

Institut für Neurowissenschaften und Medizin
Nuklearchemie (INM-5)

Synthese ^{18}F -markierter PET-Tracer durch nukleophile Kupfer-vermittelte Radiofluorierung

Sibel Evcüman

Jül-4430

Institut für Neurowissenschaften und Medizin
Nuklearchemie (INM-5)

Synthese ^{18}F -markierter PET-Tracer durch nukleophile Kupfer-vermittelte Radiofluorierung

Sibel Evcüman

Berichte des Forschungszentrums Jülich
Jül-4430 · ISSN 0944-2952
Institut für Neurowissenschaften und Medizin
Nuklearchemie (INM-5)

D 38 (Diss. Köln, Univ., 2021)

Vollständig frei verfügbar über das Publikations-
portal des Forschungszentrums Jülich (JuSER)
unter www.fz-juelich.de/zb/openaccess

Forschungszentrum Jülich GmbH · 52425 Jülich
Zentralbibliothek, Verlag
Tel.: 02461 61-5220 · Fax: 02461 61-6103
zb-publikation@fz-juelich.de
www.fz-juelich.de/zb

This is an Open Access publication distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/),
which permits unrestricted use, distribution, and



reproduction in any medium, provided the
original work is properly cited.

Kurzzusammenfassung

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ermöglicht die *in vivo* Visualisierung von physiologischen und pathologischen Prozessen auf zellulärer oder molekularer Ebene und stellt damit ein wichtiges Instrument der diagnostischen Bildgebung dar. So gehen etwa viele neurologische und onkologische Erkrankungen mit Veränderungen in der Expression oder Aktivität von bestimmten Rezeptoren, Transportern oder Enzymen einher, welche sich im Rahmen von PET Untersuchungen darstellen und quantifizieren lassen. Dazu werden radioaktiv markierte Sonden (Tracer) verwendet, die selektiv mit einem molekularen Target wechselwirken und deren Verteilung sich mittels PET nicht-invasiv erfassen lässt. Aufgrund der nahezu idealen Zerfallseigenschaften in Bezug auf Halbwertszeit und Positronen-Energie wird zur Radiomarkierung bevorzugt auf das Radionuklid Fluor-18 zurückgegriffen. Um es in Biomoleküle einzuführen, können unterschiedliche Strategien verfolgt werden, wobei in jüngster Zeit vor allem Methoden für die Übergangsmetall-vermittelte Radiofluorierung zur Markierung von aromatischen Verbindungen an Popularität gewonnen haben. Sie ermöglichen die einfache Einführung von [^{18}F]Fluorid in elektronenreiche, -arme und -neutrale Aromaten. So konnte beispielsweise mit der Kupfer-vermittelten Radiofluorierung unter Verwendung von Alkohol als Kosolvenz die Radiosynthese von vielen klinisch relevanten aber zuvor nur schwer zugänglichen PET-Tracern mit hoher Ausbeute erreicht werden.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels Alkohol-unterstützter Cu-vermittelter Radiofluorierung ^{18}F -markierte PET-Tracer für unterschiedliche molekulare Targetstrukturen herzustellen und diese in präklinischen *in vitro* und *in vivo* Versuchen zu evaluieren. Als Targetstrukturen mit pathologischer Relevanz wurden der Glycintransporter 1 (GlyT1), das synaptische Vesikelglykoprotein 2A (SV2A) und der A_1 Adenosin-Rezeptor (A_1AR) ausgewählt. Für diese Targets wurden zunächst aromatische Leitstrukturen mit entsprechend hohen Affinitäten identifiziert und diese anschließend mittels Kupfer-vermittelter Radiofluorierung markiert.

Im ersten Teil der Arbeit sollte der selektive GlyT1 Inhibitor ALX5407 mit ^{18}F markiert und hinsichtlich seiner Eignung als PET-Tracer untersucht werden. [^{18}F]ALX5407 konnte über die Kupfer-vermittelte Alkohol-verstärkte Radiofluorierung in einer radiochemischen Ausbeute (RCA) von $55 \pm 7\%$ hergestellt werden. Der experimentelle $\text{Log}D_{7.4}$ Wert des Tracers lag mit 2.2 im optimalen Bereich für eine Penetration der Bluthirnschranke (BHS) und Stabilitätsversuche mit Blutplasma ergaben keine Hinweise auf eine Metabolisierung für mindestens 60 min. *In vitro* Autoradiographien an Rattenhirnschnitten zeigten zudem eine Akkumulation, die mit dem in früheren Arbeiten beschriebenen Expressionsmuster von GlyT1 übereinstimmte. In *in vivo* PET-Experimenten in gesunden Ratten mit [^{18}F]ALX5407 alleine, [^{18}F]ALX5407 und dem Pgp-Inhibitor Elacridar oder [^{18}F]ALX5407 und nicht-radioaktivem ALX5407, konnte jedoch nur eine Akkumulation in peripheren

Gewebe ohne Aufnahme des Tracers im Gehirn nachgewiesen werden. Bei Verwendung des zugehörigen Methylesters [^{18}F]ALX5406 als Prodrug ($\text{Log}D_{7.4} = 2.9$) zeigte sich eine hohe Hirnaufnahme, allerdings spiegelte die beobachtete regionale Verteilung nicht das in der Literatur beschriebene und in den Autoradiographien beobachtete GlyT1-Verteilungsmuster wider.

Im zweiten Teil der Arbeit lag der Schwerpunkt auf dem chiralen PET-Tracer [^{18}F]MNI-1126, welches das Vesikelprotein SV2A adressiert und sich daher zur Visualisierung der synaptischen Integrität eignet. Da die Gewinnung des enantiomerenreinen Vorläufers komplex ist, wurde in dieser Arbeit eine neue Markierungsvorläufersynthese unter Verwendung eines chiralen Alkohol-modifizierten Chinidin-Derivats als Katalysator entwickelt. Dieses Verfahren lieferte den Trimethylstannyl-Vorläufer für die Kupfer-vermittelte Alkohol-unterstützte Radiofluorierung über 7 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 8% und einem Enantiomerenüberschuss (*ee*) von 98%. Durch diese Methode konnte auf eine zusätzliche Enantiomerentrennung mittels chiraler HPLC verzichtet werden. Die Übertragung der Radiosynthese auf ein automatisiertes Synthesemodul ermöglichte die Produktion von [^{18}F]MNI-1126 (in RCA von $26 \pm 6\%$) im präparativen Maßstab, sodass auch präklinische Studien durchgeführt werden konnten.

Im dritten Teil der Arbeit wurden schließlich radiofluorierte Partialagonisten für die Visualisierung der $A_1\text{AR}$ -Rezeptordichte mittels PET hergestellt. Vier potentielle Radioliganden 2-Amino-4-(3-[^{18}F]fluorphenyl)-6-[[6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril ([^{18}F]FMPD), 2-Amino-4-(3-[^{18}F]fluorphenyl)-6-[[5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril (*iso*-[^{18}F]FMPD), 2-Amino-4-(3-(2-[^{18}F]fluorethoxy)-6-[[6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril ([^{18}F]FEMPD) und 2-Amino-4-(3-(2-[^{18}F]fluorethoxy)-6-[[5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril (*iso*-[^{18}F]FEMPD) mit einstellig nanomolaren Affinitäten ($K_i = 2.6\text{--}5.8\text{ nm}$) für den $A_1\text{AR}$ und idealen $\text{Log}D_{7.4}$ -Werten (2.6–3.4) wurden dazu ausgewählt. Die Radiotracer konnten in moderaten bis guten RCA von 8–77% und ausreichenden molaren Aktivitäten von 3.5–61 GBq/ μmol (am Ende der Synthese) über die Kupfer-vermittelte Alkohol-unterstützte ([^{18}F]FMPD und *iso*-[^{18}F]FMPD) oder eine klassische Radiofluorierung ([^{18}F]FEMPD und *iso*-[^{18}F]FEMPD) hergestellt werden. *In vitro* Autoradiographien an Rattenhirnschnitten zeigten eine relativ homogene Verteilung des Radioliganden über das gesamte Gehirn und die für Ratten typische, verstärkte Anreicherung im Kleinhirn. Die spezifische Bindung wurde in Verdrängungsexperimenten mit dem $A_1\text{AR}$ -Antagonisten DPCPX und dem $A_1\text{AR}$ -Agonisten NECA ermittelt. Die höchste spezifische Bindung (40% bei Verdrängung mit DPCPX) wurde für [^{18}F]FEMPD beobachtet, woraufhin dieser Radioligand mittels *in vivo* PET-Messungen an einer gesunden Ratte evaluiert wurde. Dabei konnte neben einer effektiven Penetration der BHS ein Verteilungsmuster des Tracers beobachtet werden, welches mit der bekannten $A_1\text{AR}$ -Verteilung im Gehirn übereinstimmt. Zudem war [^{18}F]FEMPD über eine Stunde stabil,

so dass sich dieser neue Radioligand aus der Klasse der Partialagonisten zur Visualisierung der A₁AR-Verteilung für weitere Studien eignen sollte.

Abstract

Positron emission tomography (PET) enables to detect physiological and pathophysiological processes on the cellular or molecular level. Therefore, PET has gained great importance as a diagnostic imaging technique. Thus, a number of neurological and neoplastic disorders are associated with alterations in the expression or activity of certain receptors, transporters or enzymes, which can be visualized and quantified using PET imaging. This is achieved by the application of radiolabeled probes (tracers) that selectively interact with a molecular target of interest and can be detected non-invasively based on the emission of positrons. Owing to its favorable half-life and the low energy of emitted positrons, fluorine-18 is one of the most attractive radionuclides for labeling of PET-tracers. A number of novel transition metal-mediated, late-stage radiofluorination methods have enabled an easy access to ^{18}F -labeled aromatic systems regardless of their electronic properties. In particular, Cu-mediated radiofluorination with alcohols as co-solvents has been shown to afford high radiochemical yields (RCYs) of several clinically relevant PET tracers that are hardly or not accessible by conventional methods.

The aim of the present work was to prepare ^{18}F -labeled PET tracers for different molecular targets by alcohol-enhanced Cu-mediated radiofluorination and to evaluate their properties by preclinical experiments *in vitro* and *in vivo*. The molecular targets were selected based on their pathophysiological relevance and comprised the glycine transporter 1 (GlyT1), the synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) and the A_1 adenosine receptor (A_1AR). Following identification of suitable high-affinity lead structures, the corresponding precursor compounds were synthesized and subsequently radiolabeled using copper-mediated radiofluorination.

In the first part, the potent and selective GlyT1 inhibitor ALX5407 should be labeled with ^{18}F and evaluated as a potential PET tracer for imaging of GlyT1. To this end, ^{18}F ALX5407 was prepared via Cu-mediated alcohol-enhanced radiofluorination in RCYs of $55 \pm 7\%$. The experimental $\log D_{7.4}$ value of ^{18}F ALX5407 amounted to 2.2, which is in the optimal range for blood brain barrier (BBB) penetration, and experiments in human blood plasma showed its stability up to 60 min. In addition, *in vitro* autoradiography with ^{18}F ALX5407 in rat brain slices revealed a distribution of the tracer consistent with the pattern of previous studies on the expression of GlyT1 in the brain. *In vivo* PET imaging in healthy rats injected with ^{18}F ALX5407 alone, ^{18}F ALX5407 together with the Pgp-inhibitor Elacridar or ^{18}F ALX5407 together with non-radioactive ALX5407 revealed accumulation of the tracer in peripheral tissue. However, no brain uptake was observed. When the corresponding methyl ester ^{18}F ALX5406 ($\log D_{7.4}$ of 2.9) was used as a pro-drug, the corresponding PET studies showed a high

brain uptake, but regional tracer distribution did neither match with the expression pattern of GlyT1 nor with the distribution of [^{18}F]ALX5407 in autoradiographic studies.

The second part of this work focused on the chiral PET tracer [^{18}F]MNI-1126, which targets SV2A and can be used to visualize synaptic integrity. Since the existing method for synthesis and HPLC purification of the enantiomeric radiolabeling precursor is cumbersome, an optimized synthetic pathway based on a chiral alcohol-modified quinidine derivative as a catalyst was developed. This approach afforded the trimethyl stannyl precursor for Cu-mediated alcohol enhanced radiofluorination over 7 steps with an overall yield of 8% and an enantiomeric excess (*ee*) of 98%. Advantageously final chiral purification by HPLC could be omitted. Transfer of the manual radiosynthesis to an automated synthesis module allowed the production of [^{18}F]MNI-1126 (RCY of $26 \pm 6\%$) on a preparative scale and enabled its use for preclinical studies.

Finally, in the third part of this work, radiofluorinated partial agonists for imaging of the $A_1\text{AR}$ density via PET were prepared. To this end, four promising radioligands 2-amino-4-(3-[^{18}F]fluorophenyl)-6-[[6-methylpyridine-2-yl)methyl]thio]pyridine-3,5-dicarbonitrile ([^{18}F]FMPD), 2-amino-4-(3-[^{18}F]fluorophenyl)-6-[[5-methylpyridine-3-yl)methyl]thio]pyridine-3,5-dicarbonitrile (*iso*-[^{18}F]FMPD), 2-amino-4-(3-(2-[^{18}F]fluoroethoxy)-6-[[6-methylpyridine-2-yl)methyl]thio]pyridine-3,5-dicarbonitrile ([^{18}F]FEMPD) and 2-amino-4-(3-(2-[^{18}F]fluoroethoxy)-6-[[5-methylpyridine-3-yl)methyl]thio]pyridine-3,5-dicarbonitrile (*iso*-[^{18}F]FEMPD) with nanomolar affinities ($K_i = 2.6\text{--}5.8\text{ nm}$) towards $A_1\text{AR}$ and suitable $\log D_{7.4}$ -values (2.6–3.4) were prepared in moderate RCYs of 8–77% and reasonable molar activities of 3.5–61 GBq/ μmol (end of synthesis). For the radiosynthesis either Cu-mediated alcohol enhanced ([^{18}F]FMPD and *iso*-[^{18}F]FMPD) or conventional radiofluorination ([^{18}F]FEMPD and *iso*-[^{18}F]FEMPD) was applied. *In vitro* autoradiography in rat brain slices revealed a relatively homogenous brain distribution with higher accumulation in the cerebellum. Specific binding was determined by competitive displacement experiments with the $A_1\text{AR}$ antagonist DPCPX and the $A_1\text{AR}$ agonist NECA. Highest specific binding (40% for displacement with DPCPX) was found for [^{18}F]FEMPD, which was subsequently evaluated by *in vivo* PET imaging in a healthy rat. This experiment showed that [^{18}F]FEMPD is stable for at least one hour and displayed a binding pattern matching the binding pattern of previous $A_1\text{AR}$ expression studies. Taken together, this ^{18}F -labeled radioligand as a representative of a partial agonist shows high potential for the visualization of the $A_1\text{AR}$ system.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Prinzipien der Positronen-Emissions-Tomographie	2
1.1.1	Auswahl geeigneter PET-Nuklide	4
1.1.2	Anwendung des ^{11}C -Radionuklids in der PET	5
1.1.3	Anwendung des ^{18}F -Radionuklids in der PET.....	6
1.2	Radiofluorierungsstrategien.....	9
1.2.1	Elektrophile Radiofluorierung	9
1.2.2	Nukleophile Radiofluorierung	10
1.2.3	Übergangsmetall-vermittelte Radiofluorierung von Aromaten.....	16
1.2.4	Indirekte Radiofluorierungsmethoden.....	24
1.3	Entwicklung von PET-Liganden für die Neurobildgebung	26
1.3.1	Wichtige Parameter für die Etablierung neuer Radioliganden	28
1.3.1.1	Bindungsassays.....	28
1.3.1.2	Bluthirnschranke und Lipophilie.....	32
1.4	PET-Bildgebung neurologischer Target Modelle.....	33
1.4.1	Der Glycintransporter 1.....	33
1.4.2	Das synaptische Vesikelprotein 2 (SV2)	36
1.4.3	Der Adenosin A_1 Rezeptor	39
2.	Zielsetzung.....	42
3.	Ergebnisse und Diskussion	44
3.1	Herstellung von ^{18}F ALX5407.....	44
3.1.1	Synthese des Markierungsvorläufers und der Referenzverbindung von ^{18}F ALX5407	44
3.1.2	Radiosynthese von ^{18}F ALX5407.....	46
3.1.3	<i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> - Beurteilung von ^{18}F ALX5407	48
3.1.4	Anwendung von ^{18}F ALX5406 als Prodrug.....	52
3.2	Herstellung von ^{18}F MNI-1126	54
3.2.1	Synthese des Markierungsvorläufers und der Referenzverbindung von ^{18}F MNI-1126 54	
3.2.2	Herstellung von ^{18}F MNI-1126	58
3.2.3	<i>In vivo</i> Beurteilung von ^{18}F MNI-1126.....	63
3.3	Herstellung radiofluorierter Adenosin A_1 Partialagonisten.....	65
3.3.1	Synthese potentieller Referenzverbindungen.....	65
3.3.2	Markierungsvorläufersynthese	67
3.3.3	Radiosynthese von ^{18}F FMPD und <i>iso</i> - ^{18}F FMPD.....	70

3.3.4	Radiosynthese von [^{18}F]FEMPD und <i>iso</i> -[^{18}F]FEMPD	71
3.3.5	Herstellung von [^{11}C]MMPD	72
3.3.6	<i>In vitro</i> Beurteilung der radiomarkierten Partialagonisten	75
3.3.7	<i>In vivo</i> Beurteilung von [^{18}F]FEMPD	76
4.	Materialien und Methoden	79
4.1	Allgemeine experimentelle Bedingungen	79
4.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel	79
4.1.2	Reinigung	79
4.1.3	Charakterisierung	79
4.2	Organische Synthesen	81
4.3	Radiochemie	105
4.3.1	Allgemeines	105
4.3.2	Kartuschen und Lösungsmittel	105
4.3.3	Charakterisierung und Isolierung radiomarkierter Produkte	106
4.3.4	Wichtige Größen für die Beschreibung radiomarkierter Substanzen	107
4.4	Radiofluorierungsvorschriften	109
4.4.1	Radiosynthese von [^{18}F]ALX5407 nach dem „Alkohol-verstärkten Kupfer-vermittelten“ Protokoll 109	
4.4.2	Radiosynthese von [^{18}F]ALX5406	111
4.4.3	Radiosynthese von [^{18}F]MNI-1126 im Labormaßstab nach dem modifizierten Protokoll der Alkohol-verstärkten Kupfer-vermittelten Radiofluorierung	112
4.4.4	Radiosynthese von [^{18}F]FMPD und <i>iso</i> -[^{18}F]FMPD	114
4.4.5	Radiosynthese von [^{18}F]FEMPD und <i>iso</i> -[^{18}F]FEMPD	117
4.4.6	Automatisierung von [^{18}F]MNI-1126	120
4.5	Bestimmung von elementaren Verunreinigungen	121
4.6	Bestimmung des $\text{Log}D_{7,4}$ -Wertes	122
4.7	<i>In vitro</i> Stabilitätstest des Tracers	122
5.	Zusammenfassung	124
6.	Abkürzungen	129
7.	Literaturverzeichnis	133
8.	Anhang	151
8.2	<i>In vitro</i> Evaluierungen der radiofluorierten Partialagonisten	151
8.3	HPLC Chromatogramme chiraler Verbindungen	152
8.4	NMR-Spektren	154

1. Einleitung

In den Lebenswissenschaften spielen nuklearmedizinische Bildgebungsverfahren eine immer wichtigere Rolle und sind zu einem festen Bestandteil der klinischen Diagnostik und der Arzneimittelforschung geworden. Während bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT), die Computer-Tomographie (CT) oder Sonographie wichtige Informationen über morphologische Veränderungen im Gewebe des untersuchten Körpers liefern, ermöglichen die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und die Einzelphotonen-Emissions-Computer-Tomographie (SPECT; englisch: single-photon-emission-computed-tomography) durch die Verwendung radioaktiver Sonden die Visualisierung von Stoffwechselprozessen, Protein-Protein-Wechselwirkungen, Signal-Kaskaden und auch die Genexpression und -regulationen¹. Die Idee zur Verwendung von radioaktiven Indikatoren zum Verständnis biologischer Prozesse wurde bereits im Jahr 1932 von George de Hevesy entwickelt, der als Vater der Radiochemie gilt. Im Rahmen seiner Indikator–Tracer Methode verwendete er radioaktives Blei-212, um dessen Aufnahme und Verteilung in Pflanzen zu verfolgen². Das Tracer-Prinzip wurde in späteren Arbeiten auf den Tierorganismus übertragen und lieferte wertvolle Hinweise über den Phosphor-Metabolismus mit dem Radionuklid P-32³. Für seine Arbeiten über die Verwendung von Radioisotopen als Indikatoren in chemischen Prozessen wurde de Hevesy im Jahre mit 1943 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet⁴. Sie stellt den Grundbaustein für die Anwendung von Radiotracern in der modernen Nuklearmedizin dar.

In der PET werden sogenannte PET-Tracer eingesetzt. Diese radioaktiven „Sonden“ werden zum Verfolgen von physiologischen Prozessen verwendet und sind für die Detektion mit einem Positronen-emittierenden Radionuklid als signalgebendes Element ausgestattet. Ein Radiotracer zeichnet sich vor allem durch zwei grundlegende Eigenschaften aus. Der Radiotracer ist von außen mit geeigneten Methoden gut detektierbar und beeinflusst den zu verfolgenden Prozess nicht durch seine Anwesenheit (d.h. er greift nicht in die Homöostase des Organismus ein). Das Prinzip der PET basiert dabei auf der Detektion von Photonenseitenpaaren, die bei der Reaktion emittierter Positronen mit Elektronen im Gewebe freigesetzt werden. Da das emittierte γ -Quantenpaar in der Lage ist, Materie zu durchdringen, kann es auch außerhalb des untersuchten Körpers noch detektiert werden. Die Wahl eines geeigneten PET-Tracers ermöglicht die Darstellung von Stoffwechselvorgängen, Rezeptorexpressionen und anderen physiologischen Prozessen. Eine Mehrspeicherung des Radiotracers oder eine Wechselwirkung des Radioliganden mit molekularen Targets hat ein charakteristisches Anreicherungsmuster des Tracers im Körper zur Folge. Änderungen dieser „Normalverteilung“ werden daher zur frühen Erkennung von Erkrankungen oder auch zum Therapiemonitoring herangezogen. Häufig verwendete Target-Systeme für Radiotracer sind Glukose-

Analoge, Transporter-Substrate, Enzyminhibitoren, Peptide, monoklonale Antikörper und rekombinante Proteine. Eine spezielle Kategorie von Radiotracer bilden die Rezeptor-Liganden⁵.

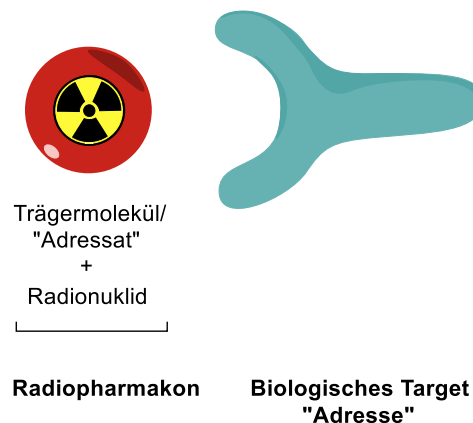


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Target–Radiotracer Prinzips

1.1 Prinzipien der Positronen-Emissions-Tomographie

PET ist ein nicht-invasives Bildgebungsverfahren. Die eingesetzten Radiotracer sind mit β^+ -emittierenden Radionukliden markiert. Diese Radionuklide weisen im Vergleich zu stabilen Nukliden eines Elements einen Protonenüberschuss im Kern auf. Beim β^+ -Zerfall wird ein Proton (p) des Atomkerns in ein Neutron (n) umgewandelt, wobei ein Positron (β^+) und ein Elektron-Neutrino (ν_e) emittiert werden.



Das emittierte Positron, das Antiteilchen des Elektrons, wird (siehe Tabelle 1) aus dem Atomkern ausgestoßen. Durch Wechselwirkungsprozesse mit der umgebenden Materie (beispielsweise Gewebe) verliert es seine kinetische Energie durch unelastische Stöße mit Elektronen der Umgebung. Wenn das Positron schließlich vollständig abgebremst ist, bildet es mit einem Elektron aus der Umgebung ein Positronium. Dieses ist instabil und zerfällt sehr schnell, wobei die Massen von Positron und Elektron in Energie umgewandelt werden. Dieser Prozess der Rekombination eines Elektrons mit einem Positron wird als Annihilation („Vernichtung“) bezeichnet. Beruhend auf dem Energieerhaltungssatz ($E = mc^2$) werden zwei γ -Photonen mit einer Energie von jeweils 511 keV, was der Masse des Elektrons und des Positrons entspricht, in einem Winkel von nahezu 180° emittiert^{5,6}. Die Messung dieser hochenergetischen Photonen erfolgt mit ringförmig angeordneten Detektoren (z.B. Szintillationszählern) in einem PET-Scanner mit einer Koinzidenzschaltung. Dabei wird ein Zerfall bei simultaner Registrierung an zwei gegenüberliegenden Detektoren als Annihilation auf einer gedachten Geraden (englisch: line of response) detektiert. Die Erfassung zahlreicher nahezu simultaner

Zerfallsereignisse ermöglicht durch die Überlagerung dieser hypothetischen Koinzidenzlinien eine genaue Bestimmung des Ortes der Annihilation und einer dreidimensionalen Rekonstruktion der Radiotracerverteilung im Körper. Das Auflösungsvermögen der resultierenden PET Bilder ist von mehreren Faktoren abhängig. Wichtig ist dabei das Auflösungsvermögen des verwendeten PET Scanners (aktuell bis zu wenigen Millimetern)⁷, die Maximalenergie des emittierten Positrons und die Materie, durch die sich das Positron im Körper bewegt bevor es zur Annihilation kommt. In Materialien mit hoher Dichte ist die Reichweite der Positronen geringer, in weichem Gewebe wie beispielsweise den Lungen hingegen können Positronen längere Strecken zurücklegen, ehe sie thermalisiert werden, wodurch das Auflösungsvermögen sinkt. Die Reihenfolge der Stärke der Abbremsung in verschiedenen Umgebungsmedien ist wie folgt: Knochen > Haut > Gehirn > Muskeln > Wasser > Lungen (daraus folgt die maximale Positronenreichweite am Beispiel von Fluor-18: 1.17 mm < 1.96 mm < 2.08 mm < 2.08 mm < 2.16 mm < 7.20 mm)^{8,9}. Da in PET-Messungen nicht direkt die Position des radioaktiven Teilchens, sondern der Ort der Annihilation bestimmt wird, beeinflussen Positronen mit einer höheren kinetischen Energie, die eine längere Strecke bis zur Annihilation zurücklegen, ebenfalls das Auflösungsvermögen. Die detektierte Annihilationsstrahlung weist einen größeren Abstand zum eigentlichen Zerfallsort auf, demzufolge sind β^+ -Emitter mit geringen Zerfallsenergien besonders gut geeignet¹⁰.

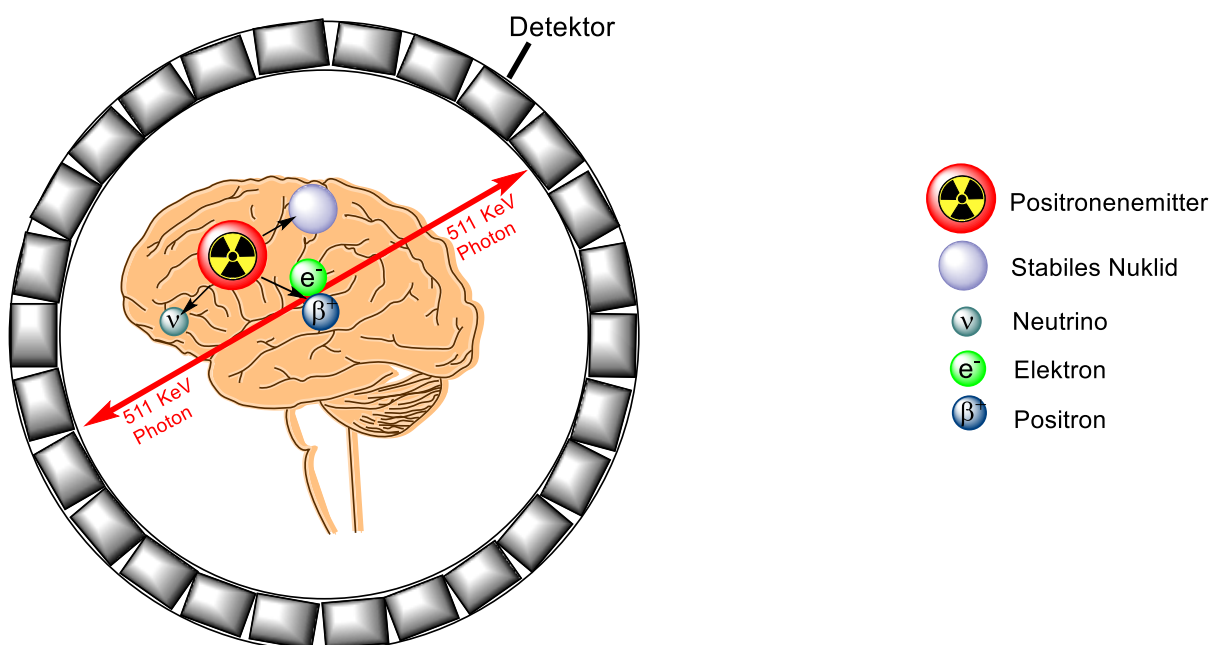


Abbildung 2. Messprinzip der Positronen-Emissions-Tomographie

1.1.1 Auswahl geeigneter PET-Nuklide

Eine Besonderheit der PET-Bildgebung ist die Möglichkeit biologische Prozesse *in vivo* zu visualisieren. Die Auswahl des geeigneten Radionuklids spielt dabei eine große Rolle. Einige der gängigen Radionuklide sind Elemente geringer Atommasse (zum Beispiel ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O und ^{18}F), die in Biomolekülen oder Medikamenten vorkommen und auch die „Generator Radioisotope“ ^{68}Ga und ^{82}Rb . Die Verwendung eines radiomarkierten organischen Moleküls ermöglicht es, PET-Messungen durchzuführen ohne biochemische Gleichgewichte zu beeinflussen. Eine Liste der am häufigsten verwendeten Radionuklide für die PET ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. Physikalische Eigenschaften der gängigsten Standard PET Radionuklide^{11,12}

Radionuklid	Halbwertszeit [min]	$E_{\max} \beta^+$ [keV]	β^+ Anteil [%]	Kernreaktion	Max. Positronen Reichweite in H_2O [mm]
^{11}C	20.4	960	99.7	$^{14}\text{N}(p, \alpha)^{11}\text{C}$	3.9
^{13}N	9.97	1198	99.8	$^{16}\text{O}(p, \alpha)^{13}\text{N}$	5.1
^{15}O	2.04	1732	99.9	$^{15}\text{N}(d, n)^{15}\text{O}$	8.0
^{18}F	109.8	635	96.7	$^{20}\text{Ne}(d, \alpha)^{18}\text{F}$ $^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$	2.3
^{68}Ga	67.6	1899	88.9	$^{69}\text{Ge}(p, 2n)^{68}\text{Ga}$	8.9

Neben den optimalen physikalischen Eigenschaften des Radionuklides wie der Halbwertszeit, der Zerfallsart und der Zerfallsenergie ist auch die Verfügbarkeit ein wichtiges Kriterium bei der Auswahl des Radionuklids. Allgemein werden Positronen-Emitter in einem Zyklotron durch Beschuss eines geeigneten Target Materials mit beschleunigten Teilchen (in der Regel Protonen, Deuteronen oder ^3H -Kerne) produziert. Auf Grund der sehr kurzen Halbwertszeiten von ^{13}N (10 min) und ^{15}O (2 min), werden diese Radioisotope lediglich für die Beobachtung von Prozessen verwendet, die in kurzer Zeit ablaufen. Das ^{15}O -Isotop findet in Form von $^{15}\text{O}[\text{H}_2\text{O}]$, $^{15}\text{O}[\text{CO}_2]$ oder $^{15}\text{O}[\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}]$ in cerebralen Blutfluss-Studien Anwendung^{13,14}, ähnlich limitiert ist auch die Anwendung von ^{13}N in Form von $^{13}\text{N}[\text{NH}_3]$ als Blutflusstracer zur Messung des myokardialen Blutflusses¹⁵.

1.1.2 Anwendung des ^{11}C -Radionuklids in der PET

Organische Moleküle, Naturstoffe und Medikamente bestehen zum größten Teil aus Kohlenstoff, deshalb ist besonders das Kohlenstoff-11 ein sehr attraktives Radionuklid zur Markierung von Verbindungen für die Untersuchung von biologischen Fragestellungen. Das chemische und biologische Verhalten von ^{11}C unterscheidet sich kaum vom stabilen ^{12}C . So sind Veränderungen auf das zu analysierende biologische System durch eine „künstliche“ Markierung nahezu ausgeschlossen. Die relativ geringe Halbwertszeit von 20 min erfordert schnell durchzuführende Markierungsschritte, so dass ^{11}C für komplizierte und zeitaufwendige Synthesen ungeeignet ist. Ein Vorteil der kurzen Halbwertszeit ist die Möglichkeit mehrere PET-Messungen innerhalb eines Tages, ohne die erlaubte Strahlenexposition des Patienten zu überschreiten, durchzuführen¹⁶. Erzeugt wird ^{11}C am Zyklotron durch Protonenbeschuss eines N-14 Gastargets über die Kernreaktion $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$. Die beiden am häufigsten verwendeten Markierungsvorläufer für C-11 markierte Verbindungen sind $^{11}\text{CO}_2$ und $^{11}\text{CH}_4$, welche durch Anwesenheit geringer Mengen Sauerstoff oder Wasserstoff im Target gebildet werden.

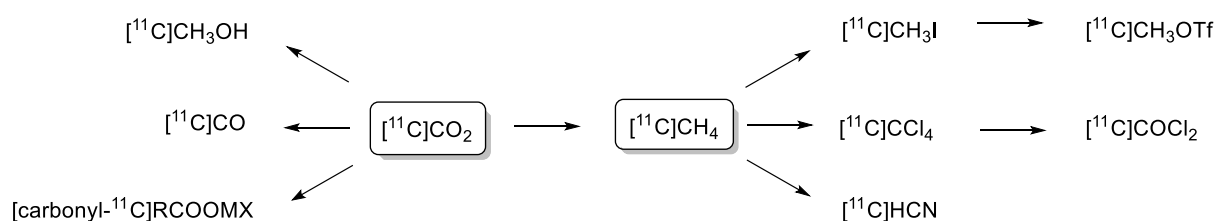


Abbildung 3. Wichtigsten ^{11}C -Vorläufer, synthetisiert aus $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ und $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ ¹

Die einfachste und überwiegend eingesetzte Methode zur Einführung von ^{11}C in ein organisches Molekül ist die Methylierungsreaktion, das allgemein verwendete Alkylierungsmittel ist dabei $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$. Es wird durch die Reduktion von $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ mit LiAlH_4 und anschließender Umsetzung mit Iodwasserstoffsäure¹⁷ oder durch die Reaktion von $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ mit elementarem Iod bei erhöhter Temperatur erhalten^{18,19}. $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ ist ein noch stärkeres Methylierungsmittel als Methyljodid und wird daher ebenfalls häufig in ^{11}C -Radiosynthesen, als Agens mit höherer Reaktivität und Flüchtigkeit, die mit einer Verkürzung der Methylierungsreaktion einhergeht, eingesetzt²⁰. Die radioaktive Gruppe wird allgemein in einer O-, N- oder S-Alkylierung in das Molekül eingeführt, demnach sind die verwendeten Vorläufer in der Regel Alkohole, Amine oder Thiole. In Abbildung 4 sind einige häufig eingesetzte ^{11}C -Radiotracer abgebildet.

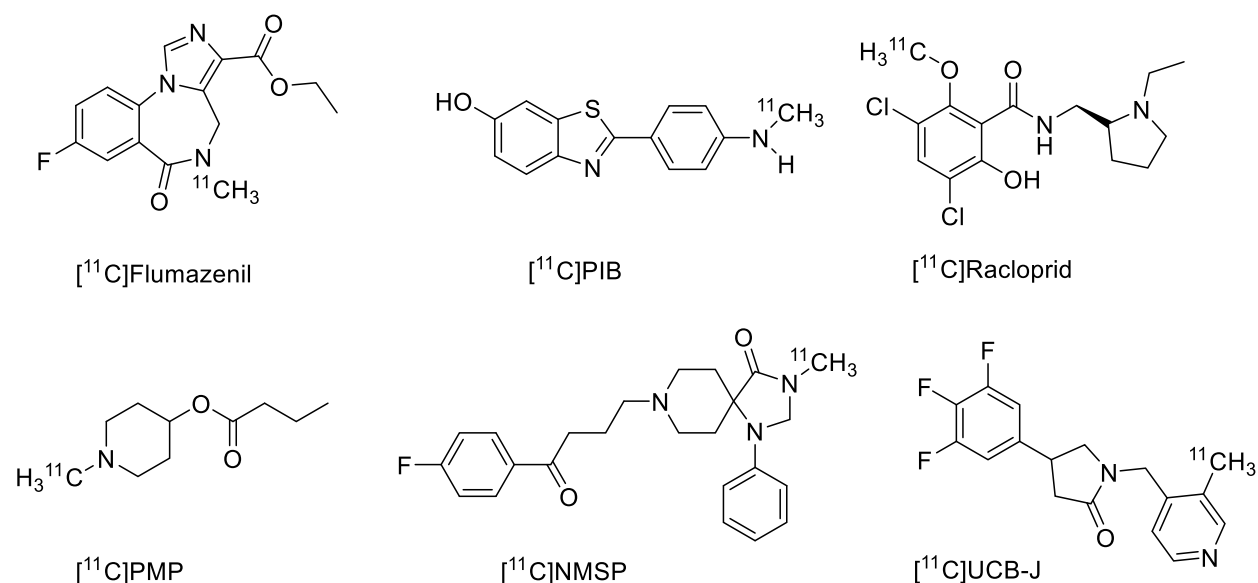


Abbildung 4. Beispiele für einige wichtige ^{11}C -markierte Radiotracer¹

Trotz der simplen Markierungsmethoden ist die Anwendung dieser Tracer limitiert, da auf Grund der kurzen Halbwertszeit ein hauseigenes Zyklotron inklusive Radiochemie vorhanden sein muss, da ein Transport der Tracer über ein Satelliten System in andere Einrichtungen (Kliniken, PET-Zentren, Radiologen) nicht möglich ist.

1.1.3 Anwendung des ^{18}F -Radionuklids in der PET

Fluor-18 ist aufgrund seiner nahezu idealen Zerfallseigenschaften und seiner umfangreichen Markierungsmethoden das am häufigste eingesetzte PET Nuklid. In natürlich vorkommenden organischen Molekülen ist Fluor selten enthalten, jedoch wird es in der Arzneimittelforschung immer häufiger eingesetzt, da die Einführung eines Fluor-Substituenten die Moleküleigenschaften, wie z.B. Acidität, Lipophilie und metabolische Stabilität positiv beeinflusst²¹. Die Lipophilie der Verbindung wird durch den Fluor-Substituenten erhöht, pKs-Werte und Dipolmomente können sich ebenfalls ändern. Im Gegensatz zum Wasserstoff ist Fluor ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor. Auf Grund dieser Eigenschaften ist Fluor in ca. 25% aller Pharmazeutika enthalten (Stand 2014)²². Der geringe Van-der-Waals-Radius von Fluor 1.47 Å (im Vergleich Wasserstoff: 1.2 Å, Sauerstoff: 1.52 Å)²³ ermöglicht es, Fluor in einer Verbindung formal anstelle von einer Hydroxy-Gruppe oder eines Wasserstoffs einzuführen, ohne eine große sterische Veränderung zu verursachen. Auf Grund seiner hohen

Elektronegativität (EN=3.98) werden sehr stabile C–F Bindungen gebildet. Die pharmakologischen Eigenschaften eines fluorierten Moleküls können sich wegen der oben dargestellten Gründe deutlich von der nichtfluorierten Verbindung unterscheiden, genau dieser Einfluss (erhöhte Lipophilie, metabolische Stabilität) wird in der medizinischen Chemie und auch für die PET ausgenutzt²⁴. Für die PET-Bildgebung weist ^{18}F ideale Zerfallseigenschaften auf. Die geringe β^+ -Energie (635 KeV) des emittierten Positrons ist die niedrigste unter den Standard-PET-Radionukliden und liefert die höchste Ortsauflösung von PET-Bildern im Vergleich zu Radionukliden mit höheren Zerfallsenergien. Fluor-18 ist ein fast reiner β^+ -Strahler (97%), so dass keine γ -Strahlung emittiert wird, die einen störenden Effekt auf die Bildqualität hat. Die Halbwertszeit von 109.8 min erlaubt es aufwendigere, mehrstufige Radiosynthesen durchzuführen und Messungen von biochemischen Prozessen über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Darüber hinaus ist auch die logistische Verbreitung der synthetisierten radiofluorierten PET-Tracer zu anderen Anwendungsorten möglich²². Viele Möglichkeiten der Herstellung des ^{18}F -Radionuklid sind entwickelt worden, die wichtigsten Kernreaktionen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2. Herstellungsrouten für Fluor-18²⁵

Kernreaktion	Target	Teilchen Energie [MeV]	Chemische Form	Erwartete Ausbeute [GBq/μAh]	Molare Aktivität [GBq/μmol]
$^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$	Ne (200 μmol F ₂)	14 → 0	[^{18}F]F ₂	0.4	0.1
$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	[^{18}O]O ₂ , Kr (50 μmol F ₂)	16 → 3	[^{18}F]F ₂	1.0	0.6
$^{16}\text{O}(^3\text{He},p)^{18}\text{F}$	H ₂ O	36 → 0	$^{18}\text{F}^-_{(\text{aq})}$	0.26	≈ 50
$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	[^{18}O]H ₂ O	16 → 3	$^{18}\text{F}^-_{(\text{aq})}$	2.22	≈ 600

Die Herstellungsmethoden zeigen große Unterschiede in ihren molaren Aktivitäten. Die molare Aktivität ist eine wichtige Größe in der Radiochemie, sie gibt die Aktivität eines bestimmten Radioisotops im Molekül im Verhältnis zur Stoffmenge des Trägers oder nicht-radioaktiven Isotops im Molekül an, ihre SI-Einheit ist GBq/μmol. Die spezifische Aktivität gibt die Aktivität eines Radionuklids, oder der Mischung vorhandener Radioisotope im Verhältnis zur Masse (g) der gesamten Verbindung an²⁶. Dementsprechend beschreiben diese beiden Werte die Verunreinigung des radioaktiven

Produkts mit der stabilen (nicht-radioaktiven) isotypen Verbindung. Abhängig von der Produktionsmethode des F-18 kann es durch sein stabiles Isotop (F-19) verunreinigt sein. Geringe molare Aktivitäten, die durch große Mengen an Träger (isotope nicht radioaktive Verunreinigung) auftreten, können die Bildgebung von manchen diagnostischen Tracern, wie Rezeptor Radioliganden negativ beeinflussen und auch pharmakologische und toxische Effekte auf den lebenden Organismus haben.²⁷ In der Rezeptorbildgebung sättigen hohe Trägermengen die Bindungsstellen von Rezeptoren geringer Dichte ab, so dass die Bindungsstellen mit der nicht-radioaktiven Verbindung belegt sind und der PET-Tracer nicht an den Rezeptor binden kann²⁷.

Die einzelnen Herstellungsmethoden aus Tabelle 2 werden im Folgenden näher beschrieben, angefangen von Fluor-18 in Form von $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$, welches durch die Bestrahlung eines ^{20}Ne oder ^{18}O Gastargets erhalten wird. Jedoch wird das produzierte Fluor-18 von den Targetwänden adsorbiert. Um es von den Wänden abzulösen, werden geringe Mengen elementares Fluor (F_2) hinzugefügt, woraufhin Fluor-18 sich an das Fluorgas (Isotopenaustausch) bindet. Dieser Vorgang ist eine Möglichkeit der Trägerung (englisch: carrier-added, c.a.). Durch den notwendigen Zusatz von Träger wird allerdings die maximal erreichbare molare Aktivität deutlich reduziert ($0.03 - 0.4 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$)²⁸. Die maximale theoretisch erreichbare radiochemische Ausbeute für Markierungen mit $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ beträgt 50%, da statistisch immer nur maximal ein F-Atom des F_2 -Moleküls radioaktiv sein kann.

Die Anwendung von $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ eignet sich überwiegend für elektrophile Radiofluorierungen von PET-Tracern, die auch mit einer geringen molaren Aktivität eingesetzt werden können. Hierbei handelt es sich zumeist um endogene Substrate und Verbindungen für die Visualisierung von metabolischen Prozessen. Dazu gehören beispielsweise Aminosäuren, Zucker oder endogene Fettsäuren, die im Körper in größeren Mengen vorkommen.

Die Herstellung von $^{18}\text{F}^-$ durch Bestrahlung von natürlichem Wasser ist eine eher selten angewendete Methode, die überwiegend im Kernreaktor aber auch am Zyklotron²⁹ stattfinden kann. Im Reaktor entsteht $^{18}\text{F}^-$ aus einer Folgereaktion von $^6\text{Li}(n,\alpha)^3\text{H}/^{16}\text{O}(^3\text{H},n)^{18}\text{F}$ nur mit maximalen Ausbeuten von $< 1 \text{ GBq}$ ²⁵.

Die mit Abstand am häufigsten verwendete Produktionsroute von Fluor-18 läuft über die $\text{O}^{18}(\text{p},\text{n})$ -Kernreaktion an angereichertem ^{18}O -Wasser ab. Das auf diese Weise produzierte $^{18}\text{F}^-$ liegt hydratisiert vor. Man kann das ^{18}F -Radioisotop ungeträgert (englisch: no-carrier-added, n.c.a.) im Zyklotron in hohen Ausbeuten und in sehr hohen molaren Aktivitäten (bis zu $600 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$) produzieren³⁰. Die Herstellung von ^{18}F -markierten Radiopharmaka mit hohen molaren Aktivitäten erfolgt ausgehend von n.c.a. $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$, allgemein liegen die molaren Aktivitäten im Bereich von $50 - 500 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ³¹.

1.2 Radiofluorierungsstrategien

Viele Methoden zur Einführung eines Fluor-Atoms in ein organisches Molekül sind in der klassischen organisch-präparativen Synthese beschrieben. Isotope eines Elements sind chemisch gesehen nahezu identisch, deshalb wurden klassische Fluorierungsreaktionen auf die Radiomarkierungen mit radioaktivem ^{18}F übertragen. Die Radiofluorierungsstrategien werden allgemein in die folgenden vier Methoden unterteilt:

- Elektrophile Substitution
- Nukleophile Substitution
- ^{18}F -Radiomarkierung über eine Aufbausynthese
- ^{18}F -Radiomarkierung über prosthetische Gruppen

Die ersten beiden Methoden sind direkte Radiofluorierungsreaktionen, die beiden letzteren bezeichnet man als indirekte Methoden, wobei das benötigte Synthone oder die prosthetische Gruppe zuvor über eine direkte Methode radiofluoriert wird. Zusätzlich kann man die Markierung mit ^{18}F in die Bildung von C- ^{18}F Bindungen, die durch elektrophile sowie nukleophile Substitutionsreaktionen entstehen, und die Bildungen von ^{18}F -Heteroatomen, die über nukleophile Substitutionsreaktionen ablaufen, unterteilen.

1.2.1 Elektrophile Radiofluorierung

Die Radiofluorierung über eine elektrophile Substitution verläuft mit $^{18}\text{F}]\text{F}_2$ als Markierungsreagenz. Jedoch bringt die Verwendung von $^{18}\text{F}]\text{F}_2$ aus der $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ Radionuklidproduktion zwei limitierende Nachteile mit sich. Zum einen ist durch den Trägerzusatz die molare Aktivität gering, zum anderen ist das Markierungsreagenz sehr reaktiv und bildet viele radiofluorierte Nebenprodukte. Weniger reaktive und selektivere Markierungsreagenzien wurden entwickelt, wie zum Beispiel $^{18}\text{F}]\text{-N-Fluorbenzolsulfonimid}^{32}$, $^{18}\text{F}]\text{Acetylhypofluorit}^{33,34}$, $^{18}\text{F}]\text{Xenondifluorid}^{35,36}$ oder $\text{N-}^{18}\text{F}]\text{Fluorsulfonamid}^{37}$. Die Markierungsreagenzien werden zur Radiofluorierung von elektronenreichen Substraten in einer direkten elektrophilen Substitution oder einer Demetallierungsreaktion von organometallischen Verbindungen verwendet. Ein prominentes Beispiel für die elektrophile Radiofluorierung an einem Organo-Zinn-Vorläufer ist das 6- $^{18}\text{F}]\text{Fluor-L-3,4-dihydroxyphenylalanin}$ (6- $^{18}\text{F}]\text{Fluor-L-DOPA}$) mit einer radiochemischen Ausbeute von 25%, welches zur Bildgebung des dopaminergen Systems eingesetzt wird³⁸.

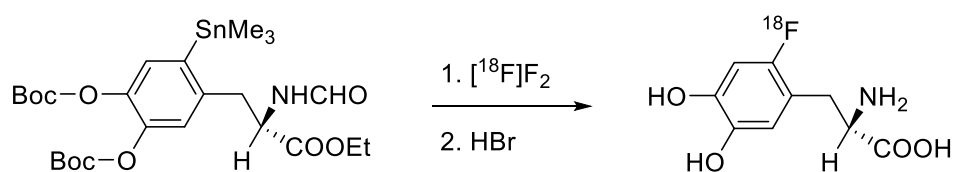


Abbildung 5. Synthese von 6-[^{18}F]Fluor-L-DOPA über die elektrophile Radiofluorierung

Um die erreichbaren molaren Aktivitäten über eine elektrophile Radiofluorierung mit $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ zu steigern, wurde die sogenannte „post-target“-Methode entwickelt. Dazu wurde zunächst das über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion hergestellte n.c.a. $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ mit Kryptofix®222 (K_{222}) und Kaliumcarbonat getrocknet und anschließend mit Methyljodid zu $[^{18}\text{F}]\text{Methylfluorid}$ umgesetzt. Das n.c.a. $[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{F}$ wurde mit geringen Mengen des Gasgemisches aus Neon und Fluorgas (F_2) in eine Entladungskammer geleitet. Durch elektrische Entladung (englisch: electrical discharge) entsteht $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ in hohen molaren Aktivitäten von bis zu $50 \text{ GBq}/\mu\text{mol}^{39,40}$.

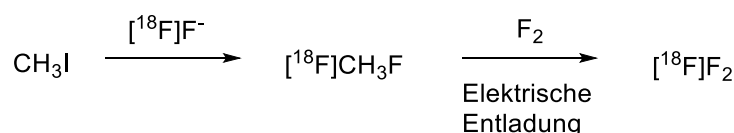


Abbildung 6. Herstellung von $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ nach der post-target-Methode

1.2.2 Nukleophile Radiofluorierung

Die nukleophile Radiofluorierung ist die routinemäßig am meisten eingesetzte und effizienteste Markierungsmethode. Das über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion in angereichertem ^{18}O -Wasser hergestellte Fluor-18 liegt zunächst solvatisiert als $^{18}\text{F}^-$ -Anion in wässriger Lösung (als $\text{H}_2\text{O}-^{18}\text{F}$) vor. In dieser Form ist das $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ für eine nukleophile Reaktion unzugänglich. Um seine Nukleophilie zu erhöhen muss zunächst die Hydrathülle abgetrennt werden. Dazu wurden verschiedene Varianten untersucht, darunter Variationen in den verwendeten Basen (Hydrogencarbonat, Oxalat), Kryptant (Kryptofix®222 (K_{222}), 18-Krone-6) oder den Gegenionen (K^+ , Rb^+ , Cs^+ , $t\text{Bu}_4\text{N}^+$). Ein Kryptant dient dabei der Erfassung des Metallkations (meistens K^+) und separiert es vom $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ -Ion. Häufig wird $\text{K}_{222}/\text{K}_2\text{CO}_3$ eingesetzt und formt, wie in Abbildung 7 dargestellt, einen starken Komplex mit dem Kaliumkation und legt die ^{18}F -Fluorid-Ionen frei. Durch mehrfache azeotrope Destillation mit Acetonitril wird das Wasser entfernt und man erhält das sogenannte „nackte“ ^{18}F -Fluorid. In polaren, nicht-protischen Lösungsmitteln wie Acetonitril (MeCN), *N,N*-Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) hat das reaktive $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ nukleophile Eigenschaften und kann dadurch

aliphatische und aromatische nukleophile Substitutionsreaktionen eingehen⁴¹. Durch Protonierung verliert das $^{18}\text{F}^-$ -Anion wieder sehr leicht seinen nukleophilen Charakter, deshalb werden die meisten Reaktionen mit $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ unter schwach basischen Bedingungen durchgeführt, um die Bildung von $[^{18}\text{F}]\text{HF}$ zu verhindern. Bevorzugt werden gering nukleophile Basen wie CO_3^{2-} , HCO_3^- oder C_2O^{4-} verwendet.

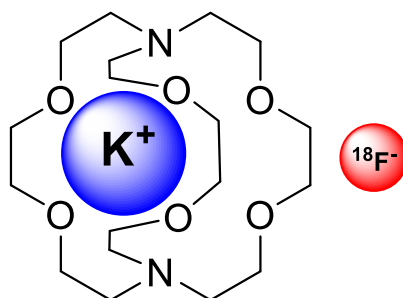


Abbildung 7. Schematische Darstellung eines $[^{18}\text{F}]\text{KF}/\text{K}_{222}$ -Komplexes

Zur räumlichen Trennung der Ladungen kann auch ein großes Kation, wie z.B. Cäsium (Cs^+) oder Tetraalkylammoniumsalze (Et_4N^+ oder $t\text{Bu}_4\text{N}^+$), ohne einen Kryptant verwendet werden.

Ebenso werden auch Anionenaustauscher-Kartuschen verwendet, das $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ wird dann auf der Kartusche fixiert und das angereicherte Wasser kann zurückgewonnen werden. Durch Spülen der Kartusche mit wasserfreiem Methanol werden Wasserreste entfernt und das reaktive $^{18}\text{F}^-$ kann anschließend mit einem geeigneten Salz eluiert werden.

1.2.2.1 Aliphatische Radiofluorierung

Aliphatische nukleophile Radiofluorierungen werden zur Einführung von ^{18}F in eine Vielzahl von Molekülen nach dem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus verwendet. Voraussetzung für die erfolgreiche Radiomarkierung ist die Anwesenheit einer guten Abgangsgruppe, wie der Triflat-, Tosylat-, Mesylat-, Iod- oder Bromabgangsgruppe. Zu beachten sind dabei potentielle Konkurrenzreaktionen, funktionelle Gruppen wie Säure-, Alkohol- und Aminogruppen im Molekül mit azidenen Protonen führen zur Verminderung der Nukleophilie des $^{18}\text{F}^-$ durch die Bildung von $\text{H}-[^{18}\text{F}]$. Deswegen müssen funktionelle Gruppen zuvor durch die Wahl geeigneter Schutzgruppen geschützt werden. Einer der wichtigsten PET-Tracer, die 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$ -2-desoxy-D-glukose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$) wird nach diesem Schema in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion hergestellt (siehe Abbildung 8). $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ist der am häufigsten eingesetzte Radiotracer in der Nuklearmedizin für die PET-Bildgebung neurologischer, kardiovaskulärer und onkologischer

Untersuchungen. Der geschützte Mannose-Triflat Vorläufer geht im Markierungsschritt eine Inversion der Konfiguration ein (Walden-Umkehr), die anschließende Entschützung mit Base und Reinigung über ein einfaches Kartuschen-System liefert [^{18}F]FDG in radiochemischen Ausbeuten von bis zu 70% und molaren Aktivitäten von 300 – 500 GBq/ μmol ^{42,43}.

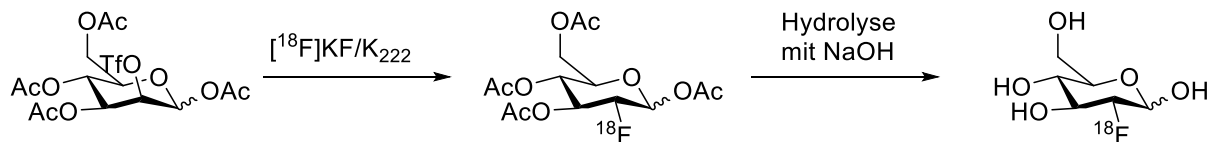


Abbildung 8. Synthese von n.c.a. [^{18}F]FDG (Ac: Acetyl, NaOH: Natronlauge)

Hier wird das Glukoseanalogon [^{18}F]FDG, bei dem die Hydroxylgruppe in 2-Position durch ein ^{18}F ersetzt wurde, durch die Transportproteine GLUT-1 in Tumor und Hirngewebe bzw. GLUT-4 in Skelettmuskulatur und Herzmuskel aufgenommen. Mit Hilfe des Enzyms Hexokinase wird [^{18}F]FDG phosphoryliert. Durch die ^{18}F -Substitution am 2-Kohlenstoff wird es im Gegensatz zur Glukose nicht weiter verstoffwechselt und reichert sich in Form des polaren [^{18}F]FDG-6-Phosphat in den Zellen an⁴⁴. Dieses Verfahren wird „metabolic trapping“ genannt und häufig in der PET eingesetzt⁴⁵.

Radiomarkierungen mittels nukleophiler Substitutionsreaktionen werden ausschließlich in aprotischen Lösungsmittel durchgeführt, allerdings wurden in Optimierungen der Markierungsbedingungen mit verschiedenen basischen Salzen (z.B. KHCO_3 , KOH , Et_4NHCO_3) und dem Zusatz protischer Lösungsmittel, vor allem für sterisch anspruchsvolle Alkohole (z. Bsp. *t*-BuOH, *t*-Amylalkohol), ein ausbeutesteigernder Effekt beobachtet^{46,47}. Sterisch anspruchsvolle Alkohole können Wasserstoffbrücken zum $^{18}\text{F}^-$ formen, dadurch verringert sich seine Basizität und Nebenreaktionen wie Eliminierungen können verhindert werden, wobei die Nukleophilie beibehalten wird⁴⁸. Die optimierten Reaktionsbedingungen konnten in der Radiosynthese von [^{18}F]Fluorthymidin ([^{18}F]FLT) erhebliche Ausbeutesteigerungen (von 15% auf 65%) erzielen⁴⁹. Dabei wurde die Elution des $^{18}\text{F}^-$ mit Tetrabutylammoniumhydrogencarbonat⁵⁰ durchgeführt, wobei das sehr effektive Radiofluorierungsreagenz [^{18}F]TBAF gebildet wurde, als protisches Lösungsmittel wurde *tert*-Butanol eingesetzt. [^{18}F]FLT wird in der Onkologie, zur Bildgebung von Tumoren als Proliferationsmarker genutzt.

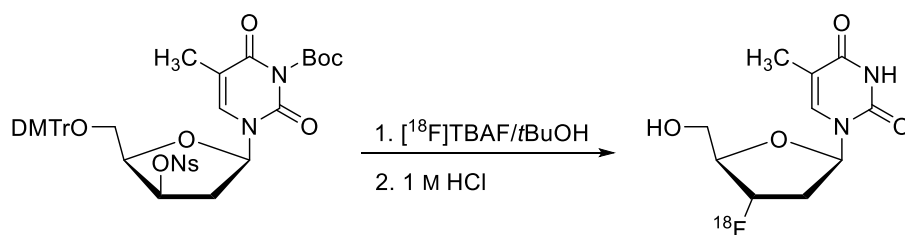
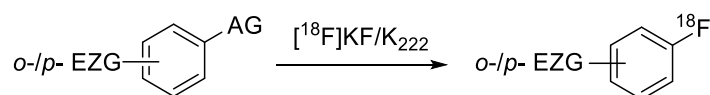


Abbildung 9. Synthese von $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ (DMTr: Dimethoxytrityl; ONs: Nosyl; Boc: *tert*-Butyloxycarbonyl)

1.2.2.2 Aromatische Radiofluorierung nach dem $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ -Mechanismus

Eine direkte Einführung von $^{18}\text{F}^-$ in einen Aromaten bzw. Heteroaromaten ist von großem Interesse, da viele biologische Substrate, Naturstoffe und Pharmazeutika aromatische Einheiten enthalten. Die Radiofluorierung über eine aromatische nukleophile Substitutionsreaktionen ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) erfordert eine Aktivierung des aromatischen Systems mit einer hohen Elektronendichte. Elektronen-ziehenden Gruppen (EZG), wie Nitro- ($-\text{NO}_2$), Cyanid- ($-\text{CN}$), Carbonyl- ($-\text{C}=\text{O}$) oder Acetylgruppen ($-\text{COCH}_3$) in *para*- oder *ortho*-Position zur Abgangsgruppe (AG) verringern über den $-\text{M}$ -Effekt die Elektronendichte des Aromaten und aktivieren ihn für eine nukleophile Substitutionsreaktion. Als Abgangsgruppen sind Nitro- und Trimethylammoniumgruppen ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) oder Halogene gut geeignet⁴³.



AG: Abgangsgruppe (Nitro, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, Hal)
 EZG: Elektronen-ziehende Gruppe
 (Nitro, Nitril, Acetyl, Hal)

Abbildung 10. Schematische Darstellung der $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ -Radiofluorierung

Elektronen-ziehende Gruppen können zur Aktivierung des Aromaten eingebaut werden, um eine Radiofluorierung zu ermöglichen, im Anschluss müssten diese wieder entfernt oder umgewandelt werden. Dies führt zu mehrstufigen Synthesen, die in der Radiochemie wegen zeitabhängigen Aktivitätsverlusten nicht durchführbar sind. Elektronenreiche und nicht-aktivierte Aromaten können mit direkten nukleophilen Substitutionen nicht markiert werden. Daher wurde für elektronenneutrale und -reiche aromatische Systeme eine alternative Synthesestrategie unter Verwendung substituierter Diaryliodoniumsalze und Triarylsulfoniumsalzen als Vorläufer entwickelt^{51,52,53}.

Die nukleophile ^{18}F -Markierung mit $\text{K}_{222}/\text{K}_2\text{CO}_3$ eines Diaryliodoniums Salzes mit unterschiedlichen Substituenten und Gegenionen in Acetonitril liefert ein Gemisch aus markierten Aren und dem dazugehörigen Iodaren. Die Produktverteilung ist stark von den elektronischen und sterischen Eigenschaften der Substituenten der jeweiligen Ringe abhängig. Bei einem unsymmetrischen Diaryliodoniumsalz wird der elektronenärmere Ring bevorzugt von ^{18}F -Fluorid angegriffen. Des Weiteren hat auch die Stellung der Substituenten Einfluss auf die Produktverteilung. Vor allem Verbindungen mit *ortho*-Substituenten werden bevorzugt fluoriert und erhöhen die Ausbeute, *para*-Substituenten hingegen vermindern die Ausbeute in folgender Reihenfolge: Brom > Chlor > Methyl²⁵. Nachteil dieser Methode ist die Begünstigung der weniger elektronenreichen Aromaten. Die Radiofluorierung von heteroaromatischen Iodoniumsalzen mit einer elektronenreichen 2-Thienyl-Einheit ermöglicht die ^{18}F -Einführung in den gewünschten Aromaten. Die Thiophen-Einheit besitzt eine hohe Elektronendichte und dirigiert daher $^{18}\text{F}^-$ an den Arylrest und wird selbst nicht von $^{18}\text{F}^-$ nukleophil angegriffen⁵⁴.

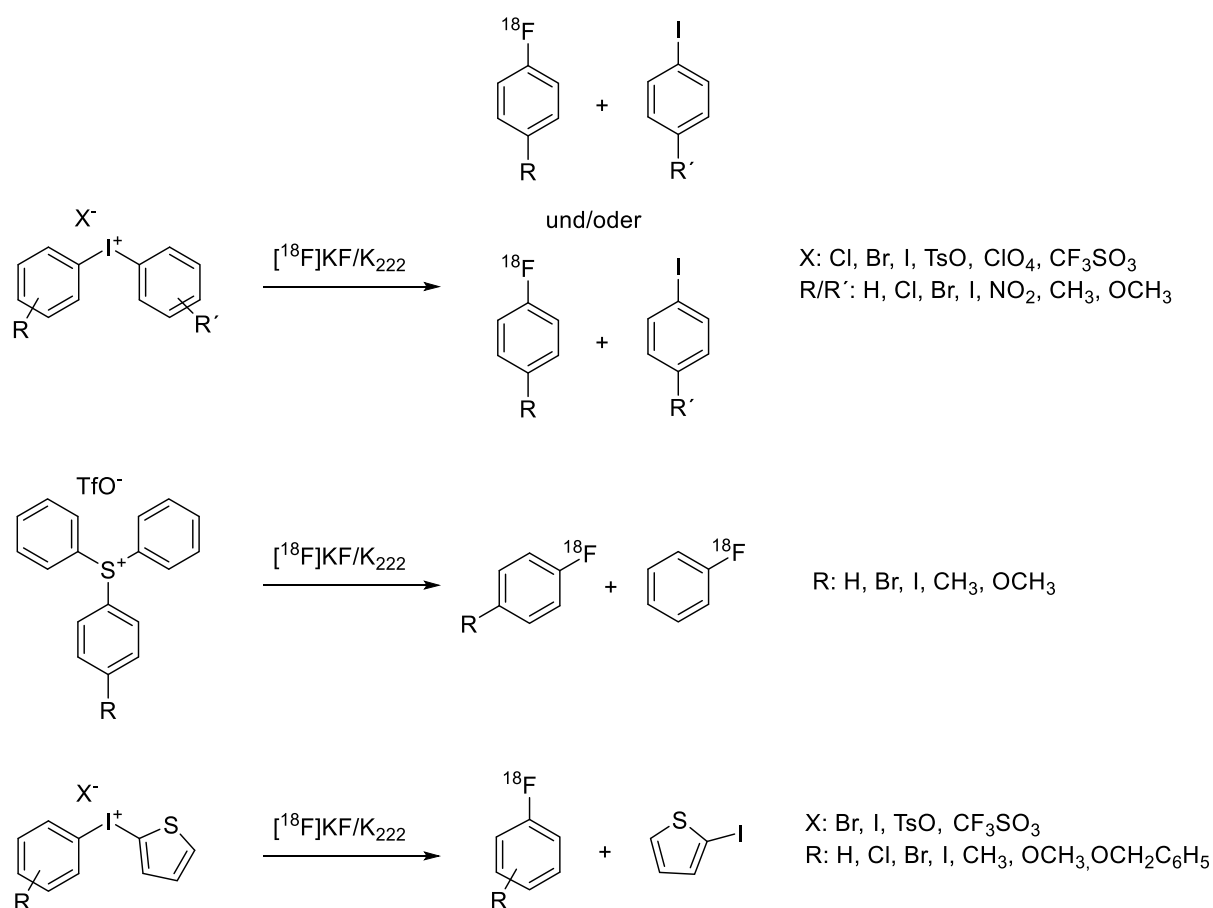


Abbildung 11. Prinzip der nukleophilen ^{18}F -Radiomarkierung über Diaryliodoniumsalze (oben), Triarylsulfoniumsalze (Mitte)⁵⁵ und Aryl(thienyl)iodoniumsalze (unten)⁵⁴

Die Anwendung von Aryl(thienyl)iodoniumsalzen ist überwiegend auf kleinere Moleküle wie [^{18}F]Fluoranol oder [^{18}F]Fluorphenol begrenzt, da die entsprechenden Thienyl-Verbindungen schwierig herzustellen sind und eine zu geringe Stabilität aufweisen.

Alternative Abgangsgruppen für die nukleophile aromatische Radiofluorierung von nicht-aktivierten aromatischen Systemen wurden intensiv erforscht. Sulfoniumsalze^{53,55}, Sulfoxide⁵⁶ und hypervalente Iod-Komplexe⁵² erwiesen sich als praktikable Vorläufer für die Markierung von nicht-aktivierten und deaktivierten Arylingen, jedoch verläuft die Synthese oft nicht regioselektiv und radiofluorierte Nebenprodukte ähnlicher Struktur müssen mühsam abgetrennt werden.

Aryliodonium-Ylid Vorläufer hingegen besitzen einen carbanionischen Charakter, durch die Verteilung der Ladungsdichte, kann der nukleophile Angriff bevorzugt an dem aromatischen Ring der Arylgruppe stattfinden^{57,58}. Des Weiteren sind Iodoniumylide relativ stabil. Im Vergleich zu den Iodoniumsalzen haben diese Verbindungen kein Gegenion und keinen unterstützenden Arylrest, wodurch keine radiofluorierten Nebenprodukte entstehen können. Die Entwicklung von spirozyklischen hypervalenten Iodoniumyliden ermöglichte die regioselektive Radiofluorierung von nicht-aktivierten (Hetero)Arenen in hohen radiochemischen Ausbeuten^{59,60}.

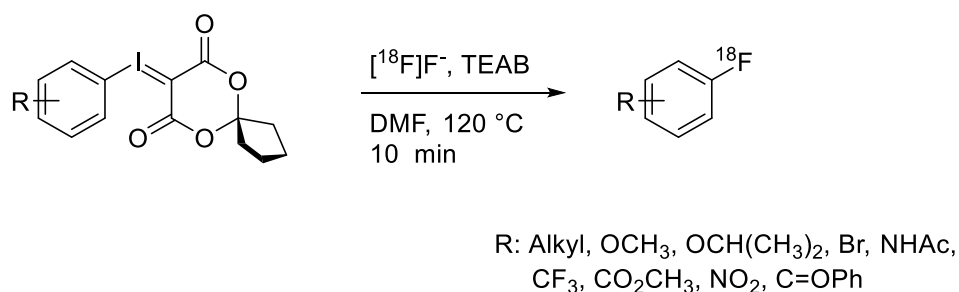


Abbildung 12. Aromatische Radiofluorierung eines spirozyklischen Iodoniumylid-Vorläufers

Mit Spiroiod(III)-basierten Vorläufern konnte ein breites Spektrum von nicht-aktivierten, sterisch gehinderten Arenen mit verschiedenen *ortho*-Funktionalitäten, wie Ester, Carbamate, Halide, Amide, Nitrogruppen, Trifluoromethylgruppen, Ketone und Heterozyklen regioselektiv radiofluoriert werden.

Im Folgenden wurden für nukleophile Substitutionen mit [^{18}F]Fluorid noch effizientere und zeitsparendere Markierungsstrategien von Diaryliodonium- und Triarylsulfoniumsalzen und quaternärem Anilinium entwickelt. Ein leistungsstarkes Konzept stellt hierbei die "minimalistische Methode" da⁶¹. Hierbei wird $^{18}\text{F}^-$ auf eine Anionenaustauschersäule (QMA, Quaternäres

Methylammonium) fixiert und mit Methanol gewaschen, um Wasserreste zu entfernen. Das $^{18}\text{F}^-$ auf der Kartusche wird anschließend mit einem Onium-Salz-Vorläufer in einer alkoholischen Lösung (meist Methanol) direkt in das Reaktionsgefäß eluiert. Unter vermindertem Druck wird der Alkohol entfernt und das eigentliche Lösungsmittel (i.d.R. DMF, DMA, MeCN) für die Reaktion hinzugefügt. Mit dieser Methode kann gänzlich auf die zeitintensive azeotrope Trocknung, den Zusatz von Base und weiteren Additiven, verzichtet werden. Somit können auch basenempfindliche Vorläufer radiofluoriert werden.

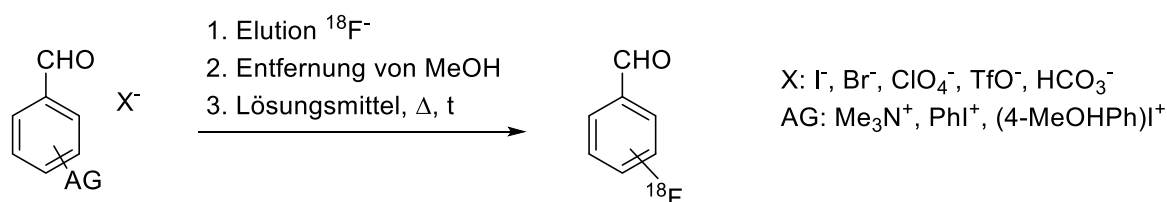


Abbildung 13. Radiofluorierung nach dem „minimalistischen“ Ansatz am Beispiel von [^{18}F]Fluorbenzaldehyd ([^{18}F]FBA)

1.2.3 Übergangsmetall-vermittelte Radiofluorierung von Aromaten

Die nukleophile aromatische Radiofluorierung von elektronenreichen Aromaten in hohen Ausbeuten und molaren Aktivitäten erwies sich als eine große Herausforderung, obgleich es eine Vielzahl von unterschiedlichen Methoden und verfügbaren unterschiedlichen Markierungsvorläufer gibt. Schließlich wurde die erste Übergangsmetall-katalysierte Radiofluorierung für die Bildung einer aromatischen C- ^{18}F Bindungen von Lee et al. entwickelt. Als Übergangsmetall wurde Pd eingesetzt, der Reaktionsmechanismus verlief über einen Pd(II)/(IV)-Katalyse Zyklus⁶². Dazu wurde erst aus nukleophilem $^{18}\text{F}^-$ und einem speziell entwickelten dikationischen Pd(IV)-Komplex ein elektrophiler ^{18}F -Pd(IV)-Komplex als Markierungsreagenz in einer Umpolungs-ähnlichen Reaktion hergestellt. Im zweiten Schritt folgte die Reaktion des markierten ^{18}F -Pd(IV)-Markierungsvorläufers mit dem Nukleophil, einem Pd(II)-Arylkomplex, wobei ein Elektronentransfer vom Pd(II)Arylkomplex zum Pd(IV) stattfand und zwei Pd(III)-Spezies generiert wurden. Anschließender Transfer von ^{18}F und einem weiteren Elektronentransfer lieferte einen Pd(IV)(aryl)- ^{18}F -Komplex. Im letzten Schritt bildete sich unter reduktiver Eliminierung der radiofluorierte Aromat (siehe Abbildung 14). Die Anwendung der luft- und feuchtigkeitsempfindlichen Palladiumkomplexe war nur unter Schutzgasatmosphäre möglich und setzte sich daher nicht in der Praxis durch.

Es folgte von derselben Arbeitsgruppe die Entwicklung einer einstufigen aromatischen Radiofluorierungsmethode über Ni-Komplexe⁶³. Dabei wurde in Anwesenheit eines Oxidationsmittels der zu markierende Aromat an ein Ni-Komplex koordiniert. Als Oxidationsmittel diente eine hypervalente Iodverbindung. Über eine Ni(IV)-Spezies erhielt man nach reduktiver Eliminierung den ¹⁸F-markierten Aromaten. Im Gegensatz zu den Pd-Komplexen sind Ni-Komplexe stabil. Allerdings war in dieser Synthese die Hydrolyse-Empfindlichkeit des hypervalenten Iod-Oxidationsmittels ein stark limitierender Faktor, so dass sich auch dieser Ansatz für eine automatisierte Anwendung in der PET-Tracerherstellung nicht durchsetzen konnte.

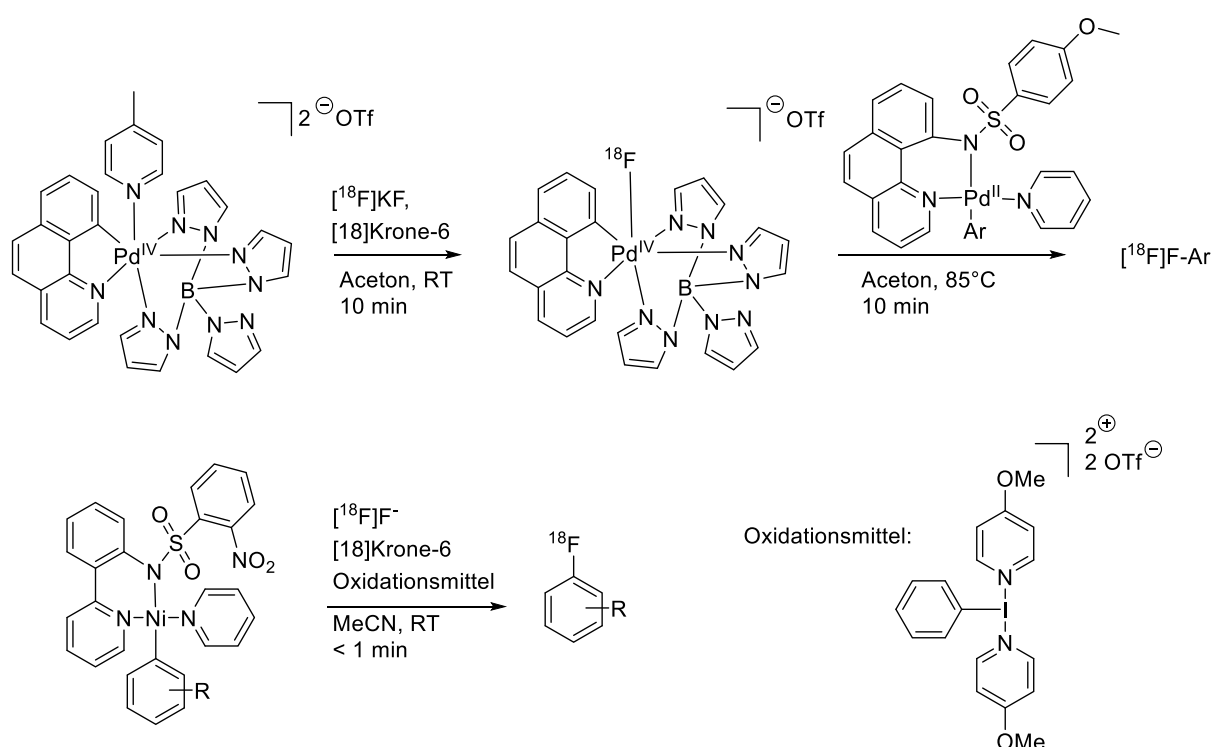


Abbildung 14. Zweistufige Pd-vermittelte aromatische Radiofluorierung (oben); einstufige Ni-vermittelte aromatische Radiofluorierung (unten)

1.2.3.1 Kupfer-vermittelte aromatische Radiofluorierung

Die mit Abstand wichtigste Übergangsmetall-vermittelte Radiofluorierungsmethode für die Bildung von aromatischen C–¹⁸F Bindungen ist die Kupfer-vermittelte Methode⁶⁴.

Ichiishi et al. veröffentlichte erstmals im Jahr 2014 die Kupfer-vermittelte Radiofluorierung von Arylmesityliodoniumsalzen⁶⁵. Mit dieser Methode konnte eine Vielzahl von radiofluorierten

(Hetero)aromaten in hohen RCA hergestellt werden, indem als Cu-Quelle $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ mit $[^{18}\text{F}]\text{KF}/18\text{-Krone-6}$ in DMF bei 60 °C verwendet wurde.

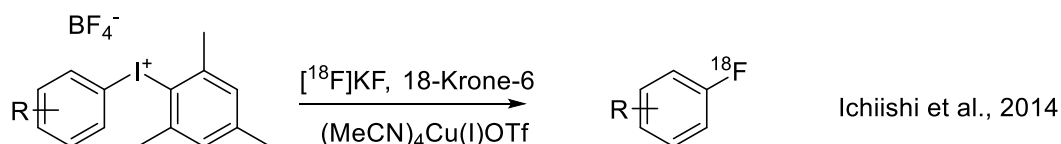


Abbildung 15. Cu-vermittelte Radiofluorierung von Arylmesityliodoniumsalzen

Im von Ichiishi postulierten Reaktionsmechanismus⁶⁶ (siehe Abbildung 16) wird zunächst aus $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ die aktive Spezies, $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{OTf})]^-$ oder $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{DMF})]^-$, gebildet. Die anschließende Oxidation des Diaryliodoniumsalzes liefert ein $\text{Cu}(\text{III})\text{-F-Aryl}$ Intermediat. Nach reduktiver Eliminierung über den π -Komplex erhält man das gewünschte Fluoraren. In diesem Fall wird die oxidative Addition und die Fluorierung von der Mesityl-Gruppe zum weniger sterisch gehinderten Aryl des Iodoniumsalzes dirigiert. Hingegen wird in einer Fluorierung ohne Cu die Addition des Fluorids durch die *ortho*-Substituenten zum sterisch anspruchsvolleren Ring dirigiert⁶⁷. Mit dieser Methode konnten elektronenreiche Aromaten in hohen Ausbeuten und guter Selektivität fluoriert werden.

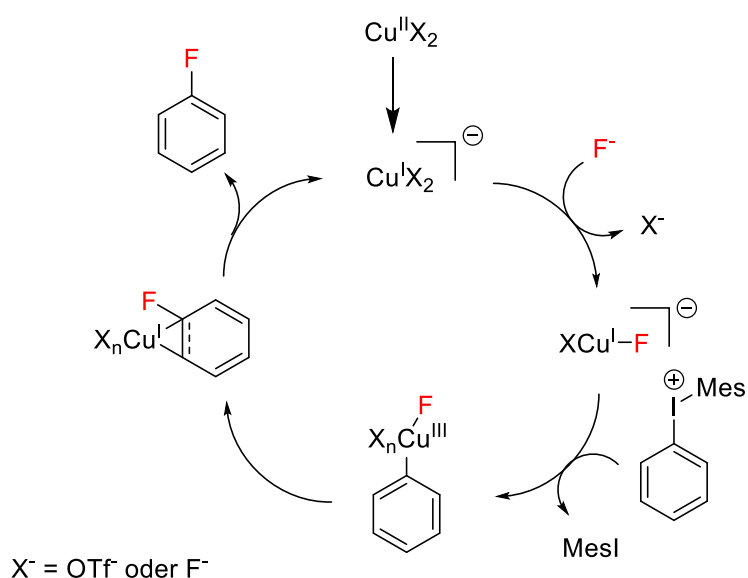


Abbildung 16. Postulierter Mechanismus des $\text{Cu}^{\text{I/III}}$ Zyklus der Fluorierung von Aromaten von Ichiishi et al.⁶⁶

Auf Grund der hohen Hygroskopie des $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, war die Anwendung dieser Radiosynthese in der Routineproduktion zunächst begrenzt. Dieses Problem konnte durch die Verwendung von kommerziell erhältlichen nicht-hygroskopischen $(\text{MeCN})_4\text{CuOTf}$ als Cu-Quelle für die Cu-vermittelte Radiofluorierung von Mesitylaryliodoniumsalzen gelöst werden⁶⁸.

Die Cu-vermittelte Radiofluorierung von Arylboronaten und Arylboronsäurepinakolester (ArylBpin) wurde von Tredwell et al.⁶⁴ und Ye et al.⁶⁹ (2014) beschrieben. Die Radiosynthese wurde mit einem Arylboronsäurepinakolester-Markierungsvorläufer in Gegenwart von $[\text{}^{18}\text{F}]\text{KF}/\text{K}_{222}$ und $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ als Cu-Quelle durchgeführt. In weiteren Untersuchungen wurde der positive Effekt von Pyridin als Co-Ligand des Kupferkomplexes in der Produktbildung festgestellt. In weiteren Arbeiten wurde der an Luft stabile Kupferkomplex $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$ eingesetzt. Die Markierungsmethode ließ sich in vielen Arbeiten mit kleinen Aliquoten von $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}^-$ effizient durchführen. Dazu wurde zunächst $^{18}\text{F}^-$ mit $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_{222}$ getrocknet und von dieser Lösung Aliquote für die Radiosynthese entnommen. Die Übertragung auf eine Eintopfsynthese mit hohen Aktivitätsmengen zeigte aber deutliche Ausbeuteverluste. So wurden bei der 6- $[\text{}^{18}\text{F}]\text{FDOPA}$ -Synthese von Tredwell et al.⁶⁴ bei kleinen Ansätzen mit Aliquoten RCA von 55% und in einem großen Ansatz nur 12% erhalten. Dieser Effekt konnte auf die Instabilität der verwendeten Kupferkomplexe ($\text{Cu}(\text{OTf})_2$, $(\text{MeCN})\text{Cu}(\text{OTf})$ und $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$) unter basischen Bedingungen zurückgeführt werden. Die zu große Basenmenge in einer Eintopfsynthese führte dazu, dass die Kupfer-vermittelte Radiofluorierung in der Praxis nicht effizient durchgeführt werden konnte⁷⁰.

Des Weiteren wurden Arylboronsäurepinakolester⁶⁴, Arylboronsäuren⁷¹ und Arylstannane⁷² als Markierungsvorläufer für die Cu-vermittelte Radiomarkierung untersucht, da sie I) stabil und II) auch oft leicht zugänglich oder gar kommerziell erhältlich sind. Eine Vielzahl von Verbindungen und auch einige PET-Tracer konnten mit diesen Methoden hergestellt werden. Allerdings sind diese Markierungsvorschriften in der Umsetzung mit einigen limitierenden Faktoren behaftet. Die benötigte azeotrope Trocknung des $[\text{}^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ ist zeitaufwendig, die benötigte Base und weitere Zusätze wie Pyridin, K_{222} , KOTf und $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ führten zu großen Aktivitäts- und Ausbeuteverlusten.

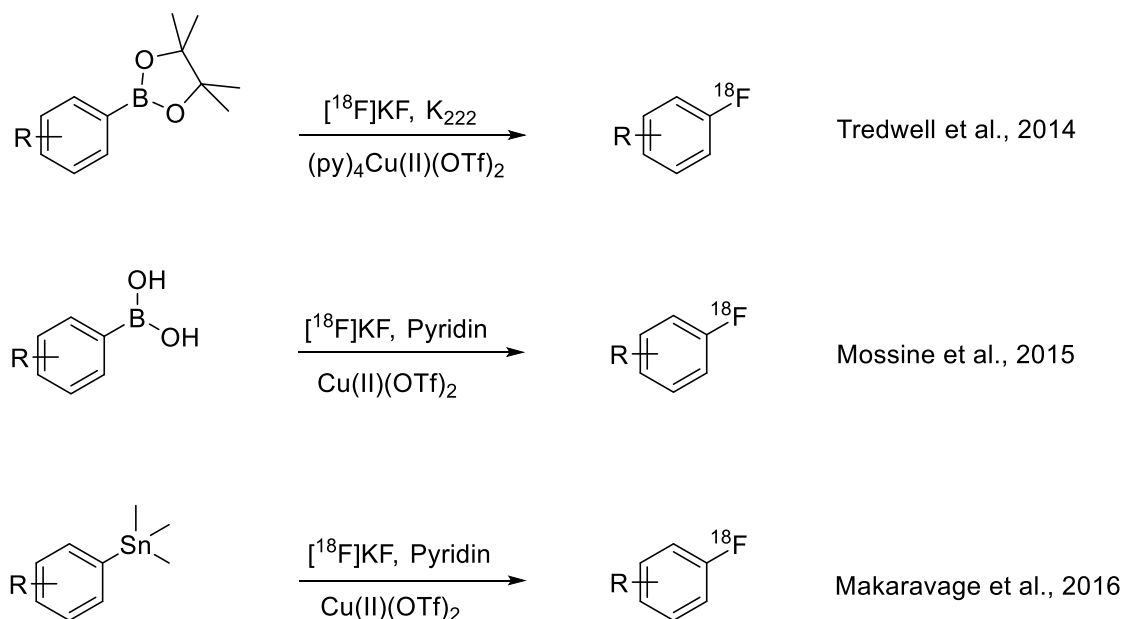


Abbildung 17. Kupfer-vermittelte Radiofluorierungen von Aromaten mit n.c.a.[¹⁸F]Fluorid

1.2.3.2 Optimierungen der Kupfer-vermittelten aromatischen Radiofluorierung nach dem „minimalistischen“ Protokoll

Für die Synthese klinisch relevanter PET-Tracer im Routinemaßstab wurden „Up-scaling“ Ansätze durchgeführt, jedoch wurden die verminderten Ausbeuten mit der höheren Basenmenge erklärt. Eine Modifizierung des Syntheseprotokolls nach der minimalistischen Methode ermöglichte es ¹⁸F-Arylverbindungen über die Cu-vermittelte Radiofluorierung von Iodoniumsalzen und Boronsäurepinakolestern in hohen Ausbeuten herzustellen⁷³. Dazu wurde [¹⁸F]F⁻ erst auf eine Anionenaustauscher-Säule fixiert, mit Luft getrocknet und anschließend mit einer alkoholischen Iodoniumsalz-Vorläuferlösung eluiert. Als Cu-Quelle wurde (MeCN)₄Cu(OTf)₂ eingesetzt. Der Alkohol wurde unter vermindertem Druck entfernt und nach Zugabe des entsprechenden Lösungsmittels die Radiofluorierung durchgeführt. Diese milden Reaktionsbedingungen ermöglichten die Radiofluorierung von aromatischen Systemen unabhängig von ihren elektronischen Eigenschaften (elektronenneutral, -arm, -reich) in hohen Ausbeuten mit einer deutlichen Zeitersparnis.

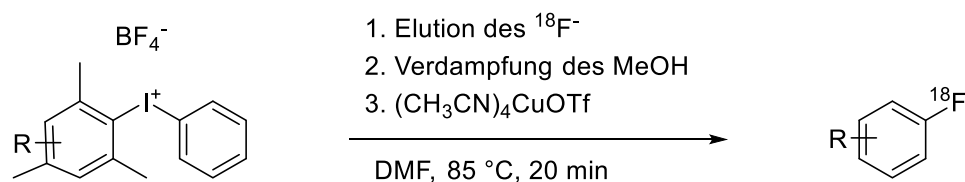


Abbildung 18. Cu-vermittelte Radiofluorierung nach dem minimalistischen Protokoll

Dieses Markierungsprotokoll konnte auf die automatisierte Radiosynthese der klinisch relevanten PET-Tracer $[^{18}\text{F}]\text{DAA1106}$ und $4\text{-}[^{18}\text{F}]\text{FPhe}$ mit hohen RCA und RCR übertragen werden⁷⁴.

1.2.3.3 Optimierung der Kupfer-vermittelten aromatischen Radiofluorierung nach der Alkohol-verstärkten Methode

Die Kupfer-vermittelte aromatische Radiofluorierung nach dem „minimalistischen“-Protokoll ermöglichte den Zugang zu einem breiten Spektrum von markierten (Hetero)arenen. Dennoch war die Anwendung in der Praxis, auf Grund der oft sehr komplizierten Vorläufersynthesen und auch der limitierenden Aufbewahrungsmöglichkeiten der Diaryliodoniumsalze begrenzt. Deswegen wurden weitere Optimierungen für eine effiziente Cu-vermittelte Radiofluorierung an Arylboronsäuren, Arylboronsäurepinakolestern und Arylstannanen untersucht. Ein wichtiger Aspekt des minimalistischen Protokolls war die zeiteffiziente Herstellung von $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ mittels Anionenaustauscher-Säulen, die einen Verzicht auf azeotrope Trocknung ermöglichte. Darauf basierend wurden verschiedene Möglichkeiten der Elution des $[^{18}\text{F}]\text{Fluorids}$ getestet. Besonders der positive Einfluss von primären und sekundären Alkoholen als Co-Lösungsmittel auf die Radiofluorierung wurde intensiv untersucht⁷⁵. Die Verwendung des primären Alkohols *n*-Butanol (*n*-BuOH) zeigte in der Radiosynthese mit $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$ als Cu-Quelle sehr hohe radiochemische Umsätze (RCU) von 80–99% für die Markierung elektronenreicher Aromaten, Phenole und Indole. Hierzu wurde zunächst $^{18}\text{F}^-$ auf eine Anionenaustauscherkartusche fixiert und diese anschließend mit wasserfreiem Methanol gespült. Die Elution des $^{18}\text{F}^-$ von der Anionenaustauscherkartusche erfolgte dann mit einer alkoholischen Lösung aus Tetraethylammoniumbicarbonat (Et_4NHCO_3) in *n*-BuOH direkt in das zuvor mit einer Lösung aus Vorläufer und der Cu-Quelle in Dimethylacetamid (DMA) befüllte Reaktionsgefäß. Hohe Umsätze wurden bei Reaktionslösungen, die aus 20–60% *n*-BuOH in DMA zusammengesetzt waren, erzielt. Da auf Trocknungsschritte gänzlich verzichtet wurde, verkürzte sich die Synthesezeit und höhere Ausbeuten konnten erzielt werden.

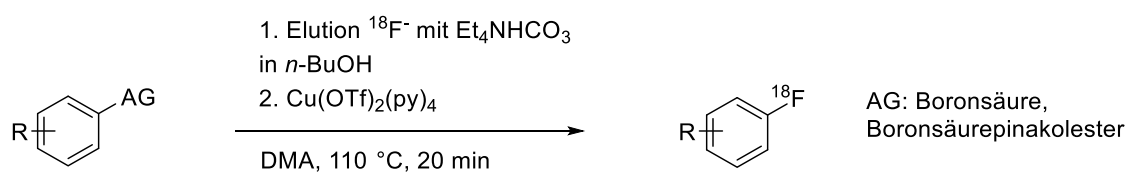


Abbildung 19. Cu-vermittelte aromatische Radiofluorierung nach dem minimalistischen Protokoll (oben) und nach der Alkohol-verstärkten Methode (unten)

Dieser positive Effekt von Alkohol bei der Radiofluorierung von Boronatvorläufern wurde mit der Solvatisierung des ^{18}F Fluorids mit Alkohol, was zu einer Verringerung der Basizität führen könnte, begründet. Dabei ist diese Wechselwirkung aber nicht groß genug, um die Nukleophilie des ^{18}F Fluorids zu verändern⁷⁶. Unter Berücksichtigung dieser Hypothese kann der Mechanismus einer Cu-vermittelten Alkohol-verstärkten Radiofluorierung von Boronat- und Stannylvorläufer folgendermaßen postuliert werden: im ersten Schritt wird über eine Anionenmetathese, gefolgt von der Oxidation des Cu(II) an der Luft, der Cu(III)-Komplex gebildet und mit Pyridin- und Alkoholat-Liganden stabilisiert⁷⁷. Danach erhält man durch Transmetallierung ^{18}F -Aryl(III)cuprat⁷⁸ mit RO^- - und Pyridin-Liganden. Im letzten Schritt wird der katalytische Zyklus beendet und man erhält unter reduktiver Eliminierung das gewünschte ^{18}F ArF oder ArOR als Nebenprodukt der Ullmann Reaktion⁷⁹. Zusätzlich wird angenommen, dass Alkohole den Übergangszustand bei der B/Cu(III)-Transmetallierung über die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wasserstoffen des Alkohols und dem Sauerstoff des $\text{B}(\text{OH})_2$ oder Bpins stabilisieren. Dieser positive Effekt sollte in der Radiofluorierung von $\text{B}(\text{OH})_2$ - und Bpin-Markierungsvorläufern beobachtet werden, aber nicht bei der Markierung von Aryltrialkylstannanen, die keine Wasserstoffbrücken bilden können. Tatsächlich konnte dies bestätigt werden. In der Cu-vermittelten Radiosynthese mit Stannylmarkierungsvorläufern konnte in alkoholischem Reaktionsmedium keine erhöhte RCA beobachtet werden.

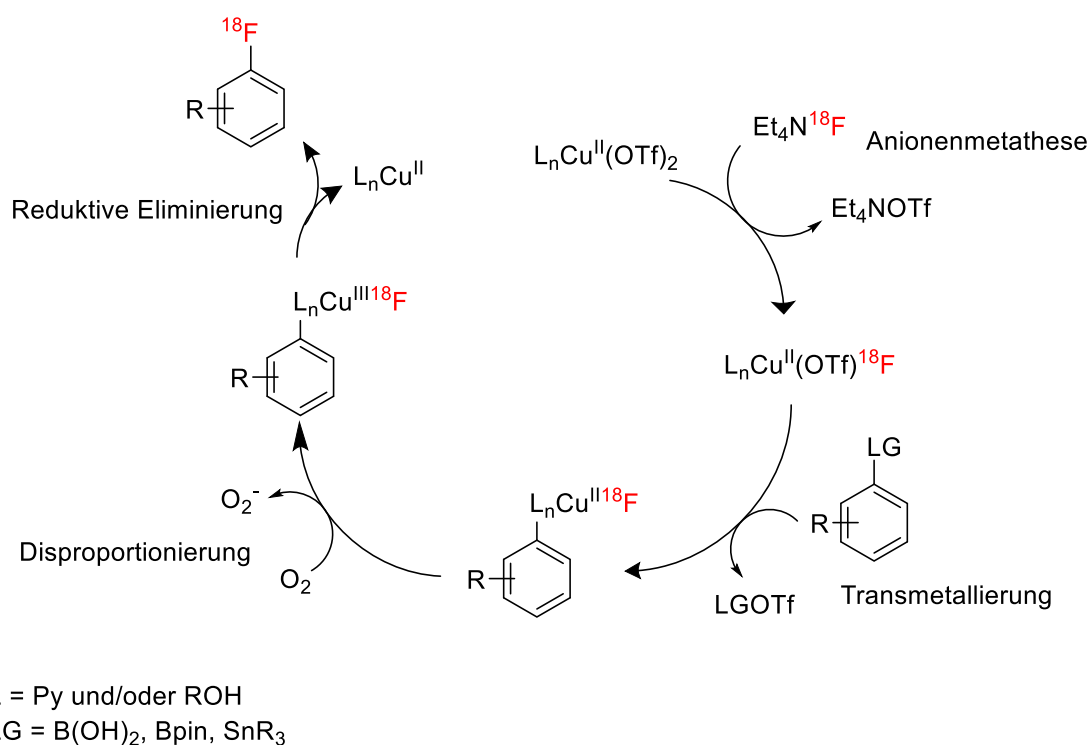


Abbildung 20. Postulierter Reaktionsmechanismus der Cu-vermittelten Radiofluorierung von Arylboronsäurepinakolestern, -boronsäuren und -stannanen.

Diese Optimierungen ermöglichten es ein breites Spektrum von klinisch relevanten PET-Tracern in vollautomatisierten Modulen zuverlässig und in hohen Ausbeuten für die klinische und präklinische neurologische und onkologische Bildgebung in der Routineproduktion herzustellen. In Abbildung 21 sind Beispiele von klinisch relevanten PET-Tracern, die über eine Kupfer-vermittelte Radiofluorierung hergestellt wurden, dargestellt.

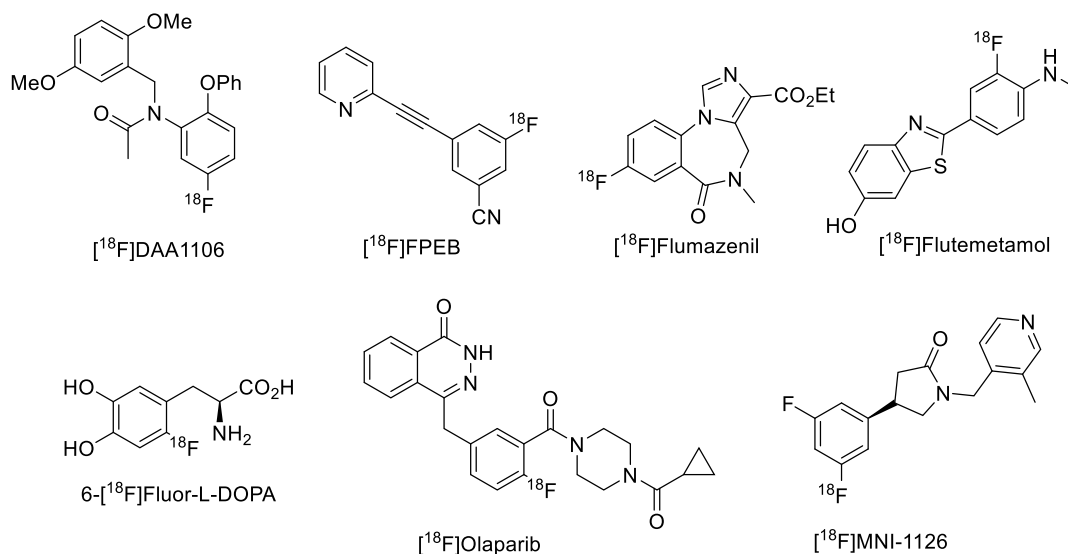


Abbildung 21. Verschiedene PET-Tracer, die durch Kupfer-vermittelter Radiofluorierung hergestellt wurden⁸⁰

1.2.4 Indirekte Radiofluorierungsmethoden

In der Radiotracer-Herstellung ist es wünschenswert die Markierung im letzten Schritt („late-stage“) durchzuführen, um hohe radiochemische Ausbeuten zu erzielen und den Automatisierungsprozess zu vereinfachen. Allerdings ist dies im Fall von komplexeren Molekülen mit multiplen Funktionalitäten oder von Biomolekülen (Proteine und Peptide) häufig nicht möglich. Hier müssen dann indirekte Radiofluorierungsmethoden eingesetzt werden. Dabei unterscheidet man zwischen Radiofluorierungen über Aufbausynthesen oder über prosthetische Gruppen. Bei ersterem wird zunächst ein kleiner, bifunktionaler Baustein, auch Synthion genannt, direkt radiofluoriert und anschließend durch geeignete Reaktionen, wie zum Beispiel einer *N*-Alkylierung, *O*-Alkylierung, Amidbildung, Acylierung oder Thiolkupplung mit dem gewünschten Zielmolekül konjugiert.

Vielseitig eingesetzte Synthions für die Radiofluorierung über eine Aufbausynthese sind 4- ^{18}F -Fluorbenzaldehyd⁸¹, 4- ^{18}F -Fluoranilin⁸², 4- ^{18}F -Fluorbrombenzol⁸³ oder ^{18}F -Fluorethyltosylat⁸⁴. Ein bekanntes Beispiel einer Aufbausynthese ist die automatisierte Herstellung von ^{18}F -FDOPA (Abbildung 22), welches ausgehend von einem Trimethylammoniumvorläufer mit einer funktionellen Aldehydgruppe über fünf Stufen in einer RCA von 23% aufgebaut wird.

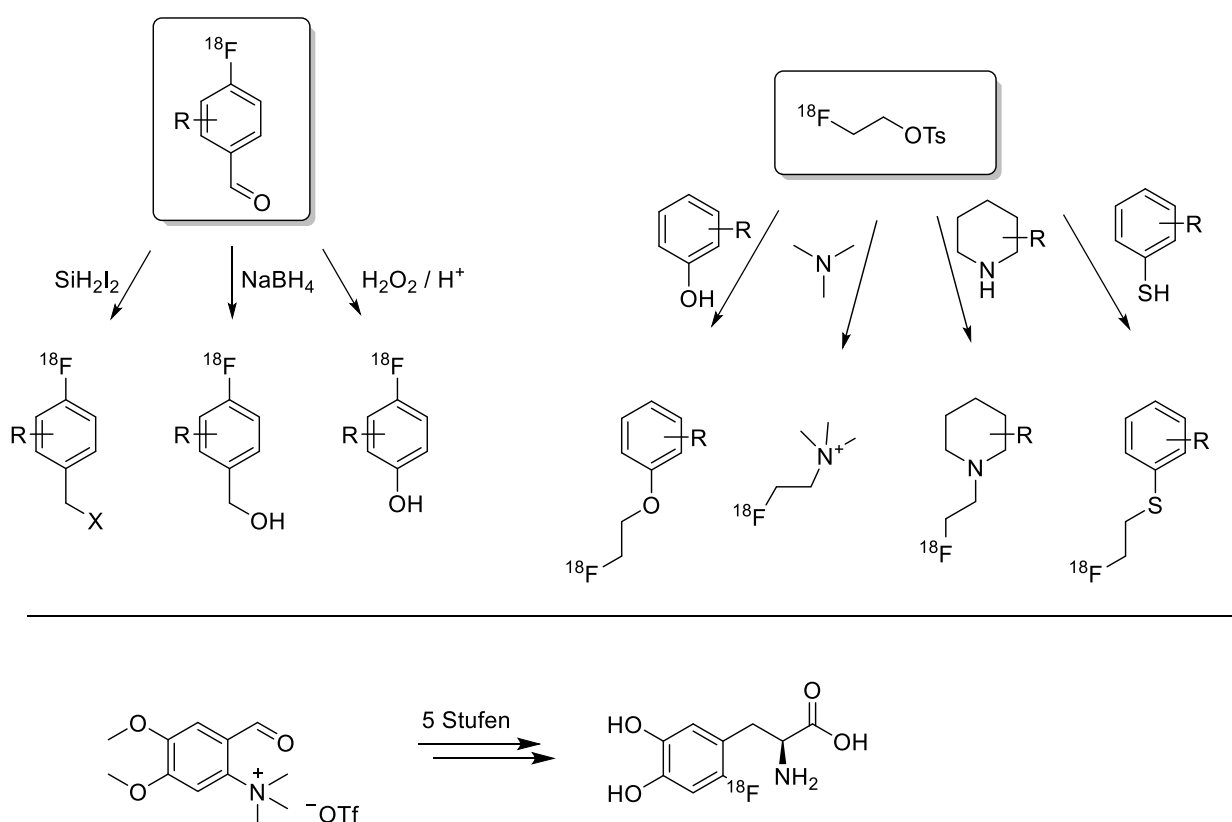


Abbildung 22. Beispielreaktionen für die Synthions ^{18}F -Fluorbenzaldehyd und ^{18}F -Fluorethyltosylat (oben); fünfstufige Aufbausynthese von ^{18}F -FDOPA (unten)

Die Radiofluorierung von Proteinen, Peptiden und Oligonukleotiden erfordert besonders milde Reaktionsbedingungen, da bei den sonst harschen Reaktionsbedingungen (hohe Temperaturen, hohe bzw. niedrige pH-Werte und organische Reaktionsmedien) sich die Biopolymere zersetzen⁸⁵. Die Einführung von F-18 in ein Biomolekül kann über eine prosthetische Gruppe erfolgen. Dabei handelt es sich um ein Synthon, welches zuvor radiofluoriert und anschließend über Kupplungsreaktionen mit der Zielstruktur konjugiert wird. Als Amino-reaktive prosthetische Gruppe haben sich 4-^[18F]Fluorbenzoesäure (^[18F]FBA) und *N*-Succinimidyl-4-^[18F]fluorbenzoat (^[18F]SFB)⁸⁶ bewährt. Ein wichtiges Beispiel für eine Thiol-reaktive prosthetische Gruppe ist das *N*-[6-(4-^[18F]Fluorbenzyliden)aminooxyhexyl]maleimid (^[18F]FBAM)^{87,88}.

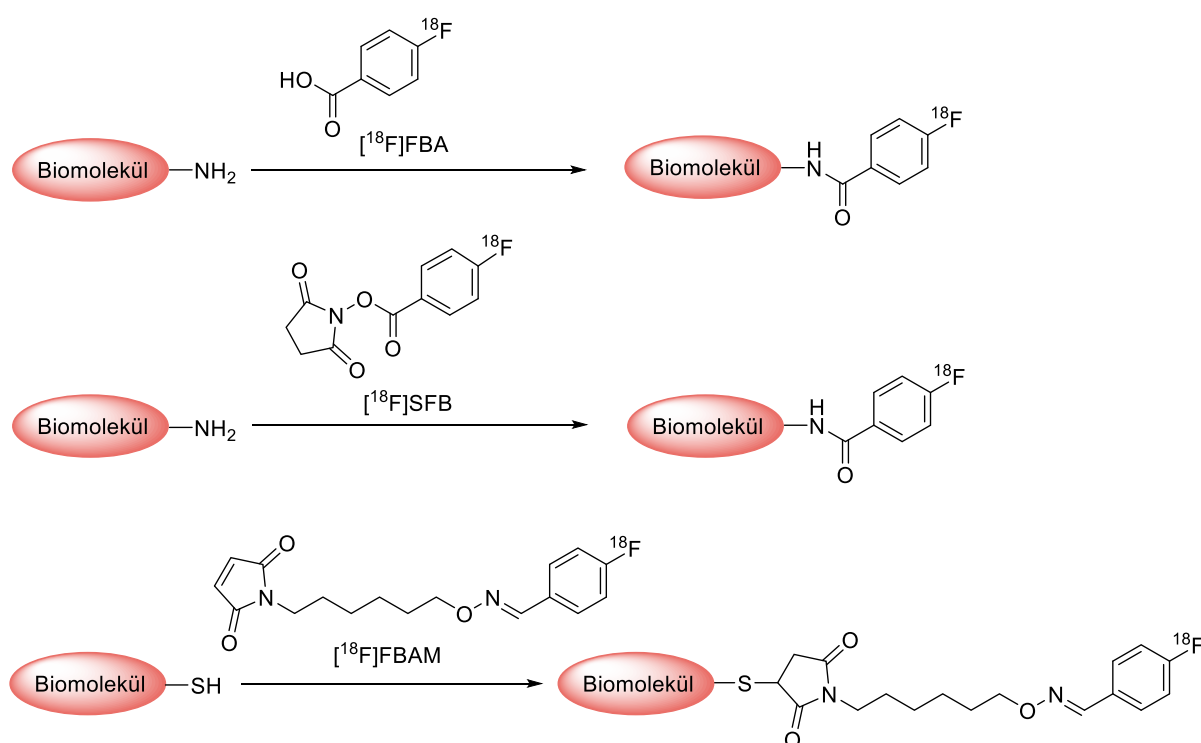


Abbildung 23. Konjugation von verschiedenen prosthetischen Gruppen an Biopolymere

Da die Radiofluorierung eines Biomoleküls in zwei separaten Schritten verläuft, der Radiofluorierung des Synthons und der nachfolgenden Kupplung an das Biomolekül, können auch harsche Markierungsbedingungen bei der Herstellung des Synthons eingesetzt werden, da erst bei der Konjugation an das Biopolymer milde Reaktionsbedingungen verwendet werden müssen.

1.3 Entwicklung von PET-Liganden für die Neurobildgebung

Die Entwicklung von neuen PET Radiotracer für die molekulare Bildgebung des Gehirns ist ein multidisziplinärer Prozess, bei dem viele komplexe Schritte durchlaufen werden müssen. Der Ausgangspunkt ist eine spezifische biomedizinische Fragestellung, die von Medizinern, Naturwissenschaftlern oder von Pharmaunternehmen gestellt wird. Die Problemstellung ergibt sich oft aus der Aufklärung klinischer Fragestellungen in der Diagnostik und der Behandlung von Patienten, oder häufig auch aus der Grundlagenforschung, die prinzipiell die Funktion und Struktur des Gehirns untersucht⁸⁹. Nach Auswahl der biomedizinischen Fragestellung, wird nach einem geeigneten molekularen Target-Liganden System gesucht. Klassische Targets in der molekularen Neurobildgebung umfassen Rezeptoren^{90,91} und Neurotransmitter-Transporter^{92,93}, Enzyme⁹⁴ oder pathologische Proteinstrukturen, wie Amyloid Plaques und Tau-Ablagerungen^{95,96}. Wichtige Kriterien sind zudem die biochemische Funktion und die Lokalisation des Targets. Ein Ansatz um das ausgewählte molekulare Target gezielt mit Radiotracer zu adressieren, ist die Suche nach geeigneten potentiellen Leitstrukturen, die mit diesem Target interagieren. Häufig dienen körpereigene Substanzen oder etablierte Medikamente als Startpunkt bei der Auswahl der Leitstruktur. Nach der Wahl einer geeigneten Leitstruktur, wird diese auf ihre physikalischen Eigenschaften (z. B. Löslichkeit, Lipophilie, Ionisationskonstante, Hirngängigkeit), ihre Affinität und Selektivität zum molekularen Target und ihre *in vitro* metabolische Stabilität untersucht. Für potentielle Kandidaten werden dann Radiomarkierungsmethoden entwickelt, welche die geeignete Wahl und Einführung des gewünschten Radionuklids ins Molekül, die Vorläufersynthese, die Aufbereitung und Formulierung des Radiotracers und abschließend die Qualitätskontrolle beinhaltet.

Neue Radioliganden werden anschließend umfangreich hinsichtlich ihrer Target-Bindungseigenschaften und pharmakokinetischen Eigenschaften charakterisiert. Dazu werden *in vitro* und *in vivo* Studien durchgeführt. Beginnend mit Bindungsassays wird die Affinität (K_D oder K_i) des neuen Radioliganden bestimmt. Dem können *in vitro* Studien folgen, welche auf autoradiographische Evaluierungen des Radiotracers an Hirnschnitten zur Abbildung der erwarteten Strukturen und zur Ermittlung der unspezifischen Bindung zum Beispiel an zerebralen Proteinen oder Fetten basieren, um somit die Spezifität einer Verbindung aufzuklären. *In vivo* Studien werden mittels PET-Bildgebung üblicherweise an Nagetieren durchgeführt. Dazu wird die Permeabilität der Bluthirnschranke, die Verteilung und die Kinetik des Tracers im Gehirn und die Bildung von Metaboliten untersucht. Wenn eine präklinische Studie positive Ergebnisse liefert, werden weiterführende Studien geplant. Der letzte Schritt in der PET-Tracer-Entwicklung beinhaltet die Evaluierung des neuen Tracers im Menschen, jedoch müssen zuvor die Einhaltung entsprechender Regularien (z. Bsp. toxikologische Sicherheit,

Strahlenschutz, gute Herstellungspraxis für Arzneimittel (GMP, englisch: good manufacturing practice) sichergestellt werden^{97,98}.

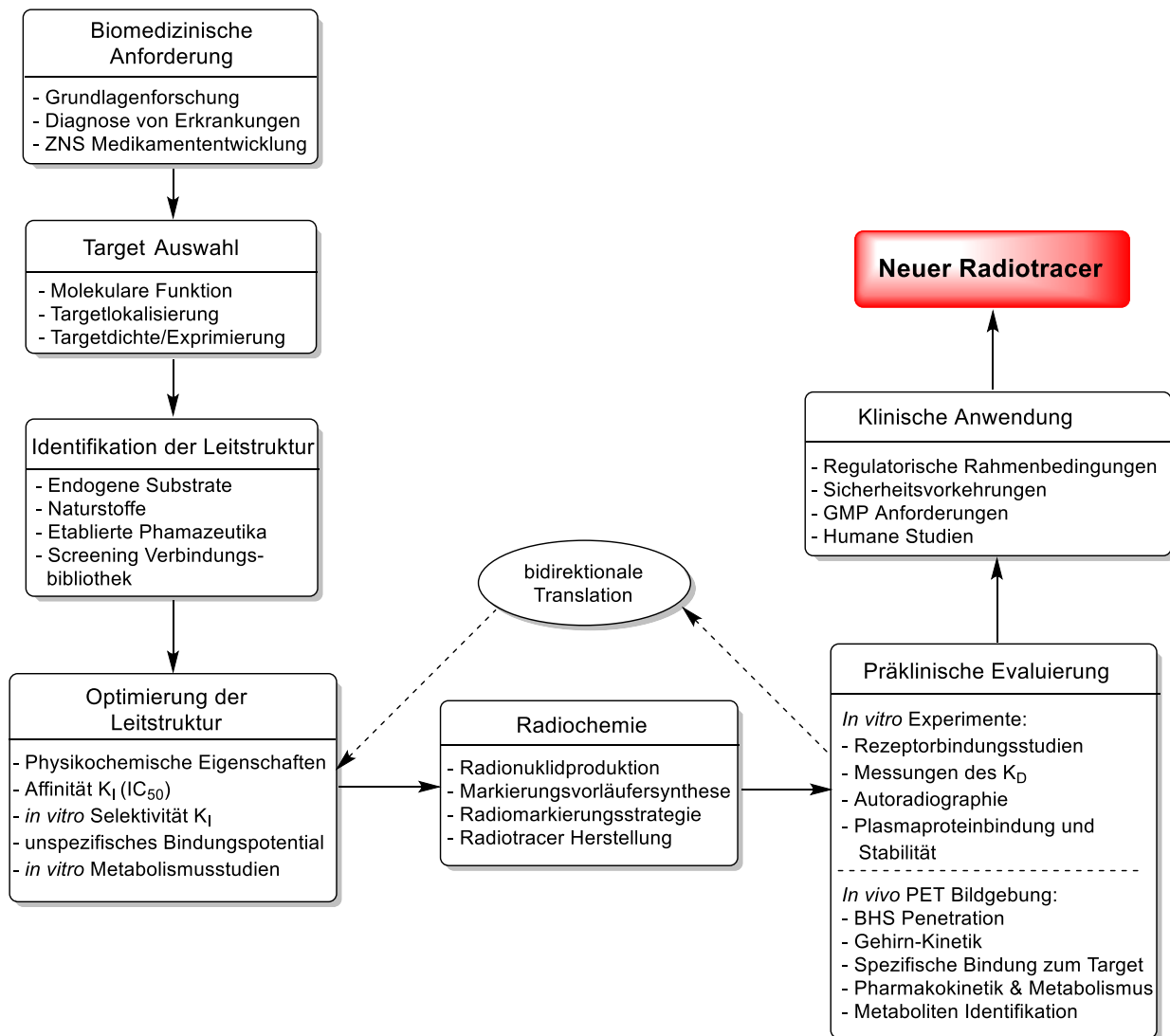


Abbildung 24. Schematische Darstellung des Radioliganden-Entwicklungsprozesses⁸⁹

1.3.1 Wichtige Parameter für die Etablierung neuer Radioliganden

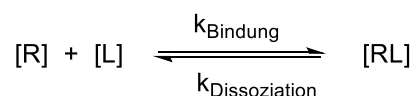
Für den Erfolg eines neuen Radioliganden zur Darstellung von molekularen Targets im Gehirn müssen viele Anforderungen erfüllt sein. Folgende Eigenschaften sollten die Kandidaten aufweisen⁹⁹:

- Hohe Affinität (üblicherweise im nM Bereich für die Dissoziationskonstante K_D oder K_i)
- Spezifität und Selektivität für das Target
- Gute Hirngängigkeit
- Kein Substrat für Efflux-Transporter
- Metabolische Stabilität des Tracers, keine Radiometaboliten im Gehirn
- Markierbarkeit mit ^{11}C oder ^{18}F mit hohen molaren Aktivitäten für die Rezeptorbildgebung
- Geringe unspezifische Bindung

1.3.1.1 Bindungsassays

Die Bindung eines Liganden an sein molekulares Target, z. B. einen Rezeptor, kann über verschiedene Methoden bestimmt werden. Eine der gängigsten Methoden ist die Verwendung von Radioliganden. Die Bindung eines Radioliganden (L) an einem bestimmten Rezeptor (R) unter Gleichgewichtsbedingungen liefert Auskünfte über die Affinität und Selektivität des Radioliganden¹⁰⁰. Dazu können zwei Arten von Bindungsexperimenten durchgeführt werden, die direkte Bestimmung der Ligandenbindung am Rezeptor über Sättigungsexperimente und die indirekte Bestimmung über Konkurrenzexperimente.

In einem Sättigungsexperiment wird die spezifische Bindung eines Radioliganden zu seinem Rezeptor im chemischen Gleichgewicht mit einer konstant gehaltenen Konzentration des Rezeptors (R) (enthalten in Gewebehomogenaten, Membransuspensionen oder Gewebeschnitten) bei konstanter Temperatur durch Inkubation mit zunehmender Radioligand-Konzentrationen (L) bestimmt. Wenn das Bindungsgleichgewicht erreicht ist, werden verbleibende freie Liganden z.B. über Zentrifugation oder Filtration vom Liganden-Rezeptor Komplex (RL) abgetrennt und letztere quantifiziert¹⁰¹.



k_{Bindung} = Geschwindigkeitskonstante Bindung

$k_{\text{Dissoziation}}$ = Geschwindigkeitskonstante Dissoziation

Gleichung 2.

Eckige Klammern stehen für molare Konzentrationen. Die Geschwindigkeit mit der, der freie Ligand reversibel an freiem Rezeptor bindet, kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$\text{Bindungsgeschwindigkeit} = k_{\text{Bindung}} [\text{L}] [\text{R}]$$

Gleichung 3.

Die Geschwindigkeit mit der, der Liganden-Rezeptor-Komplex dissoziiert als:

$$\text{Dissoziationsgeschwindigkeit} = k_{\text{Dissoziation}} [\text{RL}]$$

Gleichung 4.

Im Gleichgewicht sind diese beiden Geschwindigkeiten gleich, somit beschreibt der Quotient aus den Geschwindigkeitskonstanten k_{Bindung} zu $k_{\text{Dissoziation}}$ die Dissoziationskonstante K_D . Diese ist invers proportional zur Assoziationskonstante.

$$K_D = \frac{k_{\text{Bindung}}}{k_{\text{Dissoziation}}} = \frac{[\text{L}] \times [\text{R}]}{[\text{RL}]}$$

Gleichung 5.

Der K_D ist ein Maß für die Bindungsaffinität und für jedes Liganden-Rezeptorsystem charakteristisch. Die Affinität des Liganden steigt mit kleiner werdenden K_D -Werten¹⁰².

Die Bindung des Radioliganden zu seinem Target wird als spezifische Bindung bezeichnet, die Bindung zu anderen Verbindungen des verwendeten Gewebes oder dem Assay-Medium wird als unspezifische Bindung bezeichnet. Um für die unspezifische Bindung zu ermitteln, sind zusätzliche Messungen erforderlich. Dazu wird die unspezifische Bindung allgemein in Gegenwart hoher Konzentrationen (100–1000-facher Überschuss im Verhältnis zum erwarteten K_D -Wert) eines bereits charakterisierten nicht markierten Kompetitors bestimmt. Die spezifische Bindung wird über die Differenz der Totalbindung und der unspezifischen Bindung berechnet (dargestellt in Abbildung 25). Radioliganden mit einer geringen unspezifischen Bindung zeigen ein hohes Signal-Rauschverhältnis, welches ein erster Hinweis auf eine mögliche Eignung als PET-Ligand ist¹⁰³.

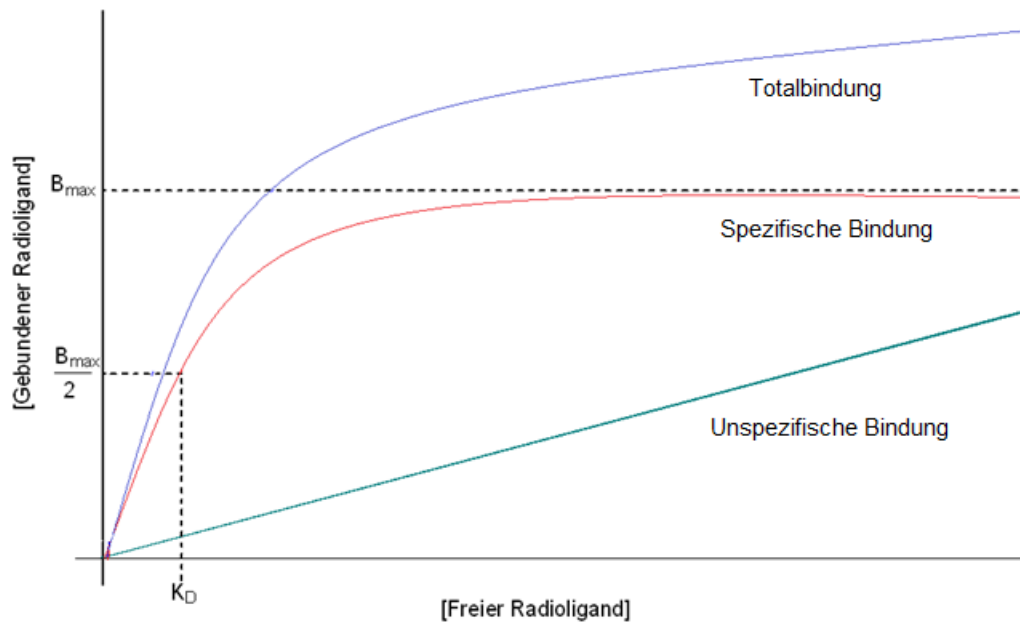


Abbildung 25. Schematische Darstellung eines Sättigungsexperiments. Rezeptor-enthaltendes Gewebe/Homogenat wird mit verschiedenen Konzentrationen des Radioliganden, entweder in Abwesenheit (Totalbindung) oder in Anwesenheit (unspezifische Bindung) eines Kompetitors inkubiert. Die Konzentration von gebundenem Radioligand wird gegen die Konzentration des freien Radioliganden aufgetragen. Die spezifische Bindung wird aus der Differenz der Totalbindung der nicht-spezifischen Bindung berechnet¹⁰⁴.

Die Sättigung der Rezeptorbindungsstellen (siehe Plateau der Sättigungskurve in Abbildung 21) bei hohen Radioligandenkonzentrationen (bei $L = 10 \times K_D$ liegen 99% der Rezeptoren als Rezeptor-Ligand-Komplex vor) bestimmt die Gesamtzahl der spezifischen Bindungsstellen $B_{\max}$ (in Gleichung 6 beschrieben). Im Gleichgewicht stellt K_D (siehe Gleichung 4) die Konzentration des Liganden dar, die 50% der Bindungsstellen besetzen ($[L] = K_D$).

$$[RL] = \frac{[L] \times B_{\max}}{[L] + K_D}$$

Gleichung 6.

$B_{\max}$ wird häufig auf das im Assay vorhandene Gesamtprotein angegeben, z.B. in pmol/mg Protein.

Kompetitions-Rezeptorbindungsassays basieren auf der Competition zwischen einem nicht-markierten konkurrierenden Liganden (häufig Inhibitoren) (I) und einem markierten Liganden (L) um

die Bindung zum Rezeptor¹⁰⁵. Die Einführung des konkurrierenden Liganden führt zur Bildung von zwei Ligand-Rezeptorkomplexen. Der Inhibitor wird dabei in Abhängigkeit zur Konzentration und zur Affinität des Inhibitors zum Rezeptor, einen gewissen Anteil des Radioliganden verdrängen.



Gleichung 7.

Dabei wird die Konzentration des Rezeptors und des Radioliganden (mit bekanntem K_D für die spezifische Bindungsstelle) konstant gehalten, während die Konzentration des Inhibitors variiert. Aus diesen Experimenten kann eine Inhibitionskurve erstellt werden, indem die ermittelte Konzentration von spezifisch gebundenem Radioligand gegen die Konzentration des Kompetitors aufgetragen wird. Daraus lässt sich der IC_{50} -Wert bestimmen. Dieser gibt die Inhibitorkonzentration an, bei dem 50% des gebundenen Radioliganden verdrängt werden. Der IC_{50} -Wert steht in Verbindung zur Inhibitionskonstante K_I des Inhibitors und wird oft mittels der Cheng-Prusoff-Näherung (8) berechnet^{106,107}:

$$IC_{50} = K_I \times \left(1 + \frac{[L]}{K_D} \right)$$

Gleichung 8.

Die Cheng-Prusoff-Gleichung ist umso zutreffender unter der Voraussetzung, dass die Rezeptorkonzentration viel kleiner ist als K_D und K_I ($B_{max} \ll K_D, K_I$)¹⁰⁷.

Liganden werden nach den Effekten, die sie an ihren entsprechenden Rezeptoren bewirken, klassifiziert. So werden Liganden, die durch ihre Bindung eine Aktivierung des Rezeptors verursachen, als Agonisten bezeichnet. Ein voller Agonist kann einen Rezeptor maximal aktivieren, während Partialagonisten nur eine Teilaktivierung bewirken und inverse Agonisten die Aktivität des Rezeptors sogar verringern. Liganden, die an einen Rezeptor binden und so dessen Aktivierung durch einen Agonisten verhindern, werden Antagonisten genannt. Antagonisten können nach ihrer Wirkungsweise weiter unterteilt werden in i) kompetitive Antagonisten, welche die Substratbindungsstelle besetzen und durch höhere Konzentrationen eines Agonisten entsprechend dem Massenwirkungsgesetz wieder vom Rezeptor verdrängt werden können und ii) allosterische Antagonisten, welche eine separate Bindungsstelle besetzen und die Affinität des Rezeptors für seinen Liganden indirekt (z.B. durch Konformationsänderungen) reduzieren. Außerdem können Antagonisten gemäß der Reversibilität ihrer Bindung zum Rezeptor in reversible und irreversible Antagonisten unterteilt werden¹⁰⁸.

1.3.1.2 Bluthirnschranke und Lipophilie

Ein neu entwickelter Neuroradioligand muss neben seiner hohen Selektivität und Affinität zum Targetprotein auch im Stande sein, dieses Target *in vivo* zu erreichen. Dieser Schritt stellt häufig eine große Herausforderung dar. Die Bluthirnschranke ist eine selektiv durchlässige Barriere, die den Austausch von Substanzen zwischen dem Zentralnervensystem und dem Blutkreislauf kontrolliert¹⁰⁹. Sie ist mit einer Vielzahl spezifischer Transporter und spezieller Kanäle in der Zellmembran ausgestattet, welche die Aufnahme von Hormonen und Nährstoffen ins Gehirn (Influx) kontrollieren und die Ausscheidung von Fremdkörpern und Metaboliten aus dem Gehirn (Efflux) vermitteln¹¹⁰. Zu den wichtigsten aktiven Efflux-Transportern zählen P-Glykoproteine (P-gp) und Multidrug-Resistance Proteine (MRP1), die zur Klasse der ABC Transporter gehören¹¹¹. Aktive Efflux-Transporter werden auch in der Arzneimittelforschung intensiv untersucht, da sie den passiven Eintritt eines potentiellen Medikaments ins Gehirn oder die Ausscheidung über Efflux-Pumpen beeinflussen¹¹². Dasselbe Hindernis muss auch in der Entwicklung von Radioliganden, die mit Strukturen im Gehirn wechselwirken sollen, berücksichtigt werden. Wenn der Radiotracer nicht aktiv über einen Carrier ins Gehirn transportiert wird, kann er durch passiven Transport (auch als freie Diffusion bekannt) ins Gehirn gelangen. Besonders kleine, nicht-geladene Moleküle mit geringem Molekulargewicht (< 500 Da), kleiner Querschnittsfläche (< 80 Å²) und wenigen Wasserstoffbrücken-Bindungen werden für den passiven Transport begünstigt¹¹³. Zugleich ist die Lipophilie der Substanz eine wichtige Größe für die Überwindung der Bluthirnschranke. Das häufigste verwendete Maß für das Verhältnis zwischen Lipophilie und Hydrophilie nicht-ionisierter Moleküle ist der Logarithmus des *n*-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (Log*P*). Der Verteilungskoeffizient bei physiologischem pH (pH = 7.4) wird als Log*D*_{7.4} (Logarithmus des Verteilungskoeffizienten *n*-Octanol/Puffer) bezeichnet. Radiotracer mit einer optimalen freien Diffusion über die Bluthirnschranke weisen Log*D*_{7.4}-Werte im Bereich zwischen 2.0–3.5 auf¹¹⁴. Viele potentielle Radioliganden sind jedoch Substrate für Efflux-Transporter und werden daher am Passieren der Bluthirnschranke gehindert. Insbesondere P-gp ist sehr stark an der Aufrechterhaltung der BHS beteiligt und verhindert den Übertritt von Substraten mit hoher Lipophilie, positiver Ladung (bei pH 7.4) und vielen aromatischen Gruppen¹¹⁵. Eine Möglichkeit dem entgegenzuwirken ist die Verabreichung von P-gp-Inhibitoren. So konnte in einigen Fällen gezeigt werden, dass durch Inhibition des P-gp – insbesondere bei Nagetieren – die Hirngängigkeit mancher Radioliganden erhöht wird¹¹⁶.

1.4 PET-Bildgebung neurologischer Target Modelle

Die Neurobildgebung mittels PET liefert viele Erkenntnisse zum Verständnis von Gehirnfunktionen unter normalen Bedingungen und bei neurologischen Störungen. Die Auswahl spezifischer Radioliganden ermöglicht dabei genaue Einsichten in den zu untersuchenden Bereich des Gehirns. Angewendete Radiotracer sollten eine hohe molare Aktivität (Verhältnis radioaktiver zu nicht-radioaktiver Substanz) aufweisen und somit die applizierten Stoffmengen des Radiotracers gering sein, um keinen, oder äußerst geringen Effekt auf das biologische System auszuüben.¹¹⁷ Da die Informationsübertragung zwischen den Zellen des Zentralnervensystems überwiegend chemisch durch die präsynaptische Freilassung von Neurotransmittern, über die Diffusion durch die Synapsen und die Aktivierung von Rezeptoren an den postsynaptischen Zellen stattfindet, eignen sich genau solche Systeme wie Neurorezeptoren, Neurotransmitter-Transporter oder Enzyme als Zielmodelle für die Bildgebung mit geeigneten Radioliganden^{118,119}.

1.4.1 Der Glycintransporter 1

Der transmembranöse Transport von Neurotransmittern spielt eine fundamentale Rolle in der Signalübertragung zwischen Neuronen. Der Transportprozess wird dabei durch verschiedene Klassen von Transportproteinen vermittelt, welche die Konzentration der Neurotransmitter im synaptischen Spalt regulieren. Neben intrazellulären, vesikulären Transportern, die die Transmitter vom Zytoplasma in synaptischen Vesikel sequestrieren, existieren spezielle Plasmamembran Transporter, welche die Rückaufnahme freigesetzter Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt in präsynaptische Neurone vermitteln. Die intrazellulären Transporter lassen sich in drei Subklassen unterteilen, die vesikulären Amintransporter, die vesikulären inhibitorischen Aminosäuretransporter und die vesikulären Glutamattransporter. Die Plasmamembrantransporter können in die zwei Hauptunterklassen, die hoch-affinen Glutamat-Transporter und die Na⁺-Cl⁻-gekoppelten Transporter der solute carrier 6 (SLC6)-Familie, welche die größte Unterklasse dieser Transporter darstellt, unterteilen. Zu ihnen zählen die Dopamin-, 5-HT-, Norepinephrin-, γ -Aminobuttersäure (GABA) - und Glycintransporter¹²⁰.

Die hoch-affinen Glycintransporter (GlyT) in Neuronen und Gliazellen sorgen in erster Linie für die Terminierung glycinерger Signale durch Wiederaufnahme von synaptischem Glycin. Sie werden in zwei Typen, Glycintransporter Typ 1 (GlyT-1a–e) und Glycintransporter Typ 2 (GlyT-2a–c) unterteilt, wobei GlyT1 in hohen Konzentrationen im Rückenmark, Hirnstamm und Kleinhirn und in moderaten Konzentrationen in Regionen des Vorderhirns, wie dem Kortex und Hippocampus zu finden ist. Die Expression von GlyT2 hingegen ist auf Rückenmark, Hirnstamm und Kleinhirn begrenzt¹²¹. Die

Aminosäure Glycin ist ein wichtiger Neurotransmitter der sowohl hemmende, als auch erregende Funktionen haben kann. Nach der Ausschüttung durch inhibitorische präsynaptische Nervenenden in Rückenmark, Hirnstamm und Kleinhirn bindet Glycin an Strychnin-sensitive Glycin-Rezeptoren (GlyR), welche dichtgepackt in der Membran postsynaptischer Neuronen lokalisiert sind. Dadurch wird der GlyR-Anionenkanal geöffnet und Chlorid-Ionen strömen ins postsynaptische Zytoplasma. Die resultierende Hyperpolarisation hebt das Schwellenpotential für die neuronale Erregung und hemmt durch das postsynaptische Neuron.

Zusätzlich zu seiner Funktion als inhibitorischer Neurotransmitter ist Glycin in die erregende, *N*-Methyl-D-Aspartat Rezeptor (NMDAR)-vermittelte glutamaterge Neurotransmission im Vorderhirn involviert. Hierbei fungiert es als einer der sogenannten Co-Agonisten, welche neben Glutamat zur Aktivierung von NMDARs benötigt werden¹²². Die anschließende Wiederaufnahme von Glycin wird im Vorderhirn durch den stark mit NMDA-Rezeptoren Co-lokalisierten Glycintransporter GlyT1 vermittelt.¹²³

1.4.1.1 Der NMDA-Rezeptor

Der NMDA-Rezeptor ist ein Liganden- und spannungsgesteuerter ionotroper Glutamaterezeptor (iGluR), der an der erregenden Neurotransmission beteiligt ist¹²⁴. Er spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen, wie beispielsweise dem Lernen, der Gedächtnisfunktion, der Langzeit-Potenzierung (englisch: long-term potentiation, LTP), der Langzeit-Depression (englisch: long-term depression, LTD) und der synaptischen Plastizität¹²⁵. Der Rezeptor weist eine heterotetramere Anordnung bestehend aus zwei GluN1 und zwei GluN2 Untereinheiten auf, die zusammen einen Kationen-Kanal formen. Jede Untereinheit enthält eine extrazelluläre Amino-terminale Domäne (ATP), eine Liganden-bindende Domäne (LTD), eine transmembranöse Domäne (TMD) und eine intrazelluläre Carboxy-terminale Domäne (CTD)¹²⁶. Neben der Bindung von präsynaptisch freigesetztem Glutamat an die GluN2 Untereinheit erfordert die Aktivierung von NMDARs die Bindung eines obligatorischen Co-Agonisten (Glycin oder D-Serin) an die sogenannte Glycin_B-Bindungsstelle der GluN1 Untereinheit. Da NMDARs bei Ruhemembranpotentialen eine spannungsabhängige Blockade des Ionenkanals durch Mg^{2+} Ionen aufweisen, ist zudem eine postsynaptische Membrandepolarisation erforderlich, um den Mg^{2+} -induzierten Block der Kanal-Pore aufzuheben. Entsprechend kommt es nur bei gleichzeitiger Aktivierung von prä- und post-synaptischen Neuronen zu einem NMDAR-vermittelten Calcium-Einstrom in post-synaptische Neurone, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird (siehe Abbildung 26). Diese Art der Koinzidenzdetektion durch NMDARs spielt eine wichtige Rolle für neuronale Plastizitätsprozesse wie LTP und LTD. Eine NMDAR Hypofunktion scheint dagegen bei verschiedenen

psychiatrischen Erkrankungen, wie beispielsweise der Schizophrenie^{127,128,129,130}, vorzuliegen. Pharmakologische Ansätze zur Verstärkung der NMDAR Funktion könnten in diesen Fällen einen attraktiven Therapieansatz darstellen. Die Verwendung von Glutamaterezeptor Agonisten wird jedoch durch deren über nicht-NMDA Glutamaterezeptor-vermittelten Nebenwirkungen wie Übererregung und Exzitotoxizität eingeschränkt.

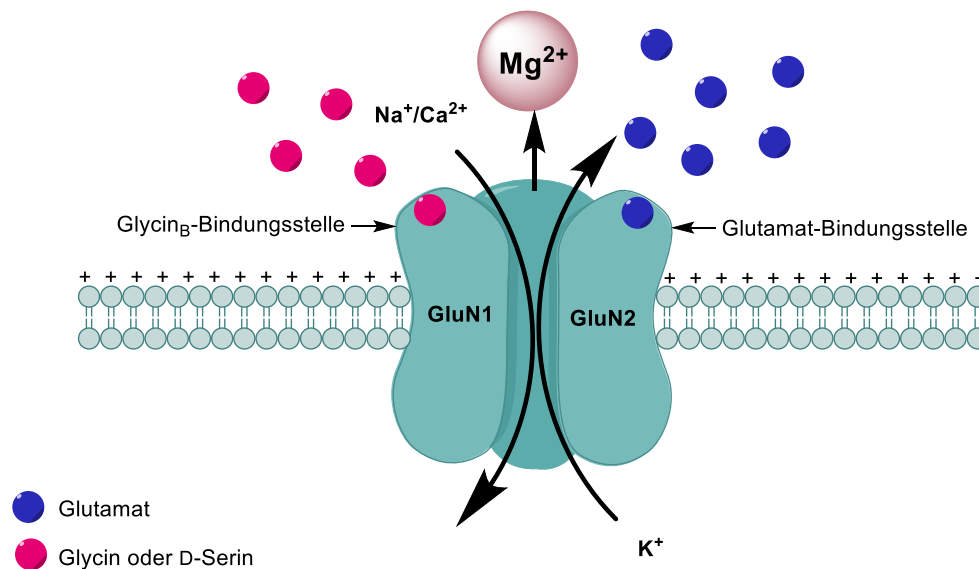


Abbildung 26. Schematische Darstellung der Funktionsweise des NMDA-Rezeptors¹³¹

1.4.1.2 Glycintransporter-1 Inhibitoren

Einen alternativen Ansatz zur selektiven Steigerung der NMDAR Aktivität stellt die Beeinflussung der Glycin-Konzentration im synaptischen Spalt durch Verwendung von Glycintransporter-1 Inhibitoren dar. Durch die „Hemmung“ des Transporters soll verhindert werden, dass ausgeschüttetes Glycin aus dem synaptischen Spalt entfernt wird, wodurch die lokale Glycin-Konzentration steigt^{132,133}. Erste Studien wurden mit Sarkosin (*N*-Methylglycin), einem schwachen aber selektiven GlyT1 Inhibitor, durchgeführt.¹³⁴ Die Weiterentwicklung von potenten und selektiven GlyT1 Inhibitoren basierte zunächst auf der Sarkosin-Struktur. Ein wichtiges Beispiel dieser Klasse ist der potente und selektive Inhibitor *N*-[3-(4'-Fluorphenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]sarkosin (NFPS), mit einer Affinität von $K_i = 5$ nM für GlyT1 (Rattenhirn) und keinem Effekt auf die Aktivität von GlyT2^{135,136}. Ebenso wurde kein messbarer Einfluss von NFPS auf die Aminosäuretransporter von Prolin, Glutamat oder γ -Aminobuttersäure (GABA) beobachtet¹³⁷. Ein weiterer selektiver Sarkosin-basierter GlyT1 Inhibitor ist LY2365109, jedoch wurden für beide Inhibitoren Nebeneffekte, wie eine beeinträchtigte Atmung und krampfhaftes Verhalten an Nagetieren festgestellt, welche vermutlich auf verstärkte Aktivierung von

Strychnin-sensitiven Glycin-Rezeptoren in kaudalen Hirnregionen zurückzuführen sind^{138,139}. Die zweite Generation von nicht-Sarkosin-basierten GlyT1 Inhibitoren besteht aus einem breiten Spektrum verschiedenster Strukturen, von denen sich einige schon in der klinischen Erprobungsphase befinden¹³¹. Die Erforschung von GlyT1 Inhibitoren hat auch die Aufmerksamkeit der pharmazeutischen Industrie geweckt. Dennoch sind weiterhin signifikante Fortschritte zum Verständnis der Abläufe im Gehirn und ihre Auswirkungen auf neuropsychiatrische Krankheitsbilder erforderlich. Das therapeutische Potential von Verbindungen die GlyT1 adressieren, ist außerdem interessant für die PET-Bildgebung, da bislang nur wenige Studien mit GlyT1 Inhibitoren durchgeführt wurden^{140,141}.

1.4.2 Das synaptische Vesikelprotein 2 (SV2)

Neurotransmitter werden in kleinen Vesikeln in der Synapse konzentriert und gelagert (Abbildung 27, (1)). Die neuronale Kommunikation wird durch die Ausschüttung von Neurotransmittern von diesen Vesikeln durch Vesikelfusion mit der Plasmamembran vermittelt. Dieser Prozess kann in vier Stufen eingeteilt werden. Zuerst werden Neurotransmitter in die synaptischen Vesikel transportiert (Abbildung 27, Schritt 2), anschließend docken diese Vesikel an die aktive Zone (docking), und bereiten die Plasmamembran vor („priming“) (Abbildung 27, Schritt 3). Abschließend wird die Neurotransmitterausschüttung durch Ca^{2+} -abhängige Exozytose der vorbereiteten Vesikel ausgelöst (Abbildung 27, Schritt 4)¹⁴². Nach der Vesikel Exozytose folgt die Endozytose und das Recycling (Abbildung 27, Schritt 5)¹⁴³. Durch die molekulare Charakterisierung von synaptischen Vesikel Komponenten wurden Proteine identifiziert, die an wichtigen Aspekten der Funktionsweise von Vesikeln, wie der Wechselwirkung mit Cytoskelettelementen und dem Docken an die aktiven Bereiche entlang der Plasmamembran, mitwirken¹⁴⁴. Eines der ersten identifizierten Proteine sind die synaptischen Vesikel Proteine 2 (SV2). Dabei handelt es sich um eine Familie von 12-Transmembranen Glykoproteinen in den synaptischen Vesikeln neuronaler und endokriner Zellen. Unter den drei bekannten Isoformen (SV2A, SV2B, SV2C) ist das synaptische Vesikel Glykoprotein 2A (SV2A) mit Abstand am stärksten in allen Gehirnregionen exprimiert^{145,146}. SV2A ist in erregenden und inhibitorischen Synapsen enthalten und in Regionen wie dem Hippocampus, Kleinhirn und Kortex, sowie besonders reichlich auch in subkortikalen Bereichen, wie dem Thalamus und den Basalganglien vorhanden¹⁴⁶. SV2B ist ebenfalls hirnspezifisch und teilweise in variierenden Konzentrationen mit SV2A coexprimiert, SV2C ist die am geringsten exprimierte Isoform im Gehirn. Ihre Verteilung begrenzt sich auf die Basalganglien und den Hirnstamm^{147,148}. In einer Studie an SV2A-defizienten Mäusen wurde

gezeigt, dass SV2A eine kritische Rolle für die ordnungsgemäße Funktion des Nervensystems hat. Die Tiere erlitten an Tag 7 nach der Geburt Anfälle und verstarben ca. 15 Tage nach der Geburt¹⁴⁹. SV2A Proteine sind auch das molekulare Target von therapeutischen Wirkstoffen für die Behandlung von Epilepsie. Das Antiepileptikum Levetiracetam (LEV) bindet zum Beispiel an die spezifische Bindungsstelle des SV2A^{150,151,152}. Eine Reduzierung der SV2A Dichte in der Zone des Anfallsausbruchs wurde in Patienten mit Temporallappenepilepsie beobachtet¹⁵³.

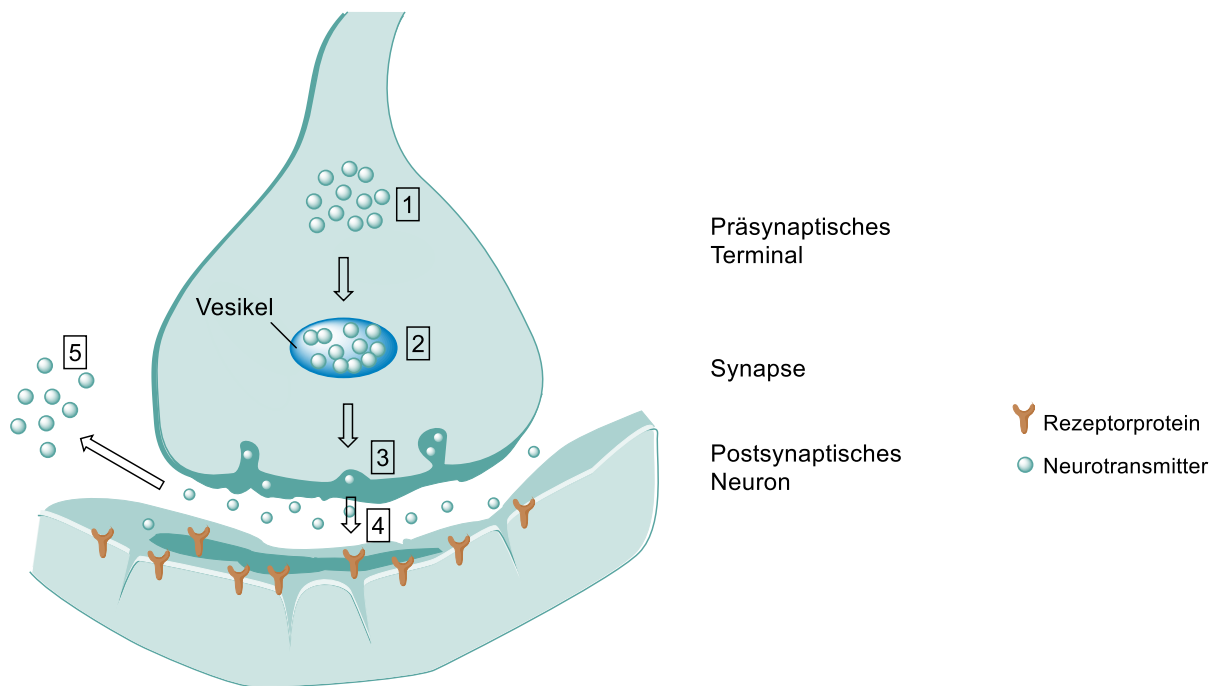


Abbildung 27. Schematische Darstellung der chemischen, synaptischen Transmission

1.4.2.1 SV2A spezifische PET-Bildgebung

Strukturelle Störungen und Veränderungen von Synapsen gehen mit vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Krankheit (englisch: Alzheimer's disease; AD)^{154,155}, Epilepsie^{156,157}, der Parkinson'schen Krankheit (englisch: Parkinson's disease; PD)¹⁵⁸ und der Autismus Spektrum Störung¹⁵⁹ sowie psychiatrischen Krankheiten wie Depression¹⁶⁰ und Schizophrenie^{161,162} einher. Traditionell basierten alle Ansätze zur Quantifizierung humaner Synapsen auf der Untersuchung von Gehirngewebe nach einer Autopsie oder einer chirurgischen Entfernung des Gewebes. Die Quantifizierung der Synapsendichte im Hirngewebe wurde typischerweise immunhistochemisch oder elektronenmikroskopisch durchgeführt. Dabei werden in der immunhistochemischen Detektion von synaptischen Elementen Antikörper verwendet, welche Schlüsselproteine in prä- und

postsynaptischen Neuronen, wie beispielsweise Synaptophysin (SYN) in synaptischen Vesikelmembranen, adressieren¹⁶³. Diese invasiven Methoden schließen eine frühzeitige Diagnose oder das Monitoring von Krankheitsverläufen aus¹⁶⁴.

Die *in vivo* Quantifizierung der Synapsendichte im gesamten Gehirn mittels PET ist ein wichtiges Tool in der Forschung, der klinischen Diagnose und der Therapiekontrolle von neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen. PET-Radioliganden die SV2A als Target anvisieren, haben folglich ein großes Potential als Biomarker in der klinischen Anwendung.

Die Entwicklung von SV2A-spezifischen Radioliganden erfolgte zunächst ausgehend von der molekularen Struktur des Antiepileptikums Levetiracetam, welches literaturbekannt spezifisch an SV2A bindet. Jedoch erwies sich [¹¹C]Levetiracetam mit einer relativ geringen Bindungsaffinität von $K_i = 1.74 \mu\text{M}$ selbst als ungeeignet, da keine kontrastreichen PET Bilder erhalten werden konnten¹⁶⁵. Durch Derivatisierungen dieser Ausgangsverbindung wurden SV2A-spezifische Liganden mit verbesserten Bindungsaffinitäten im nanomolaren Bereich und guten pharmakokinetischen und bildgebenden Eigenschaften erzeugt. In Abbildung 28 sind die wichtigsten Kandidaten von ¹¹C- und ¹⁸F-markierten SV2A PET Tracern aufgeführt¹⁶⁶.

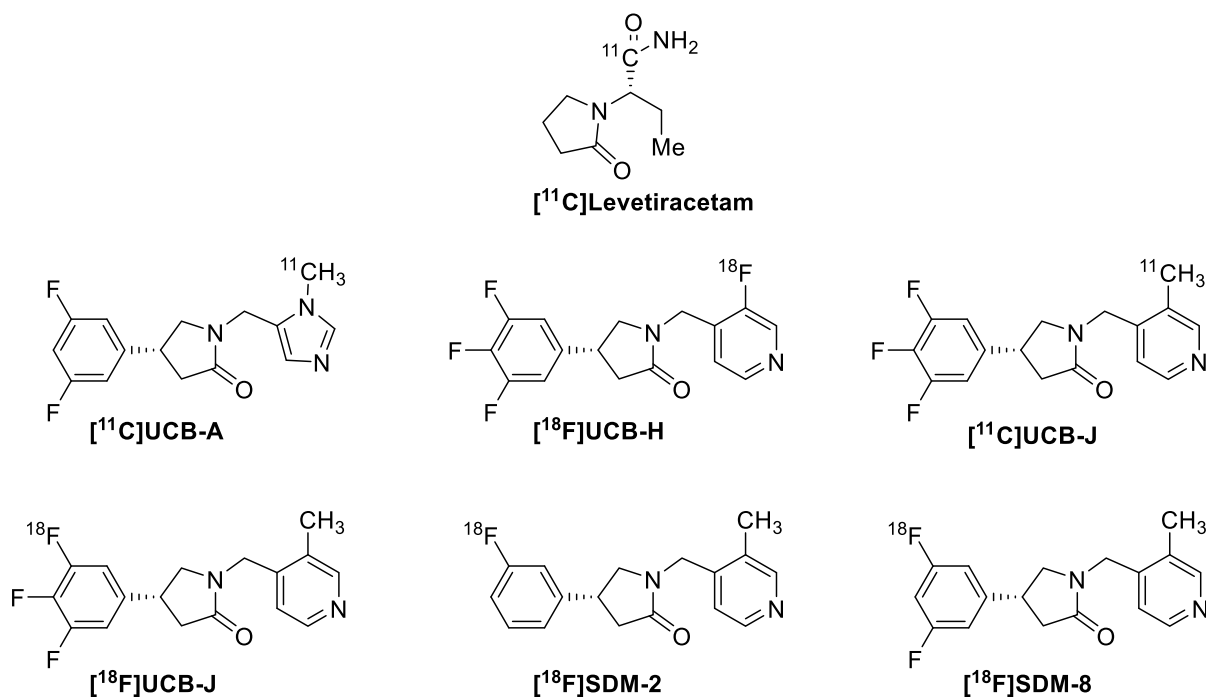


Abbildung 28. Strukturen von SV2A PET-Liganden^{167,168,169,170,171,172}

1.4.3 Der Adenosin A₁ Rezeptor

In den molekularen Neurowissenschaften sind postsynaptische transmembranöse Neurotransmitter-Rezeptoren (Neurorezeptoren) eine wichtige Klasse und werden intensiv erforscht. Die Neurorezeptoren werden in zwei Klassen unterteilt, zum einen die Liganden-gesteuerten ionotropen Rezeptoren, die einen Ionenkanal in ihrer Struktur enthalten, welcher durch die Bindung eines Liganden geöffnet wird, und den G-Protein-gekoppelten metabotropen Rezeptoren (GPCR) andererseits. Diese aktivieren nach der Bindung von Agonisten eine intrazelluläre Signalkaskade¹⁷³. Mitglieder der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind auch die Adenosin Rezeptoren (AR), welche die physiologischen Wirkungen des endogenen Purinnukleosids Adenosin vermitteln. Es sind vier Untergruppen der AR bekannt (A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃) wobei A₁AR und A_{2A}AR die am zahlreichsten vorhandenen Subtypen darstellen¹⁷⁴. Der Rezeptor mit der höchsten Dichte über das gesamte Gehirn verteilt ist der A₁AR, von dem in Nagetieren hohe Konzentrationen im zerebralen Kortex, Kleinhirn, Hippocampus, Striatum und Thalamus vorhanden sind^{175,176}. Im Menschen sind hohe A₁AR-Dichten im Hippocampus, Striatum, Thalamus und dem zerebralen Kortex zu finden, jedoch ist die Rezeptordichte im Kleinhirn gering^{177,178}. Ebenso ist der A₁AR stark in peripheren Organen, wie dem Auge, den Nebennieren, dem Herzen und der Aorta exprimiert¹⁷⁹. Er ist an der Aktivierung von K⁺-Kanälen¹⁸⁰ und der Inhibition von Ca²⁺-Kanälen¹⁸¹ beteiligt und kann somit die neuronale Aktivität reduzieren. Der A_{2A}AR hingegen ist in einigen Regionen des Gehirns, wie dem Striatum und dem Bulbus Olfactorius (bei Nagern), besonders stark konzentriert und primär mit der Aktivierung der Adenylylcyclase verbunden, einem molekülsplattendes Enzym, welches intrazellulär den sekundären Botenstoff cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) bildet. Adenosin hat zwei bedeutende Funktionen im Zentralnervensystem, es wirkt als Neuromodulator und als homöostatischer Modulator¹⁸². Neuromodulatoren, auch als Co-Transmitter bezeichnet, binden an der postsynaptischen Membran an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wodurch Signalkaskaden ausgelöst werden. Sie beeinflussen auch die Wirkung von Neurotransmittern auf die Neuronen. Neurotransmitter hingegen fungieren als Überträger von Nervenimpulsen, indem sie auf ein Signal hin in den synaptischen Spalt freigesetzt werden. Der Neuromodulator ist in die Regulierung vieler physiologischer Prozesse, wie Schlafen und Erwachen^{183,184} involviert. Eine veränderte Rezeptordichte der A₁-Adenosinrezeptoren ist korreliert mit vielen pathologischen Veränderungen des Gehirns. Zu diesen zählen die Alzheimer Krankheit¹⁸⁵, die Parkinson'sche Krankheit¹⁸⁶, Schizophrenie¹⁸⁷ und Epilepsy¹⁸⁸, folglich weist die Untersuchung der AR ein interessantes Ziel mit therapeutischem Potential auf.

Bisher wurde eine Vielzahl von Subtyp-selektiven Liganden für die *in vitro* und *in vivo* Analyse der AR beschrieben. Ausgehend von Koffein, einem Xanthin-Derivat und natürlich vorkommenden

Antagonisten für den A₁AR, wurden viele AR Antagonisten entwickelt, welche durch strukturelle Modifikationen im Gegensatz zu Koffein hohe Selektivitäten und Affinitäten zu A₁AR und A_{2A}AR besitzen. Zwei wichtige Beispiele dieser Klasse von A₁AR Antagonisten sind 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (DPCPX)¹⁸⁹ und sein ¹⁸F-markiertes Analogon 8-Cyclopentyl-3-(3-[¹⁸F]fluorpropyl)-1-propylxanthin ([¹⁸F]CPFPX)¹⁹⁰. Zusätzlich zu den Xanthin-Derivaten wurden viele nicht-Xanthin-basierte AR Antagonisten entwickelt, wie zum Beispiel das Triazol-Gerüst von Preladenant¹⁹¹.

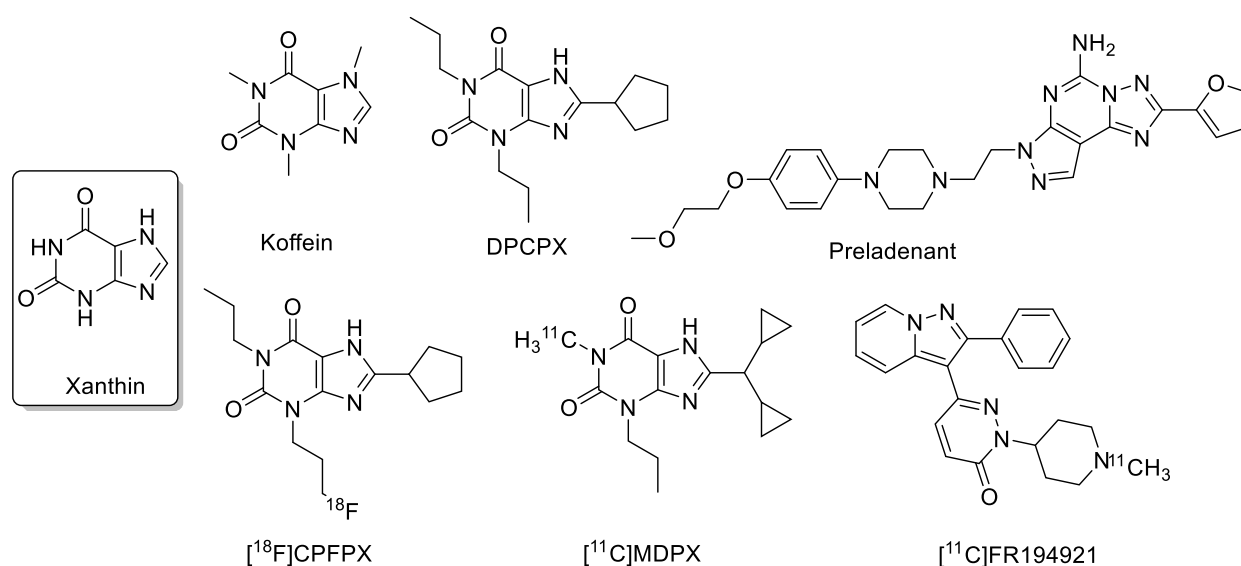


Abbildung 29. Antagonisten und Radioliganden des Adenosin A₁ Rezeptor

Die Entwicklung von Agonisten für den AR basierte zunächst auf der Struktur des endogenen Adenosins. Durch strukturelle Modifikationen an der Ribose-Einheit und dem Purin-Heterozyklus wurden zahlreiche Agonisten mit hohen Selektivitäten und Affinitäten zu A₁AR und A_{2A}AR synthetisiert, bekannte Beispiele sind *N*⁶-Cyclopentyladenosin (CPA)¹⁹² und 5'-(*N*-Ethylcarboxamido)adenosin (NECA)¹⁹³. Eine Ausnahme von AR Agonisten bildet die Klasse der 2-Aminopyridin-3,5-dicarbonitril-Derivate, welche auch hohe Subtyp-Selektivitäten aufweisen^{194,195}.

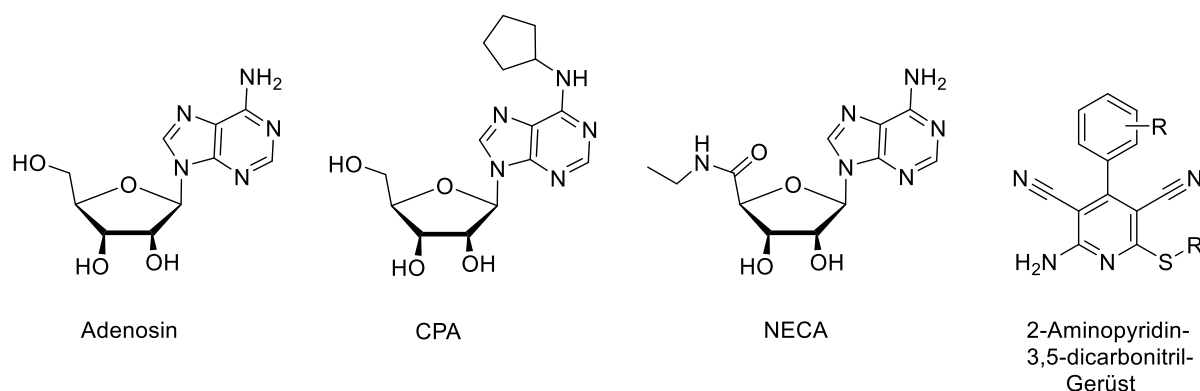


Abbildung 30. Agonisten für den Adenosin A₁ Rezeptor

Eine ausführliche Zusammenfassung über die therapeutische Anwendung von AR Agonisten und Antagonisten kann in folgenden Reviews^{196,197} gefunden werden.

Relevante Radiotracer für die Bildgebung des A₁AR mittels PET sind überwiegend Antagonisten (siehe Abbildung 29), die prominentesten Beispiele sind die Xanthin-Derivate [¹⁸F]CPFPX¹⁹⁰ und [¹¹C]MDPX (und ihre Methyl- bzw. Ethyl-Derivate)^{198,199}, und der nicht-Xanthin basierte Radiotracer [¹¹C]FR194921²⁰⁰. Vor kurzem wurde erstmals ein A₁AR Agonist radiomarkiert, [¹¹C]MMPD²⁰¹, wodurch neben der Detektierbarkeit pathologischer Veränderungen der A₁AR Dichte, auch grundsätzliche Informationen über den endogenen Adenosinspiegel gewonnen werden könnten^{202,203}.

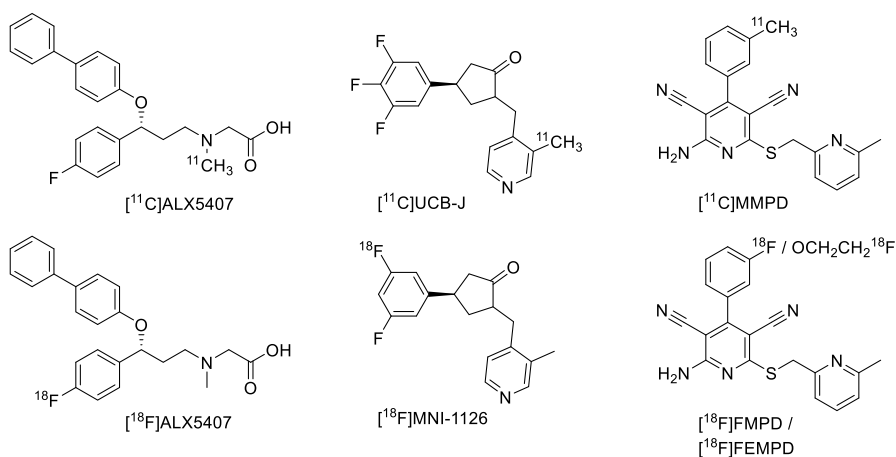
Die vielen unterschiedlichen Anwendungen von PET Radioliganden für die Visualisierung von Adenosinrezeptoren in verschiedenen Krankheitsbildern lassen sich in folgender Literaturstelle finden²⁰⁴.

2. Zielsetzung

Die Entwicklung von Radiotracer für die PET ist ein hochkomplexer Prozess, der von der Identifikation geeigneter Leitstrukturen für ein molekulares Target über die Auswahl eines geeigneten PET-Radionuklids sowie die Synthese von Referenz- und Vorläuferverbindungen, bis hin zur präklinischen und klinischen Evaluation des Tracers reicht. ^{18}F ist aufgrund seiner günstigen Zerfallseigenschaften heute das meistgenutzte Radionuklid in der klinischen Diagnostik. Zudem können ^{18}F -Radiopharmaka aufgrund der längeren Halbwertszeit von ^{18}F im Vergleich zu ^{11}C (109 vs. 20 min) über ein Satellitensystem auch an Kliniken und Praxen ohne eigene Produktionsmöglichkeit ausgeliefert werden, was ihre routinemäßige klinische Anwendung deutlich vereinfacht. Neben den Zerfallseigenschaften haben aber in den letzten Jahren Fortschritte in der ^{18}F -Markierungsschemie dazu beigetragen, dass ^{18}F in der Forschung und der klinischen Diagnostik weit verbreitet ist. So hat die Einführung von Übergangsmetall-vermittelten Radiofluorierungsmethoden die Herstellung von Radioliganden ermöglicht, die vor Jahren noch schwer oder gar nicht zugänglich waren. Vor allem Cu-vermittelte Radiofluorierungsmethoden, die in den letzten Jahren in Bezug auf ihre praktische Anwendung stetig verbessert werden konnten, werden in der aktuellen ^{18}F -Chemie vielfältig eingesetzt.

Daher war das Ziel dieser Arbeit, für bereits in der Literatur beschriebene, ^{11}C -markierte Leitstrukturen mit Hilfe der Cu-vermittelten Radiofluorierung entsprechende ^{18}F -Analoge herzustellen, und diese präklinisch auf ihre Eignung als PET-Tracer zu evaluieren.

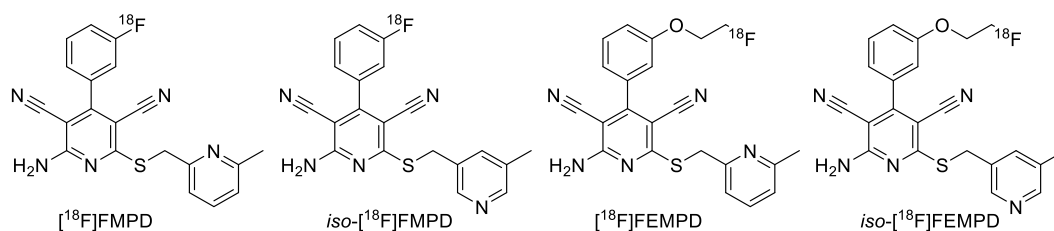
Als Leitstrukturen wurden für die ersten beiden Tracer Verbindungen gewählt, die bereits einen Fluor-Substituenten im Aromaten tragen. Nach der Synthese geeigneter Markierungsvorläufer sollte ^{18}F über die Kupfer-vermittelte Alkohol-verstärkte Radiofluorierung an den entsprechenden Positionen in die Moleküle eingeführt werden, um ^{18}F -Radiopharmaka mit identischen chemischen und biologischen Eigenschaften zu erhalten.



Bei der ersten Leitstruktur handelte es sich um den GlyT1 Inhibitor ALX5407, der im Tierversuch antipsychotische Effekte zeigte²⁰⁵ und in einer früheren Arbeit bereits mit ^{11}C markiert wurde²⁰⁶. Der durch Alkohol-verstärkte Kupfer-vermittelte Radiofluorierung erhaltene Radioligand ^{18}F ALX5407 sollte anschließend zunächst mittels *in vitro* Autoradiographien an Rattenhirnschnitten und anschließend mittels PET-Bildgebung im Nagermodell hinsichtlich seiner Eignung als Neurotracer charakterisiert werden.

Im zweiten Fall sollte für den SV2A-selektiven Tracer ^{11}C UCB-J ein F-Atom im Aromaten gegen ein ^{18}F -Atom ausgetauscht werden, um eine entsprechende ^{18}F -markierte Verbindung mit den oben genannten Vorteilen zu erhalten. Im Zuge des Vorhabens wurde jedoch durch Constantinescu et al. mit ^{18}F MNI-1126 bereits ein ^{18}F -Analogon mit guten pharmakokinetischen Eigenschaften für die SV2A-Bildgebung beschrieben²⁰⁷. Bei diesem Tracer handelt es sich allerdings um eine enantiomerenreine Verbindung, die durch zeitintensive HPLC-Trennung gewonnen werden muss. Entsprechend sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine vereinfachte Synthese des chiralen Markierungsvorläufers im Großmaßstab entwickelt werden, die es ermöglicht auf die Enantiomertrennung mittels HPLC zu verzichten. Anschließend sollte der chirale Vorläufer über die Alkohol-unterstützte Kupfer-vermittelte Radiofluorierung markiert und das Produkt auf seinen Enantiomerenüberschuss hin analysiert werden. Da SV2A-selektive Tracer zur Erfassung der synaptischen Dichte von hohem klinischem Interesse sind, sollte die Radiosynthese zudem auf ein automatisiertes Synthesemodul übertragen werden, um die Eigenschaften des Radioliganden mittels PET-Bildgebung im Nagermodell zu evaluieren.

Im dritten Teil der Arbeit sollte schließlich, basierend auf dem kürzlich beschriebenen A_1AR -selektiven Tracer ^{11}C MMPD²⁰¹, erstmals auch ein ^{18}F -markierter Partialagonist für die A_1AR Bildgebung entwickelt werden.



Dazu sollten zunächst verschiedene fluorhaltige Referenzverbindungen synthetisiert und mittels Bindungsassays auf ihre Affinität zu A_1AR untersucht werden. Anschließend sollten geeignete Markierungsvorläufer entwickelt und entweder über die Alkohol-verstärkte Kupfer-vermittelte Radiofluorierung oder auf konventionellem Wege mit ^{18}F markiert werden. Basierend auf einer ersten biologischen Evaluierung mittels *in vitro* Autoradiographien an Rattenhirnschnitten sollte schließlich der geeignetste Kandidat ausgewählt und schließlich im Nagermodell evaluiert werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Herstellung von [^{18}F]ALX5407

(*R*)-*N*-[3-(4'-Fluorphenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]sarkosin (ALX5407) ist ein sehr potenter und selektiver Glycintransporter-1-Antagonist¹³⁵. In der Vergangenheit wurde die Herstellung des C-11-markierten ALX5407 beschrieben²⁰⁶, jedoch wurden keine weiterführenden biologischen Evaluationen des Tracers veröffentlicht. Da ALX5407 bereits ein Fluor-Atom in *para*-Position des Phenylrings enthält, eignete sich dieses Molekül für die Einführung von ^{18}F mittels der Kupfer-vermittelten Alkohol-verstärkten Radiofluorierung.

3.1.1 Synthese des Markierungsvorläufers und der Referenzverbindung von [^{18}F]ALX5407

Für die Kupfer-vermittelte Radiofluorierung sind Boronsäurepinakolester-Abgangsgruppen (Bpin) besonders gut geeignet. Aus diesem Grund wurde der Bpin-Markierungsvorläufer in 4 Stufen ausgehend von 4'-Brom-3-chlorpropiophenon synthetisiert. Da ALX5407 eine enantiomerenreine Verbindung ist, war es von Interesse, bereits in der ersten Stufe das gewünschte Enantiomer herzustellen. Dazu wurde zunächst die Keto-Gruppe über eine Cu(II)-katalysierte enantioselektive Hydrosilylierung²⁰⁸ zum (*S*)-1-(4-Bromphenyl)-3-chlorpropan-1-ol **1** reduziert, als Cu-Quelle diente Cu(OAc)₂·H₂O und als Ligand (*S*)-P-Phos. Der Alkohol **1** konnte mit einer Ausbeute von 60% und einem Enantiomerenüberschuss von 96% (*ee*, englisch: enantiomeric excess) hergestellt werden. Der *ee* wurde über eine chirale HPLC bestimmt, die Peaks wurden mit der racemischen Verbindung und der Literatur²⁰⁸ verglichen. Anschließend wurde die 1-1'-Biphenyleinheit über eine Mitsunobu Reaktion in Anwesenheit von Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) und Triphenylphosphin im Ultraschallbad eingeführt. Durch die vollständige Inversion des chiralen Zentrums erhielt man das gewünschte Enantiomer (*R*)-4-[1-(4-Bromphenyl)-3-chlorpropoxy]-1,1'-biphenyl **2** in 77% Ausbeute und 96% *ee*. Danach folgte die Erweiterung der Propyl-Kette um die Sarkosinmethylester-Einheit über eine N-Alkylierung und lieferte Methyl-(*R*)-*N*-{3-[(1,1'-biphenyl)-4-yloxy]-3-(4-bromphenyl)propyl}-*N*-methylglycinat **3** mit einer Ausbeute von 55%. Schließlich wurde die Boronsäurepinakolester-Abgangsgruppe über eine Pd-katalysierte Miyaura-Borylierung mit Ausbeuten von 84% eingeführt. Der Markierungsvorläufer Methyl(*R*)-*N*-{3-[(1,1'-biphenyl)-4-yloxy]-3-[4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]propyl}-*N*-methylglycinat **4** konnte in einer Gesamtausbeute von 21% hergestellt werden. Wichtig für die folgende Radiosynthese war es, den Markierungsvorläufer zuvor nochmals säulenchromatographisch über eine C18-Phase (RP, englisch: reversed phase) zu reinigen.

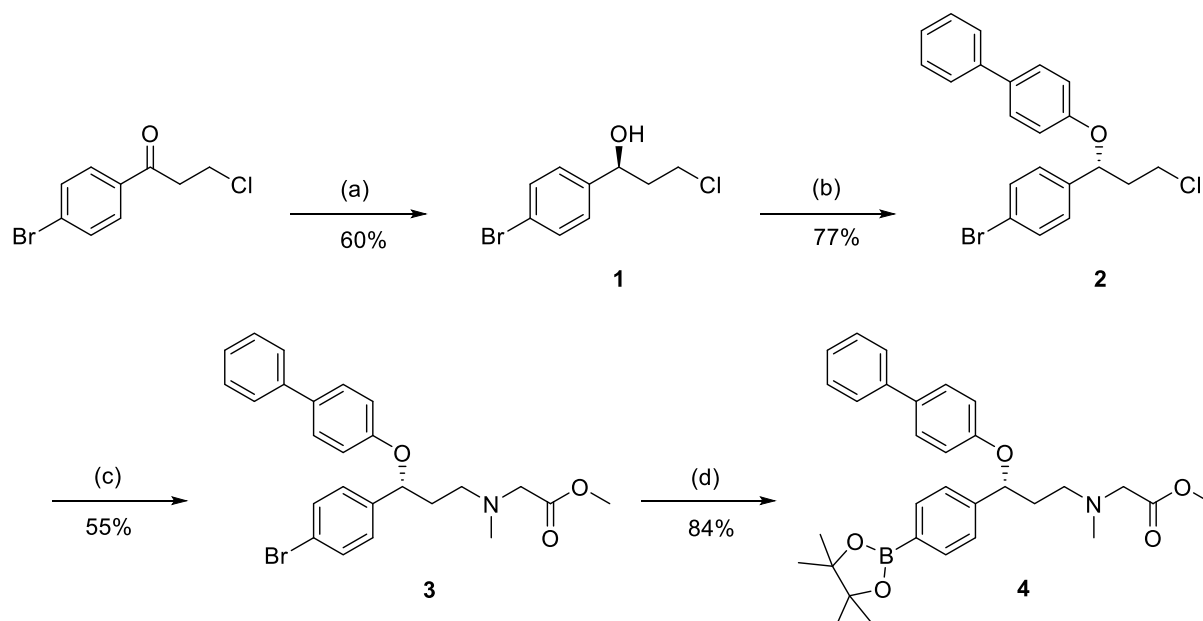


Abbildung 31. Synthese des Markierungsvorläufers **4**. Reaktionsbedingungen: a) Cu(OAc)₂H₂O, (S)-P-Phos, PhSiH₃, Toluol, -20 °C, 48h; b) DIAD, PPh₃, 1,1'-Biphenylphenol, THF, RT, 1h (Ultraschall); c) Sarkosin-methylester, K₂CO₃, KI, MeCN, Rückfluss, 24h; d) PdCl₂(dppf), Bis(pinacolato)diboron, KOAc, DMF, 80 °C, 4h.

Die Referenzsubstanz ALX5407 Hydrochlorid wurde von Sigma-Aldrich erworben. Die Methylester-geschützte Zwischenstufe ALX5406 wurde als Racemat ausgehend von 4'-Fluor-3-chlorpropiophenon über 3 Stufen nach der Literatur²⁰⁹ in einer Gesamtausbeute von 47% synthetisiert.

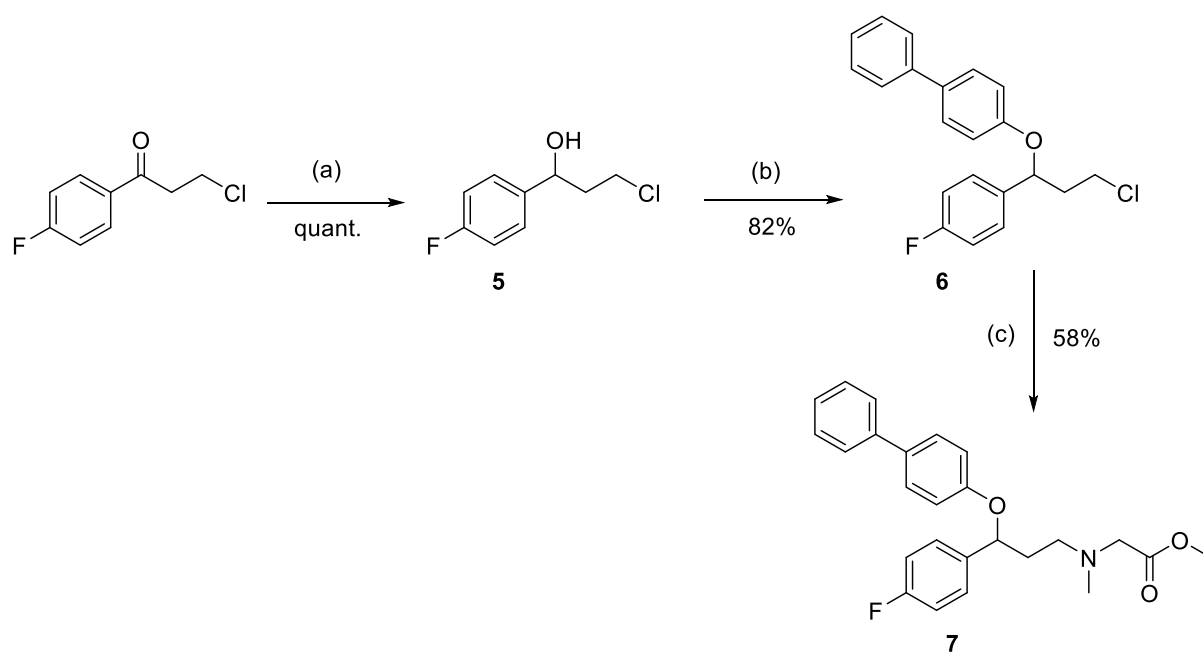


Abbildung 32. Synthese der geschützten Referenzsubstanz ALX5406. Reaktionsbedingungen: a) NaBH₄, MeOH, 0 °C, 1h; b) DIAD, PPh₃, 1,1'-Biphenylphenol, THF, RT, 1h, Ultraschall; c) Sarkosin-methylester, K₂CO₃, KI, MeCN, Rückfluss, 24h.

3.1.2 Radiosynthese von [^{18}F]ALX5407

Der Markierungsvorläufer **4** wurde nach der Anleitung der Kupfer-vermittelten Alkohol-unterstützten Radiofluorierung²¹⁰ umgesetzt. Dazu wurde [^{18}F]Fluorid, welches über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion durch Beschuss von angereichertem [^{18}O]Wasser erzeugt wurde, auf eine Anionen-Austauscher Kartusche (QMA) fixiert. Die Kartusche wurde dann mit Methanol gespült um Wasserreste zu eliminieren und mit Luft getrocknet um Methanol Reste zu entfernen. Währenddessen wurde Vorläufer **4** (30 μmol) und der Kupfermodulator $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$ (30 μmol) gelöst in Dimethylacetamid (DMA) im Reaktionsgefäß vorgelegt. Das „nackte“ [^{18}F]F⁻ wurde mit einer Lösung von Tetraethylammoniumhydrogencarbonat (Et_4NHCO_3) (5.2 μmol) in *n*-Butanol (*n*BuOH) ins befüllte V-Vial eluiert. Die Elutionsraten waren dabei nahezu quantitativ (> 99%). Die Radiosynthese wurde bei 110 °C für 10 min durchgeführt. Anschließend wurde ein Aliquot aus der Reaktionslösung entnommen, mit Wasser verdünnt und auf den Radiochemischen Umsatz (RCU) der Zwischenstufe [^{18}F]**7** mittels HPLC untersucht. Die Methylester-Schutzgruppe wurde dann durch Zugabe von Natronlauge (NaOH) verseift. Bevor die Reaktionslösung auf die semi-präparative HPLC appliziert werden konnte, wurde sie mit Salzsäure neutralisiert, wobei ein Feststoff ausfiel. Durch die Zugabe geringer Mengen Wasser wurde schließlich eine klare, applizierbare Reaktionslösung bereitgestellt.

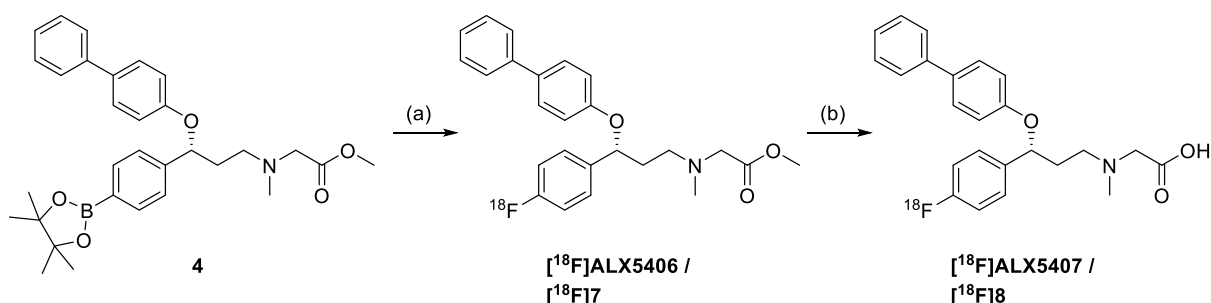


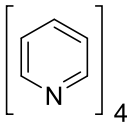
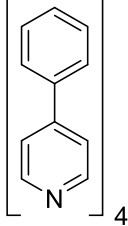
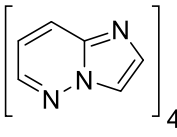
Abbildung 33. Radiosynthese von [^{18}F]ALX5407. Reaktionsbedingungen: a) Elution des ^{18}F mit Et_4NHCO_3 in *n*BuOH, $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$, DMA, 110 °C, 10 min; b) 6 N NaOH, 110 °C, 10 min.

[^{18}F]ALX5407 konnte in hohen radiochemischen Ausbeuten (RCA) von $55\pm 7\%$ und hoher radiochemischer Reinheit (RCR) > 99% isoliert werden. Die Identifizierung des Produkts wurde durch Co-Injektion mit der Referenzsubstanz bestimmt. HPLC-Chromatogramme sind unter dem Kapitel 4 (Experimental Teil) zu finden.

Der Einfluss der Liganden des Kupfer-Komplexes wurde untersucht, indem zwei weitere Kupfer-Komplexe, $\text{Cu}(\text{OTf})_2(4\text{-phenylpyridin})_4$ und $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{imidazo-[1,2-b]pyridazin})_4$ für die Radiosynthese

eingesetzt wurden. Die Reaktionsbedingungen wurden für die Testsynthesen halbiert (15 μmol Vorläufer, 15 μmol Cu-Komplex, 2.5 μmol Et_4NHCO_3), das Reaktionsvolumen wurde beibehalten. Der Austausch der Liganden führte zu erheblichen Steigerungen der radiochemischen Ausbeute ($n=1$) (siehe Tabelle3).

Tabelle 3. Radiosynthese [^{18}F]**8** nach dem Kupfer-vermittelten Alkoholverstärkten Protokoll mit variierenden Kupfer-Komplexen.

	$\text{Cu}(\text{OTf})_2$ 	$\text{Cu}(\text{OTf})_2$ 	$\text{Cu}(\text{OTf})_2$ 
RCA [^{18}F] 8	37%	57%	46%

Die Veränderung des Lösungsmittels bei gleichbleibenden Reaktionsbedingungen von DMA zu 1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinon (DMPU) hatte kaum Einfluss auf die radiochemische Ausbeute (50% $\rightarrow$ 51%). Da die Radiosynthese in moderaten Ausbeuten realisiert werden konnte, wurden keine weiteren Optimierungen durchgeführt.

Die Formulierung des isolierten Tracers [^{18}F]**8** wurde mittels Festphasen-Extraktion (SPE, englisch: solid phase extraction) auf einer Polymer-basierten Kartusche und nahezu quantitativer Elution mit Ethanol durchgeführt. Für eine präklinische Anwendung des Radiotracers [^{18}F]**8** durfte der Ethanol-Gehalt höchstens 10% in der zu applizierenden Lösung sein, deswegen wurde Ethanol soweit möglich unter reduziertem Druck abgedampft. Die verbleibende Lösung wurde mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, englisch: phosphate-buffered saline) versetzt, dabei konnte nur 60% der Aktivität in Lösung gebracht werden. Um diesen Anteil zu steigern, war die Verwendung eines Vermittlers nötig. Mit der Zugabe von 1% des Polysorbats Tween 60 zur PBS-Lösung war es möglich [^{18}F]**8** vollständig in Lösung zu bringen.

Eine wichtige Größe für PET-Studien ist die molare Aktivität, diese betrug für [^{18}F]**8** am Ende der Synthese 32–40 GBq/ μmol bei Startaktivitäten zwischen 1.7 GBq–3.4 GBq. Die molaren Aktivitäten waren noch im ausreichenden Bereich, mit höheren Startaktivitäten (in automatisierten Modulen) hätten diese möglicherweise gesteigert werden können.

Hinsichtlich der präklinischen Anwendung von [^{18}F]ALX5407 wurde die Cu- und Pd-Konzentration im Endprodukt über die Massenspektrometrie mit induktiv-gekoppeltem Plasma (ICP-MS, englisch: inductively coupled plasma mass spectrometry) gemessen. Die Vergleichsprobe aus dem HPLC-Lösungsmittel enthielt eine Kupferkonzentration von 66 $\mu\text{g/L}$ ($n=3$), hochgerechnet auf das Gesamtvolumen entspricht dies einem unbedenklichen Kupfergehalt von 0.5 $\mu\text{g/Batch}$. Der Wert für die täglich parenterale Zufuhr von Kupfer wurde gemäß der ICH-Richtlinie für elementare Verunreinigungen (2019) auf 340 μg festgelegt.²¹¹ Die Pd-Konzentration konnte mit $<0.2 \mu\text{g/L}$ ebenfalls vernachlässigt werden.

3.1.3 *In vitro*- und *in vivo*- Beurteilung von [^{18}F]ALX5407

Ein wichtiger Aspekt für die Anwendung eines Radiotracers ist die Stabilität im Blut und die mögliche Bildung von Metaboliten. Dazu wurde die Stabilität des Tracers in humanem Blut über eine Stunde untersucht. Dafür wurde humanes Vollblut zunächst zentrifugiert und das Serum separiert. Das Plasma wurde dann mit formuliertem [^{18}F]**8** versetzt und bei 37 °C inkubiert. Die Analyse zu den gegebenen Zeitpunkten (5, 10, 20, 30, 45 und 60 min nach Inkubation) in dreifacher Bestimmung erfolgte über Radio-DC (Abbildung 34). Im Plasma wurde über einen Zeitraum von einer Stunde keine Abnahme der radiochemischen Reinheit beobachtet. Die Wiederfindungsrate nach der Proteinfällung mit Acetonitril lag stets hoch bei etwa 70–95%. Das Verhältnis von der inkubierten Tracerlösung vor und nach der Proteinfällung konnte auf der Radio-DC korrekt wiedergefunden werden. Die Bildung von Metaboliten wurde nicht beobachtet.

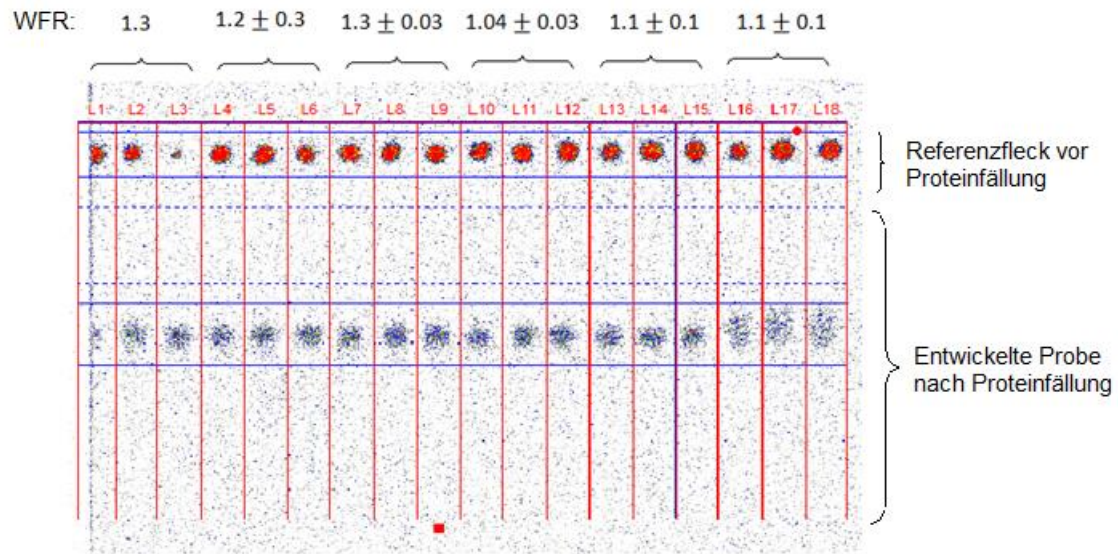


Abbildung 34. Radio-DC des Stabilitätstests von [^{18}F]ALX5407 nach 60 min Inkubation bei 37 °C in Blutplasma mit Proteinfällung zur Bestimmung der Wiederfindungsrate.

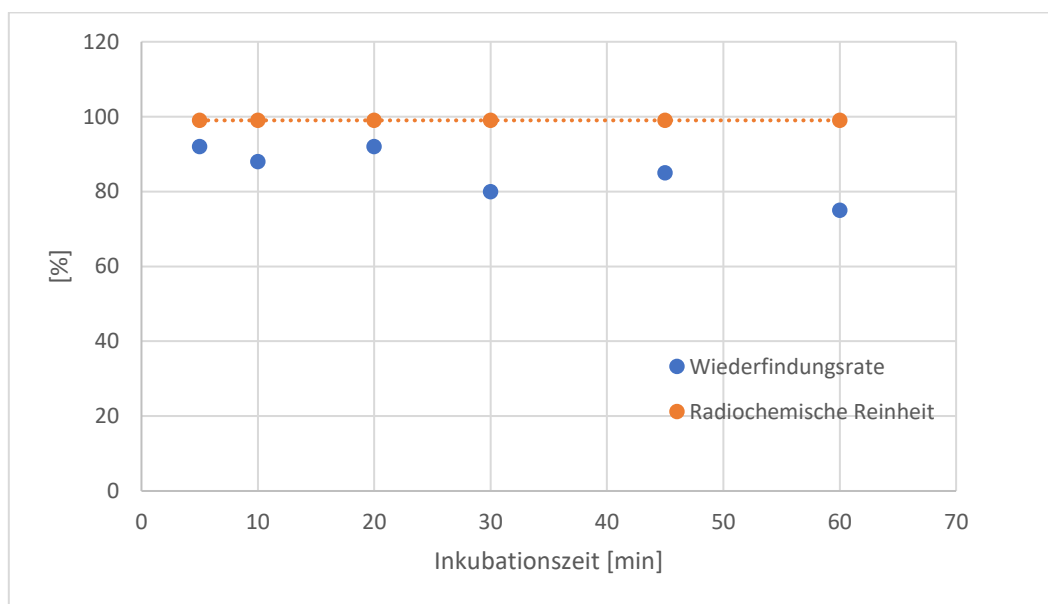


Diagramm 1. Stabilität von [^{18}F]ALX5407 in humanem Blut

Zusätzlich wurde die Tracerlösung vom ausgefällten Pellet getrennt, die Aktivitäten in Lösung und an den Proteinen wurden separat auf einem Gamma-Counter gemessen. Das Ergebnis war in Übereinstimmung mit der Auswertung der Radio-DC und zeigte, dass nur 0.02% der Aktivität ans Pellet gebunden war.

Als nächstes wurde die Lipophilie des Neurotracers [^{18}F]**8**, welche eine wichtige Größe für die Penetration der BHS ist, überprüft. Dazu wurde der Verteilungskoeffizient $\text{Log}D_{7.4}$ von [^{18}F]**8** über die Schüttelmethode²¹² in einem *n*-Octanol/Puffer-Gemisch bestimmt, wobei ein für die Penetration der BHS optimaler von 2.79 ± 0.17 erhalten wurde.

Die Akkumulation von [^{18}F]ALX5407 im Gehirn wurde zunächst in *in vitro* Autoradiographien an Rattenhirnschnitten untersucht (Abbildung 35). Zu diesem Zweck wurden Verdrängungs- und Blocking-Experimenten mit den Kompetitoren Glycin, Sarkosin, sowie den Glycintransporter 1 Inhibitoren NFPS (rac-ALX5407) und LY2365109 durchgeführt. Die Konditionen der Experimente (Puffer, Inkubationszeit, Stoffmenge) wurden in Anlehnung an die Literatur²¹³ gewählt. Eine Anreicherung des Radiotracers war im gesamten Gehirn zu sehen und war in Übereinstimmung mit der literaturbekannten GlyT1-Verteilung, besonders hoch war sie im Kleinhirn, im Hirnstamm sowie in der Capsula externa und dem Corpus callosum. Eine mittlere Anreicherung wurde im Hippocampus und im Striatum beobachtet. Die Verdrängung mit Glycin und Sarkosin erfolgte nur im geringen Ausmaß von 5.9 und 10.6%. Die selektiven GlyT1 Inhibitoren hingegen zeigten eine deutlichere Verdrängung von [^{18}F]ALX5407 mit einer spezifischen Bindung von 24.1% für NFPS und 33 % für LY2365109, wodurch man von einer Selektivität von [^{18}F]ALX5407 ausgehen werden kann.

Das Blocking zeigte ähnliche Verteilungen auf, die Hirnschnitte wurden in diesem Fall erst mit den Kompetitoren inkubiert, um die Bindungsstellen vor der Inkubation mit Tracerlösung zu blocken. Das Blocken mit Glycin und Sarkosin zeigte dasselbe Anreicherungsmuster wie aus dem Verdrängungsexperiment auf. Beim Blocking mit den GlyT1-Inhibitoren konnte kaum eine Akkumulation des Tracers beobachtet werden. In der Literatur werden NFPS und LY2365109 als nicht-kompetitiv und irreversibel bindend beschrieben²¹⁴, somit würden sich diese Beobachtungen mit der Literatur decken.

In vitro Autoradiogramme von [^{18}F]ALX5407 wurden an Rattenhirnschnitten ausgeführt. Dazu wurde jeweils 5 kBq/mL des Radiotracers eingesetzt. Für Verdrängungsexperimente wurden das Substrat des untersuchten Transporters Glycin und die Inhibitoren Sarkosin (schwach), NFPS (rac-ALX5407) und LY2365109 benutzt.

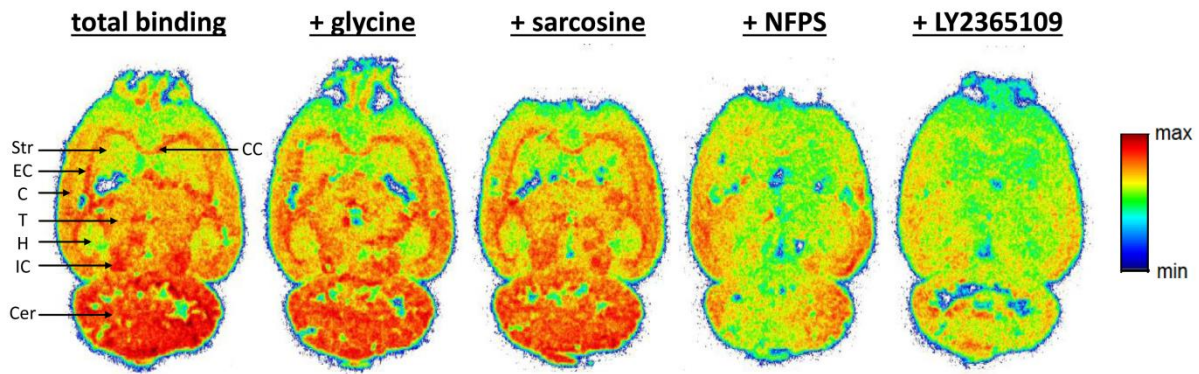


Abbildung 35. *In vitro* Autoradiographie mit [^{18}F]ALX5407 an Rattenhirnschnitten. Von links nach rechts: Totalbindung, kompetitive Verdrängungen mit jeweils 5 μM Glycin, Sarkosin, NFPS oder LY2365109. Regionen mit hoher Tracerbindung sind in rot und gelb, Regionen mit geringer bis keine Bindung sind in grün und blau ersichtlich. Abkürzungen: C, Kortex; CC, Corpus callosum; Cer, Zerebellum; EC, äußere Kapsel; H, Hippocampus; IC, Colliculi inferiores; Str, Striatum; T, Thalamus.

[^{18}F]ALX5407 wurde schließlich für *in vivo*-Untersuchungen an gesunden Ratten dem Institut für Radiochemie und Experimentelle Molekulare Bildgebung (Uniklinik Köln) zur Verfügung gestellt. Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, verblieb der Tracer ausschließlich in den peripheren Geweben und es konnte keine Aufnahme ins Gehirn beobachtet werden. Dies führte zur Annahme, dass der Radiotracer als mögliches Substrat von Pgp-Transportern fungiert und die BHS daher nicht passieren kann. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde ein weiteres *in vivo* Experiment unter Verwendung des Pgp-Inhibitors Elacridar durchgeführt. Auch dieses Experiment zeigte keinen Unterschied in der Tracerverteilung. Eine weitere Annahme für das Fehlen der Akkumulation im Gehirn war, dass die Penetration der BHS durch [^{18}F]ALX5407 ein kinetisch langsamer Prozess ist. So wurde im Rahmen einer früheren Arbeit mit dem Racemat NFPS in Ratten die maximale Hirnkonzentration erst 6 Stunden nach subkutaner Injektion erreicht²¹⁵, und von einer Konzentrationsabhängigkeit der Inhibitionskinetik von GlyT1b durch NFPS *in vitro* wurde ebenfalls berichtet²¹⁶. Zudem wurde in früheren *in vivo* Versuchen mit ALX5407 eine deutliche, dosisabhängige Verschiebung der Latenzzeit zwischen Injektion in Ratten je nach Dosis erste Effekte erst nach 2.75 h (30 mg/kg), 4.25 h (10 mg/kg) oder 7 h (6 mg/kg) beobachtet werden, bei einer Dosis von 3 mg/kg bleiben die Effekte sogar vollständig aus.²¹⁷ Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurde eine weitere PET-Untersuchung mit [^{18}F]ALX5407 durchgeführt, bei der mit der Injektion des Radiotracers eine zusätzliche Dosis ALX5407 verabreicht wurde. Das Ergebnis blieb jedoch unverändert, es wurde keine Anreicherung des Tracers im Gehirn beobachtet.

3.1.4 Anwendung von [^{18}F]ALX5406 als Prodrug

Eine neue Strategie zur Beurteilung dieses Tracers zur Bildgebung des GlyT1 wurde verfolgt. Im Rahmen der Prodrug-Strategie werden Substanzen verwendet, die nicht direkt wirksam sind, sondern zunächst durch einen enzymatischen oder nicht-enzymatischen Schritt in den aktiven Wirkstoff umgewandelt werden müssen. Hier wurde, unter der Annahme einer schnelleren Penetration der BHS mit anschließender Demethylierung durch endogene Esterasen, der Methylester-geschützte Vorläufer [^{18}F]ALX5406 ([^{18}F]7) als Prodrug verwendet.

Für die präklinische Anwendung von [^{18}F]7, musste dieser zunächst isoliert, formuliert, seine molare Aktivität bestimmt und auf seine Lipophilie untersucht werden. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4. Zusammengefasste Ergebnisse der Radiosynthese von [^{18}F]ALX5406

	[^{18}F]7
Radiochemische Ausbeute	62±5% (n=4)
Radiochemische Reinheit	> 95%
Molare Aktivität	82–319 GBq/μmol (n=4)
Log $D_{7.4}$	2.99±0.16

[^{18}F]7 wurde *in vivo* an gesunden Ratten, alleine, mit dem Pgp-Inhibitor Elacridar und zusätzlich mit nicht-radioaktivem ALX5407 untersucht. Es wurde eine hohe Akkumulation im Gehirn beobachtet, das Verteilungsmuster war aber nicht im Einklang mit der in der Literatur bekannten Lokalisierung von GlyT1^{213,218,121}.

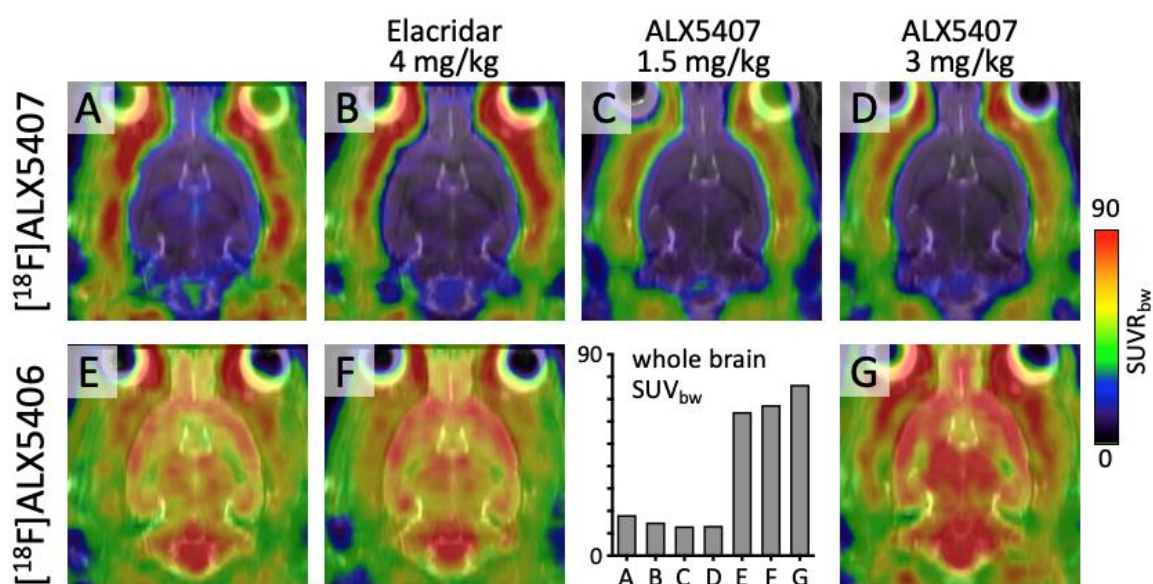


Abbildung 36. PET-Studie von $[^{18}\text{F}]\text{ALX5407}$ und $[^{18}\text{F}]\text{ALX5406}$ an gesunden Ratten. μPET Bilder (60 min Messungen), Injektion von $[^{18}\text{F}]\text{8}$ (A-D) oder $[^{18}\text{F}]\text{7}$ (E-G), nur Tracer (A+E), nach Vorbehandlung mit Pgp Inhibitor Elacridar (B+F), zusammen mit nicht-radioaktivem ALX5407 (C+D) oder nach Vorbehandlung mit nicht-radioaktivem ALX5407 (G). Abbildung zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Heike Endepols, Institut für Radiochemie und Experimentelle Molekulare Bildgebung, Uniklinik Köln.

Zusammenfassend konnte der als potent und selektiv bekannte GlyT1 Inhibitor $[^{18}\text{F}]\text{ALX5407}$ in guten radiochemischen Ausbeuten und einer sehr guten radiochemischen Reinheit hergestellt werden. In *in vitro* Autoradiographien an Rattenhirnschnitten konnte das erwartete Verteilungsmuster von GlyT1 mit $[^{18}\text{F}]\text{ALX5407}$ gezeigt werden. Der Neurotracer war bis zu mindestens einer Stunde im Blut stabil, eine Bildung von Metaboliten wurde nicht beobachtet. Doch in *in vivo* PET Experimenten an Ratten zeigte sich, dass $[^{18}\text{F}]\text{ALX5407}$ nicht zur Visualisierung des GlyT1 im Gehirn geeignet ist, da er die BHS nicht passieren kann. Die Verfolgung der Prodrug-Strategie hat sich hier nicht als nützlich erwiesen, da zwar eine hohe Aufnahme im Gehirn zu sehen war, aber das Anreicherungsmuster nicht mit der erwarteten GlyT1 Verteilung übereinstimmt. Dennoch könnten weitere strukturelle Modifikationen zur Entwicklung eines hirngängigen Tracers zur Visualisierung des GlyT1 auf die Ergebnisse dieser Arbeit folgen.

3.2 Herstellung von [^{18}F]MNI-1126

Der SV2A-selektive Radiotracer [^{11}C]UCB-J wird zur Bildgebung von diversen Krankheitsbildern verwendet, vor allem für die Bestimmung der Synapsen-Integrität in Patienten mit der Alzheimer Erkrankung. Basierend auf der 4-Phenylpyrrolidin-2-on Leitstruktur mit 1–3 Fluorsubstituenten am Phenylring wurden mehrere Derivate veröffentlicht¹⁷². [^{18}F]MNI-1126 ist das radiofluorierte Derivat mit den besten Eigenschaften für die PET-Bildgebung. Dieser Radiotracer ist eine enantiomerenreine Verbindung, um der zeitaufwendigen chiralen Trennung mittels HPLC zu entgehen, wurde versucht, den Markierungsvorläufer in einer chiralen Synthese im Großmaßstab herzustellen.

3.2.1 Synthese des Markierungsvorläufers und der Referenzverbindung von [^{18}F]MNI-1126

Für den chiralen Aufbau der Vorläufersynthese wurde durch Literaturrecherche eine chemoenzymatische Synthese gefunden, die mit Hilfe des Enzyms α -Chymotrypsin verläuft.²¹⁹ Dazu wurde zuerst ausgehend von 3-Brom-5-fluorbenzaldehyd in einer Wittig-Reaktion mit Carbomethoxymethyltriphenylphosphoran (*E*-Methyl-3-(3-brom-5-fluorphenyl)acrylat (**9**) in quantitativen Ausbeuten gebildet. Anschließend Michael-Addition von Nitromethan lieferte das racemische Methyl-3-(3-brom-5-fluorphenyl)-4-nitrobutanoat (**10**) in 69% Ausbeute. Auf dieser Stufe sollten beide Enantiomere durch die Hydrolyse mit α -Chymotrypsin in einer Pufferlösung (pH = 7.4) getrennt werden können, indem das (*S*)-Enantiomer zur Carbonsäure hydrolysiert und das (*R*)-Enantiomer nicht umgesetzt in einem Enantiomeren-Überschuss von bis zu 99% zurückgewonnen wird. Die Reaktion wurde mittels HPLC auf die chirale Trennung überprüft. Jedoch konnte für diese Verbindung diese Versuchsanleitung nicht übertragen werden, es wurde keine Umsetzung beobachtet.

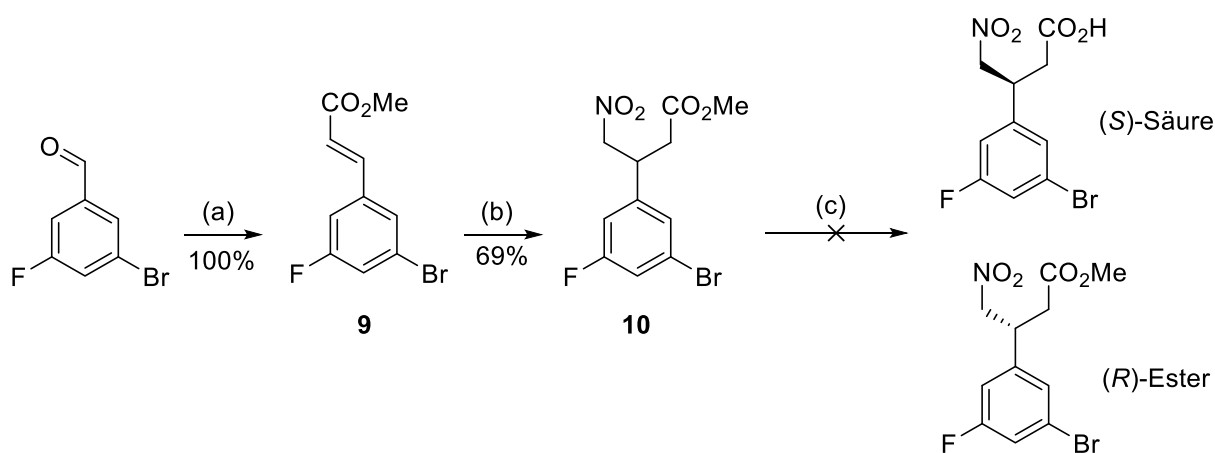


Abbildung 37. Synthese von Methyl-3-(3-bromo-5-fluorphenyl)-4-nitrobutanoat (**10**) und Hydrolyse mit α -Chymotrypsin. Reaktionsbedingungen: a) Carbomethoxymethylen-triphenylphosphoran in DCM, THF, 0 °C $\rightarrow$ RT, 24h; b) CH_3NO_2 , DBU, MeCN, 0 °C $\rightarrow$ RT, 24h; c) α -Chymotrypsin, Phosphatpuffer, RT.

Der nächste Ansatz für eine enantioselektive Synthese war die Verwendung eines bifunktionellen organischen Katalysators basierend auf einem modifizierten Chinolin Alkaloid.²²⁰ Diese chiralen Organokatalysatoren werden typischerweise zur Bildung von asymmetrischen C–C Bindungen eingesetzt. Ausgehend von Chinidin (QD) wurde durch Etherspaltung der Alkohol-modifizierte (QD-OH) Katalysator **11** in 78% Ausbeute hergestellt.

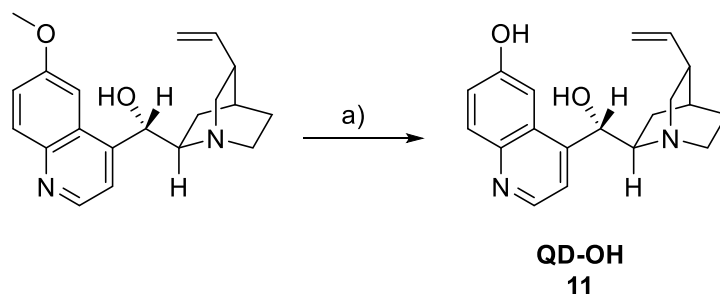


Abbildung 38. Herstellung von 4-((*S*)-Hydroxy((1*S*,2*R*,4*S*,5*R*)-5-vinylquinuclidin-2-yl)quinolin-6-ol (QD-OH). Reaktionsbedingungen: a) NaSEt, DMF, 110 °C, 6h.

Die Vorläufersynthese wurde wieder ausgehend von 3-Brom-5-fluorbenzaldehyd gestartet, in einer Henry-Reaktion wurde es mit Nitromethan zu (*E*)-1-Brom-3-fluor-5-(2-nitrovinyl)benzol (**12**) mit einer Ausbeute von 57% umgesetzt. Anschließend folgte die asymmetrische 1,4-Michael-Addition von Malonsäurediethylester in Anwesenheit des QD-OH Katalysators und lieferte das gewünschte (*R*)-Enantiomer (*R*)-2-(1-(3-Brom-5-fluorphenyl)-2-nitroethyl)malonsäurediethylester **13** in 70% Ausbeute mit einem Enantiomerenüberschuss von 92%. Durch Umkristallisation konnte der ee auf 98% erhöht werden. Das HPLC Chromatogramm der Enantiomere befindet sich im Anhang (Kapitel 6).

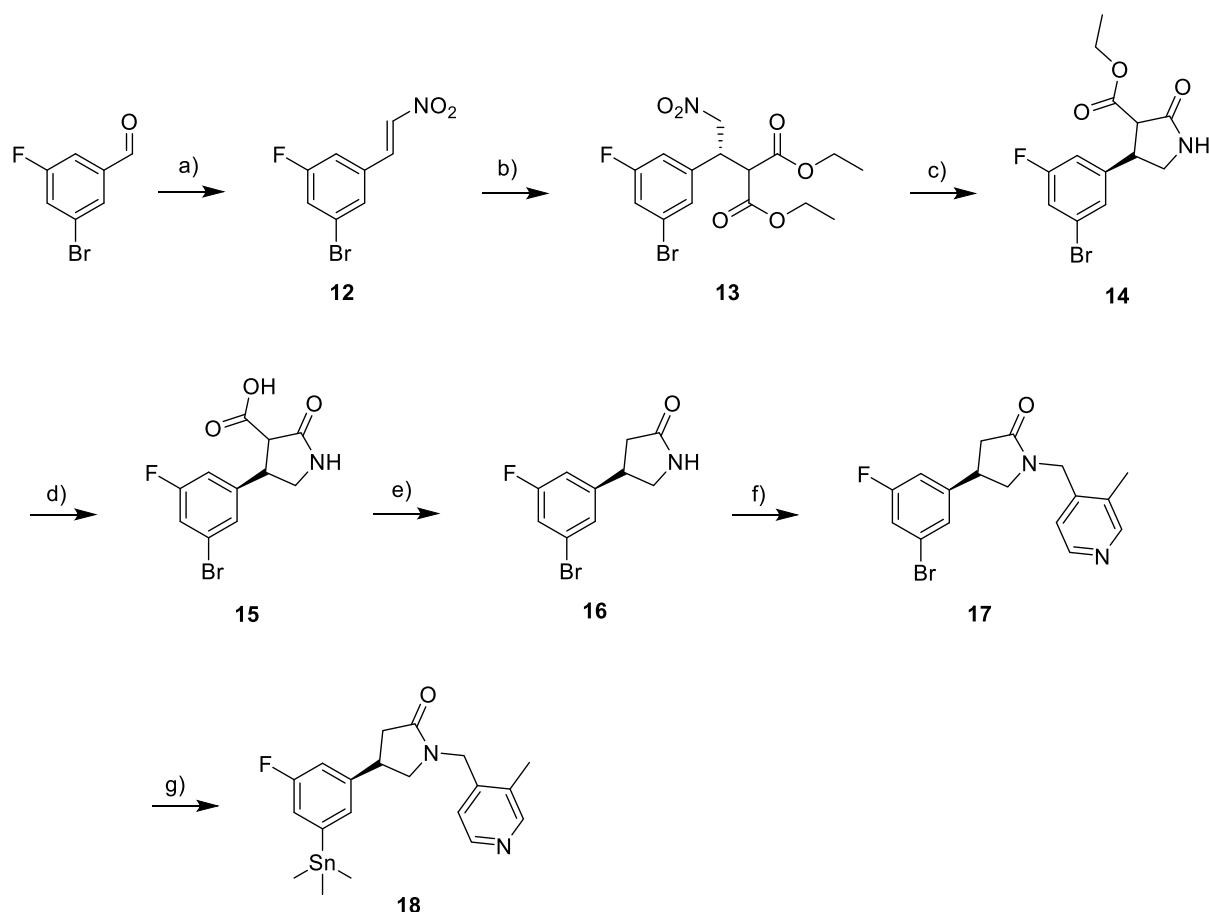


Abbildung 39. Synthese des Trimethylzinn-Markierungsvorläufers **18**. Reaktionsbedingungen: a) CH_3NO_2 , NaOH, MeOH/ H_2O , 5 °C, 1h; b) QD-OH, Malonsäurediethylester, THF, - 20 °C, 24h; c) Zn, $\text{HCl}_{\text{konz.}}$, MeOH, RT, 2h; d) 1 M NaOH, EtOH, RT, 1h; e) Toluol, Rückfluss, 4h; f) 4-(Chlormethyl)-3-methylpyridin Hydrochlorid, NaH, Bu_4NI , THF, RT, 24h; g) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Sn_2Me_6 , LiCl, Toluol, 100 °C, 3h.

Nach erfolgreicher Bildung des (*R*)-Enantiomers **13** folgte die Reduktion der Nitrogruppe, wobei auch eine in-situ Zyklisierung stattfinden sollte. Dieser Reduktionsschritt erwies sich als eine Herausforderung die überwunden werden musste. Durchgeführte Reduktionsprotokolle sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5. Ergebnisse verschiedener Ansätze für die Reduktion der Nitrogruppe.

Metall	Reduktionsmittel	Lösungsmittel	Reaktionsbedingungen	Ausbeute [%]
Ni(II)Cl ₂ ·6H ₂ O	NaBH ₄	MeOH	RT / 6h	Debromierung
Ni(II)OAc·4H ₂ O	NaBH ₄	MeOH	RT / 18h	Debromierung
Ni(II)OAc·4H ₂ O	NaBH ₄	MeCN/H ₂ O	RT / 2h	Keine Umsetzung
Raney-Ni	HCOOH	MeOH	RT / 1h	Debromierung
Raney-Ni	H ₂	MeOH	RT / 24h	Debromierung
Fe-Pulver	HCl	EtOH	RT / 24h	12
Fe-Pulver	NH ₄ Cl	EtOH/H ₂ O	RT / 48h	Keine Umsetzung
Sn-Pulver	NH ₄ Cl	EtOH	RT / 3d	Nebenprodukte
Zn-Staub	NH ₄ Cl	EtOH/EtOAc	RT / 0.5h	Nebenprodukte
Zn-Staub	NH ₄ Cl/TPGS 750M	Emulsion	RT / 24h	Keine Umsetzung
SiHCl ₃	DIPEA	DCM	RT / 18h	Keine Umsetzung
Zn-Pulver	HCl	MeOH	RT / 1h	40

Die Verwendung von Ni-haltigen Reduktionsmitteln, wie NiCl₂/NaBH₄²²¹, Ni(OAc)₂/NaBH₄²²², Raney-Nickel mit Ameisensäure²²³ und Raney-Nickel mit H₂²²⁴ führten zur Debromierung des Phenylrings. Die Reduktion der Nitrogruppe mit Eisen und Ammoniumchlorid²²⁵ zeigte keinen Umsatz, mit Salzsäure²²⁶ konnte zwar Produkt in geringer Ausbeute von 12% erzeugt werden, jedoch begleitet von vielen Nebenprodukten. Die Verwendung von Zinn mit Ammoniumchlorid²²⁷ und Zink mit Ammoniumchlorid²²⁸ führte zur Bildung einer Vielzahl von Nebenprodukten. Eine weitere Möglichkeit war die Reduktion mit Zink und Ammoniumchlorid in Anwesenheit von TPGS-750 M²²⁹, einer oberflächenaktiven Substanz in einer Emulsion, jedoch wurde auch hier keine Umsetzung zum Produkt beobachtet. Die Anwendung von Trichlorsilan und Hünig-Base²³⁰ (Diisopropylethylamin, DIPEA) lieferte ebenfalls kein Amin. Das beste Ergebnis mit akzeptabler Ausbeute wurde durch die Reduktion der Nitroverbindung mit Zink in einer 1:1 Mischung von Methanol und konzentrierter Salzsäure erreicht²³¹. Ethyl-(4*R*)-4-(3-Brom-5-fluorphenyl)pyrrolidin-3-carboxylat **14** konnte mit einer Ausbeute von 40% hergestellt werden. Als nächstes wurde der Ethylester am neu geformten Pyrrolidin-Ring zur entsprechenden (4*R*)-4-(3-Brom-5-fluorphenyl)-2-oxopyrrolidin-3-carbonsäure **15** mit Natronlauge in einer Ausbeute von 72% hydrolysiert. Die Carbonsäure-Einheit wurde durch thermische Decarboxylierung entfernt und lieferte (*R*)-4-(3-Brom-5-fluorphenyl)pyrrolidin-2-on (**16**) in

quantitativer Ausbeute. Für die *N*-Alkylierung wurde die zu alkylierende Verbindung nach Literatur hergestellt, dazu wurde zunächst 3-Methylisonicotinmethylester mit NaBH₄ reduziert, anschließend mit Thionylchlorid zum 4-(Chlormethyl)-3-methylpyridin Hydrochlorid umgesetzt²³². Die Einführung der Pyridin-Einheit über eine *N*-Alkylierung ergab (*R*)-4-(3-Brom-5-fluorphenyl)-1-[(3-methylpyridin-4-yl)methyl]pyrrolidin-2-on **17** in 88% Ausbeute. Abschließend wurde die Trimethylstannyl-Abgangsgruppe für die Radiofluorierung über eine Pd-katalysierte Stannylierung in den Phenylring mit einer Ausbeute von 80% installiert. Insgesamt konnte der Markierungsvorläufer (*R*)-4-[3-Fluor-5-(trimethylstannyl)phenyl]-1-[(3-methylpyridin-4-yl)methyl]pyrrolidin-2-on **18** über 7 Stufen in einer Gesamtausbeute von 8% hergestellt werden.

Die Referenzverbindung wurde in Anlehnung an die Literatur ausgehend von 3,5-Difluorbenzaldehyd als Racemat synthetisiert²²⁶.

3.2.2 Herstellung von [¹⁸F]MNI-1126

Markierungsvorläufer mit einer Trimethylstannyl-Abgangsgruppe sind für die Kupfer-vermittelte Radiofluorierung gut geeignet.²³³ Nach dieser Methode wurde [¹⁸F]MNI-1126 bereits markiert, jedoch betrug die radiochemische Ausbeute nur 9%²²⁶. Um die radiochemische Ausbeute zu steigern wurde der Vorläufer **18** nach dem „Alcohol-enhanced“ Protokoll⁷⁵ markiert. Der positive Effekt von Alkohol auf die Radiosynthese konnte hier nicht bestätigt werden, es konnte nur ein geringer Umsatz (RCU <1%) registriert werden (Tabelle 6, Eintrag 1).

In dem erst kürzlich erschienenen Protokoll von Antuganov et al.²³⁴ für die nucleophile Radiofluorierung mit n.c.a. [¹⁸F]F⁻ von Boronsäurepinakolestern wurde zum Fixieren des [¹⁸F]Fluorids die schwache Anionenaustauscherkartusche WAX (weak anion-exchange resin) verwendet. Anschließend wurde [¹⁸F]F⁻ mit einer Lösung von Pyridiniumsulfonat in DMA eluiert. Das Pyridiniumsulfonat diente als Base und als Phasentransfer-Katalysator bei der Elution. Außerdem wurde in dieser Radiosynthese DMA als einziges Lösungsmittel eingesetzt. Zeitintensive azeotrope Trocknungsschritte waren nicht nötig. Die Übertragung dieses Radiofluorierungsprotokolls auf die Radiosynthese von [¹⁸F]MNI-1126 zeigte keinen Erfolg, es konnte kein Produkt hergestellt werden (Tabelle 6, Eintrag 2–4).

Das Radiofluordestannylierungs-Protokoll von Zarrad et al.⁷³ wurde für verschiedene Trimethylstannyl-Vorläufer untersucht und optimiert. Ausgehend von diesem Markierungsprotokoll wurde [¹⁸F]F⁻ in [¹⁸O]Wasser auf einer Chromafix-HCO₃ Kartusche fixiert und mit Methanol gespült, um Wasserreste zu

entfernen. Anschließend wurde $^{18}\text{F}^-$ mit einer Lösung von Et_4NHCO_3 in Methanol in ein leeres V-Vial eluiert. Die Elutionsraten waren nahezu quantitativ (>99%). Das Methanol wurde unter vermindertem Druck innerhalb weniger Minuten abgedampft, sodass im V-Vial nur das „nackte“ $^{18}\text{F}^-$ blieb. Vorläufer **18** und der Kupfermediator $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$ wurden in DMA gelöst und ins V-Vial überführt. Die Radiosynthese verlief bei 110 °C, da bei höheren Temperaturen eine Racemisierung beobachtet wurde.²²⁵ Nach 20 min Reaktionszeit wurde die abgekühlte Reaktionslösung auf die semi-präparative HPLC injiziert und ^{18}F MNI-1126 mit einer radiochemischen Ausbeute von 21% isoliert (Tabelle 6, Eintrag 5). Mit weiteren Optimierungen (siehe Tabelle 6, Eintrag 6), wie der Verwendung einer QMA Kartusche und des Kupfer-Mediators $\text{Cu}(\text{OTf})_2(4\text{-phpy})_4$ konnten die radiochemischen Ausbeuten auf 31–35 % erhöht werden.

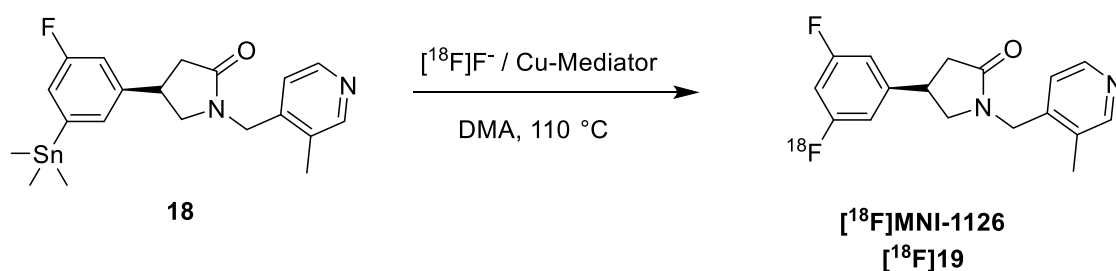


Abbildung 40. Radiosynthese von ^{18}F MNI-1126.

Tabelle 6. Reaktionsbedingungen für die Radiofluorierung von ^{18}F MNI-1126.

Eintrag	Methode	Kartusche	Elution/Solvent	Cu-Mediator	Ausbeute [%]
1	Alcohol-enhanced	QMA	Et_4NHCO_3 / n-BuOH 1 mg/ 0.4 mL	$\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$	<1
2	Antuganov et al.	Chromafix PS- HCO_3^-	DMAP-OTf/ MeOH 25 μmol /0.5 mL	$\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$	<1
3	Antuganov et al.	Chromafix PS- HCO_3^-	4-Methoxypyridinium- Triflat/MeOH 25 μmol /0.5 mL	$\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$	<1
4	Antuganov et al.	Oasis Wax CC	DMAP-OTf /DMA	$\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$	-
5	Zarrad et al.	Chromafix PS- HCO_3^-	Et_4NHCO_3 / MeOH 1 mg / 1 mL	$\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$	21
6	Zarrad et al.	QMA	Et_4NHCO_3 / MeOH 1 mg / 0.5 mL M	$\text{Cu}(\text{OTf})_2(4\text{-phpy})_4$	31.2

Ebenso wurde die Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\mathbf{19}$ in unterschiedlichen Lösungsmitteln und mit unterschiedlichen Kupfer-Komplexen auf den radiochemischen Umsatz hin untersucht. Zusätzlich zu DMA wurde 1-3-Dimethyl-2-Imidazolidinon (DMI) und der Kohlensäure-Propylenglykol Ester Propylencarbonat (PC) eingesetzt. Der Einfluss verschiedener Liganden des Kupfer-Komplexes auf die Radiosynthese und dadurch auch auf die radiochemische Ausbeute wurde schon in der Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{ALX5407}$ registriert. Zu diesem Zweck wurde $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{Pyridin})_4$ [1], $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2(4\text{-Phenylpyridin})_4$ [4], $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{Lutidin})_4$ [19] und $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2(\text{Lutidin})_4$ [20] getestet (Abbildung 41). Die Reaktionsbedingungen der Radiofluorierung waren wie folgt: 5 μmol Vorläufer **18**, 5 μmol Cu-Modulator, 3.8 μmol TEAOTf in 0.5 mL MeOH (Elution von der Kartusche), das Reaktionsvolumen betrug 0.8 mL. Der radiochemische Umsatz wurde mittels HPLC bestimmt, die verwendete HPLC-Säule Chromolith® SpeedROD C18 gibt den $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ -Anteil nahezu quantitativ wieder. Zur Bestimmung des RCU wurde das Verhältnis von radiofluoriertem Produkt zu nicht umgesetztem $^{18}\text{F}^-$ gebildet.

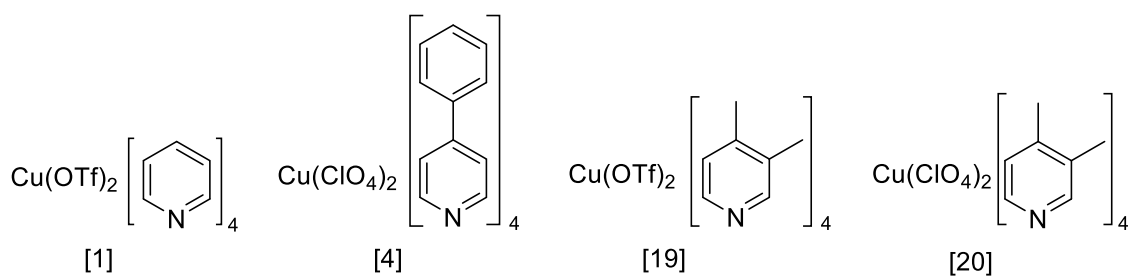


Abbildung 41. Eingesetzte Kupfer-modulatoren

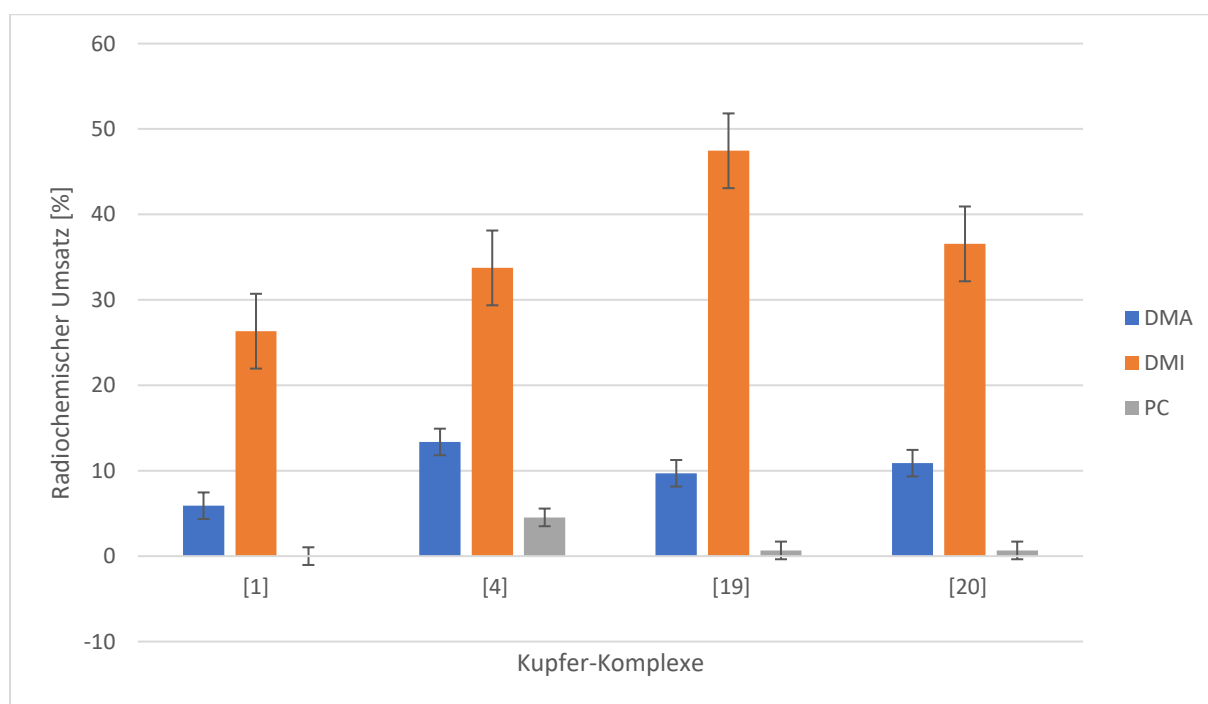


Diagramm 2. RCU von $[^{18}\text{F}]\mathbf{19}$ mit verschiedenen Cu-Komplexen/Lösungsmitteln (n = 3)

Wie in Diagramm 1 dargestellt, wurde der höchste RCU für die Radiofluorierung mit dem Kupfer-Komplex [19] in DMI erzielt ($\text{RCU} = 47.5 \pm 5.4\%$). Bevor $[^{18}\text{F}]\mathbf{19}$ mittels HPLC isoliert werden konnte, musste das Lösungsmittel DMI erst über eine SPE abgetrennt werden. Der Tracer wurde mit Acetonitril eluiert und konnte dann injiziert werden.

Die Formulierung des isolierten Tracers $[^{18}\text{F}]\mathbf{19}$ wurde mittels Festphasenextraktion durchgeführt. Dazu wurde erst eine „reversed phase“ polymere StrataX Kartusche verwendet, jedoch konnte nur 32% des Produkts fixiert werden. Mit einer Silica-basierten C18 Kartusche konnte über 90% des Tracers auf der Kartusche fixiert werden, durch anschließende Elution mit 500 μL Ethanol über einen Sterilfilter, konnte $[^{18}\text{F}]\mathbf{19}$ nahezu vollständig (99.97%) ins Endgefäß überführt werden. Durch Zugabe von 4.5 mL isotonischer NaCl-Lösung (0.9%) wurde eine 10% Ethanol-haltige Injektionslösung hergestellt.

Die Automatisierung der Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{MNI-1126}$ basierte auf der Methode (Tabelle 6, Eintrag 6), die in der manuellen Radiofluorierung erarbeitet und optimiert wurde. Trotz höherer Umsätze mit dem Cu-Modulator [19] in DMI wurde auf Grund des zusätzlichen Schrittes zur Entfernung des Lösungsmittels diese Methode nicht für die Automatisierung verwendet. Die einstufige Radiosynthese nach Eintrag 6 konnte auf ein selbst konstruiertes Synthesemodul des INM-5 des Forschungszentrums Jülich übertragen werden. In Abbildung 42 ist der Aufbau der Syntheseapparatur schematisch dargestellt. Die Verschlauchungen an den Ventilen 2, 3 und 4 ermöglichten es, die QMA-Kartusche von der erforderlichen Seite zu verwenden. Das $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ in $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ wurde von der männlichen Seite (Ventil 2 $\rightarrow$ Ventil 4) beladen. Spülen mit Methanol zur Entfernung von Wasserresten erfolgte über dasselbe Ventil ebenfalls vom männlichen Anschluss aus. Die Elution des $^{18}\text{F}^-$ von der Kartusche ins Reaktionsgefäß verlief von der weiblichen Seite der Kartusche über das Ventil 3, wodurch Wiederfindungsraten des $[^{18}\text{F}]\text{F}^- < 94\%$ bestimmt wurden. Die weiteren Reaktionsschritte (Radiosynthese, Isolierung mittels HPLC, Formulierung) der Radiosynthese konnten problemlos auf das Synthesemodul übertragen werden. Die HPLC-Bedingungen benötigten besondere Beachtung, da im UV-Kanal (220 nm) mit geringem Zeitunterschied (ca. 10 Sekunden) eine Verunreinigung lief, deswegen wurde der Produkt-Peak mit leichter Verzögerung und geringen Aktivitätsverlusten geschnitten. Dennoch konnte $[^{18}\text{F}]\text{MNI-1126}$ in moderaten Ausbeuten isoliert werden. Die injektionsfähige Tracerlösung wurde von der Qualitätskontrolle der Radiopharmaka-Produktion des INM-5 (Forschungszentrum Jülich) untersucht und für präklinische Anwendungen an gesunden Mäusen im Institut für Radiochemie und Experimentelle Molekulare Bildgebung (Uniklinik Köln) freigegeben.

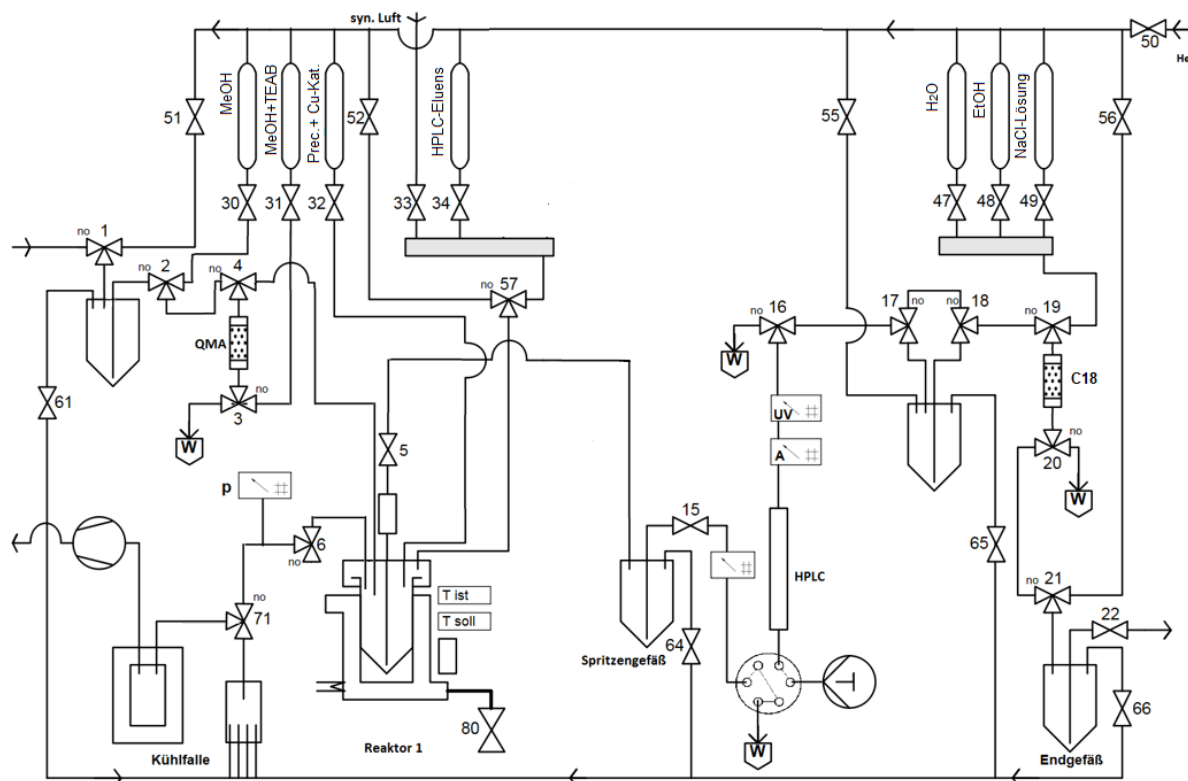


Abbildung 42. Schematische Darstellung des Synthesemoduls für die Radiofluorierung von $[^{18}\text{F}]\mathbf{19}$

Die Ergebnisse der Qualitätskontrolle sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7. Zusammenfassung der Qualitätskontrolle von $[^{18}\text{F}]\text{MNI-1126}$ (n=5)

	$[^{18}\text{F}]\text{MNI-1126}$
Radiochemische Ausbeute (zerfallskorrigiert)	26±6%
Radiochemische Reinheit	99.8%
Molare Aktivität	21–79 GBq/μmol
Enantiomeren Überschuss	98%

3.2.3 *In vivo* Beurteilung von [^{18}F]MNI-1126

Das *in vivo* Verhalten von [^{18}F]MNI-1126 wurde in gesunden Mäusen untersucht. Dazu wurde denselben Tieren in separaten Experimenten entweder [^{18}F]MNI-1126 oder der bekannte Tracer [^{18}F]UCB-H injiziert, die Aufnahme und Verteilung im Gehirn und in anderen Organen wurde miteinander und mit der Literatur verglichen^{226,235}.

[^{18}F]19 zeigte eine hohe Aufnahme ins Gehirn und eine heterogene Verteilung in Übereinstimmung mit der ubiquitären Verteilung von SV2A im Gehirn. Beide Tracer, [^{18}F]MNI-1126 und [^{18}F]UCB-H wiesen ein sehr ähnliche Anreicherungsmuster im Gehirn auf. Die Aufnahme von [^{18}F]MNI-1126 hingegen war doppelt so hoch.

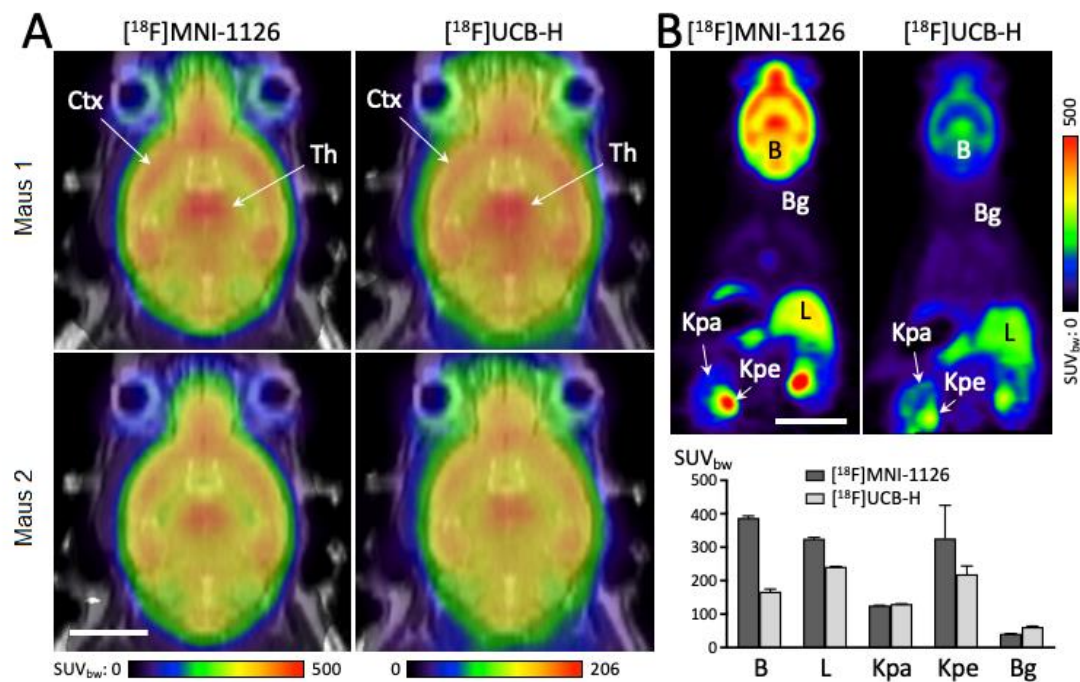


Abbildung 43. PET-Studie von [^{18}F]MNI-1126 und [^{18}F]UCB-H an gesunden Mäusen. μPET Bilder (Summe von 60 Minuten Messungen) (A) des Gehirns in der horizontalen Ebene, (B) des Gehirns und anderer Organe in der vertikalen Ebene und der quantitativen Aufnahme von [^{18}F]MNI-1126 und [^{18}F]UCB-H (unten). Abkürzungen: B: brain (Gehirn), Bg: background (Hintergrund), Ctx: cortex (Kortex), Kpa: kidney parenchyma (Nierenparenchym), Kpe: kidney pelvis (Nierenbecken), L: liver (Leber), Th: thalamus (Thalamus). Abbildung zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Heike Endepols, Institut für Radiochemie und Experimentelle Molekulare Bildgebung, Uniklinik Köln.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Vorläufer **18** mit der hier entwickelten Methode im Großmaßstab hergestellt werden konnte. Der verwendete Chinidin-basierte Katalysator ermöglichte eine kosten- und zeiteffiziente Produktion und lieferte die Zwischenstufe **13** mit einem Enantiomerenüberschuss von 98%. Durch die optimierte Radiofluorierung und anschließende Automatisierung in einem Synthesemodul des INM-5 (Forschungszentrum Jülich) konnte dieser Tracer für präklinische PET-Experimente zur Verfügung gestellt werden.

3.3 Herstellung radiofluorierter Adenosin A₁ Partialagonisten

Zur Visualisierung des A₁AR wurde erst kürzlich ein C-11 markierter Adenosin A₁ Partialagonist veröffentlicht²⁰¹. Ausgehend von dessen Leitstruktur, einem 3,5-Dicarbonitril-4-phenylpyridin-Gerüst, wurden eine direkte Radiofluorierung in *meta*-Position des Phenylrings und die Einführung des Radiolabels in einer Fluorethoxy-Einheit ebenfalls in Position 3 des Phenylrings in Betracht gezogen. Zusätzlich wurde die Bandbreite neuer Derivate über verschiedene Heterozyklen, die über den Thioether-Linker eingeführt wurden, erweitert.

3.3.1 Synthese potentieller Referenzverbindungen

In Anlehnung an die Literatur^{236,201} wurden fünf fluorierte Referenzsubstanzen basierend auf einer 3,5-Dicarbonitril-4-phenylpyridin-Leitstruktur synthetisiert. Im ersten Schritt wurde das entsprechende Aldehyd, 3-(2-Fluorethoxy)benzaldehyd **20** hergestellt. Dazu wurde 3-Hydroxybenzaldehyd mit 1-Brom-2-fluorethanol unter Zugabe von Cäsiumcarbonat in einer Ausbeute von 90% verethert. 3-Fluorbenzaldehyd wurde käuflich erworben. Die Dicarbonitril-Funktion wurde in einer Knoevenagel Kondensation mit Malonsäuredinitril in Gegenwart katalytischer Mengen Piperidin in Ausbeuten von 59% für (Z)-3-(3-Fluorphenyl)-2-methylacrylnitril **21** und 58% für (Z)-3-[3-(2-Fluorethoxy)phenyl]-2-methylacrylnitril **22** eingeführt. Anschließend wurde der Pyridin-Ring in einer Multi-Komponenten-Reaktion aufgebaut, indem die Dicarbonitril-Verbindung mit Malonsäuredinitril und Thiophenol unter basischen Bedingungen (Triethylamin) reagierten. 2-Amino-4-(3-fluorphenyl)-6-(phenylthio)pyridin-3,5-dicarbonitril **23** konnte in 29%, 2-Amino-4-[3-(2-fluorethoxy)phenyl]-6-(phenylthio)pyridin-3,5-dicarbonitrile **24** in 37% Ausbeute hergestellt werden. Im nächsten Syntheseschritt konnte der Thioether mit Hilfe von Natriumsulfid quantitativ gespalten werden und lieferte die beiden Zwischenprodukte 2-Amino-4-(3-fluorphenyl)-6-mercaptopyridin-3,5-dicarbonitril **25** und 2-Amino-4-[3-(2-fluorethoxy)phenyl]-6-mercaptopyridin-3,5-dicarbonitril **26**.

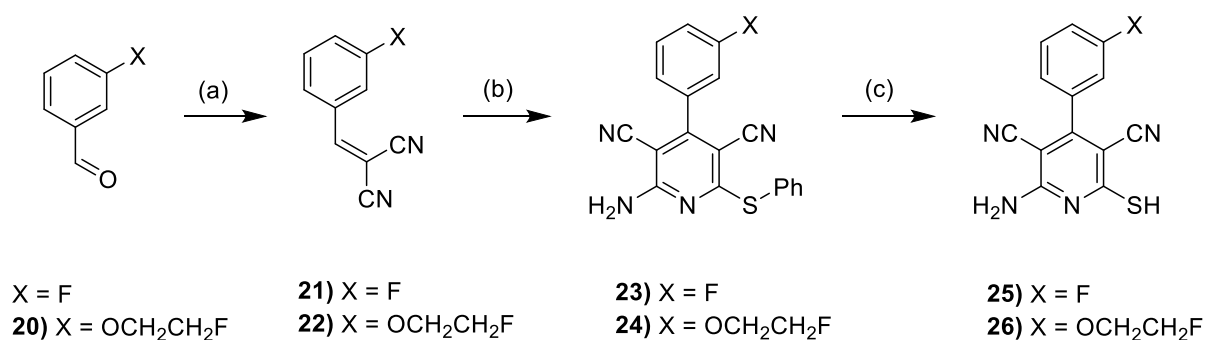


Abbildung 44. Aufbau des 3,5-Dicarbonitril-4-phenylpyridin Gerüsts für die Referenzverbindungen. Reaktionsbedingungen: a) Malonsäuredinitril, Piperidin, EtOH, RT, 2h, b) Malonsäuredinitril, Thiophenol, TEA, EtOH, Rückfluss, 5h, c) Na_2S , DMF, 80 °C

Die Derivatisierung mit isomeren Pyridin-Einheiten erfolgte über eine S-Alkylierung mit Natriumhydrogencarbonat als Hilfsbase. Als Alkylierungsmittel wurden 3-(Brommethyl)-5-methylpyridin Hydrobromid, 2-(Brommethyl)-6-methylpyridin Hydrobromid und 4-(Chlormethyl)-3-methylpyridin Hydrochlorid verwendet, ihre Strukturen sind in Abbildung 40 dargestellt.

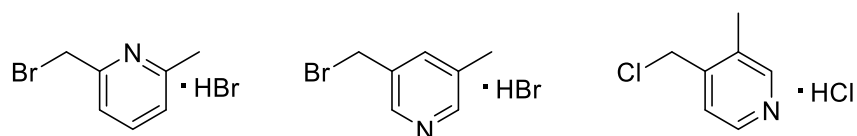


Abbildung 45. Zur Derivatisierung verwendete Pyridin-Salze

Die synthetisierten Referenzverbindungen wurden auf ihre Bindungsaffinität zu A_1AR im INM-5 (Radiotracer-Entwicklung, Forschungszentrum Jülich) überprüft. Die Kompetitionsstudien wurden an transfizierten CHO Zellhomogenaten mit $[^3H]DPCPX$ in Vierfachbestimmung durchgeführt. Die hergestellten Referenzverbindungen und ihre K_i -Werte sind in Abbildung 46 dargestellt. Verbindung **29**, 2-Amino-4-(3-fluorphenyl)-6-[[3-methylpyridin-4-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril, wurde wegen seiner schlechten Affinität als potentieller Partialagonist ausgeschlossen. Die übrigen Verbindungen zeigten alle einstellig-nanomolare Affinitäten zum A_1AR .

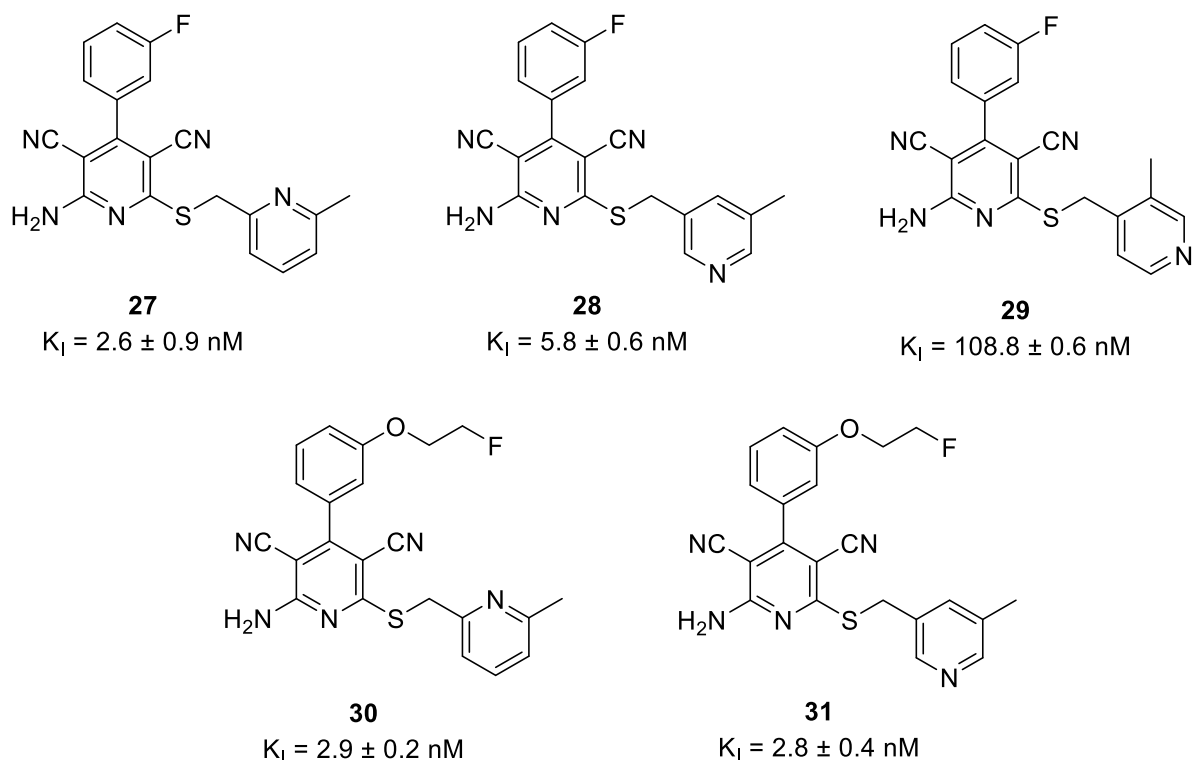


Abbildung 46. Potenzielle A₁AR Partialagonisten und ihre Bindungsaffinitäten

Die potenziellen A₁AR Partialagonisten wurden nach Abkürzungen ihrer Struktur benannt; Verbindung **27** als FMPD (2-Amino-4-(3-fluorphenyl)-6-[[[(6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril), **28** mit der isomeren Pyridin-Einheit als *iso*-FMPD, Verbindung **30** als FEMPD (2-Amino-4-[3-(fluorethoxy)phenyl]-6-[[[(6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril) und Verbindung **31** als *iso*-FEMPD.

3.3.2 Markierungsvorläufersynthese

Für die Einführung des Fluor-18 in den Phenylring über eine Kupfer-vermittelte Radiofluorierung sind Abgangsgruppen wie die Trimethylstannylfunktion oder Boronsäurepinakolester sehr gut geeignet. Zu diesem Zweck wurden die Vorläufer für Verbindung **27** und **28** ausgehend von 3-Brombenzaldehyd synthetisiert. Die konventionelle Radiofluorierung nach dem S_N2-Mechanismus mit K₂₂₂/K₂CO₃ benötigt Nukleofuge wie Toluolsulfonat (Tosylat)- oder Methansulfonat (Mesyl) Abgangsgruppen, die über die Veresterung von Alkoholen eingeführt werden können. Die Synthese der Vorläufer für Verbindungen **30** und **31** begann mit der Veretherung von 3-Hydroxybenzaldehyd mit 2-Bromethanol

und Cäsiumcarbonat und lieferte 3-(2-Hydroxyethoxy)benzaldehyd **32** in guter Ausbeute. Die folgenden Schritte erfolgten analog zur Synthese der Referenzverbindungen. Die Einführung der Dicarbonitril-Einheit erfolgte über eine Knoevenagel-Kondensation und lieferte 2-(3-Brombenzyliden)malonsäuredinitril **33** in 96%, 2-[3-(2-Hydroxyethoxy)benzylidene]malonsäuredinitril **34** in 30% Ausbeute. Die Verbindungen **21**, **22** und **33** fielen während der Synthese als Feststoff aus und konnten nach der Filtration für die Folgereaktion eingesetzt werden, Verbindung **34** jedoch konnte nicht direkt als Feststoff isoliert werden. Vermutlich veränderte die Hydroxygruppe die Löslichkeit, deswegen wurden verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Lösungsmitteln (MeOH/H₂O, EtOH) bzw. Temperaturen (Raumtemperatur, Rückfluss, Kühlschrank) evaluiert, Versuche das Produkt auszukristallisieren blieben erfolglos. Durch säulenchromatographische Trennung wurde schließlich das Produkt isoliert. Der Aufbau des Pyridinrings über eine Multi-Komponenten-Reaktion mit Malonsäuredinitril und Thiophenol in Gegenwart von Triethylamin lieferte die Zwischenprodukte 2-Amino-4-(3-bromphenyl)-6-(phenylthio)pyridin-3,5-dicarbonitril **35** und 2-Amino-4-[3-(2-hydroxyethoxy)phenyl]-6-(phenylthio)pyridin-3,5-dicarbonitril **36** in Ausbeuten von 32% und 68%. Die Thioetherspaltung mit Natriumsulfid konnte quantitativ durchgeführt werden und lieferte 2-Amino-4-(3-bromphenyl)-6-mercaptopyridin-3,5-dicarbonitril **37** und 2-Amino-4-[3-(2-hydroxyethoxy)phenyl]-6-mercaptopyridin-3,5-dicarbonitril **38**.

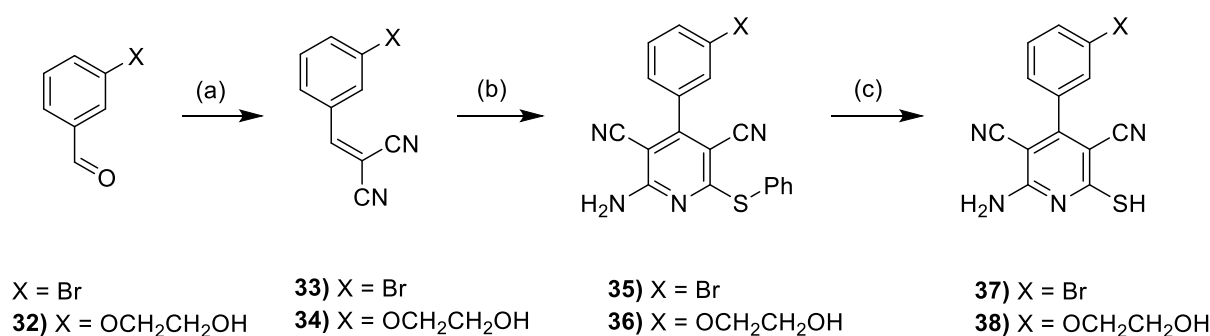


Abbildung 47. Aufbau des 3,5-Dicarbonitril-4-phenylpyridin Gerüsts der Markierungsvorläufer. Reaktionsbedingungen: a) Malonsäuredinitril, Piperidin, EtOH, RT, 2h, b) Malonsäuredinitril, Thiophenol, TEA, EtOH, Rückfluss, 5h, c) Na₂S, DMF, 80 °C

Mit einer S-Alkylierungsreaktion wurden die isomeren (2,6- und 3,5-substituierten) Pyridin-Einheiten eingeführt. Vor der Einführung der Trimethylstannylfunktion in 2-Amino-4-(3-bromphenyl)-6-[(6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio}pyridin-3,5-dicarbonitril **39** und 2-Amino-4-(3-bromphenyl)-6-[(5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio}pyridin-3,5-dicarbonitril **40**, wurde zunächst die Aminogruppe mit einer Formamidin-Schutzgruppe geschützt. Dazu wurde Dimethylformamid-Dimethylacetal in DMF

verwendet, was eine vollständige Umsetzung zum *N,N*-Dimethylformamidin-Derivat ergab. Die nachfolgende Stannylierung wurde mit Hexamethyldizinn, Tetrakis(triphenylphosphin)Palladium und katalytischen Mengen Lithiumchlorid durchgeführt und lieferte den Vorläufer (*E*)-*N'*-(3,5-Dicyano-6-[[[(6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]-4-[3-(trimethylstannyl)phenyl]pyridin-2-yl)-*N,N*-dimethylformimidamid **43** in 60% und den Vorläufer (*E*)-*N'*-(3,5-Dicyano-6-[[[(5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]-4-[3-(trimethylstannyl)phenyl]pyridin-2-yl)-*N,N*-dimethylformimidamid **44** in 51% Ausbeute. Die Alkohole 2-Amino-4-[3-(2-hydroxyethoxy)phenyl]-6-[[[(6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril **41** und 2-Amino-4-[3-(2-hydroxyethoxy)phenyl]-6-[[[(5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril **42** wurden ohne vorherige Schützung der Aminogruppe umgesetzt. Die Mesyl-Abgangsgruppe wurde über die Reaktion von Methansulfonylchlorid und Triethylamin eingeführt und lieferte die Vorläufer 2-[3-(2-Amino-3,5-dicyano-6-[[[(6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-4-yl)phenoxy]ethyl methansulfonat **45** und 2-[3-(2-Amino-3,5-dicyano-6-[[[(5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]pyridin-4-yl)phenoxy]ethyl methansulfonat **46** in quantitativen Ausbeuten.

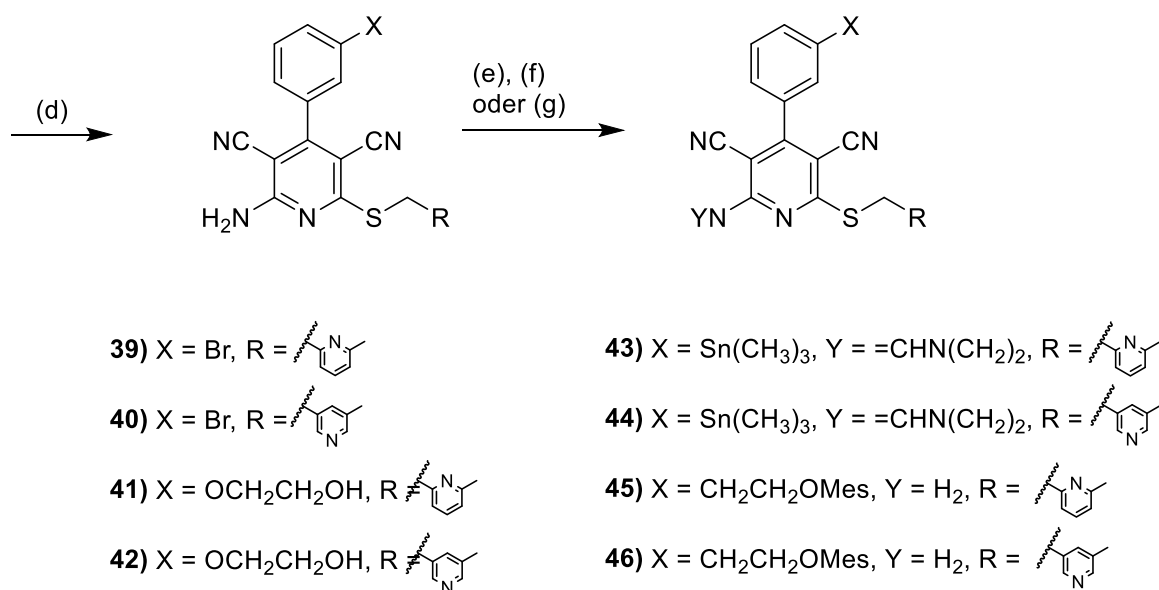


Abbildung 48. Vorläufersynthese für Radiofluorierung von A₁AR Partialagonisten. Reaktionsbedingungen: d) NaHCO₃, 3,5-Substituiertes Pyridin oder 2,6-substituiertes Pyridin, DMF, RT, 5h, e) DMF–DMA in DMF, 50 °C, 2h, f) Sn₂Me₆, (PPh₃)Pd, LiCl, Toluol, 90 °C, 2h, g) Ms-Cl, TEA, DCM, 0 °C, 3h

3.3.3 Radiosynthese von [^{18}F]FMPD und *iso*-[^{18}F]FMPD

Die Radiomarkierung der geschützten Trimethylstannylvorläufer **43** und **44** wurde nach einem modifizierten Protokoll der Alkohol-verstärkten Kupfer-vermittelten Radiofluorierung^{75,73} durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde [^{18}F]Fluorid in angereichertem ^{18}O -Wasser auf einer Anionenaustauscher Kartusche (QMA) fixiert und mit Methanol zur Entfernung von Wasserresten gewaschen. Anschließend wurde die Kartusche mit Luft getrocknet. $^{18}\text{F}^-$ wurde schließlich mit einer Lösung aus Tetraethylammoniumtriflat in Methanol in ein leeres Reaktionsgefäß (V-Vial) eluiert. Die Elutionsraten waren stets hoch (>98%). Methanol wurde unter vermindertem Druck entfernt und eine Lösung aus Vorläufer (**43** oder **44**) und Kupfermediator $\text{Cu}(\text{4-Phenylpyridin})_4(\text{ClO}_4)_2$ in DMA wurde hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde 10 Minuten bei 110 °C gerührt, anschließend wurde die Formamidin-Schutzgruppe durch Zugabe von Ammoniumhydroxid bei 110°C und weiteren 10 Minuten abgespalten. Bevor die abgekühlte Reaktionslösung über die semi-präparative HPLC gereinigt wurde, musste sie mit Salzsäure neutralisiert werden.

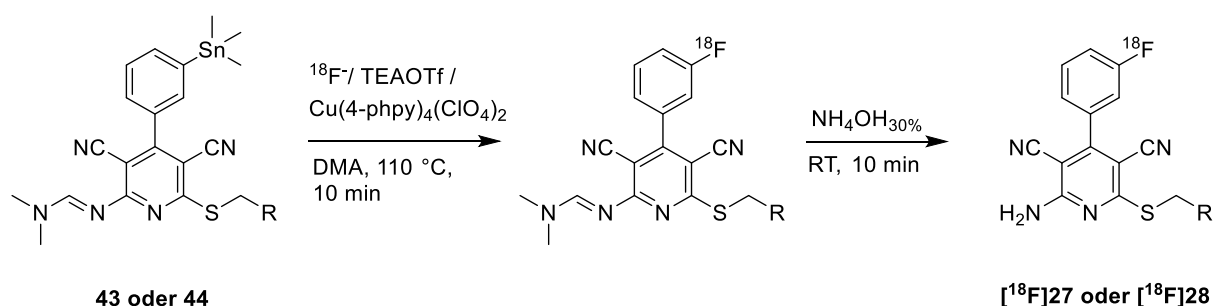


Abbildung 49. Herstellung von [^{18}F]FMPD und *iso*-[^{18}F]FMPD

[^{18}F]**27** konnte mit einer radiochemischen Ausbeute von 19 ± 3 ($n=3$) und einer radiochemischen Reinheit von >99% hergestellt werden. Die radiochemische Ausbeute von [^{18}F]**28** betrug $8 \pm 1\%$, die radiochemische Reinheit 97% ($n=2$). Die erzielten molaren Aktivitäten betrugen für [^{18}F]**27** $30 \pm 9\%$ GBq/ μmol (24–112 MBq, Ende der Synthese) und für [^{18}F]**28** 1.2–4 GBq/ μmol (5–20 MBq, Ende der Synthese). Die Identifikation der Produkte erfolgte mittels HPLC und Co-Injektion der nicht-radioaktiven Referenzsubstanzen **27** und **28**, die Chromatogramme sind in Kapitel 4 zu finden.

3.3.4 Radiosynthese von [^{18}F]FEMPD und *iso*-[^{18}F]FEMPD

Die Methansulfonylvorläufer **45** und **46** wurden nach dem konventionellen Radiomarkierungsprotokoll für die Herstellung von [^{18}F]CPFPX¹⁹⁰ markiert. Dafür wurde in einem Reaktor Kryptofix₂₂₂ und Kaliumcarbonat vorgelegt, welches dann mit [^{18}F]Fluorid in angereichertem ^{18}O -Wasser versetzt wurde. Nach mehrmaliger azeotroper Trocknung mittels Acetonitrils unter vermindertem Druck konnten Wasserreste vollständig entfernt werden. Durch die Zugabe des Markierungsvorläufers **45** oder **46** in Acetonitril wurde die Radiosynthese bei 90 °C für 20 Minuten ausgeführt. Die Radiosynthesebindungen wurden umfangreich auf Vorläufermenge, Lösungsmittel, Temperatur, Reaktionszeit und der zugefügten Base optimiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8. Optimierung der Radiosynthese von [^{18}F]FEMPD

Eintrag	Vorläufermenge [μmol]	Lösungsmittel [1000 μL]	Base [24 $\mu\text{mol}/$ 12 μmol]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	RCU [%]*
1	6.8	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	100	10	47
2	6.8	DMSO	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	100	10	<1
3	6.8	DMA	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	100	10	<1
4	3.4	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	100	10	39
5	1.7	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	100	10	30
6	0.85	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	100	5	12
7	0.85	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	100	10	40
8	0.85	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	100	15	33
9	0.85	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	100	20	10
10	0.85	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	120	5	40
11	0.85	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	120	10	36
12	0.85	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	120	15	17
13	0.85	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	90	5	20
14	0.85	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	90	10	32
15	0.85	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	90	15	38
16	0.85	MeCN	K _{2.2.2.} /K ₂ CO ₃	90	20	43
17	0.85	MeCN	Et ₄ NHCO ₃ ^a	100	10	14

*In Tabelle 8 angegebenen radiochemischen Umsätze wurden über die zweimalige Injektion jeweils derselben Reaktionslösungsmenge vor und hinter der Säule bestimmt.

Für die Radiofluorierung wurde künftig eine Vorläufermenge von 0.85 μmol , in Acetonitril bei 90 °C für 20 min verwendet (Tabelle 8, Eintrag 16).

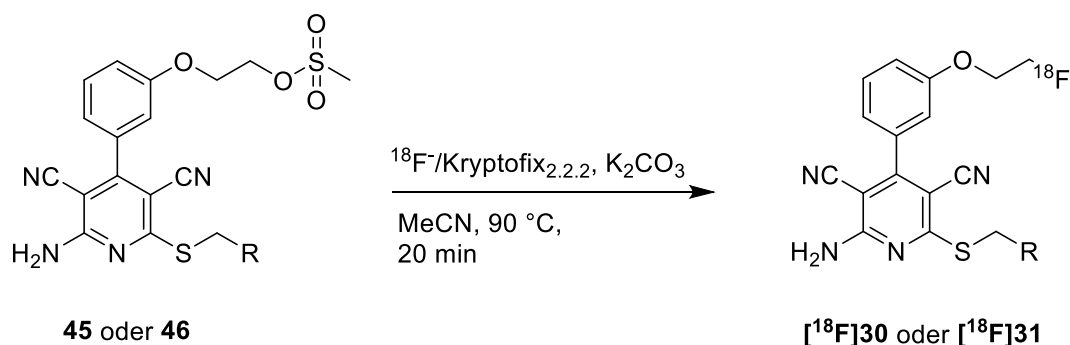


Abbildung 50. Herstellung von [¹⁸F]FEMPD und *iso*-[¹⁸F]FEMPD

Nach Beendigung der Radiosynthese wurde die abgekühlte Reaktionslösung über die semi-präparative HPLC gereinigt. [¹⁸F]**30** konnte mit einer radiochemischen Ausbeute von $56 \pm 22\%$ und einer radiochemischen Reinheit >99% hergestellt werden (n=3). Der isoforme Radiotracer [¹⁸F]**31** wurde in radiochemischen Ausbeuten von $28 \pm 1\%$ und einer radiochemischen Reinheit >99% synthetisiert (n=2). Die molaren Aktivitäten betrugen dabei $60 \pm 12 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ (106–944 MBq, Ende der Synthese) und $14.6 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ (64 MBq, Ende der Synthese). Die Identifikation der Produkte erfolgte mittels HPLC und Co-Injektion der nicht-radioaktiven Referenzsubstanzen **30** und **31**, die Chromatogramme sind in Kapitel 4 zu finden.

3.3.5 Herstellung von [¹¹C]MMPD

Zusätzlich zu den potentiellen, radiofluorierten Partialagonisten wurde auch die Verbindung MMPD²⁰¹ hergestellt, da bisher keine *in vitro* Autoradiographien dieser Verbindung veröffentlicht wurden. Dazu wurde zunächst die Referenzverbindung und der Vorläufer beginnend mit 3-Methoxybenzaldehyd in Anlehnung an die Literatur²⁰¹ synthetisiert.

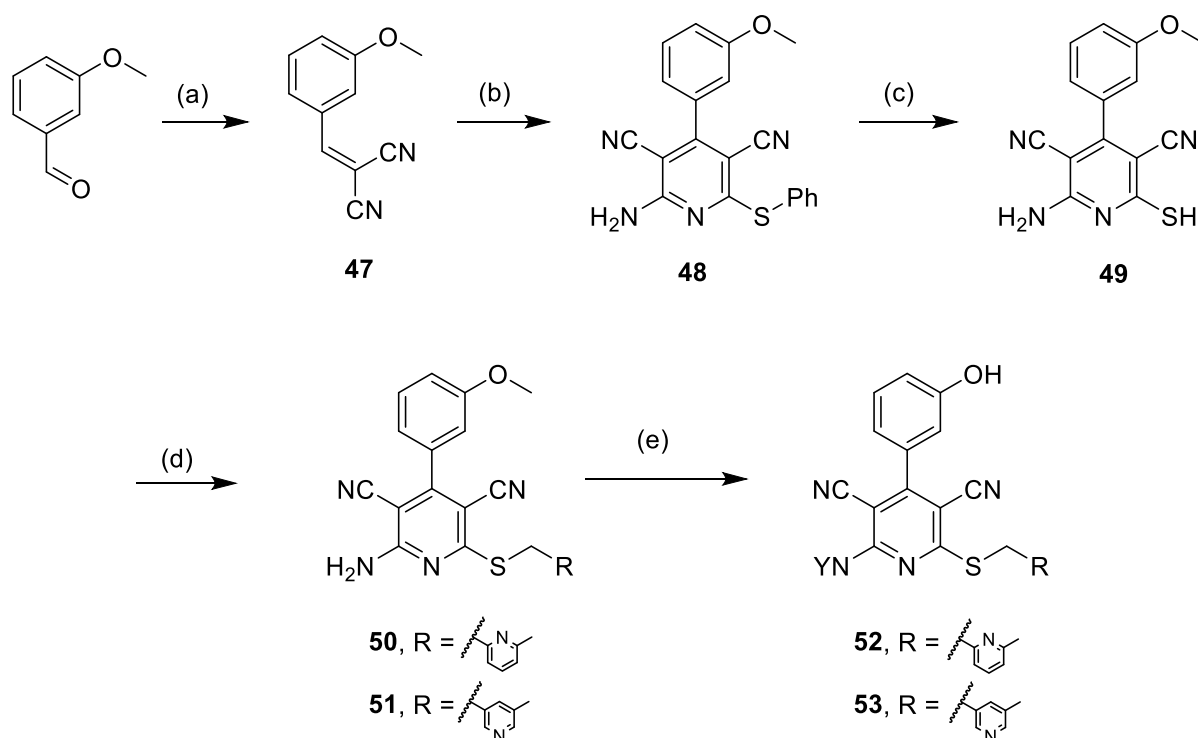
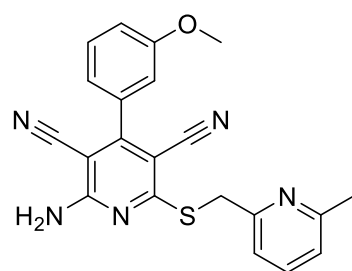


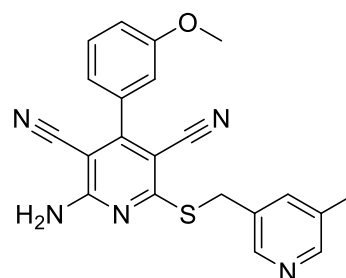
Abbildung 51. Synthese der Referenzsubstanz und des Markierungsvorläufers für die Herstellung von [^{11}C]MMPD. Reaktionsbedingungen: a) Malonsäuredinitril, Piperidin, EtOH, RT, 2h, b) Malonsäuredinitril, Thiophenol, TEA, EtOH, Rückfluss, 5h, c) Na_2S , DMF, 80 °C d) NaHCO_3 , 3,5-substituiertes Pyridin oder 2,6-substituiertes Pyridin, DMF, RT, 5h, e) BBr_3 , DCM, 0 °C $\rightarrow$ RT, 24h.

Die Einführung der Dicarbonitrilgruppe erfolgte mit 95% Ausbeute und ergab 2-(3-Methoxybenzyliden)malonsäuredinitril **47**. Anschließende Multi-Komponenten-Reaktion lieferte 2-Amino-4-(3-methoxyphenyl)-6-(phenylthio)pyridin-3,5-dicarbonitril **48** mit 34% Ausbeute. Der Thioether ließ sich quantitative abspalten und lieferte Verbindung **49**. S-Alkylierung mit den 2,6- und 3,5-substituierten Pyridinen lieferte die Referenzverbindungen 2-Amino-4-(3-methoxyphenyl)-6-[[6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril **50** und 2-Amino-4-(3-methoxyphenyl)-6-[[5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril **51** in 83% und 80% Ausbeute. Die Markierungsvorläufer 2-Amino-4-(3-hydroxyphenyl)-6-[[6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril **52** und 2-Amino-4-(3-hydroxyphenyl)-6-[[5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril **53** erhielt man durch Etherspaltung mit Bortribromid in 60% und 55% Ausbeute. Vorläufer **52** wurde im INM-4 (Forschungszentrum, Jülich) ^{11}C -methyliert.

Die Referenzsubstanzen **50** und **51** wurden auf ihre Bindungsaffinität im INM-5 (Nuklearchemie, Radiotracer-Entwicklung, Forschungszentrum Jülich) untersucht.



50, MMPD
 $K_i = 2.3 \pm 0.4$ nM



51, iso-MMPD
 $K_i = 1.6 \pm 0.4$ nM

Abbildung 52. Bindungsaffinitäten der Verbindungen **50** und **51** zu A_1AR , bestimmt mittels Kompetitionsassays an transfizierten CHO-Zellhomogenaten mit [3H]DPCPX in Vierfachbestimmung.

Die Herstellung von [^{11}C]MMPD erfolgte im INM-4 (Forschungszentrum Jülich) und wurde in Anlehnung an die Literatur²⁰¹ durchgeführt. Der C-11 markierte Radiotracer konnte in einer radiochemischen Ausbeute von $20 \pm 5\%$ und einer radiochemischen Reinheit von $>95\%$ hergestellt werden ($n=2$). Die Identität und Reinheit des Radiotracers wurde in der Qualitätskontrolle des INM-5 (Radiopharmakaservice, Forschungszentrum Jülich) bestimmt. Die erzielten molaren Aktivitäten lagen bei 28 ± 6 GBq/ μmol (Ende der Synthese, $n=2$).

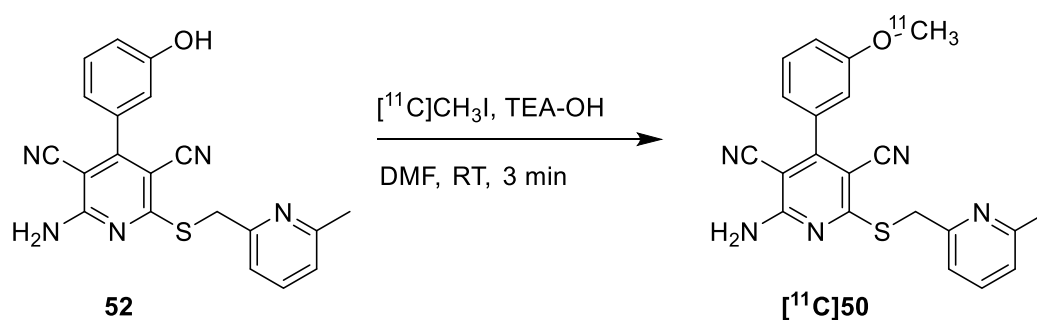


Abbildung 53. Radiomarkierung von [^{11}C]MMPD

Die Ergebnisse der Radiosynthesen, wie die erzielten radiochemischen Ausbeuten, die radiochemischen Reinheiten und die ermittelten molaren Aktivitäten sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9. Ergebnisse der Radiosynthesen

Radioligand	Radiochemische Ausbeute [%]	Radiochemische Reinheit [%]	Molare Aktivität [GBq/ μmol]
[^{18}F]FMPD	19.3 ± 2.6 ($n=3$)	> 99	19 – 40
iso-[^{18}F]FMPD	7.9 ± 0.9 ($n=2$)	97	1.2 – 4.0
[^{18}F]FEMPD	56 ± 22 ($n=3$)	> 99	24 – 64
iso-[^{18}F]FEMPD	27.9 ± 1.3 ($n=2$)	> 99	14.6
[^{11}C]MMPD	20 ± 5 ($n=2$)	95	22 – 33

3.3.6 *In vitro* Beurteilung der radiomarkierten Partialagonisten

Die Lipophilie ist vor allem für Neurotracer eine wichtige Größe. Wenn der Tracer nicht über einen Transporter ins Gehirn gelangt, muss er eine gewisse Lipophilie besitzen, um über freie Diffusion die BHS passieren zu können. Ideale $\text{Log}P$ Werte liegen im Bereich zwischen 2–4¹¹⁴.

Der $\text{Log}D_{7.4}$ Wert wurde für die neuen, radiofluorierten Partialagonisten über die Schüttelmethode²³⁷ mit *n*-Octanol/PBS-Puffer-Gemischen (pH = 7.4) bestimmt. Die erhaltenen $\text{Log}D_{7.4}$ Werte für [¹⁸F]**27**, [¹⁸F]**28**, [¹⁸F]**30** und [¹⁸F]**31** lagen alle im optimalen Bereich für die Penetration der BHS und sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10. Ermittelte $\text{Log}D_{7.4}$ - und berechnete $\text{cLog}P$ -Werte für [¹⁸F]**47**–[¹⁸F]**50**

	$\text{Log}D_{7.4}$	$\text{cLog}P^*$
[¹⁸ F] 27	3.38±0.08	3.31
[¹⁸ F] 28	2.59±0.06	3.31
[¹⁸ F] 30	3.14±0.07	3.43
[¹⁸ F] 31	3.04±0.05	3.43

*Berechnet über ChemDraw-Software

Die markierten Radioliganden [¹⁸F]**27**–[¹⁸F]**31** und [¹¹C]**50** wurden mittels *in vitro* Autoradiographien an Rattenhirnschnitten auf ihr Verteilungsmuster untersucht. Dafür wurden in den Experimenten 5 kBq/mL Radioligand zur Bestimmung der Totalbindung, und jeweils 5 kBq/mL Radioligand und nicht-radioaktiver Kompetitor eingesetzt. Als Kompetitoren in Verdrängungsexperimenten dienten die Referenzverbindungen **27**, **28**, **30**, **31** und **50** [1 µM], der AR Antagonist DPCPX [1 µM] und der AR Agonist NECA [10 µM]. Die Autoradiographien sind in einer Tabelle (Kapitel 6, Anhang) zusammengestellt.

Es wurde für alle hergestellten radiomarkierten Partialagonisten eine nahezu ubiquitäre Totalbindung beobachtet. Dieses Muster stimmt prinzipiell mit der Verteilung von A₁AR im Gehirn überein. Eine erhöhte Anreicherung im Kleinhirn, die auch schon in Autoradiogrammen mit A₁AR-Antagonisten zu sehen war und typisch für die A₁AR Verteilung bei Ratten ist, war ersichtlich¹⁷⁶.

Die Verdrängungsstudien zeigten eine homogene Abnahme der Radioliganden-Konzentration im gesamten Gehirn auf. Mit DPCPX konnte eine erhebliche Menge der Bindung des Radioliganden verdrängt werden. Die spezifischen Bindungen wurden für das gesamte Gehirn bestimmt, wobei [^{18}F]FEMPD die höchste spezifische Bindung von 40.7% für die Verdrängung mit DPCPX und 33% für die Verdrängung mit NECA aufwies und aus diesem Grund für weitere präklinische Experimente ausgewählt wurde. Die berechneten spezifischen Bindungen sind in einer Tabelle im Anhang (siehe Kapitel 6) zusammengefasst.

3.3.7 *In vivo* Beurteilung von [^{18}F]FEMPD

Die Formulierung der Radiotracer-Lösung wurde mittels Festphasenextraktion durchgeführt. Der Peak-Schnitt in HPLC-Elutionsmittel wurde mit 50 mL dest. Wasser verdünnt. Anschließend wurde diese Lösung über eine Sep-Pak[®] C18 Plus Light Kartusche eluiert, wobei >99% der Aktivität fixiert werden konnte. Die Elution des fixierten Tracers in ein leeres Reaktionsgefäß erfolgte mit 500 μL Ethanol. Dieses wurde im folgenden Schritt unter vermindertem Druck, bei 40 °C fast vollständig entfernt. Beim Versuch, [^{18}F]FEMPD in 500 μL PBS-Puffer aufzunehmen blieben 88% der Aktivität im Reaktionsgefäß zurück. Durch die Verwendung des Polysorbats Tween 60 (1% in PBS-Lösung) konnte der Radiotracer jedoch vollständig in Lösung gebracht werden. [^{18}F]FEMPD konnte dem INM-4 (Institut für Neurowissenschaften und Medizin, Physik der Medizinischen Bildgebung, Forschungszentrum Jülich) für präklinische Studien an Ratten zur Verfügung gestellt werden.

Im *in vivo* PET Experiment an einer gesunden Ratte wurde die Penetration der Bluthirnschranke beobachtet. Die Akkumulation von [^{18}F]FEMPD ist in Übereinstimmung mit dem bekannten Verteilungsmuster von A_1AR im Gehirn¹⁷⁶. Erhöhte Konzentrationen wurden im Thalamus, Hippocampus und Kleinhirn ermittelt. Der Radioligand zeigte eine Stabilität von bis zu 1 Stunde (siehe Diagramm 2).

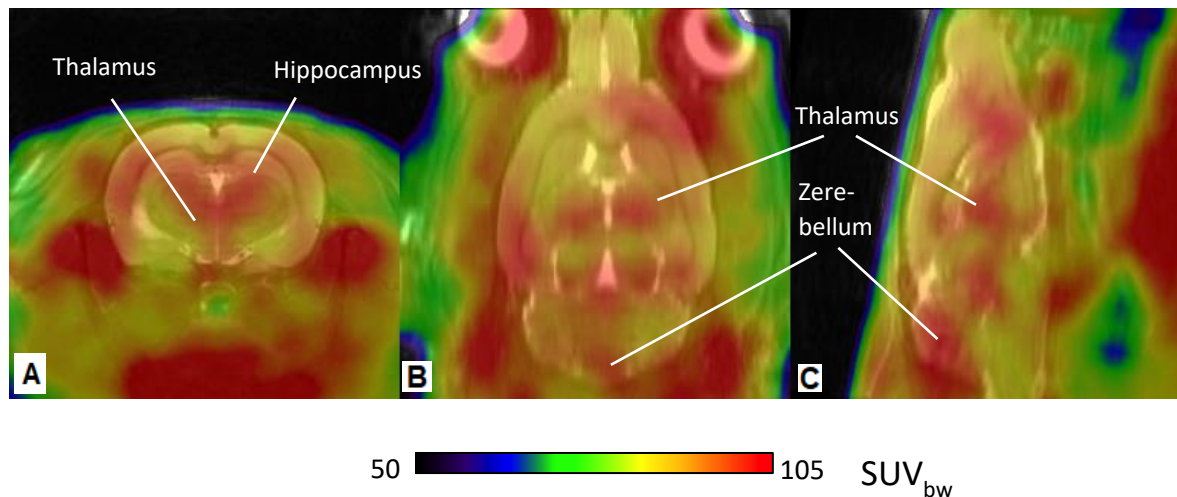


Abbildung 54. PET-Studie mit $[^{18}\text{F}]\text{FEMPD}$ an der gesunden Ratte. μPET Bilder (Summe von 15–60 Minuten Messungen) (A) des Gehirns in der coronalen Ebene, (B) des Gehirns in der horizontalen Ebene und (C) des Gehirns in der sagittalen Ebene. PET-Bilder bearbeitet und zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Heike Endepols, Institut für Radiochemie und Molekulare Bildgebung, Universitätsklinikum Köln.

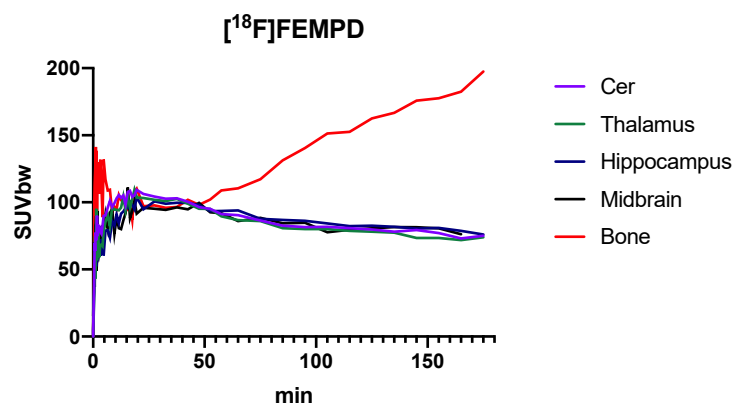


Diagramm 3. Quantitative Aufnahme von $[^{18}\text{F}]\text{FEMPD}$ über den Zeitraum 0–180 Minuten nach Injektion in verschiedenen Geweben. Abkürzungen: Cer: Zerebellum/Kleinhirn; Bone (englisch: Knochen). Auswertung zur Verfügung gestellt von Prof. Endepols, Molekulare Bildgebung, UK Köln.

Zusammenfassend konnten vier radiofluorierte Partialagonisten mit einer nanomolaren Affinität zum A_1AR hergestellt werden. Die ermittelten Lipophilien der Radioliganden von 2.6–3.4 ($\text{Log}D_{7.4}$) bei physiologischen pH-Wert befinden sich im optimalen Bereich zur Penetration der BHS. Die Radiomarkierungen mittels Kupfer-vermittelter Alkohol-unterstützter oder der konventioneller Radiofluorierung ermöglichten die Herstellung dieser Radioliganden in guten radiochemischen

Ausbeuten, sehr guten radiochemischen Reinheiten und angemessenen molaren Aktivitäten. Ergebnisse der *in vitro* Autoradiographien an Rattenhirnschnitten und der kompetitiven Verdrängungsexperimente mit einem Agonisten (NECA) und einem Antagonisten (CPFPX) zeigten, dass die Radioliganden eine spezifische Bindung zum A₁AR aufweisen. Abschließend wurde der Kandidat mit der besten spezifischen Bindung, [¹⁸F]FEMPD, ausgewählt und *in vivo* evaluiert. Das PET-Experiment wurde an einer gesunden Ratte durchgeführt und zeigte, dass mit diesem Radioliganden das gewünschte Verteilungsmuster des A₁AR visualisiert werden konnte und der Radioligand für mindestens eine Stunde stabil war. Eine neue vielversprechende Klasse an Radioliganden, radiofluorierte Partialagonisten zur Bildgebung des A₁AR mittels PET, wurde entwickelt und erfolgreich *in vitro* und *in vivo* evaluiert.

4. Materialien und Methoden

4.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

Alle Reaktionen wurden, soweit nicht anders angegeben, unter magnetischem Rühren und unter Argonatmosphäre durchgeführt.

4.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen erworben: Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland), Merck (Taufkirchen, Deutschland), Activate Scientific (Prien, Deutschland), ABCR (Karlsruhe, Deutschland) und Tocris (Bristol, Vereinigtes Königreich) und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Lösungsmittel in ausreichender Reinheit wurden von VWR (Langenfeld, Deutschland) oder Sigma Aldrich bezogen. Wasserfreie Lösungsmittel für Radiosynthesen wurden bei Acros oder Sigma Aldrich (Darmstadt, Deutschland) erworben.

4.1.2 Reinigung

Die Reinigung der synthetisierten Verbindungen erfolgte mittels Flash Chromatographie an einem Grace Reveleris® iES Flash Chromatographie System, ausgestattet mit einer RevealX™ Detektion, welches durch Multisignaldetektion (UV/ELSD) die Sammlung der Fraktionen ermöglicht. Als stationäre Phasen wurden Reveleris® Flash Silica Kartuschen unterschiedlicher Partikelgrößen verwendet (verschiedene Größen; 12 µm, 24 µm, 40 µm oder 80 µm). Die mobilen Phasen sind für die jeweiligen Verbindungen in den Synthesevorschriften angegeben.

4.1.3 Charakterisierung

Dünnschichtchromatographische Analysen (DC) wurden bei allen Reaktionen für die Verfolgung des Reaktionsverlaufs und zur Überprüfung der Reinheit erhaltener Produkte eingesetzt. Als stationäre Phase wurden Silica beschichtete DC Aluminium Platten mit einem Fluoreszenzindikator (SIL ALUGRAM G/UV254, Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland) oder Reversed-Phase DC Platten (Kieselgel 60 RP-18 F₂₅₄, Merck, Deutschland) eingesetzt. Das Laufmittel wurde so gewählt, dass der R_F-Wert der Verbindungen im Bereich von 0.2 bis 0.8 lag. Die Auswertung wurde mittels einer UV-Lampe (256 nm) oder durch Anfärbung mit einer Permanganat- oder Ninhydrin-Lösung durchgeführt.

Schmelzpunkte (Smp.) wurden an einem vollautomatischen Melting Point B-540 Instrument (Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland) in offenen Glaskapillaren gemessen und sind unkorrigiert.

NMR Spektroskopie: ^1H , ^{13}C und ^{19}F NMR Spektren wurden bei 400.13, 100.61 und 376.49 MHz an einem Bruker Avance Neo 400 Gerät (Bruker Bio Spin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) in 5% Lösung bei 299 K aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in parts per million (ppm) angegeben. Als interne Referenz dienten die residualen. ^1H NMR Spektren werden folgendermaßen angegeben: δ / ppm (Anzahl der Protonen, Multiplizität, Kopplungskonstante J in Hertz (Hz)). Folgende Abkürzungen und ihre Kombination werden für die Beschreibung der NMR Daten verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br s = breites Singulett („broad“ singlet). Alle ^{13}C - und ^{19}F -NMR-Spektren wurden unter 1H-Breitbandentkopplung (CPD) aufgenommen.

Die Benennung der Verbindungen erfolgte über ChemBioDrawTM (CambridgeSoft) und folgt der IUPAC Nomenklatur.

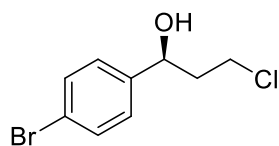
Massenspektren mit niedriger Auflösung wurden durch Elektrosprayionisation (ESI) mit einem Thermo Finnigan Surveyor Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) erhalten und werden in m/z-Werten des Pseudo-Ions $[\text{M} + \text{H}]^+$ angegeben.

Hochaufgelöste Massenspektren wurden mit einer LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Deutschland) in der Universität zu Köln gemessen.

Die Bestimmung der Enantiomerenreinheit chiraler Substanzen mittels analytischer HPLC erfolgte mit einem Dionex Ultimate[®] 3000 HPLC System, bestehend aus einem DAD UV-Detektor in Serie geschaltet mit einem Berthold NaI Radioaktivitätsdetektor zur Verfolgung der Absorption bei 254 nm und der Radioaktivität. Folgende chirale analytische HPLC Säulen wurden eingesetzt:

- Lux Cellulose-1 column (4,6 x 250 mm, 5 μm , Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
- Chiralpak-AD column (4,6 x 250 mm, 10 μm , Daicelchiral, Tokyo, Japan)

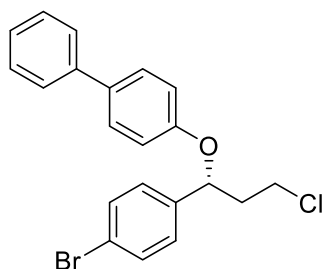
4.2 Organische Synthesen

Synthese von (S)-1-(4-Bromphenyl)-3-chlorpropan-1-ol²⁰⁸ (1)

Eine Suspension von $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (90 mg, 0.45 mmol) und (S)-P-Phos (95 mg, 0.15 mmol) in Toluol (10 mL) wurde 20 Minuten gerührt.

Anschließend wurde eine Lösung aus Phenylsilan (2.22 mL, 1.9 g, 18 mmol) in Toluol (1 mL) hinzugefügt und die Reaktionslösung auf -20°C gekühlt. Eine Lösung aus 4'-Brom-3-chloropropiophenon (3.72 g, 15 mmol) in Toluol (5 mL) wurde unter kräftigem Rühren hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde bei -20°C für 24 h gerührt. Nach Beendigung der Reduktion (DC Kontrolle) wurde das Reaktionsgemisch mit 10% HCl in H_2O (20 mL) verdünnt und mit Et_2O (3×30 mL) extrahiert. Die organische Fraktion wurde über Na_2SO_4 getrocknet, über Silica Gel filtriert und vom Lösungsmittel unter vermindertem Druck befreit. Das Rohprodukt wurde mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc 9:1) gereinigt, um die Titelverbindung als farblosen Feststoff zu erhalten (2.22 g Ausbeute, 60%, Lit. 95%). Der Enantiomerenüberschuss (ee) des Produkts wurde über chirale HPLC bestimmt und betrug 96%.

$R_f = 0.34$ (PE/EtOAc 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.03 - 2.11$ (m, 2H), 2.18 – 2.26 (m, 1H), 3.57 (dt, $J = 11.1, 5.8$ Hz, 1H), 3.76 (ddd, $J = 11.1, 8.4, 4.9$ Hz, 1H), 4.95 (dd, $J = 8.4, 4.9$ Hz, 1H), 7.26–7.29 (m, 2H), 7.49 – 7.53 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 41.50, 41.64, 70.81, 121.81, 127.63, 131.89, 142.85$. Chirale HPLC: Lux[®] 5 μm Cellulose-1, 4.6×250 mm (Phenomenex); Eluens: *i*PrOH:Hexan 2:98; Flussrate: 1.0 mL/min; Detektion: UV, $\lambda = 254$ nm; t_R [(S)-1] = 25.4 min, t_R [(R)-1] = 29.9 min.

Synthese von (R)-4-[1-(4-Bromphenyl)-3-chlorpropoxyl]-1,1'-biphenyl²⁰⁹ (2)

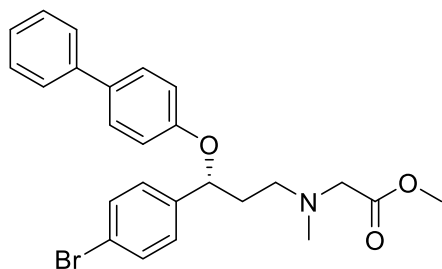
Azodicarbonsäurediisopropylester (DIAD) (1.77 mL, 1.82 g, 9 mmol) wurde langsam zu einer eiskalten Lösung von **1** (2.22 g, 9 mmol), Ph_3P (2.42 g, 9 mmol) und 4-Phenylphenol (1.53 g, 9 mmol) in trockenem THF (25 mL) hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 30°C im Ultraschallbad behandelt. Nach Beendigung der Reaktion (DC Kontrolle),

wurden alle Flüssigkeiten unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde mittels Flash Chromatographie gereinigt (1–5% EtOAc in PE). Die Titelverbindung wurde als farbloser Feststoff isoliert (2.78 g Ausbeute, 77%). Die Enantiomerenreinheit des Produkts wurde über chirale HPLC (96% ee) bestimmt.

$R_f = 0.73$ (PE/EtOAc 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.19$ (dddd, $J = 14.3, 8.7, 5.7, 4.3$ Hz, 1H), 2.46 (ddt, $J = 14.3, 8.7, 5.3$ Hz, 1H), 3.62 (dt, $J = 11.1, 5.7$ Hz, 1H), 3.82 (ddd, $J = 11.1, 8.7, 5.3$ Hz, 1H), 5.39 (dd, $J = 8.7, 4.3$ Hz, 1H), 6.96 – 6.83 (m, 2H), 7.32 – 7.26 (m, 3H), 7.46 – 7.34 (m, 4H), 7.53 – 7.46 (m,

4H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 41.24, 41.38, 76.39, 116.33, 121.93, 126.86, 127.82, 128.28, 128.83, 132.14, 134.55, 140.05, 140.74, 149.06, 157.30. Chirale HPLC: Lux[®] 5 μm Cellulose-1, 4.6 $\times$ 250 mm (Phenomenex); Eluens: *i*PrOH:Hexan 2:98; Flussrate: 1.0 mL/min; Detektion: UV, λ =254 nm; t_R [(*R*)-**2**] = 7.0 min, t_R [(*S*)-**2**] = 8.5 min.

Synthese von (*R*)-*N*-{3-[(1,1'-Biphenyl)-4-yloxy]-3-(4-bromphenyl)propyl}sarkosinmethylester (**3**)

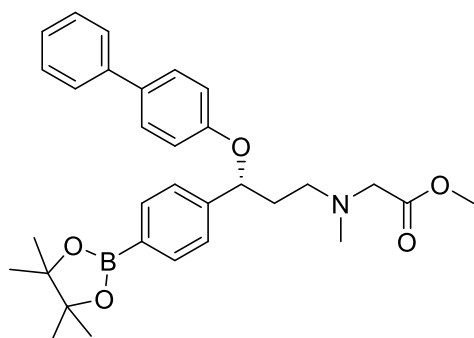


Eine Lösung von **2** (2.78 g, 6.9 mmol), Sarkosinmethylester Hydrochlorid (1.75 g, 12.5 mmol), K_2CO_3 (2.76 g, 20 mmol) und KI (330 mg, 3 mmol) in MeCN (40 mL) wurde für 48 h refluxiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt, der ausgefallene Feststoff wurde

durch Filtration abgetrennt und mit Acetonitril gewaschen. Das Filtrat wurde *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mit Flash Chromatographie (CH_2Cl_2 /Aceton 9:1) gereinigt und lieferte Verbindung **3** als leicht gelbliches Öl (1.77 g Ausbeute, 55%).

R_f = 0.36 (PE/EtOAc 5:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.95 (dddd, J = 14.0, 8.0, 6.0, 4.8 Hz, 1H), 2.17 (dtd, J = 14.0, 8.0, 6.0 Hz, 1H), 2.39 (s, 3H), 2.59 – 2.75 (m, 2H), 3.27 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 5.26 (dd, J = 8.0, 4.8 Hz, 1H), 6.84 – 6.93 (m, 2H), 7.26 – 7.31 (m, 3H), 7.34 – 7.43 (m, 4H), 7.44 – 7.53 (m, 4H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 36.78, 42.46, 51.67, 53.26, 58.75, 77.59, 116.29, 121.53, 126.80, 126.83, 127.91, 128.19, 128.81, 131.94, 134.16, 140.84, 141.07, 157.62, 171.51. HRMS berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{BrNO}_3$ ($[\text{M}+\text{H}^+]$) 468.1168; gefunden 468.1174.

Synthese von (*R*)-*N*-{3-[(1,1'-Biphenyl)-4-yloxy]-3-(4-pinakolester)phenyl}propyl)-sarkosinemethylester (**4**)



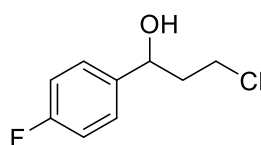
Die Feststoffe Bis(pinakolato)diboran (1.158 g, 4.56 mmol), [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (83.4 mg, 0.114 mmol, 3%mol) und KOAc (1.12 g, 11.4 mmol) wurden im Vakuum getrocknet. Unter Argon wurde eine Lösung von **3** (1.77 g, 3.8 mmol) in trockenem 1,4-Dioxan (30 mL) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch

wurde für 4 h auf 110 °C erwärmt. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) wurde das Reaktionsgemisch mit 20 mL Wasser verdünnt und mit DCM extrahiert (3 x 30 mL). Die organische Fraktion wurde über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Rückstand wurde mittels Flash Chromatographie an Silicagel (DCM/Aceton 9:1) und danach mittels RP

Flash Chromatographie (MeCN/H₂O 40/60) gereinigt und als hellgelbes Öl erhalten wurde (1.65 g, 84% Ausbeute).

$R_f = 0.8$ (DCM/Aceton). ^1H NMR (400 MHz, Methanol- D_4): $\delta = 1.34$ (s, 12H), 1.98 – 2.08 (m, 1H), 2.12 – 2.23 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.70 (dd, $J = 8.1, 6.6$ Hz, 2H), 3.31 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 5.38 (dd, $J = 8.1, 4.0$ Hz, 1H), 6.88 – 6.97 (m, 2H), 7.21 – 7.28 (m, 2H), 7.32 – 7.39 (m, 2H), 7.48 (dd, $J = 8.1, 4.0$ Hz, 4H), 7.47 – 7.54 (m, 2H), 7.70 – 7.76 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, Methanol- D_4): $\delta = 25.18, 37.12, 42.69, 52.02, 54.45, 58.93, 79.17, 85.07, 117.35, 126.57, 127.54, 128.84, 129.68, 135.13, 136.05, 142.01, 146.49, 158.97, 172.55$. HRMS berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{BNO}_5$ ($[\text{M}+\text{H}^+]$) 516.2916; gefunden 516.2917.

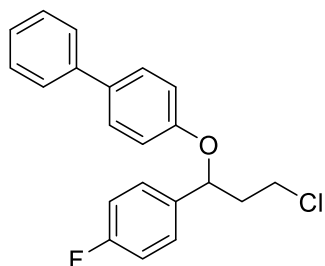
Synthese von 3-Chlor-1-(4-fluorphenyl)propan-1-ol^{238,209} (5)



Zu einer Lösung von 3-Chlor-4'-fluorpropiophenon (1.86 g, 10 mmol) in 20 mL MeOH in einer Argon-Atmosphäre wurde unter Eiskühlung NaBH_4 (454 mg, 12 mmol) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde auf RT erwärmt und nach Beendigung der Reduktion (DC Kontrolle) unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mit Wasser versetzt und mit Ether extrahiert (3 x 20 mL). Die organische Fraktion wurde über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Man erhielt die Titelverbindung ohne weitere Reinigung als farbloses Öl (1.9 g Ausbeute, quantitativ, Lit. 82%).

$R_f = 0.44$ (PE/EtOAc 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.37 - 7.30$ (m, 2H), 7.09 – 7.00 (m, 2H), 4.94 (dd, $J = 8.5, 4.7$ Hz, 1H), 3.73 (ddd, $J = 10.9, 8.2, 5.4$ Hz, 1H), 3.54 (dt, $J = 10.9, 5.9$ Hz, 1H), 2.21 (ddt, $J = 14.3, 8.5, 5.7$ Hz, 1H), 2.10 – 2.00 (m, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 163.71, 161.26, 139.58, 127.63, 127.55, 115.74, 115.53, 70.82, 41.61$.

Synthese von 4-(3-Chlor-1-(4-fluorphenyl)propoxy)-1,1'-biphenyl²⁰⁹ (6)

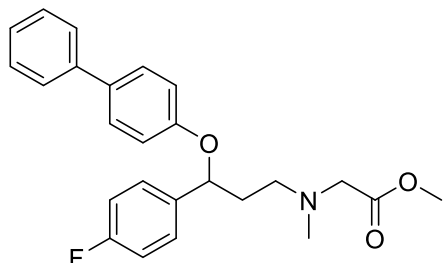


Azodicarbonsäurediisopropylester (DIAD) (1.97 mL, 2.02 g, 10 mmol) wurde langsam zu einer eiskalten Lösung von **5** (1.9 g, 10 mmol), Ph_3P (2.69 g, 10 mmol) und 4-Phenylphenol (1.7 g, 10 mmol) in trockenem THF (20 mL) hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 30 °C im Ultraschallbad behandelt. Nach Beendigung der Reaktion (DC Kontrolle), wurden alle flüchtigen Verbindungen unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Flash Chromatographie gereinigt (1–5% EtOAc in PE). Die Titelverbindung wurde als farbloser Feststoff isoliert (2.8 g Ausbeute, 82%).

$R_f = 0.79$ (PE/EtOAc 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.53 - 7.45$ (m, 2H), 7.47 – 7.34 (m, 6H), 7.31 – 7.27 (m, 1H), 7.10 – 7.01 (m, 2H), 6.94 – 6.88 (m, 2H), 5.41 (dd, $J = 8.6, 4.5$ Hz, 1H), 3.82 (ddd, $J = 11.0,$

8.4, 5.2 Hz, 1H), 3.61 (dt, $J = 11.2, 5.7$ Hz, 1H), 2.53 – 2.42 (m, 1H), 2.20 (dddd, $J = 14.4, 8.4, 5.7, 4.5$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 163.69, 157.40, 140.78, 136.71, 134.46, 128.83, 128.26, 127.83, 127.74, 126.86, 116.37, 116.04, 115.83, 76.41, 60.54, 41.54, 41.34, 21.20, 14.35$.

Synthese von Methyl *N*-(3-([1,1'-Biphenyl]-4-yloxy)-3-(4-fluorphenyl)propyl)-*N*-methylglycinat²⁰⁹ (7)

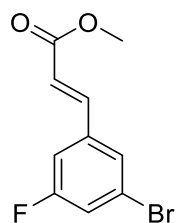


Eine Lösung von **6** (2.8 g, 8.2 mmol), Sarkosinmethylester Hydrochlorid (2.23 g, 16 mmol), K_2CO_3 (5.53 g, 40 mmol) und KI (664 mg, 4 mmol) in MeCN (50 mL) wurde für 48 h refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der ausgefallene Feststoff durch Filtration abgetrennt und mit Acetonitril

gewaschen. Das Filtrat wurde *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc 3:1) gereinigt. Verbindung **7** wurde als leicht gelbliches Öl (1.95 g Ausbeute, 58%).

$R_f = 0.25$ (PE/EtOAc 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.52 - 7.43$ (m, 2H), 7.45 – 7.33 (m, 6H), 7.30 – 7.27 (m, 1H), 7.08 – 6.98 (m, 2H), 6.94 – 6.85 (m, 2H), 5.30 (dd, $J = 8.3, 4.7$ Hz, 1H), 3.69 (s, 2H), 3.34 (s, 2H), 2.76 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.21 (dtd, $J = 14.0, 8.1, 5.8$ Hz, 1H), 2.02 (dt, $J = 19.4, 6.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 163.53, 161.09, 157.57, 140.82, 137.44, 134.15, 128.81, 128.18, 127.82, 127.74, 126.82, 116.31, 115.86, 115.64, 53.27, 51.88, 42.27, 36.50$.

Synthese von (*E*)-3-(3-Brom-5-fluorphenyl)acrylsäuremethylester^{239,226} (9)



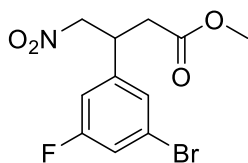
Zu einer Lösung von 3-Brom-5-fluorbenzaldehyd (5 g, 24.6 mmol) in trockenem THF (120 mL) wurde unter Eiskühlung eine Lösung von Carbomethoxymethyltriphenylphosphoran (9.06 g, 27.1 mmol) in trockenem DCM (50 mL) hinzutropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h bei RT gerührt.

Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit einem Gemisch aus Hexan / EtOAc (4:1) versetzt. Der nicht lösliche Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und das Filtrat *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc 9:1) gereinigt. Man erhielt die Titelverbindung als farblosen Feststoff (4.11 g Ausbeute, 64%).

$R_f = 0.64$ (PE/EtOAc 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.56$ (dd, $J = 16.0, 0.7$ Hz, 1H), 7.47 – 7.42 (m, 1H), 7.30 – 7.23 (m, 2H), 7.15 (dddd, $J = 9.1, 2.2, 1.5, 0.5$ Hz, 1H), 6.42 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 3.82 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 164.02, 142.03, 127.16, 120.79, 120.57, 113.67, 113.45, 52.01. ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): δ = - 110.32.

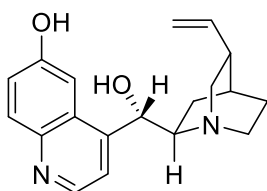
Synthese von Methyl-3-(3-brom-5-fluorphenyl)-4-nitrobutanoat²²⁶ (10)



Zu einer Lösung von **9** (4.11 g, 15.8 mmol) und Nitromethan (4.23 mL, 4.82 g, 79 mmol) in MeCN (250 mL) wurde unter Eiskühlung Diazabicycloundecen (DBU) (2.36 mL, 2.4 g, 15.8 mmol) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT für 24 h gerührt, anschließend mit Wasser verdünnt und mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert. Die organische Fraktion wurde über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc 9:1) gereinigt und lieferte die Titelverbindung als hellgelbes Öl (3.5 g Ausbeute, 69%).

R_f = 0.24 (PE/EtOAc 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.22 – 7.15 (m, 2H), 6.95 – 6.89 (m, 1H), 4.73 (dd, J = 13.0, 6.6 Hz, 1H), 4.62 (dd, J = 13.0, 8.1 Hz, 1H), 3.96 (dd, J = 7.9, 6.8 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 2.75 (dd, J = 7.3, 2.1 Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 170.63, 164.13, 161.62, 142.52, 142.35, 126.60, 123.46, 123.39, 119.21, 119.02, 113.93, 113.71, 78.72, 52.34, 39.63, 37.23. ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): δ = - 109.10.

Synthese von {(S)-Hydroxy[(1S,2R,4S,5R)-5-vinylchinclidin-2-yl]methyl}chinolin-6-ol²²⁰ (11)

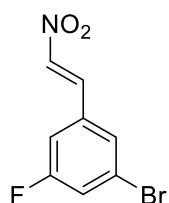


Zu einer Lösung von Chinidin (2.59 g, 8 mmol) in trockenem DMF (50 mL) wurde Natriumethanthiolat (2.69 g, 32 mmol) hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde für 16 h bei 110 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) wurde die Reaktionslösung auf RT gekühlt und mit einem Gemisch aus gesättigter NH_4Cl -Lösung (40 mL) und Wasser (50 mL) verdünnt. Das Reaktionsgemisch wurde mit EtOAc (3 x 50 mL) extrahiert. Die organische Fraktion wurde mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde mittels Flash Chromatographie (DCM/MeOH 0-10%) gereinigt und lieferte die Titelverbindung als gelben Feststoff (6.24 g Ausbeute, 78%, Lit.: 92%).

R_f = 0.6 (EtOAc). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.69 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.58 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.32 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 6.16–6.07 (m, 1H), 6.06 (s, 1H), 5.07 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.04 (s, 1H), 3.82 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 3.75 (dd, J = 13.7, 7.8 Hz, 1H), 3.02 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 2.93–2.82 (m, 1H), 2.55 (s, 1H), 2.36–2.23 (m, 2H), 2.20–2.10 (m, 1H), 1.70 (s, 1H), 1.41–1.28 (m, 2H), 0.96–0.79 (m,

2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 157.00, 150.90, 146.79, 143.31, 131.80, 126.66, 122.89, 118.05, 116.40, 104.01, 60.40, 59.59, 49.32, 48.99, 39.45, 27.76, 24.38, 18.25, 7.58. MS (ESI) berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 310.17, gefunden: 311.19.

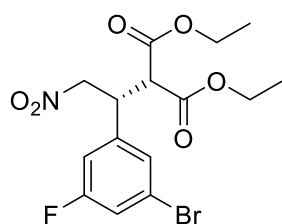
Synthese von (*E*)-1-Brom-3-fluor-5-(2-nitrovinyl)benzol²²¹ (**12**)



Zu einer Lösung von 2.5 M NaOH (32.4 mL, 81 mmol) in Methanol (72 mL) und Wasser (36 mL) wurde eine Lösung von 3-Brom-5-fluorbenzaldehyd (14.3 g, 70.4 mmol) und Nitromethan (4.36 mL, 81 mmol) in Methanol (12 mL) bei 5 °C innerhalb von 30 min hinzugefügt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch bei 5–10 °C für weitere 30 min gerührt. Eine Lösung von HCl_{konz} (1.73 mL, 141 mmol) in Wasser (36 mL) wurde unter Eiskühlung in einer Portion hinzugefügt. Die ausgefallenen Kristalle wurden durch Filtration abgetrennt und mit eiskaltem Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen erhielt man die Titelverbindung in Form eines hellgelben Pulvers (10 g Ausbeute, 57%).

R_f = 0.64 (PE/EtOAc 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.88 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 7.49 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 7.38 (ddd, J = 8.3, 2.3, 1.7 Hz, 1H), 7.20 (dt, J = 8.3, 1.7 Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 114.44, 114.64, 122.35, 122.59, 123.83, 128.04, 133.61, 136.25, 139.13, 161.61, 164.13. ^{19}F (376 MHz, CDCl_3): δ = -108.67.

Synthese von (*R*)-Diethyl-2-[1-(3-brom-5-fluorphenyl)-2-nitroethyl]malonat²²¹ (**13**)

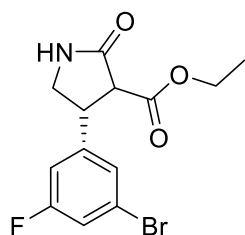


Zu einer Lösung von **12** (4.92 g, 20 mmol) in trockenem THF (35 mL) wurde **11** (310 mg, 1 mmol) und Diethylmalonat (4.31 mL, 28.35 mmol) bei RT hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde bei -20 °C für 24 h gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand wurde mit DCM (50 mL) verdünnt und mit 1 M HCl und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand wurde mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc 9:1) gereinigt. Man erhielt die Titelverbindung als weißes Pulver (5.6 g Ausbeute, 70%). Umkristallisation aus n-Hexan/MeOH lieferte Verbindung **13** mit einem ee von 98%.

Chirale HPLC: Lux® 5 μm Cellulose-1, 4.6×250 mm (Phenomenex); Eluens: *i*PrOH:Hexan 2:8; Flussrate: 0.9 mL/min; Detektion: UV, λ =254 nm; t_R [(*S*)-**13**] = 7.9 min, t_R [(*R*)-**13**] = 8.8 min.

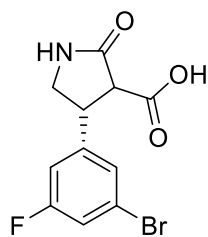
$R_f = 0.39$ (PE/EtOAc 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.23\text{--}7.14$ (m, 2H), 6.95 (dt, $J = 9.2, 2.0$ Hz, 1H), 4.92 (dd, $J = 13.6, 4.7$ Hz, 1H), 4.84 (dd, $J = 13.6, 9.2$ Hz, 1H), 4.28–4.16 (m, 3H), 4.09 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.75 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 167.14, 166.56, 163.97, 161.46, 140.58, 140.50, 127.35, 127.32, 119.54, 119.30, 114.63, 114.4, 76.96, 62.59, 62.42, 54.67, 42.37, 14.11, 13.97$. ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) $\delta = -109.10$. MS (ESI) berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{BrFNO}_6$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 406.20, gefunden: 406.06.

Synthese von (4*R*)-Ethyl-4-(3-brom-5-fluorphenyl)-2-oxopyrrolidin-3-carboxylat²³¹ (**14**)



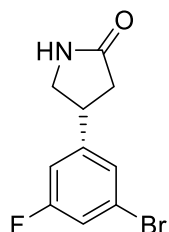
Eine Lösung von **13** (2.03 g, 5 mmol) in MeOH (5 mL) und Zn-Pulver (4 g, 60 mmol) wurde tropfenweise bzw. portionsweise gleichzeitig unter Eiskühlung zu einer Mischung aus HCl_{konz} (10 mL) und MeOH (10 mL) innerhalb von 30 min hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde nach beendeter Zugabe weitere 20 min bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) wurde das MeOH unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit EtOAc (2 x 10 mL) extrahiert. Die organische Fraktion wurde mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung versetzt, wobei Zn-Salze ausfielen. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und die Phasen erneut getrennt. Die organische Fraktion wurde über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc 7:3) gereinigt und lieferte die Titelverbindung als weißen Feststoff (660 mg Ausbeute, 40%).

$R_f = 0.46$ (DCM/Aceton 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.22\text{--}7.15$ (m, 2H), 6.92 (dt, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.75 (brs, 1H), 4.26 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.12–4.04 (m, 1H), 3.82 (ddd, $J = 9.6, 8.2, 1.5$ Hz, 1H), 3.48 (d, $J = 9.6$, 1H), 3.39 (dd, $J = 9.6, 8.2$ Hz, 1H), 1.6 (s, 1H), 1.3 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.95, 168.73, 164.22, 161.72, 144.02, 126.31, 123.44, 118.75, 113.45, 62.31, 54.94, 47.22, 43.76, 14.28$. ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): $\delta = -109.353$. MS (ESI) berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{BrFNO}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 330.15, gefunden: 330.13.

Synthese von (4R)-4-(3-Brom-5-fluorphenyl)-2-oxopyrrolidin-3-carbonsäure²²¹ (15)

Zu einer Lösung von **14** (600 mg, 1.8 mmol) in EtOH (5 mL) wurde bei RT 1 M NaOH (2 mL, 2 mmol) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde für 1 h gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand wurde in Wasser (10 mL) gelöst und mit 6 M HCl_{aq} versetzt, wobei das Produkt als Feststoff ausfiel. Die ausgefallenen Kristalle wurden durch Filtration abgetrennt, mit eiskaltem Wasser gewaschen und getrocknet. Man erhielt die Titelverbindung in Form eines weißen Pulvers (400 mg Ausbeute, 72%).

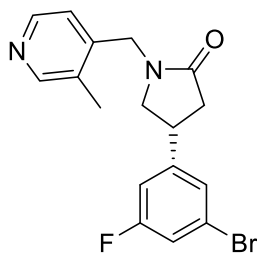
R_f = 0.12 (DCM/Aceton 9:1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.08 (dd, *J* = 9.0, 1.9 Hz, 1H), 7.00 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 9.3, 1.9 Hz, 1H), 3.86 (q, *J* = 8.3 Hz, 1H), 3.61 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.27 (dd, *J* = 9.3, 1.9 Hz, 1H), 3.24–3.15 (m, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, DMSO-d₆): δ = 171.45, 169.79, 163.40, 160.91, 144.10, 144.02, 125.70, 125.67, 122.43, 122.33, 117.63, 117.39, 112.90, 112.68, 54.23, 46.45, 42.96. ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ = -109.925. MS (ESI) berechnet für C₁₁H₉BrFNO₃ ([M+H]⁺): 302.10, gefunden: 304.11.

Synthese von (4R)-4-(3-Brom-5-fluorphenyl)pyrrolidin-2-on^{221,226} (16)

Eine Lösung von **15** (400 mg, 1.3 mmol) in Toluol (15 mL) wurde für 3 h refluxiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und lieferte das Produkt als beiges Pulver (340 mg Ausbeute, 96%).

R_f = 0.30 (DCM/Aceton 9:1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.23–7.17 (m, 1H), 7.16 (ddd, *J* = 8.3, 2.4, 1.6 Hz, 1H), 6.92 (dddd, *J* = 9.5, 2.4, 1.6, 0.7 Hz, 1H), 5.95 (s, 1H), 3.79 (ddd, *J* = 9.5, 8.3, 0.7 Hz, 1H), 3.67 (qd, *J* = 8.3, 6.8 Hz, 1H), 3.39 (dd, *J* = 9.5, 6.8 Hz, 1H), 2.75 (dd, *J* = 16.9, 9.5 Hz, 1H), 2.44 (dd, *J* = 16.9, 8.3 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 176.71, 164.23, 161.69, 146.41, 126.05, 126.02, 123.16, 118.24, 117.99, 113.11, 112.89, 48.98, 39.86, 37.55. ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -109.77. MS (ESI) berechnet für C₁₀H₉BrFNO ([M+H]⁺): 258.09, gefunden: 258.11.

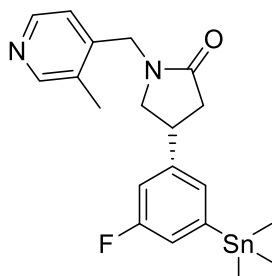
Synthese von (4R)-4-(3-Brom-5-fluorphenyl)-1-[(3-methylpyridin-4-yl)methyl]pyrrolidin-2-on^{226,172} (17)



Zu einer Lösung von **16** (800 mg, 3.1 mmol) in trockenem THF (15 mL) wurde unter Eiskühlung NaH (248 mg, 6.2 mmol) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde 30 min gerührt. Anschließend wurden Tetrabutylammoniumiodid (48 mg, 0.15 mmol) und 4-(Chlormethyl)-3-methylpyridin Hydrochlorid (600 mg, 3.1 mmol) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 16 h bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung verdünnt und mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die organische Fraktion wurde über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mittels Flash Chromatographie (EtOAc/EtOH, 0-10%) gereinigt und lieferte die Titelverbindung in Form eines weißen Feststoffs (1 g Ausbeute, 82%, Lit.: 62%).

R_f = 0.25 (DCM/Aceton 9:1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.45–8.38 (1H, m), 7.14 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.7 Hz, 1H), 7.11 (t, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 6.84 (dt, *J* = 9.2, 1.7 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 15.4, 1H), 3.65–3.51 (m, 2H), 3.23 (dd, *J* = 9.2, 5.6 Hz, 1H), 2.91 (dd, *J* = 17.1, 9.2 Hz, 1H), 2.59 (dd, *J* = 17.1, 7.9 Hz, 1H), 2.31 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 173.03, 151.53, 148.16, 142.79, 131.77, 125.90, 125.88, 122.59, 118.34, 118.10, 113.08, 112.86, 53.52, 43.75, 38.21, 36.86, 16.09. ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -109.58. MS (ESI) berechnet für C₁₇H₁₆BrFN₂O ([M+H]⁺): 363.23, gefunden: 363.13.

Synthese von (4R)-4-[3-Fluor-5-(trimethylstannyl)phenyl]-1-[(3-methylpyridin-4-yl)methyl]pyrrolidin-2-on^{226,172} (18)

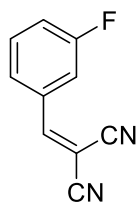


Zu einer Lösung von **17** (150 mg, 0.41 mmol) in trockenem Toluol (2 mL) wurde in einer Argon-Atmosphäre LiCl (90 mg, 2.05 mmol), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (70 mg, 0.06 mmol) und Hexamethyldizinn (130 µL, 0.63 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 3 h bei 100 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) wurde die Reaktionslösung auf RT gekühlt und mit EtOAc verdünnt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert und der Filterkuchen wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit, das Rohprodukt mittels Flash Chromatographie

(EtOAc/EtOH, 0-10%) gereinigt und lieferte die Titelverbindung als gelbes Öl (180 mg Ausbeute, 98%, Lit.: 60%).

$R_f = 0.56$ (EtOAc/EtOH 1%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.43\text{--}8.40$ (m, 2H), 7.10–7.03 (m, 2H), 6.82 (dt, $J = 9.4, 2.2$ Hz, 1H), 4.63 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 3.66 – 3.55 (m, 2H), 3.27 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 2.92 (dd, $J = 15.5, 9.4$ Hz, 1H), 2.69–2.61 (m, 1H), 2.32 (s, 3H), 0.30 (s, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 173.78, 151.44, 148.14, 143.03, 131.75, 129.74, 122.45, 121.16, 120.98, 113.55, 113.33, 54.10, 43.76, 38.52, 37.10, 16.10, 9.25$. ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): $\delta = -113.14$. MS (ESI) berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{FN}_2\text{OSn}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 448.09, gefunden: 449.15.

Synthese von 2-(3-Fluorbenzyliden)malonsäuredinitril^{236,240} (**21**)

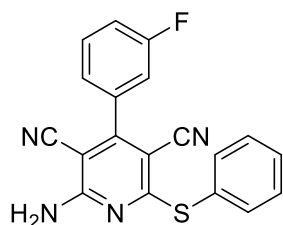


Zu einer Lösung von Fluorbenzaldehyd (1.06 mL, 1.24 g 10 mmol) und Malonsäuredinitril (693 mg, 10.5 mmol, 1.05 equiv.) in 20 mL 70% MeOH_{aq} wurde Piperidin (2 Tropfen) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 15 min bei RT gerührt und anschließend für 2

h stehen gelassen, wobei sich ein gelber Feststoff bildete. Der Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und mit eiskaltem Methanol gewaschen. Nach dem Trocknen erhielt man die Titelverbindung als gelben Feststoff (1.02 g Ausbeute, 59%).

Smp.: 93 °C dec. $R_f = 0.33$ (PE/EtOAc 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.75$ (s, 1H), 7.68 (ddt, $J = 7.8, 1.6, 0.9$ Hz, 1H), 7.64 (dt, $J = 9.1, 2.4$ Hz, 1H), 7.54 (td, $J = 8.2, 5.6$ Hz, 1H), 7.34 (tdd, $J = 8.2, 2.4, 0.9$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 161.66, 158.46, 131.50, 126.85, 121.89, 121.69, 117.16, 116.93, 113.35$. ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): $\delta = -109.39$.

Synthese von 2-Amino-4-(3-fluorphenyl)-6-(phenylthio)pyridin-3,5-dicarbonitril²³⁶ (**23**)

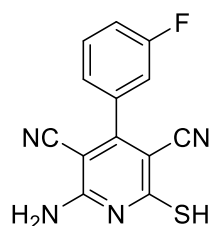


Zu einer Lösung von **21** (5 mmol), Malonsäuredinitril (330 mg, 5 mmol) und Thiophenol (515 μL , 551 mg, 5 mmol) in EtOH (10 mL) wurde Triethylamin (1 Tropfen) hinzugefügt. Die gelbe Reaktionslösung wurde 4 h refluxiert.

Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt, mit EtOH gewaschen und getrocknet. Man erhielt die Titelverbindung in Form von gelben Kristallen (500 mg Ausbeute, 29%).

Smp.: 242 °C dec. R_f = 0.86 (PE/EtOAc 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.58–7.44 (m, 6H), 7.32–7.29 (m, 1H), 7.29–7.26 (m, 1H), 7.25–7.21 (m, 1H), 5.48 (s, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 135.96, 131.19, 131.10, 130.20, 129.53, 118.33, 118.12, 116.09, 115.84, 115.00, 114.55. ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): δ = - 110.50.

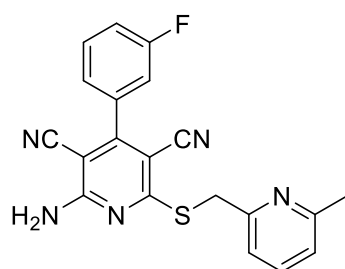
Synthese von 2-Amino-4-(3-fluorphenyl)-6-mercaptopyridin-3,5-dicarbonitril²³⁶ (25)



Zu einer Lösung von **23** (500 mg, 1.44 mmol) in DMF (5 mL) wurde wasserfreies Na_2S (360 mg, 4.6 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei 80 °C für gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf RT wurde unter Eiskühlung 1N HCl (12 mL, 12 mmol) hinzugefügt, wobei sich ein gelber Feststoff bildete. Der Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und getrocknet. Man erhielt die Titelverbindung in Form eines gelben Feststoffs (390 mg Ausbeute, quantitativ).

Smp.: 176 °C dec. R_f : 0.22 (PE/EtOAc 3:1). ^1H NMR (400 MHz, MeOD-d_4): δ = 7.63–7.56 (m, 1H), 7.38–7.30 (m, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ = 179.23, 162.87, 162.32, 160.43, 157.13, 154.80, 136.56, 136.47, 131.05, 130.96, 129.49, 127.60, 127.19, 124.27, 117.09, 116.41, 115.07, 114.46, 102.29, 81.46. ^{19}F NMR (376 MHz, MeOD-d_4): δ = - 113.80. HRMS berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ON}_4\text{NaS}$ ($[\text{M}+\text{Na}^+]$) 293.02676; gefunden 293.02695.

Synthese von 2-Amino-4-(3-fluorphenyl)-6-[[[(6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril (27)

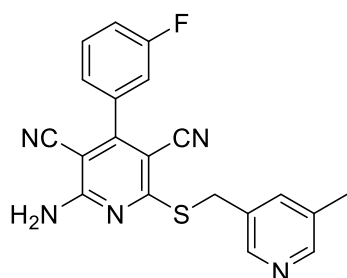


Zu einer Lösung von **25** (100 mg, 0.37 mmol) und NaHCO_3 (126.2 mg, 1.5 mmol) in DMF (5 mL) wurde 2-(Brommethyl)-6-methylpyridin Hydrobromid (69 mg, 0.37 mmol) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde es auf Eiswasser (100 mL) gegossen und 16 h bei 4 °C belassen. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und mittels Flash Chromatographie (EtOAc/MeOH 0–1%) gereinigt. Man erhielt die Titelverbindung in Form von orangen Kristallen (31 mg, 22% Ausbeute).

Smp.: 176 °C dec. R_f = 0.60 (EtOAc). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.59–7.54 (m, 1H), 7.53–7.48 (m, 1H), 7.30–7.26 (m, 1H), 7.25–7.18 (m, 3H), 7.07 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 5.79 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 2.57 (s,

3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 168.48, 163.90, 161.43, 159.38, 156.81, 155.32, 137.81, 135.19, 135.11, 131.12, 131.04, 124.41, 122.60, 120.49, 118.24, 118.03, 116.01, 115.78, 115.05, 114.50, 96.26, 86.89, 36.44, 29.82, 24.19. ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): δ = - 110.56. MS (ESI) berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{FN}_5\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 375.42 gefunden: 376.19. Elementaranalyse berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{FN}_5\text{S}$: C: 63.99%, H: 3.76%, F: 5.06%, N: 18.65%, S: 8.54%; gefunden: C: 63.32%, H: $4.06\% \pm 0.005\%$, N: $17.55\% \pm 0.045\%$, S: $8.38\% \pm 0.04\%$.

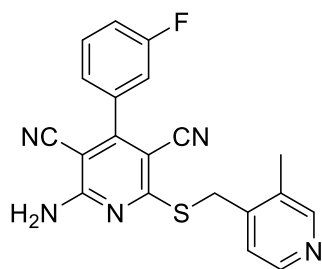
Synthese von 2-Amino-4-(3-fluorphenyl)-6-[[[(5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril (**28**)



Zu einer Lösung von **25** (100 mg, 0.37 mmol) und NaHCO_3 (126.2 mg, 1.5 mmol) in DMF (5 mL) wurde 3-(Brommethyl)-5-methylpyridin Hydrobromid (69 mg, 0.37 mmol) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde es auf Eiswasser (100 mL) gegossen und 16 h bei 4 °C belassen. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und mittels Flash Chromatographie (EtOAc/MeOH 0–1%) gereinigt. Man erhielt die Titelverbindung in Form von gelben Kristallen (65 mg, 47% Ausbeute).

Smp.: 180 °C dec. R_f = 0.34 (EtOAc). ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.43 (d, J = 56.4 Hz, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.54–7.49 (m, 1H), 7.31–7.26 (m, 1H), 7.25–7.24 (m, 1H), 7.26–7.17 (m, 1H), 5.79 (s, 2H), 4.40 (s, 2H), 2.35 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): 167.79, 163.93, 161.46, 159.41, 156.93, 138.42, 135.02, 131.18, 131.09, 124.39, 118.34, 118.13, 116.02, 115.78, 114.95, 114.44, 31.84, 18.54. ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6): δ = - 110.45. MS (ESI) berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{FN}_5\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 375.42 gefunden: 376.26. Elementaranalyse berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{FN}_5\text{S}$: C: 63.99%, H: 3.76%, F: 5.06%, N: 18.65%, S: 8.54%; gefunden: C: $64.13\% \pm 0.035\%$, H: $3.79\% \pm 0.075\%$, N: $17.75\% \pm 0.015\%$, S: $8.27\% \pm 0.025\%$.

Synthese von 2-Amino-4-(3-fluorphenyl)-6-[[4-(4-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril (**29**)



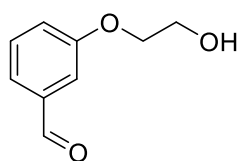
Zu einer Lösung von **25** (100 mg, 0.37 mmol) und NaHCO₃ (126.2 mg, 1.5 mmol) in DMF (5 mL) wurde 4-(Chlormethyl)-3-methylpyridin Hydrochlorid (66 mg, 0.37 mmol) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde es auf Eiswasser (100 mL)

gegossen und 16 h bei 4 °C belassen. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und mittels Flash Chromatographie (EtOAc/MeOH 0–1%) gereinigt. Man erhielt die Titelverbindung in Form von gelben Kristallen (121 mg, 87% Ausbeute).

R_f = 0.24 (EtOAc). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.43 (d, *J* = 56.4 Hz, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.54–7.49 (m, 1H), 7.31–7.26 (m, 1H), 7.25–7.24 (m, 1H), 7.26–7.17 (m, 1H), 5.79 (s, 2H), 4.40 (s, 2H), 2.35 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 167.79, 163.93, 161.46, 159.41, 156.93, 138.42, 135.02, 131.18, 131.09, 124.39, 118.34, 118.13, 116.02, 115.78, 114.95, 114.44, 31.84, 18.54. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆): δ = -110.45. MS (ESI) berechnet für C₂₀H₁₄FN₅S ([M+H]⁺): 375.42 gefunden: 376.26.

Verbindungen **20**, **22**, **24**, **26**, **30** und **31** wurden freundlicherweise von Dr. Marcus Holschbach synthetisiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Synthese von 3-(2-Hydroxyethoxy)benzaldehyd²⁴¹ (**32**)

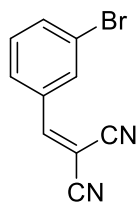


Eine Lösung von 3-Hydroxybenzaldehyd (2.4 g, 19.0 mmol), 2-Bromethanol (2.38 g, 8 mmol) und Cs₂CO₃ (1.35 mL, 9.9 g, 19 mmol) in trockenem DMF

(80 mL) wurde 24 h bei 60°C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Reaktionslösung mit Wasser (100 mL) verdünnt und mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert. Die organische Fraktion wurde über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc 3:1) gereinigt. Man erhielt die Titelverbindung als farbloses Öl (2.78 g Ausbeute, 88%, Lit.: 98%).

R_f = 0.29 (EtOAc). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.90 (s, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.35 (m, 1H), 7.15 (ddd, *J* = 7.1, 2.7, 2.0 Hz, 1H), 4.09 (dd, *J* = 5.2, 4.1 Hz, 2H), 3.94 (q, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.05 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 192.19, 159.35, 137.94, 130.29, 124.05, 122.05, 112.92, 69.67, 61.40.

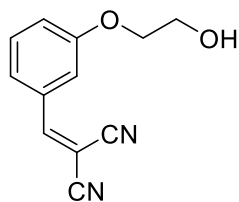
Synthese von 2-(3-Brombenzyliden)malonsäuredinitril²⁴⁰ (**33**)



Zu einer Lösung von Brombenzaldehyd (11.66 mL, 18.5 g, 100 mmol) und Malonsäuredinitril (6.93 g, 105 mmol) in 70% MeOH_{aq} (100 mL) wurde Piperidin (1 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 15 min bei RT gerührt und anschließend für 2 h stehen gelassen, wobei sich ein gelber Feststoff bildete. Der Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und mit eiskaltem Methanol gewaschen. Nach dem Trocknen erhielt man die Titelverbindung als gelben Feststoff (22.4 g Ausbeute, 96%).

Smp.: 104 °C dec. R_f = 0.27 (PE/EtOAc 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.96 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 7.89 (ddt, J = 8.0, 1.9, 0.9 Hz, 1H), 7.75 (ddd, J = 8.0, 1.9, 0.9 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.43 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 4.82 (s, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 158.23, 137.39, 133.59, 132.69, 131.20, 128.74, 113.29, 112.12, 50.97.

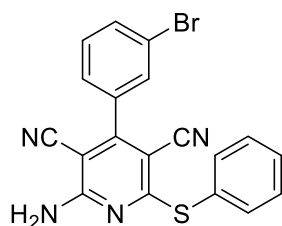
Synthese von 2-[3-(2-Hydroxyethoxy)benzyliden]malonsäuredinitril^{242,236} (**34**)



Zu einer Lösung von **32** (1.46 g, 9 mmol) und Malonsäuredinitril (625 mg, 9.45 mmol) in 70% MeOH_{aq} (10 mL) wurde Piperidin (1 Tropfen) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei RT für 1 h gerührt und anschließend *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc 3:1) gereinigt. Man erhielt das Produkt in Form eines gelben Feststoffs (638 mg Ausbeute, 30%).

R_f = 0.83 (PE/EtOAc 3:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.74 (s, 1H), 7.51 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 7.46–7.37 (m, 2H), 7.19 (ddd, J = 7.8, 2.5, 1.5 Hz, 1H), 4.12 (dd, J = 5.2, 3.9 Hz, 2H), 3.98 (dd, J = 5.2, 3.9 Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 106.00, 159.32, 132.14, 130.79, 124.44, 121.176, 114.84, 113.70, 112.69, 83.02, 69.72, 61.17.

Synthese von 2-Amino-4-(3-Bromphenyl)-6-(phenylthiopyridin)-3,5-dicarbonitril²⁴³ (**35**)

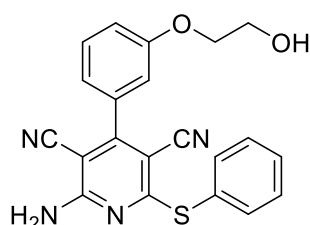


Zu einer Lösung von **33** (22.3 g, 96 mmol), Malonsäuredinitril (6.34 g, 96 mmol) and Thiophenol (9.8 mL, 10.58 g, 96 mmol) in EtOH (150 mL) wurde Triethylamin (0.2 mL) hinzugefügt. Die gelbe Reaktionslösung wurde 4 h refluxiert. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) wurde die

Reaktionslösung auf RT abgekühlt. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt, mit EtOH gewaschen und getrocknet. Man erhielt die Titelverbindung in Form von gelben Kristallen (8.9 g Ausbeute, 32%).

Smp.: 246 °C dec. R_f = 0.46 (PE/EtOAc 3:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.69 (dt, J = 6.7, 2.1 Hz, 1H), 7.67–7.64 (m, 1H), 7.58–7.53 (m, 2H), 7.50–7.42 (m, 5H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 169.51, 159.29, 156.76, 135.92, 135.21, 134.15, 131.42, 130.78, 130.19, 129.52, 127.23, 127.08, 123.18, 114.94, 114.51.

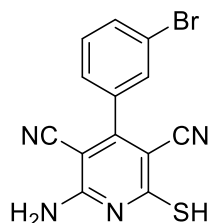
Synthese von 2-Amino-4-[3-(2-Hydroxyethoxy)phenyl]-6-(phenylthiopyridin)-3,5-dicarbonitril (**36**)



Zu einer Lösung von **34** (630 mg, 3 mmol), Malonsäuredinitril (198 mg, 3 mmol) and Thiophenol (308 μL , 330 mg, 3 mmol) in EtOH (10 mL) wurde Triethylamin (1 Tropfen) hinzugefügt. Die gelbe Reaktionslösung wurde 4 h refluxiert. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt, mit EtOH gewaschen und getrocknet. Man erhielt die Titelverbindung in Form von gelben Kristallen (800 mg Ausbeute, 68%).

Smp.: 212 °C dec. R_f = 0.78 (EtOAc). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 7.50 (dtt, J = 6.7, 2.8, 1.4 Hz, 2H), 7.44–7.35 (m, 4H), 7.15 (s, 2H), 7.05 (ddt, J = 8.3, 2.8, 1.4 Hz, 1H), 7.01–6.95 (m, 2H), 4.81–4.72 (m, 1H), 4.04 (dt, J = 5.0, 3.6 Hz, 2H), 3.84–3.75 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 166.97, 159.56, 158.54, 157.78, 134.86, 134.64, 129.65, 129.28, 128.95, 127.12, 120.26, 116.54, 114.80, 114.06, 93.57, 86.80, 69.56, 59.74.

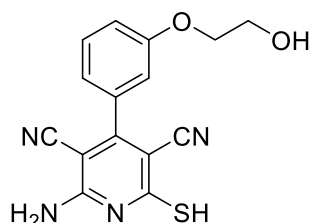
Synthese von 2-Amino-4-(3-bromphenyl)-6-mercaptopyridin-3,5-dicarbonitril (**37**)



Zu einer Lösung von **35** (8 g, 19.6 mmol) in DMF (50 mL) wurde wasserfreies Na_2S (4.9 g, 62.72 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 80 °C für 2 h erwärmt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf RT wurde unter Eiskühlung 1N HCl (125 mL, 125 mmol) hinzugefügt, wobei sich ein gelber Feststoff bildete. Der Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und getrocknet. Man erhielt die Titelverbindung in Form eines gelben Feststoffs (6.46 g Ausbeute, quantitativ).

Smp.: 262 °C dec. R_f : 0.9 (EtOAc). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 13.20 (s, 1H), 7.76 (m, 2H), 7.52 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 179.32, 157.02, 154.54, 136.57, 133.14, 130.51, 129.47, 127.12, 121.60, 116.39, 114.46, 102.42, 81.59.

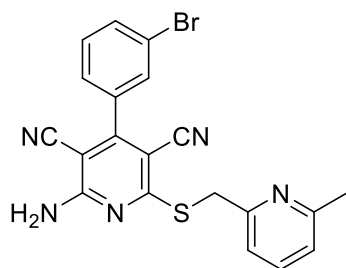
Synthese von 2-Amino-4-[3-(2-hydroxyethoxy)phenyl]-6-mercaptopyridin-3,5-dicarbonitril (**38**)



Zu einer Lösung von **36** (800 mg, 2 mmol) in DMF (5 mL) wurde wasserfreies Na_2S (468 mg, 6 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 80 °C für 2 h erwärmt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf RT wurde unter Eiskühlung 1N HCl (12.8 mL, 12.8 mmol) hinzugefügt und mit Wasser verdünnt. Die Reaktionslösung wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die organische Fraktion wurde mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Nach Waschen des Rückstands mit Hexan erhielt man die Titelverbindung in Form eines gelben Feststoffs (600 mg Ausbeute, quantitativ).

Smp.: 170 °C dec. R_f = 0.34 (EtOAc). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 12.90 (s, 1H), 7.91 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.59 (dd, J = 4.8, 3.7 Hz, 1H), 7.33 (tt, J = 8.1, 3.7 Hz, 1H), 7.06–6.86 (m, 3H), 4.50 (s, 1H), 4.02 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.81 (q, J = 4.8 Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, MeOD- d_4): δ = 181.76, 160.48, 156.27, 136.92, 131.11, 121.45, 118.17, 117.53, 115.22, 115.17, 104.56, 70.90, 61.59.

Synthese von 2-Amino-4-(3-bromphenyl)-6-[[[6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril (**39**)

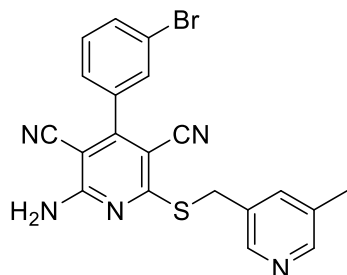


Zu einer Lösung von **37** (1 g, 3.7 mmol) und NaHCO_3 (1.26 g, 15 mmol) in DMF (30 mL) wurde 2-(Brommethyl)-6-methylpyridin Hydrobromid (690 mg, 3.7 mmol) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt, anschließend auf Eiswasser (100 mL) gegossen und 16 h bei 4 °C belassen. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und mittels Flash Chromatographie (EtOAc/MeOH 0–1%) gereinigt. Man erhielt die Titelverbindung in Form von hellbraunen Kristallen (588 mg Ausbeute, 37%).

Smp.: 290 °C dec. R_f : 0.69 (EtOAc). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.71–7.64 (m, 1H), 7.62 (q, J = 1.3 Hz, 1H), 7.54 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.44–7.37 (m, 2H), 7.21 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 5.88 (s, 2H), 4.56 (s, 2H), 2.56 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 166.39, 159.63, 158.04, 156.99, 155.93,

137.27, 136.36, 133.34, 131.22, 131.09, 129.68, 127.80, 127.39, 122.10, 121.90, 120.95, 115.23, 93.38, 86.24, 35.55, 24.15. HRMS berechnet für $C_{20}H_{15}N_5BrS$ ($[M+H]^+$) 436.02261; gefunden 436.02302.

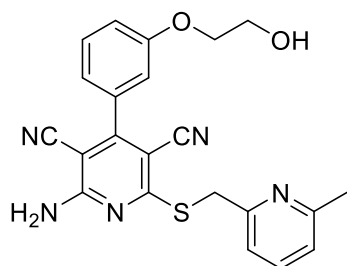
Synthese von 2-Amino-4-(3-bromphenyl)-6-[[5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio}pyridin-3,5-dicarbonitril (40)



Zu einer Lösung von **37** (1 g, 3.7 mmol) und $NaHCO_3$ (1.26 g, 15 mmol) in DMF (30 mL) wurde 3-(Brommethyl)-5-methylpyridin Hydrobromid (690 mg, 3.7 mmol) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt, anschließend auf Eiswasser (100 mL) gegossen und 16 h bei 4 °C belassen. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und mittels Flash Chromatographie (EtOAc/MeOH 0–1%) gereinigt. Man erhielt die Titelverbindung in Form von hellgelben Kristallen (594 mg Ausbeute, 37%).

Smp.: 202 °C dec. R_f : 0.55 (EtOAc). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.63–8.54 (m, 1H), 8.33–8.24 (m, 1H), 7.83–7.71 (m, 3H), 7.58–7.46 (m, 2H), 4.46 (s, 2H), 2.28 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 165.74, 159.39, 156.80, 148.70, 147.55, 137.24, 136.12, 133.25, 133.12, 132.66, 131.02, 130.86, 127.58, 121.68, 115.06, 115.00, 93.27, 86.17, 30.21, 17.74. HRMS berechnet für $C_{20}H_{15}N_5BrS$ ($[M+H]^+$) 436.02261; gefunden 436.02301.

Synthese von 2-Amino-4-[3-(2-Hydroxyethoxy)phenyl]-6-[[6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio}pyridin-3,5-dicarbonitril (41)



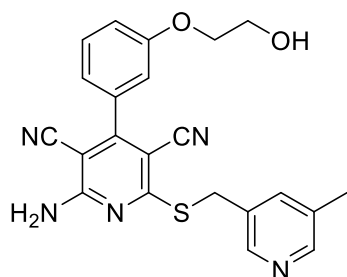
Zu einer Lösung von **36** (600 mg, 2 mmol) und $NaHCO_3$ (672 mg, 8 mmol) in DMF (5 mL) wurde 2-(Brommethyl)-6-methylpyridin Hydrobromid (350 mg, 1.9 mmol) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt, anschließend auf Eiswasser (100 mL) gegossen und 16 h bei 4 °C belassen. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und mittels Flash Chromatographie (EtOAc/MeOH 0–1%) gereinigt. Man erhielt die Titelverbindung in Form von hellbraunen Kristallen (460 mg Ausbeute, 55%).

Smp.: 180 °C dec. R_f : 0.60 (EtOAc). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.64–7.59 (m, 2H), 7.48 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.34 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.04–6.97 (m, 2H), 6.97–6.91 (m, 2H), 4.54 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 4.49 (s, 2H), 4.02 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.84–3.77 (m, 2H), 2.45 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 166.14, 159.55, 158.50, 158.24, 157.83, 155.80, 137.07, 135.17, 129.98, 121.89, 120.75,

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.64–7.59 (m, 2H), 7.48 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.34 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.04–6.97 (m, 2H), 6.97–6.91 (m, 2H), 4.54 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 4.49 (s, 2H), 4.02 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.84–3.77 (m, 2H), 2.45 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 166.14, 159.55, 158.50, 158.24, 157.83, 155.80, 137.07, 135.17, 129.98, 121.89, 120.75,

120.44, 116.55, 115.27, 93.22, 86.00, 69.78, 59.43, 35.34, 23.95. MS (ESI) berechnet für $C_{22}H_{19}N_5O_2S$ ($[M+H]^+$): 417.48, gefunden: 418.26. HRMS berechnet für $C_{22}H_{20}O_2N_5S_2$ ($[M+H]^+$) 418.13322; gefunden 418.13351.

Synthese von 2-Amino-4-[3-(2-Hydroxyethoxy)phenyl]-6-[[[(5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril (42)

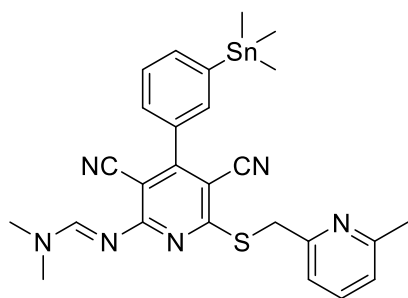


Zu einer Lösung von **36** (100 mg, 0.35 mmol) und $NaHCO_3$ (118 mg, 1.4 mmol) in DMF (5 mL) wurde 3-(Brommethyl)-5-methylpyridin Hydrobromid (94 mg, 0.35 mmol) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt, anschließend auf Eiswasser (100 mL) gegossen und 16 h bei 4 °C belassen. Der ausgefallene Feststoff wurde

durch Filtration abgetrennt und mittels Flash Chromatographie (EtOAc/MeOH 0–1%) gereinigt. Man erhielt die Titelverbindung in Form von farblosen Kristallen (100 mg Ausbeute, 68%).

Smp.: 235 °C dec. R_f : 0.25 (EtOAc). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.57 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.4 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.15–7.05 (m, 2H), 7.04 (dt, J = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.02 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.72 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 2.28 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 165.84, 159.55, 159.49, 158.60, 158.36, 148.76, 147.62, 137.37, 135.24, 130.04, 120.53, 116.67, 115.28, 115.22, 114.39, 93.44, 86.12, 69.83, 59.42, 30.29, 17.78. MS (ESI) berechnet für $C_{22}H_{19}N_5O_2S$ ($[M+H]^+$): 417.48, gefunden: 418.30. HRMS berechnet für $C_{22}H_{20}O_2N_5S_2$ ($[M+H]^+$) 418.13322; gefunden 418.13329.

Synthese von (E)-N'-(3,5-6-[[[(6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]-4-[3-(trimethylstannyl)phenyl]pyridin-2-yl)-N,N-dimethylformimidamid (43)



Zu einer Lösung von **39** (0.45 mmol, 200 mg) in 3 mL DMF wurde DMF–DMA (232.5 μ L, 208.5 mg, 1.75 mmol) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei 50 °C gerührt. Nach vollständiger Schützung (DC Kontrolle) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash Chromatographie (DCM/MeOH 0–10%) gereinigt und

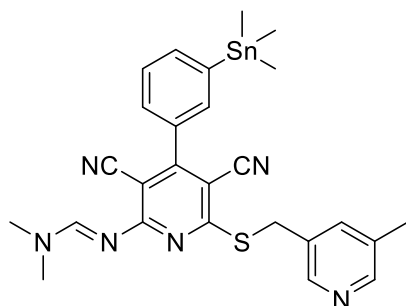
lieferte das Formamidin-geschützte Zwischenprodukt in quantitativer Ausbeute.

Anschließend wurden das geschützte Zwischenprodukt (140 mg, 0.29 mmol), LiCl (64 mg, 1.45 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (50 mg, 0.04 mmol) im Vakuum getrocknet und die

Feststoffe wurden in trockenem Toluol (15 mL) gelöst. Anschließend wurde Hexamethyldizinn (60 μ L, 0.45 mmol) zum Reaktionsgemisch hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei 90 °C gerührt, nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) auf RT gekühlt und mit EtOAc (10 mL) verdünnt. Die Suspension wurde über Celite filtriert und das Filtrat *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash Chromatographie (EtOAc/MeOH 0–5%) gereinigt. Man erhielt die Titelverbindung in Form eines farblosen Feststoffs (100 mg Ausbeute, 60%).

Smp.: 81 °C dec. R_f: 0.35 (EtOAc). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.70 (s, 1H), 7.71–7.64 (m, 1H), 7.61 (dd, *J* = 4.8, 1.4 Hz, 1H), 7.55 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.49–7.42 (m, 2H), 7.30 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 3.21 (d, *J* = 9.1 Hz, 6H), 2.55 (s, 3H), 0.32 (s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 159.04, 157.90, 156.13, 143.44, 138.08, 135.95, 133.27, 132.29, 128.70, 128.58, 128.45, 128.19, 120.28, 116.07, 115.44, 102.66, 98.96, 97.11, 96.42, 41.72, 35.67, 29.84, 9.31. HRMS berechnet für C₂₆H₂₉N₆SSn ([M+H⁺]) 577.11908; gefunden 577.11962. Elementaranalyse berechnet für C₂₆H₂₈N₆SSn: C: 54.28%, H: 4.91%, N: 14.61%, S: 5.57%, Sn: 20.63%; gefunden: C: 60.05% $\pm$ 0.075%, H: 5.54% $\pm$ 0.02%, N: 10.08% $\pm$ 0.05%, S: 3.86% $\pm$ 0.02%.

Synthese von (*E*)-*N'*-(3,5,6-[[[5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]-4-[3-(trimethylstannyl)phenyl]pyridin-2-yl)-*N,N*-dimethylformimidamid (44)



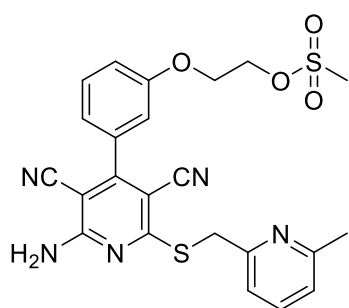
Zu einer Lösung von **40** (0.45 mmol, 200 mg) in 2 mL DMF wurde DMF–DMA (152 μ L, 135.8 mg, 1.14 mmol) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei 50 °C erwärmt. Nach vollständiger Schätzung (DC Kontrolle) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels

Flash Chromatographie (DCM/MeOH 3:1) gereinigt und lieferte das Formamidin-geschützte Zwischenprodukt in quantitativer Ausbeute.

Anschließend wurde das geschützte Zwischenprodukt (230 mg, 0.45 mmol), LiCl (74 mg, 1.74 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (60 mg, 0.05 mmol) im Vakuum getrocknet und die Feststoffe in trockenem Toluol (15 mL) gelöst. Anschließend wurde Hexamethyldizinn (140 μ L, 147 mg, 0.45 mmol) zum Reaktionsgemisch hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei 90 °C gerührt, nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) auf RT gekühlt und mit EtOAc (10 mL) verdünnt. Die Suspension wurde über Celite filtriert und das Filtrat *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash Chromatographie (EtOAc/MeOH 0–5%) gereinigt. Man erhielt die Titelverbindung in Form eines gelben Feststoffs (140 mg Ausbeute, 51%).

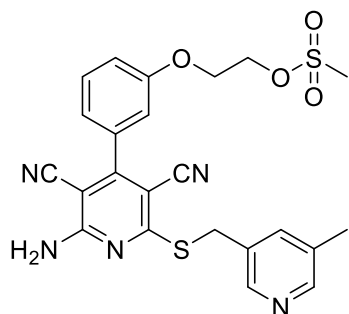
Smp.: 88 °C dec. R_f : 0.4 (EtOAc/MeOH 95/5). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.51–8.47 (m, 1H), 8.46 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.34 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.68–7.55 (m, 3H), 7.50–7.43 (m, 2H), 4.42 (s, 2H), 3.23 (s, 6H), 2.34 (s, 3H), 0.46–0.19 (m, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 165.23, 163.95, 159.07, 157.13, 148.69, 146.34, 143.52, 138.16, 137.30, 135.93, 133.15, 128.43, 128.21, 115.96, 115.35, 99.05, 98.41, 41.71, 35.73, 31.87, 18.56, 9.31. HRMS berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{SSn}$ ($[\text{M}+\text{H}^+]$) 577.11908; gefunden 577.11959. Elementaranalyse berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{SSn}$: C: 54.28%, H: 4.91%, N: 14.61%, S: 5.57%, Sn: 20.63%; gefunden: C: 54.46% $\pm$ 0.08%, H: 5.34% $\pm$ 0.045%, N: 13.11% $\pm$ 0.015%, S: 5.08% $\pm$ 0.04%.

Synthese von 2-Amino-4-[3-(2-phenoxyethyl)methansulfonat]-6-[[[6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril (45)



Zu einer Lösung von **41** (208.75 mg, 0.5 mmol) in trockenem DCM (5 mL) wurde bei 0 °C Triethylamin (104.5 μL , 0.75 mmol) und Methansulfonylchlorid (51 μL , 0.65 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei RT 4 h gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) wurde die Reaktionslösung mit DCM verdünnt und mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Fraktion wurde über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc 1:1) gereinigt. Die Titelverbindung wurde in Form eines gelben Feststoffs (240 mg Ausbeute, 99%) erhalten.

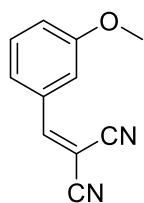
Smp.: 74 °C dec. R_f : 0.65 (EtOAc). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 7.64 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.52–7.41 (m, 2H), 7.21–7.13 (m, 3H), 7.10 (dt, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 6.0 Hz, 4H), 4.35–4.25 (m, 2H), 3.23 (s, 3H), 2.46 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 166.12, 159.51, 158.08, 157.81, 157.71, 155.78, 137.11, 135.29, 130.13, 121.92, 121.04, 120.76, 116.49, 115.17, 114.57, 93.23, 86.00, 68.52, 65.99, 36.85, 35.30, 23.93. HRMS berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}_5\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{H}^+]$) 496.11077; gefunden 496.11072. Elementaranalyse berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}_5\text{S}_2$: C: 55.74%, H: 4.27%, N: 14.13%, S: 12.94%; gefunden: C: 55.50% $\pm$ 0.065%, H: 4.68% $\pm$ 0.035%, N: 13.18% $\pm$ 0.005%, S: 12.05% $\pm$ 0.04%.

2-Amino-4-[3-(2-phenoxyethyl)methansulfonat]-6-[[5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril (46)


Zu einer Lösung von **42** (41.75 mg, 0.1 mmol) in trockenem DCM (2 mL) wurde bei 0 °C Triethylamin (21 µL, 0.15 mmol) und Methansulfonylchlorid (10 µL, 0.13 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei RT 3 h gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) wurde mit DCM verdünnt und mit

gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Fraktion wurde über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mittels Flash Chromatographie (EtOAc/MeOH 0-1%) gereinigt. Die Titelverbindung wurde in Form eines farblosen Feststoffs (39.4 mg Ausbeute, 81 %) erhalten.

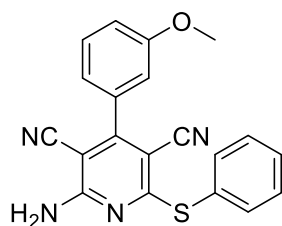
Smp.: 90 °C dec. R_f: 0.65 (EtOAc). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.68 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.56–7.42 (m, 1H), 7.16 (dq, *J* = 5.2, 1.4 Hz, 2H), 7.09 (dt, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 4.60–4.51 (m, 2H), 4.48 (s, 2H), 4.35–4.25 (m, 2H), 3.23 (s, 3H), 2.32 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 165.55, 159.48, 158.10, 157.69, 146.96, 145.91, 139.20, 135.22, 130.11, 121.01, 116.50, 115.17, 115.12, 114.55, 93.28, 86.17, 68.51, 65.98, 36.84, 30.08, 17.73. HRMS berechnet für C₂₃H₂₂O₄N₅S₂ ([M+H⁺]) 496.11077; gefunden 496.11095.

Synthese von 3-Methoxybenzylidenmalonsäuredinitril^{195,195} (47)


Zu einer Lösung von 3-Methoxybenzaldehyd (5.44 g, 40 mmol) und Malonsäuredinitril (2.77 g, 42 mmol, 1.05 equiv.) in 70% MeOH_{aq} (70 mL) wurde Piperidin (2 Tropfen) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde 10 min bei RT gerührt und anschließend 2 h

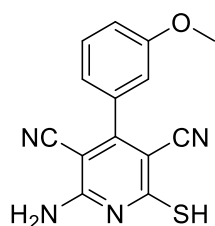
stehen gelassen, wobei sich ein gelber Feststoff bildete. Der Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt, mit eiskaltem MeOH gewaschen und getrocknet. Man erhielt die Titelverbindung in Form eines orangen Feststoffs (6.99 g Ausbeute, 95%, Lit.: 95%).

Smp.: 108 °C dec. R_f = 0.27 (PE/EtOAc 9:1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.74 (s, 1H), 7.51–7.38 (m, 3H), 7.17 (ddd, *J* = 7.5, 2.5, 1.9 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 160.25, 160.04, 132.16, 130.70, 124.00, 121.43, 114.26, 113.79, 112.73, 83.02, 55.64.

Synthese von 2-Amino-4-(3-methoxy)-6-(phenylthiopyridin)-3,5-dicarbonitril^{201,195} (48)

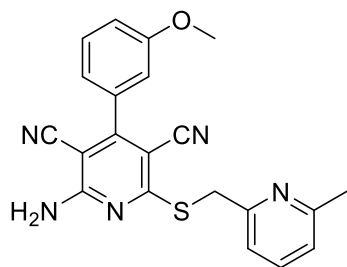
Zu einer Lösung von **47** (6.77 g, 37 mmol), Malonsäuredinitril (2.44 g, 37 mmol) and Thiophenol (3.8 mL, 4.07 g, 37 mmol) in EtOH (70 mL) wurde Triethylamin (1 Tropfen) hinzugefügt. Die gelbe Reaktionslösung wurde 4 h refluxiert. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt, der ausgefallene Feststoff durch Filtration abgetrennt, mit EtOH gewaschen und getrocknet. Man erhielt die Titelverbindung in Form von gelben Kristallen (4.47 g Ausbeute, 34%).

Smp.: 254 °C dec. R_f = 0.29 (EtOAc). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.81 (brs, 1H), 7.64–7.58 (m, 2H), 7.53–7.46 (m, 4H), 7.1–7.12 (m, 2H), 7.10 (ddd, J = 7.6, 1.6, 1.0 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 166.10, 159.65, 159.08, 158.40, 135.17, 134.84, 130.03, 129.69, 129.47, 127.15, 120.51, 115.86, 115.28, 114.99, 114.10, 93.38, 87.12, 55.36.

Synthese von 2-Amino-4-(3-methoxyphenyl)-6-mercaptopyridin-3,5-dicarbonitril^{195,201} (49)

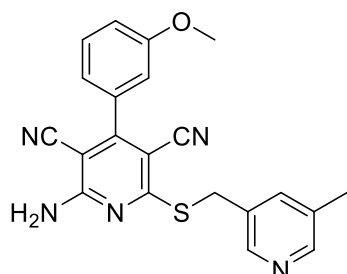
Zu einer Lösung von **48** (4.3 g, 12 mmol) in DMF (30 mL) wurde wasserfreies Na_2S (2.6 g, 33.3 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 80 °C für 2 h erwärmt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf RT wurde unter Eiskühlung 2 N HCl (33 mL, 66 mmol) hinzugefügt, wobei sich ein gelber Feststoff bildete. Der Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und getrocknet. Man erhielt die Titelverbindung in Form eines gelben Feststoffs (3.38 g Ausbeute, quantitativ).

Smp.: 235 °C dec. R_f : 0.76 (EtOAc/MeOH 95/5). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 13.04 (s, 1H), 7.46 (dd, J = 8.3, 7.5 Hz, 1H), 7.11 (ddd, J = 8.3, 2.6, 0.9 Hz, 1H), 7.08 (dd, J = 2.6, 1.6 Hz, 1H), 7.05 (ddd, J = 7.5, 1.6, 0.9 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 179.43, 158.99, 158.50, 154.52, 135.57, 129.95, 120.04, 116.48, 115.80, 114.57, 113.63, 102.44, 81.59, 55.34. HRMS berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ON}_4\text{NaS}$ ($[\text{M}+\text{Na}^+]$) 305.04675; gefunden 305.04684.

Synthese von 2-Amino-4-(3-methoxyphenyl)-6-[[6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio}pyridin-3,5-dicarbonitril²⁰¹ (50)


Zu einer Lösung von **49** (1 g, 3.5 mmol) und NaHCO₃ (1.17 g, 14 mmol) in DMF (20 mL) wurde 2-(Brommethyl)-6-methylpyridin Hydrobromid (652 mg, 3.5 mmol) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt, anschließend auf Eiswasser (100 mL) gegossen und 16 h bei 4 °C belassen. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und getrocknet. Man erhielt die Titelverbindung in Form von farblosen Kristallen (1.13 g Ausbeute, 83%, Lit.: 62%).

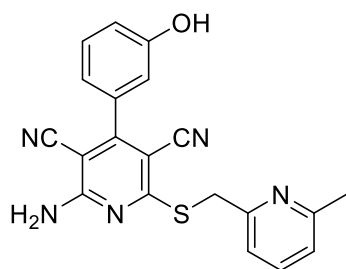
Smp.: 176 °C dec. R_f: 0.85 (EtOAc/MeOH 95/5). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.63 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.45 (ddt, *J* = 7.6, 6.3, 1.1 Hz, 2H), 7.16–7.09 (m, 3H), 7.06 (dt, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 1H), 4.56 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 2.45 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 166.15, 159.53, 159.04, 158.17, 157.80, 155.78, 137.03, 135.15, 129.96, 129.44, 127.55, 127.18, 121.85, 120.70, 120.46, 115.81, 115.22, 115.16, 114.05, 93.22, 85.98, 55.32, 35.34, 23.93.

Synthese von 2-Amino-4-(3-methoxyphenyl)-6-[[5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio}pyridin-3,5-dicarbonitril²⁰¹ (51)


Zu einer Lösung von **49** (56 mg, 0.2 mmol) und NaHCO₃ (67 mg, 0.8 mmol) in DMF (3 mL) wurde 3-(Brommethyl)-5-methylpyridin Hydrobromid (53.4 mg, 0.2 mmol) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt, anschließend auf Eiswasser (50 mL) gegossen und 16 h bei 4 °C belassen. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt und getrocknet. Man erhielt die Titelverbindung in Form von farblosen Kristallen (62 mg Ausbeute, 80%).

Smp.: 210 °C dec. R_f: 0.45 (EtOAc). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.65–8.51 (m, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.59–7.25 (m, 2H), 7.23–6.95 (m, 3H), 4.46 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 2.28 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 165.68, 159.48, 159.03, 158.22, 148.69, 147.55, 137.23, 135.13, 133.30, 132.65, 129.95, 120.45, 115.84, 115.19, 115.15, 114.03, 93.29, 86.10, 55.32, 30.18, 17.73. MS (ESI) berechnet für C₂₁H₁₇N₅OS ([M+H]⁺): 387.12, gefunden: 388.28.

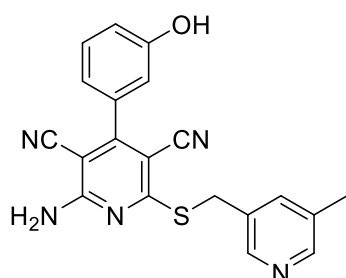
Synthese von 2-Amino-4-(3-hydroxyphenyl)-6-[[[6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril²⁰¹ (**52**)



BBr₃ (20.6 mL, 20.6 mmol, 1 M in DCM) wurde tropfenweise zu einer eisgekühlten Lösung von **50** (800 mg, 2 mmol) in trockenem DCM (20 mL) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei RT gerührt. Das braun gefärbte Reaktionsgemisch wurde mit DCM verdünnt (20 mL) und mit iPrOH (0.5 mL) und gesättigter NaHCO₃ (30 mL) versetzt. Die wässrige Fraktion wurde mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert, die organische Fraktion über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mittels Flash Chromatographie (EtOAc/MeOH 0-10%) gereinigt. Man erhielt das Produkt in Form von orangen Kristallen (450 mg Ausbeute, 60%, Lit.: 62%).

R_f: 0.88 (EtOAc/MeOH 95/5). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.87 (s, 1H), 7.63 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.34 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J* = 8.1, 2.3 Hz, 1H), 6.89 (dt, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.55 (s, 2H), 2.45 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 166.19, 159.58, 158.45, 157.83, 157.34, 155.79, 137.09, 135.08, 129.95, 121.90, 120.74, 118.88, 117.25, 115.26, 115.03, 93.08, 85.86, 35.36, 23.96. MS (ESI) berechnet für C₂₀H₁₅N₅OS ([M+H]⁺): 373.10, gefunden: 374.14.

Synthese von 2-Amino-4-(3-hydroxyphenyl)-6-[[[5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril (**53**)



BBr₃ (1.6 mL, 1.6 mmol, 1 M in DCM) wurde tropfenweise zu einer eisgekühlten Lösung von **51** (60 mg, 0.15 mmol) in trockenem DCM (3 mL) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei RT gerührt. Das braun gefärbte Reaktionsgemisch wurde mit DCM verdünnt (20 mL) und mit iPrOH (0.5 mL) und gesättigter NaHCO₃ (30 mL) versetzt. Die wässrige Fraktion wurde mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert, die organische Fraktion über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mittels Flash Chromatographie (EtOAc/MeOH 0-10%) gereinigt. Man erhielt das Produkt in Form eines gelben Öls (30 mg Ausbeute, 58%).

R_f: 0.62 (DCM/MeOH 9:1). ¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 9.85 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.32 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.93 (ddd, *J* = 8.1, 2.4, 0.9 Hz, 1H), 6.89–6.85 (m, 1H), 6.85–6.82 (m, 1H), 4.45 (s, 2H), 2.28 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 165.73, 159.52, 158.43, 157.31, 148.63,

147.49, 137.28, 135.03, 133.28, 132.68, 129.89, 118.83, 117.22, 115.14, 115.01, 93.12, 85.96, 30.19, 17.74. MS (ESI) berechnet für $C_{20}H_{15}N_5OS$ ($[M+H]^+$): 373.10, gefunden: 374.26.

4.3 Radiochemie

4.3.1 Allgemeines

No-carrier-added (n.c.a.) $[^{18}F]$ Fluorid wurde über die $^{18}O(p,n)^{18}F$ Kernreaktion durch Beschuss von angereichertem $[^{18}O]$ Wasser in einem Ti-Target mit 16.5 MeV Protonen am JSW BC1710 Zyklotron oder in einem Silbertarget des GE PETtrace des INM-5 (Forschungszentrum Jülich) produziert.

Die Radiofluorierungen wurden allgemein in Wheaton V-Vials durchgeführt, diese waren mit PTFE-Magnetrührfischen ausgestattet und mit Silikonsepten verschlossen. Reaktionen unter inerten Bedingungen wurden in Argon ausgeführt. Die Radiosynthesen wurden in einem Aluminiumblock, die mit zu den Reaktionsgefäßen passenden Bohrlöchern versehen waren, auf einem Magnetrührer durchgeführt.

4.3.2 Kartuschen und Lösungsmittel

Zum Fixieren des $^{18}F^-$ aus der Targetlösung wurden Anionenaustauscher Kartuschen verwendet. Die Sep-Pak® Accell Plus QMA Carbonate Plus Light Kartuschen (130 mg Sorbent) der Firma Waters GmbH (Eschborn, Deutschland) wurden vor Gebrauch mit 1 mL H_2O vorkonditioniert. Chromafix™ PS- H^+ Kartuschen wurden von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) erworben, diese wurden mit $NaHCO_3$ -Lösung (5 mL, 0.5 M) und DI Wasser (10 mL) vorkonditioniert. Oasis WAX 1 cc Vac Kartusche (30 mg) ebenfalls von der Firma Waters GmbH wurden mit $NaHCO_3$ -Lösung (5 mL, 0.5 M) und DI Wasser (10 mL) vorkonditioniert. Für Festphasenextraktionen (SPE) wurden Sep-Pak® C18 Plus Light Kartuschen (130 mg Sorbent) (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) oder Polymer-basierte Strata™X Kartuschen (30 mg) (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) verwendet, diese wurden mit Ethanol (2mL) und Wasser (10 mL) vorkonditioniert.

Trockene Lösungsmittel für Radiomarkierungen wurden von Sigma-Aldrich Merck (Taufkirchen, Deutschland) erworben.

4.3.3 Charakterisierung und Isolierung radiomarkierter Produkte

Radio-Dünnschicht-Chromatographische (Radio-DC) Analysen von radioaktiven Verbindungen wurden durch Auftragen von 2–3 μL einer gequenchten Reaktionslösung auf DC-Platten (Silica gel on TLC Al foils, Sigma Aldrich, Taufkirchen) durchgeführt. Die Platte wurde zunächst getrocknet und dann mit dem entsprechenden Laufmittel entwickelt, sodass das ^{18}F -markierte Produkte einen R_f -Wert von ca. 0.5 aufwiesen. Die chromatographische Verteilung der Aktivität auf der DC-Platte wurde auf einem Phosphor-Imager (Cyclone Plus, PerkinElmer) gemessen.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographische (HPLC) Analysen von radioaktiven Verbindungen wurden an einem Dionex Ultimate 3000 System mit einer Ultimate 3000 Diode Array-Detektor (UV) in Serie gekoppelt mit einem Berthold NaI Detektor durchgeführt. Die Identifikation der ^{18}F -markierten Verbindung erfolgte über die Co-Injektion der entsprechenden nicht-radioaktiven ^{19}F -Referenzverbindung. Die in Serie gekoppelten UV- und Radioaktivitätsdetektoren zeigen eine Zeitverschiebung von 0.2–0.5 min abhängig von der Flussrate. Folgende analytische RP Säulen wurden verwendet:

- Luna C18(2) Säule (4,6 x 250 mm, 4 μm , Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
- Synergi Hydro RP C18 Säule (4,6 x 250 mm, 4 μm , Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
- Luna PFP(2) Säule (4,6 x 250 mm, 4 μm , Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
- Chromolith® SpeedRod RP-18 (4,6 x 50 mm, Supelco, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Für die Reinigung und Isolierung des ^{18}F -markierten Produkts aus der Reaktionslösung wurde ein HPLC System bestehend aus einer Merck Hitachi L-6000 Pumpe, einem Knauer K-2500 Detektor, einem Rheodyne 6-Wegeventil und einem Geiger-Müller Zählrohr verwendet. Folgende semi-präparative RP Säulen wurden eingesetzt:

- Gemini C18 Säule (10 X 250 mm, 10 μm , Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
- Synergi Hydro RP Säue (10 x 250 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)

Für die genaue Identifizierung einer radioaktiven Verbindung wird die Retentionszeit t_R (bzw. der k-Wert) mit den verwendeten HPLC Bedingungen angegeben. Um den k-Wert zu berechnen, muss zuvor die Totzeit (t_0) des HPLC-Systems bestimmt werden, dabei handelt es sich um die Zeit, die die Flüssigkeit von der Injektion bis zur Detektion benötigt. T_0 kann mit Hilfe von Thioharnstoff ermittelt werden. Der k-Wert wird dann nach folgender Gleichung berechnet:

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

Gleichung 9

Tabelle 12. HPLC-Bedingungen der synthetisierten Referenzverbindungen und ihre k-Werte

Verbindung	k	Säule	Laufmittel
ALX5406	8.9	Hydro RP 4 µm 80 Å (4.6 x 250 mm)	MeCN/0.2% TFA, 45/55, 1.5 mL/min
ALX5407	10.8	Hydro RP 4 µm 80 Å (4.6 x 250 mm)	MeCN/0.2% CH ₃ COOH, 4/6, 1.5 mL/min
MNI-1126	5.5	Luna C18 5 µm 100 Å (4.6 x 250 mm)	MeCN/0.1 M NH ₄ HCO ₂ + 0.5% CH ₃ COOH, 3/7, 1.5 mL/min
MNI-1126	10.7	Chiralpak AD-H 5 µm (4.6 x 250 mm)	Hexan/iPrOH, 85/15, 1 mL/min
FMPD	4.1	Luna C18 5 µm 100 Å (4.6 x 250 mm)	MeCN/0.1% TFA 35/65 1.5 mL/min
<i>iso</i> -FMPD	2.6	Luna C18 5 µm 100 Å (4.6 x 250 mm)	MeCN/0.2% TFA 35/65 1.5 mL/min
FEMPD	5.2	Hydro RP 4 µm 80 Å (4.6 x 250 mm)	MeCN/0.1% CH ₃ COOH, 45/55, 1.5 mL/min
<i>iso</i> -FEMPD	4.8	Hydro RP 4 µm 80 Å (4.6 x 250 mm)	MeCN/0.1% CH ₃ COOH, 45/55, 1.5 mL/min

4.3.4 Wichtige Größen für die Beschreibung radiomarkierte Substanzen

Die radiochemische Ausbeute (RCA):

Das Verhältnis der Ausbeute der isolierten, radioaktiven Verbindung (zerfallskorrigiert) bezogen auf die Gesamtaktivität zu Beginn der Synthese.²⁶

Um eine möglichst genaue Bestimmung der RCA zu realisieren, wurde die Reaktionslösung mit DI Wasser (und/oder HPLC-Eluent) verdünnt, die klare Lösung möglichst vollständig aus dem V-Vial aufgenommen und ins HPLC System injiziert. Das leere Reaktionsgefäß wurde anschließend zur Korrektur nochmals ausgemessen.

Radiochemische Reinheit (RCR):

Die radiochemische Reinheit einer radiomarkierten Verbindung beschreibt das Verhältnis der Radioaktivität dieses Moleküls bezogen auf die gesamte Radioaktivität in der Probe.²⁶

Radiochemischer Umsatz (RCU):

Der radiochemische Umsatz wurde bestimmt, indem ein Aliquot aus der radioaktiven Reaktionslösung entnommen wurde, und dieses mittels HPLC auf die Aktivität des Produktpeaks im Verhältnis zur Gesamtaktivität der Reaktionslösung überprüft wurde. Dies wurde entweder durch ein HPLC-System mit zwei Injektionsventilen bestimmt, indem das gleiche Volumen der aktiven Reaktionslösung vor und hinter die Säule injiziert wurde. Dabei ist es wichtig, dass die verwendeten Probenschleifen die exakt gleichen Abmessungen besitzen. Alternativ wurde eine Chromolith Säule verwendet, die nicht-umgesetztes $^{18}\text{F}^-$ nahezu quantitativ angibt. Das Verhältnis von nicht-umgesetzten $^{18}\text{F}^-$ zu ^{18}F -markiertem Produkt kann als RCU angegeben werden.

Bestimmung der molaren Aktivität (A_m):

Zur Ermittlung der molaren Aktivität wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der Referenzverbindung mittels HPLC aufgenommen. Durch die lineare Korrelation der Peakfläche zur Konzentration der Referenzverbindung konnte die Konzentration des Trägers (nmol/mL) im Produkt bestimmt werden. Dazu wurde von der Produktlösung ein definiertes Volumen entnommen, die Aktivität dieser Menge bestimmt und auf die HPLC injiziert. Mittels HPLC konnte die Peakfläche des Trägers bestimmt werden. Mit der Konzentration des Trägers und der Aktivitätskonzentration konnte die molare Aktivität berechnet werden (EOS, „end of synthesis“, Zeitpunkt des Syntheseendes).

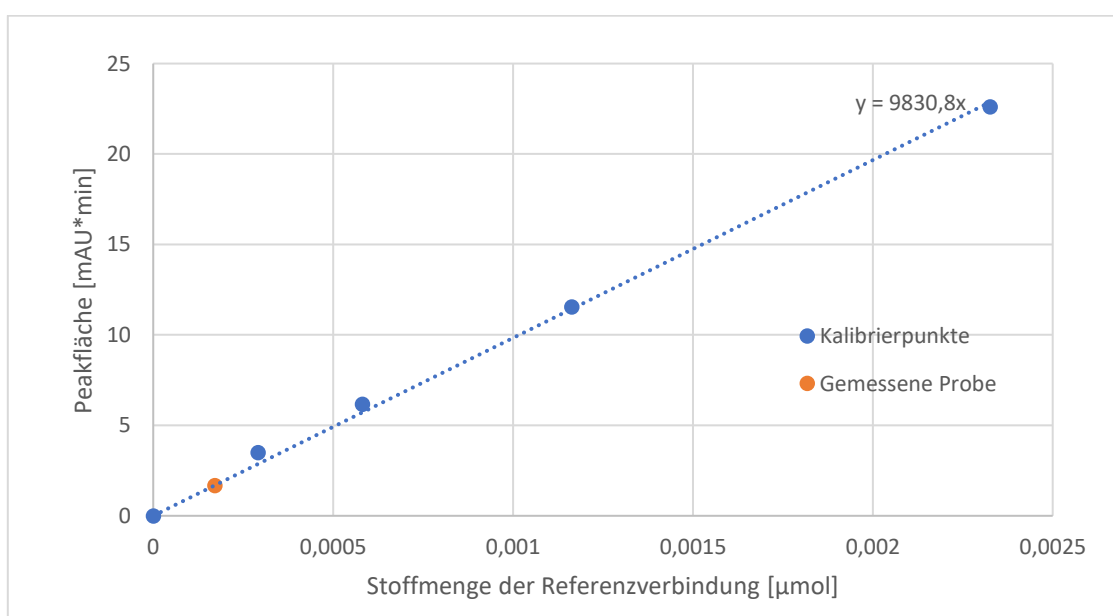


Diagramm 4. Verdünnungsreihe am Beispiel von ALX5407

4.4 Radiofluorierungsvorschriften

4.4.1 Radiosynthese von [^{18}F]ALX5407 nach dem „Alkohol-verstärkten Kupfer-vermittelten“ Protokoll

Das produzierte [^{18}F]Fluorid (30 MBq–3 GBq) im angereichertem Targetwasser wurde auf einer QMA Kartusche von der männlichen Seite (unten) beladen. Anschließend wurde die Kartusche ebenfalls von der männlichen Seite mit 1 mL MeOH gespült, um Wasserreste zu entfernen. Die Kartusche wurde dann mit Luft von der weiblichen Seite getrocknet um MeOH-Spuren zu entfernen. Eine Reaktionslösung bestehend aus Methylester-geschütztem Bpin-Vorläufer **4** (30 μmol , 15 mg) und $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$ (30 μmol , 20 mg) in trockenem DMA (800 μL) wurde in einen V-Vial mit Magnetrührer vorgelegt. [^{18}F]Fluorid wurde von der QMA Kartusche ins Reaktionsgefäß mit einer Lösung Et_4NHCO_3 (1 mg, 3.5 μmol) in *n*-BuOH (400 μL) eluiert. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei 110 °C erwärmt, wobei sich das Methylester-geschützte Zwischenprodukt [^{18}F]ALX5406 bildete. Schließlich wurde die Schutzgruppe durch Verseifung mit NaOH (250 μL , 6 M) für 10 min bei 110 °C entfernt. Nach dem die Reaktionslösung auf RT abgekühlt war, wurde sie zunächst mit wässriger HCl (200 μL , 6 M) neutralisiert und mit HPLC-Eluent verdünnt (Gesamtvolumen max. 2 mL). Die klare Lösung wurde mittels semi-präparativer HPLC (Synergi Hydro RP; MeCN/0.2% CH_3COOH in DI Wasser (4/6); 7 mL/min; 254 nm, 2000 μL Probenschleife) gereinigt.

Die radiochemische Ausbeute wurde bestimmt, indem das Verhältnis vom isolierten Peak-Schnitt zur Startaktivität gebildet wurde. Die Aktivität des Peak-Schnitts wurde entsprechend der abgelaufenen Zeit zerfallskorrigiert.

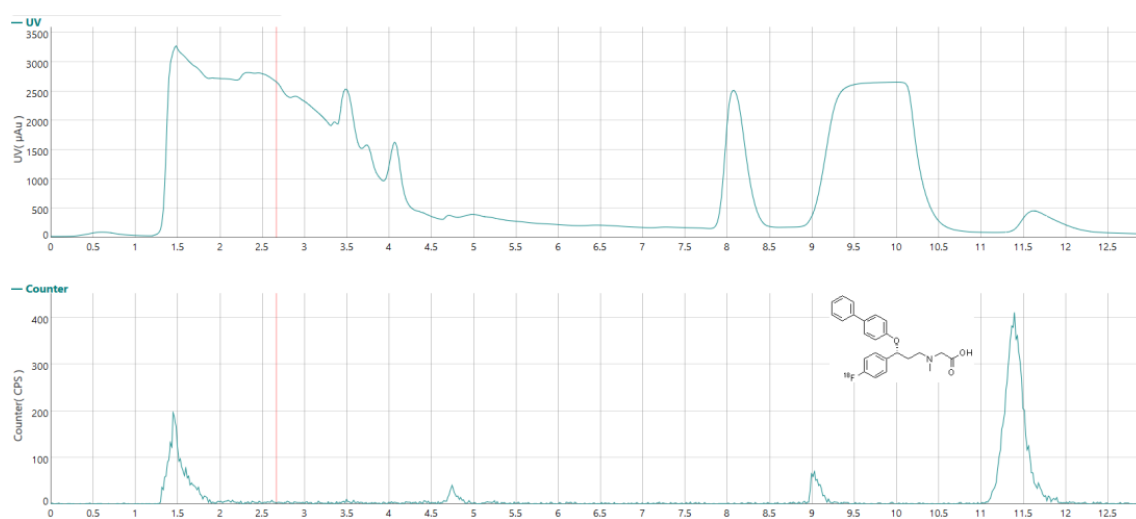


Abbildung 55. Beispielchromatogramm der Isolierung von [^{18}F]ALX5407. Das Produkt eluierte bei ca. $t_R = 11$ min.

Der isolierte Peak-Schnitt wurde auf seine Identität und auf seine radiochemische Reinheit mittels analytischer HPLC überprüft. Dazu wurde eine Probe des isolierten aktiven Produkts mit der Referenzverbindung ALX5407 (Sigma-Aldrich) auf die HPLC co-injiziert (Synergi Hydro RP; MeCN/0.2% CH₃COOH in DI Wasser (4/6); 7 mL/min; 254 nm, 20 µL Probenschleife).

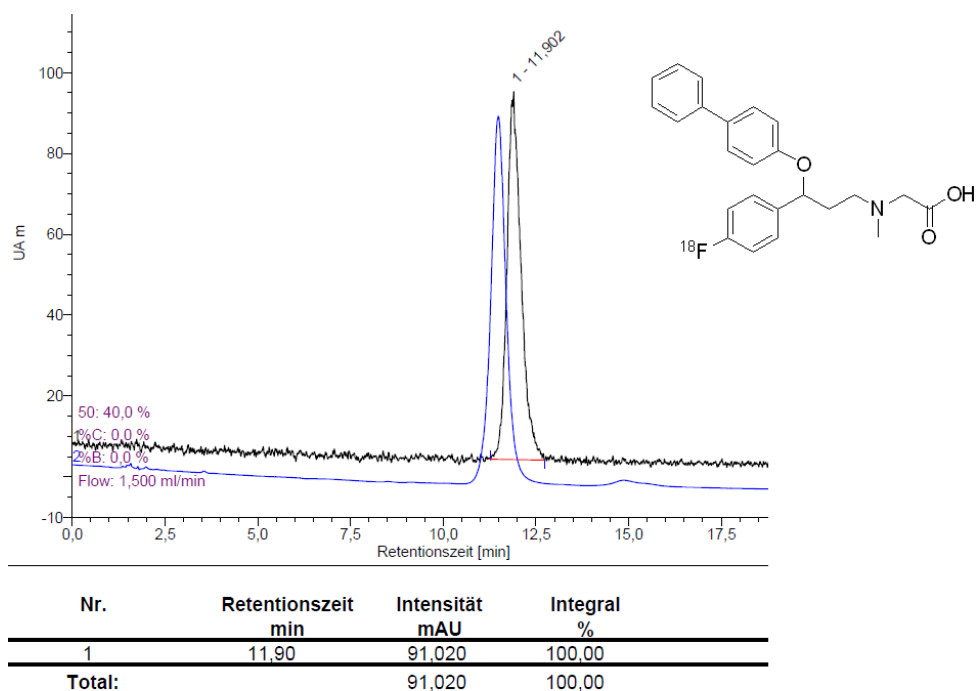


Abbildung 56. Analytisches HPLC Profil von [¹⁸F]ALX5407 co-injiziert mit nicht-radioaktivem ALX5407. (Blau: UV-Chromatogramm 254 nm, schwarz: Radio Chromatogramm).

Formulierung von [¹⁸F]ALX5407

Das über die semi-präparative HPLC isolierte Produkt wurde in einem mit 50 mL DI-Wasser befüllten Kolben gesammelt, von dort wurde es über eine Verschlauchung durch Überdruck (Argon-Strom) auf eine StrataX Kartusche (C18, 30 mg) überführt. Der entleerte Kolben wurde mit weiteren 10 mL DI-Wasser befüllt, um die StrataX nachzuspülen. Die Kartusche wurde im Argon-Strom getrocknet. Anschließend wurde [¹⁸F]ALX5407 von der Kartusche mit EtOH (500 µL) in ein leeres V-Vial eluiert. EtOH wurde bei vermindertem Druck und 40 °C nahezu vollständig entfernt. Die verbliebene Aktivität wurde mit einer Lösung aus PBS-Puffer/1%PEG-tween®80 (500 µL) aufgenommen und über einen Sterilfilter (0.22 µm, Merck Millipore) in ein steriles Probengefäß überführt.

4.4.2 Radiosynthese von [^{18}F]ALX5406

Die Radiomarkierung wurde analog zur in 4.4.1 beschriebenen Alkohol-verstärkten Kupfer-vermittelten Radiofluorierung bis zum Schritt der Verseifung durchgeführt. Das Rohprodukt wurde mittels semi-präparativer HPLC (Synergi HydroRP MeCN/0.1% TFA in DI-Wasser 45/55, 5.4 mL/min, 254 nm, 2000 μL Probenschleife) gereinigt, dafür wurde nach Beendigung der Reaktionszeit (10 min) die Reaktionslösung auf RT gekühlt und mit HPLC-Eluent (ca. 800 μL) verdünnt. Die klare Reaktionslösung wurde vollständig in die HPLC-Spritze aufgezogen und in das HPLC System injiziert. [^{18}F]ALX5406 eluierte bei ca. 25 min.

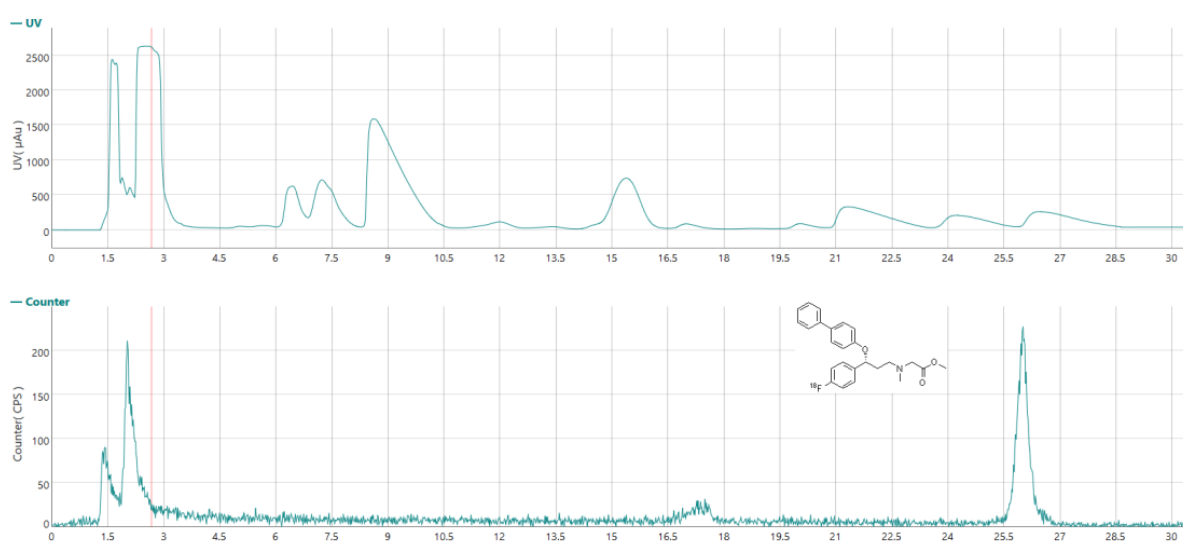


Abbildung 57. Beispielchromatogramm der Isolierung von [^{18}F]ALX5406. Das Produkt eluierte bei ca. $t_R = 25$ min. Oben: UV-Chromatogramm bei 254 nm, unten: Radio Chromatogramm.

Der isolierte Peak-Schnitt wurde auf seine Identität und auf seine radiochemische Reinheit mittels analytischer HPLC überprüft. Dazu wurde eine Probe des isolierten aktiven Produkts mit der Referenzverbindung **7** auf die HPLC co-injiziert (Synergi Hydro RP; MeCN/0.1% TFA in DI Wasser (45/55); 1.5 mL/min; 254 nm, 20 μL Probenschleife). Die radiochemische Ausbeute wurde durch das Verhältnis der zerfallskorrigierten Aktivitätsmenge des isolierten Peakschnitts zur Startaktivität berechnet.

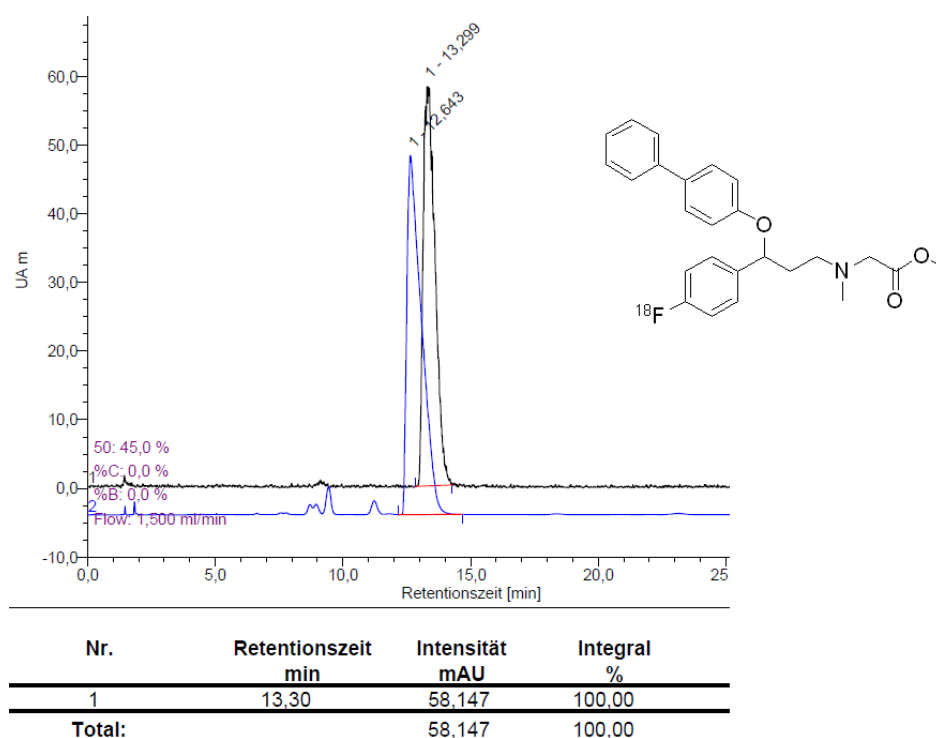


Abbildung 58. Analytisches HPLC Profil von $[^{18}\text{F}]\text{ALX5406}$ co-injiziert mit nicht-radioaktiver Referenzverbindung **7**. (Blau: UV-Chromatogramm 254 nm, schwarz: Radio Chromatogramm).

Die Formulierung von $[^{18}\text{F}]\text{ALX5406}$ wurde analog wie oben (4.4.1) beschrieben durchgeführt.

4.4.3 Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{MNI-1126}$ im Labormaßstab nach dem modifizierten Protokoll der Alkohol-verstärkten Kupfer-vermittelten Radiofluorierung

Das $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ (30–300 MBq) in ^{18}O -Wasser vom Zyklotron wurde zunächst auf eine vorkonditionierte QMA-Kartusche von der männlichen Seite beladen. Anschließend wurde die Kartusche mit MeOH (1 mL) ebenfalls von der männlichen Seite gespült, um mögliche Wasserreste zu entfernen, dann wurde sie mit Luft von der weiblichen Seite getrocknet. Die Elution des $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ erfolgte mit einer Lösung von TEAOTf (1 mg, 3.5 μmol) in MeOH (500 μL) von der weiblichen Seite in ein leeres V-Vial. Nach der Elution wurde die Kartusche mit Luft nachgetrocknet, damit die Aktivität vollständig ins Reaktionsgefäß gelangt. Die Reaktionslösung wurde unter vermindertem Druck bei 80 °C von MeOH befreit. Parallel wurde eine Lösung aus dem Vorläufer **18** (7 mg, 20 μmol) und $(4\text{-Phenylpyridin})_4\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ (21 mg, 20 μmol) in trockenem DMA (800 μL) vorbereitet. Nach vollständiger Entfernung des MeOH wurde die Reaktionslösung aus Vorläufer und Cu-Mediator hinzugefügt und das Reaktionsgemisch bei 110 °C für 20 min erwärmt. Nach Abkühlung der Reaktionslösung auf RT wurde sie mit 1 mL HPLC-Eluent

verdünnt und mittels semi-präparativer HPLC (Gemini C18, MeCN/NH₄HCO₂ (0.1 M) 3/7, mit 0.5% CH₃COOH, pH = 4.2, 5.4 mL/min, 220 nm, 2000 µL Probenschleife) gereinigt.

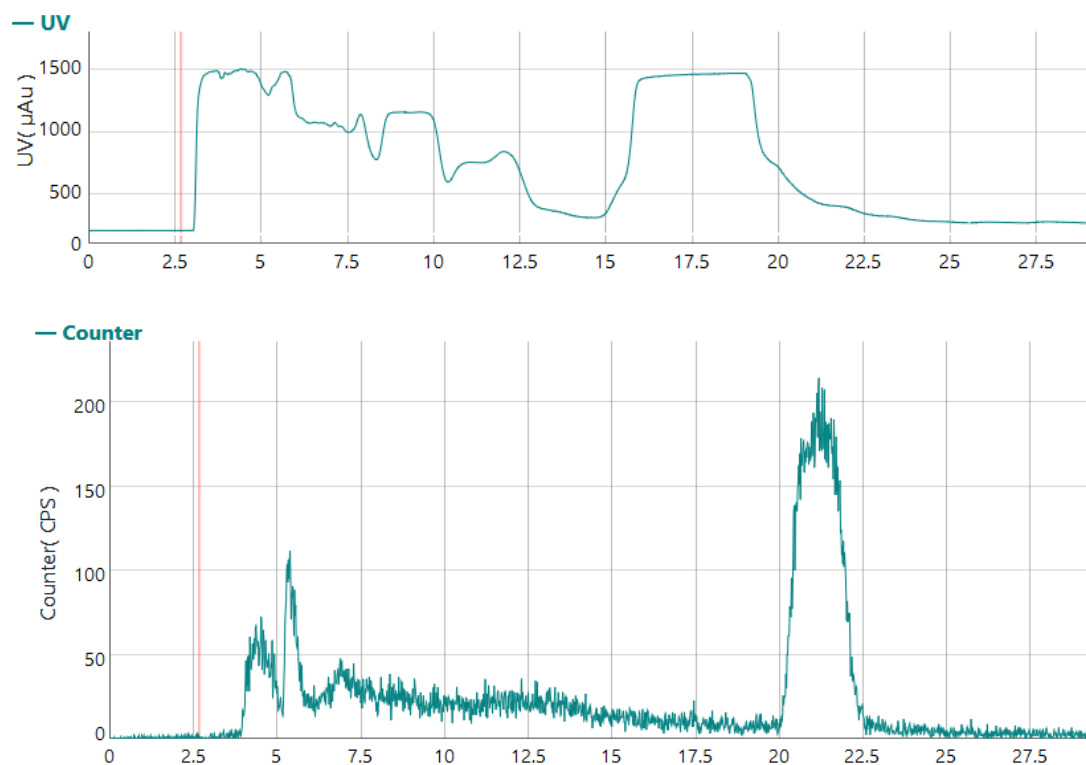


Abbildung 59. Beispielchromatogramm für die Isolierung von [¹⁸F]MNI-1126, das Produkt eluierte bei ca. 20 min. Oben: UV-Chromatogramm 220 nm, unten: Radioaktiv Chromatogramm.

Die radiochemische Ausbeute von [¹⁸F]**19** wurde bestimmt, indem das Verhältnis aus dem isolierten Radiotracer (zerfallskorrigiert) und der Startaktivität gebildet wurde. Identität und radiochemische Reinheit wurden über die analytische HPLC (Luna C18, MeCN/NH₄HCO₂ (0.1 M) 3/7, mit 0.5% CH₃COOH, pH = 4.2, 1.5 mL/min, 220 nm, 20 µL Probenschleife) durch Co-Injektion der nicht-radioaktiven Referenzsubstanz bestimmt.

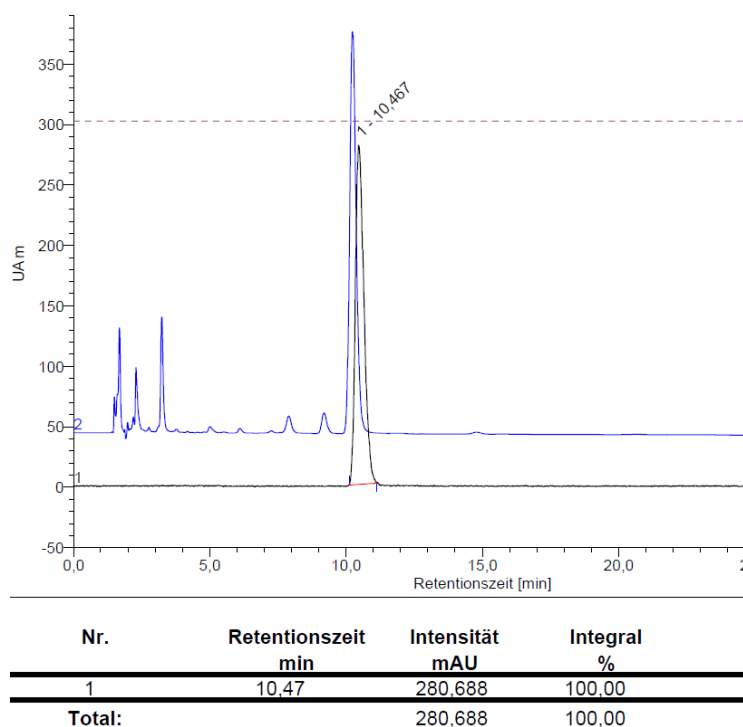


Abbildung 60. Analytisches HPLC Profil von [^{18}F]MNI-1126 co-injiziert mit nicht-radioaktiver Referenzsubstanz. (Blau: UV-Chromatogramm 220 nm, schwarz: Radiochromatogramm).

Formulierung von [^{18}F]MNI-1126

Die mittels semi-präparativer HPLC isolierte Tracer-Fraktion wurde mit 50 mL DI-Wasser verdünnt und im Argon-Strom über eine SPE Kartusche (C18 Sep-pack) geleitet. Die Kartusche wurde mit Wasser (10 mL) nachgespült. Von der C18-Kartusche wurde der Tracer langsam mit EtOH (500 μL) eluiert und mit NaCl-Lösung (0.1 M, 4.5 mL) verdünnt. Die Tracerlösung wurde über einen Sterilfilter (0.22 μm , Merck Millipore) in das finale Probengefäß befüllt.

4.4.4 Radiosynthese von [^{18}F]FMPD und *iso*-[^{18}F]FMPD

Allgemein wurde die Radiofluorierung der Trimethylstannyl-Vorläufer **43** und **44** nach der in 4.4.3 beschriebenen modifizierten Version des Alkohol-verstärkten Kupfer-vermittelten Protokolls durchgeführt. $^{18}\text{F}^-$ (30–300 MBq) in angereichertem Wasser wurde zunächst auf eine QMA Kartusche von der männlichen Seite beladen. Die QMA Kartusche wurde daraufhin mit MeOH (1 mL) gespült und mit Luft getrocknet. $^{18}\text{F}^-$ wurde langsam mit einer Lösung von TEAOTf (1 mg, 3.5 μmol) in wasserfreiem MeOH (500 μL) von der weiblichen Seite in ein leeres V-Vial eluiert. Anschließend wurde MeOH im

Argon-Strom unter vermindertem Druck bei 80 °C abgedampft. Nach dem das Reaktionsgefäß vollständig trocken war, wurde eine Lösung aus Vorläufer **43** oder **44** (5.7 mg, 10 µmol) und Cu(4-Phenylpyridin)₄(OTf)₂ (10.1 mg, 10 µmol) in trockenem DMA (800 µL) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei 110 °C erwärmt. Die anschließende Entschützung der Formamidin-Schutzgruppe erfolgte durch Zugabe von NH₄OH (30%_{aq}, 100 µL) für weitere 10 min bei 110 °C. Nachdem die Reaktionslösung auf RT abgekühlt war, wurde sie mit 2N HCl (100 µL) neutralisiert, mit HPLC-Eluent verdünnt (Gesamtvolumen max. 2 mL) und mittels semi-präparativer HPLC (Gemini, MeCN/0.2% TFA in DI-Wasser 35/65, 7.4 mL/min, 254 nm, 2000 µL Probenschleife) gereinigt.

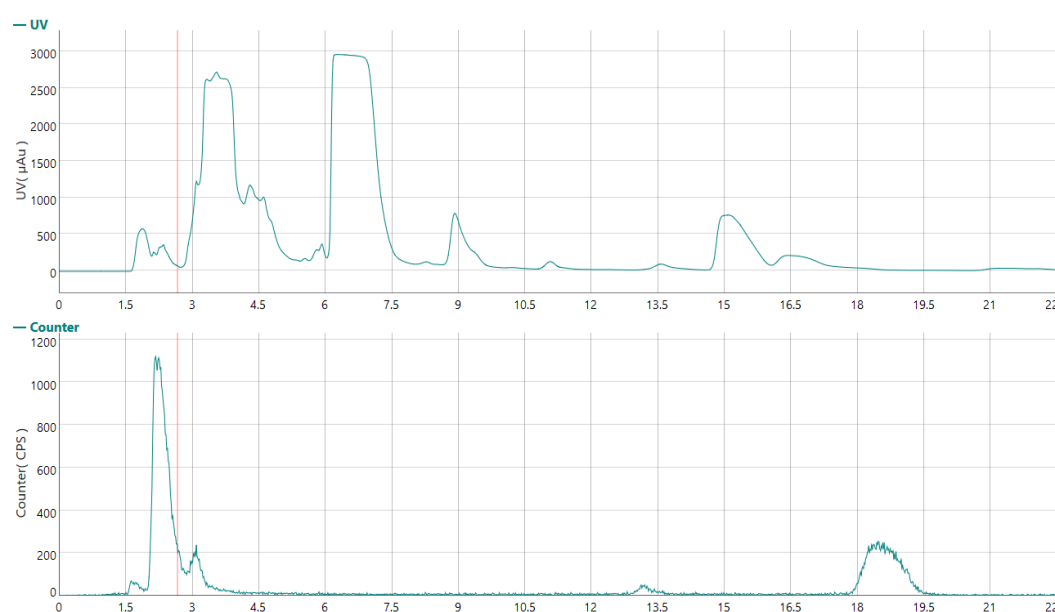


Abbildung 61. Beispielchromatogramm für die Isolierung von [¹⁸F]FMPD. Das Produkt eluierte bei 18 min. Oben: UV-Kanal bei 254 nm, unten: Radioaktiv-Kanal.

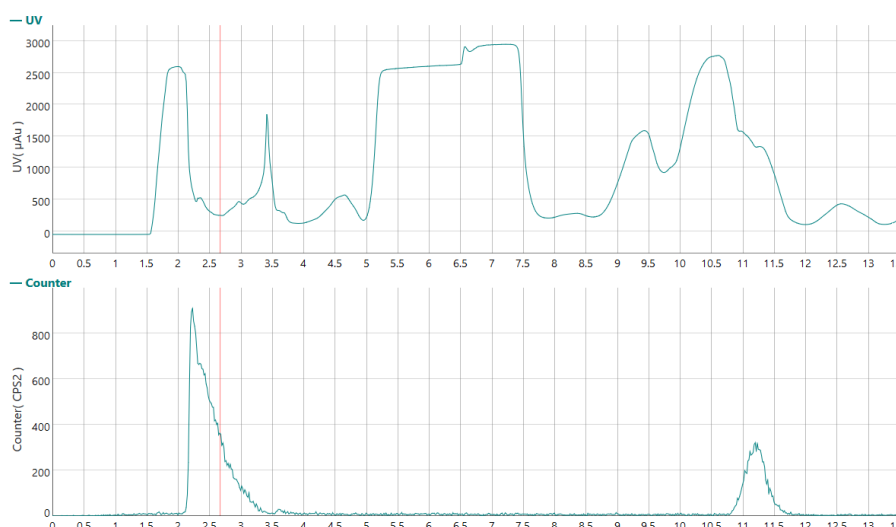


Abbildung 62. Beispielchromatogramm für die Isolierung von *iso*-[^{18}F]FMPD (oben: UV-Chromatogramm 254 nm, unten: Radioaktiv-Kanal). Das Produkt eluierte bei 11 min.

Die radiochemische Ausbeute wurde über das Verhältnis der zerfallskorrigierten, isolierten Tracer-Aktivität zu der jeweiligen Startaktivität bestimmt. Die Charakterisierung des Produkts erfolgte durch Co-Injektion der nicht-radioaktiven Referenzverbindung auf der analytischen HPLC (Luna C18, MeCN/0.2% TFA in DI-Wasser 35/65, 1.5 mL/min, 254 nm, 20 μL Probenschleife). Die Bestimmung der radiochemischen Reinheit wurde ebenfalls durch die Analyse des isolierten Peaktschnitts (20 μL) an der analytischen HPLC ausgeführt.

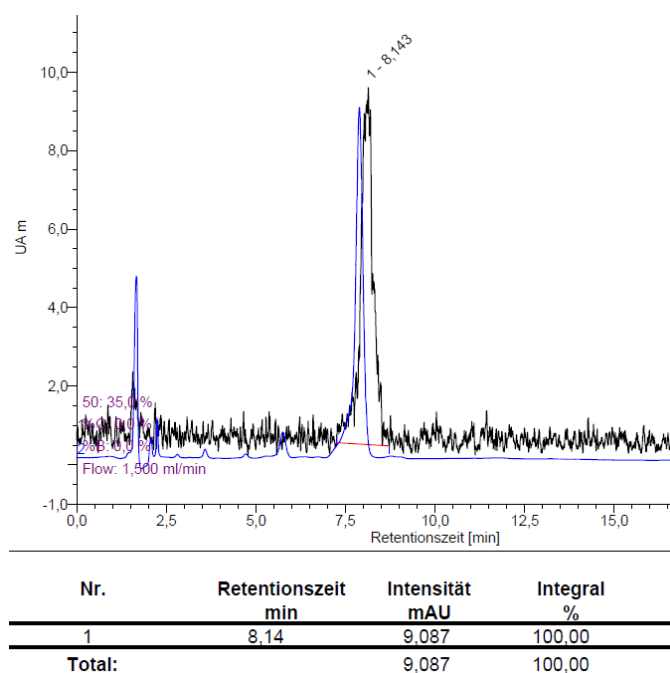


Abbildung 63. Analytisches HPLC Profil von [^{18}F]FMPD, co-injiziert mit nicht-radioaktiver Referenzsubstanz **27** (Blau: UV-Chromatogramm 254 nm, schwarz: Radio-Chromatogramm).

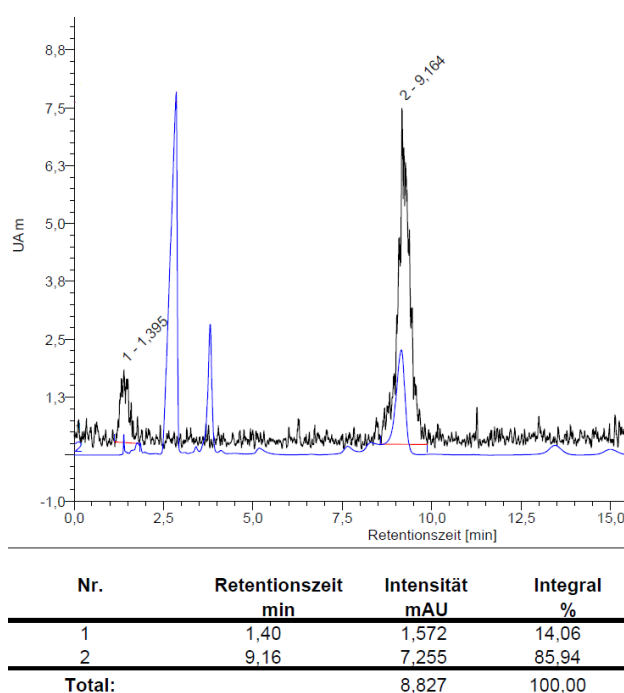


Abbildung 64. Analytisches HPLC Profil von *iso*-[^{18}F]FMPD, co-injiziert mit nicht-radioaktiver Referenzsubstanz **28** (Blau: UV-Chromatogramm 254 nm, schwarz: Radio-Chromatogramm).

4.4.5 Radiosynthese von [^{18}F]FEMPD und *iso*-[^{18}F]FEMPD

Die Radiofluorierung der Methansulfonylvorläufer **45** und **46** erfolgte nach der konventionellen Radiomarkierung. [^{18}F]F $^-$ in ^{18}O -H $_2\text{O}$ (30 MBq–1 GBq) wurde zu einem mit Kryptofix_{2.2.2}[®] (9 mg, 24 μmol) und wässrigem K $_2\text{CO}_3$ (12 μL , 12 mmol, 1 M) befüllten V-Vial hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde daraufhin durch Zugabe von MeCN (1 mL) unter vermindertem Druck bei 90 °C azeotrop getrocknet (3 x). Nach dem das Reaktionsgemisch vollständig getrocknet war, wurde eine Lösung des Vorläufers **45** oder **46** (0.8 mg, 1.7 μmol) in trockenem MeCN (1 mL) hinzugefügt. Die Radiomarkierung wurde bei 90 °C für 20 min durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktionszeit wurde das Reaktionsgemisch auf RT gekühlt, mit DI-Wasser (1 mL) versetzt und mittels semi-präparativer HPLC (Synergi Hydro RP, MeCN/0.2% CH $_3\text{COOH}$ in H $_2\text{O}$, 45/55, 5.4 mL/min, 254 nm, 2000 μL Probenschleife) gereinigt.

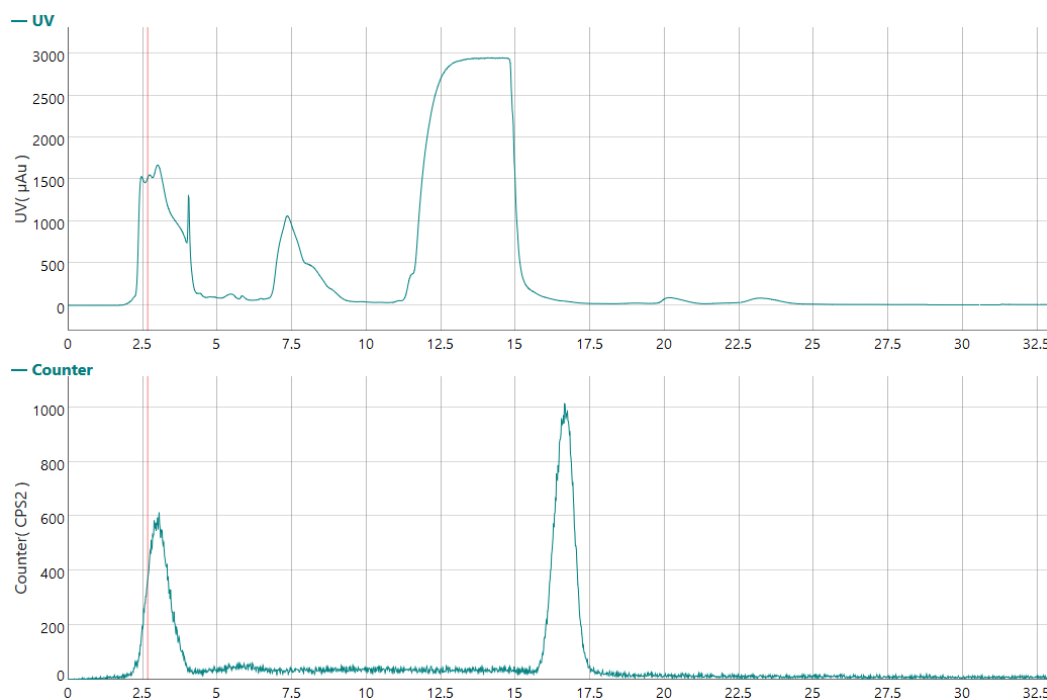


Abbildung 65. Beispielchromatogramm der Isolierung von $[^{18}\text{F}]\mathbf{30}$. Das Produkt eluierte bei ca. 15 min. (Oben: UV-Chromatogramm bei 254 nm, unten: Radio-Chromatogramm).

Die radiochemische Ausbeute von $[^{18}\text{F}]\mathbf{30}$ und $[^{18}\text{F}]\mathbf{31}$ wurde über das Verhältnis der Aktivität der isolierten Fraktionen (zerfallskorrigiert) zur Ausgangsaktivität bestimmt. Die Identität der isolierten Produkte wurde mittels analytischer HPLC (Synergi Hydro RP, MeCN/0.2% CH_3COOH in DI-Wasser, 45/55, 1.5 mL, 254 nm, 20 μL Probenschleife) durch Injektion einer Probe des Peakschnitts und Co-Injektion der Referenzverbindungen **30** oder **31** bestimmt. Die radiochemische Reinheit wurde auch mittels analytischer HPLC (gleiche Bedingungen) ermittelt.

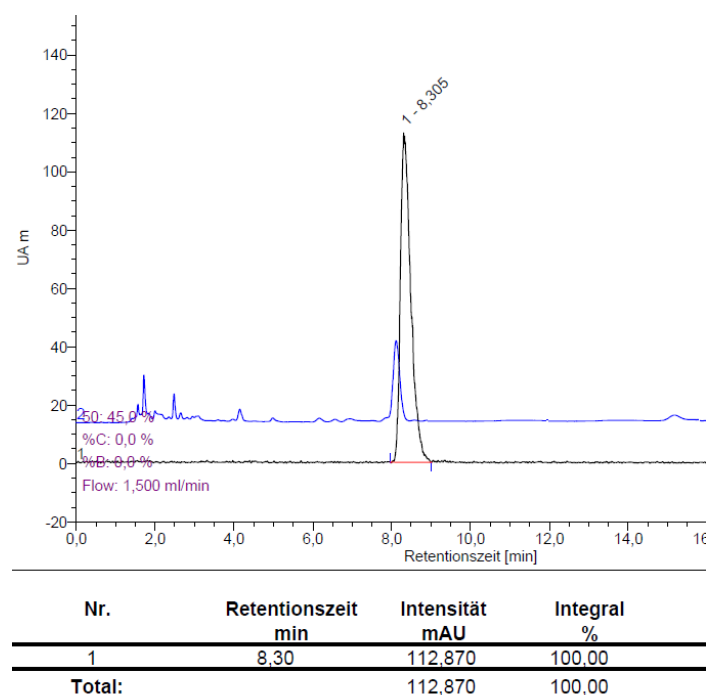


Abbildung 66. Analytisches HPLC Profil von [^{18}F]FEMPD co-injiziert mit nicht-radioaktiver Referenzverbindung **30** (Blau: UV-Chromatogramm 254 nm, schwarz: Radio-Chromatogramm).

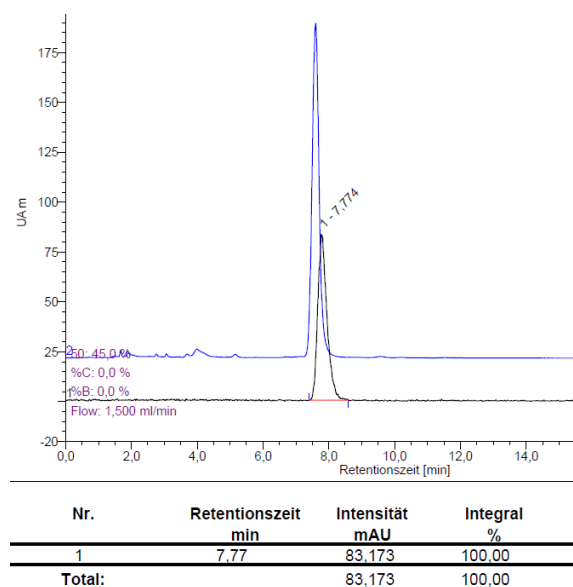


Abbildung 67. Analytisches HPLC Profil von *iso*-[^{18}F]FEMPD co-injiziert mit nicht-radioaktiver Referenzverbindung **31** (Blau: UV-Chromatogramm 254 nm, schwarz: Radio-Chromatogramm).

Der Aufbau des Synthesemoduls ist in Abb. 68 dargestellt. An den entsprechenden Positionen wurden die verwendeten vorkonditionierten Kartuschen (QMA, Sep-Pak Accell Plus QMA Carbonate Plus Light Cartridge, 46 mg, und C18, Sep-Pak Accell Plus Light Cartridge 33 mg, Waters) eingebaut. Die entsprechenden Gefäße wurden mit den in Tabelle 13 aufgeführten Substanzen befüllt. Eine Gemini HPLC Säule wurde eingebaut und mit dem Eluens (MeCN/0.1 M NH_4HCO_2 , 3/7, + 0.5% CH_3COOH , 5.4 mL/min, 220 nm, 5000 μL Probenschleife) eingelaufen.

Das Synthesemodul wurde vollautomatisch nach einem programmierten Ablauf gesteuert. Zunächst wurde $^{18}\text{F}^-$ in Targetwasser vom Zyklotron ins entsprechende Auffanggefäß übergeleitet, diese Lösung wurde im nächsten Schritt über die QMA-Kartusche befördert. Die QMA-Kartusche wurde dann mit 1 mL Methanol aus Gefäß 30 gespült. Anschließend wurde $^{18}\text{F}^-$ mit der Lösung aus Gefäß 31 langsam in den Reaktor eluiert. Um die Elution möglichst langsam durchzuführen, wurde manuell der Helium-Strom über ein Druckventil reduziert. Das Methanol wurde dann bei 80 °C im Helium-Strom abgedampft. Nach der Trocknung folgte die Einleitung des Vorläufers und des Kupfer-Modulators aus Gefäß 32 in den Reaktor. Die Radiosynthese wurde bei 110 °C für 20 min durchgeführt.

Nach dem die Reaktionszeit beendet war, wurde der Reaktor auf 40 °C gekühlt und anschließend mit 3 mL HPLC-Eluens versetzt. Diese Lösung wurde zunächst ins Spritzengefäß geleitet und von dort aus in die Probenschleife der HPLC überführt. Der Radiotracer wurde mittels semi-präparativer HPLC gereinigt, wobei der aktive Peak manuell geschnitten wurde. Der Peakschnitt wurde in einen mit 50 mL H_2O befüllten Rundkolben gesammelt, die gesamte Lösung wurde im Helium-Strom über die C18-Kartusche geleitet. Daraufhin wurde die mit dem Tracer beladene Kartusche mit weiteren 10 mL Wasser aus Gefäß 47 gespült. Der Radiotracer wurde dann mit 500 μL EtOH aus Gefäß 48 langsam ins Endgefäß eluiert. Abschließend wurde die Kartusche mit 4.5 mL NaCl-Lösung aus Gefäß 49 nachgespült und ins Endgefäß geleitet. Das Gesamtvolumen der Tracerlösung betrug ca. 5 mL, wobei der EtOH-Anteil max. 10% betrug. Der Tracer wurde aus der Bleizelle ausgeschleust und für präklinische Studien verwendet.

4.5 Bestimmung von elementaren Verunreinigungen

Die Kupferkonzentration der Tracer-Injektionslösungen wurde mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasmaionenquelle (ICP-MS) in der Zentralanalytik (ZEA-3) des Forschungszentrum Jülichs bestimmt.

4.6 Bestimmung des $\text{Log}D_{7.4}$ -Wertes

Die Lipophilie wurde bestimmt, indem ein Gemisch aus n-Octanol (1 mL) und Phosphatpuffer (1 mL, 0.1 M, pH = 7.4) mit ca. 1–2 MBq mittels SPE formuliertem [^{18}F]-markiertem Radiotracer versetzt wurde. Das Gemisch wurde für 2 min mit einem Vortexmischer gründlich durchmischt. Anschließend wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß mit der Reaktionslösung für 2 min bei 7000 rpm zentrifugiert, wobei eine vollständige Trennung der beiden Phasen erfolgte. Von beiden Phasen wurden Aliquoten (10 μL) entnommen. Die Entnahme einer Probe aus der wässrigen Phase wurde durch Durchstechen des Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einer Kanüle realisiert, wobei darauf zu achten war, dass keine Durchmischung der Phasen stattfand. Die entnommenen Proben wurden dann auf einem Gamma-Counter (Hidex, Automatic Gamma Counter) für eine Minute gemessen. Mit den bestimmten Zählraten wurde der Verteilungskoeffizient P (n-Octanol/Wasser bzw. Puffer) gebildet, der Logarithmus dieses Wertes ergibt den $\text{Log}D_{7.4}$ -Wert. Diese Prozedur wurde mindestens 9-mal wiederholt und die Ergebnisse gemittelt um einen reproduzierbaren Wert zu erhalten.

4.7 *In vitro* Stabilitätstest des Tracers

Zur Bestimmung der Stabilität eines Tracers, wurde dieser zunächst isoliert und mittels SPE mit EtOH formuliert. EtOH wurde dann zum größten Teil unter vermindertem Druck bei 40 °C im Argon-Strom abgedampft, bis eine hochkonzentrierte Lösung übrigblieb.

Humanes Vollblut wurde zentrifugiert, sodass das Plasma verwendet werden konnte. Von dem Inkubationsmedium (Plasma) wurde 1 mL in ein 2 mL Eppendorf-Vial überführt und bei 37 °C im Thermoshaker bei 400 rpm vorinkubiert. Ein Aliquot des formulierten Tracers (1–2 μL) wurde nun hinzugefügt und die Mischung weiter bei 37 °C geschüttelt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten (5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min und 60 min nach Inkubation) wurden jeweils 100 μL des Mediums entnommen, davon erst 2.5 μL mit einer Eppendorf Pipette auf den oberen Bereich der DC Platte (oberhalb der späteren Laufmittelfront) als Referenz getüpfelt (3 x). Die restliche Inkubationslösung wurde zur Proteinfällung mit 240 μL MeCN versetzt, intensiv mittels einem Vortex Schüttler durchmischt und für 2 min zentrifugiert (20000 rcf). Der Niederschlag setzte sich ab, von dem Überstand wurden erneut jeweils 2.5 μL auf den Startfleck der DC Platte (3 x) getüpfelt. Nach dem die Inkubationszeit beendet war, wurde die DC Platte mit dem zuvor ermittelten Laufmittel entwickelt. Die radiochemische Reinheit wurde über das Verhältnis der Produktaktivität einer Bahn zur Gesamtaktivität der Bahn bestimmt. Der Referenzfleck diente zur Bilanzierung der Aktivität, dabei

wurde die Wiederfindungsrate als der Quotient der Gesamtaktivität einer Bahn und des Referenzflecks multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (hier: 3.6) berechnet.

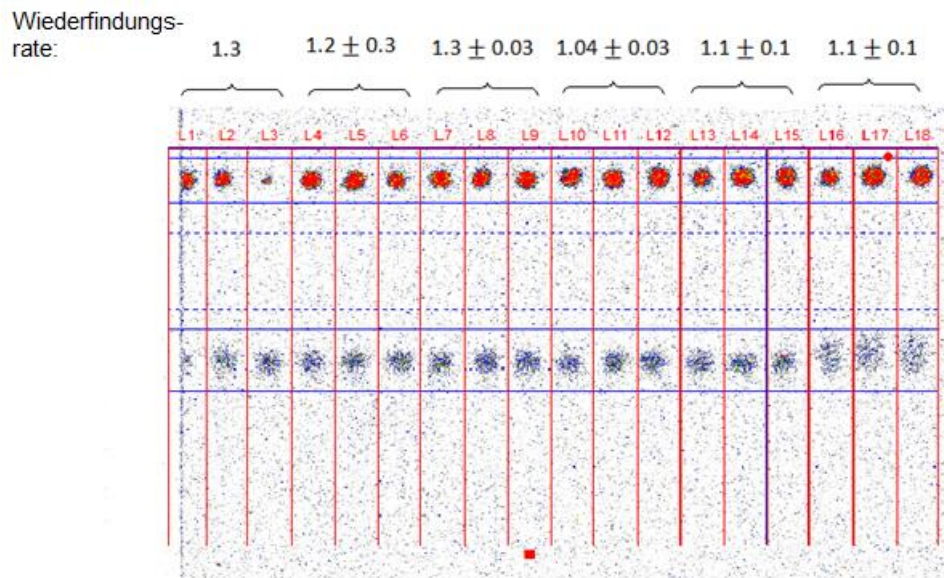


Abbildung 69. Radio-DC der Serumstabilität von [^{18}F]ALX5407. Von links nach rechts: 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min und 60 min, in Dreifachbestimmung pro Zeitpunkt.

5. Zusammenfassung

Die Positronen-Emissions-Tomographie ist ein wichtiges diagnostisches Bildgebungsverfahren und ermöglicht die Visualisierung von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen auf molekularer Ebene. Für dieses Verfahren sind PET-Tracer als molekulare Sonden notwendig. Radiotracer, die als Positronenstrahler Fluor-18 enthalten, werden aufgrund ihrer günstigen Zerfallseigenschaften besonders häufig in der klinischen Diagnostik eingesetzt. Das Fluor-18 kann entweder in Form von $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ als geträgertes Elektrophil oder in wässriger Form als $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ als ungeträgertes Nukleophil am Zyklotron produziert werden. Bei letzterem erfolgt die Einführung von F-18 vorzugsweise als nukleophile aliphatische oder aromatische Substitutionsreaktionen. Die auf diese Weise hergestellten Radiotracer sind aufgrund ihrer sehr hohen molaren Aktivitäten und der damit einhergehenden sehr geringen Konzentrationen für *in vivo* Untersuchungen in idealer Weise geeignet, da sie gemäß dem Tracerprinzip das zu untersuchende System nicht stören, sondern aufgrund ihrer radioaktiven Markierung nur ihr pharmakokinetisches Verhalten verfolgen lässt. Radiofluorierungsmethoden für die Markierung von aromatischen Systemen sind in den letzten Jahren fundamental weiterentwickelt worden. Vor allem Übergangsmetall-vermittelte Radiofluorierungen erlauben die ^{18}F -Markierung eines breiten Spektrums an aromatischen Verbindungen unabhängig von ihren elektronischen Eigenschaften. Als Übergangsmetall hat sich Kupfer besonders bewährt und viele weitere Optimierungen im Hinblick auf Abgangsgruppen, Co-Solventien und Cu-Quellen wurden eingeführt, die die Durchführung von effizienten und praktikablen Radiosynthesen ermöglichen und die auch in dieser Arbeit zum Einsatz kamen. Die Entwicklung neuer radiofluorierter Tracer erfolgt über einen mehrstufigen Prozess, indem viele für die PET-Bildgebung erforderlichen Eigenschaften angepasst und optimiert werden müssen. Neurotracer, die im Mittelpunkt dieser Arbeit standen, müssen besonderen Anforderungen genügen. Radiotracer dieser Klasse müssen für ihr Targetsystem spezifisch und zudem in der Lage sein, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, drei unterschiedliche molekulare Targets zu adressieren. Dazu gehörte der Glycintransporter 1 (GlyT1) mit dem radiofluorierten Inhibitor $[^{18}\text{F}]\text{ALX5407}$, das synaptische Vesikelprotein 2A mit dem enantiomerenreinen $[^{18}\text{F}]\text{MNI-1126}$ und der Adenosin A_1 Rezeptor mit einem radiofluorierten Partialagonisten mit der 4-Phenylpyridin-3,5-dicarbonitril-Leitstruktur. Diese Tracer sollten mittels geeigneter Radiosynthesen in ausreichenden Aktivitätsmengen synthetisiert werden, um *in vitro* und *in vivo* in präklinischen Studien zu ermöglichen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Herstellung und die präklinische Evaluierung des GlyT1 Inhibitors $[^{18}\text{F}]\text{ALX5407}$ durchgeführt. Dazu wurde zunächst der Methylester-geschützte Boronsäurepinakolester-Vorläufer Methyl-(R)-N-(3-([1,1'-Biphenyl]-4-yloxy)-3-(4-(4,4,5,5-

tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)propyl)-*N*-methylglycinat (**4**) über vier Stufen ausgehend von 1-(4-Bromphenyl)-3-chlorpropan-1-on in einer Gesamtausbeute von 16% synthetisiert. Die chirale Information wurde bereits in der ersten Stufe über eine Cu-katalysierte Hydrosilylierung bei der Reduktion des Ketons zum Alkohol in einem Enantiomerenüberschuss (*ee*) von 96% eingeführt. Die Radiosynthese wurde über die Alkohol-verstärkte Kupfer-vermittelte Radiofluorierung durchgeführt, in der durch Verwendung von Anionenaustauscherphasen zeitaufwendige azeotrope Trocknungen nicht erforderlich waren. Das [^{18}F] F^- wurde hierbei erst auf einer Anionenaustauscher-Kartusche fixiert und anschließend mit einer Lösung aus Tetraethylammoniumbicarbonat in *n*-BuOH in ein mit Kupfer-Mediator und Vorläufer **4** befülltes Reaktionsgefäß eluiert. Durch anschließendes Erhitzen der Reaktionslösung auf 110 °C für 10 Minuten erfolgte die nukleophile aromatische Substitution. Im nächsten Schritt folgte die Entschützung des Methylesters mit Natronlauge und man erhielt [^{18}F]ALX5407 in radiochemischen Ausbeuten (RCA) von bis zu 58% und molaren Aktivitäten von bis zu 40 GBq/ μmol (bezogen auf eine Aktivitätsmenge von 620 MBq) innerhalb von 90 min. Die Stabilität von [^{18}F]**8** wurde in humanem Blut über einen Zeitraum von 60 min bestimmt, wobei keine Zersetzung und keine Bildung von Radiometaboliten beobachtet wurde. Der $\text{Log}D_{7.4}$ -Wert von [^{18}F]**8** wurde anschließend mittels der Verteilung in einem *n*-Octanol/PBS-Puffer (pH=7.4) Gemisch bestimmt, wobei ein Wert von 2.8, der für die Penetration der Bluthirnschranke geeignet ist, ermittelt wurde. In *in vitro* Autoradiographien konnte an Rattenhirnschnitten eine Bindung von [^{18}F]ALX5407 gefunden werden, die der Verteilung des GlyT1, die aus der Literatur bekannt war, entsprach. Des Weiteren wurden Konkurrenzexperimente mit den Substraten Glycin und Sarkosin und den GlyT1-Inhibitoren NFPS (rac-ALX5407) und LY2365109 durchgeführt, wobei spezifische Bindungen von [^{18}F]**8** durch Verdrängung mit den GlyT1-Inhibitoren von bis zu 33% bestimmt wurden. Als nächstes folgte das PET-Experiment von [^{18}F]**8** in einer gesunden Ratte. Allerdings konnte kein Übertritt ins Gehirn beobachtet werden und der Tracer konnte nur in peripheren Geweben nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass die Aufnahme von [^{18}F]**8** durch die Efflux-Transporter in der BHS verhindert wurde, wurde in einem weiteren Versuch die zu untersuchende Ratte zuvor mit dem Pgp-Inhibitor Elacridar behandelt. Das Ergebnis blieb jedoch unverändert, auch hier zeigte sich keine Hirn-Aufnahme. In einem weiteren PET-Experiment wurde der Ratte zusammen mit dem Tracer [^{18}F]**8** nicht radioaktives ALX5407 (in Konzentrationen von 1.5 mg/kg und 3 mg/kg) appliziert, um eine ggf. konzentrationsbedingte Aufnahme des Tracers und die Bindungskinetik zu überprüfen. Jedoch wurde auch hier kein Übertritt des Tracers ins Gehirn beobachtet. Zur Visualisierung des GlyT1 mittels PET wurde schließlich auch noch eine Prodrug-Strategie verfolgt. Dazu wurde auf die Entschützung des Methylesters [^{18}F]ALX5406 verzichtet, wobei die Prodrug in radiochemischen Ausbeuten von bis zu 64% und molaren Aktivitäten bis zu 320 GBq/ μmol (bezogen auf eine Aktivitätsmenge von 320 MBq) aus dem Vorläufer **4** erhalten wurde. Der $\text{Log}D_{7.4}$ -Wert von [^{18}F]**7** lag bei 2.9, der somit auch eine Penetration der BHS ermöglichen

sollte. In darauffolgenden PET-Experimenten ($[^{18}\text{F}]\mathbf{7}$ allein, $[^{18}\text{F}]\mathbf{7}$ + Elacridar, $[^{18}\text{F}]\mathbf{7}$ + ALX5407) in gesunden Ratten konnte mit $[^{18}\text{F}]\mathbf{7}$ eine hohe Akkumulation im Gehirn festgestellt werden, wobei das Verteilungsmuster nur partiell die Ergebnisse aus den *in vitro* Autoradiographien und der Literatur widerspiegelte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine Vorläufersynthese für den PET-Tracer $[^{18}\text{F}]\text{MNI-1126}$, einem Tracer zur Adressierung des synaptischen Vesikelprotein 2A, ausgearbeitet. Dieses neue Verfahren ermöglichte die enantiomerenreine Synthese des chiralen Vorläufers (4R)-4-[3-Fluor-5-(trimethylstannyl)phenyl]-1-[(3-methylpyridin-4-yl)methyl]pyrrolidin-2-on (**18**) im Großmaßstab ausgehend von 3-Fluor-5-brombenzaldehyd in 7 Stufen und einer Gesamtausbeute von 8%. Diese Methode ermöglichte es zudem auf eine aufwendige Trennung der Enantiomere mittels HPLC zu verzichten. Zu diesem Zweck wurde ein Alkohol-modifiziertes Chinidin-Derivat {(S)-Hydroxy[(1S,2R,4S,5R)-5-vinylquinuclidin-2-yl)methyl]quinolin-6-ol (**11**) als Katalysator in der zweiten Stufe der Markierungsvorläufersynthese verwendet und lieferte Verbindung **13** in einem Enantiomerenüberschuss (ee) von 98%. Als Abgangsgruppe für die Radiosynthese wurde eine Trimethylstannyl-Funktion verwendet. Die Radiomarkierung erfolgte über eine Modifizierung des Alkohol-unterstützten Kupfer-vermittelten Radiofluorierungsprotokolls. Dazu wurde zunächst $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ aus angereichertem ^{18}O -Wasser auf einer Anionenaustauscher-Kartusche fixiert und mit einer Lösung von Tetraethylammoniumtriflat in Methanol nahezu quantitativ in ein leeres Reaktionsgefäß eluiert. Auch hier konnte auf eine zeitaufwendige azeotrope Destillation verzichtet werden. Das Methanol wurde anschließend abgedampft und eine Lösung aus Kupfer-Mediator ($\text{Cu}(\text{4-Phenylpyridin})_4(\text{ClO}_4)_2$) und Vorläufer **18** in Dimethylacetamid hinzugefügt. Nach Erhitzen der Reaktionslösung auf 110 °C für 20 min wurde $[^{18}\text{F}]\text{MNI-1126}$ mittels semi-präparativer HPLC isoliert, formuliert, und in radiochemischen Ausbeuten von $26 \pm 6\%$ und molaren Aktivitäten bis zu 79 GBq/ μmol (bei einer Aktivitätsmenge von 3.2 GBq) innerhalb von 70 min hergestellt. Die Radiosynthese wurde auf ein automatisiertes Synthesemodul übertragen, wodurch $[^{18}\text{F}]\text{MNI-1126}$ in GBq-Mengen produziert und in präklinischen Evaluierungen untersucht werden konnte.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die PET-Bildgebung des Adenosin A_1 Rezeptors mittels ^{18}F -markierten Partialagonisten behandelt. Dazu wurden zunächst vier Fluor-substituierte Derivate der 2-Amino-4-phenylpyridin-3,5-dicarbonitril-Leitstruktur synthetisiert: 2-Amino-4-(3-fluorphenyl)-6-[[[(6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril (**26**), 2-Amino-4-(3-fluorphenyl)-6-[[[(5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril (**27**) mit einem Fluoratom direkt am Phenylring und 2-Amino-4-(3-(2-fluorethoxy)-6-[[[(6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril und 2-Amino-4-(3-(2-fluorethoxy)-6-[[[(5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio]pyridin-3,5-dicarbonitril mit einer Fluorethoxy-Einheit in meta-Position des Phenylrings. Alle Referenzverbindungen zeigten eine nanomolare Affinität zum A_1AR an transferzierten CHO-

Zellhomogenaten. Die Synthese der entsprechenden Markierungsvorläufer (*E*)-*N'*-(3,5-6-[[6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio}-4-[3-(trimethylstannyl)phenyl]pyridin-2-yl)-*N,N*-dimethylformimidamid (**43**) und (*E*)-*N'*-(3,5-6-[[5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio}-4-[3-(trimethylstannyl)phenyl]pyridin-2-yl)-*N,N*-dimethylformimidamid (**44**) wurde über 5 Stufen ausgehend von 3-Brombenzaldehyd, 2-Amino-4-[3-(2-phenoxyethyl)methansulfonat]-6-[[6-methylpyridin-2-yl)methyl]thio}pyridin-3,5-dicarbonitril (**45**) und 2-Amino-4-[3-(2-phenoxyethyl)methansulfonat]-6-[[5-methylpyridin-3-yl)methyl]thio}pyridin-3,5-dicarbonitril (**46**) über 6 Stufen ausgehend von 3-Hydroxybenzaldehyd synthetisiert. Die Einführung des [¹⁸F]Fluorids in einer aromatischen Radiofluorierung erfolgte über eine Alkohol-unterstützte Kupfer-vermittelte Radiofluorierung. Dazu wurde zunächst ¹⁸F⁻ auf einer Anionenaustauscher-Kartusche fixiert und mit einer Lösung aus Tetraethylammoniumbicarbonat in Methanol in ein leeres Reaktionsgefäß eluiert. Methanol wurde unter vermindertem Druck entfernt und anschließend eine Lösung aus geschütztem Vorläufer **43** oder **44** und Cu(4-Phenylpyridin)₄(ClO₄)₂ in DMA hinzugefügt. Nach basischer Entschützung der Formamid-Schutzgruppe wurde [¹⁸F]**27** und [¹⁸F]**28** isoliert, formuliert und in radiochemischen Ausbeuten von bis zu 24% und 14% und molaren Aktivitäten von 40 GBq/μmol und 3.5 GBq/μmol in einer gesamten Synthesedauer von 60 min produziert. Die Methansulfonylvorläufer **45** und **46** wurden konventionell radiofluoriert. Dazu wurde zunächst [¹⁸F]F⁻ in ¹⁸O-Wasser in einem Reaktionsgefäß mit Kryptofix[®]₂₂₂ und Kaliumcarbonat vorgelegt. Dieses Reaktionsgemisch wurde mehrmals azeotrop getrocknet. Anschließend wurde die Radiofluorierung nach den optimierten Bedingungen (0.85 μmol **43** oder **44**, Acetonitril, 90 °C, 20 min) durchgeführt. Die Partialagonisten [¹⁸F]**30** und [¹⁸F]**31** konnten in radiochemischen Ausbeuten von bis zu 77% und 28%, exzellenten radiochemischen Reinheiten (>99%) und hohen molaren Aktivitäten bis zu 61 GBq/μmol (bei einer Aktivitätsmenge von 940 MBq) und 14 GBq/μmol (bezogen auf eine Aktivitätsmenge von 65 MBq) hergestellt werden. Der LogD_{7.4}-Wert liegt für alle vier Partialagonisten [¹⁸F]**27**, [¹⁸F]**28**, [¹⁸F]**30** und [¹⁸F]**31** im Bereich zwischen 2.3–3.3. Als nächstes wurde das Anreicherungsmuster der radiofluorierten Partialagonisten an Rattenhirnschnitten mittels *in vitro* Autoradiographien bestimmt, wobei ein ähnliches Muster für alle Radioliganden beobachtet wurde. Durch Konkurrenzexperimente mit dem AR Antagonisten DPCPX und dem AR Agonisten NECA ließen sich die spezifischen Bindungen der einzelnen Radioliganden bestimmen, die höchste spezifische Bindung wurde dabei für [¹⁸F]FEMPD (**30**) mit 40% ermittelt. Dieser Radioligand wurde schließlich *in vivo* in der gesunden Ratte evaluiert. [¹⁸F]FEMPD konnte die BHS überwinden und zeigte im Zeitfenster bis zu einer Stunde eine hohe Stabilität ohne Defluorierung (keine Anreicherung in den Knochen). Das Verteilungsmuster von [¹⁸F]FEMPD ist im Einklang mit der literaturbekannten A₁AR-Verteilung im Gehirn. Erhöhte Akkumulationen wurden im Zerebellum, Hippocampus und Thalamus detektiert. Diese hergestellten

neuartigen Partialagonisten für die Bildgebung des A₁AR stellen eine neue Klasse an Radioliganden mit großem Potential dar.

6. Abkürzungen

[¹¹ C]NMSP	<i>N</i> -[¹¹ C]Mehtylspiperon
[¹¹ C]PIB	Pittsburg Verbindung B
[¹¹ C]PMP	<i>N</i> -[¹¹ C]Methylpiperidin-4-yl propionat
[¹⁸ F]CPFPX	8-Cyclopentyl-3-(3-[¹⁸ F]fluorpropyl)-1-propylxanthin
[¹⁸ F]FBA	[¹⁸ F]Fluorbenzaldehyd
[¹⁸ F]FBA	4-[¹⁸ F]Fluorbenzoesäure
[¹⁸ F]FBAM	<i>N</i> -[6-(4-[¹⁸ F]Fluorbenzyliden)aminooxyhexyl]maleimid
[¹⁸ F]FDG	2-[¹⁸ F]Fluor-2-desoxy-D-glukose
[¹⁸ F]FLT	[¹⁸ F]Fluorthymidin
[¹⁸ F]FPEB	[¹⁸ F]-3-Fluor-5-[(pyridin-3-yl)ethylnyl]benzonitril
[¹⁸ F]SFB	<i>N</i> -Succinimidyl-4-[¹⁸ F]Fluorbenzoat
6-[¹⁸ F]Fluor-L-DOPA	6-[¹⁸ F]Fluor-L-3,4-dihydroxyphenylalanin
A	Analyt
Å	Ångström
A ₁	Adenosin A ₁ Rezeptor
A _{2A}	Adenosin A _{2A} Rezeptor
A _{2B}	Adenosin A _{2B} Rezeptor
A ₃	Adenosin A ₃ Rezeptor
Ac	Acetyl
AD	Alzheimer Krankheit (engl. Alzheimer's disease)
AG	Abgangsgruppe
A _m	molare Aktivität
Äq.	Äquivalente
AR	Adenosinrezeptor
ATP	Amino-terminale Domäne
ATP	Adenosintriphosphat
B	Brain
β ⁺	Positron
B ₂ pin ₂	Bis(pinakolato)diboran
BBB	blood brain barrier
Bg	Background
BHS	Bluthirnschranke
B _{max}	maximale Bindungskapazität
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bpin	Boronpinakolester
Bq	Bequerel
bzw.	beziehungsweise
c	Lichtgeschwindigkeit
c.a.	carrier added, geträgert
CPA	<i>N</i> ⁶ -Cyclopentyladenosin
CT	Computer-Tomographie
CTD	Carboxy-terminale Domäne
ctx	cortex
D	Deuteron

d	Duplet
Da	Dalton
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMI	1-3-Dimethyl-2-Imidazolidinon
DMPU	1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	Dimethoxytrityl
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin
E	Energie
$E = mc^2$	Energieerhaltungssatz
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss, engl. enantiomeric excess
$E_{\max}$	maximale Energie
EN	Elektronegativität
engl.	Englisch
ESI	Elektrosprayionisation
EtOH	Ethanol
EZG	Elektronen-ziehende Gruppe
g	Gram
GABA	γ -Aminobuttersäure
GlyR	Glycinrezeptor
GlyT	Glycintransporter
GMP	good manufacturing practice
GPCR	G-Protein-gekoppelter metabotroper Rezeptor
HPLC	high-performance-liquid-chromatography; engl. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
i.v.	intravenös
IC ₅₀	Halbmaximale Inhibitorkonzentration
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl. inductively coupled plasma mass spectrometry)
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
J	Kopplungskonstante
k	Retentionsfaktor
K ₂₂₂	Kryptofix®222
k _{Bindung}	Geschwindigkeitskonstante Bindung
K _D	Dissoziationskonstante
k _{Dissoziation}	Geschwindigkeitskonstante Dissoziation
keV	Kiloelektronenvolt
K _i	Inhibitionskonstante
konz.	konzentriert
K _{pa}	Nierenparenchyma; kidney parenchyma
K _{pe}	Nierenbecken; kidney pelvis

L	Radioligand
L	Leber
LEV	Levetiracetam
log	Logarithmus
log D	Verteilungskoeffizient
log P	Octanol-Wasser Verteilungskoeffizient
LTP	long-term potentiation
m	Masse
m	Multiplet
max	Maximum
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mes	Mesityl; 2,4,6-Trimethylphenyl
mGluR5	metabotroper Glutamatrezeptor Typ 5
min	Minute
min	Minimum
mm	Milimeter
MRP1	Multidrug-Resistance Proteine
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Neutron
n.c.a.	non carrier added, ohne Trägerzusatz
NaOH	Natronlauge
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
NECA	5'-(<i>N</i> -Ethylcaboxamido)adenosin
NFPS	<i>N</i> -[3-(4'-Fluorphenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]sarkosin
NMDAR	<i>N</i> -Methyl-d-Aspartat Rezeptor
NMR	Nuclear magnetic resonance
Ns	Nosyl
Otf	Triflat; Trifluormethansulfonsäure
P	Verteilungskoeffizient
p	Proton
PARP	Poly(ADP-Ribose)polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalz-Lösung
PC	Propylencarbonat
PD	Parkinson's disease; Parkinson'sche Krankheit
Pd(dppf)Cl ₂	[1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]dichlorpalladium(II)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
P-gp	P-Glykoprotein
pKs	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante Ks
ppm	parts per million
q	Quartet
QD	Chinidin
QK	Qualitätskontrolle
R	Rezeptor
rac	Racemat
RCA	Radiochemische Ausbeute
RCR	Radiochemische Reinheit
RCU	Radiochemischer Umsatz
R _f	Retentionsfaktor

RL	Rezeptorkomplex
ROI	Region of interest
RP	Umkehrphase; engl. reversed phase
RT	Raumtemperatur
s	Singulet
SLC6	solute carrier 6
Smp.	Schmelzpunkt
S _N	nukleophile Substitution
S _N 2	nukleophile Substitution 2. Ordnung
S _N Ar	aromatische nukleophile Substitution
SPE	solid phase extraction; Festphasenextraktion
SPECT	single-photon-emission-computer-tomography; Einzelphotonen-Emissions-Computer-Tomographie
SV2	synaptisches Versikelglykoprotein 2
SV2A	synaptisches Vesikelglykoprotein 2A
SYN	Synaptophysin
t	Triplet
t ₀	Totzeit
t _{1/2}	Halbwertszeit
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
Th	Thalamus
THF	Tetrahydrofuran
TMD	Transmembrane Domäne
TSPO	translocator protein 18 kDA
UV	Ultraviolet
v _e	Elektron-Neutrino
WAX	weak anion-exchange resin
ZNS	Zentralnervensystem

7. Literaturverzeichnis

- (1) Miller, P. W.; Long, N. J.; Vilar, R.; Gee, A. D. Synthesis Of¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O, and ¹³N Radiolabels for Positron Emission Tomography. *Angewandte Chemie - International Edition*. **2008**, pp 8998–9033. <https://doi.org/10.1002/anie.200800222>.
- (2) Myers, W. G. Georg Charles de Hevesy: The Father of Nuclear Medicine. *J. Nucl. Med.* **1979**, *24*, 291–294.
- (3) Chiewitz, O.; Hevesy, G. Radioactive Indicators in the Study of Phosphorus Metabolism in Rats [1]. *Nature*. **1935**, pp 754–755. <https://doi.org/10.1038/136754a0>.
- (4) Hevesy, George de, (1 Aug. 1885–5 July 1966), Professor, University of Freiburg, since 1926; Associate: Institute for Research in Organic Chemistry, University of Stockholm, since 1943; Institute of Theoretical Physics, Copenhagen, since 1920. In *Who Was Who*; **2018**. <https://doi.org/10.1093/ww/9780199540884.013.u52086>.
- (5) James, M. L.; Gambhir, S. S. A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiological Reviews*. April 1, **2012**, pp 897–965. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2010>.
- (6) Phelps, M. E. Positron Emission Tomography Provides Molecular Imaging of Biological Processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (16), 9226–9233. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.9226>.
- (7) Herzog, H.; Rösch, F. Chemie Und Physik Der Bildgebung: PET- Und SPECT-Technik. *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, *34* (6), 468–473. <https://doi.org/10.1002/pauz.200500144>.
- (8) Cal-González, J.; Herraiz, J. L.; España, S.; Corzo, P. M. G.; Vaquero, J. J.; Desco, M.; Udias, J. M. Positron Range Estimations with PeneloPET. *Phys. Med. Biol.* **2013**, *58* (15), 5127–5152. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/15/5127>.
- (9) Alva-Sánchez, H.; Quintana-Bautista, C.; Martínez-Dávalos, A.; Ávila-Rodríguez, M. A.; Rodríguez-Villafuerte, M. Positron Range in Tissue-Equivalent Materials: Experimental MicroPET Studies. *Phys. Med. Biol.* **2016**, *61* (17), 6307–6321. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/61/17/6307>.
- (10) Green, M. V.; Seidel, J.; Vaquero, J. J.; Jagoda, E.; Lee, I.; Eckelman, W. C. High Resolution PET, SPECT and Projection Imaging in Small Animals. *Comput. Med. Imaging Graph.* **2001**, *25* (2), 79–86. [https://doi.org/10.1016/S0895-6111\(00\)00057-4](https://doi.org/10.1016/S0895-6111(00)00057-4).
- (11) Positron Emitters https://www-nds.iaea.org/medical/positron_emitters.html (accessed Jan 2, 2021).
- (12) Serdons, K.; Verbruggen, A.; Bormans, G. M. Developing New Molecular Imaging Probes for PET. *Methods*. June **2009**, pp 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.03.010>.
- (13) Weber, B.; Westera, G.; Treyer, V.; Burger, C.; Khan, N.; Buck, A. Constant-Infusion H²¹⁵O PET and Acetazolamide Challenge in the Assessment of Cerebral Perfusion Status. *J. Nucl. Med.* **2004**, *45* (8), 1344–1350.
- (14) Herscovitch, P.; Raichle, M. E.; Kilbourn, M. R.; Welch, M. J. Positron Emission Tomographic Measurement of Cerebral Blood Flow and Permeability-Surface Area Product of Water Using [¹⁵O]Water and [¹¹C]Butanol. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1987**, *7* (5), 527–542. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1987.102>.

- (15) Schepis, T.; Gaemperli, O.; Treyer, V.; Valenta, I.; Burger, C.; Koepfli, P.; Namdar, M.; Adachi, I.; Alkadhi, H.; Kaufmann, P. A. Absolute Quantification of Myocardial Blood Flow with ^{13}N -Ammonia and 3-Dimensional PET. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (11), 1783–1789. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.044099>.
- (16) Takano, A.; Varrone, A.; Gulyás, B.; Salvadori, P.; Gee, A.; Windhorst, A.; Vercouillie, J.; Bormans, G.; Lammertsma, A. A.; Halldin, C. Guidelines to PET Measurements of the Target Occupancy in the Brain for Drug Development. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43* (12), 2255–2262. <https://doi.org/10.1007/s00259-016-3476-4>.
- (17) Långström, B.; Antoni, G.; Gullberg, P.; Halldin, C.; Malmberg, P.; Någren, K.; Rimland, A.; Svärd, H. Synthesis of L- and D-[Methyl- ^{11}C]Methionine. *J. Nucl. Med.* **1987**, *28* (6), 1037–1040.
- (18) Larsen, P.; Ulin, J.; Dahlstrøm, K.; Jensen, M. Synthesis of [^{11}C]Iodomethane by Iodination of [^{11}C]Methane. *Appl. Radiat. Isot.* **1997**, *48* (2), 153–157. [https://doi.org/10.1016/S0969-8043\(96\)00177-7](https://doi.org/10.1016/S0969-8043(96)00177-7).
- (19) Link, J. M.; Krohn, K. A.; Clark, J. C. Production of [^{11}C]CH₃I by Single Pass Reaction of [^{11}C]CH₄ with I₂. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24* (1), 93–97. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(96\)00181-3](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(96)00181-3).
- (20) Jewett, D. M. A Simple Synthesis of [^{11}C]Methyl Triflate. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part* **1992**, *43* (11), 1383–1385. [https://doi.org/10.1016/0883-2889\(92\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0883-2889(92)90012-4).
- (21) O'Hagan, D.; Rzepa, H. S. Some Influences of Fluorine in Bioorganic Chemistry. *Chem. Commun.* **1997**, No. 7, 645–652. <https://doi.org/10.1039/a604140j>.
- (22) Wang, J.; Sánchez-Roselló, M.; Aceña, J. L.; Del Pozo, C.; Sorochinsky, A. E.; Fustero, S.; Soloshonok, V. A.; Liu, H. Fluorine in Pharmaceutical Industry: Fluorine-Containing Drugs Introduced to the Market in the Last Decade (2001–2011). *Chemical Reviews*. February 26, **2014**, pp 2432–2506. <https://doi.org/10.1021/cr4002879>.
- (23) Bondi, A. Van Der Waals Volumes and Radii. *J. Phys. Chem.* **1964**, *68* (3), 441–451. <https://doi.org/10.1021/j100785a001>.
- (24) Swallow, S. Fluorine in Medicinal Chemistry. In *Progress in Medicinal Chemistry*; **2015**; pp 65–133. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2014.11.001>.
- (25) Coenen, H. H. Fluorine-18 Labeling Methods: Features and Possibilities of Basic Reactions. *Ernst Schering Research Foundation workshop*. **2007**, pp 15–50. https://doi.org/10.1007/978-3-540-49527-7_2.
- (26) Coenen, H. H.; Gee, A. D.; Adam, M.; Antoni, G.; Cutler, C. S.; Fujibayashi, Y.; Jeong, J. M.; Mach, R. H.; Mindt, T. L.; Pike, V. W.; Windhorst, A. D. Consensus Nomenclature Rules for Radiopharmaceutical Chemistry — Setting the Record Straight. *Nuclear Medicine and Biology*. Elsevier Inc. December 1, **2017**, pp v–xi. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.09.004>.
- (27) Cai, L.; Lu, S.; Pike, V. W. Chemistry with [^{18}F]Fluoride Ion. *European Journal of Organic Chemistry*. **2008**. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200800114>.
- (28) Guillaume, M.; Luxen, A.; Nebeling, B.; Argentini, M.; Clark, J. C.; Pike, V. W. Recommendations for Fluorine-18 Production. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part* **1991**, *42* (8), 749–762. [https://doi.org/10.1016/0883-2889\(91\)90179-5](https://doi.org/10.1016/0883-2889(91)90179-5).
- (29) Knust, E. J.; Machulla, H. J. High Yield Production of ^{18}F in a Water Target via the $^{16}\text{O}(^3\text{He},p)^{18}\text{F}$ Reaction. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1983**, *34* (12), 1627–1628. [https://doi.org/10.1016/0020-708X\(83\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0020-708X(83)90010-8).
- (30) Hess, E.; Blessing, G.; Coenen, H. H.; Qaim, S. M. Improved Target System for Production of High Purity [^{18}F]Fluorine via the $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ Reaction. *Appl. Radiat. Isot.* **2000**, *52* (6), 1431–1440.

- [https://doi.org/10.1016/S0969-8043\(99\)00248-1](https://doi.org/10.1016/S0969-8043(99)00248-1).
- (31) Ametamey, S. M.; Honer, M.; Schubiger, P. A. Molecular Imaging with PET. *Chemical Reviews*. **2008**, pp 1501–1516. <https://doi.org/10.1021/cr0782426>.
- (32) Teare, H.; Robins, E. G.; Årstad, E.; Luthra, S. K.; Gouverneur, V. Synthesis and Reactivity of [18F]-N-Fluorobenzenesulfonimide. *Chem. Commun.* **2007**, No. 23, 2330–2332. <https://doi.org/10.1039/b701177f>.
- (33) Shiue, C. Y.; Salvadori, P. A.; Wolf, A. P.; Fowler, J. S.; MacGregor, R. R. A New Improved Synthesis of 2-Deoxy-2-[18F]Fluoro-D-Glucose from 18F-Labeled Acetyl Hypofluorite. *J. Nucl. Med.* **1982**, 23 (10), 899–903.
- (34) Chaly, T.; Diksic, M. High Yield Synthesis of 6-[18F]Fluoro-L-Dopa by Regioselective Fluorination of Protected L-Dopa with [18F]Acetyl hypofluorite. *J. Nucl. Med.* **1986**, 27 (12), 1896–1901.
- (35) Schrobilgen, G.; Firnau, G.; Chirakal, R.; Garnett, E. S. Synthesis of [18F]XeF₂, a Novel Agent for the Preparation of 18F-Radiopharmaceuticals. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, No. 4, 198–199. <https://doi.org/10.1039/c39810000198>.
- (36) Chirakal, R.; Firnau, G.; Schrobilgen, G. J.; McKay, J.; Garnett, E. S. The Synthesis of [18F]Xenon Difluoride from [18F]Fluoride Gas. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1984**, 35 (5), 401–404. [https://doi.org/10.1016/0020-708X\(84\)90049-8](https://doi.org/10.1016/0020-708X(84)90049-8).
- (37) Satyamurthy, N.; Bida, G. T.; Phelps, M. E.; Barrio, J. R. N-[18F]Fluoro-N-Alkylsulfonamides: Novel Reagents for Mild and Regioselective Radiofluorination. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part* **1990**, 41 (8), 733–738. [https://doi.org/10.1016/0883-2889\(90\)90020-H](https://doi.org/10.1016/0883-2889(90)90020-H).
- (38) Namavari, M.; Bishop, A.; Satyamurthy, N.; Bida, G.; Barrio, J. R. Regioselective Radiofluorodestannylation with [18F]F₂ and [18F]CH₃COOF: A High Yield Synthesis of 6-[18F]Fluoro-L-Dopa. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part* **1992**, 43 (8), 989–996. [https://doi.org/10.1016/0883-2889\(92\)90217-3](https://doi.org/10.1016/0883-2889(92)90217-3).
- (39) Bergman, J.; Johnström, P.; Haaparanta, M.; Solin, O.; Duelfer, T.; Stone-Elander, S. Radiolabelling of 2-Oxoquazepam with Electrophilic 18F Prepared from [18F]Fluoride. *Appl. Radiat. Isot.* **1995**, 46 (10), 1027–1034. [https://doi.org/10.1016/0969-8043\(94\)00127-L](https://doi.org/10.1016/0969-8043(94)00127-L).
- (40) Bergman, J.; Solin, O. Fluorine-18-Labeled Fluorine Gas for Synthesis of Tracer Molecules. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, 24 (7), 677–683. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(97\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(97)00078-4).
- (41) Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Stocklin, G. Efficient Stereospecific Synthesis of No-Carrier-Added 2-[18F]-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Using Aminopolyether Supported Nucleophilic Substitution. *J. Nucl. Med.* **1986**, 27 (2), 235–238.
- (42) Yu, S. Review of 18F-FDG Synthesis and Quality Control. *Biomedical Imaging and Intervention Journal*. **2006**. <https://doi.org/10.2349/bij.2.4.e57>.
- (43) Ro, T. L.; Ametamey, S. M. PET Chemistry: An Introduction. In *Basic Sciences of Nuclear Medicine*; Springer Berlin Heidelberg, **2011**; pp 65–101. https://doi.org/10.1007/978-3-540-85962-8_5.
- (44) Yu, S. Review of 18F-FDG Synthesis and Quality Control. *Biomedical Imaging and Intervention Journal*. **2006**. <https://doi.org/10.2349/bij.2.4.e57>.
- (45) Gallagher, B. M.; Fowler, J. S.; Gutterson, N. I.; MacGregor, R. R.; Wan, C. N.; Wolf, A. P. Metabolic Trapping as a Principle of Radiopharmaceutical Design: Some Factors Responsible for the Biodistribution of [18F] 2-Deoxy-2- Fluoro-D-Glucose. *J. Nucl. Med.* **1978**, 19 (10), 1154–1161. <https://doi.org/10.1097/00004728-197904000-00061>.

- (46) Kim, D. W.; Ahn, D. S.; Oh, Y. H.; Lee, S.; Kil, H. S.; Oh, S. J.; Lee, S. J.; Kim, J. S.; Ryu, J. S.; Moon, D. H.; Chi, D. Y. A New Class of SN2 Reactions Catalyzed by Protic Solvents: Facile Fluorination for Isotopic Labeling of Diagnostic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (50), 16394–16397. <https://doi.org/10.1021/ja0646895>.
- (47) Dong, W. K.; Jeong, H. J.; Seok, T. L.; Sohn, M. H.; Katzenellenbogen, J. A.; Dae, Y. C. Facile Nucleophilic Fluorination Reactions Using Tert-Alcohols as a Reaction Medium: Significantly Enhanced Reactivity of Alkali Metal Fluorides and Improved Selectivity. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (3), 957–962. <https://doi.org/10.1021/jo7021229>.
- (48) Lee, J. W.; Oliveira, M. T.; Jang, H. Bin; Lee, S.; Chi, D. Y.; Kim, D. W.; Song, C. E. Hydrogen-Bond Promoted Nucleophilic Fluorination: Concept, Mechanism and Applications in Positron Emission Tomography. *Chemical Society Reviews.* **2016**, pp 4638–4650. <https://doi.org/10.1039/c6cs00286b>.
- (49) Been, L. B.; Suurmeijer, A. J. H.; Cobben, D. C. P.; Jager, P. L.; Hoekstra, H. J.; Elsinga, P. H. [18F]FLT-PET in Oncology: Current Status and Opportunities. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* **2004**, pp 1659–1672. <https://doi.org/10.1007/s00259-004-1687-6>.
- (50) Hamacher, K.; Coenen, H. H. Efficient Routine Production of the 18F-Labelled Amino Acid O-(2-[18F]Fluoroethyl)-L-Tyrosine. *Appl. Radiat. Isot.* **2002**, *57* (6), 853–856. [https://doi.org/10.1016/S0969-8043\(02\)00225-7](https://doi.org/10.1016/S0969-8043(02)00225-7).
- (51) Pike, V. W.; Aigbirhio, F. I. Reactions of Cyclotron-Produced [18F]Fluoride with Diaryliodonium Salts - A Novel Single-Step Route to No-Carrier-Added [18F]Fluoroarenes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, No. 21, 2215–2216. <https://doi.org/10.1039/C39950002215>.
- (52) Yusubov, M. S.; Svitich, D. Y.; Larkina, M. S.; Zhdankin, V. V. Applications of Iodonium Salts and Iodonium Ylides as Precursors for Nucleophilic Fluorination in Positron Emission Tomography. *Arkivoc* **2013**, *2013* (1), 364–395. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.p008.225>.
- (53) Mu, L.; Fischer, C. R.; Holland, J. P.; Becaude, J.; Schubiger, P. A.; Schibli, R.; Ametamey, S. M.; Graham, K.; Stellfeld, T.; Dinkelborg, L. M.; Lehmann, L. 18F-Radiolabeling of Aromatic Compounds Using Triarylsulfonium Salts. *European J. Org. Chem.* **2012**, *5*, 889–892. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201101730>.
- (54) Ross, T. L.; Ermert, J.; Hocke, C.; Coenen, H. H. Nucleophilic 18F-Fluorination of Heteroaromatic Iodonium Salts with No-Carrier-Added [18F]Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (25), 8018–8025. <https://doi.org/10.1021/ja066850h>.
- (55) Sander, K.; Gendron, T.; Yiannaki, E.; Cybulska, K.; Kalber, T. L.; Lythgoe, M. F.; Årstad, E. Sulfonium Salts as Leaving Groups for Aromatic Labelling of Drug-like Small Molecules with Fluorine-18. *Sci. Rep.* **2015**, *5*. <https://doi.org/10.1038/srep09941>.
- (56) Chun, J. H.; Morse, C. L.; Chin, F. T.; Pike, V. W. No-Carrier-Added [18F]Fluoroarenes from the Radiofluorination of Diaryl Sulfoxides. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (21), 2151–2153. <https://doi.org/10.1039/c3cc37795d>.
- (57) Satyamurthy, N.; Barrio, J. R. No-Carrier-Added Nucleophilic [f-18] Fluorination of Aromatic Compounds., **2014**.
- (58) Zhdankin, V. V.; Stang, P. J. Chemistry of Polyvalent Iodine. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (12), 5299–5358. <https://doi.org/10.1021/cr800332c>.
- (59) Rotstein, B. H.; Stephenson, N. A.; Vasdev, N.; Liang, S. H. Spirocyclic Hypervalent Iodine(III)-Mediated Radiofluorination of Non-Activated and Hindered Aromatics. *Nat. Commun.* **2014**, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms5365>.

- (60) Rotstein, B. H.; Wang, L.; Liu, R. Y.; Patteson, J.; Kwan, E. E.; Vasdev, N.; Liang, S. H. Mechanistic Studies and Radiofluorination of Structurally Diverse Pharmaceuticals with Spirocyclic Iodonium(III) Ylides. *Chem. Sci.* **2016**, 7 (7), 4407–4417. <https://doi.org/10.1039/c6sc00197a>.
- (61) Richarz, R.; Krapf, P.; Zarrad, F.; Urusova, E. A.; Neumaier, B.; Zlatopolskiy, B. D. Neither Azeotropic Drying, nor Base nor Other Additives: A Minimalist Approach to ¹⁸F-Labeling. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12 (40), 8094–8099. <https://doi.org/10.1039/c4ob01336k>.
- (62) Lee, E.; Kamlet, A. S.; Powers, D. C.; Neumann, C. N.; Boursalian, G. B.; Furuya, T.; Choi, D. C.; Hooker, J. M.; Ritter, T. A Fluoride-Derived Electrophilic Late-Stage Fluorination Reagent for PET Imaging. *Science (80-.)*. **2011**, 334 (6056), 639–642. <https://doi.org/10.1126/science.1212625>.
- (63) Lee, E.; Hooker, J. M.; Ritter, T. Nickel-Mediated Oxidative Fluorination for PET with Aqueous [¹⁸F] Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (42), 17456–17458. <https://doi.org/10.1021/ja3084797>.
- (64) Tredwell, M.; Preshlock, S. M.; Taylor, N. J.; Gruber, S.; Huiban, M.; Passchier, J.; Mercier, J.; Génicot, C.; Gouverneur, V. A General Copper-Mediated Nucleophilic ¹⁸F Fluorination of Arenes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, 53 (30), 7751–7755. <https://doi.org/10.1002/anie.201404436>.
- (65) Ichiishi, N.; Canty, A. J.; Yates, B. F.; Sanford, M. S. Cu-Catalyzed Fluorination of Diaryliodonium Salts with KF. *Org. Lett.* **2013**, 15 (19), 5134–5137. <https://doi.org/10.1021/ol4025716>.
- (66) Ichiishi, N.; Canty, A. J.; Yates, B. F.; Sanford, M. S. Mechanistic Investigations of Cu-Catalyzed Fluorination of Diaryliodonium Salts: Elaborating the CuI/CuIII Manifold in Copper Catalysis. *Organometallics* **2014**, 33 (19), 5525–5534. <https://doi.org/10.1021/om5007903>.
- (67) Chun, J. H.; Lu, S.; Lee, Y. S.; Pike, V. W. Fast and High-Yield Microreactor Syntheses of Ortho - Substituted [¹⁸F]Fluoroarenes from Reactions of [¹⁸F]Fluoride Ion with Diaryliodonium Salts. *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (10), 3332–3338. <https://doi.org/10.1021/jo100361d>.
- (68) Ichiishi, N.; Brooks, A. F.; Topczewski, J. J.; Rodnick, M. E.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. Copper-Catalyzed [¹⁸F]Fluorination of (Mesityl)(Aryl)Iodonium Salts. *Org. Lett.* **2014**, 16 (12), 3224–3227. <https://doi.org/10.1021/ol501243g>.
- (69) Ye, Y.; Schimler, S. D.; Hanley, P. S.; Sanford, M. S. Cu(OTf)₂-Mediated Fluorination of Aryltrifluoroborates with Potassium Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (44), 16292–16295. <https://doi.org/10.1021/ja408607r>.
- (70) Zlatopolskiy, B. D.; Zischler, J.; Krapf, P.; Zarrad, F.; Urusova, E. A.; Kordys, E.; Endepols, H.; Neumaier, B. Copper-Mediated Aromatic Radiofluorination Revisited: Efficient Production of PET Tracers on a Preparative Scale. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, 21 (15), 5972–5979. <https://doi.org/10.1002/chem.201405586>.
- (71) Mossine, A. V.; Brooks, A. F.; Makaravage, K. J.; Miller, J. M.; Ichiishi, N.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. Synthesis of [¹⁸F]Arenes via the Copper-Mediated [¹⁸F]Fluorination of Boronic Acids. *Org. Lett.* **2015**, 17 (23), 5780–5783. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b02875>.
- (72) Makaravage, K. J.; Brooks, A. F.; Lee, S.-J.; Thompson, S.; Ichiishi, N.; Mossine, A.; McCammant, M.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. Development of New Transition-Metal-Mediated Radiofluorination Reactions. In *Abstracts of Papers, 252nd ACS National Meeting & Exposition, Philadelphia, PA, United States, August 21-25, 2016*; **2016**.
- (73) Zarrad, F.; Zlatopolskiy, B. D.; Krapf, P.; Zischler, J.; Neumaier, B. A Practical Method for the Preparation of ¹⁸F-Labeled Aromatic Amino Acids from Nucleophilic [¹⁸F]Fluoride and Stannyl Precursors for Electrophilic Radiohalogenation. *Molecules* **2017**, 22 (12), 2231. <https://doi.org/10.3390/molecules22122231>.

- (74) Zischler, J.; Krapf, P.; Richarz, R.; Zlatopolskiy, B. D.; Neumaier, B. Automated Synthesis of 4-[18F]Fluoroanisole, [18F]DAA1106 and 4-[18F]FPhe Using Cu-Mediated Radiofluorination under "Minimalist" Conditions. *Appl. Radiat. Isot.* **2016**, *115*, 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2016.04.030>.
- (75) Zischler, J.; Kolks, N.; Modemann, D.; Neumaier, B.; Zlatopolskiy, B. D. Alcohol-Enhanced Cu-Mediated Radiofluorination. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23* (14), 3251–3256. <https://doi.org/10.1002/chem.201604633>.
- (76) Kim, D. W.; Jeong, H. J.; Lim, S. T.; Sohn, M. H. Tetrabutylammonium Tetra(Tert-Butyl Alcohol)-Coordinated Fluoride as a Facile Fluoride Source. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (44), 8404–8406. <https://doi.org/10.1002/anie.200803150>.
- (77) Pratesi, A.; Giuli, G.; Cicconi, M. R.; Della Longa, S.; Weng, T. C.; Ginanneschi, M. Dioxygen Oxidation Cu(II) → Cu(III) in the Copper Complex of Cyclo (Lys- d His-Bala-His): A Case Study by EXAFS and XANES Approach. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (15), 7969–7976. <https://doi.org/10.1021/ic201469h>.
- (78) Hannigan, S. F.; Lum, J. S.; Bacon, J. W.; Moore, C.; Golen, J. A.; Rheingold, A. L.; Doerrer, L. H. Room Temperature Stable Organocuprate Copper(III) Complex. *Organometallics* **2013**, *32* (12), 3429–3436. <https://doi.org/10.1021/om4000538>.
- (79) Huffman, L. M.; Casitas, A.; Font, M.; Canta, M.; Costas, M.; Ribas, X.; Stahl, S. S. Observation and Mechanistic Study of Facile C–O Bond Formation between a Well-Defined Aryl-Copper(III) Complex and Oxygen Nucleophiles. *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17* (38), 10643–10650. <https://doi.org/10.1002/chem.201100608>.
- (80) Wright, J. S.; Kaur, T.; Preshlock, S.; Tanzey, S. S.; Winton, W. P.; Sharninghausen, L. S.; Wiesner, N.; Brooks, A. F.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. Copper-Mediated Late-Stage Radiofluorination: Five Years of Impact on Preclinical and Clinical PET Imaging. *Clinical and Translational Imaging*. **2020**, pp 167–206. <https://doi.org/10.1007/s40336-020-00368-y>.
- (81) Li, L.; Hopkinson, M. N.; Yona, R. L.; Bejot, R.; Gee, A. D.; Gouverneur, V. Convergent 18F Radiosynthesis: A New Dimension for Radiolabelling. *Chem. Sci.* **2011**, *2* (1), 123–131. <https://doi.org/10.1039/c0sc00362j>.
- (82) Olma, S.; Ermert, J.; Coenen, H. H. 4-[18F]Fluorophenyl Ureas via Carbamate-4-Nitrophenyl Esters and 4-[18F]Fluoroaniline. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2006**, *49* (12), 1037–1050. <https://doi.org/10.1002/jlcr.1121>.
- (83) Ermert, J.; Hocke, C.; Ludwig, T.; Gail, R.; Coenen, H. H. Comparison of Pathways to the Versatile Synthon of No-Carrier-Added 1-Bromo-4-[18F]Fluorobenzene. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2004**, *47* (7), 429–441. <https://doi.org/10.1002/jlcr.830>.
- (84) Kniess, T.; Laube, M.; Brust, P.; Steinbach, J. 2-[18F]Fluoroethyl Tosylate-a Versatile Tool for Building 18F-Based Radiotracers for Positron Emission Tomography. *MedChemComm.* **2015**, pp 1714–1754. <https://doi.org/10.1039/c5md00303b>.
- (85) Richter, S.; Wuest, F. 18 F-Labeled Peptides: The Future Is Bright. *Molecules* **2014**, *19*, 20536–20556. <https://doi.org/10.3390/molecules191220536>.
- (86) Marik, J.; Sutcliffe, J. L. Fully Automated Preparation of n.c.a. 4-[18F]Fluorobenzoic Acid and N-Succinimidyl 4-[18F]Fluorobenzoate Using a Siemens/CTI Chemistry Process Control Unit (CPCU). *Appl. Radiat. Isot.* **2007**, *65* (2), 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2006.06.007>.
- (87) Kniess, T.; Kuchar, M.; Pietzsch, J. Automated Radiosynthesis of the Thiol-Reactive Labeling Agent N-[6-(4-[18F]Fluorobenzylidene)Aminooxyhexyl]Maleimide ([18F]FBAM). *Appl. Radiat.*

- Isot.* **2011**, 69 (9), 1226–1230. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2011.03.043>.
- (88) Berndt, M.; Pietzsch, J.; Wuest, F. Labeling of Low-Density Lipoproteins Using the ¹⁸F-Labeled Thiol-Reactive Reagent N-[6-(4-[¹⁸F]Fluorobenzylidene)Aminooxyhexyl]Maleimide. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, 34 (1), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2006.09.009>.
- (89) Van De Bittner, G. C.; Ricq, E. L.; Hooker, J. M. A Philosophy for CNS Radiotracer Design. *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47 (10), 3127–3134. <https://doi.org/10.1021/ar500233s>.
- (90) Burns, H. D.; Hamill, T. G.; Eng, W. S.; Francis, B.; Fioravanti, C.; Gibson, R. E. Positron Emission Tomography Neuroreceptor Imaging as a Tool in Drug Discovery, Research and Development. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3 (4), 388–394. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)80059-3](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)80059-3).
- (91) Ametamey, S. M.; Schubiger, P. A. PET Radiopharmaceuticals for Neuroreceptor Imaging. *Nucl. Sci. Tech.* **2006**, 17 (3), 143–147. [https://doi.org/10.1016/S1001-8042\(06\)60028-6](https://doi.org/10.1016/S1001-8042(06)60028-6).
- (92) Kilbourn, M. R. In Vivo Radiotracers for Vesicular Neurotransmitter Transporters. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, 24, 615–619. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(97\)00101-7](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(97)00101-7).
- (93) Brooks, D. J. Molecular Imaging of Dopamine Transporters. *Ageing Res. Rev.* **2016**, 30, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.12.009>.
- (94) Seo, Y. J.; Muench, L.; Reid, A.; Chen, J.; Kang, Y.; Hooker, J. M.; Volkow, N. D.; Fowler, J. S.; Kim, S. W. Radionuclide Labeling and Evaluation of Candidate Radioligands for PET Imaging of Histone Deacetylase in the Brain. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (24), 6700–6705. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.10.038>.
- (95) Nordberg, A. PET Imaging of Amyloid in Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol.* **2004**, 3, 519–527. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00853-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00853-1).
- (96) Neumaier, B.; Deisenhofer, S.; Sommer, C.; Solbach, C.; Reske, S. N.; Mottaghy, F. Synthesis and Evaluation of ¹⁸F-Fluoroethylated Benzothiazole Derivatives for in Vivo Imaging of Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Appl. Radiat. Isot.* **2010**, 68 (6), 1066–1072. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2009.12.044>.
- (97) Aerts, J.; Ballinger, J. R.; Behe, M.; Decristoforo, C.; Elsinga, P. H.; Faivre-Chauvet, A.; Mindt, T. L.; Peitl, P. K.; Todde, S. C.; Koziorowski, J. Guidance on Current Good Radiopharmacy Practice for the Small-Scale Preparation of Radiopharmaceuticals Using Automated Modules: A European Perspective. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2014**, 57 (10), 615–620. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3227>.
- (98) Lange, R.; ter Heine, R.; Decristoforo, C.; Peñuelas, I.; Elsinga, P. H.; van der Westerlaken, M. M. L.; Hendrikse, N. H. Untangling the Web of European Regulations for the Preparation of Unlicensed Radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Commun.* **2015**, 36, 414–422. <https://doi.org/10.1097/mnm.0000000000000276>.
- (99) Pike, V. W. PET Radiotracers: Crossing the Blood–Brain Barrier and Surviving Metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, 30 (8), 431–440. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.05.005>.
- (100) Rang, H.; Dale, M.; Ritter, J.; Flower, R.; Henderson, G. *Rang and Dale's Pharmacology (Ninth Ed.)*; **2019**.
- (101) Maelicke, A. Interzelluläre Botschaften: Membranrezeptoren Und Ihre Effektorsysteme. Von H. Repke Und C. Liebmann. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1987. 350 S., ca. 120 Abb., ca. 30 Tab., Geb. DM 98,-. ISBN 3-527-26023-4. *Nachrichten aus Chemie, Tech. und Lab.* **1988**, 36 (1), 45–46. <https://doi.org/10.1002/nadc.19880360114>.
- (102) Innis, R. B.; Cunningham, V. J.; Delforge, J.; Fujita, M.; Gjedde, A.; Gunn, R. N.; Holden, J.; Houle, S.; Huang, S. C.; Ichise, M.; Iida, H.; Ito, H.; Kimura, Y.; Koeppe, R. A.; Knudsen, G. M.; Knuuti, J.;

- Lammertsma, A. A.; Laruelle, M.; Logan, J.; Maguire, R. P.; Mintun, M. A.; Morris, E. D.; Parsey, R.; Price, J. C.; Slifstein, M.; Sossi, V.; Suhara, T.; Votaw, J. R.; Wong, D. F.; Carson, R. E. Consensus Nomenclature for in Vivo Imaging of Reversibly Binding Radioligands. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. September 7, **2007**, pp 1533–1539. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600493>.
- (103) Laruelle, M.; Slifstein, M.; Huang, Y. Relationships between Radiotracer Properties and Image Quality in Molecular Imaging of the Brain with Positron Emission Tomography. *Mol. Imaging Biol.* **2003**, 5 (6), 363–375. <https://doi.org/10.1016/j.mibio.2003.09.009>.
- (104) Crevat-Pisano, P.; Hariton, C.; Rolland, P. H.; Cano, J. P. Fundamental Aspects of Radioreceptor Assays. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1986**, 4 (6), 697–716. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(86\)80081-4](https://doi.org/10.1016/0731-7085(86)80081-4).
- (105) De Jong, L. A. A.; Uges, D. R. A.; Franke, J. P.; Bischoff, R. Receptor-Ligand Binding Assays: Technologies and Applications. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, 829, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.10.002>.
- (106) Yung-Chi, C.; Prusoff, W. H. Relationship between the Inhibition Constant (KI) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 per Cent Inhibition (I50) of an Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22 (23), 3099–3108. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2).
- (107) Linden, J. Calculating the Dissociation Constant of an Unlabeled Compound from the Concentration Required to Displace Radiolabel Binding by 50%. *J. Cyclic Nucleotide Res.* **1982**, 8 (3), 163–172.
- (108) Baca, Q. J.; Golan, D. E. Pharmacodynamics. In *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy: Third Edition*; **2012**; pp 71–97. https://doi.org/10.5005/jp/books/12949_4.
- (109) Banks, W. A. Blood-Brain Barrier as a Regulatory Interface. In *Frontiers in Eating and Weight Regulation*; S. Karger AG, **2009**; Vol. 63, pp 102–110. <https://doi.org/10.1159/000264398>.
- (110) Cardoso, F. L.; Brites, D.; Brito, M. A. Looking at the Blood-Brain Barrier: Molecular Anatomy and Possible Investigation Approaches. *Brain Research Reviews*. September **2010**, pp 328–363. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.05.003>.
- (111) Löscher, W.; Potschka, H. Blood-Brain Barrier Active Efflux Transporters: ATP-Binding Cassette Gene Family. *NeuroRx* **2005**, 2 (1), 86–98. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.86>.
- (112) Giacomini, K. M.; Huang, S. M.; Tweedie, D. J.; Benet, L. Z.; Brouwer, K. L. R.; Chu, X.; Dahlin, A.; Evers, R.; Fischer, V.; Hillgren, K. M.; Hoffmaster, K. A.; Ishikawa, T.; Keppler, D.; Kim, R. B.; Lee, C. A.; Niemi, M.; Polli, J. W.; Sugiyama, Y.; Swaan, P. W.; Ware, J. A.; Wright, S. H.; Wah Yee, S.; Zamek-Gliszczynski, M. J.; Zhang, L. Membrane Transporters in Drug Development. *Nature Reviews Drug Discovery*. March **2010**, pp 215–236. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>.
- (113) Fischer, H.; Gottschlich, R.; Seelig, A. Blood-Brain Barrier Permeation: Molecular Parameters Governing Passive Diffusion. *J. Membr. Biol.* **1998**, 165 (3), 201–211. <https://doi.org/10.1007/s002329900434>.
- (114) Waterhouse, R. Determination of Lipophilicity and Its Use as a Predictor of Blood–Brain Barrier Penetration of Molecular Imaging Agents. *Mol. Imaging Biol.* **2003**, 5 (6), 376–389. <https://doi.org/10.1016/j.mibio.2003.09.014>.
- (115) Raub, T. J. P-Glycoprotein Recognition of Substrates and Circumvention through Rational Drug Design. *Molecular Pharmaceutics*. January **2006**, pp 3–25. <https://doi.org/10.1021/mp0500871>.

- (116) Liow, J. S.; Lu, S.; McCarron, J. A.; Hong, J.; Musachio, J. L.; Pike, V. W.; Innis, R. B.; Zoghbi, S. S. Effect of a P-Glycoprotein Inhibitor, Cyclosporin A, on the Disposition in Rodent Brain and Blood of the 5-HT_{1A} Receptor Radioligand, [¹¹C](R)-(-)-RWAY. *Synapse* **2007**, *61* (2), 96–105. <https://doi.org/10.1002/syn.20348>.
- (117) Tai, Y. F.; Piccini, P. Applications of Positron Emission Tomography (PET) in Neurology. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2004**, *75*, 669–676. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.028175>.
- (118) Focke, P. J.; Wang, X.; Larsson, H. P. Neurotransmitter Transporters: Structure Meets Function. *Structure* **2013**, *21*, 694–705. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.03.002>.
- (119) Jacobs, A. H.; Li, H.; Winkeler, A.; Hilker, R.; Knoess, C.; Rüger, A.; Galldiks, N.; Schaller, B.; Sobesky, J.; Krach, L.; Monfared, P.; Klein, M.; Vollmar, S.; Bauer, B.; Wagner, R.; Graf, R.; Wienhard, K.; Herholz, K.; Heiss, W. D. Pet-Based Molecular Imaging in Neuroscience. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 1051–1065. <https://doi.org/10.1007/s00259-003-1202-5>.
- (120) Gether, U.; Andersen, P. H.; Larsson, O. M.; Schousboe, A. Neurotransmitter Transporters: Molecular Function of Important Drug Targets. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.05.003>.
- (121) Zafra, F.; Gomeza, J.; Olivares, L.; Aragón, C.; Giménez, C. Regional Distribution and Developmental Variation of the Glycine Transporters GLYT1 and GLYT2 in the Rat CNS. *Eur. J. Neurosci.* **1995**, *7* (6), 1342–1352. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb01125.x>.
- (122) Eulenburg, V.; Armsen, W.; Betz, H.; Gomeza, J. Glycine Transporters: Essential Regulators of Neurotransmission. *Trends in Biochemical Sciences.* **2005**. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.04.004>.
- (123) Cubelos, B.; Giménez, C.; Zafra, F. Localization of the GLYT1 Glycine Transporter at Glutamatergic Synapses in the Rat Brain. *Cereb. Cortex* **2005**, *15* (4), 448–459. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh147>.
- (124) Traynelis, S. F.; Wollmuth, L. P.; McBain, C. J.; Menniti, F. S.; Vance, K. M.; Ogden, K. K.; Hansen, K. B.; Yuan, H.; Myers, S. J.; Dingledine, R. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews.* September **2010**, pp 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>.
- (125) Bliss, T. V. P.; Collingridge, G. L. A Synaptic Model of Memory: Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Nature.* **1993**, pp 31–39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>.
- (126) Danysz, W.; Parsons, C. G. Glycine and N-Methyl-D-Aspartate Receptors: Physiological Significance and Possible Therapeutic Applications. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 597–664.
- (127) Coyle, J. T.; Tsai, G. The NMDA Receptor Glycine Modulatory Site: A Therapeutic Target for Improving Cognition and Reducing Negative Symptoms in Schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* **2004**, *174*, 32–38. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1709-2>.
- (128) Newcomer, J. W.; Krystal, J. H. NMDA Receptor Regulation of Memory and Behavior in Humans. *Hippocampus* **2001**, *11* (5), 529–542. <https://doi.org/10.1002/hipo.1069>.
- (129) Olney, J. W.; Newcomer, J. W.; Farber, N. B. NMDA Receptor Hypofunction Model of Schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* **1999**, *33* (6), 523–533. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(99\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(99)00029-1).
- (130) Marek, G. J.; Behl, B.; Beshpalov, A. Y.; Gross, G.; Lee, Y.; Schoemaker, H. Glutamatergic (N-Methyl-D-Aspartate Receptor) Hypofrontality in Schizophrenia: Too Little Juice or a Miswired Brain? *Mol. Pharmacol.* **2010**, *77*, 317–326. <https://doi.org/10.1124/mol.109.059865>.
- (131) Cioffi, C. L. Modulation of NMDA Receptor Function as a Treatment for Schizophrenia.

- Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (18), 5034–5044.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.07.019>.
- (132) Supplisson, S.; Bergman, C. Control of NMDA Receptor Activation by a Glycine Transporter Co-Expressed in *Xenopus* Oocytes. *J. Neurosci.* **1997**, 17 (12), 4580–4590.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-12-04580.1997>.
- (133) Chen, L.; Muhlhauser, M.; Yang, C. R. Glycine Transporter-1 Blockade Potentiates NMDA-Mediated Responses in Rat Prefrontal Cortical Neurons in Vitro and in Vivo. *J. Neurophysiol.* **2003**, 89 (2), 691–703. <https://doi.org/10.1152/jn.00680.2002>.
- (134) Tsai, G.; Lane, H. Y.; Yang, P.; Chong, M. Y.; Lange, N. Glycine Transporter I Inhibitor, N-Methylglycine (Sarcosine), Added to Antipsychotics for the Treatment of Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **2004**, 55 (5), 452–456. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.09.012>.
- (135) Atkinson, B. N.; Bell, S. C.; De Vivo, M.; Kowalski, L. R.; Lechner, S. M.; Ognyanov, V. I.; Tham, C.-S.; Tsai, C.; Jia, J.; Ashton, D.; Klitenick, M. A. ALX 5407: A Potent, Selective Inhibitor of the HGlyT1 Glycine Transporter. *Mol. Pharmacol.* **2001**, 60 (6), 1414–1420.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.03.028>.
- (136) Aubrey, K. R.; Vandenberg, R. J. N[3-(4'-Fluorophenyl)-3-(4'-Phenylphenoxy)Propyl]Sarcosine (NFPS) Is a Selective Persistent Inhibitor of Glycine Transport. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, 134 (7), 1429–1436. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704381>.
- (137) Bergeron, R.; Meyer, T. M.; Coyle, J. T.; Greene, R. W. Modulation of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Function by Glycine Transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95 (26), 15730–15734. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15730>.
- (138) Aubrey, K. R.; Vandenberg, R. J. N[3-(4'-Fluorophenyl)-3-(4'-Phenylphenoxy)Propyl]Sarcosine (NFPS) Is a Selective Persistent Inhibitor of Glycine Transport. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, 134 (7), 1429–1436. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704381>.
- (139) Perry, K. W.; Falcone, J. F.; Fell, M. J.; Ryder, J. W.; Yu, H.; Love, P. L.; Katner, J.; Gordon, K. D.; Wade, M. R.; Man, T.; Nomikos, G. G.; Phebus, L. A.; Cauvin, A. J.; Johnson, K. W.; Jones, C. K.; Hoffmann, B. J.; Sandusky, G. E.; Walter, M. W.; Porter, W. J.; Yang, L.; Merchant, K. M.; Shannon, H. E.; Svensson, K. A. Neurochemical and Behavioral Profiling of the Selective GlyT1 Inhibitors ALX5407 and LY2365109 Indicate a Preferential Action in Caudal vs. Cortical Brain Areas. *Neuropharmacology* **2008**, 55 (5), 743–754.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.016>.
- (140) Passchier, J.; Gentile, G.; Porter, R.; Herdon, H.; Salinas, C.; Jakobsen, S.; Audrain, H.; Laruelle, M.; Gunn, R. N. Identification and Evaluation of [11C]GSK931145 as a Novel Ligand for Imaging the Type 1 Glycine Transporter with Positron Emission Tomography. *Synapse* **2010**, 64 (7), 542–549. <https://doi.org/10.1002/syn.20760>.
- (141) Hamill, T. G.; Eng, W.; Jennings, A.; Lewis, R.; Thomas, S.; Wood, S.; Street, L.; Wisnoski, D.; Wolkenberg, S.; Lindsley, C.; Sanabria-Bohórquez, S. M.; Patel, S.; Riffel, K.; Ryan, C.; Cook, J.; Sur, C.; Burns, H. D.; Hargreaves, R. The Synthesis and Preclinical Evaluation in Rhesus Monkey of [18F]MK-6577 and [11C]CMPyPB Glycine Transporter 1 Positron Emission Tomography Radiotracers. *Synapse* **2011**, 65 (4), 261–270. <https://doi.org/10.1002/syn.20842>.
- (142) Südhof, T. C.; Rizo, J. Synaptic Vesicle Exocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, 3 (12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005637>.
- (143) Abad-Rodríguez, J.; Díez-Revuelta, N. Axon Glycoprotein Routing in Nerve Polarity, Function, and Repair. *Trends Biochem. Sci.* **2015**, 40, 385–396.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.03.015>.

- (144) Bajjalieh, S. M.; Peterson, K.; Shinghal, R.; Scheller, R. H. SV2, a Brain Synaptic Vesicle Protein Homologous to Bacterial Transporters. *Science* (80-.). **1992**, 257 (5074), 1271–1273. <https://doi.org/10.1126/science.1519064>.
- (145) Bajjalieh, S. M.; Frantz, G. D.; Weimann, J. M.; McConnell, S. K.; Scheller, R. H. Differential Expression of Synaptic Vesicle Protein 2 (SV2) Isoforms. *J. Neurosci.* **1994**, 14 (9), 5223–5235. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-09-05223.1994>.
- (146) Bajjalieh, S. M.; Peterson, K.; Linial, M.; Scheller, R. H. Brain Contains Two Forms of Synaptic Vesicle Protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, 90 (6), 2150–2154. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.6.2150>.
- (147) Dardou, D.; Dasse, D.; Cuvelier, L.; Deprez, T.; De Ryck, M.; Schiffmann, S. N. Distribution of SV2C mRNA and Protein Expression in the Mouse Brain with a Particular Emphasis on the Basal Ganglia System. *Brain Res.* **2011**, 1367, 130–145. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.063>.
- (148) Janz, R.; Südhof, T. C. SV2C Is a Synaptic Vesicle Protein with an Unusually Restricted Localization: Anatomy of a Synaptic Vesicle Protein Family. *Neuroscience* **1999**, 94 (4), 1279–1290. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00370-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00370-X).
- (149) Crowder, K. M.; Gunther, J. M.; Jones, T. A.; Hale, B. D.; Zhang, H. Z.; Peterson, M. R.; Scheller, R. H.; Chavkin, C.; Bajjalieh, S. M. Abnormal Neurotransmission in Mice Lacking Synaptic Vesicle Protein 2A (SV2A). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96 (26), 15268–15273. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15268>.
- (150) Kaminski, R. M.; Matagne, A.; Leclercq, K.; Gillard, M.; Michel, P.; Kenda, B.; Talaga, P.; Klitgaard, H. SV2A Protein Is a Broad-Spectrum Anticonvulsant Target: Functional Correlation between Protein Binding and Seizure Protection in Models of Both Partial and Generalized Epilepsy. *Neuropharmacology* **2008**, 54 (4), 715–720. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.11.021>.
- (151) Kaminski, R. M.; Gillard, M.; Klitgaard, H. Targeting SV2A for Discovery of Antiepileptic Drugs. *Epilepsia* **2010**, 51 (SUPPL. 5), 83. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02869.x>.
- (152) Lynch, B. A.; Lambeng, N.; Nocka, K.; Kinsel-Hammes, P.; Bajjalieh, S. M.; Matagne, A.; Fuks, B. The Synaptic Vesicle Protein SV2A Is the Binding Site for the Antiepileptic Drug Levetiracetam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101 (26), 9861–9866. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308208101>.
- (153) Feng, G.; Xiao, F.; Lu, Y.; Huang, Z.; Yuan, J.; Xiao, Z.; Xi, Z.; Wang, X. Down-Regulation Synaptic Vesicle Protein 2A in the Anterior Temporal Neocortex of Patients with Intractable Epilepsy. *J. Mol. Neurosci.* **2009**, 39 (3), 354–359. <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9288-2>.
- (154) Hamos, J. E.; DeGennaro, L. J.; Drachman, D. A. Synaptic Loss in Alzheimer's Disease and Other Dementias. *Neurology* **1989**, 39 (3), 355–361. <https://doi.org/10.1212/wnl.39.3.355>.
- (155) Robinson, J. L.; Molina-Porcel, L.; Corrada, M. M.; Raible, K.; Lee, E. B.; Lee, V. M. Y.; Kawas, C. H.; Trojanowski, J. Q. Perforant Path Synaptic Loss Correlates with Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease in the Oldest-Old. *Brain* **2014**, 137 (9), 2578–2587. <https://doi.org/10.1093/brain/awu190>.
- (156) Proper, E. A.; Oestreicher, A. B.; Jansen, G. H.; Veelen, C. W. M. V.; Van Rijen, P. C.; Gispen, W. H.; De Graan, P. N. E. Immunohistochemical Characterization of Messy Fibre Sprouting in the Hippocampus of Patients with Pharmacoresistant Temporal Lobe Epilepsy. *Brain* **2000**, 123 (1), 19–30. <https://doi.org/10.1093/brain/123.1.19>.
- (157) Crèvecoeur, J.; Kaminski, R. M.; Rogister, B.; Foerch, P.; Vandenplas, C.; Neveux, M.; Mazzuferi,

- M.; Kroonen, J.; Poulet, C.; Martin, D.; Sadzot, B.; Rikir, E.; Klitgaard, H.; Moonen, G.; Deprez, M. Expression Pattern of Synaptic Vesicle Protein 2 (SV2) Isoforms in Patients with Temporal Lobe Epilepsy and Hippocampal Sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2014**, *40* (2), 191–204. <https://doi.org/10.1111/nan.12054>.
- (158) Hou, Z.; Lei, H.; Hong, S.; Sun, B.; Fang, K.; Lin, X.; Liu, M.; Yew, D. T. W.; Liu, S. Functional Changes in the Frontal Cortex in Parkinson's Disease Using a Rat Model. *J. Clin. Neurosci.* **2010**, *17* (5), 628–633. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2009.07.101>.
- (159) Tang, G.; Gudsnek, K.; Kuo, S. H.; Cotrina, M. L.; Rosoklija, G.; Sosunov, A.; Sonders, M. S.; Kanter, E.; Castagna, C.; Yamamoto, A.; Yue, Z.; Arancio, O.; Peterson, B. S.; Champagne, F.; Dwork, A. J.; Goldman, J.; Sulzer, D. Loss of MTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits. *Neuron* **2014**, *83* (5), 1131–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>.
- (160) Kang, H. J.; Voleti, B.; Hajszan, T.; Rajkowska, G.; Stockmeier, C. A.; Licznarski, P.; Lepack, A.; Majik, M. S.; Jeong, L. S.; Banasr, M.; Son, H.; Duman, R. S. Decreased Expression of Synapse-Related Genes and Loss of Synapses in Major Depressive Disorder. *Nat. Med.* **2012**, *18* (9), 1413–1417. <https://doi.org/10.1038/nm.2886>.
- (161) Glantz, L. A.; Lewis, D. A. Decreased Dendritic Spine Density on Prefrontal Cortical Pyramidal Neurons in Schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* **2000**, *57* (1), 65–73. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.1.65>.
- (162) Sekar, A.; Bialas, A. R.; De Rivera, H.; Davis, A.; Hammond, T. R.; Kamitaki, N.; Tooley, K.; Presumey, J.; Baum, M.; Van Doren, V.; Genovese, G.; Rose, S. A.; Handsaker, R. E.; Daly, M. J.; Carroll, M. C.; Stevens, B.; McCarroll, S. A. Schizophrenia Risk from Complex Variation of Complement Component 4. *Nature* **2016**, *530* (7589), 177–183. <https://doi.org/10.1038/nature16549>.
- (163) Buckley, K.; Kelly, R. B. Identification of a Transmembrane Glycoprotein Specific for Secretory Vesicles of Neural and Endocrine Cells. *J. Cell Biol.* **1985**, *100* (4), 1284–1294. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.4.1284>.
- (164) Finnema, S. J.; Nabulsi, N. B.; Eid, T.; Detyniecki, K.; Lin, S. F.; Chen, M. K.; Dhaher, R.; Matuskey, D.; Baum, E.; Holden, D.; Spencer, D. D.; Mercier, J.; Hannestad, J.; Huang, Y.; Carson, R. E. Imaging Synaptic Density in the Living Human Brain. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8* (348), 1–10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6667>.
- (165) Cai, H.; Mangner, T. J.; Muzik, O.; Wang, M. W.; Chugani, D. C.; Chugani, H. T. Radiosynthesis of ¹¹C-Levetiracetam: A Potential Marker for PET Imaging of SV2A Expression. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (10), 1152–1155. <https://doi.org/10.1021/ml500285t>.
- (166) Cai, Z.; Li, S.; Matuskey, D.; Nabulsi, N.; Huang, Y. PET Imaging of Synaptic Density: A New Tool for Investigation of Neuropsychiatric Diseases. *Neurosci. Lett.* **2019**, *691*, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.07.038>.
- (167) Estrada, S.; Lubberink, M.; Thibblin, A.; Sprycha, M.; Buchanan, T.; Mestdagh, N.; Kenda, B.; Mercier, J.; Provins, L.; Gillard, M.; Tytgat, D.; Antoni, G. [¹¹C]UCB-A, a Novel PET Tracer for Synaptic Vesicle Protein 2 A. *Nucl. Med. Biol.* **2016**, *43* (6), 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2016.03.004>.
- (168) Warnock, G. I.; Aerts, J.; Bahri, M. A.; Bretin, F.; Lemaire, C.; Giacomelli, F.; Mievis, F.; Mestdagh, N.; Buchanan, T.; Valade, A.; Mercier, J.; Wood, M.; Gillard, M.; Seret, A.; Luxen, A.; Salmon, E.; Plenevaux, A. Evaluation of ¹⁸F-UCB-H as a Novel PET Tracer for Synaptic Vesicle Protein 2A in the Brain. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (8), 1336–1341. <https://doi.org/10.2967/jnumed.113.136143>.
- (169) Nabulsi, N. B.; Mercier, J.; Holden, D.; Carr, S.; Najafzadeh, S.; Vandergeten, M. C.; Lin, S. F.;

- Deo, A.; Price, N.; Wood, M.; Lara-Jaime, T.; Montel, F.; Laruelle, M.; Carson, R. E.; Hannestad, J.; Huang, Y. Synthesis and Preclinical Evaluation of ¹¹C-UCB-J as a PET Tracer for Imaging the Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A in the Brain. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (5), 777–784. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.168179>.
- (170) Li, S.; Cai, Z.; Zhang, W.; Holden, D.; Lin, S. fei; Finnema, S. J.; Shiral, A.; Ropchan, J.; Carre, S.; Mercier, J.; Carson, R. E.; Nabulsi, N.; Huang, Y. Synthesis and in Vivo Evaluation of [¹⁸F]UCB-J for PET Imaging of Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A (SV2A). *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *46* (9), 1952–1965. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04357-w>.
- (171) Cai, Z.; Li, S.; Finnema, S.; Lin, S.-F.; Zhang, W.; Holden, D.; Carson, R.; Huang, Y. Imaging Synaptic Density with Novel ¹⁸F-Labeled Radioligands for Synaptic Vesicle Protein-2A (SV2A): Synthesis and Evaluation in Nonhuman Primates. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*.
- (172) Li, S.; Cai, Z.; Wu, X.; Holden, D.; Pracitto, R.; Kapinos, M.; Gao, H.; Labaree, D.; Nabulsi, N.; Carson, R. E.; Huang, Y. Synthesis and in Vivo Evaluation of a Novel PET Radiotracer for Imaging of Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A (SV2A) in Nonhuman Primates. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10* (3), 1544–1554. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00526>.
- (173) Heiss, W. D.; Herholz, K. Brain Receptor Imaging. *Journal of Nuclear Medicine*. February 1, **2006**, pp 302–312. <https://doi.org/10.4061/2010/548913>.
- (174) Fredholm, B. B.; Ijzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacological Reviews*. **2001**, pp 527–552.
- (175) Fastbom, J.; Pazos, A.; Palacios, J. M. The Distribution of Adenosine A1 Receptors and 5'-Nucleotidase in the Brain of Some Commonly Used Experimental Animals. *Neuroscience* **1987**, *22* (3), 813–826. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)92961-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)92961-7).
- (176) Bauer, A.; Holschbach, M. H.; Cremer, M.; Weber, S.; Boy, C.; Jon Shah, N.; Olsson, R. A.; Halling, H.; Coenen, H. H.; Zilles, K. Evaluation of ¹⁸F-CPFPX, a Novel Adenosine A1 Receptor Ligand: In Vitro Autoradiography and High-Resolution Small Animal PET. *J. Nucl. Med.* **2003**, *44* (10), 1682–1689.
- (177) Fastbom, J.; Pazos, A.; Probst, A.; Palacios, J. M. Adenosine A1 Receptors in the Human Brain: A Quantitative Autoradiographic Study. *Neuroscience* **1987**, *22* (3), 827–839. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)92962-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)92962-9).
- (178) Bauer, A.; Holschbach, M. H.; Meyer, P. T.; Boy, C.; Herzog, H.; Olsson, R. A.; Coenen, H. H.; Zilles, K. In Vivo Imaging of Adenosine A1 Receptors in the Human Brain with [¹⁸F]CPFPX and Positron Emission Tomography. *Neuroimage* **2003**, *19* (4), 1760–1769. [https://doi.org/10.1016/S1053-8119\(03\)00241-6](https://doi.org/10.1016/S1053-8119(03)00241-6).
- (179) Paul, S.; H. Elsinga, P.; Ishiwata, K.; A.J.O. Dierckx, R.; van Waarde, A. Adenosine A1 Receptors in the Central Nervous System: Their Functions in Health and Disease, and Possible Elucidation by PET Imaging. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18* (31), 4820–4835. <https://doi.org/10.2174/092986711797535335>.
- (180) Trussell, L. O.; Jackson, M. B. Adenosine-Activated Potassium Conductance in Cultured Striatal Neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82* (14), 4857–4861. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.14.4857>.
- (181) MacDonald, R. L.; Skerritt, J. H.; Werz, M. A. Adenosine Agonists Reduce Voltage-dependent Calcium Conductance of Mouse Sensory Neurones in Cell Culture. *J. Physiol.* **1986**, *370* (1), 75–90. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp015923>.
- (182) Gomes, C. V.; Kaster, M. P.; Tomé, A. R.; Agostinho, P. M.; Cunha, R. A. Adenosine Receptors

- and Brain Diseases: Neuroprotection and Neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2011**, 1808, 1380–1399. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.12.001>.
- (183) Porkka-Heiskanen, T.; Strecker, R. E.; Thakkar, M.; Bjørkum, A. A.; Greene, R. W.; McCarley, R. W. Adenosine: A Mediator of the Sleep-Inducing Effects of Prolonged Wakefulness. *Science* (80-.). **1997**, 276 (5316), 1265–1267. <https://doi.org/10.1126/science.276.5316.1265>.
- (184) Kim, Y.; Elmenhorst, D.; Weisshaupt, A.; Wedekind, F.; Kroll, T.; Mccarley, R. W.; Strecker, R. E.; Bauer, A. Chronic Sleep Restriction Induces Long-Lasting Changes in Adenosine and Noradrenaline Receptor Density in the Rat Brain. *J. Sleep Res.* **2015**, 24 (5), 549–558. <https://doi.org/10.1111/jsr.12300>.
- (185) Rahman, A. The Role of Adenosine in Alzheimers Disease. *Curr. Neuropharmacol.* **2009**, 7 (3), 207–216. <https://doi.org/10.2174/157015909789152119>.
- (186) Cieślak, M.; Komoszyński, M.; Wojtczak, A. Adenosine A2A Receptors in Parkinson's Disease Treatment. *Purinergic Signal.* **2008**, 4, 305–312. <https://doi.org/10.1007/s11302-008-9100-8>.
- (187) Ferré, S. Adenosine-Dopamine Interactions in the Ventral Striatum. Implications for the Treatment of Schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. **1997**, 133, 107–120. <https://doi.org/10.1007/s002130050380>.
- (188) Tomé, Â. R.; Silva, H.; Cunha, R. A. Role of The Purinergic Neuromodulation System in Epilepsy. *Open Neurosci. J.* **2014**, 4 (1), 64–83. <https://doi.org/10.2174/1874082001004010064>.
- (189) Lohse, M. J.; Klotz, K. N.; Lindenborn-Fotinos, J.; Reddington, M.; Schwabe, U.; Olsson, R. A. 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine (DPCPX) - a Selective High Affinity Antagonist Radioligand for A1 Adenosine Receptors. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **1987**, 336 (2), 204–210. <https://doi.org/10.1007/BF00165806>.
- (190) Holschbach, M. H.; Olsson, R. A.; Bier, D.; Wutz, W.; Sihver, W.; Schüller, M.; Palm, B.; Coenen, H. H. Synthesis and Evaluation of No-Carrier-Added 8-Cyclopentyl-3-(3-[18F]Fluoropropyl)-1-Propylxanthine ([18F]CPFPX): A Potent and Selective A1-Adenosine Receptor Antagonist for in Vivo Imaging. *J. Med. Chem.* **2002**, 45 (23), 5150–5156. <https://doi.org/10.1021/jm020905i>.
- (191) Shook, B. C.; Jackson, P. F. Adenosine A2A Receptor Antagonists and Parkinson's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, 2, 555–567. <https://doi.org/10.1021/cn2000537>.
- (192) Williams, M.; Braunwalder, A.; Erickson, T. J. Evaluation of the Binding of the A-1 Selective Adenosine Radioligand, Cyclopentyladenosine (CPA), to Rat Brain Tissue. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **1986**, 332 (2), 179–183. <https://doi.org/10.1007/BF00511410>.
- (193) Bruns, R. F.; Lu, G. H.; Pugsley, T. A. Characterization of the A2 Adenosine Receptor Labeled by [3H]NECA in Rat Striatal Membranes. *Mol. Pharmacol.* **1986**, 29 (4), 331–346.
- (194) Rosentreter, U.; Henning, R.; Bauser, M.; Kraemer, T.; Vaupel, A.; Huebsch, W.; Dembowski, K.; Salcher-Schraufstaetter, O.; Stasch, J.-P.; Krahn, T.; Perzborn, E. Substituted 2-Thio-3,5-Dicyano-4-Aryl-6-Aminopyridines and the Use Thereof as Adenosine Receptor Ligands, **2001**.
- (195) Beukers, M. W.; Chang, L. C. W.; Von Frijtag Drabbe Künzel, J. K.; Mulder-Krieger, T.; Spanjersberg, R. F.; Brussee, J.; Ijzerman, A. P. New, Non-Adenosine, High-Potency Agonists for the Human Adenosine A 2B Receptor with an Improved Selectivity Profile Compared to the Reference Agonist N-Ethylcarboxamidoadenosine. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (15), 3707–3709. <https://doi.org/10.1021/jm049947s>.
- (196) Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Recent Developments in Adenosine Receptor Ligands and Their Potential as Novel Drugs. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2011**, 1808, 1290–1308.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.12.017>.
- (197) Jacobson, K. A.; Tosh, D. K.; Jain, S.; Gao, Z. G. Historical and Current Adenosine Receptor Agonists in Preclinical and Clinical Development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. **2019**. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00124>.
- (198) Ishiwata, K.; Nariai, T.; Kimura, Y.; Oda, K.; Kawamura, K.; Ishii, K.; Senda, M.; Wakabayashi, S.; Shimada, J. Preclinical Studies on [¹¹C]MPDX for Mapping Adenosine A1 Receptors by Positron Emission Tomography. In *Annals of Nuclear Medicine*; Japanese Society of Nuclear Medicine, **2002**; Vol. 16, pp 377–382. <https://doi.org/10.1007/BF02990074>.
- (199) Noguchi, J.; Ishiwata, K.; Furuta, R.; Simada, J. I.; Kiyosawa, M.; Ishii, S. I.; Endo, K.; Suzuki, F.; Senda, M. Evaluation of Carbon-11 Labeled KF15372 and Its Ethyl and Methyl Derivatives as a Potential CNS Adenosine A1 Receptor Ligand. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24* (1), 53–59. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(96\)00161-8](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(96)00161-8).
- (200) Matsuya, T.; Takamatsu, H.; Murakami, Y.; Noda, A.; Ichise, R.; Awaga, Y.; Nishimura, S. Synthesis and Evaluation of [¹¹C]FR194921 as a Nonxanthine-Type PET Tracer for Adenosine A1 Receptors in the Brain. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32* (8), 837–844. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2005.06.008>.
- (201) Guo, M.; Gao, Z. G.; Tyler, R.; Stodden, T.; Li, Y.; Ramsey, J.; Zhao, W. J.; Wang, G. J.; Wiers, C. E.; Fowler, J. S.; Rice, K. C.; Jacobson, K. A.; Kim, S. W.; Volkow, N. D. Preclinical Evaluation of the First Adenosine A1 Receptor Partial Agonist Radioligand for Positron Emission Tomography Imaging. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (22), 9966–9975. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01009>.
- (202) Caravaggio, F.; Kegeles, L. S.; Wilson, A. A.; Remington, G.; Borlido, C.; Mamo, D. C.; Graff-Guerrero, A. Estimating the Effect of Endogenous Dopamine on Baseline [¹¹C]-(+)-PHNO Binding in the Human Brain. *Synapse* **2016**, *70* (11), 453–460. <https://doi.org/10.1002/syn.21920>.
- (203) Paterson, L. M.; Tyacke, R. J.; Nutt, D. J.; Knudsen, G. M. Measuring Endogenous 5-HT Release by Emission Tomography: Promises and Pitfalls. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. October **2010**, pp 1682–1706. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.104>.
- (204) J., L.; X., H.; G., L.; P.S., C.; X., Z.; K., C. PET Imaging of Adenosine Receptors in Diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2019**, *19* (16), 1445–1463.
- (205) Kinney, G. G.; Sur, C.; Burno, M.; Mallorga, P. J.; Williams, J. B.; Figueroa, D. J.; Wittmann, M.; Lemaire, W.; Conn, P. J. The Glycine Transporter Type 1 Inhibitor N-[3-(4'-Fluorophenyl)-3-(4'-Phenylphenoxy)Propyl]Sarcosine Potentiates NMDA Receptor-Mediated Responses in Vivo and Produces an Antipsychotic Profile in Rodent Behavior. *J. Neurosci.* **2003**, *23* (20), 7586–7591. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-20-07586.2003>.
- (206) Ravert, H. T.; Mathews, W. B.; Klitenick, M. A.; Wong, D. F.; Dannals, R. F. Radiosynthesis of a Ligand for Studying the Glycine Transporter: [¹¹C]ALX-5407. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2001**, *44* (3), 241–246. <https://doi.org/10.1002/jlcr.453>.
- (207) Constantinescu, C. C.; Tresse, C.; Zheng, M. Q.; Gouasmat, A.; Carroll, V. M.; Mistico, L.; Alagille, D.; Sandiego, C. M.; Papin, C.; Marek, K.; Seibyl, J. P.; Tamagnan, G. D.; Barret, O. Development and In Vivo Preclinical Imaging of Fluorine-18-Labeled Synaptic Vesicle Protein 2A (SV2A) PET Tracers. *Mol. Imaging Biol.* **2019**, *21* (3), 509–518. <https://doi.org/10.1007/s11307-018-1260-5>.
- (208) Zhou, J. N.; Fang, Q.; Hu, Y. H.; Yang, L. Y.; Wu, F. F.; Xie, L. J.; Wu, J.; Li, S. Copper(II)-Catalyzed Enantioselective Hydrosilylation of Halo-Substituted Alkyl Aryl and Heteroaryl Ketones: Asymmetric Synthesis of (R)-Fluoxetine and (S)-Duloxetine. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (6),

- 1009–1017. <https://doi.org/10.1039/c3ob42214c>.
- (209) Ognyanov, V. I. PHARMACEUTICAL FOR TREATMENT OF NEUROLOGICAL AND NEUROPSYCHIATRIC DISORDERS. US 6191165 B1, **2001**.
- (210) Zischler, J.; Kolks, N.; Modemann, D.; Neumaier, B.; Zlatopolskiy, B. D. Alcohol-Enhanced Cu-Mediated Radiofluorination. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23* (14), 3251–3256. <https://doi.org/10.1002/chem.201604633>.
- (211) Committee for Human Medicinal Products. ICH guideline for elemental impurities https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-32.pdf (accessed Feb 20, 2021).
- (212) Wilson, A. A.; Jin, L.; Garcia, A.; DaSilva, J. N.; Houle, S. An Admonition When Measuring the Lipophilicity of Radiotracers Using Counting Techniques. *Appl. Radiat. Isot.* **2001**, *54* (2), 203–208. [https://doi.org/10.1016/S0969-8043\(00\)00269-4](https://doi.org/10.1016/S0969-8043(00)00269-4).
- (213) Zeng, Z.; O'Brien, J. A.; Lemaire, W.; O'Malley, S. S.; Miller, P. J.; Zhao, Z.; Wallace, M. A.; Raab, C.; Lindsley, C. W.; Sur, C.; Williams, D. L. A Novel Radioligand for Glycine Transporter 1: Characterization and Use in Autoradiographic and in Vivo Brain Occupancy Studies. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35* (3), 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.12.002>.
- (214) Mallorga, P. J.; Williams, J. B.; Jacobson, M.; Marques, R.; Chaudhary, A.; Conn, P. J.; Pettibone, D. J.; Sur, C. Pharmacology and Expression Analysis of Glycine Transporter GlyT1 with [3H]-(N-[3-(4'-Fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)Propyl]) Sarcosine. *Neuropharmacology* **2003**, *45* (5), 585–593. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00227-2](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00227-2).
- (215) Liu, X.; Smith, B. J.; Chen, C.; Callegari, E.; Becker, S. L.; Chen, X.; Cianfrogna, J.; Doran, A. C.; Doran, S. D.; Gibbs, J. P.; Hosea, N.; Liu, J.; Nelson, F. R.; Szewc, M. A.; Van Deusen, J. Use of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model to Study the Time to Reach Brain Equilibrium: An Experimental Analysis of the Role of Blood-Brain Barrier Permeability, Plasma Protein Binding, and Brain Tissue Binding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313* (3), 1254–1262. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.079319>.
- (216) Aubrey, K. R.; Vandenberg, R. J. N[3-(4'-Fluorophenyl)-3-(4'-Phenylphenoxy)Propyl]Sarcosine (NFPS) Is a Selective Persistent Inhibitor of Glycine Transport. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *134* (7), 1429–1436. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704381>.
- (217) Kopec, K.; Flood, D. G.; Gasior, M.; McKenna, B. A. W.; Zuvich, E.; Schreiber, J.; Salvino, J. M.; Durkin, J. T.; Ator, M. A.; Marino, M. J. Glycine Transporter (GlyT1) Inhibitors with Reduced Residence Time Increase Prepulse Inhibition without Inducing Hyperlocomotion in DBA/2 Mice. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80* (9), 1407–1417. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.07.004>.
- (218) Toyohara, J.; Ishiwata, K.; Sakata, M.; Wu, J.; Nishiyama, S.; Tsukada, H.; Hashimoto, K. In Vivo Evaluation of Carbon-11-Labelled Non-Sarcosine-Based Glycine Transporter 1 Inhibitors in Mice and Conscious Monkeys. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38* (4), 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2010.11.009>.
- (219) Felluga, F.; Gombac, V.; Pitacco, G.; Valentin, E. A Short and Convenient Chemoenzymatic Synthesis of Both Enantiomers of 3-PhenylGABA and 3-(4-Chlorophenyl)GABA(Baclofen). *Tetrahedron Asymmetry* **2005**, *16* (7), 1341–1345. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.02.019>.
- (220) Li, H.; Wang, Y.; Tang, L.; Deng, L. Highly Enantioselective Conjugate Addition of Malonate and β -Ketoester to Nitroalkenes: Asymmetric C-C Bond Formation with New Bifunctional Organic Catalysts Based on Cinchona Alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (32), 9906–9907. <https://doi.org/10.1021/ja047281l>.

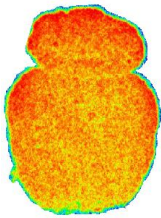
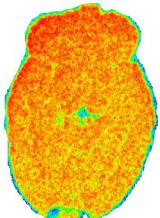
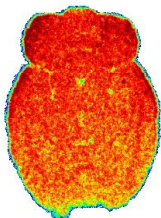
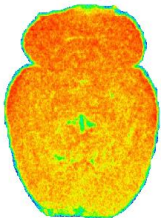
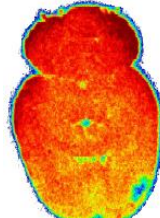
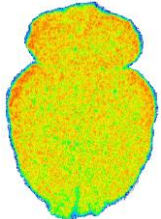
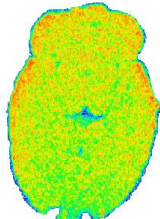
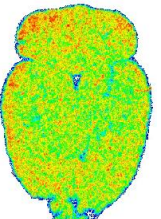
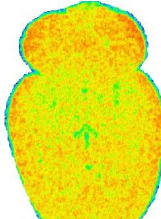
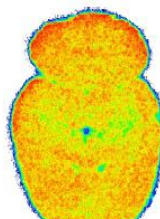
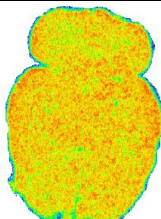
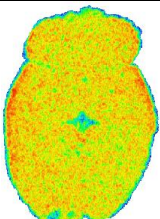
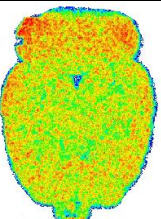
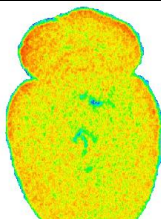
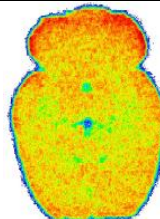
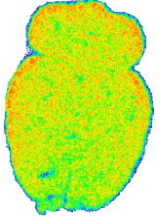
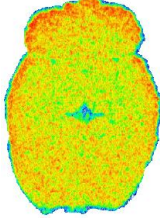
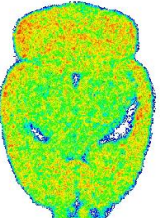
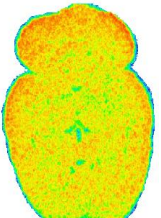
- (221) SILVA, P. S. DA; Rossi, T.; Kiss, L. E.; Beliaev, A.; Palma, P. N. L. WO 2018/056855 Dopamine-b-Hydroxylase Inhibitors, **2018**.
- (222) Travis, U. S.; Andrew, D.; Drive, F. WO2015/084796 A1 Pyrrolidinones as Herbicides. **2015**, No. 12.
- (223) Channe Gowda, D.; Prakasha Gowda, A. S.; Ramesha Baba, A.; Gowda, S. Nickel-Catalyzed Formic Acid Reductions. A Selective Method for the Reduction of Nitro Compounds. *Synth. Commun.* **2000**, 30 (16), 2889–2895. <https://doi.org/10.1080/00397910008087439>.
- (224) Wen, L.; Tang, F.; Ge, C.; Wang, X.; Han, Z.; Wu, J. Practical Large-Scale Preparation of (r)-Rolipram Using Chiral Nickel Catalyst. *Synth. Commun.* **2012**, 42 (22), 3288–3295. <https://doi.org/10.1080/00397911.2011.580880>.
- (225) Li, S.; Cai, Z.; Wu, X.; Holden, D.; Pracitto, R.; Kapinos, M.; Gao, H.; Labaree, D.; Nabulsi, N.; Carson, R. E.; Huang, Y. Synthesis and in Vivo Evaluation of a Novel PET Radiotracer for Imaging of Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A (SV2A) in Nonhuman Primates. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, 10 (3), 1544–1554. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00526>.
- (226) Constantinescu, C. C.; Tresse, C.; Zheng, M. Q.; Gouasmat, A.; Carroll, V. M.; Mistico, L.; Alagille, D.; Sandiego, C. M.; Papin, C.; Marek, K.; Seibyl, J. P.; Tamagnan, G. D.; Barret, O. Development and In Vivo Preclinical Imaging of Fluorine-18-Labeled Synaptic Vesicle Protein 2A (SV2A) PET Tracers. *Mol. Imaging Biol.* **2019**, 21 (3), 509–518. <https://doi.org/10.1007/s11307-018-1260-5>.
- (227) Elsner, J.; Boeckler, F.; Davidson, K.; Sugden, D.; Gmeiner, P. Bicyclic Melatonin Receptor Agonists Containing a Ring-Junction Nitrogen: Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling of the Putative Bioactive Conformation. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, 14 (6), 1949–1958. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.10.042>.
- (228) Muchowski, J. M.; Maddox, M. L. _Nitrorredução Zinco E Cloreto De Amônio. **2005**, 49 (1), 24–31.
- (229) Kelly, S. M.; Lipshutz, B. H. Chemoselective Reductions of Nitroaromatics in Water at Room Temperature. *Org. Lett.* **2014**, 16 (1), 98–101. <https://doi.org/10.1021/ol403079x>.
- (230) Orlandi, M.; Tosi, F.; Bonsignore, M.; Benaglia, M. Metal-Free Reduction of Aromatic and Aliphatic Nitro Compounds to Amines: A HSiCl₃-Mediated Reaction of Wide General Applicability. *Org. Lett.* **2015**, 17 (16), 3941–3943. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01698>.
- (231) Wong, J. C.; Tang, G.; Wu, X.; Liang, C.; Zhang, Z.; Guo, L.; Peng, Z.; Zhang, W.; Lin, X.; Wang, Z.; Mei, J.; Chen, J.; Pan, S.; Zhang, N.; Liu, Y.; Zhou, M.; Feng, L.; Zhao, W.; Li, S.; Zhang, C.; Zhang, M.; Rong, Y.; Jin, T. G.; Zhang, X.; Ren, S.; Ji, Y.; Zhao, R.; She, J.; Ren, Y.; Xu, C.; Chen, D.; Cai, J.; Shan, S.; Pan, D.; Ning, Z.; Lu, X.; Chen, T.; He, Y.; Chen, L. Pharmacokinetic Optimization of Class-Selective Histone Deacetylase Inhibitors and Identification of Associated Candidate Predictive Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma Tumor Response. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (20), 8903–8925. <https://doi.org/10.1021/jm3011838>.
- (232) Farooq, S.; Trah, S.; Jeanguenat, A. WO2003067987A1 - Derivatives of (1-Benzyl-Piperidine-4-Yl)-Diphenyl-Methanol and Their Use as Pesticide, **2003**.
- (233) Makaravage, K. J.; Brooks, A. F.; Mossine, A. V.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. Copper-Mediated Radiofluorination of Arylstannanes with [18F]KF. *Org. Lett.* **2016**, 18 (20), 5440–5443. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b02911>.
- (234) Antuganov, D.; Zykov, M.; Timofeev, V.; Timofeeva, K.; Antuganova, Y.; Orlovskaya, V.; Fedorova, O.; Krasikova, R. Copper-Mediated Radiofluorination of Aryl Pinacolboronate Esters:

- A Straightforward Protocol by Using Pyridinium Sulfonates. *European J. Org. Chem.* **2019**, 2019 (5), 918–922. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201801514>.
- (235) Warnier, C.; Lemaire, C.; Becker, G.; Zaragoza, G.; Giacomelli, F.; Aerts, J.; Otabashi, M.; Bahri, M. A.; Mercier, J.; Plenevaux, A.; Luxen, A. Enabling Efficient Positron Emission Tomography (PET) Imaging of Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A (SV2A) with a Robust and One-Step Radiosynthesis of a Highly Potent 18F-Labeled Ligand ([18F]UCB-H). *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (19), 8955–8966. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00905>.
- (236) Chang, L. C. W.; Von Frijtag Drabbe Künzel, J. K.; Mulder-Krieger, T.; Spanjersberg, R. F.; Roerink, S. F.; Van Den Hout, G.; Beukers, M. W.; Brussee, J.; Ijzerman, A. P. A Series of Ligands Displaying a Remarkable Agonistic-Antagonistic Profile at the Adenosine A1 Receptor. *J. Med. Chem.* **2005**, 48 (6), 2045–2053. <https://doi.org/10.1021/jm049597+>.
- (237) Pike, V. W. PET Radiotracers: Crossing the Blood-Brain Barrier and Surviving Metabolism. *Trends in Pharmacological Sciences.* **2009**. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.05.005>.
- (238) BONANOMI, Giorgio; ESTRADA, Anthony A.; FENG, Jianwen A.; FOX, Brian; LESLIE, Colin Philip; LYSSIKATOS, Joseph P.; NAPOLITANO, Carmela; POZZAN, Alfonso; SUDHAKAR, Anantha; SWEENEY, Zachary K.; TONELLI, Federica; DE VICENTE FIDALGO, J. ISOXAZOLIDINE DERIVED INHIBITORS OF RECEPTOR INTERACTING PROTEIN KINASE 1 (RIPK 1). WO2017096301 (A1), **2017**.
- (239) Andrea Vescovi; Robert Reinhard; Bernd Sievernich; Cyrill Zagar; Elmar Kibler; Ricarda Niggeweg; Toralf KÜHN; Matthias Witschel; William Karl Moberg; Liliana Parra Rapado; Tao QU; Frank Stelzer; Andree Van Der Kloet; Thomas Seitz; Thomas Ehrhardt; Klaus Kreuz; Klaus Grossmann; Anna Aleksandra Michrowska-Pianowska; Anja Simon; Richard Roger Evans; Eike Hupe; Klaus Reinhard; Matthias Bergtold; Susanne Noreen; Evelyn Kolle; Stefan Tresch; Dschun Song; Julia Major; Johannes Hutzler; Trevor William Newton. WO2011098417A1 - Substituted Cyanobutyrate Having Herbicidal Action, **2018**.
- (240) Weinberger, M. A.; Heggie, R. M.; Holmes, H. L. SOLVENT EFFECTS IN THE NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTRA OF BENZALMALONONITRILES. *Can. J. Chem.* **1965**, 43 (9), 2585–2593. <https://doi.org/10.1139/v65-355>.
- (241) Richard R. Cesati; Heike S. Radeke; Suresh K. Pandey; Ajay Purohit; Simon P. Robinson. US20150196672A1 - Compositions, Methods, and Systems for the Synthesis and Use of Imaging Agents, **2015**.
- (242) Hironori Harada; Susumu Watanuki; Tomofumi Takawa; Kenichi Kawaguchi; Toshio Okazaki; Yuusuke Hirano; Chikashi Saitoh. US 2003/0232860 A1: Medicine Comprising Dicyanopyridine Derivative, **2003**.
- (243) Ranu, B. C.; Jana, R.; Sowmiah, S. An Improved Procedure for the Three-Component Synthesis of Highly Substituted Pyridines Using Ionic Liquid. *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (8), 3152–3154. <https://doi.org/10.1021/jo070015g>.

8. Anhang

8.2 *In vitro* Evaluierungen der radiofluorierten Partialagonisten

In vitro Autoradiogramme von den Radioliganden [^{18}F]27–[^{18}F]31 und [^{11}C]50 wurden an Rattenhirnschnitten ausgeführt. Dazu wurde jeweils 5 kBq/mL Radioligand verwendet. Als Kompetitoren dienten die Referenzverbindungen [1 μM], der Adenosin Rezeptor Antagonist DPCPX [1 μM] und der Adenosin Rezeptor Agonist NECA [10 μM].

	[^{18}F]FMPD	<i>iso</i> - [^{18}F]FMPD	[^{18}F]FEMPD	<i>iso</i> - [^{18}F]FEMPD	[^{11}C]MMPD
Totalbindung					
Kompetitive Verdrängung mit DPCPX [1 μM]					
Kompetitive Verdrängung mit NECA [10 μM]					
Kompetitive Verdrängung mit entsprechenden Referenzverbindungen [1 μM]					

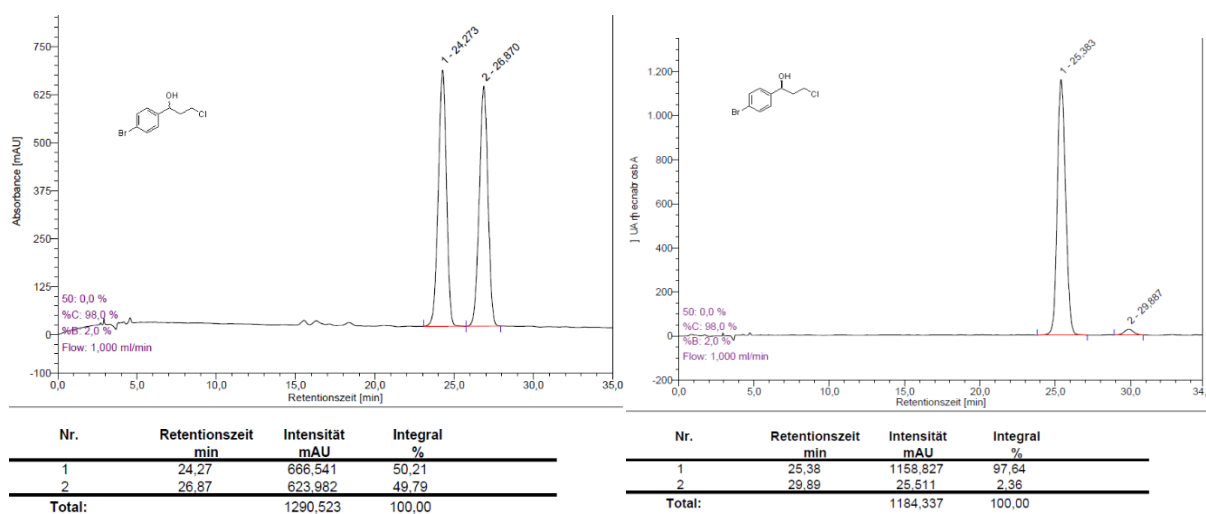


Die spezifischen Bindungen wurden über den Quotienten der nach der Verdrängung auf den Schnitten verbliebenen Aktivität zur Aktivität der Totalbindung bestimmt.

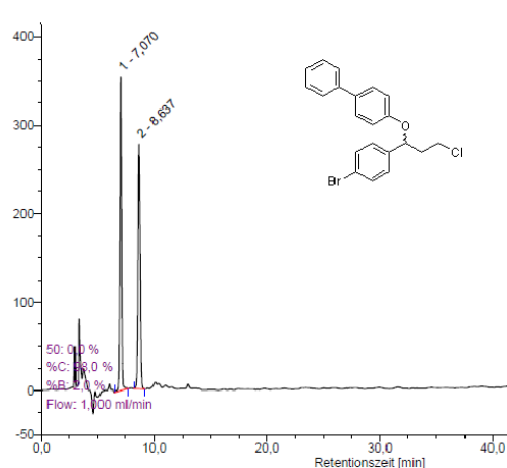
	Spezifische Bindung [%] Verdrängung mit 27, 28, 30, 31 oder 50 [1 µM]		Spezifische Bindung [%] Verdrängung mit DPCPX [1 µM]		Spezifische Bindung [%] Verdrängung mit NECA [10 µM]	
	Zerebellum	total	Zerebellum	total	Zerebellum	total
[¹⁸ F]FMPD	30.6 ± 8.2	25.6 ± 0.7	28.8 ± 3.0	14.5 ± 1.3	26.0 ± 1.9	22.2 ± 2.1
<i>iso</i> -[¹⁸ F]FMPD	24.5 ± 3.5	16.0 ± 3.6	29.5 ± 1.6	21.4 ± 3.9	28.6 ± 1.7	7.4 ± 2.3
[¹⁸ F]FEMPD	42.3 ± 2.2	41.4 ± 4.6	38.7 ± 5.7	40.7 ± 1.2	24.8 ± 5.1	32.9 ± 3.7
<i>iso</i> -[¹⁸ F]FEMPD	29.0 ± 3.6	26.2 ± 2.8	25.5 ± 3.7	20.1 ± 3.8	19.7 ± 2.2	25.1 ± 1.3
[¹¹ C]MMPD	—	—	—	23 ± 1.1	—	26.0 ± 0.6

8.3 HPLC Chromatogramme chiraler Verbindungen

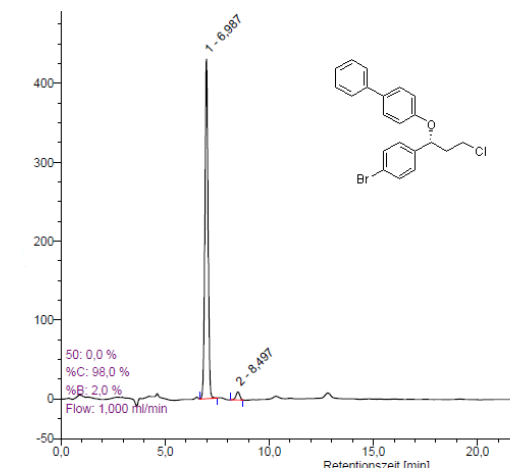
Die verwendete HPLC Säule und die Bedingungen sind in Kapitel 4 beschrieben.



Verbindung 1 als Racemat (links) und als (*S*)-Enantiomer (rechts).

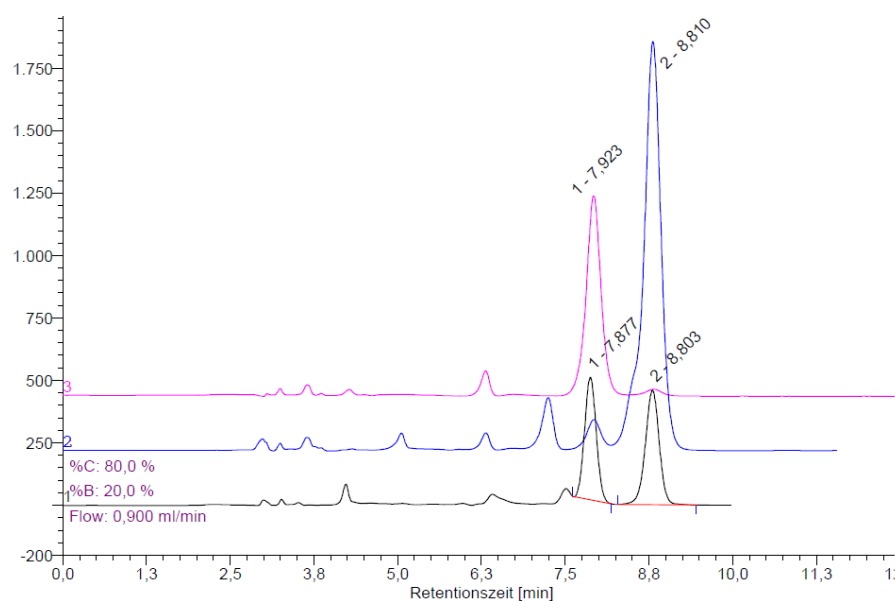


Nr.	Retentionszeit min	Intensität mAU	Integral %
1	7,07	355,047	51,25
2	8,64	276,487	48,75
Total:		631,533	100,00



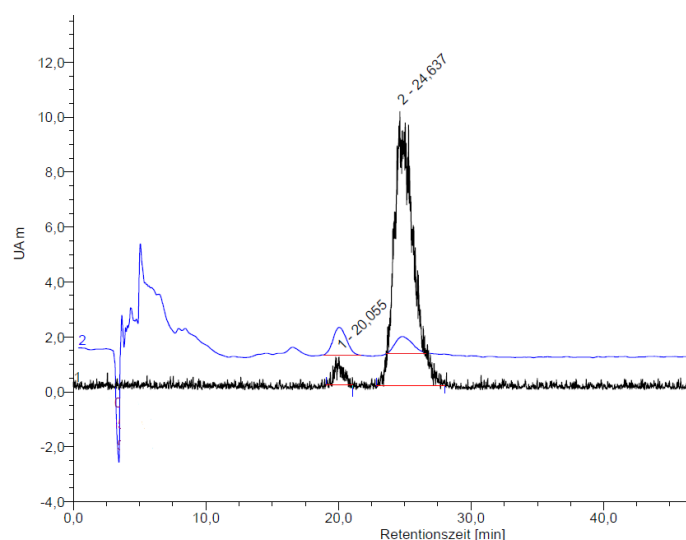
Nr.	Retentionszeit min	Intensität mAU	Integral %
1	6,99	430,292	97,25
2	8,50	10,001	2,75
Total:		440,293	100,00

Verbindung **2** als Racemat (links) und als (*R*)-Enantiomer (rechts).



Nr.	Retentionszeit min	Intensität mAU	Integral %
1	7,93	99,985	3,95
2	8,81	1623,516	96,05
Total:		1723,501	100,00

Verbindung **13** als Racemat (schwarz), (*R*)-Enantiomer (blau) und (*S*)-Enantiomer (rosa).

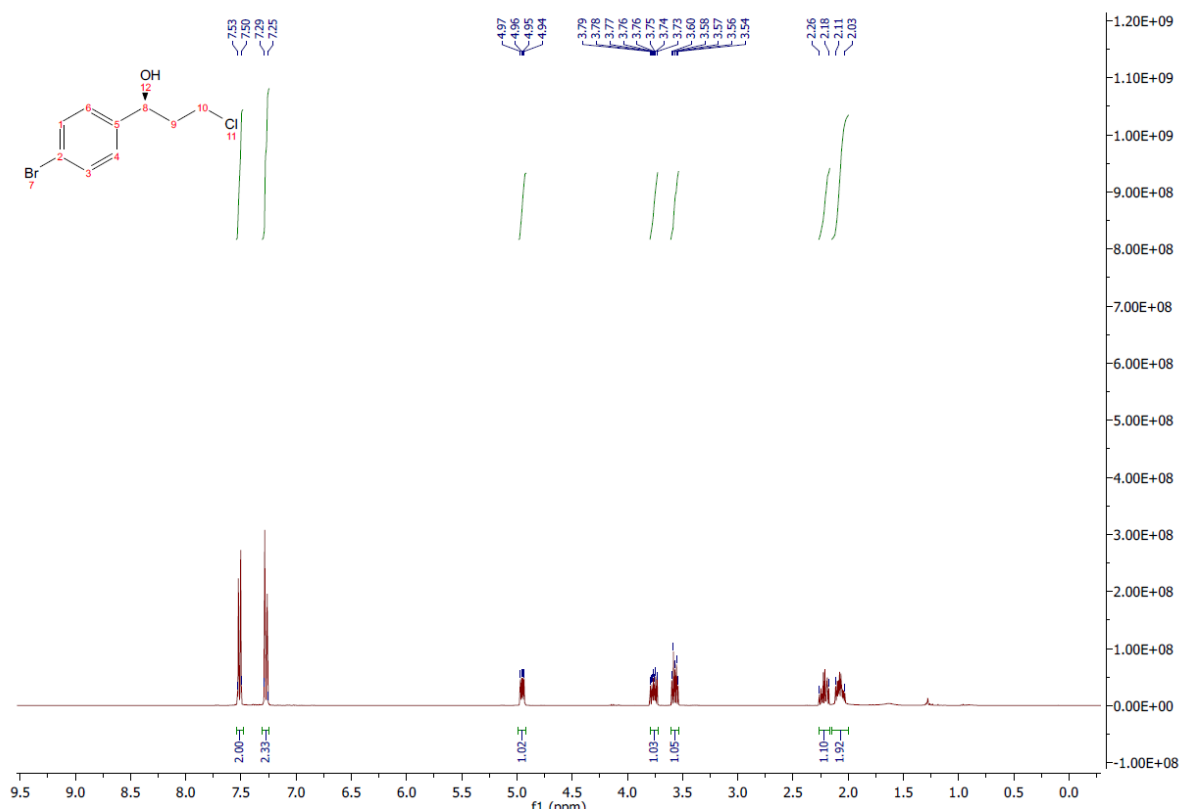


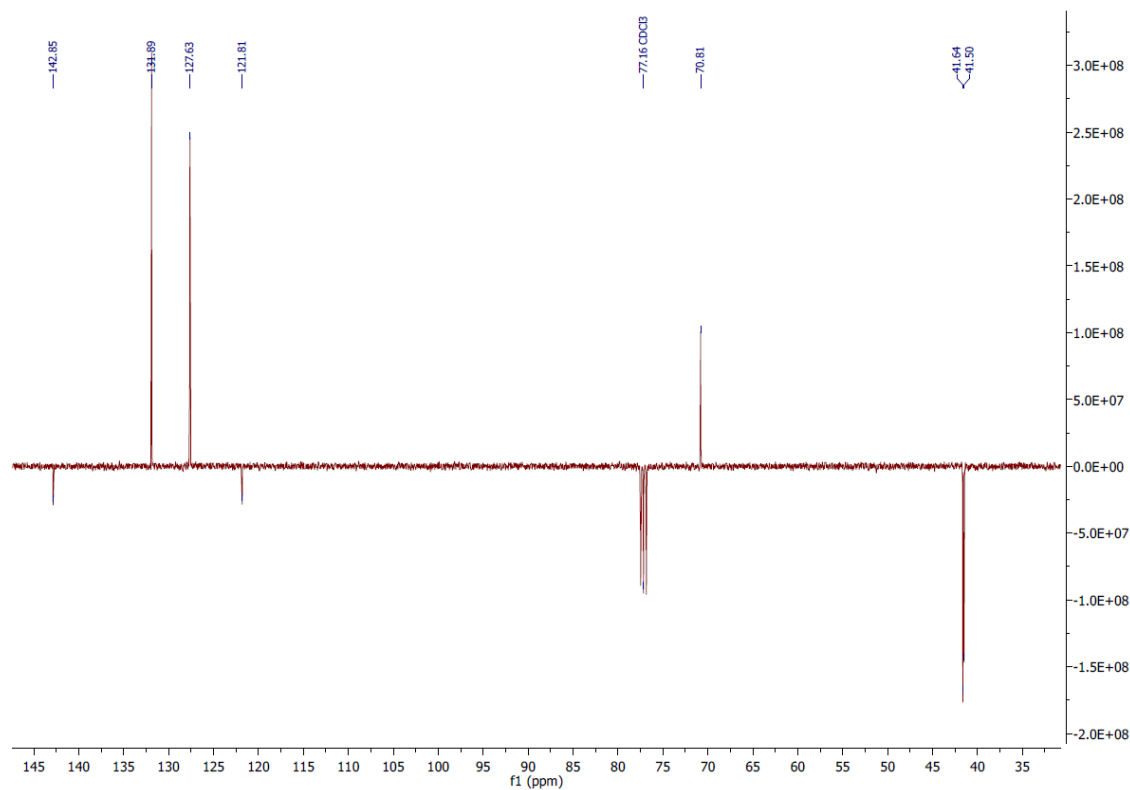
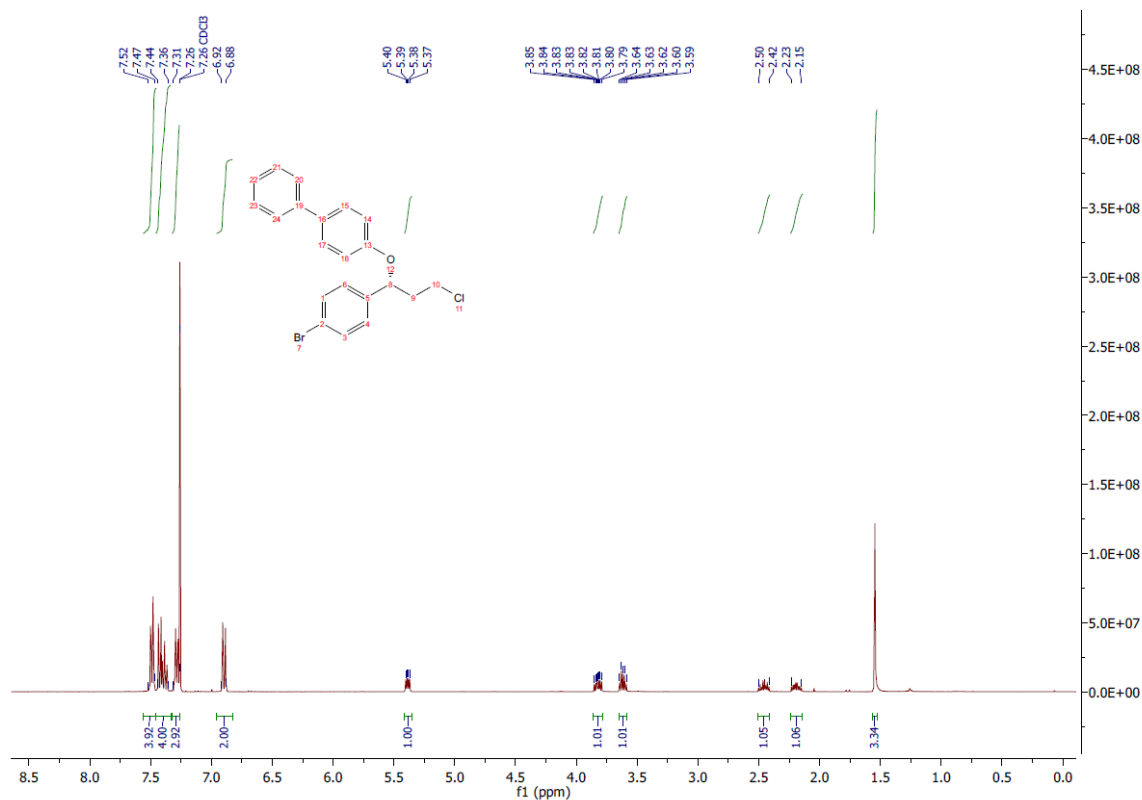
Nr.	Retentionszeit min	Intensität mAU	Integral %
1	20,06	1,023	3,82
2	24,64	9,979	96,18
Total:		11,002	100,00

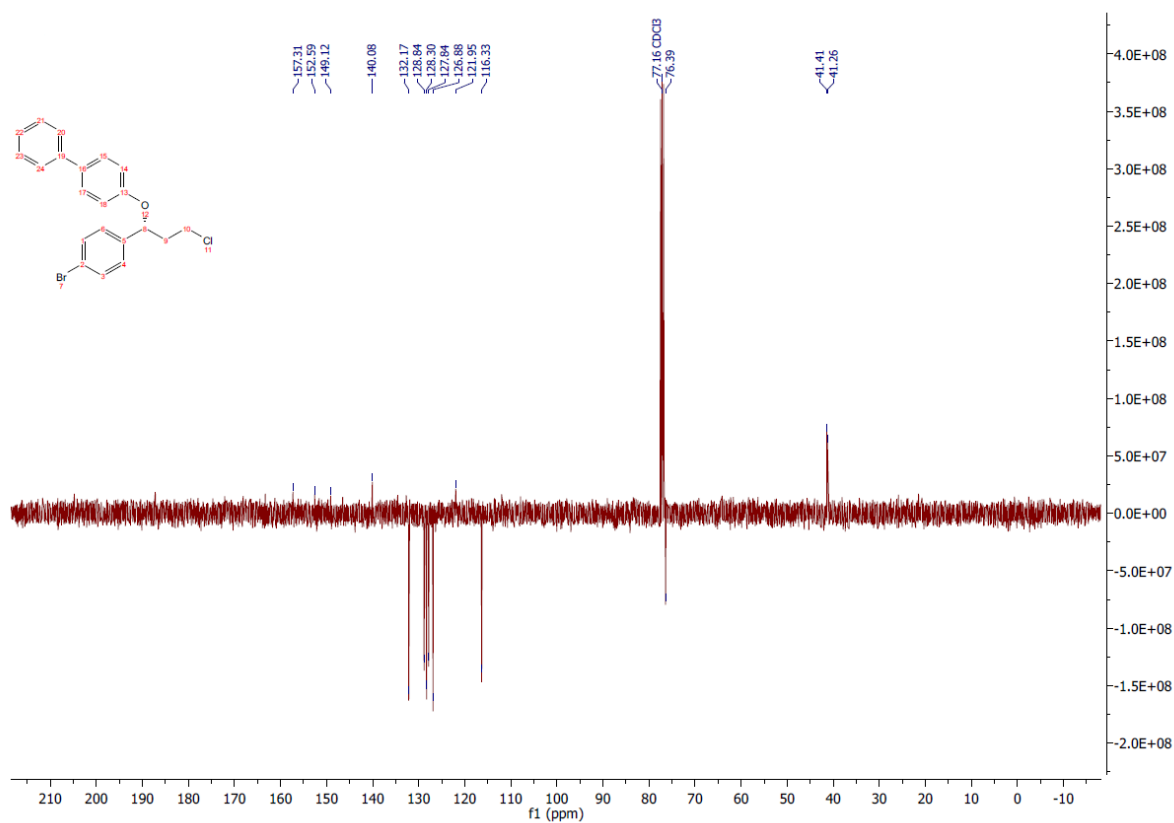
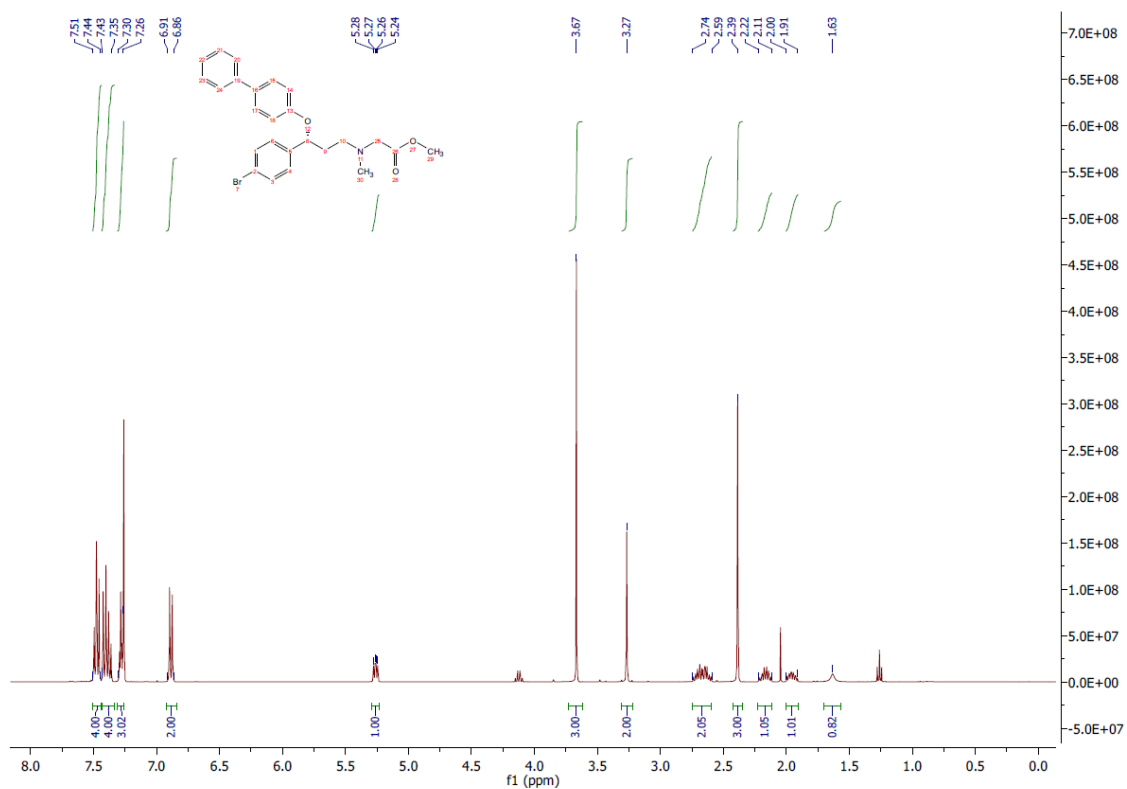
Verbindung [^{18}F]MNI-1126 ([^{18}F]19) (schwarz) und die Referenzverbindung (blau).

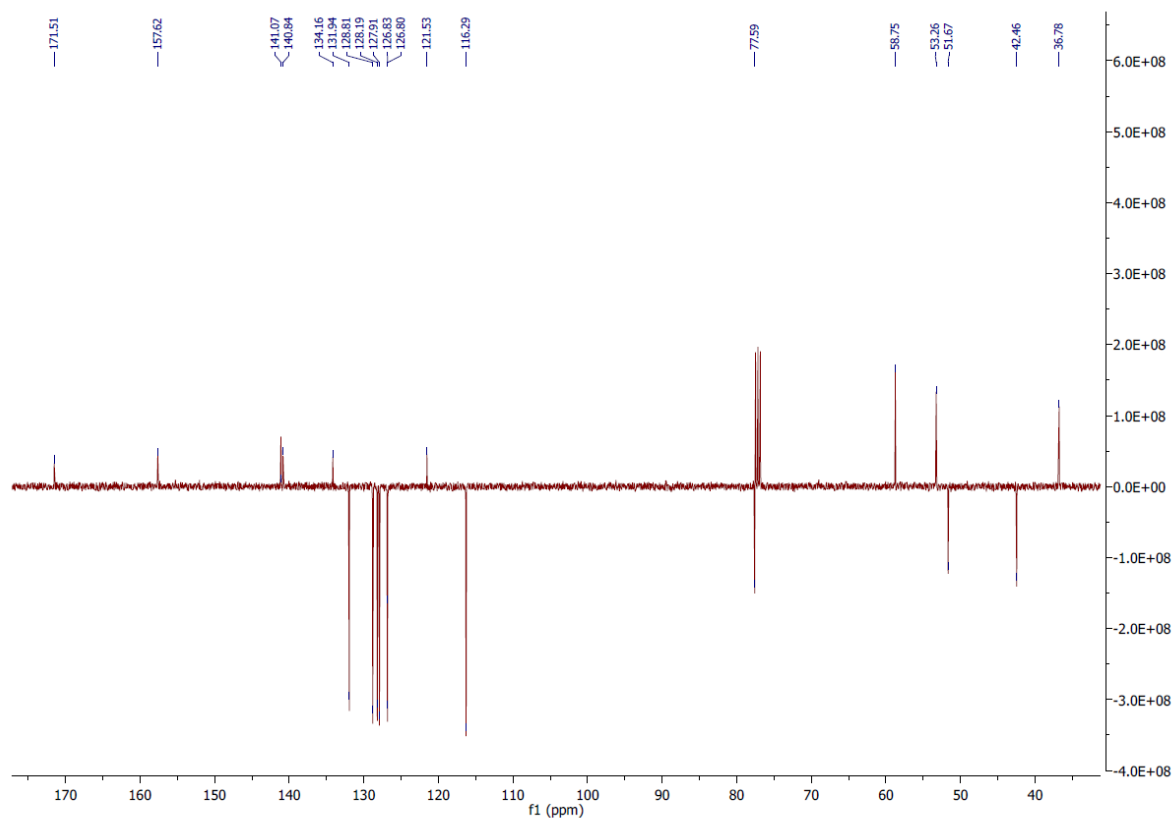
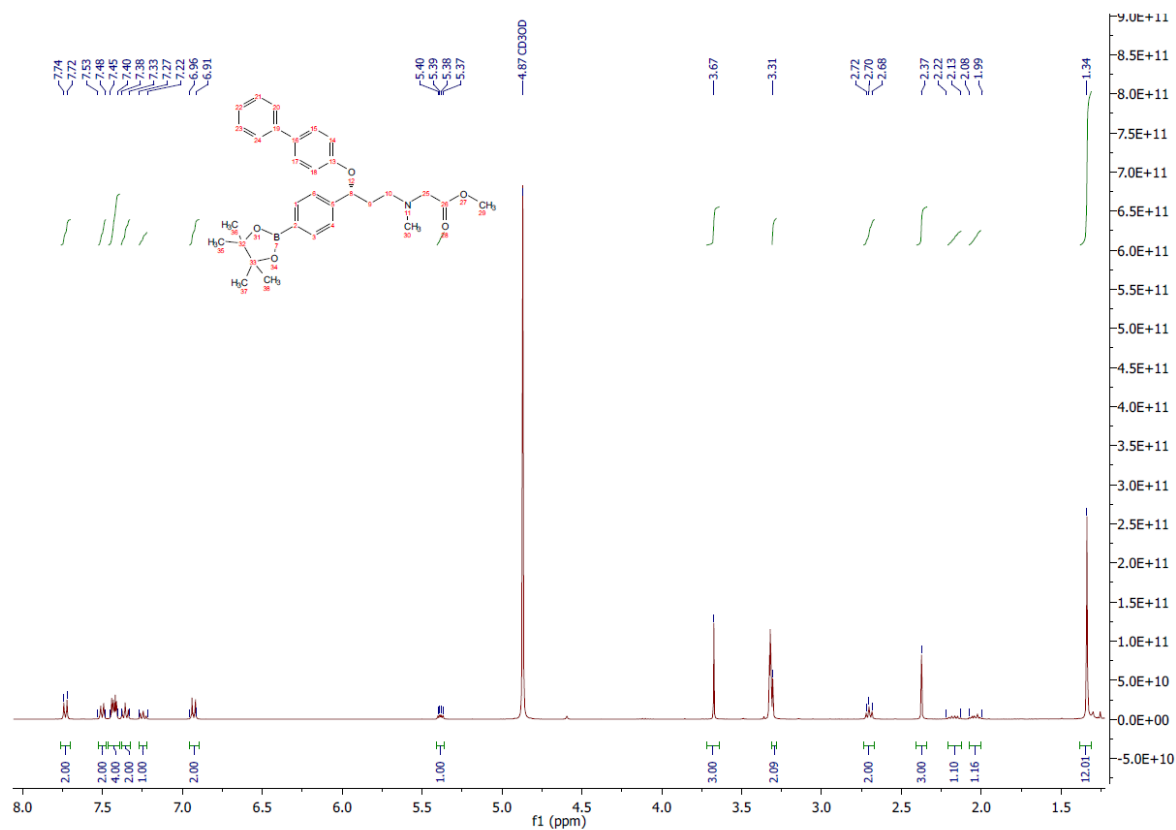
8.4 NMR-Spektren

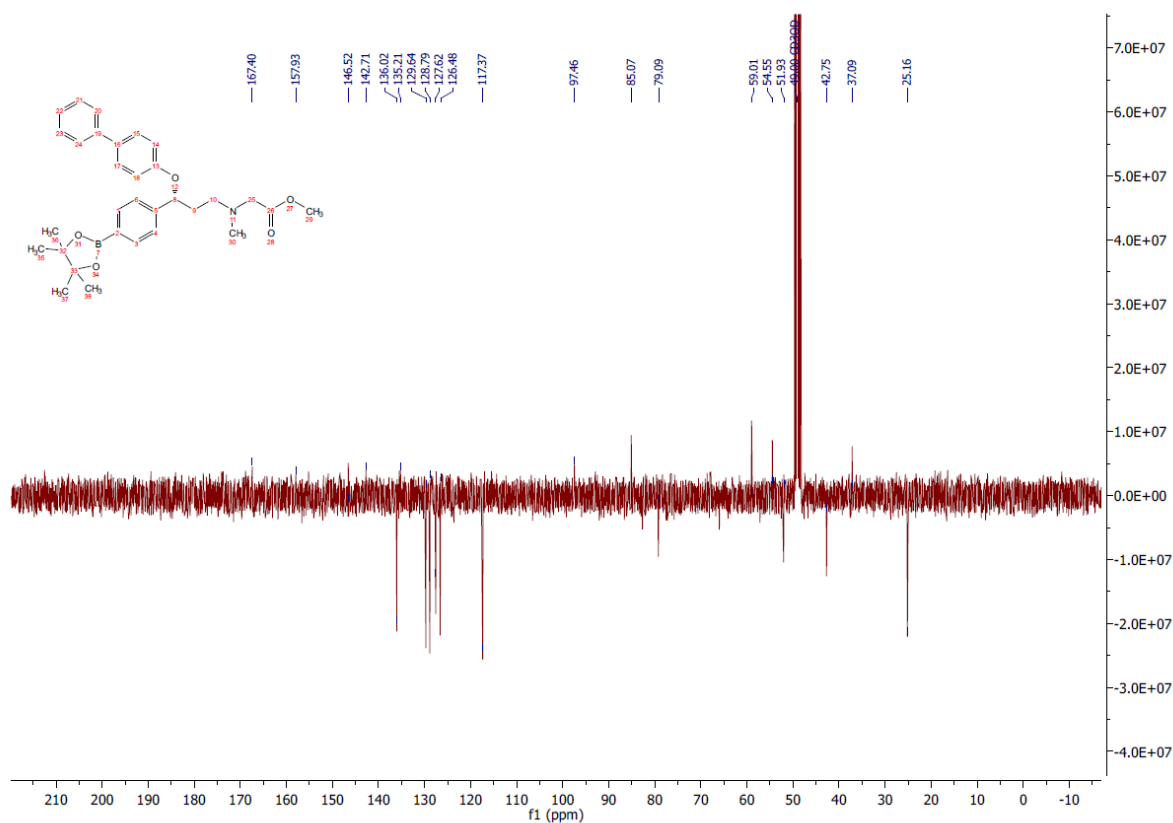
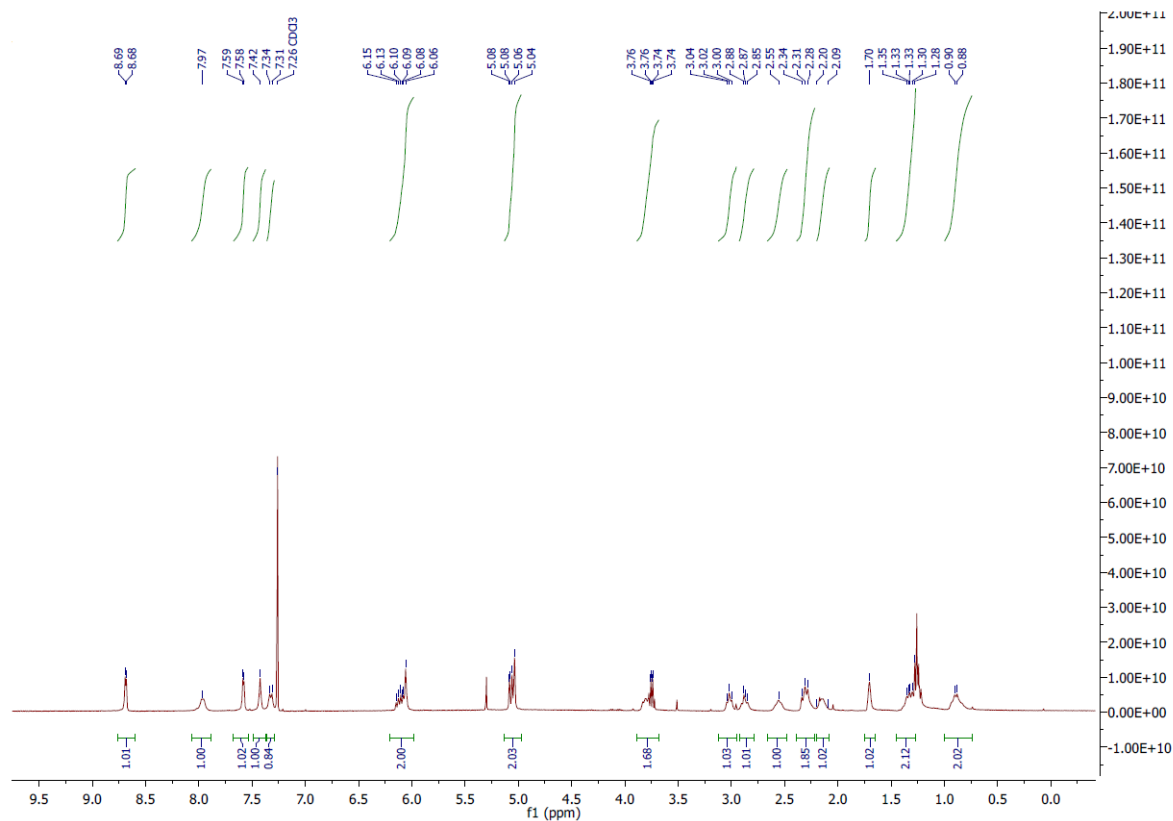
^1H -NMR Verbindung 1

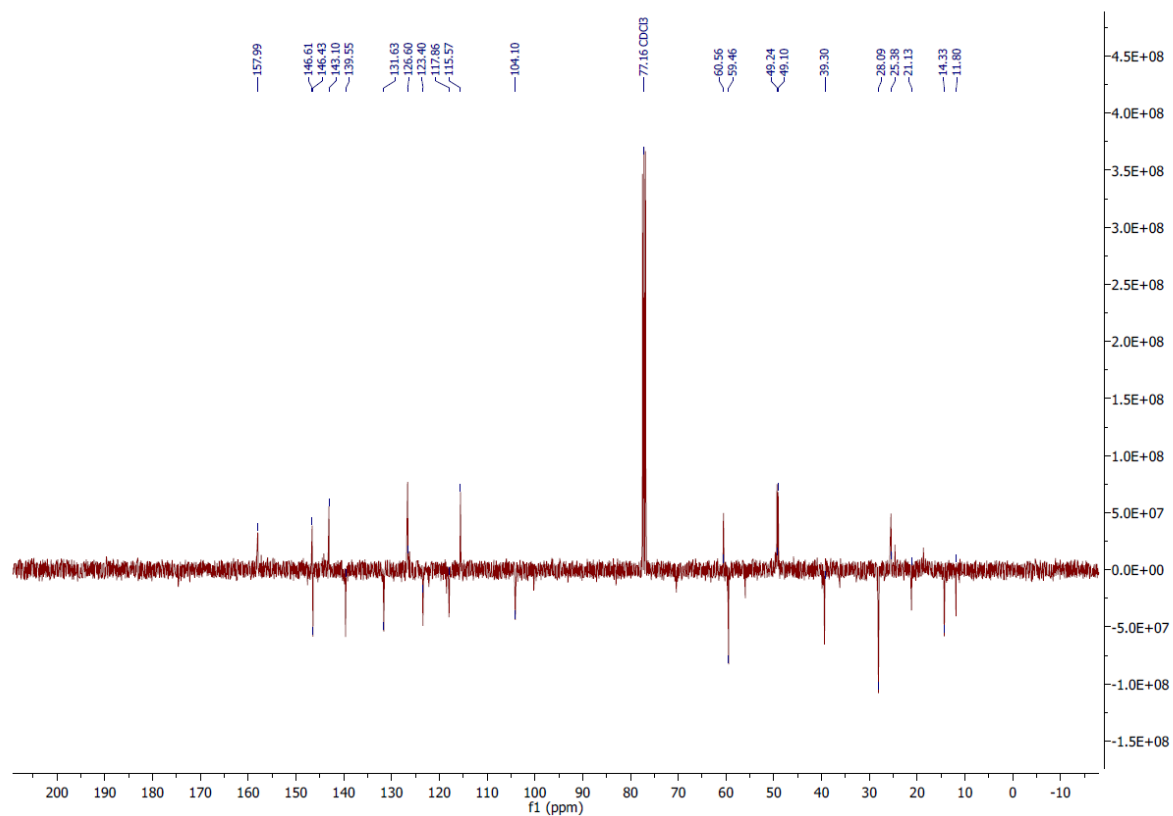
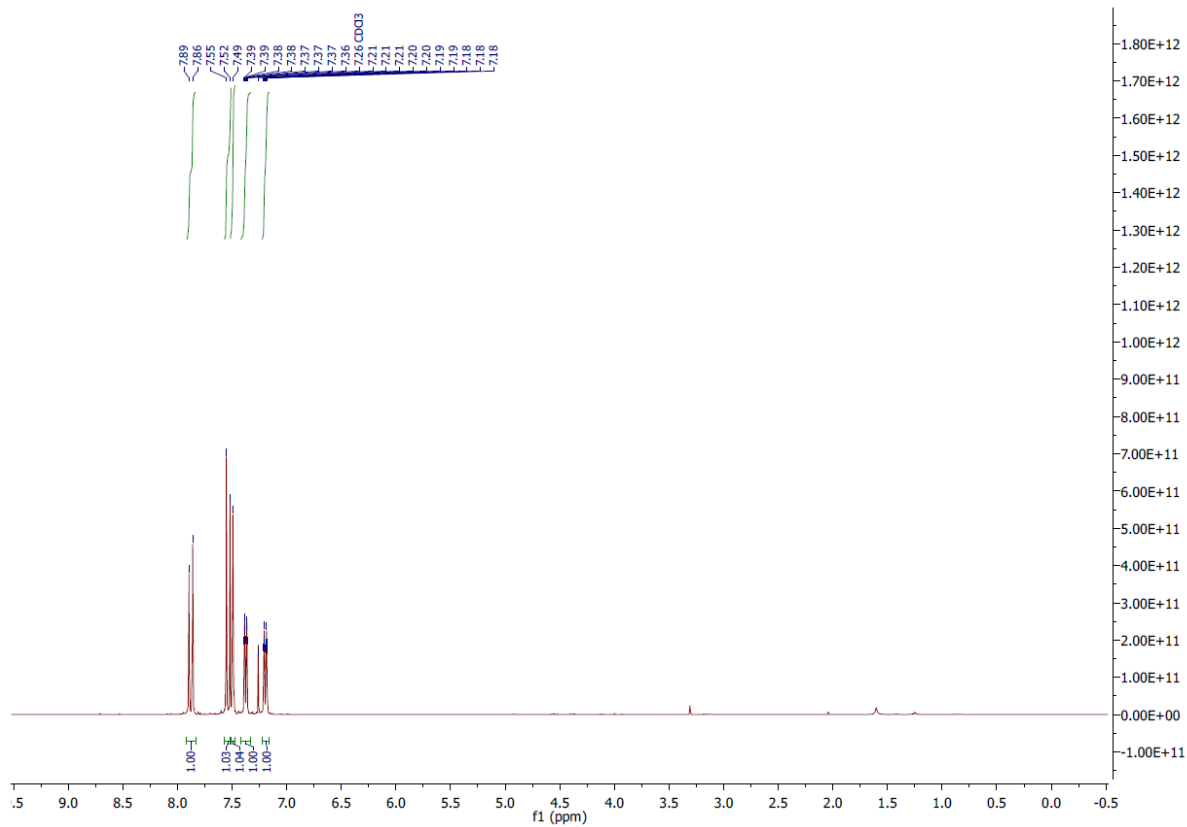


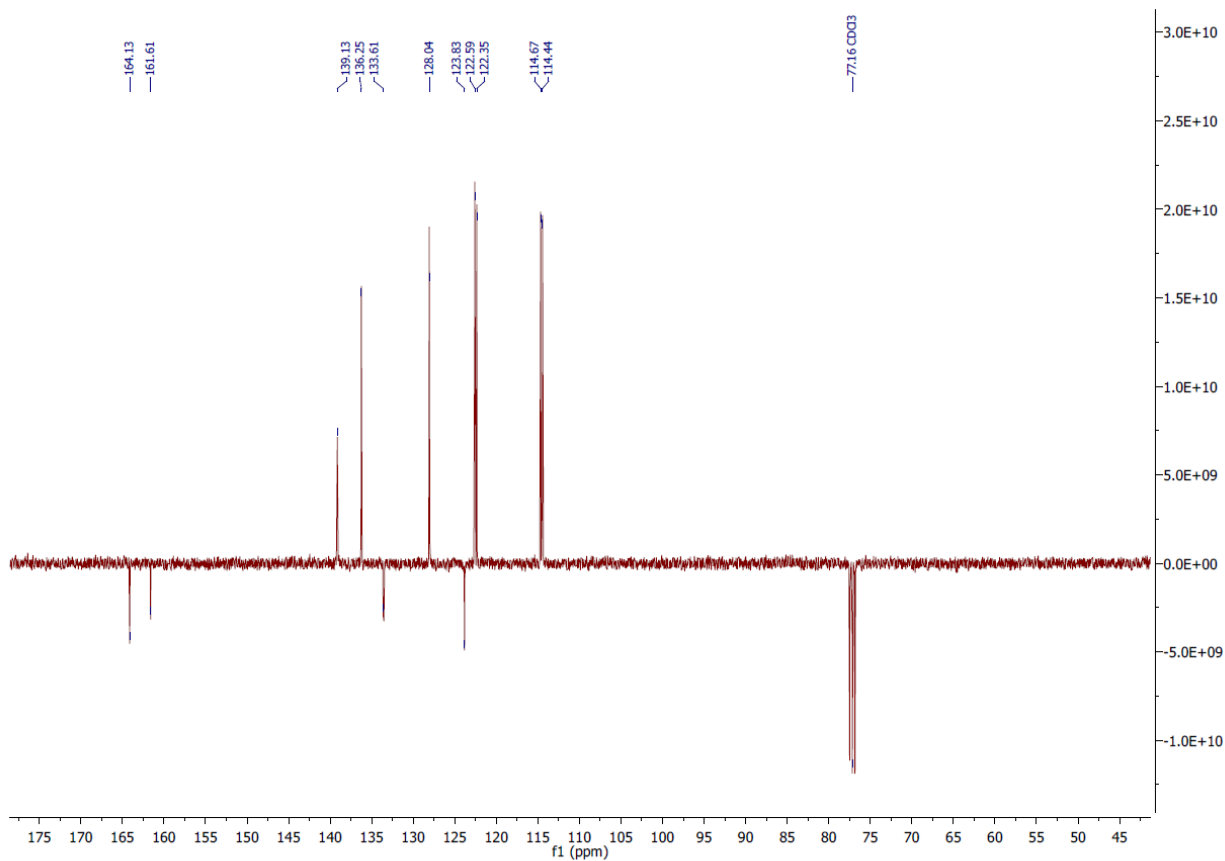
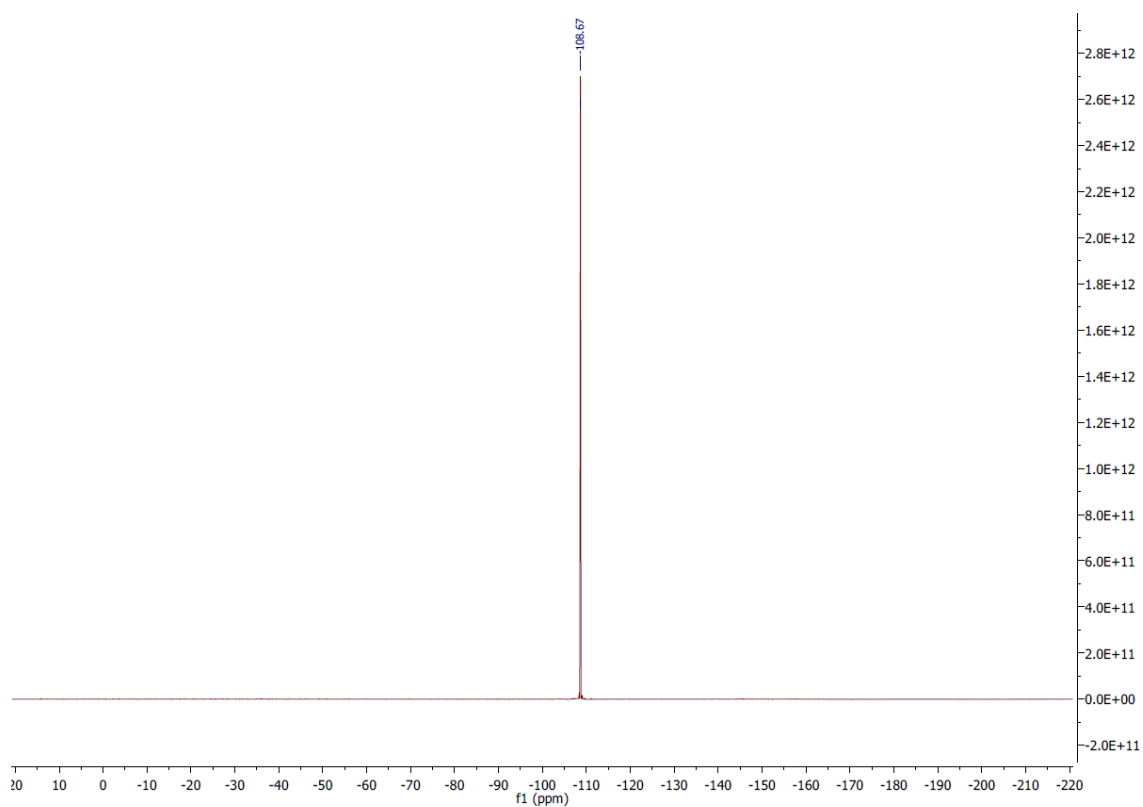
^{13}C -NMR Verbindung 1 **^1H -NMR Verbindung 2**

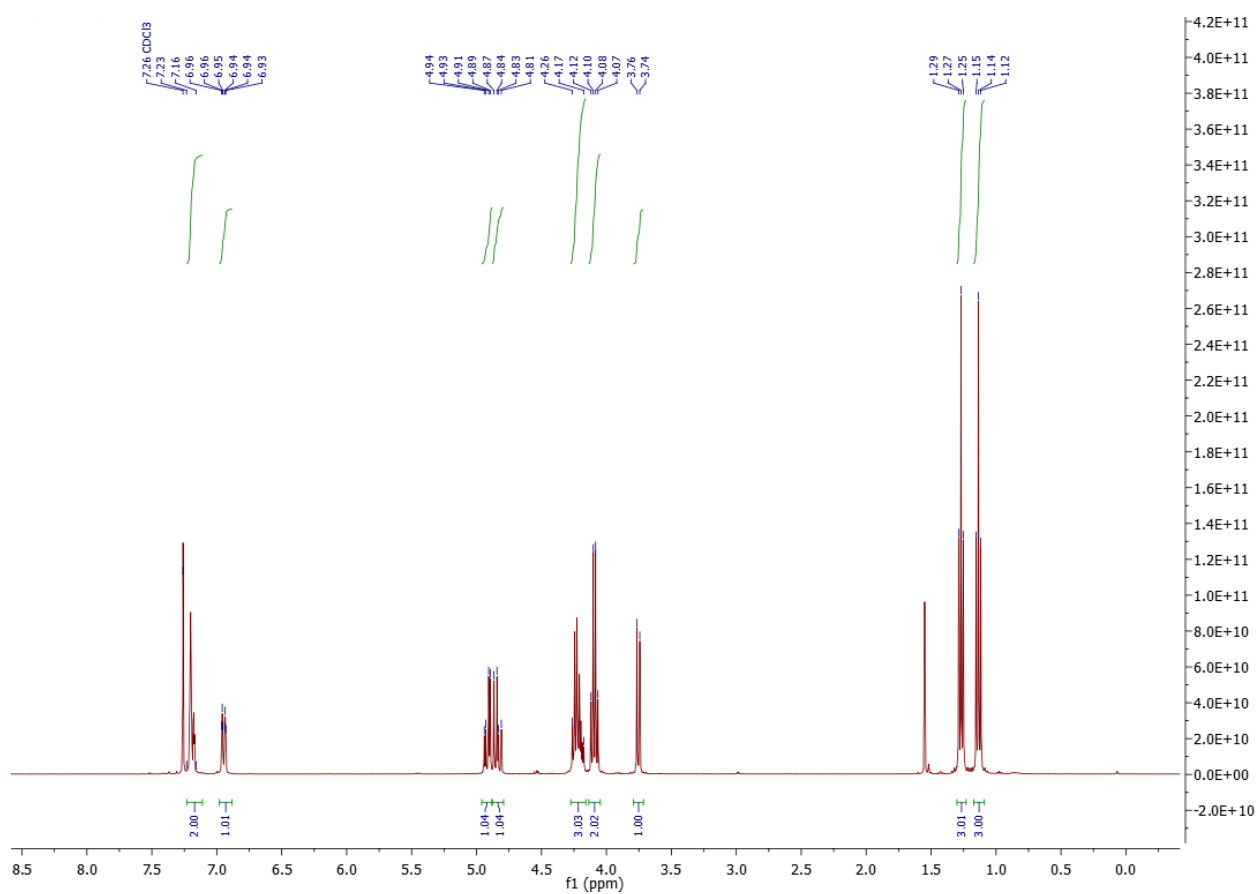
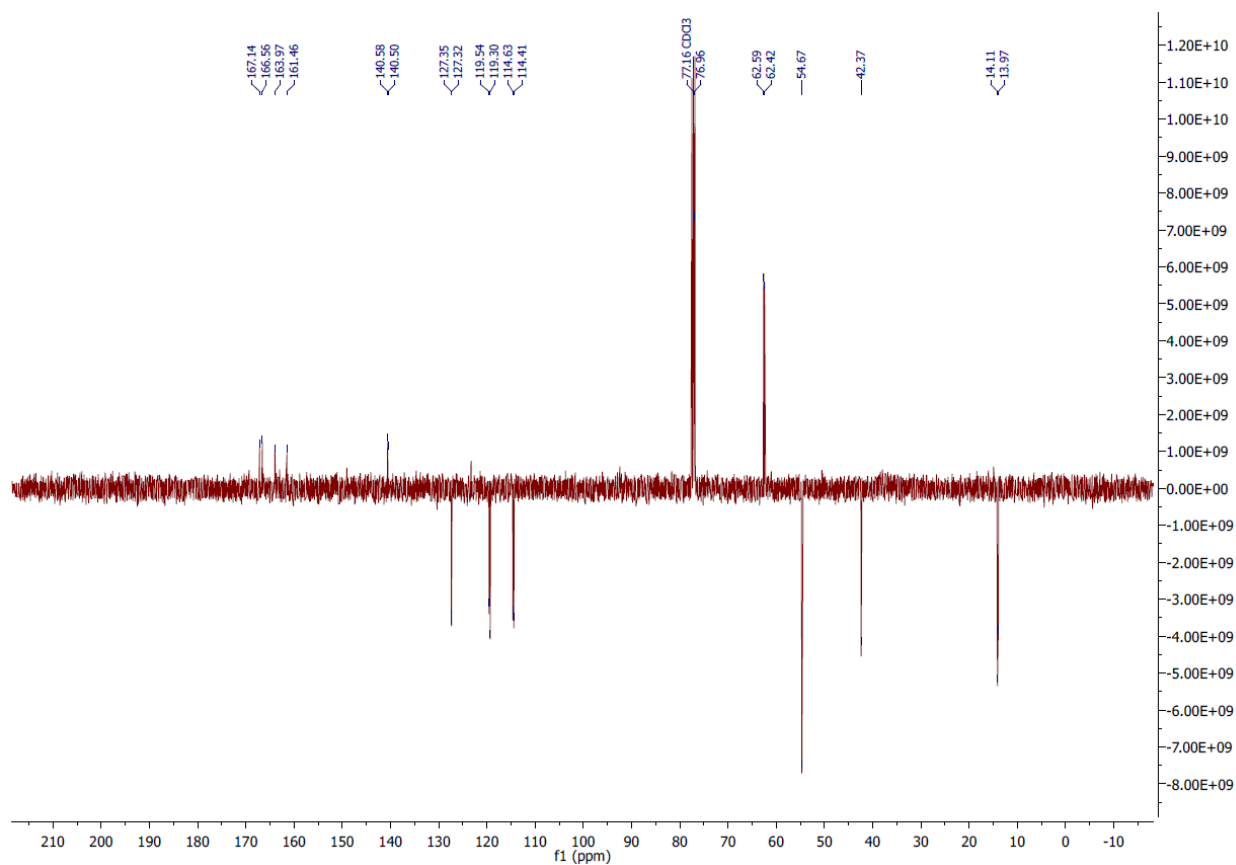
¹³C-NMR Verbindung 2**¹H-NMR Verbindung 3**

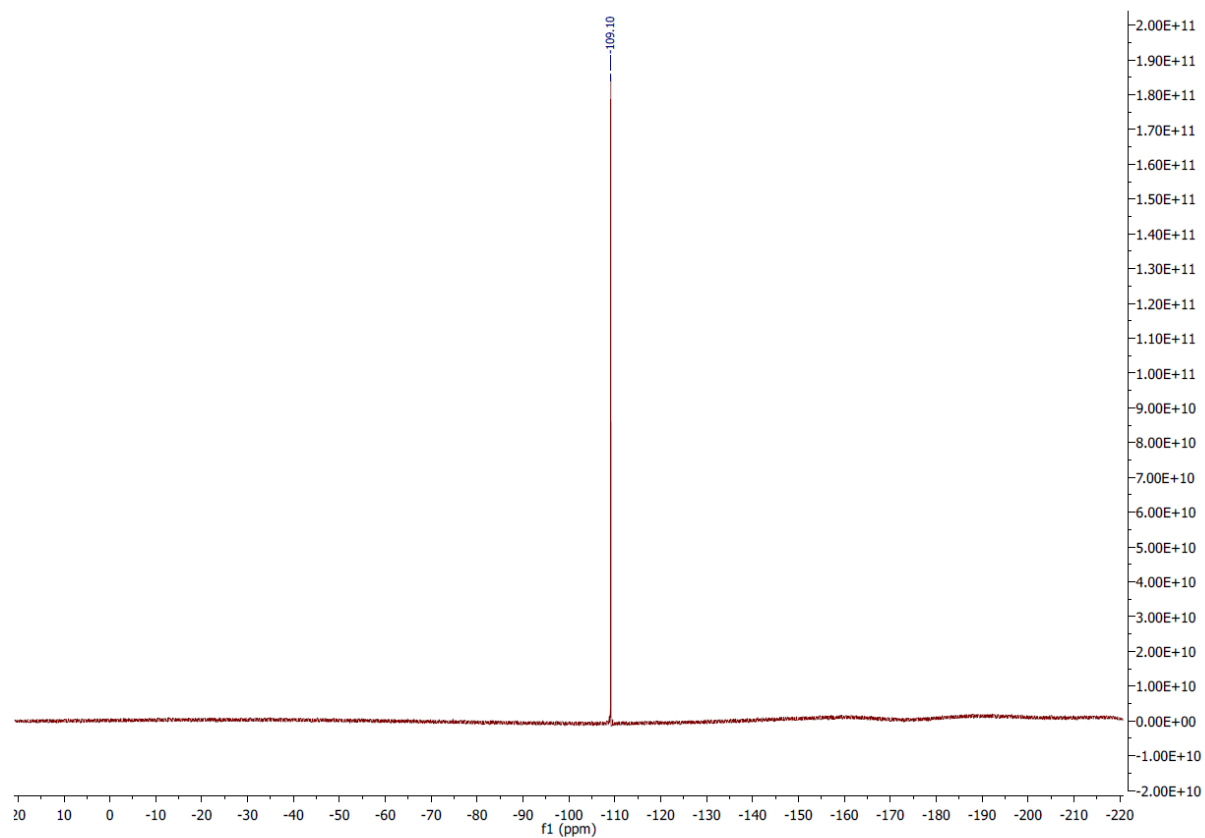
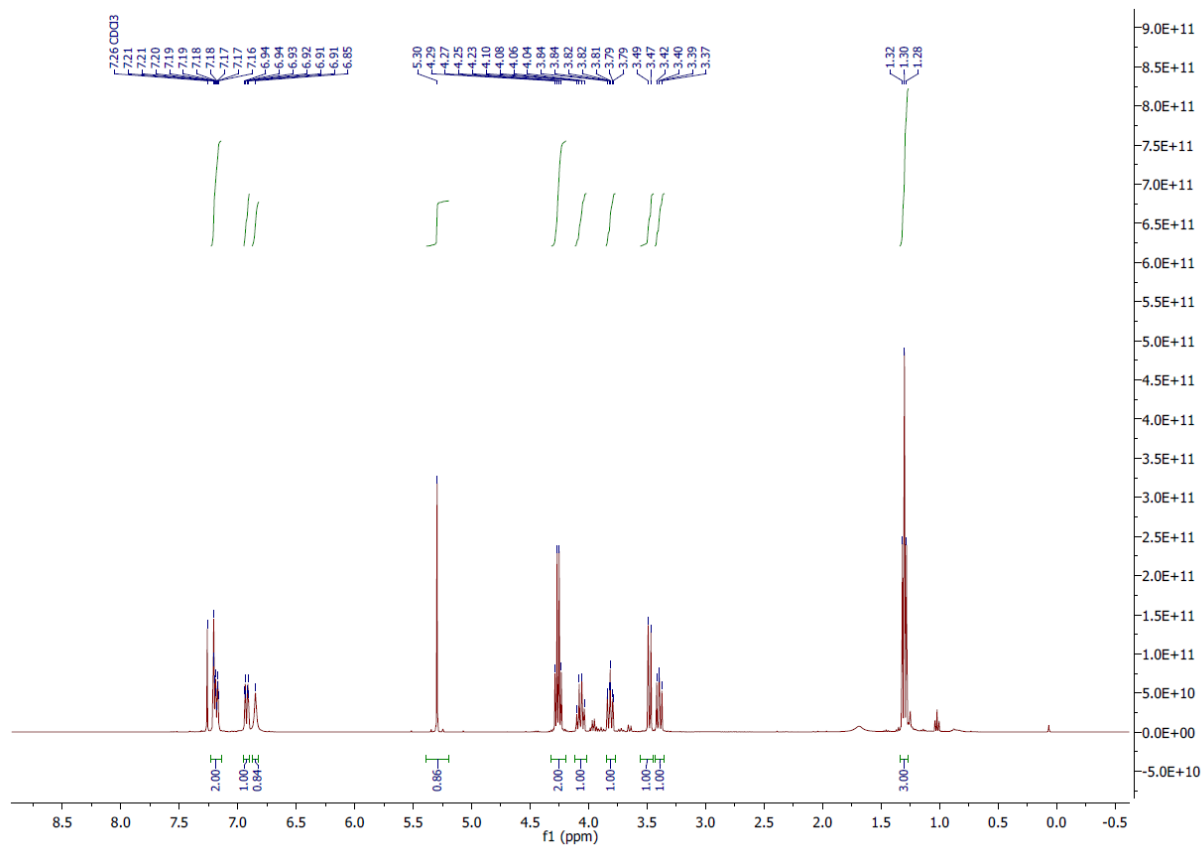
^{13}C -NMR Verbindung 3 **^1H -NMR Verbindung 4**

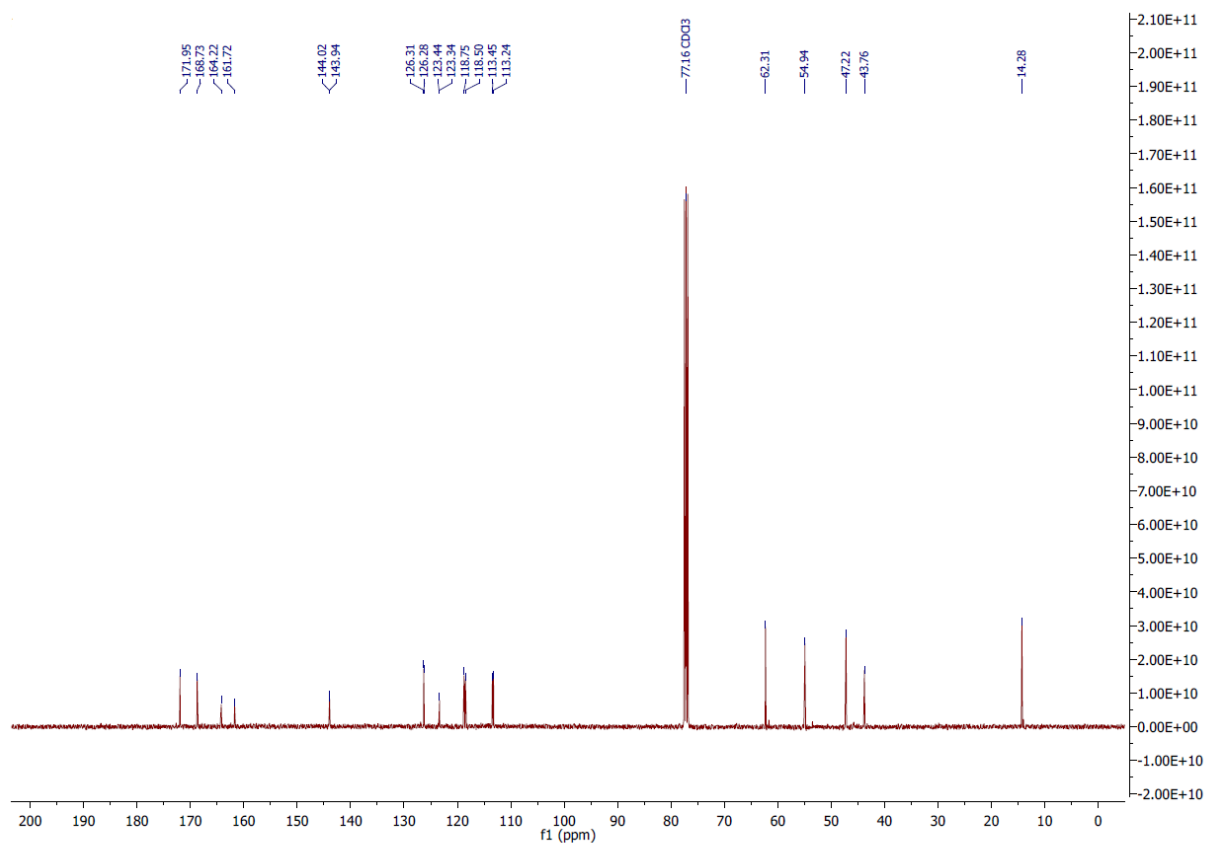
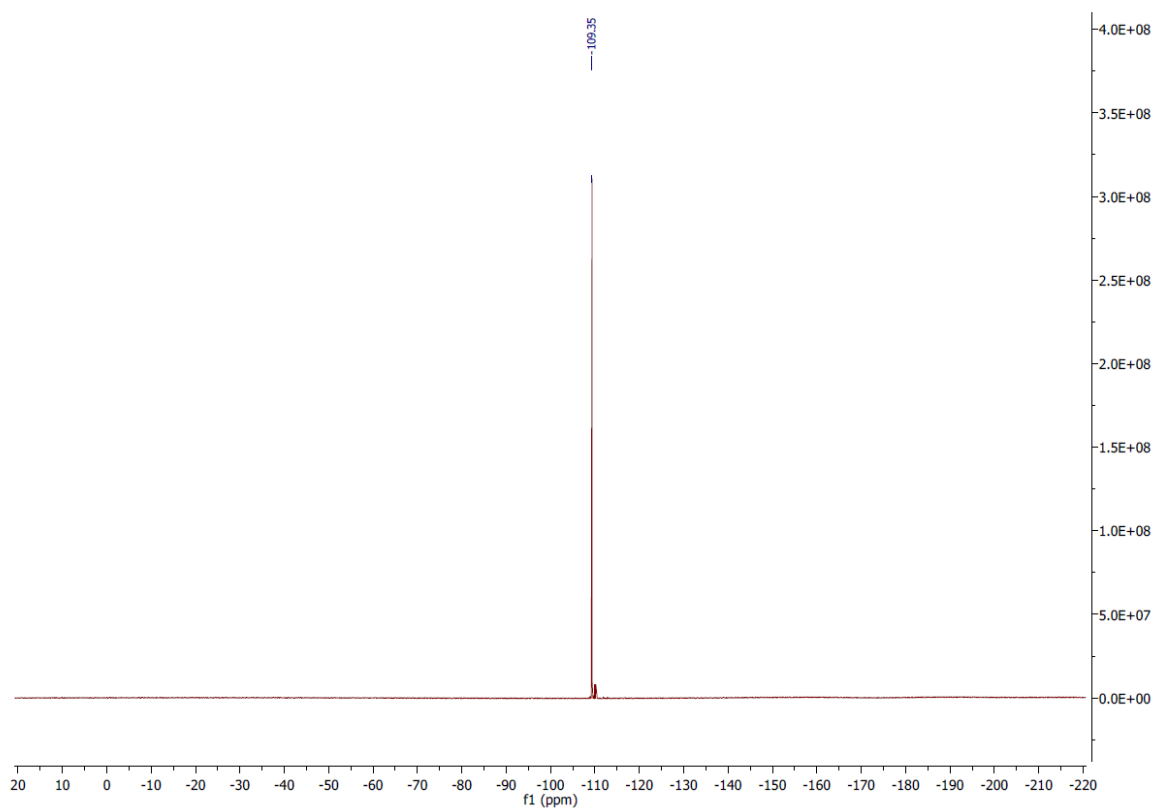
¹³C-NMR Verbindung 4**¹H-NMR Verbindung 11**

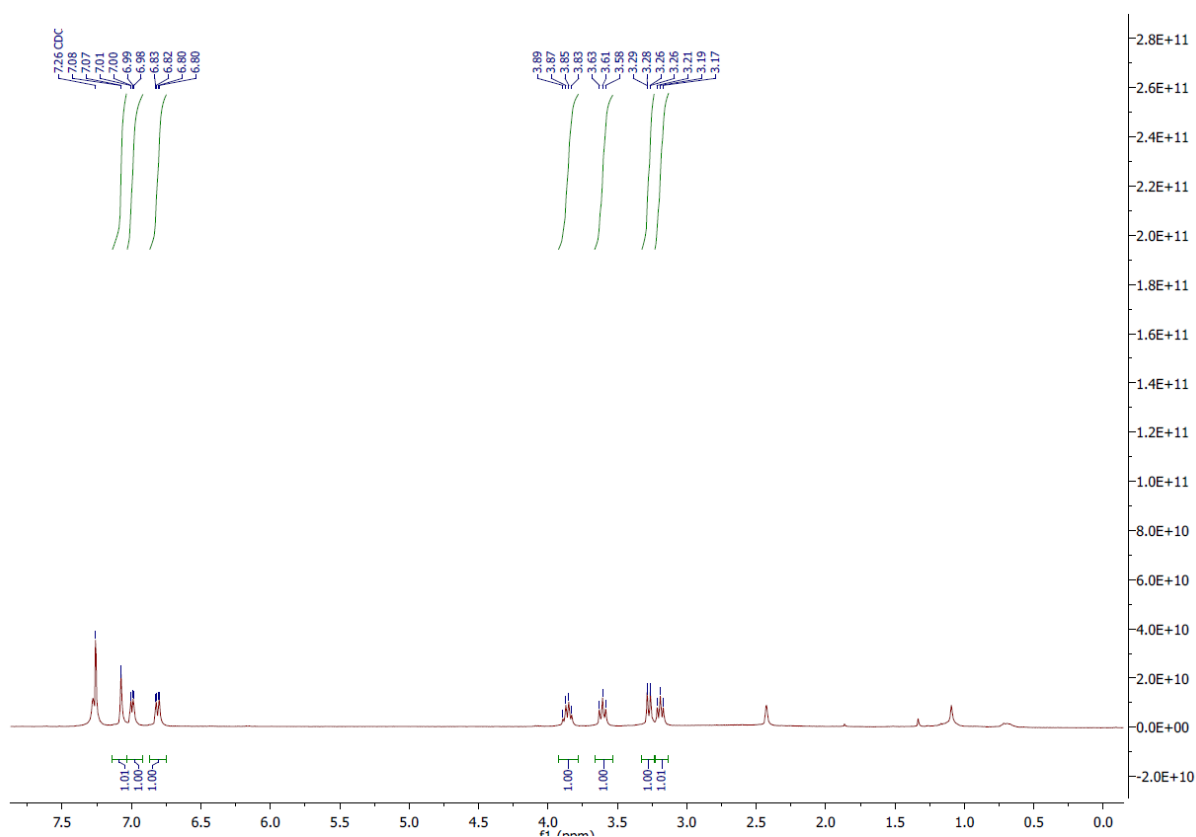
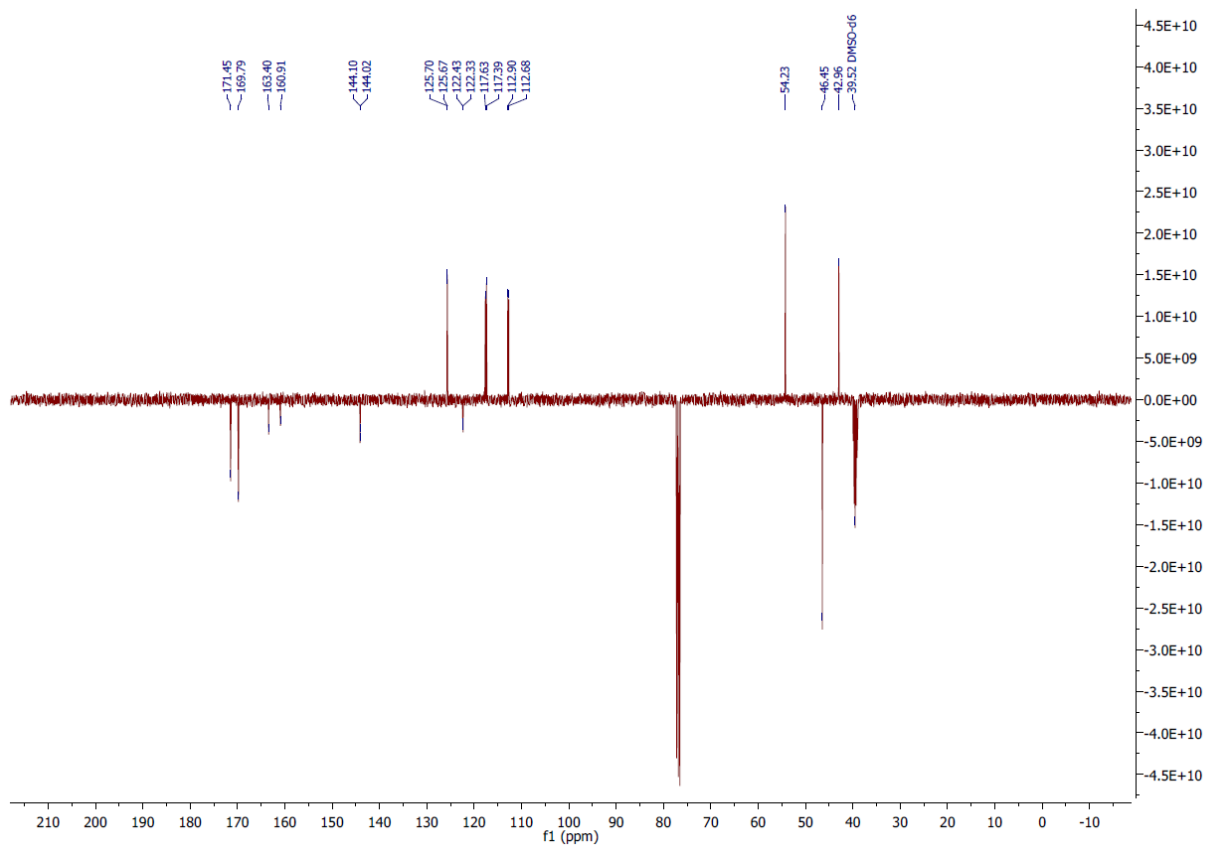
^{13}C -NMR Verbindung 11 **^1H -NMR Verbindung 12**

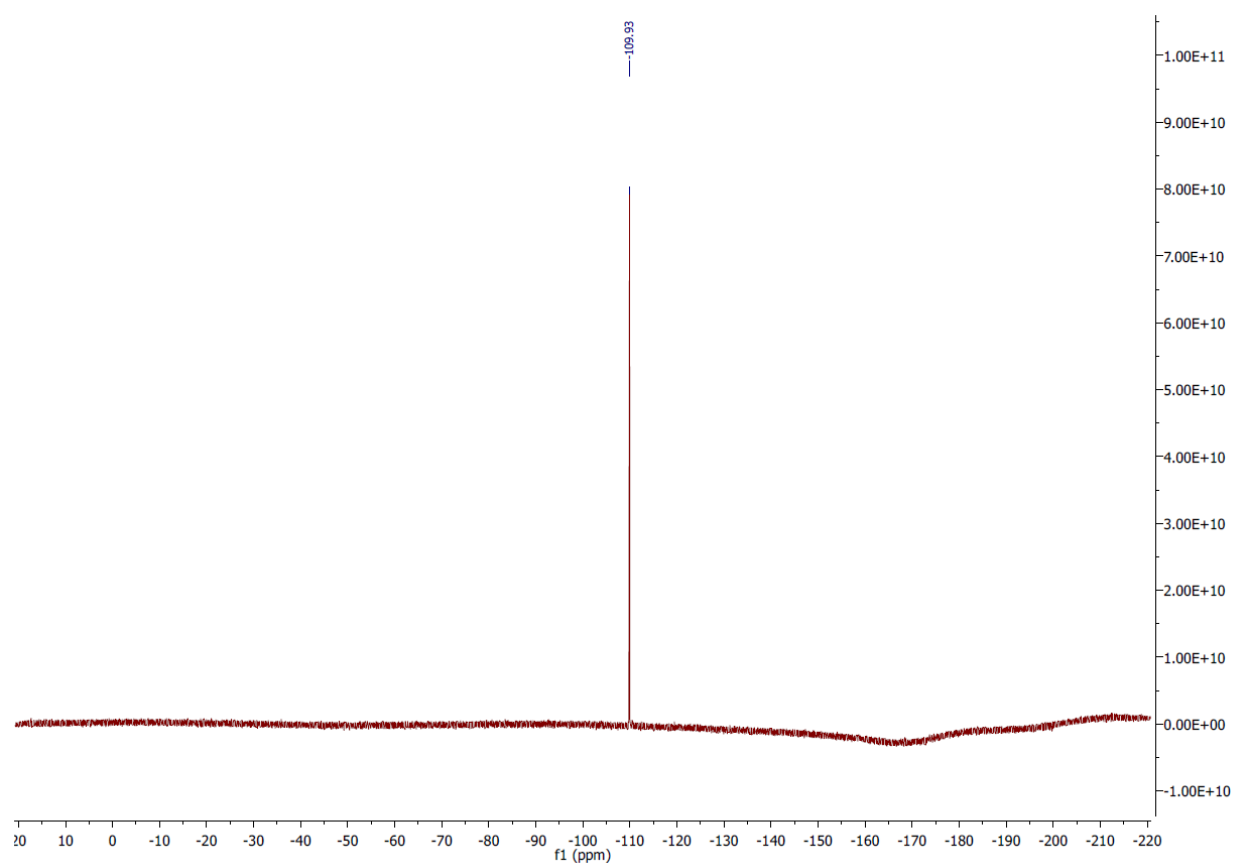
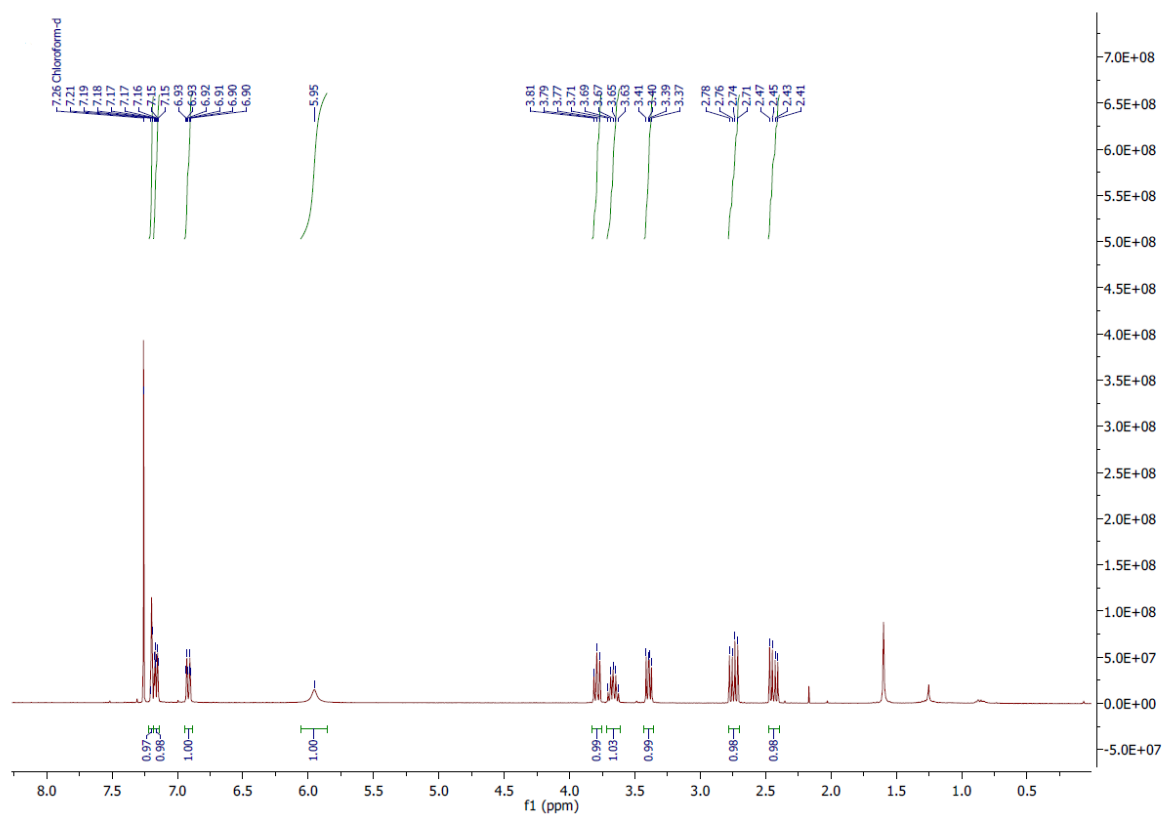
^{13}C -NMR Verbindung 12 **^{19}F -NMR Verbindung 12**

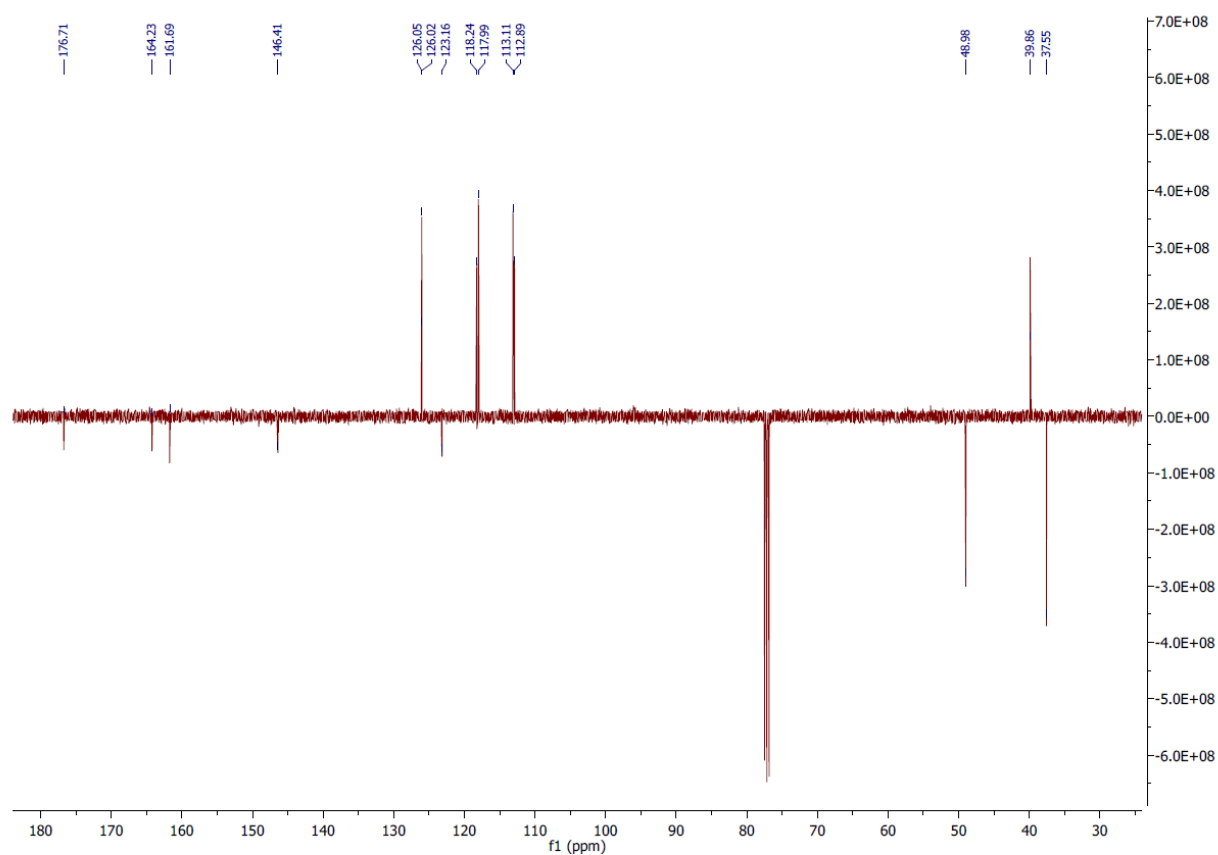
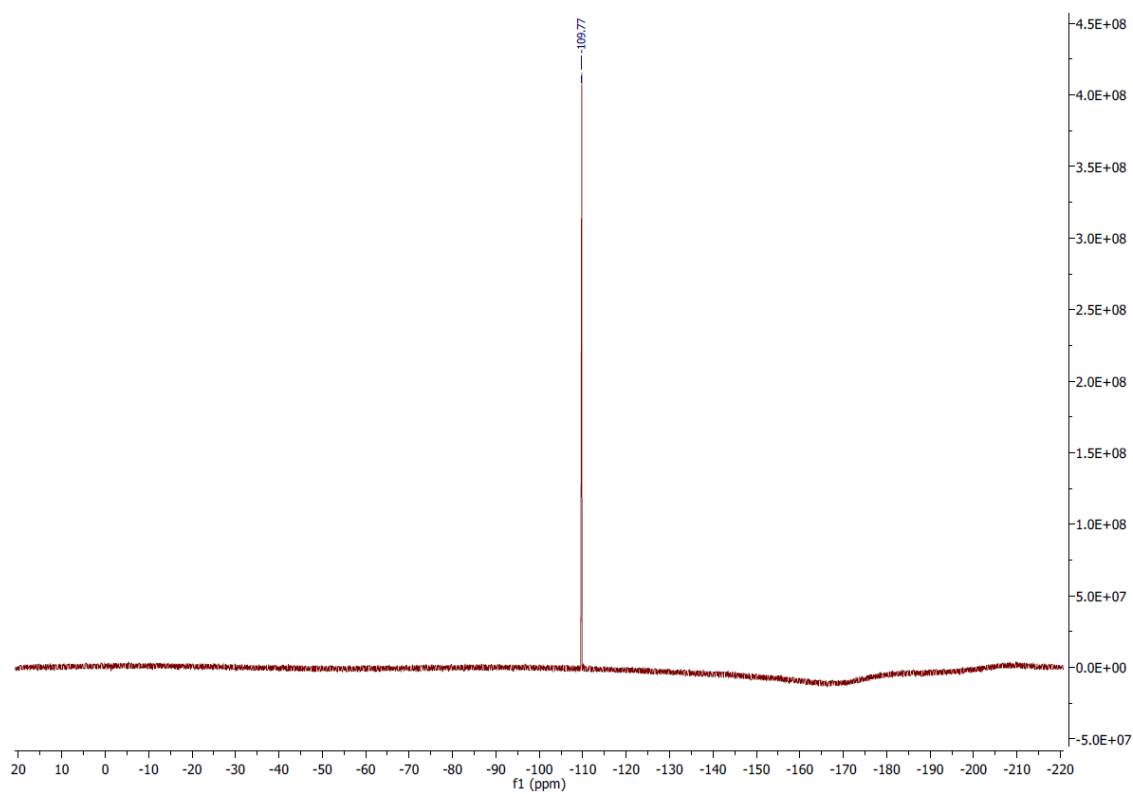
¹H-NMR Verbindung 13**¹³C-NMR Verbindung 13**

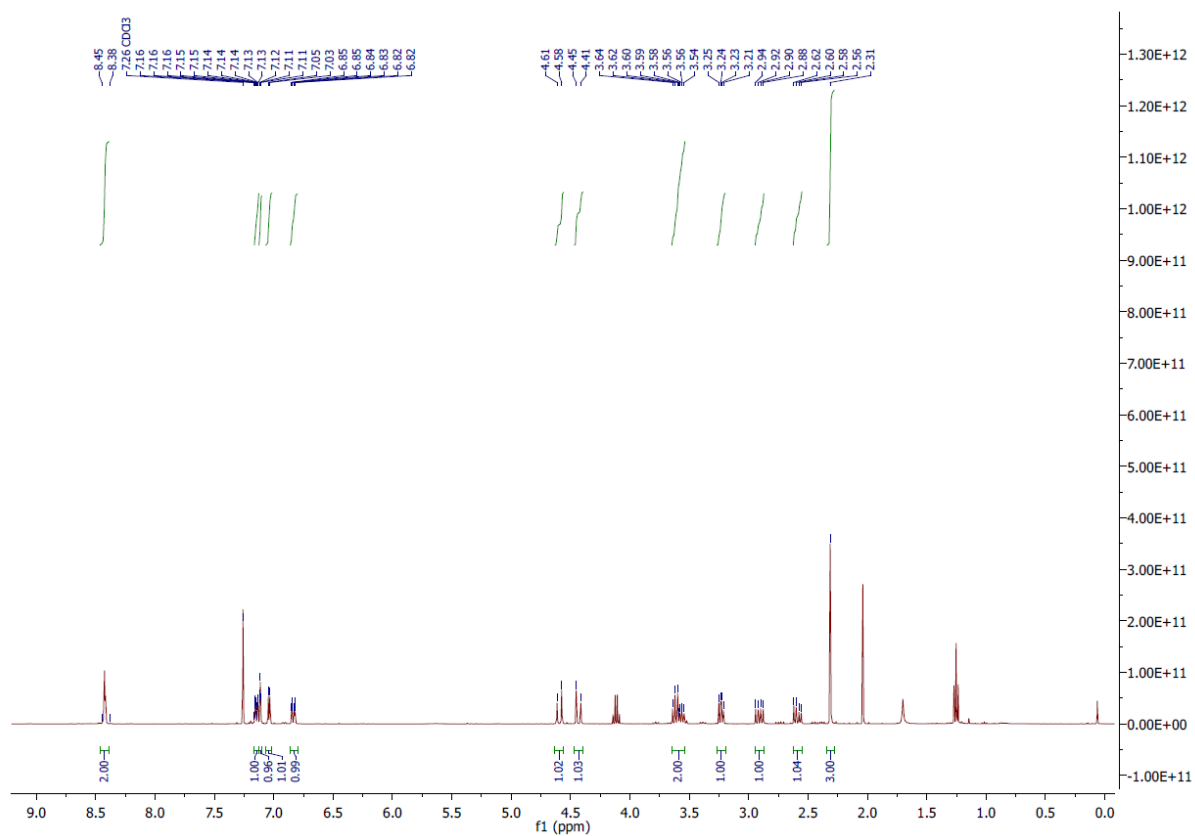
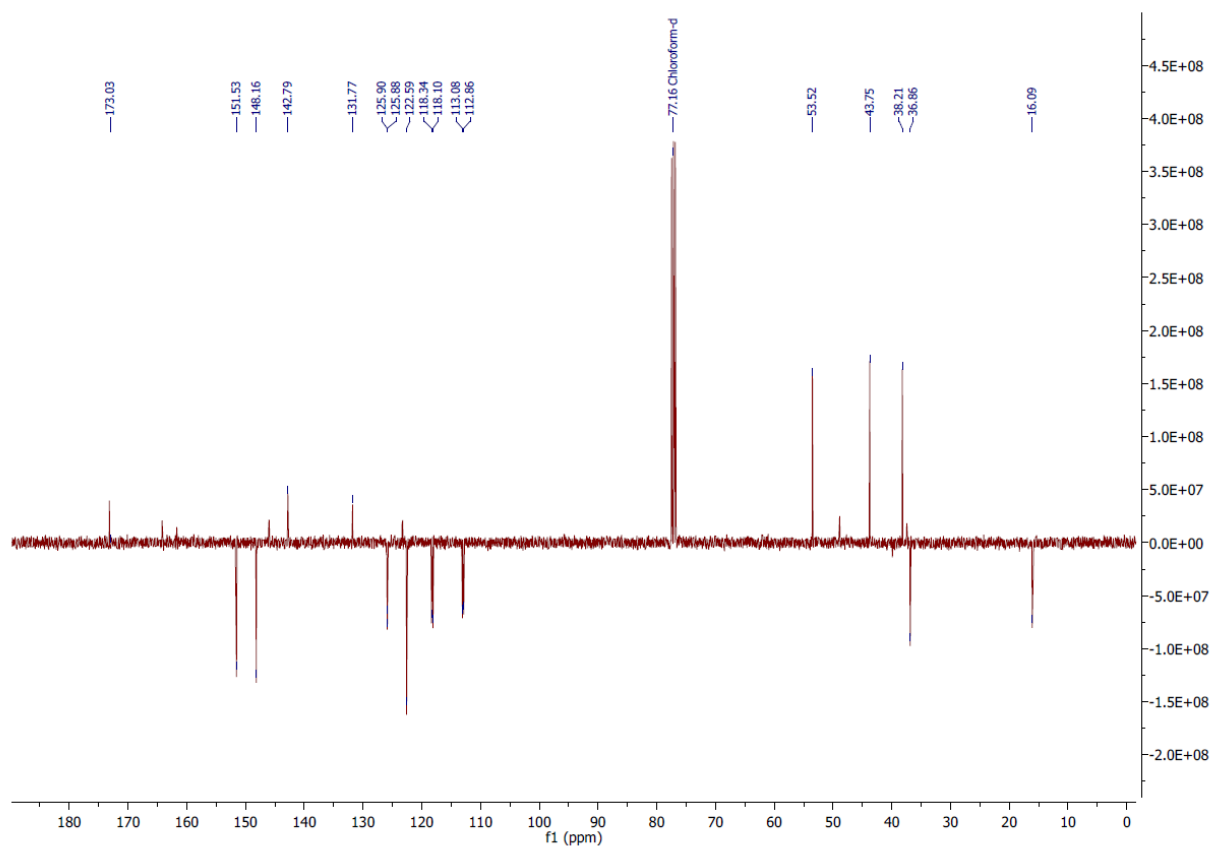
^{19}F -NMR Verbindung 13 **^1H -NMR Verbindung 14**

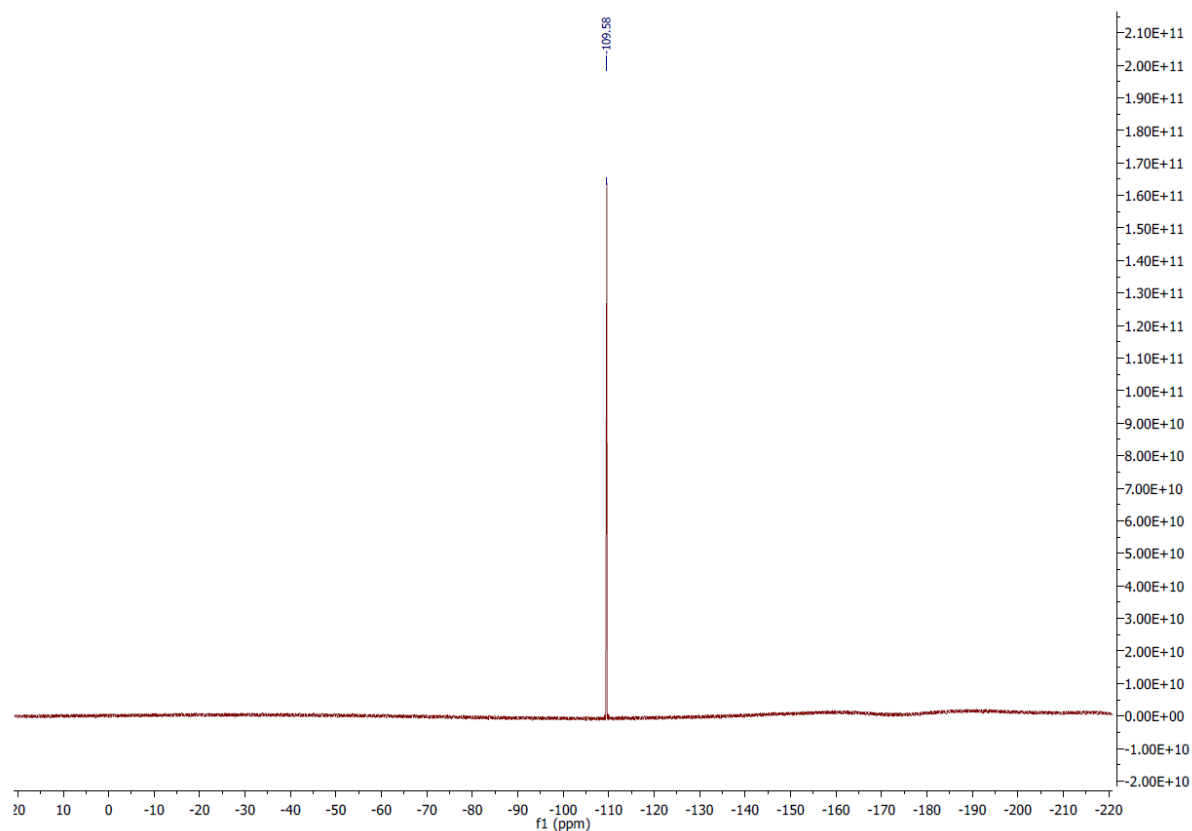
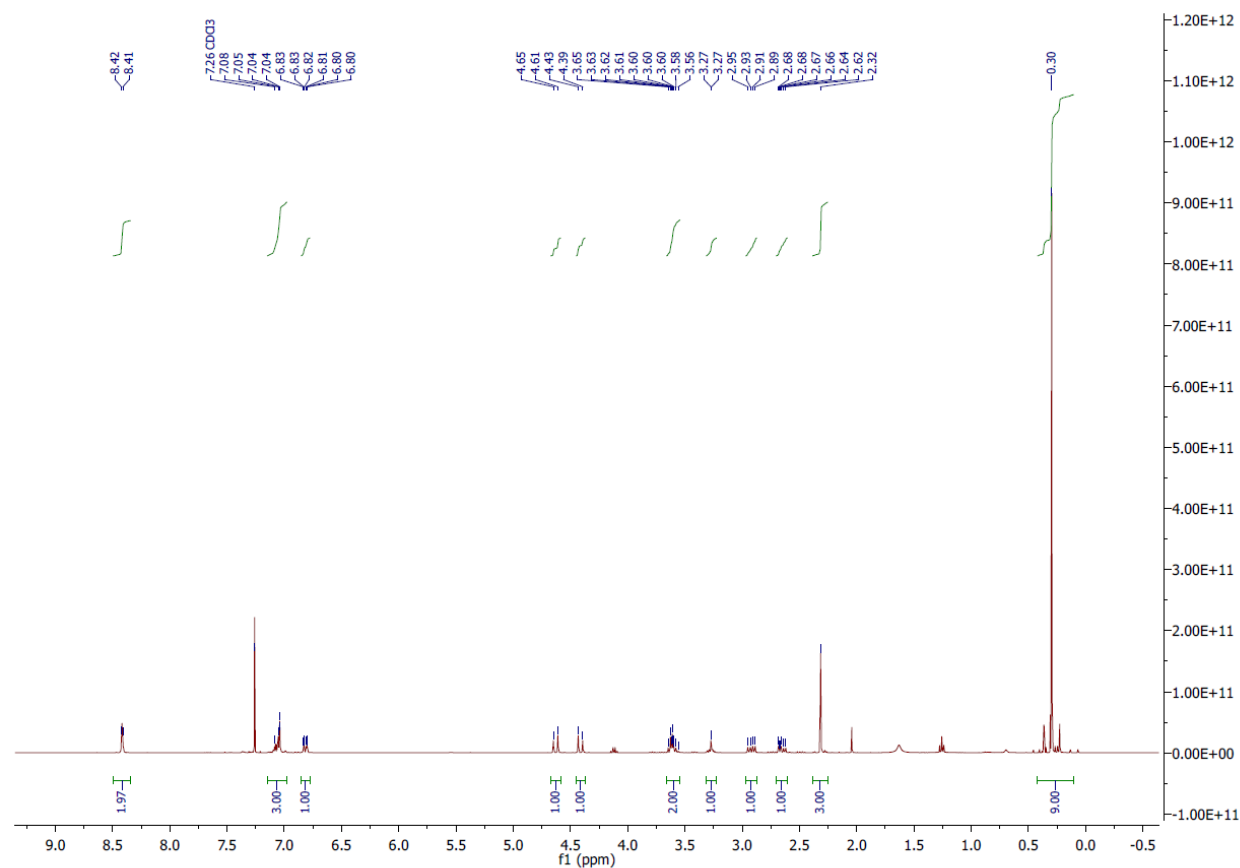
^{13}C -NMR Verbindung 14 **^{19}F -NMR Verbindung 14**

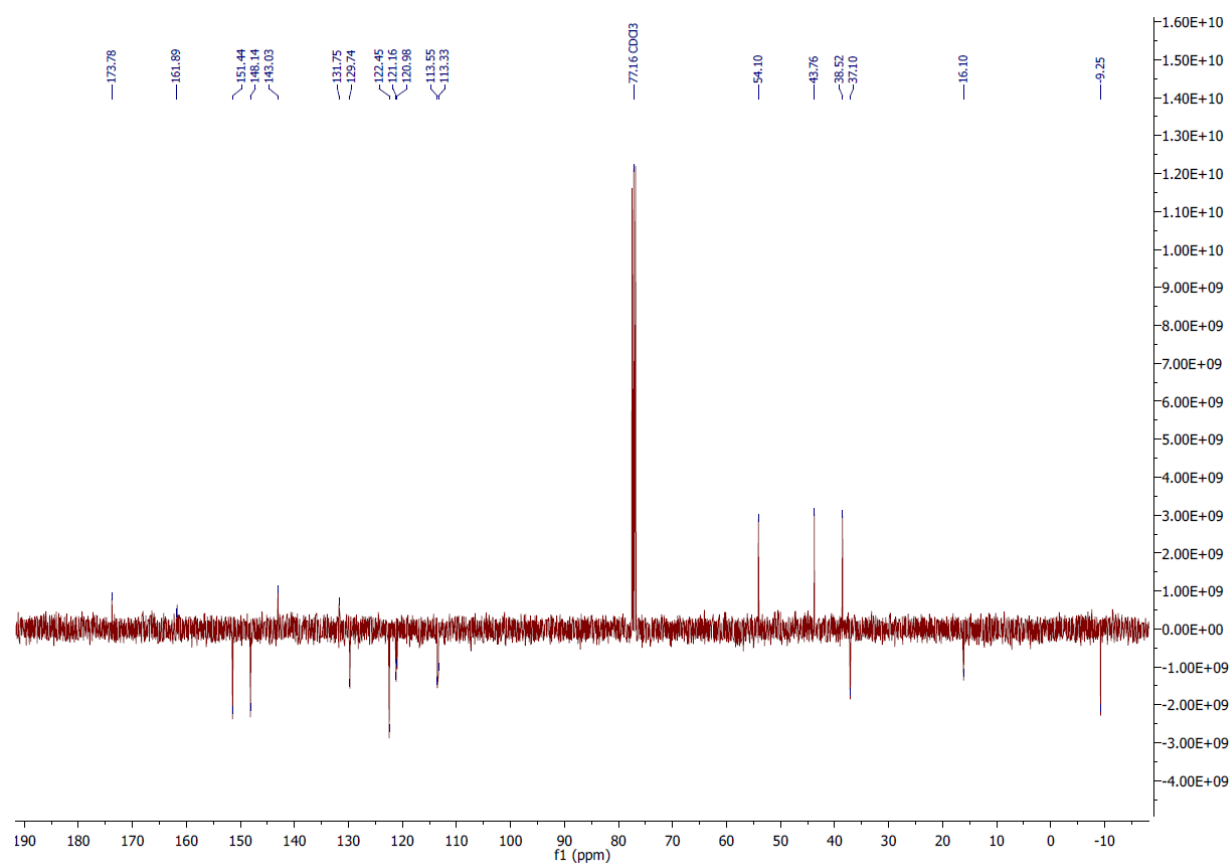
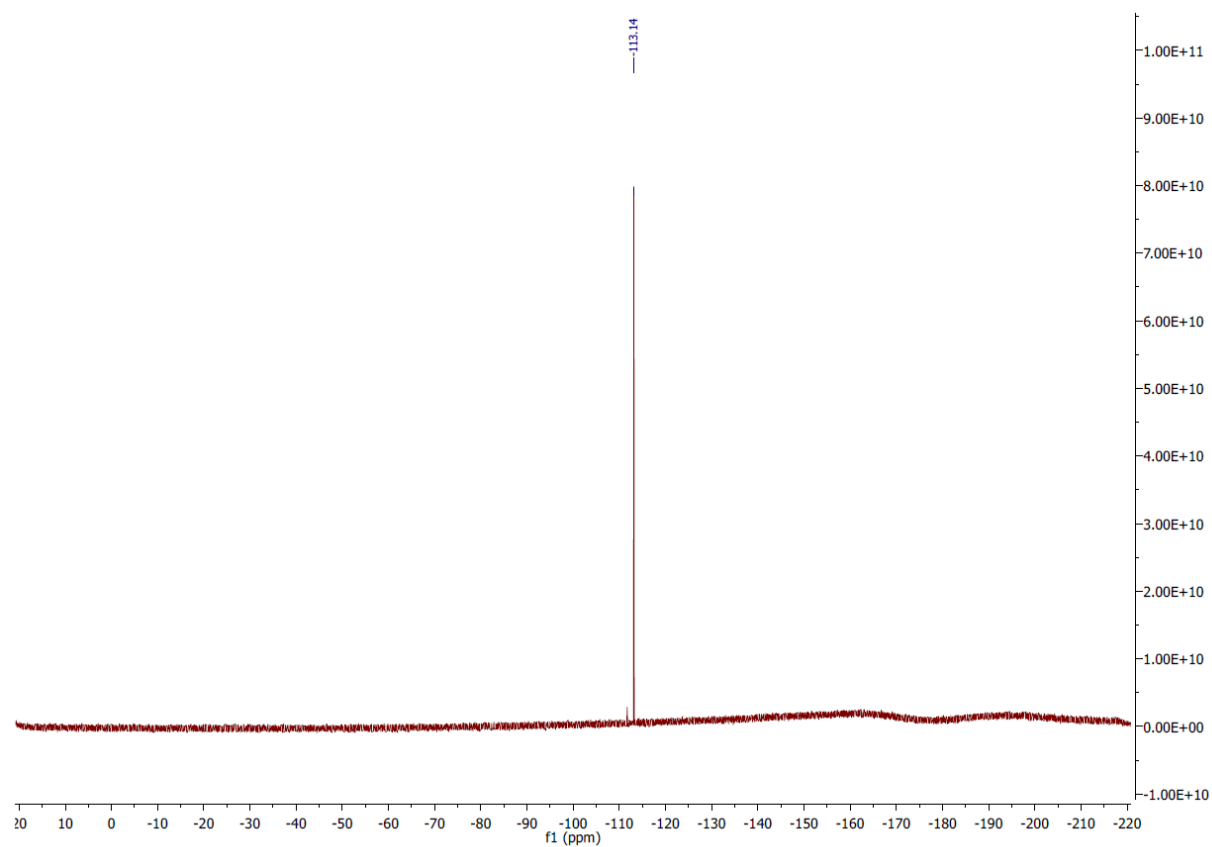
^1H -NMR Verbindung 15 **^{13}C -NMR Verbindung 15**

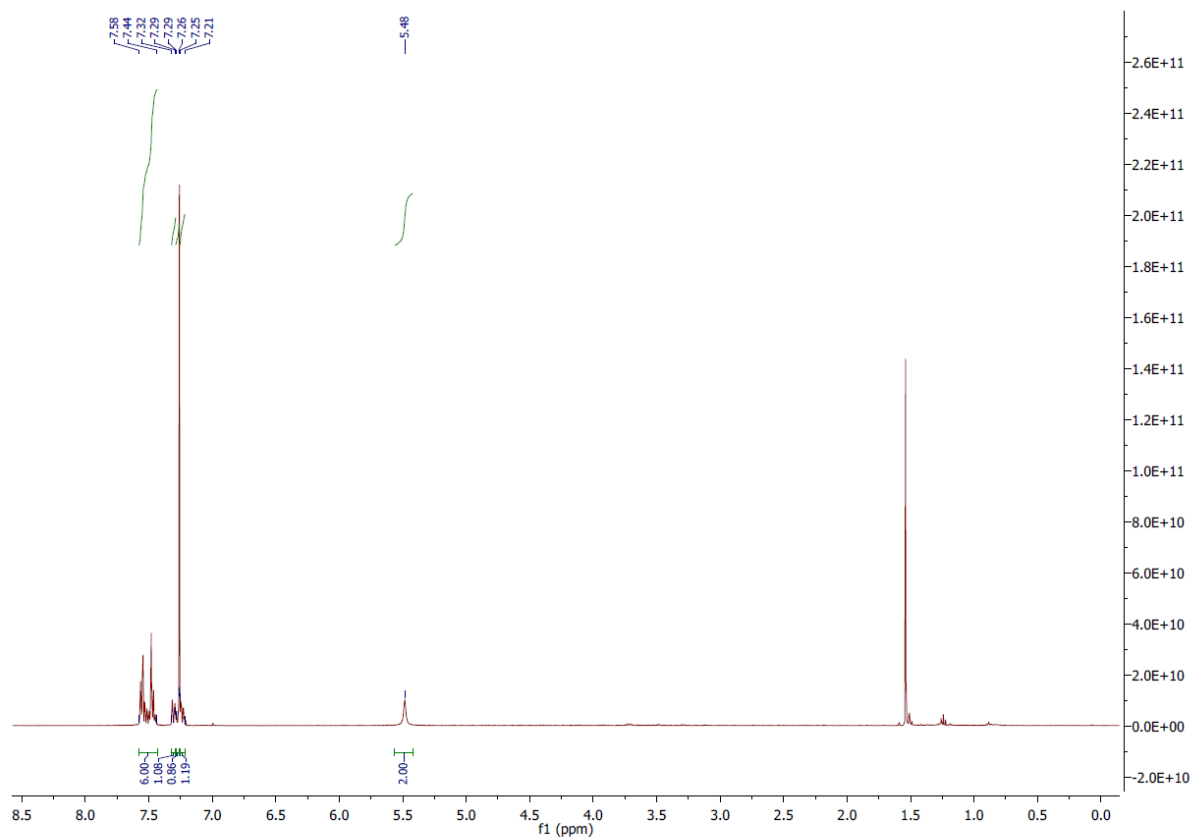
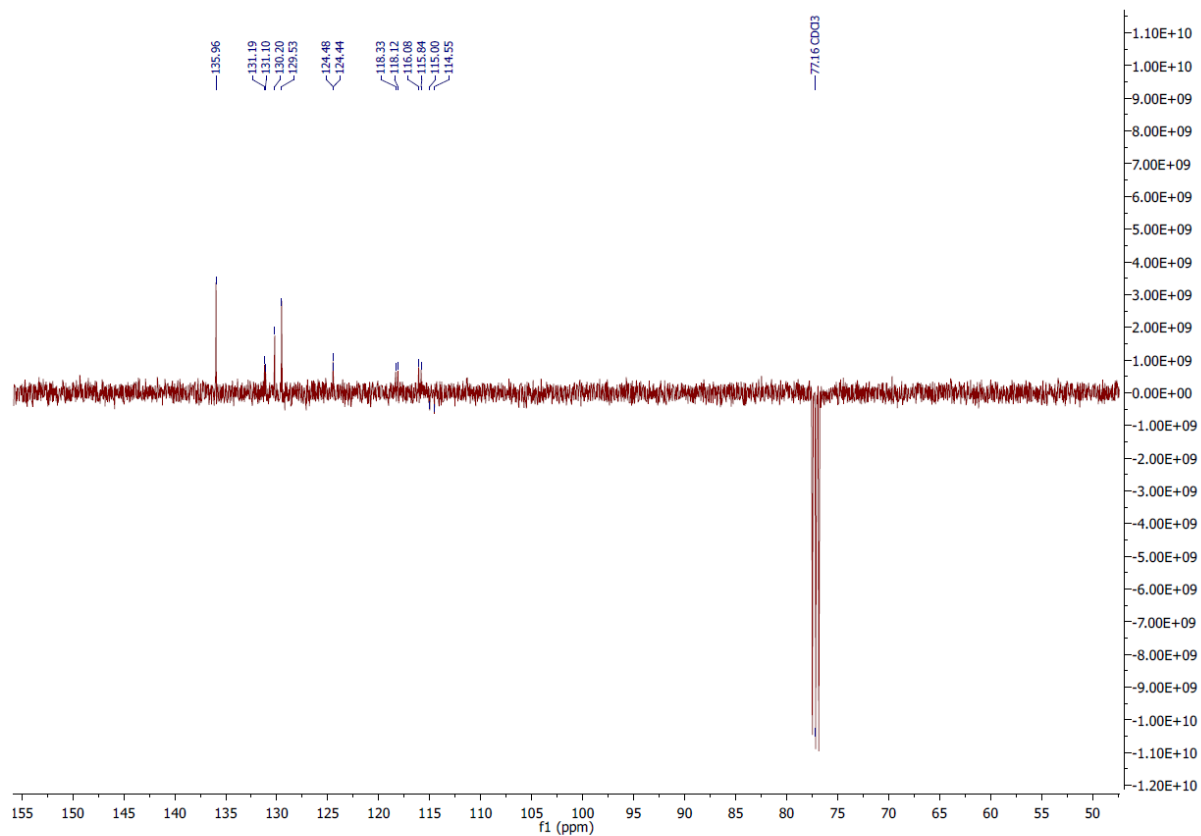
^{19}F -NMR Verbindung 15 **^1H -NMR Verbindung 16**

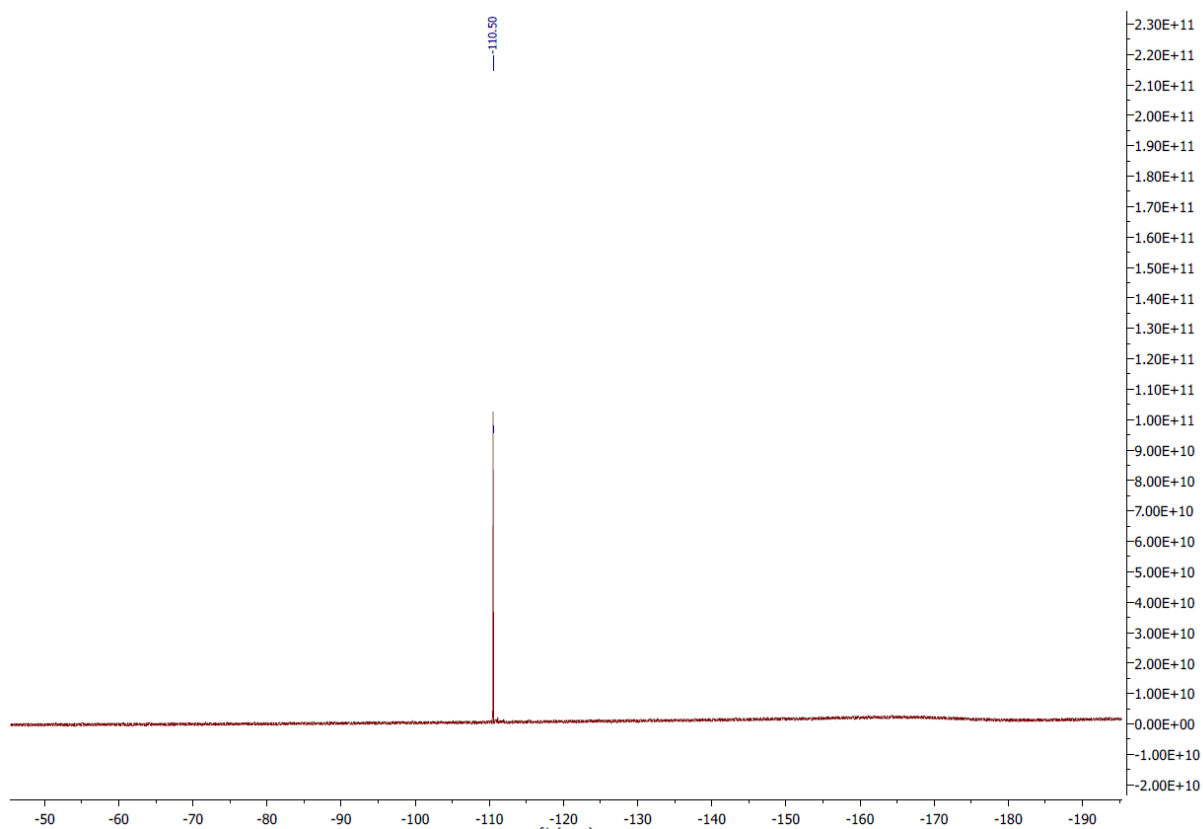
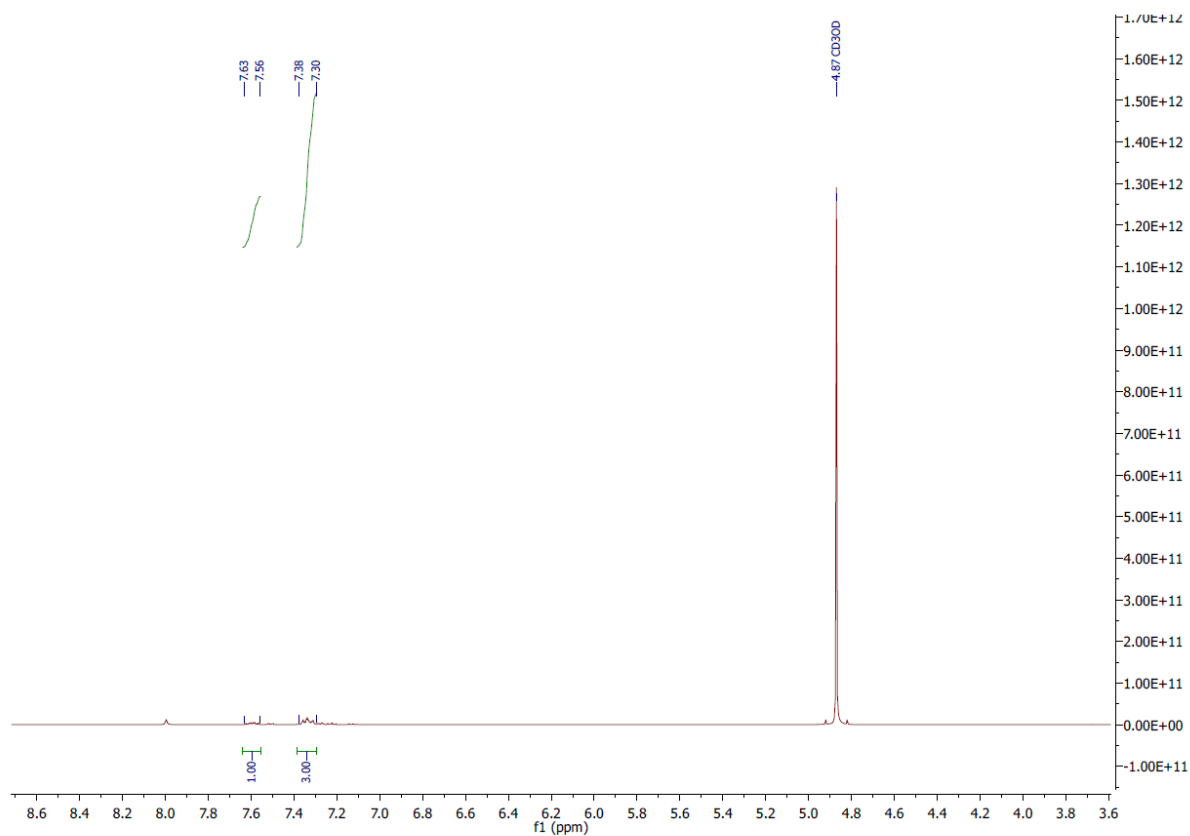
^{13}C -NMR Verbindung 16 **^{19}F -NMR Verbindung 16**

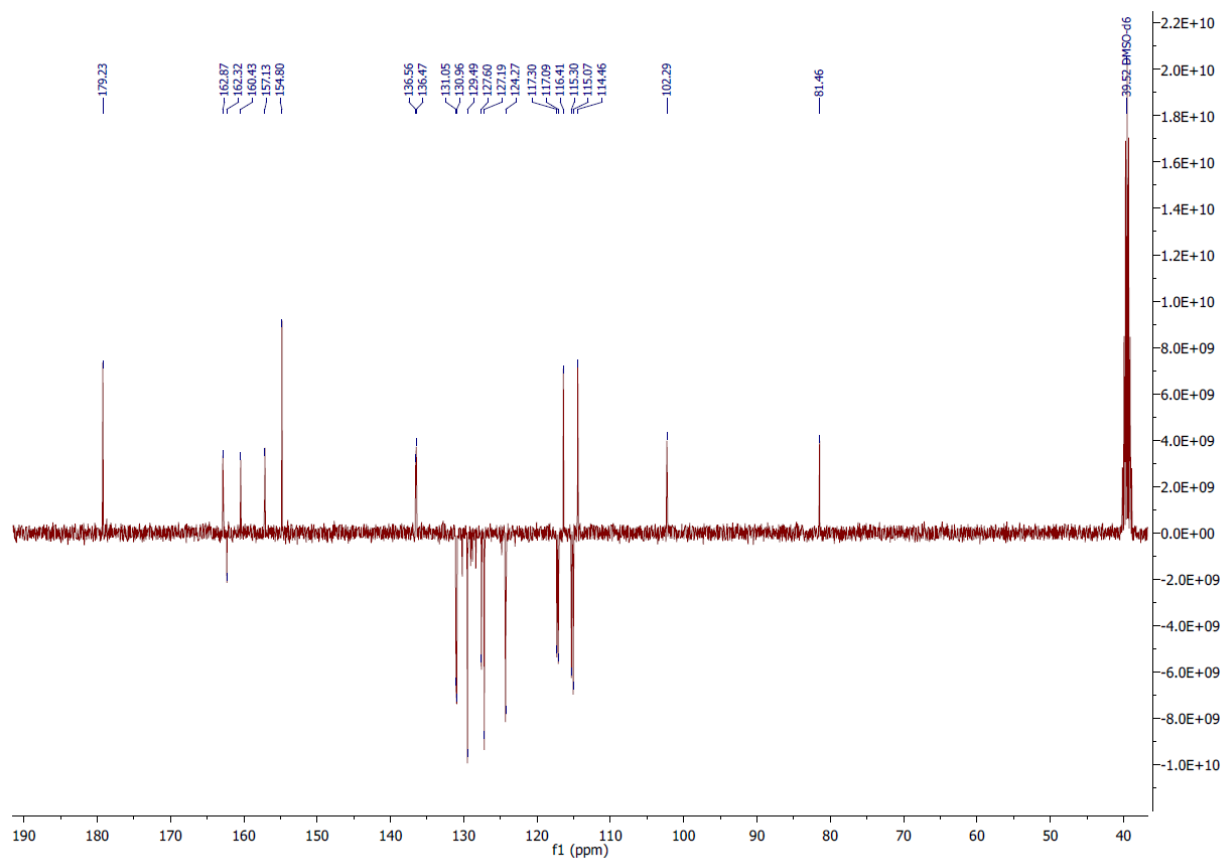
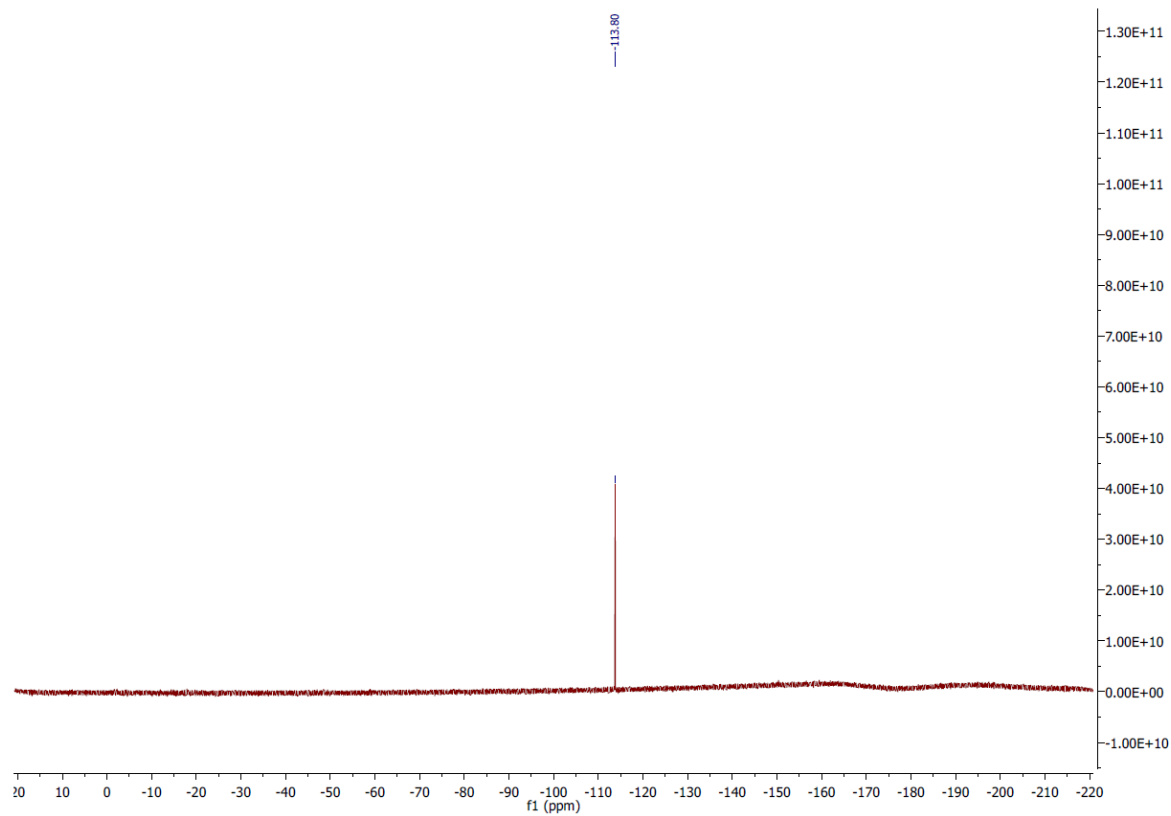
¹H-NMR Verbindung 17**¹³C-NMR Verbindung 17**

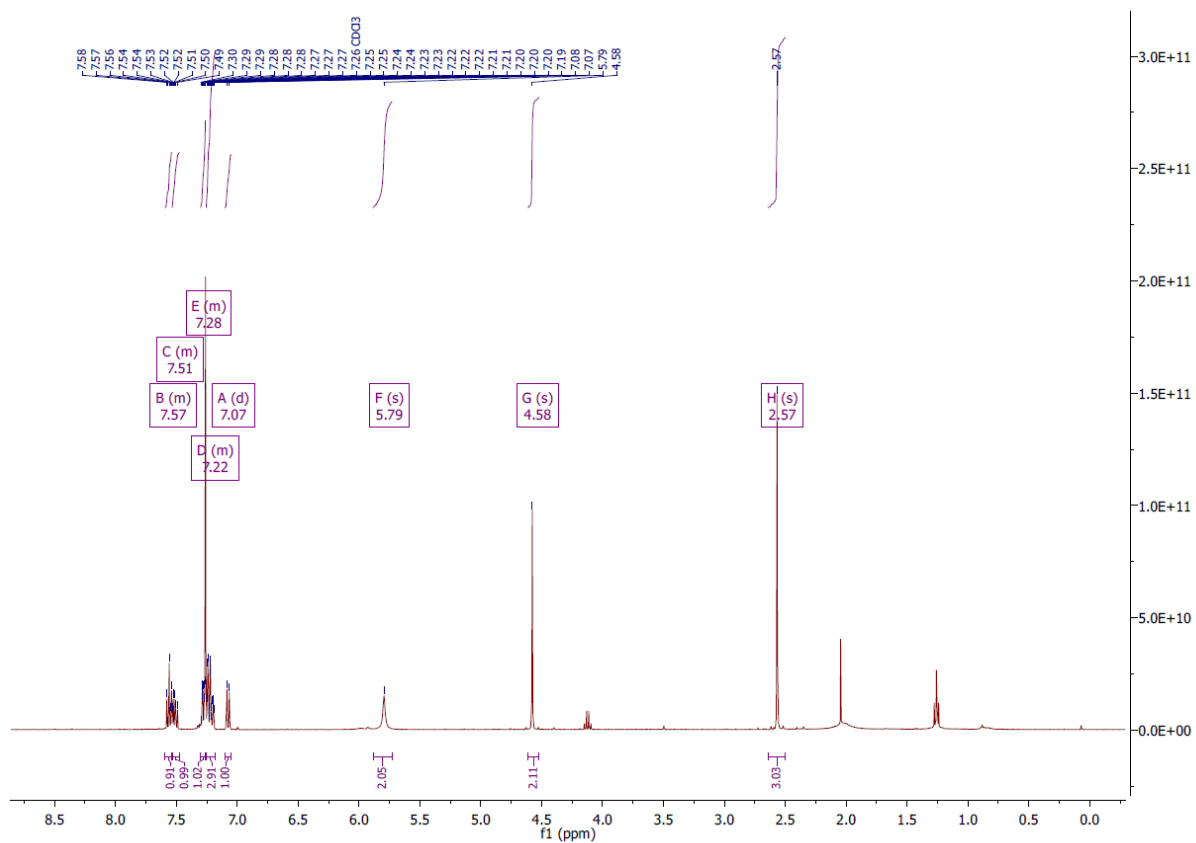
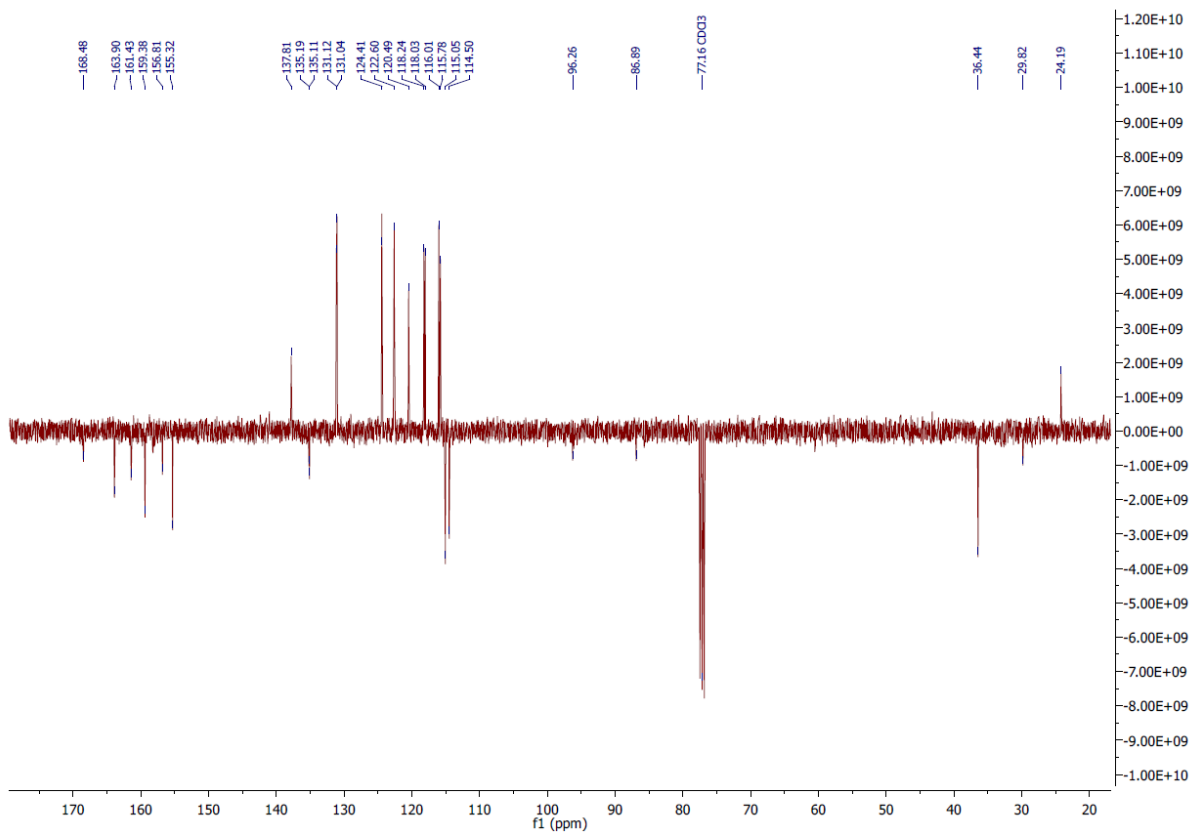
^{19}F -NMR Verbindung 17 **^1H -NMR Verbindung 18**

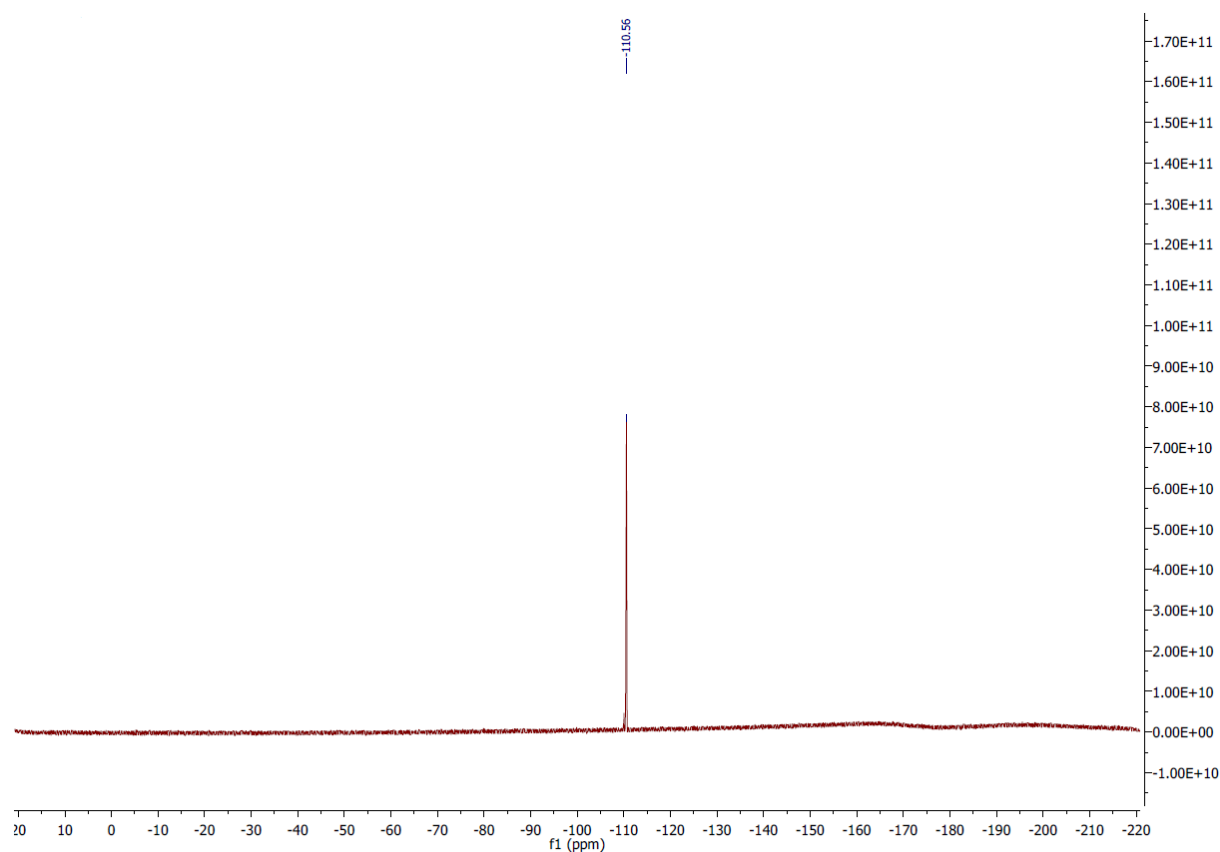
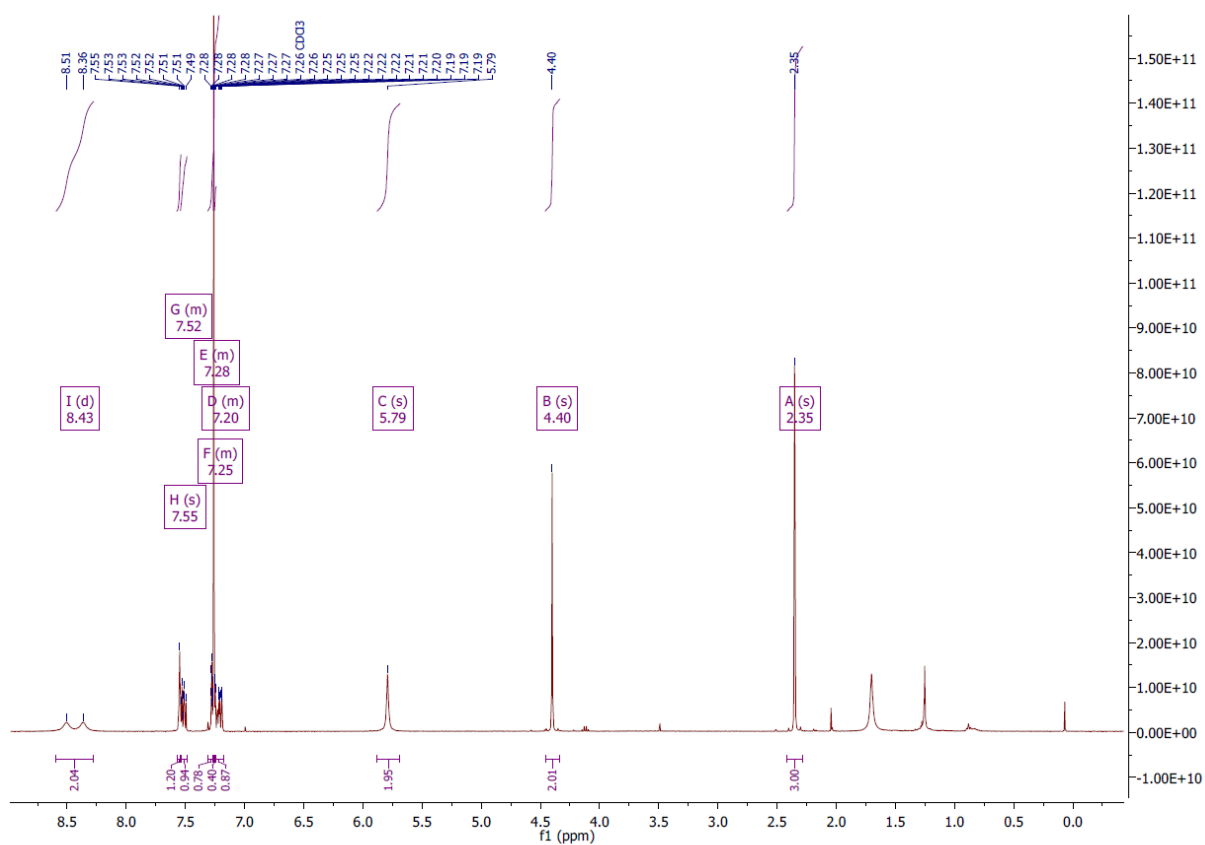
^{13}C -NMR Verbindung 18 **^{19}F -NMR Verbindung 18**

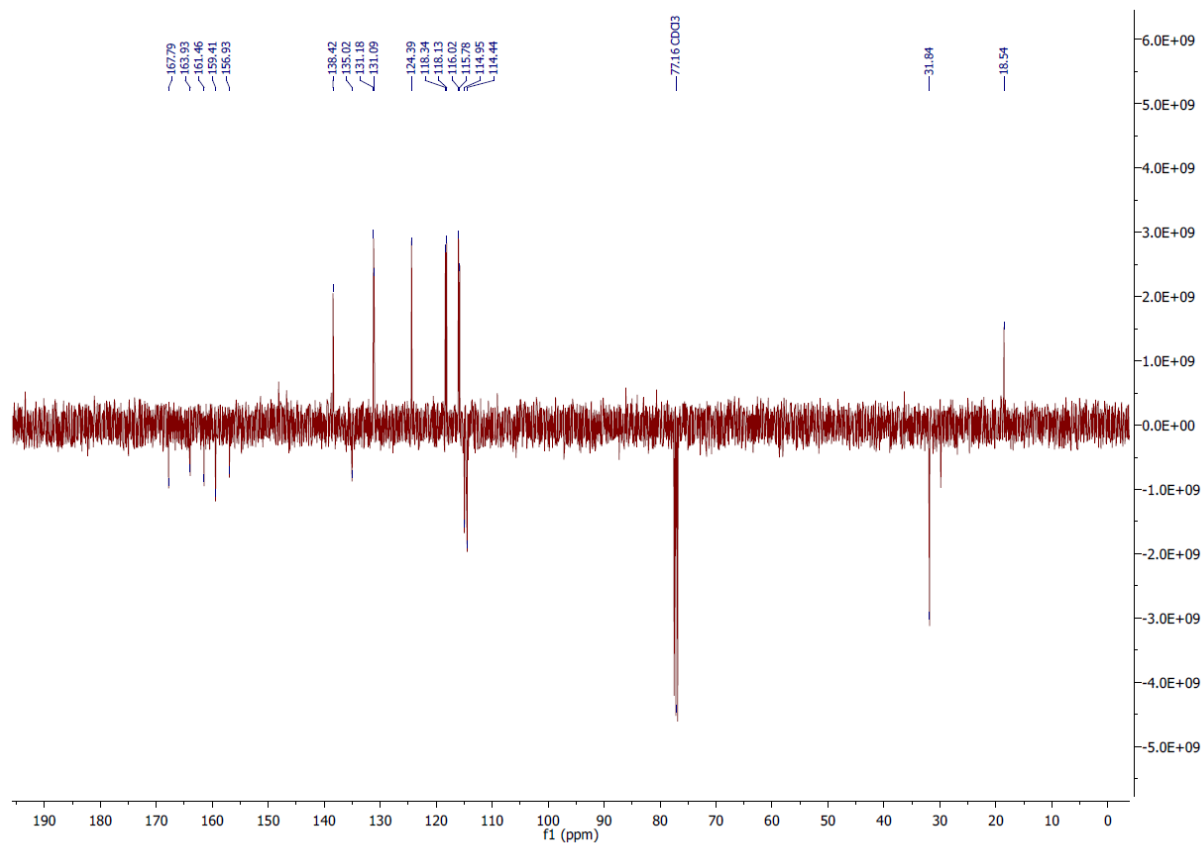
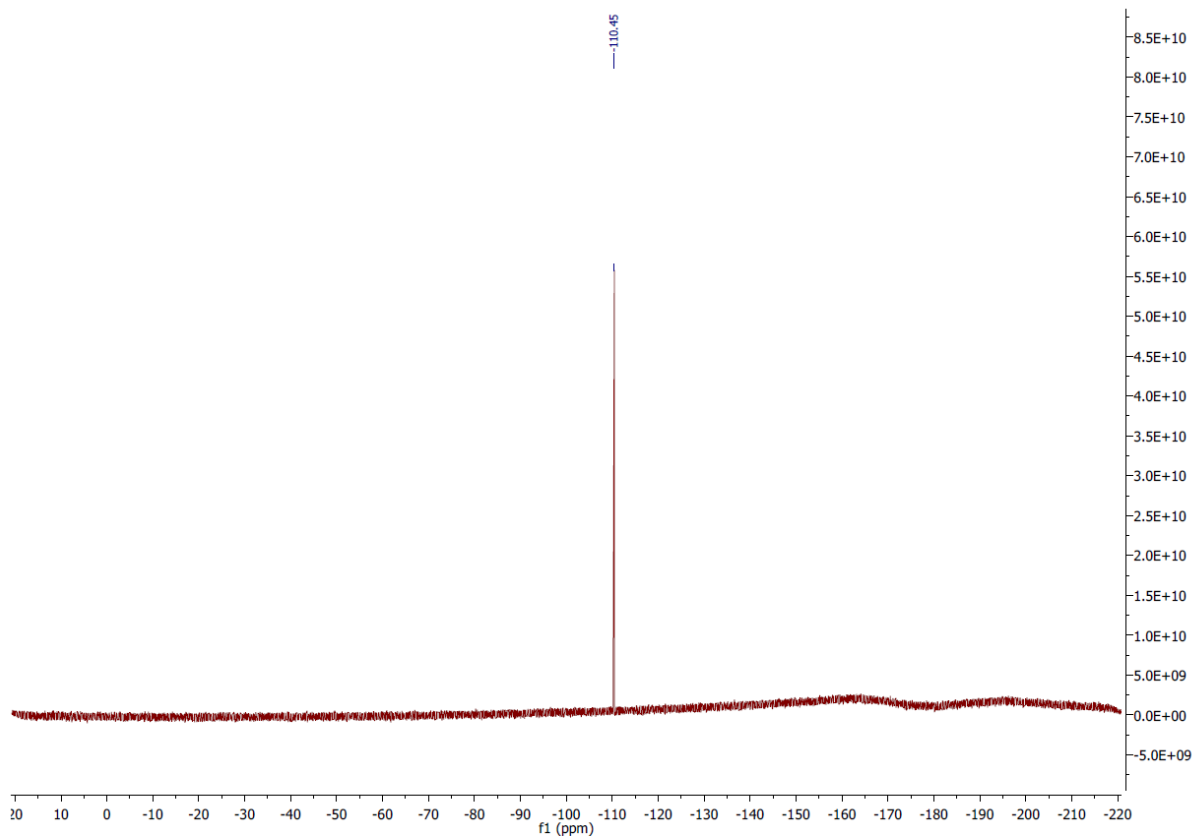
¹H-NMR Verbindung 23**¹³C-NMR Verbindung 23**

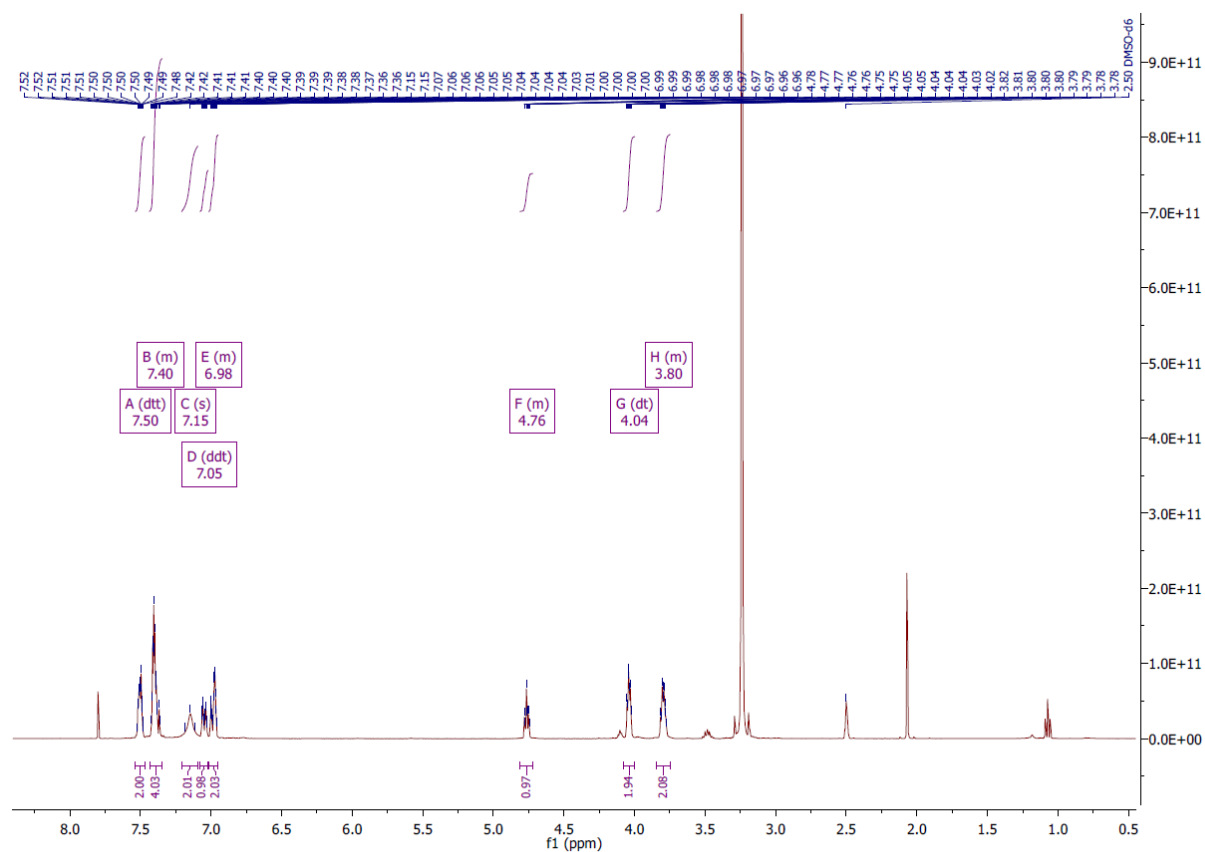
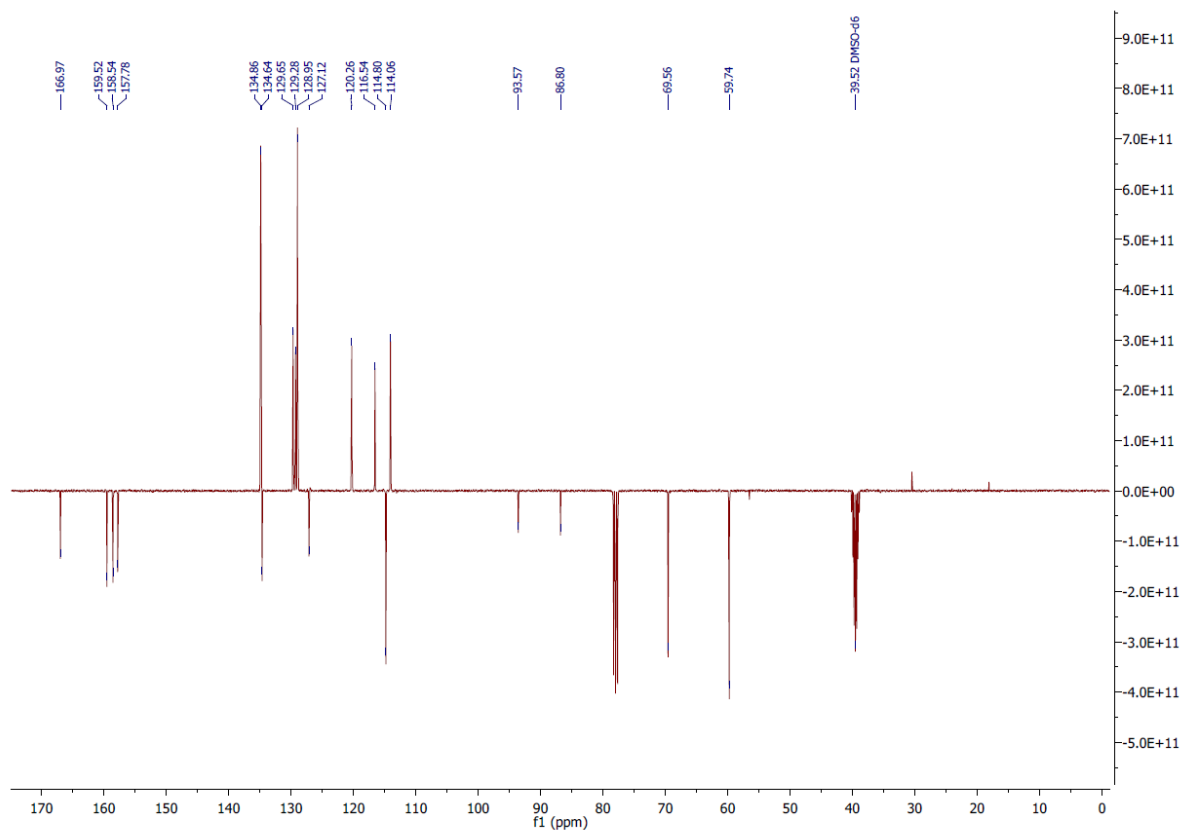
^{19}F -NMR Verbindung 23 **^1H -NMR Verbindung 25**

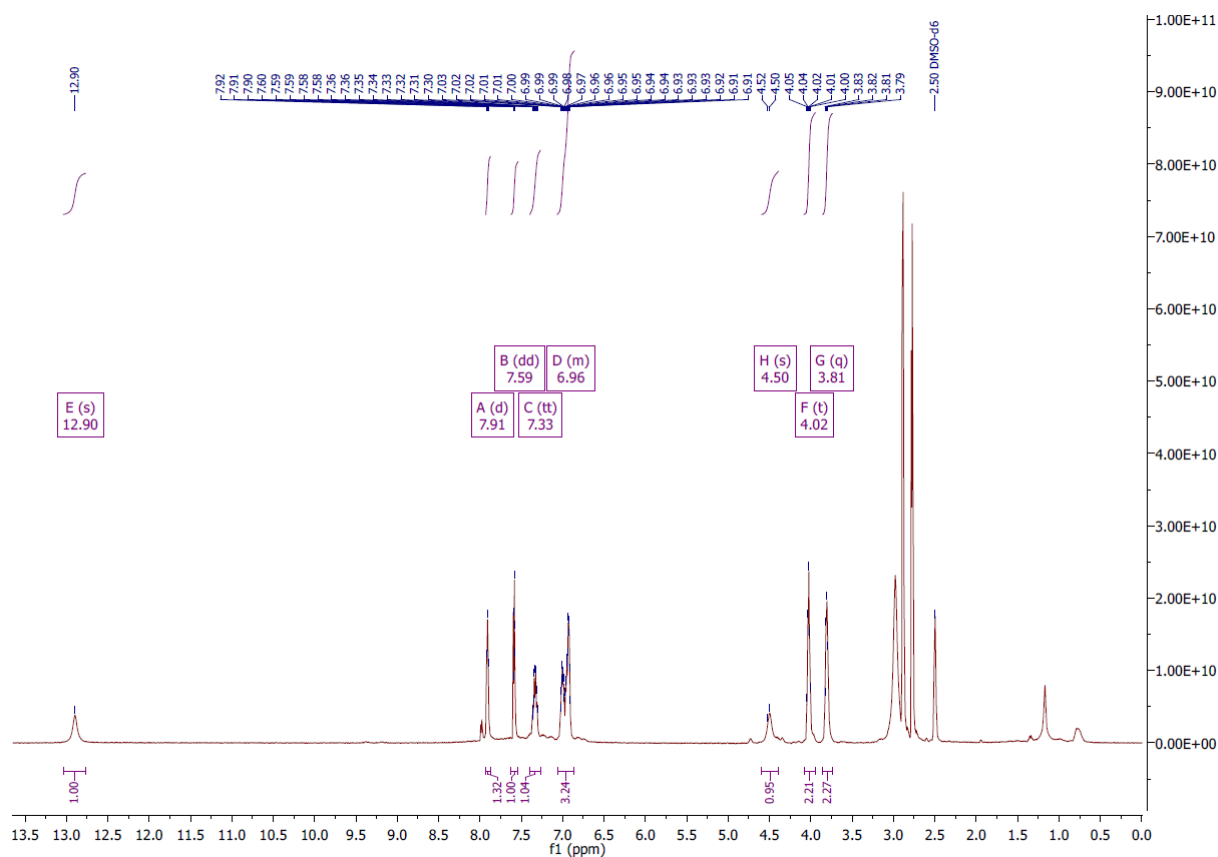
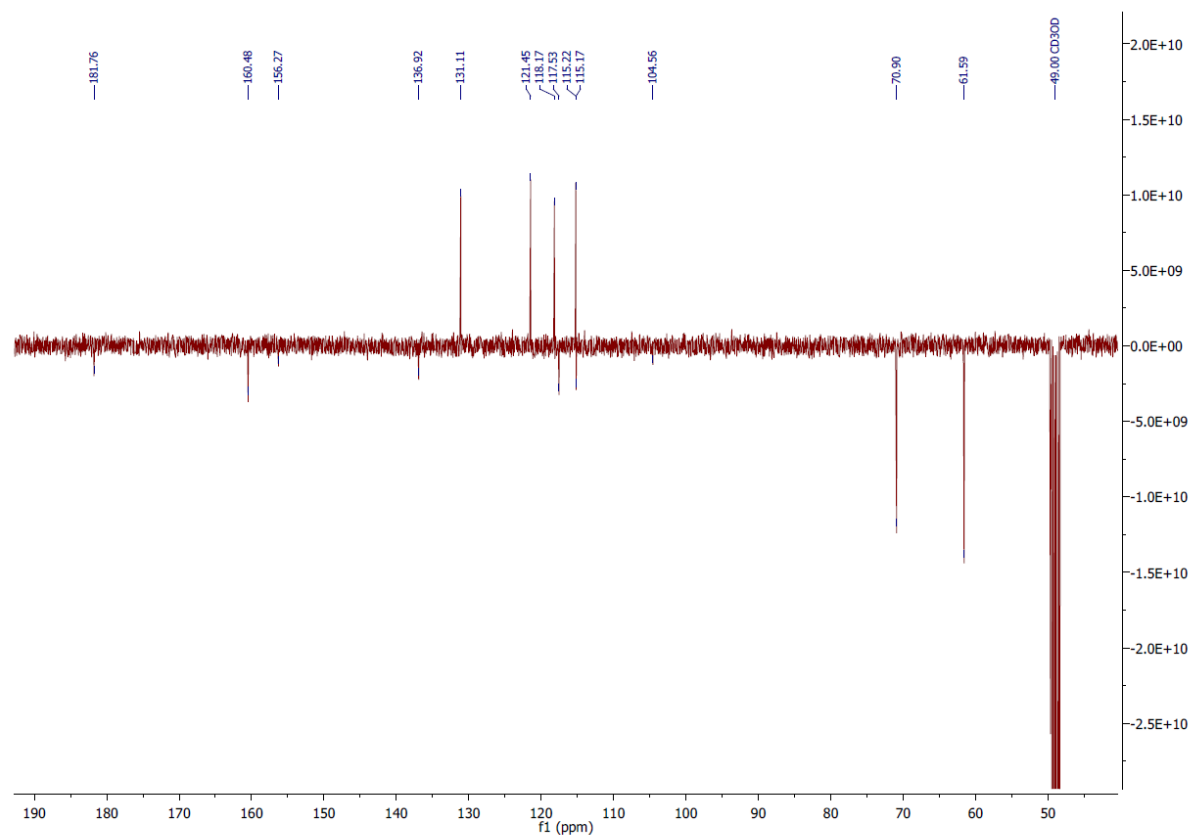
^{13}C -NMR Verbindung 25 **^{19}F -NMR Verbindung 25**

¹H-NMR Verbindung 27**¹³C-NMR Verbindung 27**

^{19}F -NMR Verbindung 27 **^1H -NMR Verbindung 28**

^{13}C -NMR Verbindung 28 **^{19}F -NMR Verbindung 28**

¹H-NMR Verbindung 36**¹³C-NMR Verbindung 36**

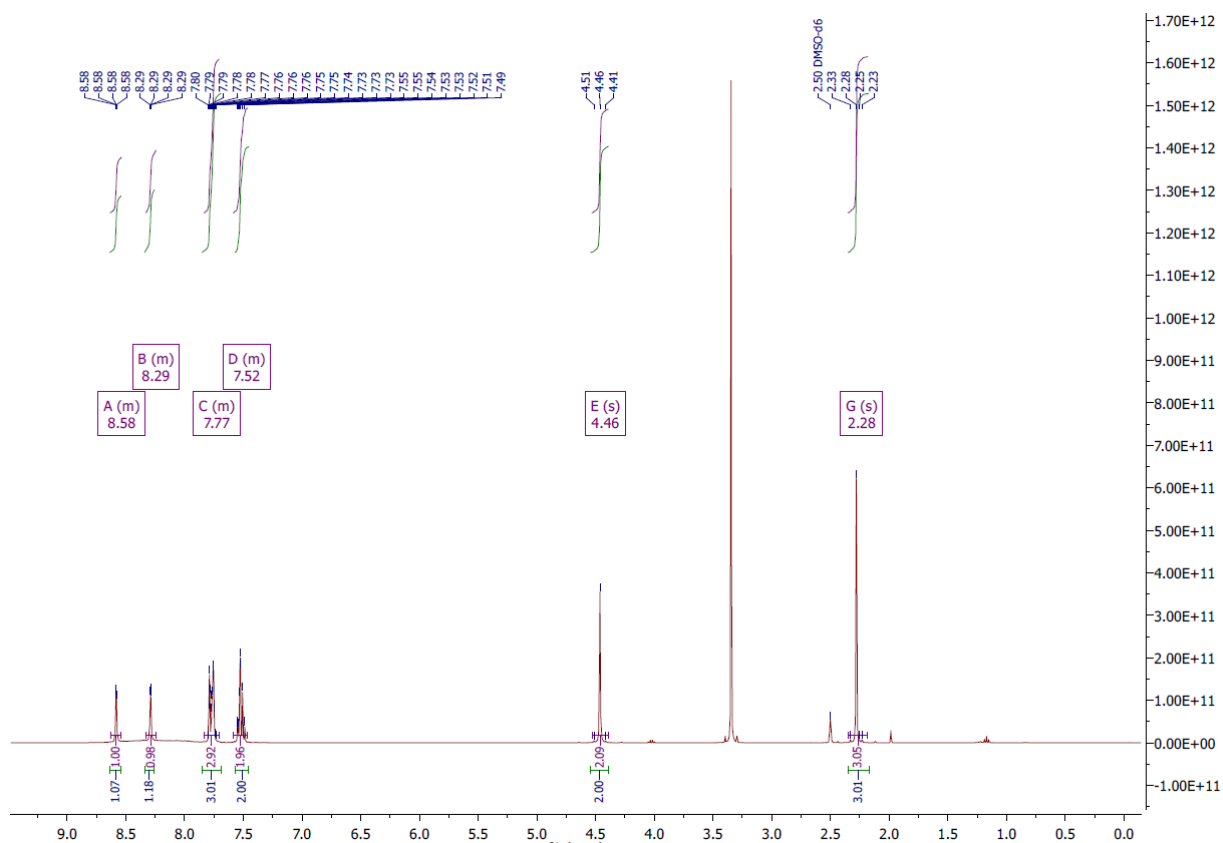
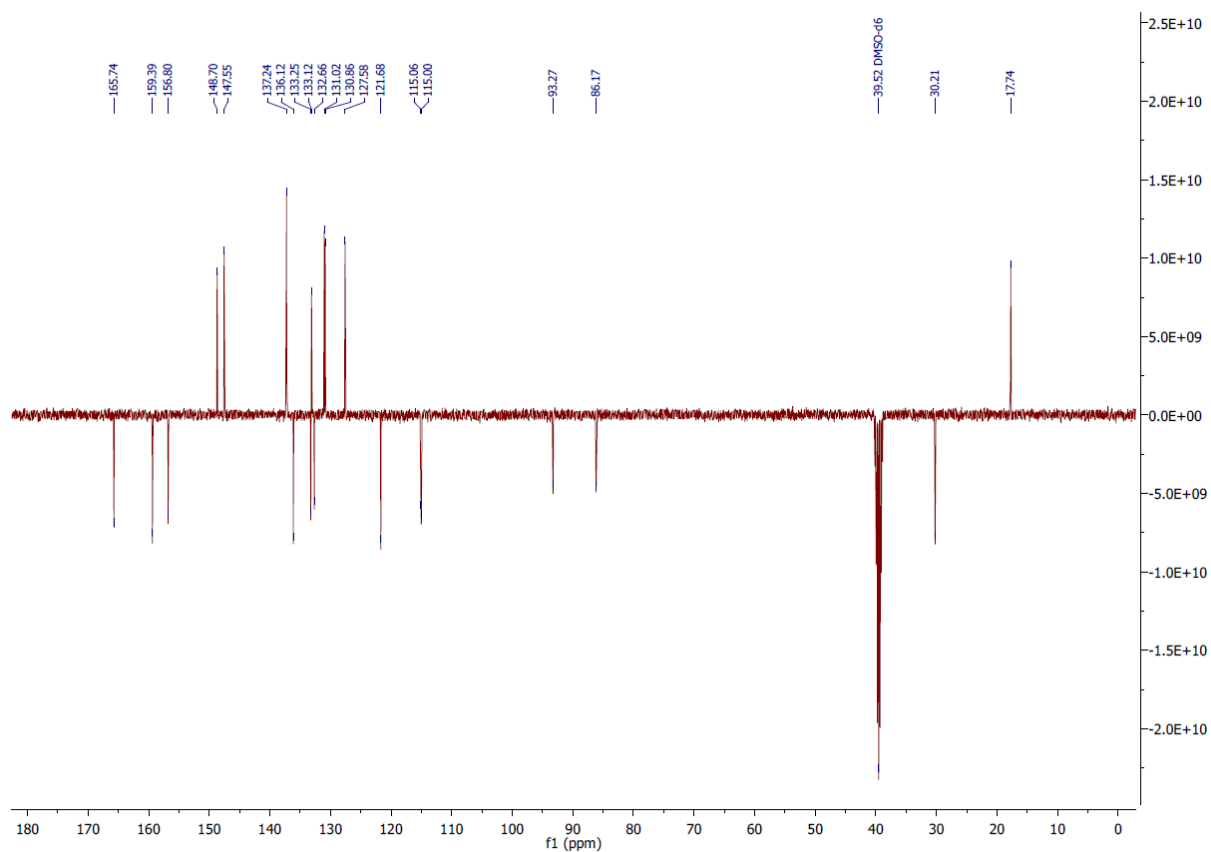
¹H-NMR Verbindung 38**¹³C-NMR Verbindung 38**

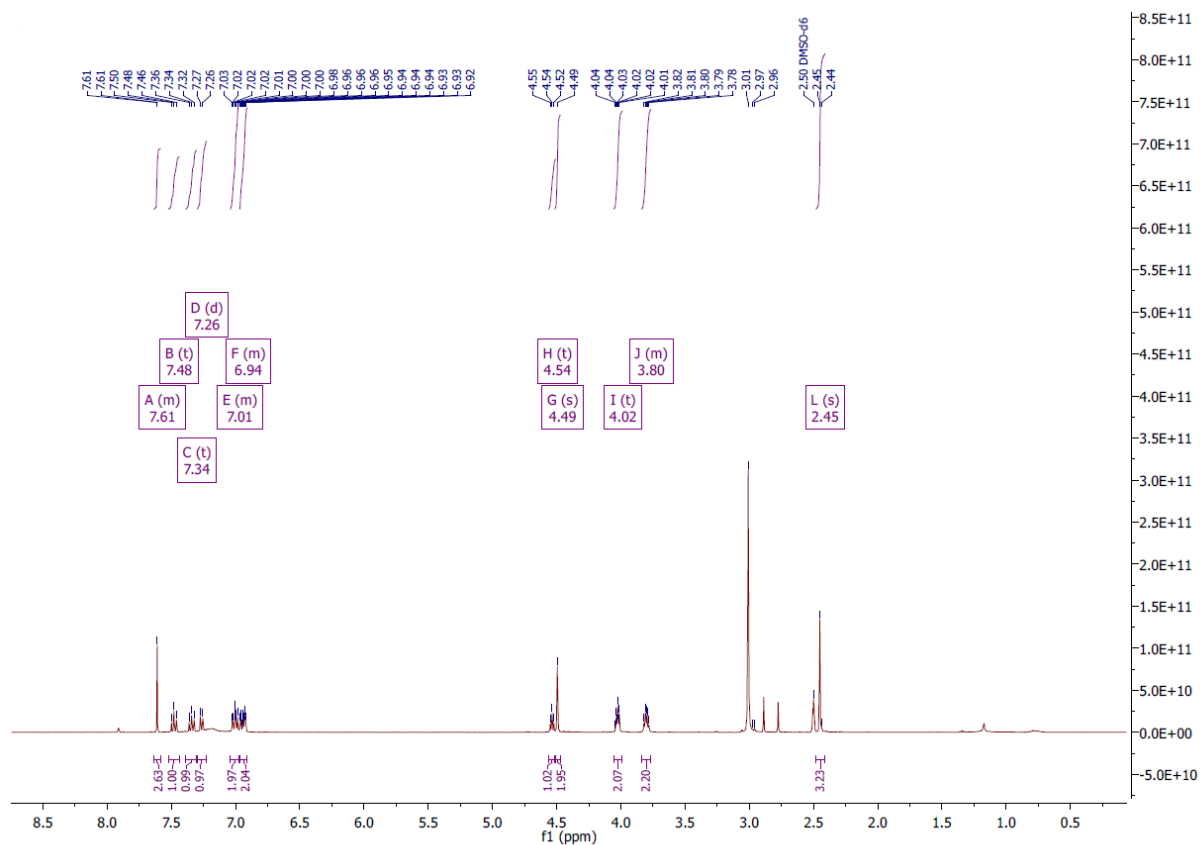
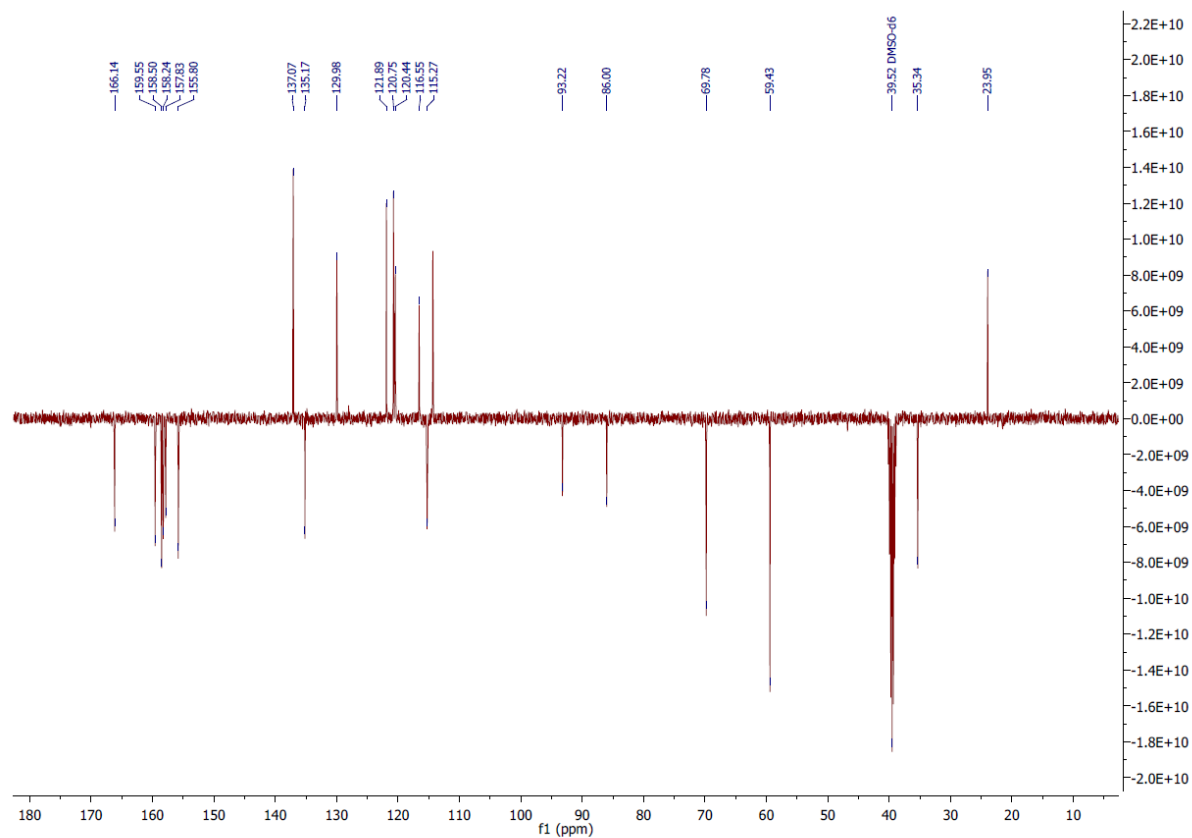
¹H NMR spectrum (CDCl₃) of compound 10a. The spectrum displays several peaks in the aromatic region (7.0-7.7 ppm) and two aliphatic singlets (4.56 and 2.56 ppm). Integration values are provided for the main peaks.

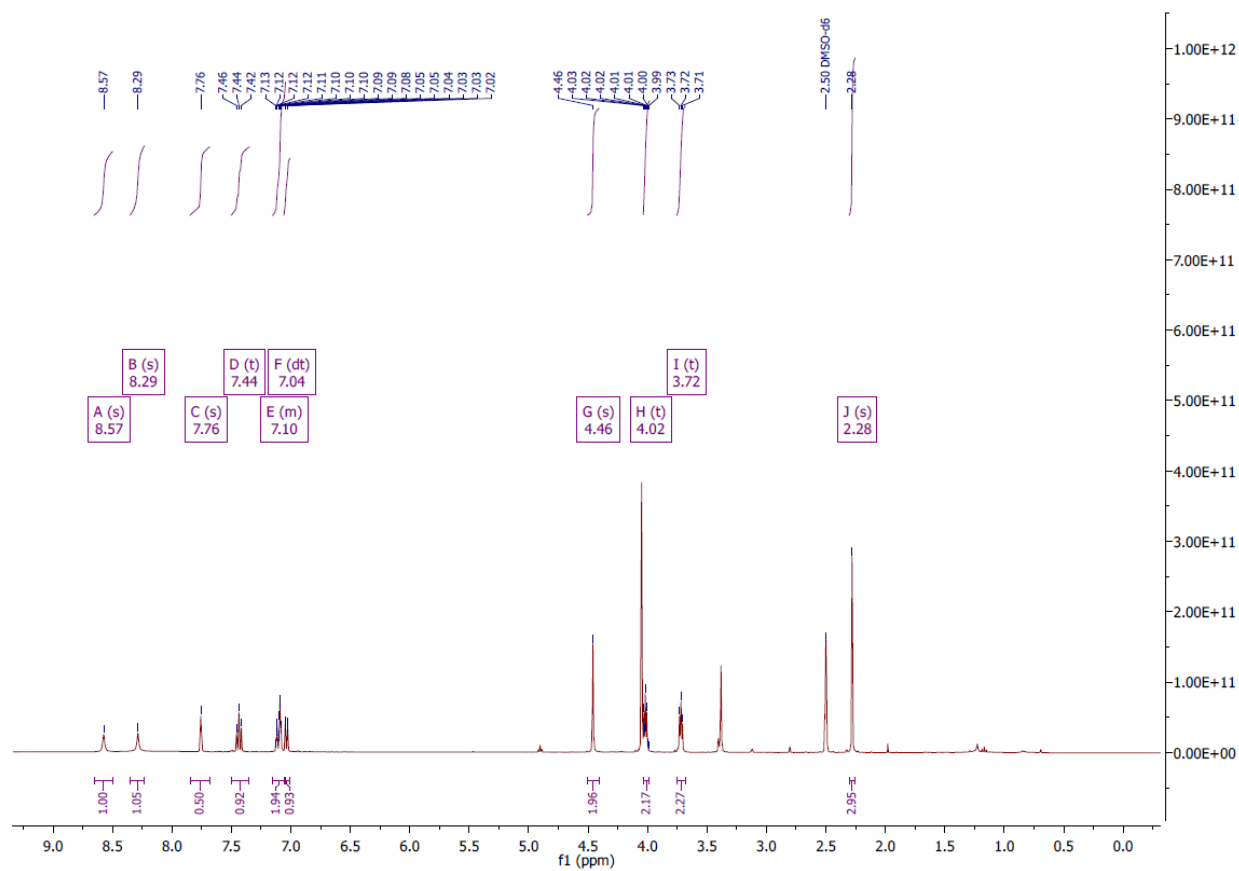
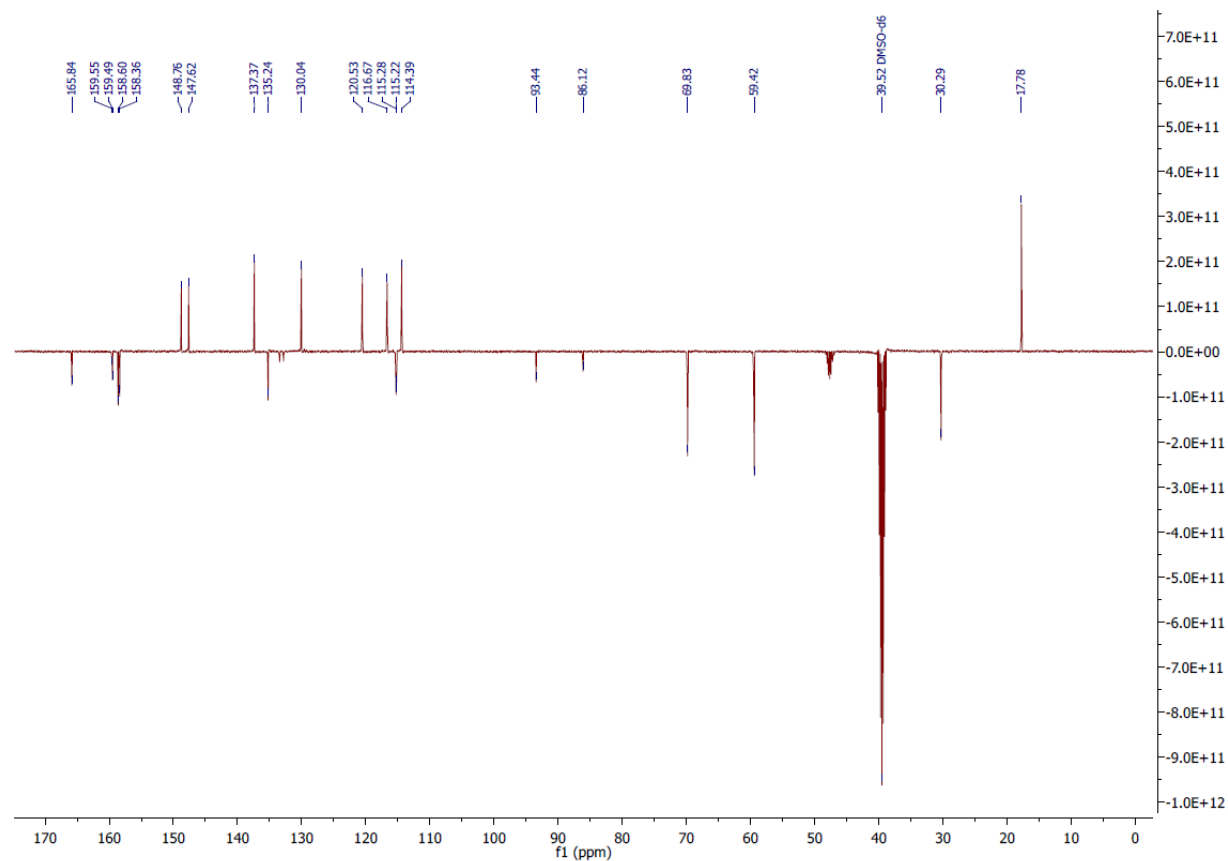
Peak Label	Chemical Shift (ppm)	Integration
A (m)	7.67	1.00
B (q)	7.62	0.89
C (t)	7.54	1.06
D (m)	7.41	1.06
E (d)	7.21	1.06
F (d)	7.06	2.09
G (s)	5.88	2.18
H (s)	4.56	3.29
I (s)	2.56	-

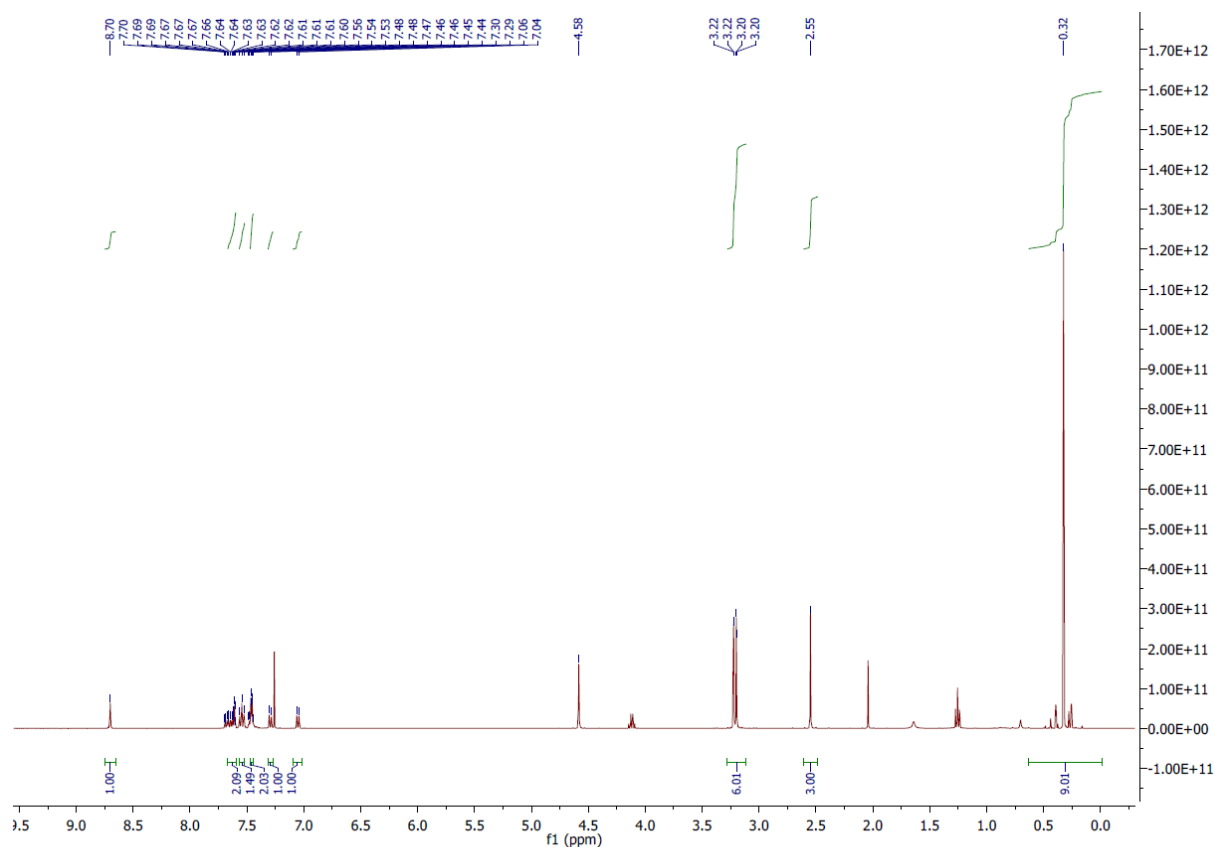
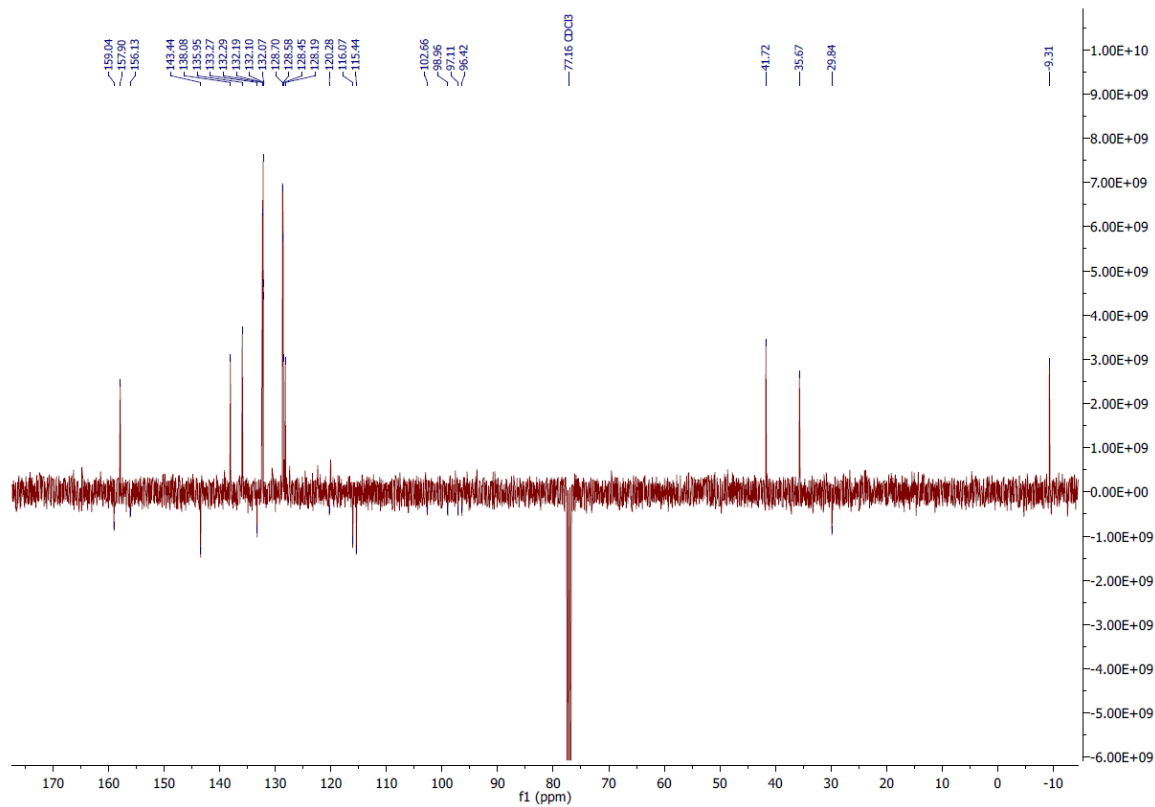
Chemical shifts (ppm) labeled on the left side of the spectrum:

- 166.39
- 159.63
- 158.04
- 156.99
- 155.93
- 137.27
- 136.36
- 133.34
- 131.22
- 131.09
- 129.68
- 127.86
- 127.30
- 122.10
- 121.90
- 120.95
- 115.23
- 93.38
- 86.24
- 39.52 DMSO-d6
- 35.55
- 24.15

^1H -NMR Verbindung 40 **^{13}C -NMR Verbindung 40**

¹H-NMR Verbindung 41**¹³C-NMR Verbindung 41**

¹H-NMR Verbindung 42**¹³C-NMR Verbindung 42**

¹H-NMR Verbindung 43**¹³C-NMR Verbindung 43**

Peak Data:

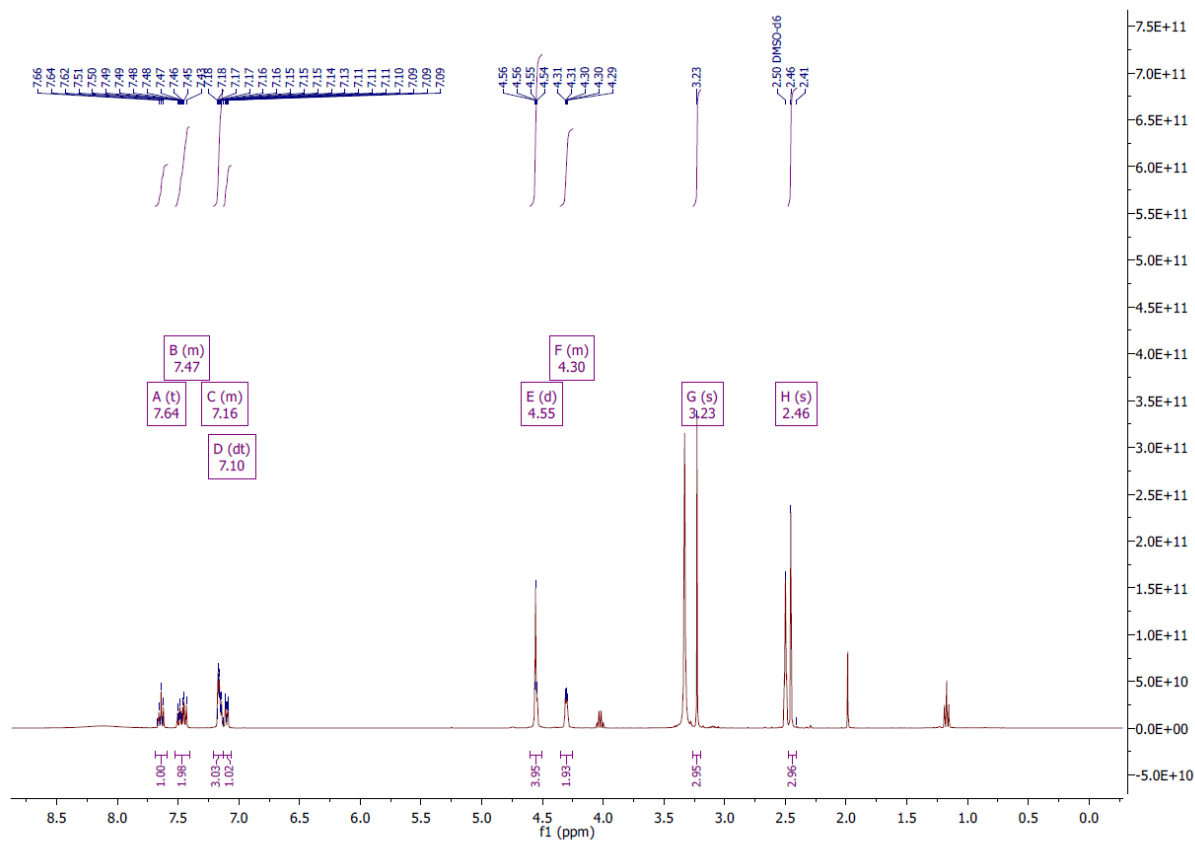
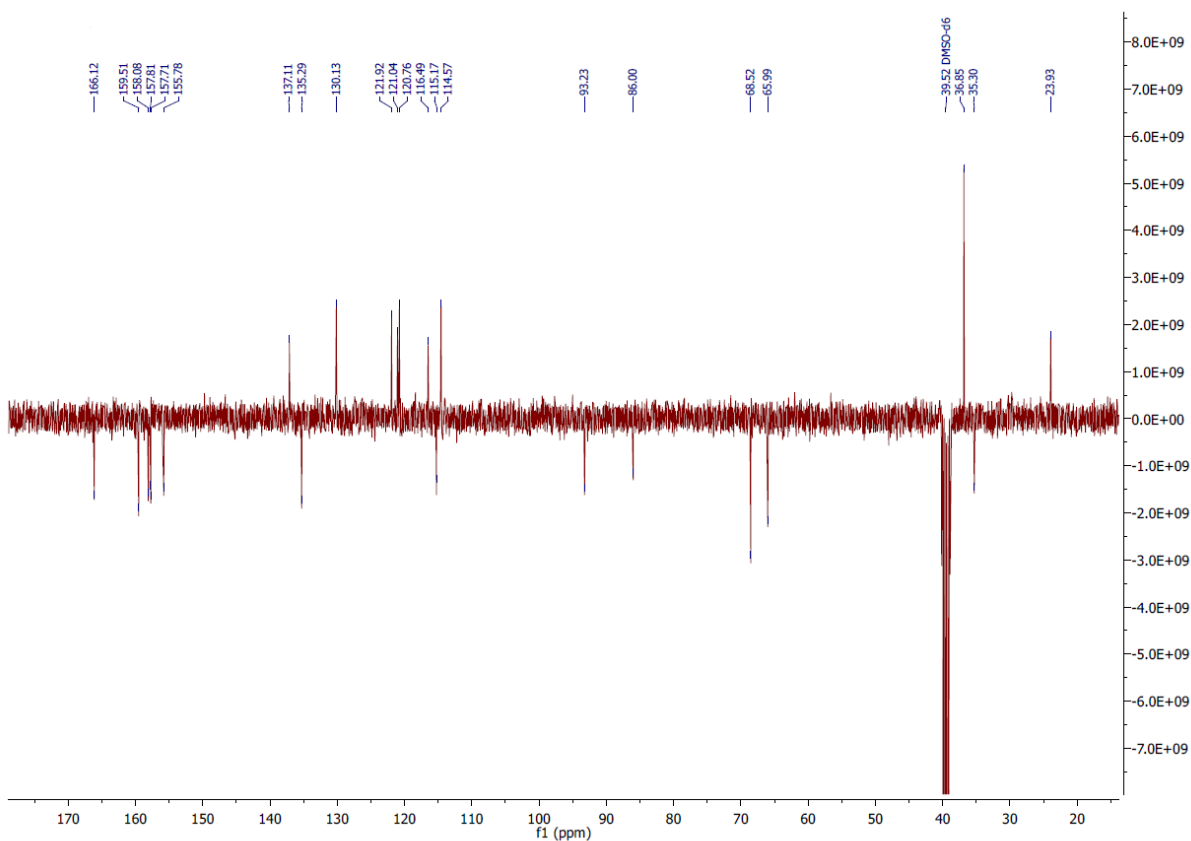
Label	Chemical Shift (ppm)	Integration
A (m)	8.49	0.96
B (d)	8.46	0.95
C (d)	8.34	0.95
D (m)	7.61	2.95
E (m)	7.46	2.01
F (s)	4.42	1.99
G (s)	3.23	6.01
H (s)	2.34	3.01
I (m)	0.29	9.06

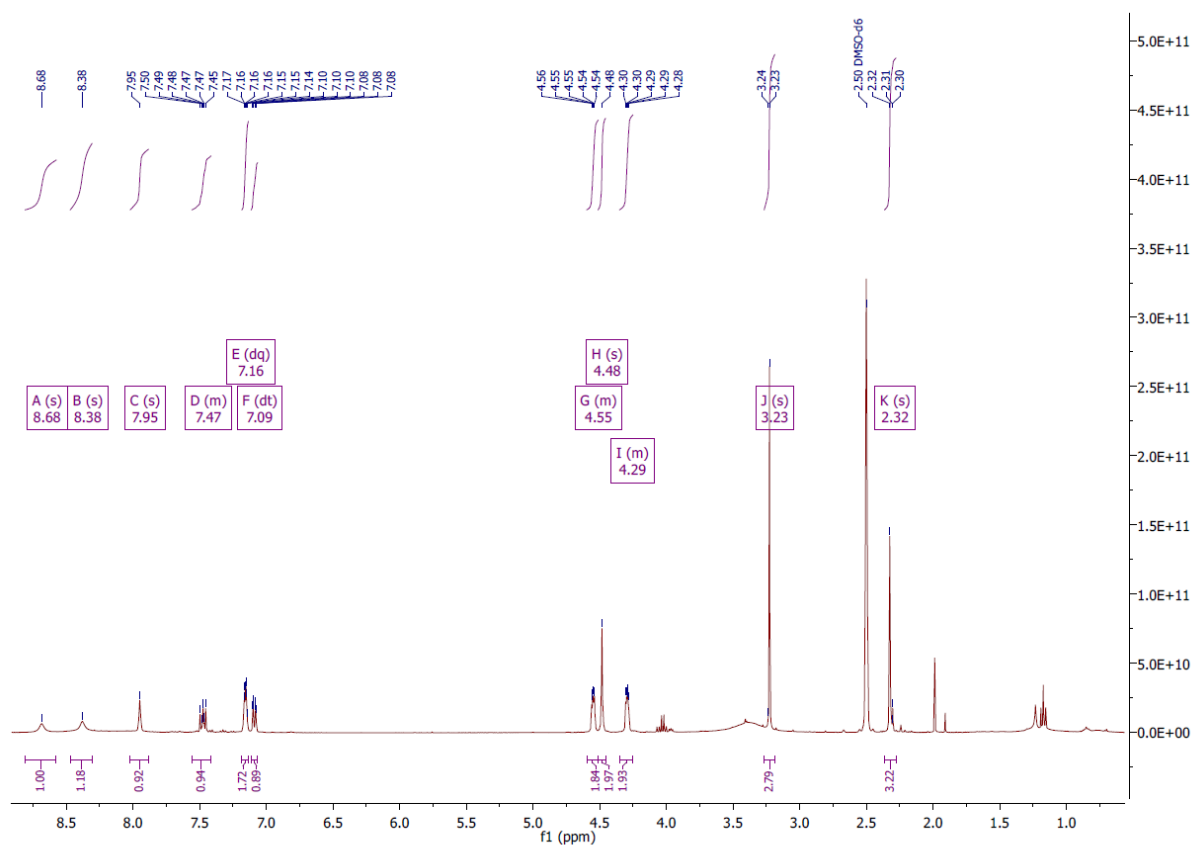
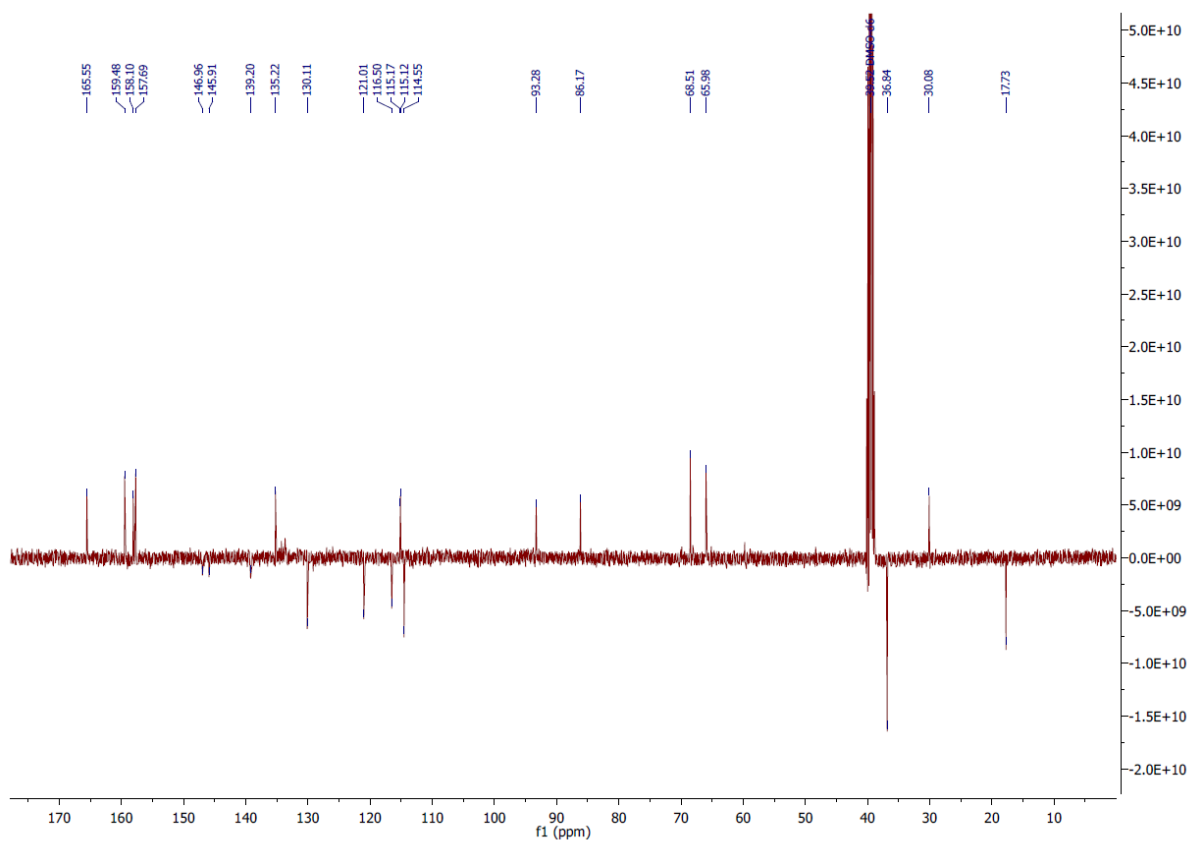
Reference Peaks:

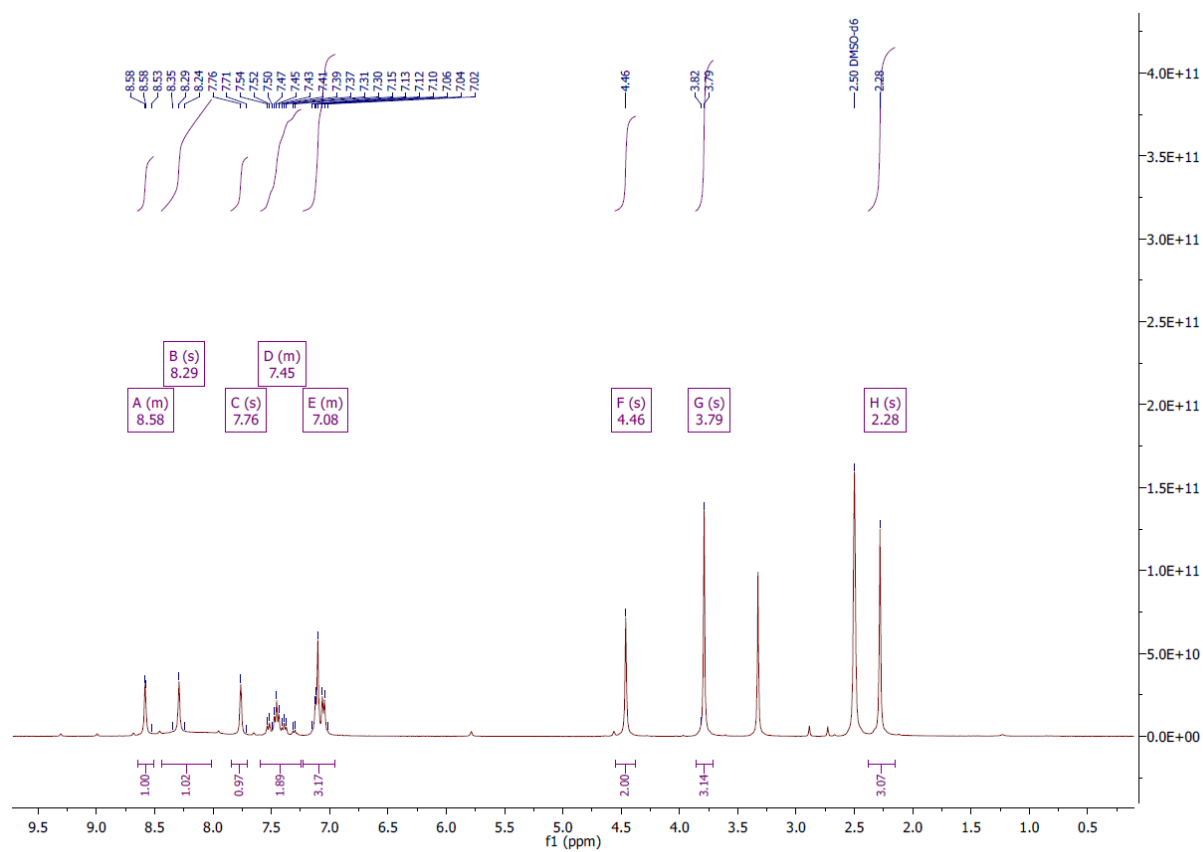
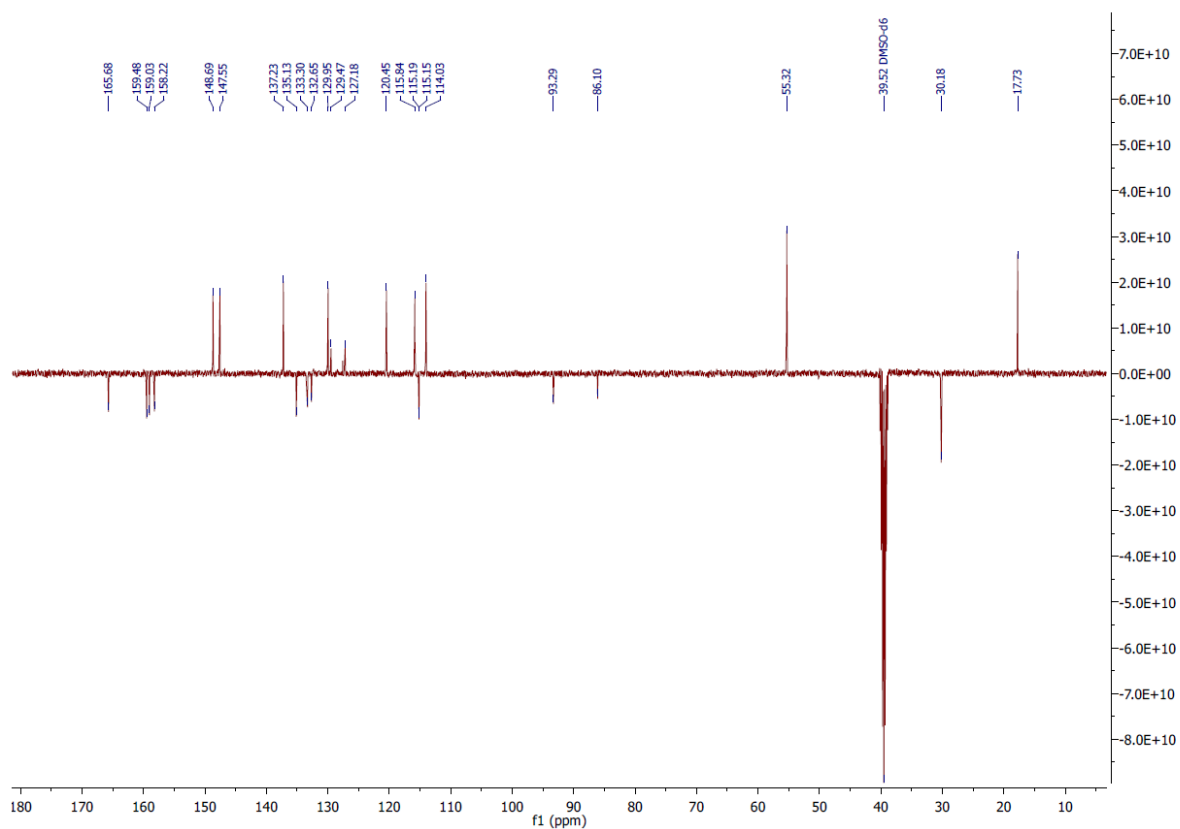
- CDCl₃: 7.26, 7.25, 7.24 ppm
- TMS: 0.00 ppm

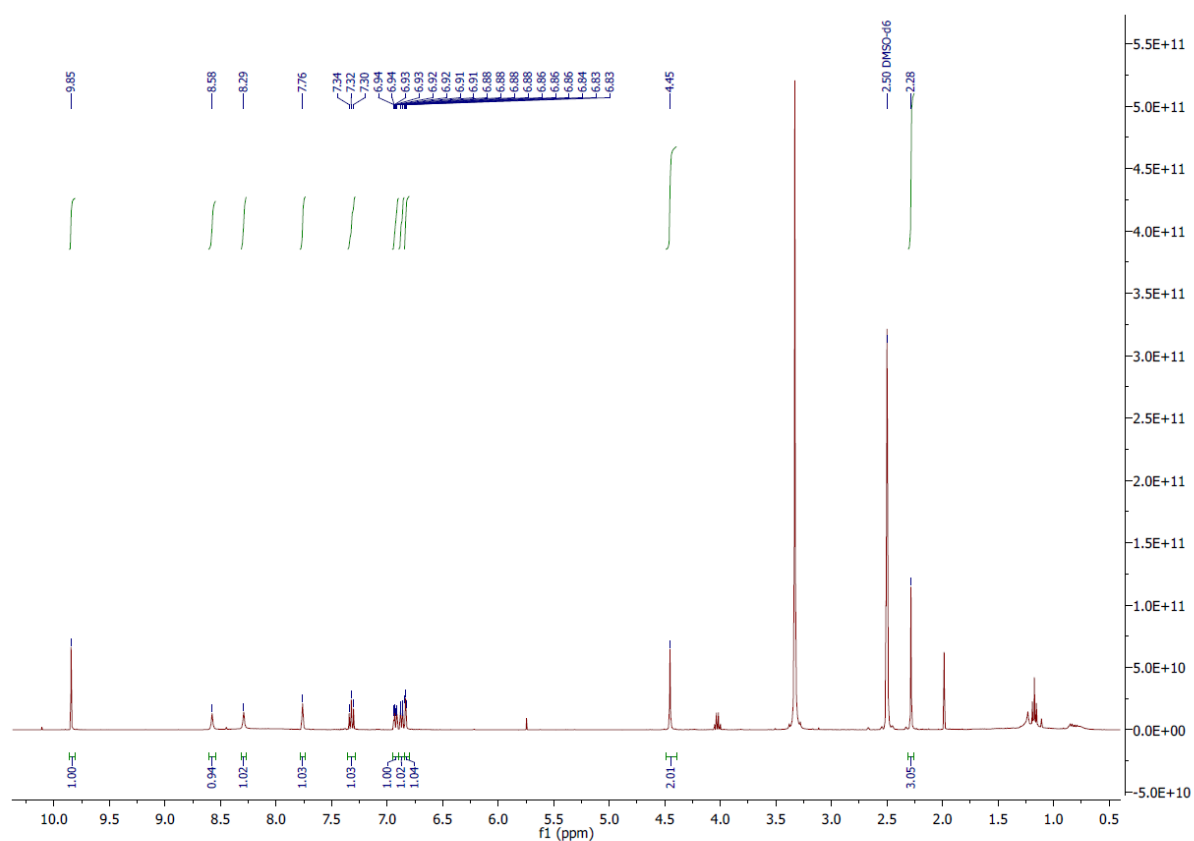
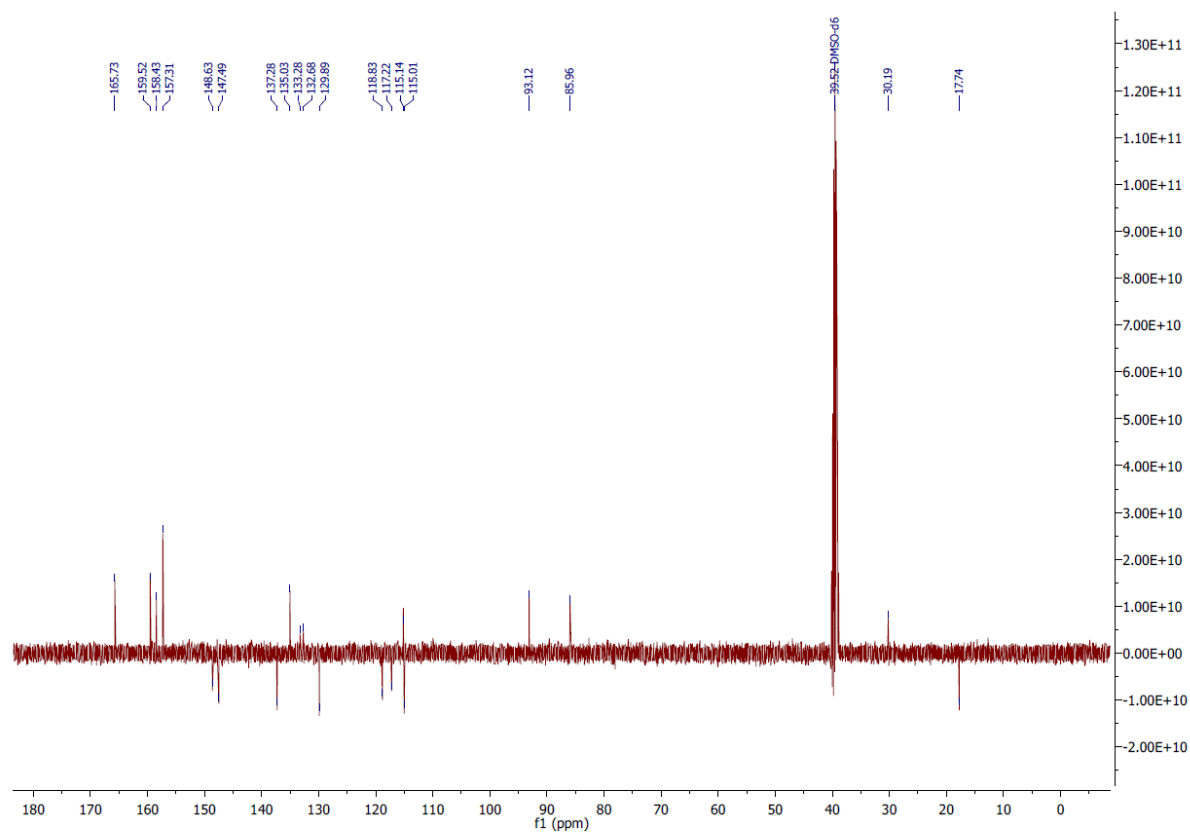
165.23
163.95
159.07
157.13
148.69
146.84
144.84
143.52
138.16
137.30
135.93
133.15
128.43
128.21
115.96
115.35
99.05
98.41
41.71
35.73
31.87
18.56
9.31

f1 (ppm)

¹H-NMR Verbindung 45**¹³C-NMR Verbindung 45**

¹H-NMR Verbindung 46**¹³C-NMR Verbindung 46**

¹H-NMR Verbindung 51**¹³C-NMR Verbindung 51**

¹H-NMR Verbindung 53**¹³C-NMR Verbindung 53**

Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Bernd Neumaier für die Möglichkeit und das Vertrauen diese Arbeit am Institut für Neurowissenschaften und Medizin, INM-5 Nuklearchemie des Forschungszentrum Jülich durchzuführen. Auch für die interessante Themenstellung und die stetige Unterstützung und Motivation, die zum Erfolg dieser Arbeit führten, möchte ich mich bedanken.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz für seine Unterstützung als Zweitbetreuer und Zweitgutachter und die jährlichen anregenden Gespräche ganz herzlich bedanken.

Ebenfalls danke ich Herrn PD Dr. Boris Zlatopolskiy für seine Betreuung, die fachlich anregenden Gespräche und die vielen Ratschläge, die diese Arbeit bereichert haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Marcus Holschbach für die stetige fachliche und persönliche Betreuung und Hilfsbereitschaft bei Problemen aller Art.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Dirk Bier für die intensive Betreuung, die vielen interessanten Gespräche, die diese Arbeit beeinflusst und mich immer wieder motiviert haben.

Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Heike Endepols für die Durchführung und Auswertung der biologischen Evaluationen der Tracer und die intensiven aufklärenden Gespräche bedanken.

Herrn Dr. Felix Neumaier danke ich für seine stetige Hilfsbereitschaft und die große Unterstützung bei Schreibaarbeiten jeglicher Art.

Ein weiterer Dank gilt Frau Annette Schulze für die Durchführung von vielen biologischen Experimenten.

Frau Franziska Wedekind und den Kollegen des INM-2 danke ich für die Durchführung des PET-Experiments.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Markus Lang, Thomas Wicher, Stefan Stüsgen und Manana Megrelishvili für die Unterstützung in den verschiedensten Fragestellungen, die zum Erfolg dieser Arbeit führten, bedanken.

Ein großer Dank gilt allen Kollegen des INM-5 für die stete Unterstützung und das tolle Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt hierbei Swen Humpert, Dana Renk Kai Gießen und Chris Hoffmann, für diese besondere Zeit.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für die große Unterstützung in all den Jahren. Insbesondere danke ich meinem Mann für seine Geduld und Unterstützung in jeder Hinsicht und dass er vorbehaltlos an mich glaubt.

Jül-4430 • Oktober 2021
ISSN 0944-2952

Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft

