



Institut für Nuklearchemie

Markierungsverfahren zur Synthese 4-[¹⁸F]Fluorprolyl-haltiger Peptide

Marianne Jelinski

Markierungsverfahren zur Synthese 4-[¹⁸F]Fluorprolyl-haltiger Peptide

Marianne Jelinski

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4008

ISSN 0944-2952

Institut für Nuklearchemie Jül-4008

D 38 (Diss., Köln, Univ., 2002)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Markierungsverfahren zur Synthese 4-[¹⁸F]Fluorprolyl-haltiger Peptide

Der Bedarf an selektiven Radiopharmaka für die PET-Diagnostik macht es erforderlich, neue Markierungsmethoden zu entwickeln, um der stofflichen und strukturellen Vielfalt der zu markierenden Verbindungen Rechnung zu tragen. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit an der Stoffklasse der Peptide, die als Pharmaka zunehmend eine wichtige Rolle spielen, verschiedene Konzepte zur ¹⁸F-Fluorierung mittels Prolylresten untersucht und bewertet.

Bei der direkten nukleophilen, Kryptat-gestützten ¹⁸F-Fluorierung des Modellpeptids Z-Pro-Leu-Gly-4-(4R)-(TsO)Pro-OMe zeigte sich, daß das Peptid unter den basischen Markierungsbedingungen nicht stabil und demzufolge eine ¹⁸F-Fluorierung nicht möglich ist.

Aufgrund der milden Reaktionsbedingungen, bei denen aliphatische Alkohole mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid fluoriert werden, bietet sich dieses Reagenz zur ¹⁸F-Fluorierung sensitiver, Hydroxylgruppen besitzender Biomoleküle an. Durch Kryptat-katalysierte, nukleophile ¹⁸F-Fluorierung von N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin und durch Evaporation des Aktivprodukts kann Perfluorbutan-1-sulfonsäure-[¹⁸F]fluorid in trägerarmer Form sowohl gelöst in Toluol (RCA: 83 ± 3 %) als auch durch Adsorption auf einer Polystyrol-Matrix (LiChrolut® EN) mit einer Gesamtausbeute von 75 ± 6 % erhalten werden. In Gegenwart einer äquimolaren Menge an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid als Träger lassen sich N-Boc-Hyp-OMe mit einer radiochemischen Ausbeute von > 90 % und die beiden Modellpeptide Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe und Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe mit 40 - 45 % bzw. 30 - 35 % ¹⁸F-fluorieren, während bei der trägerarmen Synthese lediglich ca. 1 % des ¹⁸F-Fluorproduktes erhalten wird. Der reaktionstechnisch notwendige Trägerzusatz an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid erlaubt naturgemäß nur die Darstellung von Radiotracern geringer molarer Aktivität.

Zur Durchführung der ¹⁸F-Fluorierung des Modellpeptids N-Boc-Hyp-Leu-OH, das über den C-Terminus kovalent an ein Wang-Harz gebunden ist, mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure-[¹⁸F]fluorid wird das ¹⁸F-Fluorierungsgagens in Abwesenheit eines Lösungsmittels synthetisiert und auf dem Wang-Harz adsorbiert. Die Ausbeute beträgt 31 ± 3 %. Die anschließend durchgeführte ¹⁸F-Fluorierung des Peptids in Gegenwart einer äquimolaren Menge von Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid verläuft mit einer radiochemischen Ausbeute von lediglich 4 ± 1 %.

Als Alternative ließ sich die Kondensation von 4-[¹⁸F]Fluorprolin-methylester mittels TBTU an den C-Terminus von Z-Pro-Leu-Gly-OH mit einer radiochemischen Ausbeute von 70 - 80 % unter trägerarmen Bedingungen durchführen. Der dazu notwendige 4-[¹⁸F]Fluorprolin-methylester läßt sich durch ¹⁸F-Substitution an N-Boc-*trans*-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester, bei der neben dem *cis*- jedoch auch das *trans*-Produkt entsteht, und anschließender Boc-Gruppenabspaltung mit einer Gesamtausbeute von 30 - 40 % erhalten. Somit steht eine weitere prosthetische Gruppe zur trägerarmen Markierung von Peptiden zur Verfügung.

Labelling methods for the synthesis of 4-[^{18}F]fluoroproline containing peptides

The requirement of selective radiopharmaceuticals for PET-diagnostics necessitates the development of new labelling methods taking into account the substantial and structural diversity of the compounds to be labelled. Therefore different concepts for ^{18}F -fluorination of peptides, which are increasingly important as pharmaceuticals, via proline moieties were explored and evaluated in this work.

The direct nucleophilic kryptate based ^{18}F -fluorination of the model peptide Z-Pro-Leu-Gly-4-(4R)-(TsO)Pro-OMe showed, that the peptide is not stable under the basic labelling conditions, and as a result the ^{18}F -fluorination is not possible.

Perfluorbutane-1-sulfonyl[^{18}F]fluoride is a possible reagent for ^{18}F -fluorination of sensitive hydroxy groups containing biomolecules due to the mild reaction conditions at which aliphatic alcohols are fluorinated by this reagent. By kryptate catalysed, nucleophilic ^{18}F -fluorination of N,N-bis(perfluorobutane-1-sulfonyl)aniline and evaporation of the active product no-carrier-added perfluorobutane-1-sulfonyl[^{18}F]fluoride can be achieved either dissolved in toluene (RCY: $83 \pm 3 \%$) or adsorbed on a polystyrole-matrix (LiChrolut[®] EN) with a total yield of $75 \pm 6 \%$. In the presence of an equimolar amount of perfluorobutane-1-sulfonylfluoride as carrier N-Boc-Hyp-OMe can be ^{18}F -fluorinated with a radiochemical yield of $> 90 \%$ and the two model peptides Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe and Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe with $40 - 45 \%$ and $30 - 35 \%$, while in the case of no-carrier-added synthesis only ca. 1% of the ^{18}F -fluoroproduct is obtained. The necessary addition of perfluorobutane-1-sulfonylfluoride carrier allows naturally only the synthesis of radiotracers with low molar activity.

For performance of the ^{18}F -fluorination via perfluorobutane-1-sulfonyl[^{18}F]fluoride of the model peptide N-Boc-Hyp-Leu-OH, which is covalently bound to a Wang resin via the C-terminus, the ^{18}F -fluorination reagent is prepared in absence of a solvent and adsorbed on the Wang resin with a yield of $31 \pm 3 \%$, based on [^{18}F]fluoride. The subsequent ^{18}F -fluorination of the peptide, which was done in the presence of an equimolar amount of perfluorobutane-1-sulfonylfluoride, proceeds with a radiochemical yield of merely $4 \pm 1 \%$.

Alternatively, the condensation of 4-[^{18}F]fluoroproline-methylester via TBTU at the C-terminus of Z-Pro-Leu-Gly-OH could be carried out under no-carrier-added conditions with a radiochemical yield of $70 - 80 \%$. The required 4-[^{18}F]fluoroproline-methylester could be achieved with a radiochemical yield of $30 - 40 \%$ by ^{18}F -substitution of N-Boc-*trans*-4-(p-toluenesulfonyloxy)-proline-methylester, by which the *trans*-product is also formed in addition to the *cis*-product, and the cleavage of the Boc group. As a result of these studies another prosthetic group is available for no-carrier-added labelling of peptides.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Radionuklide in den Lebenswissenschaften	1
1.2	Produktion von Fluor-18	6
1.3	Chemische und kinetische Aspekte bei Synthesen mit trägerarmen Radionukliden	8
1.4	Methoden zur Markierung mit Fluor-18	11
1.4.1	Direkte Markierungsreaktionen	11
1.4.2	Markierungen mittels prosthetischer Gruppen	17
1.5	^{18}F -Fluorierung von Peptiden und Proteinen	21
1.6	Prolin, 4-Hydroxyprolin und 4-Fluorprolin als peptidische Bausteine	28
1.7	Herstellung und chemische Eigenschaften von Perfluorbutan-1-sulfonsäure-fluorid	28
2	Problemstellung	33
3	Ergebnisse und Diskussion	35
3.1	Konzepte zur ^{18}F -Fluorierung von Peptiden und Proteinen	35
3.2	4- ^{18}F Fluorprolin-methylester als prosthetische Gruppe	36
3.2.1	Darstellung des Standards N-Boc- <i>cis</i> -4-fluorprolin-methylester	38
3.2.2	Synthese der prosthetischen Gruppe 4- ^{18}F Fluorprolin-methylester	39
3.2.3	Kopplung der prosthetischen Gruppe 4- ^{18}F Fluorprolin-methylester an das Modellpeptid Z-Pro-Leu-Gly-OH	41
3.3	Direkte, phasentransfer-katalysierte ^{18}F -Fluorierung eines Modellpeptids	43
3.4	^{18}F -Fluorierungen von Modellpeptiden mittels Perfluorbutansulfonsäure- ^{18}F fluorid	45
3.4.1	Darstellung des trägerarmen Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorids	46
3.4.1.1	Synthese von N,N-(Bisperfluorbutan-1-sulfonyl)anilin	47
3.4.1.2	Darstellung des ^{18}F -Fluorierungsagenzes Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorid in Gegenwart eines Lösungsmittels	48
3.4.1.3	Darstellung des ^{18}F -Fluorierungsagenzes Perfluorbutan-1-sulfonsäure-	58

	[¹⁸ F]fluorid in Abwesenheit eines Lösungsmittels	
3.4.1.4	Vergleich verschiedener Absorptions- bzw. Adsorptionsbedingungen zur Isolierung des Perfluorbutansulfonsäure[¹⁸ F]fluorids	59
3.4.2	Radiosynthese von N-Boc- <i>cis</i> -4-[¹⁸ F]fluorprolin-methylester mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[¹⁸ F]fluorid	61
3.4.3	Radiosynthese des N-Benzylloxycarbonyl-prolyl-leucyl-glycyl- <i>cis</i> -4-[¹⁸ F]fluorprolin-methylesters	66
3.4.3.1	Synthese von N-Benzylloxycarbonyl-prolyl-leucyl-glycyl- <i>trans</i> -4-hydroxyprolin-methylester	66
3.4.3.2	Synthese von N-Benzylloxycarbonyl-prolyl-leucyl-glycyl- <i>cis</i> -4-fluorprolin-methylester	67
3.4.3.3	¹⁸ F-Fluorierung von N-Benzylloxycarbonyl-prolyl-leucyl-glycyl- <i>trans</i> -4-hydroxyprolin-methylester	67
3.4.4	Radiosynthese des N-Benzylloxycarbonyl-glycyl-leucyl- <i>cis</i> -4-[¹⁸ F]fluorprolyl-glycyl-leucyl-methylesters	73
3.4.4.1	Synthese von N-Benzylloxycarbonyl-glycyl-leucyl- <i>trans</i> -4-hydroxy-prolyl-glycyl-leucyl-methylester	74
3.4.4.2	Synthese von N-Benzylloxycarbonyl-glycyl-leucyl- <i>cis</i> -4-fluorprolyl-glycyl-leucyl-methylester	75
3.4.4.3	¹⁸ F-Fluorierung von N-Benzylloxycarbonyl-glycyl-leucyl- <i>trans</i> -4-hydroxyprolyl-glycyl-leucyl-methylester	75
3.4.5	¹⁸ F-Fluorierung von <i>trans</i> -4-Hydroxyprolyl-leucin am Harz	79
3.4.5.1	Synthese des N-Boc-Hyp-Leu-Wang-Harzes und des Standards <i>cis</i> -4-Fluorprolyl-leucin	80
3.4.5.2	Durchführung der ¹⁸ F-Fluorierung von N-Boc-Hyp-Leu am Wang-Harz	82
3.5	Vergleichende Diskussion der durchgeführten ¹⁸ F-Fluorierungen	83
4	Experimenteller Teil	86
4.1	Bezugsnachweis	86
4.2	Charakterisierung der dargestellten Verbindungen	88
4.3	Synthese inaktiver Standardverbindungen und Markierungsvorläufern	90
4.4	Radiosynthesen	101
4.4.1	Konditionierung von n.c.a. [¹⁸ F]Fluorid	101

4.4.2	Nukleophile Substitutionsreaktionen mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid	101
4.4.3	^{18}F -Fluorierungen mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid und dessen Darstellung	103
4.4.4	^{18}F -Fluorierung von polymer-gebundenem 4-(4R)-Hydroxypropyl-leucin mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid	106
4.5	Analytische Verfahren	106
4.5.1	Radiodünnschichtchromatographie	107
4.5.2	Radio-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	107
4.5.3	Radiogaschromatographie	109
4.5.4	Bestimmung der spezifischen Aktivität	110
5	Zusammenfassung	112
6	Literatur	115
	Abkürzungsverzeichnis	125

1 Einleitung

1.1 Radionuklide in den Lebenswissenschaften

Mit der Entdeckung der Radioaktivität 1896 durch Henri Becquerel, der 1903 den Nobelpreis für Physik erhielt, war ein neues Fachgebiet der Naturwissenschaften geboren. Angefangen von der chemischen Isolierung des Radiums und Poloniums 1898 aus Uranerzen durch Marie und Pierre Curie (Nobelpreis für Physik 1903, für Chemie 1911) wurden in den folgenden Jahren eine Reihe von Entwicklungen und Entdeckungen gemacht, die zu einer Erweiterung der begrenzten Anzahl an natürlichen Radioisotopen um eine große Anzahl künstlicher Radionuklide führte: das Zyklotron durch E.O. Lawrence 1930, die neutroneninduzierte Kernspaltung durch O. Hahn (Nobelpreis für Chemie 1944) und F. Strassmann 1938/39 und der Bau des ersten Kernreaktors durch E. Fermi u. L. Szillard 1942 [1, 2]. Der Einsatz der Radionuklide erstreckt sich auf Datierungsmethoden, die Aufklärung von biochemischen Prozessen und Reaktionsmechanismen in der organischen Chemie, analytische *in vitro* Methoden (Verdünnungsanalyse, Aktivierungsanalyse, Radioimmunoassay, Autoradiographie etc.), Diagnose und Therapie in der Nuklearmedizin, Entwicklung neuer Radiopharmaka [3, 4, 5] etc.

Den meisten Anwendungen von Radionukliden in den Naturwissenschaften liegt das 1913 von G. von Hevesy und F. A. Paneth eingeführte Radiotracerprinzip (Tracer = "Spurindikator") zugrunde [6], das auf dem Einsatz von radioaktiv markierten Verbindungen im nano- bis picomolaren Stoffmengenbereich beruht. Bei der Nutzung dieser geringen Stoffmengen ist es möglich, chemische Reaktionsabläufe und biochemische Prozesse auch unter *in vivo* Bedingungen zu verfolgen, ohne dabei die Physiologie aufgrund von Gleichgewichtsverschiebungen zu beeinflussen. Sogar toxische und zentralwirksame Substanzen können unter diesen Bedingungen eingesetzt werden, ohne eine toxikologische oder immunologische Reaktion auszulösen [7]. Hierbei wird unterschieden zwischen Isotopentracern, die mit einem Isotop von Elementen markiert sind, die in den natürlichen, biochemischen Verbindungen vorkommen (z. B. ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{30}P), und sogenannten Analogtracern (markiert mit z. B. ^{18}F , ^{73}Se , ^{75}Br , ^{123}I). Während sich die Isotopentracer in ihrem chemischen und biochemischen Verhalten nicht von den nativen Verbindungen unterscheiden, werden bei den Analogtracern das Radionuklid und die Markierungsposition so gewählt, daß aufgrund von chemischen und sterischen Analogien die physiologischen Eigenschaften durch die Markierung nicht gravierend verändert werden (z. B. 2- ^{18}F Fluortyrosin [7]) bzw. eine damit verbundene Än-

derung der biochemischen Eigenschaften, wie im Fall des 'Trappings' von 2-[¹⁸F]Fluorodeoxyglucose, gezielt genutzt wird [8]. Fluor, das wichtigste Element zur Herstellung von Analogtracern, und Wasserstoff haben aufgrund ihrer ähnlichen Atomradien (R_F : 1,35 Å; R_H : 1,20 Å) einen vergleichbaren sterischen Raumanspruch und eine ähnliche Bindungsenergie der C-F bzw. C-H Valenz [9]. Aufgrund der unterschiedlichen Elektronegativität kommt es jedoch zu einer Veränderung der Polarität innerhalb des Moleküls bei einem F- für H-Austausch. Eine weitere Analogie besteht in der Ähnlichkeit der C-F und der C-OH Bindung in ihrer Bindungslänge, ihrem Dipolmoment und der Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, wobei Fluor jedoch als Protonen-Akzeptor fungiert. Aufgrund ihres ähnlichen sterischen Raumbedarfs werden Brom- und Iodisotope als Analoge für die CH₃-Gruppe eingesetzt. Selen-73, das sich chemisch ähnlich verhält wie Schwefel, kann zur analogen Markierung von schwefelhaltigen Verbindungen wie z. B. [⁷³Se]Selenomethionin dienen [10, 11, 12].

Zur Anwendung in der Medizin eignen sich von den heute ca. 1600 bekannten Radionukliden aufgrund ihrer nuklearen Eigenschaften nur wenige. Die Strahlungsart, das Verhältnis der Gewebe durchdringenden Strahlung zur absorbierten Strahlung, die physikalische Halbwertszeit, die so gewählt wird, daß sie der Dauer des Studienprotokolls angemessen ist, aber die Strahlungsbelastung des Patienten nicht zu groß wird, die Eigenschaften der Tochternuklide, die Produktionsbedingungen und die Verfügbarkeit sind entscheidende Auswahlkriterien für ein geeignetes Radionuklid [13]. Ein zur Diagnose eingesetztes Radionuklid sollte eine Halbwertszeit von $T_{1/2} < 1$ d und eine von außerhalb des Körpers gut detektierbare γ -Strahlung von 80-300 keV haben bzw. ein Positronenstrahler sein, auf dessen Zerfall die Aussendung der 511 keV-Annihilationsstrahlung folgt. Dagegen sollten Therapienuklide Partikelstrahlung (α -, β -Strahlung, Auger-Elektronen) emittieren, eine Halbwertszeit von 1 - 10 d und einen hohen LET-Wert (LET = Linear Energy Transfer) besitzen.

Mit der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und der Einzel-Photonen-Emissions-Tomographie (SPET) ist es möglich, mittels Positronen- bzw. γ -Quanten-emittierender Nuklide bzw. mit ihnen markierter Verbindungen regional ablaufende biochemische und physiologische Prozesse auf molekularer Ebene *in vivo* zu erfassen [14, 15, 16]. Im Gegensatz hierzu werden mit anderen bildgebenden Verfahren in der Medizin, wie Röntgen-Computer-Tomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT), die morphologischen Strukturen abgebildet.

Einzel-Photonen-Emissions-Tomographie

Für SPET-Aufnahmen werden Radionuklide mit einer dominanten γ -Linie zwischen 100 - 300 keV benötigt (s. Tabelle 1.1), dem Ansprechbereich der verwendeten NaI(Tl)-Detektoren, die außer den γ -Quanten keine weitere Strahlung emittieren sollten [17]. Es werden mittels eines Systems aus ein bis drei γ -Kameras, die um die Körperachse des Patienten rotieren, Schichtaufnahmen des interessierenden Organs aufgenommen. Durch Verwendung moderner Systeme aus zahlreichen, ringförmig angeordneten γ -Kameras kann die im Vergleich zu PET relativ lange Aufnahmezeit deutlich verkürzt werden, so daß auch dynamische Prozesse mit SPET erfaßt werden können [17]. Da der genaue Herkunftsort des emittierten γ -Quants nicht bestimmt und eine Abschwächungskorrektur der Strahlung im Körper nur bedingt durchgeführt werden kann, ergibt sich eine im Vergleich zu PET schlechtere Auflösung (7 - 8 mm) und damit schlechtere Qualität der Aufnahmen. Eine Quantifizierung der Meßergebnisse ist nur eingeschränkt als Relativmessung möglich [18]. Trotzdem hat sich dieses Verfahren in der medizinischen Diagnostik etabliert, da entscheidende Vorteile die bessere Verfügbarkeit geeigneter Radionuklide (z. B. ^{99m}Tc , ^{123}I oder ^{201}Tl) und die wesentlich geringeren Anschaffungskosten der SPET-Geräte sind [17].

Tabelle 1.1: Zerfallseigenschaften der wichtigsten SPET-Radionuklide [aus 2, 19]

Nuklid	Halbwertszeit $T_{1/2}$ [h]	Zerfallsart (Häufigkeit [%])	γ -Linie [keV] (%)
analoge			
^{123}I	13,02	EC (100)	159 (83)
^{77}Br	56	EC (99,3)	239 (22,4); 521 (20,3)
metallische			
^{67}Ga	78,3	EC (100)	93 (37); 185 (20)
^{99m}Tc	6,02	IT (> 95)	141 (87)
^{111}In	67,9	EC (100)	171 (91); 247 (94)
^{201}Tl	73,1	EC (100)	166 (10,2)

Positronen-Emissions-Tomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie nimmt eine gewisse Sonderstellung ein, da mit ihr nicht nur eine hohe temporale und regionale Auflösung (1 mm) erreicht wird, sondern auch

eine Quantifizierung der örtlichen Aktivitätsverteilung und damit eine Quantifizierung molekularer Vorgänge bis in den Bereich von pico- bis nanomol möglich ist [15, 20]. Das Meßverfahren nutzt den „Positronenzerfall“ neutronenarmer Radionuklide, wobei durch Umwandlung eines Protons (p) in ein Neutron (n) im Kern ein Positron (β^+) zusammen mit einem Neutrino (ν) emittiert wird. Nachdem das Positron auf seinem Bremsweg von wenigen Millimetern im Gewebe durch Ionisation und Anregung der umgebenden Materie thermalisiert worden ist, rekombiniert es mit seinem Antiteilchen, dem Elektron (e^-). Dabei wird eine der doppelten Ruhemasse des Elektrons entsprechende Energie in Form zweier 511 keV γ -Quanten unter einem Winkel von annähernd 180° ausgesandt [3, 21]. Diese Annihilationsstrahlung kann aufgrund ihres guten Durchdringungsvermögens von organischer Materie mit externen Detektoren gemessen werden. Hierzu sind BGO- (Bismutgermanat) bzw. LSO- (Luthetiumsilikat) Detektoren meist ringförmig in mehreren Schichten um den Patienten angebracht. Jeweils zwei sich gegenüberliegende Detektoren sind so in Konzidenz geschaltet (auch über die verschiedenen Schichten), daß nur die Zerfallsereignisse registriert werden, die innerhalb einer Koinzidenzauflösungszeit von wenigen Nanosekunden in zwei gegenüberliegenden Detektoren erfaßt werden. Somit wird ohne Kollimatoren eine hohe Ortsauflösung erreicht. Aufgrund der jeweils vollständigen Durchstrahlung des organischen Gewebes durch die beiden γ -Quanten kann in einer unabhängigen, externen Messung der Streu- und Absorptionsverluste eine quantitative Bestimmung der im Patienten gemessenen Aktivitätsverteilung erfolgen. Zusätzlich zur Aufnahme von Zeit-Aktivitäts-Kurven im Gewebe wird die Input-Kurve im Blut durch Messen der Aktivität im arteriellen Blut des Patienten vor und während der PET-Aufnahme ermittelt. Nach Anwenden biologisch-mathematischer Modelle auf die Zeit-Aktivitäts-Kurven werden so mit hoher regionaler Auflösung quantitative Aussagen über physiologische Prozesse und Parameter erhalten, wie Perfusionsraten, Enzymkonzentrationen, Immunreaktionen, Substratstoffwechsel, Rezeptordichten und -besetzungen, Biochemie von Neurotransmittern, Pharmakokinetik und Pharmakologie von Arzneimitteln.

Positronen-Strahler

Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die nuklearen Eigenschaften der wichtigsten Radionuklide für die Positronen-Emissions-Tomographie.

Der Einsatz der Isotopentracer ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O und ^{30}P ist aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeiten auf schnell synthetisierbare Radiopharmaka und die Messung schneller Stoffwechselprozesse beschränkt und erfordert, daß Zyklotron und PET-Klinik am gleichen Ort sind. ^{15}O und ^{13}N werden zur Bestimmung des regionalen Blutflusses oder des Sauerstoffverbrauchs in Form

einfacher Moleküle eingesetzt, wie $[^{15}\text{O}]\text{O}_2$, $[^{15}\text{O}]\text{CO}$, $[^{15}\text{O}]\text{CO}_2$, $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$, $[^{15}\text{O}]\text{n-Butanol}$ [22] und $[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$, das auch bereits zur Darstellung markierter Aminosäuren genommen wurde [23].

Tabelle 1.2: Zerfallseigenschaften der wichtigsten PET-Radionuklide [aus 5, 2, 19, 24]

Nuklid	Halbwerts- zeit $T_{1/2}$ [min]	Zerfallsart (Häufigkeit [%])	max. E_{β^+} [keV] (rel. %)	γ -Hauptlinie [keV] (Häufigkeit [%])
organische				
^{11}C	20,3	β^+ (99,8) EC (0,2)	960 (100)	511 (199,6)
^{13}N	9,96	β^+ (100)	1190 (100)	511 (200)
^{15}O	2,03	β^+ (99,9) EC (0,1)	1723 (100)	511 (200)
^{30}P	2,5	β^+ (100)	3245 (100)	511 (200)
analoge				
^{18}F	109,7	β^+ (96,9) EC (3,1)	635 (100)	511 (193,8)
^{73}Se	426,0	β^+ (65,0) EC (35,0)	1320 (91,3)	361 (97,0); 511 (130)
^{75}Br	96,0	β^+ (75,5) EC (24,5)	1740 (100)	287 (91,6); 511 (151)
^{76}Br	960,0	β^+ (57,0) EC (43,0)	3980 (22,0)	511 (114); 559 (74)
$^{120\text{g}}\text{I}$	79,2	β^+ (46) EC (54)	4000 (46,0)	511 (92); 601,1 (5,8); 1523 (11,2)
^{122}I	3,6	β^+ (77) EC (23)	3120	564 (18)
^{124}I	5904,0	β^+ (25) EC (75)	2140	511 (50)
metallische				
^{38}K	7,6	β^+ (100)	2680	511 (200), 2167,5 (99,8)
^{62}Cu	9,7	β^+ (98) EC (2)	2930	511 (196)
^{68}Ga	68,3	β^+ (90) EC(10)	1900	511 (180)
^{72}As	1560	β^+ (77) EC(23)	4355	511 (154), 834 (80)
^{82}Ru	1,3	β^+ (96) EC(4)	3350	511 (192), 776,5 (13)
^{86}Y	14,7	β^+ (34) EC(66)	1300	511 (68), 627,7 (33), 777,4 (23), 1076,6 (82), 1153 (31), 1920,7 (21)
$^{94\text{m}}\text{Tc}$	52	β^+ (72) EC(28)	2470	511 (144), 871,1 (94)

Die Halbwertszeit des Kohlenstoff-11 von 20,3 min erlaubt bereits Mehrstufensynthesen. Hierbei werden die primären Bestrahlungsprodukte $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ und $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ zunächst zu sekundären Markierungsvorläufern wie z. B. $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{Li}$, $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OSO}_2\text{CF}_3$, $[^{11}\text{C}]\text{COCl}_2$ oder $[^{11}\text{C}]\text{Carbonsäuren}$ umgesetzt, über die dann ein breites Spektrum an ^{11}C -markierten Radiotracer zugänglic ist [5]. Sind aufwendigere Aufbausynthesen notwendig oder anspruchsvollere PET-Studien gefordert, so werden die längerlebigen Nuklide ^{18}F , $^{75,76}\text{Br}$, $^{120,124}\text{I}$ oder ^{73}Se genommen. Die metallischen Positronenemitter sind oftmals Generatorknuklide (^{62}Cu , ^{69}Ga , ^{82}Ru) und damit leicht zugänglic [25]. Sie werden in Form von stabilen, an Biomoleküle gebundenen Komplexen oder als freie Ionen (zur Perfusionsmessung: ^{38}K , ^{82}Rb [5]) eingesetzt oder - wie im Falle von ^{86}Y - zur Quantifizierung der Bioverteilung von Radiotherapeutika (^{90}Y) [26].

Eine herausragende Stellung unter den PET-Radionukliden nimmt das Fluor-18 aufgrund folgender Vorteile ein:

- Seine Halbwertszeit von 109,7 min stellt ein Optimum bezüglich Radiopharmakasynthese, Reinigung und Qualitätskontrolle einerseits sowie radioaktiver Belastung des Patienten andererseits dar und ermöglicht die Messung physiologischer Prozesse mit relativ langsamer Pharmakokinetik.
- Fluor-18 besitzt von den PET-Nukliden die niedrigste β^+ -Energie (635 keV), woraus die bestmögliche Ortsauflösung (≥ 1 mm) und geringste β^+ -Dosis resultiert.
- Da das Element Fluor nur mit einer natürlichen Häufigkeit von 0,028 Gew.-% in der Geosphäre vorkommt [9], ist eine hohe spezifische Aktivität erreichbar, die z. B. für Rezeptordichtebestimmungen unerlässlich ist.
- Aufgrund der hohen Stabilität der C-F-Bindung (ca. 444 kJ/mol) [27] erreicht der ^{18}F -Tracer in der Regel seinen Bestimmungsort ohne Verlust des Radionuklids.

1.2 Produktion von Fluor-18

Für die Produktion von Radionukliden ist es unabdingbar, deren nukleare Daten und die Anregungsfunktionen der jeweiligen Kernreaktionen zu kennen. Von den über 20 bekannten Kernreaktionen zur Produktion von Fluor-18, die seit der Entdeckung dieses Radionuklids 1937 durch A. H. Snell [28] untersucht worden sind, sind in Tabelle 1.3 die heute zur Routi-

neproduktion von Fluor-18 an kleinen, stromstarken Beschleunigern (Kompakt- oder Mini-zyklotron) vier wichtigsten aufgeführt.

Tabelle 1.3: Wichtigste Kernreaktionen zur Produktion von Fluor-18 am Zyklotron
[aus 29, 30, 31]

Kernreaktion	$^{16}\text{O}(^3\text{He,p})^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}(\text{p,n})^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}(\text{p,n})^{18}\text{F}$	$^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$
Targetmaterial	H_2O	$\text{H}_2^{18}\text{O}^{\text{a)}$	$^{18}\text{O}_2^{\text{b)}$ 20 bar	Ne (0,1-0,2% F_2) 18 bar ^{c)}
Energie des Geschoßteilchens [MeV]	$36 \rightarrow 0$	$16 \rightarrow 0$	$10 \rightarrow 0$	$11,2 \rightarrow 0$
chem. Form des Fluor-18	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$	$[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}_2$	$[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}_2$
Targetausbeute [MBq/ μAh]	259	2220	≈ 370	370 - 444
spez. Aktivität [GBq/mmol]	$<3,7 \cdot 10^6$	$<3,7 \cdot 10^6$	37 - 1850	37 - 370

a) Ti-Target mit Ti-Fenster, b) zweistufige Bestrahlungsmethode (mit F_2 -Zusatz bei der zweiten Kurzbestrahlung), c) passiviertes Ni-Target

Dabei bestimmen die Art der Kernreaktion und das verwendete Targetmaterial die erreichbare spezifische Aktivität, die produzierbare Aktivitätsmenge und die chemische Form des Fluor-18. Bei der Bestrahlung von natürlichem Wasser über die $^{16}\text{O}(^3\text{He,p})^{18}\text{F}$ -Reaktion bzw. von mit Sauerstoff-18 angereichertem Wasser (Anreicherungsgrad bis 95 %) über die $^{18}\text{O}(\text{p,n})^{18}\text{F}$ -Reaktion wird trägerarmes (no-carrier-added = n.c.a.), solvatisiertes $[\text{}^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ erhalten. Dabei ist letztgenannte Kernreaktion die in der Praxis meist genutzte Produktionsmethode, da mit ihr aufgrund ihres hohen Wirkungsquerschnitts bei relativ geringer Protonenenergie bereits an kleinen Zyklotronen hohe spezifische Aktivitäten und Targetausbeuten erreicht werden. Nach Bestrahlungsende wird das $[\text{}^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ zur Abtrennung von Spuren an Metallkationen aus dem Target und zur Rückgewinnung des ^{18}O -angereicherten Wassers an einem Anionenaustauscherharz fixiert und anschließend mit einer wässrigen Kaliumcarbonatlösung eluiert. Das $[\text{}^{18}\text{O}]\text{Wasser}$ kann nach photooxidativer und destillativer Reinigung erneut zur Bestrahlung eingesetzt werden. Alternativ hierzu wird in einem neueren Verfahren das

[^{18}F]Fluorid elektrochemisch aus dem [^{18}O]Targetwasser an einer Glaskohlenstoff-Anode abgeschieden und nach Entfernung des Targetwassers durch Umpolung des elektrischen Feldes in destilliertes Wasser oder direkt ohne azeotrope Trocknung in die organische Syntheselösung überführt [32, 33].

Unter Verwendung von Gastargets wird über die beiden Kernreaktionen $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ und $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ elektrophiles, elementares [^{18}F]F₂ dargestellt [34, 35, 31]. Aufgrund des Zusatzes von F₂, das zur Extraktion des Fluor-18 aus dem Target unumgänglich ist, werden nur geringe spezifische Aktivitäten der elektrophilen Spezies und aller daraus synthetisierten Tracer erzielt (37 - 1850 GBq/mmol bzw. 1 – 50 Ci/mmol) [36, 31]. Elementares [^{18}F]F₂ mit deutlich größerer spezifischer Aktivität von > 50000 GBq/mmol kann über die elektrische Gasentladung von [^{18}F]Fluormethan in Gegenwart von ca. 150 nmol F₂ produziert werden [29, 37]. Das [^{18}F]CH₃F wird durch vorherige Umsetzung von Iodmethan mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid erhalten.

Über die Reaktionskette $^6\text{Li}(\text{n},\alpha)^3\text{H} \rightarrow ^{16}\text{O}(^3\text{H},\text{n})^{18}\text{F}$ kann Fluor-18 durch Bestrahlung von LiOH oder Li₂CO₃ auch im Reaktor produziert werden. Die hierbei erhältliche Fluoraktivität von 1 - 4 GBq ist relativ niedrig und die Aufarbeitung des Targets vor allem in Hinblick auf die großen Mengen an produziertem Tritium sehr aufwendig [38].

1.3 Chemische und kinetische Aspekte bei Synthesen mit trägerarmen Radionukliden

Die spezifische Aktivität eines Radiopharmakons, dessen applizierte Stoffmenge im allgemeinen im Subnanomol-Bereich liegt, ist in der Radiopharmazie ein wichtiges Qualitätskriterium. Bei PET-Untersuchungen der Distribution von Biomolekülen, die im zu untersuchenden Bereich u. U. in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, wie z. B. Enzyme, Rezeptoren, Neurotransmitter, Hormone etc., darf der eingesetzte Radiotracer die Sättigungskonzentration solcher Zielmoleküle nicht erreichen. Daher muß er möglichst frei sein von Verbindungen, die anstelle des Radionuklids das entsprechende stabile Isotop enthalten, d. h. der Tracer muß eine hohe spezifische Aktivität haben. Die absolute Stoffmenge des verabreichten Radiotracers ist dabei so gering, daß neben den pharmakodynamischen Effekten insbesondere auch immunologische und sogar toxische Reaktionen ausgeschlossen werden können.

Die spezifische Aktivität A_s ist definiert als Quotient der Aktivität A , die die Anzahl der Zerfälle pro Zeiteinheit angibt, und der Masse m [3]:

$$A_s = A/m \quad [\text{Bq/g}]$$

Wird in der Definitionsgleichung der Aktivität die Zerfallskonstante λ durch $\ln 2/T_{1/2}$ ersetzt, ergibt sich:

$$A = -\frac{dN}{dt} = N \cdot \lambda = \frac{N \cdot \ln 2}{T_{1/2}} \quad [\text{Bq}]$$

Hieraus ist zu ersehen, daß mit zunehmender Halbwertszeit $T_{1/2}$ des Radionuklids und zunehmender Masse m die spezifische Aktivität abnimmt.

Die theoretisch erreichbare maximale molare Aktivität $A_{s,\text{max}}$, die für den Fall gilt, daß alle Moleküle radioaktiv markiert sind bzw. nur Radionuklide vorliegen, ergibt sich unter Einführung der Stoffmenge und molarer Einheiten (N_L = Lohschmidt'sche Konstante) zu:

$$A_{s,\text{max}} = N_L \cdot \lambda \quad [\text{Bq/mol}]$$

Somit hängt die maximale molare Aktivität revers proportional von der Halbwertszeit des entsprechenden Radionuklids ab. Sie beträgt z. B. für die beiden am häufigsten eingesetzten PET-Nuklide ^{18}F und ^{11}C $6,3 \cdot 10^{10}$ Bq/mol bzw. $3,4 \cdot 10^{11}$ Bq/mol, die jedoch in der Praxis nie erreicht werden. In der Radiochemie werden folgende drei Fälle unterschieden:

- trägerfreie oder carrier-free (c.f.) Synthesen,
- trägerarme oder no-carrier-added (n.c.a.) Synthesen,
- geträgerte oder carrier-added (c.a.) Synthesen.

Die trägerfreie Synthese, bei der das Produkt keine isotopen Verunreinigungen aufweist, stellt einen Idealfall dar, der nur mit Radioelementen wie Technetium oder Astat realisiert werden kann. Mit den Radioisotopen der allgegenwärtigen Elemente Kohlenstoff, Stickstoff, Fluor etc. sind nur trägerarme Synthesen möglich, d. h. Synthesen ohne gezielten Trägerzusatz. Durch den Kontakt mit der Umgebung, Chemikalien, Reaktionsgefäßen etc. werden die Radioisotope durch ihre stabilen Isotope entsprechend ihrer natürlichen Häufigkeit verdünnt, und damit ihre spezifische Aktivität verringert. Im Fall der geträgerten Synthese wird aus reaktionsmechanistischen oder produktionstechnischen (z. B. im Fall von $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ [34, 35, 31]) Gründen gezielt ein stabiles Isotop zugegeben.

Bei Synthesen mit trägerarmen, kurzlebigen Radionukliden kann es aufgrund der sehr geringen Massen zu Effekten kommen, die in der makroskopischen Chemie keine bzw. nur eine nebensächliche Rolle spielen. So kann es zu Adsorptionsverlusten an Glasoberflächen von Laborgeräten, Kolloidbildung und zu Nebenreaktionen mit Spuren an Verunreinigungen selbst hochreiner Chemikalien kommen.

Da bei bimolekularen Markierungsreaktionen mit n.c.a. Radionukliden der allgemeinen Form $R + E \rightarrow P$ das Radionuklid R in einem Unterschuß um mehrere Zehnerpotenzen zum Edukt E vorliegt, bleibt die Eduktkonzentration $[E]$ quasi konstant, und die Reaktionskinetik gehorcht einem Geschwindigkeitsgesetz "pseudo-erster-Ordnung". Für die Produktkonzentration $[P]$ ergibt sich bei einer Anfangskonzentration $[R_0]$ des Radionuklids und einer Reaktionszeit t [3, 39]:

$$[P] = [R_0](1 - e^{-k't}) \quad \text{wobei } k' = k[E] \equiv k[E_0]$$

Hierbei ist k' die apparente Geschwindigkeitskonstante, das Produkt aus der Geschwindigkeitskonstanten k und der Eduktkonzentration E_0 . Wird die Eduktkonzentration bei einer konstanten Reaktionszeit variiert, so läßt sich entsprechend die Reaktionszeit anstelle der Eduktkonzentration in die Geschwindigkeitskonstante einbeziehen ($k'' = k \cdot t$). In beiden Fällen steigt die auf die Anfangsaktivität zerfallskorrigierte radiochemische Ausbeute mit zunehmender Reaktionszeit bzw. Eduktkonzentration exponentiell an und erreicht einen Sättigungswert. Wird keine Zerfallskorrektur durchgeführt, so beträgt die tatsächliche Ausbeute des Radioprodukts:

$$[P] = [R_0](1 - e^{-k't}) \cdot e^{-\lambda t}$$

In diesem Fall durchläuft die radiochemische Ausbeute in Abhängigkeit von der Zerfallskonstanten λ des Radionuklids und der Geschwindigkeitskonstanten k' ein Maximum.

Aufgrund der in diesem Abschnitt beschriebenen chemischen und kinetischen Aspekte bei trägerarmen Synthesen sind folgende Bedingungen bei der Darstellung von Radiopharmaka zu beachten:

- Zur Vermeidung von Nebenreaktionen, Adsorptionsverlusten und Isotopenverdünnung sollten ausschließlich hochreine Chemikalien und geeignete Werkmaterialien verwendet werden.

- Aus Strahlenschutzgründen und im Hinblick auf die Aktivitätsausbeute und Routineproduktion sollte die Markierungsreaktion möglichst der letzte Reaktionsschritt sein.

Die gesamte Synthese einschließlich Reinigung und Qualitätskontrolle des Radiopharmakons sollte innerhalb von etwa drei Halbwertszeiten abgeschlossen sein. Dies erfordert schnelle Synthesen und Methoden der Reinigung und Qualitätskontrolle, wie z. B. die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).

1.4 Methoden zur Markierung mit Fluor-18

Die Markierungen von organischen Molekülen mit Fluor-18 zur Radiotracer-synthese lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen:

Direkte Markierungsreaktionen

- Elektrophile ^{18}F -Fluorierung
- Nukleophile ^{18}F -Fluorierung

Markierungen mittels prosthetischer Gruppen

- ^{18}F -Fluorarylierung
- ^{18}F -Fluoracylierung
- ^{18}F -Fluorphenol
- ^{18}F -Fluoramidierung
- ^{18}F -Fluoralkylierung
- ^{18}F -Fluoramidinierung

1.4.1 Direkte Markierungsreaktionen

Elektrophile ^{18}F -Fluorierung

Die elektrophile ^{18}F -Fluorierung ermöglicht einen leichten Zugang zu ^{18}F -Kohlenwasserstoffen, da elektronenreiche Reaktanden wie Alkene, Aromaten oder Carbanionen direkt mit $^{18}\text{F}\text{F}_2$ oder mit den daraus hergestellten, etwas milderen, elektrophilen ^{18}F -Fluorierungsagenzien Acetylhypofluorit $^{18}\text{F}\text{CH}_3\text{COOF}$ oder Xenondifluorid $^{18}\text{F}\text{XeF}_2$ umgesetzt werden. Ein entscheidender Nachteil ist, neben den notwendigen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit F_2 , die niedrige spezifische Aktivität aufgrund des produktionsbedingten Trägerzusatzes an Fluor [35, 40, 31]. Zudem ist die radiochemische Ausbeute auf maximal 50 % begrenzt, da aus jedem $^{18}\text{F}\text{F}_2$ -Molekül nur ein Fluoratom reagieren kann. Ein weiterer Nachteil ist die hohe Reaktivität der ^{18}F -Fluorierungsagenzien, die trotz Reaktionsführung bei tiefen Temperaturen in gegenüber elementarem Fluor inerten Lösungsmitteln, wie Fluorwasserstoff, Freon, Tetrachlorkohlenstoff und Trifluoressigsäure, zu Mehrfachfluorierungen, Seitenkettenreaktionen, Bildung von Isomerengemischen und zu Reaktionen mit dem Lösungsmittel führt

und somit hohe Anforderungen an die chromatographische Isolierung des gewünschten Produktes aus dem Isomerengemisch stellt. So entsteht z. B. bei der elektrophilen aromatischen Substitution von L-DOPA mit $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ in flüssigem Fluorwasserstoff ein Isomerengemisch von 2-, 5- und 6- $[^{18}\text{F}]$ Fluordopa im Verhältnis 60:5:35, wobei sich nur das 6-Isomer als PET-Radiopharmakon eignet [40]. Das Isomerenverhältnis kann durch entsprechende Derivatisierung der Hydroxylgruppen beeinflusst werden, so daß vom gebildeten $[^{18}\text{F}]$ Fluordopa zu 70 - 86 % das 6-Isomer erhalten wird [41].

Über Demetallierungsreaktionen an organometallischen Markierungsvorläufern, wie organische Silicium-, Quecksilber-, Germanium- oder Zinnverbindungen, kann die Regioselektivität stark erhöht werden [42]. Dabei nimmt die Substituierbarkeit und somit die radiochemische Ausbeute vom Silicium über Germanium zum Zinn hin zu. So beträgt die radiochemische Ausbeute an 4- $[^{18}\text{F}]$ Fluor-L-phenylalanin bei der Synthese über einen entsprechenden Zinnvorläufer 25 % [43]. Auch durch eine Demerkurierung lassen sich gute Ergebnisse erzielen, wie die Darstellungen von 6- $[^{18}\text{F}]$ Fluormetaraminol [44] und 6- $[^{18}\text{F}]$ Fluor-L-dopa [45] zeigen. Die elektrophile ^{18}F -Fluorierung, bei der nur geringe spezifische Aktivitäten in der Größenordnung von 3,7 - 37 GBq/mmol (10 - 100 mCi/mmol) erreicht werden, wird nur in den Fällen eingesetzt, bei denen der Trägergehalt aus toxikologischer oder pharmakologischer Sicht toleriert werden kann und bei denen eine alternative nukleophile n.c.a. ^{18}F -Fluorierung nicht möglich bzw. mit einem erheblich größeren synthetischen und zeitlichen Aufwand verbunden ist. So wurde noch lange in einigen PET-Zentren $[^{18}\text{F}]$ Fluorodeoxy-D-glucose (2- $[^{18}\text{F}]$ FDG) wegen der Einfachheit der Synthese durch elektrophile ^{18}F -Fluorierung von geschütztem 3,4,6-Tri-O-acetyl-D-glucal (TAG) mit $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ bzw. $[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{COOF}$ hergestellt [23], auch wenn durch nukleophile $[^{18}\text{F}]$ Fluorierung deutlich bessere radiochemische Ausbeuten und höhere Aktivitätsmengen erhalten werden.

Nukleophile ^{18}F -Fluorierung

Die nukleophile ^{18}F -Fluorierung ist die wichtigste, weil einzige praktikable Methode zur Darstellung trägerarmer ^{18}F -Verbindungen in hohen spezifischen Aktivitäten, da hier vom n.c.a. $[^{18}\text{F}]$ Fluoridanion ausgegangen werden kann. Bei ihrer Durchführung sind jedoch einige Dinge zu beachten. Neben der Art der zu markierenden Verbindung und der zu substituierenden Gruppe ist die Nukleophilie des Fluoridions ausschlaggebend für das Gelingen der Reaktion. Aufgrund seiner hohen Ladungsdichte und Affinität zu Wasserstoff (HF-Bindungsenthalpie: 574 kJ/mol) [46] entsteht bei Anwesenheit acider Protonen $[^{18}\text{F}]$ Fluorwasserstoff. Weiterhin bildet es mit Metallkationen entsprechende Komplexe und liegt in wäßriger Lösung stark

solvatisiert vor (Δ_{Hydrat} : 506 kJ/mol) [46]. Daher ist es erforderlich, die "geringe" Nukleophilie des Fluoridions durch geeignete Reaktionsbedingungen zu erhöhen. Zudem neigt es zur Adsorption an nahezu allen Materialien, mit denen die Reaktionslösung in Berührung kommt. Als unbedingt notwendige Bedingungen für eine effiziente n.c.a. Radiofluorierung sind daher zu beachten, eine:

- Aktivierung des Fluoridions zur Erhöhung seiner Nukleophilie und seiner Löslichkeit.
- Verwendung dipolar aprotischer Lösungsmittel, Vermeidung acider Protonen und Arbeiten unter wasserfreien Bedingungen.
- Minimierung der Adsorptionsverluste durch Verwendung basischer, nicht-isotoper Träger und geeigneter Reaktionsgefäßmaterialien.

Die Aktivierung des [^{18}F]Fluoridions wird durch den Einsatz von Phasentransferkatalysatoren (PTK) in Verbindung mit nicht-isotopen, nicht-nukleophilen, basischen Anionen, wie dem Carbonat- oder Oxalation, als Träger erreicht. Hierbei haben sich Tetraalkylammoniumcarbonate und -hydroxide [47] und ganz besonders Aminopolyether wie Kryptofix 2.2.2[®] in Kombination mit K_2CO_3 [48, 49] oder Puffersystemen aus $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ -Gemischen [50] als basischen Bestandteil in der Praxis bewährt. Durch die Bildung eines Ionenpaares zwischen dem [^{18}F]Fluorid und dem Tetraalkylammoniumkation bzw. dem Kaliumkation, das, durch den Aminopolyether komplexiert, als Kryptat vorliegt, wird das [^{18}F]Fluorid in organischen Solventien seiner Solvathülle entzogen und besitzt als "nacktes" [^{18}F]Fluoridion eine gesteigerte Löslichkeit und eine erhöhte Nukleophilie. Durch den Basenzusatz wird durch β -Eliminierung entstandener [^{18}F]Fluorwasserstoff deprotoniert, und so das [^{18}F]Fluorid wieder verfügbar gemacht. Daher können mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid sogar nukleophile Substitutionen durchgeführt werden, während im äquimolaren Bereich das Eliminierungsprodukt das Hauptprodukt ist. Während das stark basische $[\text{K} \subset 2.2.2.]_2\text{CO}_3$ -System nur bei Verbindungen eingesetzt werden kann, die im Temperaturbereich von 50 - 160°C gegenüber starken Basen stabil sind, konnten mit dem weniger basischen Oxalat- bzw. Carbonat/Oxalat-System auch basenempfindliche Moleküle erfolgreich ^{18}F -fluoriert werden, wie z. B. die dopaminergen Rezeptor-Liganden N-[^{18}F]Methylspiperon [51, 52] und [^{18}F]Methylbenperidol [53]. Die dipolar aprotischen Lösungsmittel Acetonitril, N,N-Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO) und N,N-Dimethylacetamid (DMAA) eignen sich hervorragend für nukleophile ^{18}F -Fluorierungen, während Lösungsmittel mit kleiner Dielektrizitätskonstante wie Tetrahydrofuran, Dichlormethan, Dichlorbenzol und Aceton kaum Anwendung finden.

Bei der praktischen Durchführung wird das in Wasser gelöste Phasentransferkatalysator-System mit der wäßrigen [^{18}F]Fluorid-Lösung versetzt. Anschließend wird das Wasser durch azeotrope Destillation mit Acetonitril vollständig entfernt. Der Markierungsvorläufer wird dann in einem geeigneten Lösungsmittel zugegeben. Solange das Löslichkeitsprodukt des Phasentransfersystems hierbei nicht überschritten wird, sind die Adsorptionsverluste an den Gefäßwänden vernachlässigbar [54]. Alternativ hierzu kann das [^{18}F]Fluorid nach elektrochemischer Abscheidung an der Anode und Entfernen des Targetwassers durch Umpolung des elektrischen Feldes in eine organische Markierungslösung desorbiert werden (vgl. 1.2) [33].

Nukleophile aliphatische ^{18}F -Fluorierung

In den oben genannten dipolar aprotischen Lösungsmitteln verlaufen aliphatische nukleophile Substitutionen mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid ausschließlich nach dem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus. Dabei dienen Halogene und Sulfonsäureester (Mesylat, Tosylat, Nosylat, Triflat) als Abgangsgruppen [55]. Als wichtigstes Beispiel ist die stereospezifische Synthese von 2- ^{18}F Fluor-2-deoxy-D-glucose (2-FDG) mit einer radiochemischen Ausbeute von 65 % zu nennen, dem zur Zeit meist verwendeten PET-Radiodiagnostikum zur Messung des regionalen Glucosestoffwechsels [56]. Hierbei findet beim Austausch von Triflat durch [^{18}F]Fluorid im vollständig acetylierten Mannosivorläufer eine Walden-Umkehrung statt. Weiterhin läßt sich durch Substitution einer Tosylatgruppe 4- ^{18}F Fluorprolin, ein Radiotracer zur Untersuchung der Aminosäureaufnahme im Gewebe, diastereomerenrein mit einer radiochemischen Ausbeute von 36 ± 7 % darstellen [57].

Nukleophile aromatische ^{18}F -Fluorierung

Fluorierte aromatische Verbindungen besitzen meist eine hohe metabolische Stabilität unter physiologischen Bedingungen. Daher ist insbesondere die nukleophile aromatische Substitution (s. Abb. 1.1) von großer Bedeutung für die Darstellung einer Reihe ^{18}F -fluorierter Radiopharmaka.

Die zur nukleophilen aromatischen Substitution notwendige Aktivierung der Aromaten erfolgt über ortho- oder para-ständige Substituenten, die aufgrund ihres -I und -M Effekts auf die Abgangsgruppe elektronenziehend wirken. Hierfür kommen vor allem die Nitro-, Cyano- und Carbonylgruppe in Frage. Als Abgangsgruppe eignen sich trialkylierte Ammoniumgruppen, die Nitrogruppe sowie die Halogene. Dabei wird Fluor als Abgangsgruppe nur dann eingesetzt, wenn eine hohe spezifische Aktivität des Radiotracers nicht erforderlich ist, da der Austausch von Fluor-19 durch Fluor-18 naturgemäß zu geträgerten Produkten führt. Da die

Trimethylammonium-Abgangsgruppe bisher die größte Nukleofugie besitzt, hat sie auch die größte Bedeutung [58]. Zusammen mit Triflat als Gegenion liefert sie die besten radiochemischen Ausbeuten im Vergleich zu Iodid und Perchlorat als Gegenionen [59]. Es lassen sich mit Hilfe der Trimethylammoniumgruppe auch durch Halogene nur schwach aktivierte Aromaten, wenn auch nur in geringen Ausbeuten, in ihre 1-[^{18}F]Fluor-4-haloarenderivate überführen [60, 61]. Aus den 1-[^{18}F]Fluor-4-haloarenderivaten wiederum können 1-[^{18}F]Fluorphenyllithiumverbindungen synthetisiert werden, die eine ^{18}F -Fluorarylierung ermöglichen. Ein großer Nachteil der Trimethylammoniumgruppe ist die zur nukleophilen aromatischen Substitution in Konkurrenz auftretende Bildung von n.c.a. [^{18}F]Fluormethan. Die Ausbeute an ^{18}F -fluorierten Aromaten bzw. an [^{18}F]Fluormethan ist dabei stark abhängig von der Art und Position der aktivierenden Gruppe [62]. So liegt die radiochemische Ausbeute an [^{18}F]Fluormethan im Falle von para-ständigem, schwach aktivierendem Fluor und Brom, die eine Hammettkonstante von $\sigma_{\text{P}}^0 = 0,06$ bzw. $\sigma_{\text{P}}^0 = 0,22$ haben, im Bereich von 80 %, während bei stark aktivierender Cyano- bzw. Nitrogruppe ($\sigma_{\text{P}}^0 = 0,66$ bzw. $\sigma_{\text{P}}^0 = 0,78$) in para-Stellung kein [^{18}F]Fluormethan entsteht [61]. Am Beispiel der nukleophilen ^{18}F -Fluorierung von 2-Acetyl-N,N,N-phenyltrimethylammonium Triflat, bei der bis zu 67 % [^{18}F]Fluormethan erhalten werden [63], ist der Einfluß der Position zu sehen. Die entsprechende ^{18}F -fluorierte para-Verbindung wird mit ca. 80 % gebildet, während das dabei entstehende [^{18}F]Fluormethan mit 0 - 3 % zu vernachlässigen ist [62, 63].

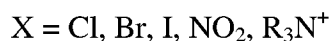
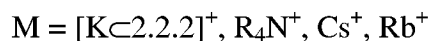
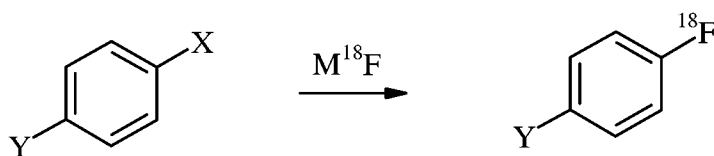


Abb. 1.1: Nukleophile Substitution an Aromaten mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid [nach 64]

Kleine aromatische Modellverbindungen lassen sich oft mit über 80 % äußerst gut nukleophil fluorieren, während es bei komplexeren und sensitiven Molekülen aufgrund der starken Basizität des Tetraalkylammonium- bzw. Kryptofix-Kaliumcarbonat-Systems und der hohen

Reaktionstemperaturen zur Zersetzung und somit nur zu einer geringen oder gar keiner Umsetzung kommt.

[^{18}F]Fluorarene nukleophil desaktivierter Vorläufer können über zwei Wege erhalten werden. Der erste führt über eine Zweistufensynthese, bei der im ersten Schritt ein aktivierter Aromat nukleophil substituiert, und im zweiten Schritt die aktivierende Gruppe abgespalten wird. Als Beispiel sei die Aldehydfunktion genannt, die nach der ^{18}F -Fluorierung mit dem Wilkinson-Katalysator Tris(triphenylphosphin)rhodium-(I)-chlorid unter milden Bedingungen abgespalten werden kann [65]. Nach dieser Methode wurde z. B. der serotonerge Radioligand [^{18}F]Lu29-024 mit einer radiochemischen Ausbeute von 20 - 35 % synthetisiert [66]. Es kann auch eine Oxidation des Aldehyds zum entsprechenden Phenol erfolgen. Auch bei Halogen-aktivierten Aromaten kann nach erfolgter ^{18}F -Fluorierung mit entsprechenden Dehalogenierungsreagenzien wie Tributylzinnhydrid oder Natriumborhydrid die aktivierende Gruppe entfernt werden [61].

Der zweite Weg führt über die Umsetzung von Diaryliodonium-Salzen mit [^{18}F]Fluorid zum entsprechenden [^{18}F]Fluoraren [67]. Werden unterschiedlich substituierte Phenylringe eingesetzt, werden entsprechend zwei ^{18}F -Fluorprodukte erhalten, deren Ausbeute von der Art der Substituenten abhängt. (Abb. 1.2).

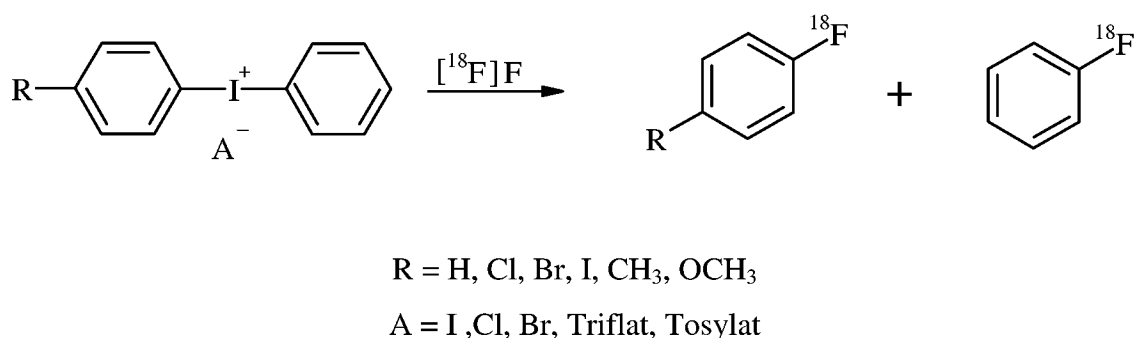


Abb. 1.2: Diphenyliodonium-Salze zur Darstellung von [^{18}F]Fluoralkylarenen [nach 67]

Substituenten mit einem nicht- oder desaktivierenden Charakter, wie z. B. die Methylgruppe oder Halogene, begünstigen die Bildung des substituierten [^{18}F]Fluorarens, wobei mit steigender Anzahl der Methylgruppen eine Zunahme der radiochemischen Ausbeute einhergeht. So wurde 2,3,5,6-Tetramethyl-[^{18}F]fluorbenzol aus (2,3,5,6-Tetramethyl)-diphenyliodonium Triflat mit 51 % dargestellt [68], die erste einstufige Synthese eines [^{18}F]Fluorarens, dessen Markierungsvorläufer einen für nukleophile, aromatische Substitutionen stark desaktivierten Aromaten darstellte. Elektronenschiebende Gruppen wie die Methoxygruppe dirigieren dage-

gen die Reaktion in Richtung [^{18}F]Fluorbenzol [69]. Bromid, Iodid, Triflat und Tosylat eignen sich als Gegenionen A^- , wobei mit den beiden Letztgenannten die besten radiochemischen Ausbeuten resultierten.

^{18}F -Fluor-Dediazonierungsreaktionen

In der präparativen organischen Chemie ist die Balz-Schiemann-Reaktion, bei der es sich ebenfalls um eine nukleophile aromatische Substitution handelt, eine effiziente Methode zur positionsspezifischen Fluorierung von Aromaten. Die durch Diazotierung von Anilinderivaten in Gegenwart von Tetrafluoroborat erhaltenen, unter Normalbedingungen relativ stabilen Diazoniumtetrafluoroborate werden thermolytisch über ihr Arylkation zum entsprechenden Fluoraromaten umgesetzt [70]. Daher wurde die Balz-Schiemann-Reaktion auch schon recht früh zur ^{18}F -Fluorierung von Aminosäuren eingesetzt (3-[^{18}F]Fluor-D,L-tyrosin, 5-[^{18}F]Fluor-2,5-dihydroxy-D,L-phenylalanin, 2-, 3-, 4-[^{18}F]Fluor-D,L-phenylalanin, 5- und 6-[^{18}F]Fluor-D,L-tryptophan) [71]. Allerdings beschränkt das Tetrafluoroboration als Gegenion die radiochemische Ausbeute auf maximal 25% und führt zu schlechten spezifischen Aktivitäten. Ein weiterer Nachteil ist der für trägerarme Synthesen ungünstige $\text{S}_{\text{N}}1$ -Reaktionsmechanismus, der zu einer weiteren Ausbeuteminderung auf weit unter 10 % führt. Die hierbei freigesetzten Kationen und Radikale können unselektiv mit allen vorhandenen Nukleophilen abreagieren, was zu vielen Nebenprodukten führt und die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid deutlich verschlechtert, und zufriedenstellende Ausbeuten nur im makroskopischen Bereich erreichen läßt [64]. Über die Balz-Schiemann-Reaktion werden jedoch auch n.c.a. Produkte in sehr geringer radiochemischer Ausbeute erhalten, wenn anstelle des Tetrafluoroborat-Anions das Tetrachloroborat-Ion als Gegenion gewählt wird [72].

1.4.2 Markierungen mittels prosthetischer Gruppen

Ist eine Direktfluorierung nicht möglich, kann die ^{18}F -Markierung über kleine, gut fluorierbare prosthetische Gruppen erfolgen, die in einem zweiten Schritt an die zu markierende Verbindung gekoppelt werden. Hierzu werden ^{18}F -Fluoralkylierungen [54, 73], ^{18}F -Fluoracylierungen [74, 75], ^{18}F -Fluoramidierungen [76, 77] sowie Umsetzungen mit 4-[^{18}F]Fluorphenyllithium [78] eingesetzt. Durch das Anhängen einer ^{18}F -fluorprosthetischen Gruppe an ein Biomolekül wird dessen physiologisches Verhalten in Abhängigkeit von der Kopplungsposition, der Größe und der Art der angehängten Gruppe unterschiedlich stark beeinflusst.

¹⁸F-Fluorarylierung

Aus 1-¹⁸F-Fluor-4-halobenzol lassen sich metallorganische ¹⁸F-Fluorarylierungsagenzien wie 4-¹⁸F-Fluorphenyllithium [78] oder 4-¹⁸F-Fluorphenylmagnesiumbromid [79] herstellen. Über die ¹⁸F-Fluorierung symmetrisch substituierter Diphenyliodonium Salze kann 1-Brom-4-¹⁸F-fluorbenzol in radiochemischen Ausbeuten von 50 - 60 % dargestellt werden [62]. Dagegen werden über die nukleophile aromatische Substitution am 4-Brom-N,N,N-trimethylanilinium triflat wegen der konkurrierenden Bildung von [¹⁸F]Fluormethan deutlich geringere Ausbeuten erreicht (s. Kap. 1.4.1). Nach einer aufwendigen gaschromatographischen Reinigung wird das 1-Brom-4-¹⁸F-fluorbenzol mit n-Buthyllithium zu 4-¹⁸F-Fluorphenyllithium umgesetzt (s. Abb. 1.3) [62].

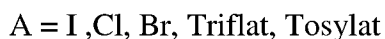
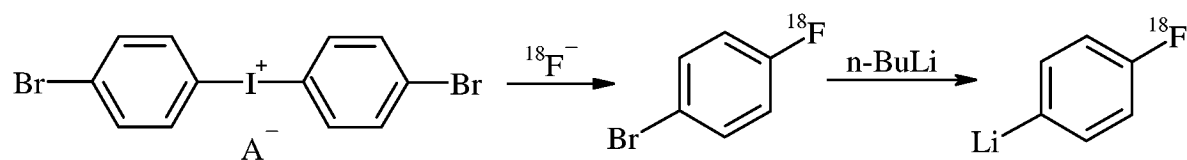


Abb. 1.3: Darstellung von 4-¹⁸F-Fluorphenyllithium ausgehend vom Diphenyliodonium-Salz [nach 62]

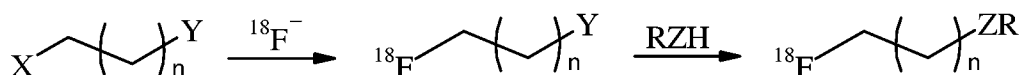
Nachdem an diversen Modellverbindungen die grundsätzliche Anwendbarkeit der ¹⁸F-Arylierung mittels 4-¹⁸F-Fluorphenyllithium gezeigt wurde [80], konnten kürzlich auch über direkte ¹⁸F-Fluorierung nicht zugängliche Verbindungen mittels 4-¹⁸F-Fluorphenyllithium in radiochemischen Ausbeuten von 20 - 30 % hergestellt werden [79].

4-¹⁸F-Fluorphenol

Als eine weitere prosthetische Gruppe bzw. Markierungssynthon sei die Verbindung n.c.a. 4-¹⁸F-Fluorphenol erwähnt, dessen Synthese aus der nukleophilen ¹⁸F-Fluorierung von Bis-(4-nitrophenyl)methanon, nachfolgender Baeyer-Villiger-Oxidation zum 4-Nitrobenzoesäure-4-¹⁸F-fluorphenylester und der Hydrolyse zum 4-¹⁸F-Fluorphenol besteht. Die radiochemische Ausbeute konnte über diesen Syntheseweg auf 60 % verbessert werden, wodurch es an Attraktivität als Markierungssynthon für PET-Tracer gewonnen hat [79]. So wurde es bereits erfolgreich zur Synthese eines Dopamin-D₄ Rezeptor Liganden eingesetzt, der mit einer auf 4-¹⁸F-Fluorphenol bezogenen radiochemischen Ausbeute von 50 % erhalten wurde [81].

¹⁸F-Fluoralkylierung

Bei der ¹⁸F-Fluoralkylierung, die als längerlebige Alternative zur ¹¹C-Alkylierung betrachtet werden kann, werden im ersten Schritt bifunktionelle Alkane, wie Alkylhalogenide, -tosylate und -triflate, ¹⁸F-fluoriert und im nächsten Schritt mit Amino-, Hydroxy- oder Thiolgruppen H-acider Verbindungen umgesetzt (Abb.1.4). Dabei werden mit Bistosylalkanen und Bistrifluormethansulfonylalkanen die besten Ausbeuten erzielt [73]. Zudem können die ¹⁸F-Fluorierung und die anschließende nukleophile Substitution der zweiten funktionellen Gruppe in einer „Eintopfreaktion“ durchgeführt werden. Bei der vom 1,2-Dibromethan ausgehenden Synthese von 2-Brom-1-[¹⁸F]fluorethan ist im Gegensatz zu 2-[¹⁸F]fluorethyltosylat eine einfache Isolierung des Aktivprodukts über ein Kartuschensystem möglich, so daß das 2-Brom-1-[¹⁸F]fluorethan innerhalb von 10 min mit einer radiochemischen Ausbeute von 60 - 70 % in Acetonitril erhalten wird [82]. Im Fall von bifunktionellen Alkanen mit unterschiedlichen Substituenten kann die unterschiedliche Nukleophilie der Gruppen zur selektiven ¹⁸F-Fluorierung genutzt werden und so auf Schutzgruppen verzichtet werden.



X, Y = Br, I, OTos, Otf

Z = NH, NR, O, S

R = Alkyl, Aryl

Abb. 1.4: *¹⁸F-Fluoralkylierung*

Angewendet wurde diese Methode zur Herstellung dopaminerger [83], serotonerger [84], opioider und muskarinischer [85] Rezeptorliganden sowie verschiedener Benzodiazepine [53]. Im Gegensatz zur einstufigen ¹⁸F-Fluorierung durch ¹⁸F-Fluorsubstitution einer Abgangsgruppe an einem entsprechenden Vorläufer werden bei der ¹⁸F-Fluoralkylierung zwei Syntheseschritte benötigt, nämlich die Darstellung des u. U. aufwendig zu isolierenden ¹⁸F-Alkylierungsreagenzes und die eigentliche ¹⁸F-Fluoralkylierung. Hier ist also die der Aufwand einer zweistufigen Radiosynthese mit dem einer Vorläufersynthese zu vergleichen, die sich jedoch u. U. schwierig gestaltet. Als Beispiel sei die zweistufige Synthese von O-(2-[¹⁸F]fluorethyl)tyrosin [86] genannt, die eine aufwendige HPLC-chromatographische Isolierung sowohl der prosthetischen Gruppe als auch des Endprodukts beinhaltet. Eine kürzlich

veröffentlichte Ein-Topf-Synthese durch nukleophile ^{18}F -Fluorierung von N-Trityl-O-(2-tosyloxyethyl)-tyrosin-*tert*-butylester, die mit einer radiochemischen Ausbeute von ca. 80 % verläuft, ermöglicht eine Routineproduktion dieses Tracers in größerem Maßstab [87].

^{18}F -Fluoracylierung

^{18}F -Fluoracylierungen eignen sich insbesondere zur Markierung von Peptiden und Proteinen, da sie im Gegensatz zur ^{18}F -Fluoralkylierung auch in protischen Solventien durchgeführt werden können. Hierzu werden ^{18}F -markierte Aktivester einer einfachen Carbonsäure mit nukleophilen Gruppen, wie Hydroxy-, Thiol- und Aminofunktionen, unter Bildung von Estern, Thioestern und Amiden umgesetzt [75]. Bei den aktivierten Estern handelt es sich um 4-Nitrophenyl-, N-succinimidyl- und Imidazylester. Mit ^{18}F -markierten Methylestern werden allerdings nur bei primären, sterisch ungehinderten Aminen in Methanol bei Erwärmen auf 60 - 80°C zufriedenstellende radiochemische Ausbeuten erzielt. Auch mit [^{18}F]Fluoracetat als kleinstem Acylierungsreagenz wurden bei der Synthese von N- ω -[^{18}F]Fluoracetyl-5-methoxytryptamin [88] und [^{18}F]Fluoracetylserotonin [89] nur geringe radiochemische Ausbeuten erzielt, die bereits bei diesen relativ kleinen Aminen auf die Schwierigkeiten dieser Methode hinweisen.

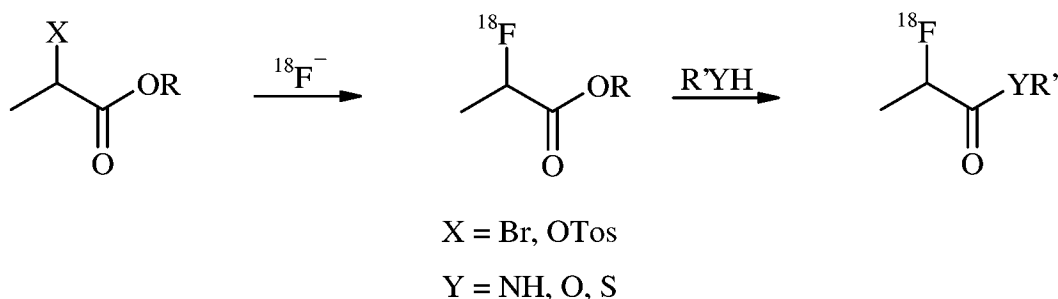


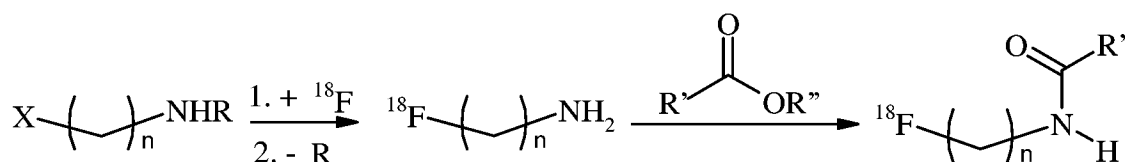
Abb. 1.5: ^{18}F -Fluoracylierung

Als Beispiele seien an dieser Stelle die Darstellungen von [^{18}F]Biotin, [^{18}F]Avidin, [90] und [^{18}F]Octreotid [91] genannt.

^{18}F -Fluoramidierung

Bei der ^{18}F -Fluoramidierung wird im Gegensatz zur ^{18}F -Fluoracylierung nicht die Carboxylkomponente sondern ein Amin ^{18}F -fluoriert. Nach Abspalten der Aminoschutzgruppe kann das [^{18}F]Fluoramin direkt mittels eines Kupplungsreagenzes (z. B. O-(Benzotriazo-yl)-

N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU)) über einen intermediär gebildeten Aktivester an ein Peptid oder Protein gekoppelt werden oder an seinen Aktivester [77, 92].



X = Br, Otos

R = Schutzgruppe

R' = Alkyl, Aryl

R'' = Alkyl, Aryl

Abb. 1.6: ${}^{18}\text{F}$ -Fluoramidierung

Als Beispiele für ${}^{18}\text{F}$ -Fluoramidierungen seien die ${}^{18}\text{F}$ -Fluoramidierung mittels p-[${}^{18}\text{F}$]Fluorbenzylamin (15-Deoxy-13,14-dihydro- Δ^7 -PGA₁) und die ${}^{18}\text{F}$ -Fluoramidierung von Biotin mittels 3-[${}^{18}\text{F}$]Fluorpropylamin [77] genannt.

Auch 4-[${}^{18}\text{F}$]Fluoranilin, eine Zwischenstufe in der Synthese von N-(p-[${}^{18}\text{F}$]Fluorphenyl)-maleinimid [93], und 4-[${}^{18}\text{F}$]Fluorbenzylamin, eine Zwischenstufe in der Synthese von m-Maleinimidobenzoesäure-p-[${}^{18}\text{F}$]fluorbenzamid [93], und N-Succinimidyl-8-[(4'-[${}^{18}\text{F}$]fluorbenzyl)amino]suberat [94] kommen zur ${}^{18}\text{F}$ -Fluoramidierung in Frage.

1.5 ${}^{18}\text{F}$ -Fluorierung von Peptiden und Proteinen

Das Interesse an radioaktiv markierten Peptiden und Proteinen in der Nuklearmedizin zur Diagnose, Therapie und Untersuchung von Krankheitsursachen und physiologischen Prozessen wächst stetig und mit ihm der Bedarf an Markierungsmethoden und neuen prosthetischen Gruppen insbesondere auch mit Fluor-18 [95]. Dabei ging in den letzten drei Dekaden die Entwicklung von großen Proteinen mit niedriger Selektivität (intakte, polyklonale Antikörper) über monoklonale Antikörper mit verbesserter Selektivität, über ihre Fab- und F(ab')₂-Fragmente mit verbesserter Pharmakokinetik, über „single chain antigen binding units“ bis hin zu Rezeptor-spezifischen Peptiden, „molecular recognition units“, die nur aus 10 oder weniger

Aminosäuren aufgebaut sind [95, 96]. Die kleinen Peptide besitzen gegenüber den Proteinen einige entscheidende Vorteile. So verlassen sie schneller den Blutkreislauf und gelangen daher schneller an ihren Wirkungsort. Weiterhin besitzen sie oft eine hohe Aufnahme im Targetgewebe, und das unspezifisch gebundene Peptid verläßt i. a. schnell den Körper, so daß ein gutes Verhältnis von Targetaktivität zu Untergrundstrahlung erhalten wird. Auch werden sie eher vom Immunsystem als nicht-körperfremd akzeptiert. Aufgrund ihrer größeren chemischen Stabilität im Vergleich zu Proteinen lassen sie sich relativ unproblematisch für Markierungsreaktionen und zur gezielten Modifikation ihrer pharmakologischen Eigenschaften derivatisieren bzw. synthetisieren. Die Komplettsynthese eines Proteins ist zudem viel aufwendiger und kostenintensiver als die eines Peptides.

Aufgrund des hohen Oxidationspotentials des Fluors kann das [^{18}F]Fluorid nicht in situ zu einer elektrophilen Fluorspezies oxidiert werden, die zur ^{18}F -Fluorierung von Peptiden und Proteinen eingesetzt werden könnte. Ein [^{18}F]Fluortyrosin-haltiges Endorphinanalogon konnte mittels aus elementarem [^{18}F]Fluor hergestelltem [^{18}F]Acetylhypofluorit nur in geträgerter Form (vgl. 1.4.1) synthetisiert werden [97]. Zur Synthese trägerarmer Produkte wird die ^{18}F -Fluorierung mittels prosthetischer Gruppen über eine der in Kap. 1.4.2 beschriebenen Methoden durchgeführt. Die Darstellung der ^{18}F -fluorprosthetischen Gruppen erfolgt über homo- oder hetero-bifunktionelle Moleküle, die eine Abgangsgruppe zur Einführung des nukleophilen [^{18}F]Fluorids besitzen und eine Linkergruppe elektrophiler oder nukleophiler Natur zur Kopplung ans Peptid.

Bei der ^{18}F -Fluoramidierung wird eine prosthetische Gruppe mit nukleophiler Kopplungsgruppe, der Aminofunktion, eingesetzt. Da Peptide und Proteine funktionelle Gruppen mit nukleophilem Charakter besitzen (Amino-, Thiol-, Alkoholfunktionen, C- und N-Terminus) muß vor dem eigentlichen Kopplungsschritt eine Präkonjugation zur Bereitstellung einer elektrophilen Gruppe am Peptid bzw. Protein erfolgen. Dies kann, wie im Fall der ^{18}F -Markierung von Insulin, die Bildung eines Aktivesters sein [98]. Die trägerarme Synthese von ^{18}F -fluoriertem Insulin beinhaltet die folgenden Syntheseschritte: a) selektives Schützen der A-Gly¹- und B-Lys²⁹-Aminogruppe des Insulins (besitzt drei Aminofunktionen: B-Phe¹, A-Gly¹, B-Lys²⁹), b) Umsetzung des Produkts zum Aktivester mit Disuccinimidylsuberat, c) Umsetzung mit N-[4-(^{18}F)Fluormethyl]benzoyl]-1,4-diaminobutan (s. Abb. 1.7) und d) Entschützung mit Trifluoressigsäure. Angaben über die radiochemische Ausbeute sowie eine Begründung für die Auswahl des relativ kompliziert aufgebauten [^{18}F]Fluoramidierungsagens wurden nicht gemacht.

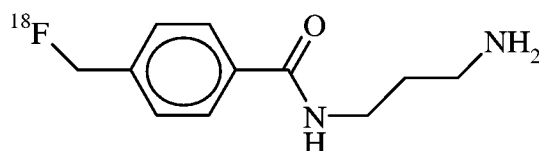


Abb. 1.7: *N*-[4-([^{18}F]Fluormethyl)benzoyl]-L,4-diaminobutan zur ^{18}F -Markierung von Insulin [aus98]

Bei der ^{18}F -Fluoramidierung von Peptiden und Proteinen, die neben ihrem N- und C-Terminus oft noch weitere funktionelle Gruppen, wie z. B. Hydroxyl-, Thiol- und Amidfunktionen, in den Seitenketten besitzen, müssen diese durch entsprechende Schutzgruppen derivatisiert werden, um Neben- und Konkurrenzreaktionen zu verhindern. Durch die Reaktion von 3-[^{18}F]Fluorpropylamin mit Biotin-p-nitrophenylester konnte Biotin quantitativ ^{18}F -fluoramiert werden [77]. Auch das Peptidhormon Oxytocin wurde über eine Amidierung mit Fluor-18 markiert [92]. Hierbei wurde das bis auf den C-Terminus geschützte Peptid in Gegenwart des Kopplungsreagenzes TBTU mit 2-[^{18}F]Fluorethylamin umgesetzt. Es bildet sich intermediär der Hydroxybenzotriazol-Aktivester, wodurch eine Präkonjugation des Peptids nicht erforderlich ist.

Hingegen eignet sich jedoch die ^{18}F -Fluoralkylierung nur beschränkt für die Markierung von Peptiden und Proteinen, da die Reaktivität von bifunktionellen Alkanen oft erst bei erhöhten Temperaturen und in organischen Solventien wie DMF oder DMSO ausreichend ist.

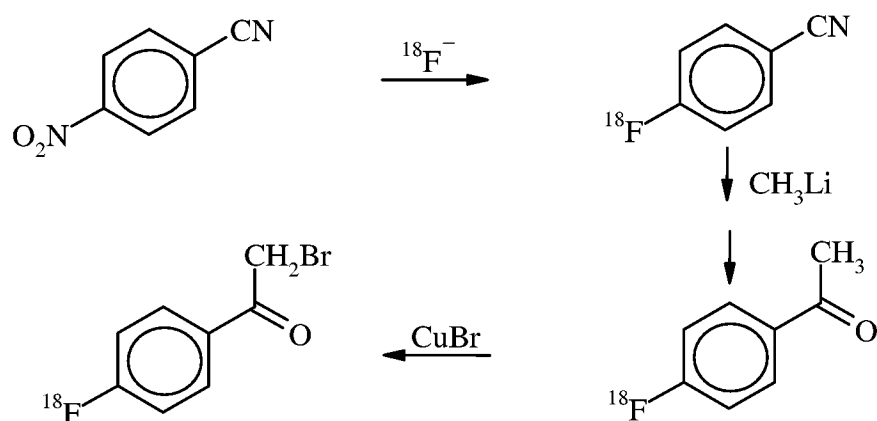


Abb. 1.8: Synthese von 4-[^{18}F]Fluorphenacylbromid zur ^{18}F -Fluoralkylierung [nach 74]

Obwohl die ^{11}C -Markierung von Proteinen mit $[^{11}\text{C}]\text{Methyliodid}$ in wässriger Phase bekannt ist [99], gibt es nur 4- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorphenacylbromid}$ als Beispiel eines für Peptidmarkierungen verwendeten ^{18}F -Fluoralkylierungsreagenzes (s. Abb. 1.8) [74]. Markierungen von Modellproteinen mit diesem Reagens ergaben jedoch nur geringe radiochemische Ausbeuten. Weiterhin war bei der HPLC-Reinigung des Produktes eine Verunreinigung mit 4-Nitrophenacylbromid nicht zu vermeiden.

Die in einer Drei- bzw. Vierstufensynthese herstellbaren ^{18}F -fluorprothetischen Gruppen m-Maleinimidobenzoessäure-p- $[^{18}\text{F}]\text{fluorbenzamid}$ (10 %, 70 min) und N-(p- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorphenyl}$)-maleinimid (15 %, 100 min) können als Spezialfall einer ^{18}F -Fluoralkylierung angesehen werden und dienen zur thioselektiven Alkylierung [93]. Der sterische Anspruch dieser Agenzien grenzt ihre Anwendung jedoch auf die Markierung großer Proteine ein.

Mit der vielseitiger einsetzbaren ^{18}F -Fluoracylierung können ^{18}F -Markierungen von Peptiden und Proteinen auch im wässrigen Milieu unter leicht basischen Bedingungen durchgeführt werden. Die erste ^{18}F -Markierung eines Proteins, der Urokinase, gelang in geringen radiochemischen Ausbeuten mit $[^{18}\text{F}]\text{Fluoracetat}$, dem strukturell einfachsten Vertreter dieser Gruppe, und wasserlöslichen Carbodiimiden zur Konjugation [100].

Während 3- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor-5-nitrobenzimidat}$ für eine breitere Anwendung eine zu geringe Aktivität besitzt, erwiesen sich ^{18}F -fluorierte Ester als geeigneter, auch wenn sich 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorpropionsäuremethylester}$ als relativ unreaktiv gegenüber sterisch gehinderten Aminen herausstellte [75]. Mit N-Succinimidyl-8-[(4'- $[^{18}\text{F}]\text{fluorbenzyl}$)amino]suberat, das in einer Dreistufensynthese innerhalb von 60 min mit 25 - 40 % dargestellt werden kann, wurden ein Immunglobulin sowie ein F(ab)- als auch ein F(ab')₂-Fragment mit 30 - 49 % markiert [94, 101, 102]. N-Succinimidyl-4- $[^{18}\text{F}]\text{fluorbenzoat}$ ($[^{18}\text{F}]\text{SFB}$), das in einer dreistufigen Synthese innerhalb von 100 min mit 25 % hergestellt wurde [103], stellt hierzu eine Alternative dar, mit einem deutlich geringeren sterischen Raumbedarf. Indem das Kopplungsreagenz Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) durch O-(N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborat (TSTU) ersetzt wurde, konnte die Synthesedauer der Acylierungsreaktion auf 35 min reduziert und die Gesamtausbeute auf 50 - 60 % gesteigert werden [104].

Die prothetische Gruppe 4-([^{18}F]Fluormethyl)benzoessäure-N-succinimidylester kann zwar direkt in einem Schritt dargestellt aber in hoher spezifischer Aktivität nur nach einer aufwendigen HPLC-Reinigung mit relativ bescheidenen $16,5 \pm 3$ % radiochemischer Ausbeute erhalten werden [105]. Mit der kleinen 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorpropionyl}$ gruppe ist aufgrund ihrer geringen Größe und geringen Lipophilie nur eine geringfügige Veränderung des *in vivo*-Verhaltens des

Zielmoleküls zu erwarten. Zu ihrer Einführung in Peptide werden die Aktivester 2- ^{18}F Fluorpropionsäure-4-nitrophenyl- bzw. -succinimidylester dargestellt und nicht der im Vergleich dazu reaktionsträge -methylester [106, 107]. Aufgrund seiner geringen Hydrolysestabilität können mit 2- ^{18}F Fluorpropionsäure-N-succinimidylester Acylierungen nur in situ durchgeführt werden [106], während mit 2- ^{18}F Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester und mittels 1-Hydroxybenzotriazol-Katalyse auch regioselektive Acylierungen möglich sind [108]. Weiterhin wurden in einer einstufigen Synthese ^{18}F Pentafluorbenzaldehyd und Pentafluorbenzoesäure- ^{18}F -2,3,5,6-tetrafluorphenylester durch einen ^{18}F -für- ^{19}F Austausch an entsprechenden perfluorierten Vorläufern hergestellt [109]. Diese Reagenzien besitzen allerdings aufgrund ihres hohen Trägergehalts keine Vorteile gegenüber einer direkten elektrophilen Fluorierung. Kürzlich wurde die ^{18}F -Fluorierung eines Peptides mittels Acylierung an fester Phase veröffentlicht [110]. Hierzu wurde nach der Methode der Festphasenpeptidsynthese 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure nach ihrer Synthese in Lösung an den N-Terminus eines Peptides gekoppelt, das über seinen C-Terminus an ein Harz gebunden war. Nach Abspalten vom Harz mit Trifluoressigsäure wurde das ^{18}F -markierte Peptid mit einer auf ^{18}F Fluorbenzoesäure bezogene Ausbeute von 70 - 80 % erhalten. Von Vorteil ist bei dieser Methode, daß die überschüssigen Reagenzien durch einfaches Filtrieren entfernt werden können und keine zeitaufwendigen Extraktions- und Reinigungsschritte notwendig sind. Die Zeit, die für den Acylierungsschritt und die Abspaltung des Peptids vom Harz benötigt wird, kann unter Umständen mit > 30 min von Nachteil sein. Im Fall des oben erwähnten 4-Fluorbenzoylpeptids konnte mittels *N*-[(Dimethylamino)-1H-1,2,2-triazol[4,5,*b*]pyridin-1-ylmethyl]-*N*-methylmethanaminium hexafluorophosphat-*N*-oxid (HATU) als Kopplungsreagenz die Zeit für den Kopplungsschritt auf 3 min und die Abspaltzeit durch Erhöhung der Temperatur auf 37°C auf 10 min reduziert werden.

Im folgenden werden drei weitere prosthetische Gruppen beschrieben, die speziell zur ^{18}F -Markierung von Peptiden eingesetzt wurden.

Bei der selten genutzten ^{18}F -Fluoramidinierung wird ein ^{18}F -fluorierter Imidoester mit einer Aminokomponente umgesetzt (z. B. Amin, Peptid, Protein) (s. Abb. 1.9). Als Beispiel sei die Markierung der Proteine HSA (human serum albumin) und Fibrinogen mittels 3- ^{18}F Fluor-5-nitro-benzimidomethylester mit einer radiochemischen Ausbeute von 30 % bzw. 17 % genannt [74].

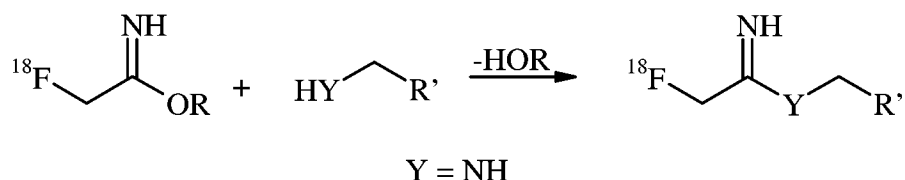


Abb. 1.9: ^{18}F -Fluoramidinierung

Die Kopplung des in einer dreistufigen Synthese hergestellten 4- ^{18}F Fluorbenzoldiazoniumions an die Tyrosineinheit eines Modellpeptids in ortho-Position zur Hydroxylfunktion verläuft bisher mit einer moderaten radiochemischen Ausbeute von ca. 20 %, wohingegen eine entsprechende Diazothioverbindung mit über 90 % an Cystein gekoppelt werden kann [111, 112]. Eine anschließende UV-induzierte Umsetzung der Diazothioverbindung zum 4- ^{18}F Fluorphenylcystein erfolgt in Ausbeuten von 30 – 50 %.

Dagegen wurden bei der photochemischen Konjugation von p-Azidophenacyl- ^{18}F fluorid (^{18}F APF) an Humanserumalbumin, Transferin, Avidin und Immunglobulinen nur geringe Konjugationsausbeuten im Bereich von 10 - 30 % erhalten [104]. Der Anreiz zur Entwicklung der Methode lag darin, daß das ^{18}F -Fluorierungsagens in einer Einstufensynthese innerhalb von 15 min mit einer Ausbeute von 71 % hergestellt werden konnte [104, 113]. ^{18}F APF enthält eine sogenannte maskierte elektrophile Gruppe, ein Arylnitren, das nach der ^{18}F -Fluorierung durch UV-Bestrahlung generiert wird und spontan mit nukleophilen Substituenten reagiert.

In Tabelle 1.4 sind die bisher bekannten Methoden und prosthetischen Gruppen zur ^{18}F -Fluorierung von Peptiden und Proteinen zusammengefaßt.

Mit den in diesem Kapitel beschriebenen ^{18}F -Fluorierungsmethoden und prosthetischen Gruppen wurden eine Reihe von Peptiden und Proteinen radioaktiv markiert [zur Übersicht 95], wobei es sich im Einzelfall entscheidet, welche Gruppe und Methode die geeignetere ist.

Tabelle 1.4: *Prosthetische Gruppen und Methoden zur ^{18}F -Fluorierung von Peptiden und Proteinen [aus 95, 77, 110]*

Methode	^{18}F -Fluorierungsagens	Schritte/ Zeit [min]	RCA [%]	Lit.
Alkylierung	4- ^{18}F Fluorphenacylbromid	3 / 75	28 - 40	[74]
	N-(p- ^{18}F Fluorphenyl)maleinimid	4 / 100	15	[93]
	m-Maleinimidobenzoessäure-p- ^{18}F fluorbenzamid	3 / 70	10	[93]
	[^{18}F]Pentafluorbenzaldehyd ^{a)}	1 / 30	60	[109]
Acylierung	[^{18}F]Fluoressigsäure/DCC	2 / 80	50	[100]
	2- ^{18}F Fluorpropionsäuremethylester	1 / 15	90	[75]
	N-Succinimidyl-8-[(4'- ^{18}F fluorbenzyl)-amino]suberate	3 / 55 - 60	25 - 40	[94]
	4- ^{18}F Fluorbenzoessäure-N-suc.ester (DCC)	3 / 100	25	[103]
	Pentafluorbenzoessäure-[^{18}F]-2,3,5,6-tetrafluorphenylester ^{b)}	1 / 30	32	[109]
	2- ^{18}F Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester	3 / 90	60	[106]
	4-([^{18}F]Fluormethyl)benzoessäure-N-succinimidylester	1 / 30 - 35	18	[114, 105]
	4- ^{18}F Fluorbenzoessäure-N-suc.ester (DSC)	3 / 55	35	[115]
	4- ^{18}F Fluorbenzoessäure-N-suc.ester (TSTU)	3 / 35	50 - 60	[104]
	[^{18}F]Fluorbenzoessäure/DCC/HOAt	2 / 20	50 - 60	[116]
	4- ^{18}F Fluorbenzoessäure (Festphase)	2 / ?	?	[110]
	N-[4-([^{18}F]Fluormethyl)benzoyl]-1,4-diaminobutan	2 / 80	52	[98]
Amidierung	3- ^{18}F Fluorpropylamin	2 / ?	86	[77]
	2- ^{18}F Fluorethylamin	2 / ?	40	[117]
		2 / 58	46	[92]
Amidinierung	3- ^{18}F Fluor-5-nitro-benzimidomethylester	3 / 45	20 - 33	[74]
Azokupplung	4- ^{18}F Fluorbenzoldiazoniumchlorid	3 / ?	?	[111, 112]
Photo. Kon.	p-Azidophenacyl-[^{18}F]fluorid	1 / 15	71	[104, 113]

a) via nukleophiler ^{18}F -Fluorierung von Pentafluorbenzaldehyd, b) via nukleophiler ^{18}F -Fluorierung von Pentafluorbenzoessäure-2,3,5,6-tetrafluorphenylester

1.6 Prolin, 4-Hydroxyprolin und 4-Fluorprolin als peptidische Bausteine

Da im Rahmen dieser Arbeit Markierungsverfahren zur Synthese von 4- ^{18}F -Fluorprolin enthaltenden Peptiden untersucht wurden, wird in diesem Kapitel kurz auf Prolin, 4-Hydroxyprolin und 4-Fluorprolin eingegangen. Prolin (Abb. 1.10) ist Bestandteil pflanzlicher und tierischer Peptide und Proteine und somit eine proteinogene Aminosäure [118]. Sie kann vom menschlichen Körper hergestellt werden und gehört daher zu den nicht-essentiellen Aminosäuren. Auch *trans*-Hydroxyprolin kommt in menschlichen Proteinen vor, insbesondere im Strukturprotein Kollagen. *Trans*-Hydroxyprolin wird nicht direkt, sondern nach Einbau von Prolin in die Proteinsequenz durch enzymatische Oxygenierung gebildet [119]. Auch die unnatürliche Aminosäure *trans*-4-Fluorprolin, dessen metabolisches Verhalten vergleichbar ist mit dem von Prolin, wird in die Proteinsequenz von Kollagen eingebaut [119]. Da Kollagen in bestimmten Tumoren in hohem Grade synthetisiert wird, wurde in tierexperimentellen Studien an Mäusen untersucht, ob die Diastereomere *cis*- und *trans*-4- ^{18}F -Fluorprolin als PET-Tracer zur Messung der Kollagensyntheserate in Tumorgewebe eingesetzt werden können. [120]. Dabei zeigte sich, daß die Anreicherung des *trans*-4- ^{18}F -Fluorprolins im Tumor im Gegensatz zum *cis*-4- ^{18}F -Fluorprolin nach 2 h abnahm. Dieser Effekt wird mit der Hydroxylierung des *trans*-Isomers erklärt. Somit erwies sich insbesondere das *cis*-Isomer als geeignet zur Detektion von neu gebildetem Kollagen in Tumoren der Maus.

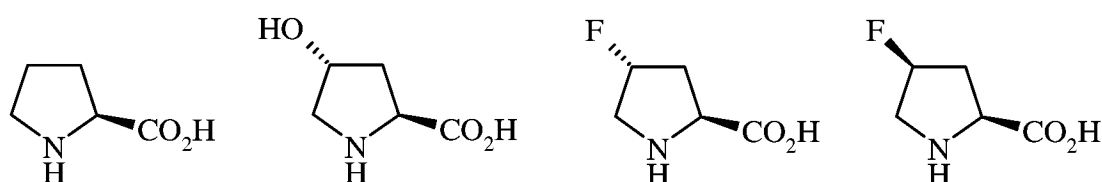


Abb. 1.10: *L*-Prolin, *trans*-4-Hydroxy-*L*-prolin, *trans*- und *cis*-4-Fluor-*L*-prolin

1.7 Herstellung und chemische Eigenschaften von Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid

Dieses Kapitel stellt einen Überblick über das Reagenz Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid dar, dessen Eignung als ^{18}F -Fluorierungsagens im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid wird im industriellen Maßstab über die anodische Fluorierung von cyclischen Sulfonen mit einer Ausbeute von 45 % produziert (Abb. 1.11)

Hierbei wird Trifluormethylnitrosoperfluorbutan-1-sulfonamid, das aus der Trifluormethylnitroso-Verbindung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid und Natriumhydrid dargestellt wird, mit 4-*tert*-Butylphenol bei 100°C oder photochemisch umgesetzt (Abb. 1.12). Dabei entstehen zu fast gleichen Anteilen das perfluorbutylierte und das trifluormethylierte Produkt.

In Dichlormethan in Gegenwart der Base Triethylamin lassen sich Alkohole mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid in ihre entsprechenden Perfluorbutan-1-sulfonate (Nonaflate) überführen [121, 125, 126,]. Als Beispiele seien die Nonaflate von 2,2,2-Trichlorethanol und 1,1,1-Trifluor-2-propanol aufgeführt, die sich mit 40 % bzw. 88 % herstellen lassen (s. Abb. 1.13) [121, 122, 125].

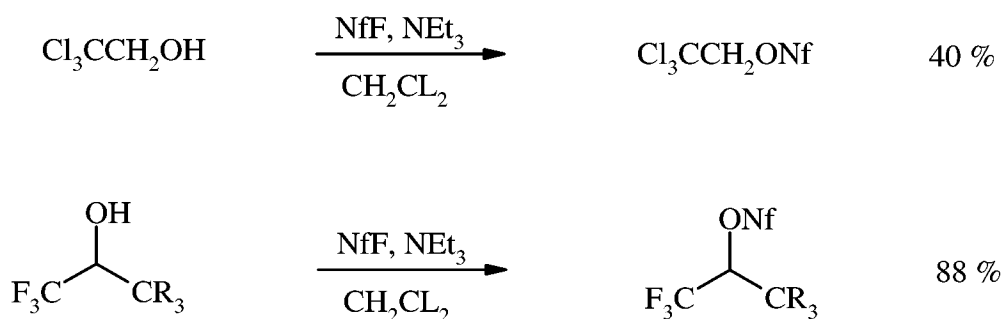


Abb.1.13: Darstellung der Nonaflate von 2,2,2-Trichlorethanol und 1,1,1-Trifluor-2-propanol [aus 121, 122, 125]

Aber auch die Ketogruppe lässt sich in das entsprechende Nonaflat mit benachbarter Doppelbindung umsetzen. So wird aus dem Steroid in Abb. 1.14 (Androst-5-ene-3,11,17-trion cyclic 3,17-bis(ethandiyl acetal) mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid das entsprechende Enol-Nonaflat erhalten, an das in einer Suzuki-Reaktion mittels Tetra(trisphenyl)phosphopalladium ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) die 4-Methoxyphenylgruppe durch Substitution der Nonaflatgruppe gekoppelt wird [121, 127]. Nonaflate können auch erfolgreich in der Heck-Reaktion eingesetzt werden, bei der ebenfalls Palladium-katalysiert C-C-Bindungen geknüpft werden [70, 121].

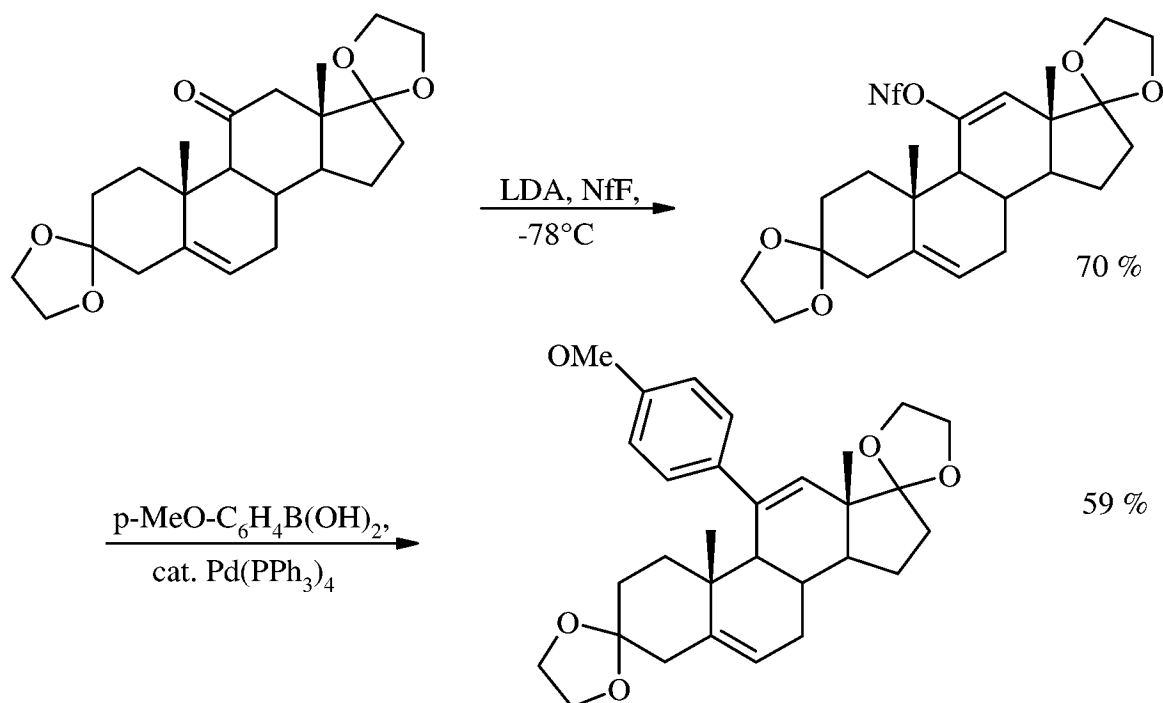


Abb. 1.14: Darstellung von Androst-5-ene-3,11,17-trion cyclic 3,17-bis(ethandiyl acetal) [aus 121, 127]

Untersuchungen zur Solvolyse von aliphatischen Trifluormethan- und Perfluorbutan-1-sulfonaten zeigen, daß Triflate und Nonaflate eine vergleichbar gute Substituierbarkeit besitzen [128]. Allerdings läßt sich weder aus dem Phenyltriflat noch aus dem Phenylnonaflat, als aromatische Vertreter, das Phenylkation erzeugen [128]. Ein Vergleich mit der 2,2,2-Trifluor-ethansulfonyl- (Tresylat-) und der 4-Toluolsulfonylgruppe (Tosylat-) ergab, daß die Tresylate eine mittlere Position unter diesen Abgangsgruppen einnehmen, da ihre Solvolysengeschwindigkeit etwa 100mal größer ist als die der Tosylate aber ca. 400mal geringer als die der Triflate und Nonaflate [128]. Dabei reagieren die Nonaflate noch um einen Faktor von 1,5 - 2 schneller als die Triflate. Somit sind die Triflat- und Nonaflatgruppe von den Genannten die besten Abgangsgruppen. Die Sulfonsäureamidfunktion wird in der Analyse von Aminen, als Schutzgruppe und in der Pharmakologie eingesetzt [129].

Mit Iminen und Ammoniak reagiert Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid zum entsprechenden Perfluorbutan-1-sulfonsäureimid bzw. -amid (s. Abb. 1.15) [130, 131]. Durch Knüpfung einer S-C-Bindung werden beim Umsetzen von Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid mit Grignard- oder Organolithiumreagenzien die entsprechenden Perfluorbutan-1-sulfone erhalten [132].

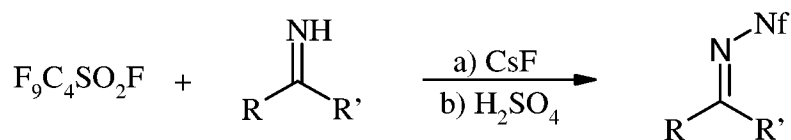


Abb. 1.15: Reaktion von Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid mit Iminen bzw. Ammoniak [aus 130, 131]

Erst seit 1995 ist bekannt, daß sich primäre und sekundäre aliphatische Alkohole mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid in Gegenwart einer starken organischen Base wie 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) bereits bei Raumtemperatur mit guten Ausbeuten in ihre entsprechenden Fluorverbindungen überführen lassen [121, 133]. So läßt sich aus 3-Phenyl-1-propanol mit dieser Methode in Toluol zu 70 % 1-Fluor-3-phenylpropan herstellen und zu 79 % der *tert*-Butylmethylether. Im Gegensatz zu Triethylamin ist in Gegenwart von DBU die Nukleophilie des bei der Nonaflatbildung freigesetzten Fluoridanions ausreichend, um die Nonaflatgruppe zu substituieren. DBU•(HF)_n ist gerade in unpolaren Lösungsmitteln ein Salz mit einem sehr nukleophilen aber weniger basischen Fluoridion [133].

Im Vergleich zu Diethylaminosulfurtrifluorid (DAST) und zum Yarovenko-Reagens (2-Chlor-1,1,2-trifluorethyldiethylamin), mit denen ebenfalls die Hydroxylfunktion durch Fluor ersetzt wird, werden mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid deutlich bessere Ausbeuten erreicht [133, 134].

Es wurden auch bereits Untersuchungen zur Radiofluorierung von Alkoholen mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[¹⁸F]fluorid durchgeführt [135, 136]. Dabei wurden bei der ¹⁸F-Fluorierung des Modellalkohols 2-(p-Bromphenyl)ethanol ca. 20 % radiochemische Ausbeute [135] erzielt, und bei der ¹⁸F-Fluorierung von 3-Phenyl-1-propanol wurden mit 60 ± 5 % in Toluol und 67 ± 4 % in Aceton [136] recht gute radiochemische Ausbeuten erhalten. Allerdings kann die Reaktion bisher nur geträgert durchgeführt werden, so daß sie nur zur Herstellung von Radiopharmaka eingesetzt werden kann, die keine hohe spezifische Aktivität benötigen.

2 Problemstellung

Die zunehmende Bedeutung markierter Biomoleküle, insbesondere von Bindungsspezifischen Peptiden, in der nuklearmedizinischen PET-Diagnostik erfordert ein breites Spektrum von Methoden, die eine maßgeschneiderte Markierung mit dem wegen seiner nuklearen Eigenschaften günstigen Radionuklid Fluor-18 ermöglichen und zugleich eine Denaturierung der Biopolymere ausschließen. In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb alternative Methoden der ^{18}F -Fluorierung an Modellpeptiden untersucht und evaluiert werden, welche Markierungskonzepte zur ^{18}F -Fluorierung dieser komplexen, chemisch sensitiven Radiotracer-Klasse geeignet sind.

Die betrachteten ^{18}F -Fluorierungskonzepte werden exemplarisch an Derivaten der proteinogenen Aminosäure Prolin untersucht. Hier bieten sich 4-Hydroxyprolin-enthaltende Peptide an, da die 4-Hydroxyprolyl-Einheit über die Hydroxylfunktion gut in entsprechende Markierungsvorläufer bzw. Fluorverbindungen überführt werden kann und zudem gut verfügbar ist. Ein weiterer Punkt, der für diese Gruppe spricht, ist, daß nach der Markierung 4- ^{18}F Fluorprolin enthaltende Peptide resultieren, bei denen, formal betrachtet, ein Wasserstoffatom des Prolylrestes durch Fluor-18 substituiert ist.

Das erste verfolgte Markierungskonzept beruht auf der direkten, nukleophilen, Kryptat-gestützten ^{18}F -Fluorierung am kompletten und geschützten Biomolekül. Am Beispiel der nukleofugen para-Toluolsulfonylgruppe soll aufgrund der guten ^{18}F -Fluorierbarkeit von N-Boc-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester untersucht werden, ob Peptide, die 4-(p-Toluolsulfonyloxy)prolin als Peptidbaustein enthalten, unter den basischen Reaktionsbedingungen einer Aminopolyether-gestützten ^{18}F -Fluorierung stabil und einer direkten Substitution der p-Toluolsulfonsäuregruppe durch Fluor-18 zugänglich sind.

Als Alternative hierzu bietet sich die Kondensation von separat hergestelltem 4- ^{18}F Fluorprolin-methylester an den C-Terminus eines Peptides an, die bereits unter milden Reaktionsbedingungen durchgeführt werden kann. Da das markierte 4- ^{18}F Fluorprolinderivat leicht zugänglich ist, steht die Kondensation von Peptid und ^{18}F -fluorierter Aminosäure im Vordergrund des Interesses, wobei die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Konzentration an Peptid einen wichtigen Reaktionsparameter darstellt.

Eine dritte angestrebte Alternative beruht auf der Fluorierung aliphatischer Hydroxylfunktionen mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid, die bereits unter milden Reaktionsbedingungen bei Raumtemperatur in Toluol abläuft. Aufgrund der milden Reaktionsbedingungen bietet

sich gerade diese Fluorierungsmethode zur ^{18}F -Fluorierung von sensitiven, Hydroxygruppen-enthaltenden Biomolekülen an, wie z. B. von 4-Hydroxyprolin-haltigen Peptiden.

Bei der nukleophilen, kryptatgestützten ^{18}F -Fluorierung von N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin entsteht die hierfür benötigte ^{18}F -Fluorverbindung Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorid, dessen Herstellungsprozeß dahingehend modifiziert werden muß, daß es als ^{18}F -Fluorierungsreagenz unter geeigneten Reaktionsbedingungen zur ^{18}F -Fluorierung verfügbar ist. Da Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid mit ca. 65°C einen niedrigen Siedepunkt besitzt, soll das ^{18}F -Fluorierungsagens nach seiner Bildung durch Evaporation aus dem Reaktionsgemisch entfernt und in einem geeigneten Medium kondensiert werden. Hierfür kommt sowohl die Adsorption des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes auf einer festen Phase in Frage als auch die Absorption in einem Lösungsmittel. Da die anschließende ^{18}F -Fluorierung der Modellverbindungen in Toluol durchgeführt wird, bietet sich gerade Toluol als Absorbens an.

Als Alternative zur Herstellung des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes in Gegenwart eines Lösungsmittels soll die Synthese auch ohne Lösungsmittel untersucht werden. Dies impliziert die Entwicklung einer geeigneten Methode für die Zugabe des Markierungsvorläufers und Homogenisierung des Reaktionsgemisches.

Nach Bereitstellung des Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorids soll die ^{18}F -Fluorierung an Modellpeptiden untersucht werden, die innerhalb ihrer Aminosäurekette bzw. als C-terminale Aminosäure 4-Hydroxyprolin besitzen. Da die Fluorierung mit diesem Reagenz in zwei Schritten abläuft, nämlich der Veresterung zum Nonaflat und der Substitution der Nonaflatgruppe durch Fluor, folgt die Notwendigkeit, die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Stoffmenge an zugesetztem Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid zu bestimmen. Im Hinblick auf eine Anwendung dieser geträgerten ^{18}F -Fluorierungsmethode zur Synthese von Radiopharmaka ist eine Minimierung der absoluten Stoffmengen unabdingbar.

Weiterhin soll als eine Variante der ^{18}F -Fluorierung an einem Modellpeptid geprüft werden, ob sich Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorid zur ^{18}F -Fluorierung der Hydroxyprolin-Einheit in einem Peptid eignet, das an einem Harz kovalent gebunden vorliegt.

Zur Durchführung der ^{18}F -Fluorierungen und Identifizierung der Reaktionsprodukte müssen die entsprechenden Synthesevorläufer und Standardverbindungen hergestellt werden sowie geeignete radioanalytische Trennbedingungen für den HPL- oder Dünnschicht-chromatographischen Nachweis entwickelt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Konzepte zur ^{18}F -Fluorierung von Peptiden und Proteinen

Die Einführung von Fluor-18 in Peptide und Proteine erfolgt aus den in Kap. 1.5 erläuterten Gründen generell über ^{18}F -fluorprothetische Gruppen. Zur direkten ^{18}F -Fluorierung bieten sich jedoch grundsätzlich die folgenden Methoden an, die durch Einsatz von Hydroxyprolin zu [^{18}F]Fluorprolyl-Derivaten führen:

- nukleophile Substitution einer geeigneten Abgangsgruppe am Prolylrest sowie
- Substitution der aliphatischen Hydroxylfunktion mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorid.

Die direkte nukleophile ^{18}F -Fluorierung setzt die Synthese eines Peptides bzw. Proteins mit einer geeigneten Abgangsgruppe voraus, da Peptide und Proteine keine funktionellen Gruppen besitzen, die sich nukleophil durch [^{18}F]Fluorid substituieren lassen. Als eine geeignete nukleofuge Gruppe bietet sich die p-Toluolsulfonsäuregruppe an, die eine sehr gute Abgangsgruppe bei nukleophilen Substitutionen darstellt. Sie kann relativ einfach durch Veresterung einer aliphatischen Hydroxylfunktion eingeführt werden. So läßt sich z. B. N-Boc-hydroxyprolin-methylester leicht in das entsprechende Tosylat überführen [57]. Nach der Synthese von N-Boc-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester kann dieser als Aminosäurederivat in die Sequenz eines Peptides eingebaut werden, z. B. endständig an den N- oder C-Terminus. Um ein derartig derivatisiertes Peptid zu markieren, ist es wichtig festzustellen, ob das Peptid unter den basischen Reaktionsbedingungen der nukleophilen ^{18}F -Fluorierung stabil ist. Die ^{18}F -Fluorierung führt formal zur Substitution eines Protons des Prolylrestes durch Fluor, so daß keine gravierenden strukturellen Veränderungen der Peptidstruktur zu erwarten sind.

Die zweite, attraktivere Methode zur direkten ^{18}F -Fluorierung eines Peptids bzw. Proteins ist die Substitution der Hydroxylfunktion von Hydroxyprolin durch Fluor-18 mit Hilfe von Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid. Bei dieser Methode handelt es sich, formal betrachtet, ebenfalls um den Austausch eines Wasserstoffatoms eines Prolylrestes durch Fluor. Entsprechend wird eine größere strukturelle Veränderung des Basismoleküls, wie sie z. B. bei der Markierung mit einer prothetischen Gruppe erhalten wird, vermieden. Wie vorher gezeigt wurde [121], kann die Fluorierung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid unter milden Bedingungen in Gegenwart der Base 1,8-Diaza-bicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) durchgeführt

werden. Prolin ist einerseits eine proteinogene Aminosäure und 4-Hydroxyprolin ist gut verfügbar. Daher bietet sich Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid aus den oben genannten Gründen zur ^{18}F -Fluorierung von Peptiden durch Substitution der prolylischen Hydroxylfunktion an. Hierbei muß Hydroxyprolin gezielt - z. B. als Substitut für Prolin - in die zu markierende Verbindung eingebaut werden. Dabei kommt sowohl eine terminale Position für das Hydroxyprolin in Frage als auch eine Position innerhalb der Aminosäurekette. Als eine elegante Variante zur Durchführung dieser Markierungsmethode bietet sich die ^{18}F -Fluorierung eines Hydroxyprolin enthaltenden Peptids an, das an einem Harz kovalent gebunden vorliegt. Hierbei lassen sich die überschüssigen Reagenzien sehr einfach durch Spülen des Harzes entfernen, bevor das Peptid vom Harz abgespalten wird.

Als Alternative zur direkten Markierung ist 4-[^{18}F]Fluorprolin auch als ^{18}F -fluorprothetische Gruppe z. B. zur C-terminalen Einführung von Interesse. Da Prolin eine natürliche Aminosäure ist, kommt 4-[^{18}F]Fluorprolin als ^{18}F -markierte prothetische Gruppe in Frage. Durch Kondensation von 4-[^{18}F]Fluorprolin-methylester mit dem C-Terminus eines Peptides wird dessen Aminosäuresequenz um den Fluorprolylrest verlängert. Dies bietet sich gerade an, wenn das zu markierende Peptid bereits Prolin als C-terminale Aminosäure besitzt.

3.2 4-[^{18}F]Fluorprolin-methylester als prothetische Gruppe

4-[^{18}F]Fluorprolin-methylester bietet sich insbesondere aus den folgenden Gründen an, als prothetische Gruppe bei der ^{18}F -Markierung von Peptiden und Proteinen eingesetzt zu werden. Prolin kommt als proteinogene Aminosäure in humanen Proteinen und Peptiden vor. 4-Hydroxyprolin, dessen Hydroxylfunktion sich leicht in nukleofuge Abgangsgruppen überführen läßt, ist gut verfügbar. Daher wird hier die C-terminale Kondensation des Modellpeptids Z-Pro-Leu-Gly-OH mit 4-[^{18}F]Fluorprolin-methylester untersucht werden. Das Modellpeptid ist N-terminal durch die Benzyloxycarbonyl-Gruppe geschützt und besitzt in den Seitenketten der Aminosäuren keine funktionellen Gruppen. In Abb. 3.1 sind die entsprechenden Reaktionsschritte dargestellt.

Der erste Schritt des Markierungsverfahrens besteht in der ^{18}F -Fluorierung eines geeigneten, am C-Terminus geschützten Prolinderivates. Als Markierungsvorläufer dient N-Boc-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester, dessen ^{18}F -Fluorierung zur Herstellung von 4-[^{18}F]Fluorprolin bereits optimiert wurde [57]. Nach Isolierung des Aktivproduktes und Abtrennung von überschüssigem Edukt besteht der zweite Syntheseschritt in der Abspaltung

der Boc-Schutzgruppe. Daran schließt sich die Kopplung der prosthetischen Gruppe an das Modellpeptid an.

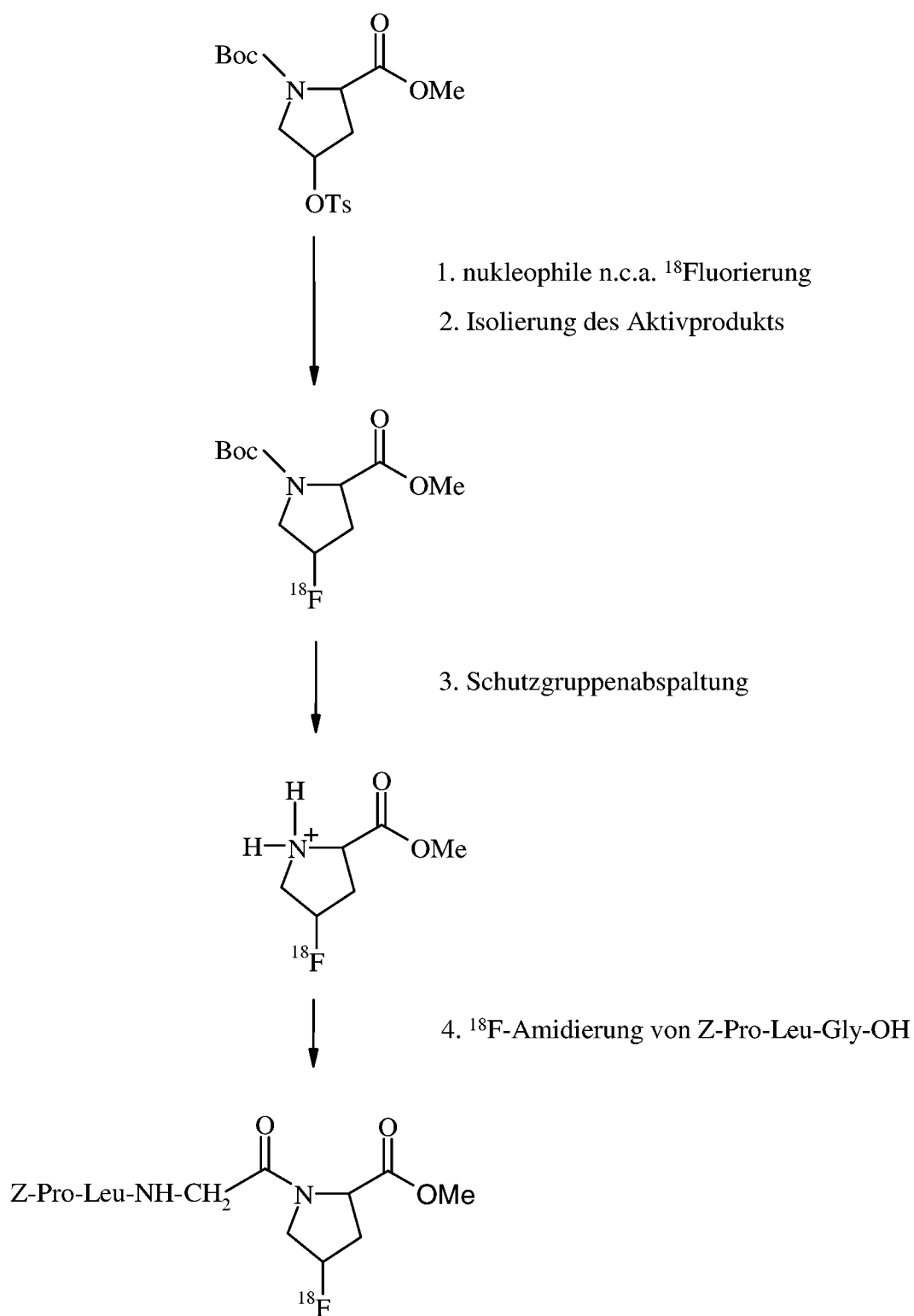


Abb. 3.1: Reaktionssequenz der ^{18}F -Fluoramidierung eines Modellpeptids mit 4- ^{18}F Fluorprolin-methylester als prosthetische Gruppe

3.2.1 Darstellung des Standards N-Boc-*cis*-4-fluorprolin-methylester

Zur Darstellung der Standardverbindung N-Boc-*cis*-4-Fluorprolin-methylester wird N-Boc-*trans*-hydroxyprolin-methylester nach einer allgemeinen Reaktionsvorschrift mittels Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) unter Schutzgasatmosphäre und Kühlung mit Trockeneis in Isopropanol fluoriert (s. Abb. 3.2). Aus der Literatur ist bekannt, daß hierbei nur das *cis*-Isomer gebildet wird [137].

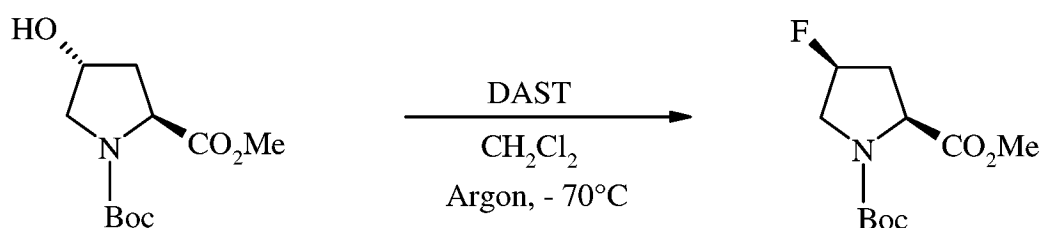


Abb. 3.2: Synthese von N-Boc-*cis*-4-Fluorprolin-methylester mittels DAST

Mit dieser Methode wird jedoch nur eine geringe Ausbeute an Fluorprodukt von ca. 16 % erhalten. Alternativ wird die Fluorierung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid durchgeführt, indem N-Boc-*trans*-hydroxyprolin-methylester in Gegenwart von DBU in Toluol bei Raumtemperatur mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid umgesetzt wird. Die Ausbeute kann so auf 54 % gesteigert werden. Bei der Fluorierung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid findet ebenfalls unter Walden-Umkehr eine Konfigurationsänderung am Kohlenstoffatom statt, das die Hydroxyl-Gruppe trägt [121]. Das Reaktionsschema ist in Abb. 3.3 dargestellt.

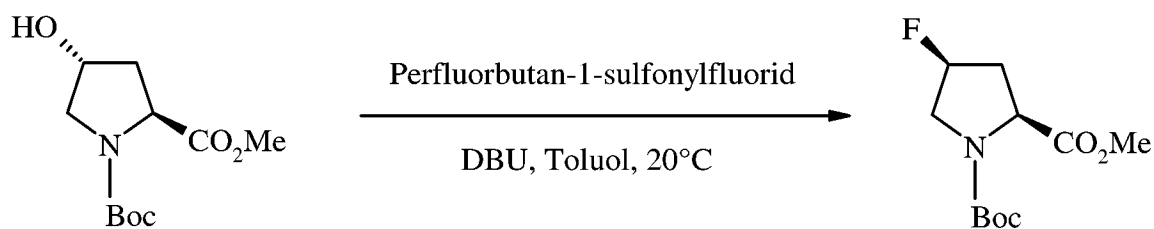


Abb. 3.3: Synthese von N-Boc-*cis*-4-fluorprolin-methylester mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid

Im ¹H-NMR-Spektrum von N-Boc-*cis*-4-fluorprolin-methylester ist das Signal der Methylgruppen aus der Boc-Schutzgruppe nicht als Singulett sondern als Dublett zu sehen und im

^{13}C -NMR-Spektrum tauchen einige Signale doppelt auf. Die C-N-Bindung der Boc-Gruppe besitzt aufgrund der direkten Nachbarschaft zur C=O-Doppelbindung einen partiellen Doppelbindungscharakter. Daher ist die Drehung um die C-N-Bindung eingeschränkt, und der Übergang zwischen den beiden in Abb. 3.4. dargestellten Konformeren erfolgt so langsam, daß beide Konformere im NMR gesehen werden und die Verdopplung einiger Signale im NMR verursachen [137].

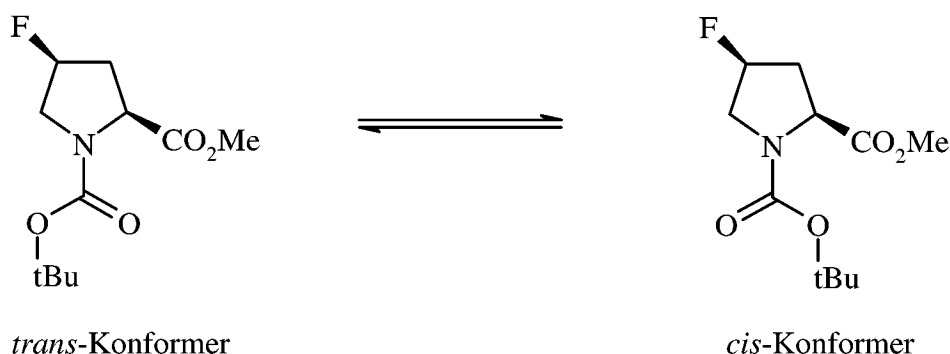


Abb. 3.4: *Trans*- und *cis*-Konformer von *N*-Boc-*cis*-4-Fluorprolin-methylester

3.2.2 Synthese der prosthetischen Gruppe 4- ^{18}F Fluorprolin-methylester

Wie erwähnt, besteht die Synthese der prosthetischen Gruppe 4- ^{18}F Fluorprolin aus zwei Reaktionsschritten, der Darstellung von *N*-Boc-4- ^{18}F Fluorprolin-methylester und der anschließenden Abspaltung der Boc-Schutzgruppe.

Durch nukleophile ^{18}F -Fluorierung von *N*-Boc-*trans*-4-(*p*-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester in Acetonitril bei 85°C bei einer Reaktionszeit von 10 min und einer Eduktkonzentration von 0,04 mol/l wird *N*-Boc-4- ^{18}F fluorprolin-methylester mit einer radiochemischen Ausbeute $87,1 \pm 0,8 \%$ erhalten. Aus der Literatur ist bekannt, daß die erwartete *cis*-Konfiguration zu $82,3 \pm 4,9 \%$ entsteht und zu 17,7 % das *trans*-Isomer, da die nukleophile ^{18}F -Fluorierung nicht nach einem reinen S_N2-Mechanismus abläuft [56]. Auch Gottlieb et al. beobachteten bei ihrer Umsetzung von *N*-Z-*trans*-4-(*p*-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester mit Kaliumfluorid in Diethylenglycol, daß zu 17 % das *trans*-Isomer gebildet wird [138].

Es wird untersucht, ob der überschüssige Synthesevorläufer *N*-Boc-*trans*-4-(*p*-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester durch Bildung eines quaternären Ammoniumsalzes mit Dimethylaminopyridin (DMAP) vom Aktivprodukt abgetrennt werden kann. Diese Methode wurde

bereits zur Abtrennung des überschüssigen Markierungsvorläufers bei der Synthese der prosthetischen Gruppe [^{18}F]Fluorethylamin angewendet [77, 92]. Während das Aktivprodukt auf einer festen Phase fixiert wurde, wurde das quaternäre Ammoniumsalz zusammen mit Kryptofix und [^{18}F]Fluorid mit verdünnter Salzsäure eluiert. Bei der Umsetzung von N-Boc-*trans*-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester mit DMAP wird jedoch keine Substitution der Tosylatgruppe durch die Base DMAP und somit keine Quaternisierung beobachtet. Auch mit anderen sekundären und tertiären Basen, wie 4-Morpholin, 4-Hydroxypiperidin, 2-Diethylaminoethylamin, 2-Diethylaminoethylamin zusammen mit Diisopropylamin, ließ sich der Markierungsvorläufer nicht derivatisieren. Die Ursache hierfür liegt in einer sterischen Abschirmung des anzugreifenden Kohlenstoffs aufgrund der freien Drehbarkeit der Methylestergruppe und der Tosylatgruppe und der durch den Prolin-Fünf-Ring vorgegebenen räumlichen Anordnung. Ein Angriff der räumlich anspruchsvollen Basen am Kohlenstoff, der die Tosylatgruppe trägt, ist im Vergleich zu N-Boc-2-bromethylamin und N-Boc-2-(p-toluolsulfonyloxy)ethylamin hier deutlich erschwert. Zudem wird die Reaktivität des sekundären Kohlenstoffs beim N-Boc-*trans*-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester für die Umsetzung zu einem quaternären Ammoniumsalzes geringer sein als bei einem primären Kohlenstoffatom der Ethylamin-Derivate.

Daraufhin wird untersucht, inwiefern sich N-Boc-*trans*-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester und N-Boc-4-[^{18}F]fluorprolin-methylester auf einer Kieselgel-60- bzw. RP-18-Phase voneinander trennen lassen. Auf der Kieselgel-60-Phase unterscheiden sich die beiden Verbindungen bei allen eingesetzten Eluenten und Eluengemischen in ihren R_f -Werten nur geringfügig, so daß eine Trennung über eine Kieselgel-60-Phase nicht möglich ist. Dagegen lassen sich die beiden Verbindungen auf einer RP-18-Phase sehr gut voneinander trennen. So besitzt der Synthesevorläufer N-Boc-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester auf einer RP-18-Phase und einem Eluens aus Acetonitril/Wasser (50/50) einen k' -Wert von 6,89 und N-Boc-4-fluorprolin-methylester einen k' -Wert von 1,48. Nach Durchführung der Trennung befindet sich in der Produktfraktion auch [^{18}F]Fluorid. Auch beim Versuch, alle ionischen Bestandteile vorher über eine RP-18-Kartusche abzutrennen, wird in der Produktfraktion [^{18}F]Fluorid festgestellt. Daher werden nun das [^{18}F]Fluorid und alle ionischen Bestandteile auf einer Si-60-Kartusche fixiert, während N-Boc-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester und N-Boc-4-[^{18}F]fluorprolin-methylester mit Diethylether eluiert werden. Nach Entfernen des Diethylethers werden die beiden Verbindungen über eine RP-18-Phase getrennt. Zur Entfernung des Eluens wird das Aktivprodukt auf einer RP-18-Kartusche fixiert und anschließend mit Diethylether eluiert. Nach Abspalten der Boc-Schutzgruppe mit

Trifluoressigsäure, die innerhalb von 2 min quantitativ verläuft, wird das Trifluoracetatsalz von 4- ^{18}F Fluorprolin-methylester mit einer radiochemischen Ausbeute von 30 – 40 % erhalten, die auf die eingesetzte Menge an ^{18}F Fluorid bezogen ist.

3.2.3 Kopplung der prosthetischen Gruppe 4- ^{18}F Fluorprolin-methylester an das Modellpeptid Z-Pro-Leu-Gly-OH

Nach der Darstellung und Isolierung von N-Boc-4- ^{18}F fluorprolin-methylester und der anschließenden Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure wird die prosthetische Gruppe 4- ^{18}F Fluorprolin-methylester mit Hilfe des Kupplungsreagenzes TBTU mit dem C-Terminus des Modellpeptids Z-Pro-Leu-Gly-OH kondensiert. Die Reaktion wird in DMF bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wird die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Reaktionszeit und der Eduktkonzentration untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.5 und 3.6 dargestellt.

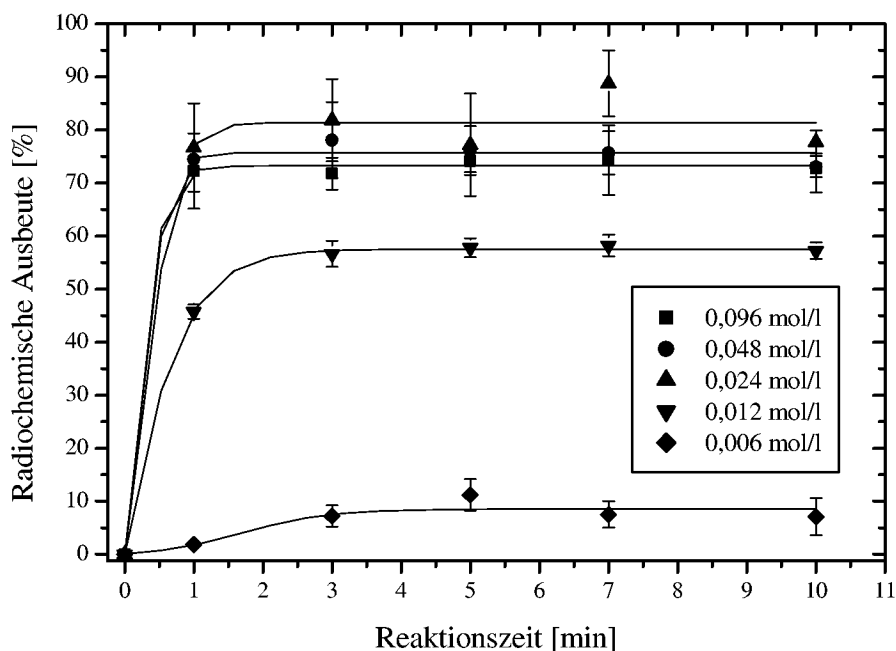


Abb. 3.5: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von Z-Pro-Leu-Gly-4- ^{18}F Fluor)Pro-OMe von der Reaktionszeit und der Konzentration an Z-Pro-Leu-Gly-OH
Z-Pro-Leu-Gly-OH /Reagenz/DIPEA : 1/1/2, 20°C, 250 μl DMF

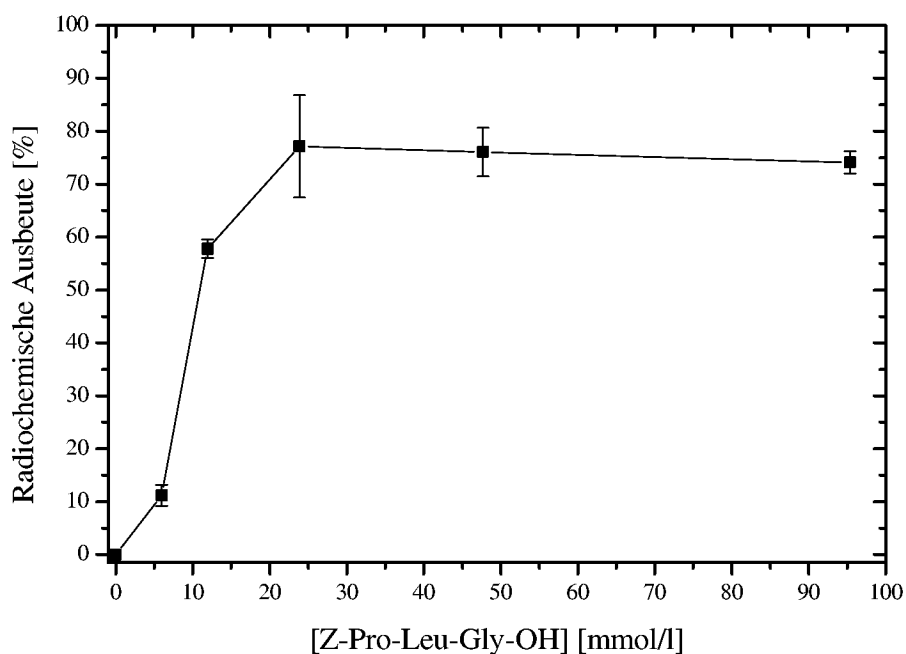


Abb. 3.6: Konzentrationsabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von Z-Pro-Leu-Gly-4-([¹⁸F]Fluor)Pro-OMe

Z-Pro-Leu-Gly-OH /Reagenz/DIPEA : 1/1/2, 20°C, 5 min, 250 µl DMF

Wie bereits bei der Synthese der Modellverbindung Z-Pro-Leu-Gly-2-[¹⁸F]fluorethylamid beobachtet [92], läuft die Ausbildung einer Amid- bzw. Peptidbindung mit Hilfe von TBTU bereits bei Raumtemperatur sehr schnell und in guten radiochemischen Ausbeuten ab. So wird auch bei der Darstellung der Modellverbindung Z-Pro-Leu-Gly-4-[¹⁸F]FluorPro-OMe bei den geringeren Eduktkonzentrationen von 0,006 mol/l und 0,12 mol/l nach 3 min und bei den höheren Eduktkonzentrationen $\geq 0,024$ mol/l bereits nach 1 min die maximale radiochemische Ausbeute und damit der Sättigungsbereich erreicht. Bei einer Eduktkonzentration $\geq 0,024$ mol/l werden radiochemische Ausbeuten von 70 - 80 % erhalten, bezogen auf die Aktivität der eingesetzten prosthetischen Gruppe 4-[¹⁸F]Fluorprolin-methylester, während bei einer Konzentration von 0,012 mol/l die radiochemische Ausbeute nur 58 ± 2 % erreicht und schließlich bei 0,006 mol/l lediglich 11 ± 3 % resultieren. Somit ergeben sich als optimale Reaktionsparameter eine Konzentration an Z-Pro-Leu-Gly-OH von 0,024 mol/l, eine Reaktionstemperatur von 20°C und eine Reaktionszeit von 3 min. Diese Reaktionsbedingungen entsprechen denen der ¹⁸F-Fluorethylamidierung des Modellpeptids, bei der nach einer 1 min mit 90 ± 2 % eine etwas höhere radiochemische Ausbeute erhalten wird [92].

Die Modellverbindung Z-Pro-Leu-Gly-4-([¹⁸F]Fluor)Pro-OMe wird mit einer Gesamtausbeute von 20 – 30 % bezogen auf die eingesetzte Menge an [¹⁸F]Fluorid erhalten.

Bei der ¹⁸F-Amidierung mit 4-[¹⁸F]Fluorprolin-methylester wird die Bildung eines Nebenproduktes mit einer Ausbeute von 15 – 25 % beobachtet. Da sich über die verwendete RP-18 Phase *cis*- und *trans*-Isomere nicht voneinander trennen lassen, handelt es sich bei dem Nebenprodukt nicht um das entsprechende *trans*-Isomer. Wird bei der Synthese nicht von N-Boc-*trans*-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester sondern vom *cis*-Isomer ausgegangen, entsteht das Nebenprodukt wie im Fall des anderen Isomeren zu 15 – 25 %, während die radiochemische Ausbeute des markierten Modellpeptids mit 60 - 70 % geringfügig niedriger ausfällt. Das Nebenprodukt wurde nicht näher bestimmt, da es sich leicht chromatographisch abtrennen lies.

Die mehrstufige Einführung der neuen prosthetischen Gruppe 4-[¹⁸F]Fluorprolin-methylester in das Modellpeptid gelingt gut. Jedoch bestehen Nachteile dieser Methode darin, daß ein *cis/trans*-¹⁸F-Fluorproduktgemisch gebildet wird und die auf das [¹⁸F]Fluorid bezogene Gesamtausbeute relativ gering ausfällt, obwohl die Kondensation der prosthetischen Gruppe mit einer guten radiochemischen Ausbeute abläuft. Daher wurde im folgenden versucht, die Radiofluorierungen mittels oben erläuterten Konzepte durch direkte ¹⁸F-Fluorierungsverfahren zu verbessern.

3.3 Direkte, phasentransfer-katalysierte ¹⁸F-Fluorierung eines Modellpeptids

Durch Direktmarkierung eines exemplarischen Tetrapeptids wird untersucht, ob Peptide, die eine geeignete Abgangsgruppe besitzen, für eine phasentransfer-katalysierte, nukleophile ¹⁸F-Fluorierung geeignet sind. Als Abgangsgruppe wird die p-Toluolsulfonsäuregruppe gewählt, die eine sehr gute Abgangsgruppe bei nukleophilen Substitutionen darstellt. Hierzu wird N-Boc-*trans*-4-hydroxyprolin-methylester wie in [56] beschrieben mit 4-Toluolsulfonylchlorid tosyliert und nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe an den C-Terminus des Modellpeptids Z-Pro-Leu-Gly-OH unter Ausbildung einer Peptidbindung kondensiert (s. Abb. 3.7).

Der N-Boc-*trans*-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester wird mit einer Ausbeute von ca. 60 % erhalten (Lit.: 60 % [56]). Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe verläuft quantitativ. Um zu vermeiden, daß gleichzeitig mit der Boc-Gruppe auch die p-Toluolsulfonsäuregruppe entfernt wird, wird die Schutzgruppenabspaltung nicht in reiner Trifluoressigsäure sondern

unter milderen Bedingungen mit einer Trifluoressigsäure/Dichlormethan-Mischung (1:1) durchgeführt. Die Ausbeute für den sich daran anschließenden Reaktionsschritt beträgt 60 %, so daß der Synthesevorläufer mit einer Gesamtausbeute von 36 % bezogen auf das geschützte Hydroxyprolin hergestellt werden kann.

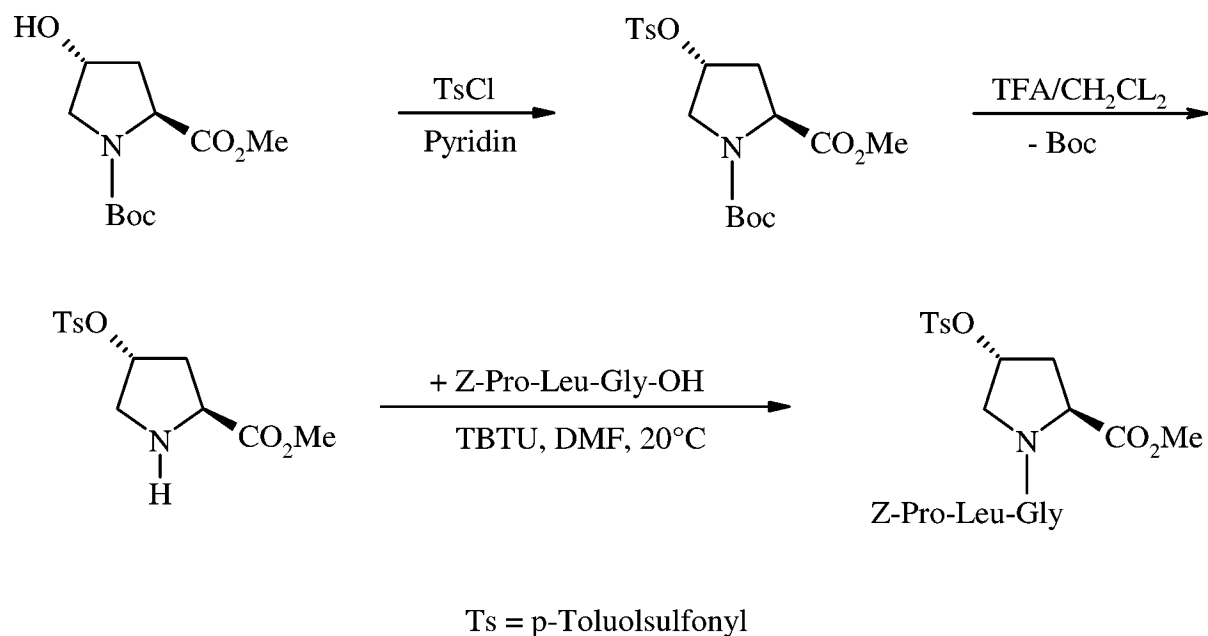


Abb. 3.7: Darstellung des Vorläufers Z-Pro-Leu-Gly-trans-4-(TsO)Pro-OMe

Das fluorierte Tetrapeptid Z-Pro-Leu-Gly-*cis*-4-FluorPro-OMe, das als chromatographischer Standard Verwendung findet, wird durch Umsetzung von Z-Pro-Leu-Gly-OH mit *cis*-4-Fluorprolin-methylester unter Einwirkung von TBTU mit einer Ausbeute von 62 % hergestellt. Die Synthese von *cis*-4-Fluorprolin-methylester erfolgt mit einer Ausbeute von 54 % durch Fluorierung von N-Boc-*trans*-4-hydroxyprolin-methylester mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure-fluorid und anschließender Abspaltung der Boc-Gruppe (s. Kap. 3.2.1). Somit ergibt sich für Z-Pro-Leu-Gly-*cis*-4-FluorPro-OMe eine Gesamtausbeute von 34 % bezogen auf den N-Boc-*trans*-4-hydroxyprolin-methylester.

Die nukleophile ^{18}F -Fluorierung des Modellpeptids wurde in Gegenwart des K_2CO_3 /Kryptofix[®] 2.2.2.-Systems [48, 49] in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Überraschenderweise ist jedoch weder in Acetonitril bei einer Reaktionstemperatur von 80°C noch in Dimethylacetamid bei 100°C und 120°C die Bildung eines Aktivprodukts zu beobachten. Dagegen werden sowohl in DMF als auch in DMSO zwei Aktivprodukte gebildet, die mit k' -Werten von 1,45 bzw. 1,70 HPL-chromatographisch getrennt werden können, jedoch nicht das gewünschte ^{18}F -fluorierte Produkt darstellen, welches unter den gleichen HPLC-

Bedingungen einen k' -Wert von 3,75 besitzt. Auch das Verseifungsprodukt Z-Pro-Leu-Gly-*cis*-4-([^{18}F]Fluor)Pro-OH wird nicht gebildet. Blindversuche, d. h. Markierungsversuche ohne Zusatz von Fluorid, zeigen, daß sowohl der Markierungsvorläufer Z-Pro-Leu-Gly-*trans*-4-(TsO)Pro-OMe als auch Z-Pro-Leu-Gly-*cis*-4-(TsO)Pro-OMe unter den Markierungsbedingungen nicht stabil sind. Bei der HPLC-analytischen Untersuchung im Rahmen der Blindversuche wird das Verschwinden des UV-Signals der beiden Synthesevorläufer beobachtet. Da außer der p-Toluolsulfonsäuregruppe, dem N- und dem C-Terminus keine weiteren funktionellen Gruppen im Modellpeptid vorhanden sind und sowohl die Z-Schutzgruppe als auch der Methylester, die unter den Reaktionsbedingungen stabil sind, bereits erfolgreich bei ^{18}F -Fluorierungen eingesetzt wurden, resultieren die beiden Aktivprodukte vermutlich aus der Spaltung einer Peptidbindung. Die Verminderung der Basizität des Kryptatsystems durch Ersatz des Kaliumcarbonats durch das weniger basische Kaliumoxalat [50] führt ebenfalls zur Fragmentierung des Synthesevorläufers. Offensichtlich sind auch kleine Peptide einer direkten, kryptat-gestützten ^{18}F -Markierung nicht zugänglich. Weitere Untersuchungen zur direkten, Aminopolyether-gestützten Radiofluorierung von Peptiden wurden daher eingestellt.

3.4 ^{18}F -Fluorierungen von Modellpeptiden mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid

Aliphatische Hydroxylfunktionen lassen sich unter milden Reaktionsbedingungen bei Raumtemperatur in Toluol und in Gegenwart der Hilfsbase DBU nach einer kürzlich entwickelten Methode mit 1,5-molaren Mengen an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid in guten Ausbeuten durch Fluorid substituieren [133]. Die hierbei zugrundeliegende Reaktionssequenz ist in Abb. 3.8 dargestellt.

Der erste Reaktionsschritt besteht in der Veresterung des Alkohols zum entsprechenden Nonaflat, wobei das Fluorid aus dem Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid freigesetzt wird. In dem darauffolgenden Reaktionsschritt wird die Nonaflatgruppe in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion durch Fluorid substituiert und so die entsprechende Fluoralkylverbindung gebildet.

Aufgrund der milden Reaktionsbedingungen, unter denen die Reaktion durchgeführt werden kann, bietet sich das Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid als Agens zur radioaktiven ^{18}F -Markierung von sensitiven Biomolekülen, z. B. von Peptiden und Proteinen, an. Voraussetzung ist, daß die Verbindung, die ^{18}F -fluoriert werden soll, eine aliphatische Hydroxylfunktion besitzt. Anstelle eines Prolylrestes in Peptiden und Proteinen kann Hydroxyprolin als

Baustein in das interessierende Biomolekül eingebaut werden und gemäß der Umsetzung von Alkoholen mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid in die entsprechende [^{18}F]Fluorpropyl-haltige Verbindung überführt werden. Hierzu kann das Hydroxyprolin terminal an das Peptid gebunden werden oder in die Aminosäuresequenz eingebaut werden.

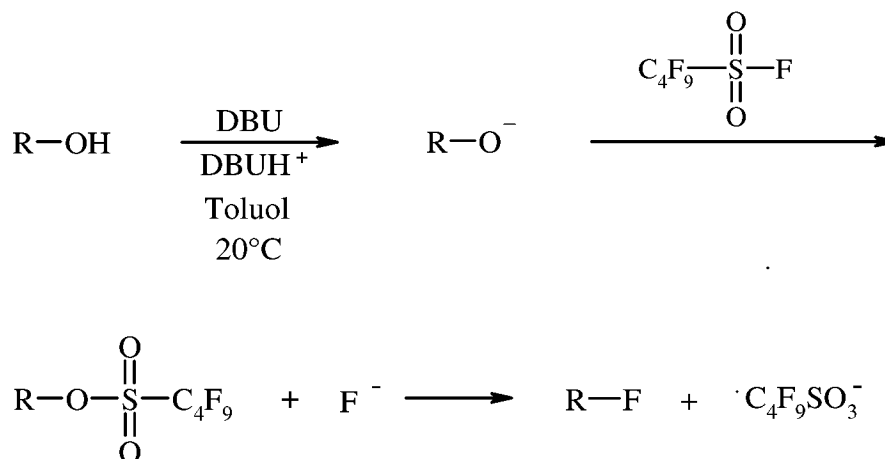


Abb. 3.8: Reaktionssequenz der Fluorierung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid

Im folgenden wird die Herstellung des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes und die damit durchgeführten ^{18}F -Fluorierungen von N-Boc-Hyp-OMe und den beiden Modellpeptiden Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe und Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe beschrieben. Bei den Peptidsynthesen und ^{18}F -Fluorierungen wird von der kommerziell günstigeren *trans*-Form des 4-Hydroxy-*L*-prolins ausgegangen.

3.4.1 Darstellung des trägerarmen Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorids

Die Disulfonimido-Gruppe von N-Alkyl-N,N-bis(alkylsulfonyl)imiden und N-Alkyl-N,N-bis(arylsulfonyl)imiden erwies sich als eine gute Abgangsgruppe bei nukleophilen, aliphatischen Substitutionen [129]. Der Versuch, 4-N,N-[Bis(trifluormethansulfonyl)imido]acetophenon nukleophil mit Fluor-18 durch Substitution der Imido-Gruppe zu fluorieren, ergab jedoch, daß das entstandene Aktivprodukt nicht der gewünschte [^{18}F]Fluoraromat war [139]. Es wurde nachgewiesen, daß es sich bei dem leicht flüchtigen Aktivprodukt um ein Sulfonsäure-[^{18}F]fluorid, d. h. das Trifluormethansulfonsäure[^{18}F]fluorid, handelt [135]. Das [^{18}F]Fluorid greift nicht, wie erhofft wurde, am Kohlenstoff der C-N-Bindung sondern am Schwefel der N,N-Disulfonimidgruppe an, der im Vergleich zum Kohlenstoff eine höhere Elektrophilie

aufweist. Da bei der nukleophilen, kryptatgestützten ^{18}F -Fluorierung aromatischer N,N-Bis(trifluormethansulfonyl)-Verbindungen Trifluormethansulfonsäure- ^{18}F fluorid gebildet wird, wurden entsprechende Untersuchungen zur Herstellung von Perfluorbutan-1-sulfonsäure ^{18}F fluorid durch nukleophile ^{18}F -Fluorierung aromatischer N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)-Verbindungen durchgeführt, wie z. B. an N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin (s. Abb. 3.9).

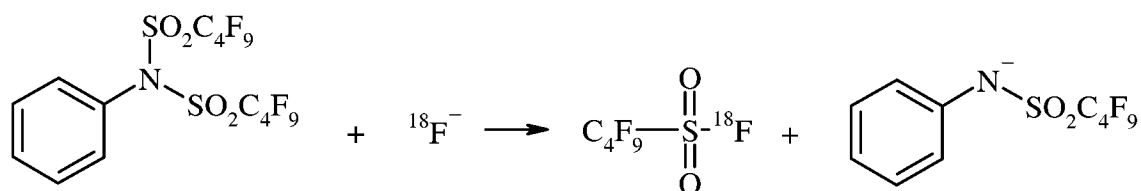


Abb. 3.9: *Nukleophile ^{18}F -Fluorierung von N,N-(Bisperfluorbutan-1-sulfonyl)anilin*

Zur Durchführung der ^{18}F -Fluorierungsreaktion wurde nach der azeotropen Trocknung des ^{18}F Fluorids in Gegenwart des Kaliumcarbonat/Kryptofix[®] 2.2.2.-Systems das ^{18}F Fluorid mit einem entsprechenden Synthesevorläufer, wie z. B. N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin, umgesetzt. Dabei konnten sowohl das Perfluorbutan-1-sulfonsäure ^{18}F fluorid als auch das Trifluormethansulfonsäure ^{18}F fluorid mit einer radiochemischen Ausbeute von ca. 90 % dargestellt werden [135]. Im Rahmen dieser Arbeit wird nun die Synthese und Isolierung des Perfluorbutan-1-sulfonsäure ^{18}F fluorids dahingehend modifiziert, daß es für Markierungsreaktionen als ^{18}F -Fluorierungsagens eingesetzt werden kann.

Im folgenden wird die Synthese des Markierungsvorläufers N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin beschrieben, anschließend die Darstellung des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes und die Umsetzungen mit diesem Reagens.

3.4.1.1 Synthese von N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin

N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin wird in einer zweistufigen Umsetzung von Anilin mit Perfluorbutan-1-sulfonsäureanhydrid hergestellt (s. Abb. 3.10).

Der Versuch, das Disulfonimid durch eine einstufige Umsetzung des Anilins mit dem Sulfonsäureanhydrid zu synthetisieren, führt lediglich zu einer Ausbeute von 4 % an N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin. Dementsprechend wird das mit 67 % als Hauptprodukt gebildete N-(Perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin chromatographisch isoliert und nochmals mit einer äquimolaren

Menge an Perfluorbutan-1-sulfonsäureanhydrid umgesetzt. Die Gesamtausbeute an N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin beträgt nach chromatographischer Reinigung 16 %.

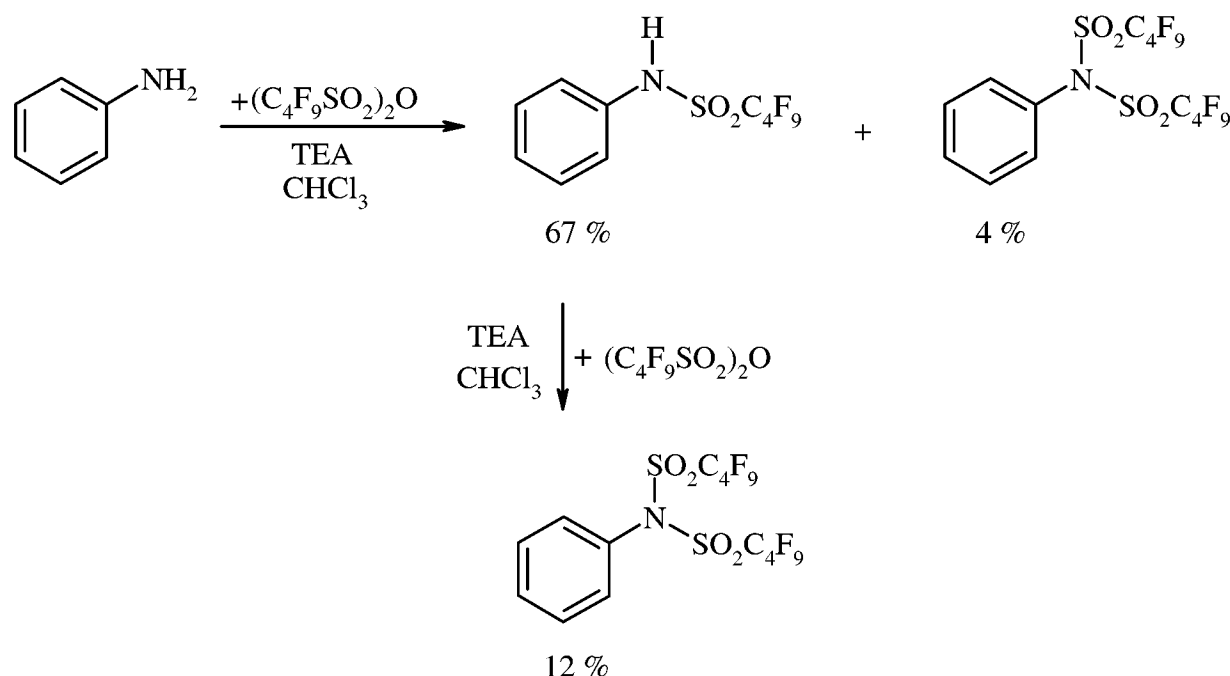


Abb. 3.10: Synthese von N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin

Das zur Herstellung von N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin benötigte Perfluorbutan-1-sulfonsäureanhydrid wird über eine in der Literatur beschriebene mehrstufige Synthese produziert [128]. Die Literatursynthese geht von der Herstellung des Bariumsalzes der Perfluorbutan-1-sulfonsäure aus, aus der die Säure mittels konz. Schwefelsäure und Oleum freigesetzt wird, die dann im letzten Schritt mit Phosphorpentoxid zu ihrem Anhydrid umgesetzt wird. Bei einer Substitution des Bariumsalzes durch das kommerziell erhältliche Kaliumsalz der Perfluorbutan-1-sulfonsäure wird jedoch die gleiche Ausbeute an Perfluorbutan-1-sulfonsäure erhalten.

3.4.1.2 Darstellung des ^{18}F -Fluorierungsagenses Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorid in Gegenwart eines Lösungsmittels

Zur Optimierung und Modifizierung der Synthese von Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorid mit dem Ziel, das ^{18}F -Fluorierungsagens in einer zur ^{18}F -Fluorierung geeigneten Form zu isolieren, werden verschiedene Reaktionsparameter wie Lösungsmittel, Reaktionszeit, Reaktionstemperatur, Eduktkonzentration, Konzentration des Kryptats und das Volumen des Lösungsmittels, in dem das Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorid aufgefangen wird, va-

riert. Hierzu wird der Synthesevorläufer N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin in Gegenwart des $[K\text{C}2.2.2.]_2\text{CO}_3$ -Systems in einem Lösungsmittel mit n.c.a. $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ umgesetzt. Während der Reaktion wird das Aktivprodukt in einem Argonstrom aus dem Reaktor entfernt und in Toluol oder auf einer Polystyrol-Matrix (LiChrolut[®] EN) kondensiert. Da der Prozeß des Transports und des Kondensierens unter anderem auch durch den Gasstrom beeinflusst wird, wird er auf lediglich 0,5 ml/min eingestellt. Die Synthese des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes wird in Gegenwart des $[K\text{C}2.2.2.]_2\text{CO}_3$ -Systems durchgeführt, da es sich zur Aktivierung des $[^{18}\text{F}]\text{Fluoridions}$ bewährt hat (s. Kap. 1.4) und frühere Untersuchungen ergeben haben, daß aus einer Reihe verschiedener Anionenaktivatoren mit dem $[K\text{C}2.2.2.]_2\text{CO}_3$ -System die beste radiochemische Ausbeute an Perfluorbutan-1-sulfonsäure $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$ erhalten wird [135]. In früheren Untersuchungen hat sich gezeigt, daß in einem Sigradur-Gefäß eine deutlich bessere radiochemische Ausbeute an Perfluoralkyl-1-sulfonyl $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$ als in einem konischen Wheaton-Glasreaktor erzielt wird. So konnte in einem Reaktor aus Glaskohlenstoff eine radiochemische Ausbeute an Perfluorbutan-1-sulfonsäure $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$ von $90 \pm 5 \%$ erreicht werden, während in einem Glasreaktor lediglich $52 \pm 3 \%$ erhalten wurden [135]. Daher wird als Reaktor ein Sigradur-Gefäß genommen. Zum Auffangen von Perfluorbutan-1-sulfonsäure $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$, das nicht in der Kühlfalle kondensiert wird, ist hinter der Kühlfalle ein Gefäß mit konzentrierter Kaliumhydroxidlösung geschaltet, in der nicht kondensiertes Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid hydrolysiert wird.

Eignung verschiedener Lösungsmittel

In der präparativen organischen Chemie wird die Fluorierung hydroxylhaltiger Verbindungen mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid in Gegenwart der Hilfsbase DBU in Toluol durchgeführt. Daher wird auch bei den Untersuchungen zur ^{18}F -Markierung der Modellpeptide mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$ Toluol als Lösungsmittel eingesetzt. Somit müssen die Reaktanden zur Durchführung der ^{18}F -Fluorierung in Toluol vorliegen. Der Prozeß der Isolierung bzw. Überführung des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes in Toluol ist ein entscheidender Faktor bei der Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels zur Synthese des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes. Eine Darstellung des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes in niedrig siedenden Lösungsmitteln, wie z. B. in Dichlormethan, wie bereits beschrieben [135], führt zu dem Problem der Isolierung des Aktivprodukts nach Reaktionsende. Da Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid einen relativ niedrigen Siedepunkt von $64 - 65^\circ\text{C}$ besitzt und als ^{18}F -Fluorverbindung in trägerarmen Mengen vorliegt, wird die Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck nach Bildung des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes zu erheblichen Verlusten an Aktivität durch

Koevaporation mit dem Lösungsmittel führen. Daher wird ein höher siedendes Lösungsmittel wie Toluol (Sdp. 111°C) gewählt, damit das Aktivprodukt abdestilliert werden kann, ohne signifikante Mengen des Toluols zu verdampfen. Da die ^{18}F -Fluorierungen der Modellverbindungen mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid in Toluol durchgeführt werden, bietet Toluol als Reaktionsmedium darüberhinaus den Vorteil, daß geringe Mengen an koevaporiertem Toluol nicht von Bedeutung sind. Als Alternativen zu Toluol werden die folgenden hoch siedenden Lösungsmittel DMF (Sdp. 153-155°C), DMSO (Sdp. 190-191°C), o-Xylol (Sdp. 137-144°C) und m-Xylol (Sdp. 138-139°C) untersucht. Während der nukleophilen ^{18}F -Fluorierung von N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin bei 130°C wird das entstehende Aktivprodukt im Argonstrom aus dem Reaktor entfernt und in Toluol aufgefangen. Als radiochemische Ausbeute wird die in Toluol absorbierte Aktivitätsmenge zugrunde gelegt, bei der es sich um das gewünschte Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid handelt. Die Ergebnisse sind in Diagramm 3.11 graphisch dargestellt.

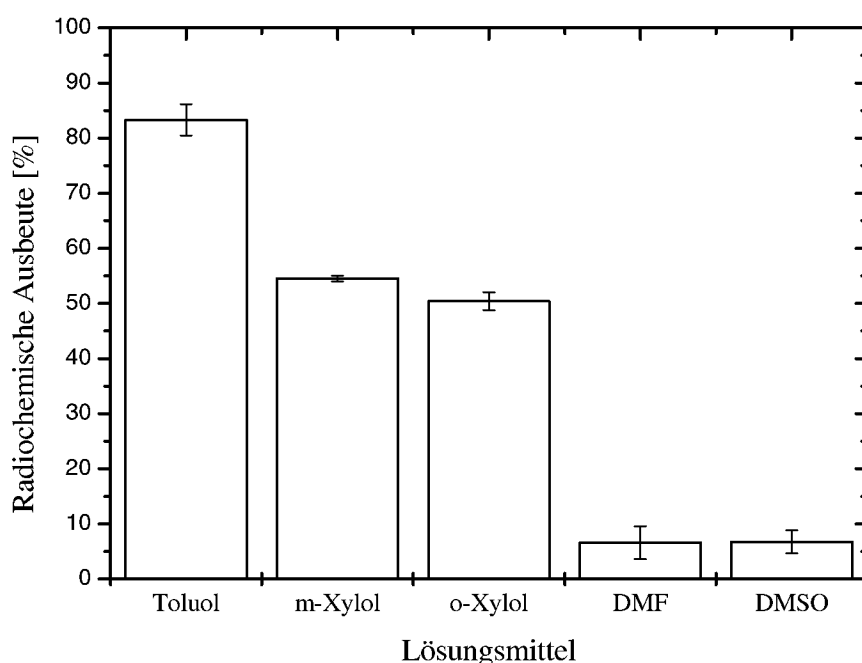


Abb. 3.11: Radiochemische Ausbeute an Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid in verschiedenen Lösungsmitteln

$c(\text{N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin})$: 0,03 mol/l, $c([\text{K} \subset 2.2.2.]_2\text{CO}_3)$: 0,05 mol/l, 130°C, Absorption des Produkts in 1,2 ml Toluol (-70°C)

Es zeigt sich, daß DMF und DMSO mit radiochemischen Ausbeuten von ca. 7 % als Reaktionsmedium ungeeignet sind. Sowohl bei Toluol als auch bei den beiden Xylol-Isomeren kann nicht vermieden werden, daß geringe Mengen an Lösungsmittel mit dem Aktivprodukt abdestilliert werden, die im Fall von Toluol 0 - 150 µl und bei den Xylol-Isomeren 0 - 100 µl betragen. Daher bieten die Xylol-Isomere trotz ihrer höheren Siedepunkte, die allerdings nur geringfügig über der Reaktionstemperatur von 130°C liegen, gegenüber Toluol keinen Vorteil. Die relativ großen Schwankungen beim koevaporiertem Lösungsmittelvolumen sind durch Schwankungen bei der Reaktionstemperatur und im Gasstrom zu erklären. Die in o-Xylol bzw. m-Xylol erzielte radiochemische Ausbeute von 50 ± 2 % bzw. 55 ± 1 % liegt deutlich unter der in Toluol von 83 ± 3 %, welches daher besser zur Herstellung von Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid geeignet ist. Auch besitzt Toluol bevorzugte Eigenschaften als Lösungsmittel, da sich N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin in DMF, DMSO und auch in den beiden Xylol-Isomeren deutlich schlechter löst.

Die Bestimmung der Aktivitätsmenge, die bei 130°C innerhalb von 20 min aus dem Reaktor ausgetrieben wird, ergibt, daß im Fall von Toluol 88 ± 4 % evaporiert werden, bei m-Xylol ca. 60 % und bei o-Xylol ca. 50 %. Somit wird in 1,2 ml Toluol bei ca. - 70 °C praktisch die gesamte aus dem Reaktor entfernte Aktivität absorbiert.

In früheren Untersuchungen sind Fluorinert, ein Gemisch aus perfluorierten Kohlenwasserstoffen mit einem Siedepunkt von ca. 100°C, und Hostinert, ein perfluoriertes Etherketon mit einem Siedepunkt von 180°C, bereits als Lösungsmittel für die Synthese eingesetzt worden. Da jedoch nur radiochemische Ausbeuten von ca. 12 % und ca. 7 % erzielt wurden [135], werden diese beiden Lösungsmittel nicht weiter verwendet.

Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Reaktionszeit

Zur Untersuchung der radiochemischen Ausbeute an Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid in Abhängigkeit von der Reaktionszeit wird N,N-(Bisperfluorbutan-1-sulfonyl)anilin in Toluol bei einer Reaktionstemperatur von 130°C und einer Eduktkonzentration von 0,03 mol/l nukleophil ^{18}F -fluoriert. Das Aktivprodukt wird während der Reaktion in einem Argonstrom von 0,5 ml/min aus dem Reaktor entfernt und in 1,2 ml Toluol aufgefangen, das auf ca. -70°C gekühlt wird. Als radiochemische Ausbeute wird die in Toluol absorbierte Aktivitätsmenge bestimmt. Somit sind die angegebenen radiochemischen Ausbeuten möglicherweise geringer als die tatsächliche radiochemische Gesamtausbeute, da unter Umständen nicht die gesamte Menge an gebildetem Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid aus dem Reaktor entfernt sowie die evaporierte Aktivitätsmenge gegebenenfalls nicht vollständig in der Vorlage absorbiert

wird. In Abb. 3.12 ist die Zeitabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute graphisch dargestellt.

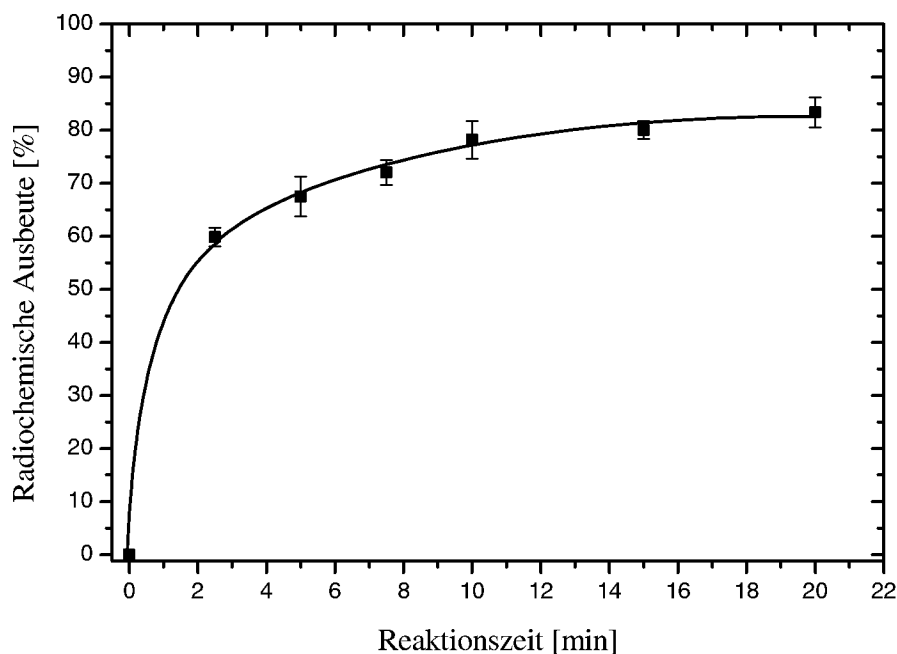


Abb. 3.12: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an Perfluorbutan-1-sulfonsäure- $[^{18}\text{F}]$ fluorid von der Reaktionszeit

500 μl Toluol, $c(\text{N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin})$: 0,03 mol/l, 130°C,
 $c([\text{K}\text{C}\text{2.2.2.}]_2\text{CO}_3)$: 0,05 mol/l, Absorption des Produkts in 1,2 ml Toluol (-70°C)

Die graphische Darstellung zeigt, daß die radiochemische Ausbeute mit ca. 80 % nach 20 min eine Sättigung erreicht. Ab einer Reaktionszeit von 10 min wird nur noch eine geringfügige Steigerung der radiochemischen Ausbeute beobachtet. Im Hinblick auf den radioaktiven Zerfall empfiehlt sich daher, die Reaktionsdauer auf 15 min zu beschränken.

Temperaturabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute

Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute bei der Herstellung von Perfluorbutan-1-sulfonyl $[^{18}\text{F}]$ fluorid wird die Synthese wie oben beschrieben bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Nach 20 min wird die Reaktion abgebrochen und die radiochemische Ausbeute bestimmt, indem die in Toluol aufgefangene Aktivitätsmenge gemessen wird. Das Ergebnis der Untersuchung ist Abb. 3.13 graphisch dargestellt.

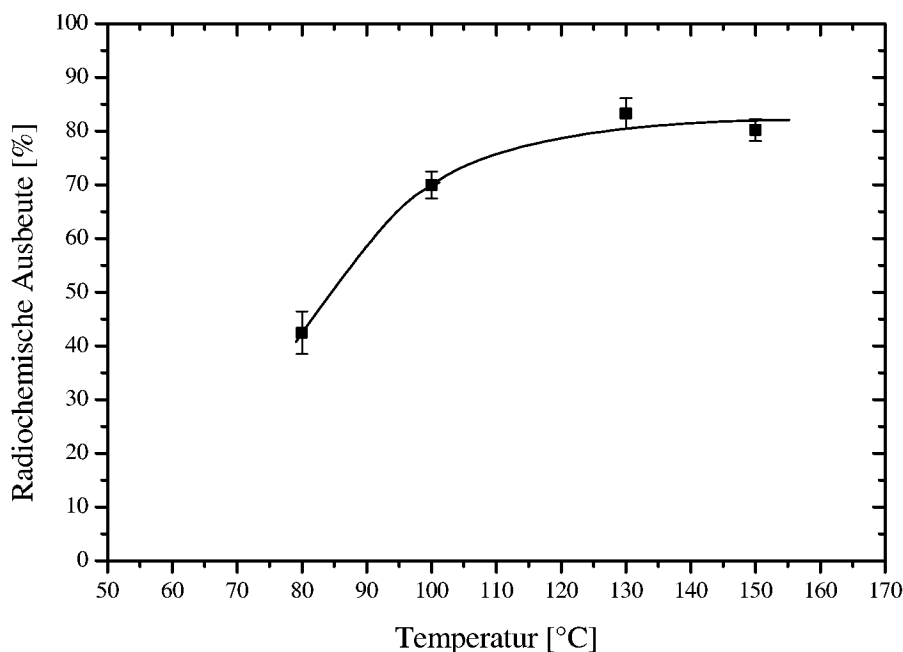


Abb. 3.13: Temperaturabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid

500 μl Toluol, $c(\text{N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin})$: 0,03 mol/l, 20 min, $c([\text{K}\text{C}\text{2.2.2.}]_2\text{CO}_3)$: 0,05 mol/l, Absorption des Produkts in 1,2 ml Toluol (-70°C)

Der graphischen Darstellung der Temperaturabhängigkeit ist zu entnehmen, daß unterhalb des Siedepunktes von Toluol (111°C) die radiochemische Ausbeute mit abnehmender Temperatur schnell sinkt; so beträgt sie bei 100°C $70 \pm 2,5$ % und bei 80°C bereits nur noch 43 ± 4 %. Oberhalb des Siedepunkts wird mit 80 - 83 % eine Sättigung der Ausbeutekurve erreicht.

Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Eduktkonzentration

Weiterhin wird die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Konzentration des Synthesevorläufers N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin untersucht. Hierzu wird, wie oben beschrieben, Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid in Toluol bei 130°C dargestellt, wobei die Eduktkonzentration im Bereich von 0,0025 - 0,030 mol/l verändert wird. Nach 20 min wird die Reaktion abgebrochen und die radiochemische Ausbeute, wie oben beschrieben, bestimmt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Abb. 3.14 zu sehen.

Die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Eduktkonzentration zeigt den erwarteten Verlauf einer Reaktion "pseudo" erster Ordnung. Ab einer Konzentration an N,N-

Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin von 0,015 mol/l wird mit ca. 80 % Ausbeute eine Sättigung der radiochemischen Ausbeute an Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid erreicht.

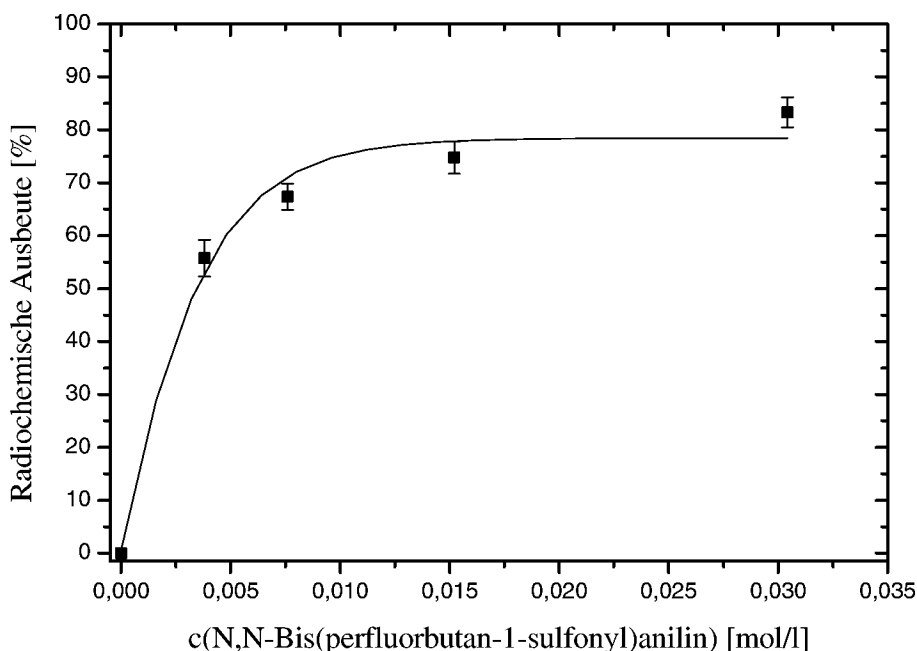


Abb. 3.14: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Konzentration an *N,N*-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin

500 μl Toluol, 20 min, 130°C, $c([\text{K}\text{C}2.2.2.]_2\text{CO}_3)$: 0,05 mol/l, Absorption des Produkts in 1,2 ml Toluol (-70°C)

Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Konzentration an $[\text{K}\text{C}2.2.2.]_2\text{CO}_3$

Ebenfalls wird die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Konzentration des $[\text{K}\text{C}2.2.2.]_2\text{CO}_3$ -Systems bestimmt. Hierzu wird das ^{18}F -Fluorierungsagens wie oben beschrieben hergestellt, wobei die Konzentration an K_2CO_3 und Kryptofix in einem konstanten molaren Verhältnis verändert wird. Die Reaktion wird nach 20 min abgebrochen und die in Toluol aufgefangene Aktivitätsmenge bestimmt. In Abb. 3.15 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

Die Änderungen in der radiochemischen Ausbeute sind allein auf die Konzentrationsänderungen des Kryptates zurückzuführen, da die Bedingungen zur Isolierung des Aktivprodukts nicht variiert werden. Im betrachteten Konzentrationsbereich von 0,05 mol/l bis 0,018 mol/l des $[\text{K}\text{C}2.2.2.]_2\text{CO}_3$ -Systems beträgt die mittlere radiochemische Ausbeute an Perfluorbutan-

1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid etwa 80 %. Unterhalb von 0,017 mol/l ist eine stetige Abnahme der radiochemischen Ausbeute zu beobachten. So beträgt sie bei einer Konzentration von 0,013 mol/l nur 43 ± 4 %.

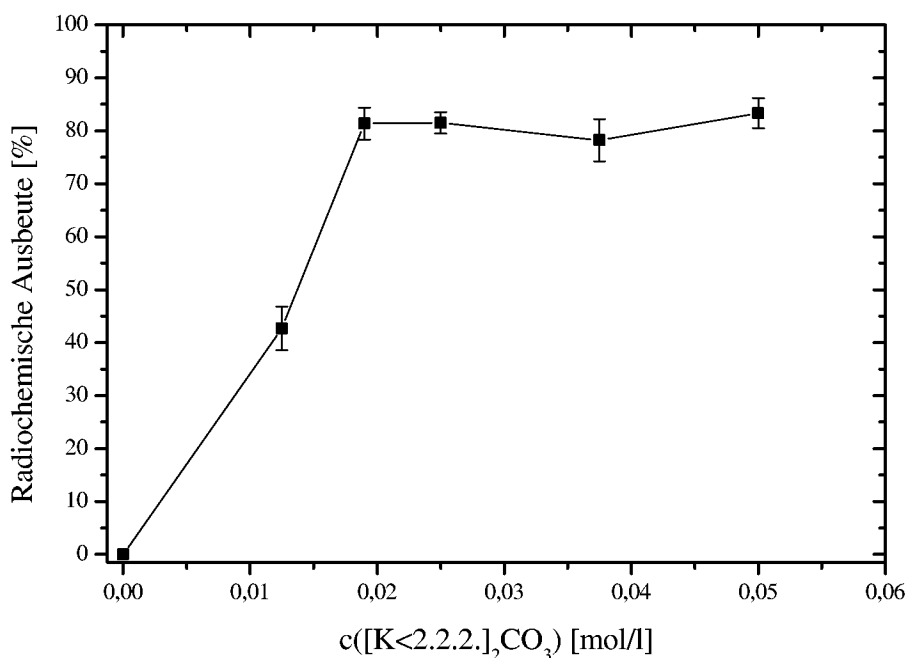


Abb. 3.15: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Konzentration des Kryptates $[\text{K}<2.2.2.>]_2\text{CO}_3$

$c(\text{N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin})$: 0,03 mol/l, 500 μl Toluol, 20 min, 130°C , Absorption des Produkts in 1,2 ml Toluol (-70°C)

Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute vom Volumen des Absorbens Toluol

Ein weiterer wichtiger Syntheseparameter ist das Volumen an Toluol, in dem das Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid nach seiner Herstellung aufgefangen wird. Die Toluollösung, die zur Absorption des ^{18}F -Fluorierungsagenses dient, wird anschließend zur ^{18}F -Fluorierung der Modellverbindungen eingesetzt. Daher soll sie, insbesondere in Hinblick auf eine spätere Herstellung von Radiopharmaka, eine möglichst hohe Konzentration an dem ^{18}F -Fluorierungsreagenz bzw. ein geringes Volumen besitzen. Daher wird untersucht, wieweit sich das Volumen an Toluol unter Vermeidung signifikanter Verluste an ^{18}F -Fluorierungsagense reduzieren läßt. Zur Ausbeutebestimmung wird die in Toluol aufgefangene Aktivitätsmenge bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.16 graphisch dargestellt.

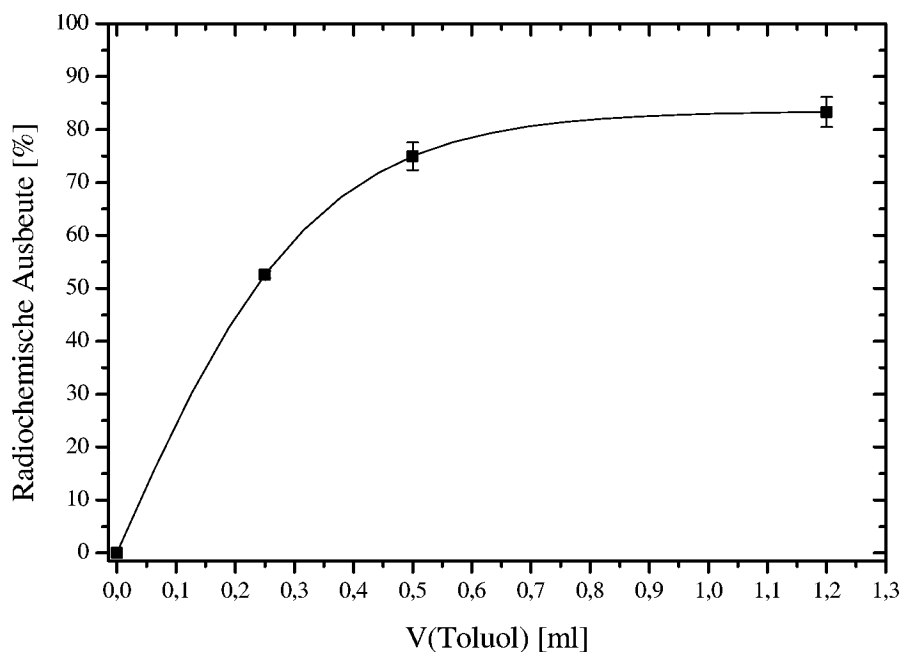


Abb. 3.16: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute vom Volumen an Absorbens Toluol
 500 μ l Toluol, 130°C, $c([K\subset 2.2.2.]_2CO_3)$: 0,05 mol/l, $c(N,N\text{-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin})$: 0,03 mol/l, 20 min, Absorption des Produkts in Toluol (- 70°C)

Bei ersten Syntheseversuchen und Untersuchungen des Perfluorbutan-1-sulfonsäure- $[^{18}F]$ fluorids sind relativ große Volumina von ca. 5 ml an Lösungsmittel und auch neben Toluol vor allem andere Lösungsmittel, wie Aceton und Dichlormethan, zum Auffangen des Reagenzes eingesetzt worden [135, 136]. Es zeigt sich, daß bei einem Volumen von 1,2 ml Toluol 83 ± 3 % radiochemische Ausbeute des ^{18}F -Fluorierungsagenzes erhalten werden. Bei einer Verminderung des Volumens auf 0,5 ml sinkt die Ausbeute geringfügig auf 75 ± 3 %, während ein Volumen von lediglich 0,25 ml zu einer Verminderung der radiochemischen Ausbeute auf 53 ± 1 % führt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sich die folgenden Reaktionsparameter zur Synthese des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes als günstig erwiesen haben: Toluol als Lösungsmittel der nukleophilen Substitutionsreaktion und als Medium zum Auffangen des Reagenzes, eine Eduktkonzentration an $N,N\text{-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin}$ von mind. 0,015 mol/l, eine Reaktionstemperatur von 130°C, eine Konzentration des $[K\subset 2.2.2.]_2CO_3$ -Systems von mind. 0,018 mol/l und mind. 0,5 ml Toluol, in denen das Aktivprodukt bei - 70°C absorbiert wird.

Trägerabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute

Als wichtiger Reaktionsparameter wird bei der Synthese von Perfluorbutan-1-sulfonsäure- $[^{18}\text{F}]$ fluorid auch die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von zugesetztem $[^{19}\text{F}]$ fluorid-Träger untersucht. Hierzu wird vor der azeotropen Trocknung des $[^{18}\text{F}]$ fluorids eine bestimmte Stoffmenge an Kalium $[^{19}\text{F}]$ fluorid dem $[\text{K} \subset 2.2.2.]_2\text{CO}_3$ -System zugegeben. Die Stoffmenge an Kryptofix[®]2.2.2., die zur quantitativen Komplexierung der Kaliumionen als Kryptat notwendig ist, wird in Abhängigkeit der Stoffmenge an Kaliumfluorid und Kaliumcarbonat berechnet. Anschließend wird das ^{18}F -Fluorierungsagens wie oben beschrieben hergestellt und auf einer Polystyrol-Phase (LiChrolut[®] EN) in einer Probenschleife kondensiert. Zur Ausbeutebestimmung wird die Aktivitätsmenge in der Probenschleife bestimmt.

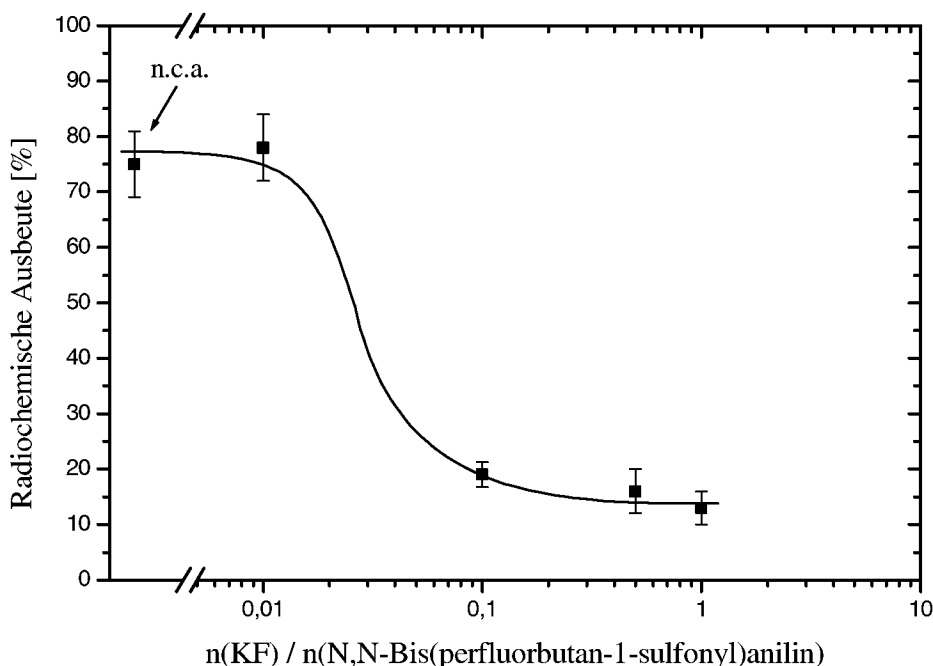


Abb. 3.17: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an Perfluorbutan-1-sulfonsäure- $[^{18}\text{F}]$ fluorid vom Stoffmengenverhältnis $n(\text{KF}) / n(\text{N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin})$

500 μl Toluol, 130°C, $c(\text{N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin})$: 0,03 mol/l,
 $c([\text{K} \subset 2.2.2.]_2\text{CO}_3)$: 0,05 mol/l, 20 min

Dem Diagramm der Ergebnisse in Abb. 3.17 ist zu entnehmen, daß von trägerarmen Bedingungen bis zu einem Stoffmengenverhältnis von Fluorid-Träger zu Synthesevorläufer von 0,01 der Gehalt an $[^{19}\text{F}]$ fluorid keinen Einfluß auf die radiochemische Ausbeute hat. Der Wert von 70 - 80 % entspricht dem der trägerarmen Synthese. Wird der Trägergehalt um eine

Zehnerpotenz erhöht, so sinkt die radiochemische Ausbeute auf ca. 20 % und bei einer äquimolaren Zugabe von Kaliumfluorid beträgt sie nur noch ca. 15 %. Die in Abb. 3.17 dargestellte Kurve beschreibt den erwarteten Verlauf der radiochemischen Ausbeute in Abhängigkeit vom Trägergehalt bei einer nukleophilen ^{18}F -Fluorierung. Dieser Verlauf der Trägerabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute wird auch bei anderen Synthesen beobachtet, wie z. B. der FDG-Synthese, bei der ebenfalls bei einem Stoffmengenverhältnis von Kaliumfluorid zu Markierungsvorläufer von 0,01 - 0,1 die radiochemische Ausbeute signifikant abnimmt [140]. Als Konkurrenzreaktion zur nukleophilen ^{18}F -Fluorierung findet eine Eliminierung statt, die unter trägerarmen Bedingungen die radiochemische Ausbeute nicht beeinflusst, da der durch die Eliminierung resultierende ^{18}F Fluorwasserstoff durch den Basenzusatz deprotoniert wird und somit ^{18}F Fluorid wieder zur Verfügung steht, um mit dem in einem sehr großen Überschuß zum ^{18}F Fluorid vorhandenen Synthesevorläufer zu reagieren. Unter geträgerten Bedingungen jedoch dominiert die Eliminierungsreaktion bereits deutlich vor einer äquimolaren Zugabe an Fluorid, so daß die Konzentration an Edukt nicht nur durch die Fluorierungsreaktion sondern vor allem durch die Eliminierung deutlich verringert wird, das eine Abnahme der radiochemischen Ausbeute zur Folge hat.

Ein Vergleich der hier durchgeführten Adsorption des Aktivprodukts auf einer Polystyrol-Phase mit der sonst durchgeführten Absorption in Toluol erfolgt in Kap. 3.4.1.4.

3.4.1.3 Darstellung des ^{18}F -Fluorierungsagences Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorid in Abwesenheit eines Lösungsmittels

Da bei der bisherigen Synthese des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes in Toluol das Solvens in Mengen von bis zu 150 µl im Argonstrom mit dem Aktivprodukt koevaporiert wird, wird eine alternative Darstellungsmethode untersucht, das Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorid lösungsmittelfrei zu erhalten. Im Hinblick auf die ^{18}F -Fluorierung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorid von Peptiden, die kovalent an einem Harz gebunden sind, erfolgt die Kondensation des Reagenzes auf einer festen Phase. Das Lösungsmittel, das zur Überführung des Synthesevorläufers N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin in das Reaktionsgefäß dient, wird vor der Bildung des ^{18}F -Fluorierungsagences entfernt und die Reaktion in der Schmelze durchgeführt.

Hierfür wird ein niedrig siedendes Lösungsmittel benötigt, das bei Raumtemperatur oder noch geringerer Temperatur innerhalb weniger Minuten vollständig unter vermindertem Druck bzw. im Argonstrom entfernt werden kann, da die ^{18}F -Fluorierung des N,N-Bis(perfluorbutan-

1-sulfonyl)anilin bereits bei niedrigen Temperaturen einsetzt. Als Solventien kommen z. B. Dichlormethan (Sdp.: 40°C), Diethylether (Sdp.: 34,6°C) und Frigen (Sdp.: 23,7°C) in Frage. Es zeigt sich, daß bei Zugabe des gelösten Synthesevorläufers und Entfernen des Solvens bei Raumtemperatur unter vermindertem Druck nach einer kurzen Homogenisierungsphase von < 30 s mit Dichlormethan zusammen ca. 45 % der Aktivität aus dem Reaktor evaporiert werden, mit Frigen ca. 35 % und mit Diethylether ca. 20 %. Für das Abdampfen des Lösungsmittels wird mit 10 - 20 min noch eine relativ lange Zeit benötigt.

Da mit Diethylether das beste Ergebnis erzielt wird, werden mit diesem Lösungsmittel in Abwesenheit von Radioaktivität weitere Optimierungsversuche bei einer niedrigeren Temperatur, bei 0°C, durchgeführt. Die Optimierungsversuche ergeben, daß der Diethylether bereits innerhalb von 2 min vollständig durch Evaporation entfernt wird, sofern der Innendurchmesser für den Gasaustritt mindestens 2 mm beträgt und das Ethervolumen 250 µl nicht überschreitet. Im Aktivversuch zeigt sich, daß mit dem Diethylether unter den optimierten Bedingungen nur 5 - 15 % der Aktivität koevaporiert werden.

Nach Evaporation des Lösungsmittels wird die Reaktion bei 130°C in der Schmelze durchgeführt, in der das Edukt und das Kryptat als homogene Mischung vorliegen. Das sich bildende Aktivprodukt wird während der Reaktion mit Hilfe von Argon aus dem Reaktor transportiert und auf einer Polystyrol-Phase (LiChrolut® EN) kondensiert. Von der nach Abdampfen des Diethylethers im Reaktor verbliebenen Aktivitätsmenge werden 77 ± 3 % auf der festen Phase aufgefangen. Bezogen auf die eingesetzte Aktivitätsmenge an $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ beträgt die Ausbeute 67 ± 8 % und bezogen auf die Aktivitätsmenge nach der azeotropen Trocknung des $[^{18}\text{F}]\text{Fluorids}$ 71 ± 5 %. Obwohl sie im Vergleich zur radiochemischen Ausbeute bei der Synthese in Toluol von 83 ± 3 % geringer ausfällt, ist sie im Hinblick auf die Vereinfachung der weiteren technischen Durchführung zufriedenstellend.

3.4.1.4 Vergleich verschiedener Absorptions- bzw. Adsorptionsbedingungen zur Isolierung des Perfluorbutansulfonsäure $[^{18}\text{F}]\text{fluorids}$

Die Methode, nach der das ^{18}F -Fluorierungsreagenz isoliert wird, ist ein entscheidender Syntheseparameter. Daher werden verschiedene Absorptions- bzw. Adsorptionsbedingungen miteinander verglichen. Das Perfluorbutan-1-sulfonsäure $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$ wird entweder nach der in Kap. 3.4.1.2 beschriebenen Methode in Toluol oder nach der in Kap. 3.4.1.3 beschriebenen Methode in der Schmelze dargestellt und im Argonstrom ausgetrieben. Die Reaktion wird nach 20 min beendet. Das ^{18}F -Fluorierungsagens wird im Hinblick der ^{18}F -Fluorierung von

Peptiden in Toluol bzw. von Peptiden, die an einem Harz kovalent gebunden sind, entweder in Toluol aufgefangen, auf einer Polystyrol-Matrix in einer Probenschleife adsorbiert oder in einer leeren Probenschleife kondensiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt. Die angegebenen radiochemischen Ausbeuten beziehen sich auf die eingesetzte Menge an [^{18}F]Fluorid.

Tabelle 3.1: Vergleich verschiedener Absorptions- bzw. Adsorptionsbedingungen bei der Synthese von Perfluorbutansulfonsäure[^{18}F]fluorid

Absorptions- bzw. Adsorptionsbedingungen	Radiochemische Ausbeute [%]
1,2 ml Toluol; - 70°C ^{A)}	83 ± 3
Polystyrol-Phase (LiChrolut [®] EN); - 70°C ^{A)}	75 ± 6
Polystyrol-Phase (LiChrolut [®] EN); - 70°C ^{B)}	67 ± 8
Leere Probenschleife (Teflon) in fl. Stickstoff ^{B)}	35 ± 1

A) Synthese in Toluol, B) Synthese in der Schmelze

Reaktionsbedingungen: *c*(N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin): 0,03 mol/l, 500 µl Toluol, *c*([K $\equiv$ 2.2.2.] $_2\text{CO}_3$): 0,05 mol/l, 130°C, 20 min

Der Vergleich der verschiedenen Absorptions- bzw. Adsorptionsbedingungen ergibt, daß ein Lösungsmittel, wie z. B. Toluol, als Absorbens die effektivste Methode ist, das Perfluorbutan-1-sulfonyl[^{18}F]fluorid zu isolieren. Wird die gleiche Methode der Radiosynthese eingesetzt, liegen in Toluol nach Beendigung der Reaktion und destillativen Isolierung 83 ± 3 % der eingesetzten Aktivität absorbtiv gebunden vor, während die auf einer Polystyrol-Matrix (LiChrolut[®] EN) adsorbierte Aktivität 75 ± 6 % beträgt. Somit ist die Adsorption bzw. Kondensation des Perfluorsulfonsäure[^{18}F]fluorids an fester Phase (LiChrolut[®] EN) der Absorption in Toluol vergleichbar, wenngleich bis zu 10 % des Aktivprodukts die Festphase passieren können. Die Verlustquote hängt naturgemäß von der Größe des Gasvolumenstroms ab, der zum Transport des Aktivprodukts dient.

Ein Vergleich der Adsorption an der Polystyrol-Matrix, bei der nach der Radiosynthese in der Schmelze 67 ± 8 % an Aktivität erhalten werden, mit der Adsorption in der leeren Probenschleife aus Teflon, bei der die kondensierte Aktivität trotz Kühlung in flüssigem Stickstoff lediglich 35 ± 1 % beträgt, zeigt, daß die Polystyrol-Phase deutlich besser zur Adsorption des Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorids geeignet ist. Zudem lassen sich lediglich ca. 60 % der in der leeren Probenschleife kondensierten Aktivität mit 100 µl Toluol in Lösung bringen.

Bei der Darstellung des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes in Toluol wird mit $75 \pm 6 \%$ eine höhere Ausbeute erzielt als in Abwesenheit eines Lösungsmittels ($67 \pm 8 \%$). Die geringere Ausbeute ist durch den Verlust an Aktivität bei der Evaporation des Diethylethers zu erklären.

Zur ^{18}F -Fluorierung der Modellverbindungen wird das Perfluorbutansulfonsäure[^{18}F]fluorid sowohl in Toluol gelöst zugegeben als auch auf dem Harz, an dem das zu markierende Peptid kovalent gebunden ist, adsorbiert (s. Kap. 3.4.2 - 5).

3.4.2 Radiosynthese von N-Boc-*cis*-4-[^{18}F]fluorprolin-methylester mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid

Zur Untersuchung, ob sich die Hydroxylfunktion in Hydroxyprolin mit diesem ^{18}F -Fluorierungsagens durch Fluor-18 substituieren läßt, wird N-Boc-*trans*-4-*L*-hydroxyprolin-methylester mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid umgesetzt. Dabei findet bei der Fluorierung mit diesem Fluorierungsreagenz unter Walden-Umkehr eine Konfigurationsänderung am Kohlenstoffatom statt, das die Hydroxyl-Gruppe trägt [121]. Es wird die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute sowohl von der Reaktionszeit als auch vom Verhältnis des als Träger zugegebenen Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorids zu N-Boc-Hyp-OMe bestimmt. Hierzu wird zu dem Prolinderivat bei Raumtemperatur die das ^{18}F -Fluorierungsagens enthaltende Toluollösung, DBU als Hilfsbase und inaktives Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid als Träger gegeben. Dabei wird der Träger erst nach der Zugabe von DBU und Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid hinzugefügt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 3.18 und 3.19 zusammengefaßt.

Alle Kurven zeigen den Verlauf einer Reaktion „pseudo erster Ordnung“. Bei den niedrigen Verhältnissen von Träger zu Synthesevorläufer von 0 - 0,2 wird bereits innerhalb einer Minute die maximale radiochemische Ausbeute erreicht und damit der Sättigungsbereich der Reaktion. Im Fall der größeren Verhältnisse von Träger zu Edukt ab 0,5 ist dies der Fall nach 3 - 5 min. Es wird beobachtet, daß bereits innerhalb einer Minute weder in der Reaktionslösung noch in der Gasphase über der Lösung intaktes Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid vorhanden ist, so daß der erste Reaktionsschritt, die Bildung des Nonaflats von Prolin (vgl. Abb. 3.13), offensichtlich sehr schnell abläuft.

Bei der trägerarmen Synthese des N-Boc-*cis*-4-[^{18}F]fluorprolin-methylesters mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid fällt die radiochemische Ausbeute mit 0,5 - 1,0 % sehr gering aus. Erst wenn das Stoffmengenverhältnis von Perfluorbutan-1-sulfonsäure zu N-Boc-*trans*-4-hydroxyprolin-methylester einen Wert von 0,1 - 1 erreicht, steigt die radiochemische Ausbeute

te, wie in Abb. 3.19 graphisch dargestellt, einem sigmoiden Funktionsverlauf folgend, deutlich an. Bei einem Verhältnis von Träger zu Edukt von 1 erreicht sie dann einen Wert von $90 \pm 4 \%$, der sich mit einer Verdoppelung des Träger-zu-Edukt-Verhältnisses auf 2 noch einmal auf $97 \pm 2 \%$ erhöht.

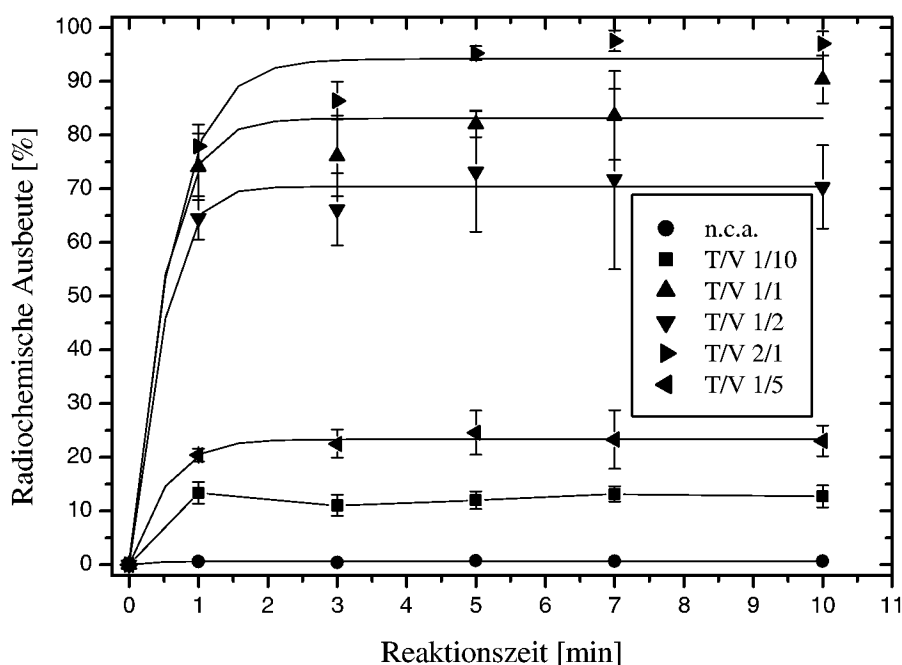


Abb. 3.18: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an *N*-Boc-cis-4- ^{18}F fluorprolin-methylester von der Reaktionszeit und dem Stoffmengenverhältnis von Träger zu *N*-Boc-Hyp-OMe

250 μl Toluol, DBU, $c(\text{N-Boc-Hyp-OMe})$: 0,04 mol/l, Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid, 20°C, T/V : $n(\text{Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid}) / n(\text{N-Boc-Hyp-OMe})$

Die geringe radiochemische Ausbeute im Fall der trägerarmen Synthese ist auf den Reaktionsmechanismus (vgl. Abb. 3.13) zurückzuführen, nach dem auch die ^{18}F -Fluorierung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure ^{18}F fluorid abläuft. Nach der Bildung des Prolinnonaflats und der Freisetzung des ^{18}F Fluorids, liegt das Nonaflat in einem großen Überschuß gegenüber dem unveränderten Edukt vor. Es handelt sich hierbei nicht um eine Konsekutivreaktion, und das freigesetzte ^{18}F Fluorid greift nicht am selben Molekül wieder an. Daher kann n.c.a. ^{18}F Fluorid aus statistischen Gründen nur selten auf seinen Reaktionspartner, das Nonaflat, im vorhandenen Überschuß an nicht umgesetzter Hydroxylverbindung stoßen, was die

radiochemische Ausbeute widerspiegelt. Aus diesem Grund ist es notwendig, Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid als Träger der Reaktion zuzugeben, um den Anteil an Nonaflat und somit an Reaktionspartner für das $[^{18}\text{F}]$ Fluorid zu erhöhen. Die Untersuchung der Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute zeigt, daß die Zugabe einer äquimolaren Menge an Träger unerlässlich ist, um eine gute radiochemische Ausbeute zu erhalten.

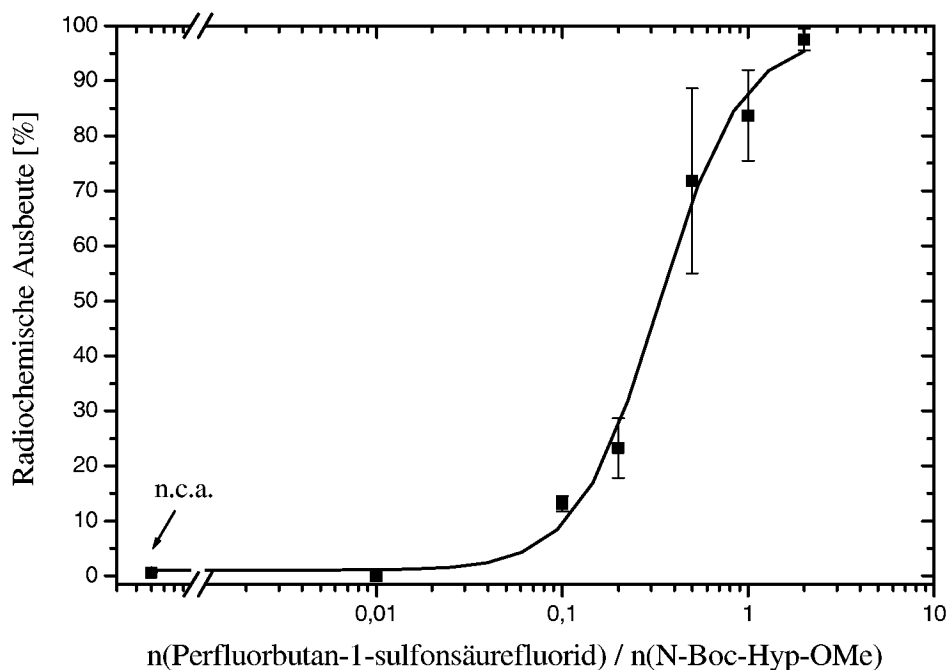


Abb. 3.19: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an *N*-Boc-*cis*-4- $[^{18}\text{F}]$ fluorprolin-methylester vom Stoffmengenverhältnis $n(\text{Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid}) / n(\text{Boc-Hyp-OMe})$

250 μl Toluol, DBU, $c(\text{Boc-Hyp-OMe})$: 0,04 mol/l, Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid, 20°C, 10 min

Bei einer Verdoppelung des Verhältnisses von Träger zu Edukt auf 2 zu 1 würde man aus statistischen Gründen eine maximale radiochemische Ausbeute von höchstens 50 % erwarten. Da in diesem Fall die Stoffmenge an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid doppelt so hoch ist wie die Stoffmenge an Prolinderivat, kann auch nur maximal die Hälfte der Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid-Moleküle mit den Hydroxyprolin-Molekülen reagieren. Bei gleichzeitigem Vorhandensein von Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid und Perfluorbutan-1-sulfonsäure- $[^{18}\text{F}]$ fluorid konkurrieren beide gleichermaßen um einen Reaktionspartner, so daß auch nur die Hälfte des radioaktiven Perfluorbutan-1-sulfonsäure- $[^{18}\text{F}]$ fluorid abreagieren kann und die radiochemische Ausbeute auf 50 % beschränkt ist. Dies wird in der Tat beobachtet, wenn das

inaktive und das ^{18}F -markierte Fluorierungsreagenz vor der Zugabe zum N-Boc-Hyp-OMe gemischt werden, wie in Abb. 3.20 zu sehen ist.

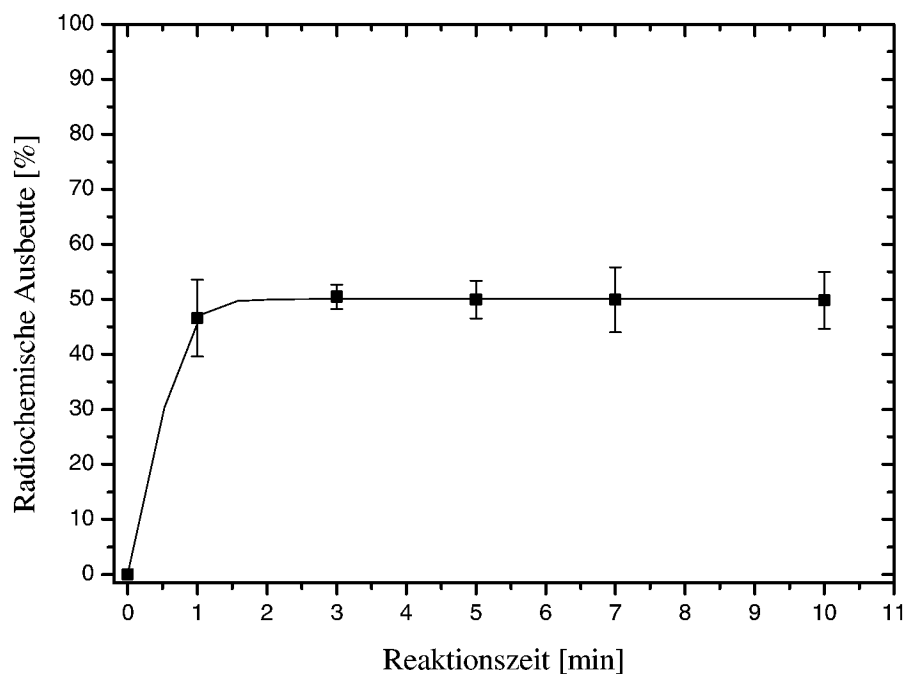


Abb. 3.20: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an N-Boc-cis-4- ^{18}F]fluorprolin-methylester von der Reaktionszeit bei gemeinsamer Zugabe von Träger und ^{18}F -Fluorierungsreagenz

$c(\text{N-Boc-Hyp-OMe})$: 0,04 mol/l, $c(\text{Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid})$:
0,08 mol/l, 20°C, 250 μl Toluol, DBU

Die überraschende, in Abb. 3.18 und 3.19 gezeigte radiochemische Ausbeute von über 90 %, die beobachtet wird, wenn das inaktive Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid als letzte Komponente nach dem ^{18}F -Fluorierungsagens und der Base zugegeben wird, lässt sich durch die spontane Reaktion des Säurefluorids sowie die geschickt gewählte Reihenfolge bei der Zugabe der Reagenzien erklären. Aufgrund der primären Zugabe von n.c.a. Perfluorbutan-1-sulfonsäure ^{18}F]fluorid kann durch die schnelle Bildung des Nonaflats bis zu 100 % an ^{18}F]Fluorid freigesetzt werden. Nach der Zugabe des Trägers zur Erhöhung der Konzentration an Nonaflat kann nur noch der Rest der freien Hydroxylgruppen abreagieren; d. h. die Summe an freigesetztem inaktiven und radioaktiven Fluorid wird maximal äquimolar zum eingesetzten Hydroxyprolinderivat bzw. daraus gebildetem Nonaflat sein. Dies ist in Abb. 3.21 veranschaulicht ($^{18}\text{F}^- + ^{19}\text{F}^- = \text{Z}$).

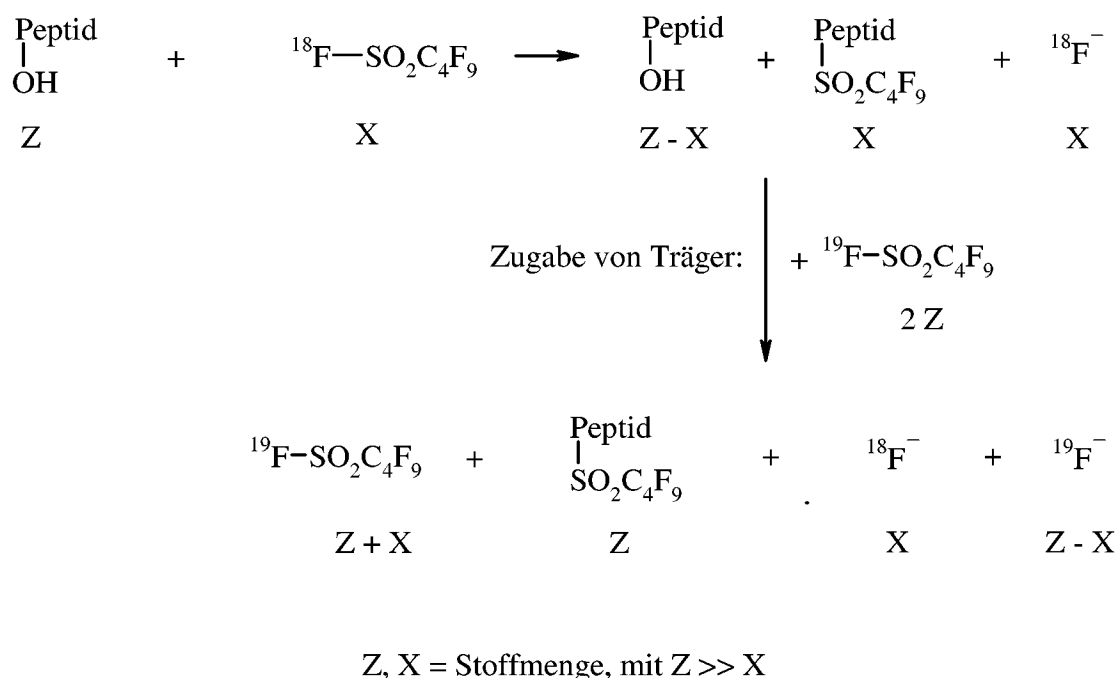


Abb. 3.21: Veranschaulichung des Reaktionsablaufes und der Stoffmengen bei einem nachträglich zugefügten doppelt-molaren Trägerzusatz an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid

Eine weitere Bedingung für den Reaktionsablauf bzw. dessen Erklärung beruht darauf, daß kein Austausch zwischen dem im Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid gebundenem Fluor mit dem sich in Lösung befindenden Fluorid stattfindet. So könnte das freigesetzte [^{18}F]Fluorid der Reaktion entzogen werden, indem es in überschüssiges Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid eingebaut wird. Daher wird überprüft, ob ein solcher Fluor-18-für-Fluor-19 Austausch stattfindet. Hierzu wird die azeotrope Trocknung der wäßrigen [^{18}F]Fluorid-Lösung mit Acetonitril in Gegenwart von Kaliumcarbonat und Kryptofix[®] durchgeführt. Nach der azeotropen Trocknung wird bei Raumtemperatur eine Lösung von Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid und DBU in Toluol zum [^{18}F]Fluorid gegeben. Die eingesetzten Stoffmengen und Konzentrationen entsprechen denjenigen bei der ^{18}F -Fluorierung von N-Boc-Hyp-OMe bei einem Verhältnis von Träger zu Edukt von zwei. Mittels Radio-HPLC wird untersucht, ob sich Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid gebildet hat. In Gegenwart des $[\text{K} \subset 2.2.2.]_2\text{CO}_3$ -Systems werden nach 10 min 1 - 2 % an Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid festgestellt, die zu vernachlässigen sind. Wird die azeotrope Trocknung des [^{18}F]Fluorids in Abwesenheit einer Base und eines Phasentransferkatalysators durchgeführt, bildet sich kein Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid.

Vergleicht man darüber hinaus die Substitution und Freisetzung eines Fluoridions mit der eines Perfluorbutan-1-sulfonsäureanions jeweils durch Fluorid, so ist die Freisetzung des Nonaflatanions aus Prolinnonaflat energetisch günstiger, da das Perfluorbutan-1-sulfonsäureanion durch die Möglichkeit zur Mesomerie besser stabilisiert wird als ein freigesetztes Fluoridion. Daher ist bei Anwesenheit von Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid und Nonaflatverbindung die Reaktion des Fluorids mit dem Nonaflat gegenüber einem Fluor für Fluor-Austausch wesentlich begünstigt.

3.4.3 Radiosynthese des N-Benzyloxycarbonyl-prolyl-leucyl-glycyl-*cis*-4-[^{18}F]fluorprolin-methylesters

Nachdem gezeigt wurde, daß sich die Hydroxylfunktion in N-Boc-*trans*-4-Hydroxyprolin-methylester mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid in guten Ausbeuten durch Fluor-18 substituieren läßt, ist die Markierungsmethode an einem 4-Hydroxyprolin enthaltenden Peptid von Interesse. Die ^{18}F -Fluorierung des N-Boc-*trans*-4-Hydroxyprolin-methylesters ergab, daß für eine gute radiochemische Ausbeute die Zugabe von Träger an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid unerläßlich ist. In Hinblick auf einen späteren Einsatz dieser Methode zur Herstellung von Radiopharmaka ist jedoch eine Minimierung des Trägergehaltes notwendig. Daher wird die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute vom Verhältnis des als Träger zugesetzten Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorids zu Peptid und von der Peptidkonzentration bestimmt. Als Modellpeptid dient Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe, das außer der Hydroxylfunktion in den Seitenketten der Aminosäuren keine weiteren funktionellen Gruppen besitzt. Der N-Terminus liegt als Carbamat geschützt vor und der C-Terminus als Ester, so daß Nebenreaktionen an diesen Funktionen ausgeschlossen werden können. Hydroxyprolin ist in dieser Aminosäuresequenz endständig gebunden und bildet den C-Terminus.

3.4.3.1 Synthese von N-Benzyloxycarbonyl-prolyl-leucyl-glycyl-*trans*-4-hydroxyprolin-methylester

Das Modellpeptid Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe wird durch Kondensation von *Trans*-4-Hydroxyprolin-methylester an den C-Terminus von Z-Pro-Leu-Gly-OH mittels TBTU hergestellt, wie in Abb. 3.22 gezeigt ist. Dabei kann der Hydroxyprolin-methylester aufgrund der geringen Reaktivität der sekundären Hydroxylfunktion direkt eingesetzt werden, ohne diese Funktion zu schützen [141]. Das Modellpeptid wird mit einer Ausbeute von 72 % erhalten.

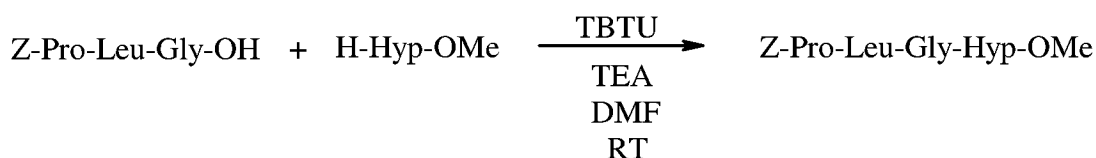


Abb. 3.22: Synthese von *Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe*

3.4.3.2 Synthese von *N*-Benzyloxycarbonyl-prolyl-leucyl-glycyl-*cis*-4-fluorprolin-methylester

Die Standardverbindung *Z-Pro-Leu-Gly-cis*-4-(Fluor)Pro-OMe wird in einer zweistufigen Aufbausynthese hergestellt. Nach der Fluorierung von *N*-Boc-Hyp-OMe mittels eines geringen Überschusses an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid in mit einer Ausbeute von 54 % (s. Kap. 3.2.1) und Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wird der 4-Fluorprolin-methylester mit dem C-Terminus von *Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe* mit einer Ausbeute von 62 % kondensiert, wie in Abb. 3.23 gezeigt ist. Die Gesamtausbeute an *Z-Pro-Leu-Gly-trans*-4-(Fluor)Pro-OMe beträgt 34 %.

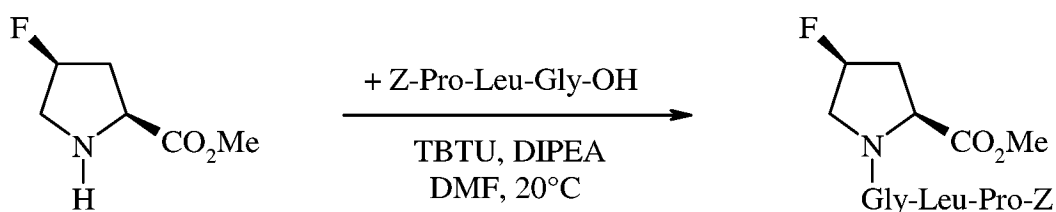


Abb. 3.23: Synthese von *Z-Pro-Leu-Gly-cis*-4-(Fluor)Pro-OMe

3.4.3.3 ¹⁸F-Fluorierung von *N*-Benzyloxycarbonyl-prolyl-leucyl-glycyl-*trans*-4-hydroxyprolin-methylester

Die ¹⁸F-Fluorierung von *Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe* mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure-[¹⁸F]fluorid wird bei Raumtemperatur in Gegenwart der Base DBU und Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid als Träger in Toluol durchgeführt. Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute wird die Menge des Vorläuferpeptids *Z-Pro-Leu-*

Gly-Hyp-OMe bei einem äquimolaren Verhältnis von Träger zu Edukt variiert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in den Abbildungen 3.24 und 3.25 graphisch dargestellt.

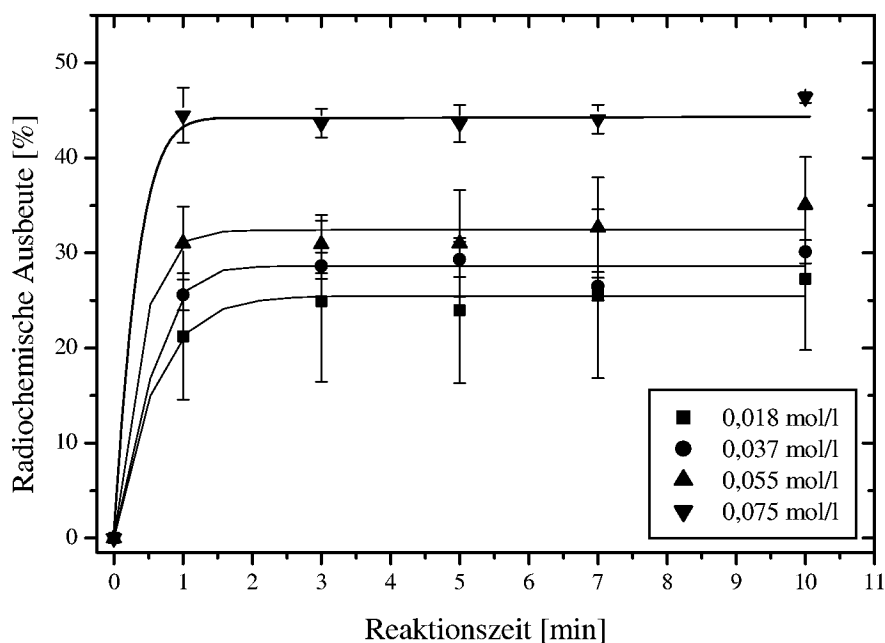


Abb. 3.24: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an Z-Pro-Leu-Gly-cis-4-([^{18}F]Fluor)Pro-OMe von der Reaktionszeit und der Konzentration an Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe
 Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe / DBU / Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid : 1 / 3 / 1,
 20°C, 250 μl Toluol

Die graphische Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute zeigt wiederum den typischen Verlauf einer Reaktion „pseudo erster Ordnung“. Bei der höchsten betrachteten Konzentration von 0,075 mol/l wird bereits innerhalb einer Minute die maximale radiochemische Ausbeute erreicht und damit der Sättigungsbereich der Reaktion. Bei der niedrigsten Konzentration von 0,018 mol/l ist dies nach ca. 3 min der Fall. Wie bei der ^{18}F -Fluorierung von N-Boc-Hyp-OMe wird auch hier beobachtet, daß sich bereits nach einer Minute weder in der Reaktionslösung noch in der Gasphase über der Lösung intaktes Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid befindet, so daß auch bei dem Modellpeptid Z-Pro-Gly-Leu-Hyp-OMe die Bildung des Nonaflats offensichtlich sehr schnell abläuft.

Im betrachteten Konzentrationsbereich von 0,018 bis 0,075 mol/l wird bei der höchsten untersuchten Konzentration an Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe von 0,075 mol/l mit $43,6 \pm 1,5 \%$ die

beste radiochemische Ausbeute erzielt. Im Vergleich zu N-Boc-Hyp-OMe fällt die radiochemische Ausbeute nur halb so groß aus. Die Ursache hierfür kann in sterischen und elektronischen Einflüssen der Peptidkette liegen, z. B. in einer ungünstigen Faltung unter den Reaktionsbedingungen. Ein weiterer Grund kann in der möglichen pH-Wert-Änderung der stark basischen Reaktionslösung durch die Stickstoff-Protonen der Peptidbindungen liegen, womit eine Beeinflussung der Nukleophilie des Fluorids einhergeht. Im N-Boc-Hyp-OMe dagegen ist ein solches Stickstoff-Proton nicht vorhanden.

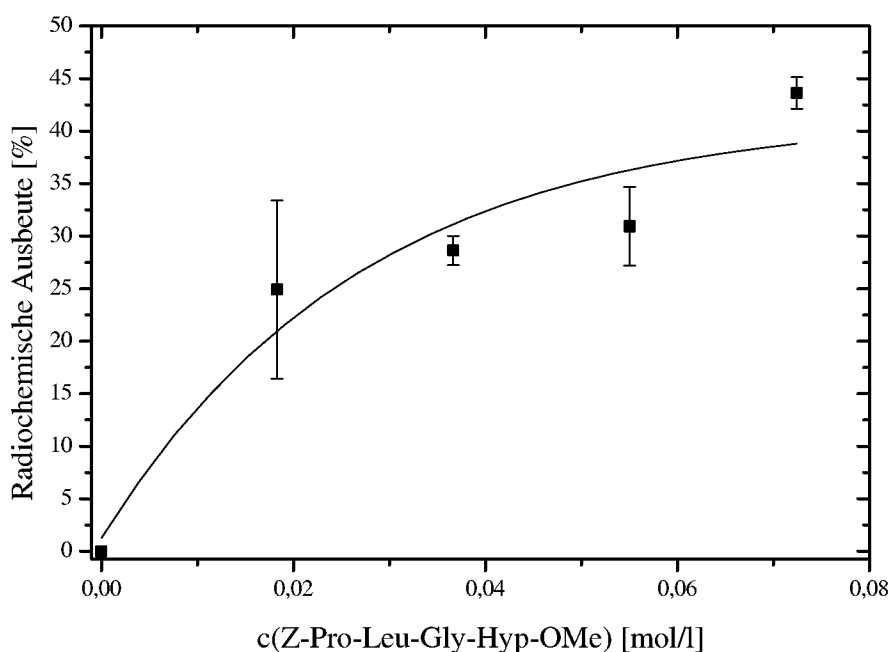


Abb. 3.25: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an Z-Pro-Leu-Gly-cis-4-([^{18}F]Fluor)Pro-OMe von der Konzentration an Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe
Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe / DBU / Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid : 1 / 3 / 1,
3 min, 20°C, 250 μl Toluol

Eine Reduzierung der Eduktkonzentration hat eine Verminderung der radiochemischen Ausbeute zur Folge. So werden bei einer Konzentration von 0,018 mol/l nur noch ca. 25 % an ^{18}F -fluoriertem Peptid erhalten.

Als ein weiterer wichtiger Reaktionsparameter wird die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute vom Verhältnis von Träger zu Edukt untersucht. Hierzu wird - wie oben beschrieben - das Modellpeptid bei einer Konzentration von 0,075 mol/l ^{18}F -fluoriert und die Konzentration des Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorids verändert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.26 und 3.27 graphisch dargestellt.

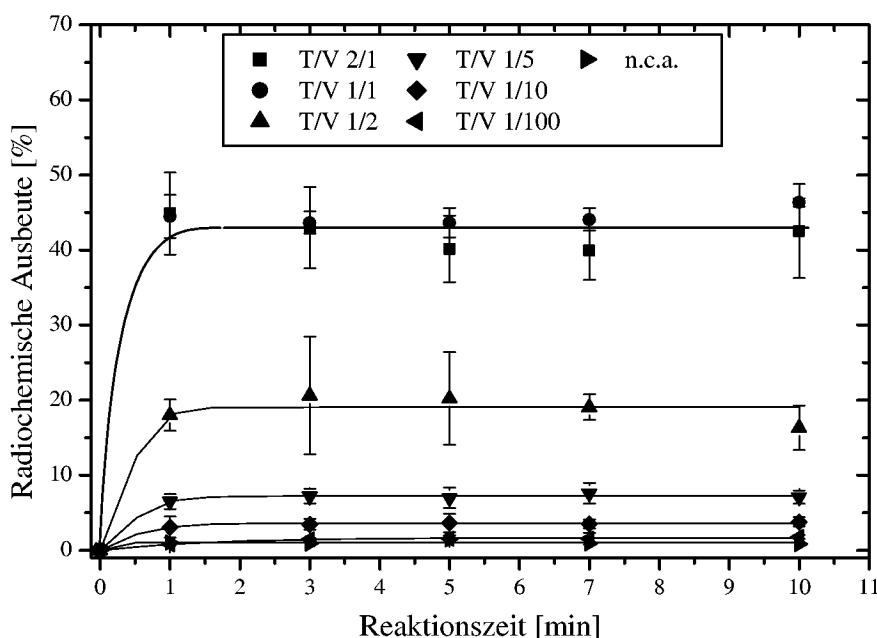


Abb. 3.26: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an Z-Pro-Leu-Gly-cis-4-
 ($[^{18}\text{F}]$ Fluor)Pro-OMe von der Reaktionszeit und dem Verhältnis von Träger zu Z-
 Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe
 $c(\text{Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe}) : 0,075 \text{ mol/l}$, DBU, 20°C , $250 \mu\text{l Toluol}$, T/V :
 $n(\text{Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid}) / n(\text{Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe})$

Unter trägerarmen Bedingungen beträgt die radiochemische Ausbeute lediglich ca. 1 %. Oberhalb eines Stoffmengenverhältnisses von Perfluorbutansulfonsäurefluorid zu Peptid von 0,1 steigt die radiochemische Ausbeute rasch an und erreicht bei einem äquimolaren Verhältnis das Maximum von 40 - 45 %. Eine Verdoppelung des Träger-zu-Peptid-Verhältnisses auf 2 hat keine weitere Erhöhung der radiochemischen Ausbeute zur Folge im Gegensatz zur Reaktion an N-Boc-Hyp-OMe. Der N-Boc-Hyp-OMe wurde mit einer Konzentration von $0,04 \text{ mol/l}$ eingesetzt, während die Konzentration von Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe dagegen mit $0,075 \text{ mol/l}$ annähernd doppelt so hoch ist, so daß es wahrscheinlich ist, daß bei N-Boc-Hyp-OMe die Sättigungskonzentration noch nicht erreicht ist. Möglicherweise ist beim Tetrapeptid keine weitere Steigerung der radiochemischen Ausbeute zu erzielen, da es im Bereich der Sättigungskonzentration umgesetzt wird, und in Bezug auf die radiochemische Ausbeute ein äquimolares Verhältnis von Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid zu Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe ausreichend ist.

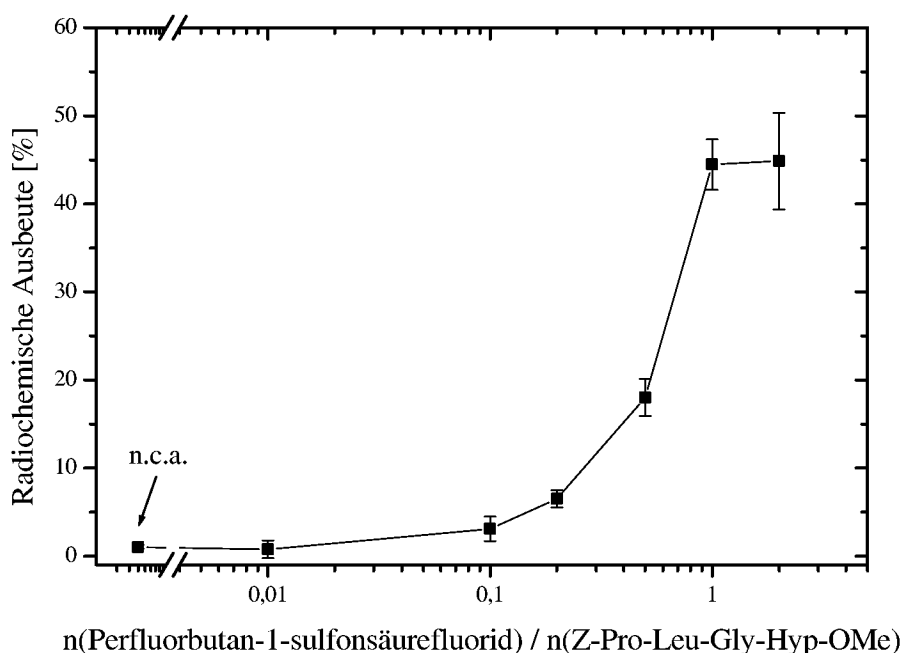


Abb. 3.27: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an Z-Pro-Leu-Gly-cis-4-([^{18}F]Fluor)Pro-OMe vom Verhältnis von n(Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid) / n(Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe)
c(Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe) : 0,075 mol/l, DBU, 1 min, 20°C, 250 μl Toluol

Da die Untersuchung der Trägerabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute ergab, daß ein äquimolarer Trägerzusatz notwendig ist, um eine zufriedenstellende Ausbeute an ^{18}F -fluoriertem Peptid zu erhalten, wird in Hinblick auf einen späteren Einsatz der Methode zur Herstellung von Radiopharmaka die Minimierung der absoluten Stoffmengen und damit des absoluten Trägergehaltes untersucht. Hierzu werden die optimalen Konzentrationen und Stoffmengenverhältnisse beibehalten und das Gesamtvolumen reduziert. Die Reaktion wird sowohl in einem 3 ml Wheaton-Reaktionsgefäß als auch in einem 1 ml Wheaton-Reaktionsgefäß durchgeführt. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 3.2 zusammengefaßt.

Es zeigt sich, daß mit der Reduzierung des Gesamtvolumens des Reaktionsansatzes eine Verringerung der radiochemischen Ausbeute einhergeht, obwohl die Konzentrations- und Stoffmengenverhältnisse der Reaktanden zueinander nicht verändert werden. So resultiert bei einer Halbierung des Gesamtvolumens eine um etwa den Faktor 2 geringere radiochemische Ausbeute von $23,7 \pm 2,0$ %. Eine weitere Halbierung des Volumens führt zu einer weiteren deutlichen Verringerung der radiochemischen Ausbeute auf $15,3 \pm 0,5$ %. Bei einem Reak-

tionsvolumen von 125 μl wird die ^{18}F -Fluorierung sowohl in einem 3 ml-Reaktionsgefäß als auch in einem 1 ml-Reaktionsgefäß durchgeführt. In den beiden eingesetzten Vials wird, wie erwartet, die gleiche radiochemische Ausbeute von ca. 23 % erhalten. So wird für diesen Fall gezeigt, daß die Dimension des Reaktionsgefäßes keinen Einfluß auf die radiochemische Ausbeute hat. Anscheinend wird beim Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes ein Grenzwert erreicht, unter dem sich die Adsorption an den Gefäßwänden stärker bemerkbar macht, und vermutlich nicht nur das ^{18}F Fluorid sondern auch bereits der Synthesevorläufer durch Adsorption der Reaktion entzogen wird.

Tabelle 3.2: Minimierung des Reaktionsansatzes zur Umsetzung von Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid

Toluol [μl]	Radiochemische Ausbeute [%]	
	3 ml Vial (1,2 mm $\varnothing$)	1 ml Vial (0,7 mm $\varnothing$)
250	43,6 $\pm$ 2,0	
125	23,7 $\pm$ 2,0	22,7 $\pm$ 1,3
60	15,3 $\pm$ 0,5	

Reaktionsbedingungen: $c(\text{Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe})$: 0,075 mol/l, $c(\text{DBU})$: 0,225 mol/l,
 $c(\text{Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid})$: 0,075 mol/l, 5 min, 20°C

Da bei der ^{18}F -Fluorierung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid ein äquimolarer Zusatz an kaltem Fluorierungsmittel notwendig ist und der zweite Reaktionsschritt der Fluorierung in der Substitution der Nonaflatgruppe durch Fluorid besteht (vergl. Abb. 3.8), stellt sich die Frage, ob auf die Synthese des Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorids verzichtet werden kann. Daher wird bei einer alternativ durchgeführten ^{18}F -Fluorierung des Modellpeptids Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe nach der azeotropen Trocknung des ^{18}F Fluorids nicht das Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid hergestellt, sondern das Modellpeptid in Gegenwart des Trägers Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid direkt mit dem ^{18}F Fluorid umgesetzt. Hierzu wird nach der azeotropen Trocknung das Peptid, gelöst in Toluol, DBU und Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid bei Raumtemperatur zugegeben. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abb. 3.28 graphisch dargestellt.

Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe wird auch unter diesen Bedingungen ^{18}F -fluoriert. Bereits nach einer Minute wird die maximale radiochemische Ausbeute erreicht, die jedoch mit 7 ± 5 % deutlich geringer ist als bei der ^{18}F -Fluorierung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid,

bei der 40 - 45 % erzielt werden. Wird das [^{18}F]Fluorid direkt in Gegenwart des Perfluorbutansulfonsäurefluorids zur ^{18}F -Fluorierung eingesetzt, entsteht aufgrund des Reaktionsmechanismus im Verhältnis zum gebildeten Nonaflat eine äquimolare Menge an Fluoridionen, die mit dem n.c.a. [^{18}F]Fluorid äquilibrieren. Aus Gründen der Statistik kann nur ein entsprechender Teil des [^{18}F]Fluorids reagieren. Bei der ^{18}F -Fluorierung unter primärer Zugabe von Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid wird dagegen nur soviel Fluorid freigesetzt wie Nonaflat gebildet wird.

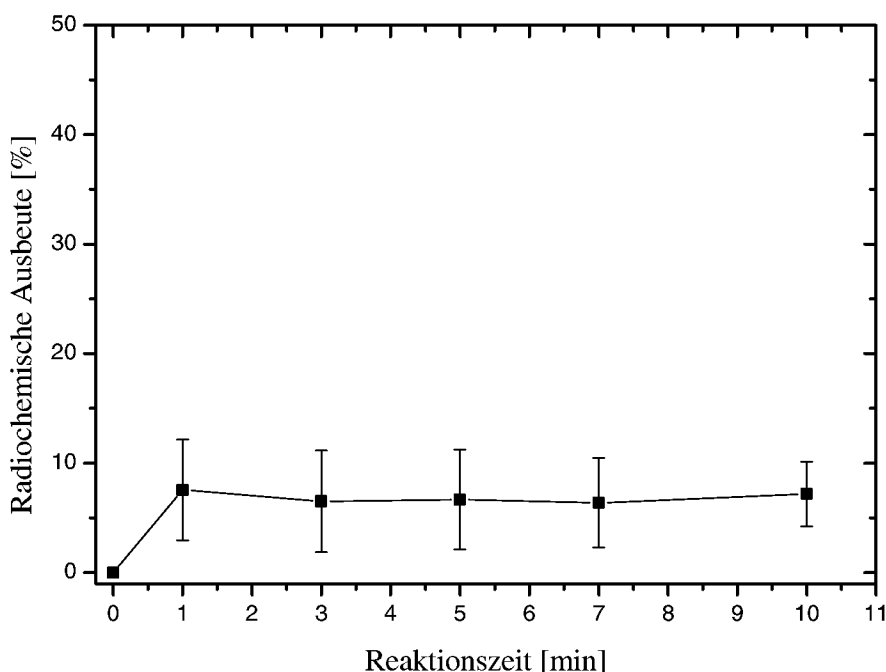


Abb. 3.28: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an Z-Pro-Leu-Gly-cis-4-([^{18}F]Fluor)Pro-OMe von der Reaktionszeit bei Umsatz von Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe in Gegenwart von Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid mit [^{18}F]Fluorid
c(Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe): 0,018 mol/l, *c*([K $\subset$ 2.2.2.] $_2\text{CO}_3$): 0,1 mol/l, DBU, Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid, 20°C, 250 μl Toluol

3.4.4 Radiosynthese des N-Benzyloxycarbonyl-glycyl-leucyl-cis-4-[^{18}F]fluorpropyl-glycyl-leucyl-methylesters

Die Ergebnisse zeigen, daß die Hydroxylfunktion von Hydroxyprolin mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid in guten radiochemischen Ausbeuten durch Fluor-18 substituiert

werden kann, wenn das Hydroxyprolin C-terminal an ein Peptid gebunden ist. Daran schließt sich die Frage an, ob sich auch Peptide, bei denen sich Hydroxyprolin innerhalb der Aminosäurekette befindet, durch Substitution der prolylischen Hydroxylfunktion mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid ^{18}F -markieren lassen. Hierzu wird 4-*trans*-L-Hydroxyprolin in die Mitte einer Aminosäuresequenz eingebaut. Als Modellpeptid wird Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe hergestellt, das außer der Hydroxylfunktion keine weiteren funktionellen Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren besitzt. C- und N-Terminus liegen beide geschützt vor, der C-Terminus als Ester und der N-Terminus als Carbamat.

Im folgenden wird zunächst die Synthese des Modellpeptids und der Standardverbindung Z-Gly-Leu-*cis*-4-(Fluor)Pro-Gly-Leu-OMe beschrieben, anschließend die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute vom Trägergehalt und von der Konzentration an Peptid.

3.4.4.1 Synthese von N-Benzoyloxycarbonyl-glycyl-leucyl-*trans*-4-hydroxyprolyl-glycyl-leucyl-methylester

Das Modellpeptid Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe wird durch eine Aufbausynthese hergestellt, die in Abb. 3.29 dargestellt ist.

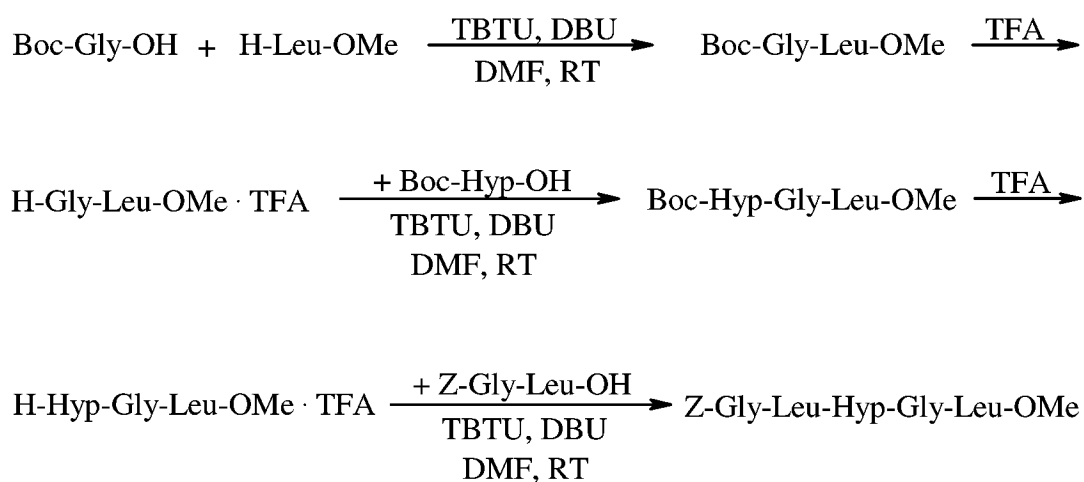


Abb. 3.29: Synthese von Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe

In einem ersten Schritt wird aus den beiden Aminosäuren N-Boc-glycin und Leucin-methylester mittels TBTU in DMF das Dipeptid N-Boc-glycyl-leucin-methylester synthetisiert. Nach Abspalten der Boc-Schutzgruppe wird das Dipeptid mit N-Boc-*trans*-4-Hydroxyprolin zum Tripeptid umgesetzt. Wie erwähnt, kann das Hydroxyprolin ohne Schützen der Hydroxyl-

funktion aufgrund der geringeren Aktivität sekundärer Alkoholfunktionen eingesetzt werden [141]. Das Tripeptid wird dann mit Z-Gly-Leu-OH zum Pentapeptid umgesetzt. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure verläuft quantitativ, und bei den Kopplungsschritten mit TBTU werden Ausbeuten im Bereich von 75 bis 90 % erhalten.

3.4.4.2 Synthese von N-Benzylloxycarbonyl-glycyl-leucyl-*cis*-4-fluorpropyl-glycyl-leucyl-methylester

Die Standardverbindung Z-Gly-Leu-*cis*-4-(Fluor)Pro-Gly-Leu-OMe wird ebenfalls durch Fluorierung von Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid, wie in Abb. 3.30 gezeigt, dargestellt.

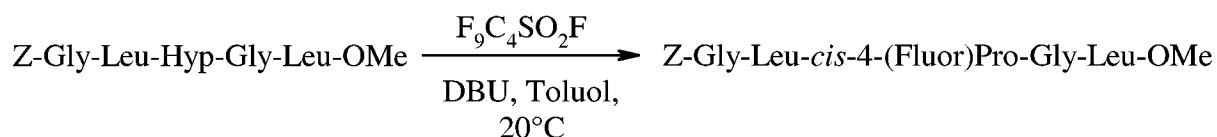


Abb. 3.30: Synthese von Z-Gly-Leu-*cis*-4-(Fluor)Pro-Gly-Leu-OMe

Als Nebenreaktion findet eine Eliminierung statt. Dabei wird anstelle der Fluorverbindung durch Elimination von formal Perfluorbutan-1-sulfonsäure die entsprechende Dehydropyrrolidinverbindung gebildet. Die beiden Produkte konnten bislang chromatographisch nicht voneinander getrennt werden. Mittels der Signalhöhen im Spektrum der Feinmassenbestimmung lässt sich der Anteil des fluorierten Peptids auf ca. 70 % abschätzen und der Anteil des Eliminierungsprodukts auf ca. 30 %.

3.4.4.3 ¹⁸F-Fluorierung von N-Benzylloxycarbonyl-glycyl-leucyl-*trans*-4-hydroxypropyl-glycyl-leucyl-methylester

Bei der ¹⁸F-Fluorierung des Modellpeptids Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[¹⁸F]fluorid wird zunächst die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Konzentration an Peptid untersucht. Hierzu wird die ¹⁸F-Fluorierung wie bereits bei dem Modellpeptid Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe beschrieben durchgeführt. Es wird die Konzentration des Synthesevorläufers variiert, während bei jeder Synthese ein äquimolares Stoffmengenverhältnis des als Träger zugesetzten Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid zu Peptid eingesetzt wird. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.31 und 3.32 graphisch dargestellt.

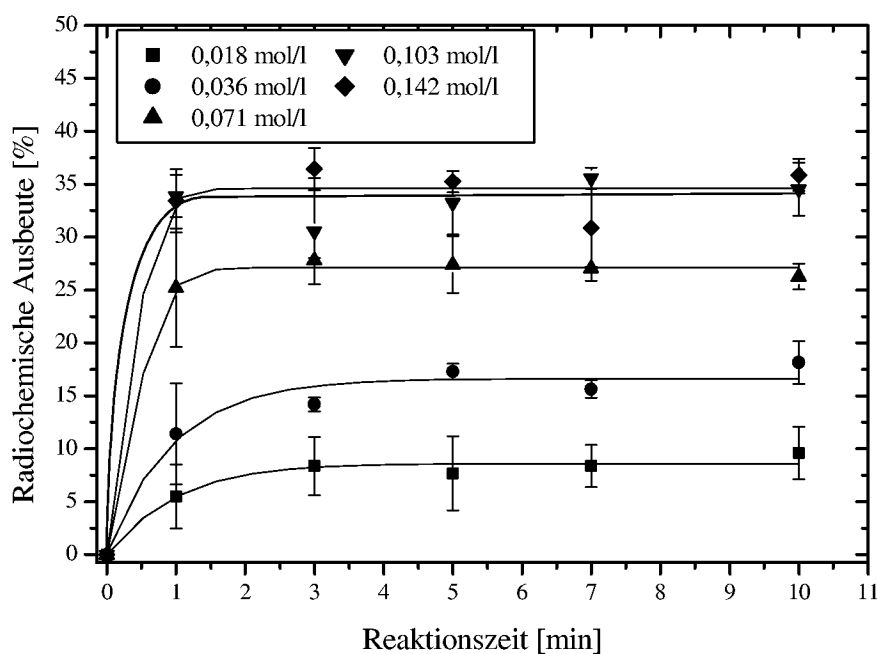


Abb. 3.31: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an Z-Gly-Leu-cis-4-
 ($[^{18}\text{F}]$ Fluor)Pro-Gly-Leu-OMe von der Reaktionszeit und der Konzentration an
 Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe
 250 μl Toluol, Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe / DBU / Perfluorbutan-1-sulfon-
 säurefluorid : 1 / 3 / 1, 20°C

Wie bereits bei N-Boc-Hyp-OMe und Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe beobachtet, zeigen auch die in Abb. 3.31 dargestellten Zeitabhängigkeiten der radiochemischen Ausbeute den für eine Reaktion „pseudo erster Ordnung“ typischen Verlauf einer Sättigungskurve. Auch die Kinetik der Reaktion entspricht den Kinetiken, die bereits bei den beiden anderen Modellverbindungen beobachtet wurden. So wird bei den Peptidkonzentration von 0,018 - 0,071 mol/l die maximale radiochemische Ausbeute nach 3 min, dagegen bei einer Eduktkonzentration von 0,103 mol/l sowie von 0,142 mol/l bereits nach 1 min erreicht.

Auch die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Konzentration des eingesetzten Peptids zeigt den für eine Radiomarkierung typischen Verlauf einer Sättigungskurve. Ab einer Konzentration von 0,1 mol/l wird im Rahmen der Fehlergrenzen keine Veränderung in der radiochemischen Ausbeute von 30 – 35 % beobachtet.

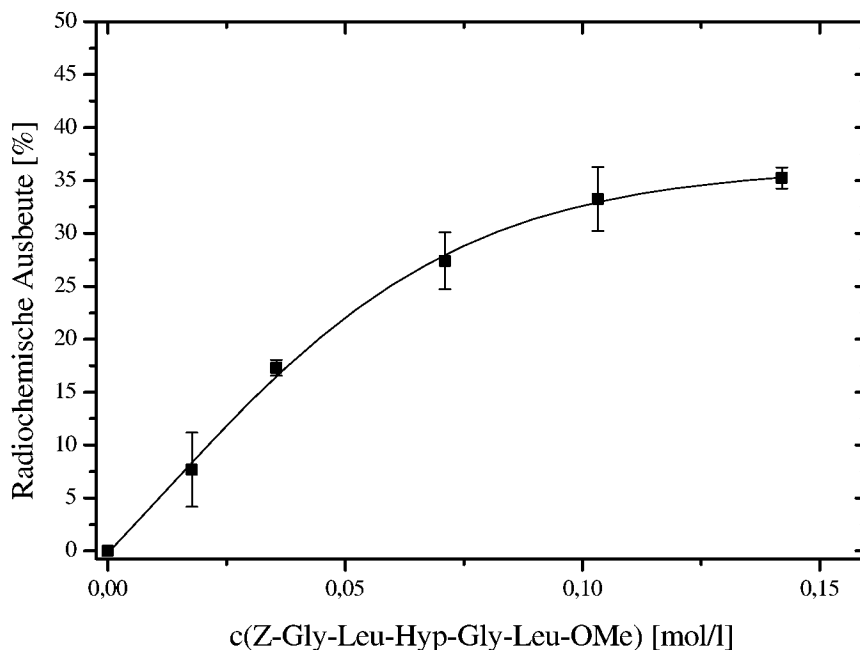


Abb. 3.32: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an Z-Gly-Leu-cis-4-([^{18}F]Fluor)Pro-Gly-Leu-OMe von der Konzentration an Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe
 250 μl Toluol, Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe / DBU / Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid : 1 / 3 / 1, 5 min, 20°C

Die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute vom Stoffmengenverhältnis des als Träger zugesetzten Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorids zum Hydroxylpeptid ist in den Abbildungen 3.33 und 3.34 graphisch dargestellt.

Analog der ^{18}F -Fluorierung mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid von N-Boc-Hyp-OMe und Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe wird im Fall der trägerarmen Synthese nur eine radiochemische Ausbeute von ca. 1 % erhalten, die sich bei einem Verhältnis von Träger zu Peptid von 0,01 bis 0,1 auf ca. 5 % erhöht. Im Bereich des Träger zu Peptid-Verhältnisses von 0,1 bis 1 steigt die radiochemische Ausbeute bis auf ca. 30 % an. Sie lässt sich wie beim N-Boc-Hyp-OMe durch eine Verdoppelung des Träger zu Peptid-Verhältnisses auf zwei weiterhin auf ca. 35 % erhöhen. Dies entspricht der radiochemischen Ausbeute, die bei einem äquimolaren Trägerzusatz im Fall der Sättigungskonzentration an Peptid erhalten wird (vgl. Abb. 3.32 u. 3.33). Die Trägerabhängigkeit der ^{18}F -Fluorierung von Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe wurde bei einer Peptidkonzentration aufgenommen, die unter der Sättigungskonzentration

liegt. Daher konnte die radiochemische Ausbeute durch Zugabe einer doppelt-äquimolaren Menge an Träger gesteigert werden.

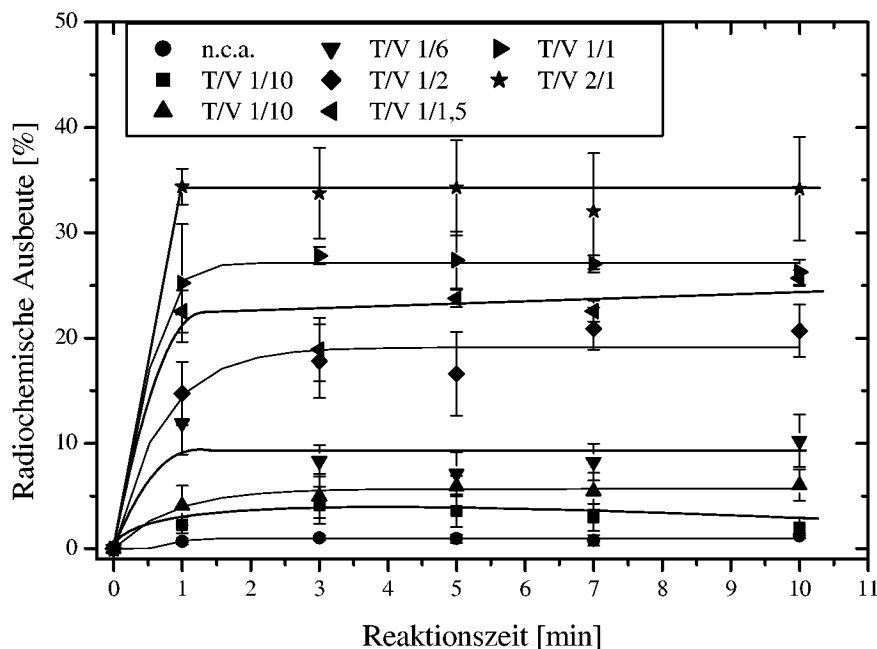


Abb. 3.33: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an Z-Gly-Leu-cis-4-([¹⁸F]Fluor)Pro-Gly-Leu-OMe von der Reaktionszeit und dem Verhältnis von Träger zu Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe
c(Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe): 0,071 mol/l, DBU, 20°C, 250 µl Toluol, T/V:
n(Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid) / *n*(Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe)

Im Rahmen der untersuchten Reaktionsparameter Eduktkonzentration und Trägergehalt beweist sich wiederum, daß eine Peptidkonzentration von 0,1 mol/l günstig und ein äquimolarer Zusatz an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid als Träger für eine gute radiochemische Ausbeute notwendig ist.

In der Reihenfolge Aminosäure (RCA: ca. 90 %), Tetrapeptid (RCA: 40 - 45 %), Pentapeptid (RCA: 30 - 35 %) ist ein Rückgang der radiochemischen Ausbeute zu beobachten, der auf den Einfluß der Peptidkettenlänge zurückzuführen ist. Daher ist anzunehmen, daß bei sehr großen Peptiden bzw. Proteinen die radiochemische Ausbeute sehr gering ausfallen wird. Zudem kann sich in der geringeren radiochemischen Ausbeute beim Pentapeptid im Vergleich zum Tetrapeptid auch der Einfluß der Position der Hydroxypropylgruppe innerhalb der Aminosäu-

resequenz widerspiegeln, da im Tetrapeptid die Hydroxypropylgruppe endständig gebunden ist, während sie sich im Pentapeptid innerhalb der Kette befindet.

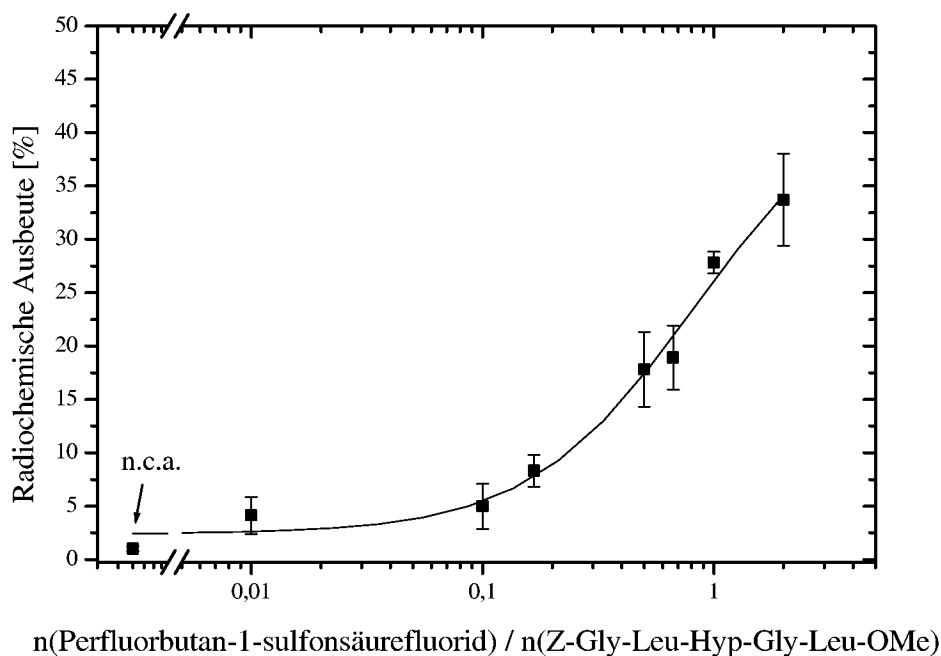


Abb. 3.34: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an Z-Gly-Leu-cis-4-([18 F]Fluor)Pro-Gly-Leu-OMe vom Stoffmengenverhältnis von n(Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid) / n(Z-Gly-Leu-4-Hyp-Gly-Leu-OMe)
c(Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe): 0,071 mol/l, DBU, 5 min, 20°C, 250 μ l Toluol

3.4.5 18 F-Fluorierung von *trans*-4-Hydroxypropyl-leucin am Harz

Eine verfahrenstechnisch elegante Markierungsmethode besteht darin, als Markierungsvorläufer ein an ein Harz kovalent gebundenes Peptid zu verwenden. Die überschüssigen Reagenzien können durch Waschen des Harzes vom Markierungsprodukt abgetrennt werden, während der Markierungsvorläufer und das markierte Peptid am Harz kovalent gebunden bleiben. Nach Abspalten gegebenenfalls vorhandener Schutzgruppen wird das markierte Peptid gemeinsam mit überschüssigem Synthesevorläufer vom Harz abgespalten und mittels semi-präparativer HPLC gereinigt.

Im folgenden wird die 18 F-Fluorierung der Hydroxylfunktion mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[18 F]fluorid in N-Boc-Hyp-Leu-Wang, die Synthese des Synthesevorläufers und der Standardverbindung *cis*-4-Fluorpropyl-leucin beschrieben.

3.4.5.1 Synthese des N-Boc-Hyp-Leu-Wang-Harzes und der Standardverbindung (2S,4S)-4-Fluorpropyl-leucin

Als Modellpeptid dient N-Boc-Hyp-Leu-OH, das über den C-Terminus des Leucins kovalent an Wang-Harz gebunden ist. Die Polymer-Matrix des Wang-Harzes ist ein Copolymerisat aus Styrol und 1 % Divinylbenzol. Als Linker-Gruppe dient beim Wang-Harz der p-Benzyloxybenzyl-alkohol, über dessen Hydroxylfunktion die Aminosäure durch Veresterung gebunden wird (s. Abb. 3.35).

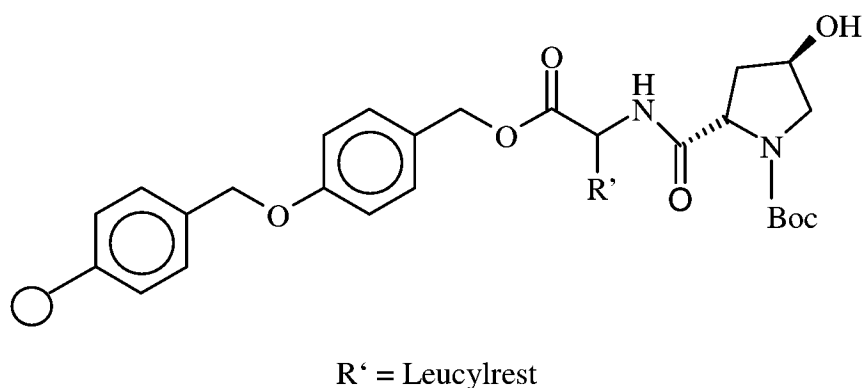


Abb. 3.35: N-Boc-Hyp-Leu-Wang-Harz

Der Aufbau eines Peptids erfolgt in der Festphasen-Peptidsynthese routinemäßig über die Fmoc-Strategie, bei der zum Kettenaufbau Fmoc-geschützte Aminosäuren eingesetzt werden. Daher sollte zunächst Fmoc-Hyp-Leu-Wang-Harz als Synthesevorläufer und Modellverbindung dienen und zur Verkürzung der Syntheszeit und der Reaktion um einen Schritt auf die Abspaltung der Fmoc-Gruppe nach der ^{18}F -Fluorierung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorid und vor der Abspaltung vom Harz verzichtet werden. Bei der Herstellung der benötigten Standardverbindung Fmoc-4-(4S)-fluorpropyl-leucin zeigte sich jedoch, daß bei der Fluorierung von Fmoc-4-(4R)-hydroxypropyl-leucin-*tert.*-butylester mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid in Gegenwart der Base DBU die Fmoc-Gruppe abgespalten wird. Somit ist Fmoc-Hyp-Leu-Wang als Synthesevorläufer für die ^{18}F -Fluorierung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure ^{18}F fluorid nicht geeignet. Daher wird anstelle der Fmoc-Gruppe die Boc-Schutzgruppe eingesetzt, die unter sauren Bedingungen mit Trifluoressigsäure entfernt wird und unter den Fluorierungsbedingungen stabil ist. Weiterhin bietet sie den Vorteil, daß die Abspaltung der Boc-Gruppe und des Peptides vom Wang-Harz mit Trifluoressigsäure in einem Reaktionsschritt durchgeführt werden kann. Auch bei der Synthese des Standards bietet sie

den Vorteil, daß sie im N-Boc-4-(4S)-fluorpropyl-leucin-*tert.*-butylester gleichzeitig mit der Ester-Funktion abgespalten wird. Die Synthese der Standardverbindung besteht in der Umsetzung von (2S,4R)-N-Boc-4-hydroxyprolin mit Leucin-*tert.*-butylester zu N-Boc-4-(4R)-hydroxypropyl-leucin-*tert.*-butylester mit einer Ausbeute von 82 %. An die Fluorierung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid mit einer Ausbeute von 65 % schließt sich die Abspaltung der beiden Schutzgruppen an, die quantitativ verläuft (s. Abb. 3.36).

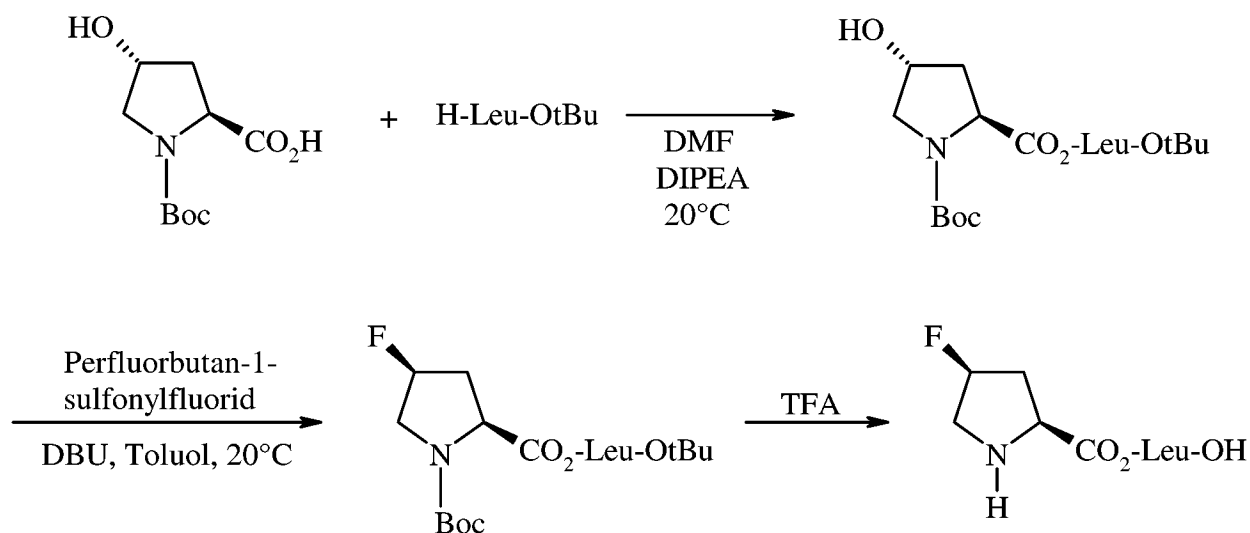


Abb. 3.36: Synthese von (2S,4S)-4-Fluorpropyl-leucin

Zur Darstellung des Markierungsvorläufers wird das Fmoc-Leu-Wang-Harz nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin in DMF mit N-Boc-Hyp-OH, TBTU und HOBt in Gegenwart von DIPEA in DMF umgesetzt (s. Abb. 3.37). Der Kaiser-Test zeigt, daß keine freien Aminofunktionen mehr vorliegen und die Acylierung quantitativ verlaufen ist [142].

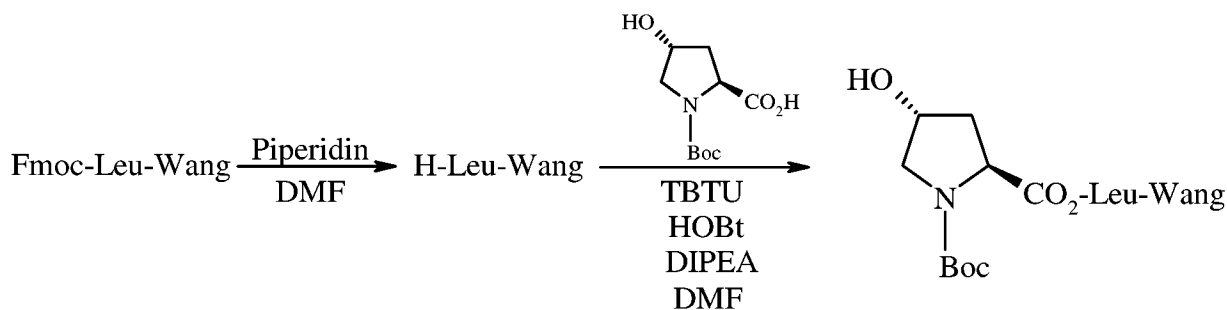


Abb. 3.37: Synthese von N-Boc-Hyp-Leu-Wang-Harz

3.4.5.2 Durchführung der ^{18}F -Fluorierung von N-Boc-Hyp-Leu am Wang-Harz

Zur ^{18}F -Fluorierung der (2S,4R)-4-Hydroxypropyl-Einheit mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid wird das ^{18}F -Fluorierungsreagenz in der Schmelze, wie in Kap. 3.4.1.3 beschrieben, hergestellt und auf dem Harz bei ca. -60°C kondensiert. Es werden $31 \pm 3\%$ des eingesetzten [^{18}F]Fluorids in Form des ^{18}F -Fluorierungsagenses auf dem Harz adsorbiert. Im Vergleich hierzu fällt bei der Adsorption des Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorids auf der Polystyrol-Phase (LiChrolut[®] EN) in der Probenschleife, die auf -70°C gekühlt wird, die Ausbeute mit $67 \pm 8\%$ doppelt so hoch aus (s. Kap. 3.4.1.3). Da in beiden Fällen das ^{18}F -Fluorierungsreagenz nach derselben Methode hergestellt wird, liegt die Ursache für die unterschiedlichen Ausbeuten in den verschiedenen Methoden zur Adsorption der ^{18}F -Fluorverbindung. Das N-Boc-Hyp-Leu-Wang-Harz, das auf ca. -60°C gekühlt wird, befindet sich in einer Glaskapillarsäule in einem Kupferblock, der in flüssigen Stickstoff eintaucht. Während das Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid für eine Dauer von 20 min evaporiert und kondensiert wird, erhöht sich die Temperatur von ca. -65°C auf ca. -55°C .

Nach der Kondensation des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes auf dem Harz und Erwärmen auf Raumtemperatur wird eine Lösung von Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid als Träger und DBU in Toluol auf das Harz gegeben. Das Volumen der toluolischen Lösung ist so bemessen, daß es das Zwischenkornvolumen des Harzes ausfüllt. Die ^{18}F -Markierungen der Modellverbindungen N-Boc-Hyp-OMe, Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe und Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe zeigten, daß ein äquimolarer Zusatz an Träger notwendig ist, um eine gute radiochemische Ausbeute zu erhalten (s. Kap. 3.4.2 - 4). Die zugegebene Stoffmenge an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid ist äquimolar in Relation zur Stoffmenge des Harz-gebundenem 4-Hydroxyprolins. Nach dem Abspalten der Boc-Schutzgruppe und des Peptids vom Harz und Entfernen der Trifluoressigsäure unter vermindertem Druck beträgt die Ausbeute an ^{18}F -fluoriertem Peptid lediglich $4,0 \pm 0,9\%$ ($n = 3$) bezogen auf die auf dem Harz kondensierte Menge an Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid und bezogen auf die eingesetzte Menge an [^{18}F]Fluorid lediglich ca. 1 %. Die Anzahl der durchgeführten Synthesen beträgt $n = 3$. Die Peptidlösung wird in Acetonitril aufgenommen, 4-(4S)-Fluorpropyl-leucin als Vergleichsstandard hinzugegeben und mittels Radio-HPLC analysiert. Wie in Abb. 3.38 zu sehen, entsteht nur ein Aktivprodukt, dessen Retentionszeit mit der der Standardverbindung 4-(4S)-Fluorpropyl-leucin übereinstimmt.

Es konnte gezeigt werden, daß die gewünschte Reaktion abläuft, wenngleich die radiochemische Ausbeute sehr gering ist.

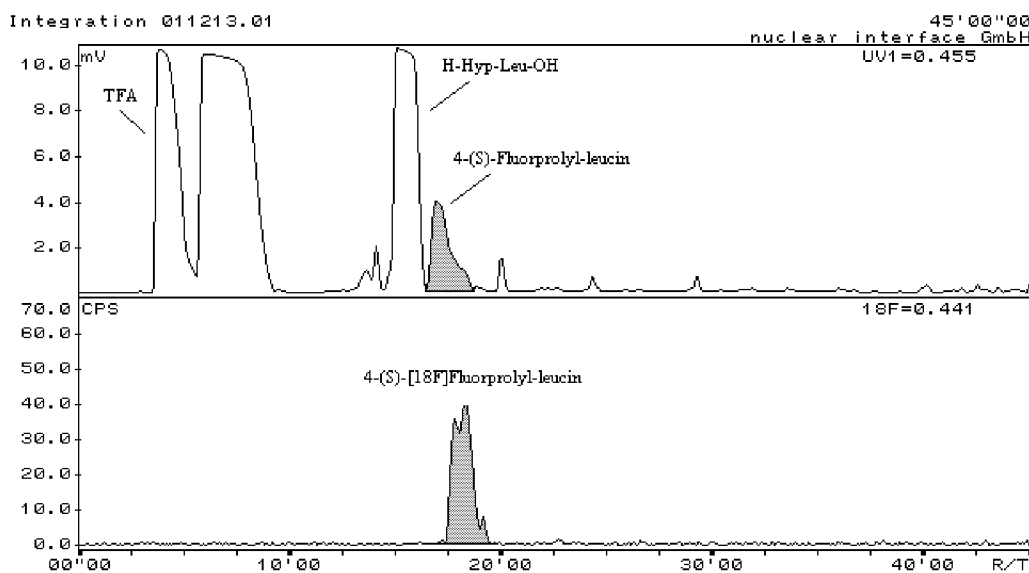


Abb. 3.38: HPLC-Analyse des an polymerer Phase (Wang-Harz) ^{18}F -fluoriertem Dipeptids *H-Hyp-Leu-OH*

HPLC-Bedingungen: Phenomenex Aqua 5μ C18 125A, 250 x 4,6 mm; 0 - 5 min: Acetonitril/Wasser (1/99) (v/v) (0,1 % TFA), 5 $\rightarrow$ 45 min: 99 % Wasser $\rightarrow$ 20 % Wasser

3.5 Vergleichende Diskussion der durchgeführten ^{18}F -Fluorierungen

Die Markierung über eine ^{18}F -fluorprothetische Gruppe stellt eine schonende Alternative zur oft nicht durchführbaren direkten nukleophilen ^{18}F -Fluorierung dar. 4- ^{18}F -Fluorprolin-methylester läßt sich mittels Aminopolyether gestützter Radiosynthese in guten radiochemischen Ausbeuten von 30 - 40 % herstellen und in guten Ausbeuten von 70 - 80 % innerhalb 1 min mit dem C-Terminus z. B. des Modellpeptids Z-Pro-Leu-Gly-OH kondensieren. Obwohl die ^{18}F -Fluorierung von (2S,4R)-N-Boc-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester mit einer radiochemischen Ausbeute von 87 ± 1 % verläuft, fällt die Ausbeute an 4- ^{18}F -Fluorprolin-methylester, der in einer Folgereaktion durch Abspaltung der Boc-Schutzgruppe hergestellt wird, aufgrund der aufwendigen Isolierung des (2S,4R)-N-Boc-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylesters mittels zweier Kartuschen und einer chromatographischen Trennung mit 30 - 40 % gering aus. Das Modellpeptid Z-Pro-Leu-Gly-4- ^{18}F -Fluorprolin-methylester wird, bezogen auf das eingesetzte ^{18}F -Fluorid, mit einer Gesamtausbeute von 20 - 30 % erhalten. Daher eignet sich 4- ^{18}F -Fluorprolin-methylester gut als prothetische Gruppe

und empfiehlt sich insbesondere zur Herstellung ^{18}F -fluorierter Peptide oder Proteine, die als C-terminale Aminosäure Prolin besitzen, so daß die ursprüngliche Aminosäuresequenz erhalten bleibt und außer der Einführung des Fluor-18 keine Veränderung im Molekül vorgenommen wird. Ungünstig ist jedoch, daß hierbei nicht ausschließlich die *cis*- oder *trans*-Verbindung entsteht sondern ein Gemisch aus beiden Isomeren.

Ein 4-(p-Toluolsulfonyloxy)prolin enthaltendes Peptid als Markierungsvorläufer für eine mögliche direkte nukleophile ^{18}F -Fluorierung läßt sich aufgrund der guten Überführbarkeit von 4-Hydroxyprolin in 4-(p-Toluolsulfonyloxy)prolin relativ gut herstellen. Somit sind O-tosylierte, geschützte Peptide zugänglich. Es zeigte sich jedoch am Beispiel des Z-Pro-Leu-Gly-4-(4R)-(p-Toluolsulfonyloxy)Pro-OMe, daß es sowohl unter den stärker basischen Bedingungen der ^{18}F -Fluorierung mit $[\text{K}2.2.2.]_2\text{CO}_3$ als auch unter den weniger basischen Reaktionsbedingungen mit $[\text{K}2.2.2.]_2\text{C}_2\text{O}_4$ zu einer Zerstörung des Peptids kommt; vermutlich zur Fragmentierung des Peptids durch Spaltung der Peptidbindung. Daher erscheint eine direkte ^{18}F -Fluorierung nicht möglich, die nicht weiter untersucht wurde.

Eine Möglichkeit zur direkten Markierung von Peptiden mit Fluor-18 durch Substitution einer prolylischen Hydroxylfunktion bietet das ^{18}F -Fluorierungsreagenz Perfluorbutan-1-sulfonsäure $^{[18\text{F}]}$ fluorid, das sich bei einer Reaktionszeit von 15 min in guter Ausbeute von ca. 80 % in Toluol gelöst herstellen läßt. Vorteil dieser Methode ist, daß die Fluorierung unter Walden-Umkehr am C-Atom verläuft, das die Hydroxygruppe trägt, und somit nur ein Isomer als Produkt erhalten wird. Die beiden Modellpeptide Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe und Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe lassen sich mit diesem Reagenz innerhalb von 1 - 3 min in guten radiochemischen Ausbeuten von 40 - 45 % bzw. 30 - 35 % ^{18}F -fluorieren, wenn eine zur eingesetzten Peptidstoffmenge äquimolare Menge an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid als Träger zugegeben wird. Der äquimolare Trägerzusatz ist aufgrund des Reaktionsmechanismus dieser Fluorierungsmethode unerläßlich. Bei einer Reduzierung des Trägergehaltes wird ein deutlicher Abfall der radiochemischen Ausbeute beobachtet. Daher kann diese ^{18}F -Fluorierungsmethode im Gegensatz zur trägerarmen Markierung mittels 4- $^{[18\text{F}]}$ Fluorprolin-methylester als prosthetische Gruppe nur zur Herstellung von Radiopharmaka eingesetzt werden, bei deren Anwendung sich der Trägergehalt nicht ungünstig auswirkt. Auch die Verminderung der Trägermenge durch eine Reduzierung der absoluten Volumina und Stoffmengen bei unveränderten Konzentrationsverhältnissen führt überraschenderweise zu deutlich geringeren radiochemischen Ausbeuten. Da das Volumen an Toluol, in dem das ^{18}F -Fluorierungsreagenz

absorbiert wird, mindestens doppelt so groß ist wie das Volumen, in dem anschließend die ^{18}F -Fluorierung durchgeführt wird, fällt die Gesamtausbeute an ^{18}F -fluoriertem Modellpeptid bezogen auf die Startaktivität an $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ mit $\leq 18\%$ beim Z-Pro-Leu-Gly-4-(4S)-($[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$)Pro-OMe und $\leq 12\%$ beim Z-Gly-Leu-4-(4S)-($[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$)Pro-Gly-Leu-OMe aufgrund der Verdünnung deutlich geringer aus als bei den Synthesen mittels 4- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorprolin-methylester}$ als prosthetische Gruppe.

Bei gleicher Peptidkonzentration wird für das Tetrapeptid eine bessere radiochemische Ausbeute erhalten als bei einem Pentapeptid. Vermutlich ist die C-terminale Position des Hydroxyprolins für die ^{18}F -Fluorierung günstiger als eine Position innerhalb der Aminosäurekette. Beim (2S,4R)-N-Boc-4-hydroxyprolin-methylester wird mit $> 90\%$ eine mehr als doppelt so hohe radiochemische Ausbeute erzielt wie bei den Modellpeptiden und beim Tetrapeptid eine größere Ausbeute als beim Pentapeptid. Somit scheint auch die Länge der Aminosäurekette die radiochemische Ausbeute zu beeinflussen. Die ^{18}F -Fluorierung mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$, die aus der Synthese des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes und der ^{18}F -Fluorierung des Peptids besteht, ist zeitlich weniger aufwendig als die ^{18}F -Fluorierung mittels 4- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorprolin-methylester}$, die aus der ^{18}F -Fluorierung des Synthesevorläufers für die prosthetische Gruppe, Isolierung des Primäraktivprodukts, Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und der Kondensationsreaktion an das Peptid besteht. Insgesamt betrachtet haben beide Methoden sowohl Vor- als auch Nachteile. Letzlich wird die Notwendigkeit bzw. Nichtnotwendigkeit eines n.c.a. ^{18}F -Fluorpeptids entscheiden, welche Methode die geeignetere ist bzw. eingesetzt werden muß.

Alternativ zur Darstellung und Absorption in Toluol kann das Perfluorbutan-1-sulfonsäure $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$ nach der Synthese in Abwesenheit eines Lösungsmittels auf einem Harz kondensiert werden, an dem das zu markierende Peptid kovalent gebunden ist. Im Vergleich zur oben erwähnten Synthese des Perfluorbutan-1-sulfonsäure $[^{18}\text{F}]\text{fluorids}$ in Toluol wird bei dieser Methode jedoch eine deutlich geringere Gesamtausbeute von nur $31,4 \pm 2,8\%$ an ^{18}F -Fluorierungsagens erhalten. Die Ursache für die schlechtere Ausbeute liegt vermutlich an der noch zu verbessernden Effizienz der Kondensation (s. Kap. 3.4.5.2). Bei der ^{18}F -Fluorierung des an einem Harz kovalent gebundenen Modellpeptids mit dem zuvor auf dem Harz kondensierten Perfluorbutan-1-sulfonsäure $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$ unter äquimolarer Zugabe von Träger wird eine radiochemische Ausbeute von lediglich $4,0 \pm 0,9\%$ erzielt. Sie fällt deutlich geringer aus als die radiochemischen Ausbeuten, die bei den oben erwähnten ^{18}F -Fluorierungen der anderen Modellpeptide erhalten werden. Daher ist sie den anderen Methoden nicht vorzuziehen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Bezugsnachweis

Die für die durchgeführten Synthesen und Analysen verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt. Soweit erforderlich wurden Chemikalien und Lösungsmittel nach Standardmethoden gereinigt und getrocknet.

Tabelle 4.1: Zur Synthese verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Verbindung	Gefahrstoff	Hersteller	Qualität
Aceton	F	Merck	zur Analyse
Acetonitril	T, F	Merck	für die Chromatographie
Acetonitril	T, F	Merck	zur Analyse
Anilin	T	Fluka	puriss., $\geq 99,5 \%$
Bariumhydroxid Monohydrat	Xn	Fluka	purum, $\geq 98 \%$
o-(Benzotriazo-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborat	Xi	Fluka	purum, $\geq 98 \%$
N-Boc-glycin	-	Bachem	$> 99 \%$
N-Boc- <i>trans</i> -4-hydroxyprolin	-	Bachem	$> 99 \%$
N-Boc- <i>trans</i> -4-hydroxyprolin-methylester	-	Bachem	$> 99 \%$
N-Boc- <i>cis</i> -4-hydroxyprolin-methylester	-	Bachem	$> 99 \%$
Chloroform	Xn	Merck	zur Analyse
DBU	C	Fluka	puriss., $\geq 99 \%$
Dichlormethan	Xn	Fluka	puriss., $\geq 99,5 \%$
Diethylether	F	Merck	zur Analyse
N-Ethyl-diisopropylamin	F, C	Fluka	purum, $\geq 98 \%$
N,N-Dimethylacetamid	Xi, Xn	Fluka	puriss., $\geq 99,5 \%$
4-Dimethylaminopyridin	T	Fluka	purum, $\geq 98 \%$
N,N-Dimethylformamid	T	Fluka	puriss., $\geq 99,5 \%$
Dimethylsulfoxid	Xi	Fluka	puriss., $\geq 99,5 \%$
Di- <i>tert</i> -butyl-dicarbonat	Xi, F	Fluka	purum, $\geq 98 \%$

Fortsetzung Tabelle 4.1: Zur Synthese verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Verbindung	Gefahrstoff	Hersteller	Qualität
Ethanol, absolut	F	Fluka	puriss., $\geq 99,5\%$
Ethylacetat	F	Merck	zur Analyse
Fmoc-Leu-Wang-Harz	-	Nova-biochem	Beladung: 0,88 mmol/g 100 – 200 mesh
n-Hexan	Xn, F	Merck	reinst
N-Hydroxybenzotriazol	Xn	Novabio.	$\geq 98\%$
<i>trans</i> -4-Hydroxyprolin-methylester•HCl	-	Bachem	$> 99\%$
Kaliumcarbonat	Xn	Merck	zur Analyse
Kieselgel 60	-	Merck	Korngröße 60 - 230 μm
Kryptofix [®] 2.2.2.	Xn	Merck	zur Synthese, $\geq 99\%$
Leucin-methylester	-	Bachem	$> 99\%$
Leucin- <i>tert</i> -butylester	-	Bachem	$> 99\%$
Methanol, absolut	F, T	Fluka	puriss., $> 99\%$
Natriumchlorid	-	Fluka	$\geq 99,5\%$
Natriumcyanid	T+	Merck	zur Analyse
Natriumhydrogencarbonat	-	Merck	zur Analyse
Natriumsulfat	-	Merck	zur Analyse, $\geq 99\%$
Oleum	C	Fluka	puriss. p.a., 27–30 % SO_3
Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid	C	Aldrich	96 %
Perfluorbutan-1-sulfonsäure Kaliumsalz	Xi	Aldrich	98 %
Phosphorpentoxid	C	Fluka	puriss., $\geq 98\%$
Piperidin in DMF, 20 %	F, T	Fluka	zur Peptidsynthese
Pyridin	F, Xn	Merck	zur Analyse
Salzsäure	C	Merck	zur Synthese, $\geq 99\%$
Schwefelsäure	C	Merck	zur Analyse, 95-97 %
Toluol	F, Xn	Fluka	puriss., $\geq 99,5\%$
Toluol-4-sulfochlorid	Xi	Fluka	purum, $\geq 98\%$
Triethylamin	F, Xi	Merck	zur Synthese, $\geq 99\%$
Trifluoressigsäure	C	Fluka	$> 99,5\%$
Z-Gly-Leu-OH	-	Bachem	$> 99\%$
Z-Pro-Leu-Gly-OH	-	Bachem	$> 99\%$

4.2 Charakterisierung der dargestellten Verbindungen

Die Charakterisierung der dargestellten Ausgangs- und Referenzverbindungen erfolgte mittels ^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -NMR-Spektroskopie, IR-Spektroskopie und Massenspektrometrie. Außerdem wurden die Schmelzpunkte der einzelnen Verbindungen und gegebenenfalls der Brechungsindex ermittelt. Für diese Untersuchungen standen folgende Geräte zur Verfügung:

NMR-Spektroskopie

Die ^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -NMR-Spektren wurden mit einem Gerät der Firma Bruker (Avance 200) aufgenommen. Als interner Standard wurde das jeweilige Lösungsmittel gewählt. Die chemische Verschiebung ist in δ (ppm) angegeben, wobei die zum Standard tieffeldverschobenen Signale ein positives Vorzeichen erhalten. Die ^1H -Spektren wurden bei 200,1 MHz gemessen, die ^{13}C -Spektren unter ^1H -Breitbandentkopplung (CPD-Verfahren) bei 50,3 MHz und die ^{19}F -Spektren bei 188,3 MHz. Die Zuordnung der Signale erfolgte über deren chemische Verschiebung, Signalmultiplizität, Integralgröße und mittels 45° -DEPT, 90° -DEPT und 135° -DEPT-Experimenten.

Infrarot-Spektroskopie

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem Gerät der Firma Shimadzu (Typ IR-460). Die Verbindungen wurden als KBr-Preßlinge gemessen. Die Absorptionsbanden ν sind als Frequenzen in cm^{-1} angegeben.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden mit einem Massenspektrometer der Firma Thermoquest (Typ Automass Multi III) aufgenommen. Die Proben wurden entweder mittels Elektronensprayionisation (ESI) in einem flüssigkeitschromatographisch gekoppelten Aqua-Modul (Cone-Spannung: 38 V) oder durch Elektronenstoßionisation (EI) bei einer Elektronenenergie von 70 eV ionisiert und analysiert.

Hochauflösende Massenspektrometrie

Die Aufnahme der hochauflösenden Massenspektren erfolgte in der Abteilung für Massenspektrometrie am Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln an einem Finnigan MAT 900 ST mittels Elektrospray-MS bei einer Auflösung ≥ 5000 oder an einem Finnigan H-SQ 30 Massenspektrometer mittels EI-MS (Auflösung ≥ 4000). Die zu analysierende Probe wurde in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und die hochauflösenden MS-Experimente mit geeigne-

ten Ionen der Referenzsubstanzen Polypropylenglycol (PPG) und Polyethylenimin (PEI) bei ESI-MS und Perfluorkerosin (PFK) bei EI-MS im Peachmatching-Verfahren ausgeführt. Der Fehler aller gemessener Spektren beträgt $\leq 0,005$ g/mol.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Gerät der Firma Mettler (FP-61) bestimmt. Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Brechungsindexbestimmung

Die Brechungsindices der als Öl erhaltenen Produkte wurden mit einem Gerät der Firma Zeiss bestimmt und sind bei den entsprechenden Synthesevorschriften angegeben.

Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Reinigung der Syntheseprodukte erfolgte an Kieselgel 60 (Merck) mit der Korngröße 60 - 230 μm . Die Zusammensetzung der verwendeten Eluentengemische ist bei den entsprechenden Synthesevorschriften angegeben.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf mit Kieselgel und UV-Fluoreszenzindikator beschichteten Aluminiumfolien (F₂₅₄ S, Merck) durchgeführt. Die Detektion der Verbindungen erfolgte entweder über Fluoreszenzlöschung oder durch Anfärben mit Ninhydrin oder Jod. Die Eluenten und R_F-Werte sind bei den entsprechenden Synthesevorschriften angegeben.

Aktivitätsbestimmungen

Die Radioaktivität wurde in einem Bohrloch-Gammacounter mit automatischem Probenwechsler der Firma Packard (Typ Minaxi γ , Auto-Gamma 5000 Series) gemessen.

Der Reaktionsverlauf und die Reinheit der synthetisierten Produkte wurden mittels HPLC- und Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Auf die im Rahmen der ¹⁸F-Fluorierungen zu analytischen und präparativen Zwecken eingesetzten Radiochromatographieverfahren wird in Abschnitt 4.5 eingegangen.

4.3 Synthese inaktiver Standardverbindungen und Markierungsvorläufer

(2S,4R)-N-Boc-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester [56]

2,56 g (10,45 mmol) N-Boc-*trans*-4-hydroxyprolin-methylester werden in 5 ml Pyridin gelöst, und unter Eiskühlung werden portionsweise 2,16 g (11,30 mmol) Toluol-4-sulfochlorid hinzugefügt. Nach 16 h Rühren bei 0°C wird der Reaktionsansatz auf ca. 30 g Eis gegeben und die ölige organische Phase mit kaltem Hexan gewaschen. Nach dem Auskristallisieren aus heißem n-Hexan wird das erhaltene Produkt chromatographisch gereinigt: Kieselgel (43 x 3,5 cm), Chloroform/Methanol (9:1), R_f : 0,88.

Ausbeute: 2,55 g (61 %); Lit.: 56%

Fp.: 74,2 °C; Lit.: 73,8°C

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (CDCl_3): 1,39 (s, 9H, CH_3 , Boc); 2,25 (dm, 2H, CH_2); 2,44 (s, 3H, CH_3 , Ts); 3,59 (m, 2H, CH_2); 3,70 (s, 3H, O- CH_3); 4,36 (m, 1H, CH); 5,03 (m, 1H, CH); 7,34 (d, 2 arom. H, 2 CH, Ts); 7,77 (d, 2 arom. H, 2 CH, Ts)

IR-Spektrum (KBr): 2980, 1752, 1702, 1598, 1406, 1364, 912

Masse: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 400,0 m/z

(2S,4S)-N-Boc-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester

wird unter Verwendung von N-Boc-*cis*-4-hydroxyprolin-methylester dargestellt wie bei (2S,4R)-N-Boc-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester beschrieben.

Ausbeute: 2,67 g (64 %); Lit.: 71 %

Fp.: 92,6 °C; Lit.: 90,4 °C

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (CDCl_3): 1,41 (s, 9H, CH_3 , Boc); 2,47 (m, 2 + 3 H, CH_2 + CH_3 -C); 3,65 (m, 2 + 3 H, CH_2 + O- CH_3); 4,40 (dm, 1H, CH); 5,05 (m, 1H, CH); 7,34 (d, 2 arom. H, 2 CH, Ts); 7,75 (d, 2 arom. H, 2 CH, Ts)

Z-Pro-Leu-Gly-4-(4R)-(TsO)Pro-OMe

860 mg (2,15 mmol) (2S,4R)-N-Boc-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester werden in 1 ml Dichlormethan gelöst. 500 μl Trifluoressigsäure werden dazugegeben. Nach 18 h Rühren bei RT werden Lösungsmittel und überschüssige Trifluoressigsäure unter vermindertem Druck entfernt. Eine Lösung von Z-Pro-Leu-Gly-OH (900 mg, 2,15 mmol) und TBTU (700 mg, 2,18 mmol) in 1,5 ml abs. DMF und 1 ml DIPEA werden zugegeben und 24 h bei RT gerührt. Der Reaktionsansatz wird auf Eiswasser gegeben. Der ölige Rückstand wird von der wäßrigen Phase abgetrennt, in Ethylacetat aufgenommen, mit ges. NaCl-Lösung, 5%-iger NaHCO_3 -Lösung und Was-

ser gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Ethylacetats unter vermindertem Druck wird das erhaltene Öl chromatographisch gereinigt (Kieselgel (43 x 3 cm), Chloroform/Methanol (9/1), R_f : 0,35). Es wird ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 901 mg (60%)

Fp.: 75,7°C

^1H -NMR-Spektrum (DMSO-d_6): 0,83 (m, 6H, 2 CH_3 , Leu); 1,49 (m, 3H, CH + CH_2 , Leu); 1,83 (m, 4H, 2 CH_2 , TsPro + Pro); 2,13 (m, 2H, CH_2 , Pro); 2,45 (m, 3H, CH_3 , Ts-Gruppe); 3,39 (m, 4H, 2 CH_2 , TsPro + Pro); 3,62 (s, 3H, O- CH_3); 3,75 (m, 2H, CH_2 , Gly); 3,90 (m, 1H, CH, Pro); 4,35 (m, 2H, CH_2 , Z-Gruppe); 5,10 (m, 3H, 3 CH, Leu + TsPro); 7,35 (m, 5H, 5 CH, Z-Gruppe); 7,52 (d, 2H, 2 CH, Ts-Gruppe); 7,88 (d, 2H, 2 CH, Ts-Gruppe); 7,99 (m, 1H, NH); 8,14 (m, 1H, NH)

^{13}C -NMR-Spektrum (DMSO-d_6): 22,00 (CH_3 , Ts-Gruppe); 22,29 + 23,92 (CH_3 , Leu); 24,94 (CH, Leu); 32,09 (CH_2 , Pro); 35,39 (CH_2 , TsPro + Pro); 41,79 (CH_2 , Leu); 48,01 (CH_2 , Gly); 51,66 (CH, Leu); 52,11 (CH_2 , TsPro + Pro); 52,98 (O- CH_3); 57,80 (CH, TsPro); 59,86 (CH, Pro); 66,56 (CH_2 , Z-Gruppe); 81,24 (CH, Pro); 128,35 (CH, arom.); 128,49 (CH, arom.); 129,06 (CH, arom.); 129,25 (CH, arom.); 131,24 (CH, Ts-Gruppe); 133,66 (C, Ts-Gruppe); 137,88 (C, Z-Gruppe); 146,22 (C, Ts-Gruppe); 154,66 (C=O); 168,05 (C=O); 172,28 (C=O); 172,85 (C=O); 173,08 (C=O)

IR-Spektrum (KBr): 3480, 3310, 3060, 2950, 2870, 1743, 1651, 1595, 1523, 1430, 1360, 1264, 1172, 1119, 1093, 1064

Masse: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 701,2 m/z

HR-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: Ber.: 701,2855 g/mol

Gem.: 701,285 g/mol

(2S,4S)-N-Boc-4-fluorprolin-methylester

Methode A:

Zu einer unter Argon im Trockeneisbad gekühlten Lösung von DAST (5 g, 31 mmol, 4,1 ml) in 30 ml abs. Dichlormethan wird eine Lösung von N-Boc-Hyp-OMe (5 g, 20,4 mmol) in 30 ml abs. Dichlormethan gegeben. Nach 8 h Rühren im Trockeneisbad unter Argonatmosphäre und Stehen im Tiefkühlfach über Nacht werden 60 ml Wasser dazugegeben und die organische Phase abgetrennt. Nach chromatographischer Reinigung (Kieselgel (38 x 4 cm): Diethylether/n-Hexan (4/1), R_f : 0,74) erhält man ein gelb-grünes Öl.

Ausbeute: 16,60 %

Methode B:

In 20 ml abs. Toluol werden 4,9 g (20 mmol) N-Boc-*trans*-4-hydroxyprolin-methylester gelöst und in Gegenwart von DBU (9 ml, 60 mmol) mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid (5,5 ml, 7,5 g, 30 mmol) bei Raumtemperatur über Nacht umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das erhaltene Öl in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die wäßrige Phase wird mit Dichlormethan gegengewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird der ölige Rückstand chromatographisch gereinigt (Kieselgel (37 x 4 cm): Diethylether/n-Hexan (4/1), R_f: 0,74). Als Produkt wird ein grünliches Öl erhalten.

Ausbeute: 2,651 g (53,65 %)

Brechungsindex: $n_D^{20} = 1,4473$

¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃): 1,49 (d, 9H, CH₃, Boc); 2,54 (m, 2H, CH₂); 3,73 (m + s, 2 + 3 H, CH₂ + O-CH₃); 4,11 (dm, 1H, CH); 5,23 (dm, 1H, CH)

¹³C-NMR-Spektrum (CDCl₃): 27,22 (CH₃, Boc); 29,66 (CH₃-O); 50,85 + 50,93 (CH₂); 53,77 + 50,85 (CH₂); 56,32 (CH); 59,23 (CH); 80,28 (O-C(CH₃)₃, Boc); 153,81 + 154,18 (C=O); 172,05 (C=O)

¹⁹F-NMR-Spektrum (CDCl₃): -173,45 (m, 1F)

Aufgrund der beiden Konformere, die durch die Boc-Gruppe resultieren, liegen einige ¹³C-Signale doppelt vor und das ¹H-Signal der Boc-Gruppe als Dublett.

IR-Spektrum (Film): 3465, 2970, 1769, 1734, 1702, 1474, 1453, 1401, 1367, 1276, 1199, 1176, 1119, 1071

Masse: [M+H]⁺: 247,7 m/z

Z-Pro-Leu-Gly-4-(4S)-(Fluor)Pro-OMe

Zu 434 mg (1,72 mmol) (2S,4S)-N-Boc-4-fluorprolinmethylester werden 800 µl Trifluoressigsäure gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen der Trifluoressigsäure unter vermindertem Druck wird eine Lösung von 724 mg (1,73 mmol) Z-Pro-Leu-Gly-OH, 554 mg (1,73 mmol) TBTU und 1,1 ml DIPEA in 3 ml DMF zugegeben und bei RT 12 h gerührt. Der Reaktionsansatz wird auf 20 - 30 ml Eiswasser gegeben und mehrmals mit 25 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene ölige Rückstand wird chromatographisch gereinigt (Multoprep RP-18, 25 - 40 µm, 230 x 15 mm, Acetonitril/ Wasser (40/60) (v/v), Flußrate: 10 ml/min, k' = 5,82).

Ausbeute: 585 mg (61,74 %)

Fp.: 105°C

¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆): 0,83 (m, 6H, 2 CH₃, Leu); 1,50 (m, 3H, CH + CH₂, Leu); 1,84 (m, 4H, 2 CH₂, FPro + Pro); 2,35 (m, 2H, CH₂, Pro); 3,39 (m, 6H, 3 CH₂, Gly + FPro + Pro); 3,63 (s, 3H, O-CH₃); 3,75 (m, 1H, CH, Pro); 3,94 (m, 2H, 2 CH, FPro); 4,33 (m, 2H, CH₂, Z-Gruppe); 5,12 (m, 1H, CH, Leu); 7,35 (m, 5 arom. H, Z-Gruppe); 7,99 (m, 1H, NH); 8,15 (t, 1H, NH)

¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-d₆): 22,20 + 23,86 (CH₃, Leu); 24,92 (CH, Leu); 32,09 (CH₂, Pro); 36,35 (CH₂, FPro + Pro); 41,74 (CH₂, Leu); 48,01 (CH₂, Gly); 51,67 (CH, Leu); 52,83 (CH₃-O); 53,34 (CH₂, FPro + Pro); 57,41 (CH, FPro); 57,87 (CH, FPro); 59,85 (CH, Pro); 66,56 (CH₂, Z-Gruppe); 127,66 (CH, Z-Gruppe); 128,31 (CH, Z-Gruppe); 129,06 (CH, Z-Gruppe); 137,88 (C, Z-Gruppe); 154,65 (C=O); 168,05 (C=O); 171,92 (C=O); 172,97 (C=O); 173,04 (C=O)

¹⁹F-NMR-Spektrum (DMSO-d₆): -172,35 (m, 1F)

IR-Spektrum (KBr): 3463, 3410, 3065, 2955, 1742, 1645, 1530, 1431, 1354, 1271, 1206, 1117, 1088, 1054, 1029

Masse: [M+H]⁺: 549,1 m/z

HR-MS [M+Na]⁺: Ber.: 571,2544 g/mol

Gem.: 571,253 g/mol

Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe

Zu einer Lösung von Z-Pro-Leu-Gly-OH (300 mg, 0,72 mmol) in 1,2 ml DMF werden DIPEA (368 µl, 2,14 mmol), TBTU (230 mg, 0,72 mmol) und H-Hyp-OMe • HCl (130 mg, 0,72 mmol) gegeben und über Nacht gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird der ölige Rückstand chromatographisch gereinigt (Multoprep RP-18, 25 - 40 µm, (230 x 15 mm), Acetonitril/Wasser (35/65) (v/v), Flußrate: 15 ml/min, k' = 3,05).

Ausbeute: 283 mg (72,4 %)

Fp.: 81,1°C

¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆): 0,83 (m, 6H, 2 CH₃, Leu); 1,48 (m, 3H, CH + CH₂, Leu); 1,87 (m, 4H, 2 CH₂, Hyp + Pro); 2,12 (m, 2H, CH₂, Pro); 3,45 (m, 6H, 3 CH₂, Gly + Hyp + Pro); 3,63 (s, 3H, O-CH₃); 3,96 (m, 2H, 2 CH, Hyp); 4,34 (m, 3H, CH + CH₂, Pro + Z-Gruppe); 5,09 (m, 1H, CH, Leu); 5,26 (m, 1H, OH); 7,32 (m, 5 arom. H, Z-Gruppe); 7,96 (m, 1H, NH); 8,14 (t, 1H, NH)

¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-d₆): 22,14 + 23,89 (CH₃, Leu); 24,94 (CH, Leu); 32,08 (CH₂, Pro); 37,97 (CH₂, Hyp + Pro); 41,85 (CH₂, Leu); 48,01 (CH₂, Gly); 51,72 (CH, Leu); 52,73 (CH₃-O); 54,56 (CH₂, Hyp + Pro); 58,36 (CH, Hyp); 59,89 (CH, Pro); 66,57 (CH₂, Z-Gruppe); 69,74 (CH,

Hyp); 127,67 (CH, Z-Gruppe); 128,33 (CH, Z-Gruppe); 129,06 (CH, Z-Gruppe); 137,88 (C, Z-Gruppe); 154,66 (C=O); 168,01 (C=O); 172,85 (C=O); 173,03 (C=O); 173,22 (C=O)

IR-Spektrum (KBr): 3310, 3065, 2950, 1746, 1643, 1535, 1432, 1359, 1271, 1232, 1202, 1177, 1117, 1084, 1026

Masse: $[M+H]^+$: 547,3 m/z

HR-MS $[M+Na]^+$: Ber.: 569,2587 g/mol

Gem.: 569,259 g/mol

N-Boc-Gly-Leu-OMe

In 2,5 ml abs. DMF werden 175 mg (1 mmol) N-Boc-Gly-OH gelöst. 322 mg (1 mmol) TBTU, 515 μ l (3 mmol) DIPEA und 182 mg (1 mmol) H-Leu-OMe werden dazugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird der ölige Rückstand chromatographisch gereinigt (Multoprep RP-18, 25 - 40 μ m, (230 x 15 mm), Acetonitril/Wasser (40/60) (v/v), Flußrate: 15 ml/min, $k' = 2,81$). Als Produkt wird ein farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 243 mg (80,46 %)

Brechungsindex: $n_D^{20} = 1,4570$

^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3): 0,74 (d, 6H, CH_3 , Leu); 1,28 (s, 9H, CH_3 , Boc); 1,46 (m, 1 + 2 H, CH + CH_2 , Leu); 3,55 (s, 3H, O- CH_3); 3,58 (m, 2H, CH_2 , Gly); 4,43 (m, 1H, N-CH-CO, Leu); 5,79 (breit, NH, Gly); 7,13 (breit, d, NH, Leu)

^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3): 21,90 + 23,02 (CH_3 , Leu); 24,94 (CH, Leu); 28,46 (CH_3 , Boc); 41,30 (CH_2 , Leu); 44,25 (CH_2 , Gly); 50,86 (N-CH, Leu); 52,35 (O- CH_3); 79,90 (O-C(CH_3)₃, Boc); 156,46 (HN-C=O, Gly); 170,15 (C=O); 173,58 (C=O)

IR-Spektrum (Film): 3315, 3065, 2955, 1744, 1716, 1672, 1523, 1523, 1468, 1437, 1389, 1366, 1271, 1247, 1204, 1167, 1049, 1024

Masse: $[M+H]^+$: 303 m/z

N-Boc-Hyp-Gly-Leu-OMe

308 mg (1,02 mmol) Boc-Gly-Leu-OMe werden in 500 μ l Trifluoressigsäure gelöst und 4 h bei RT gerührt. Nach Entfernen der Trifluoressigsäure unter vermindertem Druck wird eine Lösung von 327 mg (1,02 mmol) TBTU, 236 mg (1,02 mmol) N-Boc-Hyp-OMe und 550 μ l N-Ethyl-diisopropylamin in 2 ml DMF zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der erhaltene Rückstand chromatographisch gereinigt (Multo-

prep RP-18, 25 - 40 μm , (230 x 15 mm), Acetonitril/Wasser (25/75) (v/v), Flußrate: 15 ml/min, $k' = 7,56$).

Ausbeute: 320 mg (75,58 %)

Fp.: 166,7°C

^1H -NMR-Spektrum (DMSO- d_6): 0,88 (d, 6H, CH_3 , Leu); 1,33 (d, 9H, CH_3 , Boc); 1,55 (m, 1 + 2 H, CH + CH_2 , Leu); 1,88 (dm, 2H, CH_2 , Hyp); 3,33 (m, 2H, CH_2 , Hyp); 3,63 (s, 3H, O- CH_3); 3,70 (m, 2H, CH_2 , Gly); 4,26 (m, 2H, CH_2 , Hyp); 5,02 (m, 1H, N-CH-CO, Leu); 7,91/8,26 (d, HN, Leu); 8,11/8,40 (t, HN, Gly)

^{13}C -Spektrum (DMSO- d_6): 22,20/22,49 + 23,37/23,56 (CH_3 , Gly); 25,01 (CH, Leu); 28,79 + 29,01 (CH_3 , Boc); 39,31 (CH_2 , Hyp); 40,27 + 40,81 (CH_2 , Leu); 42,28 + 42,641 (CH_2 , Gly); 51,05 (N-CH, Leu); 52,69 (O- CH_3); 55,57 + 56,05 (CH_2 , Hyp); 59,38 + 59,58 (CH, Hyp); 68,68 + 69,25 (CH, Hyp); 79,39 + 79,74 (O-C(CH_3) $_3$, Boc); 154,36 + 154,89 (N-C=O, Gly); 169,63 + 169,78 (C=O); 173,09 + 173,51 (C=O); 173,57 + 173,77 (C=O)

Aufgrund der beiden Konformere, die durch die Boc-Gruppe resultieren, liegen einige ^{13}C - und ^1H -Signale doppelt vor.

IR-Spektrum (KBr): 3405, 3260, 3075, 2950, 1731, 1680, 1645, 1554, 1534, 1419, 1375, 1278, 1231, 1198, 1172, 1136, 1082, 1033

Masse: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 416,1 m/z

Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe

In 1 ml Trifluoressigsäure werden 245 mg (0,59 mmol) N-Boc-Hyp-Gly-Leu-OMe gelöst und bei RT 4 h gerührt. Nach Entfernen der Trifluoressigsäure unter vermindertem Druck wird der Rückstand in 1,5 ml DMF aufgenommen. Es werden 189 mg (0,59 mmol) TBTU, 300 μl N-Ethyldiisopropylamin und 191 mg (0,59 mmol) Z-Gly-Leu-OH zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das erhaltene Öl chromatographisch gereinigt (Multoprep RP-18, 25 - 40 μm , (230 x 15 mm), Acetonitril/Wasser (35/65) (v/v), Flußrate: 15 ml/min, $k' = 6,07$).

Ausbeute: 336 mg (91,96 %)

Fp.: 74,4°C

^1H -NMR-Spektrum (DMSO- d_6): 0,88 (m, 12H, 6 CH_3 , Leu); 1,51 (dm, 6H, 2 CH + 2 CH_3 , Leu); 1,96 (m, 2H, CH_2 , Hyp); 3,65 (m, 9H, 2 CH_2 Gly + CH_2 Hyp + O- CH_3); 4,35 (m, 3H, 2 CH Leu + CH Hyp); 4,58 (m, 1H, CH, Hyp); 5,04 (s, 2H, Z-Gruppe); 5,17 (m, 1H, OH); 7,37 (s, 5 arom. H, Z-Gruppe); 7,47 (t, 1H, NH, Gly); 7,98 (2d, 2H, 2 NH, Leu); 8,37 (t, 1H, NH, Gly)

^{13}C -Spektrum (DMSO-d_6): 22,35 + 23,58 (CH_3 , Leu); 24,79 + 25,00 (CH , Leu); 38,40 (CH_2 , Hyp); 40,66 (CH_2 , Leu); 41,17 (CH_2 , Leu); 42,59 (CH_2 , Gly); 44,04 (CH_2 , Gly); 49,38 + 51,04 (CH , Leu); 52,73 ($\text{CH}_3\text{-O}$); 55,90 (CH_2 , Hyp); 59,60 (CH , Hyp); 66,32 (CH_2 , Z-Gruppe); 69,63 (CH , Hyp); 128,58 (CH , Z-Gruppe); 128,67 (CH , Z-Gruppe); 129,23 (CH , Z-Gruppe); 137,89 (C , Z-Gruppe); 157,34 (C=O); 169,68 (C=O); 169,75 (C=O); 171,46 (C=O); 172,59 (C=O); 173,65 (C=O)

IR-Spektrum (KBr): 3310, 3065, 2955, 1721, 1644, 1529, 1448, 1383, 1334, 1240, 1152, 1081, 1047

Masse: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 620,3 m/z

HR-MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$: Ber.: 642,312 g/mol
 Gem.: 642,312 g/mol

Z-Gly-Leu-4-(4S)-(Fluor)Pro-Gly-Leu-OMe

Zu einer Lösung von 229 mg (0,37 mmol) Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe und 165 μl DBU in 2,5 ml Toluol werden portionsweise 100 μl (168 mg, 0,55 mmol) Perfluorbutan-1-sulfonsäure-fluorid bei RT zugegeben. Nach 6 h Rühren bei RT wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand chromatographisch gereinigt (Multoprep RP-18, 25 - 40 μm , (230 x 15 mm); Acetonitril/Wasser (40/60) (v/v), Flußrate: 15 ml/min, $k' = 11,21$). Es wird ein Gemisch erhalten, das nach der Relation der Signale in der hochauflösenden Masse zu ca. 70 % aus Z-Gly-Leu-*cis*-4-(Fluor)Pro-Gly-Leu-OMe und zu ca. 30 % aus einem Eliminierungsprodukt (durch Eliminierung von H_2O in Hyp) besteht, die bislang nicht voneinander getrennt werden konnten.

Ausbeute des Gemisches: 195 mg

Fp. des Gemisches: 65,6°C

^1H -NMR-Spektrum des Gemisches (DMSO-d_6): 0,89 (m, 12H, 4 CH_3 , Leu); 1,55 (m, 8H, 2 CH + 2 CH_2); 2,30 (m, 2H, CH_2 , Hyp); 3,63 (m, 10H, 2 CH_2 + CH_2 + O-CH_3 , Gly + Hyp); 4,45 (m, 3H, CH, Hyp + Leu); 5,03 (m, 2H, CH_2 , Z-Gruppe); 7,50 (m, 5H, 5 CH, Z-Gruppe); 8,17 (m, 1H, NH); 8,22 (m, 2H, 2 NH); 8,46 (m, 1H, NH)

^{13}C -Spektrum des Gemisches (DMSO-d_6): 22,31 + 23,59 (CH_3 , Leu); 24,80 (CH , Leu); 50,96 (CH); 49,40 (CH); 52,73 (O-CH_3); 59,54 (CH , Hyp); 66,27 (CH_2 , Hyp); 128,55 + 128,64 + 129,20 (CH , Z-Gruppe); 137,92 (C quat. , Z-Gruppe); 157,33 (C=O); 169,67 (C=O); 169,89 (C=O); 171,50 (C=O); 172,05 (C=O); 173,56 (C=O)

^{19}F -Spektrum des Gemisches (DMSO-d_6): - 172, 30

IR-Spektrum des Gemisches (KBr): 3410, 3307, 3040, 2948, 2865, 1716, 1645, 1525, 1437, 1239, 1153, 1047

Masse: $[M+H]^+$: 622,3 m/z (Nebenprodukt: 602,1 m/z)

HR-MS $[M+Na]^+$: Ber.: 644,307 g/mol

Gem.: 644,307 g/mol, Nebenprodukt: 624,37 g/mol

N-Boc-Hyp-Leu-Wang-Harz

500 mg Fmoc-Leu-Wang-Harz (0,44 mmol Fmoc-Leu) läßt man in 6 ml DMF 30 min quellen. Die Durchmischung der Suspension erfolgt mittels eines Argonstroms. Die Fmoc-Schutzgruppe wird mit einer 20 %-igen Piperidin-Lösung in DMF abgespalten. Nach 30 min wird das Harz dreimal mit 5 ml DMF und einmal mit 5 ml abs. Methanol gespült. Der anschließend durchgeführte Kaisertest (s. u.) fällt positiv aus. Zur Durchführung der Acylierung wird zu dem Harz eine Lösung von N-Boc-Hyp-OMe (308 mg, 1,26 mmol), TBTU (425 mg, 1,32 mmol), HOBt (178 mg, 1,32 mmol) und 680 µl DIPEA in 5 ml DMF gegeben. Nach 120 min wird das Harz dreimal mit 5 ml DMF und einmal mit 5 ml abs. Methanol gespült. Der anschließend durchgeführte Kaisertest fällt negativ aus. Nach dem letzten Spülschritt wird das Harz 4 h im Vakuum getrocknet.

Zur Analyse, ob sich das gewünschte Dipeptid H-Hyp-Leu-OH gebildet hat, wird eine Probe des Harzes genommen und das Peptid mit einer Lösung aus Trifluoressigsäure, Anisol und Wasser (20/1/1) abgespalten. Nach Entfernen der Trifluoressigsäure unter vermindertem Druck wird der Rückstand in Essigsäure aufgenommen und das Peptid mit Diethylether gefällt. H-Hyp-Leu-OH wird in Form eines weißen Feststoffes erhalten.

^1H -NMR-Spektrum (deut. Essigsäure): 0,99 (m, 6H, 2 CH₃, Leu); 1,77 (m, 3H, CH + CH₂, Leu + Hyp); 2,23 (m, 4H, 2 CH₂, Leu + Hyp); 2,72 (m, 1H, CH, Leu); 3,68 (m, 2H, 2 CH, Hyp); 4,62 (m, 1H, NH); 4,79 (m, 1H, OH); 5,02 (m, 1H, 1 NH); 5,68 (breit, CO₂H)

^{13}C -Spektrum (deut. Essigsäure): 20,89 + 22,48 (CH₃, Leu); 24,86 (CH, Leu); 38,67 (CH₂, Hyp); 40,09 (CH₂, Leu); 51,77 (CH, Leu); 54,45 (CH₂, Hyp); 59,29 (CH, Hyp); 70,95 (CH, Hyp); 159,84 (C=O, Hyp); 177,65 (C=O, Leu)

Kaisertest auf freie Aminofunktionen [142]

Zur Durchführung des Kaisertests werden folgende drei Lösungen angesetzt: Lösung 1: 1 g Ninhydrin in 10 ml Ethanol, Lösung 2: 80 g Phenol in 20 ml Ethanol und Lösung 3: 2 ml einer 0,001 M NaCN-Lösung in 100 ml Pyridin. Nach dem Spülen des Harzes mit DMF und Methanol wird eine kleine Probe des Harzes mit jeweils drei Tropfen der drei Lösungen versetzt und für

10 min auf 100°C erwärmt. Liegen freie Aminofunktionen vor, so tritt eine intensive Violettfärbung auf.

N-Boc-4-(4R)-hydroxypropyl-leucin-*tert*-butylester

Zu einer Lösung von 151 mg (0,65 mmol) N-Boc-*trans*-4-hydroxyprolin in 1,5 ml DMF werden 210 mg (0,70 mmol) TBTU, 340 µl DIPEA und 145 mg (0,65 mmol) Leucin-*tert*-butylester bei RT gegeben und 12 h gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck, wird der ölige Rückstand chromatographisch gereinigt (Multoprep RP-18, (230 x 15 mm), Acetonitril/Wasser (45/55) (v/v), Flußrate: 15 ml/min, $k' = 4,59$).

Ausbeute: 212 mg (81,86 %)

Fp.: 56°C

¹H-NMR-Spektrum (DMSO-*d*₆): 0,88 (m, 6H, 2 CH₃, Leu); 1,33 (d, 18H, 6 CH₃, Boc + OtBu); 1,51 (dm, 2H, CH₂, Hyp); 1,84 (m, 1H, CH, Leu); 3,33 (m, 4H, 2 CH₂, Hyp + Leu); 3,47 (dm, 2H, 2 CH, Hyp); 5,02 (m, 1H, CH, Leu); 8,05 (d, 1H, NH)

¹³C-Spektrum (DMSO-*d*₆): 22,09 + 23,72 (CH₃, Leu); 25,00 (CH, Leu); 28,47 + 28,98 (CH₃, Boc + OtBu); 39,25 (CH₂, Hyp); 40,62 (CH₂, Leu); 51,90 (NH-CH, Leu); 55,50 (CH₂, Hyp); 59,10 (CH, Hyp); 68,53 (CH, Hyp); 79,24 + 81,14 (O-C(CH₃)₃, Boc + OtBu); 154,34 (Boc-C=O, Hyp); 172,54 (O=C-NH, Hyp); 173,43 (OtBu-C=O, Leu)

IR-Spektrum (KBr): 3430, 2960, 1732, 1670, 1539, 1409, 1366, 1249, 1157, 1085

Masse: [M+H]⁺: 401,6 m/z

N-Boc-4-(4S)-fluorpropyl-leucin-*tert*-butylester

Zu einer Lösung von 132 mg (0,33 mmol) N-Boc-Hyp-Leu-OtBu in 1,5 ml Toluol werden bei RT 168 µl DBU gegeben und 100 µl (168,2 mg, 0,56 mmol) Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid zuge tropft. Nach 6 h wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der ölige Rückstand chromatographisch gereinigt: Kieselgel (2 x 40 cm), Ethylacetat, R_f: 0,84.

Ausbeute: 86 mg (64,91 %)

Fp.: 94,5°C

¹H-NMR-Spektrum (DMSO-*d*₆): 0,87 (t, 6H, 2 CH₃, Leu); 1,38 (d, 18H, 6 CH₃, Boc + tBu); 1,56 (m, 3H, CH + CH₂, Leu); 2,53 (m, 2H, CH₂, FPro); 3,64 (m, 2H, CH₂, FPro); 4,22 (m, 2H, 2 CH, FPro); 5,09 (m, 1H, CH, Leu); 7,93 (m, 1H, NH)

¹³C-Spektrum (DMSO-*d*₆): 22,43 + 23,78 (CH₃, Leu); 24,86 (CH, Leu); 28,64 + 29,01 (CH₃, Boc + OtBu); 37,92 (CH₂, Hyp); 40,85 (CH₂, Leu); 51,58 (NH-CH, Leu); 54,25 (CH₂, FPro); 59,17 (CH, FPro); 69,32 (CH, FPro); 79,72 + 81,23 (O-C(CH₃)₃, Boc + OtBu); 154,20 (Boc-C=O, FPro); 172,89 (O=C-NH, FPro); 172,51 (OtBu-C=O, Leu)

^{19}F -Spektrum (DMSO- d_6): - 172,06

IR-Spektrum: 3425, 3310, 2960, 1722, 1695, 1666, 1551, 1400, 1364, 1247, 1153, 1121, 1072

Masse: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 403,6 m/z

Bariumperfluorbutan-1-sulfonat [128]

Zu Perfluorbutan-1-sulfonylfluorid (18 ml, 30 g, 99 mmol) in Wasser (150 ml) wird bei 0°C Bariumhydroxid Monohydrat (38 g, 201 mmol) gegeben. Nach 48 h Rühren bei RT wird vom Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die vereinigten Feststoffe werden mit Aceton gewaschen und das Aceton im Vakuum entfernt. Der erhaltene Feststoff wird 24 h bei 140°C im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 27 g (74 %); Lit.: 91 %

Fp.: > 300°C

^{13}C -NMR-Spektrum (Aceton- d_6): 114,25; 144,88

^{19}F -NMR-Spektrum (Aceton- d_6): -127,22 (m, $\underline{\text{CF}_2}$ - CF_3); -122,56 (m, $\underline{\text{CF}_2}$ - CF_2 - SO_3); -115,90 (tq, CF_2 - SO_3); -82,39 (tt, CF_3)

Masse: 31 SH, 48 SO, 64 SO_2 , 69 F_3C , 81 SO_3H , 100 $\text{F}_2\text{C}-\text{CF}_2$, 119 F_5C_2 , 169 F_7C_3 , 219 F_9C_4

Perfluorbutan-1-sulfonsäure [128]

5 g (6,78 mmol) Bariumperfluorbutan-1-sulfonat werden in 4 ml konz. Schwefelsäure und 1 ml Oleum gelöst bzw. 5 g (14,79 mmol) Kaliumperfluorbutan-1-sulfonat in 8 ml konz. Schwefelsäure und 2 ml Oleum. Anschließend wird das Produkt unter vermindertem Druck abdestilliert.

Ausbeute: 1,765 g (86,48 %); Lit.: 89 %

Sdp.₂₅ 120°C; Lit. Sdp.₁₅ 112-114°C

Masse: 31 SH, 48 SO, 64 SO_2 , 65 SO_2H , 69 F_3C , 81 SO_3H , 100 $\text{F}_2\text{C}-\text{CF}_2$, 119 F_5C_2 , 169 F_7C_3 , 219 F_9C_4

Perfluorbutan-1-sulfonsäureanhydrid [128]

Zu 2,89 g (9,60 mmol) Perfluorbutan-1-sulfonsäure werden 2,1 g Phosphorpentoxid gegeben und innerhalb von 2 h auf 100°C erhitzt. Anschließend wird das Anhydrid im Vakuum abdestilliert.

Ausbeute: 1,838 g (65,45 %); Lit.: 74 %

Sdp.₂₅ 90°C; Lit. Sdp.₁₄ 84°C

N,N-(Bisperfluorbutan-1-sulfonyl)anilin [135]

In einem Einhalskolben mit Tropftrichter und Trockenrohr werden in 8 ml Chloroform 139 μ l (1,52 mmol, 142 mg) Anilin gelöst und 630 μ l Triethylamin dazugegeben. Bei 0°C werden anschließend 1,7 g (2,91 mmol) Perfluorbutan-1-sulfonsäureanhydrid tropfenweise hinzugefügt. Nach 4 h Rühren bei RT wird der Reaktionsansatz zweimal mit Wasser (5 ml) und einmal mit halbkonzentrierter Salzsäure (5 ml) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird der ölige Rückstand chromatographisch gereinigt (Kieselgel: Diethylether/n-Hexan 1/10). Das neben dem gewünschten N,N-(Bisperfluorbutan-1-sulfonyl)anilin ebenfalls entstandene N,N-(Perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin wird nochmals wie beschrieben mit Perfluorbutan-1-sulfonsäureanhydrid umgesetzt.

N-(Perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin

Ausbeute: 383 mg (67,11 %)

Fp.: 62,3°C

¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃): 7,30 (m, 5 arom. H)

¹³C-Spektrum (CDCl₃): 108,47 (CF₂-CF₃); 110,10 (CF₂-CF₂-SO₃); 115,13 (CF₂-SO₃); 117,10 (CF₃); 123,65 (CH); 127,70 (CH); 129,65 (CH); 133,80 (C quat.)

¹⁹F-NMR-Spektrum (CDCl₃): -126,52 (m, CF₂-CF₃); -121,59 (m, CF₂-CF₂-SO₃); -110,94 (tq, CF₂-SO₃); -81,33 (tt, F₃C)

IR-Spektrum: 3270, 1490, 1418, 1354, 1254, 1234, 1191, 1140, 1034, 946

Masse: [M-H]⁻: 374 m/z

N,N-(Bisperfluorbutan-1-sulfonyl)anilin

Ausbeute: 161 mg (16,07 %); Lit.: ?

Fp.: 111°C; Lit.: 109,6°C

¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃): 7,50 (m, 5 arom. H)

¹³C-Spektrum (CDCl₃): 108,36 (CF₂-CF₃); 109,94 (CF₂-CF₂-SO₃); 115,77 (CF₂-SO₃); 116,96 (CF₃); 129,79 (CH); 131,35 (CH); 132,07 (CH); 132,15 (C quat.)

¹⁹F-NMR-Spektrum (CDCl₃): -126,17 (m, CF₂-CF₃); -121,00 (m, CF₂-CF₂-SO₃); -104,13 (t, CF₂-SO₃); -81,11 (t, CF₃)

IR-Spektrum: 3450, 1449, 1420, 1349, 1236, 1211, 1179, 1139, 1024, 887

Masse: [M+H]⁺: 658,0 m/z

HR-MS [M]⁺: Ber.: 656,9372 g/mol

Gem.: 656,938 g/mol

4.4 Radiosynthesen

4.4.1 Konditionierung von n.c.a. [^{18}F]Fluorid

Nach Beendigung der Bestrahlung eines ^{18}O -angereicherten Wassertargets ($^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$) am Babyzyklotron BC 1710 (JSW) des Instituts für Nuklearchemie im Forschungszentrum Jülich [143] wird der Targetinhalt mittels eines Heliumgasstroms aus dem Target in eine elektrochemische Zelle aus Glaskohlenstoff (Sigradur) mit einer Platinkanüle als Kathode transportiert [32]. Durch elektrochemische Abscheidung bei einer Feldstärke von 110 V/cm wird das n.c.a. [^{18}F]Fluorid innerhalb von 5 Minuten praktisch quantitativ aus dem Targetwasser isoliert. Das zurückgewonnene ^{18}O -angereicherte Wasser, dessen Anreicherungsgrad durch diesen Prozeß praktisch nicht verändert wird, kann erneut zur Produktion von [^{18}F]Fluorid eingesetzt werden. Unter Umkehrung des Spannungsfeldes in der Elektrolysezelle wird dann das [^{18}F]Fluorid in normales Wasser desorbiert [32]. Diese Lösung wird in ein mit einem Septum verschlossenes Bördelgefäß abgefüllt, und das n.c.a. [^{18}F]Fluorid wird in dieser Form nach azeotroper Trocknung für Markierungssynthesen verwendet.

4.4.2 Nukleophile Substitutionsreaktionen mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid

Allgemeine Arbeitsvorschrift

Zur azeotropen Trocknung der wäßrigen [^{18}F]Fluorid-Lösung werden typischerweise 18,5 - 74,0 MBq (0,5 - 2,0 mCi) n.c.a. [^{18}F]Fluorid zu 10 mg Kryptofix[®] 2.2.2 und 12,5 µl einer 1 M K_2CO_3 -Lösung gegeben und in Abhängigkeit von der Wassermenge in 0,5 - 1,0 ml Acetonitril (Merck, zur DNA-Synthese, < 0,003 % H_2O) aufgenommen. Anschließend wird die Lösung mit einer 1 ml Tuberkulinspritze in einen konisch zulaufenden 3 ml Wheaton-Reaktor überführt und bei 80°C im Argonstrom bis zur Trockne eingedampft. Das Reaktionsgefäß besteht aus Borosilikat und ist mit einem Silikonseptum durch einen Drehverschluß verschlossen (isochore Reaktionsbedingungen). Der Reaktor ist für den Argonanschluß und für den Austritt des Gases mit je einer Kanüle versehen und mit einem Magnetrührstäbchen zur Homogenisierung der Reaktionslösung. Nach zweimaligem Wiederholen des Trocknungsschrittes wird der Reaktor auf die erforderliche Reaktionstemperatur erhitzt. Eine gewünschte Menge an Markierungsvorläufer wird in 0,25 ml des jeweiligen Lösungsmittels gelöst und mittels einer Hamilton-µl-Spritze in den Reaktor überführt. Die jeweilige Reaktionstemperatur wird mittels eines Silikonölbades, einer Heizplatte mit Rührmotor und einem digitalen Kontaktthermometer eingestellt.

Direkte n.c.a. ^{18}F -Fluorierung von Z-Pro-Leu-Gly-4-(4R)-(TsO)Pro-OMe

Im Anschluß an die oben beschriebene azeotrope Trocknung des n.c.a. ^{18}F Fluorids werden 0,25 ml einer Lösung von 10 mg (14,3 μmol) Z-Pro-Leu-Gly-4-(4R)-(TsO)Pro-OMe in einem geeigneten Lösungsmittel bei 100°C zugegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden 45 μl -Aliquots entnommen, in 150 μl HPLC-Eluens verdünnt und mit Hilfe der Radio-HPLC und Radio-Dünnschichtchromatographie analysiert. Es werden verschiedene Lösungsmittel eingesetzt und die Reaktionstemperatur variiert.

N-Boc-4-[^{18}F]fluorprolin-methylester (vgl. [56])

Im Anschluß an die azeotrope Trocknung des n.c.a. ^{18}F Fluorids werden 0,25 ml einer Lösung von 4 mg (10 μg) (2S,4R)-N-Boc-4-(p-toluolsulfonyl)prolin-methylester in Acetonitril bei 85°C zugegeben. Nach 10 min Reaktionszeit wird die Lösung in 1 ml Diethylether aufgenommen und zum Fixieren des ^{18}F Fluorids über eine Si-60-Kartusche gegeben. (2S,4R)-N-Boc-4-(p-toluolsulfonyl)prolin-methylester und N-Boc-4-[^{18}F]fluorprolin-methylester werden mit ca. 4 ml Diethylether eluiert und nach Entfernen des Lösungsmittels chromatographisch getrennt (Polygoprep 100 – 50 C18, 1 x 9 cm, Acetonitril/Wasser: 1/1). Die das Radio-Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und mit Wasser verdünnt, so daß der organische Anteil < 10 % beträgt. Nach Fixieren des Produkts auf einer RP-18-Kartusche (720 mg, Waters) wird es mit 4 ml Diethylether eluiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

*Z-Pro-Leu-Gly-4-(^{18}F Fluor)Pro-OMe***Methode A:**

Im Anschluß an die oben beschriebene Synthese des n.c.a. N-Boc-4-[^{18}F]fluorprolin-methylesters werden bei Raumtemperatur 200 μl Trifluoressigsäure zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe zugegeben. Nach 2 min Reaktionszeit wird die Trifluoressigsäure im Vakuum entfernt. Es wird eine Lösung von 1 eq Z-Pro-Leu-Gly-OH, 1 eq TBTU und 2 eq N-Ethyldiisopropylamin in 250 ml DMF bei Raumtemperatur dazugegeben. Zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit wird die Konzentration des Markierungsvorläufers variiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden 40 - 45 μl Aliquots entnommen und mit HPLC-Eluens auf 200 μl verdünnt und anschließend mittels der Radio-HPLC analysiert.

Methode B:

Im Anschluß an die oben beschriebene azeotrope Trocknung des ^{18}F Fluorids werden bei Raumtemperatur 0,25 ml einer Lösung von 10 mg (18 μmol) Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe und 8 μl

DBU in Toluol zugegeben und 3 µl (5 mg, 17 µmol) Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden 40 - 45 µl Aliquots entnommen, mit HPLC-Eluens auf 200 µl verdünnt und anschließend mittels der Radio-HPLC analysiert.

4.4.3 ^{18}F -Fluorierungen mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure ^{18}F fluorid und dessen Darstellung

Azeotrope Trocknung des n.c.a. ^{18}F Fluorids zur Synthese von Perfluorbutan-1-sulfonsäure- ^{18}F fluorid

Im Gegensatz zur in 4.4.2 beschriebenen azeotropen Trocknung des n.c.a. ^{18}F Fluorids wird nun die azeotrope Trocknung in einem Sigradurgefäß durchgeführt. Die Lösung wird 4 min bei 80°C im Argonstrom azeotrop und anschließend 1 min im Vakuum getrocknet. Dieser Schritt wird zweimal mit 0,5 - 1,0 ml Acetonitril wiederholt. Der Reaktor ist weiter unten beschrieben.

Perfluorbutan-1-sulfonsäure ^{18}F fluorid

Methode A:

Im Anschluß an die in 4.4.3 beschriebene azeotrope Trocknung des n.c.a. ^{18}F Fluorids werden 0,5 ml einer Lösung von 10 mg (15,2 µmol) N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin in Toluol bei 130°C zugegeben. Während der Reaktionsansatz 15 min bei 130°C gerührt wird, wird das Produkt im Argonstrom aus dem Reaktor ausgetrieben und in 0,5 ml mit CO_2 /Isopropanol gekühltem Toluol aufgefangen.

Methode B:

Im Anschluß an die in 4.4.3 beschriebene azeotrope Trocknung des n.c.a. ^{18}F Fluorids wird bei 0°C eine Lösung von 10 mg (15,2 µmol) N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin in 0,25 ml Diethylether zugegeben. Nach kurzem Durchmischen (< 30 s) wird das Lösungsmittel im Argonstrom bei 0°C innerhalb von 2 min entfernt. Während anschließend das Reaktionsgemisch 20 min lang bei 130°C gehalten wird, wird das Aktivprodukt im Argonstrom aus dem Reaktor entfernt und auf einer festen Phase kondensiert, die mit Trockeneis/Isopropanol oder mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird.

Reaktor zur Synthese von Perfluorbutan-1-sulfonsäure ^{18}F fluorid

Die Synthese des Perfluorbutan-1-sulfonsäure ^{18}F fluorids wird in einem Sigradur-Gefäß mit abgerundetem Boden durchgeführt, das ein Volumen von 15 ml faßt. Der Reaktor, der in Abb.

4.1 dargestellt ist, wird mit einem Kopf aus Polyetheretherketon (Polypenco PEEK) und einem Leybold-Schnell-Spannring verschlossen. Der Reaktorkopf besitzt drei Zugänge bzw. Ausgänge. Durch den einen Zugang wird über einen Ein-Wege-Hahn Argon zugeleitet, von dem anderen führt über einen Zwei-Wege-Hahn eine Leitung zur Vakuumpumpe und eine Leitung zur Kühlfalle, in der das Aktivprodukt kondensiert wird. Das Argongas wird durch einen Teflonschlauch mit einem Innendurchmesser von 1 mm in den Reaktor bis kurz über die Oberfläche der Lösung geleitet. Der dritte Zugang ist mit einem Septum verschlossen und dient zur Zugabe von Acetonitril für die azeotrope Trocknung des [^{18}F]Fluorids bzw. der Lösung des Synthesevorläufers.

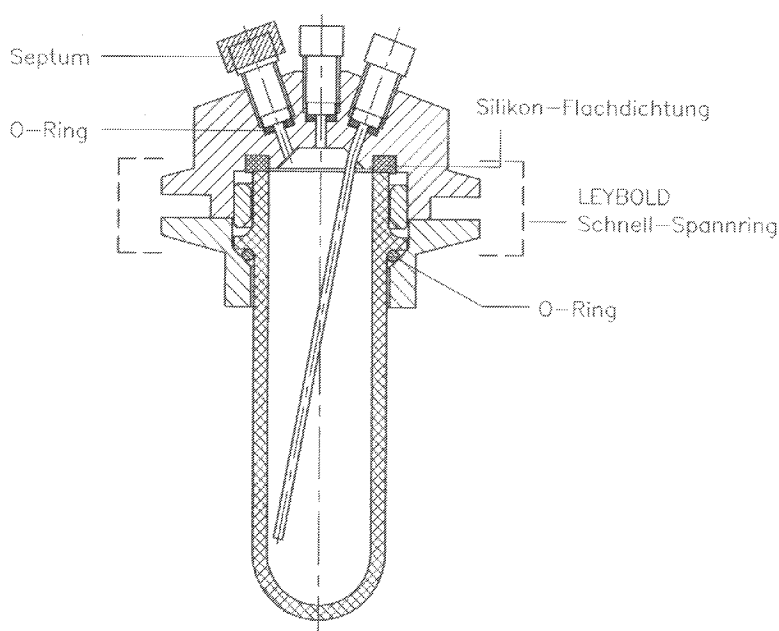


Abb. 4.1: Reaktor zur Synthese von Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid

Apparatur zur Synthese von Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid

Die Apparatur zur Synthese von Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid ist in Abb. 4.2 dargestellt. Sie besteht aus dem oben beschriebenen Reaktor, in dem das ^{18}F -Fluorierungsreagenz hergestellt wird, einer Kühlfalle, in der das ^{18}F -Fluorierungsagens kondensiert wird, einer Kalilauge-Waschflasche zur Hydrolyse von Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid, das die Kühlfalle passiert, und einem mit Aktivkohle gefüllten Glasröhrchen.

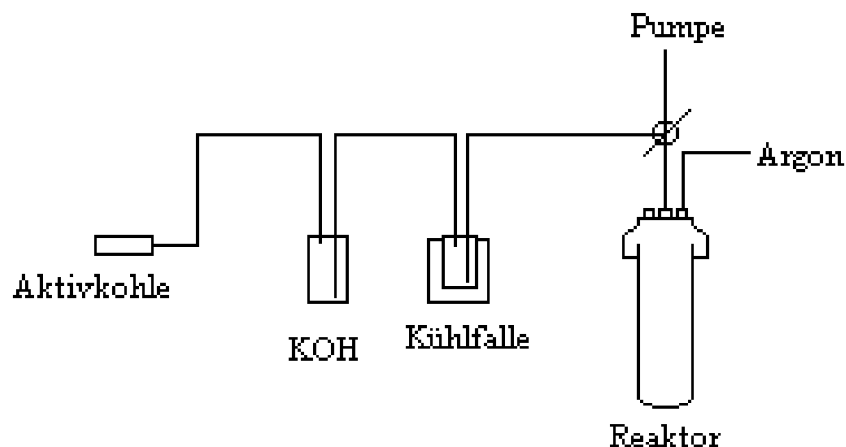


Abb. 4.2: Apparatur zur Synthese von Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid

(2S,4S)-N-Boc-4-[^{18}F]fluorprolin-methylester durch ^{18}F -Fluorierung mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid

Zu N-Boc-Hyp-OMe werden 3 Äquivalente DBU, 250 μl einer Lösung von Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid in Toluol und Perfluorbutansulfonsäurefluorid als Träger bei Raumtemperatur gegeben. Zur Optimierung der Reaktionsparameter wurden sowohl die Konzentration des Markierungsvorläufers als auch die Trägerkonzentration variiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 40 - 45 μl Aliquots entnommen, mit Acetonitril, Methanol bzw. Aceton und Wasser auf 200 μl verdünnt und anschließend mittels Radio-HPLC und -dünnschichtchromatographie analysiert.

Z-Pro-Leu-Gly-4-(4S)-([^{18}F]Fluor)Pro-OMe durch ^{18}F -Fluorierung mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid

Zu Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe werden bei RT 250 μl der Toluollösung von Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid, 3 Äquivalente DBU und Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid gegeben, dessen Stoffmengenverhältnis zum Markierungsvorläufer variiert wird. Weiterhin werden verschiedene Konzentrationen des Synthesevorläufers zur Optimierung der Reaktionsparameter eingesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden 40 - 45 μl Aliquots entnommen, mit Acetonitril, Methanol bzw. Aceton und Wasser auf 200 μl verdünnt und anschließend mittels der Radio-HPLC und -dünnschichtchromatographie analysiert.

Z-Gly-Leu-4-(4S)-([¹⁸F]Fluor)Pro-Gly-Leu-OMe durch ¹⁸F-Fluorierung mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[¹⁸F]fluorid

Zu Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe werden bei RT 250 µl der Toluollösung von Perfluorbutan-1-sulfonsäure[¹⁸F]fluorid, 3 Äquivalente DBU und Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid gegeben. Sowohl die Konzentration an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid als auch an Markierungsvorläufer werden zur Optimierung der Reaktionsparameter variiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden 40 - 45 µl Aliquots entnommen, mit Acetonitril, Methanol bzw. Aceton und Wasser auf 200 µl verdünnt und anschließend mittels der Radio-HPLC und -dünnschichtchromatographie analysiert.

4.4.4 ¹⁸F-Fluorierung von polymer-gebundenem 4-(4R)-Hydroxypropyl-leucin mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[¹⁸F]fluorid

Das ¹⁸F-Fluorierungsagens Perfluorbutan-1-sulfonsäure[¹⁸F]fluorid wird nach der in 4.4.3 beschriebenen Methode B hergestellt und auf 22,5 mg (20 µmol Peptid) Boc-Hyp-Leu-Wang-Harz kondensiert, dessen Beladungsgrad 0,88 mmol/l beträgt. Das Harz wird mit flüssigem Stickstoff auf ca. - 60°C gekühlt und befindet sich in einer Glaskapillare von 2,9 mm Ø. Die Glaskapillare liegt in einem Kupferblock, der in den flüssigen Stickstoff eintaucht. Nach dem Auffangen des ¹⁸F-Fluorierungsagenzes und Erwärmen auf RT werden 50 µl einer Toluollösung von 3,5 µl (19,5 µmol) Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid und 3 µl DBU auf das Harz gegeben und 30 min bei RT einwirken gelassen. Anschließend wird das Harz einmal mit 150 µl Toluol und zweimal mit 150 µl DMF gespült. Das Peptid wird innerhalb von 20 min mit 150 µl Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten, das noch einmal mit 150 µl Trifluoressigsäure gewaschen wird. Nach Entfernen der Trifluoressigsäure unter vermindertem Druck wird das Peptid in 200 µl Acetonitril aufgenommen und mittels Radio-HPLC und -dünnschichtchromatographie analysiert.

4.5 Analytische Verfahren

Die kurze Halbwertszeit von Fluor-18 macht es erforderlich, analytische Verfahren einzusetzen, die eine schnelle und effiziente Charakterisierung der ¹⁸F-Markierungsprodukte ermöglichen. Die Identität, die Reinheit und die radiochemische Ausbeute der Produkte wurden mit Hilfe der Radiodünnschichtchromatographie (Radio-DC), der Radio-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Radio-HPLC) und der Radiogaschromatographie (Radio-GC) bestimmt. Im folgenden werden die Verfahren beschrieben.

4.5.1 Radiodünnschichtchromatographie

Zur Bestimmung der radiochemischen Ausbeute von N-Boc-4-[^{18}F]fluorprolin-methylester und der Identität der ^{18}F -fluorierten Produkte durch Vergleich mit den entsprechenden ^{19}F -Verbindungen wurde unter anderem das Verfahren der Radiodünnschichtchromatographie verwendet. Hierzu wurden typischerweise 1 - 3 μl der Reaktionsmischung auf das Dünnschichtmaterial (Merck Si-60-F₂₅₄ S auf Aluminiumfolie) aufgetragen und die DC-Platte mit geeigneten Lösungsmittelgemischen entwickelt.

Die Auswertung der DC-Platten erfolgte mit Hilfe des Autoradiographen Instant Imager™ (Packard).

Die Bestimmung des R_f -Wertes der inaktiven Verbindung erfolgte mittels einer UV-Lampe und durch Entwickeln der DC-Platten mit einer Ninhydrin-Lösung (0,3 % Ninhydrin in Ethanol/Eisessig (150/3)).

Tabelle 4.2: R_f -Werte der Markierungsvorläufer und der Standardverbindungen unter den angegebenen chromatographischen Bedingungen

Verbindung	Laufmittel	R_f -Wert
N-Boc-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester		0,50
N-Boc-Hyp-OMe	Diethylether/n-Hexan (4/1)	0,18
N-Boc-4-fluorprolin-methylester		0,74
Z-Pro-Leu-Gly-4-(Fluor)Pro-OMe		0,35
Z-Pro-Leu-Gly-4-(TsO)Pro-OMe		0,43
Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe	Chloroform/Methanol (9/1)	0,23
Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe		0,17
Z-Gly-Leu-4-(Fluor)Pro-Gly-Leu-OMe		0,27
N-Boc-4-(Fluor)Pro-Leu-OtBu	Chloroform/Methanol/H ₂ O/	0,94
H-4-(Fluor)Pro-Leu-OH • TFA	Eisessig (10/100/1/1)	0,50

4.5.2 Radio-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Das zur Charakterisierung und Analyse der ^{18}F -Markierungsprodukte eingesetzte HPLC-System besteht aus einem Gradientenpumpensystem aus zwei HPLC-Pumpen mit analytischem Pumpenkopf (Merck, Hitachi L-6002 A und L-6000), einem UV/VIS-Photometer (Merck, Hitachi L-4200) mit variabler Wellenlänge, einem NaI(Tl)-Bohrlochkristalldetektor

(Durchmesser: 8 cm, EG & G Ortec, Model 276 Photomultiplier Base) und einem Verstärkerteil. Die Probenaufgabe erfolgt mittels eines Injektionsventils (Rheodyne, Typ 7125) mit einer Probenschleife von 50 μ l. Ein weiteres, hinter der Trennsäule angeordnetes Injektionsventil (Rheodyne, Typ 7125) mit einer Probenschleife von 50 μ l dient zur Injektion von drei Aliquots desselben Volumens, die zur Bestimmung der radiochemischen Ausbeute mit den durch die HPLC-Säule aufgetrennten radioaktiven Komponenten in Beziehung gesetzt werden. Der Ausgang des NaI(Tl)-Bohrlochdetektors ist mit einem Sammel- und Abfallbehälter verbunden. Das UV/VIS-Photometer und der NaI(Tl)-Bohrlochkristalldetektor sind über einen Analog/Digital-Wandler an einen Computer (Typ PC 386) angeschlossen. Die Aufnahme, Verarbeitung und Auswertung der Meßdaten erfolgt rechnergestützt mittels eines Meßdatenerfassungs- und Auswertungsprogramms (Nuclear Interface, Nina 2.1). Für die HPLC-Trennungen werden die RP (Reverse Phase)-Trennsäulen LiChrosphere 100 RP 18 EC - 5 μ m, 250 $\times$ 4 mm oder Phenomenex Aqua 5 μ C18 125A, 250 $\times$ 4,6 mm der Firma CS-Chromatographie-Service, Langerwehe, verwendet. Als Elutionsmittel dienen Acetonitril/Wassergemische unterschiedlicher Zusammensetzung. In Tabelle 4.3 sind die chromatographischen Trennbedingungen und Retentionszeiten bzw. k' -Werte der bei Raumtemperatur getrennten Ausgangs- und Referenzverbindungen aufgeführt.

Tabelle 4.3: k' -Werte und HPLC-Trennbedingungen der Ausgangs- und Referenzverbindungen

Verbindung	k' -Werte
N-Boc-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester	15,25 ^{A)}
N-Boc-Hyp-OMe	0,46 ^{A)}
N-Boc-4-fluorprolin-methylester	2,48 ^{A)}
Z-Pro-Leu-Gly-4-(Fluor)Pro-OMe	2,13 ^{A)} ; 3,75 ^{B)}
Z-Pro-Leu-Gly-4-(TsO)Pro-OMe	8,69 ^{B)}
Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe	0,94 ^{A)} ; 1,67 ^{B)}
Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe	1,66 ^{A)} ; 3,21 ^{B)}
Z-Gly-Leu-4-(Fluor)Pro-Gly-Leu-OMe	3,12 ^{A)}
N-Boc-4-(Fluor)Pro-Leu-OtBu	19,90 ^{D)} ; ∞ ^{E)}
H-4-(Fluor)Pro-Leu-OH • TFA	8,74 ^{D)} , 7,45 ^{E)}
H-4-Hyp-Leu-OH • TFA	7,23 ^{D)}
N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin	10,32 ^{C)}
Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid	2,15 ^{C)}

HPLC-Trennbedingungen:

- A) LiChrosphere 100 RP 18 EC - 5 μ m, 250 $\times$ 4 mm; Acetonitril/Wasser (45/55) (v/v)
- B) LiChrosphere 100 RP 18 EC - 5 μ m, 250 $\times$ 4 mm; Acetonitril/Wasser (40/60) (v/v)
- C) LiChrosphere 100 RP 18 EC - 5 μ m, 250 $\times$ 4 mm; Acetonitril/Wasser (80/20) (v/v)
- D) Phenomenex Aqua 5 μ C18 125A, 250 $\times$ 4,6 mm; 0-5 min: Acetonitril/Wasser (1/99) (v/v) (0,1 % TFA), 5 $\rightarrow$ 45 min: 99 % Wasser $\rightarrow$ 20 % Wasser
- E) Phenomenex Aqua 5 μ C18 125A, 250 $\times$ 4,6 mm; Acetonitril/Wasser (10/90) (v/v) (0,1 % TFA)

Flußrate: jeweils 1 ml/min

4.5.3 Radiogaschromatographie

Zur Identifizierung des ^{18}F -Fluorierungsagenzes Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid wurde neben der Radio-HPLC auch die Radiogaschromatographie eingesetzt. Zunächst wurden mit dem kommerziell erhältlichen Standard Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid geeignete Bedingungen für die Gaschromatographie ermittelt. Die Messungen wurden an einem Gaschromatographen der Firma Hewlett Packard (HP 5890, Serie II) mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) zur Detektion der Verbindungen durchgeführt. Die Aufnahme und Auswertung der Meßdaten erfolgte rechnergestützt mit einem Meßwerteerfassungs- und Auswertprogramm (Nuclear Interface, Raytest Gina Version 2.1). Die zur Trennung verwendete Säule besaß eine Länge von 2 m und einen Innendurchmesser von 3,5 mm. Als Säulenmaterial wurde 20 % SF-96 auf Volaspher A, 80 - 100 mesh, der Firma CS-Chromatographie-Service, Langerwehe, gewählt. Die Temperatur des Injektorblocks und des WLD's betrug 200°C. Mit einer Toluollösung von Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid wurden die folgenden Bedingungen bestimmt: Säulentemperatur: 15°C, Heliumstrom: 60 ml/min. Für Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid ergab sich unter diesen Bedingungen ein k' -Wert von 4,02 und für Toluol $k' = 22,19$. Zur Identifizierung des ^{18}F -Fluorierungsagenzes wurde nach dessen Synthese Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid als Träger zugegeben und ein Aliquot gaschromatographisch untersucht. Das gesamte Chromatogramm wurde in Zeitintervallen von 0,5 - 1 min auf Aktivkohle aufgefangen. Die adsorbierte Aktivität wurde anschließend unter den gleichen geometrischen Bedingungen in einem Gammacounter (Fa. Packard, Typ Minaxi γ , Auto-Gamma 5000 Series) gemessen. Die gesamte Aktivität befand sich zusammen mit dem zugesetzten Träger Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid in derselben Fraktion.

4.5.4 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität wurde nach Beendigung der Synthese bei einem äquimolaren Zusatz an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid als Träger die Stoffmenge der gebildeten Fluorverbindung mittels HPLC und die Aktivität der ^{18}F -Fluorverbindung bestimmt. Die Stoffmenge der fluorierten Verbindung wurde anhand der HPLC-UV-Technik bei einer Wellenlänge von $\lambda = 220\text{ nm}$ aufgenommenen Eichgeraden ermittelt. Die in Abb. 4.3 - 4.4 aufgetragenen Peakintegrale sind proportional zur Stoffmenge. Die jeweilige Geradengleichung wurde durch lineare Regression bestimmt.

(2S,4R)-N-Boc-4-[^{18}F]fluorprolin-methylester

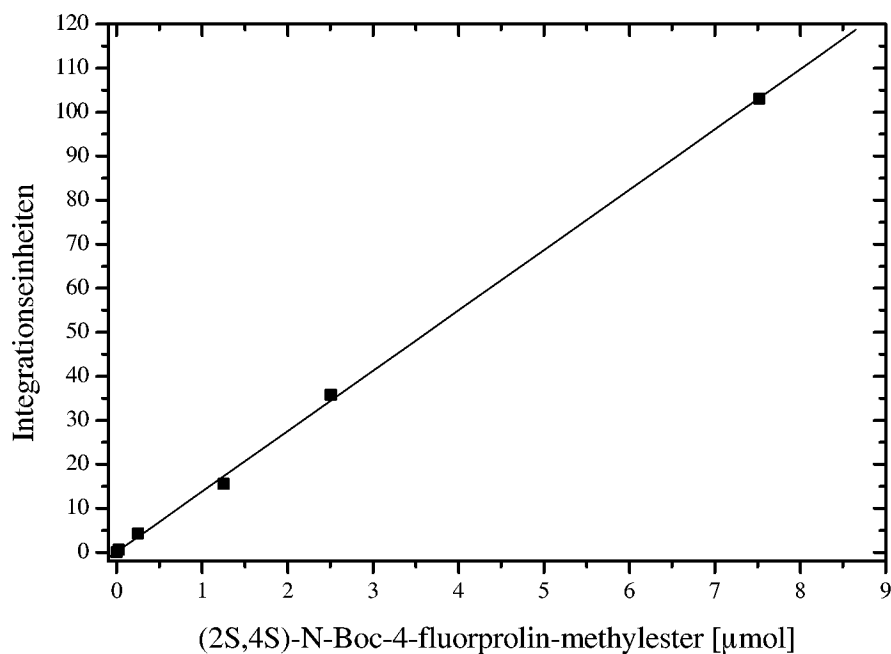


Abb. 4.3: UV-Eichgerade von (2S,4S)-N-Boc-4-fluorprolin-methylester

Mit dem aus dem Aktivexperiment ermittelten Flächenintegral des UV-Signals wurde anhand der Eichgeraden eine spezifische Aktivität für (2S,4S)-N-Boc-4-fluorprolin-methylester aus der Reaktion von N-Boc-Hyp-OMe mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid von 1,45 MBq/mmol (0,04 Ci/mmol) bestimmt.

Z-Pro-Leu-Gly-4-(4S)-([¹⁸F]Fluor)Pro-OMe

Mit dem aus dem Aktivexperiment ermittelten Flächenintegral des UV-Signals wurde anhand der Eichgeraden eine spezifische Aktivität für Z-Pro-Leu-Gly-4-(4S)-([¹⁸F]Fluor)Pro-OMe aus der Reaktion von Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure[¹⁸F]fluorid von 4,11 MBq/mmol (0,11 Ci/mmol) bestimmt.

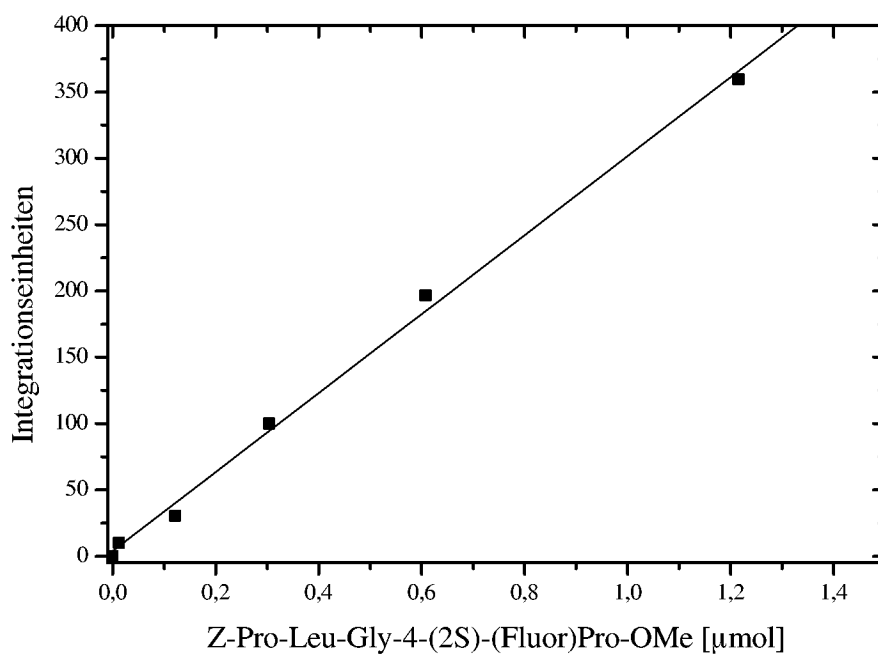


Abb. 4.4: UV-Eichgerade von Z-Pro-Leu-Gly-4-(4S)-([¹⁸F]Fluor)Pro-OMe

5 Zusammenfassung

Markierungsmethoden müssen notwendigerweise den chemischen Eigenschaften jeweiliger Stoffklassen angepaßt werden. Da markierte Peptide und Proteine ein hohes Potential als funktionsspezifische Tracer besitzen, wurden für sie im Rahmen dieser Arbeit drei neue ^{18}F -Markierungsverfahren konzipiert und bewertet. Die direkte, nukleophile ^{18}F -Fluorierung durch Substitution einer p-Toluolsulfonsäuregruppe in einer (2S,4R)-4-(p-Toluolsulfonyloxy)prolyl-Einheit, die Radiofluorierung durch Kondensation von 4-[^{18}F]Fluorprolin-methylester an den C-Terminus des Modellpeptids Z-Pro-Leu-Gly-OH und die ^{18}F -Fluorierung der Hydroxyprolyl-Einheit im Peptid mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid. Da sich mit Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid aliphatische Alkohole unter milden Reaktionsbedingungen in die entsprechenden Alkylfluoride überführen lassen, bietet sich dieses Reagenz zur ^{18}F -Fluorierung sensitiver, Hydroxygruppenenthaltender Biomoleküle an.

Am Beispiel des Modellpeptid-Derivats Z-Pro-Leu-Gly-4-(4R)-(TsO)Pro-OMe, das sich durch Tosylierung von N-Boc-*trans*-4-hydroxyprolin und nachfolgende Kondensation an Z-Pro-Leu-Gly-OH gut herstellen läßt, konnte gezeigt werden, daß eine direkte, Kryptat-katalysierte ^{18}F -Fluorierung nicht zum Erfolg führt. Sowohl unter den stärker basischen Bedingungen der ^{18}F -Fluorierung in Gegenwart von Kryptofix[®] 2.2.2. und Kaliumcarbonat als auch mit dem weniger basischen Kaliumoxalat kam es zu einer Zerstörung und vermutlich Fragmentierung des Peptids durch Spaltung der Peptidbindung.

Hingegen verläuft die Kondensation des ^{18}F -markierten Aminosäurederivats 4-[^{18}F]Fluorprolin-methylester an den C-Terminus des Modellpeptids Z-Pro-Leu-Gly-OH mit einer radiochemischen Ausbeute von 70 - 80 %. Bei dieser Kondensationsreaktion, die mittels TBTU bei Raumtemperatur in DMF in Gegenwart von DIEPA durchgeführt wird, bildet sich intermediär der aktivierte Benzotriazolester des Peptids. Mit 4-[^{18}F]Fluorprolin-methylester, das durch ^{18}F -Fluorierung von N-Boc-*trans*-4-(p-toluolsulfonyloxy)prolin-methylester und anschließender Abspaltung der Boc-Gruppe mit einer Gesamtausbeute von 30 - 40 % herstellbar ist, steht nun eine weitere ^{18}F -fluorprothetische Gruppe für eine effiziente Markierung von Peptiden unter milden Reaktionsbedingungen zur Verfügung. Allerdings entsteht bei der ^{18}F -Fluorierung des Vorläufers neben dem *cis*- auch *trans*-Produkt, was eine chromatographische Diastereomerentrennung bedingt.

Im Hinblick auf eine Reduzierung der radioaktiven Syntheseschritte und -dauer wurde die Radiomarkierung mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid untersucht, das durch Kryptat-kataly-

sierte, nukleophile ^{18}F -Fluorierung von N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin in Toluol und Überführung in eine Vorlage mittels eines Argonstroms mit einer radiochemischen Ausbeute von $83 \pm 3 \%$ erhalten wurde. Die Optimierungsversuche der Synthese von Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid ergaben eine Konzentration an Synthesevorläufer N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin von 0,015 mol/l, eine Reaktionszeit von 15 min, eine Badtemperatur von 130°C und eine Konzentration des Phasentransferkatalysators ($[\text{K}2.2.2.]_2\text{CO}_3$) von 0,018 mol/l. Es zeigte sich, daß Toluol sowohl als Reaktionsmedium als auch zur Absorption des durch Evaporation isolierten ^{18}F -Fluorierungsreagenzes geeignet ist.

Die Untersuchung der Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid von der Stoffmenge an zugesetztem Kaliumfluorid ergab, daß im Fall der trägerarmen Synthese bis zu einem Stoffmengenverhältnis von Kaliumfluorid zum Synthesevorläufer N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin von 0,01 radiochemische Ausbeuten von ca. 80 % erhalten werden. Bei einer Erhöhung des Stoffmengenverhältnisses nimmt die radiochemische Ausbeute aufgrund konkurrierender Eliminationsreaktionen drastisch ab. Alternativ zur Reaktion in homogener Lösung wurde das Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid aus dem Markierungsvorläufer N,N-Bis(perfluorbutan-1-sulfonyl)anilin in der Schmelze bei 130°C hergestellt. Die radiochemische Ausbeute fällt hierbei mit $67 \pm 8 \%$ etwas geringer aus als bei der Synthese in Toluol.

Ein Vergleich der Absorption von Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid in Toluol mit der Adsorption auf einer festen Phase ergab, daß sich die Absorption in Toluol mit einer Ausbeute an ^{18}F -Fluorierungsagens von $83 \pm 3 \%$ am besten zur Isolierung des ^{18}F -Fluorierungsreagenzes eignet. Die Adsorption auf einer Polystyrol-Matrix (LiChrolut® EN) ist mit einer Gesamtausbeute von $75 \pm 6 \%$ ebenfalls relativ effektiv, wohingegen die Gesamtausbeute in einer leeren Probenschleife aus Teflon nur $35 \pm 1 \%$ beträgt.

Die Effizienz der ^{18}F -Fluorierung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure[^{18}F]fluorid wurde an N-Boc-Hyp-OMe sowie Modellpeptiden aus vier und fünf Aminosäuren evaluiert. Die Umsetzung der Hydroxypropyl-haltigen, geschützten Derivate erfolgt in Toluol bei Raumtemperatur in Gegenwart der Base 1,8-Diaza-bicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU). Eine trägerarme Synthese führt jedoch bei allen Modellverbindungen lediglich zu radiochemischen Ausbeuten von ca. 1 %. Die Ursache für die geringe radiochemische Ausbeute unter substöchiometrischen Bedingungen läßt sich mit dem Mechanismus einer Zwei-Schritt-Reaktion erklären. Im ersten Schritt der Umsetzung wird durch Veresterung das entsprechende Nonaflat unter Freisetzung von Fluorid gebildet. Im nachfolgenden Reaktionsschritt wird unter basischen Bedingungen die Nonaflatgruppe durch Fluorid substituiert. Bei der trägerarmen Synthese ist die Stoffmenge bzw. Konzentration des gebildeten Nonaflats und des [^{18}F]Fluorids so gering, daß es aus statistischen Gründen nur zu einer geringfügigen Umsetzung zum gewünschten ^{18}F -Produkt kommt. Weitere Untersuchungen ergaben, daß eine zur

Hydroxylverbindung äquimolare Menge an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid als Träger unabdingbar ist. Unter diesen Bedingungen wurde bei der ^{18}F -Fluorierung von N-Boc-Hyp-OMe eine radiochemische Ausbeute von $90 \pm 4 \%$ erzielt. Diese konnte durch eine Verdoppelung des Trägergehaltes auf $97 \pm 2 \%$ erhöht werden, wenn das Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid erst nach dem ^{18}F -Agens zugegeben wurde. Erfolgte bei einem doppelt-äquimolaren Verhältnis von Träger zu Peptid die Zugabe des Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorids gemeinsam mit dem ^{18}F -Fluorierungsreagenz, betrug die radiochemische Ausbeute ca. 50 %. Diese Ergebnisse stehen mit dem angenommenen Reaktionsmechanismus in Einklang.

Bei dem Modellpeptid Z-Pro-Leu-Gly-Hyp-OMe wurde bei einem äquimolaren Trägerzusatz und einer Eduktkonzentration von 0,075 mol/l innerhalb von 3 min eine radiochemische Ausbeute von $46 \pm 3 \%$ erreicht. Eine Reduzierung des Reaktionsvolumens unter Beibehaltung der optimalen Konzentrations- und Stoffmengenverhältnisse zur Minimierung der absoluten Stoffmengen führte zu deutlich geringeren radiochemischen Ausbeuten. Bei dem Pentapeptid Z-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-OMe wurden bei einer Eduktkonzentration von 0,1 mol/l und einem äquimolaren Trägerzusatz an Perfluorbutan-1-sulfonsäurefluorid $33 \pm 3 \%$ an fluoriertem Produkt erhalten. Offensichtlich sinkt die radiochemische Ausbeute mit zunehmender Peptidkettenlänge aufgrund sterischer und elektronischer Einflüsse.

Bei der Radiomarkierung des über den C-Terminus kovalent an ein Wang-Harz gebundenen Modellpeptids Boc-Hyp-Leu-OH mittels Perfluorbutan-1-sulfonsäure ^{18}F fluorid, das zuvor auf dem Harz adsorbiert wurde (RCA: $31 \pm 3 \%$), wurden lediglich $4,0 \pm 0,9 \%$ des ^{18}F -markierten Produkts erhalten (bezogen auf ^{18}F fluorid ca. 1 %).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich Hydroxyprolin-enthaltende Peptide in Lösung mit Perfluorbutan-1-sulfonsäure ^{18}F fluorid in guten radiochemischen Ausbeuten in geträgerte ^{18}F -fluorierte Derivate überführen lassen. Jedoch sind zur Herstellung von Produkten höherer spezifischer Aktivität weitere verfahrenstechnische Entwicklungen notwendig. Somit stellt die ^{18}F -Fluorierung über prosthetische Gruppen die bisher effizienteste trägerarme Markierungsmethode von Peptiden dar, und die in dieser Arbeit entwickelte C-terminale Kondensation eines n.c.a. ^{18}F fluorpropylrestes empfiehlt sich mit ca. 75 % radiochemischer Ausbeute (ca. 25 % bezogen auf ^{18}F fluorid) als eine brauchbare neue Variante.

6 Literatur

- [1] M. Bruker: A chronology of nuclear medicine. Mallinckrodt Medical Heritage Publications, Inc., St. Louis (1990).
- [2] G. Stöcklin, S.M. Qaim, F. Rösch: The Impact of Radioactivity on Medicine. *Radiochimica Acta* **70/71**, 249 (1995).
- [3] K.H. Lieser: Einführung in die Kernchemie. VCH, Weinheim (1991).
- [4] I. Wendt: Radiometrische Methoden in der Geochronologie. Clausthaler Tektonische Hefte, Ellen Pilger Verlag, Clausthal-Zellerfeld (1971).
- [5] H.H. Coenen: Radiopharmazeutische Chemie: Grundlagen zur in vivo Untersuchung molekularer Vorgänge mit PET. *Der Nuklearmediziner* **17**, 203 (1994).
- [6] G. v. Hevesy, F. A. Paneth; *Zeit. Anorg. Chem.* **82**, 323 (1913).
- [7] H.H. Coenen, P. Kling. G. Stöcklin: Cerebral Metabolism of L-2-[¹⁸F]Fluorotyrosine, a New PET Tracer of Protein Synthesis. *J. Nucl. Med.* **30**, 1367 (1989).
- [8] M. Reivich, D. Kuhl, A. Wolf, J. Greenberg, M. Phelps, T. Ido, V. Casella, J. Fowler, E. Hoffman, A. Alavi, P. Som, L. Sokoloff: The [¹⁸F]Fluorodeoxyglucose Method for the Measurement of Local Cerebral Glucose Utilization in Man. *Circ. Res.* **44**, 127 (1979).
- [9] A.F. Holleman, E. Wiberg: Lehrbuch der Anorganischen Chemie. de Gruyter Verlag, Berlin (1985).
- [10] A. Pleneveaux, M. Guillaume, C. Brihaye, C. Lemaire, R. Cantineau: Chemical Processing for Production of No-carrier-added Selenium-73 from Germanium and Arsenic Targets and Synthesis of L-2-amino-4-([⁷³Se]methylseleno)butyric acid (L-[⁷³Se]selenomethionine). *Appl. Radiat. Isot.* **41**, 829 (1990).
- [11] J. Schmaljohann: Polymergestützte Synthese von unsymmetrischen n.c.a. [^{73,75}Se]Selenoethern zur Markierung von Aminosäuren. Dissertation, Universität zu Köln (1995).
- [12] J. Ermert, K. Hamacher, H.H. Coenen: New Strategy for No-carrier-added [⁷³Se]Selenomethionine as a Precursor of Homocysteine [⁷³Se]Selenolactone. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **42**, Suppl. 1, 804 (1999).
- [13] D. Parker: Tumour Targeting with Radiolabelled Macrocyclic-Antibody Conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **19**, 271 (1990).
- [14] M.E. Phelps, J. Mazziotta, H. Schelbert: Positron Emission Tomography and Autoradiography. Raven Press, New York (1986).
- [15] K. Wienhard, R. Wagner, W.D. Heiss: PET - Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissionstomographie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1989).

- [16] T.J. McCarthy, S.W. Schwarz, M.J. Welch: Nuclear Medicine and Positron Emission Tomography: An Overview, *J. Chem. Educ.* **71**, 830 (1994).
- [17] H. Schicha, O. Schober: Nuklearmedizin Compact Lehrbuch. Schattauer Verlag, Stuttgart (1997).
- [18] J. Kupferschläger, K. Bilger, W. Müller-Schauenburg, R. Bares: Theorie und Praxis der Abschwächungskorrektur. *Der Nuklearmediziner* **22**, 97 (1999).
- [19] C.M. Lederer, V.S. Shirley: Tables of Isotopes. John Wiley, New York (1987).
- [20] M.M. Ter-Pogossian, M.E. Raichle, B.E. Sobel: Tomographie mit radioaktiv markierten Substanzen. *Spekt. der Wissenschaften* **12**, 121 (1980).
- [21] H.J. Ache: Chemie des Positrons und Positroniums. *Angew. Chem.* **84**, 234 (1972).
- [22] G.W. Kabalka, R.M. Lambrecht, M. Sajjad, J.S. Fowler, S.A. Kunda, G.W. McCollum, R. McGregor: Synthesis of ^{15}O -Labelled Butanol via Organoborane Chemistry. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **36**, 853 (1985).
- [23] G.T. Bida, N. Satyamurthy, J.R. Barrio: The Synthesis of 2-[F-18]Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose using Glycols: A Reexamination. *J. Nucl. Med.* **25**, 1327 (1984).
- [24] A. Hohn, B. Scholten, H.H. Coenen, S.M. Qaim: Excitation Functions of (p,xn) Reactions on Highly Enriched ^{122}Te : Relevance to the Production of $^{120\text{g}}\text{I}$. *Appl. Radiat. Isot.* **49**, 93 (1998).
- [25] F.F. Knapp, Jr., S. Mirzadeh: The Continuing Important Role of Radionuclide Generator Systems for Nuclear Medicine. *Eur. J. Nucl. Med.* **21**, 1151 (1994).
- [26] H. Herzog, F. Rösch, G. Stöcklin, C. Lueders, S.M. Qaim, L.E. Feinendegen: Measurement of Pharmacokinetics of Yttrium-86 Radiopharmaceuticals with PET and Radiation Dose Calculation of Analogous Yttrium-90 Radiotherapeutics. *J. Nucl. Med.* **34**, 2222 (1993).
- [27] R.C. Weast: CRC Handbook of Chemistry and Physics. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1998).
- [28] A.H. Snell: A New Radioactive Isotope of Fluorine. *Phys. Rev.* **51**, 143 (1937).
- [29] S. M. Qaim, G. Stöcklin: Production of Some Medically Important Short-lived Neutron Deficient Radioisotopes of Halogenes. *Radiochim. Acta* **34**, 25 (1983).
- [30] M. Guillaume, A. Luxen, B. Nebeling, M. Argentini, J.C. Clark, V.W. Pike: Recommendations for Fluorine-18 Production. *Appl. Radiat. Isot.* **42**, 749 (1991).
- [31] E. Hess, G. Blessing, H.H. Coenen, S.M. Qaim: Improved Target System for Production of High Purity ^{18}F Fluorine via the $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Reaction. *Appl. Radiat. Isot.* **52**, 1431 (2000).
- [32] K. Hamacher, G. Blessing: Efficient electrochemical Recovery of ^{18}F Fluoride from Water. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **37**, 739 (1995).

- [33] T. Hirschfelder, K. Hamacher, H.H. Coenen: Possibilities of Nucleophilic and Electrophilic N.c.a. ^{18}F -Fluorination in an Electrochemical Cell. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **42**, Suppl. 1, 327 (1999).
- [34] R.M. Lambrecht, R. Neirinckx, A. P. Wolf: Cyclotron Isotopes and Radiopharmaceuticals XXIII. Novel Anhydrous ^{18}F -Fluorinating Intermediates. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **29**, 175 (1978).
- [35] V. Casella, T. Ido, A.P. Wolf, J.S. Fowler, R.R. McGregor, T.J. Ruth: Anhydrous ^{18}F Labelled Elemental Fluorine for Pharmaceutical Preparation. *J. Nucl. Med.* **21**, 750 (1980).
- [36] G. Blessing, H. H. Coenen, K. Franken, S. M. Qaim: Production of $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}_2$, H^{18}F and $^{18}\text{F}_{\text{aq}}^-$ using the $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ Process. *Appl. Radiat. Isot.* **37**, 1135 (1986).
- [37] J. Bergman, O. Solin: Fluorine-18-Labeled Fluorine Gas for Synthesis of Tracer Molecules. *Nucl. Med. Biol.* **24**, 677 (1997).
- [38] H. Vera Ruiz; Report of an International Atomic Energy's Consultants' Meeting on Fluorine-18: Reactor Production and Utilization. *Appl. Radiat. Isot.* **39**, 31 (1988).
- [39] P.W. Atkins: Physical Chemistry. Oxford University Press, Oxford (1994).
- [40] G. Firnau, R. Chirakal, E.S. Garnett: Aromatic Radiofluorination with $[\text{F-18}]\text{F}_2$ in Anhydrous Hydrogen Fluoride. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **23**, 1106 (1986).
- [41] M.J. Adam, J.R. Grierson, T.J. Ruth, S. Jivan: Reaction of $[\text{}^{18}\text{F}]\text{acetylhyperflluorite}$ with Derivatives of Dihydroxyphenylalanine. Synthesis of L- $[\text{}^{18}\text{F}]\text{6-fluordopa}$. *Appl. Radiat. Isot.* **37**, 877 (1986).
- [42] H.H. Coenen, S.M. Moerlein: Regiospecific Aromatic Fluorodemetalation of Group IVb Metallarenes using Elemental Fluorine or Acetyl Hypofluorite. *J. Fluorine Chem.* **36**, 63 (1987).
- [43] H.H. Coenen, K. Franken, S. Metwally, G. Stöcklin: Elektrophilic Radio-fluorination of Aromatic Compounds with $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}_2$ and $[\text{}^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{CO}_2\text{F}$ and Regioselective Preparation of L-p- $[\text{}^{18}\text{F}]\text{Fluorophenylalanine}$. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **23**, 1179 (1986).
- [44] J.S. Fowler, A.N. Ansari, H.L. Atkins, P.R. Bradley-Moore, R.R. MacGregor, A.P. Wolf: Synthesis and Preliminary Evaluation in Animals of Carrier-free ^{11}C -1-Dopamine Hydrochloride. *J. Nucl. Med.* **14**, 867 (1973).
- [45] A. Luxen, M. Perlmutter, G.T. Bida, G. van Moffaert, J.S. Cook, N. Satyamurthy, M.E. Phelps, J.R. Barrio: Remote, Semiautomated Production of 6- $[\text{}^{18}\text{F}]\text{Fluoro-L-dopa}$ for Human Studies with PET. *Appl. Radiat. Isot.* **41**, 275 (1990).
- [46] D. Naumann: in: Anorganische Chemie in Einzeldarstellungen. Fluor und Fluorverbindungen. A. Schneider (eds.), Bd. 2 (1980).

- [47] D.P. Cox, J. Terpinski, W. Lawrynowicz: *J. Org. Chem.* **49**, 3216 (1984).
- [48] H.H. Coenen, B. Klatte, A. Knöchel, M. Schüller, G. Stöcklin: Preparation of N.c.a. [17-¹⁸F]-Fluorohaptadecanoic Acid in High Yields via Aminopolyether Supported, Nucleophilic Fluorination. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **23**, 455 (1986).
- [49] D. Block, B. Klatte, R. Beckmann, U. Holm: N.c.a. [¹⁸F]-Labelling of Aliphatic Compounds in High Yields via Aminopolyether - Supported Nucleophilic Substitution: *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **23**, 467 (1986).
- [50] K. Hamacher, B. Nebeling, H.H. Coenen, G. Stöcklin: [¹⁸F]N-Methylspiperone: Direct n.c.a. Nucleophilic ¹⁸F-Fluorination of N-Methyl-4-nitrospiperone for Remote Controlled Production of n.c.a. [¹⁸F]MSP. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **30**, 353 (1991).
- [51] K. Hamacher, H.H. Coenen, G. Stöcklin: N.c.a. Radiofluorination of Spiperone and N-Methylspiperone via Aminopolyether Supported Direct Nucleophilic Substitution. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **23**, 1047 (1986).
- [52] K. Hamacher, W. Hamkens. Remote Controlled One-step Production of ¹⁸F-Labelled Butyrophenone Neuroleptics Exemplified by the Synthesis of N.c.a. [¹⁸F]N-Methylspiperone. *Appl. Radiat. Isot.* **46**, 911 (1995).
- [53] S.M. Moerlein, J.S. Perlmutter, W.R. Banks, D. Parkinson: Synthesis and Evaluation of Fluorine-18 Labelled Benzodiazepine Antagonists as PET Tracers. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **32**, 272 (1993).
- [54] D. Block, H.H. Coenen, G. Stöcklin: The N.c.a. Nucleophilic ¹⁸F-Fluorination of 1,N-disubstituted Alkanes as Fluoroalkylation Agents. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **24**, 1029 (1987).
- [55] H.H. Coenen: No-carrier-added ¹⁸F-Chemistry of Radiopharmaceuticals. in: Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds. T.A. Batille, J.R. Jones (eds.). Elsevier Publishers, Amsterdam, 443 (1989).
- [56] K. Hamacher, H.H. Coenen, G. Stöcklin: Efficient Stereospecific Synthesis of No-carrier-added 2-[¹⁸F]Fluor-2-deoxy-D-glucose Using Aminopolyether Supported Nucleophilic Substitution. *J. Nucl. Med.* **27**, 235 (1986).
- [57] K. Hamacher: Synthesis of n.c.a. cis- and trans-4-[¹⁸F]Fluoro-L-proline, Radiotracers for PET-Investigation of Disordered Matrix Protein Synthesis. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **42**, 1135 (1999).
- [58] J.R. Beck: Nucleophilic Displacement of Aromatic Nitro Groups. *Tetrahedron* **34**, 2057 (1978).
- [59] M.S. Haka, M. R. Kilbourn, G.L. Watkins: Aryl Trimethylammoniumtrifluoromethanesulfonates as Precursors to Aryl [¹⁸F]Fluorides. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **26**, 17 (1989).

- [60] R. Gail, H.H. Coenen: A One Step Preparation of the N.c.a. Fluorine-18 Labelled Synthons: 4-Fluorobromobenzene and 4-Fluoroiodobenzene. *Appl. Radioat. Isot.* **45**, 105 (1993).
- [61] J. Ermert, R. Gail, H.H. Coenen: Halogen Activation of the Aromatic Ring. A New Approach for the Synthesis of 2- and 3-[^{18}F]Fluoroalkylarenes?. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **37**, 581 (1995).
- [62] R. Gail, C. Hocke, H.H. Coenen: Diphenyliodonium Salts as Precursor for Direct N.c.a. F-18-Fluorination of Halo- and Alkyl-Substituted Arenes. *J. Nucl. Med.* **38**, 43P (1997).
- [63] W.R. Banks, M.R. Satter, D.-R. Hwang: A New Method for the N.c.a. Production of [^{18}F]Fluoromethane. *Appl. Radiat. Isot.* **45**, 69 (1994).
- [64] H.H. Coenen: New Radiohalogenation Methods: An Overview. in: Progress in Radiopharmacy. Cox P.H. (Ed.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster, 196 (1986).
- [65] A. Plenevaux, C. Lemaire, A.J. Palmer, P. Damhaut, D. Comar: Synthesis of Non-activated ^{18}F -Fluorinated Aromatic Compounds through Nucleophilic Substitution and Decarboxylation Reaction. *Appl. Radiat. Isot.* **43**, 1035 (1992).
- [66] F. Sobrio, M. Amokhtari, F. Gourand, M. Dhilly, F. Dauphin, L. Barré: Radiosynthesis of [^{18}F]Lu29-024: A Potential PET Ligand for Brain Imaging of the Serotonergic 5-HT₂ Receptor. *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 2511 (2000).
- [67] V.W. Pike, F.I. Aigbirhio: Reactions of [^{18}F]Fluoride with Aryliodonium Salts - A Novel Route to No-carrier-added Aryl[^{18}F]Fluorides. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **37**, 120 (1995).
- [68] C. Hocke, R. Gail, H.H. Coenen: Direct N.c.a. ^{18}F -Fluorination of Halo- and Alkylarenes via Corresponding diphenyliodonium Salts. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **40**, 50 (1997).
- [69] A. Shah, D.A. Widdowson, V.W. Pike: The Synthesis of [^{18}F]Fluorarenes from Reaction of Cyclotron-produced [^{18}F]Fluoride Ion with Diaryliodonium Salts. *J. Chem. Soc., perkin Trans. 1*, 2043 (1998).
- [70] T. Laue, A. Plagens: Namen- und Schlagwort-Reaktionen der Organischen Chemie. B.G. Teubner, Stuttgart (1998).
- [71] A.J. Palmer, J.C. Clark, R.W. Goulding: The Preparation of Fluorine-18 Labelled Radiopharmaceuticals. *Int. Appl. Radiat. Isot.* **28**, 53 (1977).
- [72] T. Guddat, W. Herdering, A. Knöchel, H. Salehi, O. Zwernemann: N.c.a. Labelling of Aromatic Compounds with ^{18}F . *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **26**, 5 (1989).
- [73] D. Block, H.H. Coenen, G. Stöcklin: N.c.a. ^{18}F -Fluoroalkylation of H-Acidic Compounds. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **25**, 201 (1988).
- [74] M.R. Kilbourn, C.S. Dence, M.J. Welch, C.J. Mathias: Fluorine-18 labelling of Proteins:

- J. Nucl. Med.* **28**, 462 (1987).
- [75] D. Block, H.H. Coenen, G. Stöcklin: ^{18}F -Fluoroacylation via Fluorocarboxylic Acid Esters. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **25**, 185 (1988).
- [76] S. Guhlke, H.H. Coenen, G. Stöcklin: ^{18}F Fluoroacetic Acid and $[2\text{-}^{18}\text{F}]$ Fluoropropionic Acid Derivatives as Reactive Fluoroacylation Agents. *J. Label. Compds. Radiopharm.* **32**, 108, (1993).
- [77] S. Guhlke: Zur trägerarmen Radiofluorierung von Peptiden und Proteinen über prosthetische Gruppen. Dissertation, Universität zu Köln (1995).
- [78] R. Gail, H.H. Coenen, G. Stöcklin: ^{18}F -Fluoroarylation by $4\text{-}[^{18}\text{F}]$ Fluorophenyllithium via $4\text{-}[^{18}\text{F}]$ Fluorohalobenzenes. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **35**, 197 (1994).
- [79] Th. Ludwig, R. Gail, J. Ermert, H.H. Coenen: New Ways to N.c.a. Radiofluorinated Aromatic Compounds. in: Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds. U. Pleiss, R. Voges (Eds.) Vol. 7, John Wiley & Sons, Chichester, 358 (2001).
- [80] Th. Ludwig: Zur n.c.a. ^{18}F -Fluorarylierung über metallorganische Zwischenstufen ausgehend von para- ^{18}F Fluorhalobenzolen. Diplomarbeit, Universität zu Köln (1997).
- [81] Th. Ludwig, Ermert, H.H. Coenen: Synthesis of the Dopamine- D_4 Receptor Ligand $3\text{-}(4\text{-}[^{18}\text{F}]$ Fluorophenoxy)propyl)-(2-(4-tolylphenoxy)ethyl)amine via optimized n.c.a. $4\text{-}[^{18}\text{F}]$ Fluorophenol. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **44**, Suppl. 1, S1 (2001).
- [82] S. Comagic, M. Piel, R. Schirmacher, S. Höhnemann, F. Rösch: Efficient Synthesis of 2-Bromo-1- ^{18}F fluoroethane and its Application in the Automated Preparation of ^{18}F -Fluoroethylated Radiopharmaceuticals. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **44**, Suppl. 1, S874 (2001).
- [83] H.H. Coenen, P. Laufer, G. Stöcklin, K. Wienhard, G. Pawlik, H.G. Böcker-Schwarz, W.D. Heiss: 3-N-(2'- ^{18}F fluoroethyl)piperone: A Novel Ligand for Cerebral Dopamine Receptor Studies with PET. *Life Sci.* **40**, 81 (1987).
- [84] S.M. Moerlein, J.S. Perlmutter: Central Serotonergic S_2 Binding in Papio Anubis Measured in vivo with N- ω - ^{18}F Fluoroethylketanserin and PET. *Neurosci. Lett.* **123**, 23 (1991).
- [85] A.A. Wilson, J.N. DaSilva, S. Houle: Synthesis of Two Radiofluorinated Cocaine Analogues Using Distilled 2- ^{18}F Fluoroethyl Bromide. *Appl. Radiat. Isot.* **46**, 765 (1995).
- [86] H.-J. Wester, C. Dittmar, M. Herz, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Schwaiger, G. Stöcklin: Synthesis and Biological Evaluation of O-(2- ^{18}F Fluoroethyl)-(L)-tyrosine (FET): A Potential PET Tracer for Amino Acid Transport. *J. Nucl. Med.* **38**, 175P (1997).
- [87] K. Hamacher, H.H. Coenen: Convenient Synthesis of N.C.A. O-(2- ^{18}F fluoroethyl)-L-

- tyrosine. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **44**, Suppl. 1, S855 (2001).
- [88] M. Tada, R. Iwata, H. Sugiyama, K. Sato, T. Ido: An Efficient Synthesis of [Fluoroacetyl-¹⁸F]fluoromelatonin and N-ω-[¹⁸F]Fluoroacetylserotonin. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **35**, 150 (1994).
- [89] M. Tada, R. Iwata, H. Sugiyama, K. Sato, H. Fukuda, K. Kubota, T. Fujiwara, H. Takahashi, A. Wakui, T. Ido: An Efficient Synthesis of N-ω-[¹⁸F]Fluoroacetylserotonin (N-ω-[¹⁸F]Fluoroacetyl-5-hydroxytryptamine). *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **34**, 741 (1994).
- [90] S. Guhlke, H.H. Coenen, G. Stöcklin: ¹⁸F-Fluoroacylated Biotin for Fast Localisation of Tumors with PET. *J. Nucl. Med.* **32**, 1009 (1991).
- [91] S. Guhlke, H.-J. Wester, C. Bruns, G. Stöcklin: (2-[¹⁸F]Fluoropropionyl-(D)phe¹)-octreotide, A Potential Radiopharmaceutical for Quantitative Somatostatin Receptor Imaging with PET: Synthesis, Radiolabelling, In-vitro-validation and Biodistribution in Mice. *Nucl. Med. Biol.* **21**, 819 (1994).
- [92] M. Jelinski, K. Hamacher, H.H. Coenen: C-Terminal ¹⁸F-Fluoroethylamidation exemplified on [Gly-OH⁹]oxytocin. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **45**, 217 (2002).
- [93] C.-Y. Shiue, A.P. Wolf, J.F. Hainfeld: Synthesis of ¹⁸F-Labelled N-(p-[¹⁸F]Fluorophenyl)maleimide and Its Derivatives for Labelling Monoclonal Antibody with ¹⁸F. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **26**, 287 (1988).
- [94] P.K. Garg, S. Garg, M.R. Zalutsky: Fluorine-18 Labelling of Monoclonal Antibodies and Fragments with Preservation of Immunoreactivity: *Bioconjugate Chem.* **2**, 44 (1991).
- [95] S.M. Okarvi: Recent Progress in Fluorine-18 Labelled Peptide Radiopharmaceuticals. *Eur. J. Nucl. Med.* **28**, 929 (2001).
- [96] L. Miller: Synthetic Peptides Come of Age. *J. Nucl. Med.* **34**, 15N (1993).
- [97] D. Hebel, K.L. Kirk, L.A. Cohen, V.M. Labroo: First Direct Fluorination of Tyrosine Containing Biologically Active Peptides. *Tetrahedron Lett.* **31**, 619 (1990).
- [98] Y. Shai, K.L. Kirk, M.A. Channing, B.B. Dunn, M.A. Lesniak, R.C. Eastman, R.D. Finn, J. Roth, K.A. Jacobson: ¹⁸F-Labelled Insulin: A Prosthetic Group Methodology for Incorporation of a Positron Emitter into Peptides and Proteins. *Biochem.* **28**, 4801 (1989).
- [99] D.R. Turton, F. Brady, V.W. Pike, A.P. Selwyn, M.J. Shea, R.A. Wilson, C.M. DeLandsheere: Preparation of Human Serum [Methyl-¹¹C]methylalbumin Microspheres and Human Serum [Methyl-¹¹C]methylalbumin for Clinical Use. *J. Appl. Radiat. Isot.* **35**, 337 (1984).
- [100] C.M. Müller-Platz, G. Kloster, G. Legler, G. Stöcklin: [¹⁸F]Fluoroacetate: An Agent for Introducing No-carrier-added Fluorine-18 into Urokinase without Loss of Biological

- Activity. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **19**, 1645 (1982).
- [101] M.R. Zalutsky, P.K. Garg, S.H. Johnson, H. Utsunomiya, R.E. Coleman: Fluorine-18-Antimyosin Monoclonal Antibody Fragments: Preliminary Investigations in a Canine Myocardial Infarct Model. *J. Nucl. Med.* **33**, 575 (1992).
- [102] R.L. Page, P.K. Garg, S. Garg, G.E. Archer, Ø.S. Bruland, M.R. Zalutsky: PET Imaging of Osteosarcoma in Dogs Using a Fluorine-18-labelled Monoclonal Antibody Fab Fragment. *J. Nucl. Med.* **35**, 1506 (1994).
- [103] G. Vaidyanathan, M.R. Zalutsky: Labelling Proteins with Fluorine-18 Using *N*-Succinimidyl 4- ^{18}F Fluorobenzoate. *Nucl. Med. Biol.* **19**, 275 (1992).
- [104] H.-J. Wester, K. Hamacher, G. Stöcklin: A Comparative Study of N.c.a. Fluorine-18 Labelling of Proteins via Acylation and Photochemical Conjugation. *Nucl. Med. Biol.* **23**, 365 (1996).
- [105] L. Lang, W.C. Eckelman: Labelling Proteins at High Specific Activity Using *N*-Succinimidyl 4-(fluoromethyl)benzoate. *Appl. Radiat. Isot.* **48**, 169 (1997).
- [106] S. Guhlke, H.H. Coenen, G. Stöcklin: Fluoroacylation Agents based on Small N.c.a. ^{18}F Fluorocarboxylic Acids. *Appl. Radiat. Isot.* **45**, 715 (1994).
- [107] S. Guhlke, H.-J. Wester, H.J. Biersack, G. Stöcklin: Simplified Synthesis of N.c.a. ^{18}F Fluoroacylation Agents via 2- ^{18}F Fluoropropionic Acid Chloride in View of Remote Controlled Labelling of Peptides and Proteins. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **35**, 194 (1994).
- [108] H.-J. Wester, S. Guhlke, G. Stöcklin: Regioselective ^{18}F Fluoropropionylation of Peptides and Proteins in Aqueous Solution. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **35**, 297 (1994).
- [109] L.W. Herman, A.J. Fischman, R.G. Tompkins, R.N. Hanson, C. Byon, H.W. Strauss, D.R. Elmaleh: The Use of Pentafluorophenyl Derivatives for the ^{18}F Labelling of Proteins. *Nucl. Med. Biol.* **21**, 1005 (1994).
- [110] J.L. Sutcliffe-Goulden, M.J. O'Doherty, S.S. Bansal: Solid Phase Synthesis of ^{18}F -Labelled Peptides for Positron Emission Tomography. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 1501 (2000).
- [111] J.T. Patt, M. Patt: ^{18}F -Labeled Diazonium Cation: A Possible Precursor for Radiolabeling of Peptides. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **44**, Suppl. 1, S154 (2001).
- [112] J.T. Patt, M. Patt: ^{18}F Fluorophenylcysteinconjugate und Derivate: Radiomarkierung und erste biologische Ergebnisse. *Abstractband der 40. Jahrestagung der DGN in Freiburg*, 57 (2002).
- [113] H.-J. Wester, K. Hamacher, S. Guhlke, G. Stöcklin: Simple and Fast ^{18}F -Labelling of Proteins by Coupling with Photogenerated ^{18}F Arylnitrene. *J. Nucl. Med.* **35**, 73P (1994).

- [114] L. Lang, W.C. Eckelman: One-step Synthesis of ^{18}F labelled [^{18}F]-*N*-Succinimidyl 4-(fluoromethyl)benzoate for Protein Labelling. *Appl. Radiat. Isot.* **45**, 1155 (1994).
- [115] G. Vaidyanathan, M.R. Zalutsky: Improved Synthesis of *N*-Succinimidyl 4-[^{18}F]Fluorobenzoate and its Application to the Labelling of a Monoclonal Antibody Fragment. *Bioconjugate Chem.* **5**, 352 (1994).
- [116] E.D. Hostetler, W.B. Edwards, C.J. Anderson, M. J. Welch: Synthesis of 4-[^{18}F]Fluorobenzoyl Octreotide and Biodistribution in Tumour-bearing Lewis Rats. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **42**, S720 (1999).
- [117] C. Gilissen, G. Bormans, T. de Groot, A. Verbruggen: Synthesis of *N*-(2-[^{18}F]fluoroethyl)-*N'*-methylthiourea: a Hydrogen Peroxide Scavenger. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **41**, 491 (1998).
- [118] H.-D. Jakubke, H. Jeschkeit: Aminosäuren, Peptide, Proteine. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel (1982).
- [119] B. Peterkofsky, S. Udenfriend: *J. Biol. Chem.* **238**, 3966 (1963).
- [120] K. Hamacher, M. Herz, R. Truckenbrodt, G. Stöcklin, M. Schwaiger, R. Senekowitsch-Schmidtke: 4-[F-18]Fluoroproline: A Potential Tracer for Collagen Synthesis. Radiosynthesis and Biological Evaluation. *J. Nucl. Med.* **37**, 41P (1996).
- [121] R. Zimmer, M. Webel, H.-U. Reißig: Nonafluoro-1-butanefluoride: More than a Fluorinating Reagent. *J. prakt. Chem.* **340**, 274 (1998).
- [122] V. Beyl, H. Niederprüm: Eine neue Reaktion von Perfluoralkylsulfonylfluoriden. *Liebigs Ann. Chem.* **731**, 58 (1970).
- [123] H.N. Huang, H.W. Roesky, R. Lagow: Novel Synthesis of Unusual Classes of Fluorocarbon Organosulfur Compounds using Elemental Fluorine as a Reagent. *Inorg. Chem.* **30**, 789 (1991).
- [124] T. Umemoto, A. Ando: Synthesis and Reactivity of *N*-Trifluoromethyl-*N*-nitrosotrifluoromethanesulfonamide as a New Type of Trifluoromethylating Agent. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **59**, 447 (1986).
- [125] M. Hanack, J. Ullmann: Facile Synthesis of Trifluoro- and Hexafluoroisopropyl Halides. *J. Org. Chem.* **54**, 1432 (1989).
- [126] M. Frasch, W. Sundermeyer, J. Waldi: . CB 125, 1763 (1992).
- [127] A. Cleve, K.-H. Fritzemaier, N. Heinrich, U. Klar, A. Müller-Fahrnow, G. Neef, E. Ottow, W. Schwede: 11 β -Aryl Steroids in the Androstene Series. The Role of the 11 β -Region in Steroid Progesterone Receptor Interaction. *Tetrahedron* **52**, 1529 (1996).
- [128] L.R. Subramanian, M. Hanack: Kinetik und Solvolyse von Nonafluorbutansulfonaten ("Nonaflate"). *Chemische Berichte* **105**, 1465 (1972).

- [129] P.J. DeChristopher, J.P. Adamek, G.D. Lyon, S.A. Klein, R.J. Baumgarten: Simple Deaminations. V. Preparation and Some Properties of *N*-Alkyl-*N,N*-disulfonimides. *J. Org. Chem.* **39**, 3525 (1974).
- [130] V.A. Petrov, E.T. Mlsna, D.D. Des Marteau: *J. Fluorine Chem.* **68**, 277 (1994).
- [131] H.W. Roesky. *Inorg. Nucl. Chem. Lett.* **6**, 807 (1970).
- [132] L.R. Subramanian, A.G. Martinez. M. Hanack: Nonafluorobutanesulfonyl Fluoride in: Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis. L.A. Paquette (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, Vol.6, 3780 (1995).
- [133] B. Bennua-Skalmowski, H. Vorbrüggen: A Facile Conversion of Primary or Sekundary Alcohols with *n*-Perfluorobutanesulfonyl Fluoride/1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene into their Corresponding Fluorides. *Tetrahedron Lett.* **36**, 2611 (1995).
- [134] J.T. Welch, S. Eswarakrishnan: Fluorine in Bioorganic Chemistry. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore (1991).
- [135] T. Albayrak: Untersuchungen von Sulfonimiden als neuartige Abgangsgruppen zur n.c.a. ¹⁸F-Markierung aliphatischer und aromatischer Verbindungen. Diplomarbeit, Universität zu Köln (1997).
- [136] Th. Hirschfelder: Persönliche Mitteilung
- [137] L. Demange, A. Ménez, C. Dugave: Practical Synthesis of Boc and Fmoc Protected 4-Fluoro and 4-Difluoroproline from *Trans*-4-Hydroxyproline. *Tetrahedron Lett.* **39**, 1169 (1998).
- [138] A.A. Gottlieb, Y. Fujita, S. Udenfriend B. Witkop: Incorporation of *Cis*- and *trans*-4-Fluoro-L-prolines into Proteins and Hydroxylation of the Isomer During Collagen Biosynthesis. *Biochemistry* **4**, 2507 (1965).
- [139] Persönliche Mitteilung
- [140] K. Hamacher, H.H. Coenen, G. Stöcklin: Stereospecific Synthesis of N.c.a. 2-[¹⁸F]Fluoro-2-Deoxy-D-Mannose and 2-[¹⁸F]Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose and the Influence of Added Carrier (KF) on FDG-Synthesis. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **23**, 1095 (1986).
- [141] G.B. Fields, R.L. Noble: Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* **35**, 161 (1990).
- [142] E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger, P.I. Cook: Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **34**, 595 (1970).
- [143] S.M. Qaim, G. Blessing, G. Stöcklin: in: Proceedings of the 2nd Workshop on Targetry and Target Chemistry. Routinely used Cyclotron Targets for Radioisotope Production at KFA Jülich. T.J. Ruth, S.A. McQuarrie, F. Helus, Heidelberg, 50 (1987).

Abkürzungsverzeichnis:

A _s	spezifische Aktivität
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat
Bq	Bequerel (s ⁻¹)
Ci	Curie (3,7 · 10 ¹⁰ Bq)
DAST	Diethylamino-schwefeltrifluorid
DBU	1,8-Diaza-bicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCH	N,N'-Dicyclohexylharnstoff
DIPEA	N-Ethyl-diisopropylamin
DMAA	N,N-Dimethylacetamid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EOB	end of bombardment (Bestrahlungsende)
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hyp	4- <i>trans</i> -Hydroxyprolin
n.c.a.	no-carrier-added (ohne Trägerzusatz)
PET	Positronen-Emissionstomographie
RCA	Radiochemische Ausbeute
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
SPET	Single Photon Emission Tomography (Einzelphotonenemissionstomographie)
TBTU	o-(Benzotriazo-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
tBu	<i>tert</i> -Butyl
Ts	p-Toluolsulfonyl
TsO	p-Toluolsulfonyloxy
(v/v)	Volumenanteile

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. H. Coenen möchte ich für die interessante Themenstellung, die Betreuung der Arbeit, die Möglichkeit zum freien und selbstständigen Arbeiten und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen herzlich danken.

Herrn Dr. K. Hamacher gilt für die fachkundige Begleitung dieser Arbeit, zahlreichen Diskussionen und wertvollen Hilfestellungen mein besonderer Dank.

Für die ständige Diskussionsbereitschaft und die entspannenden Gespräche geht ein großes Dankeschön an Herrn Dipl. Chem. T. Blum, Herrn Dipl. Chem. M. Breidenbach, Herrn Dr. C. Dittmar, Herrn Dr. J. Ermert, Frau Dr. E. Heß, Herrn K. Hilgers, Herrn Dipl. Chem. T. Hirschfelder, Herrn Dr. C. Hocke, Herrn Dr. A. Hohn, Frau Dipl. Chem. K. Kettern, Frau Dr. B. Krebs, Herrn Dr. T. Ludwig, Herrn Dr. E. Mennicke, Herrn Dr. O. Prante, Herrn T. Ross, Herrn I. Spahn und Herrn Dipl. Chem. T. Stoll.

Für die Aufnahme zahlreicher NMR- und Massenspektren danke ich Herrn Dr. M. Holschbach, Herrn W. Wutz, Herrn Dr. D. Bier und Herrn S. Mahbubfar.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. M. Schäfer in der Abteilung für Massenspektrometrie am Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln für die Aufnahme der hochauflösenden Massenspektren.

Für die Routineproduktion des Fluor-18 möchte ich der Betriebsgruppe des Babyzyklotrons des Instituts für Nuklearchemie der Forschungszentrum Jülich GmbH danken.

Mein genereller Dank gilt allen Mitarbeitern am Institut für Nuklearchemie der Forschungszentrum Jülich GmbH für ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und das sehr angenehme Arbeitsklima.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und Harald bedanken, die mich nach Kräften während meines gesamten Studiums unterstützt haben.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4008
Oktober 2002
ISSN 0944-2952