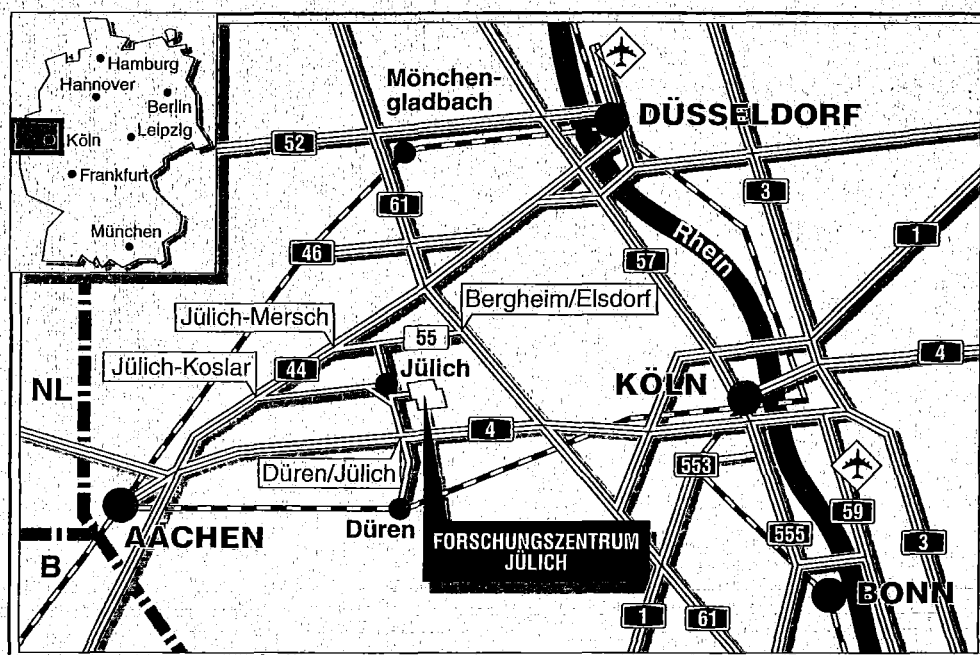


Institut für Nuklearchemie

**Zur trägerarmen Radiofluorierung
von Peptiden und Proteinen über
prosthetische Gruppen**

Stefan Guhlke



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3136

ISSN 0944-2952

Institut für Nuklearchemie Jül-3136

D38 (Diss. Universität Köln)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon : 02461/61-6102 · Telefax : 02461/61-6103 · Telex : 833556-70 kfa d

Zur trägerarmen Radiofluorierung von Peptiden und Proteinen über prosthetische Gruppen

Stefan Guhlke

Abstract

Two complementary methods, ^{18}F -fluoroacylation and ^{18}F -fluoroamidation, were studied for n.c.a. labeling of peptides and proteins.

Nucleophilic ^{18}F -fluorination of suitable protected carboxylic acids such as small aliphatic α -bromo acetic- or propionic acid esters or p-trimethylammonium triflate substituted benzoic acid esters was the common first step in the fluoroacylation methods. Following deprotection, formation of imidazolides, succinimide esters or p-nitrophenyl esters as reactive intermediates was investigated. In view of an automated synthesis for the production of ^{18}F -fluoroacylation agents as key intermediates, a route to p-nitrophenylesters via the corresponding ^{18}F -fluorinated acid chloride was also developed.

The reactivity of the ^{18}F -labeled acylation agents towards a wide range of amines with different sterical hindrance and basicities was compared. Even with low reactive aniline derivatives almost quantitative formation of the corresponding ^{18}F -fluorinated amides was observed.

For pharmacological studies using positron emission tomography (PET), the somatostatin analog octreotide was selectively ^{18}F -fluoroacylated at the N-terminus of the cyclic octapeptide using the ϵ -Lys-Boc protected precursor. Binding studies with the non radioactive fluoropropionylated standard compound and rat cortex membranes revealed high affinity ($\text{pK}_i=8.6$) to the somatostatin receptor and almost unchanged biological activity compared to the native octreotide.

As alternative to ^{18}F -fluoroacylation the inverse reaction, using ^{18}F -fluorinated amines and unlabeled acylation agents, was investigated. For this purpose halogenated, Boc-protected amines were used as precursors in the n.c.a. nucleophilic fluorination step. 3- ^{18}F Fluoropropylamine proved to be optimal for ^{18}F -fluoroamidation with respect to radiochemical yield and reactivity towards acylation agents. Thus suitable derivatives of the vitamin Biotin could be labeled with high radiochemical yields using ^{18}F -fluoroacylation as well as ^{18}F -fluoroamidation. Both methods led to labeled compounds with full biological activity as shown by their binding ability to the protein avidin. Avidin itself could be labeled using the ^{18}F -fluoroacylation method. In this case affinity chromatography revealed preservation of the biological activity of the ^{18}F -labeled compound.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	Kurzlebige Positronenstrahler für Medizin und Pharmakologie	1
1.2	Produktion von [^{18}F]Fluor-Markierungsvorläufern	5
1.3	Einige chemische und kinetische Aspekte der Chemie praktisch trägerfreier Radionuklide	7
1.4	Grundlegende Verfahren zur Markierung organischer Moleküle mit [^{18}F]Fluor	10
1.5	Radiohalogenierung von Peptiden und Proteinen; Die Sonderstellung des [^{18}F]Fluors	16
1.6	Problemstellung	25
2.	Ergebnisse und Diskussion	26
2.1	^{18}F -Fluoracylierung von Peptiden und Proteinen ohne Trägerzusatz	26
2.1.1	^{18}F -Fluoracylierung via n.c.a. 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure methylester	26
2.1.1.1	Einfluß der Nukleophilie des Amins auf die Reaktion mit 2-[^{18}F]Fluorpropionsäuremethylester	26
2.1.2	Konzept für reaktive n.c.a. ^{18}F -Fluoracylierungsreagenzien	28
2.1.3.	Carboxygeschützte Carbonsäuren zur n.c.a. ^{18}F -Fluorierung	29
2.1.4	Verfahrensoptimierung für die Routinesynthese von 2-[^{18}F]Fluorcarbonsäureestern	33

2.1.4.1	Untersuchung von quaternären Ammoniumsalzen als leicht abtrennbare Vorläufer zur nukleophilen Radiofluorierung	33
2.1.4.2	Bewertung von Betylaten als Vorläufer zur nukleophilen Radiofluorierung	35
2.1.4.3	Abtrennung des Vorläufers durch Quaternisierung nach der Markierung	37
2.1.5	Hydrolyse der ^{18}F -fluorierten Ester	41
2.1.6	Darstellung reaktiver ^{18}F -Fluoracylierungsreagenzien	44
2.1.6.1	Darstellung von n.c.a. ^{18}F -Carbonsäureimidazoliden als reaktive Fluoracylierungsagentien	44
2.1.6.2	Darstellung von n.c.a. ^{18}F -Carbonsäureaktivestern	48
2.1.6.3	Darstellung von n.c.a. 2- ^{18}F Fluorpropionsäurechlorid	53
2.1.6.4	Synthese von 2- ^{18}F Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester via 2- ^{18}F Fluorpropionsäurechlorid	55
2.1.7	Reaktionen der aktivierten n.c.a. ^{18}F -Fluoracylierungsreagenzien mit Aminverbindungen	58
2.1.7.1	Reaktionen der ^{18}F -Aktivester mit Modellaminen und -peptiden	58
2.1.7.2	Abhängigkeit der ^{18}F -Fluoracylierungsausbeute von Konzentration und Nukleophilie der Amine	60
2.1.7.3	Direkte Reaktionen des n.c.a. 2- ^{18}F Fluopropionsäurechlorids mit Aminen	62
2.1.7.4	Einige stereochemische Aspekte bei Acylierungen mit aktivierten n.c.a. 2- ^{18}F Fluorpropionsäurederivaten	64
2.1.8	^{18}F -Markierung des Somatostatin-Rezeptorliganden Octreotid via n.c.a. 2- ^{18}F Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester	66

2.2	Alternative Methoden der ^{18}F -Fluormarkierung von Peptiden und Proteinen ohne Trägerzusatz	69
2.2.1	N. c. a. ^{18}F -Fluoramidierung von aktivierten Acylverbindungen	69
2.2.1.1	Nukleophile n.c.a. ^{18}F -Fluorierung geschützter Amine	70
2.2.1.2	Syntheseablauf der ^{18}F -Fluoramidierung	72
2.2.1.3	Abhängigkeit der n.c.a. ^{18}F -Fluoramidierungsausbeute von der Konzentration des Acylierungsreagenz	73
2.2.1.4	pH- Abhängigkeit der n.c.a. ^{18}F -Fluoramidierungsausbeute	74
2.2.2.	Das [^{18}F]Fluor-Biotin-Avidin System	76
2.2.2.1	Synthese von n.c.a. ^{18}F -fluorierten Biotinderivaten	77
2.2.2.2	Bestimmung der effektiven spezifischen Aktivität ^{18}F -fluorierter Biotinderivate	82
2.2.2.3	^{18}F -Fluormarkierung des Proteins Avidin durch Fluoracylierung	84
2.2.2.5	Nachweis der Bindungsfähigkeit ^{18}F -fluormarkierten Biotins und Avidins	85
2.3	Vergleich der ^{18}F -Fluorierungsreagenzien	87
3.	Experimentelles	88
3.1	Chemikalien, Geräte und analytische Verfahren	88
3.1.1	Chemikalien	88
3.1.2	NMR-, IR-, Massen-Spektroskopie, Schmelzpunktbestimmung und Elementaranalyse	88
3.1.3	HPLC und Radio-HPLC	89

3.1.4	Radio-DC	92
3.1.5	Sonstige Radioaktivitätsmessung	92
3.2	Darstellung von Vorläuferverbindungen zur nukleophilen Substitution mit [^{18}F]Fluorid	93
3.2.1	Allgemeines Herstellungsverfahren von 2-Brompropionsäureestern	93
3.2.2	Darstellung von quaternären Ammoniumsalzen	95
3.2.3	Darstellung Boc-geschützter Amine	96
3.2.4	Darstellung von Brompropionylamiden	97
3.2.5	Biotin-2'-bromethylester	98
3.3	Darstellung inaktiver Referenzverbindungen (Chromatographiestandards)	99
3.4	Darstellung sonstiger Verbindungen	105
3.5	Radiosynthesen	106
3.5.1	Produktion von n.c.a. [^{18}F]Fluorid	106
3.5.2	Nukleophile Substitutionsreaktionen mit n.c.a. ^{18}F -Fluorid	108
3.5.3	n.c.a. ^{18}F -Fluoracylierung via 2- ^{18}F Fluorpropionsäuremethylester	108
3.5.4	n.c.a. ^{18}F -Fluoracylierung via 2- ^{18}F Fluorpropionsäureaktivestern	108
3.5.5	Darstellung von n.c.a. 4- ^{18}F Fluorobenzoessäure-N-hydroxysuccinimidylester	110
3.5.6	Abtrennung von Bromvorläufern durch Quaternisierung mit 4-Dimethylaminopyridin	110

3.5.7	n.c.a ^{18}F -Fluoracylierung via 2- ^{18}F Fluorpropionsäurechlorid	111
3.5.8	Produktionsversuche von 2- ^{18}F Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester (fernbediente Synthese in einer "heißen Zelle")	112
3.5.9	Bestimmung der spezifischen Aktivität von 2- ^{18}F Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester	115
3.5.10	2- ^{18}F Fluorpropionylierung von Octreotid	116
3.5.11	Allgemeine Methode zur Darstellung von n.c.a. ^{18}F -Aminen	117
3.5.12	n.c.a ^{18}F -Fluoramidierung aktivierter Carbonsäuren	117
3.5.13	Direkte n.c.a. ^{18}F -Fluorierung des Biotin-2'-bromethylesters	117
4.	Zusammenfassung	119
5.	Literatur	122

1. Einleitung

1.1 Kurzlebige Positronenstrahler für Medizin und Pharmakologie

Unter den bildgebenden Verfahren der modernen Nuklearmedizin haben die Methoden **SPET** (Single-Photon-Emission-Tomography) und **PET** (Positron-Emission-Tomography) hervorragende Bedeutung erlangt [1-3]. Die Möglichkeit der exakten Quantifizierung räumt der PET jedoch eine gewisse Sonderstellung ein. Der Grund hierfür ist in der Natur der Positronenstrahlung zu suchen.

Es existieren zwei Möglichkeiten für die Stabilisierung neutronenarmer Radionuklide. Ein Proton unter Einfang eines Hüllenelektrons in ein Neutron umzuwandeln, ist unter dem Begriff Elektroneneinfang (engl. Electron-capture, kurz EC) bekannt. Bei diesem Prozeß wird jedoch keine für die PET verwertbare Strahlung emittiert. Die zweite Möglichkeit besteht in der Umwandlung eines Protons in ein Neutron unter gleichzeitiger Aussendung eines Positrons und eines Antineutrinos. Diese ist für die PET verwertbar. Nach Abgabe seiner zunächst hohen kinetischen Energie durch Wechselwirkung mit der umgebenden Materie kombiniert das thermalisierte Positron (β^+) mit seinem Antiteilchen, einem Elektron, unter gegenseitiger Vernichtung. Dabei werden zwei γ -Quanten gebildet, die jeweils die Energie der Ruhemasse eines Elektrons davontragen. Diese Art von γ -Strahlung wird deshalb auch Vernichtungsstrahlung genannt. Sie tritt als charakteristische Strahlung mit einer Energie von 511 keV bei allen Positronenstrahlern auf. Die Rolle der Positronenstrahler in Medizin und Pharmakologie beruht nun auf der Eigenschaft die beiden γ -Quanten der Vernichtungsstrahlung unter einem Winkel von nahezu 180° auszusenden.

Damit wird es bei diametraler Anordnung von Detektoren um eine Strahlenquelle möglich, die Strahlung ortsabhängig genau zu detektieren. Dies wird unter Zuhilfenahme einer Koinzidenzschaltung erreicht. Hierbei werden nur solche Impulse zweier gegenüberliegender Detektoren registriert, die innerhalb eines extrem kurzen Zeitintervalls von einigen Nanosekunden auftreten. Durch diese elektronische Kollimation erfaßt man nur solche Zerfallsereignisse, die auf der Verbindungslinie der Detektoren geschehen und erreicht damit eine hohe Ortsauflösung, die u.a. durch die notwendige Größe der Detektoren und die β^+ -Reichweite bestimmt wird. Unabhängig vom Ort des Positronenzerfalls müssen die γ -Quanten stets die gesamte Strecke zwischen den Detektoren durchlaufen. Das bedeutet, daß die Summe der Absorptions- und Streuverluste konstant ist und einer externen Durchstrahlung des Objektes entspricht. Bestimmt man nun diese Verluste mittels einer zweiten Transmissionsmessung, kann damit die Emissionsmessung exakt korrigiert und somit quantifiziert werden.

Moderne PET-Geräte erlauben heute die quantitative Messung der Aktivitätskonzentration von physiologisch aktiven, mit Positronenstrahlern markierten Substanzen in nano- bis mikromolaren Konzentrationen. Die Auflösung beträgt dabei je nach mittlerer Energie des Positrons nur wenige Millimeter [zur Übersicht siehe 2,4]. Die hohe Empfindlichkeit und das hohe Auflösungsvermögen machen die PET zu einem attraktiven Forschungsinstrument besonders für in-vivo Studien in den Lebenswissenschaften. Durch dynamische Messungen und entsprechendes bio-mathematisches Modelling können physiologische Parameter bestimmt werden. Die Messung regionaler, biochemischer Funktionen oder metabolischer Prozesse mit Hilfe der PET oder auch SPET gehört daher zu den Haupteinsatzgebieten dieser Verfahren. Dies erfordert markierte endogene bzw. exogene Substrate, die an einem solchen Prozess in geeigneter Weise teilnehmen. Dies ist somit eine der grundlegenden Bedingung, die an entsprechende Tracer gestellt werden. Die Entwicklung bzw. das Design neuer Tracer ist also an physiologische Konzepte geknüpft [5]. Solche sind beispielsweise die Bestimmung von Stoffwechselraten, Enzymkonzentrationen und -aktivität, Rezeptordichten und Besetzungsgrad, die Biochemie von Neurotransmittern oder die Untersuchung von Immunreaktionen. Neben Anwendungen in der Grundlagenforschung hat sich die PET mittlerweile auch in der routinemäßigen klinischen Diagnostik etabliert und zu einer stetig steigenden Zahl von PET-Zentren in der Welt geführt [6].

Die Verfügbarkeit von positronenemittierenden Radionukliden ist die Voraussetzung der oben genannten Verfahren. Eine ganze Reihe von Isotopen sogenannten "bio-organischer" Elemente wie Kohlenstoff-11, Stickstoff-13 und Sauerstoff-15 gehört in diese Gruppe: Zur Untersuchung physiologischer Prozesse sind diese naturgemäß bestens geeignet. Eine Auswahl der wichtigsten zur Zeit gebräuchlichen Positronenstrahler ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Nukleare Daten einiger kurzlebiger medizinisch relevanter Positronenstrahler [6]

Nuklid	$t_{1/2}$	Zerfallsart % Häufigkeit	$E_{\beta \text{ max}}$ [keV]	Hauptlinie [keV] (% Häufigkeit)
^{11}C	20,3 min	β^+ (99,8) EC (0,2)	960	511 (199,6)
^{13}N	9,96 min	β^+ (100)	1190	511 (200)
^{15}O	2,03 min	β^+ (99,9) EC (0,1)	1723	511 (200)
^{18}F	109,7 min	β^+ (96,9) EC (3,1)	635	511 (193,8)
^{62}Cu	9,7	β^+ (98) EC (2)	2930	511 (196)
^{68}Ga	68,3 min	β^+ (90) EC (10)	1900	511 (180) 1077 (3)
^{73}Se	7,1 h	β^+ (65) EC (35)	1320	511 (130)
^{75}Br	98 min	β^+ (75,5) EC (24,5)	1740	511 (151) 287 (92)
^{76}Br	16,1 h	β^+ (57) EC (43)	3900	511 (114) 559 (74)
^{82}Rb	1,3 min	β^+ (96) EC (4)	3350	511 (192)
^{86}Y	14,7 h	β^+ (34) EC (66)	1300	511 (68)
^{94}Tc	4,9 h	β^+ (11) EC (89)	820	511(22)
^{124}I	4,15 d	β^+ (25) EC (75)	2140	511 (50)

Die für die Markierung von PET-Radiopharmaka am häufigsten angewandten Nuklide sind Kohlenstoff-11, Stickstoff-13, Sauerstoff-15 und, wegen seiner ausgezeichneten Zerfallseigenschaften (s. Tabelle 1), Fluor-18. Seltener werden Brom- und Selen-Isotope eingesetzt. Eine Besonderheit zeichnet die Isotope Kupfer-62, Gallium-68 und Rubidium-82 aus, welche im Gegensatz zu den anderen oben aufgeführten Isotopen nicht direkt am Zyklotron, sondern über ihre Mütter produziert werden. Sie fallen als sogenannte Generatorknuklide an und erlauben damit

prinzipiell zyklotronunabhängige Forschung mit PET-Nukliden [7]. Gallium-68 stammt vom Mutternuklid Germanium-68 ab welches eine Halbwertszeit von 271 Tagen aufweist. Die Kupfer- und Rubidium-Generatoren mit Halbwertszeiten der Mutternuklide Zink-62 und Strontium-82 von nur 9,1 Stunden bzw. 25,5 Tagen haben bis jetzt nur geringe Verbreitung erlangt.

Bei Synthesen mit "organischen", kurzlebigen Positronenstrahlern kann also auf Grund der Verfügbarkeit verschiedener Nuklide eine Markierung z.B. von körpereigenen Substanzen unter völligem Erhalt der Biochemie der betrachteten Verbindung erfolgen. Bei Fremdmarkierungen hingegen erhält man sogenannte Analog-tracer, die bei Berücksichtigung von Struktur-Analogien wie z.B. Ersatz von Fluor für das ähnlich große Wasserstoffatom, oder Brom für eine Methylgruppe, oder Selen für Schwefel in vielen Fällen sehr nützliche Tracer liefern.

Ein für den medizinisch, pharmakologischen Bereich äußerst wichtiger Aspekt beim Zerfall kurzlebiger Positronenstrahler ergibt sich aus der Tatsache, daß die Masse der radioaktiven Substanz, trotz hoher Strahlung, extrem niedrig gehalten werden kann (nano-subnanomolar). Dadurch wird es zum Beispiel möglich, selbst hochtoxische oder pharmakologisch sehr wirksame Verbindungen in vivo zu untersuchen. Tabelle 2 gibt neben den spezifischen Aktivitäten der entsprechenden Markierungsvorläufer noch die Kernreaktion und das am häufigsten verwendete Targetmaterial sowie die theoretische Targetausbeute wieder:

Tabelle 2: Herstellung und spezifische Aktivitäten kurzlebiger "trägerfreier" Markierungsvorläufer [nach 1,6]

Vorläufer	Kernreaktion	Target-material	theoret. Target-ausbeute [MBq/µAh]	Spezifische Aktivität [GBq/mmol]	
				theoretisch	praktisch
[¹¹ C]CO ₂	¹⁴ N(p,α) ¹¹ C	N ₂ (O ₂)	3820	3,4·10 ⁸	10 ⁴ -10 ⁵
[¹¹ C]HCN	¹⁴ N(p,α) ¹¹ C	N ₂ (H ₂)	s.o.	s.o.	10 ⁴ -10 ⁵
[¹⁸ F]F ⁻	¹⁸ O(p,n) ¹⁸ F	H ₂ ¹⁸ O	2960	6,4·10 ⁷	10 ⁵ -10 ⁶
[¹⁸ F]F ₂	²⁰ Ne(d,α) ¹⁸ F	Ne(F ₂)	1110	s.o.	10 ¹ -10 ²
[¹³ N]NO ₃ ⁻	¹⁶ O(p,α) ¹³ N	H ₂ O	1665	6,9·10 ⁸	
[⁷⁵ Br]Br ⁻	⁷⁶ Se(p,2n) ⁷⁵ Br	⁷⁶ SeO ₂	3700	7,2·10 ⁷	10 ⁴

Herausragende Positionen unter den verschiedenen PET-Nukliden kommen den Isotopen Kohlenstoff-11 und Fluor-18 zu. Insbesondere für die Herstellung organischer Biomoleküle und Pharmaka stellt die Möglichkeit des Einsatzes von Kohlenstoff-11 einen nicht abzuschätzenden Vorteil gegenüber anderen Nukliden

dar. Jedoch ist durch die kurze Halbwertszeit von 20 Minuten eine starke zeitliche Limitation gegeben. Mit einer Halbwertszeit von ca. zwei Stunden stellt Fluor-18 bezüglich der Zeitlimitierung von Synthese, Reinigung und Qualitätskontrolle und der Kinetik vieler Radiopharmaka, sowie der Strahlenbelastung der Patienten ein Optimum dar. Ein weiterer Vorteil besteht in der niedrigen β^+ -Energie, die zu der besten möglichen Ortsauflösung unter den in Tabelle 1 aufgeführten Nukliden führt. Weiterhin ist die praktisch erzielbare spezifische Aktivität am höchsten (Tabelle 2). Dies kann z.B. bei rezeptorbindenden Radiopharmaka von ausschlaggebender Bedeutung sein.

Mit den genannten Vorteilen kurzlebiger Positronenstrahler gehen jedoch auch signifikante Probleme bei Herstellung, Qualitätskontrolle und Vertrieb solcher Radiopharmaka einher. Insbesondere sind der hohe strahlenschutztechnische Aufwand zu nennen. Wegen der hohen Anfangsaktivitäten bei der Markierung mit kurzlebigen Isotopen müssen die Synthesen automatisiert in Bleizellen durchgeführt werden. Längere Zeit beanspruchende Qualitätskontrollen können häufig erst nach Verabreichung des Radiopharmakons durchgeführt werden. Die Kurzlebigkeit einiger Nuklide erfordert zwingend den Betrieb eines "in-house" Zyklotrons, während für vergleichsweise längerlebige Nuklide wie Fluor-18 eine Einbindung in ein regionales Satellitensystem, d. h. Versorgung von PET-Geräten ohne eigenes Zyklotron, möglich ist [5].

1.2 Produktion von [^{18}F]Fluor Markierungsvorläufern

Die Kenntnis von nuklearen Daten und Anregungsfunktionen bildet die Voraussetzung zur Produktion von Radionukliden. Die verschiedenen Produktionsmethoden zur Gewinnung von Fluor-18 unterscheiden sich zum Teil erheblich und entscheiden über die chemische Form, die spezifische Aktivität und die absolut produzierbare Aktivität. Von den zahlreichen bekannten Produktionsmethoden sind die heute wichtigsten in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Wichtige Prozesse zur Erzeugung von ^{18}F -Fluor an Zyklotronen [nach 9]

Kernreaktion	$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	$^{16}\text{O}(\text{}^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$	$^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$
Target	H_2^{18}O	H_2O	Ne (0.1-0.2% F_2 , 18 bar)	$^{18}\text{O}_2$ (20 bar)
Teilchen- energie [MeV]	16→0	36→0	11.2→0	10→0
chemische Form des F-18	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$
Ausbeute [MBq/ μAh]	2220	420	370-444	~370
spez. Aktivität [GBq/mmol]	$<3,7 \cdot 10^6$	$<3,7 \cdot 10^6$	37-370	37-1850

Fluor-18 kann trägerarm (engl.: no-carrier-added; n.c.a), als solvatisiertes Anion durch Bestrahlung von Wassertargets erhalten werden. Das angereicherte ^{18}O -Wassertarget wird auf Grund des hohen Wirkungsquerschnittes der $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Kernreaktion [9] bevorzugt zur ^{18}F -Fluoridproduktion eingesetzt. Die hohen Targetausbeuten dieser Reaktion gestatten die Produktion von Fluor-18 in GBq-Mengen mittels Zyklotronen, die 10 MeV Protonen als Geschoßteilchen [8] verwenden. Da die Möglichkeit besteht, das Fluoridion an Anionenaustauscher zu binden, kann das relativ teure angereicherte Wasser zurückgewonnen werden und erneut zu Bestrahlungszwecken genutzt werden. Dieses Verfahren führt gleichzeitig zu einer Reinigung von störenden Metallkationen, die in der folgenden nukleophilen Markierungssynthese zu Ausbeuteverminderung führen. Deshalb wird dieses Verfahren bei der Routineproduktion von Fluorradiopharmaka, wie z.B. $[^{18}\text{F}]$ Fluor-deoxyglucose [10], eingesetzt. Die Produktion von anionischem $[^{18}\text{F}]$ Fluorid an angereicherten Wassertargets stellt heute eindeutig die am häufigsten angewandte Methode zur Erzeugung dieses Radionuklides dar.

Für elektrophile Synthesen, als $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ vorliegendes Fluor kann nur mit Hilfe von Gastargets erzeugt werden. Dies geschieht unter Zugabe von kleinen Mengen elementaren Fluors als Trägergas, sodaß die spezifischen Aktivitäten um ein vielfaches gegenüber der anionischen Spezies niedriger liegen (vgl. Tabelle 3). Die gebräuchlichste Variante ist hier der $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ -Prozess. Die Bestrahlung wird an Hochdruck-Neontargets mit Deuteronen einer Energie von vorzugsweise mehr als 10 MeV durchgeführt [11]. Mit kleinen Zyklotronen, die nur Protonen als Geschoß verwenden, kann der $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Prozess Verwendung finden, jedoch muß hier die Bestrahlung in zwei Schritten erfolgen: Zunächst wird O-18 angereicherter Sauerstoff bestrahlt. Anschließend wird in einer Folgebestrahlung mit 1%

Fluor in Krypton das an der Gefäßwand anhaftende Fluor-18 in die Gasphase gebracht [12].

Eine weniger oft eingesetzte Variante besteht in der Reaktorproduktion von Fluor-18. Hier wird das Fluor-18 über die Reaktionskette ${}^6\text{Li}(n,\alpha){}^3\text{H} \rightarrow {}^{16}\text{O}({}^3\text{H},n){}^{18}\text{F}$ an LiOH oder Li_2CO_3 erzeugt. Die erhältliche Fluoraktivität ist jedoch mit 1-4 GBq relativ niedrig einzustufen, außerdem ist eine aufwendige Reinigung zur Abtrennung von Tritium und anderen Beiprodukten erforderlich [zur Übersicht s. 13].

1.3 Einige chemische und kinetische Aspekte der Chemie praktisch trägerfreier Radionuklide

Beim Umgang mit radioaktiv markierten Verbindungen hat man es oft mit sehr kleinen Substanzmengen oder mit sehr niedrigen Konzentrationen zu tun (zur Übersicht s. 14). Das gilt insbesondere für Radionuklide mit kurzer bis sehr kurzer Halbwertszeit, die wegen der angestrebten relativ kleinen Strahlendosis bei medizinischer Applikation in vivo besonders relevant sind. Die Masse (Zahl der Atome, Moleküle N) ist über die Beziehung

$$N = A \frac{T_{1/2}}{\ln 2}$$

mit der Aktivität A verknüpft. Damit ist auch die maximal erreichbare spezifische Aktivität eines Tracers mit der Halbwertszeit des zur Markierung benutzten Radionuklides gegeben.

1,0 mg Uran-238 ($t_{1/2}=4,6 \cdot 10^9 \text{a}$) entspricht z.B einer Aktivität von $1,24 \cdot 10^4$ Bq (ca. 0,3 μCi) während 1,0 mg trägerfreiem Fluor-18 eine Aktivität von $3,5 \cdot 10^{15}$ Bq (ca. 100000 Ci) zukommt. Für radiochemisch relevante Arbeiten mit einer Aktivitätsmenge von beispielsweise 370 MBq (10 mCi) entspricht dies 128 gA Uran-238 was einer Masse von ca. 30 kg des Stoffes entspricht. Im Falle von Fluor-18 entspricht die gleiche Aktivität nur $5,839 \cdot 10^{-12}$ gA mit einer Masse von 0,105 ng. Unter Berücksichtigung von Verdünnungen der spezifischen Aktivität durch ubiquitär in Spuren vorhandenem stabilem ${}^{19}\text{F}$ -Fluor entspricht dies einer tatsächlich vorliegenden Stoffmenge von ca. 0,06-0,6 ngA. Zwangsläufig werden solch niedrige Stoffmengen nicht in fester Form, sondern in Lösung gehandhabt, d.h. man arbeitet mit sehr verdünnten Lösungen. Die Probleme sind dann durch die Absorption an Gefäßwänden und durch Radiokolloidbildung gegeben. Sobald Konzentrationsbereiche von etwa 10^{-4} mol/l unterschritten werden, muß mit der Möglichkeit einer merklichen Absorption Gefäßwänden gerechnet werden. Der Umfang einer solchen hängt von den chemischen Eigenschaften der Verbindung ab, in der das betreffende Radionuklid vorliegt und von den chemischen Eigenschaften der Gefäßwand und ihrer Reinheit. An Glasoberflächen finden z.B. Ionenaustauschprozesse statt, die

häufig in neutralen Lösungen besonders hervortreten. Hier kann es zu einem Eindiffundieren von Ionen kommen, so daß die einmal absorbierten Ionen nur noch durch Abätzen mit Flußsäure von der Glasoberfläche entfernt werden können. In Gegenwart von z.B. organischen Komplexbildnern, wie sie auch bei nukleophilen Syntheseführungen mit $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ angewandt werden, sind solche Sorptionen im allgemeinen geringer. Auch die Verwendung von speziellen Gefäßen mit hydrophoben Oberflächen wie z.B. Polyethylen oder Glaskohlenstoff kann zu erheblichen Verbesserungen gegenüber herkömmlichem Glas führen. Darüber hinaus kann auch der Zusatz eines nichtisotopen Trägers die Adsorptionsverluste weitgehend verhindern.

Ein weiteres Problem in stark verdünnten Lösungen kann die Bildung von Radiokolloiden sein. Dabei kann es sich um Eigenkolloide oder um Fremdkolloide handeln. Beim Umgang mit kurzlebigen Nukliden von hoher spezifischer Aktivität ist die Bildung von Fremdkolloiden schon auf Grund der Stoßwahrscheinlichkeiten wesentlich ausgeprägter. Von Eigenkolloiden spricht man, wenn die Substanz selbst ein Kolloid bildet, z.B. durch Polykondensation eines Hydroxids zu einer hochmolekularen Verbindung. Solche Zusammenlagerungen können häufig durch Zugabe geeigneter Komplexbildner verhindert werden. Fremdkolloide entstehen durch Anlagerung der radioaktiven Substanz an bereits vorhandene Kolloide. Solche sind z.B. als Staubpartikel praktisch in jeder Lösung enthalten. Diese Fremdpartikel sind häufig in der Lage, Kationen und Anionen durch Ionenaustausch zu binden, oder aber durch Komplexbildung zu einer Chemisorption zu führen. Der Umfang der Bildung von Fremdkolloiden hängt von der Konzentration an kolloidalen Fremdpartikeln, ihrer chemischen und physikalischen Beschaffenheit sowie vom chemischen Zustand und der Konzentration der gelösten Radionuklide ab.

Das Arbeiten in stark verdünnten Lösungen kann jedoch auch von Vorteil sein. So führt trägerfreies Arbeiten praktisch zur idealen Erfüllung des Nernst'schen Verteilungssatzes, was in der klassischen Chemie oft nur näherungsweise erfüllt wird. Vom reaktionskinetischen Standpunkt aus betrachtet liegen zumeist Reaktionen pseudo erster Ordnung vor, da die Konzentration eines nicht radioaktiven Reaktionspartners in der Regel groß gegenüber der radioaktiven Verbindung ist. Dadurch kann die Konzentration der nicht radioaktiven Komponente während der Reaktion als konstant betrachtet werden.

Für die Zunahme eines Produktes bei einer Reaktion erster Ordnung der allgemeinen Form $A \rightarrow P$ gilt das Zeitgesetz erster Ordnung:

$$\frac{dA}{dt} = -kA$$

durch Integration erhält man:

$$A = A_0 e^{-kt}$$

mit $P = A_0 - A$ gilt:

$$[P] = [A_0] - [A_0]e^{-kt}$$

und umgeformt:

$$[P] = [A_0](1 - e^{-kt})$$

wobei $[P]$ die Konzentration des Produktes, $[A_0]$ die Ausgangskonzentration, k die Geschwindigkeitskonstante und t die Reaktionszeit darstellen.

Für bimolekulare Reaktionen der allgemeinen Form $A + B \rightarrow P$, die wegen praktisch konstanter Konzentration von B einer Kinetik pseudo erster Ordnung gehorchen, gilt dann analog:

$$[P] = [A_0](1 - e^{-k't})$$

mit $k' = k[B]$

Die Konstante k' , die als apparente Geschwindigkeitskonstante bezeichnet wird, stellt das Produkt der wahren Geschwindigkeitskonstanten k und der Konzentration des Reaktionspartners $[B]$ dar. Bei konstanten Reaktionszeiten und variierenden Konzentrationen des Reaktionspartners B kann die Zeit in die Geschwindigkeitskonstante einbezogen werden. In diesem Fall erhält man bei entsprechendem Ansatz:

$$[P] = [A_0](1 - e^{-k''[B]t})$$

mit $k'' = k t$

Die Abhängigkeit der Produktausbeute von der Konzentration eines Reaktionspartners B , der mit einer trägerfreien Menge eines Stoffes A reagiert, nimmt also einen der Zeitabhängigkeit analogen, exponentiellen Verlauf bis zu einem Sättigungs- oder Maximalwert $[A_0]$.

Die auf den Anfang der Synthese zerfallskorrigierte radiochemische Ausbeute nimmt also exponentiell mit der Reaktionszeit zu und erreicht einen Sättigungswert, der jedoch meist wegen Nebenreaktionen, Adsorptionsverlusten etc. von A_0 verschieden ist. Die Steigung der Kurve ist dabei abhängig von der wahren Geschwindigkeitskonstanten k und der Konzentration des Reaktionspartners B .

Für den Fall, daß keine Zerfallskorrektur durchgeführt wurde, gilt für die tatsächliche Produktaktivität folgende Gleichung:

$$[P] = [A_0](1 - e^{-kt})e^{-\lambda t}$$

Diese Kurve weist ein Maximum auf, dessen Lage sowohl von der Geschwindigkeitskonstanten der betrachteten Reaktion als auch von der Zerfallskonstanten des beteiligten Radionuklides abhängig ist. Die folgende Graphik (Abb. 1) zeigt typische

Kurvenverläufe solcher pseudo erster Ordnung verlaufender Reaktionen für den korrigierten und den nicht zerfallskorrigierten Fall. Wegen des radioaktiven Zerfalls spielt die Zeitabhängigkeit von chemischen Reaktionen beim Umgang mit kurzlebigen Radionukliden eine besondere Rolle, so daß häufig radiochemische Ausbeuten als Funktion der Zeit bestimmt werden:

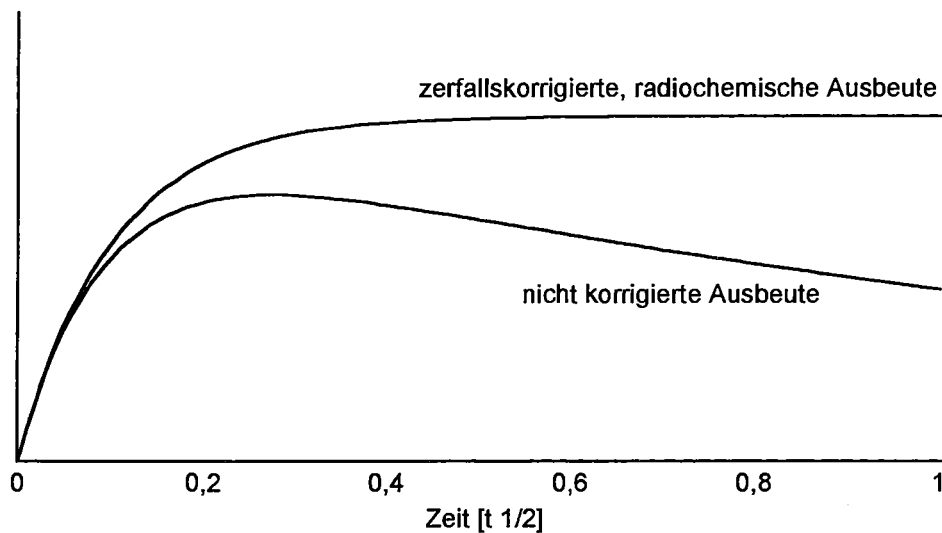


Abbildung 1: Nicht korrigierte und radiochemische Ausbeuten als Funktion der Reaktionszeit

Abbildung 1 verdeutlicht, daß es günstig ist, die Reaktion zu einem bestimmten optimalen Zeitpunkt, vor Erreichen der chemischen Sättigungsaktivität abubrechen. Darüber hinaus spielen jedoch weitere Kriterien wie Aufarbeitung, radiochemische Reinheit, chemische Reinheit etc. eine mitentscheidende Rolle, zu welchem Zeitpunkt eine Reaktion beendet wird.

1.4 Grundlegende Verfahren zur Markierung organischer Moleküle mit [^{18}F]Fluor

Die Markierungschemie zur Einführung von Fluor-18 in organische Moleküle läßt sich in zwei Hauptgruppen einteilen:

1. Direkte Markierungsmethoden

- Nukleophile Fluorierung
- Elektrophile Substitutionen

2. Markierungen mit Hilfe prosthetischer Gruppen

- Fluoralkylierung
- Fluoracylierung
- Fluoramidierung

Direkte Fluorierungen

Die nukleophile Fluorierung, ausgehend von anionischem [^{18}F]Fluorid, ist zur Zeit die wichtigste Methode zur Synthese fluorierter Radiopharmaka, da nur auf diesem Wege trägerfreie Produkte erhalten werden können (siehe Tabelle 2). Das kleine Fluorid-ion wird aufgrund seiner hohen Ladungsdichte in Anwesenheit von aciden Protonen leicht protoniert. In wässriger Lösung ist es von einer starken Hydrathülle umgeben ($\Delta H_{\text{hyd}} = 506 \text{ KJ/mol}$) (15) und damit sehr unreaktiv. Die Beachtung folgender Punkte wurden für erfolgreiches Arbeiten mit Fluor-18 hervor-gehoben (16,17). Sie gelten sinngemäß auch auf andere Radionuklide:

- Aktivierung des Fluoridions zur Steigerung der Nukleophilie und Löslichkeit
- Verwendung von dipolar aprotischen Lösungsmitteln
- Vermeiden von Substraten mit aciden Protonen
- Minimierung von Adsorptions- und Abdampfverlusten durch Erhöhung der Reaktivität, Einsatz von nichtisotopem Träger und geeigneten Gefäßen
- Vermeidung von Nebenreaktionen durch Einsatz hochreiner Chemikalien und Lösungsmittel

Die Reaktivität des Fluoridions wird also entscheidend dadurch beeinflußt, wie gut es gelingt, seine prinzipiell hohe Nukleophilie tatsächlich wirksam werden zu lassen. Dabei werden nukleophile Substitutionen nach einem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus angestrebt, da $\text{S}_{\text{N}}1$ Reaktionen auf Grund der niedrigen Stoßwahrscheinlichkeit eines

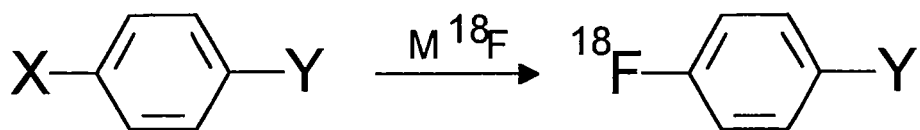
Carbokationen mit einer trägerfreien Menge Fluorids extrem benachteiligt sind. Außerdem nimmt durch die hohe Reaktivität von Carbokationen naturgemäß auch deren Selektivität gegenüber Nukleophilen ab. Dadurch können andere, neben dem trägerfreien Fluorid in viel höherer Konzentration in der Reaktionslösung vorliegende Nukleophile, eine effektive Fluorierung verhindern. Welcher Reaktionsmechanismus zum tragen kommt, wird mitentscheidend vom jeweiligen Medium geprägt. S_N2 -Reaktionen werden vorzugsweise in dipolar aprotischen Medien durchgeführt. Sie besitzen jedoch nur begrenzte Löslichkeiten für ionische Spezies. Aus diesem Grund werden trägerfreie ^{18}F -Fluorierungen fast immer in Gegenwart von weichen (Gegen-) Kationen durchgeführt. Hierzu eignen sich auch Kryptanden, die neben ihren löslichkeitsfördernden Eigenschaften zudem noch die Reaktivität des Anions (Fluorid) durch eine große räumliche Ladungstrennung erhöhen, so daß äußerst reaktive, sogenannte "nackte Anionen" vorliegen.

Tetraalkylammoniumsalze R_4N^+ (R = methyl, ethyl, butyl) [18] kommen deswegen häufig bei nukleophilen ^{18}F -Fluorierungen [19] als positive Gegenionen des Fluorids in Frage. Aber auch polymergebundene Ammoniumsalze [20,21] oder Kronenether [22] eignen sich hervorragend für diesen Anwendungsbereich. Im speziellen haben sich die Systeme Tetraethylammoniumhydroxid in Acetonitril [23] als Beispiel für quaternäre Ammoniumsalze und das System Kryptofix 2.2.2 / Kaliumcarbonat in Acetonitril [24,25] als Beispiel für Polyether gestützte ^{18}F -Fluorierungen besonders bewährt.

Als bevorzugte Lösungsmittel dienen Acetonitril, Dimethylformamid (DMF) und Dimethylsulfoxid (DMSO) sowie in neuerer Zeit auch Dimethylacetamid [26]. Dipolar aprotische Lösungsmittel mit niedrigeren Dielektrizitätskonstanten wie Aceton, Tetrahydrofuran, Dichlormethan etc. finden hingegen nur vereinzelt Anwendung. In den Medien Acetonitril, DMF und DMSO werden bei stereochemisch relevanten Syntheseprodukten wie z.B. 2- ^{18}F Fluorodeoxyglucose (FDG) (10), welche durch nukleophile Substitution an einem entsprechenden Mannosevorläufer dargestellt wird, praktisch immer nur die reinen Walden-Umkehrprodukte gefunden. Dies spricht für das Vorliegen einer mechanistisch reinen S_N2 -Reaktion in diesen Medien [16]. Die Darstellung von FDG, dem wohl nach wie vor wichtigsten PET-Tracer überhaupt, stellt auch ein klassisches Beispiel für die nukleophile aliphatische Substitution dar. Als Abgangsgruppen haben sich hier die in der klassischen organischen Chemie beschriebenen Systeme bewährt. Es werden vorwiegend schwere Halogene und Sulfonsäureester eingesetzt. Für die FDG-Synthese wird z.B. das Triflat der vollständig acetylierten Mannose eingesetzt. Die Acetylierung des Vorläufers dient dabei der Vermeidung acider Protonen.

Die nukleophile aromatische Fluorierung besitzt ebenfalls sehr große Bedeutung in der Herstellung von Fluor-18 markierten Radiopharmaka. Besonders

geeignet sind Aromaten mit mesomer-elektronenziehenden Substituenten in Ortho- oder Parastellung zur Abgangsgruppe. Diese Reaktion ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.



$\text{X} = \text{NO}_2$, Halogen, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$, $(\text{CH}_3)_2\text{S}^+$

$\text{Y} = \text{NO}_2$, CN, CRO, CHO, COOR

$\text{M} = \text{Cs}^+$, Rb^+ , R_4N^+ , $[\text{K}/222]^+$

Abbildung 2: Nukleophile aromatische ^{18}F -Fluorierung

Als aromatische Abgangsgruppen eignen sich besonders Fluor (was aber zu geträgerten Produkten führt und deswegen nur selten Anwendung findet), sonstige Halogene, die Nitrogruppe, sowie erschöpfend methylierte Ammoniumverbindungen [27,28,29]. Unter den aktivierenden Gruppen Y finden sich besonders die Carbonyl-, Cyano- und Nitrogruppen. Aber auch schwere Halogene wie Brom und Iod können eingesetzt werden [zur Übersicht s. 17]. Die radiochemischen Ausbeuten bei derartigen aromatischen Fluorierungen sind für einfache Modellverbindungen oft annähernd quantitativ. Bei zunehmend komplexeren Molekülen gibt es jedoch häufig drastische Ausbeuteverluste, da aufgrund der notwendigen relativ hohen Temperaturen Zersetzungen eine effiziente Fluorierung verhindern. Auch durch die Basenempfindlichkeit der zu fluorierenden Substrate können Probleme auftreten. Daher wurde nach Alternativen zu den relativ stark basischen Fluorierungssystemen wie Tetraalkylammoniumhydroxid oder Kryptofix-Kaliumcarbonat in DMSO gesucht. Als günstig erwiesen sich dabei der Ersatz von Kaliumcarbonat durch Oxalat [30] oder auch Hydrogencarbonat [31]. Mit diesen mildereren, nicht-isotopen Trägersalzen konnten z.B. diverse Fluor-Butyrophenon-Neuroleptika mit befriedigenden radiochemischen Ausbeuten von bis zu 45 % dargestellt werden [32].

Dediazonierungsreaktionen finden bei der Synthese trägerfreier Fluor-18 Verbindungen nur selten Anwendung [33,34]. Obwohl in der präparativen organischen Chemie Balz-Schiemann oder Wallach Reaktionen zur Einführung des Fluors in Aromaten als Methode der Wahl beschrieben werden, kommt es bei diesen Reaktionstypen bei trägerfreien Synthesen oft nur zu geringen radiochemischen Ausbeuten von wenigen Prozent. Dies ist zum einen auf die Verwendung von Tetrafluoroboratanionen als Gegenion zum Diazoniumion zurückzuführen, was die maximale radiochemische Ausbeute auf 25 % limitiert und zudem zu geträgerten

Produkten führt, zum anderen jedoch ist auch hier der Mechanismus als solcher für trägerfreie Synthesen ungeeignet. Auch hier liegen wie beim S_N1 - Mechanismus der aliphatischen Substitution reaktive Kationen vor, die relativ unselektiv mit diversen Nukleophilen abreagieren, und somit nur makroskopische Mengen Fluors zu befriedigenden Ausbeuten führen [16,17].

Ausgehend von nukleophilem $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ werden auch komplexere, mehrstufige Synthesen durchgeführt. Sie dienen dem Aufbau von nicht durch direkte nukleophile Substitution erhältlichen Molekülen. Als Beispiele seien hier die Synthesen der Tracer L-2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluortyrosin}$ [35] und L-6- $[^{18}\text{F}]\text{Fluordopa}$ [36] auf nukleophilem Wege kurz beschrieben. L-2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluortyrosin}$ erhält man ausgehend von 4-Methoxy-2-nitrobenzaldehyd, dessen nukleophile Fluorierung den entsprechenden Fluoraldehyd in guter Ausbeute liefert. Hieran schließen sich weitere drei Synthesestufen, die letztlich das gewünschte Produkt liefern. Ähnlich verläuft die enantioselektive Synthese von L-6- $[^{18}\text{F}]\text{Fluordopa}$. Durch nukleophile aromatische Substitution am 2-Trimethylammonium-triflat des 3,4-Dimethoxy-benzaldehyds wird der korrespondierende ^{18}F -Aldehyd erhalten. Die verbleibenden Syntheseschritte beinhalten die Umwandlung des Aldehyds in das entsprechende Benzyljodid, was zur Alkylierung des chiralen Auxiliars S-(-)-1-Boc-2-t-butyl-3-methyl-4-imidazolidinon (S-Boc-BMI) eingesetzt wird. Hydrolyse und anschließende HPLC-Reinigung liefern das gewünschte Produkt in guter Reinheit. Die radiochemische Ausbeute ist aufgrund der vielen Synthesestufen jedoch mit $23 \pm 6 \%$ relativ gering. Die synthetischen Möglichkeiten solcher Aufbaureaktionen sind jedoch naturgemäß durch die kurze Halbwertszeit und durch den hohen apparativen Aufwand, den der Strahlenschutz erfordert, begrenzt. Die Synthesenzeiten sollten dabei eine Halbwertszeit nach Möglichkeit nicht überschreiten.

Demgegenüber besitzen elektrophile Substitutionen eine wesentlich größere Bedeutung, da hier zumindest aus theoretischer Sicht hohe Ausbeuten erwartet werden können. Leider ist jedoch die Darstellung elektrophiler Fluorspezies problematisch und trägerarme (no-carrier-added) Fluor-18 Reagenzien sind nach wie vor nicht bekannt. Die spezifischen Aktivitäten der bekanntesten Verbindungen $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$, $[^{18}\text{F}]\text{Acetylhypofluorit}$ und $[^{18}\text{F}]\text{Xenondifluorid}$ liegen in einer Größenordnung von 370-3700 MBq/mmol (10-100 mCi/mmol). Damit ist jedoch ihre Anwendung auf solche physiologische Systeme beschränkt, die nur geringe spezifische Aktivitäten erfordern. Dies ist z.B. für die sogenannten "Metabolic-Tracers" wie $[^{18}\text{F}]\text{Fluordeoxyglukose}$, Fettsäuren und DNA-Vorläufern der Fall, da schon wegen der hohen Konzentration endogener Analoga die spezifische Aktivität eine untergeordnete Rolle spielt.

Obwohl dieser Anwendungsbereich beträchtliche Möglichkeiten zum Einsatz fluorierter Verbindungen liefert, stellt die elektrophile Substitution auf Grund der

Verfügbarkeit und der ausgereiften Chemie des nukleophilen Fluorids keine große Konkurrenz dar. Ein signifikanter Nachteil ist auch die fehlende Regioselektivität der elektrophilen Fluorierungen. Bei aromatischen Systemen finden sich häufig alle möglichen Isomeren, wenn man nicht durch den Einsatz metallorganischer Vorläufer die Selektivität verbessert. Der Einsatz von Zinnverbindungen hat hier zu den vielversprechendsten Ergebnissen geführt [37]. Diese erfordern jedoch relativ aufwendige Synthesen und sind häufig (über längere Zeit) instabil. Auch die Wahl der Lösungsmittel ist eingeschränkt, da nur Fluor inerte Lösungsmittel wie Freon, Tetrachlorkohlenstoff, Trifluoressigsäure oder Fluorwasserstoff verwendet werden können [8]. Die weiteste Verbreitung findet die elektrophile ^{18}F -Fluorierung in der Markierung von aromatischen Aminosäuren, da eine nukleophile Einführung des Fluors in desaktivierte Aromaten erheblichen synthetischen Aufwand erfordert. Hier sind als Beispiele die Markierung von L-6- ^{18}F Fluordopa [38] und L-2- ^{18}F Fluortyrosin [39] zu nennen.

Fluormarkierung über prosthetische Gruppen

Die Einführung von Fluor-18 mit Hilfe kleiner, gut fluorierbarer prosthetischer Gruppen wird zur Methode der Wahl, wenn die prinzipiell einfacheren Direktmethoden versagen.

Aufgrund ihrer vielseitigen Anwendbarkeit wurden ^{18}F -Fluoralkylierungs- und ^{18}F -Fluoracylierungsagenzien entwickelt. Als Fluoralkylierungsmittel konnten durch nukleophile Substitution an bifunktionellen Alkanen potente Reagenzien wie 2- ^{18}F Fluorethyltosylat [40] oder 2- ^{18}F Fluorethyltriflat [41] erhalten werden. Diese wurden in einem nachfolgenden Schritt mit H-aciden Zielsubstanzen umgesetzt (Vgl. Abbildung 3).

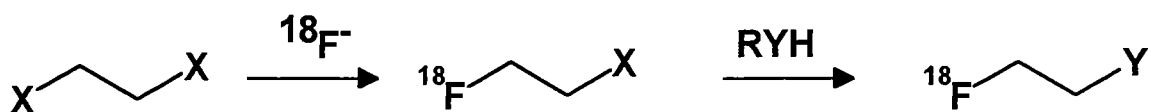


Abbildung 3: Fluoralkylierung H-acider Verbindungen

Fluoralkylierungsmittel können insbesondere als längerlebige Alternative zu C-11 Methylierungen via [^{11}C]Methyliodid [42] oder [^{11}C]Methyltriflat [43,44] aufgefaßt werden. Sie kommen besonders häufig bei Markierungen H-acider Verbindungen in Betracht, die genau deswegen einer direkten nukleophilen Fluorierung schwer zugänglich sind. Anwendung findet diese Methode z.B. bei der Markierung von dopaminergen und serotonergen [45,46] Rezeptorliganden, sowie bei der Markierung von Benzodiazepinen [47].

Fluoracylierungsmittel [48,49] und die bisher kaum untersuchten Fluoramidierungsmittel [50] eignen sich im Gegensatz zu Fluoralkylierungsreagenzien auch für Konjugationen in wässrigen Systemen und damit insbesondere zur Markierung von Peptiden und Proteinen. Die bisher bekannten Reagenzien sollen jedoch wegen des starken Bezugs zur vorliegenden Arbeit ausführlich im Fluorteil des Folgekapitels besprochen werden.

1.5 Radiohalogenierung von Peptiden und Proteinen; die Sonderstellung des [^{18}F]Fluors

Die Markierung von Peptiden und Proteinen hat in der nuklearmedizinischen Routine und Forschung einen hohen Stellenwert. Besonders die Markierung von monoklonalen Antikörpern findet klinische Anwendungen in der Radioimmundetektion (RAID) und in der Radioimmuntherapie (RAIT) [zur Übersicht s. 51]. In jüngerer Zeit gewinnen jedoch radioaktiv markierte Peptide zunehmend an Bedeutung, da sie ebenfalls hoch spezifische Bindungseigenschaften aufweisen (rezeptorbindende Peptide) und gegenüber Proteinen unter pharmakokinetischer Hinsicht Vorteile aufweisen [zur Übersicht s. 52]. In der klinischen Routineanwendung wird daher vermehrt das In-111 markierte Somatostatin-Analogon PentetreotidTM zur Tumordiagnostik eingesetzt. In der pharmakologischen Forschung werden zur Zeit eine Vielzahl weiterer interessanter Peptide wie Endotheline, Interleukine, Enkephaline und chemotaktische Peptide untersucht. Sie könnten bei einer Vielzahl von Erkrankungen wie Entzündungen, Thrombosen, Arteriosklerose diagnostische oder auch therapeutischen Anwendung finden.

Eine Art Zwischenstellung kommt dem Biotin-Avidin System zu. Aufgrund der enorm hohen Affinität dieser Moleküle zueinander ist dieses System auch für einige Anwendungen in der Nuklearmedizin geeignet [53,54]. Biotin ist ein relativ kleines peptidähnliches Molekül, welches radioaktiv markiert immer noch hohe Affinität zu Avidin besitzt. Umgekehrt kann auch Avidin, ein 60 kD Protein, ohne seine Affinität zu Biotin zu verlieren, radioaktiv markiert werden. Für nuklearmedizinische Zwecke müssen jedoch immer beide Komponenten eingesetzt werden, wobei entweder

Biotin oder Avidin in der Regel an tumoraffine Antikörper gekoppelt und injiziert werden (Pre-Targeting). Im letzten Schritt wird dann das radioaktive Molekül verabreicht.

Zur Markierung von Peptiden und Proteinen werden neben den metallischen Radionukliden Technetium-99m und Indium-111 [zur Übersicht: 55,56] hauptsächlich die schweren Radiohalogene [zur Übersicht s. 57], Nuklide des Iods und des Broms und in begrenztem Umfang auch des Astats [58] eingesetzt. Chlormarkierungen werden hingegen nur selten durchgeführt, da es hier keine geeigneten Radioisotope gibt.

Astat

Für die Markierung mit dem für radiotherapeutische Anwendungen interessanten Astat-211 [59] kann die direkte oxidative Einführung z.B. in monoklonale Antikörper zwar einfach durchgeführt werden, jedoch sind die Astat-Antikörper Bindungen zu labil, um therapeutisch verwertbare Markierungsprodukte zu erhalten [60]. Eine Übersicht über die Stabilitäten verschiedener Kohlenstoff-Halogen Bindungen inklusive Astat ist in Tabelle 4 wiedergegeben:

Tabelle 4: Bindungsenergien von Phenyl-, Vinyl- und Alkylhalogeniden [kJ / mol]
[aus 57]

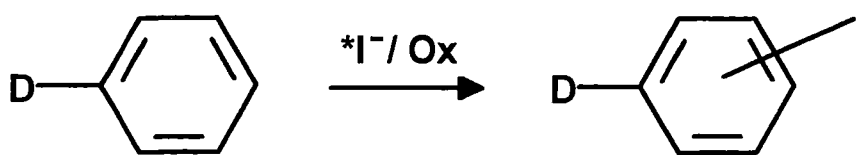
X	Phenyl-X	Vinyl-X	Alkyl-X
At	197	-	163
I	268	297	222
Br	335	343	285
Cl	398	381	339
F	523	492	444
H	460	452	398

Wie Tabelle 4 zeigt, ist die Bindungsstärke des Astats selbst in aromatischen Verbindungen deutlich schwächer als bei Alkyljodiden, die bekanntermaßen potente Alkylierungsmittel darstellen. Diese Labilität verdeutlicht die Problematik astatierter Radiopharmaka.

Iod

Die Radionuklide des Iods, speziell Iod-123, Iod-125 (in vitro) und Iod-131, gehören zu den wichtigsten radiopharmazeutisch angewandten Isotopen. Das für PET-Messungen geeignete Nuklid Iod-124 steht nur wenigen Zentren in stark begrenztem Umfang zur Verfügung. Ferner ist die Zerfallscharakteristik mit nur 25 %

β^+ , einer Halbwertszeit von 4,2 Tagen und einer Energie von 2,14 MeV im Vergleich zu anderen Positronenstrahlern, bezüglich der Dosimetrie ungünstig. Historisch leitet sich die weitverbreitete Anwendung des Iods zur Markierung von Peptiden und Proteinen aus der einfach und unter milden Bedingungen, in hohen Ausbeuten durchführbaren Radioiodierung aktivierter Aromaten ab. Solche finden sich in vielen Peptiden und fast allen Proteinen in Form der Aminosäuren Tyrosin und Histidin.



D = Elektronendonator
Ox = H₂O₂; Chloramin-T, Iodogen™, ICl u.a.

Abbildung 4: Direkte oxidative Radioiodierung aktivierter Aromaten

Für die Markierung von Peptiden und besonders von Proteinen hat sich die direkte, oxidative Iodierung als Standardreaktion etabliert. Als nachteilig erwies sich jedoch die relativ hohe in-vivo Deiodierungsrate solcher Tyrosiniodierungen [61,62], so daß auch hier prosthetische Gruppen eingesetzt werden, deren Dehalogenierungsrate wesentlich niedriger liegt als bei direkten Iodierungen [63,64].

Indirekte Iodierungen via prosthetischer Gruppen

In Ergänzung zu den direkten, oxidativen Methoden haben sich einige Methoden der indirekten Markierung via Iodprosthetischer Gruppen etabliert. Diese Methodik wird häufig auch als "conjugate-labelling" bezeichnet.

Der Einsatz prosthetischer Gruppen wird z.B. in solchen Fällen obligatorisch, in denen keine reaktiven Aminosäuren im Peptid bzw. Protein vorliegen, oder aber die biologische Aktivität des direkt markierten Produktes nicht den Erwartungen entspricht. Dies kann z.B. durch oxidative Nebenreaktionen oder durch sterisch zu starke Beanspruchung der pharmakophoren Gruppe bei der Einführung des voluminösen Iodatoms bedingt sein.

Bei der Einführung einer relativ kleinen prosthetischen Gruppe in ein Protein wird die Gesamtstruktur in der Regel nur wenig verändert, so daß auch hier die biologische Aktivität des Proteins erhalten bleibt. Bei relativ kleinen Peptiden hingegen kann die Einführung prosthetischer Gruppen die Struktur und die Eigenschaften, wie z.B. Lipophilie, Ladung, Sterik etc., erheblich verändern. Es muß daher auf jeden Fall die Markierung der pharmakophoren Sequenz vermieden werden, also derjenige strukturelle Anteil des Peptids, der für die biologische

Aktivität bzw. für die Rezeptorbindung ("recognition specific site") essentiell ist. Mit Hilfe von Bindungsstudien können die markierten Peptide dann mit ihren Stammverbindungen verglichen werden.

Als wohl bekanntestes Reagenz dieser Art ist das von Bolten und Hunter entwickelte Reagenz Desaminoiodtyrosinsuccinimidylester zu nennen [65], welches als langlebige, Iod-125 markierte Variante für in-vitro-Anwendungen kommerziell erhältlich ist (Abbildung 5).

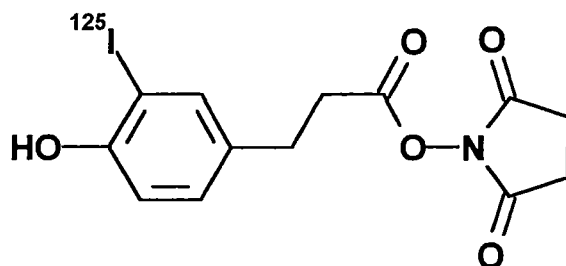


Abbildung 5: Bolten-Hunter Reagenz zur Proteinmarkierung

Kurzlebige, z.B. zu diagnostischen Zwecken genutzte Iod-123 markierte Bolten-Hunter Konjugate müssen jedoch im radiochemischen Labor nach Bedarf synthetisiert werden.

Um dem Problem der in-vivo Deiodierung zu begegnen, die nach Bolten-Hunter Markierungen ebenso wie bei direkt markierten Proteinen auftraten, werden heute proteinreaktive Acylierungsreagenzien bevorzugt, die unter Zuhilfenahme metallierter Vorläufer die direkte oxidative Einführung des Iods auch in desaktivierte aromatische Verbindungen gestatten [63,64].

Als Beispiel solcher "stabiler" Iodverbindungen ist in Abbildung 6 die Iod-Markierung von Proteinen mittels eines Trialkylzinn-Vorläufers gezeigt:

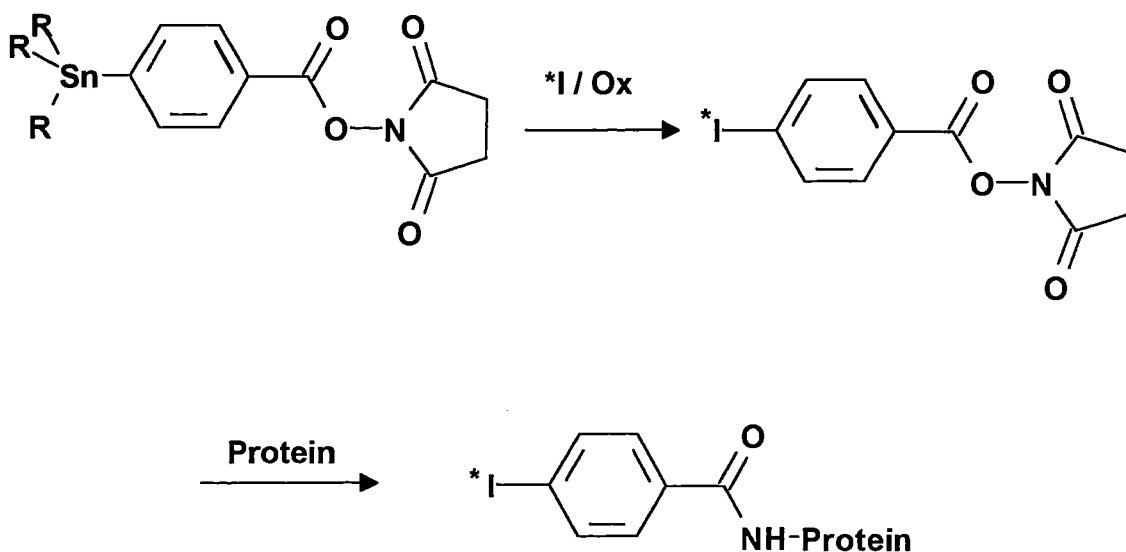


Abbildung 6: "Stabile" Iod-Markierung von Proteinen

Die Einführung einer leicht zu markierenden prosthetischen Gruppe vor der eigentlichen Radiomarkierung ist ebenfalls sehr attraktiv. Die eigentliche Radiosynthese kann dann in nur einem Reaktionsschritt erfolgen. Häufiger als bei Iodmarkierungen findet dieses "post-conjugate-labelling" Konzept bei der Markierung von Peptiden und Proteinen mit metallischen Radionukliden Anwendung. Hier werden chelatisierende Gruppen zumeist mit interessierenden Antikörpern (aber auch andere Pharmaka) konjugiert, mit dem Ziel, einstufige, in der nuklearmedizinischen Routinediagnostik zu verwendende Markierungsbestecke zu entwickeln [zur Übersicht 51,52].

Neben Acylierungsreagenzien haben sich auch Alkylierungstechniken zur Modifizierung bzw. Markierung von Proteinen etabliert. Besonders häufig werden Alkylhalogenide zur Markierung von Thiofunktionen eingesetzt, da diese auf Grund der hohen Nukleophilie des Schwefels auch in wässriger Lösung unter schonenden Bedingungen reagieren können. α -Carbonylhalogenide wie α -Halogen-carbonsäuren oder α -Halogenamide reagieren dabei teilweise schon unter pH-neutralen Bedingungen zu stabilen Thioethern. Gewöhnlich werden α -Brom- oder α -Iod-carbonsäureamide verwendet, wobei letztere aufgrund ihrer höheren Reaktivität die besseren Ausbeuten liefern (Abbildung 7).

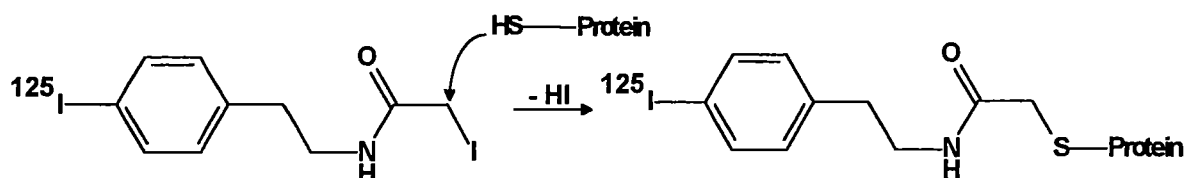


Abbildung 7: Kopplung eines Proteins mit einem Iod-125 markierten α -Iodcarbonsäureamid

Wie bei den Acylierungsreagenzien werden auch hier häufig metallierte Vorläufer, die "stabile" Radioiodverbindungen ergeben, eingesetzt [66].

Brom

Brommarkierungen sind ebenfalls durch direkte elektrophile Substitution möglich und stellen prinzipiell eine gute Methode zur Markierung von Peptiden und Proteinen mit Positronenemittern (s. Tabelle 1) dar. Die zum Iod und Astat relativ hohe Bindungsstärke und die im Vergleich zum Iod nicht vorhandene enzymatische in-vivo Dehalogenierung unterstützen den Einsatz von Bromnukliden. Die geringe Verfügbarkeit, die Labilität der Alkylbromverbindungen und die deutlich ungün-

stigeren Zerfallseigenschaften wie β^+ -Energien und β^+ -Häufigkeiten z.B. bei Brom-75 und -76 geben jedoch dem Fluor-18 den Vorzug unter den Positronenemittern.

Chlor

Chlormarkierungen finden in der Radiopharmaka orientierten Forschung keine Anwendung, da die Radionuklideigenschaften des positronenemittierenden Nuklides Chlor-34m sehr ungünstig sind [67]. Auch die direkte oxidative Einführung des Chlors ist auf Grund des Redoxpotentials wesentlich erschwert und lässt auch in dieser Hinsicht kaum Vorteile gegenüber dem Fluor erkennen. Tabelle 5 zeigt die Redoxpotentiale der Halogene, die ein Hauptkriterium bei einer direkten oxidativen Einführung des Radiohalogens in organische Verbindungen darstellen.

Tabelle 5: Redoxpotentiale der Halogene [aus 68]

Halogen	Oxidationspotential [E°/V] $X_2(aq) + 2e^- \rightarrow 2X^-$
At	~0,3
I	0,615
Br	1,087
Cl	1,395
F	2,866

Wie Tabelle 5 zeigt, müssen zur Oxidation der leichten Halogene sehr starke Oxidationsmittel eingesetzt werden, die leicht zur Denaturierung empfindlicher Biomoleküle führen können.

Fluor

Die Fluormarkierung von Peptiden und Proteinen durch direkte, oxidative Einführung ist im Gegensatz zu den anderen Halogenen aus den oben diskutierten Gründen nicht möglich. Als Alternative können jedoch prinzipiell elektrophile Fluorspezies wie $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ eingesetzt werden, jedoch führt dies wegen der hohen Reaktivität elektrophiler Fluorspezies zu Produktgemischen und oft zu schlechten Ausbeuten. Trägerarme elektrophile ^{18}F -Fluorspezies sind zudem bis heute nicht bekannt, was ihren Einsatz für rezeptorbindende Radiopharmaka unmöglich macht. Der Grund hierfür liegt in den extrem hohen Anforderungen der Darstellung von Rezeptorliganden an die spezifische Aktivität, um erfolgreich in der Diagnostik eingesetzt werden zu können. Falls jedoch auf eine hohe spezifische Aktivität verzichtet werden kann, erscheint der Umweg über "gezähmte" elektrophile Fluorspezies möglich. Dies wurde zum Beispiel in geträgerter Form, bei einer mit

Acetylhypofluorit durchgeführten Fluorierung eines tyrosinhaltigen Endorphinanalogons gezeigt [69]. Im Vergleich zu den schweren Halogenen erfordert die elektrophile Fluorierung also einen erheblich erhöhten Synthesaufwand.

Von nukleophilem [^{18}F]Fluorid ausgehende Peptid- und Proteinmarkierungen über prosthetische Gruppen erscheinen deshalb als einzige rationale Lösung, weshalb die weitere Entwicklung dieser Methoden dringend notwendig ist.

Prosthetische Gruppen, die für die Einführung von [^{18}F]Fluorid in Biomoleküle geeignet sind, müssen prinzipiell bifunktionseller Natur sein. Beide Funktionen, sowohl die Abgangsgruppe zur Einführung des nukleophilen Fluorids, als auch die Kopplungsfunktion der prosthetischen Gruppe zum Peptid (Linker), müssen dabei elektrophiler Natur sein. Der Grund hierfür ist, daß Peptide und Proteine hauptsächlich nukleophile Funktionen wie Amino-, Alkohol- und Thiolgruppen aufweisen. Einige Vorläufer und die entsprechenden ^{18}F -fluormarkierten Reagenzien sind bereits in der Literatur beschrieben. Bifunktionelle Alkane (s. Kapitel 1.4) eignen sich jedoch nur sehr beschränkt, da ihre Reaktivität oft nur bei erhöhten Temperaturen und in organischen Solventien wie DMF oder DMSO ausreichend ist. Eine Alternative wurde von Shiue et al. [70] mit der Synthese eines thiolreaktiven ^{18}F -fluorierten Maleinimids aufgezeigt (Abbildung 10):

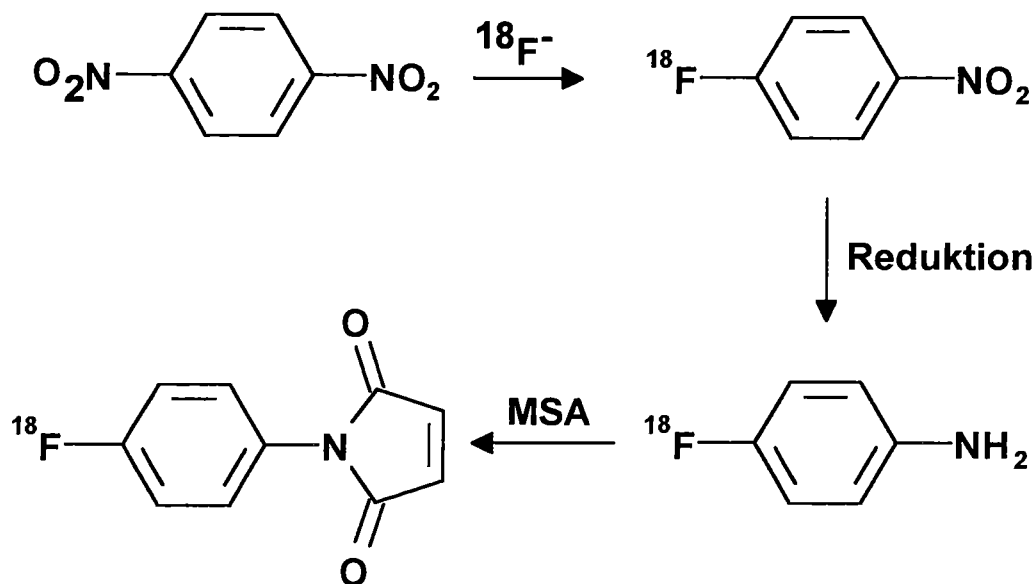


Abbildung 8: ^{18}F -markiertes Maleinimidderivat zur Markierung von Thiolen (MSA=Maleinsäureanhydrid)]

Die veröffentlichten Ergebnisse mit diesem Reagenz, welches mit einer radiochemischen Ausbeuten von 10% erhalten wurde, blieben jedoch präliminärer Natur. Da zudem die prosthetische Gruppe sterisch relativ aufwendig erscheint, dürfte

selbst unter optimierten Synthesebedingungen die allgemeine Anwendbarkeit zweifelhaft sein.

Vielseitiger als Thiolreagenzien sind aktivierte Acylverbindungen wie z.B. Aktivester, die ebenfalls im wässrigen Milieu eingesetzt werden können. Müller-Platz et al. [71] versuchten die die Kopplung von [^{18}F]Fluoracetat an Urokinase in wäßriger Lösung mittels wasserlöslicher Carbodiimide. Tada et al. nutzten ebenfalls ein Carbodiimid um [^{18}F]Fluoracetat an 5-Hydroxytryptamin zu koppeln [72]. Die erzielte radiochemische Ausbeute von 13% zeigt jedoch die Schwierigkeiten dieser Methodik, selbst bei der Markierung relativ kleiner Amine. Kilbourn et al. schlugen das in einer dreistufigen Synthese erhältliche Reagenz 3-[^{18}F]Fluor-5-nitrobenzimidat zur Fluor-18 Markierung von Proteinen vor [48]. Dieses erwies sich jedoch als zu unreaktiv, um breitere Anwendung zu finden. Block et al. [49] schlugen als Acylierungsreagenz den in einer Stufe durch direkte nukleophile Substitution erhältlichen 2-[^{18}F]Fluorpropionsäuremethylester als Resultat einer systematischen Untersuchung zur direkten nukleophilen Substitution an Estern steigender Reaktivität vor. Der Vorteil der einstufigen Darstellung eines Acylierungsreagenz wurde jedoch durch eine viel zu geringe Reaktivität dieses Esters gegenüber anspruchsvolleren Aminen, wie sie z.B. als N-terminus in Peptiden vorliegen, relativiert [73,74]. Eine ebenfalls einstufige Synthese eines ^{18}F -Fluoracylierungsreagenz wurde von Herman et al. [75] mit der Darstellung von 4-[^{18}F]Pentafluorbenzoesäuretetrafluorphenylester beschrieben. Die nukleophile Einführung des [^{18}F]Fluorids mit 32% radiochemischer Ausbeute wurde hier jedoch durch Isotopenaustausch am entsprechenden stabilen Fluorvorläufer erreicht. Das Reagenz ist daher geträgert und deshalb zur Markierung rezeptorbindender Pharmaka ungeeignet. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit veröffentlichten Vaidyanathan und Zalutsky [76] eine neue, von 4-[^{18}F]Fluorbezaldehyd ausgehende Strategie zur Synthese des N-Hydroxysuccinimidylesters der 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure (Abbildung 9). Die radiochemische Ausbeute bei diesem Verfahren blieb jedoch mit ca. 25% ebenfalls beschränkt. Dennoch gelang die Markierung monoklonaler Antikörper mit diesem Reagenz unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität [77]. Die Anwendung dieser Methode zur Markierung von kleineren Peptiden ist bislang nicht beschrieben.

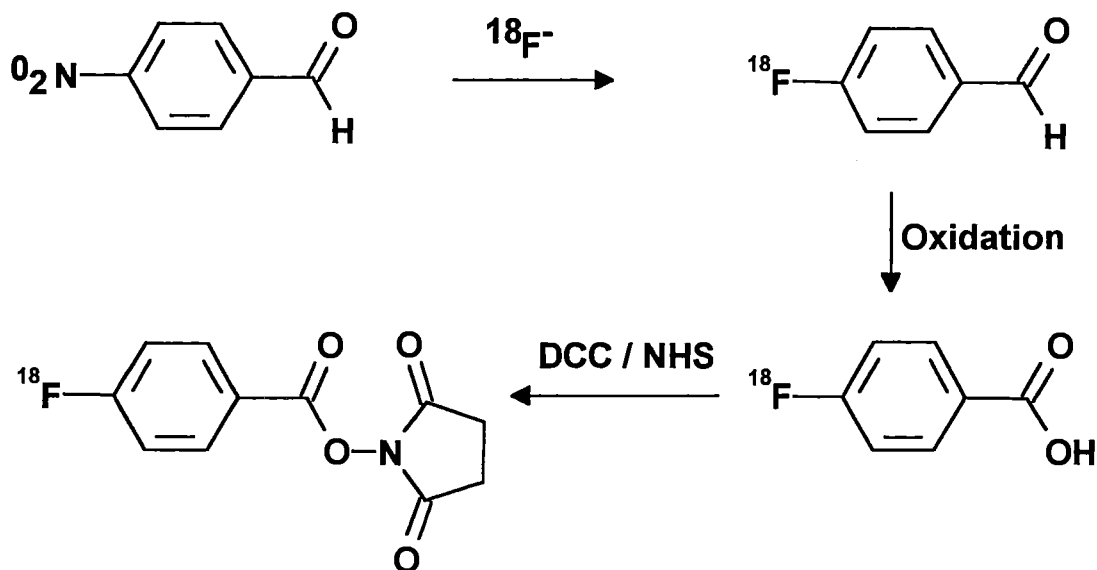


Abbildung 9: Synthese von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure-NHS-Ester

Die bisher wenig untersuchte Methode der Fluoramidierung ist zur Anwendung auf Proteine nicht geeignet, da sie acylaktivierte Zielmoleküle erfordert. Ein Beispiel für eine Peptidmarkierung via Fluoramidierung findet sich jedoch mit der trägerfreien Markierung des Insulins [78]. Bei dieser Markierungssynthese wurde selektiv geschütztes Insulin acylaktiviert und schließlich mit 1-[^{18}F][[4-(Fluormethyl)-benzoyl]amino]butan-4-amin (Abbildung 10) umgesetzt.

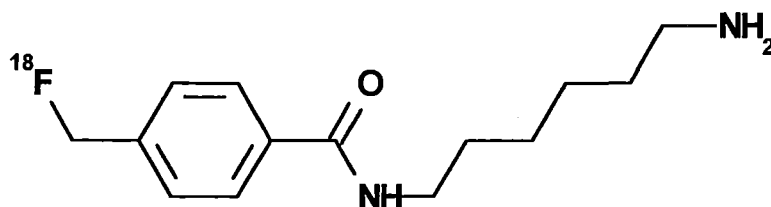


Abbildung 10: 1-[^{18}F][[4-(Fluormethyl)-benzoyl]amino]butan-4-amin zur Fluoramidierung

Radiochemische Ausbeuten wurden jedoch nicht publiziert. Vermutlich war insbesondere die Synthese des aktivierten Insulins schwierig und schwer reproduzierbar. Ebenso war die Wahl des relativ kompliziert aufgebauten fluorierten Amins nicht erklärt. Dennoch zeigt das Beispiel die potentielle Anwendbarkeit einer derartigen Markierungsstrategie auf.

1.6 Problemstellung

^{18}F -markierte Peptide und Proteine gewinnen in der nuklearmedizinischen Diagnostik mittels PET zunehmend an Bedeutung. Trägerfreies [^{18}F]Fluor kann jedoch nicht durch direkte nukleophile oder elektrophile Substitution in Peptide und Proteine eingeführt werden. Für nukleophile Substitutionen stehen keine geeigneten Vorläufer zur Verfügung. Außerdem wirken alle bisher bekannten Reaktionsbedingungen, die zur Einführung von trägerfreiem [^{18}F]Fluorid in organische Moleküle angewandt werden, auf Proteine denaturierend. Viele Peptide sind ebenfalls zu empfindlich gegenüber einer direkten nukleophilen Substitution, die nur in polar, aprotischen Lösungsmitteln unter Anionenaktivierung und erhöhten Temperaturen nennenswerte radiochemische Ausbeuten liefert.

In einigen früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß durch Zuhilfenahme prosthetischer Gruppen das Spektrum der nicht durch direkte nukleophile Substitution erhältlichen ^{18}F -PET-Radiopharmaka erheblich erweitert werden kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die bereits früher eingeführte ^{18}F -Fluoracylierung mittels 2-[^{18}F]Fluorpropionsäuremethylester hinsichtlich ihrer Anwendungsmöglichkeiten und Limitationen zu evaluieren und neuen, verbesserten Methoden gegenüberzustellen.

Diese neuen, trägerarmen ^{18}F -Reagenzien sollten unter Beachtung spezieller Aspekte der Substanzklassen Peptide und Proteine entwickelt werden. Hier galt es besonders das Löslichkeitsverhalten, die Reaktivität im wässrigen und organischen Milieu, die Basizität der Aminfunktionen und die sterischen Effekte der Zielmoleküle zu berücksichtigen. Insbesondere sollten die prosthetischen Gruppen die Bindungseigenschaften pharmakologisch relevanter Zielmoleküle nicht oder kaum beeinträchtigen.

Zur Darstellung solcher Reagenzien sollten vor allem n.c.a. ^{18}F -Aktivester als Reagenzien zur ^{18}F -Fluoracylierung und n.c.a. ^{18}F -Amine als Reagenzien zur ^{18}F -Fluoramidierung untersucht werden. Dazu sollte die ^{18}F -Fluorierung geeigneter Vorläufer, die gegebenenfalls zu synthetisieren waren, optimiert und hinsichtlich ihrer Eignung für schnelle, eventuell automatisierte Synthesen untersucht werden.

Die neuen Methoden sollten schließlich unter den geeigneten Reaktionsbedingungen auf die Markierung des für die Radiopharmazie interessanten Biotins und des Somatostatinanalogons Octreotid[®] angewandt werden.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 ^{18}F -Fluoracylierung von Peptiden und Proteinen ohne Trägerzusatz

2.1.1 ^{18}F -Fluoracylierung via n.c.a. 2- ^{18}F Fluorpropionsäuremethylester

Um ein möglichst direktes Verfahren zu entwickeln, wurde schon früher versucht, ^{18}F -Fluorcarbonsäureester nukleophil zu fluorieren und diese sofort in einem zweiten Schritt umzusetzen [73, 49]. Dazu erwies sich 2- ^{18}F Fluorpropionsäuremethylester [49] (Abbildung 11) als geeignete Verbindung. Daher wurden weitergehende Untersuchungen zur Validierung der Reaktivität dieses Acylierungsreagenz durchgeführt. Aus den vorhergegangenen Studien war bereits klar geworden, daß dieser Ester eine beachtenswerte Reaktivität gegenüber primären Aminen wie n-Butylamin, aber auch gegenüber hydrolytischen Bedingungen aufweist. Diese Reaktivität konnte insbesondere durch den starken induktiven Effekt des Fluors auf die benachbarte Carbonylposition zurückgeführt werden.

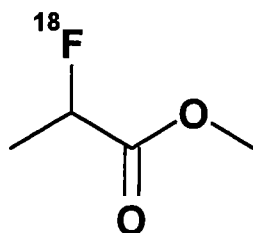


Abbildung 11: 2- ^{18}F Fluorpropionsäuremethylester

2.1.1.1 Einfluß der Nukleophilie des Amins auf die Reaktion mit 2- ^{18}F Fluorpropionsäuremethylester

Als starke Limitierung für den allgemeinen Gebrauch des 2- ^{18}F Fluorpropionsäuremethylester hatte sich die Reaktionsträgheit dieses Esters gegenüber sekundären Aminen wie Dibutylamin und auch primären Aminen mit sterischer Hinderung, wie z.B. beim 2-Butylamin, erwiesen. Ebenso lag die erforderliche Aminkonzentration in molarer Größenordnung, um bei kurzen Reaktionszeiten befriedigende radiochemische Ausbeuten zu erzielen [74]. Quantitativ unbekannt war nun der Einfluß der Basizität der zu markierenden Amine auf die Acylierungsausbeute. Um dies zu untersuchen, wurde eine Reihe von sterisch vergleichbaren primären Aminen ausgewählt, die nur aufgrund induktiver Effekte von

verschiedenen Substituenten eine unterschiedliche Nukleophilie aufweisen. Als Maß für ihre Reaktivität kann die Basizität der Amine, die als pK_a -Werte in der Literatur [79] beschrieben sind, herangezogen werden. Als Lösungsmittel für diese Untersuchung wurde absolutiertes Methanol gewählt, da hier ein hydrolytischer Verlust des Methylesters nicht zu befürchten war. Die Resultate dieser Untersuchung sind in der Art eines Brönsted-Plots in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

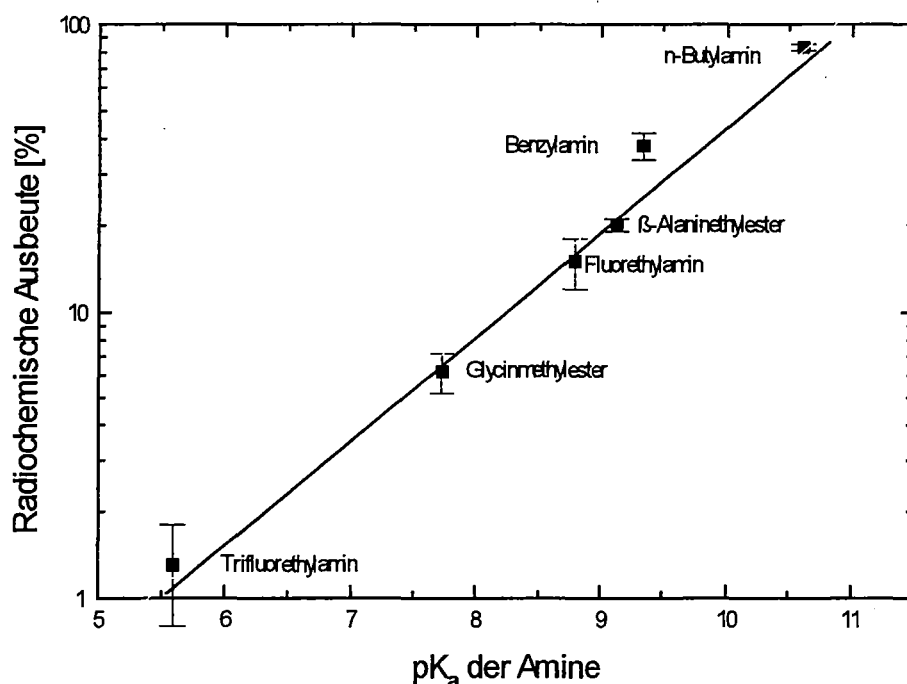


Abbildung 12: Brönstedplot der radiochemischen Ausbeute der Fluoracylierung mit 2-[^{18}F]Fluorpropionsäuremethylester als Funktion der pK_a -Werte der korrespondierenden Amine
(Reaktionsbedingungen: 64°C, MeOH, $c(\text{Amin})$: 2,0 M, 20 Minuten)

Die beobachtete, gute lineare Korrelation der logarithmierten Acylierungsausbeuten mit den pK_a -Werten der eingesetzten Amine zeigt eindrucksvoll die Korrelation von Basizität und nukleophiler Reaktivität von Aminen. Die Basizität bestimmt also bei Aminen mit vergleichbarer sterischer Hinderung direkt die radiochemische Ausbeute und damit die Reaktionsgeschwindigkeit für eine gegebene Reaktionsmischung. Dies ist von großer Wichtigkeit, wenn z.B. Peptide mit unterschiedlichen N-terminalen Aminosäuren und damit unterschiedlichen pK_a -Werten markiert werden sollen. Jedoch muß betont werden, daß diese Ergebnisse nur mit relativ hohen Aminkonzentrationen (hier 2.0 M) erzielt werden konnten [49,74], was für viele Amine, die von pharmakologischer Relevanz für PET-Untersuchungen sein könnten,

aufgrund ihrer Löslichkeit nicht realisierbar ist. Beim Übergang zu wässrigen Lösungen wird jedoch die Konkurrenz der hydrolytischen Zersetzung des trägerarmen Acylierungsreagenz ermöglicht, was die radiochemische Ausbeute schmälert und nun wiederum durch eine deutliche Erhöhung der Aminkonzentration kompensiert werden müßte.

Zusammengefaßt kann festgestellt werden, daß der Einsatz von 2-[^{18}F]Fluorpropionsäuremethylester als Acylierungsreagenz nur in Spezialfällen, nämlich der Markierung von Aminen hoher Löslichkeit, geringer sterischer Hinderung und sehr hoher Basizität (pK_a größer 9), ein gangbarer Weg ist.

2.1.2 Konzept für reaktive n.c.a. ^{18}F -Fluoracylierungsreagenzien

Auf der Grundlage der früheren Experimente zur direkten nukleophilen Substitution mit ^{18}F -Fluorid an bifunktionellen Aktivestern [49] und Carbodiimiden [71, 74] war bekannt, daß diese Methoden entweder nur zu marginalen Ausbeuten (im Falle der Substitution an Aktivestern) oder zu einem hohen Anteil von Nebenprodukten (N-Acylharnstoffbildung bei Carbodiimiden) führten. Als schwerwiegender Nachteil erwies sich auch, daß die primären Reaktionsprodukte der ^{18}F -Fluorcarbonsäure mit dem Carbodiimid (die acylierungsaktive Spezies) nicht isoliert werden können. Somit müssen zum eingesetzten Carbodiimid äquivalente Mengen an Amin eingesetzt werden, da diese selbst mit den Carbodiimiden reagieren können. Wegen dieser Nachteile wurde eine in Abbildung 13 skizzierte vierstufige Synthesestrategie über aktivierte Ester entwickelt.

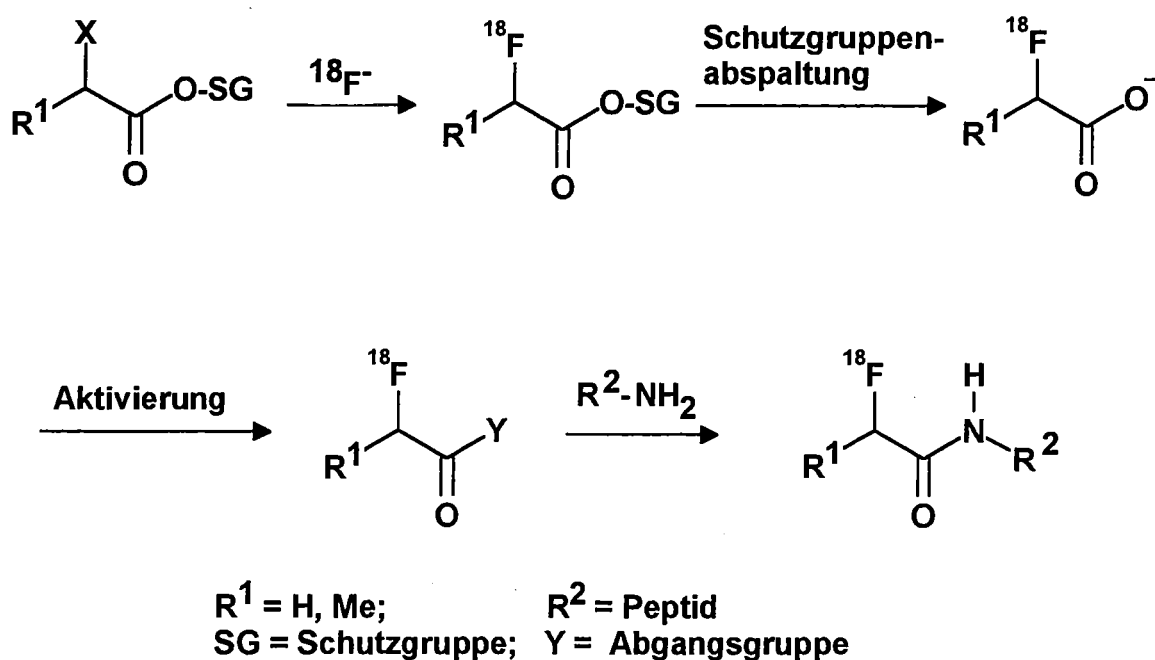


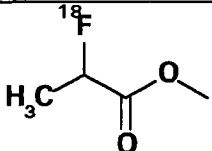
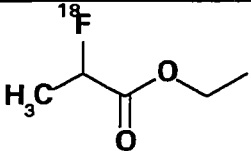
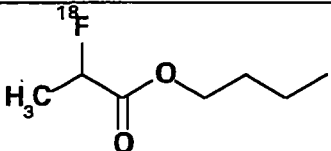
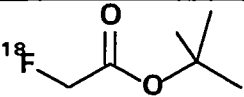
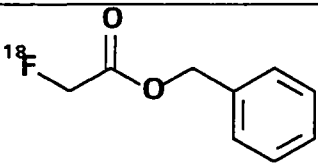
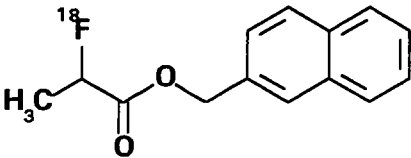
Abbildung 13: Konzept der Darstellung von Fluoracylierungsreagenzien auf der Basis kleiner Carbonsäuren

Die Einführung des ^{18}F -Fluorids erfolgt danach in eine geschützte Carbonsäure mit anschließender Abspaltung der Schutzgruppe und Aktivierung der freien ^{18}F -Fluorcarbonsäure. Dabei soll das Fluoracylierungsagens auf der einen Seite reaktiv genug sein, um mit Peptiden und Proteinen in niedrigen Konzentrationen und kurzen Reaktionszeiten in guter Ausbeute zu reagieren, auf der anderen Seite aber auch stabil genug, um das Reagenz in trägerfreiem Zustand, nach einer Isolierung mittels HPLC handhaben zu können. Ein Teil des Konzeptes war es auch, kleine, sterisch relativ anspruchslose, prothetische Gruppen zu bevorzugen. Diese sollten auch zur Modifizierung von kleineren Biomolekülen als Peptiden und Proteinen geeignet sein. Als Basis wurde daher die Einführung von ^{18}F -Fluor in Essigsäure- oder Propionsäurederivate angestrebt.

2.1.3 Carboxygeschützte Carbonsäuren zur n.c.a. ^{18}F -Fluorierung

Wegen der Nachteile der bisher bekannten Methoden (^{18}F -Methylester, ^{18}F -Carbonsäure / DCC etc.) in Bezug auf Reaktivität oder Praktikabilität, wurde entsprechend dem Konzept aus Abbildung 13 zunächst der erste Schritt, der nukleophilen ^{18}F -Fluorierung carboxy-geschützter Carbonsäuren, näher untersucht. Dies sollte zu einer breiteren Palette als den bisher zur Verfügung stehenden Primärvorläufern, nämlich Methyl- bzw. Ethylester, führen. Der Schutz der Carbonsäurefunktion bei der Einführung trägerfreien [^{18}F]Fluorids ist wegen der hohen Affinität des Fluorids zu Protonen dringend erforderlich. Auch der Versuch, entsprechend substituierte Carbonsäuren in Form ihrer Salze unter trägerfreien Bedingungen zu fluorieren, war bereits mehrfach am eigenen [80] und anderen Instituten [81] erfolglos durchgeführt worden. So werden beispielsweise alle für die PET-Untersuchungen am Herzen eingesetzten ^{18}F -fluorierten Fettsäuren zunächst als carboxy-geschützte Derivate dargestellt. Ziel der Untersuchung war es, einen Grundstock an verschiedenen Schutzgruppen zur Verfügung zu stellen, um eine spätere Optimierung der gesamten Synthesesequenz zur Fluoracylierung zu ermöglichen. Als Sekundäreffekt ermöglicht diese Untersuchung evtl. neue Produktionsverfahren für die Routineproduktion von ^{18}F -fluorierten Radiopharmaka mit Carbonsäurefunktionen wie z.B. den schon erwähnten Fettsäuren, aber auch Aminosäuren etc. Von den zahlreichen in der Literatur bekannten Carboxy-schutzgruppen [zur Übersicht: 82] wurden daher einige Gruppen ausgewählt, die für unterschiedliche Abspaltungsbedingungen charakteristisch sind, und als Derivate der 2-Brompropionsäure bzw. der Bromessigsäure der nukleophilen Substitution mit ^{18}F -Fluorid ohne Trägerzusatz unterworfen (s. Tabelle 6).

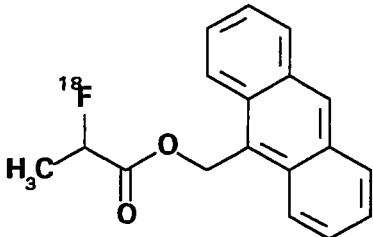
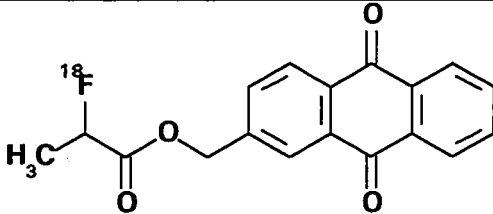
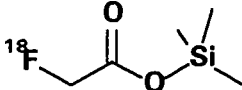
Tabelle 6: Nukleophile ^{18}F -Substitution (n.c.a.) an verschiedenen Essig- und Propionsäureestern unter Variation der Carboxyschutzgruppen

^{18}F -Carbonsäurederivat	Schmelz- oder Siedepunkt	Radiochem Ausbeute	Bemerkung
	bp.: 108°C [83]	> 90 %	Verwendung als Acylierungsreagenz möglich
	bp.: 123°C [83]	> 90 %	
		> 90 %	wenig Aktivitätsverluste bei Einengen von Lös.
	bp*: 50°C (10 mm)	> 90 %	saure Hydrolyse möglich
	bp.: 79°C (5mm) [84]	> 90 %	schonende Hydrolyse möglich
		> 90 %	radiochem Ausbeute schon bei 20°C hoch

*: Schmelz- bzw. Siedepunkte der entsprechenden Bromderivate

(90°C; 5 min; 30 µmol Br-Vorläufer in 250 µl MeCN; 10 µmol Kryptofix / K_2CO_3)

Fortsetzung Tabelle 6:

¹⁸ F-Carbonsäurederivat	Schmelz- oder Siedepunkt	Radiochem Ausbeute	Bemerkung
	mp.*: 101°C	> 90 %	Einengen von radioaktiven Lösungen ohne Aktivitätsverlust möglich
	mp.*: 113°C	> 60-80 %	photochemische Schutzgruppenabspaltung möglich
	bp.*: 56°C (20mm)	< 1 %	Si-F Affinität verhindert Ausbeute

*: Schmelz- bzw. Siedepunkte der entsprechenden Bromderivate
(90°C; 5 min; 30 µmol Br-Vorläufer in 250 µl MeCN; 10 µmol Kryptofix / K₂CO₃)

Tabelle 6 gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur trägerfreien Einführung von [¹⁸F]Fluorid in geschützte Derivate der Bromessigsäure oder der homologen 2-Brompropionsäure. Als alkalisch leicht hydrolysierbare Schutzgruppen wurden einfache Alkylester wie Methyl- oder Ethylester verwandt. Als unter sauren Bedingungen abspaltbare Gruppe wurde der tert.-Butylester eingesetzt. Unter hydrogenolytischen, aber auch alkalisch leicht hydrolysierbaren Bedingungen lassen sich Benzyl- bzw. Naphtylmethylester in die entsprechenden freien Carbonsäuren umwandeln. Speziellere Abspaltungsmöglichkeiten liefern die Anthrylmethylgruppe und die Methylanthrachinongruppe (MAQ). Erstere läßt sich sowohl unter sauren, als auch unter basisch hydrolytischen Bedingungen entfernen [85], während die MAQ-Gruppe unter photochemischen, nukleophilen und basisch hydrolytischen Bedingungen abgetrennt werden kann [86]. Bemerkenswert sind auch die für analytische Zwecke brauchbaren stark chromophoren Eigenschaften dieser Schutzgruppen. Die Trimethylsilylgruppe kann schließlich hydrolytisch unter sehr milden Bedingungen entfernt werden.

Die Radiofluorierungen wurden unter identischen Reaktionsbedingungen (siehe Tabelle) durchgeführt. Nicht ganz unerwartet war die Erfolglosigkeit der ¹⁸F-Fluorierung des Bromessigsäure-Trimethylsilylestere. Als Erklärung ist hier

sicherlich die hohe Affinität des Siliciums zum Fluor heranzuziehen. Versuche zur Fluorierung wurden jedoch trotzdem unternommen, da eine mögliche kinetische Bevorzugung der Bromsubstitution in Betracht gezogen wurde, vor allem weil die Reaktivität des Broms durch die Carbonylgruppe in α -Position erheblich gesteigert ist.

Eine deutlich geringere Ausbeute als 90 % war auch bei der Fluorierung des MAQ-Esters festzustellen. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt, jedoch liegt wahrscheinlich eine Reaktion des trägerfreien $[^{18}\text{F}]\text{Fluorids}$ mit Zersetzungsprodukten des Esters während der nukleophilen Substitutionsreaktion vor. Auf eine genauere Abklärung dieses Sachverhaltes wurde jedoch verzichtet, da mit radiochemischen Ausbeuten von 60-80 % zunächst gezeigt werden konnte, daß prinzipiell eine Fluorierung derartiger Ester möglich ist.

Alle anderen in Tabelle 6 aufgelisteten Derivate der Bromessig- bzw. Brompropionsäure konnten mit nahezu quantitativen radiochemischen Ausbeuten bei den Substitutionen mit n.c.a. $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ erhalten werden. Diese Vielfalt an möglichen Vorläufern und entsprechenden ^{18}F -Carbonsäureestern mit sehr unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften erlaubt eine hohe Flexibilität für die folgenden Syntheseschritte, die zu reaktiven Fluoracylierungsreagenzien führen.

Für die der Schutzgruppenabspaltung nachfolgende Aktivierung der freien Carbonsäure war es z.B. von ausschlaggebender Bedeutung, in wasserfreiem Milieu zu arbeiten. Beim Einsatz der kleinen Carbonsäuren, $[^{18}\text{F}]\text{Fluoressig-}$ oder $2-[^{18}\text{F}]\text{Fluorpropionsäuren}$, erwies sich die Verwendung der "großen" Schutzgruppen als äußerst hilfreich, da nach erfolgter chromatographischer Aufreinigung der fluorierten Ester organische Lösungsmittel wie Acetonitril ohne Verlust von Aktivität abgedampft werden konnten. Während Methyl- und Ethylester beim Abdampfen dieses Lösungsmittels fast vollständig mit abdestillieren, bleiben Benzylester und Naphtylmethylester bereits weitgehend im Gefäß zurück. Erst der Übergang zu den noch höhermolekularen MAQ- bzw. Anthrylmethylestern ermöglichte ein Aktivitätsverlust freies Abdestillieren organischer Lösungsmittel von den n.c.a. ^{18}F -Estern.

Der konkrete Vorteil der wenig flüchtigen Ester besteht nun darin, daß bei dem folgenden notwendigen Hydrolyseschritt mit einem Minimum an Wasser gearbeitet werden kann, was wiederum zu Zeitvorteilen bei der anschließenden azeotropen Trocknung des ^{18}F -Carboxylates führt.

2.1.4 Verfahrensoptimierung für die Routinesynthese von 2-[^{18}F]Fluorcarbonsäureestern

Die speziellen Bedingungen bei Radiosynthesen erfordern Synthesemethoden, die in Bleiboxen fernbedienbar oder vollautomatisch durchführbar sind. Deshalb können nur solche Verfahren für die Routineproduktion von PET-Radiopharmaka eingesetzt werden, die schnell, mit hohen Ausbeuten und unkompliziert verlaufen. Die Durchführung einer dreistufigen Radiosynthese ohne Trägerzusatz für die Darstellung reaktiver ^{18}F -Fluoracylierungsreagenzien (vgl. Abb. 13) mit anschließender HPLC-Reinigung des Produktes, stellt deshalb eine chemische und technische Herausforderung dar. Für die automatisierbare Herstellung von Fluoracylierungsreagenzien mußte deshalb nach Methoden zur Vereinfachung der Reaktionsführung gesucht werden.

Eine Erleichterung für prinzipiell alle von nukleophilem [^{18}F]Fluorid ausgehenden Synthesen ist die Abtrennung des in makroskopischen Mengen nötigen Vorläufers ohne relativ aufwendige HPLC-Trennungen. Der Ersatz von HPLC durch einfachere Festphasenextraktionsmethoden stellt für Radiosynthesen fast immer eine bedeutende Vereinfachung dar, die eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet. Aber auch im Hinblick auf Sterilität und Pyrogenfreiheit bei Radiopharmakasyntesen sowie hinsichtlich Kontaminationsproblemen und nicht zuletzt Kosten stellen sie oft eine ideale Lösung dar.

2.1.4.1 Untersuchung von quaternären Ammoniumsalzen als leicht abtrennbare Vorläufer zur nukleophilen Radiofluorierung

Die Vorläufer zu aliphatischen Fluorverbindungen sind in aller Regel potente Alkylierungsmittel, die eine mit hohen radiochemischen Ausbeuten verlaufende nukleophile Substitution mit n.c.a. ^{18}F -Fluorid gestatten. Für die aromatische nukleophile Substitution ist z.B. die von Haka et al. [28] in die Fluor-18 Chemie eingeführte Verwendung von Trimethylammonium-Triflat als Abgangsgruppe außerordentlich gut geeignet, da zum einen sehr gute Ausbeuten erzielt werden, zum anderen aber auch die korrespondierende Fluorverbindung wesentlich veränderte physikalisch-chemische Eigenschaften aufweist. Dies äußert sich in einem deutlichen Zugewinn des Produktes an Lipophilie, bedingt durch den Verlust des ionischen Charakters. Prinzipiell können z.B. [^{18}F]Fluorbenzolderivate von den entsprechenden Trimethylammoniumsalzen durch RP-Festphasen oder durch Festphasen auf Ionenaustauschbasis getrennt werden. Deshalb haben in den letzten Jahren diese Vorläufer bei der aromatischen nukleophilen Substitution die

früher üblichen Nitrovorläufer weitgehend abgelöst. Es wurde daher hier versucht, analoge Abgangsgruppen bei der trägerfreien, aliphatischen ^{18}F -Fluorierung einzusetzen. Ausgehend von Essigsäureethylester wurden deshalb verschiedene Ammonium-Verbindungen als Vorläufer synthetisiert, die prinzipiell zu Fluoressigsäurederivaten reagieren könnten. In der Literatur [87-89] finden sich zwar einige Beispiele für nukleophile Substitutionen an quaternären aliphatischen Ammoniumverbindungen, jedoch haben sie insgesamt wenig Bedeutung unter den Methoden der nukleophilen Substitutionen. Innerhalb der Literatur zur Fluor-18 Chemie finden sich keine Beispiele für Reaktionen dieser Art. Abbildung 14 zeigt die diesbezüglich untersuchten Substanzen:

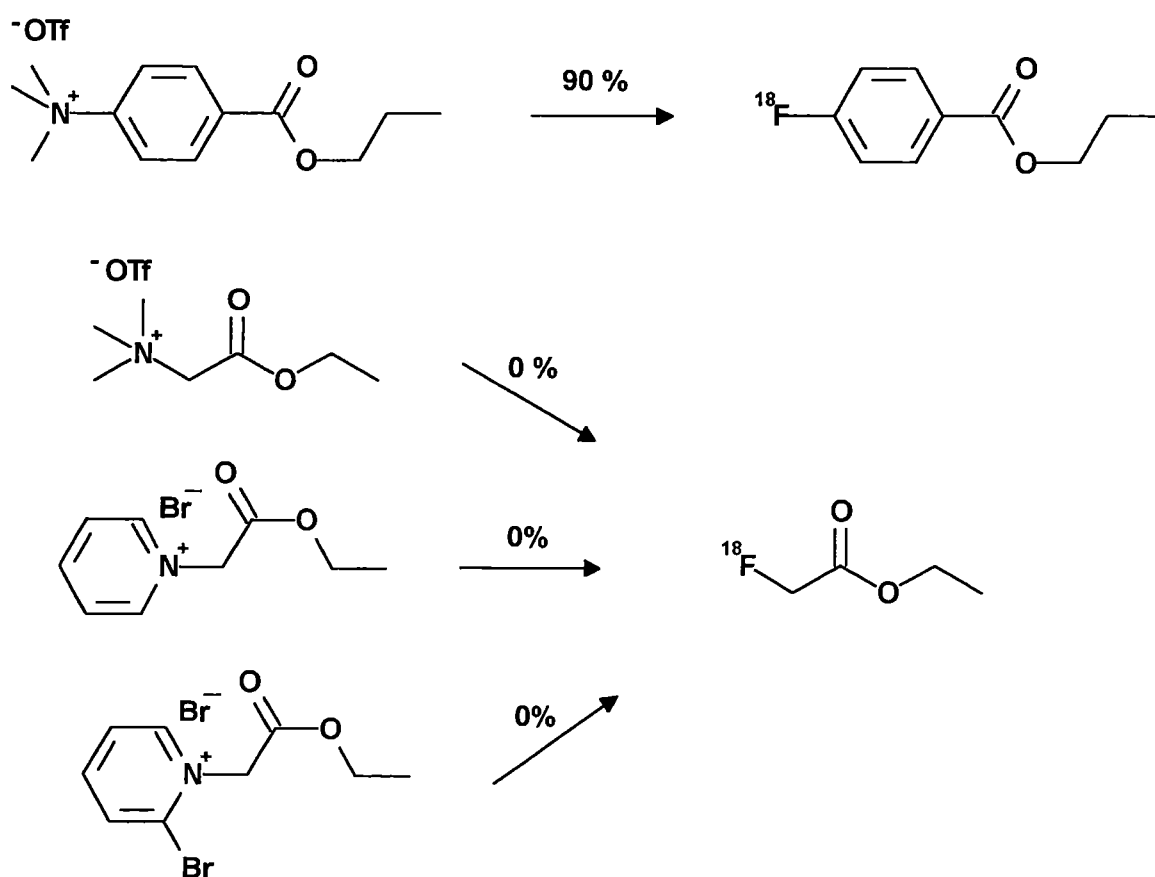


Abbildung 14: Vergleich aliphatischer und aromatischer Ammoniumsalze zur nukleophilen Substitution mit $[^{18}\text{F}]$ Fluorid

Alle in Abbildung 14 gezeigten Verbindungen zur angestrebten Synthese aliphatisch gebundenen $[^{18}\text{F}]$ Fluors über die nukleophile Substitution an Ammoniumsalzen waren nicht dazu geeignet, $[^{18}\text{F}]$ Fluorid unter Bildung von $[^{18}\text{F}]$ Fluoressigsäureethylester zu inkorporieren. Auch der Zusatz von geringen

Mengen an Träger sowie Temperatur und Solvensvariation änderte nichts an diesem Verhalten, weshalb auf weitere Untersuchungen in dieser Richtung verzichtet wurde.

2.1.4.2 Bewertung von Betylaten als Vorläufer zur nukleophilen Radiofluorierung

Als Alternative zu den Ammoniumverbindungen wurde versucht, spezielle Sulfonsäureester zur nukleophilen Reaktion heranzuziehen. Hier wurden an Stelle der üblichen Mesylate oder Tosylate etc. solche Verbindungen eingesetzt, die im Sulfonsäurerest protonierbare, tertiäre Stickstoffatome aufweisen. Solche Verbindungen werden in Anlehnung an die Begriffe Tosylat, Brosylat etc. mit dem Begriff Betylat belegt. Betylate können z.B. durch die Anzahl der Kohlenstoffatome zwischen Sulfonsäurefunktionalität und tertiärer Aminogruppe charakterisiert werden. Während O-Betylate nur in Ausnahmefällen [90] stabile Verbindungen ergeben, gehören die 2- und höheren Betylate ähnlich den "normalen" Sulfonaten [91] zur Gruppe der starken Alkylierungsmittel und damit zu guten Substraten für die nukleophile Substitution. Ein einfacher Syntheseweg zu Betylaten der hier interessierenden Essigsäure bzw. α -Propionsäureester besteht in der Umsetzung der entsprechenden Alkohole mit speziellen Derivatisierungsreagenzien zur Fluoreszenzmarkierung. So wurden auf Basis des kommerziell erhältlichen Dansylchlorids durch Umsetzung mit Milchsäure- oder Glykolsäureestern die entsprechenden "Naphtylbetylate" dargestellt und die ersten Versuche zur Substitution von n.c.a. [^{18}F]Fluorid an Betylaten durchgeführt:

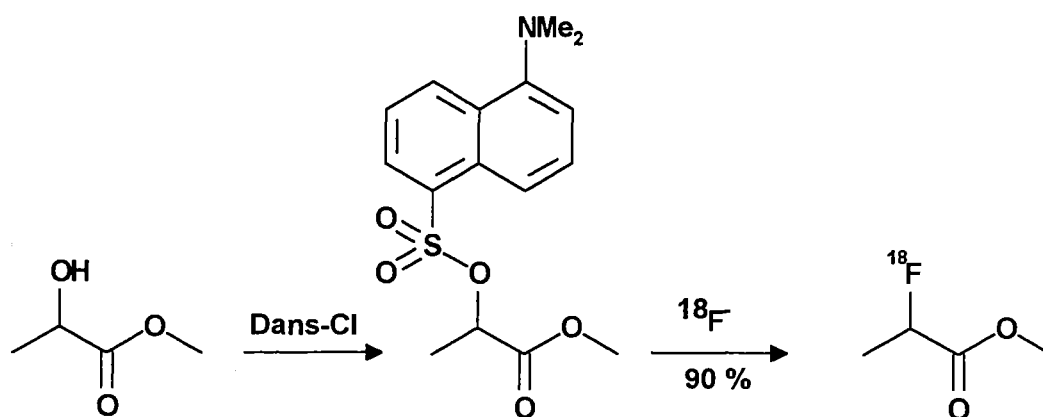


Abbildung 15: Dansylester als Abgangsgruppe zur n.c.a. Einführung von [^{18}F] Fluorid in Essigsäuremethylester.

Reaktionsbedingungen: MeCN, 90°C, 5 Min; (Kryptofix / K_2CO_3)

C(Dansylester): 5 mg / 250 μl

Diese Verbindungen lieferten zwar ebenso hohe radiochemische Ausbeuten, wie die bei den analogen nukleophilen Substitutionen an Tosylaten oder bromierten Verbindungen, jedoch erfüllen sie den Zweck einer günstigen Abtrennbarkeit dieser speziellen Vorläufer nicht, da sich die Ausgangsverbindungen in hohem Maße unter den erhöhten Temperaturen und den basischen Bedingungen zersetzten (Abbildung 16):

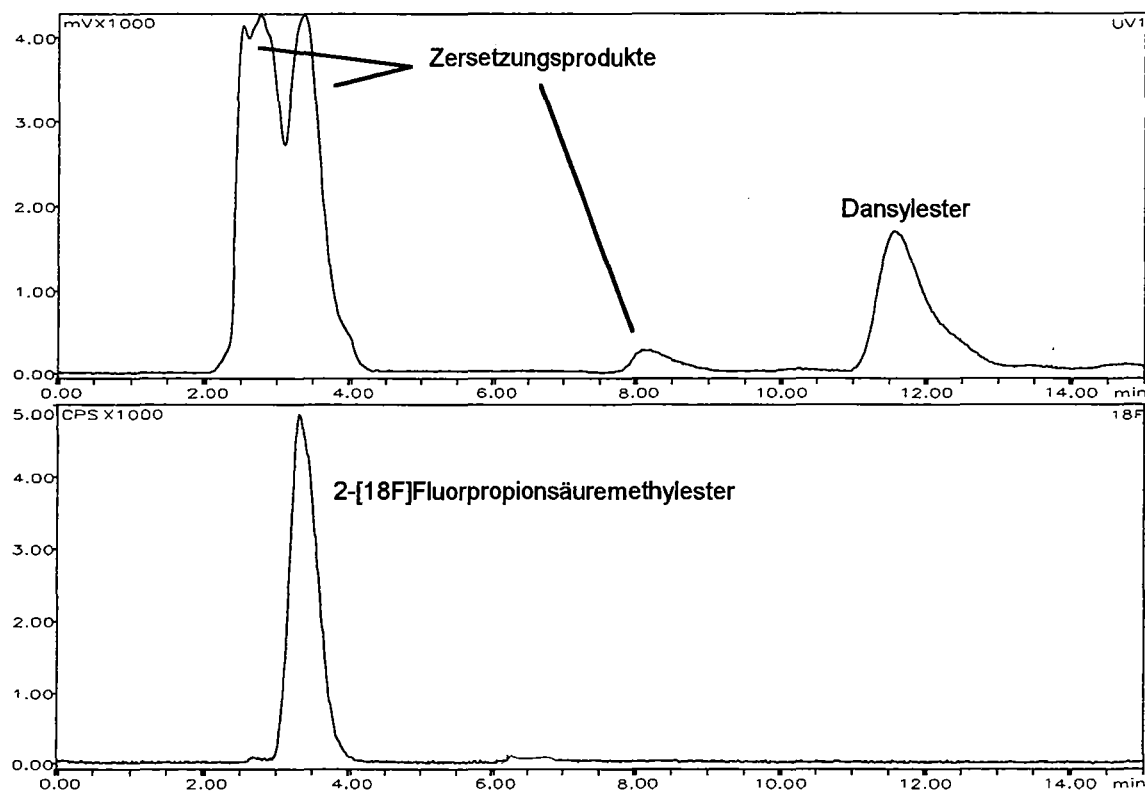


Abbildung 16: Chromatographie zur Synthese von 2-[^{18}F]Fluorpropionsäureester via Dansylester (RP-18, isokratisch, Eluens 70/30=MeOH/H₂O)

Eine Reinigungsprozedur, die auf den Eigenschaften des unzersetzten Vorläufermoleküls basiert, wird bei einem solch starken Auftreten von Zersetzungsprodukten natürlich ad-absurdum geführt. Da außerdem in Vorversuchen festgestellt worden war, daß die unzersetzte Verbindung, vermutlich aufgrund der schwachen Basizität des Anilinstickstoffs, an den getesteten Kationentauschern (Sep-Pak; Waters) unvollständige adsorbiert wird, wurde dieses spezielle Betylrat nicht weiter untersucht. Dennoch könnten andere Betylrate, vor allem solche, die aliphatisch gebundenen und damit wesentlich stärker basischen Stickstoff enthalten, diesen Zweck besser erfüllen und damit günstige Abgangsgruppen für die nukleophile Substitution am aliphatischen Kohlenstoff mit n.c.a [^{18}F]Fluorid darstellen.

2.1.4.3 Abtrennung des Vorläufers durch Quaternisierung nach der Markierung

Eine weitere Möglichkeit der Abtrennung des nicht-umgesetzten Überschusses von Bromvorläufern nach erfolgter nukleophiler Radiofluorierung (und der anderen Hilfssubstanzen wie Kryptofix 2.2.2 etc), besteht in seiner Umwandlung zu quaternären Ammoniumverbindungen wie in Abbildung 17 schematisch gezeigt:

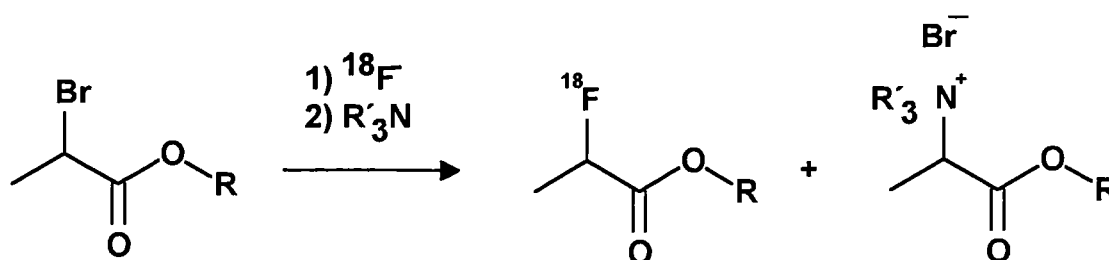


Abbildung 17: Abtrennung des Vorläufers nach erfolgter Markierung

Dies hat den Vorteil, daß die relativ stabilen, aber trotzdem mit hohen radiochemischen Ausbeuten fluorierbaren α -Bromester eingesetzt werden können. Als Quaternisierungsagentien wurde eine Reihe von tertiären Stickstoffbasen untersucht und sowohl auf Bromessigsäure-, wie auf α -Brompropionsäureester angewandt. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefaßt:

Tabelle 7: Vergleich von tertiären Stickstoffbasen zur Quaternisierung von α -Bromestern

Base	pK _a	Quaternisierungsausbeute mit α -Bromessigester	Quaternisierungsausbeute mit α -Brompropionester
Et ₃ N	9,25	> 95 %	< 20 %
Pyridin	5,25	> 95 %	20 %
4-Dimethylamino-pyridin (DMAP)	9,70	> 95 %	> 95 %

Bedingungen: MeCN; 90°C; 10 min; c(Base): 1M; c(α -Bromester): 0.12M

Die verschiedenen untersuchten Amine sind erwartungsgemäß alle in der Lage, die eingesetzten Bromderivate nukleophil anzugreifen. Der Angriff auf das primäre Kohlenstoffatom der Bromessigsäure ist dabei erleichtert, weshalb unter den gegebenen Reaktionsbedingungen praktisch für alle drei Basen quantitative Ausbeuten erzielt wurden. Unterschiede werden jedoch beim Übergang zum sekundären Kohlenstoffatom deutlich. Triethylamin wies trotz der höchsten Basizität unter den

getesteten Basen die geringste Reaktionsgeschwindigkeit auf, entsprechend seiner relativ geringen Nukleophilie. Der Stickstoff innerhalb des aromatischen Pyridinringes weist eine erhöhte Nukleophilie auf und somit eine gesteigerte Reaktionsgeschwindigkeit. Eine Dimethylaminogruppe in der 4-Position des Pyridins erhöht die Nukleophilie und die Basizität durch den +M-Effekt beträchtlich, so daß hier die höchste Reaktionsgeschwindigkeit erzielt wird. DMAP wird deshalb auch als hochwirksamer Acylierungskatalysator eingesetzt und übertrifft die katalytische Wirkung des Pyridins um mehrere Zehnerpotenzen [92]. 4-Dimethylaminopyridin erweist sich somit sowohl für Bromessigsäure- als auch für Brompropionsäurederivate als das geeignete Quaternisierungsreagenz, weshalb hier zur Optimierung die Konzentrationsabhängigkeiten der Quaternisierung für beide Bromverbindungstypen untersucht wurden (Abb. 18):

Quaternisierungsausbeute [%]

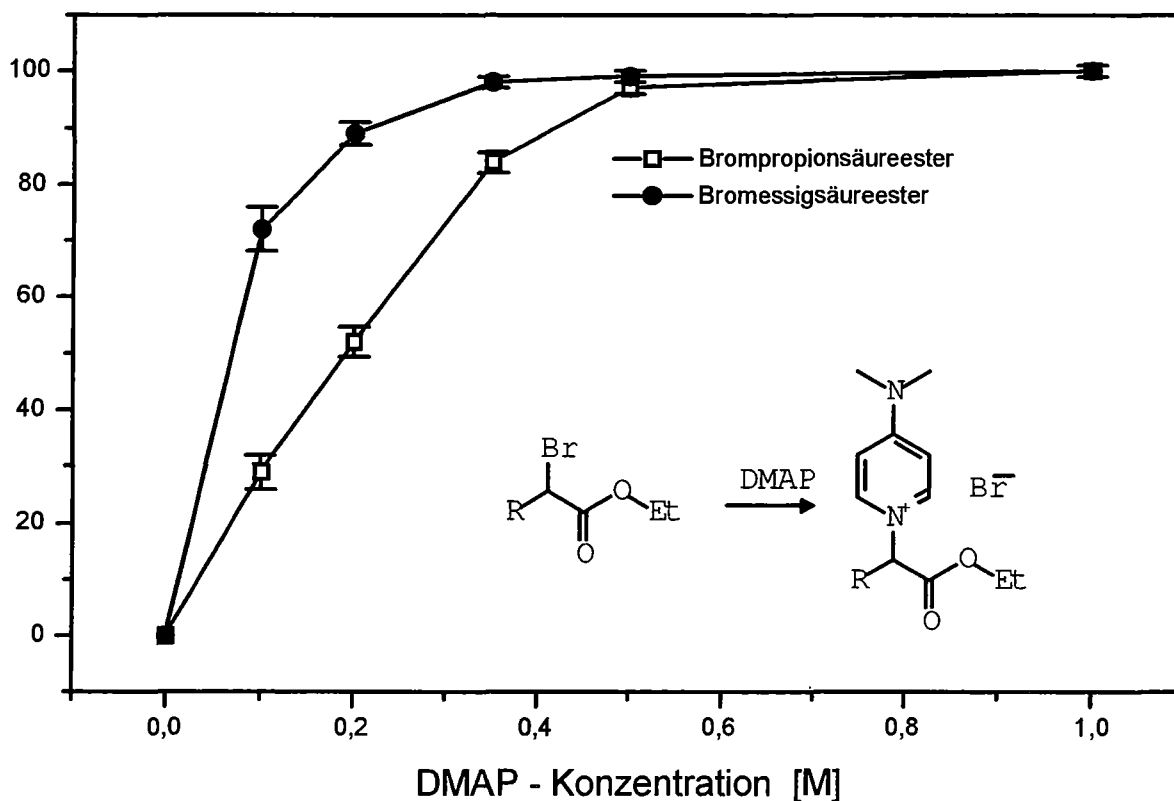


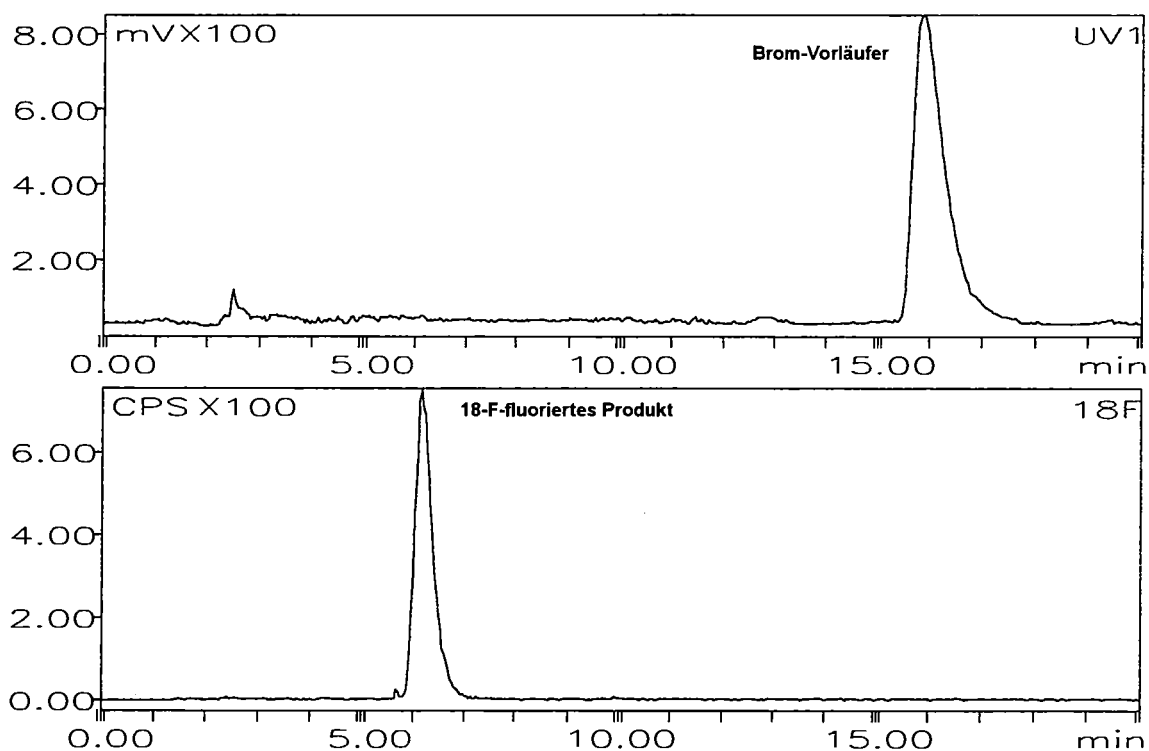
Abbildung 18: Quaternisierung von Bromalkylestern mit Dimethylaminopyridin (DMAP); Reaktionsbedingungen: MeCN; 90°C; $c(\text{Ester})$: 0,12M

Aus Abbildung 35 wird klar ersichtlich, daß sowohl für primäre als auch sekundäre α -Bromcarbonsäuren ca. 0,5-1,0 molare Lösungen an DMAP zu quantitativer Umsetzung des Vorläufers führen. Natürlich muß zusätzlich gewährleistet sein, daß die vorher erzeugte ^{18}F -Fluorverbindung unter den Reaktions-

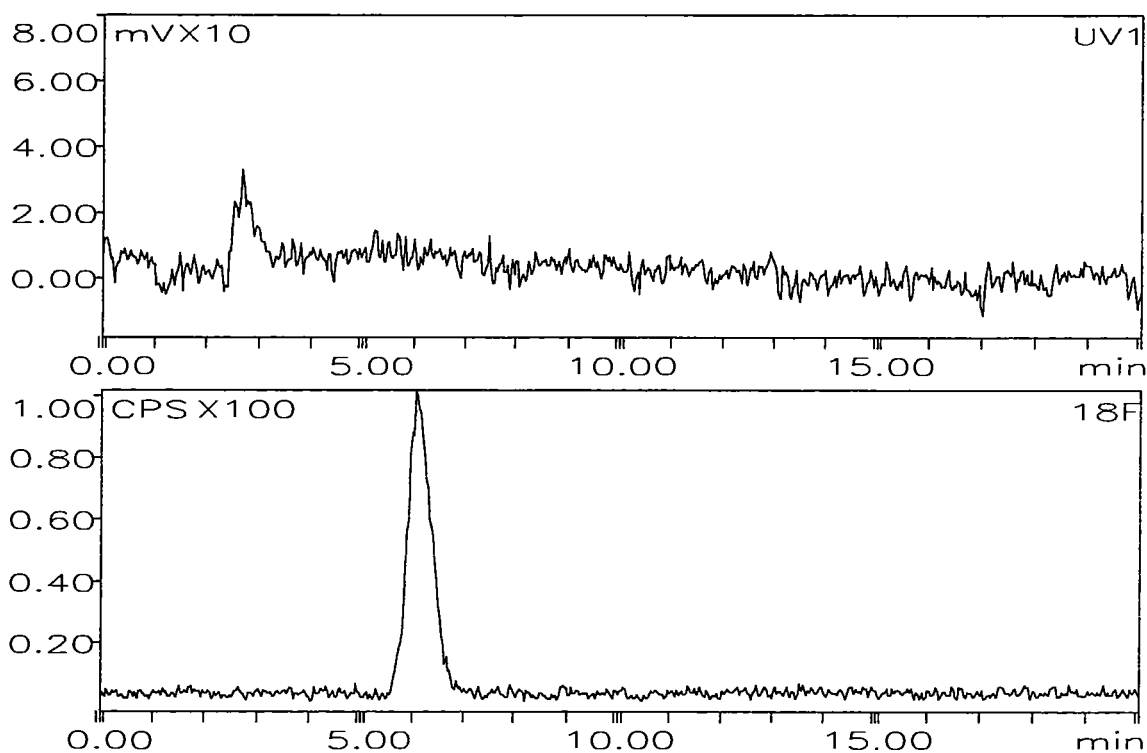
bedingungen stabil bleibt. Bei den hierzu durchgeführten Untersuchungen erwies sich diese Forderung als zutreffend. Ein nukleophiler Angriff des DMAP auf die ^{18}F -fluorierte Verbindung unter Substitution von freiem ^{18}F Fluorid war nicht zu beobachten. Ebenso war auch kein Angriff des DMAP auf die Carbonylfunktion zu beobachten, die eine Verseifung des Esters zur Folge hätte.

Somit kann der ^{18}F -Ester nach Verdünnen mit 0.1M Salzsäure bequem auf einer reversed-Phase Kartusche fixiert werden, während die quaternisierte Verbindung, die noch eine zusätzliche Ladung am Anilinstickstoff durch die Protonierung erhält, zusammen mit DMAP und dem Anionenaktivator (Kryptofix 2.2.2 oder Tetraalkylammoniumsalzen) eluiert wird. Die Abtrennung von protoniertem Kryptofix 2.2.2 von ^{18}F -Produkten mittels C-18 Sep-Pak Kartuschen durch Spülen mit angesäuertem Wasser ist dabei bereits seit längerer Zeit bekannt [10]. Zur tatsächlich quantitativen Abtrennung letzter Reste von DMAP und Quaternisierungsprodukt wird der ^{18}F -Ester zusätzlich durch eine nachgeschaltete Silikagel Kartusche eluiert. Gleichzeitig wird dabei der Vorteil des Umkehrens der Elutionsreihenfolge ausgenutzt.

Die große Effektivität dieser Derivatisierung des Substitutionsvorläufers sei an den folgenden Chromatogrammen demonstriert, die Trennungen von Reaktionsgemischen vor (a) und nach (b) der Derivatisierung zeigen (Abb. 19):



Chromatogramm (a) (Rohlösung)



Chromatogramm (b) (gereinigte Lösung)

Abbildung 19: Chromatogramme von 2-[^{18}F]Fluorpropionsäureethylester vor und nach Quaternisierung des Bromvorläufers durch DMAP;
 Chromatographiebedingungen: RP-18; 7 μ ; 250 X 4mm; 1ml / min;
 H_2O / MeOH = 30 / 70

Während Abbildung 19 (a) ein Chromatogramm des Rohproduktes zeigt, indem im UV-Bereich neben einem typischen Injektionspeak, nur der bromierte Vorläufer mit einer Retentionszeit von ca. 16 Minuten detektiert wird, zeigt Abb. 19 (b) ein Chromatogramm der in oben beschriebener Weise derivatisierten und über Sep-Pak Kartuschen aufgearbeiteten Lösung des radiofluorierten Esters. Da bei Chromatogramm (b) wegen des Verdünnungseffektes nur etwa ein Siebentel der Radioaktivität zur Trennung aufgegeben wurde, ist zum Zweck der Vergleichbarkeit die Empfindlichkeit des UV-Kanals in (b) um den Faktor 10 erhöht. Deutlich erkennbar ist nach der Reinigung keine UV-aktive Spezies detektierbar, obwohl das zur Derivatisierung eingesetzte DMAP mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\log E = 4,25$ bei 259 nm [92] extrem gut nachweisbar ist und bequem in nanomolaren Mengen detektiert werden kann. Die Methode erwies sich als sehr zuverlässig und wurde deshalb auch in der im experimentellen Teil beschriebenen Syntheseapparatur zur Produktion von 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester eingesetzt.

2.1.5 Hydrolyse von 2-[^{18}F]Fluorcarbonsäureestern

Die basisch katalysierte Hydrolyse einfacher Alkylester und komplexerer Ester wie Anthrylmethylester oder MAQ-Ester der ^{18}F -Carbonsäuren gelingt bei erhöhten Temperaturen in sehr kurzen Reaktionszeiten (10 min). Man erhält dabei quantitative Ausbeuten der freien Carboxylate. Eine genauere Untersuchung zur Kinetik der Hydrolyse des Anthrylmethylesters ergab eine Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion (k_{OH}) von $(5,5 \pm 0,2) \cdot 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [93].

Aus verschiedenen Gründen ist es von Vorteil, die Hydrolyse in einem Gemisch von Wasser und einem damit mischbaren Lösungsmittel durchzuführen. Bei der Verwendung mittel- bis schwerflüchtiger Ester, wie z.B. Butyl- oder Benzylester, kann auf das Eindampfen der in organischem Lösungsmittel anfallenden Verbindungen bis zur Trockene verzichtet werden, da der größte Verlust an Aktivität erst gegen Ende der Destillation auftritt. Anders bei der Verwendung der MAQ- oder Anthrylmethylester. Hier kann zwar problemlos zur Trockene abdestilliert werden, jedoch sind die Ester so schwer wasserlöslich, daß die Hydrolyse in rein wässriger Lösung mißlingt.

Deshalb wurde die Menge des zugesetzten Wassers optimiert, indem die radiochemische Ausbeute an freier Carbonsäure in Abhängigkeit des Verhältnisses von Wasser zu Acetonitril bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 graphisch dargestellt.

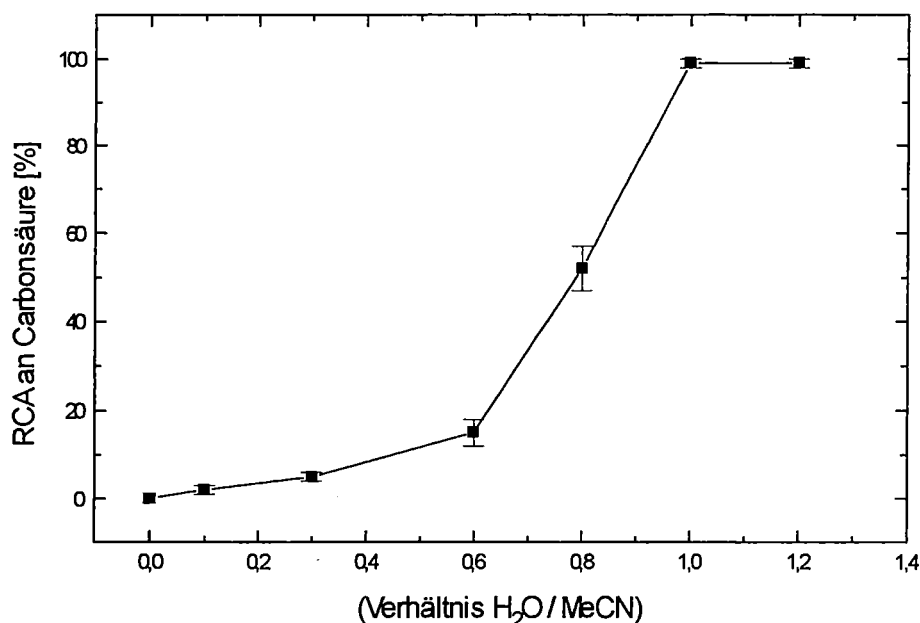


Abbildung 20: Abhängigkeit der Hydrolyse von 2-[¹⁸F]Fluorpropionsäureethylester vom Verhältnis Wasser zu Acetonitril;
Reaktionsbedingungen: 10 min; 90°C; 35 mM NMe₃

Abbildung 20 zeigt den ausgeprägten Einfluß vom Wassergehalt des Reaktionsgemisches bei der Hydrolyse am Beispiel des 2-[¹⁸F]Fluorpropionsäureethylesters. Geringe Wasseranteile reichen für quantitative Hydrolysen bei kurzen Reaktionszeiten nicht aus. Ab Mischungsverhältnissen von ca. 1:1 wird die Hydrolyse jedoch immer stärker, und der Ester ist bereits nach 10-minütiger Reaktionszeit bei 90°C nicht mehr nachweisbar.

Es erwies sich als günstig für die spätere Aktivierung des Carboxylates, bei dem Verseifungsschritt nichtflüchtige Basen (wie NaOH etc.), durch das sehr flüchtige Trimethylamin zu ersetzen. Dieses wird beim azeotropen Trocknungsprozess des ¹⁸F-Fluorcarboxylates vollständig und leicht entfernt und trägt damit zur Minimierung und erleichterten Abtrennung des basenempfindlichen Aktivierungsreagenzes im folgenden Schritt bei. Dennoch wurde festgestellt, daß ein Minimum an nichtflüchtiger Base (z. B. Kaliumcarbonat oder Tetramethylammoniumhydroxid) notwendig ist, um bei der Trocknung des Carboxylates eine Zersetzung des Trimethylammoniumsalzes in flüchtiges Trimethylamin und flüchtige freie Carbonsäure zu vermeiden. (Bei späteren Synthesen wurden deshalb stets ca 100 µg dieser Basen zugesetzt, was für eine vollständige Bildung des nichtflüchtigen Carbonsäuresalzes reicht.). Die notwendige Konzentration an Trimethylamin zur

Hydrolyse des Esters wurde in 70 % wässriger Lösung bestimmt. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 21 dargestellt

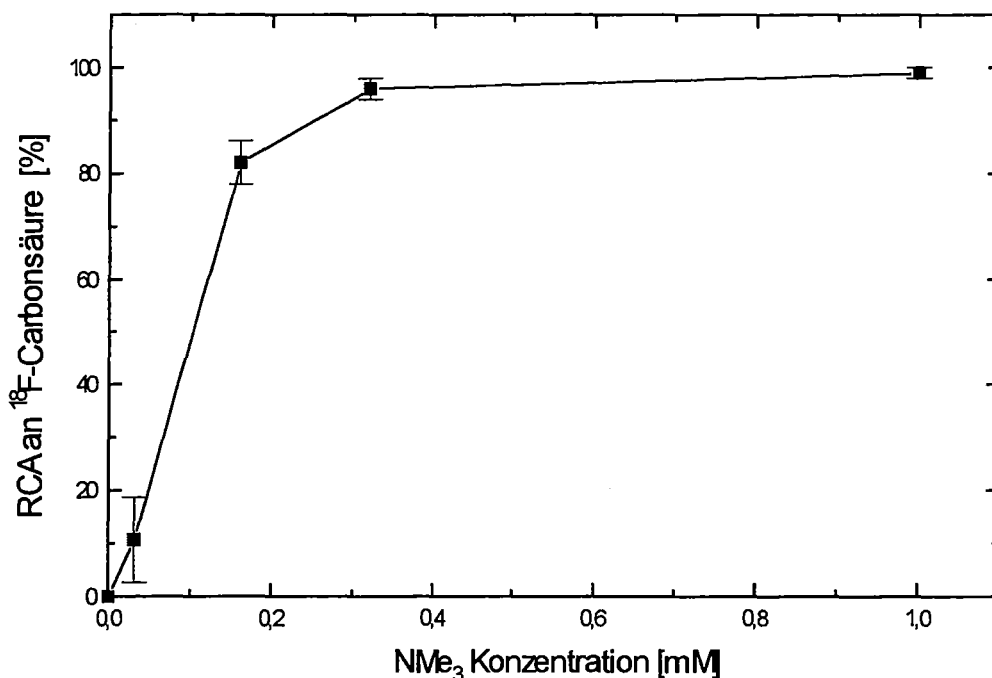


Abbildung 21: Verseifung von 2-[¹⁸F]Fluorpropionsäureethylester als Funktion der Trimethylaminkonzentration.

Reaktionsbedingungen: 90°C; 10 min; Wasser / MeCN = 70 / 30

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen klar, daß quantitative Umsetzungen des fluorierten Ethylesters schon bei geringen Basenkonzentrationen von weit unter 1mM erzielt werden können. Diese enorme Leichtigkeit der Verseifung ist sicher auf den starken induktiven Effekt des Fluoratoms zurückzuführen. Bei der Verseifung des analogen Anthrylmethylesters werden höhere Konzentrationen an Trimethylamin benötigt, da sich hier der sterische Einfluß der großen Schutzgruppe merklich auswirkt. Die Hydrolysen wurden mit 100 mM Trimethylamin-Konzentration bei 1:1-Gemischen von Methanol und Wasser durchgeführt. Diese Reaktionsbedingungen führten stets zu quantitativen Ausbeuten an freiem ¹⁸F-Fluorcarboxylat.

2.1.6 Darstellung reaktiver ^{18}F -Fluoracylierungsreagenzien

2.1.6.1 Darstellung von n.c.a. ^{18}F -Carbonsäureimidazoliden als reaktive Fluoracylierungsagentien

Carbonsäureimidazole finden große Beliebtheit zur Herstellung von Estern und Amiden, seit systematische Untersuchungen zu dieser Verbindungsklasse durchgeführt wurden [94]. Sie gehören zur Klasse reaktionsfähiger, heterocyclischer Amide, deren Amid-Stickstoff Glied eines quasi-aromatischen Fünfringes mit mindestens zwei Stickstoffatomen im Ring ist. Während "normale" Amide durch eine besondere Stabilität gekennzeichnet sind, findet man bei Imidazoliden oder allgemeiner den Azoliden eine auf den ersten Blick überraschende Reaktionsfähigkeit, die denen von Säurehalogeniden durchaus nahekommt [95]. Dies steht in Zusammenhang mit der Einbeziehung des freien Elektronenpaares des Amidstickstoffs in den aromatischen Ring. Dadurch kommt es zu einer Positivierung des Stickstoffatoms und nicht zu dem üblicherweise partiellen Doppelbindungscharakter der Amidbindung und damit letztlich zu einem stark positiv polarisierten und reaktionsfähigen Carbonyl-Kohlenstoff.

Zum Mechanismus der Reaktion von Carbonsäuren mit Carbonyldiimidazol

N,N' -Carbonyldiimidazol reagiert mit Carbonsäuren bereits bei Raumtemperatur in indifferenten Lösungsmitteln praktisch quantitativ zu den Imidazoliden (Abbildung 22). Dabei wird die Bildung eines gemischten Anhydrids als Zwischenprodukt des Angriffs der Carbonsäure auf das Diimidazol angenommen.

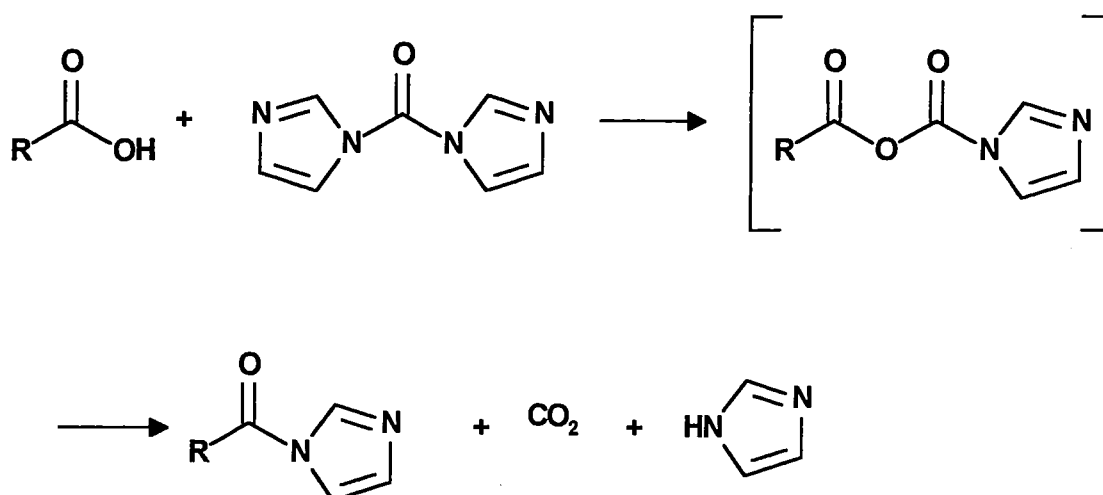


Abbildung 22: Reaktion von Carbonsäuren mit Carbonyldiimidazol zu Carbonsäureimidazoliden

Dieses gemischte Anhydrid kann prinzipiell entweder intramolekular unter CO_2 -Abspaltung, oder intermolekular, durch Angriff des freigewordenen Imidazols auf das Zwischenprodukt, zum Carbonsäureimidazolid weiterreagieren. Welche dieser beiden möglichen Alternativen tatsächlich vonstatten geht, ist für die präparative Synthesechemie im allgemeinen unbedeutend, solange das gewünschte Produkt entsteht. Für das Arbeiten mit trägerfreien, radioaktiven Carbonsäuren ist dies jedoch von entscheidender Bedeutung, da der intermolekulare Reaktionsweg die Reaktion von zwei Teilchen in trägerfreien Konzentrationen zur Bedingung hätte und somit sehr unwahrscheinlich wird.

Aus der Literatur [96] war bekannt, daß ein intermolekularer Reaktionsweg anzunehmen ist. Dazu waren Experimente mit C-14 markiertem Imidazol in Gegenwart einer Carbonsäure und unmarkierten Carbonyldiimidazol durchgeführt worden. Da das Molverhältnis von ^{14}C Imidazol zu Carbonyldiimidazol nur 1:100 betrug und trotzdem 86% der ^{14}C -Aktivität im Carbonsäureimidazolid gefunden worden waren, kamen die Autoren zu dem Schluß, daß es sich um einen intermolekularen Reaktionsweg handeln müsse. Zunächst war sichergestellt worden, daß es bei den relevanten Reaktionszeiten nur zu einem vernachlässigbaren Austausch von ^{14}C Imidazol in Carbonyldiimidazol bzw. in das Carbonsäureimidazolid kam.

Übertragen auf eine Reaktion mit n.c.a ^{18}F -Carbonsäuren war, wie zunächst erwartet, die Ausbeute an ^{18}F -markiertem Carbonsäureimidazolid vernachlässigbar klein. Dies wurde anhand der Umsetzung von n.c.a 2- ^{18}F Fluorpropionat mit Carbonyldiimidazol festgestellt und steht im Einklang mit dem oben diskutierten Mechanismus. Jedoch wäre eine merkliche Umsetzung zu erwarten, würde man dem System zusätzlich freies Imidazol zusetzen, welches dann in der Lage sein würde, mit dem gemischtem Anhydrid zu reagieren. Diese Hoffnung wurde jedoch nicht erfüllt und zwar unabhängig, in welchem Verhältnis (1:10, 1:1 und 10:1) Imidazol zu Carbonyldiimidazol zugesetzt wurde. Daher wurde gefolgert, daß auch freie Protonen zur Verfügung stehen müssen, um das Zwischenprodukt (gemischtes Anhydrid) überhaupt erst bilden zu können. Die radiochemischen Ausbeute an 2- ^{18}F Fluorpropionsäureimidazolid wurde daher in Abhängigkeit des Zusatzes einer nichtisotopen Trägersäure (Phenyllessigsäure) bestimmt und in Abbildung 23 graphisch dargestellt:

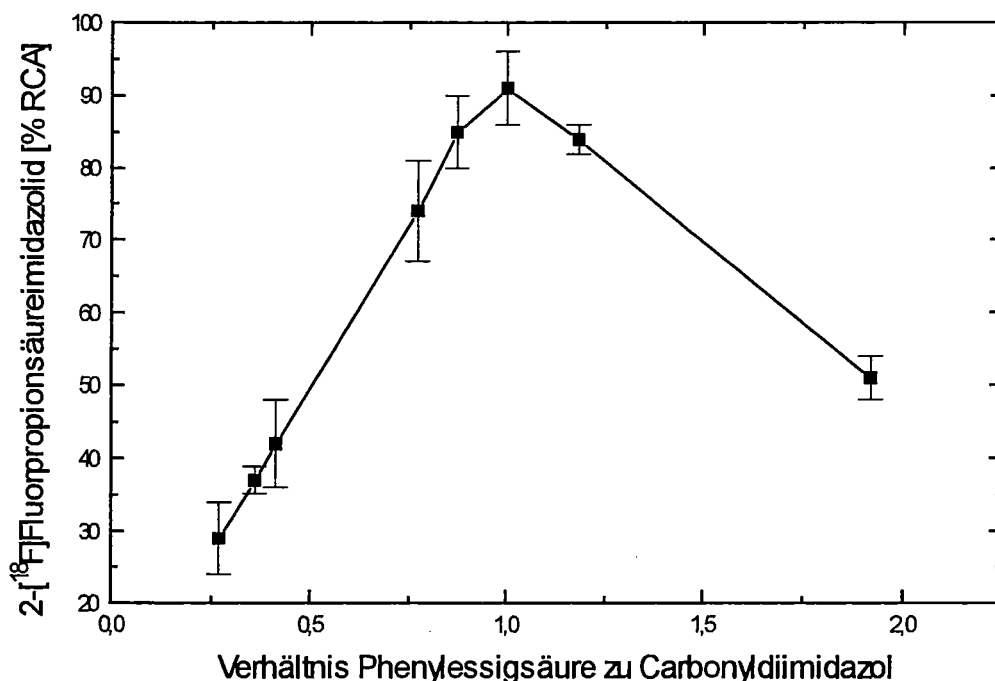


Abbildung 23: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute vom Verhältnis der nichtisotopen Trägersäure Phenyllessigsäure zu Carbonyldiimidazol
 Reaktionsbedingungen: 200 µl MeCN, 20°C, 5 min, 5,0 mg Carbonyldiimidazol, variable Mengen an Phenyllessigsäure

Abbildung 23 zeigt deutlich das Ansteigen der radiochemischen Ausbeute in Abhängigkeit des Verhältnisses von Carbonsäure zu Carbonyldiimidazol bis zu einem Verhältnis von ca. 1:1. Noch weiterer Zusatz an Carbonsäure führt dann aufgrund des molaren Überschusses von Carbonsäure gegenüber dem Aktivierungsreagenz zu einem erneuten Absinken der radiochemischen Ausbeute. Die Wahl einer nichtisotopen Trägersäure anstelle eines Zusatzes von stabiler 2-Fluorpropionsäure erfolgt deshalb, weil nur so die Möglichkeit besteht, Produkte mit hohen spezifischen Aktivitäten zu erhalten. Zunächst wurde Phenyllessigsäure ausgewählt, da hiermit sowohl gut UV-detektierbare Produkte und Edukte vorliegen, als auch durch ihren aliphatischen Charakter die Trägerfunktion am besten gewährleistet wird. Außerdem können die Produkte wegen der wesentlich höheren Lipophilie der Phenyllessigsäure sehr gut vom ¹⁸F-markierten Produkt getrennt werden. Wie sich später in stichprobenartigen Experimenten herausstellte, ist jedoch auch der Einsatz von aromatischen Säuren, wie Benzoesäure, ohne weiteres möglich und empfehlenswert, da Phenyllessigsäure geruchsbelästigend ist.

Die chromatographische Reinigung von [¹⁸F]Fluoressig- oder -propionsäureimidazoliden kann jedoch nicht, wie häufig üblich, auf reversed-phase Säulen

erfolgen, da ihre Polarität so hoch ist, daß sie keinerlei Retention erfahren und im Totvolumen eluieren. Zudem ist ihre Hydrolyseempfindlichkeit selbst in sauren wässrigen Lösungen sehr hoch, so daß als Eluenten nur organische Lösungsmittel eingesetzt werden können. Deshalb wurde eine Isolierung der ^{18}F -Imidazolide auf Normalphasen (Si60) versucht, die jedoch ebenfalls zu Zersetzung der Produkte führten. Die einzige Möglichkeit, die fluorierten Imidazolide chromatographisch zu handhaben, wurde mittels Cyanophasen erzielt. Jedoch mußten hier die kalten Standardverbindungen koinjiziert werden, um eine Zersetzung weitgehend zu verhindern.

Wegen dieser Schwierigkeiten bei der Chromatographie können die n.c.a 2- ^{18}F -Imidazolide nur in Gegenwart des nicht isotopen Trägers mit Aminen zur Reaktion gebracht werden. Dies erfordert somit zum nicht isotopen Träger äquimolare Konzentrationen, was hinsichtlich der Markierung teurer Peptide eine Limitation darstellt.

Als Ergebnis dieser Untersuchung kann also festgehalten werden, daß die Darstellung von Imidazoliden zwar unter n.c.a-Bedingungen möglich, jedoch der Zusatz von nichtisotopem Träger notwendig ist. Der Reaktionsmechanismus ist nach diesen Untersuchungen ebenfalls ein intermolekularer, wie von Staab et al. [96] beschrieben, jedoch scheint der Bildung des intermediären gemischten Anhydrids eine Protonierung des Diimidazols vorauszugehen. Die Anwesenheit von freiem Imidazol allein im Reaktionsgemisch genügt nicht, um so kleine Mengen von Carbonsäuren, wie sie bei trägerfreien Arbeiten mit kurzlebigen Radioisotopen vorliegen, mit einem Überschuss von Carbonyldiimidazol zu Imidazoliden umzusetzen. Deswegen erzielt man die höchsten Ausbeuten bei einem Verhältnis von ca. 1:1 Carbonsäure zu Diimidazol. Die Notwendigkeit einer Protonierung wird auch klar, wenn man sich vergegenwärtigt, daß ein Angriff von Carboxylat-ionen auf unprotoniertes Diimidazol eine Substitution von vergleichsweise viel stärker nukleophilen Imidazolanionen bedeuten würde. Dies erscheint schon aus thermodynamischen Gründen sehr ungünstig.

2.1.6.2 Darstellung von n.c.a ^{18}F -Carbonsäureaktivestern

Um die Nachteile der bislang untersuchten Fluoracylierungsmethoden wie der Methylestermethode (zu unreaktiv), der Dicyclohexylcarbodiimidmethode (DCC; zu geringe Ausbeuten), und der Imidazolidmethode (schwer isolierbar; nichtisotope Trägersäuren notwendig) zu umgehen, wurden Aktivester als eine weitere Substanzgruppe klassischer Acylierungsreagenzien hinsichtlich ihrer Eignung für trägerarme Fluoracylierungen untersucht. Einige der am häufigsten gebrauchten Aktivester in der präparativen organischen Chemie sind p-Nitrophenylester und N-Hydroxy-succinimidylester (s. auch Kap. 1.5). Diese Ester sollten insbesondere hinsichtlich einer alternativen Darstellung zu der oft üblichen Kombination von DCC und Phenol bzw. N-Hydroxykomponente untersucht werden, da schon von früheren Untersuchungen bekannt war, daß bei der DCC-Methode im Falle der Umsetzung von trägerfreien Carbonsäuren, ähnlich wie bei der oben beschriebenen Imidazolidmethode, zumindest nichtisotope Trägersäuren eingesetzt werden müssen. Auch hatte sich die DCC-Methode nicht für die Aufarbeitung von ^{18}F -markierten Produkten via HPLC bewährt [74].

Als Alternative zu DCC sind heute weitgehend zwei Methoden zur Darstellung von Aktivestern üblich. Diese bestehen im Einsatz von Uroniumsalzen [zur Übersicht s. 97] oder Phosphoniumsalzen [zur Übersicht s. 98] oder aber in der Anwendung entsprechender Carbonatreagenzien [zur Übersicht s. 99]. Diese Reagenzien sind in Abbildung 24 gezeigt:

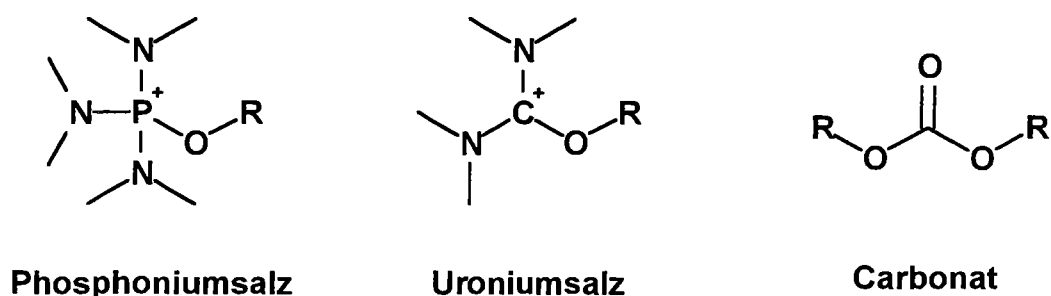


Abbildung 24: Übliche Reagenzien zur Darstellung von Aktivestern aus Carbonsäuren (R = Alkoholkomponente der korrespondierenden Aktivester)

Die ionischen Reagenzien (Uronium- bzw Phosphoniumsalze) wurden in dieser Studie auf Grund des Reaktionsmechanismus dieser Aktivierungsreagenzien [100] nicht näher untersucht. Es entsteht zunächst ein Zwischenprodukt aus Kation und markiertem Carboxylat unter Substitution der Alkoholkomponente. Die freigewordene Alkoholkomponente reagiert dann unter Angriff auf die nun hoch aktivierte Carbonylposition der Carbonsäure unter Bildung des Aktivesters. Dieser

Mechanismus, übertragen auf trägerfreie Systeme, führt wieder zu der ungünstigen Konstellation, daß zwei Teilchen in extrem niedrigen Konzentrationen miteinander reagieren müßten, was aus statistischen Gründen nur zu sehr schlechten Ausbeuten führen kann. Dies wurde auch in einigen stichprobenartigen Versuchen mit Hydroxybenzotriazolreagenzien dieser Art und n.c.a. 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure bestätigt. Leider führte auch der Zusatz der Alkoholkomponente nicht zu den gewünschten hohen Ausbeuten. Es konnte zwar n.c.a. ^{18}F -Fluorpropionsäureester detektiert werden, jedoch waren die Ergebnisse nicht konsistent. (Dies erinnert z.B. an das Verhalten trägerfreier, nukleophiler Teilchen bei Substitutionsreaktionen: $\text{S}_{\text{N}}1$ -Reaktionen gelingen nicht, $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktionen hingegen führen prinzipiell zu guten Ausbeuten. Bei Reaktionen nach $\text{S}_{\text{N}}1$ müssen kleine Konzentrationen von z.B. Carbokationen mit n.c.a. Konzentrationen von Nukleophilen zur Reaktion zusammentreffen, während nach $\text{S}_{\text{N}}2$ kleine Konzentrationen mit einem großen Überschuß des Reaktionspartners abreagieren können). Aus diesen Gründen wurde auf eine weitere Untersuchung dieser Reagenzien verzichtet.

Bei den Carbonatreagenzien hingegen war laut Literatur [101] die Wahrscheinlichkeit für einen intramolekularen Reaktionsweg, d. h. also die spontane Eliminierung von CO_2 aus dem gemischten Anhydrid von Carbonsäure und Kohlensäurehalbester gegeben (Abbildung 25):

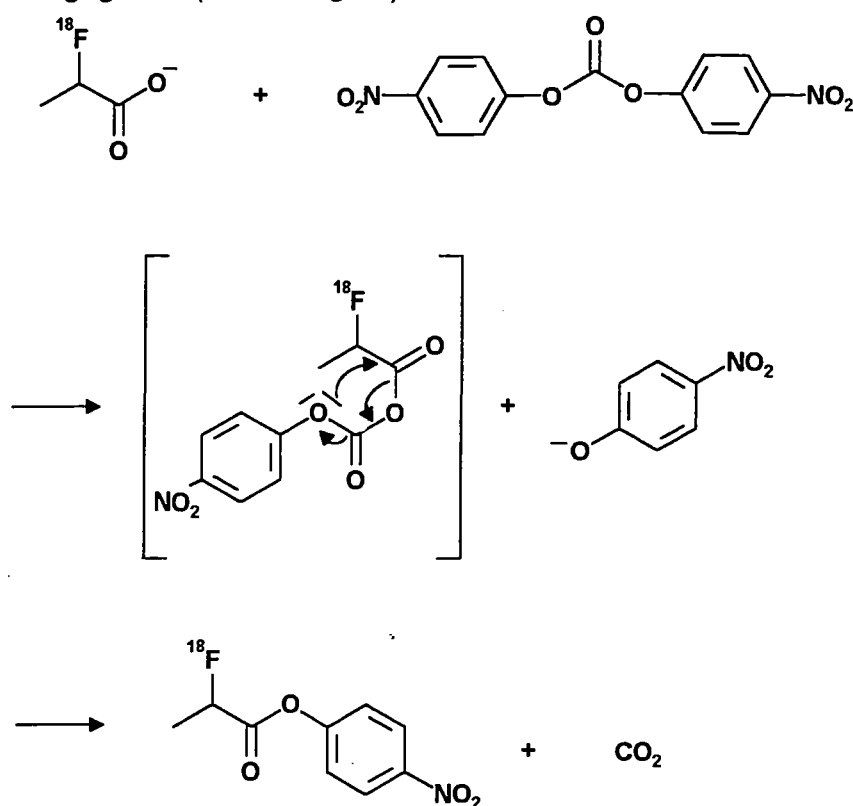


Abbildung 25: Angenommener Reaktionsmechanismus von trägerfreien ^{18}F -Carbonsäuren mit Carbonatreagenzien am Beispiel des Bis-(4-nitrophenyl)-carbonat

Träfe dieser Mechanismus tatsächlich zu, würde dies bedeuten, daß die Umsetzung von trägerarm markierten Carboxylaten wie z.B. n.c.a. [^{18}F]Fluoracetat oder 2-[^{18}F]Fluorpropionat einzig eine Funktion der zugesetzten Menge an Carbonatreagenz wäre, und somit zu guten Ausbeuten dieser Reaktion führen sollte. Die Reaktion von Bis-(4-nitrophenyl)-carbonat mit 2-[^{18}F]Fluorpropionat wurde diesbezüglich näher untersucht und optimiert (Abbildung 26):

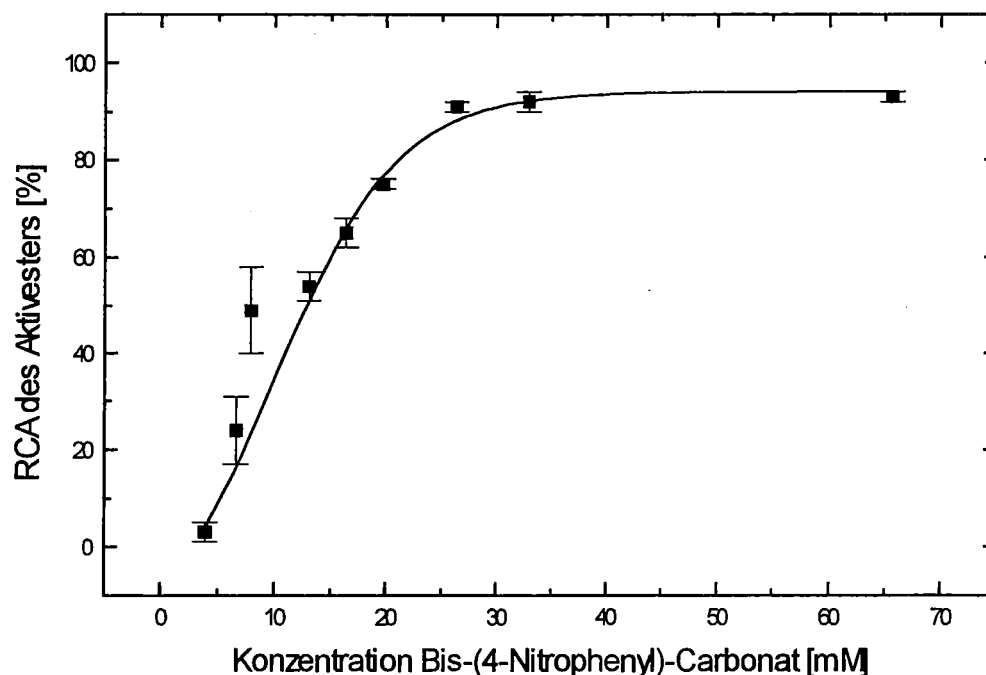


Abbildung 26: Konzentrationsabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute bei der Veresterung von 2-[^{18}F]Fluorpropionat mit Bis-(4-Nitrophenyl)-Carbonat; Reaktionsbedingungen: 5 min; 90°C; MeCN

Abbildung 26 zeigt die typische Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Konzentration des Reaktionspartners (Carbonatreagenz), wie sie bei Reaktionen pseudo-erster Ordnung auftreten (siehe Kapitel 1.3). Diese Beobachtung stützt den oben diskutierten Mechanismus der intramolekularen Weiterreaktion des anhydridischen Zwischenproduktes zum Aktivester unter CO_2 -Elimination. Somit ist mit den Carbonaten eine Stoffklasse gefunden, die es gestattet, praktisch trägerfreie Konzentrationen von Carbonsäuren ohne Zusatz weiterer Hilfsstoffe in die korrespondierenden Aktivester umzuwandeln. Mehr als 90 % radiochemische Ausbeute können bereits bei ca. 40 mM Konzentration des Carbonates innerhalb von 5 Minuten erhalten werden. Dies entspricht bei einem Reaktionsvolumen von 250 μl dem Zusatz von nur ca. 3 mg des Aktivierungsreagenz. Somit können in einer weiteren Eintopfreaktion ohne Abtrennung des

Carbonates, Amine zur Reaktion mit dem Fluoracylierungsreagenz gebracht werden, solange ihre Konzentration nur ca. das doppelte der Konzentration des Carbonates entspricht, da ein Äquivalent des Carbonates prinzipiell in der Lage ist, 2 Äquivalente des Amins unter Bildung von Harnstoffen zu binden. Tatsächlich sind jedoch die zuerst entstehenden Urethane so stabil, daß die hohe Reaktivität der fluorierten Ester (unterstützt durch die elektronenziehende Wirkung des Fluors in α -Position) ausreicht, um schon bei ca. äquimolaren Verhältnissen (Amin / Carbonat) quantitative Umsetzungen zu fluoracylierten Amiden zu ermöglichen.

In analoger Weise wurde neben 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure auch [^{18}F]Fluoressigsäure mit Carbonatreagenzien quantitativ zu Nitrophenylestern oder auch Succinimidylestern umgesetzt. Die Palette so hergestellter aliphatischer Aktivester, ausgehend von den kleinst möglichen fluorierten Carbonsäuren Fluoracetat bzw. Fluorpropionat ist in Abbildung 27 gezeigt:

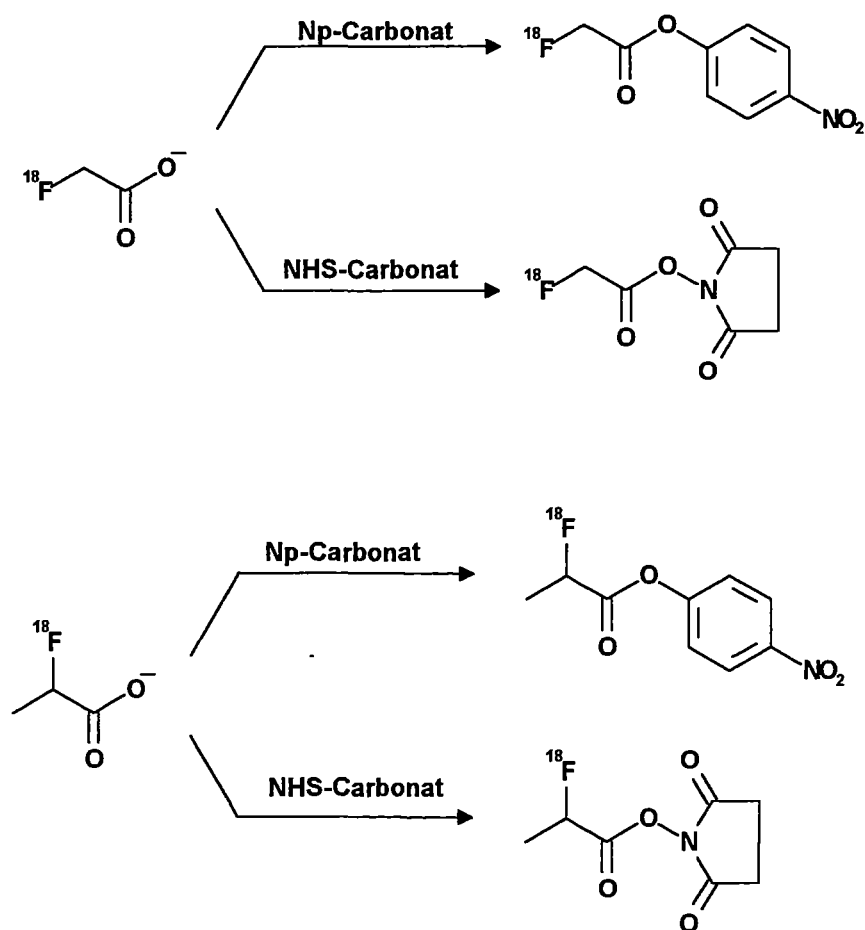


Abbildung 27: Aliphatische Aktivester durch Umsetzung von Carbonatreagenzien mit [^{18}F]Fluoracetat bzw. 2-[^{18}F]Fluorpropionat; (Np = Nitrophenyl; NHS = N-Hydroxysuccinimidyl)

Neben diesen aliphatischen Aktivestern ist es jedoch auch möglich, aromatische Aktivester durch Umsetzung mit Biscarbonaten zu erhalten. Dies wurde am Beispiel des N-Hydroxysuccinimidylesters der 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure demonstriert. Die trägerfreie Herstellung dieses Esters gelingt völlig analog zu den aliphatischen Estern durch Umsetzung des ^{18}F -Benzoates mit dem entsprechenden Biscarbonatreagenz. Die Darstellung des 4-[^{18}F]Fluorbenzoates nach diesem Verfahren unterscheidet sich jedoch erheblich von der von Vaidyanathan et al. [76] beschriebenen Synthese (vgl. Abbildung 9) und ist deshalb in Abbildung 28 skizziert:

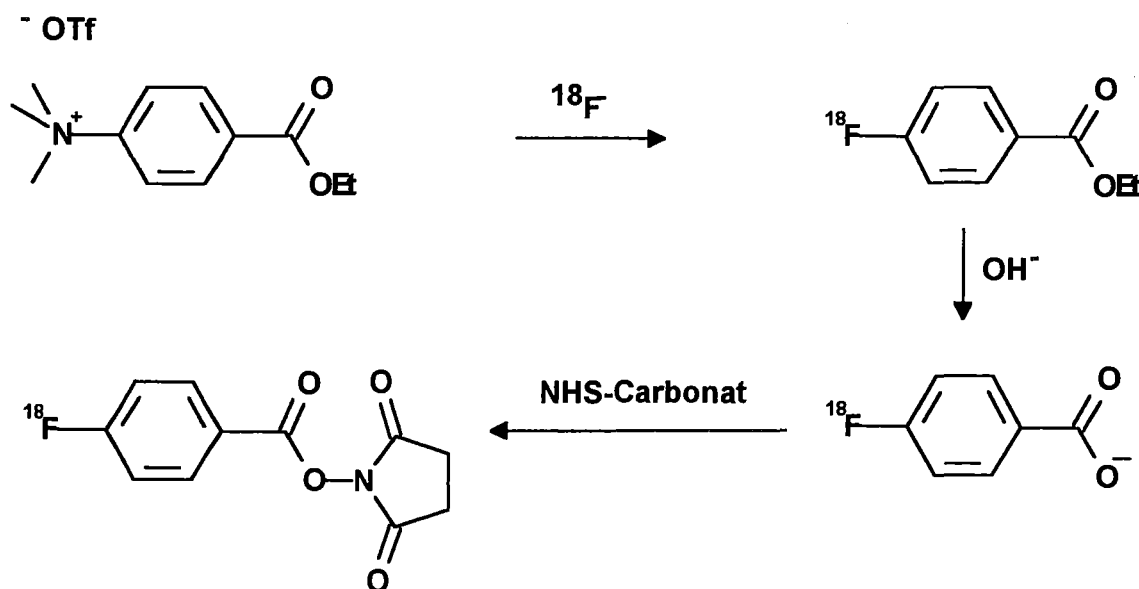


Abbildung 28: Synthese von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure-N-hydroxysuccinimidylester

Die bisher in der Literatur beschriebene Methode via nukleophiler Substitution an p-Nitrobenzaldehyd (RCA: 40-80 %), gefolgt von einer Oxidation zur entsprechenden Benzoesäure (RCA: 55-80 %) und anschließender Veresterung mit Hilfe von DCC in Gegenwart von N-Hydroxysuccinimid (RCA 60-80 %) führte zu einer Gesamtausbeute von 25% [76]. Die hier vorgestellte Methode beginnt hingegen mit einer nukleophilen Substitution am p-Trimethylammoniumtriflat des Benzoesäure-ethylesters, die mit fast quantitativen Ausbeuten von 85-90% verläuft. Die Hydrolyse des Ethylesters ist quantitativ, und die folgende Veresterung verläuft ebenfalls mit annähernd quantitativen radiochemischen Ausbeuten, so daß die Gesamtausbeute ca. 80% erreicht. Eine Aufarbeitung der Verbindung via HPLC am Ende der Synthese ist nötig, da vermutlich durch teilweise Desmethylierung des Trimethylammoniumtriflat Vorläufers die korrespondierende Dimethylaminoverbindung parallel zur aktiven Fluorverbindung gebildet wird. Diese wird bei den folgenden Schritten analog verseift und aktiviert und muß somit als Verunreinigung am Ende

am Ende der Synthese abgetrennt werden, wenn man eine hohe effektive spezifische Aktivität erreichen will. Trotz der dabei auftretenden Verluste bedeutet diese neue Synthesestrategie eine ca. 3-fache Steigerung der radiochemischen Ausbeute im Vergleich zu der in Abbildung 9 skizzierten Synthese. Es überrascht daher nicht, daß kürzlich von Vaidyanathan et. al [102] diese teilveröffentlichte Methode zur Markierung von monoklonalen Antikörpern übernommen wurde.

2.1.6.3 Darstellung von n.c.a. 2-[^{18}F]Fluorpropionsäurechlorid

Zur Darstellung von Säurechloriden aus Carbonsäuren kommen eine Reihe von Reagenzien in Betracht. Die Bekanntesten sind wohl die klassischen anorganischen Chlorierungsmittel wie Thionylchlorid und Phosphor(-III-oder-V)-chlorid. Aber auch organische Chlorierungsmittel werden gerne zu ihrer Darstellung eingesetzt, z.B. Oxalylchlorid, Benzotrichlorid und einige Phosphorreagenzien [zur Übersicht s. 103]. Unter den hier genannten wurden Thionylchlorid, Benzotrichlorid und Triphenylphosphin in Verbindung mit Tetrachlormethan und Hexachlorethan zur Darstellung des ^{18}F -Säurechlorids herangezogen. Alle Reagenzien waren zumindest teilweise in der Lage, n.c.a 2-[^{18}F]Fluorpropionat in das Säurechlorid zu überführen. Die besten Ergebnisse wurden jedoch mit Thionylchlorid und Triphenylphosphin-dichlorid erzielt. Diese führten tatsächlich zu annähernd quantitativer Umsetzung. Nur relativ geringe Ausbeuten wurden dagegen mit Benzotrichlorid und Triphenylphosphin in Tetrachlormethan erzielt, was vermutlich auf die schlechte Löslichkeit des Kalium 2-[^{18}F]Fluorpropionates in diesen Stoffen zurückzuführen ist. In Acetonitril hingegen konnten mit dem System Triphenylphosphin / Hexachlorethan sowie mit Triphenylphosphin-dichlorid quantitative Umsetzungen erzielt werden. Da jedoch in der Zugabe von zwei Substanzen kein Vorteil besteht, wurde Triphenylphosphindichlorid als Reagenz der Wahl betrachtet. Im Gegensatz zu Thionylchlorid kann das 2-[^{18}F]Fluorpropionsäurechlorid leicht vom Triphenylphosphin-dichlorid aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit abdestilliert werden, während das Phosphoran als Feststoff zurückbleibt.

In dem Bestreben eine eventuell möglichen Eintopfreaktion zu realisieren, wurde zunächst untersucht, in welchen Mengen das Chlorierungsreagenz für hohe Säurechloridausbeuten zugegeben werden muß. In Abbildung 29 ist deshalb die Abhängigkeit der Bildung des Säurechlorids in Acetonitril von der Konzentration des Phosphorreagenz gezeigt:

Radiochemische Ausbeute [%]

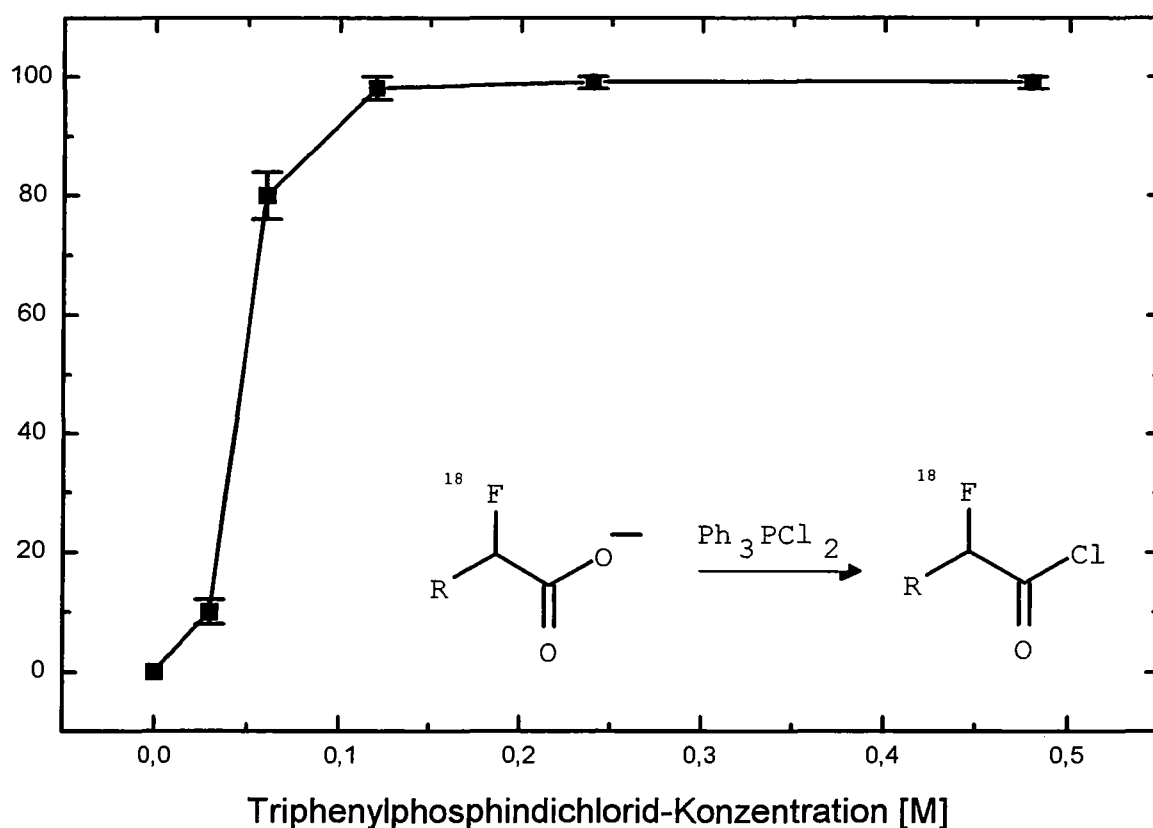


Abbildung 29: Abhängigkeit der Bildung von 2-[^{18}F]Fluorpropionsäurechlorid von der Konzentration an Triphenylphosphin-dichlorid
Reaktionsbedingungen: MeCN; 20°C; 5 min.

Abbildung 30 verdeutlicht, daß die radiochemische Ausbeute nach einer gewissen Minimalkonzentration, die vermutlich durch den Restwassergehalt des Lösungsmittels bedingt ist, den typischen Verlauf einer Kinetik pseudo erster Ordnung annimmt. Bei etwa 0,2 molaren Konzentrationen an Phosphorreagenz wird die Sättigungsausbeute von nahezu 100 % erreicht. Diese relativ hohen Konzentrationen bedingen, daß eine Eintopfreaktion nur mit relativ hohen Mengen an Aminen durchzuführen ist, da das Phosphoran selbstverständlich selbst in der Lage ist, mit Aminen und anderen Nukleophilen (insbesondere Sauerstoff-nukleophilen) zu reagieren. Praktisch gesehen kommt eine Eintopfsynthese daher nicht in Betracht.

Zu bemerken ist ferner, daß die obigen radiochemischen Ausbeuten durch Derivatisierung von Aliquots der Reaktionslösung mit einfachen Aminen wie n-Butylamin etc. bestimmt wurden. Eine direkte Messung des Säurechlorids ist auf Grund seiner außerordentlich hohen Reaktivität äußerst schwierig. Daher besteht theoretisch die Möglichkeit, daß ein Teil der in den gemessenen Amiden

befindlichen Aktivität nicht als freies Säurechlorid, sondern als Phosphorreagenzadukt mit den Aminen zur Reaktion kommt:

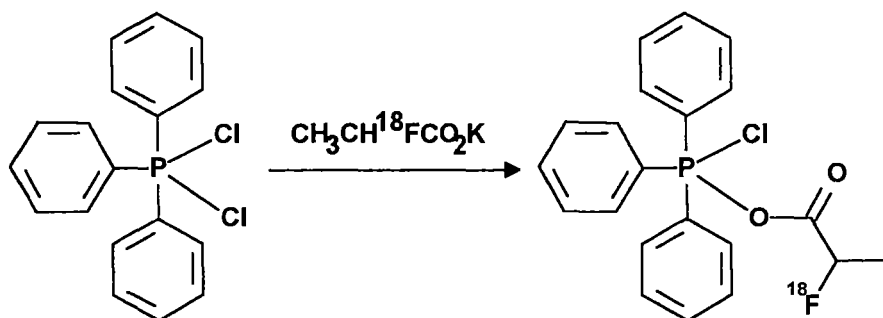


Abbildung 29: Hypothetisches Primärprodukt von 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure und Triphenylphosphindichlorid

Diese These wird z.B. dadurch gestützt, daß es nie möglich war mehr als 80% der Radioaktivität aus dem Reaktionsgefäß herauszudestillieren. Auch durch gleichzeitiges Erhitzen konnte dies nicht weiter verbessert werden.

2.1.6.4 Synthese von 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester via 2-[^{18}F]Fluorpropionsäurechlorid

Aufgrund der extremen Reaktivität des trägerfreien 2-[^{18}F]Fluorpropionsäurechlorids, die eine Handhabung fast nur in-situ zuläßt, kommen praktisch nur zwei Methoden seiner Ausnutzung in Betracht. Zum einen die sofortige Umsetzung mit Aminen, die in einer Kühlfalle vorgelegt werden, zum anderen die Überführung in einen weniger empfindlichen Aktivester. Die sofortige Umsetzung mit Aminen erscheint zunächst als die einfachere, direktere Methode. Jedoch wird die Umsetzung durch gasförmiges HCl gestört, das zusammen mit dem Säurechlorid abdestilliert wird. Somit kommt es zu einer Maskierung der Amine, die nur durch Zugabe von Hilfsbasen oder einer relativ hohen Menge an zu acylierendem Amin verhindert werden kann. Hilfsbasen reagieren jedoch selbst mit dem empfindlichen Säurechlorid und führen zu dessen Zersetzung. Desweiteren ist die Anwendung des Säurechlorids auf inerte, rein organische Lösungsmittel eingeschränkt, sodaß z. B. relativ schwer lösliche Peptide und Proteine nicht eingesetzt werden können.

Als praktikabler und vielseitiger hat sich deshalb die Umsetzung des Säurechlorids zu einem Aktivester herausgestellt. Da das Säurechlorid ohnehin aus dem Reaktionsgefäß abdestilliert wird, bot sich die Möglichkeit an, den Gasstrom durch eine Säule zu leiten, die Salze von Aktivester bildenden Alkoholen enthalten

[104,105]. Dies wurde an Hand des Kaliumsalzes von p-Nitrophenol erprobt. Hierbei entstand der relativ lipophile 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester, der durch inerte Lösungsmittel wie Äther oder Methylenchlorid eluiert werden konnte, während die Salze ungelöst blieben. Der apparative Aufbau einer sich hieraus ergebenden ^{18}F -Fluoracylierungsapparatur ist in Abbildung 30 skizziert.

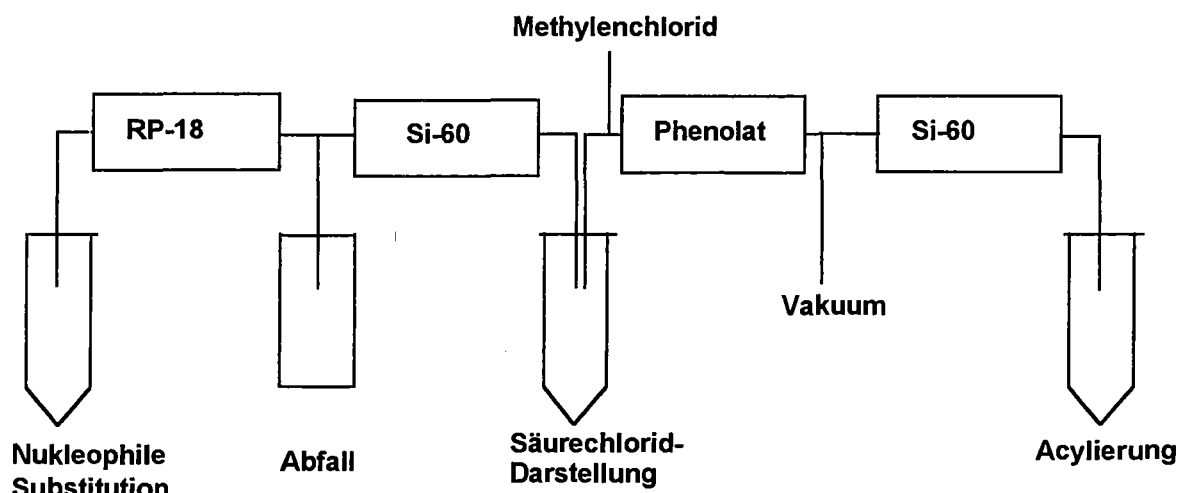


Abbildung 30: Schema einer ^{18}F -Fluoracylierungsapparatur mit Verwendung von 2-[^{18}F]Fluorpropionsäurechlorid als reaktiver Zwischenstufe

Die Synthese des ^{18}F -Fluorpropionates welches der Säurechlorid-darstellung vorausgeht, folgt zunächst der in 2.1.4 beschriebenen Methodik. Das ^{18}F -Säurechlorid wird dann mittels Triphenylphosphin-dichlorid erzeugt und durch Anlegen von Vakuum über eine direkt über dem Reaktionsgefäß aufgebrachte Säule geleitet. Die übergehende Aktivität verbleibt dabei quantitativ auf der Säule. Ein signifikanter Anteil von $35 \pm 15\%$ verbleibt jedoch im Reaktionsgefäß. Ein weiterer Teil wird auf der Säule zersetzt und nicht wie der Aktivester mit Methylenchlorid eluiert. Gegenüber der direkten Umsetzung des Säurechlorids mit Aminen stellt dies einen Nachteil dar. Die radiochemischen Ausbeuten der gesamten Synthesesequenz sind zur Übersicht in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8: Radiochemische Ausbeuten der Syntheseschritte bei der ^{18}F -Fluoracylierung via Fluorpropionsäurechlorid

Syntheseschritt	radiochemische Ausbeute [%]
Nukleophile Substitution	92 ± 5
DMAP-Derivatisierung und Verseifung	90 ± 5
Säurechloridaktivierung	100
Destillation des Säurechlorids	65 ± 15
Umsetzung zum Aktivester	70 ± 10
Acylierung	produktabhängig (meist >90)
über alle Schritte	ca. 33

Obwohl die Gesamtausbeute mit etwa 33% den oben diskutierten Methoden zur Darstellung von Aktivestern (vgl. 2.1.6.1) unterlegen ist, hat dieses Verfahren den Vorteil, daß auf aufwendigere HPLC-Trennungen zur Darstellung des Fluoracylierungsreagenz verzichtet werden kann. Daher erscheint dieses Verfahren für automatisierte Synthesen sehr attraktiv. Die HPLC muß hier nur in der letzten Reinigungsstufe eingesetzt werden. Unter günstigen Umständen könnte sogar gänzlich auf HPLC-Trennungen verzichtet werden. Falls die zur Markierung vorgesehenen Moleküle z.B. nur eine Aminofunktion tragen, geht die potentielle Ladung des Moleküls durch die Acylierung verloren. Eine Trennung auf der Basis von Kationenaustausch erscheint dann leicht möglich.

2.1.7 Reaktionen der aktivierten n.c.a. ^{18}F -Fluoracylierungsreagenzien mit Aminverbindungen

2.1.7.1 Reaktionen der ^{18}F -Aktivester mit Modellaminen und -peptiden

Um die Eignung der verschiedenen Aktivestertypen (Nitrophenyl, N-Hydroxysuccinimidyl und Imidazolid) hinsichtlich ihres Potentials zur Acylierung von Aminen zu überprüfen, wurden eine Reihe von Modellaminen untersucht. Einen vergleichenden Überblick vermittelt Tabelle 9:

Tabelle 9: Vergleich der n.c.a. ^{18}F -Fluoracylierung von Aminen via aktivierter 2- ^{18}F Fluorpropionsäurederivate (% radiochemische Ausbeute)

Amin	Acylierungsreagenz			
	2- ^{18}F Fluorpropionsäure-			
	p-Nitrophenyl- ester	Hydroxysuccin- imidylester	Imidazolid	Methylester**
n-Butylamin	92 $\pm$ 2	92 $\pm$ 3	-	88 $\pm$ 4
2-Butylamin	93 $\pm$ 3	90 $\pm$ 3	-	7 $\pm$ 2
Homoveratryl- amin	93 $\pm$ 2	-	-	70 $\pm$ 2
Benzoyl- hydrazid	90 $\pm$ 3	-	88 $\pm$ 3	-
Toluidin*	91 $\pm$ 3	-	-	0
Phenylalanin- ethylester	90 $\pm$ 3	92 $\pm$ 3	91 $\pm$ 3	0

Reaktionsbedingungen: Acetonitril, 22°C, c(Amin): 0,1 M; *DMF, 90°C, c(Amin): 1,0 M; **MeOH, 64°C, c Amin: 4,0 M

Die in Tabelle 9 aufgeführten Amine zeichnen sich durch charakteristische Reaktivitätsunterschiede aus, die entweder durch elektronische oder sterische Unterschiede verursacht werden. Sie umspannen eine weite Palette von aromatischen (Toluidin) zu aliphatischen, von primären zu sekundären Aminen, von Aminen von niedrigem (PheOEt) zu hohem (n-Butylamin) pK_a sowie von Aminen mit und ohne α -Effekt (Hydrazid). Wie man der Tabelle entnehmen kann, sind die aktivierten Ester sowie das Imidazolid bei 25°C in organischem Lösungsmitteln ähnlich reaktiv, und die entsprechenden Amide können mit sehr hohen Ausbeuten erhalten werden. Im Unterschied dazu ist der zu Vergleichszwecken aufgeführte

Methylester sehr unreaktiv, obwohl die Reaktionen bei erhöhten Temperaturen, erhöhten Konzentrationen und im für diesen Ester besten Lösungsmittel Methanol durchgeführt wurden. Dieser drastische Unterschied wird besonders bei den weniger reaktiven Aminen, wie Toluidin oder Phenylalaninethylester offenbar, wo buchstäblich 0 % RCA annähernd 100 % RCA gegenüber stehen. Phenylalaninethylester kann hier als Peptidmodell angesehen werden, z.B für solche Fälle, in denen Peptide in organischer Lösung ausreichend löslich sind und stark basische Aminosäuren wie Lysin nicht enthalten sind. Der pK_a von Phenylalaninethylester beträgt nur 7,0 während die ϵ -Aminogruppe des Lysins auch in Peptiden einen pK_a von über 10 aufweist und damit ähnliche Reaktivitäten aufweist wie n-Butylamin.

Als Peptidmodelle für Acylierungen in wässriger Lösung wurden L-Phenylalaninethylester und das Dipeptid D,L-Alanyl-D,L-alanin eingesetzt. Das Schema letzterer Reaktion ist in Abbildung 31 dargestellt.

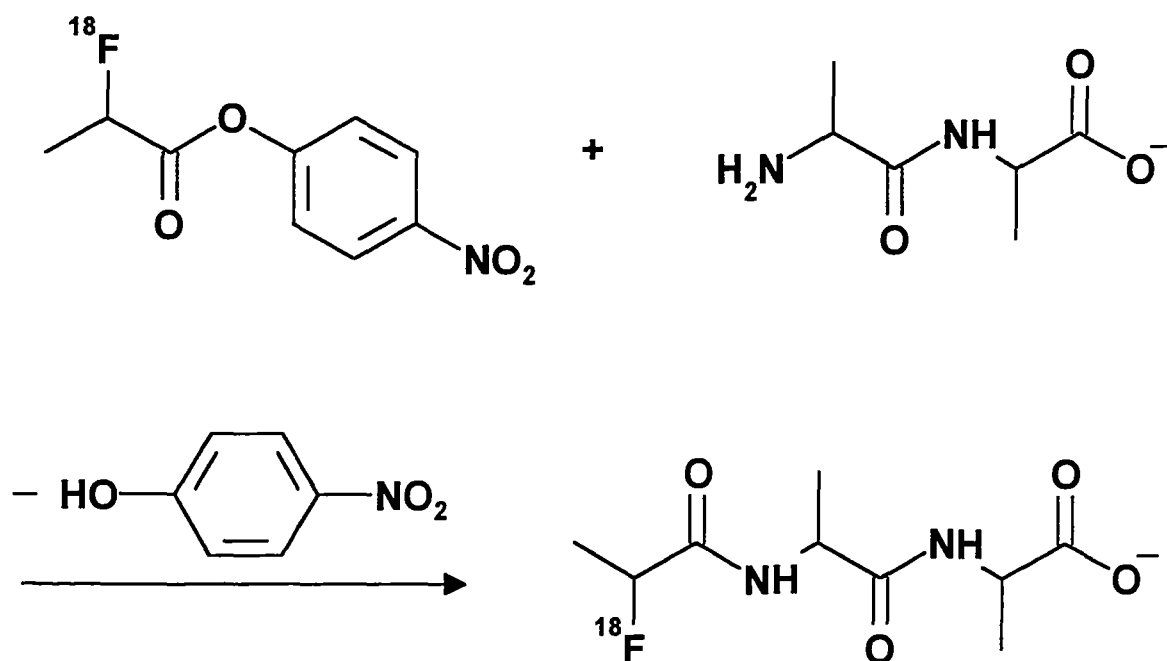


Abbildung 31: Markierung von D,L-Alanyl-D,L-alanin in Wasser (pH 8,2) mit D,L-2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester; Reaktionsbedingungen: 20°C, 10 min, $C_{(\text{alaala})}$: 0,1M

2.1.7.2 Abhängigkeit der ^{18}F -Fluoracylierungsausbeute von Konzentration und Nukleophilie der Amine

Ein quantitative Untersuchung zur Reaktivität der α -Fluoraktivester ist in Abbildung 32 gezeigt. Hier sind exemplarisch die Konzentrationsabhängigkeiten der radiochemischen Ausbeute für die Fluoracylierung von n-Butylamin, 2-Butylamin und Dibutylamin in Acetonitril bei einer sehr kurzen Reaktionszeit von nur 7 Minuten und Zimmertemperatur dargestellt.

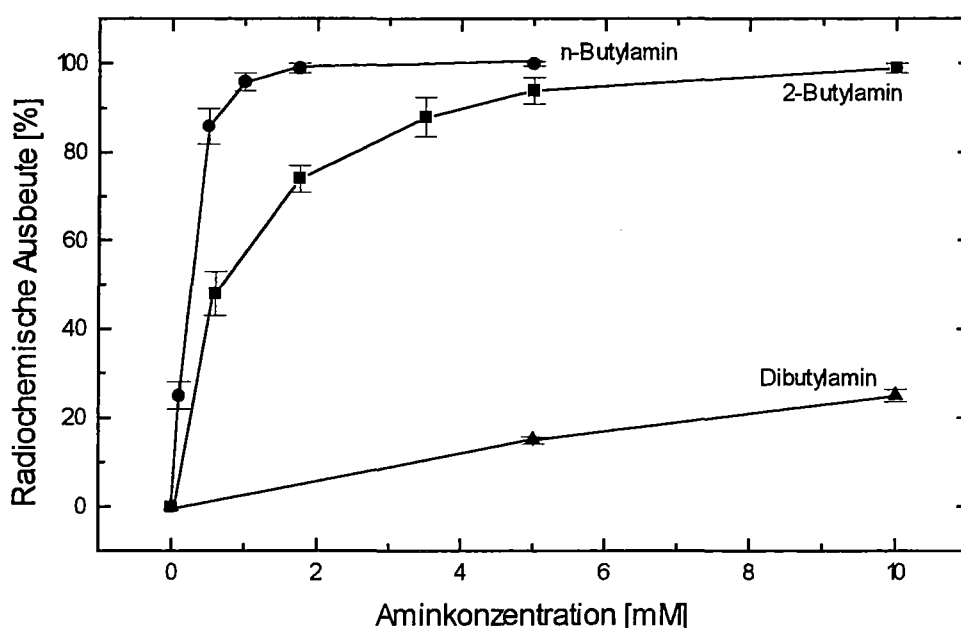


Abbildung 32: Fluoracylierung von n-Butylamin, 2-Butylamin und Dibutylamin mit 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester als Funktion der Aminkonzentration; Reaktionsbedingungen: 20°C; 7 min; MeCN

Aus Abbildung 32 geht hervor, daß primäre Amine unter den gegebenen milden Reaktionsbedingungen schon im mM Konzentrationsbereich sehr hohe radiochemische Ausbeuten liefern. Sekundäre Amine reagieren wesentlich langsamer. Die erhaltenen Abhängigkeiten der radiochemischen Ausbeuten von den Aminkonzentrationen deuten dabei erneut auf das Vorliegen einer Kinetik pseudo-erster-Ordnung hin. Für beide primäre Amine können ab ca. 5 mM Konzentration annähernd quantitative Ausbeuten erzielt werden. Diese Konzentration entspricht einer effektiven Menge von nur 0,5 mg des Amins pro ml Acetonitril. Da viele Reaktionen durchaus auch in 100 μl oder noch weniger ausgeführt werden können, reichen also Aminmengen von ca. 100 μg in der Regel aus, um gute Ausbeuten zu

erhalten. Darüber hinaus besteht noch viel Spielraum durch Erhitzen oder Verlängerung der Reaktionszeit. Die nötigen Aminmengen können also noch weiter reduziert werden.

Interessant ist ein Vergleich der Konzentrationen an n-Butylamin, die zu quantitativen radiochemischen Ausbeuten für die Umsetzung mit 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester bzw. mit dem einfachen -Methylester (vgl. Tabelle 9) führen. Man stellt fest, daß der Ersatz der Methyl- durch die p-Nitrophenylgruppe eine mindestens tausend-fache Reaktivitätserhöhung bewirkt. Tatsächlich dürfte sogar ein Faktor von ca. 10^4 - 10^5 wahrscheinlicher sein, da im Falle des Methylesters zusätzlich bei erhöhter Temperatur gearbeitet werden musste.

Wie für den Methylester (vgl. 2.1.1.1) wurde auch für den Nitrophenylester die Reaktivität in Abhängigkeit der Nukleophilie verschiedener Amine geprüft. Auch hier bot sich eine Untersuchung im Sinne eines Brönstedplots an, bei der Amine mit bekannten pK_a -Werten unter identischen Reaktionsbedingungen zur Reaktion gebracht werden. Voraussetzung, daß solche Untersuchungen zu einer annähernd linearen Abhängigkeit führen, ist die gute sterische Vergleichbarkeit der Modelle. Deshalb wurde diese Untersuchung mit den gleichen Modellverbindungen wie in 2.1.1.1 durchgeführt.

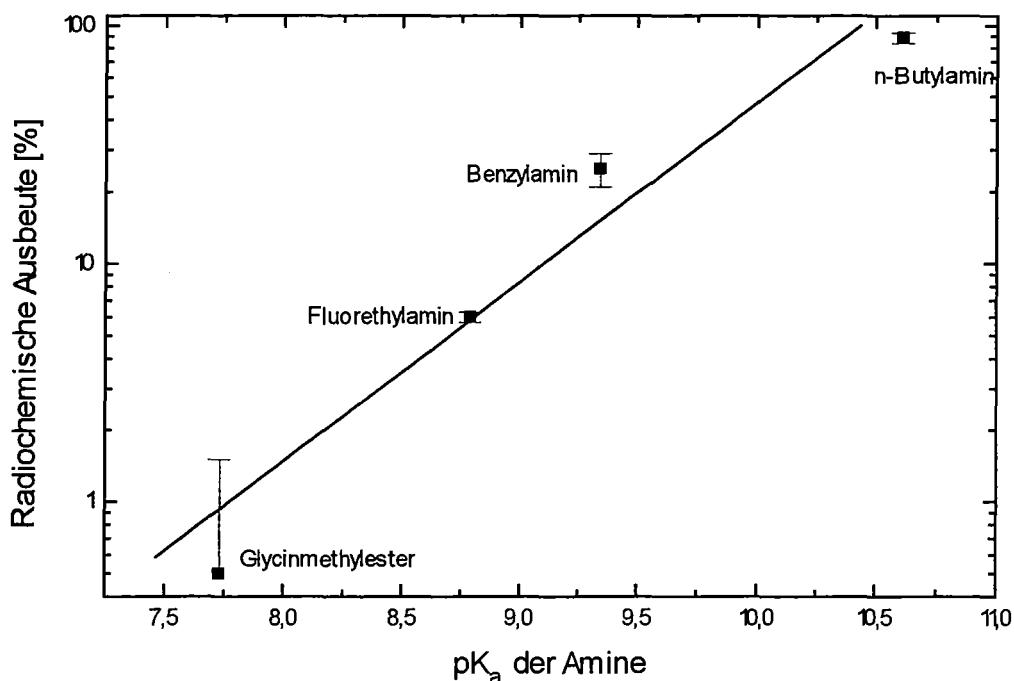


Abbildung 33: Brönstedplot für die Fluoracylierung von Aminen mit 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester; Reaktionsbedingungen: 20°C, MeCN, c (Amin): 0,5 mM, 7 min

Abbildung 33 zeigt erneut (vgl. Abb. 12) eine annähernd lineare Abhängigkeit des Logarithmus der radiochemischen Ausbeute von den pK_a -Werten der untersuchten Amine, was die sterische Vergleichbarkeit dieser Amine unterstreicht. Es wird eindeutig klar, daß der Basizität der zu markierenden Amine größte Aufmerksamkeit gewidmet werden muß, wenn man die Menge eines Amins für eine Markierung abschätzen möchte.

Für die Markierung von Peptiden kommen in der Regel zwei mögliche Angriffspunkte in Betracht:

Zum einen die N-terminale Aminofunktion der Peptide. Die gängigen Aminosäuren weisen hier pK_a -Werte zwischen 7 und 9 auf. Aus sterischer Sicht kann dabei 2-Butylamin als Modell herangezogen werden.

Zum anderen kommt eine Markierung von basischen Seitenketten in Betracht. Dies liegt z.B. in lysinhaltigen Peptiden vor. Hier liegen die pK_a -Werte (>10) beträchtlich höher, und die Reaktivität solcher Peptide kann recht gut mit der von n-Butylamin verglichen werden.

2.1.7.3 Direkte Reaktionen des n.c.a. 2-[18 F]Fluopropionsäurechlorids mit Aminen

Dieses Säurechlorid weist im Vergleich zu den Aktivestern eine nochmals erheblich gesteigerte Reaktivität auf. Es unterscheidet sich diesbezüglich sogar noch deutlich von präparativen Mengen an Acetylchlorid. Bedingt durch die Trägerarmut des n.c.a. 18 F-Säurechlorids ist es bereits in der Lage, mit Spuren von Nukleophilen quantitativ abzureagieren. Bei so hochreaktiven Molekülen wie Säurechloriden ist dies selbstverständlich deutlich ausgeprägt. Weiterhin ist die Reaktivität durch die Fluorsubstitution in α -Stellung des Acylkohlenstoffs nochmals erhöht. Setzt man die pK_a -Werte der Essigsäure (4,75) bzw. der Fluoressigsäure (2,72) in erster Näherung als Maß für ihre Reaktivität an, ergibt sich ein etwa einhundertfacher Reaktivitätsunterschied. Dies gilt auch für den Vergleich von 2-Fluorpropionsäureestern mit den entsprechenden unsubstituierten Verbindungen, wie die Geschwindigkeitskonstanten für die basischen Hydrolysereaktionen [93] zeigen [$\log k_{OH}$ (Fluorverb.) = 3,74 ; $\log k_{OH}$ (unsubst.) = 1,20]. Eine trägerarme Substanz mit einer etwa einhundertfachen Reaktivität von Acetylchlorid ist daher, wie leicht vorstellbar, äußerst sensibel in ihrer Handhabung.

Beispielsweise führt die Aufbewahrung des 18 F-Säurechlorids in trockenem Acetonitril zu dessen vollständiger Zersetzung. Selbst in Chloroform bei Raumtemperatur tritt schon eine Zersetzung des Produktes ein. Die einzige gefundene

Möglichkeit, das Reagenz überhaupt zu stabilisieren, war das Einfrieren bei -78°C in einer Acetonitrilmatrix.

Umsetzungen des Säurechlorids konnten daher nur in Anwesenheit des Triphenylphosphin-dichlorids durchgeführt werden, oder aber durch unmittelbare Umsetzung des Säurechlorids nach seiner Destillation in eine Vorlage, die das gewünschte Nukleophil bereits enthielt.

Diese Schwierigkeiten in der Handhabung der Verbindung zeugen natürlich auch im positiven Sinne von einer extremen Reaktivität. So führen aromatische Amine wie Toluidin bereits bei Raumtemperatur innerhalb von Sekunden zur quantitativen Umsetzung des ^{18}F -Säurechlorids unter Bildung des Anilids. Ebenso können saure Phenole, wie p-Nitrophenol oder Pentafluorphenol, zu den jeweiligen Aktivestern umgesetzt werden (vgl. 2.1.6.4).

Eindrucksvolle Unterschiede zeigten sich auch bei der Acylierung des sterisch gehinderten Dibutylamins. Bei einer 10 mM Lösung des Amins war die Umsetzung bereits nach Sekunden quantitativ, während die Umsetzung mit dem p-Nitrophenylester wesentlich langsamer war (vgl. 2.1.7.2). Zudem lieferte die Umsetzung des Nitrophenylesters im Gegensatz zum Säurechlorid stets einige % des n-Butylamids, da n-Butylamin als Verunreinigung im kommerziell erhältlichen Dibutylamin vorhanden war. Offenbar nimmt durch die erhöhte Reaktivität die Selektivität so stark ab, daß es hier nicht zu einer Bevorzugung des prinzipiell wesentlich reaktiveren n-Butylamins kam.

2.1.7.4 Einige stereochemische Aspekte bei Acylierungen mit aktivierten n.c.a 2-[^{18}F]Fluorpropionsäurederivaten

Die Fluoracylierung mit optisch aktiven Aminen und Peptiden weist unter stereochemischen Gesichtspunkten interessante Eigenschaften auf. So ergeben sich z.B. durch die Reaktion der chiralen Aktivester mit dem optisch aktiven Dipeptid D,L-D,L-Alanyl-alanin insgesamt 8 verschiedene Enantiomere, die als 4 Diastereomerenpaare auftreten. Diese können prinzipiell mittels reversed-phase HPLC getrennt werden.

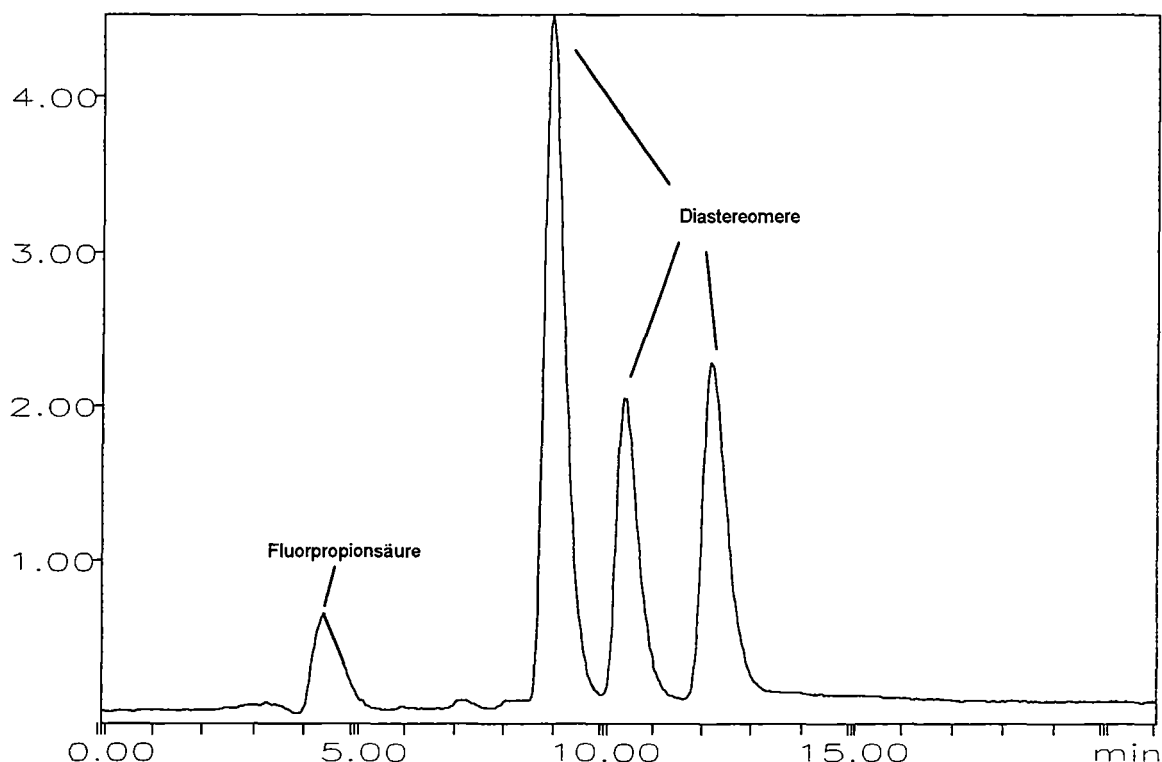


Abbildung 34: Umsetzung von D,L-Alanyl-D,L-alanin mit D,L-2-Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester; Chromatographiebedingungen: RP-18; 7 μ ; 250 X 4mm; Flow = 1 ml / min; H₂O: MeOH: HOAc = 95:5:1

Das Chromatogramm zeigt, daß tatsächlich drei der vier möglichen Diastereomerenpaare unter den gegebenen Bedingungen aufgelöst werden können. Zwei Paare werden vermutlich gemeinsam unter dem größten Peak detektiert, wie es das Integrationsverhältnis andeutet. Ähnliches Verhalten wurde auch bei einer Reihe weiterer optisch aktiver Amine gefunden, die im Rahmen dieser Arbeit markiert wurden (Octreotid, 2-Butylamin, L-Phenylalanin etc.).

Die optische Aktivität des Fluoracylierungsreagenz ermöglicht somit auch die Untersuchung einzelner Enantiomere optisch aktiver Zielverbindungen, da die

Konjugate leicht als Diastereomere getrennt werden können [vgl. dazu 106]. Auf der anderen Seite wird bei Einsatz des Acylierungsreagenz in racemischer Form aus enantiomerreinen Aminen ein Diastereomerenpaar erzeugt. Deshalb wurden auch optisch reine Acylierungsreagenzien dargestellt. Dazu wurden anstelle von α -Bromestern tosylierte Milchsäureester oder auch Dansylester (vgl. 2.1.4.2) als Ausgangssubstanzen zur nukleophilen Einführung des Fluorids eingesetzt.

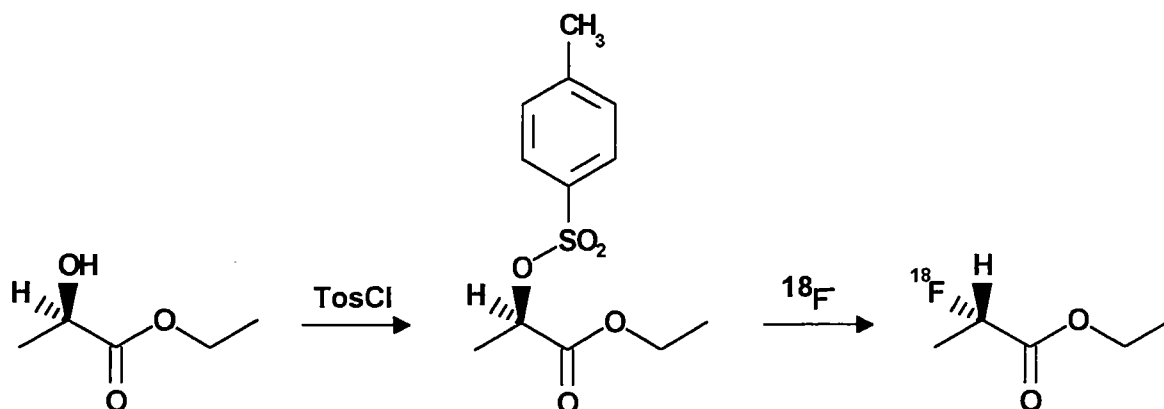


Abbildung 35: Schema der Darstellung von optisch reinen n.c.a. (R)-2-[^{18}F]Fluorpropionsäurederivaten via $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion an (S)-2-Tosylpropionsäureethylester (Reaktionsbedingungen analog Tabelle 6)

Durch Einsatz dieser Vorläufer können leicht optisch reine n.c.a. ^{18}F -Fluor-acylierungsreagenzien erhalten werden. Die glatte $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion in dipolar aprotischen Lösungsmitteln wie Acetonitril oder DMSO ermöglichten dies. So wurden bei Einsatz von optisch reinen Acylierungsreagenzien, die mit diesen Vorläufern hergestellt wurden, bei der Markierung optisch aktiver Substrate wie Octreotid (s. u.) oder L-Phenylalaninethylester anstelle von zwei Peaks der Diastereomeren nur noch ein einziger Peak bei der HPLC-Analyse beobachtet.

2.1.8 ^{18}F -Markierung des Somatostatin-Rezeptorliganden Octreotid via n.c.a. 2- ^{18}F Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester

Mit den vorangegangenen Untersuchungen und Optimierungen wichtiger Reaktionsparameter der n.c.a. Fluoracylierung war es nun möglich, auch komplexere Peptide effizient zu markieren. Als Beispiel für solche Anwendungen wurde das für pharmakologische Untersuchungen interessante zyklische Octapeptid Octreotid® (s. Abbildung 36) ausgewählt.

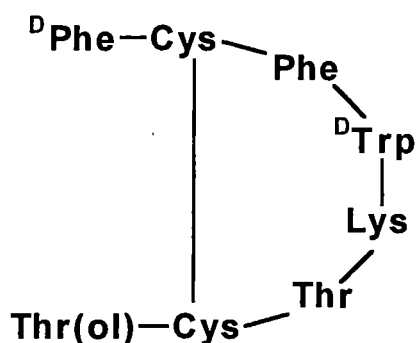


Abbildung 36: Schematische Struktur des Somatostatin-Rezeptorliganden Octreotid

Natürliches Somatostatin (SRIF-14) ist ein zyklisches Tetradecapeptid des endokrin sekretorischen Systems. Es regelt die Freisetzung der Wachstumshormone Somatotropin und Thyreotropin und wirkt über Rezeptoren der Zellmembranen. SRIF-14 wird innerhalb weniger Minuten von Peptidasen abgebaut.

Interessanterweise werden SRIF-Rezeptoren von vielen Tumortypen überexprimiert. Deshalb bieten synthetische Analoga mit längerer in-vivo Halbwertszeit Möglichkeiten zur Therapie solcher Tumore. Ein solches Analogon stellt das oben abgebildete Octapeptid Octreotid dar. Die biologische Halbwertszeit ist mit 45-120 Minuten wesentlich erhöht, bei gleichzeitig 2000-facher Steigerung der biologischen Aktivität des Peptids [107]. Durch die radioaktive Markierung mit den Isotopen Iod-123 oder Indium-111 wurde die szintigraphische Früherkennung von Tumoren und Metastasen ermöglicht [108-110].

Die Markierung des Octreotids durch die ^{18}F -Fluoracylierung sollte an der Aminogruppe des terminalen Phenylalanins erfolgen, da die unveränderte Aminogruppe des Lysins als essentiell für die biologische Aktivität des Peptids gilt [111]. Dies stellt eine bedeutende Erschwerung der Synthese dar, da die Aminogruppe des Lysins bedeutend reaktiver ist, als die des N-Terminus $^{\text{D}}\text{Phe}$ (vgl. 2.1.7.2). Jedoch ist hier der Erhalt der biologischen Aktivität des Peptids von ausschlaggebender Bedeutung. Damit ergibt sich das Problem einer regioselektiven Markierung von multifunktionellen Peptiden. Die pH-kontrollierte, regioselektive Markierung von

Peptiden mit 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester ist zwar möglich, wie in einer anderen Arbeit kürzlich gezeigt wurde [112], jedoch sind relativ hohe Peptidkonzentrationen erforderlich, um in wässrigem Milieu ausreichend hohe radiochemische Ausbeuten zu erzielen. Die Markierungssynthese wird daher besser mit einem Lysin-geschützten Derivat durchgeführt. Ein solches wurde freundlicher Weise von der Sandoz AG zur Verfügung gestellt. Die Acylierung dieser Boc-geschützten Verbindung (ϵ -Boc-Lys⁵-Octreotid) konnte daher unter Verwendung rein organischer Lösungsmittel optimiert werden. Die Zeitabhängigkeit der Acylierung ist in Abbildung [37] für die Reaktion mit bzw. ohne Zusatz des katalytisch wirkenden Hydroxybenzotriazols [113, 93] gezeigt.

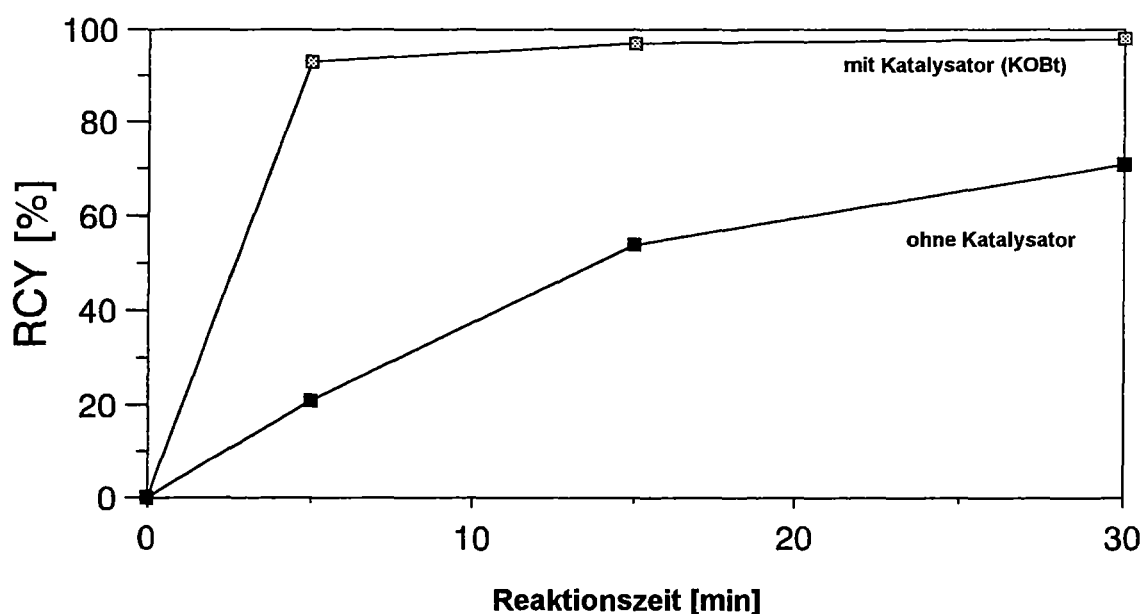


Abbildung 37: 2-[^{18}F]Fluorpropionylierung von (ϵ -Boc-Lys⁵-Octreotid);
 Reaktionsbedingungen: 0,5 mg ϵ -Boc-Lys⁵-Octreotid; 1,5 mg KOBt;
 in 50 μl DMF, 20°C; ohne Kat: 2,5 μl Di-t.-butyl-pyridin in ; 50 μl
 MeCN; 70°C

Die radiochemische Ausbeute in Acetonitril bei 70 °C erreicht nach 30 min ca. 70%. Dies reflektiert die geringe Reaktivität der terminalen Aminosäure. Um die Reaktion zu beschleunigen, wurde die in wässriger Lösung mit Erfolg eingesetzte HOBt-Katalyse [112] angewandt. Dazu wurden 1,5 mg des Kaliumsalzes der Benzotriazolverbindung zu einer Lösung des Octreotids in Gegenwart des n.c.a. 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester gegeben. Dies führte bereits nach 5 Minuten bei Zimmertemperatur zu radiochemischen Ausbeuten von über 90 %. Ähnliche Verbesserungen konnten auch in Acetonitril bei Anwendung von HOBt in Gegenwart einer Pyridinbase erzielt werden. Jedoch waren erhöhte Temperaturen (70 °C) erforderlich. Die gesamte Reaktionsfolge ist in Abbildung 38 skizziert.

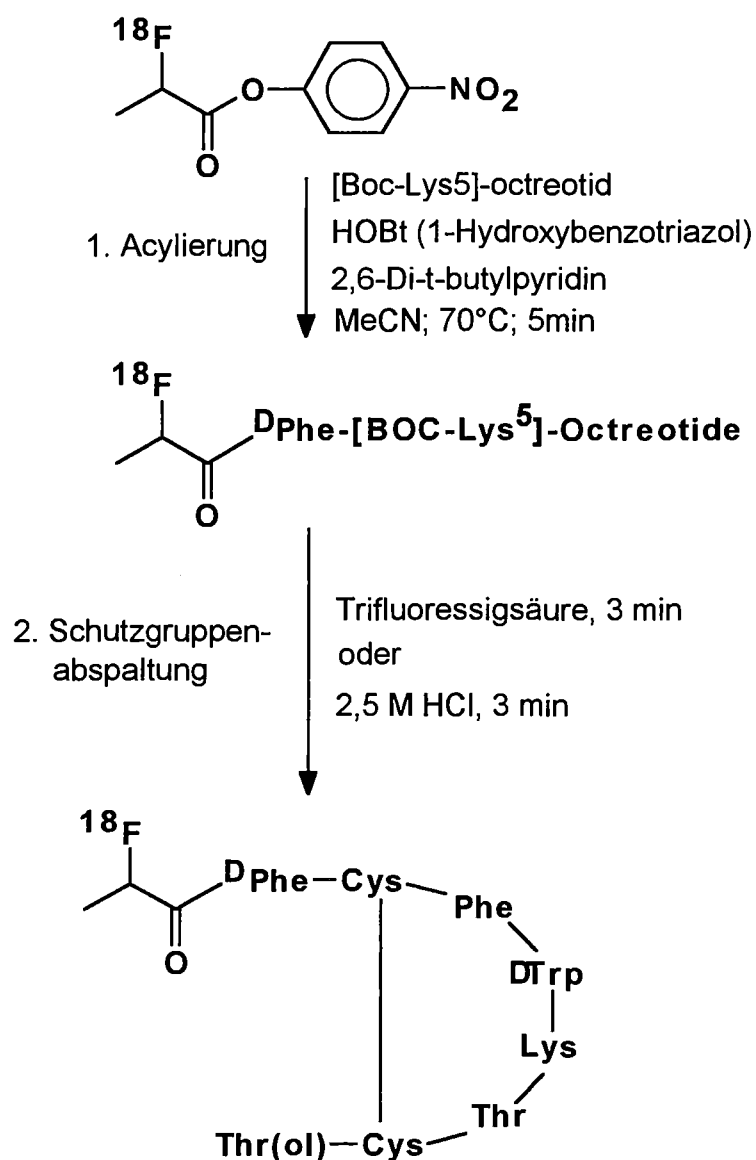


Abbildung 38: Synthese von (±)-2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D-phe1)-octreotid

Die radiochemische Ausbeute dieser Synthese beträgt $65 \pm 5 \%$ bezogen auf das eingesetzte Acylierungsreagenz. Die maximal erreichte spezifische Aktivität war $40,7 \text{ GBq} / \mu\text{mol}$. Von der Sandoz AG durchgeführte Rezeptorstudien mit der inaktiven Referenzverbindung, die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit dargestellt wurde, zeigten hohe Rezeptoraffinitäten mit einem pK_i -Wert von $8,7 \pm 0,2$. Dieser Wert entspricht einem IC_{50} im niedrig nanomolaren Bereich (ca. $3 \times 10^{-9} \text{ M}$). Gleichmaßen war die biologische Aktivität, die anhand der Wachstumshormon-inhibierung bestimmt wurde, sehr hoch (pIC_{50} : $8,75 \pm 0,02$) und nur unwesentlich von der Stammverbindung (8,88) verschieden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Modifizierung von rezeptorbindenden Peptiden mittels 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester eine geeignete Methode darstellt.

2.2. Alternative Methoden zur n.c.a. ^{18}F -Fluormarkierung von Peptiden und Proteinen

2.2.1 N. c. a. ^{18}F -Fluoramidierung von aktivierten Acylverbindungen

Obwohl die ^{18}F -Fluoracylierung eine äußerst vielseitige Methode zur Markierung von Molekülen mit basischen funktionellen Gruppen darstellt, gibt es dennoch eine Reihe von Gründen, auch alternativen Methoden Beachtung zu schenken. Ansatzpunkte sind z.B. die Einfachheit der Reagenzdarstellung, die Stabilität des Reagenz, die Gesamtausbeute sowie Synthesedauer oder Handhabbarkeit in fernbedienbaren Apparaturen.

Eine in der Fluor-18 Markierungsschemie bisher wenig berücksichtigte Methode besteht z.B. in einer Umkehrung der ^{18}F -Fluoracylierungsreaktion. Anstelle der ^{18}F -Fluoracylkomponente wird dabei ein Amin als Träger der Radioaktivität eingesetzt. Diese beiden Prinzipien sind in Abbildung 39 gegenübergestellt.

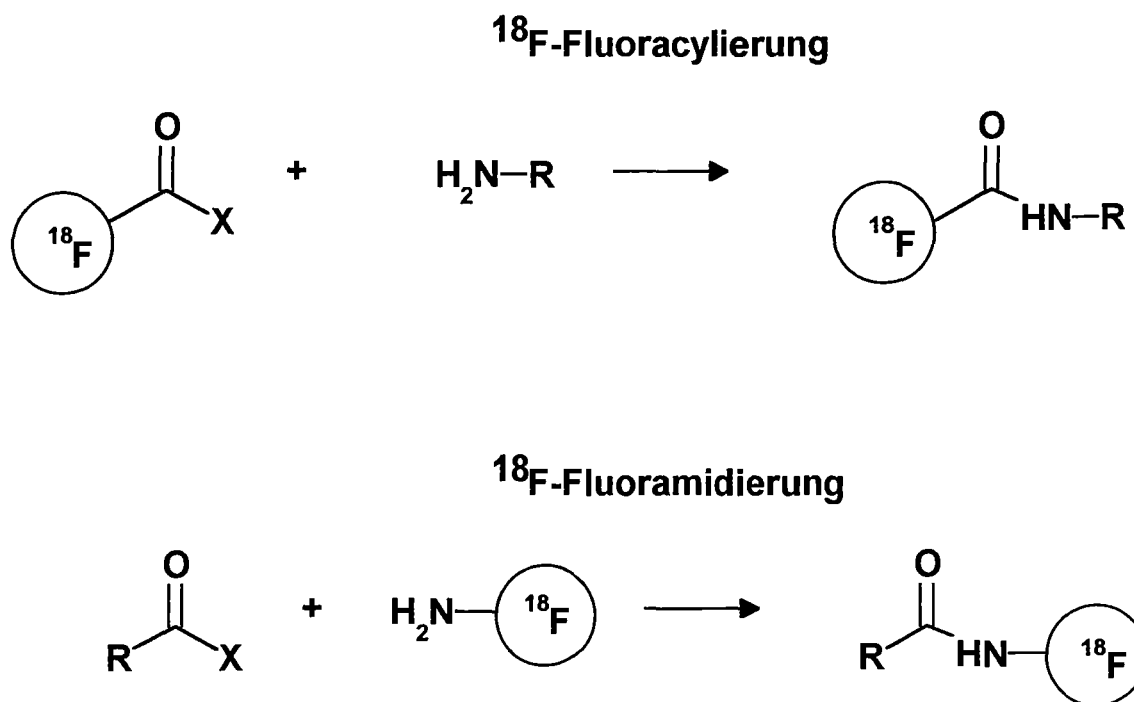


Abbildung 39: Prinzipien der ^{18}F -Fluoracylierung und der ^{18}F -Fluoramidierung

Es besteht kein Zweifel, daß der Fluoramidierung im Vergleich zur Fluoracylierung eine nur limitiertere Anwendungsbreite bei der Markierung von

Peptiden und Proteinen zukommt. Ursache hierfür ist, daß Peptide oder Proteine mit aktivierten Acylgruppen nur schwer zu erhalten sind. Dies würde nämlich die Einführung einer reaktiven, elektrophilen funktionellen Gruppe in Moleküle mit sonst überwiegend nukleophilen Eigenschaften erfordern. Solche bifunktionellen Moleküle unterliegen einer hohen Gefahr von intramolekularen Ringschlüssen oder der Polymerisation. Dennoch läßt der Trend zu immer kleineren und dennoch hochwirksamen Peptiden die Synthese von acylaktiven Spezies in Einzelfällen zu, vor allem wenn partiell geschützte Peptide zur Verfügung stehen. Die Einführung einer Aktivesterfunktion in Boc-geschütztes Octreotid stellt ein relevantes Beispiel hierfür dar. Die Aktivierung des Peptids wird dabei durch Derivatisierung mit bifunktionellen Reagenzien wie z.B. Disuccinimidyl-Glutarat erreicht [114,115].

Ein Beispiel für eine solche Peptidmarkierung via ^{18}F -Fluoramidierung findet sich in der erwähnten ^{18}F -Markierung des selektiv geschützten und acylaktivierten Insulins [78] (vgl. Abschnitt 1.5).

Eine weitere, für die Fluoramidierung interessante Variante besteht auch darin, bereits etablierte Radiopharmaka für die Markierung von Peptiden auszunutzen. Dies könnten z.B. Aminosäuren wie 2- ^{18}F Fluortyrosin oder ^{18}F Fluordopa sein. Voraussetzung ist jedoch eine trägerarme Synthese, ausgehend von nukleophilem ^{18}F Fluorid, um die hohen Anforderungen hinsichtlich der spezifischen Aktivität rezeptorbindender Peptide zu erfüllen.

Unter rein reaktionskinetischer Sicht sollten jedoch besser solche Amine für die Fluoramidierung eingesetzt werden, die möglichst hohe pK_a -Werte und möglichst geringe sterische Hinderung aufweisen. Deshalb wurden zunächst die Grundlagen dieser Methode anhand des einfachen, stark basischen und zudem sterisch anspruchslosen 3- ^{18}F Fluorpropylamin untersucht.

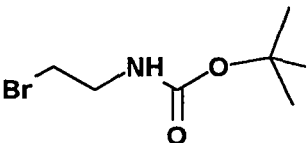
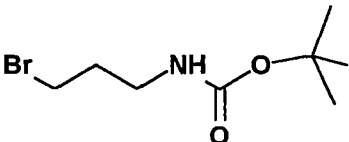
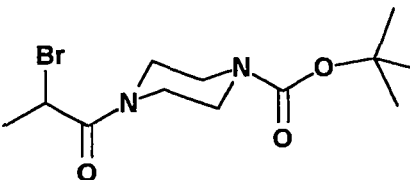
2.2.1.1 Nukleophile n.c.a. ^{18}F -Fluorierung geschützter Amine

Die trägerfreie Darstellung von ^{18}F -fluorierten Aminen ist nicht trivial, da auch hier das Problem acider Protonen auftritt. Dies verhindert deren effiziente, direkte nukleophile ^{18}F -Fluorierung. Deshalb wurde als Ausgangspunkt für die ^{18}F -Fluoramidierung die nukleophile Substitution an dazu prinzipiell besser geeigneten, geschützten Aminen untersucht.

Unter den zahlreichen möglichen Aminoschutzgruppen hat sich in der präparativen organischen Chemie die leicht entfernbare t-Butyloxycarbonylgruppe (Boc) bestens bewährt (zur Übersicht s. 82). Aufgrund ihrer hohen Basenstabilität sollte sie auch für die Bedingungen der trägerarmen, anionen-aktivierten Substitution mit ^{18}F Fluorid geeignet sein. Einige, Brom als Abgangsgruppe

enthaltende, Boc-geschützte Amine wurden deshalb synthetisiert, und auf ihre Fluorierbarkeit unter n.c.a. Bedingungen getestet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt:

Tabelle 10: Radiochemische Ausbeute der [^{18}F]Fluor für Brom Substitution an Boc-geschützten Aminen

Boc-Amin	radiochemische Ausbeute [%] des [^{18}F]Fluor für Brom Austausch
	38 ± 9
	93 ± 4
	93 ± 2

Reaktionsbedingungen: 90°C; 10 min; 100 μmol Br-Vorläufer; 250 μl MeCN;
10 μmol Kryptofix / K_2CO_3

Tabelle 10 zeigt, daß mit Ausnahme des Boc-geschützten Bromethylamins sehr hohe radiochemische Ausbeuten bei der n.c.a. ^{18}F -Fluorierung von Boc-geschützten Aminen erhalten werden können. Eine Verlängerung der Reaktionszeit führt im Falle der Bromethylaminverbindung nicht zu einer weiteren Verbesserung der radiochemischen Ausbeute. Ein möglicher Grund hierfür könnte z.B. die erhöhte Acidität des Amidprotons der in 2-Position bromierten Verbindung sein.

3-[^{18}F]Fluorpropylamin und 2-[^{18}F]Fluorpropionylpiperazin hingegen zeichnen sich neben hohen radiochemischen Ausbeuten auch durch eine höhere Basizität aus. Das Propylamin unterscheidet sich hier trotz des starken induktiven Effektes des Fluors nur noch wenig von der unsubstituierten Stammverbindung. Aus allgemein sterischen Gesichtspunkten erscheint es der Piperazinverbindung überlegen. Daher wurde 3-Fluorpropylamin für die weiterführenden Untersuchungen eingesetzt.

2.2.1.2 Syntheseablauf der ^{18}F -Fluoramidierung

Der Syntheseablauf der ^{18}F -Fluoramidierung ausgehend von N-Boc-Brompropylamin ist zur Übersicht im Fließschema (Abbildung 40) gezeigt.

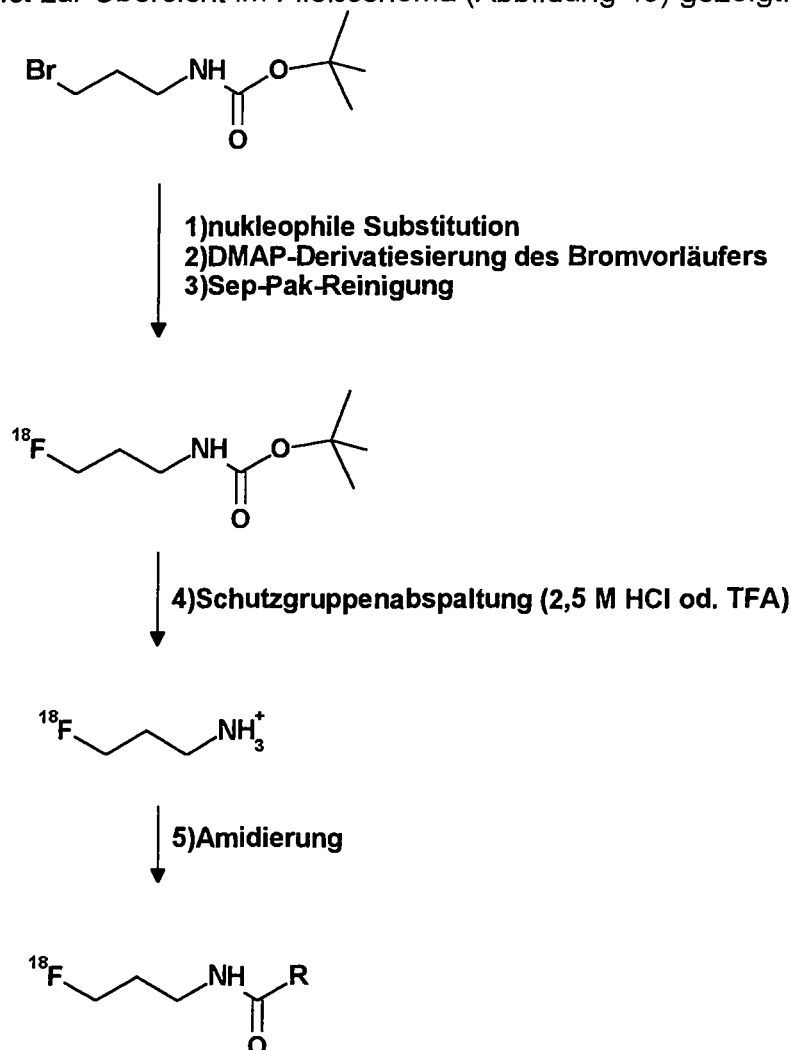


Abbildung 40: Fließschema der n.c.a. ^{18}F -Fluoramidierung

Die trägerarme, nukleophile Substitution und die anschließende Isolierung des ^{18}F -Boc-Amins durch DMAP-Derivatisierung des Bromvorläufers und Festphasenextraktion (vgl. 2.1.4.3), sowie die Abspaltung der Schutzgruppe durch Trifluoressigsäure oder 2,5 M Salzsäure verlaufen durchweg mit sehr hohen radiochemischen Ausbeuten. Die Gesamtausbeute bis zum Ammoniumsalz des 3- ^{18}F fluorpropylamins beträgt deshalb $86 \pm 7\%$. Die Stabilität des n.c.a. ^{18}F -Fluoramidierungsreagenz ist unter normalen Bedingungen gegenüber Einflüssen wie Wasser, Säuren, Laugen oder Temperatur sehr hoch. Deshalb kann die Handhabung des n.c.a. 3- ^{18}F fluorpropylamins als sehr unproblematisch eingestuft werden. Hier zeigt sich ein Vorteil gegenüber den hydrolyseempfindlichen, hochreaktiven ^{18}F -Fluoracylierungsreagenzien.

2.2.1.3 Abhängigkeit der n.c.a. ^{18}F -Fluoramidierungsausbeute von der Konzentration des Acylierungsreagenz

Als entscheidende Parameter der Reaktion von trägerfreien, markierten Aminen mit aktivierten Acylverbindungen können der pH-Wert (falls in wässriger Lösung gearbeitet wird) und die Konzentration des nicht radioaktiven Acylierungsmittels angenommen werden.

Die Temperatur spielt bei der Reaktion in wässriger Lösung eine untergeordnete Rolle, da erhöhte Temperaturen häufig nur zu schnellerer Zersetzung von Aktivestern führen. Der potentielle Gewinn an Reaktionsgeschwindigkeit wird dann durch Abnahme der effektiven Konzentration kompensiert.

Gute radiochemische Ausbeuten können im allgemeinen bei einem pH in der Nähe des pK_a -Wertes der Aminkomponente erwartet werden. Dieser pH ist oft ein guter Kompromiß zwischen der Nukleophilie eines Amins und der Hydrolyse des Acylierungsreagenz. Die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion von Essigsäure-N-hydroxysuccinimidyl-ester (Ac-NHS) mit 3- ^{18}F Fluorpropylamin wurde deshalb bei einem pH von 9,0 durchgeführt (abgeschätzter pK_a des 3-Fluorpropylamins: 9-10). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 41 graphisch dargestellt.

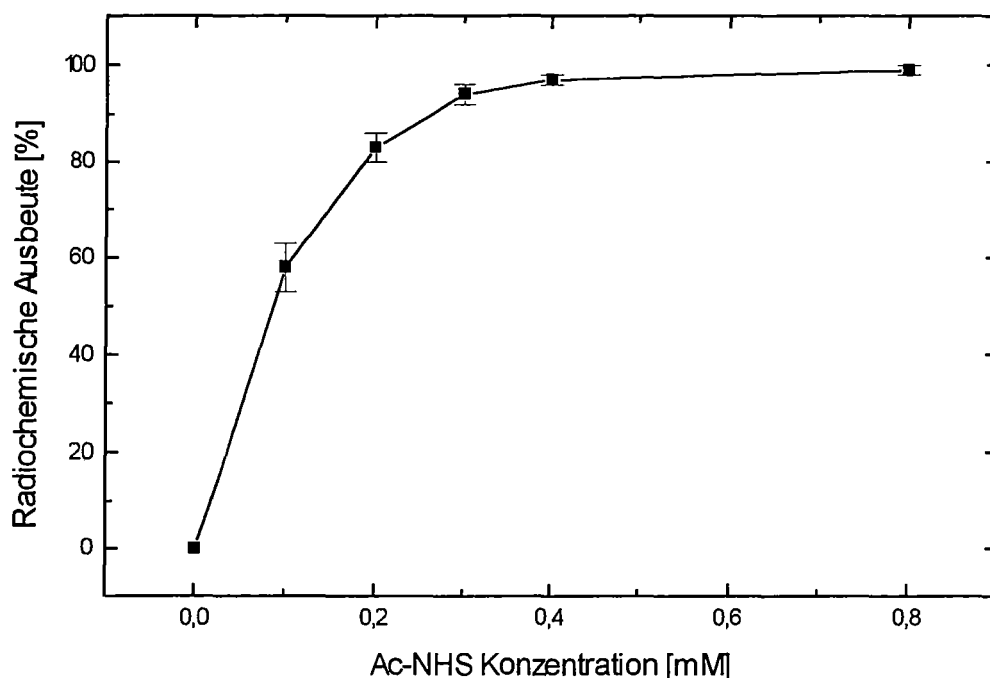


Abbildung 41: Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute der 3- ^{18}F Fluorpropylamidierung von Essigsäure-N-hydroxy-succinimidylester (Ac-NHS) in Wasser; Reaktionsbedingungen: pH 9; 10 min; 20°C

Aus der gezeigten Auftragung der radiochemischen Ausbeute in Abhängigkeit der Aktivesterkonzentration geht hervor, daß bereits bei ca 0,5 millimolarer Konzentration des Acylierungsreagenz, das 3-[^{18}F]Fluorpropylamin praktisch quantitativ in acetylierter Form vorliegt. Dies entspricht einer absolut notwendigen Menge von nur ca. 75 μg des Esters ($\text{MW}_{(\text{Ac-NHS})}$: 157,1) pro ml Reaktionslösung. Da die Volumina der Reaktionslösung leicht auf etwa 100 μl begrenzt werden können, müssen in der Praxis nur etwa 10 μg des Aktivesters zum Erreichen dieser Ausbeute eingesetzt werden.

Unter der Annahme, daß bei komplexeren Molekülen die Reaktivität um einen Faktor von etwa 10 zurückgeht und gleichzeitig das Molekulargewicht 10-fach höher ist (Peptide), entspräche dies einer nötigen Menge von etwa 1 mg zu markierender Substanz pro Ansatz.

2.2.1.4 pH-Abhängigkeit der n.c.a. ^{18}F -Fluoramidierungsausbeute

Um den günstigsten pH-Bereich für die Fluoramidierung mit n.c.a 3-[^{18}F]Fluorpropylamin in wässriger Lösung auch praktisch zu bestimmen, wurde die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute der betrachteten Reaktion in verschiedenen Pufferlösungen untersucht (Abbildung 42). Die Zugabe des in DMF gelösten Aktivesters erfolgte als letzte Komponente. (Der DMF-Anteil des resultierenden Gemisches wurde dabei stets unter 10% gehalten).

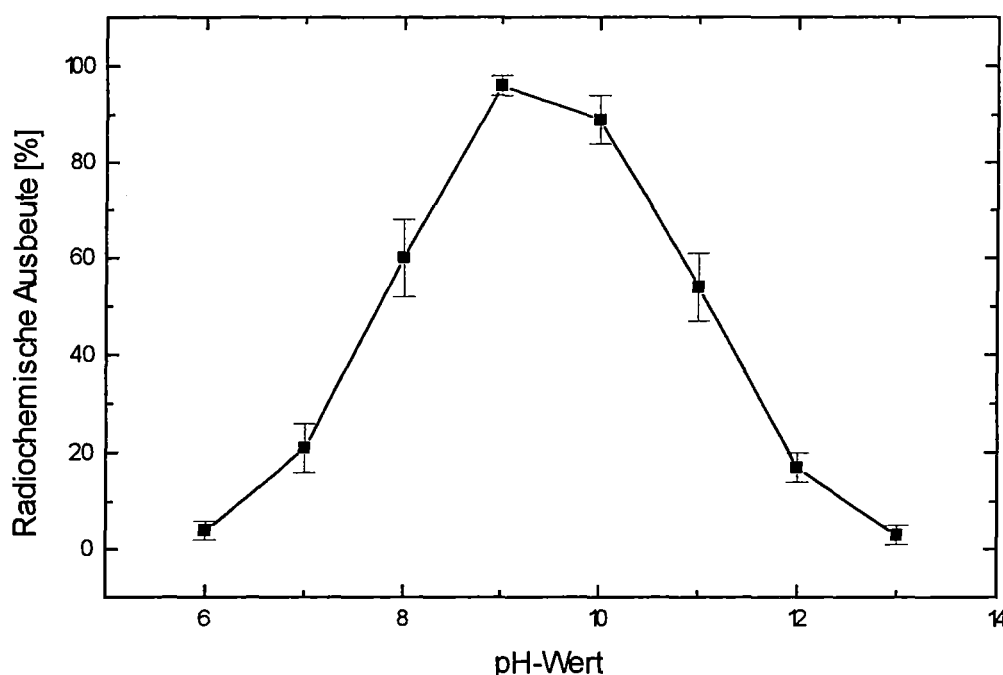


Abbildung 42: pH-Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute bei der 3-[^{18}F]Fluorpropylamidierung von Essigsäure-N-hydroxy-succinimidylester (Ac-NHS);
Reaktionsbedingungen: $c(\text{Ac-NHS}) = 0,4 \text{ mM}$; 10 min; 20°C

Da nur freie deprotonierte Aminogruppen in der Lage sind, einen nukleophilen Angriff auf die Carbonylfunktion durchzuführen, ist der Kurvenverlauf zum einen durch einen Anstieg des Anteils an freiem Amin mit steigendem pH geprägt. Gleichzeitig nimmt jedoch die Hydrolyse der Acylkomponente immer stärker zu, da Hydroxidionen verstärkt in Konkurrenz treten. Daher ist bei einem bestimmten pH-Wert (hier etwa 9) ein Maximum der radiochemischen Ausbeute zu erwarten. Ab pH-Werten von ca. 10-11 wird die Hydrolyse zur bevorzugten Reaktion. In der Summe führt dies zu dem in Abbildung 42 erhaltenen glockenförmigen Kurvenverlauf und entspricht somit den theoretischen Erwartungen.

Die ^{18}F -Fluoramidierung kann also sehr hohe radiochemische Ausbeuten liefern und selbst in wässriger Lösung mit Erfolg eingesetzt werden. Zudem ist die Synthese des Reagenz schnell und einfach durchzuführen. Ein Anwendungsbeispiel dieses Verfahrens wird im Folgekapitel mit der Markierung des pharmakologisch interessanten Biotins gegeben.

2.2.2 Das [^{18}F]Fluor-Biotin-Avidin System

Avidin, ein 67 kD Protein, und Biotin (Vitamin H; s. Abb. 50) bilden einen der stärksten bekannten Komplexe rein organischer Verbindungen überhaupt (Bindungskonstante $K_D = 10^{-15}$ M). Diese hohe Affinität ist die Grundlage der äußerst nützlichen und vielseitigen Anwendbarkeit des Biotin-Avidin Systems in biologischen Systemen [zur Übersicht s. 116]. Die oft nur geringfügig veränderte biologische Aktivität von modifiziertem Biotin oder auch Avidin bietet dabei die Möglichkeit, Konjugate der beiden Partner einzusetzen und schafft somit die Voraussetzung, dieses System auch zu Radiodetektionszwecken einzusetzen.

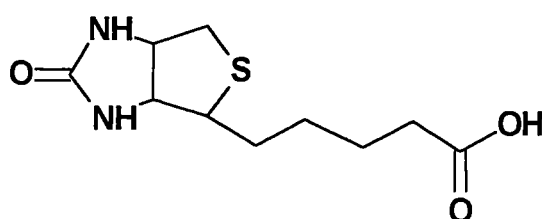


Abbildung 42: Biotin

Radioaktiv markierte Varianten des Avidins [117] oder häufiger des Biotins [118] können also dazu dienen, Radionuklide gezielt, mit hoher Affinität an Konjugate des jeweiligen Komplexpartners zu binden. In nuklearmedizinischen Ansätzen wird z.B. versucht, das System in der onkologischen Diagnostik einzusetzen. Zu diesem Zweck wird insbesondere In-111 oder Tc-99^m markiertes Biotin [119,120] eingesetzt. In jüngeren Veröffentlichungen wurde jedoch auch berichtet, daß radiomarkiertes Biotin zur Diagnose von Infektionsherden eingesetzt werden kann [121].

Auch am Institut für Nuklearchemie wurde Biotin bereits mit ^{18}F -Fluor markiert [122]. Diese Markierungen wurden entweder durch Kondensation von n.c.a. ^{18}F -Fluorpropionsäure und Biotinhydrazid via Carbodiimiden [74] oder durch Reaktion von [^{18}F]Fluorbenzaldehyden mit Biotinhydrazid [123] erreicht. Eine weitere Variante besteht in der Alkylierung von Biotinhydrazid durch [^{18}F]Fluorbenzylbromid [124]. Es wurden jedoch auch Methoden zur Markierung von Biotin durch direkte nukleophile Substitution veröffentlicht [125]. Dabei wurden jedoch nur mäßige radiochemische Ausbeuten von 10-20 % erzielt. Die Einführung nukleophilen [^{18}F]Fluorids in ein kommerziell erhältliches iodacyliertes Biotin war nicht erfolgreich [76].

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ebenfalls an der direkten nukleophilen Substitution geeigneter Biotinderivate gearbeitet. Parallel dazu wurden die ent-

wickelten Methoden zur ^{18}F -Fluoracylierung und ^{18}F -Fluoramidierung auf entsprechende Biotinderivate angewandt.

2.2.2.1 Synthese von n.c.a. ^{18}F -fluorierten Biotinderivaten

Folgende Tabelle gibt einen vergleichenden Überblick der Synthesemethoden und radiochemischen Ausbeuten in der Literatur beschriebener und in dieser Arbeit erhaltener ^{18}F -Fluorbiotinderivate.

Tabelle 11: Radiochemische Ausbeuten von n.c.a. ^{18}F -fluorierten Biotinderivaten nach verschiedenen Darstellungsmethoden

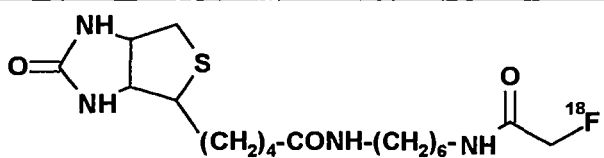
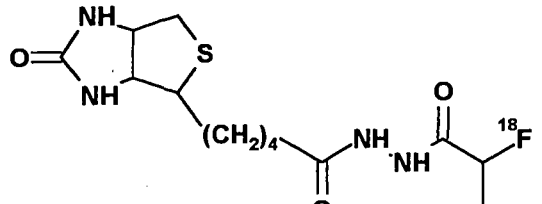
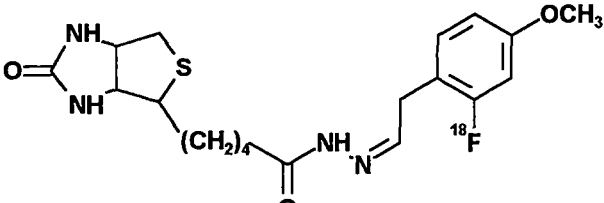
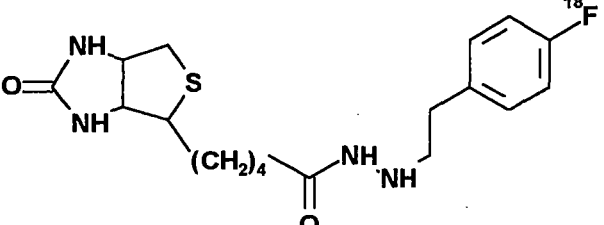
	Biotinderivat	Radiosyntheseweg	Lit.	Ausb. [%]
1		direkte nukleophile Substitution an Iodacetylderivat	[74]	<1
2		durch Kondensation von Biotinhydrazid und 2-[^{18}F]Fluorpropions. (via DCC)	[76, 123]	24-36
3		durch Hydrazonbildung von Biotinhydrazid und 2-[^{18}F]Fluor-4-methoxybenzaldehyd	[123]	42-56
4		durch Alkylierung von Biotinhydrazid mit 4-[^{18}F]Fluorbenzylbromid	[124]	10-20

Tabelle 11: Fortsetzung

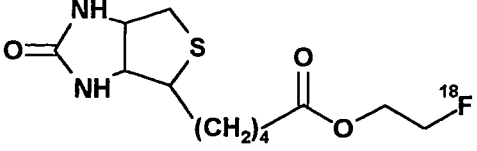
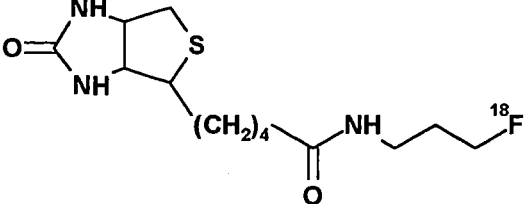
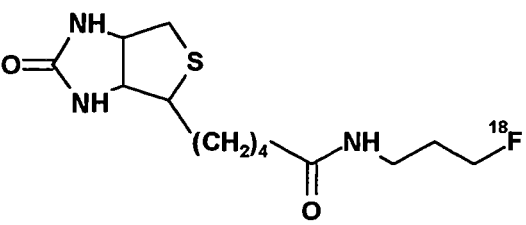
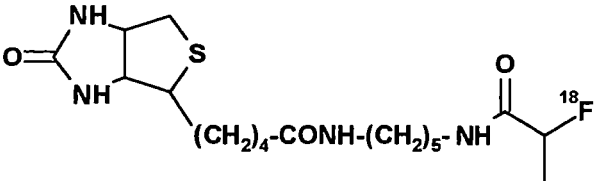
	Biotinderivat	Radiosyntheseweg	Lit.	Ausb. [%]
5		durch direkte nukl. Substitution am entspr. Bromderivat	diese Arbeit	50-70
6		durch direkte nukl. Substitution am entspr. Mesylat	[125]	12-21
7		durch Kopplung von Biotinaktivestern und 3-[¹⁸ F]Fluorpropylamin	diese Arbeit	78-93
8		durch Kopplung von 5-(Biotinamido)-pentylamin und [¹⁸ F]FPONp	diese Arbeit	45-55

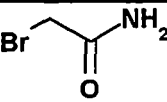
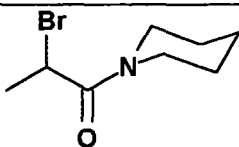
Tabelle 11 zeigt verschiedene, ¹⁸F-fluorierte Biotinderivate, die in chronologischer Reihenfolge ihrer Erstmarkierung aufgeführt sind.

Die einstufige, direkte nukleophile Substitution ausgehend von [¹⁸F]Fluorid ist die prinzipiell einfachste Möglichkeit zur Darstellung von ¹⁸F-Fluorbiotinderivaten. Leider mißlingt die Markierung des käuflichen Iodacetylderivates (Derivat 1). Die neueren in der Literatur veröffentlichten Direktmarkierungen gehen daher von anderen, nicht käuflichen Vorläufern aus. Zum Beispiel gelingt die Substitution an einem in 3-Stellung mesylierten Amid mit mäßigen Ausbeuten von 12 - 21 % (Derivat 6).

Als mögliche Ursache für die mäßigen Ausbeuten kann in erster Linie die Acidität der Amidprotonen der untersuchten Biotinderivate angeführt werden. Als Ansatz zur Klärung dieses Problems wurde Biotin daher so modifiziert, daß es an Stelle der üblichen Kopplung über Amidbindungen eine Esterfunktion enthält. Dies eliminiert den möglichen Einfluß derjenigen Amidprotonen, die nicht zum Harnstoffteil des Moleküls gehören. Die Amidprotonen des Harnstoffs sind nur von geringer Acidität

(pKa = 26,5 in DMSO nach [126]) und sollten keine Störungen verursachen. Mit dem Ester als Vorläufer wurden dann auch die besten Ausbeuten bei der direkten nukleophilen Substitution erzielt (Derivat 5). Der störende Einfluß von Amidprotonen wird auch an Hand von Ergebnissen der n.c.a. ^{18}F -Fluorierung zweier einfacher Modellverbindungen sichtbar (s. Tabelle 12). Die höhere radiochemische Ausbeute wird sogar trotz der größeren sterischen Hinderung mit dem tertiären Piperidinamid erzielt.

Tabelle 12: Vergleich der radiochemischen Ausbeute des [^{18}F]Fluor- für-Brom Austausches an primären und tertiären Amiden

Amid	Radiochemische Ausbeute [%] des [^{18}F]Fluor-für-Brom Austausches
	73 ± 5
	90 ± 2

Reaktionsbedingungen: 90°C; 10 min; 100 µmol Br-Vorläufer; 250 µl MeCN; 10 µmol Kryptofix / K_2CO_3

- Der direkt fluorierbare Biotinester kann jedoch nicht in-vivo eingesetzt werden, da im Serum vorhandene Esterasen sehr schnell zu einer Spaltung des Moleküls unter Bildung von freiem [^{18}F]Fluorethanol führen. Dies konnte durch chromatographischen Vergleich von stabilem, nichtradioaktiven Fluorethanol und dem radioaktiven Spaltprodukt des serumbehandelten Biotinderivates gezeigt werden.

Alle weiteren in Tabelle 11 aufgeführten Biotinderivate werden in mehrstufigen Verfahren mittels verschiedener prosthetischer Gruppen dargestellt. Die neuen Verbindungen (7) und (8) zeichnen sich dabei wie das frühere, durch Carbo-diimidkondensation dargestellte Biotinderivat (2), durch eine stabile Amidbindung zwischen Biotin und der ^{18}F -fluorierten prosthetischen Gruppe aus.

Die in-vivo Stabilität der Hydrazonverbindung (3) ist bislang nicht untersucht worden. Jedoch kann angenommen werden, daß die Verbindung nicht gänzlich stabil bleibt, da Hydrazone des öfteren als "Prodrugs" eingesetzt werden, die sich dann im Organismus in Amin und Aldehyd aufspalten [127]. Unter den reinen Amiden besteht der Vorteil der neuen Verbindungen (7) und (8) in der durch die neuen Techniken der ^{18}F -Fluoracylierung und ^{18}F -Fluoramidierung nun wesentlich einfacheren und effektiveren Kopplungsreaktion. Ein zusätzlicher Vorteil der Fluoracylierung (Verbindung 8) besteht auch darin, daß die Kopplung nun an dem

seit kurzem kommerziell erhältlichen Pentylaminderivat des Biotins durchgeführt werden kann. Dies zeichnet sich gegenüber dem früher eingesetzten Biotinhydrazid durch eine deutlich höhere Reaktivität gegenüber Acylierungsreagenzien aus.

Die Variante der Fluoramidierung führt jedoch unter allen Synthesemethoden klar zu den höchsten radiochemischen Ausbeuten und ist der direkten nukleophilen Substitution nach Shoup et al. [125], die zu dem gleichen Produkt führt, in dieser Hinsicht weit überlegen. Dies gilt auch im Vergleich zur Fluoracylierung, da die radiochemische Ausbeute der Darstellung von 3-[^{18}F]Fluorpropylamin höher ist, als die der ^{18}F -fluorierten Aktivester.

Die ^{18}F -Fluoramidierung von Biotinaktivestern kann einfach in wässriger Lösung durchgeführt werden, wobei nur der pH der Lösung kontrolliert werden muß. Bereits bei Raumtemperatur werden annähernd quantitative Ausbeuten bei niedrigen Konzentrationen des Biotinsuccinimidylesters erzielt. In den hierzu durchgeführten Versuchen wurde mit einer Konzentration von 0,5 mg des Succinimidylesters in 250 µl Lösung bei einem pH von 9 gearbeitet (5,8 mM).

Verwendet man hingegen die gleiche Konzentration Biotin-p-nitrophenylester und arbeitet statt in wässriger Lösung (die Löslichkeit des Nitrophenylesters in Wasser ist sehr gering) in Acetonitril und Triethylamin als Hilfsbase, werden bei gleicher Reaktionszeit geringere Ausbeuten erzielt. Dies kann jedoch durch Verlängerung der Reaktionszeit oder Erhitzen der Lösung ausgeglichen werden. Die Zeitabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute für diese ^{18}F -Fluoramidierungsreaktion ist in Abbildung 43 gezeigt:

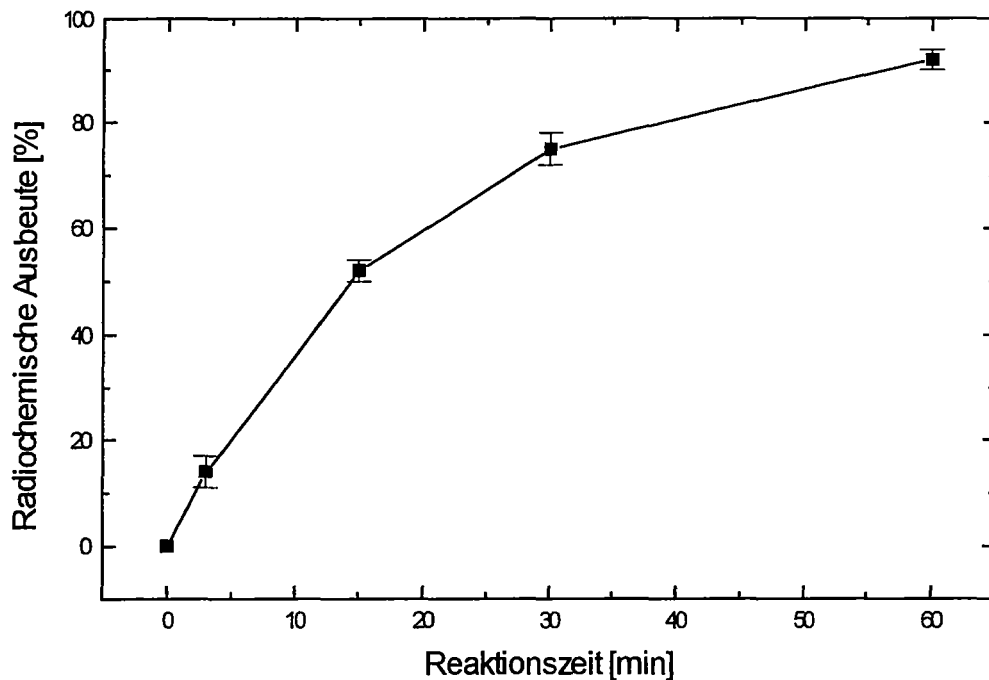


Abbildung 43: Zeitabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute für die 3-[^{18}F]Fluoramidierung von Biotin-p-nitrophenylester
 Reaktionsbedingungen: Acetonitril, 20°C, $c(\text{Biotinester})$: 5,5 mM; $c(\text{Triethylamin})$: 10 mM

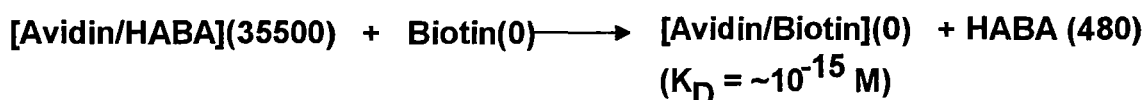
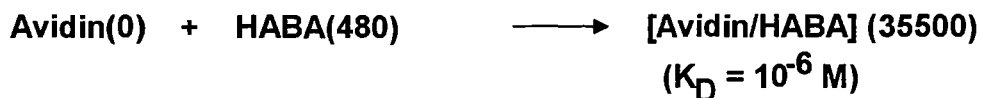
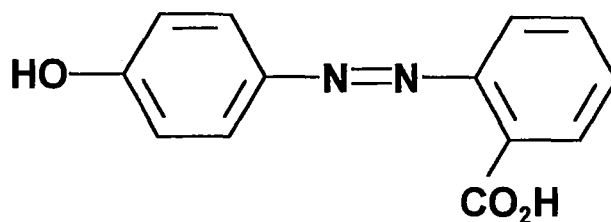
Aus dem zeitlichen Verlauf der 3-[^{18}F]Fluoramidierung von Biotin-p-nitrophenylester kann entnommen werden, daß bei der gewählten niedrigen Konzentration des Biotinesters und Raumtemperatur etwa eine Stunde Reaktionszeit erforderlich ist, um annähernd quantitativen Umsatz zu erzielen. Die im Vergleich zur Umsetzung mit Biotinsuccinimidylester in wässriger Lösung langsame Reaktion zeigt sowohl den Einfluß des Lösungsmittels als auch der Aktivesterkomponente auf die betrachtete Reaktion. Zum einen sind Nitrophenylester als weniger reaktiv bekannt [128], zum anderen weist Acetonitril eine niedrigere Dielektrizitätskonstante als Wasser auf und wirkt daher verlangsamen auf die Amidierung des Esters [129].

Biotin kann also mit einer ganzen Reihe von Markierungsverfahren als ^{18}F -Analogon dargestellt werden, und nur ein sorgfältig durchgeführter Vergleich von in-vivo und in-vitro Daten kann entscheiden, welches Derivat mögliche in-vivo Anwendung finden kann.

2.2.2.2 Bestimmung der effektiven spezifischen Aktivität ^{18}F -fluorierter Biotinderivate

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität ^{18}F -fluormarkierter Moleküle erfolgt üblicherweise durch Bestimmung der Masse, die der radioaktiven Substanz zugeordnet werden kann. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des ^{18}F -markierten Produktes allein ist jedoch nicht immer ausreichend. Es können z.B. weitere Substanzen in der Präparation vorhanden sein, die ähnliche Bindungseigenschaften wie die radioaktive Substanz besitzen. Dies führt zu einer Verminderung der effektiven spezifischen Aktivität. Es muß also peinlichst genau auf eine gute Abtrennung der Markierungsvorläufer und eventueller Nebenprodukte geachtet werden. Dies gilt besonders für Rezeptorliganden, die neben einer hohen spezifischen Aktivität unbedingt auch eine hohe effektive spezifische Aktivität erfordern.

Die Bindung des Biotins an Avidin kann durchaus mit der Situation einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung verglichen werden. Sowohl die Markierungsvorläufer als auch die markierten Biotinderivate binden an Avidin. Da Biotin selbst und einige der untersuchten Fluorderivate nur geringe Absorption im UV-Bereich aufweisen, ist die quantitative Bestimmung der spezifischen Aktivität dieser Verbindung durch herkömmliche UV-Detektionsverfahren nur schwer möglich. Eine elegante Möglichkeit besteht jedoch in der Bildung eines schwachen Komplexes von Avidin mit dem Azofarbstoff HABA (Hydroxybenzol-azo-benzoic-acid; $K_D = 10^{-6} \text{ M}$ [130]). Dieser Komplex weist einen hohen Extinktionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von 500 nm auf. Bei Substitution von HABA durch den viel stärkeren Komplexliganden Biotin ($K_D = 10^{-15} \text{ M}$) ändert sich diese Absorption in streng konzentrationsabhängiger Weise. Somit kann die Konzentration des Biotins bis hinab zu subnano-molaren Konzentrationen photometrisch bestimmt werden. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß praktisch alle Biotinderivate erfaßt werden, und somit die Messung der effektiven spezifischen Aktivität des Tracers ermöglicht wird. Das Prinzip dieses Verfahrens ist in Abbildung 44 skizziert.

HABA

$$\Delta \text{abs.} \sim [\text{Biotin}]$$

Abbildung 44: Photometrische Bestimmung der Biotinkonzentration [nach 130];
(Die Zahlenwerte in Klammern geben die Extinktionskoeffizienten
bei einer Wellenlänge von 500 nm an.)

Nach diesem Verfahren wurden die Biotingehalte verschiedener ^{18}F -Biotinpräparationen bestimmt. Die ermittelten Biotinmengen unterschieden sich dabei in Abhängigkeit der jeweils untersuchten Präparate. So wurden für fluoracyliertes Biotinhydrazid $11,8 \pm 3,8$ nmol Biotin in der Gesamtpräparation bestimmt, während für das durch direkte nukleophile Substitution am Biotin-2'-bromethylester erhaltene Präparat nur $7,8 \pm 2,5$ nmol ermittelt wurden. Dieser Unterschied wird vermutlich durch Elutionsreihenfolge der Substanzen bei der Chromatographie verursacht. Während im Falle des Hydrazidderivates der Vorläufer zuerst eluiert wird und durch Tailing in die Produktfraktion geraten kann, ist dies im Falle des Bromvorläufers umgekehrt und begünstigt damit die chemische Reinheit des Präparates.

Daraus resultiert, daß z.B. bei einer geforderten spezifischen Aktivität von ca. 37 TBq / mmol (1000 Ci / mmol), etwa 370 MBq (10 mCi) ^{18}F -fluorierter Verbindung produziert werden muß. Weil diese Aktivitätsmengen weit überschritten werden können, stellt die geforderte hohe spezifische Aktivität keine Limitierung in der Anwendung ^{18}F -fluorierten Biotins dar.

2.2.2.3 ^{18}F -Fluormarkierung des Proteins Avidin durch Fluoracylierung

Parallel zur Entwicklung ^{18}F -fluorierter Biotinderivate wurde auch die ^{18}F -Markierung des Proteins Avidin durch Fluoracylierung durchgeführt. Aufgrund der leicht durchführbaren Bindungstests stellt dieses Protein ein gutes Modell für die Anwendbarkeit der Fluoracylierung auf Proteine dar. Daneben erweitert es die Möglichkeiten bei der Nutzung des ^{18}F -Fluor-Biotin-Avidin Systems, da entweder das kleine Biotin, oder das Makromolekül Avidin nach Bedarf als Tracer eingesetzt werden können.

^{18}F -fluorpropionyliertes Avidin kann z.B. durch Umsetzung des 2- ^{18}F -Fluorpropionsäurenitrophenylesters in wässriger Lösung des Proteins erhalten werden. Die Bindung des ^{18}F -Fluorpropionylrestes an das Protein erfolgt dabei mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit über Lysinreste des Proteins unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung.

Die Bestimmung der radiochemischen Ausbeute kann durch Auftrennung des Reaktionsgemisches über eine Gel-chromatographiesäule erfolgen. Eine solche Trennung ist in Abbildung 45 dargestellt.

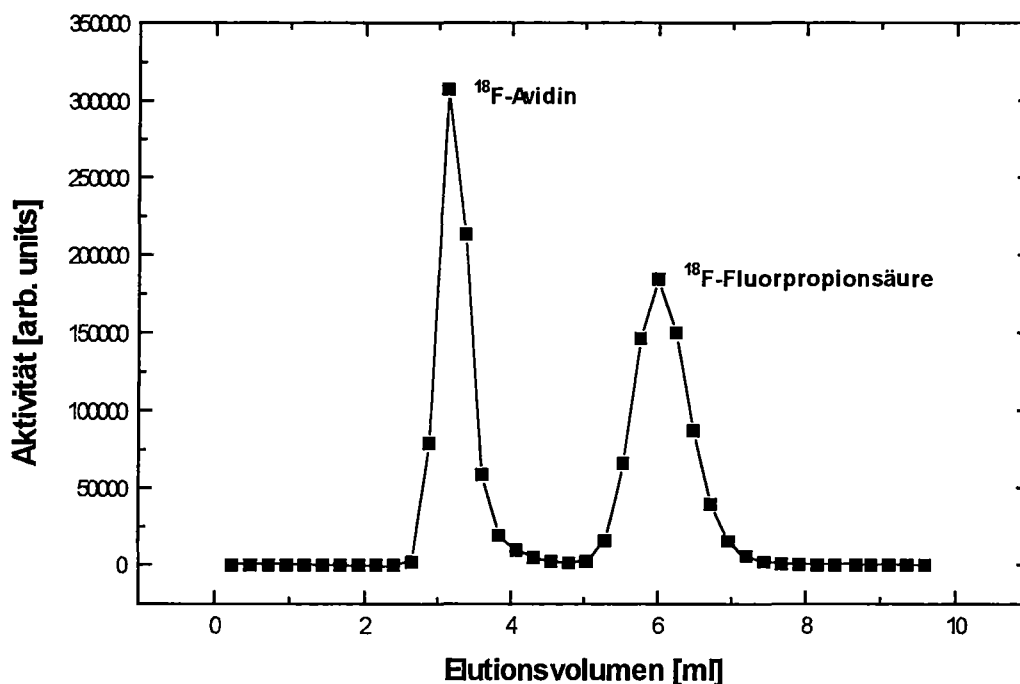


Abbildung 45: ^{18}F -Fluoracylierung von Avidin; Gel-chromatogramm (Sephadex G-25) der Reaktionslösung; Reaktionsbedingungen: pH: 9; 20°C; 10 min; 0,1M HOBt (Hydroxybenzotriazol); c_{Avidin} : 1mg / 100 μl

Bei Gel-chromatographischen Verfahren (Size exclusion chromatography) erfolgt die Trennung der Moleküle auf Grund eines Siebeffektes nach ihrer Größe. Große Moleküle können nicht in die Poren des Materials der stationären Phase eindringen, so daß sie im Vergleich zu kleineren Molekülen eine kürzere Wegstrecke zurücklegen. Die proteingebundene ^{18}F -Fluoraktivität eluiert deshalb vor kleinen Molekülen. Man erhält also ein typisches 2-Peak-Chromatogramm wie in Abbildung 45. Die Integration der Peakflächen des gezeigten Chromatogrammes ergibt eine radiochemische Ausbeute für das markierten Avidins von ca. 60 %.

Die ^{18}F -Fluoracylierung des Avidins wird am besten in Anwesenheit von Hydroxybenzotriazol (HOBt) durchgeführt. Dies führt zu einer erheblichen Steigerung der radiochemischen Ausbeute. Ohne den Zusatz von HOBt wird für die gleiche Reaktion eine Ausbeute von nur 10 ± 2 % erzielt. Dieses Ergebnis deckt sich mit Versuchen zur ^{18}F -Fluoracylierung von kleinen Modellpeptiden [93, 112] in wässriger Lösung, die zu ähnlichen Ausbeutesteigerungen führten. Wahrscheinlich kommt es dabei intermediär zu einer Bildung des entsprechenden Hydroxybenzotriazolesters der 2- ^{18}F Fluorpropionsäure. Dieser weist ein günstigeres Aminolyse zu Hydrolyseverhältnis auf, als der p-Nitrophenylester selbst und wirkt zudem reaktionsbeschleunigend (vgl. 2.1.8).

Im Gegensatz zu Biotin kann ^{18}F -markiertes Avidin nicht vom eingesetzten Substrat isoliert werden. Die Einführung der kleinen Fluorpropionylgruppe bedeutet eine viel zu geringe Veränderung des Proteins, um für eine Trennung auszureichen. Daher liegt neben dem ^{18}F -fluoracylierten Avidin immer unmarkiertes Avidin vor.

Die spezifische Aktivität markierter Proteine ist jedoch auch ohne Trennung wegen des hohen Molekulargewichtes relativ groß. Markiert man z.B. 1 mg eines Proteins (bei einem Molekulargewicht von 100 kD sind dies nur 10 nMol) mit einer Aktivität von 370 MBq (10 mCi), erhält man eine spezifische Aktivität von 37000 GBq / mmol (1000 Ci / mmol) ohne jegliche Trennung.

2.2.2.4 Nachweis der Bindungsfähigkeit ^{18}F -fluormarkierten Biotins und Avidins

Der Erhalt der Bindungsfähigkeit der Markierungsprodukte kann für Biotinderivate durch Inkubation mit Avidin und anschließender Prüfung des Verhältnisses von proteingebundener zu freier Aktivität bestimmt werden. Dies kann erneut durch Gel-chromatographie erfolgen. Für alle in dieser Arbeit markierten Biotinderivate konnte so ein praktisch vollständiger Erhalt der Bindungsfähigkeit zu Avidin gezeigt werden.

Für den Fall des durch ^{18}F -Fluoracylierung markierten Avidins wurde dies durch Bindung an immobilisiertes Biotin nachgewiesen (Entsprechende Affinitäts-Chromatographiematerialien sind im Handel erhältlich).

Der Test beruht darauf, daß Avidin im leicht sauren bis leicht alkalischen pH-Bereich fest an Biotin bindet, während 6 M Guanidin-HCl bei pH 1,5 zu einer Dissoziation des Komplexes führt [131]. In Abbildung 46 ist ein Beispiel für diesen Test auf Bindungsaffinität dargestellt:

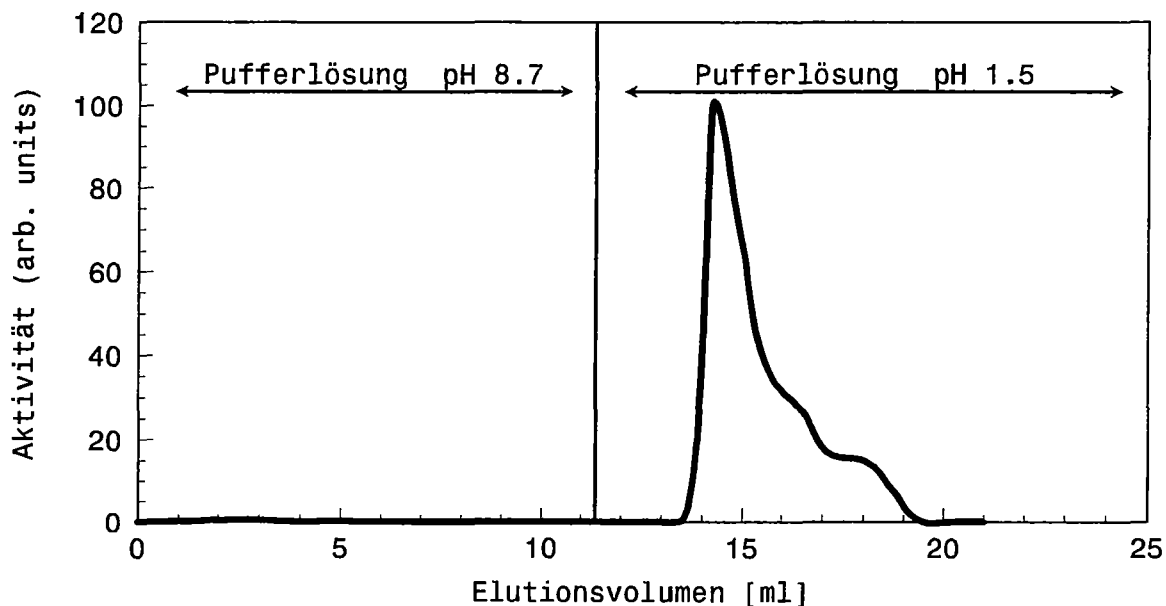


Abbildung 46: Affinitätschromatographie zum Test der Bindung von ^{18}F -fluoracyliertem Avidin an Biotin (0 - 11,5 ml: Elution mit pH 8,7 Pufferlösung, ab 11,5 ml: Elution mit pH 1,5 / 6 M Guanidin)

Unter den Komplex schonenden Elutionsbedingungen bei pH 8,7, wird eine praktisch quantitative Bindung des markierten Avidins an das festphasenfixierte Biotin festgestellt. Die so an Biotin gebundene Radioaktivität kann unter den neutralen pH-Bedingungen nicht eluiert werden. Erst unter dissoziativen Bedingungen (hier ab 11,5 ml) eluiert die Aktivität vollständig von der Säule und bestätigt das in der Literatur [131] beschriebene Verhalten vollständig.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die hier entwickelte Methode der ^{18}F -Fluoracylierung eine Markierung von Proteinen mit hoher radiochemischer Ausbeute unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität gestattet.

2.3 Vergleich der ^{18}F -Fluorierungsreagenzien

Die Radiofluorierung nicht-aktivierter Ester ist der erste gemeinsame Schritt aller Methoden zur Darstellung von ^{18}F -Fluoracylierungsreagenzien ohne Trägerzusatz. Die Radiofluorierung aliphatischer bromierter bzw. tosylierter Vorläufer gestattet im Falle der 2-Halopropionsäurederivate die Synthese optisch aktiver Acylierungsreagenzien. Diese können nach Bedarf als racemisches Gemisch oder enantiomerrein erhalten werden.

Ein Vorteil der aliphatischen Ester gegenüber dem aromatischen 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäureester liegt in ihrer höheren Reaktivität. Dies ist dem induktiven Effekt des Fluors in direkter Nachbarschaft zur aktivierten Esterfunktion zu verdanken. Unter den aliphatischen ^{18}F -Fluoracylierungsreagenzien ist der p-Nitrophenylester das beste Reagenz. Es wird vorteilhaft in organischen Lösungsmitteln eingesetzt. In speziellen Fällen der Acylierung von sehr schwachen Nukleophilen kann auf das extrem reaktive 2- ^{18}F -Fluorpropionsäurechlorid zurückgegriffen werden.

Für die Acylierungen von Peptiden in wässriger Lösung ist die fluoraromatische Verbindung wegen des sehr günstigen Aminolyse zu Hydrolyse Verhältnisses am besten geeignet.

Die Methode der ^{18}F -Fluoramidierung kann mit Vorteil eingesetzt werden, falls acylaktivierte Zielmoleküle erhältlich sind. Wegen der kürzeren nur zwei Stufen erfordernden Synthese sind hier höhere Ausbeuten als bei der Fluoracylierung erzielbar.

Nicht vollständig geklärt ist die in-vivo Anwendung der aus den unterschiedlichen Methoden resultierenden Amide. Dies muß in weiterführenden Studien abgeklärt werden. Als Anhaltspunkt bezüglich einer enzymatischen in-vivo Defluorierung kann jedoch der Vergleich der in Knochen gefundenen Aktivität von Versuchstieren dienen. Bei ^{18}F -fluoracyliertem Biotinhydrazid wurden 60 Minuten nach Injektion $0,54 \pm 0,12$ % ID / g in den Knochen von Ratten festgestellt, während für das durch Fluoramidierung erhältliche 3- ^{18}F -Fluorpropylamid-Derivat des Biotins ein Wert von 2,94 % ID / g angegeben wird [125].

3. Experimentelles

3.1 Chemikalien, Geräte und analytische Verfahren

3.1.1 Chemikalien

Die Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien und sonstiger Materialien werden bei den einzelnen Synthesen bzw. Verfahren genannt. Standardchemikalien wie Lösungsmittel, anorganische Salze etc. wurden von der Firma Merck in p.a-Qualität bezogen. Sonstige Feinchemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, über die Firmen Aldrich, Fluka, Pierce und Sigma bezogen.

Unter den Vorläufern die zur nukleophilen Substitution mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid eingesetzt wurden, waren die Methyl- und Ethylester der Bromessigsäure bzw. der 2-Brompropionsäure kommerziell erhältlich (Aldrich). Ebenfalls käuflich zu erwerben waren Benzylester (Fluka) und Trimethylsilylester (Fluka) der Bromessigsäure sowie Bromacetamid (Fluka). Alle anderen Vorläufersubstanzen wurden entsprechend Abschnitt 3.2 selbst dargestellt.

3.1.2 ^1H -NMR-, IR-, Massen-Spektroskopie, Schmelzpunktbestimmung und Elementaranalyse

Die selbst dargestellten nicht-radioaktiven Verbindungen (3.2) wurden durch IR- und ^1H -NMR-Spektroskopie charakterisiert. In vielen Fällen wurde dies durch Schmelzpunktbestimmung, Massenspektroskopie und / oder Elementaranalyse ergänzt.

^1H -NMR-Spektren wurden mit einem 80 MHz Gerät der Firma Bruker (Bruker WP-80) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen zu tiefem Feld sind in ppm (δ) gegen Tetramethylsilan (TMS) als internem Standard angegeben. Infrarotspektren wurden mit einem Gerät der Firma Shimadzu (IR-440) aufgenommen. Die Substanzen wurden entweder in Lösung oder als KBr-Pressling gemessen. Massenspektren wurden mit einem Finnigan (5100 SP) Spektrometer nach Elektronenstoßionisation aufgenommen. Der Probeneinlaß erfolgte direkt. Die Schmelzpunkte wurden mit einem Mettler FP-61 Gerät ermittelt. Die Werte wurden nicht korrigiert. Elementaranalysen wurden von der Zentralabteilung für chemische Analysen der KFA-Jülich durchgeführt.

3.1.3 HPLC und Radio-HPLC

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde mit einem System bestehend aus einer Merck-Hitachi Pumpe (L-6000) und einem Merck-Hitachi UV-Detektor (L-4000) durchgeführt. Zur Probenapplikation wurde ein Rheodyne Injektor (7125) benutzt. Zur Detektion der Radioaktivität wurde der Probenausgang des UV-Detektors direkt mit dem Probeneingang eines NaI(Tl)-Bohrloch Szintillationsdetektor verbunden. Zur Bestimmung radiochemischer Ausbeuten über die HPLC wurden 2 Aliquots der Proben über einen zweiten Injektor, der hinter der Trennsäule angeordnet war, injiziert. Die Integrale der Substanz- bzw. Aliquotpeaks wurden dann zueinander in Beziehung gesetzt. Die Meßdaten wurden mit einer Software (Ramona) der Firma Nuclear Interface (Datentechnik für Strahlungsmeßgeräte GmbH) erfaßt und bearbeitet. Zur Kontrolle wurden die Fraktionen der Substanzpeaks auch gesammelt und je nach Aktivität im γ -Counter oder in der Ionisationskammer gemessen (s. u.).

Zur Identifikation der Standards und zur Trennung bzw. Reinigung der radioaktiven Produkte wurden folgende Säulentypen der Firma CS-Chromatographie (Langerwehe) eingesetzt:

Lichrosorb RP-18, 7 μ , 250 X 4 mm

Lichrosorb RP-18, 10 μ , 250 X 10 mm

Lichrosorb SI-60, 5 μ , 250 X 4 mm

Nucleosil 5CN, 200 X 4mm

Die Flußraten betrugen 1,0 ml / min bei Verwendung analytischer Säulen bzw. 7,0 ml / min bei Verwendung von semipräparativen Säulen. Die Zusammensetzung der Eluentien und Retentionszeiten der fluorierten Verbindungen sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: HPLC-Bedingungen und k' -Werte der behandelten Fluorverbindungen an RP-18 Säulen

Verbindung	Eluens*	k' -Wert
2-Fluorpropionsäuremethylester	MeOH/H ₂ O=10/90	3,5
2-Fluorpropionsäureethylester	MeOH/H ₂ O=20/80	6,2
2-Fluorpropionsäure-9'-anthrylmethylester	MeCN/H ₂ O=40/60	5,6
2-Fluorpropionsäurebenzylester	MeOH/H ₂ O=60/40	1,8
2-Fluorpropionsäure-n-butylester	MeOH/H ₂ O=65/35	2,9
2-Fluorpropionsäure-2'-methylnaphtylester	MeOH/H ₂ O=60/40	5,8
2-Fluorpropionsäure-2'-methylanthrachinonester	MeOH/H ₂ O=60/40	7,1
Fluoressigsäureethylester	MeOH/H ₂ O=15/85	2,6
Fluoressigsäurebenzylester	MeOH/H ₂ O=50/50	2,6
Fluoressigsäure-t-butylester	MeOH/H ₂ O=50/50	3,0
2-Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester	MeCN/H ₂ O=50/50	4,6
Fluoressigsäure-4-nitrophenylester	MeOH/H ₂ O=40/60	2,6
2-Fluorpropionsäure-N-hydroxysuccinimidylester	Hexane/Dioxane=70/30	2,8**
2-Fluorpropionsäure-imidazolid	Hexane/Dioxane=80/20	2,2***
4-Fluorbenzoesäureethylester	MeCN/H ₂ O=50/50	3,5
4-Fluorbenzoesäure-N-hydroxysuccinimidylester	MeOH/H ₂ O=50/50	2,1
N-(±)-2-Fluorpropionyl-(L)-phenylalaninethylester	MeOH/H ₂ O=60/40	2,0****
N-(±)-2-Fluorpropionyl-β-alaninethyl ester	MeOH/H ₂ O=30/70	2,6
N-(±)-2-Fluorpropionyl-glycinmethylester	MeOH/H ₂ O=10/90	2,4

N-(±)-2-Fluorpropionyl-(±)-alanyl-(±)-alanin	MeOH/H ₂ O=10/90	1,8****
N-(±)-2-Fluorpropionyl-benzoylhydrazin	MeOH/H ₂ O=10/90	4,0
2-Fluorpropionsäuredibutylamid	MeCN/H ₂ O=65/35	1,8
2-Fluorpropionsäure-n-butylamid	MeOH/H ₂ O=30/70	6,0
(±)-2-Fluorpropionsäure-2'-butylamid	MeOH/H ₂ O=30/70	4,0****
2-Fluorpropionsäure-homoveratrylamid	MeOH/H ₂ O=55/45	2,4
2-Fluorpropionsäure-benzylamid	MeOH/H ₂ O=40/60	3,4
2-Fluorpropionsäure-2'-fluorethylamid	MeOH/H ₂ O=10/90	1,9
2-Fluorpropionsäure-2'-trifluorethylamid	MeOH/H ₂ O=10/90	5,4
2-Fluorpropionsäure-toluidid	MeOH/H ₂ O=50/50	2,5
(±)-2-Fluorpropionyl-(D)phe ¹ -(ε-Boc-Lys ⁵)-octreotid	MeOH/H ₂ O=80/20	2,5
(±)-2-Fluorpropionyl-(D)phe ¹ -octreotid	MeOH/H ₂ O=60/40	4,5
N-t-Butoxycarbonyl-3-Fluorpropylamin	MeOH/H ₂ O=50/50	2,3
N-t-Butoxycarbonyl-2-Fluorethylamin	MeOH/H ₂ O=50/50	1,5
N-Acetyl-3-Fluorpropylamin	MeOH/H ₂ O=10/90	1,4
N-t-Butoxycarbonyl-N'-2'-fluorpropionylpiperazin	MeOH/H ₂ O=60/40	1,1
N-t-Butoxycarbonyl-4-fluorpiperidin	MeOH/H ₂ O=60/40	3,0
2-Fluorpropionylpiperidin	MeOH/H ₂ O=40/60	2,3
Fluoracetamid	MeOH/H ₂ O=5/95	0,3
2-Fluorpropionylamid	MeOH/H ₂ O=10/90	0,6
Biotin-2'-fluorethylester	MeOH/H ₂ O=30/70	9,0
Biotin-3'-fluorpropylamid	MeOH/H ₂ O=30/70	3,0
N-2-(R)-Fluorpropionyl-N'-Biotinyl-pentandiamin	MeOH/H ₂ O=40/60	2,2

*Alle Eluenten enthielten 0.1% HOAc; ** Si60 Säule; *** 5CN Säule; **** Zentrum der Diastereomeren

3.1.4 Radio-DC

Zur Trennung radioaktiver Substanzgemische mittels Dünnschichtchromatographie wurden 0,5-3,0 µl Proben auf das Dünnschichtmaterial (Merck Si-60-F₂₅₄ auf Aluminiumfolie) aufgetragen und entsprechend den Angaben bei den einzelnen Verbindungen (vgl. Radiosynthesen, Abschnitt 3.4) entwickelt. Die Chromatographiestreifen wurden dann je nach Untersuchungszweck in Abschnitte geteilt und die Radioaktivität der Einzelstücke im Gammacounter (Packard-Cobra) bestimmt.

Die häufigste Anwendung der DC bestand in der schnellen Untersuchung der organisch gebundenen Fluoraktivität bei nukleophilen Substitutionen mit n.c.a. [¹⁸F]Fluorid. Zu diesem Zweck wurde eine Probe des Fluorierungsansatzes auf die Dünnschichtplatte aufgetragen und mit Acetonitril als mobiler Phase entwickelt. Das [¹⁸F]Fluorid bleibt an der Startzone liegen, während die meisten der untersuchten, organischen Fluorverbindungen unter diesen Bedingungen mit der Solvensfront wandern.

3.1.5 Sonstige Radioaktivitätsmessungen

Bei Radioaktivitätsmessungen, die nicht mittels chromatographischer Verfahren (s.o) erfolgten (z.B die Messung von Aktivität in Spritzen, Sep-Pak-Kartuschen, Reaktionsgefäßen etc.), wurden je nach Geometrie und / oder Aktivität unterschiedlich verfahren.

Zur Bestimmung radioaktiver Proben höherer Aktivität (> 37 kBq) wurden die Messungen in einer Ionisationskammer der Firma Capintec durchgeführt. Im Falle niedriger Radioaktivität (< 37 kBq) wurden die Messungen in einem Bohrloch Gamma-Probenwechsler der Firma Packard (Typ Cobra) durchgeführt. Da in beiden Fällen nur Relativmessungen bei gleicher Meßgeometrie durchgeführt wurden, war eine jeweilige Bestimmung der Detektorzählausbeuten nicht notwendig.

3.2 Darstellung von Vorläuferverbindungen zur nukleophilen Substitution mit [^{18}F]Fluorid

3.2.1 Allgemeines Herstellungsverfahren von ($\pm$)-2-Brompropionsäureestern

Diese Verbindungen wurden zur Untersuchung geeigneter Esterkomponenten als Ausgangsverbindung zur Darstellung von [^{18}F]Fluoressig- bzw. 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure benötigt (vgl. 2.1.3.1). Die Darstellung von ($\pm$)-2-Brompropionsäure-9'-anthrylmethylester ist als ein typisches Beispiel zur Darstellung dieser bromierten Vorläufer ausführlich beschrieben.

($\pm$)-2-Brompropionsäure-9'-anthrylmethylester

wurde durch langsames Zutropfen von 1,2 ml (11,5 mmol) ($\pm$)-2-Brompropionylbromid (Fluka) in 10 ml Dichlormethan (Merck) zu einer Lösung von 1,75 g (8,4 mmol) 9-Anthrylmethanol (Aldrich) und 1,2 ml (8,6 mmol) Triethylamin (Aldrich) in 100 ml Dichlormethan gebildet. Nach dem Ende des Zutropfens wurde die Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach mehrmaligem Waschen mit Natriumhydrogencarbonatlösung und 0,01 N Salzsäure in einem Scheidetrichter, wurde die organische Phase mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels unter Vakuum wurde das Rohprodukt aus Methanol / Wasser umkristallisiert. Es wurden 2,0 g (70%) des Esters in Form orangeroter Kristalle erhalten:

Schmp.: 101°C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,78 (d, 3H, methyl), 4,37 (q, 1H, methin), 6,20 (s, 2H, methylen), 7,35-8,48 (m, 9H, aromatisch); IR (CCl_4) [cm^{-1}]: 1729(C=O); Elementaranalyse: $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{BrO}_2$ (343,22 g/mol); berechnet: C 62,99%, H 4,41%, Br 23,28% gefunden: C 62,63%, H 4,19%, Br 23,55%

($\pm$)-2-Brompropionsäurebenzylester

Farbloses Öl; NMR (CDCl_3): 1,81 (d., 3H, methyl), 4,39 (q., 1H, methin), 5,18 (s., 2H, methylen), 7,35 (s., 5H, aromatisch); Elementaranalyse: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{BrO}_2$ (243,10 g/mol); berechnet: C 49,40%, H 4,56%, Br 32,87% gefunden: C 51,26%, H 5,03%, Br 29,60%

(±)-2-Brompropionsäure-n-butylester

Farbloses Öl; NMR (CDCl₃): 0,93 (t., 3H, methyl), 1,0-2,0 (m., 4H, methylen), 1,81 (d., 3H, methyl), 4,14 (t., 2H, methylen), 4,34 (q., 1H, methin)

(±)-2-Brompropionsäure-2'-methylnaphtylester

Farbloses Öl; NMR (CDCl₃): 1,80 (d., 3H, methyl), 4,42 (q., 1H, methin), 5,33 (s., 2H, methylen), 7,35-7,95 (m., 7H, aromatisch)

(±)-2-Brompropionsäure-2'-methylanthrachinonester

Farbloses Öl; NMR (CDCl₃): 1,88 (d., 3H, methyl), 4,48 (q., 1H, methin), 5,38 (s., 2H, methylen), 7,45-8,43 (m., 7H, aromatisch); IR (KBr) [cm⁻¹]: 1735(C=O); 1677(C=O)

Als Vorläufer zur Synthese des ¹⁸F-fluoraromatischen Acylierungsreagenz (vgl. 2.1.6.2) wurde **4-(Trimethylammonium-trifluormethansulfonat)-benzoesäureethylester** dargestellt. Die Darstellung erfolgte analog der Vorschrift von Haka et al. [28]. 1.9 g (10 mmol) 4-Dimethylaminbenzoesäureethylester wurde in 20 ml Ether gelöst gefolgt von 0.8 ml (7 mmol) Methyltriflat. Nach 2 Stunden wurden die ausgefallenen Kristalle abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. Es wurden 2.2 g (88%) des Produktes erhalten

Schmp: 122°C (Lit.: 112-114°C); NMR (DMSO-d₆): 1,35 (t., 3H, methyl), 3,65 (s., 9H, methyl), 4,38 (q., 2H, methylen), 8.13 (s., 4H, aromatisch).

(S)-2-Tosyloxypropionsäure-ethylester

Dieses Tosylat wurde ausgehend von (S)-2-Hydroxypropionsäureethylester (Aldrich) nach der Methode von Chan et al. [132] synthetisiert und als Vorläufer zu enantiomer reinen ¹⁸F-Fluoramiden eingesetzt (vgl. 2.1.7.4). Die Ausbeute betrug 3,4 g (80 %):

Schmp: 31°C (Lit.(Chan): 31,5-32,5°); NMR (CDCl₃): 1,18 (t, 3H, methyl), 1,49 (d, 3H, methyl), 2,43 (s, 3H, methyl), 4,10 (q, 2H, methylen), 4,93 (q, 1H, methin), 7,18-7,93 (m, 4H, aromatisch); IR (CCl₄) [cm⁻¹]: 1760, 1736 (C=O), 1378, 1187 (SO₂).

(S)-2-Dansyloxypropionsäuremethylester

Dieses Sulfonsäureester, (vgl. 2.1.4.2) wurde analog dem oben beschriebenen Tosylat hergestellt und aus Methanol / Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute der grün-fluoreszierenden, kristallinen Verbindung betrug 40%.

Schmp: 74°C; NMR (CDCl₃): 1,48 (d., 3H, methyl), 2,90 (s., 6H, methyl), 3,51 (s., 3H, methyl), 4,94 (q., 1H, methin), 7,13-8,70 (m., 6H, aromatisch); IR (KBr) [cm⁻¹]: 1767, 1757 (C=O), 1360, 1210, 1179 (SO₂); C₁₆H₁₉NSO₅ (337,38 g/mol); MS: m/z (relative Intensität) 373 (M⁺, 78), 251 (100), 234 (7), 170 (42), 154 (21), 127 (19).

3.2.2 Darstellung von quaternären Ammoniumsalzen

Die folgenden Trimethylammonium- und Pyridiniumsalze wurden zur Untersuchung der Fluorierung an Vorläufern mit ionischen Abgangsgruppen (vgl. 2.1.4.1) eingesetzt:

N-(Trimethylammonium-trifluormethansulfonat)-glycinethylester

Diese Verbindung wurde durch Lösen von 0,2 ml des Dimethylamino-glycinethylesters (Aldrich) in Dichlormethan und anschließender Zugabe von 0,3 ml Methyltriflat (Aldrich) hergestellt. Nach 2-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurden die entstandenen Kristalle abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet.

Schmp: 76°C; NMR (DMSO-d₆): 1,25 (t., 3H, methyl), 3,20 (s., 9H, methyl), 4,21 (q., 2H, methylen), 4,38 (s., 2H, methylen); IR (KBr) [cm⁻¹]: 1750 (C=O), 1258 (SO₂)

(Pyridinium-bromid)-essigsäureethylester

Diese Verbindung wurde durch Alkylierung von Pyridin (Merck) mit Bromessigsäureethylester (Aldrich) erhalten. Je 1 ml der Edukte wurden ohne Lösungsmittel zusammengegeben und 30 Minuten gerührt. Die entstandene sirupöse Mischung wurde dann mit Diethylether versetzt. Die ausgefallenen Kristalle wurden abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

Schmp: 134°C; NMR (DMSO-d₆): 1,25 (t., 3H, methyl), 4,23 (q., 2H, methylen), 5,80 (s., 2H, methylen), 8,13-9,30 (m., 5H, aromatisch); IR (KBr) [cm⁻¹]: 1738 (C=O)

(2'-Brompyridinium-bromid)-essigsäureethylester

Diese Verbindung wurde durch Alkylierung von 2-Brompyridin (Merck) mit Bromessigsäureethylester (Aldrich) erhalten. Je 1 ml der Edukte wurden erneut ohne Lösungsmittel gerührt und 30 Minuten bei 90°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit Diethylether versetzt. Die ausgefallenen Kristalle wurden abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

NMR (DMSO-d₆): 1,25 (t., 3H, methyl), 4,30 (q., 2H, methylen), 5,90 (s., 2H, methylen), 7,35-8,75 (m., 4H, aromatisch)

3.2.3 Darstellung Boc-geschützter Amine

Die folgenden bromierten bzw. dansylierten, Boc-geschützten Amine wurden zur Untersuchung geeigneter Vorläufer zur ¹⁸F-Fluoramidierung (vgl. 2.2.1.1) eingesetzt

Die Darstellung der Boc-geschützten Bromalkylamine erfolgte nach einer allgemeinen Vorschrift zur Einführung der Schutzgruppe von Einhorn et al. [133] in Aminhydrochloride durch Ultraschallbehandlung einer methanolischen Suspension des Hydrochlorids und Natriumhydrogencarbonat.

***N*-t-Butoxycarbonyl-3'-brompropylamin**

farbloses Öl; NMR (CDCl₃): 1,45 (s., 9H, methyl), 2,05 (t. v. t, 2H, methylen), 3,29 (d. v. t, 2H, methylen), 3,45 (t., 2H, methylen), 4,65 (breit, 1H, N-H)

***N*-t-Butoxycarbonyl-2'-bromethylamin**

farbloses Öl; NMR (CDCl₃): 1,48 (s., 9H, methyl), 3,48 (d. v. t, 2H, methylen), 3,50 (t., 2H, methylen), 5,00 (breit, 1H, N-H) IR (CHCl₃) [cm⁻¹]: 1707 (C=O)

***N*-t-Butoxycarbonyl-4-dansyloxypiperidin**

Die Synthese erfolgte analog (S)-2-Dansyloxypropionsäuremethylester. NMR (CDCl₃): 1,40 (s., 9H, methyl), 1,63 (m., 4H, methylen), 2,90 (s., 6H, methyl), 3,38 (m., 4H, methylen), 4,70 (m., 1H, methin), 7,15-8,70 (m., 6H, aromatisch); IR (CHCl₃) [cm⁻¹]: 1678 (C=O);

3.2.4 *Darstellung von Brompropionylamiden*

Die folgenden Verbindungen wurden zur Untersuchung der direkten nukleophilen n.c.a. [^{18}F]-Fluorierung von Amiden in Zusammenhang mit der nukleophilen Substitution an Biotindervaten dargestellt (vgl. 2.2.2.1)

2-Brompropionylpiperidin

Wurde durch Umsetzung von Piperidin mit 2-Brompropionylbromid in wässriger Kaliumcarbonatlösung erhalten. Nach dem Ausschütteln mit Essigester und Waschen der organischen Phase mit Hydrogencarbonat und verdünnter Salzsäure wurde das Lösungsmittel mit Natriumsulfat getrocknet, abrotiert und die Verbindung als farbloses Öl erhalten.

NMR (CDCl_3): 1,38-2,0 (m, breit, 6H, Piperidin-H); 1,83 (d., 3H, methyl), 3,13-3,9 (m, breit, 4H, Piperidin-H), 4,60 (q., 1H, methin); IR (CHCl_3) [cm^{-1}]: 1637 (C=O)

Bis-2-brompropionylpiperazin

Diese Verbindung wurde durch Zugabe eines 10-fach molaren Überschusses von 2-Brompropionylbromid über Piperazin (Fluka) in einer wässrigen Kaliumcarbonatlösung erhalten. Das Produkt fiel sofort aus und konnte nach einigen Minuten abfiltriert werden.

Schmp.: 162°C ; ^1H -NMR (CDCl_3): 1.84 (d, 6H, methyl), 3,0-4,3 (m, breit, 8H, Piperazin-H) 4,56 (q, 2H, methin), IR (KBr) [cm^{-1}]: 1648 (C=O);

2-Brompropionsäure-n-butylamid

Die korrespondierende ^{18}F -Fluorverbindung wurde als Modellverbindung zur Serumstabilitätskontrolle von ^{18}F -fluoracylierten Aminen eingesetzt (vgl. Seruminstabilität des fluorierten Biotinesters in Kap. 2.2.2.1). Die Darstellung erfolgte analog einer Vorschrift von Weaver und Whaley [134]. Zu einer 0,1molaren Lösung des Amins in Dichlormethan wurde unter Kühlung (Eisbad) 0,05 Mol 2-Brompropionylbromid eingetropft. Die ausfallenden Hydrobromide wurden abfiltriert und das Filtrat mit verdünnter Salzsäure und Hydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde destilliert und 46 % der theoretischen Ausbeute erhalten:

farbloses Öl; ^1H -NMR (CDCl_3): 1,00 (t., 3H, methyl), 1,13-1,75 (m., 4H, methylen), 1,91 (d., 3H, methyl), 3,33 (d. v. t, 2H, methylen), 4,90 (q., 1H, methin), 6,13-6,75 (1H, amid)

Essigsäure-3'-brompropylamid

Diese Verbindung wurde sowohl zu nukleophilen Substitutionszwecken mit [^{18}F]Fluorid als auch zur Darstellung des analogen Fluorstandards benötigt. Die analoge Fluorverbindung wurde als Produkt der Optimierung der Reaktionsbedingung zur ^{18}F -Fluoramidierung (s. 2.2.1.3) untersucht. Die Darstellung erfolgte durch Acetylierung des Bromamins in wässriger Lösung mit Essigsäureanhydrid bei pH 9.

farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,98 (s., 3H, methyl), 2,08 (t. v. t, 2H, methylen), 3,39 (d. v. t, 2H, methylen), 3,45 (t., 2H, methylen), 6,43 (breit, 1H, N-H)

3.2.5 Biotin-2'-bromethylester

Die Darstellung erfolgte durch Rühren einer Lösung von 325 mg (1,5 mmol) Biotin (Merck) mit 700 μl (8 mmol) Dibromethan (Aldrich) in 10 ml trockenem DMF (Fluka) in Gegenwart von 230 μl (1,5 mmol) Diazabicycloundecen (DBU) als Base. Nach 24 Stunden wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der Rückstand mit Ether digeriert. Das Rohprodukt enthielt noch freies Biotin. Daher wurde der Brombiotinester mit Acetonitril extrahiert und nach Entfernen des Lösungsmittels mit Hydrogencarbonatlösung digeriert. Der Rückstand wurde erneut mit Ether gewaschen und getrocknet. Es wurden 126 mg des Esters erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 1.1-1,8 (m., 6H, methylen), 2,30 (t., 2H, methylen), 2,65 (s., breit, 1H, methylen), 2,79 (d, 1H, methylen), 3,13 (m, 1H, methin), 3,68 (t., 2H, methylen), 4,0-4,4 (m., 2H, methin), 4,35 (t., 2H, methylen), 6,38 (breit, 2H, N-H)
 IR (KBr) [cm^{-1}]: 1730 (C=O, Ester), 1700 (C=O, Harnstoff); Elementaranalyse: $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}_3\text{S}$ (351,26 g/mol); berechnet: C 41,03%, H 5,45%, Br 22,75%
 gefunden: C 40,13%, H 5,91%, Br 21,63%

3.3 Synthese inaktiver Referenzverbindungen (Chromatographie-standards)

(±)-2-Fluorpropionsäuremethylester

wurde analog der von Block et al. [43] beschriebenen Methode dargestellt. Farblose Flüssigkeit: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,55 (d. v. d., $J = 24$ Hz, 3H, methyl), 3,75 (s., 3H, methyl), 4,98 (d. v. d., $J = 49$ Hz, 1H, methin); IR (CCl_4) [cm^{-1}]: 1761, 1737 (C=O).

(±)-2-Fluorpropionsäureethylester

wurde in leicht modifizierter Form einer Methode dargestellt, die für Fluoressigsäureethylester von Bergmann und Blank [135] beschrieben wurde. Eine Mischung von 166 g KF (getrocknet bei 150°C für 2,5 Stunden), 150 g getrocknetem (durch eiwöchiges Aufbewahren in einem Exsiccator über P_2O_5) Acetamid (Merck) und 100 g (±)-2-Brompropionsäureethylester (Fluka) wurde bei 100°C über eine Dauer von 3 Stunden gerührt. Die Acetamidschmelze wurde dann mit Ether extrahiert und fraktioniert destilliert. Die Destillation ergab 24 g des reinen Esters als farblose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,28 (t., 3H, methyl), 1,55 (d. v. d., $J = 24$ Hz, 3H, methyl), 4,26 (q., 2H, methylen), 5,00 (d. v. q., $J = 49$ Hz, 1H, methin); IR (CCl_4) [cm^{-1}]: 1765, 1737 (C=O).

(±)-2-Fluorpropionsäure-9'-anthrylmethylester

wurde analog der unter 3.2.1 beschriebenen Bromverbindung unter Benutzung Von Fluorpropionsäurechlorid dargestellt.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,52 (d. v. d., $J=23$ Hz, 3H, methyl), 5,00 (d. v. q., $J = 48$ Hz, 1H, methin), 6,25 (s., 2H, methylen), 7,30-8,52 (m, 9H, aromatisch); IR (CCl_4) [cm^{-1}]: 1764(C=O), 1739(C=O); MS: m/z (relative Intensität) 282 (M^+ , 32), 207 (4), 191 (100).

(±)-2-Fluorpropionsäurechlorid

Die Darstellung dieses Säurechlorids (vgl. Dolbier et al., [136]) wurde durch Verseifung von 23,7 g (±)-2-Fluorpropionsäureethylester mit 7,9 g NaOH in 70 ml einer Wasser-Methanol Mischung eingeleitet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittelgemisches wurden 22,5 g des Natriumsalzes der Fluorpropionsäure erhalten. Das trockene Salz wurde mit 140 g PCl_5 (Aldrich) vermischt und unter Rühren und vorsichtigem Erhitzen das leicht flüchtige Fluorpropionsäurechlorid abdestilliert. Auf diese Weise konnten 15 ml dieses Säurechlorids als farblose Flüssigkeit erhalten werden:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,71 (d. v. d., $J = 23$ Hz, 3H, methyl), 5,18 (d. v. q., $J = 48$ Hz, 1H, methin); IR (CCl_4) [cm^{-1}]: 1830, 1792 (C=O).

(±)-2-Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester

Dieser Aktivester wurde ausgehend von 2-Fluorpropionat dargestellt, welches durch Hydrolyse von 514 mg (4.1 mmol) 2-Fluorpropionsäureethylester mit 5 ml einer 20 %-igen Tetrabutylammoniumhydroxidlösung (Merck) erhalten wurde. Nach azeotroper Trocknung mit mehreren Portionen Acetonitril wurden 632 mg (3.1 mmol) Chlorameisensäure-p-nitrophenylester (Aldrich) in 5 ml trockenem Acetonitril (Merck) zugegeben. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mit 10 ml wasserfreiem Ether extrahiert und filtriert. Der Lösung wurden weitere 50 ml Ether zugefügt und in einem Scheidetrichter mit verdünnter HCl gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels wurden 196 mg (30%) des Produktes erhalten:

Schmp: 81.1°C ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,80 (d. v. d., $J = 23$ Hz, 3H, methyl), 5,30 (d. v. q., $J = 48$ Hz, 1H, methin), 7,25-8,37 (m, 4H, aromatisch); IR (KBr) [cm^{-1}]: 1771, 1751 (C=O); Elementaranalyse: $\text{C}_9\text{H}_8\text{FNO}_4$ (213,16 g/mol); berechnet: C 50.71%, H 3.78%, F 8.91%, N 6.57%, gefunden: C 50.55%, H 3.77%, F 9.02%, N 6.71%.

Fluoressigsäure-p-nitrophenylester

wurde durch Zugabe von 500 mg (2.45 mmol) Chlorameisensäure-p-nitrophenylester in 3 ml trockenem Acetonitril zu 193 mg (2,45 mmol) Fluoressigsäure (Merck) und einer Lösung von 0,35 ml (2,45 mmol) Triethylamin in 3 ml Acetonitril gegeben. Die Mischung wurde 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das gebildete Triethylaminhydrochlorid wurde abfiltriert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Dann wurden 20 ml Ether zugegeben und im Scheidetrichter mit verdünnter HCl gewaschen. Nach Trocknen mit Natriumsulfat wurde abfiltriert und der Ether abgedampft, wobei 430 mg (87%) des Rohproduktes erhalten wurden. Umkristallisation aus Petrolether (60/80) ergab weiße Kristalle:

Schmp: 96°C ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 5,18 (d., $J = 46$ Hz, 2H, methylen), 7,35-8,43 (m, 4H, aromatisch); IR (KBr) [cm^{-1}]: 1774 (C=O); Elementaranalyse: $\text{C}_8\text{H}_6\text{FNO}_4$ (199.13 g/mol); berechnet: C 48,25%, H 3,04%, F 9,54%, N 7,03%, gefunden: C 48,77%, H 3,04%, F 9,68%, N 7,10%.

(±)-2-Fluorpropionsäure-N-hydroxysuccinimidylester

wurde durch Zugabe von 200 mg (0.97 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (Fluka) zu einer Lösung von 92 mg (1,0 mmol) 2-Fluorpropionsäure und 115 mg (1 mmol) N-hydroxysuccinimid in 10 ml Dichlormethan erhalten. Die Mischung wurde 3 Stunden gerührt und der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Die Zugabe von 2 ml Ether führte zur vollständigen Abscheidung des Harnstoffs. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde ein Produkt erhalten, welches wegen der außerordentlich hohen Hydrolyseneigung dieses Aktivesters (wie im NMR-Spektrum ersichtlich) mit freiem N-Hydroxysuccinimid kontaminiert war.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,77 (d. v. d., $J = 23$ Hz, 3H, methyl), 2,75 (s., freies NHS), 2,88 (s., 4H, NHS), 5,38 (d. v. q., $J = 48$ Hz, 1H, methin); IR (KBr) [cm^{-1}]: 1818, 1787, 1736 (C=O).

(±)-2-Fluorpropionsäureimidazolid

wurde durch Zugabe von 22 mg (0,2 mmol) (±)-2-Fluorpropionsäurechlorid zu einer Suspension von 13,6 mg (0,2 mmol) Imidazol (Merck) und 14 mg K_2CO_3 in 1 ml CDCl_3 erhalten. Die Mischung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der Überstand wurde dann direkt spektroskopiert, da alle Versuche das Imidazolid zu isolieren zu dessen Zersetzung führten:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,78 (d. v. d., $J = 24$ Hz, 3H, methyl), 5,58 (d. v. q., $J = 48$ Hz, 1H, methin), 7,19 (q., 1H, C4-Imi.), 7,61 (q., 1H, C5-Imi.), 8,36 (br.s, 1H, C2-Imi.); IR (CDCl_3) [cm^{-1}]: 1745 (C=O).

4-Fluorbenzoesäure-N-hydroxysuccinimidylester

wurde analog Vaidyanathan et al. [76] durch Zugabe von 1,2 ml (8,6 mmol) Triethylamin zu einer Lösung von 1,0 g (7,13 mmol) 4-Fluorbenzoesäure (Fluka) and 2,74 g (10,7 mmol) di-(N-Succinimidyl)-carbonat (Fluka) in 30 ml trockenem Acetonitril bei 50°C erhalten. Die Lösung wurde weitere 2 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum abdestilliert und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Nach mehrmaligem Waschen mit NaHCO_3 -Lösung und 0,01 N HCl in einem Scheidetrichter, wurde die organische Phase getrocknet, filtriert und nach Entfernen des Lösungsmittels 0.9 g (51 %) des Produktes erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 2,90 (s., 4H, NHS); 7,07-7,35 (m, 2H, aromatisch); 8,07 - 8,35 (m, 2H, aromatisch).

Allgemeines Herstellungsverfahren von (±)-2-Fluorpropionsäureamiden

Diese Verbindungen wurden als chromatographische Standards zur Identifizierung der radioaktiven Produkte der n.c.a. ^{18}F -Fluorpropionylierungsreaktionen benötigt. Sie wurden analog einer Methode, die von Sawicki [137] zur

Darstellung von Fluoracetylamiden beschrieben wurde dargestellt. Die Präparation von ***N-(±)-2-Fluorpropionyl-(L)-phenylalaninethylester*** ist als ein typisches Beispiel ausführlich beschrieben:

120 mg (1.1 mmol) (±)-2-Fluoropropionsäurechlorid wurde tropfenweise zu einer Lösung von 230 mg (1,0 mmol) L-Phenylalaninethylester (Sigma) in Form des Hydrochlorids und 150 mg (2.2 mmol) Imidazol in 5 ml Dichlormethan gegeben. Die Mischung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde mit verdünnter Salzsäure und Hydrogencarbonatlösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden 80 mg (32%) des Amids als Diastereomerenpaar erhalten. Die unten beschriebenen Amide wurden analog dargestellt, wobei Ausbeuten zwischen 10 und 70% erhalten wurden.

N-(±)-2-Fluorpropionyl-(L)-phenylalaninethylester:

Schmp.: 52°C; ¹H-NMR (CDCl₃): 1,25 (t., 3H, methyl), 1,50 (d., v. d., J = 24 Hz, 1,5H, methyl), 1,58 (d. v. d., J = 24 Hz, 1,5H, methyl), 3,16 (d., 2H, benzyl), 4,21 (q., 2H, methylen), 4,88 (m., 1H, methin), 4,98 (d. v. q., J = 48Hz, methin), 6,5-7,0 (b, 1H, Amid), 7,0-7,45 (m, 5H, aromatisch); IR (KBr) [cm⁻¹]: 1735, 1658 (C=O); Elementaranalyse: C₁₄H₁₈FNO₃ (267.30 g/mol); berechnet: C 62,91%, H 6,79%, N 5,24%, gefunden: C 62,78%, H 6,69%, N 5,31%.

N-(±)-2-Fluorpropionyl-β-alaninethylester

farbloses Öl; ¹H-NMR (CDCl₃): 1,25 (t., 3H, methyl), 1,55 (d. v. d., J = 25 Hz, 3H, methyl), 2,56 (t., 2H, methylen), 3,60 (d. v. t., 2H, methylen), 4,20 (q., 2H, methylen), 5,00 (d. v. q., J = 50 Hz, 1H, methin), 6,90 (1H, amid); IR (CDCl₃) [cm⁻¹]: 1714, 1688 (C=O); MS, m/z: (relative Intensität) 191(M⁺,54), 146(80), 116(88), 98(100), 74(70), 70(79), 55(81).

N-(±)-2-Fluorpropionyl-glycinmethylester

farbloses Öl; ¹H-NMR (CDCl₃): 1,57 (d. v. d., J = 24 Hz, 3H, methyl), 3,78 (s., 3H, methyl), 4,09 (d., 2H, methylen), 5,03 (d. v. q., J = 48 Hz, 1H, methin), 6,82 (s.(br), 1H, amid); IR (Film auf KBr) [cm⁻¹]: 1745, 1669 (C=O); MS, m/z: (relative Intensität) 163(M⁺,58), 132(51), 116(75), 104(78), 88(78), 56(81), 47(100).

N-(±)-2-Fluorpropionyl-(±)-alanyl-(±)-alanin

farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $^1\text{H-NMR}$ (CD_3CN): 1,25-1,88 (m., 9H, methyl), 4,4 (m., 2H, methin), 5,05 (d. v. q., $J = 48$ Hz, 1H, methin), 7,0 ((br.), 2H, amid); IR (CDCl_3) [cm^{-1}]: 1716, 1650 (C=O); MS, m/z : (relative Intensität) 234(M^+ , 2), 207(8), 169(10), 141(45), 118(100), 99(50), 90(31), 70(79), 55(67).

N-(±)-2-Fluorpropionyl-N'-benzoylhydrazin

Schmp.: 148°C ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,48 (d. v. d., $J = 25$ Hz, 3H, methyl), 5,02 (d. v. q., $J = 49$ Hz, methin), 6,7-8,3 (m, 7H, aromatisch und amid); IR (KBr) [cm^{-1}]: 1696, 1648 (C=O); Elementaranalyse: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}_2$ (210,20 g/mol); berechnet: C 57,14%, H 5,27%, N 13,33%, F 9,03%, gefunden: C 57,23%, H 5,27%, N 13,35%, F 9,13%.

(±)-2-Fluorpropionsäure-n-butylamid

farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,00 (t., 3H, methyl), 1,15-1,62 (m., 4H, methylen), 1,58 (d. v. d., $J = 25$ Hz, 3H, methyl), 3,30 (d. v. t, 2H, methylen), 4,90 (d. v. q., $J = 49$ Hz, methin), 6,0-6,5 (1H, amid); IR (CCl_4) [cm^{-1}]: 1678 (C=O); Elementaranalyse: $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{FNO}$ (147,19 g/mol); berechnet: C 57,12%, H 9,59%, N 9,52%, gefunden: C 56,76%, H 9,75%, N 9,71%.

(±)-2-Fluorpropionsäure-2'-butylamid

farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 0,90 (t., 3H, methyl), 1,15 (d., 3H, methyl), 1,48 (d. v. q., 2H, methylen), 1,55 (d. v. d., $J = 25$ Hz, 3H, methyl), 3,95 (m, 1H, methin), 4,98 (d. v. q., $J = 49$ Hz, methin), 6,05 (1H, amid); IR (CCl_4) [cm^{-1}]: 1686 (C=O); Elementaranalyse $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{FNO}$ (147,193 g/mol); berechnet: C 57,12%, H 9,59%, N 9,52%, found: C 56,90%, H 9,71%, N 9,57% .

(±)-2-Fluorpropionsäure-homoveratrylamid

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,62 (d. of d., $J = 25$ Hz, 3H, methyl), 2,79 (t., 2H, methylen), 3,56 (d. v. t., 2H, methylen), 3,88 (s., 6H, methoxy), 5,08 (d. v. q., $J = 49$ Hz, 1H, methin), 6,38 (br, 1H, amid), 6,6-7,0 (m., 3H, aromatisch); IR (CDCl_3) [cm^{-1}]: 1666 (C=O); MS, m/z : (relative Intensität) 255(M^+ , 15), 164(100), 151(74), 135(7), 107(10), 91(7), 77(10).

(±)-2-Fluorpropionsäure-benzylamid

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,60 (d. of d., $J = 25$ Hz, 3H, methyl), 4,52 (d.(br.), 2H, methylen), 5,08 (d. v. q., $J=49$ Hz, 1H, methin), 6,7 (br., 1H, amid), 7,08-7,55 (m., 5H, aromatisch); IR (CCl_4) [cm^{-1}]: 1684 (C=O); MS, m/z : (relative Intensität) 181(M^+ , 32), 106(16), 91(100), 77(10), 65(10)

(±)-2-Fluorpropionsäure-2'-fluorethylamid

farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 1,38 (d. v. d., $J = 25$ Hz, 3H, methyl), 3,38 (d. v. d. of t, $J = 26$ Hz, 2H, methylen), 4,45 (d. v. t., $J = 49$ Hz, 2H, methylen), 5,00 (d. v. q., $J = 48$ Hz, 1H, methin), 8,28 (br., 1H, amid); IR (CCl_4) [cm^{-1}]: 1676 (C=O); MS, m/z : (relative Intensität) 137(M^+ ,20), 117(8), 104(15), 90(62), 76(100), 70(18), 62(15), 56(38).

(±)-2-Fluorpropionsäure-2'-trifluorethylamid

Schmp.:55,5°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 1,40 (d. v. d., $J = 25$ Hz, 3H, methyl), 3,38-4,25 (m., 2H, methylen), 5,10 (d. v. q., $J = 49$ Hz, 1H, methin), 8,80 (br., 1H, amid); IR (KBr) [cm^{-1}]: 1675 (C=O); MS, m/z : (relative Intensität) 173(M^+ ,61), 154(34), 126(80), 106(97), 89(100), 83(33), 76(38), 69(34), 56(53).

(±)-2-Fluorpropionsäure-toluidid

Schmp.:38,2°C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,60 (d. v. d., $J = 25$ Hz, 3H, methyl), 2,28 (s., 3H, methyl), 5,12 (d. v. q., $J = 50$ Hz, methin), 7,0-7,6 (m., 4H, aromatisch), 7,95 (1H, amid); IR (CHCl_3) [cm^{-1}]: 1673 (C=O); Elementaranalyse $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FNO}$ (181,12 g/mol); berechnet: C 66,28%, H 6,67%, N 7,73%, F 10,48% gefunden: C 66,41%, H 6,60%, N 7,80%, F 10,60%.

Essigsäure-3-fluorpropylamid

Diese Standardverbindung wurde durch nukleophilen Fluor-für-Brom Austausch an der analogen Bromverbindung erhalten. Dazu wurde mit azeotrop getrocknetem Tetramethylammoniumfluorid in Acetonitril gearbeitet.

farbloses Öl; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,5-2,2 (m., 2H, methylen), 2,07 (s. 3H, methyl), 3,40 (d. v. t, 2H, methylen), 3,93 (d. v. t., 2H, methylen), 6,0 (breit, N-H)

((±)-2-Fluorpropionyl-(D)phe¹)-octreotid ([¹⁹F]SDZ 223-228)

Die Synthese dieser Standardverbindung wurde durch tropfenweise Zugabe von 3 μl 2-Fluorpropionsäurechlorid zu einer Lösung von 25 mg Boc-Lys⁵-Octreotid und 16,8 μl 2,6-di-*t*-Butylpyridin in 2,5 ml Acetonitril eingeleitet. Die Mischung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe 1,5 ml Trifluoressigsäure zugegeben. Nach 5 Minuten wurde die Säure wieder abgezogen und der Rückstand in 1 ml Acetonitril aufgenommen. Durch Zusatz von 1 ml Ether wurde das Rohprodukt präzipitiert. Zur weiteren Reinigung wurde das Peptid mittels HPLC (LiChrosorb RP18, 10 μm , 60 MeOH/ 40 H_2O mit 3.6g NaCl und 0.1% Essigsäure; 7ml/min) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Peptid in Butanol aufgenommen, mit Wasser gewaschen und das Lösungsmittel

entfernt. Es wurden 8,1 mg des Produktes erhalten.

Die Struktur wurde durch FAB-Massenspektroskopie (Sandoz, Basel) und ^1H -NMR-Spektroskopie bestätigt. Das ^1H -NMR-Spektrum in DMSO-d_6 zeigte die Signale des Octreotids (Wynants et al. [138]) mit den zusätzlichen Signalen der Fluorpropionylgruppe bei 1,44 ppm (d. v. d) und 4,9 ppm (d. v. q). MS, m/z: (relative Intensität) 1093(100, M^+), 963(6), 565(7), 303(11), 338(35), 275(43)

3.4 Darstellung sonstiger Verbindungen

Die quaternären 4-Dimethylaminopyridiniumverbindungen wurden zum Nachweis der Derivatisierung von 2-Bromessig- bzw. 2-Brompropionsäurealkylestern mit DMAP dargestellt. Dies diente zur Abtrennung der Bromvorläufer von den analogen ^{18}F -Estern unter Vermeidung einer HPLC-Trennung (vgl. 2.1.4.3). Sie wurden durch lösungsmittelfreie Umsetzung von DMAP mit den 2-Bromcarbonsäureestern und Waschen der ausgefallenen Pyridiniumsalze mit Diethylether erhalten.

(4-Dimethylaminopyridinium-bromid)-essigsäureethylester

^1H -NMR (DMSO-d_6): 1,23 (t., 3H, methyl), 3,23 (s., 6H, methyl), 4,21 (q., 2H, methylen), 5,22 (s., 2H, methylen), 7,10 (d., 2H, aromatisch); 8,25 (d., 2H, aromatisch)

2-(4'-Dimethylaminopyridinium-bromid)-propionsäureethylester

^1H -NMR (DMSO-d_6): 1,20 (t., 3H, methyl), 1,73 (d., 3H, methyl), 3,23 (s., 6H, methyl), 4,19 (q., 2H, methylen), 5,48 (s., 1H, methin), 7,08 (d., 2H, aromatisch); 8,35 (d., 2H, aromatisch)

Kalium-p-nitrophenolat

Wurde zur Umsetzung von 2- ^{18}F Fluorpropionsäurechlorid zum entsprechenden Nitrophenylester benötigt (vgl. 2.1.6.4).

Das Kaliumsalz wurde durch Ausfällen aus methanolischer Lösung mit Diethylether erhalten. Die methanolische Lösung enthielt einen 1,5-fachen Überschuß von Nitrophenol über KOH, um ein Mitfällen von Kaliumhydroxid zu vermeiden.

Hydroxybenzotriazol Kaliumsalz

wurde analog dem oben beschriebenen Kalium-p-nitrophenolat dargestellt. Es wurde in Versuchen zur Acylierung von Boc geschütztem Octreotid eingesetzt (vgl. 2.1.8).

3.5 Radiosynthesen

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

N.c.a. [^{18}F]Fluorid wurde über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion am Babyzyklotron BC 1710 (JSW) des Instituts für Nuklearchemie der KFA-Jülich produziert. Das verwendete Target ist in Abbildung 48 dargestellt.

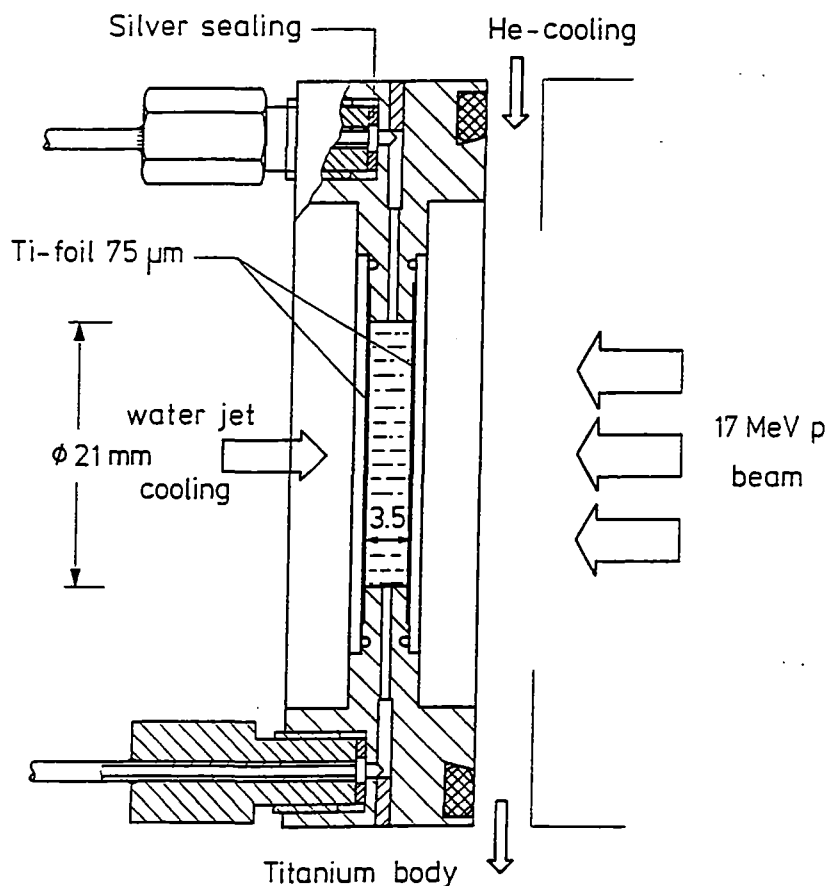


Abbildung 48: Schnittbild des H_2O -Targets zur Produktion von [^{18}F]Fluorid über die Kernreaktion $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ [aus 6].

Die Targetzelle besteht aus einem Titankörper. Zwei Titanfolien bilden die Targetfenster. Der Innendurchmesser des Targets beträgt 21 mm. Die Dicke der eingeschlossenen Wasserschicht beträgt 3,5 mm. Damit ist das Volumen des Targets zu 1,2 ml bestimmt.

Während der Bestrahlung wird das Eintrittsfenster mit Helium auf -7°C , das Austrittsfenster auf $+8$ bis 10°C gekühlt. Das bestrahlte Wasser ist zu 98 % mit [^{18}O]Sauerstoff angereichert. Die Bestrahlung erfolgt mit 17 MeV Protonen bei einem Strahlstrom von zumeist 25 μA . Während der Bestrahlung steigt der Druck im Target auf 5,5 bis 6,8 bar an.

In Abbildung 48 ist die Ausbeute der ^{18}F -Fluoraktivität in Abhängigkeit von Strahlstrom und Strahlzeit graphisch dargestellt

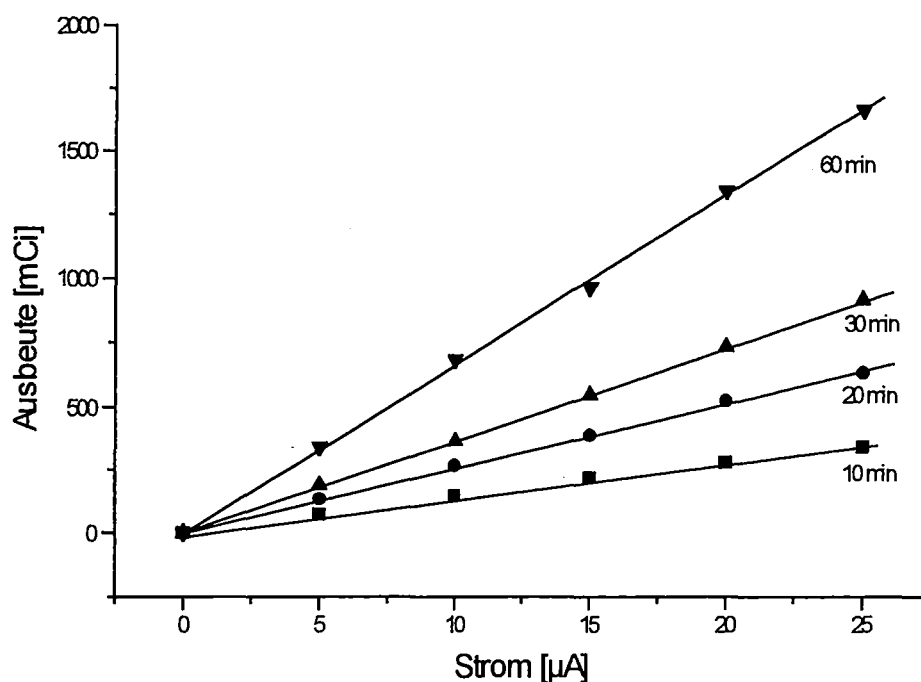


Abbildung 48: Produktion von [^{18}F]Fluorid in Abhängigkeit von Strahlstrom und Strahlzeit [nach 139].

Die Abbildung zeigt, daß im untersuchten Bereich eine lineare Abhängigkeit der ^{18}F -Aktivitätsausbeute von Strahlstrom und Strahlzeit vorliegt. Innerhalb einer Stunde können somit Aktivitäten von über 50 GBq (1,5 Curie) erzeugt werden.

Nach dem Ende der Bestrahlung wird der Inhalt des Targets mit Hilfe eines Heliumgasstromes von 1,3 bar aus dem Target in die Synthesebox geleitet. Hier kann das teure, angereicherte Wasser durch Fixierung des [^{18}F]Fluorids auf einem Anionentauscher (z.B. BioRad AG 1X8 in Carbonatform) zurückgewonnen werden. Schließlich wird das [^{18}F]Fluorid je nach Bedarf mit Kaliumcarbonat, -hydrogencarbonat oder -hydroxid eluiert und dann zu Synthesezwecken eingesetzt.

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

Allgemeine Vorschrift zur nukleophilen Substitution mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid an substituierten Essig- oder Propionsäurederivaten

Die wässrige ^{18}F -Fluoridlösung (10-100 μl , 75-750 MBq) wurde in ein konisch zulaufendes Reaktionsgefäß (Reactivial; 2,5 ml) gegeben, daß bereits 0,5 ml trockenes Acetonitril (Merck, <0.003% H_2O), 5.0 mg Kryptofix 222 (Merck) und 5 μl einer 1,0 M Kaliumcarbonatlösung (Merck, Suprapur) enthielt. Das Lösungsmittel wurde unter Zuhilfenahme eines Inertgasstromes bei einer Badtemperatur von 90°C abdestilliert. Dieser azeotrope Trocknungsschritt wurde mit 300 μl Portionen von Acetonitril solange (je nach Volumen der eingesetzten ^{18}F -Fluoridlösung) wiederholt, bis ein trockener Rückstand erhalten wurde. Dieser Rückstand wurde mit 250 μl einer Lösung der jeweils zur nukleophilen Substitution vorgesehenen Vorläufer (zumeist 5-10 mg eines bromierten Esters) wieder in Lösung gebracht. Das Reaktionsgefäß wurde geschlossen und für definierte Zeiten (meist 5-15 min) bei 90°C erhitzt.

3.5.3 N.c.a. ^{18}F -Fluoracylierung via 2- ^{18}F Fluorpropionsäuremethylester

Die Acylierung von Aminen via 2- ^{18}F Fluorpropionsäuremethylester (vgl. 2.1.1) wurde in Zweihalskolben (5ml) mit Rückflußkühler durchgeführt. Die gewünschte Menge der Amine wurde in 1,0 ml Methanol gelöst. In Fällen, in denen das Hydrochlorid der Amine vorlag, wurde zusätzlich eine äquimolare Menge Triethylamin zugegeben. Zu dieser Lösung wurden 50 μl des 2- ^{18}F Fluorpropionsäuremethylester Ansatzes in Acetonitril pipettiert. Die Acylierungsreaktionen wurden 20 Minuten bei der Rückflußtemperatur des Lösungsmittels durchgeführt.

3.5.4 N.c.a. ^{18}F -Fluoracylierung via 2- ^{18}F Fluorpropionsäureaktivestern

Nach der in 3.5.2 beschriebenen nukleophilen Substitution, wegen der geringen Flüchtigkeit bevorzugt am 2-Brompropionsäure-9'-anthrylmethylester, wurde der Ester mittels HPLC [semipräparative RP-18 Säule; CH_3CN / H_2O (0.2% HOAc) = 60 / 40, v/v] isoliert. Die Produktfraktion wurde aufgefangen und das organische Lösungsmittel weitgehend abrotiert. Der lipophile Ester wurde anschließend auf einer aktivierten Sep-Pak C-18 Kartusche (Waters, 360 mg) fixiert

und mit 5 ml H₂O gewaschen. Die Aktivität wurde mit 2,5 ml Diethylether in ein zweites Reaktionsgefäß eluiert und der Ether vertrieben. Alternativ wurde die Reinigung des ¹⁸F-fluorierten Esters durch DMAP-Derivatisierung des Vorläufers vorgenommen (s. Kap. 2.1.4.3). Bei dieser Variante wurde bevorzugt der rein aliphatische n-Butylester eingesetzt.

Zur Hydrolyse des Esters wurden 250 µl Methanol und 250 µl einer "Verseifungslösung" (10,0 mg Tetramethylammoniumhydroxid-Pentahydrat (Aldrich) sowie 0,5 ml 45% Trimethylamin (Aldrich) in 9,5 ml H₂O) zugegeben und erneut bei geschlossenem Gefäß für 5 Minuten bei 90°C erhitzt. Im Anschluß daran, wurde das Wasser zusammen mit dem flüchtigen Trimethylamin durch azeotrope Destillation entfernt (3 X 1 ml Acetonitril). Der Rückstand enthielt das Tetramethylammoniumsalz der 2-[¹⁸F]Fluorpropionsäure.

Zur Bildung des Aktivesters wurde eine Lösung von 5 mg des gewünschten Aktivierungsreagenz (Bis-p-nitrophenyl- oder Bis-N-succinimidylcarbonat) in 250 µl Acetonitril zugegeben. Bei der Herstellung von Imidazoliden wurde zunächst 125 µl einer Lösung von Benzoesäure (6,0 mg) in Acetonitril und danach 125 µl einer Lösung des Carbonyldiimidazols (8,0 mg) in Acetonitril zugegeben, und erneut bei 90°C für 5 Minuten erhitzt.

Für einige Acylierungsexperimente (vgl. Tabelle 9) wurden 50 µl der nicht aufgetrennten Reaktionslösung zu 1,0 ml einer 0.1 M Lösung der Amine in Acetonitril (also hohem Überschuss von Amin zu Aktivierungsreagenz) gegeben und Aliquots hinsichtlich der Produktverteilung via HPLC analysiert.

Für Experimente mit chromatographisch gereinigten [¹⁸F]Fluorpropionsäure-p-nitrophenylestern wurde das Reaktionsgemisch über eine semipräparative C-18 Säule aufgetrennt. Die Fraktion, die den ¹⁸F-p-Nitrophenylester enthielt, wurde gesammelt, das Acetonitril unter Vakuum abdestilliert und der ¹⁸F-Aktivester in der zurückbleibenden sauren, wässrigen Lösung auf C-18 Sep-Pak Kartusche fixiert. Das Restwasser auf der C-18 Kartusche wurde mit Hilfe von Stickstoff weitgehend entfernt. Schließlich wurde der ¹⁸F-Aktivester mit Ether oder Dichlormethan über ein System von Silicagel- und MgSO₄-Trockenkartuschen eluiert.

Unmittelbar vor der Acylierung eines Amins wurde zunächst das leicht flüchtige Lösungsmittel entfernt, und das Amins in Wasser oder organischer Lösung (je nach Untersuchung) zugegeben.

3.5.5 **Darstellung von n.c.a. 4-[¹⁸F]fluorobenzoessäure -N-hydroxysuccinimidylester**

Die Radiosynthese dieses n.c.a. ¹⁸Fluoroacylierungsreagenzes (vgl. 2.1.6.2) beginnt mit der Herstellung von 4-[¹⁸F]Fluorobenzoessäureethylester analog der Vorschrift von Haka et al. [27]. Die wässrige [¹⁸F]Fluoridlösung (10-50 µl, 75-370 MBq) wurde in ein 2,5 ml Reaktionsgefäß überführt, daß bereits eine Lösung von 0,5 ml trockenem Acetonitril (Merck, <0.003% H₂O), 5.0mg Kryptofix-222 (Merck) und 5 µl einer 1,0 M Kaliumcarbonatlösung (Merck, Suprapur) enthielt. Zu Vergleichszwecken wurde alternativ mit 10 µl einer 1 M Kaliumhydrogencarbonatlösung (Merck p.a.) oder 10 µl einer 1,0 M Tetramethylammonium-hydrogencarbonatlösung gearbeitet. Das Wasser wurde durch azeotrope Destillation entfernt (s.o.), mit einer Lösung von 10 mg des Aryltrimethylammoniumtriflatvorläufers in 250 µl wasserfreiem Dimethylacetamid (Aldrich) versetzt, und bei 95°C für 10 Minuten erhitzt.

Zur Hydrolyse des gebildeten Ethylesters wurden 0,5 ml einer 1,0 M NaOH-Lösung zugegeben und weitere 8-10 Minuten bei 95°C erhitzt. Nach dem Ansäuern mit 0,65 ml 1 M HCl wurde die Lösung auf 2,5 ml mit Wasser verdünnt und die 4-[¹⁸F]Fluorbenzoessäure auf einer aktivierten C-18 Sep-Pak-Kartusche (Waters, 360 mg) fixiert. Die Kartusche wurde mit 2,0 ml 0,01 M HCl gespült und mittels eines Stickstoffstromes weitgehend getrocknet. Nach der Elution der Aktivität mit 2,5 ml Acetonitril in ein zweites Reaktionsgefäß wurden 10 µl einer 20%igen Tetrabutylammoniumhydroxidlösung (Merck) zugegeben und erneut azeotrop getrocknet. Zuletzt wurde eine Lösung von 15 mg Bis-N-hydroxysuccinimidylcarbonat in 300 µl Acetonitril zugegeben und erneut 5-10 Minuten bei 95°C erhitzt.

Die radiochemischen Ausbeuten wurden durch Messen der Gesamtaktivität vor und nach den einzelnen Reaktionsschritten sowie durch HPLC-Analysen von Aliquots ermittelt.

3.5.6 **Abtrennung von Bromvorläufern durch Quaternisierung mit 4-Dimethylaminopyridin**

Nach beendeter nukleophiler Substitution, wie unter 3.5.2 beschrieben, wurde den Ansätzen 4-Dimethylaminopyridin (20 mg / 250 µl) zugesetzt und erneut 10 Minuten bei 100°C gerührt. Danach wurde mit 0,1 M Salzsäure verdünnt und der ¹⁸F-fluorierte Ester, der vom DMAP nicht angegriffen wird, auf einer aktivierten C-18 Sep-Pak Kartusche (Waters 360 mg) fixiert. Durch die Kartusche wurde nochmals 10 ml 0,01M Salzsäure und schließlich 5 ml Wasser gespült. Die ¹⁸F-Ester wurden mit Diethylether oder einem Diethylether/Acetonitril Gemisch über eine nachgeschaltete Si-60 Kartusche eluiert.

3.5.7 N.c.a ^{18}F -Fluoracylierung via 2- ^{18}F Fluorpropionsäurechlorid

Bei diesen Untersuchungen wurde bevorzugt 2- ^{18}F Fluorpropionsäurebutylester eingesetzt, der nach der oben beschriebenen DMAP-Derivatisierung des Bromvorläufers isoliert wurde. Die Elution des Butylesters erfolgte mit einem Gemisch (1/1, v/v) von Ether und Acetonitril. Der erste ml des Eluates wurde verworfen, während in den folgenden 2 ml etwa 95 % der auf der C-18 Kartusche fixierten Aktivität eluiert wurden. Das Lösungsmittelgemisch wurde abgedampft, bis ein Volumen von ca. 300 μl unterschritten wurde. Nach der Verseifung analog 3.5.4 wurde azeotrop getrocknet. Der Rückstand, der das 2- ^{18}F Fluorpropionat enthielt, wurde mit 250 μl einer Lösung des Dichlortriphenylphosphorans 5-10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. (Die Bildung des Säurechlorids wurde durch Pipettieren eines Aliquots in eine Butylaminlösung und anschließender HPLC-Analyse des Amids kontrolliert).

Die Acylierungen erfolgten durch Vakuumdestillation des 2- ^{18}F Fluorpropionsäurechlorids zusammen mit dem Lösungsmittel in eine Kühlfalle (-78°C ; Aceton-Trockeneis), die ein in Acetonitril gelöstes Amin als Vorlage enthielt.

Alternativ wurde das Säurechlorid mittels Vakuum durch eine mit Kaliumnitrophenolat gefüllte Kartusche destilliert, und von dieser als 2- ^{18}F Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester mit 2 ml Dichlormethan eluiert (vgl. 2.1.6.4). Weitere Reaktionen mit diesem Eluat wurden analog 3.5.4 durchgeführt.

3.5.8 Produktionsversuche von 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester (fernbediente Synthese in einer "heißen Zelle")

Abbildung 49 zeigt schematisch die Synthesemethode des 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-p-nitrophenylesters, die bei Arbeiten mit hohen Aktivitäten (> 3,7 GBq) angewandt wurde.

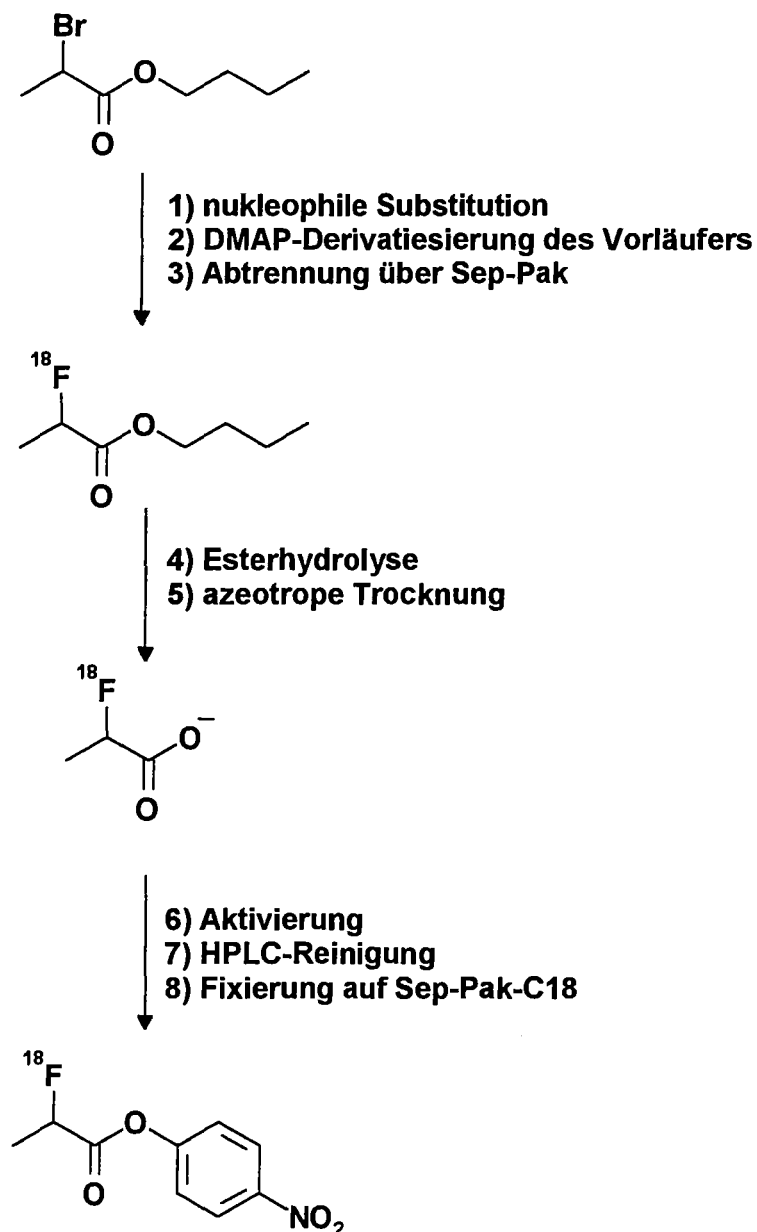


Abbildung 49: Reaktionssequenz zur fernbedienten Darstellung von 2-[^{18}F]Fluorpropionsäurep-nitrophenylester mit hoher Radioaktivität in einer Bleizelle

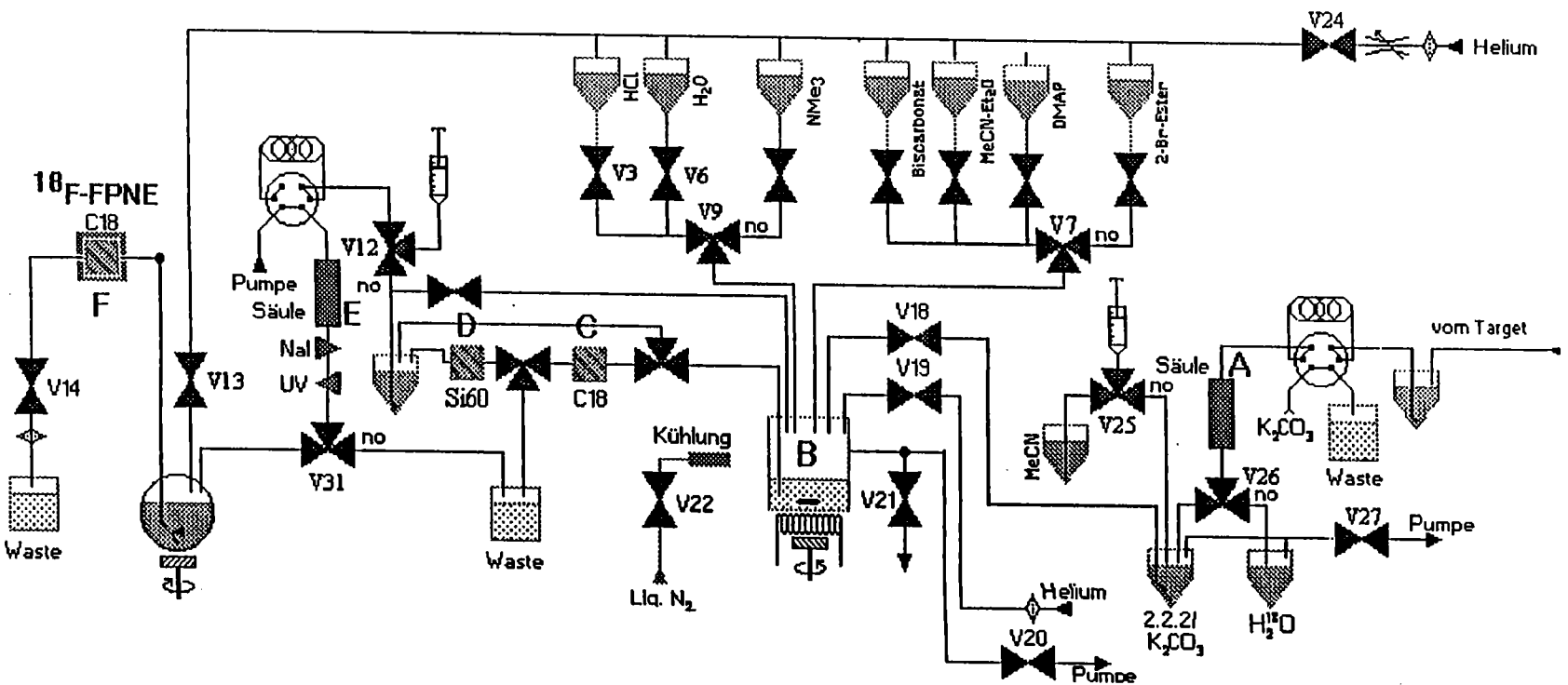


Abbildung 51: Schema der Apparatur zur Herstellung von 2-[¹⁸F]Fluorpropionsäurenitrophenylester analog
Reaktionssequenz der Abb. 50

Die verwendete Vorrichtung stellt eine Modifikation des für die Produktion von [^{18}F]FDG entwickelten Automaten dar [140]. Nach der Zyklotronbestrahlung zur Produktion des [^{18}F]Fluorids gelangt das ^{18}F -Targetwasser über eine Druckleitung vom Target in die Synthesebox. Zunächst wird zur Rückgewinnung des teuren, angereicherten [^{18}O]H $_2$ O Targetwassers das [^{18}F]Fluorid auf dem Ionentauscher (A) fixiert und anschließend mit Kaliumcarbonatlösung eluiert. Nach der Mischung mit dem Anionenaktivator (Kryptofix 2.2.2) gelangt die Fluoraktivität in den Reaktor (B) und unterliegt dort zunächst einer azeotropen Trocknung. Schließlich wird der in trockenem Acetonitril gelöste, bromierte Vorläufer zugegeben und 10 min bei 90°C erhitzt. Danach erfolgt die Derivatisierung des Bromvorläufers durch Zugabe von DMAP. Das Gemisch mit dem ^{18}F -Butylester wird mit Salzsäure verdünnt und auf einer Sep-Pak-C18 Kartusche (C) fixiert und schließlich über eine Silica-Kartusche (D) in den Reaktor (B) zurückgespült. Dort wird die Lösung eingedampft und der Ester durch Zugabe einer Trimethylamin-Lösung verseift. Der Lösung wird eine Spur Kaliumcarbonat zugesetzt, um die Bildung des Kaliumsalzes der Fluorpropionsäure zu erreichen. Das Trimethylammoniumsalz allein hätte bei dem sich anschließenden Trocknungsprozess zur Folge, daß sich das Salz thermisch in die jeweils flüchtigen Komponenten Trimethylamin und [^{18}F]Fluorpropionsäure zersetzt und aus dem Reaktor entweichen würde. Zur Bildung des aktivierten p-Nitrophenylesters wird schließlich eine Lösung von Bis-4-nitrophenylcarbonat in Acetonitril zugesetzt. Die Präparation des Aktivesters wird durch einen Reinigungsprozess via HPLC (E) abgeschlossen. Das Eluat der Aktivesterfraktion wird eingeeengt und schließlich auf einer C-18 Sep-Pak Kartusche (F) zur weiteren Nutzung fixiert.

Ein typisches Radiochromatogramm eines Produktionsversuches ist in Abbildung 51 gezeigt:

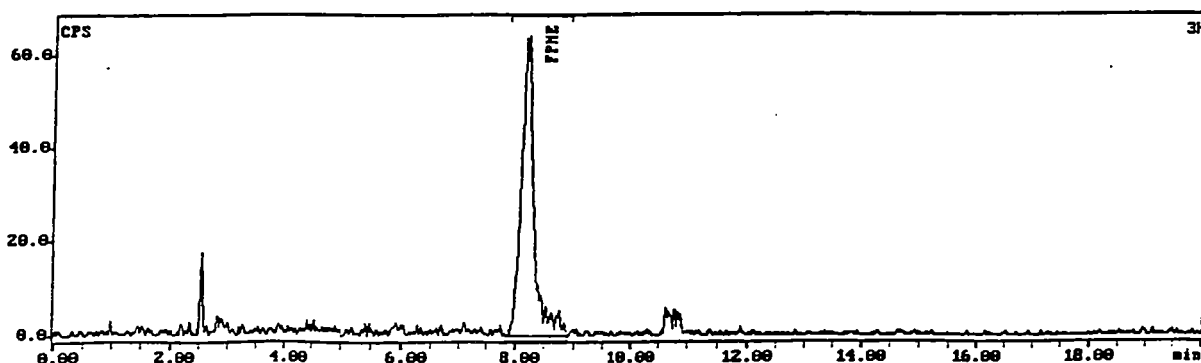


Abbildung 51: Radiochromatogramm eines Produktionsversuches von 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester; Chromatographiebedingungen: RP-18 250 X 20 mm 10 ml / min

Die Chromatographie macht deutlich, daß nur ein sehr kleiner Teil der Aktivität in Form von Nebenprodukten auftritt. Während im Totvolumen nicht umgesetztes Fluorpropionat (2,5 min) eluiert, findet sich die Hauptaktivität des ^{18}F -Aktivesters bei ca. 8 Minuten Retentionszeit. Eine vergleichsweise kleine Aktivitätsmenge findet sich noch bei 11 Minuten detektiert, wobei es sich um nicht vollständig verseiften Butylester handelt. Dennoch liegt der Anteil des Aktivesters bei ca. 90 %, was die Eignung des Syntheseprozesses deutlich macht.

3.5.9 Bestimmung der spezifischen Aktivität von 2- ^{18}F Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität dieses ^{18}F -Fluoracylierungsreagenzes wurde eine Eichkurve zur Massendetektion dieser Verbindung via HPLC ermittelt. Dazu wurde zunächst die optimale Wellenlänge zur Detektions durch Aufnahme eines UV-Spektrums des Esters zu 266 nm bestimmt. Eine definierte Menge der Standardverbindung wurde auf einer Analysenwaage abgewogen und in trockenem Acetonitril gelöst. Unterschiedliche Konzentrationen wurden durch Verdünnen mit Acetonitril hergestellt. Schließlich wurden die Peakflächen des UV-Signals gegen die jeweils injizierte Masse aufgetragen.

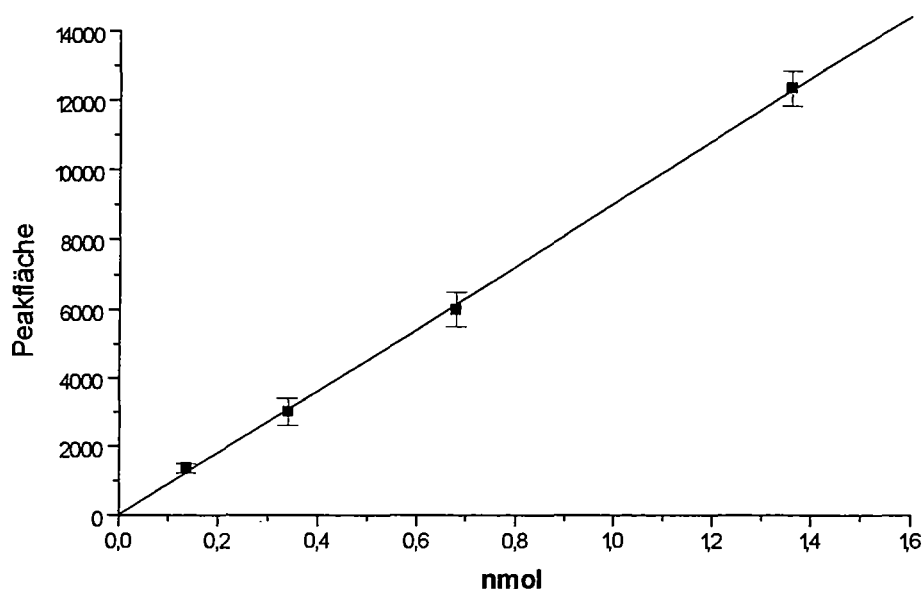


Abbildung 52: Eichgerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von 2- ^{18}F Fluorpropionsäure-p-nitrophenylester

Die Verbindung kann aufgrund der stark chromophoren Nitrogruppe im nanomolaren Bereich leicht nachgewiesen werden kann. Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität wurden an verschiedenen Tagen hergestellte Präparationen verwandt. Von diesen Präparaten wurde jeweils 1/30 des Gesamtvolumens aufgetrennt und somit die zugehörige Masse des Aktivesters bestimmt. Aus den ermittelten Peakflächen ergab sich ein Gesamtgehalt von 27 ± 3 nmol der Fluorverbindung in den Präparaten.

Bei einer maximal erzielten Ausbeute von 1,7 GBq entspricht dies einer bislang erreichten spezifischen Aktivität von 63 MBq / nmol (1700 Ci / mmol). Dieses ^{18}F -Fluoracylierungsreagenz erfüllt somit die hohen Anforderungen zur Markierung von Rezeptorliganden mit hoher spezifischer Aktivität.

3.5.10 N.c.a. ^{18}F -Fluoracylierung von Octreotid

((±)-2-[^{18}F]fluoropropionyl-(D)phe¹)-(ε-Boc-Lys⁵)-Octreotid

Zur ^{18}F -Fluoracylierung wurden 0,5 mg (ε-Boc-Lys⁵)-Octreotid, 1,0 mg 1-Hydroxybenzotriazol und 4 µl 2,6-Di-tert.-butylpyridin zu einer Lösung von (±)-2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-4-nitrophenylester in ca. 1,5 ml CH_2Cl_2 gegeben. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurde 1,0 mg 2,6-Di-tert.butyl-4-methyl-pyridin in 50 µl Acetonitril zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 Minuten bei 70°C erhitzt. Die Ausbeute wurde mittels DC kontrolliert. Auf Si-60 Platten (Merck, Si60F₂₅₄) und einem Chloroform/ Methanol/ 50% HOAc (7/3/1) Gemisch als mobiler Phase wies das acylierte Produkt einen R_f von 0,95 auf (ε-Boc-Lys⁵-octreotide: $R_f=0,4$).

((±)-2-[^{18}F]Fluoropropionyl-(D)phe¹-octreotid ([^{18}F]SDZ 223-228)

Durch Zugabe von 50 µl eines Acetonitril / 10 M HCl Gemisches (50/50; v/v) wurde die Boc-Schutzgruppe innerhalb von 3 min bei 20°C abgespalten. Die Reinigung des fluoracylierten, entschützten Peptids wurde mittels semipräparativer HPLC und einem Gradientensystem durchgeführt. [Eluens A: Wasser/ Acetonitril/ Phosphorsäure (900/100/6; v/v/v), pH zu 2,9 mit Triethylamin eingestellt.; Eluens B: Wasser/ Acetonitril (300/700; v/v); Gradient: 5-95% B in 20 Minuten, Flow: 7ml/min]

Die Produktfraktion von ca. 10 ml wurde gesammelt und die organische Phase am Rotationsverdampfer weitgehend entfernt. Die wässrige Lösung wurde durch eine Sep-Pak C-18 Kartusche (Waters, 360mg) gespült und mit 2 ml Wasser

gewaschen. Das markierte Peptid wurde mit 5 ml Methanol eluiert. Zu Injektionszwecken in Mäusen wurde der Alkohol entfernt, mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und über 0,22 µm Filter steril filtriert.

3.5.11 Allgemeine Darstellungsmethode von n.c.a ^{18}F -Fluor-Aminen

^{18}F -markierte Amine wurden zur Amidierung von aktivierten Carbonsäuren eingesetzt (vgl. 2.2.1).

Zu diesem Zweck wurden bromierte bzw. dansylierte, Boc-geschützte Amine zur nukleophilen Substitution eingesetzt (analog 3.5.2). Die Abtrennung der Markierungsvorläufer von der ^{18}F -fluorierten Verbindung wurde entweder durch HPLC oder durch Anwendung der DMAP-Methode (analog 3.5.6) vorgenommen. Die anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde durch Zusatz eines gleichen Volumens 5,0 molarer HCl erzielt. Das Wasser und HCl wurden durch azeotrope Destillation mit Acetonitril entfernt. Der Rückstand enthielt das Hydrochlorid des ^{18}F -Fluoramins welches dann je nach Untersuchung in Wasser oder organischen Lösungsmitteln zur Reaktion mit aktivierten Acylverbindungen gebracht wurde.

3.5.12 N.c.a. ^{18}F -Fluoramidierung aktivierter Carbonsäuren

Zur Optimierung der Fluoramidierung an aktivierten Carbonsäuren wurde Essigsäure-N-hydroxysuccinimidylester eingesetzt. Das ^{18}F -Amin (s. 3.5.11) wurde in Puffer gelöst und eine Lösung des Aktivesters in DMF zugesetzt. Das Verhältnis von Wasser zu DMF war mindestens 10 / 1.

Bei Verwendung organischer Solventien wurden Fluoramidierungen in Acetonitril und DMF durchgeführt. In solchen Fällen, z.B der Fluoramidierung von Biotin-p-nitrophenylester (vgl. 2.2.2.1) wurde der Reaktionslösung Triethylamin als Hilfsbase zugesetzt.

3.5.13 Direkte n.c.a. ^{18}F -Fluorierung des Biotin-2'-bromethylesters

Diese direkte ^{18}F -Fluorierungsreaktion wurde analog der allgemeinen Vorschrift in 3.5.2 durchgeführt. Die Aufarbeitung des fluorierten Produktes erfolgte mittels HPLC (vgl Tab. 13).

Zur Aufarbeitung des Produktes für Tierversuche wurde der organische

Lösungsmittelanteil der HPLC-Fraktion am Rotationsverdampfer entfernt, das Produkt auf einer Sep-Pak C-18 Kartusche fixiert und mit 4 ml Wasser gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2 ml Ethanol. Für Tierversuchszwecke wurde nach erneutem Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum, in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und über 0,22 µm Filter steril filtriert.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen der Entwicklung von Methoden zur n.c.a. ^{18}F -Fluormarkierung von Radiopharmaka für die Positronenemissionstomographie (PET) wurde die trägerarme Einführung von Fluor-18 in Peptide und Proteine unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität untersucht.

N.c.a [^{18}F]Fluorid wurde am Babyzyklotron des Instituts für Nuklearchemie der KFA-Jülich erzeugt. Die Einführung des [^{18}F]Fluorids ohne Trägerzusatz wurde zunächst unter Verwendung von Brompropionsäuremethylester durchgeführt, da dies in nur einem Schritt den als Acylierungsreagenz verwendbaren 2- ^{18}F Fluorpropionsäuremethylester liefert. Zur Evaluierung seiner Einsatzmöglichkeiten wurde die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Basizität der zu markierenden Amine in Form eines Brönstedplots quantifiziert. Dies ergab eine zu geringe Reaktivität für eine effiziente Markierung von α -Aminogruppen von Peptiden oder Proteinen. Die Einsatzmöglichkeiten dieses Reagenz bleiben daher auf spezielle Fälle der Markierung von Aminen sehr hoher Löslichkeit und hoher Basizität beschränkt.

Zur Darstellung reaktiverer Acylierungsreagenzien wurde daher eine dreistufige Syntheseroute via nukleophiler Fluorierung geschützter Carbonsäuren, anschließender Schutzgruppenabspaltung und Aktivierung der freien Carbonsäure entwickelt. Zur Einführung des n.c.a [^{18}F]Fluorids im ersten Schritt wurde die Markierung von Bromalkylestern hinsichtlich einer Carboxyschutzgruppe optimiert. Als günstigste Ester erwiesen sich die wenig flüchtigen Butyl- bzw. Anthrylmethylester. Zur Optimierung ihrer Isolierung wurde die Verwendung ionischer Abgangsgruppen untersucht. Die Einführung des Fluorids gelingt dabei mit hohen Ausbeuten an Dansylestern. Als weitere Alternative wurde auch die Quaternisierung von bromierten Markierungsvorläufern nach der ^{18}F -Fluorierung der Ester untersucht. Dies gelang mittels 4-Dimethylaminopyridin quantitativ. Eine einfache Festphasenextraktionsmethode erlaubt so die Abtrennung der ^{18}F -Fluor-carbonsäurealkylester von den Vorläufern unter Vermeidung aufwendigerer HPLC-Trennungen.

Die Hydrolyse der Ester unter Verwendung des flüchtigen Trimethylamins und Spuren von Tetramethylammoniumhydroxyd wurde ebenfalls optimiert. Die Aktivierung der gebildeten ^{18}F -Fluorcarboxylate wurde unter Bildung von Aktivestern, Imidazoliden und Säurechloriden eingehend untersucht. Im Falle der kleinen aliphatischen ^{18}F -Fluorcarboxylate erwies sich deren quantitative Reaktion mit Bis-4-nitrophenylcarbonat als optimal zur Darstellung der p-Nitrophenylester. Im Hinblick auf automatisierte Syntheseführungen empfahl sich auch die Darstellung dieses Aktivesters durch Umsetzung von Nitrophenolat mit dem ^{18}F -Säurechlorid. Dies

führte zwar zu geringeren radiochemischen Ausbeuten, ermöglichte jedoch die Darstellung des Acylierungsreagenz gänzlich ohne HPLC und mit Vorteilen bei der Synthesedauer. Es ist auch zur ^{18}F -Fluoracylierung von sehr schwachen Nukleophilen geeignet. Die direkte Umsetzung des Säurechlorids mit Aminen war jedoch auf Grund der extrem hohen Hydrolysetendenz des n.c.a. 2-[^{18}F]Fluorpropionsäurechlorids weniger geeignet als die Aktivester, die deshalb als ^{18}F -Fluoracylierungsreagenzien der Wahl anzusehen sind.

Die Umsetzung des n.c.a. 2-[^{18}F]Fluorpropionsäure-4-nitrophenylesters mit einer Vielzahl von Aminen unterschiedlicher Basizität und sterischer Hinderung zeigte die hohe Anwendungsbreite dieses Reagenz auf. In organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril oder DMF konnten in den meisten Fällen annähernd quantitative Umsetzungen zu Amiden erzielt werden. Bei erhöhten Temperaturen waren sogar schwach basische Anilinderivate mit hohen Ausbeuten acylierbar.

Im Falle des aromatischen Acylierungsmittels 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure-N-hydroxysuccinimidylester konnte die in der Literatur beschriebene radiochemische Ausbeute von 25 % durch die Anwendung der neuen Synthesemethoden auf 75 % gesteigert werden.

Für pharmakologische Untersuchungen mit Hilfe der PET wurde das Somatostatinanalogon Octreotid ^{18}F -fluoracyliert. Die ^{18}F -Fluoracylierung konnte mit ϵ -Boc-Lys⁵-Octreotid als Vorläufer selektiv am N-Terminus des Peptids durchgeführt werden. Das entschützte Peptid wurde mit 65 % radiochemischer Ausbeute, bezogen auf das Acylierungsreagenz, erhalten. Bindungsstudien an Rattencortexmembranen zeigten die fast unverändert hohe Affinität des fluoracylierten Produktes zum Somatostatinrezeptor mit einem pK_i von $8,6 \pm 0,2$ und eine praktisch unverändert hohe biologische Aktivität.

Als Alternative zur ^{18}F -Fluoracylierung wurde auch die inverse Reaktion, d.h. die Kopplung eines ^{18}F -markierten Amins mit aktivierten Acylverbindungen untersucht. Zu diesem Zweck wurde die nukleophile ^{18}F -Fluorierung an Boc-geschützten Aminen durchgeführt. Das kleine 3-Fluorpropylamin wurde als günstigstes Amin ausgewählt, da es hohe radiochemische Ausbeuten (> 90 %) bei seiner Synthese und hohe Reaktivität mit acylaktiven Verbindungen vereinigt. Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Reaktion von 3-[^{18}F]Fluorpropylamin mit Essigsäure-N-hydroxysuccinimidylester ergab optimale Ausbeuten bei $\approx$ pH 9. Bei diesem pH konnten annähernd quantitative radiochemische Ausbeuten bei sehr niedrigen Konzentrationen des Aktivesters (ca. 0,5 mM) erzielt werden.

So konnte das Vitamin Biotin sowohl durch ^{18}F -Fluoracylierung an einem Pentylaminderivat des Biotins als auch durch ^{18}F -Fluoramidierung von Biotinaktivestern markiert werden. Die radiochemischen Ausbeuten im Kopplungsschritt konnten jeweils quantitativ gestaltet werden. Am Beispiel der direkten nukleophilen

^{18}F -Fluorierung von Biotin-2'-bromethylester mit radiochemischen Ausbeuten von bis zu 70 % konnte gezeigt werden, daß auch direkte nukleophile Substitutionen mit ^{18}F -Fluorid an geeigneten Biotinvorläufern möglich sind. Das untersuchte ^{18}F -Fluorderivat wurde jedoch in-vivo schnell von Esterasen gespalten, so daß die ^{18}F -Fluoramidierung die bislang geeignetere Methode zur Darstellung von ^{18}F -Biotin darstellt. Komplementär zu ^{18}F -Biotinderivaten wurde auch das Biotin bindende Protein Avidin markiert. Das Protein konnte durch ^{18}F -Fluorpropionylierung in wässriger Lösung mit ca. 50 % radiochemischer Ausbeute markiert werden. Sowohl an ^{18}F -fluoracyliertem Avidin als auch an ^{18}F -fluoracyliertem oder ^{18}F -fluoramidiertem Biotin konnte der Erhalt der Bindungsfähigkeit affinitätschromatographisch validiert werden.

Durch diese neu entwickelten Markierungsmethoden wird es möglich, Substanzklassen wie Amine, Peptide und Proteine mit dem Positronemitter Fluor-18 zu markieren. Diese waren bislang einer effizienten Markierung nicht zugänglich. Das Spektrum Fluor-18 markierter Radiopharmaka kann damit bedeutend erweitert werden.

5. Literatur

- [1] G. Stöcklin; in Handbuch der medizinischen Radiologie, Band 15/1 B, Emissions-Computertomographie mit kurzlebigen zyklotronproduzierten Radionukliden; *Springer-Verlag* (1989)
- [2] K. Wienhard, R. Wagner, W.D. Heiss; PET - Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie; *Springer-Verlag* (1989)
- [3] G. Stöcklin; Chemie von Herz und Hirn von außen betrachtet; *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **34**, 1057 (1986)
- [4] P. F. Sharp, P. P. Dendy, W. I Keyes; Radionuclide Imaging Techniques; *Academic Press* (1985)
- [5] G. Stöcklin; Tracers for Metabolic Imaging of Brain and Heart; *Eur. J. Nucl. Med.* **19**, 527-551 (1992)
- [6] G. Stöcklin, V.W. Pike (eds.); Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography. Methodological Aspects; *Kluwer Academic Publishers* (1993)
- [7] M.A. Green and M.J. Welch; Gallium Radiopharmaceutical Chemistry; *Nucl. Med. Biol.* **16**, 435-448 (1988)
- [8] G. Stöcklin; in Principles of Nuclear Medicine, H.N. Wagner, Z. Szabo (eds.) (1995)
- [9] T. Ruth und A.P Wolf; Absolute cross sections for the production of ^{18}F via the $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ reaction; *Radiochim. Acta* **26**, 21 (1979)
- [10] K. Hamacher, H.H. Coenen, G. Stöcklin; Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2- ^{18}F fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution; *J. Nucl. Med.* **27**, 235-238 (1986)
- [11] M. Guillaume, A. Luxen, B. Nebeling, M. Argentini, J.C. Clark, V.W. Pike; Recommendations for fluorine-18 production; *Appl. Rad. Isot.* **42**, 749-762 (1991)

- [12] J.J. Sunderland, O.T. de Jesus, C.G. Martin, R.J. Nickles; Electrophilic F-18 from a small proton cyclotron; *J. Nucl. Med.* **30** (Supplement), 972 (1989)
- [13] H. Vera Ruiz; Report of an International Atomic Energy Agency's Consultants' Meeting on fluorine-18: reactor production and utilization; *Appl. Rad. Isot.* **39**, 31 (1988)
- [14] F. Kepak; Behaviour of Carrier-Free Radionuclides, in Radiotracer Techniques and Applications Vol. 1, E.A. Evans, M. Muramatsu (eds.); *Marcel Dekker* (1977)
- [15] D. Naumann in: Anorganische Chemie in Einzeldarstellungen, Bd. 2, Fluor und Fluorverbindungen, A. Schneider (ed.) (1980)
- [16] H. H. Coenen; No-carrier-added ^{18}F -chemistry of radiopharmaceuticals. In: Synthesis and application of isotopically labelled compounds, (T.A. Baillie and J.R. Jones eds.) p. 433, Elsevier Publ., Amsterdam; (1989)
- [17] H. H. Coenen; New Radiohalogenation Methods: An overview; in Progress in Radiopharmacy (Cox P. H. et al, eds.) *Martinus Nijhof Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster*; 196 (1986)
- [18] 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)
- [19] D. O. Kiesewetter, W. C. Eckelman, R. M. Cohen, R. D. Finn, S. M. Larson; Syntheses and D_2 Receptor Affinities of Derivatives of Spiperone Containing Aliphatic Halogens; *Appl. Rad. Isot.* **37**, 1181 (1986)
- [20] J. P. De Kleijn, J. W. Seetz, J. F. Zawierko, B. Van Zanten; Labelling with Reactor Produced ^{18}F -III. Polymer Supported ^{18}F as a Fluorinating Agent; *Int. J. Appl. Rad. Isot.* **28**, 591 (1977)
- [21] 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)

- [22] T. Irie, K. Fukushi, T. Ido, T. Nozaki, Y. Kasida; ^{18}F -Fluorination by Crown Ether-Metal Fluoride: (I) On Labeling ^{18}F -21-Fluoroprogesterone; *Int. J. Appl. Rad. Isot.* **33**, 591 (1982)
- [23] M. L. Korguth, T. R. DeGrado, J. E. Holden; Effects of Reaction Conditions on Rates of Incorporation of No-Carrier-Added F-18 Fluoride into Several Organic Compounds; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **25**, 369 (1988)
- [24] D. Block, B. Klatte, A. Knöchel; N.c.a. [^{18}F]-Labelling of Aliphatic Compounds in High Yields Via Aminopolyether Supported Nucleophilic Substitution; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **23**, 467, *abstr.* (1986)
- [25] H. H. Coenen, B. Klatte, A. Knöchel, M. Schüller, G. Stöcklin; Preparation of n.c.a 17- ^{18}F fluoroheptadecanoic acid in high yields via aminopolyether supported nucleophilic fluorination; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **23**, 455 (1986)
- [26] R. Gail, H. H. Coenen; A one step preparation of the n.c.a. fluorine-18 labelled synthons: 4-fluorobromobenzene and 4-fluoroiodobenzene; *Appl. Rad. Isot.* **45**, 105 (1994)
- [27] M. Attina, F. Cacace, A. P. Wolf; Labeled Aryl Fluorides from the Nucleophilic Displacement of Activated Nitro Groups by $^{18}\text{F}\text{-F}^-$; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **20**, 50 (1983)
- [28] M. S. Haka, M. R. Kilbourn, G. L. Watkins, S. A. Toorongian; Aryltrimethylammonium trifluormethanesulfonates as precursors to aryl [^{18}F]fluorides: Improved synthesis of [^{18}F]GBR-13119. *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **27**, 823 (1989)
- [29] M. Maeda, T. Fukumura, M. Kojima; Nucleophilic Displacement of Activated Aromatic Dimethylsulfonium Groups by [^{18}F]Fluoride Ion; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **23**, 1104 *abstr.* (1989)
- [30] K. Hamacher, H. H. Coenen, G. Stöcklin; N.C.A. Radiofluorination of Spiperone and N-methylspiperone via Aminopolyether Supported Direct Nucleophilic Substitution; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **23**, 1047 *abstr.* (1986)

- [31] B. F. Johnson, D. H. Maylotte, C. L. Sabourin; Synthesis of 2-[^{18}F]FDG Using Tetraalkylammonium Bicarbonates; *J. Lab. Comp. Radiopharm* **32** (1993)
- [32] A. Katsifis, K. Hamacher, J. Schnitter, G. Stöcklin; Optimization Studies Concerning the Direct Nucleophilic Fluorination of Butyrophenone Neuroleptics; *J. Lab. Comp. Radiopharm* **32** (1993)
- [33] H. L. Atkins, D. R. Christman, J. S. Fowler, W. Hauser, R. M. Hoyte, J. F. Klopfer, S. S. Lin, A. P. Wolfe; Organic Radiopharmaceuticals Labeled with Isotopes of Short Half Life V. ^{18}F -Labeled 5- and 6-Fluorotryptophane; *J. Nucl. Med.* **13**, 713 (1972)
- [34] T. J. Tewson, M. J. Welch; Preparation of Fluorine-18 Aryl Fluorides: Piperidyl Triazenes as a Source of Diazonium Salts. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1149 (1979)
- [35] C. Lemaire, M. Guillaume, R. Cantineau, A. Pleneveaux, L. Christiaens, N.c.a. Asymetric Synthesis of 2-[^{18}F]Fluorotyrosine; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **30**, 269 (1991)
- [36] C. Lemaire, P. Damhaut, A. Pleneveaux, D. Comar, Enantioselective Synthesis of L-6-[^{18}F]Fluorodopa from No-Carrier-Added Fluorine-18-Fluoride; *J. Nucl. Med.* **35**, 1996 (1994)
- [37] H. H. Coenen, S. M. Moerlein; Regiospecific Aromatic Fluorodemetalation of Group IVb Metalloarenes Using Elemental Fluorine or Acetyl Hypofluorite; *J. Fluorine Chem.* **36**, 63 (1987)
- [38] A. Luxen, J. R. Barrio, G. T. Bida, N. Satyamurthy; Regioselective Radiofluorodemercuration: A Simple High Yield Synthesis of 6-[^{18}F]Fluoro DOPA; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **23**, 1066 abstr. (1986)
- [39] H. H. Coenen, K. Franken, P. Kling, G. Stöcklin; Direct Electrophilic Radiofluorination of Phenylalanine, Tyrosine and DOPA; *Appl. Rad. Isot.* **39**, 1243 (1988)
- [40] D. Block, H. H. Coenen, G. Stöcklin; N.C.A. ^{18}F -Fluoroalkylation of H-Acidic Compounds; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **25**, 201 (1988)

- [41] D. O. Kiesewetter, R. D. Finn; [^{18}F]Fluoroethyl triflate: Preparation and Reaction with Amines; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **26**, 14 (1989)
- [42] C. Crouzel, B. Långström, V. W. Pike, H. H. Coenen; Recommendation for a practical production of [^{11}C]Methyl Iodide; *Appl. Rad. Isot.* **38**, 601 (1987)
- [43] D. M. Jewett; [^{11}C]Methyltriflate; *Appl. Rad. Isot.* **43**, 1383 (1992)
- [44] M. Holschbach, M. Schüller; An On-Line Method for the Preparation of N.c.a. [^{11}C]Methyl Iodide; *Appl. Rad. Isot.* **44**, 1129 (1993)
- [45] H.H. Coenen, P. Laufer, G. Stöcklin, K. Wienhard, G. Pawlik, H. G. Böcker-Schwarz, W. D. Heiss; 3-N-(2'-[^{18}F]fluoroethyl)sipiperone: a new ligand for cerebral dopamine receptor studies with PET; *Life Sci.* **40**, 81-88 (1987)
- [46] 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)
- [47] S. M. Moerlein, J. S. Perlmutter, D. Parkinson; Synthesis and evaluation of fluorine-18 labeled benzodiazepine antagonists as PET tracers; *J. Lab. Comp. Radiopharm* **32**, 272 (1993)
- [48] M. R. Kilbourn, C. S. Dence, M. J. Welch, C. J. Mathias; Fluorine-18 labeling of proteins; *J. Nucl. Med.* **28**, 462 (1987)
- [49] D. Block, H. H. Coenen, G. Stöcklin; N.C.A. ^{18}F -Fluoroacylation via Fluorocarboxylic Acid Esters; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **25**, 185 (1988)
- [50] 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; *Biochem.* **28**, 4801 (1989)
- [51] D. M. Goldenberg (Editor); Cancer Imaging with Radiolabeled Antibodies; Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London (1990)
- [52] A. J. Fischman, J. W. Babich, H. W. Strauss; A Ticket to Ride: Peptide Radiopharmaceuticals; *J. Nucl. Med.* **34**, 2253-2263 (1993)

- [53] D. J. Hnatowich, F. Virzi, M. Rusckowski; Investigations of Avidin and Biotin for Imaging Applications; *J. Nucl. Med* **28**, 1294-1302 (1987)
- [54] W. W. van Osdol, C. Sung, R. L. Dedrick, J. N. Weinstein; A Distributed Pharmacokinetic Model of Two-Step Imaging and Treatment Protocols: Application to Streptavidin-Conjugated Monoclonal Antibodies and Radiolabeled Biotin; *J. Nucl. Med.* **34**, 1552-1564 (1993)
- [55] G. L. Griffiths, D. M. Goldenberg, A. L. Jones, H. J. Hansen; Radiolabeling of Monoclonal Antibodies and Fragments with Technetium and Rhenium; *Bioconj. Chem.* **3**, 91-99 (1992)
- [56] O. A. Gansow; Newer Approaches to the Radiolabeling of Monoclonal Antibodies by Use of Metal Chelates; *Nucl. Med. Biol.* **18**, 369-381 (1991)
- [57] H. H. Coenen, S. M. Moerlein, G. Stöcklin; No-carrier-added radiolabeling methods with heavy halogens; *Radiochim. Acta* **34**, 47-68 (1983)
- [58] D. S. Wilbur; Radiohalogenation of Proteins: An Overview of Radionuclides, Labeling Methods and Reagents for Conjugate Labeling; *Bioconj. Chem.* **3**, 433-470 (1992)
- [59] I. Brown; Astatine Radiopharmaceuticals, Astatine-211: It's Possible Applications in Cancer Therapy; *Appl. Rad. Isot.* **43**, 1383 (1992)
- [60] A. R. Fritzberg, R. W. Berninger, S. W. Hadley, D. W. Wester; Approaches to Radiolabeling of Antibodies for Diagnosis and Therapy of Cancer; *Pharm. Res.* **5**, 325-334 (1988)
- [61] D. Engler, A. G. Burger; The deiodination of the iodothyronines and of other derivatives in man. *Endocrine Rev.* **5**, 151-184 (1984)
- [62] G. T. Rogers, Limitations associated with the use of labeled antibodies against CEA for potential tumour localization and therapy; *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **22**, 1127-1133 (1986)

- [63] M. R. Zalutsky, A. S. Narula; A method for the radiohalogenation of proteins resulting in decreased thyroid uptake of radioiodine; *Appl. Rad. Isot.* **38**, 1051-1055 (1987)
- [64] D.S. Wilbur, S. W. Hadley, M. D. Hylarides, P. G. Abrams, P. A. Beaumier, A. C. Morgan, J. M. Reno, A. R. Fritzberg; Development of a Stable Radioiodinating Reagent to Label Monoclonal Antibodies for Radiotherapy of Cancer; *J. Nucl. Med.* **30**, 216-226 (1989)
- [65] A. E. Bolten, W. M. Hunter, The Labeling of Proteins to High Specific Radioactivities by Conjugation to a I-125 Containing Acylation Agent. *Biochem. J.* **133**, 529 (1973)
- [66] D. S. Wilbur, M. D. Hylarides, S. W. Hadley, J. Schroeder, A. R. Fritzberg; A General Approach to Radiohalogenation of Organometallic Intermediates Containing Protein Reactive Substituents. *J. Lab. Comp. Radiopharm. abstr.* **26**, 316 (1989)
- [67] S.M. Qaim, G. Stöcklin; Production of Some Medically Important Short-Lived Neutron-Deficient Radioisotopes of Halogens; *Radiochim. Acta* **34**, 25-40 (1983)
- [68] N. N. Greenwood, A. Earnshaw; Chemie der Elemente; VCH-Verlagsgesellschaft Weinheim (1988)
- [69] 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)
- [70] C. Y. Shiue, A. P. Wolf, J. F. Hainfeld; Synthesis of ^{18}F -Labelled N-(p-[^{18}F]fluorophenyl)maleimide and its Derivatives for Labelling Monoclonal Antibody with ^{18}F . *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **26**, 287 (1989) (Abstract)
- [71] C. M. Müller-Platz, G. Kloster, G. Legler, G. Stöcklin; ^{18}F -Fluoroacetate: An Agent for Introducing n.c.a. Fluorine-18 into Urokinase Without Loss of Biological Activity; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **19**, 1645 (1982) (Abstract)

- [72] 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-[^{18}F]Fluoroacetyl-5-hydroxytryptamine; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **34**, 741 (1994)
- [73] K.A. Jacobson, D.C. Furlano, K.L. Kirk; A prosthetic group for the rapid introduction of fluorine into peptides and functionalized drugs. *J. Fluor. Chem.* **39**, 339 (1988)
- [74] S. Guhlke, Zur praktisch trägerfreien ^{18}F -Fluoracylierung von Aminen und Biotinderivaten; Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (1990)
- [75] L. W. Herman, A. J. Fischman, R. G. Tompkins, R. N. Hanson, C. Byon, H. W. Strauss, R. D. Elmaleh; The use of Pentafluorophenyl Derivatives for the ^{18}F Labeling of Proteins; *Nucl. Med. Biol.* **21**, 1005 (1994)
- [76] G. Vaidyanathan, M.R. Zalutsky, Labeling proteins with Fluorine-18 using N-succinimidyl 4-[^{18}F]fluorobenzoate. *Nucl. Med. Biol.* **19**, 275 (1992)
- [77] G. Vaidyanathan, D.D. Bigner, M.R. Zalutsky, Fluorine-18-labeled monoclonal antibody fragments: A potential approach for combining radioimmuno-scintigraphy and positron emission tomography. *J. Nucl. Med.* **33**, 1535 (1992)
- [78] 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; *Biochem.* **28**, 4801 (1989)
- [79] D. D. Perrin (Editor); Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution; London Butterworth (1965)
- [80] E. J. Knust et al; *J. Lab. Comp. Radiopharm.* **17**, 353 (1980)
- [81] M. R. Kilbourn; Fluorine-18 Labeling of Radiopharmaceuticals; National Academy Press, Washington D.C. (1990)

- [82] T. W. Greene; Protective Groups in Organic Synthesis; John Wiley & Sons, New York (1981)
- [83] Beilstein E III 2, 552
- [84] J. T. Welch, J. S. Plummer; The Stereoselective Aldol Condensation of α -Fluoroacetates. *Synthetic Comm.* **19**, 1081 (1989)
- [85] F. H. C. Stewart; The 9-Anthrylmethyl Esters of N-Acylamino Acids. *Aust. J. Chem.* **18**, 1699 (1965)
- [86] D. S. Kemp, J. Reczek; New Protective Groups for Peptide Synthesis III-The MAQ-Ester Group, Mild Reductive Cleavage of 2-Acyloxymethylene anthraquinones. *Tetrahedron Lett.* **12**, 1031 (1977)
- [87] K.T. Leffek, F. H.-C. Tsao; Studies on the decomposition of tetra-alkylammonium salts in solution. Part I. Phenylbenzylmethylallylammonium iodide; *Can. J. Chem.* **46**, 1215 (1968)
- [88] J. T. Burns, K. T. Leffek; Studies on the decomposition of tetraalkylammonium salts in solution. Part II; *Can. J. Chem.* **47**, 3725 (1969)
- [89] A. R. Kartritzky; Conversions of Primary Amino Groups into Other Functionalities Mediated by Pyrylium Cations; *Tetrahedron* **36**, 679 (1980)
- [90] J.F. King, T. M. Lee; Betylates. 1. Synthesis and reactions of an isolable [0]betylate, N,N-dimethyl-N-(phenoxysulfonyl)methanaminium fluorosulfate; *Can. J. Chem.* **59**, 356 (1981)
- [91] J. F. King, S. M. Loosmore, M. Aslam, J. D. Lock and M. J. McGarrity: Betylates. 3. Preparative Nucleophilic Substitution by Way of [2], [3]-, and [4]Betylates. Stoichiometric Phase Transfer and Substrate-Reagent Ion-Pair (SRIP) reactions of Betylates; *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7108 (1982)
- [92] W. Steglich, G. Höfle; 4-Dialkylaminopyridine as highly active acylation catalysts; *Angewandte Chemie Int. Ed.* **8**, 981 (1969)
- [93] H. J. Wester, Zur trägerfreien Einführung von Fluor-18 in Peptide durch Fluoracylierung; Diplomarbeit Universität Köln 1992

- [94] H. A. Staab; Synthesen mit heterocyclischen Amiden; *Angew. Chem.* **74**, 407 (1962)
- [95] H. A. Staab; Transacylierungen 1. N-Acyl-Verbindungen stickstoffhaltiger Heterocyclen; *Chem. Ber.* **89**, 1927 (1956)
- [96] H. A. Staab, G. Maleck; Über den Mechanismus der Reaktion von N,N'-Carbonyldi-azolen mit Carbonsäuren zu Carbonsäure-Azoliden; *Chem. Ber.* **99**, 2955 (1966)
- [97] D. Hudson; Methodological Implications of Simultaneous Solid-Phase Peptide Synthesis. Comparison of Different Coupling Procedures; *J. Org. Chem.* **53**, 617 (1988)
- [98] R. Knorr, A. Trezeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen; New Coupling Agents in Peptide Chemistry; *Tetrahedron Let.* **30**, 1927 (1989)
- [99] G. Wendlberger; Synthese homöomerer Peptide aus Aminosäuren; in Houben Weyl Band 15/2, 12 (1974)
- [100] V. Dourtoglou, B. Gross; O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate as a Coupling Reagent for the Synthesis of Peptides; *Synthesis*, 572 (1984)
- [101] T. Wieland, B. Heinke, K. Vogeler, H. Morimoto; Derivate der Kohlensäure in der Peptichemie; *Liebigs Ann. Chem.* **655**, 189 (1962)
- [102] G. Vaidyanathan, M. R. Zalutsky; Improved Synthesis of N-Succinimidyl 4-[¹⁸F]Fluorobenzoate and Its Application to the Labeling of a Monoclonal Antibody Fragment; *Bioconj. Chem.* **5**, 352 (1994)
- [103] J. March; Advanced Organic Chemistry; 4th. ed; John Wiley & Sons
- [104] A. Paquet; Succinimidyl esters of fatty acids for amino acid acylations; *Can. J. Chem.* **54**, 733 (1976)

- [105] E. C. Taylor, G. W. Mc. Lay, A. McKillop; Thallium in Organic Synthesis. II. Acylation, Aroylation, and Tosylation of Phenols and Carboxylic Acids; *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 2422 (1968)
- [106] E. Fritz-Langhals, G. Schütz; Simple Synthesis of Optically Active 2-Fluoropropanoic Acid and Analogs of High Enantiomeric Purity; *Tetrahedron Lett.* **34**, 293 (1993)
- [107] J. Pless, W. Bauer, U. Briner, W. Doepfner, P. Marbach, R. Maurer, T. J. Petcher, J. C. Reubi, J. Vonderscher; Chemistry and pharmacology of SMS 202-995, a long acting octapeptide analogue of somatostatin; *Int. Congr. Ser. Excerpta Med.* **683**, 319 (1985)
- [108] E.P.Krenning, W.H. Bakker, W.A.P. Breeman, J.W. Koper, P.P.M. Kooij, L. Ausema, J.S. Lameris, J.C. Reubi, S.W.J. Lamberts; Localization of endocrine-related tumors with a radioiodinated analogue of somatostatin. *Lancet* **1**, 242 (1989)
- [109] E.P. Krenning, W.H. Bakker, P.P.M. Kooij, W.A.P. Breeman, H.Y. Oei, M.de Jong, J.C. Reubi, T.J. Visser, C. Bruns, D.J. Kwekkeboom, A.E.M. Reijs, P.M. van Hagen, J.W. Koper, S.W.J. Lamberts; Somatostatin receptor scintigraphy with Indium-111-DTPA-D-phe-1-Octreotide in Man: Metabolism, Dosimetry and Comparison with Iodine-123-Tyr-3-Octreotide. *J.Nucl.Med.* **33**, 652 (1992)
- [110] P. Smith Jones; B. Stolz, C. Bruns, R. Albert, H. W. Reist, R. Fridrich, H. R. Mäcke; Gallium-67/Gallium-68-[DFO]-Octreotide-A Potential Radiopharmaceutical for PET Imaging of Somatostatin Receptor-Positive Tumors: Synthesis and Radiolabeling In Vitro and Preliminary In Vivo Studies; *J.Nucl.Med.* **35**, 317 (1994)
- [111] R.F.Nutt, D.F. Verber, P.E. Curely, R. Saperstein, R. Hirschmann, Somatostatin analogs which define the role of the lysine-9 amino group; *Int. J. Pept. Protein Res.* **21** 66-73, (1983)
- [112] H. J. Wester, S. Gohlke, G. Stöcklin; Regioselective Fluoracylation of Peptides and Proteins in Aqueous Solution; *J. Label. Comp. Radiopharm.* **35**, 297 (1994)

- [113] R. Geiger, W. König; Chem. Ber. **106**, 3626-3635 (1973)
- [114] J. Brockmann; Untersuchungen zur Synthese von $^{86,88}\text{Y}$ -markiertem Octreotid ; Diplomarbeit Universität zu Köln (1994)
- [115] T. Maina, B. Stolz, R. Albert, C. Bruns, P. Koch, H. Mäcke; Synthesis, radiochemistry and biological evaluation of a new somatostatin analogue (SDZ 219-387) labelled with technetium-99m; *Eur. J. Nucl. Med.* **21**, 437 (1994)
- [116] M. Wilchek, E. A. Bayer; The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications; *Analyt. Biochem.* **171**, 1 (1988)
- [117] D. J. Hnatowich, F. Virzi, M. Rusckowski; Investigations of avidin and biotin for imaging applications; *J. Nucl. Med* **28**, 1294 (1987)
- [118] R. K. Garlick, R. W. Giese; Avidin Binding of Radiolabeled Biotin Derivatives; *J. Biol. Chem.* **263**, 210 (1988)
- [119] R. B. Del Rosario, R. L. Wahl; Site-Specific Radiolabeling of Monoclonal Antibodies with Biotin / Streptavidin; *Nucl. Med. Biol* **16**, 525 (1989)
- [120] P. Koch, H. Mäcke; Ein $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markiertes Biotinkonjugat in einer Tumor-"Pretargeting"-Methode mit monoklonalen Antikörpern; *Angew. Chem.* 104, 1492 (1992)
- [121] M. Rusckowski, B. Fritz, D. J. Hnatowich; Localization of Infection Using Streptavidin and Biotin: An Alternative to Nonspecific Polyclonal Immunoglobulin; *J. Nucl. Med* **33**, 1810 (1992)
- [122] S. Guhlke, H. H. Coenen, G. Stöcklin; ^{18}F -Fluoroacylated biotin for fast localization of tumors with PET; *J. Nucl. Med* **32**, 1009 (1991)
- [123] A. Biedermann, trägerfreie Einführung von Fluor-18 in Biotin Diplomarbeit Universität zu Köln (1991)
- [124] A. Najafi, A. Petersen; Preparation and In Vitro Evaluation of "No-carrier-added" ^{18}F -labeled Biotin; *Nucl. Med. Biol.* **20**, 401 (1993)

- [125] T. M. Shoup, A. J. Fischman, Shreen Jaywook; J. W. Babich, H. W. Strauss, D. R. Elmaleh; Synthesis of Fluorine-18-Labeled Biotin Derivatives: Biodistribution and Infection Localization; *J. Nucl. Med.* **35**, 1685 (1994)
- [126] E. S. Petrov; The Equilibrium NH-Acidity of Organic Compounds; *Russ. Chem. Rev.* **52**, 1144 (1983)
- [127] E. Mutschler; Zytostatisch wirksame Antibiotika; Arzneimittelwirkungen; 665, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1991)
- [128] G. B. Fields, Z. Tian, G. Barany; Formation of the peptide bond in : Synthetic Peptides, G. A. Grant Ed.; UWBC biotechnical resource series (1992)
- [129] J. Kovacs in: The Peptides; E. Gross, J. Meienhofer eds. ; Vol. 2. 535; Academic Press, New York (1980)
- [130] N.M Green; Spectrophotometric Determination of Avidin and Biotin; in *Methods Enzymol.* **18**, 418 (1970)
- [131] E. A. Bayer, M. Wilchek; The use of the Avidin-Biotin complex as a tool in molecular biology; *Methods of Biochem. Anal.* **26**, 1 (1980)
- [132] J.H.H. Chan, F. Walker, C.K. Tseng, D.R. Baker, D.R. Arneklev; Synthesis and herbicidal activity of N,N-Diethyl-2(1-naphtyloxy)propionamide and its optical isomers. *J.Agric.Food Chem.* **23**,1008 (1975)
- [133] J. Einhorn, C. Einhorn, J. L. Luche; Mild and efficient sonochemical tert.-Butoxycarbonylation of amines from their salts; *Synlett*, **37** (1990)
- [134] W. E. Weaver, W. M. Whaley; Organic Fungicides. II. The Preparation of Some α -Bromopropionamides; *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 1144 (1947)
- [135] E. D. Bergmann, I. Blank; Studies on organic fluorine compounds part I. Some esters of monofluoroacetic acid and related compounds; *J. Am. Chem.Soc* **75**,3786 (1953)
- [136] W. R. Dolbier, S. K. Lee, O. Phanstiel; The in situ generation and trapping of some fluorine substituted ketenes; *Tetrahedron* **47**, 2065 (1991)

- [137] Sawicki E., Ray F.E. (1953) N-fluoroacetyl derivatives of carcinogenic amines
J. Am. Chem. Soc. **75**, 4346
- [138] 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)
- [139] M. Guillaume, A. Luxen, B. Nebeling, M. Argentini, V. W. Pike;
Recommendations for fluorine-18 production;
Appl. Radiat. Isot. **42**, 749 (1991)
- [140] 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 (1990)

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. G. Stöcklin danke ich, diese Arbeit ermöglicht zu haben, sowie für entscheidende Diskussionen und Anleitungen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. H. H. Coenen für die Betreuung dieser Arbeit auch nach der Annahme seines Rufes an die Universität Essen.

Weiteren Dank schulde ich allen Mitarbeitern des Instituts für Nuklearchemie, ohne deren Einsatz diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen wäre. Besonders danken möchte ich dabei Herrn Dr. K. Hamacher für viele anregende Diskussionen, Herrn D. Unterlugauer für die NMR-Spektroskopie und Herrn W. Wutz für die Tierversuche und nicht zuletzt dem Team um die Routineproduktion von Fluor-18.

Mein Dank gilt auch allen Kommilitonen für die freundschaftlichen Diskussionen, Rat und Tat, die ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Jül-3136
November 1995
ISSN 0944-2952