

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Master of Science (Chemie) Martin Prause
aus Mindelheim
Tag der mündlichen Prüfung:

Synthese und Evaluierung spezifischer
Radiotracer für die Bildgebung
gastrointestinaler Stromatumore

Gutachter: Prof. Dr. Gert Fricker
Prof. Dr. Björn Wängler

Abstraktum

Um die Bildgebung von gastrointestinalen Stromatumoren mittels Positronen-Emissions-Tomographie zu verbessern, wurden in dieser Arbeit neue ^{18}F -markierte PET-Radiotracer entwickelt und evaluiert. Dafür wurde einerseits ein Radiotracer (^{18}F Fluor-Norimatinib) entwickelt, der die Sensitivität des Tumors gegenüber Imatinib darstellen sollte und andererseits ein Radiotracer (^{18}F Fluor-DOG1), mit dem sich gastrointestinale Stromatumore von anderen Sarkomen ohne invasive Biopsie unterscheiden lassen sollten.

Literaturbekannte ^{18}F -markierte Imatinib-Derivate weisen eine hohe Lipophilie und damit eine starke Akkumulation in der Leber auf, die die Bildgebung von gastrointestinalen Stromatumoren erschwert, weshalb in dieser Arbeit der hydrophilere Metabolit Norimatinib als Grundstruktur verwendet wurde. Das Radiolabel wurde am Pyridin-Ring eingeführt, da an dieser Position keine metabolischen Prozesse bekannt waren und ^{18}F Fluorpyridine über Nitropyridin-Vorläufer einfach zugänglich sind.

Die Darstellung des Nitropyridin-Vorläufers und des Fluor-Standards von FNI wurden zunächst in einer 6-stufigen Synthese geplant, die allerdings nur für den Standard Fluor-Norimatinib (FNI) erfolgreich durchgeführt werden konnte, da die harschen Reaktionsbedingungen des letzten Reaktionsschrittes nicht mit dem Nitro-Derivat kompatibel waren. Eine neue 7-stufige Synthese, bei der weitestgehend auf mildere Bedingungen zurückgegriffen wurde, konnte jedoch den Nitropyridin-Vorläufer in guten Ausbeuten liefern. Die zweistufige Radiomarkierung konnte erfolgreich etabliert werden, sodass ^{18}F FNI nach Radiofluorierung, Entschützung und Aufreinigung in guten Ausbeuten erhalten wurde. Die Evaluierung *in vitro* wies aufgrund der Lipophilie nur eine geringe spezifische Bindung auf, jedoch zeigte FNI ein zu Imatinib analoges Bindungsprofil bezüglich verschiedener KIT-Mutanten. In den *in vivo*-Studien konnte zwar die renale Ausscheidung des Radiotracers stark erhöht werden, wodurch eine vorteilhafte, geringere Akkumulation in der Leber resultierte, allerdings erfolgte keine hohe Anreicherung in den Tumoren, vermutlich aufgrund deren geringer Vaskularisierung. Des Weiteren wurde durch die Metabolisierung des Radiotracers ^{18}F Fluorid freigesetzt, welches zu erhöhter Knochenanreicherung führte. Dies konnte jedoch durch Administration kleiner Mengen Ketoconazol reduziert werden, wobei zudem die Anreicherung in den Tumoren leicht stieg.

Für die Radiomarkierung von ^{18}F Fluor-DOG1 wurden zunächst verschiedene Vorläufer mit Nitro-, Triazen- bzw. Borsäureester-Abgangsgruppen erfolgreich synthetisiert. Dabei zeigte sich, dass der Nitro-Vorläufer keine ausreichende Stabilität unter den harschen Markierungsbedingungen besaß, weswegen auf den

reaktiveren Triazen-Vorläufer zurückgegriffen wurde. Dessen hohe Reaktivität führte allerdings zu einer Vielzahl an Reaktionsprodukten, die sowohl die Analytik, als auch die Aufreinigung derart erschwerten, dass auch dieser Vorläufer keine sinnvolle Option darstellte. Über die Kupfer-katalysierte Radiofluorierung des Borsäureester-Vorläufers hingegen konnte der gewünschte Radiotracer [¹⁸F]Fluor-DOG1 in guten Ausbeuten erhalten werden. In ersten *in vivo*-Studien in Mäusen zeigte der Radiotracer keine zufriedenstellende Pharmakokinetik, da die Anreicherung im Tumor nur unzureichend stattfand, jedoch eine starke Akkumulation in der Leber beobachtbar war. Dies wurde auf die geringe Stabilität von [¹⁸F]Fluor-DOG1 in murinem Blutserum zurückgeführt, weswegen eine Optimierung dahingehend vorgenommen werden sollte.

Abstract

To improve the imaging of gastrointestinal stromal tumours via positron emission tomography, novel ^{18}F -labelled PET radiotracers have been developed in this work. For this, two radiotracers have been designed, on the one hand a radiotracer (^{18}F)fluoronorimatinib) displaying the sensitivity of the tumour towards Imatinib and on the other hand another radiotracer (^{18}F)fluoro-DOG1) being able to distinguish gastrointestinal stromal tumours from other sarcoma without the need for invasive biopsy.

Literature-known ^{18}F -labelled derivatives of Imatinib show a high lipophilicity and thus a strong accumulation in the liver impeding the imaging of gastrointestinal stromal tumours. Therefore the more hydrophilic metabolite Norimatinib has been used as the lead structure in this study. The radiolabel has been introduced into the pyridine ring, since there are no known metabolic processes at this position and ^{18}F fluoropyridines are easily accessible via nitropyridine precursors.

The syntheses of the nitropyridine precursor and the non-radioactive reference of FNI were first planned in a 6-step reaction scheme, which, however, could only be successfully applied to the standard compound fluoronorimatinib (FNI), since the harsh reaction conditions of the last reaction step were not compatible with the nitro derivative. In a new 7-step synthesis employing mostly milder conditions, finally, the nitropyridine precursor could be obtained in good yields. The 2-step radiosynthesis was established successfully, so ^{18}F FNI could be synthesised in good yields after radiofluorination, deprotection and purification. The *in vitro* evaluation exhibited only a low specific binding due to the lipophilicity of the compound. However, FNI displayed a comparable binding profile as Imatinib towards different KIT mutants. Although the renal excretion of the tracer could be increased, resulting in an advantageous lower accumulation in the liver, there was only moderate uptake in the tumours, most probably due to their weak vascularisation. Furthermore, ^{18}F fluoride has been released from the radiotracer due to metabolisation leading to increased bone uptake. However, this could be reduced with the co-administration of minute amounts of ketoconazole, which also lead to a slight increase in tumour uptake.

For the radiosynthesis of ^{18}F fluoro-DOG1, at first, various precursors have been successfully synthesised, covering nitro, triazene and boronic acid ester leaving groups. It could be observed, that the nitro precursor didn't show sufficient stability under the harsh labelling conditions, which is why the more reactive triazene precursor has been evaluated. However, its high reactivity led to a huge number of reaction products impeding both analysis as well as purification in a way, that this precursor did not pose a viable option. Eventually, the radiotracer ^{18}F fluoro-DOG1

could be obtained in good yields via copper-catalysed radiofluorination of the boronic acid ester precursor and was evaluated *in vivo*. However, the radiotracer showed undesirable pharmacokinetics, since the uptake in the tumour was insufficient for imaging and a high hepatic accumulation could be observed. This was referred to the poor stability of [¹⁸F]fluoro-DOG1 in murine blood serum, which is why an optimisation in this regard should be performed.

Inhalt

Abstraktum	5
Abstract	7
1 Einleitung	15
1.1 Bildgebende Verfahren	15
1.1.1 Computertomographie	15
1.1.2 Magnetresonanztomographie	16
1.1.3 Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie und Positronen- Emissions-Tomographie	17
1.2 [¹⁸ F]Fluorid – Eigenschaften, Herstellung und Anwendungen.....	21
1.3 Gastrointestinale Stromatumoren	27
1.3.1 KIT und Imatinib	29
1.3.2 DOG1	33
1.3.3 Nuklearmedizinische Diagnostik von GIST	34
2 Zielsetzung	37
3 Ergebnisse und Diskussion	39
3.1 Organische-chemische Synthesen	39
3.1.1 Imatinib-Derivate	39
3.1.1.1 Nitro-Boc-Imatinib: 1. Syntheseweg	40
3.1.1.2 Nitro-Boc-Imatinib: 2. Syntheseweg	48
3.1.1.3 Weitere Derivate	53
3.1.1.3.1 Norimatinib	54
3.1.1.3.2 SKI696	55
3.1.2 DOG1-Verbindungen	55
3.1.2.1 Referenzsubstanzen E _{act} [*] und Fluor-DOG1	56
3.1.2.2 Nitro-DOG1.....	58
3.1.2.3 Triazen-DOG1	59
3.1.2.4 BPin-DOG1.....	61

3.2	Radiosynthesen	64
3.2.1	[¹⁸ F]Fluornorimatinib.....	64
3.2.2	[¹⁸ F]DOG1	72
3.2.2.1	Nitro-DOG1.....	72
3.2.2.2	Triazen-DOG1	75
3.2.2.3	BPin-DOG1.....	77
3.3	In vitro-Evaluierungen	81
3.3.1	Lipophilie und Stabilität.....	81
3.3.1.1	Fluor-Norimatinib	81
3.3.1.2	Fluor-DOG1.....	82
3.3.2	Permabilität der Zellmembran	83
3.3.3	Kompetitiver Bindungsassay	85
3.3.4	Radiometrischer Kinase-Assay	90
3.4	In vivo-Evaluierungen	93
3.4.1	[¹⁸ F]Fluor-Norimatinib	93
3.4.1.1	Koinjektion von Imatinib	100
3.4.1.2	Koinjektion von Ketoconazol.....	101
3.4.2	[¹⁸ F]Fluor-DOG1.....	105
4	Zusammenfassung.....	109
5	Experimenteller Teil	116
5.1	Organisch-chemische Synthesen.....	116
5.1.1	Allgemeine Methoden.....	116
5.1.1.1	Imatinib-Derivate	116
5.1.1.1.1	4-(Chlormethyl)- <i>N</i> -(4-methyl-3-nitrophenyl)benzamid (1).....	116
5.1.1.1.2	4-((4-(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)piperazin-1-yl)methyl)benzoesäure (2)	117
5.1.1.1.3	<i>tert</i> -Butyl 4-(4-((4-methyl-3-nitrophenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat (3).....	118
5.1.1.1.4	<i>tert</i> -Butyl 4-(4-((3-amino-4-methylphenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat (4).....	119
5.1.1.1.5	2-Chlor-4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin (5).....	120

5.1.1.1.6	2-Chlor-4-(6-fluorpyridin-3-yl)pyrimidin (6).....	121
5.1.1.1.7	<i>tert</i> -Butyl 4-(4-((4-methyl-3-((4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat („ <i>Boc-Nitroimatinib</i> “) (7).....	123
5.1.1.1.8	<i>tert</i> -Butyl 4-(4-((3-((4-(6-fluorpyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)-4-methylphenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat („ <i>Boc-Fluorimatinib</i> “) (8).....	124
5.1.1.1.9	<i>N</i> -(3-((4-(6-fluorpyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)-4-methylphenyl)-4-(piperazin-1-ylmethyl)benzamid („ <i>Fluornorimatinib</i> “) (9).....	125
5.1.1.1.10	1-(6-Nitropyridin-3-yl)ethan-1-on (10).....	126
5.1.1.1.11	(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)methyl (4-methyl-3-nitrophenyl)carbammat (11).....	127
5.1.1.1.12	(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)methyl (3-amino-4-methylphenyl)carbammat (12) ...	128
5.1.1.1.13	(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)methyl (4-methyl-3-((4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbammat (13)	129
5.1.1.1.14	6-Methyl- <i>N</i> ¹ -(4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)benzol-1,3-diamin (14)	129
5.1.1.1.15	3-(Dimethylamin)-1-(pyridin-3-yl)prop-2-en-1-on (15).....	130
5.1.1.1.16	1-(2-Methyl-5-nitrophenyl)guanidin (16).....	131
5.1.1.1.17	<i>N</i> -(2-Methyl-5-nitrophenyl)-4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amin (17)....	131
5.1.1.1.18	6-Methyl- <i>N</i> ¹ -(4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)benzol-1,3-diamin (18)...	132
5.1.1.1.19	<i>tert</i> -Butyl 4-(4-((4-methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat („ <i>Boc-Imatinib</i> “) (19)	133
5.1.1.1.20	<i>N</i> -(4-Methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)-4-(piperazin-1-ylmethyl)benzamid („ <i>Norimatinib</i> “) (20).....	134
5.1.1.1.21	4-((4-(2-Fluorethyl)piperazin-1-yl)methyl)- <i>N</i> -(4-methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)benzamid („ <i>Fluorethyl-Imatinib</i> “, <i>SKI696</i>) (21)	136
5.1.1.2	DOG1-Verbindungen.....	137
5.1.1.2.1	<i>N</i> -Benzyl-4-phenylthiazol-2-amin (22)	137
5.1.1.2.2	<i>N</i> -Benzyl-3,4,5-trimethoxy- <i>N</i> -(4-phenylthiazol-2-yl)benzamid („ <i>Eact[®]</i> “) (23)	138
5.1.1.2.3	<i>N</i> -benzyl-4-(4-fluorphenyl)thiazol-2-amin (24).....	139
5.1.1.2.4	<i>N</i> -Benzyl- <i>N</i> -(4-(4-fluorphenyl)thiazol-2-yl)-3,4,5-trimethoxybenzamid („ <i>Fluor-DOG1</i> “) (25).....	139

5.1.1.2.5	<i>N</i> -Benzyl-4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-amin (26).....	140
5.1.1.2.6	<i>N</i> -Benzyl-3,4,5-trimethoxy- <i>N</i> -(4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-yl)benzamid („ <i>Nitro-DOG1</i> “) (27).....	141
5.1.1.2.7	<i>N</i> -(4-(4-Aminophenyl)thiazol-2-yl)- <i>N</i> -benzyl-3,4,5-trimethoxybenzamid (28)	142
5.1.1.2.8	<i>N</i> -Benzyl-3,4,5-trimethoxy- <i>N</i> -(4-(4-(piperidin-1-yl)diazenyl)phenyl)thiazol-2-yl)benzamid („ <i>Triazen-DOG1</i> “) (29).....	143
5.1.1.2.9	2-Brom-1-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)ethan-1-on (30)	144
5.1.1.2.10	<i>N</i> -Benzyl-4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)thiazol-2-amin (31)	145
5.1.1.2.11	<i>N</i> -Benzyl-3,4,5-trimethoxy- <i>N</i> -(4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)thiazol-2-yl)benzamid („ <i>BPin-DOG1</i> “) (32)	146
5.2	Radiochemische Synthesen	147
5.2.1	Allgemeine Methoden der Radiochemie	147
5.2.2	Trocknung von [¹⁸ F]Fluorid.....	147
5.2.3	Radiosynthese von [¹⁸ F]Fluor-Norimatinib	148
5.2.4	Radiosynthese von [¹⁸ F]DOG1-Verbindungen.....	148
5.2.4.1	Precursor: Nitro-DOG1	148
5.2.4.2	Precursor: Triazen-DOG1.....	148
5.2.4.3	Precursor: BPin-DOG1	149
5.3	Ex vivo- und in vitro-Experimente	149
5.3.1	Bestimmung des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (logD)	149
5.3.2	Bestimmung der Serumstabilität	150
5.3.3	Allgemeine Methoden der Zellkultur	150
5.3.4	Zelllinien	151
5.3.5	Zellmembran-Permeabilität	151
5.3.6	Kompetitiver Bindungsassay	152
5.3.7	Zellmembranfragmentierung	152
5.3.8	Radiometrischer Kinase-Assay	152
5.4	<i>In vivo</i> -Experimente.....	153
5.4.1	Allgemeine Methoden bei in vivo-Versuchen	153
5.4.2	Tumor-Inokulation.....	153

5.4.3	PET/CT-Bildgebung.....	153
5.4.4	Bestimmung der Biodistribution	154
5.4.5	Auswertung der PET-Daten.....	155
6	Literaturverzeichnis.....	157
7	Anhang	163
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	163
7.2	Massenspektren	166
7.3	HPLC-Chromatogramme	176
7.4	NMR-Spektren.....	192
8	Veröffentlichungen	221
8.1	Kongressbeiträge.....	221
8.2	Publikationen	221
9	Eidesstaatliche Erklärung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
10	Danksagung	222

1 EINLEITUNG

1.1 Bildgebende Verfahren

Seit der Entdeckung der Röntgenstrahlen Ende des 19. Jahrhunderts haben sich zahlreiche bildgebende Verfahren in der Medizin etabliert. Neben der klassischen Radiographie stellen die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Szintigraphie die wohl bekanntesten Modalitäten in der Radiologie und der Nuklearmedizin dar. Daneben existieren noch weitere, in der klinischen Routine verwendete Verfahren, wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT). Diese werden zwar nicht in gleichem Ausmaß wie die CT oder MRT verwendet, liefern jedoch zusätzliche wichtige Informationen für die Diagnostik. Abgesehen von speziellen Messverfahren, die in der Klinik selten zum Einsatz kommen, können CT und MRT nur Aufschlüsse über die Morphologie – also die Form und Struktur von Organen und Geweben – geben. Mit PET und SPECT hingegen werden im klinischen Alltag molekulare Informationen gewonnen, beispielsweise über den Stoffwechsel oder die Proliferation. Dies ist unter anderem in der Onkologie zur Darstellung von Tumoren und Metastasen, sowie in der Neurologie zur frühzeitigen Erkennung von Gehirn-Schädigungen von großer Bedeutung. Um die Vor- und Nachteile, sowie die Einsatzgebiete dieser Modalitäten zu erörtern, werden im Folgenden CT, MRT, SPECT und PET kurz vorgestellt.

1.1.1 *Computertomographie*

Die physikalische Grundlage der CT stellt die Absorption von Röntgenstrahlen in Abhängigkeit der Gewebedichte dar, wodurch ein Kontrast zwischen dichten, stark absorbierenden Organen (beispielsweise Knochen) und schwach absorbierenden Organen (z.B. mit Luft gefüllte Lunge) entsteht. Somit lassen sich Gewebe mit ähnlichen Dichten, bzw. Absorptionsverhalten kaum voneinander unterscheiden, woraus ein niedriger Weichteilkontrast resultiert. Durch Gabe von CT-Kontrastmitteln (oft iodhaltige Verbindungen) kann der Kontrast in weichem Gewebe erhöht werden, was unter anderem in der Darstellung von Blutgefäßen Anwendung findet, beispielsweise bei Untersuchungen von Gefäßrupturen oder –verschlüssen. Im Gegensatz zur Radiographie wird jedoch keine zweidimensionale Aufnahme aus einer Projektion angefertigt, sondern ein dreidimensionales Modell, das mittels Rekonstruktionsalgorithmen aus einer Vielzahl von Projektionen gewonnen wird. Dazu rotieren die Strahlenquelle und der Detektor um den Patienten und erzeugen pro Schicht etwa 1000 Projektionen, die mit den entsprechenden Algorithmen (gefilterte Rückprojektion) zu einem zweidimensionalen transaxialen Schnittbild rekonstruiert werden. Aus der Kombination der Schnittbilder aller Schichten kann dann das dreidimensionale Modell erzeugt werden. Gegenüber der Radiographie

ergibt sich somit der Vorteil, dass keine Überlagerungen entstehen und somit eine deutlich bessere Separation der unterschiedlichen Gewebe möglich ist. Trotz der mit der Radiographie verglichenen höheren Strahlendosis ist die CT aus dem klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken, was unter anderem an der hohen räumlichen Auflösung von 0.5-1.0 mm, den kurzen Akquisitionszeiten, der hohen Verfügbarkeit in vielen klinischen Einrichtungen und nicht zuletzt den vergleichsweise niedrigen Kosten liegt.¹ Neben dem Einsatz in der Notfall-Diagnostik, beispielsweise zur Beurteilung von Knochenbrüchen oder inneren Blutungen, wird die CT unter anderem auch zur Detektion von Tumoren und Kalkablagerungen oder als Hilfsmittel während Biopsien und Operationen verwendet.

1.1.2 Magnetresonanztomographie

Komplementär zur CT stellt die MRT eine Bildgebungsmodalität dar, mit der vor allem ein hoher Weichteilkontrast erzielt werden kann. Die physikalische Grundlage stellt hierbei die Kernspinresonanz dar. Vereinfacht ausgedrückt werden dabei Atomkerne, deren Kernspin sich von null unterscheidet, in einem starken magnetischen Feld ausgerichtet und durch Radiofrequenzpulse resonant angeregt. Nach Abschalten dieser Pulse beginnen die Atomkerne sich wieder im magnetischen Feld auszurichten (Relaxation), wobei dieser Vorgang abhängig von der molekularen Umgebung dieser Atomkerne ist. In kohlenwasserstoffreichen Geweben beispielsweise besitzen ¹H-Atomkerne deutlich kürzere Relaxationszeiten als in wässriger Umgebung.² Somit wird im Gegensatz zur CT weniger der Dichteunterschied der Gewebe dargestellt, sondern vielmehr unterschiedliche chemische Umgebungen, wodurch auch weiche Gewebe mit ähnlicher Dichte in der MRT differenziert werden können. Um eine Ortskodierung der Signale zu ermöglichen, werden drei orthogonal zueinander stehende Gradientenfelder angelegt, wodurch jedem Volumenelement (*Voxel*) eine Signalintensität zugeordnet wird. Daraus können zweidimensionale Schnittbilder mit Hilfe von Rekonstruktionsalgorithmen errechnet und dreidimensionale Modelle erzeugt werden. Dabei wird in klinischen Geräten eine räumliche Auflösung von etwa 1 mm erreicht, in Kleintier-Tomographen können Auflösungen von unter 100 µm realisiert werden.¹ Neben dem hohen Weichteilkontrast zeichnet sich die MRT vor allem durch die Verwendung von Magnetfeldern aus, die im Gegensatz zu den Röntgenstrahlen der CT keine ionisierende Wirkung haben und damit den Patienten keiner Strahlenbelastung aussetzen. Dies spielt vor allem bei Patienten, die mehrfach untersucht werden müssen oder auch bei Schwangeren eine große Rolle, da bei diesen Patienten die Strahlendosis so niedrig wie möglich gehalten werden sollte. Kontraindikationen für eine Untersuchung mittels MRT stellen ferromagnetische Materialien im Patienten, wie beispielsweise Piercings, Implantate und Tätowierungen mit eisenhaltigen Farbpigmenten dar, da diese durch das starke Magnetfeld (klinisch meist 1.5-3 T) aus dem Körper gerissen

werden oder sich stark erhitzen können.³ Zusätzlich bestehen Beeinträchtigungen bei Vorhandensein von älteren Herzschrittmachern, deren Funktion durch das Magnetfeld gestört werden kann. Weitere Nachteile sind hohe Kosten, längere Untersuchungszeiten und vor allem die geringe Sensitivität, wodurch die Bildqualität ohne Verwendung von Kontrastmitteln (Gadolinium-haltige Verbindungen) stark eingeschränkt ist. Neben der Darstellung der Morphologie mittels MRT, gibt es mittlerweile auch MRT-Verfahren, die physiologische Informationen bereitstellen können, wie beispielsweise die diffusionsgewichtete MRT (DW-MRT). Diese benötigen allerdings zwingend die Gabe von Kontrastmitteln. Eine weitere moderne Modalität stellt die Magnetresonanzspektroskopie (MRS) dar, bei der in jedem Voxel ein NMR-Spektrum gemessen wird. Dadurch können Metaboliten wie Cholin (Marker für Zellwachstum) oder *N*-Acetylaspartat (Marker für die Schädigung von neuronalem Gewebe) anhand spezifischer Signale detektiert und sogar quantifiziert werden. Durch Kombination mit der MRT lassen sich somit biochemische mit morphologischen Informationen verknüpfen. Meist wird jedoch nur ein einzelner Voxel von 1-8 cm³ im Zielgewebe gemessen, da die zu quantifizierenden Metaboliten nur in sehr geringer Konzentration vorliegen und bedingt durch die geringe Sensitivität längere Messzeiten benötigt werden. Da im klinischen Alltag derart lange Untersuchungszeiten nicht realisierbar sind, findet die MRS bisher hauptsächlich Anwendung in der Forschung. Zur Darstellung von biochemischen Veränderungen oder der Rezeptorexpression mittels konventioneller MRT gibt es zwar erste Ansätze, allerdings setzen diese die Gabe von Kontrastmitteln in vergleichsweise hohen Konzentrationen voraus, wodurch physiologische Vorgänge beeinflusst und damit falsch wiedergegeben werden können. Weiterhin schränkt eine mögliche Unverträglichkeit, beziehungsweise Toxizität die Verwendung hoher Mengen an Kontrastmittel stark ein. Somit sind CT und MRT bisher größtenteils limitiert auf die Bereitstellung morphologischer Informationen.

1.1.3 Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie und Positronen-Emissions-Tomographie

Im Gegensatz dazu lassen sich mit der PET und der SPECT molekulare Informationen gewinnen, beispielsweise über den Metabolismus (Abb. 1), die Proliferation oder die Expression bestimmter Rezeptoren. Beiden Methoden gemein ist die Verwendung von Radiotracer, also radioaktiv markierten Substanzen, die sich in bestimmten Geweben vermehrt anreichern und dort mittels Detektion des radioaktiven Zerfalls nachweisbar sind. Diese Anreicherung kann nach unterschiedlichen Mechanismen erfolgen, unter anderem durch Bindung an einen extrazellulären Rezeptor oder durch sogenanntes *trapping* in den Zellen, wie es beispielsweise bei 2-Desoxy-2-[¹⁸F]fluor-D-glucose ([¹⁸F]FDG) der Fall ist (Abb. 7). Da zur Messung von Radioaktivität hochsensible Detektoren existieren, können bereits

kleinste Mengen an Strahlung nachgewiesen werden. Dadurch ist es möglich, den Radiotracer in so geringen Konzentrationen zu verabreichen, dass weder pharmakologische Effekte, noch eine Beeinflussung der beobachteten physiologischen Vorgänge auftreten. Diese Methode wurde als Radiotracer-Prinzip von George de Hevesy entwickelt, der dafür 1943 den Nobelpreis in Chemie erhielt.

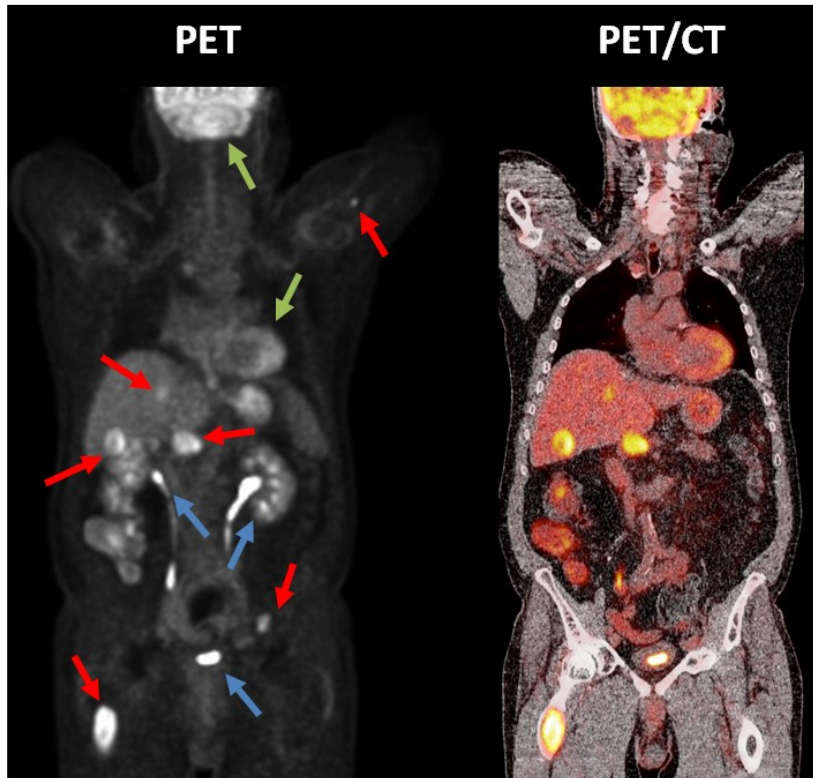


Abb. 1: Bildgebung eines GIST-Patienten mittels $[^{18}\text{F}]$ FDG-PET/CT (koronaler Schnitt) zur Darstellung des Glucose-Metabolismus. Rote Markierungen: Läsionen mit erhöhtem Glucose-Umsatz. Blaue Markierungen: Nieren, Harnleiter und Blase (renale Ausscheidung von $[^{18}\text{F}]$ FDG). Grüne Markierungen: physiologisch hoher Glucose-Bedarf des Herzens und des Gehirns.⁴

Zwar bedienen sich sowohl SPECT als auch PET des Tracer-Prinzips, benötigen also auch zwingend einen Radiotracer, um ein Bild zu erzeugen, allerdings liegen den beiden Methoden unterschiedliche Zerfallsarten und damit Detektionsmöglichkeiten zugrunde. Während in der SPECT Nuklide verwendet werden, die beim Zerfall γ -Strahlung aussenden, werden in der PET Positronen-Strahler benötigt. Ähnlich wie bei der Szintigraphie, werden bei der SPECT Gamma-Kameras verwendet, um den Ort des radioaktiven Zerfalls zu bestimmen. Diese bestehen aus NaI(Tl)-Szintillationskristallen, die die γ -Quanten aus dem Zerfall in elektrische Signale umwandeln, die wiederum über Photomultiplier verstärkt werden. Um die räumliche Auflösung zu steigern, werden Kollimatoren vor die Szintillationskristalle geschaltet, sodass nur die γ -Quanten auf die Szintillatoren treffen, die sich parallel zum Kollimator bewegen. Da so nur ein geringer Teil der ausgesandten γ -Quanten den Detektor erreicht, geht die erhöhte räumliche Auflösung (ca. 8-10 mm¹) zu

Lasten der Sensitivität. Dies kann jedoch durch eine größere Menge an Radiotracer oder eine längere Messzeit kompensiert werden. In der SPECT werden ein bis drei Gamma-Kameras gleichzeitig verwendet, die um den Patienten rotieren und so etwa 120 Projektionen aufnehmen, die anschließend zu einem dreidimensionalen Bild verarbeitet werden können. Weitverbreitete Nuklide in der SPECT sind ^{99m}Tc ($t_{1/2} = 6.01 \text{ h}$), ^{111}In ($t_{1/2} = 2.80 \text{ d}$) und ^{123}I ($t_{1/2} = 13.27 \text{ h}$), die aufgrund ihrer Halbwertszeiten nicht nur eine einfachere Handhabung, als die kurzlebigen PET-Nuklide gewährleisten, sondern auch zur Radiomarkierung von Antikörpern geeignet sind. Diese zeigen eine deutlich langsamere Distribution als Peptide oder niedermolekulare Verbindungen, wodurch die Bildgebung teilweise erst 24-72 Stunden nach Applikation erfolgt, um eine hohe Anreicherung im Zielgewebe zu gewährleisten.

Das physikalische Prinzip, das der PET zu Grunde liegt, ist die Positronen-Emission, genauer die Annihilation des ausgesandten Positrons. Bei der Positronen-Emission (β^+ -Zerfall), wird aus einem neutronenarmen Atomkern ein Proton in ein Neutron unter Emission eines Positrons und eines Elektron-Neutrinos umgewandelt. Trifft das Positron auf ein Elektron, findet eine Annihilation unter Aussendung zweier γ -Quanten statt, die in einem Winkel von etwa 180 Grad zueinander stehen und die charakteristische Energie von 511 keV besitzen (Abb. 2 A).^{5,6} Die Reichweite des Positrons wird dabei zum einen von der nuklidspezifischen Positronen-Energie, zum anderen von der Dichte des umliegenden Materials beeinflusst. Für die Bildgebung sind deshalb Radionuklide mit einer niedrigen Positronenenergie und der daraus resultierenden hohen Auflösung von Vorteil. In der Positronen-Emissions-Tomographie wird die Entstehung der entgegengesetzt ausgesandten γ -Quanten genutzt, um mittels Koinzidenzmessung die Signale an gegenüberliegenden Detektoren einem Zerfall zuzuordnen und diesen zu lokalisieren. Dazu müssen die Signale innerhalb des Koinzidenz-Intervalls von 4-6 Nanosekunden auf die Detektoren fallen und dürfen einen bestimmten Energiebereich nicht verlassen, um als Ereignis gewertet zu werden.^{6,7} Treffen auf den Detektoren γ -Quanten mit größerem Zeitunterschied ein, wird das Ereignis nicht gezählt, da dann davon ausgegangen werden muss, dass diese beiden γ -Quanten aus zwei unterschiedlichen Zerfällen stammen (Abb. 2 B). Anhand des zeitlichen Unterschieds, mit dem die γ -Quanten den Detektor erreichen, kann zudem in modernen PET-Scannern die *time of flight* (TOF) berechnet werden, anhand derer der Zerfallsort genauer bestimmt werden kann. Durch die Koinzidenzabfrage kann auf Kollimatoren verzichtet werden und somit – verglichen mit SPECT – eine höhere Empfindlichkeit erreicht werden. Abhängig vom verwendeten Radionuklid und dessen Positronenenergie werden so räumliche Auflösungen von 4-6 mm realisiert.^{8,9}

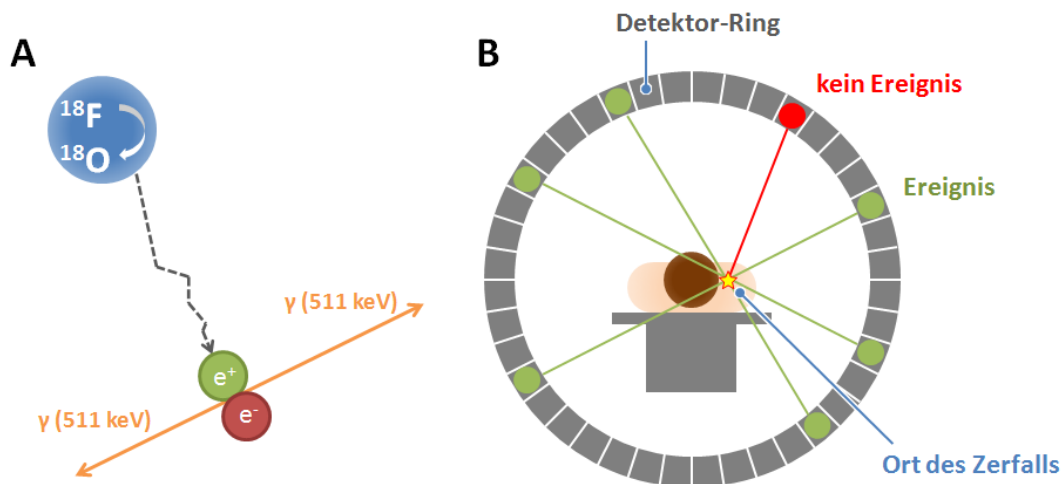


Abb. 2: A) Positronen-Emission am Beispiel von ^{18}F , welches zu ^{18}O zerfällt. Das Positron (e^+) annihiliert mit einem Elektron (e^-) unter Aussendung zweier γ -Quanten mit 511 keV im Winkel von 180 Grad. B) Schematische Darstellung der Funktionsweise der Koinzidenzabfrage bei PET.

Trotz der Koinzidenzmessung, ist die Positronen-Emissions-Tomographie nicht gänzlich fehlerfrei.^{6,10} So spielt die Compton-Streuung der γ -Quanten (*scatters*) eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Diese führt dazu, dass dem Zerfall ein falscher Ort zuordnet wird. Dabei findet eine Interaktion zwischen den γ -Quanten und dem Gewebe statt, sodass diese von ihrer Flugbahn abgelenkt werden und Energie verlieren (Abb. 3 A). Unter Verwendung der Gewebedichten, die mittels CT gemessen werden, können diese Fehler jedoch mit speziellen Algorithmen korrigiert werden.

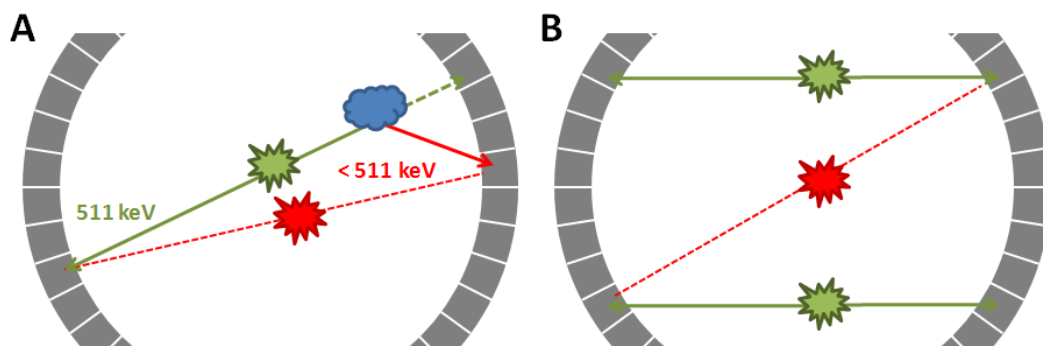


Abb. 3: Schematische Darstellung der PET-Fehlerquellen. A) Streuung: Interaktion der emittierten γ -Quanten (grün) mit Gewebe (blau) führt zur Ablenkung (roter Pfeil) und damit zum falsch bestimmten Ort des Zerfalls (rot). B) Zufallskoinzidenz: zwei voneinander unabhängige Zerfälle (grün) lösen Signale in gegenüberliegenden Detektoren aus und führen zu einem falsch-positiven Signal (rot).¹⁰

Eine weitere Fehlerquelle sind Zufallskoinzidenzen, also zwei voneinander unabhängige γ -Quanten, die im Koinzidenz-Intervall auf gegenüberliegende Detek-

toren fallen. Diese können aus singulären Ereignissen oder aus zwei unterschiedlichen Annihilationen stammen und führen zu falsch-positiven Signalen (Abb. 3 B). Da die Anzahl an γ -Quanten die Zufallskoinzidenzen stark beeinflusst, können diese durch Reduktion der Radioaktivitätsmenge, beziehungsweise durch ein engeres Koinzidenz-Intervall vermindert werden.

Da die PET-Daten keine morphologischen Informationen enthalten, wird ein CT- oder MRT-Scan benötigt, um den Signalen aus der PET eine genaue Lokation zuzuordnen. Die Kombination aus PET und CT in einem Gerät stellt heutzutage den Standard dar, PET/MRT-Geräte sind hingegen erst seit einigen Jahren erhältlich. PET/CT-Scanner bieten den Vorteil, dass der Patient in der gleichen Position bleibt für beide Messungen. Somit sind deckungsgleiche Bilder und eine eindeutige Zuordnung der Signale möglich (Abb. 4). Ebenfalls lässt sich so die vorhin genannte Schwächungskorrektur einfach durchführen.

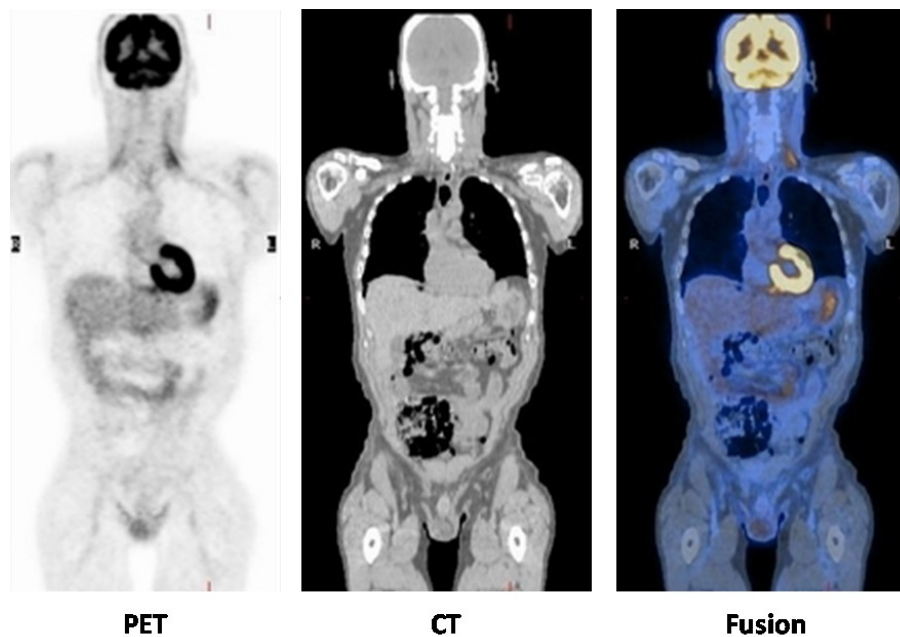


Abb. 4: PET-Scan: niedrige Auflösung, molekulare Information. CT-Scan: hohe Auflösung, morphologische Information. Fusion: molekulare Informationen aus dem PET-Scan werden mit den morphologischen Informationen vereint.¹¹

1.2 [^{18}F]Fluorid – Eigenschaften, Herstellung und Anwendungen

Fluor kommt in der Natur nur als ^{19}F vor und stellt damit ein Reinelement dar. Die künstlich erzeugten Isotope reichen von ^{14}F bis ^{31}F , sind instabil und zerfallen, bis auf eine Ausnahme, alle mit einer Halbwertszeit von unter zwei Minuten. Diese Ausnahme stellt ^{18}F dar, das eine Halbwertszeit von 109.8 Minuten aufweist und

durch Positronen-Emission zum stabilen ^{18}O zerfällt.¹² Da es keine natürlichen Quellen für dieses Isotop gibt, muss es künstlich in einem Teilchenbeschleuniger erzeugt werden. Konventionell wird dazu ein Zyklotron verwendet, bei dem Wasserstoff-Ionen (H^+ bzw. H^-) in einem magnetischen Feld beschleunigt werden bis die gewünschte Energie erreicht ist, was zu einer spiralförmigen Bahn führt und dann auf das Target treffen (Abb. 5). Dazu wird im Fall von positiven Ionen ein Deflektor genutzt, der den Strahl aus der kreisförmigen Bahn ablenkt. Bei den heutzutage gebräuchlicheren Zyklotronen, die mit negativen Ionen arbeiten, trifft das Wasserstoff-Anion auf eine Graphitfolie („Stripper-Folie“) und verliert dadurch seine Elektronen, sodass es nun als Proton vorliegt und durch die entgegengesetzte Ladung aus der Beschleunigungsbahn in Richtung Target gelenkt wird.

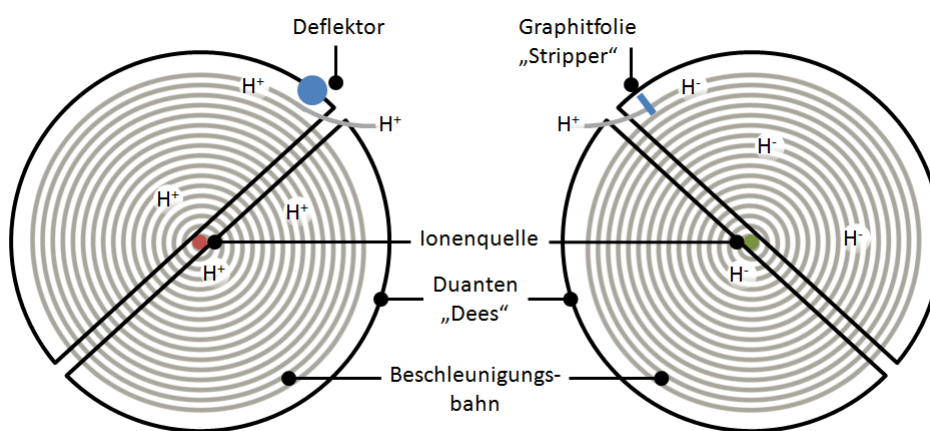


Abb. 5: Schematischer Aufbau eines Zyklotrons. Links: Beschleunigung von positiven Ionen, die durch einen Deflektor abgelenkt werden. Rechts: Beschleunigung von negativen Ionen, die beim Passieren der Graphitfolie durch Verlust der Elektronen abgelenkt werden.¹³

Um ^{18}F zu erzeugen stehen prinzipiell mehrere Kernreaktionen zur Verfügung: $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$, $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ oder $^{16}\text{O}(^3\text{H},n)^{18}\text{F}$, wobei in der Praxis zur Herstellung von [^{18}F]Fluorid nur der Beschuss von ^{18}O mit Protonen relevant ist. Diese Kernreaktion, $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$, hat die höchste Ausbeute bei einer Protonenenergie von etwa 11-17 MeV.¹³ Um Verunreinigungen durch Nebenreaktionen zu vermeiden, muss auf eine ^{18}O -Anreicherung von mindestens 95% im Target geachtet werden. Dabei stehen zwei Möglichkeiten ^{18}F zu gewinnen zur Verfügung: einerseits durch Bestrahlung eines [^{18}O]H₂O-Targets zur Gewinnung von [^{18}F]Fluoridionen in wässriger Lösung und andererseits eines gasförmigen [^{18}O]O₂-Targets unter Beimischung von [^{19}F]F₂ zur Gewinnung von [^{18}F]F₂. Dabei weist letzteres eine geringe spezifische Aktivität durch die Zugabe von nicht-radioaktivem Fluor-Gas auf, wohingegen [^{18}F]Fluorid mit einer hohen spezifischen Aktivität erzeugt werden kann. Für die PET-Bildgebung ist eine hohe spezifische Aktivität, also ein großes Verhältnis von radioaktivem zu nicht-radioaktivem Fluor, in den meisten Fällen bevorzugt. Der Protonen-Beschuss liefert je nach Bestrahlungsenergie und Targetgröße innerhalb von zwei Stunden

etwa 100-700 GBq an Aktivität. Die Wahl des Targets und damit der chemischen Form, in der ^{18}F vorliegt, hängt von der weiteren Reaktionsführung ab, je nachdem ob eine nukleophile (Fluorid) oder elektrophile (Fluor-Gas) ^{18}F -Spezies notwendig ist.

Die nukleophile Substitution durch $[^{18}\text{F}]$ Fluorid erfreut sich großer Beliebtheit, da die Handhabung sehr einfach ist und durch etablierte Verfahren der nukleophile Charakter stark erhöht werden kann. Das bekannteste Verfahren zur Bereitstellung eines reaktiven $[^{18}\text{F}]$ Fluorid-Anions stellt die azeotrope Trocknung unter Verwendung von Kronenethern dar. Dabei wird die wässrige Fluorid-Lösung über einen Anionentauscher zum einen von $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$, zum anderen von Metallionen und anderen Verunreinigungen aus dem Target befreit. Die Elution vom Anionentauscher erfolgt mit Acetonitril, welches geringe Mengen Wasser, Kaliumcarbonat und Kronenether (üblicherweise Kryptofix[®] 222) enthält. Kryptofix dient der Komplexierung von Kalium-Ionen, um die Bildung von Kaliumfluorid zu verhindern, wodurch die Reaktivität der Fluorid-Ionen stark herabgesetzt werden würde. Das zur effizienten Elution benötigte Wasser wird durch azeotrope Trocknung mit Acetonitril weitestgehend entfernt, sodass sich keine Hydrathülle um die Fluorid-Anionen ausbilden kann, wodurch die Reaktivität des Fluorids weiter gesteigert wird. Auf diese Weise wird vor allem in wasserfreien dipolar aprotischen Lösungsmitteln ein reaktives nukleophiles Fluorid-Ion erzeugt, mit dem nukleophile Substitutionen in wenigen Minuten mit hohen Ausbeuten möglich sind.

Die elektrophile Substitution mit $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ hingegen wird immer seltener eingesetzt, da oft mehr Nebenprodukte und wegen der Trägerung mit ^{19}F eine geringere spezifische Aktivität zu erwarten sind als bei der nukleophilen Substitution. Beispielsweise wurde die Synthese von $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ früher über elektrophile Substitution durchgeführt, welche nur eine geringe Ausbeute von 8% lieferte, da die Addition von $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ an die Doppelbindung des Vorläufers neben Difluor-Glucose auch zur Bildung von Difluor-Mannose führte, die vor dem nächsten Reaktionsschritt erst entfernt werden musste.¹⁴ Erst durch die nukleophile Substitution konnte die Ausbeute auf 60-70% erhöht werden,^{15,16} was langfristig unter anderem zum Durchbruch von $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ in der täglichen Routine beigetragen hat. Trotzdem stellt die elektrophile Substitution in manchen Fällen noch die einzige Möglichkeit dar, bestimmte Radiotracer herzustellen, weswegen Methoden entwickelt wurden, um aus $[^{18}\text{F}]$ Fluorid eine elektrophile $[^{18}\text{F}]$ Selectfluor-Spezies zu generieren und so die Verwendung von $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ zu vermeiden.¹⁷

Obwohl die Herstellung von ^{18}F -markierten Radiotracern ein Zyklotron in räumlicher Nähe voraussetzt, ist ^{18}F aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften eines der geeignetsten Nuklide für die Bildgebung mittels PET.¹² Im Gegensatz zu vielen anderen Positronen-Strahlern zerfällt ^{18}F fast ausschließlich über die Positronen-Emission. Lediglich 3% der Zerfälle sind auf Elektroneneinfang zurückzuführen, was

dazu führt, dass 97% der Zerfälle potentiell ein Signal in der Bildgebung auslösen können. Andere PET-Nuklide wie ^{124}I oder ^{64}Cu hingegen zerfallen nur zu einem geringen Teil (< 25%) unter Positronen-Emission, wodurch der Einsatz deutlich höherer Aktivitätsmengen oder eine längere Messdauer nötig sind, um die gleiche Signalstärke wie bei ^{18}F zu erhalten. Eine weitere vorteilhafte Eigenschaft von ^{18}F ist die Halbwertszeit von 109.8 Minuten. Diese erlaubt nicht nur mehrstufige Synthesen, die mit anderen Nukliden nicht vorstellbar sind, sondern auch den Transport von ^{18}F -markierten Radiotracer an Kliniken und Forschungseinrichtungen, die kein Zyklotron vor Ort haben.

Aus chemischer Sicht sind Nuklide wie ^{11}C ($t_{1/2} = 20.4$ min), ^{13}N ($t_{1/2} = 10.0$ min) oder ^{15}O ($t_{1/2} = 2.1$ min) ideal geeignet, um ein Biomolekül radioaktiv zu markieren, da sie weder die chemische Struktur, noch die biologischen Eigenschaften verändern. Leider schränken die sehr kurzen Halbwertszeiten dieser Nuklide deren Verwendung stark ein, sowohl bezüglich der Reaktionsführung, als auch des Transportes. Allerdings lassen sich Wasserstoff-Atome und Hydroxidgruppen in Biomolekülen oft ohne große Beeinträchtigung der biologischen Eigenschaften durch Fluor-Atome ersetzen,⁵ sodass die Substitution mit Fluorid aufgrund der ausreichend langen Halbwertszeit von ^{18}F in diesem Fall eine gute Alternative darstellt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die PET-Bildgebung ist die Positronen-Energie, da sie vorgibt, wie weit sich das Positron vom Zerfallsort entfernt, bevor es auf ein Elektron trifft, was zur Annihilation und damit erst zum Signal für die PET führt. Eine hohe Positronen-Energie geht deshalb mit einer geringen räumlichen Auflösung einher und produziert so unscharfe PET-Aufnahmen, was vor allem bei kleinen darzustellenden Strukturen (z.B. Metastasen) problematisch ist. Verglichen mit anderen gängigen PET-Nukliden wie ^{68}Ga (1899 keV) und ^{11}C (960 keV) besitzt ^{18}F eine sehr geringe Positronen-Energie von 633.5 keV und damit die höchste Auflösung. Für die dreidimensionale Bildgebung muss noch berücksichtigt werden, dass eine höhere Reichweite im Gewebe entsprechend mit einem erhöhten Volumen, über das sich das Signal erstreckt, einhergeht. Dadurch wird das Signal nicht nur unschärfer, es nimmt auch die Intensität pro Volumen ab, wodurch vor allem schwache Signale aus kleinen Läsionen deutlich schlechter sichtbar sind. Somit führt die niedrige Positronen-Energie nicht nur zur genaueren Lokalisation des Zerfallsortes, sondern erhöht auch die Wahrscheinlichkeit kleine Läsionen zu finden.

Zwar gibt es mit ^{64}Cu zwar noch ein weiteres hochauflösendes PET-Nuklid, allerdings muss dieses – wie jedes Radiometallnuklid – über einen Chelator an das Biomolekül gebunden werden. Diese Chelatoren (z.B. DOTA, NODAGA) können aufgrund ihres hohen Molekulargewichts und ihres sterischen Anspruchs jedoch nur an entsprechend großen Biomolekülen wie Peptiden, Proteinen und Antikörpern

verwendet werden ohne die biologischen Eigenschaften zu stark zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu kann ^{18}F sowohl bei niedermolekularen Verbindungen (*small molecules*), als auch bei größeren Biomolekülen (Peptide, Proteine, Antikörper-Fragmente) als Radiolabel benutzt werden, wodurch es eine große Bandbreite an Anwendungsmöglichkeiten erlangt. Insgesamt vereint ^{18}F mit seinem hohen Anteil an Positronen-Emission, seiner gut handhabbaren Halbwertszeit, der niedrigen Positronen-Energie, der vielfältigen Anwendungsoptionen und der kommerziellen Verfügbarkeit wichtige Eigenschaften zur Verwendung in der radiopharmazeutischen Chemie (Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht über die Eigenschaften gängiger PET-Radionuklide.¹⁸

Radionuklid	Halbwertszeit	max. β^+ -Energie [MeV]	Anteil β^+ -Zerfall	Reichweite in Wasser [mm]
^{18}F	109.8 min	0.634	97%	2.3
^{11}C	20.4 min	0.960	99%	3.9
^{13}N	10.0 min	1.190	100%	5.1
^{15}O	2.1 min	1.732	100%	8.0
^{64}Cu	12.7 h	0.656	19%	2.0
^{68}Ga	67.8 min	1.899	88%	9.0
^{124}I	4.18 d	2.137	22%	7.0

Im klinischen Alltag haben sich deshalb bereits einige ^{18}F -markierte Radiotracer in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) etabliert, unter anderem [^{18}F]Fluorethyltyrosin ([^{18}F]FET) zur Bildgebung von Hirn-Tumoren, [^{18}F]Florbetaben ([^{18}F]FBB) zur Früherkennung von Alzheimer durch Darstellung von β -Amyloid-Plaques und 2-Desoxy-2-[^{18}F]fluoroglucose zur allgemeinen Tumor-Bildgebung (Abb. 6).

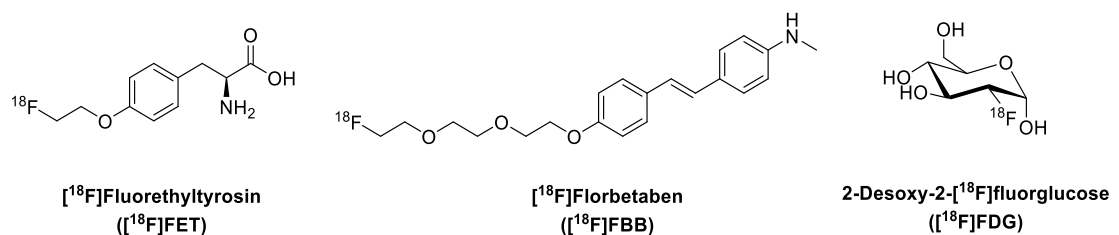


Abb. 6: Strukturformeln von [^{18}F]FET, [^{18}F]FBB und [^{18}F]FDG.

[^{18}F]FET ist ein radioaktiv markiertes Analogon der Aminosäure Tyrosin, mit dem der Aminosäurestoffwechsel dargestellt werden kann. Dieser Tracer wird vorwiegend zur Bildgebung von Hirn-Tumoren verwendet, da er über spezifische Aminosäure-Transporter die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und dort in Zellen anreichert,

deren Aminosäurebedarf erhöht ist. Somit lässt sich beispielsweise nach der operativen Entfernung des Tumors schnell beurteilen, ob eine vollständige Resektion erfolgt ist. Ebenso dient [^{18}F]FET in der Beurteilung des Therapieerfolges nach Bestrahlung des Tumors.

^{18}F -markierte PET-Tracer finden neben der Onkologie aber auch in anderen Themengebieten Anwendung, beispielsweise in der Neurologie. [^{18}F]FBB stellt hier einen vielversprechenden Radiotracer zur Bildgebung von β -Amyloid-Plaques dar.¹⁹ Diese bilden sich im Gehirn bereits Jahre bevor erste Symptome von Alzheimer auftreten, sodass durch eine frühe Detektion dieser Plaques eine bessere Planung der medizinischen Versorgung des Patienten gewährleistet wird. Da aktuell noch keine effektiven Behandlungsmöglichkeiten für Alzheimer bestehen, sind für die Forschung gerade diese Patienten im frühen, symptomfreien Krankheitsstadium interessant und können durch [^{18}F]FBB-PET-Untersuchungen frühzeitig für Studien akquiriert werden. Umgekehrt kann mit [^{18}F]FBB auch der Verdacht auf Alzheimer mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden, wenn keine Plaques detektierbar sind.

Trotz der zahlreichen PET-Radiotracer ist [^{18}F]FDG durch seine universellen Einsatzmöglichkeiten noch immer mit Abstand der am häufigsten verwendete Radiotracer zur Bildgebung in onkologischen und neurologischen Fragestellungen. Mit [^{18}F]FDG ist es möglich den Metabolismus anhand des Glucose-Umsatzes darzustellen. Dies wird besonders in der Tumorbildgebung genutzt, da die meisten Tumore einen erhöhten Stoffwechsel besitzen. [^{18}F]FDG wird, wie auch normale Glucose, über den Glucose-Transporter GLUT1 in die Zelle aufgenommen und dort durch Hexokinasen phosphoryliert, um eine passive Diffusion aus der Zelle durch die Zellmembran zu verhindern (Abb. 7). Im Gegensatz zu Glucose, wird das Fluor-Derivat jedoch nicht von der Glucose-6-Phosphat-Isomerase weiter metabolisiert, was zum *trapping* der Aktivität in der Zelle führt.^{20,21} Dadurch kann sich [^{18}F]FDG in Zellen mit hohem Glucose-Bedarf anreichern, was durch Erhöhung des Signals in diesen Geweben mittels PET detektiert werden kann. Der Einsatz von [^{18}F]FDG ist deswegen nicht nur auf die Tumor-Diagnostik beschränkt, sondern wird auch zum Therapie-Monitoring verwendet, da sich ein Ansprechen der Therapie deutlich schneller an Stoffwechsel-Veränderungen als an morphologischen Veränderungen zeigen lässt. Trotz der regen Anwendung liefert [^{18}F]FDG nicht überall gute Ergebnisse. So ist in Geweben, die einen physiologisch hohen Glucose-Metabolismus haben, wie zum Beispiel im Gehirn, die onkologische Bildgebung mit [^{18}F]FDG stark erschwert bis unmöglich. Des Weiteren können Artefakte im Bewegungsapparat durch körperliche Anstrengung vor der Messung durch dessen temporär erhöhten Stoffwechsel die Bildqualität beeinträchtigen. Auch zeigen bestimmte Tumore, wie zum Beispiel Prostata-tumore, keinen erhöhten Glucose-Metabolismus und können so mit [^{18}F]FDG nicht detektiert werden.²² Ein weiteres Problem stellen Entzündungsreaktionen dar, da hier [^{18}F]FDG ebenfalls anreichert und so eine Differenzierung

zwischen Tumor und Entzündung erschwert sein kann. Dies stellt beispielsweise ein Problem nach therapeutischer Bestrahlung des Tumors dar, da umliegendes gesundes Gewebe entzündet sein kann und somit eine schnelle Therapiekontrolle mit [^{18}F]FDG nicht eindeutig ist.

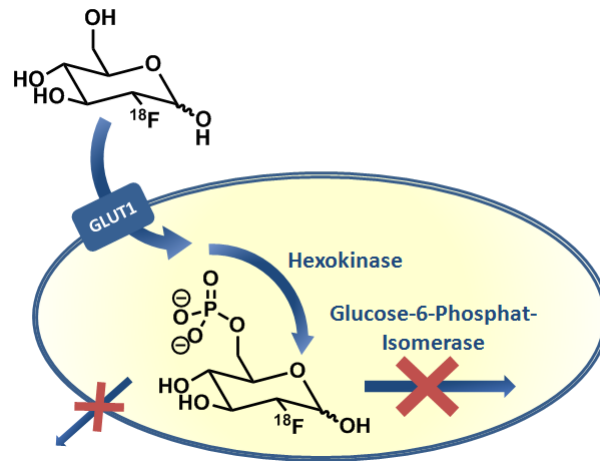


Abb. 7: Vereinfachter Mechanismus der [^{18}F]FDG-Anreicherung. [^{18}F]FDG wird über den Glucosetransporter GLUT1 in die Zelle aufgenommen und durch die Hexokinase phosphoryliert. Eine weitere Metabolisierung kann nicht stattfinden, ebenso ist eine passive Diffusion aus der Zelle nicht möglich.

1.3 Gastrointestinale Stromatumoren

Mit 482.510 Neuerkrankungen und 223.093 Todesfällen im Jahr 2013 in Deutschland ist Krebs eine der häufigsten Erkrankungen.²³ Dabei stellen Prostatakrebs bei Männern (25.3%) und Brustkrebs bei Frauen (30.8%) die häufigsten Tumorarten dar, gefolgt von Lungen- und Darmkrebs. Dass insgesamt die Anzahl an Krebsdiagnosen zunimmt, liegt zum einen an den verbesserten diagnostischen Methoden, zum anderen am demographischen Wandel, da mit zunehmendem Alter das Risiko an Krebs zu erkranken, stark zunimmt. Dennoch sanken die altersstandardisierten Sterberaten in den letzten Jahren (Abb. 8), was einerseits mit einer Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten begründet wird, andererseits auch an einer erhöhten Erkennung der Tumore in einem frühen, besser therapierbaren Stadium liegt. So führte beispielsweise das zwischen 2005 und 2009 eingeführte Mammographie-Screening-Programm zu einem deutlichen Anstieg der Krebsdiagnosen für frühe Brustkrebsstadien bei Frauen zwischen 50 und 69 Jahren, während aber fortgeschrittene Tumore seltener diagnostiziert wurden. Die frühe Erkennung führt nicht nur zu einer schonenderen Therapie für die Patienten, sondern zusätzlich auch zu einer Senkung der Sterblichkeit, was die hohe Bedeutung einer möglichst frühen Diagnose unterstreicht.²⁴

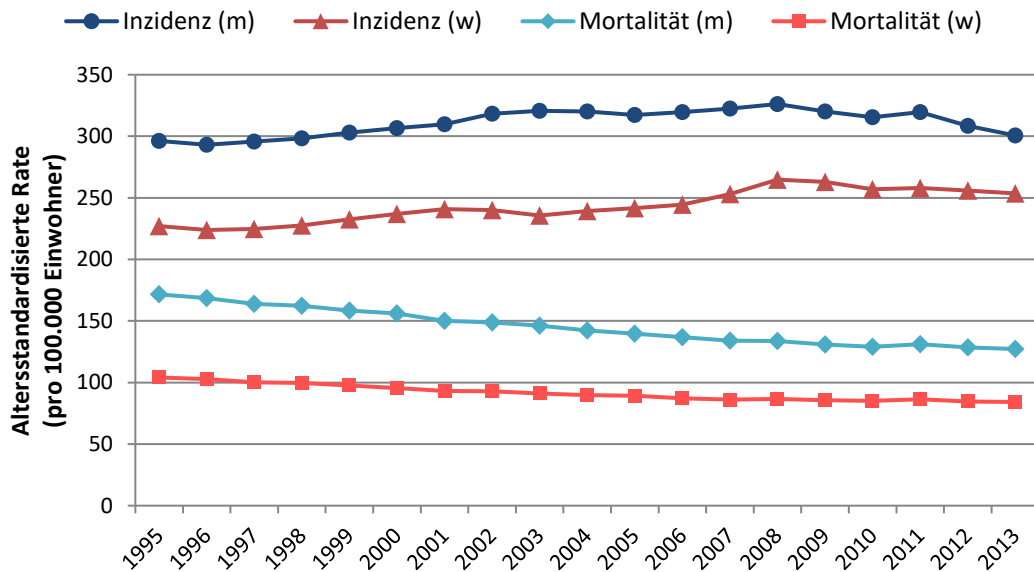


Abb. 8: Entwicklung der altersstandardisierten Raten an Erstdiagnosen und Todesfällen von 1995-2013.²³

Gastrointestinale Stromatumore (GIST) stellen mit jährlich etwa 1.200 Neuerkrankungen in Deutschland eine seltene Tumorerkrankung dar. Die häufigsten Lokationen sind Magen (60%) und Dünndarm (30%), allerdings können GIST auch in Speiseröhre, Dickdarm und Rektum vorkommen. Der Ursprung dieser Tumorart liegt in den interstitiellen Cajal-Zellen, die als Schrittmacher der Peristaltik fungieren und deshalb hauptsächlich im Gastrointestinal-Trakt vorkommen.²⁵ Da die Tumore keine spezifischen Symptome auslösen, werden sie meistens zufällig und erst spät entdeckt, was dazu führt, dass etwa 20-30% der Betroffenen bei der Erstdiagnose bereits Metastasen aufweisen, vor allem in der Leber und im Peritoneum.²⁶ Erst bei fortgeschrittenem Wachstum des Tumors treten spürbare Symptome wie Schluckbeschwerden, Übelkeit, Verstopfung oder Blutungen in Abhängigkeit von der Lokation des Tumors auf. Im Gegensatz zu den meisten Magen- und Darmkrebsarten handelt es sich bei GIST nicht um Karzinome, sondern um Sarkome, weshalb sie sich in der Biologie und damit auch in der Therapie von diesen unterscheiden. Während Karzinome ihren Ursprung in epithelalem Gewebe (Deck- und Drüsengewebe) haben, entstehen Sarkome aus mesechymalen Zellen (u.a. Binde- und Stützgewebe) und weisen dementsprechend unterschiedliches Verhalten auf. Obwohl die meisten GIST (bis zu 95%^{27,28}) Mutationen in der Rezeptor-Tyrosinkinase KIT besitzen und damit verglichen mit anderen Tumorarten relativ homogen scheinen,²⁹ wird durch Tumorlokation und die genaue Stelle der Mutation innerhalb von KIT dennoch eine größere Variabilität erreicht. So existieren beispielsweise drei histologische Subtypen: spindelzellförmig (70%), epitheloid (20%) und gemischtzellig (10%).³⁰ Ebenso ist für die Therapieplanung entscheidend, in welchem Exon die Mutationen vorliegen, da sich hieraus das Ansprechen auf

Tyrosinkinase-Inhibitoren bestimmen lässt. Da GIST weder auf konventionelle Bestrahlung, noch auf zytotoxische Chemotherapie ansprechen, stellt die vollständige Resektion des Tumors die Behandlungsmöglichkeit der Wahl dar, sofern eine Operation möglich ist.^{26,31} Dabei muss allerdings beachtet werden, dass durch eine nicht vollständige Resektion des Tumors sowie aller Metastasen, intraperitoneale Rupturen und/oder Blutungen die Bildung eines Rezidivs fast unausweichlich wird. Die Prognosen fielen damit für Betroffene lange Zeit schlecht aus und die mittlere Überlebenszeit betrug 19 Monate bei metastasierendem GIST.³² 2002 wurde Imatinib (Handelsname: Glivec (EU), Gleevec(USA)) von der FDA zur Behandlung von GIST zugelassen, was zu einer signifikanten Erhöhung der mittleren Überlebenszeit auf über 50 Monate führte.^{33,34} Der Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) Imatinib stellt damit inzwischen einen wichtigen Faktor dar, sowohl in der neoadjuvanten als auch der adjuvanten Therapie. Als Neoadjuvans kann Imatinib eine Reduktion der Tumorgroße bewirken, um eine operative Resektion zu vereinfachen, in der adjuvanten Therapie, die über mehrere Jahre andauern kann, senkt Imatinib die Wahrscheinlichkeit einer Rezidivbildung. Trotz des erfolgreichen Einsatzes von Imatinib entwickeln die Tumore langfristig Resistenzen, wodurch der Einsatz weiterer TKI wie Sunitinib oder Regorafenib notwendig wird, die unspezifischer wirken und dadurch mehr Nebenwirkungen aufweisen.

1.3.1 KIT und Imatinib

Ciba-Geigy (heute Novartis) publizierte 1997 eine Reihe von Phenylaminopyrimidin-Derivaten als Inhibitoren der Bcr-Abl-Tyrosinkinase zur Behandlung von chronischer myeloischer Leukämie (CML).³⁵ Der potenteste und selektivste Kandidat dieser Verbindungen – Imatinib – erhielt 2001 in den USA die Zulassung der FDA zur Behandlung von CML und wird seit 2002 auch zur gezielten Krebstherapie (*targeted therapy*) bei GIST eingesetzt, da in beiden Fällen erhebliche Therapieerfolge erzielt werden konnten.³⁶⁻³⁸ Durch die selektive Inhibition der Tyrosinasen Abl, KIT und PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*) bleiben die Nebenwirkungen trotz der hohen Tagesdosis von 400-800 mg vergleichsweise gering und die Compliance der Patienten wird durch die orale Einnahme zudem weiter gesteigert. Aus diesen Gründen wird Imatinib inzwischen zur Behandlung von weiteren Krankheitsbildern verwendet, wie beispielsweise der akuten lymphatischen Leukämie und der systemischen Mastozytose.

Nach oraler Einnahme liegt die Bioverfügbarkeit bei 98% und der maximale Plasmaspiegel wird innerhalb von 4 Stunden erreicht, wobei die Plasmahalbwertszeit bei etwa 17 Stunden liegt.³⁹ Die Ausscheidung erfolgt dabei hauptsächlich hepatobiliär über den Fäzes (83-87%) und nur zu einem geringen Teil über den Urin,^{39,40} was zum einen an der hohen Lipophilie von Imatinib und zum anderen durch die Metabolisierung verursacht wird. Diese findet hauptsächlich in der Leber

durch das Isoenzym Cytochrom P450 3A4 über einen oxidativen Abbau statt, bei dem *N*-Oxide am Pyridin- und Piperazin-Ring entstehen, sowie Hydroxylierungen z.B. an der Methylgruppe, stattfinden (Abb. 9).

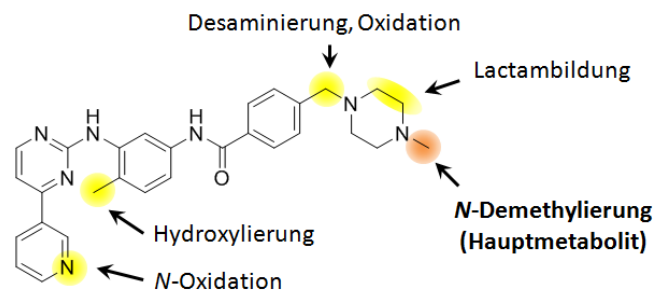


Abb. 9: Strukturformel von Imatinib. Hervorgehoben sind die wichtigsten Stellen der Metabolisierung.⁴⁰

Dem Hauptmetaboliten *N*-Desmethylimatinib (Norimatinib) gilt eine besondere Bedeutung, da dessen biologische Aktivität in etwa der von Imatinib entspricht, die Plasmahalbwertszeit jedoch bis zu viermal höher ist. Des Weiteren wurde in *in vitro*-Versuchen festgestellt, dass Norimatinib in Zellen eine höhere Anreicherung aufweist als Imatinib, da durch die Demethylierung die Hydrophilie und damit auch die Bioverfügbarkeit erhöht werden kann.³⁹ Der Verlust dieser Methylgruppe wirkt sich kaum auf die Affinität aus, da der Piperazin-Ring keine spezifischen Wechselwirkungen eingeht und sich nicht im aktiven Zentrum befindet. Die Pyridinylpyrimidin-Einheit hingegen wechselwirkt mit der ATP-Bindestelle so, dass der Adenin-Ring des ATPs keine Bindung mehr mit der Kinase eingehen kann. Am wichtigsten für die Selektivität ist jedoch die Benzamid-Einheit, vor allem deren Methylgruppe. Entscheidend ist hierbei, dass Imatinib nicht mit der hochkonservierten, aktiven Form der ATP-Bindestelle wechselwirkt, sondern an die inaktive Konformation der Kinase bindet, die sich von den inaktiven Formen anderer Tyrosinkinase deutlich unterscheidet.⁴¹ Dadurch bleibt die Inhibition anderer Tyrosinkinase aus, wodurch sich wiederum die vergleichsweise geringen Nebenwirkungen von Imatinib – vor allem im Vergleich zu konventioneller Chemotherapie – ergeben.

Die Regulierung von KIT (auch: c-Kit, CD117, Stammzellfaktor-Rezeptor) wird normalerweise durch Bindung des Stammzellfaktors (SCF) hervorgerufen, die zur Dimerisierung zweier KIT-Monomere führt. Dadurch ergeben sich strukturelle Veränderungen, die zur Aktivierung der Kinase-Domänen führen und damit zur gegenseitigen Phosphorylierung der Tyrosin-Reste am jeweils anderen KIT-Monomer. An den Phospho-Tyrosinen können nun Signalmoleküle binden und dort entweder von KIT phosphoryliert werden oder weitere Signalmoleküle phosphorylieren. Auf diese Weise wird eine komplexe Kaskade über die Signalwege

PI3K/mTOR/AKT und RAS/RAF/MAPK in Gang gesetzt, die Proliferation, Adhäsion, Apoptose und Differenzierung beeinflusst (Abb. 10 A).⁴²⁻⁴⁴

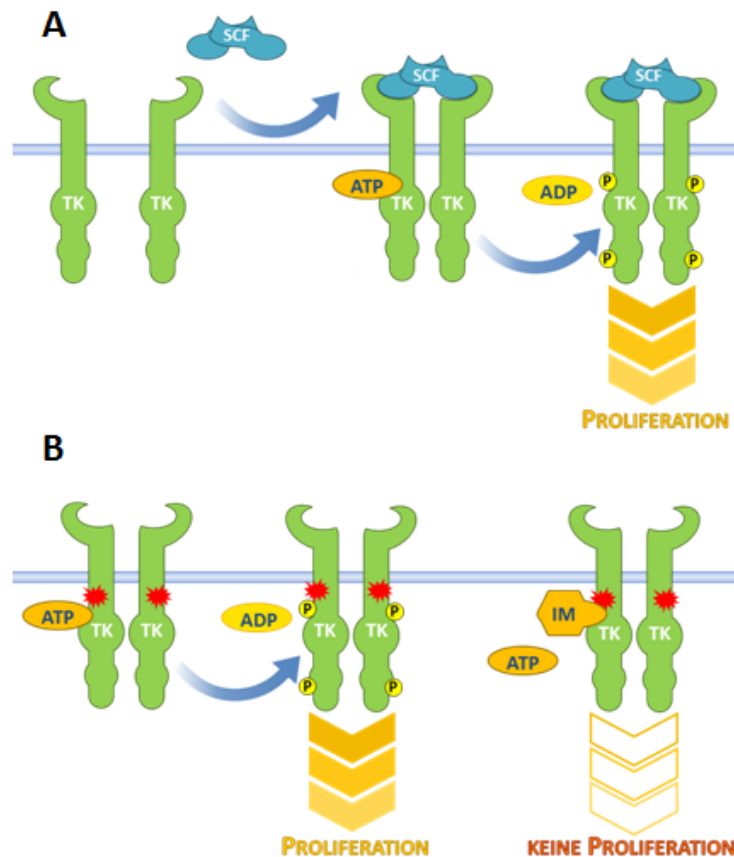


Abb. 10: A) Funktionsweise von KIT: Bindung des Stammzellfaktors (SCF) führt zur Dimerisierung von KIT und damit zur Aktivierung der Tyrosinkinasen (TK), die über Phosphorylierung (P) weiterer Moleküle eine Signalkaskade in Gang setzen, die zur Proliferation führt. B) Mutationen (rote Markierung) in KIT führen zur Aktivierung der TK in Abwesenheit von SCF. Durch TKIs wie Imatinib (IM) wird die Signalkaskade unterbrochen.⁴⁴

Zusätzlich zu den extrinsischen Faktoren wird die Signalkaskade durch die selbst-inhibierende Juxtamembran-Region (Exon 11) reguliert, die das DFG-Bindemotiv (Asp-Phe-Gly) der Kinase sterisch blockiert.⁴⁵ Bis zu 95% aller GIST besitzen Mutationen in KIT,^{27,28} die zu einer dauerhaften Aktivierung der Kinase führen und somit die Zelle unabhängig vom Wachstumsfaktor SCF zur Proliferation anregt (Abb. 10 B). Mutationen in der Juxtamembran-Region (Exon 11) etwa führen zur Aufhebung der Selbst-Regulierung und damit zu einem *gain-of-function*, also einer erhöhten Aktivität. Die häufigsten Mutationen in GIST befinden sich in Exon 11 (Juxtamembran-Region) und Exon 9 (extrazelluläre Domäne), welche zusammen 80-90% der Primärmutationen bei GIST darstellen (Abb. 11). Dabei bleibt das aktive Zentrum der Kinase jedoch unverändert, sodass mit Hilfe von Kinase-Inhibitoren wie Imatinib eine externe Regulierung der Aktivität ermöglicht wird. Die seltenen

Primärmutationen in Exon 13 und 17 hingegen führen zu einer Veränderung der Tyrosinkinase-Domäne, wodurch der Einsatz von Imatinib erfolglos bleibt.

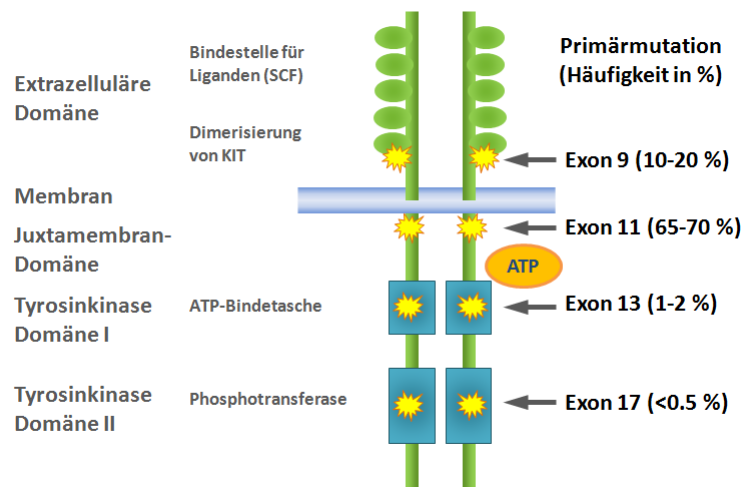


Abb. 11: Schematischer Aufbau von KIT mit den Lokationen der Primärmutationen und der dazugehörigen Häufigkeit.^{25,30}

Da allerdings nicht nur direkt das katalytische Zentrum an der Phosphorylierung beteiligt ist, können auch Mutationen in anderen Bereichen zu einer Resistenz führen. Wichtig für die Konformation der Kinase ist die α -C-Helix, die das katalytische Zentrum je nach Position verschließt bzw. öffnet. Die Positionierung von ATP und die Übertragung der Phosphatgruppe erfolgt durch den Glycin-reichen *loop*, einen Lysinrest und den *activation loop*, der ein DFG-Bindemotiv enthält. Durch die Bindung von Imatinib wird nun sowohl die α -C-Helix, als auch der *activation loop* derart verschoben, dass die Kinase in der inaktiven Konformation fixiert wird und nicht zurück in die aktive Konformation wechseln kann. Mutationen, die diese Konformationsänderung verhindern, können folglich zu einer Resistenz gegenüber Imatinib führen und werden meist erst während der TKI-Therapie erworben.

Diese Sekundärmutationen entwickeln sich in 40-50% der Patienten innerhalb von zwei Jahren^{46,47} und befinden sich meist zwischen Exon 13 und 17. Dies verursacht Änderungen in den Tyrosinkinase-Domänen, die zur Resistenz gegenüber Imatinib führen. Dabei handelt es sich beispielsweise um Gatekeeper-Mutationen wie T670I oder V654A in der ATP-Bindetasche oder um Mutationen im *activation loop* der Kinase. Aufgrund der hohen Selektivität von Imatinib gegenüber wenigen Tyrosinkinasen (Abl, KIT, PDGFR) verursachen Sekundärmutationen in der Bindetasche meistens eine enorme Verminderung der Bindungsaffinität. Insgesamt erwerben $\frac{2}{3}$ aller Patienten im Lauf der First-Line-Therapie solche Sekundärmutationen⁴⁸⁻⁵² und müssen dadurch mit unspezifischeren TKIs behandelt werden, die stärkere Nebenwirkungen mit sich bringen.

1.3.2 DOG1

Bei DOG1 handelt es sich um einen Kalzium-aktivierten Chloridionenkanal (*CaCC* = *calcium activated chloride channel*), der unter anderem im Epithel der Atemwege und des Darms, sowie der glatten Muskulatur und in den interstitiellen Cajal-Zellen vorkommt.⁵³⁻⁵⁵ Neben DOG1 (*discovered on GIST 1*)⁵⁶ ist dieser Ionenkanal unter weiteren Namen wie ANO1 (*anoctamin-1*), TMEM16A (*transmembrane member 16A*) oder ORO1 (*oral cancer overexpressed protein 2*) bekannt. Er spielt zum einen eine Rolle in der epithelialen Chloridionen-Sekretion, zum anderen beeinflusst er die Schrittmacher-Funktion der interstitiellen Cajal-Zellen und somit die Peristaltik des Darms.⁵⁷ Dabei wird die Aktivität des Ionenkanals über die Kalziumkonzentration durch autokrine und parakrine Mechanismen gesteuert. Durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration auf 0.2-1.0 μM wird DOG1 aktiviert und Chloridionen können entlang des Konzentrations-Gradienten transportiert werden.^{58,59} In Epithel-Zellen beispielsweise liegt eine hohe intrazelluläre Chlorid-Konzentration vor, die bei Aktivierung von DOG1 deren Efflux bewirkt und letztendlich dazu führt, dass der transepitheliale Wasser-Transport erhöht wird. In den Atemwegen spielt dieser Mechanismus eine Rolle bei der mukoziliären Reinigung.⁶⁰

In der Onkologie ist DOG1 vor allem aufgrund seiner starken Expression in 98% aller GIST interessant. Die Überexpression von DOG1 selbst scheint jedoch nicht für die Tumorentwicklung verantwortlich zu sein, sondern könnte mit dem Genomabschnitt zusammenhängen, auf dem neben DOG1 ebenfalls Gene für andere tumorassoziierte Proteine kodiert werden.^{61,62} Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich weder Inhibition, noch Knockout von DOG1 *in vitro* auf die KIT-Aktivität, die Imatinib-Sensitivität und die Proliferation der GIST-Zellen auswirken. *In vivo* konnte jedoch in manchen GIST-Zelllinien eine Reduktion der Proliferationsaktivität beobachtet werden.⁶³

Verglichen mit anderen Ionenkanälen stellt DOG1 eine Besonderheit dar, da nicht nur die Primärstruktur keine Ähnlichkeit zu anderen Chlorid-Kanälen besitzt, sondern auch keine typische Kalzium-bindende Domäne gefunden werden kann.^{64,65} Das DOG1-Protein liegt als Dimer vor, bestehend aus jeweils 8 transmembranen Domänen, von denen die 5. und 6. Domäne eine Pore formen.⁶⁶ Da die Aktivierung, beziehungsweise Inhibition von DOG1 und anderen Chlorid-Ionen-Kanälen möglicherweise Therapieansätze zu Krankheitsbildern wie zystischer Fibrose, Asthma oder Schmerzen liefern kann, stellt die genauere Untersuchung von DOG1 eine vielversprechende Forschungsthematik dar.⁶⁷⁻⁶⁹ Besonders hervorzuheben ist dabei ein High-Throughput-Screening aus dem Jahr 2011, bei dem etwa 100.000 *small molecules* (niedermolekulare Verbindungen, $M \leq 900 \text{ g/mol}$) bezüglich ihres Effekts auf DOG1 evaluiert wurden.^{68,69} Hierbei konnten wichtige Informationen

bezüglich der chemisch-strukturellen Eigenschaften der Inhibitoren und Aktivatoren gewonnen werden, die zur Aufklärung der Struktur und Funktion von DOG1 beitragen können.

Da DOG1 auf 98% aller GIST exprimiert wird, wird er in der Immunohistochemie bereits als Biomarker verwendet, um GIST von anderen Tumoren zu unterscheiden.⁷⁰ Obwohl dieser Ionenkanal bei anderen Sarkomen fast nicht exprimiert wird,⁶³ spielt DOG1 bei einigen Karzinomen, unter anderem den Kopf-Hals-Karzinomen (*HNSCC = head and neck squamous-cell carcinoma*), dem Ösophaguskarzinom (*ESCC = esophageal squamous-cell carcinoma*) und dem Mammakarzinom, eine wichtige Rolle für die Prognose.^{71,72} Dennoch stellt DOG1 einen spezifischen und zuverlässigen Tumor-Marker für GIST in der klinischen Routine dar, teilweise auch bei KIT-negativen GIST.⁷³

1.3.3 Nuklearmedizinische Diagnostik von GIST

2012 wurde innerhalb der deutschen Arbeitsgruppe zur Bildgebung von GIST diskutiert, welche Modalitäten für das Staging, die Nachsorgeuntersuchung und die Responsekontrolle bei GIST sinnvoll sind.⁷⁴ Dabei stellte sich die Computertomographie als Standard-Methode aufgrund der hohen Verfügbarkeit und der geringen Kosten heraus, obwohl gerade das Therapieansprechen nicht immer zuverlässig mit der CT überprüft werden kann. Dies hängt zum einen damit zusammen, dass die Progression der Krankheit nicht immer mit einer Vergrößerung der Läsionen einhergeht, sondern fokal als Läsion innerhalb der Läsion (*nodule in a mass*) auftritt. Andererseits zeigt sich ein erfolgreiches Therapieansprechen auch nicht gleich mit einer Reduktion der Tumormasse, wodurch die CT in diesen Fällen keine eindeutigen Aussagen treffen kann. Zudem sollte eine MRT-Untersuchung bei Verdacht auf kleine Läsionen durchgeführt werden, da diese mittels CT – vor allem in der Leber – oft nicht detektierbar sind. In Fällen, in denen weder mit CT, noch mit MRT eine klare Aussage getroffen werden kann, sollte ein [¹⁸F]FDG-PET-Scan durchgeführt werden. Dabei bietet die Bildgebung des Glucose-Metabolismus eine hohe diagnostische Genauigkeit, die vor allem in der frühen Responsekontrolle von metastasierendem GIST einen großen Mehrwert darstellt.⁷⁵ Somit ist es möglich den Erfolg von neoadjuvanten Therapien mit Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Imatinib bereits wenige Tage nach Therapiebeginn zu überprüfen (Abb. 12).

Neben den hohen Kosten und der limitierten Verfügbarkeit steht dem routinemäßigen Einsatz von [¹⁸F]FDG-PET jedoch noch entgegen, dass 10-20% der GIST-Läsionen non-avid gegenüber [¹⁸F]FDG sind, also keine erhöhte Anreicherung zeigen.⁷⁵⁻⁷⁷ Somit stellt die Bildgebung von GIST durch [¹⁸F]FDG-PET zwar prinzipiell eine gute Methode dar, leidet allerdings unter den bereits erwähnten Problemen von [¹⁸F]FDG (Abb. 13, Abb. 1).

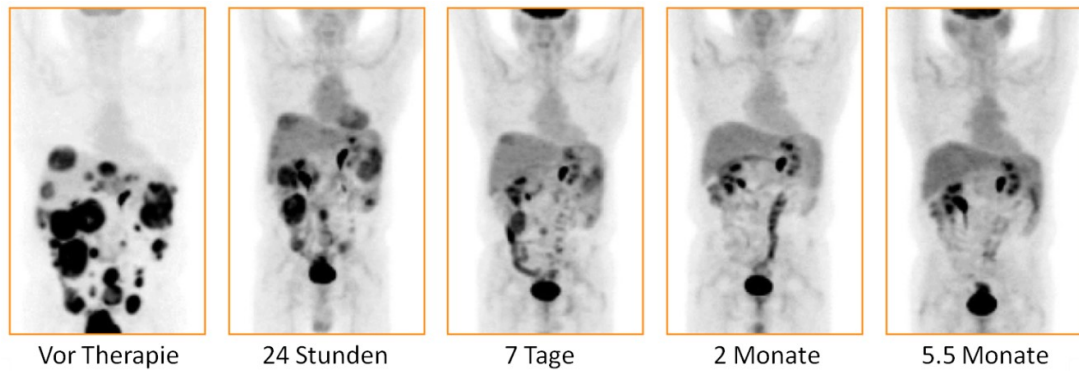


Abb. 12: Therapiekontrolle eines Patienten mit metastasierendem gastrointestinalen Stromatumor (GIST) mittels [^{18}F]FDG-PET vor bzw. nach Therapiebeginn mit Imatinib. Bereits 24 Stunden nach Therapiebeginn zeigen mehrere Läsionen einen verminderten Glucose-Stoffwechsel, was auf das Ansprechen der Therapie deutet. 2 bzw. 5.5 Monate nach Therapiebeginn kann nur noch die renale Ausscheidung des Radiotracers beobachtet werden.⁷⁸

So kann GIST mittels [^{18}F]FDG-PET auch nicht von anderen Tumoren unterschieden werden, wodurch eine invasive Biopsie zur genauen Abklärung notwendig bleibt. Weiterhin können mit [^{18}F]FDG-PET keine molekularen Informationen über den Tumor erlangt werden. Gerade bei GIST wäre jedoch eine Darstellung des Mutationszustandes von KIT von großer Relevanz, da sich dieser während der Therapie mit TKIs wie Imatinib in den meisten Fällen ändert und somit zu einer Resistenz gegenüber diesen Wirkstoffen führt. Auch hierfür sind bisher Biopsate notwendig, die erst über immunohistochemische und genetische Analysen Aufschluss über den Mutationszustand geben können. Dies stellt allerdings bei multimetastasierten Patienten ein Problem dar, da sich in jeder Läsion unterschiedliche Sekundärmutationen ausbilden können und die Biopsie einer Läsion somit keine repräsentative Aussage liefern kann.

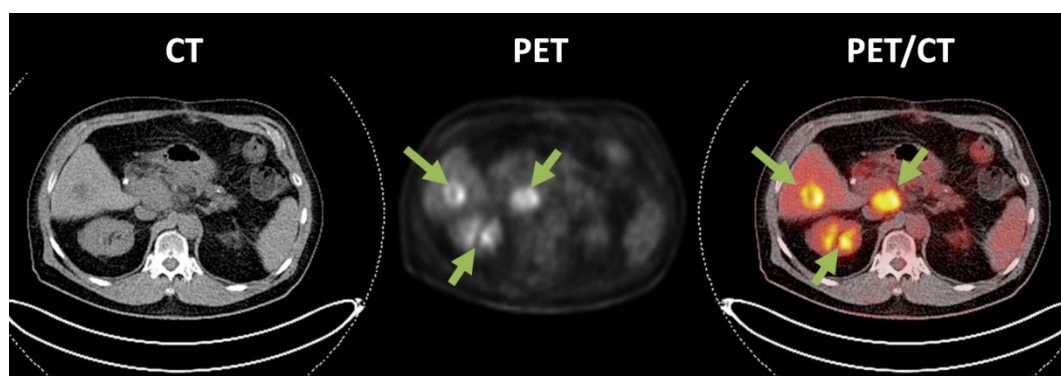


Abb. 13: Bildgebung eines GIST-Patienten mittels [^{18}F]FDG-PET/CT (transaxialer Schnitt). In der PET-Aufnahme sind die drei Läsionen (grüne Markierung) deutlich besser sichtbar als in der CT-Aufnahme.

2 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war die Synthese, *in vitro*- sowie *in vivo*-Evaluierung neuartiger ^{18}F -markierter Radiotracer zur Bildgebung von gastrointestinalen Stromatumoren. Dabei sollte einerseits ein Radiotracer entwickelt werden, mit dem sich GIST spezifisch darstellen lässt und andererseits ein weiterer Radiotracer zur Differenzierung von GIST hinsichtlich der Imatinib-Sensitivität. Diese unterschiedlichen Sensitivitäten beruhen auf Sekundärmutationen in der Rezeptor-Tyrosinkinase KIT, die zur Entwicklung von Resistenzen führen können. Um ein Therapieansprechen frühzeitig nicht-invasiv abschätzen zu können, sollte der potentielle Radiotracer bezüglich Struktur, und damit Spezifität und Affinität der Leitstruktur Imatinib möglichst ähnlich sein. Bisher publizierte Versuche zu ^{18}F -markierten Imatinib-Derivaten^{79,80} nutzten dazu den Piperazin-Ring, da dieser nicht an der Bindung zu KIT beteiligt ist^{39,45,79,80} und ersetzten die Methyl-Gruppe des Piperazin-Rings mit dem Radiolabel in Form einer [^{18}F]Fluorethyl-Gruppe. Trotz der vielversprechenden Resultate der *in vitro*-Evaluierung zeigten die PET-Untersuchungen von tumortragenden Mäusen eine hohe Aktivitätsanreicherung in der Leber und im Gastrointestinal-Trakt, was in der hohen Lipophilie des Radiotracers begründet ist. Des Weiteren zeigten Metabolisierungsstudien von Imatinib eine rasche Demethylierung am Piperazin-Ring,⁴⁰ sodass sich das Einführen des Radiolabels an dieser Position vermutlich ungünstig auf die Stabilität des Radiotracers auswirken könnte.

Vor dem Hintergrund dieser Studien sollte ein auf Imatinib basierender Radiotracer entwickelt werden, dessen ^{18}F -Radiolabel metabolisch stabiler gebunden ist. Gleichzeitig sollte eine Reduktion der unspezifischen Akkumulation in Leber und Gastrointestinal-Trakt durch Senkung der Lipophilie erreicht werden, um eine Verlangsamung der Metabolisierung durch Cytochrom P450 Enzyme^{81,82} und somit eine höhere Stabilität des Radiotracers zu erreichen. Unter Berücksichtigung der für die Spezifität notwendigen Strukturelemente, der Metabolisierung von Imatinib und der radiochemischen Möglichkeiten wurde als Position für die Radiomarkierung der Pyridin-Ring als beste Option angesehen. Da der demethylierte Hauptmetabolit Norimatinib bei deutlich reduzierter Lipophilie eine fast identische biologische Aktivität wie Imatinib aufweist,³⁹ sollte in dieser Arbeit Norimatinib als Leitstruktur dienen. Zur Einführung des Radiolabels sollte ein entsprechendes Nitropyridin-Derivat synthetisiert werden, welches durch Substitution der Abgangsgruppe mit [^{18}F]Fluorid hohe Ausbeuten ermöglichen sollte.⁸³

Nach erfolgreicher Etablierung der Radiosynthese von [^{18}F]Fluor-Norimatinib sollten dessen Eigenschaften bezüglich Lipophilie, Serumstabilität und Bindungsaffinität *in vitro* untersucht werden. Da die Tyrosinkinase-Domäne von KIT intrazellulär vorliegt und kein aktiver Transport von Imatinib erfolgt, sollte gezeigt werden, dass der

Radiotracer trotz reduzierter Lipophilie passiv durch die Zellmembran diffundieren und somit sein Ziel erreichen und dort ausreichend binden kann. Hierzu sollten drei GIST-Zelllinien (GIST-T1, GIST882, GIST430) mit unterschiedlicher Imatinib-Sensitivität, sowie die Imatinib-sensitive CML-Zelllinie K562 als Referenz verwendet werden.

Um die Pharmakokinetik des Radiotracers und dessen Anreicherung im Tumorgewebe zu untersuchen, sollten *in vivo*-Evaluierungen mittels Kleintier-PET/CT an tumortragenden Balb/c SCID-Mäusen durchgeführt werden. Des Weiteren sollte der Einfluss eines ko-injizierten CYP3A4-Inhibitors auf die Pharmakokinetik des Radiotracers in initialen Versuchen untersucht werden.

Um GIST unabhängig von ihrer Imatinib-Sensitivität möglichst spezifisch mittels PET darstellen zu können, sollte zusätzlich ein Radiotracer entwickelt werden, der ein weiteres Target neben KIT auf GIST adressiert. Hierzu wurde der Kalzium-aktivierte Chloridionenkanal DOG1 gewählt, da dieser auf 98% aller GIST vorkommt⁷⁰ und bereits in der Immunohistochemie routinemäßig zum spezifischen Nachweis von GIST verwendet wird. Da der dort eingesetzte Antikörper an eine intrazelluläre Domäne des Kanals bindet und somit nicht für die *in vivo*-Bildgebung geeignet ist,⁸⁴ sollte basierend auf literaturbekannten niedermolekularen DOG1-Inhibitoren und –Aktivatoren^{68,69} ein ¹⁸F-markierter Radiotracer synthetisiert werden. Der Fokus dieses Teils der Arbeit sollte auf der Entwicklung geeigneter Markierungsstrategien zur Einführung von Fluorid in die vielversprechendsten Verbindungen liegen. Nach erfolgreicher Radiosynthese sollte ebenfalls eine initiale *in vivo*-Evaluierung an tumortragenden Balb/c SCID-Mäusen mittels Kleintier-PET/CT durchgeführt werden, um erste Eindrücke der pharmakokinetischen Verteilung des Radiotracers zu gewinnen.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Organische-chemische Synthesen

3.1.1 Imatinib-Derivate

Als Vorläufer für die Radiosynthese von [^{18}F]Fluor-Norimatinib wurde ein entsprechender Vorläufer mit einer Nitro-Abgangsgruppe (Abb. 14) gewählt, da diese exzellente Eigenschaften in der Radiosynthese von [^{18}F]Fluorpyridinen besitzt, und zusätzlich eine vergleichsweise einfache Reaktionsführung erlaubt. Die systematischen Untersuchungen von Dolci et al.⁸³ zur Radiosynthese von [^{18}F]Fluorpyridinen lieferten dazu wichtige Erkenntnisse, die im Folgenden kurz erläutert werden. Halogenide eignen sich in diesem Fall nicht als Abgangsgruppen, da diese – wenn überhaupt – nur bei Temperaturen von über 180 °C zufriedenstellende Ergebnisse liefern würden und sich vor allem der Chlorpyridin-Vorläufer bei der Aufreinigung aufgrund der ähnlichen chemischen Eigenschaften nur schlecht vom gewünschten Produkt abtrennen ließe. Eine deutlich bessere Abgangsgruppe als die Halogenide stellt der Trimethylammonium-Substituent dar, der schon ab 120 °C hervorragende radiochemische Ausbeuten erlaubt und sich einfach vom Produkt abtrennen lässt. Allerdings würde sich die Synthese eines solchen Vorläufers sehr schwierig gestalten, gerade wegen der Reaktivität der Trimethylammonium-Abgangsgruppe. Diese könnte deshalb erst im letzten Schritt der organischen Synthese des Vorläufers durch Methylierung einer Dimethylamino-Gruppe eingeführt werden. Dabei würden jedoch die im Imatinib-Gerüst vorhandenen sekundären und tertiären Amine ebenfalls methyliert, weshalb eine Synthese dieses Vorläufers als wenig erfolgversprechend angesehen wurde. Die Nitro-Abgangsgruppe stellte in diesem Fall die beste Option dar, da sich nicht nur die organische Synthese im Vergleich zur Trimethylammonium-Gruppe als realisierbar eingestuft wurde, sondern sich auch hohe radiochemische Ausbeuten und eine einfachere Aufreinigung als bei den Halogeniden erwarten ließen.

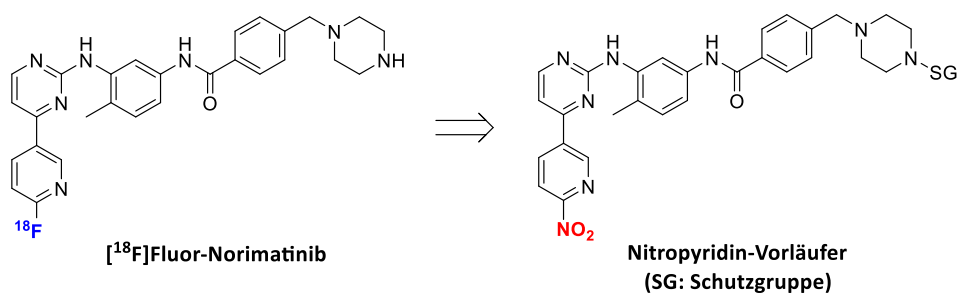


Abb. 14: Strukturen des Produktes [^{18}F]Fluor-Norimatinib und des entsprechenden Nitropyridin-Vorläufers.

Die Synthese des Nitropyridin-Derivats stellte dennoch eine Herausforderung dar, da weder die von Zimmermann et al. publizierte Syntheseroute für die Leitstruktur Imatinib (Abb. 15),³⁵ noch andere bekannte Alternativen verwendet werden konnten.⁸⁵ Zum einen ändert sich durch Einbringen einer Nitro-Gruppe die Reaktivität des Moleküls aufgrund der starken Akzeptor-Eigenschaften grundlegend, sodass die Reaktionsbedingungen entsprechend angepasst werden mussten. Zum anderen wird bei der Route von Zimmermann et al. das zur Synthese benötigte Anilin-Intermediat durch Reduktion einer Nitro-Gruppe erhalten. Dieser Schritt würde gleichzeitig die Nitro-Abgangsgruppe am Pyridin-Ring reduzieren, sodass die Generierung der Amino-Funktion des Anilin-Intermediates im Zuge der Nitropyridin-Vorläufer-Synthese über einen anderen Weg erfolgen musste. Auch eine spätere Re-Oxidation des Amino-Pyridins stellte keine praktikable Lösung dar, da hierbei eine Vielzahl an *N*-Oxiden durch Oxidation weiterer Stickstoff-Atome, beispielsweise im Piperazin-Ring, erzeugt werden würde. Unter Berücksichtigung dieser Umstände wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Synthesansätze zur Darstellung des Nitropyridin-Vorläufers und des nicht-radioaktiven Standards Fluor-Norimatinib entwickelt, die im Folgenden im Detail vorgestellt werden.

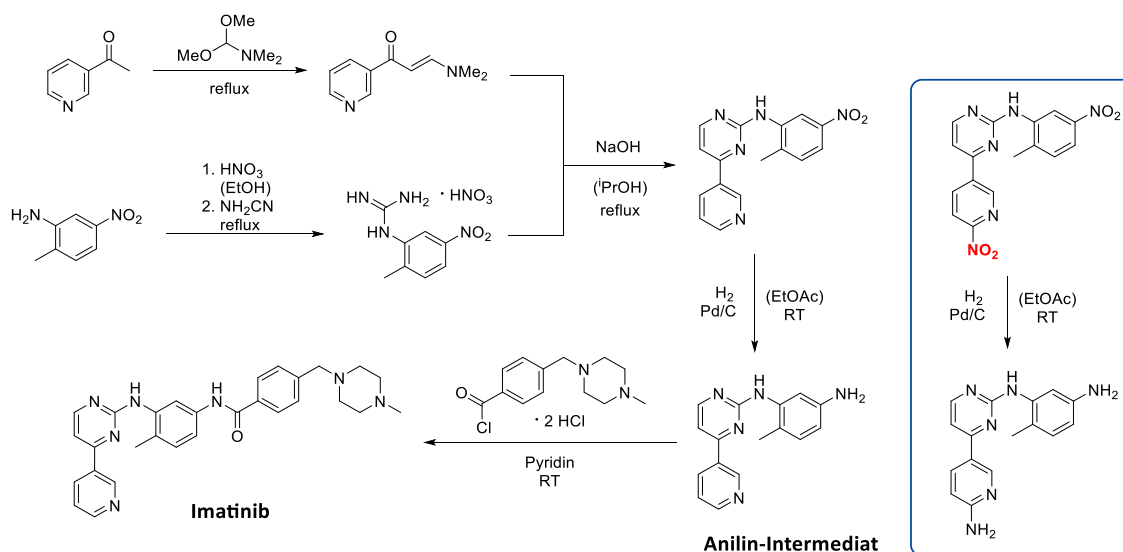


Abb. 15: Darstellung des Synthesewegs von Imatinib nach Zimmermann et al. Blau umrahmt ist die theoretische Reduktion eines Nitropyridin-Derivates und der Verlust der Nitro-Abgangsgruppe (rot).

3.1.1.1 Nitro-Boc-Imatinib: 1. Syntheseweg

Um die Reduktion der Nitro-Abgangsgruppe zu vermeiden, sollte in diesem Ansatz die Nitropyridinylpyrimidin-Einheit erst im letzten Reaktionsschritt mit dem

restlichen Molekül verbunden werden (Abb. 16). Der Vorteil dabei wäre gewesen, dass bis zu diesem Kondensationsschritt die Nitro-Gruppe nicht beachtet werden müsste und somit keine Limitierungen in der Reaktionsführung bestanden hätten.

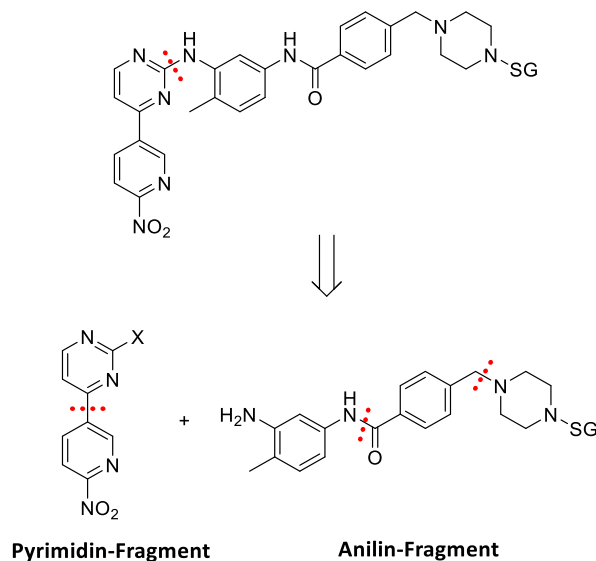


Abb. 16: Retrosynthetische Darstellung des 1. Synthesewegs: Kondensation eines Pyrimidin-Fragments mit einem Anilin-Derivat. Die retrosynthetischen Schnittstellen sind rot gestrichelt gekennzeichnet.

Die Synthese der Nitro-Vorstufe des Anilin-Fragments wurde auf zwei Wegen realisiert. Weg A beschreibt eine Synthese unter milden Bedingungen, die allerdings nur moderate Ausbeuten lieferte (Abb. 17). Der erste Schritt dabei war die Umsetzung von 4-(Chlormethyl)benzoesäure mit 1-Boc-Piperazin unter schwach basischen Bedingungen bei Raumtemperatur. Die nukleophile Substitution des Chlorids durch das Piperazin-Derivat war zwar nach 22 Stunden Reaktionszeit vollständig, allerdings ging durch die zur Aufreinigung nötige Umkristallisation ein Teil des Intermediates **2** verloren, sodass nur eine moderate Ausbeute von 65% erhalten werden konnte. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe des Kopplungsreagenzes HBTU und DIPEA die Carbonsäure **2** aktiviert für die Reaktion zum Amid mit 4-Methyl-3-nitroanilin. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur konnte die Reaktion beendet werden und nach Extraktion als sauberes Produkt **3** mit einer Ausbeute von 59% erhalten werden. Über zwei Stufen konnte so eine Ausbeute von 38% erreicht werden, wobei auf aufwendige Aufreinigungsverfahren verzichtet werden konnte.

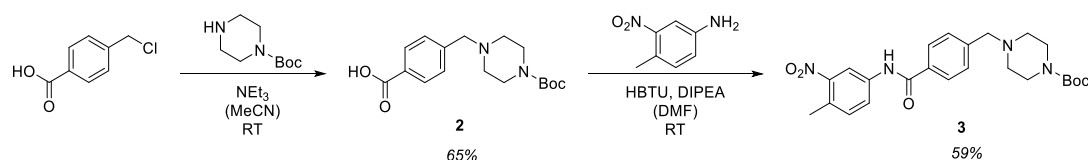


Abb. 17: Darstellung des Weges A für die Synthese von **3**. Alkylierung eines Piperazins mit 4-(Chlormethyl)benzoesäure führt zur Carbonsäure **2**, die unter milden Bedingungen mit einem Anilin zur Nitro-Vorstufe **3** umgesetzt wird.

Um höhere Ausbeuten zu erreichen, wurde ein effizienterer Syntheseweg gesucht (Abb. 18). Dies gelang, indem deutlich härtere Reaktionsbedingungen gewählt wurden. Im ersten Schritt von Weg B wurde 4-(Chlormethyl)benzoesäure in Thionylchlorid erhitzt, um das Säurechlorid zu bilden. Dieses wurde nicht aufgereinigt, sondern direkt für die Umsetzung mit 4-Methyl-3-nitroanilin eingesetzt, um nach säulenchromatographischer Aufreinigung **1** in einer fast quantitativen Ausbeute von 96% zu erhalten. Die anschließende Reaktion von **1** mit 1-Boc-Piperazin unter basischen Bedingungen wurde zuerst bei Raumtemperatur begonnen, später wurde jedoch aufgrund der langsamen Reaktionsgeschwindigkeit die Temperatur auf 50 °C erhöht. Produkt **3** musste zwar wiederum mittels Säulenchromatographie aufgereinigt werden, jedoch lag die Ausbeute bei sehr zufriedenstellenden 92%. Somit stellte Weg B trotz des höheren Aufwandes mit 88% Ausbeute über zwei Stufen die deutlich effizientere Syntheseroute dar.

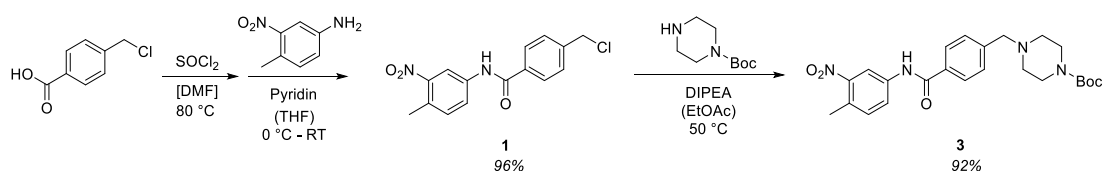


Abb. 18: Darstellung des Weges B für die Synthese von **3**. Erzeugung eines Carbonsäurechlorids mittels Thionylchlorid, gefolgt von der Umsetzung mit einem Anilin-Derivat zu **1**. Die abschließende Alkylierung eines Piperazins mit **1** führt zur Nitro-Vorstufe **3**.

Die Reduktion der Nitro-Vorstufe **3** zum Amin **4** (Anilin-Fragment) gestaltete sich zunächst kompliziert. Eine Palladium-katalysierte Reduktion mit Wasserstoff sorgte zwar für die gewünschte Umwandlung der Nitro-Gruppe in eine Amino-Gruppe, allerdings ging durch hydrolytische Spaltung an der benzylicischen Position der Piperazin-Ring verloren. Eine alternative Möglichkeit Nitro-Gruppen zu reduzieren, stellt die Verwendung von Zinn(II)-chlorid unter Säurezusatz dar. Da jedoch die säurelabile Boc-Schutzgruppe erhalten bleiben sollte, mussten die Reaktionsbedingungen dahingehend angepasst werden. Die Reduktion funktionierte zwar auch ohne Zusatz von Säure, allerdings war Zinn(II)-chlorid selbst sauer genug, um die Boc-Schutzgruppe abzuspalten (Abb. 19).

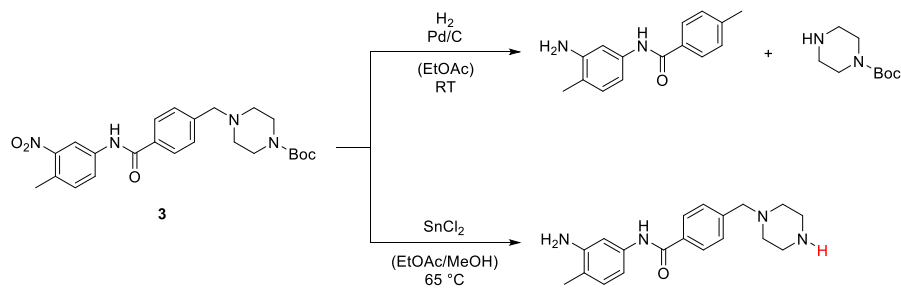


Abb. 19: Die Palladium-katalysierte Reduktion von **3** mit Wasserstoff (oben) führt zum Verlust des Piperazin-Rings durch hydrolytische Spaltung an der benzylic Position. Die Reduktion von **3** mit Zinn(II)-chlorid unter sauren Bedingungen (unten) führt zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe.

Da Zinn(II)-chlorid unter basischen Bedingungen als Zinn(II)-hydroxid ausfällt und somit nicht mehr der Reaktion zur Verfügung steht, konnte der pH-Wert nicht beliebig erhöht werden. Um nun sowohl das Ausfallen der Zinn(II)-Verbindung, als auch eine Abspaltung der Boc-Gruppe zu verhindern, wurden mit Hilfe von Amin-Basen die Reaktionsbedingungen entsprechend angepasst. Bei der Evaluierung verschiedener Amin-Basen stellte sich die Verwendung von Pyridin als optimal heraus, da sowohl eine kurze Reaktionsdauer, als auch eine einfache Aufreinigung zum gewünschten Amin **4** führten. Wurden äquimolare Mengen an Pyridin und Zinn(II)-chlorid verwendet, fiel zwar während der Reaktion langsam Zinnhydroxid aus, allerdings konnte das Edukt innerhalb von 3.5 Stunden komplett reduziert werden. Die Aufreinigung konnte aufgrund des quantitativen Umsatzes durch Filtration und Extraktion bewerkstelligt werden. Die Reduktion von Nitro-Verbindungen zu Aminen mit Zinn(II)-chlorid unter neutralen bis schwach basischen Bedingungen stellt somit eine neue Methode dar, die die Verwendung von säurelabilen Schutzgruppen zulässt. Insgesamt konnte das Amin **4** auf diesem Weg in 4 Stufen mit einer exzellenten Ausbeute von 91% synthetisiert werden (Abb. 20).

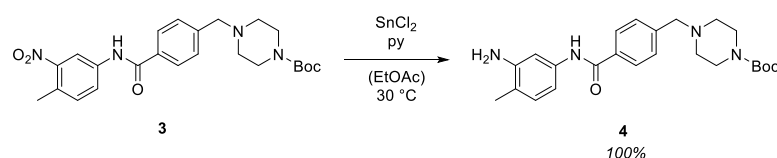


Abb. 20: Reduktion der Nitro-Verbindung **3** zum Amin **4** unter Verwendung von Zinn(II)-chlorid unter basischen Bedingungen.

Die Synthese des Pyridinylpyrimidins sollte über eine Übergangsmetall-katalysierte Kreuzkupplung erfolgen. Da die Negishi-Kupplung von Organozink-Verbindungen mit Heteroarylhalogeniden viele funktionelle Gruppen toleriert,⁸⁶ sollte ausgehend von 5-Brom-2-nitropyridin zuerst mit *n*-Butyllithium ein Halogen-Lithium-Austausch

bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ wasserfrei stattfinden, gefolgt von der Umsetzung mit Zinkbromid. Das entstehende Organozinkbromid sollte dann mit 2,4-Dichlorpyrimidin unter Palladium(II)-Katalyse zum gewünschten Produkt **5** führen (Abb. 21). Zwar zeigte sich nach Zugabe von *n*-Butyllithium eine Gelbfärbung der Reaktionslösung, was für einen erfolgreichen Halogen-Lithium-Austausch spricht, jedoch setzte kurz darauf ein weiterer Farbumschlag nach Braun ein. Die Reaktion führte nicht zum gewünschten Produkt, was wahrscheinlich auf eine Zersetzung der Lithium-Spezies zurückzuführen ist.

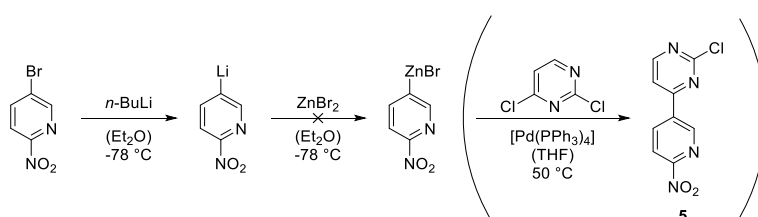


Abb. 21: Negishi-Kupplung von 5-Brom-2-nitropyridin mit 2,4-Dichlorpyrimidin.

Mit der Negishi-Kupplung konnte jedoch das Fluor-Analogen **6**, welches für die Synthese des nicht-radioaktiven Standards benötigt wurde, in sehr guten Ausbeuten synthetisiert werden. Hier zeigte sich nach der Gelbfärbung durch den erfolgreichen Halogen-Lithium-Austausch kein weiterer Farbumschlag bis zur Zugabe des Zinkbromids, wobei sich die Lösung fast vollständig entfärbte. Nach Zugabe des Palladium-Katalysators und 2,4-Dichlorpyrimidins musste darauf geachtet werden, dass die Reaktionslösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur rührte, damit sich das Intermediat aus Pyrimidin und Palladium-Katalysator bilden kann, bevor sich die Organozink-Verbindung zersetzte. Das Fluorpyridinylpyrimidin **6** konnte so in einer Ausbeute von 66% dargestellt werden (Abb. 22).

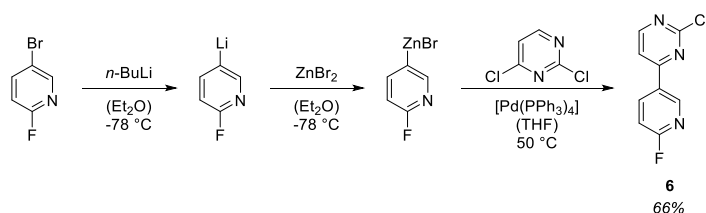


Abb. 22: Negishi-Kupplung von 5-Brom-2-fluoropyridin mit 2,4-Dichlorpyrimidin.

Eine weitere Kreuzkupplung, die tolerant ist gegenüber einer Vielzahl an funktionellen Gruppen, ist die Suzuki-Kupplung.⁸⁶ Dabei werden Organobor-Verbindungen mit Heteroarylhalogeniden Palladium-katalysiert umgesetzt, wobei diese Reaktion im Gegensatz zu Reaktionen mit *n*-Butyllithium gegenüber Wasser unempfindlich ist und inzwischen viele Organobor-Verbindungen kommerziell verfügbar sind. Für die Synthese von **5** wurde somit in einer Suzuki-Kupplung 2-Nitro-5-pyridinylboronsäurepinakolester mit 2,4-Dichlorpyrimidin in wässrigem THF erfolg-

reich umgesetzt. (Abb. 23). Dabei zeigte sich in der Analytik ein fast vollständiger Umsatz der Edukte, während sich kaum Nebenprodukte bildeten. Allerdings zeigten sich große Verluste bei der Aufreinigung des Produktes, sodass aufgrund der Bedingungen von Extraktion und Säulenchromatographie nur geringe Ausbeuten von 3-7% erreicht wurden. Ein neuer Aufreinigungs-Ansatz sollte auf diese Techniken verzichten und die Nebenprodukte, die hauptsächlich aus den Liganden des Palladium-Katalysators bestanden, durch Filtration entfernen. Dazu wurde das Lösungsmittel des Reaktionsgemisches im Vakuum entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und filtriert um polare Verbindungen und Salze zu entfernen. Das Filtrat wurde anschließend in Cyclohexan gefällt, um stark unpolare Verbindungen zu entfernen. Der erhaltene rotbraune Feststoff konnte so zwar nicht vollständig von Nebenprodukten befreit werden, allerdings war die Reinheit laut HPLC-Analytik ausreichend für weitere Reaktionen und die Ausbeute konnte so auf 60% erhöht werden. Bei einem weiteren Aufreinigungs-Ansatz wurde nach Entfernen des Lösungsmittels des Reaktionsgemisches ebenfalls der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und filtriert, jedoch anschließend das Filtrat per Säulenchromatographie aufgereinigt. Die Ausbeute mit dieser Methode war zwar mit 51% etwas geringer, allerdings konnte ein hellgelber Feststoff gewonnen werden, dessen Reinheit mit über 98% (bestimmt per HPLC) deutlich gegenüber der vorherigen Methode gesteigert werden konnte, weshalb diese kombinierte Methode (Filtration und Säulenchromatographie) bevorzugt wurde.

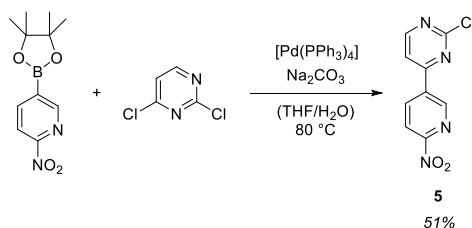


Abb. 23: Suzuki-Kupplung des Nitropyridin-Boronsäurepinakolesters mit 2,4-Dichlorpyrimidin.

Den letzten Schritt in der Synthese des Nitropyridin-Vorläufers und des Fluor-Standards stellte die Kondensation der Fragmente **4** mit **5** bzw. **6** dar. Dazu wurde zunächst ein Ansatz nach einer literaturbekannten Vorschrift ⁸⁷ gewählt, die eine Kopplung von Chlorpyrimidinen mit Anilinen mittels Säure-Katalyse beschreibt. Vor der Synthese des Fluor-Standards wurde zunächst untersucht, ob eine mögliche Substitution des Fluors am Pyridin-Ring Einbuße in der Ausbeute bzw. Schwierigkeiten bei der Aufreinigung hervorrufen könnte. Dazu wurde das Intermediat **6** mit 2-Methyl-5-nitroanilin umgesetzt, wobei nach 28 Stunden Reaktionszeit nur das gewünschte Produkt entstanden war. An dieser Testsynthese konnte somit die Kompatibilität der Reaktion nachgewiesen werden (Abb. 24).

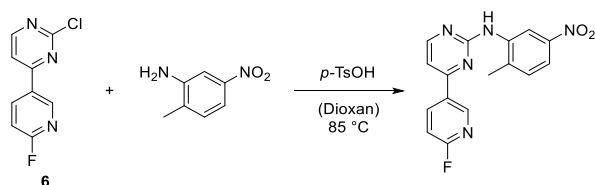


Abb. 24: Säurekatalysierte Kondensation des Chlorpyrimidins **6** mit einem Anilin.

Diese Bedingungen konnten zwar auf die Synthese des Fluor-Standards **8** angewendet werden, führten allerdings nur zu sehr geringen Ausbeuten. Die Verwendung von Essigsäure anstelle von *para*-Toluolsulfonsäure konnte die Ausbeute auf immerhin 5% steigern ohne die Boc-Schutzgruppe abzuspalten, wobei die Aufreinigung aufgrund der Nebenprodukte besondere Bedingungen erforderte. Die säulenchromatographische Aufreinigung führte nur durch Zusatz von Essigsäure im Laufmittel zu einer erfolgreichen Trennung der Verbindungen. Bei der Entfernung des Lösungsmittels stieg zwar die Konzentration an Essigsäure, die zur partiellen Abspaltung der Boc-Schutzgruppe führte, jedoch wurde im finalen Reaktionsschritt diese Schutzgruppe ohnehin entfernt (Abb. 25). Dazu wurde die Fluor-Verbindung **8** in Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur entschützt und mittels Extraktion und HPLC aufgereinigt, um das Produkt **9** in einer Ausbeute von 18% zu erhalten. Da die Extraktion teilweise unter basischen Bedingungen durchgeführt wurde, könnte eine mögliche Hydrolyse zum Hydroxypyridin stattgefunden haben, was die reduzierte Ausbeute erklären würde. Des Weiteren entsteht bei der Entschützung ein reaktives Carbokation, welches zur Entstehung von Nebenprodukten führen kann.

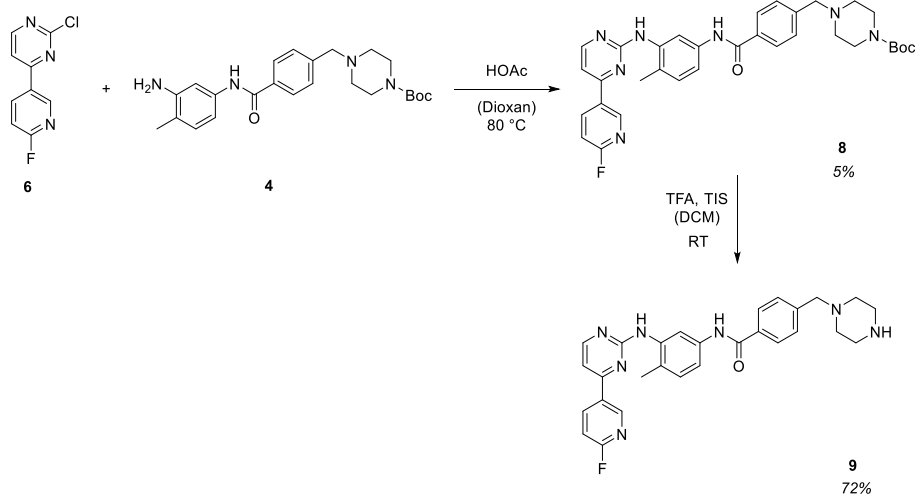


Abb. 25: Kondensation des Chlorpyrimidins **6** mit dem Anilin **4** unter Säure-Katalyse zum Boc-geschützten Fluor-Imatinib-Derivat **8**. Anschließende Entschützung lieferte Fluor-Norimatinib **9**.

Die Reaktionsbedingungen wurden unter Berücksichtigung dieser Faktoren angepasst: zum einen wurde in Dichlormethan/Trifluoressigsäure (4:1) unter Zugabe des Scavengers Triisopropylsilan für 20 Minuten entschützt, zum anderen wurde das

Reaktionsgemisch direkt mittels HPLC aufgereinigt. Durch diese Maßnahmen konnte die Ausbeute von ^{19}F FNI (**9**) von 18% auf 72% vervierfacht werden, wobei die notwendige hohe Reinheit von über 99% gewährleistet blieb (Abb. 25).

Die säurekatalysierte Kondensation mit **4** konnte allerdings nicht direkt auf das Nitro-Derivat übertragen werden, da sich hierbei kein Produkt bildete (Abb. 26). Deshalb wurde die Reaktion dieses Chlorpyrimidins ebenfalls zunächst mit 2-Methyl-5-nitroanilin vorevaluiert. Dabei zeigte sich, dass unter den drei gefundenen Hauptprodukten auch die gewünschte Verbindung enthalten war, allerdings konnte auch die Substitution der Nitro-Gruppe durch das Anilin beobachtet werden (Abb. 27).

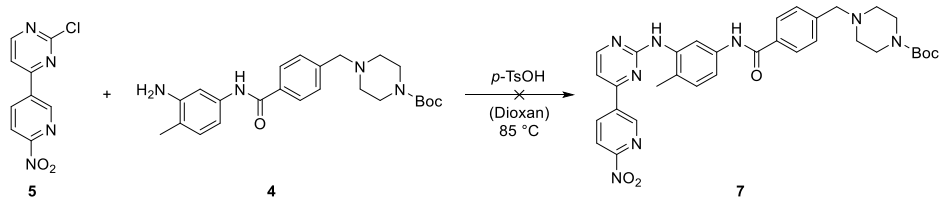


Abb. 26: Die säurekatalysierte Kondensation von **5** und **4** führte nicht zum gewünschten Produkt **7**.

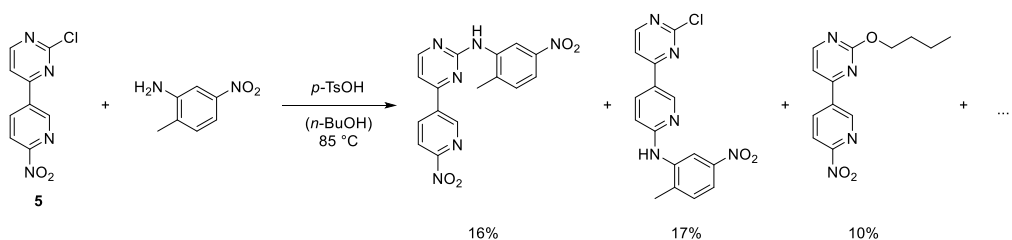


Abb. 27: Säurekatalysierte Kondensation des Chlorpyrimidins **5** mit 2-Methyl-5-nitroanilin. Die Ausbeuten der dargestellten Hauptprodukte wurden mittels HPLC (UV, $\lambda = 210\text{nm}$) bestimmt.

Da die Kondensation des Chlorpyrimidins **5** also prinzipiell funktionierte, wurden verschiedene Parameter, wie Lösungsmittel, Konzentration, Säure und Temperatur, variiert, jedoch konnte der Nitropyridin-Precursor **7** auf diesem Weg (Abb. 28) nicht erfolgreich synthetisiert werden. Während bei den vergleichsweise milden Bedingungen aus Abb. 26 die Edukte **5** und **4** keine Reaktion eingingen, fand bei harscheren Reaktionsbedingungen eine Zersetzung der Edukte, vor allem des Anilins **4**, statt. Aus diesem Grund musste die Synthese so verändert werden, dass die Kondensation des Chlorpyrimidins **5** mit einem Anilin nicht den letzten Reaktionsschritt darstellt, sondern möglichst früh im Reaktionsschema stattfindet.

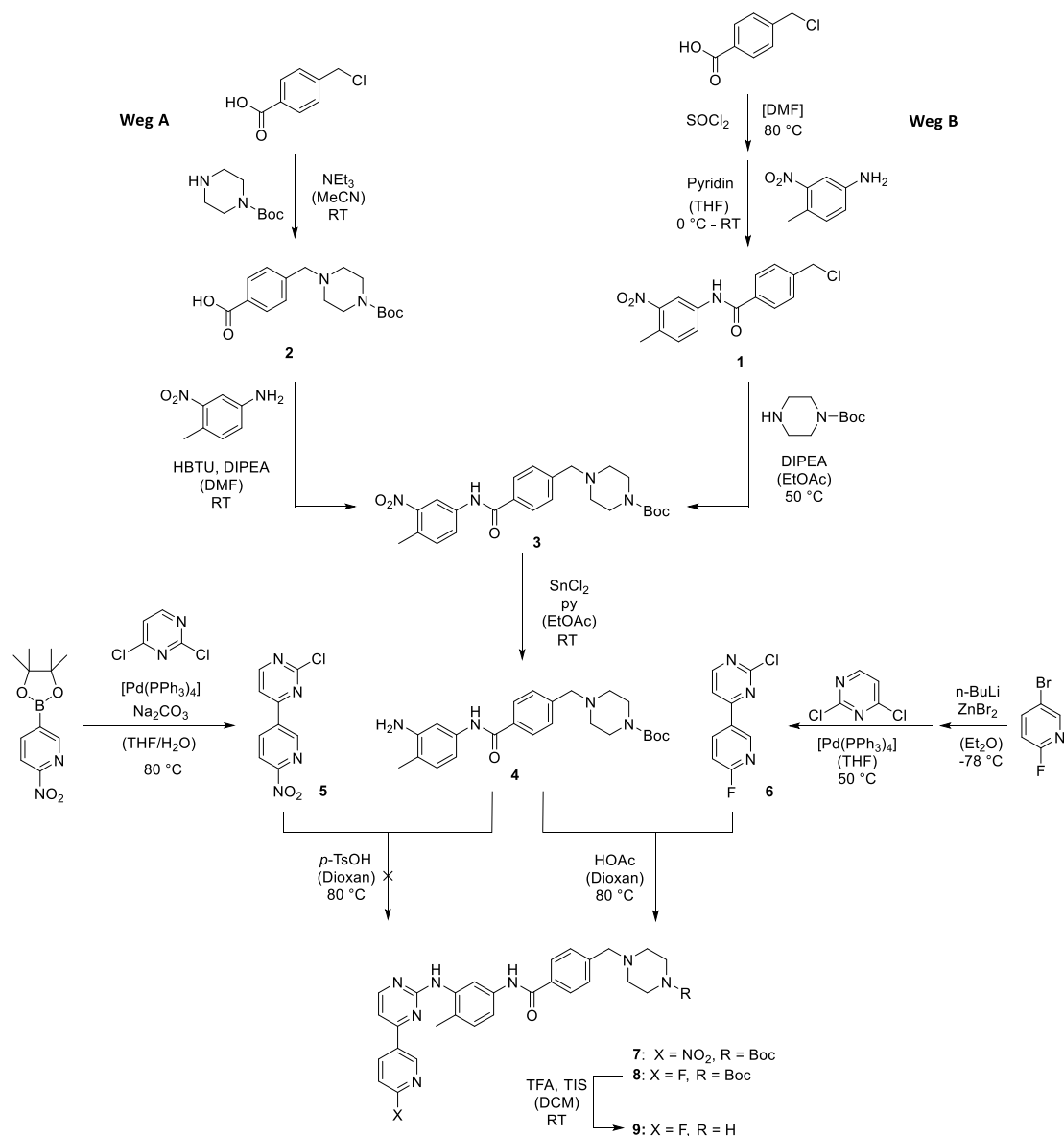


Abb. 28: Schematische Darstellung des kompletten 1. Syntheseweges. Dieser führte zur erfolgreichen Synthese des Standards Fluor-Norimatinib (9), jedoch zeigte sich dieser nicht zielführend bei der Synthese des Nitropyridin-Precursors 7.

3.1.1.2 Nitro-Boc-Imatinib: 2. Syntheseweg

Bei diesem Syntheseweg sollten die Reaktionsbedingungen so gewählt werden, dass vor allem am Ende der Synthese milde Bedingungen herrschen, um eine Substitution der Nitro-Gruppe und andere unerwünschte Nebenreaktionen zu verhindern. Dazu wurde die Ausbildung der Amidbindung zwischen dem Anilin-Fragment und dem Carbonsäure-Fragment als letzter Schritt der Synthese gewählt, wobei unter ähnlich milden Bedingungen wie bei der Peptidsynthese gearbeitet werden sollte. Das bei diesem Syntheseweg zentrale Intermediat ist das Anilin-

Fragment, das grundsätzlich auf zwei Wegen dargestellt werden kann (Abb. 29). Eine Möglichkeit stellt die klassische Pyrimidin-Synthese dar, bei der ein Enon-Fragment mit einem Guanidin-Fragment kondensiert und so den heteroaromatischen Ring ausbildet. Diese Methode wurde von Zimmermann et al. in der Imatinib-Synthese ebenfalls verwendet, wobei dort andere Substituenten vorlagen. Eine weitere Möglichkeit, das Anilin-Fragment darzustellen, ist die säurekatalysierte Kondensation des Pyrimidin-Fragmentes mit einem Diamino-Fragment unter ähnlichen Bedingungen, wie im ersten beschriebenen Syntheseweg.

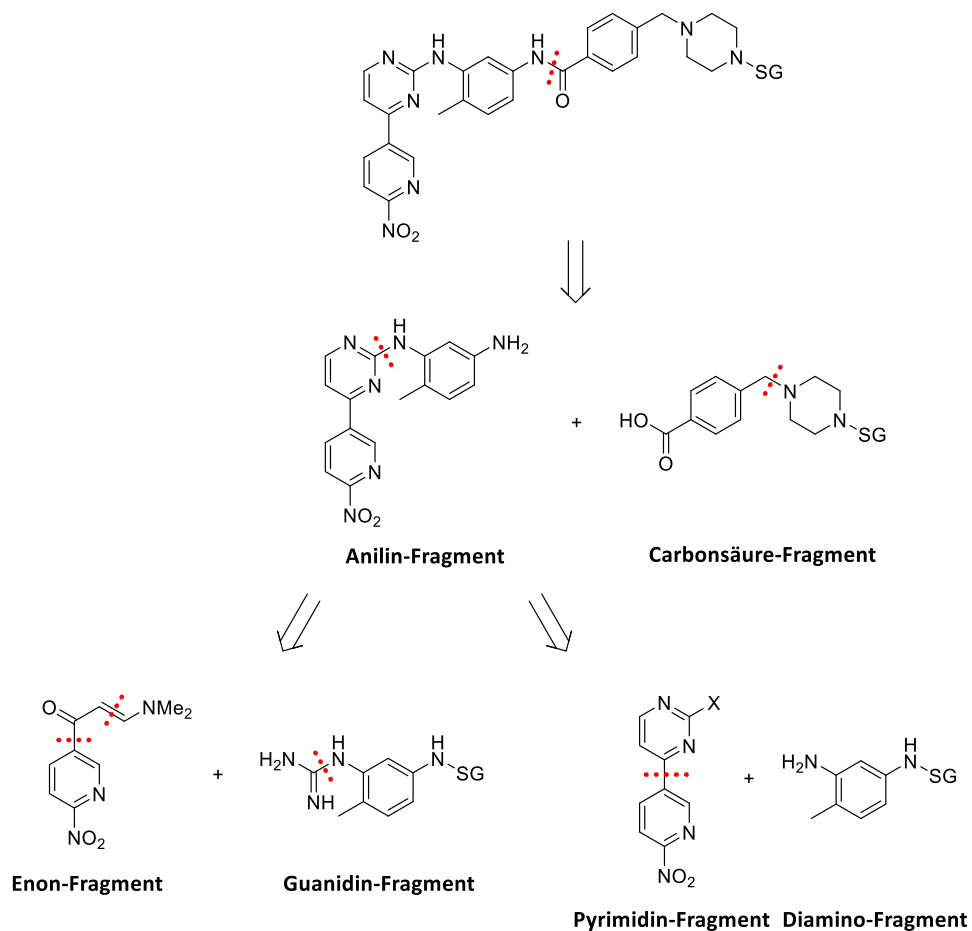


Abb. 29: Retrosynthetische Darstellung der Synthesestrategie des 2. Synthesewegs: Bildung der Amidbindung aus dem Carbonsäure- und dem Anilin-Fragment. Letzteres lässt sich entweder über die Reaktion aus dem Enon-Fragment und dem Guanidin-Fragment bilden oder über die Kondensation des Pyrimidin- und des Diamino-Fragments. Die retrosynthetischen Schnittstellen sind rot gestrichelt gekennzeichnet.

Die Methode der Pyrimidinsynthese stellte zwar eine vielversprechende Option dar, bedeutete aber auch die Durchführung von mehr Reaktionsschritten bis zum Erhalt der Zielverbindung. Die Synthese des Enon-Fragments ging von 5-Brom-2-nitropyridin aus, welches in einer Stille-Kupplung mit Tributyl-(1-ethoxyvinyl)zinn unter Palladium-Katalyse zum Ethoxyvinylpyridin umgesetzt wurde. Die anschließende

saure Hydrolyse zum Keton **10** führte zu einer Ausbeute von 96% über zwei Stufen nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Abb. 30).

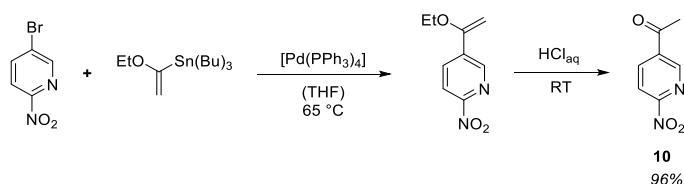


Abb. 30: Zweistufige Synthese des Ketons **10** mittels Stille-Kupplung und saurer Hydrolyse.

Die Umsetzung von **10** mit *N,N*-Dimethylformamid-dimethylacetal zum Enon-Fragment konnte jedoch nicht erfolgreich durchgeführt werden, weshalb auf die alternative Möglichkeit, die Kondensation des Pyrimidin-Fragments mit dem Diamino-Fragment (Abb. 29), zurückgegriffen wurde.

Die zweistufige Synthese des Diamino-Fragments ging dabei von 4-Methyl-3-nitroanilin aus, welches im ersten Reaktionsschritt mit einer Schutzgruppe versehen wurde. Da die Kondensation des Pyrimidin- und des Diamino-Fragments unter sauren Bedingungen stattfinden musste, wurde die Aminbasen-labile Fluorenylmethoxycarbonyl-Grupp (Fmoc) verwendet, um die Amin-Funktion zu schützen. Die Umsetzung von 4-Methyl-3-nitroanilin mit Fmoc-Cl und Natriumcarbonat gelang dabei fast quantitativ, sodass das Produkt direkt nach Extraktion für weitere Reaktionen verwendet werden konnte. Die Reduktion der Nitro-Gruppe von **11** fand unter Verwendung von Zinn(II)-chlorid statt und lieferte so das Anilin-Fragment **12** in einer Ausbeute von insgesamt 92% über zwei Stufen (Abb. 31). Die Reaktionsbedingungen wurden dabei soweit optimiert, dass die Aufreinigung nicht über Säulenchromatographie erfolgen musste, sondern das Produkt in hoher Reinheit über Filtration und Extraktion gewonnen werden konnte.

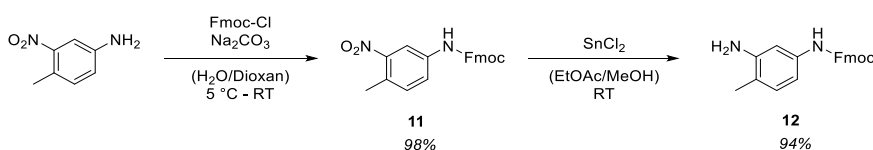


Abb. 31: Zweistufige Synthese des Anilin-Fragmentes **12**: Schützung der Amin-Funktion von 4-Methyl-3-nitroanilin und anschließende Reduktion der Nitro-Gruppe von **11** zum Amin.

Die säurekatalysierte Kondensation des Anilin-Fragmentes **12** mit dem Pyrimidin-Fragment **5** zeigte unter denselben Reaktionsbedingungen, unter denen der Fluor-Standard **8** erfolgreich synthetisiert werden konnte, fast keinen Umsatz, weswegen die Menge an Säure von einem Äquivalent auf das Zehnfache erhöht wurde, um das gewünschte Produkt letztendlich zu erhalten. Diese Option stand beim ersten Syntheseweg nicht zur Verfügung, da hierbei die Boc-Schutzgruppe vollständig abgespalten worden wäre und dies eventuell zur Bildung von weiteren Nebenprodukten geführt hätte. Dennoch mussten die Reaktionsbedingungen noch

optimiert werden, da die notwendige hohe Konzentration an Edukten aufgrund der geringen Löslichkeit aus praktischen Gründen nur in einem Eppendorf Reaktionsgefäß in einem Thermomixer durchgeführt werden konnte. Eine Reaktion im Glaskolben erwies sich zunächst als nicht erfolgreich, da die Reaktionssuspension dort vermutlich nicht gut genug durchmischt werden konnte und somit keine gleichmäßigen Bedingungen (Temperatur, Konzentration an Edukten und Säure) vorlagen, wodurch Einbußen in der Ausbeute beobachtet werden konnten. Aufgrund der Durchlässigkeit der Eppendorf Reaktionsgefäße für Dioxan und Essigsäure unter erhöhten Temperaturen bis zu 100 °C konnte jedoch die Konzentration nicht konstant gehalten werden. Außerdem mussten so immer wieder Dioxan und Essigsäure zugegeben werden, wodurch die Reproduzierbarkeit der Reaktion erschwert wurde. Ein weiteres Problem ist ein Upscaling der Reaktion, da pro Reaktionsgefäß nur ca. 100 µmol eingesetzt werden konnten und bei einer Ausbeute von 28-67% nur geringe Mengen an Produkt erhalten werden konnten. Um die Reaktion hochzuskalieren, musste zuerst die Löslichkeit der Edukte erhöht werden, damit die Reaktion in einem Glaskolben stattfinden kann. Als Lösungsmittel wurde DMSO ausgewählt, da dieses nicht nur ausgezeichnete Lösungseigenschaften besitzt, sondern ebenfalls einen hohen Siedepunkt, sodass ein Verdampfen während der Reaktion nicht möglich war. Dadurch konnte die Reaktion in einem Glaskolben mit Rückflusskühler durchgeführt werden, wodurch ebenfalls die Säuremenge konstant gehalten werden konnte. Die durch DMSO entstandenen Nebenprodukte führten allerdings nicht nur zu einer Verringerung der Ausbeute auf 40%, sondern erschwerten zusätzlich die Aufreinigung des Fmoc-geschützten Anilin-Derivates **13**. So konnte **13** selbst durch mehrfache Säulenchromatographie nicht vollständig von Nebenprodukten befreit werden und wurde direkt im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte durch die Amin-Base Piperidin und erzielte eine hohe Ausbeute von 85% innerhalb von 30 Minuten Reaktionszeit. Zwar vereinfachte sich die Aufreinigung im Vergleich zur Vorstufe, allerdings war es trotzdem nicht möglich das Anilin-Fragment **14** vollständig von Nebenprodukten zu befreien (Abb. 32), sodass eine Reinheit von nur etwa 82% erzielt wurde.

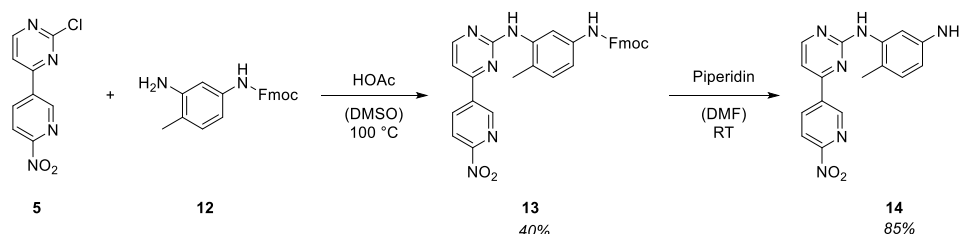


Abb. 32: Säurekatalysierte Kondensation des Pyrimidin-Fragments **5** mit dem Diamino-Fragment **12** liefert das Fmoc-geschützte Intermediat **13**, welches nach Entschützung durch Piperidin zum Anilin-Fragment **14** führt.

Den letzten Schritt der Synthese des Nitropyridin-Precursors **7** stellt die Kopplung des Anilin-Fragments **14** mit dem Carbonsäure-Fragment **2** dar. Dazu wurden milde Bedingungen gewählt, die in der Peptidsynthese fest etabliert sind und hohe Ausbeuten versprechen. Die Carbonsäure **2** wurde mit dem Kopplungsreagenz HBTU und DIPEA zu einem Aktivester umgesetzt, zu dem das Anilin-Fragment gegeben wurde, um die Amidbindung auszubilden (Abb. 33). Da nach säulen-chromatographischer Aufreinigung die Reinheit noch nicht ausreichend war, wurde das Produkt mehrfach in Methanol umkristallisiert, wodurch eine Reinheit von 98% bei einer Ausbeute von 34% erreicht werden konnte (Abb. 34).

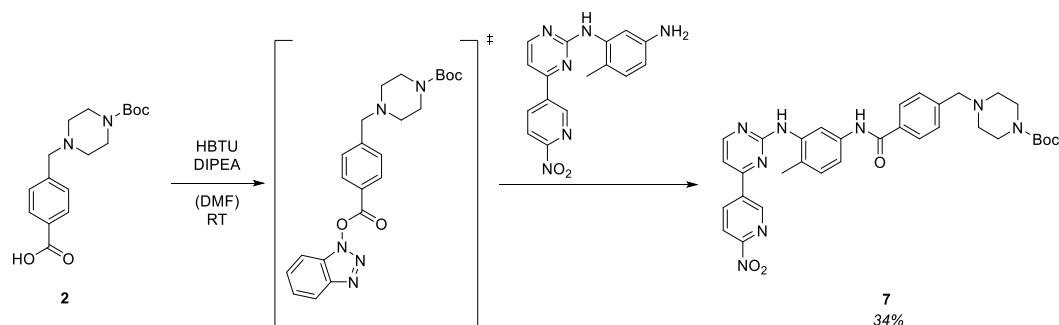


Abb. 33: Aktivierung der Carbonsäure **2** durch Bildung eines Aktivesters, der mit dem Anilin-Fragment **14** eine Amidbindung ausbildet und so zum Nitropyridin-Precursor **7** führt.

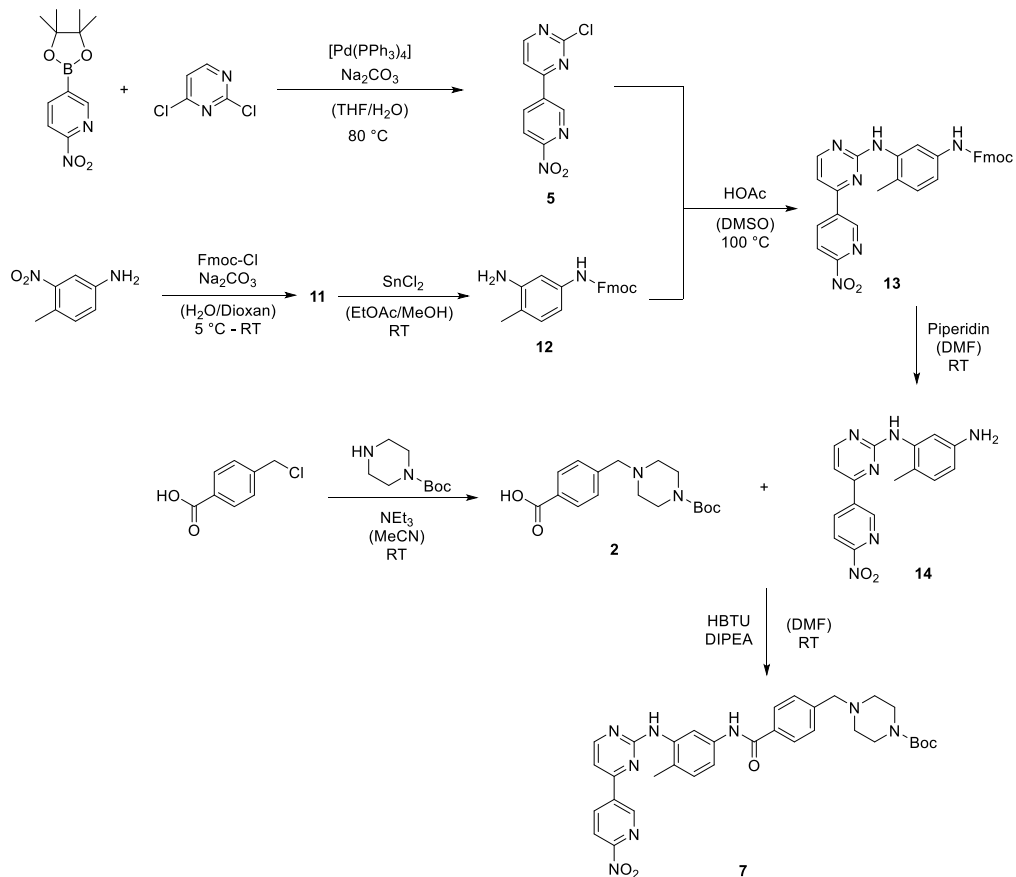


Abb. 34: Darstellung des Schema des 2. Syntheseweges, der erfolgreich zum Nitropyridin-Precursor 7 führte.

Diese hohe Reinheit ging zwar mit einer vergleichsweise niedrigen Ausbeute einher, war aber für die Radiomarkierung von großer Bedeutung, da hierbei schon geringe Mengen an Verunreinigungen die Reaktion stark beeinflussen könnten.

3.1.1.3 Weitere Derivate

Für eine biologische Evaluierung neuer Substanzen empfiehlt es sich Referenzsubstanzen zu benutzen, um zum einen die Testmethode auf Validität zu überprüfen und zum anderen einen direkten Vergleich zwischen den Substanzen zu ermöglichen. In diesem Fall wurden drei Referenzsubstanzen herangezogen: Imatinib, Norimatinib und SKI696⁷⁹ („Fluorethyl-Imatinib“). Ersteres konnte kommerziell erworben werden, die Synthesen der beiden anderen Verbindungen werden im Folgenden vorgestellt.

3.1.1.3.1 Norimatinib

Die Synthese von Norimatinib orientierte sich an der von Zimmermann et al. beschriebenen Imatinib-Synthese unter Verwendung von publizierten Optimierungen.^{35,85} Zuerst wurde 3-Acetylpyridin durch Kondensation mit *N,N*-Dimethylformamidmethylacetal zum Enaminon **15** umgesetzt, welches nach Umkristallisation in einer guten Ausbeute von 54% erhalten werden konnte. Für die Synthese des Guanidins **16** wurde unter stark sauren Bedingungen 2-Methyl-5-nitroanilin an Cyanamid addiert und durch Erhöhung des pH-Wertes nach der Reaktion unter Kühlung ausgefällt. Ohne weitere Aufreinigung konnte so das Guanidin **16** in einer Ausbeute von 85% erhalten werden. Durch Kondensation dieser beiden Bausteine konnte das Phenylaminopyrimidin **17** hergestellt werden. Die hohe Ausbeute von 88% ist dabei nicht zuletzt auf Ausbildung der aromatischen Pyrimidin-Einheit zurückzuführen, die die Triebkraft der Reaktion darstellt. Anschließend wurde die Nitro-Gruppe dieses Bausteins mit Hilfe von Wasserstoff und Palladium quantitativ reduziert zum Amin **18** (Abb. 35).

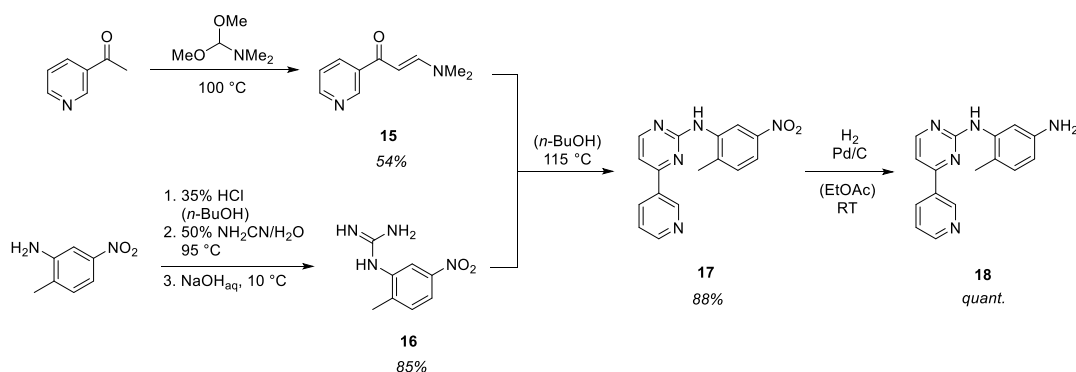


Abb. 35: Synthese des Phenylaminopyrimidin-Fragmentes **18** ausgehend von 3-Acetylpyridin und 2-Methyl-5-nitroanilin.

Unter den milden Bedingungen der Peptidsynthese wurde die Carbonsäure **2** mittels HBTU und DIPEA zu einem Aktivester umgewandelt (analog zu Abb. 33) und anschließend mit dem Amin **18** umgesetzt, wodurch sich nach Ausbildung der Amidbindung das Boc-geschützte Norimatinib (**19**) erhalten ließ. Die Entschützung zu Norimatinib (**20**) erfolgte gekühlt unter Verwendung von Trifluoressigsäure und lieferte nach Aufreinigung das Produkt in einer Ausbeute von 61%. Die reduzierte Ausbeute begründete sich in der notwendigen Säulenchromatographie, um die für biologische Evaluierungen nötige hohe chemische Reinheit von über 97% gewährleisten zu können (Abb. 36).

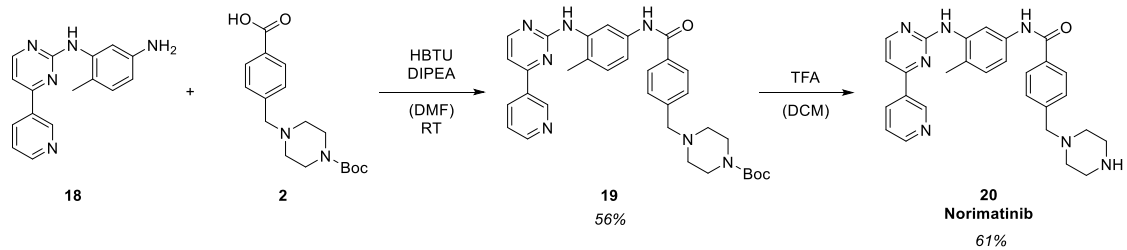


Abb. 36: Ausbildung der Amidbindung zwischen **18** und **2** zum Boc-geschützten Norimatinib (**19**) und anschließende Entschützung zu Norimatinib (**20**).

3.1.1.3.2 SKI696

Die Synthese der Referenzverbindung SKI696 (**21**) konnte ausgehend von Norimatinib (**20**) in einem Schritt erfolgen. Dabei reagierte unter basischen Bedingungen 1-Brom-2-fluorethan mit Norimatinib unter Substitution von Bromid durch das sekundäre Amin des Piperazin-Rings zum gewünschten Produkt, welches mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt wurde. Die von Glekas et al. publizierte Ausbeute von 17%⁷⁹ für das Produkt konnte, trotz der für biologische Evaluierungen geforderten chemischen Reinheit von über 99%, auf 57% mehr als verdreifacht werden (Abb. 37).

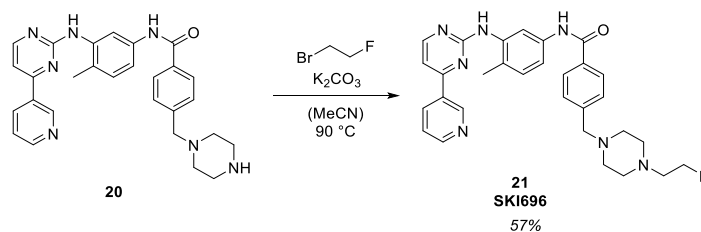


Abb. 37: Synthese der Referenzverbindung SKI696 (**21**) ausgehend von Norimatinib (**20**) und 1-Brom-2-fluorethan.

3.1.2 DOG1-Verbindungen

Obwohl DOG1, ein Kalzium-aktivierter Chloridkanal, ein relativ junges Forschungsobjekt darstellt, konnten bereits durch High-Throughput-Screenings wichtige Informationen bezüglich der chemischen Strukturen von Aktivatoren und Inhibitoren gewonnen werden.^{68,69} Anhand dieser Daten wurden *N*-(4-Phenylthiazol-2-yl)benzamide als die vielversprechendste Substanzklasse für die Entwicklung eines spezifischen Radiotracers gewählt. Da die Substituenten einen erheblichen Einfluss auf die Bindungsaffinitäten ausüben,^{68,69} musste die Position für das Radiolabel so gewählt werden, dass einerseits die Affinität nicht verloren geht und andererseits eine Radiomarkierung mit [¹⁸F]Fluorid möglich ist. Das

Einbringen des Fluor-Atoms wäre prinzipiell an zwei Positionen (R^1 , R^3) denkbar gewesen, jedoch würde mit $R^3 = 4\text{-F}$ eine deutliche Reduktion der Bindungsaffinität einhergehen (Abb. 38). Obwohl $R^1 = 4\text{-F}$ in Bezug auf die Affinität ein attraktives Ziel darstellt, ist eine Radiomarkierung mit $[^{18}\text{F}]$ Fluorid an dieser Stelle durch die hohe Elektronendichte ungünstig. Aufgrund dessen sollte eine geeignete Markierungsstrategie entwickelt werden, die trotz des deaktivierten Systems den gewünschten Radiotracer $[^{18}\text{F}]$ Fluor-DOG1 bereitstellen sollte.

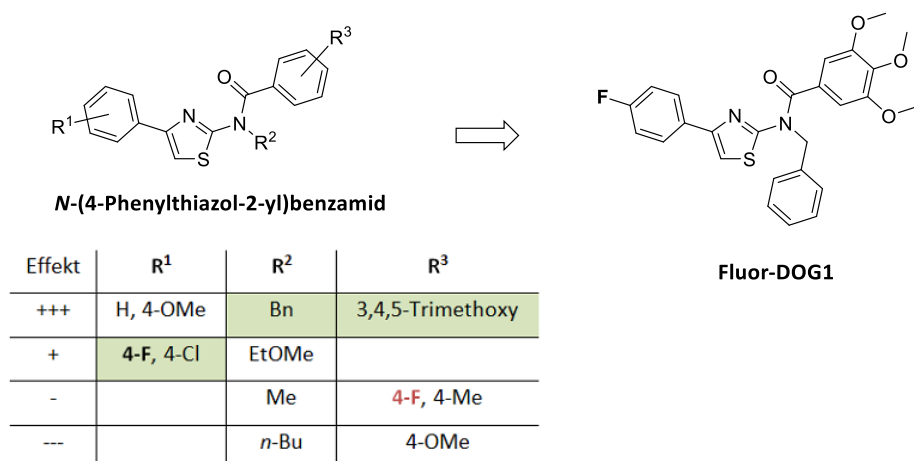


Abb. 38: Allgemeine Struktur der Aktivoren der Substanzklasse *N*-(4-Phenylthiazol-2-yl)benzamide und ein Auszug über den Einfluss der Substituenten auf die Bindungsaffinität. Aufgrund dieser Informationen wurde Fluor-DOG1 als Leitstruktur ausgewählt. Legende: +++: stark erhöhte Affinität; +: erhöhte Affinität; -: gesenkte Affinität; ---: nicht affin.⁶⁹

3.1.2.1 Referenzsubstanzen E_{act}^* und Fluor-DOG1

Zur Synthese der Derivate musste zuerst die Synthese der Referenzverbindung E_{act}^* (*N*-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)benzamid, **23**, Abb. 39) etabliert werden. In der zweistufigen Synthese sollte zuerst die Thiazol-Einheit generiert werden und anschließend die Amidbindung zum Benzoesäurederivat ausgebildet werden (Abb. 39).

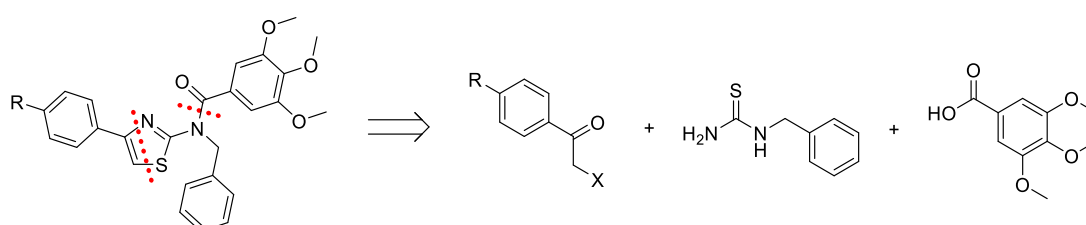


Abb. 39: Retrosynthetische Betrachtung zur Synthese von E_{act}^* ($R = \text{H}$) und dessen Derivate ($R = \text{F}$, Abgangsgruppen)

Über die Hantzsch-Thiazol-Synthese konnte ausgehend von 2-Brom-1-phenylethan-1-on und *N*-Benzylthioharnstoff das 2-Aminothiazol **22** in einer Ausbeute von

98% erhalten werden (Abb. 40). Durch den fast quantitativen Umsatz konnte das Produkt nach Extraktion in hoher Reinheit gewonnen werden.

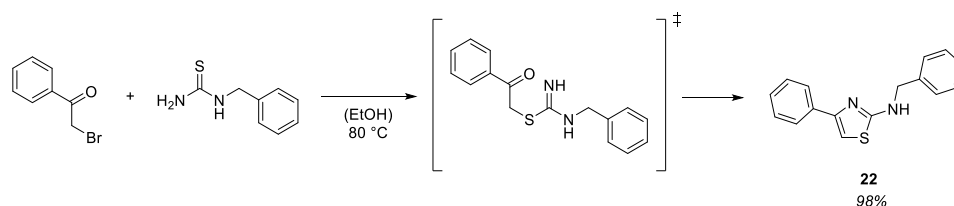


Abb. 40: Hantzsch-Thiazol-Synthese des 2-Aminothiazols **22**.

Der zweite Reaktionsschritt war die Ausbildung der Amidbindung zwischen **22** und 3,4,5-Trimethoxybenzoesäurechlorid unter basischen Bedingungen (Abb. 41). Hierbei konnte eine Ausbeute von 68% erreicht werden, die in Anbetracht der geringen Reaktivität des sekundären Amins und einer Reinheit von über 99% ein gutes Ergebnis darstellt. Die Gesamtausbeute nach zwei Synthesestufen betrug 67% für die Referenzverbindung E_{act}^* (**23**).

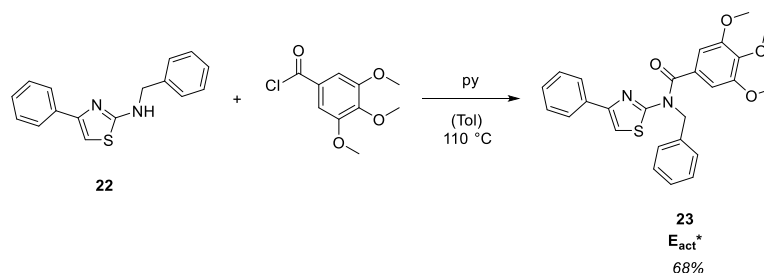


Abb. 41: Reaktion des sekundären Amins **22** mit 3,4,5-Trimethoxybenzoesäurechlorid zur Referenzverbindung E_{act}^* (**23**).

Diese Reaktionsbedingungen wurden nun verwendet, um den Fluor-Standard Fluor-DOG1 (**25**) zu erhalten. Dabei zeigte sich in der Thiazol-Synthese ein quantitativer Umsatz. Im zweiten Reaktionsschritt wurde ebenfalls eine höhere Ausbeute als für die Referenzsubstanz erhalten, sodass in diesem Fall über zwei Stufen eine exzellente Ausbeute von 89% bei einer Reinheit von über 99% erreicht werden konnte (Abb. 42).

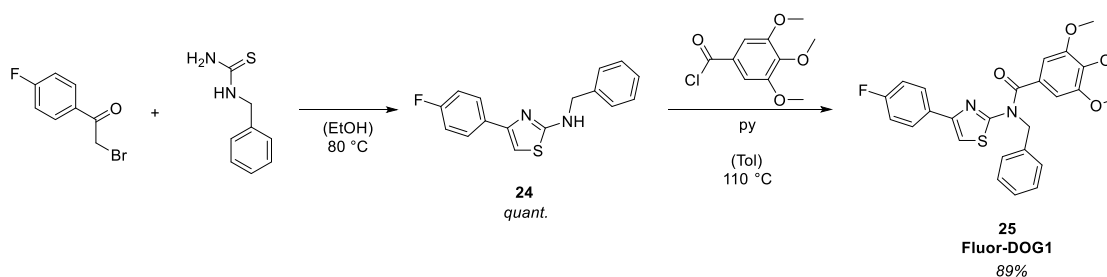


Abb. 42: Zweistufige Synthese des Standards Fluor-DOG1 (**25**).

Da diese Synthesestrategie hohe Ausbeuten bei einer einfachen Reaktionsführung und Aufreinigung lieferte, sollte sie auf die Synthese der Vorläufer-Moleküle übertragen werden.

3.1.2.2 *Nitro-DOG1*

Die Nitro-Gruppe stellt eine gute Abgangsgruppe für die aromatische nukleophile Substitution mit [¹⁸F]Fluorid dar und kann sogar in deaktivierten Systemen verwendet werden. Als Beispiel sei hier die Radiosynthese von [¹⁸F]Flumazenil ausgehend vom entsprechenden Nitro-Precursor erwähnt, die trotz des elektronenreichen Aromaten [¹⁸F]Fluorid-Inkorporationen von 55-60% erreichen konnte.⁸⁸ Aus diesem Grund wurde ein Nitro-Precursor für die Radiosynthese von [¹⁸F]Fluor-DOG1 als vielversprechendes Vorläufer-Molekül erachtet, das eine einfache Radiosynthese erlaubt.

Die Hantzsche-Thiazol-Synthese lieferte auch hier quantitative Ausbeuten (Abb. 43), allerdings führte die schlechte Löslichkeit des 2-Aminothiazols **26** während der Extraktion zu einer reduzierten Wiedergewinnung des reinen Produktes, sodass die Aufreinigungsstrategie modifiziert werden musste. Das Reaktionsgemisch wurde nach der Reaktion zuerst in verdünnter Natriumhydroxid-Lösung gerührt und anschließend filtriert, um zu verhindern, dass das Produkt als Hydrogenbromid-Salz vorliegt und somit den nächsten Reaktionsschritt beeinflusst.

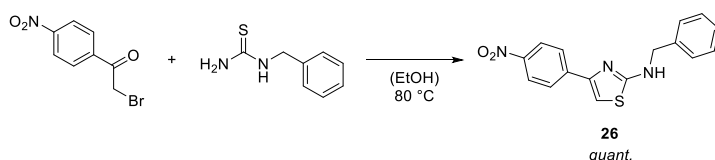


Abb. 43: Hantzsche-Thiazol-Synthese des 2-Aminothiazols **26**.

Die Ausbildung der Amidbindung lieferte zwar eine vergleichbare Ausbeute von 64%, benötigte aber eine deutlich längere Reaktionszeit (Abb. 44). Die Löslichkeit spielte dabei nicht nur während der Reaktion eine entscheidende Rolle, sondern auch bei der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie, da das Produkt als sehr breite Bande eluierte und somit erst durch wiederholte Säulenchromatographie eine ausreichende Reinheit von über 97% erreicht werden konnte.

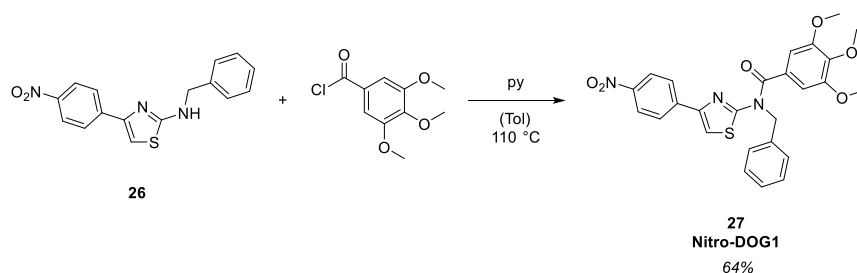


Abb. 44: Reaktion des sekundären Amins **26** mit 3,4,5-Trimethoxybenzoesäurechlorid zum Precursor Nitro-DOG1 (**27**).

3.1.2.3 Triazen-DOG1

Eine weitere Methode deaktivierte Aromaten für die nukleophile Substitution mit [^{18}F]Fluorid zugänglich zu machen, ist die sogenannte Wallach-Reaktion.⁸⁹⁻⁹¹ Dabei wird durch Protonierung eines Triazens *in situ* ein Diazoniumion erzeugt, welches als sehr gute Abgangsgruppe in der nukleophilen Substitution verwendet wird (Abb. 45). Dabei zeigt das Triazen gegenüber dem Diazoniumion eine deutlich höhere Stabilität, wodurch sich dessen Synthese und Lagerung stark vereinfacht.

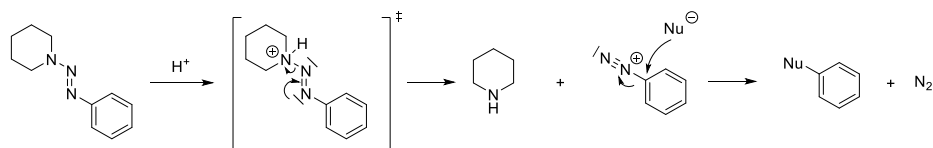


Abb. 45: Reaktionsmechanismus der Säure-induzierten *in situ*-Generierung des Diazoniumions. Durch den Angriff des Nucleophils wird Stickstoff freigesetzt. Nu: Nucleophil.

Dennoch führt das hochreaktive Diazoniumion zu einer Vielzahl an möglichen Nebenreaktionen (Abb. 46), die durch eine geschickte Wahl der Reaktionsbedingungen eingeschränkt bzw. vermieden werden können. Pages *et al.* haben die Fluordiazotierung intensiv untersucht, um die radikalischen Prozesse zu unterdrücken, bei denen schwer abzutrennende Nebenprodukte entstehen. So wurden etliche Parameter wie Lösungsmittel, Temperatur, Reaktionszeit, Konzentration, Verhältnis des Gasvolumens zum Lösungsmittelvolumen und Reihenfolge der Reaktandenzugabe evaluiert, um die Bildung des gewünschten Arylfluorids zu maximieren und diese Bedingungen auf die ^{18}F -Radiomarkierung von Triazen-Vorläufern anzuwenden.^{89,90}

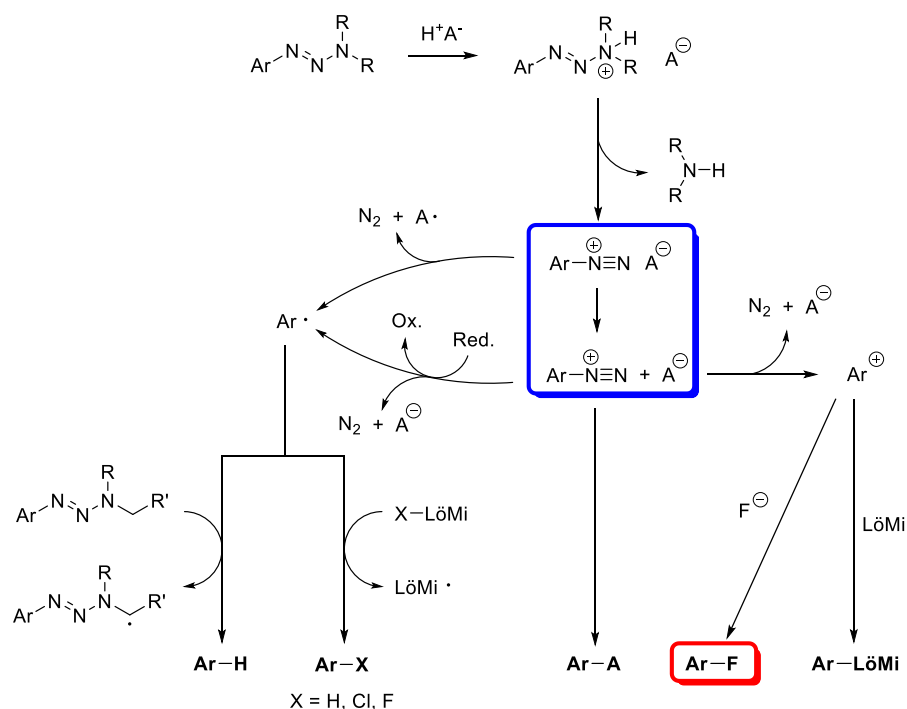


Abb. 46: Erzeugung des Diazoniumions (blau markiert) und mögliche radikalische und kationische Nebenreaktionen während der Fluordiazotierung zum Arylfluorid (rot markiert). Ar: Aryl, LöMi: Lösungsmittel, A⁻: Anion.⁸⁹

Die Synthese des Triazen-Derivates wurde dabei ausgehend von Nitro-DOG1 (**27**) in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst wurde dabei die Nitro-Verbindung **27** durch Zinn(II)-chlorid zum Amin **28** reduziert (Abb. 47). Die mäßige Ausbeute von 51% wurde durch die geringe Löslichkeit von **27** hervorgerufen, die nicht nur eine zuverlässige Reaktionskontrolle, sondern auch die Aufreinigung erschwerte. Die Entfernung der Zinnverbindungen fand durch Ausfällen statt, wodurch vermutlich auch das Produkt mitgefällt wurde, welches auch nach mehrmaligem Waschen des Niederschlages nicht vollständig zurückgewonnen werden konnte. Eine Reduktion durch Wasserstoffgas unter Palladium-Katalyse wäre aufgrund der Benzylgruppe nicht möglich gewesen, da diese dabei abgespalten worden wäre.

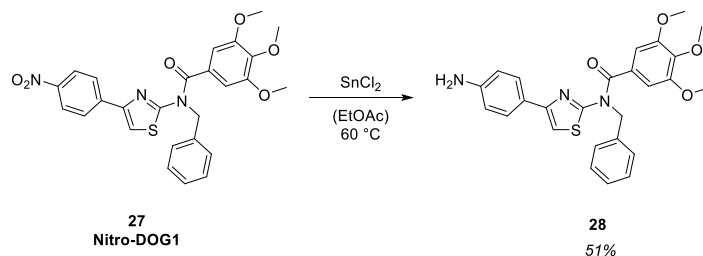


Abb. 47: Reduktion von Nitro-DOG1 (**27**) zum Amin **28** durch Zinn(II)-chlorid.

Im nächsten Schritt wurde das Amin **28** in einer Eintopf-Reaktion zum Triazen **29** umgesetzt. Dabei fand zuerst im Säuren die Diazotierung statt, anschließend wurde diese saure Reaktionslösung langsam zu einer basischen Lösung aus Piperidin und

Kaliumcarbonat gegeben. Dadurch konnte die Addition von Piperidin schneller erfolgen als die Substitution des Diazoniumions durch Hydroxidionen. Des Weiteren wurde so die säurelabile Triazengruppe vor der Zersetzung geschützt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das Produkt in einer guten Ausbeute von 59% bei einer Reinheit von über 98% erhalten.

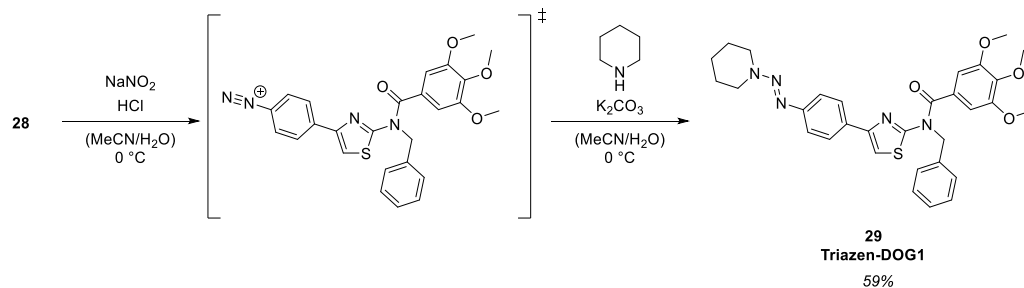


Abb. 48: Zweistufige Eintopfreaktion: Diazotierung des Amins **28** und anschließende Addition von Piperidin zu Triazen-DOG1 (**29**).

3.1.2.4 *BPin-DOG1*

Als dritte Möglichkeit eines vielversprechenden Vorläufers wurde ein Borsäure-Pinakolester-Derivat von E_{act}^* gebildet. Diese Gruppe stellt keine klassische Abgangsgruppe an sich dar, da Organo-Borsäure-Verbindungen unter vielen Reaktionsbedingungen eine hohe Stabilität aufweisen. Unter Einsatz von Palladium- oder Kupfer-Katalysatoren erschließen sich jedoch mit diesen Organo-Borsäure-Verbindungen vielfältige Möglichkeiten in der chemischen Synthese. Die bekannteste Reaktion dieser Art stellt wohl die Suzuki-Kupplung dar, die 2010 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde. Da die Borsäure-Gruppe übergangsmetall-katalysiert auch durch Fluorid ausgetauscht werden kann, wurde dieser Vorläufer-Ansatz zur Radiosynthese von $[^{18}F]$ Fluor-DOG1 ebenfalls evaluiert (Abb. 49).

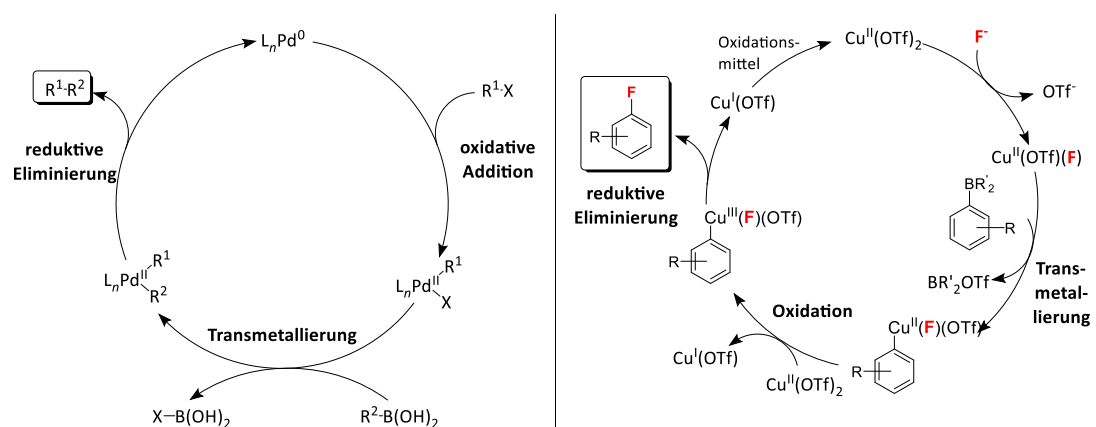


Abb. 49: Links: Vereinfachter Mechanismus der Suzuki-Kupplung. Durch oxidative Addition von R^1-X an den Pd^0 -Komplex wird die Pd^{II} -Spezies gebildet, welche mit der Organo-Borsäure-

Verbindung eine Transmetallierung eingeht. Aus dem entstandenen Pd^{II}-Komplex bildet sich das Produkt R¹-R² durch reduktive Eliminierung und der Pd⁰-Komplex. R¹, R²: Aryl, Vinyl, Alkyl; X: Halogenid, Triflat; L: Ligand.⁹² Rechts: Vermuteter Mechanismus der Kupfer-katalysierten Fluorierung von Organo-Bor-Verbindungen: Durch eine Disproportionierungsreaktion von Cu^I(OTf)₂ entsteht die hochreaktive Cu^{III}-Spezies, die das Arylfluorid durch reduktive Eliminierung bildet.⁹³

Bei der Synthese des BPin-Precursors sollte dieselbe Synthesestrategie wie bei den anderen Derivaten angewendet werden. Dazu wurde zuerst aus 4-Acetylphenylboronsäurepinakolester durch Umsetzung mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) die entsprechende α -Bromketon-Verbindung **30** hergestellt, welche für die Thiazol-Synthese benötigt wurde (Abb. 50). Als einziges Nebenprodukt wurde das zweifach bromierte Analogon gebildet, welches allerdings unbedingt entfernt werden musste, da es die gleiche Reaktivität wie **30** in den nächsten Schritten aufgewiesen hätte. Die dadurch entstehenden Nebenprodukte wären nur schwer entfernbar, weswegen schon in diesem Reaktionsschritt auf eine möglichst hohe Reinheit geachtet werden musste. Nach säulenchromatischer Aufreinigung wurde zwar eine hohe Ausbeute bei einer Reinheit von unter 90% erreicht, allerdings konnte durch anschließende Umkristallisation eine Reinheit von etwa 95% bei einer Ausbeute von 67% erzielt werden.

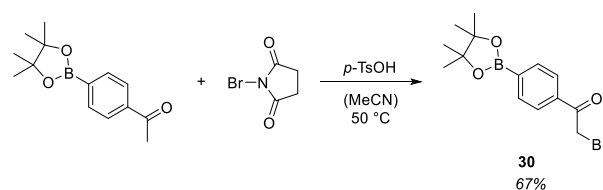


Abb. 50: Synthese des α -Bromketons **30** aus 4-Acetylphenylboronsäurepinakolester und NBS.

Die Hantzsche-Thiazol-Synthese aus **30** und *N*-Benzylthioharnstoff musste aufgrund der Reaktivität des Pinakolesters angepasst werden, da beim Erhitzen mit Ethanol eine Umesterung stattfinden könnte. Als Lösungsmittel wurde Acetonitril aufgrund der Löslichkeit der Edukte und des ausreichend hohen Siedepunktes gewählt. Da im Gegensatz zu den anderen 2-Aminothiazol-Derivaten **22**, **24** und **26** hier Nebenprodukte entstanden, musste mittels Säulenchromatographie aufgereinigt werden. Die Ausbeute wurde dadurch leicht gesenkt auf 79% (Abb. 51).

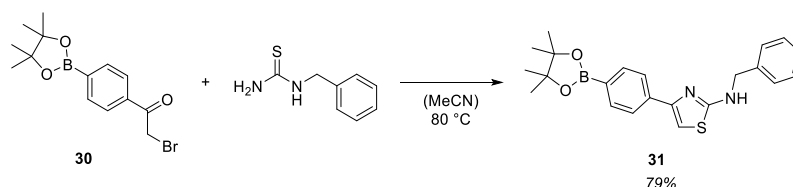


Abb. 51: Hantzche-Thiazol-Synthese des 2-Aminothiazols **31**.

Im letzten Schritt wurde die Amidbindung durch Reaktion des sekundären Amins **31** mit 3,4,5-Trimethoxybenzoesäurechlorid gebildet (Abb. 52). Nach Aufreinigung mittels Extraktion und Säulenchromatographie konnte das Produkt in einer sehr guten Ausbeute von 70% bei einer Reinheit von >99% erhalten werden. Somit ließ sich der BPin-Precursor in einer moderaten Ausbeute von 37% über 3 Stufen synthetisieren. Erwähnenswert ist hierbei, dass der Borsäureester in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit dem entsprechenden Boronat-Komplex stand und dadurch im HPLC-Chromatogramm zwei Peaks sichtbar waren. Zum einen konnte allerdings durch MALDI-MS nachgewiesen werden, dass beide Peaks nach Lyophilisation die gleiche Masse besaßen, zum anderen konnte durch Veränderung des pH-Wertes das Gleichgewicht reversibel verschoben werden. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass dieses literaturbekannte Gleichgewicht vorliegt und es sich nicht um ein Zersetzungs- oder Umlagerungsprodukt handelte.⁹⁴

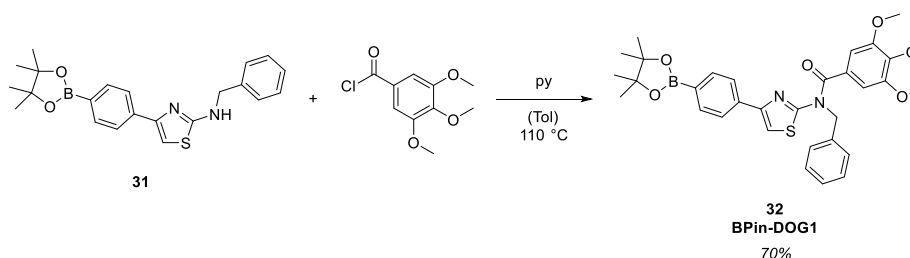


Abb. 52: Reaktion des sekundären Amins **31** mit 3,4,5-Trimethoxybenzoesäurechlorid zum Precursor BPin-DOG1 (**32**).

3.2 Radiosynthesen

3.2.1 [¹⁸F]Fluornorimatinib

Die Radiosynthese von [¹⁸F]Fluor-Norimatinib ([¹⁸F]FNI) sollte als zweistufige Eintopf-Reaktion stattfinden, bei der zuerst [¹⁸F]Fluorid inkorporiert und dann die Schutzgruppe am Piperazin-Ring entfernt wird. Anschließend sollte das Reaktionsgemisch mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt werden und zur *in vivo*-Anwendung entsprechend pharmazeutisch formuliert werden (Abb. 53).

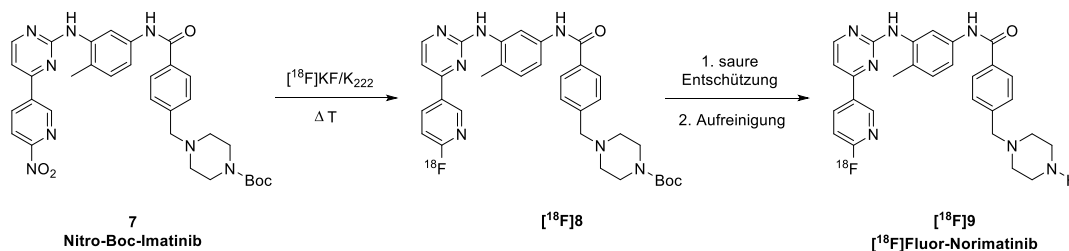


Abb. 53: Darstellung der zweistufigen Radiosynthese von [¹⁸F]Fluor-Norimatinib ([¹⁸F]9). Radiofluorierung des Nitropyridin-Precursors **7** unter Verwendung von [¹⁸F]KF/K₂₂₂, gefolgt von der sauren Entschützung zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe und abschließender Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC.

Die Radiosynthese von 2-[¹⁸F]Fluorpyridinen mittels nukleophiler Substitution durch [¹⁸F]KF/K₂₂₂ wurde von Dolci systematisch untersucht⁸³ und lieferte wichtige Anhaltspunkte für die Radiomarkierung von [¹⁸F]FNI. Wie bereits in Kapitel 3.1.1 erwähnt, fiel die Wahl auf eine Nitro-Abgangsgruppe aufgrund der hohen [¹⁸F]Fluorid-Inkorporationsraten bei vergleichsweise einfacher Synthese des Precursors. Dolci et al. evaluierten hierzu folgende Parameter für die Radiofluorierung: Temperatur, Reaktionszeit, eingesetzte Stoffmenge des Precursors und Lösungsmittel. Die höchsten [¹⁸F]Fluorid-Inkorporationsraten von 81-92% ließen sich demnach ab 150 °C innerhalb von 10-20 Minuten erreichen, wenn DMSO oder Sulfolan als Lösungsmittel eingesetzt wurden und eine ausreichend hohe Menge an Precursor (mindestens 7.3 μmol) verwendet wurde (Abb. 54).

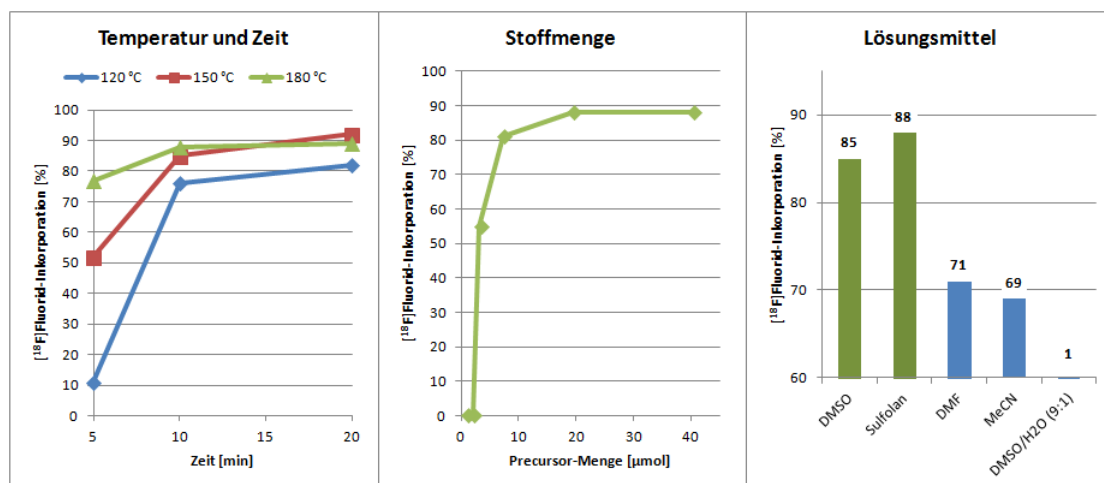


Abb. 54: Zusammenfassung der Untersuchungen zur Radiomarkierung von 2-[¹⁸F]Fluorpyridin ausgehend von 2-Nitropyridin von Dolci et al.⁸³ Reaktionsbedingungen: links: LM: DMSO (600 μL), n = 40.3 μmol. Mitte: LM: DMSO (600 μL), T = 180 °C, 10 min. Rechts: T = 150 °C, n = 40.3 μmol, 10 min, V = 600 μL.

Diese Ergebnisse dienen als Startpunkt zur Radiomarkierung von **7** und konnten auch hier sehr gute [¹⁸F]Fluorid-Inkorporationsausbeuten liefern. Bei Verwendung von 400-1200 MBq [¹⁸F]Fluorid als Startaktivität konnten mit 8.0 μmol Precursor (± 5 mg) in DMSO (500 μL) nach 10 Minuten bei 150 °C ¹⁸F-Inkorporationen von bis zu 90% erzielt werden, wobei im Mittel $82.8 \pm 3.6\%$ (n = 21) erreicht wurden. Dabei zeigte sich neben einer geringen Menge an freiem [¹⁸F]Fluorid ($6.4 \pm 2.6\%$) ebenfalls die Bildung eines Nebenproduktes (Abb. 55). Dieses konnte zwar nicht eindeutig identifiziert werden, allerdings wurde angenommen, dass es sich um ein Oxidationsprodukt handeln könnte, da DMSO unter diesen Reaktionsbedingungen als Oxidationsmittel agieren könnte. Ein Wechsel des Lösungsmittels auf DMF hätte diese Nebenreaktion vermutlich verhindert, allerdings wäre laut Dolci die Ausbeute auf etwa 70% gesunken, weshalb DMSO trotz der Nebenreaktion als sinnvollere Variante angesehen wurde.

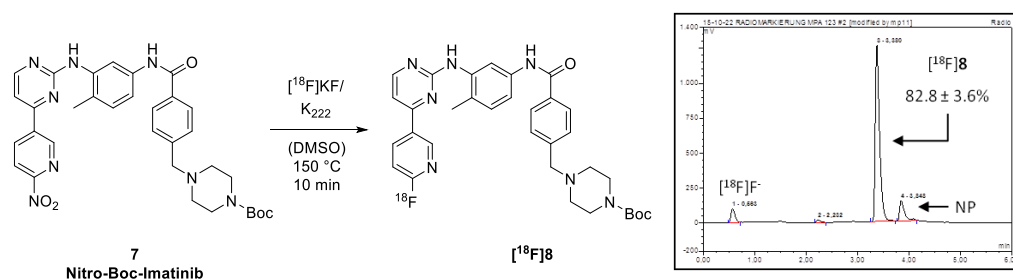


Abb. 55: Radiofluorierung des Nitropyridin-Precursors unter folgenden Bedingungen: **7** (8.0 μmol), [¹⁸F]KF/K₂₂₂ (400-1200 MBq), DMSO (500 μL), 150 °C, 10 min. Im Radio-HPLC-Chromatogramm ist neben dem Produkt auch freies [¹⁸F]Fluorid und Nebenprodukt (NP) sichtbar (Gradient: 0-65% MeCN + 0.1% TFA, 5 min).

Um die Reaktionsführung eventuell zu vereinfachen, wurde die Notwendigkeit der Boc-Schutzgruppe am Piperazin-Ring untersucht. Dazu wurde der Nitropyridin-Precursor vor der Reaktion entschützt und unter den ansonsten gleichen Bedingungen eingesetzt. Dabei konnte allerdings selbst nach 35 Minuten keine [^{18}F]Fluorid-Inkorporation beobachtet werden, was vermutlich am ungeschützten Amin lag. Dieses ist in der Lage mit [^{18}F]Fluorid über Wasserstoffbrücken zu wechselwirken und die Reaktivität des Fluorids herabzusetzen, sodass keine nukleophile Substitution mehr möglich ist.⁹⁵ Somit musste weiterhin eine zweistufige Radiosynthese verfolgt werden.

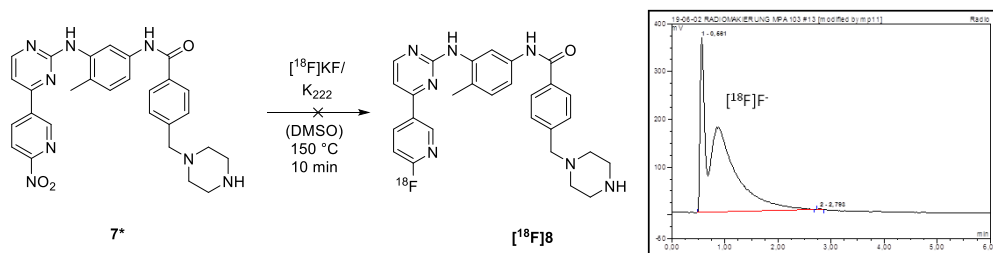


Abb. 56: Radiofluorierung des vorher entschützten Nitropyridin-Precursors. **7*** (8.0 μmol), [^{18}F]KF/K₂₂₂ (450-500 MBq), DMSO (500 μL), 150 °C, 10 min. Im Radio-HPLC-Chromatogramm ist nur freies [^{18}F]Fluorid sichtbar (Gradient: 0-65% MeCN + 0.1% TFA, 5 min).

Ein weiterer Aspekt der Optimierung war die verwendete Menge an Precursor. Die Mindeststoffmenge für eine hohe Ausbeute stellte laut Dolci 7.3 μmol dar, weshalb die Verwendung von 8.0 μmol bereits die untere Grenze darstellen sollte. Dennoch wurde untersucht, ob die Radiomarkierung auch mit weniger Precursor funktionierte. Wurden 4.0 μmol in 500 μL DMSO verwendet, konnte nach 10 Minuten bei 150 °C eine [^{18}F]Fluorid-Inkorporation von 76% erzielt werden, in 300 μL DMSO nur mehr 57%. Der Einsatz von 1.6 μmol in 300 μL DMSO zeigte hingegen nur 22% Inkorporation nach 10 Minuten. Diese Ergebnisse lagen in Übereinkunft mit den von Dolci et al. publizierten Daten, allerdings konnte zusätzlich eine Zeitabhängigkeit beobachtet werden. Wurde 2.5 Minuten nach Reaktionsbeginn die [^{18}F]Fluorid-Inkorporation bestimmt, zeigte sich bei allen Stoffmengen (1.6-8.0 μmol) eine Ausbeute von 76-83%, die jedoch wieder abnahm in Abhängigkeit von der eingesetzten Stoffmenge (1.6-4.0 μmol). Die Substitution des Fluorids blieb lediglich bei Verwendung von 8.0 μmol aus und führte zu einer konstanten Inkorporation (Abb. 57). Dieser Effekt wurde bereits von Kügler et al. bei der Radiofluorierung von 2-Chlorpyridinen beschrieben. Hier wurde vermutet, dass die C-F-Bindung durch das Pyridin und weitere aktivierende Gruppen (bei Kügler Aldehyde) derart polarisiert ist, dass eine Substitution durch schwache Nukleophile, wie Halogenide, möglich sei.⁹⁶ Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese [^{18}F]Fluorid-Exkorporation nicht weitergehend untersucht, da Reaktionsbedingungen gefunden wurden, die eine stabile [^{18}F]Fluorid-Inkorporation ermöglichten. Diese war für die Entschützung und

die weitere Verwendung zwingend notwendig, um eine möglichst hohe Gesamtausbeute zu erhalten.

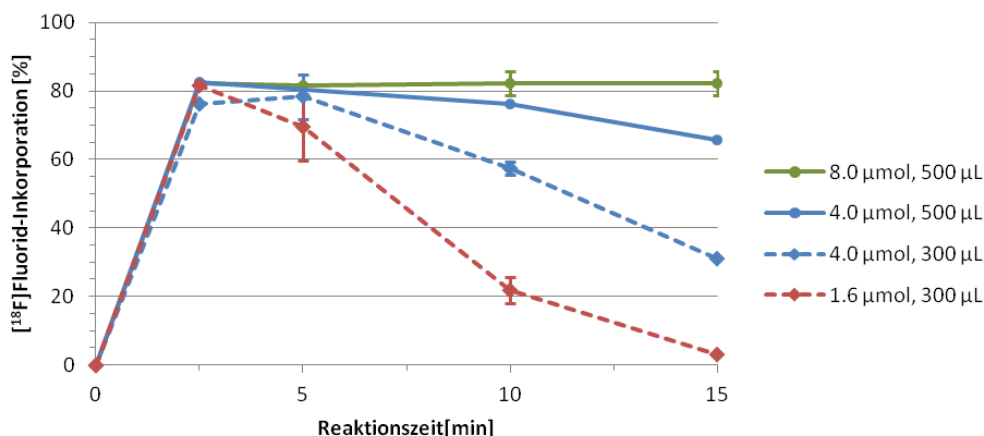


Abb. 57: Zeit-, Volumens- und Stoffmengen-Abhängigkeit der Radiofluorierung von **7**. Reaktionsbedingungen: **7** (1.6-8.0 μmol), [^{18}F]KF/K₂₂₂, DMSO (300-500 μL), 150 °C, n = 1-5.

Die Entfernung von Boc-Schutzgruppen erfolgt im Allgemeinen durch starke Säuren, wie beispielsweise Salzsäure oder Trifluoressigsäure (TFA).⁹⁷ Da letztere in der Festphasen-Peptidsynthese standardmäßig zur Entschützung eingesetzt wird und im Vakuum einfach entfernt werden kann, wurde nach der Radiofluorierung TFA zu einem Aliquot der Reaktionslösung gegeben. Entgegen der Erwartung fand bei Raumtemperatur allerdings keine Entschützung zum Produkt statt. Schrittweises Erhitzen auf 80 °C führte ebenfalls nicht zur Entschützung, sondern erzeugte lediglich unerwünschte Nebenprodukte (Abb. 58). Anschließend wurde die Verwendung von Salzsäure zur Entschützung evaluiert. Dazu wurden verschiedene Säure-Konzentrationen und Reaktionstemperaturen untersucht, wobei die effizienteste Entschützung bei Zugabe von 2 M Salzsäure zu einem Aliquot der Reaktionslösung bei 80 °C stattfand. Allerdings konnte so nur eine unzureichende Ausbeute von 20% nach 30 Minuten Reaktionszeit erzielt werden, da einerseits durch Hydrolyse [^{18}F]Fluorid freigesetzt wurde und andererseits ein Nebenprodukt gebildet wurde (Abb. 58). Aufgrund der harschen Reaktionsbedingungen wurde angenommen, dass dieses Nebenprodukt durch Oxidation entstanden war, weswegen der Salzsäure-Lösung Ascorbinsäure als Anti-Oxidanz zugesetzt wurde. Dies unterdrückte die Bildung des Nebenproduktes fast vollständig und beschleunigte gleichzeitig die Entschützung, sodass sich die Ausbeute des gewünschten Produktes [^{18}F]**9** mehr als verdreifachte auf 68% (Abb. 58). Um das zweite Problem der Entschützung – die Hydrolyse von [^{18}F]Fluorid – zu adressieren, wurde Salzsäure in Dioxan anstelle von wässriger Salzsäure verwendet. Diese zeigte allerdings keine reduzierte Hydrolyse, sondern nur eine deutlich verlangsamte Entschützung, sodass selbst durch höhere Konzentrationen und Ascorbinsäure-Zugabe nur eine Ausbeute von maximal 30% erreicht werden konnte. Diese

Vorevaluierungen an Aliquots der Reaktionslösung wurden anschließend auf den gesamten Reaktionsansatz übertragen und optimiert. Neben der Anpassung der Stoffmengen und Volumina wurde vor allem darauf geachtet, die Reaktionszeit von 30 Minuten zu verkürzen, um eine effizientere Radiosynthese zu ermöglichen.

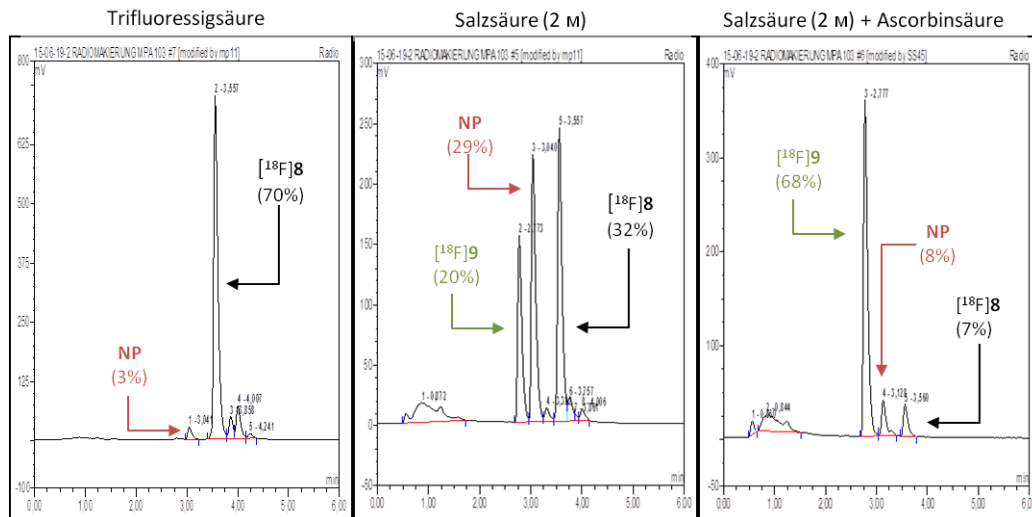


Abb. 58: Vergleich der verschiedenen Methoden zur Entschützung. Links: Trifluoressigsäure bei 80 °C für 25 min. Mitte: Salzsäure (2 M) bei 80 °C für 30 min. Rechts: Salzsäure (2 M) mit Ascorbinsäure (10 mg/mL) bei 80 °C für 30 min. Gradient: 0-65% MeCN + 0.1% TFA, 5 min. NP: Nebenprodukt.

Hochskaliert auf die Entschützung des kompletten Ansatzes mussten somit 200 µL einer Lösung aus 2 M Salzsäure mit Ascorbinsäure (10 mg/mL) zur Reaktionslösung gegeben und bei 85 °C erhitzt werden. Nach 12 Minuten Reaktionszeit konnte das entschützte Produkt $[^{18}\text{F}]\mathbf{9}$ so in einer analytischen Ausbeute von $47.4 \pm 7.6\%$ ($n = 18$) erhalten werden. Allerdings erhöhte sich in den größeren Ansätzen die Hydrolyse, sodass $45.1 \pm 9.1\%$ ($n = 18$) $[^{18}\text{F}]$ Fluorid freigesetzt wurde (Abb. 59). Eine Reduktion der Reaktionszeit konnte zwar die Hydrolyse senken, jedoch fand dann keine vollständige Entschützung mehr statt. Da der Ausbeute-Verlust durch die Hydrolyse geringer war, als durch die unvollständige Entschützung, wurde die Reaktionszeit bei 12 Minuten belassen.

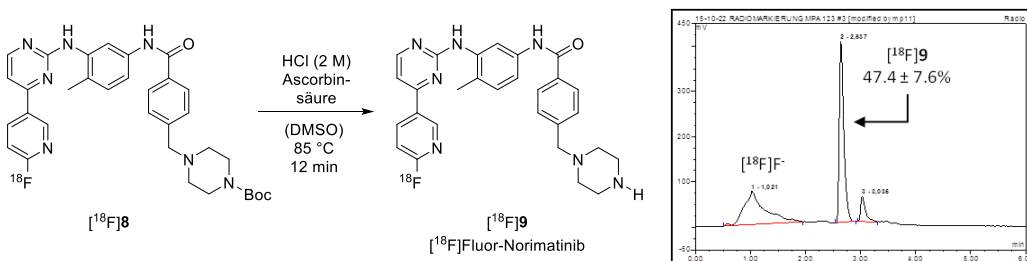


Abb. 59: Entschützung von $[^{18}\text{F}]\mathbf{8}$ zum Radiotracer $[^{18}\text{F}]$ Fluor-Norimatinib ($[^{18}\text{F}]\mathbf{9}$) mit Salzsäure (2 M) und Ascorbinsäure (10 mg/mL). Im Radio-HPLC-Chromatogramm ist neben dem entschützten Produkt, auch freies $[^{18}\text{F}]$ Fluorid und Nebenprodukt sichtbar (Gradient: 0-65% MeCN + 0.1% TFA, 5 min).

Den letzten Schritt der Radiosynthese stellte die Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC dar. Dazu wurde die Reaktionslösung nach Entschützung auf Raumtemperatur gekühlt und anschließend in die HPLC injiziert. Dabei stellte allerdings der hohe Anteil an DMSO ein Problem dar, da hierdurch keine Trennung auf der Säule stattfand und das Reaktionsgemisch unaufgereinigt eluiert wurde. Um die Parameter für die Aufreinigung zu evaluieren, wurde zunächst nur ein Teil des gesamten Ansatzes verwendet. Dadurch konnte zwar die Aufreinigung erfolgreich bewältigt werden, allerdings hätte mit diesem Verfahren eine unpraktikable schrittweise Aufreinigung des gesamten Ansatzes erfolgen müssen für die spätere Verwendung des Radiotracers für *in vivo*-Experimente. Um den Anteil an DMSO zu senken und somit den gesamten Ansatz auf einmal aufzureinigen, musste die Reaktionslösung verdünnt werden. Dabei mussten zwei limitierende Faktoren beachtet werden: das maximal mögliche Volumen war nicht nur durch den Injektionsloop der HPLC, sondern vor allem durch die Größe der Säule und den Laufmittel-Fluss (4 mL/min) beschränkt. Das Reaktionsvolumen ließ sich somit nicht unbegrenzt erhöhen, da ansonsten keine ausreichende Trennung stattfinden hätte können. Ein weiterer Faktor war die Löslichkeit des Reaktionsgemisches, da durch das Verdünnen kein Niederschlag erzeugt werden durfte. Aufgrund dieser Punkte wurde das Reaktionsgemisch zunächst mit Acetonitril/Wasser (1:1), später mit dem bisherigen Laufmittel der HPLC (MeCN/H₂O = 23:79 + 0.1% TFA) auf ein maximales Volumen von 2 mL verdünnt. Dadurch konnte zwar die Trennleistung gesteigert werden, allerdings konnte nicht der gesamte Reaktionsansatz in einem Lauf aufgereinigt werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde das Reaktionsgemisch nur mit Wasser verdünnt, wobei auf eine vollständige Vermischung geachtet werden musste, um eine erfolgreiche Trennung der Komponenten mittels HPLC zu erreichen. Eine weitere Optimierung bestand in der Wahl eines polarerer Laufmittels (MeCN/H₂O = 18:82 + 0.1% TFA), wodurch sich zwar die Retentionszeit auf 13-16 Minuten verlängerte, allerdings eine höhere Reinheit und molare Aktivität durch die verbesserte Trennung ermöglicht wurde. Zu entfernende Nebenprodukte bestanden unter anderem aus dem nicht markierten, aber entschütztem Nitropyridin-Precursor **7*** und dessen Oxidations- sowie Zersetzungsprodukten (Abb. 60).

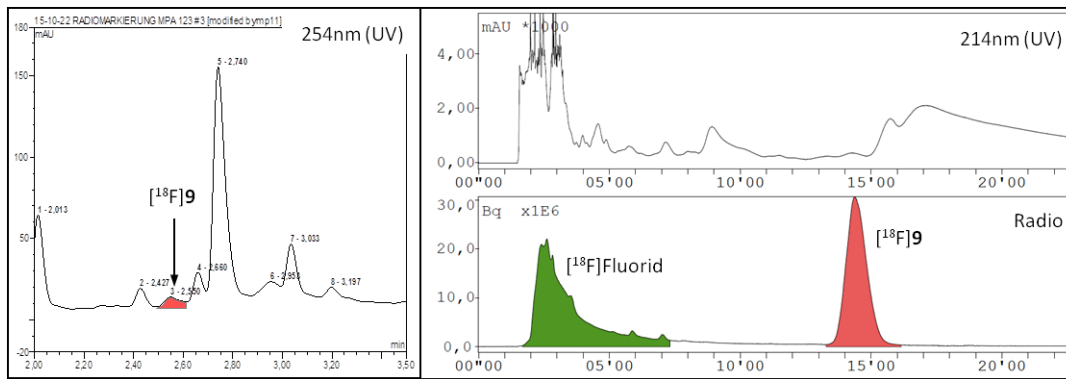


Abb. 60: Links: UV-Chromatogramm (254 nm) nach der Entschützung (vor der Aufreinigung) mit rot markiertem Produkt-Peak (Analytische HPLC, Gradient: 0-65% MeCN + 0.1% TFA, 5 min). Rechts: Chromatogramm der Aufreinigung (Semipräparative HPLC, 18% MeCN + 0.1% TFA, 30 min).

Anschließend wurde das gesammelte HPLC-Eluat mit Wasser verdünnt (Anteil an Acetonitril < 13%) und auf eine C18-Kartusche geladen, um das Produkt $[^{18}\text{F}]\mathbf{9}$ von organischen Lösungsmitteln (Acetonitril, DMSO) und eventuell vorhandenem freiem $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ zu befreien. Die Elution von der C18-Kartusche erfolgte mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch, da Ethanol im Gegensatz zu Acetonitril physiologisch geringere toxische Eigenschaften aufweist und somit zu höherem Maß physiologisch verträglich ist. Um den Radiotracer $[^{18}\text{F}]\mathbf{9}$ möglichst konzentriert zu erhalten, wurde eine fraktionierte Elution mit verschiedenen Ethanol-Anteilen evaluiert. Dabei zeigte sich allerdings eine fast gleichmäßige Verteilung des Radiotracers über alle Fraktionen, sodass durch Elution mit Ethanol (80%) nur etwa 70% des Radiotracers in 1 mL Volumen wiedergewonnen werden konnten. Diese Lösung hätte für *in vivo*-Versuch noch auf 8 mL mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt werden müssen, da der maximal tolerierte Ethanol-Gehalt für intravenöse Injektionen 10% betragen sollte. Zur Injektion des Radiotracers in Mäuse für PET/CT-Messungen wird jedoch eine höhere Volumensaktivität benötigt, als durch diese Verdünnung erhalten werden kann, sodass die Elutionsmethode modifiziert werden musste. Um die Retention auf der C18-Kartusche zu senken und somit eine schärfere Elution zu erhalten, wurde dem Elutionsmittel eine Säure zugesetzt. Diese sollte den Piperazin-Ring von $[^{18}\text{F}]\text{FNI}$ protonieren und somit die Retention senken. Um das Eluat auch für *in vivo*-Versuche benutzen zu können, wurde Ascorbinsäure gewählt, da diese nicht toxisch ist und zusätzlich als Radikalfänger in der Formulierung den Radiotracer stabilisieren könnte. Somit konnte durch Zusatz von Ascorbinsäure (0.125 mg/mL) zu Ethanol (50%) der Radiotracer fast vollständig (ca. 85%) von der C18-Kartusche eluiert werden in einem Volumen von 0.5 mL. Für *in vivo*-Versuche wurde abschließend mit Natriumphosphat-Puffer (1 mM, pH 7.4) auf einen pH-Wert von 7.0-7.4 neutralisiert und mit isotoner Kochsalzlösung auf ein Volumen von 2.5 mL verdünnt. Die radiochemische Ausbeute lag dabei nach etwa 95 Minuten Synthesedauer bei $19.6 \pm 2.5\%$ (d.c., $n = 7$) bei einer radiochemischen

Reinheit von über 99% und einer molaren Aktivität von 2.9 ± 1.2 GBq/ μmol ($n = 4$). Somit wurden etwa 130 MBq an Produkt erhalten, was einer Volumensaktivität von 52 MBq/mL entspricht. Da dieser Wert für die PET/CT-Messungen immer noch zu niedrig war, sollte die Radiosynthese mit größeren Aktivitätsmengen gestartet werden, um auf mindestens 100 MBq/mL zu kommen.

Beim Hochskalieren der Radiosynthese auf 3.8 GBq Startaktivität sank jedoch unerwarteterweise die radiochemische Ausbeute auf etwa 12%, weswegen die Reaktionsbedingungen leicht angepasst werden mussten. So wurde die Reaktionszeit der Radiofluorierung von 10 Minuten auf 8 Minuten verkürzt, was eine ^{18}F Fluorid-Inkorporation von $83.1 \pm 1.7\%$ ($n = 15$) ermöglichte. Ebenfalls zeigte eine kürzere Entschützung positive Effekte bezüglich der Ausbeute, da bereits nach 10 Minuten kein geschütztes Intermediat mehr vorlag und die Hydrolyse des ^{18}F Fluorids gesenkt werden konnte, sodass das entschützte Produkt vor der Aufreinigung in einer analytischen Ausbeute von $58.2 \pm 4.7\%$ ($n = 15$) vorlag. Als Laufmittel für die HPLC-Aufreinigung wurde Acetonitril/Wasser = 17:83 + 0.1% TFA verwendet, wobei das Produkt bei 17-21 Minuten eluierte. Unter diesen leicht angepassten Bedingungen wurde nach 90 Minuten Synthesedauer das Produkt ^{18}F Fluor-Norimatinib in einer radiochemischen Ausbeute von $22.2 \pm 3.3\%$ (d.c., $n = 15$) mit einer molaren Aktivität von 3.1 ± 1.7 GBq/ μmol ($n = 15$) erhalten (Abb. 61). Dabei lagen nach der Synthese etwa 490 MBq an Produkt vor, was einer für die PET/CT-Messungen geeigneten Volumensaktivität von 196 MBq/mL entspricht.

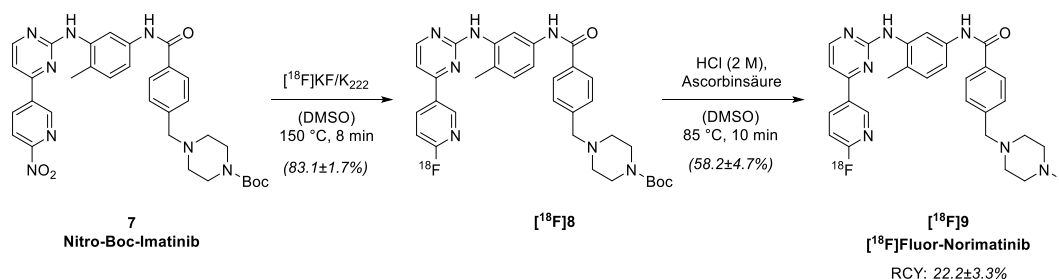


Abb. 61: Für größere Startaktivitäten optimierte Radiosynthese von ^{18}F Fluor-Norimatinib. In Klammern sind die analytisch bestimmten radiochemischen Ausbeuten angegeben. RCY: radiochemische Ausbeute (*radiochemical yield*).

Die erhaltenen vergleichsweise niedrigen molaren Aktivitäten könnten mehrere Gründe haben. Eine mögliche Ursache für die geringe molare Aktivität wäre eine Verunreinigung des Produktes mit nicht-aktiven ^{19}F Fluor-Norimatinib. Die einzige ^{19}F Fluor-Quelle in der Synthese stellt Trifluoressigsäure als Laufmittelzusatz während der semipräparativen Aufreinigung dar, jedoch ist ein solcher Isotopen-Austausch unter diesen Bedingungen höchst unwahrscheinlich, da auch zahlreiche andere Radiofluorierungen Triflate verwenden und dennoch hohe molare Aktivitäten vorweisen können.⁹⁸ Andererseits wurden unter den harschen Reaktionsbedingungen diverse Nebenprodukte gebildet, die möglicherweise

teilweise nicht mittels HPLC-Aufreinigung vom Produkt abgetrennt werden konnten. Da die Stoffmenge des Vorläufers und damit der Nebenprodukte ein Vielfaches der Stoffmenge des eingesetzten [^{18}F]Fluorids entsprachen, wurde die Isolation des gewünschten Produktes erschwert. Ein mögliches Nebenprodukt stellt Hydroxy-Norimatinib dar, das durch saure Hydrolyse während der Entschützung von [^{18}F]**8** entstehen könnte. Dieses Nebenprodukt entsteht zusätzlich als Zerfallsprodukt und konnte bei den Stabilitätsuntersuchungen unter den verwendeten Bedingungen der HPLC-Analytik nicht von [^{18}F]**9** unterschieden werden, da beide ein vergleichbares Retentionsverhalten aufwiesen. Da die semipräparative Aufreinigung nach der Entschützung ebenfalls in saurem Milieu stattfand, ist nicht auszuschließen, dass während der Aufreinigung ebenfalls [^{18}F]**9** hydrolysiert wurde und somit eine Mischung aus dem gewünschten Produkt und Hydroxy-Norimatinib erhalten wurde. Ein Wechsel des Elutionsmittels auf ein weniger saures Lösungsmittel-Gemisch wurde allerdings aufgrund des vorliegenden Trennproblems nicht für sinnvoll erachtet, um die Trennschärfe nicht weiter zu reduzieren. Um die molare Aktivität dennoch zu erhöhen, bietet es sich an, in weiteren Untersuchungen verschiedene Säulenmaterialien und Elutionsmittel-Gemische zu evaluieren. Dabei sollte auf eine gute Abtrennung von fluorierten Aromaten bei möglichst neutralen Eluenten geachtet werden.

3.2.2 [^{18}F]DOG1

Die Radiosynthese von [^{18}F]Fluor-DOG1 sollte als einstufige Radiofluorierungs-Reaktion mit anschließender Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC durchgeführt werden. Dabei musste auf Grund des für nukleophile Substitutionen ungünstigen Systems auf besonders reaktive Vorläufer-Moleküle zurückgegriffen werden, die eine kurze Reaktionszeit mit hohen Ausbeuten versprechen. Dazu wurden drei verschiedene Ansätze gewählt: die Nitrogruppe, die Triazengruppe und ein Borsäureester. Dabei stellt die Nitrogruppe in dieser Reihe die unreaktivste Abgangsgruppe dar, die allerdings auch unter einfachen Reaktionsbedingungen handhabbar ist. Die Triazengruppe hingegen stellt eine Quelle zur *in situ*-Generierung eines Diazoniumions dar, das eine sehr hohe Reaktivität aufweist und daher zur Bildung zahlreicher Nebenprodukte neigt, falls die Reaktionsbedingungen nicht optimiert werden. Der Borsäureester sticht aus dieser Reihe heraus, da er an sich keine hohe Reaktivität besitzt, allerdings durch Übergangsmetall-Katalyse vielfältige Reaktionsmöglichkeiten besitzt.

3.2.2.1 Nitro-DOG1

Die Nitro-Abgangsgruppe stellt in der aromatischen nukleophilen Substitution eine häufig verwendete Methode dar und wurde auch hier verwendet. Dabei musste die

Radiofluorierung (Abb. 62) aufgrund des elektronenreichen Systems unter möglichst hohen Temperaturen stattfinden, weswegen als Lösungsmittel zunächst DMSO gewählt wurde. Dieses ermöglichte zudem eine ausreichend hohe Konzentration des schlecht löslichen Precursors Nitro-DOG1 (**27**) von 16 mM.

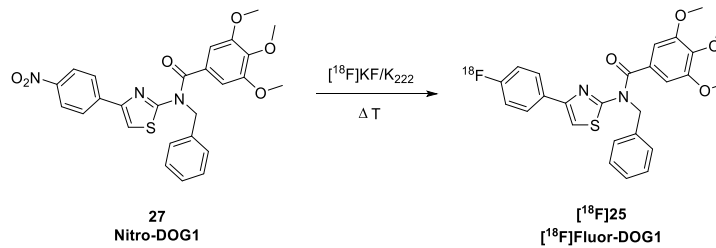


Abb. 62: Schematische Darstellung der geplanten Radiomarkierung von Nitro-DOG1 (**27**) zu [¹⁸F]Fluor-DOG1 ([¹⁸F]25).

Allerdings zeigte sich bei der Radiomarkierung bei 120-140 °C in DMSO bzw. DMF keine Produktbildung, da sich der Precursor innerhalb weniger Minuten zersetzte (Abb. 63). Daraufhin wurde die Stabilität von Nitro-DOG1 in Abhängigkeit von Lösungsmittel, Basenzusatz und Temperatur untersucht. Dabei zeigte der Precursor **27** in allen Lösungsmitteln bis 140 °C eine hohe Stabilität von über 98%, wenn keine Base zugesetzt wurde. Die Verwendung von Kaliumcarbonat hingegen führte dazu, dass selbst bei niedrigen Temperaturen von 80 °C innerhalb weniger Minuten kaum noch intakter Precursor vorlag. Als mildere Alternative zu Kaliumcarbonat wurde Kaliumoxalat evaluiert. Diese führte zwar auch zur teilweisen Zersetzung des Precursors, lieferte aber auch bei hohen Temperaturen noch über 60% intakten Precursor (Tab. 2).

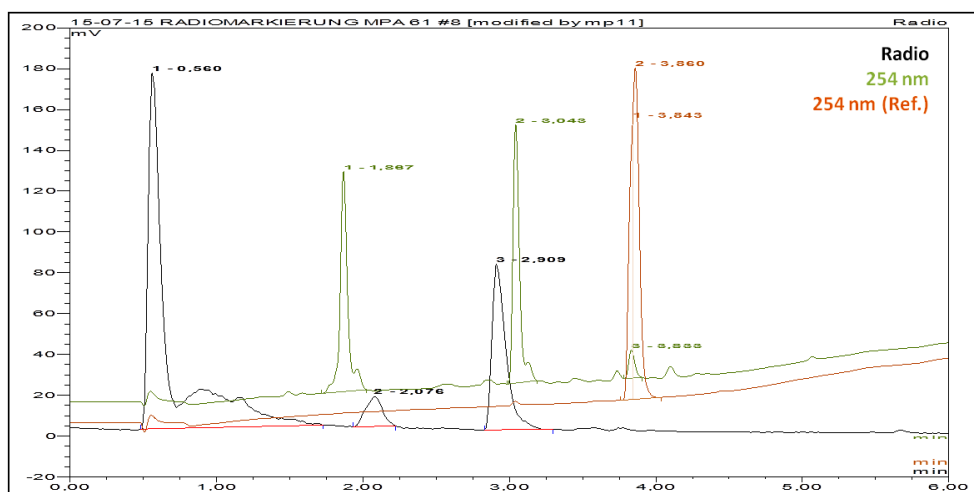


Abb. 63: Chromatogramm der Radiomarkierung von Nitro-DOG1 (**27**). Durch fast vollständige Zersetzung (>95%) des Precursors wurden nur radioaktive Nebenprodukte und freies [¹⁸F]Fluorid detektiert. Schwarz: Signal des Aktivitätsdetektors, grün: UV-Signal (254 nm), orange: UV-Signal (254 nm) des Precursors und des Fluor-Standards **25**. Bedingungen: **27** (8 μmol), DMSO (500 μL), [¹⁸F]KF/K₂₂₂, K₂CO₃ (12.5 μmol), 120 °C, 20 min.

Tab. 2: Evaluierung der Stabilität von Nitro-DOG1 (**27**) in Abhängigkeit von Lösungsmittel, Base und Temperatur. Bedingungen: **27** (4 μmol), K_{222} (6.25 mg), Base (6.25 μmol), LM (250 μL), 20 min. *) 10 min.

Temp.	DMSO			DMF			MeCN		
	-	K_{222} , K_2CO_3	K_{222} , $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$	-	K_{222} , K_2CO_3	K_{222} , $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$	-	K_{222} , K_2CO_3	K_{222} , $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$
80 °C	>98%*	14%*	>98%*				>98%	7%	93%
100 °C	>98%	10%	91%	>98%	6%	78%	>98%	2%	86%
120 °C	>98%	4%	82%	>98%	<1%	84%	>98%	<1%	74%
140 °C	>98%	<1%	63%	>98%	<1%	76%	>98%	<1%	61%

Die Radiomarkierung wurde vor diesen Ergebnissen zunächst in DMF, sowohl mit Kaliumcarbonat, als auch mit Kaliumoxalat durchgeführt. Des Weiteren wurden noch Acetonitril und ein Acetonitril-*tert*-Butanol-Gemisch – jeweils wieder mit beiden Basen – verwendet, jedoch konnte unter keiner dieser Bedingungen eine Radiomarkierung erfolgreich absolviert werden (Tab. 3). Der Grund hierfür lag vermutlich daran, dass die für die nukleophile Substitution notwendigen hohen Temperaturen nicht erreicht werden konnten, bevor sich der Nitro-Precursor zersetzte. Eines dieser Zersetzungsprodukte stellte **26** dar, das durch Freisetzung des Trimethoxybenzoesäure-Fragmentes unter Spaltung der Amidbindung gebildet wurde. Da diese harschen Bedingungen nicht für das zu markierende Molekül geeignet waren (Abb. 64), wurde die Markierungsstrategie geändert, sodass nun auf die reaktivere Triazen-Abgangsgruppe zurückgegriffen wurde.

Tab. 3: Untersuchte Markierungsbedingungen von Nitro-DOG1 (**27**). LM: Lösungsmittel.

Precursor Menge [μmol]	LM	Volumen LM [μL]	Base (12.5 μmol)	Temperatur [°C]
8	DMSO	500	Kaliumcarbonat	120
				140
			Kaliumoxalat	150
				180
16		1000		150-180
8	DMF	500	Kaliumcarbonat	120
				140
			Kaliumoxalat	150
8	MeCN	500	Kaliumoxalat	110
8	MeCN/ <i>t</i> BuOH (2:1)	500	Kaliumcarbonat	110
				Kaliumoxalat

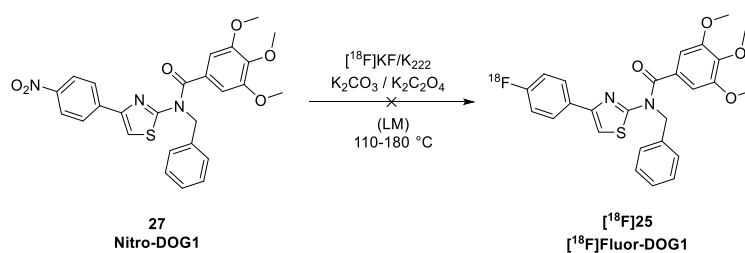


Abb. 64: Radiosynthese von ^{18}F Fluor-DOG1 (^{18}F 25) ausgehend vom Nitro-Precursor **27**. LM: DMSO, DMF, MeCN, MeCN: t BuOH (2:1).

3.2.2.2 Triazen-DOG1

Als hochreaktive Abgangsgruppe ist das Diazoniumion zwar für die nukleophile Substitution äußerst geeignet, allerdings ist dieses nur bedingt handhabbar, da die Zersetzung unter Stickstoff-Abspaltung bei den meisten Verbindungen bereits bei Raumtemperatur rasch eintritt. Allerdings können Diazoniumionen *in situ* aus Triazenen generiert werden und so direkt mit einem Nukleophil umgesetzt werden. Diese als Wallach-Reaktion bekannte Strategie findet auch in der Radiochemie Anwendung bei deaktivierten Systemen, die die hohe Reaktivität des Diazoniumions benötigen.^{89,90,99,100} Dabei wird der Triazen-Precursor zunächst unter sauren Bedingungen wie bereits in Abb. 45 gezeigt, durch Abspaltung von Piperidin in das entsprechende Diazoniumion umgewandelt, das eine exzellente Abgangsgruppe darstellt. Bei Radiosynthesen mit Diazoniumionen muss allerdings darauf geachtet werden, nicht Kryptofix zu verwenden, da dieses mit dem Diazoniumion einen Komplex bildet und somit die Reaktivität stark herabsetzt.^{100,101} Als alternativer Kryptand bietet sich hier der kleinere Kronenether 15-Krone-5 (15-C-5) an.

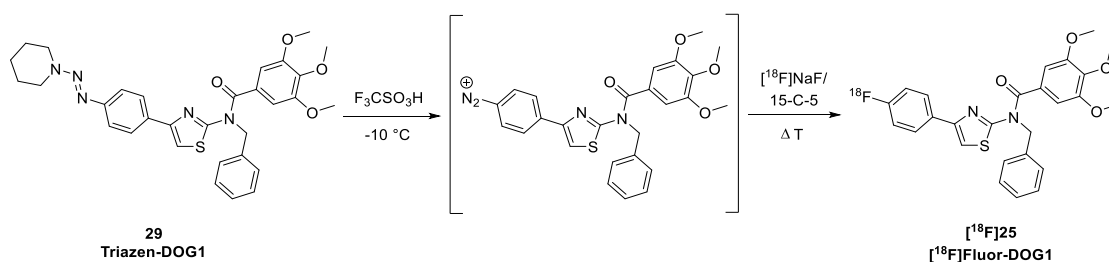


Abb. 65: Schematische Darstellung der geplanten Radiomarkierung von Triazen-DOG1 (**29**) zu ^{18}F Fluor-DOG1 (^{18}F 25). 15-C-5: 15-Krone-5.

Diese theoretisch guten Voraussetzungen für die Radiomarkierung von Triazen-DOG1 (**29**) wurden jedoch in der praktischen Umsetzung vor einige Probleme gestellt. Pages *et al.* konnten zeigen, dass nur sehr wenige Lösungsmittel überhaupt in Frage kommen bei dieser Reaktion. DMSO, Methanol oder Pyridin sind in der

Lage, das Diazoniumion zu reduzieren, während THF, Ethylacetat und Cyclohexan zu einer Protodediazotierung führen. Ebenso konkurrieren nukleophile Lösungsmittel wie Ethanol, Acetonitril und Trichlorethanol mit dem Fluoridion, sodass eine Fluordediazotierung nicht möglich ist. Fluorierte Lösungsmittel wie Trifluorethanol, Ethyltrifluoroacetat und Trifluoressigsäure führten zwar bei den nicht-radioaktiven Vorversuchen von Pages et al. zu hohen Ausbeuten, allerdings konnte gezeigt werden, dass diese auch in Abwesenheit von Fluoridionen in der Lage sind eine Fluordediazotierung durchzuführen. Sie sind somit nicht für die Radiomarkierung geeignet, da eine sehr geringe spezifische Aktivität zu erwarten wäre. Somit blieb für die Radiomarkierung nur Tetrachlormethan übrig, da es laut Literatur keine der oben genannten Probleme aufwies.⁸⁹

Die Radiosynthese gliederte sich in zwei Schritte: zuerst wurde der Triazen-Precursor **29** unter Eiskühlung mit Trifluormethansulfonsäure versetzt, um das Diazoniumion zu generieren. Anschließend wurde [¹⁸F]Fluorid zugegeben und erhitzt, um die Fluordediazotierung zu starten. Dabei wurde allerdings die geringe Löslichkeit, nicht nur des Triazen-Precursors, sondern auch des [¹⁸F]Fluorid-Kryptanden-Gemisches in Tetrachlormethan zum Problem. Einerseits führte vermutlich die heterogene Suspension des Precursors zu einer unvollständigen Piperidin-Abspaltung, andererseits konnte das [¹⁸F]Fluorid-Kryptanden-Gemisch nur zu einem Bruchteil (10-20%) in den zweiten Reaktor überführt werden. Bei der Reaktion selbst ging noch ein Teil der Reaktivität durch Zugabe der Säure als gasförmiges [¹⁸F]HF verloren, sodass nach Reaktionsende nur etwa 8-25 MBq an Aktivität im Reaktionsgefäß verblieben waren. Ein Hochskalieren durch eine höhere Startaktivität war nicht möglich, da die Menge an Base und Kryptand genau festgelegt werden musste anhand der Menge an Precursor und Säure.

Ein weiteres Problem stellte die Vielzahl an Reaktionsprodukten dar. Wie in Abb. 66 gezeigt, wurden bei der Reaktion nicht nur etliche nicht-radioaktive Produkte gebildet, sondern auch mehrere radioaktiv markierte. Allerdings konnte das gewünschte Produkt [¹⁸F]Fluor-DOG1 unter den radioaktiven Produkten nicht nachgewiesen werden. Ein Vergleich mit dem Standard [¹⁹F]Fluor-DOG1 konnte zeigen, dass kein Signal im Radio-Chromatogramm dem UV-Signal des Standards zugeordnet werden kann, da die Radio-Signale im verwendeten HPLC-System etwa 5 Sekunden nach dem UV-Signal aufgezeichnet werden. Im Radio-Chromatogramm (Abb. 66) befindet sich jedoch nur ein Radio-Signal etwa 4 Sekunden vor dem UV-Signal des Standards, sodass nicht davon ausgegangen werden kann, dass es sich dabei um das gewünschte Produkt [¹⁸F]Fluor-DOG1 handelte.

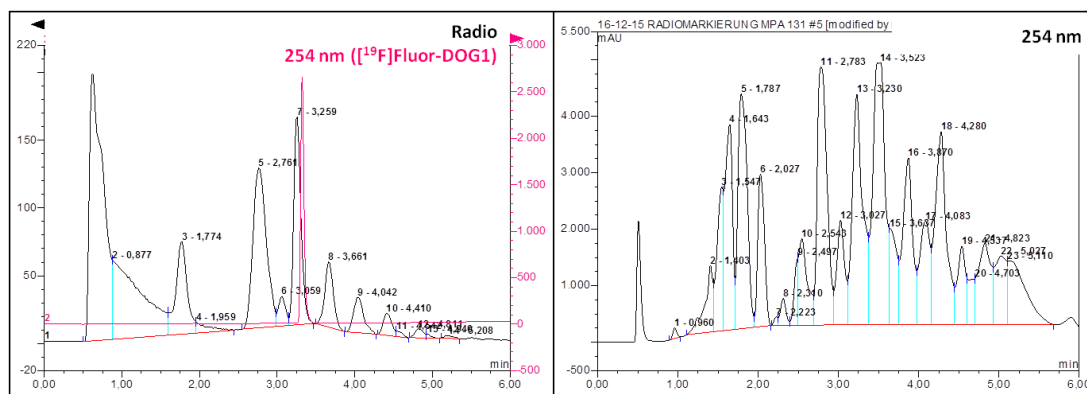


Abb. 66: Chromatogramme der $[^{18}\text{F}]$ Fluoriediazotierung. Links: Radio-Chromatogramm (schwarz) mit Überlagerung des Standards $[^{19}\text{F}]$ Fluor-DOG1 (pink). Das UV-Signal kommt beim verwendeten HPLC-System etwa 5 Sekunden vor dem dazugehörigen Radio-Signal, weswegen keines der Radio-Signale dem gewünschten Produkt zugeordnet werden konnte. Rechts: das UV-Chromatogramm (254 nm) zeigt die Vielzahl an Reaktionsprodukten. Bedingungen: **29** (25 mg, 43.75 μmol), TfOH (7.62 μL , 87.5 μmol), Na_2CO_3 (1.83 mg, 17.5 μmol), 15-C-5 (4.33 μL , 21.86 μmol), CCl_4 (600 μL), 90 $^\circ\text{C}$, 30 min.

Die Parameter der Radiomarkierung wurden nur bezüglich der Precursor-Menge (5 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg) und des Lösungsmittelvolumens (400-800 μL) variiert, da aus den ausführlichen Untersuchungen von Pages et al. die restlichen Parameter (Säure, Lösungsmittel, Kryptand, Base, Temperatur, Reaktionsdauer) bereits optimiert waren. Dennoch konnte unter keiner dieser Reaktionsbedingungen das Produkt $[^{18}\text{F}]$ Fluor-DOG1 erhalten werden (Abb. 67). Selbst im Falle einer erfolgreichen Radiomarkierung hätte das Produkt anschließend mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt werden müssen, was aufgrund der Menge an Nebenprodukten stark erschwert bis unmöglich gewesen wäre. Aus diesen Gründen wurde diese Markierungsstrategie nicht weiter verfolgt.

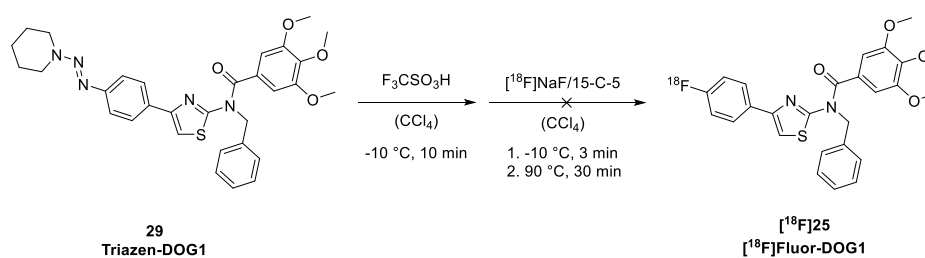


Abb. 67: Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]$ Fluor-DOG1 ($[^{18}\text{F}]$ 25) ausgehend vom Triazen-Precursor **29**. Bedingungen: **29** (5-25 mg), TfOH (2.0 Äq.), Na_2CO_3 (0.4 Äq.), 15-C-5 (0.5 Äq.), CCl_4 (400-800 μL).

3.2.2.3 *BPin-DOG1*

Da die bisher untersuchten Abgangsgruppen zwar nicht zum radiofluorierten Produkt führten, stattdessen aber entweder eine zu geringe Reaktivität besaßen

oder aufgrund ihrer zu hohen Reaktivität eine Vielzahl an Nebenprodukten hervorriefen, wurde eine stabilere Abgangsgruppe benötigt, die sich idealerweise spezifisch mit Fluorid substituieren lässt. Von Tredwell et al. wurde 2014 eine Methode publiziert, bei der mit Hilfe von an Luft stabilen Kupfer(II)-Komplexen Aryl-Borsäureester in guten Ausbeuten radiofluoriert werden konnten.¹⁰² Durch weitere Optimierungen wurden anfängliche Limitationen, wie beispielsweise eine stark begrenzte Hochskalierbarkeit oder die Bandbreite an Substraten, aufgehoben, sodass inzwischen sowohl elektronenarme, als auch elektronenreiche (Hetero-)Aromaten mit Startaktivitäten im Gigabecquerel-Bereich auf diese Weise radiomarkiert werden können.^{98,103} Auf Basis dieser vielversprechenden Ergebnisse sollte nun diese elegante Radiomarkierungsstrategie zur Synthese von [¹⁸F]Fluor-DOG1 angewendet werden.

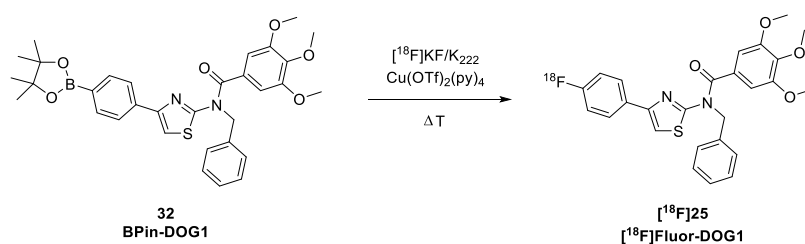


Abb. 68: Schematische Darstellung der geplanten Radiomarkierung von BPin-DOG1 (**32**) zu [¹⁸F]Fluor-DOG1 (**[¹⁸F]25**).

In der Literatur wird beschrieben, dass der Katalysator Tetrakis(pyridin)kupfer(II)-triflat durch die üblicherweise in Radiomarkierungen verwendete Menge an Kaliumcarbonat (10-15 μmol) bereits während der Reaktion zersetzt wird und somit die Ausbeute gesenkt wird. Um dieses Problem zu vermeiden, beschreibt Zlatopolskiy et al. die Markierung von Borsäureestern unter Verwendung kleinster Mengen Kaliumcarbonat (0.43 μmol) und Kryptofix (0.72 μmol).¹⁰³ Diese Methode konnte jedoch nicht erfolgreich angewendet werden, da durch den niedrigen Basengehalt die Elution des [¹⁸F]Fluorids von der QMA-Kartusche stark erschwert wurde. Erst durch Verdreifachung von Kaliumcarbonat auf 1.30 μmol und einen deutlich höheren Wasseranteil (900 μL statt 200 μL) in der Elutionslösung konnte ein Großteil der Aktivität in das Reaktionsgefäß überführt werden. Obwohl so das gewünschte Produkt [¹⁸F]Fluor-DOG1 erhalten werden konnte, lag die analytische Ausbeute bei nur 19%. Aufgrund des erhöhten Wasser-Anteils wurde zwar die azeotrope Trocknung öfter wiederholt, allerdings kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass noch Spuren von Wasser vorhanden waren und so die Radiomarkierung beeinflussten.

Eine deutliche Steigerung der Ausbeute konnte jedoch mit der Methode nach Preshlock et al. erreicht werden.⁹⁸ Hier wird die Menge an Base nur geringfügig reduziert auf 6.7 μmol , allerdings werden Kaliumoxalat und Kaliumcarbonat in einem molaren Verhältnis von etwa 8.4:1 verwendet. Mit diesem deutlich milderen

Basengemisch sollte der Kupfer-Katalysator weitestgehend intakt bleiben und gleichzeitig eine effiziente Elution des $[^{18}\text{F}]$ Fluorids von der QMA-Kartusche möglich sein. Mit der Elutionslösung aus Kaliumoxalat (6.0 μmol), Kaliumcarbonat (0.7 μmol) und Kryptofix (16.7 μmol) in Acetonitril (800 μL) und Wasser (200 μL) konnten so etwa 98.7% der Aktivität in das Reaktionsgefäß eluiert werden. Die $[^{18}\text{F}]$ Fluorid-Inkorporation betrug in DMF 36% und konnte durch den Wechsel auf *N,N*-Dimethylacetamid (DMA) unter sonst gleichen Bedingungen auf 69% erhöht werden. Da neben dem Lösungsmittel vor allem die verwendete Base einen entscheidenden Einfluss auf die Radiomarkierung hat, wurde auf die Zugabe von Kaliumcarbonat verzichtet, sodass nur mit Kaliumoxalat (6.0 μmol) eluiert wurde. Dabei zeigte sich neben einer leicht erhöhten Elution (99.4%) ebenfalls eine deutliche Steigerung der $[^{18}\text{F}]$ Fluorid-Inkorporation auf bis zu 83%. Die Methode nach Preshlock et al. war somit gegenüber der von Zlatopolskiy et al. nicht nur hinsichtlich der Ausbeute überlegen, sondern benötigte dazu auch weniger Precursor (20 μmol statt 60 μmol) und sorgte für eine effizientere Elution der Aktivität.

Tab. 4: Übersicht der Markierungsbedingungen von BPin-DOG1 (**32**) zu $[^{18}\text{F}]$ Fluor-DOG1 (**25**). 220-355 MBq $[^{18}\text{F}]$ Fluorid, 120 °C, 20 min.

K ₂₂₂ [μmol]	K ₂ CO ₃ [μmol]	K ₂ C ₂ O ₄ [μmol]	BPin-DOG1		Cu(OTf) ₂ (py) ₄		Lösungsmittel	analytische Ausbeute
			[mg]	[μmol]	[mg]	[μmol]		
2.15	1.30	-	35.2	60	3.6	5.3	DMF/MeCN (10:1, 330 μL)	19.3%
16.7	0.72	6.02	11.7	20	13.6	20	DMF (400 μL)	36.5%
16.7	0.72	6.02	11.7	20	13.6	20	DMA (400 μL)	68.6%
16.7	-	6.02	11.7	20	13.6	20	DMA (400 μL)	83.3%

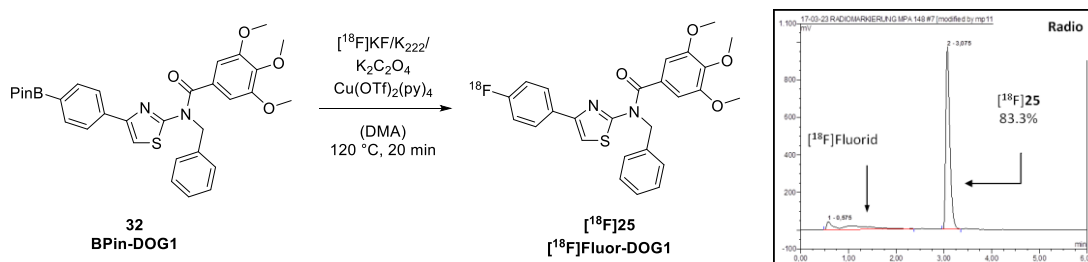


Abb. 69: Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]$ Fluor-DOG1 ($[^{18}\text{F}]$ **25**) ausgehend vom BPin-Precursor **32**. Bedingungen: **32** (20 μmol), $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$ (20 μmol), $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (6.02 μmol), DMA (400 μL), 120 °C, 20 min.

Beim Hochskalieren der Radiosynthese auf höhere Startaktivitäten zeigte sich die Methode nach Preshlock mit dem Oxalat-Carbonat-Gemisch jedoch geringfügig vorteilhafter, weswegen auf die Zugabe von Kaliumcarbonat nicht weiter verzichtet

wurde. Bei einer Startaktivität von etwa 700 MBq konnte eine [^{18}F]Fluorid-Inkorporation von 66.2% erreicht werden, wohingegen durch Einsatz von 5 GBq [^{18}F]Fluorid eine Inkorporation von bis zu 83 % möglich waren unter ansonsten identischen Bedingungen. Vor der Aufreinigung mittels HPLC musste das Reaktionsgemisch verdünnt werden, da die Menge an DMA ansonsten zu einer sofortigen Elution führte. Durch Verdünnen mit einem Acetonitril-Wasser-Gemisch wurde der Anteil an DMA auf 33.3% gesenkt (DMA/MeCN/H₂O = 2:3:1) und somit eine ausreichende Trennung erreicht. Eine weitere Senkung des Anteils an organischen Lösungsmitteln wäre zwar vorteilhaft bezüglich der Trennleistung, konnte allerdings aufgrund der Löslichkeit der Reaktionskomponenten nicht erreicht werden. Die Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer HLPC mit isokratischer Elution (MeCN/H₂O = 52:48 + 0.1% TFA), wobei das Produkt zwar radiochemisch sauber erhalten wurde, allerdings eine geringfügige Verunreinigung im UV-Chromatogramm ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar war. Die Verwendung eines niedrigeren Acetonitril-Anteils im Laufmittel würde zwar die Retentionszeit erhöhen und damit theoretisch zu einer besseren Trennleistung führen, allerdings würde dadurch auch eine ungünstige Verbreiterung des Peaks stattfinden. Die Entfernung von Acetonitril und Trifluoressigsäure erfolgte durch Aufreinigung über eine C18-Kartusche, wobei nach fraktionierter Elution mit Ethanol (90%, + 0.125 mg/mL Ascorbinsäure) über 80% des nach HPLC-Aufreinigung erhaltenen Produktes in einem Volumen von 500 μL erhalten werden konnten. Durch diese 85-minütige Synthese konnte der Radiotracer [^{18}F]Fluor-DOG1 in einer radiochemischen Ausbeute von $34.0 \pm 11.1\%$ (d.c., $n = 7$) mit einer molaren Aktivität von $8.21 \pm 2.95 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ hergestellt werden. Eine Erhöhung der molaren Aktivität könnte durch Optimierung der Aufreinigung erzielt werden, da hier durch den hohen Anteil an organischen Lösungsmitteln in der Reaktionsmischung die Trennleistung der semipräparativen HPLC stark herabgesetzt wurde. Bedingt durch die hohen Stoffmengen und die hohe Lipophilie der Reaktionskomponenten führte eine weitere Senkung des organischen Lösungsmittels jedoch zur Präzipitation, wodurch eine Aufreinigung mittels HPLC nicht möglich war. Um den Einfluss des organischen Lösungsmittels auf die Elution zu verringern, wäre ein größerer Säulendurchmesser zielführend. Dieser hätte zusätzlich höhere Kapazitäten bezüglich der Stoffmengen und würde somit die Isolation des gewünschten Produktes von Nebenprodukten und Reaktanden erleichtern. Eine andere Möglichkeit wäre eine zweistufige Aufreinigung, bei der im ersten Schritt eine Vorreinigung stattfände, bei der große Teile der Reaktionskomponenten entfernt würden. Somit wäre die Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC im zweiten Schritt vereinfacht. Allerdings hätte diese zweistufige Aufreinigung den Nachteil des höheren zeitlichen Aufwandes und größerer Verluste.

3.3 In vitro-Evaluierungen

3.3.1 Lipophilie und Stabilität

Die Verteilung einer Substanz im Organismus wird über vier Kriterien charakterisiert: Absorption (bzw. Verabreichung), Distribution, Metabolismus und Exkretion. Dabei beeinflusst die Lipophilie der Substanz diese Punkte entscheidend, da je nach Wirkort und –mechanismus das Medikament eine bestimmte Lipophilie aufweisen muss. Für den passiven Transport von Imatinib zum intrazellulären Rezeptor ist beispielsweise eine relativ hohe Lipophilie notwendig, um durch die ebenfalls lipophilen Zellmembranen diffundieren zu können. Andererseits werden stark lipophile Substanzen in der Regel nicht renal ausgeschieden, sondern über hepatobiliären Metabolismus in hydrophilere Verbindungen umgewandelt und anschließend über den Darm eliminiert. Somit beeinflusst die Lipophilie einer Substanz entscheidend die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik.^{81,82} Sie wird als numerischer Wert über den Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ermittelt und berechnet sich wie folgt:

$$\log D = \log \frac{c(\text{Substrat in Octanol-Phase})}{c(\text{Substrat in Wasser-Phase})}$$

Dabei werden jeweils alle Formen des Substrats (ungeladen, geladen) je Phase zusammengezählt. Um die physiologischen Bedingungen möglichst genau nachzuahmen, wurde anstelle von Wasser ein Phosphatpuffer (0.05 M, pH 7.4) verwendet, der zudem die Vergleichbarkeit mit anderen Substanzen erhöht, da der pH-Wert der Pufferlösung auch bei sauren oder basischen Substanzen stabil bei pH 7.4 bleibt.

3.3.1.1 Fluor-Norimatinib

Bei der radiometrischen Ermittlung der Lipophilie von [¹⁸F]FNI ([¹⁸F]9) ergab sich ein logD-Wert von 1.16 ± 0.01 (n = 6). Dieser Wert liegt deutlich unter dem der Leitstruktur Imatinib ($\log D = 2.34 \pm 0.17$ ¹⁰⁴), sodass die angestrebte Reduktion der Lipophilie erreicht wurde, welche zu einer verringerten Aufnahme des Radiotracers in die Leber führen sollte. Inwiefern diese reduzierte Lipophilie die Diffusion durch die Zellmembran beeinflusst, wird in Abschnitt 3.3.2 erörtert.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist eine für die Bildakquisition ausreichend hohe Stabilität des Radiotracers, um eine diagnostische Genauigkeit zu gewährleisten. Dazu wurden unterschiedliche Systeme verwendet, um im Falle einer Zersetzung des Radiotracers die Ursachen genauer beschreiben zu können. So wurde für die Evaluierung der chemischen Stabilität Fluor-Norimatinib in injektionsfertiger phosphatgepufferter Kochsalzlösung bei pH 7.4 bei Raumtemperatur untersucht. Dabei zeigte sich eine Stabilität von über 99% über 2 Stunden, sodass eine Appli-

kation des Tracers innerhalb dieses Zeitrahmens nach Herstellung ohne Qualitätsverluste durchgeführt werden kann. Um den Einfluss von Enzymen im Blut auf die Stabilität zu bestimmen, wurde Fluor-Norimatinib sowohl in humanem Blutserum, als auch in Blutserum von Ratten bei 37 °C inkubiert. Dabei zeigte sich in humanem Serum nach 2 Stunden ebenfalls eine Stabilität von über 99%, wohingegen in murinem Serum geringe Mengen an Metaboliten des Radiotracers gefunden werden konnten (Abb. 70). Dies begründet sich in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Serumenzyme von Mensch und Nagetieren. Da nach 2 Stunden bei 37 °C jedoch noch über 95% des Radiotracers intakt waren, konnte davon ausgegangen werden, dass Fluor-Norimatinib eine ausreichend hohe Stabilität für PET-Messungen mit 2 Stunden Akquisitionszeit besaß.

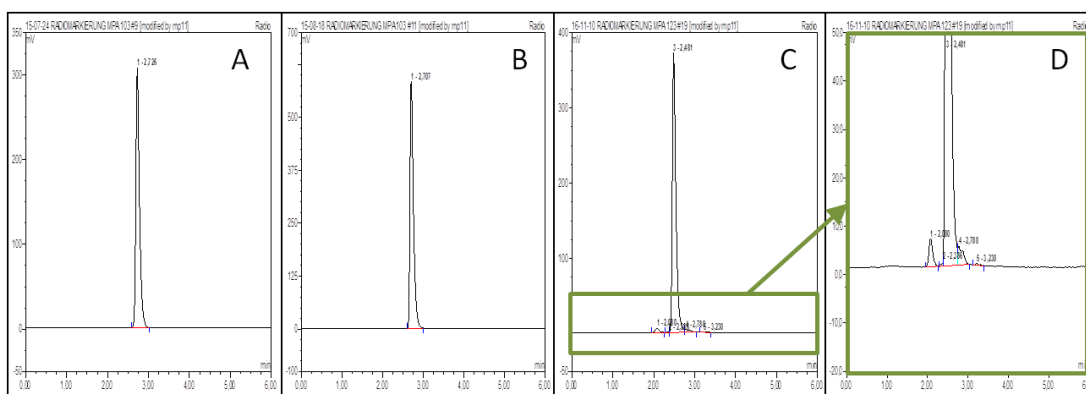


Abb. 70: Radio-Chromatogramme der Stabilitätsuntersuchungen von [¹⁸F]Fluor-Norimatinib nach 2 Stunden. A) phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH 7.4, RT): >99%. B) humanes Blutplasma (37 °C): >99%. C) murines Blutplasma (37 °C): >95%. D) murines Blutplasma, vergrößerter Ausschnitt (37 °C).

3.3.1.2 Fluor-DOG1

Die radiometrische Ermittlung der Lipophilie von [¹⁸F]Fluor-DOG1 ergab einen relativ hohen log*D*-Wert von 2.51 ± 0.13 ($n = 6$), was zu einer hohen hepatobiliären Akkumulation des Tracers führen könnte. Da jedoch alle potentiellen Kandidaten aus dem High-Throughput-Screening von Namkung *et al.* stark lipophile Verbindungen sind,^{68,69} liegt die Vermutung nahe, dass für die Bindung am Ionenkanal DOG1 möglicherweise eine Wechselwirkung zwischen lipophilen Strukturelementen nötig sein könnte.

Die Stabilitätsuntersuchungen von [¹⁸F]Fluor-DOG1 zeigten, dass dieser Tracer in injektionsfertiger, phosphatgepuffertes Lösung (1 mM, pH 7.0) über einen Zeitraum von 2 Stunden bei Raumtemperatur zu über 99% intakt blieb. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass aufgrund der hohen chemischen Stabilität [¹⁸F]Fluor-DOG1 innerhalb dieses Zeitraums nach Herstellung der Radiotracer injiziert werden konnte. In humanem Blutserum zeigte der Radiotracer ebenfalls eine sehr hohe Stabilität von über 99% über 2 Stunden bei 37 °C, welche für PET-Messungen ideal

ist. Da in den *in vivo*-Untersuchungen dieses Tracers jedoch eine unerwartete Pharmakokinetik beobachtet werden konnte (Kapitel 3.4.2), wurde die Stabilität zusätzlich in murinem Blutserum (Maus und Ratte) evaluiert. In Rattenserum zeigte sich hierbei eine schnelle Metabolisierung von [^{18}F]Fluor-DOG1, sodass bereits nach 10 Minuten bei 37 °C ein polarer Metabolit in größeren Mengen (24.6%) nachgewiesen wurde und nach 2 Stunden nur noch 3.4% des Tracers intakt vorlagen. [^{18}F]Fluor-DOG1 zeigte eine leicht höhere Stabilität in Mäuseserum, allerdings lagen auch hier nach 2 Stunden nur noch 16.6% des Tracers intakt vor. Aufgrund der erhöhten Hydrophilie gegenüber dem Radiotracer liegt die Vermutung nahe, dass eine Abspaltung der Benzylgruppe oder der 3,4,5-Trimethoxybenzoesäuregruppe stattgefunden haben könnte. Diese Beobachtung ist deshalb interessant, da scheinbar spezie-spezifische Enzyme des murinen Serums für die Metabolisierung verantwortlich sind. Dieser Umstand sollte bei der Optimierung des Radiotracers im Hinblick auf die Durchführung von *in vivo*-Studien mit Mäusen berücksichtigt werden.

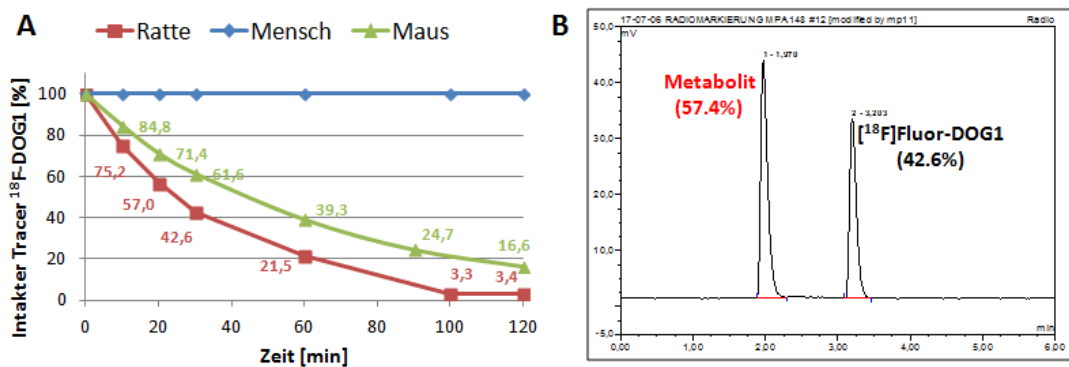


Abb. 71: A: Stabilität von [^{18}F]Fluor-DOG1 in humanem (blau) und murinem (rot, grün) Serum bei 37 °C. B: Radio-Chromatogramm von [^{18}F]Fluor-DOG1 in Rattenserum nach 30 min bei 37 °C.

3.3.2 Permeabilität der Zellmembran

Da kein aktiver Transport (z.B. über rezeptorvermittelte Internalisierung) von Imatinib in die Zelle hinein bekannt ist, muss Imatinib eine bestimmte Lipophilie aufweisen, um mittels passiver Diffusion durch die Zellmembran zur intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne zu gelangen. Aufgrund der reduzierten Lipophilie von Fluor-Norimatinib musste evaluiert werden, ob ein Passieren der Zellmembran ohne Einschränkungen möglich ist. Dazu wurden die GIST-Zelllinien GIST-T1, GIST882 und GIST430, sowie die CML-Zelllinie K562 mit [^{18}F]FNI – analog zu einem Internalisierungsassay – inkubiert und anschließend radiometrisch ermittelt, welcher Anteil des Radiotracers sich jeweils im Überstand, an der Zellmembran und intrazellulär befand. Daraus konnte nicht nur bestimmt werden, wie gut die

Diffusion durch die Zellmembran war, sondern auch, ob unspezifische Bindung an der Membranoberfläche stattfand. Nach einer Stunde Inkubation konnte beobachtet werden, dass bei den GIST-Zelllinien GIST-T1, GIST882 und GIST430 fast keine unspezifische Bindung an der Membran (2-3%) stattfand, während 43-55% des Radiotracers intrazellulär vorlagen. Um die Spezifität zum intrazellulären Rezeptor zu ermitteln, wurden die Zellen zusätzlich mit einem 1000-fachen Überschuss an Imatinib (1 μ M) als Kompetitor zum Radiotracer inkubiert („Block“). Dabei sollte im Fall von hoher Spezifität die intrazelluläre Bindung auf ein Minimum reduziert werden. Allerdings konnte diese nur auf 39-46% gesenkt werden, weswegen davon ausgegangen werden musste, dass der Großteil der intrazellulären Aktivitätsanreicherung ungebunden, bzw. unspezifisch gebunden vorlag. Um auszuschließen, dass Imatinib deutlich langsamer ins Zellinnere diffundiert und dadurch die kompetitive Verdrängung des Radiotracers beeinflusst wird, wurden in weiteren Untersuchungen die Zellen 30 Minuten mit Imatinib vorinkubiert. Dabei konnte allerdings kein Unterschied zu den anderen Versuchen beobachtet werden. Eine mögliche Begründung hierfür wäre unspezifische Bindung des Radiotracers an intrazelluläre Proteine, vermutlich aufgrund der – für biologische Systeme immer noch – hohen Lipophilie. Trotz des geringen Anteils an spezifischer Bindung an die Tyrosinkinase konnte jedoch ein Unterschied bezüglich der gemessenen Aktivitätsmengen zwischen den Zelllinien beobachtet werden. Die spezifische intrazelluläre Bindung betrug bei den Imatinib-sensitiven Zelllinien $9.3 \pm 1.0\%$ (GIST-T1) bzw. $11.0 \pm 0.4\%$ (GIST882), während bei Imatinib-resistenten GIST430 nur $3.9 \pm 0.3\%$ spezifisch gebunden waren. Diese Ergebnisse wurden durch die Positiv-Kontroll-Zelllinie K562 bestätigt, da auch hier $9.3 \pm 5.5\%$ spezifisch gebunden waren (Abb. 72, Tab. 5). Auffallend bei diesen Zellen ist allerdings ein deutlich erhöhter Anteil an Aktivität in der Membran-Fraktion. Eine mögliche Begründung dafür könnte der unterschiedliche Versuchsaufbau sein, da die K562-Zellen als Suspensionszellen zwischen den Wasch-Schritten zentrifugiert werden müssen im Gegensatz zu den adhärennten GIST-Zelllinien. Bei unzureichender Zentrifugation lässt sich der Überstand nur unvollständig von den Zellen trennen, bei zu starker Zentrifugation können die Zellen beschädigt werden und intrazellulär angereicherte Aktivität in den Überstand oder die Membran-Fraktion gelangen. Da GIST430 als resistent gegenüber Imatinib gelten, dürfte erwartungsgemäß keine spezifische Bindung stattfinden, allerdings konnte in Therapiestudien von tumortragenden Mäusen gezeigt werden, dass GIST430-Tumore – wenn auch nur geringfügig – auf die Administration von Imatinib ansprachen.¹⁰⁵ Dieses Ergebnis deckte sich mit der geringeren spezifischen Bindung von etwa 4%, sodass davon ausgegangen werden musste, dass diese Tumorzelllinie nicht komplett resistent gegenüber Imatinib ist.

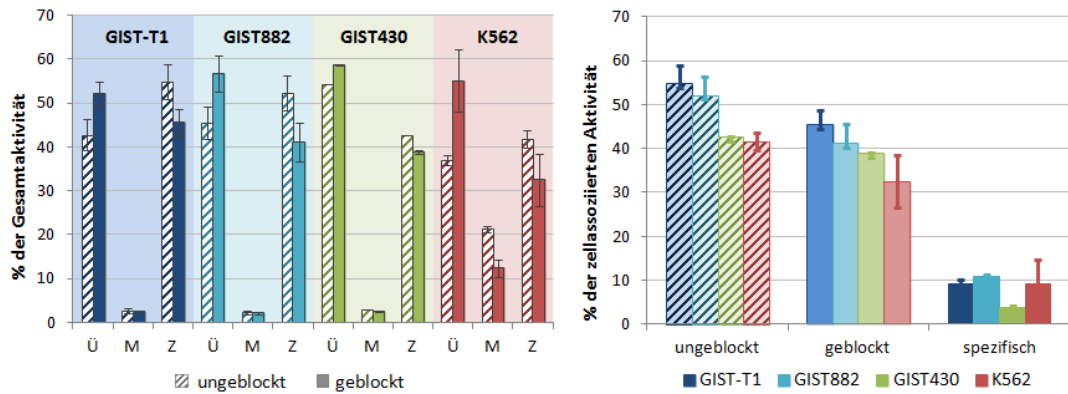


Abb. 72: Ergebnisse der Untersuchungen zur Zellmembran-Permeabilität von Fluor-Norimatinib (siehe Kapitel 5.3.5). Links: Verteilung der Aktivitätsmenge über die Fraktionen (Ü: Überstand, nicht gebunden; M: Membran-gebundene Aktivität; Z: zellassozierte Aktivität). Rechts: Darstellung der zellassozierten Aktivitätsmengen nach Inkubation ohne und mit Imatinib (1 μ M) als Blocksubstanz, sowie die daraus resultierende spezifische Anreicherung nach Inkubation bei 37 °C für 1 h in DMEM (+ 1% FCS).

Tab. 5: Ergebnisse der Untersuchungen zur Zellmembran-Permeabilität von Fluor-Norimatinib.

Zelllinie	Block	Überstand	membran-gebunden	intrazellulär	spezifisch gebunden
GIST-T1	-	42.7 \pm 3.5	2.6 \pm 0.5	54.8 \pm 4.0	9.3 \pm 1.0
	1 μ M Imatinib	52.0 \pm 2.8	2.5 \pm 0.3	45.5 \pm 3.1	
GIST882	-	45.5 \pm 3.6	2.3 \pm 0.4	52.2 \pm 4.0	11.0 \pm 0.4
	1 μ M Imatinib	56.7 \pm 4.2	2.1 \pm 0.2	41.2 \pm 4.4	
GIST430	-	54.3 \pm 0.0	3.0 \pm 0.0	42.7 \pm 0.0	3.9 \pm 0.3
	1 μ M Imatinib	58.6 \pm 0.1	2.6 \pm 0.2	38.8 \pm 0.3	
K562	-	37.0 \pm 1.1	21.3 \pm 0.7	41.7 \pm 2.0	9.3 \pm 5.5
	1 μ M Imatinib	55.1 \pm 7.1	12.4 \pm 2.0	32.5 \pm 5.9	

Die Bestimmung der Permeabilität der Zellmembran für Fluor-Norimatinib konnte somit zeigen, dass trotz der reduzierten Lipophilie eine ausreichend hohe Diffusion durch die Zellmembran stattfinden konnte. Dennoch sorgte die immer noch relativ hohe Lipophilie vermutlich für die unspezifische Bindung an intrazelluläre Proteine, die die geringe Spezifität hervorrief. Für weitere *in vitro*-Versuche mit vitalen Zellen musste daher mit einem niedrigen Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (SNR; „*signal-to-noise-ratio*“) gerechnet werden.

3.3.3 Kompetitiver Bindungsassay

Um die Bindungsaffinität von Fluor-Norimatinib zu unterschiedlich Imatinib-sensitiven Tumorzelllinien zu bestimmen, wurde ein kompetitiver Bindungsassay

durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit Fluor-Norimatinib in einer bestimmten Konzentration (z.B. 1 nM) und einem Kompetitor wie Imatinib in unterschiedlichen Konzentrationen (z.B. 0-5000 nM) inkubiert. Anschließend wurde der Anteil an intrazellulärem Fluor-Norimatinib in Abhängigkeit von der Kompetitor-Konzentration ermittelt, woraus die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) abgeleitet werden kann. Der IC_{50} -Wert wird als Maßstab für die Bindungsaffinität benutzt und gibt allgemein wieder, welche Konzentration eines Inhibitors nötig ist, um die Bindungsaktivität auf 50% zu reduzieren. Die obere Grenze (100%) wurde definiert, indem kein Kompetitor zugegeben wurde und somit die maximal mögliche Menge an Fluor-Norimatinib intrazellulär vorlag. Um Fluor-Norimatinib möglichst vollständig zu verdrängen und so die untere Grenze (0%) festzulegen, wurde der Kompetitor in großem Überschuss zugegeben. Normalerweise reicht dazu ein 1000-facher Überschuss, allerdings musste aufgrund der Lipophilie damit gerechnet werden, dass es zu einer hohen unspezifischen Aktivitäts-Akkumulation des Tracers kommt, weswegen ein 5000-facher Überschuss eingesetzt wurde. Somit sollte sichergestellt werden, dass Fluor-Norimatinib komplett aus der Bindungstasche der Tyrosinkinase verdrängt werden kann.

Als Ausgangspunkt für die Assay-Bedingungen sollten Parameter aus einem kompetitiven Bindungsassay für Peptide benutzt werden. Da diese Peptide meist extrazellulär binden und eine deutlich geringere unspezifische Anreicherung aufweisen, mussten die Bedingungen für den Bindungsassay einer intrazellulär bindenden niedermolekularen Verbindung wie Fluor-Norimatinib erst optimiert werden. Dabei wurden folgende Parameter variiert: Medium, Zellzahl pro Well, Temperatur, Kompetitor und Konzentration des Radioliganden (Tab. 6).

Um ein geeignetes Medium zu finden, wurden zunächst verschiedene Medien unter ansonsten gleichen Bedingungen anhand der Positiv-Kontroll-Zelllinie K562 evaluiert. Als ungeeignet stellten sich hierbei HBSS und DMEM heraus, da der Radioligand nur zu einem geringen Anteil (17-27%) verdrängt werden konnte. Mit DMEM konnte zwar die typische sigmoidale Verdrängungskurve erhalten werden, allerdings führte die geringe Verdrängung zu einem ungenauen Ergebnis. Auf die Problematik der geringen Verdrängung und der daraus resultierenden Fehler wird später noch genauer eingegangen. Sowohl mit OptiMEM, als auch mit Puffer A (150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MnCl_2$, pH 7.4) konnten bessere Ergebnisse erhalten werden, auch wenn hier ebenfalls keine vollständige Verdrängung (39-41%) des Radioliganden erzielt werden konnte.

Tab. 6: Übersicht der evaluierten Bedingungen für den kompetitiven Bindungsassay. BSA: bovines Serum-Albumin; HBSS: Hank's Balanced Salt Solution; Im: Imatinib; NIm: Norimatinib; PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung; Puffer A: 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris, 2 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, pH 7.4.

Zelllinie	Medium (+ 0.5% BSA)	Zellzahl pro Well	Temperatur	Kompetitor	Konzentration des Radioliganden
K562	HBSS	1 × 10 ⁵	37 °C	Im	1 nM
	DMEM				
	Puffer A				
	OptiMEM		RT	NIm	1 nM
		37 °C		Im	0.5 nM
			Im	1 nM	
		NIm		5 nM	
	NIm		1 nM		
GIST-T1		RPMI	2 × 10 ⁵	37 °C	Im
	PBS				
	Puffer A	1 × 10 ⁵	37 °C	Im	1 nM
	OptiMEM	1 × 10 ⁵			
				RT	
	NIm				
Im	2 × 10 ⁵	37 °C	Im	2 nM	
GIST882	Puffer A	1 × 10 ⁵	37 °C	Im	1 nM
	OptiMEM			NIm	
			RT	Im	
	NIm				
GIST430	RPMI	2 × 10 ⁵	37 °C	Im	2 nM
	PBS				
	OptiMEM	1 × 10 ⁵	37 °C	Im	1 nM
				RT	
		37 °C	Im		
			NIm	2 nM	

Diese Ergebnisse wurden auf die GIST-Zelllinien GIST-T1 und GIST882 übertragen, wobei sich OptiMEM in beiden Fällen als vorteilhafter herausstellte und deswegen als Medium für die weiteren Assays benutzt wurde. Als nächstes wurde die Zellzahl pro Well evaluiert. Theoretisch führt eine hohe Anzahl an Zellen zwar zu einem größeren Signal, da mehr Radioligand intrazellulär vorliegt, allerdings kann eine zu hohe Zellzahl pro Well das Ergebnis beeinflussen, wenn beispielsweise die Zellen nicht einzeln vorliegen, sondern sich aneinander haften und somit die für die passive Diffusion des Radiotracers notwendige Oberfläche reduziert wird. Dieses Problem wird durch eine geringe Zellzahl zwar umgangen, jedoch sinkt die aufgenommene Aktivität dadurch, was problematisch sein kann bei der Aktivitätsmessung durch den Gamma-Counter. Durch eine höhere Anzahl an Zellen von 1×10^5 auf 2×10^5 pro Well konnte das Radioaktivitätssignal und die Anzahl an simultan durchgeführten Assays erhöht werden, wobei die Ergebnisse der kompetitiven Verdrängung unverändert blieben. Somit wurde wie auch in der Literatur beschrieben mit 2×10^5 Zellen pro Well gearbeitet.⁷⁹ Als Kompetitoren wurden sowohl Imatinib als auch Norimatinib (Leitstruktur für Fluor-Norimatinib) evaluiert. Da beide Substanzen eine hohe Spezifität, sowie eine hohe Bindungsaffinität zu KIT besitzen, konnte in diesem Assay kein relevanter Unterschied zu Imatinib festgestellt werden, weswegen mit kommerziell erhältlichem Imatinib weitergearbeitet wurde. Als letzter Faktor wurde die Konzentration des Radioliganden variiert. Bei einer Konzentration von 0.5 nM konnten ähnliche Ergebnisse wie mit 1 nM erzielt werden, allerdings wurde letztere Konzentration bevorzugt, da durch die höhere eingesetzte Aktivitätsmenge auch ein höheres Signal mit besserer Messsicherheit des Gamma-Counters erhalten werden konnte. Dass sich die eingesetzte Konzentration im idealen Bereich befand, zeigte sich auch in der Evaluierung einer höheren Konzentration von 5 nM, welche dazu führte, dass der Kompetitor nur 2% des Radioliganden verdrängen konnte. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Experimente mit einer Radioliganden-Konzentration von 1 nM durchgeführt.

Diese weitgehend optimierten Parameter aus den Vorevaluierungen mit der Positiv-Kontroll-Zelllinie K562 wurden anschließend auf die GIST-Zelllinien übertragen. Die damit erhaltenen Ergebnisse zeigten jedoch eine hohe Ungenauigkeit und eine fehlende Reproduzierbarkeit. Ein großes Problem bei der Auswertung der Daten stellte die hohe unspezifische Anreicherung dar, da selbst durch einen 5000-fachen Überschuss an Kompetitor in den meisten Fällen nur etwa 20-40% des Radiotracers verdrängt werden konnten. Diese unspezifische Anreicherung wurde von allen Messwerten subtrahiert, wodurch zwar ein Nullwert definiert werden konnte, allerdings alle Messwerte stark gesenkt wurden. Dadurch wuchs der Fehler relativ zu den Messwerten, wodurch die Genauigkeit des Assays stark herabgesetzt wurde (Abb. 73). Bei der Auswertung der so erhaltenen Verdrängungskurven konnte der IC_{50} -Wert nicht ausreichend genau bestimmt werden, da aufgrund des großen

Fehlers der Messwerte ebenfalls der IC_{50} -Wert einen großen Fehler aufwies. So berechnete sich der IC_{50} -Wert für das Beispiel aus Abb. 73 B auf 26-433 nM. Durch den großen Fehler litt nicht nur die Genauigkeit bei der Bestimmung des IC_{50} -Wertes, sondern auch die Reproduzierbarkeit. Unter denselben Bedingungen wurden so nicht nur stark unterschiedliche IC_{50} -Werte ermittelt, sondern auch unterschiedliche Bindungskurven erhalten. Dies führte teilweise sogar bei Imatinib-sensitiven Zelllinien dazu, dass überhaupt keine Verdrängung gemessen werden konnte.

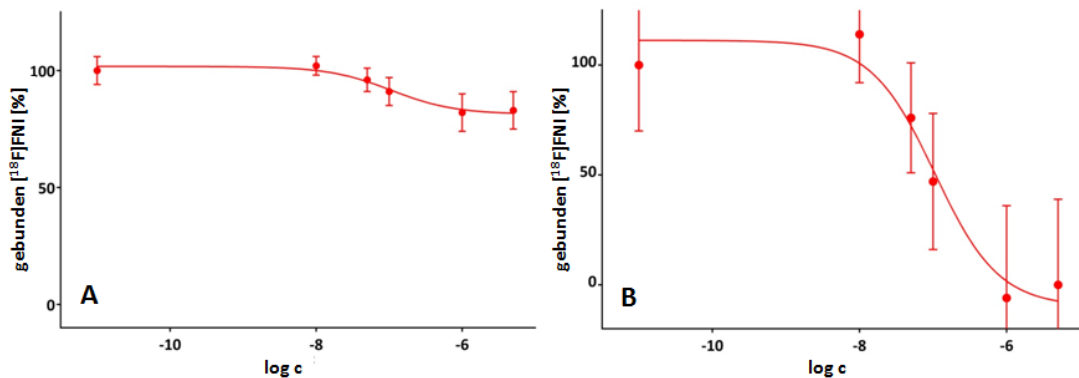


Abb. 73: Verdrängungskurven erstellt aus den Daten des kompetitiven Bindungsassays. A: Nicht auf den Nullwert korrigierte Messwerte. B: Messwerte korrigiert auf die unspezifische Anreicherung bei Zugabe von 5 mM Kompetitor (Nullwert). Assay-Bedingungen: GIST-T1 (1×10^5 Zellen/Well), DMEM+BSA (0.5%), 37 °C, $[^{18}F]FNI$ (1 nM), Kompetitor: Imatinib (0-5000 nM).

Da unter den zahlreichen Assay-Bedingungen keine zuverlässigen Bedingungen gefunden werden konnten, musste die Bestimmung der Affinität von Fluor-Norimatinib zu KIT in einem System erfolgen, in dem eine unspezifische Anreicherung möglichst gering gehalten werden konnte. Eine Möglichkeit wäre gewesen, anstelle von vitalen Zellen nur Zellmembran-Fragmente zu benutzen, da hierbei unspezifisch angelagerter Radioligand durch Waschschriffe weitgehend entfernt werden hätte können. Diese Methode bot sich hier vor allem an, da KIT als Transmembran-Protein in der Zellmembran verankert ist und zudem der Radiotracer durch das offene System leichter zur Tyrosinkinase-Domäne gelangen könnte. Allerdings stellt die Fragmentierung von Zellmembranen und deren Aufreinigung einen komplexen Vorgang dar, vor allem unter der Voraussetzung, dass eine Protein-Denaturierung möglichst vermieden werden muss. In ersten Vorversuchen, die Evaluierung der Bindungsaffinität mit selbst isolierten Zellmembranen durchzuführen, konnte kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden, weswegen diese Methode im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde.

3.3.4 Radiometrischer Kinase-Assay

Eine weitere Methode um die Affinität von Inhibitoren zu Kinasen zu ermitteln, ist der radiometrische Kinase-Assay. Dabei werden Störfaktoren, wie intrazelluläre unspezifische Bindung, weitestgehend umgangen, indem direkt der inhibitorische Effekt einer Substanz auf die Kinase anhand deren Phosphorylierungsaktivität bestimmt wird. Dazu werden die entsprechende Kinase, Substrat (meist ein Peptid oder Protein), Inhibitor (in variabler Konzentration) und ATP (Adenosintriphosphat) inkubiert und anschließend die Menge an phosphoryliertem Substrat in Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration bestimmt. Eine elegante Methode stellt hierbei die radiometrische Bestimmung dar, bei der die endständige Phosphatgruppe von ATP radioaktiv markiert wird, beispielsweise mit ^{33}P ($t_{1/2} = 25.3$ d) oder ^{32}P ($t_{1/2} = 14.3$ d). In Abwesenheit von Inhibitoren findet die Phosphorylierung statt, bei der die radioaktiv markierte Phosphatgruppe auf das Substrat übertragen wird. Im Falle einer Inhibition hingegen wird ATP nicht umgesetzt und das Substrat folglich nicht phosphoryliert. Aus der radiometrischen Bestimmung des Verhältnisses von ATP zu phosphoryliertem Substrat kann somit die Kinaseaktivität in Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration ermittelt werden (Abb. 74).

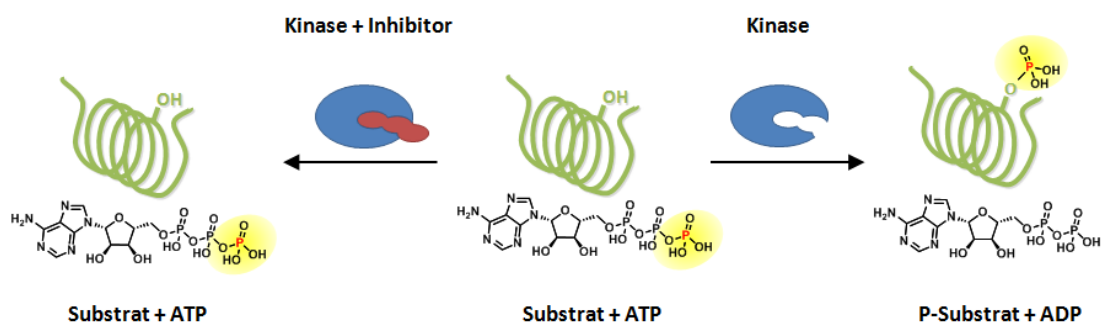


Abb. 74: Schematische Darstellung der Funktionsweise des radiometrischen Kinase-Assays. Gelb hervorgehoben ist die endständige Phosphatgruppe, rot markiert ist das radioaktive Phosphoratom.

Um die Affinität von Fluor-Norimatinib zu verschiedenen Mutationen von KIT zu bestimmen, wurde der Assay sowohl mit wt-KIT (*wildtype*, keine Mutation), als auch mit 9 weiteren, GIST-relevanten KIT-Mutanten durchgeführt. Als Vergleichssubstanz wurde Norimatinib ausgewählt, da es die Leitstruktur für FNI darstellt und somit der Einfluss durch das Fluor-Atom am Pyridin-Ring genau bestimmt werden kann. Als weitere Referenz diente SKI696 (**21**, „Fluorethyl-Imatinib“), da dieses bei *in vitro*-Untersuchungen der CML-Zelllinie K562 bereits eine etwas höhere Affinität als Imatinib gegenüber Bcr-Abl aufweisen konnte und somit gezeigt wurde, dass eine Modifikation am Piperidin-Ring wahrscheinlich keinen relevanten Einfluss auf die Bindungsaffinität hat.⁷⁹

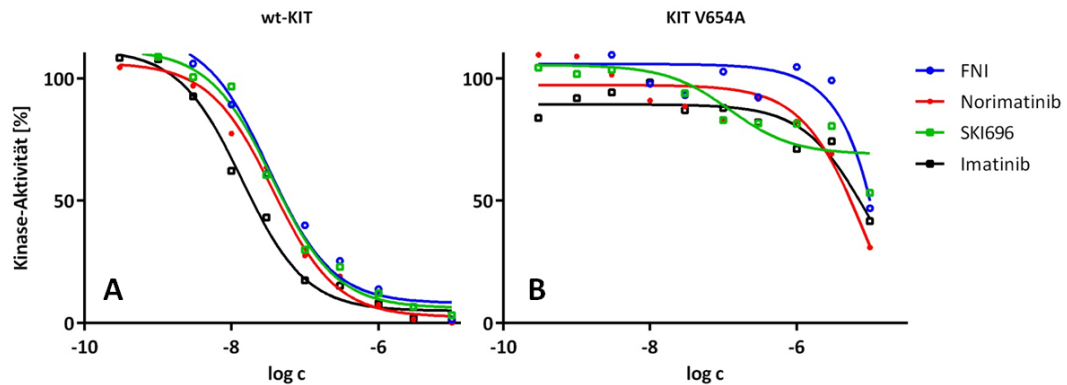


Abb. 75: Vergleich der Ergebnisse aus dem Kinase-Assay von wt-KIT (Imatinib-sensitiv, A) und KIT V654A (Imatinib-resistent, B) mit Fluor-Norimatinib, Norimatinib, SKI696 und Imatinib. Bedingungen: ATP (entsprechend der apparenten ATP-Km: A = 3.0 μ M, B = 0.3 μ M), [γ - 33 P]-ATP (6×10^5 cpm/Well), Kinase (A = 12.9 nM, B = 38.7 nM), Substrat (Poly-(Glu, Tyr)4:1, 2.5 ng/ μ L), 30 °C, 1 h.

Die Bindungsaffinitäten der Substanzen zu wt-KIT lagen alle in einem engen Bereich um 50 nM, wobei FNI mit 65 nM eine etwas geringere Affinität als Norimatinib (53 nM) und SKI696 (48 nM) zeigte. Somit schien die Einführung des Fluor-Atoms in den Pyridin-Ring keinen großen Einfluss auf die Wechselwirkungen in der ATP-Bindetasche zu haben. Bei den Imatinib-resistenten Mutanten V654A und T670I zeigte sich FNI ebenfalls als nicht affin ($IC_{50} > 9000$ nM), woraus geschlossen werden konnte, dass Gatekeeper-Mutationen wie T670I die gleichen Auswirkungen auf FNI wie auf Imatinib haben (Abb. 75). Dennoch konnte beobachtet werden, dass FNI, aber auch SKI696 eine geringere Bindungsaffinität als Norimatinib gegenüber den meisten Mutanten besaßen. Sowohl die Fluorethylgruppe am Piperazin-Ring, als auch das Fluor-Atom am Pyridin-Ring beeinflussten somit die Bindungsaffinitäten, dennoch konnte der Trend der Imatinib-Sensitivität mit FNI dargestellt werden. Größere Abweichungen konnten nur bei den KIT-Mutanten V559D und V560G festgestellt werden, da FNI zu diesen einen 6- bis 7-fach höheren IC_{50} -Wert besaß als Norimatinib (Abb. 76). Dadurch würde die schwach Imatinib-sensitive Mutante V559D in der PET-Bildgebung mit [18 F]FNI vermutlich als resistent dargestellt werden. Dies stellt allerdings nur bedingt ein Problem dar, da Tumore mit einer nur schwach Imatinib-sensitiven KIT-Mutation auf eine Therapie mit Imatinib wahrscheinlich auch nur schlecht ansprechen würden. Ein größeres Problem stellt allerdings die Bindungsaffinität zu KIT V560G dar, da diese Mutation als stark Imatinib-sensitiv beschrieben wird, dies aber in der PET-Bildgebung mit [18 F]FNI wahrscheinlich nicht ersichtlich wäre. Interessanterweise zeigt SKI696 ebenfalls nur bei diesen beiden KIT-Mutanten größere Abweichungen bezüglich der Bindungsaffinität. Zwar besitzt SKI696 nur eine 4- bis 5-fache Erhöhung des IC_{50} -Wertes, allerdings würden sich die Ergebnisse aus der PET-Bildgebung mit [18 F]SKI696 nur geringfügig von denen mit [18 F]FNI unterscheiden. Insgesamt bildete sich bei FNI

und SKI696 ein sehr ähnliches Bindungsprofil (Abb. 76) ab, obwohl sich deren Strukturen stärker voneinander als von Norimatinib unterscheiden.

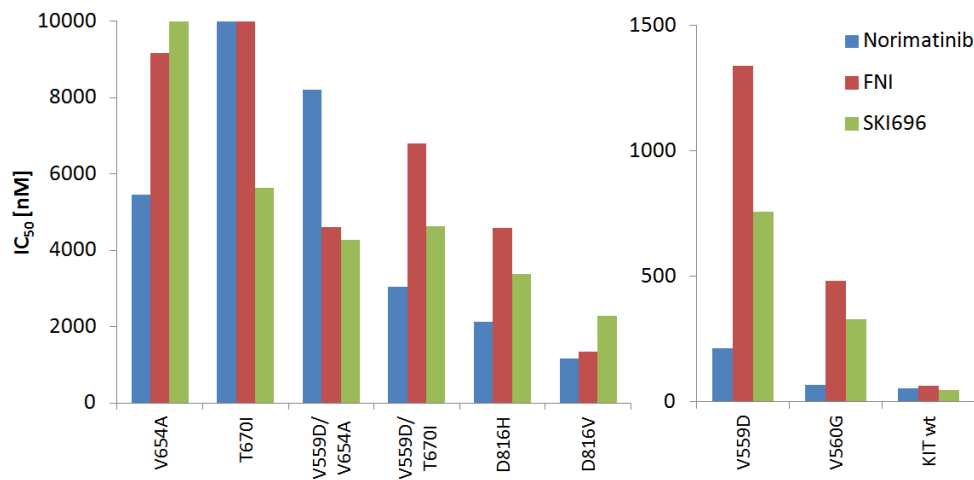


Abb. 76: Mittels Kinase-Assay ermittelte Bindungsaffinitäten von Norimatinib, FNI und SKI696. Links: Imatinib-resistente KIT-Mutanten. Rechts: Imatinib-sensitive KIT-Mutanten.

Trotz der geringeren Bindungsaffinitäten ist es sowohl mit FNI, als auch SKI696 möglich, Imatinib-resistente von –sensitiven KIT-Mutanten in den meisten Fällen zu unterscheiden. Lediglich schwach Imatinib-sensitive Mutanten würden durch die verringerte Bindungsaffinität als resistent eingestuft werden. Da die Therapie mit Imatinib bei solchen Tumoren allerdings voraussichtlich nicht oder nur moderat erfolgsversprechend wäre, könnte bereits frühzeitig eine Umstellung auf eine effizientere Therapie bei diesen Patienten in Betracht gezogen werden.

3.4 In vivo-Evaluierungen

Die *in vivo* Evaluierung der Radiotracer hinsichtlich der Aktivitätsanreicherung im Tumorgewebe und seiner Pharmakokinetik sollte an tumortragenden Mäusen durchgeführt werden. Dazu sollten den Tieren in die linke Flanke Tumorzellen subkutan injiziert und PET/CT-Messungen durchgeführt werden, sobald die Tumoren eine ausreichende Größe erreicht haben. Studien eines Kooperationspartners der Universität Turin konnten zeigen, dass zur erfolgreichen Tumorinduktion stark immunsupprimierte Mäuse nötig sind. So konnte in CD-1 Mäusen, die trotz geringerer Immunsuppression (Fehlen von T-Zellen) in vielen Studien als Tumor-Mausmodell dienen, nur in 20% der Inokulationen überhaupt ein Tumorwachstum nach 4 Monaten beobachtet werden. In den stark immunsupprimierten NSG-Mäusen (NOD SCID gamma; Fehlen von T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, sowie mehrerer Zytokin-Signalwege¹⁰⁶) hingegen konnte ein zuverlässiges und relativ schnelles Wachstum der Tumoren aus GIST-Zelllinien nachgewiesen werden. Allerdings bedingen diese Mäuse durch ihr kaum vorhandenes Immunsystem sehr aufwendige Haltungsbedingungen. Als Kompromiss wurde auf Balb/c SCID-Mäuse (Balb/cJHan[®]Hsd-Prkdc^{scid}) zurückgegriffen, die zwar ein robusteres Immunsystem als NSG-Mäuse besitzen, jedoch ein fast identisches Tumorwachstum zeigen. Balb/c SCID-Mäuse besitzen zwar wie NSG-Mäuse Defekte in der Entwicklung von T- und B-Zellen, können allerdings NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten ausbilden, wodurch eine einfachere Handhabung dieser Mäuse ermöglicht wird.

Als Zelllinien wurden GIST-T1, GIST882 und GIST430 verwendet, da diese aufgrund ihrer Mutationen nicht nur unterschiedliche Imatinib-Sensitivitäten besitzen, sondern sich unter anderem auch in Morphologie, Wachstumsgeschwindigkeit und Vaskularisierung unterscheiden. So sollte mit einer geringen Anzahl an Zelllinien ein möglichst breites Spektrum an GIST erfasst werden.

3.4.1 [¹⁸F]Fluor-Norimatinib

Nachdem die Tumore auf einen Durchmesser von etwa 5-8 mm gewachsen waren, wurde den Tieren der Radiotracer intravenös in die Schwanzvene injiziert und eine 90-minütige PET-Messung, gefolgt von einer 30-minütigen CT-Messung unter Narkose durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere getötet und die Organe zur Bestimmung ihrer Aktivitätsanreicherung entnommen („*Biodistribution*“). Die Bestimmung dieser Biodistribution 2 Stunden nach Injektion diente als Vergleich zu den mittels PET erhaltenen Daten und ermöglichte die Berechnung der aufgenommenen Aktivität korrigiert auf das Gewicht des Organs. Zusätzlich konnte so die Aktivitätsanreicherung in beispielsweise Pankreas oder Nebennieren bestimmt

werden, was aufgrund von Größe und Lage dieser Organe mittels PET/CT stark erschwert beziehungsweise unmöglich gewesen wäre.

Anhand der Biodistribution (Abb. 77) 2 Stunden nach Injektion konnte beobachtet werden, dass in den Tumoren nur sehr wenig Radiotracer akkumulierte (0.8 – 1.5 %ID/g) und somit das Tumor-zu-Muskel-Verhältnis (T/M) – in Abhängigkeit von der GIST-Zelllinie – bei 0.9-2.2 lag. Das T/M dient als Maß für die Bildqualität, da hierdurch der Kontrast zwischen Tumor- und Muskelgewebe beschrieben wird: Je höher das T/M, desto mehr Radiotracer akkumuliert im Tumor verglichen zum Muskelgewebe und desto besser kann der Tumor in der PET-Bildgebung von umliegendem Gewebe unterschieden werden. Die GIST-T1-Tumoren konnten mit einem T/M von 0.9 2 h p.i. demnach nicht von Muskelgewebe differenziert werden, da sie eine fast identische Radiotracer-Aufnahme zeigten. Bessere Ergebnisse konnten bei den GIST882- und GIST430-Tumoren 2 h p.i. erzielt werden, die ein T/M von 2.2 bzw. 1.8 aufwiesen.

Unerwartet hoch war die Anreicherung in Pankreas und Knochen, wobei sich die Anreicherung in das Pankreas durch das physiologische Vorhandensein von Rezeptoren aus der PDGFR-Familie erklären lässt, zu der auch PDGFRA und KIT gehören, die dort unter anderem die Insulin-Ekretion beeinflussen.¹⁰⁷ Auf diese Weise läge im Pankreas vermutlich eine hauptsächlich spezifische Bindung (siehe Kapitel 3.4.1.1) vor. Die Akkumulation in den Knochen hingegen deutet auf eine Abspaltung von [¹⁸F]Fluorid aus dem Radiotracer hin, da sich [¹⁸F]Fluorid bevorzugt in den Knochen als Fluorapatit anreichert. Die hohe Stabilität von FNI in humanem und murinem Serum führte deshalb zur Hypothese, dass [¹⁸F]Fluorid durch hepatischen Metabolismus – beispielsweise durch Cytochrom P450 Enzyme – freigesetzt wurde. Diese Hypothese wird in Kapitel 3.4.1.2 genauer beschrieben. Auffallend hoch war die Anreicherung von FNI in den Nieren, vor allem im Vergleich zu Dünndarm und Leber (entsprechen dem hepatobiliären Exkretionsweg). Dieser Effekt wurde vermutlich durch die erhöhte Hydrophilie herbeigeführt und zeigte eine Verschiebung von hepatobiliärer zu renaler Exkretion. Während bei Glekas et al. mit SKI696 die Anreicherungen in Leber (11.8 %ID/g) und Niere (11.1 %ID/g) in etwa gleich hoch waren,⁷⁹ konnte mit FNI eine etwa dreifach höhere renale Akkumulation (14.4-24.1 %ID/g) verglichen mit der Anreicherung in der Leber (5.5-8.0 %ID/g) erzielt werden. Diese Ergebnisse gaben erste Hinweise auf die *in vivo*-Verteilung von Fluor-Norimatinib, jedoch muss beachtet werden, dass diese nur den Zeitpunkt 2 Stunden nach Injektion wiedergeben und somit zu früheren Zeitpunkten hiervon deutlich abweichen können.

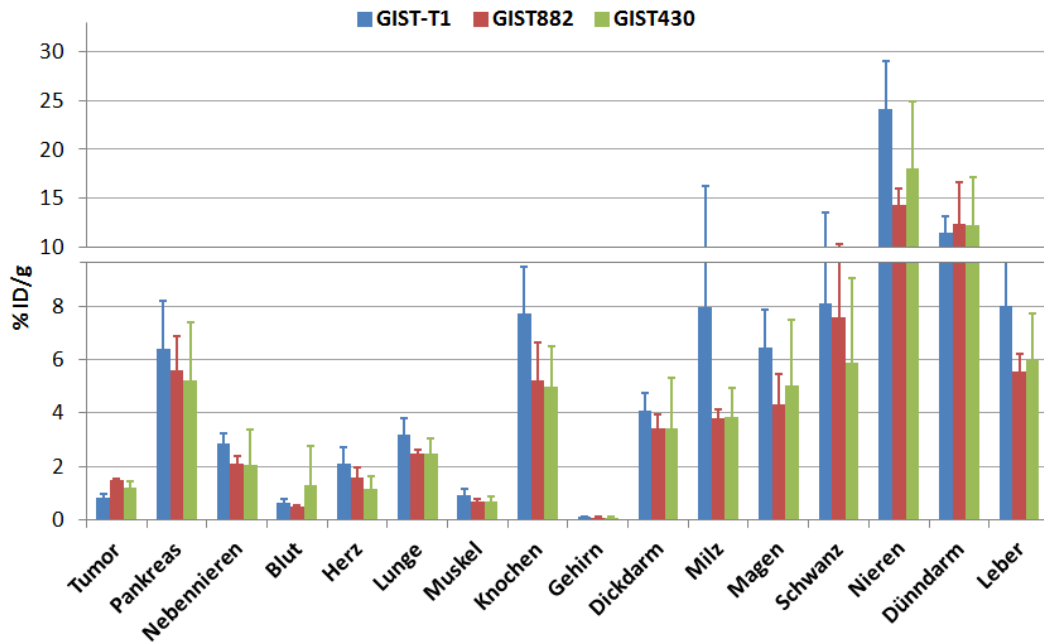


Abb. 77: Darstellung der Daten aus Biodistributionsstudien mit dem Radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{FNI}$ 2 h p.i. Evaluiert wurde die Aktivitätsverteilung in tumortragenden Balb/c SCID-Mäusen (n = 5).

Durch Auswerten der PET-Daten war es möglich, die Verteilung des Radiotracers *in vivo* dynamisch darzustellen und somit den Zeitpunkt mit der maximalen Anreicherung in den Organen zu bestimmen. Dazu wurden VOIs (*volumes of interest*) in die entsprechenden Organe gelegt und ausgewertet, wie viel Radioaktivität sich zu jedem Zeitpunkt in diesen VOIs befand (Abb. 78).

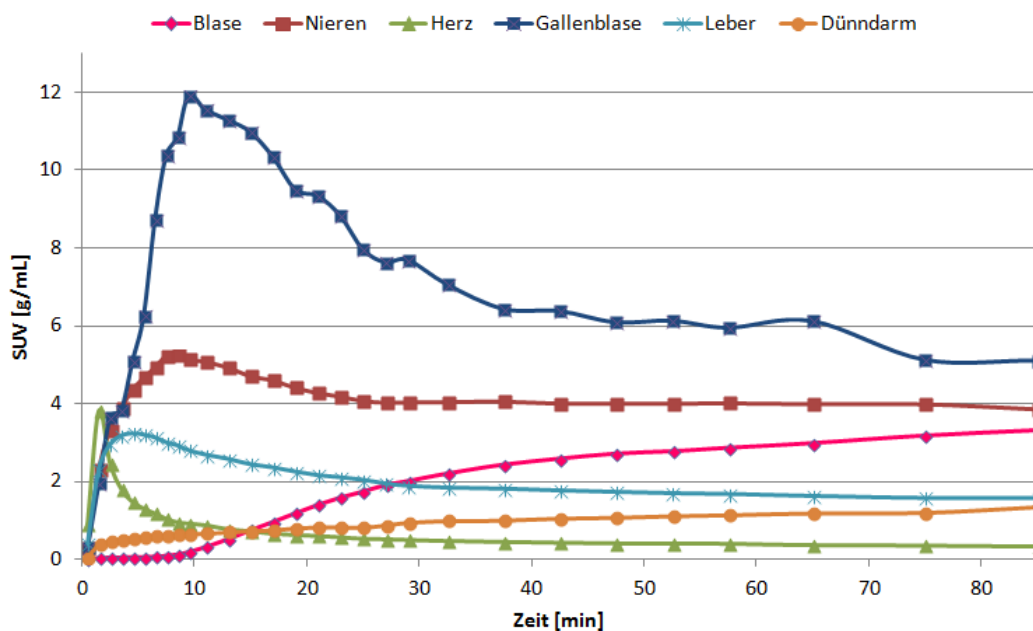


Abb. 78: Darstellung der Verteilung des Radiotracers an ausgewählten Organen über 90 Minuten nach Injektion von $[^{18}\text{F}]\text{FNI}$ am Beispiel einer tumortragenden Balb/c SCID-Maus.

Dabei konnten einige Beobachtungen aus der Biodistribution nach 2 Stunden bestätigt werden. So zeigte sich in den Nieren eine konstant etwa doppelt so hohe Anreicherung wie in der Leber, was durch eine erhöhte renale Ausscheidung des Tracers bedingt wurde. Auffällig war jedoch die Aktivitäts-Akkumulation in der Gallenblase, die bei fast allen Tieren beobachtet werden konnte. Dies spricht für eine hepatobiliäre Metabolisierung von FNI, die sich auch durch Anreicherung im Dünndarm bemerkbar machte und durch die dynamische PET-Akquisition über den gesamten Messzeitraum verfolgt werden konnte.

Ebenfalls durch die Auswertung der PET-Daten bestätigt wurde die geringe Aktivitäts-Akkumulation von [^{18}F]FNI in den unterschiedlichen GIST. Sowohl die Anflutung, als auch der *Washout* der Aktivität erfolgten in den Tumoren und Muskelgeweben mit einer ähnlichen Kinetik, sodass das T/M zu keinem Zeitpunkt deutlich erhöht war (Abb. 79). Problematisch für die Auswertung war dabei vor allem das Volumen des Muskel-VOIs. Aufgrund der Größe des verwendeten Mausstamms konnte der Radius des VOIs auf maximal 1-1.5 mm festgelegt werden, ohne andere Gewebe, wie z.B. Knochen, mit einzubeziehen. Um dennoch eine ausreichend hohes Volumen zu erhalten, wurden zwei Muskel-VOIs in das rechte Bein gelegt und ein Mittelwert aus den erhaltenen Daten gebildet. Dadurch konnte das SNR erhöht werden und Schwankungen des SUV im Muskel wurden deutlich reduziert. Somit ergaben sich bei Mäusen mit GIST-T1-Tumoren ein T/M von 0.98 ± 0.21 in den ersten 15 Minuten der Messung, welches bis zum Messende kontinuierlich auf 0.69 ± 0.22 sank (Abb. 79), was sich ebenfalls in den PET-Bildern zeigte, da dort kein Tumor detektiert werden konnte. Für die GIST882-Tumoren konnte ein höheres T/M von 1.51 ± 0.43 (0-15 min) ermittelt werden, wobei das T/M hier auch über längere Bereiche deutlich höhere Werte von 1.50-2.00 aufwies. Im Gegensatz zu den GIST-T1-Tumoren konnten in diesen Bereichen dadurch GIST882-Tumore mittels PET-Bildgebung dargestellt werden. Die zeitlichen Bereiche der maximalen T/Ms unterschieden sich jedoch innerhalb der Tiere, sodass die maximale Tumoranreicherung teilweise nach 10 Minuten, in anderen Fällen erst nach 30 Minuten stattfand. Danach sank das T/M auf 1.30 ± 0.36 (30-45 min) und blieb auf diesem Niveau bis zum Messende. Bei den GIST430-Tumoren konnte hingegen nur in den ersten 15 Minuten ein leicht erhöhtes T/M von 1.18 ± 0.29 beobachtet werden, das anschließend auf 1.04 ± 0.21 (15-30 min) fiel. Da ebenfalls die maximalen T/Ms geringere Werte als die der GIST882-Tumoren aufwiesen, zeigte sich in den PET-Bildern ein geringerer Kontrast (Abb. 80). Wie auch schon bei GIST882-Tumoren variierte die Dauer bis zur maximalen Tumoranreicherung zwischen 5 und 20 Minuten. Mögliche Gründe für die unterschiedlichen Tumor-Akkumulationen könnten Varianzen der Gewichte der Mäuse (14-24 g), der Tumor-Volumina, der Nahrungsaufnahme und der molaren Aktivitäten (0.99 - 6.84 GBq/ μmol) sein.

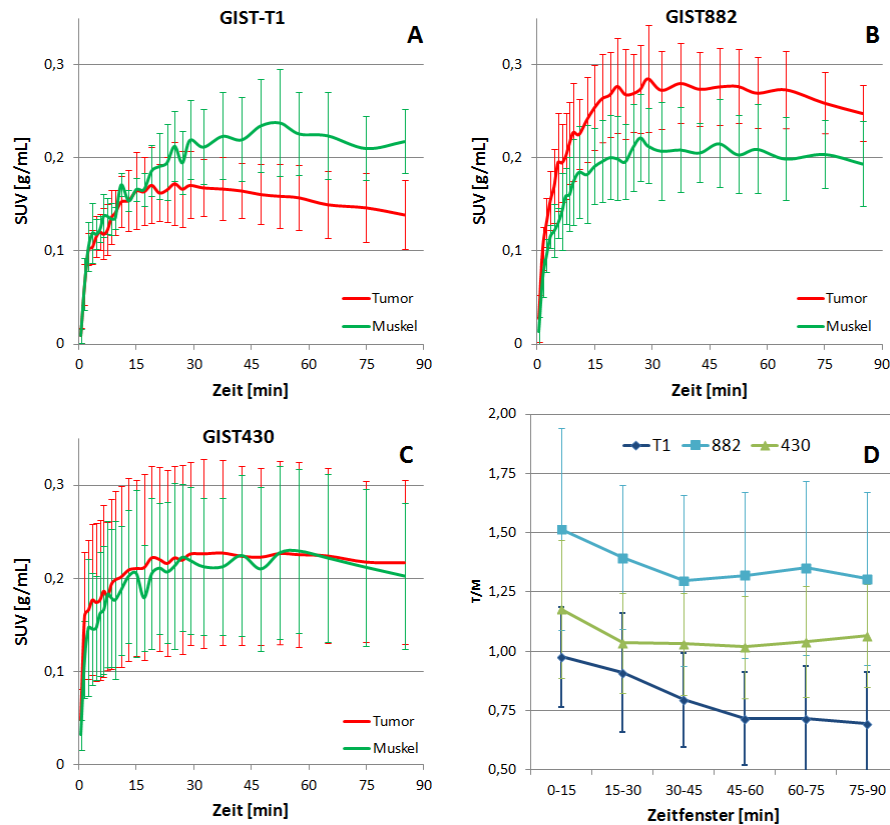


Abb. 79: Durchschnittliche Verteilung (A-C) von $[^{18}\text{F}]$ FNI in Tumor und Muskel, sowie das sich daraus ergebende T/M (D) über 90 Minuten nach Injektion. A: GIST-T1 ($n = 5$). B: GIST882 ($n = 4$). C: GIST430 ($n = 5$). D: T/M jeweils über 15-Minuten-Intervalle gemittelt.

Da diese Ergebnisse nicht mit den Erwartungen aus den *in vitro*-Evaluierungen übereinstimmten, musste untersucht werden, welche Faktoren die *in vivo*-Ergebnisse beeinflussen haben könnten. Ein Problem könnte die für Radiotracer relativ niedrige Bindungsaffinität von FNI gegenüber den KIT-Mutanten sein. Zusammen mit der hohen Lipophilie führte dies wahrscheinlich vermehrt zu unspezifischer Bindung und damit einem hohen Hintergrund-Signal, was in den Permeabilitäts-Evaluierungen bereits festgestellt werden konnte. *In vivo* sollte hingegen ein *Washout* stattfinden, da durch das dynamische System unspezifisch gebundene Radiotracer wieder abtransportiert werden können, um entweder im Blutkreislauf wieder für spezifische Bindung zur Verfügung zu stehen oder ausgeschieden werden. Bei diesen *in vivo*-Untersuchungen konnte allerdings kein ausreichender *Washout* beobachtet werden, wodurch das durch unspezifische Bindung erzeugte Hintergrund-Signal kaum reduziert wurde. Durch eine höhere Bindungsaffinität könnte der *Washout* des Radiotracers aus dem Zielgewebe verlangsamt werden, da die spezifische Bindung dann stärker wäre als die unspezifische.

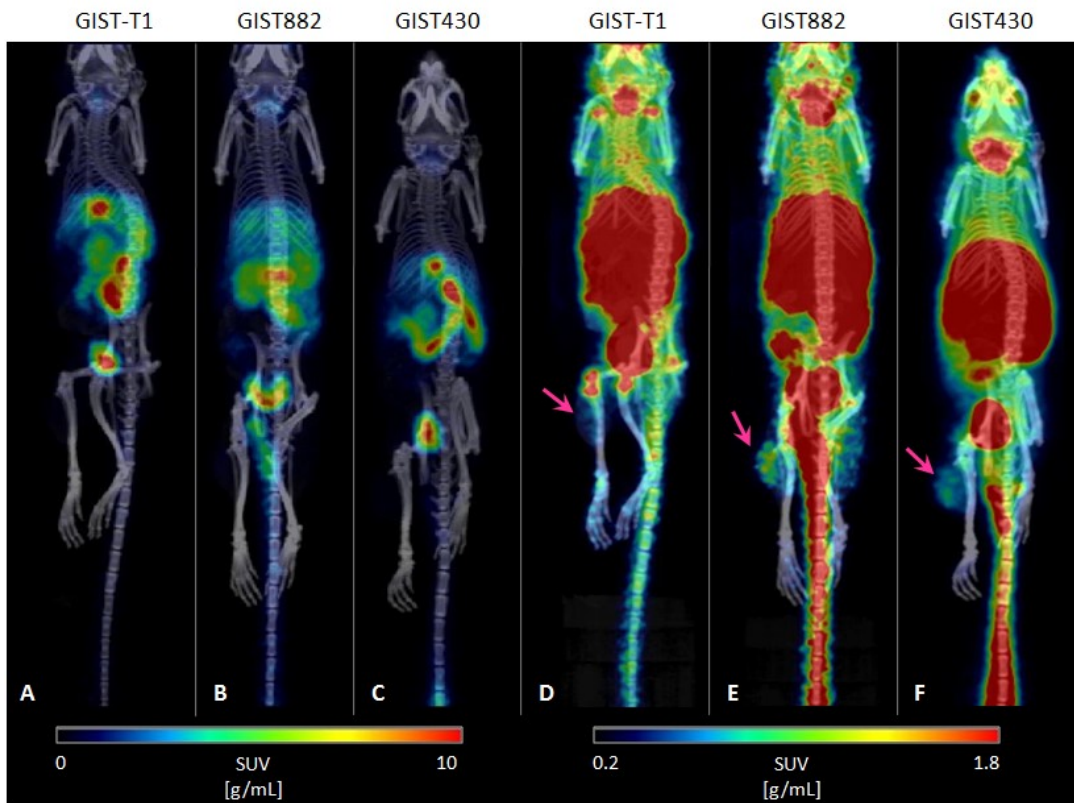


Abb. 80: MIPs (*maximum intensity projections*) der GIST-tragenden Mäuse 18 Minuten nach Injektion von $[^{18}\text{F}]$ Fluor-Norimatinib. A-C: Darstellung des SUVs von 0-10 g/mL. Hier sind hauptsächlich Gallenblase, Nieren, Dünndarm und Blase sichtbar. D-F: Darstellung des SUVs von 0.2-1.8 g/mL. Die Lokation der Tumoren ist mit einem pinken Pfeil gekennzeichnet.

Eine weitere Erhöhung des SNR könnte durch eine größere Anzahl an KIT-Rezeptoren erreicht werden, da dadurch die Wahrscheinlichkeit steigt, dass die Bindung zum Target ausgebildet wird, bevor der Radiotracer durch unspezifische Bindung nicht mehr frei verfügbar ist. Hier spielt eventuell der Wirkmechanismus von Imatinib eine Rolle, da Imatinib nur an die inaktive Form der Kinase bindet. Der genaue Mechanismus der Bindung ist bisher nicht geklärt, allerdings wird unter anderem davon ausgegangen, dass sich die theoretisch permanent aktiven Tyrosinkinasen bei GIST in einem dynamischen Gleichgewicht mit der inaktiven Form befinden, welche allerdings nur kurzfristig vorliegt.⁴¹ Dadurch sinkt die Wahrscheinlichkeit der Bindung eines Inhibitors stark ab und könnte im Rahmen einer PET-Messung problematisch sein, vor allem wenn die geringen Stoffmengen an Radiotracer (hier etwa 1-10 nmol/Injektion) miteinbezogen werden. Zusätzlich könnte durch die niedrige molare Aktivität ($3.1 \pm 1.7 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$) dieser Effekt verstärkt worden sein, da die nicht-radioaktive Verbindung zwar die Kinase inhibiert, aber kein Signal erzeugt.

Neben diesen Faktoren war jedoch die unterschiedliche Vaskularisierung der Tumore ein ausschlaggebender Punkt. Consolino et al. konnten zeigen, dass die

Vaskularisierung und Permeabilität der hier verwendeten GIST-Zelllinien untereinander stark variierte. So konnte bei den GIST430-Tumoren eine etwa 2.6-3.9-fach höhere Permeabilität der Gefäße als bei den GIST-T1- und GIST882-Tumoren gemessen werden, was dazu führt, dass eine Anreicherung in den GIST430-Tumoren begünstigt wird. Dies wird durch eine 2.5-5.0-fach stärkere Vaskularisierung der GIST430-Tumoren, verglichen mit den anderen GIST, zusätzlich verstärkt, wodurch sich die unerwartet hohe Aufnahme von FNI in den GIST430-Tumoren, trotz der niedrigen Bindungsaffinität von FNI, erklären lässt.¹⁰⁸ Die Imatinib-resistenten GIST430-Tumore besitzen neben einer *in-frame*-Deletion in Exon 11 noch die Mutation V654A,¹⁰⁹ die eine sehr geringe Bindungsaffinität sowohl von Imatinib, als auch von FNI ($IC_{50} > 9000$ nM, siehe Kapitel 3.3.4) erzeugt. Dennoch konnten Consolino et al. in Therapiestudien von Mäusen mit Imatinib feststellen, dass auch GIST430-Tumore auf die Gabe von Imatinib ansprachen, wenn auch deutlich schwächer als GIST-T1- und GIST882-Tumore.¹⁰⁵ Bauer et al. konnten ebenfalls zeigen, dass GIST430-Zellen *in vitro* nicht komplett resistent gegenüber Imatinib waren,⁴² was mit den Ergebnissen aus dem Permeabilitäts-Untersuchungen aus dieser Arbeit (Kapitel 3.3.2) übereinstimmt, da auch dort eine spezifische Anreicherung nachgewiesen werden konnte. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren ist die beobachtete Aufnahme von FNI bei GIST430-Tumoren nachvollziehbar. Ebenso lässt sich die fehlende Anreicherung in GIST-T1-Tumoren anhand ihrer schlechten Vaskularisierung begründen, die unter anderem durch das schnelle Tumorstadium *in vivo* hervorgerufen worden sein kann. Aufgrund der schwachen Durchblutung und der geringen Permeabilität der Gefäße wurde erschwert, dass der Radiotracer in den Tumor gelangte und deshalb nicht an das Target binden konnte. Da die GIST-T1-Tumore in beiden Parametern die niedrigsten Werte der hier untersuchten Tumoren aufweisen, lässt sich dadurch die fehlende Anreicherung von [¹⁸F]FNI in GIST-T1-Tumoren erklären. GIST882-Tumoren hingegen besitzen eine 1.5-fach höhere Permeabilität und eine doppelt so hohe Vaskularisierung als GIST-T1-Tumore, was ausreichend war, um deutlich höhere T/M zu erzielen, obwohl GIST882-Zellen eine geringere Sensibilität gegenüber Imatinib besitzen sollten als GIST-T1-Zellen. Somit scheint die Angiogenese in den Tumoren einen entscheidenden Einfluss auf die Anreicherung des Radiotracers zu haben. Die starke physiologische Varianz zwischen den GIST-Zelllinien lässt vermuten, dass der Einfluss der Vaskularisierung stärker ist als der Einfluss der Bindungsaffinität des Radiotracers, womit ein praktischer Einsatz von [¹⁸F]FNI als PET-Diagnostikum zur Unterscheidung der Imatinib-Sensitivität bei GIST nicht zielführend erscheint. Die Einflüsse der weitreichenden Unterschiede bezüglich Morphologie und Vaskularisierung von GIST müssen noch weiter in die Entwicklung eines geeigneten Radiotracers einfließen, um eventuell falsche Rückschlüsse bei Diagnosen für eine Therapieumstellung zu ziehen.

3.4.1.1 Koinjektion von Imatinib

Die Überprüfung auf Spezifität erfolgt in sogenannten Blockade-Experimenten, bei denen eine bekannte Verbindung als Kompetitor koinjiziert wird, die mit dem Radiotracer um die gleiche Bindungsstelle konkurriert. Durch den großen Überschuss des Kompetitors wird der Radiotracer im Idealfall komplett aus der Bindungsstelle verdrängt. Unspezifische Bindung des Radiotracers wird durch den Kompetitor üblicherweise nicht signifikant verändert, sodass durch den Vergleich des Blockade-Experiments mit dem normalen Experiment ermittelt werden kann, wie spezifisch die Bindung des Radiotracers ist.

Durch Koinjektion von Imatinib sollte so die Spezifität von FNI in ersten Pilot-Experimenten (ein Tier je Zelllinie) überprüft werden. Dabei wurden vor der Injektion des Radiotracers 200 µg Imatinib in gepufferter Lösung intravenös verabreicht, was einem mindestens 50-fachen Überschuss (verglichen mit der Menge an Radiotracer) entsprach. In der Biodistribution nach der PET-Messung konnte bei GIST-T1-Tumoren eine Reduktion der Tumoraufnahme von 0.80 ± 0.17 %ID/g auf 0.38 %ID/g beobachtet werden, während bei GIST882-Tumoren eine unveränderte Tumoraufnahme von 1.47 %ID/g (99%) vorlag und bei GIST430-Tumoren eine Erhöhung der Tracer-Anreicherung von 1.22 ± 0.24 %ID/g auf 3.91 %ID/g stattfand. Bei den Imatinib-resistenten GIST430-Tumoren wurde keine Reduktion der Tumoranreicherung erwartet, da hier theoretisch keine spezifische Bindung vorliegen sollte. Da jedoch, wie bereits erwähnt, keine vollständige Resistenz gegenüber Imatinib vorliegt, wäre auch hier eine Reduktion der Tracer-Anreicherung zu erwarten. Die tatsächlich beobachtete Erhöhung der Akkumulation könnte durch die langsamere Metabolisierung von [¹⁸F]FNI bei den Blockade-Experimenten erklärt werden, da die Cytochrom P450-Enzyme durch den Überschuss an Imatinib okkupiert sind und somit durch die längere Zirkulationsdauer im Blut eine größere Menge an Radiotracer den Tumor erreichen kann. Dennoch scheint eine Verdreifachung der Tumoranreicherung allein durch diesen Effekt unwahrscheinlich, sodass von einem statistischen Fehler ausgegangen werden sollte, da für die Blockade-Experimente nur ein Tier je Zelllinie verwendet wurde. Dass trotz Blockade-Experiment bei den Imatinib-sensitiven GIST keine vollständige Verdrängung des Radiotracers erreicht werden konnte, könnte zum einen an unspezifischer Bindung im Tumor liegen, zum anderen darauf hinweisen, dass der Überschuss an Kompetitor zu gering war. In den Untersuchungen der Permeabilität (Kapitel 3.3.2) und in den kompetitiven Bindungsassays (Kapitel 3.3.3) wurde selbst durch bis zu 5000-fachen Überschuss an Imatinib keine vollständige Verdrängung erreicht, was auf eine unspezifische intrazelluläre Akkumulation des Radiotracers hinweist. Da die Verwendung eines so hohen Überschusses aufgrund der Löslichkeit *in vivo* nicht möglich war, wurde auch nur mit einer teilweisen Verdrängung des Radiotracers aus dem Tumor gerechnet. Dadurch wurde das

Tumor-zu-Muskel-Verhältnis durch die Koinjektion von Imatinib nur geringfügig beeinflusst (Abb. 81).

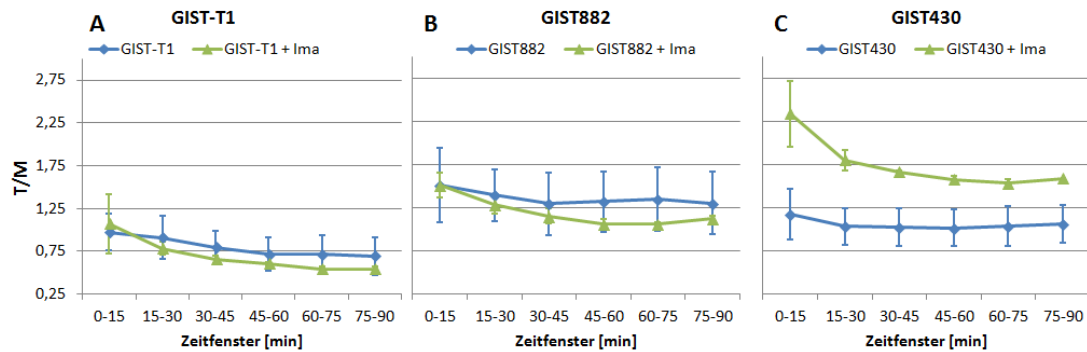


Abb. 81: Vergleich der Tumor-zu-Muskel-Verhältnisse (T/M) von $[^{18}\text{F}]$ FNI in GIST-T1 (A), GIST882 (B) und GIST430 (C), jeweils ohne und mit Koinjektion von Imatinib (Ima) über 90 Minuten nach Injektion. T/M jeweils über 15-Minuten-Intervalle gemittelt.

Allerdings konnten in den Blockade-Experimenten die Radiotracer-Aufnahme in Pankreas, Nieren und Dünndarm bei allen Tieren gesenkt werden. Die Anreicherung in das Pankreas konnte durch die Koinjektion von Imatinib von 5.20-6.40 %ID/g auf 0.77-1.98 %ID/g (entspricht einer Reduktion um 65-88%) gesenkt werden, was auf eine großteils spezifische Bindung – wahrscheinlich zu den in Kapitel 3.4.1 erwähnten PDGF-Rezeptoren – deutet. Ein möglicher Grund für diese relativ hohe spezifische Anreicherung könnte die gute Durchblutung des Pankreas sein, wodurch der Radiotracer – und auch der Kompetitor – dort stärker akkumulieren als im Tumor. Ebenso konnte die Anreicherung in den Nieren um 39-83% (von 14.37-24.13 %ID/g auf 4.22-10.07 %ID/g) und im Dünndarm um 40-61% (von 11.45-12.40 %ID/g auf 4.48-7.47 %ID/g) gesenkt werden, was sich durch die bereits beschriebene langsamere Metabolisierung erklären lässt. In der aktuellen Literatur finden sich weiterhin Hinweise, dass manche Rezeptoren der PDGFR-Familie in den Mesangiumzellen der Nierenglomeruli ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Migration und Produktion von extrazellulärer Matrix spielen.¹¹⁰ Somit könnte eine Blockade dieser Rezeptoren in den Nieren durch Imatinib ebenfalls zu einer Verringerung der Aktivitäts-Akkumulation beigetragen haben.

3.4.1.2 Koinjektion von Ketoconazol

Im Zuge der PET-Auswertungen konnte ein stetiger Anstieg der Knochenanreicherung mit der Zeit beobachtet werden. Da $[^{18}\text{F}]$ FNI sowohl in gepufferter Lösung, als auch in humanem, sowie murinem Serum eine hohe Stabilität aufweisen konnte, wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Knochenanreicherung und der hepatobiliären Metabolisierung des Radiotracers bestand.

Enzyme der Cytochrom P450-Familie haben die Funktion, vorwiegend körperfremde Stoffe zu metabolisieren, weswegen die beobachtete Freisetzung von [¹⁸F]Fluorid aus dem Radiotracer vermutlich durch diese Enzyme verursacht wurde. Eine Inhibition dieser Enzyme sollte daher zu einer verminderten Metabolisierung des Radiotracers in der Leber und damit einer reduzierten Aktivitäts-Anreicherung in Knochen und Leber führen.

Die Koinjektion des potenten CYP-Inhibitors führte in der Biodistribution 2 Stunden nach Injektion allerdings nicht zu einheitlichen Ergebnissen. So variierte die Aktivitäts-Akkumulation in der Leber stark (50-150% verglichen mit den Ergebnissen ohne Ketoconazol), was vermutlich auf die geringe Anzahl an Tieren in diesem Versuch zurückzuführen ist. Die Daten aus der dynamischen PET-Bildgebung konnten ebenfalls zeigen, dass die Koinjektion von Ketoconazol keine eindeutigen Rückschlüsse zulässt, allerdings schien die Kinetik der hepatobiliären Radiotracer-Anreicherung nicht signifikant verändert gegenüber den Versuchen ohne Ketoconazol. Durch die starke Varianz zeigte zwar auch die absolute Aktivitäts-Anreicherung in den Knochen in der Biodistribution 2 Stunden nach Injektion kein eindeutiges Ergebnis, jedoch konnte in den dynamischen PET-Datensätzen beobachtet werden, dass die Anreicherung in den Knochen bei zwei von drei Tieren langsamer stattfand. Da über fast den gesamten Messbereich eine lineare Kinetik vorlag, konnte über die Steigung dieser Geraden die Geschwindigkeit der Akkumulation berechnet werden. Durch die Koinjektion von Ketoconazol verringerte sich diese Steigung bei dem GIST-T1-Tumor von 34.7 ± 13.8 mg/(L·s) auf 25.7 mg/(L·s) (Reduktion um 26%) und bei dem GIST430-Tumor von 34.3 ± 10.2 mg/(L·s) auf 18.0 mg/(L·s) (Reduktion um 47%) verglichen mit den Experimenten ohne Ketoconazol (Abb. 82). Dies spricht für eine Metabolisierung von [¹⁸F]FNI durch CYP-Enzyme, bei der [¹⁸F]Fluorid freigesetzt wird und sich in den Knochen einlagert. Bei dem GIST882-Tumor hingegen blieb die Geschwindigkeit der Knochenanreicherung nahezu unverändert (37.5 ± 13.2 mg/(L·s) bzw. 43.2 mg/(L·s)), was auf mögliche experimentelle Fehler zurückzuführen sein könnte. So könnte beispielsweise die Injektion ganz oder teilweise paravenös – also neben die Vene – erfolgt sein, wodurch nicht die gesamte Menge an Ketoconazol intravenös injiziert wurde, sondern subkutan vorlag. Dies hätte zur Folge, dass Ketoconazol nicht ausreichend schnell in die Leber transportiert werden konnte und somit nicht die CYP-Enzyme inhibieren konnte. Ketoconazol wurde zudem nur in initialen Versuchen appliziert, sodass nur ein Tier je Zelllinie dafür verwendet wurde, wodurch auch statistische Fehler nicht ausgeschlossen sind.

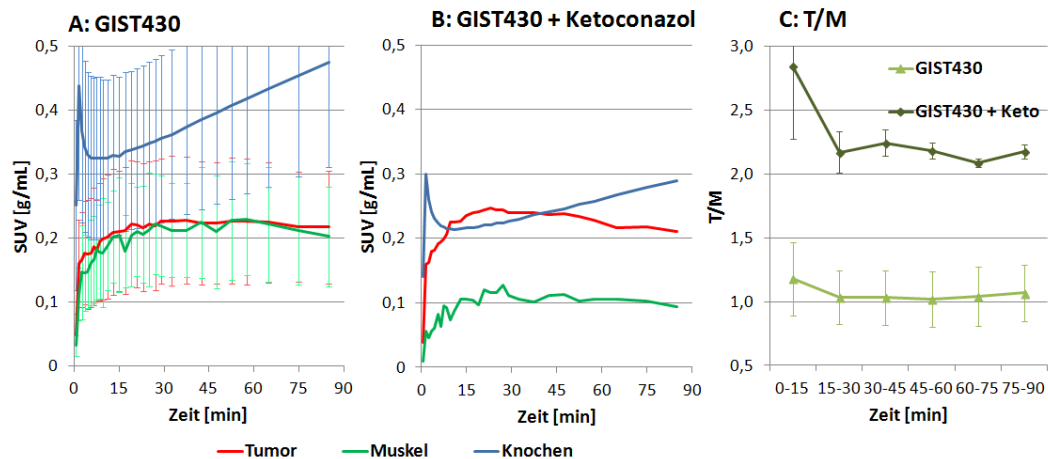


Abb. 82: Vergleich von Tumor-, Muskel- und Knochen-Uptake über 90 Minuten nach Injektion von $[^{18}\text{F}]$ FNI ohne (A) und mit Ketoconazol (B). Deutlich zu sehen ist die reduzierte Knochenanreicherung mit Ketoconazol bei GIST430-Tumoren, sowie ein deutlich erhöhtes T/M (C).

Bei der Betrachtung des T/M konnte bei den GIST-T1- und GIST882-Tumoren kein wesentlicher Unterschied erkannt werden (0.72 ± 0.17 statt 0.98 ± 0.21 bzw. 1.32 ± 0.17 statt 1.51 ± 0.43 in den ersten 15 Minuten), allerdings zeigte der GIST430-Tumor eine signifikante Erhöhung des T/M von 1.18 ± 0.29 auf 2.84 ± 0.57 in den ersten 15 Minuten. Zwar muss berücksichtigt werden, dass es sich um ein einzelnes Tier handelte, allerdings konnte hier durch Koinjektion von Ketoconazol die Bildqualität derart erhöht werden, dass der Tumor deutlich besser durch die PET-Bildgebung detektiert werden konnte (Abb. 83).

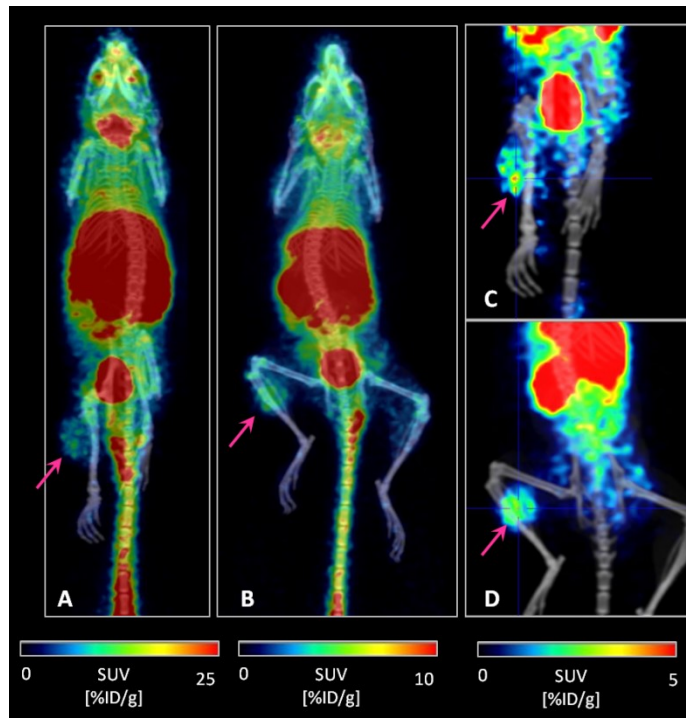


Abb. 83: PET-Bilder von GIST430-tragenden Mäusen 18 Minuten nach Injektion von [^{18}F]Fluor-Norimatinib. A, B: Darstellung der MIPs ohne (A) und mit Koinjektion von Ketoconazol (B). C, D: Ebenendarstellung ohne (C) und mit Ketoconazol (D). Die Lokation der Tumoren ist mit einem pinken Pfeil gekennzeichnet.

Problematisch war allerdings die bereits erwähnte geringe Löslichkeit von Ketoconazol unter physiologischen Bedingungen. Selbst unter optimierten Bedingungen und unter Zuhilfenahme von Tensiden konnte nur eine maximale Konzentration von 0.9 mg/mL erreicht werden, damit eine stabile Lösung vorlag, bei der sich während der Injektion kein Niederschlag bildete, der Katheter oder Blutgefäße blockieren könnte. Aufgrund dieser geringen Löslichkeit konnte bei diesen Vorversuchen nicht die gewünschte Menge von 200 μg Ketoconazol pro Maus injiziert werden, sondern nur 45 μg . Dennoch zeigte schon die Verwendung dieser geringen Menge messbare Effekte, sodass in weitergehenden Untersuchungen zur Inhibition der CYP-Enzyme mittels Ketoconazol auf andere Applikationswege (z.B. peroral via Schlundsonde) zurückgegriffen werden sollte, um den Einfluss auf die Metabolisierung des Radiotracers zu evaluieren. Insgesamt lieferten diese Experimente aber bereits wichtige Hinweise auf die hepatobiliäre Metabolisierung von FNI durch CYP-Enzyme, bei der Fluorid aus Fluorpyridinen abgespalten wird. Des Weiteren könnte durch diese Erkenntnis Ketoconazol gezielt eingesetzt werden, um die Stabilität von Fluorpyridinen *in vivo* zu erhöhen, was potentiell auch auf andere Radiotracer angewendet werden könnte.

3.4.2 [^{18}F]Fluor-DOG1

Für eine erste Evaluierung von [^{18}F]Fluor-DOG1 als GIST-spezifischen Radiotracer wurden analog zu den Versuchen mit [^{18}F]Fluor-Norimatinib ebenfalls Balb/c SCID-Mäuse verwendet, denen GIST430-Tumore inokuliert wurden. Nachdem die Tumore einen Durchmesser von etwa 8 mm erreicht hatten, wurde der Radiotracer den Tieren intravenös injiziert und eine 90-minütige PET-Messung, gefolgt von einer 30-minütigen CT-Messung unter Narkose durchgeführt. Nach der Tötung der Tiere wurden die Organe zur Bestimmung der Aktivitätsanreicherung (2h p.i., Abb. 84) entnommen und im Gamma-Counter vermessen.

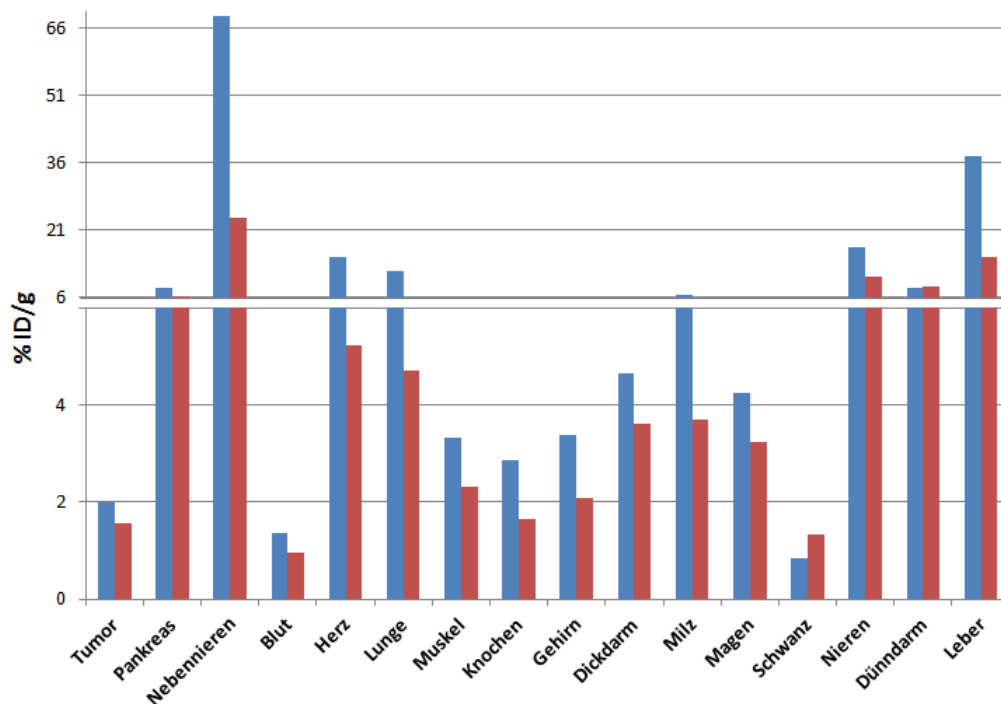


Abb. 84: Darstellung der Daten aus Biodistributionsstudien mit dem Radiotracer [^{18}F]F-DOG1 2 h p.i. Evaluiert wurde die Aktivitätsverteilung in zwei tumortragenden (GIST430) Balb/c SCID-Mäusen.

Wie bereits in Kapitel 3.3.1.2 beschrieben, wurde in der *in vivo*-Evaluierung eine unerwartete Pharmakokinetik beobachtet, weshalb die Stabilität von [^{18}F]Fluor-DOG1 in murinem Blutserum überprüft wurde. Da sich hierbei zeigte, dass eine rasche Metabolisierung des Radiotracers stattfand, beziehen sich die in diesem Kapitel vorgestellten Daten auf die Biodistribution von [^{18}F]Fluor-DOG1 und dessen Metaboliten.

Neben einer hohen Anreicherung in den Ausscheidungsorganen Niere (17.3 bzw. 10.7 %ID/g), Leber (37.7 bzw. 15.1 %ID/g) und Dünndarm (8.2 bzw. 8.3 %ID/g) zeigte sich eine auffallend hohe Aktivitätsanreicherung in den Nebennieren von 68.8 bzw. 23.9 %ID/g (Abb. 84). Da in der Literatur keine Hinweise zur erhöhten Expression von DOG1 in den Nebennieren zu finden waren, wäre denkbar, dass

[¹⁸F]Fluor-DOG1 oder dessen Metabolit an andere Rezeptoren in der Nebenniere bindet. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass Messfehler bei der Bestimmung des geringen Gewichts der Nebennieren (<0.01 g) die Ergebnisse verfälscht haben. Die hohe Anreicherung in der Leber und im Dünndarm könnte sich durch die hohe Lipophilie von [¹⁸F]Fluor-DOG1 und dessen Metaboliten erklären, die vermutlich der hepatischen Metabolisierung durch CYP-Enzyme (bspw. Demethylierung, Hydroxylierung, Debenzylierung) unterlagen. Interessanterweise fand im Herz eine deutlich höhere Aktivitätsanreicherung (14.9 bzw. 5.2 %ID/g) statt als im Blut (1.4 bzw. 1.0 %ID/g) oder in Muskelgewebe (3.3 bzw. 2.3 %ID/g). Da nicht geklärt werden konnte, ob diese Anreicherung durch den Radiotracer oder einen Metaboliten verursacht wurde, lässt sich keine eindeutige Aussage treffen, inwiefern eine spezifische Bindung vorliegen könnte. Gleiches gilt für die ungewöhnlich hohe Aktivitätsanreicherung im Gehirn (3.4 bzw. 2.1 %ID/g), die näher untersucht werden sollte. Auch konnte die hohe Anreicherung in der Lunge (11.8 bzw. 4.7 %ID/g) aufgrund der Metabolisierung des Radiotracers nicht mehr eindeutig den dort physiologisch vorkommenden Kalzium-aktivierten Chloridionen-Kanälen (u.a. DOG1) zugeordnet werden.^{60,65} Dem entgegen steht jedoch die geringe Aktivitätsakkumulation in den GIST430-Tumoren, die nur 2.0 bzw. 1.6 %ID/g betrug. Somit ergab sich ein T/M von 0.60 bzw. 0.67, also eine deutlich höhere Anreicherung in Muskelgewebe verglichen mit dem Tumor. Da GIST430-Tumore den Ionenkanal DOG1 überexprimieren und eine ausreichend hohe Vaskularisierung aufweisen, wäre denkbar, dass durch die rasche Metabolisierung des Radiotracers die Bindungsaffinität zu DOG1 verloren ging und deswegen keine Anreicherung stattfand.

Die Ergebnisse aus den dynamischen PET-Messungen (Abb. 85, Abb. 86) waren in Einklang mit den Ergebnissen aus der Biodistribution 2 h p.i. Es zeigte sich bei beiden Tieren eine starke Aktivitätsanreicherung in der Leber mit einer langsamen Exkretion, wobei die Anreicherung im Darm fast konstant blieb. Ebenso zeigte sich nach einer anfänglich schnellen Anflutung von Aktivität in die Nieren keine bzw. kaum Exkretion in die Blase. Ob diese Akkumulation in den Nieren durch spezifische Bindung von [¹⁸F]Fluor-DOG1 bzw. einem Metaboliten hervorgerufen wurde, sollte in weitergehenden Studien überprüft werden. Bei Betrachtung der Aktivitätsanreicherungen in Tumor- und Muskelgewebe konnte beobachtet werden, dass in beiden Geweben eine ähnliche Kinetik vorlag und somit konstant ein T/M von 0.41 ± 0.04 bzw. 0.50 ± 0.15 (jeweils gemittelt über 90 min) ermittelt wurde. Dabei sollte beachtet werden, dass in der Biodistribution 2h p.i. im Tumor eine höhere Aktivitätsakkumulation vorlag als im Blut und somit von einer ausreichend hohen Vaskularisierung des Tumors auszugehen war. Allerdings könnte die metabolische Instabilität des Radiotracers dazu geführt haben, dass für die Wechselwirkung zu DOG1 relevante Strukturelemente von [¹⁸F]Fluor-DOG1, wie beispielsweise die

3,4,5-Trimethoxybenzoylgruppe, abgespalten wurden und somit keine ausreichende Bindungsaffinität mehr vorhanden war.

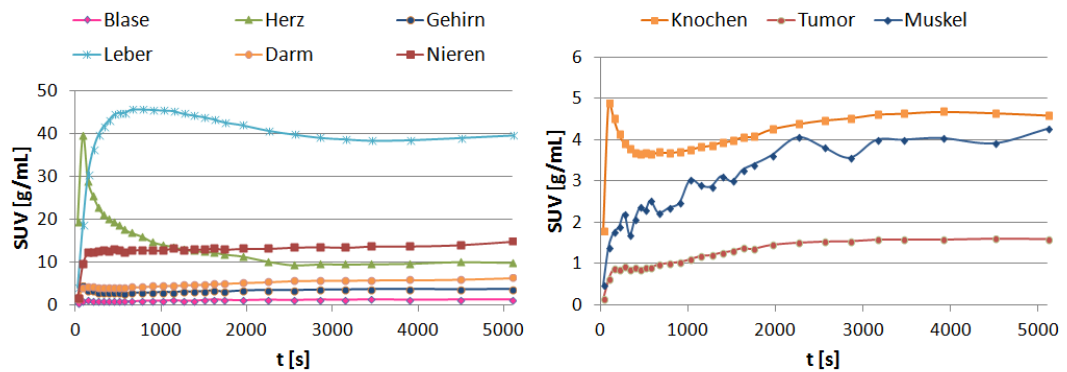


Abb. 85: Darstellung der Verteilung von $[^{18}\text{F}]$ Fluor-DOG1 an ausgewählten Organen über 90 Minuten nach Injektion am Beispiel einer tumortragenden (GIST430) Balb/c SCID-Maus.

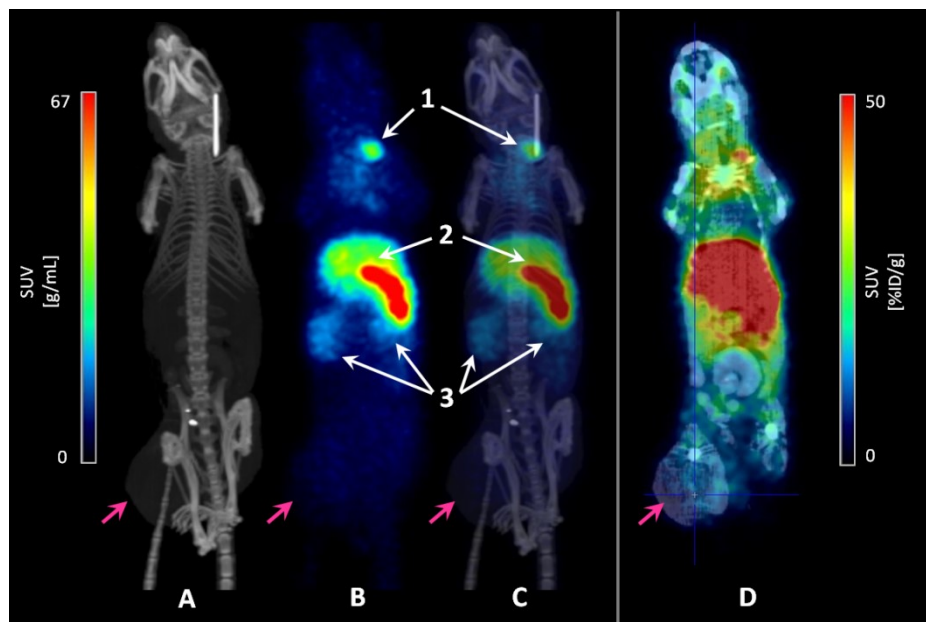


Abb. 86: MIPs (A: CT, B: PET, C: Fusion aus PET und CT) bzw. koronarer Schnitt (D: PET/CT) einer Maus mit GIST430-Tumor nach Injektion von $[^{18}\text{F}]$ Fluor-DOG1. Darstellung des SUVs (PET) von 0-67 g/mL (60 min p.i., A-C), bzw. von 0-50 %ID/g (85 min p.i., D). Sichtbar ist hauptsächlich die Aktivitäts-Anreicherung in der Leber, sowie in den Nieren. Die Lokation des Tumors ist mit einem pinken Pfeil gekennzeichnet. 1: Injektionsstelle. 2: Leber. 3: Nieren.

Da es sich hierbei um Pilot-Versuche mit 2 Tieren handelte, sollten die Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Tieren und mit unterschiedlichen GIST-Zelllinien durchgeführt werden, um eine aussagekräftige Statistik zu generieren. Zuvor jedoch muss der Radiotracer bezüglich seiner *in vivo*-Stabilität optimiert werden, da ansonsten keine eindeutigen Schlüsse aus den Daten gezogen werden können. Bei den sich daraus anschließenden Untersuchungen ist es

unbedingt erforderlich, Blockade-Experimente durchzuführen, um die Spezifität der Anreicherungen zu bestimmen.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Bildgebung von gastrointestinalen Stromatumoren mittels Positronen-Emissions-Tomographie sollten niedermolekulare ^{18}F -markierte Radiotracer entwickelt und evaluiert werden, die eine genauere Diagnostik als ^{18}F FDG erlauben. Dazu sollte zum einen ein Radiotracer zur funktionellen Bildgebung entwickelt werden, der die Rezeptor-Tyrosinkinase KIT adressiert. Auf diese Weise sollte die Sensitivität des Tumors gegenüber Imatinib mittels PET dargestellt werden, wodurch Resistenzen frühzeitig detektierbar sein sollten. Zum anderen sollte ein Radiotracer entwickelt werden, der an den GIST-spezifischen Ionenkanal DOG1 bindet und damit ermöglicht, GIST ohne invasive Biopsie von anderen Tumoren unterscheiden zu können.

Synthese und Radiomarkierung der Imatinib-Derivate

Aufgrund der hepatobiliären Metabolisierung von Imatinib wurde das ^{18}F -Radiolabel nicht über den Piperazin-Ring, sondern über den Pyridin-Ring eingeführt, da diese Position als metabolisch stabiler erachtet wurde. Um gleichzeitig die Pharmakokinetik – verglichen mit bisherigen ^{18}F -markierten Imatinib-Derivaten – zu verbessern, wurde auf die Methylgruppe am Piperazin-Ring verzichtet, da hierdurch die Lipophilie gesenkt und somit die unerwünschte Akkumulation in der Leber reduziert werden sollte. Als Vorläufer für diese Zielstruktur sollte ein Nitropyridin-Derivat von Norimatinib, dem biologisch ähnlich aktiven Hauptmetaboliten von Imatinib, synthetisiert werden. Da herkömmliche Synthesen für Imatinib nicht kompatibel mit der Einführung der Nitro-Abgangsgruppe waren, musste eine neue Synthese entwickelt werden. Im ersten Versuch wurden dazu zwei Fragmente – ein 2-Chlorpyrimidin- und ein Anilin-Derivat – im letzten Schritt der 6-stufigen Synthese kondensiert, was allerdings nur für den Fluor-Standard erfolgreich durchgeführt werden konnte (Abb. 87), da die harschen Reaktionsbedingungen der Kondensation nicht mit dem Nitro-Derivat kompatibel waren. Für die Synthese des Nitropyridin-Vorläufers musste deshalb eine alternative Synthesestrategie entwickelt werden. Hierbei konnte die Kondensation der 2-Chlorpyrimidin-Verbindung mit einem Phenylendiamin-Derivat erfolgreich am Anfang des Syntheseweges durchgeführt werden. Alle nachfolgenden Reaktionsschritte konnten dadurch unter milden Bedingungen erfolgen. Über diese neue 7-stufige Synthesestrategie konnte so der Nitropyridin-Vorläufer im Hundert-Milligramm-Maßstab erhalten werden. Die notwendige Reinheit des Nitropyridin-Vorläufers von 98% wurde mittels Säulenchromatographie und Umkristallisation erreicht, sodass auf eine aufwendige Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC verzichtet werden konnte.

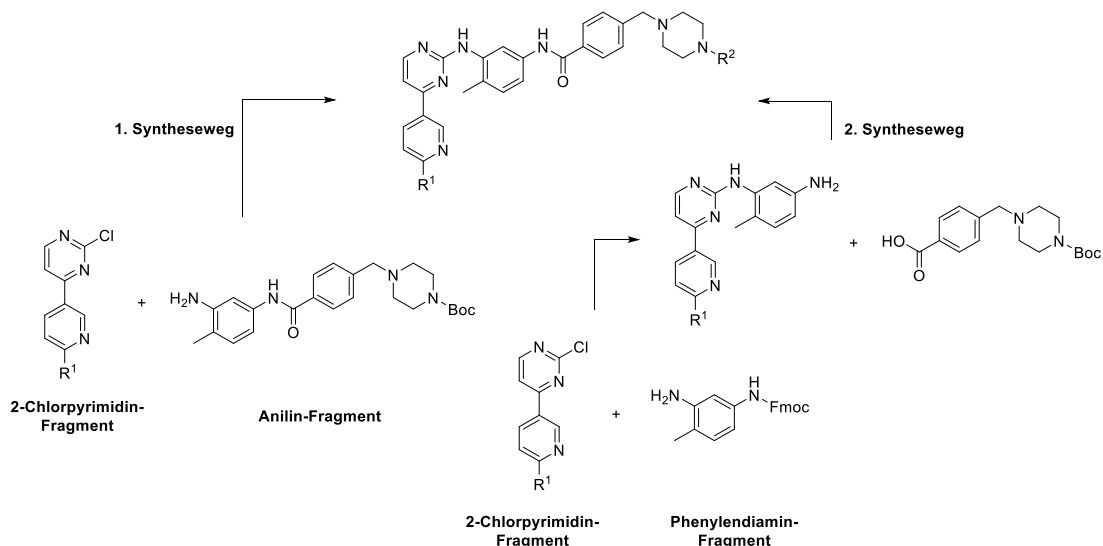


Abb. 87: Darstellung der wichtigsten Schritte der beiden verwendeten Synthesewege. Der Boc-geschützte Nitropyridin-Vorläufer (R^1 : NO_2 , R^2 : Boc) war nur über den 2. Syntheseweg zugänglich, während der Fluor-Standard (R^1 : F, R^2 : H) über den 1. Syntheseweg synthetisiert werden konnte.

Die Radiomarkierung von [^{18}F]Fluor-Norimatinib wurde als zweistufige Synthese realisiert (Abb. 88). Der erste Schritt – die Radiofluorierung – fand zwar unter harschen Bedingungen statt, konnte allerdings eine exzellente [^{18}F]Fluorid-Inkorporation von $82.8 \pm 3.6\%$ vorweisen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Stabilität des entstehenden [^{18}F]Fluorpyridin-Derivats abhängig von der Vorläufer-Konzentration war und nur unter optimierten Reaktionsbedingungen keine Freisetzung von zuvor inkorporiertem [^{18}F]Fluorid stattfand. Die nachfolgende saure Entschützung wies zunächst nur eine geringe Reaktionsgeschwindigkeit auf, wobei erhebliche Mengen an radioaktivem Nebenprodukt, sowie freiem [^{18}F]Fluorid gebildet wurden. Durch Evaluieren verschiedener Entschützungsbedingungen konnte zwar sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit leicht erhöht werden, als auch die Freisetzung von [^{18}F]Fluorid geringfügig eingedämmt werden, jedoch wurden weiterhin große Mengen an dem vermutlich durch Oxidation entstehenden radioaktiven Nebenprodukt gebildet. Durch Zusatz von Ascorbinsäure als Anti-Oxidanz konnte die Bildung dieses Nebenproduktes fast vollständig unterdrückt und gleichzeitig eine erhebliche Beschleunigung der Reaktion erzielt werden. Die Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer HPLC und C18-Kartusche, sodass der Radiotracer [^{18}F]Fluor-Norimatinib in guter radiochemischer Ausbeute und Reinheit erhalten werden konnte. Die optimierten Bedingungen führten somit innerhalb einer Synthesedauer von 90 Minuten zu einer radiochemischen Ausbeute von $22.2 \pm 3.3\%$ und einer radiochemischen Reinheit von über 99%.

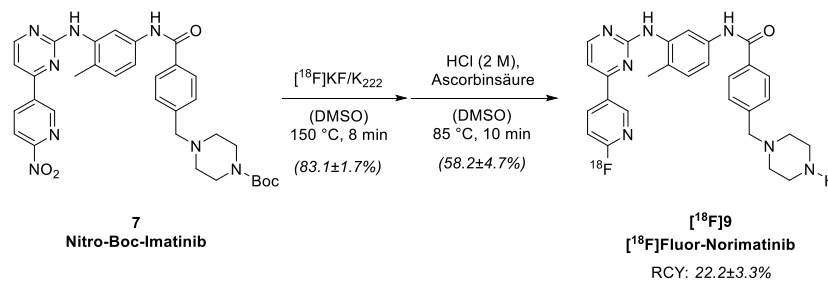


Abb. 88: Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]$ Fluor-Norimatinib. In Klammern sind die analytisch bestimmten radiochemischen Ausbeuten angegeben.

***In vitro-* und *in vivo-*Evaluierung von $[^{18}\text{F}]$ Fluornorimatinib**

Der Radiotracer $[^{18}\text{F}]$ Fluor-Norimatinib zeigte sowohl in der injektionsfertigen Puffer-Lösung, als auch in humanem Blutserum eine hervorragende Stabilität von über 99% über einen Zeitraum von zwei Stunden. Lediglich in Blutserum von Ratten konnten geringe Mengen an Metaboliten (<5%) detektiert werden, die für die PET-Messung aber kein Problem darstellten. Die Entfernung der Methylgruppe am Piperazin-Ring führte zwar zu einer deutlich reduzierten Lipophilie (von $\log D_{\text{Imatinib}} = 2.34 \pm 0.17$ ¹⁰⁴ auf $\log D_{\text{FNI}} = 1.16 \pm 0.01$), allerdings konnten keine Einschränkungen bezüglich des passiven Transports in die Zelle mittels Diffusion durch die Zellmembran *in vitro* beobachtet werden. Bei der Evaluierung der Zellmembran-Permeabilität konnte zudem festgestellt werden, dass ein Großteil der intrazellulären Aktivitätsanreicherung unspezifisch vorlag, was auf die – für biologische Systeme – immer noch hohe Lipophilie zurückgeführt werden konnte. Dennoch konnte so zwischen den Imatinib-sensitiven Zelllinien GIST-T1 und GIST882 und der Imatinib-resistenten Zelllinie GIST430 unterschieden werden. Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten wurde zunächst ein kompetitiver Bindungsassay mit vitalen Zellen durchgeführt, jedoch erschwerte die hohe unspezifische Anreicherung in den Zellen die Reproduzierbarkeit und Auswertung der Assays, sodass zunächst probiert wurde, mit isolierten Zellmembranfragmenten die Bindungsaffinität zu ermitteln. Da jedoch keine optimalen Bedingungen für die Fragmentierung und Aufreinigung der Membranen gefunden werden konnten, wurde ein radiometrischer Kinase-Assay in Auftrag gegeben. Hierin wurden die Bindungsaffinitäten von Fluor-Norimatinib, Norimatinib und SKI696 an 10 KIT-Mutanten ermittelt, wobei sich zeigte, dass die Verbindungen gegenüber dem *wildtype*-KIT ähnliche Affinitäten ($\text{IC}_{50} = 48\text{-}65 \text{ nM}$) besitzen. Fluor-Norimatinib wies zwar gegenüber den anderen KIT-Mutanten geringere Affinitäten als Norimatinib auf, dennoch war eine Unterscheidung zwischen resistenten und sensitiven Mutanten möglich, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Selektivität von Fluor-Norimatinib der von Norimatinib entspricht.

Die *in vivo*-Evaluierung wurde an tumortragenden Balb/c SCID-Mäusen mittels dynamischer PET-Messung durchgeführt. Dabei zeigte sich eine deutlich erhöhte renale Exkretion des Radiotracers im Vergleich zu SKI696, die der reduzierten Lipophilie geschuldet war und so zu einer geringeren Leberakkumulation führte. Die Tumoranreicherung hingegen konnte nicht mit den Ergebnissen aus den *in vitro*-Evaluierungen in Einklang gebracht werden, da einerseits die GIST-T1-Tumore trotz ihrer hohen Imatinib-Sensitivität keine Akkumulation des Radiotracers zeigten ($T/M = 0.98 \pm 0.21$), andererseits aber eine Anreicherung in den Imatinib-resistenten GIST430-Tumoren ($T/M = 1.18 \pm 0.29$) stattfand. Diese Ergebnisse ließen sich anhand der unterschiedlichen Vaskularisierungen der Tumoren erklären. Während GIST-T1- und GIST882-Tumore ($T/M = 1.51 \pm 0.43$) nur sehr schlecht vaskularisiert sind, konnte bei GIST430-Tumoren eine vielfach höhere Durchblutung und Permeabilität der Gefäße festgestellt werden, sodass die Akkumulation im Tumor stärker durch Vaskularisierung und unspezifische Bindung, als durch spezifische Bindung beeinflusst wurde. Weiterhin konnte ein stetiger Anstieg der Knochenanreicherung beobachtet werden, der auf eine Metabolisierung durch Cytochrom P450-Enzyme zurückzuführen war und bereits mit geringen Mengen Ketoconazol in ersten Vorversuchen teilweise reduziert werden konnte. Die Inhibition dieser Enzyme führte damit nicht nur zu einer Erhöhung der Stabilität des Radiotracers, sondern auch zu einer leicht erhöhten Tumoraufnahme (Abb. 89), die vermutlich in der erhöhten Verfügbarkeit des Radiotracers aufgrund dessen verlangsamter Metabolisierung begründet war.

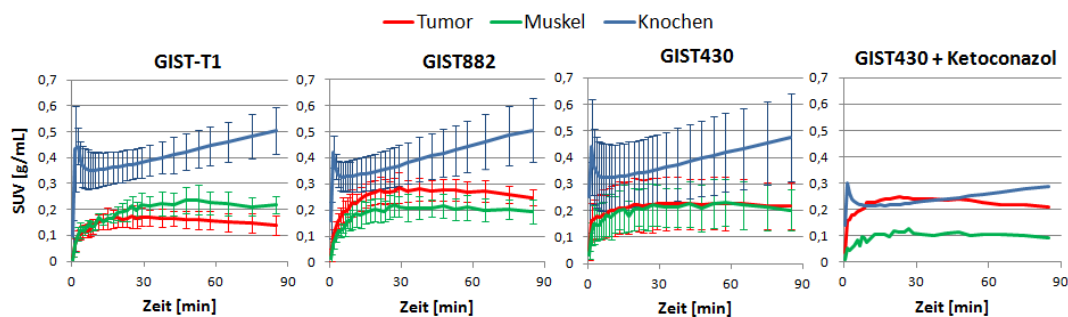


Abb. 89: Vergleich von Tumor-, Muskel- und Knochen-Uptake über 90 Minuten bei GIST-T1, GIST882 und GIST430 (jeweils $n = 5$). Deutlich zu sehen ist die reduzierte Knochenanreicherung mit Ketoconazol bei dem GIST430-Tumor ($n = 1$), sowie ein deutlich erhöhtes T/M.

Synthese und Radiomarkierung der DOG1-Liganden

Auf Basis publizierter Daten aus einem High-Throughput-Screening wurde die niedermolekulare Verbindung Fluor-DOG1 als Zielstruktur ausgewählt, da diese zu den affinsten DOG1-Liganden dieser Substanzklasse gehören sollte. Da das ^{18}F -

Radiolabel jedoch an einer für nukleophile Substitutionen ungünstigen Position eingeführt werden sollte, wurden mehrere Markierungsstrategien für elektronenreiche Aromaten untersucht. Dazu wurden Vorläufer mit Nitro-, Triazen- und Borsäureester-Abgangsgruppen erfolgreich synthetisiert (Abb. 90) und anschließend die Radiomarkierungen evaluiert. Den ersten Reaktionsschritt stellte dabei die Hantzsch Thiazolsynthese dar, über die die 2-Aminothiazol-Kernstruktur aller Derivate zugänglich war. Nach Kopplung eines Benzoesäurederivates konnten so der Nitro- und der Borsäureester-Vorläufer erhalten werden. Die Synthese des Triazen-Vorläufers hingegen benötigte ausgehend vom Nitro-Vorläufer zuerst eine Reduktion zum Amin, welches dann diazotiert wird und nach Kopplung mit Piperidin das gewünschte Produkt lieferte.

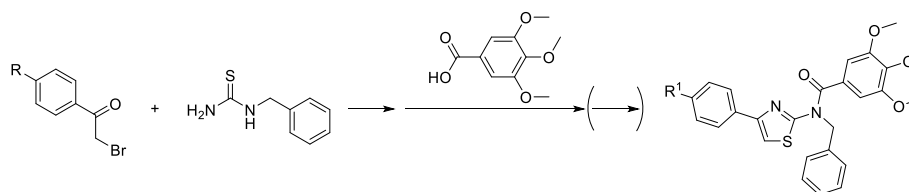


Abb. 90: Darstellung der Synthesen von Fluor-DOG1 ($R^1 = F$) Nitro-DOG1 ($R^1 = NO_2$), Triazen-DOG1 ($R^1 = N=N\text{-Pip}$) und BPin-DOG1 ($R^1 = BPin$).

Der Nitro-Vorläufer führte dabei nicht zum gewünschten Radiotracer, da sich dieser Vorläufer unter den benötigten harschen Reaktionsbedingungen schnell zersetzte. Bei der vom Triazen-Vorläufer ausgehenden Radiosynthese wurde zuerst das entsprechende Diazonium-Ion *in situ* über eine saure Zersetzung gebildet, welches allerdings, bedingt durch seine hohe Reaktivität, zu einer Vielzahl an Produkten führte. Die Reaktionsführung wurde zudem durch die Erzeugung von flüchtigem [^{18}F]HF durch die sauren Bedingungen erschwert, da ein Großteil der Radioaktivität so nicht mehr für die Radiofluorierung zur Verfügung stand. Der Borsäureester hingegen stellte eine unkonventionelle Abgangsgruppe dar, die eine relativ hohe chemische Stabilität aufwies, allerdings mittels Kupfer-Katalyse durch Tetrakis-(pyridin)kupfer(II)-triflat den gewünschten Radiotracer [^{18}F]Fluor-DOG1 mit einer [^{18}F]Fluorid-Inkorporation von $73.9 \pm 8.0\%$ zugänglich machte. Aufgrund der ausgezeichneten Selektivität wurden keine radioaktiv markierten Nebenprodukte gebildet, sodass der Radiotracer nach Aufreinigung mittels HPLC und C18-Kartusche in guter radiochemischer Ausbeute ($34.0 \pm 11.1\%$) erhalten werden konnte. Sowohl in Phosphatpuffer, als auch in humanem Blutserum wies der Radiotracer eine sehr hohe Stabilität von über 99% über zwei Stunden auf, die für PET-Messungen vorteilhaft ist.

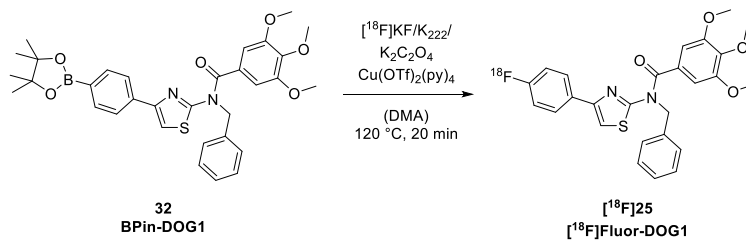


Abb. 91: Radiosynthese von [¹⁸F]Fluor-DOG1 ausgehend von BPin-DOG1.

***In vivo*-Evaluierung von [¹⁸F]Fluor-DOG1**

Die erste *in vivo*-Evaluierung von [¹⁸F]Fluor-DOG1 wurde an Balb/c SCID Mäusen mit GIST430-Tumoren mittels dynamischer PET/CT-Messung durchgeführt. Dabei konnte eine starke Akkumulation des Radiotracers in der Leber beobachtet werden, die vermutlich der hohen Lipophilie ($\log D_{\text{Fluor-DOG1}} = 2.51 \pm 0.13$) und damit der Metabolisierung durch CYP-Enzyme geschuldet war. In GIST430-Tumoren konnte im Gegensatz zu fast allen anderen Geweben eine niedrigere Anreicherung beobachtet werden, was zu einem für die PET-Bildgebung ungünstigen Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis von <1 führte. Um mögliche Gründe für die niedrige Aktivitätsanreicherung herauszufinden, wurde die Stabilität zusätzlich in Blutserum von Mäusen und Ratten evaluiert. Dies zeigte im Gegensatz zum humanen Blutserum, dass Fluor-DOG1 dort einer raschen Metabolisierung unterlag, sodass bereits nach 25 Minuten nur noch 65% (Maus) bzw. 50% (Ratte) und bis Ende der PET/CT-Messung nur noch geringe Mengen (Maus: 17%, Ratte: 3%) des Radiotracers intakt vorlagen. Somit könnte die Metabolisierung des Radiotracers zur unvorteilhaften Pharmakokinetik beigetragen haben. Um das gewünschte Verhalten *in vivo* zu erreichen, müssen somit noch stärkere Optimierungen des Radiotracers vorgenommen oder alternativ andere Tiermodelle in Betracht gezogen werden.

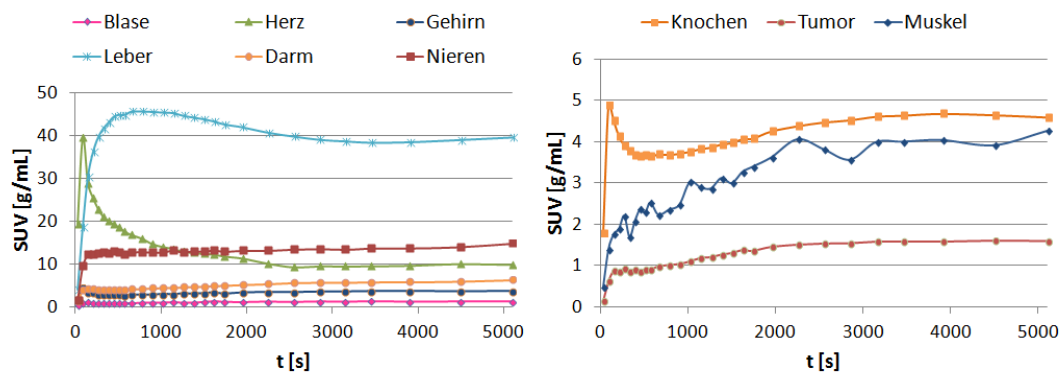


Abb. 92: Darstellung der Verteilung von [¹⁸F]Fluor-DOG1 an ausgewählten Organen über 90 Minuten nach Injektion am Beispiel einer tumortragenden (GIST430) Balb/c SCID-Maus.

Ausblick

Die Unterschiede der untersuchten GIST-Zelllinien bezüglich der Vaskularisierung beeinflussten zwar die Bildgebung so stark, dass eine Darstellung der Imatinib-Sensitivität bei diesen Zelllinien mit [¹⁸F]FNI nicht möglich war, jedoch stellt die Ko-Administration von CYP3A4-Inhibitoren wie Ketoconazol zumindest in der prä-klinischen Forschung einen interessanten Ansatz dar. Eine Übertragung auf den Menschen könnte möglicherweise mit verträglicheren CYP-Inhibitoren, wie beispielsweise Naringenin (in Grapefruit-Saft enthalten) realisiert werden, um den Abbau des Radiotracers zu verlangsamen, falls beim Menschen ebenfalls eine Metabolisierung stattfindet. Weiterhin könnte [¹⁸F]FNI nicht nur für die Diagnostik von GIST eingesetzt werden, sondern auch bei anderen mit Imatinib behandelten Krankheiten. So entstehen bei der chronischen myeloischen Leukämie ebenfalls Resistenzen gegenüber Imatinib, die mit [¹⁸F]FNI potentiell dargestellt werden könnten. Eine Evaluierung dieses Radiotracers sollte deshalb auch außerhalb von GIST erfolgen. Zuvor empfiehlt es sich jedoch noch, die Radiosynthese und speziell die Aufreinigung weiter zu optimieren, um höhere molare Aktivitäten zu erhalten.

Um den Ursachen für die schlechte Anreicherung von [¹⁸F]Fluor-DOG1 in GIST430 auf den Grund zu gehen, sollten folgende Maßnahmen unternommen werden: zum einen müsste anhand von *in vitro*-Evaluierungen abgeklärt werden, ob eine spezifische Bindung zu DOG1 vorliegt. Zum anderen sollte dieser Radiotracer in einem anderen Tiermodell evaluiert werden, dessen Metabolismus dem humanen ähnlicher ist. Da sich die Serum-Stabilitäten zwischen Mensch und Maus in diesem Fall derart stark unterscheiden, lassen sich die *in vivo*-Ergebnisse der Mäuse nicht auf den Menschen übertragen. Alternativ bietet sich an, statt eines DOG1-Aktivators einen der literaturbekannten DOG1-Inhibitoren radioaktiv zu markieren, dessen Stabilität zu überprüfen und *in vivo* zu evaluieren.

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Organisch-chemische Synthesen

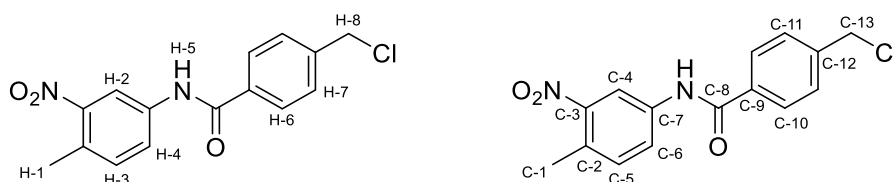
5.1.1 Allgemeine Methoden

Kommerziell erhältliche Chemikalien und Lösungsmittel wurden in analytischem Reinheitsgrad erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet (ABCR, Acros, Activate Scientific, Alfa Aesar, Carl Roth, Chempur, Fluorochem, Sigma Aldrich, VWR).

Zur Analyse bzw. Aufreinigung per HPLC wurden Dionex UltiMate 3000 Systeme ausgestattet mit Chromolith Performance (RP-18e, 100-4.6 mm bzw. RP-18e, 100-10 mm, Merck) Säulen verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurden als Laufmittel Wasser und MeCN mit jeweils 0.1% TFA bei einem Flow von 4 mL/min verwendet. ESI-MS-Messungen wurden am Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Mannheim oder am Department Chemie der Ludwigs-Maximilians-Universität München an einem Finnigan LTQ FT Ultra FT-ICR (Thermo) System durchgeführt. Die NMR-Messungen wurden mit einem 300 MHz Varian Mercury Plus (Bruker) bzw. einem 500 MHz Varian NMR System (Bruker) durchgeführt.

5.1.1.1 Imatinib-Derivate

5.1.1.1.1 4-(Chlormethyl)-N-(4-methyl-3-nitrophenyl)benzamid (1)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
4-(Chlormethyl)benzoesäure	170.59	9.00	1.54 g	1.0
Thionylchlorid	118.96		18 mL	
DMF	73.10	0.90	69 µL	0.1
4-Methyl-3-nitroanilin	152.15	9.00	1.37 mg	1.0
Pyridin	79.10	18.00	1.45 mL	2.0

Unter Stickstoff wurde zu einer Lösung aus 4-(Chlormethyl)benzoesäure in Thionylchlorid DMF gegeben, anschließend wurde langsam auf 80 °C erhitzt und 3.5 Stunden im Rückfluss gerührt bis in der Waschflasche mit Natriumhydroxid-Lösung

(20%, 50 mL) keine Gasbildung mehr erkennbar war. Die Reaktionslösung wurde auf 50 °C gekühlt und im Vakuum das restliche Thionylchlorid entfernt. Der Rückstand wurde in trockenem THF (30 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 4-Methyl-3-nitroanilin wurde Pyridin langsam zugetropft und die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 2 Stunden wurde mit Salzsäure (1 M) neutralisiert und mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

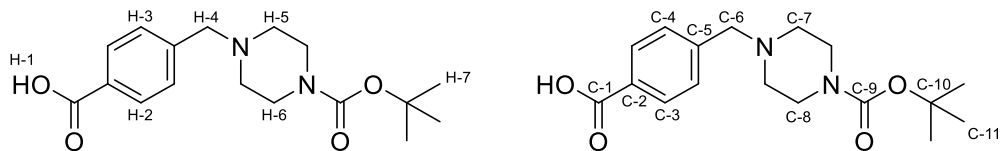
Ausbeute: 2.62 g, 8.60 mmol, 96%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.59 (s, 1H, H-5), 8.54 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.99 (dt, $J = 8.3$ Hz, 2.3 Hz, 1H, H-4), 7.98 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-6), 7.60 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-7), 7.48 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-3), 4.84 (s, 2H, H-8), 2.49 (s, 3H, H-1).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.80 (C-8), 148.93 (C-3), 141.90 (C-12), 138.49 (C-7), 134.52 (C-9), 133.45 (C-5), 129.29 (2C, C-11), 128.54 (2C, C-10), 128.12 (C-2), 125.23 (C-6), 115.90 (C-4), 45.79 (C-13), 19.70 (C-1).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 304.95 (305.07).

5.1.1.1.2 4-((4-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperazin-1-yl)methyl)benzoesäure (2)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
4-(Chlormethyl)benzoesäure	170.59	5.862	1.00 g	1.0
<i>tert</i> -Butylpiperazin-1-carboxylat	186.26	5.862	1.09 g	1.0
Triethylamin	101.19	29.31	4.06 mL	5.0

Eine Lösung aus 4-(Chlormethyl)benzoesäure, *tert*-Butylpiperazin-1-carboxylat und Triethylamin in MeCN (30 mL) wurde bei Raumtemperatur für 22 Stunden gerührt, anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Durch mehrmaliges Umkristallisieren in MeOH wurde das Produkt als beiger Feststoff erhalten.

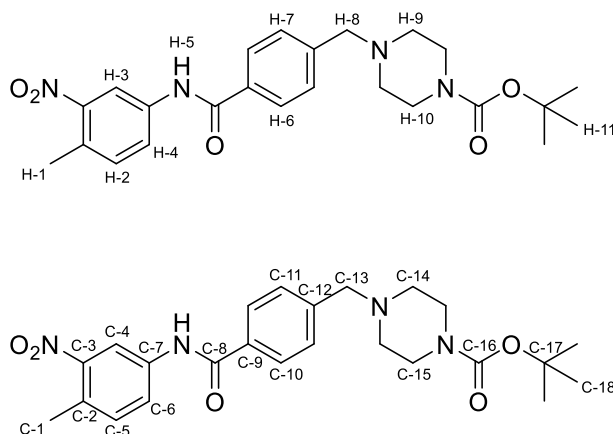
Ausbeute: 1.22 g, 3.81 mmol, 65%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.64 (s, 1H, H-1), 7.90 (dt, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 2H, H-2), 7.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3), 3.54 (s, 2H, H-4), 2.32 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H, H-6), 2.30 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H, H-5), 1.38 (s, 9H, H-7).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 167.19 (C-1), 153.76 (C-9), 143.17 (C-5), 129.62 (C-2), 129.26 (2C, C-3), 128.79 (2C, C-4), 78.73 (C-10), 61.46 (C-6), 52.38 (2C, C-7), 45.52 (2C, C-8), 28.04 (3C, C-11).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 321.07 (321.18).

5.1.1.1.3 *tert*-Butyl 4-(4-((4-methyl-3-nitrophenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat (3)



Weg A

Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
2	320.39	0.156	50 mg	1.0
4-Methyl-3-nitroanilin	152.15	0.156	24 mg	1.0
HBTU	379.24	0.187	71 mg	1.2
DIPEA	129.25	0.187	32.6 μL	1.2

Eine Lösung aus **2**, HBTU und DIPEA in DMF (500 μL) wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde eine Lösung aus 4-Methyl-3-nitroanilin in DMF (200 μL) zur Reaktion gegeben. Nach 2 Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und mit Wasser und DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das erhaltene Öl wurde in Wasser (4 mL) suspendiert und bei 65 °C gerührt, anschließend filtriert, sodass das Produkt als gelber Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 41.7 mg, 0.09 mmol, 59%.

Weg B

Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
1	304.73	0.656	200 mg	1.0
<i>tert</i> -Butylpiperazin-1-carboxylat	186.26	0.984	368 mg	3
DIPEA	129.25	1.641	572 μ L	5

Eine Lösung aus **1**, *tert*-Butylpiperazin-1-carboxylat und Diisopropylethylamin in EtOAc (5.4mL) wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur, dann 34 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach Extraktion mit EtOAc und Wasser wurden die organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH = 97:3) aufgereinigt, um das Produkt als hellgelben Feststoff zu erhalten.

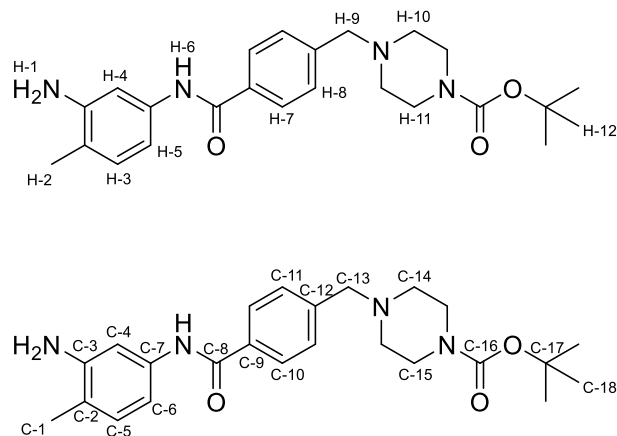
Ausbeute: 273 mg, 0.60 mmol, 92%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.54 (s, 1H, H-5), 8.55 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-3), 8.00 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H, H-4), 7.94 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-6), 7.48 (dd, $J = 8.5, 2.6$ Hz, 1H, H-2), 7.48 (d, $J = 8.5$, 1H, H-7), 3.57 (s, 2H, H-8), 3.32 (d, $J = 15.4$ Hz, 4H, H-10), 3.31 (s, 3H, H-1), 2.38 – 2.30 (m, 4H, H-9), 1.39 (s, 9H, H-11).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.64 (C-8), 153.77 (C-16), 148.49 (C-3), 142.24 (C-12), 138.15 (C-7), 133.00 (C-9), 132.96 (C-5), 128.79 (2C, C-11), 127.70 (2C, C-10), 127.51 (C-2), 124.74 (C-6), 115.38 (C-4), 78.75 (C-17), 61.42 (C-13), 52.36 (2C, C-14), 43.58 (2C, C-15), 28.04 (3C, C-18), 19.22 (C-1).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 455.17 (455.23), $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$ (berechnet): 355.07 (355.18).

5.1.1.1.4 *tert*-Butyl 4-(4-((3-amino-4-methylphenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat (**4**)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
3	454.53	6.00	2.73 g	1.0
Zinn(II)-chlorid	189.61	42.00	7.96 g	7.0
Pyridin	79.10	42.00	3.39 mL	7.0

Zu einer Suspension aus **3** in EtOAc/MeOH (55mL, 9:1) wurde zuerst Pyridin, anschließend Zinn(II)-chlorid gegeben. Nach 3.5 Stunden Rühren bei 30 °C wurde die Reaktionsmischung mit EtOAc verdünnt und filtriert. Der Rückstand wurde mehrmals zuerst mit EtOAc, dann mit Aceton gewaschen und die Filtrate wurden vereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand mit 0.1 M NaOH (200 mL) suspendiert und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in Aceton, der restliche Rückstand in DMF aufgenommen, die beiden Fraktionen wurden vereint, filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung als hellgelber Feststoff erhalten.

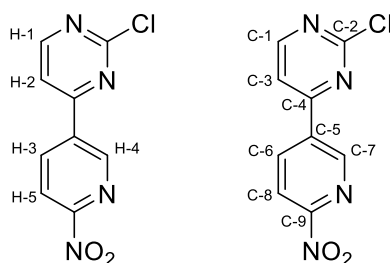
Ausbeute: 2.55 g, 6.00 mmol, 100%.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.85 (s, 1H, H-6), 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-7), 7.42 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-8), 7.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-4), 6.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-3), 6.80 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H, H-5), 4.83 (s, 2H, H-1), 3.55 (s, 2H, H-9), 3.32 (m, 4H, H-11), 2.35 – 2.30 (m, 4H, H-10), 2.02 (s, 3H, H-2), 1.39 (s, 9H, H-12).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 164.87 (C-8), 153.78 (C-16), 146.45 (C-3), 141.35 (C-12), 137.58 (C-7), 134.11 (C-9), 129.60 (C-5), 128.60 (2C, C-11), 127.52 (2C, C-10), 116.69 (C-2), 108.75 (C-6), 106.37 (C-4), 78.74 (C-17), 61.48 (C-13), 52.36 (2C, C-14), 43.67 (2C, C-15), 28.04 (3C, C-18), 16.98 (C-1).

ESI-MS *m/z* für [M+H]⁺ (berechnet): 425.18 (425.25).

5.1.1.1.5 2-Chlor-4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin (**5**)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
2-Nitro-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyridin	250.06	9.31	2.33 g	1.0
2,4-Dichloropyrimidin	148.97	9.31	1.39 g	1.0

Natriumcarbonat	105.99	23.27	2.47 g	2.5
Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium (0)	1155.56	0.186	215 mg	0.02

2-Nitro-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyridin, 2,4-Dichlorpyrimidin, Natriumcarbonat und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (0) wurden in einem entgastem Lösungsmittelgemisch (THF/Wasser = 9:1, 125 mL) suspendiert und unter Argonatmosphäre bei 80 °C für 20 Stunden gerührt. Nach Neutralisation mit 1 M Salzsäure (25 mL) wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und filtriert. Der Filtrerrückstand wurde mit Wasser gewaschen und erneut in DCM aufgenommen. Nach mehrmaligem Wiederholen wurden die organischen Phasen vereint und am Rotationsverdampfer eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH = 99:1) wurde das Produkt als hellgelber Feststoff erhalten.

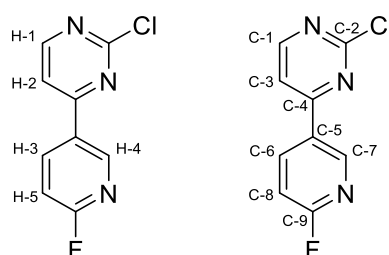
Ausbeute: 1.13 mg, 4.80 mmol, 51%.

^1H NMR (300 MHz, Aceton- d_6) δ 9.40 (dd, $J = 2.3, 0.5$ Hz, 1H, H-4), 9.00 (dd, $J = 8.5, 2.3$ Hz, 1H, H-3), 8.96 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H-1), 8.50 (dd, $J = 8.5, 0.6$ Hz, 1H, H-5), 8.32 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-2).

^{13}C NMR (75 MHz, Aceton- d_6) δ 163.59 (C-2), 162.63 (C-4), 159.45 (C-1), 148.86 (C-9), 140.30 (C-7), 137.18 (C-5), 134.34 (C-6), 119.27 (C-8), 118.13 (C-3).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 236.81 (237.02).

5.1.1.1.6 2-Chlor-4-(6-fluorpyridin-3-yl)pyrimidin (6)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
5-Brom-2-fluorpyridin	175.99	5.60	573 μL	1.4
<i>n</i> -Butyllithium (1.6 M)		6.00	3.75 mL	1.5
Zinkbromid	225.19	6.00	1.35 g	1.5
2,4-Dichlorpyrimidin	148.97	4.00	596 mg	1.0
Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium (0)	1155.56	0.20	231 mg	0.05

In einem ausgeheizten Kolben wurde unter Argonatmosphäre 5-Brom-2-fluorpyridin in trockenem Diethylether (16 mL) gelöst und auf -80 °C gekühlt. Nach tropfenweiser Zugabe von *n*-Butyllithium-Lösung rührte die gelbe Reaktionslösung für 60 Minuten bei -80 °C. Das unter Vakuum getrocknete Zinkbromid wurde unter Argonatmosphäre in trockenem Diethylether (22 mL) vollständig gelöst, leicht gekühlt und zur Reaktion gegeben. Nach einer Stunde Rühren bei -80 °C wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der rosafarbene Rückstand wurde unter Argonatmosphäre in trockenem Tetrahydrofuran (15 mL) aufgenommen, sowie eine Lösung aus 2,4-Dichlorpyrimidin und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (0) in trockenem Tetrahydrofuran (15 mL) zugegeben. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde weitere 1.5 Stunden bei 50 °C gerührt, anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Extraktion mit EtOAc und Wasser wurden die vereinten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EtOAc/cHex = 2:5) als beiger Feststoff erhalten.

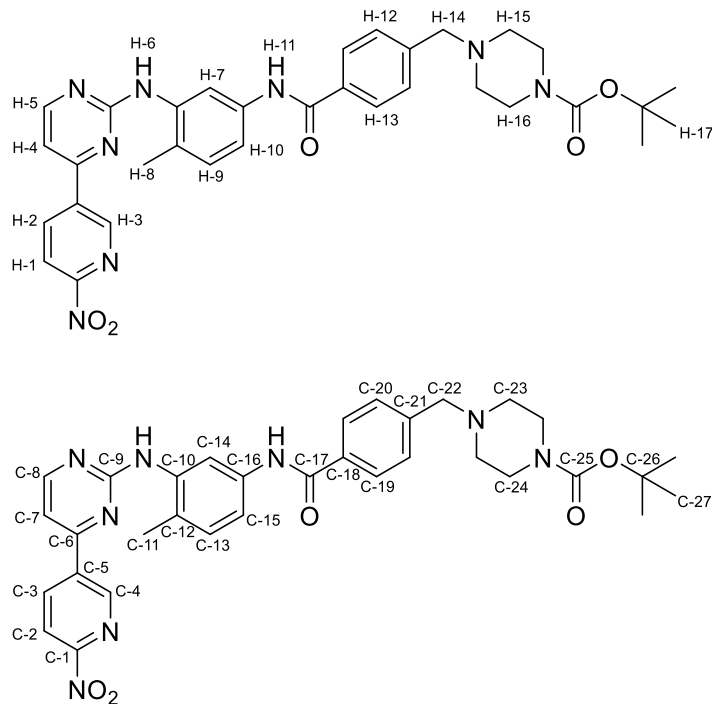
Ausbeute: 556 mg, 3.71 mmol, 66%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.05 (dd, $J = 1.8, 0.8$ Hz, 1H, H-4), 8.90 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H-1), 8.73 (ddd, $J = 8.6, 7.8, 2.6$ Hz, 1H, H-3), 8.25 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H-2), 7.42 (ddd, $J = 8.7, 2.8, 0.6$ Hz, 1H, H-5).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.72 (d, $J = 241.3$ Hz, C-9), 163.18 (C-2), 161.54 (C-1), 160.47 (C-4), 147.50 (t, $J = 16.5$ Hz, C-7), 141.26 (d, $J = 9.3$ Hz, C-6), 129.20 (C-5), 116.44 (C-3), 110.28 (d, $J = 37.8$ Hz, C-8).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 209.81 (210.02).

5.1.1.1.7 tert-Butyl 4-(4-((4-methyl-3-((4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)-amino)phenyl)carbonyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat („Boc-Nitro-*imatib*“) (7)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
14	322.33	0.761	245.4	1.0
2	320.39	0.761	244.2	1.0
HBTU	379.25	0.761	278.7	1.0
DIPEA	129.25	0.761	133 μ L	1.0

Eine Lösung aus **2**, HBTU und DIPEA in DMF (3.5 mL) wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde eine Lösung aus **14** in DMF (3.75 mL) zugegeben. Nach Beenden der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das als rotes Öl erhaltene Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH = 95:5) aufgereinigt. Nach mehrfachem Umkristallisieren in MeOH wurde das Produkt als gelboranger Feststoff erhalten.

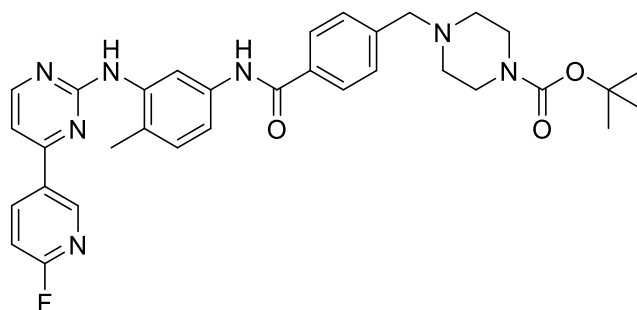
Ausbeute: 161 mg, 0.258 mmol, 34%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.17 (s, 1H, H-11), 9.33 (dd, J = 2.2, 0.5 Hz, 1H, H-3), 9.13 (s, 1H, H-6), 8.88 (dd, J = 8.5, 2.3 Hz, 1H, H-2), 8.61 (d, J = 5.1 Hz, 1H, H-5), 8.45 – 8.38 (m, 1H, H-1), 8.10 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H-7), 7.91 (dd, J = 8.1, 1.8 Hz, 2H, H-13), 7.56 (d, J = 5.1 Hz, 1H, H-4), 7.47 (dd, J = 8.2, 2.2 Hz, 1H, H-10), 7.46 – 7.43 (m, 2H, H-12), 7.21 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-9), 3.56 (s, 2H, H-14), 3.32 (s, 4H, H-16), 2.33 (s, 4H, H-15), 2.23 (s, 3H, H-8), 1.39 (s, 9H, H-17).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.25 (C-9), 161.21 (C-17), 159.42 (C-6), 157.18 (C-1), 153.78 (C-25), 147.49 (C-4), 141.66 (C-21), 138.91 (C-3), 137.73 (C-10), 137.53 (C-5), 137.20 (C-16), 133.84 (C-18), 131.75 (C-12), 130.08 (C-13), 128.69 (2C, C-20), 127.61 (2C, C-19), 124.40 (C-8), 118.39 (C-2), 117.22 (C-14), 116.89 (C-15), 108.44 (C-7), 78.74 (C-26), 61.47 (C-22), 52.37 (2C, C-23), 43.16 (2C, C-24), 28.04 (3C, C-27), 17.63 (C-11).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 625.29 (625.29).

5.1.1.1.8 tert-Butyl 4-(4-((3-((4-(6-fluorpyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)-4-methylphenyl)carbonyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat („Boc-Fluorimatinib“) (8)



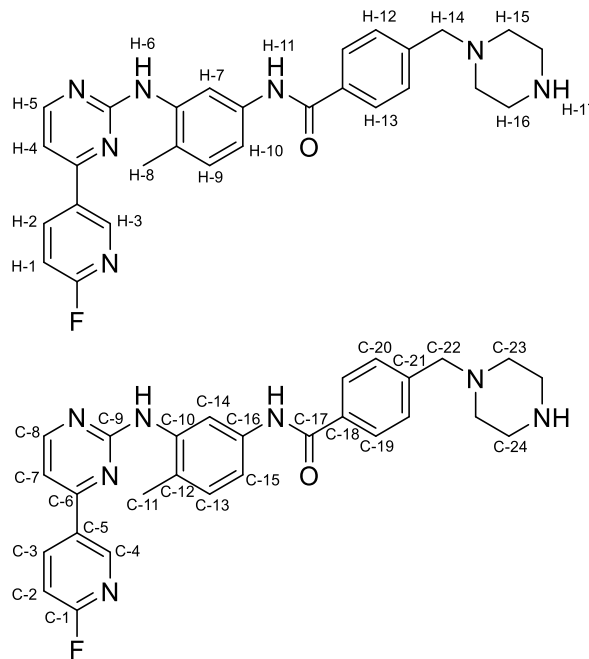
Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
6	209.61	0.954	200 mg	1.0
4	424.55	1.144	486 mg	1.2
Essigsäure	60.05	0.764	43.7 μL	0.8

6 und **4** wurden in einem Gemisch aus Essigsäure und Dioxan (1.92 mL) suspendiert und auf 8 Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 80 °C für 4 Tage geschüttelt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit DCM in einen Kolben überführt. Nach Filtration wurde der Rückstand mit Aceton und EtOAc gewaschen, die organischen Phasen vereint und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH/HOAc = 92:7:1) wurde das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 30 mg, 0.050 mmol, 5%.

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 598.21 (598.29).

5.1.1.1.9 *N*-(3-((4-(6-fluorpyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)-4-methylphenyl)-4-(piperazin-1-ylmethyl)benzamid („Fluornorimatinib“) (9)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
Boc-Fluorimatinib (8)	597.70	0.050	30 mg	1.0
TFA	114.02		2 mL	
Triisopropylsilan	158.36		50 µL	

Zu einer Lösung aus Boc-Fluorimatinib (8) und Triisopropylsilan in DCM (8 mL) wurde TFA (2 mL) gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen von Lösungsmittel und TFA im Vakuum wurde der Rückstand in Wasser/MeCN (1:1) aufgenommen und mittels semipräparativer HPLC (Gradient: 15-40% MeCN) aufgereinigt und lyophilisiert. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 17.9 mg, 0.036 mmol, 72%.

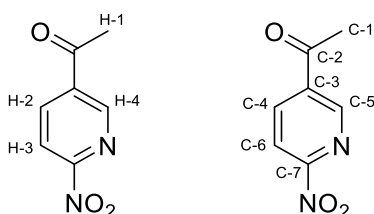
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.23 (s, 1H, H-11), 9.00 (s, br, 2H, H-6, H-17), 8.98 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-3), 8.68 (td, $J = 8.3, 2.5$ Hz, 1H, H-2), 8.52 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-5), 8.11 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-7), 8.00 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-13), 7.57 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-12), 7.47 (dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, 1H, H-10), 7.43 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-4), 7.32 (dd, $J = 8.6, 2.6$ Hz, 1H, H-1), 7.21 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-9), 4.05 (s, 2H, H-14), 3.25 (s, 4H, H-16), 2.96 (s, 4H, H-15), 2.22 (s, 3H, H-8).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.84 (C-17), 164.04 (d, $J = 201.4$ Hz, C-1), 161.04 (C-9), 160.43 (C-6), 159.52 (C-8), 146.83 (d, $J = 15.9$ Hz, C-4), 140.69 (d, $J = 8.8$ Hz, C-3), 137.71 (C-10), 137.04 (C-16), 136.63 (C-21), 134.96 (C-18), 130.97 (d, $J = 4.3$ Hz,

C-5), 130.05 (2C, C-20), 129.95 (C-13) 127.86 (2C, C-19), 127.66 (C-12), 117.19 (C-14), 116.79 (C-15), 109.73 (d, $J = 37.8$ Hz, C-2), 107.37 (C-7), 59.70 (C-22), 48.43 (2C, C-23), 41.73 (2C, C-24), 17.62 (C-11).

ESI-MS m/z für $[M+H]^+$ (berechnet): 498.24 (498.24).

5.1.1.1.10 1-(6-Nitropyridin-3-yl)ethan-1-on (10)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
5-Brom-2-nitropyridin	203.00	0.50	101.5 mg	1.0
Tributyl-(1-ethoxyvinyl)zinn	361.16	0.60	203 μ L	1.2
Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium (0)	1155.56	0.05	58 mg	0.1
Salzsäure	3 M		20 mL	

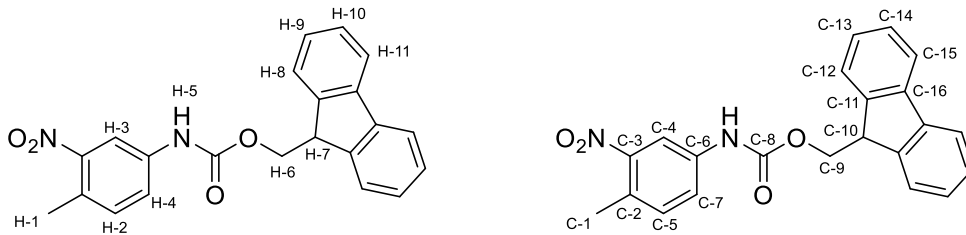
Unter Argonatmosphäre wurden 5-Brom-2-nitropyridin, Tributyl-(1-ethoxyvinyl)zinn und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) in wasserfreiem THF (15 mL) gelöst und bei 65 °C unter Rühren im Rückfluss erhitzt. Nach 2 Stunden wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt, vorsichtig mit Salzsäure (3 M, 20 mL) versetzt, bei Raumtemperatur für 45 Minuten gerührt und anschließend mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit DCM und Wasser extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden sowohl mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung, als auch mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH = 199:1) wurde das Produkt als hellgelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 80 mg, 0.48 mmol, 96%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.15 (dd, $J = 2.2, 0.6$ Hz, 1H, H-4), 8.67 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 8.42 (dd, $J = 8.4, 0.7$ Hz, 1H, H-3), 2.72 (s, 3H, H-1).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 196.23 (C-2), 148.97 (C-7), 140.48 (C-5), 136.33 (C-4), 118.36 (C-6), 109.54 (C-3), 27.51 (C-1).

ESI-MS m/z für $[M+H]^+$ (berechnet): 167.1 (167.05).

5.1.1.1.11 (9*H*-Fluoren-9-yl)methyl (4-methyl-3-nitrophenyl)carbamat (11)

Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
4-Methyl-3-nitroanilin	152.15	4.0	609 mg	1.0
9-Fluorenylmethylchloroformat	258.70	4.0	1035 mg	1.0
Natriumcarbonat	105.99	10.0	1060 mg	2.5

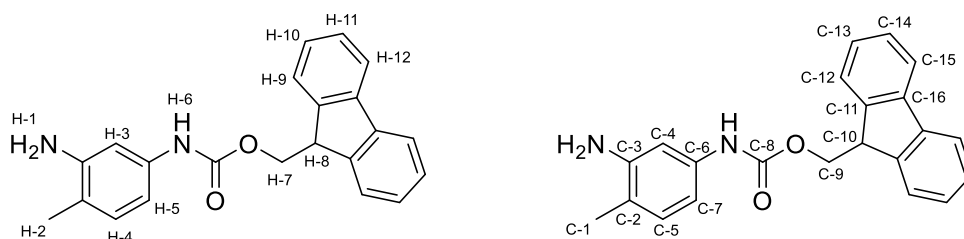
Eine Lösung aus 4-Methyl-3-nitroanilin in Dioxan (20 mL) wurde zu einer Lösung aus Natriumcarbonat in Wasser (12 mL) gegeben und auf 5 °C gekühlt. Unter Rühren wurde eine Lösung aus 9-Fluorenylmethylchloroformat in Dioxan (8 mL) langsam zum Reaktionsgemisch getropft. Nach 45 Minuten bei 5 °C wurde die Reaktion langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 2 Stunden gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Produkt durch Zugabe von Wasser ausgefällt und das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt, gefolgt von einer Extraktion mit EtOAc. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um das Produkt als hellbraunen Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 1.462 g, 3.91 mmol, 98%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.06 (s, 1H, H-5), 8.18 (s, 1H, H-3), 7.91 (dt, $J = 7.6$, 0.9 Hz, 2H, H-11), 7.77 – 7.71 (m, 2H, H-8), 7.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-4), 7.49 – 7.31 (m, 5H, H-2, H-9, H-10), 4.54 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-6), 4.32 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-7), 2.44 (s, 3H, H-1).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 153.34 (C-8), 148.65 (C-3), 143.63 (2C, C-11), 140.78 (2C, C-16), 138.05 (C-6), 133.11 (C-5), 127.68 (2C, C-14), 127.10 (2C, C-15), 126.31 (C-2), 125.03 (2C, C-13), 122.83 (C-7), 120.18 (2C, C-12), 113.30 (C-4), 65.78 (C-9), 46.54 (C-10), 19.03 (C-1).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 375.05 (375.13).

5.1.1.1.12 (9H-Fluoren-9-yl)methyl (3-amino-4-methylphenyl)carbamat (12)


Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
11	374.40	3.794	1.42 g	1.0
Zinn(II)-chlorid	189.61	53.1	10.07 g	14.0

Unter Argon-Atmosphäre wurde zu einer Lösung aus **11** in EtOAc/MeOH (50 mL, 9:1) Zinn(II)-chlorid gegeben und bei Raumtemperatur für 27 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit konzentrierter Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert. Die ausfallenden Zinn-Verbindungen wurden abfiltriert und mehrmals mit EtOAc gewaschen. Das Filtrat wurde mit EtOAc extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um das Produkt als hellgelben Feststoff zu erhalten.

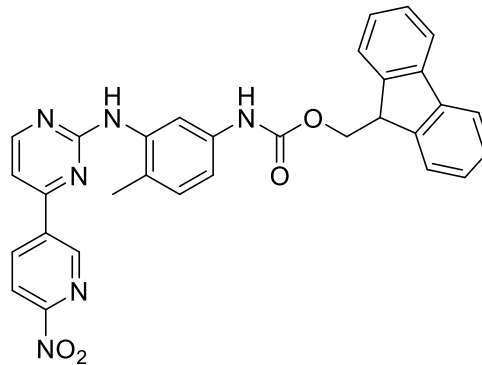
Ausbeute: 1.229 g, 3.57 mmol, 94%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.34 (s, 1H, H-6), 7.91 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H-12), 7.75 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H-9), 7.46 – 7.39 (m, 2H, H-11), 7.34 (td, J = 7.4, 1.2 Hz, 2H, H-10), 6.81 (s, 1H, H-3), 6.77 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-4), 6.53 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-5), 4.78 (s, 2H, H-1), 4.40 (d, J = 6.9 Hz, 2H, H-7), 4.28 (t, J = 6.8 Hz, 1H, H-8), 1.97 (s, 3H, H-2).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 153.29 (C-8), 146.62 (C-3), 143.84 (2C, C-11), 140.74 (2C, C-16), 137.39 (C-6), 129.76 (C-5), 127.65 (2C, C-14), 127.09 (2C, C-15), 125.19 (2C, C-13), 120.14 (2C, C-12), 115.52 (C-2), 109.53 (C-7), 106.36 (C-4), 65.37 (C-9), 46.64 (C-10), 16.83 (C-1).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 345.16 (345.16).

5.1.1.1.13 (9H-Fluoren-9-yl)methyl (4-methyl-3-((4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbammat (13)



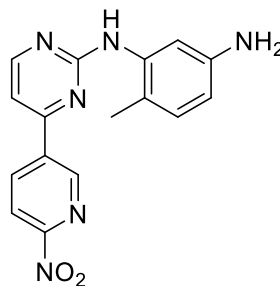
Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
5	236.61	1.27	300 mg	1.0
12	344.41	1.52	524 mg	1.2
Essigsäure	60.05	1.27	72.5 µL	1.0

Zu einer Suspension aus **5** und **12** in DMSO (3 mL) wurde Essigsäure gegeben und bei 100 °C für 30 Stunden erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde Natriumcarbonat-Lösung zugegeben (130 mL) zugegeben und filtriert. Der Filtrerrückstand wurde mit Wasser gewaschen, anschließend in DCM aufgenommen. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das braune Öl mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH = 99:1) aufgereinigt, um das Produkt (Reinheit < 90%) als rotbraunen Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 276 mg, 0.507 mmol, 40%.

ESI-MS m/z für $[M+H]^+$ (berechnet): 545.3 (545.19).

5.1.1.1.14 6-Methyl-N¹-(4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)benzol-1,3-diamin (14)



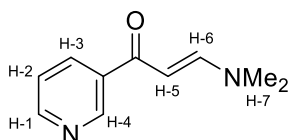
Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
13	544.57	1.66	904 mg	1.0
Piperidin	85.15	33.2	3.3 mL	20

Eine Lösung aus **13**, Piperidin und DMF (20 mL) wurde bei Raumtemperatur 30 Minuten gerührt, danach das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH = 98:2) wurde das Produkt als dunkelrotes Öl erhalten.

Ausbeute: 455 mg, 1.41 mmol, 85%.

ESI-MS m/z für $[M+H]^+$ (berechnet): 323.20 (323.13).

5.1.1.1.15 3-(Dimethylamin)-1-(pyridin-3-yl)prop-2-en-1-on (15)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
3-Acetylpyridin	121.14	11.28	1.24 mL	1.0
<i>N,N</i> -Dimethylformamid-dimethylacetal	119.16	22.56	3 mL	2.0

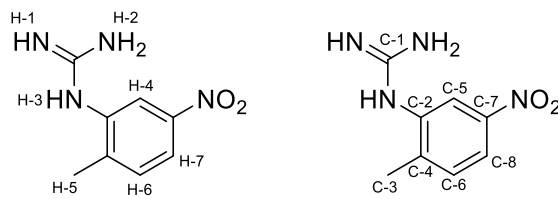
3-Acetylpyridin wurde in *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal gelöst und bei 100 °C 5 Stunden im Rückfluss erhitzt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war und das restliche *N,N*-Dimethylformamid-dimethylacetal im Vakuum entfernt wurde, wurde das Rohprodukt in DCM/cHex umkristallisiert, um das Produkt als gelb-orange Kristalle zu erhalten.

Ausbeute: 1.08 g, 6.13 mmol, 54%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.12 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-4), 8.69 (dd, $J = 5.0, 1.7$ Hz, 1H, H-1), 8.38 (dt, $J = 7.9, 1.9$ Hz, 1H, H-3), 7.88 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, H-6), 7.50 (ddd, $J = 7.9, 5.0, 0.7$ Hz, 1H, H-2), 5.68 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, H-5), 3.09 (d, $J = 67.6$ Hz, 6H, H-7).

ESI-MS m/z für $[M]^+$ (berechnet): 176.037 (176.095).

5.1.1.1.16 1-(2-Methyl-5-nitrophenyl)guanidin (16)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
2-Methyl-5-nitroanilin	152.15	6.57	1.00 g	1.0
Salzsäure (konz.)	12 M	15.12	1.26 mL	2.3
Cyanamid	42.04	19.72	829 mg	3.0
Natriumhydroxid	40.00	22.34	894 mg	3.4

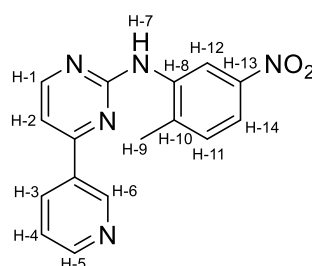
Zu einer Suspension aus 2-Methyl-5-nitroanilin in Butanol (5 mL) wurde über 15 Minuten unter starkem Rühren konzentrierte Salzsäure (0.36 mL) zugegeben. Nach Zugabe einer Lösung von Cyanamid in Wasser (830 μ L) über 5 Minuten, wurde die Reaktionsmischung auf 95 °C im Rückfluss erhitzt. Zur rot-orangen Reaktionslösung wurde sowohl nach 4 Stunden als auch nach 3 weiteren Stunden konzentrierte Salzsäure (0.36 mL und 0.54 mL) gegeben. Nach 22 Stunden im Rückfluss wurde die Reaktionslösung auf 10 °C gekühlt und mit einer Lösung von Natriumhydroxid in Wasser (8 mL) versetzt. Der entstehende gelbe Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.092 g, 5.62 mmol, 85%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.58 (dd, $J = 8.2, 2.5$ Hz, 1H, H-7), 7.47 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 7.30 (dd, $J = 8.4, 0.4$ Hz, 1H, H-6), 5.28 (s, 4H, H-1, H-2, H-3), 2.16 (s, 3H, H-5).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 152.59 (C-1), 151.12 (C-7), 146.34 (C-2), 139.83 (C-6), 130.35 (C-4), 116.54 (C-8), 114.47 (C-5), 18.29 (C-3).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 194.87 (195.09).

5.1.1.1.17 *N*-(2-Methyl-5-nitrophenyl)-4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amin (17)

Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
16	194.19	22.4	4.34 g	1.0
15	176.22	24.6	4.33 g	1.1

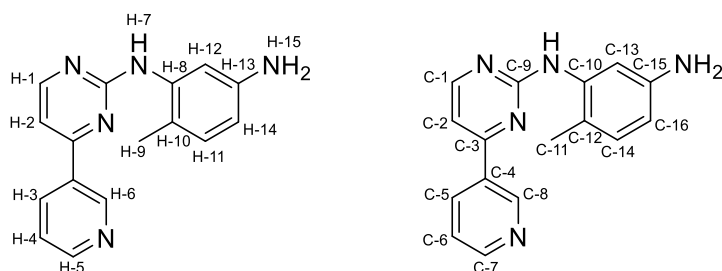
16 und **15** wurden in Butanol (60 mL) gelöst und für 48 Stunden auf 115 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser (30 mL) verdünnt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration wurde das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 6.02 g, 22.35 mmol, 88%.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.33 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-6), 9.25 (s, 1H, H-7), 8.80 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-12), 8.73 (dd, *J* = 4.8, 1.5 Hz, 1H, H-5), 8.63 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H-1), 8.52 (dt, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H, H-3), 7.90 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H, H-14), 7.59 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-2), 7.59 (m, 1H, H-4), 7.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-11), 2.43 (s, 3H, H-9).

ESI-MS *m/z* für [M]⁺ (berechnet): 307.457 (307.107).

5.1.1.1.18 6-Methyl-N¹-(4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)benzol-1,3-diamin (**18**)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
17	307.31	1.302	400 mg	1.0
Palladium auf Aktivkohle			40 mg	10 wt-%
Wasserstoff				

In entgastem EtOAc (50 mL) wurden **17** und Palladium auf Aktivkohle suspendiert und 22 Stunden bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre gerührt, anschließend wurde über Celite® 535 (Carl Roth) filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung quantitativ als gelber Feststoff erhalten.

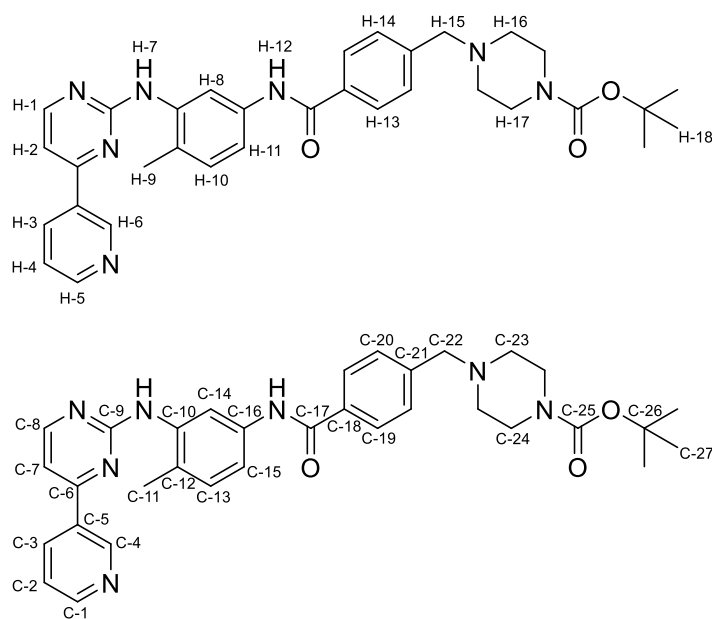
Ausbeute: 360 mg, 1.30 mmol, 100%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.24 (dd, $J = 2.2, 0.7$ Hz, 1H, H-6), 8.69 (dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz, 1H, H-5), 8.66 (s, 1H, H-7), 8.46 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-1), 8.40 (dt, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H, H-3), 7.53 (ddd, $J = 8.0, 4.8, 0.7$ Hz, 1H, H-4), 7.36 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-2), 6.86 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-11), 6.78 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-12), 6.33 (dd, $J = 8.0, 2.3$ Hz, 1H, H-14), 4.84 (s, 2H, H-15), 2.06 (s, 3H, H-10).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 161.46 (C-9), 161.28 (C-3), 159.31 (C-1), 151.29 (C-7), 148.09 (C-8), 146.72 (C-15), 137.92 (C-10), 134.22 (C-5), 132.27 (C-4), 130.29 (C-14), 123.78 (C-6), 119.29 (C-12), 111.08 (C-16), 110.89 (C-13), 107.04 (C-2), 17.21 (C-11).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 277.99 (278.14).

5.1.1.1.19 tert-Butyl 4-(4-((4-methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat („Boc-Imatinib“) (19)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
18	277.33	1.42	394 mg	1.0
2	320.39	1.56	500 mg	1.1
HBTU	379.24	1.56	592 mg	1.1
DIPEA	129.25	1.56	272 μL	1.1

Eine Lösung aus **2**, HBTU und DIPEA in DMF (10 mL) wurde bei Raumtemperatur 10 Minuten gerührt. Anschließend wurde eine Lösung **18** in DMF (6 mL) zugegeben. Nach 4 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung in eiskaltem Wasser (180 mL) gefällt und der Niederschlag abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde durch Säulenchromatographie (DCM/MeOH = 95:5) das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

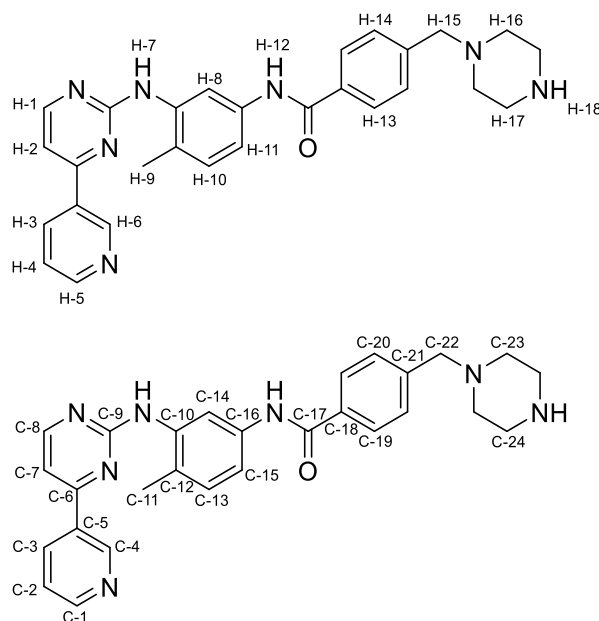
Ausbeute: 459 mg, 0.96 mmol, 56%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.21 (s, 1H, H-12), 9.28 (dd, J = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H-6), 8.97 (s, 1H, H-7), 8.68 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H-5), 8.51 (d, J = 5.2 Hz, 1H, H-1), 8.48 (ddd, J = 8.0, 2.3, 1.7 Hz, 1H, H-3), 8.08 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-8), 7.99 (dt, J = 8.4, 0.9 Hz, 2H, H-13), 7.58-7.39 (m, 4H, H-4, H-11, H-14), 7.43 (d, J = 5.2 Hz, 1H, H-2), 7.21 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-13), 3.57 (s, 2H, H-15), 2.89 (d, J = 0.4 Hz, 4H, H-17), 2.73 (d, J = 0.7 Hz, 4H, H-16), 2.23 (s, 3H, H-9), 1.40 (s, 9H, H-18).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 162.27 (C-17), 161.58 (C-9), 161.15 (C-6), 159.46 (C-8), 151.34 (C-25), 148.17 (C-1), 137.80 (C-10), 137.05 (C-16), 134.41 (C-3), 132.19 (C-5), 130.03 (C-13), 127.81 (C-12), 127.72 (2C, C-20), 127.36 (2C, C-19), 123.77 (C-2), 117.22 (C-14), 116.74 (C-15), 107.52 (C-7), 79.21 (C-26), 51.54 (C-22), 35.77 (2C, C-23), 30.76 (2C, C-24), 27.99 (3C, 27), 17.64 (C-11).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 580.31 (580.30).

5.1.1.1.20 *N*-(4-Methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)-4-(piperazin-1-ylmethyl)benzamid („Norimatinib“) (**20**)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
Boc-Imatinib (19)	579.70	0.173	100 mg	1.0
TFA	114.02		1.52 mL	

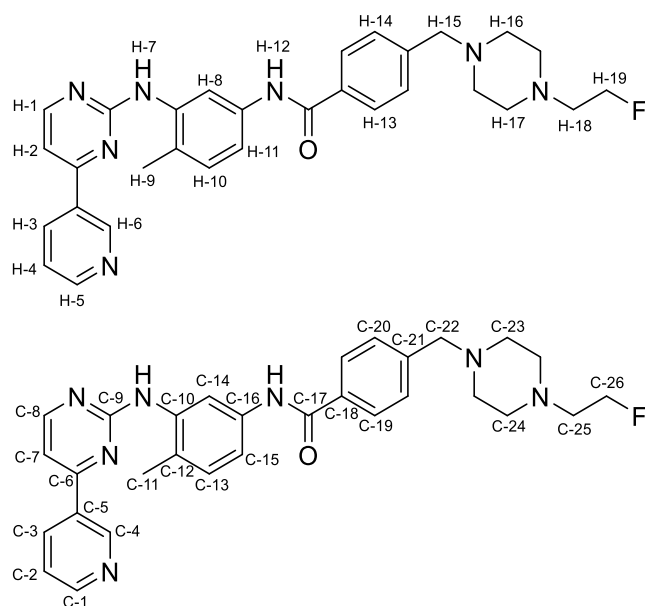
Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus Boc-Imatinib (**19**) in DCM (3 mL) wurde langsam TFA gegeben, sodass die Temperatur konstant blieb. Nach 1 Stunde bei 0 °C ließ man das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmen und entfernte DCM und TFA im Vakuum, sobald kein Edukt mehr vorhanden war. Nach Extraktion mit DCM und Wasser wurden die organischen Phasen vereint, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH/Triethylamin = 84:15:1) wurde das Produkt erneut extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um das Produkt als gelblichen Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 51 mg, 0.106 mmol, 61%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.25 (s, 1H, H-12), 9.37 – 9.29 (m, 1H, H-6), 9.05 (s, 1H, H-7), 9.02 (s, 1H, H-18), 8.78 – 8.72 (m, 1H, H-5), 8.63 (dt, $J = 8.1, 1.8$ Hz, 1H, H-3), 8.54 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-1), 8.10 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-8), 8.02 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-13), 7.66 (dd, $J = 8.1, 5.0$ Hz, 1H, H-4), 7.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-14), 7.50 – 7.46 (m, 1H, H-11), 7.47 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-2), 7.22 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-10), 4.17 (s, 2H, H-15), 3.29 (s, 4H, H-17), 3.08 (s, 4H, H-16), 2.23 (s, 3H, H-9).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.77 (C-17), 161.08 (C-9), 159.55 (C-8), 158.26 (C-6), 149.84 (C-1), 146.81 (C-4), 137.70 (C-10), 137.01 (C-16), 136.12 (C-3), 135.26 (C-18), 132.83 (C-5), 130.37 (C-13), 130.34 (C-21), 130.08 (2C, C-20), 127.94 (2C, C-19), 127.83 (C-12), 124.44 (C-2), 117.32 (C-14), 116.88 (C-15), 107.63 (C-7), 48.22 (2C, C-23), 41.31 (2C, C-24), 17.64 (C-11).

5.1.1.1.21 4-((4-(2-Fluorethyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-(4-methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)benzamid („Fluorethyl-Imatinib“, SKI696) (21)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
Norimatinib (20)	479.59	0.083	40 mg	1.0
1-Brom-2-fluorethan	126.96	0.667	49.6 µL	8.0
Kaliumcarbonat	138.20	0.459	63.4 mg	5.5

Zu einer Suspension aus Norimatinib (**20**) in MeCN (5 mL) wurde Kaliumcarbonat, sowie 1-Brom-2-fluorethan gegeben und bei 90 °C im Rückfluss erhitzt. Nach 18 Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, mit EtOAc und Wasser extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Feststoff wurde in DCM aufgenommen, zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (Gradient: 15-23% MeCN) wurde das Produkt als oranger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 25 mg, 0.048 mmol, 57%.

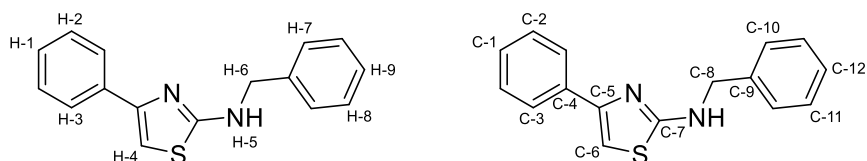
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.25 (s, 1H, H-12), 9.37 (s, 1H, H-6), 9.04 (s, 1H, H-7), 8.79 (s, 1H, H-5), 8.63 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-3), 8.54 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-1), 8.10 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-8), 8.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-13), 7.66 (s, 1H, H-4), 7.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-14), 7.50 – 7.46 (m, 1H, H-11), 7.47 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H-2), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-10), 4.72 (dt, *J* = 47.2, 4.1 Hz, 2H, H-19), 4.08 (s, 2H, H-15), 3.23 – 2.91 (m, 10H, H-16, H-17), 2.23 (s, 3H, H-9).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164.84 (C-17), 161.08 (C-9), 159.56 (C-8), 149.90 (C-1), 146.86 (C-4), 137.70 (C-10), 137.03 (C-16), 136.03 (C-3), 135.10 (C-18), 130.09 (2C, C-20), 127.92 (2C, C-19), 117.30 (C-14), 116.87 (C-15), 107.63 (C-7), 79.51 (d, J = 167.9 Hz, C-26), 59.12 (C-22), 55.80 (d, J = 18.8 Hz, C-25), 50.16 (2C, C-24), 49.38 (2C, C-23), 17.65 (C-11).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 526.33 (526.27).

5.1.1.2 DOG1-Verbindungen

5.1.1.2.1 *N*-Benzyl-4-phenylthiazol-2-amin (22)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
2-Brom-1-phenylethan-1-on	199.05	3.00	597 mg	1.0
<i>N</i> -Benzylthioharnstoff	166.24	3.15	524 mg	1.05

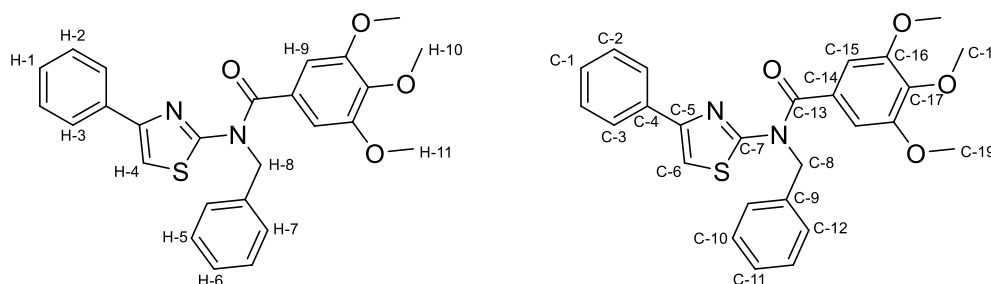
Eine Lösung aus 2-Brom-1-phenylethan-1-on in EtOH (12 mL) wurde auf 80 °C erhitzt und *N*-Benzylthioharnstoff wurde zugegeben. Nach 45 Minuten bei 80 °C wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit DCM und Wasser extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das gelbe Öl mit Aceton versetzt, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 785 mg, 2.95 mmol, 98%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.16 (t, J = 5.9 Hz, 1H, H-5), 7.82 (dd, J = 8.3, 1.3 Hz, 2H, H-3), 7.43 – 7.30 (m, 6H, H-1, H-2, H-8, H-9), 7.28 – 7.21 (m, 2H, H-7), 7.05 (s, 1H, H-4), 4.51 (d, J = 5.9 Hz, 2H, H-6).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168.26 (C-7), 149.85 (C-5), 139.25 (C-9), 134.84 (C-4), 128.42 (2C, C-2), 128.28 (2C, C-11), 127.52 (2C, C-3), 127.23 (C-1), 126.93, 125.58 (2C, C-10), 101.15 (C-6), 47.78 (C-8).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 267.05 (267.10).

5.1.1.2.2 N-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-N-(4-phenylthiazol-2-yl)benzamid („EactSM“)
(23)


Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
22	266.36	1.50	400 mg	1.0
3,4,5-Trimethoxybenzoylchlorid	230.64	2.25	519 mg	1.5
Pyridin	79.10	6.00	484 μ L	4.0

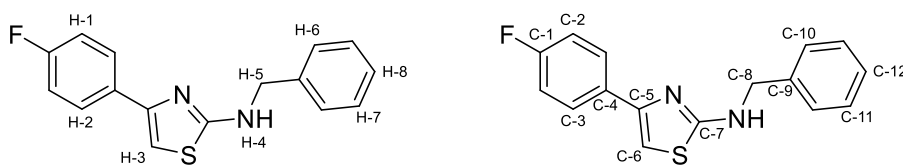
Unter Argonatmosphäre wurde zu einer Suspension aus **22** und Pyridin in wasserfreiem Toluol (16 mL) eine Lösung aus 3,4,5-Tromethoxybenzoylchlorid in wasserfreiem Toluol (8 mL) gegeben und das Reaktionsgemisch bei 110 °C im Rückfluss erhitzt. Nach 6 Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit EtOAc und Wasser extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (cHex/EtOAc = 4:1) wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 470mg, 1.02 mmol, 68%.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.84 (dd, J = 8.3, 1.2 Hz, 2H, H-3), 7.79 (s, 1H, H-4), 7.39 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H-2), 7.32 – 7.27 (m, 3H, H-1, H-5), 7.22 (d, J = 7.3 Hz, 1H, H-6), 7.18 (d, J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 6.81 (s, 2H, H-9), 5.45 (s, 2H, H-8), 3.69 (s, 3H, H-10), 3.63 (s, 6H, H-11).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 170.03 (C-13), 158.94 (C-7), 152.70 (2C, C-16), 148.27 (C-5), 139.06 (C-17), 137.56 (C-9), 134.07 (C-4), 129.39 (C-14), 128.68 (2C, C-10), 128.44 (2C, C-2), 127.84 (C-1), 126.99 (C-11), 126.39 (2C, C-12), 125.59 (2C, C-3), 110.34 (C-6), 104.62 (2C, C-15), 60.10 (C-18), 55.84 (2C, C-19), 52.79 (C-8).

ESI-MS m/z für $[M+H]^+$ (berechnet): 461.20 (461.15).

5.1.1.2.3 *N*-benzyl-4-(4-fluorphenyl)thiazol-2-amin (24)

Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on	217.04	2.00	434 mg	1.0
<i>N</i> -Benzylthioharnstoff	166.24	2.00	333 mg	1.0

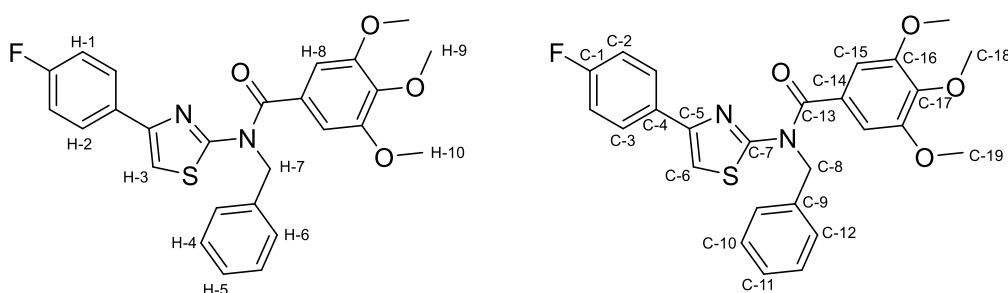
Eine Lösung aus 2-Brom-1-(4-fluorphenyl)ethan-1-on in EtOH (8 mL) wurde auf 80 °C erhitzt und Thioharnstoff zugegeben. Nach 30 Minuten bei 80 °C wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit DCM und Wasser extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung, sowie mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 572 mg, 2.00 mmol, 100%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.18 (t, J = 5.9 Hz, 1H, H-4), 7.85 (dd, J = 8.9, 5.6 Hz, 2H, H-2), 7.42 – 7.30 (m, 4H, H-6, H-7), 7.26 (d, J = 7.0 Hz, 1H, H-8), 7.19 (t, J = 9.0 Hz, 2H, H-1), 7.03 (s, 1H, H-3), 4.50 (d, J = 5.9 Hz, 2H, H-5).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168.33 (C-7), 161.40 (d, J = 244 Hz, C-1), 148.76 (C-5), 139.19 (C-9), 131.46 (C-4), 128.27 (2C, C-10), 127.50 (d, J = 8.1 Hz, 2C, C-3), 127.50 (2C, C-11), 126.93, (C-12) 115.22 (d, J = 21.5 Hz, 2C, C-2), 100.86 (C-6), 47.74 (C-8).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 285.05 (285.09).

5.1.1.2.4 *N*-Benzyl-*N*-(4-(4-fluorphenyl)thiazol-2-yl)-3,4,5-trimethoxybenzamid („Fluor-DOG1“) (25)

Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
------------	-----------	----------	----------	-----

24	284.35	0.25	71 mg	1.0
3,4,5-Trimethoxybenzoylchlorid	230.64	1.00	230 mg	4.0
Pyridin	79.10	2.00	160 μ L	8.0

Unter Argonatmosphäre wurde zu einer Suspension aus **24** und Pyridin in wasserfreiem Toluol (5 mL) 3,4,5-Trimethoxybenzoylchlorid gegeben und das Reaktionsgemisch bei 110 °C im Rückfluss erhitzt. Nach 5 Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit EtOAc und Wasser extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (cHex/EtOAc = 3:1) wurde das Produkt als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 107 mg, 0.22 mmol, 89%.

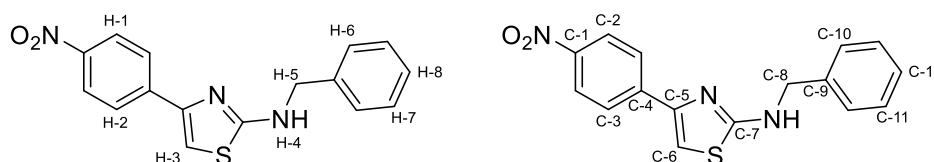
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.92 – 7.82 (m, 2H, H-2), 7.77 (s, 1H, H-3), 7.35 – 7.13 (m, 7H, H-1, H-4, H-5, H-6), 6.81 (s, 2H, H-8), 5.45 (s, 2H, H-7), 3.69 (s, 3H, H-9), 3.62 (s, 6H, H-10).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6)* δ 170.05 (C-13), 160.17 (C-7), 152.70 (2C, C-16), 147.26 (C-5), 139.06 (C-17), 137.54 (C-9), 130.70 (d, $J = 3.3$ Hz, C-4), 129.34 (C-14), 128.46 (2C, C-10), 127.61 (d, $J = 8.1$ Hz, 2C, C-3), 127.00 (C-11), 126.36 (2C, C-12), 115.57 (d, $J = 21.4$ Hz, 2C, C-2), 110.10 (C-6), 104.60 (2C, C-15), 60.11 (C-18), 55.83 (2C, C-19), 52.80 (C-8).

* Anmerkung: das Signal von C-1 konnte nicht eindeutig zugeordnet werden, da durch die niedrige Signalintensität das Dublett im Rauschen nur schlecht sichtbar war.

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 479.3 (479.14).

5.1.1.2.5 *N*-Benzyl-4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-amin (26)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
2-Brom-1-(4-nitrophenyl)ethan-1-on	244.04	5.0	1.22 g	1.0
<i>N</i> -Benzylthioharnstoff	166.24	5.0	831 mg	1.0

Eine Lösung aus 2-Brom-1-(4-nitrophenyl)ethan-1-on in EtOH (14 mL) wurde auf 80 °C erhitzt und *N*-Benzylthioharnstoff zugegeben. Nach 20 Minuten wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, die gelben Kristalle wurden in Natriumhydroxid-Lösung (0.1 M, 55 mL) bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt als orangen Feststoff erhalten.

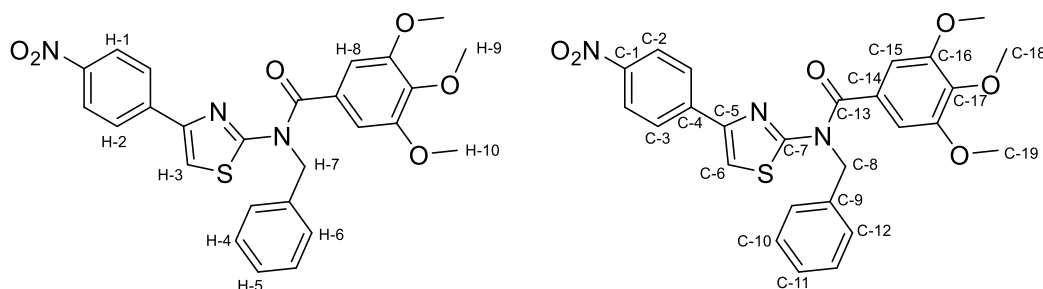
Ausbeute: 1.56 g, 5.0 mmol, 100%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.37 (s, 1H, b, H-4), 8.24 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-1), 8.07 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-2), 7.47 (s, 1H, H-3), 7.40 (d, J = 7.1 Hz, 2H, H-6), 7.35 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H-7), 7.26 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-8), 4.54 (s, 2H, H-5).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168.57 (C-7), 147.58 (C-5), 146.03 (C-1), 140.66 (C-4), 138.91 (C-9), 128.34 (2C, C-11), 127.56 (2C, C-10), 127.05 (C-12), 126.37 (2C, C-3), 123.99 (2C, C-2), 106.35 (C-6), 47.79 (C-8).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 312.06 (312.08).

5.1.1.2.6 *N*-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-*N*-(4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-yl)benzamid („Nitro-DOG1“) (27)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
26	311.36	4.82	1.50 g	1.0
3,4,5-Trimethoxybenzoylchlorid	230.64	7.23	1.67 g	1.48
Pyridin	79.10	19.27	1.56 mL	4.0

Unter Argonatmosphäre wurde zu einer Suspension aus **26** und Pyridin in wasserfreiem Toluol (50 mL) 3,4,5-Trimethoxybenzoylchlorid gegeben und das Reaktionsgemisch bei 110 °C im Rückfluss erhitzt. Nach 22 Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (cHex/EtOAc = 3:1 \rightarrow 1:1) aufgereinigt. Die Säule wurde gespült (DCM/MeOH = 90:10) und die erhaltene Fraktion über eine kurze Säulenchromatographie (DCM/MeOH = 100:0) erneut aufgereinigt. Die Produktfraktionen

wurden vereint und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um das Produkt als gelben Feststoff zu erhalten.

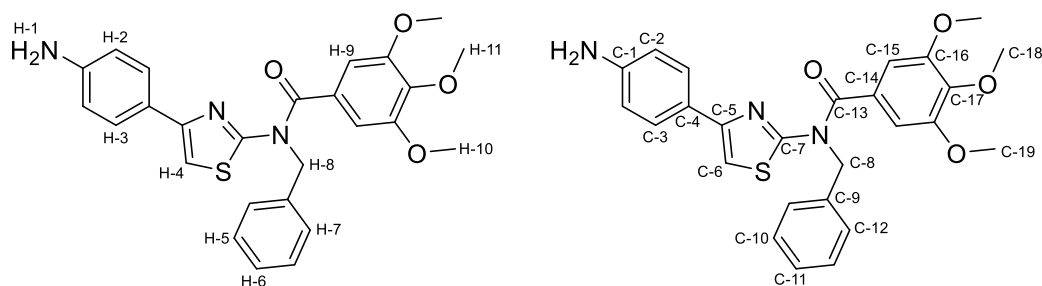
Ausbeute: 1.56 g, 3.09 mmol, 64%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.26 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-1), 8.15 (s, 1H, H-3), 8.10 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-2), 7.35 – 7.26 (m, 2H, H-4), 7.26 – 7.14 (m, 3H, H-5, H-6), 6.82 (s, 2H, H-8), 5.47 (s, 2H, H-7), 3.69 (s, 3H, H-9), 3.63 (s, 6H, H-10).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 170.25 (C-13), 159.56 (C-7), 152.71 (C-16), 146.51 (C-5), 146.09 (C-1), 140.02 (C-4), 139.13 (C-17), 137.38 (C-9), 129.13 (C-14), 128.48 (2C, C-10), 127.06, 126.46 (2C, C-12), 126.44 (2C, C-3), 124.18 (2C, C-2), 114.47 (C-6), 104.65 (2C, C-15), 60.10 (C-18), 55.84 (2C, C-19), 52.12 (C-8).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 506.19 (506.14).

5.1.1.2.7 *N*-(4-(4-Aminophenyl)thiazol-2-yl)-*N*-benzyl-3,4,5-trimethoxybenzamid (28)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
Nitro-DOG1 (27)	505.55	0.99	500 mg	1.0
Zinn(II)-chlorid	189.61	6.93	1.31 g	7.0

Nitro-DOG1 (27) und Zinn(II)-chlorid wurden in entgastem EtOAc (10 mL) suspendiert und unter Argonatmosphäre auf 60 °C erhitzt. Nach 55 Stunden wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur gekühlt und mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung versetzt. Nach Filtration wurde das Filtrat mit EtOAc und Wasser extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat gewaschen. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (cHex/EtOAc = 3:2) wurde das Produkt als gelber kristalliner Feststoff erhalten.

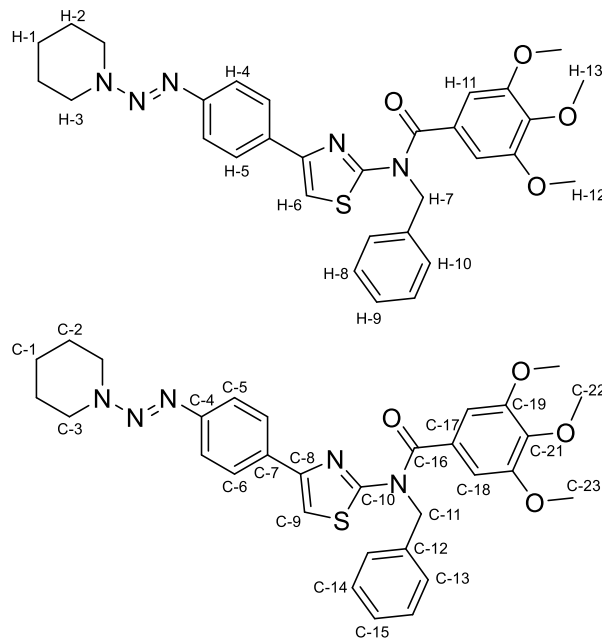
Ausbeute: 239 mg, 0.50 mmol, 51%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.51 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-3), 7.35 (s, 1H, H-4), 7.33 – 7.13 (m, 5H, H-5, H-6, H-7), 6.78 (s, 2H, H-9), 6.55 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-2), 5.43 (s, 2H, H-8), 5.27 (s, 2H, H-1), 3.69 (s, 3H, H-11), 3.62 (s, 6H, H-10).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 169.82 (C-13), 158.51 (C-7), 152.68 (2C, C-16), 149.38 (C-5), 148.55 (C-1), 138.97 (C-17), 137.69 (C-9), 129.62 (C-14), 128.42 (2C, C-10), 126.96 (C-11), 126.65 (2C, C-3), 126.43 (2C, C-12), 122.28 (C-4), 113.72 (2C, C-2), 105.70 (C-6), 104.58 (2C, C-15), 60.10 (C-18), 55.82 (2C, C-19), 52.66 (C-8).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 476.16 (476.16).

5.1.1.2.8 *N*-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-*N*-(4-(4-(piperidin-1-yl)diazenyl)phenyl)-thiazol-2-yl)benzamid („Triazen-DOG1“) (29)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
28	475.56	0.303	144 mg	1.0
Salzsäure	3 M	1.212	404 μL	4.0
Natriumnitrit	68.99	0.455	31.3 mg	1.5
Piperidin	85.15	0.758	75.8 μL	2.5
Kaliumcarbonat	138.20	1.576	217 mg	5.2

Zu einer auf 0 °C gekühlten Suspension aus **28** in MeCN/H₂O (2:1, 792 μL) wurde langsam Salzsäure zugegeben, sodass die Temperatur konstant blieb. Eine Lösung aus Natriumnitrit in Wasser (396 μL) wurde tropfenweise zugegeben und die Reaktion bei 0 °C für 30 Minuten gerührt. Die Reaktionslösung wurde langsam zu einer Suspension aus Piperidin, Kaliumcarbonat und MeCN/H₂O (2:1, 1.5 ml)

gegeben und für 45 Minuten bei 0 °C gerührt, anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde mit EtOAc und Wasser extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (cHex/EtOAc = 3:1) wurde über Kieselgel filtriert (Laufmittel: cHex/EtOAc = 3:2) und das Produkt als rosabeiger Feststoff erhalten.

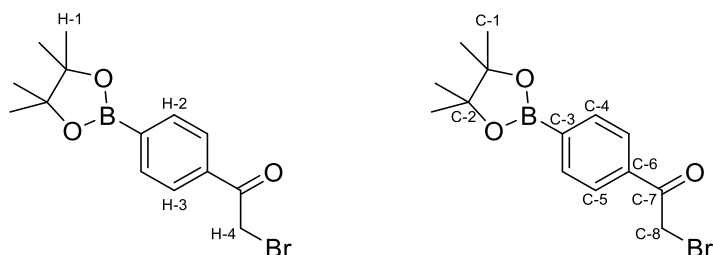
Ausbeute: 102 mg, 0.179 mmol, 59%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.81 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-5), 7.72 (s, 1H, H-6), 7.36 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-4), 7.33 – 7.14 (m, 5H, H-8, H-9, H-10), 6.80 (s, 2H, H-11), 5.46 (s, 2H, H-7), 3.74 (s, 4H, H-3), 3.69 (s, 3H, H-13), 3.63 (s, 6H, H-12), 1.64 (s, 6H, H-1, H-2).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 170.00 (C-16), 158.94 (C-10), 152.70 (2C, C-19), 149.77 (C-8), 148.16 (C-4), 139.04 (C-21), 137.58 (C-12), 131.28 (C-7), 129.43 (C-17), 128.45 (2C, C-14), 127.00 (C-15), 126.43 (2C, C-13), 126.29 (2C, C-6), 120.36 (2C, C-5), 109.56 (C-9), 104.61 (2C, C-18), 60.10 (C-22), 55.84 (2C, C-23), 52.77 (3C, C-3, C-11), 23.68 (3C, C-1, C-2).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 572.23 (572.23).

5.1.1.2.9 2-Brom-1-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)ethan-1-on (30)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
4-Acetylphenylboronsäurepinakolester	246.11	5.00	1.230 g	1.0
<i>N</i> -Bromsuccinimid	177.99	5.50	1.046 g	1.1
<i>para</i> -Toluolsulfonsäure Monohydrat	190.22	5.50	0.979 g	1.1

Zu einer Lösung aus 4-Acetylphenylboronsäurepinakolester und *para*-Toluolsulfonsäure in MeCN (50 mL) wurde *N*-Bromsuccinimid gegeben und bei 50 °C für 3 Stunden gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde mit

EtOAc und wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt wurde nach säulenchromatischer Aufreinigung (cHex/EtOAc = 9:1) und anschließender Umkristallisation in cHex als kristalliner farbloser Feststoff erhalten

Ausbeute: 1.089 g, 3.35 mmol 67%.

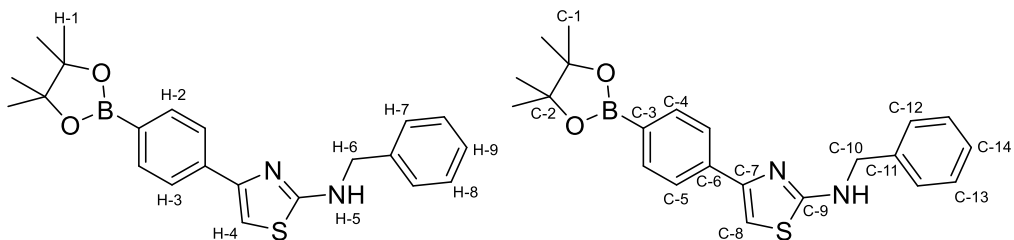
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.10 – 7.76 (m, 4H, H-2, H-3), 5.66 (s, OH, H-4)*, 4.79 (s, OH, H-4)*, 1.42 – 1.18 (m, 12H, H-1).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 199.81 (C-7), 196.80 (C-7), 186.70 (C-7), 137.16, 135.30, 135.15, 135.06, 134.90, 134.77, 134.71, 133.74, 129.96, 129.66, 128.97, 128.90, 128.22, 127.21, 89.74 (C-2), 84.72 (C-2), 84.63 (C-2), 84.52 (C-2), 84.49 (C-2), 65.93 (C-8), 25.11 (4C, C-1).

* Anmerkung: Signale für Keto- und Enol-Form sind sichtbar, allerdings fand ein H-D-Austausch statt, sodass diese Signale sehr klein sind. Im ^{13}C -NMR sind nicht alle Signale eindeutig zuzuordnen aufgrund der verschiedenen Tautomere.

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{OH}]^-$ (berechnet): 341.05663, 343.05458 (341.057, 343.055).

5.1.1.2.10 *N*-Benzyl-4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)thiazol-2-amin (31)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
30	325.01	2.32	754 mg	1.0
<i>N</i> -Benzylthioharnstoff	166.24	2.32	386 mg	1.0

Eine Lösung aus **30** in MeCN (6 mL, + 0.017% TFA) wurde auf 80 °C erhitzt und *N*-Benzylthioharnstoff zugegeben. Nach 2 Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und mit EtOAc und wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (cHex/EtOAc = 4:1 → 1:1) wurde das Produkt als blassgelber kristalliner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 721 mg, 1.84 mmol, 79%.

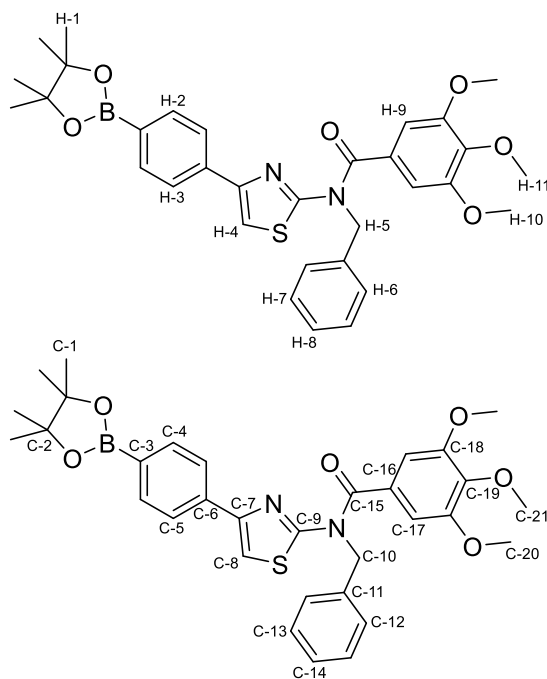
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.18 (t, J = 5.9 Hz, 1H, H-5), 7.84 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-2), 7.67 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-3), 7.40 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H-7), 7.34 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H-8), 7.25 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-9), 7.16 (s, 1H, H-4), 4.52 (d, J = 5.9 Hz, 2H, H-6), 1.30 (s, 10H, H-1).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 168.77 (C-9), 150.04 (C-7), 139.58 (C-11), 137.90 (C-6), 135.11 (2C, C-5), 128.74 (2C, C-12), 127.98 (2C, C-13), 127.41 (C-14), 125.37 (2C, C-4), 103.07 (C-8), 84.02 (2C, C-2), 72.45 (C-), 25.15 (4C, C-1).

* Anmerkung: das Signal von C-3 konnte nicht eindeutig zugeordnet werden, aufgrund der niedrigen Signalintensität.

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 393.18023 (393.180).

5.1.1.2.11 *N*-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-*N*-(4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)thiazol-2-yl)benzamid („*BPin-DOG1*“) (32)



Verbindung	M [g/mol]	n [mmol]	m bzw. V	Äq.
31	392.32	1.40	551 mg	1.0
3,4,5-Trimethoxybenzoylchlorid	230.64	2.81	648 mg	2.0
Pyridin	79.10	11.25	900 μL	8.0

Zu einer Lösung aus **31** und Pyridin in wasserfreiem Toluol (10 mL) wurde unter Argon-Atmosphäre 3,4,5-Trimethoxybenzoylchlorid gegeben und bei 110 °C für 8

Stunden im Rückfluss gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde mit EtOAc und leicht angesäuertem Wasser (pH 5-6) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (cHex/EtOAc = 3:1) wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 578 mg, 0.99 mmol, 70%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.87 (d, J = 8.5 Hz, 2.5H, H-2, H-4), 7.81 (d, J = 8.7 Hz, 0.5H, H-2), 7.69 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-3), 7.29 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-6), 7.25 – 7.14 (m, 3H, H-7, H-8), 6.82 (d, J = 3.6 Hz, 3H, H-9), 5.46 (s, 2H, H-5), 3.69 (s, 3H, H-11), 3.64 (s, 6H, H-10), 1.29 (s, 12H, H-1).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 170.07 (C-15), 159.10 (C-9), 152.71 (2C, C-18), 147.95 (C-7), 139.08 (C-19), 137.51 (C-11), 136.68 (C-6), 134.84 (2C, C-5), 133.61 (C-3), 129.36 (C-16), 128.43 (2C, C-13), 127.02 (C-14), 126.51 (2C, C-12), 124.96 (2C, C-4), 111.60 (C-8), 104.65 (2C, C-17), 83.65 (2C, C-2), 60.10 (C-21), 55.85 (2C, C-20), 52.78 (C-10), 24.67 (4C, C-1).

ESI-MS m/z für $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): 587.23763 (587.238).

5.2 Radiochemische Synthesen

5.2.1 Allgemeine Methoden der Radiochemie

Sowohl für die Trocknung des Fluorids, als auch die Radiosynthesen wurden absolute Lösungsmittel in mindestens analytischem Reinheitsgrad verwendet, sofern nicht anders angegeben. Für die Herstellung wässriger Lösungen wurde Tracepur-Wasser (Merck) verwendet. Chemikalien wurden in mindestens analytischem Reinheitsgrad verwendet. Als Reaktionsgefäße dienten 5mL Wheaton Vials aus Glas mit konischem Boden.

Zur Analyse per HPLC wurde ein Dionex UltiMate 3000 System ausgestattet mit einer Chromolith Performance (RP-18e, 100-4.6 mm, Merck) Säule verwendet. Zur semipräparativen Aufreinigung wurde ein Knauer Blue Shadow System mit Chromolith Performance (RP-18e, 100-10 mm, Merck) Säule verwendet. Beide Systeme waren mit den Radioaktivitätsdetektoren Gabi-Star (Raytest) ausgestattet.

5.2.2 Trocknung von ^{18}F Fluorid

Wässrige ^{18}F Fluorid-Lösung wurde von der Zyklotron AG (Karlsruhe) oder von EuroPET (Freiburg) erworben, die durch Bestrahlung von ^{18}O H₂O via der Kernreaktion $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ erhalten wurde. Vor weiterer Benutzung wurde diese Lösung mittels Anionenaustausch und azeotroper Trocknung wie folgt aufgereinigt.

Die [¹⁸F]Fluorid-Lösung wurde auf eine konditionierte Anionenaustauscher-Kartusche (Sep-Pak® Light Accell™ Plus QMA Carbonate, Waters) gegeben und mit Luft getrocknet zur Entfernung von Target-Wasser. Die Elution des [¹⁸F]Fluorids erfolgte mit einer Lösung aus MeCN (800 µL), Base (Kaliumcarbonat-Lösung bzw. Kaliumoxalat-Lösung, 1 M, 12.5 µL), Tracepur-Wasser (187.5 µL) und K₂₂₂ (12.5 mg) in ein Wheaton-Vial. Unter einem Heliumstrom wurde das Gemisch bei 90 °C und bei 600 mbar 4 Minuten azeotrop getrocknet. Die azeotrope Trocknung wurde zweimal unter Zugabe von MeCN (800 µL) wiederholt, anschließend wurde bei reduziertem Druck (< 50 mbar) bis zur vollständigen Trockenheit eingedampft.

5.2.3 Radiosynthese von [¹⁸F]Fluor-Norimatinib

Eine Lösung aus dem Precursor Boc-Nitroimatinib (**7**, 5 mg, 8 µmol) in DMSO (500 µL) wurde zur frisch getrockneten [¹⁸F]KF/K₂₂₂/K₂CO₃ Mischung gegeben und für 8 Minuten bei 150 °C unter Rühren erhitzt. Die Reaktionslösung wurde auf etwa 90 °C gekühlt und eine Lösung aus Ascorbinsäure (2 mg) in wässriger Salzsäure (2 M, 200 µL) zugegeben. Nach 10 Minuten bei 85 °C wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt, mit Wasser (1.5 mL) verdünnt und mittels semipräparativer HPLC (MeCN/H₂O/TFA = 17/83/0.1) aufgereinigt. Das erhaltene Produkt wurde mit Wasser auf ein Volumen von 20-25 mL verdünnt, auf eine zuvor konditionierte C-18-Kartusche (Sep-Pak® Light C18 Plus, Waters) geladen und mit Wasser (10 mL) gewaschen. Die fraktionierte Elution des Produktes erfolgte mit einer Lösung aus Ascorbinsäure (0.125 mg/mL) in EtOH/Wasser (1/1).

5.2.4 Radiosynthese von [¹⁸F]DOG1-Verbindungen

5.2.4.1 Precursor: Nitro-DOG1

Eine Lösung aus Nitro-DOG1 (**27**, 4 mg, 8 µmol) in Lösungsmittel (500 µL; DMSO, DMF, MeCN bzw. MeCN/^tBuOH) wurde zur frisch getrockneten [¹⁸F]KF/K₂₂₂/Base Mischung gegeben und für 30 Minuten bei 110-180 °C unter Rühren erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktion auf Raumtemperatur erfolgte die Reaktionskontrolle mittels analytischer HPLC.

5.2.4.2 Precursor: Triazen-DOG1

Die [¹⁸F]Fluorid-Lösung wurde auf eine konditionierte Anionenaustauscher-Kartusche (Sep-Pak® Light Accell™ Plus QMA Carbonate, Waters) gegeben und mit Luft getrocknet zur Entfernung von Target-Wasser. Die Elution des [¹⁸F]Fluorids erfolgte mit Natriumcarbonat-Lösung (50.6 mM, 800 µL) in ein Eppendorf Reaktionsgefäß. 80 µL des Eluats wurden in ein Wheaton-Vial (A) überführt und nach

Zugabe von MeCN (800 μ L) unter einem Heliumstrom bei 90 °C und 600 mbar 4 Minuten azeotrop getrocknet. Die azeotrope Trocknung wurde zweimal unter Zugabe von MeCN (800 μ L) wiederholt, anschließend wurde bei reduziertem Druck (< 50 mbar) bis zur vollständigen Trockenheit erhitzt.

In einem weiteren Wheaton-Vial (*B*) wurde eine Suspension aus Triazen-DOG1 (**29**, 1.0 Äq.) und Tetrachlormethan (200 μ L) auf -10 °C gekühlt, Trifluormethansulfonsäure (2.0 Äq.) zugegeben und bei -10 °C für 10 Minuten gerührt.

Eine Suspension aus dem azeotrop getrockneten [18 F]NaF/Na₂CO₃, 15-C-5 (0.5 Äq.) und Tetrachlormethan (200 μ L) wurde zu *B* gegeben, 3 Minuten bei -10 °C gerührt und auf 90 °C erhitzt. Nach 30 Minuten wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt, mit MeCN versetzt und mittels HPLC analysiert.

5.2.4.3 Precursor: BPin-DOG1

Die [18 F]Fluorid-Lösung wurde auf eine konditionierte Anionenaustauscher-Kartusche (Sep-Pak® Light Accell™ Plus QMA Carbonate, Waters) gegeben und mit Luft getrocknet zur Entfernung von Target-Wasser. Die Elution des [18 F]Fluorids erfolgte mit einer Lösung aus MeCN (800 μ L), Kaliumcarbonat-Lösung (0.1 M, 7.23 μ L), Kaliumoxalat-Lösung (1 M, 6.02 μ L), Tracepur-Wasser (186.8 μ L) und K₂₂₂ (6.3 mg) in ein Wheaton-Vial. Unter einem Heliumstrom wurde das Gemisch bei 90 °C und bei 600 mbar 4 Minuten azeotrop getrocknet. Die azeotrope Trocknung wurde zweimal unter Zugabe von MeCN (800 μ L) wiederholt, anschließend wurde bei reduziertem Druck (< 50 mbar) bis zur vollständigen Trockenheit erhitzt.

Eine Lösung aus dem Precursor BPin-DOG1 (**32**, 11.7 mg, 20 μ mol) und Tetrakis(pyridin)kupfer(II)-triflat (13.6 mg, 20 μ mol) in *N,N*-Dimethylacetamid (400 μ L) wurde zur frisch getrockneten [18 F]KF/K₂₂₂/K₂CO₃/K₂C₂O₄ Mischung gegeben und für 20 Minuten bei 120 °C unter Rühren erhitzt. Die Reaktionslösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt, mit MeCN/H₂O (3:1, 800 μ L) verdünnt und mittels semipräparativer HPLC (MeCN/H₂O/TFA = 52/48/0.1) aufgereinigt. Das erhaltene Produkt wurde mit Wasser auf ein Volumen von 20-25 mL verdünnt, auf eine zuvor konditionierte C-18-Kartusche (Sep-Pak® Light C18 Plus, Waters) geladen und mit Wasser (10 mL) gewaschen. Die fraktionierte Elution des Produktes erfolgte mit einer Lösung aus Ascorbinsäure (0.125 mg/mL) in EtOH/Wasser (9/1).

5.3 Ex vivo- und in vitro-Experimente

5.3.1 Bestimmung des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (logD)

Zu einem Zwei-Phasen-Gemisch aus *n*-Octanol (800 μ L) und Natriumphosphat-Puffer (0.05 M, pH 7.4, 800 μ L) wurde der Radiotracer (2 μ L) gegeben und für 5

Minuten gut durchmischt. Nach Zentrifugation zur Trennung der Phasen wurden aus jeder Phase Proben zur Aktivitätsbestimmung im Gamma-Counter entnommen. Die Berechnung des logD-Wertes ergab sich wie folgt:

$$\log D = \log \frac{C_{\text{pmOctanol-Phase}}}{C_{\text{pmPuffer-Phase}}}$$

5.3.2 Bestimmung der Serumstabilität

Eine phosphat-gepufferte Lösung des Radiotracers (100 µL, pH 7-7.4, EtOH < 10%) wurde zum Serum (500 µL, Ursprung: Mensch, Ratte oder Maus) gegeben und bei 37 °C vorsichtig geschüttelt. Zu definierten Zeitpunkten wurde ein Aliquot (75 µL) entnommen, mit MeCN (75 µL) gemischt und 5 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation wurden Überstand und Niederschlag getrennt und die Aktivitäten gemessen. Der Überstand wurde per HPLC auf Metaboliten analysiert.

5.3.3 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Medien, Puffer und Zusätze (Invitrogen, Merck Millipore, PAA, Sigma Aldrich) wurden unter steriler Handhabung verwendet und nach dem Öffnen bei 4 °C gelagert. Die GIST-Zelllinien wurden durch das MITIGATE-Konsortium erworben und entsprechend der Protokolle (s.u.) kultiviert. Die Zelllinie K562 wurde von der ECACC erworben und unter den empfohlenen Bedingungen (s.u.) kultiviert.

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C mit angefeuchteter Luft, die 5% CO₂ enthält, inkubiert und bei einer Konfluenz von etwa 90% den empfohlenen Bedingungen (s.u.) entsprechend gesplittet.

Zum Splitten von Suspensionszellen wurden die Zellen zuerst resuspendiert, um Aggregate zu trennen. Das entsprechende Volumen wurde in ein Falcon-Tube pipettiert und bei 300G für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt.

Bei adherenten Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS (10 mL) vorsichtig gewaschen ohne den Zellrasen zu beschädigen. Nach Entfernen des PBS, wurde Trypsin (2-3 mL, je nach Flaschengröße) so zugegeben, dass der Zellrasen komplett benetzt ist und bei 37 °C für mehrere Minuten inkubiert bis sich die Zellen ablösen lassen. Die Zellen werden mit frischem Medium resuspendiert und ein entsprechendes Volumen in eine Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt.

Zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes mittels kompetitivem Bindungsassay wurde ein MultiScreen_{HTS} Vakuum-Filtrationssystem (Merck Millipore) und dazugehörige 96-Well DV-Filtermembran-Platten (Merck Millipore) verwendet.

Die Radioaktivitätsmessungen erfolgten in verschlossenen Kunststoff-Röhrchen mit dem Wizard 2480 (Perkin Elmer) mit einer Messdauer von einer Minute pro Probe.

5.3.4 Zelllinien

- GIST-T1: Medium: DMEM mit FCS (10%) und L-Glutamin (2 mM)
Splitten: Trypsin (0.05%), 3 Minuten bei 37 °C; 1:10 – 1:15 (alle 4-6 Tage)
- GIST882: Medium: RPMI 1640 mit FCS (15%), L-Glutamin (2 mM) und Gentamycin (10 µg/mL)
Splitten: Trypsin (0.25%), 6 Minuten bei 37 °C; 1:3 – 1:6 (alle 6-8 Tage)
- GIST430: Medium: IMDM (mit GlutaMax) mit FCS (15%) und Gentamycin (10 µg/mL)
Splitten: Trypsin (0.25%), 5 Minuten bei 37 °C; 1:4 – 1:8 (alle 6-8 Tage)
- K562: Medium: RPMI 1640 mit FCS (10%) und L-Glutamin (2 mM)
Splitten: 1:10 – 1:40 (alle 3 – 6 Tage)

5.3.5 Zellmembran-Permeabilität

24-48 Stunden vor Beginn des Experiments wurden 1×10^6 Zellen in jedes Well einer 6-Well-Platte pipettiert und direkt vor dem Experiment dreimal mit kaltem DMEM (+ 1% FCS) gewaschen. Die Inkubation des Radioliganden (1 nM je Well, mit bzw. ohne Zugabe von 1 µM Imatinib als Block-Substanz) fand in DMEM (+ 1% FCS) bei 37 °C für 1-3 Stunden statt (Gesamtvolumen: 1.5 mL/Well), anschließend wurden der Überstand entfernt und die Zellen zweimal mit kaltem DMEM (+ 1% FCS) gewaschen. Die vereinten Überstände wurden als „Waschfraktion“ gesammelt, um den Anteil an freiem [^{18}F]FNI zu bestimmen. Die Zellen wurden zweimal für je 5 Minuten mit kaltem Glycin-Puffer (0,05 M, pH 2.8) inkubiert und die Überstände als „Glycin-Fraktion“ zur Bestimmung des membrangebundenen Anteils gesammelt. Danach wurden die Zellen mit Natriumhydroxid-Lösung (1 M) lysiert und als „NaOH-Fraktion“ gesammelt, um den Anteil an intrazellulärem [^{18}F]FNI zu bestimmen. Abschließend wurden die Aktivitäten der Fraktionen und der Standards des Radioliganden in einem Gamma-Counter gemessen. Zur Bestimmung der spezifischen intrazellulären Anreicherung wurden die Aktivitäten der Wells mit Block-Substanz von denen ohne abgezogen.

5.3.6 Kompetitiver Bindungsassay

Nach Inkubation einer 96-Well-Multiscreen-Filterplatte mit PBS (+1% BSA) für eine Stunde bei 37 °C, wurde der Überstand entfernt und 1×10^5 in Assay-Puffer suspendierte Zellen in jedes Well pipettiert. Nach gleichzeitiger Zugabe des Radioliganden (1 nM) und des Kompetitors (0-5 μ M Norimatinib oder Imatinib) wurde die Zellen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert (Gesamtvolumen: 100 μ L/Well). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Membranfilter wurden ausgestanzt und für die Aktivitäts-Messung im Gamma-Counter gesammelt. Standards des Radioliganden wurden zur Bestimmung der eingesetzten Aktivitätsmenge verwendet. Alle Messergebnisse wurden sowohl gegenüber unspezifischer Bindung an den Membranfiltern korrigiert, als auch gegenüber den Aktivitäten der komplett geblockten Fraktionen (5 μ M Kompetitor), um Nullwerte zu erhalten. IC_{50} -Werte wurden mittels GraphPad Prism 6.03 mittels nicht-linearer Regression mit der Fitting-Methode *least-squares (ordinary) fit* erhalten.

5.3.7 Zellmembranfragmentierung

Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (350G, 5 min), anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet mit PBS (50 mL) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (350G, 5 min), wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Homogenisationspuffer (10 mM HEPES, pH 7.6, 5 mL) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einen vorgekühlten Dounce-Homogenisator überführt und bei 4 °C mit 20 Hüben homogenisiert. Nach Zentrifugation (600G, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und dessen Proteingehalt mittels Bradford-Assay bestimmt. Die Suspension wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.¹¹¹

5.3.8 Radiometrischer Kinase-Assay

Der radiometrische Kinase-Assay wurde durch ProQinase (Freiburg, Deutschland) nach folgender Vorschrift durchgeführt: In einer 96-Well FlashPlate (Perkin Elmer) wurden zum Assay-Puffer [70 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 3 mM $MgCl_2$, 3 mM $MnCl_2$, 3 μ M Natriumorthovanadat, 1.2 mM DTT, 50 μ g/mL PEG₂₀₀₀₀, ATP (entsprechend der apparenten ATP- K_m der jeweiligen Kinase)], [γ -³³P]-ATP (6×10^5 cpm/well), Kinase, Substrat und der zu testende Inhibitor hinzugegeben und bei 30 °C eine Stunde inkubiert. Durch Zugabe von Phosphorsäure (2%) wurde die Enzym-Reaktion abgebrochen. Der Überstand wurde entfernt und die Wells zweimal mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen. Die Inkorporation von [³³P]Phosphat wurde durch einen Mikroplatten-Szintillations-Zähler (Microbeta, Wallac) ermittelt. Die unspezifische

Bindung an der Platte wurde in Wells ohne Kinase, aber mit Substrat bestimmt („low control“), sowie die maximale Bindung in Wells mit Kinase, aber ohne Inhibitor („high control“). Alle Aktivitätsmessungen wurden anhand der folgenden Formel korrigiert:

$$\text{Korrigierte Aktivität (\%)} = 100 \times \frac{\text{Messwert (cpm)} - \text{low control (cpm)}}{\text{high control (cpm)} - \text{low control (cpm)}}$$

Die IC₅₀-Werte wurden mittels Quattro Workflow V3.1.1 (Quattro Research GmbH, Deutschland) berechnet. Als Fitting-Modell wurde *sigmoidal response (variable slope)* mit der Fitting-Methode *least-squares fit* verwendet.

5.4 In vivo-Experimente

5.4.1 Allgemeine Methoden bei in vivo-Versuchen

Alle Tierstudien erfolgten gemäß dem Tierversuchsantrag G197/14 unter Einhaltung geltender deutscher Tierschutzgesetze und den Vorschriften des lokalen Tierschutzkomitees. Die Mäuse vom Stamm Balb/cJHan[®]HsdPrkdc^{scid} („Balb/c SCID“) wurden bei Envigo im Alter von 5-8 Wochen erworben und in einem IVC-Käfigsystem unter *ad libido* Bedingungen mit sterilem Futter und Wasser gehalten. Die Tiere wurden täglich zur Beobachtung des Tumorwachstums und des Gesundheitszustandes untersucht.

Die PET/CT-Messungen wurden am Kleintier-PET/SPECT/CT Albira II (Bruker Biospin) durchgeführt.

5.4.2 Tumor-Inokulation

Eine gekühlte Zellsuspension (100 µL, 10⁸ Zellen/mL in PBS) wurde mit eisgekühltem Matrigel (100 µL, Corning) vorsichtig gemischt und in eine gekühlte Spritze aufgezogen. 100 µL dieser Suspension wurden jeder Maus unter Atemnarkose mit Isofluran (2-3%) subkutan in den linken Oberschenkel injiziert. Nach der Inokulation ließ man die Tumore wachsen bis sie einen Durchmesser von 5-8 mm erreichten.

5.4.3 PET/CT-Bildgebung

Die Tiere wurden mindestens 24 Stunden vor der Messung vom Tierhaus in die eigene Tierhaltungseinrichtung überführt, um den Einfluss von transportbedingtem Stress auf die Messung zu eliminieren.

Vor der Messung wurden die Tiere mittels Atemnarkose (2-3% Isofluran) narkotisiert, anschließend wurden Tiergröße und -gewicht bestimmt, sowie ein Flüssigkeitsdepot (0.6-1 mL isotone Kochsalzlösung) subkutan verabreicht. Der

Radiotracer und eventuelle Inhibitoren/Block-Substanzen wurden intravenös über die laterale Schwanzvene injiziert.

Mit der Injektion des Radiotracers wurde die 90-minütige PET-Messung gestartet, die von einer 30-minütigen CT-Messung gefolgt wurde. Während der Messung wurde die Narkose so angepasst, dass eine stabile Atmung der Tiere vorlag. Nach Ende der Messungen wurden die Tiere in eine tiefere Narkose versetzt (4-5% Isofluran) und durch zervikale Dislokation getötet.

Parameter der verwendeten Messprotokolle (Albira Software Suite 5.6.6.20265):

- PET Single 90min
 - Modality: PET
 - Type: Single
 - Capture Mode: Time
 - Capture Time: 5400 s
 - Reconstruction: MLEM GPU 3R 20x20 0.5, 30 iterations (corrected for scatter, decay, randoms)

- CT Bed 2 Positions Standard (H/H)
 - Modality: CT
 - Type: Bed
 - Capture Mode: Step&Shoot
 - Quality: Standard (250 projections, 500 μ M)
 - Intensity: High Dose (400 μ A)
 - Voltage: High Voltage (45 kV)
 - Reconstruction: FBP

- CT Bed Good (H/H)
 - Modality: CT
 - Type: Bed
 - Capture Mode: Step&Shoot
 - Quality: Good (400 projections, 250 μ M)
 - Intensity: High Dose (400 μ A)
 - Voltage: High Voltage (45 kV)
 - Reconstruction: FBP

5.4.4 Bestimmung der Biodistribution

Sofort nach der Sakrifizierung wurden den Tieren die Organe entnommen, deren Gewicht bestimmt und die Aktivitätsmenge im Gamma-Counter bestimmt. Dazu wurden die Organe entweder komplett (Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Magen, Milz,

Nebennieren, Nieren, Schwanz, Tumor) oder teilweise (Blut, Dünndarm, Dickdarm, Knochen, Muskel, Pankreas) entnommen. Magen, Dick- sowie Dünndarm wurden zusätzlich geleert.

5.4.5 Auswertung der PET-Daten

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm PMOD 3.611 (PMOD Technologies). Messzeitabschnitte (*Frames*) wurden wie folgt definiert:

Frame	Messzeit (Sekunden)	Dauer (Minuten)	Frame	Messzeit (Sekunden)	Dauer (Minuten)
1	0 – 60	1	16	1200 – 1320	2
2	60 – 120	1	17	1320 – 1440	2
3	120 – 180	1	18	1440 – 1560	2
4	180 – 240	1	19	1560 – 1680	2
5	240 – 300	1	20	1680 – 1800	2
6	300 – 360	1	21	1800 – 2100	5
7	360 – 420	1	22	2100 – 2400	5
8	420 – 480	1	23	2400 – 2700	5
9	480 – 540	1	24	2700 – 3000	5
10	540 – 600	1	25	3000 – 3300	5
11	600 – 720	2	26	3300 – 3600	5
12	720 – 840	2	27	3600 – 4200	10
13	840 – 960	2	28	4200 – 4800	10
14	960 – 1080	2	29	4800 - 5400	10
15	1080 – 1200	2			

Nach Eintragen der Versuchsparameter (Tiergewicht, -größe, injizierte Aktivität, Messbeginn), wurden die VOIs (*volumes of interest*) erstellt. Dabei wurden je nach Organ entweder die automatische Konturenzeichnung, die manuelle Zeichnung oder geometrische Formen (Kugeln, Quader) verwendet (Abb. 93).

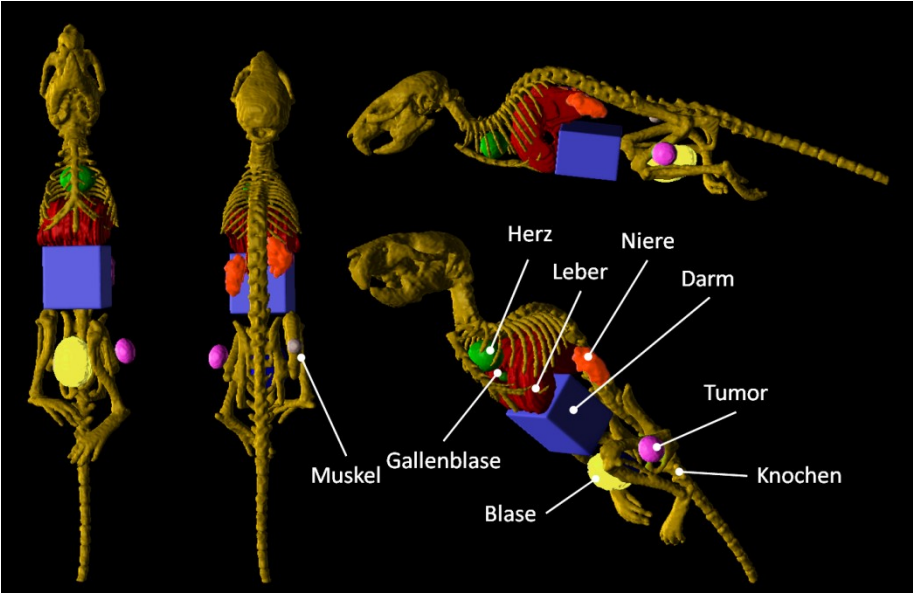


Abb. 93: Definition der VOIs (volumes of interest) am Beispiel einer Maus.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) James, M. L.; Gambhir, S. S. *Physiological Reviews* **2012**, *92*, 897.
- (2) Massoud, T. F.; Gambhir, S. S. *Genes Dev* **2003**, *17*, 545.
- (3) Ross, J. R.; Matava, M. J. *Sports Health* **2011**, *3*, 431.
- (4) zur Verfügung gestellt von: IKRN, Universitätsklinikum Mannheim, 2017.
- (5) Ametamey, S. M.; Honer, M.; Schubiger, P. A. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 1501.
- (6) Standke, R. *Acta Med Austriaca* **2002**, *29*, 149.
- (7) Vandenberghe, S.; Mikhaylova, E.; D’Hoe, E.; Mollet, P.; Karp, J. S. *EJNMMI Physics* **2016**, *3*.
- (8) Karlberg, A. M.; Sæther, O.; Eikenes, L.; Goa, P. E. *EJNMMI Physics* **2016**, *3*.
- (9) Saha, G. B. *Basics of PET imaging : physics, chemistry, and regulations*; 2nd ed.; Springer: New York ; London, **2010**.
- (10) Valk, P. E. *Positron Emission Tomography - Clinical Practice*; Springer: London, **2006**.
- (11) Basics of PET-CT: www.med.harvard.edu/JPNM/chetan/petct/petct.html (abgerufen: 31.07.2017)
- (12) National Nuclear Data Center, Chart of Nuclides database (abgerufen: 23.01.2017)
- (13) *Technical reports series*, International Atomic Energy Agency, **2008**.
- (14) Fowler, J. S.; Ido, T. *Seminars in Nuclear Medicine* **2002**, *32*, 6.
- (15) Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Stocklin, G. *J Nucl Med* **1986**, *27*, 235.
- (16) Lindner, S.; Rensch, C.; Neubaur, S.; Neumeier, M.; Salvamoser, R.; Samper, V.; Bartenstein, P. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 729.
- (17) Preshlock, S.; Tredwell, M.; Gouverneur, V. *Chemical Reviews* **2016**, *116*, 719.
- (18) Zanzonico, P. *Semin Nucl Med* **2004**, *34*, 87.
- (19) Zhang, W.; Oya, S.; Kung, M.-P.; Hou, C.; Maier, D. L.; Kung, H. F. *Nuclear Medicine and Biology* **2005**, *32*, 799.
- (20) Gallagher, B. M.; Fowler, J. S.; Guttererson, N. I.; MacGregor, R. R.; Wan, C. N.; Wolf, A. P. *J Nucl Med* **1978**, *19*, 1154.
- (21) Yu, S. *Biomedical Imaging and Intervention Journal* **2006**, *2*.
- (22) Hofer, C.; Laubenbacher, C.; Block, T.; Breul, J.; Hartung, R.; Schwaiger, M. *Eur Urol* **1999**, *36*, 31.
- (23) Krebsregister des Robert-Koch-Instituts (abgerufen: 03.11.2016)
- (24) *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*, Robert Koch Institut, **2016**.
- (25) Duensing, S.; Duensing, A. *Biochem Pharmacol* **2010**, *80*, 575.
- (26) Beham, A. W.; Schaefer, I.-M.; Schüler, P.; Cameron, S.; Michael Ghadimi, B. *International Journal of Colorectal Disease* **2011**, *27*, 689.
- (27) Hirota, S.; Isozaki, K.; Moriyama, Y.; Hashimoto, K.; Nishida, T.; Ishiguro, S.; Kawano, K.; Hanada, M.; Kurata, A.; Takeda, M.; Tunio, G. M.; Matsuzawa, Y.; Kanakura, Y.; Shinomura, Y.; Kitamura, Y. *Science* **1998**, *279*, 577.
- (28) Kindblom, L. G.; Remotti, H. E.; Aldenborg, F.; Meis-Kindblom, J. M. *American Journal of Pathology* **1998**, *152*, 1259.

- (29) Biankin, A. V.; Piantadosi, S.; Hollingsworth, S. J. *Nature* **2015**, *526*, 361.
- (30) Zhao, X.; Yue, C. *J Gastrointest Oncol* **2012**, *3*, 189.
- (31) Ronellenfitsch, U.; Henzler, T.; Menge, F.; Dimitrakopoulou-Strauss, A.; Hohenberger, P. *Der Chirurg* **2016**, *87*, 389.
- (32) Gold, J. S.; van der Zwan, S. M.; Gonen, M.; Maki, R. G.; Singer, S.; Brennan, M. F.; Antonescu, C. R.; De Matteo, R. P. *Ann Surg Oncol* **2007**, *14*, 134.
- (33) Blanke, C. D.; Demetri, G. D.; von Mehren, M.; Heinrich, M. C.; Eisenberg, B.; Fletcher, J. A.; Corless, C. L.; Fletcher, C. D. M.; Roberts, P. J.; Heinz, D.; Wehre, E.; Nikolova, Z.; Joensuu, H. *Journal of Clinical Oncology* **2008**, *26*, 620.
- (34) Blanke, C. D.; Rankin, C.; Demetri, G. D.; Ryan, C. W.; von Mehren, M.; Benjamin, R. S.; Raymond, A. K.; Bramwell, V. H. C.; Baker, L. H.; Maki, R. G.; Tanaka, M.; Hecht, J. R.; Heinrich, M. C.; Fletcher, C. D. M.; Crowley, J. J.; Borden, E. C. *Journal of Clinical Oncology* **2008**, *26*, 626.
- (35) Zimmermann, J.; Buchdunger, E.; Mett, H.; Meyer, T.; Lydon, N. B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1997**, *7*, 187.
- (36) Call, J.; Walentas, C. D.; Eickhoff, J. C.; Scherzer, N. *Bmc Cancer* **2012**, *12*.
- (37) De Giorgi, U.; Verweij, J. *Molecular Cancer Therapeutics* **2005**, *4*, 495.
- (38) Druker, B. J.; Guilhot, F.; O'Brien, S. G.; Gathmann, I.; Kantarjian, H.; Gattermann, N.; Deininger, M. W. N.; Silver, R. T.; Goldman, J. M.; Stone, R. M.; Cervantes, F.; Hochhaus, A.; Powell, B. L.; Gabrilove, J. L.; Rousselot, P.; Reiffers, J.; Cornelissen, J. J.; Hughes, T.; Agis, H.; Fischer, T.; Verhoef, G.; Shepherd, J.; Saglio, G.; Gratwohl, A.; Nielsen, J. L.; Radich, J. P.; Simonsson, B.; Taylor, K.; Baccarani, M.; So, C.; Letvak, L.; Larson, R. A. *New England Journal of Medicine* **2006**, *355*, 2408.
- (39) le Coutre, P.; Kreuzer, K.-A.; Pursche, S.; v. Bonin, M.; Leopold, T.; Baskaynak, G.; Dörken, B.; Ehninger, G.; Ottmann, O.; Jenke, A.; Bornhäuser, M.; Schleyer, E. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2003**, *53*, 313.
- (40) Gschwind, H. P. *Drug Metabolism and Disposition* **2005**, *33*, 1503.
- (41) Nagar, B.; Bornmann, W. G.; Pellicena, P.; Schindler, T.; Veach, D. R.; Miller, W. T.; Clarkson, B.; Kuriyan, J. *Cancer Research* **2002**, *62*, 4236.
- (42) Bauer, S.; Duensing, A.; Demetri, G. D.; Fletcher, J. A. *Oncogene* **2007**, *26*, 7560.
- (43) Duensing, A.; Medeiros, F.; McConarty, B.; Joseph, N. E.; Panigrahy, D.; Singer, S.; Fletcher, C. D. M.; Demetri, G. D.; Fletcher, J. A. *Oncogene* **2004**, *23*, 3999.
- (44) Heinrich, M. C.; Rubin, B. P.; Longley, B. J.; Fletcher, J. A. *Human Pathology* **2002**, *33*, 484.
- (45) Mol, C. D. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 31655.
- (46) Gramza, A. W.; Corless, C. L.; Heinrich, M. C. *Clinical Cancer Research* **2009**, *15*, 7510.
- (47) Verweij, J.; Casali, P. G.; Zalcberg, J.; LeCesne, A.; Reichardt, P.; Blay, J. Y.; Issels, R.; van Oosterom, A.; Hogendoorn, P. C. W.; Van Glabbeke, M.; Bertulli, R.; Judson, I.; Grp, E. S. T. B. S.; Grp, I. S.; Tria, A. G. *Lancet* **2004**, *364*, 1127.

- (48) Antonescu, C. R.; Besmer, P.; Guo, T. H.; Arkun, K.; Hom, G.; Koryotowski, B.; Leversha, M. A.; Jeffrey, P. D.; Desantis, D.; Singer, S.; Brennan, M. F.; Maki, R. G.; DeMatteo, R. P. *Clinical Cancer Research* **2005**, *11*, 4182.
- (49) Chen, L. L.; Trent, J. C.; Wu, E. F.; Fuller, G. N.; Ramdas, L.; Zhang, W.; Raymond, A. K.; Prieto, V. G.; Oyedeji, C. O.; Hunt, K. K.; Pollock, R. E.; Feig, B. W.; Hayes, K. J.; Choi, H.; Macapinlac, H. A.; Hittelman, W.; Velasco, M. A.; Patel, S.; Burgess, M. A.; Benjamin, R. S.; Frazier, M. L. *Cancer Research* **2004**, *64*, 5913.
- (50) Debiec-Rychter, M.; Cools, J.; Dumez, H.; Sciot, R.; Stul, M.; Mentens, N.; Vranckx, H.; Wasag, B.; Prenen, H.; Roesel, J.; Hagemeyer, A.; Van Oosterom, A.; Marynen, P. *Gastroenterology* **2005**, *128*, 270.
- (51) Lim, K. H.; Huang, M. J.; Chen, L. T.; Wang, T. E.; Liu, C. L.; Chang, C. S.; Liu, M. C.; Hsieh, R. K.; Tzen, C. Y. *Medical Oncology* **2008**, *25*, 207.
- (52) Tamborini, E.; Pricl, S.; Negri, T.; Lagonigro, M. S.; Miselli, F.; Greco, A.; Gronchi, A.; Casali, P. G.; Ferrone, M.; Fermeglia, M.; Carbone, A.; Pierotti, M. A.; Pilotti, S. *Oncogene* **2006**, *25*, 6140.
- (53) Hwang, S. J.; Blair, P. J. A.; Britton, F. C.; O'Driscoll, K. E.; Hennig, G.; Bayguinov, Y. R.; Rock, J. R.; Harfe, B. D.; Sanders, K. M.; Ward, S. M. *The Journal of Physiology* **2009**, *587*, 4887.
- (54) Manoury, B.; Tamuleviciute, A.; Tammaro, P. *The Journal of Physiology* **2010**, *588*, 2305.
- (55) Yang, Y. D.; Cho, H.; Koo, J. Y.; Tak, M. H.; Cho, Y.; Shim, W.-S.; Park, S. P.; Lee, J.; Lee, B.; Kim, B.-M.; Raouf, R.; Shin, Y. K.; Oh, U. *Nature* **2008**, *455*, 1210.
- (56) West, R. B.; Corless, C. L.; Chen, X.; Rubin, B. P.; Subramanian, S.; Montgomery, K.; Zhu, S.; Ball, C. A.; Nielsen, T. O.; Patel, R.; Goldblum, J. R.; Brown, P. O.; Heinrich, M. C.; van de Rijn, M. *The American Journal of Pathology* **2004**, *165*, 107.
- (57) Sanders, K. M.; Zhu, M. H.; Britton, F.; Koh, S. D.; Ward, S. M. *Experimental Physiology* **2012**, *97*, 200.
- (58) Billig, G. M.; Pál, B.; Fidzinski, P.; Jentsch, T. J. *Nature Neuroscience* **2011**, *14*, 763.
- (59) Hartzell, C.; Putzier, I.; Arreola, J. *Annual Review of Physiology* **2005**, *67*, 719.
- (60) Tarran, R.; Button, B.; Boucher, R. C. *Annual Review of Physiology* **2006**, *68*, 543.
- (61) Gibcus, J. H.; Menkema, L.; Mastik, M. F.; Hermsen, M. A.; de Bock, G. H.; van Velthuysen, M. L. F.; Takes, R. P.; Kok, K.; Alvarez Marcos, C. A.; van der Laan, B. F. A. M.; van den Brekel, M. W. M.; Langendijk, J. A.; Kluin, P. M.; van der Wal, J. E.; Schuurin, E. *Clinical Cancer Research* **2007**, *13*, 6257.
- (62) Huang, X.; Godfrey, T. E.; Gooding, W. E.; McCarty, K. S.; Gollin, S. M. *Genes, Chromosomes and Cancer* **2006**, *45*, 1058.
- (63) Simon, S.; Grabellus, F.; Ferrera, L.; Galiotta, L.; Schwindenhammer, B.; Muhlenberg, T.; Taeger, G.; Eilers, G.; Treckmann, J.; Breitenbuecher, F.; Schuler, M.; Taguchi, T.; Fletcher, J. A.; Bauer, S. *Cancer Research* **2013**, *73*, 3661.
- (64) Bao, L.; Kaldany, C.; Holmstrand, E. C.; Cox, D. H. *The Journal of General Physiology* **2004**, *123*, 475.

- (65) Ferrera, L.; Caputo, A.; Galiotta, L. J. V. *Physiology* **2010**, *25*, 357.
- (66) Berglund, E.; Akcakaya, P.; Berglund, D.; Karlsson, F.; Vukojević, V.; Lee, L.; Bogdanović, D.; Lui, W.-O.; Larsson, C.; Zedenius, J.; Fröbom, R.; Bränström, R. *Experimental Cell Research* **2014**, *326*, 315.
- (67) Mazzone, A.; Eisenman, S. T.; Strege, P. R.; Yao, Z.; Ordog, T.; Gibbons, S. J.; Farrugia, G. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**, *427*, 248.
- (68) Namkung, W.; Phuan, P. W.; Verkman, A. S. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 2365.
- (69) Namkung, W.; Yao, Z.; Finkbeiner, W. E.; Verkman, A. S. *The FASEB Journal* **2011**, *25*, 4048.
- (70) Kamar, Z. A.; Sedky, A. A. F.; Nada, O. H.; Abd Raboh, N. M.; El-Mishad, N. M. *Egyptian Journal of Pathology* **2014**, *34*, 89.
- (71) Britschgi, A.; Bill, A.; Brinkhaus, H.; Rothwell, C.; Clay, I.; Duss, S.; Rebhan, M.; Raman, P.; Guy, C. T.; Wetzel, K.; George, E.; Popa, M. O.; Lilley, S.; Choudhury, H.; Gosling, M.; Wang, L.; Fitzgerald, S.; Borawski, J.; Baffoe, J.; Labow, M.; Gaither, L. A.; Bentires-Alj, M. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, E1026.
- (72) Kashyap, M. K.; Marimuthu, A.; Kishore, C. J. H.; Peri, S.; Keerthikumar, S.; Prasad, T. S. K.; Mahmood, R.; Rao, S.; Ranganathan, P.; Sanjeeviah, R. C.; Vijayakumar, M.; Veerendra Kumar, K. V.; Montgomery, E. A.; Kumar, R. V.; Pandey, A. *Cancer Biol Ther* **2014**, *8*, 36.
- (73) Liegl, B.; Hornick, J. L.; Corless, C. L.; Fletcher, C. D. M. *The American Journal of Surgical Pathology* **2009**, *33*, 437.
- (74) Kalkmann, J.; Zeile, M.; Antoch, G.; Berger, F.; Diederich, S.; Dinter, D.; Fink, C.; Jank, R.; Stattaus, J. *Cancer Imaging* **2012**, *12*, 126.
- (75) Ronellenfitch, U.; Wängler, B.; Niedermoser, S.; Dimitrakopoulou-Strauss, A.; Hohenberger, P. *Der Chirurg* **2014**, *85*, 493.
- (76) Choi, H.; Charnsangavej, C.; Faria, S. d. C.; Tamm, E. P.; Benjamin, R. S.; Johnson, M. M.; Macapinlac, H. A.; Podoloff, D. A. *American Journal of Roentgenology* **2004**, *183*, 1619.
- (77) Treglia, G.; Mirk, P.; Stefanelli, A.; Rufini, V.; Giordano, A.; Bonomo, L. *Clinical Imaging* **2012**, *36*, 167.
- (78) van den Abbeele, A. D.; Badawi, R. D.; Janicek, M.; Blanke, C.; Joensuu, H.; Robert, P.; Silberman, S.; Dimitrijevic, S.; Demetri, G. D. In *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; Vol. 20, p 362a.
- (79) Glekas, A. P.; Pillarsetty, N. K.; Punzalan, B.; Khan, N.; Smith-Jones, P.; Larson, S. M. *Journal of Nuclear Medicine* **2011**, *52*, 1301.
- (80) Peng, Z. H.; Maxwell, D. S.; Sun, D. L.; Prasad, B. A. B.; Pal, A.; Wang, S. M.; Balatoni, J.; Ghosh, P.; Lim, S. T.; Volgin, A.; Shavrin, A.; Alauddin, M. M.; Gelovani, J. G.; Bornmann, W. G. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22*, 623.
- (81) Arnott, J. A.; Kumar, R.; Planey, S. L. *Journal of Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics* **2013**.
- (82) van de Waterbeemd, H.; Smith, D. A.; Beaumont, K.; Walker, D. K. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, *44*, 1313.

- (83) Dolci, L.; Dolle, F.; Jubeau, S.; Vaufrey, F.; Crouzel, C. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* **1999**, *42*, 975.
- (84) Espinosa, I.; Lee, C.-H.; Kim, M. K.; Rouse, B.-T.; Subramanian, S.; Montgomery, K.; Varma, S.; Corless, C. L.; Heinrich, M. C.; Smith, K. S.; Wang, Z.; Rubin, B.; Nielsen, T. O.; Seitz, R. S.; Ross, D. T.; West, R. B.; Cleary, M. L.; van de Rijn, M. *The American Journal of Surgical Pathology* **2008**, *32*, 210.
- (85) Kompella, A.; Adibhatla, B. R. K.; Muddasani, P. R.; Rachakonda, S.; Gampa, V. K.; Dubey, P. K. *Organic Process Research & Development* **2012**, *16*, 1794.
- (86) Schröter, S.; Stock, C.; Bach, T. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2245.
- (87) Bursavich, M. G.; Lombardi, S.; Gilbert, A. M. *Organic Letters* **2005**, *7*, 4113.
- (88) Ryzhikov, N. N.; Seneca, N.; Krasikova, R. N.; Gomzina, N. A.; Shchukin, E.; Fedorova, O. S.; Vassiliev, D. A.; Gulyás, B.; Hall, H.; Savic, I.; Halldin, C. *Nuclear Medicine and Biology* **2005**, *32*, 109.
- (89) Pages, T.; Langlois, B. R. *Journal of Fluorine Chemistry* **2001**, *107*, 321.
- (90) Pages, T.; Langlois, B. R.; Le Bars, D.; Landais, P. *Journal of Fluorine Chemistry* **2001**, *107*, 329.
- (91) Tewson, T. J.; Welch, M. J. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1979**, 1149.
- (92) Suzuki, A. *Angewandte Chemie-International Edition* **2011**, *50*, 6722.
- (93) Ye, Y.; Schimler, S. D.; Hanley, P. S.; Sanford, M. S. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 16292.
- (94) Carrow, B. P.; Hartwig, J. F. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 2116.
- (95) Schirrmacher, R.; Wängler, C.; Schirrmacher, E. *Munich Molecular Imaging Handbook Series, Volume 1: Pharmaceutical Radiochemistry (I)*; Scintomics Print Media and Publishing: Fürstenfeldbruck, **2010**.
- (96) Kügler, F.; Ermert, J.; Coenen, H. H. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2013**, *56*, 609.
- (97) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; Wiley-Interscience: Hoboken, **2007**.
- (98) Preshlock, S.; Calderwood, S.; Verhoog, S.; Tredwell, M.; Huiban, M.; Hienzsch, A.; Gruber, S.; Wilson, T. C.; Taylor, N. J.; Cailly, T.; Schedler, M.; Collier, T. L.; Passchier, J.; Smits, R.; Mollitor, J.; Hoepping, A.; Mueller, M.; Genicot, C.; Mercier, J.; Gouverneur, V. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 8361.
- (99) Berridge, M. S.; Crouzel, C.; Comar, D. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* **1985**, *22*, 687.
- (100) Riss, P. J.; Kuschel, S.; Aigbirio, F. I. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53*, 1717.
- (101) Krane, J.; Skjetne, T. *Tetrahedron Letters* **1980**, *21*, 1775.
- (102) Tredwell, M.; Preshlock, S. M.; Taylor, N. J.; Gruber, S.; Huiban, M.; Passchier, J.; Mercier, J.; Génicot, C.; Gouverneur, V. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 7751.
- (103) Zlatopolskiy, B. D.; Zischler, J.; Krapf, P.; Zarrad, F.; Urusova, E. A.; Kordys, E.; Endepols, H.; Neumaier, B. *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21*, 5972.
- (104) Kil, K.-E.; Ding, Y.-S.; Lin, K.-S.; Alexoff, D.; Kim, S. W.; Shea, C.; Xu, Y.; Muench, L.; Fowler, J. S. *Nuclear Medicine and Biology* **2007**, *34*, 153.
- (105) nicht veröffentlichte Ergebnisse: Consolino, L., **2016**.

- (106) Shultz, L. D.; Lyons, B. L.; Burzenski, L. M.; Gott, B.; Chen, X.; Chaleff, S.; Kotb, M.; Gillies, S. D.; King, M.; Mangada, J.; Greiner, D. L.; Handgretinger, R. *The Journal of Immunology* **2005**, *174*, 6477.
- (107) Welsh, M. *Diabetologia* **2012**, *55*, 2092.
- (108) Consolino, L.; Longo, D. L.; Sciortino, M.; Dastrù, W.; Cabodi, S.; Giovenzana, G. B.; Aime, S. *Gastric Cancer* **2016**, *20*, 629.
- (109) Bauer, S.; Yu, L. K.; Demetri, G. D.; Fletcher, J. A. *Cancer Research* **2006**, *66*, 9153.
- (110) Ishii, Y.; Hamashima, T.; Yamamoto, S.; Sasahara, M. *Pathology International* **2017**, *67*, 235.
- (111) Reubi, J. C.; Perrin, M. H.; Rivier, J. E.; Vale, W. *Life Sci* **1981**, *28*, 2191.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

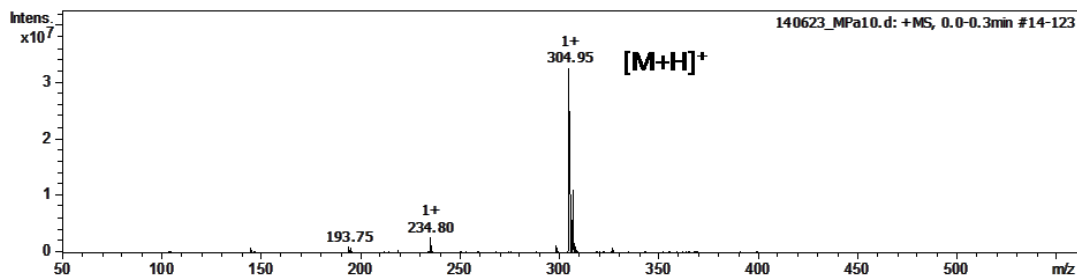
% ID/g	Injizierte Dosis pro Gramm in Prozent
15-C-5	1,4,7,10,13-Pentaoxacyclopentadecan ([15]Krone-5)
Äq.	Äquivalent
Ar	Aryl
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BPin	Borsäure-Pinakolester (4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolanyl)
BSA	Bovines Serumalbumin
cHex	Cyclohexan
CML	chronische myeloische Leukämie
cpm	Ereignisse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CT	Computertomographie
CYP	Cytochrom P450
d.c.	zerfallskorrigiert (<i>decay corrected</i>)
DC	Dünnschichtchromatographie
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOG1	<i>Discovered on GIST 1</i>
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclodecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
[¹⁸ F]FBB	[¹⁸ F]Florbetaben
FBP	gefilterte Rückprojektion (<i>filtered back projection</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetale calf serum</i>)
[¹⁸ F]FDG	2-Desoxy-2-[¹⁸ F]fluor-D-glucose

[¹⁸ F]FET	[¹⁸ F]Fluorethyltyrosin
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FNI	Fluor-Norimatinib (<i>N</i> -(3-((4-(6-Fluorpyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)-4-methylphenyl)-4-(piperazin-1-ylmethyl)benzamid)
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
Gly	Glycin
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HBTU	(2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat)
HOAc	Essigsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
ID	injizierte Dosis
ⁱ PrOH	2-Propanol
IVC	einzelbelüfteter Käfig (<i>individually ventilated cage</i>)
K ₂₂₂	Kryptofix® 222
LM	Lösungsmittel
M	Molekülmasse
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MIP	Maximumintensitätsprojektion (<i>maximum intensity projection</i>)
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NODAGA	1,4,7-Triazacyclononan-1-glutarsäure-4,7-essigsäure
PAP	<i>N</i> -Phenylpyrimidin-2-amin („Phenylamin-Pyrimidin“)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Phe	Phenylalanin
p.i.	nach Injektion (<i>post injection</i>)

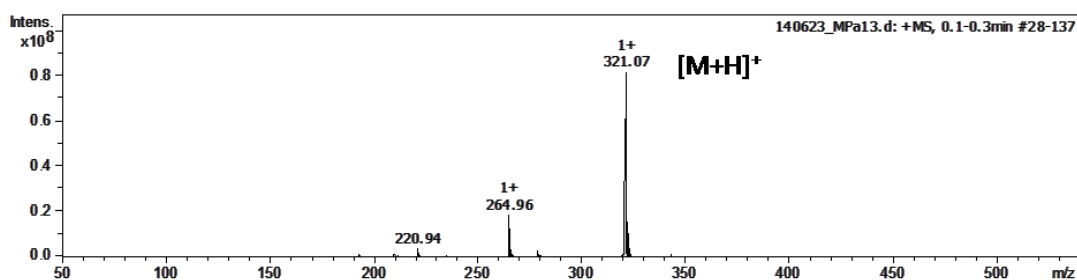
Pip	Piperazin
py	Pyridin
RCY	radiochemische Ausbeute (<i>radiochemical yield</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt (<i>severe combined immunodeficiency</i>)
SG	Schutzgruppe
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (<i>single photon emission computed tomography</i>)
SUV	<i>standardized uptake value</i> ; SUV = Aktivitätskonzentration [Bq/mL] * Normierungswert / applizierte Aktivität [Bq]
TAC	Zeit-Aktivitäts-Kurve (<i>time activity curve</i>)
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
TfOH	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TOF	<i>time of flight</i>
T/M	Tumor-zu-Muskel-Verhältnis
VOI	für die Auswertung markierter Bereich (<i>volume of interest</i>)
X	Halogen-Atom: Cl, Br, I

7.2 Massenspektren

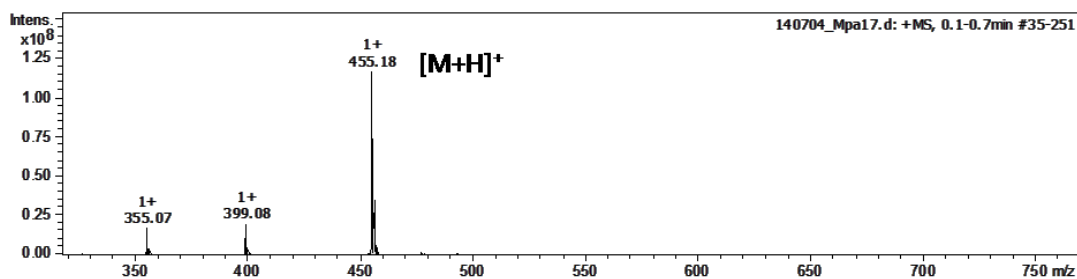
4-(Chlormethyl)-N-(4-methyl-3-nitrophenyl)benzamid (1)



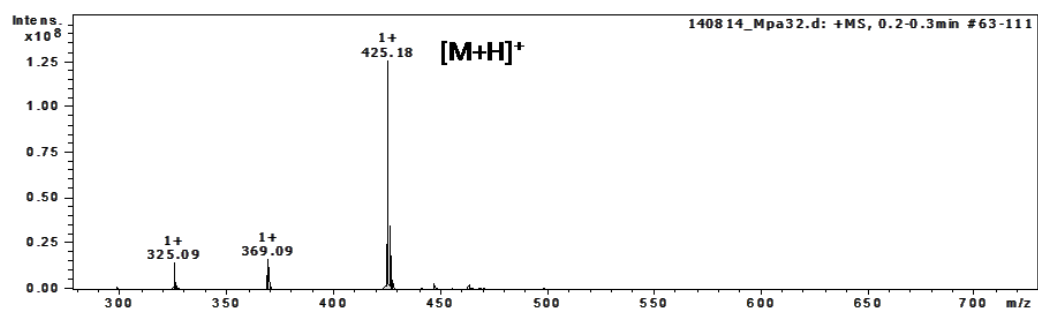
4-((4-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperazin-1-yl)methyl)benzoesäure (2)



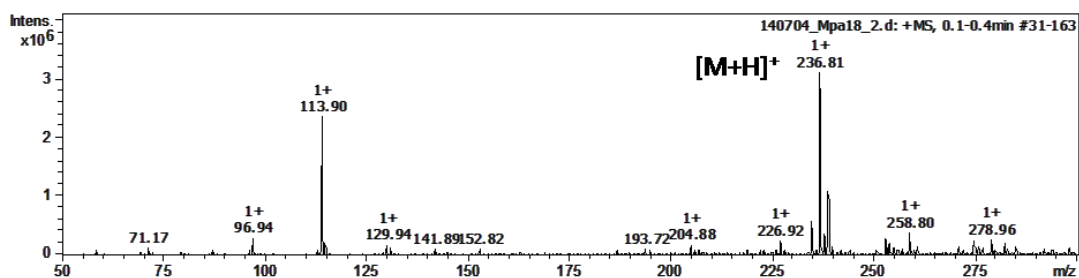
tert-Butyl 4-(4-((4-methyl-3-nitrophenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat (3)



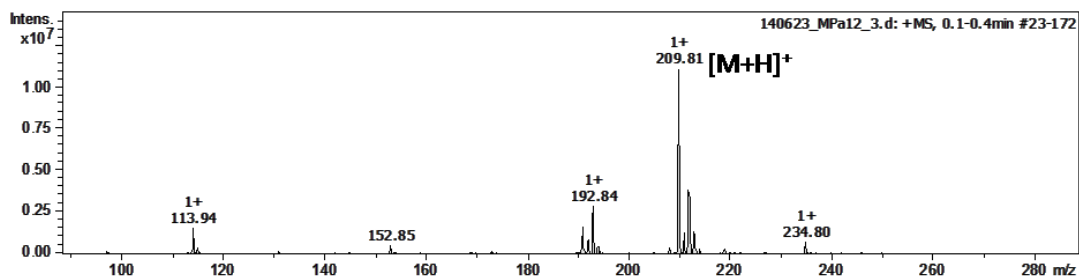
tert-Butyl 4-(4-((3-amino-4-methylphenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat (4)



2-Chlor-4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin (5)

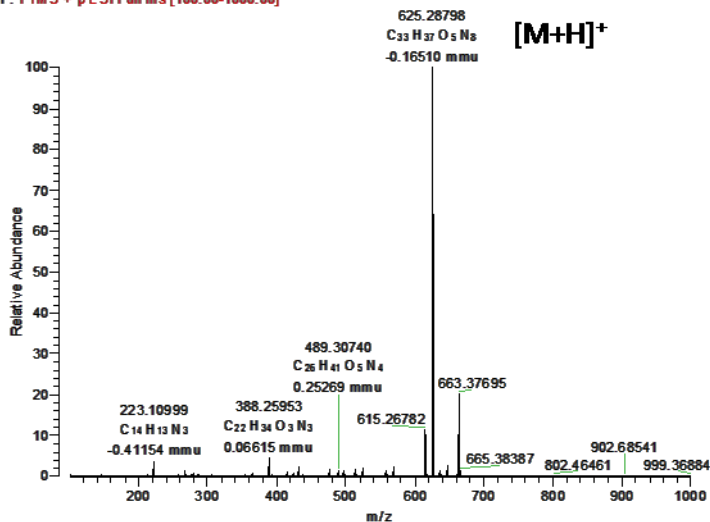


2-Chlor-4-(6-fluoropyridin-3-yl)pyrimidin (6)

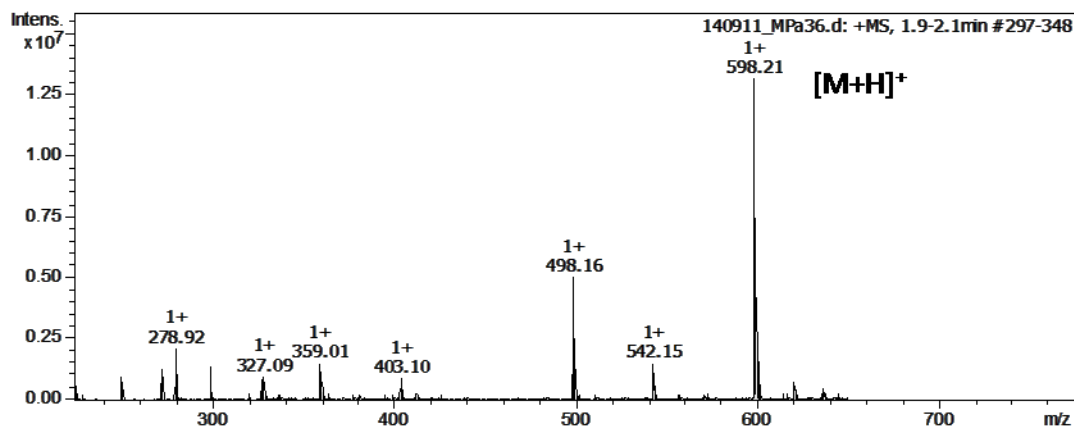


tert-Butyl 4-(4-((4-methyl-3-((4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)-carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat („Boc-Nitroimatinitib“) (7)

10-cawel Pa-103_151013162453 #41-134 RT: 0.52-1.46 AV: 12 NL: 2.01E 6
 F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]

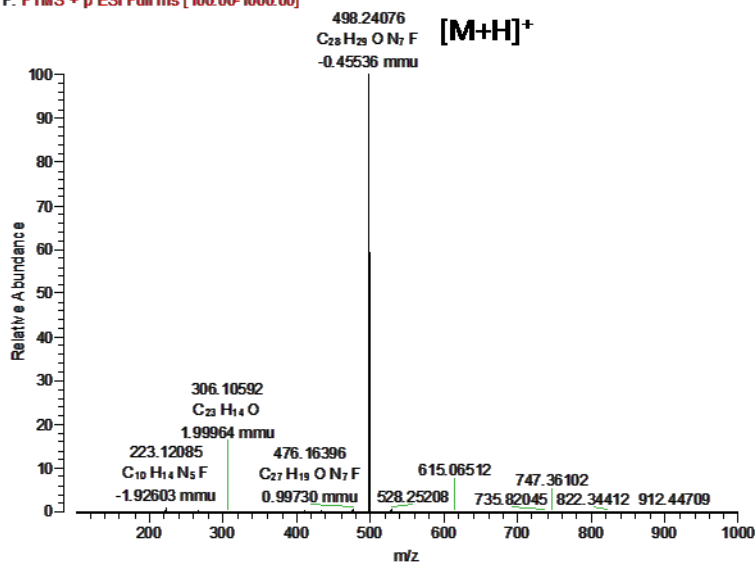


***tert*-Butyl 4-(4-(3-((4-(6-fluoropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)-4-methylphenyl)-carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat („*Boc-Fluorimatinib*“) (8)**

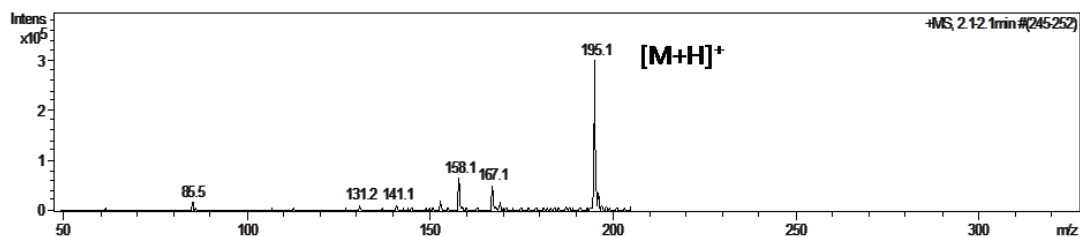


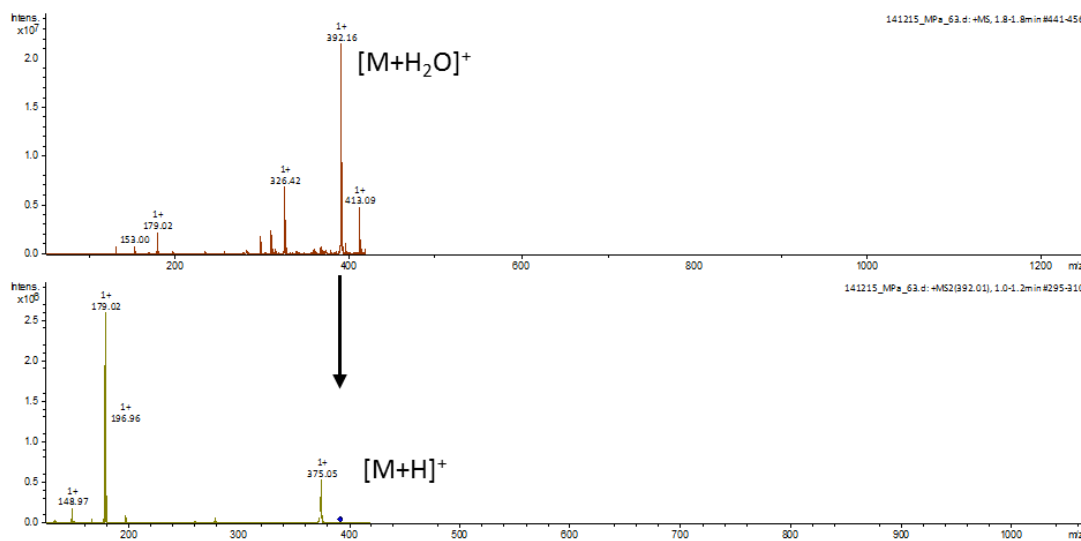
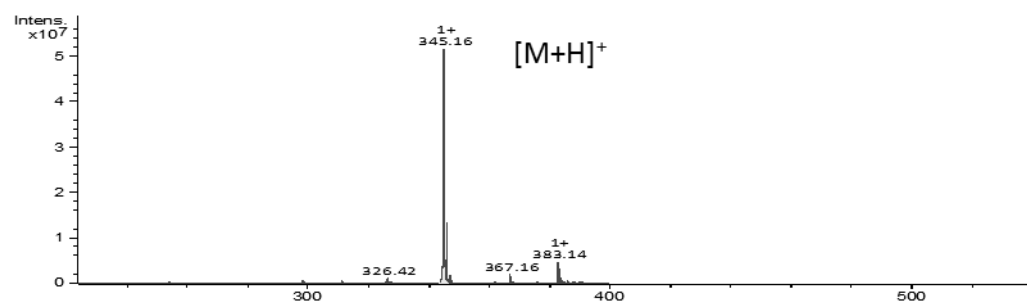
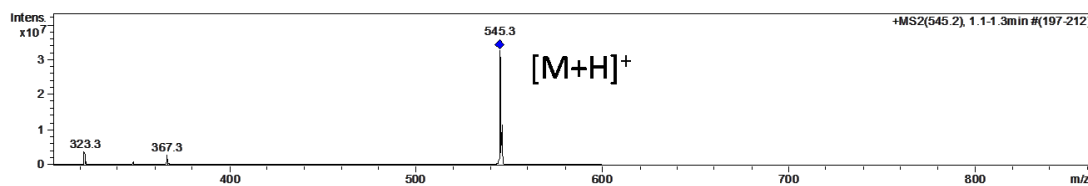
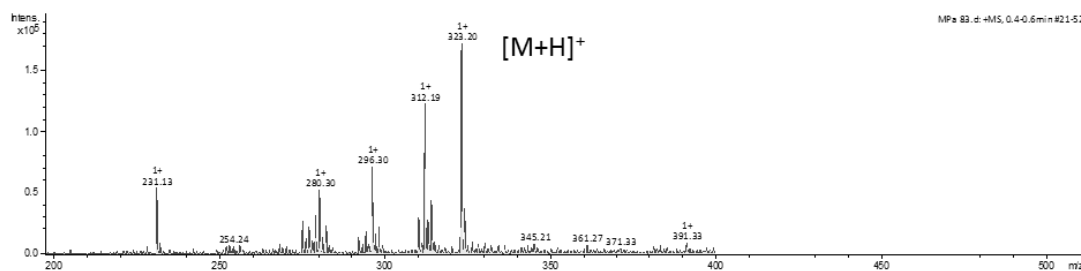
***N*-(3-((4-(6-fluoropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)-4-methylphenyl)-4-(piperazin-1-ylmethyl)benzamid („*Fluornorimatinib*“) (9)**

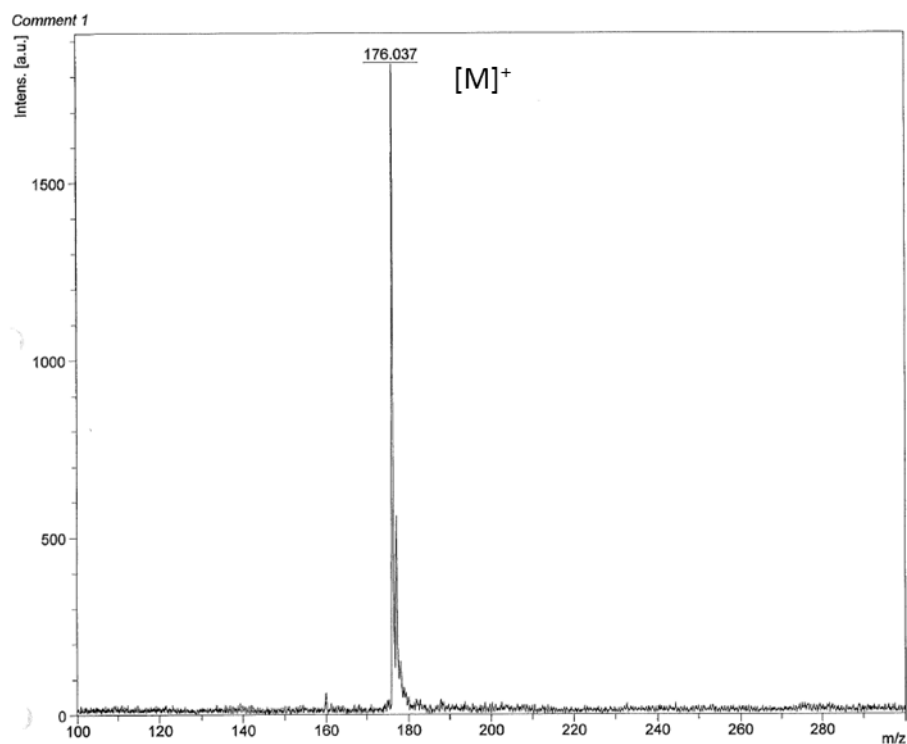
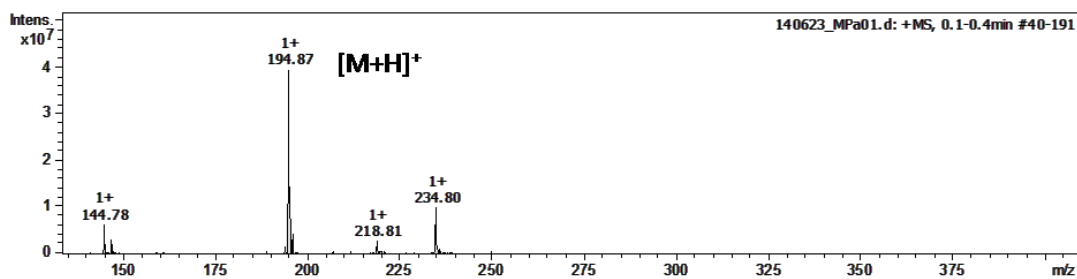
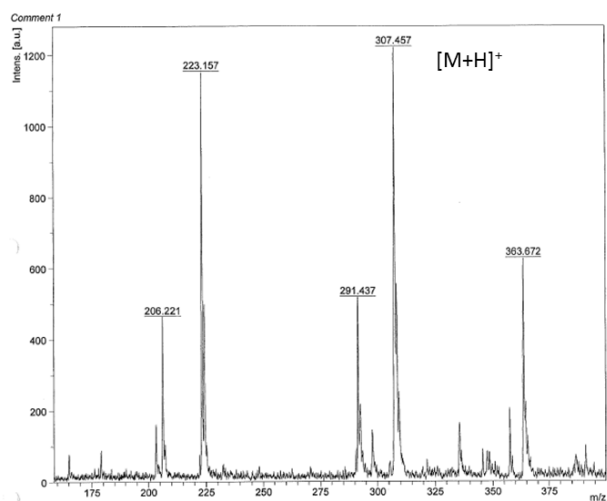
10-cawe-MPa-105C_151013154723 #41-132 RT: 0.52-1.43 AV: 12 NL: 5.01E7
F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]

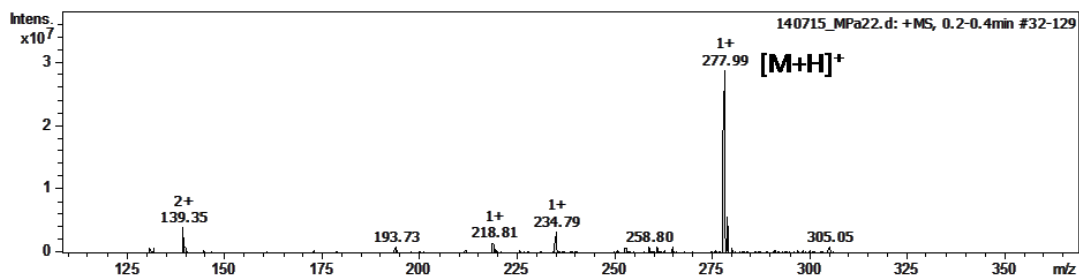
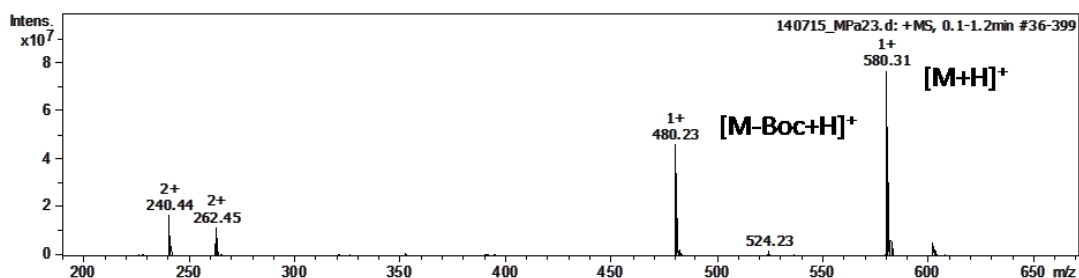
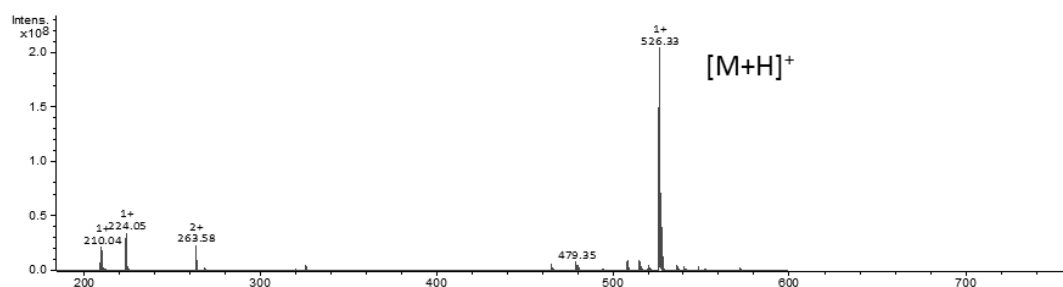
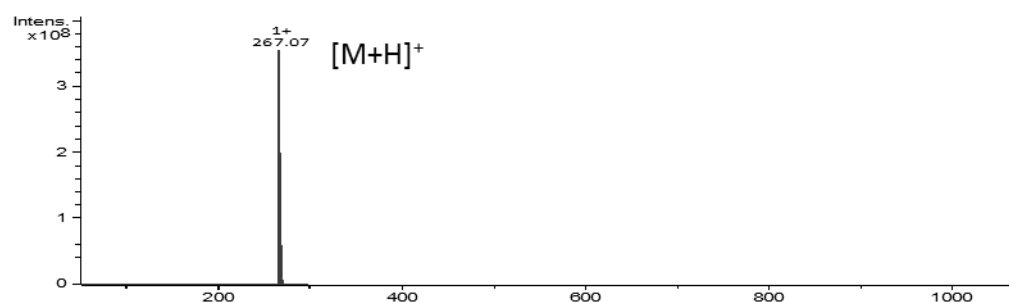


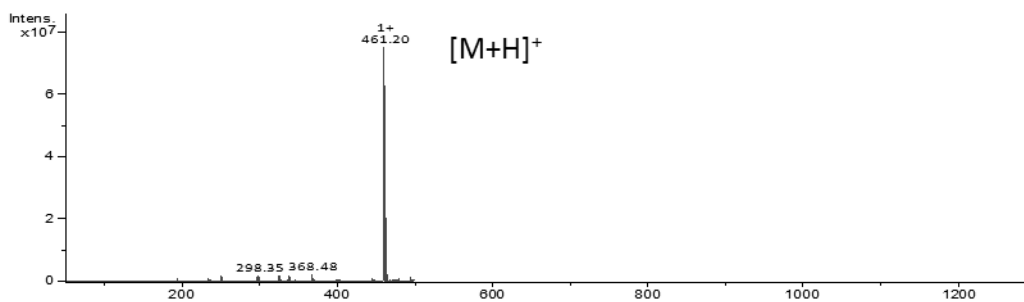
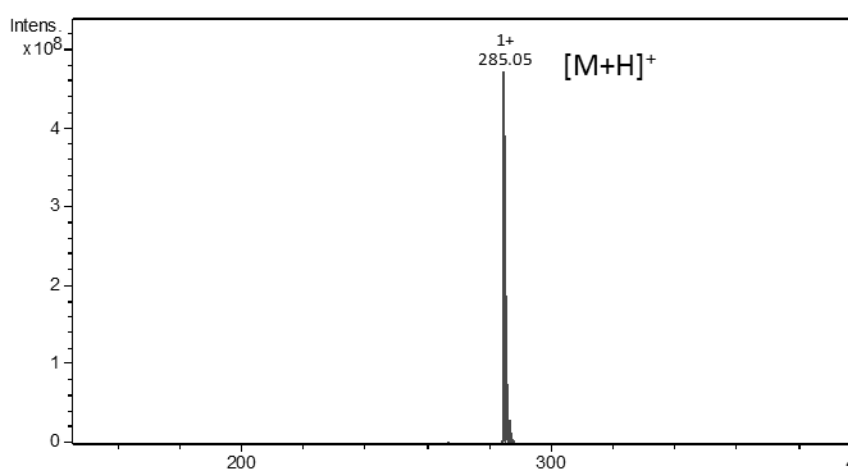
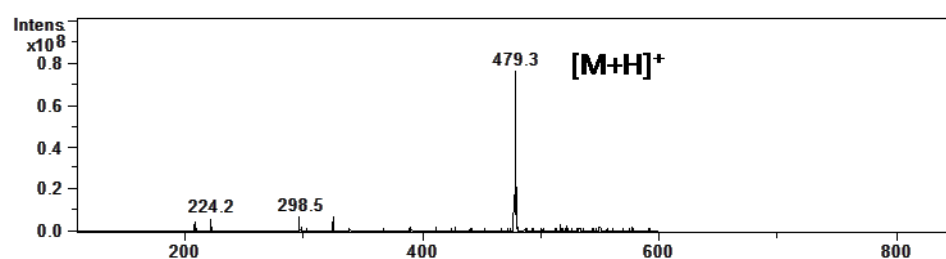
1-(6-Nitropyridin-3-yl)ethan-1-on (10)

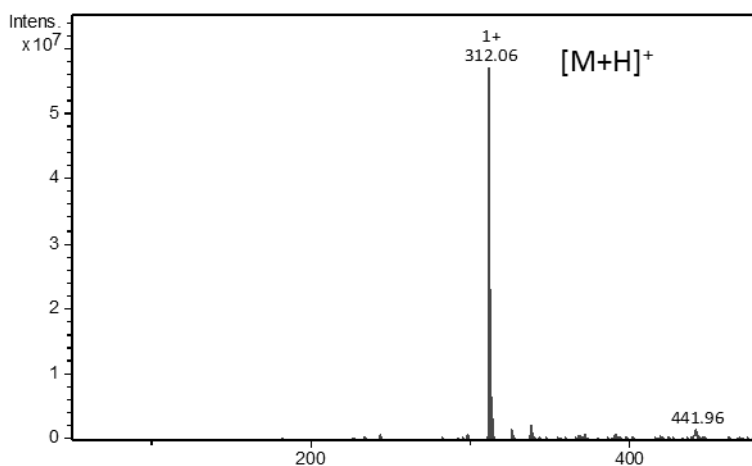
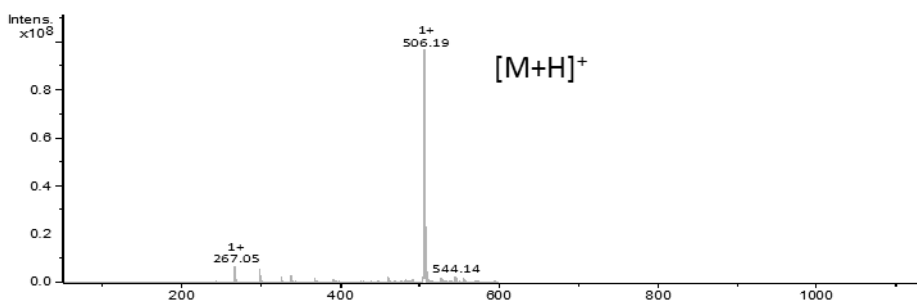


(9H-Fluoren-9-yl)methyl (4-methyl-3-nitrophenyl)carbamat (11)**(9H-Fluoren-9-yl)methyl (3-amino-4-methylphenyl)carbamat (12)****(9H-Fluoren-9-yl)methyl (4-methyl-3-((4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)-amino)phenyl)carbamat (13)****6-Methyl-N¹-(4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)benzol-1,3-diamin (14)**

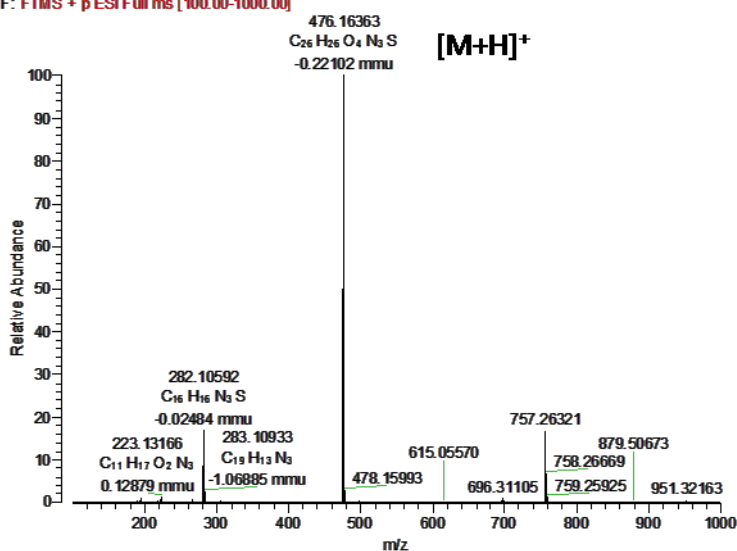
3-(Dimethylamin)-1-(pyridin-3-yl)prop-2-en-1-on (15)**1-(2-Methyl-5-nitrophenyl)guanidin (16)****N-(2-Methyl-5-nitrophenyl)-4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amin (17)**

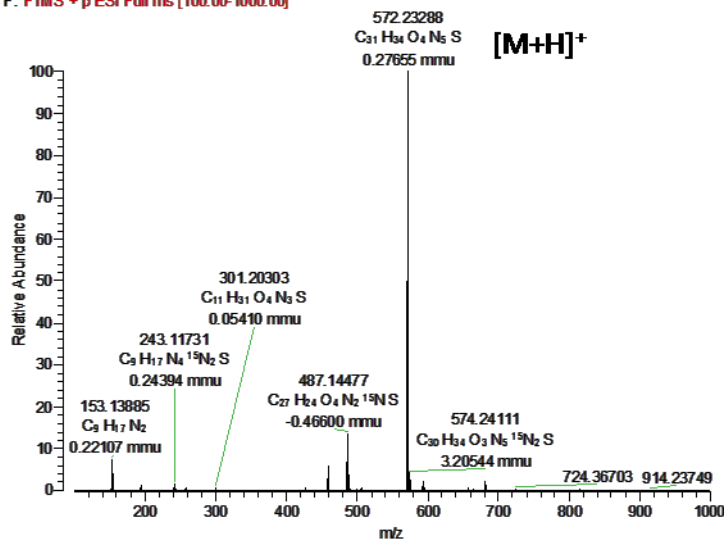
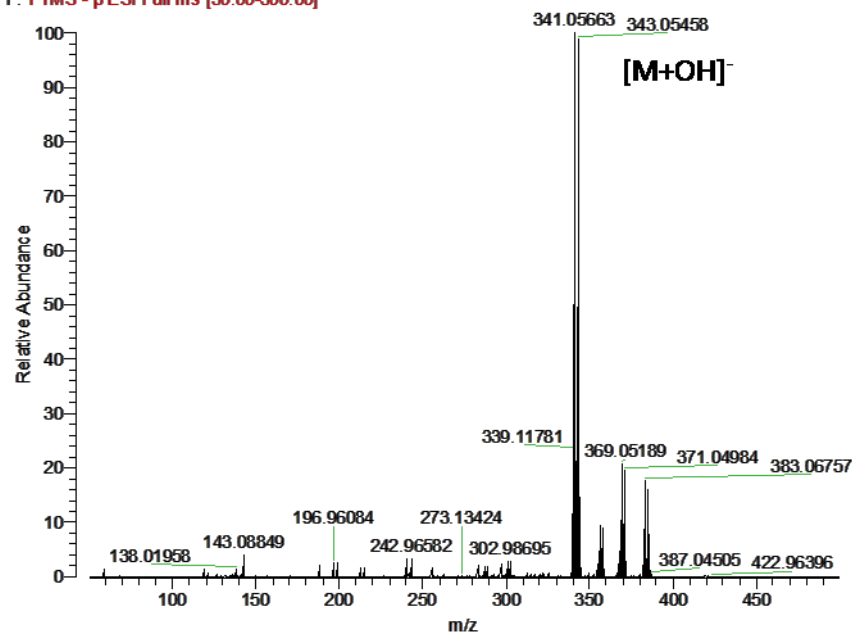
6-Methyl-*N*¹-(4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)benzol-1,3-diamin (18)***tert*-Butyl 4-(4-((4-methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbonyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat („*Boc-Imatinib*“) (19)****4-((4-(2-Fluorethyl)piperazin-1-yl)methyl)-*N*-(4-methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)benzamid („*Fluorethyl-Imatinib*“, *SKI696*) (21)*****N*-Benzyl-4-phenylthiazol-2-amin (22)**

N-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-N-(4-phenylthiazol-2-yl)benzamid („Eact”) (23)**N-benzyl-4-(4-fluorophenyl)thiazol-2-amin (24)****N-Benzyl-N-(4-(4-fluorophenyl)thiazol-2-yl)-3,4,5-trimethoxybenzamid („Fluor-DOG1”) (25)**

N*-Benzyl-4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-amin (26)**N*-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-*N*-(4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-yl)benzamid („Nitro-DOG1“) (27)*****N*-(4-(4-Aminophenyl)thiazol-2-yl)-*N*-benzyl-3,4,5-trimethoxybenzamid (28)**

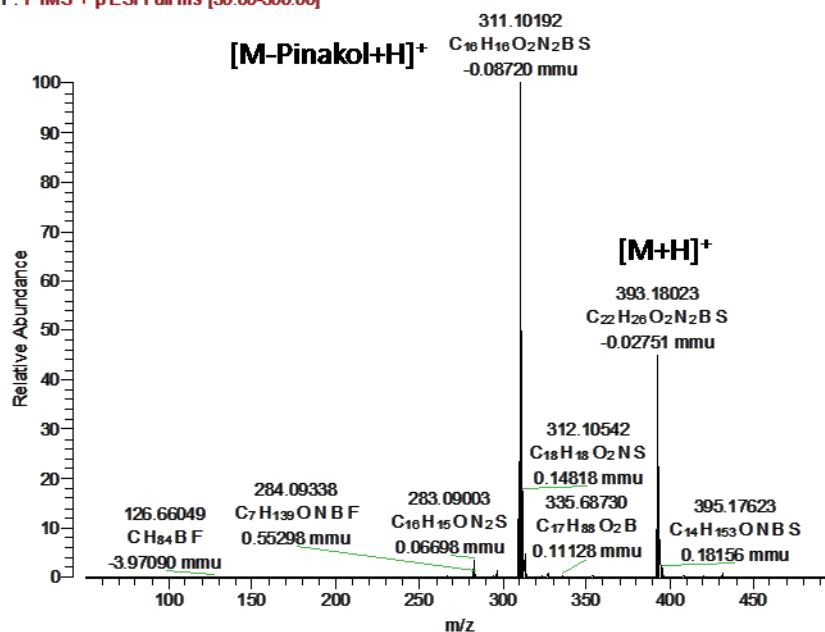
10-cave-MPa-120 #42-139 RT: 0.51-1.48 AV: 13 NL: 1.45E7
 F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]



N-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-N-(4-(4-(piperidin-1-yl)diazenyl)phenyl)thiazol-2-yl)benzamid („Triazen-DOG1“) (29)03-MPa-129 #54-171 RT: 0.52-1.48 AV: 15 NL: 3.33E6
F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]**2-Brom-1-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)ethan-1-on (30)**03-nuki-MPa-144 #52-278 RT: 0.49-2.51 AV: 29 NL: 2.52E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-500.00]

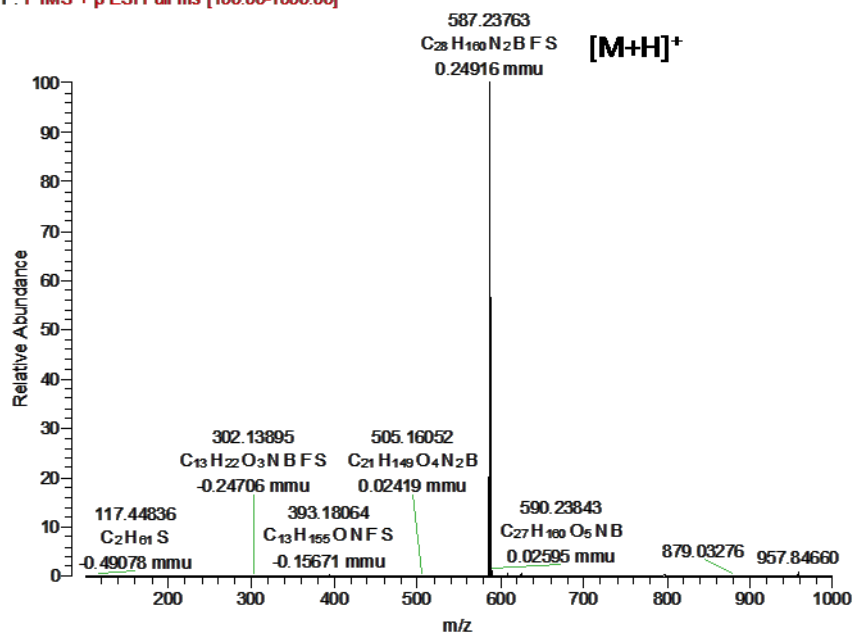
***N*-Benzyl-4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)thiazol-2-amin
(31)**

03-nuki-MPa-143 #54-304 RT: 0.53-2.44 AV: 31 NL: 2.67E6
F: FTMS + pESI Full ms [50.00-500.00]



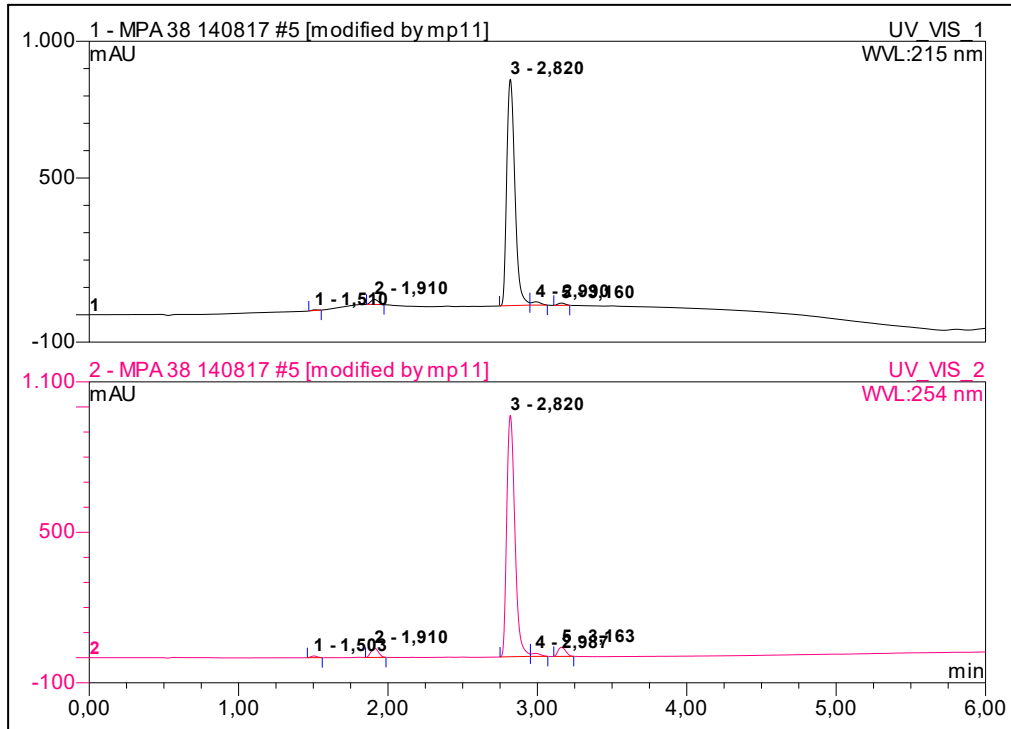
***N*-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-*N*-(4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)thiazol-2-yl)benzamid („*BPin-DOG1*”) (32)**

03-nuki-MPa-146 #53-178 RT: 0.53-1.49 AV: 16 NL: 8.29E6
F: FTMS + pESI Full ms [100.00-1000.00]

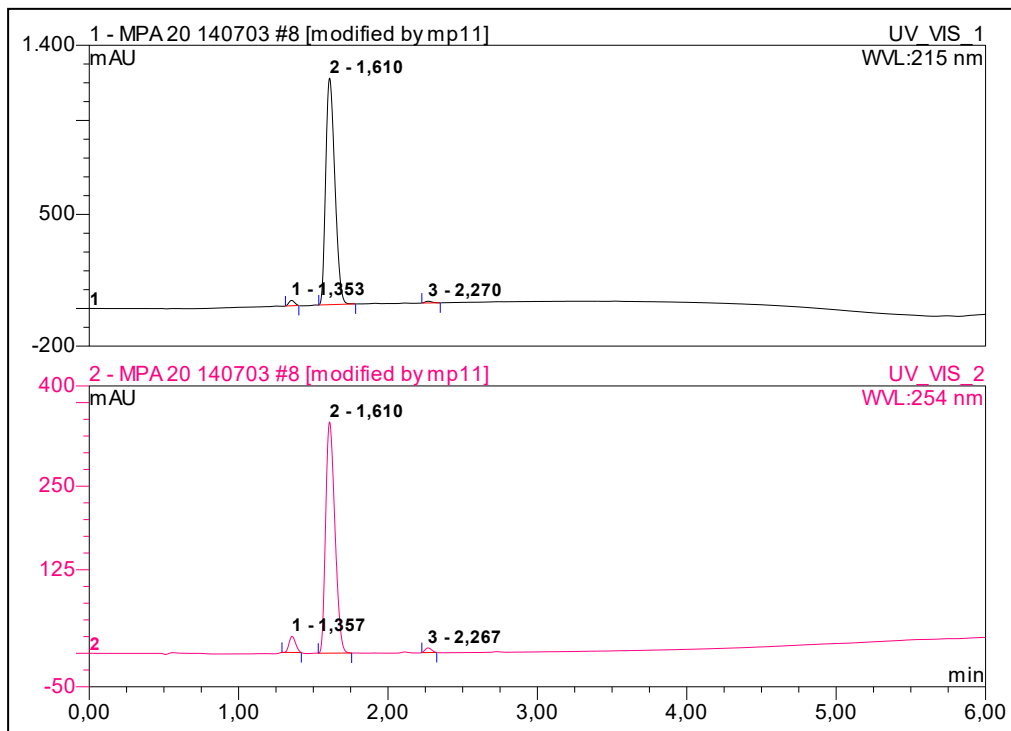


7.3 HPLC-Chromatogramme

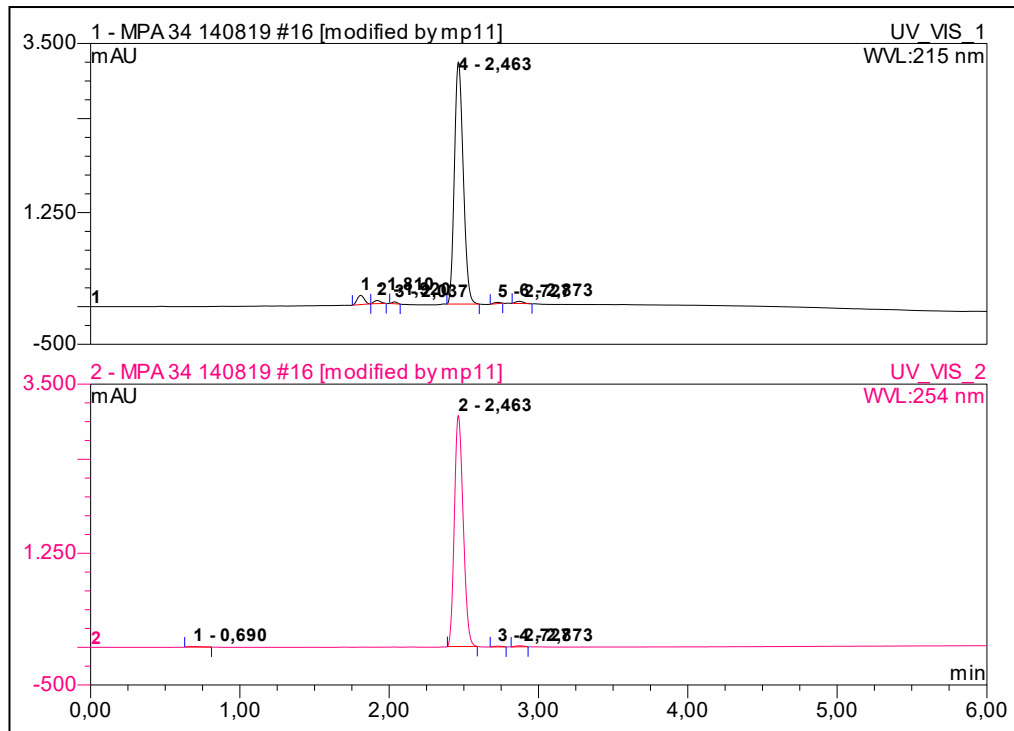
4-(Chlormethyl)-*N*-(4-methyl-3-nitrophenyl)benzamid (1)



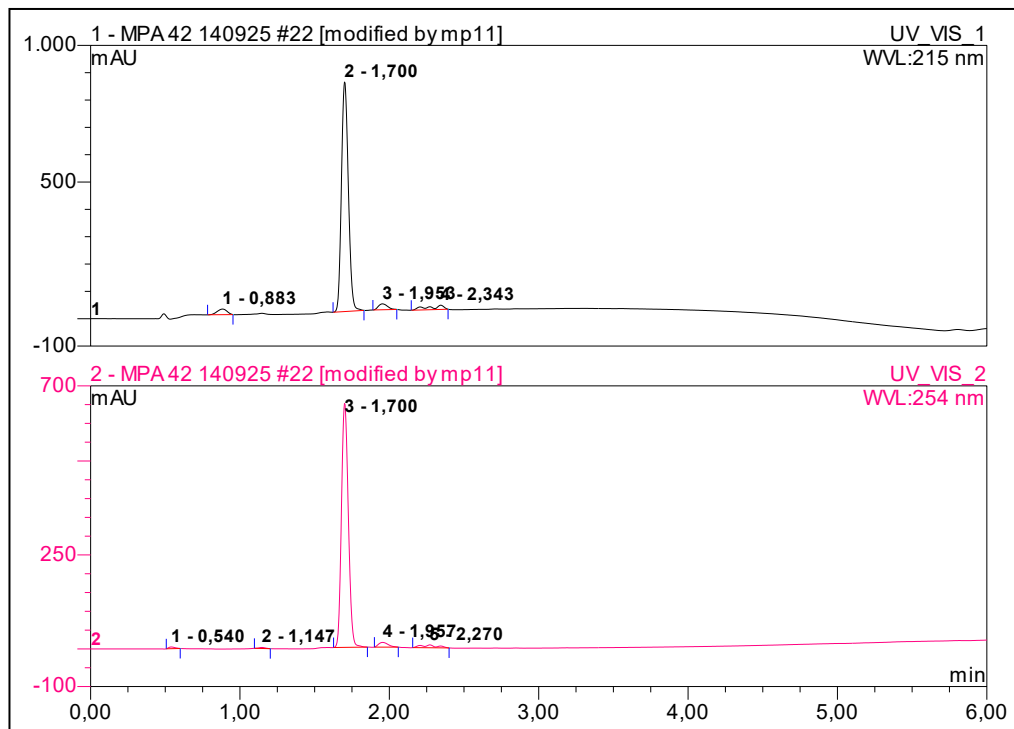
4-((4-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperazin-1-yl)methyl)benzoesäure (2)



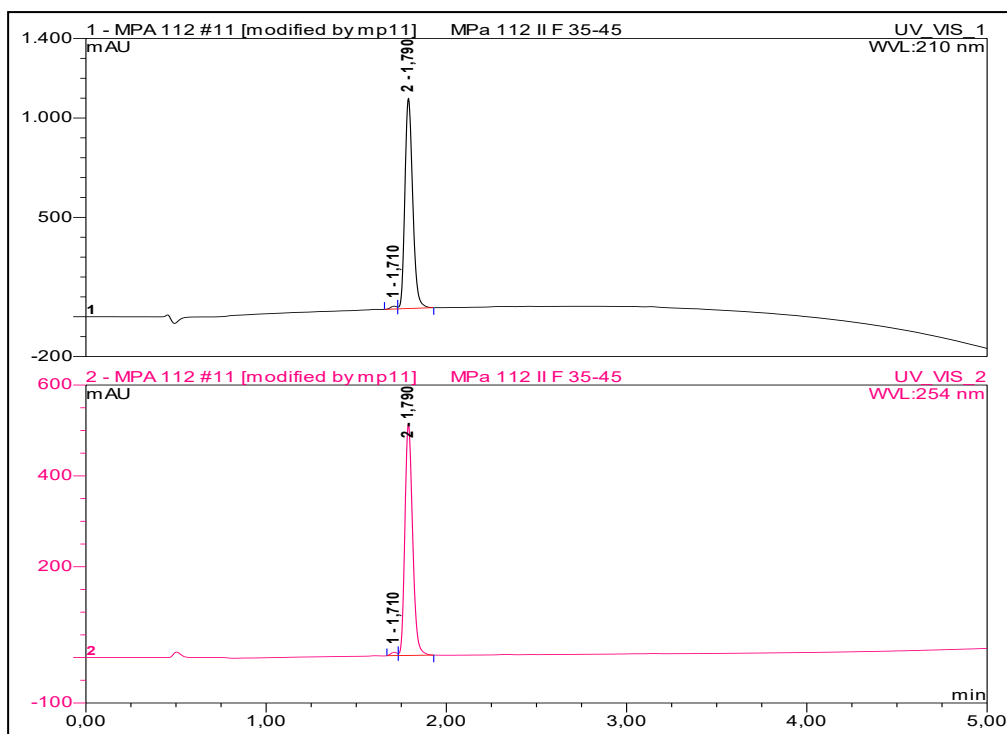
***tert*-Butyl 4-(4-((4-methyl-3-nitrophenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat (3)**



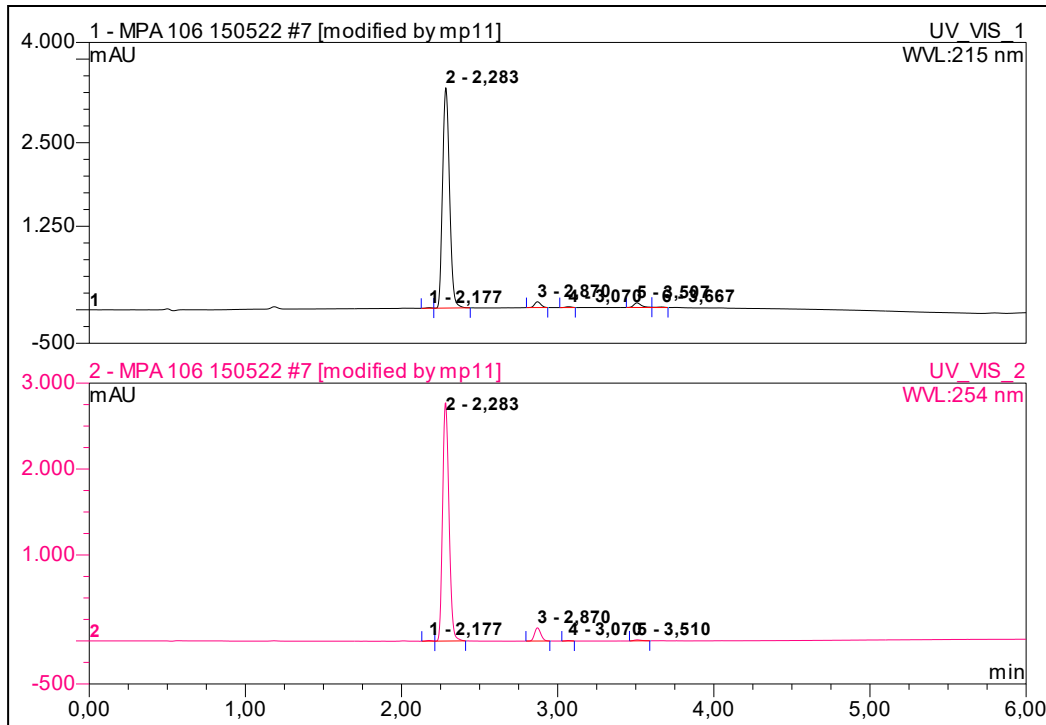
***tert*-Butyl 4-(4-((3-amino-4-methylphenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat (4)**



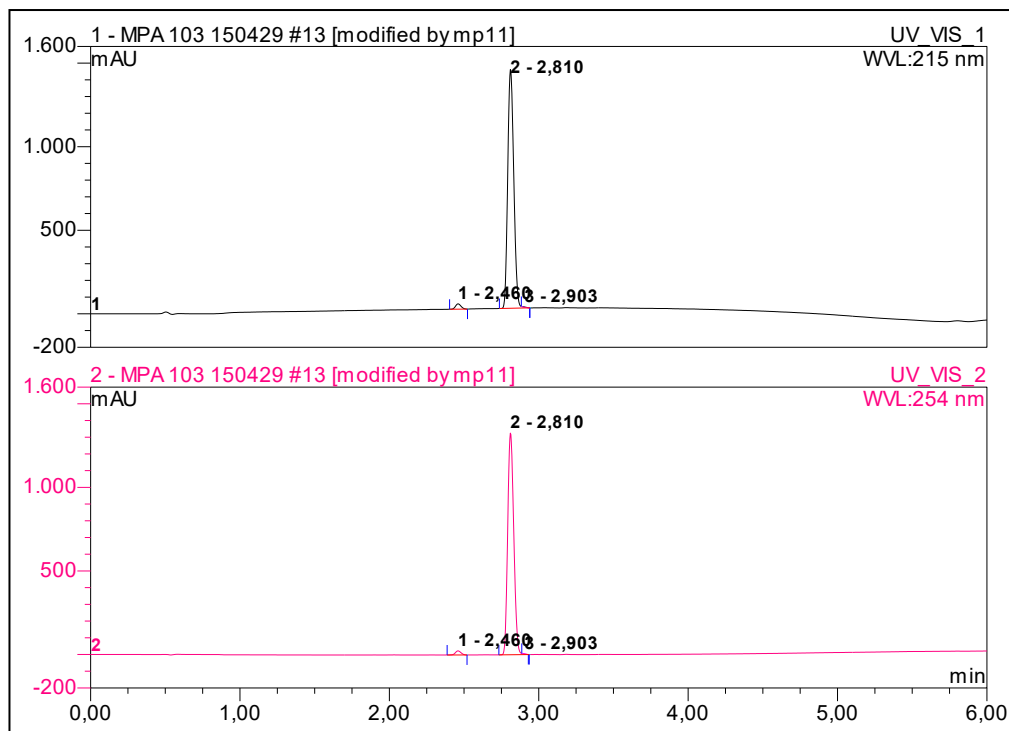
2-Chlor-4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin (5)



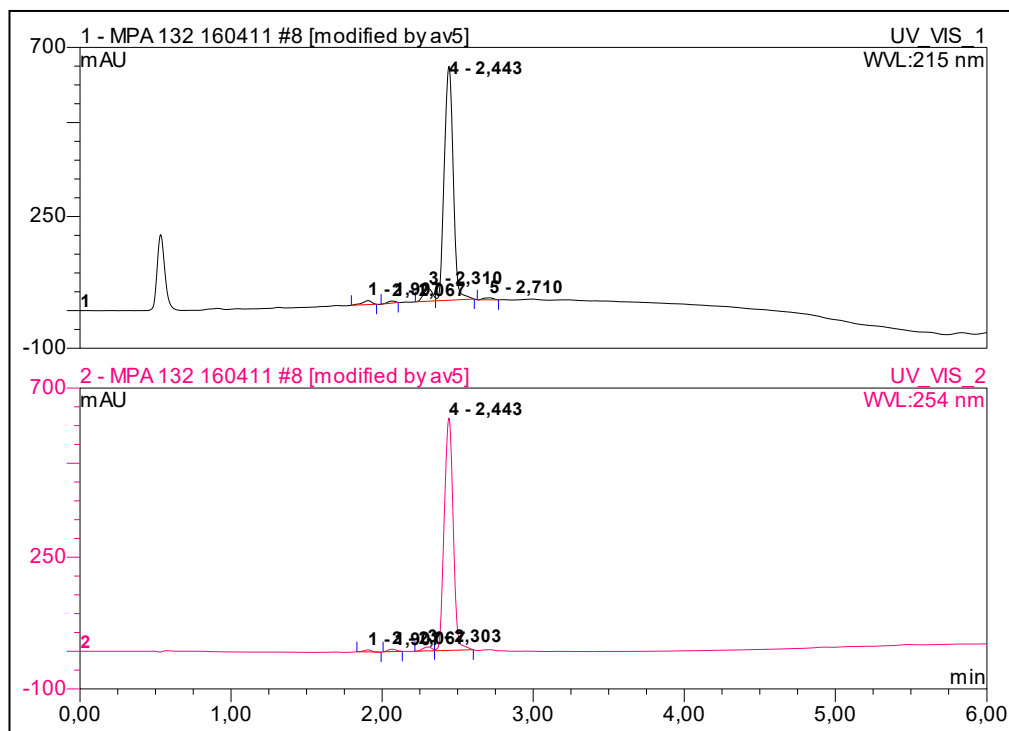
2-Chlor-4-(6-fluoropyridin-3-yl)pyrimidin (6)

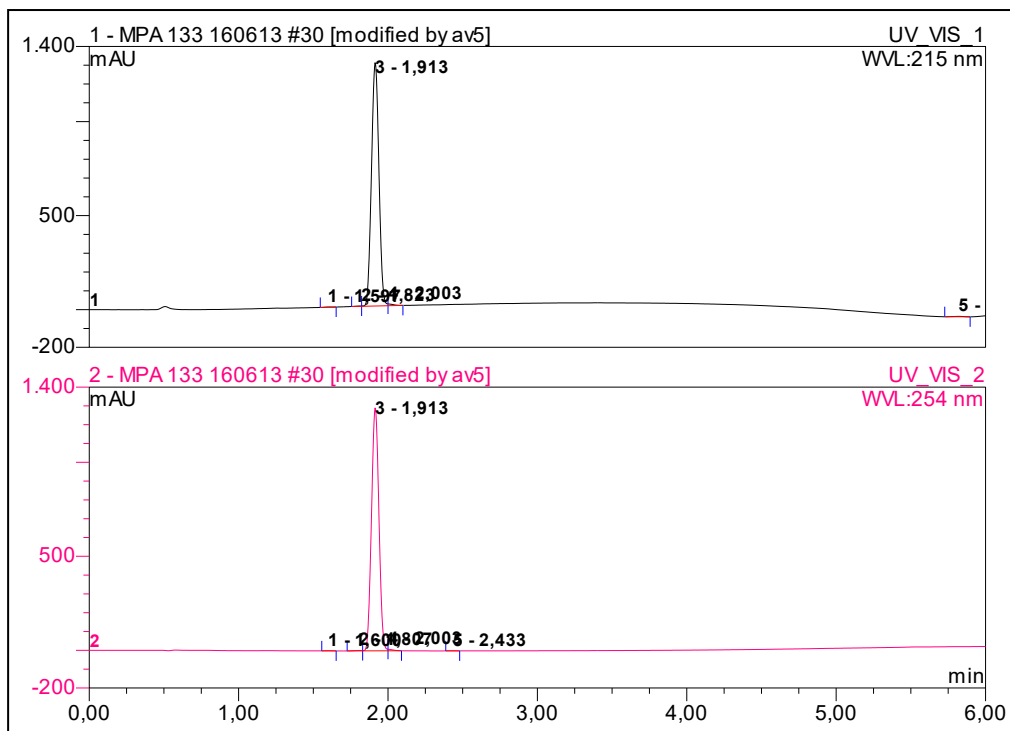
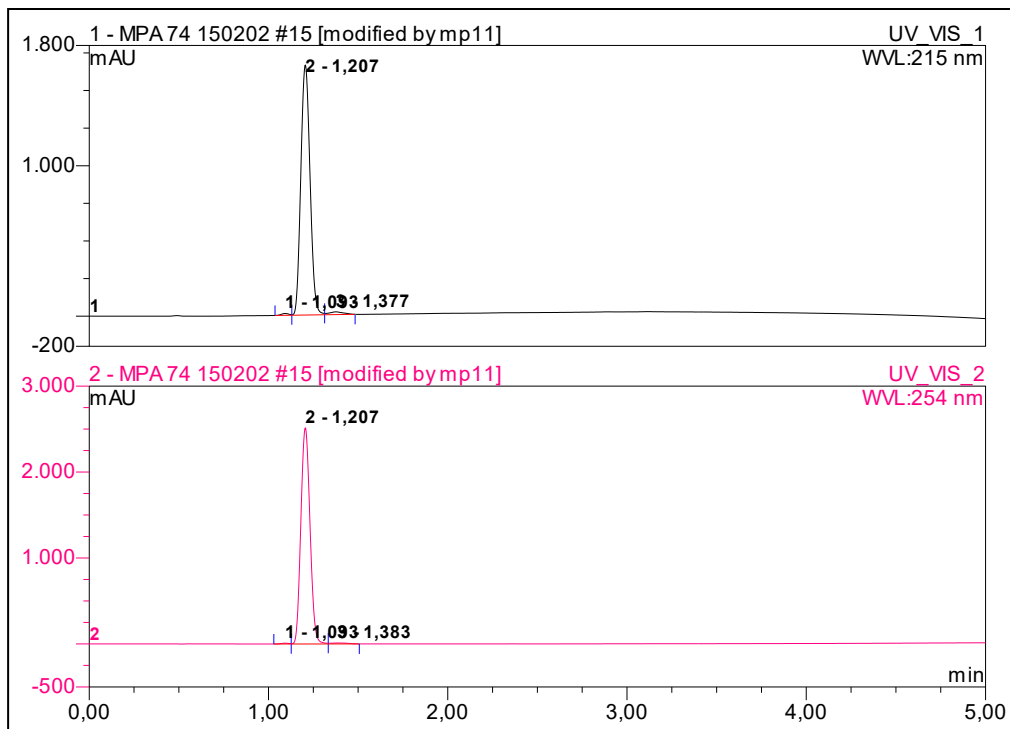


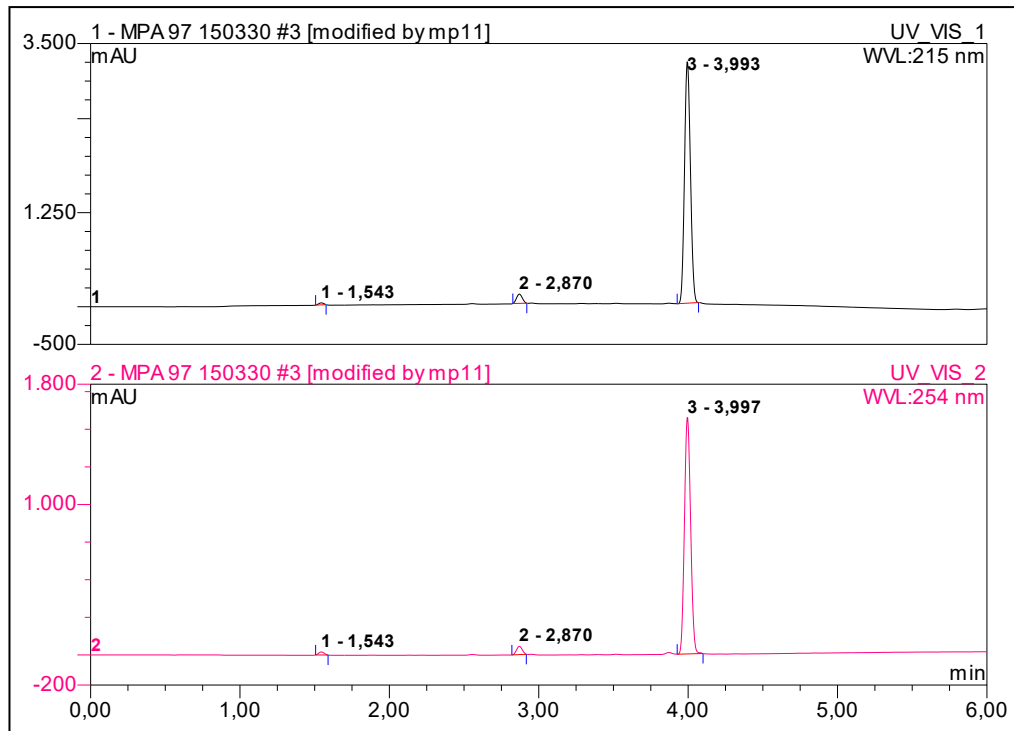
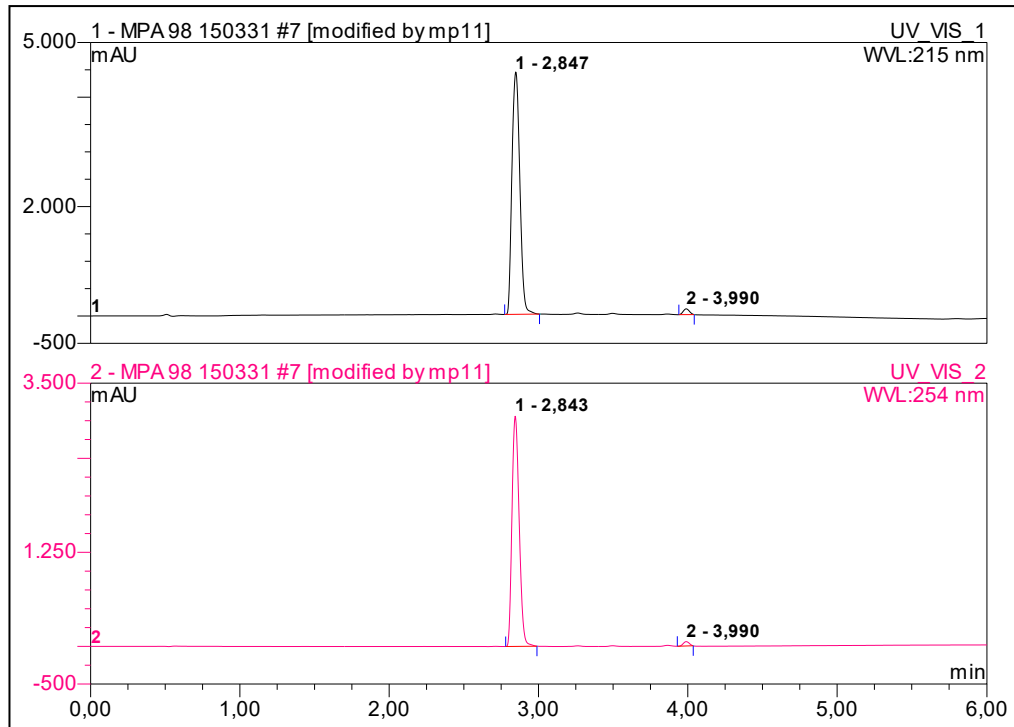
***tert*-Butyl 4-(4-((4-methyl-3-((4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)-carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat („*Boc-Nitroimatib*“) (7)**



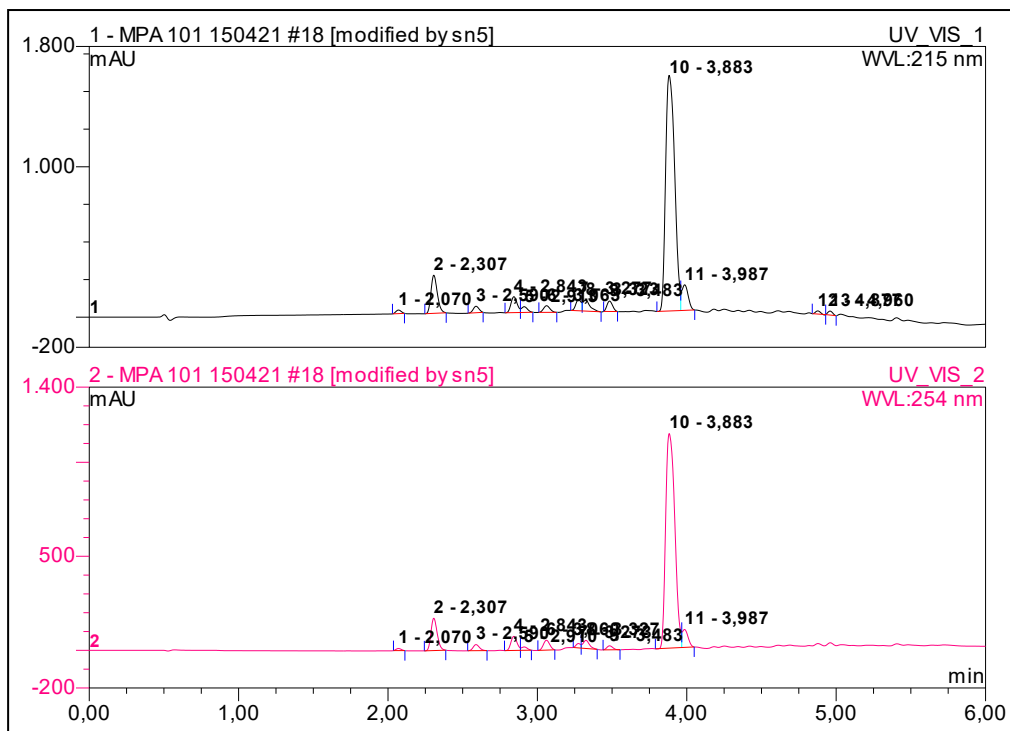
***tert*-Butyl 4-(4-((3-((4-(6-fluoropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)-4-methylphenyl)-carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat („*Boc-Fluorimatib*“) (8)**



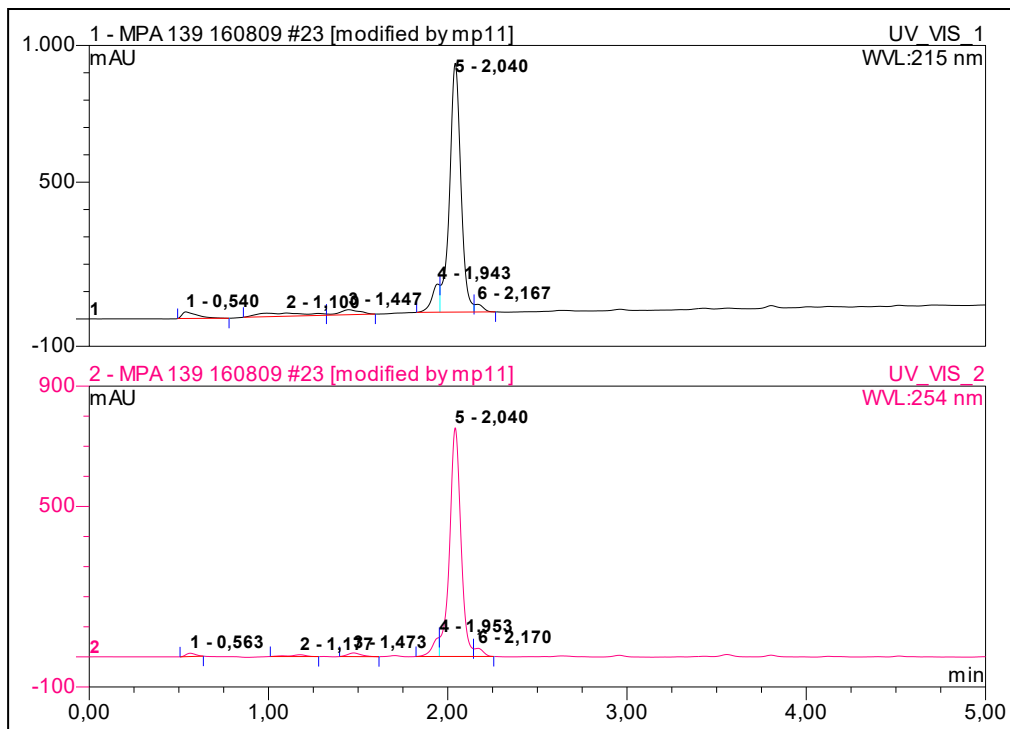
N-(3-((4-(6-fluorpyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)-4-methylphenyl)-4-(piperazin-1-ylmethyl)benzamid („Fluornorimatinib“) (9)**1-(6-Nitropyridin-3-yl)ethan-1-on (10)**

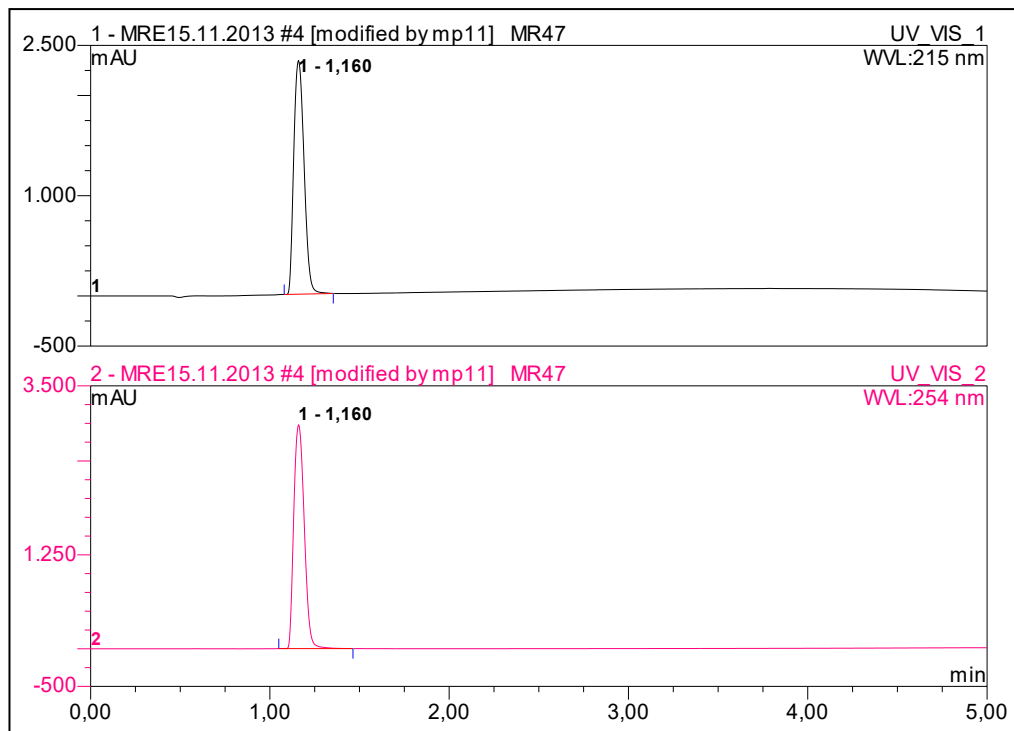
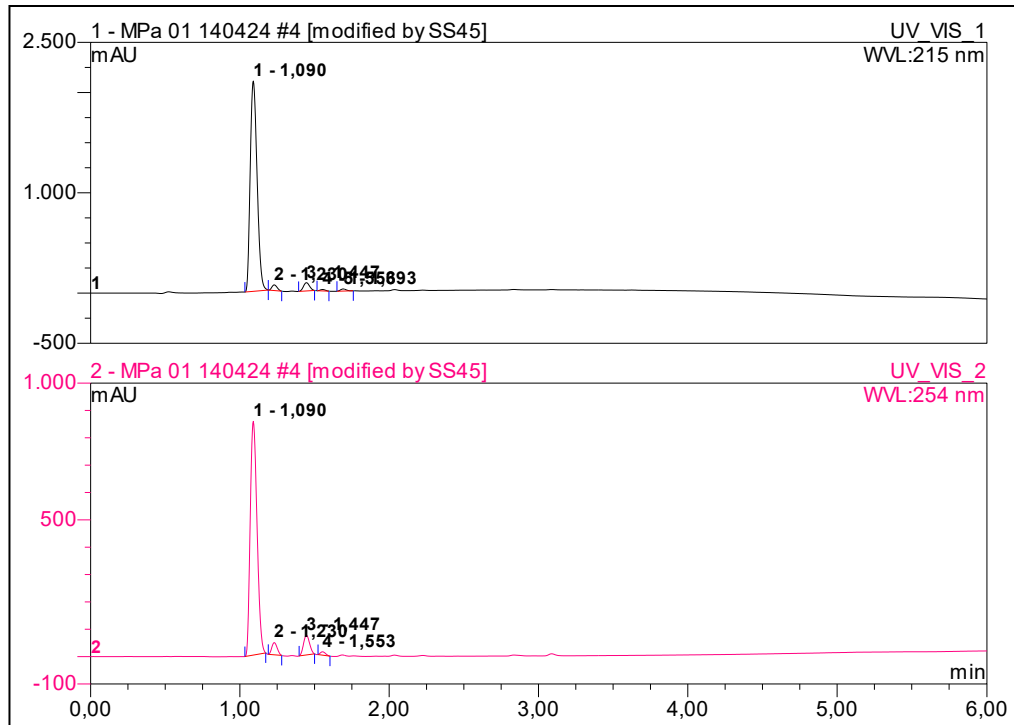
(9H-Fluoren-9-yl)methyl (4-methyl-3-nitrophenyl)carbamate (11)**(9H-Fluoren-9-yl)methyl (3-amino-4-methylphenyl)carbamate (12)**

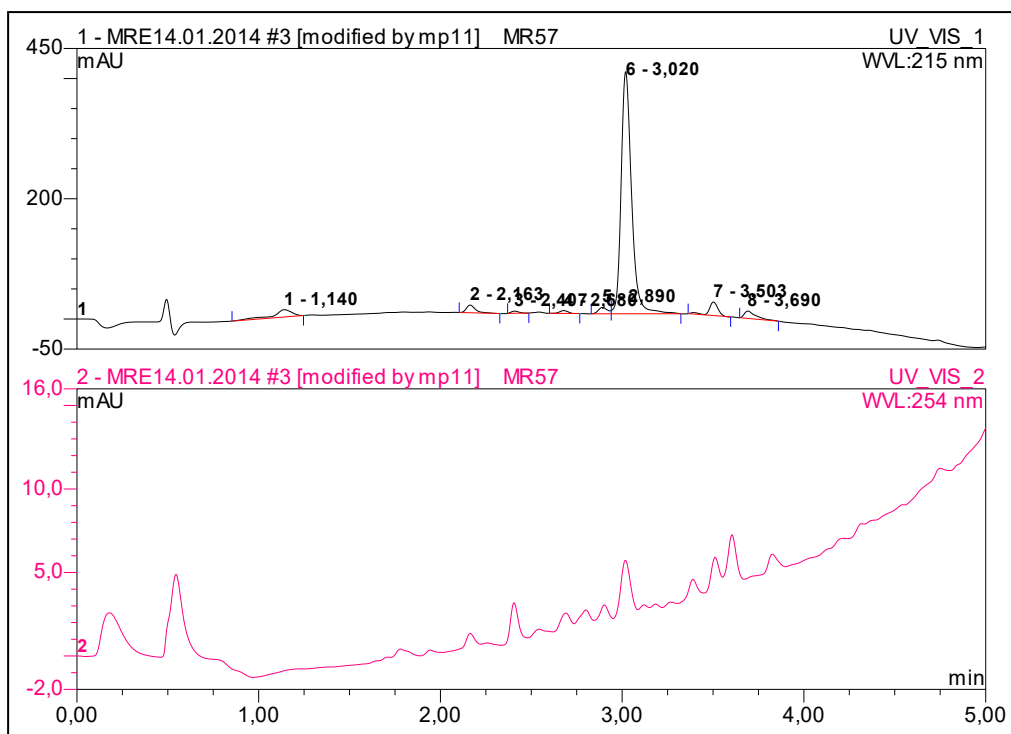
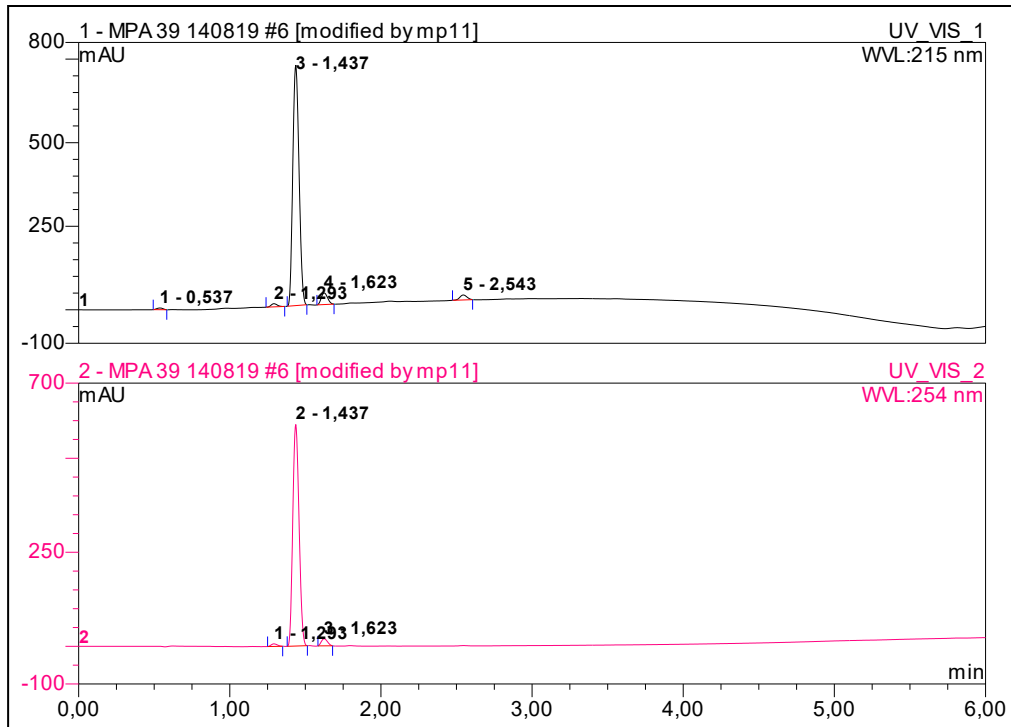
(9H-Fluoren-9-yl)methyl (4-methyl-3-((4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbamate (13)



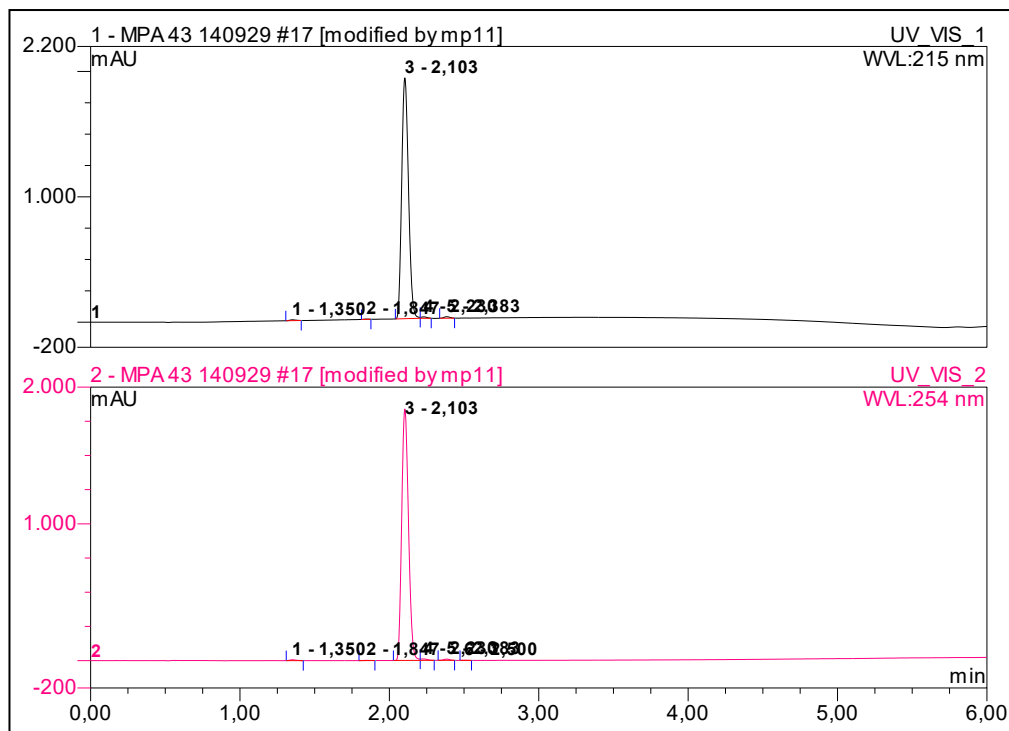
6-Methyl-*N*¹-(4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)benzol-1,3-diamin (14)



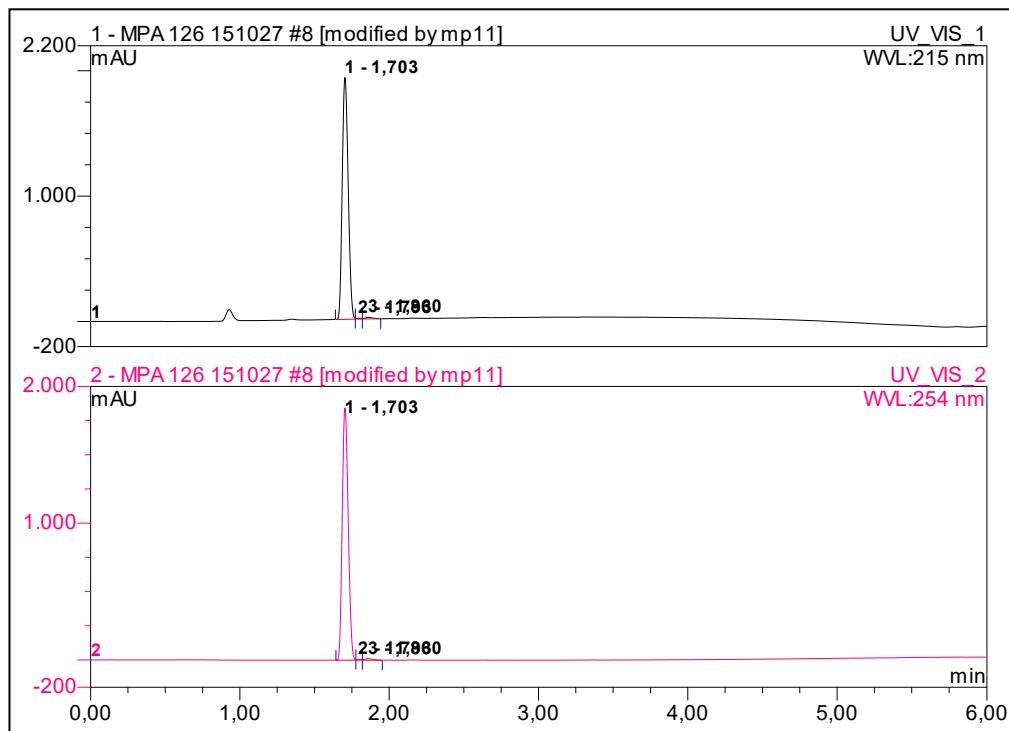
3-(Dimethylamin)-1-(pyridin-3-yl)prop-2-en-1-on (15)**1-(2-Methyl-5-nitrophenyl)guanidin (16)**

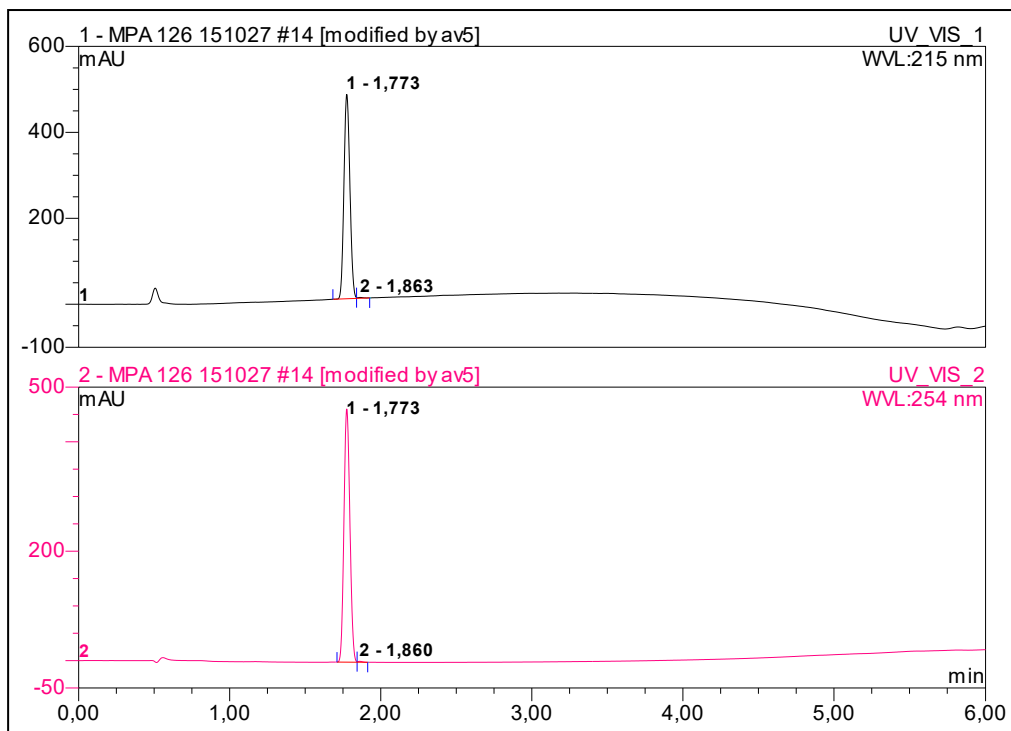
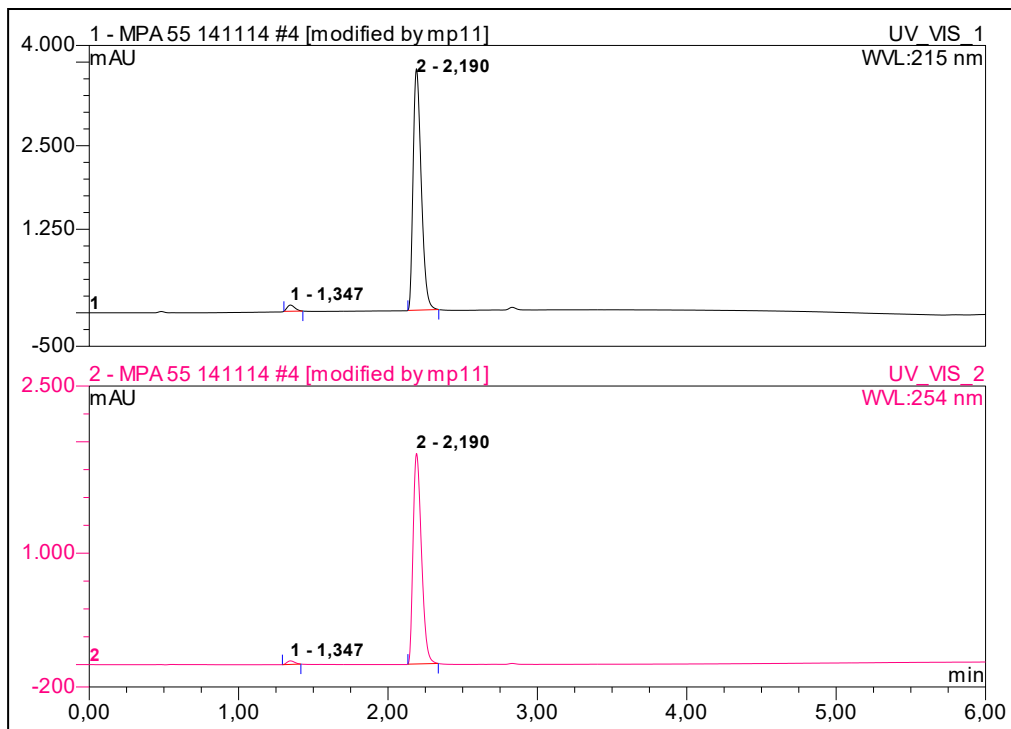
N-(2-Methyl-5-nitrophenyl)-4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amin (17)**6-Methyl-N¹-(4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)benzol-1,3-diamin (18)**

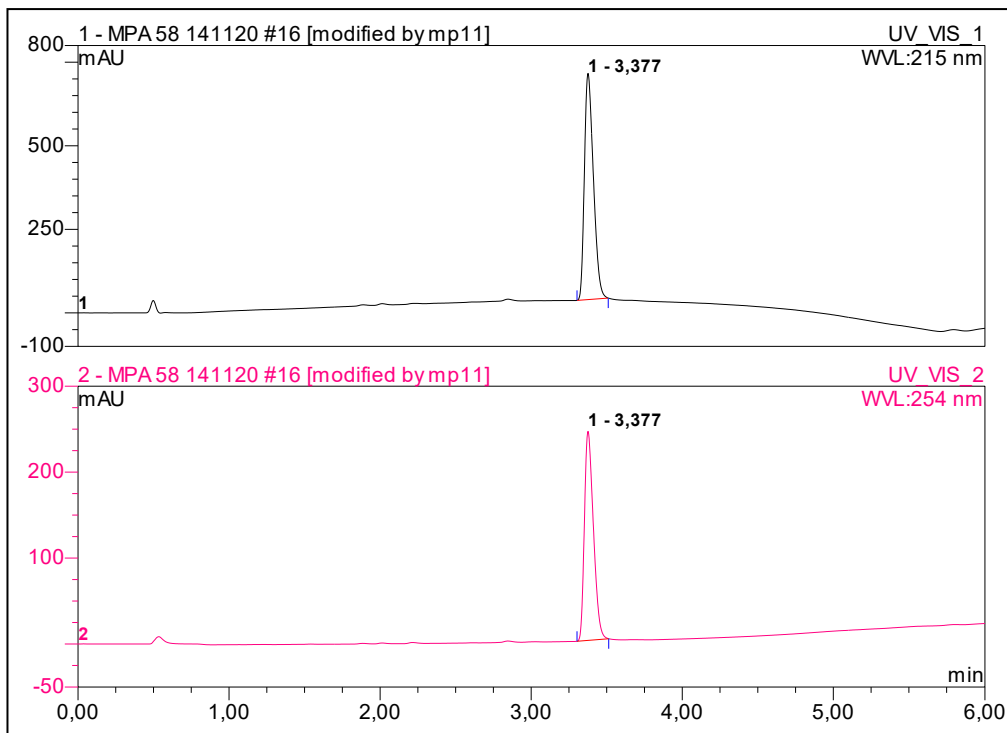
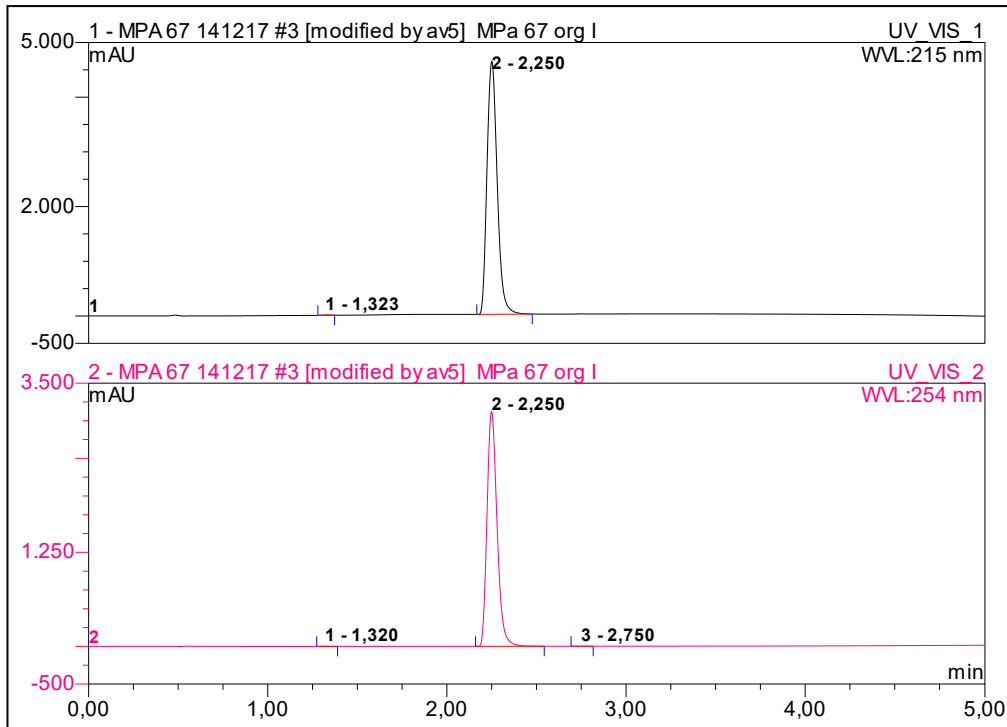
tert-Butyl 4-(4-((4-methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat („Boc-Imatinib“) (19)

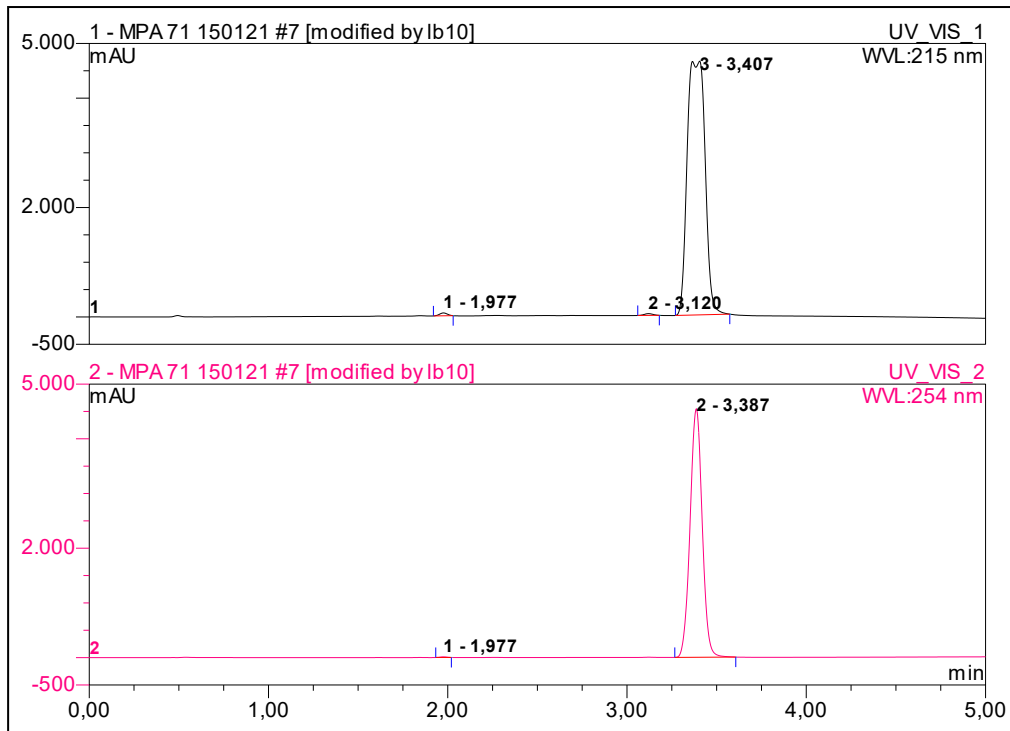
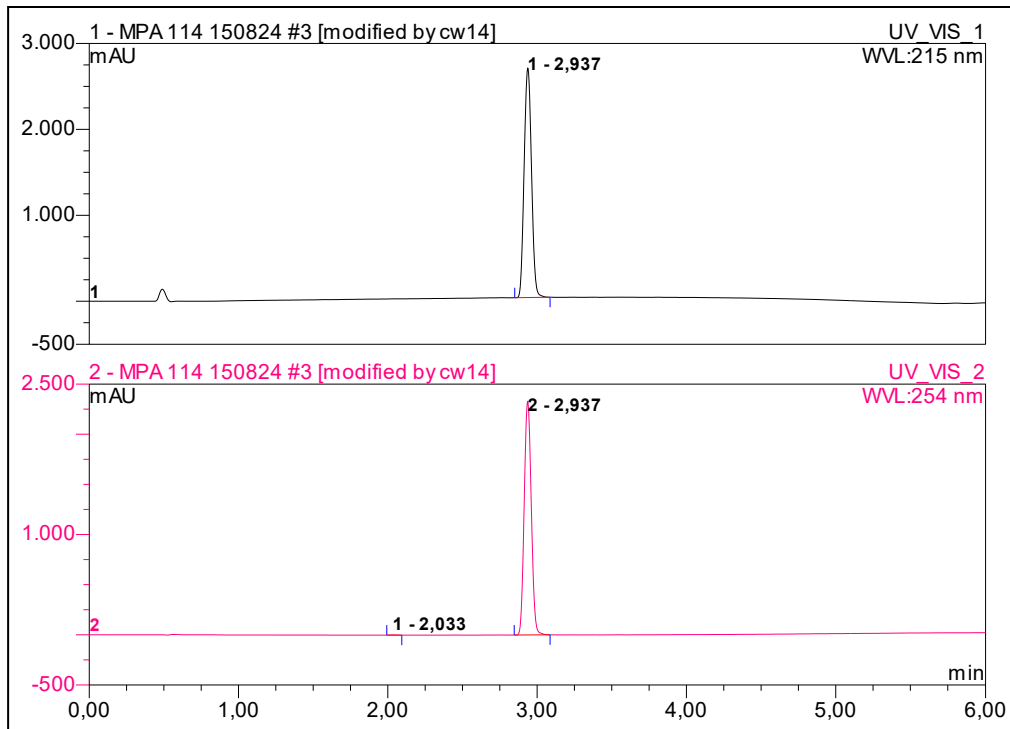


N-(4-Methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)-4-(piperazin-1-ylmethyl)benzamid („Norimatinib“) (20)

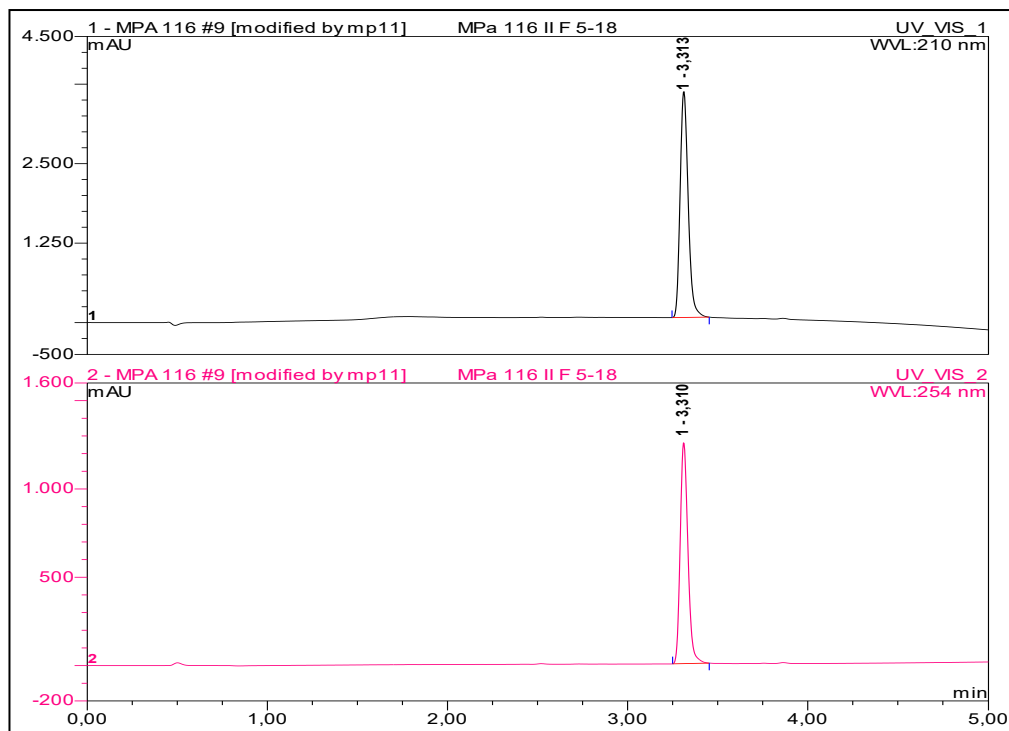


4-((4-(2-Fluorethyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-(4-methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)benzamid („Fluorethyl-Imatinib“, SKI696) (21)**N-Benzyl-4-phenylthiazol-2-amin (22)**

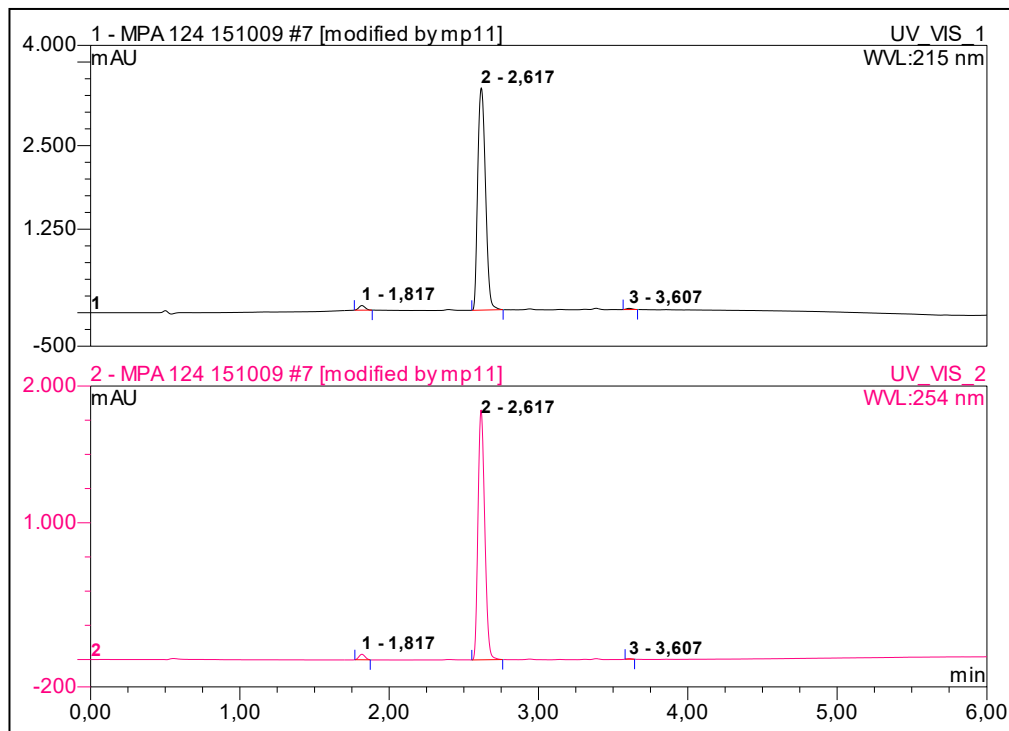
N*-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)benzamid („*E*_{act}“) (23)**N*-benzyl-4-(4-fluorophenyl)thiazol-2-amin (24)**

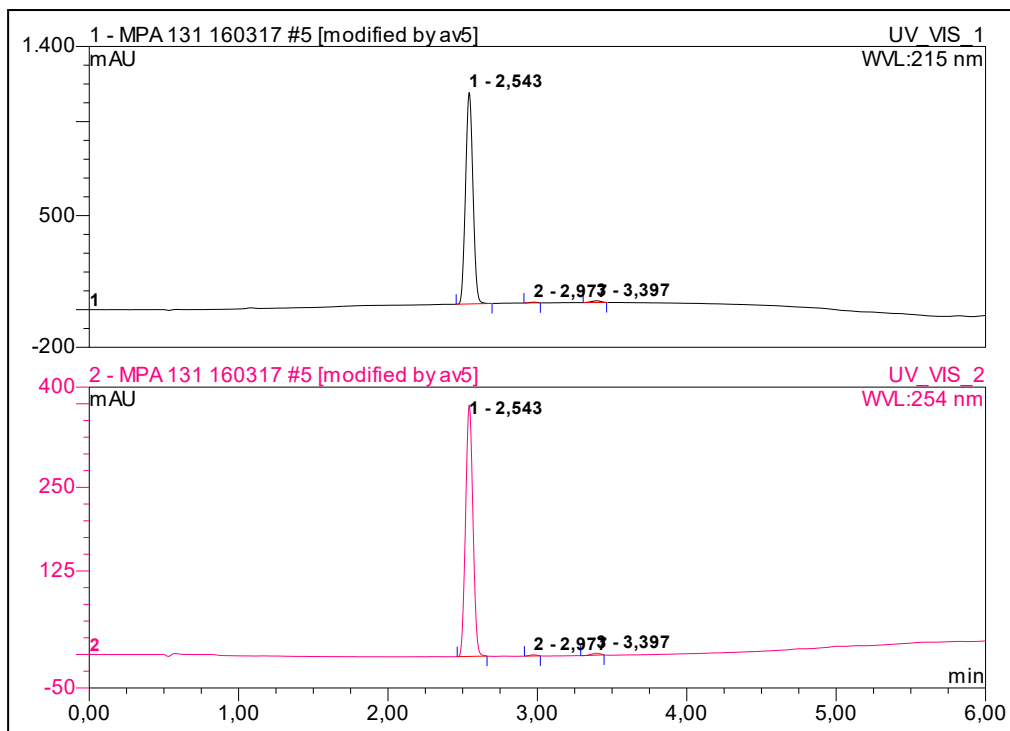
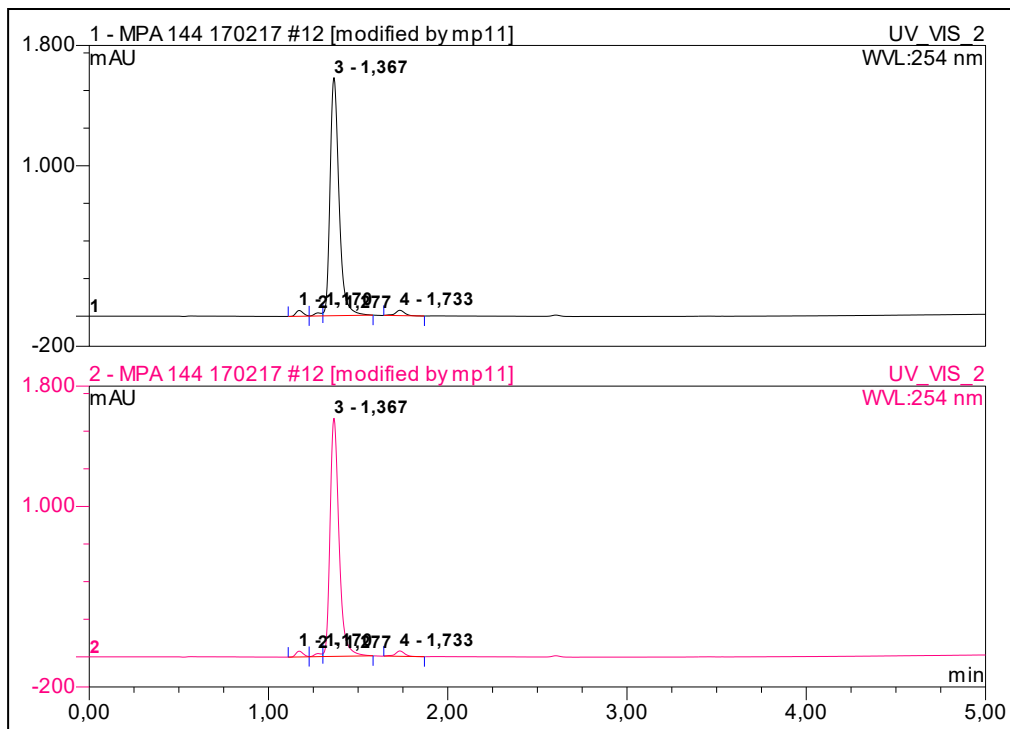
N-Benzyl-N-(4-(4-fluorophenyl)thiazol-2-yl)-3,4,5-trimethoxybenzamid („Fluor-DOG1“) (25)**N-Benzyl-4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-amin (26)**

***N*-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-*N*-(4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-yl)benzamid („Nitro-DOG1“) (27)**

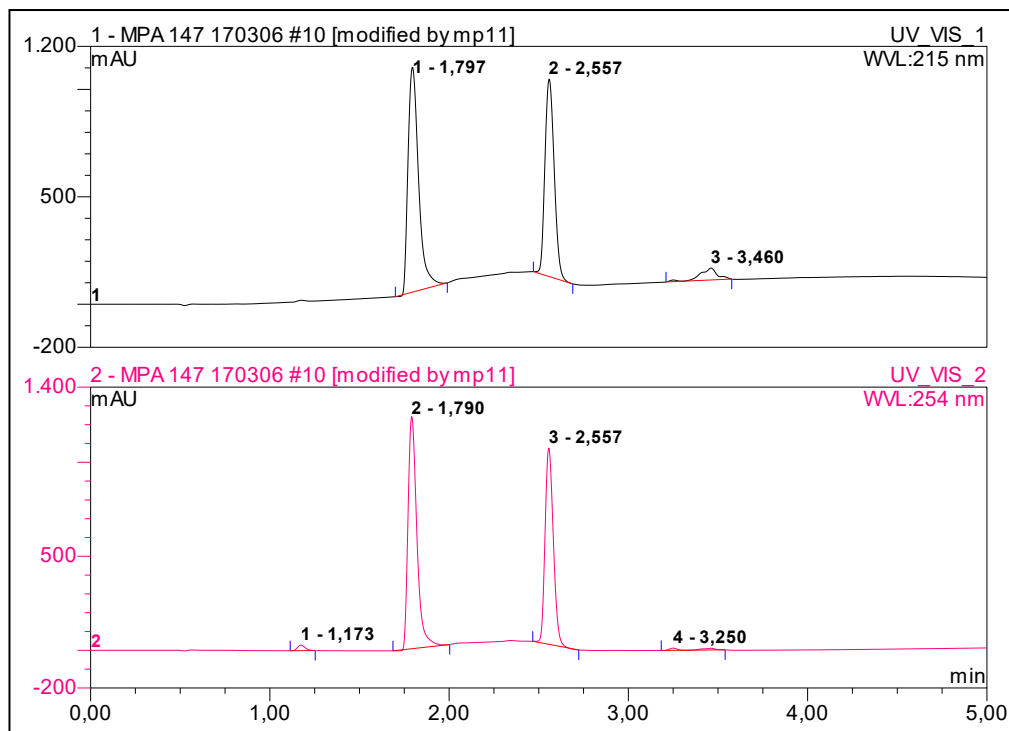


***N*-(4-(4-Aminophenyl)thiazol-2-yl)-*N*-benzyl-3,4,5-trimethoxybenzamid (28)**

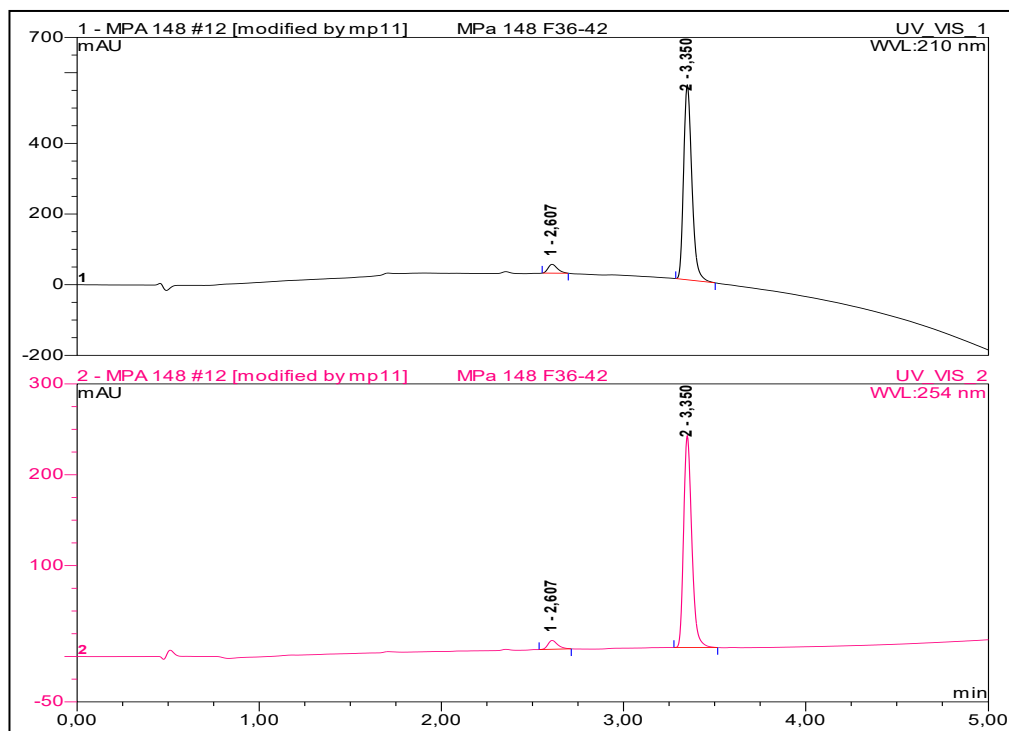


N-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-N-(4-(4-(piperidin-1-yl)diazenyl)phenyl)thiazol-2-yl)benzamid („Triazen-DOG1“) (29)**2-Brom-1-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)ethan-1-on (30)**

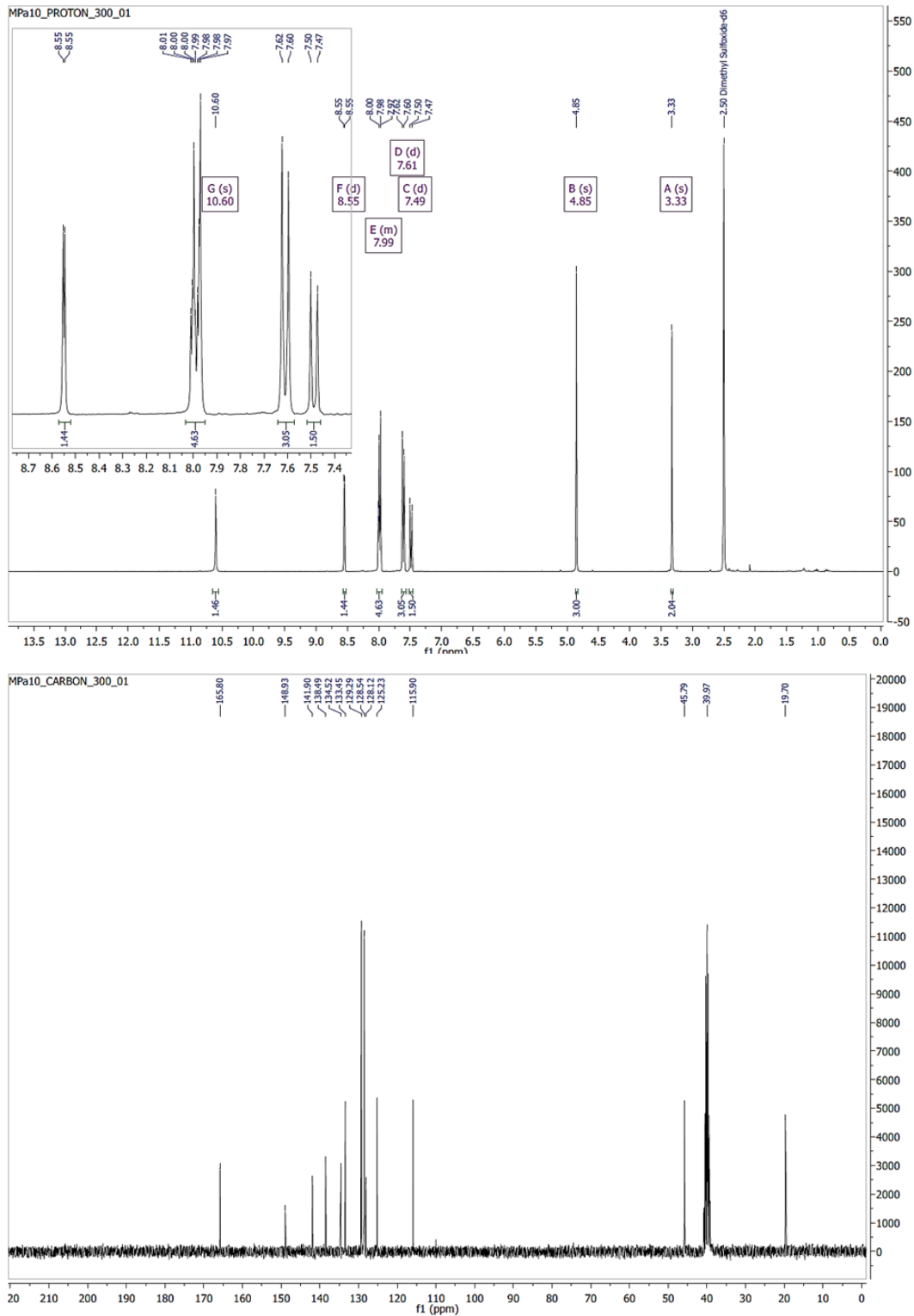
***N*-Benzyl-4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)thiazol-2-amin
(31)**

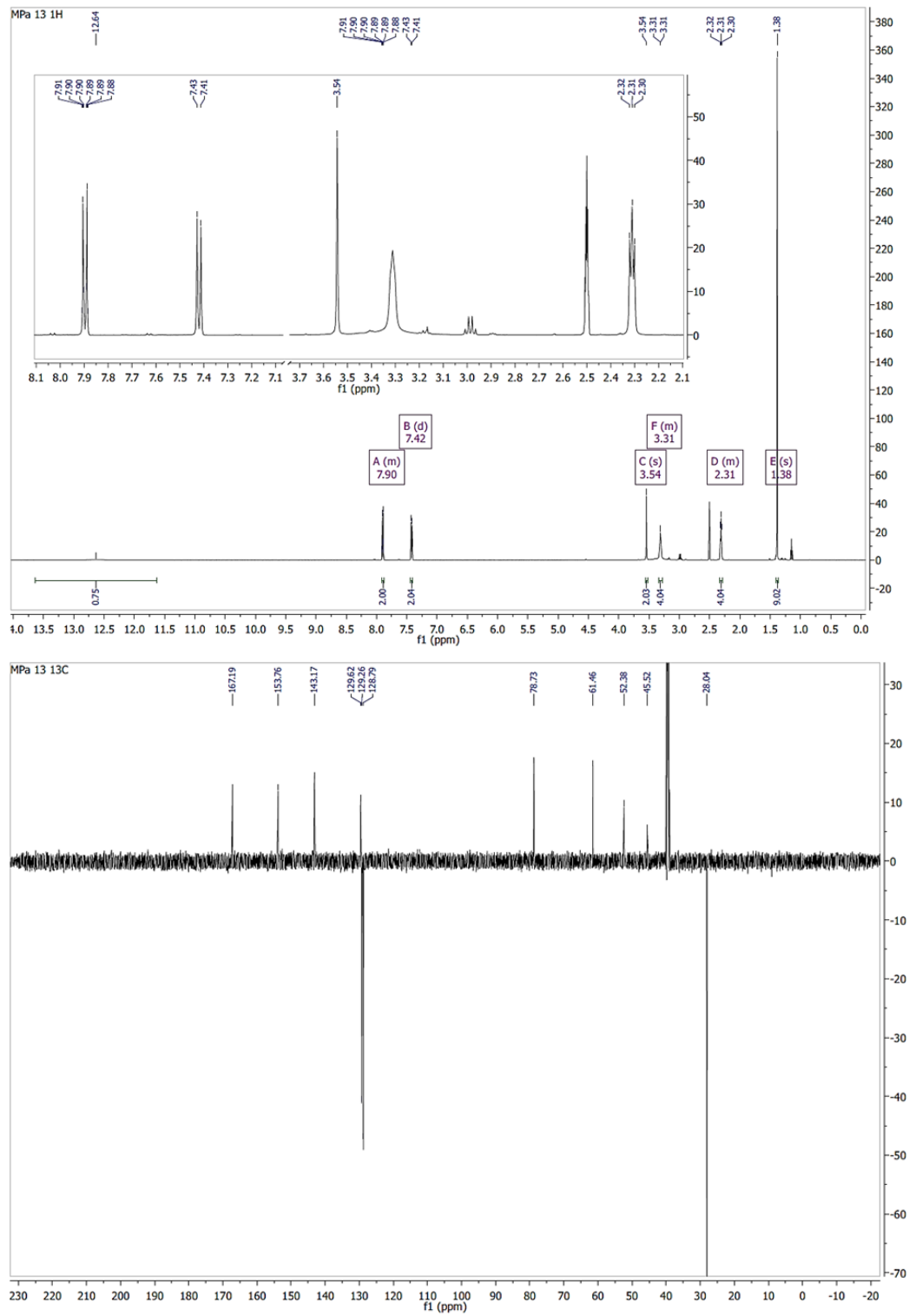


***N*-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-*N*-(4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)thiazol-2-yl)benzamid („*BPin-DOG1*“) (32)**

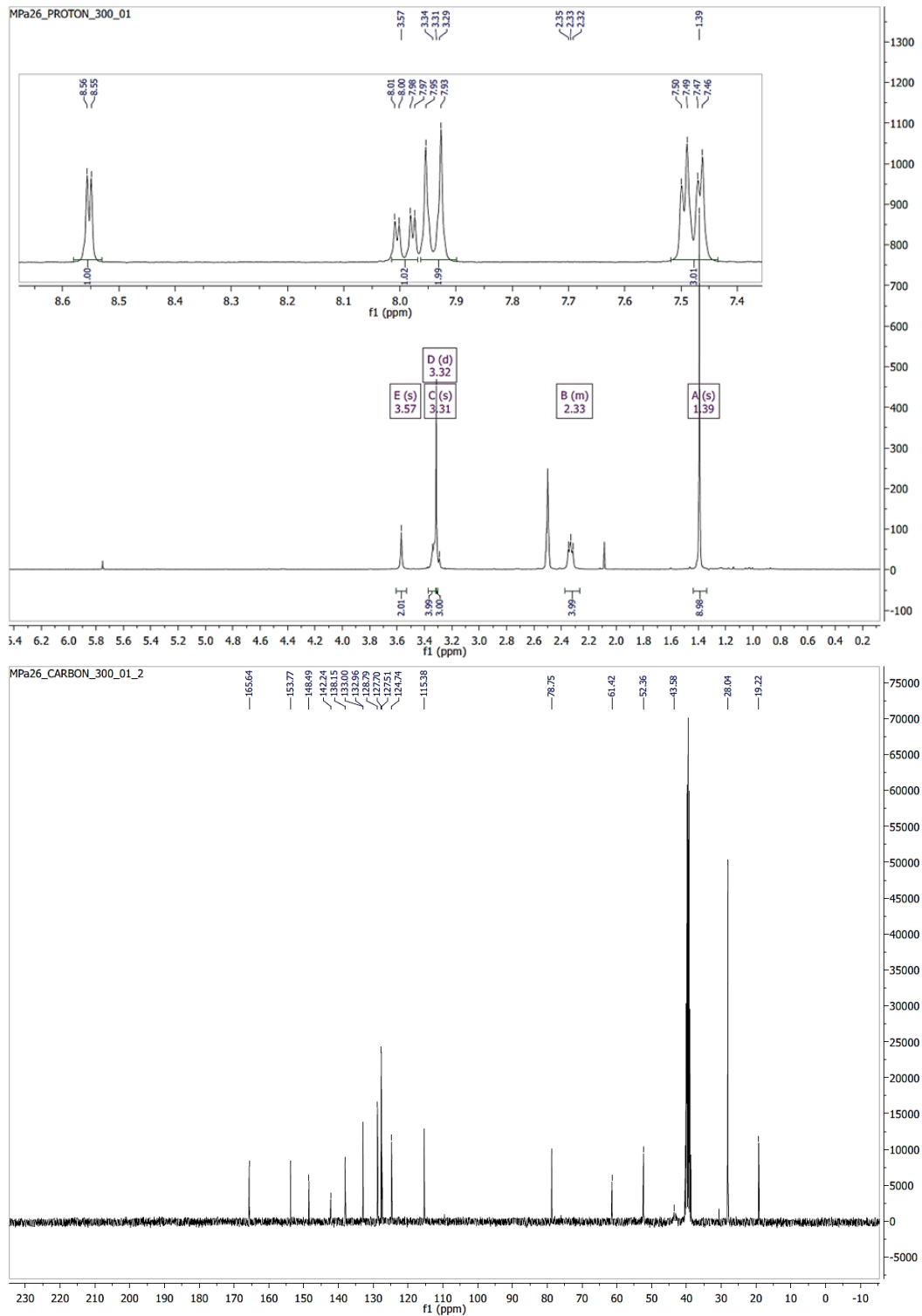


7.4 NMR-Spektren

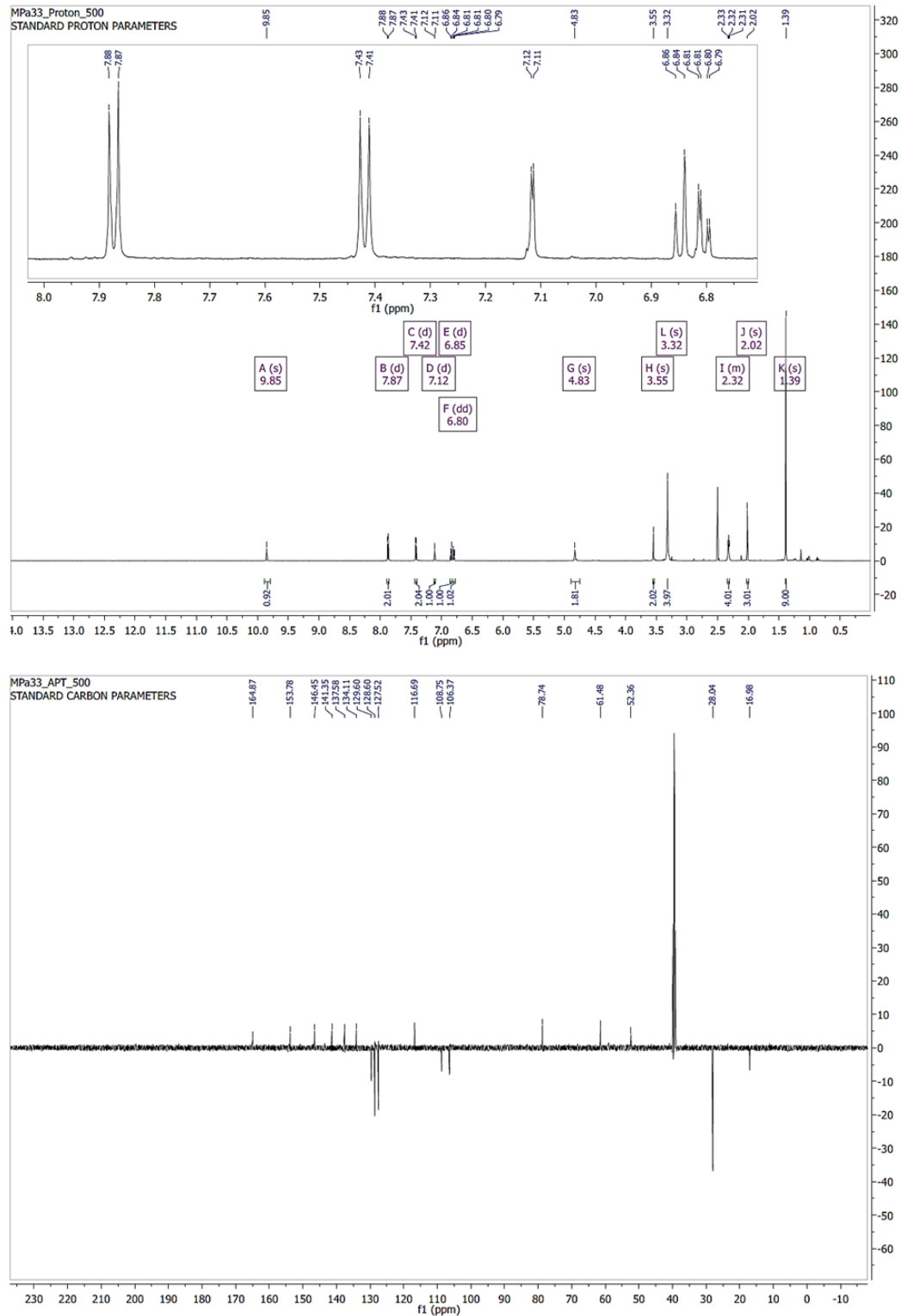
4-(Chlormethyl)-*N*-(4-methyl-3-nitrophenyl)benzamid (1)

4-((4-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperazin-1-yl)methyl)benzoesäure (2)

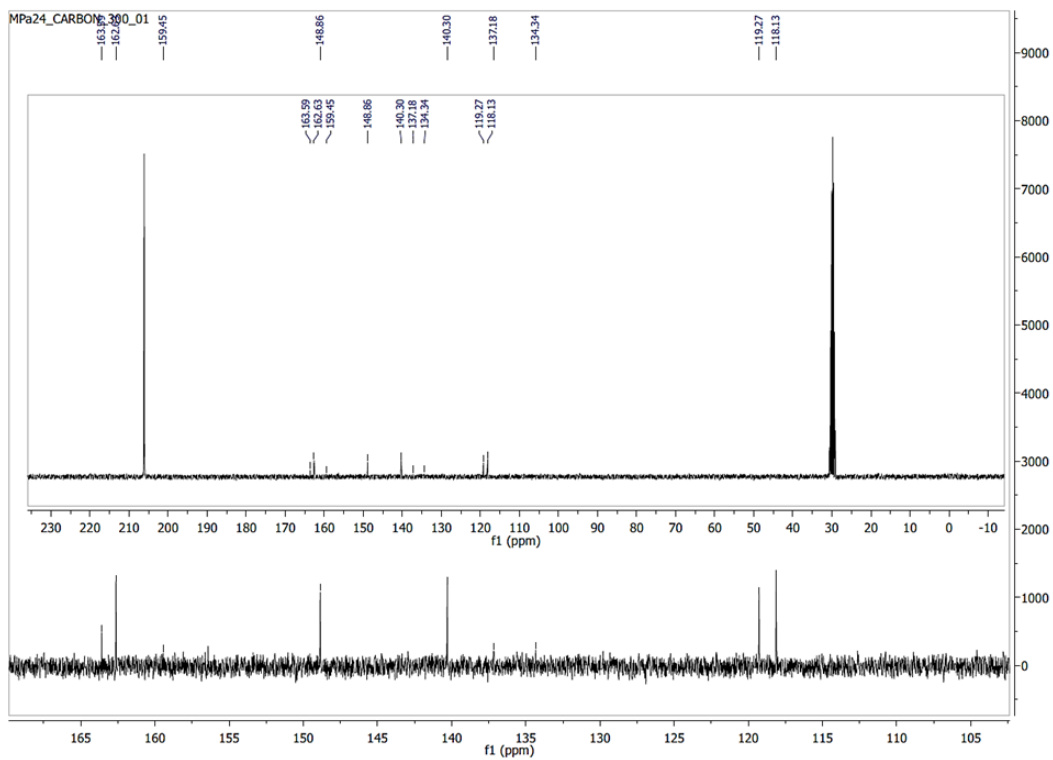
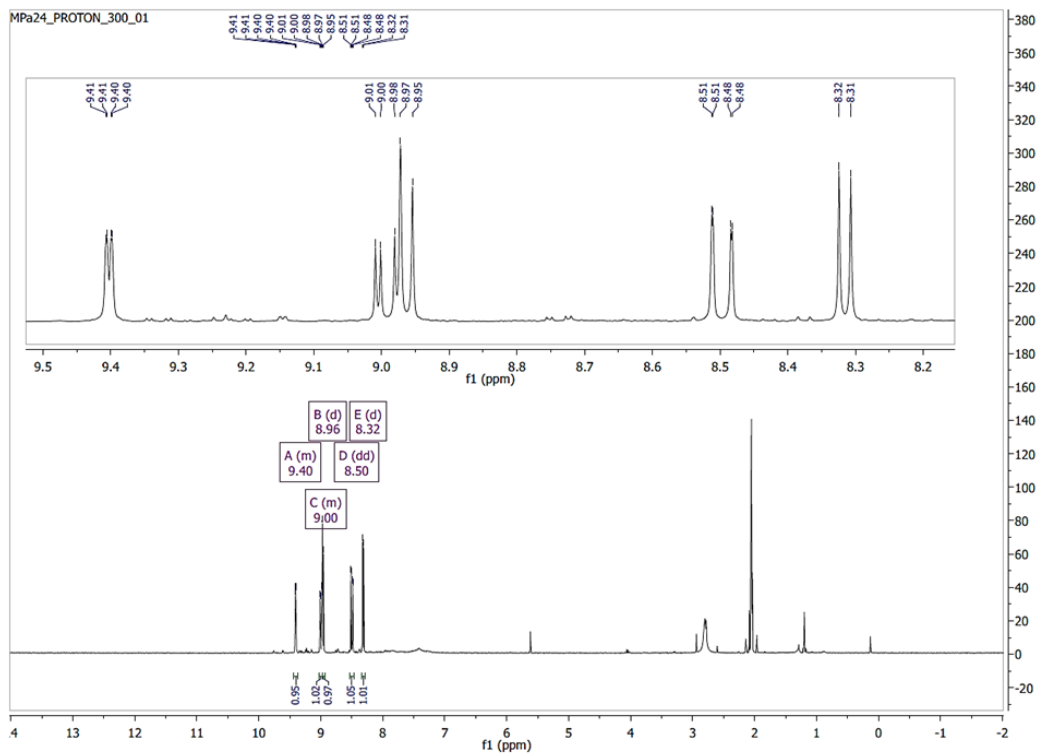
**tert-Butyl 4-(4-((4-methyl-3-nitrophenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat
(3)**



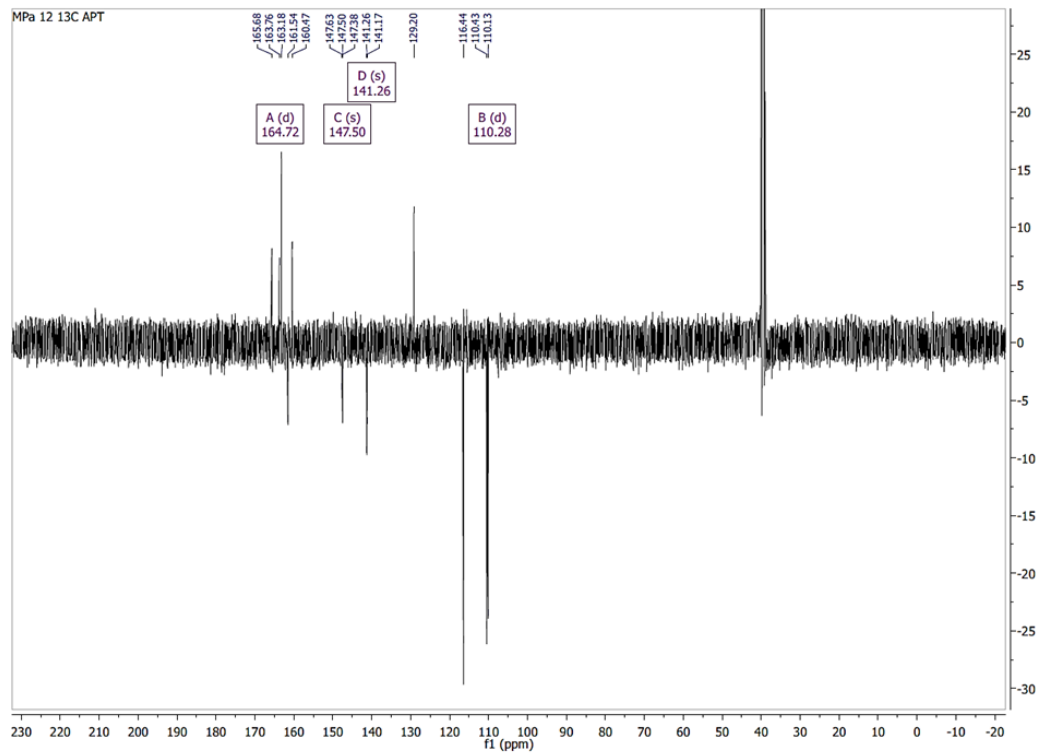
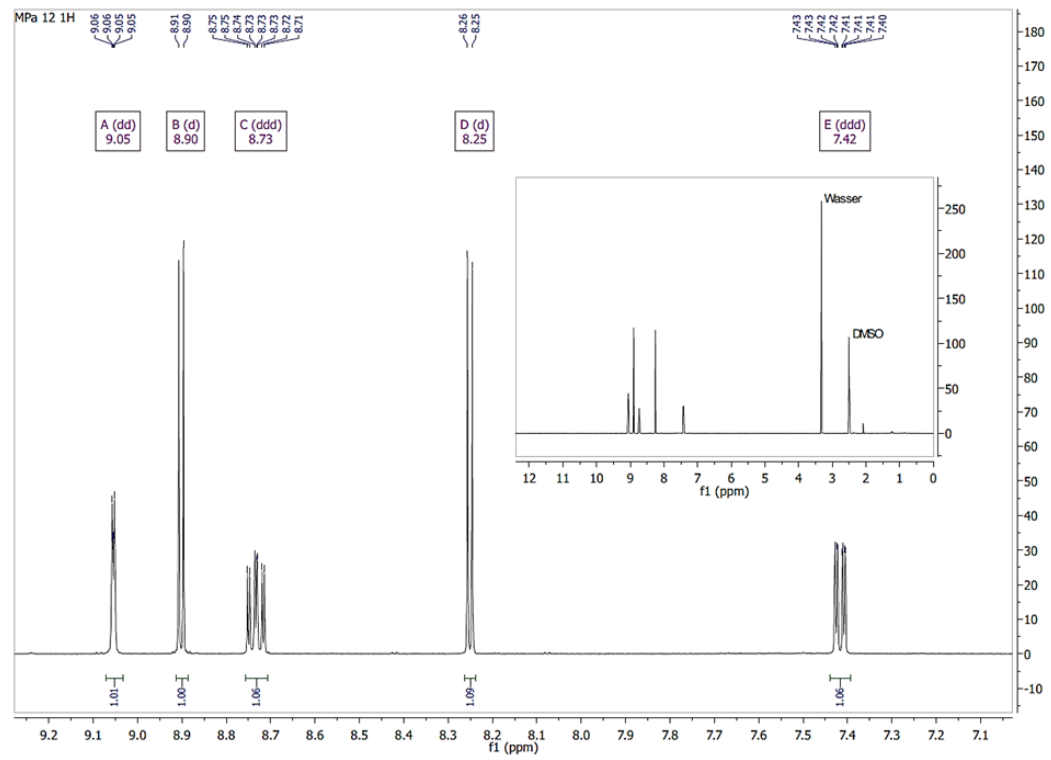
tert-Butyl 4-(4-((3-amino-4-methylphenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat (4)



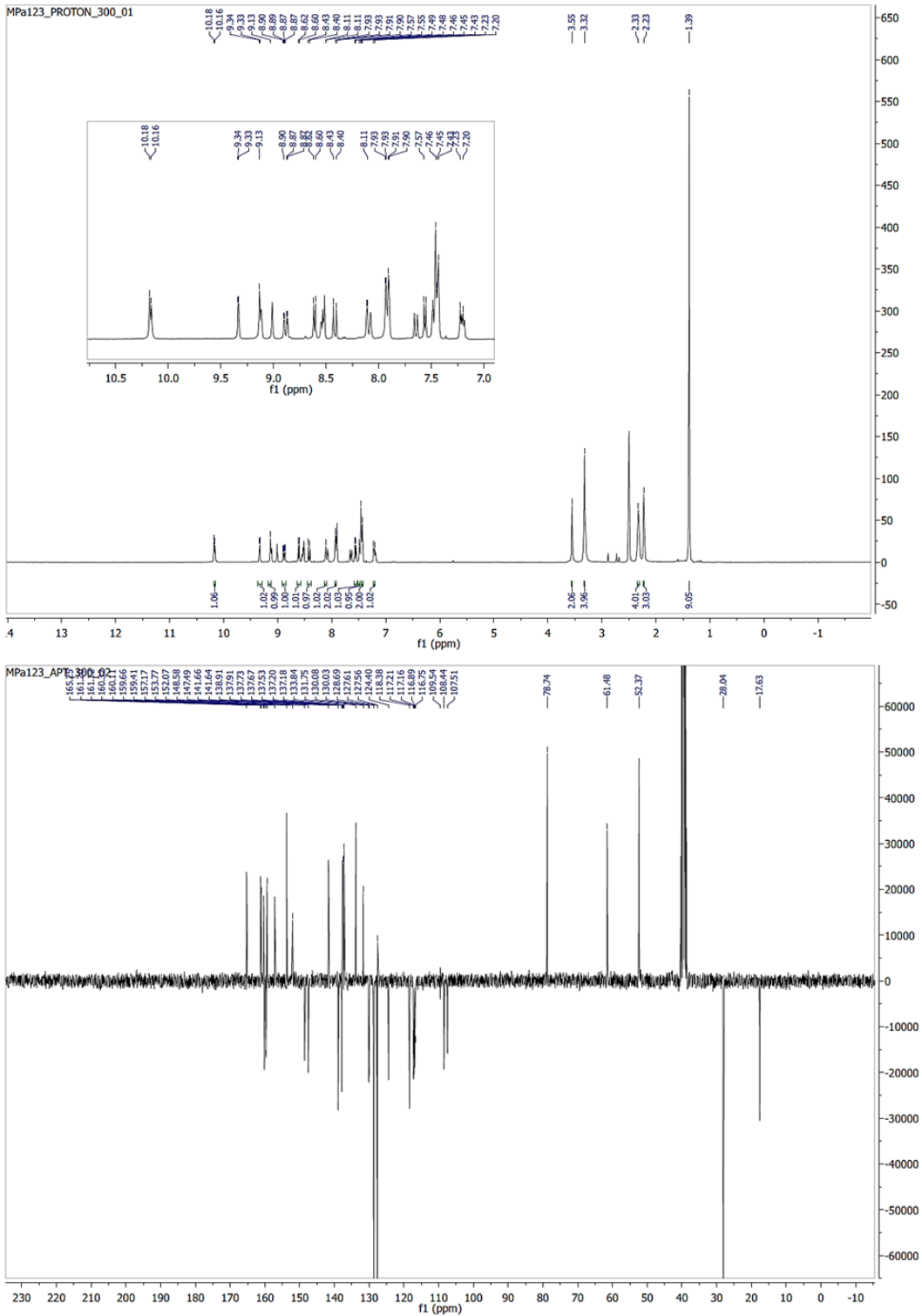
2-Chlor-4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin (5)



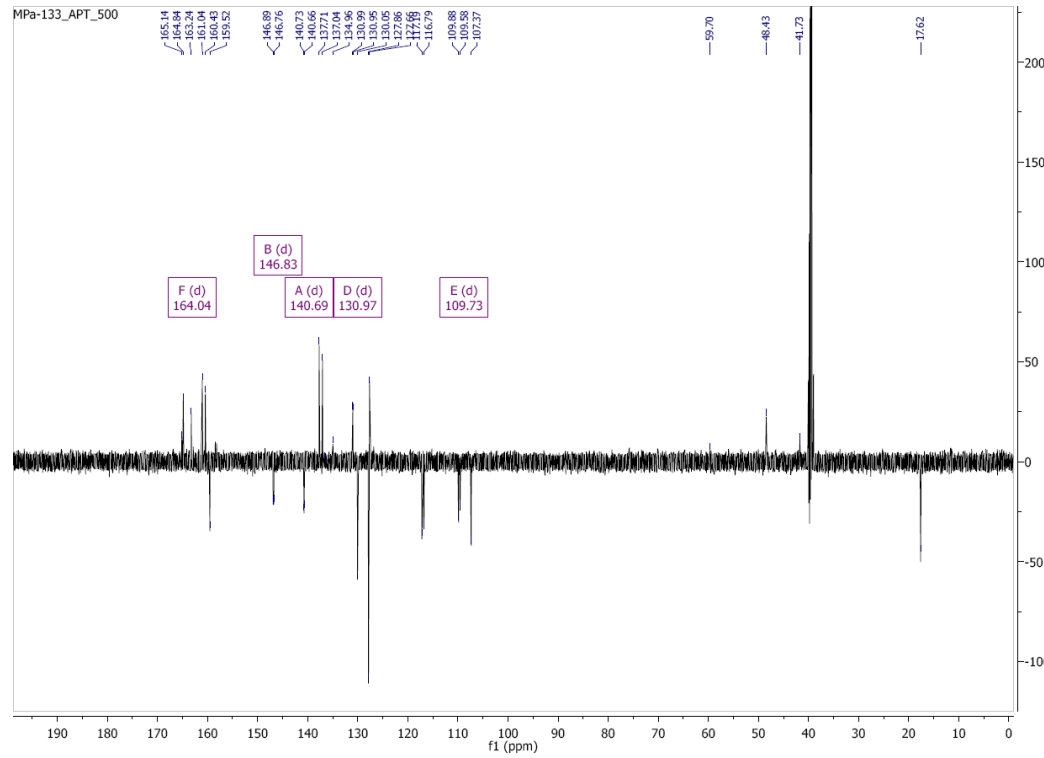
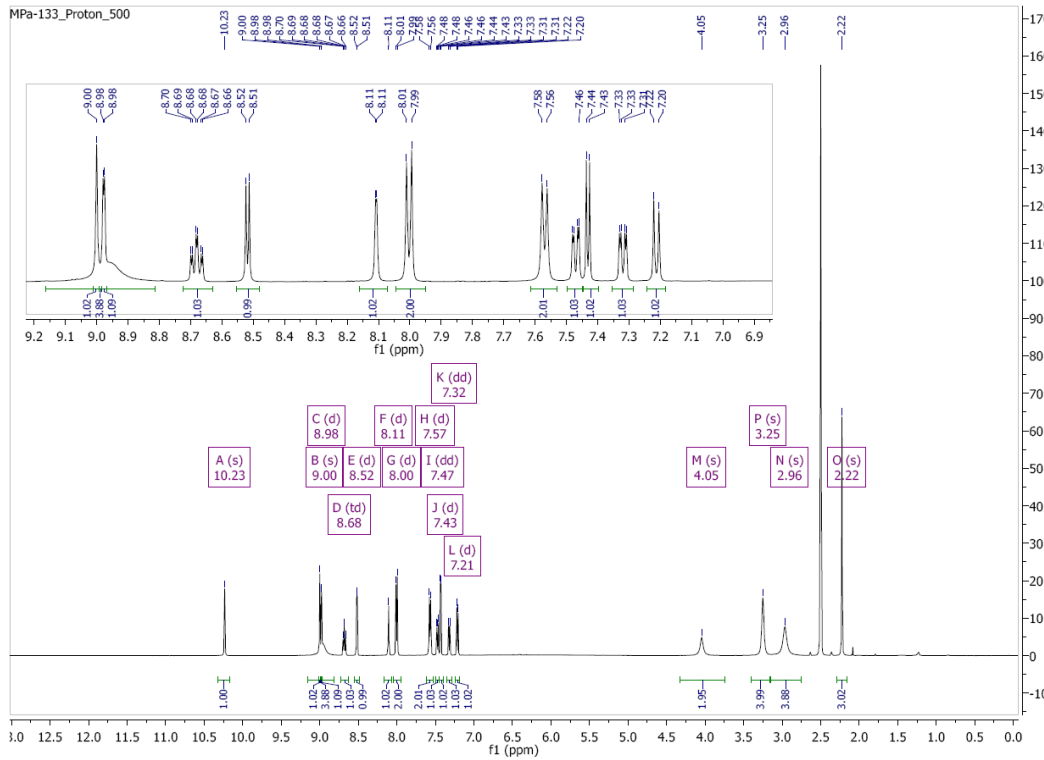
2-Chlor-4-(6-fluorpyridin-3-yl)pyrimidin (6)



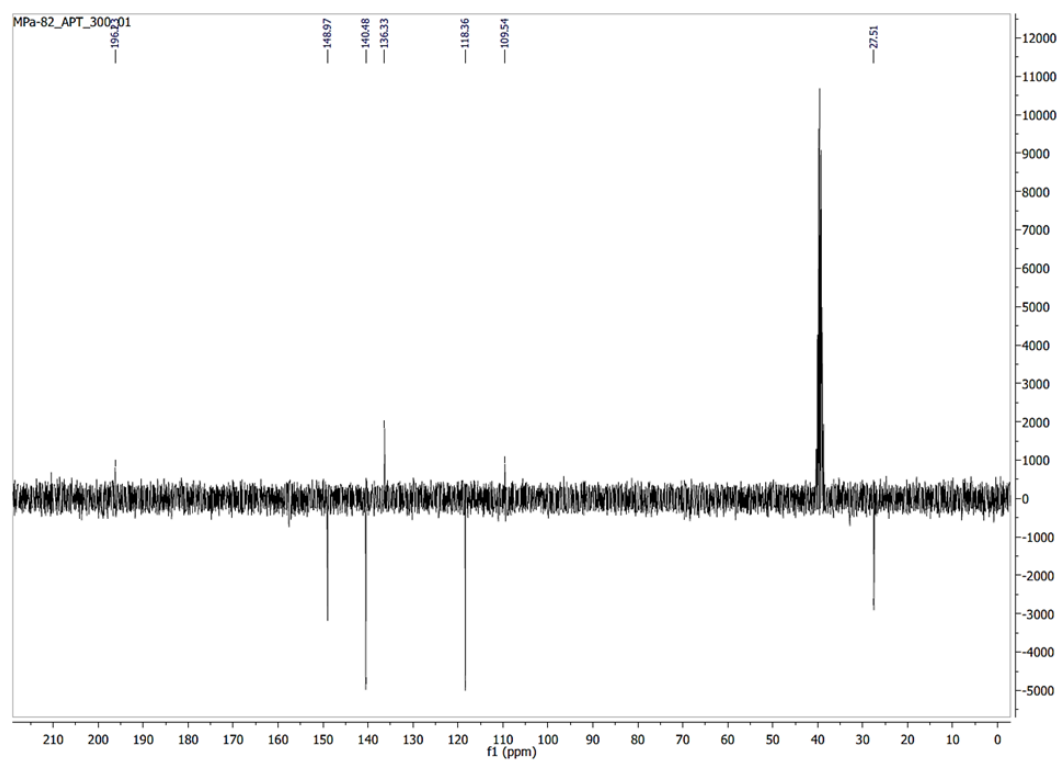
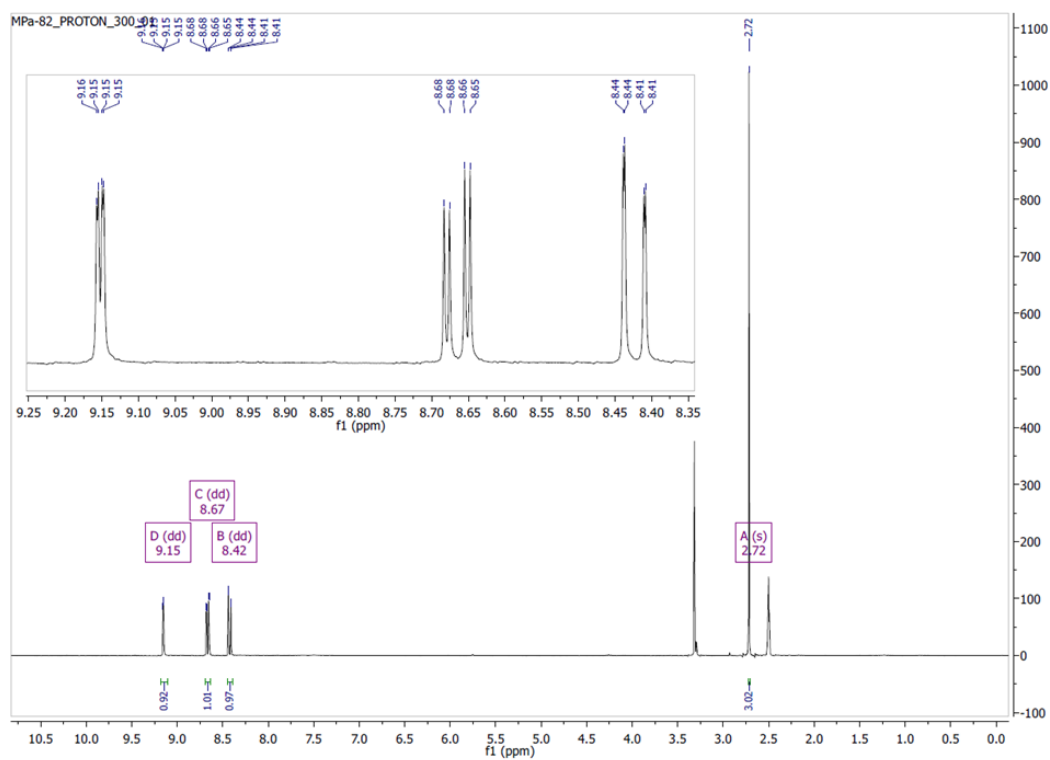
***tert*-Butyl 4-(4-((4-methyl-3-((4-(6-nitropyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)-carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat (*Boc-Nitroimatinib*) (7)**

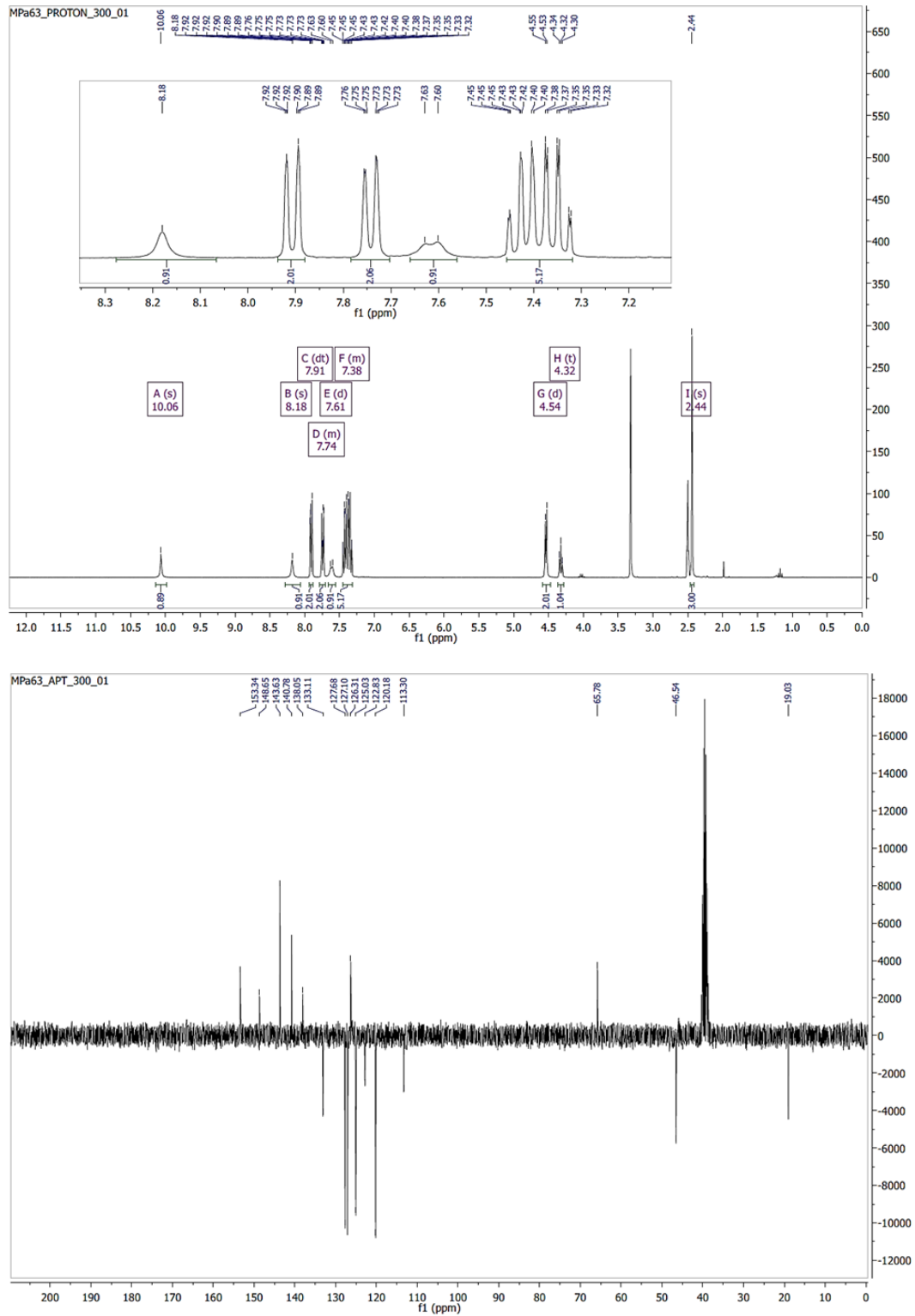


N-(3-((4-(6-fluorpyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)-4-methylphenyl)-4-(piperazin-1-ylmethyl)benzamid („Fluornorimatinib“) (9)

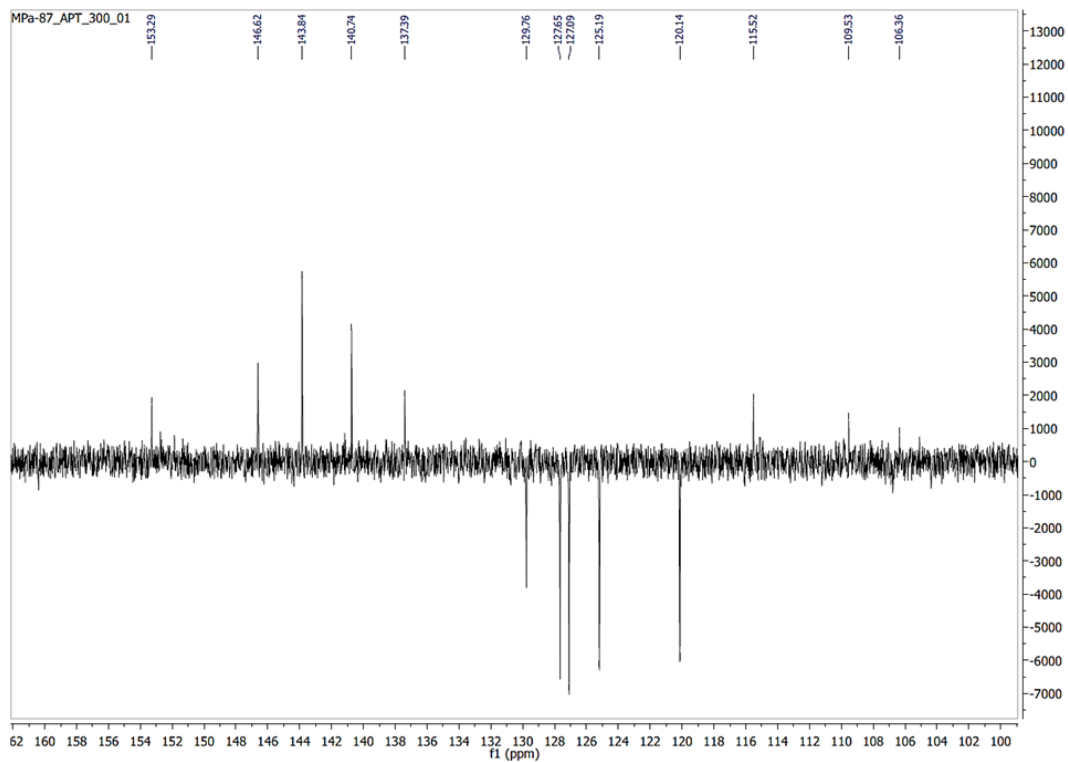
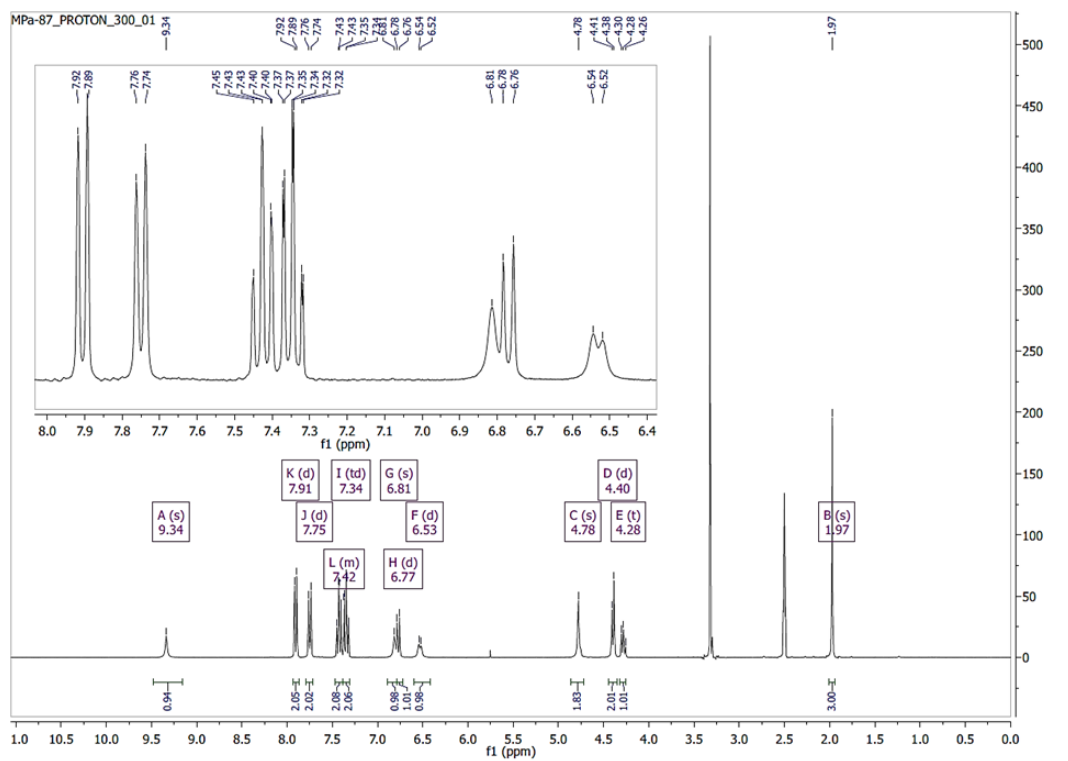


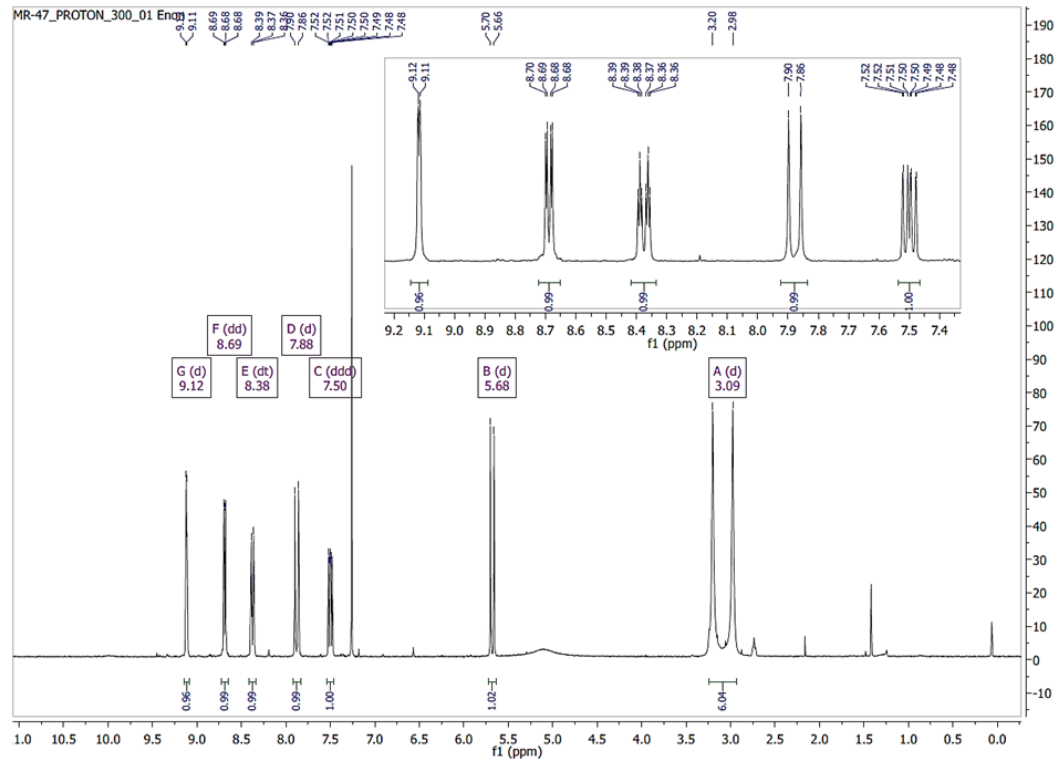
1-(6-Nitropyridin-3-yl)ethan-1-on (10)



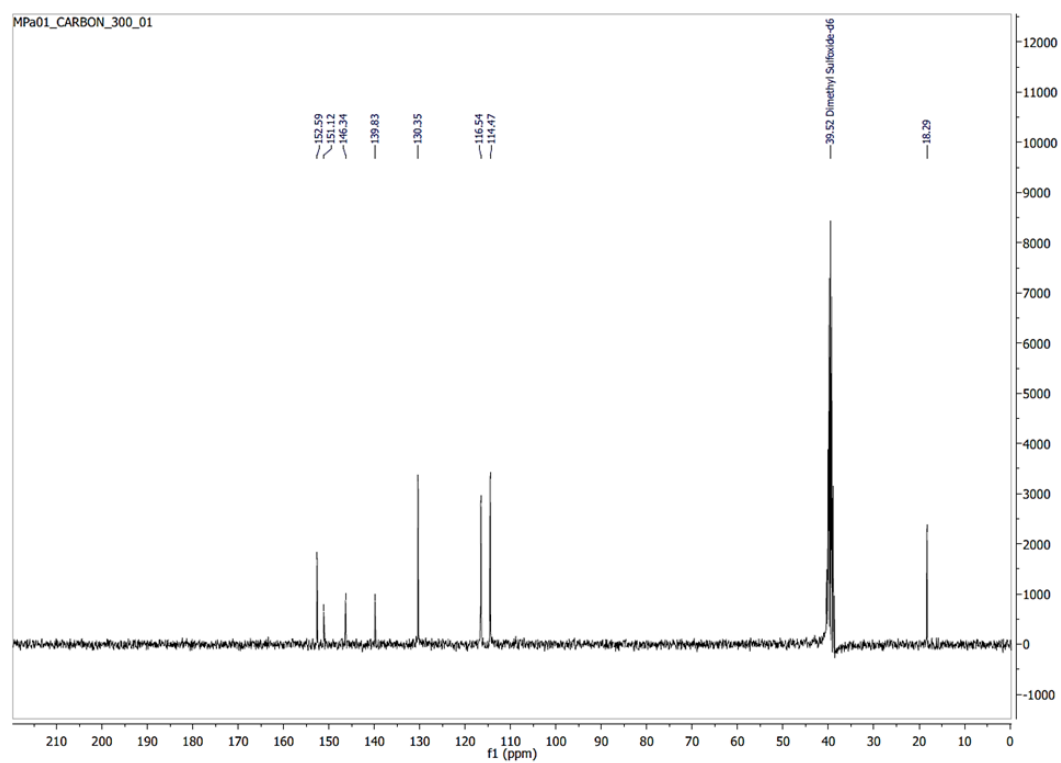
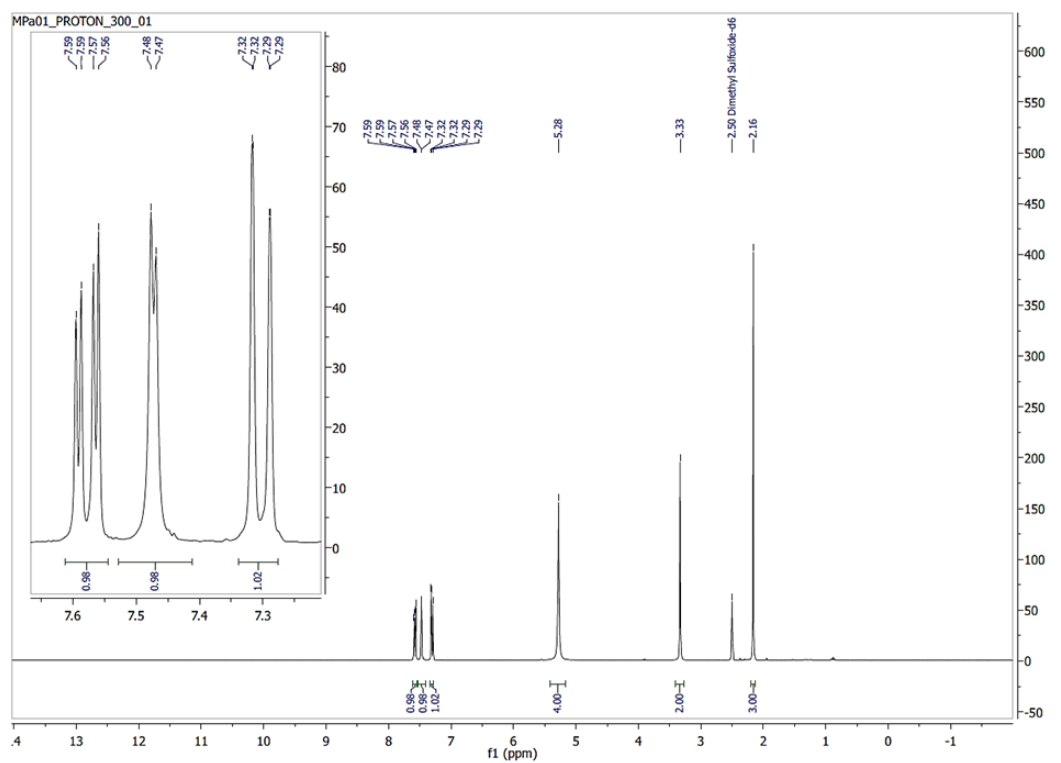
(9H-Fluoren-9-yl)methyl (4-methyl-3-nitrophenyl)carbamat (11)

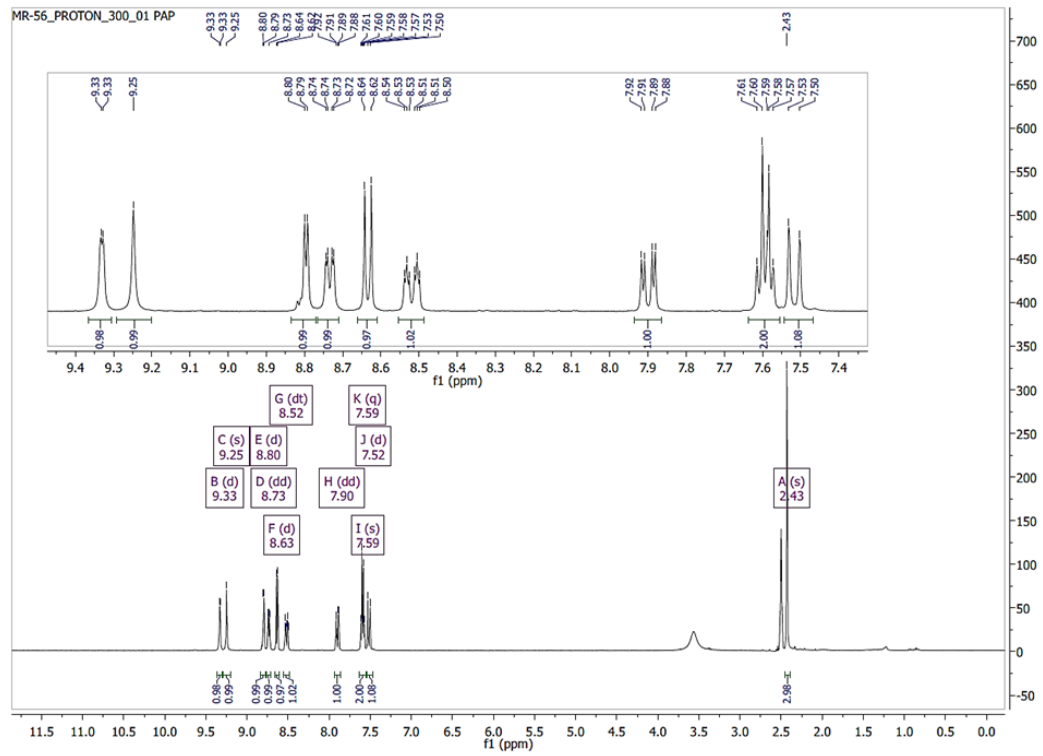
(9H-Fluoren-9-yl)methyl (3-amino-4-methylphenyl)carbamate (12)



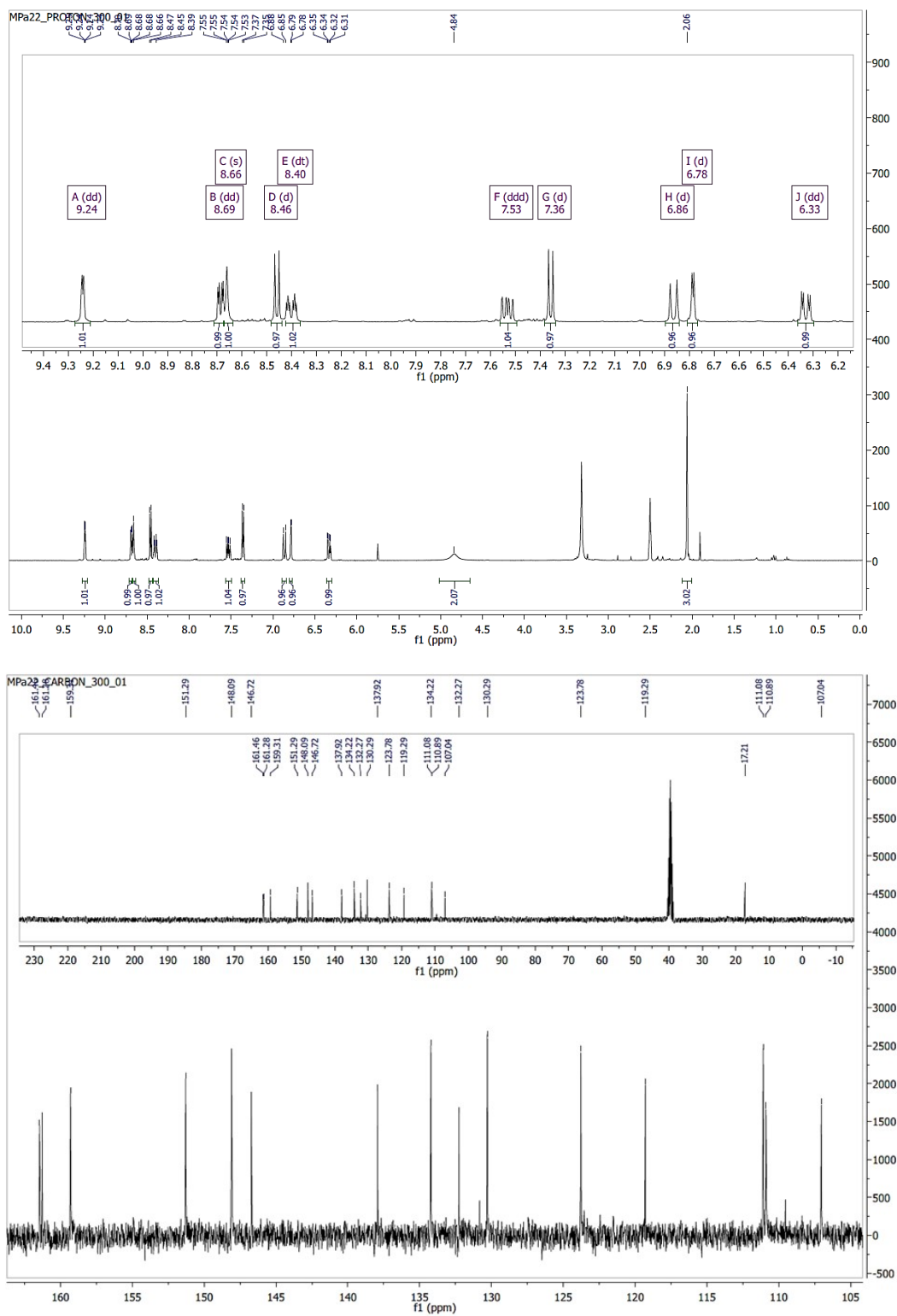
3-(Dimethylamin)-1-(pyridin-3-yl)prop-2-en-1-on (15)

1-(2-Methyl-5-nitrophenyl)guanidin (16)

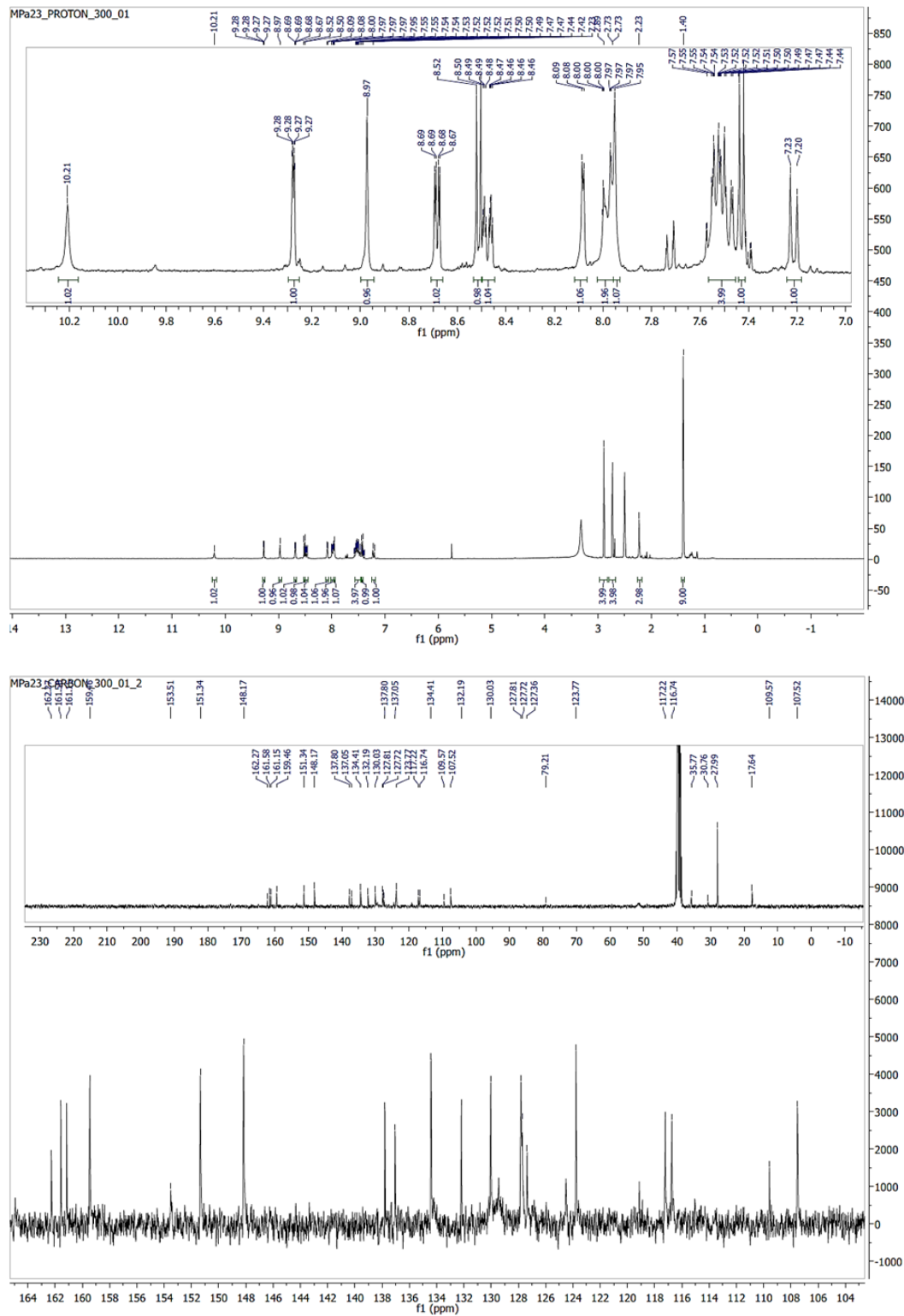


***N*-(2-Methyl-5-nitrophenyl)-4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amin (17)**

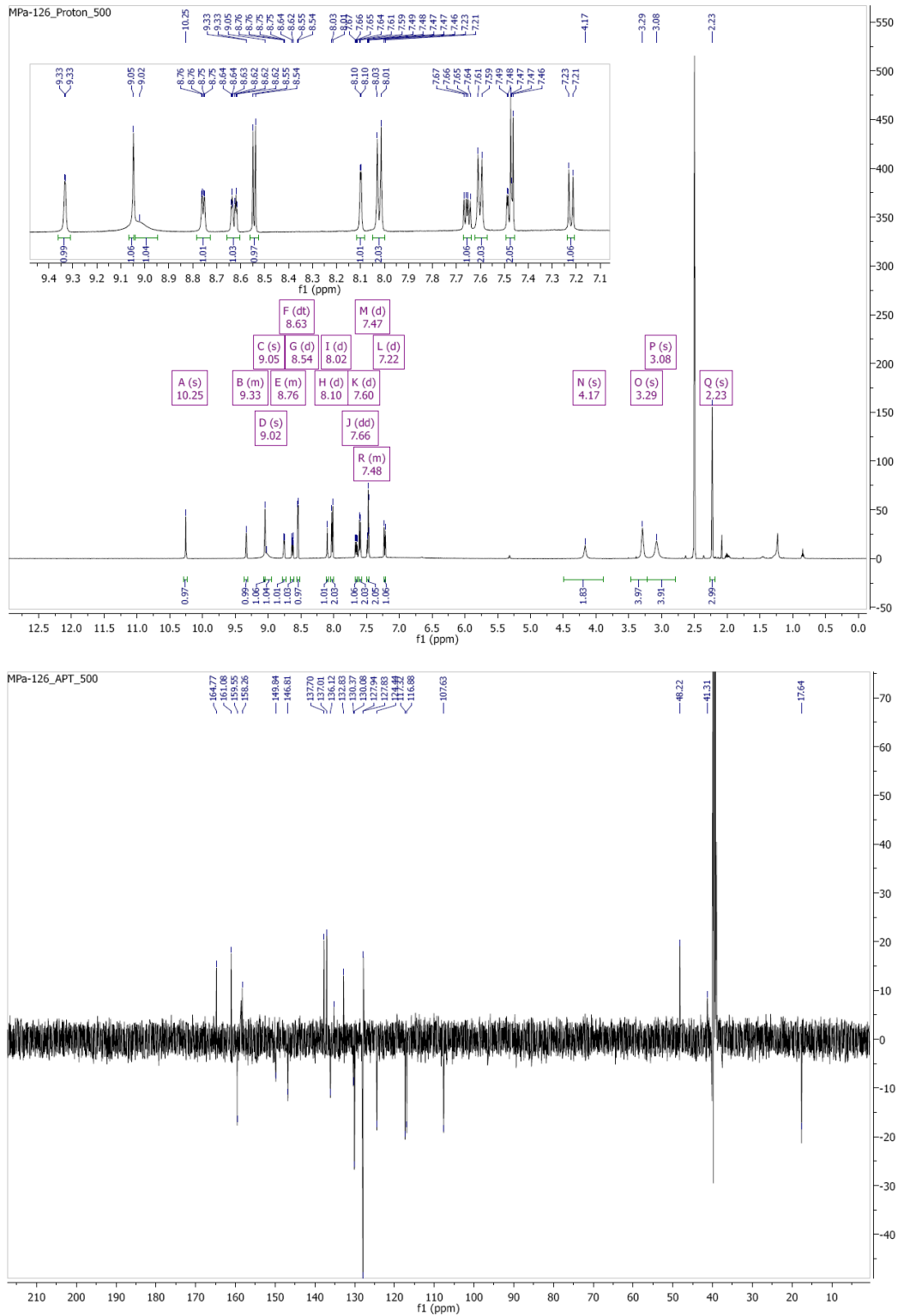
6-Methyl-*N*¹-(4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)benzol-1,3-diamin (18)



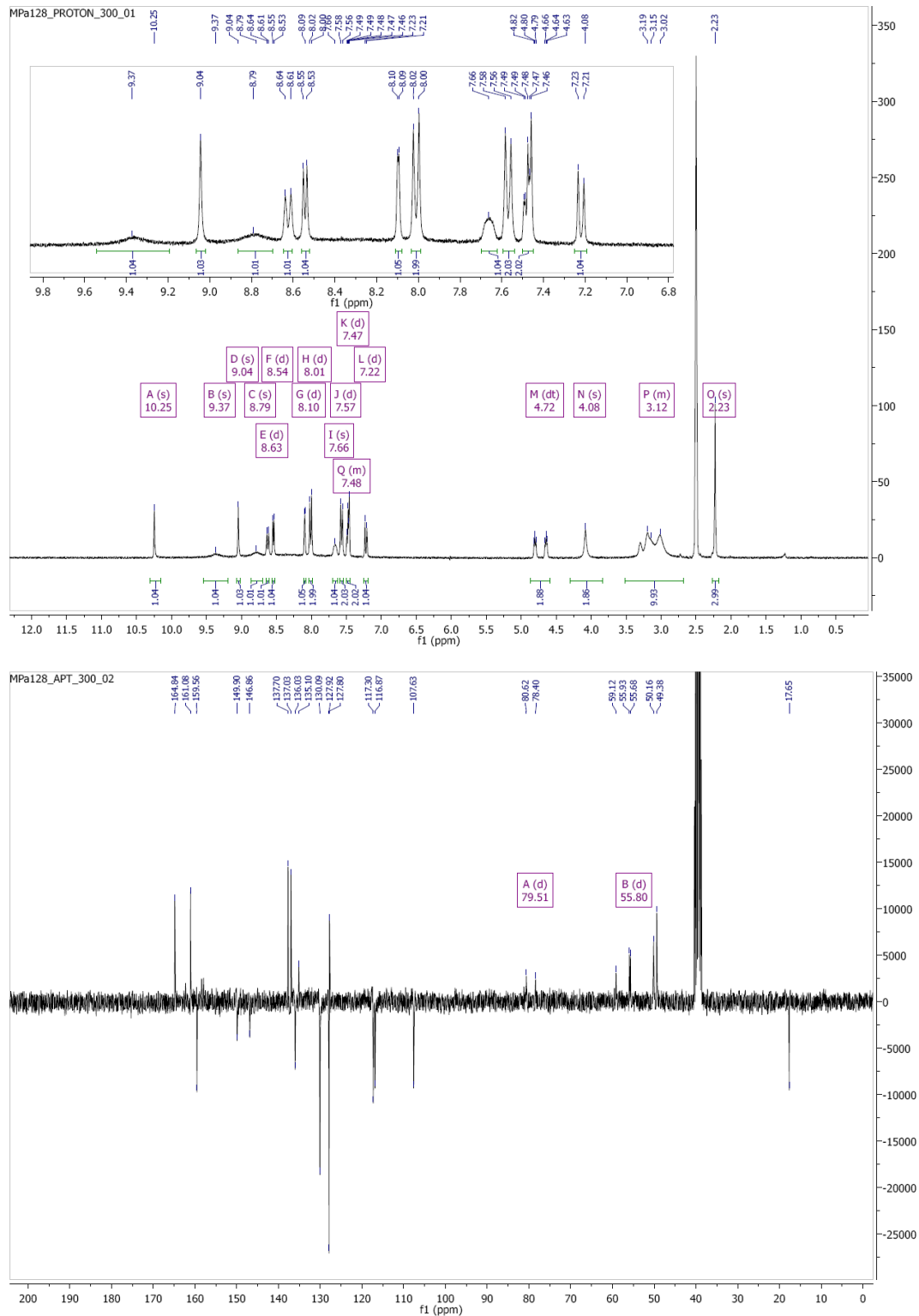
tert-Butyl 4-(4-((4-methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbamoyl)benzyl)piperazin-1-carboxylat („Boc-Imatinib“) (19)



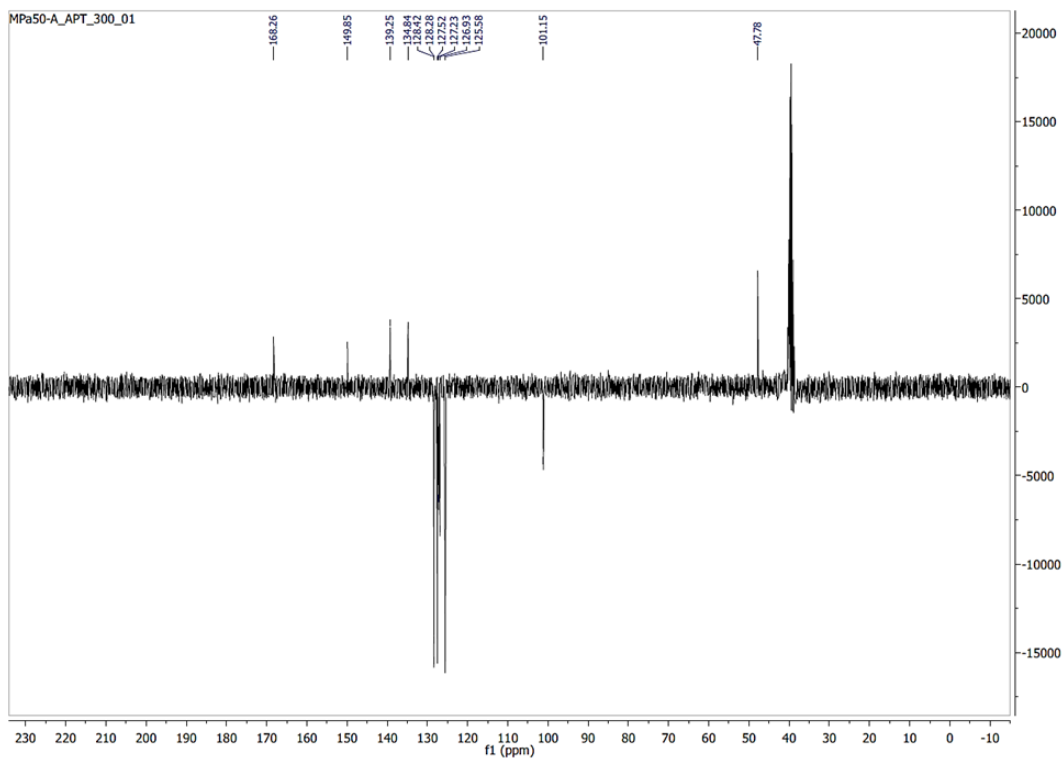
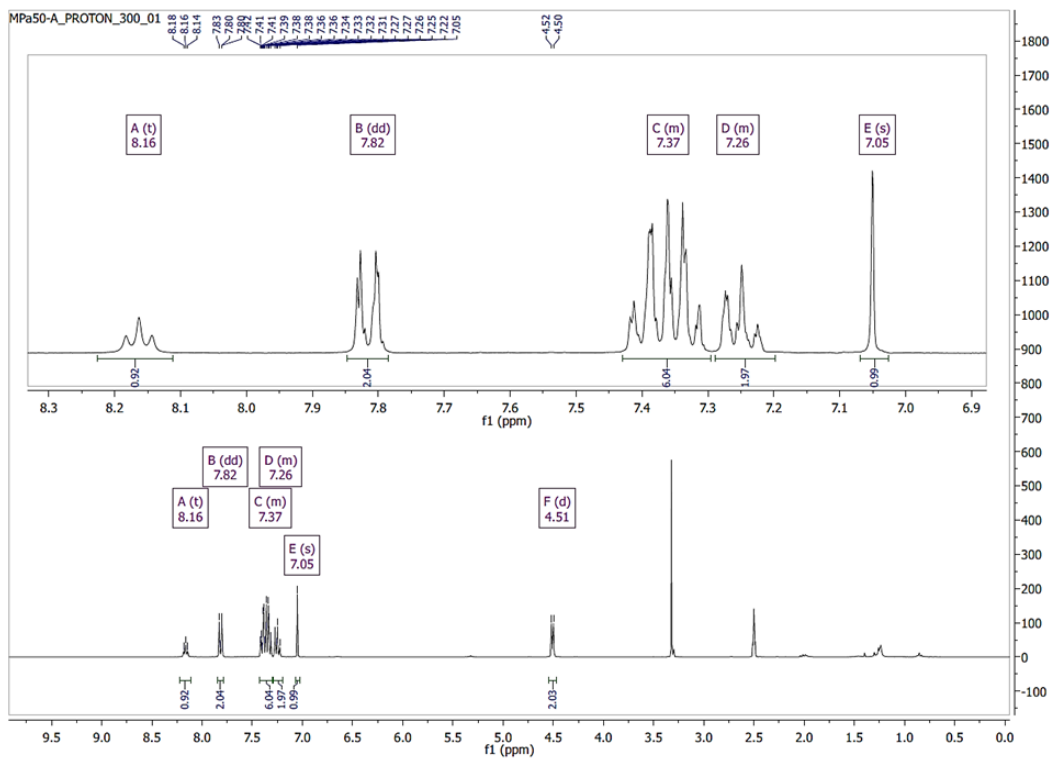
N-(4-Methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)-4-(piperazin-1-ylmethyl)benzamid („Norimatinib“) (20)



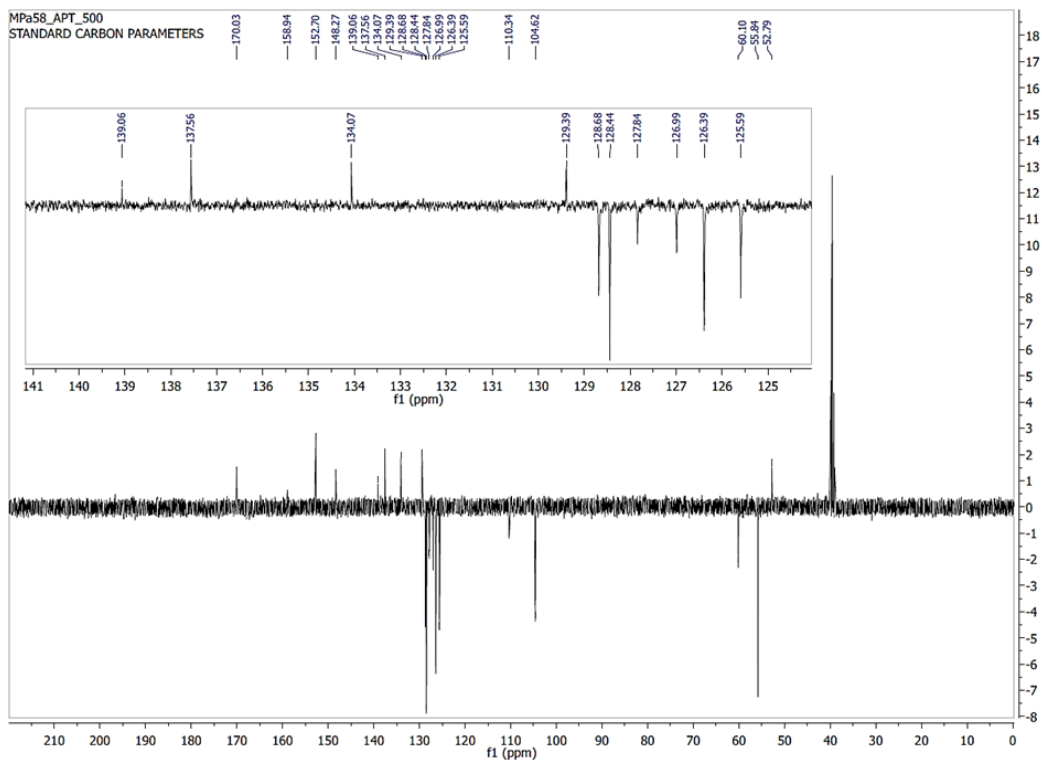
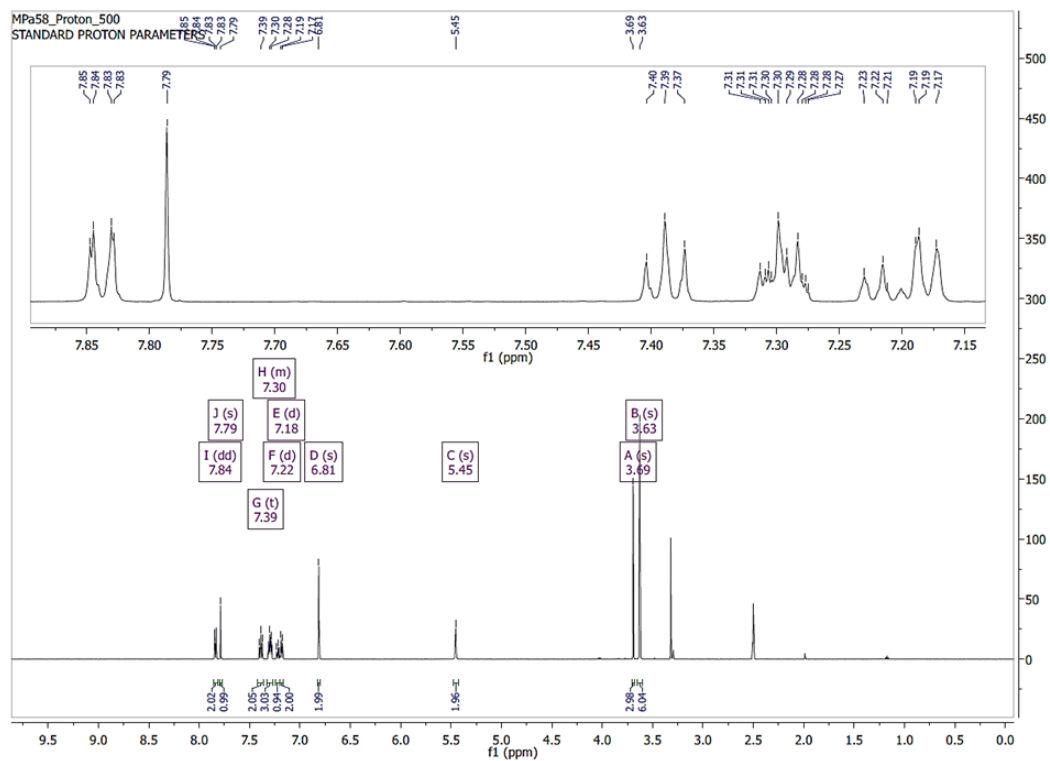
4-((4-(2-Fluorethyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-(4-methyl-3-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)benzamid („Fluorethyl-Imatinib“, SKI696) (21)



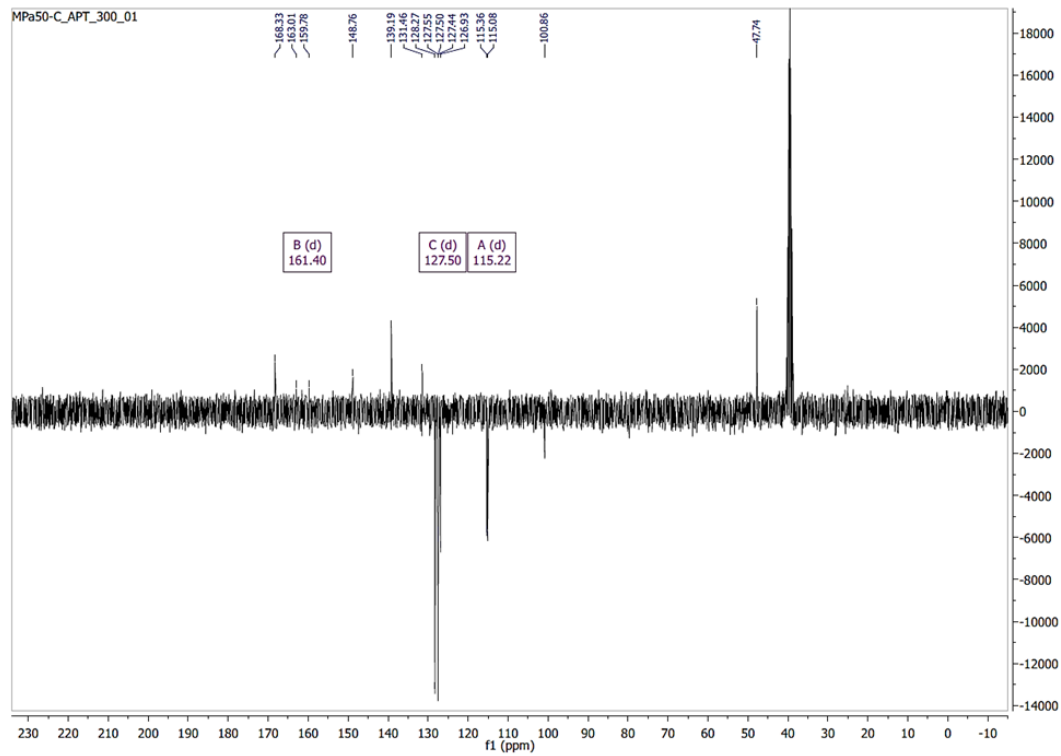
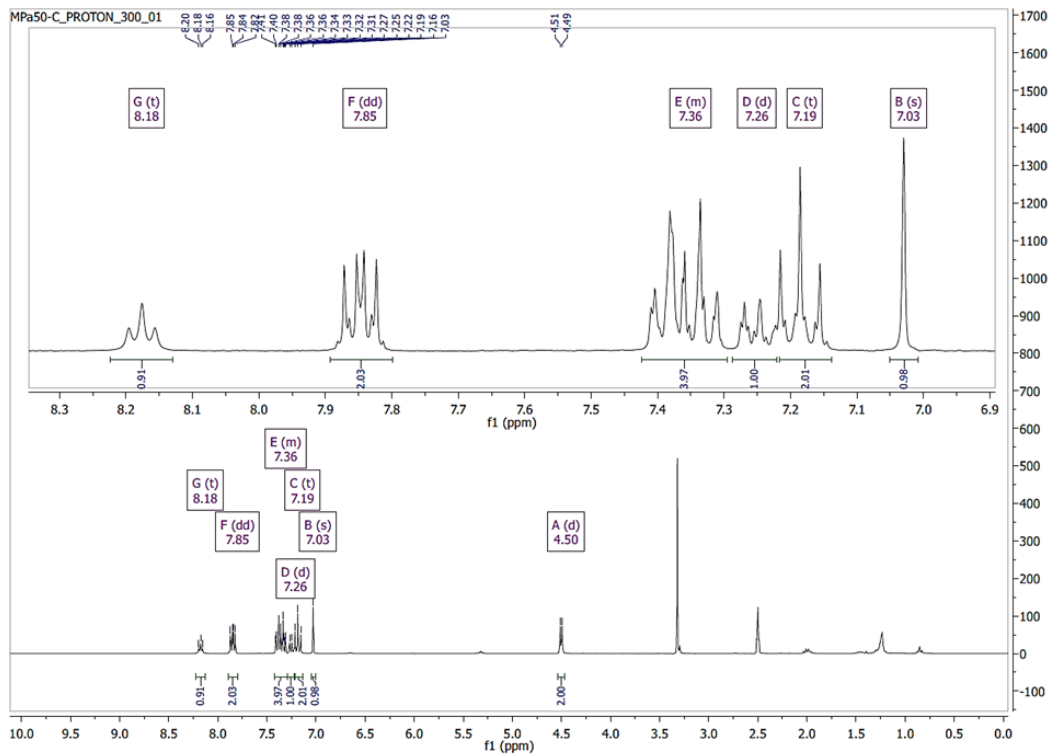
N-Benzyl-4-phenylthiazol-2-amin (22)



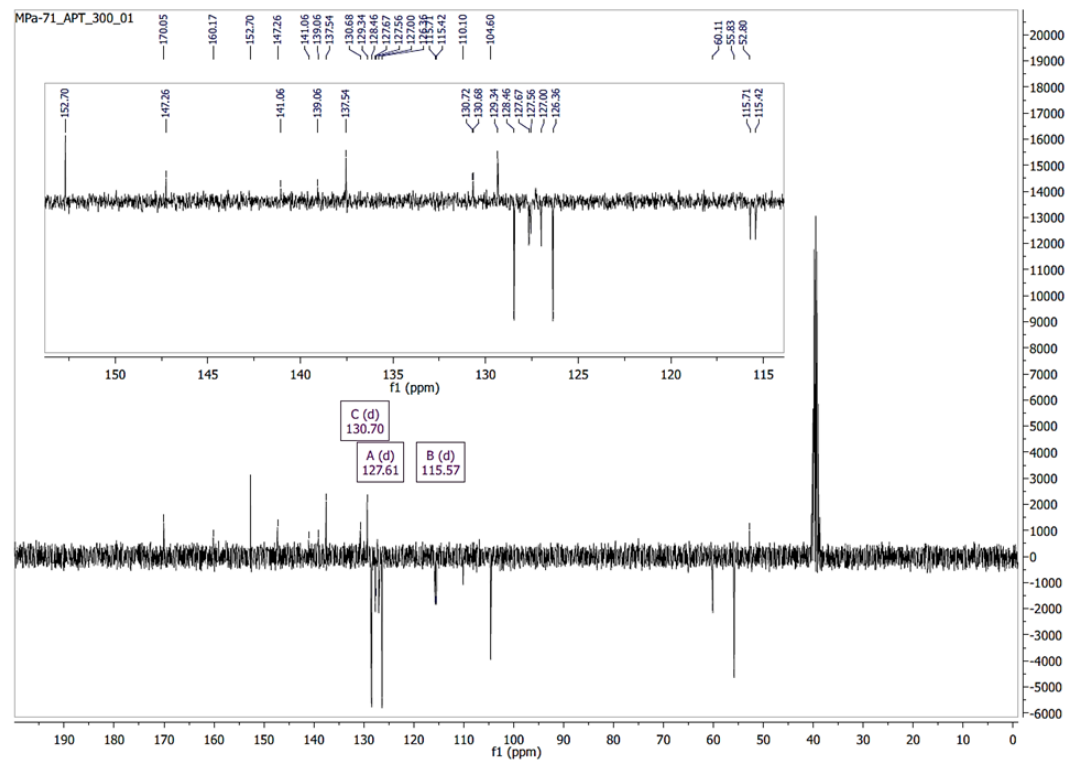
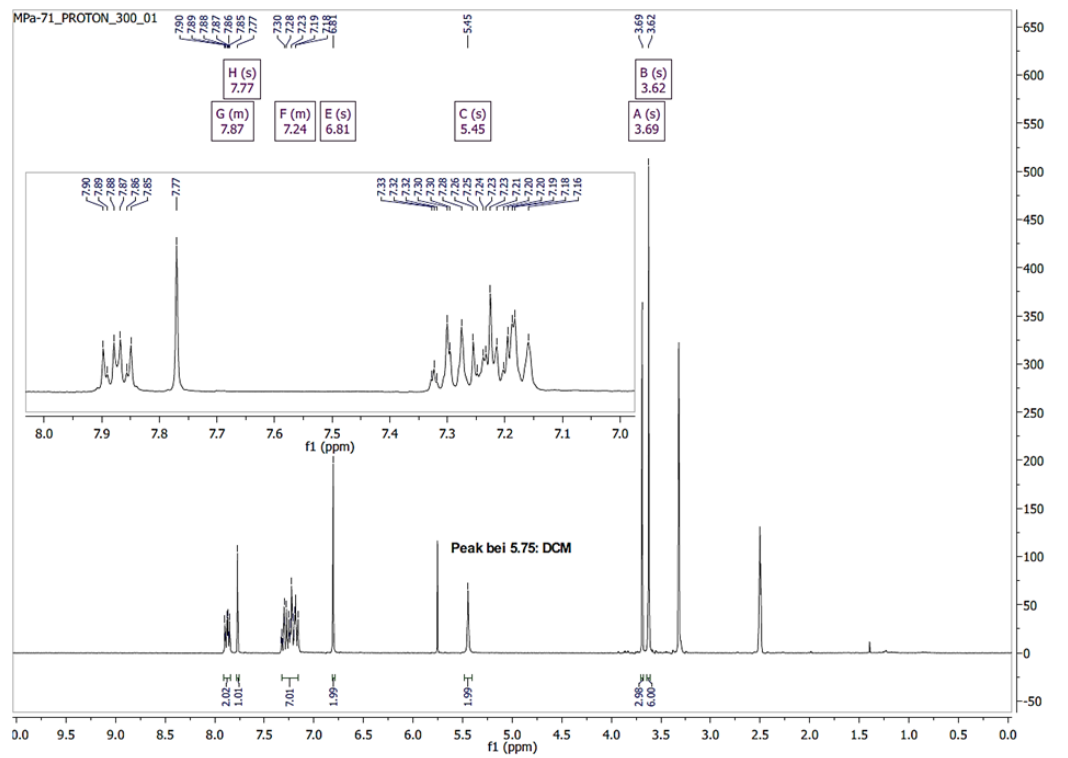
***N*-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-*N*-(4-phenylthiazol-2-yl)benzamid („*E_{act}*“) (23)**

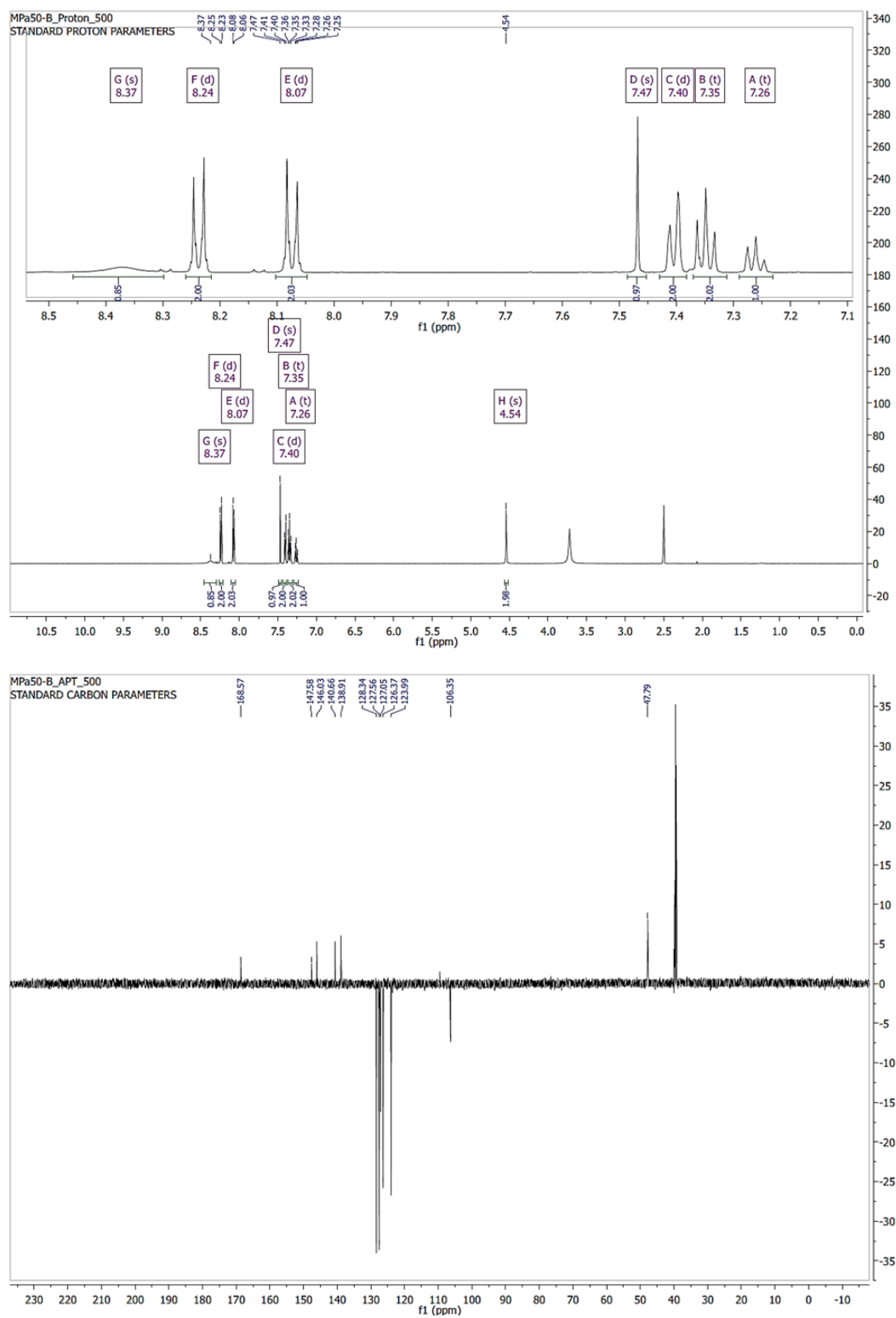


N-benzyl-4-(4-fluorophenyl)thiazol-2-amin (24)

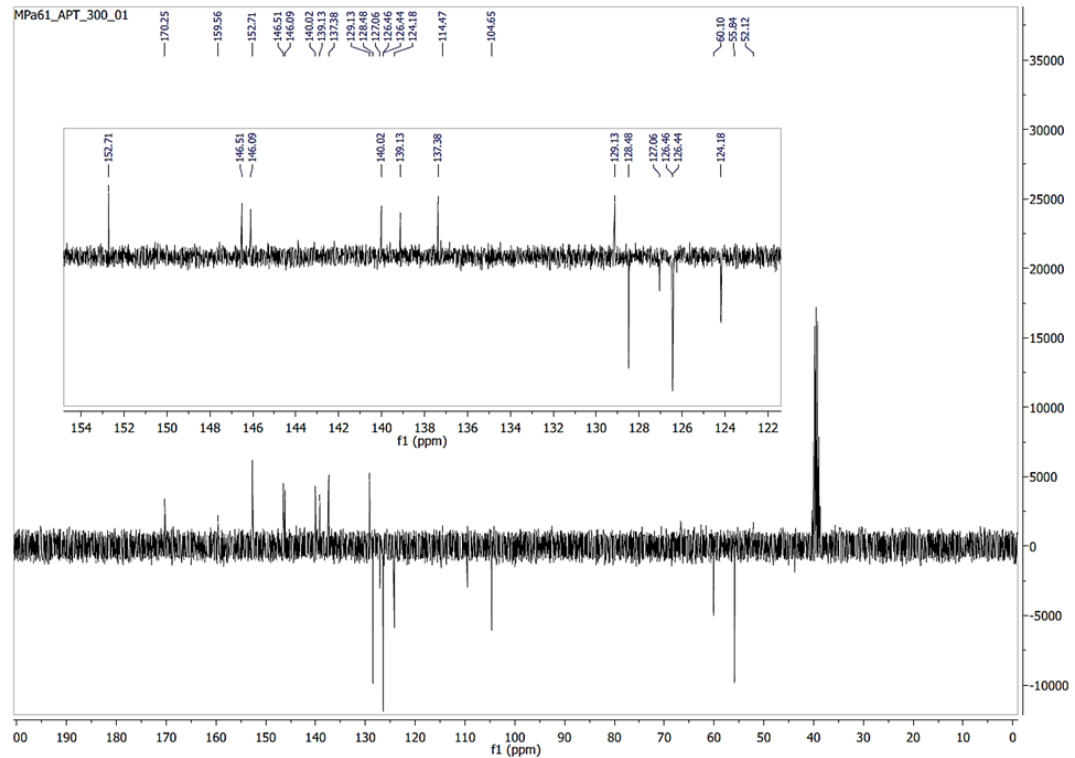
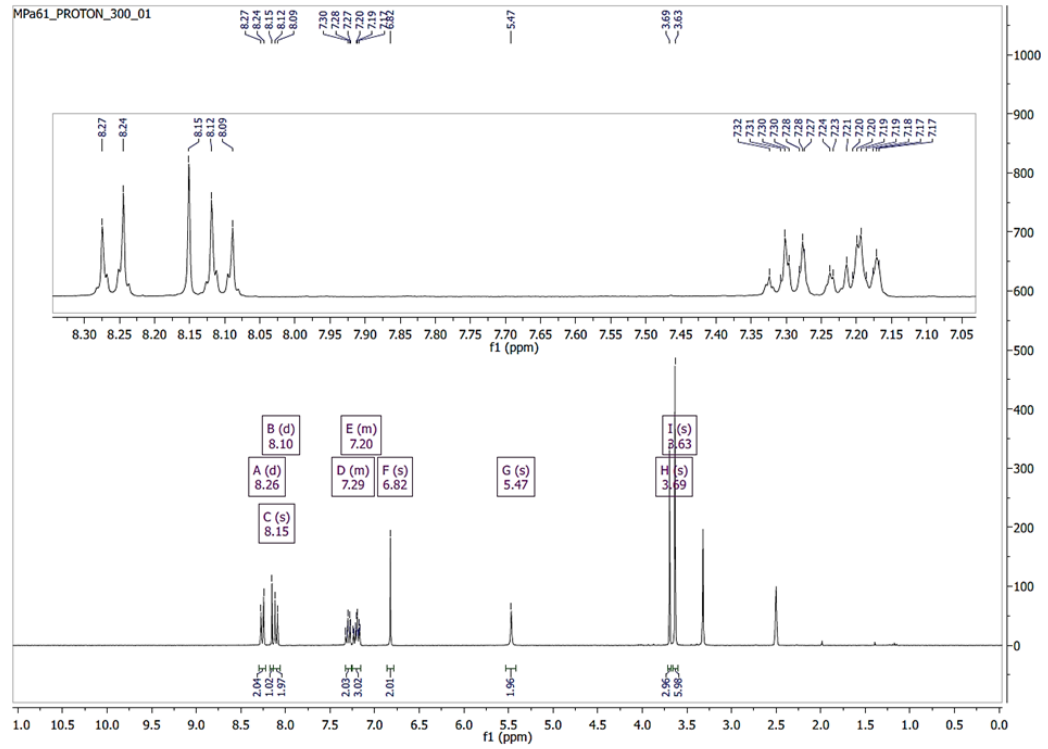


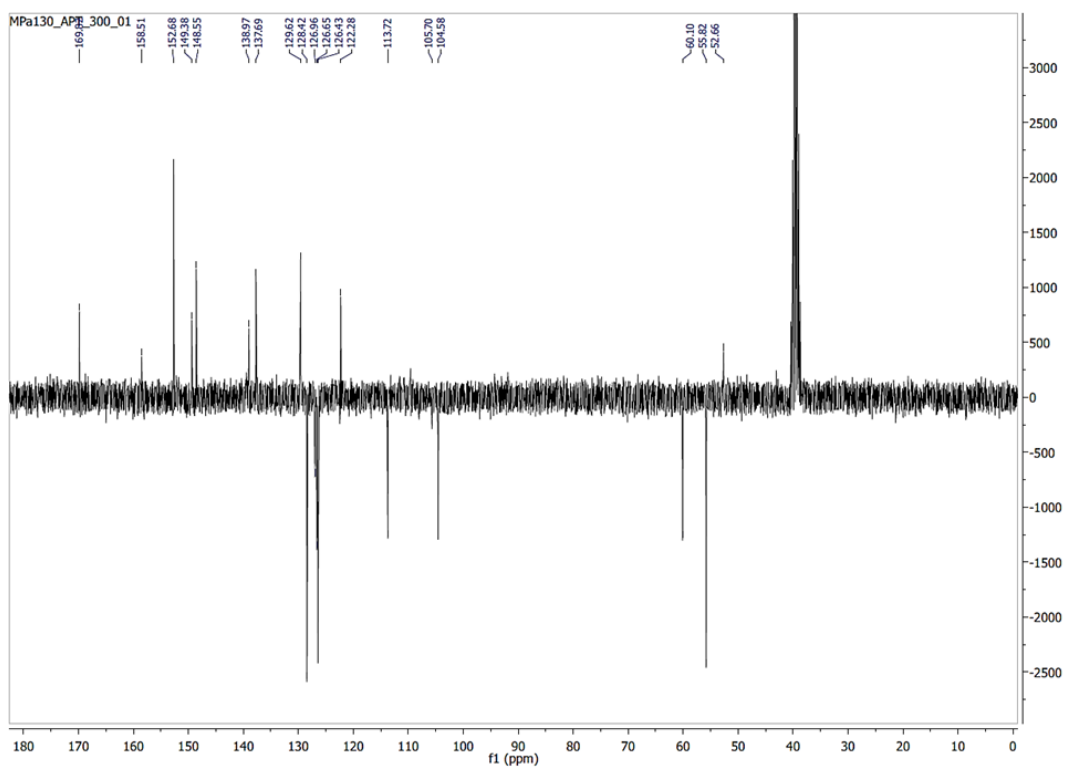
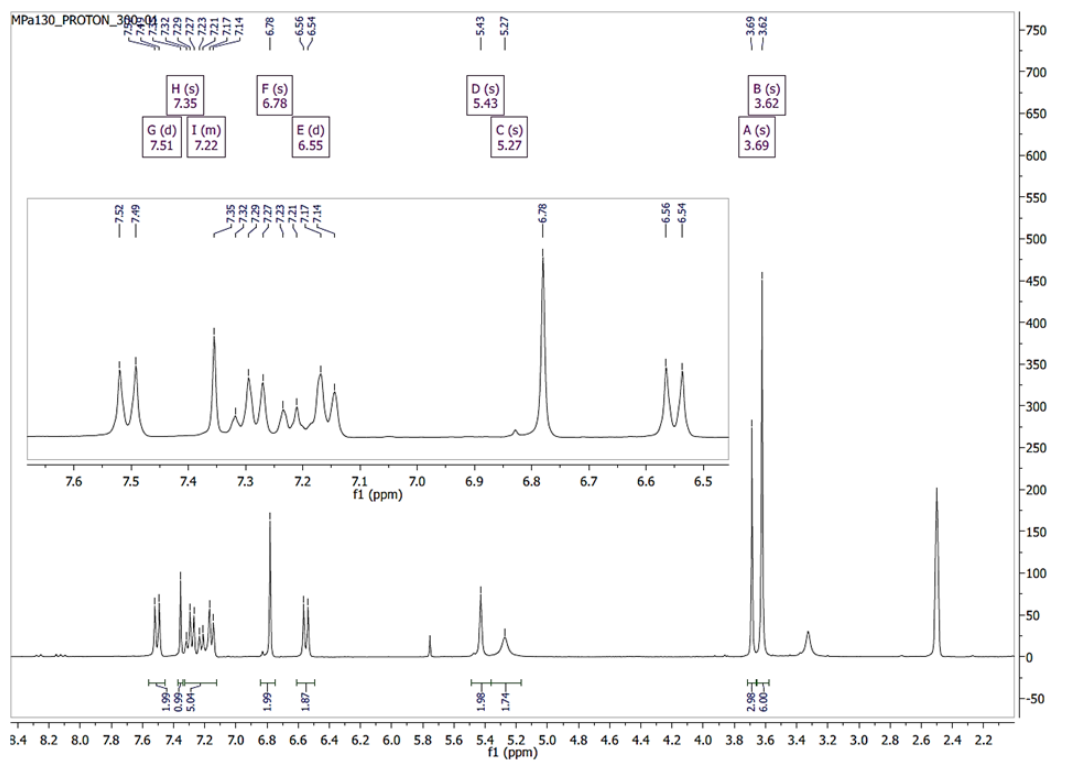
***N*-Benzyl-*N*-(4-(4-fluorphenyl)thiazol-2-yl)-3,4,5-trimethoxybenzamid („Fluor-DOG1“) (25)**



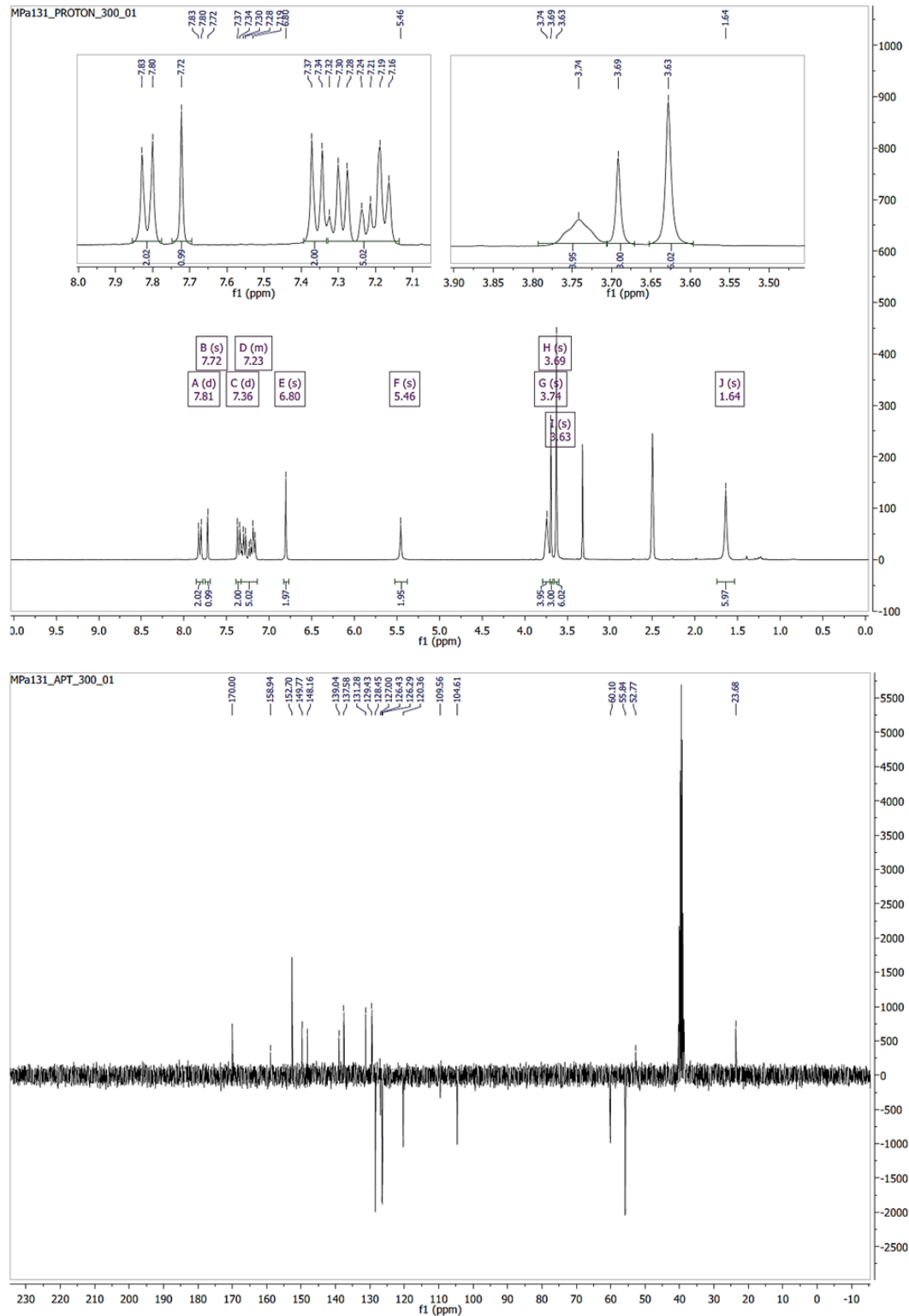
N-Benzyl-4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-amin (26)

***N*-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-*N*-(4-(4-nitrophenyl)thiazol-2-yl)benzamid („Nitro-DOG1“) (27)**

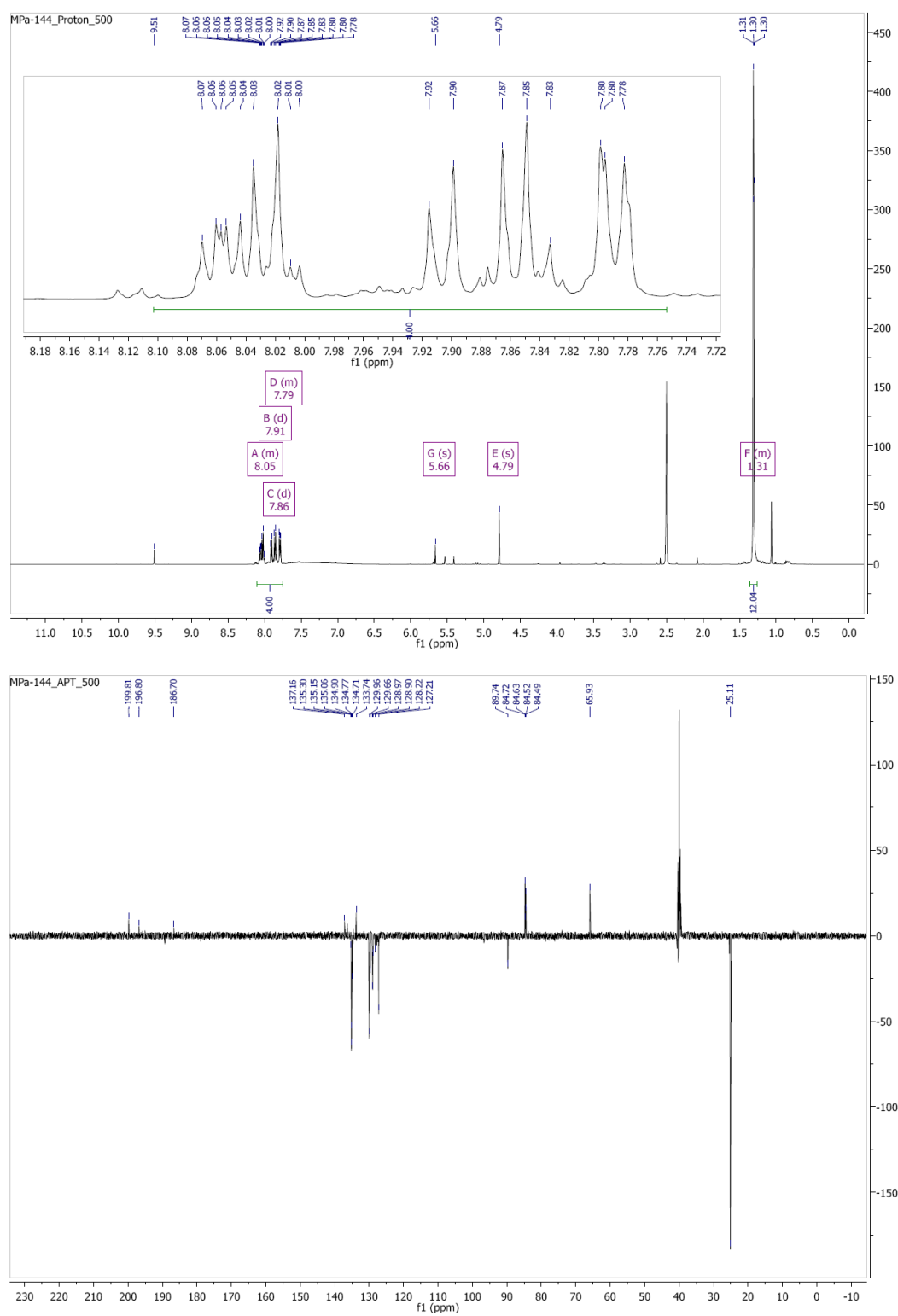


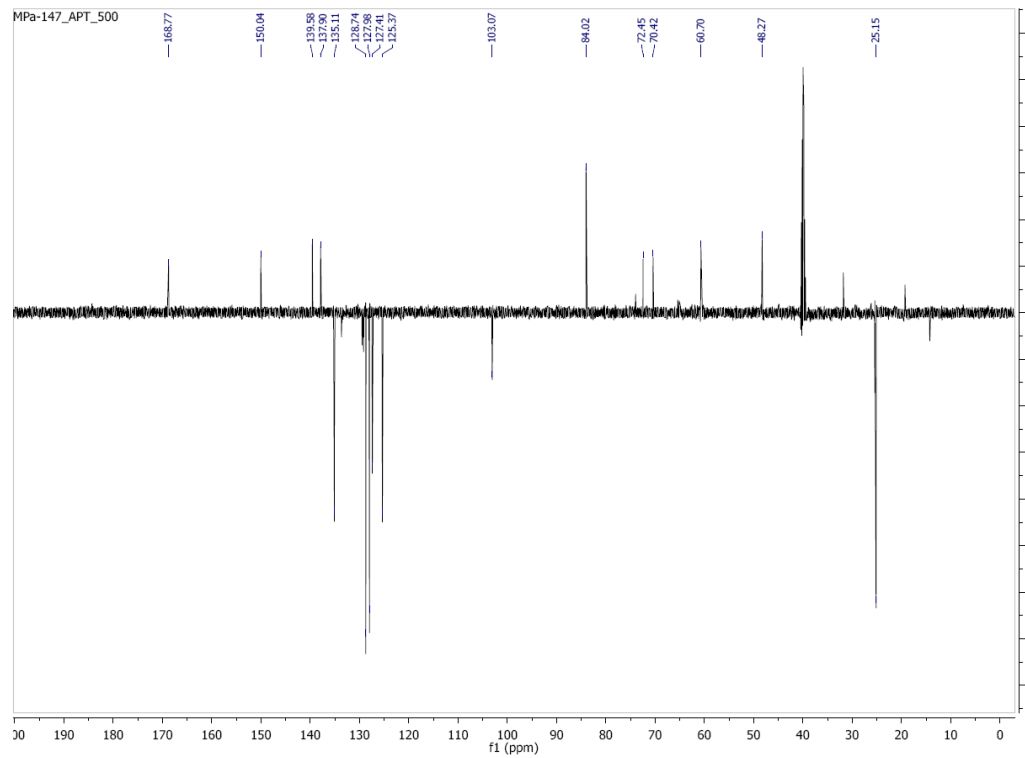
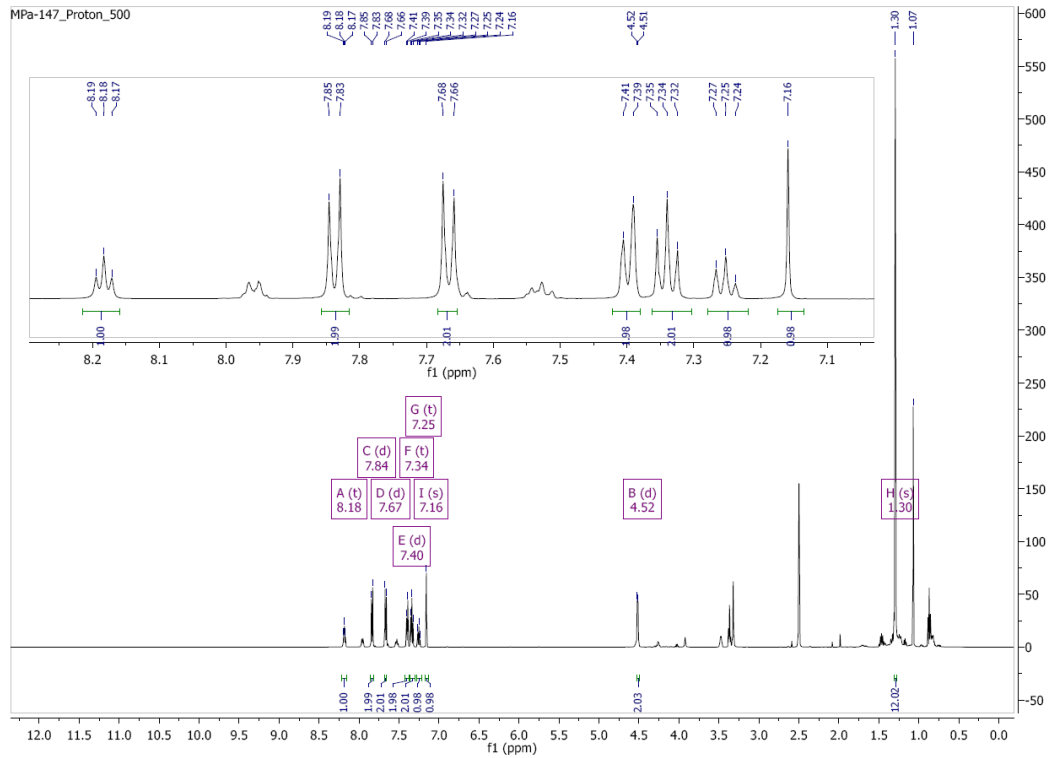
***N*-(4-(4-Aminophenyl)thiazol-2-yl)-*N*-benzyl-3,4,5-trimethoxybenzamid (28)**

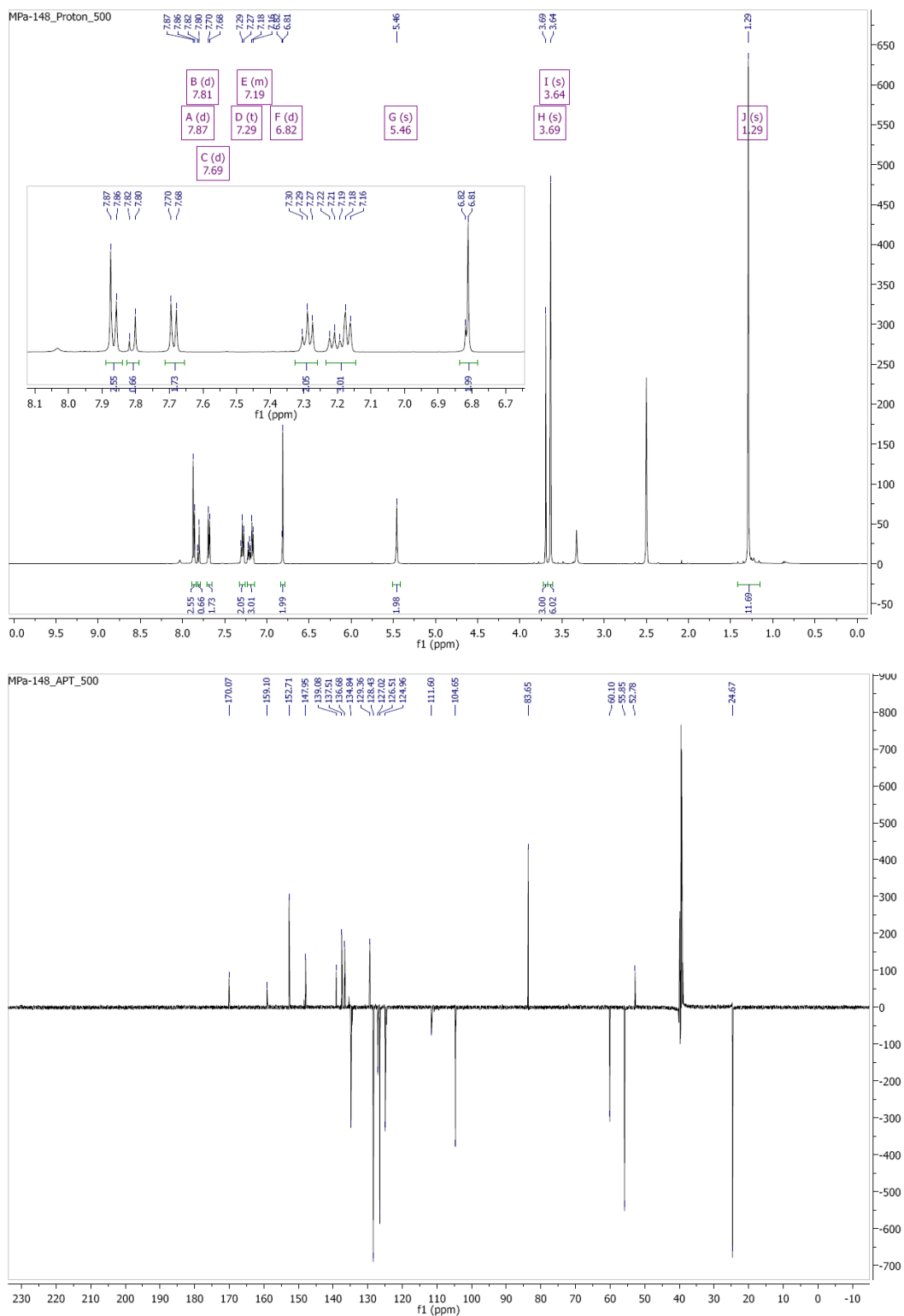
***N*-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-*N*-(4-(4-(piperidin-1-yl)diazenyl)phenyl)thiazol-2-yl)-benzamid („*Triazen-DOG1*“) (29)**



2-Brom-1-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)ethan-1-on (30)



**N-Benzyl-4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)thiazol-2-amin
(31)**

***N*-Benzyl-3,4,5-trimethoxy-*N*-(4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-phenyl)thiazol-2-yl)benzamid („*BPin-DOG1*“) (32)**

8 VERÖFFENTLICHUNGEN

8.1 Kongressbeiträge

DGN 2016 (54. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, 20.-23.04.2016)

„Entwicklung und erste Evaluierung eines neuen F-18-markierten Imatinib-Derivates zur Bildgebung von GIST“ (Vortrag, Session: Radiochemie I)

Autoren: M. Prause, S. Niedermoser, B. Wängler

ISRS 2017 (22nd International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, 14.-19.05.2017)

„Synthesis, in vitro and in vivo evaluation of [¹⁸F]fluoronorimatinib as a novel radiotracer for imaging of gastrointestinal stromal tumors“ (Vortrag, Session: Fluorine-18-Chemistry – New Compounds)

Autoren: M. Prause, S. Niedermoser, S. Riester, A.-M. Suhr, L. Consolino, T. Taguchi, C. Decristoforo, B. Wängler

8.2 Publikationen

„Synthesis, in vitro and in vivo evaluation of ¹⁸F-fluoronorimatinib as radiotracer for Imatinib-sensitive gastrointestinal stromal tumors“

Prause, M.; Niedermoser, S.; Wängler, C.; Decristoforo, C.; Seibold, U.; Riester, S.; Taguchi, T.; Schirmacher, R.; Fricker, G.; Wängler, B. *Nuclear Medicine and Biology* **2018**, *57*, 1.

„Synthetic approaches towards [¹⁸F]fluoro-DOG1, a potential radiotracer for the imaging of gastrointestinal stromal tumors“

Prause, M.; Niedermoser, S.; Schirmacher, R.; Wängler, C.; Wängler, B. *Tetrahedron Letters* **2018**, *59*, 35.

9 DANKSAGUNG

Mein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Björn Wängler für die sehr interessante Themenstellung, den großen Freiraum bei der Bearbeitung und die kompetente fachliche Betreuung, sowie die Möglichkeit an Kongressen teilzunehmen. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gert Fricker für die Betreuung und die fachlichen Diskussionen bedanken. Bei Frau Prof. Dr. Wängler möchte ich mich für die fachliche Unterstützung und ihre Hilfe beim Verfassen von Skripten bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Sabrina Niedermoser für die intensive Betreuung, die Unterstützung in allen Belangen und den ein oder anderen Denkanstoß, der die Arbeit in die richtige Richtung gelenkt hat. Ebenso möchte ich mich für die hervorragende Einarbeitung in der Radiofluorierung, der *in vitro*- und *in vivo*-Evaluierungen bedanken.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Molekulare Bildgebung & Radiochemie und Biomedizinische Chemie“ möchte ich für das gute Arbeitsklima, die stete Hilfsbereitschaft und die große Unterstützung danken. Dr. Uwe Seibold danke ich besonders für die Diskussionen und Anekdoten über organische Chemie, die fachliche Unterstützung im Chemie-Labor, sowie die gemeinsamen Kaffeepausen. Shanna und Alicia danke ich dafür, dass sie die ein oder andere Fahrt nach Heidelberg erträglicher gemacht haben, sowie für den allgemeinen Blödsinn im Doktoranden-Alltag. Mareike danke ich für die Unterstützung mit dem ganzen „Bio-Zeug“, ihre Geduld mit uns Chemikern und für ihr sonniges Gemüt, mit dem sie es immer wieder geschafft hat, mich auch nach Rückschlägen weiter zu motivieren und die schlechte Laune zu vertreiben.

Ich möchte mich auch bei allen Beteiligten des Mitigate-Projektes für ihre Unterstützung bedanken und bin froh, ein Teil dieses Projektes gewesen zu sein.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinem Freundeskreis und meiner Partnerin Luise bedanken. Ihr habt mir alle auf eure Art geholfen und ohne eure Unterstützung hätte ich das alles nicht geschafft.