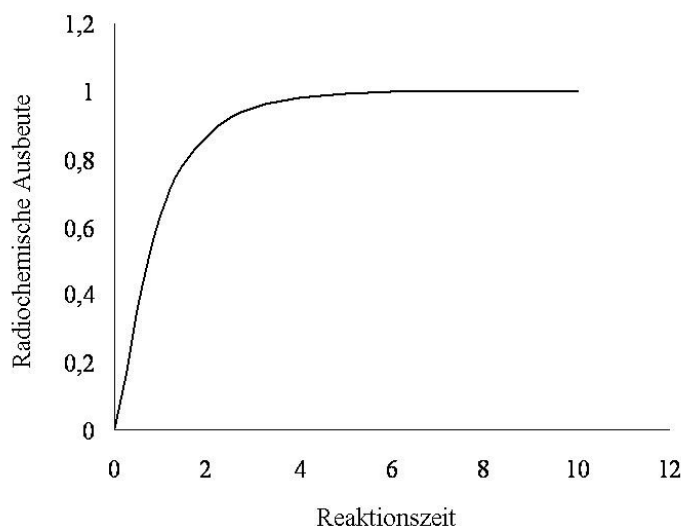


Abb. 3: Theoretische radiochemische Ausbeutekurve von nca-Markierungen

Die Bildungskonstante k' des Radionuklids bestimmt die Größe der Anfangssteigung. Da sich diese Konstante aus der Vorläuferkonzentration und der eigentlichen Geschwindigkeitskonstanten k zusammensetzt, ist daraus direkt ersichtlich, dass die Anfangssteigung der Ausbeutekurve proportional der Reaktivität des Markierungsvorläufer ist.

1.4.1 Produktion von ^{18}F -Fluor

Zu Beginn der 80er Jahre wurde die ursprünglich Herstellung von ^{18}F -Fluor an einem Kernreaktor über die $^6\text{Li}(n,\alpha)^3\text{H}$ - oder die $^{16}\text{O}(^3\text{H},n)^{18}\text{F}$ -Reaktion durch die Produktion am Zyklotron ersetzt. Hierbei ist je nach Kernreaktion das ^{18}F -Fluor in zwei sich voneinander unterscheidenden chemischen Formen zugänglich: als $[^{18}\text{F}]\text{F}_{\text{aq}}^-$ in einer nukleophilen, ungeträgerten Form oder als

elektrophiles, geträgertes $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$. Von den vielen Möglichkeiten ^{18}F -Fluor darzustellen, sind in Tab. 2 die vier wichtigsten Kernreaktionen aufgeführt:

Kernreaktion	Target	chem. Form des Fluors	Spezifische Aktivität [GBq/mmol]
$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	H_2^{18}O	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$	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	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	37-370
$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}_2$, Kr (1% F_2), 20 bar	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	37-1850

Tab. 2: Kernreaktionen zur Produktion von ^{18}F -Fluor im Zyklotron⁷.

Die Darstellung des nukleophilen Fluorids erfolgt im Wesentlichen über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Kernreaktion. Entstandenes $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ wird nach der Bestrahlung an einen Anionenaustauscher gebunden und anschließend mit einer wässrigen Kaliumcarbonatlösung eluiert. Der schematische Aufbau eines Targets für die $^{16}\text{O}({}^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$ -Reaktion kann aus der Abb. 4 entnommen werden. Die zyklische Nutzung des $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ erfolgt durch photochemische und destillative Reinigung⁸.

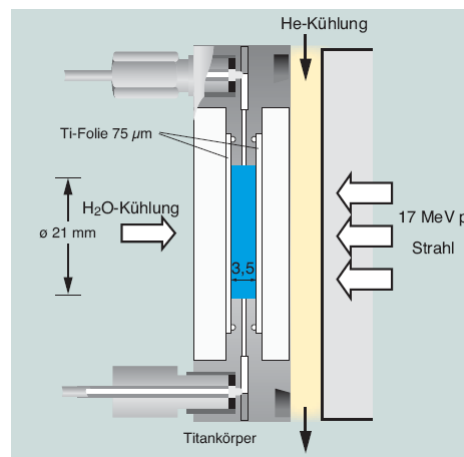


Abb. 4: Aufbau eines Wasser-Target-Systems zur Produktion von $[^{18}\text{F}]\text{F}^-_{\text{aq}}$ ⁹

Die Produktion des elektrophilen $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ erfolgt entweder über die $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ - oder die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Reaktion an einem Gastarget¹⁰. Um die Anlagerung des ^{18}F -Fluors an der Targetwand auf ein Minimum zu reduzieren, muss das $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ durch F_2 -Trägerzusatz aus dem Target gewonnen werden. Die spezifischen Aktivitäten sind somit deutlich geringer als bei der Herstellung von $[^{18}\text{F}]\text{F}^-_{\text{aq}}$ (Tab. 2).

1.4.2 ^{18}F -Markierungsstrategien organischer Moleküle

Hinsichtlich der Einführung von ^{18}F -Fluor in organischen Verbindungen lassen sich je nach Art des Produktionsprozesses von ^{18}F -Fluor drei grundlegende Synthesestrategien unterscheiden:

- Elektrophile ^{18}F -Fluorierung mit ca $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$, $[^{18}\text{F}]\text{XeF}_2$, $[^{18}\text{F}]\text{AcOF}$
- Nukleophile ^{18}F -Fluorierung mit nca $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$
- ^{18}F -Fluorierung über eine prosthetische Gruppe

Bis auf wenige Ausnahmen (z.B. 6-L- $[^{18}\text{F}]\text{Fluordopa}^{11}$) ist man von der elektrophilen ^{18}F -Fluorierung abgekommen, da durch die höhere spezifische Aktivität und die einfachere Handhabung des $[^{18}\text{F}]\text{F}_{\text{aq}}^-$ die nukleophile der elektrophilen ^{18}F -Fluorierung deutlich überlegen ist.

1.4.2.1 Nukleophile ^{18}F -Fluorierung

Die nukleophile Substitution ist die zurzeit chemisch gebräuchlichste Methode zur Darstellung nca ^{18}F -markierter Radiopharmaka. Bei dieser Art der Reaktionsführung handelt es sich im Allgemeinen um eine Substitutionsreaktion von nukleofugen Gruppen wie z.B. Halogenen, verschiedenen Sulfonsäureestern sowie cyclischen Schwefelsäureestern (Abb. 5):

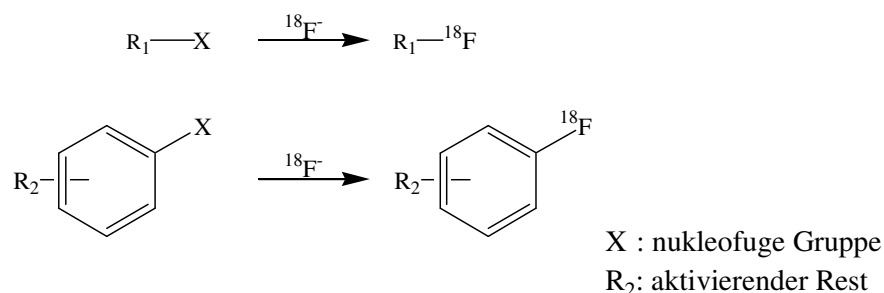


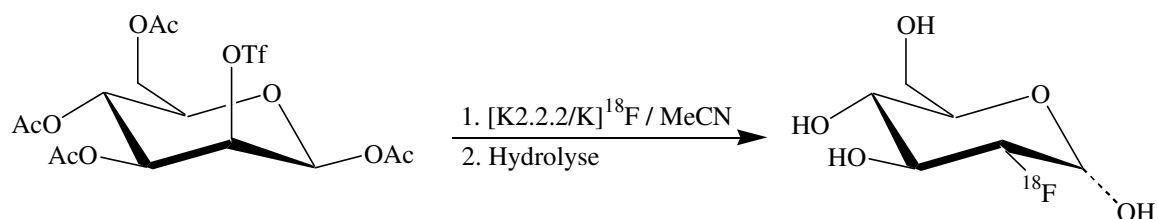
Abb. 5: Allgemeine nukleophile aliphatische und aromatische Substitution mit $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$

Nukleophile Fluorierungen können mechanistisch als $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion angesehen werden, wobei Halogene und die Sulfonsäurederivate (Mesylate und Tosylate) aber auch die Nitrogruppe als bevorzugte Abgangsgruppen dienen. Da aufgrund der hohen metabolischen Stabilität fluoridierte Aromaten eine wichtige Rolle in der Radiopharmaka-Herstellung spielen, muss die ^{18}F -Fluorierungsreaktion am Aromaten durch elektronenziehende Substituenten die Abgangsgruppe aktiviert werden.

Besonders Reaktionen vom Typ der nukleophilen S_N2 -Substitution zeigen eine starke Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Temperatur und vom Lösungsmittel. Ferner ist zu beachten, dass es wegen der großen Ladungsdichte des $[^{18}\text{F}]\text{F}^-_{\text{aq}}$, die in wässrigem Medium zur Ausbildung einer voluminösen Solvathülle führt, und bedingt durch die hohe Nukleophilie bei Anwesenheit acider Protonen zur Entstehung von HF kommen kann. Um diesen Prozess zu unterbinden und eine direkte Fluorierung zu ermöglichen, sollte daher besonders auf die Wahl des Lösungsmittels, des Basensystems und des Phasentransferkatalysators geachtet werden:

- *Lösungsmittel:* Die Verwendung dipolarer aprotischer Lösungsmittel mit hoher Dielektrizitätskonstante erweist sich als günstig¹², da diese auf Salze dissoziierend wirken, jedoch das Fluoridanion nicht protonieren. Daher sind Lösungsmittel wie Acetonitril (MeCN), N,N-Dimethylformamid (DMF) und Dimethylsulfoxid (DMSO) zu bevorzugen.
- *Basensystem:* Durch Zugabe nicht-nukleophiler, basischer Anionen (Oxalate, Carbonate) kann die Bildung von HF verhindert werden. Ferner verringert man eine Adsorption des $[^{18}\text{F}]\text{Fluors}$ an der Gefäßwand, da die Base als nicht-isotoper Träger fungiert. In der Regel wird Kaliumcarbonat als Base zugesetzt, aber auch Kaliumhydrogencarbonat und Cäsiumcarbonat kommen zur Verwendung.
- *Phasentransferkatalysator:* Neben einer Steigerung der Löslichkeit des Kaliumfluorids erfährt das Fluoridanion eine weitere Aktivierung, indem das Kaliumkation durch den Kryptanden maskiert wird. Häufige Verwendung findet Kryptofix[®] 2.2.2, welches das Kaliumkation komplexiert. Das Maskieren des Gegenions zum Fluoridanion führt zu dessen besonders ausgeprägter Reaktivität.
- *Schutzgruppen:* Bis auf die zu fluorierende Funktion müssen alle weiteren reaktiven Gruppen innerhalb des zu markierenden Moleküls, besonders solche mit aciden Protonen, durch geeignete Schutzgruppen geschützt werden, insofern sie in die Reaktion mit einbezogen werden können.

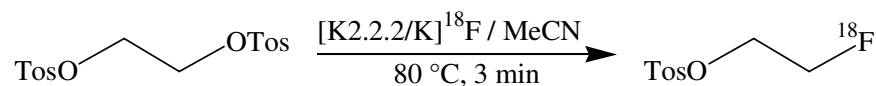
Das bekannteste Beispiel einer nukleophilen Substitution mit $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ ist die Darstellung von 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluordesoxy-D-glukose}$ (2- $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$)¹³. Dieser Radioligand ist das klinisch am häufigsten eingesetzte Radiopharmakon in der PET-Diagnostik (Abb. 6).

Abb. 6: Nukleophile ^{18}F -Fluorierung zur Herstellung von ^{18}F FDG

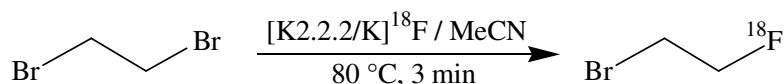
1.4.2.2 Fluorierung über prosthetische Gruppen

Ist eine Direktfluorierung nicht oder nur auf Umwegen zu erreichen, greift man auf so genannte sekundäre Markierungsvorläufer (prosthetische Gruppen) zurück. Dies sind kleine, gut fluorierbare Moleküle, welche mit ^{18}F -Fluor umgesetzt und anschließend an das zu markierende Molekül gekoppelt werden. Sie werden zur Fluoralkylierung, -acylierung, -amidierung, -amidinierung, photochemischen Konjugation oder auch einer Oximbildung in der Markierungschemie eingesetzt.

Von den bisher evaluierten Gruppen zur Fluoralkylierung haben sich insbesondere ^{18}F -markierte Alkyltosylate, -triflate und -bromide zur Fluoralkylierung durchgesetzt. Als wichtigster Vertreter dieser Markierungsreagenzien ist das 2- ^{18}F Fluorethyltosylat (^{18}F FETos) zu nennen (Abb. 7).

Abb. 7: Synthese des 2- ^{18}F Fluorethyltosylats¹⁴

Eine weitere interessante prosthetische Gruppe zur Fluoralkylierung ist das 2-Brom-1- ^{18}F fluorethan (^{18}F BFE), wobei jedoch der hohe Aufwand der destillativen Isolation der Gruppe^{15,16} nach der Synthese ein Problem darstellen kann. Ein alternativer Aufarbeitungsweg kann über eine Kombination von Festphasenkartuschen erfolgen. Dies hat den Vorteil, dass ^{18}F BFE in ähnlich einfacher Weise wie ^{18}F FETos erhalten werden kann (Abb. 8).

Abb. 8: Synthese des 2-Brom-1- ^{18}F fluorethans¹⁷

1.4.2.3 Weitere Fluorierungsmethoden

In einigen Fällen stellt trotz schlechter radiochemischer Ausbeute die direkte nukleophile aromatische Substitution die einzige sinnvolle Möglichkeit dar, ein Molekül mit [^{18}F]Fluorid zu markieren. Um die chemische Struktur des Liganden nicht zu verändern ist es daher möglich, in vorhergehenden, präparativ-organischen Syntheseschritten bereits eine die Abgangsgruppe aktivierende Gruppierung einzuführen, die direkt im Anschluss an die ^{18}F -Fluorierung wieder abgespalten werden kann. Im Folgenden sei dies an der Einführung eines Aldehyds als aktivierende Gruppe und anschließender Abspaltung unter Verwendung des Wilkinson-Katalysators ($\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$) in Abb. 9 erläutert. Der Ligand kann dadurch in hohen chemischen Ausbeuten markiert werden, ohne dass dabei die chemische Struktur verändert wird. Diese Möglichkeit der Radiofluorierung wurde von Kreis et al. (2006)¹⁸ und der deutschen Gruppe um H.-J. Machulla^{19,20} im darauffolgenden Jahr beschrieben.

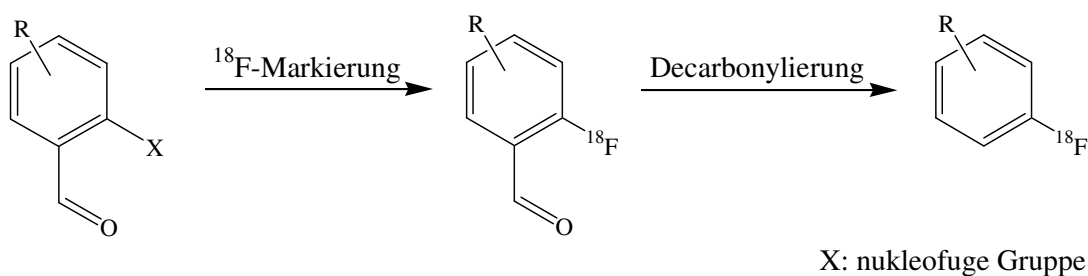


Abb. 9: Radioaktive Markierung über eine aktivierende Gruppe¹⁹

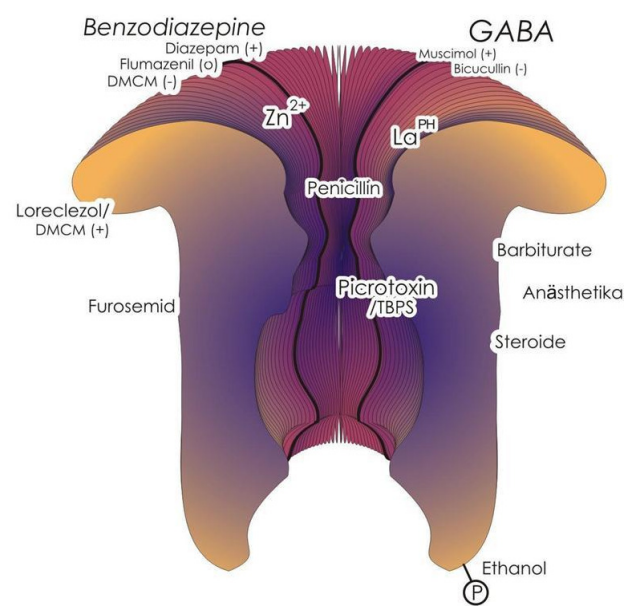
1.5 Das GABAerge System

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der primäre Neurotransmitter inhibitorischer Transmission im zentralen Nervensystem der Säugetiere und an bis zu 40% aller Synapsen im Gehirn beteiligt^{21,22}. Die spezifische Bindung des Neurotransmitters GABA findet an Transmembranproteinen in Nervenzellen der ionotropen Typen A und C Rezeptoren (GABA_A - und GABA_C -Rezeptoren) und des metabotropen Typ B Rezeptors (GABA_B -Rezeptor) statt. Ferner interagiert GABA außerordentlich komplex mit anderen Neurotransmittersystemen durch diese Rezeptoren und dient so als Targets für viele endogene und exogene Modulatoren^{23,24,25,26}.

Besonders GABA_A -Rezeptoren besitzen inhibitorische Eigenschaften gegenüber Neuronen und sind daher äußerst wichtig zur Kontrolle der Reizreaktionen des Gehirns^{24,27}.

1.5.1 Die GABA_A-Rezeptorbindungsstelle

GABA_A-Rezeptoren sind ligandgesteuerte Ionenkanäle. Durch Wechselwirkung von GABA mit dem Rezeptor öffnet sich der als Teil der Proteinstruktur ausgebildete Chloridionenkanal. Der Ionenkanal bildet sich aus fünf Proteinuntereinheiten, die jeweils aus ca. 400-450 Aminosäuren bestehen²⁸. Diese Untereinheiten lagern sich derart zusammen, dass sich in ihrer Mitte eine für Chloridionen durchlässige Pore bildet. In Abb. 10 ist der Aufbau eines solchen Rezeptors dargestellt. Die vorherrschende Lokalisation für GABA_A-Rezeptoren ist in der postsynaptischen Membran²⁹.



Hevers & Lüddens, 1997

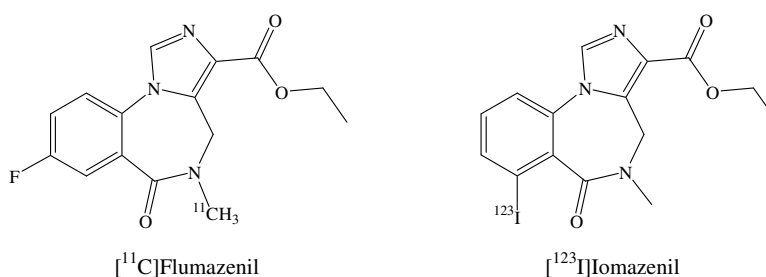
Abb. 10: Schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptors

GABA_A-Rezeptoren sind als molekulare Zielstrukturen für viele Modulatoren wie Barbiturate, Benzodiazepine, Steroide, Ethanol^{24,30,31} und zahlreicher Allgemeinanästhetika von zentraler Bedeutung²⁹.

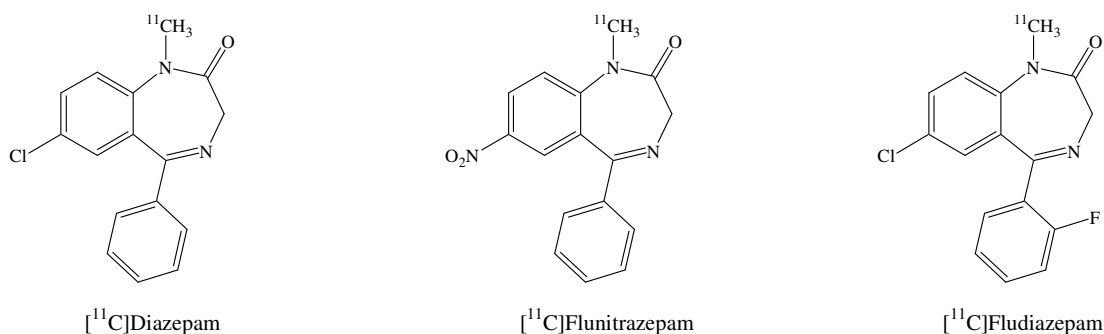
Der GABA_A-Rezeptor bildet verschiedene Bindungsstellen aus, wobei besonders drei Bindungsstellen zu erwähnen sind. Die namensgebende Bindungsstelle ist die GABA-Bindungsstelle, die selektiv mit dem Neurotransmitter GABA, aber auch mit Muscimol und dessen Derivaten wechselwirkt. Weitere Bindungsstellen befinden sich im Chlorid-Ionophor und können unter anderem durch Picrotoxinderivate besetzt werden. Die bekannteste und am Besten erforschte Bindungsstelle ist die Benzodiazepinbindungsstelle. Mit ihr wechselwirken hauptsächlich Benzodiazepine, aber auch andere Moleküle ohne typische Benzodiazepinstruktur.

1.5.1.1 Aktueller Status der Entwicklung selektiver PET-Liganden für die Benzodiazepin-bindungsstelle des GABA_A-Rezeptors

Die Mehrheit der klinischen Anwendungen im Bereich der Visualisierung der zentralen Benzodiazepinbindungsstelle des GABA_A-Rezeptors im Menschen wird mit den Antagonisten [¹¹C]Flumazenil für PET- und [¹²³I]Iomazenil für SPECT-Untersuchungen durchgeführt. Um die Thematik auf einen überschaubaren Rahmen zu begrenzen soll hier der bisherige Status der Entwicklung von selektiven Radioliganden für die PET erläutert werden.



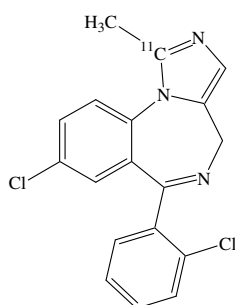
Die ersten Studien in denen radioaktiv markierte Benzodiazepine zur Visualisierung verwendet wurden, reichen zurück in die frühen achziger Jahre. Zunächst wurden die Benzodiazepine Diazepam und Flunitrazepam ¹¹C-markiert, beide jeweils mittels einer N-Methylierung^{32,33}. Jedoch war die Anwendbarkeit aufgrund ihrer fehlenden Selektivität gegenüber den zentralen Benzodiazepinbindungsstellen des GABA_A-Rezeptors stark limitiert. Ferner wurde eine verminderte Benzodiazepinrezeptoraffinität *in vivo* als auch eine schnelle Dissoziation vom Rezeptor bei Körpertemperatur (37 °C) festgestellt. Das daraufhin ebenfalls am Amidstickstoff ¹¹C-markierte 2'-Fluorderivat Fludiazepam³⁴ zeigte eine identische Bindung *in vivo*.



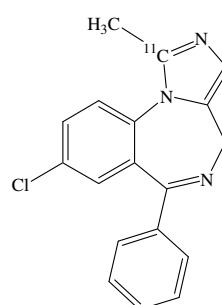
Die N-¹¹C-Methylierung des Amidstickstoffs der zuvor genannten Moleküle Diazepam, Flunitrazepam und Fludiazepam basierte jedoch auf der Einführung des Radiolabels an einer metabolisch instabilen Position und führte dadurch zu Liganden mit einer kurzen biologischen Halbwertszeit. Mit diesen neuen Erkenntnissen wurden darauf die Benzodiazepinagonisten Alprazolam und Triazolam an der C₁-Position des Triazolrings ¹¹C-markiert. Dadurch gelangte man zu metabolisch stabileren Molekülen. Die erhaltenen *in vivo*-Pharmakokinetiken von

[^{11}C]Triazolam in Primaten³⁵ zeigten eine schnelle Aufnahme des Radioliganden in die benzodiazepinrezeptorexprimierenden Hirnregionen, mit einem Maximum der Anreicherung bei 25 Minuten nach der Injektion und eine anschließende langsame Dissoziation des Radioliganden vom Rezeptor. Die Aufnahme des Radioliganden konnte durch Gabe des Benzodiazepinrezeptorantagonisten Flumazenil blockiert werden. Ebenfalls konnte eine schnelle Abnahme der Aktivität im Gehirn nach Gabe verschiedener Benzodiazepine wie Flumazenil, Triazolam oder Zolpidem gezeigt werden.

Der Ligand [^{11}C]Alprazolam wurde direkt im Menschen getestet³⁶. Die Aufnahme des Radioliganden im Gehirn zeigte ein charakteristisches Aufnahmeverhalten für eine rezeptorvermittelte Bindung in Hirnregionen mit hoher Benzodiazepinrezeptordichte. Auch hier konnte der Radioligand durch nichtmarkierte Benzodiazepine verdrängt werden. Der Ligand zeigte jedoch eine ungewöhnliche Pharmakokinetik welche auf eine starke Wechselwirkung des Radioliganden mit einer peripheren Bindungsstelle zurückgeführt wurde. Dadurch steht der Radioligand einer Aufnahme im Gehirn nur sehr verzögert zur Verfügung. Weitere Experimente mit diesen beiden Liganden wurden nicht publiziert.



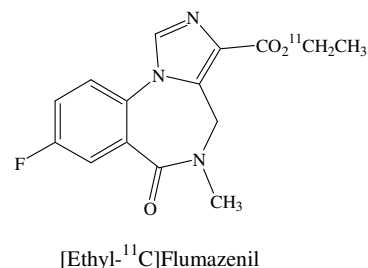
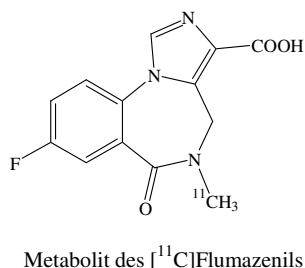
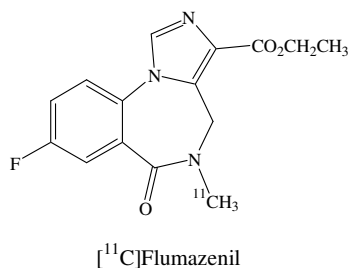
[^{11}C]Triazolam



[^{11}C]Alprazolam

Die bei den Radioliganden [^{11}C]Diazepam und [^{11}C]Flunitrazepam auftretenden pharmakologischen Probleme führten zur Radiomarkierung des Antagonisten Flumazenil (Ro 15-1788). Dieser Ligand war einer neuen Gruppe von Benzodiazepinen zugeordnet, denen der 5-Phenylsubstituent fehlte und ein Imidazolringsystem enthielt. Die Darstellung des [^{11}C]Flumazenil erfolgte durch die zuvor schon etablierte N-[^{11}C]Methylierung eines demethylierten Markierungsvorläufers³⁷. PET-Studien an Primaten zeigten hohe Aufnahmen des Radioliganden in Hirnregionen mit hoher Benzodiazepinrezeptordichte wie das Cerebellum und die kortikalen Regionen. Nach 10 Minuten befand sich der Ligand im Gleichgewicht und nach weiteren 10 Minuten konnte eine langsame Verdrängung des Radioliganden beobachtet werden. Aufgenommenes [^{11}C]Flumazenil konnte durch Gabe von kaltem Flumazenil verdrängt werden und wies auf eine spezifische Bindung $> 80\%$ *in vivo* hin. Kurze Zeit später wurde die Synthese des [^{11}C]Flumazenil automatisiert und als Routinesynthese für klinische Anwendungen zur Verfügung gestellt. Da [^{11}C]Flumazenil *in vivo* sehr schnell metabolisiert wird, forderte jede Form von Analysen der erhaltenen PET-Daten und der Kinetiken eine genaue Kenntnis über die Metabolisierung des [^{11}C]Flumazenils.

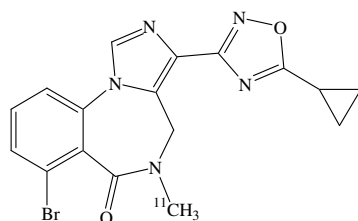
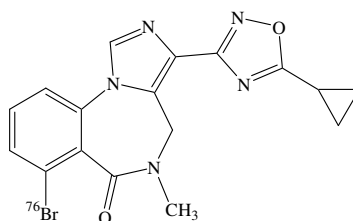
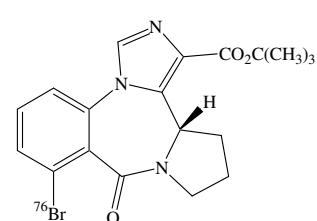
Als Folge davon wurde Flumazenil auch in der 2-Ethylesterkette radiomarkiert. Ausgehend von der freien Säure Ro 15-3890 führte eine Markierung mit [^{11}C]Ethyliodid zu [Ethyl- ^{11}C]Flumazenil³⁸. Der Hauptmetabolit, das Carboxysäurederivat des [^{11}C]Flumazenils wurde durch eine einfache Esterspaltung des [^{11}C]Flumazenil erhalten.



Die hervorragenden pharmakologischen Eigenschaften und die annehmbare Pharmakokinetik machten [^{11}C]Flumazenil zum am Besten studierten ^{11}C -markierten Benzodiazepinrezeptorliganden. Seit seiner Entwicklung vor rund 20 Jahren wurde dieser Ligand intensiv zur Studie des Benzodiazepinrezeptors verwendet und stellt den sogenannten Gold-Standard für PET-Studien am Benzodiazepinrezeptorsystem dar. Auch heute noch wird dieser Ligand routinemäßig zur Untersuchung der Rolle der Benzodiazepinbindungsstelle des GABA_A-Rezeptors in einer Vielzahl klinischer Fragestellungen (z.B. Epilepsie) genutzt.

Der schnelle Metabolismus des [^{11}C]Flumazenil führte zur Entwicklung weiterer Benzodiazepinrezeptorliganden für *in vivo*-Studien, die vor allem eine bessere Metabolisierungsrate aufweisen sollten. Einer dieser Ansätze war die Derivatisierung der Esterfunktion um dadurch eine höhere metabolische Stabilität zu erreichen. NNC 13-8199 ist ein Imidazobenzodiazepinderivat, welches eine 5-Cyclopropyl-1,2,4-oxadiazolgruppe anstelle eines Esters trägt³⁹. Dieser Ligand zeigt Eigenschaften eines partiellen Agonisten mit hoher Affinität und Selektivität zu den zentralen Benzodiazepinrezeptoren. Hinzu kommt eine höhere Stabilität der eingeführten 5-Cyclopropyl-1,2,4-oxadiazolgruppe gegenüber Metabolisierungsprozessen im Vergleich zum Ethylester des Flumazenil aufweist. Das Vorhandensein des Bromatoms im Molekül erlaubte ferner neben der konventionellen ^{11}C -Methylierung auch eine Markierung mit dem langlebigeren PET-Isotop ^{76}Br -Brom ($t_{1/2} = 16$ h). Primatenstudien wiesen auf eine hohe Aufnahme dieses Radioliganden ins Gehirn mit maximalen Aufnahmen nach 50 Minuten nach Injektion mit einer totalen Aufnahme von 8 % der injizierten Dosis hin. Es konnte gezeigt werden, dass der Ligand an zentrale Benzodiazepinrezeptoren bindet und durch Zugabe von kaltem Flumazenil verdrängt werden kann. Eine HPLC-Analyse der Plasmaaktivität bestätigte die erhoffte langsamere Metabolisierung wobei kein radioaktiver Metabolit gefunden werden konnte. Allerdings ist die Anwendung als ^{11}C -markierter Ligand aufgrund der langsamen Aufnahmekinetik nicht praktikabel, so dass diese Substanz mit dem schon erwähnten ^{76}Br -Brom markiert wurde. PET-Studien am Primaten zeigten eine kontinuierliche Aufnahme ins Gehirn ohne Einstellung eines Gleichgewichts bis ei-

ne Verdrängung mit kaltem Flumazenil nach 215 Minuten nach Injektion durchgeführt wurde. Die Analyse der Metaboliten zeigte, dass nach 40 Minuten immer noch 98 % des Radioliganden intakt im Plasma vorliegen. Allerdings sind die langsame Dissoziation von der Bindungsstelle und die kontinuierliche Aufnahme des Radioliganden problematisch für quantitative Analysen.

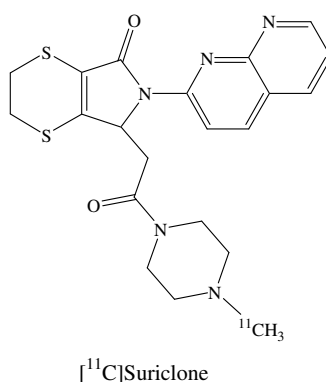
[¹¹C]NNC 13-8199[⁷⁶Br]NNC 13-8199(S)-[⁷⁶Br]Bretazenil

Schnell wurde erkannt, dass die Struktur Bretazenil (Ro 16-6028), ein hochaffiner Benzodiazepinrezeptoragonist, ebenfalls eine verbesserte metabolische Stabilität gewährleistet und auch hier eine Radiomarkierung mit ⁷⁶Br-Brom möglich ist. Zu beachten war jedoch die Chiralität des Bretazenils, da lediglich das (S)-Enantiomer *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität zeigt. *In vivo*-Studien in Nagetieren zeigten ein Verteilungsmuster entsprechend der Benzodiazepinrezeptorverteilung im Gehirn, ferner konnte sowohl mit Flumazenil als auch mit anderen Benzodiazepinen geblockt werden. Metabolitenstudien zeigten 60 % intakten Radioligand nach 30 Minuten und nach 150 Minuten konnten immer noch 40 % intakter Ligand nachgewiesen werden⁴⁰. Einer hohen Aufnahmerate von 30-60 min folgte eine Abnahme des Radioliganden nach 2-3 Stunden. Auch die im Anschluss durchgeführten Primatenstudien führten zum Ergebnis, dass [⁷⁶Br]Bretazenil ein identisches Verteilungsmuster wie andere spezifische Benzodiazepinrezeptorliganden aufweist und ebenfalls mit Flumazenil verdrängt werden kann.

Nicht nur die Benzodiazepine selbst wechselwirken mit dem Benzodiazepinrezeptor, auch andere Liganden mit ganz verschiedenen chemischen Strukturen sind in der Lage, mit der Benzodiazepinbindungsstelle des GABA_A-Rezeptors zu wechselwirken. Obwohl eine Vielzahl von Substanzen die eine nicht-benzodiazepinartige Struktur aufweisen auch eine gewisse Affinität für den Benzodiazepinrezeptor zeigen, wurden nur wenige radioaktiv markiert und *in vivo* evaluiert.

Von all diesen Liganden die mit [¹¹C]Kohlenstoff markiert wurden, ist [¹¹C]Suriclone die auffälligste Substanz ohne 1,4-Benzodiazepin-Gerüst. Suriclone ist ein Cyclopyrrolon mit gleichen pharmakologischen Eigenschaften wie klassische Benzodiazepinagonisten und zeigt eine hohe Aktivität im Tier und im Menschen. Obwohl es sich bei Raumtemperatur und tieferen Temperaturen analog zu Flunitrazepam verhält, zeigt es im Gegensatz dazu bei 37 °C mit einer zehnfach höheren Affinität einen deutlichen Unterschied zu den klassischen 1,4-Benzodiazepinen. PET-Studien mit [¹¹C]Suriclone^{41,42} zeigten eine hohe und persistente Aufnahme in Hirnregionen mit bekannter Verteilung an Benzodiazepinrezeptoren, wobei die höchste Aufnahme im Cerebellum

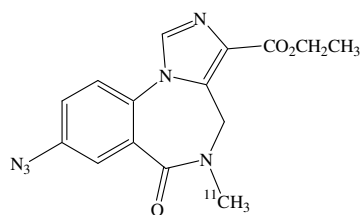
und in den kortikalen Regionen gefunden wurde. Eine vorherige Gabe von Flumazenil verringerte die Aufnahme des Radioliganden um das vierfache. Das Verteilungsmuster von [^{11}C]Suriclone ist im Menschen identisch mit dem von [^{11}C]Flumazenil. Auch hier zeigten sich die höchsten Aufnahmen im Cerebellum und im cerebralen Cortex, die niedrigsten Aufnahmen konnten im Striatum nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum [^{11}C]Flumazenil zeigte das [^{11}C]Suriclone eine nur langsam stattfindende Dissoziation vom Benzodiazepinrezeptor. Obschon [^{11}C]Suriclone exzellente Eigenschaften zur Visualisierung des GABA_A-Benzodiazepinrezeptors besitzt, wurden keine weiteren Studien damit durchgeführt.



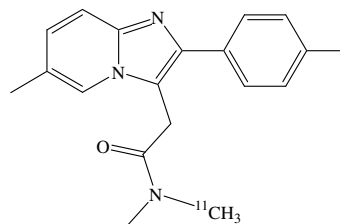
Ebenfalls in das Interesse der Wissenschaft rückte der partielle inverse Agonist Ro 15-4513 und seine Analoga, insbesondere auch durch seine teilweise Selektivität auf die α_6 -Untereinheit („Diazepam-insensitive“ Rezeptoren). Diese inversen Agonisten besitzen einzigartige Eigenschaften einschließlich einer Steigerung der kognitiven Funktionen, Anxiogenese und die Fähigkeit, die Effekte von Alkohol aufzuheben. Ro 15-4513 ist ein Azidderivat des Flumazenils und wurde mit [^{11}C]Methyliodid markiert. Obwohl sowohl Flumazenil als auch Clonazepam in autoradiographischen Experimenten eine Aktivitätsaufnahme in den cerebralen Regionen blocken konnten, wurde keine signifikante Verminderung der Aktivitätsaufnahme im Cerebellum nachgewiesen. Dies wurde auf die Diazepaminsensitivität dieser Region zurückgeführt. Es wurden weitere PET-Studien in Primaten angeschlossen in denen hohe Aufnahmen des Radioliganden im Gehirn nachgewiesen und mit hohen Dosen des kalten Liganden oder Clonazepam verdrängt werden konnte^{43,44}. Nach diesen Ergebnissen wurden keine weiteren Studien mit diesem Liganden durchgeführt. Allerdings führte die Verfügbarkeit diverser Benzodiazepinderivate des Ro 15-4513 zur Entwicklung einiger neuer SPECT-Liganden in Form von Halogenderivaten des ursprünglichen Liganden^{45,46}.

Fast zehn Jahre später wurde erstmals Zolpidem mit ^{11}C -Kohlenstoff an der Acetamidseitenkette radioaktiv markiert. Zolpidem zeigt eine hohe Affinität zu Benzodiazepinrezeptoren mit der α_1 -Untereinheit und wurde in einer Vielzahl pharmakologischer Studien zur Aufklärung der Funktion des Benzodiazepinrezeptors in Verdrängungs- und Blocking-Experimenten verwendet. Die Evaluierung des [^{11}C]Zolpidems zeigte jedoch trotz der klinischen Anwendung von Zolpidem als

Schlafmittel eine zu niedrige Aufnahme des Radioliganden in das Gehirn von Primaten⁴⁷ um damit praktikable PET-Experimente betreiben zu können.

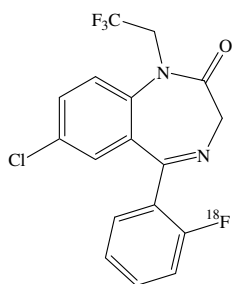


[¹¹C]Ro 15-4513



[¹¹C]Zolpidem

Bis zu dieser Zeit wurden benzodiazepinrezeptorselektive Liganden fast ausschließlich mit ¹¹C-markiert. Trotz der bekannten Vorteile des Radioisotops ¹⁸F-Fluor zur Visualisierung mittels PET wurde mit diesem Radioisotop nur wenig auf dem Gebiet der Benzodiazepinrezeptorforschung unternommen. Einer der Gründe ist die nicht immer einfache Einführung des ¹⁸F-Fluors mittels nukleophilen Substitution in ausreichend hohen spezifischen Aktivitäten in 1,4-Benzodiazepinsysteme. Als erster literaturbekannter, ¹⁸F-markierter Benzodiazepinrezeptorligand ist der selektive Agonist Oxoquazepam zu nennen. Dieser wurde in der 2'-Position des 5-Phenylringes über eine elektrophile Substitution ¹⁸F-fluoriert. Die erhaltene niedrige spezifische Aktivität des 2-[¹⁸F]Oxoquazepam ist jedoch für eine PET-Studie am Benzodiazepinrezeptor nicht geeignet^{48,49,50}.



2-[¹⁸F]Oxoquazepam

Auch das bisher als Goldstandard geltende [¹¹C]Flumazenil sollte nun aufgrund seiner guten pharmakologischen Eigenschaften mit den hervorragenden Isotopeneigenschaften des ¹⁸F-Fluors in Form eines ¹⁸F-Derivat des Flumazenils verbunden werden.

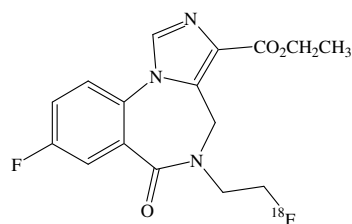
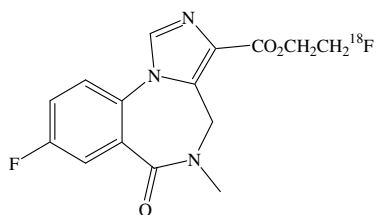
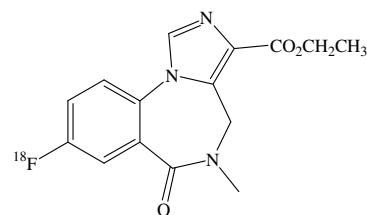
Da die Einführung von ¹⁸F-Fluor in der natürlichen Position der Flumazenilstruktur zunächst nicht möglich schien, wurde eine ¹⁸F-Markierung über eine Fluoralkylierung angestrebt. Diese ist zum Einen an der N-Methylposition durchführbar zum Anderen auch durch Ersetzen des Esters der Flumazenilstruktur durch eine [¹⁸F]Fluoralkylester. Die N-Alkylierung mit einem [¹⁸F]Fluorethylsynthon führte zu einem Liganden mit guten Affinitäten und Selektivitäten als auch eine ausreichend hohe spezifische Aktivität zur Untersuchung am Menschen⁵¹. Sowohl das

N-(3-[^{18}F]fluorpropyl)-Derivat als auch der 3-[^{18}F]Fluorpropylester von Ro 15-3890 zeigten keine geeigneten Eigenschaften zur weiteren Untersuchung in Rezeptorbindungsstudien. *In vitro*-Studien des im weiteren Verlauf dargestellten N-[^{18}F]Fluorethylflumazenil⁵² wiesen auf eine hohe Affinität im unteren nanomolaren Bereich hin und zeigten eine etwas schlechtere GABA_A-Benzodiazepinrezeptorselektivität als das ursprüngliche Flumazenil. PET-Studien im Menschen zeigten eine identische Verteilung des Radioliganden in Gebieten mit bekannter Benzodiazepinrezeptordichte und eine deutlich verringerte Aufnahme in allen Regionen nach Gabe von kaltem Flumazenil. Nach bereits 4 Minuten konnte eine maximale Aktivitätsaufnahme verzeichnet werden, gefolgt von einer schnellen Abnahme der Aktivität auf 50 % des Maximums bereits nach 10 Minuten. Nach 20 Minuten konnten nur noch 20 % der maximalen Aufnahme registriert werden. Metabolitenstudien zeigten, dass nach 5 Minuten bereits über 50 % des N-[^{18}F]Fluorethylflumazenils metabolisiert wurden, nach 20 Minuten waren nur noch 10-20 % intakter Radioligand im Plasma nachweisbar. In PET-Studien konnte eine prinzipielle Eignung des Radioliganden nachgewiesen werden, allerdings können die guten Isotopeneigenschaften des ^{18}F -Fluors aufgrund der kurzen biologischen Halbwertszeit nicht genutzt werden. Daher stellt dieser Ligand keine wirklichen Alternative zum Goldstandard [^{11}C] Flumazenil dar.

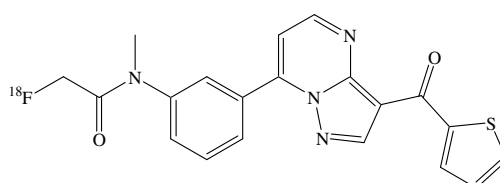
Eine [^{18}F]Fluorethylierung an der Position des 2-Ethylester des Flumazenils führte zum 2-[^{18}F]Fluorethylflumazenil. Dieses Molekül zeigt eine größere strukturelle Ähnlichkeit zum Flumazenil als das N-[^{18}F]Fluorethylflumazenil und hat eine höhere Affinität zum Benzodiazepinrezeptor als das N-fluorethylierte Derivat. In den im Anschluss durchgeführten biologischen Studien wurden identische metabolische Eigenschaften zum N-[^{18}F]Fluorethylflumazenil nachgewiesen. Auch hier kann aufgrund der kurzen biologischen Halbwertszeit kein Vorteil aus der längeren Halbwertszeit des [^{18}F]Fluors gewonnen werden. Einziger Vorteil ist ein besseres Untergrund-Verhältnis, da bei einer Metabolisierung das radioaktive Label als hydrophiles 2-[^{18}F]Fluorethanol aus dem Hirn ausgeschleust wird⁵³.

Es gelang erstmals 2004, Flumazenil in seiner natürlichen Position mit [^{18}F]Fluorid über einen $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch darzustellen. Das so erhaltene [^{18}F]Flumazenil stellte allerdings aufgrund der schlechten spezifischen Aktivität keinen Radioliganden zur biologischen Evaluierung *in vivo* dar⁵⁴.

Im darauffolgenden Jahr konnte in der gleichen Gruppe [^{18}F]Flumazenil über eine nukleophile Substitution in ausreichend hohen spezifischen Aktivitäten dargestellt werden. In den zunächst durchgeführten Primatenstudien zeigte es alle pharmakologischen Eigenschaften des [^{11}C]Flumazenils. Später durchgeführte Studien am Menschen konnten diese Ergebnisse bestätigen^{55,56}.

N-[^{18}F]Fluoroethylflumazenil2-[^{18}F]Fluoroethylflumazenil[^{18}F]Flumazenil

Auch andere, von der Benzodiazepinstruktur abweichende Moleküle wurden weiterhin im Hinblick auf ihre mögliche Visualisierung der Benzodiazepin-Bindungsstelle des GABA_A -Rezeptors ^{18}F -markiert. So wurde zum Beispiel [^{18}F]Fluorindiplon aufgrund seiner guten Affinität zum Benzodiazepinbindungsstelle des GABA_A -Rezeptors synthetisiert. *In vitro*-Studien konnten zunächst vielversprechende Ergebnisse erzielt werden, die im Anschluss durchgeführten *ex vivo*- und *in vivo*-Studien in Mäusen zeigten jedoch keine spezifische Bindung und eine hohe Metabolisierungsrate mit einem radioaktiven und gleichzeitig benzodiazepinrezeptoraffinen Metaboliten⁵⁷.

[^{18}F]Fluorindiplon

Das Bestreben, neue radioaktiv markierte Liganden für das GABA_A -Benzodiazepinrezeptorsystem zu entwickeln, ging in den letzten Jahren zurück. Anstelle dessen werden nun vermehrt Liganden entwickelt und evaluiert, die hohe Selektivitäten zu bestimmten Untereinheiten des Rezeptorsystems aufweisen. Man erhofft sich dadurch einen besseren Einblick in die verschiedenen Funktionen der einzelnen Untereinheiten im Hinblick auf eine mögliche Verbindung definierter Untereinheiten mit bestimmten Erkrankungen und die Entwicklung neuer, nebenwirkungsfreier Medikamente.

Um die Visualisierung des GABA_A -Rezeptorsystems voran zu treiben werden des Weiteren immer häufiger Radioliganden entwickelt, die gute Affinitäten auf andere Bindungsstellen des GABA_A -Rezeptors zeigen. Dabei stehen vor allem Muscimol-Derivate mit guten Affinitäten zur GABA-Bindungsstelle^{58,59,60} und Picrotoxin-Derivate mit Affinitäten zum Chlorid-Ionotroph^{61,62,63,64,65} des GABA_A -Rezeptors im Vordergrund.

1.5.1.2 Verschiedene Subtypen der GABA_A-Bindungsstelle

GABAerge Transmission operiert über eine Vielzahl strukturell deutlich voneinander verschiedener GABA_A-Rezeptoren. Diese Rezeptorheterogenität entsteht durch ein Repertoire von 20 zurzeit bestätigten Untereinheiten, die durch ihren Grad an Sequenzhomologie in verschiedene Gruppierungen gegliedert werden können: α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-3} , ρ_{1-3} , δ , ϵ , π und θ .

Der kombinatorische Aufbau der Untereinheiten in $(\alpha)_2(\beta)_2\gamma$, eine pentamere Struktur, führt zu unterschiedlichen Rezeptoruntereinheiten, die sich je nach enthaltener Untereinheit in ihrer Funktion unterscheiden. Dabei liegt eine Verteilungswahrscheinlichkeit von über 80% des Subtyps α_1 , α_2 , α_3 , und α_5 in Kombination mit zwei β - und einer γ_2 -Untereinheit, wobei die funktionellen Effekte von GABA durch eine zwischen der α - und γ -Untereinheit ausgebildete Benzodiazepin-Bindungsstelle allosterisch moduliert werden^{29,66}.

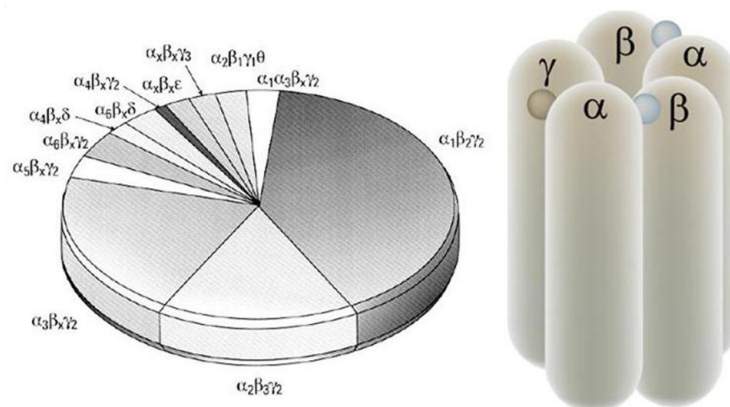


Abb. 11: Diversität des GABA_A-Rezeptors⁶⁷

Nachfolgende Tab. 3 zeigt eine Übersicht über die Funktionen der verschiedenen Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors:

Untereinheit	Primäre Funktion
α_1	Sedative, amnestische und anticonvulsive Effekte der BZ
α_2	Angstlösende, muskelrelaxierende und antikonvulsive Effekte der BZ
α_3	muskelrelaxierende und „anti-absence“, evtl. auch angstlösende Effekte der BZ
α_5	Wahrnehmung, Lern- und Gedächtnisvorgänge
β_2	Beruhigung
β_3	Anästhetischer Effekt der Etomidate
γ_2	Ängste

Tab. 3: GABA_A-Untereinheiten und ihre vermuteten primären Funktionen⁶⁸

Diese Tabelle fasst den aktuellen Progress der Identifizierung und Abschätzung der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten im Hinblick auf neue und weiterentwickelte therapeutische Targets zusammen. Dabei wurde das Verhalten von Wildtyp- und genetisch manipulierten Mäusen unter dem Einfluss verschiedener relevanter Modulatoren getestet und bewertet.

1.5.1.3 Die GABA_A/α₅-Bindungsstelle und ihre Bedeutung für die PET

Bei Betrachtung der Verteilungshäufigkeit der GABA_A/α₅-Bindungsstelle zeichnet sich ab, dass trotz der geringen Verteilung von maximal 5 % im gesamten Gehirn in bestimmten Hirnregionen auch höhere GABA_A/α₅-Bindungsstellendichten nachgewiesen werden können. Die α₅-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors ist hauptsächlich im Hippocampus, aber auch im Cortex und im olfaktorischen System des Säugetiergehirns exprimiert und macht dort einen Anteil von bis zu 20 % der GABA_A-Bindungsstellen aus^{69,70}: Die relativ hohe Häufigkeit im Hippocampus lässt die Vermutung zu, dass die α₅-Untereinheit einbezogen ist in die Kontrolle von Lern- und Gedächtnisvorgängen^{71,72,73,74,75}.

Collinson et al.⁷⁶ beschrieb α₅-knockout Mäuse, die eine gesteigerte Leistungsfähigkeit des Gedächtnisses und des Lernprozesses in hippocampusabhängigen Aufgabenstellungen zeigten. Auch andere Gruppen konnten in der Vergangenheit aufgrund ihrer Ergebnisse belegen, dass eine Verbindung zwischen der GABA_A/α₅-Untereinheit und Lern- und Gedächtnisprozessen nicht von der Hand zu weisen ist^{77,78}.

Diese Erkenntnisse machen die GABA_A/α₅-Untereinheit besonders interessant im Bezug auf neue, diagnostisch und therapeutisch verwendbare Erkenntnisse über neurodegenerative Prozesse, in denen besonders die Gedächtnisfunktion und das Lernvermögen verändert vorzufinden sind (z.B. Alzheimer⁷⁹, ischämie-bedingte Folgen eines Hirnschlags, posttraumatische Belastungsstörungen und traumatischen Neurosen). Aber auch in anderen Bereichen wie Epilepsie^{80,81,82}, dem Einfluss von Alkohol (Ethanol)^{83,84,85}, bipolaren Störungen^{86,87,88} und Autismus⁸⁹ scheint die GABA_A/α₅-Untereinheit maßgeblich beteiligt zu sein.

So könnten durch den Nachweis einer Veränderung des GABA_A/α₅-Rezeptorstatus *in vivo* mittels PET bei relevanten Krankheitsbildern die Diagnose und die damit verbundene Einleitung einer geeigneten Therapie sehr viel früher erfolgen.

1.5.1.4 Aktueller Forschungsstand

Eine Vielzahl verschiedener Forschergruppen beschäftigt sich seit langem mit der Suche nach GABA_A-subtypselektiven Ligandstrukturen zur Entwicklung nebenwirkungsfreier Medikamente.

Aber auch auf dem Sektor der Molekularen Bildgebung ist der Einsatz dieser selektiven Liganden unumgänglich. Der seit langem verwendeten „Goldstandard“ [^{11}C]Flumazenil wird hauptsächlich zur exakten Lokalisation des epileptischen Fokus bei fokaler Epilepsie^{90,91} verwendet. Zwar zeigt Flumazenil eine selektive Bindung an den GABA_A-Benzodiazepinrezeptor allerdings ist die Untereinheitenselektivität auf α_1 , α_2 , α_3 , α_5 und β_{1-3} in Verbindung mit γ_2 für diverse spezifische Fragestellungen nicht ausreichend. Besonders der Einfluss der einzelnen GABA_A-Untereinheiten auf neurodegenerative Krankheitsbilder rückt immer mehr in das Blickfeld der Wissenschaft und die PET ist hier das Mittel der Wahl zur Visualisierung des GABA_A-Benzodiazepinrezeptorstatus der verschiedenen Untereinheiten. Eine amerikanisch-australische Forschergemeinschaft konnte 2003 erstmals einen solchen, für die PET geeigneten Liganden radioaktiv markieren⁹². Das [^{11}C]Zolpidem zeigt eine hohe Präferenz zur α_1 -Untereinheit und zugleich eine zehnfach niedrigere Affinität zu den Untereinheiten α_2 und α_3 . Im PET konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es zu einer nur sehr geringen Aufnahme im Gehirn kam und aufgrund der homogenen Verteilung des Radioliganden im Gehirn keine typische Verteilung der zentralen Benzodiazepinrezeptoren gefunden werden konnte. Es wurde bisher kein weiterer Radioligand für die PET identifiziert, der ausschließlich an eine einzige Untereinheit bindet.

2 Problemstellung

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) nimmt einen immer größeren Raum in der medizinischen Diagnostik ein. Besonders in der Hirnforschung eröffnet die PET die Möglichkeit, durch gezieltes Moleküldesign von Radiopharmaka *in vivo*-Untersuchungen normaler als auch veränderter Gehirnaktivitäten am Menschen durchzuführen. Dies hilft bei der Aufklärung biochemischer Prozesse und Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen und darauf aufbauend bei Diagnostik und Behandlung verschiedener Krankheitsbilder.

Da der GABA_A-Rezeptor sich als Ziel vieler neuroaktiver Medikamente (u.a. Benzodiazepine, Barbiturate und Steroide) darstellt, ist hier ein hervorragender Angriffspunkt zur Entwicklung neuer diagnostischer Verfahren. Dadurch besteht die Möglichkeit auf verbesserte therapeutische Profile neurodegenerativer Krankheiten wie Epilepsie, Alzheimer, Morbus Parkinson, Schizophrenie, Alkoholismus, Depressionen und Manien, Autismus und vieler anderer.

Die Beteiligung der Benzodiazepin-Bindungsstelle an vielen neurodegenerativen Erkrankungen gilt dabei allgemein als gesichert. Neben Diazepam (Valium) als Beruhigungsmittel zur Behandlung diverser Formen von Angststörungen sind etliche Medikamente wie Triazolam (Schlafmittel) und Oxazepam (Unruhe, Angst, Schlafmittel) im Handel erhältlich.

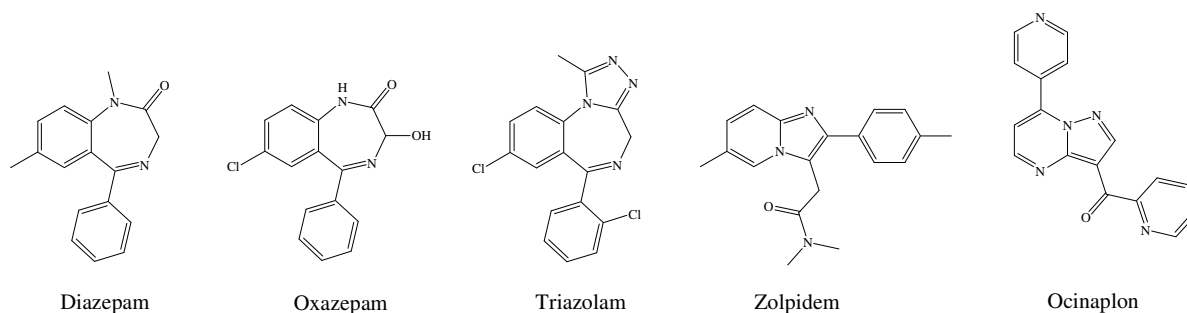


Abb. 12: Strukturen mit Affinität an Benzodiazepin-Bindungsstellen

Substanzen mit hohen Affinitäten zu bestimmten GABA_A-Rezeptoruntereinheiten sind von großer Bedeutung, da hier unerwünschte Nebeneffekte (Nebenwirkungen) nahezu ausgeschlossen werden können. Zolpidem und Ocinaflon sind bereits zugelassene Arzneimittel mit sedativer und anxiolytischer Wirkung, die selektiv auf eine bestimmte α -Untereinheit wirken. So hat Zolpidem eine bevorzugte Affinität an α_1 zu binden, Ocinaflon ist partieller Agonist für die Untereinheiten α_2 , α_3 und α_5 und wirkt als Agonist an α_1 ⁹³. Demzufolge sind weitere systematische Studien zu Struktur-Wirkungs-Korrelationen zwingend erforderlich. Dabei spielen die nicht-invasive Untersuchung der Pharmakologie und die Pharmakokinetik der neuen Liganden eine entscheidende Rolle. Jedoch sind für diagnostische Zwecke mittels PET nur Liganden ge-

eignet, die sowohl eine sehr hohe Affinität als auch eine hohe Selektivität zu der entsprechenden Rezeptoruntereinheit aufweisen.

Die α_5 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors im Hippocampus macht einen Anteil von 20 % gegenüber allen anderen GABA_A-Subtypen aus. Diese relativ hohe Häufigkeit im Hippocampus lässt die Vermutung zu, dass die α_5 -Untereinheit einbezogen ist in die Kontrolle von Lern- und Gedächtnisvorgängen^{76,77}. Dies macht sie als Zielstruktur bei der Suche nach neuen, diagnostisch und therapeutisch verwendbare Erkenntnisse über neurodegenerativer Prozesse, in denen besonders die Gedächtnisfunktion und das Lernvermögen beeinträchtigt werden (Alzheimer, traumatische Neurosen etc.) besonders interessant. Ferner könnte man tiefe Einblicke in die Funktionsweise der Lern- und Gedächtnisleistungen des Menschen gewinnen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen neuartige Liganden auf Basis von 6-(6-Fluor-pyridin-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazins als Leitstruktur, angelehnt an Synthesevorschriften von Street et al.⁹⁴ und Pesti et al.⁹⁵ dargestellt werden. Die Gruppe um Street zeigte dabei, dass die entsprechenden nicht-fluorierten Substanzen hohe Affinitäten sowie Selektivitäten zur GABA_A/ α_5 -Bindungsstelle besitzen.

Analog zu der Substanzklasse der Benzodiazepine trägt in diesen neuartigen Strukturen das Triazolophthalazin-Gerüst offensichtlich zur hohen Affinität an die Benzodiazepinbindungsstelle bei. Besonders wichtig erscheint hier auch die Erhaltung des Bicyclosystems, welches im Vergleich zu anderen, ähnlichen Strukturen zu einer deutlichen Verbesserung der Selektivität zur GABA_A/ α_5 -Bindungsstelle führt. Der radioaktive Marker ¹⁸F-Fluor soll anstelle der im Molekül vorhandenen Methylgruppe eingebracht werden. Dies sollte die gesamte Struktur und deren biologische Eigenschaften nicht weiter beeinflussen^{96,97}.

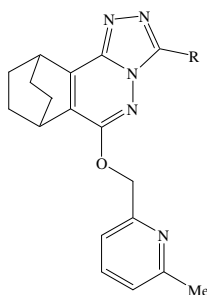


Abb. 13: Struktur des 6-(6-Methyl-pyridin-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazins nach Street et al.⁹⁴

Es sollen fluorierte, nichtradioaktive Referenzverbindungen synthetisiert werden, die sich in einer Substitution des an Position 3 des 7,8,9,10-Tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin-Grundgerüst sitzenden Restes unterscheiden.

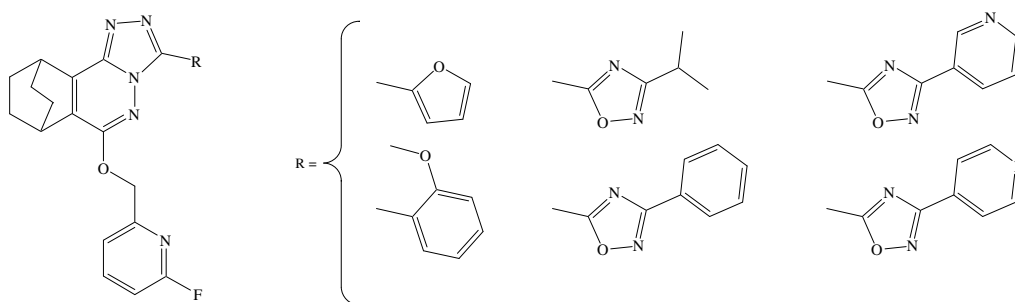


Abb. 14: 6-(6-Fluor-pyridin-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo-[3,4- α]-phthalazin-Derivate

Mit Hilfe dieser Referenzverbindungen soll unter Anderem eine geeignete Radioanalytik für die Radio-DC und Radio-HPLC etabliert werden, um bei den späteren radioaktiven ^{18}F -Markierungsreaktionen eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung zu gewährleisten.

Im Anschluss an eine erfolgreiche Synthese der Referenzverbindungen und der entsprechenden Markierungsvorläufer soll deren radioaktive Markierung stattfinden. Dabei sollen Markierungsvorläufer mit unterschiedlichen nukleofugen Gruppen eingesetzt werden. Es sollen die Parameter Reaktionszeit, Temperatur, Lösungsmittel, Markierungsvorläuferkonzentration, Basensystem und Basen-Markierungsvorläufer-Verhältnis so variiert werden, dass eine möglichst hohe radiochemisch Ausbeute erreicht werden kann. Ferner soll der Einfluss verschiedener Markierungsmethoden (Heizbad und Mikrowelle PT-Modus und STD-Modus) auf die radiochemische Ausbeute unter Verwendung verschiedener Markierungsvorläufer verifiziert werden.

Nach Optimierung der Reaktionsparameter und Definition der idealen Markierungsmethode soll die Evaluierung der Radioliganden erfolgen. Die aufgeführten Verbindungen müssen dabei bestimmte Bedingungen erfüllen, um die Bindung des Radioliganden an den Rezeptor zu gewährleisten⁹⁸:

- die Blut-Hirn-Schranke muss möglichst schnell und vollständig überwunden werden
- die unspezifische Bindung des Radioliganden sollte möglichst gering sein
- es muss eine hochaffine und themenbezogen eine subtyp-selektive Bindung am Target stattfinden
- der Metabolismus und daraus resultierende Metaboliten sollten polar sein und nach Möglichkeit geeignete Eigenschaften zum schnellen Abtransport aus der Hirnregion besitzen (geringe Affinität, polare Eigenschaften)

- die Abstimmung zwischen biologischer Halbwertszeit am Rezeptor und der physikalischen Halbwertszeit des eingesetzten Nuklids muss gewährleistet sein

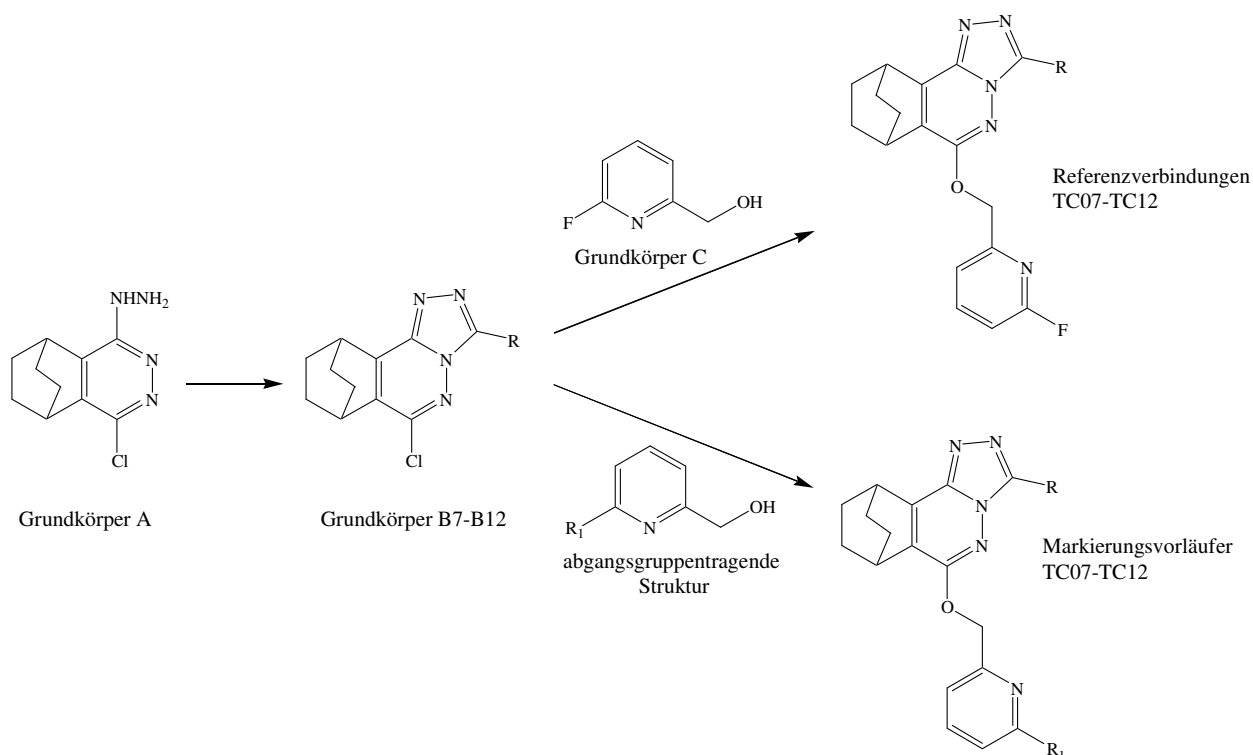
Mit Hilfe von Verdrängungsversuchen eines bekannten tritiierten Radioliganden durch die Referenzverbindungen *in vitro* und *ex vivo* können Aussagen über die Affinitäten und Selektivitäten erfolgen. Zudem geben *ex vivo*-Versuche eine erste Aussage über die Passierbarkeit der Blut-Hirn-Schranke. Nach Abtrennung entsprechender ^{18}F -markierter Radioliganden sollen *ex vivo*- und *in vivo*-Evaluierungen weitere Ergebnisse zur Eignung der Visualisierung des GABA_A/α₅-Rezeptorstatus liefern.

Im Erfolgsfall wäre es dann erstmals möglich, den Einfluss diverser neurologischer Krankheitsbilder auf die für das Lernen und Erinnern so wichtige α₅-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors zu erkennen und dadurch wichtige neue Resultate im Bezug auf Diagnostik und Therapie zu erlangen.

3 Ergebnisse und Diskussion der organischen Synthesen

Zunächst wurden die Referenzverbindungen TC07-TC12 organisch-präparativ aufgebaut. Dabei wurde wie in Abb. 15 dargestellt als erster Schritt Grundkörper A synthetisiert. Darauf folgend konnten aus Grundkörper A die einzelnen Ausgangsverbindungen (Grundkörper B7-B12) der Liganden TC07-TC12 über einen Ringschluss hergestellt werden. Mittels dieser Grundkörper B7-B12 wurden nun durch Kopplung an Grundkörper C die kalten Referenzverbindungen TC07-TC12 synthetisiert, die im Weiteren auf ihre Affinität und Selektivität bezüglich des GABA_A/α₅-Untereinheit evaluiert werden sollten. Daraus sollte Aufschluss gewonnen werden, welcher der Liganden TC07-TC12 die besten biologischen Eigenschaften zu späteren Evaluierung des entsprechenden ¹⁸F-markierten Radioliganden aufweist.

Im Anschluss wurden die Markierungsvorläufer der ausgewählten Referenzverbindung durch Kopplung des entsprechenden Grundkörpers B mit den nukleofuge Gruppen tragenden Strukturen dargestellt. Hierbei sollten letztendlich Chlor-, Brom-, Trimethylammonium- und Nitromarkierungsvorläufer zur späteren ¹⁸F-Markierung zur Verfügung stehen.



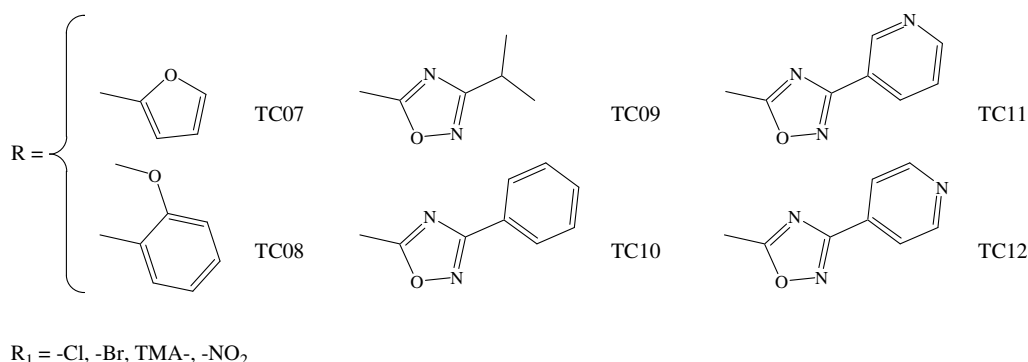
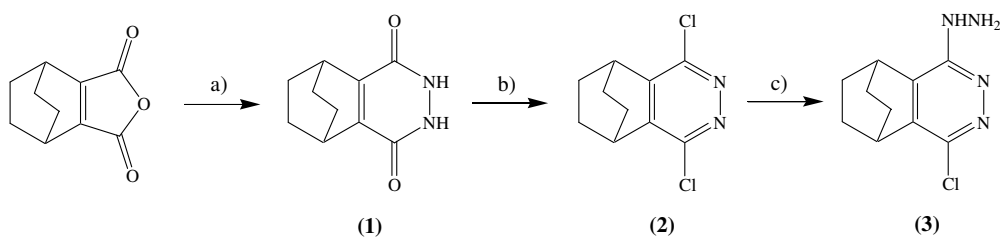


Abb. 15: Allgemeine Synthesestrategie zur Darstellung der Referenzverbindungen TC07-TC12 sowie entsprechender Markierungsvorläufer

3.1 Darstellung des Grundkörpers A

Grundkörper A, 3-Chlor-6-hydrazin-4,5-diazatricyclo[5.2.2,7]dodeca-2(7),3,5-trien (**3**), wurde nach einer Vorschrift von Street et al.⁹⁴ ausgehend von Bicyclo[2.2.2]oct-2-en-2,3-dicarboxysäureanhydrid in drei Schritten zum gewünschten Hydrazin überführt. Dabei wurde zunächst das Anhydrid durch Kondensation mit Hydrazinhydrat umgesetzt. Aus der resultierenden Diaza-Verbindung (**1**) entstand durch die Einführung von Chlor mittels Phosphorylchlorid 3,6-Dichlor-4,5-diazatricyclo[6.2.2.2,7]dodeca-2(7),3,5-trien (**2**). Im letzten Schritt wurde durch Substitution eines der beiden Chloratome gegen eine Hydrazinfunktion der Grundkörper A (**3**) gebildet. Alle Stufen konnten problemlos mit sehr hohen Ausbeuten (> 94 %) durchgeführt werden.



a): N₂H₅OH, NaOAc, AcOH, H₂O, Rückfluss; b): POCl₃, Rückfluss; c): N₂H₅OH, EtOH, Rückfluss

Abb. 16: Synthese des Grundkörpers A

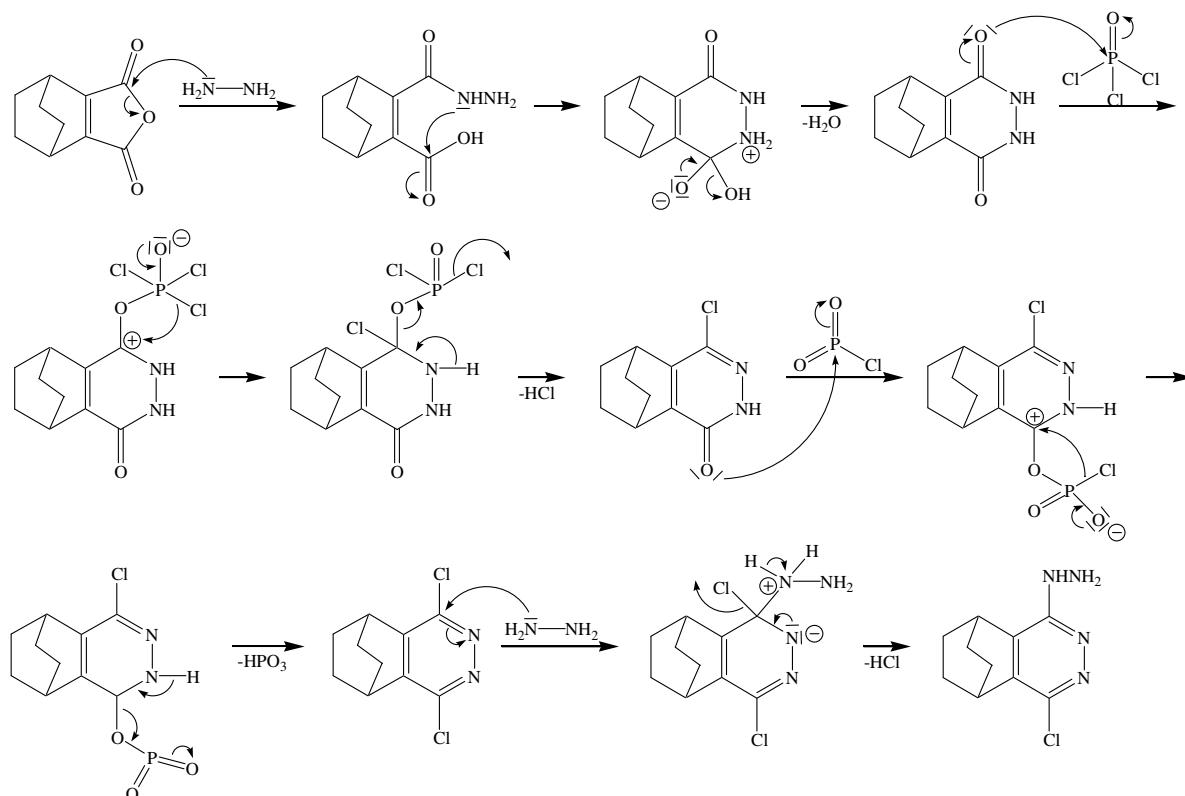


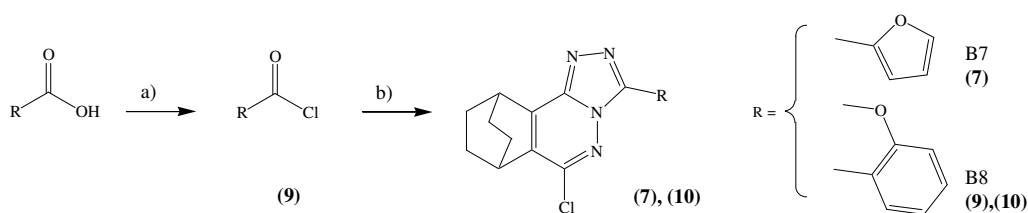
Abb. 17: Mechanistische Betrachtung der Synthese des Grundkörpers A

3.2 Darstellung der Grundkörper B7 und B8

Zunächst mussten die für die weitere Reaktion erforderlichen Säurechloride der Substanzen B7 (**7**) und B8 (**10**) erhalten werden. Furan-2-carbonsäurechlorid konnte als Ausgangsprodukt für die Synthese von TC07 käuflich erworben werden. Das für TC08 benötigte 2-Methoxybenzoylchlorid (**9**) wurde ausgehend von 2-Methoxybenzoesäure durch den Umsatz mit Oxalylchlorid erhalten.

Um die 6-Chlor-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazine zu erhalten wurde der Grundkörper A (**3**) mit der Hilfsbase Triethylamin versetzt und dann durch Zugabe äquivalenter Mengen des entsprechenden Säurechlorids umgesetzt.

Zur Darstellung des 6-Chloro-3-(2-methoxy-phenyl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**10**) wurde das frisch synthetisierte Säurechlorid (**9**) als Rohprodukt eingesetzt, da eine Aufreinigung nicht möglich war. Daraus resultieren vermutlich auch Ausbeuten von 61 %, die im Vergleich zu Ausbeuten von über 80 % bei Verwendung des gekauften Säurechlorids zur Darstellung des Grundkörpers B7 (**7**) als schlecht zu bewerten sind.



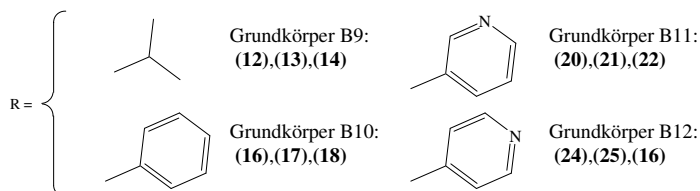
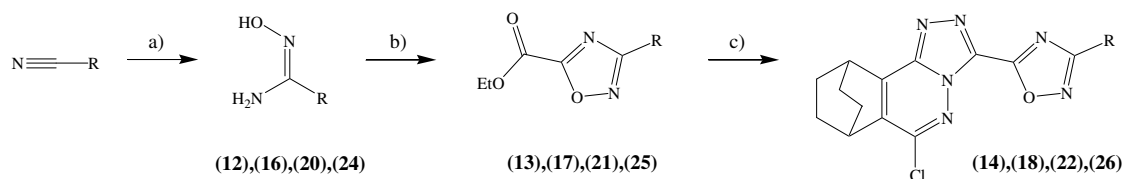
a): Oxalylchlorid, Dichlormethan, 45 °C; b): Grundkörper A (3), Trimethylamin, Xylol, Rückfluss

Abb. 18: Synthese der Grundkörper B7 (7) und B8 (10)

3.3 Darstellung der Grundkörper B9-B12

Diese Grundkörper bestehen im Wesentlichen aus einem 1,3-Oxadiazol mit einem gewählten Rest R in Position 2 und einer funktionellen Gruppe an Position 5 des Oxadiazols, die im letzten Schritt die Kopplung der Substanzen B an den Grundkörper A ermöglicht.

Ausgehend von den entsprechend substituierten Nitrilen erfolgt deren Umsatz mit zwei Äquivalenten Hydroxylamin-hydrochlorid unter basischen Bedingungen. Dabei entstehen die entsprechenden Carboxamidoxime (12), (16), (20) und (24), aus denen in späteren Reaktionen die Substanzen TC09-12 hervor gehen. Diese Oxime wurden als Rohprodukte direkt weiter eingesetzt, da keine Aussage über die Stabilität der Verbindungen getroffen werden konnte. Die Analytik beschränkte sich hier auf massenspektrometrische Methoden (FD), da sich die Wahl eines geeigneten deuterierten Lösungsmittels zur NMR-Spektroskopie als sehr schwierig erwies. Die Darstellung der Ethyl-(1,2,4-oxadiazol-5-yl)carboxylate erfolgt durch Deprotonierung der Oxime (12), (16), (20) und (24) mit Natriumhydrid in DMF unter Schutzgas. Eine anschließende Zugabe von äquimolaren Mengen an Ethylchlorformylformiat führt über die in situ entstehenden Carboxylhydrazine durch Zyklisierung zu den gewünschten 1,3-Oxadiazolen (13), (17), (21) und (25) mit entsprechendem Carboxylatrest. Die durchschnittliche Ausbeute lag bei diesen Reaktionen im Bereich von 30 %, dies kann man auf den Einsatz der Oxime als Rohprodukte begründen. Die entstandenen 1,3-Oxadiazole (13), (17), (21) und (25) und der zugegebene Grundkörper A (3) zyklisieren im letzten Schritt zu den gewünschten Triazolophtalazinen (14), (18), (22) und (26). Die insgesamt bis hierhin dargestellten Grundkörper B7 – B12 werden im weiteren Verlauf zum Einen mit einem fluorierten Pyridinmethanol (5) umgesetzt, um die entsprechenden Referenzverbindungen TC07 – TC12 zu erhalten (Kapitel 3.5), zum Anderen erfolgt die Kondensation von abgangsgruppentragenden Strukturen speziell an den Grundkörper B7 (Kapitel 3.11), um geeignete Markierungsvorläufer darzustellen.



a): $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, K_2CO_3 , EtOH, Rückfluss; b): NaH, EtO_2CCOCl , THF, Rückfluss; c): Grundkörper A (3), Dioxan, Rückfluss

Abb. 19: Darstellung der Grundkörper B9 (14), B10 (18), B11 (22) und B12 (26)

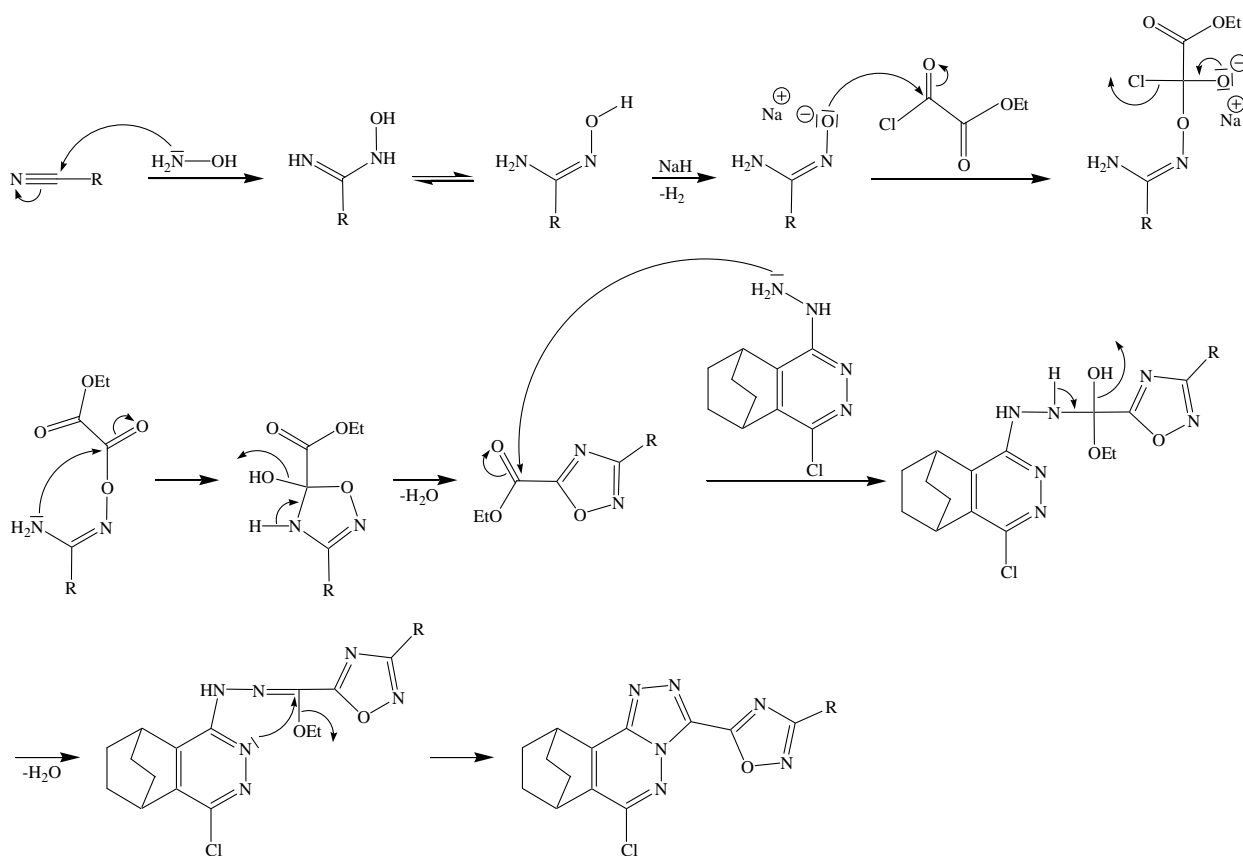
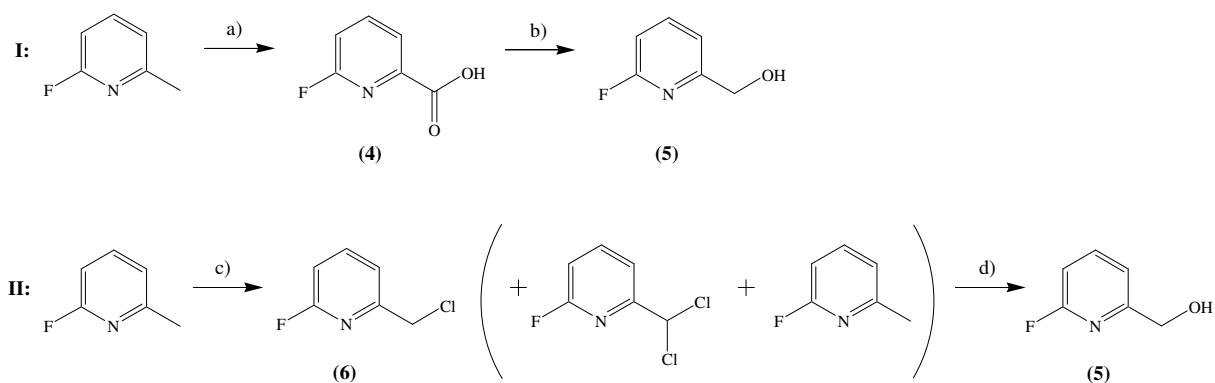


Abb. 20: Mechanistische Betrachtung der Synthese der Grundkörper B9-12

3.4 Darstellung des Grundkörpers C

Ausgehend von 6-Fluor-2-methylpyridin sollte zunächst die Darstellung von 6-Fluor-2-pyridinmethanol (**5**) (Grundkörper C) nach Schema I durchgeführt werden. Zwar waren die Ausbeuten der Synthese der Carbonsäure (**4**) gut (70 %) ⁹⁹, allerdings wurden im darauf folgenden Schritt, der Reduktion zum Alkohol durch LiAlH_4 ¹⁰⁰, nur mäßige Ausbeuten von unter 20 % erreicht. Ferner waren sowohl die Oxidation als auch die Reduktion thermisch nur sehr schwer zu kontrollieren. Aus diesem Grund wurde ein neues Syntheschema II, basierend auf Literatur von Pesti et al. ⁹⁵, erarbeitet.

Es wurde mit N-Chlorsuccinimid und AIBN als Starter radikalisch die Methylgruppe des 6-Fluor-2-methylpyridins in die Zwischenstufe (**6**) überführt. Erhalten wurde neben dem Produkt stets auch etwas Edukt und ein zweifach chloriertes Nebenprodukte. Die Zwischenstufe (**6**) wurde als Rohprodukt weiter eingesetzt. Bei der darauffolgenden basischen Hydrolyse zum gewünschten Produkt (**5**) liegen aufgrund der im Rohprodukt enthaltenen Nebenprodukte in der Reaktion nach Abbruch neben dem Produkt auch noch 6-Fluor-2-methylpyridin und das 6-Fluor-2-pyridincarbaldehyd vor. Durch geeignetes Aufarbeiten des Reaktionsgemisches und säulen-chromatographische Aufarbeitung konnte 6-Fluor-2-pyridinmethanol (**5**) mit geringem Zeitaufwand in hohen Ausbeuten (55 % über zwei Stufen) dargestellt werden.



a): KMnO_4 , H_2O , Phasentransferkatalysator, Rückfluss; b): 1. NEt_3 , EtOCOCl , Benzol; 2. LiAlH_4 , THF, -78°C c): NCS, AIBN, AcOH, MeCN, Rückfluss; d): K_2CO_3 , H_2O

Abb. 21: Darstellung des Grundkörpers C (**5**)

3.5 Darstellung der inaktiven Referenzverbindungen TC07 - TC12

Zur Synthese von 6-Fluor-2-methylpyridin wurde mit NaH deprotoniert und dann die entsprechenden Grundkörper B7-12 zugegeben. Dabei wurden Ausbeuten zwischen 3 und 57 % erreicht.

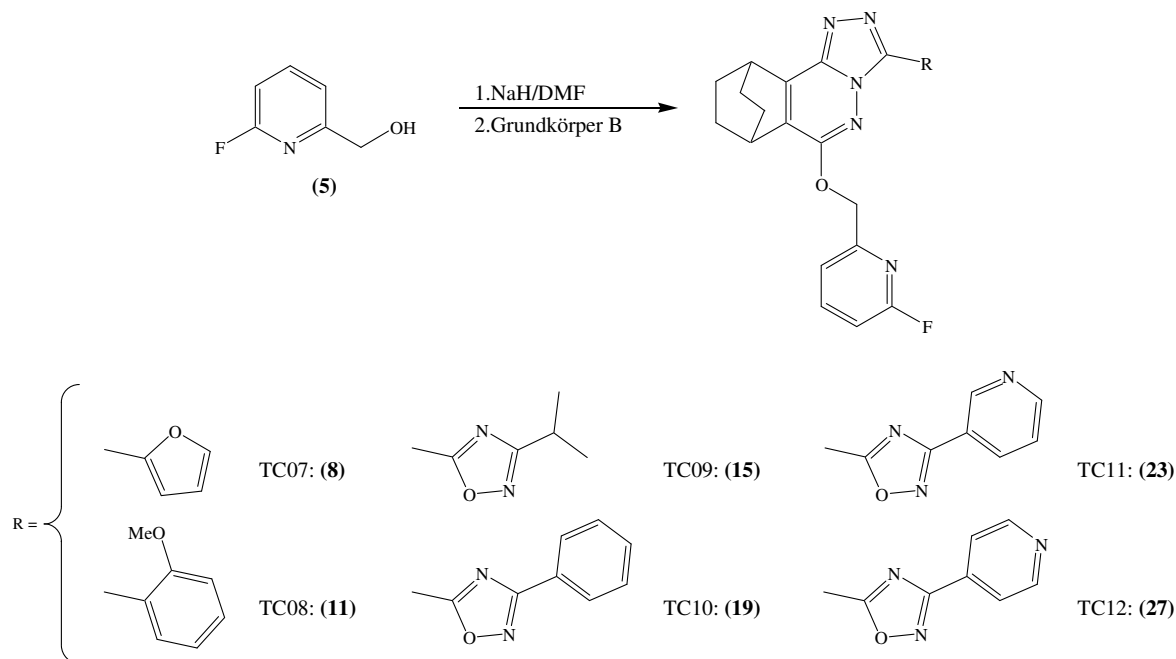


Abb. 22: Darstellung der kalten Referenzverbindungen TC07-12

Es entstanden viele Nebenprodukte, die nicht weiter analysiert wurden, allerdings handelt es sich hierbei vermutlich um Zersetzungsprodukte des Triazolophthalazinsystems.

Aufgrund der hohen Abgangstendenz des Fluors bildete sich nicht nur das einfachsubstituierte Produkt aus, es konnte des weiteren auch eine Substitution am Fluor des Pyridinringes gegen ein weiteres Alkoholat gefunden werden. Ob es hierbei allerdings bei der Deprotonierung des Pyridinmethanols zu einer Substitution des Fluors durch eine deprotonierte Hydroxyfunktion eines zweiten Moleküls kam oder erst nach Kopplung an den Grundkörper das Fluors durch eine weitere Pyridinmethanolateinheit substituiert wurde, wurde nicht weiter untersucht. Die so entstandenen einfach- und zweifachsubstituierten Produkte konnten säulenchromatographisch nicht vollständig voneinander isoliert werden. Aus diesem Grund wurden alle synthetisierten kalten Referenzverbindungen im Anschluss an eine säulenchromatographische Trennung mittels HPLC nochmals weiter aufgereinigt. Hierbei wurde das Gerätesystem „HPLC-System I“ verwendet (Luna5 μ C18RP 250x30.00 mm, 10 ml/min). Dadurch konnten die kalten Referenzverbindungen NMR-rein isoliert werden.

3.6 Darstellung der Strukturen mit nukleofugen Gruppen

Diese Strukturen zeichnen sich durch eine funktionelle Gruppe aus, die unter bestimmten Reaktionsbedingungen nukleophil substituiert werden kann. Dabei sind besonders Halogene, aber auch bestimmte andere Gruppierungen wie zum Beispiel die Nitrofunktion als typische Abgangsgruppen zu nennen. Die Tendenz nimmt zu, je besser die Abgangsgruppe nach Austritt stabilisiert werden kann.

Bei Pyridinen sind nukleophile Substitutionsreaktionen relativ leicht möglich. Dies kann begründet werden durch Betrachtung der mesomeren Grenzstrukturen (Abb. 23). Hierbei kann eine negative Ladung am elektronegativen N-Atom des Pyridins auftreten, was eine Substitution in ortho- und para-Position erleichtert. Im Allgemeinen ist die ortho-Position wegen der Nähe zum elektronenziehenden N-Atom bevorzugt.

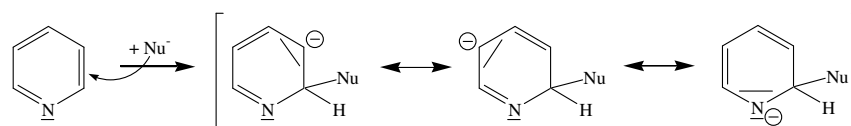


Abb. 23: Mesomere Grenzstrukturen von Pyridin bei Angriff eines Nukleophils in ortho-Position

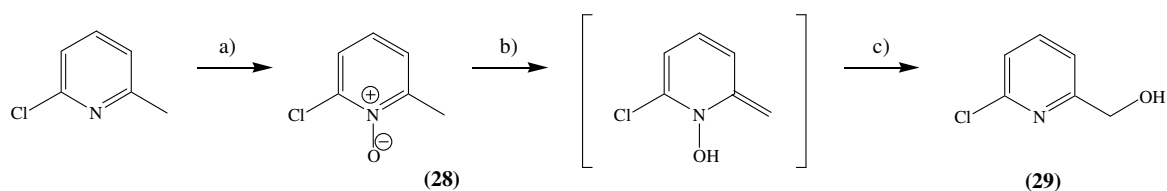
Zunächst werden Strukturen auf 2-Pyridinmethanolbasis synthetisiert, die später über die aliphatische Hydroxyfunktion mit den entsprechenden Grundkörpern B gekoppelt werden sollen. Als nukleofuge Gruppen wurden in Position 6 die Chlor- und die Brom-Funktion mit eher mittlerer Tendenz zur Substitution durch [^{18}F]Fluorid als auch die beiden sehr guten Abgangsgruppen $-\text{NO}_2$ und $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ eingeführt.

3.7 6-Chlor-2-pyridinmethanol (29)

Ausgehend von 6-Chlor-2-methylpyridin wurde das Amin zum entsprechenden N-Oxid (28) durch Oxidation mit 3-Chlorperbenzoesäure nahezu vollständig umgesetzt. Anschließend wurde die im späteren Verlauf zur Kopplung an die Grundkörper B7-12 verwendete Hydroxyfunktion gebildet.

Hierbei erforderte der erste Schritt aufgrund der geringen Basizität der N-Oxidgruppe eine starke Säure, deren konjugierte Base folglich zu schwach ist, um den α -Kohlenstoff zu deprotonieren und damit eine Allylumlagerung zu ermöglichen. Deshalb wurde die Reaktionslösung nach beendeter Reaktion zum Intermediat zusätzlich mit der Base K_2CO_3 versetzt, um die gewünschte

Hydroxyfunktion des 6-Chlor-2-pyridinmethanols (**29**) zu erhalten. Die Gesamtausbeute über beide Stufen betrug 38 %^{101,102}.

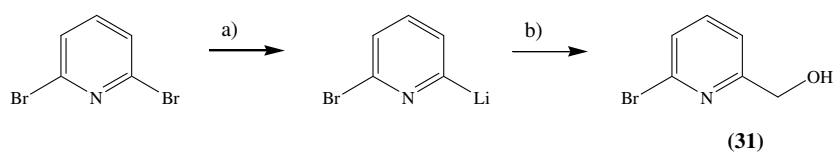


a): m-CPBA, 50°C, 12 Std.; b): Ac₂O, H₂SO₄, 110°C, 3 Std; c): K₂CO₃, MeOH/H₂O, RT, 15 min

Abb. 24: Darstellung von 6-Chlor-2-pyridinmethanol

3.8 6-Brom-2-pyridinmethanol (31)

Der gängige, literaturbeschriebene Syntheseweg¹⁰³ zur Darstellung von 2-Pyridinmethanolderivaten über eine Oxidation zur Carbonsäure mit starkem Oxidationsmittel und anschließender Reduktion zu Alkohol zeigte sich bereits in ähnlichen Synthesen (siehe Kapitel 3.4) als sehr aufwendig. Daher wurde eine von Cai et al.¹⁰⁴ vorgestellte Syntheseroute modifiziert angewandt. Hierbei wurde zunächst das 2,6-Dibrompyridin analog einer Gilman-van-Ess-Synthese durch einen Halogen-Metall-Austausch monolithiiert, in situ zur Carbonsäure umgesetzt und durch Zugabe von NaBH₄ zum Alkohol reduziert (Abb. 25).



a): BuLi/THF; b): 1.AcOH/Methanol, 2.NaBH₄

Abb. 25: Modifizierte Gilman-van-Ess-Synthese zur Darstellung von 6-Brom-2-pyridinmethanol

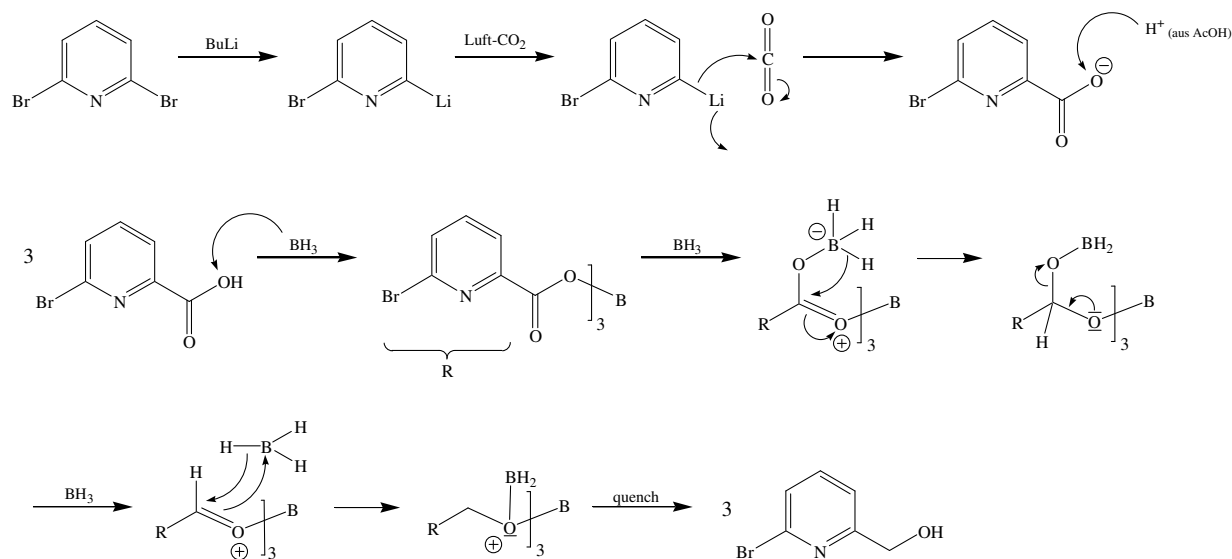


Abb. 26: Mechanistische Betrachtung der Synthese von 6-Brom-2-pyridinmethanol

3.9 6-Nitro-2-pyridinmethanol (37)

Zwar kann prinzipiell das entsprechende Carbonsäurederivat oxidativ dargestellt werden, allerdings würde durch die anschließende Reduktion die funktionelle Nitrogruppe ebenfalls reduziert werden und somit nicht mehr als Abgangsgruppe fungieren können. Aus diesem Grund wurde ein literaturbeschriebener, fünfstufiger Syntheseweg gewählt (Schema I, siehe Abb. 27). Zunächst wurde die Amino-Funktion des 2-Amino-6-methylpyridins acetylgeschützt¹⁰⁵. 2-Acetamidopyridine können in hohen Ausbeuten mit Peressigsäure zu den korrespondierenden N-Oxiden oxidiert werden¹⁰⁶.

Nach Darstellung des 2-Acetamido-6-methylpyridin-N-oxides (**34**) wurde dieses zur Bildung der späteren Abgangsgruppe zum 6-Nitro-2-methylpyridin-N-oxid (**35**) oxidiert. Als gängiges Oxidationsmittel wurde in der Literatur^{107,108} zur Bildung einer Nitrofunktion aus einer Aminofunktion stets Caro'sche Säure (sog. „Piranha-Säure“) verwendet. Diese Reaktion stellte sich als extrem problematisch dar, da der Reaktionsverlauf so stark exotherm verlief, dass er nur sehr schwer zu kontrollieren war.

Für den weiteren Syntheseverlauf wurde nach Ashimori et al.¹⁰⁷ vorgegangen, wobei zunächst das 6-Nitro-2-methylpyridin-N-oxid (**35**) durch Zugabe von Acetanhydrid zum 6-Nitro-2-acetoxymethylpyridin (**36**) umgesetzt wurde. Im Anschluss wurde alkalisch hydrolysiert und das gewünschte Endprodukt 6-Nitro-2-pyridinmethanol (**37**) in insgesamt sehr schlechter Ausbeute erhalten.

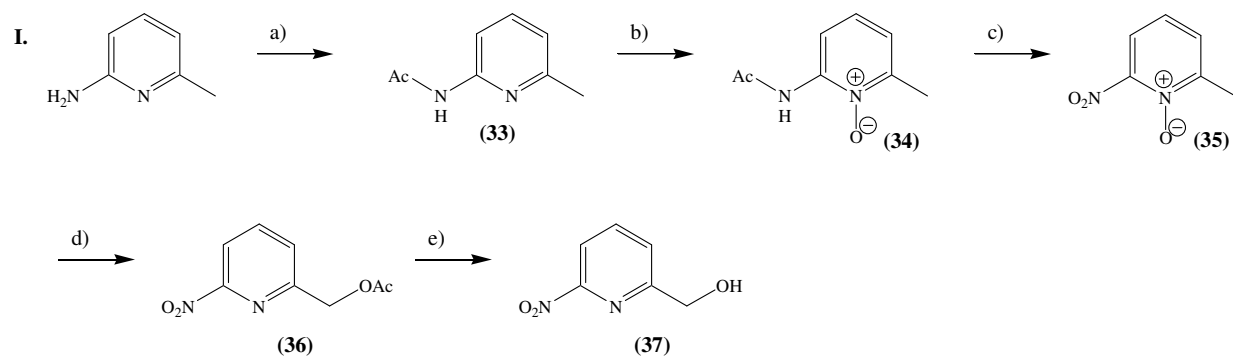


Abb. 27: Darstellung des 6-Nitro-2-pyridinmethanols nach Schema I

Daher wurde der bereits zur Darstellung des 2-Fluor-6-methylpyridins erläuterte Syntheseweg über eine radikalische Substitution mit anschließender Hydrolyse verwendet (Schema II, siehe Abb. 28).

Zur Darstellung des dafür benötigten Ausgangsproduktes 6-Nitro-2-methylpyridin (**38**) konnte trotz der schwierigen Reaktionskontrolle und der schlechten Ausbeuten nicht auf eine Oxidation mit Caro'scher Säure verzichtet werden. Allerdings konnte diese Reaktion ausgehend von 6-Amino-2-methylpyridin ohne weitere Zwischenstufen durchgeführt werden¹⁰⁸ und somit auch ohne vorherigen synthetischen Aufwand 6-Nitro-2-methylpyridin (**38**) erhalten werden. Dieses wurde radikalisch mit N-Brom-succinimid an der Methylgruppe einfach bromiert und anschließend alkalisch zur Hydroxyfunktion des 6-Nitro-2-pyridinmethanol (**37**) hydrolysiert.

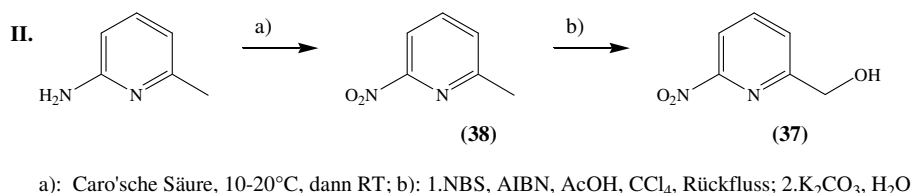


Abb. 28: Darstellung des 6-Nitro-2-pyridinmethanols nach Schema II

3.10 6-Amino-2-pyridinmethanol

Das 6-Amino-2-pyridinmethanol stellt an sich keine nukleofuge Gruppe dar, da die Aminofunktion für eine nukleophile Substitution mit Fluorid nicht zur Verfügung steht. Allerdings soll nach Kopplung des 6-Amino-2-pyridinmethanols mit den Grundkörpern B7-12 die Aminofunktion des entstandenen Produktes in eine Trimethylammonium-Funktion umgewandelt werden.

Damit hätte man einen Markierungsvorläufer mit sehr guten Bedingungen zur nuklophilen Substitution.

Auch hier sollte durch Oxidation zur Carbonsäure und anschließender Reduktion zum Alkohol das entsprechende 2-Pyridinmethanol dargestellt werden. Allerdings kam es bei der Aufarbeitung der 6-Amino-2-pyridincarbonsäure (**40**) zu großen Schwierigkeiten. Es war festzustellen, dass das Produkt durch Extraktion nicht zu isolieren war, da es bei jedem pH-Wert entweder durch die Carboxy-, die Aminofunktion oder den Pyridinstickstoff protoniert vorlag und sich somit stets in der verunreinigten wässrigen Phase befand. Auch durch Entfernen des Wassers, Versetzen des Rückstandes mit Ethanol und anschließender Behandlung im Ultraschallbad war es nicht möglich, das gewünschte Produkt zu isolieren.

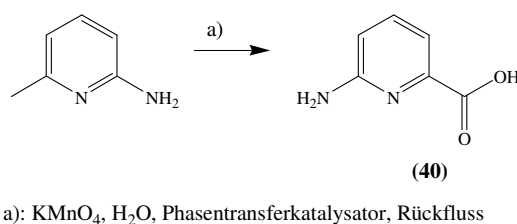


Abb. 29: Oxidation des 6-Amino-2-methylpyridins zur entsprechenden Carbonsäure

Die Möglichkeit, die Polarisierbarkeit des Moleküls einzuschränken, wäre die Verwendung einer zweifach methylierten Aminogruppe, mit der später ebenfalls die Synthese zur Trimethylammonium-Abgangsgruppe durchführbar wäre. Allerdings würde der Aufbau des zur späteren Kopplung benötigten Alkohols durch radikalische Substitution zu weiteren Bromierungen an den Methyleinheiten des Aminstickstoffes führen. Damit wäre später die Überführung in die Trimethylamingruppe nicht mehr möglich.

Da die Isolierung der Carbonsäure nicht erfolgreich war, wurde die Einführung der aliphatischen Hydroxyfunktion auch analog der Vorschrift für die Synthese von Grundkörper C (**5**) durchgeführt. Jedoch kommt es durch Mesomerieeffekte zwischen der Amino-Funktion und dem Pyridin-Stickstoff zu einer Aktivierung des Ringes. Obwohl Reaktionsbedingungen zur radikalischen Bromierung der aliphatischen Seitenkette gewählt wurden, ist die Aktivierung des Ringes durch diesen vorherrschenden Mesomerieeffekt so hoch, dass es zu einer zusätzlichen Bromierung des Ringes in meta-Stellung kommt¹⁰⁹.

3.11 Darstellung verschiedener Markierungsvorläufer von TC07 zur ^{18}F -Direktmarkierung

Die Darstellung der verschiedenen Markierungsvorläufer basierte primär auf der Deprotonierung der Struktur mit nukleofuger Gruppe und der nachfolgenden Zugabe des Grundkörpers B7. Dieser wurde aufgrund seiner Eigenschaften als idealster Ligand zur ^{18}F -Markierung und anschließender Evaluierung ausgewählt, da sehr gute Affinität und Selektivität zum GABA_A/α_5 -Rezeptor gemessen werden konnte (siehe Anhang C) und es sich gleichzeitig zeigte, dass die Referenzverbindung TC07 (**8**) die stabilste Molekülstruktur unter den Verbindungen TC07-12 aufweist. Ferner ist der Grundkörper B7 (**7**) synthetisch sehr schnell und mit vergleichsweise hohen Ausbeuten zugänglich.

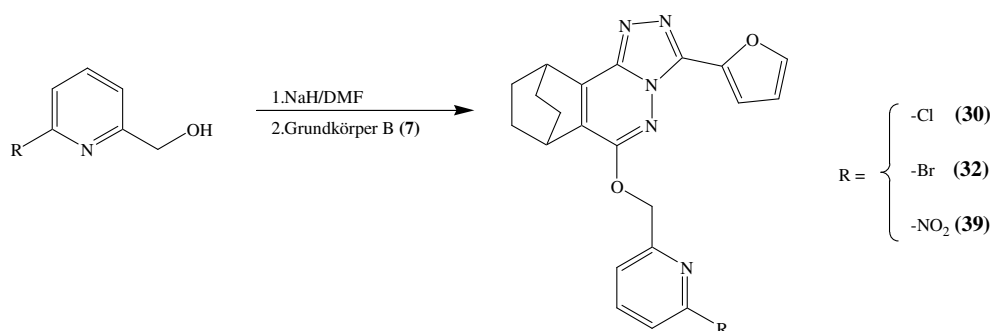


Abb. 30: Darstellung verschiedener Markierungsvorläufer zur ^{18}F -Direktmarkierung

Interessanterweise konnte man bei dieser Kopplung bereits die Abgangstendenz der verschiedenen funktionellen Gruppen erkennen. So wurde bei äquimolarem Einsatz von deprotoniertem 6-Chlor-2-pyridinmethanol chromatographisch keine Polymerisierung des Alkohols festgestellt. Beim Einsatz von äquimolaren Mengen an 6-Brom-2-pyridinmethanol konnte bereits eine zweite Substitution nachgewiesen werden. Wurden bei der Reaktion des 6-Nitro-2-pyridinmethanols mit dem Grundkörper B7 (**7**) äquimolare Mengen des deprotonierten Alkohols verwendet, konnten nach Isolierung einzelner Molekülstrukturen nach Auftrennung mit HPLC Polymerisierungen bis $n = 4$ nachgewiesen werden. Dies zeigt die extrem hohe Abgangstendenz der Nitrofunktion im Gegensatz zu denen der Halogene.

Erst durch Verdopplung der Stoffmenge des Grundkörpers B7 (**7**) in der Reaktion und sehr kurzen Reaktionszeiten konnte verhältnismäßig viel einfachsubstituiertes Produkt erhalten werden. Die trotzdem entstandenen geringen Mengen an zweifach substituiertem Produkt wurde mittels HPLC entfernt und das Produkt konnte NMR-rein isoliert werden.

Da es wie bereits beschrieben nicht möglich war, ein entsprechendes Pyridinmethanol zur Darstellung eines die trimethylammoniumgruppentragenden Markierungsvorläufers zu synthetisieren, wurde hier ein anderer Weg gewählt¹¹⁰. Dabei wurde der bereits zuvor synthetisierte Chlor-

Markierungsvorläufer (**30**) äquimolar mit Trimethylamin in ethanolischer Lösung versetzt. Nach einstündiger Reaktionszeit wurde ein weiteres Mol der ethanolischen Lösung von Trimethylamin zugesetzt. Trotz der in der Literatur beschriebenen Ausbeuten¹¹¹ konnte in dieser Reaktion (Abb. 31) keine Umsetzung zum gewünschten Produkt nachgewiesen werden.

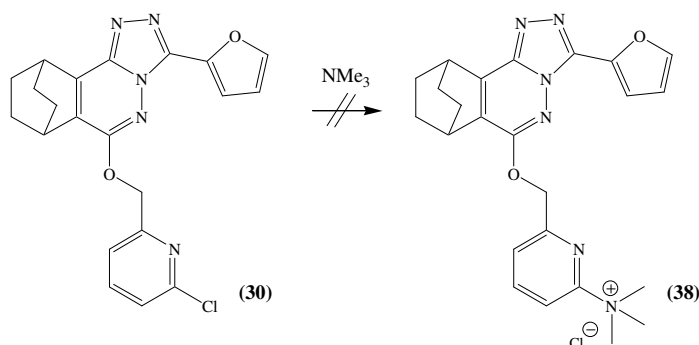


Abb. 31: Überführung des Chlor-Markierungsvorläufers (**30**) in den Trimethylammonium-Markierungsvorläufer (**38**)

3.12 Darstellung einer Modellverbindung TC14 zur ¹⁸F-Direktmarkierung

Da Markierungsvorläufer des Liganden TC07 in nur begrenzten Mengen vorhanden und erste Markierungsversuche nicht erfolgreich waren, wurde eine Modellverbindung TC14 synthetisiert. Der charakteristische Pyridinring sollte dabei erhalten bleiben, genauso wie die im späteren Molekül vorhandene Etherbrücke. Durch Aufbringen einer Schutzgruppe auf die Hydroxygruppierung soll der spätere Grundkörper B7 (**7**) simuliert werden. Dieser sollte generell die Markierungseigenschaften des Moleküls nicht weiter beeinflussen.

Ausgangssubstanz war hierbei die zuvor synthetisierte Verbindung 6-Chlor-2-pyridinmethanol (**29**) zur Darstellung eines geeigneten Markierungsvorläufers. Erste Versuche der Schützung mit aliphatischen Schutzgruppen wie der *tert*-Butylschutzgruppe (**42**) oder auch einer einfachen Methylierung (**43**) schlugen fehl. Allerdings konnte die Hydroxyfunktion erfolgreich und in hohen Ausbeuten (> 80 %) mit Benzylbromid umgesetzt werden, es wurde 6-Chlor-2-(benzyloxymethyl)pyridin (**44**) erhalten. Zur Quantifizierung einer erfolgreichen Markierung durch HPLC-Verfahren musste noch die entsprechende Referenzverbindung 6-Fluor-2-(benzyloxymethyl)pyridin (**45**) synthetisiert werden. Auch diese analoge Reaktion konnte in guten Ausbeuten (65 %) durchgeführt werden.

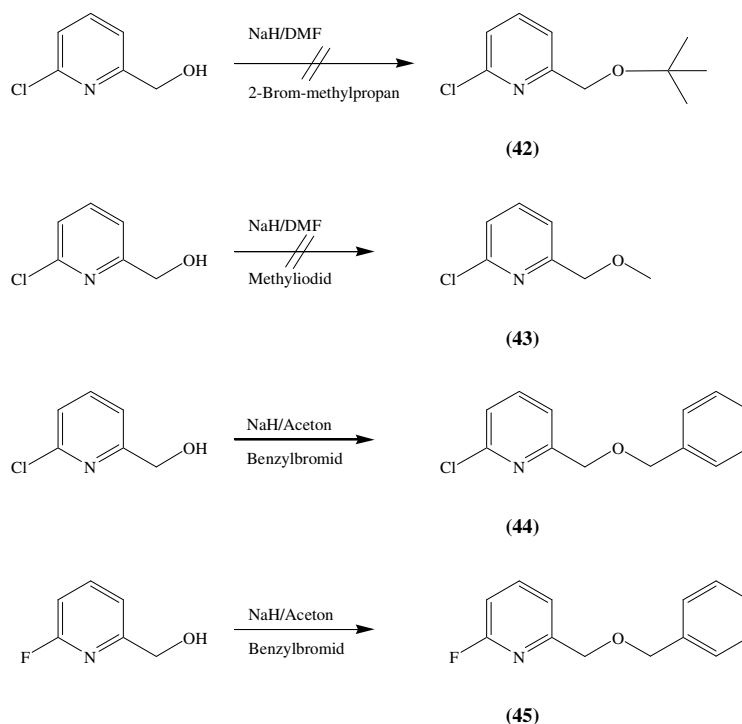


Abb. 32: Darstellung der Modellverbindung TC14 (**45**) und ihres Markierungsvorläufers (**44**)

3.13 Darstellung von geeigneten Markierungsvorläufern zur [^{18}F]FETos-Markierung und deren Referenzverbindungen

Ein weiteres etabliertes Markierungsverfahren neben der Direktmarkierung ist die Markierung über die prosthetische Gruppe [^{18}F]Fluorethyltosylat ([^{18}F]FETos). Erfahrungsgemäß sind bei diesem Verfahren sehr hohe radiochemische Ausbeuten zu erwarten. Aus diesem Grund wurde auch an einem geeigneten Molekül zur [^{18}F]FETos-Markierung gearbeitet. Nachteilig hierbei ist allerdings, dass es durch die strukturelle Veränderung des Moleküls zu einer Veränderung der Affinität und Selektivität kommen kann. Aus diesem Grund war es zwingend erforderlich, eine entsprechende kalte Referenzverbindung zu synthetisieren. Diese sollte hinsichtlich ihrer Affinität und Selektivität auf den GABA_A/α₅-Rezeptor getestet und des Weiteren zur Bestimmung der Retentionszeit der späteren ^{18}F -Verbindung verwendet werden.

Das direkte Analoga zu der bisher synthetisierten Verbindung TC07 wäre das 3-(2-Furyl)-6-(6-fluorethoxypyridin-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4-α]-phthalazin (FETC07P). 2-Hydroxypyridine sind jedoch tautomer und liegen in Lösung fast ausschließlich als Pyridone vor¹¹²:

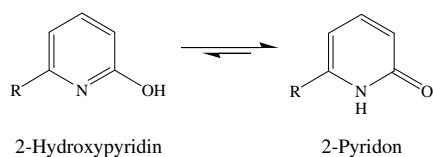


Abb. 33: Tautomerie des 2-Hydroxypyridins

Eine Markierung der NH-Funktion mit $[^{18}\text{F}]\text{FETos}$ wäre als Hauptprodukt jedoch nicht das gewünschte $[^{18}\text{F}]\text{FETC07P}$. Aus diesem Grund wurde zunächst das Phenol-Derivat (TC07BOH) als Markierungsvorläufer synthetisiert.

3.14 TC07BOH und FETC07B: 3-(2-Furyl)-6-(6-hydroxyphen-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin und 3-(2-Furyl)-6-(6-fluor-ethoxyphen-2-yl)methyl-oxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α] phthalazin

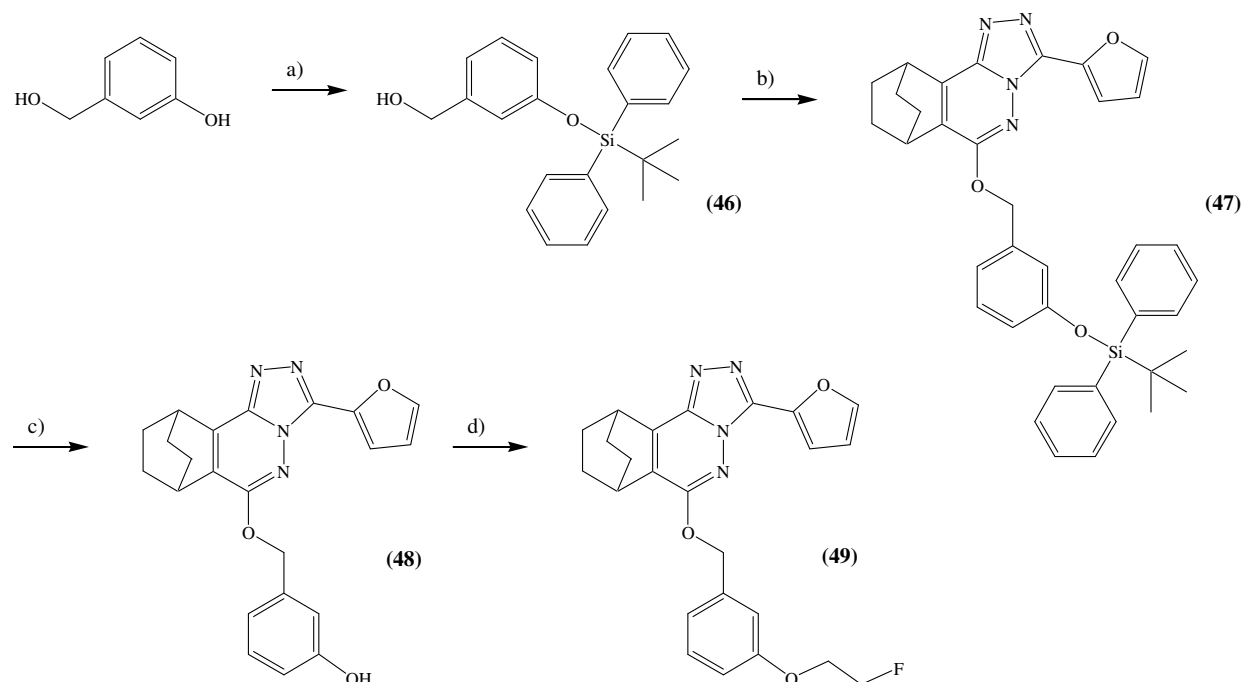
Ein weiterer Grund zunächst den Phenol-Markierungsvorläufer zu synthetisieren war, dass wie auch schon zuvor synthetische Probleme aufgrund des Pyridins zu erwarten waren. So wurde die Syntheseroute ausgehend von einem „Phenylmethanol“-Derivat anstelle des bisher verwendeten Pyridinmethanolderivats geplant.

Ausgehend von 3-Hydroxybenzylalkohol musste zunächst selektiv die phenolische Hydroxyfunktion geschützt werden, da die im Anschluss stattfindende Kopplung an den Grundkörper B7 (7) über die aliphatische Hydroxyfunktion erfolgen sollte. Diese selektive Schützung erfolgte unter Verwendung von äquimolaren Mengen *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (*tert*-BDPS). Es kam wie erwartet ausschließlich zur Silylierung der phenolischen Hydroxyfunktion, was ein Vergleich der NMR-Daten von Edukt und Produkt (46) zeigte. Die Kopplung an den Grundkörper B7 (7) gelang in über 95 % Ausbeute, im Vergleich dazu lagen die Ausbeuten der Kopplungen mit den Pyridinmethanolderivaten zwischen 3,4 und 57,4 %. Offenbar trägt der π -elektronenarme Pyridinring zur verminderten Ausbeute bei.

Zur Darstellung des Markierungsvorläufers TC07BOH (48) mit freier phenolischer Hydroxyfunktion wurde die Silylschutzgruppe basisch abgespalten. Aufgrund der möglichen Zersetzungsprodukte war eine thermische, basische Hydrolyse hier ungeeignet. Eine andere Möglichkeit ist die Abspaltung der Silylschutzgruppe durch Zugabe von Ammoniumfluorid. Nach einstündiger Reaktionszeit bei 80°C und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung konnte der Markierungsvorläufer (48) in 65 %iger Ausbeute erhalten werden.

Zur Darstellung der entsprechenden Referenzverbindung (49) wurde die Hydroxyfunktion des Markierungsvorläufers (48) zunächst deprotoniert und mit 1,2-Bromfluorethan versetzt. Dabei

fungiert das Brom als Abgangsgruppe und es kann fluorethyliertes Produkt als Referenzverbindung FETC07B (**49**) erhalten werden.



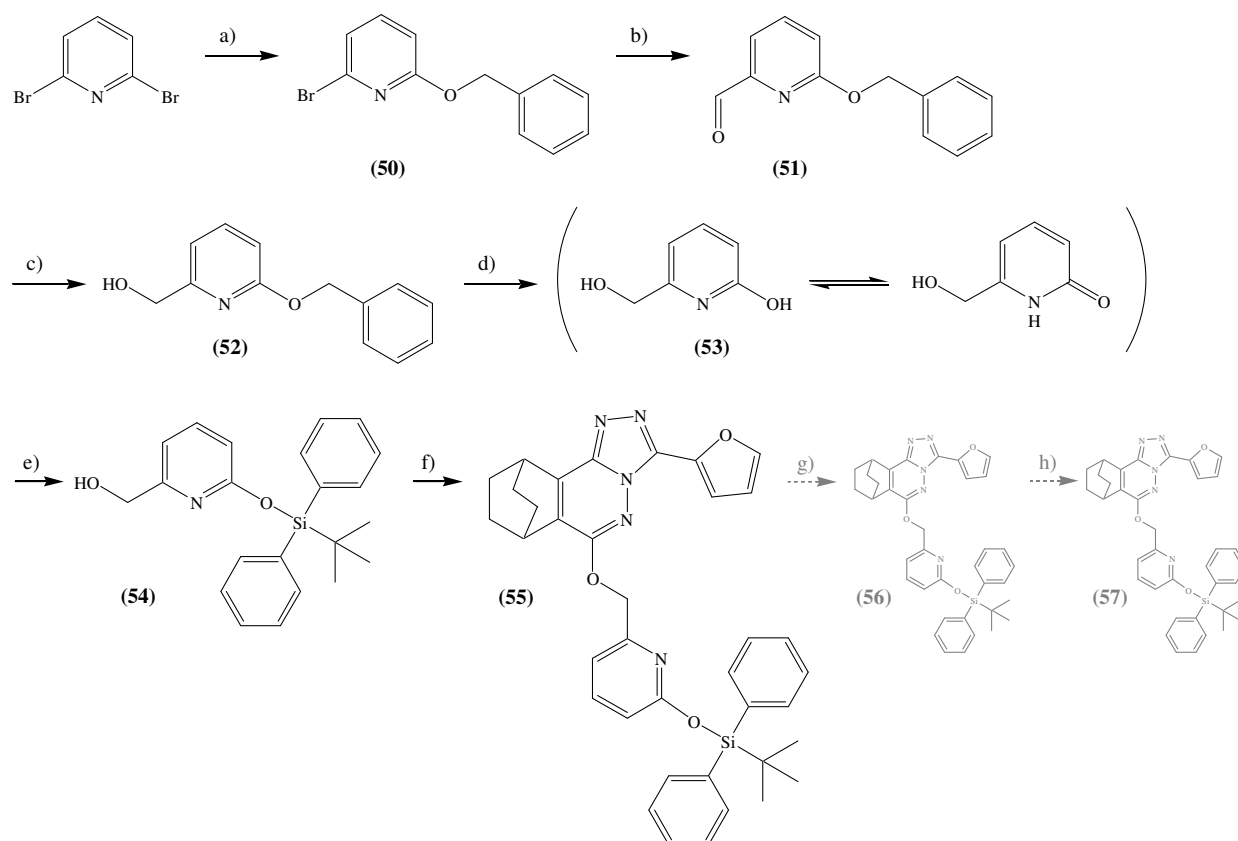
a): Imidazol/THF, t.-BDPS, 40°C; b): NaH/DMF, Grundkörper B7 (**7**), RT; c): NH_4F /DMF, 80°C; d): NaH/DMF, 1,2-Bromfluorethan, Rückfluss

Abb. 34: Darstellung des Markierungsvorläufers TC07BOH (**48**) und der entsprechenden Referenzverbindung FETC07B (**49**)

3.15 TC07POH und FETC07P: 3-(2-Furyl)-6-(6-hydroxypyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin und 3-(2-Furyl)-6-(6-fluor-ethoxypyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α] phthalazin

Zur Darstellung der Verbindungen (**56**) und (**57**) wurde von 2,6-Dibrompyridin ausgegangen. Dabei wurde zunächst der Benzylalkohol aktiviert um dann als Alkoholat nukleophil am 2,6-Dibrompyridin ein Brom zu substituieren. Aus der dadurch entstandenen Verbindung 2-Brom-6-benzoyloxy-pyridin (**50**) wurde dann die später an Grundkörper **7** (**7**) koppelnde aliphatische Hydroxyfunktion aufgebaut. Zunächst wurde dafür das verbliebene Brom zu einem Aldehyd nach abgewandelter Synthese von Burstein et al.¹¹³ umgesetzt. Zur Darstellung des 6-Benzoyloxy-2-pyridinmethanol (**52**) konnte 2007 eine iranische Forschergruppe zeigen, dass durch den Einsatz von Lithiumbromid und Hydridonoralkohol in äquimolaren Mengen mit dem Aldehyd unter

sehr milden Bedingungen dieses in einer Meerwein-Ponndorf-Verley-Reaktion zum entsprechenden Alkohol überführt werden kann¹¹⁴. Im nächsten Schritt wurde durch Abspaltung der Benzylschutzgruppe mittels eines Palladium/Aktivkohle-Katalysators und Wasserstoff das Zwischenprodukt 6-Hydroxy-2-pyridinmethanol (**53**) dargestellt. Dieses wurde nicht weiter aufgereinigt, da eine Isolierung aufgrund der starken Polarisierung des Moleküls nicht möglich war. Das Rohprodukt wurde direkt mit *tert*-BDPS an der phenolischen Hydroxygruppe geschützt und isoliert. Dabei erhielt man auch nach Aufreinigung immer noch stark verunreinigtes Produkt (**54**) in sehr geringen Mengen (Ausbeute < 1 %). Die Syntheseroute wurde hier beendet. Zur Darstellung des entsprechenden Markierungsvorläufers und der dazugehörigen Referenzverbindung würde die Kopplung an den Grundkörper B7 (**7**), die anschließende Entschützung und Fluorethylierung analog der Verbindungen (**47**), (**48**) und (**49**) erfolgen.



a): Benzylalkohol, NaH/DMF, 90°C; b): N-BuLi/Et₂O, DMF, -78°C; c): LiBr, TEA, Isoprop., RT; d): EtOH, C/Pd, H₂, RT; e): Imidazol/THF, *t*.-BDPS, 40°C; f): NaH/DMF, Grundkörper B7 (**7**), RT; g): NH₄F/DMF, 80°C; h): NaH/DMF, 1,2-Bromfluorethan, Rückfluss

Abb. 35: Syntheseroute zur Darstellung der geplanten Markierungsvorläufers TC07POH (**56**) und der entsprechenden Referenzverbindung FETC07P (**57**)

4 Ergebnisse und Diskussion der Radiofluorierungen

4.1 Radioaktive ^{18}F -Markierung der Modellverbindung TC14

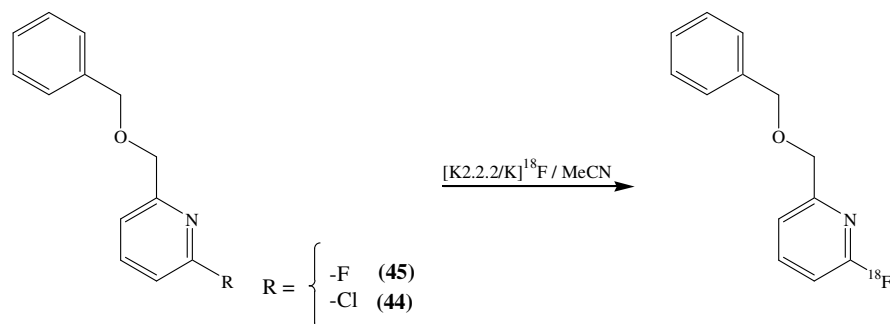


Abb. 36: Synthesestrategie zur Darstellung von [^{18}F]TC14

Zunächst sollte das benzylgeschützte 6-Fluor-2-pyridinmethanol über einen $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$ -Isotopenaustausch radioaktiv markiert werden. Der Isotopenaustausch zeigte in früheren Versuchen schon oft hohe Ausbeuten und wurde hier zunächst dazu verwendet, einen ersten Eindruck über die Reaktionsfähigkeit der Modellverbindungen zu bekommen. Die Reaktion wurde beispielhaft bei zwei Temperaturen (120 °C und 160 °C) durchgeführt, als Lösungsmittel wurde N,N-Dimethylformamid (DMF) verwendet. Die Markierungsvorläuferkonzentration betrug 24 μmol , dies entspricht etwa 5 mg Markierungsvorläufer.

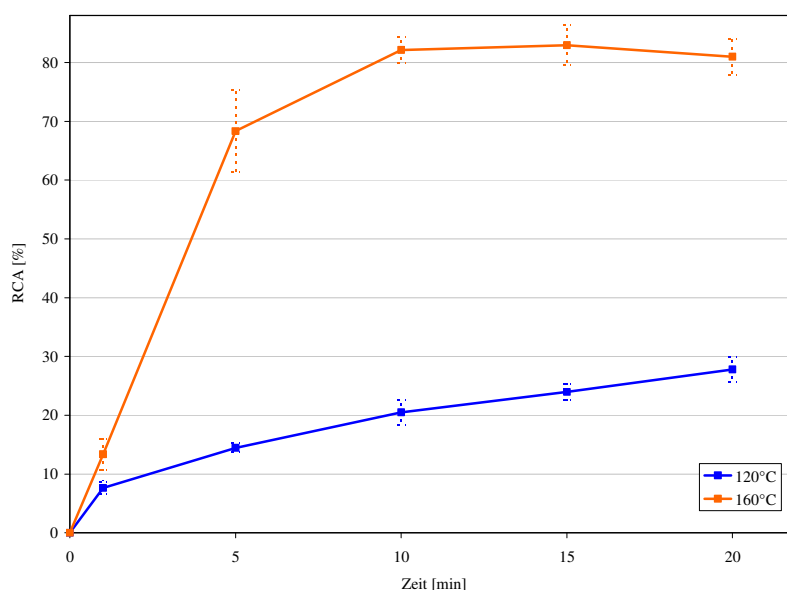


Abb. 37: Markierung von benzylgeschütztem 6-Fluor-2-pyridinmethanol (DMF, 24 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)

Deutlich zu erkennen ist die massive Ausbeutezunahme bei Erhöhung der Temperatur. Dies war jedoch zu erwarten, da die Reaktionskinetik bei 120 °C nach 20 min Reaktionszeit und knapp 30 % RCA immer noch einen Anstieg dieser Ausbeute zeigt. Bei 160 °C ist eine maximale Ausbeute von 82 % bereits nach 10 Minuten erreicht.

Es wurden hier keine weiteren Experimente mit dem fluorierten Standard durchgeführt. Betrachtet man sich im Vergleich zu dem $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$ -Isotopenaustausch die radioaktive Markierung über einen Chlor-Markierungsvorläufer unter den gleichen Parametern, kann man deutliche Unterschiede in der radiochemischen Ausbeute verzeichnen. Da die Abgangstendenz von Chlor nur im mittleren Bereich liegt, sind die niedrigeren Ausbeuten hierauf zurückzuführen. Trotzdem können wie auch beim Isotopenaustausch bei 120 °C radiochemische Ausbeuten von um die 20 % erzielt werden. Ebenso konnten bei 140 °C Ausbeuten über 40 % erzielt werden. Zu beachten ist allerdings, dass bei 160 °C Ausbeuten von unter 20 % auftreten. Dies könnte eventuell einen Hinweis darauf geben, dass das Pyridingerüst und/oder die Etherbrücke im Molekül bei höheren Temperaturen einer Reaktion unterliegen, welche radioaktives Nebenprodukt entstehen lässt. Diese Nebenprodukte konnten sowohl in der durchgeführten Dünnschichtchromatographie als auch in der HPLC nachgewiesen werden. Als Beispiel hierfür sei das in Kapitel 4.2.5.8 abgebildete HPLC-Diagramm erwähnt.

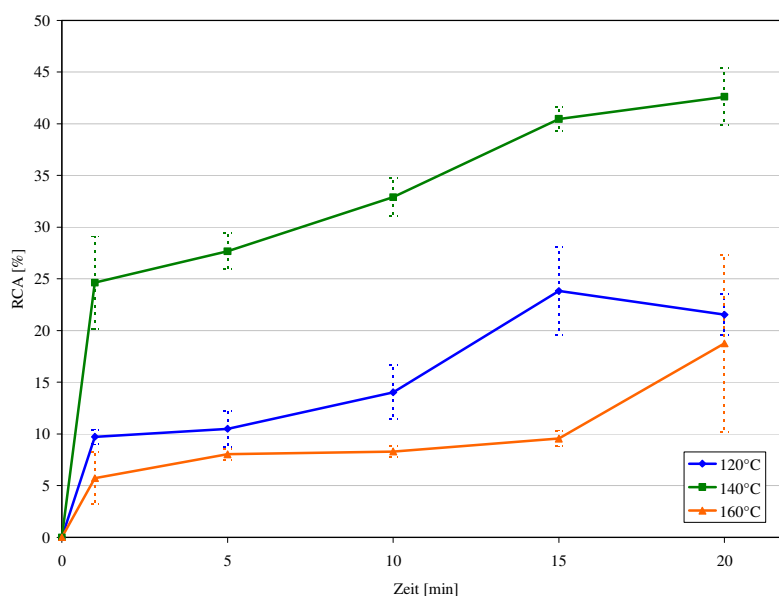


Abb. 38: Markierung von benzylgeschütztem 6-Chlor-2-pyridinmethanol (DMF, 24 μmol , $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)

4.2 Radioaktive ^{18}F -Markierung von TC07

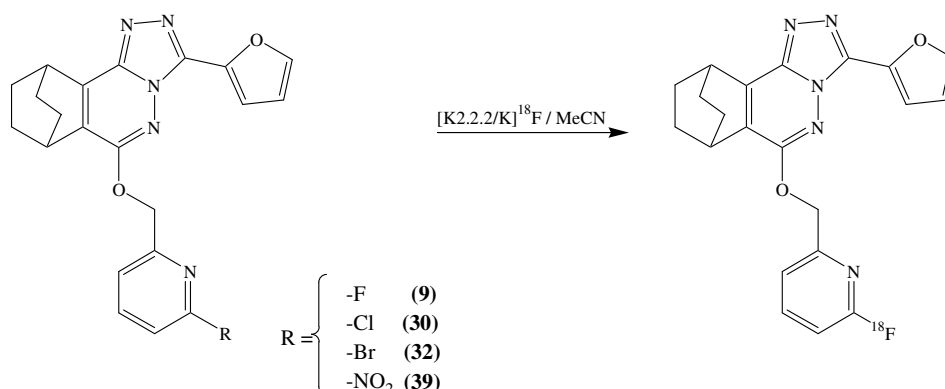


Abb. 39: Synthesestrategie zur Darstellung von $[^{18}\text{F}]\text{TC07}$

Ausgehend von den Affinitäten und Selektivitäten der getesteten Verbindungen TC07-TC12 stellen sich vor allem die Liganden TC07 und TC12 als herausragend dar. Aufgrund der etwas unkomplizierteren Syntheseroute des Markierungsvorläufers von TC07 und der praktischen Erfahrung, dass TC07 in Lösung bedeutend stabiler ist als TC12, wurde TC07 als geeignetster Ligand für den weiteren Verlauf gewählt.

Im Folgenden soll durch Optimierung der ^{18}F -Markierung verschiedener Markierungsvorläufer das Produkt $[^{18}\text{F}]\text{TC07}$ in möglichst hoher radiochemischer Ausbeute dargestellt werden, um später in eine injizierbare, für Tierversuche geeignete Lösung überführt zu werden.

Aufgrund der geringen Menge an Markierungsvorläufer wurden sowohl bei dem Chlor- als auch bei dem Brommarkierungsvorläufer für alle Kinetiken mit Markierungsvorläuferkonzentrationen von 6–7 μmol (dies entspricht jeweils 3 mg für jeden Markierungsvorläufer) nach den gängigen Parametern optimiert. Alle Markierungen wurden, falls nicht anders erwähnt, mit $n = 3$ durchgeführt.

4.2.1 $^{18}\text{F} / ^{19}\text{F}$ -Isotopenaustausch an der Referenzverbindung TC07

Analog zu der zuvor markierten Modellverbindung TC14 wurde vor der eigentlichen nca-Markierung des Liganden TC07 ein $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$ -Isotopenaustausch an der Referenzverbindung $[^{19}\text{F}]\text{TC07}$ durchgeführt. Dabei zeigte sich sehr schnell, dass nicht mit den gleichen hohen radiochemischen Ausbeuten wie bei der Modellverbindung TC14 gerechnet werden kann. Die Reaktion von 30 μmol kalter Referenzverbindung mit $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ wurde in DMF unter Verwendung des Systems $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$ bei den Temperaturen 100, 120, 140 und 160 $^\circ\text{C}$ durchgeführt. Es ist ein Anstieg der radiochemischen Ausbeute von 15 % bei 100 $^\circ\text{C}$ nach

15 min, auf 24 % (120 °C, 20 min) und dann auf knapp 29 % bei 140 °C nach bereits 10 min zu beobachten. Bei einer weiteren Temperaturerhöhung auf 160 °C ist eine Ausbeute nahe Null zu verzeichnen. Offensichtlich kommt es bei diesen hohen Temperaturen zur Zersetzung des Produktes in mehrere Nebenprodukte. Da diese Nebenprodukte bei der ^{18}F -Markierung der fluorierten Referenzverbindung TC14 nicht auftrat, muss davon ausgegangen werden, dass es zu starken Zersetzungsreaktionen im stickstoffreichen Grundgerüst der Verbindung TC07 kommt.

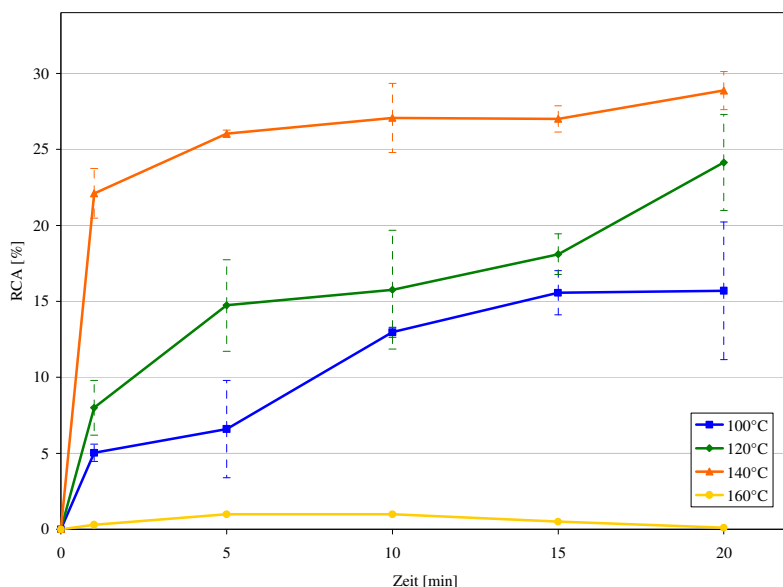


Abb. 40: $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$ -Isotopenaustausch an $[^{19}\text{F}]\text{TC07}$ (DMF, 30 μmol , $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)

4.2.2 ^{18}F -Fluorierung des Chlor-Markierungsvorläufers von TC07

Zunächst wurde ein Chlor-Markierungsvorläufer synthetisiert, da dieser noch in guten Ausbeuten zugänglich war. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Abgangstendenz der nukleofugen Gruppen von Chlor zu Brom zu Nitro stark ansteigt. Es konnte hier also nicht mit hohen radiochemischen Ausbeuten gerechnet werden.

4.2.3 Abhängigkeit der RCA von $[^{18}\text{F}]\text{TC07}$ von der Reaktionstemperatur

Erste Markierungsversuche bei einer mittleren Reaktionstemperatur von 120 °C zeigten überhaupt keine Ausbeute. Erst nach Steigerung der Temperatur auf 140 °C konnten radiochemische Ausbeuten im Bereich von unter 2,5 % gefunden werden. Bei einem weiteren Anstieg der Reak-

tionstemperatur auf 160 °C war wie auch schon im Fall des Isotopenaustauschs ein Abfall der radiochemischen Ausbeute zu verzeichnen.

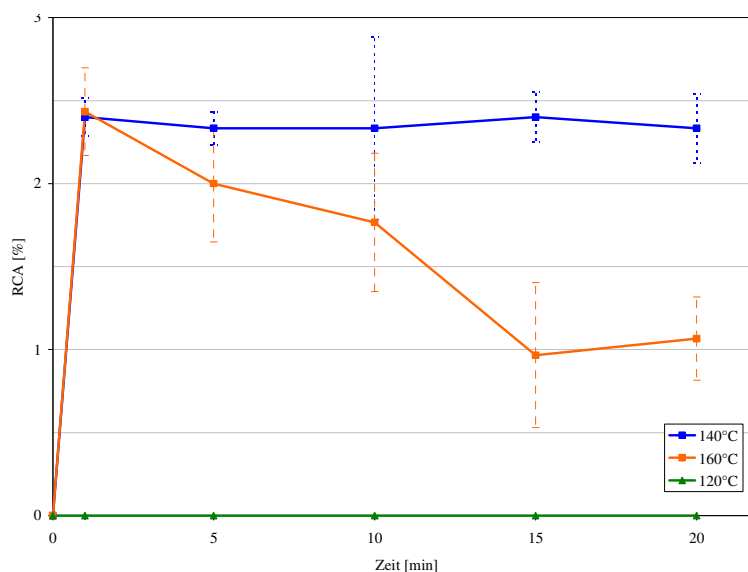


Abb. 41: Abhängigkeit der radiochemische Ausbeute von der Reaktionstemperatur (DMF, 6,6 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)

4.2.3.1 Abhängigkeit der RCA von $[^{18}\text{F}]\text{TC07}$ von der Markierungsvorläuferkonzentration

Da im Fall des Isotopenaustauschs höhere Konzentrationen verwendet wurden, sollte bei diesem Markierungsvorläufer ausgeschlossen werden, dass die geringe Ausbeute von unter 3 % an der zu geringen Markierungsvorläuferkonzentration begründet liegt. Eine Verdopplung der Markierungsvorläuferkonzentration führt nicht zu einer Steigerung der radiochemischen Ausbeute.

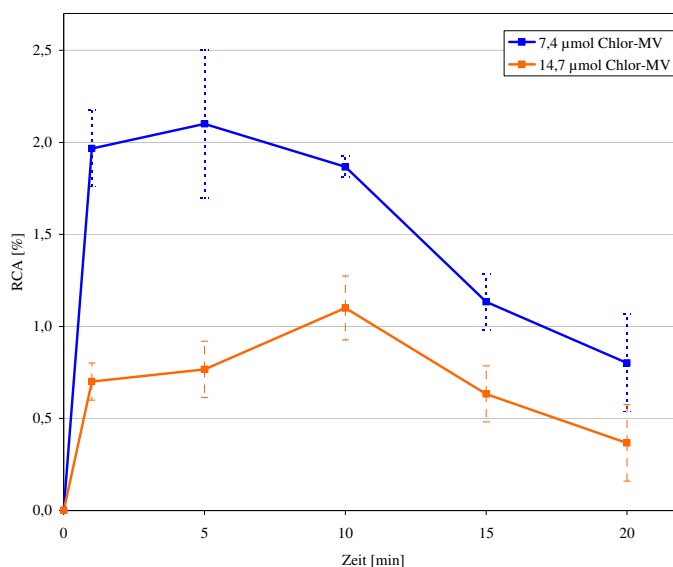


Abb. 42: Einfluss der Markierungsvorläuferkonzentration auf die radiochemische Ausbeute (DMF, 150°C, K₂CO₃/K222)

4.2.3.2 Optimierte Reaktionsparameter zur Darstellung von [¹⁸F]TC07 über einen Chlor-Markierungsvorläufer

[¹⁸F]TC07 konnte über einen Chlor-Markierungsvorläufer in maximal 2,5 % radiochemischer Ausbeute bei 140 °C dargestellt werden. Eine Temperaturverringerung führte zu keiner messbaren Ausbeute, eine Erhöhung der Reaktionstemperatur bewirkte die Zersetzung des Produktes. Der Chlor-Markierungsvorläufer ist daher nicht geeignet, um [¹⁸F]TC07 für weitere Evaluierungszwecke darzustellen.

4.2.4 ¹⁸F-Fluorierung des Brom-Markierungsvorläufers von TC07

Eine bedeutend bessere Abgangsgruppe bei nca-Reaktionen ist im Vergleich zum Chlor das Brom. Ein weiterer Vorteil gegenüber dem Chlor ist die starke Begünstigung von Mikrowellenreaktionen¹¹⁵. Der Vorteil der Mikrowellenreaktion gegenüber der klassischen Temperaturzufuhr über ein Heizbad ist der hohe Energieeintrag in polare Funktionen des Moleküls in relativ kurzer Zeit, so dass man hohe Ausbeuten schon nach kurzer Zeit erreichen und Zersetzungsprozessen zuvor kommen kann.

4.2.4.1 Abhängigkeit der RCA von [^{18}F]TC07 von der Reaktionstemperatur

Analog zum Chlor-Markierungsvorläufer ist in Abb. 43 die ebenfalls schlechte radiochemische Ausbeute von [^{18}F]TC07 zu erkennen. Ein Maximum konnte bei 140 °C nach 1 min Reaktionszeit gemessen werden. Bei Temperaturen von 100 °C und 120 °C wurden hier allerdings Ausbeuten verzeichnet, dies ist auf die bessere Abgangstendenz des Broms gegenüber dem Chlor zurückzuführen. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur um 10 °C auf 150 °C zeigt keine Steigerung der radiochemischen Ausbeute, die etwas höhere Ausbeute von 2,5 % bei 180 °C kann auf statistische Fehler zurückgeführt werden, da bei dieser Temperatur nur eine Reaktionskinetik ($n = 1$) durchgeführt wurde.

Sicherlich interessant ist die deutliche Abnahme der radiochemischen Ausbeute bei 140 °C. Zwar konnte hier nach sehr kurzer Zeit bereits die maximale Ausbeute erreicht werden, allerdings führt offensichtlich starke Zersetzung zu einer raschen Abnahme. Hier scheint nicht nur wie schon beim Isotopenaustausch an [^{19}F]TC07 beobachtet die Zersetzung des Grundgerüsts stattzufinden.

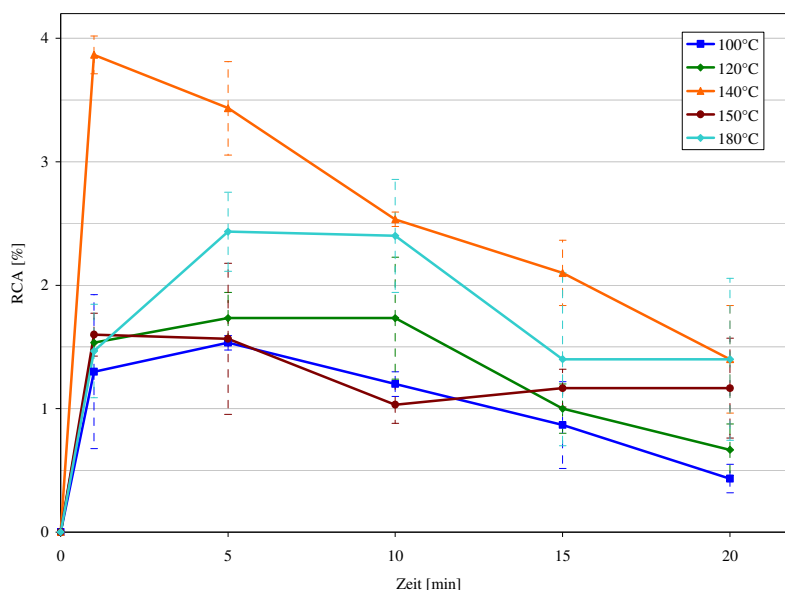


Abb. 43: Abhängigkeit der radiochemische Ausbeute von der Reaktionstemperatur (DMF, 6,6 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)

4.2.4.2 Abhängigkeit der RCA von [^{18}F]TC07 vom verwendeten Lösungsmittel

Es kann zwar durch Variation des Lösungsmittels gezeigt werden, dass DMSO bei hohen Temperaturen etwas später zu ähnlichen radiochemischen Ausbeuten wie unter Verwendung von

DMF führen kann, allerdings ist es fraglich, in wie weit es bei diesen geringen Ausbeuten wirklich ausschlaggebend ist. Ferner wurde bei geringeren Temperaturen nahezu keine Ausbeute erzielt. Mit DMF wurden etwas schlechtere Ausbeuten erzielt (~2,5 %), allerdings war die Ausbeute über den gewählten Temperaturbereich stabiler.

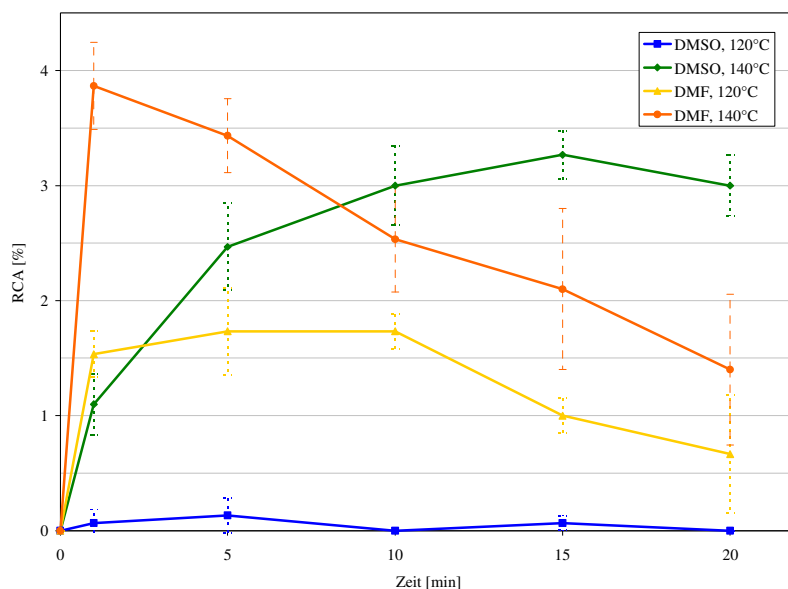


Abb. 44: Einfluss des Lösungsmittels auf die radiochemische Ausbeute von $[^{18}\text{F}]\text{TC07}$ (6,6 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)

4.2.4.3 Abhängigkeit der RCA von $[^{18}\text{F}]\text{TC07}$ von der Markierungsvorläuferkonzentration

Wie bereits im Fall der ^{18}F -Markierung des Chlor-Markierungsvorläufers in unterschiedlichen Vorläuferkonzentrationen zeigt sich auch hier, dass eine Erhöhung der Markierungsvorläuferkonzentration des Brom-Markierungsvorläufers zu geringeren radiochemischen Ausbeuten führt. So können bei einer Reaktionskonzentration von 6,6 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ DMF radiochemische Ausbeuten von 2,7 % nachgewiesen werden. Eine Verdopplung senkt die Ausbeute um etwa 1 %. Diese Tendenz kann jedoch erst bestätigt werden, wenn höhere Ausbeuten erreicht werden können.

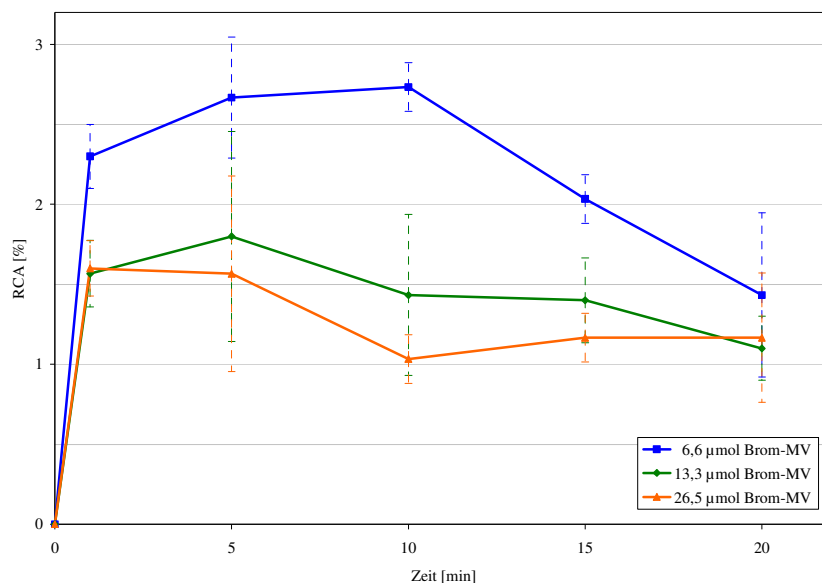


Abb. 45: Einfluss der Markierungsvorläuferkonzentration auf die radiochemische Ausbeute (DMF, 150 °C, K222/K₂CO₃)

4.2.4.4 Abhängigkeit der RCA von [¹⁸F]TC07 im Powertest-Modus der Mikrowelle

Wie schon zu Beginn dieses Abschnittes erwähnt, zeigt sich eine Brom-Abgangsgruppe vielversprechend für eine mikrowelleninduzierte nukleophile Substitution. Durch Einstrahlen von 50 bzw. 100 W mit unterschiedlicher Strahlungsdauer konnten deutlich höhere Ausbeuten erreicht werden. Nach vierminütiger Einstrahldauer von 50 W auf die Reaktionslösung konnte eine radiochemische Ausbeute von über 6 % erzielt werden. Eine Leistung von 100 W zeigte einen schnelleren Anstieg der radiochemischen Ausbeute, allerdings führte das Auftreten von Zersetzung bereits nach einer Minute zu einem nur geringen weiteren Anstieg der Ausbeuten bis zu einer Maximalausbeute von rund 5 % nach 2 min.

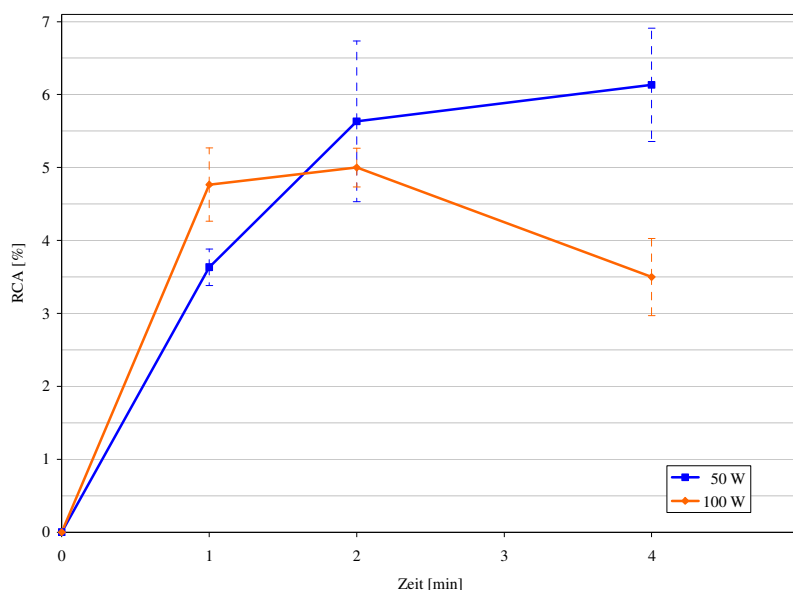


Abb. 46: Markierung im Powertest-Modus der Mikrowelle bei 50 und 100 W (DMF, 6,6 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)

4.2.4.5 Optimierte Reaktionsparameter zur Darstellung von [^{18}F]TC07 über einen Brom-Markierungsvorläufer

Unter Verwendung eines klassischen Heizbades (Ölbad) konnten radiochemische Ausbeuten von 3,9 % nach bereits einer Minute bei 140 °C in DMF erhalten werden. Eine Erhöhung der Markierungsvorläuferkonzentration verringerte die radiochemische Ausbeute.

In einer mikrowelleninduzierten ^{18}F -Markierungsreaktion konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Mikrowellenstrahlung eine deutliche Steigerung der radiochemischen Ausbeute erzeugt werden kann (über 6 % bei 50 W nach 4 min). Die Möglichkeit einer weiteren Optimierung der Mikrowellen-Markierungsreaktion des Brom-Markierungsvorläufers wurde allerdings nicht in Erwägung gezogen, da hierfür die radiochemischen Ausbeuten im Hinblick auf eine spätere Evaluierungen immer noch zu schlecht sind.

4.2.5 ^{18}F -Fluorierung des Nitro-Markierungsvorläufers von TC07

Eine der besten Abgangsgruppen für nukleophile Substitutionen am Aromaten ist die Nitro-Gruppe. Jedoch war diese nukleofuge Gruppe als Nitro-Markierungsvorläufer von TC07 synthe-

tisch sehr schwer zugänglich. Aufgrund der resultierenden schlechten Ausbeuten wurden hier nur 2,6 μmol Substanz (entspricht 1 mg) zur Optimierung der Parameter verwendet.

Es wurden neben den Parametern Temperatur und Lösungsmittel hier auch der Einfluss verschiedener Basen auf die radiochemische Ausbeute untersucht. Ferner konnte auch die radiochemische Ausbeute unter mikrowelleninduzierter Strahlung optimiert werden.

4.2.5.1 Abhängigkeit der RCA von $[^{18}\text{F}]\text{TC07}$ von der Reaktionstemperatur

Zunächst ist bei der Untersuchung des Einflusses der Temperatur festzustellen, dass Temperaturen bis 110 °C keine ausreichende Energiemenge in das Markierungssystem einbringen können. Es werden maximale Ausbeuten von 20 % bei 110 °C erhalten. Durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 120 °C wurde ein sprunghafter Anstieg der radiochemischen Ausbeute beobachtet, Ausbeuten von über 40 % können erreicht werden. Analog zu dem bisherigen Trend ist auch hier zu beobachten, dass bei höherer Abgangstendenz der nukleofugen Gruppe die Zersetzung des Produktes bei niedrigeren Temperaturen einsetzt. Bereits bei 130 °C sind starke Zersetzungsprozesse zu erkennen, dies zeigt sich in dem starken Abfall der radiochemischen Ausbeute in Abb. 47.

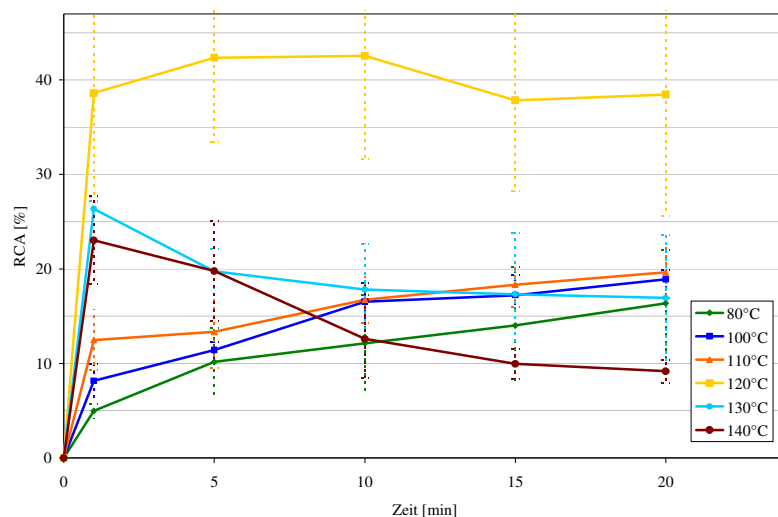


Abb. 47: Abhängigkeit der radiochemische Ausbeute von der Reaktionstemperatur (DMF, 2,4 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)

4.2.5.2 Abhängigkeit der RCA von [^{18}F]TC07 vom verwendeten Lösungsmittel

Betrachtet man den Einfluss des Lösungsmittels auf die radiochemische Ausbeute, kann auch bei diesem Markierungsvorläufer keine nennenswerte Verbesserung der Ausbeute festgestellt werden. Im Vergleich dargestellt (Abb. 48) ist das bisher verwendete Lösungsmittel DMF und das Lösungsmittel DMSO. Das häufig verwendete aprotische Lösungsmittel Acetonitril kam aufgrund seines niedrigen Siedepunktes von 85 °C bei diesen Reaktionstemperaturen nicht verwendet werden.

Es wurden beispielhaft die Temperaturen 110 °C und 130 °C gewählt. Beide Lösungsmittel zeigen bei höherer Temperatur eine bessere radiochemische Ausbeute, jedoch kann bei einer Markierung in DMF bis zu 7 % mehr Ausbeute erwartet werden. Diese Kinetiken wurden nur einmalig ($n = 1$) durchgeführt, da die Tendenz des Lösungsmiteleinflusses hinreichend zu erkennen war.

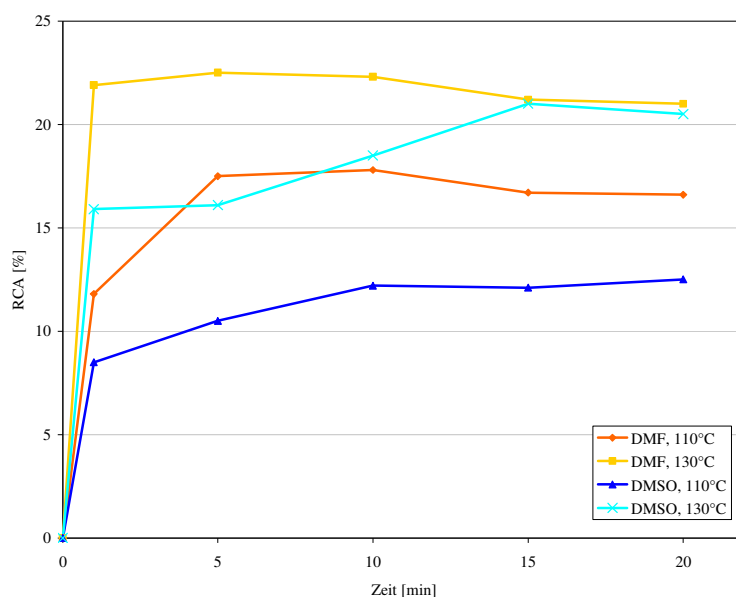


Abb. 48: Einfluss des Lösungsmittels bei verschiedenen Temperaturen auf die radiochemische Ausbeute von [^{18}F]TC07 (2,4 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)

4.2.5.3 Abhängigkeit der RCA von [^{18}F]TC07 von der Markierungsvorläuferkonzentration

Es wurden Markierungsvorläuferkonzentrationen im Bereich von 2,4 μmol bis 24 μmol gewählt. Dies entspricht Einwaagen von 1 mg bis 10 mg Markierungsvorläufer. Allgemein konnte festgestellt werden, dass sich die radiochemische Ausbeute reziprok zur Markierungsvorläuferkonzentration verhält.

So können bei einer Konzentration von 24 μmol gerade 15 % des $[^{18}\text{F}]$ Fluorids zum gewünschten $[^{18}\text{F}]$ TC07 nach 20 min umgesetzt werden. Verringert man die Konzentration auf ein Zehntel, wird ein Umsatz von fast 40 % zu $[^{18}\text{F}]$ TC07 erreicht. Diese ungewöhnliche Beobachtung könnte sich mit den entstehenden Zersetzungsprodukten erklären. Falls diese entstehenden Zersetzungsprodukte die Zersetzung des Produktes fördern oder eine Inaktivierung des $[^{18}\text{F}]$ Fluorids verursacht, könnte dies eine Erklärung darstellen. Allerdings ist der korrekte Mechanismus unbekannt.

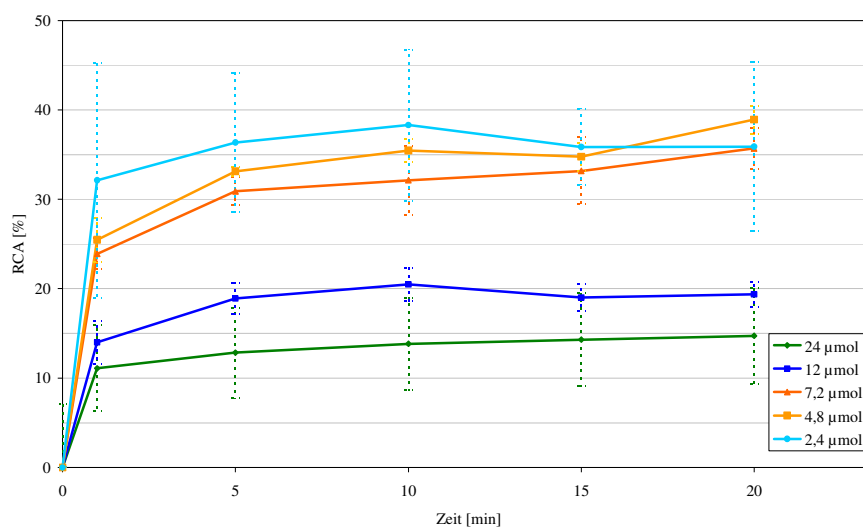


Abb. 49: Einfluss der Markierungsvorläuferkonzentration auf die radiochemische Ausbeute (DMF, 120 °C, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)

4.2.5.4 Abhängigkeit der RCA von $[^{18}\text{F}]$ TC07 von verschiedenen Basenzusätzen

Zur Betrachtung der Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von $[^{18}\text{F}]$ TC07 wurden verschiedene Basensysteme getestet: $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$, $\text{KHCO}_3/\text{K222}$ und Cs_2CO_3 . Bei letzterem ist kein Zusatz von Komplexbildner nötig, da im Sinne des HSAB-Prinzips dass Cäsiumcarbonat zum Einen eine vergleichsweise gute Löslichkeit in Acetonitril aufweist, zum Anderen das Cäsiumkation eine nur schwache Bindung mit dem $[^{18}\text{F}]$ Fluorid eingeht. Ferner wurden je zwei verschiedene Konzentrationen der Basen gewählt.

Generell ist zu sehen, dass K_2CO_3 als zugesetzte Base den positivsten Effekt auf die radiochemische Ausbeute hat, die schwächere Base KHCO_3 jedoch nur geringe Ausbeuten zeigt (um 5 % RCA). Cs_2CO_3 zeigt ebenfalls schlechtere radiochemische Ausbeuten als eine Markierungsreaktion mit K_2CO_3 . Jedoch ist hier zu erkennen, dass die sechsfache Basenkonzentration im Verhältnis zur Markierungsvorläuferkonzentration bedeutend bessere Ausbeuten erzeugt (knapp

20 % nach 5 min) als ein 3:1-Verhältnis von Base zu Markierungsvorläufer (11 % nach 5 min). Auch KHCO_3 zeigt vergleichsweise etwas höhere Ausbeuten bei höherer Basenkonzentration. Betrachtet man sich die Auswirkung der Basenkonzentration auf die radiochemische Ausbeute bei K_2CO_3 ist festzustellen, dass die sechsfache Basenkonzentration zwar zunächst ebenfalls etwas höhere Ausbeuten von 28 % nach einer Minute liefert, allerdings kommt es im weiteren Verlauf zur Abnahme der radiochemischen Ausbeute. Dies kann an beginnenden Zersetzungsreaktionen, bedingt durch die hohe Basenkonzentration liegen, denn im Vergleich dazu zeigt eine dreifache Basenkonzentration keinerlei Zersetzung im Laufe der Reaktionszeit. Des Weiteren könnte die zunehmende Basenstärke die radiochemische Ausbeute positiv beeinflussen.

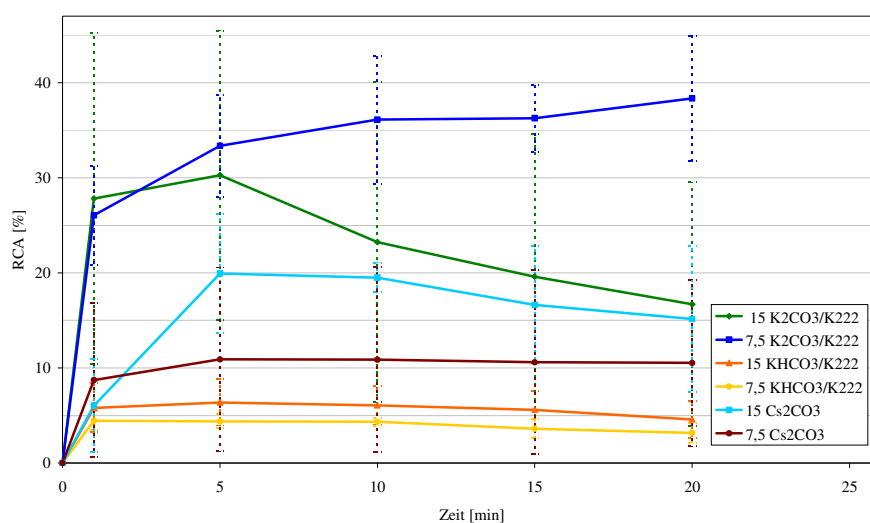


Abb. 50: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von verschiedenen Basen und verschiedener Basenkonzentrationen (DMF, 120 °C, 2,4 μmol MV)

Sinnvoll war nun die Überprüfung der radiochemischen Ausbeuten bei weiteren Basen-Markierungsvorläuferverhältnissen. Hierbei wurde berücksichtigt, dass durch zu hohe Basenkonzentration Zersetzung eintritt, bei zu niedriger Konzentration die Reaktionskinetik zu stark verlangsamt wird. Da ein 3:1-Verhältnis von Base zu Markierungsvorläufer schon einen permanenten Anstieg der radiochemischen Ausbeute auch noch bei 20 min zeigt, sollte die optimale Basenkonzentration theoretisch über dem dreifachen der Markierungsvorläuferkonzentration liegen. Es wurden die Verhältnisse 1,5:1 und 4,5:1 Base zu Markierungsvorläufer gewählt.

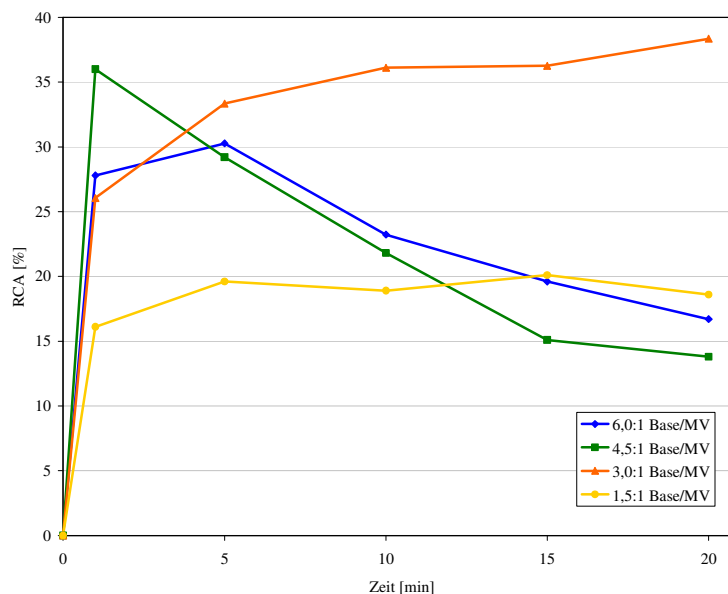


Abb. 51: Abhängigkeit der RCA von dem Verhältnis von $K_2CO_3/K222$ zum Markierungsvorläufer

Es zeigt sich wie in Abb. 51 dargestellt, dass die Verringerung des Verhältnisses $K_2CO_3/K222$ zur Markierungsvorläuferkonzentration auf 1,5:1 eine Verringerung der radiochemischen Ausbeute auf 20 % nach 5 min mit sich bringt. Hier ist keine Zersetzung des Produktes über die Zeit zu erkennen. Bei einem 4,5:1-Verhältnis ist diese Zersetzung wieder an stark abfallenden radiochemischen Ausbeuten mit der Zeit zu erkennen. Allerdings kann hier nach 1 min eine maximale Ausbeute von 36 % erreicht werden.

Insgesamt resultiert aus der Betrachtung der radiochemischen Ausbeute bei verschiedenen Basen und Basenverhältnissen, dass nach einer vorher bestimmten idealen Reaktionsdauer von 5 min ein Verhältnis von 3:1 $K_2CO_3/K222$ zum Markierungsvorläufer zu den besten radiochemischen Ausbeuten führt.

4.2.5.5 Abhängigkeit der RCA von $[^{18}F]TC07$ im Powertest-Modus der Mikrowelle

Analog zum Brom-Markierungsvorläufer wurde der Nitro-Markierungsvorläufer ebenfalls hinsichtlich der radiochemischen Ausbeuten in einer mikrowelleninduzierten Reaktion getestet.

Zu beobachten ist hier die extrem schnelle Umsetzung des $[^{18}F]$ Fluorids zum $[^{18}F]TC07$ in nur 30 sec bis 1 min in radiochemischen Ausbeuten von über 40% bei 75 W. Erkennbar ist die proportional langsamere Reaktionskinetik und schlechtere radiochemische Ausbeute bei geringerem Energieeintrag (25 W und 50 W). Alle durchgeführten Reaktionen zeigen bereits nach kurzer Zeit Zersetzung. Eine weitere Erhöhung des Energieeintrags auf 100 W ergab nach 1 min eine

radiochemische Ausbeute von 25 %, bereits nach zweieinhalb Minuten wurde das Lösungsmittel DMF so stark aufgeheizt, dass die Reaktion abgebrochen werden musste.

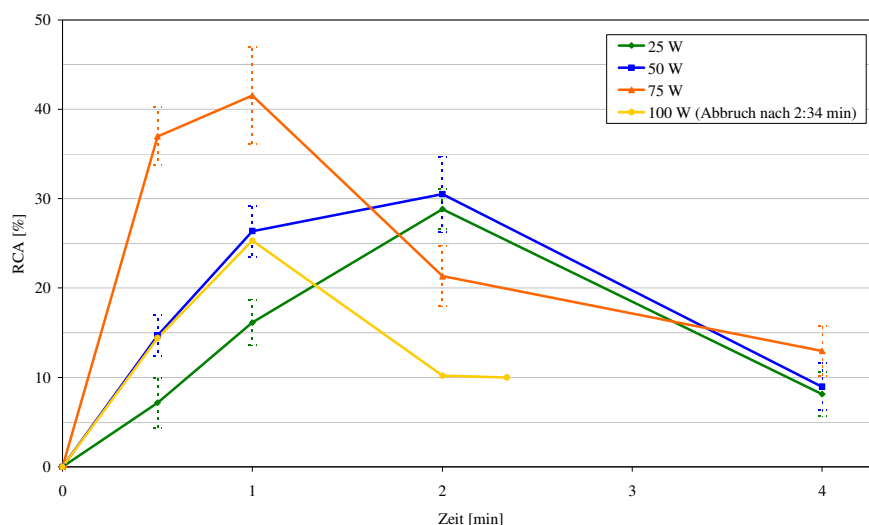


Abb. 52: Markierung im Powertest-Modus der Mikrowelle bei 50 und 100 W (DMF, 2,4 μmol MV, K222/ K_2CO_3)

4.2.5.6 Abhängigkeit der RCA von $[^{18}\text{F}]\text{TC07}$ im Standard-Modus der Mikrowelle

Eine weitere Methode der mikrowelleninduzierten ^{18}F -Markierungsreaktion ist der Standardmodus, bei dem der Energieeintrag gerade so groß ist, dass eine gewählte Maximaltemperatur nicht überschritten wird. Ferner ist es in diesem Programm möglich, die Reaktionslösung über Druckluft zu kühlen. Dadurch muss zum Erhalt der programmierten Maximaltemperatur mehr Energie eingestrahlt werden.

Letztendlich zeigte sich im Rahmen der Fehler ein Einfluss der Kühlung und der damit verbundene höhere Energieeintrag nur in der 80 °C-Reaktionskinetik. Offenbar liegt in diesem Bereich gerade die Energieschwelle der Reaktion. Bei der im Heizbad bereits optimierten Temperatur von 120 °C konnten auch hier die höchsten radiochemischen Ausbeuten von 41 % nach bereits 30 Sekunden analysiert werden. Da bereits nach einer Minute bei diesen Temperaturen ein Rückgang der radiochemischen Ausbeute zu verzeichnen ist, wurde die Temperatur nicht weiter erhöht. Die Reaktionskinetik von 100 °C zeigt einen vergleichsweise langsameren Anstieg und nicht ganz so hohe Ausbeuten (39 % nach 2 min).

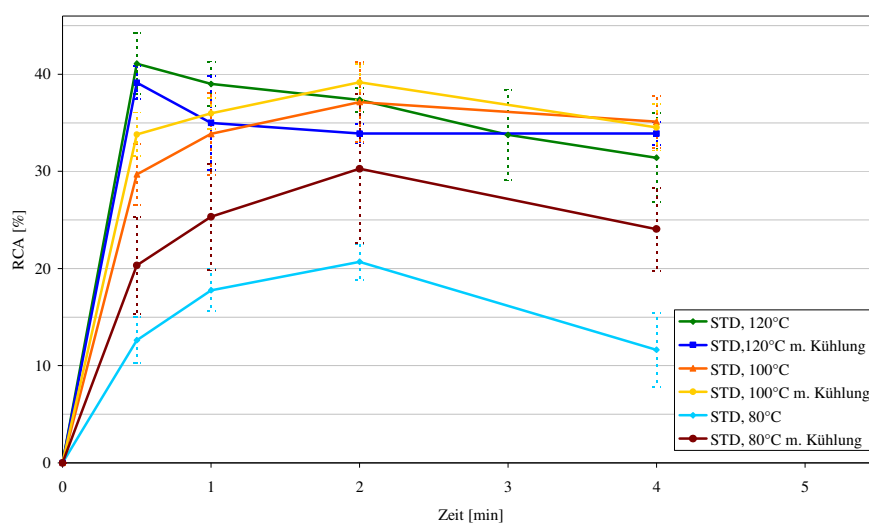


Abb. 53: Markierung im Standardmodus der Mikrowelle bei verschiedenen Temperaturen (DMF, 2,4 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)

Auch im Standard-Modus der Mikrowelle wurde analog zu den Reaktionen im Heizbad der Einfluss verschiedener Basen und Basenkonzentrationen auf die radiochemische Ausbeute untersucht. Hierbei wurden die Basensysteme $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$ und Cs_2CO_3 in den Verhältnissen 3:1 und 6:1 zur Markierungsvorläuferkonzentration getestet. Festzustellen ist, dass sich die radiochemische Ausbeute unter Verwendung von Cs_2CO_3 im Vergleich zur ^{18}F -Markierung im Heizbad halbiert hat (von 20% bzw. 10 % nach 5 min auf 10 % bzw. 5 % nach 1 min in der Mikrowelle). Allerdings sind die Reaktionskinetiken im System $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$ nahezu identisch zu denen im Heizbad. Auch hier ist zu erkennen, dass ein 6:1-Verhältnis von Base zu Markierungsvorläufer in nur 30 Sekunden radiochemische Ausbeuten von 40 % erreicht werden, danach jedoch Zersetzung zu erkennen ist. Wird das Verhältnis 3:1 betrachtet, zeigt sich die Reaktionskinetik deutlich verlangsamt, es können jedoch auch hier radiochemischen Ausbeuten von über 40 % nach 2 min Reaktionszeit erreicht werden bevor dann auch hier Zersetzungsprozesse die Ausbeute verringern. Auch hier wurde jede Kinetik mit $n = 1$ bestimmt, da sich eine eindeutige Tendenz abzeichnete.

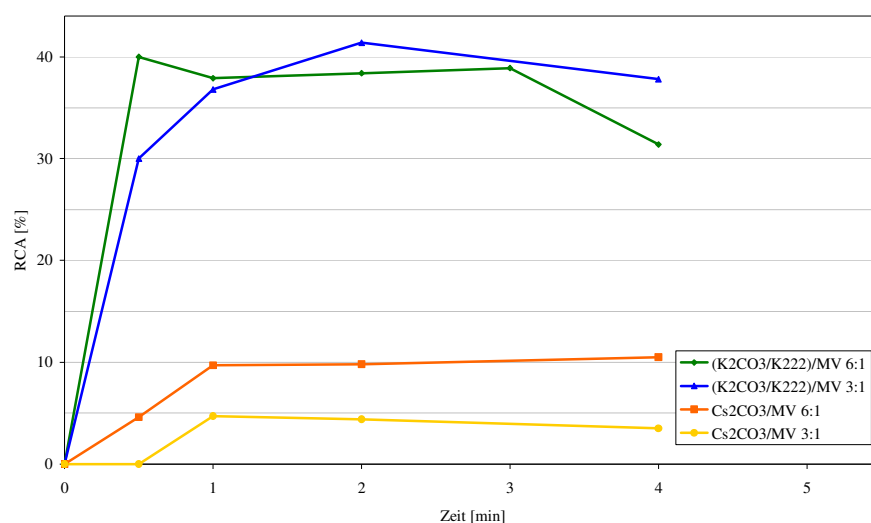


Abb. 54: Einfluss verschiedener Basen und Basenkonzentrationen auf die radiochemische Ausbeute im Standardmodus der Mikrowelle (DMF, 2,4 μ mol MV, 120°C)

4.2.5.7 Optimierte Reaktionsparameter zur Darstellung von [^{18} F]TC07 über einen Nitro-Markierungsvorläufer

Nach systematischer Untersuchung der Parameter Reaktionszeit, Temperatur, Lösungsmittel, Markierungsvorläuferkonzentration, Basensystem, Basen-Markierungsvorläufer-Verhältnis und Untersuchung verschiedener Markierungsmethoden (Heizbad, Mikrowelle PT-Modus und STD-Modus) kann [^{18} F]TC07 in optimierter [^{18} F]-Markierungsreaktion in über 40% radiochemischer Ausbeute dargestellt werden.

Mit allen drei Markierungsmethoden ist die radioaktive ^{18} F-Markierung von TC07 in guten radiochemischen Ausbeuten möglich. Dabei wird bei allen beschriebenen Methoden 2,4 μ mol Nitro-Markierungsvorläufer in 1 ml DMF in einem Verhältnis 3:1 (K₂CO₃/K222)/Markierungsvorläufer eingesetzt. Lediglich die Reaktionszeit und -temperatur müssen der entsprechenden Markierungsmethode angepasst werden.

Methode	RCA	Zeit	Temperatur bzw. Leistung
Heizbad (Ölbad)	42,4 %	5 min	120 °C
Mikrowelle STD	41,4 %	2 min	120 °C
Mikrowelle PT	41,5 %	1 min	75 W

Tab. 4: Radiochemische Ausbeuten bei verschiedenen Markierungsmethoden

4.2.5.8 Abtrennung und Qualitätskontrolle von [^{18}F]TC07

[^{18}F]Fluorid in wässriger Lösung wurde auf einer QMA-Kartusche fixiert und anschließend in einen Wheaton-Reaktor mit Rührfisch mit einer Lösung aus 7,5 μmol Kryptofix und 7,5 μl 1M K_2CO_3 -Lösung in 1 ml Acetonitril eluiert. Es wurde azeotrop unter mehrfacher Zugabe von Acetonitril bei einem anliegenden Vakuum von 400 mbar und einen Stickstoffstrom von 300 ml/min getrocknet. Es wurden 2,4 μmol Nitro-Markierungsvorläufer in 1 ml DMF zugegeben und für 5 min im Ölbad gerührt. Der Abbruch der Reaktion erfolgte mit 1 ml Acetonitril/Wasser (50:50). Prinzipiell ist eine Mikrowellenreaktion ebenfalls denkbar, allerdings war dies mit hohen Aktivitätsmengen über 100 kBq räumlich nicht möglich.

Die komplette Reaktionslösung wurde im Anschluss auf eine semipräparative HPLC aufgegeben und der Produktpeak von [^{18}F]TC07 nach 26 Minuten aufgefangen.

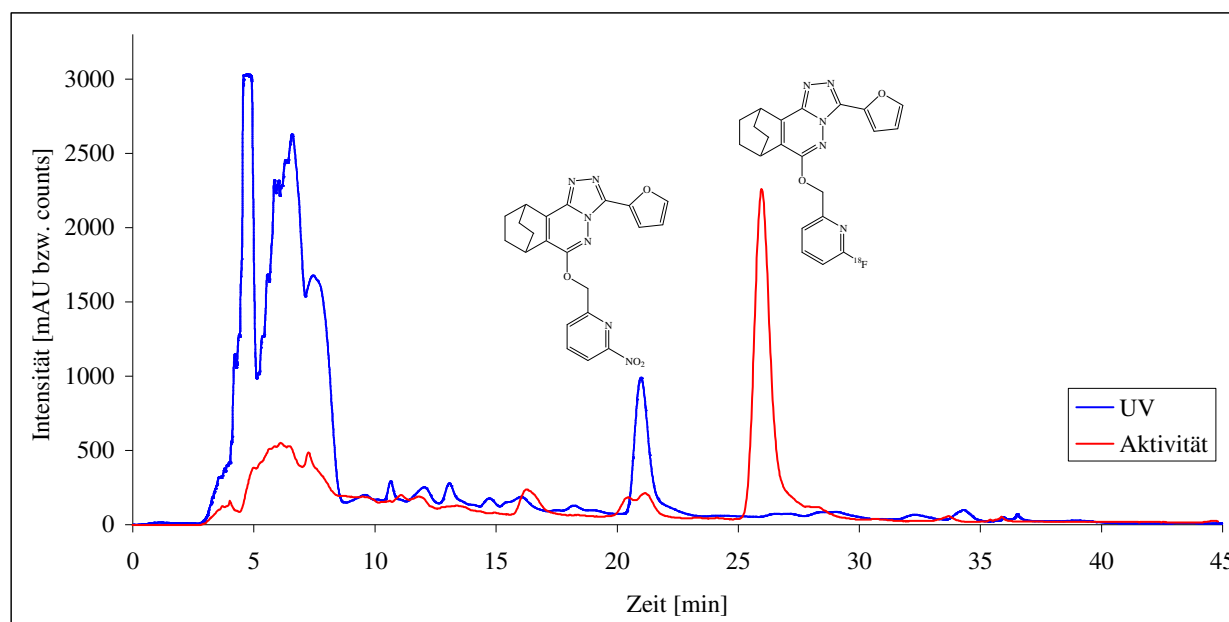


Abb. 55: HPLC-Abtrennung von [^{18}F]TC07

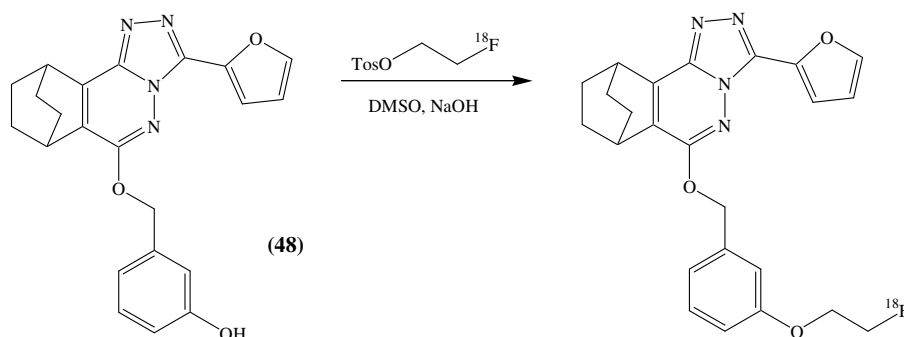
Diese Produktfraktion wurde mit zwei Teilen Wasser versetzt und auf einer C18-Kartusche fixiert. Das Produkt wurde mit 2 ml Diethylether in einen Rundkolben überführt und das Lösungsmittel mittels eines Mini-Rotationsverdampfers im Vakuum entfernt. Der resultierende Feststoff wurde mit isotonischer Kochsalzlösung versetzt, mit Ultraschall behandelt und in ein Eppendorffgefäß überführt.

Hierbei konnten zerfallskorrigierte Ausbeuten von 14,8 % erhalten werden. Die durchschnittliche Syntheszeit betrug 110 min. Es wurden spezifische Ausbeuten von 6,5 GBq/ μmol erreicht. Die Wiederauffindungsrate der Aktivität war mit 91,6 % $\pm$ 13,4 % in einem guten Bereich. Die Verteilung der Aktivität auf die einzelnen Syntheseschritte ist in Tab. 5 wiedergegeben.

	Mittelwert [%] (n = 10)	Standardabweichung [%]
Synthesebeginn	100,0	± 0,0
Vial, leer	6,3	± 3,7
HPLC-Spritze leer	4,1	± 0,3
¹⁸ F-Front	25,4	± 3,8
¹⁸ F-Waste	46,5	± 12,9
C-18-Kartusche leer	0,9	± 0,4
C-18-Kartusche Waste	1,9	± 1,5
[¹⁸ F]TC07	11,6	± 5,7
Wiederauffindungsrate	91,6	± 13,4

Tab. 5: Durchschnittliche Aktivitätsbilanz der Radiosynthese von [¹⁸F]TC07

4.2.6 [¹⁸F]FETos-Markierung des Markierungsvorläufers TC07BOH

Abb. 56: Synthesestrategie zur Darstellung von [¹⁸F]FETC07B

Da Fluorethylierungen mit der prosthetischen Gruppe [¹⁸F]FETos in hohen radiochemischen Ausbeuten durchgeführt werden können, wurde im Rahmen dieser Arbeit neben der Direktfluorierung zum Erhalt des [¹⁸F]TC07 auch eine Fluorethylierung in Erwägung gezogen, nicht zuletzt auch aufgrund der sehr aufwendigen Syntheseroute des Nitro-Markierungsvorläufers von TC07. Hier soll zunächst die synthetisch einfach zugängliche Substanz als [¹⁸F]FETC07B aus dem entsprechenden Markierungsvorläufer TC07BOH dargestellt werden. Die Markierungsstrategie dieser Modellverbindung sollte dann im Anschluss auf die Darstellung des [¹⁸F]FETC07P übertragen werden.

Analog der bisherigen Markierungen wurden jeweils 2,4 μmol äquimolar mit Base versetzt und mit [^{18}F]FETos bei Reaktionstemperaturen von 100 °C, 120 °C und 140 °C umgesetzt.

Deutlich zu erkennen ist die hohe radiochemische Ausbeute von 45-50 % nach 5 min bei allen untersuchten Temperaturen. Neben dem gewünschten Produkt [^{18}F]FETC07B entstand noch ein weiteres, unpolareres Nebenprodukt. Das [^{18}F]FETos wurde vollständig umgesetzt.

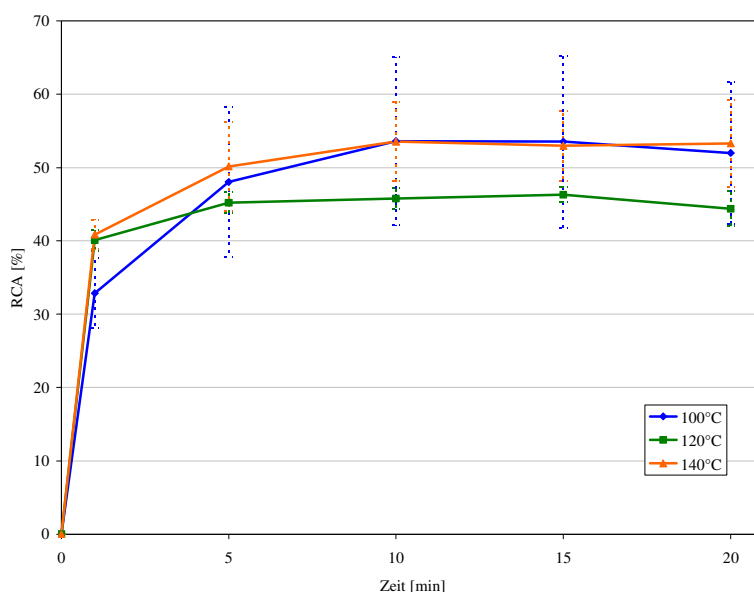


Abb. 57: [^{18}F]FETos-Markierung von TC07BOH bei verschiedenen Temperaturen (DMSO, 2,4 μmol MV, 2,5 μmol NaOH)

Es wäre hier sicherlich interessant, tiefere Reaktionstemperaturen zu untersuchen und durch Optimierung weiterer Parameter noch höhere radiochemische Ausbeuten zu erzielen.

Da jedoch diese Verbindung nur als Modellverbindung für das spätere Pyridin-Derivat [^{18}F]FETC07P dienen sollte, sollte hier lediglich gezeigt werden, dass eine [^{18}F]FETos-Markierung unter den gewählten Parametern prinzipiell möglich ist. Im Verlauf der organischen Synthese des Markierungsvorläufers TC07POH stellte sich allerdings so große präparative Probleme dar, dass kein Markierungsvorläufer zur Darstellung des [^{18}F]FETC07P erhalten werden konnte.

5 Ergebnisse und Diskussion der Evaluierungen

Zunächst erfolgte die Evaluierung der kalten Referenzverbindungen. Hierbei wurden die Lipophilien, Affinitäten und Selektivitäten untersucht, um einen ersten Eindruck über die biologischen Eigenschaften der Liganden TC07-TC12 zu erhalten. Daraus abgeleitet sollte dann der beste Ligand gewählt werden, um dessen radioaktive ^{18}F -Markierung zu etablieren und in weiteren Experimenten zu evaluieren.

Nach erfolgreicher Überführung des gewählten Liganden in eine injizierbare Lösung sollte dieser Radioligand in Autoradiographien und in Tier-PET-Experimenten auf seine biologischen Eigenschaften untersucht werden.

Die Evaluierung der kalten Referenzverbindungen TC07-TC12 im Hinblick auf ihre Affinitäten und Selektivitäten wurde in Kooperation mit der Psychiatrischen Klinik und Poliklinik der Universität Mainz von Herrn Dr. Fabian Debus durchgeführt und von ihm 2008 in seiner Promotionsarbeit¹¹⁶ hinreichend erläutert. Eine Zusammenfassung der relevantesten Ergebnisse ist in Anhang C einsehbar.

5.1 Bestimmung der Lipophilie

Um eine Wirkung im ZNS entfalten zu können, müssen Arzneistoffe in der Lage sein, die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu überwinden. Diese ist eine physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem zentralen Nervensystem (ZNS) und dient dazu, das ZNS vor im Blut zirkulierenden Krankheitserregern und Toxinen, schwankenden Bedingungen und Botenmolekülen des Blutes zu schützen. Um dabei eine Aufnahme von notwendigen Substanzen wie Glukose und Aminosäuren zu gewährleisten, stellen spezifische Transportsysteme eine permanente Versorgung des Gehirnes sicher.

Die BHS ist durch ihren speziellen Aufbau in der Lage, ein Durchdringen von polaren Substanzen fast völlig zu unterbinden. Lipophile Substanzen können bis zu einer gewissen Größe passiv durch die BHS diffundieren. Jedoch bergen zu lipophile Substanzen die Gefahr, vor Durchdringen der BHS in biologischen Membranen und im Plasmaprotein festgehalten zu werden. Somit ist die Durchlässigkeit der BHS eine nicht vernachlässigbare Größe und ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung neuer Radiopharmaka für das ZNS.

Im Hinblick auf eine spätere *in vivo*-Evaluierung der Substanzen TC07-TC12 wurden die Lipophilien dieser Referenzverbindungen über ein HPLC-Verfahren bestimmt. Durch Ermittlung

der Retentionszeit kann über eine vorher bestimmte Eichgerade direkt die Lipophilie der Verbindung vorhergesagt werden.

Allerdings ist die Lipophilie einer Verbindung stets nur als Richtwert zu verstehen, da es ausschließlich den Diffusionsprozess durch die BHS widerspiegelt. Andere Transportprozesse wie zum Beispiel der aktive Transport in die Zelle und aus der Zelle durch Transportsysteme werden hierbei nicht berücksichtigt.

Testsubstanz	Retentionszeit	Lipophilie (logP)
TC07	12,94	2,69 ± 0,01
TC08	12,67	2,66 ± 0,01
TC09	11,81	2,56 ± 0,01
TC10	12,27	2,62 ± 0,01
TC11	14,48	2,85 ± 0,01
TC12	15,03	2,91 ± 0,01

Tab. 6: Retentionszeiten und Lipophilien der Testsubstanzen TC07-TC12

Die in Tab. 6 aufgeführten Lipophilien liegen alle in einem Bereich zwischen 2 und 3 und sollten daher durch Diffusionsprozesse die BHS durchdringen können.

5.2 Evaluierung der ^{18}F -markierten Verbindungen [^{18}F]TC07

Die folgende Evaluierung des Radioliganden [^{18}F]TC07 fand in Kooperation mit der Psychiatrischen Klinik und Poliklinik der Universität Mainz in Zusammenarbeit mit Frau Vanessa Bockhart statt.

5.2.1 Ergebnisse der Autoradiographien

Nachdem [^{18}F]TC07 dargestellt werden konnte, sollte zunächst die Affinität und Selektivität dieses Liganden in Autoradiographien bestätigt werden. Dafür wurden wie auch schon in vorangegangenen Autoradiographien 14 μm dicke, transversale Rattenhirnschnitte verwendet.

Es wurden für alle Hirnschnitte jeweils 3 nM [^{18}F]TC07 verwendet, die Verdrängung des Radioliganden erfolgte mit je 10 μM der kalten TC07 und Zolpidem. Tab. 7 gibt eine Übersicht über die getesteten Inkubationsbedingungen. Die daraus ausgelesenen Daten unterscheiden sich jedoch in keiner Weise voneinander.

Puffer	Waschzeiten [sec]	Inkubationstemperatur
50 mM Tris/Citrat pH 7,4 120 mM NaCl	15 + 15 + 10	Raumtemperatur
50 mM Tris/Citrat pH 7,4 120 mM NaCl	60 + 60 + 30	Raumtemperatur
50 mM Tris/Citrat pH 7,4 120 mM NaCl + 0,01 w/v Triton X-100	15 + 15 + 10	Raumtemperatur
50 mM Tris/Citrat pH 7,4 120 mM NaCl + 0,01 w/v Triton X-100	60 + 60 + 30	Raumtemperatur
50 mM Tris/Citrat pH 7,4 120 mM NaCl + 0,01 w/v Triton X-100	60 + 60 + 30	auf Eis
50 mM Tris/Citrat pH 7,4 120 mM NaCl + 100µl/ml BSA	15 + 15 + 10	Raumtemperatur
50 mM Tris/Citrat pH 7,4 120 mM NaCl + 100µl/ml BSA	60 + 60 + 30	Raumtemperatu
50 mM Tris/Citrat pH 7,4 120 mM NaCl + 100µl/ml BSA	60 + 60 + 30	auf Eis
10 mM Tris/HCl pH 7,4 0 nM NaCl	5 + 5 + 5	Raumtemperatur
10 mM Tris/HCl pH 7,4 0 nM NaCl	15 + 15 + 10	Raumtemperatur
50 mM Tris/HCl pH 7,4 120 mM NaCl	5 + 5 + 5	Raumtemperatur
50 mM Tris/HCl pH 7,4 120 mM NaCl	15 + 15 + 10	Raumtemperatur
50 mM Tris/HCl pH 7,4 200 mM NaCl	5 + 5 + 5	Raumtemperatur
50 mM Tris/HCl pH 7,4 200 mM NaCl	15 + 15 + 10	Raumtemperatur

Tab. 7: Übersicht über die getesteten Inkubationsbedingungen der Autoradiographien

Die Resultate dieser Experimente sind hier an einer repräsentativen Abbildung dargestellt, jedes Experiment wurde mit $n \geq 3$ durchgeführt. Die erhaltenen Bilder sind in Falschfarbe mit Dunkelblau als Hintergrundfarbe und Rot als maximale Signalintensität abgebildet. Abb. 58 zeigt eine repräsentative Autoradiographie des Liganden [^{18}F]TC07.

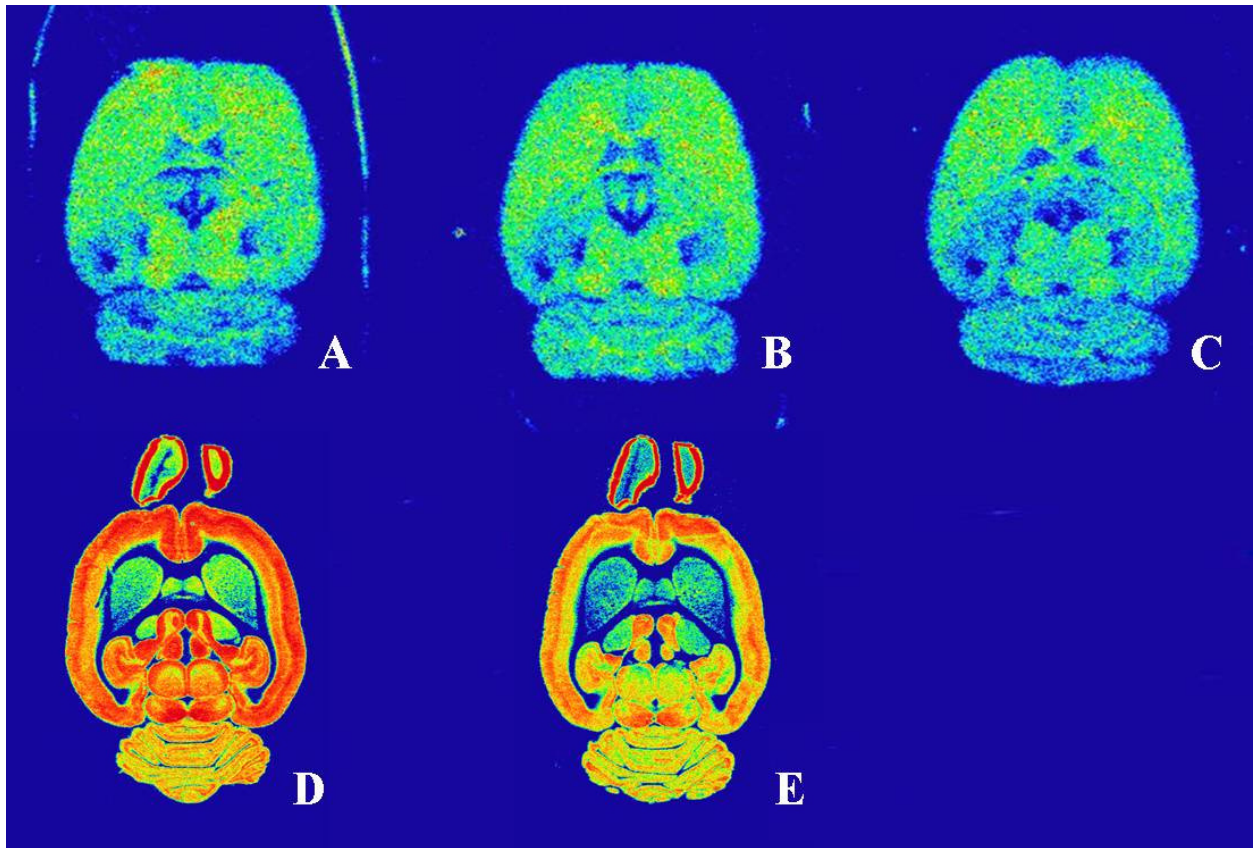


Abb. 58: Transversale Autoradiographien auf 14 µm Rattenhirnschnitten mit A: totale Bindung , B: spezifische Bindung und C: unspezifische Bindung von je 3nM [^{18}]TC07; im Vergleich dazu D: totale Bindung von 6 nM [^{3} H]Ro15-4513 und E: 6 nM [^{3} H]Ro15-4513 nach Zugabe von 512 nM von kaltem TC07

Visuell ist hier keine Anreicherung in irgendeiner spezifischen Gehirnregion zu erkennen. Auch ein Vergleich der Aktivitätsmengen in spezifischen Hirnregionen durch Legen von ROIs (Regions Of Interest) zeigte keine spezifische Anreicherung. Grund hierfür ist die sehr hohe unspezifische Bindung des Radioliganden, die eine Auswertung der Daten nahezu unmöglich macht. Dies war nicht zu erwarten, da die Autoradiographien der Verdrängung des Radioliganden [^{3} H]Ro15-4513 mit der kalten Referenzverbindung TC07 sehr gute Ergebnisse zeigten (Abb. 58).

Ein Grund hierfür kann eine Bindung des Liganden TC07 an weitere Rezeptorsysteme oder im Gehirn befindliche Proteineinheiten sein. Diese unspezifische Bindung kann in einem Verdrängungsversuch nicht nachgewiesen werden, da man durch den gewählten Radioliganden nur die Abnahme dessen selektiver Bindung betrachtet. Das weitere Bindungsverhalten einer kalten Substanz kann durch Verdrängungsversuche an Autoradiographien mit selektiven Radioliganden nicht nachgewiesen werden.

5.2.2 Ergebnisse der Tier-PET-Studie

Trotz dieser Ergebnisse in den vorhergegangenen Autoradiographien wurden PET-Scans durchgeführt.

Dafür wurden 250 g schwere, 8 Wochen alte Sprague-Dawley Ratten mit Isofluran narkotisiert, die Applikation des Radiotracers [^{18}F]TC07 erfolgte intravenös in einen Katheter. Es wurden dynamische Scans über einen Zeitraum von 60 min durchgeführt.

Deutlich zu erkennen sind die Harderschen Drüsen. Im Gehirn ist visuell keine Aktivitätsanreicherung zu erkennen.

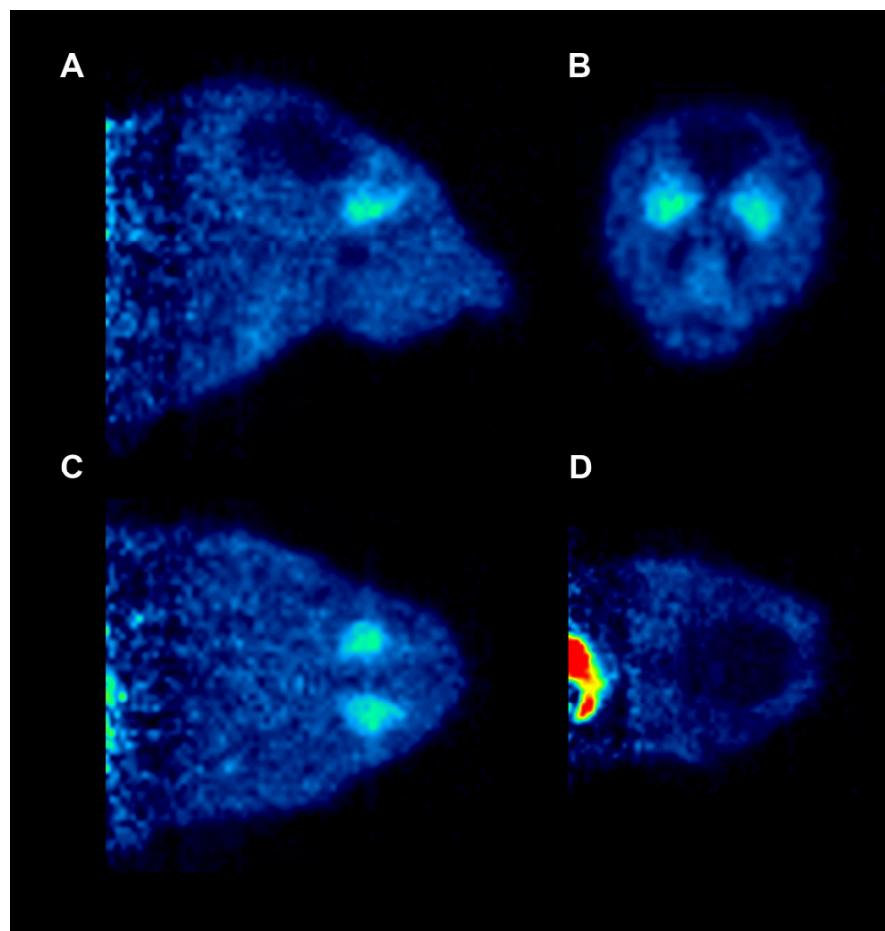


Abb. 59: PET-Bilder von [^{18}F]TC07; A sagittal, B coronal, C transversal, jeweils auf Höhe der Harderschen Drüsen und D transversal auf Höhe des Gehirnes

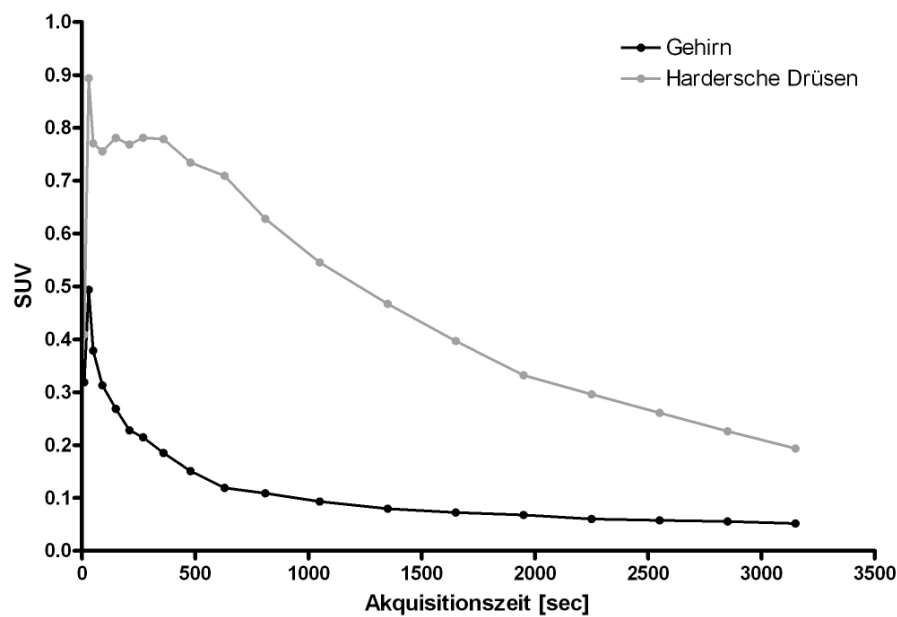


Abb. 60: Repräsentative Zeit-Aktivität-Kurve der PET-Aufnahme aus Abb. 59

Die Resultate der aufgenommenen Zeit-Aktivitäts-Kurve (Abb. 60) zeigen eine maximale Aufnahme von 0,5 % der injizierten Aktivität direkt bei Anfluten der Aktivität im Gehirn. Danach erfolgt ein schnelles Auswaschen und nach etwa 17 min sind lediglich 0,1 % der injizierten Aktivität im Gehirn nachweisbar. Dies ist zu gering, um genaue Aussagen über die Verteilung des Liganden [^{18}F]TC07 im Gehirn zu treffen. Allerdings konnte bereits in Publikationen nachgewiesen werden, dass das bereits erwähnte α_1 -selektive [^{11}C]Zolpidem ebenfalls keine spezifische Anreicherung im Gehirn bei PET-Experimenten zeigte⁴⁷. Eine Parallele kann hier also nicht ausgeschlossen werden.

Aufgrund der sehr guten Autoradiographien *in vitro*- und der *ex vivo*-Verdrängungsexperimente der kalten Referenzverbindungen stellt sich hier die Frage, warum der ^{18}F -markierte Ligand keine bzw. eine nur sehr schwache Bindung im Gehirn aufweist.

Die Autoradiographien von [^{18}F]TC07 zeigen zwar sehr hohe unspezifische Bindung, aber sie zeigen eine Anreicherung von Aktivität auf den Hirnschnitten. Ferner konnte das in Anhang E beschriebene *ex vivo*-Experiment mit der kalten Referenzverbindung TC07 nachgewiesen werden, dass die Blut-Hirn-Schranke überwunden werden kann.

Folgende Gründe der geringen Aufnahmen von [^{18}F]TC07 im Gehirn können formuliert werden:

- Höhere Konzentrationen im *ex vivo*-Experiment führten zu höheren Anflutungskonzentrationen im Gehirn, 5 mg/kg [^{19}F]TC07 im *ex vivo*-Experiment, nca [^{18}F]TC07 im nanomolaren Bereich

- Zu hohe Metabolisierungsraten im Blut, es ist nach sehr kurzer Zeit kein intaktes [^{18}F]TC07 mehr vorhanden
- Zu hohe Aufnahme des Radioliganden in andere Organe (Leber, Niere)
- Interaktion der GABA_A-Benzodiazepinbindungsstellen durch das verwendete Betäubungsmittel Isofluran, die Anreicherung von [^{18}F]TC07 ist dadurch erniedrigt
- [^{18}F]TC07 wird als P-Glykoproteinsubstrat oder durch ein anderes Effluxsystem direkt wieder aus den Zellen ausgeschleust

Diese aufgeführten Überlegungen sollen in weiteren Experimenten überprüft werden.

5.2.3 Metabolismus von [^{18}F]TC07 im Blut

Um herauszufinden, ob es *in vivo* zur Ausbildung aktiver Metaboliten während der Aufnahme von [^{18}F]TC07 kommt, wurde dessen Metabolismus untersucht.

Während der Studien zur Organverteilung (Kapitel 5.2.4) wurden nach Dekaptation der Mäuse nach 3 min bzw. 10 min Blutproben gesammelt und heparisiert.

Die dünnschichtchromatographische Vermessung des Vollblutes, des isolierten Plasmas und des aus Plasma gewonnenen Serums aller Proben zeigt eine relativ hohe Stabilität des Liganden [^{18}F]TC07 im Blut. Wie in Abb. 61 zu erkennen, sind auch nach 10 min im Serum noch über 50 % des Liganden intakt.

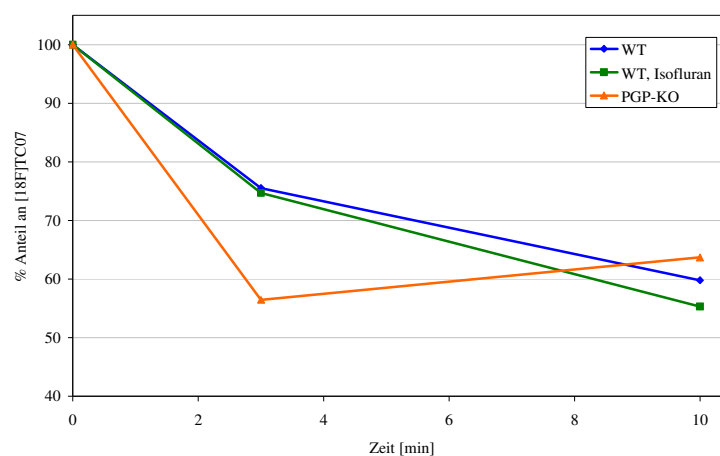


Abb. 61: Ergebnis der Metabolitenstudie von [^{18}F]TC07 im Serum; WT: Wildtyp-Maus; WT, Isofluran: Wildtyp-Maus unter Isofluranbetäubung; PGP-KO: PGP-knockout-Maus

Es konnten zwei aktive Metaboliten bestimmt werden, ein sehr polarer Metabolit M₁ ($R_f = 0,0$) und ein Metabolit M₂ ($R_f = 0,17$) mit etwas polareren Eigenschaften als [^{18}F]TC07 ($R_f = 0,40$).

5.2.4 Organverteilung

Aufgrund der schlechten Ergebnisse in der PET wurde in diesem Experiment untersucht, ob das Betäubungsmittel Einfluss auf die Bindung des Liganden [^{18}F]TC07 haben könnte oder das [^{18}F]TC07 als P-Glykoproteinsubstrat anzusehen ist. Hierzu wurden Wildtyp-Mäusen mit und ohne Betäubung und PGP-knockout-Mäusen [^{18}F]TC07 i.p. injiziert. Nach definierten Zeitpunkten (3 min und 10 min) wurden die Mäuse dekaptiert, die zu untersuchenden Organe Blut, Gehirn, Niere und Leber herauspräpariert, homogenisiert und im Gamma-Detektor vermessen. Abb. 62 zeigt sehr deutlich, dass bei einer Betrachtung der Verteilung der Aktivität pro Gramm Organ die Verteilungsverhältnisse im Rahmen der statistischen Verteilung bei Mäusen liegen. Die Vermutung, dass eines der Organe eine überdurchschnittliche Anreicherung des [^{18}F]TC07 zeigt, ist demnach auszuschließen.

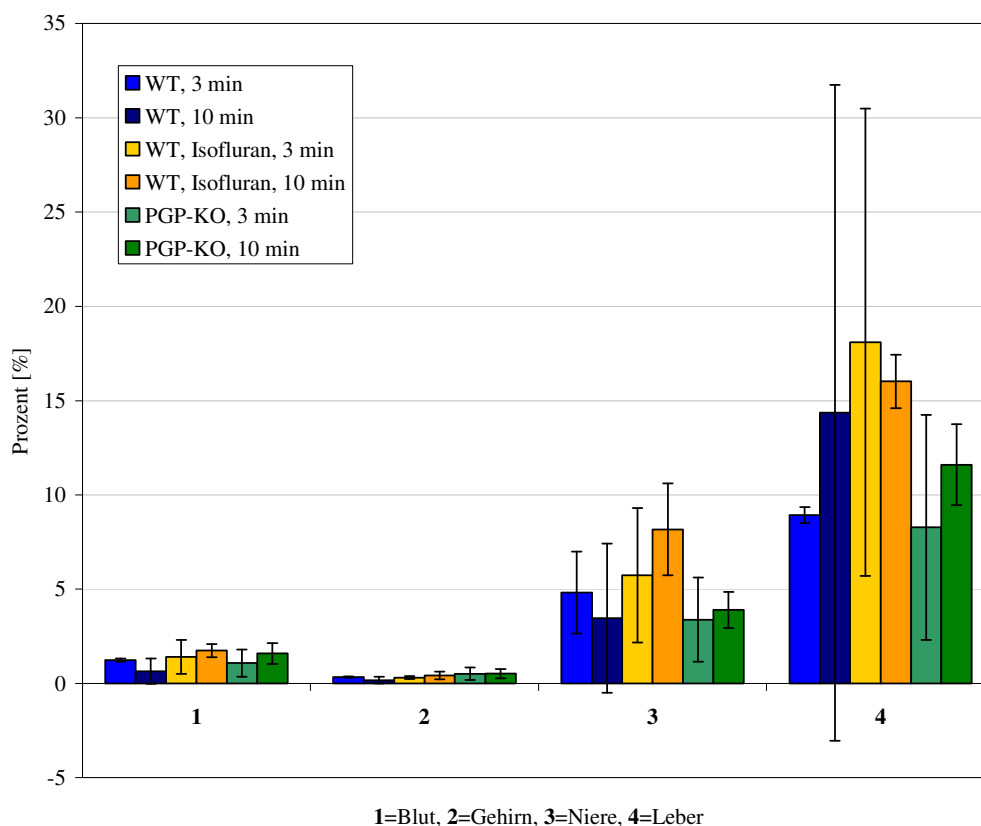


Abb. 62: Organverteilung von [^{18}F]TC07 in 1: Blut, 2: Gehirn, 3: Niere, 4: Leber nach 3 min, respektive 10 min; dabei sind WT: Wildtyp-Maus; WT, Isofluran: Wildtyp-Maus unter Isofluranbetäubung; PGP-KO: PGP-knockout-Maus

Um einen Eindruck über den Einfluss des Betäubungsmittels und des P-Glykoproteins auf die Bindung von [^{18}F]TC07 zu erhalten, ist in Abb. 63 graphisch die Verteilung der Aktivität im Gehirn über die Zeit dargestellt:

- Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Anreicherung des Radioliganden in Mäusen mit und ohne Betäubung festzustellen.
- Es ist ein Unterschied zwischen den Wildtyp-Mäusen und den PGP-knockout-Mäusen festzustellen.

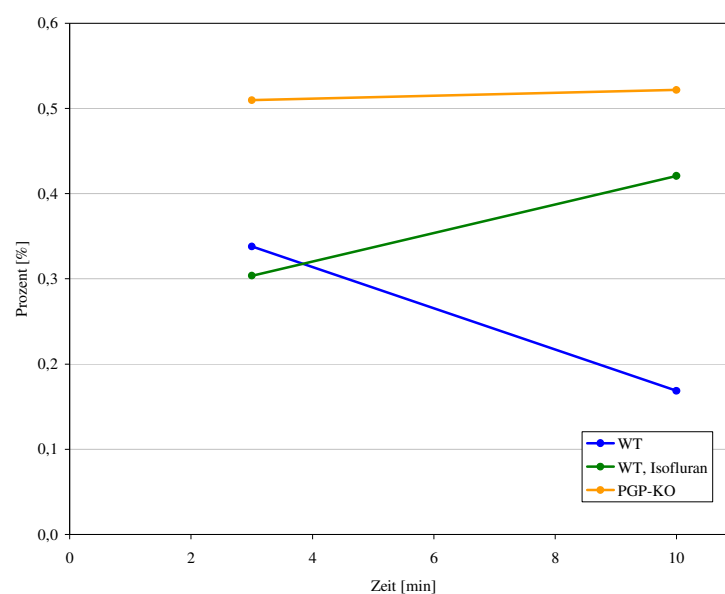


Abb. 63: Verteilung von [^{18}F]TC07 im Gehirn bei 3 min, respektive 10 min; dabei sind WT: Wildtyp-Maus; WT, Isofluran: Wildtyp-Maus unter Isofluranbetäubung; PGP-KO: PGP-knockout-Maus

Um die Relevanz dieses Unterschiedes wirklich beurteilen zu können, muss eine größere Versuchszahl angestrebt werden (in diesem Experiment: $n = 2$). Allerdings ist dies ein erster Hinweis darauf, dass die Substanz [^{18}F]TC07 als mögliches P-Glykoproteinsubstrat oder als Substrat für ein anderes Effluxsystem dient.

Zur Bestätigung, dass [^{18}F]TC07 als mögliches P-Glykoproteinsubstrat in Betracht gezogen werden kann, wurde ein weiteres PET-Experiment durchgeführt. Dafür wurden sowohl Wildtypmäuse als auch PGP-knockout-Mäuse mit Isofluran narkotisiert, die Applikation des Radiotracers [^{18}F]TC07 erfolgte i.p.. Es wurden dynamische Scans über einen Zeitraum von 30 min durchgeführt.

Deutlich zu erkennen sind auch hier die Harderschen Drüsen. Es kann zunächst visuell bestätigt werden, dass sich vorhandenes P-Glykoprotein negativ auf eine Radioligandaufnahme im Gehirn auswirkt.

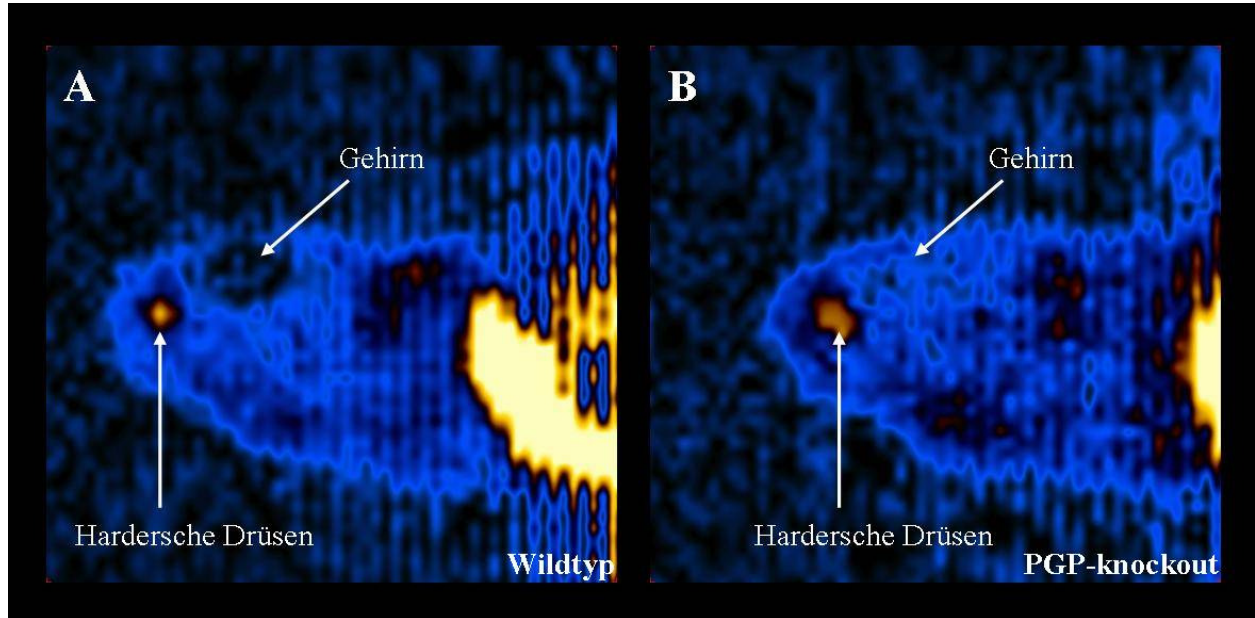


Abb. 64: Sagittale PET-Bilder von $[^{18}\text{F}]\text{TC07}$; sagittal jeweils auf Höhe der Harderschen Drüsen und des Gehirnes, A Wildtyp-Maus, B: PGP-knockout-Maus

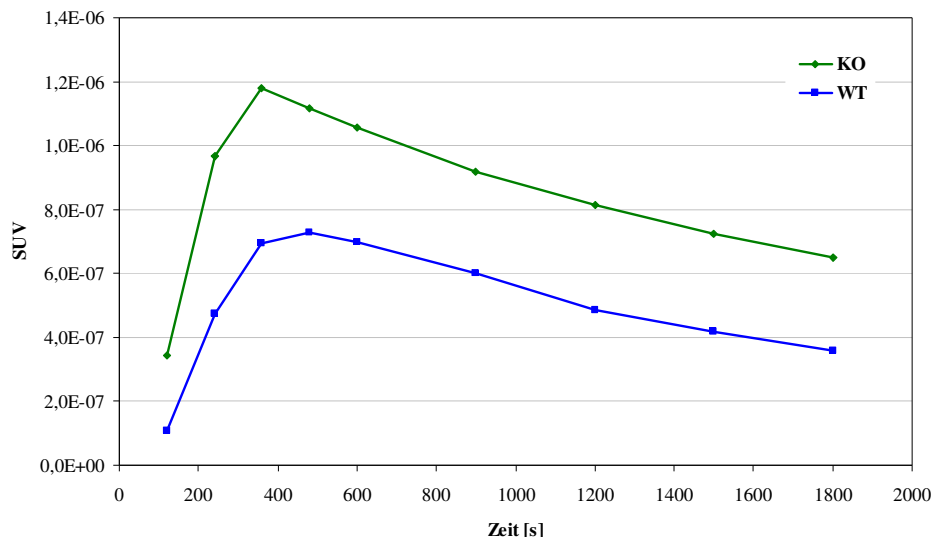


Abb. 65: Repräsentative Zeit-SUV-Kurve der PET-Aufnahme aus Abb. 64

Die in Abb. 65 dargestellte zeigt einen standardisierten Aufnahmewert (SUV, Standard Uptake Value), der eine zerfalls- und gewichtsabhängige Quantifizierung von Regionen mit gesteigerter Aktivitätsaufnahme ermöglicht.

Es ist in beiden Kurvenverläufen keine spezifische Anreicherung von [^{18}F]TC07 im Gehirn zu erkennen. Ersichtlich ist jedoch eine generell höhere Aktivitätsaufnahme im Gehirn der PGP-knockout-Maus. Damit kann belegt werden, dass [^{18}F]TC07 als schwaches P-Glykoproteinsubstrat anzusehen ist. Die Effekte weiterer Effluxsysteme sind nicht auszuschließen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien und Geräte wurden größtenteils von den Firmen Acros Organics, Aldrich und Merck bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Getrocknete Lösemittel wurden über Molekularsieb gelagert. Die verwendeten Chemikalien sind nachfolgend aufgelistet.

Acetonitril, über Molensieb	Fluka	
AIBN	Acros Organics	98%
2- Amino-6-methylpyridin	Alpha-Aesar	99%
Ammoniaklösung	Riedel-de-Haen	ca. 25%
Ammoniumfluorid	Aldrich	ACS reagenz, >98.0%
Benzol	Merck	p.a.
Benzonitril	VWR	≥99%, zur Synthese
Benzylalkohol	Aldrich	trocken, 99.8%
Benzylbromid	Aldrich	reagenz grade, 98,0%
Bicyclo[2.2.2]oct-2-en-2,3-dicarboxy- anhydrid	Lancaster	98%
2- Brom-2-methylpropan	Aldrich	98%
1,2- Bromfluorethan	ABCR	>99%
N- Bromsuccinimid	Acros Organics	99%
tert.- Butyldiphenylchlorsilan	Acros Organics	98%
Celite 545	Merck	Korngr. 0.02-0.1 mm
2- Chlor-6-methylpyridin	Acros Organics	98%
Chloroform	Acros Organics	p.a.
3- Chlorperbenzoesäure	Alpha aesar	tech., ca70-75%
DC-Platten, Kieselgel	Merck	60F(254)
2,6- Dibrompyridin	Fluka	purum, >97%
Dichlormethan	Acros Organics	p.a.
Diethylether	Fischer Scientific	analyt. reagenz grade
Dimethylformamid, über Molensieb	Fluka	>99.5%
Dioxan	Fluka	
Eisessig	Merck	p.a.
Essigsäureanhydrid	Acros Organics	
Ethanol	Merck	reinst
Ethylacetat	Acros Organics	p.a.
Ethylchlorformiat	Merck	

	Ethylchlorformylformiat	Acros Organics	≥98%, zur Synthese
2-	Fluor-6-methylpyridine	Fluorochem	
	Furan-2-carbonsäurechlorid	VWR	≥98%, zur Synthese
	HCl	Fisher Scientific	37%
n-	Hexan	Acros Organics	p.a.
	Hydraziniumhydroxid	VWR	zur Synthese
3-	Hydroxybenzylalkohol	Aldrich	99%
	Hydroxylamin-hydrochlorid	Merck	p.a.
	Imidazol	Merck	zur Synthese
	Isobutyronitril	VWR	≥98%, zur Synthese
	Isopropylalkohol	Aldrich	99.7%
	K ₂ (SO ₄)	Merck	
	Kaliumcarbonat	Fisher Scientific	anhydrous
	Kaliumpermanganat	Acros Organics	98%
	LiAlH ₄	Merck	
	Lithiumbromid	Riedel de Haen	puriss., >99%
	Magnesiumsulfat	Merck	p.a.
	Methanol	VWR	p.a.
2-	Methoxybenzoesäure	Aldrich	99%
2-	Methoxy-benzoylchlorid	Aldrich	97%
	Methyliodid	Lancaster	99%
	Methyltrioctylammoniumchlorid (Aliquat336®)	VWR	zur Synthese
4 Å	Molekularsieb	Merck	Kugeln (1,7-2,4 mm)
	NaSO ₄	Acros Organics	anhydrous, 98%
	Natriumacetat Trihydrat	VWR	zur Analyse
	Natriumhydrid	Aldrich	trocken, 95%
	Natriumhydrid, 60%ige Dispersion in Mineralöl	Acros Organics	
	Natriumhydrogencarbonat	Fisher Scientific	
	Natriumhydroxid	Acros Organics	98.5%
	N-Chlorsuccinimid	Acros Organics	98%
	Oxalylchlorid	Aldrich	reagent grade, 98%
	Peressigsäure	Merck	38-40%
	Petrolether	Merck	Siedebereich 40-80°C
	Phosphorylchlorid	VWR	≥99%, zur Synthese
	Pyridin-3-carbonitril	VWR	≥98%, zur Synthese
	Pyridin-4-carbonitril	VWR	≥98%, zur Synthese

Schwefelsäure, konz.	Riedel-de-Haen	95-97%
Schwefelsäure, rauchend (65% SO ₃)	Fischer Scientific	reinst
Silicagel	Acros Organics	0.060-0.200 mm, 60A
Tetrahydrofuran über Molensieb	Acros Organics	>99.8%
Toluol	Merck	p.a.
Triethylamin, 4.2M in Ethanol	Fluka	p.a.
Trimethylamin-Lösung	Fluka	31-35% in Ethanol
Wasserstoffperoxid	Merck	30%, zur Synthese
Xylol	Merck	p.a.

Die dünnschichtchromatographischen Analysen wurden auf kieselgelbeschichteten Aluminiumfolien 60 F₂₅₄ der Firma Merck durchgeführt, die Detektion erfolgte bei 254 nm und 365 nm. Säulenchromatographische Trennungen erfolgten mit Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma Acros Organics.

Die HPLC-chromatographischen Trennungen erfolgten mit Säulen der Typen LiChrospher100 RP 18-5µ EC und Luna RP 18-5µ EC.

Die Charakterisierung der nicht-radioaktiven Verbindungen erfolgte mit Hilfe der ¹H-, ¹³C-NMR-Spektroskopie und Massenspektroskopie. Hierbei wurden DMSO-d₆ und CDCl₃ als Lösungsmittel verwendet. Die Analysen der radioaktiven Verbindungen erfolgten mittels Radio-HPLC und Radio-DC.

¹H-NMR-Spektroskopie: 300 MHz-FT-NMR-Spektrometer AC 200 der Firma Bruker

¹³C-NMR-Spektroskopie: 75.5 MHz-FT-NMR-Spektrometer AC 200 der Firma Bruker

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

Mikrowelle: Discover single-mode Mikrowellen Kavität der Firma CEM,
Infrarotsensor zur Temperaturkontrolle, Piezo-Druckzelle

HPLC-Systeme:

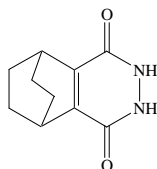
- I) HPLC-System der Firma Sykam, Pumpen S 1100, Hochdruckinjektionsventil S 9010, UV Detektor K-2501 von Knauer
- II) HPLC-System der Firma Sykam, Pumpen S 1100, Hochdruckinjektionsventil S 9010, UV Detektor K-2501 von Knauer, Aktivitätsdetektor Berthold Flowstar LB 513

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

6.2 Synthese der Referenzverbindungen und Markierungsvorläufer

6.2.1 Darstellung des Grundkörpers A

6.2.1.1 4,5-Diazatricyclo[6.2.2.2,7]dodeca-2(7)-en-3,6-dion (1**)**



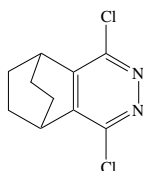
In einer Lösung aus 9,13 g (197,0 mmol) Natriumacetat-trihydrat und 3,26 g (197,0 mmol equiv.) Hydrazinhydrat in 500 ml 50 %iger Essigsäure wurden 10,0 g (56,0 mmol) Bicyclo[2.2.2]oct-2-ene-2,3-dicarboxysäureanhydrid gelöst. Die Reaktionslösung wurde unter Rückfluss für 16 Stunden gerührt und anschließend abgekühlt. Der ausfallende Feststoff wurde abgesaugt, mit Wasser und Diethylether gewaschen und im Hochvakuum über Nacht getrocknet.

Ausbeute: 10,72 g (55,8 mmol, 99,6 % d.Th) weißer, flockiger Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm]: 11.70 (bs, 1H, OH), 10.80 (bs, 1H, NH), 3.15 (s, 2H), 1.67 (d, 4H, $J=7.6$ Hz), 1.14 (d, 4H, $J=7.2$)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 192,2 (100,00 $[\text{M}]^+$), 193,3 (7,30 $[\text{M}]^+$)

6.2.1.2 3,6-Dichlor-4,5-diazatricyclo[6.2.2.2,7]dodeca-2(7),3,5-trien (2**)**



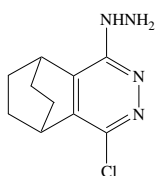
11,0 g (56 mmol) 4,5-Diazatricyclo[6.2.2.2,7]dodeca-2(7)-en-3,6-dion (**1**) wurden in 57 ml Phosphorylchlorid gelöst und unter Rückfluss für 14 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und zweimalig azeotrop mit Toluol getrocknet. Der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst, vorsichtig durch Zugabe von festem und gelöstem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und nochmals mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute: 12,54 g (55 mmol, 99,0 % d.Th) weißer Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 3.44 (s, 2H), 1.89 (d, 4H, $J=8.4$ Hz), 1.35 (d, 4H, $J=8.4$)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 228,2 (100,00 $[\text{M}]^+$), 229,2 (9,83 $[\text{M}]^+$), 230,2 (60,55 $[\text{M}]^+$), 231,2 (5,30 $[\text{M}]^+$), 232,2 (10,04 $[\text{M}]^+$)

6.2.1.3 3-Chlor-6-hydrazin-4,5-diazatricyclo[5.2.2,7]dodeca-2(7),3,5-trien (3)



Zu einer Lösung von 17,04 g (339,0 mmol) Hydrazinhydrat in 180 ml Ethanol wurden 12,09 g (53,0 mmol) 3,6-Dichlor-4,5-diazatricyclo[6.2.2,2,7]dodeca-2(7),3,5-trien (**2**) unter Rühren eingebracht und unter Rückfluss für 18 Stunden gerührt. Die Lösung wurde abgekühlt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der zurückbleibende Feststoff wurde mit Wasser versetzt und mit 5 M HCl auf pH 1-2 angesäuert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert, mit festem K_2CO_3 alkalisch gestellt und erneut mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute: 11,23 g (50,1 mmol, 94,5 % d. Th.) beiger Feststoff.

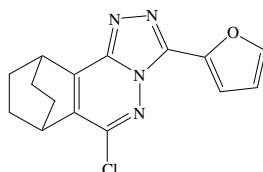
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 5.27 (s, 1H, NH), 3.36 (s, 1H), 3.14 (s, 1H), 1.81 (d, 4H, $J=8.4$ Hz), 1.30 (d, 4H, $J=9.0$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 155.5, 146.4, 142.1, 132.5, 29.5, 26.7, 24.5, 24.4

MS (FD) m/z (% rel Int.): 224,3 (100,00 $[\text{M}]^+$), 223,3 (5,75 $[\text{M}]^+$), 225,3 (23,81 $[\text{M}]^+$), 226,3 (30,72 $[\text{M}]^+$), 227,3 (6,21 $[\text{M}]^+$), 449,3 (6,34 $[\text{M}]^+$), 451,3 (3,66 $[\text{M}]^+$)

6.2.2 Darstellung der Grundkörper B

6.2.2.1 6-Chlor-3-(2-furyl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]-phthalazin (7)



Zu einer Lösung aus 2,0 g (8,90 mmol) 3-Chlor-6-hydrazin-4,5-diazatricyclo[5.2.2,7]dodeca-2(7),3,5-trien (**3**) in 20 ml Xylol wurden 1,34 g Triethylamin und 1,16 g (8,8 mmol) Furan-2-carbonsäurechlorid gegeben. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur, anschließend unter Rückfluss für 16 Stunden gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das resultierende Rohprodukt wurde in Dichlormethan gelöst und mit Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde darauf folgend mit Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

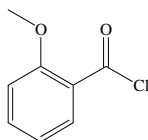
Ausbeute: 2,184 g (7,26 mmol, 82,5 % d.Th) weißer Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.67 (d, 1H, $J=1.8$ Hz), 7.51 (d, 1H, $J=3.3$ Hz), 6.62-6.63 (m, 1H), 4.04 (d, 1H, $J=2.1$ Hz), 3.55 (d, 1H, $J=2.1$ Hz), 1.94 (d, 4H, $J=7.5$ Hz), 1.45 (d, 4H, $J=9.3$)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 300,1 (100,00 $[\text{M}]^+$), 301,1 (16,74 $[\text{M}]^+$), 302,1 (33,63 $[\text{M}]^+$), 303,1 (5,04 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,34$ (EA/PE 1:1 v/v)

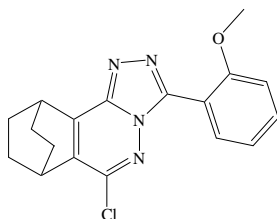
6.2.2.2 2-Methoxy-benzoylchlorid (9)



1,00 g (6,57 mmol) 2-Methoxybenzoesäure wurden in 50 ml Dichlormethan und 3,33 g (26,25 mmol) Oxalylchlorid suspendiert und 20 Stunden unter Argonatmosphäre bei 45 °C gerührt bis eine klare Lösung entsteht. Durch abwechselndes Evakuieren und Begasen mit Argon wurde das überschüssige Oxalylchlorid und das Dichlormethan entfernt.

Ausbeute: Der verbleibende Rückstand wurde direkt ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

6.2.2.3 6-Chloro-3-(2-methoxyphenyl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]-phthalazin (10)



Zu einer Lösung aus 1,49 g (6,65 mmol) 3-Chlor-6-hydrazin-4,5-diazatricyclo[5.2.2,7]dodeca-2(7),3,5-trien (**3**) in 30 ml Xylol wurden 1,00 g (10,0 mmol) Triethylamin und 0,87 mg (6,57 mmol) 2-Methoxy-benzoylchlorid (**9**) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur und dann unter Rückfluss über Nacht gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das resultierende Rohprodukt wurde in Dichlormethan gelöst und mit Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde dann mit Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

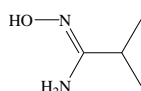
Ausbeute: 1,37 g (4,01 mmol, 61,1 % d. Th.) weißer Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.62 (dd, 1H, $J_1=1.5$ Hz, $J_2=7.5$ Hz), 7.52 (t, 1H, $J=8.0$ Hz), 7.06-7.13 (m, 2H), 4.06 (s, 1H), 3.84 (s, 1H), 3.52 (s, 1H), 1.89-1.99 (m, 4H), 1.40-1.54 (m, 4H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 340,4 (100,00 [M]⁺), 341,4 (19,13 [M]⁺), 342,4 (45,81 [M]⁺), 343,4 (4,42 [M]⁺)

R_f = 0,57 (EA)

6.2.2.4 Isopropylcarboxamidoxim (**12**)

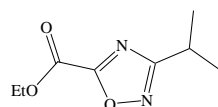


Zu einer schlammigen Suspension aus 20,1 g (290 mmol) Hydroxylamin-hydrochlorid und 24,0 g (181 mmol) K₂CO₃ in 225 ml Ethanol wurde eine Lösung aus 10,0 g (145 mmol) Isobutyronitril in 150 ml Ethanol gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rückfluss für 16 Stunden gerührt. Nach Abkühlen wurde die Reaktionslösung durch ein Celite-Bett gefiltert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 11,95 g (117,0 mmol) gelbes Rohprodukt, welches ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt wurde.

MS (FD) m/z (% rel Int.): 102,1 (100,00 [M]⁺), 103,1 (5,04 [M]⁺)

6.2.2.5 Ethyl-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)carboxylat (**13**)



11,95 g (117,0 mmol) Isopropylcarboxamidoxim (**12**) wurden zusammen mit 4 Å Molekularsieb in 600 ml THF bei Raumtemperatur unter N₂ kräftig gerührt. 5,11 g (127,65 mmol) einer 60 %igen Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl wurden zugegeben, die Reaktionsmischung für wenige Minuten gerührt und darauf folgend 15,9 g (117,0 mmol) Ethylchlorformylformiat zugesetzt. Es wurde für eine Stunde unter Rückfluss gerührt, abgekühlt, durch Celite gefiltert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst, mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel erneut entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

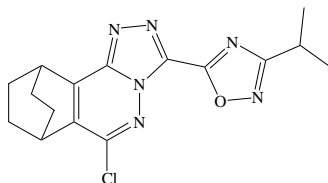
Ausbeute: 6,59 g (35,78 mmol, 30,6 % d. Th.) hellbrauner Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 4.50 (q, 2H, $J=7.2$ Hz), 3.18 (sept, 1H, $J=6.9$ Hz) 1.43 (t, 3H, $J=7.2$ Hz), 1.37 (s, 3H, H_2''), 1.35 (s, 3H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 184,1 (100,00 $[\text{M}]^+$), 185,1 (42,97 $[\text{M}]^+$), 309,2 (3,49 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,66$ (EA/PE 1:5 v/v)

6.2.2.6 6-Chlor-3-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**14**)



Zu einer Lösung aus 2,36 g (10,5 mmol) 3-Chlor-6-hydrazin-4,5-diazatricyclo[5.2.2,7]dodeca-2(7),3,5-trien (**3**) in 55 ml trockenem Dioxan wurden 2,3 g (12,5 mmol) Ethyl-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)carboxylat (**13**) gegeben und die Reaktionsmischung für 3 Tage unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Dichlormethan gelöst, mit Wasser gewaschen, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

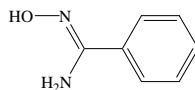
Ausbeute: 1,13 g (3,3 mmol, 31,3 % d. Th.) weißer Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 4.09 (s, 1H), 3.61 (s, 1H) 3.28 (sept, 1H, $J=6.9$), 1.98 (d, 4H, $J=7.2$ Hz), 1.43-1.48 (m, 10H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 344,0 (100,00 $[\text{M}]^+$), 345,0 (15,40 $[\text{M}]^+$), 346,0 (24,14 $[\text{M}]^+$), 347,0 (3,90 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,74$ (EA/PE 1:1, v/v)

6.2.2.7 Phenylcarboxamidoxime (**16**)

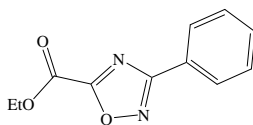


Zu einer schlammigen Suspension aus 13,4 g (194 mmol) Hydroxylamin-hydrochlorid und 16,1 g (121 mmol) K_2CO_3 in 150 ml Ethanol wurde eine Lösung aus 10,0 g (97 mmol) Benzonitril in 100 ml Ethanol gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rückfluss für 16 Stunden gerührt. Nach Abkühlen wurde die Reaktionslösung durch ein Celite-Bett gefiltert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 11,65 g (85 mmol) gelbes Rohprodukt, welches ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt wurde.

MS (FD) m/z (% rel Int.): 136,3 (100,00 $[M]^+$), 135,3 (4,90 $[M]^+$), 137,3 (19,27 $[M]^+$), 84,3 (13,38 $[M]^+$), 118,1 (9,65 $[M]^+$), 120,1 (12,01 $[M]^+$), 121,3 (18,08 $[M]^+$), 290,4 (9,75 $[M]^+$)

6.2.2.8 Ethyl-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)carboxylat (**17**)



11,65 g (85,6 mmol) Phenylcarboxamidoxime (**16**) wurden zusammen mit 4 Å Molekularsieb in 420 ml THF bei Raumtemperatur unter N_2 kräftig gerührt. 3,73 g (93,3 mmol) einer 60 %igen Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl wurden zugegeben und die Reaktionsmischung für wenige Minuten gerührt und anschließend 11,65 g (85,0 mmol) Ethylchlorformylformiat zugegeben. Es wurde für eine Stunde unter Rückfluss gerührt, abgekühlt, durch Celite gefiltert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der resultierende Feststoff wurde in Dichlormethan gelöst, mit Wasser gewaschen, die organische Phase getrocknet und das Lösungsmittel erneut entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

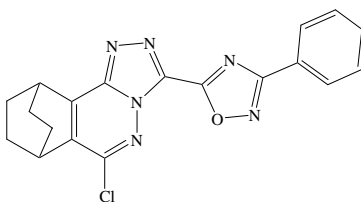
Ausbeute: 9,08 g (41,61 mmol, 48,6 % d. Th.) farblose Nadeln.

^1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 8.13 (dd, 2H, $J_1=1.7$ Hz, $J_2=7.7$ Hz), 7.45-7.53 (m, 3H), 4.55 (q, 2H, $J=6.9$ Hz), 1.47 (t, 3H, $J=7.2$ Hz)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 218,3 (100,00 $[M]^+$), 219,3 (12,20 $[M]^+$), 83,2 (2,32 $[M]^+$), 118,1 (3,50 $[M]^+$), 120,1 (2,89 $[M]^+$)

$R_f = 0,33$ (EA/PE 1:4 v/v)

6.2.2.9 6-Chlor-3-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**18**)



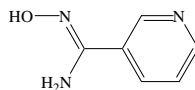
Zu einer Lösung aus 2,82 g (12,6 mmol) 3-Chlor-6-hydrazin-4,5-diazatricyclo[5.2.2,7]dodeca-2(7),3,5-trien (**3**) in 80 ml trockenem Dioxan wurden 3,27 g (15,0 mmol) Ethyl-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)carboxylat (**17**) gegeben und die Reaktionsmischung für 3 Tage unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Feststoff in Dichlormethan gelöst, mit Wasser gewaschen, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 1,07 g (2,8 mmol, 22,4% d. Th.) farblose Kristalle.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 8.24-8.28 (m, 2H), 7.50-7.55 (m, 3H), 4.12 (s, 1H), 3.63 (s, 1H), 1.99-2.01 (m, 4H), 1.47-1.51 (m, 4H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 378,4 (100,00 $[M]^+$), 379,4 (25,38 $[M]^+$), 380,4 (28,25 $[M]^+$), 381,4 (2,86 $[M]^+$)

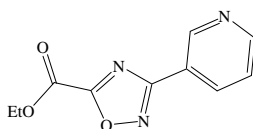
$R_f = 0,64$ (EA/PE 1:1 v/v)

6.2.2.10 3-Pyridylcarboxamidoxime (20)

Zu einer schlammigen Suspension aus 13,3 g (192 mmol) Hydroxylamin-hydrochlorid und 15,9 g (120 mmol) K_2CO_3 in 150 ml Ethanol wurde eine Lösung aus 10,0 g (96 mmol) Pyridin-3-carbonitril in 100 ml Ethanol gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rückfluss für 16 Stunden gerührt. Nach Abkühlen wurde die Reaktionslösung durch ein Celite-Bett gefiltert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 13,41 g (97,7 mmol) gelbes Rohprodukt, welches ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt wurde.

MS (FD) m/z (% rel Int.): 137,3 (100,00 $[M]^+$), 234,1 (58,08 $[M]^+$)

6.2.2.11 Ethyl [3-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]carboxylat (21)

13,2 g (96 mmol) 3-Pyridylcarboxamidoxime (**20**) wurden zusammen mit 4 Å Molekularsieb in 500 ml THF bei Raumtemperatur unter N_2 kräftig gerührt. 4,22 g (106 mmol) einer 60%igen Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl wurden zugegeben und die Reaktionsmischung für wenige Minuten gerührt und darauf folgend 13,9 g (102 mmol) Ethylchlorformylformiat zugegeben. Es wurde für eine Stunde unter Rückfluss gerührt, abgekühlt, durch Celite gefiltert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst, mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel erneut entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

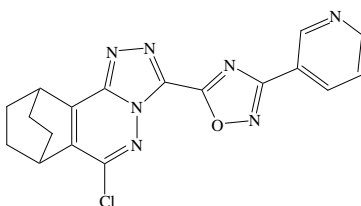
Ausbeute: 2,91 g (13,28 mmol, 13,8% d. Th.) hellbrauner Feststoff.

^1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 9.36 (d, 1H, $J=1.8$ Hz), 8.41 (dd, 1H, $J_1=1.4$ Hz, $J_2=5.0$ Hz), 8.41 (td, 1H, $J_1=2.1$ Hz, $J_2=8.1$ Hz), 7.43-7.47 (m, 1H), 4.56 (q, 2H, $J=7.2$ Hz), 1.47 (t, 3H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 219,3 (100,00 [M]⁺), 220,3 (18,75 [M]⁺)

R_f = 0,51 (EA/PE 1:1 v/v)

6.2.2.12 6-Chlor-3-[3-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**22**)



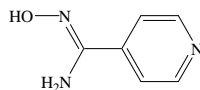
Zu einer Lösung aus 2,50 g (11,0 mmol) 3-Chlor-6-hydrazin-4,5-diazatricyclo[5.2.2,7]dodeca-2(7),3,5-trien (**3**) in 60 ml trockenem Dioxan wurden 2,91 g (13,3 mmol) Ethyl [3-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]carboxylat (**21**) gegeben und die Reaktionsmischung für 3 Tage unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der resultierende Feststoff in Dichlormethan gelöst, mit Wasser gewaschen, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 1,42 g (3,75 mmol, 33,8% d. Th.) weißer Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 9.48 (d, 1H, J=2.1 Hz), 8.79 (dd, 1H, J₁=1.5 Hz, J₂=4,8 Hz), 8.55 (td, 1H, J₁=2.1 Hz, J₂=7.8 Hz), 7.47-7.51 (m, 1H), 4.12 (s, 1H), 3.64 (s, 1H), 2.01 (d, 4H, J=6.0 Hz), 1.49 (d, 4H, J=9.3 Hz)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 379,3 (100,00 [M]⁺), 380,3 (20,44 [M]⁺), 381,3 (30,98 [M]⁺), 382,3 (6,64 [M]⁺)

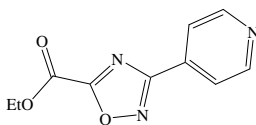
R_f = 0,68 (EA)

6.2.2.13 4-Pyridylcarboxamidoxim (24)

Zu einer schlammigen Suspension aus 13,3 g (192 mmol) Hydroxylamin-hydrochlorid und 15,9 g (120 mmol) K_2CO_3 in 150 ml Ethanol wurde eine Lösung aus 10,0 g (96 mmol) Pyridin-4-carbonitril in 100 ml Ethanol gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rückfluss für 16 Stunden gerührt. Nach Abkühlen wurde die Reaktionslösung durch ein Celite-Bett gefiltert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 11,2 g (81,5 mmol) gelbes Rohprodukt, welches ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt wurde.

MS (FD) m/z (% rel Int.): 137,4 (100,00 $[M]^+$), 136,4 (7,14 $[M]^+$), 138,4 (30,91 $[M]^+$), 122,3 (31,24 $[M]^+$), 123,4 (11,95 $[M]^+$), 181,4 (5,12 $[M]^+$)

6.2.2.14 Ethyl[3-(pyridin-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]carboxylat (25)

13,0 g (95,3 mmol) 4-Pyridylcarboxamidoxim (**24**) wurden zusammen mit 4 Å Molekularsieb in 520 ml THF bei Raumtemperatur unter N_2 kräftig gerührt. 4,16 g (104 mmol) einer 60%igen Natriumhydrid-Suspension in Mineralöl wurden zugegeben und die Reaktionsmischung für 6 min gerührt und darauf folgend 13,0 g (95,3 mmol) Ethylchlorformylformiat zugegeben. Es wurde für eine Stunde unter Rückfluss gerührt, abgekühlt, durch Celite gefiltert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst, mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel erneut entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

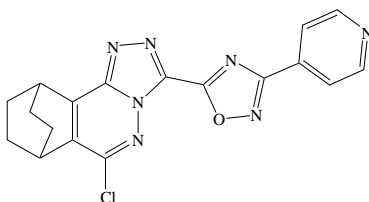
Ausbeute: 5,65 g (25,9 mmol, 27,2 % d. Th.) weißer Feststoff.

^1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm]: 8.80 (d, 2H, $J=6.0$ Hz), 8.00 (dd, 2H, $J_1=1.5$ Hz, $J_2=4.5$ Hz), 4.57 (q, 2H, $J=7.2$ Hz), 1.48 (t, 3H, $J=7.2$ Hz)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 218,0 (0,32 $[M]^+$), 219,0 (100,00 $[M]^+$), 220,0 (38,70 $[M]^+$), 221,0 (1,24 $[M]^+$), 438,9 (2,23 $[M]^+$), 530,2 (2,22 $[M]^+$)

$R_f = 0,55$ (EA/PE 2:1 v/v)

6.2.2.15 6-Chlor-3-[3-(pyridin-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (26)



Zu einer Lösung aus 2,91 g (13,0 mmol) 3-Chlor-6-hydrazin-4,5-diazatricyclo[5.2.2,7]dodeca-2(7),3,5-trien (**3**) in 70 ml trockenem Dioxan wurden 3,4 g (15,5 mmol) Ethyl[3-(pyridin-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]carboxylat (**25**) gegeben und die Reaktionsmischung für 3 Tage unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Feststoff in Dichlormethan gelöst, mit Wasser gewaschen, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 1,62 g (4,3 mmol, 32,9 % d. Th.) weißer Feststoff.

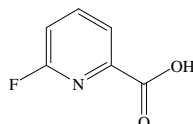
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 8.82 (dd, 2H, $J_1=1.5$ Hz, $J_2=4.5$ Hz), 8.11 (dd, 2H, $J_1=1.5$ Hz, $J_2=4.5$ Hz), 4.11 (s, 1H, H7), 3.64 (s, 1H), 2.01 (d, 4H, $J=6.9$ Hz), 1.48 (d, 4H, $J=7.5$ Hz)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 378,9 (100,00 $[M]^+$), 379,9 (20,14 $[M]^+$), 380,9 (34,08 $[M]^+$), 382,0 (5,17 $[M]^+$), 465,9 (2,88 $[M]^+$)

$R_f = 0,47$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20:1 v/v)

6.2.3 Darstellung des Grundkörpers C

6.2.3.1 6-Fluorpyridin-2-carbonsäure (**4**)



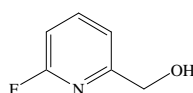
Eine Lösung aus 10,0 g (90 mmol) 2-Fluor-6-methylpyridin in 3,0 ml Aliquat 336 wurde in 180 ml Wasser 45 min unter Rückfluss erhitzt. Dabei wurden 47,4 g (300 mmol) Kaliumpermanganat in 30 ml Wasser zugegeben. Es wurde heiß vom Braunstein abgesaugt und mit wenig heißem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Reaktionslösung eingeeengt, mit halbkonzentrierter Schwefelsäure angesäuert, gekühlt und nach beendeter Kristallisation abgesaugt.

Ausbeute: 9,0 g (63,6 mmol, 70,7% d. Th.) farblose Kristalle.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 8.12-8.20 (m, 1H), 7.98 (dd, 1H, $J_1=1.65$ Hz, $J_2=4.2$ Hz), 7.43 (dd, 1H, $J_1=2.55$ Hz, $J_2=8.25$), 3.4 (bs, 1H, OH)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 141,1 (100,00 $[\text{M}]^+$), 80,2 (6,84 $[\text{M}]^+$), 124,1 (11,07 $[\text{M}]^+$)

6.2.3.2 6-Fluor-2-pyridinmethanol (**5**), I



Zu einer Suspension aus 10,00 g (71 mmol) 6-Fluorpyridin-2-carbonsäure (**4**) in 380 ml Benzol wurden 7,58 g (75 mmol) NEt_3 bei Raumtemperatur zugegeben. Nach vollständigem Lösen der Carbonsäure in der Reaktionslösung wurden 8,14 g (75 mmol) Ethylchlorformiat zugegeben und bei Raumtemperatur für 1 Stunde gerührt. Ausgefallenes $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ wurde abgesaugt und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Das aus der Reaktion resultierende gemischte Anhydrid wurde direkt in der nächsten Reaktion weiterverwendet.

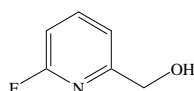
Zu einer Suspension von 2,85 g (75 mmol) LiAlH_4 in 95 ml THF bei -78°C wurde eine Lösung aus frisch synthetisiertem gemischtem Anhydrid in 240 ml THF tropfenweise zugegeben und bei gleicher Temperatur für 30 min gerührt. Das THF wurde im Vakuum vollständig entfernt und eine pH 9-Lösung (aus NaHCO_3 -Lösung/ NaOH -Lösung) wurde zugesetzt. Das Produkt wurde mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase mit Wasser (pH 9) gewaschen, die organischen Phasen vereinigt, getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 1,94 g (15,3 mmol, 21,5% d. Th.) hellbraunes, viskoses Öl.

MS (FD) m/z (% rel Int.): 127,1 (100,00 $[M]^+$), 128,1 (8,10 $[M]^+$), 83,1 (20,36 $[M]^+$), 85,1 (5,00 $[M]^+$), 118,0 (50,60 $[M]^+$), 120,0 (26,19 $[M]^+$), 743,5 (10,83 $[M]^+$)

$R_f = 0,79$ (EA/PE 2:1, v/v)

6.2.3.3 6-Fluor-2-pyridinmethanol (5), II



Eine Lösung aus 20,0 g (176,4 mmol) 2-Fluor-6-methylpyridin in 100 ml Acetonitril wurde mit 35,36 g (264,0 mmol) N-Chlorsuccinimid, 592 mg (3,6 mmol) AIBN und 0,6 ml (10,4 mmol) Essigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 90 min unter Rückfluss erhitzt und anschließend in Wasser gegossen. Diese Lösung wurde mit Essigester extrahiert, die organischen Phasen vereint, mit 5 %iger Kochsalzlösung gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Erhalten wurde ein rotes Öl (**6**), welches ohne weitere Aufreinigung eingesetzt wurde.

Eine ölige Suspension des Rohprodukts in Wasser, versetzt mit 1,32 Moläquivalenten Kaliumcarbonat wurde für 2 Stunden erhitzt. Die verschiedenen Phasen der abgekühlten Lösung wurden getrennt und die organische Phase mit Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Hexan gewaschen und im Anschluss mit Essigester extrahiert. Die Essigester-Phasen wurden vereint, getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 12,3 g (96,8 mmol, 54,9 % d. Th.) gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.68-7.77 (m, 1H), 7.18 (d, 1H, $J=7.2$ Hz), 6.75 (d, 1H, $J=7.5$ Hz), 4.65 (s, 2H), 3.80 (bs, 1H, OH)

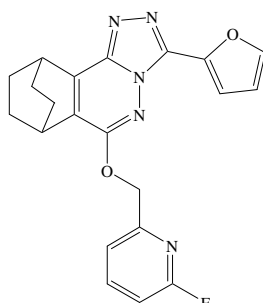
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 164.7, 161.5, 159.2, 159.1, 141.9, 141.8, 117.7, 117.6, 108.0, 107.5, 64.0

MS (FD) m/z (% rel Int.): 127,2 (100,00 $[M]^+$), 128,2 (9,15 $[M]^+$)

$R_f = 0,8$ (EA/PE 2:1, v/v)

6.2.4 Darstellung der inaktiven Referenzverbindungen

6.2.4.1 3-(2-Furyl)-6-(6-fluorpyridin-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (8)



Zu einer Lösung aus 127 mg (1,00 mmol) 6-Fluor-2-pyridinmethanol (**5**) in 15 ml DMF wurden 27 mg (1,10 mmol) NaH gegeben und kurze Zeit bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 300 mg (1,00 mmol) 6-Chlor-3-(2-furyl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**7**) zugegeben und für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das resultierende Rohprodukt wurde in Ethylacetat gelöst und mit Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 120 mg (0,31 mmol, 31,0 % d.Th) weißer Feststoff.

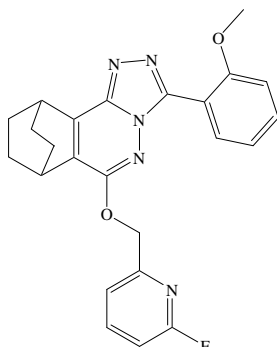
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.85 (q, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J=0.6$ Hz), 7.40 (dd, 1H, $J_1=2.3$ Hz, $J_2=7.4$ Hz), 7.36 (d, 1H, $J=3.6$ Hz), 6.90 (dd, 1H, $J_1=2.7$ Hz, $J_2=8.4$ Hz), 6.60-6.61 (m, 1H), 5.54 (s, 2H), 3.96 (s, 1H), 3.55 (s, 1H), 1.91 (d, 4H, $J=7.2$ Hz), 1.46 (d, 4H, $J=10.8$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 164.7, 161.5, 156.4, 154.6, 146.8, 142.4, 142.3, 142.0, 141.9, 141.8, 141.3, 128.4, 118.4, 118.3, 111.5, 111.4, 109.1, 108.6, 68.9, 28.6, 27.0, 25.7, 24.7

MS (FD) m/z (% rel Int.): 391,1 (100,00 $[\text{M}]^+$), 392,2 (25,37 $[\text{M}]^+$), 393,1 (2,41 $[\text{M}]^+$), 498,2 (4,07 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,34$ (EA)

6.2.4.2 3-(2-Methoxyphenyl)-6-(6-fluorpyridin-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**11**)



Zu einer Lösung aus 152 mg (1,2 mmol) 6-Fluor-2-pyridinmethanol (**5**) in 15 ml DMF wurden 50 mg (1,2 mmol) einer 60%igen NaH-Suspension in Mineralöl gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 431 mg (1,00 mmol) 6-Chlor-3-(2-methoxyphenyl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**10**) zugegeben, für 2 Stunden bei Raumtemperatur und dann für weitere 15 Stunden bei 100°C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das resultierende Rohprodukt wurde in Ethylacetat gelöst und mit Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde darauf folgend mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung über Kieselgel und anschließende Aufreinigung über HPLC führten zu sauberem Produkt.

Ausbeute: 26 mg (0,06 mmol, 6,0% d. Th.) weißer Feststoff.

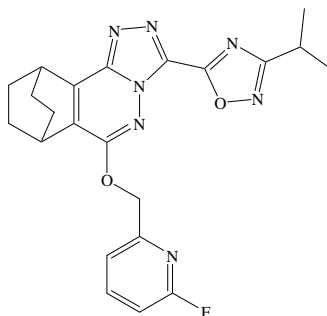
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.76 (q, 1H, $J=7.9$ Hz), 7.41-7.55 (m, 2H), 7.26 (d, 1H, $J=8.7$ Hz), 7.03-7.09 (m, 2H), 6.85 (dd, 1H, $J_1=2.4$ Hz, $J_2=8.4$ Hz), 5.30 (s, 2H), 3.99 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.50 (s, 1H), 1.84-1.96 (m, 4H), 1.38-1.54 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 164.6, 158.2, 156.0, 154.7, 154.5, 147.2, 141.8, 141.7, 132.0, 131.8, 120.4, 118.8, 111.3, 109.0, 108.5, 68.6, 55.6, 28.7, 27.0, 25.7, 24.8

MS (FD) m/z (% rel Int.): 431,9 (100,00 $[\text{M}]^+$), 432,9 (7,83 $[\text{M}]^+$), 647,0 (3,08 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,46$ (EA)

6.2.4.3 3-(3-Isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-6-(6-fluorpyridin-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**15**)



Zu einer Lösung aus 160 mg (1,26 mmol) 6-Fluor-2-pyridinmethanol (**5**) in 15 ml DMF wurden 30 mg (1,25 mmol) NaH gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 230 mg (0,67 mmol) 6-Chlor-3-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**14**) zugegeben, für 2 Stunden bei Raumtemperatur und dann für weitere 15 Stunden bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das resultierende Rohprodukt wurde in Ethylacetat gelöst, mit Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde darauf folgend mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 167 mg (0,38 mmol, 57,4 % d. Th.) hellbrauner Feststoff.

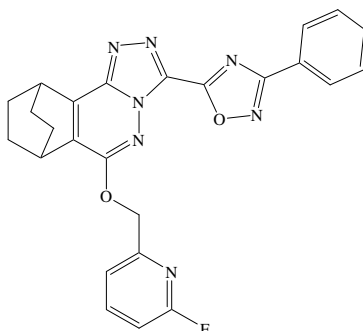
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.83 (q, 1H, $J=7.5$ Hz), 7.58 (dd, 1H, $J_1=2.3$ Hz, $J_2=7.4$ Hz), 6.85 (dd, 1H, $J_1=2.9$ Hz, $J_2=8.3$ Hz), 5.56 (s, 2H), 3.99 (s, 1H), 3.58 (s, 1H), 3.25 (sept, 1H, $J=6.9$), 1.92 (s, 4H), 1.43-1.46 (m, 10H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 175.7, 164.9, 164.8, 161.6, 157.3, 153.9, 153.7, 143.9, 142.3, 141.8, 141.7, 141.8, 137.6, 131.2, 120.3, 109.5, 109.0, 69.3, 28.7, 27.1, 26.9, 25.4, 24.7, 20.5

MS (FD) m/z (% rel Int.): 435,4 (100,00 $[\text{M}]^+$), 436,4 (23,08 $[\text{M}]^+$), 437,4 (2,69 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,45$ (EA/PE 2:1 v/v)

6.2.4.4 3-(3-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-6-(6-fluorpyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**19**)



Zu einer Lösung aus 304 mg (2,39 mmol) 6-Fluor-2-pyridinmethanol (**5**) in 15 ml DMF wurden 192 mg (4,79 mmol) einer 60%igen NaH-Suspension in Mineralöl gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 379 mg (1,00 mmol) 6-Chlor-3-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**18**) zugegeben, für 2 Stunden bei Raumtemperatur und dann für weitere 15 Stunden bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das resultierende Rohprodukt wurde in Ethylacetat gelöst, mit Wasser extrahiert, die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Im Anschluss erfolgten sowohl säulenchromatographische Aufreinigung über Kieselgel als auch eine Aufreinigung über HPLC.

Ausbeute: 16 mg (0,034 mmol, 3,4% d. Th.) farblose Nadeln.

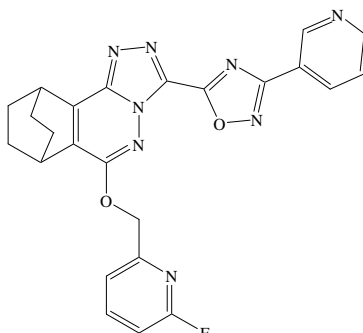
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 8.24 (d, 2H, $J=9.3$ Hz), 7.81 (q, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.61 (d, 1H, $J=7.2$ Hz), 7.51-7.59 (m, 3H), 6.89 (dd, 1H, $J_1=2.4$ Hz, $J_2=8.1$ Hz), 5.62 (s, 2H), 4.02 (s, 1H), 3.60 (s, 1H), 1.88-2.00 (m, 4H), 1.39-1.53 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 169.0, 157.4, 153.7, 142.4, 141.9, 131.6, 129.0, 127.8, 126.2, 120.3, 109.5, 109.0, 69.5, 28.8, 27.1, 25.5, 24.7

MS (FD) m/z (% rel Int.): 470,2 (100,00 $[\text{M}]^+$), 471,2 (31,27 $[\text{M}]^+$), 472,3 (4,11 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,5$ ($\text{CHCl}_3/\text{i-Prop}$ 20:1 v/v)

6.2.4.5 3-[3-(Pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-6-(6-fluorpyridin-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**23**)



Zu einer Lösung aus 304 mg (2,39 mmol) 6-Fluor-2-pyridinmethanol (**5**) in 15 ml DMF wurden 192 mg (4,79 mmol) einer 60%igen NaH-Suspension in Mineralöl gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 379 mg (1,00 mmol) 6-Chlor-3-[3-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**22**) zugegeben, für 2 Stunden bei Raumtemperatur und dann für weitere 15 Stunden bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das resultierende Rohprodukt wurde in Ethylacetat gelöst, mit Wasser extrahiert, die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung über Kieselgel und anschließende Aufreinigung über HPLC mit Acetonitril/Wasser (75:25 v/v) führten zu sauberem Produkt.

Ausbeute: 22 mg (0,047 mmol, 4,7% d. Th.) farblose Nadeln.

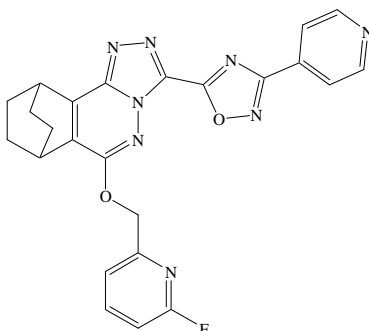
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 9.47 (bs, 1H), 8.78 (bs, 1H), 8.54 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.83 (q, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.56 (d, 1H, $J=6.9$ Hz), 7.24-7.52 (m, 1H), 6.90 (dd, 1H, $J_1=2.4$ Hz, $J_2=8.4$ Hz), 5.61 (s, 2H), 4.02 (s, 1H), 3.61 (s, 1H), 1.91-1.98 (m, 4H), 1.41-1.52 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 164.8, 161.9, 157.5, 153.7, 151.2, 147.8, 142.5, 141.9, 137.2, 136.1, 131.6, 124.3, 120.1, 109.6, 109.1, 69.5, 28.8, 27.1, 25.4, 24.7

MS (FD) m/z (% rel Int.): 470,9 (100,00 $[\text{M}]^+$), 471,3 (28,83 $[\text{M}]^+$), 472,9 (4,31 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,58$ (EA/Isoprop 30:1 v/v)

6.2.4.6 3-[3-(Pyridin-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-6-(6-fluorpyridin-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (27)



Zu einer Lösung aus 127 mg (1,00 mmol) 6-Fluor-2-pyridinmethanol (**5**) in 15 ml DMF wurden 27 mg (1,10 mmol) NaH gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 380 mg (1,00 mmol) 6-Chlor-3-[3-(pyridin-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**26**) zugegeben, für 2 Stunden bei Raumtemperatur und dann für weitere 15 Stunden bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das resultierende Rohprodukt wurde in Ethylacetat gelöst und mit Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde darauf folgend mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 152 mg (0,32 mmol, 32,3 % d. Th.) weißer Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 8.83 (d, 2H, $J=5.7$ Hz), 8.11 (d, 2H, $J=6.0$ Hz), 7.83 (q, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.54 (dd, 1H, $J_1=2.0$ Hz, $J_2=7.4$ Hz), 6.91 (dd, 1H, $J_1=2.6$ Hz, $J_2=8.3$ Hz), 5.63 (s, 2H), 4.03 (s, 1H), 3.62 (s, 1H), 1.86-2.10 (m, 4H), 1.38-1.57 (m, 4H)

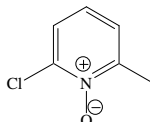
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 167.5, 157.4, 153.8, 150.7, 142.5, 141.8, 133.8, 131.6, 121.5, 119.8, 109.8, 109.5, 109.1, 69.4, 28.8, 27.1, 26.9, 25.4, 24.7

MS (FD) m/z (% rel Int.): 470,3 (100,00 $[\text{M}]^+$), 471,3 (27,03 $[\text{M}]^+$), 472,2 (4,02 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,2$ (EA/PE 2:1 v/v)

6.2.5 Darstellung der Strukturen mit nukleofuger Gruppe

6.2.5.1 6-Chlor-2-picolin-N-oxid (**28**)



Zu einer Lösung aus 4,00 g (31,50 mmol) 2-Chlor-6-methylpyridin in 20 ml Chloroform wurden 12,64 g (47,24 mmol) *m*-CPBA bei Raumtemperatur gegeben und für 12 Std bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser abgebrochen und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt wurde in Wasser aufgenommen, filtriert, das Filtrat eingengt und im Hochvakuum getrocknet.

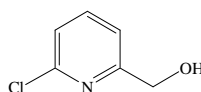
Ausbeute: 4,47 g (31,20 mmol, 99% d. Th.) gelbes Öl.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.35 (dd, 1H, J₁=1.4 Hz, J₂=8.0 Hz), 7.17 (d, 1H, J=6.3 Hz), 7.09 (t, 1H, J=7.8 Hz), 2.51 (s, 3H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 143,6 (100,00 [M]⁺), 144,6 (9,44 [M]⁺), 145,6 (28,79 [M]⁺)

R_f = 0,1 (EA/PE 1:1 v/v)

6.2.5.2 6-Chlor-2-pyridinmethanol (**29**)



Zu einer Lösung aus 4,00 g (27,97 mmol) 6-Chlor-2-picolin-N-oxid (**28**) in 85 ml Essigsäureanhydrid wurden 13 Tropfen konz. Schwefelsäure gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3 Std bei 110 °C anschließend bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das resultierende Rohprodukt wurde eingengt, in Ethylacetat aufgenommen und gewaschen mit NaHCO₃-Lösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung. Die organischen Phasen wurden vereint, getrocknet und aufkonzentriert.

Anschließend wurde mit 85 ml Methanol, 45 ml Wasser und 13,0 g K₂CO₃ versetzt, für 30 min gerührt, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Lösung wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte über Silicagel.

Ausbeute: 1,71 g (11,96 mmol, 42,8% d. Th.) gelbes Öl.

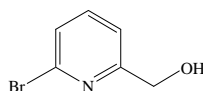
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7,60 (t, 1H, $J=7.5$ Hz), 7.23 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.16 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 4.69 (s, 2H), 3.72 (s, 1H, OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 161.0, 150.6, 139.4, 122.8, 119.0, 64.2

MS (FD) m/z (% rel Int.): 143,9 (100,00 $[\text{M}]^+$), 144,9 (10,85 $[\text{M}]^+$), 145,9 (21,60 $[\text{M}]^+$), 146,9 (3,00 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,36$ (EA/PE 1:2)

6.2.5.3 6-Brom-2-pyridinmethanol (31)



Zu einer Lösung aus 31,25 ml (50 mmol) $n\text{-BuLi}$ (1.6 M in Hexan) in 30 ml THF wurden bei -78°C tropfenweise 11,85 g (50 mmol) 2,6-Dibrompyridin zugegeben (nicht über -70°C). Nach vollständigem Zugeben wurde die dunkelgrüne Lösung für weitere 15 Minuten gerührt, dann wurden 50 ml Methanol und 3,2 ml Essigsäure und im Anschluss 1,90 g (50 mmol) NaBH_4 zugegeben. Die Reaktionslösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und vorsichtig mit 150 ml gesättigter NH_4Cl -Lösung versetzt. Das Produkt wurde mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 7,17 g (38,15 mmol, 76,3% d. Th.) hellgelbes Öl.

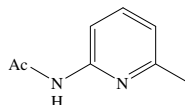
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.54 (t, 1H, $J=7.5$ Hz), 7.36 (d, 1H, $J=8.1$ Hz), 7.26 (d, 1H, $J=7.5$ Hz), 4.72 (s, 2H), 3.35 (s, 1H, OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 161.5, 141.3, 139.1, 126.6, 119.4, 64.2

MS (FD) m/z (% rel Int.): 186,9 (100,00 $[\text{M}]^+$), 187,9 (13,05 $[\text{M}]^+$), 188,9 (97,25 $[\text{M}]^+$), 189,9 (10,94 $[\text{M}]^+$), 616,8 (11,66 $[\text{M}]^+$), 618,8 (14,60 $[\text{M}]^+$), 620,8 (7,36 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,48$ (EA/PE 1:1, v/v)

6.2.5.4 2-Acetamido-6-methylpyridin (33)



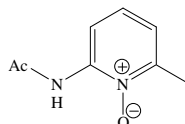
Zu 100 ml (1,0 mol) Essigsäureanhydrid wurden 107,0 g (1,0 mol) 2-Amino-6-methylpyridin zugegeben und für eine Stunde refluxiert. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, der dabei entstandene Niederschlag abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisation aus Wasser weiter gereinigt.

Ausbeute: 89,6 g (0,9 mol, 89,6% d. Th.) farblose Kristalle.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 10.39 (s, 1H, NH), 8.10 (d, 1H, $J=8.4$ Hz), 7.60 (t, 1H, $J=8.1$ Hz), 6.84 (d, 1H, $J=7.5$ Hz), 2.43 (s, 3H), 2.09 (s, 3H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 150,3 (100,00 $[\text{M}]^+$), 151,3 (9,24 $[\text{M}]^+$)

6.2.5.5 2-Acetamido-6-methylpyridin-*N*-oxid (34)

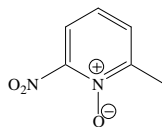


Zu einer Lösung aus 150 ml Eisessig und 125 ml Peressigsäure (40%) wurden 115,0 g (0,77 mol) 2-Acetamido-6-methylpyridin (**33**) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde zunächst im Eisbad gekühlt und anschließend bei 70 °C für 3 Stunden gerührt, dann abgekühlt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Durch Umkristallisation aus Toluol konnte das Produkt weiter gereinigt werden.

Ausbeute: 116,1 g (0,70 mol, 90,7% d. Th.) farblose Nadeln.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6), δ [ppm]: 10.54 (s, 1H, NH), 8.15 (d, 1H, $J=8.4$ Hz), 7.27 (t, 1H, $J=8.1$ Hz), 7.15 (d, 1H, $J=7.5$ Hz), 2.40 (s, 3H), 2.24 (s, 3H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 166,2 (100,00 $[\text{M}]^+$), 167,2 (11,96 $[\text{M}]^+$)

6.2.5.6 6-Nitro-2-picolin-N-oxid (35)

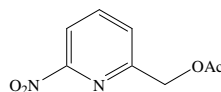
23,2 g (140 mmol) 2-Acetamido-6-methylpyridin-N-oxid (**35**) wurden in 115 ml H₂SO₄ gelöst und bei 80 °C für 2 Stunden gerührt. Nach Abkühlen im Eisbad wurde die Reaktionslösung langsam in gekühlte Caro'sche Säure getropft. Die Suspension wurde für 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt, dann in Eiswasser gegossen und anschließend mit konzentrierter Ammoniaklösung neutralisiert. Die resultierende Lösung wurde mit Ethylacetat extrahiert, das Extrakt mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 2,25 g (14 mmol, 10,4% d. Th.) gelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.51 (d, 1H, J₁=7.2 Hz), 7.44 (d, 1H, J₁=7.2 Hz), 7.27 (d, 1H, J=7.8 Hz), 2.57 (s, 3H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 154,1 (100,00 [M]⁺), 155,1 (6,21 [M]⁺)

R_f = 0.48 (EA)

6.2.5.7 6-Nitro-2-Acetoxymethylpyridin (36)

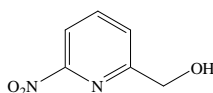
Zu 7 ml vorgeheiztem Essigsäureanhydrid wurden 2,13 g (13,8 mmol) 6-Nitro-2-picolin-N-oxid (**35**) zugegeben. Nach weiterem Rühren bei gleicher Temperatur für 5 min wurde die Reaktionslösung für 90 min refluxiert, 7 ml Ethanol zugegeben und weitere 10 min refluxiert. Nach Abkühlen im Eisbad wurde die Reaktionslösung in Wasser gegossen und mit NaHCO₃ neutralisiert, dann mit Et₂O extrahiert, das Extrakt mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 324 mg (1,65 mmol, 12,0 % d.Th) gelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 8.17 (d, 1H, $J=7.5$ Hz), 8.02-8.07 (1H, m), 7.72 (d, 1H, $J=7.2$ Hz), 5.31 (s, 2H), 2.18 (s, 3H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 196,1 (100,00 $[\text{M}]^+$), 197,2 (12,2 $[\text{M}]^+$)

6.2.5.8 6-Nitro-2-pyridinmethanol (37), I



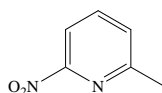
Zu einer Lösung aus 324 mg (1,65 mmol) 6-Nitro-2-Acetoxymethylpyridin (**36**) in 1,35 ml Methanol wurde eine katalytische Menge K_2CO_3 zugegeben und für 3 Stunden unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Nach Zugabe von Wasser und Neutralisation mit 5 %iger Essigsäure wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat extrahiert, das Extrakt mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 72 mg (0,47 mmol, 28,3% d. Th.) gelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 8.14 (dd, 1H, $J_1=0.8$ Hz, $J_2=8.3$ Hz), 8.04 (t, 1H, $J=7.7$ Hz), 7.76 (dd, 1H, $J_1=1.1$ Hz, $J_2=7.7$ Hz), 4.90 (d, 2H, $J=3.6$ Hz), 3.16 (bs, 1H, -OH)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 154,0 (100,00 $[\text{M}]^+$), 155,0 (16,98 $[\text{M}]^+$)

6.2.5.9 2-Nitro-6-methylpyridin (38)



10,00 g (95,5 mmol) 2-Amino-6-methylpyridin wurden bei 10 °C in 25 ml konzentrierter H_2SO_4 gelöst. Zu dieser Lösung wurde tropfenweise ein Gemisch aus 75 ml 30 %iger H_2O_2 und 150 ml 30 %iger rauchender Schwefelsäure (Caro'sche Säure) bei 10-20 °C zugegeben. Nachdem die Lösung für wenige Nach 3 Stunden bei 20 °C wurde für weitere 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung in 300 ml Eiswasser gegossen und anschließend mit NaOH-Lösung basisch gestellt. Die resultierende Lösung wurde mit Ether ext-

rahiert, das Extrakt mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.

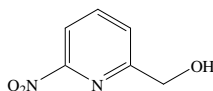
Ausbeute: 1,33 g (9,6 mmol, 10,0% d. Th.) hellgelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 8.04 (d, 1H, $J=8.1$ Hz), 7.89 (td, 1H, $J=7.7$ Hz), 7.51 (d, 1H, $J=7.2$ Hz), 2.67 (s, 3H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 138,1 (100,00 $[\text{M}]^+$), 139,1 (4,81 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,79$ (EA)

6.2.5.10 6-Nitro-2-pyridinmethanol (37), II



Eine Lösung aus 1,00 g (7,24 mmol) 2-Nitro-6-methylpyridin (**38**) in 25 ml frisch destilliertem Tetrachlorkohlenstoff wurde mit 1,93 g (10,83 mmol) N-Bromsuccinimid, 25 mg (0,15 mmol) AIBN und 25 μl Essigsäure versetzt. Die Reaktionssuspension wurde über Nacht unter Rückfluss erhitzt, anschließend der Feststoff abgesaugt und verworfen. Das Filtrat wurde mit Essigester extrahiert, die organischen Phasen vereint, mit 5 %iger Kochsalzlösung gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Erhalten wurde ein rotes Öl, welches ohne weitere Aufreinigung eingesetzt wurde.

Eine ölige Suspension des Rohprodukts in Wasser und 1,32 mol-äquiv Kaliumcarbonat wurde für 2 Stunden erhitzt. Die verschiedenen Phasen der abgekühlten Lösung wurden getrennt, die untere, organische Phase mit Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Hexan gewaschen und im Anschluss mit Essigester extrahiert. Die Essigester-Phasen wurden vereint, getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 157 mg (1,02 mmol, 14,1 % d. Th.) hellgelber Feststoff.

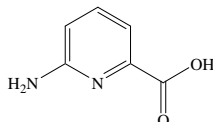
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 8.14 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 8.04 (t, 1H, $J=7.5$ Hz), 7.77 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 4.90 (s, 2H), 3.08 (bs, 1H, OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 160.4, 156.1, 140.3, 129.6, 118.9, 64.3

MS (FD) m/z (% rel Int.): 153,9 (100,00 [M]⁺), 152,9 (4,18 [M]⁺), 154,9 (26,33 [M]⁺)

R_f = 0,58 (EA/PE 1:1, v/v)

6.2.5.11 6-Aminopyridin-2-carbonsäure (40)

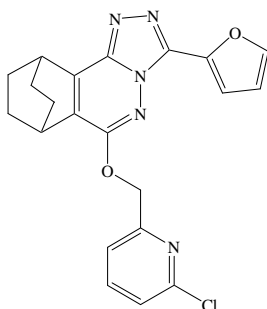


Eine Lösung aus 9,73 g (90 mmol) 2-Amino-6-methylpyridin in 3,0 ml Aliquat 336 wurde in 180 ml Wasser 45 min unter Rückfluss erhitzt. Dabei wurden 47,41 g (300 mmol) Kaliumpermanganat in 30 ml Wasser über einen Tropftrichter zugegeben. Es wurde heiß vom Braunstein abgesaugt und mit wenig heißem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Reaktionslösung eingengt, mit halbkonzentrierter Schwefelsäure angesäuert, gekühlt und nach beendeter Kristallisation abgesaugt.

Ausbeute: Es konnte analytisch keine Ausbeute nachgewiesen werden.

6.2.6 Darstellung verschiedener Markierungsvorläufer zur ^{18}F -Fluorierung von TC07

6.2.6.1 3-(2-Furyl)-6-(6-chlorpyridin-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**30**)



Zu einer Lösung aus 144 mg (1,00 mmol) 6-Chlor-2-pyridinmethanol (**29**) in 15 ml DMF wurden 27 mg (1,10 mmol) NaH gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 300 mg (1,00 mmol) 6-Chlor-3-(2-furyl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**7**) zugegeben, für 2 Stunden bei Raumtemperatur und dann für weitere 15 Stunden bei 100°C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das resultierende Rohprodukt wurde in Ethylacetat gelöst, mit Wasser extrahiert, die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch über Silicagel.

Ausbeute: 89 mg (0,22 mmol, 21,8 % d.Th) weißer Feststoff.

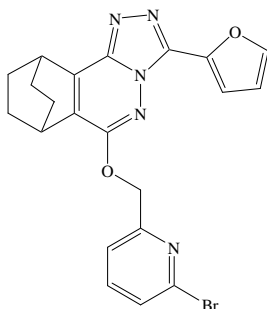
^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.72 (t, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.65 (d, 1H, $J=1.8$ Hz), 7.45 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.40 (d, 1H, $J=3.6$ Hz), 7.31 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 6.63-6.64 (m, 1H), 5.59 (s, 2H), 4.04 (s, 1H), 3.56 (s, 1H), 1.90-1.96 (m, 4H, $J=7.2$ Hz), 1.41-1.50 (m, 4H, $J=10.8$ Hz)

^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 156.7, 156.4, 151.0, 143.9, 142.4, 141.1, 139.6, 128.8, 123.7, 111.6, 69.2, 28.7, 27.0, 25.7, 24.7

MS (FD) m/z (% rel Int.): 407,2 (100,00 $[\text{M}]^+$), 408,1 (4,55 $[\text{M}]^+$), 409,1 (25,25 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,31$ (EA)

6.2.6.2 3-(2-Furyl)-6-(6-brompyridin-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (32)



Zu einer Lösung aus 188 mg (1,00 mmol) (6-Brom-pyridin-2-yl)methanol (**31**) in 15 ml DMF wurden 27 mg (1,10 mmol) NaH gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 300 mg (1,00 mmol) 6-Chlor-3-(2-furyl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**7**) zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das resultierende Rohprodukt wurde in Ethylacetat gelöst, mit Wasser extrahiert, die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert und die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch über Silicagel.

Ausbeute: 260 mg (0,57 mmol, 57,5 % d.Th) weißer Feststoff.

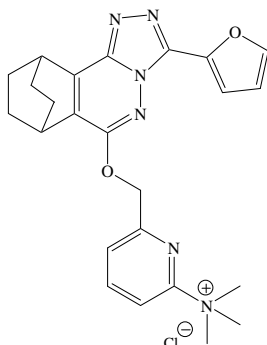
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.69 (d, 1H, $J=0.6$ Hz), 7.60-7.65 (m, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 6.67-6.69 (m, 1H), 5.62 (s, 2H), 4.27 (s, 1H), 3.61 (s, 1H), 1.91-2.02 (m, 4H), 1.39-1.53 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 157.2, 156.3, 143.9, 142.4, 142.3, 141.9, 141.6, 141.1, 139.3, 128.8, 127.5, 119.9, 111.7, 69.2, 28.7, 27.0, 25.7, 24.7

MS (FD) m/z (% rel Int.): 451,2 (100,00 $[\text{M}]^+$), 452,1 (14,49 $[\text{M}]^+$), 453,2 (90,14 $[\text{M}]^+$), 454,2 (21,13 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,41$ (EA)

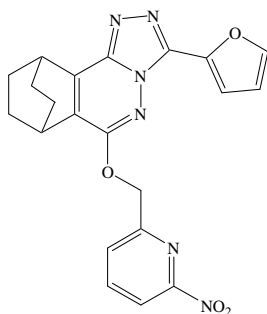
6.2.6.3 3-(2-Furyl)-6-(6-trimethylaminpyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**38**)



Zu einer Lösung aus 612 mg (1,5 mmol) 3-(2-Furyl)-6-(6-chlorpyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**30**) in 10 ml DMSO wurden 380 μ g (1,5 mmol) Trimethylamin-Lösung (4.2 M in Ethanol) zugetropft. Nach einstündigem Rühren wurden nochmals 380 μ g (1,5 mmol) Trimethylamin-Lösung (4.2 M in Ethanol) zugegeben und die Reaktionslösung 72 Stunden bei Raumtemperatur rühren lassen. Die Reaktion wurde beendet, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert, mit Ethylacetat und Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: Es wurde kein Produkt erhalten.

6.2.6.4 3-(2-Furyl)-6-(6-nitropyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**39**)



Zu einer Lösung aus 154 mg (1,00 mmol) 6-Nitro-2-pyridinmethanol (**37**) in 25 ml DMF wurden 27 mg (1,10 mmol) NaH gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 600 mg (2,00 mmol) 6-Chlor-3-(2-furyl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**7**) zugegeben und für 1 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das resultierende

Rohprodukt wurde in Ethylacetat gelöst, mit Wasser extrahiert, die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch über Silicagel.

Ausbeute: 47 mg (0,11 mmol, 11,3% d. Th) hellgelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 8.22 (d, 1H, $J=8.4$ Hz), 8.11 (t, 1H, $J=7.5$ Hz), 7.91 (d, 1H, $J=7.2$ Hz), 7.62 (d, 1H, $J=1.8$ Hz), 7.35 (d, 1H, $J=3.0$ Hz), 6.60 (q, 1H, $J=1.8$ Hz), 5.73 (s, 1H), 3.97 (s, 1H), 3.55 (s, 1H), 1.92-1.94 (m, 4H), 1.40-1.44 (m, 4H)

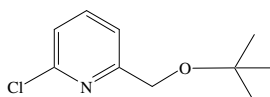
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 156.6, 156.2, 144.0, 142.8, 142.6, 141.0, 126.2, 117.2, 111.6, 68.9, 28.7, 27.0, 25.7, 24.7

MS (FD) m/z (% rel Int.): 418,0 (100,00 $[\text{M}]^+$), 419,0 (22,42 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,16$ (EA)

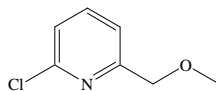
6.2.7 Darstellung einer Modellverbindung TC14 zur ^{18}F -Direktmarkierung

6.2.7.1 6-Chlor-2-[(1,1-dimethylethoxy)methyl]pyridin (**42**)



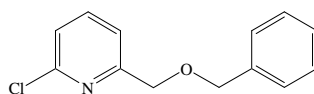
Eine Lösung aus 244 mg (1,7 mmol) 6-Chlor-2-pyridinmethanol (**29**) in 15 ml DMF wurde mit 46 mg (1,8 mmol) NaH versetzt. Nach 15 min wurden 233 mg (1,7 mmol) 2-Brom-methylpropan zugegeben und für 2 Stunden Raumtemperatur und weitere 15 Stunden bei 60°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereint, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: Es wurde kein Produkt erhalten.

6.2.7.2 6-Chlor-2-(methoxymethyl)pyridin (**43**)

Eine Lösung aus 560 mg (3,9 mmol) 6-Chlor-2-pyridinmethanol (**29**) in 50 ml DMF wurde mit 98,4 mg (4,1 mmol) NaH versetzt. Nach 15 min wurden 567,8 mg (4,0 mmol) Methyljodid zugegeben und für 2 Stunden Raumtemperatur und weitere 15 Stunden bei 40 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereint, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: Es wurde kein Produkt erhalten.

6.2.7.3 6-Chlor-2-(benzyloxymethyl)pyridin (**44**)

Eine Lösung aus 250 mg (1,75 mmol) 6-Chlor-2-pyridinmethanol in 15 ml Aceton wurde mit 50,4 mg (2,1 mmol) NaH versetzt. Nach 15 min wurden 359 mg (2,1 mmol, 250 µl) Benzylbromid zugegeben und für 2 Stunden refluxiert. Die Reaktionslösung wurde in Wasser gegossen und mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereint, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 342 mg (1,46 mmol, 83,6 % d. Th.) hellgelbes Öl.

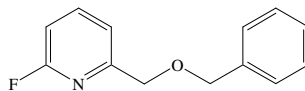
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.64 (t, 1H, $J=7,8$ Hz), 7.43 (d, 1H, $J=7,8$ Hz), 7.26-7.38 (m, 5H), 7.21 (d, 1H, $J=7,8$ Hz), 4.64 (s, 2H), 4.63 (s, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 139.3, 137.6, 128.5, 127.8, 122.8, 119.6, 73.1, 72.3

MS (FD) m/z (% rel Int.): wegen niedrigem Siedepunkt keine FD-Messung möglich

$R_f = 0,62$ (EA/PE 1:4, v/v)

6.2.7.4 6-Fluor-2-(benzyloxymethyl)pyridin (45)



Eine Lösung aus 1,00 g (7,9 mmol) 6-Fluor-2-pyridinmethanol (**37**) in 50 ml Aceton wurde mit 0,21 g (8,7 mmol) NaH versetzt. Nach 15 min wurden 1,62 g (9,4 mmol) Benzylbromid zugegeben und für 2 Stunden refluxiert. Die Reaktionslösung wurde in Wasser gegossen und mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereint, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 1,13 g (5,2 mmol, 65,4 % d. Th.) hellgelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.77 (q, 1H, $J=7,8$ Hz), 7.27-7.39 (m, 6H), 6.81 (dd, 1H, $J_1=2,9$ Hz, $J_2=8,3$ Hz), 4.64 (s, 2H, H7''), 4.60 (s, 2H)

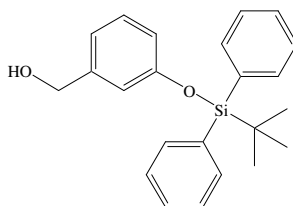
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 141.6, 137.7, 128.3, 127.8, 118.3, 108.1, 107.6, 73.0, 72.1

MS (FD) m/z (% rel Int.): wegen niedrigem Siedepunkt keine FD-Messung möglich

$R_f = 0,75$ (EA)

6.2.8 Darstellung von geeigneten Markierungsvorläufern zur [^{18}F]FETos-Markierung und dessen Referenzverbindungen

6.2.8.1 3-(tert.-Butyldiphenylsilyl)oxybenzylalkohol (46)



Zu einer Lösung aus 2,5 g (20 mmol) 3-Hydroxybenzylalkohol in 20 ml trockenem THF wurden 1,36 g (20 mmol) Imidazol gegeben. Anschließend wurde auf 0°C abgekühlt, 5,63 g (20 mmol)

t.-Butyldiphenylsilylchlorid zugetropft, für 40 min bei 0 °C und weitere 20 min bei 40 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das resultierende Rohprodukt mit Wasser, gesättigter NaCl-Lösung und Ethylacetat aufgearbeitet. Die organischen Phasen wurden vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel.

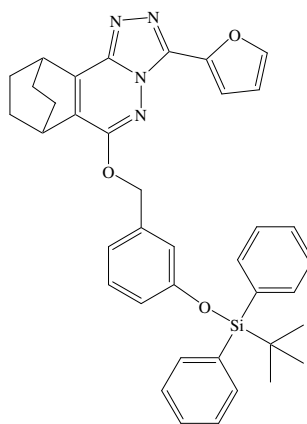
Ausbeute: 6,86 g (18,9 mmol, 94,5 % d. Th.) gelbes Öl.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.70 (d, 2H, J=1.2 Hz), 7.67 (d, 2H, J=1.5 Hz), 7.34-7.44 (m, 6H), 7.18 (t, 1H, J=7.8 Hz), 6.86-6.88 (m, 2H), 6.71 (dd, 1H, J₁=2.4 Hz, J₂=7.8 Hz), 4.99 (s, 1H), 4.72 (s, 2H), 1.09 (s, 9H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 362,3 (100,00 [M]⁺), 363,3 (32,48 [M]⁺), 124,0 (15,57 [M]⁺), 195,9 (8,48 [M]⁺), 724,9 (79,12 [M]⁺), 725,9 (16,19 [M]⁺)

R_f = 0,87 (EA/PE 1:8, v/v)

6.2.8.2 3-(2-Furyl)-6-(6-(tert.-butyldiphenylsilyl)oxybenz-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4-α]phthalazin (47)



Zu einer Lösung aus 1,088 g (3,0 mmol) 3-(tert.-butyldiphenylsilyl)oxybenzylalkohol (**46**) in 50 ml DMF wurden 79 mg (3,3 mmol) NaH gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 900 mg (3,0 mmol) 6-Chlor-3-(2-furyl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4-α]phthalazin (**7**) zugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das resultierende Rohprodukt mit Wasser, gesättigter NaCl-Lösung und Ethylacetat aufgearbeitet. Die organischen Phasen wurden

vereint, getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.

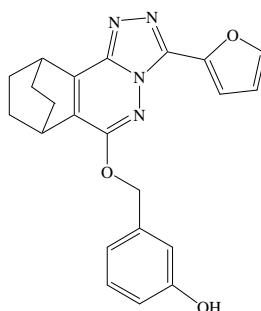
Ausbeute: 1,8 g (2,9 mmol, 96,7 % d. Th.) gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.63-7.66 (m, 4H), 7.53 (d, 1H, $J=1.8$ Hz), 7.44 (t, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.28-7.40 (m, 7H), 7.17 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 6.76 (d, 1H, $J=3.6$ Hz), 6.33 (q, 1H, $J=1.8$ Hz), 4.81 (s, 2H), 4.01 (s, 1H), 3.63 (s, 1H), 1.95 (d, 4H, $J=6.6$ Hz), 1.51 (d, 4H, $J=6.9$ Hz), 1.06 (s, 9H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 626,5 (100,00 $[\text{M}]^+$), 627,6 (47,46 $[\text{M}]^+$), 628,5 (15,22 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,73$ (EA)

6.2.8.3 3-(2-Furyl)-6-(6-hydroxypyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (48)



Zu einer Lösung aus 1,21 g (2 mmol) 3-(2-Furyl)-6-(6-(tert.-butyldiphenylsilyl)oxybenz-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**47**) in DMF wurden 0,37 g (10 mmol) Ammoniumfluorid gegeben und für eine Stunde bei 80 °C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser beendet und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 0,50 g (1,29 mmol, 64,5 % d.Th.) hellbrauner Feststoff.

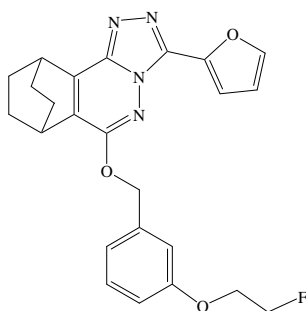
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.89-7.90 (m, 1H), 7.47 (t, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.35 (s, 1H), 7.26-7.30 (m, 2H), 6.76 (d, 1H, $J=3.3$ Hz), 6.59-6.61 (m, 1H), 4.55 (s, 2H), 3.76 (s, 1H), 3.50 (s, 1H), 1.88-1.94 (m, 4H), 1.42-1.46 (m, 4H)

^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 152.8, 143.5, 143.0, 141.0, 129.6, 124.1, 120.3, 119.8, 111.3, 111.1, 64.4, 29.7, 28.8, 27.1, 25.7, 24.7

MS (FD) m/z (% rel Int.): 388,2 (100,00 $[\text{M}]^+$), 386,2 (13,86 $[\text{M}]^+$), 387,2 (4,15 $[\text{M}]^+$), 389,2 (27,52 $[\text{M}]^+$), 312,3 (17,69 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,50$ (EA)

6.2.8.4 3-(2-Furyl)-6-(6-fluorethoxybenz-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**49**)



Zu einer Lösung aus 100 mg (0,257 mmol) 3-(2-Furyl)-6-(6-hydroxypyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**48**) in 15 ml DMF wurden 7 mg (0,28 mmol) NaH gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 39,1 mg (0,308 mmol, 23 μl) 1,2-Bromfluorethan zugegeben und für 2 Stunden refluxiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das resultierende Rohprodukt mit Wasser, gesättigter NaCl-Lösung und Ethylacetat aufgearbeitet. Die organischen Phasen wurden vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Es erfolgte säulenchromatographische Aufreinigung über Silicagel.

Ausbeute: 29 mg (0,07 mmol, 25,9% d. Th.) hellbrauner Feststoff.

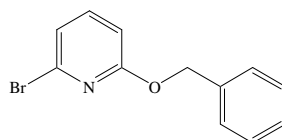
^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.64 (m, 1H), 7.37 (d, 1H, $J=3.6$ Hz), 7.32 (t, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.08-7.10 (m, 2H), 6.91 (dd, 1H, $J_1=2.0$ Hz, $J_2=7.7$ Hz), 6.60-6.61 (m, 1H), 5.44 (s, 2H), 4.82 (t, 1H, $J=4.2$ Hz), 4.66 (t, 1H, $J=3.9$ Hz), 4.25 (t, 1H, $J=3.9$ Hz), 4.16 (t, 1H, $J=3.9$ Hz), 3.93 (s, 1H), 3.48 (s, 1H), 1.81-1.93 (m, 4H), 1.34-1.49 (m, 4H)

^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 158.7, 156.9, 143.8, 142.4, 142.0, 141.8, 141.6, 137.2, 129.9, 129.2, 120.8, 114.6, 114.3, 111.4, 111.1, 83.0, 80.7, 69.2, 67.3, 67.0, 28.6, 26.8, 25.6, 24.8

MS (FD) m/z (% rel Int.): 434,5 (100,00 $[\text{M}]^+$), 435,5 (37,24 $[\text{M}]^+$), 436,5 (5,31 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,15$ (EA)

6.2.8.5 2-Brom-6-benzyloxypyridin (50)



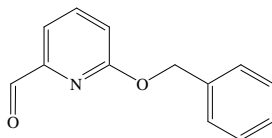
Zu einer Lösung aus 2,62 g (24,25 mmol) Benzylalkohol in 150 ml DMF wurden 1,07 g (26,67 mmol) NaH gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 6,30 g (26,68 mmol) 2,6-Dibrompyridin zugegeben und für eine Stunde bei 90 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das resultierende Rohprodukt mit Wasser, gesättigter NaCl-Lösung und Diethylether aufgearbeitet. Die organischen Phasen wurden vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel.

Ausbeute: 3,77 g (23,0 mmol, 94,8 % d. Th.) gelbes Öl.

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 7.27-7.51 (m, 7H), 7.06 (d, 1H, $J=7.2$ Hz), 5.35 (s, 2H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 262,9 (100,00 $[\text{M}]^+$), 263,9 (13,21 $[\text{M}]^+$), 264,9 (84,61 $[\text{M}]^+$), 265,9 (10,17 $[\text{M}]^+$), 291,1 (25,50 $[\text{M}]^+$), 292,1 (11,13 $[\text{M}]^+$)

$R_f = 0,38$ (PE/Aceton 20:1, v/v)

6.2.8.6 6-Benzyloxy-2-pyridincarbaldehyd (51)

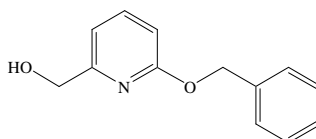
1,010 g (3,8 mmol) 2-Brom-6-benzyloxy-pyridin (**50**) wurden in 30 ml Diethylether auf -78°C vorgekühlt. Es wurden 2,4 ml (6 mmol) N-Butyllithium (2,5 M in Hexan) langsam unter Rühren zugetropft. Anschließend wurden 464 µl (6 mmol) trockenes DMF zugegeben und 30 Minuten bei -78 °C, anschließend 30 Minuten im Eisbad gerührt. Die Reaktion wurde in 5 %ige NaHCO₃ gegossen und weitere 15 Minuten gerührt. Nach Extraktion wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 436 mg (2,04 mmol, 68,2% d. Th.) hellgelbes Öl.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 9.96 (s, 1H, CHO), 7.73 (t, 1H, J=7.5 Hz), 7.56 (d, 1H, J=7.2 Hz), 7.47-7.50 (m, 2H), 7.29-7.41 (m, 3H), 7.02 (d, 1H, J=7.8 Hz), 5.47 (s, 2H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 213,4 (100,00 [M]⁺), 214,4 (19,15 [M]⁺)

R_f = 0,42 (PE/EA 16:1, v/v)

6.2.8.7 6-Benzyloxy-2-pyridinmethanol (52)

1,25 g (5,87 mmol) 6-Benzyloxy-2-pyridincarboxaldehyd (**51**) wurden mit 510 mg Lithiumbromid (5,87 mmol), 4,09 ml (29,34 mmol) Triethylamin und 350 mg (5,86 mmol) Isopropylalkohol versetzt und 24 Stunden gerührt. Danach wurde mit Ethylacetat, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel.

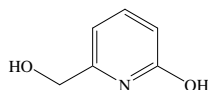
Ausbeute: 964 mg (4,78 mmol, 76,3 % d. Th.) hellgelbes Öl.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 7.55 (d, 1H, J=8.3 Hz), 7.45-7.26 (m, 5H), 6.80 (d, 1H, J=9.0 Hz), 6.69 (d, 1H, J=9.0 Hz, H3''), 5.37 (s, 2H), 4.65 (s, 1H)

MS (FD) m/z (% rel Int.): 215,0 (100,00 [M]⁺), 216,1 (27,84 [M]⁺), 271,1 (9,99 [M]⁺)

R_f = 0,38 (EA/PE 1:4, v/v)

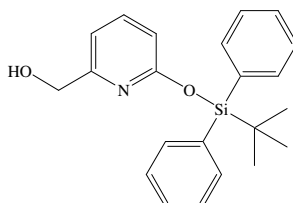
6.2.8.8 6-Hydroxy-2-pyridinmethanol (**53**)



964 mg (4,78 mmol) 6-Benzyloxy-2-pyridinmethanol (**52**) wurden in Ethanol gelöst, 10 mol % eines Kohlenstoff/Palladium Katalysators zugegeben und für 3 Stunden Wasserstoff in das Reaktionsgemisch eingeleitet. Nach beendeter Reaktion wird der Katalysator über Celite abgesaugt und das Lösungsmittel wird im Vakuum aus dem Filtrat entfernt.

Ausbeute: 900mg (7,2 mmol) Rohprodukt, welches direkt weiter umgesetzt wurde.

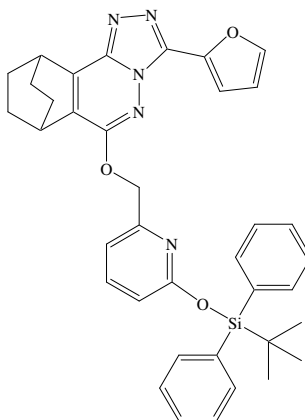
6.2.8.9 6-[(tert.-Butyldiphenylsilyl)oxy]-2-pyridinmethanol (**54**)



900 mg (7,2 mmol) Rohprodukt von 6-Hydroxy-2-pyridinmethanol (**53**) wurden in THF gelöst und 440,5 mg (6,47 mmol) Imidazol zugegeben. Unter Argonatmosphäre wurden 1,77 g (6,47 mmol) tert-Butyldiphenylsilylchlorid bei 0 °C zugetropft. Nach beendeter Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan, Wasser und gesättigter Natrimchloridlösung aufgearbeitet und säulenchromatographisch über Silicagel aufgereinigt.

Ausbeute: 34 mg (0,09 mmol) stark verunreinigtes Produkt, es konnte keine eindeutige Analytik angefertigt werden.

6.2.8.10 3-(2-Furyl)-6-(6-(tert.-butyldiphenylsilyl)oxy)pyridin-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (55)



Zu einer Lösung aus 34 mg (0,09 mmol) stark verunreinigtes 6-((tert.-Butyldiphenylsilyl)oxy)-2-pyridinmethanol (**54**) in 5 ml DMF wurden 2 mg (0,1 mmol) NaH gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 31 mg (0,1 mmol) 6-Chlor-3-(2-furyl)-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazin (**7**) zugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das resultierende Rohprodukt mit Wasser, gesättigter NaCl-Lösung und Ethylacetat aufgearbeitet. Die organischen Phasen wurden vereint, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt.

Ausbeute: Erhalten wurde Rohprodukt, welches in der Analytik das geringfügige Vorhandensein des gewünschten Produktes zeigt. Allerdings ist die Probe mit anderen, aus der Reaktion stammenden Substanzen derart verunreinigt, dass keine weitere Quantifizierung möglich ist.

6.3 Radiofluorierungen

6.3.1 Identifizierung der ^{18}F -fluorierten Verbindungen

Die Identifizierung der ^{18}F -markierten Produkte erfolgte sowohl über Radio-HPLC als auch über Radio-DC.

Mit Hilfe der ^{19}F -Referenzverbindungen wurden die jeweiligen Retentionszeiten der Verbindungen bestimmt. Dazu wurde das in Kapitel 6.1 beschriebene HPLC-System II) verwendet. Es wurde eine analytische Säule (LiChrospherRP18-EC 5 μm , 250x4mm) bei einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt, als Eluens wurde ein Laufmittelgemisch aus gleichen Teilen Wasser und Acetonitril verwendet. Die Auftrennung der Aliquotlösungen der ^{18}F -Markierungsreaktionen erfolgte im gleichen System.

Die Bestimmung der ^{18}F -Markierungsausbeute durch Radio-DC erfolgte durch Auftragen eines bestimmten Volumens (2 μl) auf eine ALUGRAM[®]SIL G/UV₂₅₄ Kieselgel-Platte der Firma Roth und dessen Entwicklung in Ethylacetat über eine Laufstrecke von 60 mm; im Anschluss wurden die Markierungsausbeuten mit dem Instant Imager der Firma Packard Canberra bestimmt. Die entsprechenden R_f -Werte wurden zuvor mit Hilfe der ^{19}F -Referenzverbindungen unter Verwendung einer UV-Lampe (254 nm/365 nm) ermittelt.

6.3.2 Optimierung der ^{18}F -Fluorierung der Markierungsvorläufer von TC07

Alle radiochemischen Synthesen im Ölbad wurden in 5 mL Wheaton-Reaktoren, die mittels einer Schraubkappe mit Silikonseptum verschlossen waren, unter Verwendung der Lösungsmittel DMF oder DMSO durchgeführt. Zur Aufnahme der Reaktionskinetiken wurden zu den gewählten Reaktionszeiten (1, 5, 10, 15, 20 min) Aliquots von je 100 μL entnommen, in Eppendorfgefäßen gefüllt und die Reaktion mit je 100 μL Wasser/Acetonitril (50:50) abgebrochen.

Bei Mikrowellenreaktionen wurden alle radiochemischen Synthesen in speziellen Mikrowellenvials unter Verwendung der Lösungsmittel DMF oder DMSO durchgeführt. Zur Aufnahme der Reaktionskinetiken wurden zu den gewählten Reaktionszeiten mit gleichen Volumina Wasser und Acetonitril gequencht.

Im Anschluss wurden die radiochemischen Ausbeuten mittels Radio-DC und/oder Radio-HPLC bestimmt.

6.3.3 Abtrennung des radiofluorierten Produkts [^{18}F]TC07

Zur Isolation von [^{18}F]TC07 aus der Reaktionslösung wurde das in Kapitel 6.1 beschriebene HPLC-System III) verwendet. Es wurde eine semipreparative Säule (LiChrospherRP18-EC 5 μm , 250x12mm) bei einer Flussrate von 10 ml/min verwendet. Als Eluens wurde ein Laufmittelgemisch aus gleichen Teilen Acetonitril und 0,25 M Natriumacetatpuffer mit pH~4 eingesetzt. Der dem [^{18}F]TC07 entsprechende Radiopeak bei 26 min wurde gesammelt und mit der zweifachen Menge an Milliporewasser verdünnt. Im Anschluss erfolgte die Kartuschenfixierung der verdünnten Lösung auf einer C-18 Kartusche der Firma Waters. Durch Elution des ^{18}F -markierten Produktes mit 2 ml Diethylether in einen Spitzkolben, der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum und Versetzen des Rückstandes mit 10 % isotonischer Kochsalzlösung wurde das Produkt [^{18}F]TC07 in eine injektionsfertige Lösung überführt.

6.3.4 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde zunächst eine Eichgerade erstellt. Hierfür wurden Lösungen mit definierten Stoffmengen der kalten Referenzverbindung TC07 (0.026 nmol, 0.256 nmol, 0.511 nmol, 1.278 nmol, 2.555 nmol, 5,110 nmol und 25.550 nmol) in das HPLC-System II (Kapitel 6.1) injiziert und die entsprechenden Peakflächen bestimmt. Hierbei wurde eine analytische Säule (LiChrospherRP18-EC 5 μm , 250x4mm) bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet, als Eluens wurde ein Laufmittelgemisch aus gleichen Teilen Wasser und Acetonitril verwendet. Aus den bekannten Stoffmengen und den daraus resultierenden, experimentell bestimmten Peakflächen konnte eine Kalibriergerade durch lineare Regression erstellt werden. Mit der so erhaltenen Eichgeraden ist man in der Lage, die spezifische Aktivität in GBq/ μmol zu bestimmen.

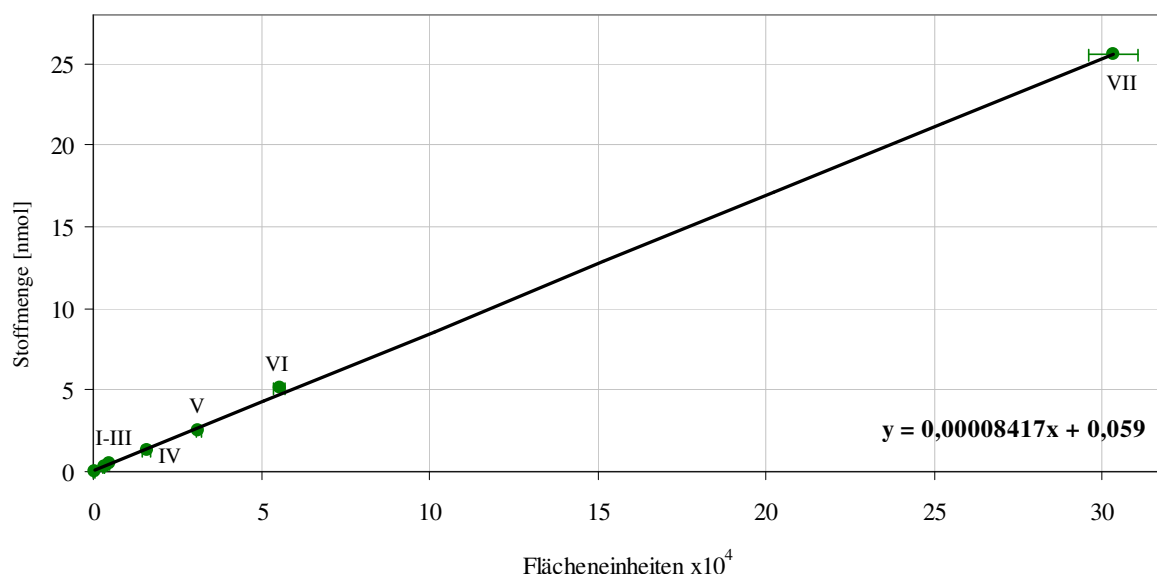


Abb. 66: Eichgerade verschiedener Stoffmengen der Referenzverbindung TC07 (I: 0.026 nmol, II: 0.256 nmol, III: 0.511 nmol, IV: 1.278 nmol, V: 2.555 nmol, VI: 5,110 nmol. VII: 25.550 nmol)

6.4 Bestimmung der Lipophilie

Zur Bestimmung der Lipophilien wurde das in Kapitel 6.1 beschriebene HPLC-System verwendet. Hierbei wurde eine analytische Säule (LiChrospherRP18-EC 5µm, 250x4mm) bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet, als Eluens wurde ein Laufmittelgemisch aus Wasser:MeOH 25/75, pH=7,3 verwendet.

Es wurden 20 µl einer jeweils 1 mg/ml Lösung von TC07, TC08, TC09, TC10, TC11, TC12 injiziert, die Retentionszeit bestimmt und mittels einer Eichgeraden der logP der entsprechenden Substanz ermittelt.

Zur Erstellung der entsprechenden Eichgeraden wurde 20 µl einer jeweils Lösung mit 1mg/ml der Eichsubstanzen Benzaldehyd-, Anisol-, Toluol-, 4-Bromanisol- und 4-Iodanisol-Lösung in Methanol mit bekannten logP-Werten verwendet. Dabei wurde auf die bekannte Gleichung

$$\log K = \log \left[\frac{(t_R - t_0)}{t_0} \right]$$

t_R : Retentionszeit der Substanz; t_0 : Totzeit des Systems

zur Berechnung des logK zurückgegriffen. Nach der Berechnung der logK-Werte und der bekannten logP-Werte der Eichsubstanzen wurde eine Kalibriergerade durch lineare Regression

erstellt wobei für die Bestimmung des Kapazitätsfaktors K die Retentionszeit der Ascorbinsäure als Totzeit (t_0) zugrunde gelegt wurde. Mit der so erhaltenen Eichgeraden ist man in der Lage, durch die experimentell bestimmten Retentionszeiten der neuen Substanzen TC07-TC12 die entsprechenden $\log P$ -Werte zu bestimmen.

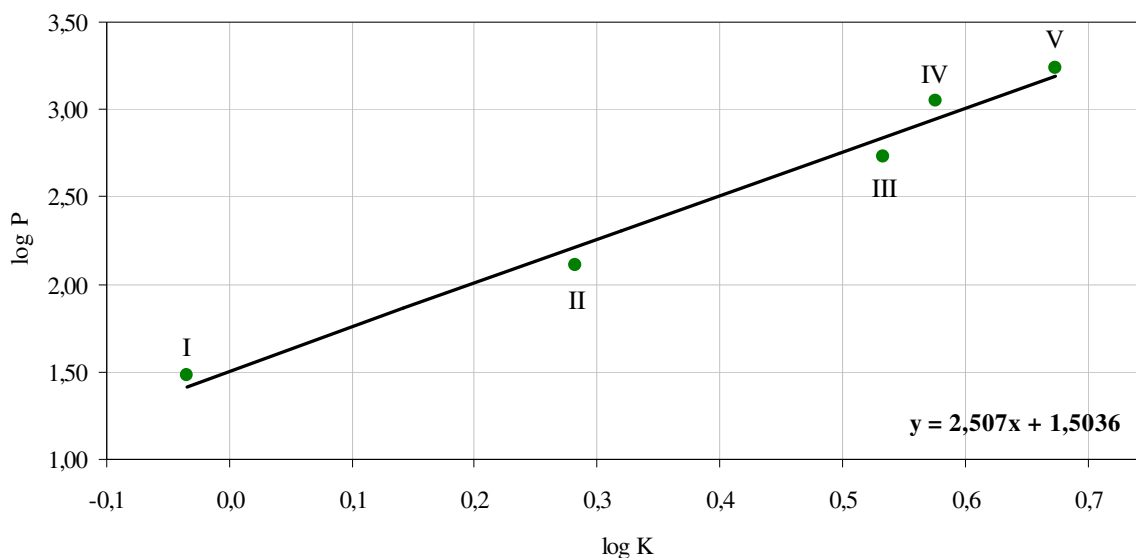


Abb. 67: Eichgerade der Standards Benzaldehyd (I: 1.48), Anisol (II: 2.11), Toluol (III: 2.73), 4-Bromanisol (IV: 3.05), 4-Iodanisol (V: 3.24)

6.5 Evaluierungen

6.5.1 Bestimmung der IC_{50} -Werte

Alle verwendeten Lösungen wurden frisch angesetzt. Anschließend wurden Ständer mit eisgekühlten Glasreaktionsgefäßen als auch Ständer mit Szintillationsvials in ausreichender Menge vorbereitet. Membranpellets wurden in adequate Mengen an 50 mM Tris/Citrat pH 7,4 Puffer resuspendiert. Es wurden Proben zur Bestimmung des Proteingehaltes (Bradford Assay) genommen. Danach wurden alle Lösungen und Membranen dem Experiment entsprechend in folgender Reihenfolge pipettiert: Puffer für die totale Bindung, Kompetitor für die unspezifische Bindung, Verdünnungsreihe der Testsubstanzen, Radioligand und die vorbereiteten Membranen. Nach Zugabe der Membranen wurde für 60 min inkubiert. Die Glasreaktionsgefäße wurden nach beendeter Inkubationszeit durch einen Glasfaserfilter mit 5 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 Lösung gefiltert und mit weiteren 5 ml auf einem Brandel cell harvester gewaschen. Die Filterpapiere wurden in Gefäße zur Flüssigszintillation transferiert und mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit be-

deckt. Nach 30 min Inkubationszeit wurden alle Gefäße in einem Beckman LS 6000 SC Flüssigszintillator vermessen. Die Aktivitäten der Proben wurden über eine zuvor erstellt Eichgerade ermittelt. Aus diesen Aktivitätsmengen lässt sich zunächst der IC₅₀-Wert des verwendeten Liganden mathematisch bestimmen und daraus direkt der K_i-Wert berechnen.

6.5.2 Autoradiographien von [¹⁹F]TC07 und nca [¹⁸F]TC07

Rezeptorautoradiographien für [³H]Ro15-4513 und [³H]Ro15-1788 wurden auf Eis durchgeführt, für das Experiment wurden 14 µM dicke Rattenhirnschnitte verwendet. Die Hirnschnitte wurden mit wasserabweisendem „pap-pen“ umkreist um ein Verlaufen der Reaktionslösung zu vermeiden. Die Schnitte wurden während der gesamten Inkubationszeit in dampfgesättigten Kulturschalen aufbewahrt. Alle verwendeten Lösungen wurden frisch angesetzt und in adequate Mengen auf die Hirnschnitte aufgegeben. Nach Inkubation wurde 3 x 10 Sekunden mit eiskaltem Puffer gewaschen und eventuelle Salzzurückstände durch kurzes Tauchen in eiskaltem Wasser entfernt. Die Hirnschnitte wurden in einem kalten Luftstrom getrocknet, auf einer tritiums sensitiven Bildplatte (Fujifilm, IP-ST 2040) für 3-5 Tagen exponiert, und danach auf einem Fujifilm FLA-7000 Imager ausgelesen und mit der Programm Multigauge 3.0 bearbeitet.

Für Autoradiographien mit dem heißen Liganden [¹⁸F]TC07 wurde nach gleicher Methode verfahren. Die Expositionszeit lag hier bei nur 2,5-3,5 Stunden auf einer Fujifilm IP-SR 2040-Bildplatte.

6.5.3 Ex vivo-Bindungsstudien mit der Referenzverbindung [¹⁹F]TC07

Die Experimente wurden mit ausgewachsenen Sprague-Dawley Ratten im Alter von 8-10 Wochen und einem Körpergewicht von 250-310 g durchgeführt. Den Ratten wurde entweder nur Lösungsmittel (DMSO), 5 mg/kg Flumazenil zur Bestimmung der unspezifischen Bindung bzw. der Baseline oder 5 mg/kg TC07 i.p. injiziert. Nach 27 min wurde 8 µCi/kg [³H]Ro15-1788 in die Schwanzvene appliziert und nach 3 min die Ratten dekapitiert, die Gehirne herauspräpariert, Vorderhirn und Cerebellum separiert, gewogen und in 15 bzw 25 ml eiskühlem 50 mM Tris/Citrat pH 7,4 Puffer homogenisiert.

Es wurden jeweils 6 x 200 µl der Homogenate in Glasröhrchen pipettiert und über Glasfiberfilter mit Brandel cell harvester gefiltert. Die Filterpapiere wurden in Szintillationsgefäße überführt und mit 4 mL Zinsser Analytics Aquasafe 300 Plus Szintillationsflüssigkeit versetzt. Nach 30 min Inkubationszeit wurden alle Gefäße in einem Beckman LS 6000 SC Flüssigszintillator

vermessen. Der Proteingehalt jeder Probe wurde mittels Bradford Assay (BIO-RAD) ausgewertet und wurde letztendlich als dpm/mg Protein ermittelt.

Als totale Bindung wurde der Durchschnittswert der trägersubstanzinjizierten Ratten verwendet, das durchschnittliche Ergebnis der TC07-injizierten Ratten wurde als Prozent der totalen Bindung ermittelt.

6.5.4 *In vivo*-Bindungsstudien mit nca [^{18}F]TC07 mittels Kleintier-PET

Kleintier- bzw. Micro-Positronenemissionstomographie (MicroPET)-Scans wurden mit einer Siemens/Concorde Microsystems microPET Focus 120 Kleintier PET (saPET)-Kamera durchgeführt (Abb. 68).

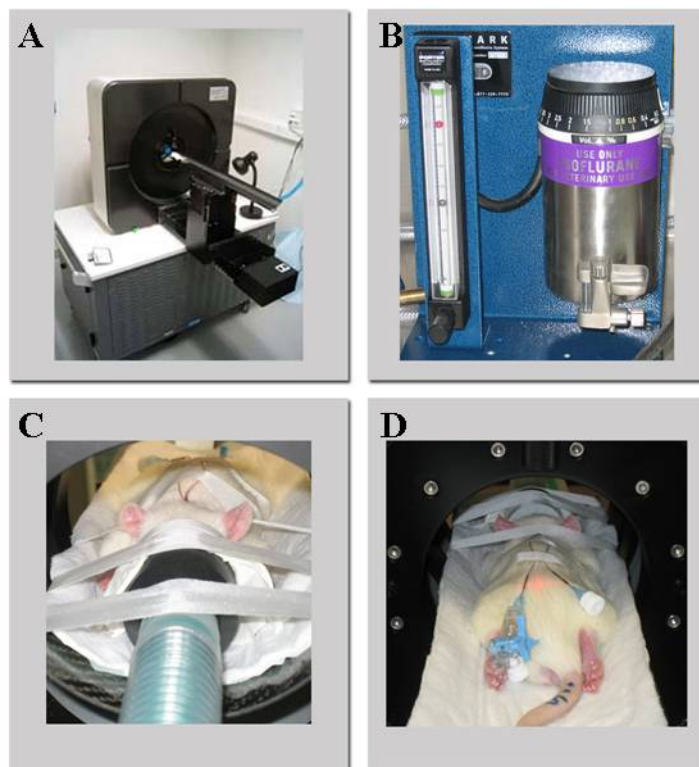


Abb. 68: Ausrüstung für die Untersuchung von Ratten bzw. Mäusen mittels μPET ; A: μPET der Firma Siemens/Concord, B: Isofluranbetäubung mit einer Konzentration von 1,8 %, C und D: Versuchstier mit Kathetern, das Tier wurde betäubt und fixiert, um verschwommene Aufnahmen zu verhindern

Es wurden 250 g schwere, 8 Wochen alte Sprague-Dawley Ratten mit Katheter in der Femoralvene von Charles River Laboratories, France gekauft. Die Tiere wurden mit Isofluran mit einer

Konzentration von 1,8 % narkotisiert. Die Applikation des Radiotracers erfolgte intravenös in den Katheter, dieser wurde nach der Applikation mit heparinisierter 0,9 % NaCl-Lösung nachgespült.

Die Ergebnisse wurden als standardisierte Aufnahmewerte (Standardized Uptake Value, SUV) definiert:

$$SUV = \frac{\text{Aktivität in ROI [Bq/ml]} \cdot \text{Körpergewicht [g]}}{\text{Injizierte Dosis [Bq]}}$$

Die Quantifizierung der PET-Daten erfolgte mit dem PMOD Softwarepaket, indem manuell das Gehirn bzw. die Harderschen Drüsen als „Region of Interest“ (ROI) definiert wurden. Es wurden dynamische Scans über einen Zeitraum von 60 min durchgeführt.

6.5.5 Organverteilung von [^{18}F]TC07 in Mäusen

Im Experiment wurden sowohl Wildtyp-Mäuse als auch PGP-knockout (PGP-KO) Mäuse (freundlicherweise von Herrn Dr. Ulrich Schmitt, Mainz, zu Verfügung gestellt) verwendet. Es wurde eine definierte Aktivitätsmenge an [^{18}F]TC07 i.p. injiziert und die Tiere nach 3 bzw. 10 min dekapitiert. Zur Untersuchung des Betäubungsmiteleinflusses wurde eine Gruppe von Mäusen vor der Injektion mit Isofluran narkotisiert und während der gesamten Inkubationszeit unter Isofluranbetäubung gehalten.

Es wurden jeweils Gehirn, eine Niere und ein Teil Leber herauspräpariert als auch etwa 200 μl heparinisiertes Blut gesammelt und gewogen. Gehirn, Niere und Leber wurden in ein Eppendorfgefäß transferiert, mit 300 μl 6M NaOH und jeweils 1-2 NaOH Plättchen versetzt und im Ultraschallbad bei ca. 60°C homogenisiert. Das Homogenat als auch das Vollblut wurden in Bestrahlungsröhrchen überführt und mit einem Gammacounter (mit Probenwechsler, Eigenbau Institut für Kernchemie) vermessen. Im Anschluss wurde das Vollblut zentrifugiert, 250 μl Plasma abpipettiert, mit Wasser auf 500 μl aufgefüllt und ebenfalls im Gammacounter gemessen. Durch Fällung der Plasmaproteine mit 500 μl Acetonitril konnten letztendlich 500 μl Serum im Gammacounter gemessen werden. Die Auswertung erfolgte über eine zuvor bestimmte Eichgerade (Abb. 69).

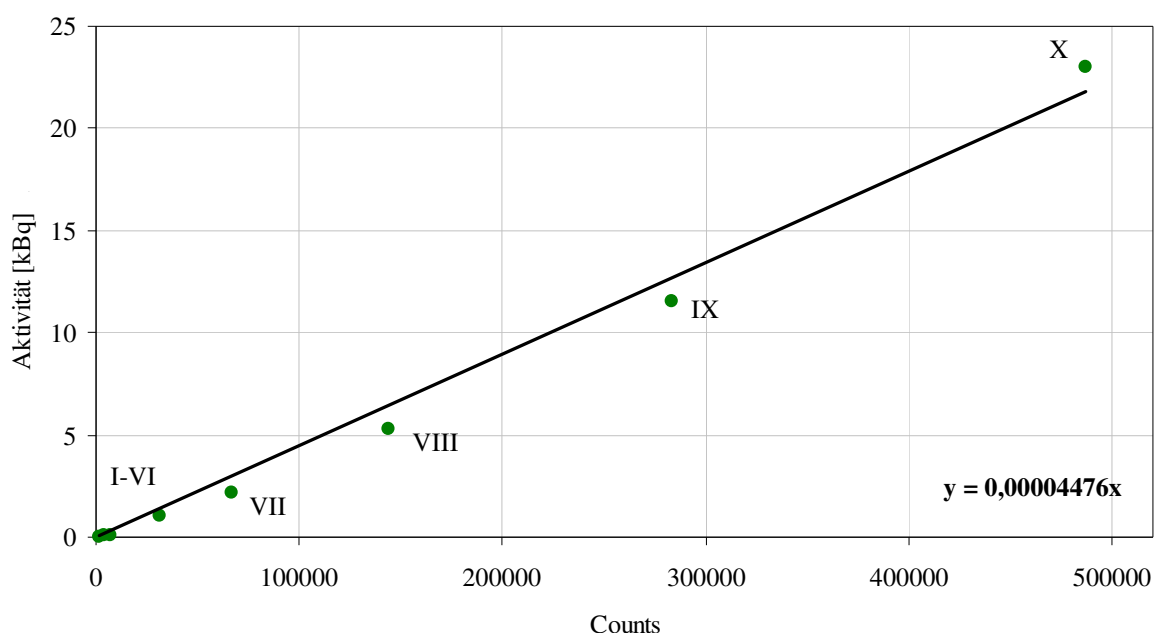


Abb. 69: Eichgerade zur Bestimmung der Aktivität (I: 23 kBq, II: 11,5 kBq, III: 5,25 kBq, IV: 2,125 kBq, V: 1,0625 kBq, VI: 0,10625 kBq, VII: 0,050313 kBq, VIII: 0,0050313 kBq, IX: 0,0025156 kBq, X: 0,00025156 kBq)

Die daraus erhaltenen Aktivitäten wurden zunächst auf 1 g Organ bezogen, die Ergebnisse wurden als prozentualer Anteil an Aktivität pro Gramm der injizierten Aktivität berechnet.

6.5.6 Metabolitenstudie von Rattenblut mit nca [^{18}F]TC07

Für die Metabolitenstudie wurden Blutproben von etwa 200 μl nach Dekaptieren der Mäuse zur Ermittlung der Organverteilung verwendet. Die Zeitpunkte der Tötung betrugen jeweils 3 min oder 10 min.

Das Blut wurde in heparinisierten Eppendorfgefäßen gesammelt und auf 500 μl mit Wasser aufgefüllt. Nach Sammeln der letzten Blutprobe wurde das Blut zentrifugiert und 250 μl Plasma wurde entnommen. Dieses wurde mit der gleichen Menge an Acetonitril versetzt um die im Plasma vorhandenen Proteine zu denaturieren. Diese Plasmaproteine wurden abzentrifugiert und 2 μl des Überstandes (Serum) wurde auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (DC-Platte) getragen. Ebenso wurden je 2 μl Vollblut und Plasma auf diese DC-Platte aufgetupft. Die Platte wurde mit Ethylacetat über eine Laufstrecke von 6 cm entwickelt und mit dem Packard Bell β^+ Imager ausgelesen. Der prozentuale Anteil an noch vorhandenem [^{18}F]TC07 wurde relativ zur Menge der gefundenen aktiven Metaboliten angegeben.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs neue, fluorhaltige und potentielle GABA_A/α₅-subtypselektive Liganden synthetisiert. Zunächst wurden die Referenzverbindungen TC07-TC12 organisch-präparativ aufgebaut und im Weiteren auf ihre Affinität und Selektivität bezüglich der GABA_A/α₅-Untereinheit evaluiert. Daraus sollte Aufschluss gewonnen werden, welcher der Liganden die besten Parameter zu späteren ¹⁸F-Synthese und Evaluierung des entsprechenden ¹⁸F-markierten Radioliganden aufweist.

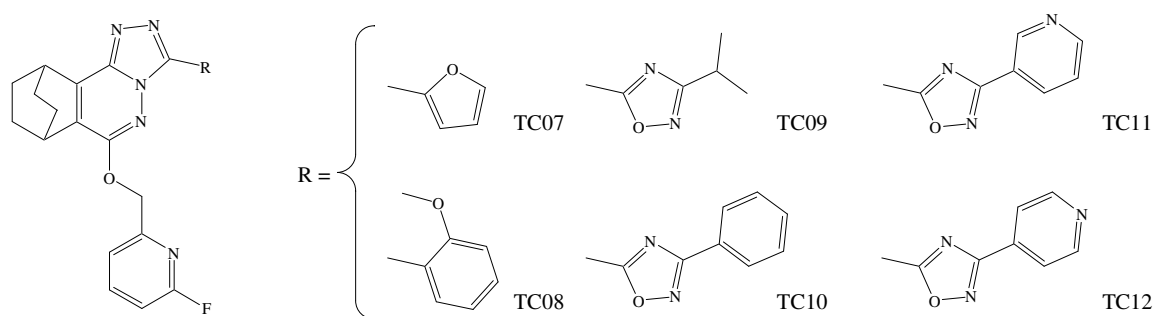


Abb. 70: 6-(6-Fluor-pyridin-2-yl)methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo-[3,4-α]-phthalazin-Derivate TC07-TC12

Um einen ersten Eindruck über die Affinität und Selektivität dieser sechs neuen fluorhaltigen Liganden zu erhalten, wurden Experimente mit Rattenhirnmembranen aus drei verschiedenen Hirnregionen durchgeführt. Dabei wurde der Radioligand [³H]Ro15-4513 verwendet. Die Bestimmung der Affinitäten und Selektivitäten als auch die nachfolgend zusammengefassten Autoradiographien der kalten Referenzverbindungen TC07-TC12 wurde in Kooperation mit der Psychiatrischen Klinik und Poliklinik der Universität Mainz von Herrn Dr. Fabian Debus durchgeführt und von ihm 2008 in seiner Promotionsarbeit¹¹⁶ veröffentlicht.

Die im Experiment erhaltenen Daten deuteten auf eine Verdrängung des gewählten Radioliganden [³H]Ro15-4513 durch 512 nM der Substanzen TC07, TC08, TC11 und TC12 hin. Es konnten signifikante Unterschiede in ihrer Bindung zu den drei verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen werden, wobei der größte Effekt im Hippocampus zu erkennen ist. Ein weiteres Experiment mit identischem Aufbau, jedoch einer höheren Konzentration von 6 nM [³H]Ro15-4513 bestätigte das vorhergegangene Experiment mit nahezu identischen Ergebnissen. Diese Ergebnisse unterstützten das Vorhaben, alle sechs neuen Liganden hinsichtlich ihrer Selektivitäten zu den einzelnen Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors zu evaluieren.

K_i [nM]	TC07	TC08	TC09	TC10	TC11	TC12
α₁β₃γ₂	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
α₂β₃γ₂	223 ± 28	>1000	>1000	>1000	106 ± 18	22 ± 5
α₃β₃γ₂	142 ± 6	>1000	>1000	>1000	>1000	54 ± 29
α₄β₃γ₂	408,2	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
α₅β₃γ₂	12 ± 1,2	>1000	>1000	>1000	10,4 ± 1	4 ± 0,4
α₆β₃γ₂	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
LogP	2,69 ± 0,01	2,66 ± 0,01	2,56 ± 0,01	2,62 ± 0,01	2,85 ± 0,01	2,91 ± 0,01

Tab. 8: K_i-Werte der sechs getesteten Liganden TC07-TC12

Die genaue Bestimmung der Affinitäten und damit auch der Selektivitäten zu den einzelnen Untereinheiten zeigte, dass die Liganden TC08, TC09 und TC10 keine geeigneten Liganden für GABA_A-subtypselektive Benzodiazepinbindungsstellen darstellen, da die ermittelten K_i-Werte jenseits 1 μM liegen. Aus diesem Grund wurden diese drei Liganden in der weiteren Testung nicht mehr berücksichtigt. Hingegen haben die Liganden TC07, TC11 und TC12 die gewünschten Eigenschaften einer hohen Affinität auf den GABA_A/α₅-Rezeptor und zeigen zur gleichen Zeit eine erhöhte Selektivität bezüglich der α₅-Untereinheit. Ferner ist das Verhältnis α₂/α₅ und das Verhältnis α₃/α₅ in einem akzeptablen Rahmen um eine weitere Evaluierung dieser Liganden zu rechtfertigen.

Parallel zu den ersten biologischen Experimenten wurden alle sechs Liganden hinsichtlich der Passierbarkeit der Blut-Hirn-Schranke getestet. Die experimentell mittels HPLC bestimmten LogP-Werte lagen alle im Bereich zwischen 2 und 3, daher sollten die Liganden TC07-TC12 durch Diffusionsprozesse die BHS durchdringen können.

Erste Autoradiographien mit den ¹⁹F-haltigen Verbindungen wurden so gut wie möglich in Anlehnung an die zuvor durchgeführten *in vitro*-Bindungsexperimente an Rattenhirnmembranen durchgeführt. Dabei wurde eine Konzentration von 6 nM [³H]Ro15-4513 als Radioligand verwendet. Für die Liganden TC07, TC11 und TC12 konnten signifikante Bindungsunterschiede zwischen Cerebellum und Hippocampus festgestellt werden. Die Inkubation mit TC12 zeigte dabei die größte Differenz. Zur Bestätigung dieser Experimente wurde als Vergleich auch der Ligand TC08 getestet, die Inkubation mit diesem Liganden führte zu keiner detektierbaren Differenz. Eine weitere Bestätigung dieser Ergebnisse wurde in einem weiteren Experiment erhalten. Die Verdrängung der Restbindung von [³H]Ro15-1788 nach Zugabe 10 μM Zolpidem erfolgte am stärksten durch die Liganden TC07 und TC12. Für die Liganden TC08 und TC11 konnte keine signifikante Verdrängung festgestellt werden. Insgesamt unterstützen diese *in vitro*-Ergebnisse weitere Experimente mit den Substanzen TC07 und TC12.

Da der Ligand TC07 in allen *in vitro*-Experimenten insgesamt betrachtet die besten Ergebnisse erzielte, aber auch aufgrund seiner guten Löslichkeit, seiner hohen Stabilität in Lösung und sei-

ner guten synthetischen Zugänglichkeit, wurden *ex vivo*-Experimente mit diesem Liganden durchgeführt. Dabei wurde der Radioligand [^3H]Ro15-4513 im Vorderhirn weitaus stärker verdrängt als im Cerebellum. Diese Resultate bestätigen, dass auch hier eine Verdrängung des Radioliganden durch die getestete Substanz TC07 stattfand und somit TC07 in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

All diese experimentell gewonnenen Ergebnisse unterstützen das Vorhaben, den neuen GABA_A/α_5 -subtypeselektiven Liganden TC07 mit [^{18}F]Fluorid radioaktiv zu markieren und eine anschließende *in vivo*-Evaluierung von [^{18}F]TC07 anzustreben.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene, zur ^{18}F -Markierung geeignete Markierungsvorläufer dargestellt und hinsichtlich ihrer radiochemischen Ausbeuten bei einer Markierung mit [^{18}F]Fluorid untersucht, um im weiteren Verlauf das Produkt [^{18}F]TC07 in möglichst hoher radiochemischer Ausbeute darzustellen und in eine injizierbare Lösung zu überführen.

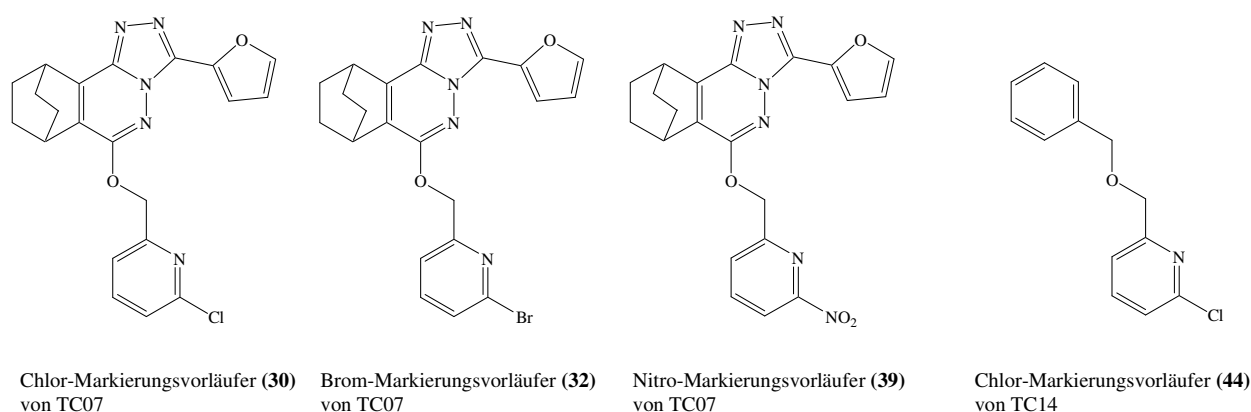


Abb. 71: Verschiedene Markierungsvorläufer zur Synthese von [^{18}F]TC07 und [^{18}F]TC14

Nach ersten Probemarkierungen einer für diesen Zweck hergestellten Modellverbindung TC14 zeigte sich, dass sich die aktivierenden Eigenschaften des Pyridinstickstoffs bezüglich einer Abgangsgruppe in ortho-Position bestätigen. Ferner ist festzustellen, dass in weiteren Markierungsreaktionen mit Zersetzungsprodukten gerechnet werden muss.

Analog zu der zuvor markierten Modellverbindung [^{18}F]TC14 wurde vor der eigentlichen nca-Markierung des Liganden TC07 ein $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$ -Isotopenaustausch an der Referenzverbindung [^{19}F]TC07 durchgeführt, um das allgemeine Reaktionsverhalten und die Stabilität des Liganden unter Markierungsbedingungen zu testen. Hier konnten rund 30 % radiochemischen Ausbeute nachgewiesen werden. Dies deutet auf generell eher schlechtere Markierungseigenschaften der Verbindung TC07 hin. Ferner zeigten sich bei diesem $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$ -Isotopenaustausch wie auch bei den darauffolgenden nca-Markierungen der Verbindung TC07 über einen Chlor-, Brom- oder Nitromarkierungsvorläufer bis zu fünf verschiedene radioaktive Zersetzungsprodukte.

Erste Versuche einer nca-Markierung über den zunächst dargestellten Chlor-Markierungsvorläufer bestätigten die zu erwartenden schlechtere Markierungseigenschaften der Verbindung TC07. Der Chlor-Markierungsvorläufer ist aufgrund seiner sehr geringen Ausbeuten von unter 3 % nicht dazu geeignet, [^{18}F]TC07 zweckmäßig darzustellen.

Aus diesem Grund wurde ein Brom-Markierungsvorläufer synthetisiert, da Brom als nukleofuge Gruppe bei Fluorierungen von Elektronenmangelaromaten nahezu immer höhere radiochemische Ausbeuten aufweist. Unter Verwendung eines klassischen Heizbades (Ölbad) konnten radiochemische Ausbeuten von 4 % nach bereits einer Minute bei 140°C in DMF erhalten werden. In einer mikrowelleninduzierten ^{18}F -Markierungsreaktion konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Mikrowellenstrahlung eine Steigerung der radiochemischen Ausbeute auf über 6 % bei 50 W nach 4 min möglich war. Allerdings war diese radiochemische Ausbeute immer noch in einem Bereich, in dem eine Evaluierung mit vorangehender Separation des Produktes [^{18}F]TC07 zu großen Problemen hinsichtlich der benötigten Aktivitätsmengen im Tierexperiment führen würde.

Die Synthese eines besseren Markierungsvorläufers erwies sich synthetisch als äußerst schwierig. Dennoch konnte mit hohem präparativen Aufwand ein Nitro-Markierungsvorläufer dargestellt werden. Dieser wurde ausgiebig im Hinblick auf möglichst hohe radiochemische Ausbeuten unter Variation der Parameter Reaktionszeit, Temperatur, Lösungsmittel, Markierungsvorläuferkonzentration, Basensystem, Basen-Markierungsvorläufer-Verhältnis und Untersuchung verschiedener Markierungsmethoden (Heizbad, Mikrowelle PT-Modus und STD-Modus) optimiert. Es konnten dabei Ausbeuten von über 40 % [^{18}F]TC07 als maximale radiochemische Ausbeute erhalten werden. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass dieser Nitro-Markierungsvorläufer sehr gut für Reaktionen mit mikrowelleninduzierter Strahlung geeignet ist, da hier ebenfalls radiochemische Ausbeuten von über 40 % erzielt werden konnten. Dabei wurde bei allen angewandten Markierungsmethoden jeweils 2,4 μmol Nitro-Markierungsvorläufer in 1 ml DMF in einem Verhältnis 3:1 ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}222$)/Markierungsvorläufer eingesetzt. Lediglich die Reaktionszeit und -temperatur muss der entsprechenden Markierungsmethode angepasst werden.

Da ein weiteres etabliertes Markierungsverfahren neben der Direktmarkierung die Markierung über die prosthetische Gruppe [^{18}F]Fluorethyltosylat ([^{18}F]FETos) ist, wurde auch für diese Methode ein Markierungsvorläufer TC07BOH (**48**) mit entsprechender kalten Referenzverbindung FETC07B (**49**) synthetisiert. Aufgrund großer präparativer Probleme bei der Darstellung, wurde das entsprechende Phenolderivat synthetisiert und markiert. Eine Markierung des zur ^{18}F -Fluorethylierung synthetisierten TC07-Derivates erbrachte in ersten Testsynthesen bis zu 50 % radiochemische Ausbeute. Da jedoch die Direktmarkierung von TC07 über einen Nitro-Markierungsvorläufer zum Zeitpunkt dieser Markierung bereits zu ersten Ergebnissen bei der Evaluierung führte, wurde diese Markierungsstrategie nicht weiter verfolgt. Ferner hätte durch die strukturellen Veränderungen im Molekül (Fluorethylrest statt Fluor und Phenol-Derivat an-

stelle des Pyridinderivates) eine komplett neue Evaluierung der Substanz hinsichtlich ihrer Lipophilie, Affinität und Selektivität erfolgen müssen.

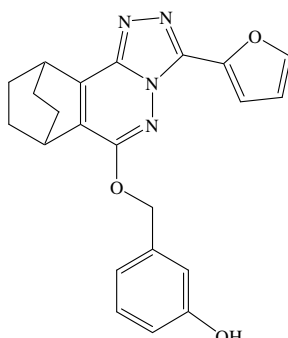


Abb. 72: Markierungsvorläufer zur Synthese von [^{18}F]FETC07B

Im Anschluss an die Optimierung der radiochemischen Ausbeute zur Darstellung von [^{18}F]TC07 erfolgte die Separation des Produktes über eine HPLC-Auftrennung mit anschließender Kartuschenfixierung. Nach Elution der Kartusche wurde das Produkt in üblicher Weise in eine injizierbare Lösung überführt. Es konnten zerfallskorrigierte Ausbeuten von 14,8 % erhalten werden. Die durchschnittliche Syntheszeit betrug 110 min, es konnten spezifische Ausbeuten von 6,5 GBq/ μmol erreicht werden. Die Wiederauffindungsrate der Aktivität war mit 91,6 % $\pm$ 13,4 % im guten Bereich.

Nachdem durch Optimierung [^{18}F]TC07 in ausreichend großen Aktivitätsmengen und als injizierbare Lösung dargestellt werden konnte, sollten zunächst die Affinität und Selektivität dieses Liganden in Autoradiographien bestätigt werden. Visuell konnte in den angefertigten Autoradiographien mit dem Liganden [^{18}F]TC07 jedoch keine Anreicherung in irgendeiner spezifischen Gehirnregion erkannt werden. Auch ein Vergleich der Aktivitätsmengen in verschiedenen Hirnregionen wie dem Hippocampus zeigte keine spezifische Anreicherung, da durch die sehr hohe unspezifische Bindung des Liganden das Hippocampus/Hintergrund-Verhältnis viel zu klein ist. Ein im Anschluss an dieses Experiment durchgeführter PET-Scan an Ratten zeigte *in vivo* nur eine geringe Aktivitätsanreicherung im Rattenhirn.

Aufgrund der zuvor durch die Evaluierung der Referenzverbindung TC07 bestimmten hervorragenden Eigenschaften als GABA_A/ α_5 -subtypselektiver Ligand und die experimentelle Bestätigung, dass TC07 in der Lage sein sollte, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, musste nach weiteren möglichen Faktoren gesucht werden, die eine ausreichende Aufnahme von [^{18}F]TC07 im Gehirn beeinträchtigen. Wie bereits diskutiert, sind generell verschiedene Faktoren zu berücksichtigen. Hierbei können Metabolisierungsprozesse im Blut und in anderen Organen

eine Rolle spielen, aber auch der Einfluss des Betäubungsmittels sowie ein Ausschleusen aus der Zelle durch das P-Glykoprotein.

Der Ligand [^{18}F]TC07 zeigte eine hohe Stabilität von über 50 % nach 10 min im Blut, des Weiteren konnten zwei ^{18}F -Metaboliten nachgewiesen werden, die jedoch aufgrund ihrer Hydrophilie keinen Einfluss auf die Aktivitätsaufnahme im Gehirn haben sollten. Es konnten keine Auffälligkeiten in der Organverteilung gefunden werden, auch ein negativer Einfluss des Betäubungsmittels auf den GABA_A-Rezeptorstatus konnte ausgeschlossen werden. Jedoch weist ein Unterschied von etwa 0,2 % in der Aktivitätsanreicherung in Gehirn bei Wildtyp-Mäusen und PGP-knockout-Mäusen darauf hin, dass der Radioligand [^{18}F]TC07 als mögliches P-Glykoproteinsubstrat dient und somit relativ schnell wieder aus der Zelle ausgeschleust wird. Ein anschließendes PET-Experiment mit PGP-knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen konnte bestätigen, dass es sich bei [^{18}F]TC07 um ein schwaches P-Glykoproteinsubstrat handelt.

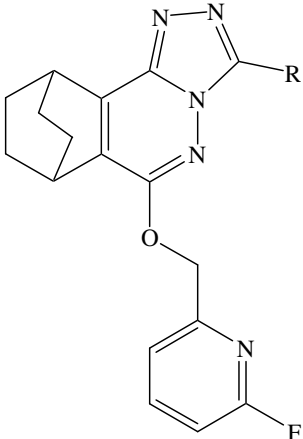
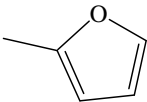
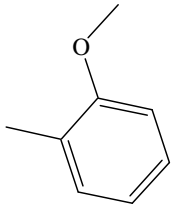
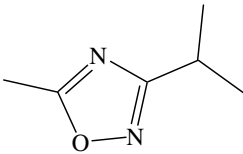
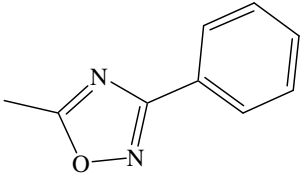
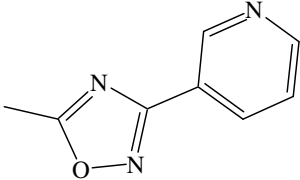
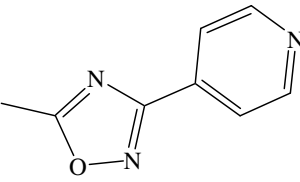
Zusammenfassend ist also wiederzugeben, dass die in dieser Arbeit neu synthetisierten fluorhaltigen Liganden zum Teil eine hohe GABA_A/α₅-Subtypselektivität aufweisen. Auch die ^{18}F -markierte Verbindung TC07 lässt sich über einen geeigneten Markierungsvorläufer direkt mit [^{18}F]Fluorid synthetisieren.

Allerdings wurde in weiterführenden Experimenten festgestellt, dass die ^{18}F -markierte Verbindung TC07 in Autoradiographien und Verdrängungsexperimenten einen sehr hohen Anteil an unspezifischer Bindung aufweist. Die durchgeführten Kleintierexperimente am μPET zeigten, dass keine ausreichende Anreicherung des Radioligand [^{18}F]TC07 im Gehirn erreicht werden kann. Ferner ist keine spezifische Bindung des Radioliganden an Regionen mit hoher GABA_A/α₅-Subtypverteilung nachzuweisen. Eine Hypothese war die Eigenschaft des [^{18}F]TC07 als P-Glykoproteinsubstrat zu fungiert. Dies konnte in einem μPET-Experiment nachgewiesen werden. Jedoch erklärt dies nicht die große Abweichung von den zuvor erhaltenen Daten der Evaluierung der kalten Referenzverbindung TC07. Welche anderen Faktoren noch eine Rolle spielen könnten (z.B. andere Effluxsysteme) bleibt unklar.

Aus den erhaltenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der Radioligand [^{18}F]TC07 kein geeigneter Tracer zur *in vivo*-Visualisierung der α₅-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors ist

8 Anhang

8.1 Anhang A: Strukturen der inaktiven Referenzverbindungen

	Rest R	Substanzname
		TC07
		TC08
		TC09
		TC10
		TC11
		TC12

8.2 Anhang B: Häufig verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Äquiv.	Äquivalente
bs	breites Singulett
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
dd	Dublett vom Dublett
d. Th.	der Theorie
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
[¹⁸ F]FETos	2-[¹⁸ F]Fluorethyltosylat
ges.	gesättigt
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Lit.	Literatur
LM	Lösungsmittel
m	Multiplett
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minuten
MS	Massenspektrum
MV	Markierungsvorläufer
NMR	magnetische Kernresonanz
q	Quartett
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
t	Triplett
Tab.	Tabelle
tert.	tertiär

8.3 Anhang C: Ergebnisse der Evaluierung der kalten Referenzverbindungen TC07-TC12

8.3.1 Bestimmung der Affinitäten und Selektivitäten zu den GABA_A-Untereinheiten

Strukturelle Veränderungen an Biomolekülen können prinzipiell immer zu einer Veränderung des Bindungsverhaltens an dem entsprechenden Rezeptor führen. Da die Liganden von Street et al. mit Methylgruppe hohe Affinitäten zeigten, soll in einem ersten Vorversuch gezeigt werden, dass ein Fluor anstelle der Methylgruppe bei den Substanzen TC07-TC12 keinen wesentlichen Einfluss auf die Affinität gegenüber der GABA_A-Benzodiazepinbindungsstelle hat.

In diesem Vorversuch wurden Rattenhirnmembranen aus dem Cortex, dem Cerebellum und dem Hippocampus präpariert und in Bindungsassays mit Radioliganden verwendet. Dabei wurde 1 nM Radioligand [³H]15-4513 eingesetzt. Dieser wurde mit jeweils 512 nM der sechs Liganden TC07, TC08, TC09, TC10, TC11 und TC12 verdrängt. Die Experimente wurde mindestens drei Mal (n ≥ 3) durchgeführt.

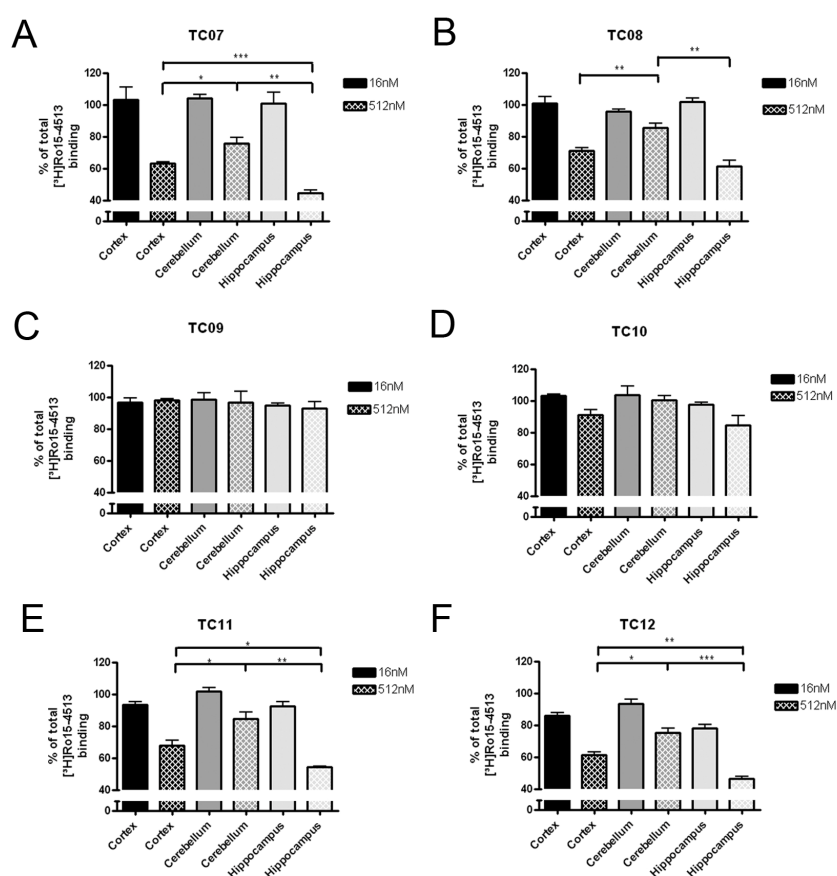


Abb. 73: Kompetitive Bindung von 512 nM TC07-TC12 gegen 1 nM [³H]Ro15-4513 mit Rattenhirnmembranen aus Cortex, Cerebellum und Hippocampus (*p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001).

Die Daten in Abb. 73 deuten auf eine Verdrängung des Radioliganden durch 512 nM der Substanzen TC07, TC08, TC11 und TC12 hin. Bei diesen Konzentrationen weisen diese Substanzen ferner auch einen statistisch signifikanten Unterschied in ihrer Bindung zu den drei verschiedenen Hirnregionen auf. Der größte Effekt ist im Hippocampus zu erkennen, der größte Unterschied in der Verdrängung des Radioliganden ist zwischen Hippocampus und Cerebellum festzustellen. Die getesteten Substanzen TC09 und TC10 hatten eine nur sehr geringe Affinität auf die Benzodiazepinbindungsstelle und wurden aus diesem Grund in der weiteren Testung nicht mehr berücksichtigt.

Ein weiteres Experiment mit identischem Aufbau, jedoch einer höheren Konzentration von 6 nM [^3H]Ro15-4513 bestätigte das vorhergegangene Experiment mit nahezu identischen Ergebnissen.

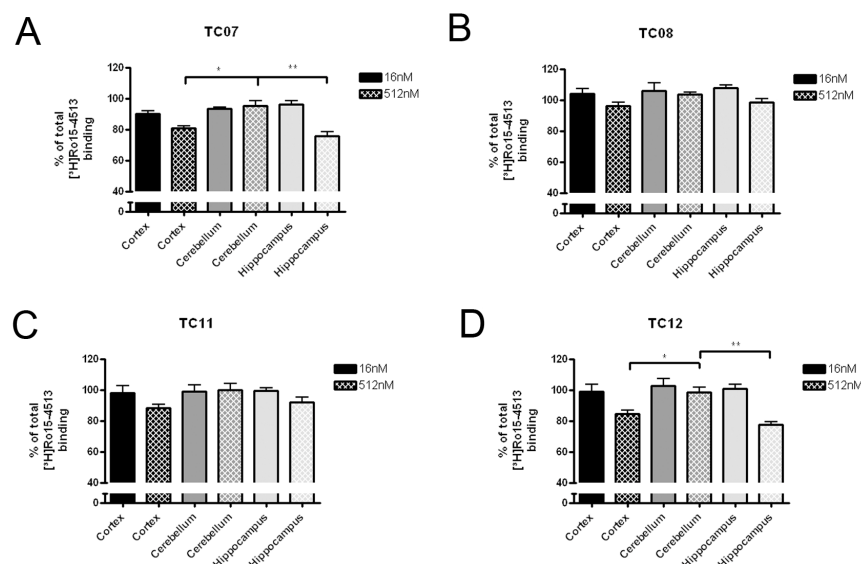


Abb. 74: Kompetitive Bindung von 512 nM TC07-TC12 gegen 6 nM [^3H]Ro15-4513 mit Rattehirnmembranen aus Cortex, Cerebellum und Hippocampus (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

Bei Betrachtung der erhaltenen Daten mit entsprechender Literatur^{117,118,119} könnte dieses Experiment einen ersten Hinweis darauf geben, dass durch die Verdrängung von [^3H]Ro15-4513 in verschiedenen Gehirnregionen die getesteten Substanzen TC07, TC08, TC11 und TC12 deutlich verschiedene Affinitäten auf die Subtypen α_1 und α_5 aufweisen. Dies rechtfertigt eine genauere Betrachtung der Substanzen TC07, TC08, TC11 und TC12 hinsichtlich ihrer Selektivität zu den einzelnen Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors.

Dazu wurden α_1 -, α_2 -, α_3 -, α_4 -, α_5 - und $\alpha_6\beta_3\gamma_2$ Rezeptoren in HEK293-Zellen transfiziert und Bindungsstudien von allen sechs potentiellen GABA_A- α_5 -subtypeselektiven Liganden TC07-TC12 in mindestens sieben verschiedenen Konzentrationen angefertigt.

Zwei repräsentative Dosis-Wirkungsbeziehungskurven für den α_5 -Rezeptor sind in Abb. 75 zu sehen. Dabei wird die Inhibition der Bindung an $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ von 1 nM des Radioliganden [^{3} H]Ro15-4513 gezeigt. Deutlich zu erkennen ist die vollständige Verdrängung des Radioliganden durch 1 μ M TC07. Vollständige Verdrängung durch den Liganden TC12 konnte aufgrund seiner schlechten Löslichkeit bei diesen Konzentrationen nicht erreicht werden.

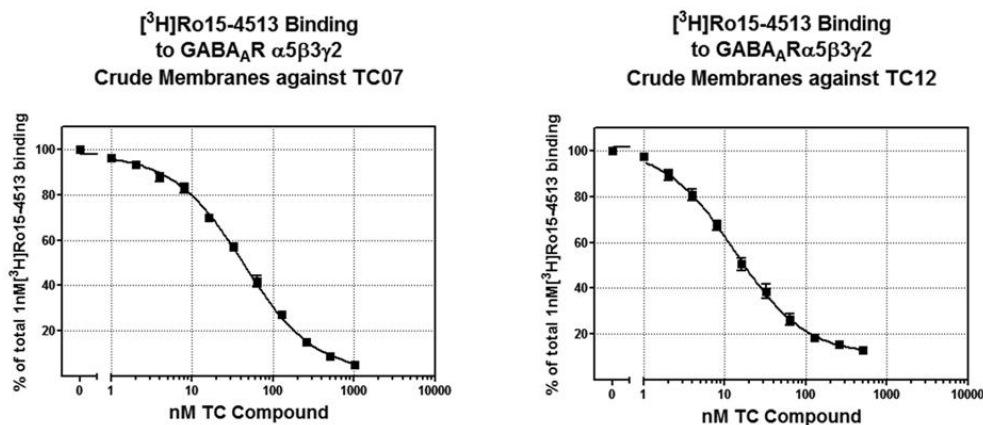


Abb. 75: Dosis-Wirkungskurve der Liganden TC07 und TC12; Verdrängung von [^{3} H]Ro15-4513

Aus diesem Experiment konnten die jeweiligen IC₅₀- und K_i-Werte der sechs getesteten Liganden bestimmt werden:

IC ₅₀ [nM]	TC07	TC08	TC09	TC10	TC11	TC12
$\alpha_1\beta_3\gamma_2$	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	417	>1000	>1000	>1000	252	41
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	281	>1000	>1000	>1000	>1000	80
$\alpha_4\beta_3\gamma_2$	681,9	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
$\alpha_5\beta_3\gamma_2$	42,6	>1000	>1000	>1000	36,8	13,9
$\alpha_6\beta_3\gamma_2$	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
K _i [nM]	TC07	TC08	TC09	TC10	TC11	TC12
$\alpha_1\beta_3\gamma_2$	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	223 ± 28	>1000	>1000	>1000	106 ± 18	22 ± 5
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	142 ± 6	>1000	>1000	>1000	>1000	54 ± 29
$\alpha_4\beta_3\gamma_2$	408,2	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
$\alpha_5\beta_3\gamma_2$	12 ± 1,2	>1000	>1000	>1000	10,4 ± 1	4 ± 0,4
$\alpha_6\beta_3\gamma_2$	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Tab. 9: IC₅₀- und K_i-Werte der sechs getesteten Liganden TC07-TC12

Die Liganden TC07, TC11 und TC12 zeigen dabei sehr gute α_5 -Affinitäten und –Selektivitäten während TC08, TC09 und TC10 gar keine Affinitäten im unteren μ molaren Bereich zeigen. Diese Ergebnisse rechtfertigen die Durchführung weiterer *in vitro* Experimente, die sich *in vivo*-Bedingungen durch *in situ* Rezeptor-Autoradiographien an Rattenhirnschnitten annähern.

8.3.2 Ergebnisse der Autoradiographien der kalten Referenzverbindungen

Die Resultate dieser Experimente sind hier an repräsentativen Abbildungen dargestellt, jedes Experiment wurde mit $n \geq 3$ durchgeführt. Die erhaltenen Bilder sind in Falschfarbe mit Dunkelblau als Hintergrundfarbe und Rot als maximale Signalintensität abgebildet.

Die Experimente wurden mit 14 μ m dicken Rattenhirnschnitten durchgeführt. Abb. 76 zeigt die Resultate der ersten Verdrängungsversuche von 6 mM [^{3} H]Ro15-4513 durch 512 nM Tc07, TC08, TC11 und TC12. Sogar visuell lässt sich die Verdrängung des tritiierten Liganden im Hippocampus durch TC07, TC11 und TC12 erkennen. Die Inkubation mit TC08 lässt keine ersten visuellen Rückschlüsse auf eine Verdrängung des Radioliganden zu.

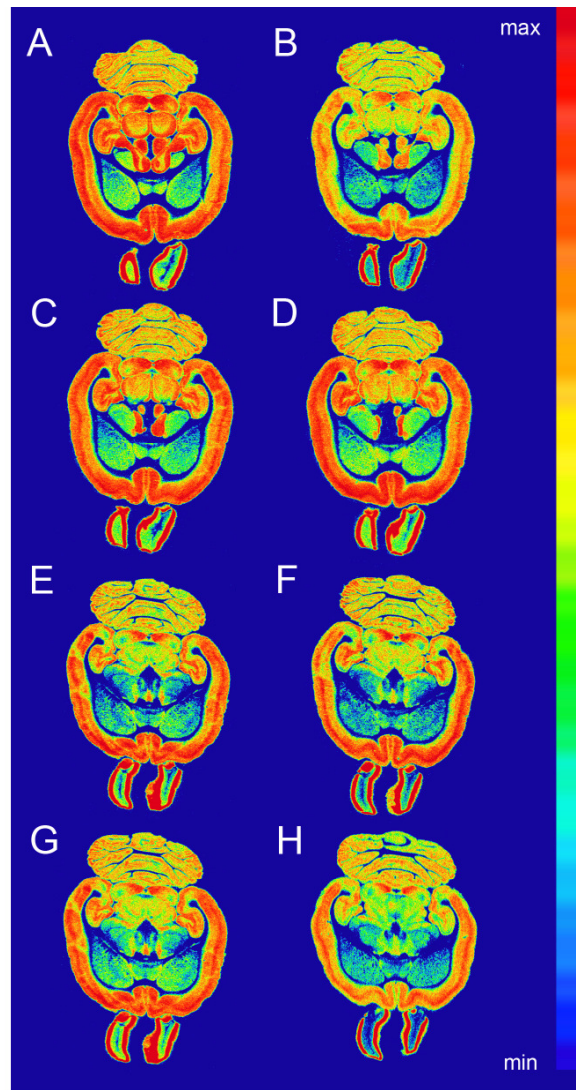


Abb. 76: Transversale Autoradiographie mit 6 nM [^3H]Ro15-4513 auf 14 μm Rattenhirnschnitten. A, C, E und G stellen jeweils die totale Bindung dar; B, D, F und H nach Zugabe von 512 nM von TC07 (B), TC08 (D), TC11 (F) und TC12 (H).

Die quantitative Auswertung dieses Versuches ist in Abb. 77 graphisch dargestellt und kann die visuelle Vermutung bestätigen.

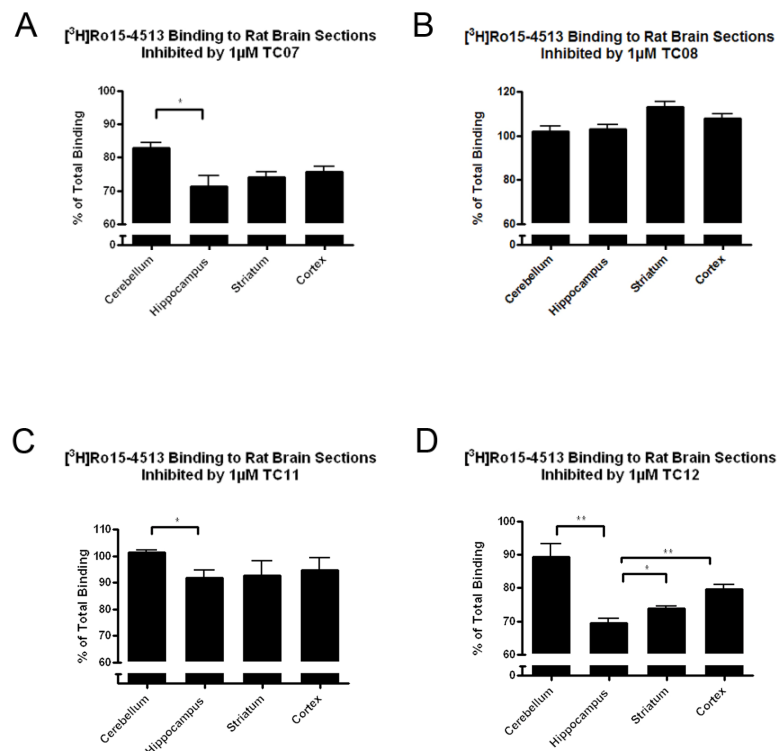


Abb. 77: Ergebnisse der Autoradiographien der Abb. 76 (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$)

Für TC07, TC11 und TC12 konnten signifikante Bindungsunterschiede zwischen Cerebellum und Hippocampus festgestellt werden. Die Inkubation mit TC12 zeigte dabei die größte Differenz. Die Inkubation mit dem Ligand TC08 führte zu keiner detektierbaren Differenz.

Nach diesen vielversprechenden Ergebnissen wurden coronale Rattenhirnschnitte verwendet, um den Hippocampus in einer anderen Perspektive untersuchen zu können. Ferner sollten die zuvor erlangten Resultate durch einen weiteren Radioligand bestätigt werden. $[^3\text{H}]\text{Ro15-1788}$ weist eine andere Affinität zum GABA_A -Rezeptor und eine andere Subtypselektivität auf.

Um einen Eindruck darüber zu erhalten, wieviel der totalen Bindung sich an den α_5 -haltigen Rezeptoren befindet, wurden dem Radioligand (1 nM) sowohl 512 nM der jeweiligen Test-Substanz (TC07, TC08, TC11, TC12) als auch 10 μM Zolpidem zugegeben.

Abb. 78 zeigt die erhaltenen Bilder des Experiments. Die Schnitte A zeigen die totale Bindung des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{Ro15-1788}$, die Schnitte B stellen die unspezifische Bindung dar, es ist keine unspezifische Bindung zu erkennen. Die Schnitte C repräsentieren die totale Bindung von $[^3\text{H}]\text{Ro15-1788}$ in der Anwesenheit von Zolpidem und D bis G zeigen die Bindung nach zusätzlicher Zugabe von TC07, TC08, TC11 und TC12 (von links nach rechts).

Auch hier kann bereits visuell eine erste Vermutung zur Verdrängung durch die TC-Substanzen getroffen werden: TC07 und TC12 scheinen die größte Affinität an GABA_A - α_5 -Rezeptoren zu haben, TC11 und TC08 scheinen wenig bis gar keinen Einfluss auf die restliche $[^3\text{H}]\text{Ro15-1788}$ -Bindung zu haben.

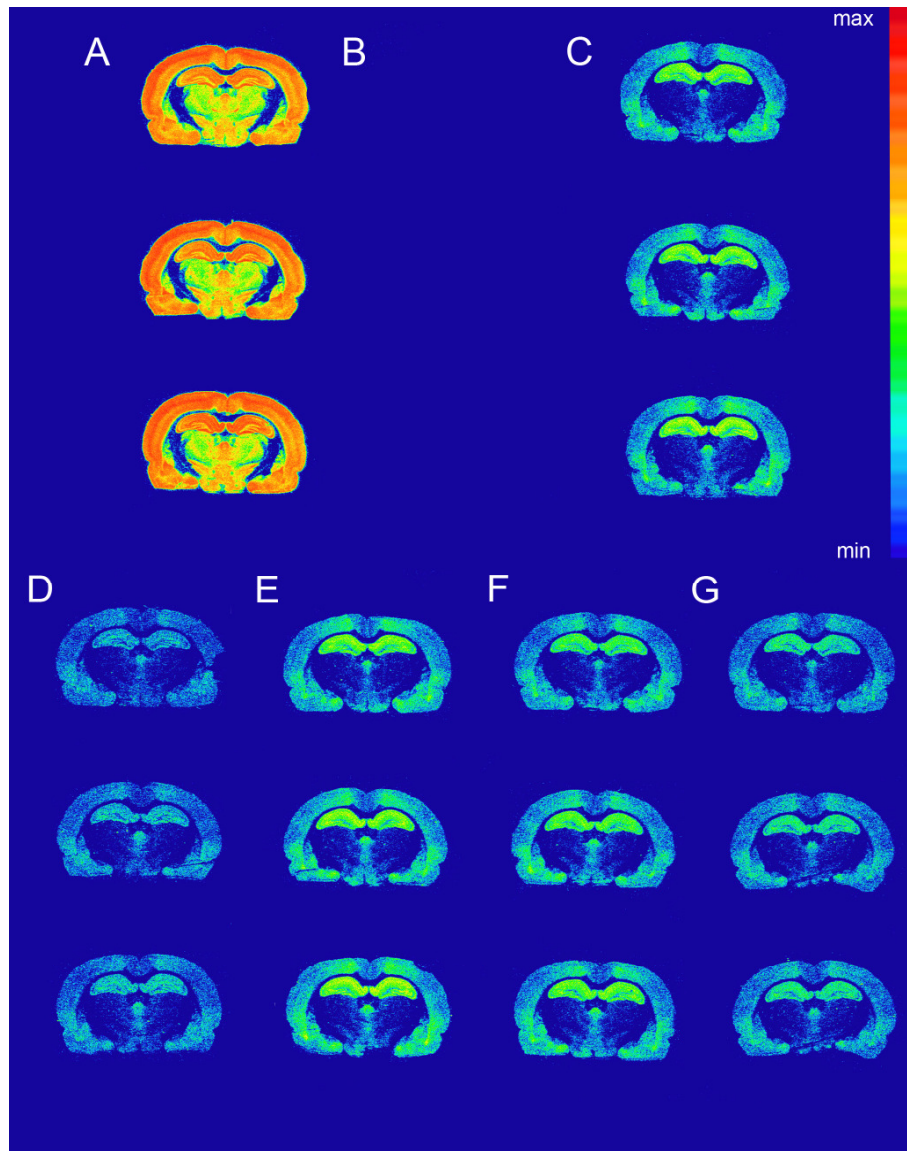


Abb. 78: Coronale Autoradiographie mit 1 nM [^3H]Ro15-1788. A: totale Bindung, B: unspezifische Bindung, C: 1 nM [^3H]Ro15-1788 + 10 μM Zolpidem, D: 512 nM TC07 + 10 μM Zolpidem, E: 512 nM TC08 + 10 μM Zolpidem, F: 512 nM TC11 + 10 μM Zolpidem, G: 512 nM TC12 + 10 μM Zolpidem

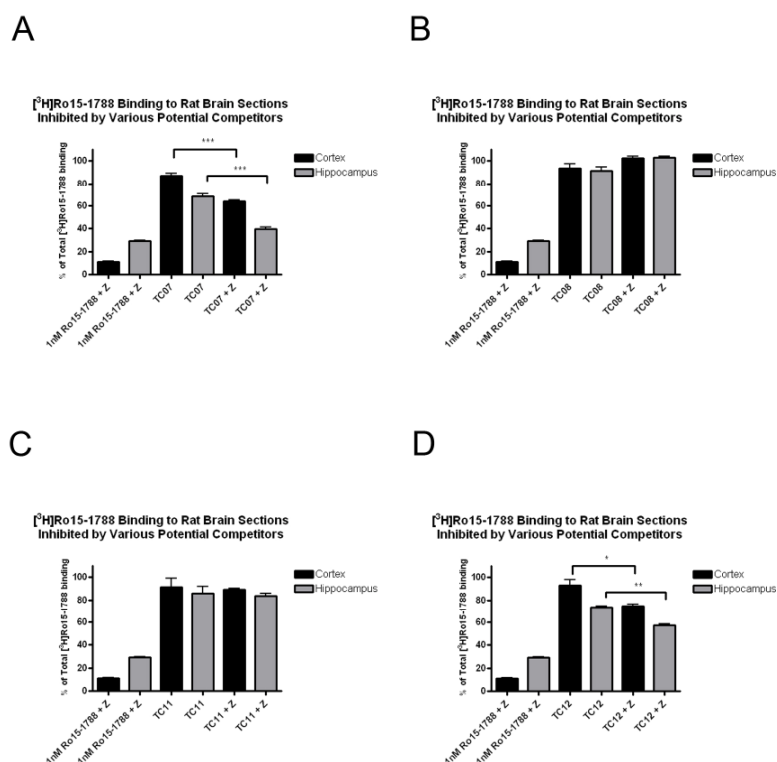


Abb. 79: Ergebnisse der Autoradiographien aus Abb. 78 als % der totalen [^3H]Ro15-1788-Bindung mit A: (TC07), B: (TC08), C: (TC11) und D: (TC12); (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Nach Koinkubation mit 10 μM Zolpidem bleiben vom tritiierten Liganden [^3H]Ro15-1788 etwa 10 % im Cortex und etwa 30 % im Hippocampus über. Die Verdrängung dieser restlichen Bindung erfolgte am stärksten durch die Liganden TC07 und TC12. Für die Liganden TC08 und TC11 konnte keine signifikante Verdrängung der restlichen [^3H]Ro15-1788-Bindung festgestellt werden.

Alles in allem unterstützen diese *in vitro*-Ergebnisse weitere Experimente mit den Substanzen TC07 und TC12.

8.3.3 Ergebnisse der *ex vivo*-Experimente der Referenzverbindung TC07

Um zu überprüfen, ob der bisher aussichtsreichste Ligand TC07 in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, wurde ein *in vivo*-Experiment durchgeführt.

Dabei wurde 8 Wochen alten, männlichen Sprague-Dawley Ratten reine Trägersubstanz (DMSO), 5 mg/kg TC07 oder 5 mg/kg Ro15-4513 (für unspezifische Bindung) i.p. injiziert. Nach 27 min wurde [^{3} H]Ro15-1788 (Flumazenil) in die Schwanzvene der Ratten appliziert. 3 min später wurden die Ratten dekaptiert, Vorderhirn und Cerebellum herauspräpariert, homogenisiert und gemessen. Der Proteingehalt des Homogenats wurde mittels Bradford Assay ermittelt und auf dpm/mg Protein normalisiert.

Die Ergebnisse der Graphik A in Abb. 80 zeigen, dass bei den mit TC07 behandelten Ratten die Bindung des Radioliganden [^{3} H]Ro15-1788 im Vorderhirn im Vergleich mit den trägersubstanz-behandelten Ratten um fast die Hälfte reduziert ist. Auch im Cerebellum zeigt sich eine leichte Verdrängung durch die Substanz TC07, allerdings ist kein signifikanter Unterschied zur totalen Bindung festzustellen.

Die Graphik B in Abb. 80 zeigt die mittlere Bindung der mit TC07 behandelten Ratten prozentual zur mittleren Bindung der mit Trägersubstanz behandelten Ratten (totale Bindung). Die Verdrängung im Cerebellum bleibt in einem Bereich unter 20 % während eine Verdrängung von über 40 % des Radioliganden im Vorderhirn erreicht wird.

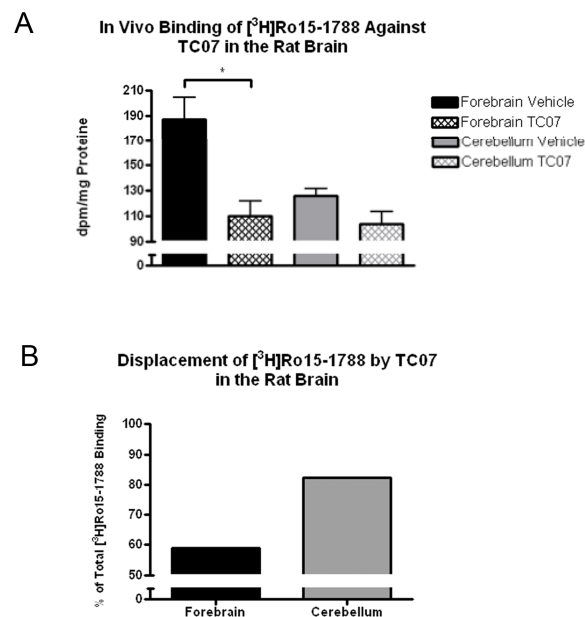


Abb. 80: *Ex vivo*-Ergebnisse der *in vivo*-Bindungsstudie von [^{3} H]Ro15-1788, A: *in Vivo*-Bindung von [^{3} H]Ro15-1788 im Vorderhirn und im Cerebellum nach Behandlung mit TC07 oder Trägersubstanz; B: Mittlere Bindung in TC07-behandelten Ratten in % der mittleren Bindung der mit reiner Trägersubstanz behandelten Ratten

Diese Ergebnisse bestätigen die bereits in der Autoradiographie gewonnenen Erkenntnisse über die GABA_A- α_5 -Subtypselektivität der Verbindung TC07 und weisen gleichzeitig darauf hin, dass TC07 in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

8.4 Anhang D: Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: PET-Aufnahme der benzodiazepinrezeptorselektiven Liganden [¹¹ C]Flumazenil und [¹⁸ F]FEF im Menschen	5
Abb. 2: Schema der Positronenvernichtung und der Detektion der Vernichtungsstrahlung	6
Abb. 3: Theoretische radiochemische Ausbeutekurve von nca-Markierungen	10
Abb. 4: Aufbau eines Wasser-Target-Systems zur Produktion von [¹⁸ F]F ⁻ _{aq}	11
Abb. 5: Allgemeine nukleophile aliphatische und aromatische Substitution mit [¹⁸ F]F ⁻	12
Abb. 6: Nukleophile ¹⁸ F-Fluorierung zur Herstellung von [¹⁸ F]FDG	14
Abb. 7: Synthese des 2-[¹⁸ F]Fluorethyltosylats	14
Abb. 8: Synthese des 2-Brom-1-[¹⁸ F]fluorethans	14
Abb. 9: Radioaktive Markierung über eine aktivierende Gruppe ¹⁷	15
Abb. 10: Schematische Darstellung des GABA _A -Rezeptors	16
Abb. 11: Diversität des GABA _A -Rezeptors	25
Abb. 12: Strukturen mit Affinität an Benzodiazepin-Bindungsstellen	28
Abb. 13: Struktur des 6-(6-Methyl-pyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4- α]phthalazins nach Street et al. ⁹²	29
Abb. 14: 6-(6-Fluor-pyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo-[3,4- α]-phthalazin-Derivate	30
Abb. 15: Allgemeine Synthesestrategie zur Darstellung der Referenzverbindungen TC07-TC12 sowie entsprechender Markierungsvorläufer	33
Abb. 16: Synthese des Grundkörpers A	33
Abb. 17: Mechanistische Betrachtung der Synthese des Grundkörpers A	34
Abb. 18: Synthese der Grundkörper B7 (7) und B8 (10)	35
Abb. 19: Darstellung der Grundkörper B9 (14), B10 (18), B11 (22) und B12 (26)	36
Abb. 20: Mechanistische Betrachtung der Synthese der Grundkörper B9-12	36
Abb. 21: Darstellung des Grundkörpers C (5)	37
Abb. 22: Darstellung der kalten Referenzverbindungen TC07-12	38
Abb. 23: Mesomere Grenzstrukturen von Pyridin bei Angriff eines Nukleophils in ortho-Position	39
Abb. 24: Darstellung von 6-Chlor-2-pyridinmethanol	40

Abb. 25: Modifizierte Gilman-van-Ess-Synthese zur Darstellung von 6-Brom-2-pyridinmethanol	40
Abb. 26: Mechanistische Betrachtung der Synthese von 6-Brom-2-pyridinmethanol	41
Abb. 27: Darstellung des 6-Nitro-2-pyridinmethanols nach Schema I	42
Abb. 28: Darstellung des 6-Nitro-2-pyridinmethanols nach Schema II	42
Abb. 29: Oxidation des 6-Amino-2-methylpyridins zur entsprechenden Carbonsäure	43
Abb. 30: Darstellung verschiedener Markierungsvorläufer zur ^{18}F -Direktmarkierung	44
Abb. 31: Überführung des Chlor-Markierungsvorläufers (30) in den Trimethylammonium-Markierungsvorläufer (38)	45
Abb. 32: Darstellung der Modellverbindung TC14 (45) und ihres Markierungsvorläufers (44)	46
Abb. 33: Tautomerie des 2-Hydroxypyridins	47
Abb. 34: Darstellung des Markierungsvorläufers TC07BOH (48) und der entsprechenden Referenzverbindung FETC07B (49)	48
Abb. 35: Syntheseroute zur Darstellung der geplanten Markierungsvorläufers TC07POH (56) und der entsprechenden Referenzverbindung FETC07P (57)	49
Abb. 36: Synthesestrategie zur Darstellung von ^{18}F TC14	50
Abb. 37: Markierung von benzylgeschütztem 6-Fluor-2-pyridinmethanol (DMF, 24 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)	50
Abb. 38: Markierung von benzylgeschütztem 6-Chlor-2-pyridinmethanol (DMF, 24 μmol , $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)	51
Abb. 39: Synthesestrategie zur Darstellung von ^{18}F TC07	52
Abb. 40: $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$ -Isotopenaustausch an ^{19}F TC07 (DMF, 30 μmol , $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)	53
Abb. 41: Abhängigkeit der radiochemische Ausbeute von der Reaktionstemperatur (DMF, 6,6 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)	54
Abb. 42: Einfluss der Markierungsvorläuferkonzentration auf die radiochemische Ausbeute (DMF, 150°C, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)	55
Abb. 43: Abhängigkeit der radiochemische Ausbeute von der Reaktionstemperatur (DMF, 6,6 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)	56
Abb. 44: Einfluss des Lösungsmittels auf die radiochemische Ausbeute von ^{18}F TC07 (6,6 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)	57
Abb. 45: Einfluss der Markierungsvorläuferkonzentration auf die radiochemische Ausbeute (DMF, 150 °C, $\text{K222}/\text{K}_2\text{CO}_3$)	58
Abb. 46: Markierung im Powertest-Modus der Mikrowelle bei 50 und 100 W (DMF, 6,6 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)	59
Abb. 47: Abhängigkeit der radiochemische Ausbeute von der Reaktionstemperatur (DMF, 2,4 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)	60
Abb. 48: Einfluss des Lösungsmittels bei verschiedenen Temperaturen auf die radiochemische Ausbeute von ^{18}F TC07 (2,4 μmol MV, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K222}$)	61

Abb. 49: Einfluss der Markierungsvorläuferkonzentration auf die radiochemische Ausbeute (DMF, 120 °C, K ₂ CO ₃ /K222)	62
Abb. 50: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von verschiedenen Basen und verschiedener Basenkonzentrationen (DMF, 120 °C, 2,4 µmol MV)	63
Abb. 51: Abhängigkeit der RCA von dem Verhältnis von K ₂ CO ₃ /K222 zum Markierungsvorläufer	64
Abb. 52: Markierung im Powertest-Modus der Mikrowelle bei 50 und 100 W (DMF, 2,4 µmol MV, K222/K ₂ CO ₃)	65
Abb. 53: Markierung im Standardmodus der Mikrowelle bei verschiedenen Temperaturen (DMF, 2,4 µmol MV, K ₂ CO ₃ /K222)	66
Abb. 54: Einfluss verschiedener Basen und Basenkonzentrationen auf die radiochemische Ausbeute im Standardmodus der Mikrowelle (DMF, 2,4 µmol MV, 120°C)	67
Abb. 55: HPLC-Abtrennung von [¹⁸ F]TC07	68
Abb. 56: Synthesestrategie zur Darstellung von [¹⁸ F]FETC07B	69
Abb. 57: [¹⁸ F]FETos-Markierung von TC07BOH bei verschiedenen Temperaturen (DMSO, 2,4 µmol MV, 2,5 µmol NaOH)	70
Abb. 58: Transversale Autoradiographien auf 14 µm Rattenhirnschnitten mit A: totale Bindung , B: spezifische Bindung und C: unspezifische Bindung von je 3nM [¹⁸]TC07; im Vergleich dazu D: totale Bindung von 6 nM [³ H]Ro15-4513 und E: 6 nM [³ H]Ro15-4513 nach Zugabe von 512 nM von kaltem TC07	74
Abb. 59: PET-Bilder von [¹⁸ F]TC07; A sagital, B coronal, C transversal, jeweils auf Höhe der Harderschen Drüsen und D transversal auf Höhe des Gehirnes	75
Abb. 60: Repräsentative Zeit-Aktivität-Kurve der PET-Aufnahme aus Abb. 56	76
Abb. 61: Ergebnis der Metabolitenstudie von [¹⁸ F]TC07 im Serum; WT: Wildtyp-Maus; WT, Isofluran: Wildtyp-Maus unter Isofluranbetäubung; PGP-KO: PGP-knockout-Maus	77
Abb. 62: Organverteilung von [¹⁸ F]TC07 in 1: Blut, 2: Gehirn, 3: Niere, 4: Leber nach 3 min, respektive 10 min; dabei sind WT: Wildtyp-Maus; WT, Isofluran: Wildtyp-Maus unter Isofluranbetäubung; PGP-KO: PGP-knockout-Maus	78
Abb. 63: Verteilung von [¹⁸ F]TC07 im Gehirn bei 3 min, respektive 10 min; dabei sind WT: Wildtyp-Maus; WT, Isofluran: Wildtyp-Maus unter Isofluranbetäubung; PGP-KO: PGP-knockout-Maus	79
Abb. 64: Sagitale PET-Bilder von [¹⁸ F]TC07; sagital jeweils auf Höhe der Harderschen Drüsen und des Gehirnes, A Wildtyp-Maus, B: PGP-knockout-Maus	80
Abb. 65: Repräsentative Zeit-SUV-Kurve der PET-Aufnahme aus Abb. 61	80
Abb. 66: Eichgerade verschiedener Stoffmengen der Referenzverbindung TC07 (I: 0.026 nmol, II: 0.256 nmol, III: 0.511 nmol, IV: 1.278 nmol, V: 2.555 nmol, VI: 5,110 nmol. VII: 25.550 nmol)	128

- Abb. 67: Eichgerade der Standards Benzaldehyd (I: 1.48), Anisol (II: 2.11), Toluol (III: 2.73), 4-Bromanisol (IV: 3.05), 4-Iodanisol (V: 3.24) 129
- Abb. 68: Ausrüstung für die Untersuchung von Ratten bzw. Mäusen mittels μ PET; A: μ PET der Firma Siemens/Concord, B: Isofluranbetäubung mit einer Konzentration von 1,8 %, C und D: Versuchstier mit Kathetern, das Tier wurde betäubt und fixiert, um verschwommene Aufnahmen zu verhindern 131
- Abb. 69: Eichgerade zur Bestimmung der Aktivität (I: 23 kBq, II: 11,5 kBq, III: 5,25 kBq, IV: 2,125 kBq, V: 1,0625 kBq, VI: 0,10625 kBq, VII: 0,050313 kBq, VIII: 0,0050313 kBq, IX: 0,0025156 kBq, X: 0,00025156 kBq) 133
- Abb. 70: 6-(6-Fluor-pyridin-2-yl)methyloxy-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo-[3,4- α]-phthalazin-Derivate TC07-TC12 134
- Abb. 71: Verschiedene Markierungsvorläufer zur Synthese von [^{18} F]TC07 und [^{18} F]TC14 136
- Abb. 72: Markierungsvorläufer zur Synthese von [^{18} F]FETC07B 138
- Abb. 73: Kompetitive Bindung von 512 nM TC07-TC12 gegen 1 nM [^{3} H]Ro15-4513 mit Rattenhirnmembranen aus Cortex, Cerebellum und Hippocampus (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$) 142
- Abb. 74: Kompetitive Bindung von 512 nM TC07-TC12 gegen 6 nM [^{3} H]Ro15-4513 mit Rattenhirnmembranen aus Cortex, Cerebellum und Hippocampus (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$;) 143
- Abb. 75: Dosis-Wirkungskurve der Liganden TC07 und TC12; Verdrängung von [^{3} H]Ro15-4513 144
- Abb. 76: Transversale Autoradiographie mit 6 nM [^{3} H]Ro15-4513 auf 14 μ m Rattenhirnschnitten. A, C, E und G stellen jeweils die totale Bindung dar; B, D, F und H nach Zugabe von 512 nM von TC07 (B), TC08 (D), TC11 (F) und TC12 (H) 146
- Abb. 77: Ergebnisse der Autoradiographien der Abb. 70 (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$) 147
- Abb. 78: Coronale Autoradiographie mit 1 nM [^{3} H]Ro15-1788. A: totale Bindung, B: unspezifische Bindung, C: 1 nM [^{3} H]Ro15-1788 + 10 μ M Zolpidem, D: 512 nM TC07 + 10 μ M Zolpidem, E: 512 nM TC08 + 10 μ M Zolpidem, F: 512 nM TC11 + 10 μ M Zolpidem, G: 512 nM TC12 + 10 μ M Zolpidem 148
- Abb. 79: Ergebnisse der Autoradiographien aus Abb. 72 als % der totalen [^{3} H]Ro15-1788-Bindung mit A: (TC07), B: (TC08), C: (TC11) und D: (TC12); (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$) 149
- Abb. 80: *Ex vivo*-Ergebnisse der *in vivo*-Bindungsstudie von [^{3} H]Ro15-1788, A: *in Vivo*-Bindung von [^{3} H]Ro15-1788 im Vorderhirn und im Cerebellum nach Behandlung mit TC07 oder Trägersubstanz; B: Mittlere Bindung in TC07-behandelten Ratten in % der mittleren Bindung der mit reiner Trägersubstanz behandelten Ratten 150

8.5 Anhang E: Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Wichtige Positronenstrahler	8
Tab. 2: Kernreaktionen zur Produktion von ^{18}F -Fluor im Zyklotron	11
Tab. 3: GABA _A -Untereinheiten und ihre vermuteten primären Funktionen	25
Tab. 4: Radiochemische Ausbeuten bei verschiedenen Markierungsmethoden	67
Tab. 5: Durchschnittliche Aktivitätsbilanz der Radiosynthese von [^{18}F]TC07	69
Tab. 6: Retentionszeiten und Lipophilien der Testsubstanzen TC07-TC12	72
Tab. 7: Übersicht über die getesteten Inkubationsbedingungen der Autoradiographien	73
Tab. 8: K _i -Werte der sechs getesteten Liganden TC07-TC12	135
Tab. 9: IC ₅₀ - und K _i -Werte der sechs getesteten Liganden TC07-TC12	144

8.6 Anhang F: Literaturverzeichnis

- [1] Phelps M.E., *Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes.*, Proc Natl Acad Sci, 97(16) (2000), 9226–9233
- [2] <http://frontal21.zdf.de/ZDFde/inhalt/6/0,1872,5387366,00.html?dr=1>, *Strahlende Geschäfte – Die Gefahren der Computertomographie* (2007)
- [3] Herzog H., Rösch F., *PET- und SPECT-Technik.*, Pharmazie in unserer Zeit 34 (2005), 468-473
- [4] Qaim S.M., *Cyclotron production of medical radionuclides.*, Handbook of Nuclear Chemistry, Vol. 4: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Science (2003)
- [5] Shiue C.-Y., Fowler J.S., Wolf A.P., Watanabe M., Arnett C.D., *Syntheses and specific activity determinations of no-carrier-added fluorine-18-labeled neuroleptic drugs.*, J Nucl Med 26 (1985), 181-186
- [6] Stöcklin G., *Emissions-Computertomographie mit kurzlebigen zyclotronproduzierten Radionukliden.*, Handbuch der medizinischen Radiologie, Band 15/1B (1989)
- [7] Qaim S.M., Stöcklin G., *Production of some medically important short-lived neutron deficient radioisotopes of halogens.*, Radiochim Acta 34 (1983), 25

- [8] Hamacher K., Blessing G., Nebeling B., *Computer-aided synthesis (CAS) of no-carrier added 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose: an efficient automated system for the aminopolyether-supported nucleophilic fluorination.*, Appl. Radiat. Isot. 41 (1990), 49-55
- [9] Qaim S.M., Coenen H.H., *Produktion pharmazeutisch relevanter Radionuklide.*, Pharm. Unserer Zeit 6 (2005), 460
- [10] Casella V., Ido T., Wolf A.P., Fowler J.S., MacGregor R.R., Ruth T.J., *Anhydrous ¹⁸F-labeled elemental fluorine for pharmaceutical preparation.*, J Nucl Med 21 (1980), 750
- [11] Firnau G., Nahmias C., Garnett S., *Preparation of fluorine-18-labeled 5-fluoro-DOPA with reactor-produced fluorine-18.*, Int J Appl Radiat Iso 24 (1973), 182-4
- [12] Loewenthal H.J.E., *Der clevere Organiker.*, Edition Deutscher Verlag der Wissenschaften (1993), 173
- [13] Hamacher K., Coenen H.H., Stöcklin G., *Efficient Stereospecific Synthesis of No-Carrier-Added 2-[¹⁸F]-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Using Aminopolyether Supported Nucleophilic Substitution.*, J Nucl Med 27 (1986), 235-238
- [14] Block D., *Diplomarbeit: Zur praktisch trägerfreien ¹⁸F-Fluoralkylierung und ¹⁸F-Fluoracylierung.*, Universität zu Köln (1987)
- [15] Mulholland G.K., Zheng Q.-H., Mock B.H. and Vavrek M.T., *Convenient labeling and isolation of [¹¹C-methyl]quaternary amines.*, J Label Compds Radiopharm 42 (1999), 318-320
- [16] Wilson A.A. , Dasilva J.N., Houle S., *Synthesis of two radiofluorinated cocaine analogs using distilled 2-[¹⁸F]fluoroethyl bromide.*, Appl Radiat Isot 46 (1995), 765-770
- [17] Comagic S., *Diplomarbeit: Darstellung sekundärer Markierungsvorläufer zur ¹⁸F-Fluorethylierung nukleophiler Gruppen*, Universität Mainz (2001)
- [18] Kreis M., Palmelund A., Bunch L., Madsen R., *A General and Convenient Method for the Rhodium-Catalyzed Decarbonylation of Aldehydes.*, Adv Synth Catal 348 (2006), 2148-2154

- [19] Shen B., Löffler D., Zeller K.-P., Übele M., Reischl G., Machulla H.-J., *Decarbonylation of multi-substituted [^{18}F]benzaldehydes for modelling syntheses of ^{18}F -labelled aromatic amino acids.*, Applied Radiation and Isotopes 65 (2007), 1227-1231
- [20] Shen B., Löffler D., Zeller K.-P., Übele M., Reischl G., Machulla H.-J., *Effect of aldehyde and methoxy substituents on nucleophilic aromatic substitution by [^{18}F]fluoride.*, J Fluor Chem 128 (2007), 1461-1468
- [21] Sieghart W., *Structure and pharmacology of gamma amino acidA receptor subtypes.*, Pharmacol Rev 47 (1995), 181-234
- [22] Sieghart W., Fuchs K., Tretter V., Ebert V., Jechlinger M., Hoyer H., Adamiker D., *Structure and subunit composition of GABA(A) receptors.*, Neurochem Int 34 (1999), 379-385
- [23] Nutt D.J. and Malizia A.L., *New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorders.*, Br J Psychiatry 179 (2001), 390-396
- [24] Korpi E.R., Gründer G., Lüddens H., *Drug interactions at GABA(A) receptors.*, Prog Neurobiol 67 (2002), 113-159
- [25] Boehm S.L., Ponomarev I., Jennings A.W., Whitting P.J., Rosahl T.W., Garrett E.M., Blednov Y.A., Harris A., *γ Aminobutyric acid A receptor subunit mutant mice: new perspectives on alcohol actions.*, Biochem Pharmacol 68 (2004), 1581-1602
- [26] Mombereau C., Kaupmann K., Froestl W., Sansig G., Van der Putten H., Cryan J.F., *Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behaviour.*, Neuropsychopharmacology 29 (2004), 1050-1062
- [27] Chang L., Cloak C.C., Ernst T., *Magnetic resonance spectroscopy studies of GABA in neuropsychiatric disorders.*, J Clin Psychiatry 64 (2003), 7-14
- [28] Drexler B., Grasshoff C., Rudolph U., Unertl K., Antkowiak B., *Die GABAA-Rezeptor-Familie: Möglichkeiten für die Entwicklung besserer Anästhetika.*, Anaesthesist 55 (2006), 287-295

- [29] Franks N.P., *Molecular targets underlying general anaesthesia.*, British Journal of Pharmacology 147 (2006), S72-S81
- [30] Sieghart W., Fuchs K., Tretter V., Ebert V., Jechlinger M., Hoyer H., Adamiker D., *Structure and subunit composition of GABA(A) receptors.*, Neurochem Int 34 (1999), 379-385
- [31] Olsen R.W., Chang C.S., Li G., Hancher H.J., Wallner M., *Fishing für allosteric sites on GABA(A) receptors.*, Biochem Pharmacol 68 (2004) 1675-1684
- [32] Comar D., Maziere M., Godot J.M., Berger G., Soussaline F., Menini C., Arfel G., Naquet R., *Visualisation of ^{11}C -flunitrazepam displacement in the brain of the live baboon.*, Nature 280 (1979), 329-331
- [33] Maziere M., Godot J.M., Berger G., Prenant C., Comar D., *High specific activity carbon-11 labelling of benzodiazepines: Diazepam and flunitrazepam.*, J Radioanal Chem 56 (1980), 229-235
- [34] Ishiwata K., Yanai K., Ido T., Miura-Kanno Y., Kawashima K., *Synthesis and biodistribution of [^{11}C]fludiazepam for imaging benzodiazepine receptors.*, Nucl Med Biol 15 (1988), 365-371
- [35] Le Breton C., Bottaender M., Crouzel C., Varastet M., Sitbon R., Maziere M., *Radiosynthesis and Baboon Experiments of [^{11}C]Triazolam.*, J Label Compds Radiopharm 32 (1993), 525-527
- [36] Dobbs F.R., Banks W., Fleishaker J.C., Valentine A.D., Kinsey B.M., Franceschini M.P., Digenis G.A., Tewson T.J., *Studies with [^{11}C]alprazolam: an agonist for the benzodiazepine receptor.*, Nucl Med Biol 22 (1995), 459-466
- [37] Maziere M., Hantraye P., Prenant C., Sastre J., Comar D., *Synthesis of ethyl 8-fluoro-5,6-dihydro5- [^{11}C]methyl-6-oxo-4H-imidazo[1,5-a] [1,4]benzodiazepine-3-carboxylate (RO 15.1788- ^{11}C): A specific radioligand for the in vivo study of central benzodiazepine receptors by positron emission tomography.*, Int J Appl Radiat Isot 35 (1984), 973-976
- [38] Halldin C., Stone-Elander S., Thorell J.-O., Persson A., Sedvall G., *11C-labeling of Ro 15-1788 in two different positions, and also 11C-labeling of its main metabolite Ro 15-*

- 3890, for PET studies of benzodiazepine receptors., *Int Appl Radiat Isot* 39 (1988), 993-997
- [39] Foged C., Halldin C., Loch C., Maziere B., Pauli S., Maziere M., Hansen H.C., Suhara T., Swahn C.-G., Karlsson P., Farde L., *Bromine-76 and carbon-11 labeled NNC 13 - 8199, metabolically stable benzodiazepine receptor agonists as radioligands for positron emission tomography (PET).*, *Eur J Nucl Med* 24 (1997), 1261-1267
- [40] Katsifis A., Kassiou M., *Developemt of Radioligands for In Vivo Imaging of GABA_A-Benzodiazepine Receptors.*, *Mini-Reviews in Med Chem* 4 (2004), 909-921
- [41] Frost J.J., Wagner H.N., Dannals R.F., Ravert H.T., Wilson A.A., Links J.M., Rosenbaum A.E., Trifiletti R.R., Snyder S.H., *Imaging benzodiazepine receptors in man with [¹¹C]suriclone by positron emission tomography.*, *Eur J Pharmacol* 122 (1986), 381-383
- [42] Boullais C., Oberdorfer F., Sastre J., Prenant C., Crouzel C., *Synthesis of ¹¹C-suriclone.*, *J Label Compds Radiopharm* 22 (1985), 1081-1086
- [43] Halldin C., Farde L., Litton J.E., Hall H., Sedvall G., *[¹¹C]Ro 15-4513, a ligand for visualization of benzodiazepine receptor binding. Preparation, autoradiography and positron emission tomography.*, *Psychopharmacology* 108 (1992), 16-22
- [44] Inoue O., Suhara T., Itoh T., Kobayashi K., Suzuki K., Tateno Y., *In vivo binding of [¹¹C]Ro15-4513 in human brain measured with PET.*, *Neurosci letters* 145 (1992), 133-136.
- [45] He X., Metecka D., Lee K.S., Gu Z.-Q., Rice K.C., Wong G., Skolnick P., de Costa B.R., *Synthesis of [¹²³I]tert-butyl 8-iodo-5,6-dihydro-5-methyl-6-oxo-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepine 3-carboxylate, a potential SPECT imaging agent for diazepam-insensitive (DI) benzodiazepine receptors.*, *J Label Compds Radiopharm* 34 (1993), 27-32
- [46] Katsifis A., Mardon K., McPhee M.E., Mattner F., Dikic B., Ridley D.D., *Synthesis and evaluation of [¹²³I]labelled analogues of the partial inverse agonist Ro 15-4513 for the study of diazepam-insensitive benzodiazepine receptors.*, *Nucl Med Biol* 26 (1999), 641-649

- [47] Dommont F., Waterhouse R., Montoya J., Mattner F., Katsifis A., Kegeles L., Laurelle M., *Synthesis and in vivo evaluation of [^{11}C]zolpidem, an imidazopyridine with agonist properties at central benzodiazepine receptors.*, Nucl Med Biol 30 (2003), 435-439
- [48] Duelfer T., Johnstrom P., Stone-Elander S., Holland A.; Halldin C.; Haaparanta M.; Solin O.; Bergman J.; Steinman M.; Sedvall G., *The labelling of 2-oxoquazepam with electrophilic ^{18}F .*, J Label Compds Radiopharm 29 (1991), 1223-1239
- [49] Johnstrom P., Stone-Elander S., Duelfer T., *[2'- ^{18}F]-2-Oxoquazepam: Synthesis of a 5-(2-[^{18}F]fluorophenyl)-1,4-benzodiazepine-2-one.*, J Label Compds Radiopharm 34 (1994), 147-156
- [50] Bergmann J., Johnstrom P., Haaparanta M., Solin O., Duelfer T., Stone-Elander S., *Radio-labelling of 2-oxoquazepam with electrophilic ^{18}F prepared from ^{18}F fluoride.*, Appl Radiat Isot 46 (1990), 477-482
- [51] Moerlein S.M., Perlmutter J.S., *Binding of 5-(2'-[^{18}F]fluoroethyl)flumazenil to central benzodiazepine receptors measured in living baboon by positron emission tomography.*, Eur J Pharmacol 218 (1992), 109-115
- [52] Gruender G., Siessmeier T., Lange-Asschenfeldt C., Vernaleken I., Buchholz H.-G., Stoeter P., Drzezga A., Lueddens H., Roesch F., Bartenstein P., *[^{18}F] Fluoroethylflumazenil : a novel tracer for PET imaging of human benzodiazepine receptors.*, Eur J Nucl Med 28 (2001), 1463-1470
- [53] Chang Y.S., Jeong J.M., Yoon Y.H., Kang W.J., Lee S.J., Lee D.S., Chung J.-K., Lee M.C., *Biological properties of 2'-[^{18}F]fluoroflumazenil for central benzodiazepine receptor imaging.*, Nucl Med Biol 32 (2005), 263-268
- [54] Ryzhikov N.N., Gomzina N.A., Fedorova O.S., Vasilev D.A., Kostikov A.P., Krasikova R.N., *Preparation of [^{18}F]Flumazenil, a Potential Radioligand for PET Imaging of Central Benzodiazepine Receptors, by Isotope Exchange.*, Radiochem 46 (2004), 290-294
- [55] Ryzhikov N.N., Senec N., Krasikova R.N., Gomzina N.A., Shchukin E., Fedorova O.S., Vassiliev D.A., Hall H., Savic I., Halldin C., *Preparation of highly specific radioactivity [^{18}F]flumazenil and its evaluation in cynomolgus monkey by positron emission tomography.*, Nucl Med Biol 32 (2005), 109-116

- [56] Odano I., Farde L., Karlsson P., Varrone A., Krasikova R., Airaksinen A., Halldin C., *[18F]Flumazenil for central benzodiazepine receptor imaging and its comparison with [11C] in human brain.*, J Nucl Med 48 Supplement 2 (2007), 61P
- [57] Hoepping A., Scheunemann M., Fischer S., Deuther-Conrad W., Hiller A., Wegner F., Diekers M., Steinbach J., Brust P., *Radiosynthesis and biological evaluation of an 18F-labeled derivative of the novel pyrazolopyrimidine sedative-hypnotic agent indiplon.*, Nucl Med Biol 34 (2007), 559–570
- [58] Krogsgaard-Larsen P., Krogsgaard-Larsen P., Arnt J., *GABA receptor agonists: relationship between structure and biological activity in vivo and in vitro.*, Advances exp med biol 123 (1979), 303-321
- [59] Naik S.R., Guidotti A., Cost E., *Central GABA receptor agonists: comparison of muscimol and baclofen.*, Neuropharmacology 15 (1976), 479-484
- [60] Snodgrass S.R., *Use of 3H-muscimol for GABA receptor studies.*, Nature 273 (1978), 392-394.
- [61] Elliot M., Pullman D.A., Larkin J.P., Casida J.E., *Insecticidal 1,3-dithianes.*, J Agric Food Chem 40 (1992), 147–151
- [62] Wachter V.J., Toia R.E., Casida J.E., *2-Aryl-5-tert-butyl-1,3-dithianes and their S-oxidation products: structure-activity relationships of potent insecticides acting at the GABA-gated chloride channel.*, J Agric Food Chem 40 (1992), 497–505
- [63] Culbert P.A., Chan S., Wearing A.V., Chamberlain M.J., Hunter D.H., *Potential imaging agent for the GABAA receptor: 4-tert-butyl-1-(4-[123I]iodophenyl)-2,6,7-trioxabicyclo[2.2.2]octane.*, Nucl Med Biol 20 (1993), 469–75
- [64] Mulholland G.K., Kilbourn M.R., *[18F]Fluoro-tert-butyl-bicycloorthobenzoate (FTBOB): a potential tracer for the GABAA chloride channel.*, J Label Compd Radiopharm 32 (1993), 313
- [65] Chen L., Durkin K.A., Casida J.E., *Structural model for γ -aminobutyric acid receptor noncompetitive antagonist binding; widely diverse structures fit the same site.*, Proc Natl Acad Sci U S A 103 (2006), 5185–90

- [66] McKernan R.M. and Whiting P.J., *Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain?*. Trends Neurosci 19(4) (1996), 139-43
- [67] Whiting P.J., Bonner T.P., *Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family.*, Ann N Y Acad Sci 868 (1999), 645-653
- [68] Rosahl T.W., *Validation of GABAA Receptor Subtypes as Potential Drug Targets by Using Genetically Modified Mice.*, Current Drug Targets – CNS & Neurological Disorders 2 (2003), 207-212
- [69] Sieghart W., *Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes.*, Pharmacol Rev 47(2) (1995), 181-234
- [70] Sur C., Quirk K. Dewar D., Attack J., McKernan R., *Rat and human hippocampal alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric AcidA receptors have alpha5 beta3 gamma2 pharmacological characteristics.*, Mol Pharmacol 54(5) (1998), 928-933
- [71] Chambers M.S., Attack J.R., Broughton H.B., Collinson N., Cook S., Dawson G.R., Hobbs S.C., Marshall G., Maubach K.A., Pillai G.V., Reeve A.J., MacLeod A.M., *Identification of a novel, selective GABA(A) alpha5 receptor inverse agonist which enhances cognition.*, J Med Chem 46(11) (2003), 2227-2240
- [72] Chambers M.S., Attack J.R., Carling R.W., Collinson N., Cook S.M., Dawson G.R., Ferris P., Hobbs S.C., O'connor D., Marshall G., Rycroft W., Macleod A.M., *An orally bioavailable, functionally selective inverse agonist at the benzodiazepine site of GABAA alpha5 receptors with cognition enhancing properties.* J Med Chem 47(24) (2004), 5829-5832
- [73] Carling R.W., Madin A., Guiblin A., Russell M.G.N., Moore K.W.; Mitchinson A., Sohal B., Pike A., Cook S.M., Ragan I.C., McKernan R.M., Quirk K., Ferris P., Marshall G., Thompson S.A., Wafford K.A., Dawson G.R., Attack J.R., Harrison T., Castro J.L., Street L.J., *7-(1,1-Dimethylethyl)-6-(2-ethyl-2H-1,2,4-triazol-3-ylmethoxy)-3-(2-fluoro phenyl)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pyridazine: a functionally selective gamma-aminobutyric acid(A) (GABA(A)) alpha2/alpha3-subtype selective agonist that exhibits potent anxiolytic activity but is not sedating in animal models.* J Med Chem 48(23) (2005), 7089-7092

- [74] Collinson N., Attack J., Laughton P., Dawson G., Stephens D., *An inverse agonist selective for alpha5 subunit-containing GABA(A) receptors improves encoding and recall but not consolidation in the Morris water maze.*, Psychopharmacology 188(4) (2006), 619-628
- [75] Dawson G.R., Maubach K.A., Collinson N., Cobain M., Everitt B.J., MacLeod A.M., Choudhury H.I., McDonald L.M., Pillai G., Rycroft W., Smith A.J., Sternfeld F., Tattersall F.D., Wafford K.A., Reynolds D.S., Seabrook G.R. and Attack J.R., *An inverse agonist selective for alpha5 subunit-containing GABAA receptors enhances cognition.*, J Pharmacol Exp Ther 316(3) (2006), 1335-1345
- [76] Collinson N., Kuenzi F., Jarolimek W., Maubach K.A., Cothliff R., Sur C., Smith A., Otu F.M., Howell O., Attack J.R., McKernan R.M., Seabrook G.R., Dawson G.R., Whiting P.J., Rosahl T.W., *Enhanced Learning and Memory and Altered GABAergic Synaptic Transmission in Mice Lacking the $\alpha 5$ Subunit of the GABA_A Receptor.*, J Neurosci 22(13) (2002), 5572
- [77] Crestani F., Keist R., Fritschy J.-M., Benke D., Vogt K., Prut L., Bluethmann H., Möhler H., Rudolph U., *Trace fear conditioning involves hippocampal $\alpha 5$ GABA_A receptors.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 99(13) (2002), 8980
- [78] Rosahl T.W., *Validation of GABAA Receptor Subtypes as Potential Drug Targets by Using Genetically Modified Mice.*, Current Drug Targets – CNS & Neurological Disorders 2 (2003), 207-212
- [79] Howell O., Attack J.R., *Density and pharmacology of alpha5 subunit-containing GABA(A) receptors are preserved in hippocampus of Alzheimer's disease patients.*, Neuroscience 98(4) (2000), 669-675
- [80] Sander T., Kretz R., Williamson M.P., Elmslie F.V., Rees M., Hildmann T., Bianchi A., Bauer G., Sailer U., Scaramelli A., Schmitz B., Gardiner R.M., Janz D., Beckl-Managetta G., *Linkage analysis between idiopathic generalized epilepsies and the GABA(A) receptor alpha5, beta3 and gamma3 subunit gene cluster on chromosome 15.*, Acta Neurol Scand 96(1) (1997), 1-7
- [81] Poulter, M.O., Brown L.A., Tynan S., Willick G., William R., McIntyre D.C., *Differential expression of alpha1, alpha2, alpha3, and alpha5 GABAA receptor subunits in seizure-*

- prone and seizure-resistant rat models of temporal lobe epilepsy.*, J Neurosci 19(11) (1999), 4654-4661
- [82] Houser C.R. und Esclapez M., *Downregulation of the alpha5 subunit of the GABA(A) receptor in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.*, Hippocampus 13(5) (2003), 633-645
- [83] McKay P.F., Foster K.L., Mason D., Cummings R., Garcia M., Williams L., Grey C., McCane S., He X., Cook J., June H., *A high affinity ligand for GABAA-receptor containing alpha5 subunit antagonizes ethanol's neurobehavioral effects in Long-Evans rats.* Psychopharmacology 172(4) (2004), 455-462
- [84] Cook J.B., Foster K.L., Eiler W.J. 2nd, McKay P.F., Woods J. 2nd, Harvey S.C., Garcia M., Grey C., McCane S., Mason D., Cummings R., Li X., Cook J.M., June H.L., *Selective GABAA alpha5 benzodiazepine inverse agonist antagonizes the neurobehavioral actions of alcohol.*, Alcohol Clin Exp Res 29(8) (2005), 1390-1401
- [85] Stephens D.N., Pistovcakova J., Worthing L., Atack J.R., Dawson G.R., *Role of GABA(A) alpha5-containing receptors in ethanol reward: The effects of targeted gene deletion, and a selective inverse agonist.*, Eur J Pharmacol 526(1-3) (2005), 240-250
- [86] Papadimitriou G.N., Dikeos D.G., Daskalopoulou E., Karadima G., Avramopoulos D., Contis C., Stefanis C., *Association between the GABA(A) receptor alpha5 subunit gene locus (GABRA5) and bipolar affective disorder.*, Am J Med Genet 81(1) (1998), 73-80
- [87] Papadimitriou G.N., Dikeos D.G., Karadima G., Avramopoulos D., Daskalopoulou E.G., Stefanis C.N., *GABA-A receptor beta3 and alpha5 subunit gene cluster on chromosome 15q11-q13 and bipolar disorder: a genetic association study.*, Am J Med Genet 105(4) (2001), 317-320
- [88] Otani K., Ujike H., Tanaka Y., Morita Y., Katsu T., Nomura A., Uchida N., Hamamura T., Fujiwara Y., Kuroda S., *The GABA type A receptor alpha5 subunit gene is associated with bipolar disorder*, Neurosci Lett 381(1-2) (2005), 108-113
- [89] DeLong R., *GABA(A) receptor alpha5 subunit as a candidate gene for autism and bipolar disorder: A proposed endophenotype with parent-of-origin and gain-of-function features, with or without oculocutaneous albinism.*, Autism 11 (2007), 135-147

- [90] Szelies B., Weber G., Mielke R., *Interictal hippocampal benzodiazepine receptors in temporal lobe epilepsy: comparison with coregistered hippocampal metabolism and volumetry.*, Eur J Neurol 7 (2000), 393-400
- [91] Savic I., Ingvar M., Stone-Elander S., *Comparison of 11C flumazenil and 18F FDG as PET markers of epileptic foci.*, J Neurol Neurosurg Psychiatry 56 (1993), 615-621
- [92] Filip Dumont F., Waterhouse R.N., Montoya J.A., Mattner F., Katsifis A., Kegeles L.S., Laruelle M., *Synthesis and in vivo evaluation of [11C]zolpidem, an imidazopyridine with agonist properties at central benzodiazepine receptors.*, Nuclear Medicine and Biology 30 (2003), 435-439
- [93] Rudolph U. and Möhler H., *GABA-Based Therapeutic approaches: GABAA Receptor Subtype Functions.*, Current Opinion in Pharmacology 6 (2006), 18-23
- [94] Street L.J., Sternfeld F., Jelley R.A., Reeve A.J., Carling R.W., Moore K.W., McKernan R.M., Sohal B., Cook S., Pike A., Dawson G.R., Bromidge F.A., Wafford K.A., Seabrook G.R., Thompson S.A., Marshall G., Pillai G.V., Castro J.L., Atack J.R., MacLeod A.M., *Synthesis and Biological Evaluation of 3-Heterocycl-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4-a]phthalazines and Analogues as Subtype-Selective Inverse Agonists for the GABAA5 Benzodiazepine Binding Site.*, J Med Chem 47 (2004), 3642-3657
- [95] Pesti J.A., Huhn G.F., Xing J.Y., Fortunak J.M., *Efficient Pyridinylmethyl Functionalization: Synthesis of 10,10-Bis[(2-fluoro-4-pyridinyl)methyl]-9(10H)-anthracenone (DMP 543), an Acetylcholine Release Enhancing Agent.*, J Org Chem 65 (2000), 7718-7722
- [96] Patani G.A., LaVoie E.J., *Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design.*, Chem Rev 96 (1996), 3147-3176
- [97] Schlosser M., Michel D., *About the „Physiological Size“ of Fluorine Substituents: Comparison of Sensorially Active Compounds with Fluorine and Methyl Substituted Analogues.*, Tetrahedron 52(1) (1996), 99-108
- [98] Rösch F., Gründer G., Schreckenberger M., Dannhardt G., *Radiopharmazeutische Strategien und klinische Anwendungen: Diagnostik von ZNS-Erkrankungen mittels PET bzw. SPECT.*, Pharmazie in unserer Zeit 34(6) (2005), 474-482

- [99] Organikum, 20.Auflage, S.387
- [100] Harrison I.T., Lewis B., Nelson P., Rooks W., Roszkowski A., Tomolonis A., Fried J.H., *Nonsteroidal Antiinflammatory Agents. I. 6-Substituted 2-Naphthylacetic Acids.*, J Med Chem 13 (1970), 203-205
- [101] Lee K.C. and Chi D.Y., *An Efficient Synthesis of (Fluoromethyl)-pyridylamines for Labeling with Fluorine-18.*, J Org Chem 64 (1999), 8576-8581
- [102] Schnekenburger J., *Benzo[1,2-b]indolizine als Folgeprodukte bei der Umlagerung von 2-substituierten Pyridin-N-oxiden.*, Arch Pharmaz 306(5) (1973), 360-366
- [103] Organikum, 20.Auflage (1999), 385
- [104] Cai D., Hughes D.L. and Verhoeven T.R., *A Study of the Lithiation of 2,6-Dibromopyridine with Butyllithium, and its Application to Synthesis of L-739,010.* Tetrahedron Letters 37(15) (1996), 2537-2540
- [105] Gannett P.M., Johnson E.M., Grimes M.A., Myers A.L., Deavers III R.E., Tracy T.S., *Synthesis of deuterated 4,4'-diaminodiphenylsulfone (Dapsone) and related analogs.*, J Label Comp Radiopharm 46 (2003), 107-114
- [106] Adams R., Miyano S., *2-Aminopyridine 1-Oxides.*, J Am Chem Soc 76 (1954), 2785
- [107] Ashimori A., Ono T., Uchida T., Ohtaki Y., Fukaya C., Watanabe M., Yokoyama K., *Novel 1,4-Dihydropyridine Calcium Antagonists. I. Synthesis and Hypotensive Activity of 4-(Substituted Pyridyl)-1,4-dihydropyridine Derivatives.*, Chem Pharm Bull 38(9) (1990), 2446-2458
- [108] Brown E.V., *Preparation and reactions of 2-nitropyridine 1-oxides.*, J Am Chem Soc 79 (1957), 3565-3566
- [109] Goswami S.; Ghosh K.; Mukherjee R.; Adak A.K.; Mahapatra A.K., *N-Bromosuccinimide reactions of some heterocycles in the presence or absence of water: an overview of ring versus side chain bromination for the synthesis of important brominated heterocyclic synthons.*, J Het Chem 38(1) (2001), 173-178

- [110] Mühlhausen U., *Synthese, Radioiodierung und Evaluierung von neuen MGMT-Inhibitoren und ihren Glucose-Konjugaten - Dissertation zur Erlangung des Grades "Doktor der Naturwissenschaften"*., Johannes Gutenberg-Universität Mainz (2005), 34
- [111] Schirmacher R., Wängler B., Schirmacher E., August T., Rösch F., *Dimethylpyridin-4-ylamine-Catalysed Alcoholysis of 2-Amino-N,N,N-trimethyl-9H-purine-6-ylammonium Chloride: An Effective Route to O⁶-Substituted Guanine Derivatives from Alcohols with Poor Nucleophilicity.*, Synthesis 4 (2002), 538-542
- [112] Beyer Walter, Lehrbuch der Organischen Chemie, 23.Auflage, S.818
- [113] Burstein C., Lehmann C.W., Glorius F., *Imidazo[1,5- η]pyridine-3-ylidenes-pyridine derived N-heterocyclic carbene ligands.*, Tetrahedron 61 (2005), 6207–6217
- [114] Mojtahedi M.M., Akbarzadeh E., Sharifi R., Abaee M.S., *Lithium Bromide as a Flexible, Mild, and Recyclable Reagent for Solvent-Free Cannizzaro, Tishchenko, and Meerwein-Ponndorf-Verley Reactions.*, Organic Letters 9(15) (2007), 2791-2793
- [115] Guoa N., Alagilleb D., Tamagnanb G., Pricea R.R., Baldwin R.M., *Microwave-induced nucleophilic [¹⁸F]fluorination on aromatic rings: Synthesis and effect of halogen on [¹⁸F]fluoride substitution of meta-halo (F, Cl, Br, I)-benzonitrile derivatives.*, Applied Radiation and Isotopes 66 (2008), 1396–1402
- [116] Debus F., *Specific PET-ligands for Selected 5-HT and GABA_A-Receptor Subtypes.*, Promotionsarbeit 2008, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- [117] Wisden W., Laurie D.J., Monyer H., Seeburg P.H., *The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon.*, J Neurosci 12(3) (1992), 1040-62
- [118] Laurie D.J., Seeburg P.H., Wisden W., *The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum.*, J Neurosci 12(3) (1992), 1063-76
- [119] Pirker S., Schwarzer C., Wieselthaler A., Sieghart W., Sperk G., *GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain.*, Neuroscience 101(4) (2000), 815-50