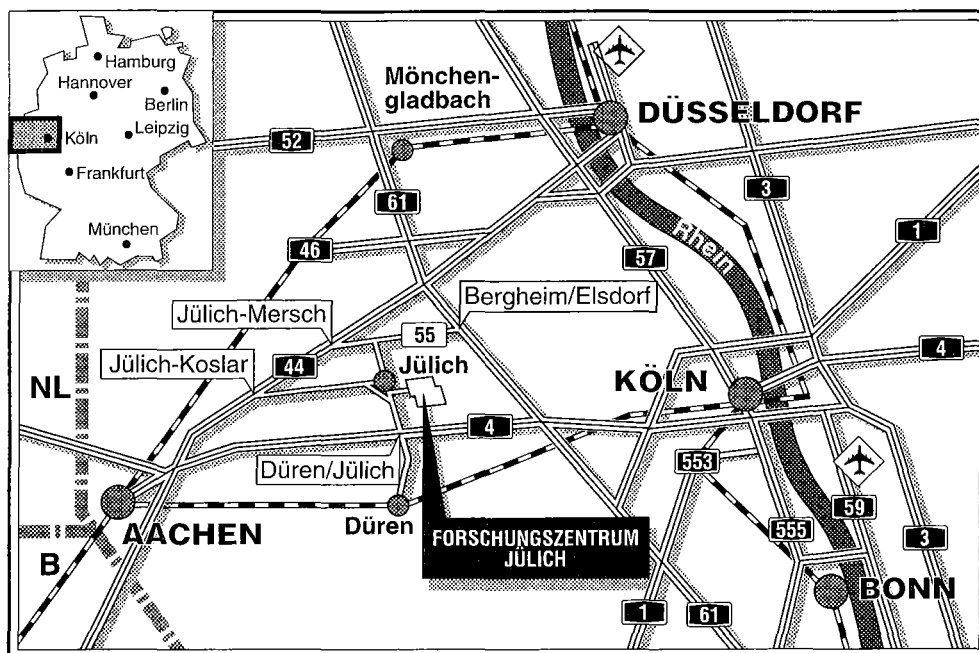


Institut für Nuklearchemie

**Zur praktisch trägerfreien ^{18}F -
Fluorierung von Proteinen,
Peptiden und Tyrosin**

Hans-Jürgen Wester



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3206

ISSN 0944-2952

Institut für Nuklearchemie Jül-3206

D 38 (Diss. Universität Köln)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon: 02461/61-61 02 · Telefax: 02461/61-61 03 · Telex: 833 556-70 kfa d

Zur praktisch trägerfreien ^{18}F - Fluorierung von Proteinen, Peptiden und Tyrosin

Hans-Jürgen Wester

Abstract

Radiolabeled amino acids, biospecific peptides and proteins, including monoclonal antibodies and their fragments are widely used as imaging and therapeutic agents, particularly for tumor targeting. To take advantage of the nearly ideal nuclidic properties of fluorine-18 ($T_{1/2} = 110$ min, $E_{\beta^+} = 635$ keV) for non-invasive diagnostic imaging with positron emission tomography (PET), suitable ^{18}F -fluorination procedures via prosthetic group labeling and subsequent conjugation for the above mentioned classes of compounds were investigated and compared with respect to synthesis time, radiochemical yield (RCY), suitability for automation, in vivo stability and preservation of the biological activity of the labeled biomolecules.

For the ^{18}F -fluorination of proteins, such as transferrin, human serum albumin, avidin and various immunoglobulins three methods were investigated, i.e. classical acylation using N-succinimidyl 4- ^{18}F fluorobenzoate (^{18}F SFB), nitrophenyl 2- ^{18}F fluoropropionate (^{18}F NPFP) and a photochemical conjugation using 4-azidophenacyl ^{18}F fluoride (^{18}F APF). For this purpose, ^{18}F SFB and ^{18}F NPFP were synthesized in three steps, the latter compound via an improved method using O-(N-succinimidyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate as activating agent (35 min, 50% RCY). Preparation of ^{18}F APF via fluorine-for-bromine exchange on 4-azidophenacyl bromide was achieved within 15 min with a RCY of up to 70%.

Compared to ^{18}F APF, protein labeling with ^{18}F NPFP and ^{18}F SFB gave rise to considerably higher RCY of up to 90%. The conjugation yields using ^{18}F NPFP in the presence of 1-hydroxy benzotriazole depend on the relative lysine, tyrosine and histidine content of the proteins used, whereas photochemical conjugation with ^{18}F APF, as well as acylation with ^{18}F SFB, predominantly depend on the lysine content. Due to competing O-acylation of tyrosine residues, ^{18}F fluoropropionylated human serum albumin was partially unstable even under slightly basic conditions. Biodistribution studies with ^{18}F -labeled human serum albumin in NMRI mice revealed the highest in vivo stability for the ^{18}F SFB conjugate. Subsequently, the applicability of these methods to smaller bioactive peptides was demonstrated. Thus, ^{18}F fluoropropionyl-octreotide, a somatostatin receptor ligand, and ^{18}F fluorobenzoyl-apamin, a selective blocker of calcium dependent potassium channels, were prepared with RCY of up to 70% (based on the acylation agent). In addition, both compounds were biologically evaluated. Whereas the binding of the fluorinated octreotide to somatostatin receptors in pancreas, pituitary and adrenals of NMRI mice could be blocked by pretreatment with unlabeled octreotide, lack of displacement at later times indicated internalization of the radioligand.

As a potential tracer for the cerebral amino acid transport system, O-(2- ^{18}F fluoroethyl)tyrosine was prepared by O-(2- ^{18}F fluoroethylation of fully protected tyrosine and unprotected tyrosine using 2- ^{18}F fluoroethyltosylat with RCY of 35-39%. The tracer showed high and continuous uptake in mice brain reaching 2.5% injected dose/g at 60 minutes and exhibited high in vivo stability.

1.	Einleitung	1
1.1	Radionuklide in den Naturwissenschaften	1
1.2	Kurzlebige Positronenstrahler in der Nuklermedizin und Pharmakologie	1
1.3	Produktion von ^{18}F -Fluor	7
1.4	Grundlegende Verfahren zur ^{18}F -Fluorierung organischer Moleküle	8
1.4.1	Elektrophile Fluorierungen	9
1.4.2	Nukleophile Fluorierungen	10
1.5	Synthesestrategien zur Darstellung ^{18}F -fluorierter Aminosäuren, Peptide und Proteine	13
1.5.1	^{18}F -fluorierte Aminosäuren	14
1.5.2	^{18}F -fluorierte Peptide und Proteine	16
2.	Problemstellung	22
3.	Ergebnisse und Diskussion	24
3.1	Zur spezifischen Aktivität radioaktiv markierter Polypeptide und Proteine	24
3.2	Zur Radiofluorierung von Proteinen via ^{18}F -markierter prosthetischer Gruppen	30
3.2.1	Überlegungen zur Synthesestrategie	30
3.2.2	Zur ^{18}F -Fluoracylierung von Proteinen	32
3.2.2.1	Darstellung von 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester	32
3.2.2.1.1	Einfluß des Lösungsmittels auf die Zersetzung des Triflat-Salzes von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester	34
3.2.2.1.2	Abhängigkeit der ^{18}F -Fluorierung des Triflat-Salzes von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester von der Carbonat- und Oxalat-Konzentration	35
3.2.2.1.3	Darstellung 'aktivierter' 4- ^{18}F Fluorbenzoesäureester	38
3.2.2.2	Proteinkonjugation via ^{18}F -Fluoracylierung	43
3.2.3.	Zur ^{18}F -Fluorierung von Proteinen durch photochemische Konjugation	51
3.2.3.1	Strategie der photoinduzierten ^{18}F -Markierung von Proteinen	51
3.2.3.2	Darstellung von 4-Azidophenacyl- ^{18}F fluorid	53
3.2.3.2.1	Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von ^{18}F APF als Funktion der Reaktionszeit	54
3.2.3.2.2	Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von ^{18}F APF als Funktion der Eduktkonzentration	55
3.2.3.2.3	Zur Reinigung und Isolierung von ^{18}F APF	55

3.2.3.3	Photolyse von [^{18}F]APF	57
3.2.3.4	^{18}F -Photomarkierung von Proteinen	58
3.2.3.4.1	Abhängigkeit der photochemischen Konjugationsausbeute von ^{18}F -HSA als Funktion des pH-Wertes	58
3.2.3.4.2	^{18}F -Markierung von Transferrin, Avidin und einem monoclonalen Antikörper	60
3.2.4	Vergleichende Bewertung der ^{18}F -Markierungen von Proteinen durch ^{18}F -Acylierung und photochemische Konjugation	62
3.2.5	Optimierung der chromatographischen Reinigung markierter Proteine	64
3.2.6	Unspezifische Markierung, biologische Aktivität und in-vivo Stabilität	65
3.3	^{18}F -Fluoracylierung von Peptiden	68
3.3.1	Darstellung von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe ¹)-(SMS 201-995)	68
3.3.1.1	Strategie zur Darstellung eines ^{18}F -markierten SMS 201-995 Analogons	68
3.3.1.2	^{18}F -Fluoracylierung von (ϵ -Boc-Lys ⁵)-(SMS 201-995)	71
3.3.1.3	Abspaltung der Schutzgruppe von [(2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe ¹)-(ϵ -Boc-Lys ⁵)]-(SMS 201-995)	77
3.3.1.4	Einfluß der Lipophilie und Nettoladung von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe ¹)-(SMS 201-995) und anderer SMS 201-995-Analoga auf ihre Rezeptoraffinität	80
3.3.2	Zur Radiohalogenierung von Apamin	86
3.3.2.1	Strategie zur Darstellung radiohalogenierter Apaminderivate	86
3.3.2.2	Darstellung von [N^ϵ -(4-[^{18}F]Fluorbenzoyl)Lys ⁴]-Apamin und [N^ϵ -(3-(3-[^{131}I]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl)Lys ⁴]-Apamin	88
3.4	Synthese von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin	91
3.4.1	Strategie zur Darstellung einer aromatischen ^{18}F -markierten Aminosäure als potentieller Tracer zur Messung des Aminosäuretransportes im Hirn	91
3.4.2	O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin via ^{18}F -Alkylierung von BOC-TyrOMe und anschließende Abspaltung der Schutzgruppen	93
3.4.3	O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin via ^{18}F -Alkylierung von L-Tyrosin	96
3.4.4	Radiopharmakologische Untersuchungen mit O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin	99
3.4.4.1	Bestimmung der Lipophilie von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin und deren Vergleich mit anderen radiomarkierten Aminosäuren	99
3.4.4.2	Bestimmung der proteingebundenen ^{18}F -Aktivität im Hirn	100
3.4.4.3	Bestimmung der metabolischen Stabilität von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin	101

4.	Experimentelles	103
4.1	Chemikalien und Geräte	103
4.2	Darstellung der inaktiven Ausgangs- und Referenzverbindungen	103
4.3	Radiosynthesen	109
4.3.1	Produktion von n.c.a. [^{18}F]Fluorid	109
4.3.2	Allgemeine Vorschrift zur azeotropen Trocknung von [^{18}F]Fluorid	110
4.3.3	Synthese von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester	111
4.3.4	Synthese von 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester	112
4.3.5	Allgemeine Methode zur ^{18}F -Fluoracylierung von Proteinen	112
4.3.6	Synthese von 4-Azidophenacyl-[^{18}F]fluorid	113
4.3.7	^{18}F -Markierung von Proteinen durch Photochemische Konjugation	113
4.3.8	Synthese von 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat	113
4.3.9	Synthese von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin via ^{18}F -Fluorethylierung von N-Boc-TyrOMe	114
4.3.10	Synthese von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin via ^{18}F -Fluorethylierung von L-Tyrosin	114
4.3.11	Synthese von (2-[^{18}F]Fluoropropionyl-(D)Phe ¹)-(SMS 201-995)	114
4.3.12	Synthese von [N ^ε -(4-[^{18}F]Fluorbenzoyl)Lys ⁴]-Apamin	115
4.3.13	Synthese von 3-(3-[^{131}I]Iod-4-methoxyphenyl)propionsäure-N-succinimidylester	115
4.3.14	Synthese von [N ^ε -(3-(3-[^{131}I]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl)Lys ⁴]-Apamin	116
4.4	Reinigung der Immunglobuline mittels Ultrafiltration und Dialyse sowie Bestimmung der Proteinkonzentration	116
4.5	Bestimmung der biologischen Aktivität eines ^{131}I -markierten Anti-HSA-IgG _E mittels Immunpräzipitation	117
4.6	HPLC und Radio-HPLC	118
4.7	Radiopharmakologische Untersuchungen	119
4.7.1	Bestimmung der metabolischen Stabilität in Blut, Hirn, Leber, Nieren, Tumor und Urin.	119
4.7.2	Quantifizierung des Einbaus von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin in zerebrale Proteine	119

4.7.3	Bestimmung des Lipophilie von O-(2-[¹⁸ F]Fluorethyl)-L-tyrosin und (2-[¹⁸ F]Fluorpropionyl-(D)Phe ¹)-(SMS 201-995)	120
4.7.4	Bestimmung der spezifischen Aktivität einiger untersuchter Tracer	120
5.	Zusammenfassung	123
6.	Anhang	127
6.1	In-vivo Studien mit (2-[¹⁸ F]Fluorpropionyl-(D)Phe ¹)-(SMS 201-995)	127
6.1.1	Bestimmung der Biodistribution von (2-[¹⁸ F]Fluorpropionyl-(D)Phe ¹)-(SMS 201-995) in NMRI-Mäusen	127
6.1.2	Bestimmung der Biodistribution und Pharmakokinetik von (2-[¹⁸ F]Fluorpropionyl-(D)Phe ¹)-(SMS 201-995) in Kontrollratten und tumortragenden Ratten	130
6.1.3	Blockade- und Verdrängungs-Studien mit (2-[¹⁸ F]Fluorpropionyl-(D)Phe ¹)-(SMS 201-995)	131
6.1.4	Bestimmung der Pharmakokinetik von (2-[¹⁸ F]Fluorpropionyl-(D)Phe ¹)-(SMS 201-995) Ratten mittels quantitativer Messungen am Positronenemissionstomographen	134
6.1.5	Bestimmung der metabolischen Stabilität von 2-[¹⁸ F]Fluorpropionyl-(D)Phe ¹ -(SMS 201-995)	135
6.1.6	Vergleich der biologischen Aktivität und Rezeptoraffinität von (2-[¹⁹ F]Fluorpropionyl-(D)Phe ¹)-(SMS 201-995)	136
6.2	Bestimmung der Biodistribution und der Aufnahmekinetiken von O-(2-[¹⁸ F]Fluorethyl)-L-tyrosin	138
6.3	Die Bestimmung der Biodistribution von [N ^ε -(4-[¹⁸ F]Fluorbenzoyl)Lys ⁴]-Apamin und [N ^ε -(3-(3-[¹³¹ I]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl)Lys ⁴]-Apamin	142
6.9	Abkürzungen	145
7	Literatur	147

1. Einleitung

1.1 Radionuklide in den Naturwissenschaften

Den meisten Anwendungen von Radionukliden in den Lebenswissenschaften liegt ein Tracerkonzept zugrunde, dessen Anfänge bis zu den Arbeiten von G. von Hevesy (1913) reichen. Nachdem v. Hevesy zwei Jahre vergeblich versucht hatte, Radium-D (welches später als ^{210}Pb identifiziert wurde) von natPb abzutrennen, schlug er vor, Radium (D) als Indikator für Blei zu verwenden [1]. Die heutige Definition eines radioaktiven Tracers lautet: Radiotracer sind Verbindungen, welche es uns ermöglichen, aufgrund der chemischen und physiologischen Nichtunterscheidbarkeit isotoper Nuklide einen chemischen oder biochemischen Prozess zu verfolgen, ohne ihn dabei zu beeinflussen.

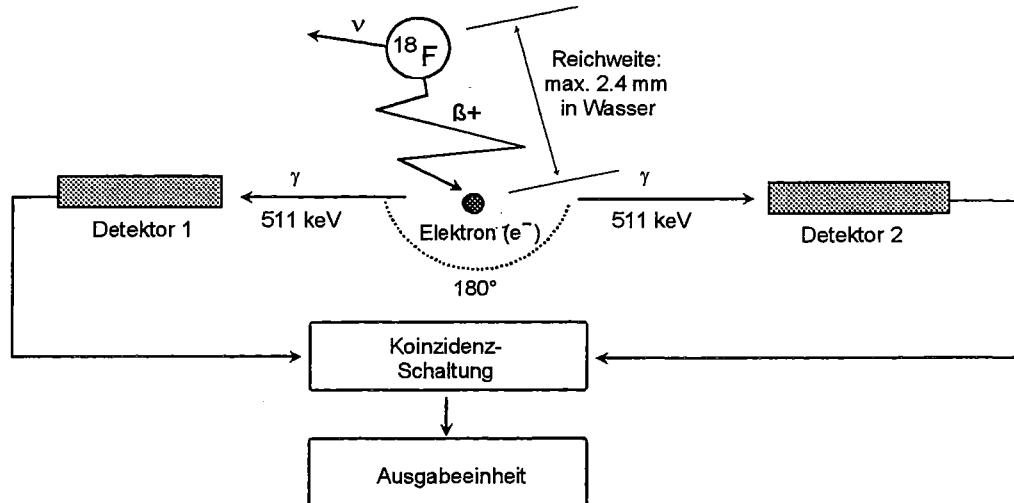
Auf diesem Tracerkonzept beruhend ist heute in nahezu allen Teilbereichen der Naturwissenschaften der Einsatz natürlicher und künstlich erzeugter Radionuklide zur Grundlage verschiedenster analytischer, diagnostischer und therapeutischer Verfahren geworden. So wurden innerhalb der letzten 100 Jahre zahlreiche Methoden, die auf der Nutzung von Radionukliden basieren, zur wissenschaftlichen Routine.

Um nur einige zu nennen:

- In der Mineralogie, Geologie und Archäologie wird der Zerfall natürlicher Radionuklide zur Altersbestimmung und Datierung herangezogen [2].
- In der organischen Chemie werden Markierungen genutzt, um komplexe Reaktionsabläufe aufzuklären [3].
- In der Biochemie wird durch Markierung endogener oder exogener Substrate die Aufklärung ihres Metabolismus möglich [4].
- In der Nuklearmedizin können pathophysiologische Prozesse nichtinvasiv diagnostiziert [5], quantifiziert [6] und therapiert [7] sowie biochemische Reaktionsketten *in vivo* studiert werden [8].
- Der Pharmakologie können mittels der Positronen-Emissions-Tomography (PET) Informationen zur Optimierung und Entwicklung neuer Pharmaka bereitgestellt werden [19].
- Ferner finden Radionuklide in den Lebenswissenschaften in einer Vielzahl analytischer Methoden Anwendung (Aktivierungsanalyse [9], Radioimmunoassay [10,11], Autoradiographie [12] etc.).

1.2 Kurzlebige Positronenstrahler in der Nuklearmedizin und Pharmakologie

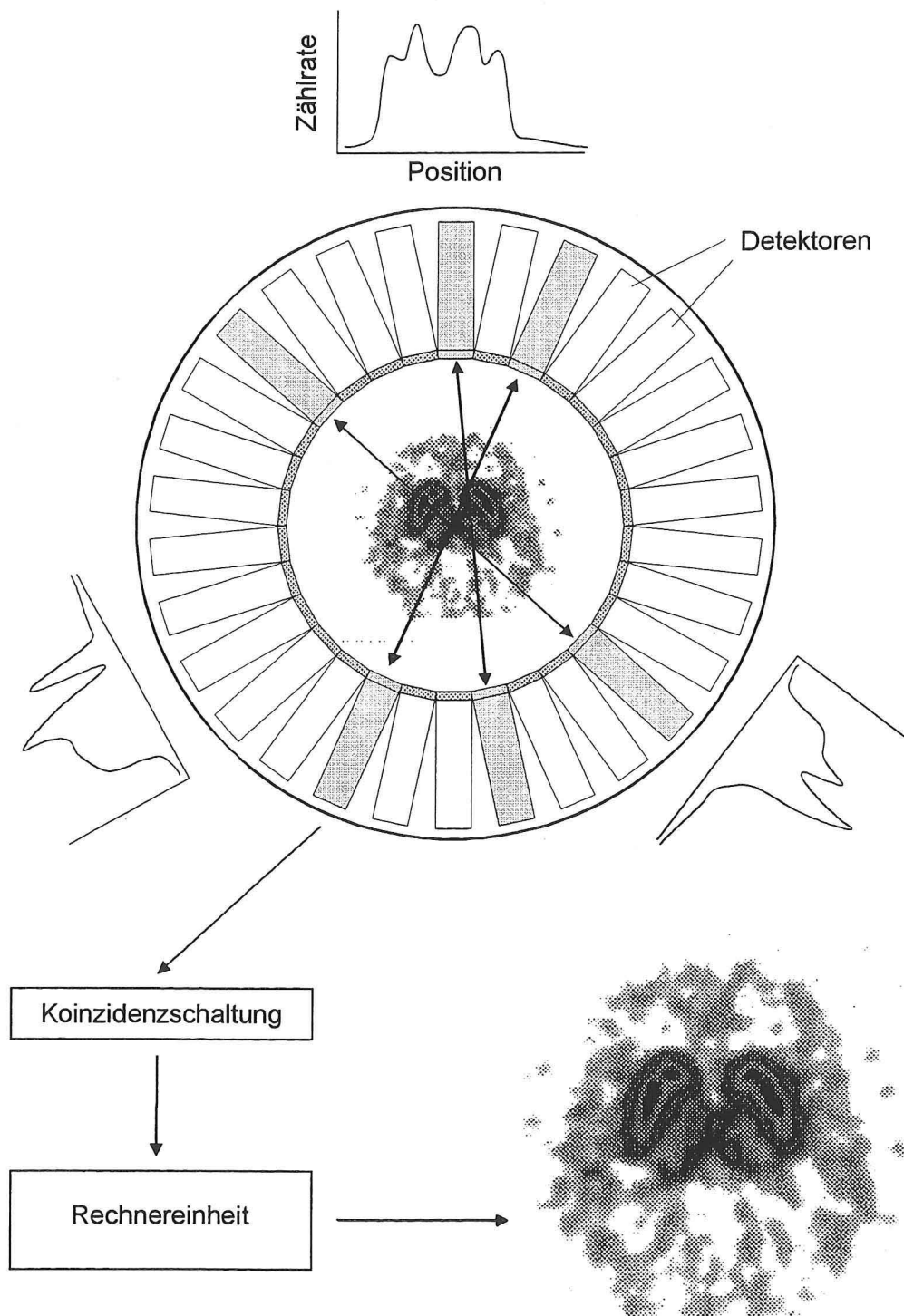
Besondere Bedeutung für die Etablierung der nuklearmedizinischen Anwendung von Radionukliden während der letzten 2½ Jahrzehnte kommt zwei bildgebenden Verfahren zu: der 'Single-Photon-Emission-Tomography' (SPET) und der 'Positron-Emission-Tomography' (PET) [12-15]. Die Möglichkeit der exakten Quantifizierung regionaler Aktivitätskonzentration *in vivo* räumt der PET jedoch eine gewisse Sonderstellung ein.



Schema 1: Vereinfachtes Schema der Positronenvernichtung und der γ - γ -Koinzidenz

Der Zerfallsprozess eines Positronenstrahlers (zur Übersicht siehe [16]) und der ortsabhängige Nachweis der Vernichtungsstrahlung durch γ - γ -Koinzidenz sind in Schema 1 dargestellt. Merkmal neutronenarmer, instabiler Atomkerne ist ihr >Zerfall< durch Umwandlung eines Protons in ein Neutron. Dies geschieht durch Emission eines Positrons (β^+) und eines Neutrinos (ν). Nach der Thermalisierung durch Ionisation und Anregung der umgebenden Materie entlang seines Bremsweges wird das Positron vernichtet, sobald es auf sein Antiteilchen, das Elektron (e^-), trifft. Hierbei wird die Ruhemasse der beiden Teilchen in zwei 511 keV γ -Quanten umgewandelt, welche bei vollständiger Thermalisierung des Positrons unter einem Winkel von 180° emittiert werden. Diese Zwei-Quanten-Vernichtungsstrahlung macht man sich aufgrund ihres festen Emissionswinkels zur ortsabhängigen Aktivitätsdetektion zu Nutze. Dies erfolgt mittels zweier gegenüberliegender Detektoren, die nur dann ein Zerfallsereignis registrieren, wenn auf beide Detektoreinheiten quasi gleichzeitig, d.h. während eines Zeitintervalls von einigen Nanosekunden, ein γ -Quant trifft (Koinzidenzschaltung).

Das Bauprinzip heutiger Tomographen besteht aus der kreisförmigen Anordnung vieler solcher Detektorpaare zu Detektorringen (Schema 2) und der gleichzeitigen Verwendung mehrerer hintereinanderliegender Detektorringe. Mit einem 8-Ring-Tomographen können auf diese Weise 15 Schichten gleichzeitig aufgenommen werden. Die Ortsauflösung beträgt 4-6 mm innerhalb der Schichten bei Schichtdicken von etwa 6-8 mm. Diese Meßanordnung erlaubt daher die quantitative Erfassung regionaler Aktivitätskonzentrationen eines Positronenstrahlers in vivo (zur Übersicht [18-20]).



Schema 2.: Das Meßprinzip eines Positronenemissionstomographen basiert auf der ringförmigen Anordnung von Detektoren, welche in γ,γ -Koinzidenz geschaltet sind. Diese liefern die quantitative Aktivitätsverteilung für verschiedene Detektionswinkel. Die Daten werden anschließend durch eine nachgeschaltete Rechneinheit in dreidimensionale (aus Einzelschnitten bestehende) Abbildungen konvertiert. (Hier die Ebene des D_2 -rezeptorreichen Striatums im Gehirn eines Patienten 200 min nach Injektion von [^{18}F]Fluorethylspiperon [22])

Voraussetzung für die Anwendung dieses Verfahrens zur Messung regionaler physiologischer oder biochemischer Prozesse ist die Verfügbarkeit von geeigneten positronenemittierenden Radionukliden und die Bereitstellung markierter endogener oder exogener Substrate.

Hierbei orientiert sich die Entwicklung eines Tracers an verschiedenen physiologischen Prozessen [6, 12], wie Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel, Enzymaktivität, Rezeptor-Ligand-Interaktionen, biochemischer Kommunikation (Neurotransmission und Hormone) sowie Immunreaktionen. Die Synthese des Tracers umfaßt typischerweise die Auswahl und Produktion des geeigneten Radionuklids, die Markierung des Tracers mittels schneller, effizienter und leicht zu automatisierender Synthesen, die Qualitätskontrolle, die in vitro und in vivo Evaluierung, Untersuchungen zur Metabolisierung, Toxikologie und Dosimetrie, das up-scaling der Synthesen in den GBq-Bereich (Automatisierung und Routineproduktion), die Quantifizierung der Pharmakokinetik mittels PET sowie die klinische Evaluierung.

Relevante Kriterien für die Auswahl eines optimalen Radionuklids für nuklearmedizinische Zwecke sind neben Zerfallsart und Zerfallsenergie des Radionuklids auch die Zerfallscharakteristika der instabilen Tochternuklide. Ebenso muß die physikalische Halbwertszeit des Emitters auf die Pharmakokinetik des Tracers abgestimmt sein. Einen Überblick über die zur Zeit wichtigsten Positronenstrahler gibt Tab.1. Von großer Bedeutung ist ferner eine hohe Isotopenreinheit, die hauptsächlich durch die Anregungsfunktion der zur Produktion des Nuklids verwendeten Kernreaktion bestimmt wird (zur Übersicht siehe [21]). So können heute Radiopharmaka synthetisiert werden, welche besonders bei Verwendung kurzlebiger Radionuklide mit hoher Isotopenreinheit spezifische Aktivitäten von $1\text{-}10^2$ TBq/mmol EOS (EOS: end of synthesis) aufweisen. Daher ist sogar der in vivo Einsatz zentralwirksamer oder toxischer Substanzen möglich, da bei Applikationen im subnanomolaren Bereich keine pharmakologischen Effekte zu erwarten sind.

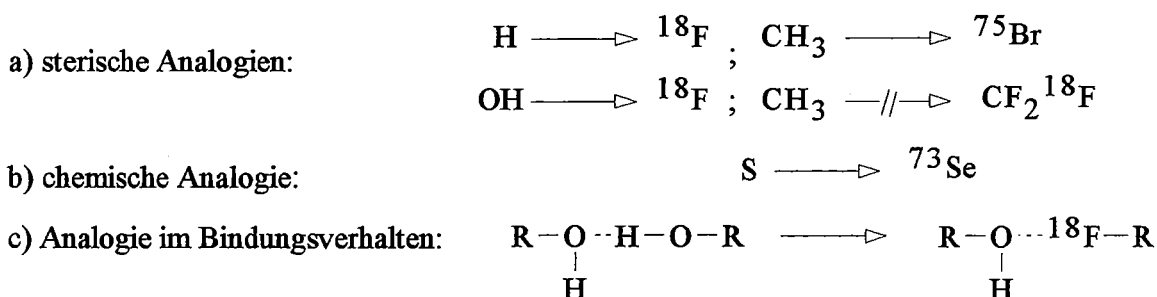
Neben diesen medizinischen und nuklearchemischen Aspekten der Radionuklidwahl sind jedoch auch kommerzielle und logistische Gesichtspunkte wie Produktionskosten und Verfügbarkeit von Bedeutung. Da die Synthese und Qualitätskontrolle eines Radiopharmakons innerhalb von etwa drei Halbwertszeiten abgeschlossen sein sollte, ist bei kurzlebigen Radionukliden wie ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O oder ^{18}F ein sogenanntes 'in-house' - Zyklotron für die Radionuklidproduktion notwendig oder, wie im Falle der etwas längerlebigen ^{18}F -Verbindungen, zumindest die Einbindung in ein sogenanntes Satellitenkonzept (regionale Versorgung verschiedenen PET-Zentren mit Radiopharmaka eines Zyklotronbetreibers) erforderlich [6]. Eine Umgehung dieses logistischen Aufwands bei Verwendung von Radionukliden wie ^{62}Cu , ^{68}Ga oder ^{82}Rb etc. durch einfaches 'melken' kommerziell erhältlicher Radionuklidgeneratoren besitzt daher trotz eingeschränkter Verwendungsmöglichkeit der genannten Nuklide nicht unerhebliche Vorteile.

Tabelle 1: Einige Positronenstrahler sowie deren Vor- und Nachteile

Nuklid	Halb- wertzeit (HWZ, $t_{1/2}$)	Zerfallsart (Häufigkeit; $E_{\beta^+ \max}$ [keV])	Vorteile	Nachteile
^{11}C	20.4 min	β^+ (99,8) [960]	Isotopentracer, hoher β^+ -Anteil	kurze HWZ
^{13}N	9.96 min	β^+ (100) [1190]	Isotopentracer, hoher β^+ -Anteil	sehr kurze HWZ
^{15}O	2.03 min	β^+ (99,9) [1723]	Isotopentracer; hoher β^+ -Anteil	sehr kurze HWZ
^{18}F	110min	β^+ (96,9) [635]	niedrige β^+ -Energie, hoher β^+ -Anteil; hohe spez. Aktivität möglich; ausreichende HWZ. => <i>ideales PET- Nuklid</i>	nur selten Isotopentracer; meist Analogtracer
$^{34\text{m}}\text{Cl}$	32.4min	β^+ (53) [4500]		aufwendige Produktion, kurze HWZ, hohe β^+ -Energie
^{62}Cu	9,7min	β^+ (98) [2930]	Generatorkern (via ^{62}Zn)	kurze HWZ, hohe β^+ -Energie
^{68}Ga	68,3 min	β^+ (90) [1900]	Generatorkern (via ^{68}Ge)	hohe β^+ -Energie
^{73}Se	7.1 h	β^+ (65) [1300]	S-Analogtracer, HWZ	aufwendige Produktion mittlere β^+ - Häufigkeit, hohe β^+ -Energie.
^{75}Br	97 min	β^+ (75,5) [1740]	einfache Chemie	aufwendige Produktion, hohe β^+ -Energie, lange HWZ der ^{75}Se -Tochter
^{76}Br	16 h	β^+ (57) [3900]	HWZ, für Tiermodell geeignet	aufwendige Produktion, mittlere β^+ - Häufigkeit, hohe β^+ -Energie, lange HWZ
^{82}Rb	1,3 min	β^+ (96) [3350]	Generatorkern (via ^{82}Sr)	kurze HWZ, hohe β^+ -Energie
^{86}Y	14,7 h	β^+ (34) [1300]	HWZ, in Kombination mit ^{90}Y (β^-) für PET - Therapiestudien	geringe β^+ - Häufigkeit
^{94}Tc	4,9 h	β^+ (11) [820]	HWZ, in Kombination mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (β^-) für PET - Therapiestudien	geringe β^+ - Häufigkeit
^{124}I	4.2 d	β^+ (25) [2140]	einziges längerlebiges PET - Nuklid von Iod	lange HWZ geringe β^+ - Häufigkeit,

Aufgrund der Möglichkeit, mittels C-11-, N-13- und O-15-Markierungen entsprechender Vorläufer eine Vielzahl isoton markierter, d.h. 'echter Tracer' biospezifischer Verbindungen zu erhalten, scheinen diese Positronenstrahler zunächst für diagnostische Anwendungen besonders gut geeignet.

Allerdings können diese Radionuklide wegen ihrer kurzen Halbwertszeit nur zur Messung schneller Stoffwechselvorgänge eingesetzt werden. Eine Alternative stellen in diesem Zusammenhang die Analogtracer dar, die unter Berücksichtigung von sterischen und chemischen Analogien sowie Analogien im Bindungsverhalten den Einbau längerlebiger Positronenstrahler in Pharmaka erlauben, ohne in gravierendem Maße die physiologischen Eigenschaften des Moleküls zu verändern (z.B. 2-[^{18}F]Fluortyrosin [23]) oder sogar erwünschte Änderungen hervorrufen (z.B. metabolisches Trapping bei 2-[^{18}F]Fluordeoxyglucose [24] oder 14-[^{18}F]Fluor-6-thia-heptadecansäure [25a,b]).



Schema 3: Analogiebeziehungen zur Entwicklung von Analogtracern

Fluor besitzt mit einem Van-der-Waals-Radius von 1.35Å einen dem Wasserstoff (1.20Å) ähnlichen Atomradius. Hieraus ergibt sich die sterische Analogie von F und H (Schema 3), auf deren Basis die Entwicklung des weitaus größten Teils aller ^{18}F -markierten Verbindungen beruht. So ist z.B. mittels des metabolisch akzeptierten künstlichen Tyrosin-Analogons 2-[^{18}F]Fluortyrosin eine Quantifizierung der regionalen Proteinsyntheserate im Hirn möglich [23]. Bezüglich der Bindungslängen weist die C-F Bindung mit 1.39Å einen ähnlich Wert auf wie die C-OH Bindung. Zu dieser sterischen Analogie kommt weiterhin die Gemeinsamkeit beider Substituenten hinzu, sich als Elektronenpaardonatoren an Wasserstoffbrücken zu beteiligen. Hierauf beruht die seltener genutzte F-für-OH Analogie. Als typisches Beispiel ist hier 2-[^{18}F]Fluordeoxyglucose -das gegenwärtig weltweit meistgenutzte Radiopharmakon- zu nennen. Ebenso dienen ähnliche chemische Eigenschaften zweier Elemente zur Entwicklung neuer Radiopharmaka, wenn keine geeigneten Isotope des ursprünglichen Elements zur Verfügung stehen. Hier ist die Entwicklung von ^{73}Se -Selenomethionin [26, 220] sowie im weiteren Sinne die früher angewandte Knochenszintigraphie mittels ^{89}Sr , ^{85}Sr und ^{18}F (statt Ca bzw. Phosphat) zu nennen [17].

Die für die Markierung von PET-Radiopharmaka am häufigsten angewandten Isotope sind Kohlenstoff-11, Stickstoff-13, Sauerstoff-15 und Fluor-18, seltener die Isotope Brom-75 und Selen-73. Eine herausragende Stellung unter diesen PET - Radionukliden kommt dem Fluor-18 zu. Folgende Vorteile machen es gegenüber den "organischen" Markierungsnukliden ^{15}O , ^{13}N und ^{11}C zu dem am häufigsten genutzten PET-Nuklid:

- Als Positronenstrahler mit einer Halbwertszeit von 109.7 min stellt es ein Optimum bezüglich Synthese, Reinigung und Qualitätskontrolle einerseits und radioaktiver Belastung des Patienten andererseits dar.
- Die β^+ -Energie liegt beim Fluor am niedrigsten und ermöglicht damit theoretisch die beste Ortsauflösung und geringste β^+ -Dosis.
- ^{18}F -Fluor weist eine hohe erreichbare spezifische Aktivität auf (siehe unten Tab.2). Dies hat z.B. bei Rezeptordichtebestimmungen ausschlaggebende Bedeutung.
- Innerhalb der Reihe der Halogene besitzt die Fluor-Kohlenstoffbindung die größte Stabilität. Die mit ^{18}F -Fluor markierten Radiopharmaka haben somit auch die besseren Voraussetzungen, ohne vorzeitigen Verlust des Markierungsisotops zum Wirkungsort zu gelangen. Dem gegenläufig ist die besonders bei aliphatischen Fluorverbindungen häufig festzustellende Dehydrofluorierung (H^{18}F -Elimination). Daher werden zumeist ^{18}F -kernfluorierte, aromatische Radiopharmaka bevorzugt.

Mit den Vorteilen kurzlebiger Radionuklide gehen ebenso signifikante Probleme bei Synthese und Handhabung der Radiopharmaka einher. So sind bei routinemäßig produzierten Verbindungen hohe Anfangsaktivitäten (einige GBq) erforderlich, deren Handhabung nur durch automatisierte und fernbedienbare Systeme in Bleizellen möglich ist. Diese Notwendigkeit zur Fernbedienbarkeit muß als wesentlicher Aspekt bei der Entwicklung neuer Synthesen Berücksichtigung finden und beinhaltet im Einzelnen Forderungen wie einfache, leicht zu automatisierende, schnelle Synthesen mit möglichst guten radiochemischen Ausbeuten, Minimierung der radioaktiven Syntheseschritte, 'Eintopfreaktionen' oder Verwendung von Durchflußreaktoren sowie schnelle und einfache Reinigung und Formulierung der Radiopharmaka.

1.3 Produktion von ^{18}F -Fluor

Als primärer Vorläufer steht Fluor-18 je nach Art der verwendeten Kernreaktion und des Targetmaterials in zwei verschiedenen chemischen Formen zur Verfügung: in ungeträgerter (engl.: no-carrier-added, n.c.a.), nukleophiler Form als $^{18}\text{F}_{\text{aq}}^-$ oder geträgert (engl.: carrier-added, c.a.) als elementares $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$. Von den über zwanzig bekannten Kernreaktionen zur Produktion von Fluor-18 an Teilchenbeschleunigern und Kernreaktoren [27,28] sind in Tabelle 2 die vier heute bedeutendsten aufgeführt.

Die Erzeugung von n.c.a. Fluor-18 in ^{18}O -angereicherten Wassertargets [28-30] über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion (I) stellt heute die am häufigsten angewandte Produktionsmethode dar. Ihr Vorteil liegt im hohen Wirkungsquerschnitt, der damit verbundenen hohen Targetausbeute, der hohen spezifischen Aktivität sowie der relativ geringen erforderlichen Protonenenergie. In der routinemäßigen Produktion wird nach der Bestrahlung das erzeugte ^{18}F -Fluorid an einen Anionenaustauscher gebunden und anschließend mit einer wässrigen Kaliumcarbonatlösung eluiert [31,37]. Dieses Verfahren erlaubt die Rückgewinnung des

angereicherten Wasser, welches dann nach photochemischer und destillativer Reinigung erneut zu Bestrahlungszwecken genutzt werden kann.

Tab.2: Wichtigste Kernreaktionen zur Produktion von F-18 mit Hilfe eines Zyklotrons [21,30].

Reaktion	$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ (I)	$^{16}\text{O}(^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$ (II)	$^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ (III)	$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ (IV)
Target	H_2^{18}O a)	H_2O	Ne (0.1-0.2% F_2) b), 18 bar	$^{18}\text{O}_2$ c), 20 bar
Energie der Strahlteilchen [MeV]	$16 \rightarrow 0$	$36 \rightarrow 0$	11.2	10
chemische Form des Fluor-18	$^{18}\text{F}^-$ (aq)	$^{18}\text{F}^-$ (aq)	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$
Targetausbeute [mCi/ μAh]	60	7	10-12	~10
spezifische Aktivität [Ci/mmol]	bis zu 10^5	bis zu 10^5	1-10	1-50

a) Ti-Target und Ti-Fenster; b) passiviertes Ni-Target; c) zweistufige Bestrahlungsmethode

Die Produktion der elektrophilen $^{18}\text{F}[\text{F}_2]$ Spezies erfolgt in Gastargets. Der gebräuchlichste Prozess ist hier die $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ Kernreaktion [33,34]. Steht nur ein kleines Zyklotron mit Protonen als Geschossteilchen zur Verfügung, kann $^{18}\text{F}[\text{F}_2]$ auch in einem $[^{18}\text{O}]\text{O}_2$ -Gastarget über den $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ - Prozess produziert werden. Da aufgrund der niedrigen absoluten Stoffmenge an gebildetem ^{18}F -Fluor eine in-Target-Bildung von $^{18}\text{F}[\text{F}_2]$ statistisch ausgeschlossen ist und das an der Targetwand haftende ^{18}F -Fluor nur nach Isotopenaustausch als $^{18}\text{F}[\text{F}_2]$ aus dem Target ausgeschleust werden kann, ist bei beiden Produktionsverfahren (III und IV) der Zusatz von F_2 -Träger zwingend notwendig. Aus diesem Grund ist die spezifische Aktivität dieser elektrophilen Spezies und aller hieraus synthetisierten Tracer auf 1-50 Ci/mmol (37-1.850 GBq/mmol) limitiert [21].

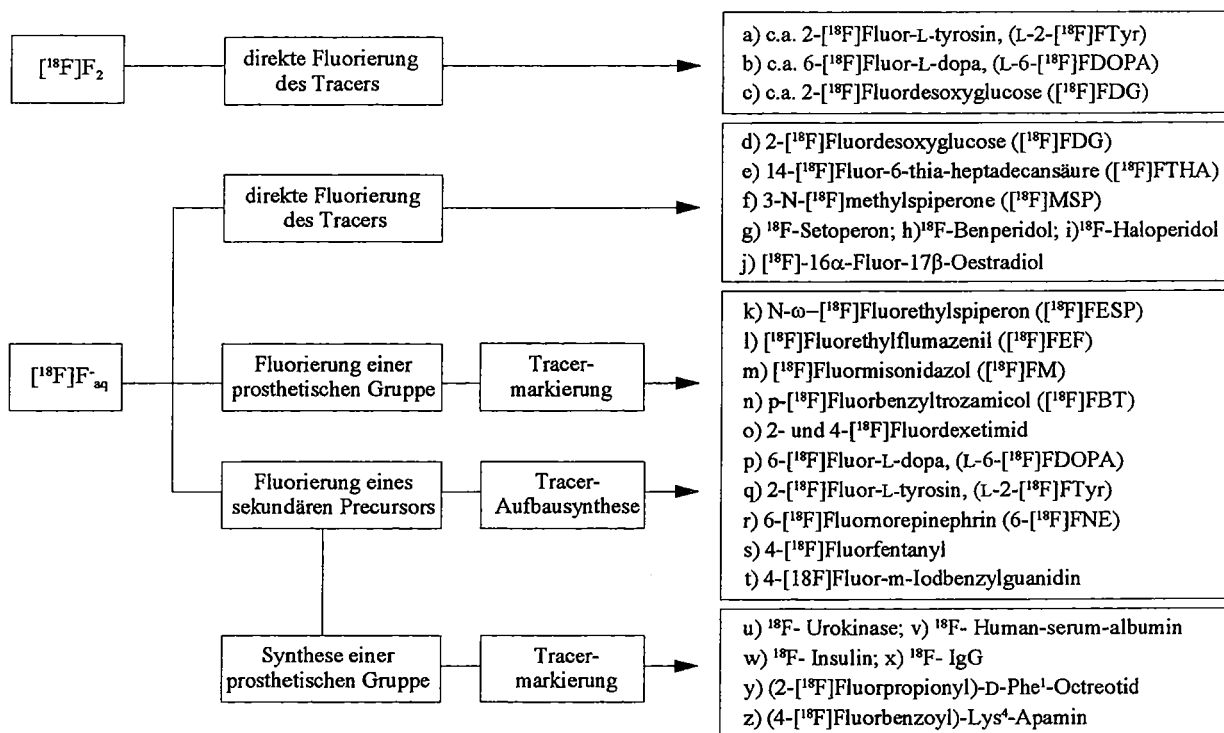
1.4. Grundlegende Verfahren zur ^{18}F -Fluorierung organischer Moleküle

Wie anhand der schematischen Synthesewege einiger gängiger und typischer ^{18}F -markierter Verbindungen in Schema 4 zu erkennen ist, läßt sich die ^{18}F -Markierungsschemie organischer Verbindungen mit dem Ziel der Radiopharmakasynthese entsprechend der chemischen Form des primären Precursors in zwei Hauptgruppen einteilen:

- elektrophile Fluorierungen mittels primär gebildetem c.a. $^{18}\text{F}[\text{F}_2]$
- sowie nukleophile ^{18}F -Fluorierungen mit n.c.a. ^{18}F -Fluorid.

1.4.1 Elektrophile Fluorierungen

Da durch den Trägeranteil die radiochemischen Ausbeuten der elektrophilen Fluorierung maximal 50% betragen (da ^{18}F und ^{19}F im ^{18}F - ^{19}F praktisch gleichwertig reagieren und ein Fluor als HF verlorengelht), findet $^{18}\text{F}[\text{F}_2]$ zur Zeit nur dann Anwendung, wenn für die

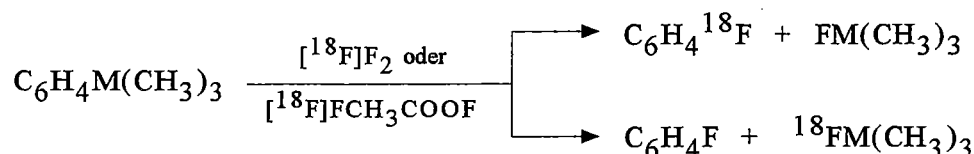


Schema 4: Synthesewege zur Darstellung ^{18}F -markierter Radiopharmaka am Beispiel einiger nuklermedizinisch relevanter bzw. synthesesetypischer Verbindungen. Lit: a.[23,40], b.[38,40], c.[36], d.[37], e.[25], f.[44], g.[45], h.,i.[42,43], j.[46] k.[47], l.[49], m.[50], n.[53], o.[54], p.,q.[41], r.[51], s.[48], t.[52], u.[55], v.[56], w.[57], x.[58], y.[59], z.[60]

Darstellung des gewünschten Tracers keine geeignete Alternative über nukleophiles ^{18}F -Fluorid zur Verfügung steht, oder wenn aufgrund der hohen in vivo Konzentration endogener Analoga die spezifische Aktivität der applizierten Tracer keine maßgebliche Rolle spielt. Obgleich dies für die sogenannten "metabolischen Tracer" wie Kohlenhydrate, Fettsäuren, DNA-Vorläufer und Aminosäuren zutrifft, kann es in diesen Fällen durch Kompetition spezifischer Carriersysteme zur Beeinflussung der regionalen Aufnahme und Störungen der

physiologischen Gleichgewichte kommen. Ebenso ist in diesen Fällen die Toxizität der Fluorverbindungen zu berücksichtigen.

Ein signifikanter Nachteil ist ebenso die fehlende Regiospezifität, welche bei elektrophilen Fluorierungen mittels $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ sowie den milderen sekundären Spezies $[^{18}\text{F}]\text{XeF}_2$ und $[^{18}\text{F}]\text{Acetylhypofluorit}$ beobachtet wird. Eine Verbesserung der Regioselektivität läßt sich zwar über Fluordemetallierungsreaktionen erreichen, doch erfordert die Hydrolyse der notwendigerweise geschützten Vorläufer weitere, aktive Syntheseschritte.



Schema 5: Fluordemetallierungsreaktionen (M = Si, Ge, Sn) [61]

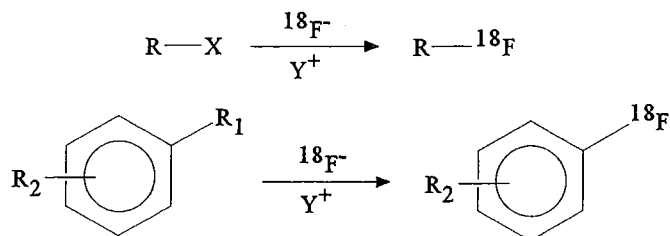
Als typische Lösungsmittel sind Freon, Tetrachlorkohlenstoff, Trifluoressigsäure oder Fluorwasserstoff zu nennen, doch wurde auch die Verwendung von Wasser als Solvens bei elektrophilen Fluorierungen beschrieben [62].

Anwendung findet die direkte elektrophile Fluorierung bei der Darstellung aromatischer ^{18}F -Aminosäuren (Schema 4) wie c.a. L-2- $[^{18}\text{F}]$ Fluortyrosin [23,40] und c.a. L-6- $[^{18}\text{F}]$ Fluordopa [38-40], da der erhebliche synthetische und damit zeitliche Aufwand, der mit der alternativen nukleophilen Einführung des Fluor-18 verbunden ist (zur Übersicht [41]), gegenwärtig nicht durch eine höhere radiochemische Ausbeute kompensiert werden kann. Ebenso wird 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluordeoxy-D-Glucose (^{18}F -FDG) von einigen PET-Gruppen auch heute noch in geträgerter Form (c.a.) über die elektrophile Fluorierung von 3,4,6-Tri-O-acetyl-D-glucal mittels $[^{18}\text{F}]\text{Acetylhypofluorit}$ hergestellt [36]. Obwohl die spezifische Aktivität des auf diese Weise dargestellten ^{18}F -FDG um 4-5 Größenordnungen geringer ist als die des mittels ^{18}F -dargestellten n.c.a. ^{18}F -FDG, wurden bis heute im diagnostischen Einsatz beider Präparationen keine Unterschiede festgestellt. Ebenso haben Untersuchungen gezeigt, daß die Anwesenheit der epimeren 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluor-2-deoxy-D-mannose, welche bei den elektrophilen Verfahren gebildet wird, zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der diagnostischen Anwendung führt [63]. ^{18}F -FDG ist somit das typische Beispiel eines Radiopharmakons, bei welchem durch die hohe endogene Konzentration eines nichtisotopen Trägers (hier D-Glucose) die Tracereigenschaft nicht an eine hohe spezifische Aktivität gebunden ist.

1.4.2 Nukleophile Fluorierungen

Die zur Zeit gebräuchlichste Methode zur Darstellung ^{18}F -markierter Radiopharmaka stellt die nukleophile Substitution ausgehend von n.c.a. $^{18}\text{F}^-$ dar. Als Abgangsgruppen für die nukleophile aliphatische Substitution dienen die in der klassischen organischen Chemie

bewährten Substituenten (Schema 6) Br und I, die verschiedensten Sulfonsäureester $R'-SO_3$ (Mesylate, Toylate, Nosylate sowie Triflate), cyclische Schwefelsäureester sowie cyclische Sulfamate. Als Lösungsmittel werden Acetonitril, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder Dimethylacetamid eingesetzt, während Lösungsmittel mit geringer Dielektrizitätskonstanten (wie Tetrahydrofuran, Dichlormethan oder Aceton) nur selten Anwendung finden.



Schema 6: Nukleophile aliphatische und aromatische Substitution

$X = Br, I, R'-SO_3, R-OSO_3, R-N(CH_3)-SO_3$

$R_1 = NO_2, N(CH_3)_3^+, (TfO^-, Tos^-, ClO_4^-, Cl), Br, Cl, I$

$R_2 = CN, NO_2, CHO, CRO, COOR$

$Y^+ = [K^+ \subset 2.2.2]_2CO_3^{2-}; ([K^+ \subset 2.2.2]_2C_2O_4^{2-}, CO_3^{2-}); R_4N^+, polymer geb. R_4N^+, Cs^+, Rb^+$

Von besonderem Interesse ist ferner, daß die nukleophile aliphatische Substitution in erstgenannten Lösungsmitteln mechanistisch einer S_N2 -Reaktion entspricht und durch Wahl der korrespondierenden Vorläufer die erforderlichen stereospezifischen ^{18}F -markierten Produkte erhalten werden können, wie z.B. 2- $[^{18}F]$ Fluor-2-deoxy-D-glucose aus 1,3,4,6-tetraacetylierter >2-Triflyl-mannose< [37], $[^{18}F]$ -16 α -Fluor-17 β -Oestradiol aus dem cyclischen Schwefelsäureester des 16-Epioestriol [46] oder (1S,2S)-1- $[^{18}F]$ Fluor-1-deoxy-meta-hydroxyephedrin aus dem methoxymethylgeschützten cyclischen Sulfamat des (1R,2S)-(-)-Metaraminol [64].

Aufgrund der hohen metabolischen Stabilität von aromatisch gebundenem ^{18}F -Fluor wird die nukleophile Fluorierung von Aromaten mit elektronenziehenden Substituenten in ortho- oder para-Stellung zur Abgangsgruppe besonders häufig genutzt (Schema 6). Während Edukte mit einer Nitro-Abgangsgruppe häufig sehr schwer oder unzureichend von den korrespondierenden ^{18}F -fluorierten Produkten abzutrennen sind [56] (in jüngster Zeit gelingt dies durch RP-HPLC mittels Nitrophenyl-Phase [43]), unterscheiden sich die entsprechenden Trimethylammonium-Vorläufer zumeist hinreichend von den ^{18}F -fluorierten Analoga und werden daher bevorzugt und mit vergleichbaren Ausbeuten eingesetzt.

Wie anhand der schematischen Synthesewege einiger typischer ^{18}F -markierter Verbindungen in Schema 4 zu erkennen ist, handelt es sich bei den von nukleophilem ^{18}F -Fluorid ausgehenden Synthesen zumeist um mehrstufige Reaktionen. Dies beruht hauptsächlich auf zwei Faktoren: 1) den chemischen Eigenschaften des Fluoridions und 2) der Unzugänglichkeit nicht aktivierter, ^{18}F -fluorierter Aromaten über die nukleophilen Synthese.

Aufgrund seiner hohen Ladungsdichte und der hohen Bindungsenergie für HF (574 kJ/mol) [65] wird das kleine Fluoridion in Anwesenheit acider Protonen leicht protoniert. Ferner ist HF in verdünnter wässriger Lösung eine schwache Säure, da durch die geringe Hydratationsenthalpie von 506 kJ/mol [65] (im Vergleich zur Bindungsenergie) nur eine schwache Dissoziation möglich ist.

Die Reaktivität des Fluoridions in nukleophilen aliphatischen und aromatischen Substitutionen wird demnach von folgenden Faktoren maßgeblich gefördert:

- Deprotonierung von H^{18}F zur Bildung des Nukleophils
- Löslichkeitssteigerung des 'nackten' ^{18}F -Fluorids
- Vermeidung von Substraten mit aciden Protonen

Ersteres wird durch Zusatz einer Base erreicht. Hierzu werden vorzugsweise Verbindungen eingesetzt, welche gleichzeitig eine Löslichkeitssteigerung des Ionenpaares gewährleisten (Phasentransferkatalysatoren). Daher finden oftmals Tetraalkylammoniumcarbonate und -hydroxide R_4N^+ (R= methyl, ethyl, propyl) [66], seltener polymergebundene Ammoniumsalze [67,68] Anwendung. Zur nukleophilen aromatischen und aliphatischen Substitution hat sich besonders das Kryptofix 222[®] / K_2CO_3 - System ($[\text{K}^+ \subset 2.2.2]_2\text{CO}_3^{2-}$ -System) bewährt (zur Übersicht [69]). Dieses System ist jedoch limitiert auf Edukte, welche unter den stark basischen Bedingungen der nukleophilen ^{18}F -Fluorierung ($\text{pK}_a([\text{K}^+ \subset 2.2.2]_2\text{CO}_3^{2-}) \leq 19$) bei Reaktionstemperaturen von ca. 90-140°C hinreichende Stabilität besitzen. Durch eine Verringerung der Basizität durch Zusatz des weniger basischen Oxalats ($[\text{K}^+ \subset 2.2.2]_2\text{C}_2\text{O}_4^{2-}; \text{CO}_3^{2-}$) [44] konnten jedoch auch komplexere, im Carbonat-System instabile Substanzen einer direkten, nukleophilen aromatischen Substitution zugänglich gemacht werden. So sind heute mit Hilfe des Oxalat-Carbonat-Systems Rezeptorliganden des dopaminergen Systems (z.B. 3-N- ^{18}F -Methylspiperon [44], ^{18}F -Benperidol oder ^{18}F -Haloperidol [42,43], welche früher in mehrstufigen Synthesen markiert werden mußten, durch einstufige aromatische F-für- NO_2 Substitutionen in radiochemischen Ausbeuten von 30-45% darstellbar.

Häufig ist jedoch eine direkte nukleophile ^{18}F -Fluorierung aufgrund der stark basischen Bedingungen, der thermischen Instabilität der Edukte oder einer nicht ausreichenden 'Aktivierung' des Aromaten unmöglich. In diesen Fällen weicht man auf die Darstellung eines sekundären, ^{18}F -markierten Precursors aus, an dessen Fluorierung sich eine Traceraufbausynthese anschließt (Schema 4). Diese zum Teil 4-stufigen Synthesen [z.B. 51] repräsentieren jedoch bei einem Zeitaufwand von bis zu ca. 2h und dementsprechend geringen unkorrigierten Ausbeuten das Limit im Hinblick auf fernbedienbare, automatisierte Synthesen mit kurzlebigen Radionukliden.

Eine andere Alternative stellt in diesem Zusammenhang die ^{18}F -Markierung kleiner, gut fluorierbarer Gruppen dar. Eine anschließende ^{18}F -Fluoralkylierungs- [70-73], ^{18}F -Fluoracylierungs- [74,75] oder ^{18}F -Fluoramidierungsreaktion [57] liefert dann die mittels direkter ^{18}F -Fluorierung nicht zugänglichen ^{18}F -Tracer.

So können z.B. [^{18}F]FESP [47], [^{18}F]FEF [49] oder [^{18}F]FM [50] in zweistufigen 'Eintopfsynthesen' (^{18}F -Fluorierung der prosthetischen Gruppe und anschließende Alkylierung des entsprechenden Precursors) dargestellt werden. Abgesehen von diesen einfachen Synthesebeispielen sind die mehrstufigen Darstellungen prosthetischer Gruppen (wie z.B. zur Darstellung von p-[^{18}F]Fluorbenzyltrozamicol [53] oder [^{18}F]Fluordexetimid [54] eher als Traceraufbausynthesen über ^{18}F -fluorierte sekundäre Vorläufer anzusehen.

Während sich die Fluoracylierungs- und Fluoramidierungsreagenzien auch für Konjugationen in wässriger Phase eignen und daher auch für die ^{18}F -Markierung von Peptiden und Proteinen geeignet sind, finden ^{18}F -Fluoralkylierungen besonders bei der ^{18}F -Markierung von serotonergen, dopaminergen, opioiden und muskarinischen Rezeptorliganden sowie Benzodiazepinen Verwendung.

Im Hinblick auf die Themenstellung dieser Arbeit werden die bisher bekannten und häufig verwendeten prosthetischen Gruppen im nächsten Abschnitt genauer beschrieben.

1.5 Synthesestrategien zur Darstellung ^{18}F -fluorierter Aminosäuren, Peptide und Proteine

Neben einigen markierten Aminosäuren, welche zur Tumordiagnose mittels PET und SPET bereits routinemäßig verwendet werden (zur Übersicht siehe [76]), kommt in der nuklearmedizinischen Diagnose, Therapie und Forschung den Peptiden und Proteinen, einschließlich monoklonaler Antikörper und ihrer Fragmente, eine stetig wachsende Bedeutung zu. Diese Entwicklung ist besonders auf die kontinuierliche Optimierung dieser biospezifischen Substanzen zurückzuführen (zur Übersicht siehe [77,78]). So ging in den letzten drei Dekaden die Entwicklung von großen Proteinen mit niedriger Selektivität (intakte, polyclonale Antikörper), über monoklonale Antikörper mit verbesserter Spezifität, über ihre Fab - und F(ab')₂ - Fragmente mit verbesserter Pharmakokinetik, über humanisierte und chimere Antikörper mit verminderter 'Human Antibody Mouse Antibody response' (HAMA), über 'single chain antigen binding units' bis hin zu kleinen, die hypervariablen Regionen repräsentierenden Peptiden ('molecular recognition units' mit ca. 10 und weniger Aminosäuren) [79-85]. Diese kleinen, Antigen-bindenden Peptide weisen eine schnellere Pharmakokinetik und eine reduzierte unspezifische Bindung in 'normalem' Gewebe auf. In gleichem Maße stellt die Vielzahl endogener Peptide, Peptidhormone und bekannter Polypeptid-Neurotoxine ein reichhaltiges Reservoir potentieller Radiopharmaka dar, die in

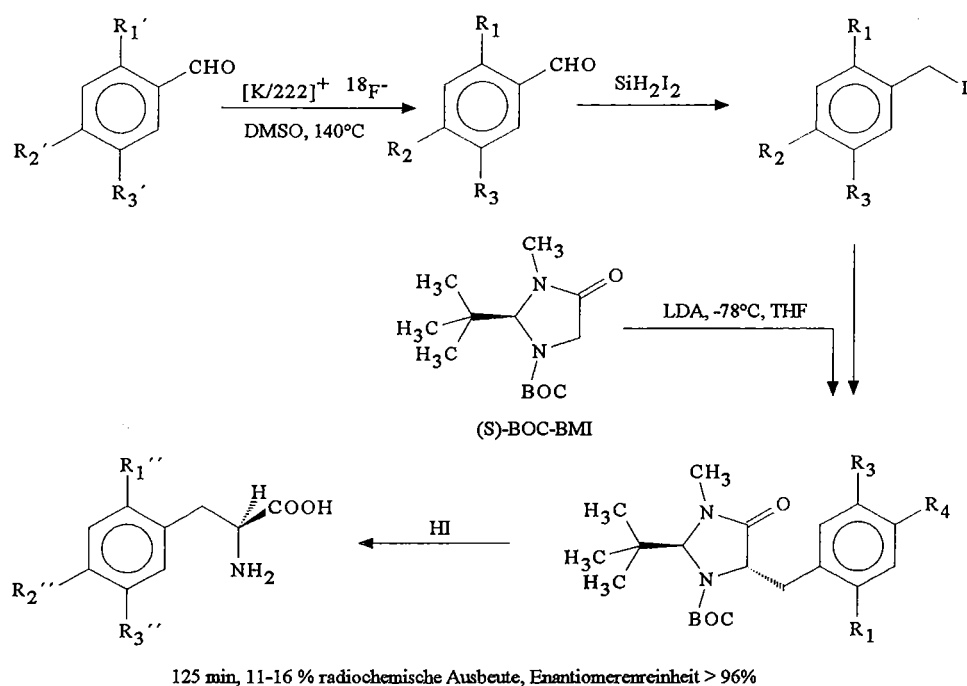
einer Vielzahl von Erkrankungen (wie Entzündungen, Thrombosen, Arteriosklerose) sowie zur Tumordiagnose und zum Rezeptor-Mapping Anwendung finden könnten.

1.5.1 ^{18}F -fluorierte Aminosäuren

Radioaktiv markierte Aminosäuren werden gegenwärtig nahezu ausschließlich zur Diagnose von Hirntumoren (über regionale Proteinsyntheserate -PSR- und Aminosäuretransport) und neurologischen Erkrankungen eingesetzt [76]. Um eine hohe Anreicherung im Gehirn zu erreichen, werden hierzu ausschließlich für das Gehirn als 'essentiell' zu betrachtende Aminosäuren (Phe, Leu, Tyr, Met, Val, Dopa) verwendet [8], da diese mittels des Aminosäure-Carriers für 'große, ungeladene Aminosäuren' leicht die Blut-Hirn-Schranke passieren. Von den bisher dargestellten und evaluierten ^{18}F -Aminosäuren haben sich lediglich drei Aminosäuren als hinreichend geeignet herausgestellt (zur Übersicht siehe [8]): 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin (2- ^{18}F TYR) zur Messung der regionalen PSR im Hirn sowie L-6- ^{18}F Fluor-3,4-dihydroxyphenylalanin (6- ^{18}F FDOPA) und 4- ^{18}F Fluor-L-meta-tyrosin (4- ^{18}F FMT) als Tracer für das dopaminerge System. Einige andere ^{18}F -Aminosäuren eignen sich zwar als Tracer zur Untersuchung metabolischer Reaktionsfolgen, sind jedoch für die oben genannten Fragestellungen ungeeignet.

Die aromatischen Aminosäuren 2- ^{18}F TYR, 6- ^{18}F FDOPA und 4- ^{18}F FMT wurden sowohl auf elektrophile Weise c.a. ^{18}F -fluoriert [40,87] als auch via nukleophile n.c.a. ^{18}F -Fluorid dargestellt. Zur Routinedarstellung von c.a. 6- ^{18}F FDOPA wurde die direkte ^{18}F -Fluorierung des komplett geschützten Vorläufers mit ^{18}F -Acetylhypofluorit sowie die effizientere, regioselektive Demerkurierung empfohlen (zur Übersicht siehe [88]). In ähnlicher Weise wurde die Synthese von 2- ^{18}F TYR durch Fluorierung mit ^{18}F -Acetylhypofluorit am O-acetylgeschützten Vorläufer beschrieben. Anschließende basische Hydrolyse und HPLC-Trennung der gebildeten 2- und 3- ^{18}F Fluortyrosin - Isomeren liefert nach einer Gesamt-synthesezeit von 2h 2- ^{18}F TYR in einer radiochemischen Ausbeute von ca. 10% [40].

Obwohl die Darstellung ^{18}F -markierter aromatischen Aminosäuren in trägerfreier Form via nukleophilem ^{18}F -Fluorid aufgrund fehlender Aktivierung des Aromaten über aufwendige Mehrstufensynthesen erfolgen muß (Schema 4), weist diese Art der Präparation im Vergleich zur elektrophilen Direktmarkierung neben den allgemeinen Vorteilen einer trägerfreien Darstellung aufgrund der effizienteren Radionuklidproduktion bei vergleichbaren radiochemischen Ausbeuten größere, absolute Aktivitätsmengen der ^{18}F -Tracer auf. Als Beispiel einer solchen Aufbausynthese ist in Schema 7 die stereoselektive Synthese von 2- ^{18}F TYR, 6- ^{18}F FDOPA und 4- ^{18}F FMT auf nukleophilem Wege dargestellt (zur Übersicht siehe [41]).



Synthese von 2-[¹⁸F]Fluor-L-tyrosin: $R_1' = \text{NO}_2$ oder $\text{Me}_3\text{N}^+ \text{SO}_3\text{CF}_3$; $R_1 = R_1'' = {}^{18}\text{F}$; $R_2 = R_2' = \text{OCH}_3$; $R_2'' = \text{OH}$; $R_3 = R_3' = R_3'' = \text{H}$. *Synthese von 4-[¹⁸F]Fluor-L-m-tyrosin:* $R_2' = \text{NO}_2$ oder $\text{Me}_3\text{N}^+ \text{SO}_3\text{CF}_3$; $R_2 = R_2'' = {}^{18}\text{F}$; $R_3 = R_3' = \text{OCH}_3$; $R_3'' = \text{OH}$; $R_1 = R_1' = R_1'' = \text{H}$. *Synthese von 6-[¹⁸F]Fluor-L-DOPA:* $R_1' = \text{NO}_2$ oder $\text{Me}_3\text{N}^+ \text{SO}_3\text{CF}_3$; $R_1 = R_1'' = {}^{18}\text{F}$; $R_2 = R_2' = R_3 = R_3' = \text{OCH}_3$; $R_2'' = R_3'' = \text{OH}$.

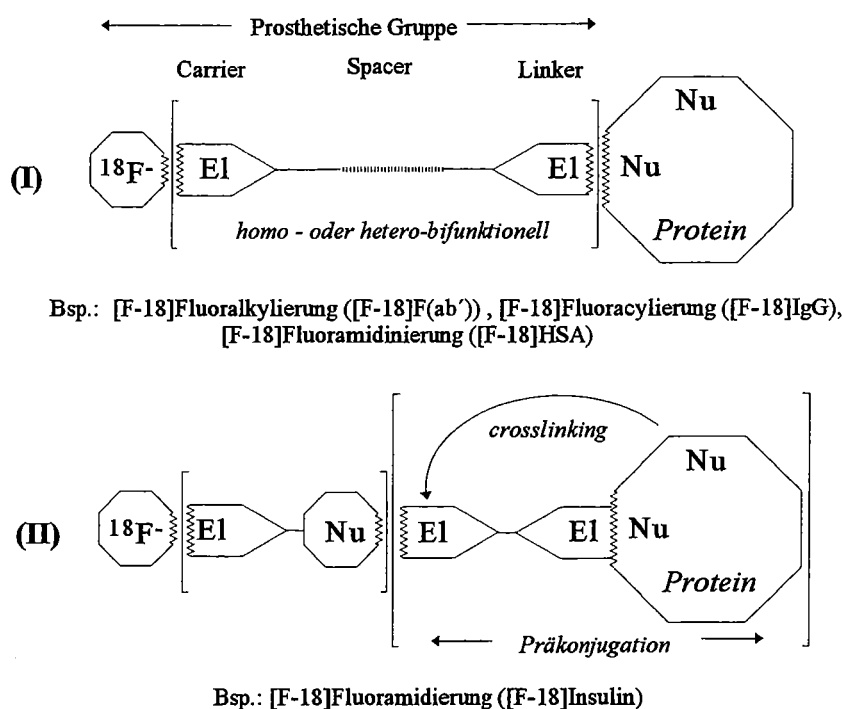
Schema 7: Synthese der n.c.a. [¹⁸F]fluorierter aromatischer Aminosäuren 2-[¹⁸F]Fluor-L-Tyrosin (2-[¹⁸F]TYR), 4-[¹⁸F]Fluor-L-meta-tyrosin (4-[¹⁸F]FMT) und 6-[¹⁸F]Fluor-L-DOPA (6-[¹⁸F]FDOPA) via nukleophiler Substitution des korrespondierenden, aktivierten Benzaldehyds und anschließender, mehrstufiger Aufbausynthese mittels (S)-BOC-BMI (S-(-)-1-BOC-2-t.butyl-3-methyl-4-imidazolidinon) [41].

Aliphatische ¹⁸F-markierte Aminosäuren haben bisher aufgrund ihrer erwarteten, geringen metabolischen Stabilität kaum Beachtung gefunden. Als einzige Ausnahme ist hier (2S,4R)-4-[¹⁸F]Fluorprolin zu erwähnen [89,90]. Die Darstellung erfolgt durch ¹⁸F-für-Tos-Austausch an (2S,4S)-N-BOC-4-O-tosyl-hydroxyprolinmethylester und anschließender saurer Schutzgruppenabspaltung. Die Gesamtsynthesezeit beträgt ca. 80 min, die radiochemische Ausbeute wird mit 20-30% angegeben [89]. Die Eignung von ¹⁸F-Fluorprolin als Tracer der Prokollagen- und Kollagen-Synthese zur Diagnose von peripheren Tumoren wird zur Zeit untersucht.

1.5.2 ^{18}F -fluorierte Peptide und Proteine

Proteine und Peptide können aufgrund des hohen Oxidationspotentials von Fluor nicht über eine oxidative ^{18}F -Fluorierung markiert werden. Falls jedoch auf hohe spezifische Aktivitäten der Produkte verzichtet werden kann, wird bisweilen die geträgerte elektrophile ^{18}F -Fluorierung als potentielle Alternative angesehen. So wurde beispielsweise über Acetylhypofluorit ein tyrosinhaltiges Endorphinanalogon dargestellt [91]. Aufgrund der begrenzten Anwendbarkeit dieser Alternative sowie den Problemen, die sich durch eine 'geringe spezifische Aktivität' der Produkte ergeben (siehe Abschnitt 3.1), wird auf diese Methode nicht weiter eingegangen.

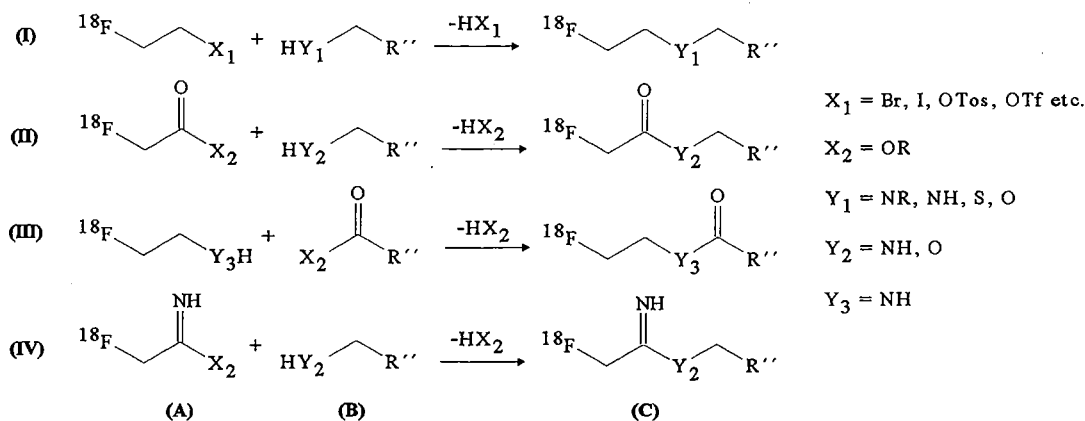
Somit ist die von nukleophilem ^{18}F -Fluorid ausgehende Peptid- und Proteinmarkierung via prosthetischer Gruppen (prosthetic group labelling) aus radiochemischer und nuklearmedizinischer Sicht die zur Zeit einzig anwendbare Methode. Hierbei sind prinzipiell zwei verschiedene Strategien zu unterscheiden, deren Zweckmäßigkeit abhängig ist von den chemischen und pharmakologischen Eigenschaften des zu markierenden Moleküls (Schema 8).



Schema 8: Strategien zur ^{18}F -Markierung von Peptiden und Proteinen mittels ^{18}F -markierter prosthetischer Gruppen. (I): ^{18}F -Markierung via homo- oder hetero- bifunktioneller Gruppen mit elektrophiler Natur (El) oder mittels (II) heterobifunktionellen Gruppen mit sowohl elektrophiler als auch nukleophiler Natur (El, Nu) und Präkonjugation des Peptids oder Proteins.

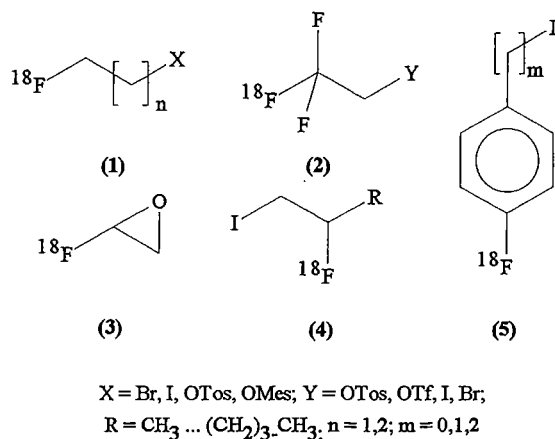
(I) Die ^{18}F -Markierung via homo- und hetero- bifunktioneller Gruppen mit elektrophiler Natur (El): Beide Funktionen sowohl die Abgangsgruppe zur Einführung des nukleophilen ^{18}F -Fluorids (Carrier) als auch die Kopplungsfunktion der prosthetischen Gruppe zum Peptid oder Protein (Linker) sind elektrophiler Natur. Hierbei ist die elektrophile Natur der >Linkergruppe< durch die nukleophile Natur der zu markierenden Seitenketten der

Peptide und Proteine gegeben (Amino-, Thiol- und Alkoholfunktionen). Typische Vertreter dieser Gruppe sind Reagenzien zur ^{18}F -Fluoralkylierung, zur ^{18}F -Fluoracylierung und zur ^{18}F -Fluoramidinierung (Schema 9, (I), (II) und (IV)).

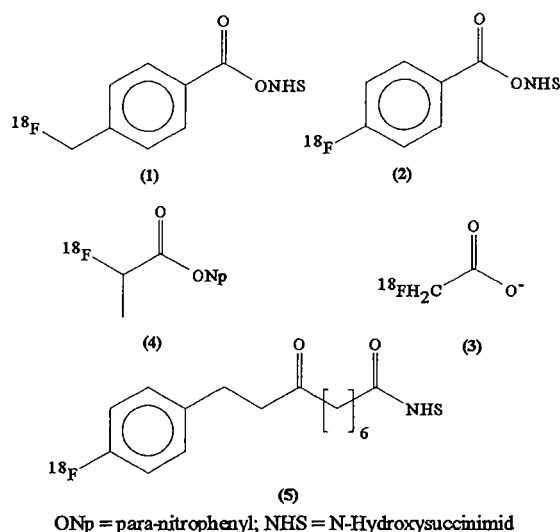


Schema 9: Reaktionsschemata der (I) Fluoralkylierung, (II) Fluoracylierung, (III) Fluoramidierung und (IV) Fluoramidinierung. Beispiele für Reagenzien des Typs (A) und der Produkte (C) sind in den nachfolgenden Schemata aufgeführt.

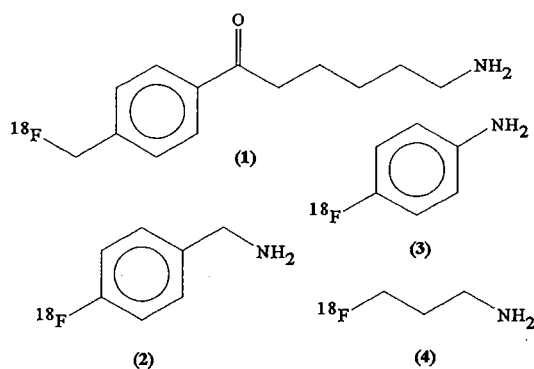
(II) Die ^{18}F -Markierung via heterobifunktioneller Gruppen mit sowohl elektrophiler als auch nukleophiler Natur (El, Nu) und Präkonjugation des Peptids oder Proteins, wie z.B. die ^{18}F -Fluoramidierung (Schema 9, (III)): Diese Strategie erlaubt über die Präkonjugation der nukleophilen Zentren des Proteins die Markierung des entstandenen Konjugats über eine nukleophile Funktion der prosthetischen Gruppe. Obwohl diese Strategie eine zumeist einfachere Synthese der ^{18}F -markierten prosthetischen Gruppe erlaubt, erfordert sie eine sehr aufwendige Schutzgruppenchemie am Peptid oder Protein, um ein 'crosslinking' mit weiteren nukleophilen Zentren am Zielmolekül zu verhindern. Daher bietet sich diese Strategie besonders für kleinere Peptide oder Proteine an, welche nur über eine geringe Zahl nukleophiler Zentren verfügen. Andererseits ist die sterische Veränderung des Zielmoleküls bei Anwendung dieser Strategie besonders groß, da im Gegensatz zu Methode (I) zur Markierung zwei Gruppen (prosth. Gruppe und Gruppe zur Präkonjugation) notwendig sind. Die einzige, bisher veröffentlichte ^{18}F -Markierung eines Proteins nach dieser Methode ist die Synthese von ^{18}F -Insulin [57]. Sie umfaßt die folgenden Schritte: a) Selektives Schützen der A-Gly¹ und B-Lys²⁹-Aminogruppe des Insulins (3 Aminfunktionen: B-Phe¹, A-Gly¹, B-Lys²⁹); b) Umsetzung des Produktes (A-Phe¹, B-Lys²⁹-Di-BOC-Insulin) mit Disuccinimidylsuberat (Präkonjugation) liefert carbonsäureaktiviertes B-Phe¹-Konjugat; c) Umsetzung mit N-[4-([^{18}F]Fluormethyl)benzoyl]-1,4-diaminobutan und d) anschließende Entschützung der beiden Aminfunktionen mit Trifluoressigsäure liefert ^{18}F -Insulin. Die nachfolgenden Schemata zeigen einige prosthetische Gruppen sowie exemplarische Anwendungen zur ^{18}F -Fluoralkylierung (Schema 10), ^{18}F -Fluoracylierung (Schema 11) und ^{18}F -Fluoramidierung (Schema 12).



Schema 10: Einige prosthetische Gruppen zur ¹⁸F-Fluoralkylierung



Schema 11: Einige prosthetische Gruppen zur ¹⁸F-Fluoracylierung



Schema 12: Einige prosthetische Gruppen zur ¹⁸F-Fluoramidierung

exemplarische Anwendungen:

(1): (n=1): Rezeptorliganden des serotonergen (N-[ω-¹⁸F]Fluorethylketanserin [92]) und dopaminergen Systems (N-[ω-¹⁸F]Fluorethyspiperon [47]) sowie zur Darstellung ¹⁸F-markierter Benzodiazepine ([¹⁸F]Fluorethylflumazenil [49]). (2): [N- [2-¹⁸F]- 2,2,2- trifluorethyl] 2- oxoquazepam [93]; (3): [¹⁸F]Fluor-misonidazol [50]; (4,1): N-([¹⁸F]Fluoralkyl)spiperone [71]; (5): (m=1): muskarinische Rezeptorliganden 2- und 4-[¹⁸F]Fluordexetimid [94]; Opioid-Rezeptorligand 4-[¹⁸F]Fluorfantanyl [48] (m=2) sowie Mehrstufensynthese von Butyrophenon-neuroleptika (m=3), z.B. ¹⁸F-Benperidol oder ¹⁸F-Haloperidol [95].

exemplarische Anwendungen:

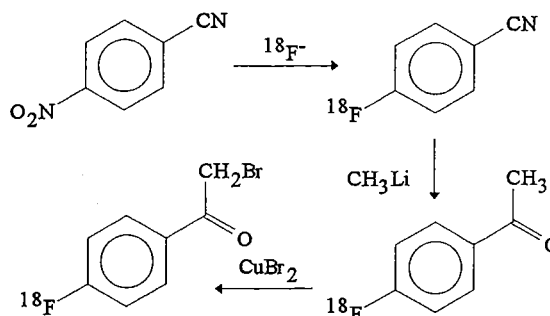
(1): Darstellung ¹⁸F-markierter Peptide und Proteine [96,97]; (2): 4-[¹⁸F]Fluorbenzoylierte Immunglobuline (IgG) [98,99] sowie ¹⁸F-markiertes chemotaktisches Peptid [100]; (3): [¹⁸F]Fluoracetylierte Urokinase [55]; N-ω-[¹⁸F]Fluoracetyl-5-methoxytryptamin und N-ω-[¹⁸F]Fluoracetyl-serotonin [101] (4): 2-[¹⁸F]Fluor-propionyl-(D)-Phe¹-Octreotid [59]; (5): ¹⁸F-markierte, monoclonale Antikörper [103,104]

exemplarische Anwendungen:

(1): ¹⁸F-Insulin [57]; (2): Zwischenstufe in der Synthese von m-Maleimido-N-(p-[¹⁸F]fluorbenzoyl)benzamid [105] und N-Succinimidyl 8-[4'-fluorbenzyl)amino]suberat [58] zur IgG-Markierung, Synthese von 4-[¹⁸F]Fluor-m-Iodobenzyl-guanidin [52] (3): Zwischenstufe in der Synthese von N-(p-[¹⁸F]Fluorphenyl)-maleimid [105] zur IgG-Markierung; [¹⁸F]RP 62203 (5HT₂ - Rezeptor Antagonist) [106,107] (4): ¹⁸F-Fluorierung kleinerer Peptide [108].

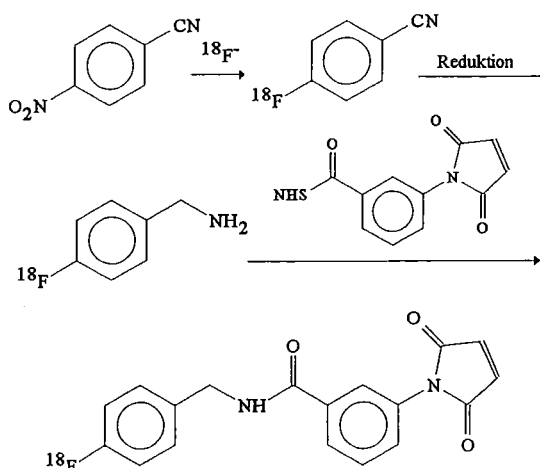
Die ^{18}F -Fluoralkylierung eignet sich besonders zur Darstellung kleiner, ^{18}F -markierter Peptide, da im Gegensatz zur ^{18}F -Acylierung eine ^{18}F -Alkylierung von Aminfunktionen in der Regel unter physiologischen Bedingungen nicht zu einer Veränderung der Nettoladung des Peptids oder Proteins führt. Obgleich jedoch sogar ^{11}C -Markierungen von Proteinen mit $[^{11}\text{C}]$ Methyliodid in wässriger Phase bekannt sind [109], findet sich bisher in der Literatur nur ein Beispiel einer ^{18}F -Fluoralkylierung dieser Art [56].

So beschrieben Kilbourn et al. [56] die Synthese von 4- $[^{18}\text{F}]$ Fluorphenacylbromid (Schema 13). ^{18}F -Markierungen von Modellproteinen mit diesem Reagens zeigten jedoch nur geringe Ausbeuten bei Reaktionszeiten von bis zu 1h. Ebenso konnte während der HPLC-Reinigung des Produktes aufgrund schlechter Trennung eine Koelution und Verunreinigung des Produktes mit 4-Nitrophenacylbromid (bis zu 100 μg) nicht vermieden werden.



Schema 13: Synthese von 4- $[^{18}\text{F}]$ Fluorphenacylbromid zur ^{18}F -Fluoralkylierung von Proteinen [56]

Eine ^{18}F -prosthetische Gruppe zur thiolselektiven Alkylierung wurde von Shiue et al. [105] beschrieben. Ihre Darstellung gelang nach nebenstehender Dreistufensynthese mit einer radiochemischen Ausbeute von 10% in einer Gesamtsynthesezeit von 70 min. Trotz ihres größeren sterischen Anspruchs dürfte sie zur Markierung von großen Proteinen geeignet sein. Ein Nachteil dieser Methode ist die geringe Häufigkeit freier Thiolgruppen in Peptiden und Proteinen und die somit zu erwartende geringe Ausbeute für den Konjugationsschritt.

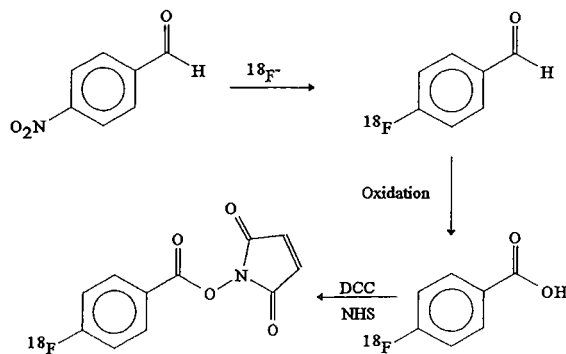


Schema 14: Synthese von 3-Maleinimido-benzoesäure-4- $[^{18}\text{F}]$ fluorbenzamid zur Markierung von Thiolen [105]

Letztgenanntes gilt ebenso für ein N-(4-[^{18}F]Fluorphenyl)-maleinimid, welches als weiteres Reagens dieser Art in einer 4-stufigen Reaktion (100 min, 15 % RCA) synthetisiert wurde [105]. Vielseitiger einsetzbar sind die ^{18}F -Acylierungsagenzien. Sie erlauben die ^{18}F -Markierung von Proteinen und Peptiden auch in wässrigen Lösungsmitteln unter leicht basischen Bedingungen. Mit Hilfe ihres strukturell einfachsten Vertreters, dem [^{18}F]Fluoracetat, welches mittels wasserlöslicher Carbodiimide zur Konjugation von Urokinase diente, gelang Müller-Platz et al. [55] die erste ^{18}F -Markierung eines Proteins. Nach dieser Methode wurde ebenso N- ω -[^{18}F]Fluoracetyl-5-methoxytryptamin sowie N- ω -[^{18}F]Fluoracetylserotonin dargestellt [101,102].

Als geeigneter erwiesen sich in der Folgezeit ^{18}F -fluorierte Ester. Während sich 2-[^{18}F]Fluorpropionsäuremethylester [74] gegenüber sterisch gehinderten Aminen als relativ unreaktiv erwies [75], konnte mit Hilfe von N-Succinimidyl-8-[(4'-[^{18}F]fluorbenzyl)-amino]suberat ein Immunglobulin E sowie ein F(ab) und F(ab')₂-Fragment mit radiochemischen Ausbeuten von 30-49% markiert werden [58,103,104]. Die dreistufige Darstellung dieses ^{18}F -Agens (25-40% RCA, 60 min) orientierte sich an der Synthese von 3-Maleinimidobenzoessäure-4-[^{18}F]fluorbenzamid (Schema 14). So wurde nach der Synthese von 4-[^{18}F]Fluorbenzylamin N-Succinimidyl-8-[(4'-[^{18}F]fluorbenzyl)-amino]suberat im letzten Schritt durch Umsetzung mit Disuccinimidylsuberat dargestellt (Schema 15) [58].

Zur Reduzierung des sterischen Bedarfs der prosthetischen Gruppe und der damit verbundenen unerwünschten Modifikation des Zielmoleküls stellt N-Succinimidyl-4-[^{18}F]fluorbenzoat ([^{18}F]SFB) eine geeignete Alternative zu obengenanntem Agens dar (3 Stufen, 100 min, RCA 25%) [99]. Aufgrund der mäßigen radiochemischen Ausbeute von 25% wurde kürzlich eine verbesserte Methode vorgestellt, welche die Darstellung von [^{18}F]SFB in radiochemischen Ausbeuten von 75% binnen 60 min erlaubt [75].



Schema 15: Synthese von N-Succinimidyl-4-[^{18}F]fluorbenzoat zur Markierung von Peptiden und Proteinen [99]

Besonders günstige Voraussetzungen zur erfolgreichen Markierung auch kleinster Peptide besitzt die 2-[^{18}F]Fluorpropionyl-Gruppe, da sie, abgesehen von ihrer geringen Größe im Vergleich zu [^{18}F]SFB, eine geringere Lipophilie besitzt und somit eine geringere Veränderung des in vivo-Verhaltens der Zielmoleküle zu erwarten ist.

Ihre Einführung in Peptide oder Proteine gelingt über den 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-4-nitrophenyl- bzw. N-succinimidylester [75,110]. Während sich mit 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester durch 1-Hydroxybenzotriazol-Katalyse auch regioselektive Acylierungen durchführen lassen [111], können Acylierungen mit 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-N-succinimidylester -aufgrund seiner geringen Hydrolysestabilität- nur in situ durchgeführt werden [75].

Einstufige Synthesen von ^{18}F -Fluorierungsreagenzien durch nukleophile ^{18}F -Fluorierungen an den entsprechenden perfluorierten Vorläufern wurden von Herman et al. [112] am Beispiel der Synthesen von [^{18}F]-Pentafluorbenzaldehyd und Pentafluorbenzoesäure-[^{18}F]-2,3,5,6-tetrafluorphenylester beschrieben. Da es sich in diesen Fällen jedoch um Isotopenaustauschreaktionen handelt, besitzen diese Reagenzien aufgrund ihres hohen Trägergehaltes keine Vorteile gegenüber einer direkten elektrophilen Fluorierung des Zielmoleküls und sind zur Markierung von Peptiden und Proteinen für nuklearmedizinische Zwecke ungeeignet.

Vielversprechender erscheint die kürzlich veröffentlichte einstufige Synthese von 4-[^{18}F]Fluormethylbenzoesäure-N-succinimidylester via nukleophiler ^{18}F -Fluorierung von 4-[(2,4-Dinitroxyloxy)-methyl]-benzoesäure-N-succinimidylester in Aceton mit radiochemischen Ausbeuten von ca. 25% (40 min) [97,113].

Tabelle 3: Zusammenfassung der bisher bekannten Methoden zur ^{18}F -Fluorierung von Peptiden und Proteinen via 'Prosthetischer Gruppen'

Methode	^{18}F -Markierungsagens	Syntheseschritte/ Zeit [min] / RCA ⁺ [%]
Acylierung	[^{18}F]Fluoressigsäure / DCC	2 / 80min / 50% [55]
	2-[^{18}F]Fluorpropionsäuremethylester	1 / 15 min / 90% [74]
	Pentafluorbenzoesäure-[^{18}F]-2,3,5,6-tetrafluorphenylester (*)	1 / 30 min / k.D.v. [112]
	N-Succinimidyl-8-[(4'-[^{18}F]fluorbenzyl)-amino]suberate	3 / 55-60min / 25-40% [58]
	[^{18}F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester	3 / 100min / 25% [99]
	2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester	3 / 90 min / 60% [75]
	4-([^{18}F]Fluormethyl)benzoesäure-N-succinimidylester	1 / 30-35 min / 18% [97,113]
Amidierung	N-[4-([^{18}F]Fluormethyl)benzoyl]-1,4-diaminobutan	2 / 80min / 52% [57]
Amidinierung	3-[^{18}F]Fluor-5-nitro-benzimidomethylester	3 / 45min / 20-33% [56]
Alkylierung	N-(4-[^{18}F]Fluorphenyl)-maleinimid	4 / 100min / 15% [105]
	3-Maleinimido benzoesäure-4-[^{18}F]fluorbenzamid	3 / 70min / 10% [105]
	[^{18}F]-Pentafluorbenzaldehyd (**)	1 / 30 min / 60 % [112]
	4-[^{18}F]Fluorphenacylbromid	3 / 75min / 28-40% [56]

(+) radiochemische Ausbeute bezogen auf ^{18}F -Fluorid;

(*) via nucleophiler ^{18}F -Fluorierung von Pentafluorbenzoesäure-[^{18}F]-2,3,5,6-tetrafluorphenylester;

(**) via nucleophiler ^{18}F -Fluorierung von [^{18}F]-Pentafluorbenzaldehyd;

(k.D.v) keine Daten verfügbar

2. Problemstellung

Radiomarkierte Aminosäuren werden in der bildgebenden Nuklearmedizin bereits als äußerst hilfreiche Hirn - und Tumortracer eingesetzt und zum Teil bereits routinemäßig genutzt. Auch Peptiden und Proteinen kommt vor allem in der Tumordiagnostik eine stetig wachsende Bedeutung zu.

Aufgrund seiner Zerfallscharakteristik ist als Markierungsisotop für die obengenannten Verbindungsklassen zur Darstellung eines geeigneten Tracers für den diagnostischen Einsatz mittels der Positronen-Emissions-Tomographie Fluor-18 ($t_{1/2} = 109.7$ min) von besonderem Interesse.

Die Darstellung ^{18}F -fluorierter Aminosäuren gelingt geträgert auf direktem Wege über elektrophile ^{18}F -Spezies ($^{18}\text{F}[\text{F}_2]$ und $[^{18}\text{F}]\text{Acetylhypofluorit}$) als auch in trägerfreier Form über mehrstufige Aufbausynthesen. Demgegenüber ist eine trägerfreie oder zumindest trägerarme, direkte Radiofluorierung von Peptiden und Proteinen nicht möglich. Alternativ stehen hierzu gegenwärtig nur einige wenige, kaum zu automatisierende ^{18}F -Markierungsmethoden via prosthetischer Gruppen zur Verfügung.

Als Beitrag zur Entwicklung und Etablierung von Markierungsstrategien zur Darstellung trägerfreier (n.c.a.) ^{18}F -fluorierter Peptide und Proteine sollten bereits eingeführte ^{18}F -Fluoracylierungs- und ^{18}F -Fluoramidierungstechniken verglichen werden. Hierzu sollten Mehrstufensynthesen der entsprechenden ^{18}F -Reagenzien optimiert und im Hinblick auf eine Routineproduktion vereinfacht werden.

Anschließend sollte eine neue Markierungsstrategie zur Darstellung n.c.a. ^{18}F -fluorierter Proteine entwickelt werden. Anders als bei den bisher bekannten Verfahren sollte diese auf einer einfachen und effizienten, leicht zu automatisierenden Einstufensynthese eines ^{18}F -fluorierten Proteinmarkierungsreagens basieren. Zur deren Optimierung sollten die grundlegenden Parameter für die n.c.a. ^{18}F -Fluorierung der prosthetischen Gruppe ebenso untersucht werden wie die ausbeutebestimmenden Faktoren der nachfolgenden Proteinmarkierungsreaktion.

Weiterhin sollten die verschiedenen Proteinmarkierungsverfahren bezüglich ihrer radiochemischen Ausbeute, Anwendbarkeit und eventueller Limitierungen verglichen und bewertet werden.

Diese Ergebnisse sollten sodann unter Berücksichtigung der spezifischen Eigenschaften der untersuchten prosthetischen Gruppen auf die Radiofluorierung der beiden

nuklearmedizinisch interessanten Peptide SMS 201-995 (Octreotid) und Apamin übertragen werden.

Schließlich sollten im Hinblick auf die mehrstufigen Traceraufbausynthesen n.c.a. ^{18}F -fluorierter aromatischer Aminosäuren zur Messung des Aminosäuretransports alternative Ansätze zur Synthese n.c.a. ^{18}F -markierter Tyrosinanaloga aufgezeigt und optimiert werden.

Zur Isolierung der Produkte in einer hohen radiochemischen Reinheit und einer der Halbwertszeit des Fluor-18 kompatiblen Zeitspanne sollten für alle untersuchten Reaktionen schnelle Trennmethode ausgearbeitet werden. Während dies für analytische Fragestellungen vorwiegend durch chromatographische Verfahren erreicht werden kann, sollte für präparative Zwecke die Festphasenextraktionstechnik Anwendung finden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Zur spezifischen Aktivität radioaktiv markierter Polypeptide und Proteine

Für die nuklearmedizinische Anwendung radioaktiv markierter Verbindungen besitzt die spezifische Aktivität große Bedeutung. Sie ist die auf die absolute Stoffmenge eines Radiopharmakons bezogene absolute Aktivität und wird gewöhnlich als molare Aktivitätskonzentration angegeben ($[\text{GBq}/\mu\text{mol}]$ oder $[\text{Ci}/\mu\text{mol}]$). Eine hohe spezifische Aktivität und eine damit verbundene geringe 'Verdünnung' des Produktes mit isotop inaktiv markiertem Produkt oder nicht-isotopen Analoga mit ähnlicher oder gleicher physiologischer Wirksamkeit ist beispielsweise bei der Erfassung physiologischer Organfunktionen oder Rezeptorstudien von entscheidender Bedeutung (siehe z.B. [88]). Daher stellt die spezifische Aktivität eine mitunter wichtige Größe in der Qualitätskontrolle kurzlebiger Radiopharmaka dar. Bei Anwesenheit von Verunreinigungen, wie z.B. Edukten, analogen Verbindungen oder Derivaten mit gleicher oder ähnlicher physiologischer Aktivität, werden bisweilen auch die Begriffe der 'apparenten' oder 'effektiven' spezifischen Aktivität verwendet [88].

Im folgenden Abschnitt soll am Beispiel der ^{18}F -Markierung über prosthetische Gruppen erläutert werden, warum die spezifische (oder apparente oder effektive) Aktivität für die Qualitätskontrolle und zur Beurteilung der biologischen Aktivität eines radioaktiv markierten Polypeptids oder Proteins keine Aussagekraft besitzt.

Bei der Radiofluorierung von Peptiden und Proteinen mittels prosthetischer Gruppen ist eine Beeinträchtigung bzw. ein partieller Verlust der biologischen Aktivität der sich bildenden Konjugate nicht ausgeschlossen, da durch die große Anzahl funktioneller Gruppen (z.B. Amin- oder Thiolgruppen in größeren Proteinen wie Mab's mit ca. 1.500 Aminosäuren) die Konjugatbildung statistisch (über das gesamte Makromolekül verteilt) erfolgt und somit Modifikationen pharmakophorer Gruppen, biologisch aktiver Sequenzen oder einzelner Epitope nicht vermieden werden können. Eine potentielle Beeinträchtigung der biologischen Aktivität ist daher besonders bei 'Mehrfachmarkierungen' eines Proteinmoleküls zu beachten. Ferner stehen zur Zeit außer der HPCE (Hochleistungskapillarelektrophorese, high performance capillary electrophoresis) keine instrumentellen Methoden zur Verfügung, radioaktiv markierte Proteine von ihren nichtmarkierten Analoga (bei Massendifferenzen im Bereich von 0.1-0.4% im Falle molarer Massen von 50.000 - 300.000 g/mol) zu trennen. Die Anwendung der HPCE ist jedoch zur Zeit nur auf analytische Fragestellungen beschränkt.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität eines ^{18}F -markierten Polypeptids oder Proteins kann daher nicht, wie bei kleineren (vom Edukt abtrennbaren) ^{18}F -fluorierten Verbindungen, die *Stoffmenge des Produktes* zugrunde gelegt werden. In diesen Fällen berechnet sich die spezifische Aktivität unter Berücksichtigung der *Eduktstoffmenge* wie folgt:

$$\text{spezifische Aktivität [GBq/}\mu\text{mol]} = \frac{\text{absolute Aktivität des Produktes [GBq]}}{\text{Stoffmenge (Edukt + Produkt) [}\mu\text{mol]}}$$

Da in diese Beziehung die spezifische Aktivität des verwendeten Vorläufers (der prosthetischen Gruppe) nicht eingeht, geht laut dieser Definition im Konjugationsschritt jede Information über die absolute Stoffmenge des 'kalten Fluorträgers' verloren.

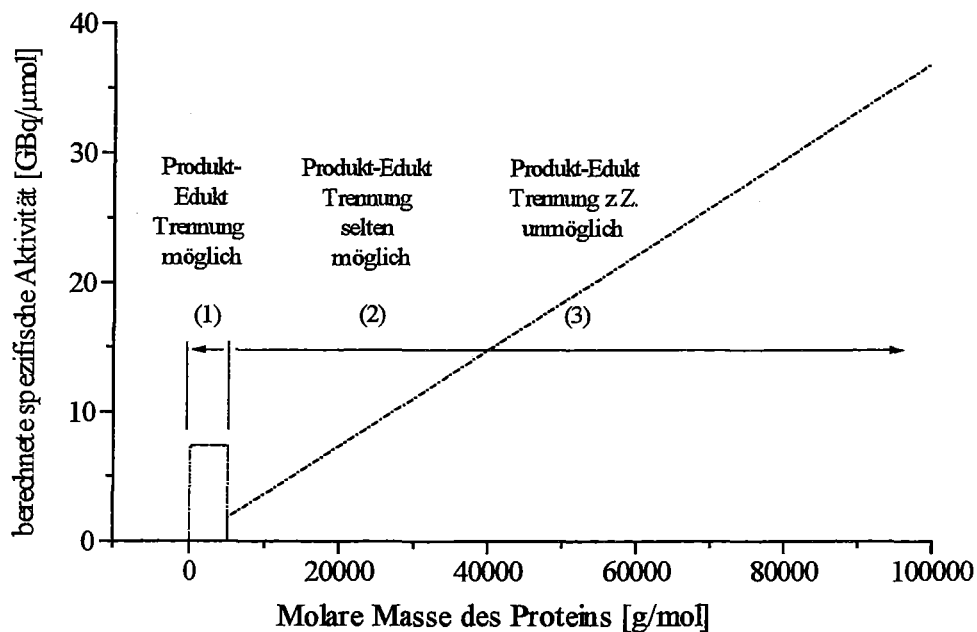
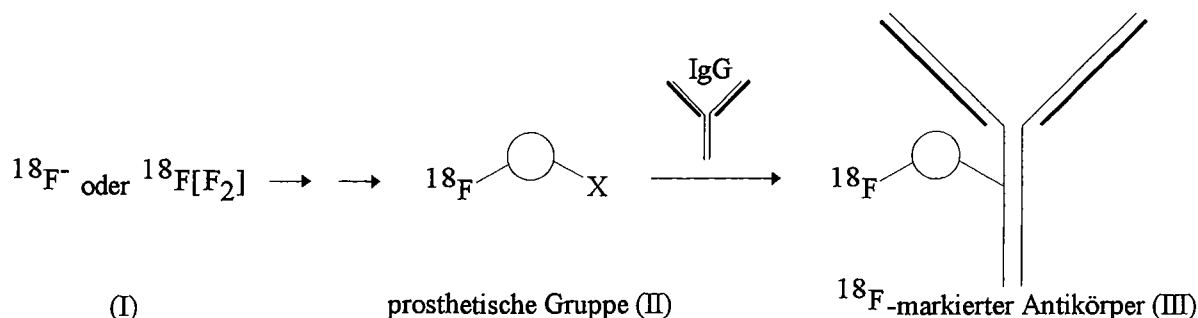


Abbildung 1: Theoretische spezifische Aktivität eines ^{18}F -markierten Peptids oder Proteins als Funktion seiner molaren Masse.

Randbedingungen: 1 mg Peptid bzw. Protein; Aktivität der prosthetischen Gruppe: 10 mCi (370 MBq); RCA: 100%; spez. Aktivität des ^{18}F -Markierungsagens = 200 Ci/mmol (7.4 GBq/ μmol)

In Abbildung 1 ist dies durch den berechneten Verlauf der spezifischen Aktivität für ^{18}F -markierte Polypeptide bzw. Proteine als Funktion ihrer molaren Masse des Proteins dargestellt. Bei kleinen molaren Massen ist die spezifische Aktivität des Produktes durch die Möglichkeit der Produkt-Edukt Trennung nur eine Funktion der spezifischen Aktivität der prosthetischen Gruppe; bei großen molaren Massen hingegen ist sie nur eine Funktion der molaren Masse bzw. der eingesetzten Eduktmenge.

Daher ist, wie in Schema 16 dargestellt wird, zumindest rechnerisch die ^{18}F -Markierung eines Immunglobulin G (IgG) über die Synthese einer prosthetischen Gruppe via elektrophiler Fluorierung sowie via nukleophiler Fluorierung in spezifischen Aktivitäten von 1500 Ci/mmol (56 GBq/ μmol) mittels prosthetischen Gruppen der unterschiedlichsten spezifischen Aktivität möglich.



Spezifische Aktivität der ^{18}F -Spezies (I)	Spezifische Aktivität der prosth. Gruppe (II)	Absolute ^{18}F -Aktivität der prosth. Gruppe (II)	Absolute ^{18}F -Aktivität d. ^{18}F -Antikörpers (III)	Anzahl prosth. Gruppe pro Antikörper (III)	Spezifische Aktivität des ^{18}F -Antikörpers (III)
$^{18}\text{F}^-$: 200 Ci/ μmol (7.4 TBq/ μmol)	200 Ci/ mmol (7.4 GBq/ μmol)	10 mCi (370 MBq)	max. 10 mCi (370 MBq) (bei 100% RCA)	7,5	1500 Ci/ mmol (56 GBq/ μmol)
$^{18}\text{F}^-$: 200 Ci/ μmol (7.4 TBq/ μmol)	1500 Ci/ mmol (56 GBq/ μmol)	10 mCi (370 MBq)	max. 10 mCi (370 MBq) (bei 100% RCA)	1	
$^{18}\text{F}[\text{F}_2]$: 3.5 mCi/ μmol (130 MBq/ μmol)	3.5 Ci/ mmol (130 MBq/ μmol)	20 mCi (740 MBq)	max. 10 mCi (370 MBq) (bei 50% RCA)	'430'	

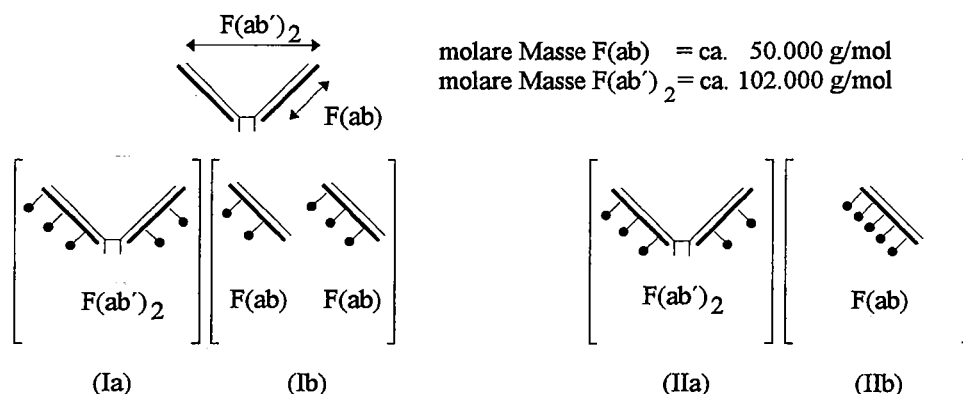
Schema 16: Hypothetische Wege zur Darstellung von 10 mCi (370 MBq) eines ^{18}F -markierten Antikörpers mit einer 'spezifischen Aktivität' von 1500 Ci/ mmol (56 GBq/ μmol) (molare Masse IgG = ca. 150.000 g/mol).

Diese hohe spezifische Aktivität entsteht durch Mehrfachmarkierung (mehrere prosthetische Gruppen je Proteinmolekül), die -wie zuvor erwähnt- potentiell zur Beeinträchtigung oder Verlust der biologischen Aktivität des Proteins führen kann. Somit ist statt der spezifischen Aktivität des markierten Proteins nur die Zahl der prosthetischen Gruppen je Proteinmolekül bzw. der Quotient (spezifische Aktivität des Antikörpers / Zahl der prosthetischen Gruppen je Molekül) von entscheidender Bedeutung und zur qualitativen Beurteilung einer Polypeptid- oder Proteinmarkierungsreaktion geeignet.

Ebenso ist es zur Diskussion und zur Beurteilung der Frage, in welchem Maße eine Markierungsreaktion z.B. die Immunreaktivität eines Antikörpers oder seiner Fragmente beeinträchtigt, zweckmäßig, statt der Stoffmenge [mol] die Angabe der absoluten Masse [g] zu verwenden. Dies wird anhand einer vergleichenden, qualitativen Beurteilung der Immunreaktivität markierter F(ab')_2 - und F(ab) -Antikörperfragmente (Schema 17) deutlich. Werden zur Markierung gleiche Massenkonzentrationen [g/l] der Fragmente verwendet (I), führt dies in beiden Fällen bei gleicher absoluter ^{18}F -Aktivität der Produkte zu gleicher Anzahl prosthetischer Gruppen pro F(ab) - Fragment (bzw. F(ab) -Teilregion auf F(ab')_2) (Ia und Ib).

Hieraus folgt, daß die Immunreaktivität trotz ungleicher spezifischer Aktivität in beiden Präparationen als gleich zu betrachten ist, da die hypervariablen Regionen innerhalb der 'light chains' in gleichem Ausmaß statistisch von Konjugationen betroffen sind.

Demgegenüber weisen die Produkte zweier Markierungsreaktionen mit gleichen molaren Konzentrationen der Fragmente (IIa und IIb) zwar die gleiche spezifische Aktivität auf, doch wird aufgrund der größeren Anzahl prosthetischer Gruppen eine deutliche Abnahme der Immunreaktivität des markierten F(ab)-Fragments (IIb) zu erwarten sein.



(I): Gleiche Massenkonzentration [g/l]:

prosth.Gruppen/F(ab)-Fragment: F(ab')₂ = F(ab)

Immunreaktivität: F(ab')₂ = Immunreakt. F(ab)

spezifische Aktivität: F(ab')₂ ≠ spez. Akt. F(ab)

Σ¹⁸F-Aktivität F(ab')₂ = Σ¹⁸F-Aktivität F(ab)

(II): Gleiche molare Konz. [mol/l]:

prosth.Gr./F(ab)-Fragment: F(ab')₂ ≠ F(ab)

Immunreakt. F(ab')₂ ≠ Immunreakt. F(ab)

spezifische Akt. F(ab')₂ = spez. Akt. F(ab)

Σ¹⁸F-Aktivität F(ab')₂ = Σ¹⁸F-Akt. F(ab)

Schema 17: Qualitativer Einfluß gleicher Massenkonzentrationen und gleicher molarer Konzentrationen auf verschiedene Parameter zur Beurteilung der Immunreaktivität markierter F(ab')₂- und F(ab)-Antikörperfragmente.

Daher läßt sich zusammenfassend feststellen, daß die spezifische Aktivität allein kein geeigneter Wert zur Qualitätskontrolle eines radioaktiv markierten Proteins darstellt. Als einzig geeignet scheint hierzu die gemeinsame Angabe von zwei Werten:

$$\text{spezifische Aktivität [GBq/mg]} = \frac{\text{absolute Aktivität des Produktes [GBq]}}{\text{Masse des Eduktes [mg]}} \quad (1)$$

sowie:

$$\text{Konjugationszahl (k)} \equiv \text{Zahl der prosthetischen Gruppen je Polypeptidmolekül} \quad (II)$$

Die Konjugationszahl k ermöglicht neben einer qualitativen Beurteilung der Bioaktivität oder Immunreaktivität auch eine qualitative Beurteilung des verwendeten Markierungsagens bei gegebener Aktivität der Proteinlösung (Abb. 2):

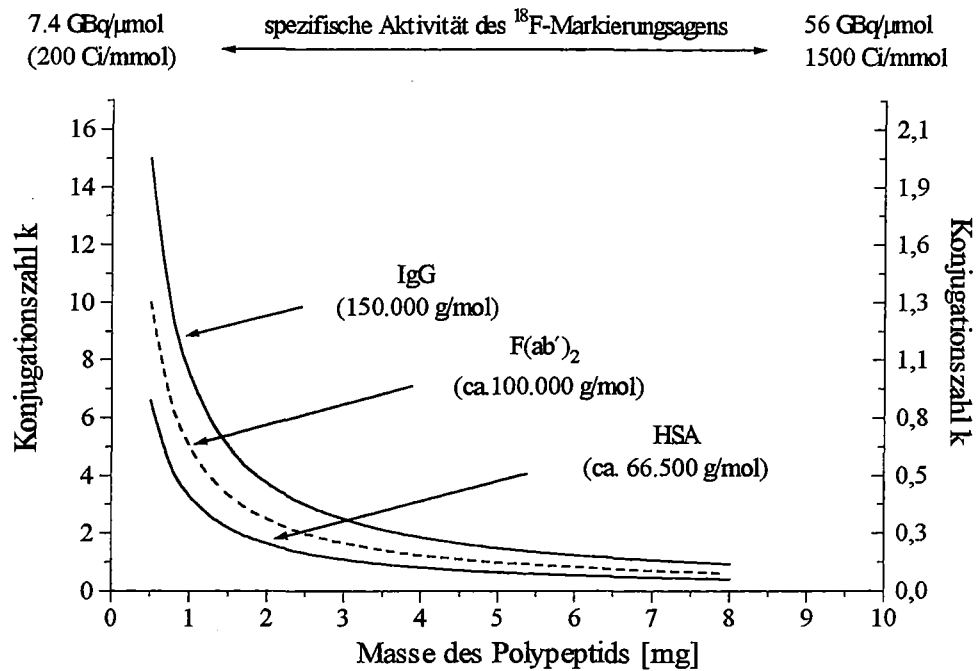


Abbildung 2: Berechnete Anzahl der prosthetischen Gruppen pro Polypeptid (Konjugationszahl k) als Funktion der Proteinmasse für Proteine mit verschiedener molarer Masse.

Randbedingungen: 10 mCi (370 MBq) proteingebundene Aktivität; spezifische Aktivität der verwendeten prosthetischen Gruppe = 200 Ci/mmol (7.4 GBq/μmol, linke Ordinate) und 1500 Ci/mmol (56 GBq/μmol, rechte Ordinate).

Da bei Markierungsexperimenten mittels selektiver prosthetischer Gruppen für jedes beliebige Protein bei gleicher eingesetzter Proteinmasse aufgrund der konstanten, mittleren Häufigkeit der Aminosäuren in Proteinen -beispielsweise- humanen Ursprungs (Lysin als Targetaminosäure für ^{18}F -Acylierungen mit 7.0 % Häufigkeit in humanen Proteinen [115], 6.4 % in E.Coli-Proteinen [114]) eine nahezu vergleichbare radiochemische Ausbeute zu erwarten ist, wurde auch in Abbildung 2 die Abhängigkeit der Konjugationszahl von der verwendeten Proteinmasse [mg] gewählt. Wie anhand der linken Ordinate zu erkennen ist, ist bei ^{18}F -Markierungen mittels prosthetischer Gruppen der typischen spezifische Aktivität von ca. 200 Ci/mmol (7.4 GBq/μmol) [56,99] unter Verwendung von typischerweise ca. 1 mg Protein bereits bei der Erzeugung von 10 mCi (370 mBq) proteingebundener Aktivität eine Konjugationszahl > 10 und somit eine deutliche Beeinträchtigung der biologischen Aktivität zu erwarten. Diese Mehrfachmarkierungen lassen sich zwar leicht durch Verwendung größerer Proteinmengen (bei sinkender spezifischer Aktivität) vermeiden, doch liegt aus nuklearmedizinischer Sicht die Grenze bei ca. 3-5 mg Protein / Applikation. Wie jedoch an der rechten Ordinate zu erkennen ist, sind durch Steigerung der spezifischen Aktivität des ^{18}F -Markierungsreagens auf 1500 Ci/mmol (56 GBq/μmol) selbst bei einem intakten Immunglobulin G statistisch kaum noch Mehrfachmarkierungen zu erwarten (Konjugationszahl ≤ 1).

Daher scheinen ^{18}F -Markierungsreagenzien geringer spezifischer Aktivität [103,104] zwar geeignet, erste in vitro-Ergebnisse sowie initiale in vivo Daten am Tiermodell mit maximalen absoluten Aktivitäten von ca. 1-2 mCi/mg Protein zu ermitteln, doch dürfte ihr erfolgreicher Einsatz zur nuklearmedizinischen Routineproduktion größerer Mengen ^{18}F -markierter Proteine oder Antikörper zweifelhaft sein.

3.2 Zur Radiofluorierung von Proteinen via ^{18}F -markierter prosthetischer Gruppen

3.2.1 Überlegungen zur Synthesestrategie

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, ist eine direkte Radiofluorierung von Polypeptiden nicht möglich. Daher bedient man sich zur ^{18}F -Fluorierung von Proteinen kleiner, ^{18}F -markierter prosthetischer Gruppen, welche folgende Voraussetzungen erfüllen sollten:

- Die Synthese sollte schnell und automatisierbar sein sowie hohe radiochemische Ausbeuten liefern; das Produkt sollte hohe spezifische Aktivitäten aufweisen.
- Der Proteinmarkierungsschritt sollte schnell und schonend durchzuführen sein, hohe radiochemische Ausbeuten liefern und keine Nebenreaktionen zeigen (kein inter- oder intra-molekulares Crosslinking etc.)

In Abbildung 3 sind alle bisher bekannten prosthetischen Gruppen zur ^{18}F -Markierung von Proteinen sowie die zur Konjugation genutzten Aminosäuren und ihre mittlere Häufigkeit in Proteinen humanen Ursprungs dargestellt. Die größte Gruppe bilden die ^{18}F -Fluoracylierungsagenzien (A), welche zur Derivatisierung der ε -Aminofunktion der Lysinreste (sowie der N-Termini) führen und die ^{18}F -Alkylierungsagenzien ((C),(D) und (F)) zur Derivatisierung der Lysin- ((C),(D)) sowie Cystein-Seitenketten ((D),(F)). Die ^{18}F -Fluoramidinierung (B) basiert ebenso auf der Modifikation der Lysinreste des Oligopeptids, während die ^{18}F -Fluoramidierung (E) von aktivierten Carbonsäurederivaten des Proteins ausgeht (Glu, Asp, oder Lys-CO-....-COOR').

Von Bedeutung für die radiochemische Ausbeute des Proteinmarkierungsschrittes ist neben der Reaktivität der prosthetischen Gruppe naheliegenderweise auch die relative Häufigkeit der zur Derivatisierung genutzten Aminosäure. Dies gilt besonders bei ^{18}F -Alkylierungen des Typs (D) und (F). Proteinmarkierungen dieser Art zeigen aufgrund der geringen Häufigkeit von Cystein trotz der hohen Nukleophilie der Sulfhydrylgruppe nur geringe Ausbeuten. Zu beachten ist hier ebenso, daß ein großer Teil der Cysteingruppen eines Proteins aufgrund von Disulfidbrückenbildung einer Alkylierung nicht zugänglich ist. So ist beispielsweise von den 35 (5.98%) Cystein-Resten der insgesamt 585 Aminosäuren, welche die komplette Sequenz von Human-Serum-Albumin bilden [116], nur ein Cystein-Rest (Cys³⁴) (dies entspricht 0.002% aller Aminosäuren in HSA) einer Alkylierung zugänglich! Daher ist eine Derivatisierung einer relativ häufig vorkommenden Aminosäure (z.B. 59 Lys / 585 Aminosäuren_(HSA) = 10.09 %) generell von Vorteil.

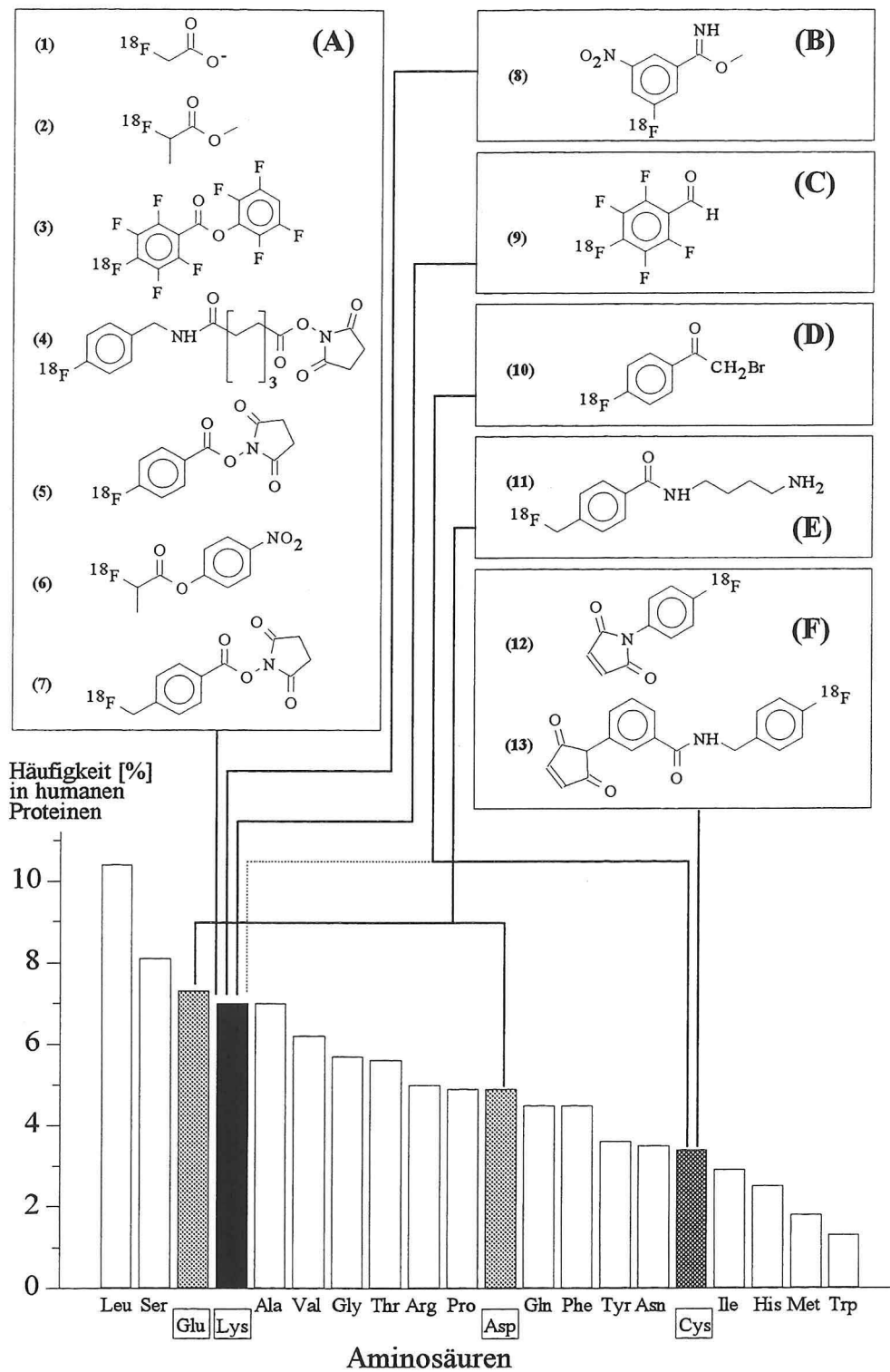


Abb. 3: Bisher verwendete prosthetischen Gruppen (Lit. siehe Tab.4) zur ^{18}F -Markierung von Proteinen mit Darstellung der zur Konjugation genutzten Aminosäuren. Die Aminosäuren sind geordnet nach ihrer statistischen Häufigkeit in Proteinen humanen Ursprungs [115].

Tab. 4: Einige Charakteristika der ^{18}F -markierten prosthetische Gruppen aus Abbildung 3

Gruppe	Nr.	Konjugations-Methode	Bemerkungen zum Konjugationsschritt	Lit.
(A)	(1)	Acylierung	Aktivierung mit DCC, Nebenreaktionen, Crosslinking	[55]
	(2)	Acylierung	unreaktiv, schlechte Konjugationsausbeuten	[74]
	(3)	Acylierung	spezifische Aktivität zu gering	[112]
	(4)	Acylierung	sterisch anspruchsvolle Gruppe, für kleine Polypeptide nicht geeignet	[58]
	(5)	<i>Acylierung</i>	<i>gute Konjugationsausbeuten</i>	[99]
	(6)	<i>Acylierung</i>	<i>Proteinmarkierg. mit diesem Agens noch nicht evaluiert</i>	[75]
	(7)	Acylierung	wenig Daten zur Proteinmarkierung verfügbar	[97]
(B)	(8)	Amidinierung	schlechte Konjugationsausbeuten, spez. Aktivität gering	[56]
(C)	(9)	reduktive Alkylierung	spezifische Aktivität zu gering, lange Reaktionszeiten, anschließende Reduktion mit NaBH_4 notwendig	[112]
(D)	(10)	Alkylierung	geringe Konjugationsausbeuten, lange Reaktionszeiten	[56]
(E)	(11)	Amidierung	nur selten anwendbar, Protein muß aktiviert werden	[57]
(F)	(12)	Alkylierung	lange Reaktionszeiten, erwartete Ausbeuten gering	[105]
	(13)	Alkylierung	lange Reaktionszeiten, erwartete Ausbeuten gering	[105]

Im Hinblick auf den Proteinmarkierungsschritt (siehe Tabelle 4) genügen nur die ^{18}F -Fluoracylierungsagenzien (A)-(5-7) in Abbildung 3 den obengenannten Voraussetzungen. Da 4- ^{18}F -Fluormethylbenzoesäure-N-succinimidylester ((A)-(7)) bezüglich des Konjugationsverhaltens im Vergleich zu 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester ((A)-(5)) keine signifikanten Unterschiede zeigen sollte und aufgrund des aromatisch gebundenen Fluors für 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester - Konjugate eine höhere in vivo Stabilität gegenüber Defluorierung zu erwarten ist, wurden im folgenden die Anwendungsmöglichkeiten und Limitierungen der ^{18}F -Markierung von Proteinen via ^{18}F -Fluoracylierung mit 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester ((A)-(6)) und 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester ((A)-(5)) untersucht.

3.2.2 Zur ^{18}F -Fluoracylierung von Proteinen

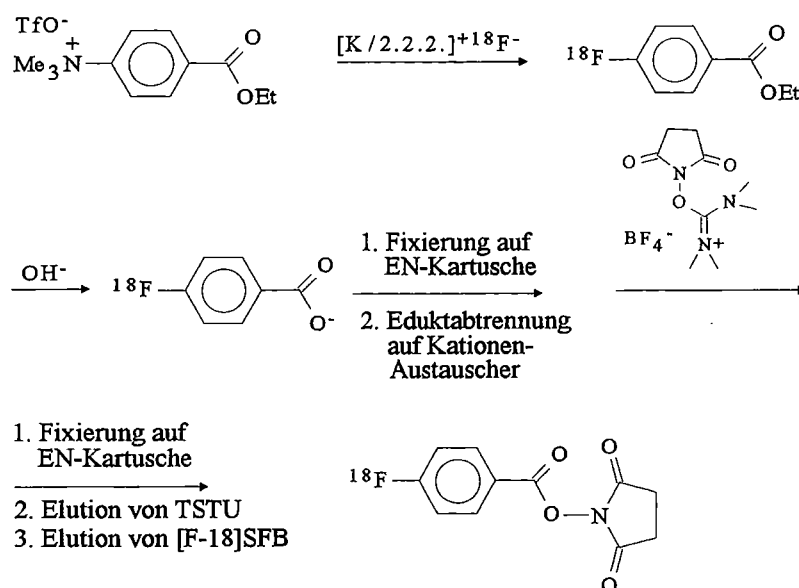
3.2.2.1 Darstellung von 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester

Zur Synthese von 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester (^{18}F SFB) wurde ursprünglich die nukleophile ^{18}F -Fluorierung von 4-Formyl-N,N,N-trimethylanilinium-triflat vorgeschlagen [99], der eine Oxidation mit KMnO_4 zur 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure und anschließende Aktivierung mittels DCC/ N-Hydroxysuccinimid (NHS) folgte (radiochemische Ausbeute ca. 25%, 100 min). Eine Abtrennung des ^{18}F -markierten Produktes vom Edukt erfolgte hierbei über eine RP-18 Kartuschenfixierung und anschließende Si-60-

Kartuschenfiltration. Nach diesem Verfahren ist eine Isolierung von [^{18}F]SFB in trägerfreier und chemisch reiner Form nur mit abschließender HPLC Reinigung möglich, da 4-Formyl-N,N-dimethylanilin, welches durch Demethylierung des Eduktes entsteht, mit oben genanntem Kartuschensystem nicht abgetrennt werden kann.

Eine kürzlich veröffentlichte, verbesserte Synthese [75] basiert auf der ^{18}F -Fluorierung des Triflatsalzes von 4-N,N,N-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester. Die Hydrolyse des Reaktionsgemisches und anschließendes Ansäuern sollte eine Abtrennung der 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure von 4-Dimethylaminobenzoessäure und 4-Trimethylammoniumbenzoessäure mittels RP-18-Kartuschenfixierung ermöglichen. Doch auch hier wird wegen der Unvollständigkeit der Kartuschentrennung eine HPLC-Reinigung empfohlen. Ebenso muß das verwendete Aktivierungsgens, N,N'-Disuccinimidylcarbonat, HPL-chromatographisch abgetrennt werden (radiochemische Ausbeute ca. 70%; 60 min).

Zur Vereinfachung der Synthese von n.c.a. [^{18}F]SFB wurde eine Strategie entwickelt, welche eine quantitative Isolierung des primär gebildeten ^{18}F -Fluorierungsproduktes beinhaltet und eine Abtrennung des Aktivesters von überschüssigem Aktivierungsgens ohne HPLC ermöglicht (s.u. Schema 18).



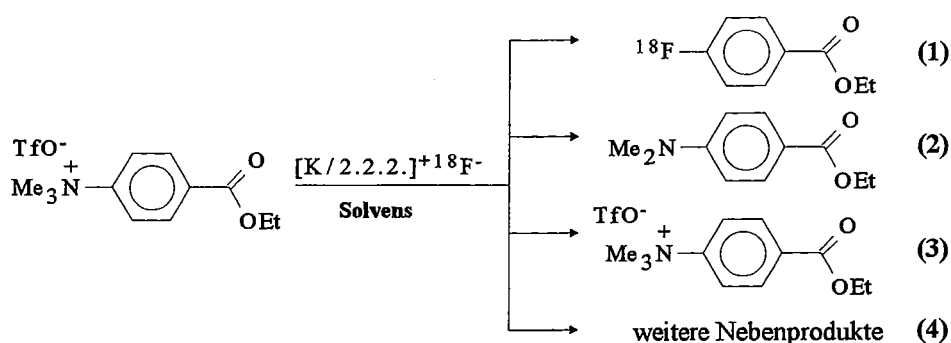
Schema 18: Syntheschema der Darstellung von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester ([^{18}F]SFB).

Primäre Reaktion ist die n.c.a. ^{18}F -Fluorierung des Triflatsalzes von 4-N,N,N-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester [117]. Die anschließende Hydrolyse liefert neben 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure auch 4-N,N,N-Trimethylammoniumbenzoesäure und 4-N,N-Dimethylaminobenzoessäure (über Demethylierung des Eduktes). Die Isolierung der aktiven Verbindung erfolgt über Zwischenfixierung auf einer Polystyrolkartusche (EN) und anschließendem

Kationenaustausch. Zur abschließenden Veresterung werden Uroniumsalze eingesetzt, welche aufgrund ihrer geringen Lipophilie eine Isolierung des Esters mittels Festphasenextraktion ermöglichen.

3.2.2.1.1 Einfluß des Lösungsmittels auf die Zersetzung des Triflat-Salzes von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester

Erste Versuche zur ^{18}F -Fluorierung von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester in Acetonitril zeigten neben der Bildung von 4- ^{18}F Fluorbenzoesäureethylester und 4-Dimethylaminobenzoethylester die Bildung weiterer, nicht identifizierter, inaktiver Nebenprodukte (Schema 19). Da diese jedoch im Gegensatz zur 4-N,N-Dimethylaminobenzoethylester nur teilweise durch den nach der Hydrolyse folgenden Reinigungsschritt am Kationenaustauscher von 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure abgetrennt werden konnten, wurde zur Reduzierung dieser inaktiven Verunreinigungen die Abhängigkeit der Zersetzung des Eduktes vom verwendeten Solvens bei zwei verschiedenen Reaktionstemperaturen untersucht.



Schema 19: Reaktionsprodukte der ^{18}F -Fluorierung von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester

Tabelle 5: Abhängigkeit der Zersetzung des Triflat-Salzes von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester vom Solvens bei 92°C und 115°C.
(Reaktionsbedingungen: 250µl Solvens, 6 mg des Triflat-Salzes von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester, 5 min)
Die Bestimmung der Nebenprodukte erfolgte näherungsweise durch Integration der UV-Signale (254 nm).

Nr.	T [°C]	K ₂ CO ₃ (1M) [µl]	Solvens	Kryptofix 2.2.2 [mg]	Produktverteilung [%]		
					(3)	(4)	(2)
1	92	-	CH ₃ CN	-	>99	0	<1
2	92	-	CH ₃ CN	5	98	< 1	<2
3	92	5	CH ₃ CN	5	77	16	7
4	92	5	DMAA	5	70	3	27
5	92	5	DMSO	5	94	<1	5
6	92	5	DMF	5	77	10	13
7	92	5	DEGDEE (*)	5	52	37	11
8	115	5	DMSO	5	63	9	28
9	115	5	DMAA	5	47	24	29
10	115	5	DMF	5	38	35	27

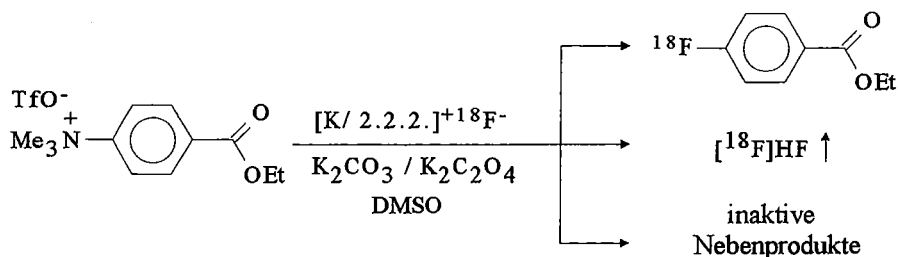
(*) DEGDEE = Diethylenglycoldiethylether

So führt die Zersetzung in Dimethylacetamid, DMF, Acetonitril und Diethylenglycoldiethylether neben der Bildung von 4-N,N-Dimethylaminobenzoesäureethylester zur Entstehung von bis zu 37% Nebenprodukten, während das Edukt in DMSO mit weniger als 1% Nebenprodukten unter den genannten Bedingungen die höchste Stabilität aufweist.

Eine Temperaturerhöhung auf 115°C führt dagegen sowohl bei Verwendung von DMSO als auch bei DMAA und DMF zu starker Zersetzung des Eduktes. Daher wurde bei allen folgenden Untersuchungen zur ¹⁸F-Fluorierung von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester DMSO als Solvens verwendet.

3.2.2.1.2 Abhängigkeit der ¹⁸F-Fluorierung des Triflat-Salzes von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester von der Carbonat- und Oxalat-Konzentration

Wie in Tabelle 5 (Eintrag 1, 2 und 3) zu erkennen ist, tritt eine Zersetzung des Eduktes in Acetonitril erst in Gegenwart von K₂CO₃ ein. Daher wurde im folgenden der Einfluß einer Reduzierung der K₂CO₃-Konzentration auf die radiochemische Ausbeute von 4-[¹⁸F]Fluorbenzoesäureethylester, auf den Aktivitätsverlust während der azeotropen Trocknung (Bildung von [¹⁸F]HF ↑) und auf die Zersetzung des Eduktes in DMSO untersucht.



Schema 20: Reaktionsprodukte der ^{18}F -Fluorierung von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester

Hierzu wurde bei einer konstanten K^+ -Konzentration von $10\ \mu\text{mol}$ das Verhältnis ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$) verkleinert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt.

Die radiochemische Ausbeute von 4- ^{18}F Fluorbenzoesäureethylester zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$)-Verhältnis (siehe Abb. 4). So wurde für die ^{18}F -Fluorierung ohne Kaliumcarbonat (nur Oxalat) unabhängig von der Reaktionszeit nur eine radiochemische Ausbeute von ca. 30% gefunden. Bereits ein ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$)-Verhältnis von 1/4 führt zu einer Steigerung der RCA auf 80% bzw. 85% bei einer Reaktionszeit von 6 bzw. 15 min. Die maximalen radiochemischen Ausbeuten von >90% sind bei einem molaren ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$)-Verhältnis von 2/3 bis 4/1 zu erreichen. Analoge Ausbeuten (innerhalb der präparativen Fehler) wurden gefunden, wenn die radiochemische Ausbeute nicht auf die in

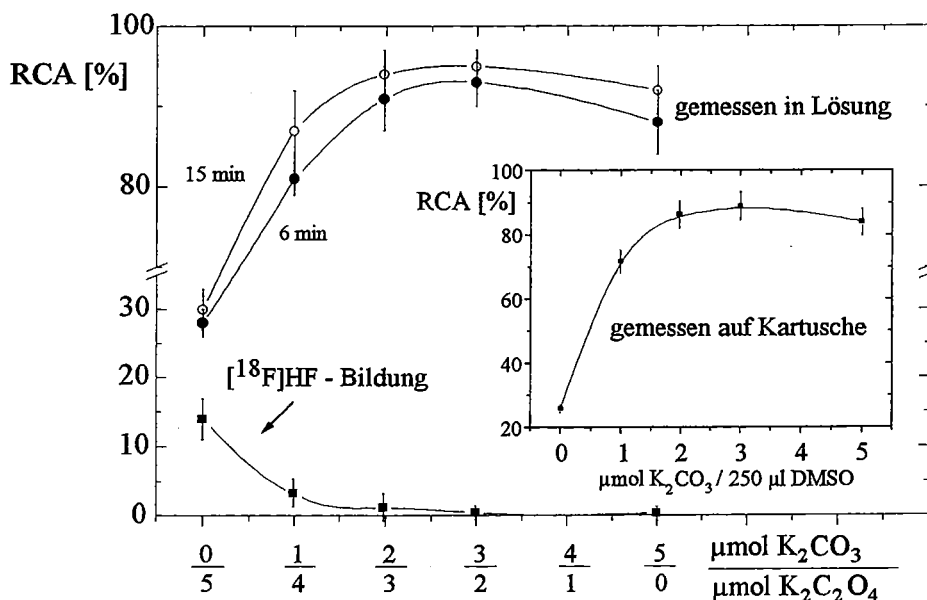


Abbildung 4: Radiochemische Ausbeute (RCA) von 4- ^{18}F Fluorbenzoesäureethylester ((●) 6 min Reaktionsdauer; (○) 15 min Reaktionsdauer) und Aktivitätsverluste durch flüchtiges ^{18}F HF (■) als Funktion des ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$)-Verhältnisses. Das insertierte Diagramm zeigt zum Vergleich die nach 15 min durch Fixierung auf einer Polystyrolkartusche gemessene RCA von 4- ^{18}F Fluorbenzoesäureethylester (zur Bestimmung der Bildung von $^{18}\text{F}\text{CH}_3\text{F}$). Reaktionsbedingungen: 250 μl DMSO, 5 mg des Triflat-Salzes von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester, $110\ ^\circ\text{C}$

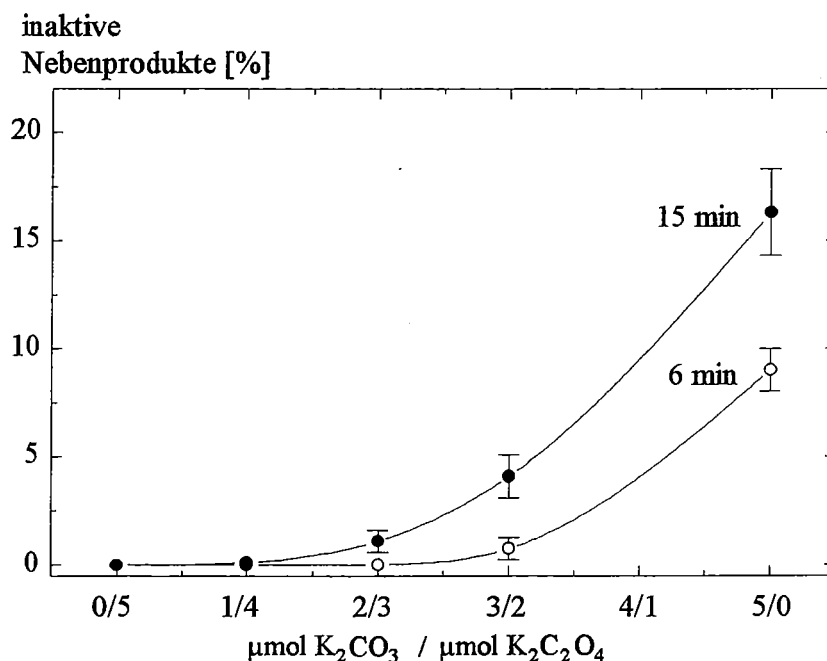


Abbildung 5: Bildung von inaktiven Nebenprodukten bei der ^{18}F -Fluorierung des Triflatsalzes von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester. ((o) 6 min Reaktionsdauer; (•) 15 min Reaktionsdauer) als Funktion des ($\text{K}_2\text{CO}_3 / \text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$)-Verhältnisses. Reaktionsbedingungen: 250 μl DMSO, 5 mg des Triflat-Salzes von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester, 110 $^\circ\text{C}$. Die Bestimmung der Nebenprodukte erfolgte näherungsweise durch Integration der UV-Signale (254 nm).

Lösung befindliche Aktivität normiert wurde (durch Aliquotentnahme mittels HPLC), sondern nach Fixierung der Reaktionsprodukte auf einer Polystyrolkartusche auf die gesamte eingesetzte Aktivität bezogen wurde (insertiertes Diagramm). Auf diese Weise kann eine signifikante Bildung von flüchtigem $^{18}\text{F}[\text{CH}_3\text{F}]$, welches bei der ^{18}F -Fluorierung von Aromaten durch nukleophile ^{18}F -für-(Me) $_3\text{N}$ -Substitution entstehen kann [z.B.118,119] ausgeschlossen werden.

Eine Verringerung der Basizität des Kryptand/Basen-Systems ($[\text{K}^+ \subset 2.2.2]_2\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$; CO_3^{2-}) bei steigenden $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ -Anteil führt, wie ebenfalls in Abb 4 dargestellt ist, bereits bei ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$)-Verhältnissen $< 2/3$ während der azeotropen Trocknung zu Aktivitätsverlusten durch flüchtiges $^{18}\text{F}[\text{HF}]$. Diese erreichen im reinen ($[\text{K}^+ \subset 2.2.2]_2\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$)-System einen Wert von 14%.

Die Bildung von inaktiven Nebenprodukten (Zersetzung des Eduktes) während der ^{18}F -Fluorierung des Triflatsalzes von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester als Funktion des ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$)-Verhältnisses gibt Abbildung 5 wieder. Hierbei wurde die Demethylierung des Eduktes nicht berücksichtigt, da der hieraus entstandene 4-N,N-Dimethylaminobenzoessäureethylester nach der Hydrolyse ebenso wie das Edukt am Kationenaustauscher abgetrennt werden kann. Während bei einer Reaktionszeit von 6 min nur bei ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$)-Verhältnissen $> 2/3$ Nebenprodukte detektiert werden konnten, führt eine Verlängerung der Reaktionszeit zu einer deutlich stärkeren Zersetzung des Eduktes.

Anhand dieser Untersuchungen sollte zur Vermeidung von störenden, inaktiven Verunreinigungen die ^{18}F -Fluorierung von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester

- in DMSO
- unter Verwendung des Kryptand/Basen-Systems ($[\text{K}^+ \subset 2.2.2]_2\text{C}_2\text{O}_4^{2-}; \text{CO}_3^{2-}$)
- und einem ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$)-Verhältnis von 1/4 bis 2/3
- bei Temperaturen $<110^\circ\text{C}$
- sowie einer Reaktionszeit von ca. 6 min durchgeführt werden.

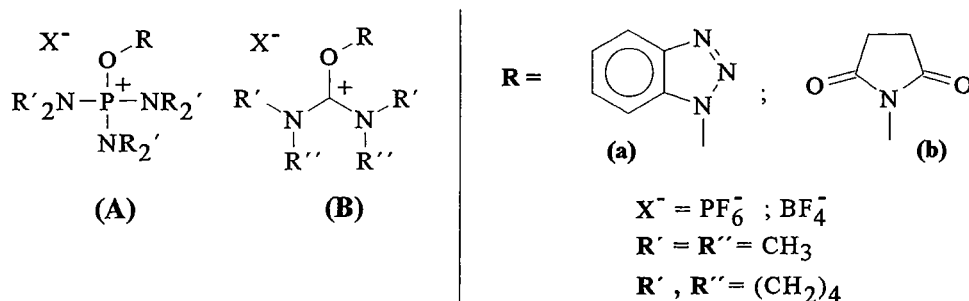
Die radiochemische Ausbeute von 4- ^{18}F Fluorbenzoesäureethylester beträgt unter diesen Reaktionsbedingungen ca. 80-90% bei Aktivitätsverlusten durch flüchtiges ^{18}F HF von $<5\%$.

3.2.2.1.3 Darstellung 'aktivierter' 4- ^{18}F Fluorbenzoesäureester

Zur Darstellung von acylierungsreaktiven 4- ^{18}F Fluorbenzoesäureestern wurde bisher neben Dicyclohexylcarbodiimid/N-Hydroxysuccinimid (DCC/NHS) [99] ebenso N,N'-Disuccinimidyl-carbonat [75,120] verwendet. Beide Methoden weisen jedoch einige Nachteile auf:

- die DCC/NHS-Methode benötigt relativ lange Reaktionszeiten und führt nur zu geringen radiochemischen Ausbeuten (40 min, 60% unkorrigierte Ausbeute)
- die Esterbildung unter Verwendung von N,N'-Disuccinimidylcarbonat führt zur intermediären Bildung eines gemischten Anhydrids aus 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure und Kohlensäure-N-succinimidylester, aus welchem erst bei erhöhten Temperaturen unter CO_2 -Eliminierung 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester gebildet wird.

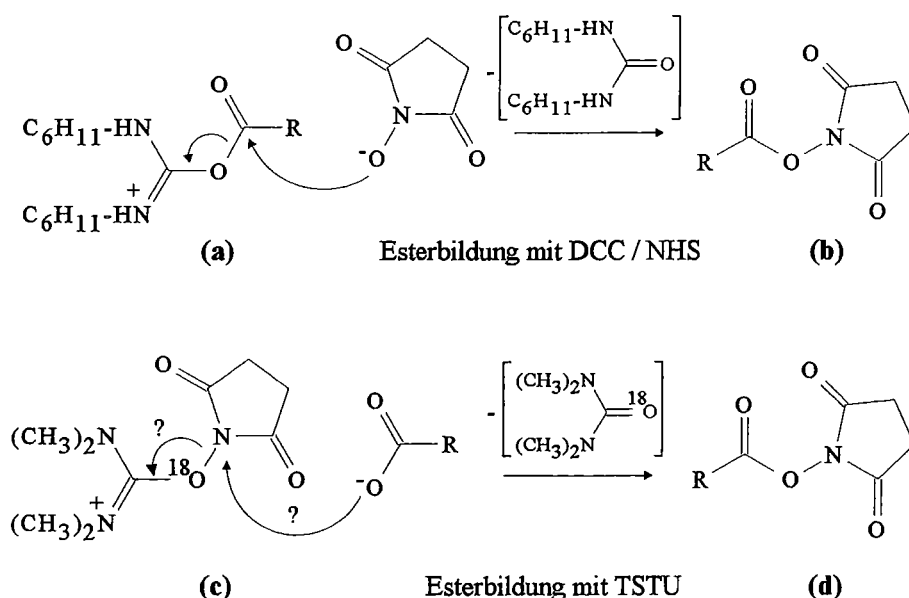
Alternative Reagenzien zur Aktivierung von Carbonsäuren stellen die Phosphoniumsalze des Typs (A) [121,122] und die Uroniumsalze des Typs (B) [123,124] (Schema 21) dar, mit welchen in den letzten Jahren gute Ergebnisse bei Peptidsynthesen an fester Phase erzielt wurden (125,126).



TSTU = (O-(N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-Tetramethyluronium) Tetrafluorborat : (B), R = (b), R' = R'' = CH_3
 HBbTU = (O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-bis(tetramethylen)uronium) Hexafluorborat:
 (B), R = (a), R', R'' = $(\text{CH}_2)_4$

Schema 21: Einige Phosphonium- und Uroniumsalze zur Aktivierung von Carbonsäuren

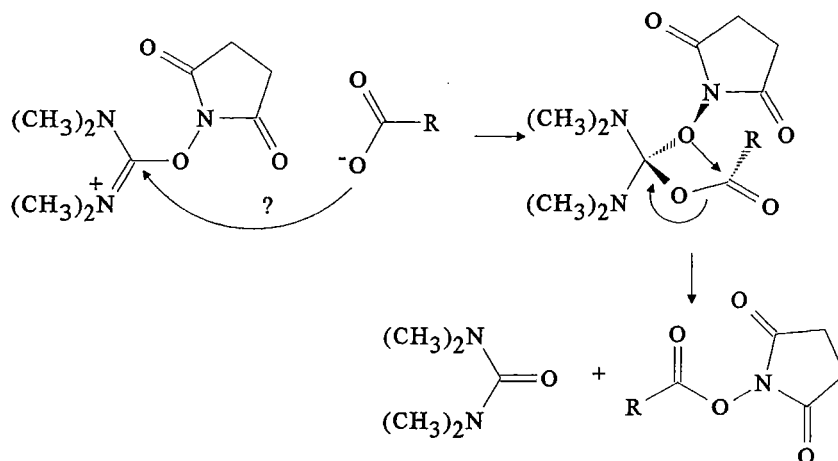
Der Mechanismus der Aktivierung der Carboxylatfunktion bei Verwendung dieser Reagenzien ist noch nicht geklärt. Während bei den Phosphoniumsalzen als reaktive Acylierungsagenzien Carbonsäure-Phosphonium-Intermediate angenommen werden [121] (über Substitution der Alkoholfunktion des Phosphonium-Salzes durch das Carboxylat), wird bei den Uroniumsalzen hauptsächlich Esterbildung beobachtet [123,126]. Hierbei könnte der Mechanismus der Esterbildung mit TSTU wie in Schema 22 dargestellt ablaufen. Nach diesem Mechanismus greift (ähnlich wie bei der DCC/NHS- Methode eine DDC-aktivierte Säure von einem Alkohol angegriffen wird [127]) eine Säure einen 'aktivierten Alkohol' unter Esterbildung an. Hierbei scheint jedoch eine Spaltung der N-O Bindung des Hydroxysuccinimidrestes relativ unwahrscheinlich, obwohl bei DCC/NHS - Kopplungen mit hohem Überschuß an NHS durch Bildung eines NHS/DCC-Intermediates des Typs (c) und anschließendem Angriff eines weiteren Äquivalents NHS in Analogie zu (d) die Bildung von Di-(N-Succinimidyl)ether beobachtet wurde [127].



Schema 22: Mechanismus der Esterbildung mit DCC / NHS (a)→(b) [127] und möglicher Mechanismus der Esterbildung bei Verwendung von TSTU (c)→(d)

Ebenso könnte jedoch auch ein Angriff der Carboxylatfunktion an der Uroniumverbindung stattfinden (Schema 23). Das intermediär entstehende Additionsprodukt würde dann durch Umlagerung unter Abspaltung von Tetramethylharnstoff den Ester freisetzen. Diese Art der Umlagerung findet in ähnlicher Weise bei der Bildung von N-Acylharnstoffen aus den primären Additionsprodukten von DCC und Carboxylat statt [127].

Eine Aufklärung des Mechanismus könnte durch Verwendung von ^{18}O -markiertem NHS erfolgen. So würde der ^{18}O -Sauerstoff im Falle eines Mechanismus nach Schema 22 ((c)→(d)) im Harnstoff, nach Schema 23 im Ester verbleiben.



Schema 23 : Möglicher Mechanismus der Esterbildung bei Verwendung von TSTU in Analogie zur N-Acyllarnstoffbildung bei DCC / NHS -Kopplungen

Aufgrund der Toxizität (Karzinogenität) von Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT) [128], welches bei Veresterungen mit Phosphoniumsalzen freigesetzt wird, wurde in dieser Arbeit die Synthese von Aktivestern der 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure nur mit Uroniumsalzen untersucht. Abbildung 6 zeigt die 'Zeitabhängigkeit' der Esterbildung von 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester und 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure-1-benzotriazolylester in CH_3CN im trägerfreien Maßstab. Bereits nach 5 min Reaktionszeit und einer Reaktionstemperatur von 50°C können auf diese Weise für beide Ester radiochemische Ausbeuten von $>90\%$ erzielt werden. Die Aktivierung mittels Uroniumsalzen stellt somit die bisher effizienteste und schnellste Methode zur Darstellung ^{18}F -markierter Aktivester dar.

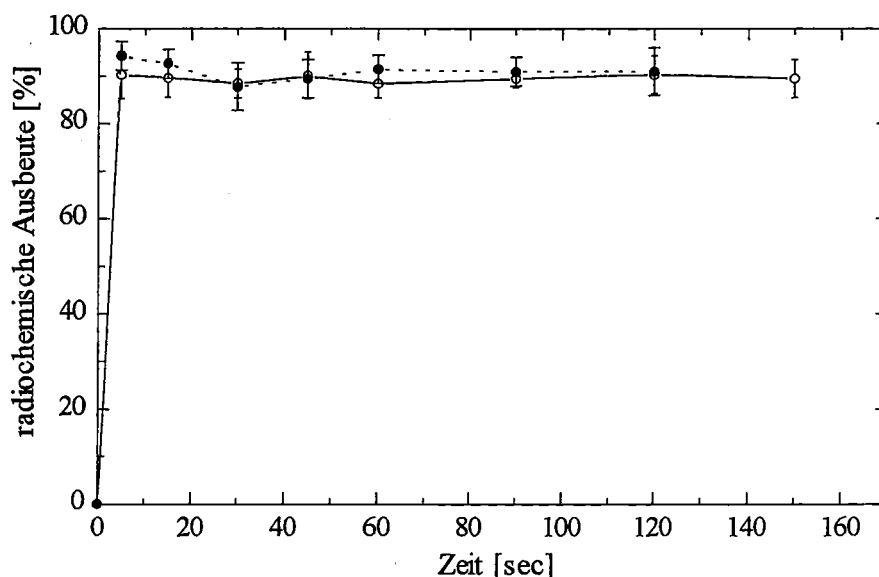


Abbildung 6: Radiochemische Ausbeute von 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester (o) und 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure-1-benzotriazolylester (•) als Funktion der Zeit.
Reaktionsbedingungen:
130 mM TSTU bzw. HBbTU, 50°C , 250 μl CH_3CN , n.c.a. 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure.

Aufgrund dieser Ergebnisse war es von Interesse zu prüfen, ob eine vergleichbare Kinetik der Esterbildung mittels Uroniumsalzen in Anwesenheit einer 'makroskopischen Menge' Carbonsäure zu beobachten ist. Wäre dies der Fall, so könnte die gesamte Synthese von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester als Eintopfsynthese ausgelegt werden, da eine intermediäre Abtrennung des Triflatsalzes von 4-Trimethylammoniumbenzoesäure und 4-Dimethylaminobenzoesäure nicht zwingend erforderlich wäre und durch eine abschließende Produktreinigung ersetzt werden könnte. Hierzu wurde die Esterbildung von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure in Anwesenheit von 'kalter' 4-Fluorbenzoesäure durchgeführt. Dabei wurde für letztere eine Konzentration gewählt, die der Eduktkonzentration des ^{18}F -Fluorierungsschrittes entspricht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 7 dargestellt.

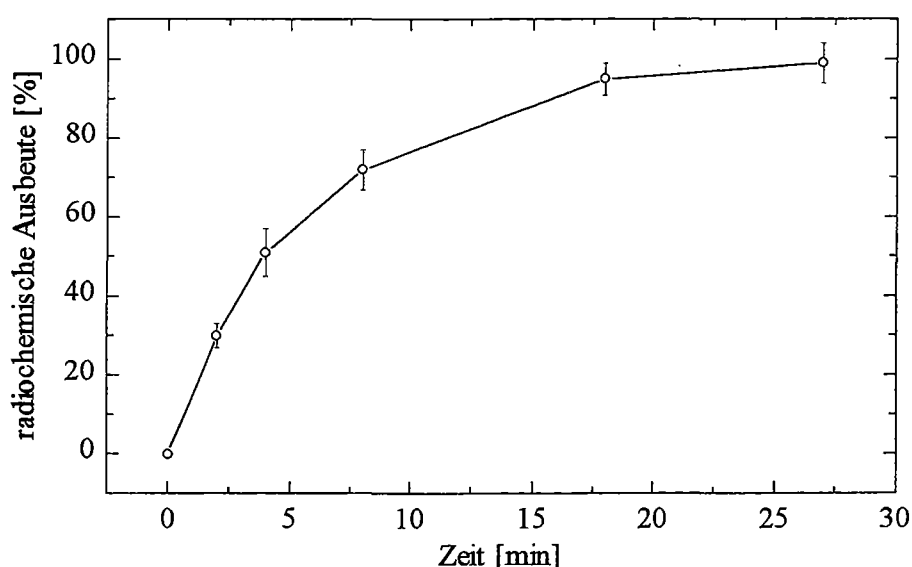


Abbildung 7: Radiochemische Ausbeute von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester (o) als Funktion der Zeit. Reaktionsbedingungen: 166 mM TSTU, 50°C, CH_3CN , n.c.a. 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure, 166 mM 4-Fluorbenzoesäure

Eine radiochemische Ausbeute von >90% (= effektive Ausbeute von ca 80%) ist unter diesen Bedingungen erst nach einer Reaktionszeit von > 15 min zu erzielen. Berücksichtigt man weiterhin, daß bei einer Eintopfsynthese die Hydrolyse ohne vorherige Eduktabtrennung in gleicher Weise eine etwas langsamere Kinetik zeigen sollte, so scheint eine intermediäre Eduktabtrennung hinsichtlich der radiochemischen Ausbeute und dem Zeitaufwand der Gesamtsynthese vorteilhafter.

Wie im folgenden Fließschema (Schema 24) dargestellt ist, konnte durch die Anwendung der Festphasenextraktionstechnik und der Aktivierung mittels Uroniumsalzen die Gesamtsynthesezeit zur Darstellung von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester auf ca. 35 min reduziert werden.

Syntheseschritte	Zeit	RCA
[F-18]Fluorid	t=0	100%
↓ azeotr. Trocknung	t=3min	98%
1. [F-18]Fluorierung von $\text{Tft}^- + \text{TMABE}$	t=9min	83%
2. Hydrolyse	t=14min	80%
↓ 1. Fixierung auf Polystyrolkart. 2. Elution durch SCX- Kartusche	t=27min	64%
Veresterung durch TSTU	t=29min	58%
↓ 1. Fixierung auf Polystyrolkart. 2. selektive Elution	t=35min	50%
4-[F-18]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester		
unkorrigierte Gesamtausbeute: ca. 40 %		
spezifische Aktivität: 70 GBq / μmol		

Schema 24: Fließschema zur Synthese von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester
 $\text{Tft}^- + \text{TMABE}$: Triflatsalz des Tetramethylammoniumbenzoesäureethylesters
 TSTU: (O-(N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-Tetramethyluronium) Tetrafluorborat

3.2.2.2 Proteinkonjugation via ^{18}F -Fluoracylierung

Zur ^{18}F -Fluoracylierung von Proteinen wurde neben 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester auch 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester verwendet, welche entsprechend einer bereits optimierten Synthese dargestellt wurde [110].

Um die Anwendbarkeit der ^{18}F -Fluoracylierung von Proteinen mit 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester zu untersuchen, wurde zunächst die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von '18F-Fluorpropionyl-HSA' (^{18}F -HSA) als Funktion der HSA-Konzentration bestimmt (Abb.8.). Diese Versuche wurden (trotz der zu erwartenden höheren radiochemischen Ausbeuten bei erhöhten pH-Werten von 9-9.5) bei pH 8.5 durchgeführt, da höhere pH-Werte bei späteren Markierungen von komplexeren Immunglobulinen leicht zum Verlust der biologischen Aktivität führen.

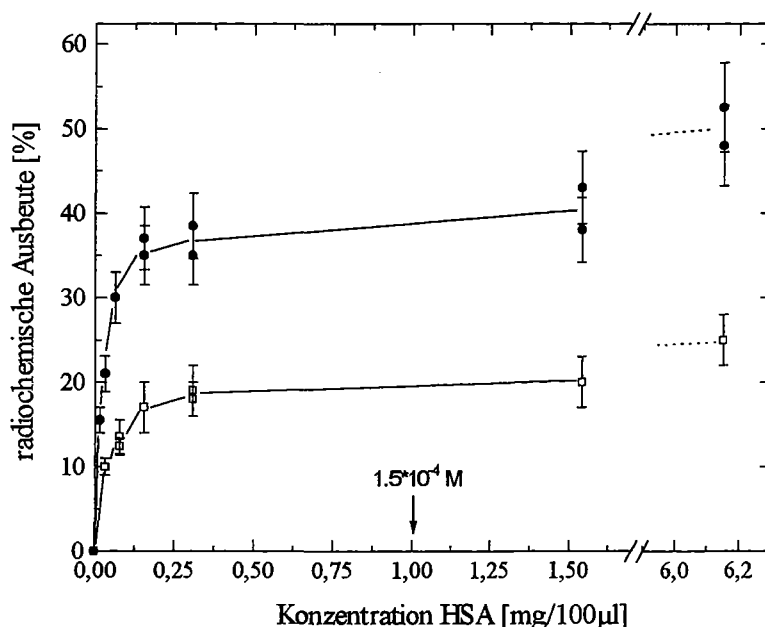


Abb.8: Radiochemische Ausbeute der 2- ^{18}F -Fluorpropionylierung von HSA mit 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester als Funktion der Proteinkonzentration (RT, 8 min, pH 8.5) ohne ($\square$) und mit ($\bullet$) 0.1M 1-Hydroxybenzotriazol.

Da frühere Studien zeigten [111,129], daß die radiochemischen Ausbeuten der ^{18}F -Fluoracylierung mit 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester besonders in wässriger Lösung bei pH-Werten unterhalb des pK_a -Wertes einer Aminfunktion durch Zusatz des Aminolysekatalysators 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) deutlich gesteigert werden konnten, war auch in diesem Fall eine Verbesserung der radiochemischen Ausbeute von ^{18}F -HSA durch HOBt-Katalyse naheliegend. Die Ergebnisse dieser Untersuchung ist in Abbildung 8 dargestellt.

Wie erwartet, liefert die HOBt-katalysierte Acylierung im Vergleich zur nichtkatalysierten Acylierung von HSA eine deutlich höhere radiochemische Ausbeute. So ist im unteren Konzentrationsbereich ein steilerer Anstieg der Konjugationsausbeuten in Gegenwart von

HOBt zu erkennen, während bei höheren Konzentrationen die radiochemischen Ausbeuten nahezu doppelte Beträge aufweisen. Dennoch sind die maximalen Ausbeuten mit ca. 50% in Gegenwart von HOBt und ca. 25% ohne HOBt unerwartet niedrig.

Zum Vergleich wurde anschließend die radiochemische Ausbeute der ^{18}F -Fluorbenzoylierung von HSA mit 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester als Funktion der HSA-Konzentration bestimmt. Wie in Abb. 9 dargestellt ist, können mit diesem Acylierungsagens radiochemischen Ausbeuten von 90% bei HSA-Konzentrationen $>\text{ca. } 0.75 \text{ mg} / 100 \mu\text{l}$ erreicht werden. Neben dieser (im Vergleich zum aliphatischen Ester) weitaus höheren Sättigungsausbeute, erlaubt der aromatische Ester darüber hinaus eine effizientere Konjugation bei niedrigen Proteinkonzentrationen (ca. 55% RCA bei $80 \mu\text{g}$ HSA/ $100 \mu\text{l}$ Puffer).

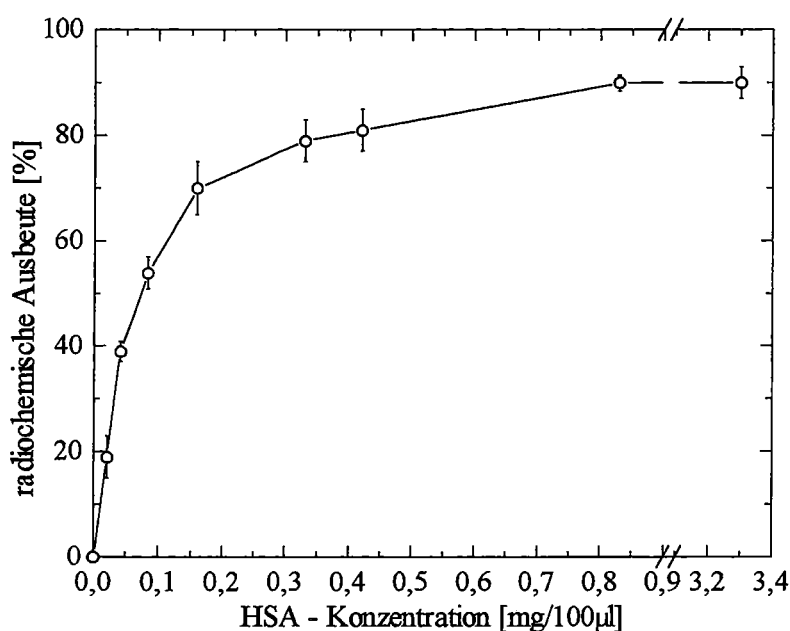


Abb.9: Radiochemische Ausbeute der 4- ^{18}F -Fluorbenzoylierung von HSA mit 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester als Funktion der Proteinkonzentration (RT, 5 min, Puffer pH 8.5)

Einen Vergleich der Ausbeuten der ^{18}F -Fluoracylierung der Proteine HSA, Avidin und IgG für die drei verschiedenen Acylierungsreagenzien zeigt Tabelle 6.

^{18}F -Fluoracylierungen von Avidin mit 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester liefern bei einer Avidinkonzentration von $1 \text{ mg} / 100 \mu\text{l}$ radiochemische Ausbeuten von $61 \pm 6\%$ für die HOBt-katalysierte bzw. $12 \pm 2\%$ für die nicht-katalysierte Reaktion (siehe Tab.6) [111].

Eine deutlich voneinander abweichende Reaktivität der beiden Ester, wie sie bei der Konjugation von HSA gefunden wurde, konnte auch bei der ^{18}F -Fluoracylierung eines Immunglobulin G (IgG) festgestellt werden.

Tabelle 6: Radiochemische Ausbeuten [%] von ^{18}F -HSA, ^{18}F -Avidin und ^{18}F -IgG durch ^{18}F -Fluoracylierung mit 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester [^{18}F]NPFP (ohne Katalyse sowie mit HOBt-Katalyse) und 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester ([^{18}F]SFB)

Protein	Protein Konzentration [mg/100µl]	[^{18}F]SFB ¹⁾	[^{18}F]NPFP ^{1,2)}	[^{18}F]NPFP ¹⁾ 0.1 M HOBt
HSA	1	90±4% ^{1.1)}	20±3%	43±5%
Avidin	1	-	12±2% ²⁾	62±6% ²⁾
IgG	0.14	24±3% ^{1.2)}	-	-
	0.25	54±6% ^{1.2)}	-	8±2% ³⁾

¹⁾ 22°C, pH 8.5, Zeit : ^{1.1)} 8min, ^{1.2)} 15min; ²⁾ [111] ³⁾ 22°C, pH 8.8., 30 min

So ergibt der aromatische Ester bereits bei einer IgG-Konzentration von 250 µg /100 µl radiochemische Ausbeuten von ca. 50%, während die radiochemische Ausbeute an ^{18}F -Fluorpropionyl-IgG $<10\%$ ist (Tab.6).

Zur Bewertung der vorgenannten Konjugationsausbeuten wird im folgenden die Aminosäurezusammensetzung der drei verwendeten Proteine betrachtet (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Einige Daten von Avidin [130], HSA [116] und eines Immuglobulin G im Vergleich [115]

	Avidin	HSA	IgG
Molare Masse [g / mol]	67.000	66.500	150.000
1mg Protein entsprechen	14.9 nmol	15.0 nmol	6.7 nmol
Gesamtzahl der Aminosäuren / Molekül	512	585	≈1300
isoelektrischer Punkt	10-10.5	4.8-5.6	-
Lysin: Häufigkeit (absolute Anzahl)	7.03%, (36)	10.09%, (59)	Ø 7.0% (*), (Ø 91)
[nmol Lys / mg Protein]	536.4	885.0	607.0
Histidin: Häufigkeit (absolute Anzahl)	0.78%, (4)	2.74%, (16)	Ø 2.5% (*), (Ø 32)
[nmol His / mg Protein]	59.6	240.0	213.4
Tyrosin: Häufigkeit (absolute Anzahl)	0.78%, (4)	2.74%, (16)	Ø 3.6% (*), (Ø 47)
[nmol Tyr / mg Protein]	59.6	240.0	313.5
(Lysin / Histidin) - Verhältnis	9.08	3.69	2.84
(Lysin / Tyrosin) - Verhältnis	9.08	3.69	1.94

(*) durchschnittliche (Ø) Häufigkeit in Proteinen humanen Ursprungs [115]

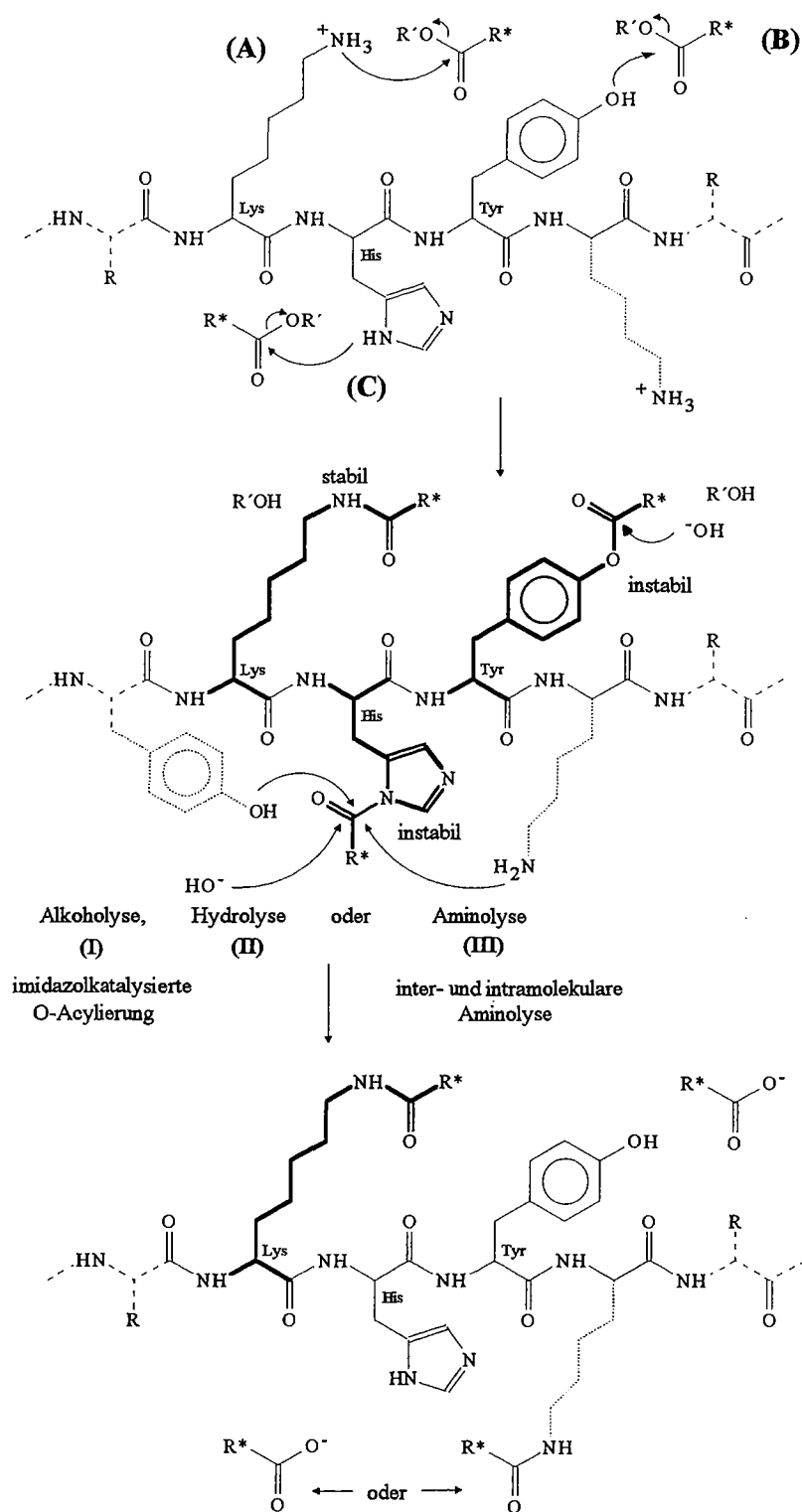
Da eine Proteinderivatisierung mittels aktivierten Carbonsäureestern hauptsächlich zur Acylierung der stark nukleophilen Aminofunktion der Seitenkette der Lysyl-Reste führt, sollte die radiochemische Ausbeute einer ^{18}F -Fluoracylierung in erster Näherung eine Funktion des

Lysingehaltes des zu markierenden Proteins sein. So besitzt z.B. HSA im Vergleich zu Avidin die 1,64 fache Anzahl an Lysin-Resten (885 nmol Lys / mg HSA gegenüber 536 nmol Lys / mg Avidin). Dies spiegelt sich in der radiochemischen Ausbeute der nicht-katalysierten ^{18}F -Fluorpropionylierung beider Proteine wider: $20 \pm 3\%$ ^{18}F -HSA gegenüber $12 \pm 2\%$ ^{18}F -Avidin. Ähnliches ist bei der ^{18}F -Fluoracylierung mit 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester festzustellen: ca. 75% radiochemische Ausbeute an ^{18}F -HSA (250 μg HSA/100 μl ; 885 nmol Lys / mg HSA) (s. Abb 9) gegenüber $54 \pm 5\%$ ^{18}F -IgG (250 μg IgG_E / 100 μl ; ; 607 nmol Lys / mg IgG_E) (s. Tab. 6 und 7).

Somit läßt sich für die nichtkatalysierte ^{18}F -Fluorpropionylierung und die ^{18}F -Fluorbenzoylierung von Proteinen -wie zu erwarten- eine direkte Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Lysinkonzentration der untersuchten Proteine bestätigen. Eine ähnliche Abhängigkeit ist bei der HOBt-katalysierten ^{18}F -Fluorpropionylierung jedoch nicht festzustellen. Wie der Tab. 6. entnommen werden kann, zeigt z.B. Avidin bei der ^{18}F -Markierung mit 2- ^{18}F Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester in Anwesenheit von HOBt eine RCA von $62 \pm 6\%$, während HSA trotz deutlich höherem Lys-Gehalt nur mit einer RCA von $43 \pm 5\%$ markiert wird. Ebenso spiegelt sich der hohe Lysingehalt von IgG_E nicht in der RCA an ^{18}F -IgG_E ($8 \pm 2\%$; Tab. 6) wider. Zur Erklärung dieser Beobachtung müssen zwei weitere Aminosäuren berücksichtigt werden: Tyrosin und Histidin (Schema 25).

So ist die O-Acylierung von Tyrosin bei Peptidsynthesen über aktivierte Ester eine bekannte Nebenreaktion [132-134], welche durch die Anwesenheit von HOBt verstärkt wird [131]. Daher kommt es bei der HOBt- katalysierten ^{18}F -Fluorpropionylierung von Proteinen durch Umesterung zur Bildung von O-(2- ^{18}F Fluorpropionsäure)-tyrosylester (Schema 25 (B)), der, aufgrund der Aktivierung durch das α -ständige ^{18}F -Fluor, im basischen Milieu leicht hydrolysiert wird (siehe auch [129,111]). Diese Nebenreaktion führt zunächst zwar zu einer Proteinmarkierung; im weiteren Reaktionsverlauf (d.h. bei längerer Reaktionsdauer unter den gewählten Bedingungen (pH 8.5)) oder in vivo kommt es dagegen durch Hydrolyse bzw. durch Esterasen zur Abspaltung der ^{18}F -markierten prosthetischen Gruppe.

Ebenso kann es zu Acylierungen der Histidylgruppen kommen (Schema 25 (C)) [135]. Im Gegensatz zu den O-Acylderivaten des Tyrosins handelt es sich bei den N^{im}-Acylierungsprodukten des Histidins jedoch um reaktive Spezies (Acyylimidazolen), welche auf vielfältige Weise weiterreagieren können [136]. So kann es durch inter- oder intramolekulare Aminolyse (III) (N^ω-NH₂-Gruppen der Lysylreste oder N^α-Termini) dieser Intermediate zur Bildung einer stabilen Proteinmarkierung kommen; andererseits ist bekannt, daß die Anwesenheit N^{im}-ungeschützter Histidylgruppen in Peptidsynthesen via Aktivester zur verstärkten Bildung von O-Acylderivaten führt [137,138] ((I) Imidazol-katalysierte O-Acylierung). Eine anschließende Hydrolyse der auf diese Weise gebildeten Ester führt daher im Gegensatz zur o.g. Aminolyse der Acyylimidazole zur Abspaltung der Markierung vom Protein.



Schema 25: ^{18}F -Fluoracylierung von Proteinen. Neben einer ^{18}F -Fluoracylierung der Aminogruppen der Lysyl-Seitenketten (A) unter Bildung einer stabilen Amidbindung kann es durch Alkoholyse des Aktivesters zur Bildung hydrolyseempfindlicher Phenylester des Tyrosins (B) und Imidazoliden des Histidins (C) kommen. Letztere hydrolysieren anschließend (His-katalysierte Aktivesterhydrolyse), führen über eine Aminolyse zur stabilen ^{18}F -Markierung des Proteins (siehe A) oder bilden durch Alkoholyse instabile Ester (siehe B) (inter- und intra- molekularer Acyltransfer).

Gleiches gilt für die dritte Möglichkeit, die direkte Hydrolyse der Acylimidazole (II).

Durch die geringe Beweglichkeit und die 'feste Bindung' der Histidylgruppen innerhalb des Proteingerüsts scheint jedoch die Wahrscheinlichkeit einer Hydrolyse größer als die einer Alkoholyse oder Aminolyse. Histidylgruppen können daher bei Proteinmarkierungen via Aktivester als Hydrolysekatalysatoren wirken und zur Limitierung der maximalen radiochemischen Ausbeute beitragen.

Reaktionen der Cysteinyl-Gruppen werden in dieser Betrachtung vernachlässigt, da alle 8 Cysteinyl-Reste des Avidins [130] sowie 34 der 35 Cysteinyl-Reste des HSA [116] Disulfidbrücken bilden und somit für eine vergleichende Betrachtung der radiochemischen Ausbeuten der beiden Proteine keine Rolle spielen.

Eine Übersicht der RCA der ^{18}F -Fluorbenzoylierung eines Immunglobulin G und HSA, der nichtkatalysierten ^{18}F -Fluorpropionierung von Avidin und HSA und der HOBt-katalysierten ^{18}F -Fluorpropionierung von Avidin, HSA und Immunglobulin G sowie die absolute Häufigkeit der Lysyl- und Tyrosyl-Reste dieser Proteine zeigt Abbildung 10. Anhand dieser Darstellung ist deutlich zu erkennen, daß das relative Verhältnis der in Schema 25 dargestellten Reaktionen (N° -Lys-Acylierung, N^{im} -His-Acylierung, O-Tyr-Acylierung sowie Hydrolyse) eine Funktion des Acyl- und Alkoholkomponente des Esters sowie anwesender Katalysatoren ist. So spiegeln die hohen radiochemischen Ausbeuten der ^{18}F -Fluorbenzoylierung von IgG und HSA bei hohem Lysin-Gehalt der beiden Proteine das hohe (Aminolyse/Hydrolyse)-Verhältnis des verwendeten 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylesters (^{18}F SFB) wider.

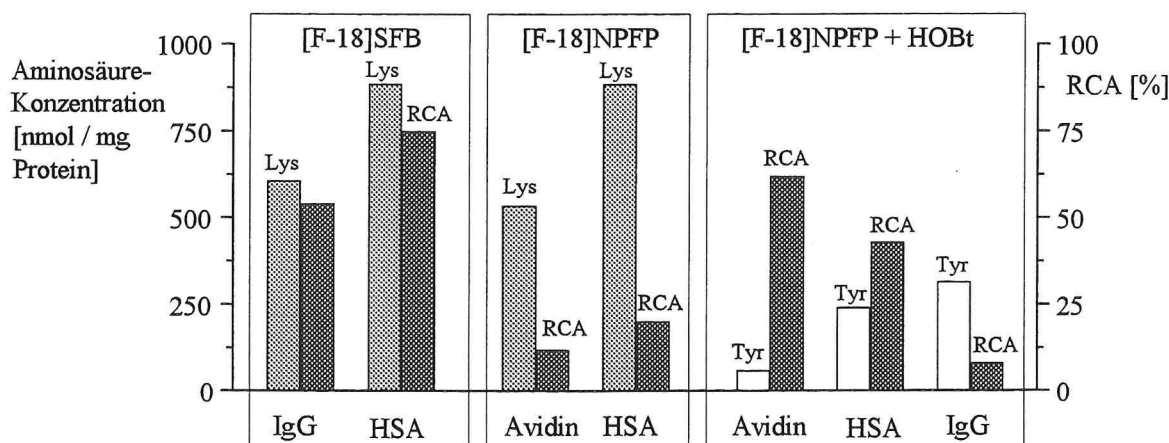


Abbildung 10: Die Konzentration von Lysyl- und Tyrosylgruppen [nmol Aminosäure / mg Protein] in IgG [115], HSA [116] und Avidin [130] (linke Ordinate) sowie die radiochemischen Ausbeuten der ^{18}F -Fluoracylierung mit 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester (^{18}F NPFP) und 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester (^{18}F SFB) (rechte Ordinate). Reaktionsbedingungen s. Tab. 6 sowie Abb. 8 und 9.

Ebenso weisen die geringen Ausbeuten der ^{18}F -Markierung von Avidin und HSA mit 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester (^{18}F NPFP) auf eine geringere Hydrolysestabilität und eine geringere Aminolyse dieses Esters hin. Eine HOBt-katalysierte ^{18}F -Markierung von Avidin, HSA und IgG mit ^{18}F NPFP fördert zwar die Aminolyse, wie

anhand der deutlichen Ausbeutesteigerung an ^{18}F -Avidin zu erkennen ist; sie führt jedoch auch zu verstärkter O-Acylierung des Tyrosins. Während die O-Acylierung der Tyrosyl-Reste bei der Markierung von Avidin wegen des geringen Tyrosingehaltes und des hohen Lys / Tyr - Verhältnisses von 9.0 keinen großen Einfluß ausübt, kann die geringere Ausbeute der HOBt-katalysierten Acylierung von HSA (Lys/Tyr-Verhältnis von 3.69) nur über eine verstärkte O-Acylierung erklärt werden. Unter Berücksichtigung eines Lys/Tyr-Verhältnisses von 1.98 für IgG ordnet sich ebenso die geringe radiochemische Ausbeute an ^{18}F -IgG in diese Argumentation ein.

Um diese Aussagen weiter zu verifizieren, wurde HSA mit 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester in Anwesenheit von 0.1M HOBt sowie mit 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester bei pH 8.5 markiert, und die Stabilität der Konjugate über die radiochemische Ausbeute bis zu 60 min HPL-chromatographisch verfolgt (s. Abb. 11).

Wie zu erkennen ist, nimmt die radiochemische Ausbeute an ^{18}F -Fluorpropionyl-HSA als Funktion der Zeit ab und fällt von ca. 50% radiochemischer Ausbeute nach 5min auf 30% RCA nach 60 min. Anhand des Kurvenverlaufs ist nach 60 min Reaktionszeit eine weitere signifikante Abnahme der Ausbeute nicht mehr zu erwarten. Das Ergebnis zeigt, daß innerhalb von 60 min ca. 40% der initial (nach 5 min Reaktionszeit) proteingebundenen Aktivität hydrolytisch abgespalten wird.

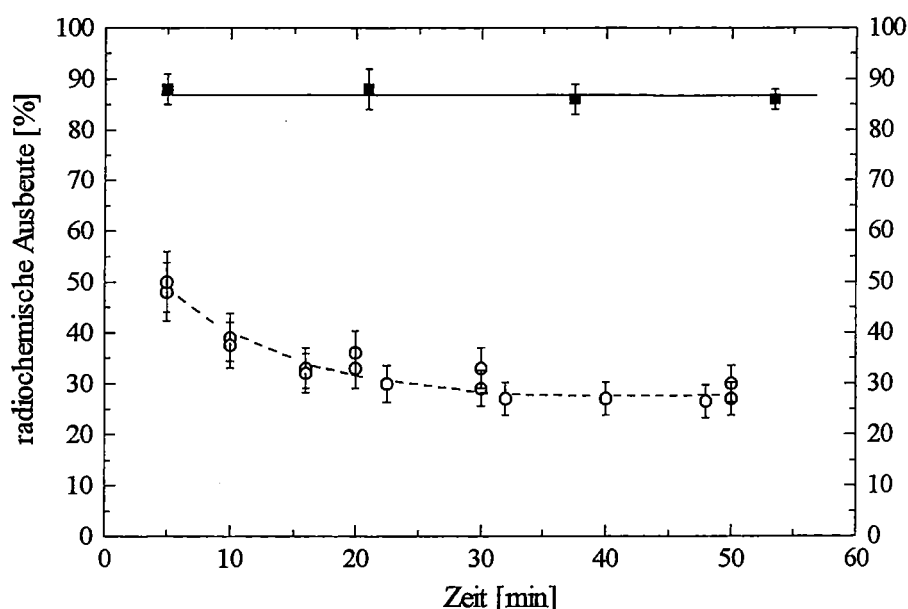


Abb.11: Stabilität des ^{18}F -HSA in wässriger Lösung als Funktion der Zeit.
 (o) HSA-Markierung mit 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester in Anwesenheit von 1-Hydroxybenzotriazol (0.1 M HOBt); (•) HSA-Markierung mit 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester (RT, 8 min, pH 8.5, 3 mg HSA/ 100 μl).

Aufgrund der hohen Stabilität der Amidbindungen, welche durch N^ε-Acylierung von Lysylgruppen entstehen, kann es sich dabei nur um die Hydrolyse der durch O-Acylierung der Tyrosylgruppen und N^{im}-Acylierung der Histidylgruppen entstandenen Proteinmarkierungen handeln. Im Gegensatz zum ¹⁸F-Fluorpropionyl-Derivat des ¹⁸F-HSA war das durch den aromatischen 4-[¹⁸F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester markierte Produkt über den gesamten Beobachtungszeitraum stabil, da eine Proteinmarkierung aufgrund der geringen Hydrolyse- und Alkoholyserate von [¹⁸F]SFB hauptsächlich durch Acylierung der Lysylfunktionen erfolgt.

Die in Schema 25 dargestellten Nebenreaktionen bei Proteinmarkierungen mit [¹⁸F]NPFP / HOBt machen deutlich, daß diese Konjugationsmethode zur Markierung von Proteinen und Peptiden mit hohem Tyrosin- und Histidin- Anteil ungeeignet ist.

3.2.3. Zur ^{18}F -Fluorierung von Proteinen durch photochemische Konjugation

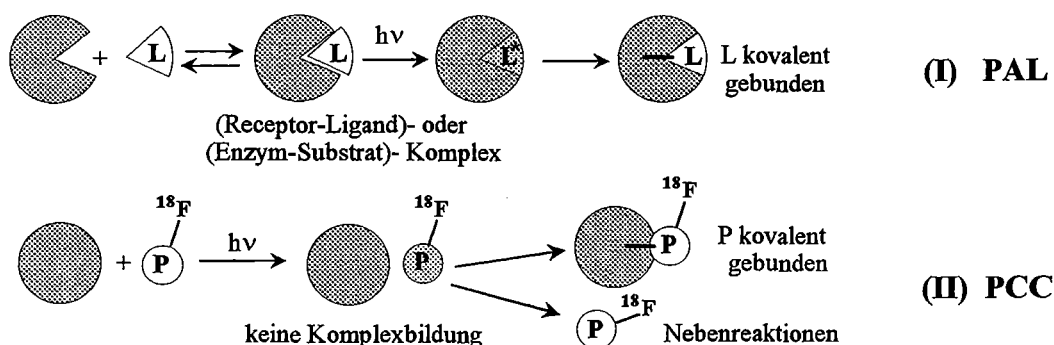
3.2.3.1 Strategie der photoinduzierten ^{18}F -Markierung von Proteinen

Basierend auf den ersten Untersuchungen von Westheimer et al. [139] wurde die >Fixierung molekularer Wechselwirkungen< mittels 'photo affinity labeling' zu einer vielgenutzten biochemischen Arbeitsmethode zur Untersuchung von Enzym-Substrat- oder Rezeptor-Ligand-Komplexen, zur Identifizierung von Hormonrezeptoren oder zur Bestimmung der Funktion und topographischen Distribution membranständiger Proteine (zur Übersicht siehe [140,141]):

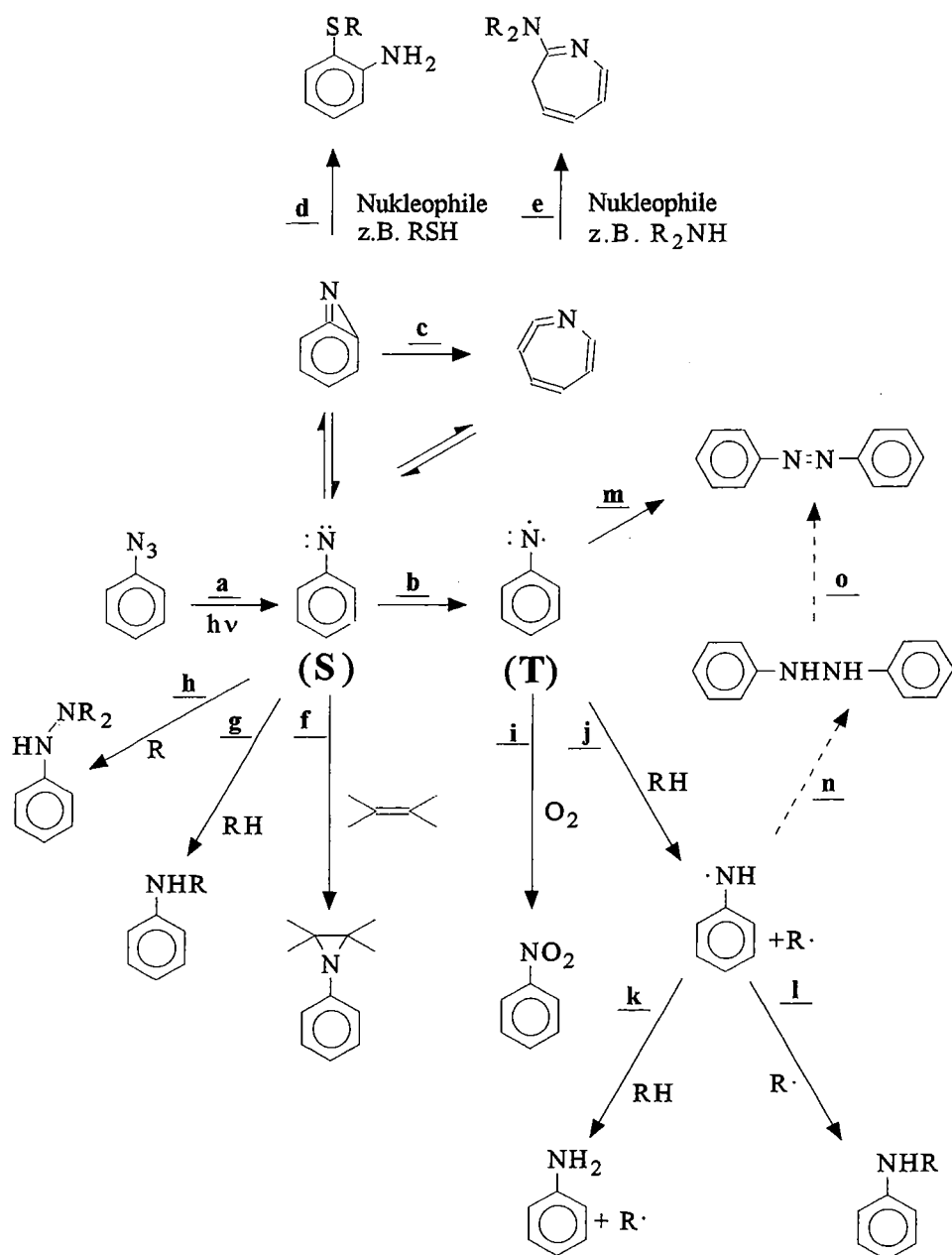
Rezeptorliganden oder Substrate mit einer photolabilen funktionellen Gruppe erlauben nach Inkubation mit komplexen Rezeptor- bzw. Enzymgemischen und anschließender Bestrahlung den für diesen Liganden spezifischen Rezeptor bzw. das für dieses Substrat spezifische Enzym zu identifizieren, da durch die bei der Bestrahlung erzeugte reaktive Spezies der nunmehr kovalent verbrückte 'Rezeptor-Ligand- bzw. Enzym-Substrat-Komplex' keiner Dissoziation mehr unterliegt und isoliert werden kann (Schema 26: (I) 'photo affinity labeling', PAL) [142].

Als Alternative zu den bisher bekannten ^{18}F -Markierungsmethoden via prosthetischer Gruppen wird im folgenden als neue Methode zur Synthese ^{18}F -markierter Proteine die 'Photochemische Konjugation' (PCC) beschrieben.

Diese Markierungsmethode basiert auf der Verwendung eines leicht zu fluorierenden aromatischen Azids. Nach dessen ^{18}F -Fluorierung wird durch Bestrahlung mit UV-Licht ein elektrophiles Zentrums El_2 (siehe Einleitung Schema 8), ein Arylnitren, erzeugt. Wird die Photolyse in Gegenwart von Proteinen durchgeführt, so kann man sich die für Arylnitrene charakteristischen Folgereaktionen wie Additionen und Insertionen zur Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen Arylnitren und Biomolekül zu nutze machen und somit eine mehr oder minder unspezifische Markierung des Proteins erreichen (Schema 26, (II)).



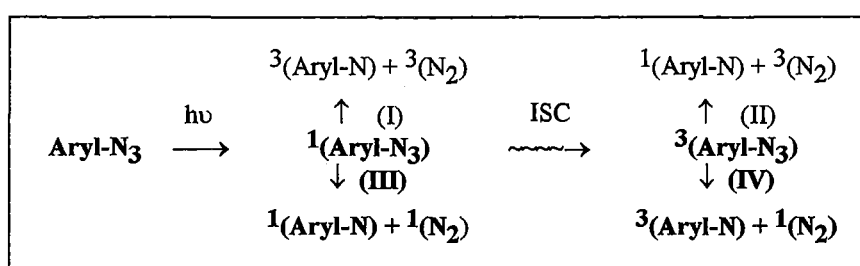
Schema 26: Photo affinity labeling (PAL, (I) [142]) und Photochemische Konjugation (PCC, (II)). Aufgrund fehlender Affinität der ^{18}F -markierten prosthetischen Gruppe zum Protein besteht bei der PCC zum Zeitpunkt der Bestrahlung keine direkte Nähe (kein Komplex) zwischen der prosthetischen Gruppe P und dem Protein.



Schema 27 : Die Photolyse von Arylaziden am Beispiel des Phenylazids [141]. a) die nachfolgenden Reaktionen hängen von der Wellenlänge des verwendeten UV-Lichts ab; b) irreversibles intersystem crossing; c) reversible Umwandlung des Singulett Nitren in ein 7-Aza-bicyclo[4.1.0]hepta-1⁷,2,4-trien und ein 1-Aza-1,2,4,6-Cycloheptatetraen. d,e) Art der Umsetzung mit einem Nukleophil hängt sowohl vom Lösungsmittel als auch von der Struktur des Arylnitrens und des Nukleophils ab; f) nur stark elektrophile Arylnitrene wie Pentafluorphenylnitren gehen intermolekulare Additionsreaktionen mit Alkenen ein; g) ebenso insertieren nur stark elektrophile Arylnitrene in aromatische C-H-Bindungen; h) wenn die Photolyse mit langwelligem UV-Licht durchgeführt wird, können elektrophile Arylnitrene direkt von Aminen angegriffen werden; i) Bildung von Nitro- und Azoxyverbindungen; j) Radikalbildung tritt besonders in Anwesenheit von Donatoren mit schwachen X-H Bindungen auf (z.B. RSH); k) Bildung von Anilinen; l) Insertion in aliphatische C-H-Bindungen über Anilinylnitren; m) Azoverbindungen werden zumeist nur in Anwesenheit von Substituenten mit Elektronendonatoreigenschaften beobachtet; trägerfrei kann diese Reaktionen aus statistischen Gründen nicht auftreten, da es sich um eine (n) Dimersierung von Anilinylnitrenen mit (o) anschließender Oxidation handelt.

Mehrere Eigenschaften machen Arylazide zu besonders geeigneten photochemischen Reagenzien (zur Übersicht siehe [141,148]): a) Arylazide sind leicht zugänglich b) sie sind in der Dunkelheit oder bei Vermeidung direkter Sonneneinstrahlung sowie bei moderaten Temperaturen stabil, d) sie sind chemisch stabil gegenüber gängigen Lösungsmitteln einschließlich wässriger Pufferlösungen, und e) die durch Photolyse gebildeten Intermediate sind hochreaktiv und können über vielfältige Konsekutivreaktionen stabile kovalente Bindungen ausbilden.

Die Photolyse von Arylaziden beruht auf der Lichtabsorption durch den aromatischen Ring mit anschließender Schwingungsübertragung der absorbierten Energie auf die Azidgruppe und N₂-Abspaltung [144].



Schema 28: Photolyse von Arylaziden. ISC=Spinsystemwechsel (intersystem crossing) [143]

Von den vier verschiedenen Wegen, die nach diesem Modell die Bildung des Singulett- bzw. des weniger bevorzugten Triplett-nitrens erklären, werden nur die Wege (III) und (IV) eingeschlagen [145] (Schema 28). Diese beiden Spinzustände beeinflussen in nicht unerheblichem Maße die Folgereaktionen der Arylnitrene (s. Schema 27). Während Singulettarylnitrene typischerweise 1-Aza-1,2,4,6-Cycloheptatetraene bilden, welche mit Nukleophilen zu 2-Hetero-3-H-azepinen bilden (Schema 27, (e)), reagieren Triplett-nitrene zumeist durch H-Abstraktion mit hohen Ausbeuten zu Anilinderivaten und Azobenzolen (Schema 27, (j),(m)) [141,143]. Jedoch stellen oben genannte Reaktionen nur Hauptreaktionspfade innerhalb eines komplexen Reaktionsgeschehens dar, welches zur gleichzeitigen Bildung verschiedenster Produkte führt.

3.2.3.2 Darstellung von 4-Azidophenacyl-[¹⁸F]fluorid

Als geeignete Verbindung zur Radiofluorierung von Proteinen via photochemischer Konjugation wurde 4-Azidophenacyl-[¹⁸F]fluorid ([¹⁸F]APF) in Erwägung gezogen. Der entsprechende ¹⁸F-Fluorierungsvorläufer 4-Azidophenacylbromid (APBr) [146,147] verfügt neben der Arylazidgruppe in para-Position über einen Bromacylrest, der, analog der Darstellung α-[¹⁸F]fluorierter Carbonsäureester, eine nukleophile ¹⁸F-Fluorierung in hoher radiochemischer Ausbeute erlauben sollte.

3.2.3.2.1 Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von [^{18}F]APF als Funktion der Reaktionszeit

Die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute der ^{18}F -Fluorierung von Azidophenacylbromid von der Reaktionszeit ist in Abbildung 12 dargestellt.

Der Kurvenverlauf zeigt nach Erreichen des Ausbeutemaximums von ca. 70% nach Reaktionszeiten von ca. 4-5 min eine stetige Abnahme der Produktausbeute.

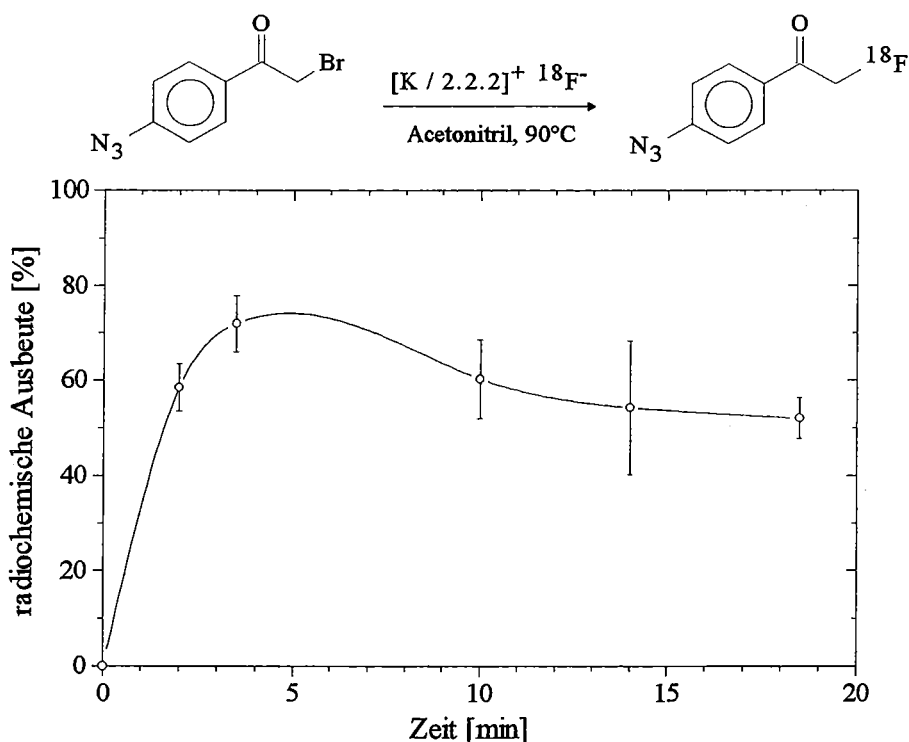


Abbildung 12: Radiochemische Ausbeute der ^{18}F -Fluorierung von APBr als Funktion der Zeit. Reaktionsbedingungen: 7.5 mg (31 μmol) Azidophenacylbromid, 6 mg Kryptofix 222, 250 μl CH_3CN , 90°C)

Als Grund für diese, im Vergleich zur n.c.a. ^{18}F -Fluorierung von α -Bromcarbonsäureestern [74,75], geringe radiochemische Ausbeute ist die thermische Instabilität der Azidfunktion bei erhöhter Temperatur unter Bildung von polymeren und niedermolekularen Verbindungen [148] zu nennen. Dies führt, neben einer Eduktumsetzung unter Bildung störender Verunreinigungen, ebenso zu einer Ausbeuteminderung durch Thermolyse des [^{18}F]APF. Durch Reduzierung der Reaktionstemperatur auf 60°C konnte zwar eine geringere Zersetzung festgestellt werden, doch führten diese Reaktionsbedingungen gleichzeitig zu einer verminderten ^{18}F -Fluorierung.

Ebenso scheiterte der Versuch, die nukleophile Substitution mit Mikrowellenbestrahlung zu verbessern. Diese lieferte während des gesamten Beobachtungszeitraums von 120 sec nicht mehr als 9% radiochemische Ausbeute, während ein hydrophileres Nebenprodukt, welches bei der ^{18}F -Fluorierung bei 90°C in CH_3CN nur in Spuren beobachtet wurde, mit bis zu 31% RCA gebildet wurde.

3.2.3.2.2 Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ als Funktion der Eduktkonzentration

Auch hier deutet die in Abbildung 13 dargestellte Kurve wiederum auf eine Ausbeuteminderung durch Thermolyse hin. So führt nach Erreichen einer maximalen radiochemischen Ausbeute von ca. 75% bei einer Eduktkonzentration von 15-20 μmol APBr in CH_3CN eine weitere Steigerung der APBr-Konzentration zu einer stetigen Abnahme der radiochemischen Produktausbeute. Dies ist möglicherweise auf eine höhere Konzentration von Zersetzungsprodukten zurückzuführen, die eine ^{18}F -Fluorierung des verbleibenden Eduktes beeinträchtigen.

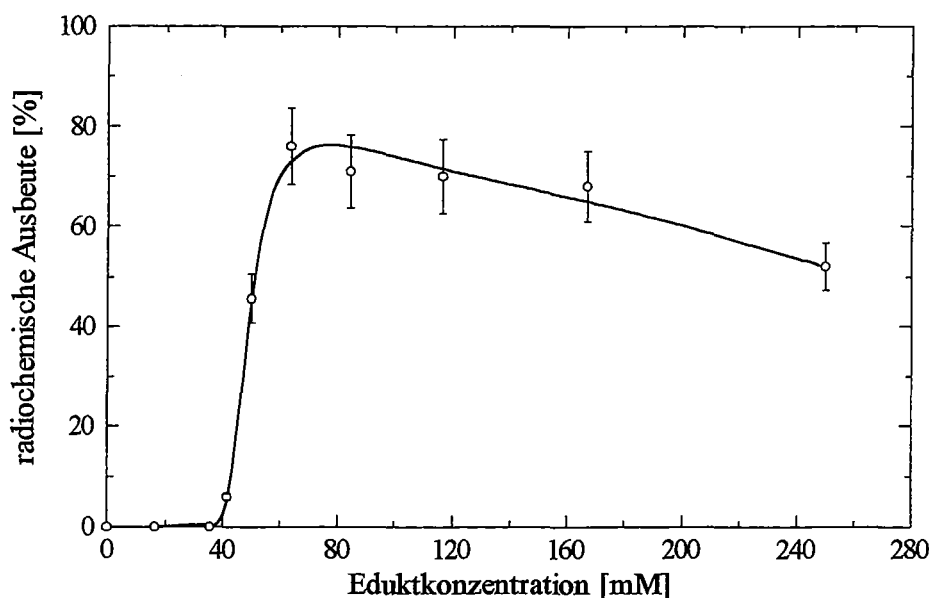


Abbildung 13: Radiochemische Ausbeute der ^{18}F -Fluorierung von Azidophenacylbromid als Funktion der Eduktkonzentration.
Reaktionsbedingungen: 6 mg Kryptofix 222, 250 μl CH_3CN , 90°C, 4 min)

3.2.3.2.3 Zur Reinigung und Isolierung von $[^{18}\text{F}]\text{APF}$

Die Isolierung des $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ gestaltete sich aufgrund der Eduktzersetzung zunächst schwierig. Eine Abtrennung des Bromvorläufers durch Umsetzung mit Dimethylaminopyridin, Piperazin oder längerkettigen Aminen wie Spermidin und anschließende Festphasenextraktion an Si-60- oder Kationenaustauscherkartuschen, wie bei der Darstellung aliphatischer α - $[^{18}\text{F}]\text{Fluorcarbonsäureester}$ bereits beschrieben [108,110], führte in diesem Fall, aufgrund der starken Zersetzung des Eduktes, nicht zum Erfolg.

Daher konnte auf eine HPL-chromatographische Aufreinigung des $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ nicht verzichtet werden. Durch Optimierung der Chromatographiebedingungen und anschließende 'on-line

Fixierung' des Produktes aus der HPLC-Produktfraktion konnte jedoch die Gesamtsynthesezeit von $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ incl. der optimierten HPLC-Trennung und Festphasenextraktion auf ca. 15 min begrenzt werden.

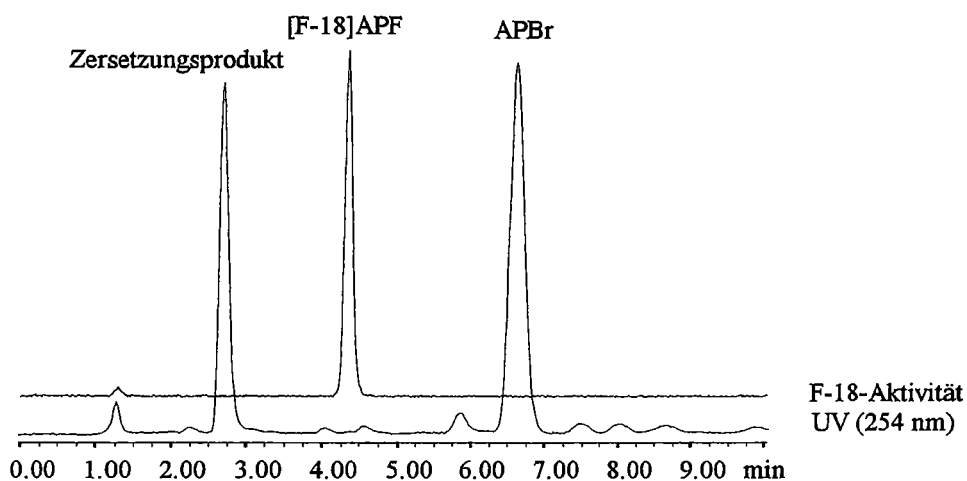


Abb. 14: UV- und Radiochromatogramm der präparativen Abtrennung von 4-Azidophenacyl- $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$.
Säule: LiChrolut RP-8 select B, 125x 8mm; Eluens: CH_3CN / Wasser (50/50) (v/v);
Flußrate: 4ml/min, Detektion: 254 nm, $k'([^{18}\text{F}]\text{APF}) = 3.3$

Schema 29: Fließschema der Synthese von 4-Azidophenacyl- $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$

Syntheseschritte	Zeit	RCA
$[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$	t=0	100%
↓ azeotr. Trocknung	t=3min	98%
$[^{18}\text{F}]\text{Fluorierung von Azidophenacylbromid}$	t=9min	74%
↓ 1. HPLC-Trennung 2. one-line-Fixierung 2. Elution		
4-Azidophenacyl- $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$	t=15min	70%
unkorrigierte Gesamtausbeute: ca. 63 % spezifische Aktivität: > 100 GBq / μmol		

3.2.3.3 Photolyse von [^{18}F]APF

Zur Vermeidung einer Photooxidation der anwesenden Proteine (bzw. ihrer Tyr-, Trp- und Phe-Gruppen) wurde die Photolyse von Azidophenacyl- ^{18}F fluorid bei Wellenlängen >300 nm durchgeführt. Als UV-Quelle diente eine herkömmliche UV-Handlampe (für dünnschichtchromatographische Zwecke, 15W, 365nm, System 1) sowie ein UV-Hochleistungsstrahler (100W, 365nm, System 2). Zur Ermittlung der optimalen Photolyseparameter, wie Lichtintensität, Bestrahlungszeit und Abstand zu UV-Quelle wurden verschiedene Messreihen durchgeführt.

Zunächst wurde die zur nahezu vollständigen Photolyse des Azids notwendige Bestrahlungsdauer mit System 1 und System 2 bestimmt. Um eine Erwärmung der Probe zu vermeiden, wurde die zu bestrahlende Quarzküvette (10x10x50mm) im Abstand von 8 cm (System 1) bzw 15 cm (System 2) von der Lichtquelle fixiert und zu verschiedenen Zeiten Proben radiochromatographisch untersucht.

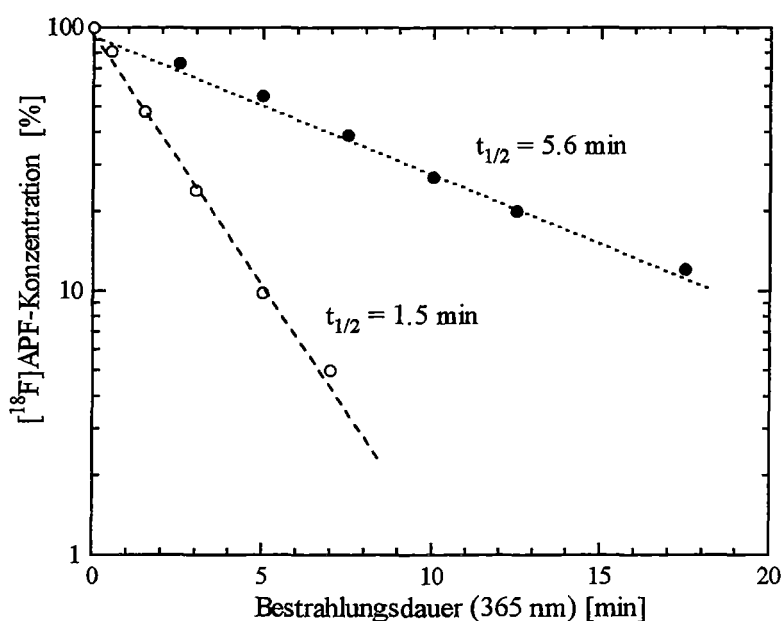


Abbildung 15: Photolytische Zersetzung von [^{18}F]APF in CH_3CN als Funktion der Bestrahlungsdauer mit UV-Licht (365 nm). (o) 100W Hochleistungsstrahler, 15 cm Abstand; (•) 15W UV-Handlampe, 8 cm Abstand.

Wie in Abb 15 aus der logarithmischen Darstellung der noch vorhandenen Menge an [^{18}F]APF (in [%] der Anfangskonzentration) als Funktion der Bestrahlungsdauer zu erkennen ist, betragen die photochemischen Halbwertszeiten $t_{1/2} = 1.5$ min (100W) bzw. $t_{1/2} = 5.6$ min (15W). Diese Zeiten entsprechen einer notwendigen Bestrahlungsdauer zur 99%igen Photolyse von [^{18}F]APF von 10.0 min bzw 37.5 min. Um die Reaktionszeit für die Markierung des Proteins zu minimieren, wurde daraufhin untersucht, wie weit der Abstand zur UV-Quelle reduziert werden muß, um eine nahezu quantitative Photolyse ($>99\%$) binnen 5 min zu

erreichen. Im Hinblick auf die potentielle Gefahr der Denaturierung von Proteinen durch erhöhte Temperaturen wurde in allen folgenden Experimenten auf die Anwendung des 100W-Strahlers verzichtet.

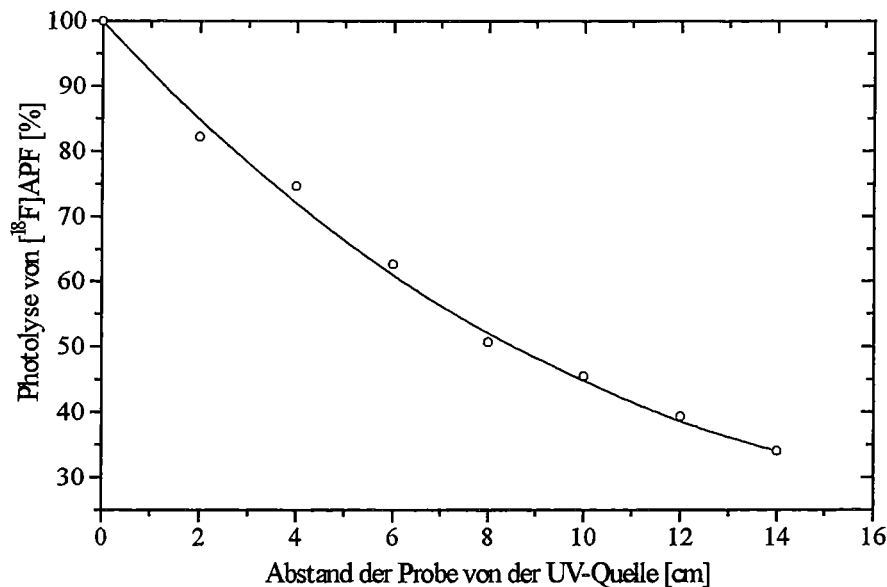


Abbildung 16: Photolytische Zersetzung von $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ in CH_3CN als Funktion des Abstandes zur UV-Quelle (15W-UV-Handlampe, 366nm, Bestrahlungsdauer: 5 min)

Wie anhand von Abbildung 16 deutlich wird, war eine photolytische Zersetzung von 4-Azidophenacyl- $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$ >99% innerhalb von 5min nur möglich, wenn die Küvette direkt vor das Filterfenster der Handlampe positioniert wurde. Da die hierbei beobachtete Erwärmung der Küvette auf 30-35°C (bei ca. 100µl Lösung) keine negativen Auswirkungen auf die Eigenschaften der Proteinen hat, wurden bei allen weiteren Markierungen mit $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ eine Bestrahlungsdauer von 5-8 min gewählt.

3.2.3.4 ^{18}F -Photomarkierung von Proteinen

3.2.3.4.1 Abhängigkeit der photochemischen Konjugationsausbeute von ^{18}F -HSA als Funktion des pH-Wertes

Da bei Proteinen und besonders im Falle von Antikörpern bei größeren Abweichungen vom physiologischen pH-Wert mit einem erhöhten Verlust der biologischen Aktivität zu rechnen ist, wurde diese Abhängigkeit nur über einen Bereich von $\text{pH } 7 \pm 2$ untersucht. Die Abhängigkeit der photochemischen Konjugationsausbeute von ^{18}F -HSA vom pH-Wert für zwei verschiedene HSA-Konzentrationen zeigt Abbildung 17.

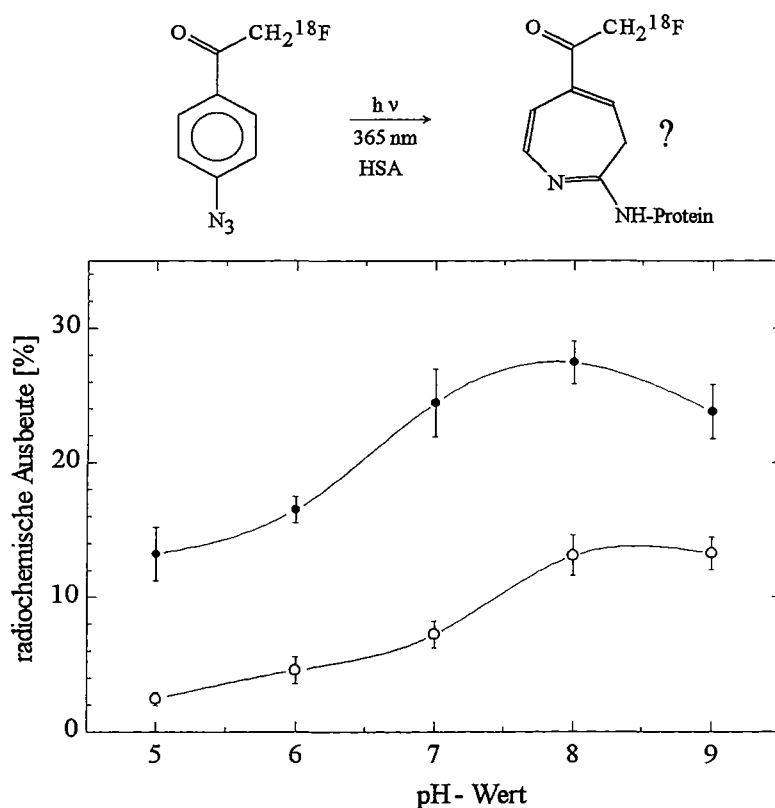


Abb. 17: Abhängigkeit der photochemischen Konjugationsausbeute von ¹⁸F-HSA als Funktion des pH-Wertes bei einer HSA-Konzentration von (●) 1mg/150μl Puffer und (○) 0.1mg/150μl Puffer (6min, RT, 365nm).

Beide Kurven zeigen eine deutliche Abhängigkeit der photochemischen Konjugationsausbeute vom pH-Wert mit einem Maximum bei ca. pH 8. Dieser Kurvenverlauf gibt bereits erste Hinweise auf die Art der Folgereaktionen, welche zur Proteinmarkierung führen. So sollten die in Schema 27 dargestellten Additions- und Insertionsreaktionen (f), (g) und (h) des bevorzugt gebildeten Singuletnitrens keine Abhängigkeit vom pH-Wert zeigen. Dagegen sollte ein nukleophiler Angriff auf das 7-Aza-bicyclo[4.1.0]hepta-1⁷,2,4-trien - Derivat (d) oder das 1-Aza-1,2,4,6-Cycloheptatetraen - Derivat (e) erwartungsgemäß durch die 'Abnahme der Konzentration nukleophiler Zentren' am Protein (Lysylgruppen) bei niedrigen pH-Werten deutlich geringere Umsetzungsraten zeigen. Da es jedoch in wässriger Lösung bei Anwesenheit von Aminen bevorzugt zur Umlagerung (c) (Schema 27) und anschließender Bildung der 3-H-Azepine kommt [148], sollte dieser Reaktionsverlauf auch bei der ¹⁸F-Markierung von Proteinen mittels [¹⁸F]APF vorherrschend sein. In Übereinstimmung mit diesem Reaktionsverlauf kann ein Ausbleiben einer weiteren Ausbeutezunahme oberhalb pH 8 durch vermehrte Nebenreaktionen als Folge der erhöhten OH⁻-Konzentration erklärt werden.

Da besonders eine Markierung von Antikörpern nahezu physiologische Bedingungen (pH 7-8) erfordert, ist das beobachtete Maximum der RCA im physiologischen pH-Bereich als optimal anzusehen.

3.2.3.4.2 ^{18}F -Markierung von Transferrin, Avidin und einem monoclonalen Antikörper

Zur vergleichenden Betrachtung wurde die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von ^{18}F -HSA, ^{18}F -Transferrin, ^{18}F -Avidin und eines monoclonalen Antikörpers ($\text{IgG}_{2\text{a}}$) als Funktion der Proteinkonzentration bestimmt (siehe Abb. 18).

Die ^{18}F -Markierung von HSA durch photochemische Konjugation gelingt bereits bei einer HSA-Konzentration von 0.5 mg/100 μl Puffer (pH 8.0) mit einer Ausbeute von ca. 27 %. Eine Steigerung der HSA-Konzentration auf bis zu 5.3 mg/100 μl Puffer führt dagegen nur noch zu einer geringen Verbesserung der radiochemischen Ausbeute auf ca. 33 %. Eine radiochemische Ausbeute an ^{18}F -Transferrin von > 30% ist dagegen erst mit Transferrinkonzentrationen > 2.5 mg / 100 μl zu erreichen. Gleichzeitig ist im Vergleich zur Markierung von HSA ein flacherer Anstieg der Produktausbeutekurve bei kleinen Transferrinkonzentrationen festzustellen. ^{18}F -Avidin konnte im untersuchten Konzentrationsbereich (bis 1.3 mg / 100 μl) nur mit maximal 16 % Ausbeute markiert werden. Eine noch geringere Produktausbeute von ca. 12% wurde für die Markierung des Antikörpers bei einer Konzentration von 830 μg / 100ml beobachtet.

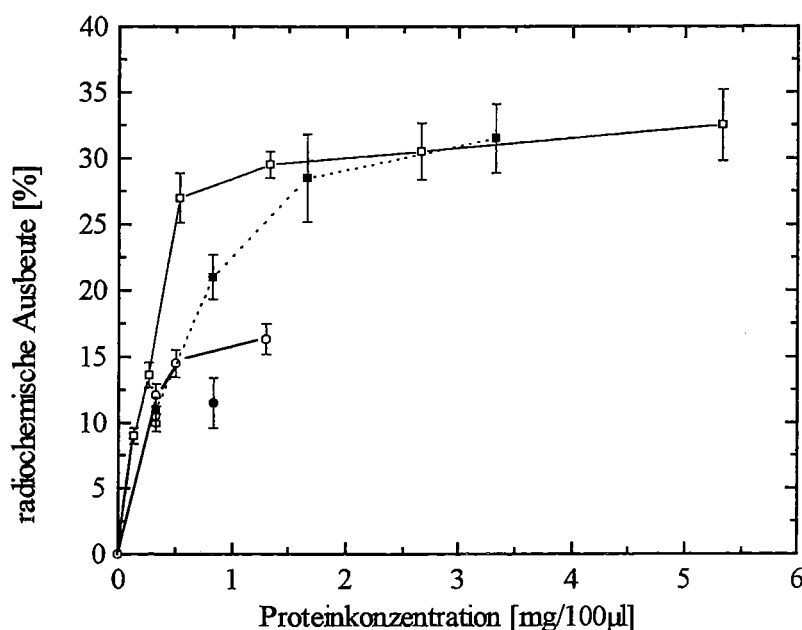


Abbildung 18: Radiochemische Ausbeute der photochemischen Konjugation von Human-Serum-Albumin (□), Transferrin (■), Avidin (o) und eines monoclonalen Antikörpers (●) mit [^{18}F]APF als Funktion der Proteinkonzentration; (Boratpuffer pH 8.0, 366nm; 8 min, 22°C).

Zur Diskussion dieser Ergebnisse wird wiederum die Aminosäuresäurezusammensetzung der untersuchten Proteine herangezogen.

Hierzu ist in Abbildung 19 der Gehalt an Threonin, Serin, Tyrosin, Histidin und Lysin [nmol Aminosäure / mg Protein] (linke Ordinate) in Avidin [130], Transferrin [149] und Human-

Serum-Albumin [116] sowie die radiochemische Ausbeute der photochemischen Konjugation dieser Proteine mit [^{18}F]APF (rechte Ordinate) dargestellt.

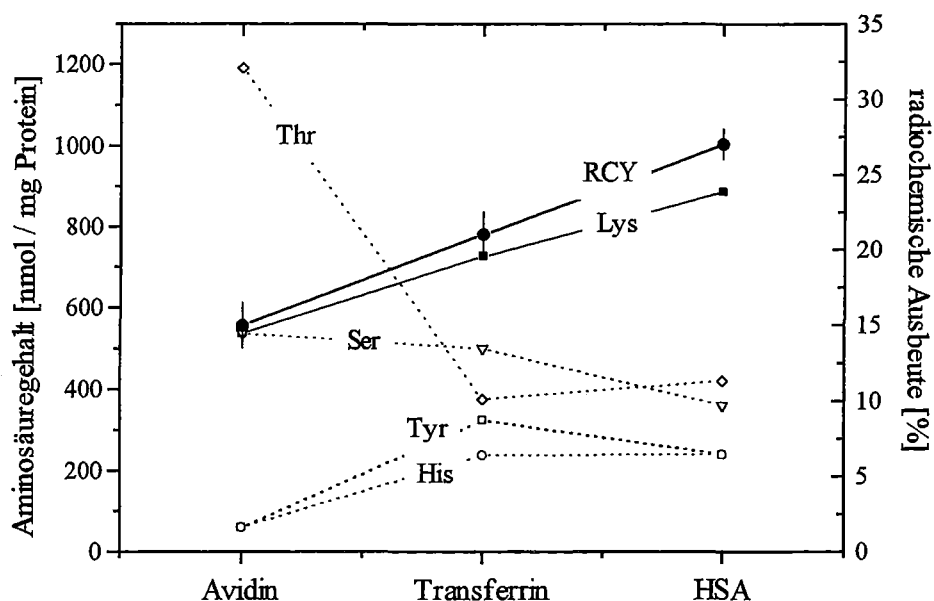


Abb. 19: Gehalt an Threonin, Serin, Tyrosin, Histidin und Lysin in Avidin [130], Transferrin [149] und Human-Serum-Albumin [116] [nmol Aminosäure / mg Protein] (linke Ordinate) sowie die radiochemische Ausbeute der photochemischen Konjugation dieser Proteine mit [^{18}F]APF (rechte Ordinate).
Konjugationsbedingungen: 1 mg Protein / 100 μl Puffer pH 8.0, 365 nm, 8min)

Die erwähnten Aminosäuren werden in der Literatur bei Protein-Rezeptor-Studien mittels photo-affinity-labeling als 'Hauptreaktionspartner' der verwendeten Arylnitrene angesehen [141].

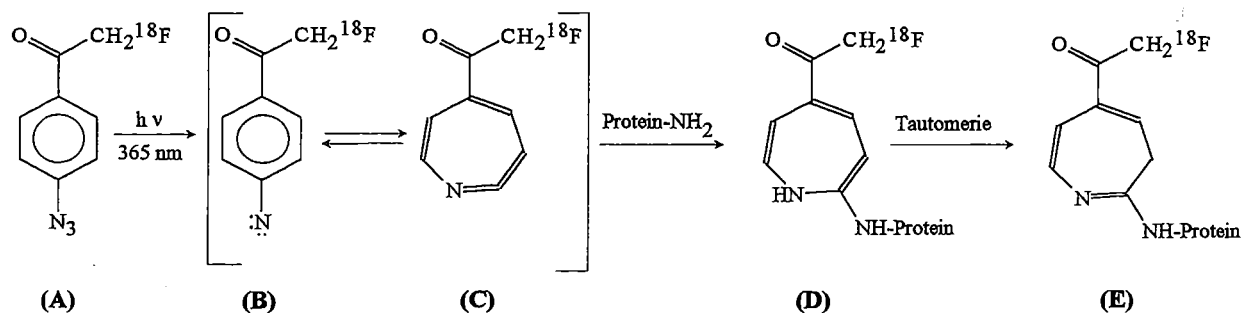
Falls eine ^{18}F -Markierung der untersuchten Proteine durch photochemische Konjugation, wie anhand der pH-Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute bereits vermutet wurde, hauptsächlich durch einen nukleophilen Angriff obengenannter Aminosäuren auf das 7-Aza-bicyclo[4.1.0]hepta-1⁷,2,4-trien - Derivat ((d), Schema 27) oder das 1-Aza-1,2,4,6-Cycloheptatetraen - Derivat ((e), Schema 27) zurückzuführen ist, sollte in Abbildung 19 eine Korrelation zwischen der Konzentration der beteiligten Aminosäuren und der radiochemischen Ausbeute zu beobachten sein.

Diese Korrelation kann mit hinreichender Genauigkeit nur für die Lysylgruppen der untersuchten Proteine festgestellt werden. Dagegen weisen die Konzentrationen aller anderen Aminosäuren deutliche Abweichungen von der beobachteten radiochemischen Ausbeute auf.

Die ^{18}F -Markierung von Proteinen über photochemische Konjugation mittels [^{18}F]APF ist demzufolge hauptsächlich auf die Derivatisierung der Lysylgruppen zurückzuführen. Eine signifikante Derivatisierung der Seitenketten anderer Aminosäuren konnte nicht festgestellt werden. Ebenso kann eine unspezifische Markierung der Proteine durch Insertionen etc.

ausgeschlossen werden, da in diesem Falle die radiochemische Ausbeute hauptsächlich eine Funktion der Massenkonzentration der Proteine wäre.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann für die photochemische Konjugation von Proteinen mit $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ der in Schema 30 dargestellte Reaktionsverlauf angenommen werden.



Schema 30: Reaktionsschema der ^{18}F -Markierung von Proteinen mittels $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ durch photochemische Konjugation.

3.2.4 Vergleichende Bewertung der ^{18}F -Markierungen von Proteinen durch ^{18}F -Acylierung und photochemische Konjugation

Zusammenfassend werden im folgenden die untersuchten Methoden zur ^{18}F -Fluorierung von Proteinen vergleichend bewertet (siehe Tabelle 8).

Bezüglich der Synthese des ^{18}F -Markierungsreagenzes besitzen die ^{18}F -Fluoracylierungsmethoden aufgrund ihrer Mehrstufigkeit und des damit verbundenen Zeitaufwands einen deutlichen Nachteil. Demgegenüber kann $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ in einer nur 15-minütigen Einstufensynthese mit einer unkorrigierten radiochemischen Ausbeute von ca. 64% und minimalem apparativen Aufwand dargestellt werden. Dieser Vorteil kann jedoch nur in Einzelfällen die geringen Ausbeuten der anschließenden Proteinmarkierung kompensieren. So erreicht die unkorrigierte Gesamtausbeute beider Syntheschritte (Synthese der prosthetischen Gruppe und photochem. Konjugation) nur bei Markierungen von Proteinen mit hohem Lysylgehalt Werte von ca. 20%, während z.B. eine Markierung eines Antikörpers mit niedrigem Lysylgehalt nur zu Gesamtausbeuten von etwa 5% führt.

Ähnlich niedrige Ausbeuten für den Konjugationschritt wurden aufgrund der Aktivesterhydrolyse für die Proteinmarkierung via $[^{18}\text{F}]\text{NPFP}$ gefunden. Diese ^{18}F -Acylierungsvariante bedarf ebenso wie die PCC-Methode eines hohen Lysylgehalts des zu markierenden Proteins. Ferner ist die Mehrstufensynthese des $[^{18}\text{F}]\text{NPFP}$ sehr zeitaufwendig

und weist daher auch die niedrigste unkorrigierte Gesamtausbeute bei der Markierung der prosthetischen Gruppe auf.

Durch eine HOBt-katalysierte ^{18}F -Acylierung mittels $[^{18}\text{F}]\text{NPFP}$ kann zwar eine signifikante Steigerung der Konjugationsausbeute erreicht werden, doch führen hier Nebenreaktionen durch O-Acylierung von Tyrosylresten und Acylierungen der Histidylgruppen zur Bildung instabiler Nebenprodukte. Somit ist diese Variante auf die Markierung von Proteinen mit hohem Lysylgehalt bei gleichzeitig niedrigem Tyrosyl- und Histidylgehalt begrenzt.

Tabelle 8: Vergleich der verschiedenen Methoden zur ^{18}F -Fluorierung von Proteinen.

	PCC (Photo- chemische Konjugation)	^{18}F-Fluoracylierung		
	$[^{18}\text{F}]\text{APF}$	$[^{18}\text{F}]\text{SFB}$	$[^{18}\text{F}]\text{NPFP}$	$[^{18}\text{F}]\text{NPFP} + \text{HOBt}$
Synthese der prosthetischen Gruppe:				
RCA:	70 %	50 %	60 %	
unkorrigierte Ausb.:	64 %	40 %	34 %	
Zeit:	15 min	35 min	90 min	
Syntheseschritte:	1	3	3	
Konjugationsschritt:				
RCA:	< 35 %	bis 90 %	< 25 %	bis ca. 60 %
Zeit:	6-8 min	< 10 min	< 10 min	< 10 min
in vivo-Stabilität:	mittel	hoch	hoch	niedrig bis hoch (= f (Tyr, His))
Bemerkungen:	hoher Lys-Gehalt notwenig	keine störenden Nebenreaktionen	hoher Lys-Gehalt notwendig	hoher Tyr- und His- Gehalt stört
R.C.Gesamtausbeute:	< 24 %	< 45 %	< 15 %	< 36 %
Gesamtsynthesezeit (*):	21-23 min	45 min	100 min	100 min
unkorrigierte Gesamtausbeute (*):	5 - 20 %	< 33 %	4 - 8 %	12 - 27 %

(*) ohne abschließende Gelfiltration

Durch die Optimierung der Synthese von $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ konnte der erste Schritt dieser Proteinmarkierungsmethode erheblich verbessert werden. Proteinmarkierungen mit diesem Reagens gelingen in hohen radiochemischen Ausbeuten ohne störende Nebenreaktionen und bedürfen daher bezüglich des verwendeten Proteins keiner besonderen Voraussetzungen.

Somit ist die ^{18}F -Fluoracylierung via $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ bei einem Gesamtzeitaufwand von ca. 45 min und einer radiochemischen Ausbeute von maximal ca. 30% als eine universell einsetzbare Variante zur ^{18}F -Markierung von Proteinen anzusehen.

Dennoch kann im Einzelfall durch Besonderheiten des zu markierenden Polypeptids eine Markierung über $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ oder $[^{18}\text{F}]\text{NPFP}$ von Vorteil sein. Dies gilt im Besonderen bei Markierungen kleiner Proteine bzw Peptide, bei welchen sich die geringere Lipophilie und die kleinere Größe der ^{18}F -Fluorpropionylgruppe im Vergleich zur ^{18}F -Fluorbenzoylgruppe als günstig erweisen kann. Ebenso könnte durch den geringen Zeit- und apparativen Aufwand die photochemische Konjugation eines Proteins mit hohem Lysylgehalt vorteilhaft sein.

Hierbei ist besonders zu beachten, daß die photochemische Konjugation im Gegensatz zu den Acylierungen eine neue Methode ist und daher in den nächsten Jahren durch Optimierungen deutlich verbesserte Konjugationsausbeuten zu erwarten sind. So wurden bereits ein Jahr nach Publikation der o.g. Studien zur ^{18}F -Markierung von Proteinen via $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ durch photochemische Konjugation [150,151] von einer anderen Arbeitsgruppe in Studien zur ^{14}C -Markierung eines Antikörpers und HSA deutlich höhere radiochemische Ausbeuten durch Verwendung eines tetrafluorierten Arylazids erzielt [152-154].

3.2.5 Optimierung der chromatographischen Reinigung markierter Proteine

Der abschließende Präparationsschritt ist die Abtrennung der markierten und nichtmarkierten Proteine von nicht umgesetztem Markierungsagens und/ oder der durch Hydrolyse entstandenen, niedermolekularen, markierten Verbindungen.

Diese Abtrennung erfordert in der Regel bei Verwendung der handelsüblichen HPLC-Säulen zur Gelfiltrationschromatographie eine Gesamtchromatographiedauer von bis zu 20 min bei einer Elution der hochmolekularen Proteinfraction im Bereich von 7.5-10 min. Dies entspricht bei den vier vorgenannten ^{18}F -Markierungsmethoden einem Anteil von 8-30% an der Gesamtsynthesezeit eines ^{18}F -markierten Proteins.

Zur Optimierung dieser Trennung und somit zur Optimierung der Gesamtsynthese wurde, wie in der routinemäßigen Synthese eines Radiopharmkons üblich, eine Differenzierung zwischen präparativer Trennung und Qualitätskontrolle vorgenommen. Auf diese Weise ist eine schnelle chromatographische Aufreinigung des Produkts möglich, während eine abschließende Qualitätskontrolle nach Bereitstellung des markierten Proteins durch eine hochauflösende Chromatographie an einer Probe der applikationsfertigen Lösung durchgeführt wird.

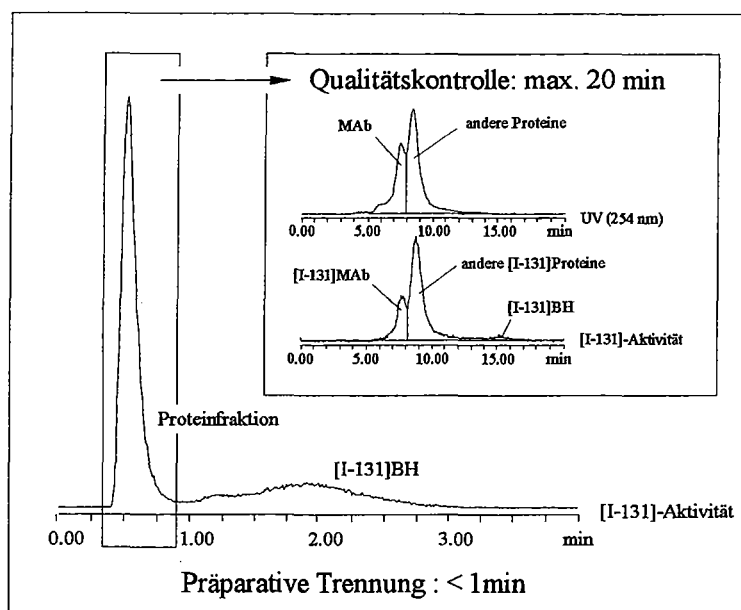


Abb. 20: Reinigung eines ^{131}I -iodierten Proteingemisches (bestehend aus 12.6 Gew.% Anti-HSA IgG No.6684 -Sigma- und 87.4 Gew.% Restprotein); markiert via 3-(3- ^{131}I iod-4-methoxyphenyl)propionsäure-NHS (^{131}I -Bolton-Hunter-Reagens; ^{131}I -BH).
 Präparative Trennung: HiTrap - Kartusche, Eluens: PBS-Puffer, pH 7.4, Flußrate 5 ml/min ($\neq$ max.). Qualitätskontrolle: Säule: Bio-Sil SEC 250x10 mm, Eluens: PBS-Puffer pH 7.4 Flußrate 1ml / min ($=$ max.)

Hierzu wurde eine käufliche Kartusche zur Entsalzung von Proteinlösungen verwendet. Auf dieser Kartusche werden die aromatischen Markierungsreagenzien aufgrund lipophiler Wechselwirkungen mit der als oberen Filter in die Kartusche eingebauten Polypropylenfritte in der Art einer reversed-phase-Chromatographie retentiert. Hierdurch kann die Zeit zur Abtrennung der hochmolekularen Fraktion je nach Flußrate auf 30 sec bis max. 1 min reduziert werden. In Abb. 20 sind zwei Beispiele dargestellt: die präparative Abtrennung der hochmolekularen Fraktion eines ^{131}I -iodierten Proteingemisches mittels einer HiTrap-Kartusche (welche als HPLC-Säule verwendet wurde) sowie die nachfolgende Qualitätskontrolle auf einer hochauflösenden Bio-Sil SEC 250x10mm Gelfiltrationssäule. Die Qualitätskontrolle zeigte in diesem Fall eine 98.8%ige radiochemische Reinheit des Produktes (= proteingebundene Aktivität) bei einer Markierungsausbeute von 65%. Dies entspricht einer 97.7-prozentigen Abtrennung der niedermolekularen Fraktion.

3.2.6 Unspezifische Markierung, biologische Aktivität und in vivo Stabilität

Da Proteine potentiell durch unspezifische, d.h. über nichtkovalente, ionische bzw. lipophile Wechselwirkungen Substanzen binden können [141], wurde durch Trichloressigsäurefällung der Anteil der unspezifischen, d.h. nicht-kovalent proteingebundenen Aktivität des Proteins bestimmt.

Tabelle 9: Einige Daten zur biologischen Aktivität, zur unspezifischen Bindung und zur in vivo-Stabilität der radiohalogenierten Proteine

Protein: Markierungs- methode	Biologische Aktivität	unspezifische Bindung	in vivo Stabilität (NMRI-Mäuse, n=3)	
			Stabilität der prosth. Gruppe	Dehalogenierung
¹⁸ F-Avidin: [¹⁸ F]APF [¹⁸ F]NPFP	> 85 % > 98 % [111]	n.b. n.b.	n.b. n.b.	n.b. n.b.
¹⁸ F-HSA: [¹⁸ F]SFB [¹⁸ F]APF	n.b. n.b.	< 1 % < 2 %	Blut (1 h) 18.2 ± 0.5 %iD/g 11.5 ± 1.3 %iD/g	Knochen (20 min) 1.2 ± 0.1 %iD/g 3.1 ± 0.8 %iD/g
[¹³¹ I]HSA [¹³¹ I]BH [¹³¹ I]OMeBH	n.b. n.b.	n.b. n.b.	Blut (1 h) 24.5 ± 2.2 %iD/g 23.5 ± 2.1 %iD/g	Schilddrüse (6 h) 0,11 ± 0,04 %iD/org 0,08 ± 0,03 %iD/org
¹⁸ F-IgG _E : [¹⁸ F]NPFP	n.b.	n.b.	Nieren (30 min) 12.9 ± 1.7 %iD/g	Knochen (30 min) 1.7 ± 0.3 %iD/g
¹³¹ I-Anti-HSA-IgG: [¹³¹ I]BH	> 90 % ? (*)	n.b.	n.b.	n.b.

%iD/g = Prozent der injizierten Dosis pro Gramm; %iD/org = Prozent der injizierten Dosis pro Organ
n.b. = nicht bestimmt; OMeBH = O-Methyl-Bolton-Hunter-Reagens; BH = Bolton-Hunter-Reagens
(*) bezogen auf Herstellerangaben, siehe Erläuterungen im Text

Ferner wurde in einigen Fällen der Erhalt der biologischen Aktivität der markierten Proteine quantifiziert. Dies gelang im Falle des Avidins durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Imino-Biotin und im Falle eines iodierten Anti-HSA-IgG durch Immunopräzipitation.

Ebenso sind in Tabelle 9 einige ausgewählte Biodistributionsdaten aufgeführt, welche eine vergleichende Beurteilung der in vivo-Stabilität gestatten. Hierbei stellt eine ¹⁸F-Aktivitätsanreicherung in den Knochen ein Maß für die in vivo Entstehung von [¹⁸F]Fluorid und eine ¹³¹I-Aktivitätsanreicherung in der Schilddrüse ein solches für die Deiodierung dar.

¹⁸F-Avidin, welches über [¹⁸F]APF und photochemischer Konjugation dargestellt wurde, zeigt einen geringen aber signifikanten Verlust seiner biologischen Aktivität. Dieser teilweise Verlust der Affinität zu Biotin wird verursacht durch die zur Konjugation eingesetzte intensive UV-Bestrahlung. Eine Verminderung der UV-Intensität durch einzelne UV-Blitze kann diesen Aktivitätsverlust möglicherweise reduzieren. Demgegenüber weist das unter deutlich milderen Bedingungen dargestellte ¹⁸F-Fluorpropionyl-Konjugat nahezu unveränderte Affinität zum Biotin auf [111].

Ebenso wurde durch Immunopräzipitation für die Konjugation eines Anti-HSA-Antikörpers (Anti-HSA-IgG) ein 10-prozentiger Verlust der biologischen Aktivität festgestellt. Da dieser Antikörper jedoch in einem Proteingemisch, bestehend aus 12.6 Gew.% immunreaktivem IgG und 87.4 Gew.% Restprotein geliefert wurde, kann dieser Wert (aufgrund seiner ungenauen Normierung) nur als Näherungswert dienen.

Die unspezifische Bindung niedermolekularer, markierter Verbindungen an HSA war in beiden untersuchten Fällen mit $< 1\%$ bzw. $< 2\%$ sehr niedrig. Da das Phänomen der unspezifischen Bindung besonders bei diesem 'physiologischen Transportprotein' am deutlichsten ausgeprägt sein sollte, wurde der Wert der unspezifischen Bindung bei den anderen markierten Proteinen nicht bestimmt.

Bezüglich der Stabilität der prosthetischen Gruppen in vivo kann festgestellt werden, daß ein deutlich schnelleres Absinken der Aktivitätskonzentration im Blut nach Injektion von $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ -markiertem HSA im Vergleich zum $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ -Analoga entweder für eine geringere in vivo Stabilität der erstgenannten prosthetische Gruppe und/oder eine schnellere Defluorierung spricht. Betrachtet man die Aktivitätskonzentrationen in den Knochen, welche - wie erwähnt - als Indikatoren für in vivo-Defluorierung dienen, so kann eine extensive Defluorierung beider Konjugate durch die relativ niedrigen Aktivitätskonzentrationen in den Knochen ausgeschlossen werden. Demzufolge ist die vergleichsweise rasche Blutclearance des $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ -Konjugats auf eine geringere in vivo-Stabilität der prosthetischen Gruppe zurückzuführen.

Zum Vergleich sind in Tab. 9 ebenso die Aktivitätskonzentrationen des ^{131}I -Bolton-Hunter-Derivats sowie des ^{131}I -(O-Methyl)-Bolton-Hunter-Derivats von HSA im Blut angegeben. Da anhand einer im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls durchgeführten vergleichenden Studie gezeigt werden konnte, daß ^{131}I -HSA, welches mittels vier verschiedener Methoden (1. direkte Iodierung mit Chloramin-T [155], 2. Acylierung mit 4- $[^{131}\text{I}]$ Iodbenzoesäure-N-succinimidylester [156], 3. Acylierung mit ^{131}I -Bolton-Hunter-Reagens [157], 4. Acylierung mit ^{131}I -(O-Methyl)-Bolton-Hunter-Reagens) [60] markiert wurde, identische Plasmahalbwertszeiten aufweist ($t_{1/2} = 24.4 \pm 0.5$ h), sollten die Aktivitätskonzentrationen der ^{18}F -markierten HSA-Konjugate in Blut 60 min p.i. ähnliche Werte aufweisen wie die iodierten HSA-Derivate. Dieser Vergleich verdeutlicht nochmals die Instabilität des $[^{18}\text{F}]\text{APF}$ -markierten HSA, weist jedoch auch für das $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ -Konjugat einen Unterschied zu den iodierten Derivaten auf. Worin dieser Stabilitätsunterschied begründet ist, ist zur Zeit ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die in vivo Stabilität eines ^{18}F -fluorpropionylierten (via $[^{18}\text{F}]\text{NPFP}$ / HOBt) Granulozyten-spezifischen monoclonalen Antikörpers (Anti-CEA MAb BW 250/183 [158], Behringwerke) zeigte wie die ^{18}F -fluorierten HSA-Derivate eine nur geringe Defluorierung (ca. 1.7% iD/g in den Knochen, 30 min p.i.). Demgegenüber weist eine Aktivitätsakkumulation in den Nieren von 12.9% iD/g sowie die hohe renale Ausscheidung (5% der applizierten Gesamtaktivität binnen 30 min im Urin) auf eine für diese Molekülgröße (MW_{IgG} ca. 150.000 g/mol) unerwartet schnelle renale Ausscheidung der Labels hin. Dies kann nur über eine 'teilweise Instabilität der Proteinmarkierung' erklärt werden. Hierfür dürften vor allem die in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Nebenreaktionen bei ^{18}F -Markierungen mit $[^{18}\text{F}]\text{NPFP}$ / HOBt (wie O-Acylierungen etc.) verantwortlich sein.

3.3 ^{18}F -Fluoracylierung von Peptiden

Die ständig wachsende Anzahl verfügbarer natürlicher, bioaktiver Peptide sowie die stetig zunehmenden Kenntnisse über Rezeptorstrukturen, deren Untertypen und sterische Parameter sowie der daraus resultierenden Möglichkeit, synthetische Peptide mit optimierten Eigenschaften (wie z.B. höhere Rezeptoraffinität, verbesserte physiologische Stabilität und biologische Halbwertszeit) zu gewinnen, führt seit einiger Zeit zu einem wachsenden nuklearmedizinischen Interesse an dieser Substanzklasse [77,78]. Dementsprechend ist insbesondere die Markierung dieser Verbindungen mit kurzlebigen Positronenemittern zur Diagnose und mit längerlebigen β^- -Emittern zur Therapie ein aktuelles Forschungsgebiet der radiopharmazeutischen Chemie.

Als Beitrag hierzu wird im folgenden die ^{18}F -Markierung des von der Sandoz AG entwickelten Oktapeptids SMS 201-995 [35,160], einem synthetischen Analogon des endogenen Somatotropin-Release-Inhibiting-Factor (SRIF) und Apamin [159], einem Neurotoxin aus dem Gift der Honigbiene, beschrieben. Hierbei wurde unter Berücksichtigung der speziellen Eigenschaften der verschiedenen ^{18}F -markierten prosthetischen Gruppen das jeweils günstigste Markierungsverfahren angewendet.

3.3.1 Darstellung von (2- ^{18}F Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995)

3.3.1.1 Strategie zur Darstellung eines ^{18}F -markierten SMS 201-995 Analogons

Radiomarkierte, synthetische Analoga des Somatotropin Release Inhibiting Factor (SRIF) sind potente Liganden für die in vivo und in vitro Detektion [160,168] der Somatostatin-Rezeptor-Subtypen hSSTR 2 bis hSSTR 5 [161,162] (siehe Tab. 10).

Tab. 10: IC₅₀-Werte [nmol/l] einiger endogener Fragmente des Somatotropin Release Inhibiting Factor (SRIF) im Vergleich zum synthetischen, in vivo stabilen Analogon SMS 201-995 [162]

Peptid	SRIF (Somatostatin) Rezeptor Subtypen (humane Subtypen)				
	hSSTR1	hSSTR2	hSSTR3	hSSTR4	hSSTR5
SRIF-14	0.40	0.10	0.25	0.79	0.59
SRIF-25	0.79	0.32	0.40	1.26	n.b.
SRIF-28	0.79	0.40	0.63	1.00	0.28
SMS 201-995	>1000	0.32	31.6	>1000	7.3

n.b.: nicht bestimmt

In den letzten Jahren konnte in zahlreichen Veröffentlichungen die erfolgreiche in vivo Markierung SRIF-rezeptor positiver Tumoren mittels der SMS 201-995 - Analoga [^{123}I]SDZ-204-090 [163], [^{111}In]SDZ-215-811 [164], [$^{67,68}\text{Ga}$]SDZ-216-927 [165], [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]SDZ-

220-778 [166] sowie [$^{86,90}\text{Y}$]SDZ-215-811 [167] gezeigt werden. Da eine genaue Quantifizierung des Rezeptorstatus jedoch nur mittels PET möglich ist, könnte die Verfügbarkeit eines ^{18}F -markierten SMS 201-995-Analogons von nuklearmedizinischem Interesse sein.

Wie in Abb. 21 dargestellt ist, besitzt SMS 201-995 neben der N-terminalen Aminogruppe des Phenylalanyl-Restes eine freie Aminogruppe in der Seitenkette des Lysins (Lys^5). Da jedoch eine Derivatisierung bzw. Acylierung innerhalb der pharmakophoren Sequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit sowohl zum Verlust der biologischen Aktivität als auch der hohen Affinität zum 'SRIF-Rezeptor' führen würde [35], sollte die Einführung einer prosthetischen Gruppe am Phe^1 -Rest erfolgen.

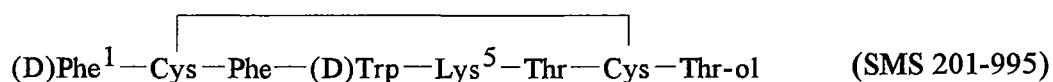
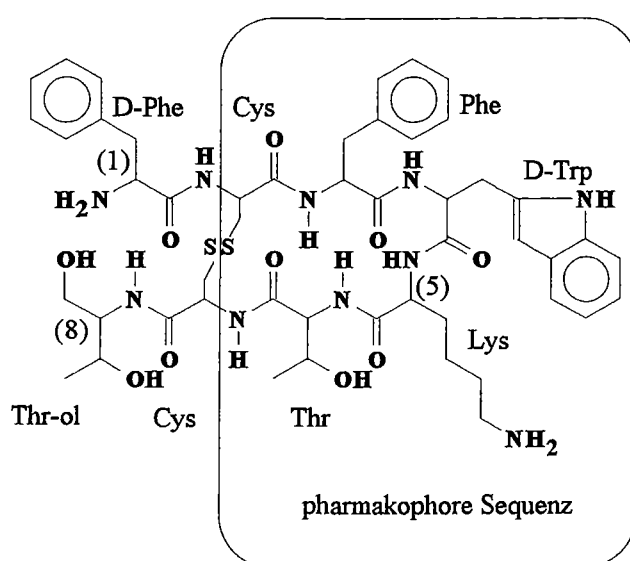


Abb. 21 : SMS 201-995, ein synthetisches Analogon des Somatotropin Release Inhibiting Factor (SRIF) ist ein Oktapeptid mit Cystinbrücke. Der D-Phe Terminus und der zum Alkohol reduzierte C-Terminus verleihen dem Peptid eine im Vergleich zum endogenen SRIF verbesserte metabolische Stabilität. Die Derivatisierung der pharmakophoren Sequenz (z.B. am Lys^5) führt zum Verlust der biologischen Aktivität [35].

So könnte durch ^{18}F -Fluoracylierung am Phenylalanylrest ein ^{18}F -markiertes SMS 201-995 Analogon synthetisiert werden, das aufgrund der Amidbindung über eine hinreichende in vivo Stabilität verfügt und durch geeignete Wahl der prosthetischen Gruppe bei geringer sterischer Modifikation eine vergleichbar hohe Affinität zum Somatostatinrezeptor zeigen sollte.

Eine selektive ^{18}F -Fluoracylierung der Phe¹-Aminosäure lässt sich dabei auf zwei verschiedenen Wegen erreichen:

- I. Durch regioselektive ^{18}F -Acylierung des ungeschützten SMS 201-995 in wässriger, gepufferter Lösung (pH 7.5) in Anwesenheit von 1-Hydroxybenzotriazol unter Berücksichtigung der Basizität der konkurrierenden Nukleophile ($\text{pK}_a(\text{Phe}^1)$ ca. 7.2, $\text{pK}_a(\text{Lys}^5)$ ca. 9.1). Diese Methode wurde bereits erfolgreich an kleineren Modellpeptiden zur regioselektiven ^{18}F -Fluoracylierung angewendet [111,129]
- II. Einführung einer Schutzgruppe am Lys⁵-Rest und deren Abspaltung nach der ^{18}F -Fluoracylierung.

Ein Nachteil der ersten Methode ist die nicht quantitative Acylierungsausbeute (ca. 65%) durch die konkurrierende Hydrolyse des ^{18}F -Acylierungsgens sowie die relativ hohe, notwendige Peptidkonzentration (0.05 mmol/ml). Die zweiten Methode erfordert die Synthese oder Bereitstellung eines derivatisierten Vorläufers. Darüber hinaus ist bei einer Markierung nach der zweiten Methode durch die anschließende Schutzgruppenabspaltung ein weiterer 'aktiver' Syntheseschritt notwendig.

Von besonderem Vorteil erweist sich jedoch bei letztgenannter Methode die hohe Lipophilie des BOC-Lys⁵ geschützten SMS 201-995 (ϵ -BOC-Lys⁵)-(SMS 201-995), welche eine ^{18}F -Acylierung in organischen Lösungsmitteln, wie beispielsweise Acetonitril, DMF oder DMSO ermöglicht. Auf diese Weise können Hydrolyseverluste vermieden und die notwendigen Peptidkonzentrationen minimiert werden.

Als prosthetische Gruppe empfiehlt sich für diesen Zweck der kleine 2- ^{18}F Fluorpropionyl-Rest. Seine geringe Größe im Vergleich zur 4- ^{18}F Fluorbenzoyl-Gruppe führt zu einer nur geringen sterischen Änderung des Zielmoleküls. Ebenso ist die geringere Lipophilie des 2- ^{18}F Fluorpropionyl-Restes von Vorteil, da eine Acylierung mit der deutlich lipophileren 4- ^{18}F Fluorbenzoyl-Gruppe die ohnehin hohe hepatobiliäre Ausscheidung von SMS 201-995 [170] in unvorteilhafter Weise verstärken könnte.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde die Darstellung von ^{18}F -markiertem SMS 201-995 über die 2- ^{18}F Fluorpropionylierung von (ϵ -BOC-Lys⁵)-(SMS 201-995) in organischen Solventien mit anschließender Schutzgruppenabspaltung untersucht (siehe unten Abb.22).

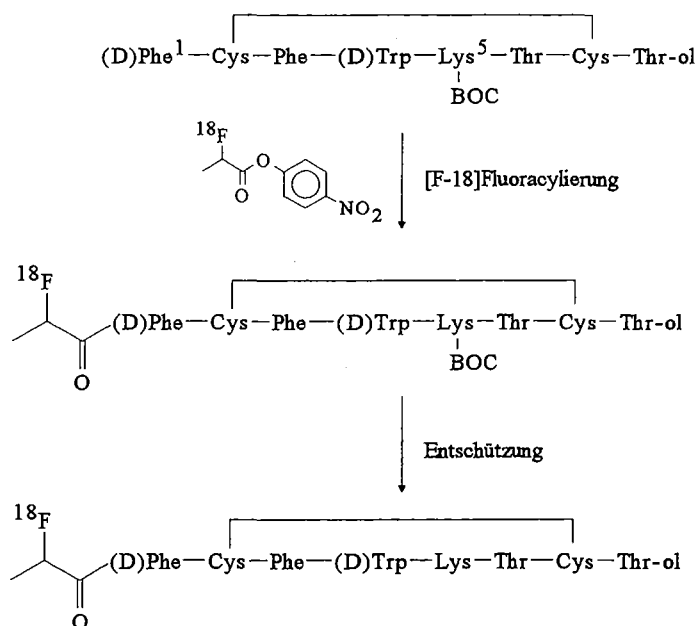


Abb. 22 : Syntheseweg zur Darstellung von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) über die ^{18}F -Fluoracylierung von (ϵ -BOC-Lys⁵)-(SMS 201-995) mit 2-[^{18}F]Fluorpropionyl-4-nitrophenylester und anschließender Schutzgruppenabspaltung.

3.3.1.2 ^{18}F -Fluoracylierung von (ϵ -BOC-Lys⁵)-(SMS 201-995)

Die Synthese des Acylierungsagens 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester erfolgte nach einer Dreistufensynthese (siehe Experimentelles).

Wie aus Tabelle 11 (Eintrag (a)) zu entnehmen ist, beträgt die radiochemische Ausbeute der [^{18}F]Fluorpropionylierung von (ϵ -BOC-Lys⁵)-(SMS 201-995) in DMF nach 5 min Reaktionszeit bei Zusatz der sterisch gehinderten Base 2,6-Di-tert.-butylpyridin 13%.

Tabelle 11: Einfluß verschiedener Aminolysekatalysatoren und Solventien auf die die RCA von [(2-[^{18}F]Fluorpropionyl)-(D)Phe¹)-(ϵ -BOC-Lys⁵)]-(SMS 201-995).

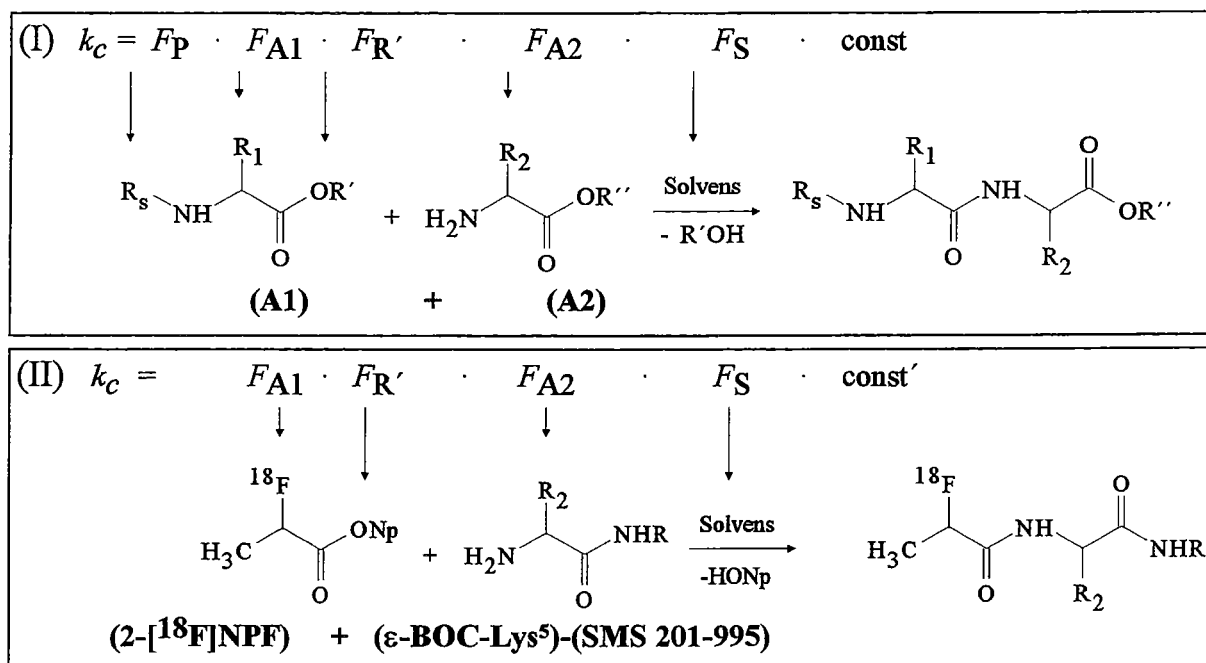
Eintrag	Aminolyse-Katalysator bzw. Base	Solvens	Reaktions-Zeit	Radiochemische Ausbeute
a	2,6-Di-tert.-butylpyridin (11 μmol)	DMF	5 min	13%
b	Imidazol (10 μmol)	DMF	8 min	16%
c	Imidazol (30 μmol)	DMF	8 min	21%
d	K ⁺ OBt ⁻ (10 μmol) (*)	DMF	5 min	95%
e	K ⁺ OBt ⁻ (10 μmol)	H ₂ O	10 min	<1%
f	TMA ⁺ OBt ⁻ (8 μmol) (**)	CH ₃ CN	10 min	9%
g	HOBt (8 μmol) mit (***)			
	2,6-Di-tert.-butylpyridin (8 μmol)	CH ₃ CN	10 min	23%

Reaktionsbedingungen: 0.5 mg (0.45 μmol) (ϵ -BOC-Lys⁵)-(SMS 201-995), T=22°C, 50 μl Solvens
 (*): Kaliumsalz von 1-Hydroxybenzotriazol; (**): Tetramethylammoniumsalz von 1-Hydroxybenzotriazol; (***) HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol

Diese geringe Ausbeute konnte auch durch die Gegenwart des Aminolysekatalysators Imidazol nicht signifikant gesteigert werden (b,c). Dagegen wurde in Anwesenheit des Kaliumsalzes von 1-Hydroxybenzotriazol (KOBt) eine nahezu quantitative Ausbeute bereits nach 5 min festgestellt (d), während die ^{18}F -Acylierung in Wasser praktisch keine ($<1\%$, (e)) Ausbeute lieferte. Für die Reaktionen in Acetonitril wurden aufgrund der Unlöslichkeit von $\text{K}^+ \text{OBt}^-$ in diesem Solvens entweder das Tetramethylammoniumsalz von HOBt ($\text{TMA}^+ \text{OBt}^-$) (f) verwendet oder HOBt in Gegenwart einer Hilfsbase (g) eingesetzt. Die erzielten Ausbeuten lagen jedoch mit 9% bzw. 23% deutlich unter den in DMF erreichten.

Zur Erklärung dieser Ergebnisse kann ein Modell [171] dienen, welches die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_c der Kopplungsreaktion einer aktivierten, N-geschützten Aminosäure A1 und einer Aminosäure A2 erlaubt (siehe Schema x, (31)).

Die verschiedenen Faktoren F_i berücksichtigen hierbei die sterischen Einflüsse der Aminosäureseitenketten (F_{A1} , F_{A2}) und der Schutzgruppe (F_P) der als Acylkomponente dienenden Aminosäure, die Aktivierung der Acylkomponente ($F_{R'}$) sowie den Solvenseinfluß (F_S). Dieses Modell kann ebenso auf die ^{18}F -Fluoracylierung angewendet werden (Schema 31, II) und erlaubt durch quantitative Abschätzung der Einflüsse der einzelnen Faktoren eine Optimierung der ^{18}F -Markierungsreaktion.



Schema 31: (I) Modell zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_c der Kopplungsreaktion einer aktivierten, N-geschützten Aminosäure A1 und einer Aminosäure A2 mittels einer Konstanten (*const*) und verschiedenen Faktoren F , welche den sterischen Einfluß der Schutzgruppe (F_P) und der Seitenkette der Aminosäure A1 (F_{A1}), die Aktivierung von A1 durch die Alkoholkomponente OR' ($F_{R'}$), den sterischen Einfluß der als Aminokomponente dienenden Aminosäure A2 (F_{A2}) sowie den Solvenseinfluß (F_S) multiplikativ berücksichtigen [171]
 (II) Übertragung dieses Modells auf die ^{18}F -Fluoracylierung von (ϵ -BOC-Lys⁵)-(SMS 201-995)

Der Wertebereich der verschiedenen F_i -Faktoren (Daten aus [171]) ist in Abbildung 23 dargestellt. So reicht beispielsweise der F_{A2} -Faktor, welcher den Einfluß der als Aminkomponente A2 dienenden Aminosäure berücksichtigt, von $F_{A2} = 0.58$ für Methionin über $F_{A2} = 1.2$ für Phenylalanin bis $F_{A2} = 19$ für Glycin. Einen größeren Einfluß übt dagegen der F_{A1} -Wert der als Acylkomponente dienenden Aminosäure aus. Er reicht von $F_{A1} = 0.05$ für Valin über 0.7 für Phenylalanin bis hin zu 1.5 für Glycin. Den größten Einfluß auf die Geschwindigkeitskonstante hat jedoch die Wahl eines geeigneten Solvens und einer geeigneten Alkoholkomponente zur Aktivierung der Acylkomponente (Abb.23).

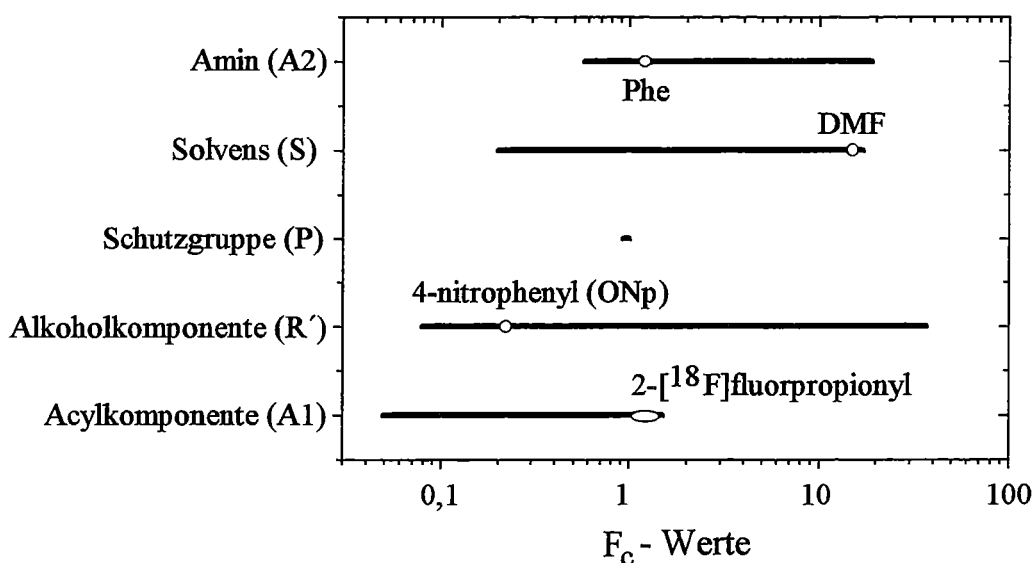


Abb. 23: Quantitativer Vergleich der Wertebereiche der verschiedenen Faktoren F . (Daten aus [171]. Zum Vergleich ist die Lage der bei der ^{18}F -Fluorpropionylierung von (ϵ -BOC-Lys⁵)-(SMS 201-995) verwendeten Komponenten nach Eintrag a, Tabelle 11, aufgeführt. Hierbei wurde angenommen, daß der Faktor F_{A1} , welcher die sterische Hinderung der ^{18}F -Fluorpropionyl-Gruppe angibt, den F_{A1} -Werten von Alanin bzw. Glycin ($F_{A1} = 1.0$ bzw. 1.5) gleichgesetzt werden kann.

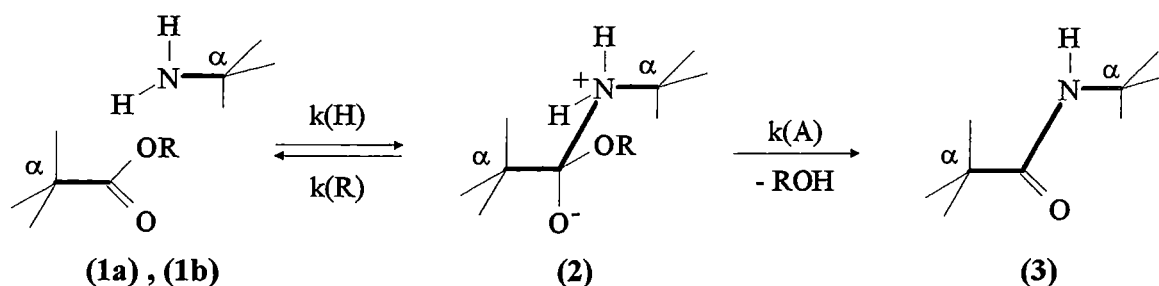
Wird dieses Modell auf die ^{18}F -Fluorpropionylierung von (ϵ -BOC-Lys⁵)-(SMS 201-995) angewendet, so können die Reaktionsparameter laut Tabelle 11, Eintrag (a), wie folgt bewertet werden:

- 1.) Die N-terminale Aminosäure Phenylalanin geht mit einem F_{A2} -Wert von 1.2 in die Gleichung zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten ein. Dieser Wert ist eine Funktion des Zielmoleküls und ist daher nicht optimierbar.
- 2.) DMF liegt mit einem F_S -Wert von 15 an der oberen Schranke des Wertebereiches und ist somit schon als nahezu ideales Solvens anzusehen.
- 3.) Der Wert der Schutzgruppe der Acylkomponente entfällt und kann in die Konstante einbezogen werden (const').
- 4.) Die Aktivierung der 2-[^{18}F]Fluorpropionylgruppe über den 4-Nitrophenylester ist mit einem $F_{R'}$ -Wert von 0.22 nicht als optimal anzusehen. Entsprechende N-Succinimidylester liegen dagegen mit einem $F_{R'}$ -Wert von 13 [171] am oberen Rand

des Wertebereiches. Der entsprechende 2-[^{18}F]Fluorpropionyl-N-succinimidylester konnte jedoch aufgrund seiner geringen Hydrolysestabilität nicht trägerfrei isoliert werden. Eine Optimierung der Aktivierung sollte daher zu einer deutlichen Steigerung der radiochemischen Ausbeute führen.

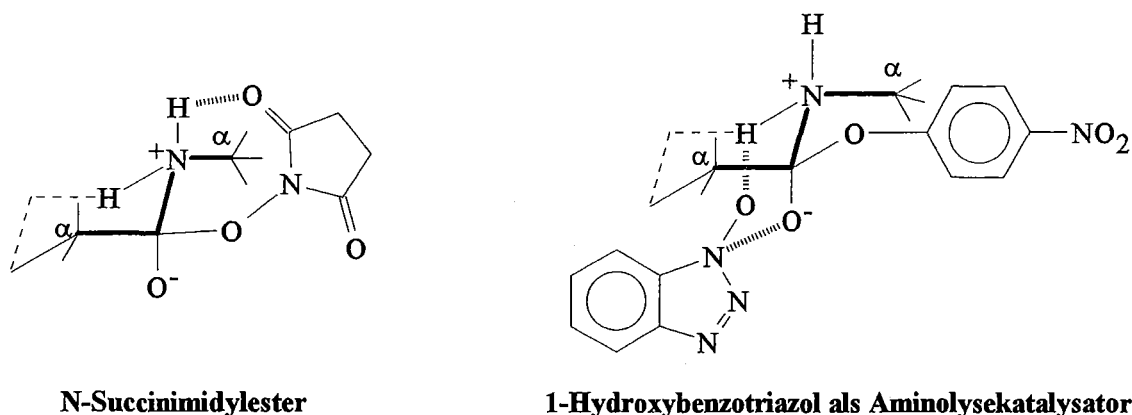
- 5.) Der Einfluß der Acylkomponente kann nur abgeschätzt werden. Während im Falle der Reaktion nach Schema 31, (I) der F_{A1} - Wert hauptsächlich die sterischen Einflüsse der Seitenketten von A1 berücksichtigt, muß im Falle der 2-[^{18}F]Fluorpropionyl-Gruppe (Reaktion nach Schema 31, (II)) neben einem (geringen) sterischen Effekt der negative, induktive Effekt des ^{18}F -Fluors in α -Stellung zur Carbonylgruppe berücksichtigt werden. Näherungsweise sollte der F_{A1} -Wert der 2-[^{18}F]Fluorpropionyl-Gruppe jedoch dem von Alanin bzw. Glycin (1.0-1.5) gleichkommen und somit an der oberen Grenze des Wertebereiches liegen.

Aufgrund dieser Überlegungen ist eine signifikante Verbesserung der radiochemischen Ausbeute der ^{18}F -Fluorpropionylierung von (ϵ -BOC-Lys⁵)-(SMS 201-995) nur über eine Optimierung der 'Aktivierung der ^{18}F -Fluorpropionylgruppe' möglich. Da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Aminolyse von Aktivestern, wie in Schema 32



Schema 32: Aminolyse der Phenylester von Aminosäuren [172].
Geschwindigkeitsbestimmender Schritt ($k(\text{A})$) ist der Zerfall des reversibel gebildeten, tetraedrischen Intermediates (2)

dargestellt ist, der Zerfall des tetraedrischen Übergangszustands ist (z.B. [172]), kann eine solche Optimierung in einfacher Weise durch den Zusatz von Aminolysekatalysatoren geschehen. Ihre Wirkung beruht darauf, daß die Deprotonierung der Ammoniumgruppe des Intermediates unterstützt und somit der Zerfall des Intermediats beschleunigt wird (zur Übersicht siehe [171,173]). Diese Unterstützung geschieht im Falle der sehr reaktiven (über einen sehr großen F_{R} - Wert verfügenden) N-Succinimidylester *ohne Zusatz* eines besonderen Aminolysekatalysators über die Wechselwirkung einer Carbonylgruppe des Succinimid-Restes [171] (Schema 33). Die Aminolyse von Aktivestern ohne einen solchen intramolekularen Katalysemechanismus, wie z.B. die 4-Nitrophenylester, kann in ähnlicher Weise in Anwesenheit von N-Hydroxyverbindungen mit einem pK_a -Wert von ca. 4.0 über Additionskomplexe beschleunigt werden [174]. Als besonders wirkungsvoll hat sich dabei 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) erwiesen (Schema 33) [175].



Schema 33: Katalysierte Aminolyse aktivierter Aminosäuren [171].
 Der Zerfall des reversibel gebildeten, tetraedrischen Intermediates wird im Falle der N-Succinimidylester durch Wechselwirkung der Carbonylgruppen des N-Succinimids mit dem Proton des Amins beschleunigt. 1-Hydroxybenzotriazol als Additiv bei der Aminolyse von 4-Nitrophenylestern wirkt in gleicher Weise über einen Additionskomplex.

Der Einfluß von HOBt auf die ^{18}F -Fluorpropionylierung von $(\epsilon\text{-BOC-Lys}^5)$ -(SMS 201-995) ist in Abbildung 24. dargestellt. Sie gibt die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Reaktionsdauer für die HOBt - katalysierte und nichtkatalysierte Reaktion in DMF wieder.

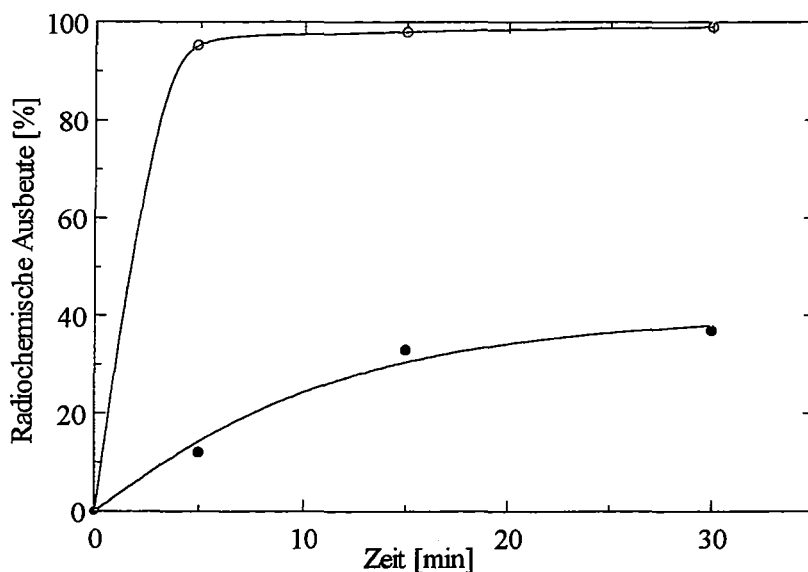


Abb. 24: Radiochemische Ausbeute von $[(2\text{-}[^{18}\text{F}]\text{Fluorpropionyl})-(\epsilon\text{-BOC-Lys}^5)]$ -(SMS 201-995) als Funktion der Reaktionsdauer mit (o) und ohne (●) Benzotriazolkatalyse. 0.5 mg $(\epsilon\text{-BOC-Lys}^5)$ -(SMS 201-995), n.c.a. 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorpropionyl-4-nitrophenylester bei 22°C in 50 µl Dimethylformamid; 1.5 mg KOBt (o) bzw. 2.5 µl 2,6-Di-tert-butylpyridin (●).

Während die nichtkatalysierte Reaktion nach etwa 20 min eine Sättigungsausbeute von nahezu 30% ergibt, wurde in Anwesenheit von HOBt (hier K^+OBt^- , um die Anwesenheit einer Hilfsbase zu vermeiden) bereits nach 5 min eine Ausbeute von 95% erhalten. Dieses Ergebnis

zeigt in beeindruckender Weise die Wirksamkeit der HOBt-Katalyse zur Aminolyse von 4-Nitrophenylestern.

Bezüglich der anschließenden BOC-Abspaltung ist DMF jedoch kein Lösungsmittel der Wahl. Wie im Folgekapitel dargestellt wird, sollte die Entschützung von [(2-[^{18}F]Fluorpropionyl)-(ε-BOC-Lys⁵)]-(SMS 201-995) bevorzugt mit 100% Trifluoressigsäure (TFA) durchgeführt werden. Die Möglichkeit der einfachen und schnellen Entfernung des zur Acylierung verwendeten Solvens (z.B. durch Trocknen im leichten Gasstrom) vor Zugabe der TFA ist jedoch von erheblicher präparativer Bedeutung. Leicht flüchtige Solventien, wie Chloroform oder Ethylacetat besitzen jedoch niedrige F_s -Werte [171] und sind daher für die zu untersuchende Reaktion ungeeignet (Tab. 13), während THF, DMF oder Dioxan mit hohen F_s Werten [171] aufgrund ihrer hohen Siedepunkte nicht geeignet sind. Eine Ausnahme bildet hier Acetonitril. Es besitzt einen relativ niedrigen Siedepunkt und scheint als Solvens für Acylierungen des zu untersuchenden Typs dennoch besser geeignet zu sein als Dioxan (Tab. 12). Durch Vergleich der Daten in Tabelle 12 und 13 kann der F_s -Wert von CH_3CN mit ca. 5-6 angegeben werden.

Tabelle 12:

Notwendige Reaktionszeiten zum Erreichen einer Ausbeute von 99% Z-Gly-Gly-OEt in verschiedenen Solventien[171].

(Z-Gly-ONp + H-Gly-OEt → Z-Gly-Gly-OEt + HONp);

(Z = Benzyloxycarbonyl; ONp = para-Nitrophenyl)

Solvens	$t_{99\%}$ (h)
Dioxan	18
Acetonitril	11.5
DMF	0.5

Tabelle 13:

F_s - Werte einiger Solventien [171].

Solvens	F_s - Wert
Chloroform	0.2
Ethylacetat	0.32
Dioxan	0.92
THF	1
DMF	15

Die radiochemischen Ausbeute der ^{18}F -Fluorpropionylierung von (ε-BOC-Lys⁵)-(SMS 201-995) in Acetonitril als Funktion der Reaktionsdauer zeigt Abbildung 25. Wegen der schlechten Löslichkeit von KOBt in Acetonitril war bei diesen Versuchen die Anwendung des Base-Katalysator-Gemisches 2,6-Di-tert.-butylpyridin / HOBt notwendig. Die Reaktionstemperatur wurde aufgrund der im Vergleich zur ^{18}F -Acylierung in DMF zu erwartenden niedrigeren Ausbeuten von 22°C auf 70°C erhöht.

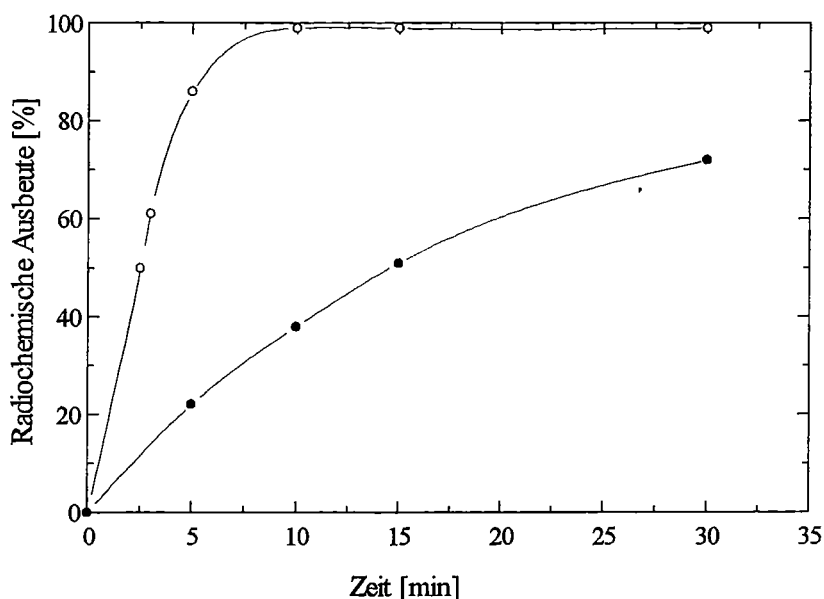


Abb.25: Radiochemische Ausbeute der ^{18}F -Fluorpropionylierung von $(\epsilon\text{-BOC-Lys}^5)\text{-(SMS 201-995)}$ als Funktion der Reaktionsdauer mit (○) und (●) ohne HOBt-Katalyse. 0.5 mg $(\epsilon\text{-BOC-Lys}^5)\text{-(SMS 201-995)}$, n.c.a. 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorpropionyl-4-nitrophenylester, 2,5 μl 2,6-Di-tert.-butylpyridin bei 70°C in 50 μl Acetonitril in Anwesenheit von (○) 1 mg 1-Hydroxybenzotriazol sowie (●) ohne HOBt

Analog der nichtkatalysierten Reaktion in DMF weist auch die ^{18}F -Fluoracylierung von $(\epsilon\text{-BOC-Lys}^5)\text{-(SMS 201-995)}$ in Acetonitril trotz der Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 70°C nach 10 min nur etwa 40% radiochemische Ausbeute auf. Ein Zusatz von HOBt führt jedoch auch hier zu einer bemerkenswert beschleunigten Produktbildung. So steigt die radiochemische Ausbeute nach 5 min von 22% bei der nichtkatalysierten Reaktion auf ca. 85% bei der katalysierten Reaktion. Zwar ist eine nahezu quantitative Umsetzung (>95%) im System $\text{CH}_3\text{CN/HOBt/2,6-Di-tert.-butylpyridin}$ erst nach ca 8-10 min erreicht, doch ist diese geringe Zeitdifferenz im Vergleich zum DMF/KOBt-System im Hinblick auf vorgenannte präparative Vorteile akzeptabel.

3.3.1.3 Abspaltung der Schutzgruppe von $[(2\text{-}[^{18}\text{F}]\text{Fluorpropionyl-(D)Phe}^1)\text{-(}\epsilon\text{-BOC-Lys}^5)]\text{-(SMS 201-995)}$

Zur Darstellung von $(2\text{-}[^{18}\text{F}]\text{Fluorpropionyl-(D)Phe}^1)\text{-(SMS 201-995)}$ muß im abschließenden Syntheseschritt die tert.-Butyloxycarbonylgruppe abgespalten werden. Von der Vielzahl der hierzu in Frage kommenden organischen und anorganischen Säuren hat sich in der Peptidchemie besonders Trifluoressigsäure zur schnellen und quantitativen Abspaltung der BOC-Gruppe bewährt [176]. Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse einiger untersuchten Säure/Solvens-Kombinationen zur Entschützung von $[(2\text{-}[^{18}\text{F}]\text{Fluorpropionyl-(D)Phe}^1)\text{-(}\epsilon\text{-BOC-Lys}^5)]\text{-(SMS 201-995)}$.

Tabelle 14: Einige untersuchte Säure/Solvens - Kombinationen zur Entschützung von [(2-[^{18}F]Fluorpropionyl)-(D)Phe 1)-(ε-BOC-Lys 5)]-(SMS 201-995) mit den RCA von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl)-(D)Phe 1)-(SMS 201-995)

Säure, Solvens (v/v)(*)	Reaktions-Zeit	Radiochemische Ausbeute
DMF, TFA (1/1) (a)	10 min	50%
DMF, TFA (1/2) (b)	10 min	92%
TFA (a)	3 min	>98%
CH ₃ CN, 5 N HCl (1/1) (a)	3 min	83%
CH ₃ CN, 10 N HCl (1/1) (a)	3 min	>98%

Reaktionsbedingungen: n.c.a. (2-[^{18}F]Fluorpropionyl)-(D)Phe 1)-(SMS 201-995), 0.5 mg (0.45 μmol) (ε-BOC-Lys 5)-(SMS 201-995), T=22°C,

Gesamtvolumen Solvens: (a): 100 μl, (b): 150 μl

(*): Volumenanteile

Während die Abspaltung der BOC-Gruppe in den DMF/TFA-Solvensgemischen nach 10 min noch nicht abgeschlossen ist, kann mittels reiner TFA nach Entfernen der als Acylierungssolvens verwendeten CH₃CN bereits nach 3 min eine nahezu quantitative Entschützung erzielt werden.

Ebenso kann durch direkte Zugabe von 50 μl 5 bzw. 10 molarer HCl zum Acylierungsansatz binnen 3 min 83% bzw. mehr als 95% des [(2-[^{18}F]Fluorpropionyl)-(D)Phe 1)-(ε-BOC-Lys 5)]-(SMS 201-995) umgesetzt werden. Besonders die letztgenannte Methode führt jedoch zur Bildung von Nebenprodukten (siehe Abbildung 26).

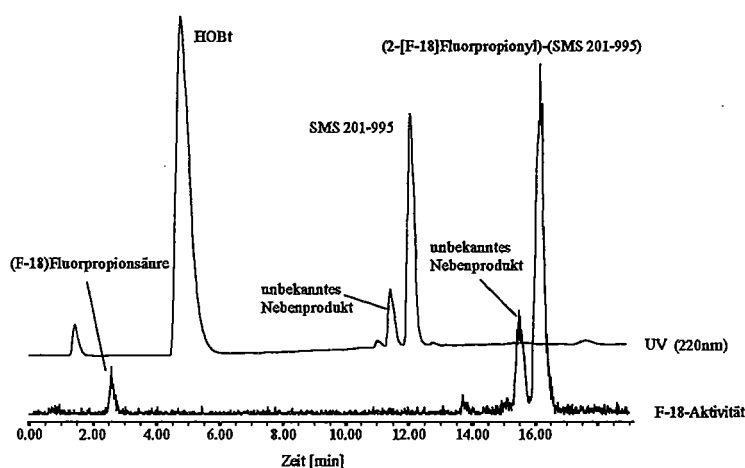


Abb. 26: Semipräparatives HPL-Chromatogramm (Gradientensystem) der Abtrennung von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl)-(D)Phe 1)-(SMS 201-995); Abspaltung der BOC-Gruppe durch Zugabe von 50 μl 10 N HCl.

Säule: LiChrosorb RP-18, 10 μm, 250 × 10 mm; Detektion: UV (220 nm) und ^{18}F -Aktivität; Gradient: 5-95 B in 20 min; B = H₂O, CH₃CN, 300/700 (v/v); A = H₂O, CH₃CN, H₃PO₄ (85%) 900/100/6 (v/v/v), pH 2.9; Flußrate: 7 ml/min

So sind sowohl im UV-Chromatogramm als auch im Radiochromatogramm vor dem SMS 201-995- bzw. 2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995)- Peak nicht identifizierte Nebenprodukte zu erkennen. Aufgrund des ähnlichen Peakmusters im UV- und Radiochromatogramm scheint diese Fragmentierung jedoch nicht die 2-[^{18}F]Fluorpropionylgruppe zu betreffen.

Die gesamte Reaktionsfolge der Darstellung von n.c.a. (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) ist in Schema 34 dargestellt.

Syntheseschritte	Zeit	RCA
2-[F-18]NPFP	t=0	100%
↓		
[F-18]Fluoracylierung von (ε-Boc-Lys ⁵)-(SMS 201-995)	t=5min	95%
↓ Entfernen des Acetonitrils		
t=7min	95%	
↓		
Entschützung von [(2-[F-18]Fluorpropionyl- (D)Phe ¹)-(ε-Boc-Lys ⁵)]- (SMS 201-995)	t=10min	76%
↓ HPLC, Einengen		
(2-[F-18]Fluorpropionyl- (D)Phe ¹)-(SMS 201-995)	t=35min	68%
unkorrigierte Gesamtausbeute: ca. 55 % spezifische Aktivität: 41 GBq / μmol		

Schema 34: Fließschema zur Synthese von n.c.a. (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) ausgehend von 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester (2-[^{18}F]NPFP)

3.3.1.4 Einfluß der Lipophilie und Nettoladung von (2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) und anderer SMS 201-995-Analoga auf ihre Rezeptoraffinität

Die Lipophilie von (2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)-Phe¹)-(SMS 201-995) und deren Vergleich mit anderen radiomarkierten SMS 201-995 - Derivaten kann zur ersten Abschätzung des Verhältnisses der renalen / hepatobiliären Ausscheidung des Radiotracers dienen [169,170,181]. Dieser Quotient ist besonders für die medizinische Anwendung von Bedeutung, da eine hohe renale Ausscheidungsrate der zirkulierenden Radioaktivität durch schnelle Akkumulation in der Blase kontrastreiche PET-Aufnahmen bereits nach kurzer Zeit ermöglicht. Eine hohe hepatobiliäre Ausscheidung führt dagegen zu einer zumeist länger andauernden Verteilung der Aktivität über den gesamten Leber/Galle/Darm - Bereich.

Ebenso hat die Lipophilie der SMS 201-995-Derivate einen großen Einfluß auf ihr Bindungsverhalten an Biomembranen [181-183].

Die Lipophilie wurde durch Ermittlung des Verteilungsquotienten von (2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)-Phe¹)-(SMS 201-995) in einem (Oktanol/Phosphatpuffer) - Zweiphasengemisch bei pH 7.0 bestimmt (siehe Experimentelles).

Tabelle 15: Lipophilie einiger radiomarkierter SMS 201-995- Derivate

Derivat	(2-[¹⁸ F]Fluorpropionyl-(D)-Phe ¹)-(SMS 201-995)	[Ga-68]SDZ 216-927	[Y-86]SDZ 215-811
log P	-0,07 ± 0,01	-1,49 [185]	-2,14 [185]

Wie aus Tabelle 15 ersichtlich ist, besitzt (2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)-Phe¹)-(SMS 201-995) im Vergleich zu den aufgeführten Metall-Chelat-Derivaten von SDZ 201-995 eine deutlich höhere Lipophilie und sollte daher auch eine signifikant verringerte renale Ausscheidung zeigen. Zurückzuführen ist die hohe Lipophilie der ¹⁸F-fluorierten Verbindung darauf, daß durch die Acylierung am N-terminalen Phenylalanin die Nettoladung des Peptids unter physiologischen Bedingungen von $\approx +1.7$ auf +1 gesenkt wird ($pK(\text{Phe}^1)=7.2$; $pK(\text{Lys}^5)>9$).

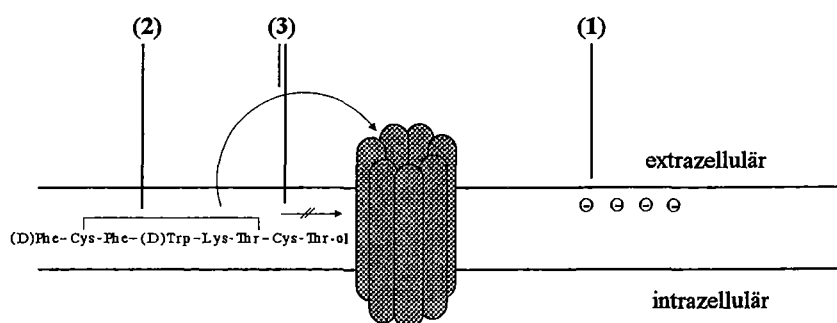
Die anschließende in vitro und in vivo-Evaluierung des Tracers (siehe Anhang 6.1) zeigte, daß SMS 201-995 auch nach der Markierung mit 2-[¹⁸F]Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester über eine hohe Affinität zum SSTR-Rezeptor verfügt ($pK_i = 8.6 \pm 0.2$) und eine nahezu unveränderte biologische Aktivität ($IC_{50} = 8.75 \pm 0.02$) aufweist. Ebenso konnte anhand einer PET Studie am Tiermodell (Ratten, exokrin pankreatische Inselzellentumoren) gezeigt werden, daß eine erfolgreiche Lokalisation von Tumoren mittels n.c.a.(2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) möglich ist (siehe Anhang) [186].

Obleich in erster Näherung die nur geringfügige sterische Änderung von SMS 201-995 außerhalb der pharmakophoren Gruppe durch die ^{18}F -Fluorpropionylierung des (D)Phe¹-Terminus zu einem Analogon mit nur wenig veränderter Rezeptoraffinität führen sollte, weist das ^{18}F -markierte SMS 201-995 mit einem pK_i -Wert von 8.60 [59] eine im Vergleich zu SMS 201-995 ($\text{pK}_i = 9.33$) deutlich geringere Affinität auf (siehe Anhang). Demgegenüber besitzt [^{68}Ga]SDZ 216-927 trotz des 'großen' Desferrioxaminchelators einen nur wenig reduzierten pK_i -Wert von 9.16 [165]. [^{111}In]SDZ 215-811, in welchem ein vergleichsweise 'kleines' [^{111}In]DTPA-Chelat über eine Carbonsäuregruppe des DTPA an den (D)Phe¹-Terminus gekoppelt ist, bindet mit einem pK_i von 8.70 an den SSTR-Rezeptor [164], während SDZ 212-699, in welchem Maltotriose (ein Trisaccharid) an den N-Terminus von SMS 201-995 gebunden ist, eine im Vergleich zu SMS 201-995 nahezu identische Rezeptoraffinität besitzt (9.32 gegenüber 9.33 für SMS 201-995 !) [189].

Diese scheinbar widersprüchlichen Daten lassen sich zusammen mit der ermittelten biologischen Aktivitäten anhand eines Modells erklären, welches, neben der Lipophilie der Analoga, in gleichem Maße ihre Nettoladung unter physiologischen Bedingungen berücksichtigt.

Die Hypothese basiert auf folgenden Membranmerkmalen (siehe Schema 35):

1. Da Biomembranen zu ca. 80% aus neutralen und zu ca. 20% aus negativ geladenen Lipiden bestehen, weisen diese Membranen eine negative Oberflächenladung auf [181].
2. Lipophile SMS 201-995-Derivate können, ebenso wie underivatisiertes SMS 201-995, durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Lipidmembran gebunden bzw. in die Lipidmembran aufgenommen werden [182,183].
3. Die Bindungsstelle des Rezeptors [190] ist für den Liganden nicht direkt von der Membranoberfläche aus erreichbar, sondern nur über die wässrige Phase.



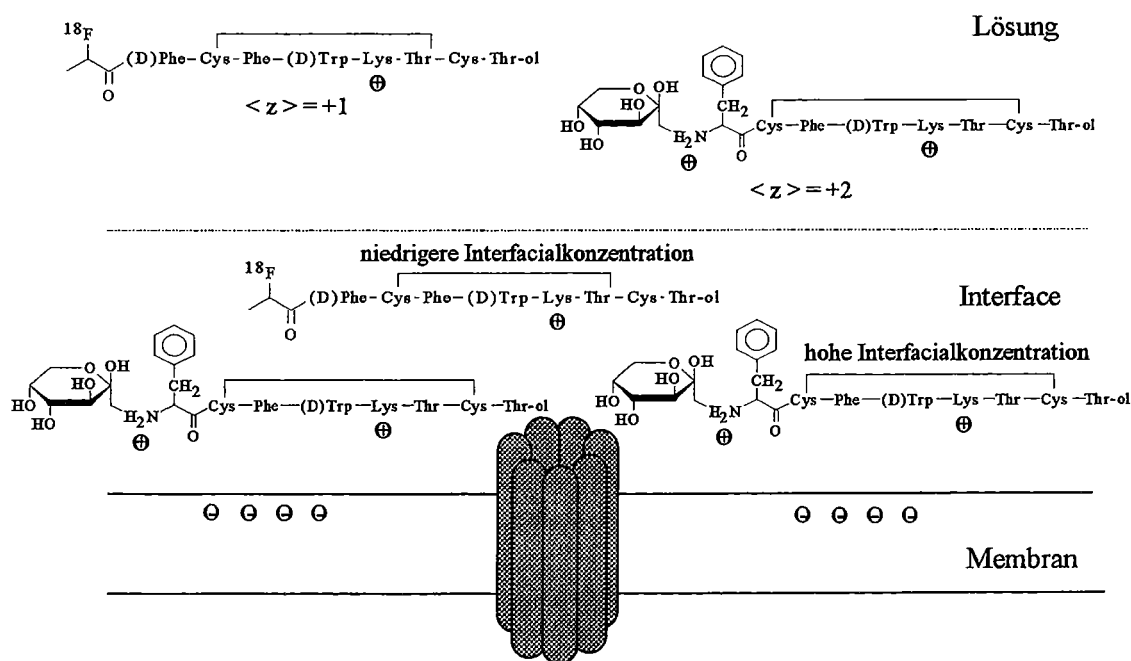
Schema 35 (Erläuterung siehe oben Punkt 1-3)

B) Einfluß der Nettoladung des Liganden auf die Rezeptoraffinität

Der Einfluß der Nettoladung der Liganden auf die Rezeptoraffinität ist in Schema 36 dargestellt. Für diese Betrachtung wird der Extrazellularraum in zwei Kompartimente unterteilt: ein Raum, welcher der Membran direkt vorgelagert ist (Interfacialraum) sowie die verbleibende Lösung (bulk). Aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung (negative Membranoberfläche $\leftrightarrow$ positiv geladener Rezeptorligand) ist die Konzentration eines Liganden mit positiver Nettoladung im Interfacialraum größer als in der verbleibenden Lösung. Hierbei ist die Anreicherung des Liganden in direkter Nähe zur Membran umso größer, je höher die positive Nettoladung ist.

Handelt es sich, wie beim ^{18}F -markierten SMS 201-995 (Nettoladung $z = +1$), um einen lipophilen *und* positiv geladenen Liganden, so führt die elektrostatische Attraktion in diesem Fall zu einer Verstärkung der Lipid-Ligand-Bindung und somit zu einer Reduzierung der am Rezeptor wirksamen Ligandkonzentration. Handelt es sich jedoch um hydrophile Liganden, wie z.B. alle Saccharidderivate (Nettoladung $z = +2$) oder $[^{68}\text{Ga}]$ -DFO-SDZ 216-927 ($z = +(1-2)$), so kommt es zu einer Erhöhung der Interfacialkonzentration *ohne* anschließenden Phasenübergang in die Lipidschicht. Daher führt in diesen Fällen die elektrostatische Feldwirkung der Membran zu einer Erhöhung der am Rezeptor wirksamen Konzentration,

größere positive Ladung $\rightarrow$ höhere Interfacialkonzentration $\rightarrow$ größere Wahrscheinlichkeit für Rezeptorbindung



Schema 37: Einfluß der Nettoladung eines SMS 201-995-Analogons auf die Rezeptoraffinität (Erläuterungen siehe Text)

die die tatsächliche Konzentration des Liganden in der verbleibenden Lösung um ein Vielfaches übersteigen kann. So lassen sich für SMS 201-995-Derivate mit einer Nettoladung von $z = 0,4$, 1,4 und 2,4 bei einer Ligandkonzentration von 1 nM (in der verbleibenden Lösung) 'rezeptorwirksame' Interfacialkonzentration C_i von 3,1, 19,2 und 121 nM errechnen [184]! Diese Liganden zeigen daher bei Verdrängungsexperimenten eine hohe Wirksamkeit bei nur geringer, tatsächlicher Konzentration $\rightarrow$ großer pK_i !

[^{111}In]SDZ 215-811 kann in diesem Modell als Sonderfall betrachtet werden. Da dieser Ligand keine Nettoladung besitzt ($z=0$), kommt es nicht zu einer Erhöhung der Interfacialkonzentration; andererseits ist aufgrund der Hydrophilie des Liganden eine signifikante Lipid-Peptid-Wechselwirkung nicht zu erwarten. Somit zeigt dieses Derivat einen pK_i -Wert, der weder durch Lipid-Peptid-Wechselwirkungen in signifikanter Weise erniedrigt ist, noch aufgrund der fehlenden elektrostatischen Attraktion signifikant erhöht ist. Daher zeigt [^{111}In]SDZ 215-811 einen im Vergleich zu SMS 201-995 ($pK_i = 9.33$) deutlich geringeren pK_i -Wert von 8.30 .

Eine Art Nivelierung der Ligandeigenschaften ist beim ^{18}F -markierten SMS 201-995 zu beobachten: die positive Ladung trägt zur Verbesserung des pK_i -Wertes bei, während sich die hohe Peptid-Lipid-Wechselwirkung negativ auswirkt. Als Ergebnis führt dies zu einem pK_i -Wert von 8.60.

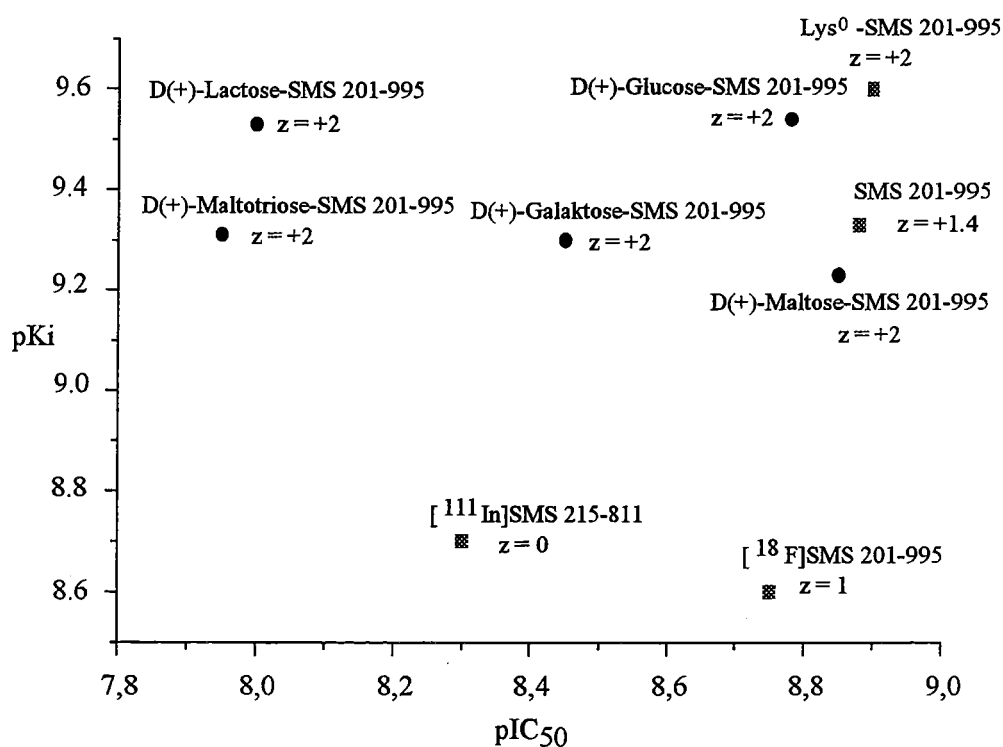


Abb. 27: Auftragung des Rezeptoraffinität (pK_i) einiger SMS 201-995 Derivate gegen die biologische Aktivität (pIC_{50}) (z = Nettoladung).

Zusammenfassend können aufgrund dieses Modells einige generelle Aussagen über die Rezeptoraffinität und biologische Aktivität der verschiedensten SMS 201-995 - Analoga formuliert werden, deren Gültigkeit anhand Abbildung 27 nachvollzogen werden kann:

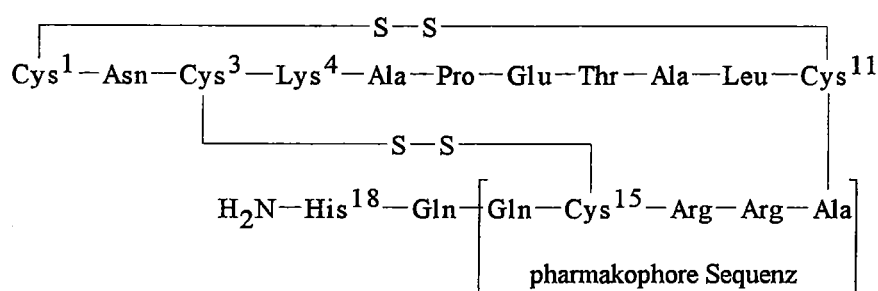
1. *Hydrophile SMS 201-995-Analoga mit einer positiven Nettoladung $z > 1$ besitzen eine hohe Rezeptoraffinität (großer pK_i -Wert).*
2. *Die Sterik der prosthetischen Gruppen bzw. gebundenen Chelatoren hat auf die Rezeptoraffinität keinen nennenswerten Einfluß.*
3. *Lipophile Liganden bzw. Liganden ohne oder mit geringer Nettoladung besitzen unabhängig von der Größe der prosthetischen Gruppen oder gebundenen Chelatoren eine niedrigere Rezeptoraffinität.*
4. *Lipophilie und Nettoladung haben keine signifikanten Auswirkungen auf die biologische Aktivität.*
5. *Je kleiner die prosthetische Gruppe bzw. der gebundene Chelator des SMS 201-995-Derivats, desto größer ist seine biologische Aktivität.*

3.3.2 Zur Radiohalogenierung von Apamin

3.3.2.1 Strategie zur Darstellung radiohalogener Apaminderivate

Apamin, ein Oktadecapeptid aus dem Gift der Honigbiene (*Apis mellifera*) [159], unterscheidet sich von vielen anderen Polypeptidneurotoxinen durch seine Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und im Zentralnervensystem als selektiver Blocker Calcium-Ionen-gesteuerter-Kalium-Kanäle ($K^+_{Ca^{2+}}$ -Kanäle) zu wirken [191]. Während die Bindung zu diesen Ionen-Kanälen hochspezifisch ist und eine Dissoziationskonstante im Bereich von $K_D = 7$ bis 60 pM aufweist [192], ist die Rezeptordichte mit 3 bis 30 fmol/mg Protein (Rattenhirn) ausgesprochen gering [193].

Die Primärstruktur des Apamins besteht aus 18 Aminosäuren sowie zwei intrakatenären Disulfidbrücken zwischen Lys¹-Lys¹¹ und Lys³-Lys¹⁵ (Schema 38) [196]. Wie anhand der IC_{50} und LD_{50} -Werte einiger Derivate des Apamins gezeigt werden konnte, ist die pharmakologische Wirkung des Apamins eng an die Aminosäuresequenz [Ala¹²-Arg¹³-Arg¹⁴-Cys¹⁵-Gln¹⁶] gebunden (pharmakophore Sequenz) [194]. Eine chemische Modifikation dieser Aminosäuren führt zum nahezu vollständigen Verlust der biologischen Aktivität und der Rezeptoraffinität [195].



Schema 38: Primärstruktur und pharmakophore Sequenz von Apamin [196]

Besonders im Hinblick auf eine kürzlich veröffentlichte Studie, in welcher durch post-mortem Autoradiographie eine signifikante Verringerung der $K^+_{Ca^{2+}}$ -Kanäle im Hippocampus von Patienten mit Alzheimer Demenz festgestellt wurde [197], könnten radiomarkierte Derivate des Apamins zur in vivo Bestimmung des 'Apamin-Rezeptor-Status' mittels PET oder SPET aufgrund der Hirngängigkeit von Apamin, seiner hohen Rezeptorspezifität und Affinität von potentiell Interesse sein.

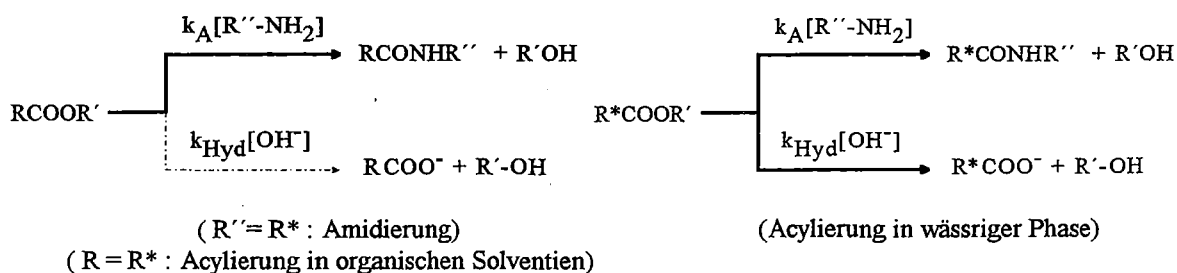
Wie in Tabelle 16 dargestellt ist, bieten sich zur ^{18}F -Markierung von Apamin drei verschiedene Strategien an: 1. die ^{18}F -Fluoracylierung in wässriger Phase, 2. die ^{18}F -Fluoracylierung in organischen Solventien und 3. die ^{18}F -Fluoramidierung.

Tabelle 16: Strategien zur ^{18}F -Fluorierung von Apamin via ^{18}F -markierter prosthetischer Gruppen

Strategie	Markierte Aminosäure	Voraussetzungen	Vorteile	Nachteile
1. Acylierung in wässriger Phase	Lys ⁴ Cys ¹	keine	keine Schutzgruppen notwendig	I) Hydrolyse des Aktivesters durch His ¹⁸ möglich II) evtl. Acylierung von Arg ^{13,14}
2. Acylierung in organischen Solventien	a) Cys ¹ b) Lys ⁴	a) Arg ^{13,14} und Lys ⁴ geschützt b) Arg ^{13,14} und Cys ¹ geschützt evtl. muß Löslichkeit durch Schutzgruppen an Glu ⁷ und His ¹⁸ gesteigert werden	a) mittlere bis hohe Ausbeuten b) hohe Ausbeuten	I) In beiden Fällen aufwendige Vorläufersynthese notwendig, II) Nach Markierung weiterer 'Aktivschritt' (Entschützung) notwendig; hier Nebenreaktionen zu erwarten
3. Amidierung	Glu ⁷	Cys ¹ und Lys ⁴ geschützt (evtl auch His ¹⁸ und Arg ^{13,14}) Glu ⁷ aktiviert (Aktivester)	I) leichte Markierung mit ^{18}F -Aminen aus Routineproduktion II) hohe Ausbeuten	I) Aufwendige Vorläufersynthese notwendig, II) Nach Markierung weiterer 'Aktivschritt' (Entschützung) notwendig; hier Nebenreaktionen zu erwarten

Die ^{18}F -Fluoracylierung in wässriger Lösung stellt die 'direkteste' Methode zur ^{18}F -Markierung von Apamin dar. Nach dieser Strategie erfolgt die Einführung von ^{18}F -Fluor über ^{18}F -markierte Aktivester an Lys⁴ sowie Cys¹. Während Nebenreaktionen an Arg^{13,14} durch Wahl eines geeigneten Puffers (pH 7-9) vermieden werden können, muß einer ausbeutemindernden, verstärkten Hydrolyse des Aktivesters durch His¹⁸ Rechnung getragen werden.

Der Vorteil der Methoden 2. und 3. liegt in den zu erwartenden höheren radiochemischen Ausbeuten, da im Falle der Acylierung in organischen Solventien (Methode 2) eine Hydrolyse des ^{18}F -markierten Aktivesters vermieden wird bzw. bei der Amidierung (Methode 3, siehe auch Schema 39) die konkurrierende Hydrolyse am Aktivester des Peptids stattfindet.



Schema 39: Strategien zur ^{18}F -Fluorierung von Apamin via ^{18}F -markierter prosthetischer Gruppen.
R* = radiohalogenierter Rest

Im Gegensatz zur ersten Methode ist jedoch bei den beiden alternativen Methoden eine aufwendige Vorläufersynthese mit selektiver Schutzgruppeneinführung sowie die abschließende Abspaltung dieser Schutzgruppen als 'aktiver Syntheseschritt' notwendig. Daher stellt die ^{18}F -Fluoracylierung in wässriger Phase die günstigste Methode zur Synthese von ^{18}F -Apamin dar [32]. Von besonderem Vorteil ist hierbei die hohe Nukleophilie der ε -Aminogruppe der Lys⁴-Seitenkette.

3.3.2.2 Darstellung von $[\text{N}^\varepsilon\text{-(4-[}^{18}\text{F}\text{]Fluorbenzoyl) Lys}^4\text{]-Apamin}$ und $[\text{N}^\varepsilon\text{-(3-(3-[}^{131}\text{I}\text{]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl) Lys}^4\text{]-Apamin}$

Als Acylierungsmittel wurde 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester gewählt, da er durch seine hohe Reaktivität in wässriger Phase zu hohen radiochemischen Ausbeuten auch bei niedrigen Peptidkonzentrationen führt.

Im Hinblick auf eine Anwendung mit SPET wurde auch radioiodiertes Apamin dargestellt. Anfängliche Versuche, ^{131}I -markiertes Apamin analog früherer Studien [198] durch direkte Iodierung am His¹⁸-Rest zu erhalten, lieferten jedoch nur unbefriedigende Ergebnisse. Wie anhand des Chromatogramms in Abbildung 28 zu erkennen ist, führte die oxidative Direktmarkierung (sowohl mittels Chloramin-T (CAT) als auch mittels Iodo-Gen) zu einer solchen Vielzahl von Produkten, daß eine Zuordnung und saubere Abtrennung eines konkreten Produktes nicht möglich war.

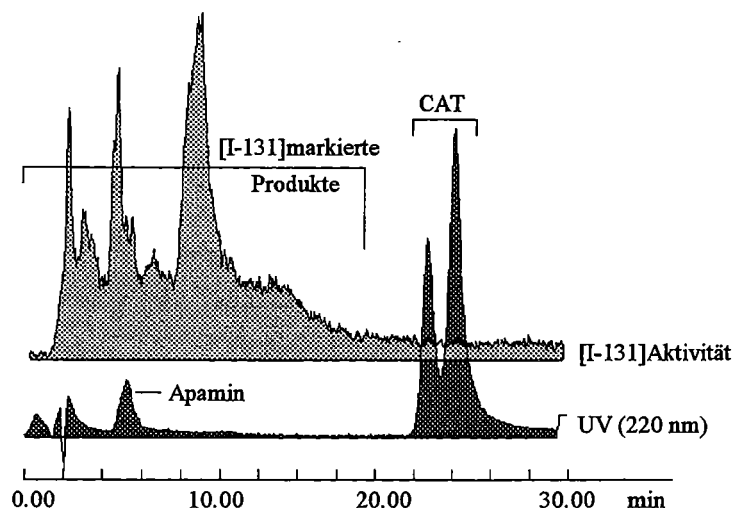


Abb. 28: Analytisches HPL-Chromatogramm von Apamin sowie diverser ^{131}I -markierter Produkte nach Direktiodierung. Reaktionsbedingungen nach [198]. Säule: LiChrosorb RP-select B, $5\mu\text{m}$, 250-4mm; Detektion: UV (220 nm) und ^{131}I -Aktivität; Eluens: 250 mM H_3PO_4 / NEt_3 / CH_3CN , (93/7) (v/v); Flußrate: 1 ml/min.

Als alternative Radioiodierungsmethode wurde analog der ^{18}F -Fluoracylierung eine ^{131}I -Iodacylierung durchgeführt. Aufgrund jüngster Untersuchungen in diesem Institut [199],

welche eine verbesserte in vivo-Stabilität von ^{131}I -iodierten, O-methylierten Tyrosinderivaten nachwiesen, wurde zur Radioiodierung von Apamin 3-(3-[^{131}I]Iod-4-methoxyphenyl)propionsäure-N-succinimidylester (3-[^{131}I]Iod-O-methyldesaminotyrosyl-N-succinimidylester) verwendet (Abb. 29,(B)). Konjugate dieses Esters sollten in ähnlicher Weise wie die O-methylierten Tyrosine eine im Vergleich zum bekannten Bolton-Hunter-Reagens (3-[^{131}I]Iod-desaminotyrosyl-N-succinimidylester) [157] verbesserte Stabilität gegenüber einer in vivo-Deiodierung aufweisen. Die Darstellung von 3-(3-[^{131}I]Iod-4-methoxyphenyl)propionsäure-N-succinimidylester erfolgte durch direkte oxidative Radioiodierung in TFA/Wasser [200].

Abbildung 29 zeigt die radiochemischen Ausbeuten der Radiohalogenierungen von Apamin als Funktion der Apaminkonzentration.

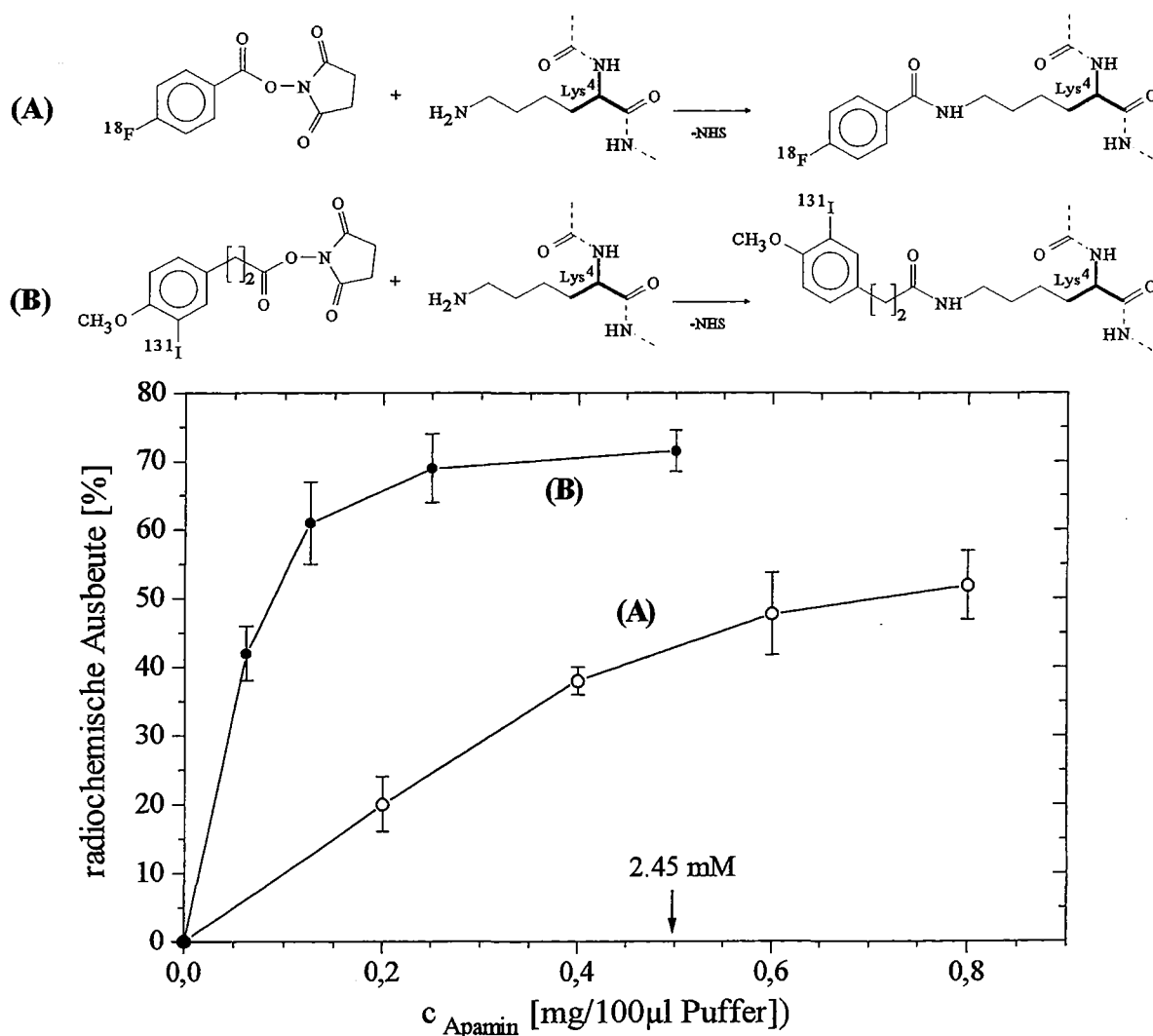


Abb. 29: Radiochemische Ausbeuten von [N ϵ -(4-[^{18}F]Fluorbenzoyl)Lys⁴]-Apamin (A) und [N ϵ -(3-(3-[^{131}I]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl)Lys⁴]-Apamin (B) als Funktion der Apamainkonzentration (5 mg Apamin /100µl Puffer entsprechen einer Konzentration von 2.45 mM). Reaktionsbedingungen: 22°C, 15 min, Puffer pH 8.7.

Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, führt bei gleicher Apaminkonzentration die ^{18}F -Markierung zu deutlich geringeren radiochemischen Ausbeuten als die ^{131}I -Radioiodierung. So wurde bei einer Apaminkonzentration von $500\mu\text{g} / 100\mu\text{l}$ Puffer (2.45 mM) eine ^{18}F -Acylierungsausbeute von ca. 43% und eine ^{131}I -Iodierungsausbeute von ca. 70% gefunden. Obwohl aufgrund der hohen Kosten von Apamin nicht bis zum Erreichen der Sättigungsausbeute untersucht wurde, kann für die Radioiodierung ein Näherungswert von ca. 75% (bei Apaminkonzentrationen $> 0.6\text{mg} / 100\mu\text{l}$) angenommen werden.

Ein Grund für die höhere radiochemische Ausbeute der ^{131}I -Acylierung könnte eine größere Hydrolysestabilität von 3-(3-[^{131}I]Iod-4-methoxyphenyl)propionsäure-N-succinimidylester sein. Dies würde auch die höhere Sättigungsausbeute im Vergleich zum ^{18}F -fluorierten Apamin erklären. Die Zeitabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute wurde nicht untersucht, da bereits nach einer Reaktionsdauer von 15 min (pH 8.7) durch die konkurrierende Hydrolyse kein intakter Aktivester mehr nachzuweisen war.

Die Abtrennung der Produkte mittels RP-HPL-Chromatographie erforderte wegen des stark basischen und extrem hydrophilen Charakters von Apamin extrem 'schwache' mobile Phasen (siehe auch Abb. 28). Wie in Abbildung 30 exemplarisch für $[\text{N}^{\epsilon}\text{-(3-(3-[}^{131}\text{I}]\text{Iod-4-methoxyphenyl)propionyl})\text{Lys}^4]\text{-Apamin}$ dargestellt ist, konnte mittels HPLC und Wahl eines geeigneten Gradienten eine Auftrennung und Elution aller Produkte erreicht werden.

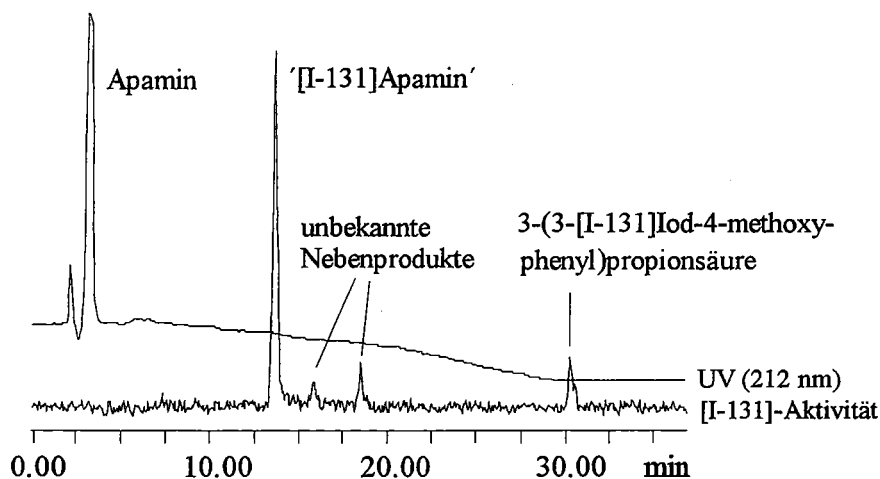


Abb. 30: Analytisches HPL-Chromatogramm (Gradienten-System) der Abtrennung von $[\text{N}^{\epsilon}\text{-(3-(3-[}^{131}\text{I}]\text{Iod-4-methoxyphenyl)propionyl})\text{Lys}^4]\text{-Apamin}$ ('[I-131]Apamin'). Säule: LiChrosorb RP-select B, $5\mu\text{m}$, 250-4mm; Detektion: UV (212 nm) und ^{131}I -Aktivität; Gradient: 10% B $\rightarrow$ 25% B (0-15 min), 25% B $\rightarrow$ 50% B (15-25 min); A = 0.01M Citratpuffer pH 3.0, B = CH_3CN ; Flußrate: 1 ml/min.

Die im Anhang (6.3) aufgeführten Biodistributionsdaten beider Radiotracer sowie vorläufige in vitro-Studien an kortikalen und hippocampalen Synaptosomen zeigten [60], daß nur die ^{18}F -Acylierung als hinreichend geeignete Methode zur Synthese eines radiohalogenierten

Apaminderivats anzusehen ist, während das ^{131}I -acylierte Produkt, möglicherweise durch die stark erhöhte Lipophilie, eine signifikante unspezifische Bindung in den untersuchten Hirnregionen aufweist.

3.4 Synthese von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin

3.4.1 Strategie zur Darstellung einer aromatischen ^{18}F -markierten Aminosäure als potentieller Tracer zur Messung des Aminosäuretransportes im Hirn

Wie in Kapitel 1.5 beschrieben wurde, finden in der Nuklearmedizin aufgrund ihrer guten Hirngängigkeit neben wenigen Ausnahmen (L-[methyl ^{11}C]Methionin, L-[1- ^{11}C]Methionin und L-[1- ^{11}C]Leucin) nahezu ausschließlich radioaktiv markierte aromatische Aminosäuren Anwendung (zur Übersicht siehe [6,76,201]).

Von den bisher evaluierten Aminosäuren ist nur 2-[^{18}F]Fluor-L-tyrosin [23] ein geeigneter Tracer zur Messung der regionalen Proteinsyntheserate im Hirn. Alle anderen halogenierten Aminosäuren werden nicht in Proteine eingebaut. Sie finden als Tracer für das dopaminerge System oder zur Messung des Aminosäuretransports (Tumordiagnose) Anwendung. Aufgrund der aufwendigen Mehrstufensynthesen zur Darstellung n.c.a. ^{18}F -fluorierter Tyrosinderivate (siehe Kapitel 1.5, zur Übersicht siehe [41]) stehen jedoch zur Zeit keine den iodierten Tyrosinderivaten vergleichbare, leicht synthetisierbare, ^{18}F -markierte Verbindungen zur Verfügung.

In Tabelle 17 sind einige der bisher pharmakologisch untersuchten, fluorierten Derivate des Tyrosins aufgeführt. Wegen ihrer vielfältig inhibitorischen Effekte scheiden die α - und β -fluorsubstituierten Derivate des Tyrosins als geeignete Tracer des Aminosäuretransportes aus, während die dafür geeigneten aromatisch fluorierten Verbindungen nur schwer zugänglich sind.

Eine bisher nicht untersuchte, jedoch vielversprechende Alternative stellt die ^{18}F -Fluorethylierung der phenolischen Hydroxyfunktion dar. Neben dem Vorteil einer schnellen und einfachen Synthese wären von diesem ^{18}F -Tracer günstige in vivo Eigenschaften zu erwarten: a) Etherfunktionen sind metabolisch zumeist hinreichend stabil, b) die ^{18}F -Fluorethylgruppe besitzt eine ausreichende Stabilität bezüglich in vivo Defluorierung, c) die zu erwartende höhere Lipophilie des alkylierten Produktes im Vergleich zum Tyrosin sollte zu einer höheren Hirnaufnahme führen; und d) aufgrund der mit 3-[^{131}I]Iod-O-methyl-L-tyrosin vergleichbaren sterischen Modifikation des Aromaten sollte in Analogie zum iodierten Tracer der aktive Transport über den Aminosäure-Carrier (AAAT) nicht beeinflusst werden.

Tabelle 17: Substitutionsmuster und pharmakologisches Verhalten bekannter, fluorierter Tyrosinderivate (zur Übersicht siehe [8, 201, 202])

Substitutionsmuster 		pharmakologisches Verhalten
1.	$R' = \text{CH}_2\text{F}$; $R_1=R_2=R''=\text{H}$, $R_3=\text{OH}$ $R' = \text{CHF}_2$; $R_1=R_2=R''=\text{H}$, $R_3=\text{OH}$	irreversible Inhibitoren der α -Aminosäure Decarboxylasen (hier Tyr-Decarboxylase)
2.	$R' = \text{CF}_3$; $R_1=R_2=R''=\text{H}$, $R_3=\text{OH}$	Potentieller Antimetabolit
3.	$R'' = \text{F}$; $R_1=R_2=R'=\text{H}$, $R_3=\text{OH}$	Inhibitor Pyridoxal-Phosphat abhängiger Enzyme
4.	$R'' = (= \text{CHF})$; $R_1=R_2=R'=\text{H}$, $R_3=\text{OH}$	Inhibitor der Monoaminoxidase
5.	$R_1 = \text{F}$; $R_2=R'=R''=\text{H}$, $R_3=\text{OH}$	Protein precursor
6.	$R_2 = \text{F}$; $R_2=R'=R''=\text{H}$, $R_3=\text{OH}$	Protein precursor
7.	$R_3 = \text{F}$; $R_1=R'=R''=\text{H}$, $R_2=\text{OH}$	Substrat der arom. Aminosäure-decarboxylase, kein Substrat d. Catechol-OMe-Transferase
8.	$R_3 = -\text{O-Alkylfluorid}$; $R_1=R_2=R'=R''=\text{H}$	mit 3-[^{131}I]Iod-O-methyl-L-tyrosin vergleichbar ?

Die Synthese von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin kann prinzipiell über drei verschiedene Wege erfolgen:

- 1)
 - a) Synthese eines ^{18}F -Fluorethylierungsagens
 - b) ^{18}F -Fluorethylierung eines geschützten Tyrosinderivates
 - c) vollständige Entschützung des Produktes
- 2)
 - a) Synthese eines ^{18}F -Fluorethylierungsagens
 - b) ^{18}F -Fluorethylierung am ungeschützten Tyrosin
- 3)
 - a) Direkte ^{18}F -Fluorierung eines geschützten Vorläufers
 - b) vollständige Entschützung des Produktes

Der Vorteil der erstgenannten Dreistufensynthese (1) liegt in der Möglichkeit, die gesamte Synthese als 'Eintopfreaktion' durchzuführen. Allerdings ist in diesem Fall durch die hohe Konzentration des nicht abgetrennten Eduktes eine mäßige ^{18}F -Alkylierungsausbeute zu erwarten. Demgegenüber setzt eine ^{18}F -Fluorethylierung von ungeschütztem Tyrosin (2) eine vorherige Isolierung des ^{18}F -Fluorethylierungsreagenzes voraus, da durch anwesendes Edukt

eine Mehrfachalkylierung des Tyrosins unvermeidbar ist. Der Alkylierungsschritt sollte in diesem Fall aufgrund des großen Tyrosinüberschusses jedoch hohe radiochemische Ausbeuten aufweisen. Ein weiterer Vorteil liegt in der zweistufigen Reaktionsführung ohne abschließenden Entschützungschritt. Eine direkte ^{18}F -Fluorierung eines geschützten Vorläufers (3) mit anschließender Entschützung könnte ebenso wie erstgenannte Methode als 'Eintopfsynthese' konzipiert werden. Aufgrund der stark basischen Fluorierungsbedingungen könnte sich in diesem Fall eine ungenügende Basenstabilität des Eduktes sowie eine Racemisierung des Eduktes und Produktes als ausbeutemindernd herausstellen.

Die in den nachfolgenden Abschnitten aufgeführten Untersuchungen beschreiben die Entwicklung einer Synthese von O-(2- ^{18}F Fluorethyl)tyrosin über die beiden erstgenannten Synthesewege. Das zur ^{18}F -Alkylierung eingesetzte, durch HPLC gereinigte n.c.a. 1- ^{18}F Fluor-2-tosyloxyethan, das sich in früheren Studien im Vergleich zu anderen bifunktionellen Alkanen als gut fluorierbares und potentes ^{18}F -Alkylierungsmittel bewährt hat [72,73], wurde über die direkte nukleophile ^{18}F -Fluorierung von Bistosyloxyethan in radiochemischen Ausbeuten von 82 ± 5 % dargestellt.

3.4.2 O-(2- ^{18}F Fluorethyl)-L-tyrosin via ^{18}F -Alkylierung von BOC-Tyr-OMe und anschließende Abspaltung der Schutzgruppen

Zunächst wurde die Synthese von O-(2- ^{18}F Fluorethyl)-L-tyrosin (^{18}F FET) durch ^{18}F -Alkylierung eines geschützten Tyrosinderivates und anschließender Entschützung des Produktes untersucht. Hierzu wurde als Aminoschutzgruppe die tert.-Butyloxycarbonylgruppe (BOC) verwendet, da sie unter den basischen Bedingungen der ^{18}F -Alkylierung stabil ist und acidolytisch einfach zu entfernen ist [176]. Die Carboxylfunktion wurde zur Steigerung der Löslichkeit des Eduktes in organischen Solventien durch Veresterung mit Methanol geschützt. Hier erweist sich die Verwendung von TFA zur Entfernung der BOC-Gruppe als vorteilhaft, da sie im leichten Gasstrom rasch ausgetrieben werden kann und somit eine sich direkt anschließende basische Hydrolyse des Methylesters erlaubt. Als Hilfsbase diente Natriummethanolat.

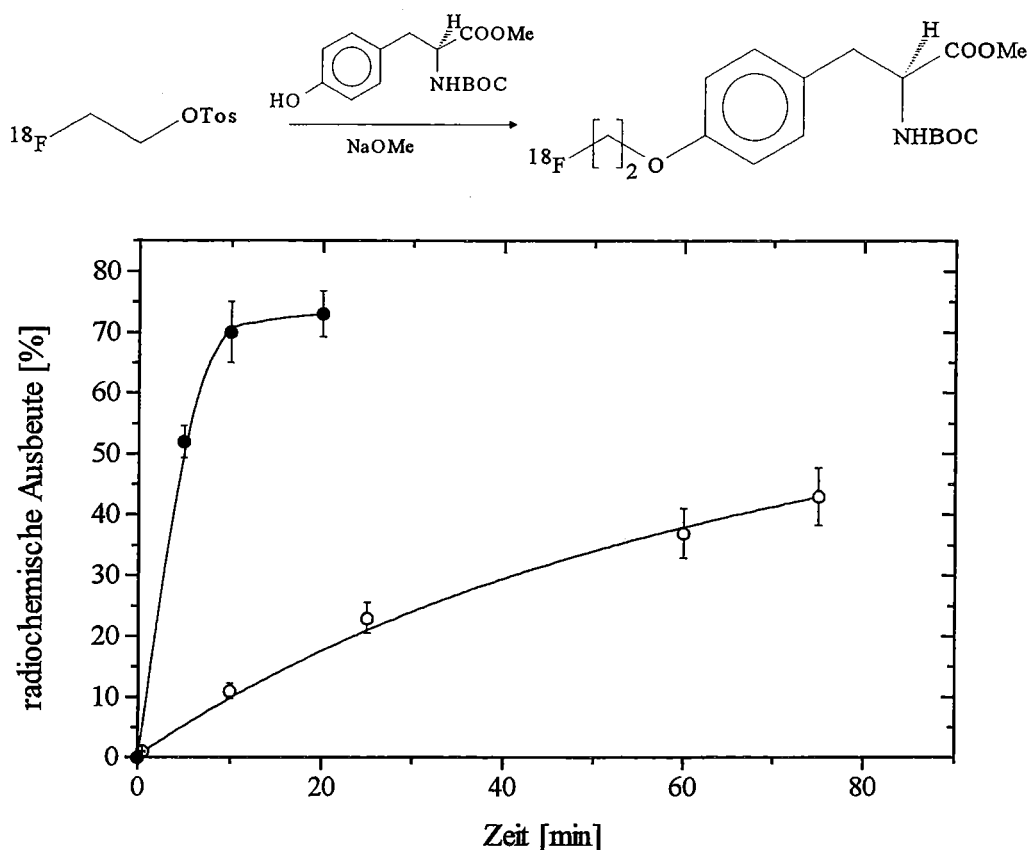


Abb. 31: Radiochemische Ausbeute der ^{18}F -Fluorethylierung von BOC-Tyr-OMe als Funktion der Reaktionszeit in (●) DMSO (90°C) und (○) CH₃CN (50°C) (176 mM BOC-Tyr-OMe, 173 mM NaOMe; n.c.a. 1-[^{18}F]Fluor-2-tosyloxyethan, 180 μl Solvens)

Wie in Abbildung 31 dargestellt wird, führt die [^{18}F]Fluorethylierung von BOC-Tyr-OMe in DMSO zu deutlich höheren radiochemischen Ausbeuten als in CH₃CN. Dieses Ergebnis scheint zunächst den gängigen Regeln bezüglich des Einflusses der Solvenspolarität bei S_N2-Reaktionen zu widersprechen, da es sich hier um eine S_N2-Reaktion des Typs $\text{RX} + \text{Y}^-\text{M}^+ \rightarrow \text{Y}^\delta\cdots\text{R}\cdots\text{X}^\delta + \text{M}^+ \rightarrow \text{RY} + \text{X}^-\text{M}^+$ handelt [203], und somit ein weniger polares Solvens die größere Ladungsverteilung im Übergangszustand begünstigt. Daher sollten, ähnlich früherer Studien [73], ^{18}F -Alkylierungen in CH₃CN hohe radiochemische Ausbeuten liefern. Von entscheidender Bedeutung ist hier jedoch die Wahl des Gegenions M^+ . Während gemäß dem HSAB-Konzept 'harte' Kationen, wie z.B. Na⁺ in Solventien wie Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid oder HMPT, die über ein Sauerstoffatom mit hoher Elektronendichte verfügen, stark solvatisiert sind, verfügt das Anion Y⁻ in diesem System aufgrund seiner geringen Solvatisierung über eine hohe Nukleophilie. Im Gegensatz hierzu kommt es bei Verwendung von CH₃CN als Solvens nicht zu einer bevorzugten Solvatisierung des Kations. Dies erklärt die in Abb.31 dargestellte höhere radiochemische Ausbeute mit DMSO als Solvens. In ähnlicher Weise, wie im (DMSO/Li⁺,Na⁺,K⁺)-System eine hohe

Kationensolvatisierung erreicht werden kann, wird bei ^{18}F -Alkylierungen in CH_3CN eine Steigerung der Nukleophilie und somit eine Erhöhung der radiochemischen Ausbeute von Y^- häufig durch Komplexierung des Kations mittels Kryptofix[®] 2.2.2 in Verbindung mit K_2CO_3 als Base erreicht. So wurde für die ^{18}F -Fluorethylierung von Phenol im $[\text{K}^+ \subset 2.2.2]/\text{CH}_3\text{CN}$ -System eine maximale radiochemische Ausbeute von ca. 50% angegeben [73].

Die anschließende Abspaltung der Schutzgruppen von N-BOC-(O-(2- ^{18}F fluorethyl))-tyrosinmethylester unter Bildung von O-(2- ^{18}F fluorethyl)tyrosin mittels Trifluoressigsäure und anschließender basischer Hydrolyse des Methylesters erfolgte für beide Schritte in nahezu quantitativer radiochemischer Ausbeute. Im Falle der BOC-Schutzgruppe konnte nach einer Reaktionszeit von 3 min bei Raumtemperatur kein Edukt mehr nachgewiesen werden, während die basische Hydrolyse des Methylesters mittels 1 N NaOH bei 90°C nach 5 Minuten abgeschlossen war.

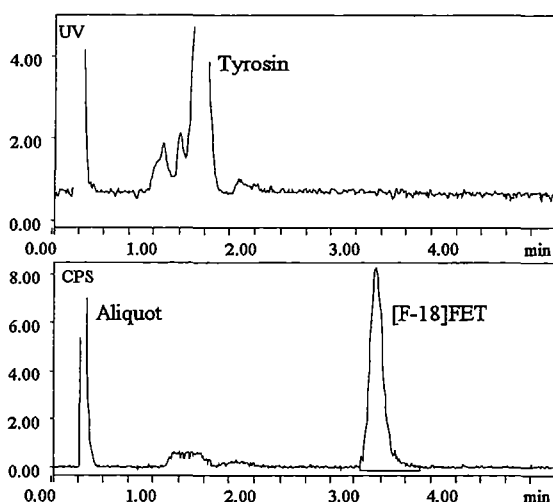


Abb. 32:

Analytisches HPL-Chromatogramm von
[O-(2- ^{18}F fluorethyl)]tyrosin ([F-18]FET)
nach vollständiger Entschützung.

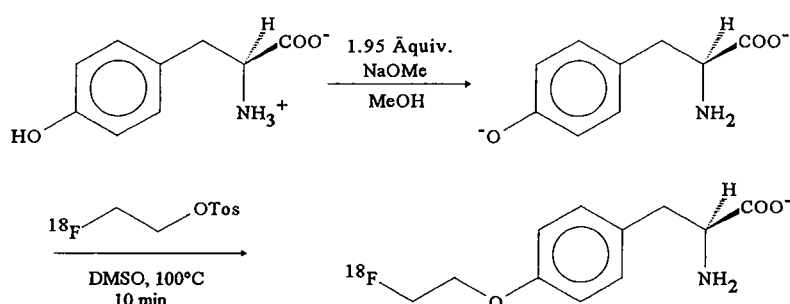
Säule: RP-18 125 x 8 mm;
Eluens: Wasser / Ethanol / HOAc
(87.5/10/2.5) (v/v); 2.5g $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{l}$,
pH 3.0
Flußrate: 4 ml / min
UV-Detektion : 254 nm

Auf eine weitere Optimierung der Reaktion wurde im Hinblick auf eine einfachere, direkte ^{18}F -Alkylierung an ungeschütztem Tyrosin verzichtet.

3.4.3 O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin via ^{18}F -Alkylierung von L-Tyr

Zur Optimierung der Synthese von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin wurde im folgenden untersucht, ob eine ^{18}F -Fluoralkylierung an ungeschütztem Tyrosin selektiv an der phenolischen Hydroxygruppe durchgeführt werden kann.

Hierzu wurde Tyrosin in Methanol suspendiert und mit Natriummethanolat das Dinatriumsalz des Tyrosins dargestellt. Die anschließende Alkylierung mit 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat erfolgte aus den in Kapitel 3.4.2. genannten Gründen wiederum in DMSO (Schema 40).



Schema 40: Reaktionsschema der [^{18}F]Fluorethylierung von L-Tyrosin

Die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin als Funktion der Zeit ist für zwei verschiedene Tyrosinkonzentrationen in Abb.33 dargestellt.

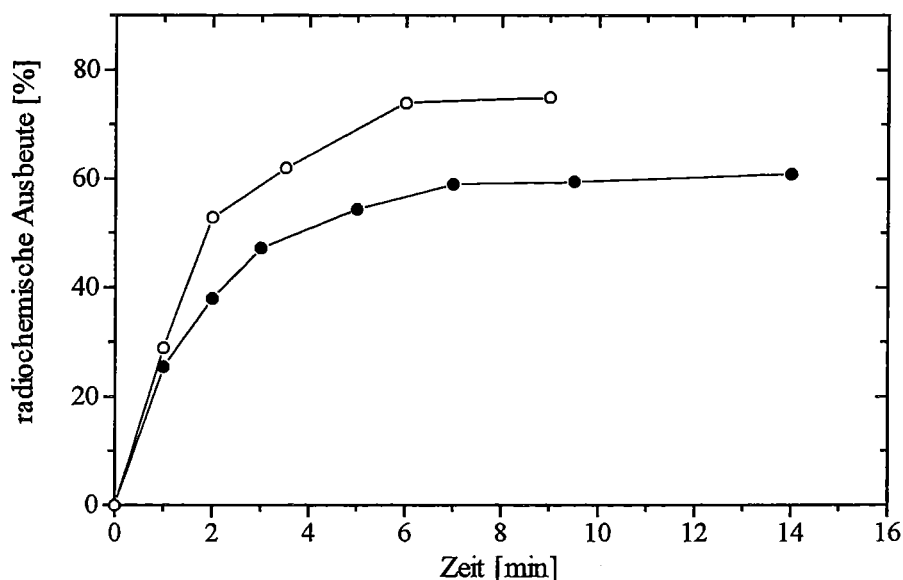


Abb. 33: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin als Funktion der Reaktionszeit. Reaktionsbedingungen: 300 µl DMSO, [^{18}F]Fluorethyltosylat in 25 µl CH₃CN, 100°C, (●) 25 µl gesättigte methanolische Tyrosinlösung (Dinatriumsalz), (○) 50 µl gesättigte methanolische Tyrosinlösung (Dinatriumsalz).

Die maximale radiochemische Ausbeute an O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)tyrosin von etwa 60 % bzw 75% bei Verwendung der doppelten Tyrosinkonzentration wird unter den gewählten Bedingungen nach einer Reaktionszeit von etwa 7 min erreicht. Eine Verlängerung der Reaktionszeit führt bei keiner der beiden Tyrosinkonzentrationen zu einer Erhöhung der Ausbeute.

Die Kinetik der Alkylierung zeigt somit nahezu den bei der ^{18}F -Fluoralkylierung von BOC-TyrOMe in DMSO ermittelten Verlauf. Dieses Ergebnis zeigt, daß in Analogie zur ^{11}C -Methylierung des Natriumsalzes von Homocystein in flüssigem NH_3 eine ^{18}F -Fluoralkylierung des Natriumsalzes von Tyrosin in DMSO an der phenolischen Hydroxyfunktion durchgeführt werden kann [204]. Ebenso steht dieses Ergebnis in Einklang mit Studien zur regioselektiven ^{11}C -Methylierung des O-Desmethyl-N-desmethyl-tramadols [205]. Auch hier konnte zur Markierung der Metaboliten eine regioselektive N- bzw. O-Methylierung durchgeführt werden. Als Grund für die im Vergleich zur konkurrierenden N-Alkylierung bevorzugte O-Alkylierung des Tyrosins ist neben der höheren Nukleophilie der Phenolatgruppe die Verwendung des stark polaren, aprotischen DMSO zu nennen.

Wenn beide 'angreifenden Atome' der zu vergleichenden nukleophilen Gruppen innerhalb einer Reihe des Periodensystems stehen, kann zur einer vergleichenden Abschätzung ihrer Nukleophilie in erster Näherung ihre Basizität bzw. ihr $\text{p}K_{\text{a}}$ -Wert herangezogen werden. Dieser beträgt für die Aminogruppe des Tyrosins $\text{p}K_{\text{a}}=10.07$ und für die aromatischen Hydroxyfunktion $\text{p}K_{\text{a}}=9.11$ [206]. Daher sollte die Phenolat-Gruppe im Vergleich zur Aminogruppe nur über eine geringfügig höhere Nukleophilie verfügen. Die Verwendung von DMSO als Solvens führt jedoch, wie in Kapitel 3.4.2 erläutert, zu einer erhöhten Reaktivität anionischer Nukleophile und somit, in Verbindung mit der etwas höheren Basizität, zu einer bevorzugten O-Alkylierung.

Zur Verdeutlichung dieses Solvenseinflusses sind in nachfolgender Tab. 18 die radiochemischen Ausbeuten für vier verschiedene Solventien aufgeführt. So können mit dem polar aprotischen Dimethylacetamid (DMAA), welches ähnlich wie DMSO kleine, harte Kationen stark zu solvatisieren vermag, noch radiochemische Ausbeuten von ca. 55% erhalten werden, während die Reaktion in 1 N NaOH oder MeOH nur zu geringen radiochemischen Ausbeuten führt.

Tabelle 18: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)tyrosin vom Solvens

	Solvens	radiochemische Ausbeute
Reaktionsbedingungen : 300 µl Solvens, 50µl gesättigter Tyr-Lösung (Dinatriumsalz) in MeOH, 20 µl [^{18}F]Fluorethyltosylat in CH_3CN , 100°C, 10 min (*) 3 min, 60°C	DMSO	72 ± 3%
	DMAA	55 ± 4%
	1 N NaOH	12 ± 4%
	MeOH (*)	<1 %

Für die geringe Ausbeute in wässriger NaOH ist auch die geringe Reaktivität des ^{18}F -Ethyltosylats in Betracht zu ziehen. So konnte zwar in wässriger Natronlauge ein Metabolit des Analgetikums Tramadols durch ^{11}C -Methylierung der aromatischen Hydroxygruppe mittels ^{11}C -Methyliodid mit radiochemischen Ausbeuten von bis zu 70% dargestellt werden [205], doch zeigte in einer vergleichenden Studie über die ^{11}C -Methylierung und ^{18}F -Fluorethylierung des Norclozapins via ^{11}C -Methyliodid und ^{18}F -Ethyltosylat letztgenanntes Alkylierungsmittel eine deutlich geringere Reaktivität [207].

Zum Vergleich der beiden untersuchten Wege zur Darstellung von n.c.a. O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)tyrosin sind in Schema 41 die Fließschemata der Synthesen dargestellt. Zur weiteren Reduzierung der Gesamtsynthesezeit bietet sich im Falle der routinemäßigen Darstellung von n.c.a. [^{18}F]FET über Syntheseweg 2 der Ersatz der abschließenden HPLC-Reinigung des Produktes (HPLC-Trennung, Festphasenfixierung, Elution und Einengen) durch eine Aufreinigung via Festphasenextraktion in Analogie zur Darstellung der iodierten Tyrosinderivate an.

Schema 41: Fließschema zur Synthese von n.c.a. O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin

Syntheseweg 1	Zeit	RCA	Syntheseweg 2	Zeit	RCA
EOB ($^{18}\text{F}_{\text{aq}}^-$)	t=0	100%	EOB ($^{18}\text{F}_{\text{aq}}^-$)	t=0	100%
↓			↓		
Darstellung von [F-18]Fluorethyltosylat	t=10min	70%	Darstellung von [F-18]Fluorethyltosylat	t=10min	70%
↓ HPLC Festphasenfixierung und Elution, Einengen	t=20min	63%	↓ HPLC Festphasenfixierung und Elution, Einengen	t=20min	63%
[F-18]Fluorethylierung von Boc-Tyr-OMe	t=30min	44%	[F-18]Fluorethylierung von Tyr	t=30min	44%
↓ HPLC, Festphasenfixierung und Elution, Einengen	t=50min	39%	↓ HPLC, Festphasenfixierung und Elution, Einengen	t=50min	39%
↓ Entschüttung					
↓ HPLC Festphasenfixierung und Elution, Einengen			O-(2-[F-18]Fluorethyl)tyrosin		
O-(2-[F-18]Fluorethyl)tyrosin	t=60min	35%			
unkorrigierte Gesamtausbeute: ca. 24 %			unkorrigierte Gesamtausbeute: ca. 29 %		

3.4.4 Radiopharmakologische Untersuchungen mit O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-tyrosin

3.4.4.1 Bestimmung der Lipophilie von O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-tyrosin und deren Vergleich mit anderen radiomarkierten Aminosäuren

Mit Hilfe der Lipophilie $\log P$ ($\equiv \log (c_{\text{Oktanöl}} / c_{\text{Wasser}})$) einer Substanz lassen sich Struktur-Verteilungs-Beziehungen (Quantitative structure-distribution relationships; QSDR [208]) von Radiopharmazeutika vorhersagen. Die Bestimmung der Lipophilie von O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-tyrosin ([¹⁸F]FET) und deren Vergleich mit anderen radiomarkierten Aminosäuren kann daher zur ersten Abschätzung der zu erwartenden Aufnahme des ¹⁸F-markierten Tyrosins in Biomembranen dienen.

Hierzu wurde O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)tyrosin HPL-chromatographisch gereinigt und etwa 10 µl der erhaltenen Fraktion zu einem Zweiphasengemisch aus je 1 ml isotonischer Kochsalzlösung und n-Oktanöl gegeben. Dieses Gemisch wurde anschließend 3 min bei Raumtemperatur geschüttelt und zur vollständigen Phasentrennung zentrifugiert. Anschließend wurde der Verteilungskoeffizient durch Bestimmung der Radioaktivität an Aliquoten beider Phasen bestimmt (n=4).

Tabelle 19: Lipophilie ($\log P$) von O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-tyrosin ([¹⁸F]FET) sowie einiger anderer Aminosäuren und deren prozentualer Anteil in der Oktanolphase [%] eines Zweiphasengemisches (Oktanöl/ isotonischer NaCl-Lösung (50/50, v/v))

Aminosäure	Ala*	Tyr*	Leu*	FET	Phe*	IT#	IMT#	OMIT#	OMIMT#	4-IPhe ⁺
in Oktanol [%]	0,12	0,55	1,91	2,99	3,59	14	19	36	49	49,2
$\log P$	-2,94	-2,26	-1,71	-1,51	-1,43	-0,79	-0,63	-0,25	-0,01	-0,02

(*) [209]; (#) [210,199]; (+) [211]

FET = O-(2-Fluorethyl)tyrosin; IT = 3-Iodtyrosin; IMT = 3-Iod- α -methyltyrosin; OMIT = 3-Iod-O-methyltyrosin; OMIMT = 3-Iod- α -methyl-O-methyltyrosin; 4-IPhe = 4-Iodphenylalanin

Die Lipophilie von O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)tyrosin liegt mit einem $\log P$ -Wert von -1.51 im Bereich des Phenylalanins und ist somit deutlich größer als die des nichtderivatisierten Tyrosins. Dennoch bewirkt die Fluorethylierung der phenolischen Hydroxyfunktion keine so ausgeprägte Erhöhung der Lipophilie wie dies durch O-Methylierung von 3-Iodtyrosin zu erreichen ist. Dieser geringere Anstieg wird im Falle des FET wahrscheinlich durch die polare C-F Bindung verursacht, während im Falle des OMIT die hohe Lipophilie des Iods durch Veretherung der benachbarten Hydroxygruppe erst voll wirksam werden kann.

Anhand dieser Ergebnisse sollte daher O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)tyrosin, im Vergleich zu den iodierten Tyrosinderivaten, eine deutlich geringere Aufnahme in Biomembranen zeigen. (siehe Anhang 6.2).

In Abb. 34 ist der Hirnuptake von [^{18}F]FET und einigen anderen markierten, aromatischen Aminosäuren (40 min p.i.) sowie deren prozentualer Anteil in der Oktanolphase eines Zweiphasengemischs (Okt./ H_2O) dargestellt.

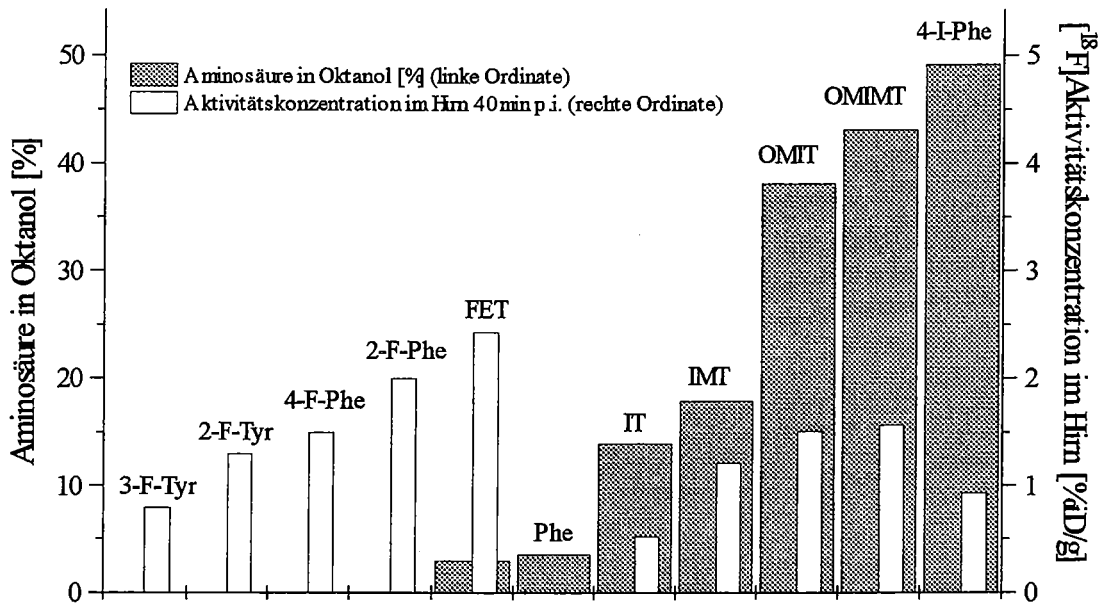


Abb. 34: Hirnaufnahme (40 min p.i., NMRI-Mäuse, $n \geq 3$) (weiße Balken, rechte Ordinate) und prozentualer Anteil einiger Aminosäuren in der Oktanolphase [%] eines Zweiphasengemisches (Oktanol/ isotonischer NaCl-Lösung (50/50, v/v) (graue Balken, linke Ordinate)
 Legende: F-Tyr = Fluortyrosin; F-Phe = Fluorphenylalanin, FET = O-(2-Fluorethyl)tyrosin
 IT = 3-Iodtyrosin, IMT=3-Iod- α -methyltyrosin, OMIT= 3-Iod-O-methyltyrosin, OMIMT=3-Iod-O-methyl- α -methyltyrosin).
 Lit.: 2- und 3-F-Tyr, 2- und 4-F-Phe: [201]; Hirnaufnahme IT, IMT, OMIT, OMIMT: [211,199], 4-I-Phe [211], Phe [209]

Wie zu erkennen ist, kann für die iodierten Tyrosine in erster Näherung eine gute Übereinstimmung zwischen der Lipophilie und Hirngängigkeit festgestellt werden [210,199]. Ein Vergleich mit anderen Aminosäuren zeigt jedoch, daß eine direkte Erweiterung dieses Konzepts auf andere Substanzgruppen nicht möglich ist. So zeigen die Fluortyrosine und Fluorphenylalanine, besonders jedoch [^{18}F]FET, im Vergleich zu den Iodtyrosinen trotz deutlich geringerer Lipophilie eine vergleichbare oder höhere Anreicherung im Hirngewebe, während z.B. 4-Iodphenylalanin entgegengesetztes Verhalten zeigt.

3.4.4.2 Bestimmung der proteingebundenen ^{18}F -Aktivität im Hirn

Die Bestimmung des proteingebundenen Anteils der ^{18}F -Aktivität im Hirn von NMRI-Mäusen diente zur Klärung der Frage, in welchem Maße O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin an der Proteinsyntheserate teilnimmt. Hierzu wurden 40 min p.i. des Tracers Hirnproben entnommen

und durch Trichloressigsäurefällung (siehe Experimentelles) der proteingebundene Anteil des Radiotracers im Hirn mit $6.0 \pm 2.5\%$ 40 min p.i. bestimmt. Aufgrund des geringen Wertes kann davon ausgegangen werden, daß es zu keinem signifikanten Einbau von $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ in cerebrale Proteine kommt und $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ kein geeigneter Tracer zur Bestimmung der regionalen Proteinsyntheserate ist. Auf welcher Art von 'Trapping' die im Anhang 6.2 dargestellte Akkumulation von $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ im Hirn beruht, ist z. Z. noch ungeklärt und bedarf einer weitergehenden, pharmakologischen Untersuchung.

3.4.4.3 Bestimmung der metabolischen Stabilität von O-(2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorethyl}$)-L-tyrosin

Zur Bestimmung der metabolischen Stabilität des applizierten Tracers wurden 10 und 40 min p.i. sowohl Blut als auch Hirnproben HPL-chromatographisch untersucht.

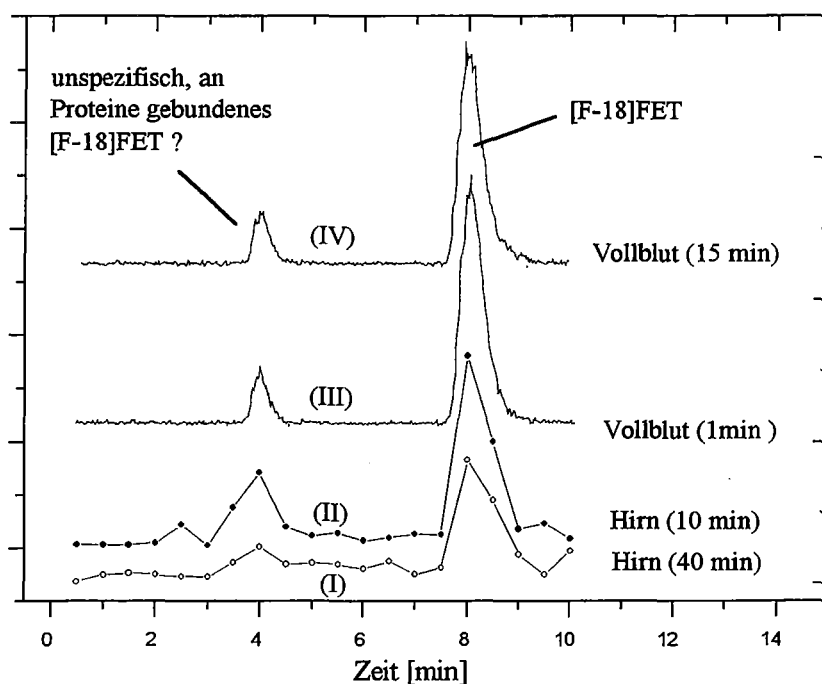


Abb. 35: Analytische Radiochromatogramme zur Bestimmung der metabolischen Stabilität von $[^{18}\text{F}]\text{FET}$: (I) Hirn (40 min p.i.), (II) Hirn (10 min p.i.). Zum Vergleich zwei Vollblutproben, welche ex vivo mit $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ versetzt wurden und nach einer Inkubationszeit von 1 min (III) bzw 15 min (IV) HPLC-chromatographisch untersucht wurden. Chromatographiebedingungen: LiChrosorbRP-18 250x4mm, Wasser/Ethanol/Essigsäure (87.5/10/2.5) (v/v/v), 2.5 g NH_4OAc /l, pH 3.0.

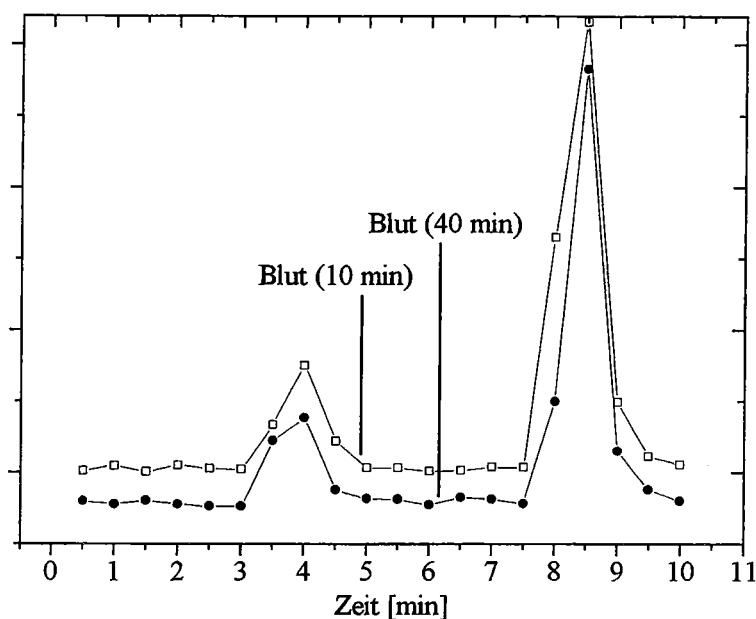


Abb. 36: Analytische Radiochromatogramme zur Bestimmung der Stabilität von $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ in Blut: Blutproben 10 und 40 min p.i. (NMRI-Mäuse)
Chromatographiebedingungen siehe Legende zu Abb. 35.

Wie in Abbildung 36 anhand der analytischen Radiochromatogramme der Hirnproben dargestellt ist, erscheint neben einem Hauptpeak, welcher intaktes $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ repräsentiert, zu beiden Untersuchungszeiten ein weiterer Peak bei einer kürzeren Elutionszeit (ca. 4 min). Hierbei kann es sich einerseits um einen Metaboliten handeln, andererseits ist eine Coelution des $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ mit der hydrophilen Proteinfraktion nicht auszuschließen. Für letztere Interpretation spricht die Beobachtung, daß der vermeintliche Metabolit sowohl bei 10 min als auch bei 40 min mit nahezu gleichem prozentualen Anteil an der Gesamtaktivität erscheint. Zur Untersuchung dieses Sachverhalts wurde anschließend je 1 ml Vollblut mit $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ 1 min bzw. 15 min inkubiert und nach Zentrifugation die überstehenden Plasmen HPLC-chromatographisch untersucht (siehe Abb. 35, (III),(IV)). Beide Chromatogramme zeigen wiederum einen hydrophilen Nebenpeak, welcher in seiner Intensität unabhängig von der Inkubationszeit ist. Ähnliche Radiochromatogramme lieferten die Blutproben, welche 10 bzw. 40 min nach Injektion des Tracers entnommen wurden (Abb. 36). Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß es sich bei der hydrophileren 'Verbindung' nicht um einen Metaboliten, sondern um den intakten Tracer handelt, welcher aufgrund unspezifischer Proteinbindung teilweise mit der hochmolekularen, hydrophilen Proteinfraktion coeluiert wird. Zur Klärung dieses Fragestellung sind ergänzende Untersuchungen mittels einer Gelfiltrationschromatographie oder einer Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen notwendig.

4. Experimentelles

4.1 Chemikalien und Geräte

Die Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien und sonstiger Materialien werden bei den einzelnen Synthesen bzw. Verfahren genannt.

Die Charakterisierung der synthetisierten Ausgangs- und Referenzverbindungen erfolgte durch ^1H -NMR-, IR- und Massenspektroskopie.

Die ^1H -NMR-Spektren wurden, soweit nicht anders angegeben, mit einem 80 MHz Gerät (Bruker WP-80) aufgenommen. Die Messung erfolgte gegen Tetramethylsilan als interner Standard. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben. Die Infrarotspektroskopie wurde an Lösungen (CCl_4) oder KBr-Presslingen mit einem Gerät der Firma Shimadzu (IR-440) durchgeführt. Die Massenspektren wurden, soweit nicht anders angegeben, am Institut für Erdöl und Organische Geochemie der KFA-Jülich mittels eines Finnigan 5100 SP - Gerätes aufgenommen (Elektronenstoßionisation, Direkteinlaß). Die Bestimmungen der Schmelzpunkte erfolgte mit einem Mettler FP-61 Gerät. Die angegebenen Werte wurden nicht korrigiert.

4.2 Darstellung der inaktiven Ausgangs- und Referenzverbindungen

2-Brompropionsäure-9'-anthrylmethylester [75]

Die Darstellung erfolgte durch langsames Zutropfen von 63 μl (0.6 mmol) 2-Brompropionsäurebromid zu einer Lösung von 104 mg (0.5 mmol) 9-Anthrylmethanol (Aldrich) und 50 μl (0.74 mmol) Triethylamin (Aldrich) in 15 ml Dichormethan. Nachdem die Lösung über Nacht gerührt wurde, erfolgte die Abtrennung des Produktes durch mehrmaliges Waschen mit verdünnter Salzsäure und Natriumcarbonatlösung im Scheidetrichter. Anschließend wurde die organische Phase über wasserfreiem Magnesiumsulfat (Fluka) getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt in Petrolether umkristallisiert. Ausbeute: 75 mg (44 %); Lit: [75] 70%.

Smp: 101°C; Lit [75]: 101°C

^1H -NMR (CDCl_3): δ = 7.32-8.55 (m, 9 H_{arom}), 6.20 (s, 2 $\text{H}_{\text{methylen}}$), 4.39 (q, $J=7$ Hz, 1 H_{methin}), 1.80 (d, $J=7$ Hz, 3 H_{methyl})

IR (CCl_4): ν = 2970 cm^{-1} (w), 2885 (w), 1727 (s), 1530 (s), 1440 (w), 1365 (w), 1318 (w), 1253 (w), 1210 (w), 1150 (w), 1114 (w), 1060 (w), 1001 (w), 955 (w), 884 (w), 798 (ss), 759 (ss), 456 (ss), 432 (ss)

2-Fluorpropionsäure-9'-anthrylmethylester [75]

Die Synthese erfolgte in Analogie zur Darstellung des Bromderivates (siehe oben) unter Verwendung von 2-Fluorpropionsäurechlorid.

IR (CCl₄): $\nu = 3055 \text{ cm}^{-1}$ (w), 2935 (w), 1764 (s), 1739 (w), 1542 (s), 1472 (w), 1445 (w), 1371 (w), 1273 (m), 1194 (m), 1125 (s), 1003 (m), 941 (w), 888 (m), 804 (s), 776 (s), 752 (s), 731 (s), 451 (s)

MS (EI) m/z (%): 282 (M⁺, 31), 242 (5), 222 (3), 207 (3), 191 (100), 178 (8), 165 (8), 149 (5), 131 (4), 95 (7), 83 (5)

2-Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester [75]

Zu einer Lösung von 4.2 g (30 mmol) 4-Nitrophenol und 4.95 g (45 mmol) 2-Fluorpropionsäurechlorid in 15 ml Dichlormethan wurden unter Eiskühlung und Rühren 4.85 g (40 mmol) Triethylamin in 5 ml Dichlormethan zugetropft. Nach 30 min wurde die Eiskühlung entfernt und weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde angesäuert und dreimal mit je 10 ml 1 mM HCl gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, einrotiert und das Produkt in wenig Diethylether umkristallisiert. Ausbeute: 1.8 g (28%).

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 7.1 - 8.4$ (m, 4H_{arom}), 5.3 (dq, $J_{d1} = 47 \text{ Hz}$, $J_{d2} = 7 \text{ Hz}$; 1H_{methin}), 1.78 (dd, $J_{d1} = 23 \text{ Hz}$, $J_{d2} = 7 \text{ Hz}$; 3H_{methyl})

IR (KBr): $\nu = 3112 \text{ cm}^{-1}$ (w), 1771 (s), 1605 (w), 1573 (w), 1509 (s), 1479 (w), 1440 (w), 1338 (s), 1210 (s), 1160 (s), 1103 (s), 1041 (w), 920 (m), 750 (w)

2-Fluorpropionsäurechlorid [110]

Die Darstellung von 2-Fluorpropionsäurechlorid erfolgte durch eine dreistufige Synthese: die Synthese von 2-Fluorpropionsäureethylester, die anschließende Hydrolyse zum Natriumsalz der 2-Fluorpropionsäure sowie die abschließende Umsetzung zum 2-Fluorpropionsäurechlorid.

2-Fluorpropionsäureethylester

Die Darstellung erfolgte in Analogie zu [218]. Eine Mischung aus 166 g (2.86 mol) Kaliumfluorid (2.5 h bei 150°C getrocknet) und 150 g Acetamid (7 Tage über P₂O₅ getrocknet) sowie 100g (0.55mol) 2-Brompropionsäureethylester wurden bei 100°C 3 h gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde der Ester mit Diethylether extrahiert und durch Destillation gereinigt (220 mbar, 71°C). Ausbeute: 23.7 g (0.19 mol) entspricht 34%.

Natrium 2-Fluorpropionat

23.7 g (0.19 mol) 2-Fluorpropionsäureethylester wurden mit 7.91 g (0.19 mol) Natriumhydroxid in einem Lösungsmittelgemisch aus 35 ml H₂O und 35 ml Methanol gelöst. Es wurde 30 min im Rückfluß gerührt und anschließend das Reaktionsprodukt vom Lösungsmittel befreit.

2-Fluorpropionsäurechlorid

Die Umsetzung erfolgte analog [219]. 22.5 g (0.19 mol) Natrium-2-Fluorpropionat wurden mit 140 g (0.67 mol) Phosphorpentachlorid zusammengegeben und 30 min bei 200°C erhitzt. Das Reaktionsprodukt konnte anschließend als farblose Flüssigkeit abdestilliert werden.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 5,27 (dq, J_d = 48 Hz, J_q = 6.5 Hz; 1H_{methin}), 1.71 (dd, J_{d1} = 23 Hz, J_{d2} = 6.5 Hz; 3H_{methyl})

IR (CCl₄): ν = 2995 cm⁻¹ (w), 1877 (w), 1833 (s), 1789 (s), 1543 (s), 1441 (w), 1373 (w), 1304 (s), 1253 (w), 1158 (w), 1093 (w), 1051 (m), 973 (m), 875 (m), 797 (s), 760 (s), 590 (s)

4-(Trimethylammonium-trifluormethansulfonat)-benzoesäureethylester

Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von Haka et al.[117]. 2 g (10.4 mmol) 4-N,N-Dimethylaminobenzoesäureethylester wurden in 20 ml Ether gelöst und 1.18 ml (10.5 mmol) Trifluormethansulfonsäuremethylester versetzt. Nach 24 h wurden die ausgefallenen Kristalle abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet.

Smp.: 118°C ; Lit [117]: 112-114°C; [108]: 122 °C

¹H-NMR (d₆-DMSO): δ = 8.13 (s; 4H_{arom}), 4.37 (q, J = 7 Hz, 2H_{methylen}), 3.55 (s; 9H_{methyl}), 1.33 (t, J = 7 Hz, 3H_{methyl})

4-Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester

70 mg (0.5 mmol) 4-Fluorbenzoesäure wurden in 3 ml Acetonitril gelöst, mit 50 mg (0.47 mmol) wasserfreiem Na₂CO₃ versetzt und 5 min gerührt. Anschließend wurden 150 mg (0.5 mmol) O-(N-succinimidy)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Tetrafluoroborat zugegeben und 50 min bei 50°C gerührt. Anschließend wurde filtriert. Das Filtrat wurde mit 7 ml 1% Essigsäure verdünnt und mit einer Flußrate von ca. 3.5 ml / min mittels einer 10 ml Luer-Lock-Spritze zur Fixierung der lipophilen Produkte durch drei hintereinander gesteckte Polystyrolkartuschen (Merck, EN, 0.2g) gedrückt. Die Kartuschen wurden mit 10 ml 0.01% Essigsäure / MeCN (70/30) (v/v) nachgewaschen und anschließend im leichten N₂-Strom getrocknet. Die Elution

des Produkts mit 3 ml MeCN und anschließendes Entfernen des Lösungsmittels lieferte 105 mg (89%) des reinen Produktes.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.07\text{--}8.35$ (m; 4H_{arom}), 2,90 (s, $4\text{H}_{\text{methylen}}$)

4-Fluorbenzoesäure-1-benzotriazolylester

4-Fluorbenzoesäure-1-benzotriazolylester wurde mittels O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-bis(tetramethylen)-uronium Hexafluorophosphat analog der oben beschriebenen Darstellung von 4-Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester synthetisiert.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.14\text{--}8.45$ (m; 8H_{arom})

MS (EI) m/z (%): 258 (34), 257 (M^+ , 68), 229 (71.5), 185 (36), 170 (13.5), 140 (14), 124 (75), 123 (100), 96 (26), 95 (100), 76 (40), 75 (77), 64 (44), 63 (53), 51 (35), 50 (56), 39 (44.5)

IR (KBr): 3070 cm^{-1} (w), 1776 (ss), 1507 (s), 1493 (m), 1441 (m), 1410 (m), 1362 (m), 1279 (m), 1250 (ss), 1151 (m), 1083 (m), 1017 (s), 953 (w), 917 (w), 850 (m), 730 (s)

(2-Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) [59]

3 μl 2-Fluorpropionsäurechlorid wurden tropfenweise zu einer Lösung von 25 mg (ϵ -BOC-Lys⁵)-(SMS 201-995) (Sandoz, Basel) und 16.8 μl 2,6-di-tert. Butylpyridin in 2.5 ml CH_3CN gegeben. Die Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde der trockene Rückstand mit 1.5 ml Trifluoressigsäure (TFA) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 3 min wurde die TFA binnen 2 min im leichten N_2 -Strom ausgetrieben und der Rückstand mit 1 ml CH_3CN aufgenommen. Der verbleibende weiße Niederschlag wurde abfiltriert und mittels semipräparativer HPLC gereinigt (LiChrosorb RP-18, 10 μm , 60 MeOH/ 40 0.1% CH_3COOH , 3.6 g NaCl / l; Flußrate 7 ml / min). Abschließendes Einengen der gesammelten Fraktionen lieferte 8.1 mg 2-Fluorpropionyl-(D)Phe¹-SMS 201-995.

MS (FAB, m/z (%) von 250-1200): 1093 (M^+ , 100), 1061 (3), 963 (6), 566 (7), 539 (5), 504 (7), 468 (8), 446 (7.5), 428 (7), 412 (7.5), 383 (11), 338 (35), 275 (43)

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO), 360 MHz: neben SMS 201-995 Signalen [221] Signale der Fluorpropionylgruppe: $\delta = 1.4$ (dd, $3\text{H}_{\text{methyl}}$), 4.9 (dq, $1\text{H}_{\text{methin}}$).

4-Azidophenacylfluorid

Zu 20 mg (83.3 μmol) 4-Azidophenacylbromid (Fluka) in 1 ml CH_3CN wurden 31.4 mg (83.3 μmol) Kryptofix 2.2.2, 5 μl 1 M K_2CO_3 Lösung und 14.52 mg (250 μmol) KF gegeben. Die Lösung wurde 2 h bei 70°C gerührt und anschließend filtriert. Nachdem das Filtrat auf ca. 500 μl eingengt war, wurde das Produkt mittels semipräparativer HPLC (LiCrolut RP-select B, 125 x 8mm, Flußrate 4 ml / min, H_2O / CH_3CN (50/50) (v/v), $k' = 3.3$) aus dem Filtrat isoliert. Das Einengen der gesammelten Fraktionen lieferte 1.5 mg (10%) des reinen Produktes.

MS (EI) m/z (%): 179 (M^+ , 17), 151 (100), 146 (4), 131 (7), 123 (19), 118 (22), 96 (11), 91 (28), 90 (95), 76 (8), 69 (17), 63 (67), 61 (33), 50 (18)

UV (CH_3CN): $\lambda_{\text{max}} = 282 \text{ nm}$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.09\text{--}8.10$ (m, 4 H_{arom}), 5.49 (d, $J = 34.5 \text{ Hz}$, 2 $\text{H}_{\text{methylen}}$)

N-BOC-(O-(2-Fluorethyl)-L-tyrosin)methylester

1 g (3.38 mmol) N-tert.Butyloxycarbonyl-L-tyrosinmethylester wurden in 2 ml CH_3CN suspendiert und mit 0.183 g (3.38 mmol) NaOMe versetzt. Zu dieser Lösung wurde tropfenweise 0.74 mg (3.38 mmol) 2-Fluortosyloxyethan in 1 ml CH_3CN gegeben und 12 h unter Rückfluß gerührt. Die Isolierung des Produktes erfolgte mittels präparativer HPLC (LiChrosorb RP-18, 250 x 20 mm, CH_3CN / H_2O (50/50) (v/v), Flußrate 25 ml / min, $k' = 3.3$). Die Produktfraktionen wurden anschließend eingengt und unter reduziertem Druck von restlichen Lösemittel befreit. Ausbeute: 622 mg (54%).

MS (EI) m/z (%): 341 (M^+ , 0.7), 286 (77), 242 (91), 224 (79), 197 (48), 182 (37), 153 (100), 107 (52), 91 (3.5), 77 (3), 57 (15), 47 (3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 6.75\text{--}7.12$ (m, 4 H_{arom}), 4.67 (dt, $J_{\text{d}} = 48 \text{ Hz}$, $J_{\text{t}} = 4 \text{ Hz}$; 2 $\text{H}_{\text{methylen}}$), 4.37 (t, $J = 5 \text{ Hz}$, 1 H_{methin}), 4.17 (dt, $J_{\text{d}} = 28 \text{ Hz}$, $J_{\text{t}} = 4 \text{ Hz}$; 2 $\text{H}_{\text{methylen}}$), 3.66 (s, 3 H_{methyl}), 2.97 (d, $J_{\text{d}} = 5 \text{ Hz}$, 2 $\text{H}_{\text{methylen}}$), 1.37 (s, 9 H_{methyl})

IR (KBr): $\nu = 3355 \text{ cm}^{-1}$ (m), 2975 (m), 1772 (s), 1681 (s), 1610 (w), 1520 (s), 1448 (m), 1390 (w), 1366 (m), 1315 (w), 1281 (w), 1245 (m), 1225 (w), 1167 (s), 1112 (w), 1074 (s), 1029 (w), 992 (m), 923 (m), 884 (m), 836 (m)

O-(2-Fluorethyl)-L-tyrosin

100 mg (0.3 mmol) *N-BOC-(O-(2-Fluorethyl)-L-tyrosin)methylester* wurden mit 2 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach 3 min wurde die TFA im leichten N_2 -Strom ausgetrieben und der trockene Rückstand 10 min mit 0.5 ml 0.1 n NaOH auf 80°C erhitzt. Anschließend wurde mit 0.7 ml 0.1 n HCl angesäuert und die Lösung mittels einer 2 ml Luer-Lock-Spritze über eine

Polystyrol-Kartusche (Merck, EN) gegeben. Die Kartusche wurde mit 2 ml H₂O gewaschen und das Produkt mit 4 ml Ethanol/Wasser (50/50) (v/v) eluiert. Anschließendes Einengen und Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck lieferte 28 mg (0.12 mmol; 41%) reines O-(2-Fluorethyl)-L-tyrosin.

MS (EI) m/z (%): 228 (M+1, 1.5), 227 (6), 210 (1), 197 (9), 182 (27), 154 (68), 153 (100), 134 (13), 107 (98), 91 (21), 77 (34), 74 (8), 47 (12).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 6.78-7.25 (m, 4H_{arom}), 4.75 (dt, J_d = 48 Hz, J_t = 4 Hz; 2H_{methylen}), 4.27 (dt, J_d = 28 Hz, J_t = 4 Hz; 2H_{methylen}), 3.37 (m, 1H_{methin}), 2.82 (m, 2H_{methylen})

IR (KBr): ν = 3360 cm⁻¹ (w), 3135 (m), 2975 (m), 2645 (sw), 2060 (w), 1962 (w), 1907 (w), 1596 (s), 1506 (m), 1448 (w), 1396 (m), 1307 (w), 1249 (m), 1185 (w), 1147 (w), 1117 (w), 1071 (w), 1036 (m), 994 (w), 919 (m), 871 (w)

1-Fluor-2-tosyloxyethan [73]

0.58 g (25 mmol) Natrium wurden unter Eiskühlung in 3 ml (51.1 mmol) Fluorethanol gelöst und anschließend in kleinen Portionen 4.76 g (25 mmol) Toluolsulfonsäurechlorid zugegeben. Es wurde 2 h bei 0°C gerührt und anschließend im Vakuum destilliert. Ausbeute: 3.6 g (66%).

Siedepunkt: 145 - 147 °C (12 mbar)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.25-7.93 (m, 4H_{arom}), 4.36-4.95 (m, 2H_{methylen}), 4.04-4.36 (m, 2H_{methylen}), 2.45 (s, 3H_{methyl})

4.3 Radiosynthesen

4.3.1 Produktion von n.c.a. [^{18}F]Fluorid

Die Produktion des für die durchgeführten Untersuchungen verwendeten n.c.a. [^{18}F]Fluorid erfolgte über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion am Babycyclotron BC 1710 (JSW) des Instituts für Nuklearchemie der KFA-Jülich. Das verwendete H_2^{18}O -Target [21] ist in Abb. 37 dargestellt.

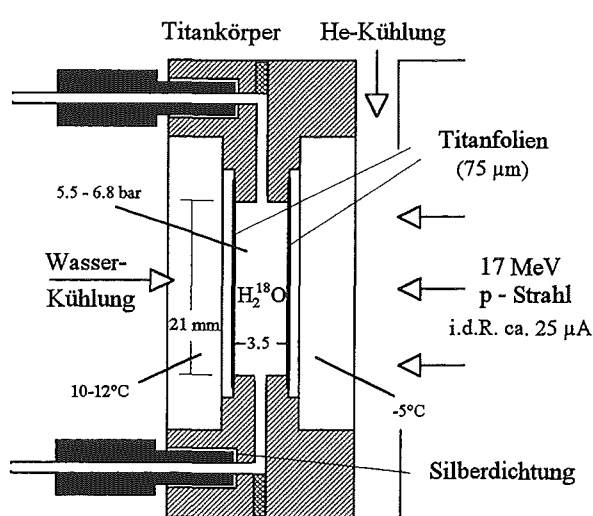


Abb. 37: Schematische Darstellung des im Elektronenstrahlverfahren verschweißten Titantargets (1.3 ml Volumen) zur Produktion von [^{18}F]Fluorid über die Kernreaktion $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ an angereichertem H_2^{18}O [21]

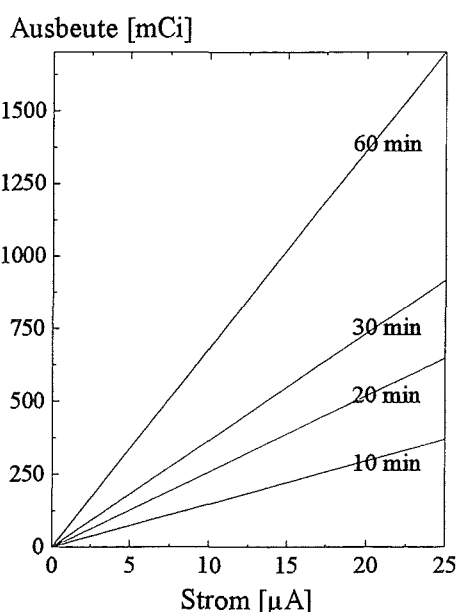


Abb. 38: Produktion von [^{18}F]Fluorid über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion in einem Titantarget als Funktion des Strahlstroms und der Bestrahlungsdauer (17 MeV Prot.) [27].

Die Targetzelle ($d = 21 \text{ mm}$; $h = 3.5 \text{ mm}$; d.h. $V = 1.33 \text{ ml}$) befindet sich in der Mitte des Titantargets und wird durch zwei Titanfolien, welche als Eintritts- und Austrittsfenster dienen, begrenzt. Während der Bestrahlung des auf 98% angereicherten H_2^{18}O mit auf 17 MeV beschleunigten Protonen wird das Eintrittsfenster mittels einer Heliumkühlung auf eine Temperatur von typischerweise ca. -5°C , das Austrittsfenster durch eine Wasserkühlung auf ca. $10-12^\circ\text{C}$ gekühlt. In diesem Target können, wie in Abb. 38 anhand der Auftragung der experimentell ermittelten Ausbeute an ^{18}F -Fluorid als Funktion des Strahlstroms und der Bestrahlungsdauer [27] dargestellt ist, bei Strahlströmen von bis zu 35 µA und einer Protonenenergie von 17 MeV innerhalb 1 h bis zu 85 GBq EOB (2.4 Ci EOB) n.c.a.

[^{18}F]Fluorid mit einer spezifischen Aktivität (EOB) von bis zu 7.4 TBq / μmol (200 Ci / μmol) erzeugt werden.

Der Targetinhalt wird nach Ende der Bestrahlung mittels eines Heliumgasstromes aus dem Target herausgespült und das n.c.a. [^{18}F]Fluorid zur Abtrennung von radionuklidischen Verunreinigungen (z.B. aus Targetmaterial) an einem Austauscherharz (BioRad AG1X8 in der Carbonatform) gebunden. Dieser Schritt dient ebenso zur Rückgewinnung des angereicherten H_2^{18}O . Anschließend wird die ^{18}F -Aktivität mit 300 μl einer 60mM Kaliumcarbonatlösung eluiert, in 1 ml Acetonitril aufgenommen und diese Lösung anschließend in ein mit einem Septum verschlossenen Bördelgefäß abgefüllt.

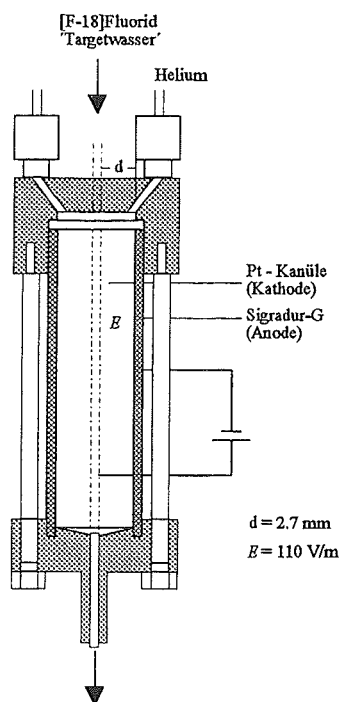


Abb.39: Schematische Darstellung einer Durchflußzelle zur Abscheidung von [^{18}F]Fluorid mittels eines elektrischen Feldes [86]

Für einige ^{18}F -Markierungsexperimente wurde carbonatfreies ^{18}F -Fluorid benötigt. In diesen Fällen erfolgte die Abscheidung und Reinigung des [^{18}F]Fluorids von radionuklidischen Verunreinigungen an einem Sigradur-G Zylinder durch Anlegen eines elektrischen Feldes [86].

Auf diese Weise gelingt es, binnen 5 min 95 $\pm 2\%$ des [^{18}F]Fluorids zu fixieren. Danach wird das Targetwasser durch einen Heliumstrom aus der Zelle herausgedrückt und die Zelle mit carbonatfreiem H_2O gefüllt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit umgekehrter Richtung kann mehr als 90% der Aktivität binnen 3 min bei 50°C wieder in Lösung gebracht werden [86].

4.3.2 Allgemeine Vorschrift zur azeotropen Trocknung von [^{18}F]Fluorid

Da nukleophile Substitution zur Darstellung einer ^{18}F -markierten Verbindung mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid generell unter wasserfreien Bedingungen durchgeführt werden müssen (siehe Einleitung), bedarf es grundsätzlich im ersten Syntheseschritt einer Trocknung der wässrigen [^{18}F]Fluorid-Lösung. Gleichzeitig werden bei dieser Trocknung durch Zusatz geeigneter Phasentransferkatalysatoren (Kryptofix 2.2.2 oder Tetraalkylammoniumsalze) Salze von [^{18}F]Fluorid gebildet, welche die anschließende Solubilisation in organischen Lösungsmitteln ermöglichen. Die Anwesenheit basischer Substanzen während der Trocknung dient der

Vermeidung von Abdampfverlusten an ^{18}F -Aktivität durch Bildung von flüchtigem ^{18}F Hydrogenfluorid. In ein konisch zulaufendes Reaktionsgefäß (Reactivial, $V = 2.5 \text{ ml}$) werden 0.25 ml trockenes CH_3CN (Merck, $< 0.003\% \text{ H}_2\text{O}$), 5 mg ($13.3 \mu\text{mol}$) Kryptofix 2.2.2 (Merck) sowie $5 \mu\text{l}$ einer 1 M Kaliumcarbonatlösung (Merck, suprapur) gegeben. Dieser Lösung werden anschließend $10 - 100 \mu\text{l}$ wässrige ^{18}F Fluoridlösung ($0.1 - 1 \text{ GBq}$) zugesetzt und das Lösungsmittel unter Zuhilfenahme eines Inertgasstroms bei 90°C abdestilliert. Dieser azeotrope Trocknungsschritt wird in Abhängigkeit von der eingesetzten ^{18}F -Fluoridlösung mindestens zweimal wiederholt. Zur Darstellung von 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester empfiehlt sich die Verwendung von carbonatfreiem ^{18}F -Fluorid. Ebenso sollte in diesem Fall zur Reduzierung des Basizität statt $5 \mu\text{l}$ 1 M Kaliumcarbonatlösung $1 - 2 \mu\text{l}$ 1 M K_2CO_3 -Lösung sowie $4 - 3 \mu\text{l}$ 1 M $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ -Lösung zugesetzt werden. Ist kein carbonatfreies ^{18}F -Fluorid verfügbar, so sollte zumindest ein $1/4 - \text{bis } 2/3 - \text{Verhältnis}$ Carbonat / Oxalat durch Zugabe von Oxalatlösung eingestellt werden.

4.3.3 *Synthese von 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester*

Trockenes Kryptat ($[\text{K}^+ \subset 2.2.2]^{18}\text{F}^-$) wurde durch Zugabe einer Lösung von 5 mg ($14 \mu\text{mol}$) des Triflatsalzes von 4-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester in $250 \mu\text{l}$ wasserfreiem DMSO in Lösung gebracht und bei verschlossenem Vial 6 min auf Temperaturen von $90 - 110^\circ\text{C}$ erhitzt. Zur anschließenden Hydrolyse wurden $100 \mu\text{l}$ 1 M Natriumhydroxidlösung zugesetzt und nochmals 8 min bei $90 - 110^\circ\text{C}$ gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 0.65 ml 1 M HCl angesäuert, mit 2 ml H_2O verdünnt und in eine 5 ml Luer-Lock-Spritze überführt. Diese Lösung wurde zur Fixierung der organischen Produkte langsam (Flußrate ca. 2 ml/min) durch eine Polystyrolkartusche (Merck, LiChrolut EN, 0.2 g) gedrückt. Diese wurde mit 1 ml H_2O gewaschen und mittels eines N_2 -Stroms nachgespült. Die Abtrennung des Produktes gelang durch Elution der auf der EN-Kartusche fixierten Verbindungen mit 6 ml MeOH durch eine nachgeschaltete Kationenaustauschersäule ($8 \times 30 \text{ mm}$, LiChrolut SCX, Merck), welche zuvor mit 5 ml 0.1 M HCl konditioniert, mit H_2O neutral gewaschen und mit MeOH nachgespült worden war. Der $2.$ und $3. \text{ ml}$ des Eluats wurde gesammelt, mit $10 \mu\text{l}$ Tetramethylammoniumhydroxid versetzt und im leichten Gasstrom bei 90°C eingeeengt. Anschließend erfolgte zweifache azeotrope Trocknung mit $250 \mu\text{l}$ CH_3CN . Zur Umsetzung der isolierten 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure zum N-Succinimidylester wurde mit 10 mg O-(N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Tetrafluoroborat in $250 \mu\text{l}$ CH_3CN versetzt und 2 min bei 90°C gerührt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in eine 10 ml Luer-Lock-Spritze, gefüllt mit 8 ml $\text{H}_2\text{O} / \text{HOAc}$ ($95/5, \text{ v/v}$) aufgenommen und zur Fixierung des Esters und des Aktivierungagens über eine EN-Kartusche gegeben (Flußrate ca. 5 ml/min). Diese wurde mit 10 ml $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ($35/65, \text{ v/v}$) gespült und anschließend das Produkt mit $1 - 1.5 \text{ ml}$ CH_3CN eluiert.

4.3.4 *Synthese von 2-[¹⁸F]Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester*

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Guhlke et al. [75]. Trockenes Kryptat ($[K^+ \subset 2.2.2]^{18}F^-$) wurde mit 10 mg 2-Brompropionsäure-9'-anthrylmethylester in 250 μ l CH_3CN gelöst und bei einer Badtemperatur von 95°C 5 min gerührt. Die Isolierung von 2-[¹⁸F]Fluorpropionsäure-9'-anthrylmethylester erfolgte mittels semipräparativer HPLC (LiChrolut RP-18, 7 μ m, 250x10mm, Flußrate 7 ml/min, $CH_3CN/0.1\%$ HOAc (60/40) (v/v), $k' = 4.1$). Die Produktfraktion wurde mit H_2O auf das doppelte Volumen verdünnt, das Produkt durch Festphasenextraktion (LiChrolut EN, Merck) isoliert, mit 2.5 ml Diethylether in ein konisches Reactivial ($V = 5$ ml) eluiert und anschließend unter Zuhilfenahme eines leichten N_2 -Gasstroms von Lösemittel befreit. Zur Hydrolyse wurden 130 μ l MeOH und 170 μ l einer Mischung von 9.5 ml H_2O , 0.5 ml 45% Triethylamin und 10 mg Tetramethylammoniumhydroxid Pentahydrat zugegeben und 5 min bei 90°C gerührt. Im Anschluß hieran wurde eingengt und mit 3 x 0.5 ml CH_3CN azeotrop getrocknet. Die Bildung des Aktivesters aus dem nun vorliegenden Tetramethylammoniumsalz von 2-[¹⁸F]Fluorpropionat erfolgte durch Zugabe von 10 mg Bis-(4-nitrophenyl)carbonat (Aldrich) in 250 μ l CH_3CN binnen 5 min bei 95°C in nahezu quantitativer Ausbeute. Die Produktisolierung erfolgte durch semipräparative HPLC (LiChrolut RP-18, 7 μ m, 250x10mm, Flußrate 7 ml/min, $CH_3CN/0.1\%$ HOAc (50/50) (v/v), $k' = 4.2$), Verdünnung der Produktfraktion mit H_2O auf das dreifache Volumen und anschließende Festphasenextraktion (LiChrolut EN, Merck). Die Kartusche wurde mit 2 ml H_2O (pH 4-6) gewaschen, durch einen leichten N_2 -Strom von Restwasser befreit und anschließend zur Trocknung des hydrolyseempfindlichen 2-[¹⁸F]Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester mit 2.5 ml Diethylether durch eine Trockenkartusche (gefüllt mit 0.3 g Magnesiumsulfat, wasserfrei) eluiert.

4.3.5 *Allgemeine Methode zur ¹⁸F-Fluoracylierung von Proteinen*

Nachdem die Lösung des Aktivesters in einem 2 ml Eppendorfgefäß eingengt und vorsichtig im Inertgasstrom getrocknet war, wurden 75-150 μ l gepufferte Proteinlösung zugegeben und 10-15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die präparative Isolierung sowie die Bestimmung der radiochemischen Konjugationsausbeuten erfolgte durch Gelfiltrationschromatographie (BioSil SEC 250, 300x7.8 mm, Mobile Phase: 0.05 M NaH_2PO_4 , 0.05 M Na_2HPO_4 , 0.15 M NaCl, 0.01 M NaN_3 , pH 6.8, Flußrate 1 ml/min, Elution der Proteine bei 8 min (IgG) bis 9.5 min (HSA). Zur schnellen Isolierung ¹⁸F-markierter Proteine diente eine Entsalzungskartusche (Pharmacia, High Trap Desalting, 1.6 x 2.5 cm, gefüllt mit Sephadex G-15 Superfine), welche mittels eines geeigneten Adapters als HPLC-Säule genutzt wurde. Um den Maximaldruck auf < 3 bar zu limitieren, wurde bei diesem Trennsystem auf eine kontinuierliche UV-Detektion verzichtet. Auf diese Weise war eine Isolierung markierter Proteine binnen 30-40 sec möglich.

4.3.6 *Synthese von 4-Azidophenacyl-[¹⁸F]fluorid*

Trockenes Kryptat ($[K^+ \subset 2.2.2]^{18}F^-$) wurde mit 3.6 - 4 mg (15-16.5 mg) 4-Azidophenacylbromid (Fluka, in $CHCl_3$ umkristallisiert) in 250 μ l CH_3CN gelöst. Das Vial wurde verschlossen und 4 min auf eine Temperatur von 90°C erhitzt. Die Isolierung von 4-Azidophenacyl-[¹⁸F]fluorid ([¹⁸F]APF) erfolgte mittels HPLC (LiChrolut RP-Select B, 125 x 8mm, Flußrate 4ml/min, H_2O/CH_3CN (50/50) (v/v), $k'=3.3$) und anschließender 'on-line'-Festphasenextraktion an einer Polystyrolkartusche (LiChrolut EN, Merck). Die Elution der Kartusche erfolgte mit 1 ml CH_3CN und lieferte die [¹⁸F]APF in einer radiochemischen Ausbeute von 71 ± 5 % (bezogen auf [¹⁸F]Fluorid) bei einer Gesamtsynthesezeit von ca. 15 min

4.3.7 *¹⁸F-Markierung von Proteinen durch Photochemische Konjugation*

10-50 μ l (10-50 MBq) der (wie oben dargestellten) [¹⁸F]APF-Lösung wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß im leichten Gasstrom eingengt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurden 100-200 μ l einer wässrigen, gepufferten Proteinlösung zugegeben und die Lösung anschließend in eine Quarzküvette überführt. Die Küvette wurde verschlossen, auf das Deckglas einer 15 W TLC-UV-Handlampe gelegt und 5 -10 mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm bestrahlt.

4.3.8 *Synthese von 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat [73]*

Zur n.c.a. Synthese von 2-[¹⁸F]Fluortosyloxyethan wurde das trockene Kryptat mit 4-5 mg (10-12.5 μ mol) Ethylenglycol-1,2-ditosylat in 250 μ l CH_3CN gelöst. Das Vial wurde verschlossen und bei einer Ölbadtemperatur von 90°C 10 min gerührt. Die Isolierung erfolgte durch HPLC (LiChrosorb RP-Select B, 125x8mm, CH_3CN/H_2O (50/50) (v/v), Flußrate 4 ml/min, $k'=5,7$). Die Produktfraktion wurde mit H_2O auf das fünffache Volumen verdünnt und anschließend 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat an fester Phase (LiChrolut EN, Merck) extrahiert. Die Elution der Kartusche mit 2 ml CH_3CN lieferte das Produkt in radiochemischen Ausbeuten von 82 ± 5 %.

4.3.9 *Synthese von O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-tyrosin via ¹⁸F-Fluorethylierung von N-BOC-TyrOMe*

55 mg (0.169 mmol) BOC-TyrOMe und 9 mg (0.166 mmol) NaOMe wurden in 160 µl MeOH gelöst. 30 µl dieser Lösung wurden anschließend zu 150 µl 2-[¹⁸F]Fluorethyltosylat-Lösung gegeben und die radiochemische Ausbeute als Funktion der Zeit und des Lösungsmittels (DMSO und CH₃CN) bestimmt. Hierzu wurden zu vorgegebenen Zeiten Proben (je 5 µl) entnommen, mit 50 µl CH₃CN verdünnt und HPL-chromatographisch untersucht (LiChrosorb RP-Select B, 125 x 8mm, CH₃CN/H₂O (50/50) (v/v), Flußrate 4 ml/min, k' = 7.5). Zur Darstellung von O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-tyrosin wurden die Fraktionen gesammelt, mit H₂O auf das doppelte Volumen verdünnt und auf einer EN-Kartusche fixiert. Diese wurde mit 1 ml Wasser gewaschen, das Produkt anschließend mit 2 ml CH₃CN eluiert und die erhaltene Lösung eingengt. Nachdem das Lösungsmittel vollständig entfernt war, wurde mit 200 µl Trifluoressigsäure versetzt und 3 min gerührt. Die TFA wurde mittels eines Gasstroms ausgetrieben und der Rückstand zur Hydrolyse bei einer Temperatur von 90°C 5 min mit 200 µl 1 N NaOH behandelt. Die abschließende HPLC-Reinigung (LiChrosorb RP-Select B, 125x8mm, Ethanol/H₂O/HOAc (87.5/10/2.5) (v/v/v), 2.5 g NH₄OAc/l, pH 3.0, Flußrate 4 ml/min, k' = 1.5) lieferte O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-tyrosin in einer radiochemischen Ausbeute von ca. 35% bei einer Gesamtsynthesezeit von 1h.

4.3.10 *Synthese von O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-tyrosin via ¹⁸F-Fluorethylierung von Tyrosin*

50 mg (276 µmol) L-Tyrosin wurden zusammen mit 1.95 Äquivalenten (29.06 mg, 538.1 µmol) Natriummethanolat in 1 ml MeOH suspendiert und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde zentrifugiert. 25 bzw. 50 µl dieser Lösung sowie 25 µl einer Lösung von 2-[¹⁸F]Fluortosyloxyethan in CH₃CN wurden zu 300 µl DMSO gegeben und bis zu 15 min bei einer Ölbadtemperaturen von 100°C gerührt. Zu vorgegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, mit H₂O verdünnt und anschließend mittels HPLC die radiochemischen Ausbeuten bestimmt (LiChrosorb RP-Select B, 125x8mm, Ethanol/H₂O/HOAc (87.5/10/2.5) (v/v/v), 2.5 g NH₄OAc/l, pH 3.0, Flußrate 4 ml/min, k' = 1.5).

4.3.11 *Synthese von (2-[¹⁸F]Fluoropropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995)*

Zur ¹⁸F-Fluoropropionylierung von SMS 201-995 wurden 0.5 mg (ε-BOC-Lys⁵)-(SMS 201-995) (Sandoz, Basel), 1.0 mg 1-Hydroxybenzotriazol und 4 µl 2,6-Di-tert.butylpyridin zu einer Lösung von 2-[¹⁸F]Fluoropropionsäure-4-nitrophenylester in 1.5 mL CH₂Cl₂ gegeben.

Nachdem das Lösungsmittel im leichten N₂-Gasstrom entfernt worden war, wurde der Rückstand mit 1 mg 2,6,-Di-tert.-4-methylpyridin in 50 µl CH₃CN aufgenommen und 5 min auf 70°C erhitzt. Die Bestimmung der radiochemischen Ausbeute erfolgte mittels HPLC (LiChrosorb RP-18, 7 µm, 250x 4 mm, MeOH/ 0.2% HOAc, (80/20) (v/v), Flußrate 1 ml/min, k' = 1.75).

Durch Zugabe von 50 µl CH₃CN/10 N HCl (50/50) (v/v) zu obiger Reaktionslösung oder durch Einengen und Zugabe von 100 µl TFA wurde die tert.-Butyloxycarbonylgruppe innerhalb von 3 min bei Raumtemperatur abgespalten. Zur abschließenden HPLC-Reinigung des Produktes wurde ein Gradientensystem verwendet (LiChrosorb RP-18, 7 µm, 250x 10 mm, Gradient: 5%-95% B in 20 min; A = H₂O/CH₃CN/H₃PO₄ (900/100/6) (v/v/v), pH 2.9; B = H₂O/CH₃CN (300/700) (v/v); Flußrate 7 ml / min, k' = 7.1). Die Produktfraktion wurde vom organischen Lösemittelanteil befreit und das markierte Peptid mittels einer Sep-Pak C-18-Kartusche (Waters, 360 mg) extrahiert. Es wurde mit 2 ml Wasser nachgewaschen und das Produkt anschließend mit 5 ml MeOH eluiert. Für in vivo Untersuchungen wurde mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, der organische Lösungsmittelanteil am Rotationsverdampfer entfernt und anschließend steril filtriert (Waters, 0.22 µm).

4.3.12 *Synthese von [N^ε-(4-[¹⁸F]Fluorbenzoyl)Lys⁴]-Apamin*

Die Synthese von [N^ε-(4-[¹⁸F]Fluorbenzoyl)Lys⁴]-Apamin erfolgte in Analogie zu den ¹⁸F-Acylierungen der Proteine. Lösungen von 4-[¹⁸F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester in CH₃CN wurden unter Zuhilfenahme eines leichten N₂-Gasstroms getrocknet und mit 0.2 bis 0.8 mg Peptid in 100 µl Boratpuffer pH 8.7 aufgenommen. Nach 10-15 minütiger Reaktionszeit wurde die radiochemische Ausbeute mittels eines HPLC-Gradientensystems bestimmt (RP-18 Select B, 5 µm, 250x4mm, Gradient: 0-15 min, 10-25% B; 15-25 min, 25-50% B; A = 0.005 M Citratpuffer pH 3, B = CH₃CN, k' = 4.1).

4.3.13 *Synthese von 3-(3-[¹³¹I]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl-N-succinimidylester [200]*

3 mg 3-(4-Methoxyphenyl)propionsäure-N-succinimidylester wurden in 250 µl TFA gelöst. Hierzu wurden 0.5 mg IodoGen[®] (Pierce) in 50 µl TFA gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe der ¹³¹I-Radioiodlösung (in 30 µl H₂O) gestartet. Zur Vermeidung einer Freisetzung von Radioiod wurde nach Beendigung der Reaktion (2-45 min bei einer Temperatur von 65°C) ein Aktivkohlefilter (1ml Luer-Lock-Spritze gefüllt mit Aktivkohle) mittels einer Spritzenkanüle durch das Septum des Vials gesteckt und die Trifluoressigsäure im leichten Argonstrom ausgetrieben. Der trockene Rückstand wurde mit 250 µl 0.2% HOAc/CH₃CN (50/50) (v/v) aufgenommen und anschließend mittels HPLC gereinigt (RP-18 Select B, 250x4

mm, 0.2% HOAc/CH₃CN (50/50) (v/v), Flußrate 1 ml/min, $k' = 5.2$). Die Produktfraktion wurde mit H₂O auf das doppelte Volumen verdünnt, das Produkt auf einer EN-Kartusche (Merck) fixiert, mit 1 ml H₂O nachgewaschen und mit 3 ml CH₃CN eluiert.

4.3.14 *Synthese von [N^ε-(3-(3-[¹³¹I]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl)Lys⁴]-Apamin*

Die ¹³¹I-Iodacylierung von Apamin mit 3-(3-[¹³¹I]Iod-4-methoxyphenyl)propionsäure-N-succinimidylester wurde analog der Synthese von [N^ε-(4-[¹⁸F]Fluorbenzoyl)Lys⁴]-Apamin durchgeführt. (HPLC: RP-18 Select B, 5 µm, 250x4mm, Gradient: 0-15 min, 10-25% B; 15-25 min, 25-50% B; A = 0.005 M Citratpuffer pH 3, B = CH₃CN, $k' = 6.6$).

4.4 *Reinigung der Immunglobuline mittels Ultrafiltration und Dialyse sowie Bestimmung der Proteinkonzentration*

Immunglobulin G (IgG_{2a}) wurde als Kulturüberstand sowie in gereinigter Form (Affinitätschromatographie, Protein A-Säulen) in Konzentrationen 0.1 - 0.7 mg/ml (0.1 M Citratpuffer, pH 6-7) von Institut für Biotechnologie zur Verfügung gestellt. Nachdem sich eine Ultrafiltration mittels Micron-30-Filtern (Amicon, USA) zur Reduzierung der Citratkonzentration als ungeeignet erwiesen hatte, wurden die vereinigten Lösungen 24 h gegen H₂O und anschließend 24 h gegen PBS-Puffer dialysiert.

Die Konzentrationsbestimmung der durch Dialyse gereinigten IgG_{2a}-Lösung erfolgte photometrisch. Hierzu wurde zuerst die Absorption bei 280 nm (Tyr, Trp) als Funktion der HSA-Konzentration ($n=3$) bestimmt und durch eine Auftragung $\lg(\text{Absorption})$ gegen $\lg(\text{HSA-Konz.})$ der lineare Meßbereich des Photometers (0.1 - 3 mg Protein /ml PBS) bestimmt (Abb.40).

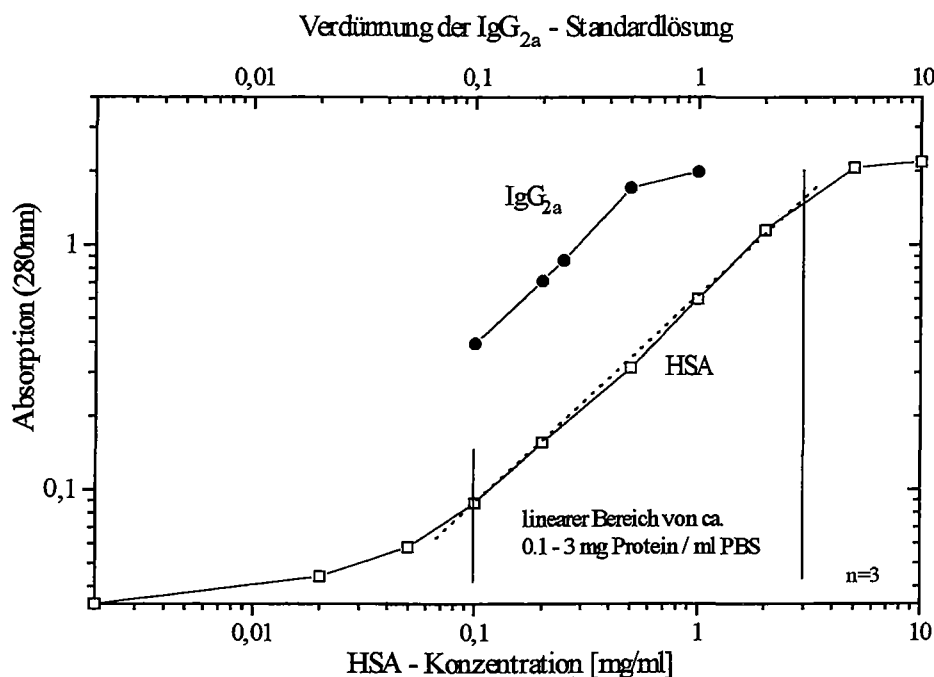


Abb.40: Bestimmung des linearen Meßbereichs des Photometers bei 280 nm zur Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinlösungen

Anschließend wurde die Absorption ($n=3$) verschiedener IgG_{2a}-Lösungen (Verdünnungsreihe 1, 0.5, 0.2, 0.25, 0.1) bestimmt und über die Werte innerhalb des linearen Bereichs die Konzentration der Standardlösung zu 5.96 mg IgG_{2a} / ml PBS errechnet.

Zu Vergleichszwecken erfolgte in gleicher Weise die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Lösung des monoklonalen Antikörpers Anti-HSA-IgG (Monoclonal Anti-Human Serum Albumin, A-6684, Sigma Immunochemicals), welcher für die Bestimmung des Erhalts der biologischen Aktivität von ¹³¹I-markiertem HSA mittels Immunpräzipitation diente. Nach obiger Methode wurde die Gesamtproteinkonzentration mit 28.3 mg/ml bestimmt (Herstellerangabe: Gesamtprotein 28.5 mg/ml, hiervon 3.6 mg/ml Anti-HSA-IgG).

Zur Markierung des 'Granulocyten spezifischen' monoklonalen Antikörpers MAb BW 250/183 (Behringwerke AG, Marburg), welcher freundlicherweise von Prof. Dr.S.N.Reske, Ulm, zur Verfügung gestellt wurde, wurde die gewünschte Menge des lyophilisierten MAb (mit Phosphatpuffer und Sorbitol) aus Vial 1 des käuflich zu erhaltenden ^{99m}Tc-Markierungskits direkt verwendet.

4.5 *Bestimmung der biologischen Aktivität eines ¹³¹I-markierten Anti-HSA-IgG_E mittels Immunpräzipitation*

Die Bestimmung des Erhalts der biologischen Aktivität des ¹³¹I-markierten monoklonalen Antikörpers Anti-HSA-IgG (Monoclonal Anti-Human Serum Albumin, A-6684, Sigma

Immunochemicals), welcher durch ^{131}I -Iodacylierung mit 3-(3-[^{131}I]Iod-4-methoxyphenyl)propionsäure-N-succinimidylester nach einer zur ^{18}F -Fluoracylierung von Proteinen analogen Methode dargestellt wurde, erfolgte mittels Affinitätschromatographie an einer HSA-Sephrose Matrix. Hierzu wurde 1.5 ml (18 μmol aktivierte Funktionen) 'Aktivierte CH-Sephrose 4B' (über Aminofunktion polymer gebundener 6-Aminohexansäure-N-succinimidylester, Pharmacia, Schweden) mit 20 ml 1% HOAc versetzt und 10 min gerührt. Anschließend wurde mit einem Glasfalteriegel (Nr.3) filtriert und mit 10 ml PBS-Puffer pH 7.0 gewaschen. Es wurden 100 mg HSA in 10 ml Puffer pH 8.0 gelöst, das gewaschene Harz zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach einer weiteren Stunde wurde 1 g Lysin in 3 ml Puffer pH 9.0 zugesetzt (zur Umsetzung der freien Esterfunktionen) und wiederum 1 h mit gelegentlichem Schütteln stehengelassen. Dann wurde wieder filtriert, mit 30 ml Puffer pH 7.0 langsam nachgewaschen, in 10 ml PBS-Puffer suspendiert und das Produkt in dieser Form im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität des markierten Antikörpers wurden ca. 200 μl der Harzsuspension in ein Eppendorfgefäß gegeben und zur Entfernung von nicht polymergebundenem HSA mit ca. 1.5 ml PBS-Puffer versetzt und geschüttelt, zentrifugiert und anschließend der Überstand dekantiert. Dieser Waschvorgang wurde nochmals wiederholt und der Zentrifugationsrückstand mit 1.5 ml PBS-Puffer aufgenommen. Hierzu wurden 10-100 μl der ^{131}I -MAb - Lösung gegeben (Proteinfraction nach Gelfiltrationschromatographie) und 3 min geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert, dekantiert, der Rückstand wieder mit 1.5 ml PBS-Puffer aufgenommen, nochmals leicht geschüttelt (ca. 10 sec), zentrifugiert und dekantiert. Die Überstände wurden vereinigt, der Rückstand mit ca. 2 ml PBS-Lösung versetzt und anschließend die Aktivität beider Fraktionen bestimmt. Die biologische Aktivität (%) ergab sich aus dem Quotienten (Sephrose-gebundenen Aktivität / Aktivität in den vereinigten Überständen).

4.6 *HPLC und Radio-HPLC*

Zur Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde ein Merck-Hitachi Gradientensystem (UV-Detektor: L-4000, Pumpen: L-6000 und L6200A) verwendet, welches bei einfacheren Trennungen isokratisch betrieben wurde. Zur Probenaufgabe wurde ein Rheodyne Injektor (7125) benutzt. Die kontinuierlichen Radioaktivitätsmessung erfolgte mittels eines NaI(Tl)-Bohrloch Szintillationsdetektors, welcher dem UV-Detektor nachgeschaltet wurde. Teilweise erfolgte die Bestimmung der radiochemischen Ausbeute durch Aliquotinjektion. Hierzu war zwischen Trennsäule und UV-Detektor ein zweiter Injektor installiert.

Die Detektoren waren mit einem Personal Computer verbunden, welcher durch eine HPLC-Software (Ramona) der Firma Nuclear Interface (Datentechnik für Strahlenmeßgeräte GmbH) eine Bearbeitung und quantitative Auswertung der Meßdaten erlaubte.

Zur Trennung der Proben wurden folgende HPLC-Säulen verwendet:

‘Reversed Phase’ Chromatographie: LiChrosorb RP-18, 7 μ m, 250 x 4 mm, ⁽¹⁾
 LiChrosorb RP-18, 10 μ m, 250 x 10 mm ⁽¹⁾
 LiChrosorb RP Select B, 250 x 4 mm, ⁽¹⁾
 LiChrosorb RP Select B, 125 x 8 mm ⁽¹⁾
 LiChrospher WP-300 RP-18, 5 μ m, 250 x 4 mm ⁽²⁾
 Gelfiltrationschromatographie: Bio-Sil SEC 250, 300 x 7.8 mm ⁽³⁾
 Hi-Trap Desalting, 1.6 x 2.5 cm ⁽⁴⁾

(1) CS-Chromatographie-Servive, Langerwehe; (2) Merck, Darmstadt; (3) BioRad, USA (4) Pharmacia Biotech, Schweden

Die Flußraten betrugen 1.0 ml/min bei Anwendung der analytischen RP-Säulen und der hochauflösenden Gelchromatographie, 4-5 ml zur Gelchromatographie mit den HiTrap-Kartuschen sowie bis zu 7 ml/min zur semipräparativen RP-Chromatographie.

4.7 *Radiopharmakologische Untersuchungen*

4.7.1 *Bestimmung der metabolischen Stabilität in Blut, Hirn, Leber, Nieren, Tumor und Urin.*

Zur Bewertung der metabolischen Stabilität einiger Tracer wurden Urin-, Nieren, Leber-, und Blutproben sowie im Falle des ¹⁸F-markierten SMS-201-995 auch Tumorproben 60 bzw. 120 min p.i. (Mäuse und Ratten) mittels HPLC untersucht.

Die Urinproben wurden direkt aus der Blase der Versuchstiere entnommen. Die Metabolitenanalyse der Blutproben erfolgte nach Zentrifugation am Plasma. Zur Analyse der in Leber, Nieren und Tumor lokalisierten Aktivität wurden ca. 0.2 g schwere Gewebeproben 60 und 120 min p.i. entnommen und nach Zugabe von 2 ml CH₃CN/MeOH (50/50; v/v) homogenisiert. Nach Zentrifugation dieser Suspensionen wurden Aliquote der überstehenden Lösung Radio-HPLC-chromatographisch analysiert.

Handelte es sich um ¹⁸F-markierte Proteine, so wurde die proteingebundene Aktivität im Blutplasma (nach Zentrifugation) mittels Gelfiltration bestimmt.

4.7.2 *Quantifizierung des Einbaus von O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-tyrosin in zerebrale Proteine*

Zur Bestimmung des proteingebundenen Anteils der ¹⁸F-Aktivität im Hirn von NMRI-Mäusen wurden 40 Minuten p.i. des Tracers Hirnproben entnommen, in einen Milliliter destilliertes Wasser gegeben und zur Unterbindung aller enzymatischen Prozesse sofort auf 0°C abgekühlt.

Nach Homogenisierung mittels einer Ultraschallsonde und einer Proteinfällung durch Zugabe von Trichloressigsäure wurden die Proben zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Proteinpellet nochmals mit Trichloressigsäure gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum dekantiert und der Rückstand nochmals mit 500 µl Wasser gewaschen. Abschließend wurde die ^{18}F -Aktivität der vereinigten Überstände und des festen Rückstands im γ -Counter bestimmt.

4.7.3 *Bestimmung des Lipophilie von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin und (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995)*

Zur Bestimmung der Lipophilie wurden die ^{18}F -markierten Verbindungen HPLC-chromatographisch gereinigt und etwa 10 µl der erhaltenen Fraktion zu einem Zweiphasengemisch aus je 1 ml isotonischer Kochsalzlösung und n-Oktanol gegeben. Dieses Gemisch wurde anschließend 3 min bei Raumtemperatur geschüttelt und zur vollständigen Phasentrennung zentrifugiert. Anschließend wurde der Verteilungskoeffizient durch Bestimmung der Radioaktivität an Aliquoten beider Phasen bestimmt (n=4). Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in einem γ -Probenwechsler der Firma Packard.

4.7.4 *Bestimmung der spezifischen Aktivität einiger untersuchter Tracer*

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivitäten einiger untersuchter Tracer wurden mittels der entsprechenden Referenzverbindungen Eichgeraden zur Massendetektion via HPLC ermittelt. Hierzu wurden bei geeigneter Wellenlänge die Peakflächen der UV-Signale gegen die jeweils injizierte Masse aufgetragen. Anschließend wurde durch lineare Regression die jeweilige Geradengleichung bestimmt. Anhand der ermittelten UV-Peakflächen von Proben verschiedener Tracerpräparationen wurde dann die spezifische Aktivität [$\text{Ci} / \mu\text{mol}$] bestimmt.

Spezifische Aktivität von 4-Azidophenacyl-[^{18}F]fluorid

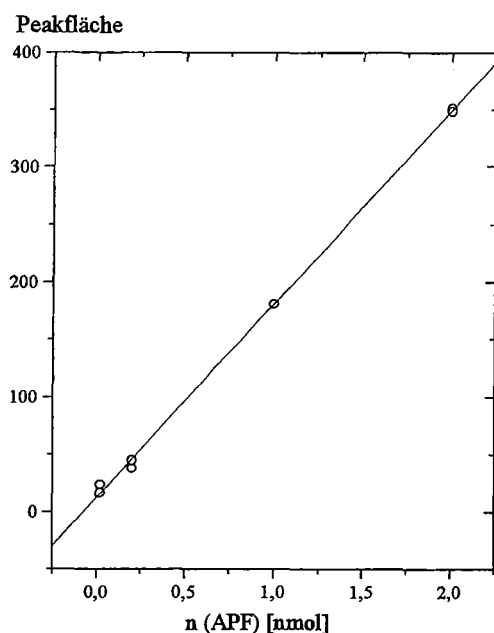


Abb. 41: Eichgerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von 4-Azidophenacyl-[^{18}F]fluorid (UV-Detektion bei 280 nm).

Lineare Regression: $Y = A + B \cdot X$;
 $A = 12.63 \pm 2.75$; $B = 168.68 \pm 2.42$;
 $R = 0,99949$, $N = 7$

Anhand dieser Eichgerade wurde an zwei verschiedenen Tagen für injizierte Aktivitäten von 116.6 μCi und 110.2 μCi (4.3 bzw. 4.1 MBq) spezifische Aktivitäten von 3.3 und 5.5 $\text{Ci} / \mu\text{mol}$ APF (122 und 203 GBq / μmol APF) ermittelt. Daraus folgt:

$$A_s ([^{18}\text{F}]\text{APF}) > 122 \text{ GBq} / \mu\text{mol} \\ (> 3.3 \text{ Ci} / \mu\text{mol})$$

Spezifische Aktivität von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester

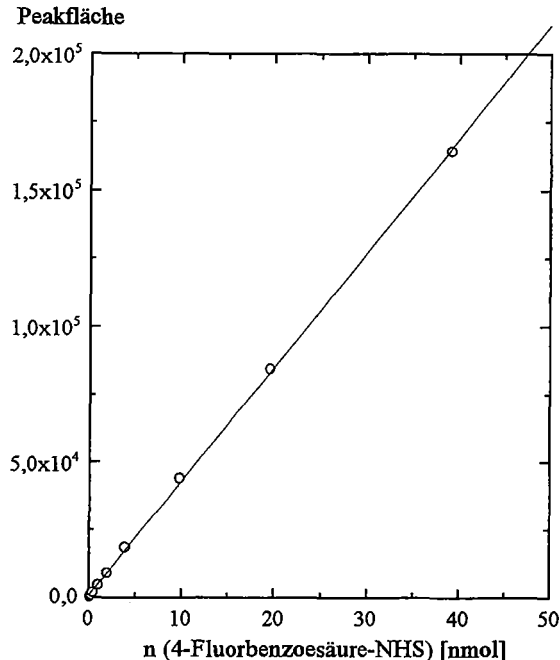


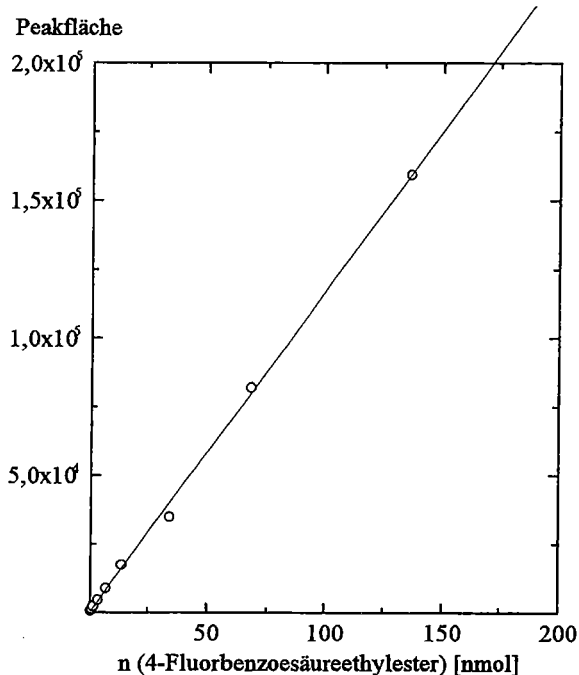
Abb. 42: Eichgerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester (UV-Detektion bei 254 nm).

Lineare Regression: $Y = A + B \cdot X$;
 $A = 1018 \pm 462$; $B = 4196 \pm 31$;
 $R = 0,99981$, $N = 9$

Für eine injizierte Aktivität von 1.336 mCi (49.4 MBq) wurde eine spezifische Aktivität von 1.96 $\text{Ci} / \mu\text{mol}$ 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester (72.8 GBq / μmol) ermittelt. Daraus folgt:

$$A_s ([^{18}\text{F}]\text{SFB}) \approx 70 \text{ GBq} / \mu\text{mol} \\ (\approx 2.0 \text{ Ci} / \mu\text{mol})$$

Spezifische Aktivität von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäureethylester



Lineare Regression: $Y = A + B \cdot X$;

$A = 244 \pm 881$, $B = 1166 \pm 17$;

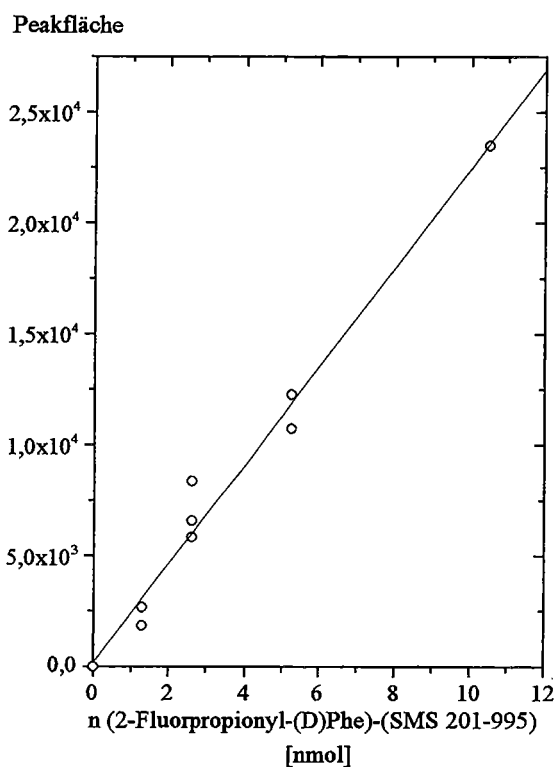
$R = 0,99927$, $N = 9$

Anhand dieser Eichgerade wurde für eine injizierte Aktivität von 1.563 mCi (57 GBq) eine spezifische Aktivität von 5.1 Ci / μmol 4-Fluorbenzoesäureethylester (188 GBq/ μmol) errechnet. Daraus folgt:

$$A_s (4-[^{18}\text{F}]\text{Fluorbenzoesäureethylester}) \approx 180 \text{ GBq} / \mu\text{mol} (\approx 5.0 \text{ Ci} / \mu\text{mol})$$

Abb. 43: Eichgerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäureethylester (254 nm).

Spezifische Aktivität von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl)-(D)Phe¹-(SMS 201-995)



Lineare Regression: $Y = A + B \cdot X$;

$A = 179 \pm 587$; $B = 2227 \pm 127$;

$R = 0,98865$, $N = 9$

Die Bestimmung der spezifische Aktivität von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl)-(D)Phe¹-(SMS 201-995) wurde an verschiedenen Präparationen durchgeführt, welche auch für in vivo Experimente verwendet wurden. Hierbei wurde eine mittlere spez. Akt. von 1.2 Ci/ μmol (44.4 GBq/ μmol) ermittelt. Bei keiner Synthese wurde eine spez. Aktivität $A_s < 1.0 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$ (37 GBq/ μmol) festgestellt. Die spez. Akt. des Acylierungsagens [^{18}F]NPFP wurde mit ca. 1.7 Ci/ μmol (63 GBq/ μmol) angegeben [75].

$$A_s ([^{18}\text{F}]\text{SMS 201-995}) \approx 44 \text{ GBq} / \mu\text{mol} (\approx 1.2 \text{ Ci} / \mu\text{mol})$$

Abb. 39: Eichgerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl)-(D)Phe¹-(SMS 201-995) (254 nm).

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die trägerfreie (n.c.a.) Darstellung von ^{18}F - ($t_{1/2} = 109.7$ min) markierten Proteinen, Peptiden und Tyrosinderivaten als potentielle Tracer für den Einsatz in der nuklearmedizinischen Diagnostik mittels der Positronenemissionstomographie (PET) untersucht. N.c.a. ^{18}F -Fluorid wurde über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion in einem H_2^{18}O Target am Babycyclotron BC 1710 des Instituts für Nuklearchemie des Forschungszentrums Jülich GmbH erzeugt.

Zur Entwicklung einer für die routinemäßige ^{18}F -Markierung von Proteinen geeigneten Synthese wurden zunächst alle bisher bekannten ^{18}F -Proteinmarkierungsverfahren bewertet. Anhand verschiedener Kriterien, wie Synthesedauer, radiochemische Ausbeuten (RCA), Automatisierbarkeit der Synthese der ^{18}F -markierten prosthetischen Gruppe und des Proteinmarkierungsschrittes sowie potentielle in vivo-Stabilität der Konjugate wurde gezeigt, daß nur die ^{18}F -Fluoracylierungsagenzien 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester (^{18}F -SFB), 4- ^{18}F -Fluormethylbenzoesäure-N-succinimidylester und 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester (^{18}F -NPFP) geeignete Voraussetzungen besitzen.

Überlegungen zur spezifischen Aktivität von Polypeptiden zeigten, daß ein Erhalt der biologischen Aktivität eines ^{18}F -markierten Proteins nur bei Verwendung von ^{18}F -Markierungsagenzien mit spezifischen Aktivitäten > 37 GBq/ μmol zu erwarten ist. Es wurde deshalb eine dreistufige Synthese entwickelt, welche die Darstellung von 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester in einer RCA von 50% bei einer Gesamtsynthesezeit von 35 min und einer spezifischen Aktivität (A_s) von 70 GBq/ μmol ohne abschließende HPLC-Reinigung erlaubt.

Mit dem Ziel, eine photochemische Konjugation durchzuführen, wurde zunächst als ^{18}F -markierte prosthetische Gruppe zur Markierung von Proteinen 4-Azidophenacyl- ^{18}F -fluorid (^{18}F -APF) über eine nukleophile ^{18}F -für-Br Substitution dargestellt (15 min, 70% RCA, $A_s=122$ GBq/ μmol). Durch Photolyse von ^{18}F -APF in Gegenwart wässriger Lösungen von Humanserumalbumin, Transferrin, Avidin und Immunglobulinen konnten ^{18}F -Konjugationsausbeuten von bis zu 30% erhalten werden. Mittels dieser neuen 'photochemischen Konjugation' (PCC) zur Proteinmarkierung konnte die Gesamtsynthesezeit zur Darstellung ^{18}F -markierter Proteine um mehr als 65% reduziert werden.

Durch einen anschließenden Vergleich der Proteinmarkierungsreaktion via ^{18}F -Fluoracylierung (^{18}F -SFB und ^{18}F -NPFP) und photochemischer Konjugation (^{18}F -APF) konnte gezeigt werden, daß eine hohe radiochemische Konjugationsausbeute mit ^{18}F -APF nur bei Proteinen mit hohem Lysingehalt (>700 - 800 nmol Lys / mg Protein; z.B. HSA: 30% RCA bei 2 mg HSA/100 μl Puffer) erzielt werden kann. Gleiches konnte für ^{18}F -Acylierungen mit ^{18}F -NPFP

festgestellt werden (HSA: 20 RCA bei 1 mg HSA / 100µl Puffer). Eine Verbesserung der RCA auf 62% konnte zwar, wie erwartet, bei [^{18}F]NPFP durch Anwesenheit des Aminolysekatalysators 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) erreicht werden, doch führte diese Katalyse nur bei Proteinen mit niedrigem Tyrosin- und Histidingehalt (z.B. Avidin) zu einer stabilen Proteinmarkierung. Bei ^{18}F -Fluorpropionylierungen von HSA und Immunglobulin G (IgG) in Gegenwart von HOBt wurde dagegen die Bildung hydrolyseempfindlicher (in vitro und in vivo instabiler) Konjugate festgestellt. Anhand einer systematischen Analyse der Ergebnisse konnten diese Befunde einer vermehrten O-Acylierung (Tyrosylgruppen) und N^{im}-Acylierung (Histidylgruppen) der untersuchten Proteine bei Verwendung von [^{18}F]NPFP / HOBt zugeschrieben werden.

Im Unterschied zu [^{18}F]APF und [^{18}F]NPFP konnten mit [^{18}F]SFB alle untersuchten Proteine schon bei niedrigen Konzentrationen in hohen radiochemischen Ausbeuten markiert werden (z.B. 0.25 mg IgG/100µl Puffer: 54% RCA). Untersuchungen zur in vitro und in vivo Stabilität der Produkte zeigten, daß die [^{18}F]SFB - Konjugate im Vergleich zu den [^{18}F]APF und [^{18}F]NPFP - Proteinkonjugaten die höchste Stabilität besitzen. Aufgrund einer in dieser Arbeit verbesserten Synthese von [^{18}F]SFB, den hohen radiochemischen Konjugationsausbeuten und der hohen Stabilität der Konjugate stellt [^{18}F]SFB daher das z.Z. geeignetste Proteinmarkierungsmittel dar.

Zur Isolierung ^{18}F -markierter Proteine wurde ein Trennverfahren entwickelt, welches eine Abtrennung der niedermolekularen, ^{18}F -markierten Verbindungen in 30-60 s ermöglicht. Dies stellt im Vergleich zu den bisher angewandten Trennverfahren eine Reduzierung der Trennzeit um ca. 90% auf ca. 30-60 s dar.

Die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der speziellen Eigenschaften der verschiedenen prosthetischen Gruppen, wie Reaktivität, in vivo-Stabilität, Lipophilie und Sterik, wurden anschließend auf die ^{18}F -Markierung der Peptide Octreotid (SMS 201-995) und Apamin angewandt.

Die Darstellung des ^{18}F -markierten Tumormarkers SMS-201-995 erfolgte zur Vermeidung einer unerwünschten Derivatisierung innerhalb der pharmakophoren Sequenz über die ^{18}F -Acylierung eines tert.-Butyloxycarbonylgeschützten (SMS-201-995)-Vorläufers.

Als Markierungsmittel wurde aufgrund der günstigen Sterik und der geringen Lipophilie [^{18}F]NPFP verwendet. Eine Instabilität der Konjugation war in diesem Fall nicht zu befürchten, da SMS-201-995 (ein Oktapeptid) weder Tyrosyl- noch Histidylgruppen besitzt.

Diese zweistufige Synthese, welche die Acylierung des Vorläufers und die anschließende Abspaltung der Schutzgruppe beinhaltet, konnte ausgehend von [^{18}F]NPFP in einer Syntheszeit von 35 min mit 68% RCA durchgeführt werden. Anhand der Untersuchungen zur ^{18}F -Acylierung von SMS 201-995 konnte die Nützlichkeit eines Modells dargestellt werden,

welches eine semiquantitative Bewertung der Syntheseparameter (Lösungsmittel, sterische Hinderung der Acyl- und Aminkomponente, Aktivierung der Acylkomponente) erlaubt, die die radiochemische Ausbeute einer Acylierungsreaktion beeinflussen.

Durch einen Vergleich der durch die Firma Sandoz, Basel, bestimmten biologischen Aktivität und der Rezeptoraffinität des fluorpropionylierten-SMS-201-995 mit anderen SMS-201-995-Analoga konnten Aussagen zur Abhängigkeit der beiden Parameter von Nettoladung, Sterik der prosthetischen Gruppe und Lipophilie des Produktes gemacht werden, welche erstmals ein qualitatives Verständnis der experimentell ermittelten biologischen Aktivitäten und Rezeptoraffinitäten ermöglicht.

Die Untersuchung der in vivo-Stabilität des Tracers an NMRI-Mäusen umfaßte die Bestimmung der metabolischen Stabilität in Blut, Urin, Nieren, Leber und Tumor mittels HPLC. Hierbei konnte gezeigt werden, daß ^{18}F -Fluorpropionyl-SMS 201-995 über den gesamten Beobachtungszeitraum (120 min) nahezu unverändert vorliegt und weder Fragmentierung, noch Defluorierung zu beobachten ist. Ebenso konnte durch Blockade- und Verdrängungsexperimente die spezifische Bindung des ^{18}F -markierten Derivats in Somatostatinrezeptor positiven Organen, wie Pankreas, Nebennieren und Hypophyse nachgewiesen werden.

Zur ^{18}F -Markierung von Apamin, einem zentral wirksamen selektiven Blocker von Kaliumkanälen, wurde aufgrund der bisherigen Befunde die Markierung mittels [^{18}F]SFB vorgezogen. Zur ebenfalls durchgeführten Radioiodierung von Apamin wurde ein modifiziertes Bolton-Hunter-Markierungsgagens, 3-(3-[^{131}I]Iod-4-methoxyphenyl)propionsäure-N-succinimidylester, dargestellt. Dieses ermöglicht im Gegensatz zu Direktiodierung von Apamin mittels Chloramin-T oder Iodo-Gen die Darstellung eines radioiodierten Apaminderivates mit hoher in vivo-Stabilität. Wie anhand einer vergleichenden Betrachtung der Abhängigkeit der radiochemischen Acylierungsausbeute von der eingesetzten Apaminkonzentration gezeigt wurde, erlaubt dieser aliphatische, radioiodierte Ester eine Konjugation mit deutlich höherer RCA.

Vorläufige in vivo-Studien an NMRI Mäusen deuten auf eine geringe, jedoch signifikante Aktivitätsakkumulation des ^{18}F -markierten Apamins im Hippocampus hin. Eine hippocampale Aktivitätsanreicherung konnte zwar auch für das radioiodierte Derivat festgestellt werden, doch deutet ein Vergleich der Aktivitätsakkumulation mit der Rezeptordichte auf eine signifikante, unspezifische Bindung des radioiodierten Derivates hin.

Abschließend wurde zur Darstellung eines ^{18}F -markierten Tyrosinanalogs die ^{18}F -Fluorethylierung der Phenolfunktion des Tyrosins untersucht. Hierzu wurden zwei verschiedene Synthesestrategien verfolgt: die ^{18}F -Fluorethylierung von N-tert-Butyloxycarbonyl-geschützten Tyrosinmethylester mit anschließender Abspaltung der Schutzgruppen sowie die direkte ^{18}F -Fluorethylierung des ungeschützten Tyrosins. Über den

erstgenannten Syntheseweg konnte O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin bei einer Gesamtsynthesedauer von 60 min in einer RCA von 35% dargestellt werden. Dagegen ergab die direkte, selektive ^{18}F -Fluorethylierung von Tyrosin, welche in DMSO am Natriumsalz des Tyrosins durchgeführt werden konnte, eine RCA von 72% bei einer Gesamtsynthesezeit von nur 50 min. Somit kann L-Tyrosin auf sehr effiziente Weise durch Fluorethylierung ^{18}F -markiert werden. Eine HPLC-analytische Untersuchung der im Hirn von NMRI-Mäusen lokalisierten Aktivität ergab, daß es sich nahezu ausschließlich um O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin handelt.

6. Anhang

6.1 *In vivo Studien mit (2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995)*

Im Tiermodell wurde das in vivo-Verhalten von (2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-SMS 201-995 überprüft. Hierzu wurde die Biodistribution, die in vivo-Stabilität des Tracers und die Aktivitätsanreicherungsverhältnisse (Tumor/Organ) mit bereits entwickelten sowie in der Entwicklung befindlichen radiopharmazeutischen Analoga von SMS 201-995, wie [¹²³I]SDZ 204-090 [163], [¹¹¹In]SDZ 215-811 [164], [^{67/68}Ga]SDZ 216-927 [165] und [^{86/90}Y]SDZ 215-811 [167] verglichen.

6.1.1 *Bestimmung der Biodistribution von (2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-SMS 201-995 in NMRI-Mäusen*

Jeweils 50-100 kBq einer isotonischen NaCl-Lösung von (2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-SMS 201-995 wurden i.v. in die Schwanzvene von NMRI-Mäusen (28-34g) injiziert. 5, 10, 20 und 60 min nach Injektion (p.i.) wurden die Tiere getötet und die zur Untersuchung relevanten Organe, wie Leber, Nieren, Darm etc. sowie Blut-, Urin- und Knochen-Proben entnommen. Die ¹⁸F-Aktivität der ausgewogenen Proben wurde anschließend im γ -Counter gemessen und hieraus die relative Organverteilung in Prozent der injizierten Dosis pro Gramm (ID/g[%]) errechnet ($\bar{x} \pm s$, n=3).

Ein hoher Anteil der applizierten ¹⁸F-Aktivität ist während der ersten 10min in Leber und Nieren lokalisiert (Tab. 20). Während die Werte für diese Organe im Untersuchungszeitraum von 60 min auf 11.1 bzw 2.9% ID/g abnehmen, steigt die ¹⁸F-Aktivität im Darm von 6% ID/g nach 5 min binnen 60 min auf 20% ID/g an.

Ebenso ist eine sehr rasche Blut-Clearance zu beobachten. Die geringe ¹⁸F-Aktivität in den Knochen, die einen Wert von ca. 3% ID/g binnen 60 min nicht übersteigt, deutet auf eine untergeordnete metabolische Hydrolyse des Tracers unter Abspaltung von [¹⁸F]Fluorid hin. Die Aktivitätsaufnahme in allen anderen Organen ist mit max 3% ID/g nach 20 min und 2% ID/g innerhalb von 60 min gering.

Tab. 20: Biodistribution der ^{18}F -Aktivität nach intravenöser Applikation von (2- ^{18}F Fluorpropionyl-(D)Phe 1)-SMS 201-995 in NMRI-Mäuse

Organ	injizierte Dosis / g [%] ($\bar{x} \pm s.$, n=3)			
	5 min	10 min	20 min	60 min
Darm	5.4 $\pm$ 1.4	9.9 $\pm$ 1.7	18.6 $\pm$ 2.6	20.0 $\pm$ 3.7
Leber	25.4 $\pm$ 4.3	22.3 $\pm$ 5.3	15.1 $\pm$ 1.1	11.1 $\pm$ 4.6
Nieren	18.4 $\pm$ 2.6	13.5 $\pm$ 1.5	6.0 $\pm$ 0.9	2.9 $\pm$ 0.2
Lunge	5.2 $\pm$ 0.6	4.0 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.2
Milz	1.6 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$.9	0.8 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.2
Herz	1.6 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
Nebennieren	2.5 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 1.2	1.6 $\pm$ 0.6	
Thymus	2.3 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2
Pankreas	4.9 $\pm$ 2.0	3.1 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.5
Hirn	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Blut	4.3 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.04
Urin	271 $\pm$ 349	481 $\pm$ 258	480 $\pm$ 160	316 $\pm$ 66
Knochen	1.6 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.3

Wie im Ergebnisteil bereits erwähnt, wird das Verhältnis der renalen / hepatobiliären Ausscheidung eines Radiopharmakons von seiner Lipophilie beeinflusst. So konnte an perfundierten Rattenlebern (Messung der Aktivität in der mittels einer Kanüle gesammelten Gallenflüssigkeit) [170] gezeigt werden, daß nach 60 min ca. 70% [^{131}I]SDZ 204-090 dem Perfusionsmedium über die Leber entzogen wurde. 60% der ursprünglichen Aktivität konnte in der Gallenflüssigkeit nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu verringerte sich die ^{111}In -Aktivität im Perfusionsmedium 1h nach Zugabe von [^{111}In]SDZ 215-811 nur um 5.1%.

Das Ausmaß der hepatobiliären Ausscheidung von (2- ^{18}F Fluorpropionyl-(D)Phe 1)-(SMS 201-995) ist in Abbildung 45 anhand der Aufnahmekinetiken des Tracers in Leber, Gallenflüssigkeit und Darm von NMRI-Mäusen dargestellt (n=2). Der Tracer zeigt bereits 5 min nach Injektion eine hohe Anreicherung in der Leber mit einer Aktivitätskonzentration von ca. 20% iD/g. In gleicher Weise nimmt die ^{18}F -Aktivität in der Galle zu und weist bei 20 min ein Maximum auf, welches im Vergleich zur ^{18}F -Aktivität im Darm um 10 min verzögert erscheint. Die Aktivitätskonzentration im Darm nimmt dagegen, beginnend bei 2% iD/g 5 min p.i., stetig zu und erreicht 120 min p.i. einen Wert von 14 $\pm$ 4% iD/g. Diese ^{18}F -Konzentration entspricht ca. 45% der applizierten Gesamtaktivität 120 min p.i.. Weitere 15% der applizierten Gesamtaktivität befinden sich 120 min p.i. in der Leber.

(2- ^{18}F Fluorpropionyl-(D)Phe 1)-(SMS 201-995) zeigt somit ein zu [^{123}I]SDZ 204-090 analoges Verhalten und wird hauptsächlich hepatobiliär ausgeschieden.

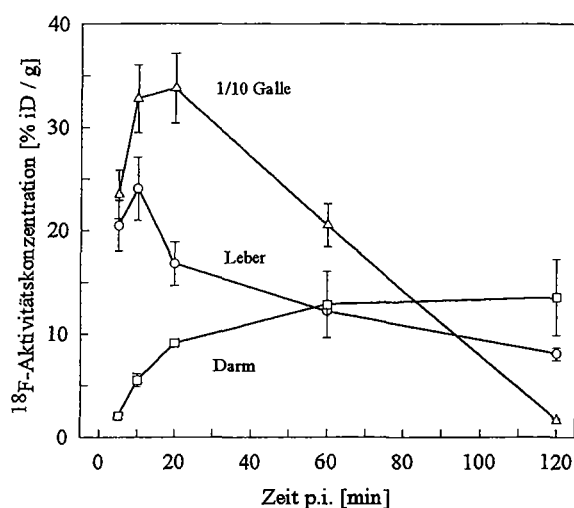


Abb. 45: Hepatobiliäre Ausscheidung von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995). Aufnahmekinetik des Tracers in Leber, Galle, und Darm von NMRI-Mäusen. (die Werte für die Aufnahme des Tracers in der Galle sind mit 10 zu multiplizieren)

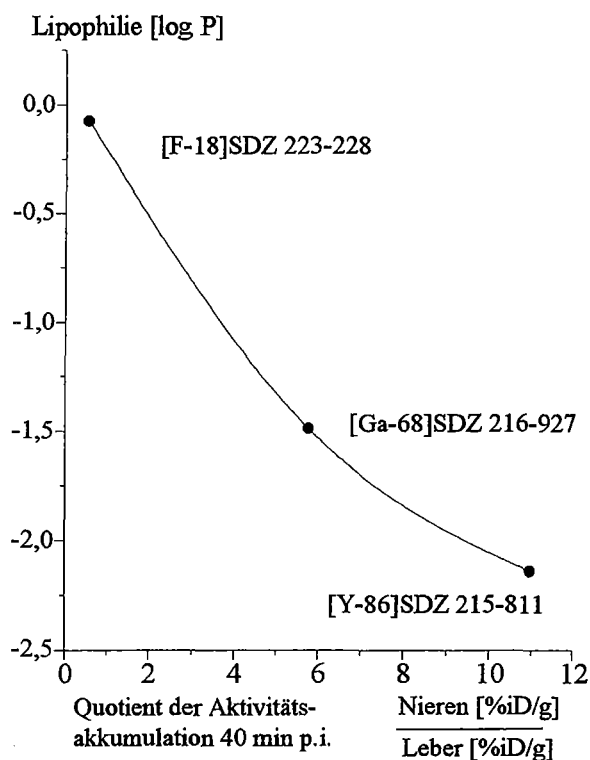


Abb. 46:

Einfluß der Lipophilie verschiedener markierter Derivate von SMS 201-995 auf das Verhältnis der Aktivitätskonzentration (Nieren [%iD/g] / Leber [%iD/g]) 40 min p.i. (Ratten)

Lit.: [Ga-86]SDZ 216-927 und [Y-86]SDZ 215-811 [185,167]

Der Einfluß der Lipophilie auf das Verhältnis der Aktivitätskonzentration (Nieren [%iD/g] / Leber [%iD/g]) (40 min p.i., Ratten) für verschiedene markierte Derivate von SMS 201-995 ist in Abb. 46 dargestellt. Sie zeigt eine mit abnehmender Lipophilie deutlich erhöhte renale Akkumulation und bestätigt die im Ergebnisteil geäußerte Vermutung, daß (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) aufgrund seiner hohen Lipophilie ($\log P = -0.07 \pm 0.01$) eine signifikant verringerte renale Ausscheidung aufweisen sollte.

6.1.2 Bestimmung der Biodistribution und Pharmakokinetik von (2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) in Kontrollratten und tumortragenden Ratten

Zur Bestimmung der Biodistribution wurde Kontrollratten (Lewis-Ratten, männlich, 240-260g) nach Betäubung mit Isofluran (1min) und Narkose (durch Injektion von 1-2ml einer 0.9% NaCl-Lösung von Pentobarbital (60mg/ml)) ca. 200µl einer isotonischen NaCl-Lösung von (2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) mit einer Aktivität von 200-250 µCi i.v. (vena jugularis) injiziert. 60 und 120 min p.i. wurden die Tiere getötet und die Aktivitätskonzentrationen der Organe bestimmt. In gleicher Weise wurde die Biodistribution von n.c.a.(2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) in Ratten (240-270g) mit einem exokrin-pankreatischen Inselzellen-Tumor bestimmt.

Wie anhand der Tabelle 21 zu erkennen ist, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Biodistribution der tumortragenden Ratten und Kontrollratten festgestellt werden. Desweiteren sind die relativen Aktivitätsverteilungen in den Organen tendentiell analog den bei NMRI-Mäusen bestimmten Daten.

Tab. 21: Ex vivo Biodistribution von (2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) in 'Tumorratten' (exokrin pankreatischer Inselzellentumor) und Kontrollratten 60 und 120 min. p.i. (%iD/g (x±s); n=3; Kontrolle bei 120 min : n=1)

Organ	Tumor-Ratten		Kontroll-Ratten	
	60 min p.i.	120 min p.i.	60 min p.i.	120 min p.i.
Hypophyse	0.71±0.03	0.69±0.37	1.27±0.21	1.42
Hirn	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01
Knochen	0.04±0.01	0.05±0.01	0.17±0.14	0.03
Darm	1.90±0.34	1.79±0.24	6.30±2.41(*)	2.57
Pankreas	0.70±0.08	0.34±0.01	1.12±0.41	0.67
Leber	1.23±0.04	1.63±1.41	1.93±0.29	1.11
Blut	0.10±0.03	0.04±0.01	0.12±0.03	0.06
Nieren	1.30±0.13	0.59±0.21	1.04±0.22	1.50
Nebennieren	2.40±0.48	1.07±0.38	2.18±0.27	1.71
Herz	0.06±0.01	0.02±0.01	0.07±0.02	0.04
Lunge	0.14±0.01	0.06±0.01	0.19±0.03	0.09
Tumor	0.52±0.24	0.17±0.04	-	-
Milz	0.21±0.05	0.11 0.02	0.14±0.04	0.07

(*) ohne Blinddarm

Obwohl die Aktivitätsaufnahme im Tumor 60 min p.i. mit $0.52 \pm 0.24\%$ iD/g deutlich über der Aktivitätskonzentration im Blut ($0.10 \pm 0.03\%$ iD/g) liegt und somit ein hinreichend geringer 'Aktivitätsuntergrund' zu erwarten ist, könnten sich die durch die hohen Aktivitätskonzentrationen in Leber, Darm, Niere und Blase ergebenden 'hot spots' als störende Überlagerungen bei PET-Messungen bemerkbar machen. PET-Messungen zu einem späteren Zeitpunkt (z.B. 120 min p.i.) sind wegen der schnellen Abnahme der ^{18}F -Aktivität im Tumor nicht zweckmäßig.

Wie eine Gegenüberstellung der Anreicherungsverhältnisse (Tumor/Organ) von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) (1), [^{67}Ga] SDZ 216-927 (2) und [^{86}Y] SDZ 215-811(3) in Tumorratten 60 und 120min p.i. zeigt (Tab. 22), sind besonders beim ^{18}F -markierten Analogon niedrige Tumor/Darm- und Tumor/Leber-Relationen festzustellen.

Tab. 22: Vergleich der (Tumor/Organ)-Verhältnisse von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-SMS 201-995 (1), [^{67}Ga] SDZ 216-927 (2) und [^{86}Y] SDZ 215-811 (3) in Tumorratten; bestimmt durch ex vivo Biodistribution 60 und 120 min p.i. (n=3) [186]

(Tracer) Zeit p.i.	Tumor / Darm	Tumor / Niere	Tumor / Leber	Tumor / Knochen
(1) 60 min	0.28 ± 0.09	0.40 ± 0.11	0.42 ± 0.19	12.5 ± 2.5
120 min	0.09 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.20 ± 0.08	3.72 ± 0.69
(2) 60 min	5.64 ± 0.69	0.20 ± 0.02	1.09 ± 0.18	3.13 ± 0.35
120 min	4.29 ± 0.39	0.21 ± 0.05	1.05 ± 0.14	2.14 ± 0.20
(3) 60 min	1.93 ± 0.23	0.31 ± 0.05	0.53 ± 0.18	0.23 ± 0.01
120 min	3.90 ± 1.19	0.42 ± 0.02	0.54 ± 0.05	0.25 ± 0.01

6.1.3 Blockade- und Verdrängungs-Studien mit (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995)

Da einige Organe, wie Nebennieren, Pankreas und Hypophyse über eine hohe Dichte an SSTR2 und SSTR5-Rezeptoren verfügen (Tab. 23), konnten die Verdrängungs- und Blockade- Studien zur Bestimmung der spezifischen Bindung von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-SMS 201-995 an normalen (nicht tumortragenden) Ratten durchgeführt werden.

Tab. 23: Distribution der SSTR - mRNA in einigen Organen (Ratte) [215]

Gewebe	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Hypophyse	++	++	+	±	++
Nebennieren	±	++	-	-	+
Pankreas	±	++	++	-	+

Zur Blockade wurden 5 und 10 min vor Injektion des Radiotracers 0.2 mg SMS 210-995 / Ratte intravenös (i.v.) bzw. subcutan (s.c.) injiziert. Verdrängung erfolgte in analoger Weise 5, 10 und 20 min nach Injektion von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995). Die Bestimmung der Aktivitätskonzentration erfolgte in allen Fällen 60 min p.i. des Radiotracers. Die Normierung wurde an Kontrolltieren durchgeführt.

Die Ergebnisse der Blockade- und Verdrängungs - Studien zeigen die Tabellen 21 und 25 sowie Abbildung 47. Eine Blockade 5 min vor Injektion des Tracers führte im Falle der Nebennieren und des Pankreas zu einer deutlich reduzierten ^{18}F -Aktivitätsaufnahme 60 min p.i., während die Aktivitätskonzentration in der Hypophyse nur bei ca. 30% des Kontrollwertes lag. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten, welche für die Blockade mittels 0.2 mg/Ratte i.v. 5 bzw. 10 min vor Applikation des Radiotracers ermittelt wurden, festgestellt werden. Bei subcutaner Injektion ist eine geringere Blockade der SSTR-Rezeptoren zu erkennen. Intravenöse Applikation von 0.4 mg SMS 201-995 / Ratte 5 min vor Injekt. d. Radiotracers verursachte die effizienteste Blockade. Somit wurde für alle drei untersuchten Organe mit hoher SSTR2- und SSTR5-Dichte eine spezifische Bindung von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) nachgewiesen.

Eine Verdrängung von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) konnte ebenfalls in allen drei Organen nachgewiesen werden; diese zeigt jedoch, wie in Abbildung 47 zu erkennen ist, eine deutliche Abhängigkeit von der Zeitdifferenz zwischen Applikation des Radiotracers und Injektion des 'kalten' SMS 201-995. In Analogie zu den Ergebnissen der Blockade-Studie zeigt auch hier die Hypophyse den quantitativ geringsten Effekt.

Die Zeitabhängigkeit, welche bei den Verdrängungsstudien gefunden wurde, deutet auf eine Internalisierung von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) hin. Eine solche, Rezeptor-vermittelte Endozytose wurde bereits für einige iodierte Somatostatine (SS-14 und SS-28) sowohl in vivo für die Hypophyse als auch in vitro an Pankreaszellen (A- und B-Zellen: ca. 60%, D-Zellen ca. 30% Internalisierung von ^{125}I -SS-14 binnen 1h) nachgewiesen [212-214].

Hierbei könnten die unterschiedlichen Internalisierungsraten (siehe Verdrängungsexperimente Abb. 47), welche für das ^{18}F -markierte SMS 201-995 festgestellt wurden, durch die verschiedenen SSTR2- und SSTR5-Rezeptordichten in der Hypophyse, den Nebennieren und dem Pankreas [215] und verschiedenen Endozytoseraten dieser Rezeptorsubtypen verursacht werden (Tabelle 23).

Tab. 24: Blockade- und Verdrängungs-Studien mit (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe 1)-(SMS 201-995) (Ratten, n=3)
Angaben in %iD / Organ (x ($\pm$ s)), 60 min p.i. von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe 1)-SMS 201-995

	Hypophyse	Pankreas	Nebennieren
Kontrolle:	0,0048 (0,0002)	1,0591 (0,1080)	0,0453 (0,0042)
Blockade:			
10 min vor Injektion des Radiotracers:			
0.2 mg SMS 201-995 i.v.	0,0016 (0,0008)	0,0768 (0,0171)	0,0059 (0,0007)
0.2 mg SMS 201-995 s.c.	0,0019 (0,0004)	0,1892 (0,0299)	0,0055 (0,0009)
5 min vor Injektion des Radiotracers:			
0.2 mg SMS 201-995 i.v.	0,0017 (0,0005)	0,0777 (0,0170)	0,0063 (0,0010)
0.4 mg SMS 201-995 i.v.	0,0015 (0,0006)	0,0454 (0,0039)	0,0048 (0,0006)
Verdrängung: 0.2 mg SMS 201-995 i.v:			
5 min nach Injektion des Radiotracers:	0,0030 (0,0002)	0,3007 (0,0062)	0,0093 (0,0007)
10 min nach Injektion des Radiotracers:	0,0036 (0,0001)	0,3436 (0,0134)	0,0105 (0,0009)
20 min nach Injektion des Radiotracers:	0,0043 (0,0007)	0,4455 (0,0021)	0,0131 (0,0005)

Tab. 25: Blockade- und Verdrängungs-Studien mit (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe 1)-(SMS 201-995) (Ratten, n=3).
Angaben in % der Kontrolle, 60 min p.i. von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe 1)-SMS 201-995

	Hypophyse	Pankreas	Nebennieren
Kontrolle:	100	100	100
Blockade:			
10 min vor Injektion des Radiotracers:			
0.2 mg SMS 201-995 i.v.	33,0	7,3	13,0
0.2 mg SMS 201-995 s.c.	39,6	17,9	12,1
5 min vor Injektion des Radiotracers:			
0.2 mg SMS 201-995 i.v.	36,9	7,3	13,9
0.4 mg SMS 201-995 i.v.	31,2	4,3	10,6
Verdrängung: 0.2 mg SMS 201-995 i.v:			
5 min nach Injektion des Radiotracers:	62,5	28,4	20,5
10 min nach Injektion des Radiotracers:	75,0	32,4	23,2
20 min nach Injektion des Radiotracers:	89,5	42,1	28,9

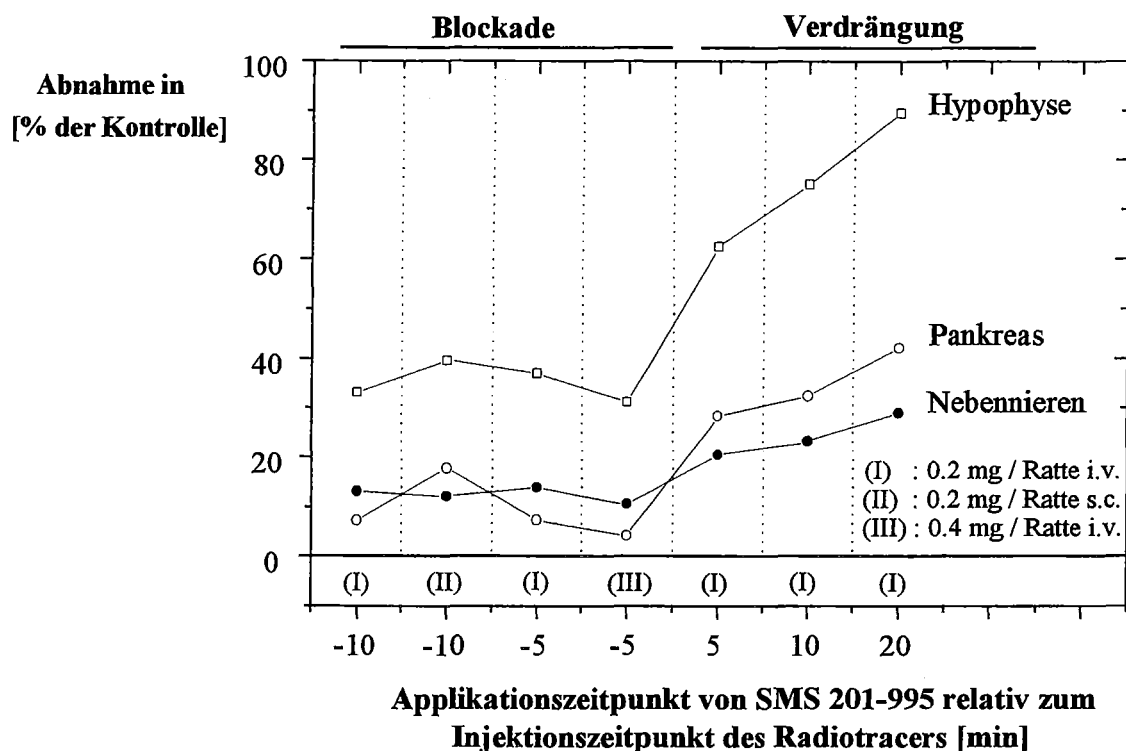


Abb. 47: Blockade- und Verdrängungs-Experimente mit (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe 1)-(SMS 201-995) (Ratten, n=3, applizierte Masse SMS 201-995 und Applikationsform siehe Legende in Abbildung). Abnahme der Aktivitätsakkumulation [%iD/ Organ] in Prozent der Kontrolle.

6.1.4 Bestimmung der Pharmakokinetik von 2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe 1)-SMS 201-995 Ratten mittels quantitativer Messungen am Positronenemissionstomographen

Zur quantitativen in vivo Bestimmung der Pharmakokinetik von 2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe 1)-SMS 201-995 wurden die ^{18}F -Aktivitätskonzentrationen im Tumor dreier Ratten als Funktion der Zeit mittels eines Positronenemissionstomographen (PET) erfasst.

Wie in Abb. 48 zu erkennen ist, wird die anhand der Biodistribution erwartete schnelle Pharmakokinetik von 2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe 1)-SMS 201-995 im Tumor bestätigt. So ist der Tumor schon nach 30 sec sichtbar und erreicht ca. 3 min p.i. das Maximum der ^{18}F -Akkumulation. Anschließend ist bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (120 min) eine kontinuierliche Abnahme der Aktivitätskonzentration mit einem k_{off} von $1.0 \pm 0.2 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ zu beobachten. Die Unterschiede der absoluten Aktivitätskonzentrationen sind durch die verschiedenen Tumorgößen allerdings erheblich.

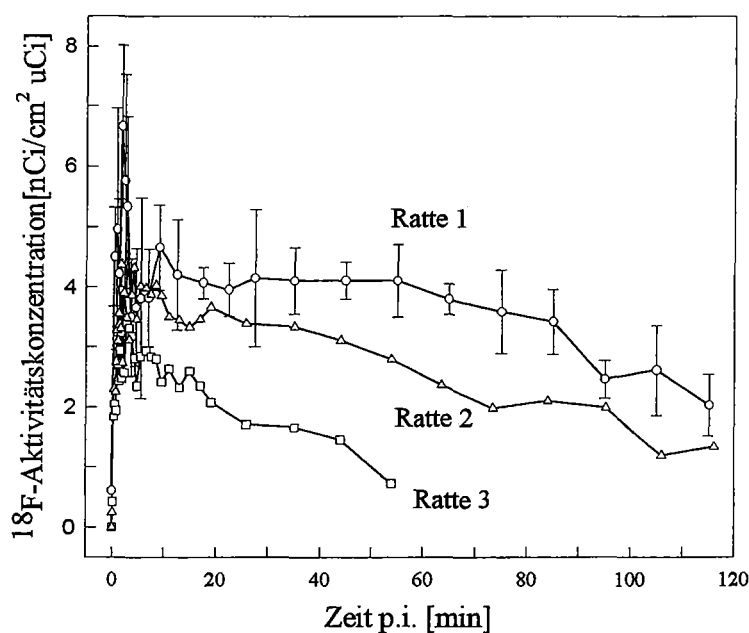


Abb. 48: Mittels PET an drei verschiedenen Ratten bestimmte Kinetik der ^{18}F -Aktivitätsaufnahme in exokrin pankreatischen Inselzellentumoren.

6.1.5 Bestimmung der metabolischen Stabilität von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995)

Zur Bewertung der metabolischen Stabilität von (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) wurden Urin-, Nieren, Leber-, Tumor- sowie Blutproben 60 bzw. 120 min p.i. mittels HPLC untersucht.

Die Urinproben wurden direkt aus der Blase der Versuchstiere entnommen. Die Metabolitenanalyse der Blutproben erfolgte nach Zentrifugation des Blutes im Plasma. Zur Analyse der in Leber, Nieren und Tumor lokalisierten Aktivität wurden ca. 0.2 g schwere Gewebeproben 60 und 120 min p.i. entnommen und nach Zugabe von 2 ml $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ (50/50; v/v) homogenisiert. Nach Zentrifugation dieser Suspensionen wurden Aliquote der überstehenden Lösung Radio-HPL-chromatographisch analysiert.

Weder 60 noch 120 min p.i. konnte eine nennenswerte Metabolisierung des Tracers festgestellt werden. Der Anteil an intaktem (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) war in allen untersuchten Proben > 95%.

Aufgrund der geringen ^{18}F -Aktivitätsakkumulation in den Knochen und der Analyse der in Leber, Nieren, Tumor, Blut und Urin lokalisierten Aktivität kann daher festgestellt werden, daß (2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) innerhalb des für PET-Messungen relevanten Zeitraums von ca. 2h eine hohe in vivo Stabilität aufweist und praktisch unverändert vorliegt.

6.1.6 *Vergleich der biologischen Aktivität und Rezeptoraffinität von (2-[¹⁹F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995)*

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften von (2-[¹⁸F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-SMS 201-995 wurden von der Sandoz AG, Schweiz, Bindungsstudien mit (2-Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-SMS 201-995 an Rattencortex-Membranen durchgeführt.

Hierbei wurde die Bindung des Radioliganden [¹²⁵I]SDZ 204-090 zum SSTR-Rezeptor in Anwesenheit steigender Konzentrationen von (2-Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) bestimmt. Die Ermittlung des pK_i -Wertes ($x \pm s$, $n=2$) erfolgte anhand von zwei Kompetitionsexperimenten mit jeweils acht verschiedenen Konzentrationen des Standards.

Tab.26: Verdrängung von [¹²⁵I]SDZ 204-090 durch verschiedene SRIF Analoga

SRIF-Analog	pK_i -Wert
[¹²⁷ I]SDZ 204-090	9.90±0.30 [164]
Somatostatin	9.55±0.15 [216]
SRIF-14	
SMS 201-995	9.33±0.06 [216]
[^{nat} In]SDZ 215-811	8.70±0.20 [164]
(2-Fluorpropionyl-(D)Phe ¹)-SMS 201-995	8.60±0.20

Die Versuche zeigten, daß die Rezeptoraffinität von (2-Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-SMS 201-995 mit einem pK_i -Wert von 8.6 ± 0.2 um nahezu eine Größenordnung niedriger ist als die des [¹²⁷I]SDZ 204-090, jedoch im Bereich des pK_i des nuklearmedizinisch häufig genutzten [¹¹¹In]SDZ 215-811 ($pK_i = 8.7 \pm 0.2$) liegt. Somit verfügt SMS 201-995 auch nach der 2-[¹⁸F]Fluorpropionylierung am N-Terminus mit einem IC_{50} -Wert im nanomolaren Bereich über eine hohe Affinität zum SSTR-Rezeptor.

Die biologische Aktivität von (2-Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) wurde (ebenfalls von der Sandoz AG, Schweiz) an Adenohypophysenzellen durch eine konzentrationsabhängige Inhibierung der GHRH (growth hormone release hormone) induzierten GH (growth hormone)-Freisetzung mittels Radioimmunoassay bestimmt.

Tab. 27: Biologische Aktivität verschiedener Somatostatin Analoga in vitro

SRIF-Analog	Inhibierung der GH Freisetzung pIC ₅₀
SRIF-14	8.90±0.03 [216]
SMS 201-995	8.88 [216]
(2-Fluorpropionyl-(D)Phe ¹)-SMS 201-995	8.75±0.02
[^{nat} In]SDZ 215-811	8.30±0.07 [216]

Für die Inhibierung der GH-Freisetzung durch (2-Fluorpropionyl-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) wurde ein pIC₅₀ von 8.75±0.02 ermittelt. Im Vergleich zu SMS 201-995 mit einem pIC₅₀ von 8.88 bedeutet dies nur eine geringe Abnahme der biologischen Aktivität. Demgegenüber wurde für [^{nat}In]SDZ 215-811 (pIC₅₀=8.30) ein deutlich geringerer Wert ermittelt.

6.2 *Die Bestimmung der Biodistribution von [N^ε-(4-[¹⁸F]Fluorbenzoyl)Lys⁴]-Apamin und [N^ε-(3-(3-[¹³¹I]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl)Lys⁴]-Apamin*

Die Bestimmung der Biodistribution von [N^ε-(4-[¹⁸F]Fluorbenzoyl)Lys⁴]-Apamin und [N^ε-(3-(3-[¹³¹I]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl)Lys⁴]-Apamin ([¹³¹I]Apamin) wurde an NMRI-Mäusen durchgeführt. Die Versuche wurden in Analogie zu den in Anhang 6.1 dargestellten in vivo Versuchen mit (2-[¹⁸F]Fluorpropionyl)-(D)Phe¹)-(SMS 201-995) durchgeführt.

Tab. 28: Biodistribution von [N^ε-(4-[¹⁸F]Fluorbenzoyl)Lys⁴]-Apamin (I) und [N^ε-(3-(3-[¹³¹I]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl)Lys⁴]-Apamin (II) in NMRI-Mäusen.

Organ	Apamin Derivat	Aktivitätskonzentration [% iD/g] (x ± s)				
		2 min p.i.	5 min p.i.	10 min p.i.	20 min p.i.	60 min p.i.
Hippocampus	(II)	0,33±0,06	0,39±0,09	0,33±0,07	0,21±0,03	0,23±0,10
	(I)		0,36±0,23	0,39±0,15	0,17±0,04	0,19±0,04
Cerebellum	(II)	0,18±0,02	0,20±0,03	0,26±0,06	0,17±0,01	0,16±0,06
	(I)		0,27±0,07	0,28±0,11	0,16±0,02	0,06±0,02
Hirnrest	(II)	0,18±0,03	0,11±0,02	0,21±0,01	0,13±0,02	0,11±0,03
	(I)		0,16±0,04	0,13±0,03	0,07±0,02	0,03±0,01
Hirn ges.	(II)	0,19±0,02	0,14±0,01	0,23±0,01	0,14±0,01	0,12±0,03
Leber	(II)	20,2±3,2	22,1±7,2	41,4±5,0	29,7±3,2	26,7±3,3
	(I)		4,61±0,75	5,80±0,79	4,77±1,00	4,19±0,27
Blut	(II)	1,75±0,54	1,23±0,29	1,37±0,16	0,53±0,10	0,30±0,11
	(I)		3,26±0,80	2,77±0,51	1,63±0,37	0,38±0,17
Nieren	(II)	20,0±2,8	16,1±1,6	24,2±3,2	9,42±1,60	3,52±0,91
	(I)		38,2±12,4	41,9±4,7	20,1±4,9	7,20±3,19
Herz	(II)	3,66±0,63	2,70±0,78	3,23±0,08	1,76±0,23	0,87±0,09
	(I)		1,77±0,30	1,70±0,18	1,08±0,11	0,51±0,12
Schilddrüse [% iD/g]	(II)	10,3±1,7	9,76±3,14	4,61±1,02	6,44±2,08	7,65±6,44
[% iD/Organ]	(II)	0,043±0,004	0,032±0,010	0,033±0,011	0,031±0,002	0,035±0,012
Knochen	(II)		2,17±0,19	2,09±0,56	1,31±0,02	0,72±0,11

Abbildung 49-51 zeigen die ^{18}F - und ^{131}I -Aktivitätsaufnahme im Hippocampus und Resthirn (Hirn ohne Hippocampus und Cerebellum) sowie die Blutclearance.

Wie in Abbildung 49 zu erkennen ist, erreicht nach Applikation beider Tracer die Aktivitätskonzentration im Hippocampus nach 5-10 min ein Maximum von ca. 0.4% iD/g. Anschließend wird für beide Tracer eine deutliche Abnahme der Aktivitätskonzentration beobachtet (ca. 0.2% iD/g; 20 min p.i.). Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums erfolgt ein weiterer Uptake, der jedoch nur zu einem geringfügigen Anstieg der Aktivitätskonzentration führt (0.2 - 0.25% iD/g, 60 min p.i.).

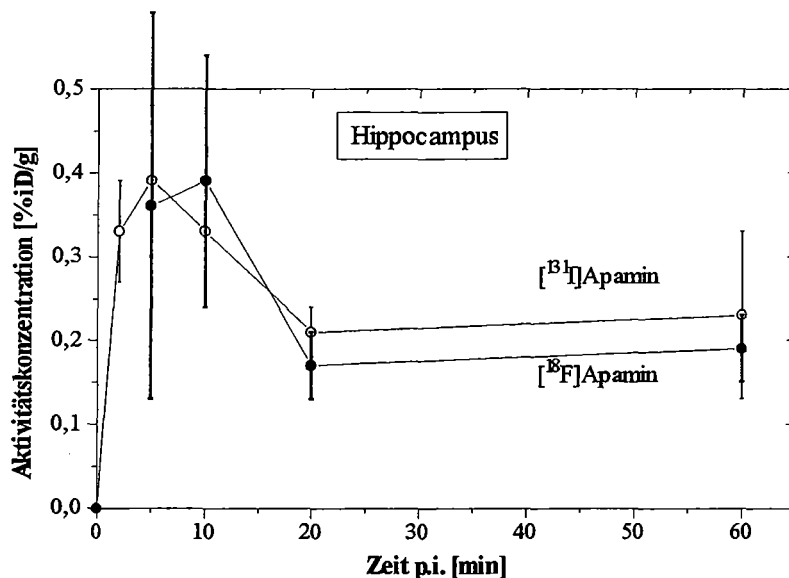


Abb. 49: ^{18}F - und ^{131}I -Aktivitätskonzentration im Hippocampus von NMRI-Mäusen nach Injektion von $[\text{N}^{\epsilon}\text{-(4-[}^{18}\text{F}\text{]Fluorbenzoyl)Lys}^4\text{]-Apamin}$ ($[\text{}^{18}\text{F}\text{]Apamin}$) und $[\text{N}^{\epsilon}\text{-(3-(3-[}^{131}\text{I}\text{]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl)Lys}^4\text{]-Apamin}$ ($[\text{}^{131}\text{I}\text{]Apamin}$).

Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Aktivitätskonzentration im Resthirn (Abb.50): Ein frühes, jedoch niedrigeres Maximum bei 5-10 min (ca. 0.2 % iD/g) wird gefolgt von einer stetigen Abnahme der Aktivitätskonzentration. Im Unterschied zum Aktivitätsverlauf im Hippocampus (siehe Abb.49) nimmt jedoch die Aktivitätskonzentration kontinuierlich weiter ab.

Somit ist besonders zu späten Beobachtungszeitpunkten (60min) ein deutlicher Unterschied der Aktivitätskonzentration im Hippocampus gegenüber der Aktivitätskonzentration im Resthirn feststellbar.

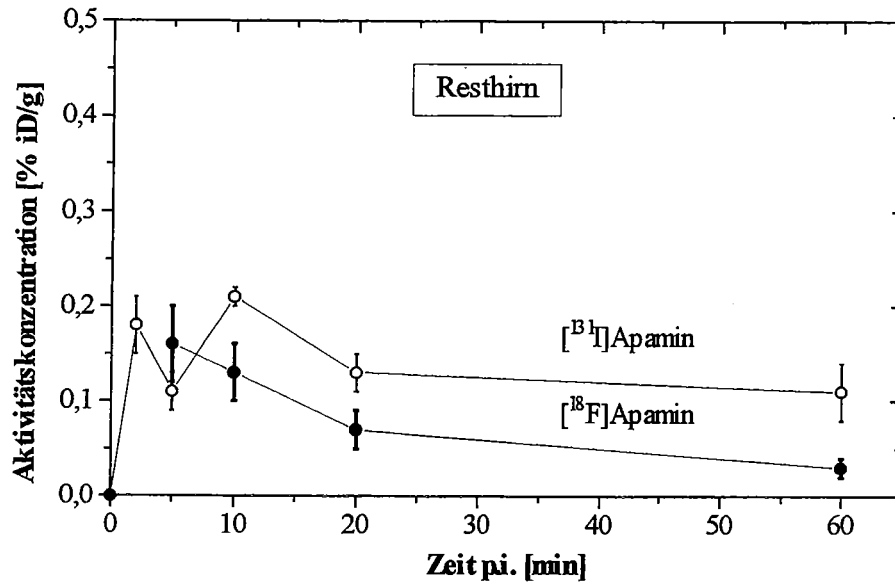


Abb. 50: ^{18}F - und ^{131}I -Aktivitätskonzentration im Resthirn (Hirn ohne Hippocampus und Cerebellum) von NMRI-Mäusen nach Injektion von $[\text{N}^{\epsilon}\text{-(4-[}^{18}\text{F}\text{]Fluorbenzoyl)lys}^4\text{]-Apamin}$ und $[\text{N}^{\epsilon}\text{-(3-(3-[}^{131}\text{I}\text{]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl)lys}^4\text{]-Apamin}$.

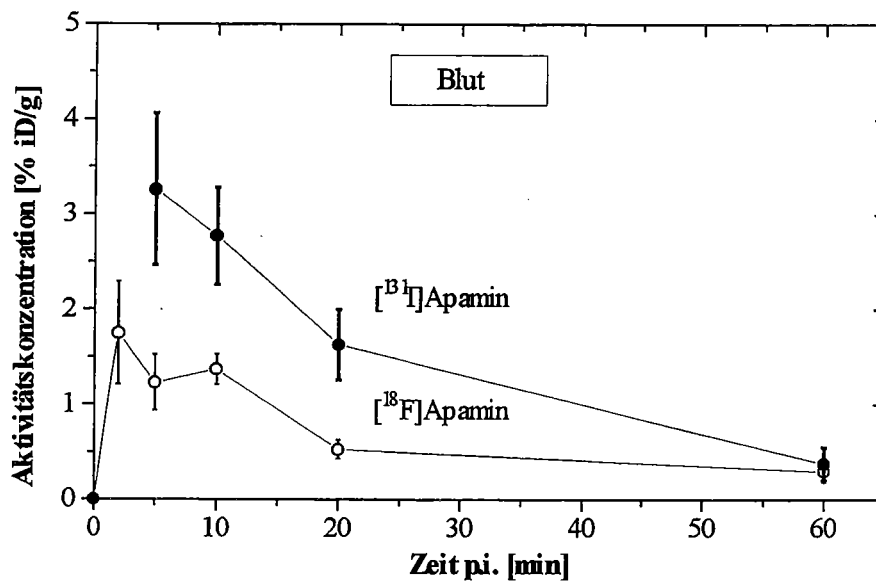


Abb. 51: ^{18}F - und ^{131}I -Aktivitätskonzentration im Blut von NMRI-Mäusen nach Injektion von $[\text{N}^{\epsilon}\text{-(4-[}^{18}\text{F}\text{]Fluorbenzoyl)lys}^4\text{]-Apamin}$ und $[\text{N}^{\epsilon}\text{-(3-(3-[}^{131}\text{I}\text{]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl)lys}^4\text{]-Apamin}$.

Eine einfache Betrachtung läßt jedoch die Vermutung zu, daß bei nahezu gleicher Rezeptoraffinität von ^{18}F - und ^{131}I -markiertem Apamin das radioiodierte Produkt eine weitaus größere unspezifische Bindung aufweist als das ^{18}F -fluorierte Derivat (Abb. 52).

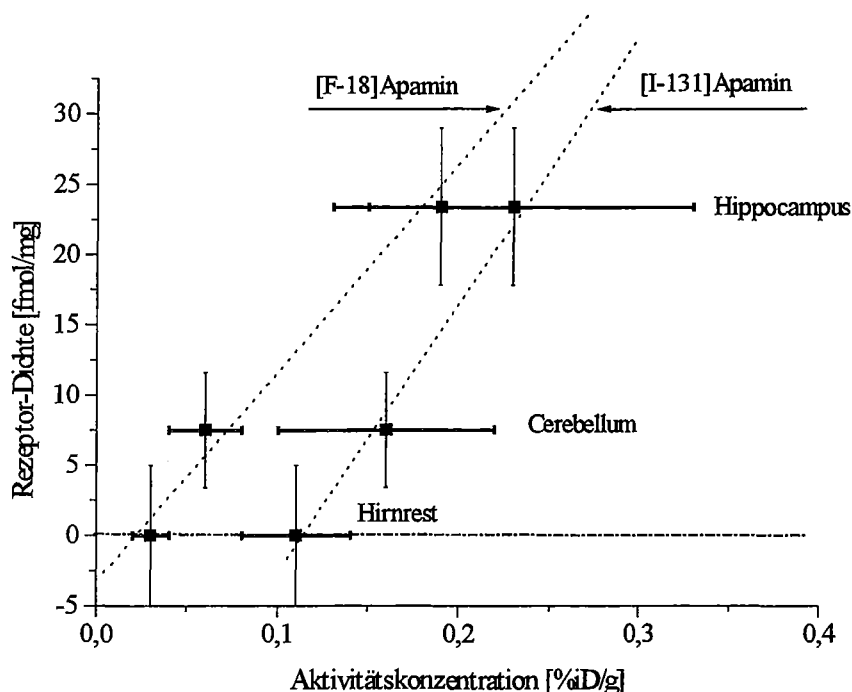


Abb. 52: Auftragung der Apamin-Rezeptordichte [fmol/mg Protein] [193] im Hippocampus, Cerebellum und Hirnrest (Hirn ohne Hippocampus und Cerebellum) gegen die experimentell ermittelten ^{18}F -Aktivitätskonzentrationen der entsprechenden Regionen ('eye fitted'). (x-Achsenabschnitt entspricht der unspezifischen Bindung, Steigung entspricht in erster Näherung der Rezeptoraffinität)

Eine Auftragung der Apamin-Rezeptordichte [fmol/mg Protein] [193] im Hippocampus, Cerebellum und Hirnrest (Hirn ohne Hippocampus und Cerebellum) gegen die experimentell ermittelten ^{18}F -Aktivitätskonzentrationen der entsprechenden Regionen (Abb. 52) sollte eine Gerade ergeben. Der x-Achsenabschnitt repräsentiert hierbei die unspezifische Bindung (nicht rezeptorgebundene Aktivitätskonzentration [%ID/g]) des applizierten Tracers. Die Steigung der Geraden wird dagegen von mehreren Faktoren, wie beispielsweise der Rezeptoraffinität oder der spezifischen Aktivität des applizierten Tracers beeinflusst.

Auf diese Weise errechnet sich für $[\text{N}^\epsilon\text{-(4-[}^{18}\text{F}\text{]Fluorbenzoyl)lys}^4\text{]-Apamin}$ eine spezifische Bindung im Hippocampus von ca. 90%, während $[\text{N}^\epsilon\text{-(3-(3-[}^{131}\text{I}\text{]Iod-4-methoxyphenyl)propionyl)lys}^4\text{]-Apamin}$ nur ca. 50% spezifische Bindung im Hippocampus zeigt.

Ein maßgeblicher Grund für die hohe unspezifische Bindung des ^{131}I -Apamins könnte, in Übereinstimmung mit der im Vergleich zu ^{18}F -Apamin hohen Aktivitätsakkumulation des iodierten Produktes in der Leber, an dessen höherer Lipophilie liegen.

6.3. Bestimmung der Biodistribution und der Aufnahmekinetik von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin

Zur Bestimmung der Biodistribution und zur Messung der Aufnahmekinetik von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin wurden ca. 50 μCi des Radiotracers in die Schwanzvene von NMRI-Mäusen injiziert. 2, 5, 10, 20 und 40 min nach Injektion (p.i.) wurden die Tiere getötet, die Organe entnommen, gewogen und ihre ^{18}F -Aktivität im γ -Counter bestimmt. Die errechneten Aktivitätskonzentrationen (injizierte Dosis [%] / Masse des Gewebe [g]) wurden angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (n=3). Ferner wurde untersucht, ob sich die Hirnaufnahme des Tracers durch Sättigung des physiologischen Aminosäuretransporters (aromatischer Aminosäure Carrier) durch Gabe von 1.5 mg Tyr / kg 10 min vor Injektion des Radiotracers reduzieren oder blockieren läßt. In diesem Fall könnte ein Transport von [^{18}F]FET durch die Blut-Hirn-Schranke über diesen Transportmechanismus angenommen werden.

Tab. 29: Bioverteilung von [^{18}F]FET in NMRI-Mäusen als Funktion der Zeit

	^{18}F -Aktivitätskonzentration in den einzelnen Organen in % der injizierten Dosis pro g [% iD/g]						
Zeitpunkt p.i.	Hirn	Knochen	Darm	Leber	Blut	Nieren	Herz
Reihe 1:	Lewis Mäuse, n=3						
2 min	1,08 $\pm$ 0,15	1,69 $\pm$ 0,11	2,82 $\pm$ 0,24	4,82 $\pm$ 0,18	6,15 $\pm$ 0,24	5,17 $\pm$ 0,19	n.b.
5 min	1,49 $\pm$ 0,20	1,96 $\pm$ 0,33	3,08 $\pm$ 0,18	4,61 $\pm$ 0,42	5,88 $\pm$ 0,25	5,00 $\pm$ 0,33	n.b.
10 min	2,03 $\pm$ 0,17	1,74 $\pm$ 0,36	3,00 $\pm$ 0,26	4,45 $\pm$ 0,12	5,50 $\pm$ 0,11	5,39 $\pm$ 0,14	n.b.
20 min	2,34 $\pm$ 0,23	2,19 $\pm$ 0,49	2,75 $\pm$ 0,19	4,21 $\pm$ 0,40	5,39 $\pm$ 0,54	4,65 $\pm$ 0,13	n.b.
40 min	2,43 $\pm$ 0,20	1,91 $\pm$ 0,27	2,67 $\pm$ 0,13	3,74 $\pm$ 0,27	4,73 $\pm$ 0,30	4,09 $\pm$ 0,30	n.b.
Reihe 2a:	Lewis Mäuse, n=3						
10 min	1,93 $\pm$ 0,20	1,71 $\pm$ 0,02	2,90 $\pm$ 0,29	3,70 $\pm$ 0,17	4,60 $\pm$ 0,26	4,44 $\pm$ 0,03	3,85 $\pm$ 0,38
40 min	2,63 $\pm$ 0,25	2,19 $\pm$ 0,36	2,90 $\pm$ 0,18	3,45 $\pm$ 0,13	4,28 $\pm$ 0,12	3,96 $\pm$ 0,17	3,70 $\pm$ 0,06
Reihe 2b:	Lewis Mäuse, n=3, zur Sättigung des Aminosäurecarriers (AAAT) mit 1.5 mg Tyr / kg vorgespritzt						
10 min	1,75 $\pm$ 0,17	1,90 $\pm$ 0,17	2,74 $\pm$ 0,30	3,84 $\pm$ 0,42	4,80 $\pm$ 0,54	4,19 $\pm$ 0,27	4,16 $\pm$ 0,65
40 min	2,52 $\pm$ 0,23	2,03 $\pm$ 0,07	2,78 $\pm$ 0,18	3,34 $\pm$ 0,10	4,05 $\pm$ 0,08	3,65 $\pm$ 0,19	3,64 $\pm$ 0,19

n.b. = nicht bestimmt

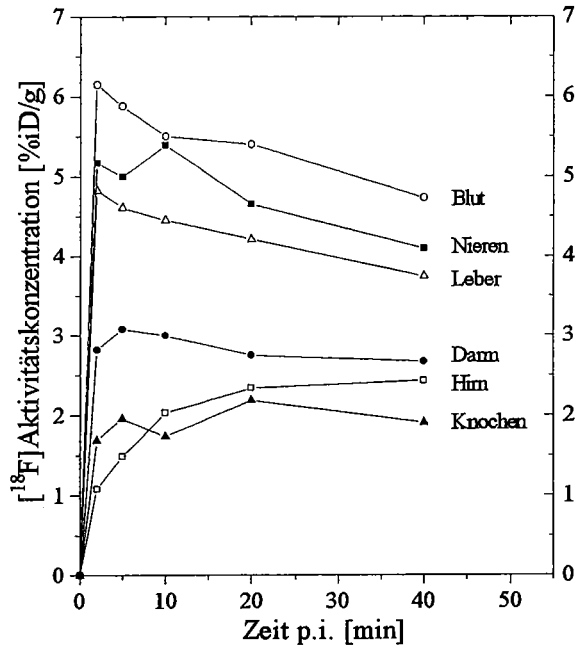


Abb. 53: Organverteilung und Aufnahmekinetik von $[^{18}\text{F}]$ FET in NMRI-Mäusen (n=3)

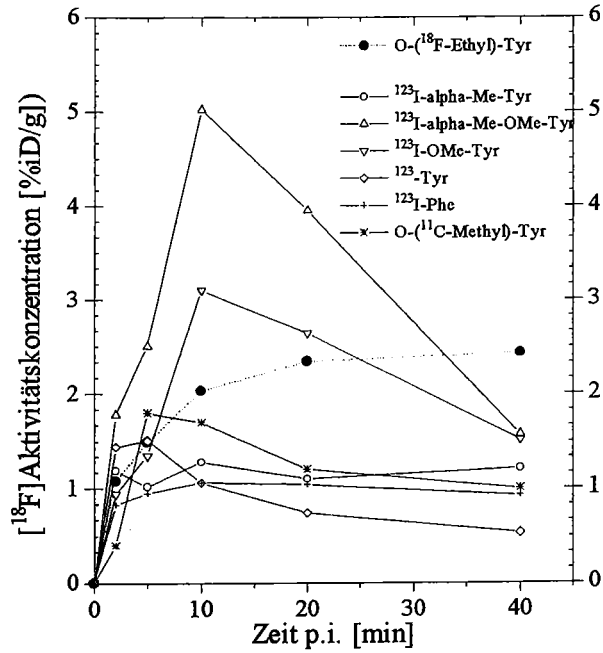


Abb. 54: Vergleichende Übersicht über die Kinetik der Hirnaufnahme einiger markierter arom. Aminosäuren in NMRI-Mäusen (Literaturangaben siehe Text)

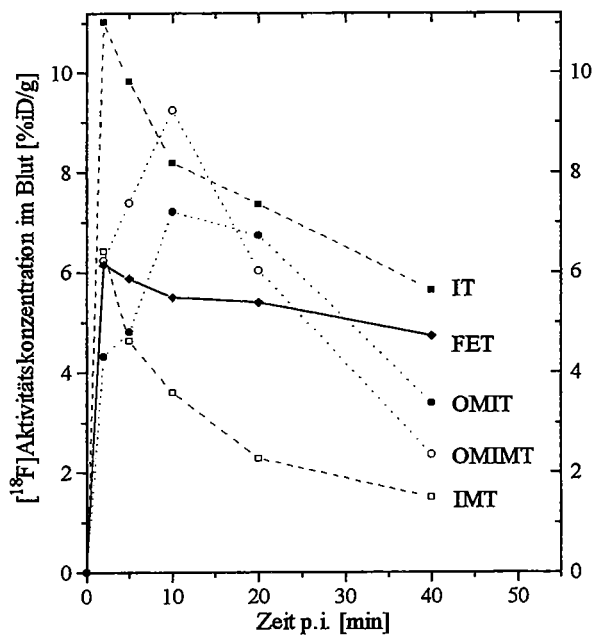


Abb. 55: Vergleichende Übersicht über die Blut-Clearance verschiedener Tyrosinderivate in NMRI-Mäusen [Lit.s.Text].
(IT=3-Iodtyrosin, FET=Fluorethyltyrosin, OMIT= 3-Iod-O-Methyltyrosin, OMIMT=3-Iod-O-methyl- α -methyltyrosin, IMT=3-Iod- α -methyltyrosin)

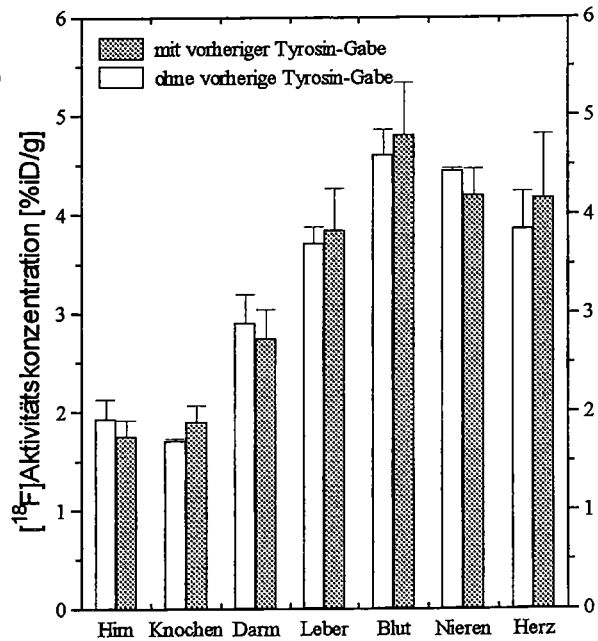


Abb. 56: ^{18}F -Aktivitätskonzentration in einigen Organen (10 min p.i.) mit und ohne vorherige Gabe von 1.5 mg Tyr/kg 10 min vor der Injektion von $[^{18}\text{F}]$ FET. (n=3, NMRI-Mäuse)

Wie in Abbildung 53 dargestellt ist, findet sich nach einer schnellen Verteilung des Tracers eine annähernd gleiche Abnahme der Aktivitätskonzentration in Blut, Nieren, Leber und Darm. Die ^{18}F -Aktivitätsakkumulation in den Knochen steigt schnell an und zeigt 5 min p.i. bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (40 min) einen Wert von ca. 2% iD/g. Somit ist trotz der aliphatischen Natur der ^{18}F -C Bindung von einer hinreichend hohen metabolischen Stabilität dieser Bindung auszugehen. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Organen zeigt das Hirn eine stetige Zunahme der ^{18}F -Aktivität und erreicht eine Aktivitätskonzentration von ca. 2.5% iD/g 40 min p.i.

Zum Vergleich mit anderen, teilweise routinemäßig als Radiodiagnostika eingesetzten markierten, aromatischen Aminosäuren ist in Abb. 54 die Kinetik der Aktivitätsaufnahme ins Hirn von NMRI-Mäusen dargestellt. Wie kürzlich gezeigt wurde, weisen besonders die stark lipophilen, O-methylierten, iodierten Tyrosinderivate eine hohe Aktivitätsanreicherung im Hirn mit einem Maximum im Bereich von 10 min auf, während für die weniger lipophilen Tyrosinderivate, wie O-([^{11}C]-Methyl)tyrosin [217], [^{123}I]Iodtyrosin oder [^{123}I]Iod- α -methyltyrosin, deutlich geringere Uptake-Maxima gefunden wurden [199]. Die Aktivitätsanreicherung von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)tyrosin im Hirn als Funktion der Zeit zeigt dagegen im Vergleich zu den anderen dargestellten Aminosäuren einen untypischen Verlauf. So weist die dargestellte Kurve einen stetigen Anstieg der Aktivitätskonzentration im Hirn auf und erreicht mit einem Wert von bis zu 2.5% iD/g 40 min p.i. die höchste Aktivitätsanreicherung aller dargestellten Aminosäurederivate.

Interessanterweise läuft diese hohe Hirnanreicherung parallel mit einer nur langsamen Abnahme der ^{18}F -Aktivität in allen anderen Organen. Letztgenanntes ist im Vergleich zu den iodierten Tyrosinderivaten in Abb. 55 exemplarisch für die Blutclearance der Aktivität über den gesamten Beobachtungszeitraum dargestellt. Wie zu erkennen ist, weisen die Aktivitätskonzentrationen im Blut als Funktion der Zeit für die O-methylierten iodierten Tyrosinderivate (ähnlich wie die Hirnakkumulation dieser Tracer) Maxima im Bereich von 10 min p.i. auf. Dagegen zeigen die nichtmethylierten, iodierten Tyrosinderivate eine stetige Abnahme der Aktivitätskonzentration. Aufgrund der stetigen, jedoch langsamen Abnahme der ^{18}F -Aktivität im Blut ähnelt die Blutclearance von [^{18}F]FET daher überraschenderweise eher der Blutclearance der nichtmethylierten Tyrosinanaloga IT und IMT. Gleiche Analogien lassen sich für Herz, Leber, Darm, und Nieren feststellen.

In Abb. 56 ist die ^{18}F -Aktivitätskonzentration in einigen Organen (10 min p.i.) mit und ohne vorheriger Gabe von 1.5 mg Tyr/kg 10 min vor der Injektion von [^{18}F]FET dargestellt. Da keine signifikante Abnahme der ^{18}F -Aktivitätsaufnahme im Hirn nach vorheriger Gabe von Tyrosin festgestellt werden konnte, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Aussage darüber gemacht werden, ob und in welchem Maße an der Aufnahme des Radiotracers im Hirn der Carrier für aromatische Aminosäuren beteiligt ist. Zu überprüfen bleibt auch, ob durch die *gleichzeitige* Gabe einer aromatischen Aminosäure ein signifikanter Effekt zu beobachten ist.

6.9 Abkürzungen

%iD/g	Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe
%iD/org.	Prozent der injizierten Dosis pro Organ
(v/v) (60/40)	Volumenanteile
[¹¹¹ In]SDZ-215-811	([¹¹¹ In]DTPA-(D)-Phe ¹)-(SMS 201-995)
[¹²³ I]SDZ-204-090	[¹²³ I]Iod-(Tyr ³ -SMS 201-995)
[¹³¹ I]BH	3-(3-[¹³¹ I]Iod-4-hydroxyphenyl)propionsäure-N-succinimidylester
[¹³¹ I]OMeBH	3-(3-[¹³¹ I]Iod-4-methoxyphenyl)propionsäure-N-succinimidylester
[¹⁸ F]APF	4-Azidophenacyl-[¹⁸ F]fluorid
[¹⁸ F]FDG	2-[¹⁸ F]Fluor-2-deoxy-(D)-Glucose
[¹⁸ F]FEF	[¹⁸ F]Fluorethylflumazenil
[¹⁸ F]FESP	3-N-(ω-[¹⁸ F]Fluorethyl)spiperon
[¹⁸ F]FET	O-(2-[¹⁸ F]Fluorethyl)-L-tyrosin
[¹⁸ F]FM	[¹⁸ F]Fluormisonidazol
[¹⁸ F]NPFP	2-[¹⁸ F]Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester
[¹⁸ F]SFB	4-[¹⁸ F]Fluorbenzoesäure-N-succinimidylester
[^{67,68} Ga]SDZ-216-927	([^{67,68} Ga]Desferrioxamin-succinyl-(D)-Phe ¹)-(SMS 201-995)
[^{86,90} Y]SDZ-215-811	([^{86,90} Y]DTPA-(D)-Phe ¹)-(SMS 201-995)
[K ⁺ c 2.2.2] ₂ CO ₃ ²⁻	Kryptat des 4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosans und Kaliumcarbonats
¹³¹ I-Anti-HSA-IgG	¹³¹ I-markierter Monoclonaler Antikörper gegen ein Epitop des Humanserumalbumins
¹⁸ F-HSA	Fluor-18 markiertes Humanserumalbumin
¹⁸ F-IgG _E	Fluor-18 markiertes Immunglobulin E
2-[¹⁸ F]TYR	2-[¹⁸ F]Fluor-L-tyrosin
2-F-Phe	2-Fluorphenylalanin
4-[¹⁸ F]FMT	4-[¹⁸ F]Fluor-meta-Tyrosin
4-IPhe	4-Iodphenylalanin
6-[¹⁸ F]FDOPA	L-6-[¹⁸ F]Fluor-3,4-dihydroxyphenylalanin
A1, A2	Aminosäure 1; Aminosäure 2
Anti-CEA Mab BW 250/183	monoclonaler Antikörper gegen carcinoembryonales Antigen
A _s	spezifische Aktivität, [GBq/μmol] oder [Ci/mmol]
BOC	tert.-Butyloxycarbonyl
BOC-Tyr-OMe	N ^α -tert.-butyloxycarbonyltyrosinmethylester
Bq	Bequerel (Zerfälle/s)
c.a.	carrier-added, geträgert
CAT	Chloramin-T
Ci	Curie (3.7·10 ¹⁰ Bq)
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DEGDEE	Diethylenglycoldiethylether
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
EI	Elektrophil
EOB	end of bombardment (bezogen auf Bestrahlungsende)
EOS	end of synthesis (bezogen auf Syntheseende)
F _{Ax}	kinetischer Faktor, der die Sterik der Aminosäureseitenkette bei der Bildung von Peptidbindungen berücksichtigt
F _p	kinetischer Faktor, der die Sterik der Schutzgruppe der N-geschützten Acylkomponente bei der Bildung von Peptidbindungen berücksichtigt
F _R	kinetischer Faktor, der die Aktivierung der Acylkomponente bei der Bildung von Peptidbindungen berücksichtigt
F _S	kinetischer Faktor, der den Solvenseinfluß bei der Bildung von Peptidbindungen berücksichtigt
GH	growth hormone, Wachstumshormon, Somatotropin
GHRH	growth hormone release hormone, das die Somatotropin Absonderung fördernde Decapeptid aus dem Hypothalamus
HAMA	human antibody mouse antibody response. Unerwünschte Bildung von Antikörpern gegen den injizierten, radiomarkierten Maus-Antikörper
HBbTU	(O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-bis(tetramethylen)uronium)
HMPT	Tetrafluoroborat
	Hexamethylphosphorsäuretriamid

HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPCE	Hochleistungskapillarelektrophorese, high performance capillary electrophoresis
HPLC	high performance liquid chromatography; Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
hSSTR1-5	humane Somatostatin Rezeptorsubtypen 1-5
HWZ	Halbwertszeit
i.v.	intravenös
IC ₅₀	Halb-maximale Hemmdosis; Dosis, bei welcher 50% Inhibition auftritt
IgG	Immunglobulin G
IMT	3-Iod- α -methyltyrosin
IT	3-Iodtyrosin
k	Konjugationszahl
K ⁺ OBt ⁻	Kaliumsalz des 1-Hydroxybenzotriazols
K ⁺ Ca ²⁺ - Kanäle	Calciumionen gesteuerte Kaliumkanäle
k _c	Geschwindigkeitskonstante
k _D	Dissziationskonstante
Krytofix® 2.2.2	4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosans
LD ₅₀	Mittlere Letaldosis; Dosis, bei welcher 50% der Versuchstiere getötet werden
log P	$\equiv \log (c_{\text{Octanol}} / c_{\text{Wasser}})$; Lipophilie
MAb	monoclonaler Antikörper, monoclonal antibody
MW	molare Masse
n.b.	nicht bestimmt
n.c.a.	no-carrier-added, nicht geträgert
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Nu	Nukleophil
OMes	Methylsulfonyloxy
OMIMT	3-Iod- α -methyl-O-methyltyrosin
OMIT	3-Iod-O-methyltyrosin
ONp	p-Nitrophenyl
OTf	Trifluormethansulfonyloxy
OTos	Toluolsulfonyloxy
p.i.	post injectionem
PAL	Photo affinity labeling
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung; phosphate buffered saline
PCC	Photochemische Konjugation
PET	Positron emission tomography; Positronenemissionstomographie
pIC ₅₀	neg. dekadischer Log. der Halb-maximalen Hemmdosis
(S)-BOC-BMI	S-(-)-1-Boc-2-t.butyl-3-methyl-4-imidazolidinon
QSDR	Quantitative structure-distribution relationships
RCA	radiochemische Ausbeute (laut Def. immer zerfallskorrigiert)
RP	reversed phase
s.c.	subcutan
SMS 201-995	Somatostatinanaloges Oktapeptid der Firma Sandoz, (Sandostatin® = Octreotide)
SPET	Single photon emission tomography; Einzelphotonenemissionstomographie
SRIF	Somatotropin-Release-Inhibiting-Factor
SS-28; SS-14	Prosomatostatin; Fragment (1-14) von Prosomatostatin
t _{1/2}	Halbwertszeit
TFA	Trifluoressigsäure
Tft ⁻ + TMABE	Triflatsalz von Tetramethylammoniumbenzoesäureethylester
TMA ⁺ OBt ⁻	Tetramethylammoniumsalz von 1-Hydroxybenzotriazol
Triflat	Trifluormethansulfonat
TSTU	(O-(N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-Tetramethyluronium)
	Tetrafluoroborat
x $\pm$ s	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

7. Literatur

- [1] aus H.N.Wagner Jr. Outline of the past and the future of nuclear medicine. In: The chemistry of radiopharmaceuticals. Ed: N.D.Heindel, H.D.Burns, T.Honda und L.W.Brady, Mason Publishing, New York (1978)
- [2] I.Wendt. Radiometrische Methoden in der Geochronologie, Clausthaler Tektonische Hefte, Ellen Pilger Verlag, Clausthal-Zellerfeld (1971)
- [3] H.Schütte. Medizinische Isotope in der organischen Chemie und Biochemie, Verlag Chemie Weinheim (1966)
- [4] T.G.Cooper. The tools of biochemistry, Kap.3, Wiley-Interscience (1977)
- [5] H.Schicha. Kompendium der Nuklearmedizin, Schattenauer Verlag, Stuttgart (1991)
- [6] G.Stöcklin. Tracers for metabolic imaging of brain and heart. Radiochemistry and Radiopharmacology. *Eur.J.Nucl.Med.* **19**, 527-551 (1992)
- [7] Radionuclide Therapy: From palliation to cure. EANM Task Group Radionuclidic Therapy (1994)
- [8] H.H.Coenen. Biochemistry and evaluation of fluoroamino acids. in: PET studies on amino acid metabolism and protein synthesis. Ed: B.M.Mazoyer, W.D.Heiss, D.Comar. Kluwer Academic Publishers, Netherlands 109-129, (1993)
- [9] R.C.Koch. Activation analysis Handbook, Academic press, New York (1960)
- [10] E.Harlow, D.Lane. Antibodies: A laboratory manual. Cold Springs Harbor Laboratory, USA (1988)
- [11] T.Chard. An introduction to radioimmunoassays and related techniques. In: Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Ed: T.S.Work und E.Work, Vol.6, Part II, Noth Holland (1978)
- [12] G. Stöcklin. In: Handbuch der medizinischen Radiologie, Band 15/1B, Emissions-Computertomographie mit kurzlebigen zyklotronproduzierten Radionukliden, Springer-Verlag (1989)
- [13] K. Wienhard, R. Wagner, W.D. Heiss. PET-Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie, Springer-Verlag (1989)
- [14] G. Stöcklin. Chemie von Herz und Hirn von außen betrachtet, *Nachr.Chem.Tech.Lab.* **34**, 1057 (1986)
- [15] K.Jordan, B.Knopp. Meßtechnik in der Emission-Computertomographie. In: Handbuch der medizinischen Radiologie. Teil 1B: Emissions-Computertomographie mit kurzlebigen zyklotronproduzierten Radiopharmaka. H.Hundeshagen (Hrsg.). Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1988; 149-313
- [16] H.J. Ache. Chemie des Positrons und Positroniums, *Angew.Chem.* **84**, 234 (1972)
- [17] G.Pfeiffer. Knochenaffine radioaktive Substanzen in der Nuklearmedizin. *Nucl.Med.* **15**, 273-281 (1976)
- [18] M.M. Ter-Pogossian, *Spekt. der Wissenschaft* **12**, 121 (1980)
- [19] G.Stöcklin, PET in der Neuropharmakologie, *Labor 2000*, 2 (1991)
- [20] K.Ziemons. Optimierung der Bildauflösung eines PET. Berichte des Forschungszentrum Jülich, Jül-2827, Oktober 1993
- [21] G. Stöcklin, V.W. Pike (Eds.). Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography. Methodological Aspects, Kluwer Academic Publishers (1993)
- [22] K. Wienhard, H.H. Coenen, G. Pawlik et al. PET investigations on the dopaminergic systems in neurological patients, using 3-N-(F-18)fluoroethylspiperone. *J.Nucl.Med.* **29**, 821 (1988)
- [23] 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**, 1367-1372 (1989)
- [24] 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**, 127-137 (1979)

- [25] a) T.R. DeGrado, H.H. Coenen, G. Stöcklin. 14(R,S)-[¹⁸F]Fluoro-6-Thia-Heptadecanoic Acid (FTHA): Evaluation in Mice as a New Probe of Myocardial Utilization of Long Chain Fatty Acids. *J.Nucl.Med.* **32**, 1888-1896 (1991)
 b) T.R. DeGrado, D.C.Moka. Non- β -oxidizable ω -[¹⁸F]Fluoro Long Chain Fatty Acid Analogs Show Cytochrome P-450-mediated Defluorination: Implications for the Design of PET Tracers of Myocardial Fatty Acid Utilization. *Nucl.Med.Biol.* **19**, 389-397 (1992)
- [26] A. Plenevaux, 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)
- [27] M. Guillaume, A. Luxen, B. Nebeling, M. Argentini, C.J. Clark, V.W. Pike. Recommendations for fluorine-18 production. *Appl.Radiat.Isot.* **42**, 749-762 (1991)
- [28] S.M. Qaim, G. Stöcklin. Production of some medically important short-lived neutron-deficient radioisotopes of halogens. *Radiochim. Acta.* **34**, 25-40 (1983)
- [29] T. Ruth und A.P. Wolf. Absolute cross sections for the production of ¹⁸F via the ¹⁸O(p,n)¹⁸F reaction, *Radiochim.Acta* **26**, 21 (1979)
- [30] G. Stöcklin. in: Principles of Nuclear Medicine, H.N. Wagner, Z. Szabo (Eds.) in press
- [31] D. Schlyer, M. Bastos, A.P. Wolf. A rapid quantitative separation of fluorine-18 fluoride from oxygen-18 water. *J.Nucl.Med.* **28**, 764 (1987)
- [32] W.Förmer. ¹⁸F-Markierung von Apamin, Diplomarbeit, Universität zu Köln (1994)
- [33] R.M. Lambrecht, R. Neirinckx, A.P. Wolf. Cyclotron isotopes and radiopharmaceuticals XXIII. Novel anhydrous ¹⁸F-fluorinating intermediates. *Int.J.Appl.Radiat.Isot.* **29**, 175 (1978)
- [34] V. Casella, T.Ido, J.S Fowler, R.R. McGregor, T.J. Ruth. Anhydrous ¹⁸F-labeled elemental fluorine for pharmaceutical preparation. *J.Nucl.Med.* **21**, 750 (1980)
- [35] J.Pless, W.Bauer, U.Briner, W.Doepfner, P.Marbach, R.Maurer, T.Petcher, J.C.Reubi J.Vanderscher. Chemistry and pharmacology of SMS 201-995, a long acting octapeptide analogue of somatostatin. *Int.Congr. Ser.-Excerpta Med.* **683**, 319 (1986)
- [36] G.T.Bida, N.Satyamurthy, J.R.Bario. The synthesis of 2-[F-18]fluoro-2-deoxy-D-glucose using glycals: a reexamination. *J.Nucl.Med.* **25**, 1327-1334 (1984)
- [37] K.Hamacher, H.H.Coenen, G.Stöcklin. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J.Nucl.Med.* **27**, 235-238 (1986)
 K.Hamacher, G. Blessing, B.Nebeling. Computer aided synthesis (CAS) of no-carrier-added 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose: an efficient automated system for the aminopolyether-supported nucleophilic fluorination. *Appl. Radiat.Isot.* **41**, 49-55 (1990)
- [38] A. Luxen, M. Guillaume, W.P. Melaga, V.W. Pike, O. Solin, R. Wagner. Production of 6-[¹⁸F]fluoro-L-DOPA and its metabolism in vivo - a critical review. *Nucl Med Biol* **19**, 149-158 (1992)
- [39] G. Firmau, R.Chirakal, S.Sood. Aromatic fluorination with xenon difluoride: L-3,3-dihydroxy-6-fluorophenylalanine. *Can.J.Chem.* **58**, 1449-1450, 1980
- [40] H.H. Coenen, K. Franken, P. Kling, G. Stöcklin. Direct electrophilic radiofluorination of Phenylalanine, tyrosine and Dopa. *Appl.Radiat.Isot.* **39**, 1243-1250 (1988)
- [41] C.Lemaire. Production of L-[¹⁸F]fluoro amino acids for protein synthesis: overview and recent developments in nucleophilic synthesis. In: PET studies on amino acid metabolism and protein synthesis. Eds: B.M.Mazoyer, W.D.Heiss and D.Comar. Developments in Nuclear Medicine, Vol.23, Kap.2, 89-108, Kluwer Academic Publishers (1993)
- [42] K.Katsifis, K. Hamacher, J. Schnitter, G. Stöcklin. Optimization Studies Concerning the Direct Nucleophilic Fluorination of Butyrophenone Neuroleptics. *Appl.Radiat.Isot.* **44**, 1015-1020 (1993)
- [43] K. Hamacher, W. Hamkens. Remote Controlled One-step Production of ¹⁸F Labeled Butyrophenone Neuroleptics Exemplified by the Synthesis of n.c.a. [¹⁸F]N-Methylspiperone. *Appl.Radiat.Isot.* **46**, 911-912 (1995)
- [44] K. Hamacher, H.H. Coenen, G. Stöcklin. N.C.A. Radiofluorination of Spiperone and N-Methylspiperone via Aminopolyether Supported Direkt Nucleophilic Substitution. *J. Label. Compds.Radiopharm.* **23**, 1047 (1986)

- [45] C.Crouzel, M.Venet, T.Irie, G.Sanz, C.Boullais. Labelling of a serotonergic ligand with ^{18}F : [^{18}F]setoperone. *J.Label. Compds. Radiopharm.* **25**, 403 (1988)
- [46] S.J.Lim, M.S.Berridge, T.J.Tewson. Preparation of [^{18}F]16 α -fluoro-17 β -estradiol by selective nucleophilic substitution. *J.Label. Compds. Radiopharm.* **35**, 176-177 (1994)
- [47] H.H. Coenen, P. Laufer, G. Stöcklin, K. Wienhard, G. Pawlik, H.G. Böcker-Schwarz, H.-D. Heiss. 3-N-(2'-[^{18}F]fluoroethyl)piperone: a new ligand for cerebral dopamine receptor studies with PET. *Life Sci.* **40**, 81-88 (1987)
- [48] D.R. Hwang, W.R. Banks, J.C. Mantil. A general method for preparing [^{18}F]fluorophenethylamines. Synthesis of 4-[^{18}F]fluorofentanyl. *J Label Compds Radiopharm.* **32**, 328-329 (1993)
- [49] S.M. Moerlein, J.S. Permuter, D. Parkinson. Synthesis and evaluation of fluorine-18 labeled benzodiazepine antagonists as PET tracers. *J Label Compds Radiopharm.* **32**, 516-517 (1993)
- [50] J.R. Grierson, J.M. Link, C.A. Mathias, J.S. Rasey, K.A. Krohn. A radiosynthesis for fluorine-18 fluoromisonidazole. *J.Nucl.Med.* **30**, 343-350 (1989)
- [51] Y.-S.Ding, J.S. Fowler, S.J.Gatley, S.L.Dewey, A.P.Wolf. Synthesis of high specific activity (+) and (-) 6-[^{18}F]fluoronorepinephrine via the nucleophilic aromatic substitution reaction. *J.Med.Chem.* **34**, 767-771 (1991)
- [52] G. Vaidyanathan, D.J. Affleck, M.R. Zalutsky. (4-[^{18}F]Fluoro-3-iodobenzyl)guanidine, a Potential MIBG Analogue for Positron Emission Tomography. *J. Med. Chem.* **37**, 3655-3662 (1994)
- [53] S.M.N. Efange, R.H. Mach, A. Khare, R.H.Michelson, P.A. Nowak, P.H. Evora. p-[^{18}F]Fluorobenzyl-trozamicol ([^{18}F]FBT): Molecular Decomposition-Reconstitution Approach to Vesamicol Receptor Radioligands for Positron Emission Tomography. *Appl. Radiat. Isot.* **45**, 465-472 (1994)
- [54] A.A. Wilson, R.F. Dannals, H.T. Ravert, H.N. Wagner, Jr.. Reductive Amination of [^{18}F]Fluorobenzaldehydes: Radiosyntheses of [2- ^{18}F]- and [4- ^{18}F]Fluorodexetimides. *J Label. Compds Radiopharm.* **28**, 1189-1199 (1990)
- [55] C.M. Müller-Platz, G. Kloster, G. Legler, G. Stöcklin. ^{18}F -Fluoroacetate: An Agent for Introducing No-Carrier-Added Fluorine-18 into Urokinase without loss of Biological Activity. *J Label Compds Radiopharm.* **19**, 1645 (1982)
- [56] M.R. Kilbourn, C.S. Dence, M.J. Welch, C.J. Mathias. Fluorine-18 Labeling of Proteins. *J. Nucl. Med.* **28**, 462-470 (1987)
- [57] 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. ^{18}F -Labeled Insulin: A Prosthetic Group Methodology for Incorporation of a Positron Emitter into Peptides and Proteins. *Biochemistry* **28**, 4801-4806 (1989)
- [58] P.K. Garg, S. Garg, M.R. Zalutsky. Fluorine-18 Labeling of Monoclonal Antibodies and Fragments with Preservation of Immunoreactivity. *Bioconjugate Chem.* **2**, 44-49 (1991)
- [59] S. Gohlke, H.-J. Wester, Ch. Bruns, G. Stöcklin. (2-[^{18}F]Fluoropropionyl-(D)phe¹)-octreotide, a Potential Radiopharmaceutical for Quantitative Somatostatin Receptor Imaging with PET: Synthesis, Radiolabeling, In Vitro Validation and Biodistribution in Mice. *Nucl. Med. Biol.* **21**, 819-825 (1994)
- [60] H.J.Wester, C.Krummeich, A.Fixmann, W.Förmer, H.W.Müller-Gärtner, G.Stöcklin. ^{18}F - and ^{131}I -Labeling of the octadecapeptide Apamin: A selective blocker of the Ca^{2+} dependent K^{+} channels. Synthesis and in vivo evaluation in NMRI mice. *11th International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry*, 13-17.08.1995, Vancouver, Canada, Symposium Abstract 513-515 (1995).
- [61] H.H. Coenen, S.M. Moerlein. Regiospecific Aromatic Fluorodemetalation of Group IVb Metalloarenes using Elemental Fluorine or Acetyl Hypofluorite. *J.Fluorine Chemistry.* **36**, 63-75 (1986)
- [62] M. Diksic, P.Di Raddo. New Syntheses of Fluoro-Compounds by fluorination in Water. *Tetrahedron Lett.* **25**, 4885-4888 (1984)

- [63] K. Wienhard, G. Pawlik, B. Nebeling, J. Rudolf, G. Fink, K. Hamacher, G. Stöcklin, W.-D. Heiss. Estimation of local cerebral glucose utilization by positron emission tomography : Comparison of 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose and 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-mannose in patients with local brain lesions. *J Cereb Blood Flow Metab* **11**, 485-489 (1991)
- [64] M.E.v.Dort, Y.W.Jung, M.R.Kilbourn, D.M.Wieland. Biogenic Benzyl-[¹⁸F]fluorides: (1s,2s)-1-Deoxy-1-[¹⁸F]fluoro-Meta-Hydroxyephedrine for Mapping Cardiac Sympathic Neurons. *J.Label.Compds. Radiopharm.* **35**, 117-119 (1994)
- [65] D. Naumann in: Anorganische Chemie in Einzeldarstellungen, Bd. 2, Fluor und Fluorverbindungen, A. Schneider (Ed.) (1980)
- [66] D.P.Cox, J. Terpinski, W. Lawrynowicz. Anhydrous Tetrabutylammonium Fluoride: A mild but highly efficient Source of Nucleophilic Fluoride Ion. *J. Org. Chem.* **49**, 3216 (1984)
- [67] J.P. De Kleijn, J.W. Seetz, J.F. Zawierko, B. Van Zanten. Labelling with Reactor Produced ¹⁸F. III. Polymer Supported ¹⁸F as a Fluorinating Agent. *Appl. Rad. Isot.* **28**, 591 (1977)
- [68] G.K. Mulholland, S.A. Toorongian, D.M. Jewett, M.R. Kilbourn. Polymer Supported N.C.A. Nucleophilic Radiofluorination. Rapid New Synthesis of [F-18]FDG with recovery of [O-18]Water. *J. Nucl.Med.* **29**, 754 (1988)
- [69] H.H. Coenen. New Radiohalogenation Methods: An overview. In: Progress in Radiopharmacy (P.H.Cox et al, Edts.) Martinus Nijhof Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster, 196 (1986)
- [70] D.Y. Chi, M.R. Kilbourn, J.A. Katzenellenbogen, M.J. Welch. A Rapid and Efficient Method for the Fluoroalkylation of Amines and Amides. Development of a Method Suitable for Incorporation of the Short-Lived Positron Emitting Radionuclide Fluorine-18. *J.Org.Chem.* **52**, 658-664 (1987)
- [71] D.Y. Chi, M.R. Kilbourn, J.A. Katzenellenbogen, J.W. Brodack, M.J. Welch. Synthesis of No-Carrier-Added N-([¹⁸F]Fluoroalkyl)Spiperone Derivatives. *Appl.Radiat.Isot.* **37**, 1173-1180 (1986)
- [72] D. Block, H.H. Coenen, P. Laufer, G. Stöcklin. N.c.a [¹⁸F]-Fluoroalkylation via nucleophilic fluorination of disubstituted alkanes and application to the preparation of N-[¹⁸F]-fluoroethylspiperone. *J.Label.Comp.Radiopharm.* **23**, 1042-1044 (1986)
- [73] D. Block, H.H. Coenen, G. Stöcklin. N.c.a ¹⁸F-fluoroalkylation of H-acidic compounds. *J. Label.Comp.Radiopharm.* **25**, 201-216 (1987)
- [74] D. Block, H.H. Coenen, G. Stöcklin. N.c.a ¹⁸F-fluoroacylation via fluorocarboxylic acid esters. *J.Label.Compds.Radiopharm.* **25**, 185-200 (1988)
- [75] S. Guhlke, H.H. Coenen, G. Stöcklin. Fluoroacylation Agents Based on Small n.c.a.[¹⁸F]Fluorocarboxylic Acids. *Appl. Radiat. Isot.* **45**, 715-727 (1994)
- [76] B.M.Mazoyer, W.D.Heiss and D.Comar. PET studies on amino acid metabolism and protein synthesis. Developments in Nuclear Medicine, Vol.23, Kluwer Academic Publishers (1993)
- [77] A.N. Serafini. From monoclonal antibodies to peptides and molecular recognition units: An overview. *J.Nucl.Med.* **34**, 533-536 (1993)
- [78] A.J. Fishman, J.W. Babich, H.W. Strauss. A ticket to ride: Peptide Radiopharmaceuticals. *J.Nucl.Med.* **34**, 2253-2263 (1993)
- [79] D.A. Goodwin. Pharmacokinetics and Antibodies. *J. Nucl. Med.* **28**, 1358-1362 (1987)
- [80] D.J. Hnatowich. Antibody radiolabeling, problems and promises. *Nucl.Med.Biol.* **17**, 49-55 (1990)
- [81] A.J. Fishman, M.C. Pike, D. Kroon, A.J. Fucello, D. Rexinger, C. Kate, R. Wilkinson, R.H. Rubin, W.H. Strauss. Imaging focal sites of bacterial infection in rats with In-111-labeled chemotactic peptide analogs. *J. Nucl.Med.* **32**, 483-491 (1991)
- [82] F.H.M. Corstens, J.W.M. van der Meer. Chemotactic peptides: New locomotion for imaging of infection. *J. Nucl. Med.* **31**, 491-494 (1991)
- [83] D.M. Goldenberg. Cancer imaging and therapy with radiolabeled antibodies. In: Immunobiology of proteins and peptides VI, M.Z. Atassi (Ed.) Plenum Press, New York (1992)
- [84] L. Miller. Synthetic peptides come of age. *J. Nucl. Med.* **34**, 15N-30N (1993)
- [85] D.M. Goldenberg. Radiolabeled Antibodies. *Science & Medicine.* **1**, 64-73 (1994)

- [86] K.Hamacher und G.Blessing. Efficient electrochemical recovery of [^{18}F]fluorine from water. *11th International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry*, 13-17.08.1995, Vancouver, Canada, Symposium Abstract 739-740, (1995).
- [87] O.T.DeJesus, J.Mukherjee, E.H. Appelman. Synthesis of o- and m-tyrosine analogs as potential tracers for CNS dopamine. *J.Label.Compds.Radiopharm.* **26**, 133-134 (1989)
- [88] G.J. Meyer, H.H.Coenen, S. Waters, B. Långström, R.Cantineau, K.Strijckmans, W. Vaalburg, C.Halldin, C. Crouzel, B.Mazière, A.Luxen. Quality assurance and quality control of short lived radiopharmaceuticals for PET. In: *Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography, Methodological aspects*. Eds.: G.Stöcklin and V.W.Pike. *Developments in Nuclear Medicine*, Vol.24, Kap.3, 91-150, Kluwer Academic Publishers (1993)
- [89] K. Hamacher, G. Stöcklin. Synthesis of N.C.A. (2S,4R)-4-[^{18}F]Fluoroproline: A Potential Amino Acid for PET Measurements of Procollagen and Matrix Protein Synthesis. *11th International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry*, 13-17.08.1995, Vancouver, Canada, Symposium Abstract 175-176 (1995).
- [90] M. van der Ley. [^{18}F]Fluorine labeled aliphatic acids. *J.Label.Compds.Radiopharm.* **10**, 453-461 (1983)
- [91] 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)
- [92] 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**, 23-26 (1991)
- [93] P.Johnström and S.Stone-Elander. Synthesis of fluorine-18-labelled 2,2,2-trifluoroethyl triflate *J.Label.Compds.Radiopharm.* **35**, 146-147 (1994)
- [94] D.R. Hwang, C.S. Dence, Z.A. McKinnon, C.J. Mathias, M.J. Welch. Positron labeled muscarinic acetylcholine receptor antagonist: 2- and 4-[^{18}F]fluorodexetimide. Synthesis and biodistribution. *Nucl.Med.Biol.* **18**, 247-252 (1991)
- [95] C.Y. Shiue, J.S. Fowler, A.P. Wolf, M. Watanabe, C.D. Arnett. Synthesis and specific activity determinations of no-carrier-added fluorine-18 labelled butyrophenone neuroleptics-benperidol, haloperidol, spiroperidol and pipamperone. *J. Nucl. Med.* **26**, 181-186 (1985)
- [96] K.A. Jacobson, D.C. Furlano, K.L. Kirk. A prosthetic group for the rapid introduction into peptides and functionalized drugs. *J. Fluorine Chem.* **39**, 339-347 (1988)
- [97] L.Lang, W.C. Eckelmann. One-Step Synthesis of ^{18}F labeled [^{18}F]-N-succinimidyl 4-(fluoromethyl)benzoate for Protein Labeling. *Appl. Radiat. Isot.* **45**, 1155-1163 (1994)
- [98] G. Vaidyanathan, D.D. Bigner, M.R. Zalutsky. Fluorine-18-Labeled Monoclonal Antibody Fragments: A Potential Approach for Combining Radioimmunoscinigraphy and Positron Emission Tomography. *J.Nucl.Med.* **33**, 1535-1541 (1992)
- [99] G. Vaidyanathan, M.R. Zalutsky. Labeling Proteins with Fluorine-18 using N-Succinimidyl 4-[^{18}F]Fluorobenzoate. *Nucl. Med. Biol.* **19**, 275-281 (1992)
- [100] G.Vaidyanathan, D.A.Affleck, P.Welsh, M.R.Zalutsky. Fluorine-18 labeled chemotactic peptide: A potential agent for the imaging of focal infection. *J.Label.Compds. Radiopharm.* **35**, 365-367 (1994)
- [101] M.Tada, R.Iwata, H.Sugiyama, K.Sato, T.Ido. An efficient synthesis of [fluoroacetyl- ^{18}F]fluoromelatonin and N-(ω)-[^{18}F]Fluoroacetylserotonin. *J.Label.Compds. Radiopharm.* **35**, 150-151 (1994)
- [102] M. Tada, R. Iwata, H. Sugiyama, K. Sato, H. Fukuda, K. Kubota, R. Kubota, T. Fujiwara, H. Takahashi, A. Wakui, T. Ido. An Efficient Synthesis of N-(ω)-[^{18}F]Fluoroacetylserotonin (N-(ω)-[^{18}F]Fluoroacetyl-5-hydroxytryptamine). *J. Label. Compds. Radiopharm.* **34**, 741-746 (1994)
- [103] M.R. Zalutsky, P.K. Garg, S.H. Johnson, H. Utsunomiya, R.E. Colemann. Fluorine-18-Antimyosin monoclonal antibody fragments: Preliminary investigations in a canine myocardial infarct model. *J. Nucl. Med.* **33**, 575-580 (1992)
- [104] 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-labeled monoclonal antibody Fab fragment. *J. Nucl. Med.* **35**, 1506-1513 (1994)

- [105] C.Y. Shiue, A.P. Wolf, J.F. Hainfeld. Synthesis of ^{18}F -labeled N-(p- ^{18}F fluorophenyl)maleimide and its derivative for labeling monoclonal antibodies with ^{18}F . *J.Label. Compds. Radiopharm.* **26**, 278 (1988)
- [106] M.C. Lasne, B.Le Secq, L.Barre, M.Collins, C.Huard, J.C.Baron. Synthesis of [^{18}F]RP 62203, a selective antagonist of 5HT₂ receptors for PET studies. *J.Label.Compds. Radiopharm.* **35**, 441-443 (1994)
- [107] M.K.Das, J.Mukherjee. [^{18}F]RP 62203: A high affinity and selective radioligand as a potential PET tracer for serotonin 5HT₂ receptor. *J.Label.Compds. Radiopharm.* **35**, 497-499 (1994)
- [108] S. Guhlke. Zur trägerarmen Radiofluorierung von Peptiden und Proteinen über prosthetische Gruppen. Dissertation, Universität zu Köln (1995)
- [109] 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- ^{11}C]methylalbumin microspheres and human serum [Methyl- ^{11}C]methylalbumin for clinical use. *J. Appl. Radiat. Isot.* **35**, 337-344 (1984)
- [110] 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 labeling of peptides and proteins. *J.Label.Compds. Radiopharm.* **35**, 194-196 (1994)
- [111] H.J.Wester, S.Guhlke, G.Stöcklin. Regioselective [^{18}F]fluoropropionylation of peptides and proteins in aqueous solution. *J.Label.Compds. Radiopharm.* **35**, 297-299 (1994)
- [112] L.W. Hermann, L.W. Elmaleh, A.J. Fischmann, H.W. Strauss. A novel method for the labeling of proteins with F-18. *J. Nucl. Med.* **31**, 619 (1990)
- [113] G.Lang, W.C.Eckelman. Improved one-step synthesis of N-succinimidyl 4- ^{18}F fluoromethylbenzoate for protein labeling. *11th International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry*, 13-17.08.1995, Vancouver, Canada, Symposium Abstract 551-553 (1995)
- [114] R.Grantham, C.Gautier, M.Gouy, M.Jacobzone, R.Mercier. Codon usage in the genome strategy modulated for gene epressivity. *Nucleic Acids Res.* **9**, r43-r74 (1981)
- [115] R.Lathe. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *J.Mol.Biol.* **183**, 1-12 (1985)
- [116] U. Kragh-Hansen. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Am. Soc. Pharm. Exper.Therap.* **33**, 17-53 (1981)
- [117] M.S. Haka, M.R. Kilbourn, G.L. Watkins, S.A. Toorongian. Aryltrimethylammonium trifluormethane sulfonates as precursors to aryl [^{18}F]fluorides: Improved synthesis of [^{18}F]GBR-119. *J.Lab.Comp.Radiopharm.* **27**, 823 (1989)
- [118] 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? *11th International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry*, 13-17.08.1995, Vancouver, Canada, Symposium Abstract 581-583 (1995).
- [119] W.R. Banks, D.-R. Hwang. N.c.a F-18 Fluoroarylketones: Useful bifunctional radiopharmaceutical intermediates. *Appl. Radiat. Isot.* **45**, 599-608 (1994)
- [120] G. Vaidyanathan, M.R. Zalutsky. Improved synthesis of N-succinimidyl 4- ^{18}F fluorobenzoate and its application to the labeling of a monoclonal antibody fragment. *Bioconjugate Chem.* **5**, 352-356 (1994)
- [121] J.Coste, M.N.Dufour, A. Pantaloni, B. Castro. BROP: A new reagent for coupling N-methylated amino acids. *Tetrahedron Lett.* **31**, 669-672 (1990)
- [122] J. Coste., D. Le-Nguyen, B. Castro. PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.* **31**, 205-208 (1990)
- [123] V. Dourtoglou, B. Gross. O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate as a coupling reagent for the Synthesis of Peptides. *Synthesis*, 572 (1984)
- [124] R. Knorr, A.Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillesen. New coupling reagents in peptide chemistry.*Tetrahedron Lett.* **30**, 1927-1930, (1989)
- [125] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillesen. 1,1,3,3-Tetramethyluronium compounds as coupling reagents in peptide and protein chemistry. *Peptides 1990*, Eds: E. Giralt and D. Andreu. ESCOM science Publishers B.V. (1991)
- [126] J. Coste, E. Frérot, P. Jouin. Oxybenzotriazole free peptide coupling reagents for N-Methylated amino acids. *Tetrahedron Letters* **32**, 1967-1970 (1991)

- [127] D.H.Rich und J.Singh. The carbodiimide method. In: The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol.1., Major Methods of Peptide Bond Formation, Kap. 5, 241-260. Eds: E.Gross und J.Meienhofer. Academic Press, New York (1979)
- [128] a) L.D. Shott, A.B. Borkovec, W.A. Knapp Jr., *Toxicol Appl. Pharmacol.* **18**, 499, (1971)
b) Journal Officiel de la République Française, Paris, November 24. (1988)
- [129] H.J. Wester. Zur trägerfreien Einführung von Fluor-18 in Peptide durch Fluoracylierung. Diplomarbeit, Universität zu Köln (1992)
- [130] ImmunoPure® Avidin. Instruction Manual No. 0420, Pierce Chemical Company, USA (1992)
- [131] Y.S.Klauser und M.Chroev. Synthesis of depsipeptides by catalysis of active esters with 1-hydroxybenzotriazole. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 973-974 (1975)
- [132] J.Martinez, J.C.Tolle, M.Bodanszky. Side reactions in peptide chemistry. *Int.J.Peptide Protein Res.* **13**, 22-27 (1979)
- [133] R.Paul. O-Acylation of tyrosine during peptides synthesis. *J.Org.Chem.* **28**, 236 (1962)
- [134] J.Ramachandran und C.H.Li. The synthesis of L-valyl-L-lysyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-proline. *J.Org.Chem.* **28**, 173-177 (1963)
- [135] D.Yamashiro, C.H.Li. Preparation of N^α-BOC-N^ε-P-BRZ-lysine and N^α-BOC-O-MRBZL-tyrosine and their use for the solid phase synthesis of an octapeptide occurring in the HGH molecule. *Int.J.Peptide Protein Res.* **4**, 181-185 (1972)
- [136] G.Barany und R.B. Merrifield. Solid phase peptide synthesis. In: The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol.2.: Special methods in peptide synthesis (Part 1). Chap. 1, 185. Eds: E.Gross und J.Meienhofer. Academic Press, New York (1980)
- [137] a) F.H.C. Stewart. Benzyloxycarbonylamino acid 2,6-dichloro-5-nitrophenyl esters and the reaction of 2,6-dichloro-4-nitrophenol with N,N'-dicycloheylcarbodiimide. *Aust. J.Chem.* **21**, 477-482 (1968)
b) F.H.C. Stewart. Depsipeptide synthesis by accelerated active ester coupling. *Aust. J.Chem.* **21**, 1639-1649 (1968)
- [138] K.Imman. Peptide synthesis with minimal protection of side-chain functions. In: The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol.3.: Protection of functional groups in peptide synthesis. Chap. 6, 254-293. Eds: E.Gross und J.Meienhofer. Academic Press, New York (1981)
- [139] A.Singh, E.R.Thornton, F.H.Westheimer. The photolysis of diazoacetylchymotrypsin *J.Biol.Chem.* **237**, PC 3006 (1962)
- [140] V.Chowdry, F.H.Westheimer. Photoaffinity labeling of biological systems. *Ann.Rev. Biochem.* **48**, 293-325 (1979)
- [141] H.Bayley, J.V.Staros. Photoaffinity labeling and related techniques. In: Azides and Nitrenes. Ed.: E.F.V.Scriven. Chap. 9, 433-490. Academic Press, Orlando (1984)
- [142] A.E.Ruoho, H.Kiefer, P.E.Roeder, S.J.Singer. The mechanism of photoaffinity labeling. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* **70**, 2567-2571 (1973)
- [143] B.v.Iddon, O.Meth-Cohn, E.F.V.Scriven, H.Suschnitzky, P.T. Gallagher. Entwicklungen in der Arylnitren-Chemie: Synthesen und Mechanismen. *Angew.Chem.* **91**, 965-981 (1979)
- [144] S.P.McManus: Organic reactive intermediates. Academic Press, New York 1973
- [145] A.Reiser und L.J.Leyshon. Spin state of photogenerated phenylnitrene *J.Am.Chem.Soc.* **93**, 4051 (1971)
- [146] S.H.Hixson und S.S.Hixson. p-Azidophenacyl bromide, a versatile photolabile bifunctional reagent. Reaction with Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry.* **14**, 4251 (1975)
- [147] B.D.Smith, K.Nakanishi, K.Watanabe, S.Ito. 4-Azido[3,5-³H]phenacyl bromide, a versatile bifunctional reagent for photoaffinity radiolabeling. Synthesis of prostaglandin 4-azido [3,5-³H]phenacylestere. *Bioconjugate Chem.* **1**, 363-364 (1990)
- [148] J.Backes. Arylnitrene. Houben Weyl, Bd. E 16 c, 149-196, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1992)
- [149] R.T.A MacGillivray, E.Mendez, J.G.Shewale, S.K.Shina, J Lineback-Zins, K.Brew. The primary structure of human serum transferrin. *J.Biol.Chem.* **258**, 3543-3553 (1983)
- [150] H.J.Wester, K.Hamacher, G.Stöcklin. Simple and fast ¹⁸F-labeling of proteins by coupling with photogenerated [¹⁸F]arylnitrene. *J.Nucl.Med.* **35**, 73p (1994) abstr.

- [151] H.J.Wester, S.Guhlke, G.Stöcklin. Comparative evaluation of n.c.a. ^{18}F -fluorination agents for peptides and proteins. *Eur.J.Nucl.Med.* **21**, 794 (1994) abstr.
- [152] R.S.Pandurangi, R.R.Kuntz, W.A.Volkert. Photolabeling of human serum albumin by 4-Azido-2-([^{14}C]-methylamino)trifluorobenzonitrile. A high efficiency, long wavelength photolabel. *Appl.Radiat.Isot.* **46**, 233-239 (1995)
- [153] R.S.Pandurangi, R.R.Kuntz, W.A.Volkert. High efficiency photolabeling of human serum albumin and γ -globulin with 4-azido-2,3,5,6-tetrafluoro- ^{14}C -methyl benzoate. *Bioconjugate Chem.* (1995) in press.
- [154] R.S.Pandurangi, R.R.Kuntz, W.A.Volkert. Photoaffinity labeling of B72.3 antibodies using C-14-methyltetrafluoro azido benzoate. *J.Nucl.Med.* **36**, 156p (1995) abstr.
- [155] E.Regoeczi. Iodine-labeled plasma proteins. Vol.1. CRC Press Boca Raton, Florida, USA (1984)
- [156] a) L.A.Kwawli und A.I.Kassis. Synthesis of ^{125}I -labeled N-succinimidyl p-iodobenzoate for use in radiolabeling antibodies. *Nucl.Med.Biol.* **16**, 727-733 (1989)
b) P.Garg, G.E.Archer, D.D.Bigner, M.R.Zalutsky. Synthesis of radiolabeled N-succinimidyl iodobenzoate: Optimization for use in antibody labeling. *Appl.Radiat.Isot.* **40**, 485-490, 1989
- [157] A.E.Bolton, W.M.Hunter. The labeling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylation agent. *Biochem.J.* **133**, 529-539 (1973)
- [158] K.Bosslet, G.Lüben. A.Schwarz, E.Hundt, H.P.Harthus, F.R.Seiler, C.Muhrer, G.Klöppel, K.Kayser, H.H.Sedlacek. Immunohistochemical localization and molecular characteristics of three monoclonal antibody defined epitopes detectable on carcinoembryonic antigen (CEA). *Int.J.Cancer* **36**, 75-84 (1985)
- [159] Habermann E. Apamin. *Pharmac.Ther.* **25**, 255-270 (1984)
- [160] H.Bühl und U.Dörr (Eds.) Somatostatin receptor imaging. *Hormone and Metabolic Reserach, Suppl.Ser.* **27** (1993)
- [161] K.Reynor, T.Reisine. Somatostatin Receptors. *Critical. Rev. Neurobiol.* **6**, 273-289 (1992)
- [162] C.Bruns, G.Weckbecker, F.Raulf, K.Kaupmann, P.Schoeffter, D.Hoyer, H.Lübbert. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **733**, 138-146 (1994)
- [163] W.H.Bakker, E.P.Krenning, W.H.Breeman, J.W.Koper, P.P.Kooij, J.C.Reubi, J.G.Klijn, T.J.Visser, R.Docter, S.W.Lamberts. Receptor scintigraphy with radioiodinated somatostatine analogue: radiolabeling, purification and in vivo application in animals. *J.Nucl.Med.* **31**, 15001-1509 (1990)
- [164] W.H.Bakker, E.P.Krenning, W.H.Breeman, L.J.Hofland, P.Marbach, J.Pless, P.Pralet, B.Stolz, J.W.Koper, S.W.J.Lamberts, T.J.Visser, E.P.Krenning. [^{111}In -DTPA-D-phe 1]octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor positiv tumors: synthesis, radiolabeling and in vitro validation. *Life Sci.* **49**, 1583-1591 (1991)
- [165] P.M.Smith-Jones, B.Stolz, C.Bruns, R.Albert, H.W.Reist, R.Friedrich, H.R. Mäcke. Gallium-67/Gallium-68-DFO-octreotide - A potential radiopharmaceutical for PET imaging of somatostatin receptor-postive tumors: Synthesis and radiolabeling, in vitro and preliminary in-vivo studies. *J.Nucl.Med.* **35**, 317-325 (1994)
- [166] B.Stolz, T.Marina, R.Albert, C.Bruns, P.Koch, H.Mäcke: Synthesis, radiochemistry and biological evaluation of a new somatostatin analogue (SDZ 219-387) labeled with technetium-99m. *Eur.J.Nucl.Med.* **21**, 437-444 (1994)
- [167] J.Brockmann, F.Rösch, H.Herzog, B.Stolz, C.Brun, G.Stöcklin. Un vivo uptake kinetics and dosimetric calculations of ^{86}Y -DTPA-octreotide with PET as a model for potential endotherapeutic octreotides labelled with ^{90}Y . *11th International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry*, 13-17.08.1995, Vancouver, Canada, Symposium Abstract 519-521, (1995).
- [168] S.W.J.Lamberts, E.P.Krenning, J.C.Reubi. The role of somatostatin and its analogues in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocrine Reviews.* **12**, 450-482 (1991)
- [169] G.Fricker, V.Dubost, D.Schwab, C.Bruns, C.Thile. Heterogenity in hepatic transport of somatostatin analog octapeptides. *Hepatology* **20**, 191-200 (1994)
- [170] M. de Jong, W.H.bakker, W.A.P Breeeman, M.E.va der Pluijm, P.P.M.Kooij, T.J.Visser, R.Docter, E.P.Kreening. Hepatobiliary handling of iodine-125-Tyr 3 -octreotide and indium-111-DTPA-D-Phe 1 - octreotide by isolated perfused rat liver. *J.Nucl.Med.* **34**, 2025-2030 (1993)

- [171] J.Kovács. Racemization and coupling rates of N(α)-protected amino acid and peptide esters: Predictive potential. In: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol.2.: Special methods in peptide synthesis (Part 1). Chap. 8, 486-536. Eds: E.Gross und J.Meienhofer. Academic Press, New York, 1980.
- [172] M.Bodanszky, Y.S.Klausner, M.A.Onetti. *Peptide Synthesis*, 2nd ed. Wiley, New York, (1976)
- [173] D.S.Kemp. In: *Peptides 1971*. Ed.: H.Nesvadba. 1-20, North-Holland Publ., Amsterdam
- [174] E.Gross und J.Meienhofer. The peptide bond. In: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol.1., Major Methods of Peptide Bond Formation, Kap. 1, 2-56. Eds: E.Gross und J.Meienhofer. Academic Press, New York (1979)
- [175] R.Geiger, W.König. *Chem.Ber.* **106**, 3626-3635 (1973)
- [176] B.F.Lundt, N.L. Johansen, A.Vølund, J.Markussen. Removal of t-butyl and t-butyloxycarbonyl protecting groups with trifluoroacetic acid. *Int.J.Peptide Protein Res.* **12**, 258-268 (1978)
- [180] J.Brockmann, F.Rösch. Labeling of small peptides with yttrium and gallium via a new DOTA-derivative of DFO using different disuccinimidyl esters as linkers. *11th International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry*, 13-17.08.1995, Vancouver, Canada, Symposium Abstract 516-518, (1995).
- [181] G.Beschiaschvili und J.Seelig. Peptides Binding to lipid bilayers. Binding isotherms and ζ -potential of a cyclic somatostatin analogue. *Biochemistry* **29**, 10995-11000, 1990
- [182] G.Beschiaschvili und J.Seelig. Peptides Binding to lipid bilayers. Nonclassical hydrophobic effect and membrane-induced pK shifts. *Biochemistry* **31**, 10044-10053, 1992
- [183] G.Beschiaschvili und J.Seelig. Peptide binding to lipid membranes. Spectroscopic studies on the insertion of a cyclic somatostatin analog into phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* **1061**, 78-84 (1991)
- [184] J.Seelig, S.Nebel, P.Ganz, C.Bruns. Electrostatic and nonpolar peptide-membrane interactions. Lipid binding and functional properties of somatostatin analogues of charge $z = +1$ to $z = +3$. *Biochemistry* **32**, 9714-9721 (1993)
- [185] J.Brockmann, persönliche Mitteilung, Forschungszentrum Jülich GmbH
- [186] a) H.J. Wester, J. Brockmann, F.Rösch, B.Stolz, W.Wutz, H.Herzog, P.M.Smith-Jones, C.Bruns, G.Stöcklin. Quantitative in vivo uptake kinetics of ^{18}F -octreotide as measured by PET: A comparison with ^{86}Y -DTPA-octreotide and ^{68}Ga -DFO-octreotide in tumor bearing rats. *Symposium on Tumor Targeting with Radiolabeled Hormones and Antibodies*, Nürnberg (1994)
b) H.J. Wester, J. Brockmann, F.Rösch, B.Stolz, W.Wutz, H.Herzog, P.M.Smith-Jones, C.Bruns, G.Stöcklin. Quantitative in vivo uptake kinetics of ^{18}F -octreotide in tumor bearing rats as measured by PET: A comparison with ^{86}Y -DTPA-octreotide and ^{68}Ga -DFO-octreotide. *J.Nucl.Med.* **36**, 113p-114p (1995) abstr.
- [189] R.Albert, P.Marbach, W.Bauer, U.Briner, G.Fricker, C.Bruns, J.Pless. SDZ CO 611: A highly potent glycosylated analog of somatostatin with improved oral activity. *Life Sci.* **53**, 517-525 (1993)
- [190] K.Kaupmann, C.Bruns, F.Raulf, H.P.Weber, H.Mattes, H.Lübbert. Two amino acids, located in the transmembrane domain VI and VII, determine the selectivity of the peptide agonist SMS 201-995 for the SSTR2 somatostatin receptor. *The EMBO Journal* **14**, 727-735 (1995)
- [191] M. Hugues, G.Romey, D.Duval, J.P.Vincent, M.Dazdunski. Apamin as a selective blocker of calcium-dependent potassium channels in neuroblastoma cells: Voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. *Proc.Natl.Acad.Soc. USA* **79**, 108-1312 (1982)
- [192] G.Romey, M.Hugues, H.Schmid-Antomarchi, M.Lazdunski. Apamin: a specific toxin to study a class of Ca^{2+} dependent K^{+} channels. *J.Physiol.Paris* **79**, 259-264 (1984)
- [193] D.R.Gehlert, S.L.Gackenhimer. Comparison of the distribution of binding sites for the potassium channel ligands [^{125}I]apamin, [^{125}I]Charybdotoxin and [^{125}I]Iodoglyburide in the rat brain. *Neuroscience* **52**, 191-205 (1993).
- [194] J.P.Vincent, H. Schweitz, M.Lazdunski. Structure-function relationships and sites of action of apamin, a neurotoxic polypeptide of the bee venom with an action on the central nervous system. *Biochemistry* **14**, 2521-2525 (1975)
- [195] C.Granier, E.Pedroso-Muller, J.van Rietschoten. Use of synthetic analogs for a study on the structure-activity relationship of apamin. *Eur.J.Biochem.* **82**, 193-299 (1978)

- [196] J.Gauldie, J.M.Hanson, F.D.Rumlanek, R.Shipolini, C.A.Vernon. The peptide components of bee venom. *Eur.J.Biochem.* **61**, 369-376 (1976)
- [197] M.Ikeda, D.Dewar, J.McCulloch. Selective reduction of [125 I]apamin binding sites in Alzheimer hippocampus: a quantitative autoradiographic study. *Brain Research.* **567**, 51-56 (1991)
- [198] M.Hugues, D.Duval, P.Kitabgi, M.Lazdunski, J.P.Vincent. Preparation of a pure monoiododerivative of the bee venom neurotoxin apamin and its binding properties to rat brain synaptosomes. *J.Biol.Chem.* **257**, 2762-2769 (1982)
- [199] C.Krummeich, M.Holschbach, G.Stöcklin. Direct n.c.a. electrophilic radioiodination of tyrosine analogues; their in vivo stability and brain uptake in mice. *Appl.Radiat.Isot.* **45**, 929-935 (1994)
- [200] C.Krummeich, M.Holschbach, G.Stöcklin. Convenient high yield direct electrophilic n.c.a. radioiodination of poorly activated anisole derivatives using the Iodo-genTM trifluoroacetic acid system. *11th International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry*, 13-17.08.1995, Vancouver, Canada, Symposium Abstract 628-629 (1995).
- [201] H.H.Coenen und G.Stöcklin. Evaluation of radiohalogenated amino acid analogues as potential tracers for PET and SPECT studies of protein synthesis. *Radioisot.Klinik u.Forschung* **18**, 402-407 (1988)
- [202] J.T.Welsh. The effects of selective fluorination on reactivity in organic and bioorganic chemistry. In: Selective fluorination; Ed.: J.T.Welsh, ACS Symposium Series, Chap. 1, 1-15. American Chemical Society (1991) und dort aufgeführte Literatur.
- [203] J.March. Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanism and Structure. 4th Edition, 357-358, J.Wiley, USA (1992) und dort aufgeführte Literatur.
- [204] B.Langström und H.Lundqvist. The preparation of ^{11}C -methyl iodide and its use in the synthesis of ^{11}C -methyl-L-methionine. *Appl.Radiat.Isot.* **27**, 357-363 (1976)
- [205] R.Gail, H.H.Coenen, K.Hamacher, G.Stöcklin. *Appl. Radiat.Isot.* **43**, 1129 (1992)
- [206] Dawson, Elliot, Elliot, Jones. Data for biochemical research, Clarendon, Oxford (1959)
- [207] D.Bender. Zur praktisch trägerfreien ^{11}C und ^{18}F - Markierung von Benzodiazepinen (Clopazin) und Analogen, Dissertation, Universität zu Köln (1994)
- [208] D.P.Nowotnik. In: Radiopharmaceuticals, using radioactive compounds in pharmaceutic and medicine. Ed.: A.E.Theobald, Ellias Howard Limited, Chichester, West Sussex (1989)
- [209] A.Leo, C.Hansch, D.Elkins. Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* **71**, 525-616 (1971)
- [210] C.Krummeich. Zur trägerfreien (n.c.a.) Radioiodierung aromatischer Aminosäureanaloge. Diplomarbeit. Universität zu Köln (1993)
- [211] C.Krummeich. persönliche Mitteilung, Forschungszentrum Jülich GmbH.
- [212] G.Morel. Internalization and nuclear localization of peptide hormones. *Biochemical Pharmacology.* **47**, 63-76 (1994)
- [213] M.Amherdt, Y.C.Patel, L.Orci. Binding and internalization of somatostatine, insulin and glucagon by cultured rat islet cells. *J.Clin.Invest.* **84**, 412-417 (1989)
- [214] B.Draznin, N.Sherman, K.E.Sussman, R.Dahl, R.Vatter. Internalization and cellular processing of somatostatin in primary cultures of rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **177**, 980 (1985)
- [215] R.Raulf, J.Perez, D.Hoyer, C.Bruns. Differential expression of five somatostatin receptor subtypes, SSTRI-5, in the CNS and peripheral tissue. *Digestion* **55** (suppl.3), 46-53 (1994)
- [216] C.Bruns, B.Stolz, R.Albert, P.Marbach, J.Pless. OctreoScan®111 for imaging of a somatostatin receptor positive islet cell tumor in rat. In: *Hormone and Metabolic Research, Suppl.Ser.* **27**, 4-11 (1993)
- [217] M.Holschbach. persönliche Mitteilung, Forschungszentrum Jülich.
- [218] E.D.Bergmann und I.Blank. Studies on organic fluorine compounds part I. Some esters of monofluoroacetic acid and related compounds. *J.Am.Chem.Soc.* **75**, 3786 (1953)
- [219] W.R.Doiber, S.K.Lee, O.Phanstiel. The in-situ generation and trapping of some fluorine substituted ketenes. *Tetrahedron* **47**, 2065 (1991)
- [220] J.Schmaljohann. Polymergestützte Synthese von unsymmetrischen n.c.a.[$^{73,75}\text{Se}$]Selenoethern zur Markierung von Aminosäuren. *Dissertation*, Universität zu Köln (1995)

- [221] C.Wynants, G.Van Binst, H.R.Looli. SMS 201-995, a very potent analogue of somatostatin. *Int.J.Peptide Protein Res.* **25**, 608 (1985)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Stöcklin möchte ich an dieser Stelle für die interessante Themenstellung und die Chance zu freier, wissenschaftlicher Arbeit danken. Seiner unermüdlichen Diskussionsbereitschaft und seinem verbindlichen und gleichsam motivierenden Führungsstil gilt mein besonderer Respekt.

Für die Betreuung der Arbeit und das entgegengebrachte Interesse möchte ich mich ebenso herzlich bei Herrn Dr. K. Hamacher bedanken. Sein kompetenter Rat bei theoretischen und experimentellen Fragestellungen war mir stets und jederzeit eine große Hilfe.

Bei Herrn Dr. M. Holschbach möchte ich mich sowohl für seinen stets kompetenten Rat, als auch für seine geduldige und glücklicherweise nicht quantifizierbare Hilfe bei der Vorbereitung einiger Vorträge bedanken.

Meinen Kommilitonen, den Herrn Dipl. Chem. Ch. Krummeich, Dipl. Chem. J. Brockmann, Dr. J. Schmaljohann und Dipl. Chem. B. Neumaier gilt in ebenso herzlicher Weise mein Dank für unzählige, produktive Diskussionen, tatkräftige Hilfe und zahlreiche, entspannende Koffein- und Nikotin- Pausen.

Bei den Herrn PD. Dr. F. Rösch und Dipl. Chem J. Brockmann möchte ich für die engagierte und kollegiale Zusammenarbeit im Rahmen der Markierung von SMS 201-995 bedanken.

Herrn Dipl. Chem. Ch. Krummeich und Dipl. Chem. W.Förmer danke ich in gleicher Weise für die Zusammenarbeit im Rahmen der Untersuchungen mit radiohalogenierten Peptiden und Proteinen.

Herrn Dipl. Chem. S.Guhlke gilt mein Dank für seine 'Starthilfe' in die Welt der Radiofluorierung.

Ein großes Dankeschön auch an Herrn W. Wutz für die Durchführung der Tierexperimente und Herrn D. Unterlugauer für die Durchführung der NMR-Spektroskopie.

Für die Routineproduktion des Fluor-18 bedanke ich mich bei der Betriebsgruppe des Babycyclotrons des Instituts für Nuklearchemie des Forschungszentrums Jülich.

Mein abschließender, genereller Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen der Forschungs- und Routinelabors des Instituts für Nuklearchemie für das herzliche, unkomplizierte und außergewöhnlich angenehme Arbeitsklima.

Jül-3206

März 1996

ISSN 0944-2952