

Institut für Neurowissenschaften und Medizin
Nuklearchemie (INM-5)

Herstellung und Evaluation spezifischer PET-Liganden unter Anwendung moderner Radiofluorierungsmethoden

Michael Andreas Willmann

Jül-4431

Institut für Neurowissenschaften und Medizin
Nuklearchemie (INM-5)

Herstellung und Evaluation spezifischer PET-Liganden unter Anwendung moderner Radiofluorierungsmethoden

Michael Andreas Willmann

Berichte des Forschungszentrums Jülich
Jül-4431 · ISSN 0944-2952
Institut für Neurowissenschaften und Medizin
Nuklearchemie (INM-5)

D 38 (Diss. Köln, Univ., 2021)

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

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

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



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

Berichterstatter:

Prof. Dr. J. Ermert

Prof. Dr. H. G. Schmalz

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 27.04.2021

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von November 2017 bis Januar 2021 am Institut für Neurowissenschaften und Medizin (Teilinstitut INM-5) des Forschungszentrums Jülich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. Ermert angefertigt.

Für meinen Sohn
Alexander

Kurzzusammenfassung

Die molekulare Bildgebung mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist wesentlich von der Verfügbarkeit geeigneter Radiotracer abhängig. Der erste Schritt im Entwicklungsprozess eines Radiotracers ist die Identifikation eines geeigneten molekularen Targets, welches durch den Radiotracer adressiert werden soll. Molekulare Targets sind beispielsweise Rezeptorproteine, die Erkrankungen aufzeigen können, da das regionale Rezeptorexpressionsprofil aufgrund pathologischer Prozesse verändert sein kann. Auch Enzyme eignen sich als molekulare Targets, da deren veränderte Aktivität mit Hilfe von Radiotracern detektiert werden kann. Nach Targetidentifikation, müssen Radioliganden entwickelt und deren Eignung für die Bildgebung evaluiert werden. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Radiosynthese und Evaluation geeigneter ^{18}F -markierter Radioliganden für die Bildgebung der Dopamin- D_4 sowie der Serotonin $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ -Rezeptoren, deren Funktion und Beteiligung bei der Entstehung neurologischer und psychischer Erkrankungen, wie der Schizophrenie oder der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS), heute noch nicht ausreichend geklärt ist. *In-vivo*-PET-Studien könnten einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der Funktion dieser Rezeptoren liefern und dazu beitragen neue Therapieansätze zu entwickeln. Besonderer Klärungsbedarf besteht dabei für die Funktionen des Dopamin- D_4 -Rezeptors (D_4R), der aufgrund seiner geringen Verteilungsdichte im Gehirn eine besondere Herausforderung für die Bildgebung darstellt. Die aus der aktuellen Literatur bekannten, D_4R -spezifischen Liganden, wurden als nicht-radioaktive Referenzverbindungen hergestellt und ihr Bindungsverhalten gegenüber den Subtypen der Dopaminrezeptoren D_{1-5}R , hinsichtlich Bindungsaffinität und Selektivität, in Bindungsstudien evaluiert. In dieser Arbeit wurden zwei Leitstrukturen ausgewählt und mit Fluor-18 markiert. In *In-vitro*-Autoradiographien wurde für eine der ^{18}F -markierten Verbindungen ein spezifisches Bindungsverhalten gezeigt.

Für PET-Studien des $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ -Rezeptors sind die Radioliganden $[^{18}\text{F}]\text{Altanserin}$ und $[^{11}\text{C}]\text{MDL100,907}$ im klinischen Einsatz. Allerdings ist deren Anwendung mit einigen Nachteilen verbunden, wie z.B. der Bildung hirngängiger Radiometaboliten bei $[^{18}\text{F}]\text{Altanserin}$ oder einer (zu) kurzen Halbwertszeit bei $[^{11}\text{C}]\text{MDL100,907}$, die den Einsatz in klinischen Studien erschweren. R91150 ist ein spezifischer $5\text{-HT}_{2\text{A}}\text{R}$ -Ligand, der als radioiodiertes Derivat $[^{123}\text{I}]\text{Iod-R91150}$ allerdings aufgrund seiner hohen Lipophilie ein unspezifisches Bindungsverhalten zeigt. Das entsprechende radiofluorierte Analogon sollte mit knapp zwei Stunden Halbwertszeit und geringerer Lipophilie günstigere Bindungseigenschaften aufweisen. Vor ca. 10 Jahren wurde bereits eine 6-stufige Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{R91150}$ vorgestellt. Trotz vielversprechender Resultate aus ersten Metabolismusstudien hat die aufwendige und schwierig zu automatisierende Radiosynthese bisher weitere Studien verhindert. Die Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{R91150}$ konnte in vorliegender Arbeit durch Anwendung moderner Radiofluorierungsmethoden deutlich vereinfacht werden, sodass erstmals der *In-vitro*-Einsatz von $[^{18}\text{F}]\text{R91150}$ möglich wurde. Der ^{18}F -markierte $5\text{-HT}_{2\text{A}}\text{R}$ -Ligand hat in den *In-vitro*-Autoradiographien eine klar abgegrenzte, spezifische Bindung in Hirnarealen mit hoher $5\text{-HT}_{2\text{A}}\text{R}$ -Expression gezeigt.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung neuer, ^{18}F -markierter prosthetischer Gruppen für die indirekte Radiofluorierung empfindlicher Biomoleküle. Dazu wurden Amin-reaktive sowie für die „Click-Chemie“ funktionalisierte Azaisotosäureanhydride mit ^{18}F -markiert und ihre Reaktivität gegenüber verschiedenen Aminen, bzw. im Fall einer Propargyl-funktionalisierten Verbindung, die Konjugation mit Aziden

in der Kupfer(I)-vermittelten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) entwickelt. Durch Adaption neuer Methoden der Radiofluorierung konnten die neuen Markierungsbausteine innerhalb von nur 1-2 min direkt auf einer Anionenaustauscherkartusche mit Fluor-18 markiert werden. Die Reaktion mit verschiedenen Modellaminen lieferte überwiegend moderate bis quantitative radiochemische Ausbeuten (RCY = 15-98%). Durch Konjugation an die PSMSA-spezifische Glu-C(O)-Lys Struktur konnte ein neuer PSMA-selektiver Tracer [^{18}F]JK-PSMA-15 erhalten werden.

Die Azid-funktionalisierten Azaisatosäureanhydride wurden mittels CuAAC mit verschiedenen Propargyl-funktionalisierten Modellverbindungen in radiochemischen Umsätzen von 38-56% dargestellt. Mit dieser Methode wurden zwei weitere, auf der Glu-C(O)-Lys Struktur basierende PSMA-Tracer, [^{18}F]JK-PSMA-16 und [^{18}F]JK-PSMA-17, synthetisiert. [^{18}F]JK-PSMA-15 wurde in *In-vivo*-PET-Studien an gesunden Ratten (PSMA-positives Ganglien-Modell) evaluiert, wobei der Tracer eine PSMA-spezifische Anreicherung mit hohem Signal-Hintergrund-Verhältnis, ohne Hinweise auf Defluorierung oder unspezifischem Bindungsverhalten aufwies. Der neue Markierungsbaustein lässt sich schneller markieren und isolieren als vergleichbare prosthetische Gruppen für die indirekte Radiofluorierung und kann sehr effektiv zur Konjugation mit Aminen und Aziden eingesetzt werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Positronen-Emissions-Tomographie (PET).....	1
1.2	Fluor-18 in der Bildgebung molekularer Targets	4
1.3	Innovationen in der ^{18}F -Radiochemie	5
1.3.1	Methoden zur Abtrennung und Aktivierung von [^{18}F]Fluorid	5
1.3.2	Direkte ^{18}F -Markierungsmethoden.....	6
1.3.3	Indirekte ^{18}F -Markierungsmethoden	9
1.4	PET-Bildgebung biologischer Targets.....	11
1.4.1	Wichtige Kriterien für den Einsatz von Radioliganden	12
1.4.2	Rezeptorliganden und Enzyminhibitoren	18
2	Veröffentlichungen & Manuskripte	26
2.1	Radiosynthesis and evaluation of ^{18}F -labeled dopamine D_4 -receptor ligands	27
2.2	Radiosynthesis and biological evaluation of [^{18}F]R91150, a selective 5-HT $_{2A}$ receptor antagonist for PET-imaging.....	52
2.2.1	Supporting Information	65
2.3	Fast indirect ^{18}F -labeling via new prosthetic groups - Radiosynthesis and in vivo PET studies of the new PSMA specific Tracer [^{18}F]JK-PSMA15	101
2.3.1	Supporting Information	117
3	Zusammenfassende Diskussion	189
3.1	Radiosynthese und Evaluation ^{18}F -markierter Dopamin D_4 -Rezeptorantagonisten	189
3.1.1	Synthese und Bindungsstudien der Referenzverbindungen I-IV	189
3.1.2	Synthese der Markierungsvorläufer und Radiosynthesen von [^{18}F]I & [^{18}F]II	191

3.1.3	<i>In-vitro</i> -Autoradiographie von [^{18}F]I & [^{18}F]II	193
3.1.4	Zusammenfassung	195
3.2	Radiosynthese und Evaluation des ^{18}F -markierten Serotonin 5-HT _{2A} -Rezeptorliganden [^{18}F]R91150	196
3.2.1	Synthese der Referenzverbindung R91150	196
3.2.2	Synthese des Markierungsvorläufers und „Late-stage“-Radiofluorierung	196
3.2.3	<i>In-vitro</i> -Autoradiographie von [^{18}F]R91150	197
3.2.4	Zusammenfassung	199
3.3	Neue prosthetische Gruppen für die indirekte Radiofluorierung	200
3.3.1	Synthese der Markierungsvorläufer	201
3.3.2	Radiosynthesen der Amin-reaktiven Azaisatosäureanhydride	203
3.3.3	<i>In-vivo</i> -PET-Evaluation von [^{18}F]JK-PSMA-15	206
3.3.4	Radiosynthese einer prosthetischen Gruppe für die „Click“-Chemie	207
3.3.5	Zusammenfassung	209
4	Literaturverzeichnis	211

Anlagen

- Danksagung
- Deklaration des eigenen Beitrags der dieser Arbeit zugrundeliegenden Veröffentlichungen und Manuskripte
- Erklärung gemäß Prüfungsordnung vom 12. März 2021

1 Einleitung

1.1 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ermöglicht eine quantitative und nicht-invasive Bildgebung molekularer Targets für die Untersuchung von biochemischen, metabolischen und physiologischen Funktionen *in vivo*. Die PET ermöglicht die räumliche und zeitliche Verteilung einer radioaktiv markierten Substanz (Radiopharmakon) im Körper zu visualisieren. Im Gegensatz zu morphologisch bildgebenden Verfahren wie der Computer- (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT), welche im Wesentlichen strukturelle Informationen über Gewebe und Organe im Organismus liefern, ermöglicht die PET die gezielte Darstellung von biochemischen Prozessen also der Funktion auf molekularer Ebene. Da die PET keine morphologisch-strukturelle Aufklärung ermöglicht, hat sich in der medizinischen Diagnostik heute die simultane Kombination der PET mit CT oder MRT als Hybridverfahren durchgesetzt.¹⁻⁵

Die Basis der medizinischen Diagnostik mittels PET ist das Einbringen (meist durch intravenöse Injektion) eines für den jeweiligen Zweck entwickelten, mit einem Positronenstrahler markierten Radiopharmakons (auch Radiotracer) in den Probanden bzw. Patienten. Der Tracer verteilt sich im Organismus und es erfolgt eine Anreicherung (Uptake) des Tracers gemäß seiner spezifischen pharmakokinetischen Eigenschaften und Wechselwirkungen mit physiologischen Prozessen. Zur Anreicherung des Tracers kommt es durch spezifische Wechselwirkungen mit molekularen Targets (z.B. Rezeptoren). Auch kann der Tracer als Substrat an biologischen Prozessen teilnehmen und ermöglicht somit die Darstellung entsprechender Stoffwechselvorgänge.¹⁻³ Die daraus resultierende Verteilung kann dann mit der PET erfasst werden.

Die zeit- und orts aufgelöste Detektion des Radiotracers erfolgt indirekt über die kontinuierlichen Zerfallsereignisse der Radionuklide. Der Zerfall eines Positronenemitters setzt bei der Umwandlung eines Protons (p) zu einem Neutron (n) ein Positron (β^+) und ein Neutrino (ν_e) gemäß Gl. 1 frei (β^+ -Strahlung).^{6, 7}



Die emittierten Positronen haben im Gewebe nur eine sehr geringe Lebensdauer (wenige Nanosekunden) bevor sie auf ihrem Weg mit einem Elektron (dem entsprechenden Antiteilchen)

rekombinieren. Dadurch, dass es sich bei dem Positron um das Antiteilchen des Elektrons handelt, werden beide Teilchen vernichtet und es kommt zur Annihilation beider Elementarteilchen.⁷

Gemäß

$$E = mc^2$$

Gl. 1.2

ist die Energieerhaltung bedingt, durch die Aussendung zweier hochenergetischer Photonen (γ -Quanten) mit einer Energie von jeweils 511 keV (entsprechend der Ruhemassen von Elektron und Positron) in entgegengesetzte Richtungen ($180 \pm 0,3^\circ$).⁶⁻¹⁰

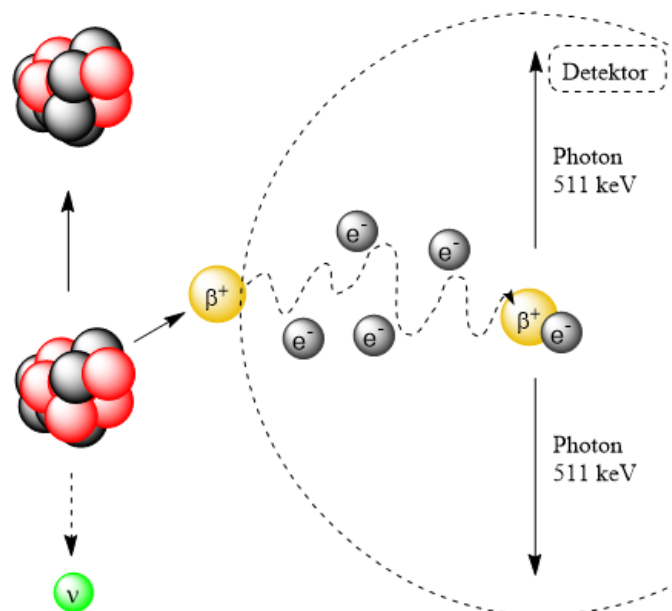


Abbildung 1: Positronenemission bei β^+ -Zerfall, Thermalisierungsphase und Detektion der Annihilationsphotonen durch die ringförmige Anordnung der Detektoren.

Die Annihilationsphotonen durchdringen das umliegende Gewebe nahezu ungehindert und treffen auf die ringförmige Anordnung von Detektoren. Ein Zerfallsereignis, welches exakt in der Mitte der Anordnung stattfindet, wird von zwei gegenüberliegenden Detektoren zeitgleich erfasst (Koinzidenzereignis). Zerfälle mit örtlicher Abweichung in x/y-Richtung der Detektionsebene werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Weglängen nicht zeitgleich an allen Detektorpaaren erfasst. Die größtmögliche zeitliche Abweichung, die durch den Abstand zweier gegenüberliegenden Detektoren und der Lichtgeschwindigkeit, mit der sich Annihilationsphotonen ausbreiten, gegeben ist, bedingt das Koinzidenzintervall ($\Delta t \sim 20 \text{ ns}^{11-13}$), innerhalb dessen eine Detektion als Koinzidenzereignis gewertet wird. Ein Annihilationsereignis liegt somit auf einer direkten Linie, auch als *Line of Response* (LOR) bezeichnet, die zwei Detektoren bei Koinzidenz verbindet. Durch Summierung von detektierten

Koinzidenzereignissen erhöht sich die Ortsauflösung zunehmend im Verlauf der Messung.^{1-3, 6, 8-10, 12, 14-}

22

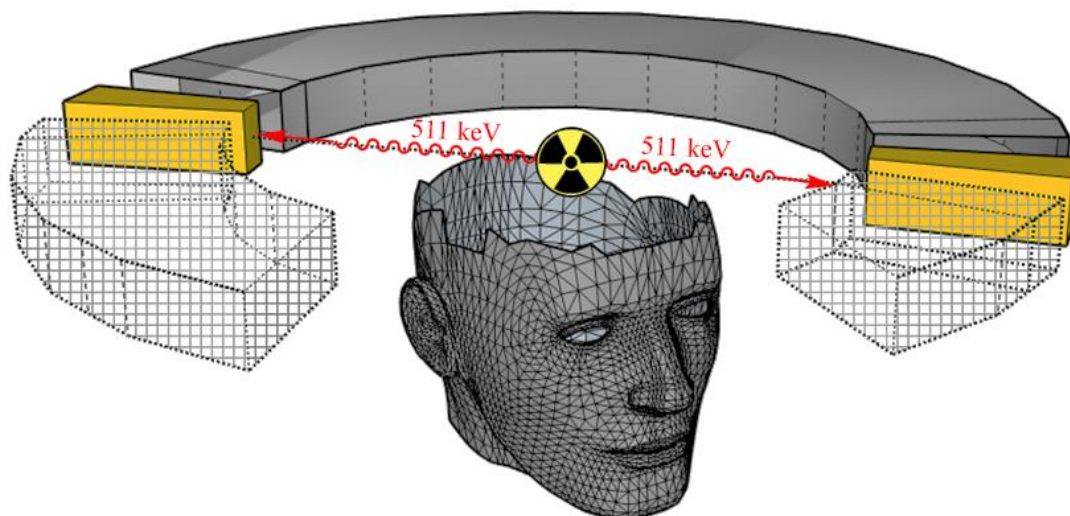


Abbildung 2: Detektion der Annihilationsstrahlung in einem PET-Scanner.

Durch detektierte Koinzidenzereignisse werden allerdings nur Informationen über den Ort der Annihilation gesammelt. Die mittlere freie Weglänge, die das Positron bis dahin zurücklegt, ist entscheidend für die Auflösung der PET-Bildgebung. Da die Energieerhaltung bei der Auslöschung von Elementarteilchen diskrete Energien erfordert und die Ruhemassen von Elektron und Positron mit jeweils 511 keV identisch sind,²³ muss das Positron seinen Überschuss an kinetischer Energie durch elastische Stöße bzw. Streuung an Materie abbauen, um die Bildung eines Positroniums und anschließende Annihilation mit einem Elektron zu ermöglichen (Thermalisierungsphase).⁷ Die maximale freie Weglänge im Gewebe (und somit die maximal erreichbare Ortsauflösung) ist damit direkt abhängig von der maximalen Energie des β^+ -Zerfalls ($\beta^+_{\max}$) eines Positronenstrahlers.^{1-3, 6, 9, 10, 14,}

15

Tabelle 1: Charakteristika einiger relevanter PET Radionuklide.²⁴

Radionuklid	Halbwertszeit	Zerfallsart	$\beta^+_{\max}$ [MeV]	mittlere Reichweite in Wasser [mm]
¹¹ C	20,4 min	β^+ (100)	0,96	3,9
¹³ N	9,97 min	β^+ (100)	1,20	5,1
¹⁵ O	2,03 min	β^+ (100)	1,73	8,0
¹⁸ F	109,8 min	β^+ (97) EC (3)	0,64	2,3
⁶⁸ Ga	67,7 min	β^+ (89) EC (11)	1,90	8,9
¹²⁴ I	4,2 d	β^+ (23) EC (77)	1,54	6,9

1.2 Fluor-18 in der Bildgebung molekularer Targets

Obwohl Fluor äußerst selten Bestandteil natürlich vorkommender Moleküle ist,²⁵ sticht das radioaktive Isotop Fluor-18 mit einigen besonderen Eigenschaften unter den Positronenemittern heraus und gehört daher zu den am häufigsten eingesetzten Radionukliden für die PET. Ein Grund hierfür sind die passenden Zerfallseigenschaften des Fluor-18 für die klinische Diagnostik mittels PET.²⁶

- Die Halbwertszeit von 109,78 min ermöglicht PET-Studien von längeren Stoffwechselvorgängen über mehrere Stunden.²⁶
- Radiosynthesen sind zudem auch über mehrere Stufen mit adäquaten radiochemischen Ausbeuten (RCAs) möglich und auch der anschließende Transport des Radiopharmakons in umliegende Kliniken ist möglich.²⁶
- Mit seiner vergleichsweise niedrigen, maximalen β^+ -Energie von 0,635 MeV kann eine gute Ortsauflösung in der Bildgebung erzielt werden. Gleichzeitig reduziert sich die Strahlenbelastung für den Patienten.²⁷
- ^{18}F -Markierte Radiotracer lassen sich mit hoher molarer Aktivität herstellen.²⁷

Zur Produktion von Fluor-18 bieten sich in der Theorie eine Vielzahl von möglichen Kernreaktionen an. Fluor-18 kann entweder als positiv geladenes Elektrophil in Form von ^{18}F F₂-Gas oder als elektronenreiches Nukleophil ^{18}F Fluorid hergestellt werden. Zur Produktion von Fluor-18 an einem Zyklotron bieten sich hierfür vier gängige Kernreaktionen an, wie in Tabelle 2 aufgeführt.²⁷⁻²⁹

Tabelle 2: Gängige Kernreaktionen zur Produktion von Fluor-18.²⁷⁻²⁹

Kernreaktion	Target	chem. Form	Molare Aktivität
$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	^{18}O H ₂ O	^{18}F F _(aq.) ⁻	3,7 [TBq/μmol]
$^{16}\text{O}(^3\text{He},n)^{18}\text{F}$	H ₂ O	^{18}F F _(aq.) ⁻	3,7 [TBq/μmol]
$^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$	Ne (0.1% F ₂)	^{18}F F ₂	0,4 [GBq/μmol]
$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	^{18}O O ₂ (0.1% F ₂)	^{18}F F ₂	1,9 [GBq/μmol]

Bei der Herstellung von elektrophilem ^{18}F F₂ ist die Dotierung des ^{18}O Sauerstoff- bzw. Neon-Targets mit F₂ als Trägergas erforderlich (engl. *carrier-added*, c.a.), wodurch nur geringe molare Aktivitäten erreicht werden können. Ohne Trägergas verbleibt das ^{18}F Fluoratom wegen mangelnder Wechselwirkungen mit O₂ bzw. Ne an der Targetwand zurück. Durch Zugabe des F₂-Trägers wird es dann in ^{18}F F₂ überführt.²⁷ Aufgrund der Statistik reduziert sich bei Reaktionen mit ^{18}F F₂ die theoretisch maximal erreichbare radiochemische Ausbeute (RCA) auf 50%.²⁷ Da der Handhabung und dem effektiven Einsatz des reaktiven und wenig selektiven ^{18}F F₂ in elektrophilen

Substitutionsreaktionen damit gravierende Grenzen gesetzt sind, hat die elektrophile Radiofluorierung in der Radiochemie heute weitgehend an Bedeutung verloren.³⁰

Die $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ -Kernreaktion liefert $[^{18}\text{F}]$ Fluorid mit hoher spezifischer Aktivität als solvatisiertes Anion in $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$. Vor dem Einsatz in nukleophilen Substitutionsreaktionen wird das $[^{18}\text{F}]$ Fluorid aus dem Targetwasser zunächst über Anionenaustauscherharze isoliert und liegt nach azeotroper Trocknung als nukleophiles „nacktes $[^{18}\text{F}]$ Fluorid“ vor.³¹

1.3 Innovationen in der ^{18}F -Radiochemie

45 Jahre nach der ersten Radiosynthese von 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluor-2-desoxy-D-glucose ($[^{18}\text{F}]$ FDG) und der kurz darauf erfolgten Bildgebung eines menschlichen Gehirns mit $[^{18}\text{F}]$ FDG, sind der ^{18}F -Radiochemie heute kaum noch Grenzen bei der Entwicklung von Radiopharmazeutika gesetzt. Insbesondere durch die Fortschritte der letzten 10-20 Jahre konnten zeitaufwendige Syntheseschritte optimiert und vereinfacht werden, wodurch inzwischen auch komplexere Zielverbindungen in hohen radiochemischen Ausbeuten (RCA, engl. RCY, radiochemical yield) zugänglich sind. Deutliche Fortschritte wurden dabei in der Aufbereitung und Isolation des $[^{18}\text{F}]$ Fluorids erzielt, welches als Nukleophil in einer Vielzahl an neuartigen Markierungsmethoden zum Einsatz kommt.^{24, 27, 32}

1.3.1 Methoden zur Abtrennung und Aktivierung von $[^{18}\text{F}]$ Fluorid

Für den Einsatz in nukleophilen Substitutionsreaktionen muss $[^{18}\text{F}]$ Fluorid für gewöhnlich zunächst aus dem ^{18}O -angereichertem Targetwasser isoliert werden (vgl. 1.2). Traditionell wird dazu das wässrige $[^{18}\text{F}]$ Fluorid auf eine Anionenaustauscherkartusche geladen und mit einer basischen Lösung aus K_2CO_3 oder KHCO_3 und [2.2.2]Kryptand (5 μmol) eluiert. Darauf folgt azeotropes Abdampfen unter wiederholter Zugabe von Acetonitril, um schließlich reaktives $[^{18}\text{F}]$ Fluorid zu erhalten. Die basische Elutionslösung verhindert Bildung und Verlust von $[^{18}\text{F}]\text{HF}$ während der azeotropen Trocknung. Die Ionenstärke des Kryptand/ K^+ -Komplexes ist (gegenüber der von KF) zugunsten der Nukleophile des $[^{18}\text{F}]$ Fluorids stark abgeschwächt. Alternativ zum [2.2.2]Kryptand/Carbonat-Systems wurden auch Tetraalkylammoniumsalze als Anionenaktivatoren eingesetzt.^{33, 34}

Während der zeitliche Aufwand für diese traditionelle „Aufbereitung“ des $[^{18}\text{F}]$ Fluorids mit ca. 15-30 min noch vertretbar erscheint, ist die Automatisierung von Radiosynthesen mit diesem Prozess problematisch. Die zusätzlich notwendige Base wirkt sich vor allem bei basenempfindlichen Vorläufern negativ auf die Radiomarkierung aus. So zeigt die Erfahrung mitunter, dass anschließende

Radiosynthesen mit Aliquots des eluierten [^{18}F]Fluorids deutlich bessere RCAs liefern gegenüber dem Einsatz der Gesamtmenge (entsprechend höherer Anteil an Base).

RICHARZ et al. haben kürzlich gezeigt, dass auf einem Anionenaustauscher fixiertes [^{18}F]Fluorid direkt mit Onium- oder Iodonium-Markierungsvorläufern (0,5 - 2,5 mg in Methanol), ohne Zugabe einer Base, quantitativ eluiert werden kann. Nach Abdampfen von Methanol (3 min) kann die eigentliche Markierung im entsprechenden Lösungsmittel durchgeführt werden. Es konnten gleichwertige oder auch bessere RCAs im Vergleich zur konventionellen Methode gefunden werden.³³

Ein Ansatz, der komplett ohne azeotrope Trocknung und Verdampfung von Lösungsmitteln auskommt, wurden von ZISCHLER et al. demonstriert. [^{18}F]Fluorid wird dazu mit 1 mg Et_4NHCO_3 in 400 μL *n*-BuOH nahezu quantitativ eluiert und direkt mit dem vorgelegten Markierungsvorläufer (als Boronsäurepinakolester) in *N,N*-Dimethylacetamid (DMA) zur Reaktion gebracht („Low-base“-Ansatz). Ganz im Gegensatz zu der verbreiteten Überzeugung über die Notwendigkeit einer aprotischen Umgebung bei nukleophilen Radiofluorierungen, konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Alkoholen (bis 50 vol-%) einen positiven Einfluss auf die RCAs in der Kupfer(II)-vermittelten Radiofluorierung hat.³²⁻³⁴

1.3.2 Direkte ^{18}F -Markierungsmethoden

3,4-Dihydroxy-6- ^{18}F fluor-L-phenylalanin (^{18}F -L-DOPA) ist seit über 30 Jahren in der Bildgebung des dopaminergen Systems im menschlichen Gehirn im Einsatz. Entsprechend zahlreiche Strategien zur Radiosynthese von ^{18}F -L-DOPA sind seither veröffentlicht worden, womit sich ein vergleichender Einblick in die Anwendung aktueller Methoden der nukleophilen Radiofluorierung in der Synthese von ^{18}F -L-DOPA anbietet.³⁵⁻³⁷

Die asymmetrische ^{18}F -L-DOPA Synthese mit $^{18}\text{F}\text{F}^-$ von LEMAIRE et al. (1991) umfasst, neben der initialen nukleophilen Radiofluorierung eines 6-Nitrobenzaldehyds (3,4-Dimethoxy- oder 3,4-Methylenedioxy-) und einer Alkylierung bei -78°C , insgesamt 6 Stufen über 120 min. Mit einer zerfallskorrigierten Ausbeute von 5-10% und einem Enantiomerenüberschuss (e.e.) von nur 50% war die Synthese für die Routineproduktion von ^{18}F -L-DOPA wenig geeignet.³⁸ 2004 wurden von LEMAIRE et al. eine optimierte Version seiner Synthese von 1991 vorgestellt. Ausgehend von einem Oniumtriflat- ($^+\text{OTf}/^+\text{NRMe}_3$) Markierungsvorläufer, konnte ^{18}F -L-DOPA in 100 min über 3 Stufen mit einer RCA von 25-30% und einem Enantiomerenüberschuss von 95% erhalten werden. Markierungsvorläufer in Form von Trialkylammonium-Salzen (hier mit Triflat als Anion), kommen aufgrund der hohen Nukleofugie der Oniumspezies häufig zum Einsatz. Vorteilhaft ist die besonders

einfache Abtrennung des polaren Vorläufers nach der Radiomarkierung (z.B. mittels Festphasenextraktion, engl. *Solid Phase Extraction*, SPE).

Lemaire 2004

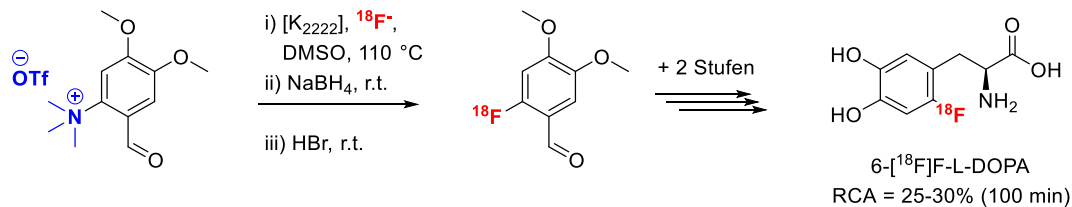


Abbildung 3: Asymmetrische Radiosynthese von [^{18}F]-L-DOPA von LEMAIRE et al. (2004).³⁹

Etwas schwerer zugänglich sind Vorläufer als Diaryliodoniumylide, wie sie von ELSINGA et al. in der [^{18}F]-L-DOPA Synthese eingesetzt wurden (Abbildung 4).⁴⁰ Die hypervalente Iod(III)-Verbindung steuert den nukleophilen Angriff des [^{18}F]Fluorids an den elektronenärmeren Aromaten, sodass als Abgangsgruppe stark elektronenreiche Aromaten gewählt werden (z.B. auch Thiophen).⁴¹ Hervorragende Löslichkeit der Vorläufer und gute radiochemische Ausbeuten stehen allerdings oft einer schwierigen Handhabung, Synthese und Lagerung der Iodonium(III)ylid-Vorläufer entgegen.^{32, 42}

Bemerkenswert ist die extrem kurze Synthesedauer von nur jeweils 5 min für die Radiomarkierung sowie die anschließende Entschützung. Die angegebene RCA von 14%, bei einer gesamten Synthesezeit von 117 min ist allerdings vergleichsweise niedrig. Dennoch ist diese Variante der [^{18}F]-L-DOPA Synthese von ELSINGA et al. beispielhaft für den Einsatz neuer Methoden unter dem Ansatz der „Late-stage“-Radiofluorierung.^{40, 43}

Elsinga 2015

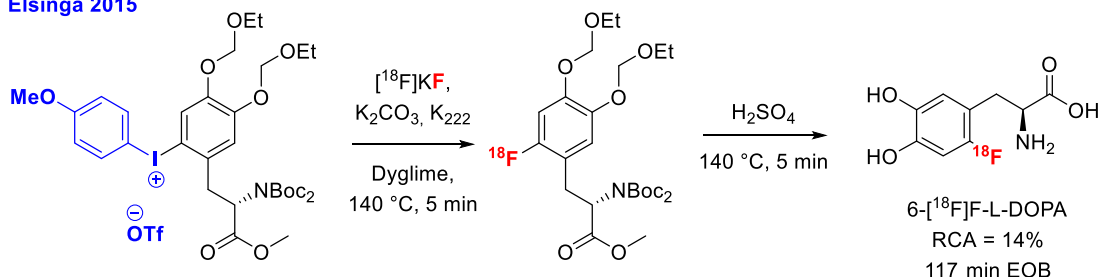


Abbildung 4: „Late-stage“-Radiofluorierung in eines Diaryliodoniumylides in nur 10 min.^{40, 43}

Ein wichtiger Durchbruch für die synthesebasierte Radiochemie gelang 2014 GOUVERNEUR et al.⁴⁴ Basierend auf den Ergebnissen zahlreicher vorangegangener Arbeiten zur Übergangsmetall-(Ag^I, Pd^{IV}, Ni^{II})-vermittelten [^{18}F]-Insertion an (Hetero)-Aromaten, gelang die effiziente Radiofluorierung von Boronsäurepinakolestervorläufern durch den Einsatz von Tetrakis(pyridin)kupfer-(II)-triflat [$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{py})_4(\text{OTf})_2$]. Im Gegensatz zu den bereits bekannten Methoden sind sowohl die Radiosynthese als auch der neue Metallkomplex unempfindlich gegenüber Luftsauerstoff bzw. Luftfeuchtigkeit

(tatsächlich scheint die Radiomarkierung unter inerter Atmosphäre einen negativen Einfluss auf die RCAs zu bewirken). Es wurde gezeigt, dass zahlreiche (Hetero-)Arene innerhalb von 20 min in überwiegend guten RCA zugänglich sind. In einer „*Proof-of-Concept*“-Radiosynthese von [^{18}F]F-L-DOPA konnte der Boronsäurepinakolestervorläufer in einer RCA von $55 \pm 23\%$ markiert werden. Anschließende *N*-Boc-Entschützung (HCl, 130 °C, 10 min) lieferte [^{18}F]F-L-DOPA mit >99% e.e., jedoch in unerwartet geringer isolierter RCA von 12% (basierend auf den Angaben zu zerfallskorrigierter sowie absoluter Ausbeute betrug die gesamte Synthesedauer 149 min).

Eine wesentliche Ergänzung zur Kupfer-vermittelten Radiochemie kam 2017 aus der NEUMAIER-Gruppe. Mit der Motivation den „*Low-base*“-Ansatz (vgl. 1.3.1) mit den Ergebnissen der GOUVERNEUR-Gruppe zu kombinieren, stellten ZISCHLER et al. einen ausbeutesteigernden Einfluss der zur Elution verwendeten Alkohole auf die Cu(II)-vermittelte Radiofluorierung fest. Ein Screening variierender Anteile von Ethanol und *n*-Butanol in DMA zeigte bei Alkoholgehalten von bis zu 50% eine deutliche Steigerung der RCAs.³⁴ Zahlreiche (Hetero-)Aromaten konnten nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen in guten bis quantitativen RCAs innerhalb von 10 min markiert werden. Zusätzlich wurde die alkoholunterstützte, Kupfer(II)-vermittelte Radiofluorierung neben der Synthese von [^{18}F]F-L-DOPA (Abbildung 5) auch für die Radiosynthese anderer klinisch relevanter Tracer [^{18}F]FDA (6- ^{18}F -Fluordopamin) sowie [^{18}F]DAA1106 (*N*-(2,5-Dimethoxybenzyl)-*N*-(5- ^{18}F fluoro-2-phenoxyphenyl)acetamid) angewendet. Erwähnenswert ist außerdem, dass eine Kupfer($\text{Cu}^{0\text{-III}}$)-Gehaltsbestimmung (ICP-MS) der isolierten Fraktionen keine, für eine klinische Anwendung bedenklichen, Mengen an Kupfer nachweisen konnte (jeweils ca. 6-7 μg).³⁴ Boronsäure(-ester) sind synthetisch leicht zugänglich, weitgehend stabil und konnten sich als geeignete Substrate in der Cu(II) vermittelten Radiofluorierung beweisen. Dennoch geht mit ihnen die grundsätzliche Notwendigkeit der Schutzgruppenchemie einher. Wie u.a. aus den Arbeiten von GOUVERNEUR & ZISCHLER et al. hervorgeht,^{34, 45} scheint die konkurrierende *Chan-Lam-Kupplung*⁴⁶ ursächlich dafür zu sein, dass selbst sekundäre Amine schlecht toleriert werden und geeignet geschützt werden müssen.

Neumaier 2017

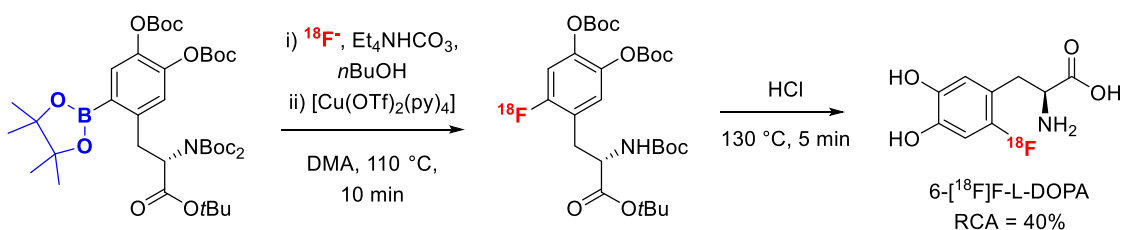


Abbildung 5: Kupfer(II)-vermittelte Radiofluorierung eines Boronsäurepinakolesters.³⁴

1.3.3 Indirekte ^{18}F -Markierungsmethoden

Direkte Methoden der Radiofluorierung sind trotz der überzeugenden Fortschritte der letzten Jahrzehnte nicht immer die geeignete Wahl. Sobald empfindliche Biomoleküle wie Proteine, Peptide oder andere empfindliche Strukturen markiert werden sollen, sind die hohen Temperaturen sowie stark saure oder basische Entschützungs-schritte, Ausschlusskriterien bei der Wahl einer geeigneten Markierungsmethode. Indirekte Methoden der Radiofluorierung können hier Abhilfe schaffen und haben sich im Wesentlichen als Alternative zu den direkten Methoden in der Radiochemie etabliert. Das Prinzip ähnelt dem „Late-stage“-Ansatz der direkten Methoden. Die Radiomarkierung soll getrennt von dem Aufbau (bzw. der Synthese) der Zielverbindung stattfinden. Indirekt ist dies allerdings (fast) nur möglich, wenn kleinere Modifikationen der Zielstruktur für die gedachte Verwendung bzw. den Einsatz unerheblich sind. Für solche Verbindungen steht eine Vielzahl von prosthetischen Gruppen mit funktionellen, reaktiven Gruppen für geeignete Konjugationsreaktionen zur Verfügung, von denen hier nur eine kurze Übersicht gegeben werden soll. So ist die 1,3-dipolare-Huisgen-Cycloaddition in ihrer als „Click“-Chemie bekannten Variante⁴⁷⁻⁴⁹ (auch CuAAC, engl.: copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition) von herausragender Bedeutung für die Radiochemie. Tatsächlich ist die Azid-Alkin Cycloaddition unter den Methoden der indirekten Markierung wohl eine der populärsten Methoden zur Konjugation einer markierten prosthetischen Gruppe mit der Zielverbindung (Abbildung 6).^{48, 50-52}

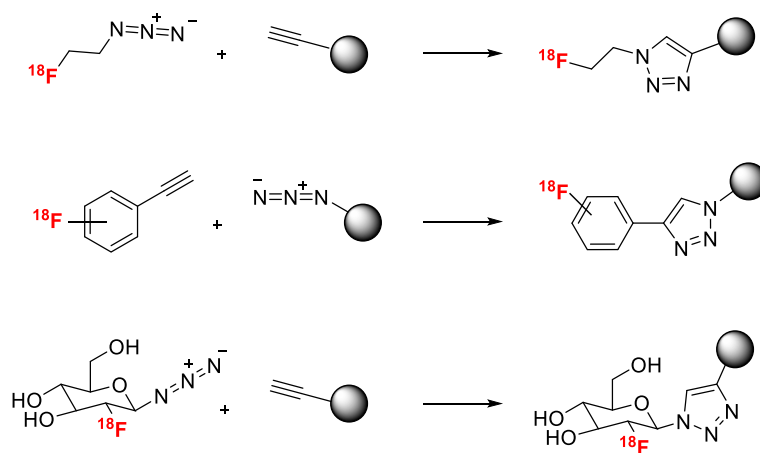


Abbildung 6: Beispiele für „clickbare“ Markierungsbausteine: 2-[^{18}F]fluorethylazid, 1-Ethynyl-4-[^{18}F]fluorbenzol und 2-Desoxy-2-[^{18}F]fluorglucopyranosylazid.

Nicht selten sind entsprechende Azide und noch viel eher Alkine, wegen ihrem analogen Einsatz in der organischen Synthesechemie bereits kommerziell verfügbar (gute Verfügbarkeit von Zuckern, Aminosäuren und Nukleosiden, die mit einem als Azid- oder Alkin-Rest funktionalisiert sind⁵³). Die hohe Reaktionskinetik der CuAAC^{47, 52}, die selbst in der stöchiometrischen Chemie schnelle und hohe Reaktionsumsätze bei Raumtemperatur ermöglichen, ist gerade in der Radiochemie vorteilhaft. Dennoch, Azide und Alkine sind keine natürlich vorkommenden funktionellen Gruppen und ihre

Einführung in komplexe Verbindungen ist häufig kompliziert. In diesem Fall bieten sich für Biomoleküle mit Amin- oder Thiol-reaktiven Gruppen andere prosthetische Gruppe an. Dazu gehören vor allem verschiedene radiofluorierte Aktivester.^{54, 55} Sehr bewährt bei der indirekten Radiofluorierung von Proteinen und Peptiden haben sich die Aktivester *N*-Succinimidyl-4-([¹⁸F]fluorbenzoat [¹⁸F]SFB⁵⁶⁻⁶⁰ (Abbildung 7) sowie 6-[¹⁸F]Fluornicotinsäuretetrafluorphenylester [¹⁸F]FPy-TFP^{61, 62} (Abbildung 8). Die Radiosynthese von [¹⁸F]SFB, ausgehend von dem entsprechenden *N,N,N*-Trimethylammoniumtriflat-Markierungsvorläufer, umfasst mit der Oxidation⁶³ der Aldehydfunktion und der Einführung des Aktivesters mit *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat (DSC) 3 Stufen, bei radiochemischen Ausbeuten von 20-50% (Abbildung 7).⁵⁵ Zur Kupplung wird das funktionelle Amin (Protein, Peptid etc.) für 25-20 min mit [¹⁸F]SFB bei pH 8,5 inkubiert.⁶⁰ Typische radiochemische Ausbeuten der Amin-Konjugation liegen im Bereich von 40-60%.⁶⁰ Nachteilig ist allerdings, dass die prosthetische Gruppe [¹⁸F]SFB nach der Radiosynthese chromatographisch isoliert werden muss und häufig eine weitere Aufreinigung nach der Konjugation nötig ist. Eine direkte Radiofluorierung des Aktivesters ist aufgrund seiner hohen Reaktivität, auch gegenüber [¹⁸F]Fluorid, bisher nicht bekannt.⁶³

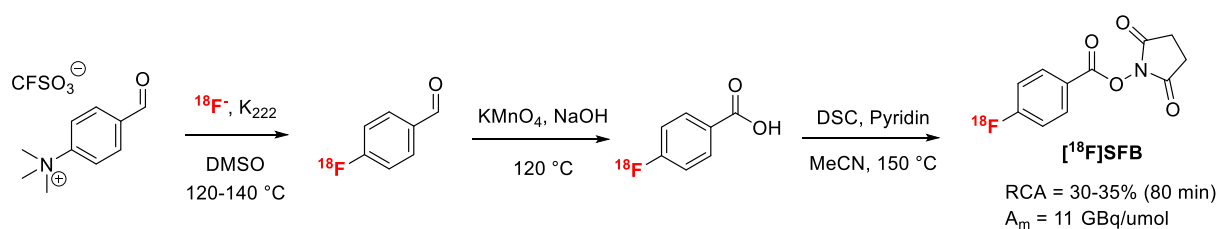


Abbildung 7: Radiosynthese der prosthetischen Gruppe [¹⁸F]SFB in 80 min über drei Stufen.⁵⁶

BASULI et al. konnten kürzlich zeigen, dass [¹⁸F]FPy-TFP durch direkte Elution des [¹⁸F]Fluorids mit dem *N,N,N*-Trimethylammoniumtriflat-Markierungsvorläufer in nur 10 min hergestellt werden kann. Zudem ist mit [¹⁸F]FPy-TFP die Markierung von Albumin in nur 30 min mit einer radiochemischen Ausbeute von 26-34% gelungen (Abbildung 8).⁶⁴ [¹⁸F]FPy-TFP kann zudem durch einfache Festphasenextraktion von dem Markierungsvorläufer abgetrennt werden. Eine zeitaufwendige chromatographische Isolation über HPLC entfällt damit.

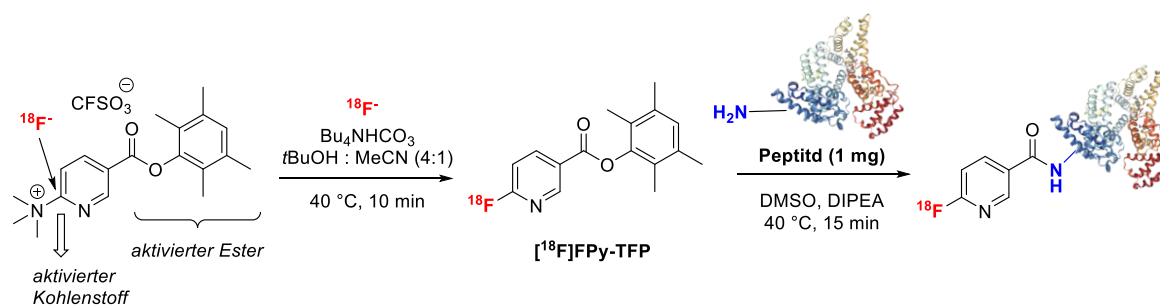


Abbildung 8: Radiofluorierung von Proteinen (hier Albumin) mit dem Markierungsbaustein [¹⁸F]FPy-TFP (BASULI et al, 2017).⁶⁴

Unter der Vielzahl an beschriebenen prosthetischen Gruppen für die indirekte Radiofluorierung hat jede Methode sicherlich ihre eigenen Vor- und Nachteile für das jeweilige Target. Die Mehrheit der etablierten indirekten Methoden erfordert derzeit jedoch noch eine meist (zeit-)aufwendige Herstellung, bevor das eigentliche Target mit dem Markierungssyntheton konjugiert werden kann. Neue Ansätze, wie von BASULI et al.⁶⁴⁻⁶⁶, lassen auf weitere Innovationen hoffen, die indirekte Radiosynthesen vereinfachen und damit insbesondere die Automatisierung für die klinische Bildgebung ermöglichen.

1.4 PET-Bildgebung biologischer Targets

Mit Beginn der Neunzehnhundertsiebzigerjahre fanden bildgebende Verfahren wie die Computertomographie (CT), die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (kurz SPECT, engl. Single photon emission computed tomography) und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ihren Einzug in die Onkologie und Neurowissenschaften.⁶⁷ Die Möglichkeit, auf nicht-invasive Weise einen tiefen Einblick in die Strukturen (CT) und Funktionen (PET, SPECT) eines lebenden Organismus zu erlangen, ist heute fester Bestandteil der modernen Medizin. Durch SPECT und PET werden biologische Prozesse wie u.a. Genexpression, Enzymaktivität oder Verteilungsdichten von Rezeptoren dargestellt. So ist es beispielsweise möglich, Herde bakterieller Infektionen über ihren Maltodextrin-Stoffwechsel zu lokalisieren.⁶⁸ Das „molekulare Ziel“ (auch Target), welches hier adressiert wird, ist der von Escherichia Coli (E. coli) exprimierte Maltodextrin-Transporter den Maltodextrin hochspezifisch bindet.⁶⁹

2-^[18F]Fluordesoxy-D-glucose (^[18F]FDG), ein Klassiker unter den ^{18F}-Radiopharmaka,⁷⁰⁻⁷³ ist für den Glucosestoffwechsel ein ähnlich geeignetes Substrat wie die Glucose selbst. Ein abnormer Glucosestoffwechsel, wie ihn auch Tumor-Zellen zeigen (*Warburg-Effekt*⁷⁴), kann durch ^[18F]FDG-PET (eine der Hauptanwendungen von ^[18F]FDG) detektiert werden. Daneben wird ^[18F]FDG vielfältig eingesetzt, darunter auch zur Diagnose der Alzheimer-Krankheit, Demenz oder Epilepsie.⁷⁵⁻⁸⁰

Ein erhöhter Glucosestoffwechsel zeigt sich allerdings auch bei sterilen Entzündungsprozessen (z.B. durch Autoimmunerkrankungen),⁸¹ sodass mit ^[18F]FDG keine Abgrenzung zwischen steriler und bakterieller Entzündung getroffen werden kann (entscheidend ist die Abklärung z.B. wenn nach aufwendigen Transplantationen Entzündungsherde auftreten). Neben radiomarkierten, auf Maltodextrin-basierten Tracern, konnte durch die Reduktion von ^[18F]FDG zu ^[18F]Fluordesoxysorbitol ein spezifisches Substrat für bakterielle Stoffwechselvorgänge gefunden werden.^{82, 83}

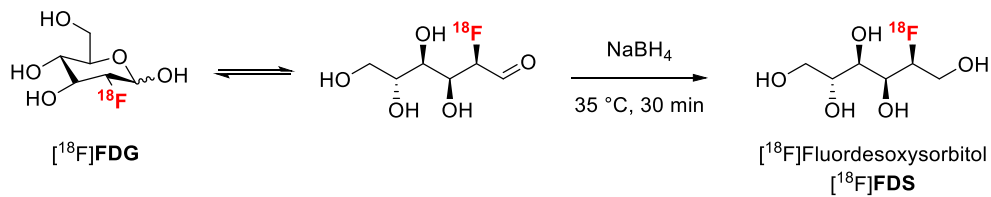


Abbildung 9: Zucker-basierte ^{18}F -Radiotracer zur Bildgebung metabolischer Prozesse.

Zur Darstellung der Funktionen des Gehirns kommen, neben metabolischen Markern wie $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, markierte Rezeptorliganden zum Einsatz, mit denen die Verteilungsdichte des jeweils adressierten Rezeptors visualisiert werden kann. In Kapitel 1.4.2.1 & 1.4.2.2 wird mit dem Dopamin- D_4 -Rezeptor sowie dem Serotonin- $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ -Rezeptor näher darauf eingegangen.

1.4.1 Wichtige Kriterien für den Einsatz von Radioliganden

1.4.1.1 Lipophilie

Lipophile ist eine der physiochemischen Eigenschaften von Pharmazeutika mit besonderer Bedeutung im pharmazeutischen Wirkstoffdesign. So ist sie eine der Kerngrößen aus Lipinski's „*rule of five*“ (Ro5), eine 1997 im Zuge einer Publikation erklärte Faustregel zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit von pharmazeutischen Verbindungen.⁸⁴⁻⁹⁰ Nach Definition der „International Union of Pure and Applied Chemistry“ (IUPAC) repräsentiert Lipophilie die Affinität eines Moleküls zu einer unpolaren Umgebung. Der Verteilungskoeffizient K_{OW} einer Substanz in einem biphasischen Oktanol/Wasser System ist eine einfach zugängliche experimentelle Messgröße für die Lipophile. Für gewöhnlich wird das Verhältnis K_{OW} der Substanzkonzentrationen c als dekadischer Logarithmus $\log D$ angegeben.^{91, 92}

$$\log D = \frac{c_{\text{O}}}{c_{\text{W}}} \quad \text{Gl. 2}$$

Da $\log D$ die Konzentrationen c als Summe aller Ionenspezies einer Verbindung darstellt, ist $\log D$ abhängig von dem pH-Wert der wässrigen Phase. Für nicht ionisierbare Verbindungen gilt $\log D = \log P$. Für den pharmazeutischen Chemiker ist zumeist der Verteilungskoeffizient bei physiologischem pH, ausgedrückt als $\log D_{7.4}$, von Interesse^{91, 92}. Sollen Pharmazeutika über den Blutkreislauf in das Gehirn gelangen, um dort ihre Funktion erfüllen zu können, müssen sie geeignet sein die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Dagegen ist eine solche Hirngängigkeit, bei Arzneimitteln unerwünscht, die in der Peripherie wirken sollen. Die Blut-Hirn-Schranke schützt als physiologische Barriere das Gehirn vor oftmals schädlichen, polaren Stoffen aus dem Blutkreislauf (daneben werden auch nicht-chemische Bestandteile wie Partikel oder Krankheitserreger an der Passage gehindert). Polare Moleküle mit

höherem Molekulargewicht als Harnstoff ($\log P = -2.11$, $M_w = 60 \text{ g/mol}$)⁹³, kann die Blut-Hirn-Schranke effektiv an der Passage hindern.⁹⁴ Die Permeabilität für essentielle hydrophobe Verbindungen wie Aminosäuren oder Glucose wird durch aktive Transporterproteine⁹² gewährleistet und teilweise sind auch Pharmazeutika, unabhängig von ihrer Lipophilie, in der Lage diese Transportmechanismen zu nutzen. Um die notwendige Permeabilität zu gewährleisten, sollten Radiopharmaka also hinreichend lipophil sein (daneben gelten weitere limitierende Kriterien z.B. nach Ro5). Tatsächlich zeigt die Auftragung der K_{ow} -Werte einiger gängiger ZNS-aktiver Arzneimittel, sowie biologische Substrate, gegen die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke einen annähernd linearen Zusammenhang.⁹⁵ In der Realität zeigt sich allerdings, dass die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke mit steigender Lipophilie nur bis zu einem gewissen Grad ansteigt und dann ein gegenläufiger Trend einsetzt. Mit zunehmender Lipophilie steigt auch die Affinität zu Plasma-Proteinen an denen die Pharmazeutika reversibel binden, und es stellt sich ein Gleichgewicht aus gebundener und ungebundener Fraktion ein. Die gebundene Fraktion kann die Blut-Hirn-Schranke aufgrund ihrer Größe nun nicht mehr passieren, ein Effekt der in Zusammenhang mit Albumin und Aspirin erstmals beschrieben worden ist.⁹⁶⁻⁹⁸ Zudem geht mit erhöhter Lipophilie auch eine höhere Affinität zu metabolischen Enzymen wie P450^{97, 98} sowie eine schnellere Aufnahme in den Leberstoffwechsel einher. Diese, sowie weitere Faktoren die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vernachlässigt werden müssen, haben im Wirkstoffdesign empirische Kriterien etabliert, um die Wirksamkeit von Pharmazeutika vorhersagen zu können.^{91, 92, 99-103}

1.4.1.2 Rezeptor-Ligandenbindung

Rezeptoren sind auf Zellmembranen oder im Zytoplasma integrierte Proteinkomplexe, die durch Bindung geeigneter Liganden Signale weiterleiten (Signaltransduktion) und dadurch direkt oder indirekt biochemische Prozesse regulieren. Endogene Rezeptorliganden (z.B. Neurotransmitter oder Hormone) binden spezifisch und reversibel an den passenden Rezeptortyp (Schlüssel-Schloss-Prinzip) und inhibieren oder aktivieren in der Folge den assoziierten biochemischen Signalweg. Die Affinität eines Liganden, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass der Ligand zu jedem beliebigen Zeitpunkt einen Rezeptor besetzt, zu einem bestimmten Rezeptortyp ist maßgeblich durch seine chemische Struktur bestimmt.¹⁰⁴ Eine möglichst hohe Affinität eines Radioliganden zu seinem Zielrezeptor (*Target*) ist ausschlaggebend für die Bildgebung in der PET. Die Affinität zu anderen Rezeptoren (*off-target affinity*) sollte dabei möglichst gering sein, d.h. der Radioligand sollte neben der hohen Spezifität eine hohe Selektivität aufweisen.^{91, 92}

Das Gleichgewicht zwischen freier Liganden- und Rezeptorkonzentration und dem Rezeptor-Ligand Komplex nach dem Massenwirkungsgesetz ist durch Gleichung 3.1 beschrieben.^{91, 92}



Die Dissoziationskonstante K_D beschreibt das Verhältnis von ungebundener Fraktion und dem Rezeptor-Ligand Komplex $[RL]$ (Gleichung 3.2).^{91, 92}

$$\frac{[L] \cdot [R]}{[LR]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} = K_D \quad \text{Gl. 3.2}$$

Die Affinität eines Liganden ist umso höher, je geringer K_D ist. Durch den Einsatz des Radioliganden in einem Sättigungsexperiment lässt sich K_D direkt experimentell bestimmen.

Dazu werden Zellen, die den Target-Rezeptor überexprimieren, mit steigenden Konzentrationen des Radioliganden inkubiert (Einstellung des Gleichgewichts nach Gl. 3.1 in Abhängigkeit von $[L]$), gewaschen (also ungebundene Liganden $[L]$ entfernt) und die gebundene Aktivität des Zellmaterials bestimmt. Die Auftragung der Aktivitäten der gebundenen Ligandenfraktion $[RL]$, die der Rezeptorkonzentration B entspricht, gegen die Konzentrationen des eingesetzten Radioliganden würde in einem idealen Experiment eine Sättigungskurve erwarten lassen ($[RL]_{\max} = B_{\max}$). Im Normalfall wird sich eine solche Sättigung allerdings nicht beobachtet, da der Ligand neben seiner spezifischen Bindung an den entsprechenden Rezeptoren auch an Nichtrezeptor-Bindungsstellen unspezifisch bindet. Solche unspezifischen Bindungsstellen liegen für lipophile (Radio-)liganden, in Form von Assoziation an Proteinen oder lipidreichen Membranen (insbesondere im fettreichen Hirngewebe) vor. Da die Anzahl der unspezifischen Bindungsmöglichkeiten, die der Rezeptoren für gewöhnlich um mehrere Größenordnungen übersteigt, gilt die spezifische Bindung im Rahmen des Experiments als nicht-sättigbar und folgt daher einem linearen Verlauf.^{91, 92}

Zur Darstellung der unspezifischen Bindung wird die spezifische Bindung des Radioliganden durch einen Überschuss seines nicht-radioaktiven (aber chemisch identischen) Konterparts verdrängt, bzw. in Konkurrenz um die Bindungsstellen gemeinsam mit diesem inkubiert. Die Totalbindung ist die Summe aus unspezifischer und spezifischer Bindung (Abbildung 10).^{91, 92, 99-101}

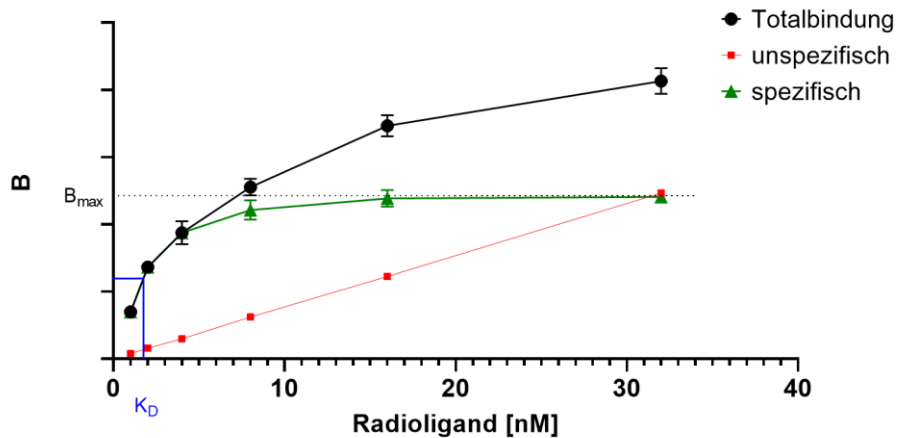


Abbildung 10: Darstellung eines Sättigungsexperiments zur experimentellen Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D eines Radioliganden. Die Totalbindung (schwarz) ist die Summe aus spezifischer (grün) und unspezifischer Bindung (rot).

Generell eignen sich Radioliganden mit geringer unspezifischer Bindung am besten für die Bildgebung. Als empirische Richtwerte für den Anteil an spezifischer Bindung gelten $\geq 50\%$ als gerade noch akzeptabel, $\geq 70\%$ als gut und $\geq 90\%$ als hervorragend.¹⁰⁵

Für die Charakterisierung der lokalen Verteilung eines Rezeptortyps im Gehirn, oder um die Eignung eines Radioliganden zu diesem Zweck zu evaluieren, bietet sich die *In-vitro*-Autoradiographie an Rattenhirnschnitten an. Ähnlich wie bei einem Sättigungsexperiment werden Hirnschnitte zunächst mit dem Radioliganden inkubiert und nach Herauswaschen der ungebundenen Fraktion auf einer Fotoplatte entwickelt. Über die Bindung des Radioliganden lassen sich je nach Spezifität des Radioliganden, Rückschlüsse auf die Verteilung des Rezeptors im Gehirn schließen.

Während die Konzentration an unspezifischen Bindungsstellen für eine bestimmte Gewebeart annähernd als konstant „hoch“ betrachtet werden kann, ist die Rezeptordichte $[B_{\max}]$ abhängig vom Typ des jeweiligen Rezeptors (Expression). Für besonders geringere Verteilungsdichten $[B_{\max}]$ eines Rezeptortyps, wie dem Dopamin D_4 -Rezeptor ($B_{\max} = 8-64 \text{ fmol/mg}^{106}$; normalerweise liegen Rezeptorkonzentrationen im nanomolaren Bereich), erhöhen sich daher die Anforderungen an Spezifität und Selektivität an den (Radio-)Liganden. Für solche Fälle, in denen der Bildgebung von Rezeptoren mit extrem geringer Verteilungsdichte Grenzen gesetzt sind (aus Mangel an ausreichend hochspezifischen und selektiven Liganden), wird mitunter die molare Aktivität (A_M) des Radioliganden zu einem Faktor mit entscheidender Bedeutung für den Erfolg des Experiments.^{91, 92, 99-101}

Bei geringen Verteilungsdichten $B_{\max}$ wird der Sättigungsbereich bereits bei entsprechend geringen Ligandenkonzentrationen (Radioligand + Träger) erreicht, deren Aktivität für eine Bildgebung unter Umständen zu gering ist. Eine weitere Erhöhung der Ligandenkonzentration (Aktivität) würde nun

lediglich den Anteil an unspezifischer Bindung erhöhen und ist daher kontraproduktiv für die Bildgebung. In solchen Grenzfällen ist es also umso mehr erforderlich, dass ausreichend freie Bindungsstellen durch den Radioligand besetzt werden. Bei der ^{18}F -Markierung ist allerdings der Eintrag von ^{19}F -Fluorid in Spuren in die Synthese nicht zu vermeiden und daher wird Fluor-19 ebenso wie Fluor-18 in das Zielmolekül eingebaut. Daher lässt sich der Radioligand nur gemeinsam mit seinem ^{19}F -Analogon (auch „Träger“; ebenso wird $^{19}\text{F}^-$ in Bezug zu $^{18}\text{F}^-$ als Träger bezeichnet) isolieren. Da sich Träger und Radioligand chemisch identisch verhalten, konkurrieren beide um die freien Bindungsplätze an den Rezeptoren. Bei geringen Verteilungsdichten $B_{\max}$ des Targetrezeptors kommt es daher auf einen möglichst geringen Trägergehalt an, d.h. der Radioligand muss eine hohe molare Aktivität aufweisen.^{24, 102}

1.4.1.3 Molare Aktivität

Die molare Aktivität (A_m) beschreibt das Verhältnis der Aktivität A (z.B. die Anzahl an ^{18}F -markierten Molekülen) zu der Summe der Teilchenzahl derselben chemischen Verbindung mit nicht-radioaktivem Isotop (Träger) sowie der Teilchenzahl des Radioliganden (Gl. 4):¹⁰⁷

$$A_m = \frac{A}{n} = \frac{[GBq]}{[\mu\text{mol}]} \quad \text{Gl. 4.1}$$

Analog ist bereits die molare Aktivität A_m von ^{18}F -Fluorid durch den Gehalt n an ^{19}F -Fluorid determiniert.

Die Aktivität A ist gegeben durch die Anzahl N der Radionuklide sowie deren Halbwertszeit $t_{1/2}$:

$$A = \frac{dN}{dt} = N \cdot \lambda = \frac{N \cdot \ln 2}{t_{1/2}} \quad \text{Gl. 4.2}$$

Durch die intrinsische Abhängigkeit der Aktivität von der Halbwertszeit ergeben sich für kurzlebige Radionuklide höhere molare Aktivitäten.

Für Anwendungen im Bereich der Bildgebung sind im Normalfall hohe molare Aktivitäten gewünscht. Da die molare Aktivität mit dem Zerfall des Radionuklids, entsprechend dem Zerfallsgesetz, kontinuierlich abnimmt, ist die maximale molare Aktivität $A_m^{\max}$ abhängig von der Halbwertszeit und daher für jedes Radionuklid spezifisch. Für radiofluorierte Verbindungen liegt der theoretische Wert für $A_m^{\max}$ mit 63 TBq/ μmol weit über den molaren Aktivitäten, die sich in der Praxis erzielen lassen (100-350 GBq/ μmol). Dieser erheblichen Diskrepanz von Theorie und Praxis kann zum einen der

Kontamination des $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ Targets durch $[^{19}\text{F}]\text{Fluorid}$ während der Produktion (^{19}pF), als auch dem ungewollten Einbringen von $[^{19}\text{F}]\text{Fluorid}$ in die Radiosynthese zugerechnet werden (^{19}sF). Im Normalfall ist A_m^{max} vor allem durch ^{19}sF limitiert ($^{19}\text{pF} \ll ^{19}\text{sF}$).¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

$$A_m = A_m^{\text{max}} \left(\frac{^{18}\text{pF}}{^{18}\text{pF} + ^{19}\text{pF} + ^{19}\text{sF}} \right); ^{19}\text{pF} \ll ^{19}\text{sF} \quad \text{Gl. 4.3}$$

Für gewöhnlich werden große Anstrengungen unternommen, um die Kontamination durch ^{19}pF über den gesamten Produktionsweg auf ein Minimum zu reduzieren. Um bei der Radiosynthese eines Tracers eine möglichst hohe molare Aktivität zu bewahren, muss der Anteil an eingebrachten ^{19}sF möglichst geringgehalten werden. Neben der Vermeidung von Kontaminationsmöglichkeiten, beispielsweise durch Reduktion der eingesetzten Substanzmengen (Lösungsmittel, Reagenzien), sind die entscheidenden Faktoren:

- die Syntheszeit ab *EOB*,
- die eingesetzte Startaktivität.

Nach der Bestrahlung des $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ Targets (*EOB: End of Bombardement*) verringert sich A_m kontinuierlich entsprechend der Halbwertszeit. Während auf den Anteil ^{19}pF nur durch eine möglichst kurze Syntheszeit ab *EOB* Einfluss genommen werden kann, lässt sich der ^{19}sF -Anteil durch Erhöhung der eingesetzten Startaktivität verringern (da $^{19}\text{pF} \ll ^{19}\text{sF}$).¹⁰⁸ Mitunter werden Radiosynthesen ausschließlich zum Zweck einer hohen molaren Aktivität mit hohen Startaktivitäten (>10 GBq) durchgeführt. Da die molare Aktivität der Zielverbindung nach der Radiomarkierung weitestgehend festgelegt ist, können nachfolgende Synthesestufen sowie Isolation des Radiotracers manuell mit einem Aliquot, also einem Bruchteil der Gesamtaktivität, durchgeführt werden.

Die hohen molaren Aktivitäten erlauben den Einsatz von n.c.a. Tracern im subnanomolaren Bereich, sodass eine pharmakologische Beeinflussung oder gar toxische Effekte ausgeschlossen werden können (Tracerprinzip).¹⁰⁹

1.4.2 Rezeptorliganden und Enzyminhibitoren

1.4.2.1 Dopamin D₄-Rezeptor

Fünf Subtypen an Dopaminrezeptoren D₁₋₅ gehören nach heutigem Kenntnisstand zur Signalerfassung des dopaminergen Systems. Sie alle gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die Signaltransduktion erfolgt daher nach Aktivierung des Rezeptors über das G-Protein (Guanosintriphosphat-bindendes Protein). Untereinheiten der G-Proteine modulieren bei Aktivierung durch die Rezeptor-Ligand-Bindung die Aktivität der Adenylatcyclase, welche die Umwandlung von ATP (Adenosintriphosphat) zum sekundären Botenstoff cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) reguliert.¹¹⁰ Eine Hochregulierung des lokalen cAMP-Spiegels bewirkt, unter Beteiligung von Proteinkinasen (insbesondere Proteinkinase A, PKA) die Phosphorylierung von Proteinen, welche dann durch Konformationsänderung ihrer Funktion als Enzyme nachkommen. Auf die Weise kann letztendlich am Ende einer Signaltransduktionskaskade eine biochemische Reaktion regulativ beeinflusst werden.¹¹¹⁻¹²⁰

Unterschiede in ihrer pharmakologischen Beeinflussbarkeit sowie der unterschiedlichen Second-Messenger-Kaskaden führen zu einer weiteren Einteilung der Subtypen in die D₁- (ähnliche) sowie D₂- (ähnliche) Gruppe, deren Namegeber die jeweils mengenmäßig häufigste Unterform ist. Die Gruppe der D₁-ähnlichen Rezeptoren bilden der D₁- sowie der D₅- Subtyp, die überwiegend postsynaptisch auftreten. Gekoppelt an ein stimulierendes G_s-Protein, das bei Bindung eines Agonisten an den Rezeptor die Enzymfunktion der Adenylatcyclase aktiviert, haben die D₁-Rezeptoren eine stimulierende Wirkung auf die nachgeschaltete Zelle. Dagegen sind D₂-, D₃- und D₄-Rezeptoren, welche die D₂- (ähnliche) Gruppe bilden, an G_i-Proteine gekoppelt, die auf die nachgeschaltete Zelle eine hemmende Wirkung entfalten.¹¹¹⁻¹²⁰

Tabelle 3: Wesentliche Unterscheidungsmerkmale der D₁/D₂-Gruppen.

Gruppe	Adenylatcyclase	cAMP	Wirkung auf die Zelle
D₁ (D ₁ /D ₅)	Aktivierung durch G _s -Protein	↑	stimulierend
D₂ (D ₂ /D ₃ /D ₄)	Hemmung durch G _i -Protein	↓	hemmend

Die Anhäufung dopaminerger Nervenzellen in der Substantia nigra pars compacta, Area tegmentalis ventralis (engl.: ventral tegmental area, VTA) und im Hypothalamus deuten auf den Ursprung der drei wesentlichen Projektionen des dopaminergen neuronalen Systems:¹²¹

- Mesolimbisch-mesocorticales System: Die VTA liegt im Mittelhirn nahe der Substantia nigra und projiziert zu Strukturen des Limbischen Systems (z.B. Nucleus accumbens). Motivation und emotionale Reaktionen werden hier gesteuert (dopaminerges Belohnungssystem).
- Nigrostriatales System: Dopaminerge Neurone in der Substantia nigra pars compacta, stehen über nigrostriatale Bahnen in Kontakt zum Putamen und Nucleus caudatus. Dieses System koordiniert die extrapyramidale Motorik.
- Tuberoinfundibuläres System: Verbindet Hypothalamus und Hypophyse. Nimmt Einfluss auf den Prolaktinhaushalt.

Tabelle 4: Hirnregionen mit erhöhter Expression der Dopaminrezeptoren D₁₋₅ im Gehirn.^{106, 122-128}

D ₁ -Gruppe		D ₂ -Gruppe		
D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
Striatum	Hippocampus ¹²⁹ (gering)	Striatum (hoch)	Striatum	Hippocampus ¹²⁶
Nucl. accumbens			Nucl. accumbens	Präfrontalkortex
(alle hoch)			(alle hoch)	(alle gering)

Eine besonders geringe Verteilungsdichte im Gehirn weist der D₄-Rezeptor auf.¹³⁰⁻¹³³ Daher ist es nicht überraschend, dass die Kenntnislage über diesen Rezeptor heute immer noch allenfalls als „unsicher“ bezeichnet werden muss. Dies gilt sowohl für die pharmakologischen Funktionen unter der Beteiligung des D₄R, als auch für die genaue Lokalisierung dieses Rezeptors im Gehirn. *In-situ*-Hybridisierung (mit D₄R-mRNA) sowie immunohistochemische Untersuchungen (mit D₄R-Antikörpern) als auch Radioligand-Bindungsstudien bieten widersprüchliche und semi-quantitative Aussagen über die Lokalisierung des D₄R. Während immunohistochemische Befunde nur einen stark eingeschränkten quantitativen Vergleich zwischen den D_iR-Subtypen zulassen, zeigt die *In-situ*-Hybridisierung über den Nachweis der mRNA lediglich den Ort der Translation, was nicht zwangsläufig mit der tatsächlichen Expression des Rezeptors in Übereinstimmung steht.¹³⁰⁻¹³⁸

Dem D₄-Rezeptor wurde besondere Aufmerksamkeit zuteil, als 1991 mit der in *Nature* veröffentlichten Bindungsstudie des Neuroleptikums *Clozapin* eine um den Faktor 10 höhere Affinität für den D₄R gegenüber dem D₂R gezeigt hat,¹³⁹ womit erstmals eine plausible Erklärung für das günstige Wirkprofil dieses ersten atypischen Neuroleptikums gegeben wurde. Zu den Charakteristika der Atypika zählt neben der für den Therapieeffekt hauptsächlich verantwortlichen Blockade der D₂-Rezeptoren, das weitgehende Ausbleiben extrapyramidalmotorischer Störungen (EPMS). Das Bindungsprofil des *Clozapins* hat eine entscheidende Rolle des D₄R für das günstige Wirkprofil dieses Neuroleptikums nahegelegt, wodurch sich Forschungsansätze zur Entwicklung von D₄-spezifischen Antagonisten zur Behandlung der Schizophrenie kurzzeitig intensiviert haben. Da folgende Studien mit spezifischen D₄-

Antagonisten wie L-745,870 (Abbildung 11) allerdings keinen unmittelbaren Zusammenhang von spezifischer D₄R-Blockade und Therapieeffekt bestätigen konnten, hat sich das Interesse an der Entwicklung spezifischer D₄R-Antagonisten in darauffolgenden Jahren weitgehend verloren.

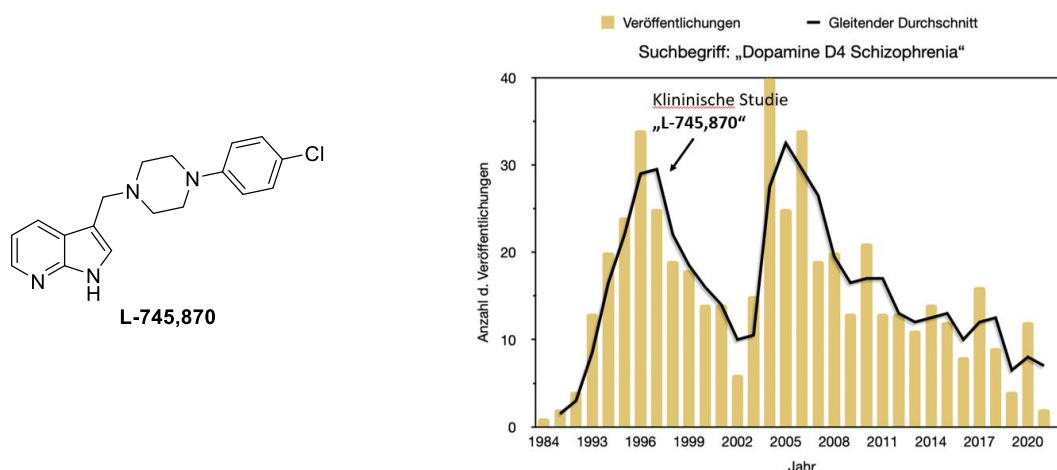


Abbildung 11: Links: Struktur des D₄-spezifischen Antagonisten L-745,870. Rechts: Anzahl der jährlichen Veröffentlichungen zu dem Suchbegriff „Dopamine D4 Schizophrenia“ (pubmed.gov).

Heute etablierte und gängige Neuroleptika zeigen ein vielfältiges Bindungsprofil mit mehr oder weniger unselektiv ausgeprägten Affinitäten zu verschiedenen Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren („dirty drugs“). Bis heute ist die Auswahl an hochspezifischen D₄-Rezeptorliganden daher sehr gering¹³⁴ und Radioliganden zur spezifischen Darstellung des D₄-Rezeptors *in vivo* sind nicht verfügbar. Bisher veröffentlichte, Studien mit Bildgebung von D₄-Radioliganden (markiert mit klinisch relevanten Radionukliden) beschränken sich derzeit auf die Arbeiten von KÜGLER & PRANTE et al.^{130, 131} KÜGLER et al. hatten 2011 eine Reihe von (Benzodioxin-6-yl)-benzylpiperazinen (mit K_i(hD_{4.4}R) = 1.1 - 15 nM) mit Fluor-18 markiert und systematisch evaluiert. Der dabei postulierte Einfluss der Lipophilie auf die unspezifische Bindung der jeweiligen Derivate konnte dabei überzeugend bestätigt werden. Nur eine der Verbindungen ([¹⁸F]FPBP, Abbildung 12) zeigte einen ausreichend geringen Anteil an unspezifischer Bindung in den *In-vitro*-Autoradiographien. Die Totalbindung zeigte eine deutliche und abgegrenzte Anreicherung in den Colliculi sowie in den inneren Strukturen des Cerebellums. Da die Totalbindung hier allerdings mit den strukturverwandten Derivaten verdrängt wurde, kann eine „off-target“-Bindung nicht zuverlässig ausgeschlossen werden. In diesen Hirnrealen wurde durch *In-situ*-Hybridisierung und Immunohistochemie zudem keine erhöhte D₄R-Expression nachgewiesen. In der *Ex-vivo*-Autoradiographie zeigte die Totalbindung desselben Markierungsprodukts dagegen eine deutliche Anreicherung im Cortex sowie Hippocampus (D₄R-Expression¹⁰⁶). Im Cerebellum war die Anreicherung auf die äußeren Bereiche begrenzt und in den Colliculi im Vergleich zu den *In-vitro*-Autoradiographien weniger stark ausgeprägt. Die Ergebnisse der *Ex-vivo*-Autoradiographie stehen in guter Übereinstimmung mit den Resultaten von [¹³¹I]FAUC113 (PRANTE et al., 2006¹³²). Eine Bestätigung

der Ergebnisse durch nicht-strukturverwandte D₄-spezifische Radioliganden ist allerdings unbedingt notwendig, um die Annahme einer D₄-spezifischen Anreicherung der Radioliganden von KÜGLER & PRANTE et al. zu unterstützen.²⁴

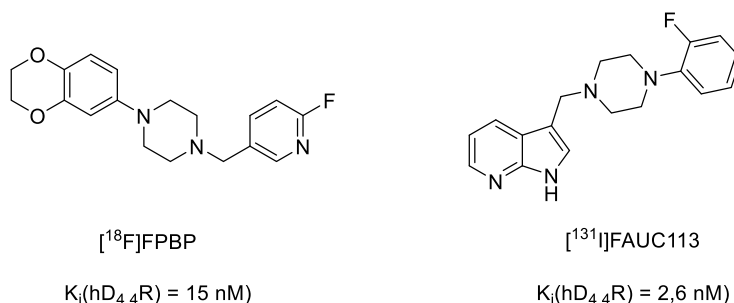


Abbildung 12: Chemische Strukturen von ^[18F]FPBP und ^[131I]FAUC113.^{131, 132}

Eingehendere Kenntnisse über die Funktionen und Beteiligungen des D₄R an psychischen Erkrankungen wie der Schizophrenie oder ADHS (Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung) könnten durch *In-vivo*-PET-Studien an Erkrankten ermöglicht werden.¹⁴⁰⁻¹⁴⁸ Der Bedarf an solchen Studien gab den Anlass zur Radiosynthese und Evaluation neuer, ¹⁸F-markierter D₄-Rezeptorliganden der im ersten Teil der vorliegenden Arbeit beschrieben wird.

1.4.2.2 Serotonin 5-HT_{2A}-Rezeptor

Serotonerge Fasern innervieren, ausgehend von den Raphekernen, die kortikalen und limbischen Strukturen des medialen Temporallappens und modulieren mit der Freisetzung von Serotonin (5-HT, 5-Hydroxytryptophan) unsere emotionale Wahrnehmung sowie Prozesse des Erlernens und der Gedächtnisbildung.^{149, 150} Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass der 5-HT_{2A}-Rezeptor hierbei entscheidende modulatorische Funktionen übernimmt. Abnormale 5-HT_{2A}R-Aktivität wird mit einigen psychischen und kognitiven Störungen wie Depression, Schizophrenie, Alzheimer- und Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht.¹⁵¹ 5-HT_{2A}-adressierende Antagonisten sind daher ein vielversprechender Ansatz bei der Behandlung einiger dieser neuropsychiatrischen Störungen wie aus Studien zu antidepressiven¹⁵², angstlösenden¹⁵³ und antipsychotischen¹⁵⁴ Effekten des 5-HT_{2A}-Antagonismus hervorgeht. Wie die Dopaminrezeptoren sind auch Serotoninrezeptoren (5-HT₁₋₇R) G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (vgl. 1.4.2.1), mit Ausnahme des 5-HT₃ Subtyps, der als ligandengesteuerter Ionenkanal fungiert. Der 5-HT_{2A}-Subtyp ist wohl der bedeutendste unter den Rezeptoren des serotonergen Systems und ein häufig adressiertes Target diverser Psychopharmaka.¹⁵⁵⁻
¹⁵⁸ Im zentralen Nervensystem (ZNS) ist der 5-HT_{2A}R insbesondere in der Lamina V des Cortex, im caudalen Teil des Caudate-Putamen,¹⁵⁹ im Tuberculum olfactorium sowie in einigen Nuclei des

Hirnstammes exprimiert, wie durch *In-vitro*-Autoradiographie sowie *In-situ*-Hybridisierung übereinstimmend gezeigt werden konnte.¹⁶⁰

Aus pharmakologischer Sicht sind die Funktionen (oder auch die funktionelle Beteiligung) des 5-HT_{2A}R im ZNS besonders interessant. So wird heute davon ausgegangen, dass die unter 1.4.2.1 beschriebenen Nebenwirkungen (EPMS), durch 5-HT_{2A}R Blockade weitgehend kompensiert werden (gilt daneben auch für 5-HT_{1A}R und D₄R).¹⁶¹ Übereinstimmend wird heute zudem die halluzinogene Wirkung einiger Substanzen wie LSD (Lysergsäurediethylamid), Psilocybin, Meskalin oder DOI (2,5-Dimethoxy-4-iodamphetamin) ihrer (partial-)agonistischen 5-HT_{2A} Bindung zugerechnet.¹⁵⁹ Aktuellere Forschungsansätze versuchen Veränderungen der 5-HT_{2A}R Verteilungsdichte zur Früherkennung von Personen mit erhöhtem Erkrankungsrisiko für Psychosen zu nutzen.^{162, 163}

Bisher wurden verschiedene Radioliganden für die PET-basierte Visualisierung von 5-HT_{2A}Rs entwickelt, darunter radioaktiv markierte Antagonisten wie [¹⁸F]Setoperon^{164, 165}, [¹⁸F]Altanserin¹⁶⁶⁻¹⁶⁸, [¹¹C]MDL 100,907¹⁶⁹⁻¹⁷¹ oder [¹⁸F]MDL 100,907¹⁷¹⁻¹⁷⁴ und auch Agonisten wie [¹¹C]CIMBI-36^{175, 176} oder [¹⁸F]FETCIMBI-36¹⁷⁷ (Abbildung 13).

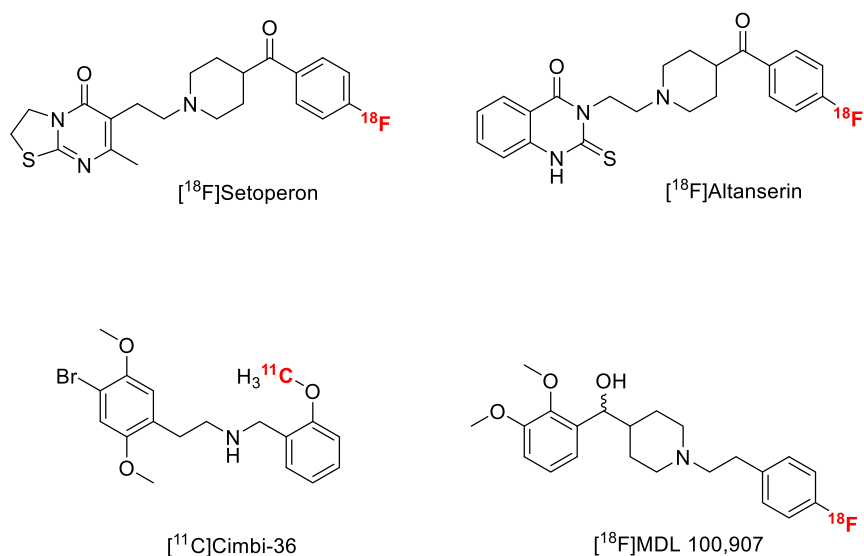


Abbildung 13: Chemische Strukturen bekannter Radioliganden für die PET-basierte Visualisierung des 5-HT_{2A}R.

Ebenso wurden mehrere ¹²³I-markierte Verbindungen für die SPECT-Bildgebung entwickelt, obwohl nur der Antagonist [¹²³I]Iod-R91150 geeignete Bindungseigenschaften, Selektivität und Hirngängigkeit für die Bildgebung von 5-HT_{2A}Rs bei Ratten aufwies.^{178, 179} Spätere Tier- und Humanstudien mit [¹²³I]Iod-R91150 zeigten ein Bindungsmuster das mit in früheren autoradiografischen Studien zur 5-HT_{2A}-Bildgebung¹⁸⁰⁻¹⁸² übereinstimmt. [¹²³I]Iod-R91150 wurde inzwischen in klinischen Studien bei Patienten mit Schizophrenie¹⁸³, Depression¹⁸⁴, „Parkinson“¹⁸⁵ sowie dem Asperger-Syndrom¹⁸⁶ eingesetzt.

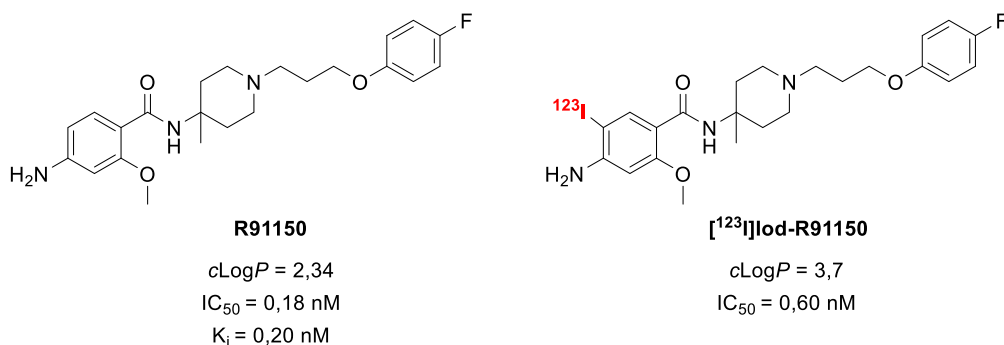


Abbildung 14: Struktur und Eigenschaften der 5-HT_{2A} selektiven Verbindung R91150 und des radioiodierten Analogons [¹²³I]iod-R91150. K_i Werte wurden durch Inhibition mit [³H]Ketanserin ermittelt. Daten aus ^{178, 179, 187, 188-191}

Die mit der Iodierung einhergehende Erhöhung der Lipophilie gegenüber der Stammverbindung R91150 wirkt sich allerdings nachteilig auf das Signal-Hintergrund-Verhältnis der Bildgebung aus.¹⁹² 2009 wurde daher von MÜHLHAUSEN et al. die erste Radiosynthese von [¹⁸F]R91150 vorgestellt. In den vorläufige Metabolismusstudien mit [¹⁸F]R91150 konnten Vorteile gegenüber etablierten 5-HT_{2A}-Radioliganden gezeigt werden. Darunter eine höhere Selektivität und das Ausbleiben hirngängiger Radiometaboliten (im Vergleich mit [¹⁸F]Altanserin und [¹⁸F]Setoperon) sowie geringere Lipophilie und eine verbessertes Signal-Hintergrund-Verhältnis (verglichen mit [¹²³I]iod-R91150) und die in der *In-vivo*-Bildgebung vorteilhafte Halbwertszeit des Fluor-18 Isotops (gegenüber [¹¹C]MDL100,907. Die Radiosynthese von MÜHLHAUSEN et al. ist mit 6-Stufen über 190 min allerdings zeitaufwändig und nicht automatisierbar, wodurch weitere Studien mit [¹⁸F]R91150 bisher nicht realisiert wurden.

1.4.2.3 Prostata-spezifisches Membran-Antigen (PSMA)

„Prostatakrebs ist weiterhin die häufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste Krebstodesursache bei Männern in Deutschland“. 23% der im Jahr 2016 bei Männern auftretenden malignen Neoplasien betrafen die Prostata.^{193, 194}

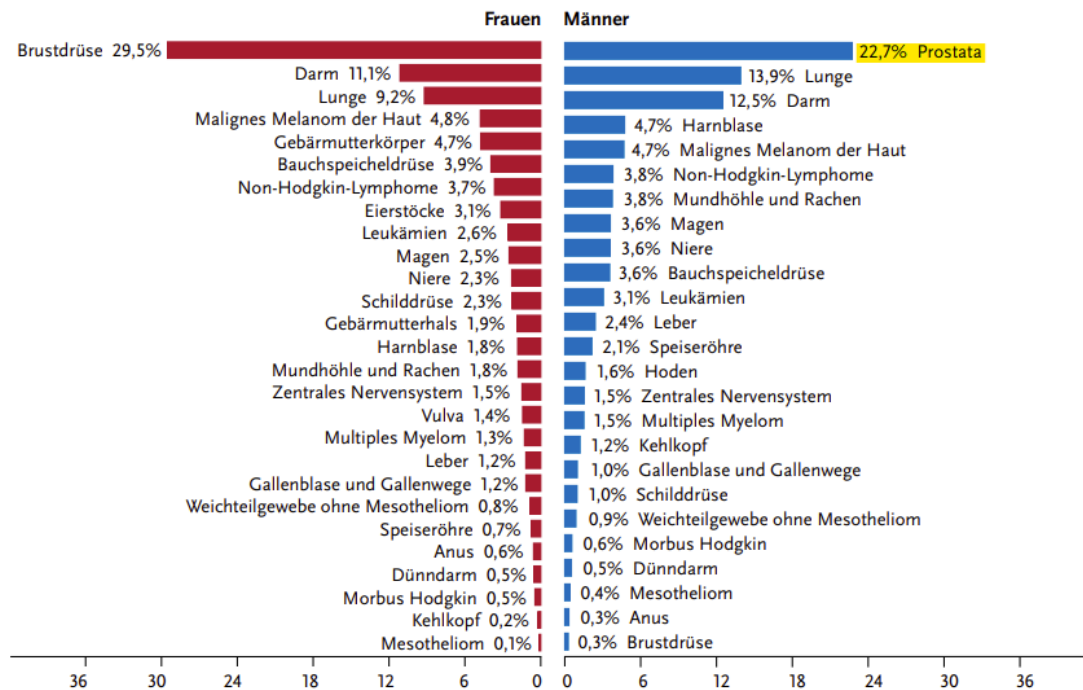


Abbildung 15: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs). Modifiziert von Robert-Koch-Institut: „Krebs in Deutschland 2015/2016“.¹⁹⁴

Krebszellen, die von der Prostata ausgehen, tragen auf ihrer Zelloberfläche das Prostata-spezifische Membran-Antigen (PSMA) mit einer deutlich erhöhten Expression im Vergleich zu den meisten anderen Geweben. Dieses Membranantigen stellt daher ein hervorragendes Target für die nuklearmedizinische Bildgebung und Therapie dar. Für die klinische Diagnostik sind heute vor allem ⁶⁸Ga- und ¹⁸F-markierte PSMA-Liganden im klinischen Einsatz (Abbildung 16).¹⁹⁵⁻¹⁹⁹

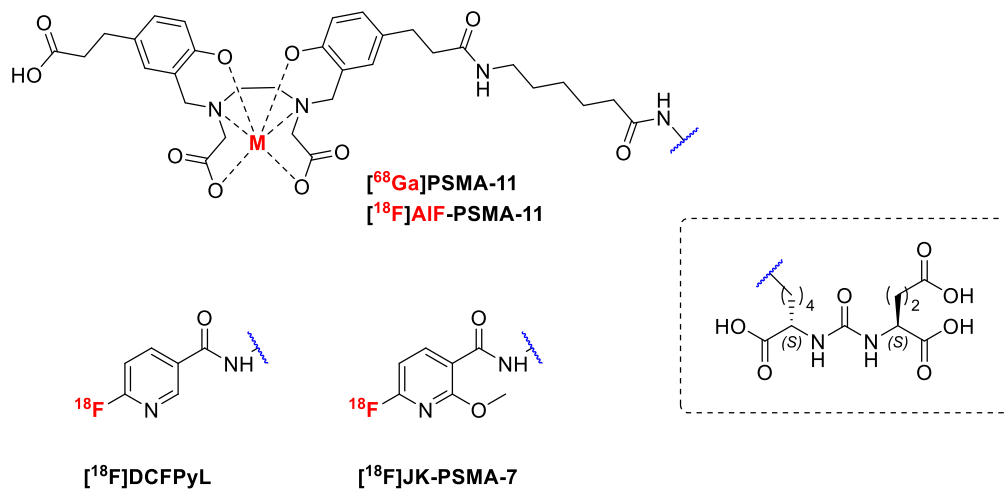


Abbildung 16: Strukturen von klinisch relevanten, ^{68}Ga - und ^{18}F -markierten PSMA-Liganden.

Ganz allgemein sollten PET-basierte PSMA-Liganden folgende wichtige Voraussetzungen erfüllen:

- hohe Affinität zu PSMA,
- hohes “Target-to-background”-Verhältnis,
- *In-vivo*-Stabilität.

Die Bindungsaffinität eines PSMA-Liganden kann *in vitro* an LNCaP-Zellen (humane Prostatakarzinomzelllinie, 1983 von HOROSZEWCZ et al. identifiziert²⁰⁰) bestimmt werden (vgl. 1.4.1.2). Damit bietet sich die Möglichkeit, die grundsätzliche Eignung eines Kandidaten festzustellen, sodass teilweise auf Tierversuche verzichtet werden kann. Da *In-vitro*-Ergebnisse allerdings nur bedingt eine Aussage über den Metabolismus *in vivo* zulassen, sind *In-vivo*-Versuche an Kleintieren für geeignete Kandidaten letztendlich unumgänglich. Als Tumormodell kommen hierfür gewöhnlich Kleintiere (Mäuse oder Ratten) zum Einsatz, bei denen ein Tumorwachstum durch implantierte LNCaP-Zellen ausgelöst wurde.²⁰¹⁻²⁰⁷ Eine Alternative dazu bietet das Ganglien-Tumormodell an gesunden Ratten, wie von ENDEPOLS et al. beschrieben.²⁰⁸ Der Umstand, dass es sich bei Ganglien von Ratten ebenfalls um PSMA-positives Gewebe handelt, macht diese Ganglien zu hervorragende Surrogate für Prostatakrebs-Metastasen, mit denen PSMA-Liganden evaluiert werden können. Mit der geringen Größe der Ganglien einer Ratte von nur 1-2 mm, sind diese gut geeignet, kleine PSMA-positive Läsionen in frühen Stadien des Tumorwachstums zu imitieren.²⁰⁸

2 Veröffentlichungen & Manuskripte

A. *Radiosynthesis and evaluation of ^{18}F -labeled dopamine D_4 -receptor ligands.*

M. Willmann, J. Ermert*, O. Prante, H. Hübner, P. Gmeiner, B. Neumaier, *Nuclear Medicine and Biology* **2021**, 92, 43-52.

DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2020.07.004

Received 29 June 2020, Accepted 9 July 2020, Available online 16 July 2020.

B. *Radiosynthesis and biological evaluation of [^{18}F]R91150, a selective 5-HT_{2A} receptor antagonist for PET-imaging*

Michael Willmann, Julian Hegger, Bernd Neumaier*, Johannes Ermert.

Manuskript in Revision, *ACS Medicinal Chemistry Letters*

C. *Fast indirect ^{18}F -labeling via new prosthetic groups - Radiosynthesis and in vivo PET studies of the new PSMA specific Tracer [^{18}F]JK-PSMA15*

Michael Willmann, Benedikt Gröner, Lisa Donnerstag, Elizaveta A. Urusova, Heike Endepols, J. Ermert, Bernd Neumaier, Boris Zlatopolskiy*

Manuskript in Bearbeitung, *European Journal of Medicinal Chemistry*

2.1 Radiosynthesis and evaluation of ^{18}F -labeled dopamine D_4 -receptor ligands

M. Willmann, J. Ermert*, O. Prante, H. Hübner, P. Gmeiner, B. Neumaier, *Nuclear Medicine and Biology* **2021**, 92, 43-52.

DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2020.07.004

Received 29 June 2020, Accepted 9 July 2020, Available online 16 July 2020.

Radiosynthesis and evaluation of ^{18}F -labeled dopamine D_4 -receptor ligands

Michael Willmann^a, Johannes Ermert^{a*}, Olaf Prante^c, Harald Hübner^d, Peter Gmeiner^d, Bernd Neumaier^{a,b}

^a Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Neurowissenschaften und Medizin, INM-5, Nuklearchemie, 52425 Jülich, Germany

^b Uniklinik Köln, Institut für Radiochemie und Experimentelle Molekulare Bildgebung, 50937 Köln, Germany

^c Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg (FAU), Department of Nuclear Medicine, Molecular Imaging and Radiochemistry, Translational Research Center, 91054 Erlangen, Germany

^d Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg (FAU), Department Chemistry and Pharmacy, Medicinal Chemistry, 91058 Erlangen, Germany

* Corresponding author: j.ermert@fz-juelich.de

Abbreviated title: ^{18}F -labeled dopamine D_4 -receptor ligands

Keywords: ^{18}F -labeling, positron emission tomography, autoradiography, dopamine D_4 -receptor, schizophrenia, neurological diseases

ABSTRACT

Introduction: The dopamine D₄ receptor (D₄R) has attracted considerable attention as potential target for the treatment of a broad range of central nervous system disorders. Although many efforts have been made to improve the performance of putative radioligand candidates, there is still a lack of D₄R selective tracers suitable for *in vivo* PET imaging. Thus, the objective of this work was to develop a D₄-selective PET ligand for clinical applications.

Methods: Four compounds based on previous and new lead structures were prepared and characterized with regard to their D₄R subtype selectivity and predicted lipophilicity. From these, 3-((4-(2-fluorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine **I** and (S)-4-(3-fluoro-4-methoxybenzyl)-2-(phenoxyethyl)morpholine **II** were selected for labeling with fluorine-18 and subsequent evaluation by *in vitro* autoradiography to assess their suitability as D₄ radioligand candidates for *in vivo* imaging.

Results: The radiosynthesis of [¹⁸F]**I** and [¹⁸F]**II** was successfully achieved by copper-mediated radiofluorination with radiochemical yields of 7 % and 66 %, respectively. The radioligand [¹⁸F]**II** showed specific binding in areas where D₄ expression is expected, whereas [¹⁸F]**I** did not show any uptake in distinct brain regions and exhibited an unacceptable degree of nonspecific binding.

Conclusions: The compounds studied exhibited high D₄R subtype selectivity and log*P* values compatible with high brain uptake, but only ligand [¹⁸F]**II** showed low nonspecific binding and is therefore a good candidate for further evaluation.

Advances in Knowledge: The discovery of new lead structures for high-affinity D₄ ligands opens up new possibilities for the development of suitable PET-radioligands.

Implications for patient: PET-imaging of dopamine D₄-receptors could facilitate understanding, diagnosis and treatment of neuropsychiatric and neurodegenerative diseases.

1 Introduction

Dopamine (DA) is an important neurotransmitter involved in cognitive control, reward-related cognition and motor function that produces its effects by interaction with the DA receptors belonging to the G-protein-coupled receptor (GPCR) family. DA D₂ receptor (D₂R) antagonists have a long history as effective antipsychotic drugs, but their clinical application is limited by serious extrapyramidal side effects thought to result from DA receptor blockade in the striatum [1]. The DA D₄ receptor (D₄R), a less abundant member of the D₂-like DA receptor subfamily, has attracted considerable attention as potentially more suitable target for the treatment of central nervous system disorders such as schizophrenia [2], drug abuse [3] and attention deficit hyperactivity disorder [4]. First cloned in 1991, D₄R was identified as a preferential target of the atypical antipsychotic agent clozapine [5] showing a 10-fold higher affinity for the D₄ than for the D₂ receptor [6, 7] (**Fig. 1**), which suggested that selective D₄R antagonism could be responsible for the drug's unique clinical efficacy in otherwise treatment-resistant patients [8].

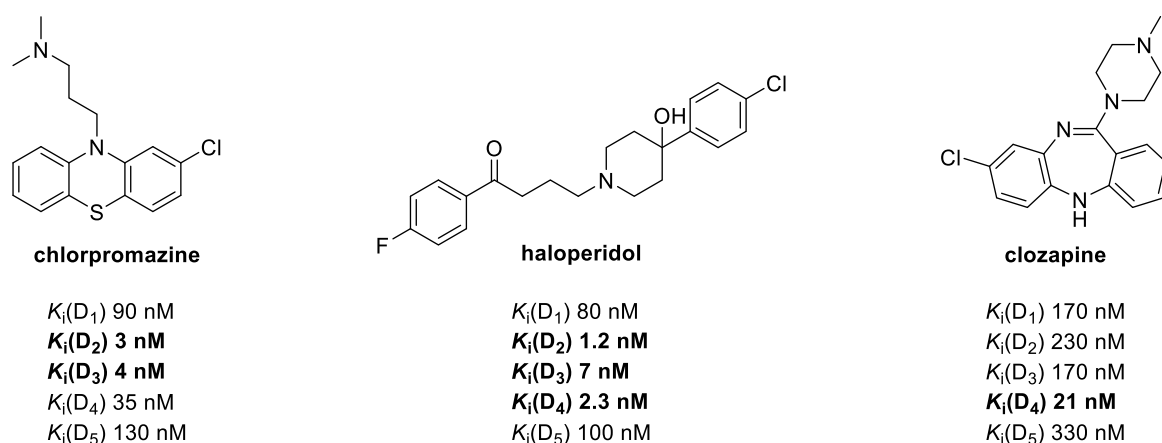


Fig. 1. The first atypical antipsychotic clozapine in comparison with typical antipsychotics. Clozapine shows a 10-fold higher affinity for the D₄ than for the D₂ receptor [41,42].

In addition, early mRNA and immunohistochemical studies indicated that D₄R expression is mostly restricted to extra-striatal (cortical and limbic) brain regions [9, 10], which could explain the very low propensity of clozapine to induce extrapyramidal side effects [11]. However, further studies could not confirm the clinical efficiency of D₄R antagonists in schizophrenia [12, 13] and a number of inconsistent or contradictory findings as well as apparent species differences in receptor distribution have complicated conclusions with regard to the role of D₄R in human health and disease [14, 15]. Imaging techniques like positron emission tomography (PET) could greatly aid in deciphering the physiological and pathophysiological role of D₄R, but their application has been hampered by a number of methodological difficulties. For example, while ligands like L-745,870 (**Fig. 2**) possess subnanomolar affinity and >2,000-fold selectivity for D₄R over D₂R, their aryl piperazine-based structure is common

to many GPCR ligands and associated with high off-target affinity (i.e. unspecific binding). The latter could be overcome by rational drug design based on structure-activity-relationship (SAR) studies, which led to the development of improved ligands with reduced specific binding to non-D₄ receptors [9, 10]. However, their use for PET imaging studies is further complicated by the low abundance of D₄R in the brain, as even moderate nonspecific binding of radioligand candidates can be sufficient to mask specific binding.

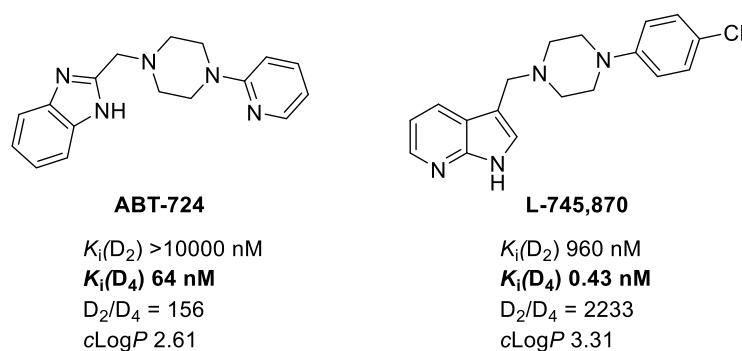


Fig. 1. D₄ selective receptor ligands ABT-724 and L-745,870 with binding affinities and calculated LogP values (ChemDraw 16) [43].

While difficult to predict based on SAR studies, nonspecific binding involves partitioning of ligands into phospholipid membranes [11] and often correlates with their lipophilicity/phospholipicity [12-14]. Here, we report our results with four candidate D₄R ligands (**Fig. 3**), which were derived from previous and new lead structures. The potential D₄ selective compounds were synthesized and their dopamine receptor affinities determined. Among these candidates, the two most promising compounds were ¹⁸F-labeled and evaluated by means of *in vitro* autoradiography to assess their suitability as D₄ radioligand candidates for *in vivo* imaging.

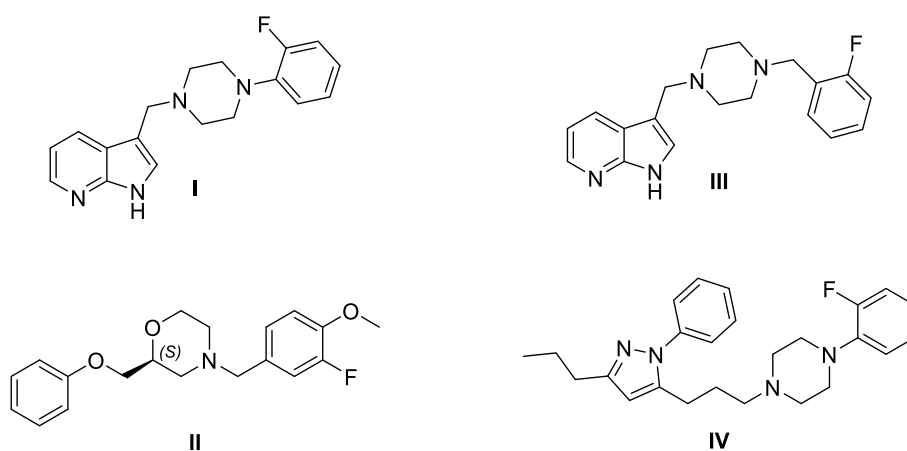


Fig 2. Compounds selected for binding studies.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

All chemicals and solvents were purchased by Aldrich (Germany), Fluka (Switzerland), Fluorochem (United Kingdom) and Merck (Germany) and used without any purification. Thin layer chromatography (TLC) was performed on precoated plates of silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany) and the compounds were detected at 254 nm. All reactions sensitive to moisture were carried out under argon atmosphere in reaction flasks dried overnight at 140 °C prior to use. All reaction mixtures were magnetically stirred. Organic extracts were dried with anhydrous MgSO_4 or Na_2SO_4 . ^1H , ^{13}C , and ^{19}F NMR spectra were recorded at 400.13, 100.61, and 376.49 MHz, respectively, by means of a Bruker Avance Neo 400 instrument (Bruker Bio Spin GmbH, Rheinstetten, Germany) in 5 % solution at 25 °C. Chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm) relative to trace amounts of the residual solvent signals. High-resolution mass spectrometry (HRMS) analyses were performed using a hybrid linear ion trap FTICR mass spectrometer LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a 7 T superconducting magnet by infusion. The mass spectrometer was first tuned and calibrated in the positive mode following the standard optimization procedure for all voltages and settings. Mass spectra were recorded in full scan from 200 to 1000 Da with a resolution of 100.000 at m/z 400. All data were processed using the Xalibur software version 2.1.

2.2 Syntheses of labeling precursors and reference standards

1H-Pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-3-carbaldehyde (1): To a solution of 7-azaindole (10.0 g, 84.7 mmol) in acetic acid (20 mL) and H_2O (40 mL) was added HMTA (10.6 g, 75.3 mmol). The reaction mixture was stirred at 120 °C for 6 h. It was cooled with an ice bath, and the resulting precipitate was collected and dried to afford **1** (7.83 g, 71 %) as pale yellow solid. Yield: 7.83 g (71 %); pale yellow solid; *R*_f 0.34 (80 % EtOAc/PE). ^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.69 (s, 1H), 9.93 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.40 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 8.36 (dd, *J* = 4.7, 1.7 Hz, 1H), 7.27 (dd, *J* = 7.8, 4.7 Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 185.40, 149.39, 144.83, 138.74, 129.21, 118.42, 116.63, 116.47. MS (ESI): m/z [$\text{M}+\text{H}$]⁺ calcd for $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_2\text{O}^+$: 147.06; found: 147.13. HRMS (ESI): m/z [M]⁺ calcd. for $\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_2\text{O}^+$: 145.03964; found: 145.04075.

Compounds **2** & **3** were synthesized according to a published procedure [15].

3-(1-Phenyl-3-propyl-1H-pyrazol-5-yl)propanal (4): To 3-(1-phenyl-3-propyl-1H-pyrazol-5-yl)propan-1-ol (**2**) (1.89 g, 7.74 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (100 mL) at 0 °C (ice bath) was added NaHCO_3 (1.30 g; 15.5 mmol, 2.0 eq.) and *Dess-Martin periodinane* (DMP) (3.94 g, 9.29 mmol, 1.2 eq.) under argon. The reaction mixture was stirred for 10 min at 0 °C and then allowed to warm up to ambient temperature. Stirring was continued for 2 h, maintaining the inert atmosphere. Consumption of the

starting material was monitored by TLC. The reaction mixture was diluted with a 1:1 mixture of 10 % aq. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and sat. aq. NaHCO_3 solution (50 mL) and stirred for 10 min. Et_2O (100 mL) was added and the layers were separated. The organic layer was washed with above 1:1 mixture of 10 % aq. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and sat. aq. NaHCO_3 solution (50 mL), dried (Na_2SO_4) and concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by flash column chromatography (silica: EtOAc/PE) to obtain 1.61 g (86 %) of product **4**. *R_f* 0.51 (33 % EtOAc/PE). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 9.75 (s, 1H), 7.57 – 7.27 (m, 5H), 6.00 (s, 1H), 3.10 – 2.84 (m, 2H), 2.84 – 2.45 (m, 4H), 1.89 – 1.47 (m, 2H), 0.98 (t, J = 7.3 Hz, 3H). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 153.78 (s), 142.29 (s), 139.54 (s), 77.79 (s), 77.36 – 76.83 (m), 76.52 (s), 42.67 (s), 30.31 (s), 22.98 (s), 19.01 (s). MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}^+$: 243.15; found: 243.20.

N-Benzilidene-2-hydroxyethylamine (5): Benzaldehyde (102.04 mL, 1.00 mol), 2-aminoethanol (60.48 mL, 1.00 mol) and *p*-toluenesulfonic acid (400 mg, 2 mmol) were added to toluene (400 mL). The solution was refluxed for 4 h in a *Dean-Stark* apparatus until 18 mL (1.00 mol) of water were collected in the water trap. The solvent was removed *in vacuo*, dissolved in EtOAc (400 mL) and washed with brine (200 mL) and water (200 mL). After drying (MgSO_4) and concentration *in vacuo*, compound **5** (137.00 g, 92 %) was obtained as orange oil. Yield: 137.00 g (92%); orange oil; *R_f* 0.68 (17 % EtOAc/PE). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.31 (s, 1H), 7.77 – 7.65 (m, 2H), 7.41 (ddd, J = 5.4, 4.3, 2.5 Hz, 3H), 3.93 – 3.87 (m, 2H), 3.79 – 3.71 (m, 2H), 3.45 (s, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 163.44, 135.87, 131.03, 128.75, 128.32, 63.41, 62.43. HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NONa}^+$: 172.07383; found: 172.07335.

2-(Benzylamino)ethanol (6): Compound **5** (20 g, 134 mmol) in 200 mL dry MeOH was chilled in an ice bath and the bottle was flushed with argon. NaCNBH_3 (17 g, 270 mmol) was added in portions over the course of 12 h. The complete consumption of starting material was verified by TLC. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and brine (200 mL) was added to the residue, which was then extracted with DCM (3 x 200 mL). The organic layers were washed with water (100 mL), dried and concentrated *in vacuo* to obtain 17.14 g (94 %) of yellow oil of compound **6**, which was purified by acid-base extraction (HCl/NaOH) directly before use. Yield: 17.14 g (94%); yellow oil; *R_f* 0.77 (75 % EtOAc/PE). ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.28 (tdd, J = 14.4, 9.0, 4.8 Hz, 6H), 3.74 (s, 2H), 3.69 – 3.48 (m, 2H), 3.19 (s, 3H), 2.79 – 2.61 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 139.67, 128.58, 128.31, 127.27, 60.82, 53.55, 50.66, 32.22. MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NO}^+$: 152.11; found: 152.10. HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NO}^+$: 152.10699; found: 152.10703.

(S)-(4-Benzylmorpholin-2-yl)methanol (7): To compound **6** (9.64 g, 63.8 mmol) in water (5 mL) and 2-propanol (5 mL) was added (*R*)-epichlorohydrin (5.9 g, 63.8 mmol) and the solution was stirred overnight. A 20 wt-% aqueous solution of Et_4NOH (61 mL, 83.0 mmol) was added over 5 min. After 4 h, the reaction was adjusted to pH 9 with 1 M HCl (10 mL). Water (50 mL) was added and the mixture

was extracted with DCM (3 × 500 mL). The extracts were combined and evaporated to an oil, which was purified by flash column chromatography (silica, EtOAc/PE) to afford compound **7**. Yield: 4.66 g (35 %); colorless oil; *R*_f 0.18 (50 % EtOAc/PE). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (d, *J* = 4.4 Hz, 4H), 7.21 – 7.15 (m, 1H), 3.80 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 3.64 (dd, *J* = 12.4, 10.0 Hz, 2H), 3.56 – 3.38 (m, 4H), 2.69 – 2.56 (m, 2H), 2.54 – 2.22 (m, 1H), 2.13 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 2.01 – 1.87 (m, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 129.39, 128.44, 127.44, 76.04, 66.61, 64.23, 63.40, 54.62, 53.07. MS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₂H₁₈NO₂⁺: 208.13; found: 208.26. HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₂H₁₈NO₂⁺: 208.13321; found: 208.13322.

(S)-Morpholin-2-ylmethanol (8): To a stirred mixture of **7** (2.43 g, 12.0 mmol) and 10 % Pd-C (2.43 g) in dry MeOH (80 mL) was added NH₄CO₂H (3.78 g, 60 mmol) in a single portion under nitrogen. This was refluxed for approx. 30 min until TLC showed complete consumption of the starting material. The reaction mixture was filtered through a celite pad, which was then washed with 20 mL CHCl₃. Concentration *in vacuo* afforded 1.40 g of product **8**. Yield: 1.40 g (>99 %), pale yellow oil; no UV trace in TLC. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 4.64 (s, 2H), 3.75 (dd, *J* = 11.4, 2.3 Hz, 1H), 3.58 – 3.21 (m, 4H), 3.17 (s, 1H), 2.90 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 2.76 (s, 1H), 2.70 (dd, *J* = 11.6, 3.4 Hz, 1H), 2.44 (dd, *J* = 12.2, 10.3 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 76.15, 65.83, 62.47, 47.08, 44.64, 39.52. MS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₅H₁₂NO₂⁺: 118.09; found: 118.15. HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₅H₁₂NO₂⁺: 118.08626; found: 118.08619.

tert-Butyl (S)-2-(hydroxymethyl)morpholine-4-carboxylate (9): **8** (2.88 g, 24.6 mmol) was added to a stirred solution of guanidine hydrochloride (352 mg, 3.69 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (5.37 g, 24.6 mmol) in EtOH (60 mL) at 40 °C and stirred for 1 h until evolution of CO₂ had ceased. EtOH was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by flash column chromatography (silica, EtOAc/PE) to afford the pure product **9**. Yield: 3.07 g (57 %), colorless solid, no UV trace in TLC. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.82 – 3.60 (m, 1H), 2.86 (dd, *J* = 10.7, 5.8 Hz, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.24 (d, *J* = 6.6 Hz, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 143.84, 83.35, 75.15, 62.46, 53.99, 45.63 (s), 29.84, 25.00. MS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₀H₂₀NO₄⁺: 218.14; found: 218.23. HRMS (ESI): *m/z* [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₁₉NNaO₄⁺: 240.12063; found: 240.12074.

tert-Butyl (S)-2-(phenoxymethyl)morpholine-4-carboxylate (10): To **9** (500 mg, 2.30 mmol) was added anhydrous THF (1.14 mL), phenol (216 mg, 2.30 mmol) and PPh₃ (604 mg, 2.30 mmol). The mixture was sonicated (40 kHz) for several minutes to allow for mixing. More anhydrous THF (1.26 mL) was added slowly until all compounds were dissolved. Under sonification, DIAD (0.454 mL, 2.30 mmol) was added dropwise over a course of 2 min. The mixture was sonicated for further 13 min. Anhydrous MgCl₂ (0.44 g, 4.6 mmol) was added, and the mixture was refluxed for 2 h, then chilled in an ice bath and filtered to remove the majority of PPh₃O byproduct by complexation. The crude material was

purified by flash column chromatography (silica, hexane/EtOAc) and recrystallized from methanol to obtain 259 mg (77 %) of pure product **10**. Yield: 259 mg (77 %), colorless crystals, *R_f* 0.60 (33 % EtOAc/PE). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.26 (s, 2H), 7.07 – 6.77 (m, 3H), 4.08 (ddd, *J* = 15.3, 12.1, 6.2 Hz, 2H), 3.95 (dd, *J* = 9.9, 4.9 Hz, 2H), 3.78 (ddd, *J* = 17.4, 10.1, 7.5 Hz, 1H), 3.65 – 3.54 (m, 1H), 1.47 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.67, 154.90, 129.61, 121.30, 114.73, 80.34, 73.98, 70.69, 68.66, 66.76, 29.85, 28.52. MS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₆H₂₄NO₄⁺: 294.16; found: 294.22. HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₆H₂₄NO₄⁺: 294.16998; found: 294.17003.

(S)-(2-Methoxy-5-((2-(phenoxymethyl)morpholino)methyl)phenyl)boronic acid (11): (S)-2-(Phenoxymethyl)morpholine (455 mg, 2.35 mmol) and (5-formyl-2-methoxyphenyl)boronic acid (424 mg, 2.35 mmol) in 10 mL MeOH was adjusted to pH 5 with acetic acid. NaCNBH₃ (399 mg, 6.36 mmol) was added under argon atmosphere. The mixture was stirred at 60 °C for 24 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. To the residue was added water (20 mL), adjusted to pH 9 with 1 M NaOH and extracted with DCM (3 × 100 mL). The organic layers were dried and concentrated to obtain crude oil, which was purified by flash column chromatography (silica, EtOAc/PE) to provide 423 mg (50 %) of pure product **11**. Yield: 423 mg (50 %); colorless solid. *R_f* 0.24 (33 % EtOAc/PE). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.96 – 7.83 (m, 1H), 7.44 – 7.35 (m, 1H), 7.34 – 7.22 (m, 3H), 6.97 – 6.82 (m, 4H), 4.08 – 3.87 (m, 7H), 3.58 – 3.42 (m, 2H), 2.98 – 2.58 (m, 3H), 2.31 – 2.04 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 163.93, 158.75, 138.33, 133.81, 129.59, 129.39, 128.44, 126.22, 120.93, 114.65, 109.76, 73.90, 69.25, 66.71, 62.70, 55.58, 55.26, 52.85. MS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₂₅NO₅⁺: 358.18; found: 358.20. HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₂₅BNO₅⁺: 358.18203; found: 358.18202.

3-[4-(2-Fluorophenyl)piperazin-1-yl]-1H-pyrrolo-[2,3-*b*]pyridine (I): To **1** (800mg, 5.47mmol) in methanol (14 mL) was added 1-(2-fluorophenyl)piperazine (986 mg, 5.47 mmol). The reaction mixture was adjusted with acetic acid to pH 5 and then reacted with NaBH₃CN (928 mg, 14.77 mmol) at 80 °C for 15 h. After the solvent has been removed *in vacuo*, the residue was diluted with ethyl acetate and neutralized with 10 % NaOH. Product isolation (ethyl acetate) followed by flash column chromatography (silica: EtOAc/PE) afforded compound **I** (611 mg, 36 %) as colorless crystals. Yield: 611 mg (36 %); colorless crystals; *R_f* 0.10 (50 %; EtOAc/PE). ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.49 (s, 1H), 8.20 (dd, *J* = 4.7, 1.5 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.17 – 6.86 (m, 5H), 3.70 (s, 2H), 3.33 (s, 2H), 2.99 (s, 4H), 2.57 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 156.15, 153.72, 148.73, 142.50, 127.28, 124.79, 122.25, 122.17, 119.77, 119.17, 115.97, 115.76, 115.11, 53.07, 52.41, 50.13. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -122.79 (s). HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₈H₂₀FN₄⁺: 311.16665; found: 311.16662.

(S)-4-(3-Fluoro-4-methoxybenzyl)-2-(phenoxymethyl)morpholine (II): **10** (116 mg, 0.56 mmol) was treated with 1 mL trifluoroacetic acid (TFA) in 3 mL DCM and the mixture was stirred for 1 h at 30 °C. The mixture was then adjusted to pH 9 with 1 m NaOH and extracted with DCM and concentrated *in*

vacuo to obtain 104 mg of a crude oil. The unprotected amine (104 mg, 0.54 mmol) in 2 mL MeOH was added with 3-fluoro-4-methoxybenzaldehyde (83 mg, 0.54 mmol), the mixture adjusted to pH 5 with acetic acid and NaBH₃CN (92 mg, 2.7 eq.) was added. The mixture was stirred for 16 h at 60 °C. Aqueous workup and extraction with DCM afforded a crude oil, which was purified by flash column chromatography (EtOAc/PE) to obtain compound **11**. Yield: 183 mg (99 %); colorless oil. *R*_f 0.44 (33 % EtOAc/PE). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.33 – 7.19 (m, 4H), 7.16 – 7.06 (m, 2H), 7.04 – 6.82 (m, 10H), 4.07 – 3.84 (m, 14H), 3.73 (td, *J* = 11.3, 2.5 Hz, 2H), 3.45 (s, 4H), 2.85 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 2.66 (dd, *J* = 11.4, 1.9 Hz, 2H), 2.21 (td, *J* = 11.3, 3.3 Hz, 2H), 2.13 – 2.02 (m, 2H), 1.98 (s, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.77, 153.65, 151.21, 146.91, 146.80, 130.89, 129.51, 124.77, 124.73, 121.08, 114.70, 113.19, 113.17, 74.20, 69.23, 66.97, 62.41, 56.40, 55.43, 52.93. ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -135.43. HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₂₃FNO₃⁺: 332.1656; found: 332.1656.

3-((4-(2-Fluorobenzyl)piperazin-1-yl)methyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (III): 1 (225 mg, 1.54 mmol) was dissolved in 5 mL MeOH and 1-(2-fluorobenzyl)piperazine (299 mg, 1.54 mmol) was added thereto. The mixture adjusted to pH 5 with acetic acid and NaBH₃CN (260 mg, 2.7 eq.) was added. The mixture was stirred for 16 h at 60 °C. Aqueous workup and extraction with DCM afforded a crude oil, which was purified by flash column chromatography (silica, EtOAc/PE) to obtain the pure compound **III** as yellow oil. Yield: 250 mg (50 %); yellow oil. *R*_f 0.20 (75 % EtOAc/PE). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.69 (s, 2H), 8.29 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 8.05 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.07 (dd, *J* = 7.3, 5.5 Hz, 2H), 7.04 – 6.95 (m, 1H), 3.73 (s, 2H), 3.59 (s, 2H), 3.28 (s, 2H), 2.55 (s, 8H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 162.77, 160.32, 148.94, 142.62, 131.84, 128.89, 128.29, 124.71, 124.63, 124.49, 123.95, 123.91, 120.85, 115.71, 115.47, 115.25, 110.57, 55.28, 55.26, 53.53, 52.85, 52.77. ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -117.73. HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₁₂FN₄⁺: 325.1823; found: 325.1823.

1-(2-Fluorophenyl)-4-(3-(1-phenyl-3-propyl-1*H*-pyrazol-5-yl)propyl)piperazine (IV): 4 (220 mg, 0.91 mmol) was dissolved in 10 mL of DCM together with 1-(2-fluorophenyl)piperazine (164 mg, 0.91 mmol). To the mixture was added 1.40 g of molecular sieve (4 Å). DIPEA (0.16 mL, 0.91 mmol) was slowly added thereto and stirred for 30 min at room temperature. Then, NaBH(OAc)₃ (674 mg, 3.18 mmol) was added and stirred at r.t. for 3 d. Water (5 mL) was added and the organic layer was separated and concentrated in *vacuo* to obtain 404 mg of crude oil, which was purified by flash column chromatography (silica, EtOAc/PE) to obtain 331 mg (90 %) of the pure product **IV** as yellow oil. *R*_f 0.20 (33 % EtOAc/PE). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.56 – 7.30 (m, 5H), 7.11 – 6.82 (m, 4H), 6.05 (s, 1H), 3.24 – 2.93 (m, 4H), 2.81 – 2.45 (m, 8H), 2.46 – 2.27 (m, 2H), 1.89 – 1.58 (m, 4H), 1.00 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 157.08, 154.63, 153.79, 143.87, 140.30, 140.17, 129.15, 127.62, 125.55, 124.59, 124.55, 122.59, 122.51, 118.99, 116.32, 116.11, 104.46, 77.48, 77.16, 77.16, 76.84, 57.80,

53.32, 50.64, 50.61, 30.51, 26.23, 24.21, 23.10, 14.18. ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -122.73 (s). HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{FN}_4^+$: 407.2605; found: 407.2605.

2.3 Receptor binding assay

Radioligand binding studies with the subtypes of the D_2 receptor family were performed as described previously [16]. In brief, competition binding experiments were done using membranes of CHO cells stably expressing the human $\text{D}_{2\text{L}}$, $\text{D}_{2\text{S}}$ [17], D_3 [18] or $\text{D}_{4.4}$ [19] receptor. Radioligand displacement assays were run in binding buffer (25 mM HEPES, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0.006% BSA at a pH of 7.4) with $[\text{}^3\text{H}]\text{spiperone}$ (molar activity = 68 Ci/mmol, PerkinElmer, Rodgau, Germany). The assays were carried out at a protein concentration of 4 $\mu\text{g}/\text{well}$, $B_{\text{max}}=1900$ fmol/ μg , $K_{\text{D}}=0.10$ nM and a concentration of the radioligand of 0.2 nM for $\text{D}_{2\text{L}}$, of 1 $\mu\text{g}/\text{well}$, $B_{\text{max}}=500$ fmol/ μg , $K_{\text{D}}=0.10$ nM and radioligand of 0.2 nM for $\text{D}_{2\text{S}}$, of 2 $\mu\text{g}/\text{well}$, $B_{\text{max}}=3500$ fmol/ μg , $K_{\text{D}}=0.25$ nM and radioligand of 0.3 nM for D_3 , and of 6 $\mu\text{g}/\text{well}$, $B_{\text{max}}=1800$ fmol/ μg , $K_{\text{D}}=0.40$ nM and radioligand of 0.4 nM for $\text{D}_{4.4}$, respectively. Unspecific binding was determined in the presence of 10 μM haloperidol, protein concentration was established by the method of Lowry using bovine serum albumin as standard [20]. Competition binding experiments with GPCRs related to D_2 - D_4 were performed in an analogous manner with membranes from HEK293T cells transiently transfected with the corresponding cDNA by using the Mirus TransIT-293 transfection reagent (PepLab, Erlangen, Germany) or a solution of polyethylenimine in PBS (PEI, linear 25 kDa, Polysciences, 1 mg/mL) as transfection reagent at a 3:1 PEI to cDNA ratio [21]. Binding to the dopamine receptors D_1 and D_5 was performed with the radioligand $[\text{}^3\text{H}]\text{SCH23390}$ (80 Ci/mmol, Biotrend, Cologne, Germany) at a concentration of 0.30 nM, $K_{\text{D}}=0.23$ nM, $B_{\text{max}}=3500$ fmol/mg and 2 μg protein/well for D_1 , and of 0.50 nM, $K_{\text{D}}=0.50$ nM, $B_{\text{max}}=1000$ fmol/mg and 14 μg protein/well for D_5 , respectively. Affinities to serotonin receptors was measured with $[\text{}^3\text{H}]\text{WAY100635}$ (80 Ci/mmol, Biotrend) at 0.20 nM, $K_{\text{D}}=0.10$ nM, $B_{\text{max}}=3000$ fmol/mg and 2 μg protein/well for $5\text{-HT}_{1\text{A}}$, and $[\text{}^3\text{H}]\text{ketanserin}$ (47 Ci/mmol, Biotrend) at 0.30 nM, $K_{\text{D}}=0.35$ nM, $B_{\text{max}}=3400$ fmol/mg and 4 μg protein/well for $5\text{-HT}_{1\text{A}}$, respectively. Adrenergic $\alpha_{1\text{A}}$ binding was determined applying $[\text{}^3\text{H}]\text{prazosin}$ (84 Ci/mmol, Biotrend) at 0.20 nM, $K_{\text{D}}=0.095$ nM, $B_{\text{max}}=7500$ fmol/mg and 2 μg protein/well.

The resulting competition curves of the receptor binding experiments were analyzed by nonlinear regression using the algorithms in PRISM 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). The data were initially fit using a sigmoid model to provide an IC_{50} value, representing the concentration corresponding to 50% of maximal inhibition. IC_{50} values were transformed to K_{i} values according to the equation of Cheng and Prusoff [22].

2.4 Radiochemistry

All radiosyntheses were carried out using anhydrous *N,N*-dimethylacetamide (DMA) (Aldrich). QMA cartridges (Sep-Pak Accell Plus QMA Carbonate Plus Light, 46 mg sorbent per cartridge) were obtained from Waters (Waters GmbH, Eschborn, Germany) and preconditioned with 1 mL H₂O directly before use. [¹⁸F]Fluoride was produced by the ¹⁸O(p,n)¹⁸F reaction by bombardment of enriched [¹⁸O]water with 16.5 MeV protons using a BC1710 cyclotron (The Japan Steel Works Ltd., Shinagawa, Japan) at the INM-5 (Forschungszentrum Jülich). All radiolabeling experiments were carried out under ambient atmosphere.

Before radiosynthesis, [¹⁸F]fluoride was processed as follows. Aqueous [¹⁸F]fluoride was loaded onto an anion-exchange resin (QMA cartridge). It should be noted, that aqueous [¹⁸F]fluoride was loaded onto the cartridge from the male side, whereas flushing, washing and ¹⁸F⁻ elution were carried out from the female side. If MeOH was used for elution, the resin was flushed with MeOH (2 mL) before use. In order to account for surface-adsorbed [¹⁸F]fluoride, reaction vials were completely emptied after the addition of water, and radioactivity in the aqueous solution and remaining radioactivity in the reaction vessel was separately determined and quantified. For radiolabeling, [¹⁸F]fluoride was eluted from the QMA cartridge with a solution of Et₄NHCO₃ (1.0 mg) in *n*BuOH (500 µL).

General procedure: The borylated precursor (60 µmol) and Cu(OTf)₂(py)₄ (30 µmol) in DMA (600 µL) were added to the dried [¹⁸F]fluoride and the reaction mixture was stirred at 110 °C for 10 min, then cooled to room temperature, diluted with water (1 mL) and stirred again for 30 s. Thereafter, RCY was determined by radio-HPLC.

3-((4-(2-[¹⁸F]Fluorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine ([¹⁸F]I): [¹⁸F]Fluoride was eluted from a QMA cartridge with a solution of Et₄NHCO₃ (1.0 mg) in *n*BuOH (500 µL). A solution of tert-butyl 4-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)piperazine-1-carboxylate (23 mg, 60 µmol) and Cu(OTf)₂(py)₄ (20 mg, 30 µmol) in DMA (600 µL) was added. The reaction mixture was heated at 110 °C for 10 min under air in a capped vial. The solvent was then removed *in vacuo* and 1 mL TFA was added. This was heated for 20 min at 110 °C. TFA was then removed *in vacuo* and **1** (9 mg, 60 µmol) suspended in 2 mL acetonitrile was added. This was heated under reduced pressure and with a stream of argon for azeotropic removal of the ascending water. Then, NaBH₃CN (10 mg) in 1 mL methanol was added and the mixture heated at 80 °C for 5 min. The reaction mixture was quenched with water (4 mL) and passed through a C18 cartridge (500 mg), preconditioned with EtOH (1 mL) and water (10 mL). The cartridge was washed with water (10 mL) and the product was eluted with MeOH (2 mL) and purified by preparative HPLC to afford the desired tracer. HPLC conditions for purification: Synergi 4µ Hydro-RP 150×21.2 mm; eluent: water, 60 % MeCN; flow rate: 6 mL/min; t_R = 5.3 min.

(S)-4-(3-[¹⁸F]fluoro-4-methoxybenzyl)-2-(phenoxymethyl)morpholine ([¹⁸F]II): [¹⁸F]Fluoride was eluted from a QMA cartridge with a solution of Et₄NHCO₃ (1.0 mg) in *n*BuOH (500 µL). A solution of (S)-(2-methoxy-5-((2-(phenoxymethyl)morpholino)methyl)phenyl)boronic acid **11** (21 mg, 60 µmol) and Cu(OTf)₂(py)₄ (20 mg, 30 µmol) in DMA (600 µL) was added. The reaction mixture was heated at 110 °C for 10 min under air in a capped vial. The reaction mixture was quenched with water (4 mL) and passed through a C18 cartridge (500 mg), preconditioned with EtOH (1 mL) and water (10 mL). The cartridge was washed with water (10 mL) and the product was eluted with MeOH (2 mL) and purified by preparative HPLC to afford [¹⁸F]II. HPLC conditions for purification: Synergi 4µ Hydro-RP 150×21.2 mm; eluent: water, 60 % MeCN; flow rate: 6 mL/min; t_R = 8.5 min.

2.5 *In vitro* autoradiography

Wistar rats weighting 250 to 300 g (Charles River Deutschland GmbH) were decapitated, the brains removed and frozen at –80 °C. For autoradiography, they were warmed to –20 °C, cut into 20 µm thick horizontal and sagittal sections (CM 3050 or CM 3500 Polycut, Leica AG Microsystems, Germany), mounted on gelatin-coated object glasses, dried and stored at –80 °C until use.

Autoradiography was performed as described previously [23]. Briefly the frozen brain sections were thawed, dried in air at room temperature and then preincubated for 5 min at ambient temperature in 50 mM Tris HCl (pH 7.4). Sections were then incubated for 70 min in Tris HCl buffer containing a solution of the tracer (2.5 kBq/mL), together or without the “cold” reference compound at a final concentration of 5 µM. Labeling was terminated by rinsing the sections for 1 min in TrisHCl and dipping them in deionized water. The dried sections were placed on a phosphor imaging plate (Fuji) together with a tritium standard (Amersham Bioscience). After exposure for 75 minutes, a laser phosphor imager (BAS 5000, Fuji) controlled with software from the vendor (Version 3.14, Raytest, Germany) was used for image acquisition.

2.6 HPLC Analysis

Before the determination of radiochemical yield (RCY), reaction mixtures were diluted with 50% MeOH to dissolve any [¹⁸F]fluoride adsorbed onto the reaction vessel walls. HPLC analyses were carried out on a Dionex Ultimate® 3000 HPLC system and a DAD UV-detector coupled in series with a Berthold NaI detector. A Chromolith® SpeedROD RP-18e column (Merck, Darmstadt Germany), 50×4.6 mm was used. UV and radioactivity detectors were connected in series, giving a time delay of 0.1–0.9 min depending on the flow rate. ¹⁸F-Labeled compounds were identified by co-injection of the unlabeled reference compounds using HPLC. The completeness of the radioactivity elution was checked by analyzing the same sample amount choosing a column bypass. Column: Chromolith SpeedROD®,

50×4.6 mm (Merck Millipore); gradient: 0–2 min: 5 % MeCN, 2–2.5 min: 5→20 % MeCN, 2.5–6 min: 20 % MeCN, 6–7 min: 20→70 % MeCN, 7–9 min: 70 % MeCN, flow rate: 3.0 mL/min.

2.7 Determination of carrier content

The amount of unlabeled carrier was determined from the peak area in UV–HPLC chromatograms using an UV absorbance/concentration calibration curve ($[^{18}\text{F}]\text{I}$: $\lambda = 223\text{ nm}$; $[^{18}\text{F}]\text{II}$: $\lambda = 256\text{ nm}$). The solutions of radiolabeled products obtained after HPLC purification were allowed to stand at ambient temperature for at least 24 h, concentrated under reduced pressure, and the residues were re-dissolved in the appropriate HPLC eluents (500 μL). The resulting solutions were completely injected into the HPLC system. The peak area was determined, and the amount of carrier was calculated according to the calibration curve.

2.8 Estimation of lipophilicity

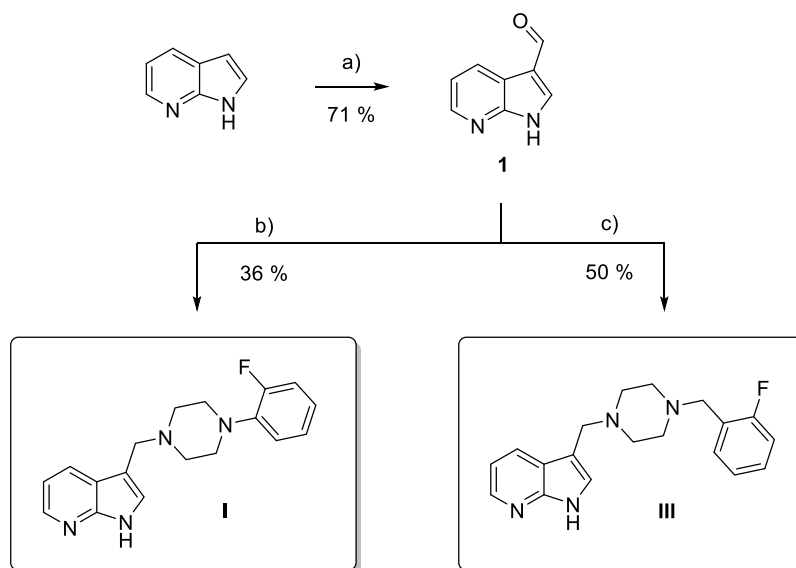
The software program ChemDraw 16.0 (PerkinElmer) using Crippen's fragmentation method [24] and the online tools ALOGPS 2.1 [25] and Chemicalize [26] were used for the estimation of $\text{Log}P$ values.

3 Results and discussion

3.1 Synthesis of reference compounds **I–IV** and labeling precursor **12**

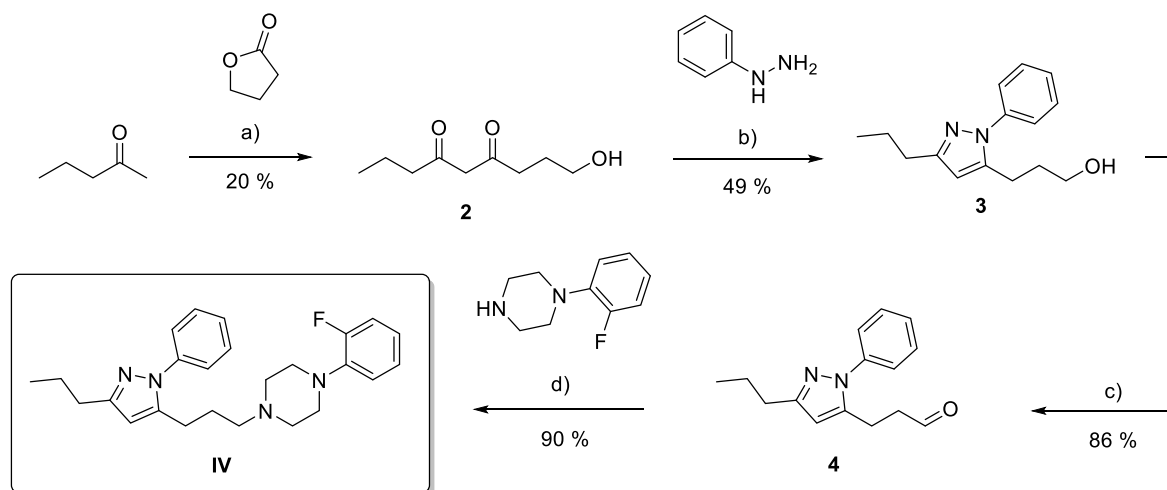
Based on azaindoles like L-745.870 [27, 28], FAUC 113/213 [29–31], ABT-124 [32, 33] or PIP3EA [34] as D₄R selective lead structures, compounds **I** and **III** were prepared by reductive amination of 1*H*-Pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-3-carbaldehyde **1** and 1-(2-fluorophenyl)piperazine (2-FPP) (for **I**, see scheme 1) or 1-(2-fluorobenzyl)piperazine (for **III**, see scheme 2) using NaBH₃CN as reductant.

To obtain 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-3-carbaldehyde **1**, a formylation of 7-azaindol was carried out using either the *Vilsmeier-Haack reaction* [35] or the *Duff reaction* [36], with the Duff reaction performing better in terms of yield (71%) and ease of work-up.



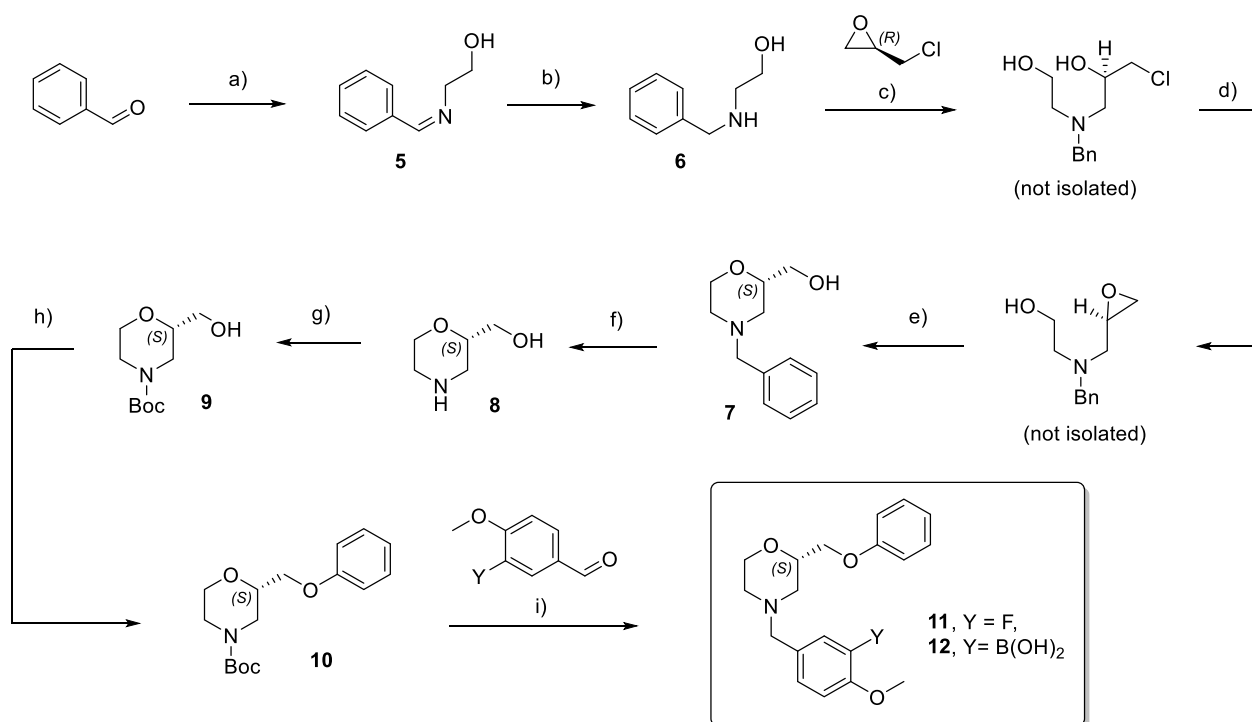
Scheme 1. Synthesis of reference compound **I** & **III**: a) Hexamethylenetetramine (HMTA, 120 °C, 6 h). b) 1-(2-fluorophenyl)piperazine, NaBH₃CN, pH 5 (AcOH), 80 °C, 15 h. c) 1-(2-fluorobenzyl)piperazine, NaBH₃CN, pH 5 (AcOH), 80 °C, 15 h.

Reference compound **IV** was chosen based on D₄R selective piperazinyl-propyl-pyrazole derivatives as alternative lead structures and synthesized according to a known procedure modified only by the use of the less toxic oxidant *Dess-Martin periodinane* (DMP) in the oxidation step (Scheme 2) [15].



Scheme 2. Synthesis of reference compound **IV** a) NaOMe, benzene, 30-50 °C. b) TEA 3 eq., MeOH, r.t., 4 h. c) DMP, DCM, r.t., 12 h. d) NaBH₃CN, MeOH, 80 °C, 12 h.

The synthesis of the chiral alkoxy morpholines **II** and **12** was achieved according to a procedure from HENEGAR [37] (Scheme 4), starting with the condensation of benzaldehyde and 2-aminoethanol under *Dean-Stark* conditions, yielding the benzyl-protected ethanolamine **6** (94 %) after reduction of the aldimine **5** by NaBH₄ (92 %). Chirality was introduced by the reaction of **6** with enantiomerically pure (*R*)-epichlorohydrin, yielding an intermediate chlorohydrin (Scheme 3).



Scheme 2. Synthesis of labeling precursor **22** and reference compound **II** a) 2-aminoethanol, toluene b) NaBH_3CN , r.t., 12 h. c) (*R*)-epichlorohydrin d&e) 20 wt-% aq. Et_4NOH , 2-PrOH/ H_2O (1:1) f) 10 % Pd-C, $\text{NH}_4\text{CO}_2\text{H}$, MeOH g) guanidine $\cdot$ HCl, di-*tert*-butyl dicarbonate, EtOH h) phenol, PPh_3 , diisopropyl azodicarboxylate (DIAD), THF, 40 kHz, 15 min i) HCl, NaBH_3CN , MeOH, 60 $^\circ\text{C}$, 12 h.

Without isolation of the intermediate, the cyclization reaction forming the epoxide was initiated by addition of Et_4NOH . Under inversion of the configuration (*Walden inversion*), the epoxide underwent further cyclization to form the morpholine oxide **7** in a yield of 35 %. Subsequent *Mitsunobu reaction* [38] with the phenol of either the *N*-benzyl or the *N*-Boc protected morpholine proceeded under sonification (40 kHz) in 15 minutes with comparable yields, but reductive cleavage (HCO_2NH_4 , 10 % Pd-C) of the benzyl group, which was used as a chromophore for reaction monitoring, gave significantly better yields (77 %) when it was performed prior to *Mitsunobu* coupling. Since the *Mitsunobu* reaction failed with the unprotected morpholine, it was again protected with the easily removable *N*-Boc group in a yield of 57 %. Reductive amination (NaBH_3CN) with either 3-fluoro-4-methoxybenzaldehyde or (5-formyl-2-methoxyphenyl)boronic acid yielded the reference compound **II** (99 %) or the radiolabeling precursor **12** (50 %) respectively. Enantiomeric purity (>99 %) was conserved for both compounds throughout the synthesis and verified by chiral HPLC.

3.2 Receptor binding studies

The target compounds **I-IV** were subjected to *in vitro* receptor binding assays to test their ability to displace [^3H]SCH 23990 from the cloned human D_1 -like DA receptors D_1R and D_5R , or [^3H]spiperone

from the cloned human D₂-like DA receptors D₂Long, D₂Rshort, D₃R and the most common D₄R polymorphism D_{4.4}R, which were stably expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells. In addition, binding to the cloned human serotonin receptors 5-HT_{1A}R and 5-HT_{2A}R as well as the cloned human alpha adrenergic receptor α_{1A} transiently transfected in human embryonic kidney (HEK293T) cells were examined by displacement experiments with the selective radioligands [³H]WAY600135, [³H]ketanserin and [³H]prazosin respectively. The results of these experiments are summarized in Table 1.

Table 1. Receptor binding affinities of fluorine-substituted candidate ligands **I-IV** to the human dopamine receptor subtypes, serotonin and adrenergic receptors.

	$K_i \pm \text{SD} [\text{nM}]^a$			
	I	II	III	IV
hD ₁ R ^b	7300 $\pm$ 1100	4800 $\pm$ 1300	18000 $\pm$ 2800	290 $\pm$ 7.1
hD ₅ R ^b	51000 $\pm$ 4900	8100 $\pm$ 1800	71000 $\pm$ 20000	1000 $\pm$ 0
hD ₂ Long ^c	1400 $\pm$ 710	470 $\pm$ 110	14000 $\pm$ 710	40 $\pm$ 4.2
hD ₂ Rshort ^c	960 $\pm$ 480	450 $\pm$ 120	14000 $\pm$ 2100	27 $\pm$ 6.4
hD ₃ R ^c	2400 $\pm$ 920	3600 $\pm$ 920	36000 $\pm$ 9900	59 $\pm$ 9.2
hD _{4.4} R ^c	4.1 $\pm$ 1.5	13 $\pm$ 4.2	18 $\pm$ 7.1	6.4 $\pm$ 0.6
h5-HT _{1A} R ^d	14000 $\pm$ 5700	7900 $\pm$ 210	17000 $\pm$ 0	180 $\pm$ 14
h5-HT _{2A} R ^e	560 $\pm$ 210	7400 $\pm$ 1800	6000 $\pm$ 710	22 $\pm$ 14
h α_{1A} ^f	69 $\pm$ 12	280 $\pm$ 0	2000 $\pm$ 1100	1.2 $\pm$ 0.1

^a K_i values are the mean of two independent experiments $\pm$ SD each done in triplicates; ^b [³H]SCH 23990;

^c [³H]spiperone; ^d [³H]WAY600135; ^e [³H]ketanserin; ^f [³H]prazosin.

All compounds exhibited high affinity for the D₄ receptor subtype with K_i values ranging from 4.1 to 18 nM (Table 1) and, except for compound **IV**, reduced affinity for all other receptors tested (Table 2). Based on its very high affinity for the human α_{1A} receptor (K_i=1.2 nM, Table 1 & 2) combined with a high predicted lipophilicity (see below), compound **IV** was excluded from further studies. In comparison with reported D₄-subtype selective ligands, such as FAUC 213 with a D₄-over-D₃ selectivity of 2400-fold [30], compound **III** showed very similar D₄ subtype selectivity (2000-fold, Table 2), but its D₄ affinity (K_i=18 nM, Table 1) was almost ten-fold lower than that of FAUC 213 (2 nM). However, the outstanding subtype selectivity and very low affinity for 5-HT receptors suggested that this compound might still be worthwhile for radiolabeling and future *in vivo* studies. The highest affinity for the D₄ receptor was found for the 2-fluorophenylpiperazinyl 7-azaindole (**I**) (K_i=4.1 nM), which exhibited moderate to good selectivity over 5-HT (140 to 3400-fold) and D₂ (230 to 340-fold) receptors (Table 2). The morpholine derivative (**II**) showed a less variable D₄-over-5-HT selectivity (570 to 610-fold) but only low D₄-subtype selectivity (35 to 36-fold) (Table 2). Thus, taken together, ligand **I** and **II** both revealed adequate D₄ affinity combined with variable affinities to 5-HT (**I** > **II**) and non-D₄ DA (**I** < **II**) receptors.

Table 2. D₄ receptor subtype selectivity of fluorine-substituted ligands **I-IV**.

	K _i (hD _{4.4} R)	Ratio K _i / K _i (hD _{4.4} R)							
	[nM]	hD ₁ R	hD ₅ R	hD ₂ R _{long}	hD ₂ R _{short}	hD ₃ R	h5-HT _{1A} R	h5-HT _{2A} R	hα _{1A}
I	4.1 ± 1.5	1800	12000	340	230	590	3400	140	17
II	13 ± 4.2	370	620	36	35	280	610	570	22
III	18 ± 7.1	1000	3900	780	780	2000	940	330	110
IV	6.4 ± 0.6	45	160	6.3	4.2	9.2	28	3.4	0.2

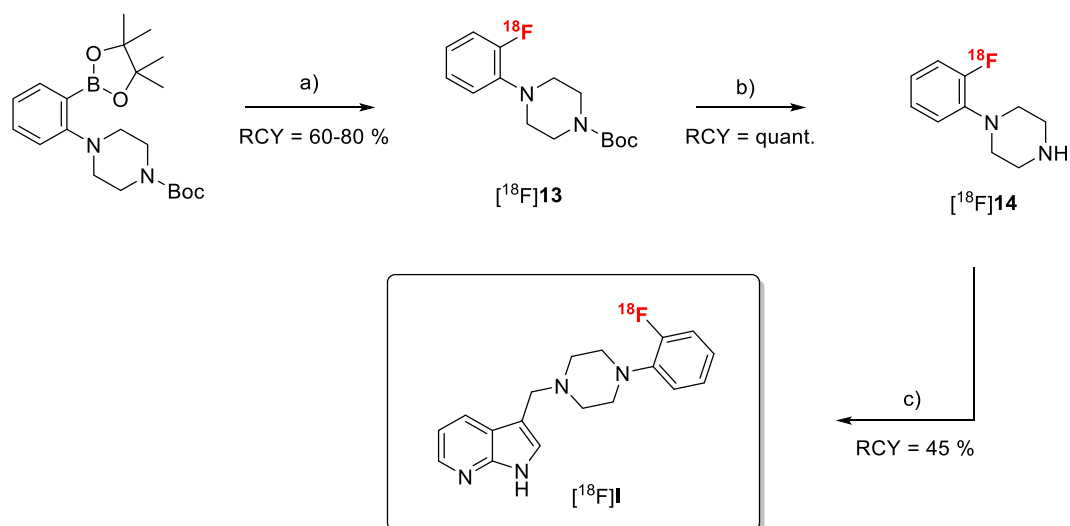
3.3 Lipophilicity

A number of previous studies indicate that blood-brain-barrier (BBB) penetration and nonspecific binding are often correlated with the lipophilicity of a ligand. To obtain a rough measure of this physiochemical property, various tools were used to calculate log*P* and log*D*_{7.4} values for compounds **I-IV**. As illustrated in **Tab. 3**, the different algorithms showed similar results, with values determined to be between 2 and 3 for compounds **I-III**, a range considered optimal for ligands to penetrate the blood-brain-barrier without excessive nonspecific binding. In contrast and as already noted above, values between 5 and 6 were obtained for compound **IV**, suggesting that nonspecific binding of this ligand could be high. Therefore, **IV** was not selected for radiosynthesis and excluded from further evaluation.

3.4 Radiosynthesis

Due to their promising D₄ selectivities, compounds **I** & **II** were selected for radiolabeling and subsequent *in vitro* autoradiographic studies. The synthesis of radiotracer [¹⁸F]**I** was performed by a three-step one-pot reaction without the need for isolation of any intermediates (Scheme 5). Attempts for late stage radiofluorination were not successful since the corresponding *ortho*-borylated precursor for [¹⁸F]**I** was challenging to synthesize and degraded upon purification by column chromatography.

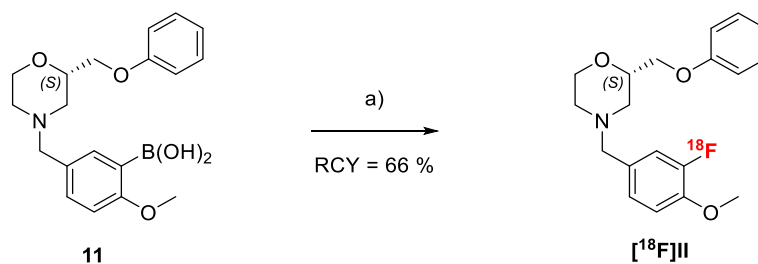
The [¹⁸F]fluoride used for radiofluorination was trapped on a QMA cartridge and eluted with tetraethylammonium bicarbonate (TEAHC) in *n*-butanol with an elution efficacy of 90 ± 5 %.



Scheme 5. Synthesis of compound $[^{18}\text{F}]\text{I}$ a) Elution of $^{18}\text{F}^-$ with Et_4NHCO_3 in $n\text{BuOH}$; $[\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4]$, dimethylacetamide (DMA), 110°C , 10 min. b) TFA, 110°C , 20 min. c) **3**, NaBH_3CN , 80°C , 5 min. (RCY determined by radio-HPLC).

A Cu(II)-mediated radiofluorination protocol as described by ZISCHLER et al. [39], with commercially available *tert*-butyl 4-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)piperazine-1-carboxylate as the precursor was performed at 110°C for 10 min, which led to $[^{18}\text{F}]\text{13}$ in 60-80 % radiochemical yield (RCY). Deprotection was achieved with excess trifluoroacetic acid (TFA) at 110°C for 20 min. Under less harsh conditions, deprotection did not proceed quantitatively. Subsequently, the D_4R -radioligand $[^{18}\text{F}]\text{I}$ was obtained by reductive amination with azaindole 3-carbaldehyde **1**, using an excess of NaBH_3CN as reductant, for 5 min at 80°C . The crude solution was passed through a C18 cartridge to trap the product, washed with water and eluted with methanol. $[^{18}\text{F}]\text{I}$ was then isolated by semi-preparative HPLC with a total RCY of 7 %.

Precursor **11** (Scheme 6) was used for aromatic nucleophilic ^{18}F -substitution with the same Cu(II)-mediated radiofluorination protocol by ZISCHLER et al. as used above [39]. $[^{18}\text{F}]\text{Fluoride}$ was trapped on a QMA cartridge and eluted with tetraethylammonium bicarbonate (TEAHC) into a solution of **11** and $[\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4]$ in *N,N*-dimethylacetamide (DMA) and reacted at 110°C for 10 min to obtain $[^{18}\text{F}]\text{II}$. The crude solution was passed through a C18 cartridge to trap the product, washed with water and eluted with methanol. Finally, the radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{II}$ was (partially) isolated by semi-preparative HPLC with a RCY of 66% ($n=5$).



Scheme 6. Synthesis of compound $[^{18}\text{F}]\text{II}$ a) Elution of $^{18}\text{F}^-$ with Et_4NHCO_3 in $n\text{BuOH}$; $[\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4]$, DMA, 110°C , 10 min.

3.5. Autoradiography

The main reason for failure of D_4R selective radioligand candidates in *in vivo* experiments is a high ratio of nonspecific to specific binding. Here, we used *in vitro* autoradiography in competition with the non-labeled reference compounds to determine nonspecific binding of the radiolabeled compounds $[^{18}\text{F}]\text{I}$ and $[^{18}\text{F}]\text{II}$. To this end, rat brain slices were incubated either with the labeled compounds alone (total binding) or with the labeled compounds and an excess of the corresponding non-labeled reference compound (non-specific binding). In three independent experiments with molar activities of up to $90\text{ GBq}/\mu\text{mol}$, the D_4 receptor ligand $[^{18}\text{F}]\text{I}$ did not show any uptake in distinct brain regions and exhibited an unacceptably high degree of non-specific binding that could not be displaced by the non-radioactive reference compound (Fig. 4).

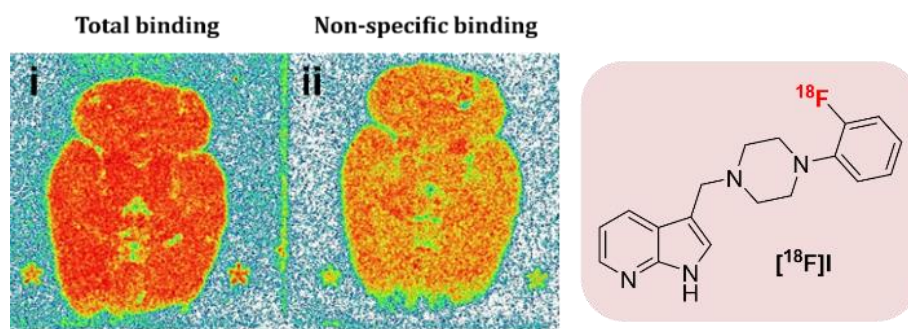


Figure 4. *In vitro* autoradiography of horizontal rat brain slices with 2.31 kBq/mL $[^{18}\text{F}]\text{I}$ alone (total binding) or after blocking with $5\text{ }\mu\text{M}$ non-labeled **I** (non-specific binding). i) Total binding profile. ii) Competition with non-radioactive $[^{19}\text{F}]\text{I}$, displaying non-specific binding.

Thus, $[^{18}\text{F}]\text{I}$ is presumably unsuitable for *in vivo* PET imaging applications and was therefore excluded from further studies.

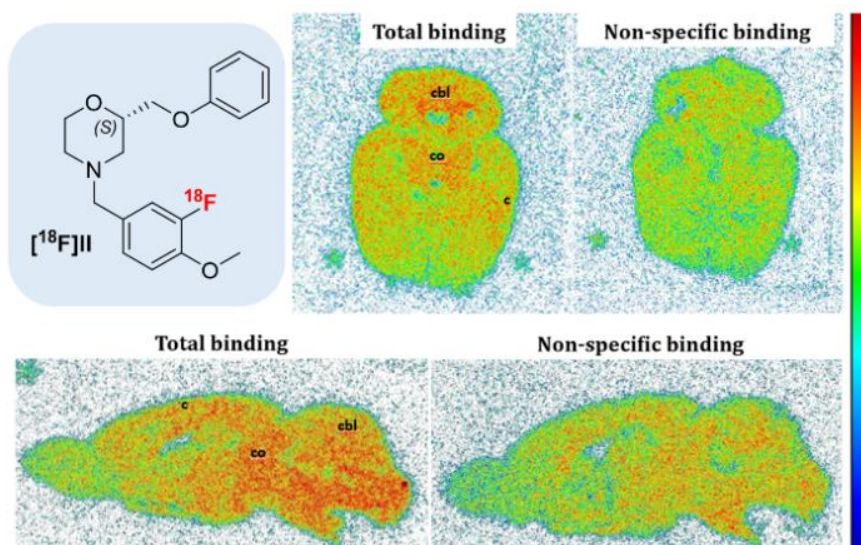


Figure 5. *In vitro* autoradiography of horizontal (top) and sagittal (bottom) rat brain slices with 2.31 kBq/mL [^{18}F]II alone (total binding) or after blocking with 5 μM non-labeled II (nonspecific binding). cbl: cerebellum, co: colliculi, c: cortex).

In any case, [^{18}F]II appeared to show specific binding throughout the brain, with no uptake in the striatum but distinct high accumulation in the colliculi and medial nuclei of the cerebellum (Fig. 5), which is in line with previous results obtained using *in vitro* autoradiography with [^{18}F]FPPB by KÜGLER et al. [14]. On the other hand, little binding was observed in prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HC), even though mRNA [40], immunohistochemical [41-43] and autoradiographic [14, 44, 45] findings indicate predominant expression of D₄R in these regions of the rat brain. Interestingly, lack of binding in PFC and HC was also observed in previous *in vitro* autoradiography experiments with [^{18}F]FPPB, while *ex vivo* autoradiography with the same radioligand revealed clear binding in these regions [14]. With this in mind, our findings encourage further evaluation of [^{18}F]II brain uptake and distribution in preclinical animal models by PET.

4. Conclusion

In summary, four compounds that appeared suitable for the development of a D₄-selective radioligand for PET imaging were first examined for their D₄R subtype selectivity. Based on the properties found, two of the compounds were ^{18}F -labeled and examined by *in vitro* autoradiography. Of these, only ligand (S)-4-(3-[^{18}F]fluoro-4-methoxybenzyl)-2-(phenoxy)morpholine [^{18}F]II showed low non-specific binding and accumulation in distinct, extra-striatal brain regions. Further work is in progress to study the brain uptake and metabolism of [^{18}F]II in preclinical animal models.

5. Acknowledgement

The authors would like to thank Annette Schulze, Dr. Dirk Bier and Dr. Marcus Holschbach (all INM-5), and Dr. Sabine Willbold (Zentralinstitut für Engineering, Elektronik und Analytik, ZEA-3), all Forschungszentrum Jülich, for recording the spectroscopic data and conducting the biological studies.

References

1. Reynolds GP. Developments in the drug treatment of schizophrenia. *Trends in Pharmacological Sciences* 1992; 13:116-121.
2. Sanyal S, Van Tol HHM. Review the role of dopamine D₄ receptors in schizophrenia and antipsychotic action. *Journal of Psychiatric Research* 1997; 31:219-232.
3. Di Ciano P, Grandy DK, Le Foll B (2014) Chapter Eight - Dopamine D₄ Receptors in Psychostimulant Addiction In: Dwoskin L P *Advances in Pharmacology Academic Press* pp 301-321.
4. Sunohara GA, Roberts W, Malone M, Schachar RJ, Tannock R, Basile VS, Wigal T, Wigal SB, Schuck S, Moriarty J, Swanson JM, Kennedy JL, Barr CL. Linkage of the Dopamine D₄ Receptor Gene and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2000; 39:1537-1542.
5. Van Tol HHM, Bunzow JR, Guan H-C, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O. Cloning of the gene for a human dopamine D₄ receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 1991; 350:610-614.
6. Strange PG, Neve K. Dopamine Receptors. *Tocris Scientific Review Series* 2013:1-11.
7. Roth B, Lopez E. *PDSP Ki Database. Psychoactive Drug Screening Program (PDSP)*. 2019 [cited 2019 15.07.2019]; Available from: <https://pdsp.unc.edu/databases/kidb.php>.
8. Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H. Clozapine for the Treatment-Resistant Schizophrenic: A Double-blind Comparison With Chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry* 1988; 45:789-796.
9. Lanig H, Utz W, Gmeiner P. Comparative Molecular Field Analysis of Dopamine D₄ Receptor Antagonists Including 3-[4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-ylmethyl]pyrazolo[1,5-*a*]pyridine (FAUC 113), 3-[4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-ylmethyl]-1H-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (L-745,870), and Clozapine. *J Med Chem* 2001; 44:1151-1157.
10. Kortagere S, Gmeiner P, Weinstein H, Schetz JA. Certain 1,4-disubstituted aromatic piperidines and piperazines with extreme selectivity for the dopamine D₄ receptor interact with a common receptor microdomain. *Mol Pharmacol* 2004.
11. Nagar S, Korzekwa K. Nonspecific Protein Binding Versus Membrane Partitioning - It Is Not Just Semantics. *Drug Metab Dispos* 2012; 40:1649-1652.
12. Wang Y, Mathis CA, Huang G-F, Debnath ML, Holt DP, Shao L, Klunk WE. Effects of lipophilicity on the affinity and nonspecific binding of iodinated benzothiazole derivatives. *J Mol Neurosci* 2003; 20:255-260.
13. Sebai S, Baci M, Ces O, Clarke J, Cunningham V, Gunn R, Law R, Mulet X, Parker C, Plisson C, Templer R, Gee A. To lipophilicity and beyond—towards a deeper understanding of radioligand non-specific binding. *NeuroImage* 2006; 31:T56.
14. Kügler F, Sihver W, Ermert J, Hübner H, Gmeiner P, Prante O, Coenen HH. Evaluation of ¹⁸F-labeled benzodioxine piperazine-based dopamine D₄ receptor ligands: Lipophilicity as a determinate of nonspecific binding. *J Med Chem* 2011; 54:8343-8352.
15. Kong JY, Park WK, Cho H, Jeong D, Choi G, Koh HY, Kim SH, Pae AN, Cho YS, Cha JH (2007) Piperazinyl-propyl-pyrazole derivatives as dopamine D₄ receptor antagonists, and pharmaceutical compositions containing the same. Patent WO2008108517A2.
16. Hübner H, Haubmann C, Utz W, Gmeiner P. Conjugated Enynes as Nonaromatic Catechol Bioisosteres: Synthesis, Binding Experiments, and Computational Studies of Novel Dopamine Receptor Agonists Recognizing Preferentially the D₃ Subtype. *Journal of Medicinal Chemistry* 2000; 43:756-762.

17. Hayes G, Biden TJ, Selbie LA, Shine J. Structural subtypes of the dopamine D₂ receptor are functionally distinct: expression of the cloned D_{2A} and D_{2B} subtypes in a heterologous cell line. *Mol Endocrinol* 1992; 6:920-926.
18. Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D₃) as a target for neuroleptics. *Nature* 1990; 347:146-151.
19. Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol HHM. Modulation of Intracellular Cyclic AMP Levels by Different Human Dopamine D₄ Receptor Variants. *J Neurochem* 1995; 65:1157-1165.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
21. Möller D, Banerjee A, Uzuneser TC, Skultety M, Huth T, Plouffe B, Hübner H, Alzheimer C, Friedland K, Müller CP, Bouvier M, Gmeiner P. Discovery of G Protein-Biased Dopaminergics with a Pyrazolo[1,5-*a*]pyridine Substructure. *J Med Chem* 2017; 60:2908-2929.
22. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship Between the Inhibition Constant (K_i) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 Per Cent Inhibition (I₅₀) of an Enzymatic Reaction *Biochem Pharmacol* 1973; 22:3099-3108.
23. Sihver W, Bier D, Holschbach MH, Schulze A, Wutz W, Olsson RA, Coenen HH. Binding of tritiated and radioiodinated ZM241,385 to brain A_{2A} adenosine receptors. *Nuclear medicine and biology* 2004; 31:173-177.
24. Ghose AK, Crippen GM. Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 1987; 27:21-35.
25. Tetko IV, Gasteiger J, Todeschini R, Mauri A, Livingstone D, Ertl P, Palyulin VA, Radchenko EV, Zefirov NS, Makarenko AS, Tanchuk VY, Prokopenko VV. Virtual Computational Chemistry Laboratory – Design and Description. *J Comput Aided Mol Des* 2005; 19:453-463.
26. *Chemicalize was used for prediction of LogP & LogD values.* 2020 26. July 2020]; Available from: <http://www.chemaxon.com>.
27. Kulagowski JJ, Broughton HB, Curtis NR, Mawer IM, Ridgill MP, Baker R, Emms F, Freedman SB, Marwood R, Patel S, Patel S, Ragan CI, Leeson PD. 3-[[4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl]methyl]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine: An Antagonist with High Affinity and Selectivity for the Human Dopamine D₄ Receptor. *J Med Chem* 1996; 39:1941-1942.
28. Gazi L, Bobirnac I, Danzeisen M, Schüpbach E, Langenegger D, Sommer B, Hoyer D, Tricklebank M, Schoeffter P. Receptor density as a factor governing the efficacy of the dopamine D₄ receptor ligands, L-745,870 and U-101958 at human recombinant D_{4.4} receptors expressed in CHO cells. *Br J Pharmacol* 1999; 128:613-620.
29. Löber S, Hübner H, Gmeiner P. Azaindole derivatives with high affinity for the dopamine D₄ receptor: Synthesis, ligand binding studies and comparison of molecular electrostatic potential maps. *Bioorg Med Chem Lett* 1999; 9:97-102.
30. Löber S, Hübner H, Utz W, Gmeiner P. Rationally Based Efficacy Tuning of Selective Dopamine D₄ Receptor Ligands Leading to the Complete Antagonist 2-[4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-ylmethyl]pyrazolo[1,5-*a*]pyridine (FAUC 213). *Journal of Medicinal Chemistry* 2001; 44:2691-2694.
31. Boeckler F, Russig H, Zhang W, Löber S, Schetz J, Hübner H, Ferger B, Gmeiner P, Feldon J. FAUC 213, a highly selective dopamine D₄ receptor full antagonist, exhibits atypical antipsychotic properties in behavioural and neurochemical models of schizophrenia. *Psychopharmacology* 2004; 175:7-17.
32. Cowart M, Latshaw SP, Bhatia P, Daanen JF, Rohde J, Nelson SL, Patel M, Kolasa T, Nakane M, Uchic ME, Miller LN, Terranova MA, Chang R, Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Hollingsworth PR,

- Martino BR, Lynch JJ, Sullivan JP, Hsieh GC, Moreland RB, Brioni JD, Stewart AO. Discovery of 2-(4-Pyridin-2-ylpiperazin-1-ylmethyl)-1*H*-benzimidazole (ABT-724), a Dopaminergic Agent with a Novel Mode of Action for the Potential Treatment of Erectile Dysfunction. *J Med Chem* 2004; 47:3853-3864.
33. Brioni JD, Moreland RB, Cowart M, Hsieh GC, Stewart AO, Hedlund P, Donnelly-Roberts DL, Nakane M, Lynch JJ, Kolasa T, Polakowski JS, Osinski MA, Marsh K, Andersson K-E, Sullivan JP. Activation of dopamine D₄ receptors by ABT-724 induces penile erection in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101:6758-6763.
 34. Enguehard-Gueiffier C, Hübner H, El Hakmaoui A, Allouchi H, Gmeiner P, Argiolas A, Melis MR, Gueiffier A. 2-[(4-Phenylpiperazin-1-yl)methyl]imidazo(di)azines as Selective D₄-Ligands. Induction of Penile Erection by 2-[4-(2-Methoxyphenyl)piperazin-1-ylmethyl]imidazo[1,2-*a*]pyridine (PIP3EA), a Potent and Selective D₄ Partial Agonist. *J Med Chem* 2006; 49:3938-3947.
 35. Yadav RR, Battini N, Mudududdla R, Bharate JB, Muparappu N, Bharate SB, Vishwakarma RA. Deformylation of indole and azaindole-3-carboxaldehydes using anthranilamide and solid acid heterogeneous catalyst via quinazolinone intermediate. *Tetrahedron Letters* 2012; 53:2222-2225.
 36. Jia H, Dai G, Weng J, Zhang Z, Wang Q, Zhou F, Jiao L, Cui Y, Ren Y, Fan S, Zhou J, Qing W, Gu Y, Wang J, Sai Y, Su W. Discovery of (S)-1-(1-(Imidazo[1,2-*a*]pyridin-6-yl)ethyl)-6-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)-1*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyrazine (Volitinib) as a Highly Potent and Selective Mesenchymal–Epithelial Transition Factor (c-Met) Inhibitor in Clinical Development for Treatment of Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 57:7577-7589.
 37. Henegar KE. Concise Synthesis of (S)-N-BOC-2-Hydroxymethylmorpholine and (S)-N-BOC-Morpholine-2-carboxylic Acid. *The Journal of Organic Chemistry* 2008; 73:3662-3665.
 38. Lepore SD, He Y. Use of Sonication for the Coupling of Sterically Hindered Substrates in the Phenolic Mitsunobu Reaction. *The Journal of Organic Chemistry* 2003; 68:8261-8263.
 39. Zischler J, Kolks N, Modemann D, Neumaier B, Zlatopolskiy BD. Alcohol-Enhanced Cu-Mediated Radiofluorination. *Chem Eur J* 2017; 23:3251-3256.
 40. O'Malley KL, Harmon S, Tang L, Todd RD. The rat dopamine D₄ receptor: sequence, gene structure, and demonstration of expression in the cardiovascular system. *New Biol* 1992; 4:137-146.
 41. Khan ZU, Gutiérrez A, Martín R, Peñafiel A, Rivera A, De La Calle A. Differential regional and cellular distribution of dopamine D₂-like receptors: An immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *J Comp Neurol* 1998; 402:353-371.
 42. Defagot MC, Malchiodi EL, Villar MJ, Antonelli MC. Distribution of D₄ dopamine receptor in rat brain with sequence-specific antibodies. *Mol Brain Res* 1997; 45:1-12.
 43. Ariano MA, Wang J, Noblett KL, Larson ER, Sibley DR. Cellular distribution of the rat D₄ dopamine receptor protein in the CNS using anti-receptor antisera. *Brain Res* 1997; 752:26-34.
 44. Prante O, Tietze R, Hocke C, Löber S, Hübner H, Kuwert T, Gmeiner P. Synthesis, Radiofluorination, and In Vitro Evaluation of Pyrazolo[1,5-*a*]pyridine-Based Dopamine D₄ Receptor Ligands: Discovery of an Inverse Agonist Radioligand for PET. *J Med Chem* 2008; 51:1800-1810.
 45. Primus RJ, Thurkauf A, Xu J, Yevich E, McInerney S, Shaw K, Tallman JF, Gallagher DW. II. Localization and characterization of dopamine D₄ binding sites in rat and human brain by use of the novel, D₄ receptor-selective ligand [³H]NGD 94-1. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282:1020-1027.

2.2 Radiosynthesis and biological evaluation of [^{18}F]R91150, a selective 5-HT_{2A} receptor antagonist for PET-imaging

Michael Willmann, Julian Hegger, Bernd Neumaier*, Johannes Ermert.

Forschungszentrum Jülich GmbH, Institute of Neuroscience and Medicine, Nuclear Chemistry (INM-5), Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich, Germany

* Corresponding author: b.neumaier@fz-juelich.de

Manuskript in Revision, ACS Medicinal Chemistry Letters

Radiosynthesis and biological evaluation of [¹⁸F]R91150, a selective 5-HT_{2A} receptor antagonist for PET-imaging

Michael Willmann, Julian Hegger, Bernd Neumaier*, Johannes Ermert.

Forschungszentrum Jülich GmbH, Institute of Neuroscience and Medicine, Nuclear Chemistry (INM-5), 52425 Jülich, Germany

ABSTRACT: Serotonergic 5-HT_{2A} receptors (5-HT_{2A}Rs) in cortical and forebrain regions are an important substrate for the neuromodulatory actions of serotonin in the brain. They have been implicated in the etiology of many neuropsychiatric disorders and serve as a target for (novel) antipsychotic, antidepressant and anxiolytic drugs. Positron emission tomography (PET) imaging using suitable radioligands can be applied for *in vivo* quantification of (alterations in) receptor densities and receptor occupancy for therapy evaluation. Recently the radiosynthesis of the selective 5-HT_{2A}R antagonist [¹⁸F]R91150 was reported. However, the 6-step radiosynthesis is cumbersome and time-consuming (190 min) with low radiochemical yields (RCYs) of <5%, obviating widespread use of this radioligand. In this work, [¹⁸F]R91150 was prepared using late-stage Cu-mediated radiofluorination to simplify and accelerate synthesis of the radioligand. The detailed protocol enabled to obtain RCYs of 14% and the total synthesis time was reduced to 60 min. In addition, autoradiographic studies with [¹⁸F]R91150 in rat brain slices revealed the typical uptake pattern of serotonergic (5-HT_{2A}) receptor ligands.

KEYWORDS: 5-HT_{2A}, autoradiography, PET imaging, fluorine-18, [¹⁸F]R91150

Serotonin, or 5-hydroxytryptamine (5-HT), is an important neurotransmitter in the central nervous system and peripheral tissues that exerts its effects through a family of seven 5-HT receptors (5-HT₁₋₇). In the brain, 5-HT release from serotonergic fibers that originate in the raphe nuclei and innervate cortical and limbic structures of the medial temporal lobe system has long been recognized to modulate cognition, emotional processes and various forms of learning and memory^{1, 2}. More recent findings indicate that serotonergic 5-HT_{2A} receptors (5-HT_{2A}Rs), which are widely expressed in cortical and forebrain regions, may be an important substrate for these neuromodulatory actions³. In support of this assumption, changes in 5-HT_{2A}R expression or function have been implicated in the etiology of many neuropsychiatric disorders like depression, anxiety or schizophrenia and cognitive disturbances associated with Alzheimer's or Parkinson disease⁴⁻⁷. Based on these findings, pharmacological manipulation of 5-HT_{2A}Rs has emerged as a promising approach for the treatment of mental or

cognitive disorders, as evidenced by various studies on the antidepressant⁸, anxiolytic⁹ and antipsychotic¹⁰ effects of 5-HT_{2A}R antagonism.

Molecular imaging techniques like positron emission tomography (PET) or single photon emission computed tomography (SPECT) can be used for *in vivo* quantification of (changes in) receptor densities and measurement of receptor occupancy by novel therapeutic drugs. To date, various radioligands for PET-based visualization of 5-HT_{2A}Rs have been developed that can be broadly classified into radiolabeled antagonists like [¹⁸F]setoperone^{11, 12}, [¹⁸F]altanserin¹³, [¹¹C]MDL100907^{14, 15} or [¹⁸F]MDL100907^{16, 17}, and radiolabeled agonists like [¹¹C]CIMBI-36¹⁸⁻²⁰ or [¹⁸F]FETCIMBI-36²¹. Likewise, several ¹²³I-labelled compounds have been developed for SPECT imaging, although only the antagonist [¹²³I]iodo-R91150, a radiolabeled analog of the Janssen Research Foundation compound R91150 (Fig. 1), proved to exhibit suitable binding properties, selectivity and brain uptake for imaging of 5-HT_{2A}Rs in rats^{22, 23}. Subsequent animal and human studies with [¹²³I]iodo-R91150 revealed a binding pattern consistent with the distribution of 5-HT_{2A}Rs observed in previous autoradiographic studies²⁴⁻²⁷, and the tracer has since been used for imaging in patients with schizophrenia²⁸, depression²⁹, Parkinson's disease³⁰ or Asperger's syndrome³¹. A disadvantage of [¹²³I]iodo-R91150, especially with regard to preclinical imaging in small animal models, is that radioiodination increases the lipophilicity relative to the parent compound R91150 more than 10-fold³² (Fig. 1), which results in a relatively low signal-to-noise ratio. Exploiting the presence of an aromatic fluorine atom in the parent compound (Fig. 1), this aspect has been addressed by preparation of the ¹⁸F-labeled analog [¹⁸F]R91150 for use in PET measurements³². Preliminary *in vitro* and *ex vivo* experiments indicated that [¹⁸F]R91150 may have certain advantages over established 5-HT_{2A} antagonist radioligands in human use³², including a higher selectivity and lack of lipophilic, brain-permeant radiometabolites when compared to [¹⁸F]altanserin³³ or [¹⁸F]setoperone¹², increased 5-HT_{2A} affinity, reduced lipophilicity and improved signal-to-background ratio when compared to [¹²³I]iodo-R91150^{32, 34} and a longer-lived ¹⁸F-label which should confer a better match between isotope and biological half-life when compared to [¹¹C]MDL100907^{35, 36}. On the other hand, a major disadvantage of [¹⁸F]R91150 so far is the time-consuming 6-step radiosynthesis, which provides [¹⁸F]R91150 in RCYs of <5%, is not amenable to automation³², and has prevented a more widespread use of this radioligand. However, a number of Cu-mediated radiofluorination methods developed in the last decade (for overview³⁷⁻⁴¹) have provided new approaches for facile introduction of ¹⁸F into aromatic compounds. In the present work, we describe a novel synthetic strategy for production of [¹⁸F]R91150 via copper-mediated late-stage radiofluorination and present the results from autoradiographic studies performed with the tracer.

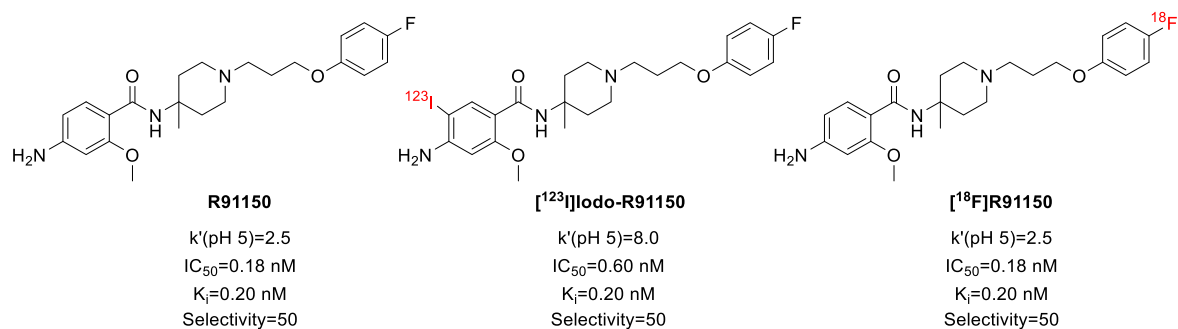
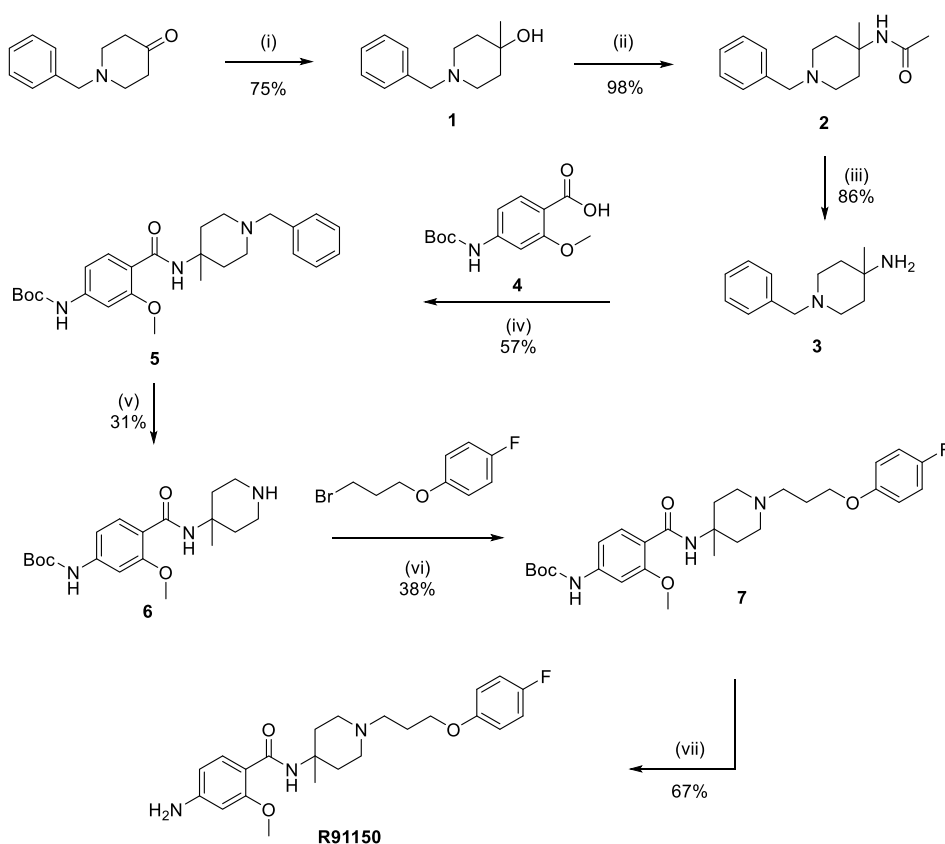


Figure 1. Structure and properties of the selective 5-HT_{2A}R antagonist R91150 and its radiolabeled analogs. K_i values refer to inhibition of [³H]ketanserin binding to rat frontal cortex membranes. Selectivity factors refer to 5-HT_{2A}R over serotonergic 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2C} and 5-HT₃, adrenergic α_1 and α_2 , histaminergic H₁ and dopaminergic D₂ receptors. Capacity factors k' were determined at pH 5 and provide a measure for lipophilicity with excellent correlation to logP octanol/buffer values. Data from ^{4-7, 16, 22, 23}.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of reference compounds and labeling precursor

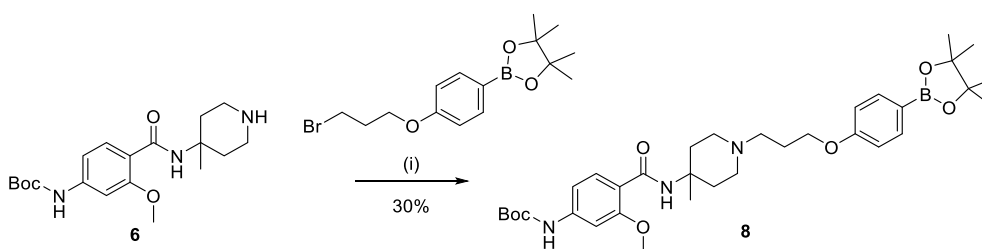
For competition studies and to confirm the identity of [¹⁸F]R91150, the reference compound R91150 was prepared according to the total synthesis described by Mülhausen *et al.*³² (Scheme 1).



Scheme 1: Synthesis of **R91150**. Reaction conditions: (i) MeLi, Et₂O, -78 °C to r.t., 2 h. (ii) conc. H₂SO₄, MeCN, r.t., 2 h. (iii) conc. HCl, 100 °C, 48 h. (iv) PyBOP, Et₃N, 4, DCM, r.t., 18 h. (v) NH₄HCO₂, palladium black, MeOH, 65 °C, 3.5 h. (vi) K₂CO₃, KI, DMF, 80 °C, 12 h. (vii) DCM/TFA (3:1), 80 °C, 2 h.

To this end, commercially available *N*-benzyl-piperid-4-one was reacted with methyllithium (MeLi) to introduce the quaternary methyl bearing carbon atom, which provided benzyl-4-methyl-piperidin-4-ol (**1**) in good yields (75%). The hydroxyl group was almost quantitatively (98%) converted into the acetyl-protected amine by a *Ritter-Reaction* of **1** with MeCN and concentrated H₂SO₄ to obtain *N*-(1-benzyl-4-methylpiperidin-4-yl)acetamide (**2**), which was directly de-protected to 1-benzyl-4-methyl-piperidin-4-amine (**3**) in 86% yield by refluxing in concentrated hydrochloric acid (aq. HCl) for at least 2 days. Intermediate **3** was conjugated with 4-(*tert*-butoxycarbonylamino)-2-methoxybenzoic acid **4** (prepared from commercially available 4-amino-2-methoxybenzoic acid) using benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) for carboxylic acid activation, which provided *tert*-butyl 4-(1-benzyl-4-methylpiperidin-4-ylcarbamoyl)-3-methoxyphenylcarbamate (**5**) in fair yield (57%), but still contaminated with pyrrolidine by-products according to ¹H/¹³C-NMR. Subsequent benzyl deprotection of **5** with palladium black was complete after 3.5 h (as indicated by TLC) and purification by flash column chromatography effectively removed all pyrrolidine from the previous step, affording **6** in 31% yield. The following amination of **6** with commercially available 1-(3-bromopropoxy)-4-fluorobenzene gave the *N*-Boc-protected reference compound **7** in 34% yield. R91150 was finally obtained in 67% yield by deprotection of **7** in a 3:1 mixture of dichloromethane (DCM) and trifluoroacetic acid (TFA) at 80 °C for 2 h. For optimal purity, the compound was purified by semi-preparative HPLC, followed by solid phase extraction (SPE) using a C18 cartridge.

The radiolabeling precursor **8** was synthesized in an analogue manner in 30% yield by employing commercially available 2-(4-(3-bromopropoxy)phenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane in the amination reaction (Scheme 2).

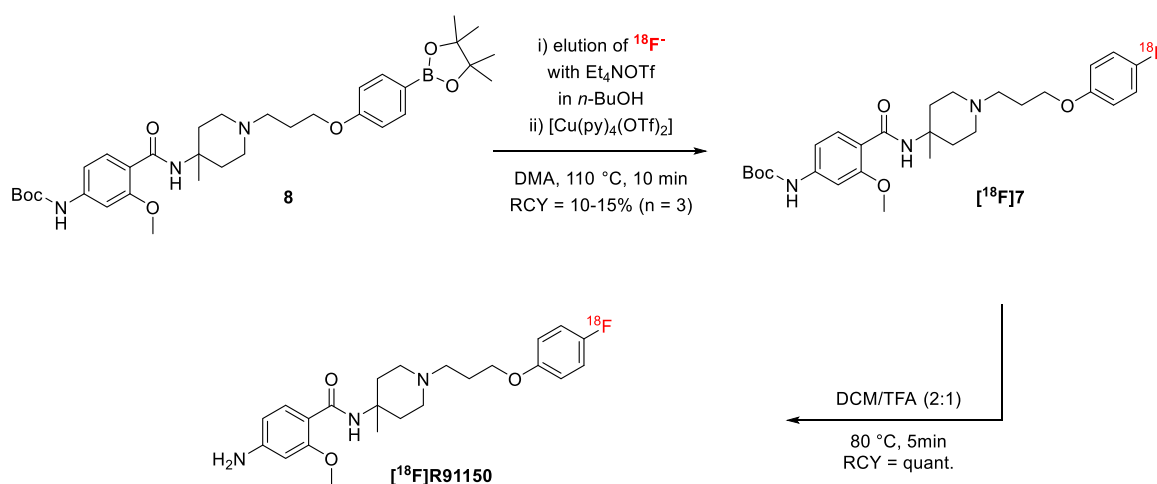


Scheme 2: Synthesis of labeling precursor **8**. Reaction conditions: (i) K₂CO₃, KI, DMF, r.t., 12 h.

Radiosynthesis

Note: Unless noted otherwise, all radiochemical yields (RCY) described herein have been corrected for decay to the start of synthesis, as recommended in the consensus nomenclature rules for radiopharmaceutical chemistry⁴².

[^{18}F]R91150 was prepared in a two-step synthesis by Cu-mediated radiofluorination of the *N*-Boc-protected precursor **8** with subsequent deprotection followed by HPLC-purification. The tracer was prepared within 60 min. Initially we attempted a direct labeling approach that involved deprotection of **8** (33% TFA in DCM at 80 °C for 5 min) with subsequent labeling in the same vial (after removal of TFA/DCM). Unfortunately, these attempts were not successful, potentially due to fast protodeboronation⁴³ of the precursor under the applied conditions. Assuming that the deprotected boronic acid pinacol ester might be prone to degradation upon long-term storage, we did not make further attempts to employ a one-step radiosynthesis of [^{18}F]R91150.



Scheme 3: 2-Step radiosynthesis of [^{18}F]R91150.

Therefore, the *N*-Boc-protected boronic acid pinacol ester **8** was radiofluorinated using the Cu(II)-mediated radiofluorination protocol according to Zischler et al.⁴⁴. To this end, [^{18}F]fluoride was trapped on a QMA cartridge and eluted with tetraethylammonium bicarbonate (Et_4NHCO_3) in *n*-butanol with an elution efficacy of $95 \pm 4\%$ ($n = 10$). A solution of precursor **8** and $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$ in DMA was added and the mixture was stirred at 110 °C for 10 min, which afforded [^{18}F]7 in RCYs of 15% ($n = 3$) after isolation by SPE (Sep-Pak C18). Quantitative deprotection of [^{18}F]7 was achieved with TFA in DCM at 80 °C for 5 min. Subsequently, the 5-HT_{2A}-radioligand [^{18}F]R91150 was isolated using an analytical HPLC column with 14% RCY (aliquots, $n = 3$) or in 13% RCY ($n = 1$) using a semi-preparative HPLC column. For *in vitro* studies, [^{18}F]R91150 was isolated using an analytical HPLC column and the collected fraction (2-5 MBq/mL) was diluted in Tris HCl (pH 7.4) buffer (~2.5 kBq/mL).

The molar activity was determined to be 70 GBq/ μmol with a radiochemical purity of 97%, based on a starting activity of 4.4 GBq and a synthesis time of approx. 60 min. Cu-content was determined by ICP-MS of the isolated fraction (using semi-preparative HPLC) containing the tracer (10 mL, 174 MBq) and found to be 2.6 $\mu\text{g/L}$. This is far below any level of concern according to the ICH Guideline of Elemental Impurities (Q3D)⁴⁵.

In summary, the radiosynthesis of [^{18}F]R91150 was considerably facilitated by reduction of synthesis time and improvement of radiochemical yield (Tab. 1). This enabled first *in vitro* studies of this radioligand and finally also allows for automation of the radiosynthesis.

Tab. 1: Comparison of the radiosynthesis of [^{18}F]R91150 as published by Mülhausen *et al.*³² with the two-step radiosynthesis in this work.

	reaction steps	synthesis time	RCY	n.d.c. yield	automation
This work	2 (facile)	60 min	14%	10±1%	possible
Mülhausen <i>et al.</i> ³²	6 (complex)	190 min	1.8-5.7%	0.5-1.7%	not applicable

Autoradiography

The suitability of radioligand candidates for *in vivo* experiments strongly depends on a high ratio of specific to nonspecific binding and a lack of affinity for other, non-target receptors (unspecific binding). Here, *in vitro* autoradiography was used in competition with non-radioactive R91150 to determine nonspecific binding of the radioligand. To this end, transaxial and sagittal rat brain slices were either incubated with [^{18}F]R91150 alone (total binding, Fig. 2 A, Fig. 3 A & C, Fig. 4 A) or with [^{18}F]R91150 and an excess of the corresponding non-radioactive reference compound (nonspecific binding, Fig. 2 B, Fig. 3 B & D, Fig. 4 B-D).

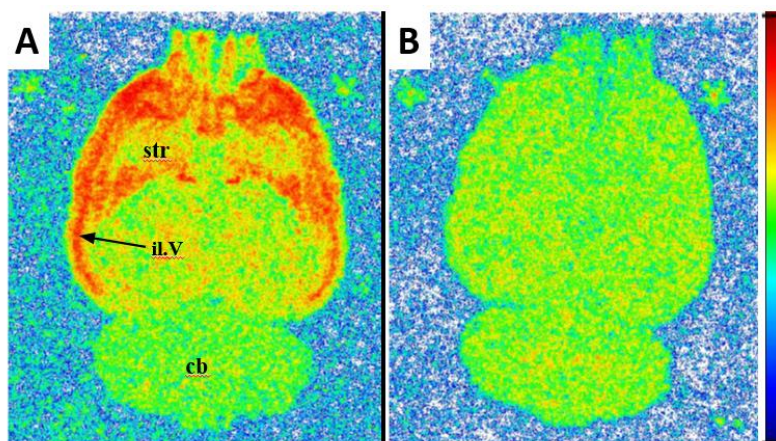


Fig. 2: *In vitro* autoradiography of transaxial rat brain slices with [^{18}F]R91150 (A: total binding) and in competition with R91150 (B: nonspecific binding). Major binding was detected in the lamina V (il.V) of the cortex and in the caudal parts of the striata (str). Abbreviations: cerebellum (cb), lamina V of the cortex (il.V), orbital cortex (orb), striatum (str).

In addition, the specific binding pattern of [^{18}F]R91150 was verified in competition assays with the 5-HT_{2A} targeting drugs altanserin, (+)-lisuride⁴⁶ and (-)-lisuride (Fig. 4). In three independent experiments with molar activities between 1.5 and 70 GBq/μmol, [^{18}F]R91150 showed distinct specific

binding throughout the cortex, with a higher binding in frontal compared to caudal cortical regions (Fig. 2). Binding was displaced by R91150, altanserin and (+)-lisuride to approximately the same extent, validating 5-HT_{2A} specificity of [¹⁸F]R91150. In direct comparison with other specific 5-HT_{2A} ligands (e.g. (R)-[¹⁸F]MH.MZ⁴⁷, [¹⁸F]MDL100,907¹⁶, [¹⁸F]altanserin^{48, 49}), a high degree of regional correspondence was observed for binding in neocortex (strongest labelling in lamina V), striatum (stronger signal in caudal parts of the nucleus) and the olfactory tubercle along with several of the brainstem nuclei (see Fig. 3)⁵⁰. These regions of high 5-HT_{2A}R expression, as determined in previous *in situ* hybridization studies⁵¹, are clearly visualized in the autoradiographic images (see Fig. 2 & Fig. 3).

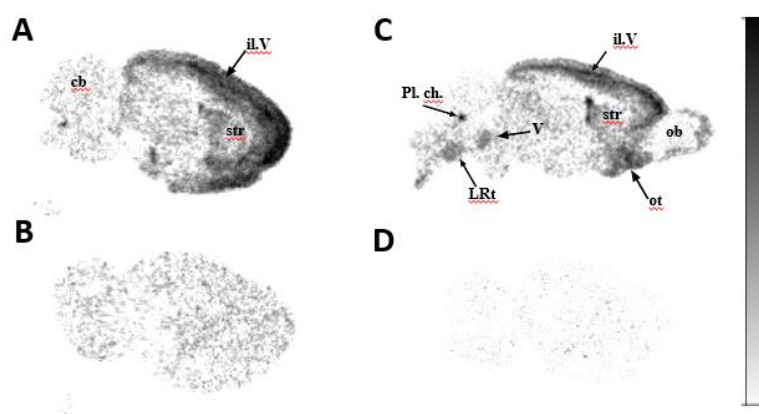


Fig. 3: *In vitro* autoradiography of sagittal rat brain slices with [¹⁸F]R91150 (A & C: total binding) and in competition with R91150 (B & D: nonspecific binding). Abbreviations: cerebellum (cb), choroid plexus (Ph. ch.), lamina V of the cortex (il.V), olfactory bulb (ob), olfactory tubercle (ot), lateral reticular nucleus (LRt), striatum (str), trigeminal nerve (V). Each column shows different sets of experiments (A, B & C, D).

Almost no specific binding was observed throughout the cerebellum, which is consistent with several previous autoradiographic and immunohistological studies which confirmed low 5-HT_{2A}R abundance in the cerebellum.⁵²⁻⁵⁴ Nonspecific binding was determined as the non-displaceable radioligand binding in the presence of 1 μM R91150, pointing to a low degree of nonspecific binding of 29% (Fig. 2B,

Tab. 2). A high [¹⁸F]R91150 accumulation was found in the anterior forebrain, where tracer accumulation displayed a strong laminar pattern, similar to that observed in immunohistochemical localization studies on 5-HT_{2A}R expression in the middle layers of the cortex, that identified layer V as the region with most conspicuous 5-HT_{2A}R densities.⁵⁵ In the competition assays with (-)-lisuride, (+)-lisuride and altanserin, (-)-lisuride displaced [¹⁸F]R91150 binding in the cortex to a lower degree (53%) than (+)-lisuride (76%, Fig. 4), indicating a lower 5-HT_{2A} affinity of this enantiomer as compared to (+)-lisuride.

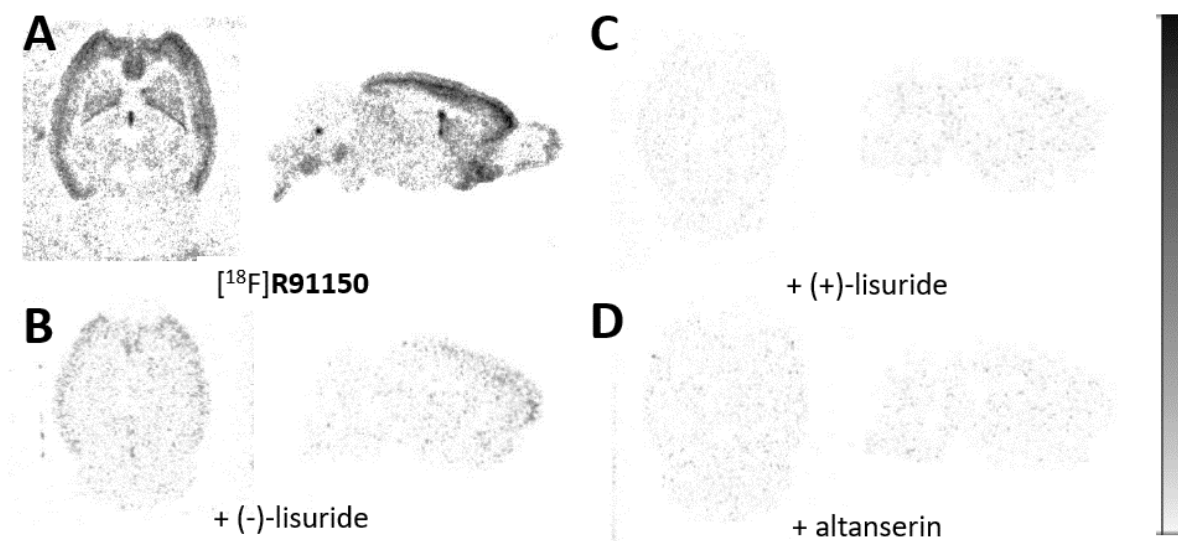


Fig. 4: Competition assay of [^{18}F]R91150 (A) with (-)-lisuride (B), (+)-lisuride (C) and altanserin (D). Only (-)-lisuride (B) could not completely block the binding of [^{18}F]R91150. Transaxial & sagittal orientation are shown for each set (A, B & C, D).

Tab. 2: Quantification of [^{18}F]R91150 binding. Displacement by known 5-HT $_2\text{A}$ targeting drugs indicates specific binding behavior of [^{18}F]R91150.

	%Displacement of [^{18}F]R91150 binding ^a			
	R91150	altanserin	(+)-lisuride	(-)-lisuride
	1 μM		2 μM	
cortex	70.5 $\pm$ 3.8	70.6 $\pm$ 3.2	75.6 $\pm$ 5.5	52.7 $\pm$ 2.6
striatum	34.3 $\pm$ 12.5	32.9 $\pm$ 12.6	49.9 $\pm$ 13.7 ^b	32.4 $\pm$ 4.5
cerebellum	0	0	0	0

^a Corrected for background, n=4. Regions of interest and data used for quantification are described in the supporting information. ^b Stronger displacement compared to R91150 due to higher concentration of the ligand.

CONCLUSION

The radiosynthesis of [^{18}F]R91150 was simplified by using late stage Cu-mediated radiofluorination, facilitating the production of [^{18}F]R91150 in fair RCY of 14% within 60 min. The *in vitro* evaluation of [^{18}F]R91150 revealed the potential of this tracer for PET imaging of 5-HT $_2\text{A}$ R status in the human brain. Future studies should focus on the *in vivo* behavior of [^{18}F]R91150 and the transfer of its synthesis to an automated module for clinical applications.

References

1. Schmitt, J. A.; Wingen, M.; Ramaekers, J. G.; Evers, E. A.; Riedel, W. J., Serotonin and human cognitive performance. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12* (20), 2473-86.
2. Barnes, N. M.; Sharp, T., A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **1999**, *38* (8), 1083-152.
3. Zhang, G.; Stackman, R. W., The role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in memory and cognition. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6* (225), Article 225.
4. Naughton, M.; Mulrooney, J. B.; Leonard, B. E., A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders. *Hum. Psychopharmacol.* **2000**, *15*, 397-415.
5. Perry, E. K.; Perry, R. H.; Candy, J. M.; Fairbairn, A. F.; Blessed, G.; Dick, D. J.; Tomlinson, B. E., Cortical serotonin-S₂ receptor binding abnormalities in patients with Alzheimer's disease: Comparisons with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **1984**, *51* (3), 353-357.
6. Dean, B.; Hayes, W., Decreased frontal cortical serotonin_{2A} receptors in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **1996**, *21* (3), 133-139.
7. Rodríguez, J. J.; Noristani, H. N.; Verkhatsky, A., The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **2012**, *99* (1), 15-41.
8. Kroeze, W. K.; Roth, B. L., The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis. *Biol. Psychiatry* **1998**, *44* (11), 1128-1142.
9. Cohen, H., Anxiolytic effect and memory improvement in rats by antisense oligodeoxynucleotide to 5-hydroxytryptamine-2A precursor protein. *Depression and anxiety* **2005**, *22* (2), 84-93.
10. Meltzer, H. Y., The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* **1999**, *21* (2 Suppl), 106s-115s.
11. Crouzel, C.; Venet, M.; Irie, T.; Sanz, G.; Boullais, C., Labeling of a serotonergic ligand with ¹⁸F: [¹⁸F]setoperone. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1988**, *25* (4), 403-414.
12. Blin, J.; Sette, G.; Fiorelli, M.; Blettry, O.; Elghozi, J. L.; Crouzel, C.; Baron, J. C., A Method for the In Vivo Investigation of the Serotonergic 5-HT₂ Receptors in the Human Cerebral Cortex Using Positron Emission Tomography and ¹⁸F-Labeled Setoperone. *J. Neurochem.* **1990**, *54* (5), 1744-1754.
13. Lemaire, C.; Cantineau, R.; Guillaume, M.; Plenevaux, A.; Christiaens, L., Fluorine-18-altanserin: A radioligand for the study of serotonin receptors with PET: Radiolabeling and in vivo biologic behavior in rats. *J. Nucl. Med.* **1991**, *32* (12), 2266-2272.
14. Lundkvist, C.; Halldin, C.; Ginovart, N.; Nyberg, S.; Swahn, C. G.; Carr, A. A.; Brunner, F.; Farde, L., [¹¹C]MDL 100907, a radioligand for selective imaging of 5-HT_{2A} receptors with positron emission tomography. *Life Sciences* **1996**, *58* (10), PL187-PL192.
15. Ito, H.; Nyberg, S.; Halldin, C.; Lundkvist, C.; Farde, L., PET imaging of central 5-HT_{2A} receptors with carbon-11-MDL 100,907. *J. Nucl. Med.* **1998**, *39* (1), 208-214.

16. Mühlhausen, U.; Ermert, J.; Herth, M. M.; Coenen, H. H., Synthesis, radiofluorination and first evaluation of (+/-)-[¹⁸F]MDL 100907 as serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonist for PET. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2008**, 52 (1-2), 6-12.
17. Ren, H.; Wey, H. Y.; Strebl, M.; Neelamegam, R.; Ritter, T.; Hooker, J. M., Synthesis and imaging validation of [¹⁸F]MDL100907 enabled by Ni-mediated fluorination. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, 5 (7), 611-615.
18. Ettrup, A.; da Cunha-Bang, S.; McMahon, B.; Lehel, S.; Dyssegaard, A.; Skibsted, A. W.; Jørgensen, L. M.; Hansen, M.; Baandrup, A. O.; Bache, S.; Svarer, C.; Kristensen, J. L.; Gillings, N.; Madsen, J.; Knudsen, G. M., Serotonin_{2A} Receptor Agonist Binding in the Human Brain with [¹¹C]Cimbi-36. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2014**, 34 (7), 1188-1196.
19. Ettrup, A.; Hansen, M.; Santini, M. A.; Paine, J.; Gillings, N.; Palner, M.; Lehel, S.; Herth, M. M.; Madsen, J.; Kristensen, J.; Begtrup, M.; Knudsen, G. M., Radiosynthesis and in vivo evaluation of a series of substituted ¹¹C-phenethylamines as 5-HT_{2A} agonist PET tracers. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, 38 (4), 681-693.
20. Erritzoe, D.; Ashok, A. H.; Searle, G. E.; Colasanti, A.; Turton, S.; Lewis, Y.; Huiban, M.; Moz, S.; Passchier, J.; Saleem, A.; Beaver, J.; Lingford-Hughes, A.; Nutt, D. J.; Howes, O. D.; Gunn, R. N.; Knudsen, G. M.; Rabiner, E. A., Serotonin release measured in the human brain: a PET study with [¹¹C]CIMBI-36 and d-amphetamine challenge. *Neuropsychopharmacology* **2020**, 45 (5), 804-810.
21. Prabhakaran, J.; Underwood, M. D.; Kumar, J. S. D.; Simpson, N. R.; Kassir, S. A.; Bakalian, M. J.; Mann, J. J.; Arango, V., Synthesis and in vitro evaluation of [¹⁸F]FECIMBI-36: A potential agonist PET ligand for 5-HT_{2A/2C} receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25 (18), 3933-3936.
22. Mertens, J.; Terriere, D.; Sipido, V.; Gommeren, W.; Janssen, P. M. F.; Leysen, J. E., Radiosynthesis of a new radioiodinated ligand for serotonin-5HT₂-receptors, a promising tracer for γ-emission tomography. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1994**, 34 (9), 795-806.
23. Terriere, D.; Janssen, P. M. F.; Gommeren, W.; Gysemans, M.; Mertens, J. J. R.; Leysen, J. E., Evaluation of radioiodo-4-amino-N-[1-[3-(4-fluorophenoxy)-propyl]-4-methyl-4-piperidiny]-5-iodo-2-methoxybenzamide as a potential 5HT₂ receptor tracer for SPE(C)T. *Nucl. Med. Biol.* **1995**, 22 (8), 1005-1010.
24. Abi-Dargham, A.; Zea-Ponce, Y.; Terriere, D.; Al-Tikriti, M.; Baldwin, R. M.; Hoffer, P.; Charney, D.; Leysen, J. E.; Laruelle, M.; Mertens, J.; Innis, R. B., Preclinical evaluation of [¹²³I]R93274 as a SPECT radiotracer for imaging 5-HT_{2A} receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, 321 (3), 285-293.
25. Catafau, A. M.; Danus, M.; Bullich, S.; Llop, J.; Perich, J.; Cunningham, V. J.; Plaza, P.; Penengo, M. M.; Eersels, J. L. H.; Squassante, L.; Ros, D.; Barbanoj, M., Characterization of the SPECT 5-HT_{2A} Receptor Ligand ¹²³I-R91150 in Healthy Volunteers: Part 1—Pseudoequilibrium Interval and Quantification Methods. *J. Nucl. Med.* **2006**, 47 (6), 919-928.
26. Catafau, A. M.; Danus, M.; Bullich, S.; Nucci, G.; Llop, J.; Abanades, S.; Cunningham, V. J.; Eersels, J. L. H.; Pavia, J.; Farre, M., Characterization of the SPECT 5-HT_{2A} Receptor Ligand ¹²³I-R91150 in Healthy Volunteers: Part 2—Ketanserin Displacement. *J. Nucl. Med.* **2006**, 47 (6), 929-937.
27. Busatto, G. F.; Pilowsky, L. S.; Costa, D. C.; Merteys, J.; Terriere, D.; Ell, P. J.; Mulligan, R.; Travis, M. J.; Leysen, J. E.; Lui, D.; Gacinovic, S.; Waddington, W.; Lingford-Hughes, A.; Kerwin, R. W., Initial evaluation of ¹²³I-5-I-R91150, a selective 5-HT_{2A} ligand for single-photon emission tomography, in healthy human subjects. *Eur. J. Nucl. Med.* **1997**, 24 (2), 119-124.

28. Travis, M. J.; Busatto, G. F.; Pilowsky, L. S.; Mulligan, R.; Acton, P. D.; Gacinovic, S.; Mertens, J.; Terrière, D.; Costa, D. C.; Ell, P. J.; Kerwin, R. W., 5-HT_{2A} receptor blockade in patients with schizophrenia treated with risperidone or clozapine. A SPET study using the novel 5-HT_{2A} ligand ¹²³I-5-I-R-91150. *British Journal of Psychiatry* **1998**, *173*, 236-241.
29. Schins, A.; Van Kroonenburgh, M.; Van Laere, K.; D'Haenen, H.; Lousberg, R.; Crijns, H.; Eersels, J.; Honig, A., Increased cerebral serotonin-2A receptor binding in depressed patients with myocardial infarction. *Psychiatry Res., Neuroimaging* **2005**, *139* (2), 155-163.
30. Melse, M.; Tan, S. K. H.; Temel, Y.; Van Kroonenburgh, M. J. P. G.; Leentjens, A. F. G., Changes in 5-HT_{2A} receptor expression in untreated, de novo patients with Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease* **2014**, *4* (2), 283-287.
31. Murphy, D. G. M.; Daly, E.; Schmitz, N.; Toal, F.; Murphy, K.; Curran, S.; Erlandsson, K.; Eersels, J.; Kerwin, R.; Ell, P.; Travis, M., Cortical serotonin 5-HT_{2A} receptor binding and social communication in adults with Asperger's syndrome: An in vivo SPECT study. *Am. J. Psychiatry* **2006**, *163* (5), 934-936.
32. Mühlhausen, U.; Ermert, J.; Coenen, H. H., Synthesis, labelling and first evaluation of [¹⁸F]R91150 as a serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonist for PET. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2008**, *52* (1), 13-22.
33. Tan, P. Z.; Baldwin, R. M.; Van Dyck, C. H.; Al-Tikriti, M.; Roth, B.; Khan, N.; Charney, D. S.; Innis, R. B., Characterization of radioactive metabolites of 5-HT_{2A} receptor PET ligand [¹⁸F]altanserin in human and rodent. *Nucl. Med. Biol.* **1999**, *26* (6), 601-608.
34. Leysen, J. M. F.; Van Daele, G. H. P. 4-Amino-N-(4-methyl-4-piperidiny)-2-methoxybenzamides. WO 9402462, 1994.
35. Kristiansen, H.; Elfving, B.; Plenge, P.; Pinborg, L. H.; Gillings, N.; Knudsen, G. M., Binding characteristics of the 5-HT_{2A} receptor antagonists altanserin and MDL 100907. *Synapse* **2005**, *58* (4), 249-257.
36. Watabe, H.; Channing, M. A.; Der, M. G.; Adams, H. R.; Jagoda, E.; Herscovitch, P.; Eckelman, W. C.; Carson, R. E., Kinetic Analysis of the 5-HT_{2A} Ligand [¹¹C]MDL 100,907. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2000**, *20* (6), 899-909.
37. Preshlock, S.; Tredwell, M.; Gouverneur, V., ¹⁸F-Labeling of Arenes and Heteroarenes for Applications in Positron Emission Tomography. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (2), 719-766.
38. Coenen, H. H.; Ermert, J., ¹⁸F-labelling innovations and their potential for clinical application. *Clin. Transl. Imaging* **2018**, *6* (3), 169-193.
39. Deng, X.; Rong, J.; Wang, L.; Vasdev, N.; Zhang, L.; Josephson, L.; Liang, S. H., Chemistry for Positron Emission Tomography: Recent Advances in ¹¹C-, ¹⁸F-, ¹³N-, and ¹⁵O-Labeling Reactions. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (9), 2580-2605.
40. Brooks, A. F.; Topczewski, J. J.; Ichiishi, N.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H., Late-stage [¹⁸F]fluorination: new solutions to old problems. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (12), 4545-4553.
41. Wright, J. S.; Kaur, T.; Preshlock, S.; Tanzey, S. S.; Winton, W. P.; Sharninghausen, L. S.; Wiesner, N.; Brooks, A. F.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H., Copper-mediated late-stage radiofluorination: five years of impact on preclinical and clinical PET imaging. *Clin. Transl. Imaging* **2020**.

42. Coenen, H. H.; Gee, A. D.; Adam, M.; Antoni, G.; Cutler, C. S.; Fujibayashi, Y.; Jeong, J. M.; Mach, R. H.; Mindt, T. L.; Pike, V. W.; Windhorst, A. D., Consensus nomenclature rules for radiopharmaceutical chemistry — Setting the record straight. *Nuclear Medicine and Biology* **2017**, *55*, v-xi.
43. Lee, C.-Y.; Ahn, S.-J.; Cheon, C.-H., Protodeboronation of ortho- and para-Phenol Boronic Acids and Application to ortho and meta Functionalization of Phenols Using Boronic Acids as Blocking and Directing Groups. *The Journal of Organic Chemistry* **2013**, *78* (23), 12154-12160.
44. Zischler, J.; Kolks, N.; Modemann, D.; Neumaier, B.; Zlatopolskiy, B. D., Alcohol-Enhanced Cu-Mediated Radiofluorination. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (14), 3251-3256.
45. ICH Guideline of Elemental Impurities (Q3D). International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use: 2019.
46. Millan, M. J.; Maiofiss, L.; Cussac, D.; Audinot, V.; Boutin, J. A.; Newman-Tancredi, A., Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned human receptor subtypes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2002**, *303* (2), 791-804.
47. Debus, F.; Herth, M. M.; Piel, M.; Buchholz, H.-G.; Bausbacher, N.; Kramer, V.; Lüddens, H.; Rösch, F., ¹⁸F-Labeling and evaluation of novel MDL 100907 derivatives as potential 5-HT_{2A} antagonists for molecular imaging. *Nuclear Medicine and Biology* **2010**, *37* (4), 487-495.
48. Biver, F.; Lotstra, F.; Monclus, M.; Dethy, S.; Damhaut, P.; Wikler, D.; Luxen, A.; Goldman, S., In vivo binding of [¹⁸F]altanserin to rat brain 5HT₂ receptors: A film and electronic autoradiographic study. *Nuclear Medicine and Biology* **1997**, *24* (4), 357-360.
49. Kroll, T.; Elmenhorst, D.; Matusch, A.; Wedekind, F.; Weisshaupt, A.; Beer, S.; Bauer, A., Suitability of [¹⁸F]Altanserin and PET to Determine 5-HT_{2A} Receptor Availability in the Rat Brain: In Vivo and In Vitro Validation of Invasive and Non-Invasive Kinetic Models. *Molecular Imaging and Biology* **2013**, *15* (4), 456-467.
50. Herth, M. M.; Piel, M.; Debus, F.; Schmitt, U.; Lüddens, H.; Rösch, F., Preliminary in vivo and ex vivo evaluation of the 5-HT_{2A} imaging probe [¹⁸F]MH.MZ. *Nucl. Med. Biol.* **2009**, *36* (4), 447-454.
51. Pompeiano, M.; Palacios, J. M.; Mengod, G., Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Mol. Brain Res.* **1994**, *23* (1), 163-178.
52. Pazos, A.; Cortés, R.; Palacios, J. M., Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res* **1985**, *346* (2), 231-49.
53. Pazos, A.; Probst, A.; Palacios, J. M., Serotonin receptors in the human brain—IV. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors. *Neuroscience* **1987**, *21* (1), 123-139.
54. Xu, T.; Pandey, S. C., Cellular localization of serotonin(2A) (5HT(2A)) receptors in the rat brain. *Brain research bulletin* **2000**, *51* (6), 499-505.
55. Weber, E.; Andrade, R., Htr2a Gene and 5-HT_{2A} Receptor Expression in the Cerebral Cortex Studied Using Genetically Modified Mice. *Frontiers in Neuroscience* **2010**, *4* (36).

Supporting Information

Radiosynthesis and biological evaluation of [¹⁸F]R91150, a selective 5-HT_{2A} receptor antagonist for PET-imaging

Michael Willmann, Julian Hegger, Bernd Neumaier*, Johannes Ermert.

Forschungszentrum Jülich GmbH, Institute of Neuroscience and Medicine, Nuclear Chemistry (INM-5), Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich, Germany

* Corresponding author:

Prof. Dr. Bernd Neumaier, Forschungszentrum Jülich GmbH, Institute of Neuroscience and Medicine, Nuclear Chemistry (INM-5), Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich, Germany. b.neumaier@fz-juelich.de

Table of contents:

1	Materials and Methods.....	
1.1	Syntheses of labeling precursors and reference standards.....	3
1.2	Radiochemistry	6
1.3	<i>In vitro</i> autoradiography	7
1.4	HPLC Analysis	7
1.5	Determination of molar activity	8
2	NMR-Spectra	
2.1	Compound 1	10
2.2	Compound 2	11
2.3	Compound 3	12
2.4	Compound 4	13
2.5	Compound 5	14
2.6	Compound 6	15
2.7	Compound 7	16
2.8	Compound 8	18
2.9	Compound R91150	22
3	HRMS-spectra	
4	<i>In vitro</i> autoradiography	
5	Radio-HPLC.....	

2.2.1.1 Materials and Methods

All chemicals and solvents were purchased from Aldrich (Germany), Fluka (Switzerland), Fluorochem (United Kingdom) and Merck (Germany) and used without further purification. Thin layer chromatography (TLC) was performed on pre-coated plates of silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany) and the compounds were detected at 254 nm. All reactions sensitive to moisture were carried out under argon and in reaction flasks dried overnight at 140 °C prior to use. All reaction mixtures were magnetically stirred. Organic extracts were dried with anhydrous MgSO_4 . ^1H , ^{13}C , and ^{19}F NMR spectra were recorded at 400.13, 100.61, and 376.49 MHz, respectively, on a Bruker Avance Neo 400 instrument (Bruker Bio Spin GmbH, Rheinstetten, Germany) in 5 % solution at 25 °C. Chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm) relative to trace amounts of the residual solvent signals. High-resolution mass spectrometry (HRMS) analyses were performed using the LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) in the LC/MS mode (direct inlet & constant flow processing). The mass spectrometer was first tuned and calibrated in the positive mode following the standard optimization procedure for all voltages and settings. Mass spectra were recorded with a resolution of 300.000.

2.2.1.1.1 Syntheses of labeling precursors and reference standards

Compounds **1-7** & **R91150** were synthesized according to the procedures described by Mühlhausen et al.³⁶.

1-Benzyl-4-methylpiperidin-4-ol (**1**)³⁶

N-benzyl-piperid-4-one (11.4 g, 60.0 mmol) was dissolved in dry diethyl ether (50 mL) under an atmosphere of argon and cooled to -78°C. A solution of methyllithium in diethyl ether (1.6 M, 50 mL, 78.0 mmol) was added dropwise under stirring. The resulting mixture was stirred for 2 h at room temperature and the reaction terminated by dropwise addition of ice-cold water (40 mL). The water phase was extracted with diethyl ether (3 x 70 mL) and the combined organic layers were dried over Na_2SO_4 . After evaporation of the solvent, the crude product was purified by flash column chromatography (silica: DCM/MeOH) to give **1** (6.48 g, 31.5 mmol) in 74.7% yield as a yellow oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.21 (d, J = 11.6 Hz, 5H), 3.46 (s, 2H), 2.49 (t, J = 11.7, 8.6 Hz, 2H), 2.32 (td, J = 11.3, 3.1 Hz, 2H), 1.62 (ddd, J = 14.3, 10.6, 4.4 Hz, 2H), 1.52 (td, J = 13.3, 3.4 Hz, 2H), 1.17 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 138.6, 129.3, 128.3, 127.1, 68.0, 63.3, 49.9, 38.9, 29.9. MS(ESI): calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}^+$: 206.2, found: m/z 206.3 (100) [$\text{M}+\text{H}^+$].

N-(1-Benzyl-4-methylpiperidin-4-yl)acetamide (**2**)³⁶

1-Benzyl-4-methylpiperidin-4-ol (**1**) (6.48 g, 31.5 mmol) was dissolved in absolute acetonitrile (45 mL) under an atmosphere of argon and cooled to 0°C. To this solution concentrated sulfuric acid (30 mL) was added dropwise, with temperature not exceeding 30°C. After the addition, the mixture was stirred at room temperature for 2 h. For termination of the reaction the resulting oil was poured onto ice (100 g) and adjusted to pH 10 with a 50% KOH solution. Extraction with dichloromethane (4 x 100 mL), drying over Na₂SO₄ and evaporation of the solvent gave crude product (**2**) (4.48 g, 18.2 mmol) as yellow solid in 98% yield, pure enough for direct use without further purification. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.34 – 7.18 (m, 5H), 5.24 (s, 1H), 3.46 (s, 2H), 2.60 – 2.43 (m, 2H), 2.29 – 2.12 (m, 2H), 2.06 (d, *J* = 20.9 Hz, 2H), 1.92 (s, 3H), 1.62 (ddd, *J* = 14.0, 10.3, 3.9 Hz, 2H), 1.36 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.7, 138.5, 129.2, 128.3, 127.1, 63.2, 51.6, 49.5, 36.3, 24.6, 22.6. MS(ESI): calcd. for C₁₅H₂₃N₂O⁺: 247.2, found: *m/z* 247.1 (100) [M+H⁺].

1-Benzyl-4-methyl-piperidin-4-amine (**3**)³⁶

For deacetylation, *N*-(1-benzyl-4-methylpiperidin-4-yl) acetamide (**2**) (3.1 g, 12.5 mmol) was heated to 100°C in concentrated hydrochloric acid (15 mL) for 48 h. The reaction was terminated by adjustment to pH-12 with 12 M KOH solution (20 mL). The water phase was extracted with DCM (4 x 70 mL), dried over Na₂SO₄ and the solvent was evaporated. Purification by flash column chromatography (silica: DCM:MeOH) gave **3** (2.2 g, 10.8 mmol) as a yellow oil in 86% yield. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.36 – 7.16 (m, 5H), 5.41 (s, 2H), 3.47 (s, 2H), 2.57 (dd, *J* = 12.2, 4.7 Hz, 2H), 2.22 (dd, *J* = 10.5, 3.0 Hz, 2H), 1.70 (td, *J* = 12.7, 11.0, 3.9 Hz, 2H), 1.59 (dt, *J* = 13.3, 4.4 Hz, 2H), 1.22 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 138.5, 128.7, 128.2, 126.9, 61.8, 50.9, 48.4, 35.5, 18.5. MS(ESI): calcd. for C₁₃H₂₁N₂⁺: 205.2, found: *m/z* 205.1 (100) [M+H⁺].

4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-2-methoxybenzoic acid (**4**)³⁶

To a solution of 4-amino-2-methoxybenzoic acid (6.16 g, 36.9 mmol) in absolute methanol (60 mL), triethylamine (Et₃N) (5.2 mL, 36.9 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (8.04 g, 36.9 mmol) were added. The mixture was stirred for 6 h at room temperature and the solvent was evaporated. Purification by column chromatography (9:1 DCM:MeOH) gave **4** (3.9 g, 14.7 mmol) as a beige solid in 37% yield. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.64 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.04 (dd, *J* = 8.6, 1.8 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 1.48 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 166.4, 159.6, 152.5, 144.6, 132.4, 113.5, 109.2, 101.4, 79.7, 55.5, 28.0. MS(ESI): calcd. for C₁₃H₁₈NO₅⁺: 268.1, found: *m/z* 268.1 (100) [M+H⁺].

tert-Butyl 4-(1-benzyl-4-methylpiperidin-4-ylcarbamoyl)-3-methoxyphenylcarbamate (**5**)³⁶

4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-2-methoxybenzoic acid (**4**) (1.53 g, 5.73 mmol), was dissolved in absolute DCM (25 mL) and Et₃N (0.5 mL) under an atmosphere of argon. After 1 minute, the solution was reacted with PyBOP (2.98 g, 5.73 mmol) for 40 minutes at room temperature. **3** (1.17 g, 5.73 mmol) dissolved in DCM (25 mL) and Et₃N (0.5 mL) was then added dropwise and the resulting mixture was reacted for 18 h at room temperature. The organic phase was washed successively with water (200 mL), 5% NaOH solution (300 mL) and water (200 mL), dried over Na₂SO₄ and stripped of solvent. Purification by column chromatography (silica: 9:1 DCM:MeOH) yielded **5** (1.47 g, 3.24 mmol) as a yellow oil still containing pyrrolidine by-products. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.30 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.32 – 7.12 (m, 5H), 6.90 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.46 (s, 2H), 2.60 (d, *J* = 11.9 Hz, 2H), 2.30 – 2.17 (m, 2H), 2.12 (d, *J* = 13.5 Hz, 2H), 1.70 – 1.60 (m, 2H), 1.45 (s, 12H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 164.3, 158.2, 152.8, 143.2, 138.4, 132.4, 129.2, 128.2, 127.0, 116.7, 110.7, 101.2, 80.6, 63.3, 56.0, 51.4, 49.5, 46.3, 46.3, 36.6, 28.4. MS(ESI): calcd. for C₂₆H₃₆N₃O₄⁺: 454.3, found: *m/z* 454.4 (75) [M+H⁺].

tert-Butyl 3-methoxy-4-(4-methylpiperidin-4-ylcarbamoyl)phenylcarbamate (**6**)³⁶

5 (1.48 g, 3.3 mmol) in absolute methanol (25 mL), ammonium formate (967 mg, 15.3 mmol) and palladium black (174 mg, 1.63 mmol) were reacted at 65°C for 3.5 h. Purification by column chromatography (9:1 DCM:MeOH) gave **6** (376 mg, 1.00 mmol) as a white solid in 31% yield. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 6.74 – 6.65 (m, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.35 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H), 3.11 (t, *J* = 12.6 Hz, 2H), 2.50 (d, *J* = 14.3 Hz, 2H), 2.14 – 1.95 (m, 2H), 1.55 (s, 3H), 1.53 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 164.8, 158.2, 152.2, 143.1, 132.6, 116.0, 110.6, 100.9, 81.3, 56.3, 53.4, 50.3, 40.1, 33.1, 28.3, 26.3. MS(ESI): calcd. for C₁₉H₃₀N₃O₄⁺: 364.2, found: *m/z* (% int.) 364.2 (100) [M+H⁺].

tert-Butyl 4-(1-(3-(4-fluorophenoxy)propyl)-4-methylpiperidin-4-ylcarbamoyl)-3-methoxyphenylcarbamate (**7**)³⁶

6 (300 mg, 0.83 mmol) in dry DMF (1 mL) and potassium carbonate (114 mg, 0.83 mmol), potassium iodide (137 mg, 0.83 mmol) and 1-(3-bromopropoxy)-4-fluorobenzene (196 mg, 0.83 mmol) in dry DMF (1 mL) were reacted at 80 °C for 12 h. Purification by flash column chromatography (silica: DCM/MeOH) gave **7** (130 mg, 0.25 mmol) as a pale-yellow solid in 30% yield. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.61 (s, 1H), 7.74 – 7.58 (m, 2H), 7.39 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.10 (t, *J* = 8.9 Hz, 3H), 6.92 (dd, *J* = 9.2, 4.4 Hz, 2H), 4.01 – 3.90 (t, 2H), 3.87 (s, 3H), 2.62 (m, 2H), 2.49-2.15 (m, 4H), 1.87 (m, 3H), 1.54 (m, *J* = 5.3 Hz, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.38 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 157.5, 155.2, 154.9, 154.9, 154.73, 152.6, 143.4,

131.2, 115.9, 115.7, 115.7, 115.6, 109.9, 101.1, 79.6, 66.3, 55.8, 54.4, 48.9, 40.2, 28.1, 28.1. ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -124.24. MS(ESI): calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{FN}_3\text{O}_5^+$: 516.3, found: m/z (% int.) 516.4 (100) $[\text{M}+\text{H}^+]$.

tert-Butyl (3-methoxy-4-((4-methyl-1-(3-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenoxy)propyl)piperidin-4-yl)carbamoyl)phenyl)carbamate (**8**)

6 (300 mg, 0.83 mmol) in dry DMF (1 mL) and potassium carbonate (114 mg, 0.83 mmol), potassium iodide (137 mg, 0.83 mmol) and 2-[4-(3-bromopropoxy)phenyl]-4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]-dioxaborolane (282 mg, 0.83 mmol) in dry DMF (1 mL) were reacted for 12 h at ambient temperature. Purification by flash column chromatography (silica: DCM/MeOH) gave **8** (376 mg, 0.60 mmol) as a pale yellow solid in 73% yield. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.04 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.77 – 7.66 (m, 3H), 7.54 (s, 1H), 6.90 – 6.83 (m, 2H), 6.74 – 6.65 (m, 2H), 4.04 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.98 (s, 3H), 2.77 (d, J = 11.3 Hz, 2H), 2.58 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.33 (t, J = 10.9 Hz, 2H), 2.23 (d, J = 13.7 Hz, 2H), 2.01 (dd, J = 13.8, 7.0 Hz, 2H), 1.84 – 1.73 (m, 2H), 1.52 (s, 9H), 1.51 (s, 3H), 1.32 (s, 12H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 164.3, 161.7, 158.4, 152.4, 142.7, 136.6, 132.7, 117.1, 114.0, 110.6, 101.2, 83.7, 81.3, 66.1, 56.2, 55.5, 51.4, 49.7, 36.4, 28.4, 26.8, 25.0. MS(ESI): calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{BN}_3\text{O}_7^+$: 624.4; found: m/z (% int.) 624.4 (100) $[\text{M}+\text{H}^+]$. HRMS(ESI): m/z (%int.) calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{BN}_3\text{O}_7^+$: 624.38146; found: 624.38162 (100).

4-Amino-*N*-(1-(3-(4-fluorophenoxy)propyl)-4-methylpiperidin-4-yl)-2-methoxybenzamide (**R91150**)³⁶

7 (50 mg, 9.7 mmol) was dissolved in a 3:1 mixture of DCM/TFA (3 mL), the solution was stirred at 40 °C for 2 h and concentrated *in vacuo*. A 15 mg portion of the crude product was purified by semi-preparative HPLC followed by solid phase extraction using a C18 SPE cartridge to obtain 10 mg (67%) of the pure compound.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.96 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.05 – 6.72 (m, 4H), 6.34 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 6.20 (s, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.96 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.83 – 2.63 (m, 2H), 2.53 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.29 (t, J = 11.6 Hz, 2H), 2.21 (d, J = 13.8 Hz, 2H), 1.97 (p, J = 6.6 Hz, 2H), 1.73 (t, J = 12.4 Hz, 2H), 1.50 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 164.8, 159.0, 158.5, 156.1, 155.2, 155.2, 150.8, 133.7, 116.0, 115.7, 115.6, 115.5, 113.0, 107.9, 97.4, 67.6, 55.9, 55.5, 51.3, 49.7, 36.6, 29.8, 27.0. ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -123.77. MS(ESI): calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{FN}_3\text{O}_3^+$: 416.2; found: m/z 416.2 (100) $[\text{M}+\text{H}^+]$. HRMS(ESI): m/z (%int.) calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{FN}_3\text{O}_3^+$: 416.23440, found: 416.23432 (100).

2.2.1.1.2 Radiochemistry

All radiosyntheses were carried out using anhydrous *N,N*-dimethylacetamide (DMA) (Aldrich). QMA cartridges (Sep-Pak Accell Plus QMA Carbonate Plus Light, 46 mg sorbent) were obtained from Waters (Waters GmbH, Eschborn, Germany) and preconditioned with 1 mL H₂O immediately prior to use. Sep-Pak C18 cartridges (Sep-Pak C18 Plus Short, 360 mg sorbent) were also from Waters and preconditioned with 5 mL ethanol and 10 mL water before use. [¹⁸F]Fluoride was produced by the ¹⁸O(p,n)¹⁸F reaction by bombardment of enriched [¹⁸O]water with 16.5 MeV protons using a BC1710 cyclotron (The Japan Steel Works Ltd., Shinagawa, Japan) at the INM-5 (Forschungszentrum Jülich). All radiolabeling experiments were carried out under ambient atmosphere.

Before radiosynthesis, [¹⁸F]fluoride was processed as follows. Aqueous [¹⁸F]fluoride was loaded onto an anion-exchange resin (QMA cartridge). It should be noted, that aqueous [¹⁸F]fluoride was loaded onto the cartridge from the male side, whereas flushing, washing and ¹⁸F⁻ elution were carried out from the female side.

4-Amino-N-(1-(3-(4-[¹⁸F]fluorophenoxy)propyl)-4-methylpiperidin-4-yl)-2-methoxybenzamide ([¹⁸F]**R91150**):

[¹⁸F]Fluoride (100-4400 MBq) was eluted from a QMA cartridge with a solution of Et₄NHCO₃ (1.0 mg) in *n*-BuOH (400 µL). A solution of precursor **8** (6 mg, 10 µmol) and Cu(OTf)₂(py)₄ (7 mg, 10 µmol) in DMA (800 µL) was added and the reaction mixture was heated at 110 °C for 10 min with stirring under air in a capped vial. The solution was diluted with water (40 mL) and loaded on a preconditioned Sep-Pak C18 cartridge, which was washed with water (10 mL) and dried in a stream of argon for 1 min. [¹⁸F]**7** was eluted from the cartridge with 1 mL of a 2:1 mixture of DCM and TFA into a reaction vial and heated at 80 °C for 5 min. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* in a stream of argon and diluted with 1 mL of the mobile phase. An aliquot of the resulting solution (at least 2 MBq/20 µL) was isolated by analytical HPLC (*Multokrom-100*, 250×4.6 mm, 20 µL injection loop; eluent: water/MeCN/Et₃N 70:30:0.01 - 50:50:0.01 (v/v/v); flow rate: 1 mL/min; t_R = 21.3 min) for subsequent *in vitro* autoradiographic studies. The collected fraction was diluted with enough water to reduce the total concentration of organic solvent below 10%. The solution was then loaded onto a preconditioned Sep-Pak C18 cartridge, which was washed with water (10 mL) and briefly dried by a steam of argon before the product was eluted with 1 mL EtOH. The specified amount of activity needed for subsequent *in vitro* autoradiographic studies (2.5 kBq/mL) was taken from the eluent and diluted with 65 mL aqueous 50 mM TrisHCl buffer (pH 7.4).

2.2.1.1.3 *In vitro* autoradiography

After the animals (Wistar rats weighting 250 to 300 g, Charles River Deutschland GmbH) were sacrificed, whole brains were rapidly removed and immediately frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. For autoradiography, the brains were warmed to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and cut into $20\text{ }\mu\text{m}$ thick transaxial and sagittal sections (CM 3050 or CM 3500 Polycut, Leica AG Microsystems, Germany), which were mounted on gelatine-coated object glasses, dried and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Autoradiography was performed as described previously³⁷. Briefly the frozen brain sections were thawed, dried in air at room temperature and preincubated for 5 min at ambient temperature in 50 mM Tris HCl (pH 7.4). The sections were then incubated for 70 min in Tris HCl buffer containing the tracer (2.5 kBq/mL), together or without the non-radioactive reference compound. Labeling was terminated by rinsing the sections for 1 min in Tris HCl and dipping them in deionized water. The dried sections were placed on a phosphor imaging plate (Fuji) together with a tritium standard (Amersham Bioscience). After exposure for 75 minutes, the plate was laser-scanned with a phosphor imager (BAS 5000; Fuji). The image file was generated with BAS-Reader 3.14, and regions of interests (ROIs) were defined with the image analyzer software AIDA 4.13 (both Raytest Isotopenmessgeräte, Germany).

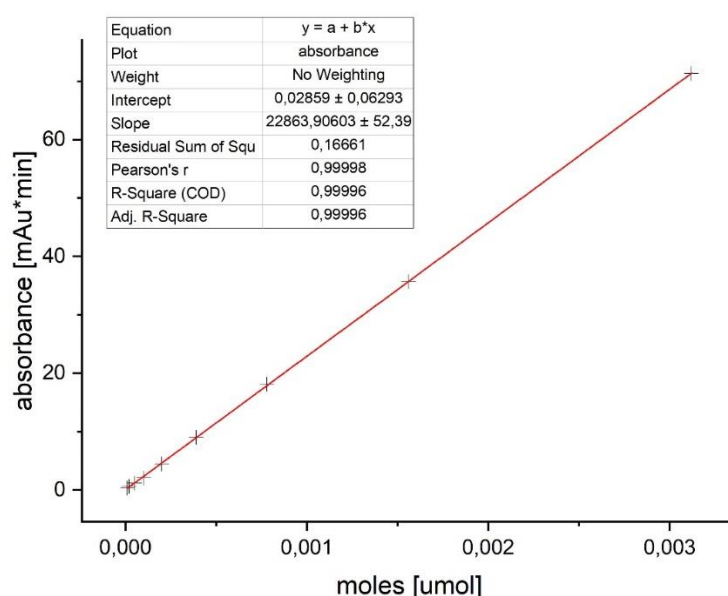
2.2.1.1.4 HPLC Analysis

For determination of radiochemical yield (RCY), reaction mixtures were diluted 1:1 (v/v) with 50% aq. MeOH to dissolve any [^{18}F]fluoride adsorbed onto the reaction vessel walls. HPLC analyses were carried out on a Dionex Ultimate® 3000 HPLC system and a DAD UV-detector coupled in series with a Berthold NaI detector. A *Multokrom-100*, $250\times 4.6\text{ mm}$ column was used. UV and radioactivity detectors were connected in series, giving a time delay of 0.1–0.2 min depending on the flow rate. ^{18}F -Labeled compounds were identified by co-injection of the unlabeled reference compounds using HPLC. The completeness of radioactivity elution was determined by comparison with a second sample injection bypassing the column (corresponds to total activity of the sample volume).

For isolation of [^{18}F]R91150 (semi-)preparative HPLC was used (Synergi $4\text{ }\mu\text{m}$ Hydro-RP $150\times 21.2\text{ mm}$; eluent: water, 50% MeCN, 0.1% triethylamine; 10 mL/min).

2.2.1.1.5 Determination of molar activity

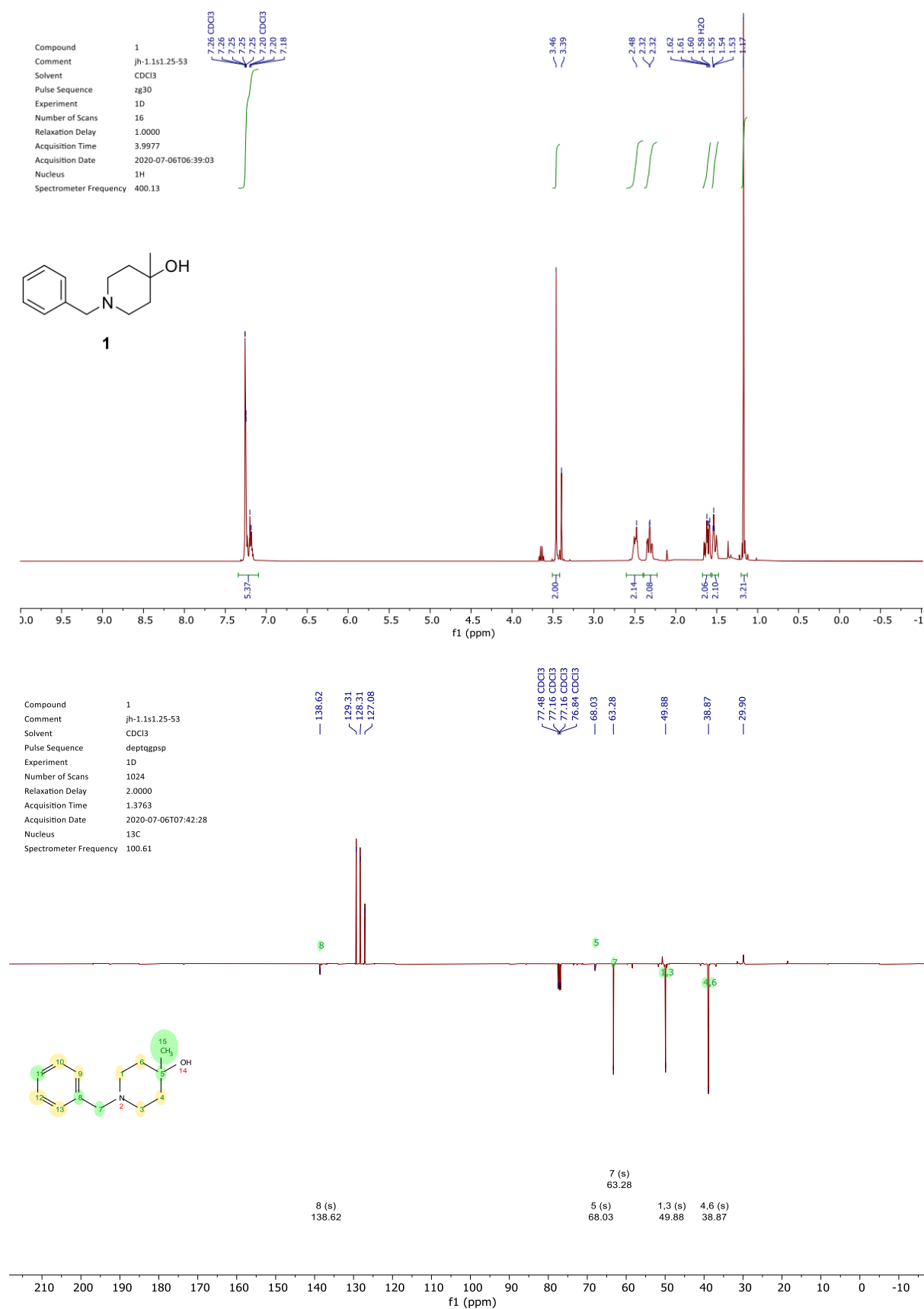
The amount of non-radioactive carrier was determined from the peak area in UV–HPLC chromatograms using an UV absorbance/concentration calibration curve ($\lambda = 280$ nm). The solutions of radiolabeled products obtained after HPLC purification were allowed to stand at ambient temperature for at least 24 h, concentrated under reduced pressure, and the residues were re-dissolved in the appropriate HPLC eluents (200 μ L). 100 μ L of the resulting solution was injected into the HPLC system (20 μ L loop, equals 10% of total carrier content). An isocratic run (35% acetonitrile, 0.1% triethylamine) gave adequate resolution for the carrier peak. The peak area was determined, and the amount of carrier was calculated according to the calibration curve.



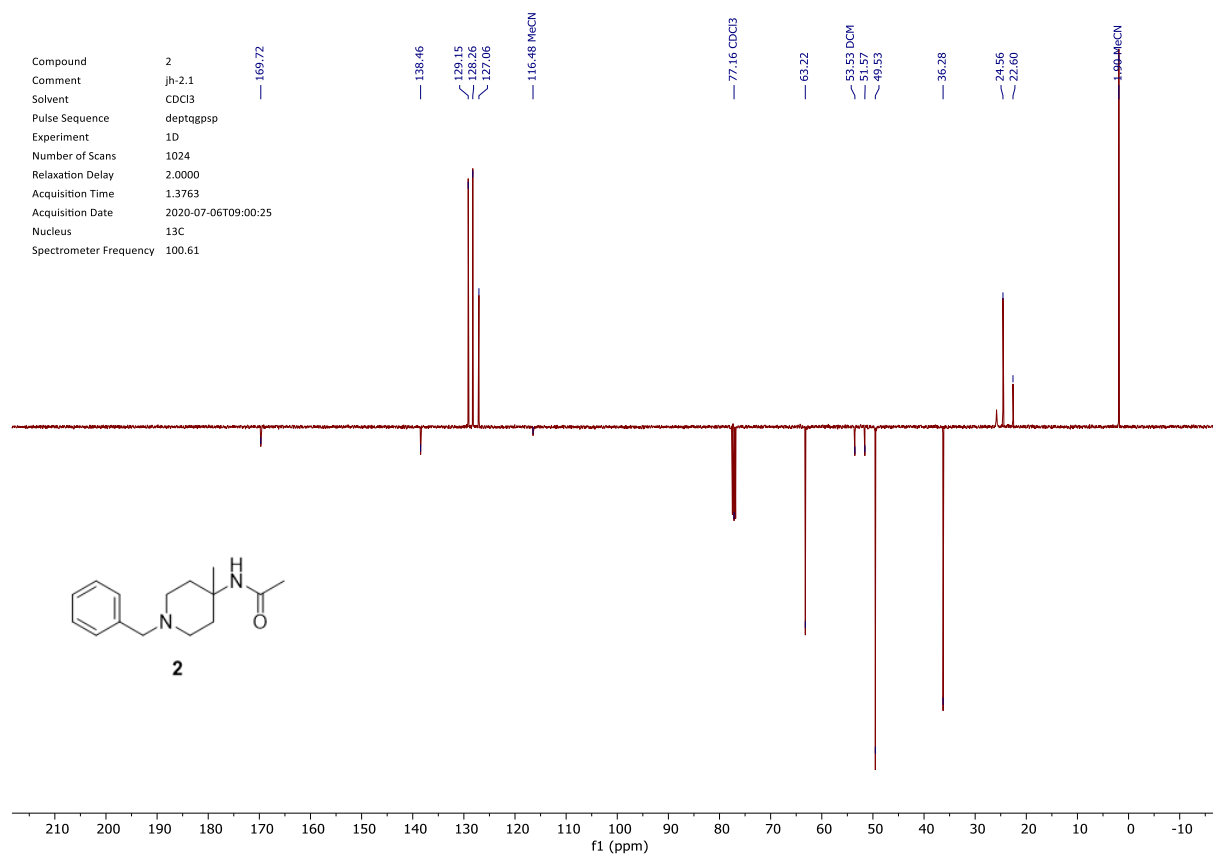
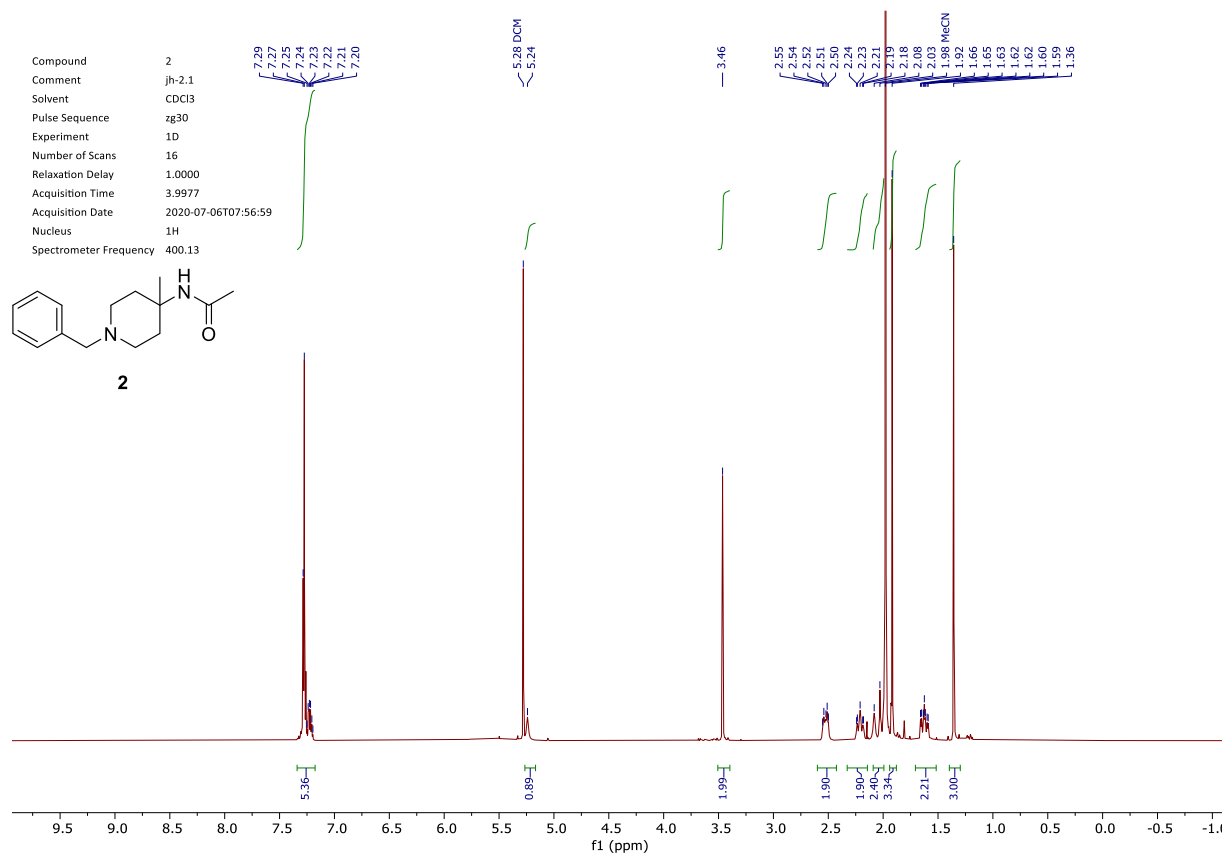
S1: HPLC calibration curve for determination of molar activity of [18]R91150.

2.2.1.2 NMR-Spectra

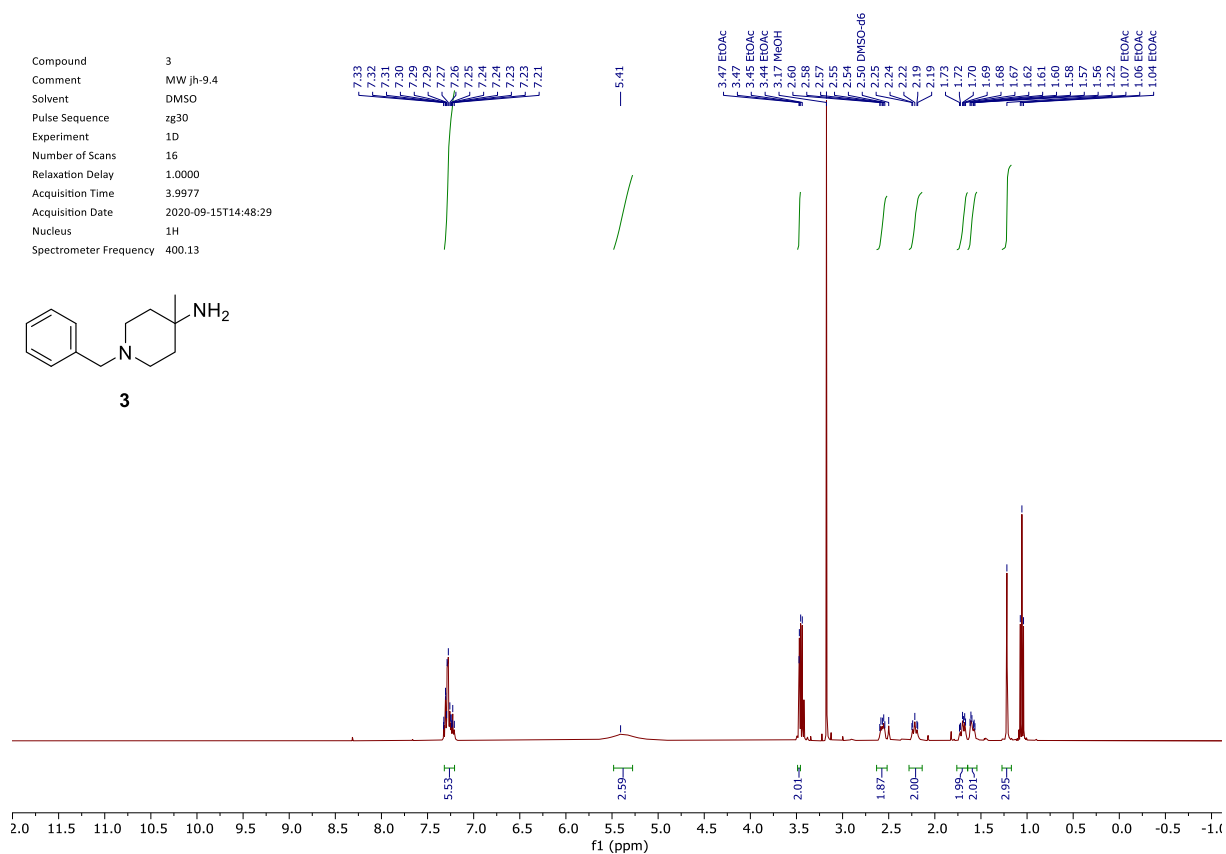
2.2.1.2.1 Compound 1



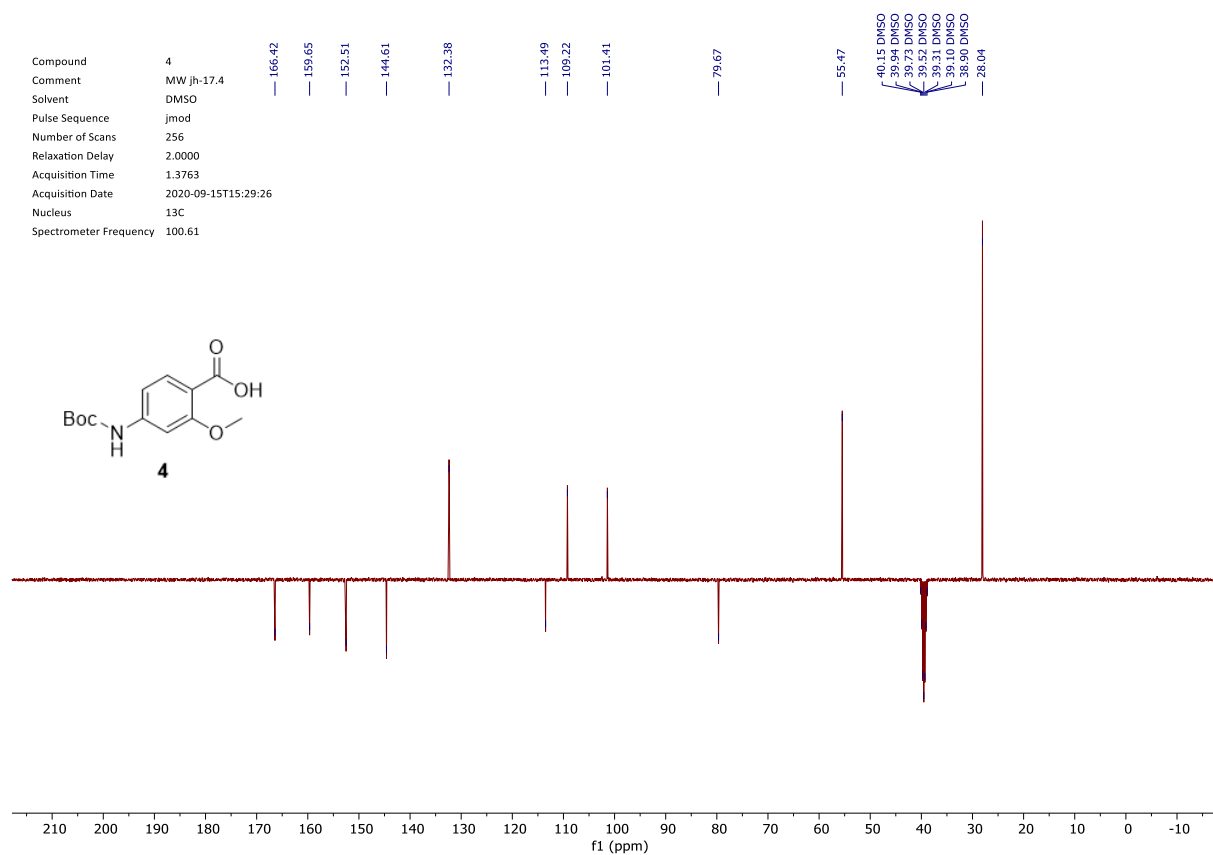
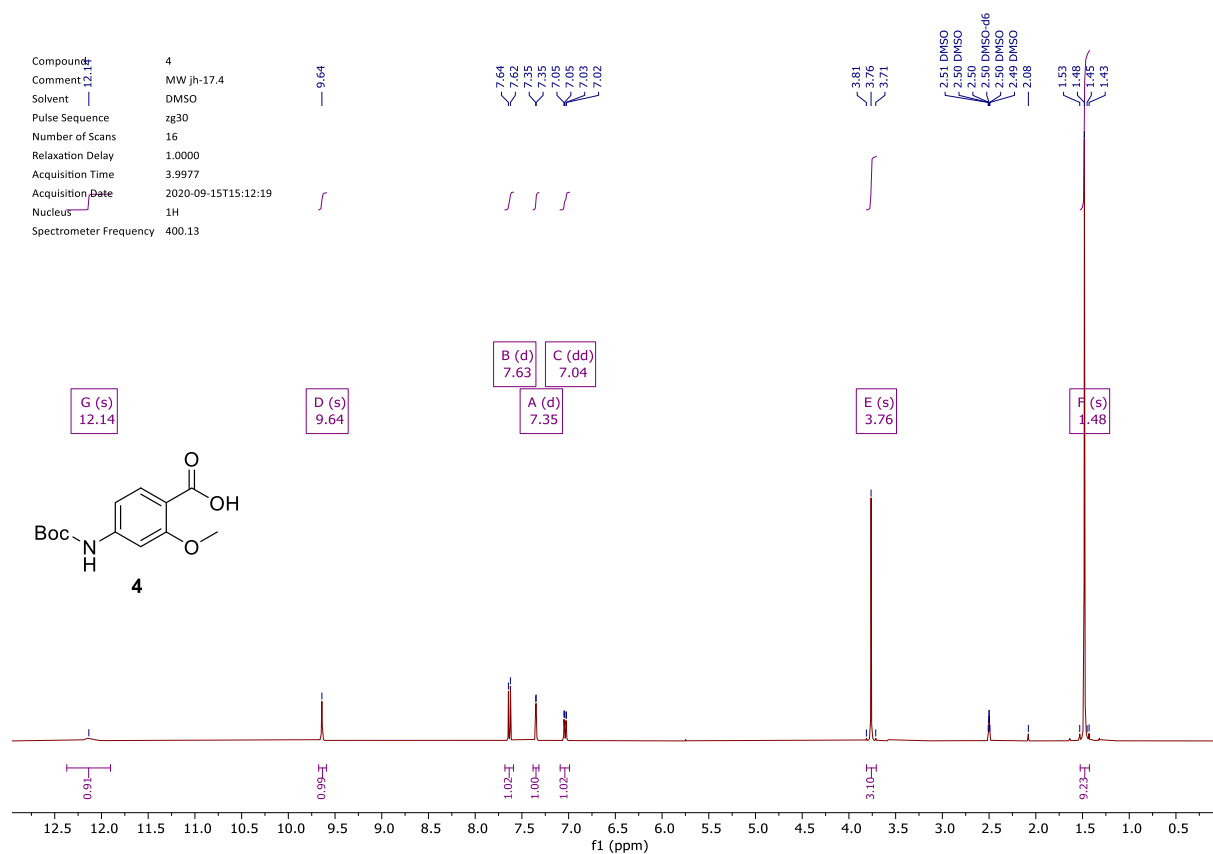
2.2.1.2.2 Compound 2



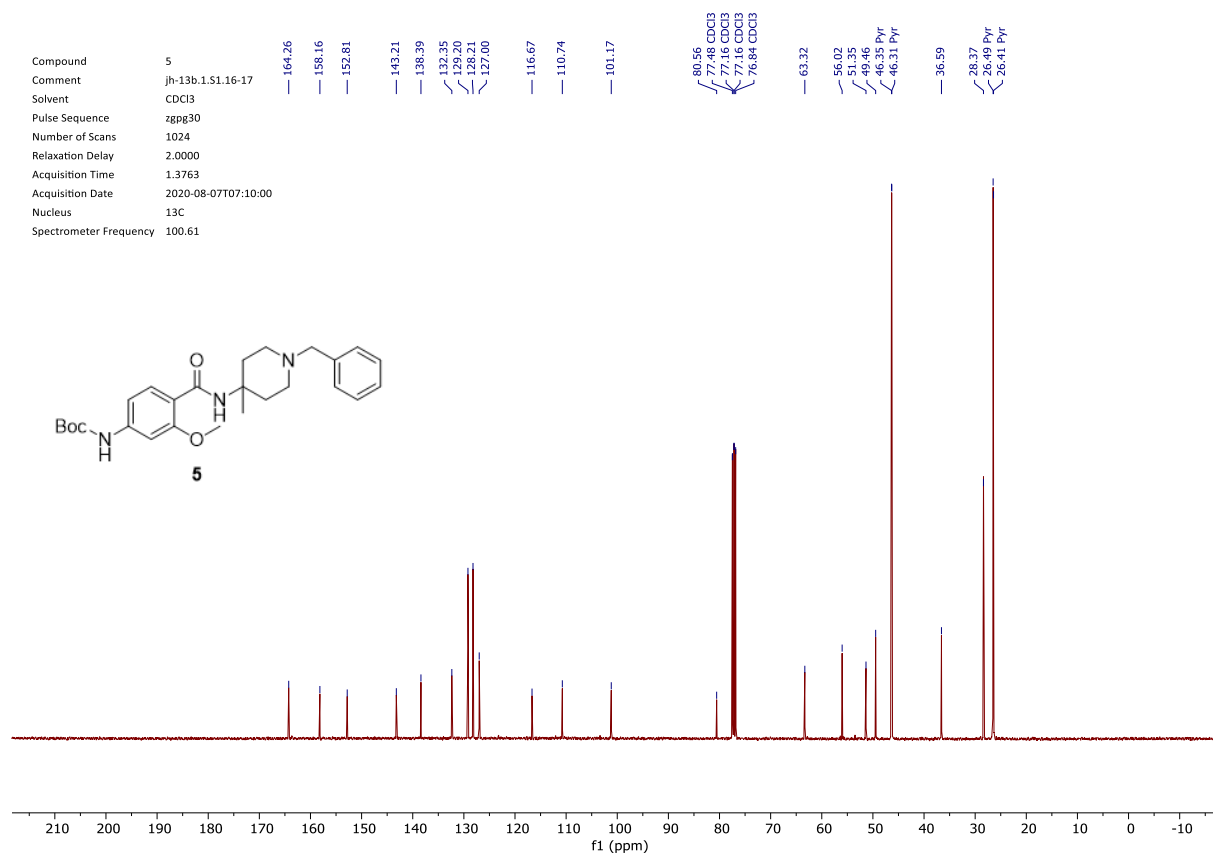
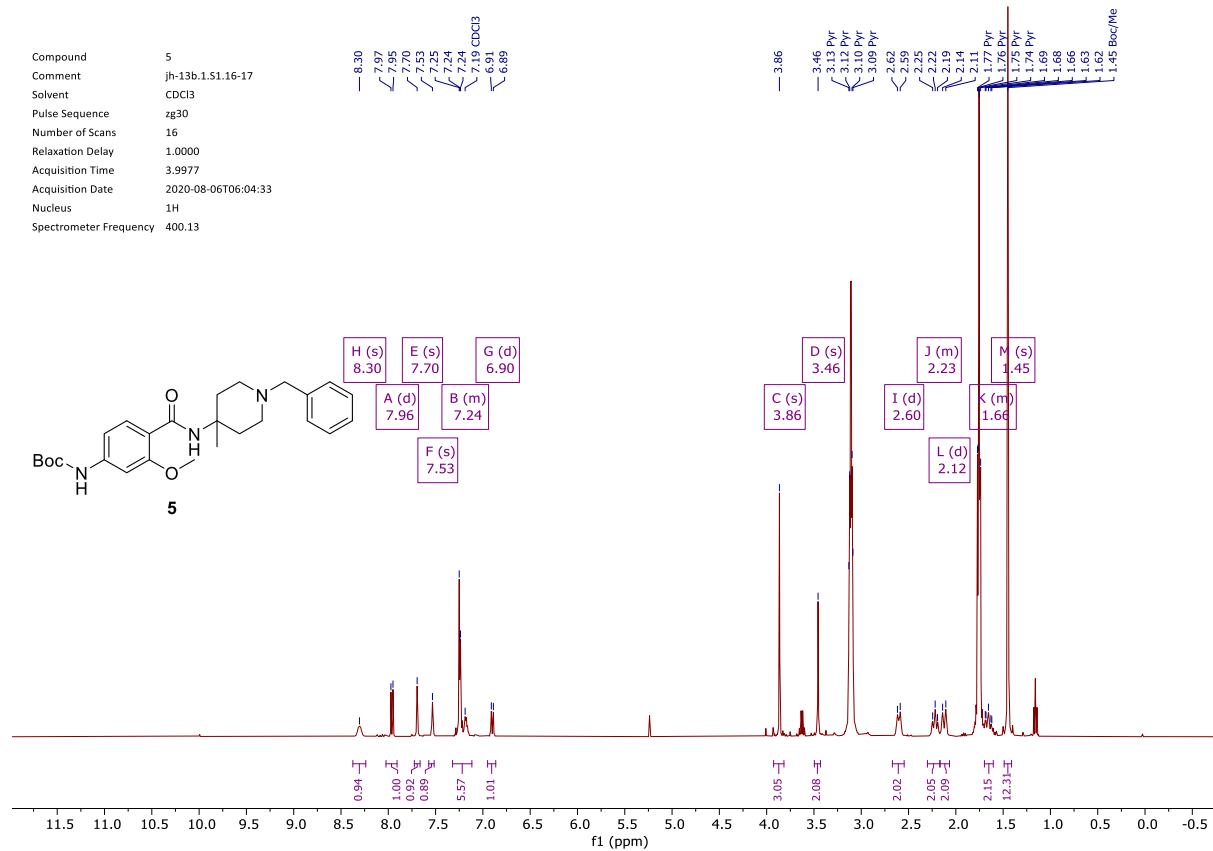
2.2.1.2.3 Compound 3



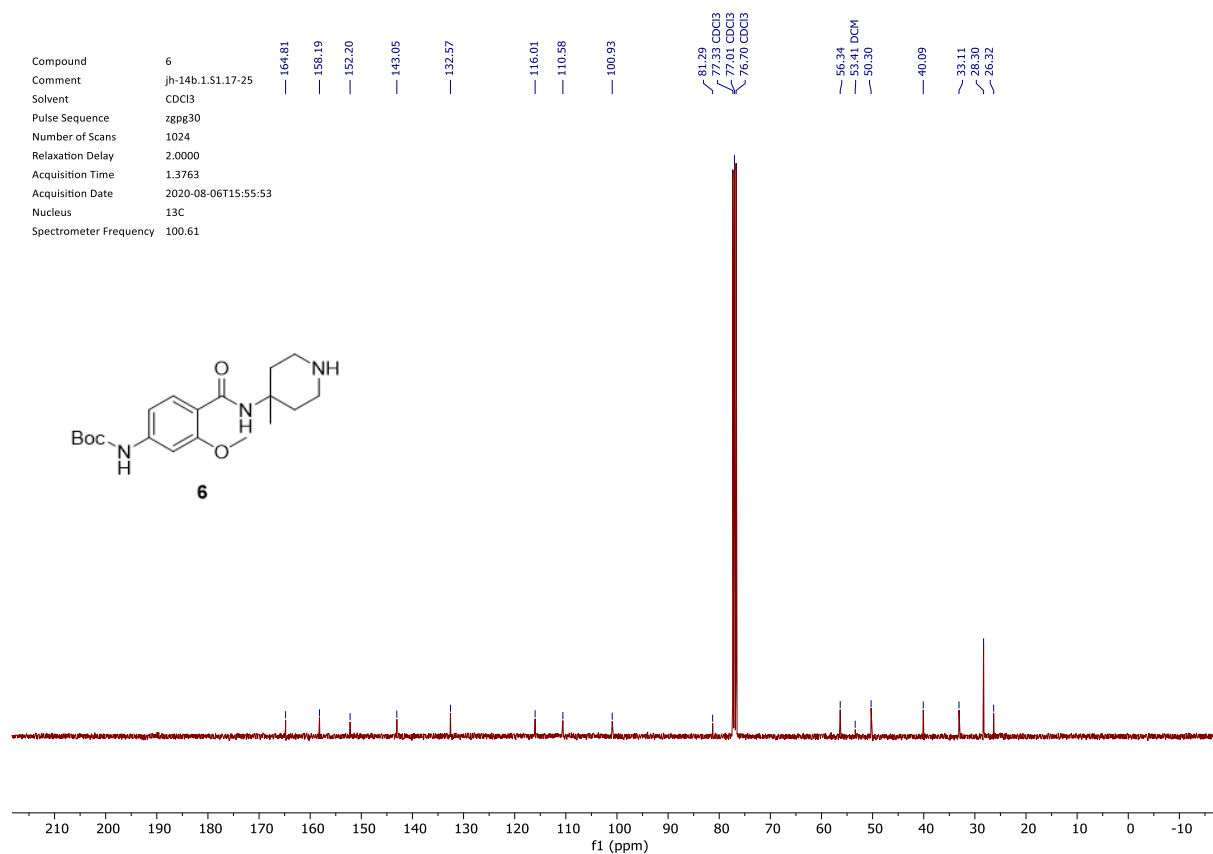
2.2.1.2.4 Compound 4



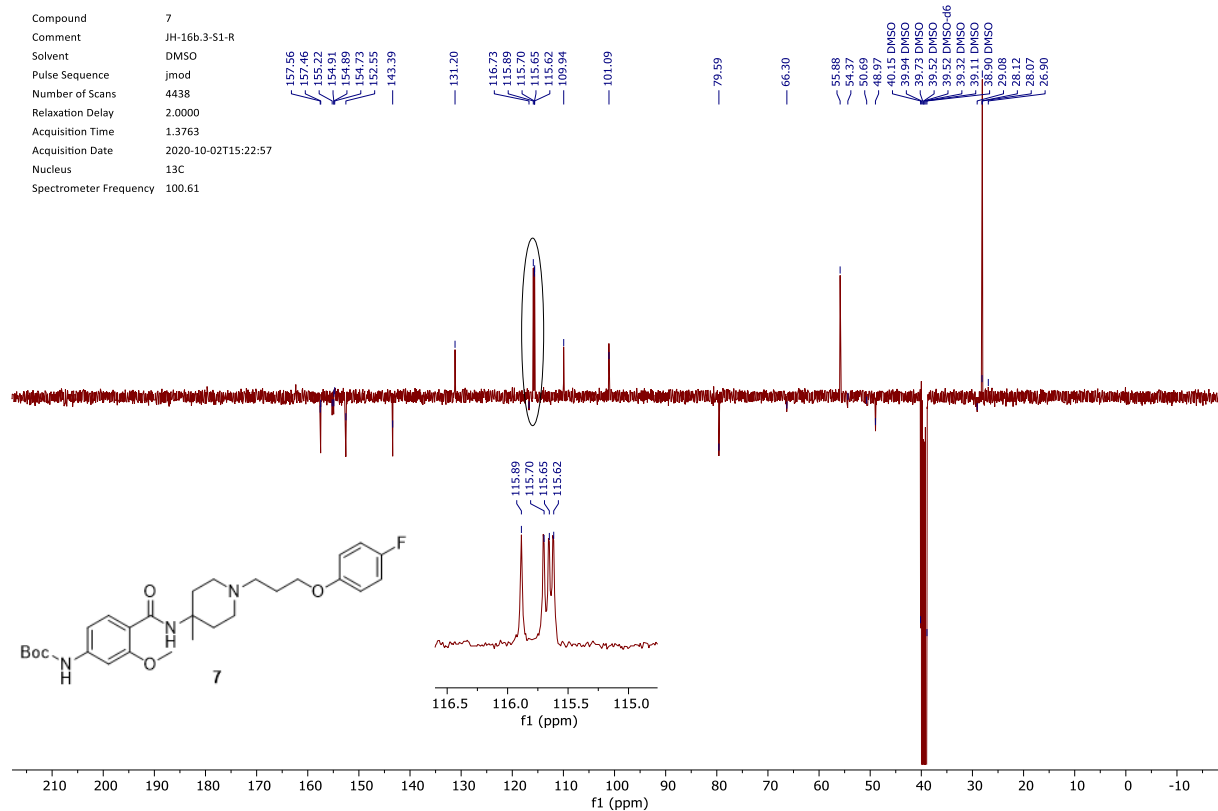
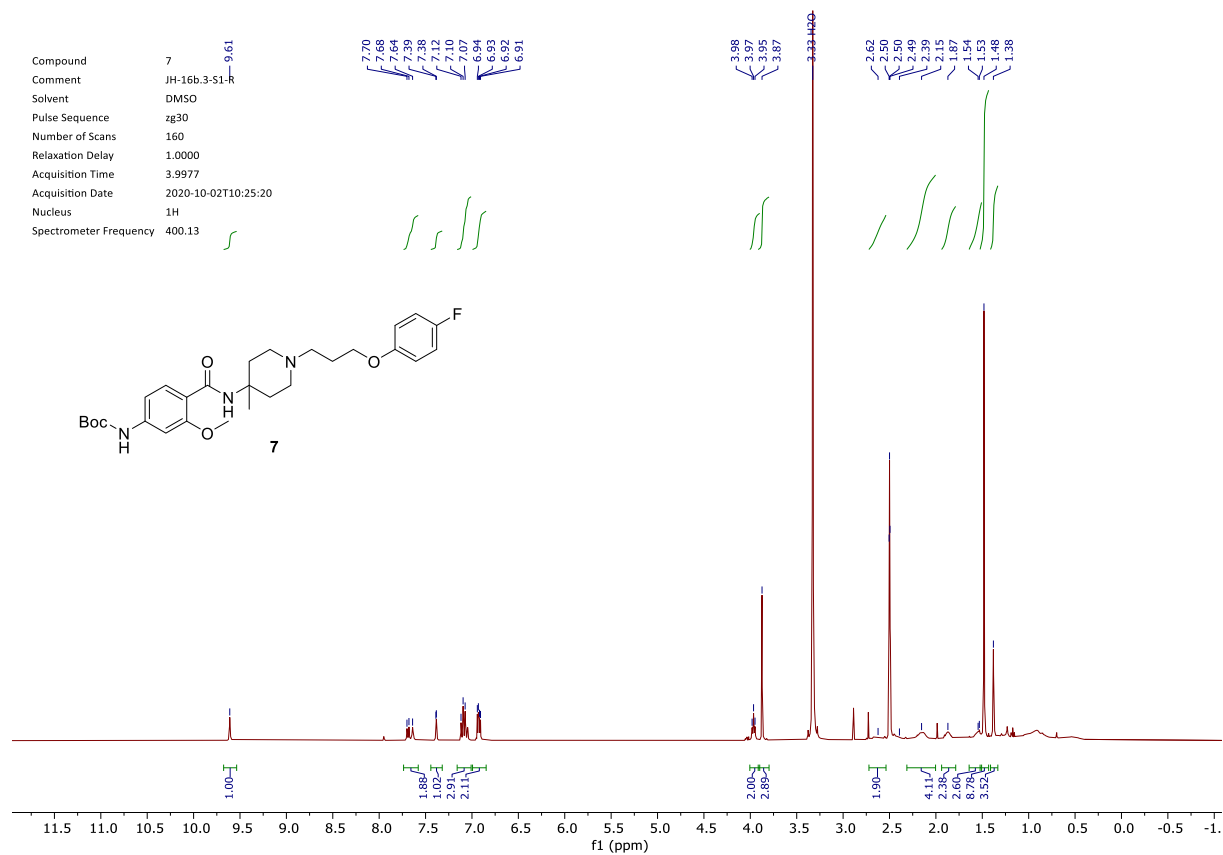
2.2.1.2.5 Compound 5



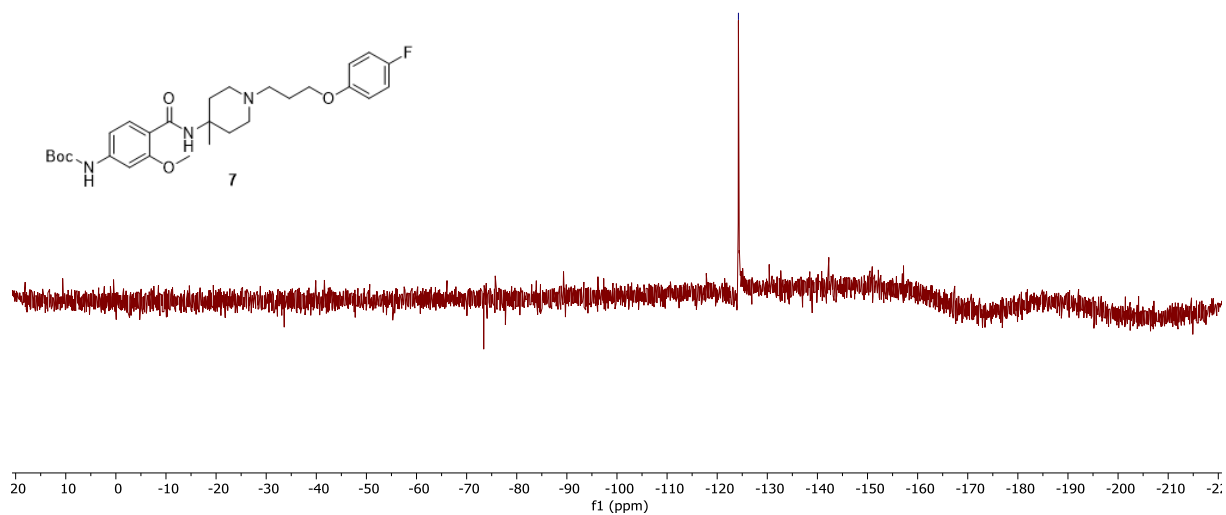
2.2.1.2.6 Compound 6



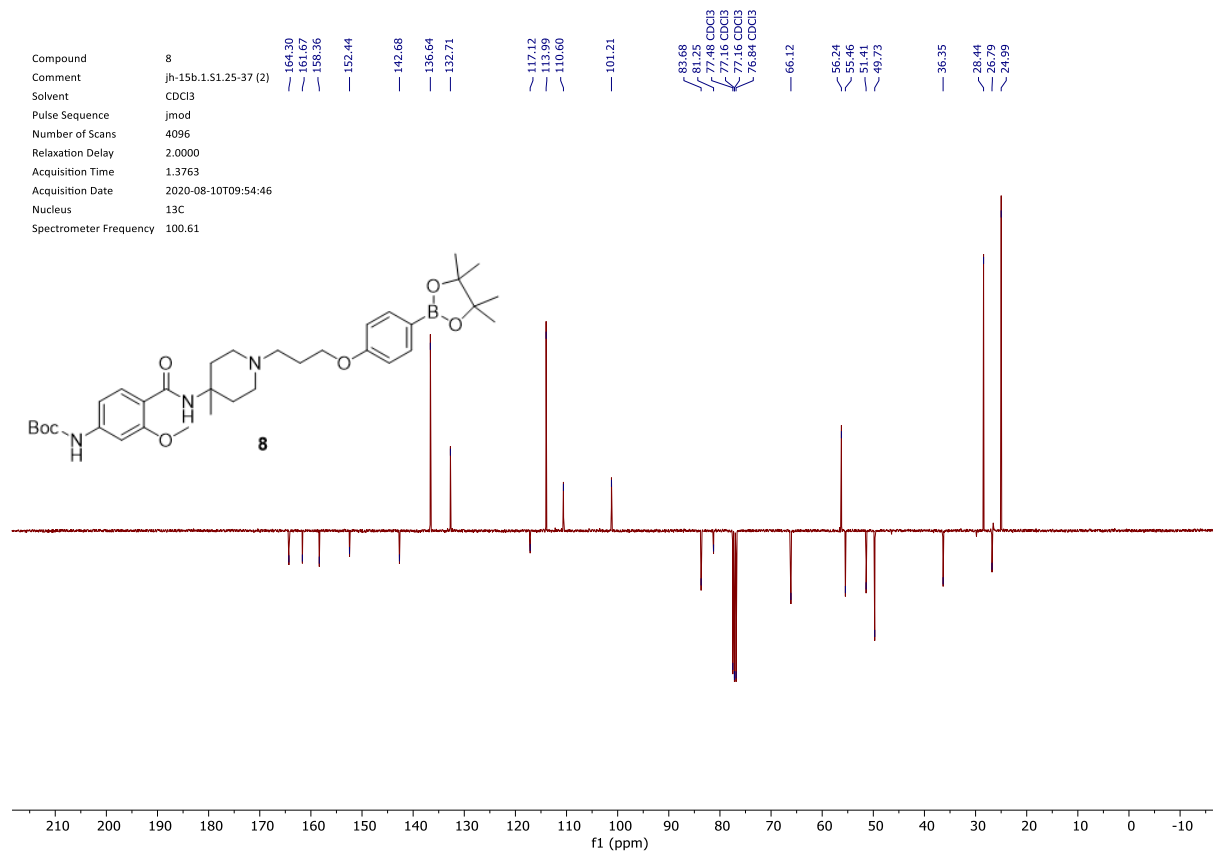
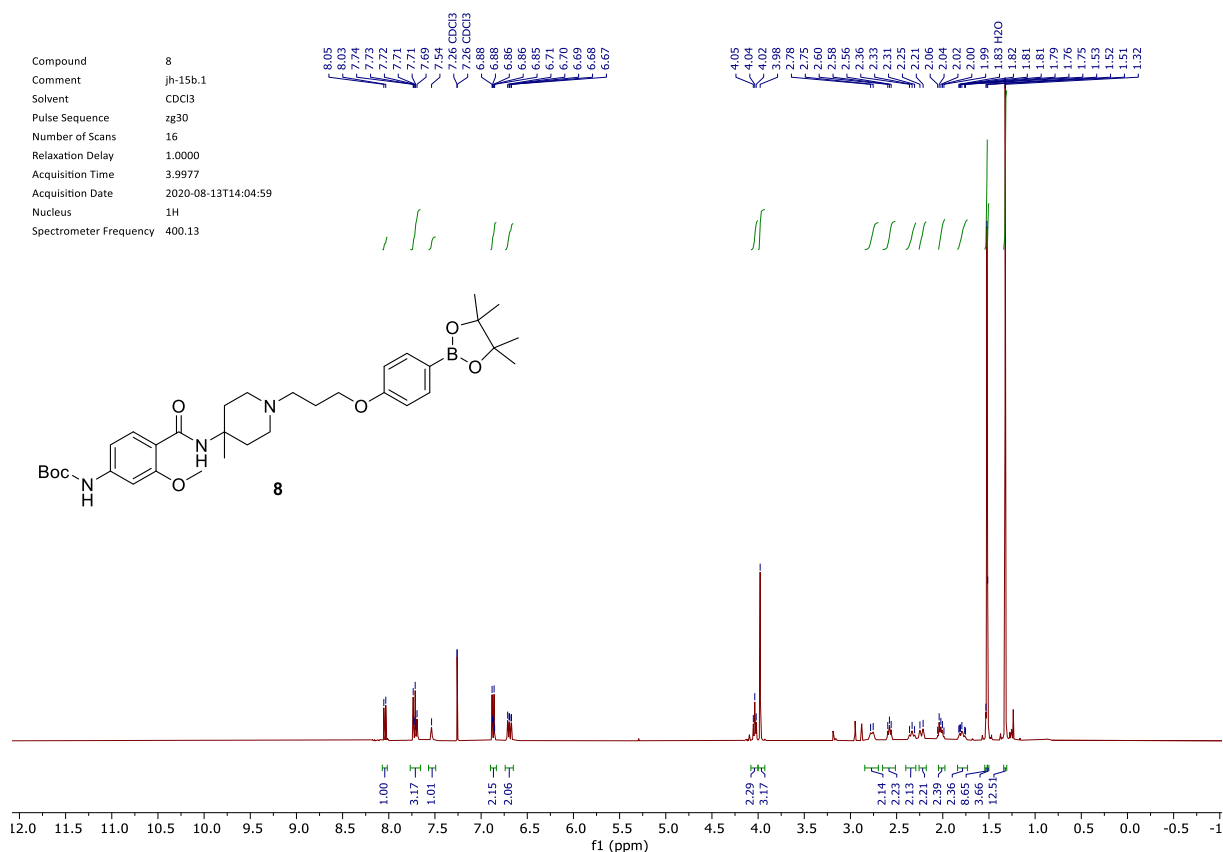
2.2.1.2.7 Compound 7



Compound 7
 Comment JH-16b.3-S1-R
 Solvent DMSO
 Pulse Sequence zgig
 Number of Scans 16
 Relaxation Delay 1.0000
 Acquisition Time 0.7209
 Acquisition Date 2020-10-02T10:05:59
 Nucleus 19F
 Spectrometer Frequency 376.50



2.2.1.2.8 Compound 8



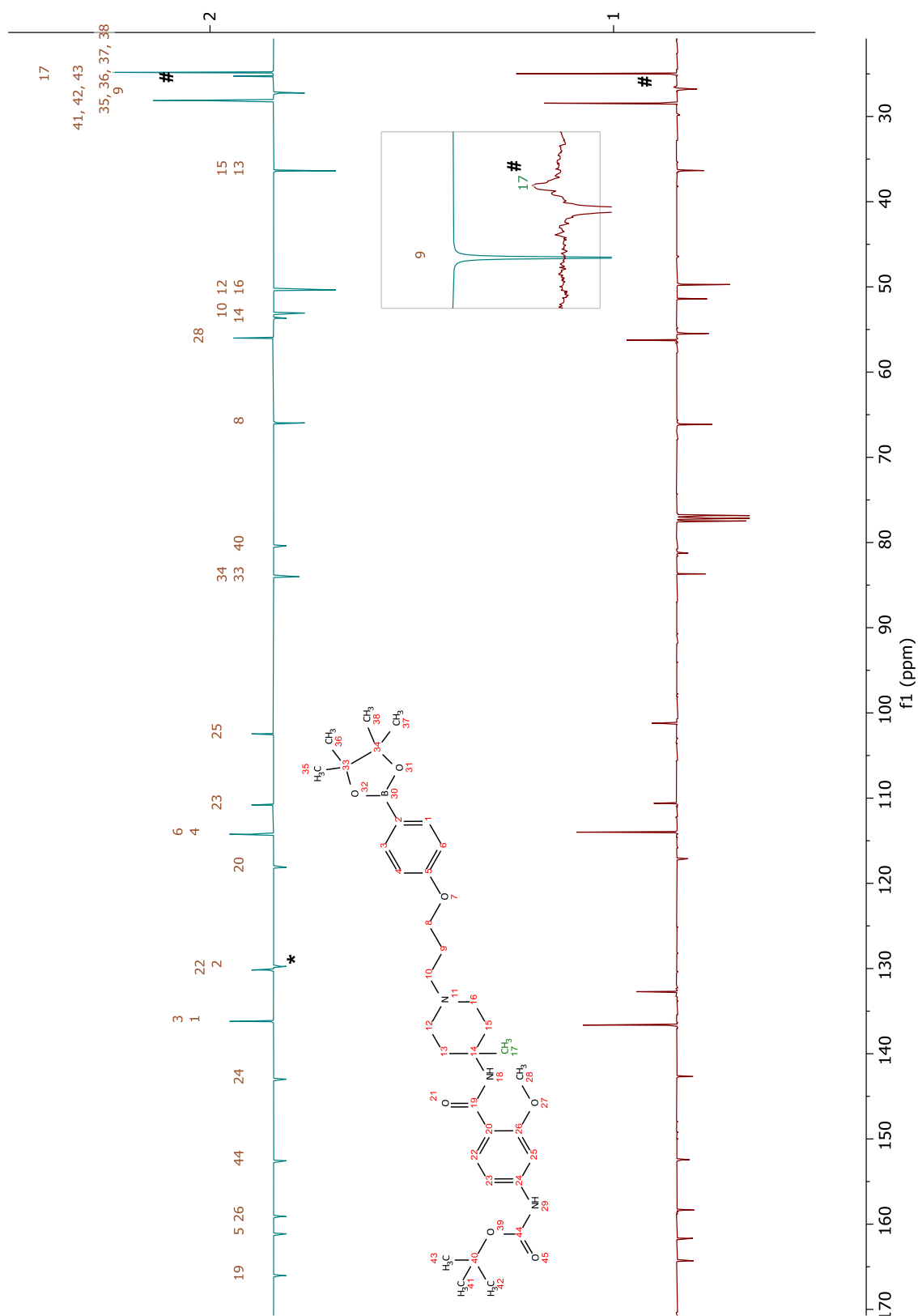
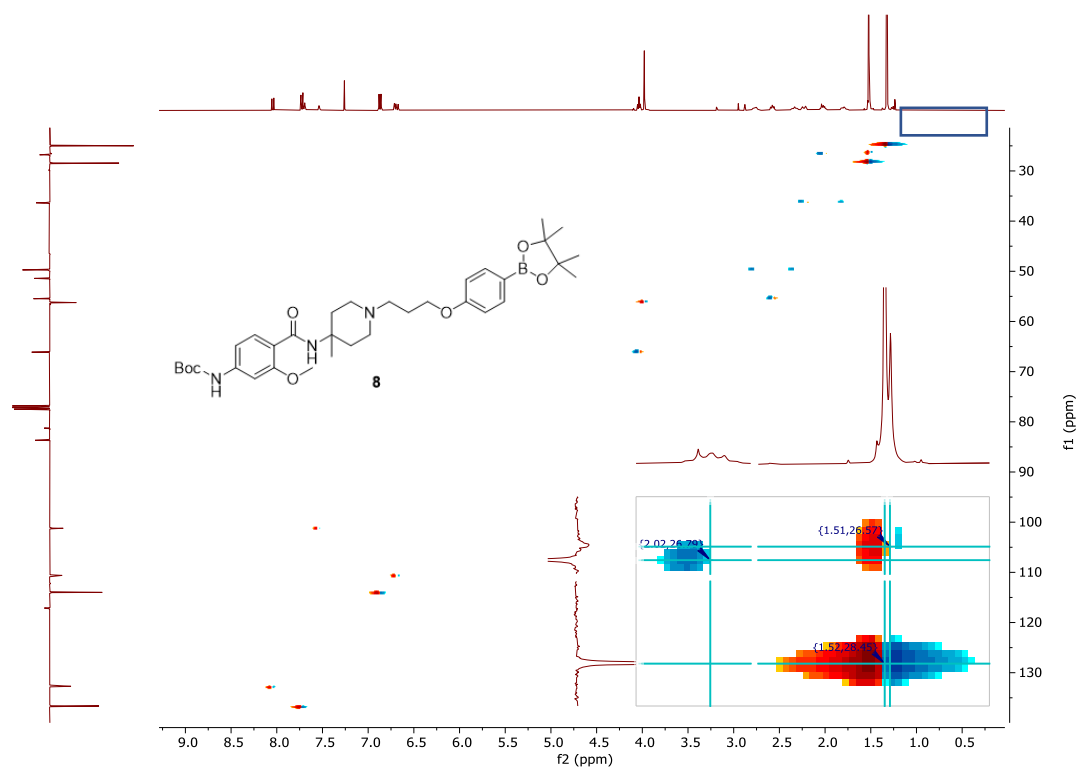
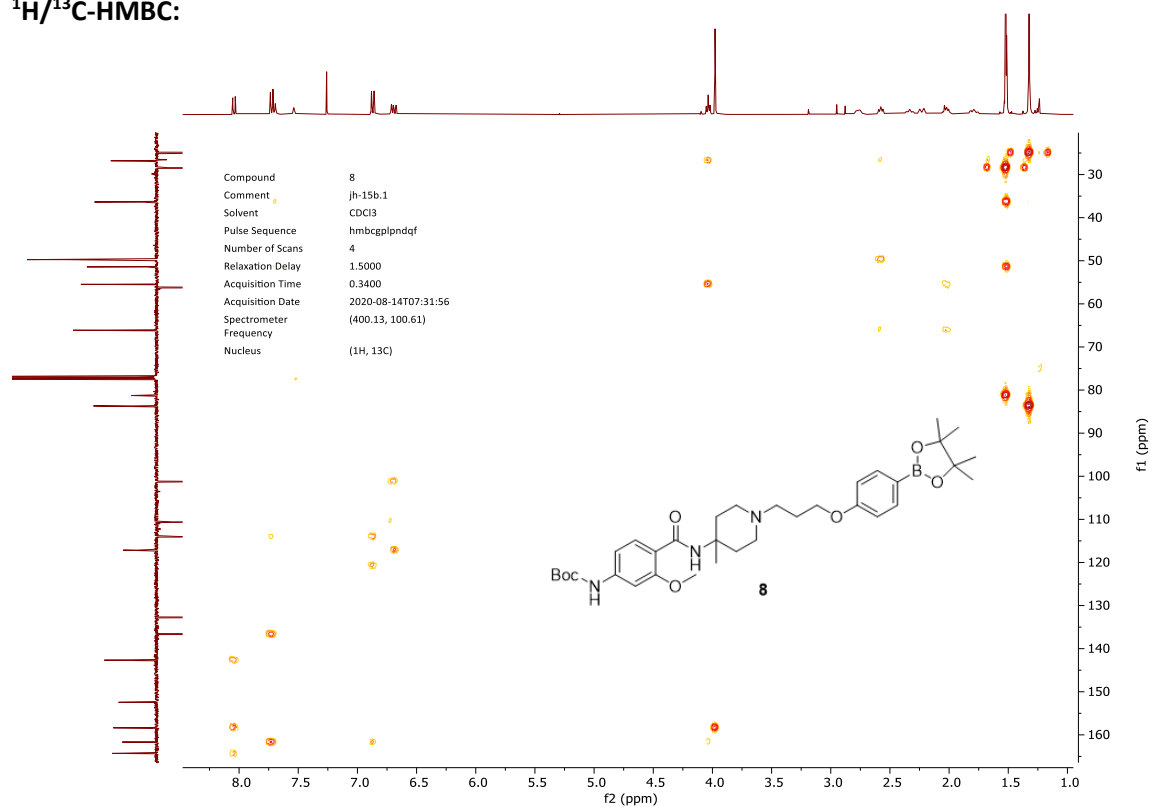


Figure 1: Structural elucidation of the ^{13}C -NMR (DEPTQ-135) supported by NMR prediction (MestReNova v14.1.1-24571). Not observed signals in the experimental spectrum (bottom/red) are indicated in the predicted spectrum (top/blue): (*) The quaternary carbon signal is broadened due to ^{13}C - $^{10/11}\text{B}$ quadrupole-induced relaxation. (#) The methyl group is observed in the ^1H -NMR but very weak in the DEPTQ-135 experiment, possibly due to fast T2-relaxation (assignment is supported by $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC (1.8.3)).

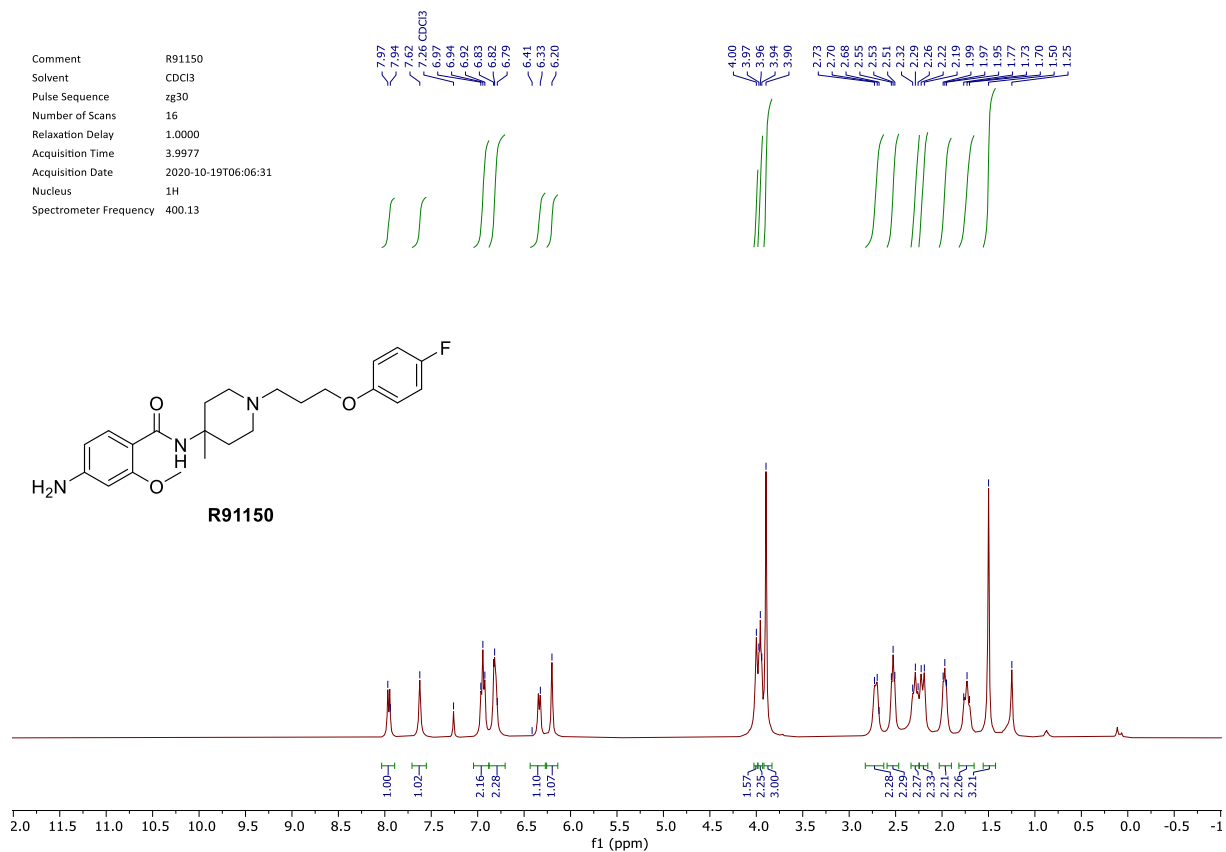
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC:

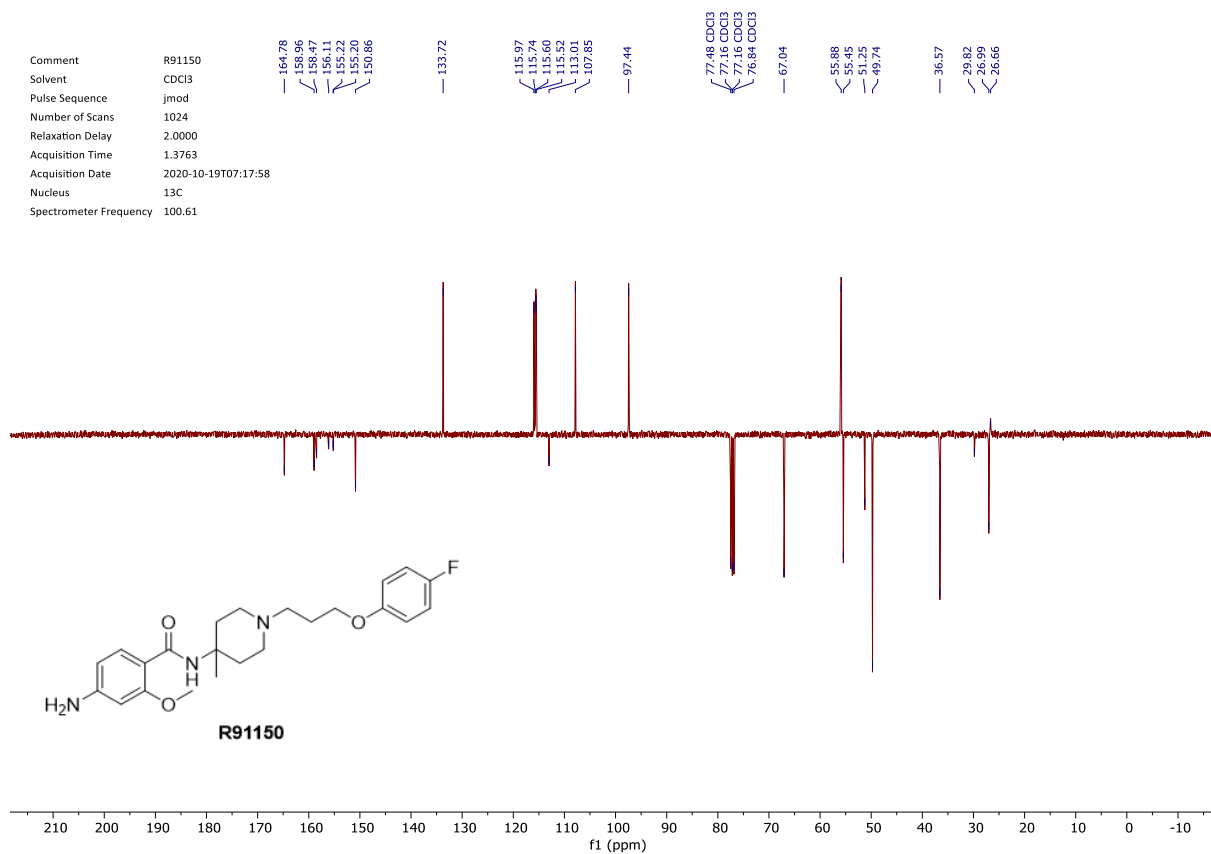


$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC:



2.2.1.2.9 Compound R91150





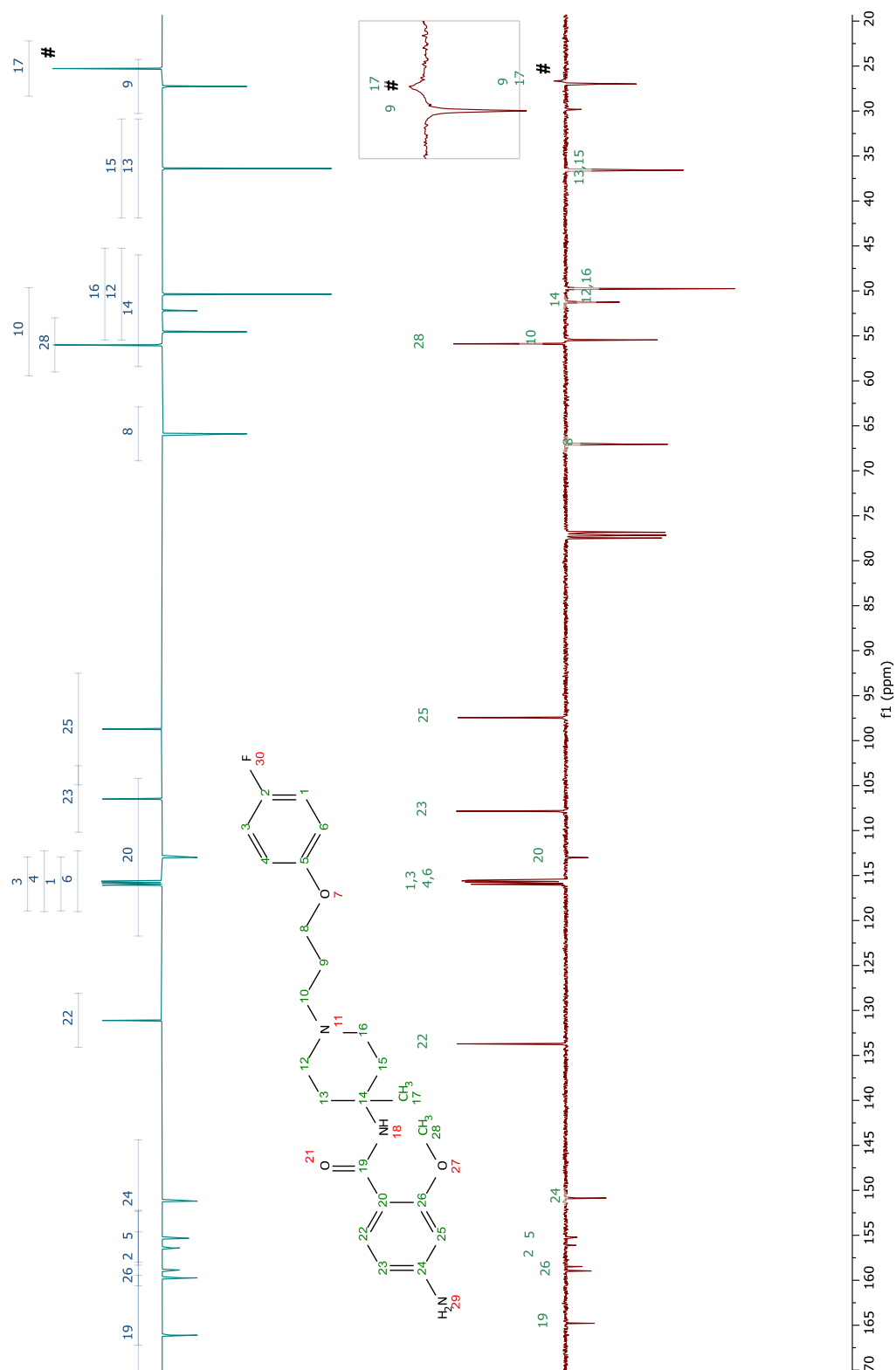
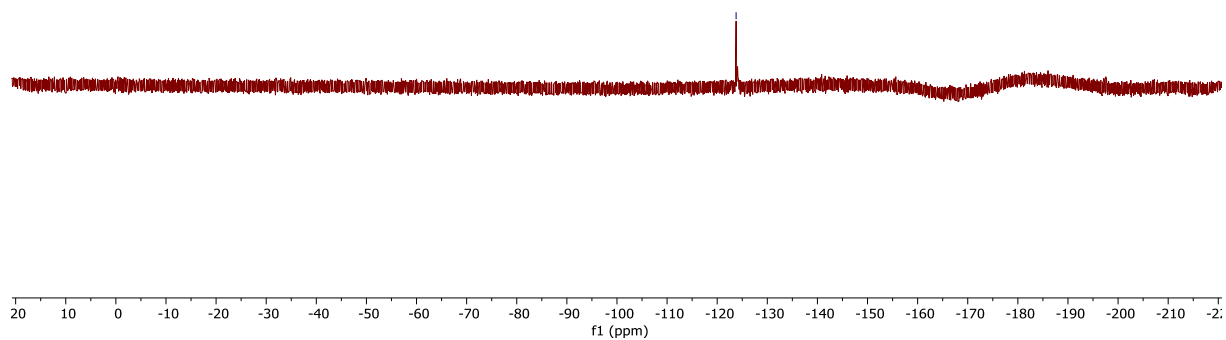
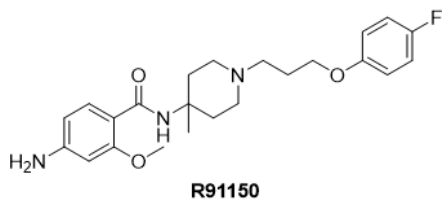
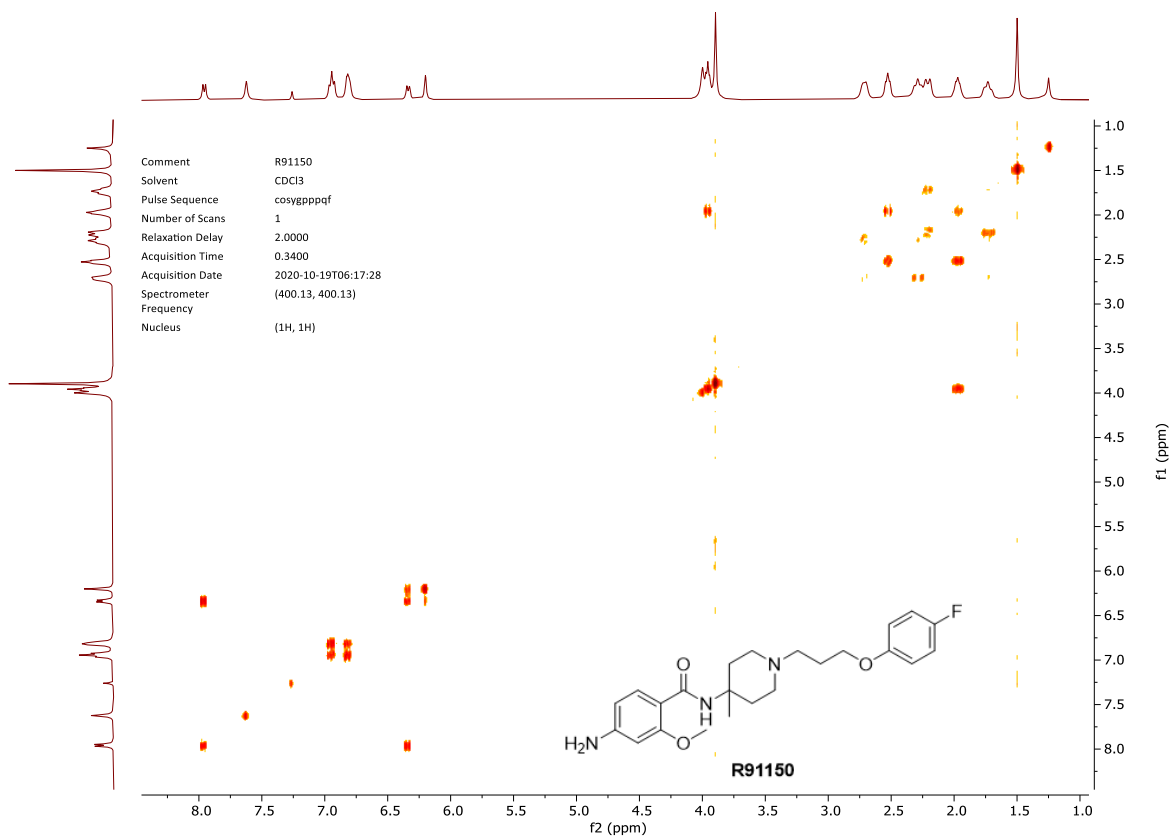


Figure 2: Structural elucidation of the ^{13}C -NMR (DEPTQ-135) supported by NMR prediction (MestReNova v14.1.1-24571). Not observed signals in the experimental spectrum (bottom/red) are indicated in the predicted spectrum (top/blue): (#) the methyl group is observed in the ^1H -NMR but not clearly in the ^{13}C -NMR, probably due to fast T2-relaxation.

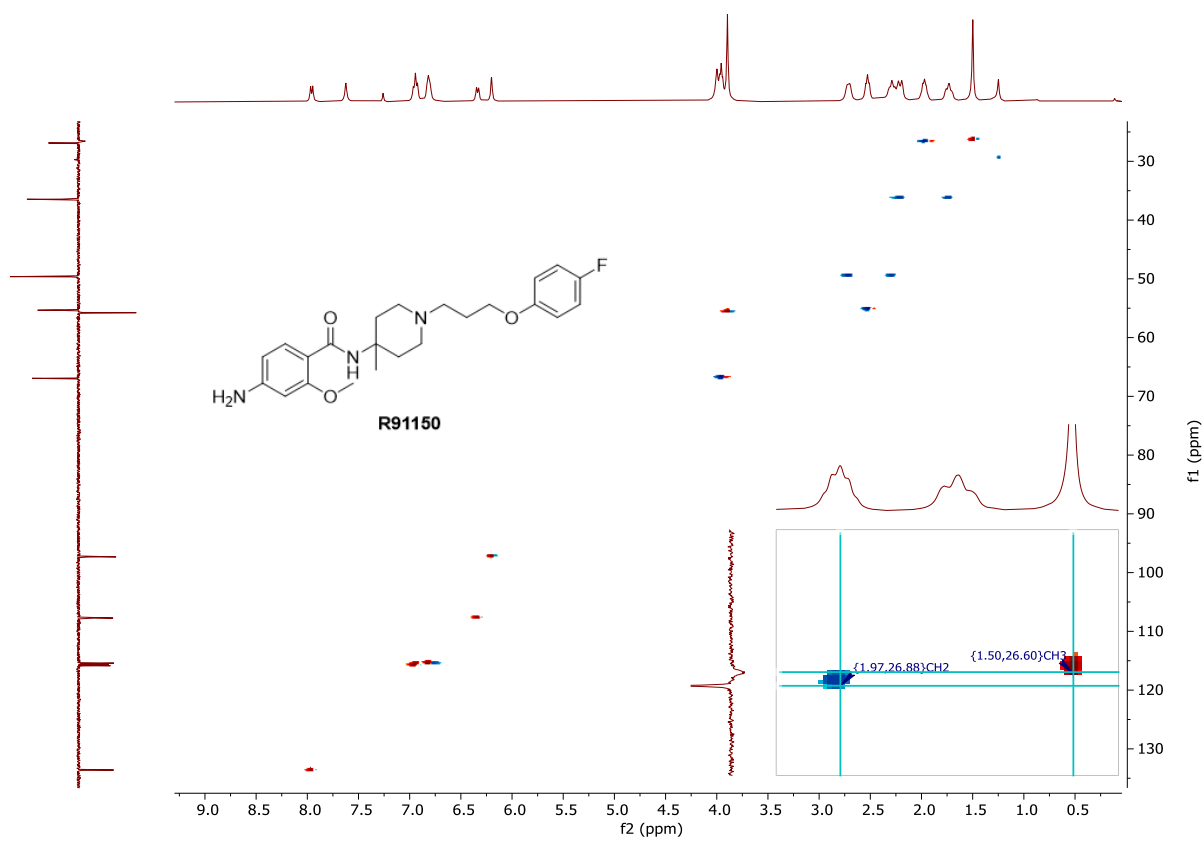
Comment R91150
 Solvent CDCl₃
 Pulse Sequence zgpg
 Number of Scans 16
 Relaxation Delay 1.0000
 Acquisition Time 0.7209
 Acquisition Date 2020-10-06T06:55:34
 Nucleus ¹⁹F
 Spectrometer Frequency 376.50



¹H/¹H-COSY:

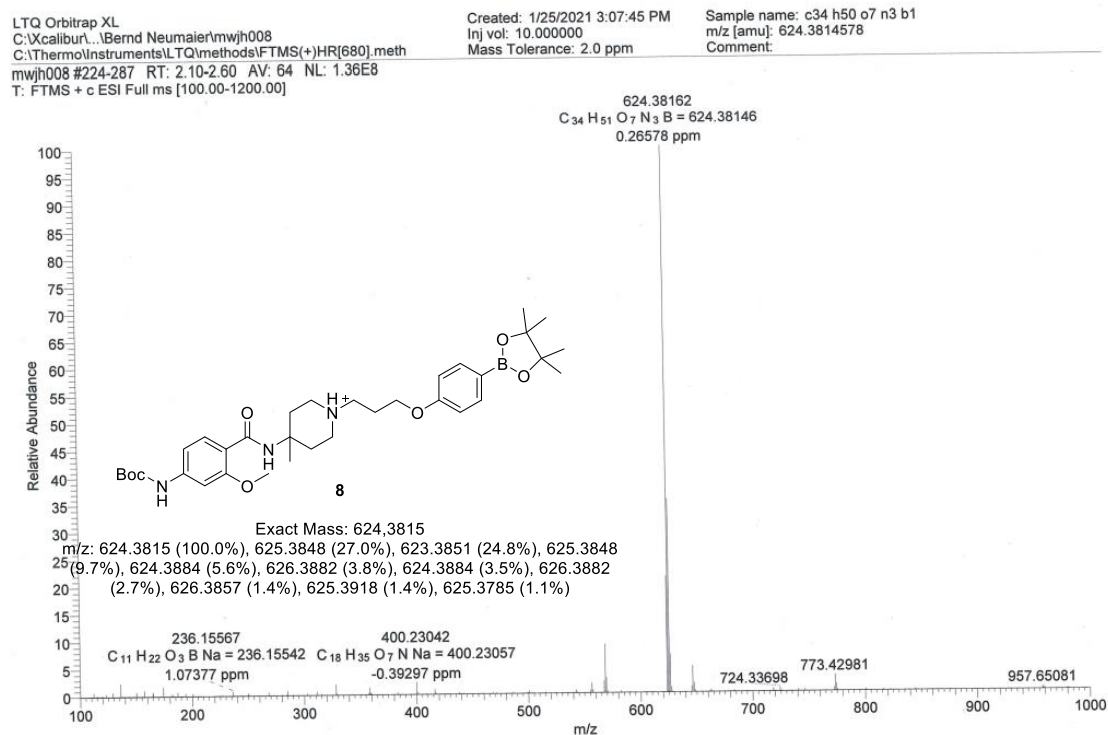


$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC:

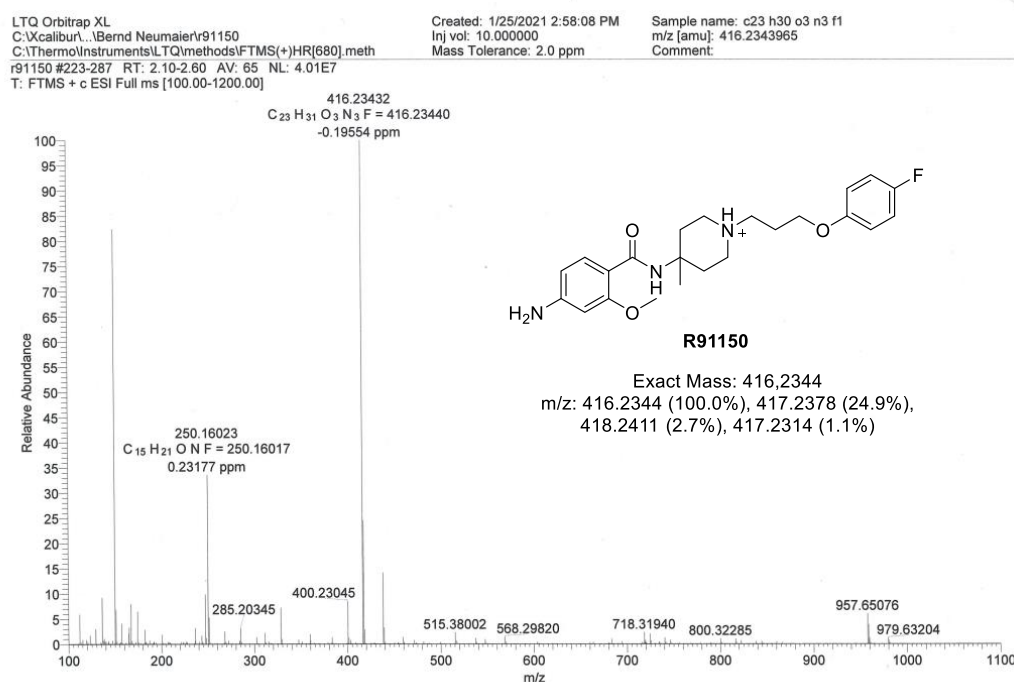


2.2.1.2.10 HRMS-spectra

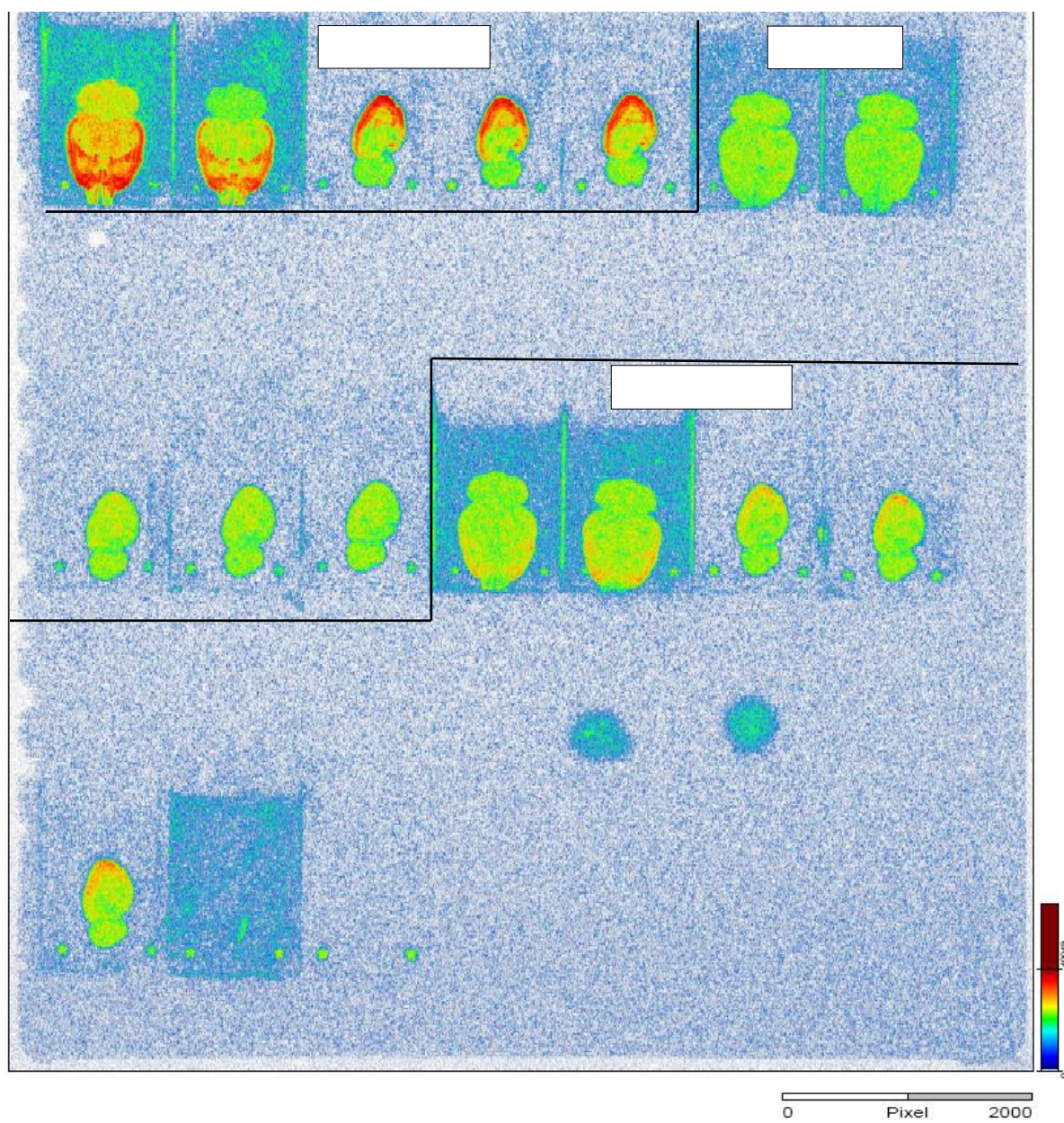
Compound 8



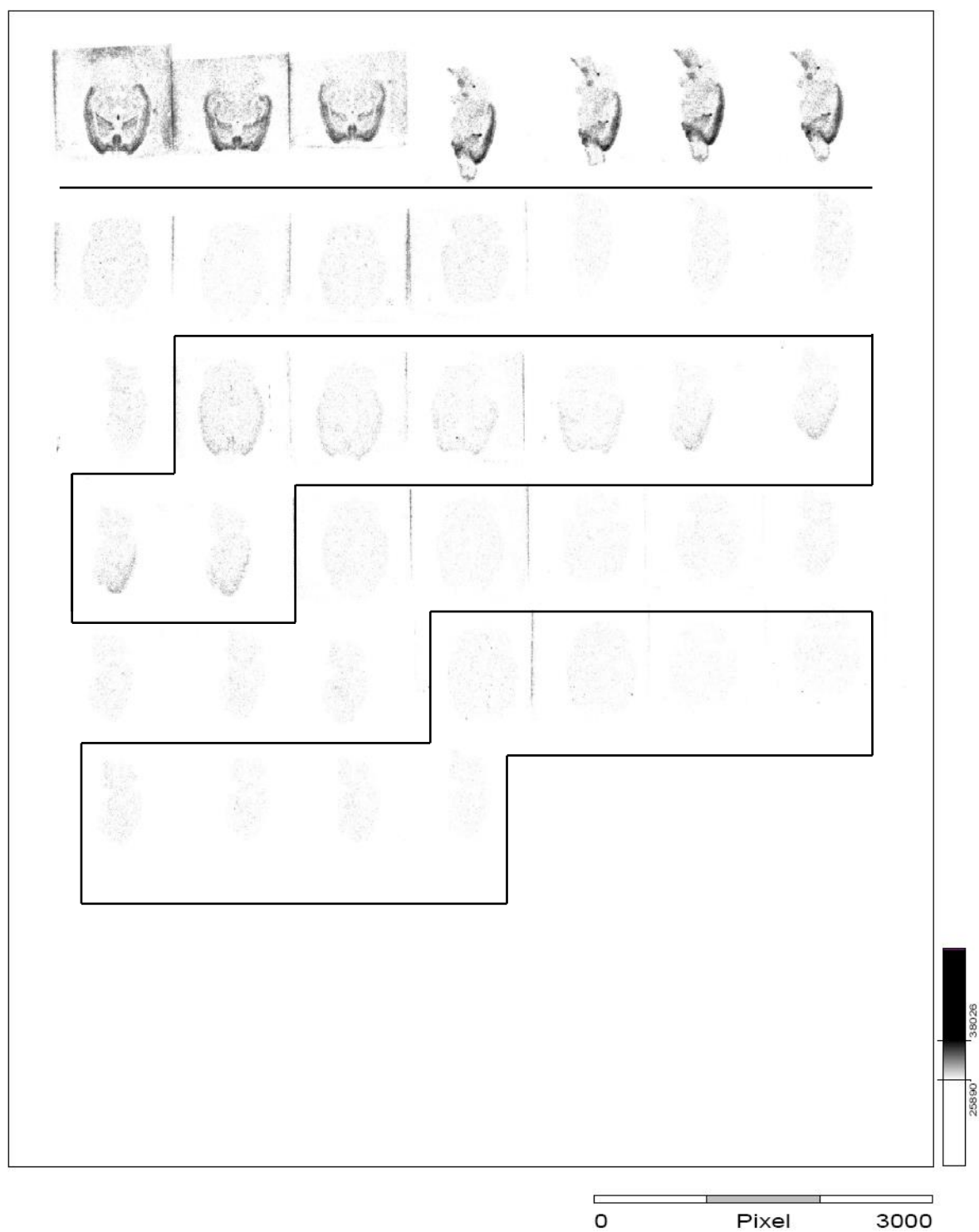
Compound R91150



2.2.1.3 In vitro autoradiography

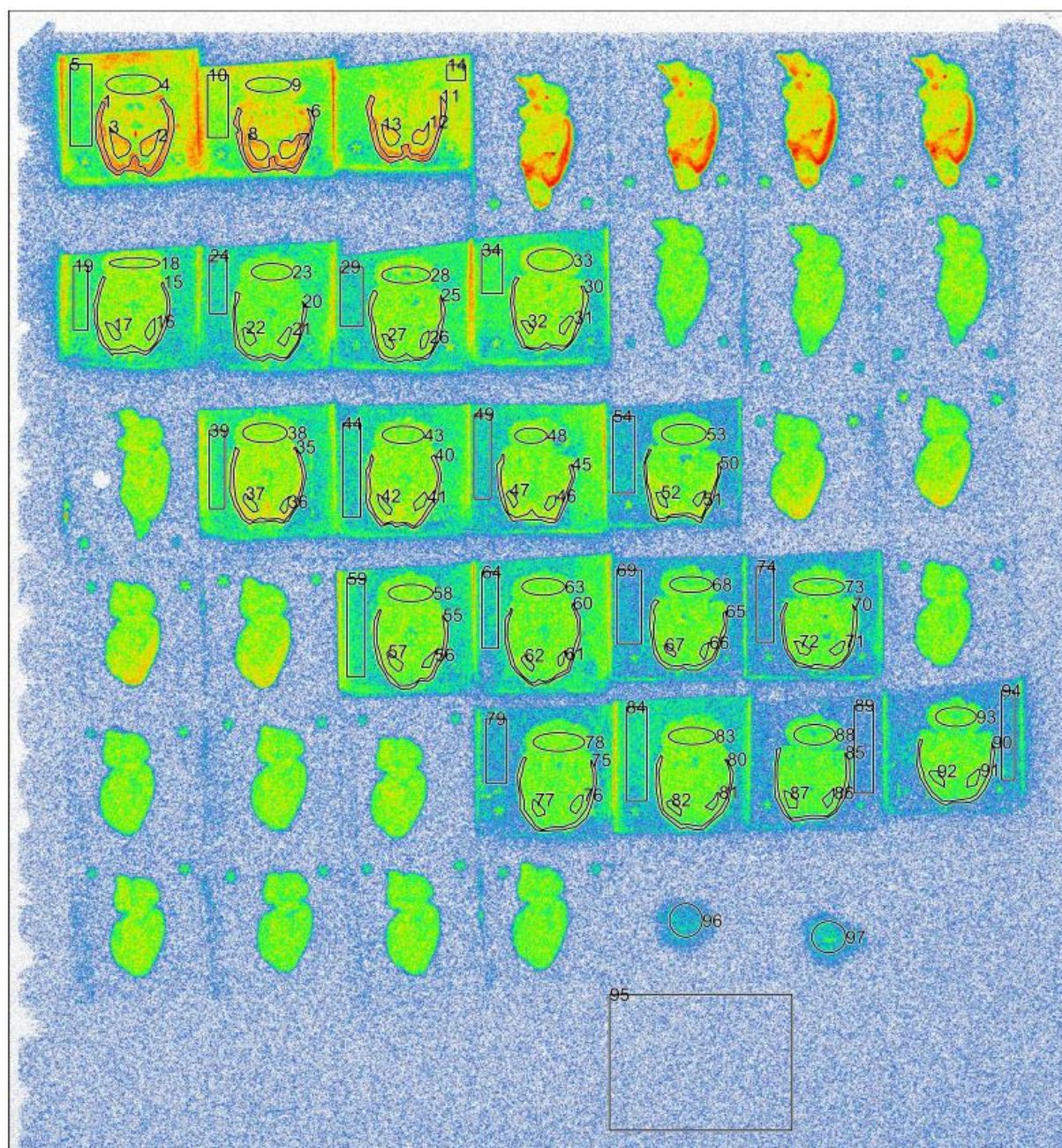


S 1: *In vitro* autoradiography of $[^{18}\text{F}]\text{R91150}$



S 2: *In vitro* autoradiography of [^{18}F]R91150

Regions of interest used for quantification:



S 3: *In vitro* autoradiography of [^{18}F]R91150

Table S 4: Intensity/Area-data from regions of interest (**S 3**):

No	Intensity/Area [PSL/pixel]	Intensity [PSL]	Area [pixel]
1	0,02098	1342,37094	63995,00
2	0,01457	230,66071	15832,00
3	0,01531	320,60865	20944,00
4	0,00803	407,13635	50726,00
5	0,00535	560,50863	104709,00
6	0,02196	828,61079	37737,00
7	0,01429	256,92763	17979,00
8	0,01403	269,06129	19171,00
9	0,00838	265,14001	31637,00
10	0,00797	622,28208	78077,00
11	0,02012	1055,66879	52470,00
12	0,01285	158,01557	12295,00
13	0,01279	182,45550	14271,00
14	0,00900	155,78974	17303,00
15	0,00785	305,73405	38925,00
16	0,00753	57,66588	7657,00
17	0,00746	59,70069	8001,00
18	0,00791	185,28655	23427,00
19	0,00492	269,17188	54723,00
20	0,00652	186,40364	28601,00
21	0,00617	46,00360	7462,00
22	0,00638	58,52842	9178,00
23	0,00689	222,79127	32346,00
24	0,00300	178,31716	59451,00
25	0,00702	254,83505	36321,00
26	0,00733	45,12041	6156,00
27	0,00724	41,83983	5775,00
28	0,00674	254,91835	37817,00
29	0,00276	216,55849	78489,00
30	0,00746	257,91461	34557,00
31	0,00742	57,80579	7795,00
32	0,00779	42,40680	5441,00
33	0,00749	357,05168	47656,00
34	0,00490	266,98908	54442,00
35	0,01048	378,30108	36089,00
36	0,00819	38,45403	4693,00
37	0,00810	64,16817	7918,00
38	0,00770	307,21889	39906,00
39	0,00414	297,88951	72000,00
40	0,00937	340,92542	36390,00
41	0,00765	60,86510	7954,00
42	0,00720	52,82996	7342,00
43	0,00687	232,84119	33902,00

44	0,00275	274,28690	99663,00
45	0,00853	307,17695	36015,00
46	0,00678	44,37770	6544,00
47	0,00710	40,49176	5702,00
48	0,00647	147,77359	22852,00
49	0,00256	215,62756	84237,00
50	0,00875	249,83773	28540,00
51	0,00689	40,75968	5915,00
52	0,00625	37,19833	5947,00
53	0,00644	271,60483	42154,00
54	0,00198	200,45349	101403,00
55	0,00718	259,34635	36110,00
56	0,00675	41,08195	6090,00
57	0,00734	67,83924	9246,00
58	0,00700	249,12711	35604,00
59	0,00359	378,37508	105280,00
60	0,00652	209,44069	32138,00
61	0,00676	28,07775	4154,00
62	0,00632	37,29530	5903,00
63	0,00657	223,94292	34067,00
64	0,00259	192,52588	74295,00
65	0,00613	223,60179	36452,00
66	0,00662	34,68289	5240,00
67	0,00651	27,19849	4177,00
68	0,00592	184,72110	31228,00
69	0,00162	174,44283	107915,00
70	0,00579	176,01618	30423,00
71	0,00624	43,44796	6962,00
72	0,00683	49,52033	7254,00
73	0,00640	249,96780	39075,00
74	0,00134	104,77163	78165,00
75	0,00632	241,10877	38144,00
76	0,00643	56,15180	8739,00
77	0,00670	49,47034	7382,00
78	0,00671	298,98511	44579,00
79	0,00170	135,28395	79695,00
80	0,00643	224,46506	34905,00
81	0,00579	33,35659	5762,00
82	0,00654	42,78521	6543,00
83	0,00711	259,35043	36460,00
84	0,00305	351,90839	115437,00
85	0,00502	172,30073	34356,00
86	0,00561	36,73343	6553,00
87	0,00621	54,56637	8786,00
88	0,00531	204,58054	38498,00
89	0,00107	105,17210	97875,00
90	0,00568	187,08074	32929,00

91	0,00604	50,27949	8318,00
92	0,00590	46,34862	7854,00
93	0,00593	217,76530	36702,00
94	0,00163	112,92565	69185,00
95	0,00033	479,95365	1458441,00
96	0,00180	92,07387	51137,00
97	0,00226	111,77799	49533,00
	0,00422	20143,20918	4774123,00

Table S 5: %-Inhibition:

	Cor +L	Cor -L	Cor altan	Cor R	Str +L	Str -L	Str altan	Str R
	78,375	53,261	73,569	65,942	60,533	38,575	47,213	25,495
	74,086	51,261	71,084	75,086	49,906	28,469	39,561	52,295
	68,641	56,028		70,973	30,667	32,911	24,228	25,991
	81,147	50,078	67,255	70,173	58,647	29,626	20,482	33,536
mean [%]	75,562	52,657	70,636	70,543	49,938	32,395	32,871	34,329
standard deviation	5,452	2,603	3,181	3,747	13,656	4,529	12,631	12,530

Data were corrected for background. Cor (Cortex), Str /Striatum, + L (+ Lisurid), - L (-Lisurid), altan (Altanserin), R (R91950).

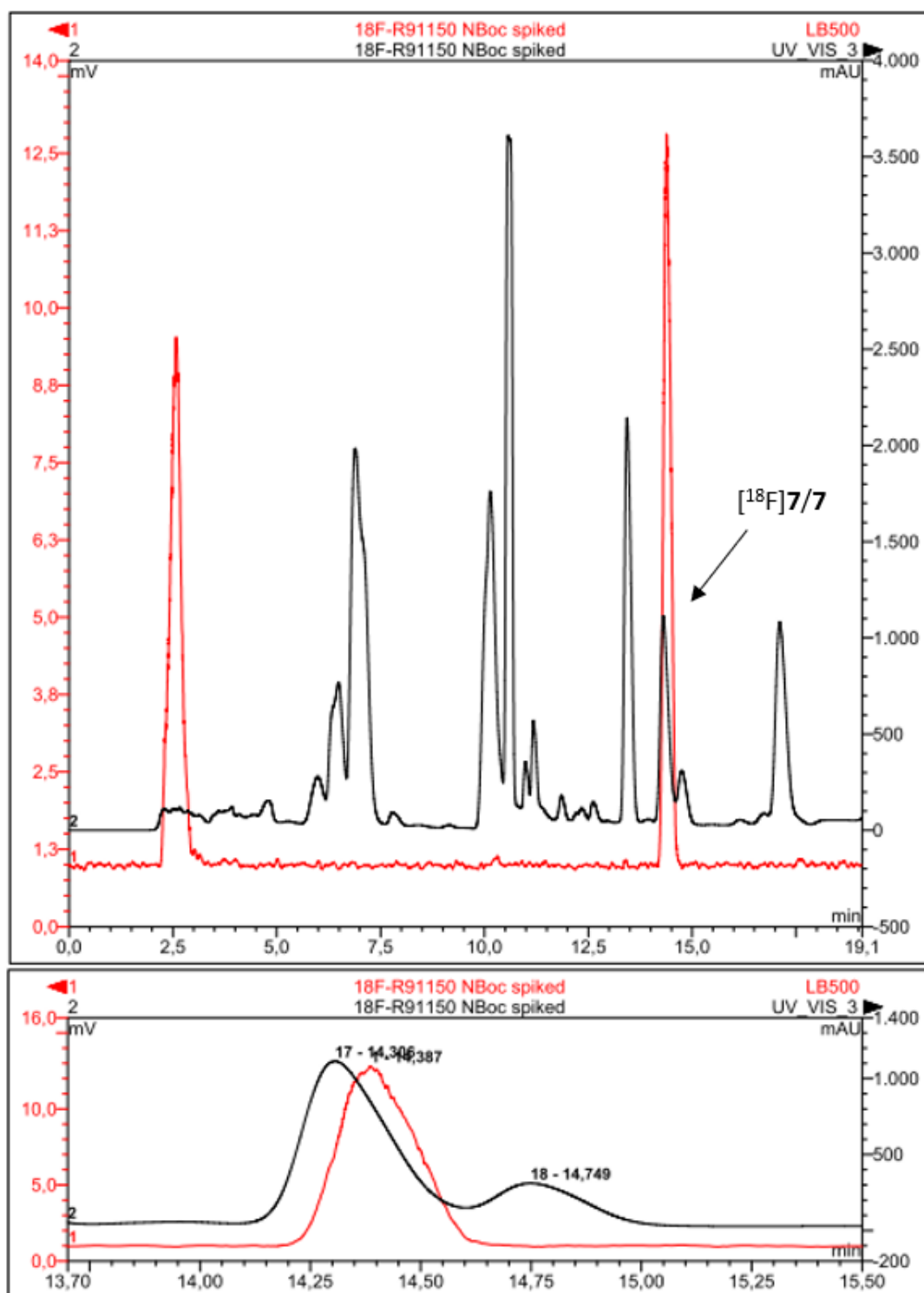
Table S 6: One-way analysis of variance (ANOVA)

Project1:1way ANOVA of Data 1:Tabular results - Mon Feb 01 15:01:30 2021

	Parameter	A Value	B Data Set-B	C Data Set-C	D Data Set-D
		Y	Y	Y	Y
1	Table Analyzed				
2	Data 1				
3	One-way analysis of variance				
4	P value	P<0.0001			
5	P value summary	***			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	8			
8	F	16.79			
9	R squared	0.8364			
10					
11	ANOVA Table	SS	df	MS	
12	Treatment (between columns)	8905	7	1272	
13	Residual (within columns)	1742	23	75.76	
14	Total	10650	30		
15					
16	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
17	cor +L vs Cor -L	22.91	5.263	P < 0.05	2.429 to 43.38
18	cor +L vs Cor altan	4.926	1.048	P > 0.05	-17.19 to 27.04
19	cor +L vs Cor R	5.019	1.153	P > 0.05	-15.46 to 25.50
20	cor +L vs Str +L	25.62	5.888	P < 0.01	5.148 to 46.10
21	cor +L vs Str -L	43.17	9.919	P < 0.001	22.69 to 63.64
22	cor +L vs Str altan	42.69	9.810	P < 0.001	22.21 to 63.17
23	cor +L vs Str R	41.23	9.474	P < 0.001	20.76 to 61.71
24	Cor -L vs Cor altan	-17.98	3.825	P > 0.05	-40.10 to 4.138
25	Cor -L vs Cor R	-17.89	4.110	P > 0.05	-38.36 to 2.590
26	Cor -L vs Str +L	2.719	0.6247	P > 0.05	-17.76 to 23.20
27	Cor -L vs Str -L	20.26	4.656	P > 0.05	-0.2145 to 40.74
28	Cor -L vs Str altan	19.79	4.546	P > 0.05	-0.6903 to 40.26
29	Cor -L vs Str R	18.33	4.211	P > 0.05	-2.149 to 38.80
30	Cor altan vs Cor R	0.09249	0.01968	P > 0.05	-22.02 to 22.21
31	Cor altan vs Str +L	20.70	4.403	P > 0.05	-1.419 to 42.81
32	Cor altan vs Str -L	38.24	8.135	P < 0.001	16.12 to 60.36
33	Cor altan vs Str altan	37.77	8.034	P < 0.001	15.65 to 59.88
34	Cor altan vs Str R	36.31	7.724	P < 0.001	14.19 to 58.42
35	Cor R vs Str +L	20.61	4.735	P < 0.05	0.1290 to 41.08
36	Cor R vs Str -L	38.15	8.766	P < 0.001	17.67 to 58.62
37	Cor R vs Str altan	37.67	8.656	P < 0.001	17.20 to 58.15
38	Cor R vs Str R	36.21	8.321	P < 0.001	15.74 to 56.69
39	Str +L vs Str -L	17.54	4.031	P > 0.05	-2.933 to 38.02
40	Str +L vs Str altan	17.07	3.922	P > 0.05	-3.409 to 37.54
41	Str +L vs Str R	15.61	3.587	P > 0.05	-4.867 to 36.09
42	Str -L vs Str altan	-0.4758	0.1093	P > 0.05	-20.95 to 20.00
43	Str -L vs Str R	-1.934	0.4444	P > 0.05	-22.41 to 18.54
44	Str altan vs Str R	-1.458	0.3351	P > 0.05	-21.93 to 19.02

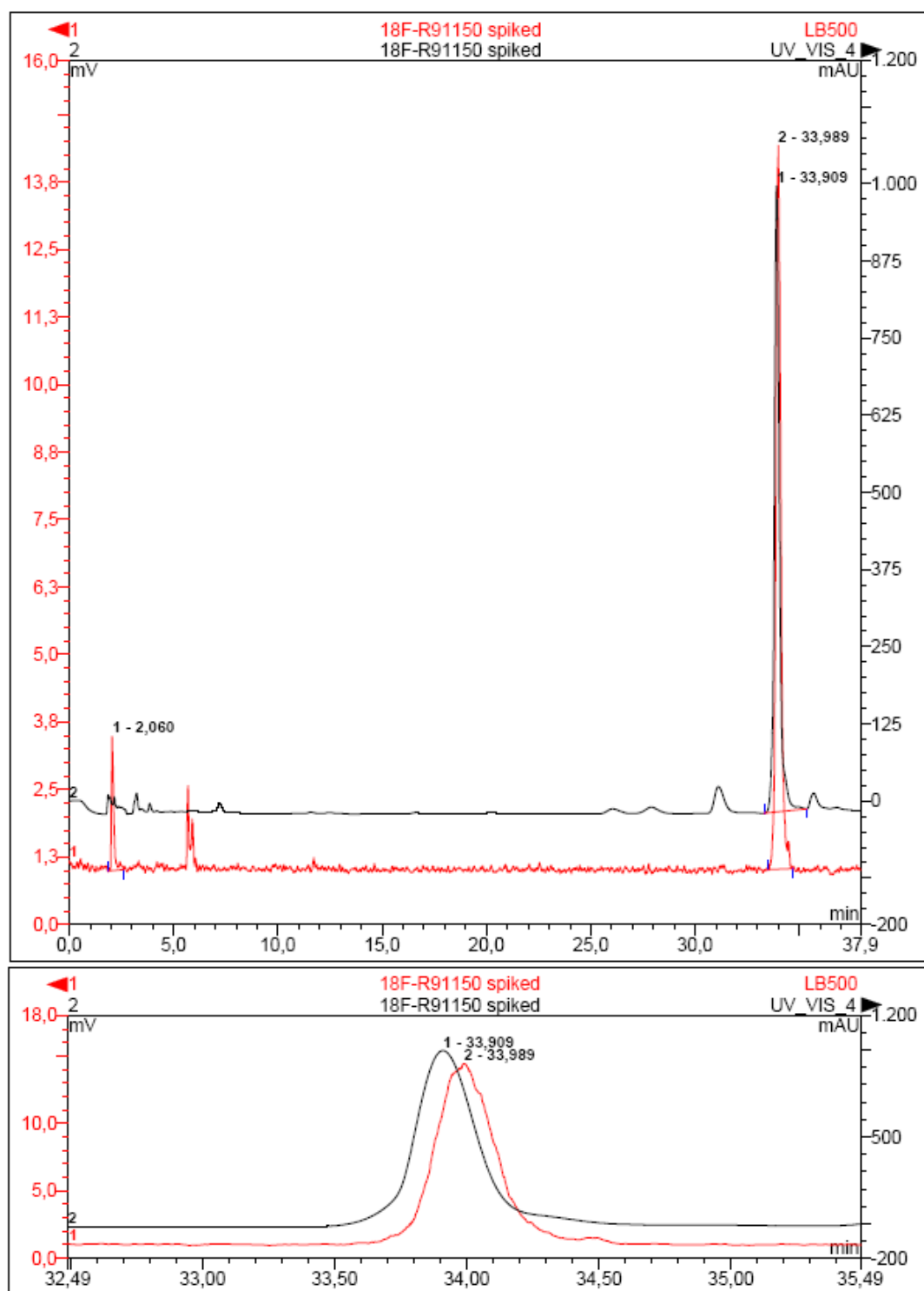
2.2.1.4 Radio-HPLC

Compound [^{18}F]**7**

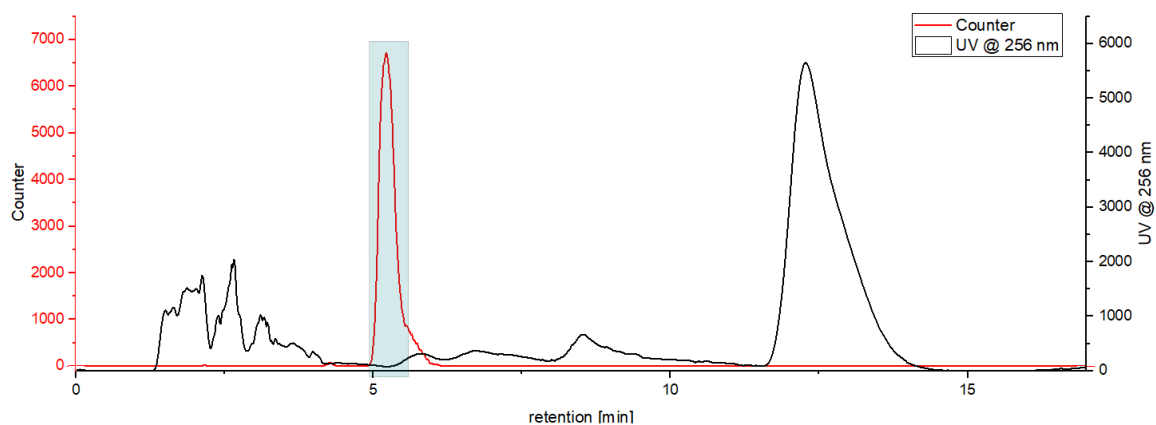


S 7: (Radio)-HPLC chromatogram of [^{18}F]**7** (red: radio-channel) coinjected with reference compound **7** (black: UV-channel @256 nm).

[¹⁸F]R91150



S 8: (Radio)-HPLC chromatogram of [¹⁸F]R91150 (red: radio-channel), coinjected with reference compound R91150 (black: UV-channel @280 nm).



S 9: Isolation of [^{18}F]R91150 using (semi-)preparative HPLC (Synergi 4 μ Hydro-RP 150 $\times$ 21.2 mm; eluent: water, 50% MeCN, 0.1% triethylamine; 10 mL/min). The highlighted fraction was collected (4.8-5.6 min).

2.3 Fast indirect ^{18}F -labeling via new prosthetic groups - Radiosynthesis and in vivo PET studies of the new PSMA specific Tracer [^{18}F]JK-PSMA15

Michael Willmann, Benedikt Gröner, Lisa Donnerstag, Elizaveta A. Urusova, Heike Endepols, J. Ermert, Bernd Neumaier, Boris Zlatopolskiy*

* corresponding author: boris.zlatopolskiy@uk-koeln.de

Manuskript in Bearbeitung

Fast indirect ^{18}F -labeling via new prosthetic groups - Radiosynthesis and *in vivo* PET studies of the new PSMA specific Tracer [^{18}F]JK-PSMA15

Michael Willmann^[a], Benedikt Gröner^[a], Lisa Donnerstag, Elizaveta A. Urusova^[b], Heike Endepols^[b], Johannes Ermert^[a], Bernd Neumaier^[a,b] and, Boris Zlatopolskiy^{*[b]}

[a] Institut für Neurowissenschaften und Medizin, INM-5: Nuklearchemie, Forschungszentrum Jülich GmbH, D-52425 Jülich, Germany

[b] Institut für Radiochemie und Experimentelle Molekulare Bildgebung (IREMB), Uniklinik Köln, D-50937 Köln, Germany

*Corresponding author: boris.zlatopolskiy@uk-koeln.de

Keywords: Prostate cancer; Prostate-specific membrane antigen; Fluorine-18; Positron-emission tomography.

Abstract: ^{18}F -labeled nicotinic acids are potential amine-reactive prosthetic groups for the indirect radiolabeling of sensitive biomolecules with fluorine-18. We report a fast and simple method for the radiofluorination of azaisatoic anhydrides, which give rise to their substituted nicotinic acid derivatives by amine conjugation or copper(I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition respectively. A simple on-cartridge radiolabeling protocol is employed to obtain the ^{18}F -labeled azaisatoic anhydrides or the respective 2-aminonicotinic acids directly upon hydrolysis in radiochemical yields of 60-80% within 2 min, obviating the need for time-consuming drying steps. The versatility and scope of our protocol is illustrated by conjugation reactions with small molecule amines and azides as well as several more elaborate radiosyntheses of novel prostate-specific membrane antigen (PSMA)-targeting imaging candidates. In addition, we report encouraging early results from the *in vivo* evaluation of one of these candidates ([^{18}F]JK-PSMA15), which demonstrate its suitability as PSMA-specific positron emission tomography (PET) tracer.

Introduction

Positron emission tomography (PET) is a non-invasive technique that allows for imaging and quantification of physiological processes by tracking the *in vivo* fate of radiopharmaceuticals labelled with positron-emitting radionuclides. Unlike conventional imaging techniques such as computed tomography or magnetic resonance imaging, which mainly provide anatomical information, PET can be used for functional imaging on the cellular or molecular level.¹ For example, PET imaging with probes targeting prostate-specific membrane antigen (PSMA), a transmembrane glycoprotein that is

highly overexpressed on malignant prostate cells,²⁻⁷ has proven instrumental for the detection and staging of prostate cancer (PCa).⁴ ⁶⁸Ga-labeled PSMA-radioligands have demonstrated superior detection efficiency in PCa patients when compared to choline-based tracers^{6, 8} or conventional imaging⁵, although they are increasingly replaced by probes labelled with fluorine-18, the most frequently used radionuclide for PET imaging. Important advantages of imaging with fluorine-18 over gallium-68 include its longer half-life ($t_{1/2}$ = 110 vs. 68 min), improved spatial resolution due to its lower positron energy (E_{max} = 0.63 vs. 1.9 MeV) and the possibility of large-scale, centralized production and distribution of ¹⁸F-labeled radioligands.^{9, 10} Although a plethora of direct ¹⁸F-labeling methods have been developed,^{1, 11} most of them either require harsh reaction conditions, toxic reagents or barely available precursors.¹² An indirect alternative for radiofluorination of sensitive biomolecules is to use ¹⁸F-labeled prosthetic groups (PGs), which can be conjugated to the unlabelled target molecule under suitably mild conditions.^{11, 13} One of the most commonly used PGs is *N*-succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB)^{12, 14-18}, which can be readily reacted with the primary amine groups present in the backbone of peptides or proteins.¹⁹ Although it can be prepared in good radiochemical yields (RCY), the radiosynthesis of [¹⁸F]SFB involves a time-consuming (58 min), multi-step procedure that cannot be implemented at all production sites.²⁰ The aim of the present work was to develop alternative, amine reactive PGs that can be obtained by fast and simple (automatable) radiosyntheses. To meet these criteria, we contemplated the use of azaisatoic anhydrides (Figure 1) as 2-aminonicotinic acid derivatives that would not require protection/deprotection of the amino and carboxy groups but provide excellent reactivity towards amines.



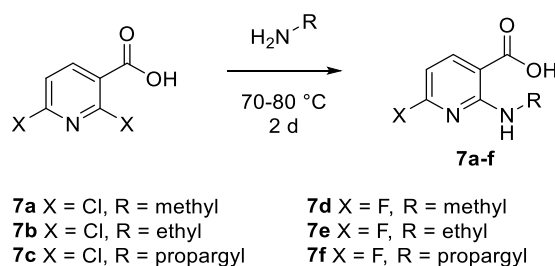
Figure 1: Structures of 2-aminonicotinic acid and (aza)isatoic anhydrides.

Thus, even though the literature on the preparation and reactivity of isatoic and azaisatoic anhydrides is sparse, some authors have demonstrated that isatoic anhydrides react with amines under the release of CO₂ to form 2-aminonicotinamides.²¹ This amine-reactivity of isatoic anhydrides motivated us to investigate their usability as PGs for indirect radiofluorination, so as to expand the scope of labelling techniques that are compatible with sensitive substrates.

Results and Discussion

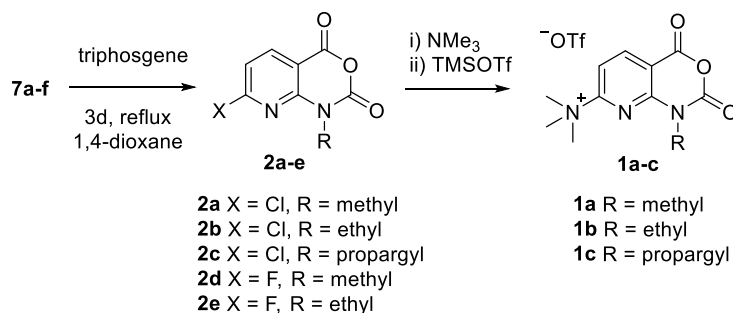
Precursor and reference compounds synthesis

Reference compounds and *N,N,N*-trimethylammonium triflate precursors for radiolabeling were synthesized starting from 2,6-dichloronicotinic (precursor compounds) or 2,6-difluoronicotinic (reference compounds) acid, which were subjected to amination with various amines bearing different substituents (Scheme 4).



Scheme 4: Amination of 2,6-dihalonicotinic acid.

To this end, the 2,6-dihalonicotinic acids were refluxed in a 3-20-fold molar excess of the respective amine over the course of 2 days, which afforded the corresponding 2-aminonicotinic acid derivatives **7a-f** in yields of 47-84%. Subsequent cyclisation by reflux of **7a-f** with triphosgene in 1,4-dioxane afforded the azaisatoic anhydrides **2a-e** (Scheme 5).



Scheme 5: Synthesis of precursor and reference compounds: Cyclisation of 2,6-dihalonicotinic acid with triphosgene formed azaisatoic anhydrides **2a-e**. These were converted to *N,N,N*-trimethylammonium triflate precursors **1a-c** by treatment with trimethylamine (NMe₃) followed by anion metathesis with trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf).

Anhydride formation was validated by ¹H- (absence of OH/NH signal in DMSO-d₆) and ¹³C-NMR (additional *q*C in the DEPTQ-135 experiment). None of the anhydrides (**1a-c**, **2a-e**) gave a molecular ion signal or reproducible mass fragment signals in LRMS/HRMS, so that structural validation was supported by X-ray crystallography (**1c**, Figure 2) or full characterization of the resulting conjugates (**3a-o**). *N,N,N*-Trimethylammonium triflate precursors **1a-c** were synthesized from 7-chloro azaisatoic anhydrides **2a**, **2b** and **2e** by treatment with an excess of trimethylamine (NMe₃) in THF at ambient

temperature. The resulting *N,N,N*-trimethylammoniumchlorides were dissolved in DCM and treated with trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf) to obtain the corresponding triflates **1a-c** within 10 min. All three *N,N,N*-trimethylammonium triflate precursors **1a-c** were bench-stable for at least 6 months. Single crystals of compound **1c** for X-ray crystallography were obtained from MeCN/*t*BuOH (1:4) at ambient temperature.

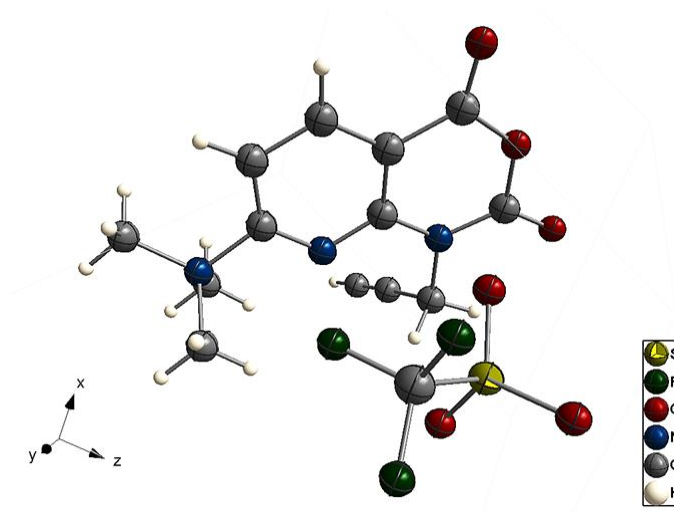
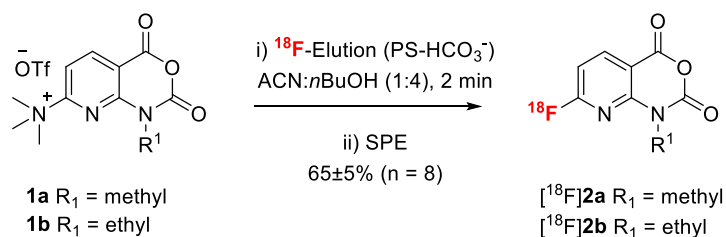


Figure 2: X-ray crystallography of *N,N,N*-trimethyl-2,4-dioxo-1-(prop-2-yn-1-yl)-1,4-dihydro-2*H*-pyrido[2,3-*d*][1,3]oxazin-7-ammonium triflate (**1c**). View along *y*-axis.

Radiosynthesis

We first attempted labelling of azaisatoic anhydrides **1a** and **1b** with the “minimalist protocol” as described earlier²², which involves elution of [¹⁸F]fluoride ([¹⁸F]F[−]) from a QMA carbonate cartridge with the triflate precursor (5-8 mg) in 0.5 mL MeOH, evaporation of the solvent and heating (10 min, 40 °C) in DMSO or MeCN. Using this approach, the RCY and radiochemical purity were generally undesirably low (10-60%) and the products were contaminated by various side products. To improve radiochemical yields and purity, we next applied the on-cartridge labelling procedure recently published by Basuli et al.²³ to prepare azaisatoic anhydrides [¹⁸F]**2a** and [¹⁸F]**2b**. To this end, [¹⁸F]F[−] was trapped on an anion-exchange-cartridge (CHROMAFIX® PS-HCO₃[−]), washed with dry acetonitrile (4 mL), eluted with a solution of the respective *N,N,N*-trimethylammonium triflate precursor (12 mg, **1a** or **b**) in 1 mL MeCN/*t*-BuOH (1:4) and flushed with 1 mL MeCN into the same vial. ¹⁸F-incorporation readily took place while passing the precursor solution through the cartridge (0.5 mL/min) with an elution efficiency of 65-80%. The combined eluents contained the radiolabeled product [¹⁸F]**2a** or [¹⁸F]**2b** without any radiochemical impurities (RCP >99%). The identity of the products was confirmed by HPLC-coinjection of the nonradioactive reference compounds.



Scheme 6: On-cartridge radiolabeling and isolation of azaisatoic anhydrides [¹⁸F]2a-b.

Attempts to further enhance the elution efficiency, like decreased flow rate, change of solvent mixture or amount of precursor, were not successful. Even if the sorbent was removed from the cartridges, dispersed in the eluent and stirred at elevated temperatures, the remaining activity (20-35%) remained trapped on the sorbent after filtration. However, unreacted *N,N,N*-trimethylammonium triflate precursor could effectively be removed by solid phase extraction (Oasis HLB Plus short) and used for subsequent derivatization with the respective amines (Scheme 7).

The stability of [¹⁸F]2a towards decarboxylation was investigated in acidic (pH 2.0), basic (pH 9.0) and physiological (pH 7.4) media. To this end, 50 MBq aliquots of [¹⁸F]2a were stirred at 20 °C in open vials containing 1 ml of either pH 2.0 buffer (30 mM citric acid, 8 mM HCl, 61 mM sodium chloride), pH 9.0 buffer (50 mM Na₂CO₃/Na₂HCO₃) or pH 7.4 buffer (50 mM TRIS-HCl) solution. 30 µL samples were removed every 30 min for up to three hours and the activity in the samples was measured, corrected for decay and side-product formation (radio-HPLC) and plotted as a function of time (Figure 3).

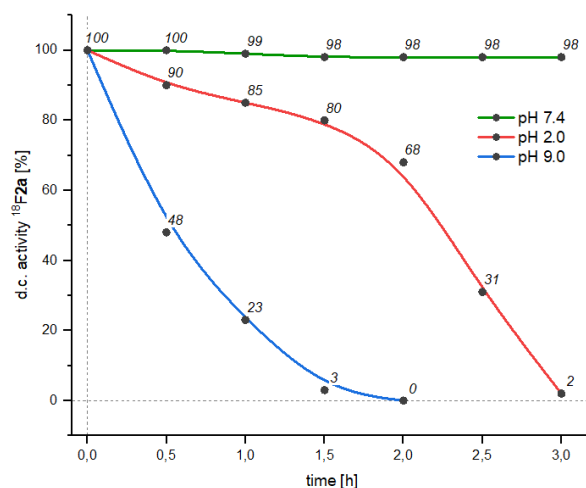
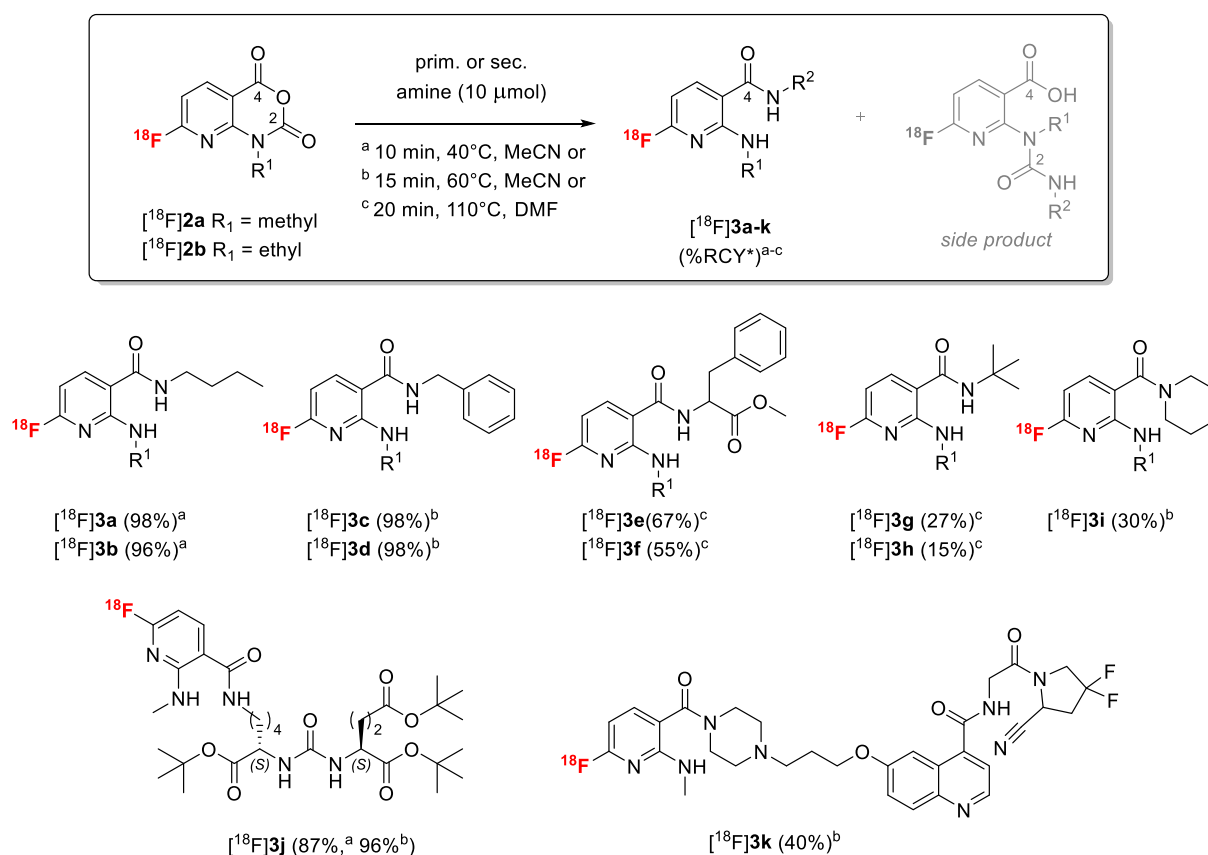


Figure 3: Stability of [¹⁸F]2a in aq. media buffered @ pH 2.0 (orange), pH 7.4 (green) and pH 9.0 (blue) over 3 hours at 20 °C. %-Activity of [¹⁸F]2a was determined by radio-HPLC and corrected by decay.

As illustrated in Figure 3, [¹⁸F]2a proved to be stable in aqueous solution at pH 7.4 over 3 hours, but prone to decarboxylation, defluorination and decomposition in basic and acidic aqueous solution (pH 9.0 or 2.0 respectively). For a first evaluation of the conjugation reaction between prosthetic

groups [^{18}F]**2a-b** and amines (see Scheme 7), *n*-butylamine was chosen as a surrogate for the lysine residue present in typical PSMA-binding motifs like the Glu-Ureido-Lys ligand. Given its iso-structural analogy to the lysine moiety, and the similar *pK*_a values (10.6 for *n*-butylamine vs. 10.5 for lysine's $\epsilon\text{-NH}_2$),^{24, 25} successful conjugation to *n*-butylamine indicated that the reaction should also be applicable for amide formation with more complex Lys-containing biomolecules. The reaction between [^{18}F]**2a-b** and *n*-butylamine (10 μmol) in acetonitrile (MeCN) proceeded almost quantitative (96-98%) within 10 min at 40 °C. Various other amines were then conjugated with [^{18}F]**2a** or [^{18}F]**2b** at 40-110 °C for 10-20 min using acetonitrile (MeCN) or *N,N*-dimethylformamide (DMF) as solvents, which yielded the anthranilamides [^{18}F]**3a-k** in analytical RCYs of 15-98% (Scheme 7).



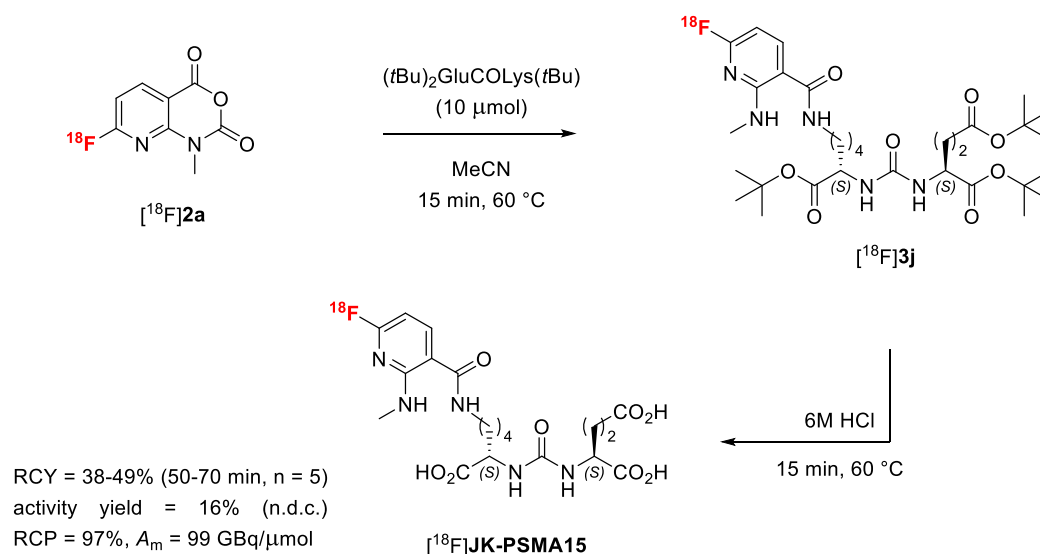
Scheme 7: Conjugation products [^{18}F]**3a-k** from reaction of [^{18}F]**2a-b** with various amines (10 μmol). *Analytical RCYs are given for the different reaction conditions applied: a) 40 °C, 10 min, MeCN, b) 60 °C, 15 min, MeCN, c) 110 °C, 20 min, DMF. d) H_2O (1 mL) was added to quench the reaction and completely solubilize surface-adsorbed [^{18}F] F^- . Product identity with the respective reference compounds and RCY were determined by radio-HPLC. Numbering scheme is given for the carbonyl carbon atoms.

Based on the conjugation yields, sterically demanding amines seemed to have a negative impact on the radiochemical yields ([^{18}F]**3e-f**, [^{18}F]**3g-h**), whereas long-chained terminal amines gave almost quantitative RCYs ([^{18}F]**3a-b**, [^{18}F]**3j**). A possible explanation could be the more favorable formation of 2-ureidonic acid byproducts in the case of sterically demanding amines (amines attack on C2 instead of C4; see Scheme 7 for carbon numbering). Conjugation with the secondary amines piperidine

and the FAP binding warhead “FAPI-Pipz” yielded anthranilamides [^{18}F]**3i** and [^{18}F]**3k** in moderate yields of 30% and 40% respectively.

Radiosynthesis of [^{18}F]**JK-PSMA15**

For the radiosynthesis of [^{18}F]**JK-PSMA15**, [^{18}F]**2a** was prepared and isolated as described above and reacted with (*t*Bu)₂Glu-CO-Lys(*t*Bu) (10 μmol) in 500 μL MeCN for 15 min at 60 $^{\circ}\text{C}$, which afforded [^{18}F]**3j** in almost quantitative RCY, as determined by radio-HPLC. Deprotection was achieved without isolation of the *Boc*-protected intermediate [^{18}F]**3j** by simply adding an equivalent volume of *conc.* hydrochloric acid (HCl) and heating for an additional 15 min at 60 $^{\circ}\text{C}$.



Scheme 8: 2-Step radiosynthesis of [^{18}F]**JK-PSMA15** by amination, followed by acidic deprotection.

[^{18}F]**JK-PSMA15** was isolated by semi-preparative HPLC (Figure 4) and the collected fraction was trapped on a SPE cartridge. After elution with 750 μL MeOH and evaporation of the solvent *in vacuo*, [^{18}F]**JK-PSMA15** was obtained in 14-18% ($n = 5$) activity yields (based on ^{18}F activity at start of synthesis) with a synthesis times of 70-90 min. The molar activity, based on a radiosynthesis of [^{18}F]**JK-PSMA15** with 2.28 GBq starting activity (activity yield = 16%, 365 MBq), determined 120 min after “end of bombardment” (EOB), was 99 GBq/ μmol .

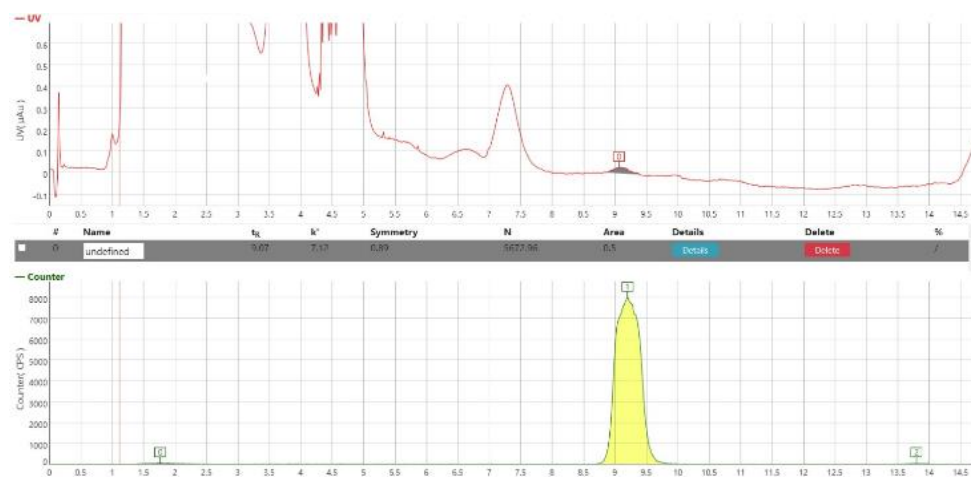
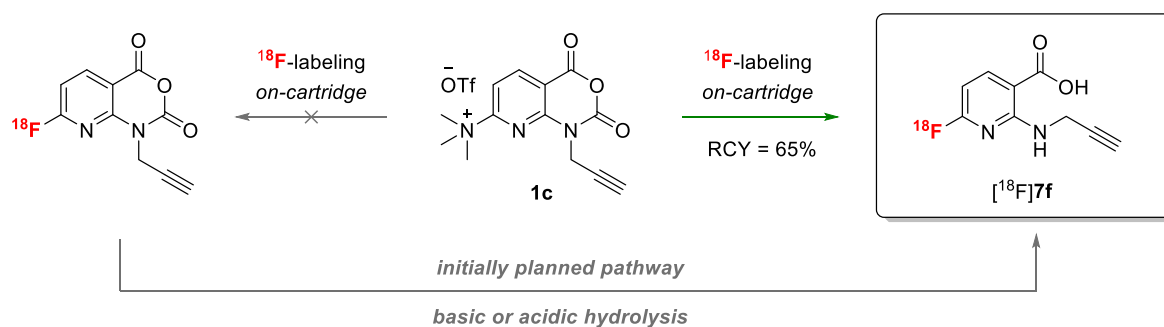


Figure 4: Isolation of [^{18}F]JK-PSMA15 by preparative HPLC. The fraction, indicated by the yellow area, was collected.

Prosthetic group for CuAAC

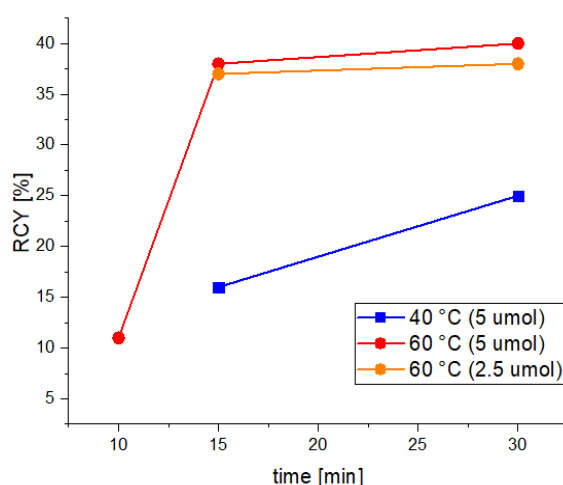
We initially planned to use the *N*-propargyl substituted azaisatoic anhydride precursor **1c** as a means to expand the scope of our new prosthetic groups to the field of “Click”-chemistry, which was envisioned to provide access to nicotinic acid [^{18}F]**7f**, after an additional hydrolysis step in order to maintain the hydrophilic characteristics of the nicotinic acid. To our surprise, [^{18}F]**7f** was already obtained as the only observed radioproduct immediately after on-cartridge labelling of **1c** ($n > 10$).



Scheme 9: Nicotinic acid [^{18}F]**7f** is obtained from azaisatoic anhydride **1c**, straight upon the *on-cartridge* labeling.

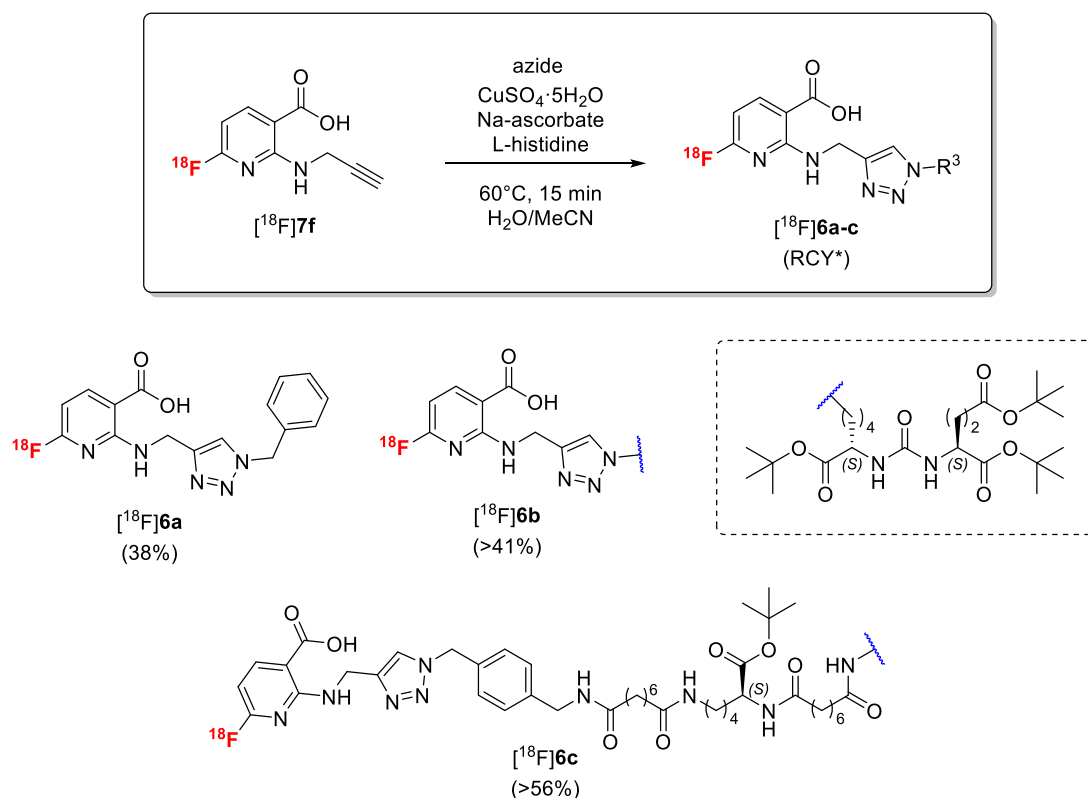
For the radiosynthesis of [^{18}F]**7f**, the on-cartridge protocol for the preparation of **2a-b** (see 3.2.1) could be adapted without further modifications, which afforded the desired product [^{18}F]**7f** in comparable radiochemical yields of $65 \pm 5\%$ ($n = 10$). *N,N,N*-Trimethylammonium triflate precursor **1c** was radiolabeled on-cartridge (PS-HCO_3^-) as already described for [^{18}F]**2a-b**. Fluorine-18 was retained on the anion-exchange-cartridge, washed with dry acetonitrile (4 mL) and eluted with a solution of **1c** (15 mg) in 1 mL MeCN/tBuOH (1:4). ^{18}F -incorporation took place readily on the cartridge in radiochemical yields of 60-70% (n.d.c.) after isolation by SPE (Oasis HLB Plus Short). To test the conjugation efficiency of the labeled PG, we performed the “Click” reaction under the reaction

conditions described by Krapf et al.²⁶. To this end, [^{18}F]**7f** in a solution ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$) of CuSO_4 (5 μmol), L-histidine (12.5 μmol) and sodium ascorbate (25 μmol) was reacted with benzylazide (2.5-5.0 μmol) for 10-30 min at 40-60 °C. We found, that reaction volume and the content of organic solvent are crucial factors for the reaction to succeed, as the conjugation yields were most ideal and consistent when the content of MeCN did not exceed 33% of the aqueous reaction volume of 125-400 μL . Reduction of the azide amount to 2.5 μmol had not a significant impact on the RCYs, while reduction of the conjugation temperature decreased the yield to 16%. The reactions were completed within 15 min at 60 °C or within 30 min at 40 °C (Scheme 10). Product identity was confirmed by HPLC-coinjection of the nonradioactive reference compounds.



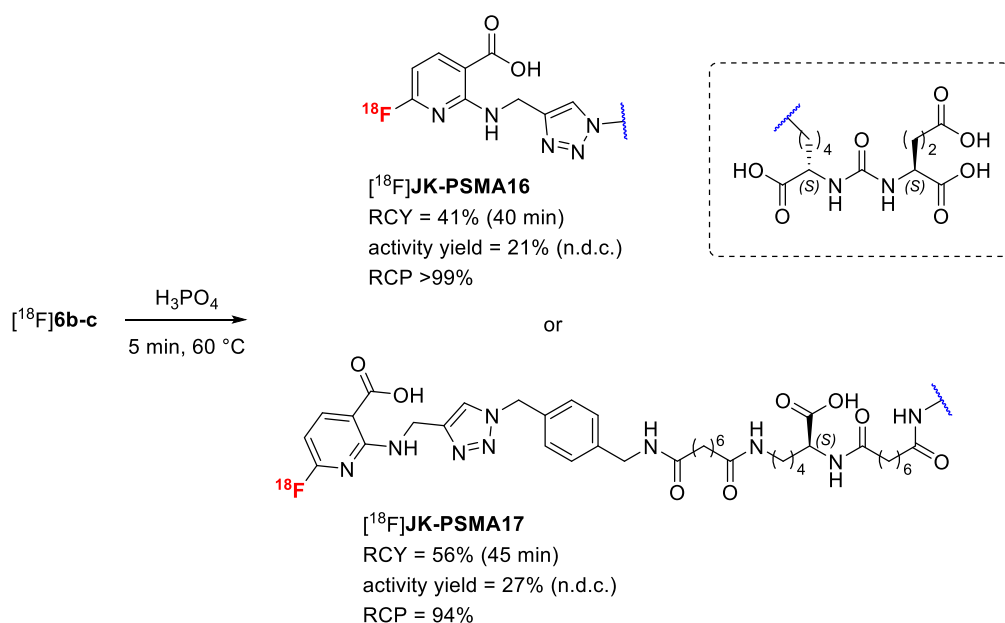
Scheme 10: “Click”-reaction of [^{18}F]**7f** with benzylazide under variation of reaction conditions.

“Click”-reactions with *t*-Bu-protected PSMA binding moieties based on *t*Bu-protected Glu-ureido-Lys (*t*Bu)₂Glu-CO-Lys(*t*Bu)N₃ were performed under the preliminary optimized reaction conditions (60 °C, 15 min, 5 μmol azide). Unfortunately, the resulting radio-HPLC traces were not consistent, as they showed only minor traces of conjugation products [^{18}F]**6b-c**, but already significant amounts of the deprotected products [^{18}F]**JK-PSMA16** & [^{18}F]**JK-PSMA17**, along with various radio products in between, which we contributed to partly deprotected intermediates. Therefore, [^{18}F]**6b-c** were directly deprotected by addition of 85% H_3PO_4 (400 μL) at 60 °C for 5 min. Again, the radio-HPLC traces of the crude reaction mixtures did not allow for reasonable quantification, as they showed mainly broadened, not distinct signals possibly due to complexation by ionic copper species. Therefore, it was necessary to isolate the radio-products from the crude reaction mixture using SPE (Oasis HLB Plus Short), which trapped (70-90%) of the activity. For reasonable quantification of the RCYs, the eluted fractions were concentrated and [^{18}F]**JK-PSMA16** or [^{18}F]**JK-PSMA17** respectively, were isolated as aliquots using analytical HPLC (20 μL loop overfilled by 100 μL injection, >2 MBq/20 μL).



Scheme 11: Copper(I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition (CuAAC) of $[^{18}\text{F}]\mathbf{7f}$ with various azides. Reaction conditions: $[^{18}\text{F}]\mathbf{7f}$ in MeCN (25 μL), 25 μL aq. 0.2 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, L-histidine (2 mg, 13 μmol) in H_2O (25 μL), 25 μL aq. sodium ascorbate (5 mg, 25 μmol) in H_2O , 5 μmol of the respective azide in 25 μL MeCN ($[^{18}\text{F}]\mathbf{6a}$) or in 100 μL 1:1 MeCN/ H_2O ($[^{18}\text{F}]\mathbf{6b-c}$), 60°C , 15 min. *Analytical yields for $[^{18}\text{F}]\mathbf{6b-c}$ could not be quantified and are therefore based on the isolated yields after deprotection (see text).

The isolated activity yields, based on $[^{18}\text{F}]\mathbf{7f}$, were determined to 21% for $[^{18}\text{F}]\mathbf{JK-PSMA16}$ or 27% for $[^{18}\text{F}]\mathbf{JK-PSMA17}$ respectively. In principle, there is no need for protecting groups within “click”-reactions and the radiosynthesis of $[^{18}\text{F}]\mathbf{JK-PSMA16}$ & $[^{18}\text{F}]\mathbf{JK-PSMA17}$ should work as well or even better than the two step synthesis. Anyway, this was not assayed within the scope of these preliminary trials.



Scheme 12: Deprotection of [¹⁸F]6b-c with 6 M HCl for 15 min at 60 °C afforded the novel PSMA tracers [¹⁸F]JK-PSMA16 & [¹⁸F]JK-PSMA17.

in vivo evaluation of [¹⁸F]JK-PSMA15

Stability towards *in vivo* defluorination, as well as the signal-to-background ratio of the novel PSMA-targeting radioligand [¹⁸F]JK-PSMA15 was determined by small-animal PET imaging in healthy rats, using the PSMA-positive spinal ganglia as surrogates for small PSMA expressing lesions. The biodistribution of [¹⁸F]JK-PSMA15 (Figure 5) was comparable to that of the established tracer [¹⁸F]JK-PSMA7 (Zlatopolskiy et al, 2019). In the summed image of 60-120 min post-injection, mean uptake values (SUV_{bw}±SD) were 46.1 ± 8.7 in the superior cervical ganglion (SCG), 13.1 ± 1.1 in the salivary gland, and 140.3 ± 18.8 in the liver. For the SCG, signal-to-background ratio increased with time from 4.7 ± 0.5 (0-30 min) to 7.6 ± 1.7 (30-60 min), 10.3 ± 3.0 (60-90 min) and finally 14.0 ± 4.4 (90-120 min). Edge contrast was 0.073 ± 0.032 %ID/g/mm, and resolution with respect to the first pair of cervical dorsal root ganglia (DRGs) was 1.03 ± 0.05 (dimensionless). The PSMA inhibitor 2-PMPA abolished all binding of [¹⁸F]JK-PSMA15, except in the liver (Figure 5). Compared with the established tracers [¹⁸F]JK-PSMA7 and [¹⁸F]DCFPyL, [¹⁸F]JK-PSMA15 demonstrated a higher accumulation in SCG and comparable accumulation in the salivary gland. The DRG were clearly visible and there was no evidence for significant defluorination, since bone uptake was negligible (see Figure 5 and reference²⁷ for comparison with other [¹⁸F]PSMA ligands).

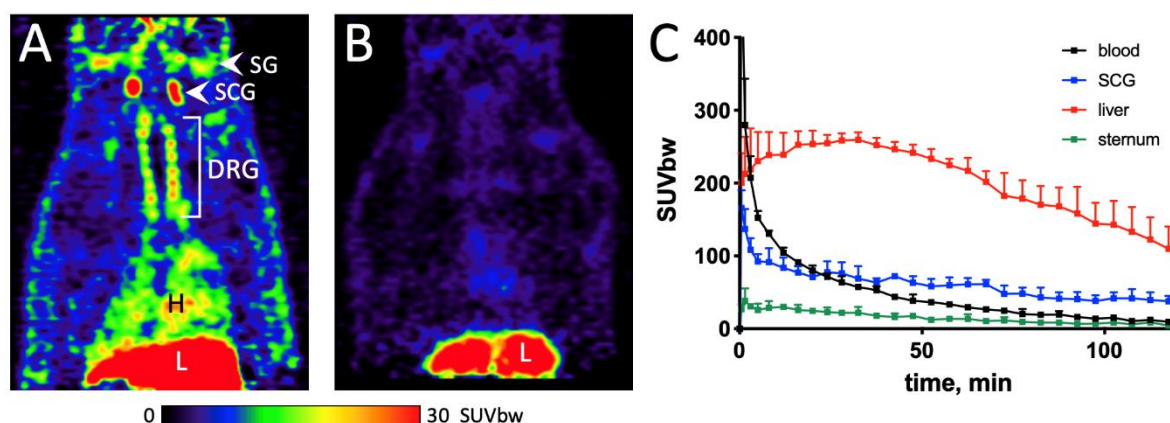


Figure 5: Biodistribution of [^{18}F]JK-PSMA15 in healthy rats. (A): Horizontal view of a rat's neck and thorax; summed image of 60-120 min post injection. (B): Blocking experiment with [^{18}F]JK-PSMA15 + 2-PMPA (23 mg/kg). (C): Time activity curves. Tracer uptake (SUV_{BW}) in different tissues 60 – 120 minutes after injection. Abbreviations: DRG: cervical dorsal root ganglia; H: heart; L: liver; SCG: superior cervical ganglion; SG: salivary gland.

Conclusion

To our knowledge, this is the first time that azaisatoic anhydrides have been employed as easily accessible radiofluorinated building blocks that enable efficient and fast production of metabolically stable, ^{18}F -labeled conjugates. The azaisatoic anhydride building blocks [^{18}F]2a-b & [^{18}F]7f were labelled and isolated *on-cartridge* within 15 min (RCY = 60-70%). A series of amines were conjugated with the amine-reactive azaisatoic anhydrides [^{18}F]2a-b, providing excellent yields (RCY = 86-98%) for unhindered amines and moderate to good yields (RCY = 14-64%) for hindered or secondary amines. Their convenience was demonstrated by radiosynthesis of the new PSMA specific tracer [^{18}F]JK-PSMA15, which showed promising first results in the *in vivo* PET studies for the detection of small PSMA positive lesions. Additionally, the novel PSMA targeting tracers [^{18}F]JK-PSMA16-17 were synthesized by copper-mediated azide-alkyne cycloaddition using the novel nicotinic acid building block [^{18}F]7a.

Experimental Section

Experimental Details are provided in the supporting information.

Acknowledgements

The authors would like to thank Melanie Brugger, Dr. Dirk Bier and Dr. Marcus Holschbach (all INM-5), and Dr. Sabine Willbold (Zentralinstitut für Engineering, Elektronik und Analytik, ZEA-3), all Forschungszentrum Jülich, for recording the spectroscopic data and conducting the biological studies.

References

1. Ametamey, S. M.; Honer, M.; Schubiger, P. A., Molecular Imaging with PET. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (5), 1501-1516.
2. Ghosh, A.; Heston, W. D. W., Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* **2004**, *91* (3), 528-539.
3. Endepols, H.; Morgenroth, A.; Zlatopolskiy, B. D.; Krapf, P.; Zischler, J.; Richarz, R.; Muñoz Vázquez, S.; Neumaier, B.; Mottaghy, F. M., Peripheral ganglia in healthy rats as target structures for the evaluation of PSMA imaging agents. *BMC Cancer* **2019**, *19* (1), 633.
4. Van Der Sar, E. C. A.; Van Kalmthout, L. M.; Lam, M. G. E. H., PSMA PET/CT in primary prostate cancer diagnostics: an overview of the literature. *Tijdschrift voor Urologie* **2020**, *10* (6-7), 101-108.
5. Donswijk, M. L.; van Leeuwen, P. J.; Vegt, E.; Cheung, Z.; Heijmink, S. W. T. P. J.; van der Poel, H. G.; Stokkel, M. P. M., Clinical impact of PSMA PET/CT in primary prostate cancer compared to conventional nodal and distant staging: a retrospective single center study. *BMC Cancer* **2020**, *20* (1), 723.
6. Afshar-Oromieh, A.; Zechmann, C. M.; Malcher, A.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Linhart, H. G.; Holland-Letz, T.; Hadaschik, B. A.; Giesel, F. L.; Debus, J.; Haberkorn, U., Comparison of PET imaging with a ⁶⁸Ga-labelled PSMA ligand and ¹⁸F-choline-based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2014**, *41* (1), 11-20.
7. Malik, N.; Machulla, H.-J.; Solbach, C.; Winter, G.; Reske, S. N.; Zlatopolskiy, B., Radiosynthesis of a new PSMA targeting ligand ([¹⁸F]FPy-DUPA-Pep). *Applied Radiation and Isotopes* **2011**, *69* (7), 1014-1018.
8. Afshar-Oromieh, A.; Haberkorn, U.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Zechmann, C. M., [⁶⁸Ga]Gallium-labelled PSMA ligand as superior PET tracer for the diagnosis of prostate cancer: comparison with ¹⁸F-FECH. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2012**, *39* (6), 1085-1086.
9. Jacobson, O.; Kiesewetter, D. O.; Chen, X., Fluorine-18 radiochemistry, labeling strategies and synthetic routes. *Bioconjug Chem* **2015**, *26* (1), 1-18.
10. Ametamey, S. M.; Honer, M.; Schubiger, P. A., Molecular imaging with PET. *Chem Rev* **2008**, *108* (5), 1501-16.

11. Jacobson, O.; Kiesewetter, D. O.; Chen, X., Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjugate Chemistry* **2015**, 26 (1), 1-18.
12. Van Der Born, D.; Pees, A.; Poot, A. J.; Orru, R. V. A.; Windhorst, A. D.; Vugts, D. J., Fluorine-18 labelled building blocks for PET tracer synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46 (15), 4709-4773.
13. Krishnan, H. S.; Ma, L.; Vasdev, N.; Liang, S. H., (18) F-Labeling of Sensitive Biomolecules for Positron Emission Tomography. *Chemistry* **2017**, 23 (62), 15553-15577.
14. Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R., Synthesis of N-succinimidyl 4-[18F]fluorobenzoate, an agent for labeling proteins and peptides with 18F. *Nat Protoc* **2006**, 1 (4), 1655-61.
15. Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R., Fluorine-18-labeled [Nle4,d-Phe7]- α -MSH, an α -melanocyte stimulating hormone analogue. *Nuclear Medicine and Biology* **1997**, 24 (2), 171-178.
16. Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R., Fluorine-18 labeled chemotactic peptides: a potential approach for the PET imaging of bacterial infection. *Nucl Med Biol* **1995**, 22 (6), 759-64.
17. Vaidyanathan, G.; Bigner, D. D.; Zalutsky, M. R., Fluorine-18-labeled monoclonal antibody fragments: a potential approach for combining radioimmunoscinigraphy and positron emission tomography. *J Nucl Med* **1992**, 33 (8), 1535-41.
18. Vaidyanathan, G.; Bigner, D. D.; Zalutsky, M. R., Fluorine-18-Labeled Monoclonal Antibody Fragments: A Potential Approach for Combining Radioimmunoscinigraphy and Positron Emission Tomography. *Journal of Nuclear Medicine* **1992**, 33 (8), 1535-1541.
19. Krishnan, H. S.; Ma, L.; Vasdev, N.; Liang, S. H., 18F-Labeling of Sensitive Biomolecules for Positron Emission Tomography. *Chemistry - A European Journal* **2017**, 23 (62), 15553-15577.
20. Ackermann, U.; Yeoh, S. D.; Sachinidis, J. I.; Poniger, S. S.; Scott, A. M.; Tochon-Danguy, H. J., A simplified protocol for the automated production of succinimidyl 4-[18F]fluorobenzoate on an IBA Synthera module. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2011**, 54 (10), 671-673.
21. Coppola, G. M., The Chemistry of Isatoic Anhydride. *Synthesis* **1980**, 1980 (07), 505-536.
22. Richarz, R.; Krapf, P.; Zarrad, F.; Urusova, E. A.; Neumaier, B.; Zlatopolskiy, B. D., Neither azeotropic drying, nor base nor other additives: a minimalist approach to 18F-labeling. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, 12 (40), 8094-8099.

23. Basuli, F.; Zhang, X.; Jagoda, E. M.; Choyke, P. L.; Swenson, R. E., Rapid synthesis of maleimide functionalized fluorine-18 labeled prosthetic group using "radio-fluorination on the Sep-Pak" method. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* **2018**, 61 (8), 599-605.
24. Hall, H. K., Correlation of the Base Strengths of Amines¹. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, 79 (20), 5441-5444.
25. Oregioni, A.; Stieglitz, B.; Kelly, G.; Rittinger, K.; Frenkiel, T., Determination of the pKa of the N-terminal amino group of ubiquitin by NMR. *Scientific Reports* **2017**, 7 (1), 43748.
26. Krapf, P.; Richarz, R.; Urusova, E. A.; Neumaier, B.; Zlatopolskiy, B. D., Seyferth-Gilbert Homologation as a Route to ¹⁸F-Labeled Building Blocks: Preparation of Radiofluorinated Phenylacetylenes and Their Application in PET Chemistry. *European Journal of Organic Chemistry* **2016**, 2016 (3), 430-433.
27. Zlatopolskiy, B. D.; Endepols, H.; Krapf, P.; Guliyev, M.; Urusova, E. A.; Richarz, R.; Hohberg, M.; Dietlein, M.; Drzezga, A.; Neumaier, B., Discovery of (18)F-JK-PSMA-7, a PET Probe for the Detection of Small PSMA-Positive Lesions. *J Nucl Med* **2019**, 60 (6), 817-823.

Supporting Information

Fast indirect ^{18}F -labeling via new prosthetic groups - Radiosynthesis and in vivo PET studies of the new PSMA specific Tracer [^{18}F]JK-PSMA15

Michael Willmann^a, Benedikt Gröner^a, Lisa Donnerstag, Elizaveta A. Urusova, Heike Endepols, Johannes Ermert, Bernd Neumaier, Boris Zlatopolskiy*

^a Forschungszentrum Jülich GmbH, Institute of Neuroscience and Medicine, Nuclear Chemistry (INM-5), Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich, Germany

^b Institut für Radiochemie und Experimentelle Molekulare Bildgebung (IREMB), Uniklinik Köln, D-50937 Köln, Germany

* Corresponding author: boris.zlatopolskiy@uk-koeln.de

1.1	Materials	118
1.2	Synthesis of precursor and reference compounds	118
1.3	Radiochemistry	124
1.4	HPLC Analysis	126
1.5	Determination of carrier content	126
1.6	Experimental animals	127
1.7	<i>in vivo</i> PET experiments	127
1.8	NMR-spectra	128

2.3.1.1 Materials

All chemicals and solvents were purchased from Aldrich (Germany), Fluka (Switzerland), Fluorochem (United Kingdom) or Merck (Germany) and used without further purification. Thin layer chromatography (TLC) was performed on pre-coated silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany) plates and the compounds were detected at 254 nm. All reactions sensitive to moisture were carried out under argon atmosphere in reaction flasks dried overnight at 140 °C prior to use. All reaction mixtures were magnetically stirred. Organic extracts were dried with anhydrous MgSO₄. ¹H, ¹³C, and ¹⁹F NMR spectra were recorded at 400.13, 100.61, and 376.49 MHz, respectively, on a Bruker Avance Neo 400 instrument (Bruker Bio Spin GmbH, Rheinstetten, Germany) in 5 % solution at 25 °C. Chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm) relative to trace amounts of the residual solvent signals. High-resolution mass spectrometry (HRMS) analyses were performed using a hybrid linear ion trap FTICR mass spectrometer LTQ -FT (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a 7 T superconducting magnet by infusion. The mass spectrometer was first tuned and calibrated in the positive mode following the standard optimization procedure for all voltages and settings. Mass spectra were recorded in full scan from 200 to 1000 Da with a resolution of 100.000 at m/z 400. All data were processed using the Xalibur software.

2.3.1.2 Synthesis of precursor and reference compounds

2.3.1.2.1 Reference compounds

General procedure for amine-conjugated compounds (**3a-k**)

To **2** was added the respective amine (1 eq.) in 500 µL MeCN. The mixture was stirred at 60 °C for 30 min in MeCN. Amides (**3a-k**) were isolated using flash column chromatography (silica: DCM/MeOH).

“Click”-reactions were performed based on a previously published procedure.²⁰⁹

2-(((1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)-6-fluoronicotinic acid (**6a**)

7f (423 mg, 2.18 mmol) and **LD-28** (290 mg, 2.18 mmol) were dissolved in MeOH (3 mL) and H₂O (1 mL). Sodium ascorbate (310 mg, 1.55 mmol) was added and the flask briefly sonicated. A solution of CuSO₄·5H₂O (110 mg, 0.44 mmol) in H₂O (0.5 mL) was added, inducing a color change to yellow-green. The reaction was briefly sonicated again and kept in a water bath at room temperature. After 2 h, the MeOH was concentrated under reduced pressure to approx. 5 mL and the remaining oil was diluted with saturated EDTA solution and passed through a preconditioned C18 SPE cartridge (Sep-Pak C18 Plus Short). The cartridge was washed with water (10 mL) and the product was eluted with MeCN.

Recrystallization from acetone gave the target compound as colorless crystals (524 mg, 74%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.6 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.1 (td, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 7.7 – 7.5 (m, 1H), 7.4 – 7.1 (m, 5H), 6.2 – 5.9 (m, 1H), 5.4 (s, 2H), 4.6 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 167.7, 164.2 (d, *J* = 242.7 Hz), 157.5 (d, *J* = 19.6 Hz), 145.0 (d, *J* = 10.5 Hz), 144.6, 134.3, 128.1, 127.6, 127.1, 121.6, 103.4 (d, *J* = 4.4 Hz), 94.3 (d, *J* = 38.1 Hz), 52.9, 35.6 ppm. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -60.8 ppm. MS(ESI+): *m/z* (%int.) calcd. for C₁₆H₁₄FN₅O₂⁺: 328.12, found: 328.25 [M+H⁺] (74).

2-(((1-(6-(Tert-butoxy)-5-(3-(1,5-di-tert-butoxy-1,5-dioxopentan-2-yl)ureido)-6-oxohexyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)-6-fluoronicotinic acid (**6b**)

7f (25.0 mg, 129 μmol) was reacted with di-*tert*-butyl ((6-azido-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl)carbamoyl)glutamate (66 mg, 129 μmol) as described for **6a** to yield 69 mg (87%) of a colourless solid.

6-Fluoro-2-(((1-(4-(16,31,35-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-40,40-dimethyl-3,10,18,25,33,38-hexaoxo-39-oxa-2,11,17,26,32,34-hexaazahentetracontyl)benzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)nicotinic acid (**6c**)

7f (25.0 mg, 129 μmol) was reacted with 1-(4-(azidomethyl)phenyl)-3,10,18,25,33-pentaoxo-2,11,17,26,32,34-hexaazaheptatriacontane-16,31,35,37-tetracarboxylate (145 mg, 129 μmol) as described for **6a** to yield 124 mg (73%) of a colourless solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.99 (s, 1H), 8.25 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.20 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.07 – 7.94 (m, 2H), 7.73 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.31 (dd, *J* = 14.5, 8.3 Hz, 2H), 6.24 (dd, *J* = 7.6, 1.9 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 4.59 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 4.21 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 4.03 (td, *J* = 8.3, 5.0 Hz, 2H), 3.95 (td, *J* = 7.9, 5.4 Hz, 1H), 2.99 (q, *J* = 6.7 Hz, 4H), 2.29 – 2.15 (m, 2H), 2.15 – 2.05 (m, 6H), 2.01 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H), 1.93 – 1.78 (m, 1H), 1.73 – 1.53 (m, 2H), 1.53 – 1.41 (m, 9H), 1.41 – 1.30 (m, 33H), 1.29 – 1.17 (m, 12H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 172.8, 172.7, 172.5, 172.4, 172.0, 171.9, 171.7, 167.7, 166.4, 163.5, 160.2, 160.0, 157.6, 139.6, 135.0, 128.0, 101.6, 101.5, 81.1, 80.7, 80.7, 80.2, 53.5, 53.0, 52.9, 52.6, 42.1, 38.7, 38.6, 36.9, 36.6, 35.9, 35.8, 35.4, 31.3, 29.3, 29.2, 28.9, 28.8, 23.2, 23.0 ppm. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -61.4 ppm.

((1-carboxy-5-(4-(((3-carboxy-6-fluoropyridin-2-yl)amino)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl)carbamoyl)glutamic acid (**JK-PSMA16**)

6b was treated with 1 mL TFA containing 5% H₂O for 3 h at ambient temperature. TFA was removed in vacuo and another 1 mL TFA was added. This was concentrated slowly over the course of 1 h on the rotary evaporator. The residue was solved in a small amount of MeOH and precipitated with Et₂O. This

was sonicated before the colorless solid was filtered to yield 5 mg (20%) of a colorless compound. MS(ESI⁻): m/z (%int.) calcd. for C₂₁H₂₅FN₇O₉⁻: 538.17, found: 538.26 [M-H]⁻ (35). MS(ESI⁺): m/z (%int.) calcd. for C₂₁H₂₇FN₇O₉⁺: 540.18, found: 540.31 [M+H]⁺ (100).

1-(4-((4-(((3-carboxy-6-fluoropyridin-2-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)phenyl)-3,10,18,25,33-pentaoxo-2,11,17,26,32,34-hexaazaheptatriacontane-16,31,35,37-tetracarboxylic acid (**JK-PSMA17**)

6c (124 mg, 93.8 μmol) was dissolved in 1 mL TFA containing 3 vol% H₂O and heated for 2 h at 60 °C. The reaction mixture was diluted in 50 mL 0.5 M aq. NaHCO₃ and passed through a preconditioned C18 SPE (Sep-Pak C18 Plus Short) cartridge. The cartridge was washed with water (15 mL) and the product was eluted with MeCN. Removal of the solvent under reduced pressure gave 80 mg (78%) of the product. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.70 (s, 1H), 8.34 – 8.12 (m, 2H), 8.09 – 7.87 (m, 2H), 7.84 – 7.63 (m, 2H), 7.37 – 7.10 (m, 4H), 6.28 (dd, *J* = 8.3, 2.5 Hz, 2H), 5.52 (s, 2H), 4.62 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 4.21 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.18 – 3.91 (m, 3H), 2.99 (d, *J* = 5.8 Hz, 4H), 2.24 (q, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.08 (s, 9H), 2.02 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H), 1.93 (s, 1H), 1.79 – 1.59 (m, 3H), 1.58 – 1.41 (m, 10H), 1.37 (s, 4H), 1.24 (d, *J* = 17.7 Hz, 13H) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 174.6, 174.2, 173.9, 173.8, 172.4 (s), 172.2 (s), 172.0 (s), 172.0, 167.9, 165.8, 163.4, 158.0, 157.8, 157.3, 146.2, 146.1, 143.9, 143.8, 139.8, 134.5, 128.2 (d), 128.0, 127.6, 110.0, 110.0, 104.1, 104.1, 95.3, 94.9, 52.6 (t), 52.4, 52.3, 51.7, 41.7, 38.3, 38.2 (t), 36.1, 35.4 (t), 35.3 (t), 35.1 (t), 31.8, 30.7, 29.9, 28.9 (t), 28.8, 28.5, 28.5 (t), 28.4, 27.6 (t), 25.3, 25.2, 22.9, 22.7 (t), 17.9, 12.1 ppm. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -60.9 ppm. MS(ESI): m/z (%int.) calcd. for C₅₁H₇₄FN₁₁O₁₅²⁺: 549.77, found: 549.97 [M+2H]²⁺ (100).

2.3.1.2.2 General procedure (**7a-f**):

Exemplary procedures are provided for **7a** & **7f**. 2,6-Difluoronicotinic acid was used as starting material for **7d-f**.

6-Chloro-2-(methylamino)nicotinic acid (**7a**)

2,6-Dichloronicotinic acid (3.99 g, 20.8 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in 5 mL of anhydrous THF and methylamine (22.7 mL 33-wt% in ethanol, 553 mmol, 27.0 eq.) was added under argon. The mixture was allowed to react at 80 °C for 3 days. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was dissolved in 40 mL MeOH and 160 mL EtOAc and washed with 1 M HCl (4 x 50 mL) and brine (100 mL). The organic layer was dried (Na₂SO₄) and concentrated *in vacuo* to obtain 3.25 g (84 %) of pure product

as a colourless solid. ^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ 2.91 (s, 3H), 6.57 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.0 Hz, 1H) ppm. ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 27.8, 106.0, 109.7, 142.8, 153.0, 158.8, 168.3 ppm.

6-Chloro-2-(ethylamino)nicotinic acid (**7b**)

Yield: 2.85 g (68 %) of pure product as a colourless solid. ^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.16 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 6.59 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 8.0 Hz, 1H) ppm. ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 15.0, 35.7, 105.3, 110.4, 143.5, 153.9, 158.5, 168.7 ppm.

6-Chloro-2-(prop-2-yn-1-ylamino)nicotinic acid (**7c**)

Purified by flash column chromatography (silica: DCM/MeOH) Yield: 6.41 g (67 %) of pure product as a colourless solid. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 11.80 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.94 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.43 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.16 (dd, J = 5.2, 2.2 Hz, 2H), 2.23 – 1.94 (m, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 168.71, 157.51, 154.12, 142.59, 111.19, 105.53, 80.39, 70.81, 30.34. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_9\text{H}_8\text{ClN}_2\text{O}_2^+$: 211.03; found: 211.21.

6-Fluoro-2-(methylamino)nicotinic acid (**7d**)

Yield: 2.01 g (46 %) of pure product as a colourless solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 2.90 (d, J = 4.4 Hz, 3H), 6.21 (dd, J = 8.3 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 8.4 Hz, 1H) ppm. ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 28.2, 94.5, 104.4, 146.3, 159.4, 165.2, 168.4 ppm. ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -61.00 ppm.

6-Fluoro-2-(ethylamino)nicotinic acid (**7e**)

Yield 2.70 g (47 %) of pure product as a colourless solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 1.16 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 3.39 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 6.21 (dd, J = 8.3, 2.8 Hz, 1H), 8.19 (t, J = 8.5 Hz, 1H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 15.0, 35.7, 94.7, 104.1, 146.0. ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -60.92 ppm.

6-Fluoro-2-(prop-2-yn-1-ylamino)nicotinic acid (**7f**)

2,6-Difluoronicotinic acid (2.41 g, 15.1 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in 5 mL of anhydrous THF and propargylamine (5.00 g, 90.8 mmol, 6 eq.) was added under argon. The mixture was allowed to react at 75 °C (propargylamine: b.p. 85 °C) for 3 days, during which the inert atmosphere was maintained with an argon-filled balloon. The solvent was removed *in vacuo*, the residue was taken up in 1 M HCl (100 mL) and extracted with DCM (4 x 100 mL). The combined organic extracts were washed with 1 M HCl (100 mL) and brine (100 mL), dried (Na_2SO_4) and concentrated *in vacuo* to obtain the crude product, which was purified by flash column chromatography (silica: DCM/MeOH) to afford 2.28 g (78 %) of the pure product as a colourless solid. ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN) δ 8.28 (dd, J = 25.0, 16.7 Hz, 2H), 6.24 (dd, J = 8.4, 2.7 Hz, 1H), 4.20 (dd, J = 5.7, 2.5 Hz, 2H), 2.44 (t, J = 2.5 Hz, 1H) ppm. ^{13}C NMR

(101 MHz, CD₃CN) δ 168.4, 166.3 (d, J = 242.1 Hz), 159.2 (d, J = 19.4 Hz), 147.2 (d, J = 10.8 Hz), 104.6 (d, J = 3.9 Hz), 96.7 (d, J = 38.5 Hz), 71.6, 31.0 ppm. ¹⁹F NMR (376 MHz, CD₃CN) δ -61.99 (s) ppm. MS(ESI): m/z (%int.) calcd. for C₉H₈FN₂O₂⁺: 195.06, found: 195.25 [M+H⁺] (100).

2.3.1.2.3 General procedure (**2a-e**):

7-Chloro-1-methyl-2*H*-pyrido[2,3-*d*][1,3]oxazine-2,4(1*H*)-dione (**2a**)

6-Chloro-2-(methyldamino)nicotinic acid (**7a**) (2.10 g, 11.3 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dioxane (30 mL), triphosgene (1.70 g, 5.65 mmol, 0.5 eq.) was added under argon and the mixture was refluxed for 3 days. The solvent was removed *in vacuo* to afford the crude product, which was purified by flash column chromatography (silica: PE/EtOAc) to obtain 1.20 g (51 %) of the pure product as a colourless solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 3.46 (s, 3H), 7.46 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.40 (d, J = 8.1 Hz, 1H) ppm. ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 30.3, 107.2, 119.6, 141.6, 147.5, 152.8, 157.5, 168.0 ppm.

7-Chloro-1-ethyl-2*H*-pyrido[2,3-*d*][1,3]oxazine-2,4(1*H*)-dione (**2b**)

Yield: 1.10 g (82 %) of the pure product as a colourless solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 1.24 (t, J = 7.1, 3H, H-1), 4.11 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.40 (d, J = 8.1 Hz, 1H) ppm. ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 12.6, 39.2, 107.9, 120.1, 142.2, 147.5, 152.6, 155.9, 158.1 ppm.

7-Chloro-1-(prop-2-yn-1-yl)-2*H*-benzo[*d*][1,3]oxazine-2,4(1*H*)-dione (**2c**)

Yield: 0.80 g (40%) of the pure product as a colourless solid. ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 8.4 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.4 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.9 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 2.6 (t, J = 2.5 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 157.1, 155.3, 151.3, 146.8, 141.8, 120.3, 107.6, 77.8, 74.7, 33.0 ppm. MS(ESI): m/z (%int.) calcd. for C₉H₈ClN₂O₂⁺: 211.03, found: 211.21 [M+H⁺] (100).

7-Fluoro-1-methyl-2*H*-pyrido[2,3-*d*][1,3]oxazine-2,4(1*H*)-dione (**2d**)

Yield: 1.00 g (58 %) of the pure product as a colourless solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 3.45 (s, 3H), 7.14 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 8.58 (dd, J = 8.3, 7.7 Hz, 1H) ppm. ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 30.7, 105.4, 106.5, 145.5, 148.2, 153.4, 156.6, 165.9 ppm. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -65.82 ppm.

1-Ethyl-7-fluoro-2*H*-pyrido[2,3-*d*][1,3]oxazine-2,4(1*H*)-dione (**2e**)

Purified by flash column chromatography (silica: PE/EtOAc). Yield: 2.00 g (62 %) of the pure product as a colourless solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 4.08 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 7.13 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 8.57 (t, J = 8.0 Hz, 1H) ppm. ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 12.6, 39.3, 105.4, 106.7, 145.5, 147.7, 152.77, 157.7, 165.9 ppm. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -56.88 ppm.

2.3.1.2.4 General procedure (**1a-c**):

2 M Trimethylamine in THF was dried over night with CaH₂ and filtered (por4 glass frit) before it was transferred to the receiving flask by a cannula under argon atmosphere.

N,N,N,1-Tetramethyl-2,4-dioxo-1,4-dihydro-2*H*-pyrido[2,3-*d*][1,3]oxazin-7-aminium triflate (**1a**)

2a (0.63 g, 2.96 mmol, 1.00 eq.) was treated with 2 M trimethylamine in THF (12.6 mL, 25.2 mmol, 8.51 eq.) under argon and stirred for 1 h. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was suspended in 5 mL DCM, filtered and washed successively with 20 mL of Et₂O and *n*-pentane. Drying *in vacuo* afforded 0.78 g (97%) of the moisture sensitive chloride salt, which was directly converted into the triflate by treatment with TMSOTf (1.10 mL, 6.30 mmol, 2.5 eq.) in DCM (12 mL) for 1 h under stirring at ambient temperature. After removal of the solvent *in vacuo*, the residue was washed successively with Et₂O and EtOAc and dried *in vacuo* to afford the product as a colourless solid in 73% yield, based on the starting material (**2a**). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ 3.56 (s, 3H), 3.66 (s, 9H), 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H) ppm. ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ 30.9, 55.1, 110.6, 110.7, 144.2, 147.9, 152.2, 157.4, 160.0 ppm. ¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO): δ -77.76 ppm.

1-Ethyl-*N,N,N*-trimethyl-2,4-dioxo-1,4-dihydro-2*H*-pyrido[2,3-*d*][1,3]oxazin-7-aminium triflate (**1b**)
Yield: 68% as a colourless solid. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ 1.28 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 3.66 (s, 9H), 4.21 (q, *J* = 7.0, 2H), 7.93 (d, *J* = 8.4, 1H), 8.79 (d, *J* = 8.4, 1H) ppm. ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ 12.6, 39.5, 55.07 (C-10), 110.6, 110.8, 144.2, 147.4, 152.3, 157.4, 160.1 ppm. ¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO): δ -77.76 ppm.

N,N,N-Trimethyl-2,4-dioxo-1-(prop-2-yn-1-yl)-1,4-dihydro-2*H*-pyrido[2,3-*d*][1,3]oxazin-7-aminium triflate (**1c**) The crude product was purified by flash column chromatography (silica: DCM/acetone). Yield: 30% as a colourless crystals. ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 8.7 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.8 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.0 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 3.6 (s, 9H), 2.6 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN) δ 160.6, 157.1, 152.0, 147.6, 145.6, 111.6, 111.5, 77.8, 73.9, 56.2, 34.7 ppm. ¹⁹F NMR (376 MHz, CD₃CN) δ -79.3 ppm.

2.3.1.2.5 Intermediate compounds:

(Azidomethyl)benzene

**Caution! Nucleophilic azides should never be reacted in the presence of dichloromethane (DCM) or chloroform (CHCl₃) due to the risk of highly explosive by-product formation!*

A 100 mL round-bottom flask was charged with water (20 mL), acetone (80 mL) and benzyl bromide (2.00 mL, 17 mmol, 1.0 eq.). Sodium azide (1.64 g, 25.2 mmol, 1.5 eq.) was added in one portion and the solution stirred overnight at ambient temperature. DCM* (50 mL) was added and the organic layer separated. The aqueous layer was extracted with DCM (3×10 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄ and filtered. Removal of the solvent under reduced pressure afforded 2.24 g (>99%) of the pure product as a yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.4 – 7.3 (m, 5H), 4.4 (s, 2H) ppm.

2.3.1.3 Radiochemistry

All radiosyntheses were carried out using anhydrous solvents (Aldrich). Anion exchange resins (PS-HCO₃⁻, 30 mg or 45 mg sorbent) were obtained from Synthra GmbH (22761 Hamburg, Germany) and preconditioned with 1 mL H₂O directly before use. SPE cartridges (Oasis® HLB Plus Short & HLB PRiME Light) were obtained from Waters™ (65760 Eschborn, Germany) and used without preconditioning.

[¹⁸F]Fluoride was produced by the ¹⁸O(p,n)¹⁸F reaction by bombardment of enriched [¹⁸O]water with 16.5 MeV protons using a BC1710 cyclotron (The Japan Steel Works Ltd., Shinagawa, Japan) at the INM-5 (Forschungszentrum Jülich). All radiolabeling experiments were carried out under ambient atmosphere.

Before radiosynthesis, [¹⁸F]fluoride was processed as follows. Aqueous [¹⁸F]fluoride was loaded onto the anion-exchange resin from the male side, whereas flushing, washing and elution were carried out from the female side.

2.3.1.3.1 Synthesis of [¹⁸F]**2a-b** and [¹⁸F]**7f** General procedure (GP1):

[¹⁸F]**2a-b** and [¹⁸F]**7f** were prepared as follows. Fluorine-18 was trapped on an anion-exchange-cartridge (PS-HCO₃⁻, 30 mg sorbent), washed with dry acetonitrile (4 mL) and slowly eluted (0.5 mL/min) with a solution of the respective *N,N,N*-trimethylammonium triflate precursor (12 mg, **1a-b** or 15 mg **4**) in 1 mL MeCN/*t*BuOH (1:4) and flushed with 1 mL MeCN into the same vial, containing 30 mL water. The water was passed through a SPE cartridge (Oasis® HLB Plus Short) and the cartridge

was washed with 5 mL of 5% acetone in water, briefly dried in a stream of argon (1 min) and the labeled product was eluted with 1.5 mL MeCN.

Alternatively, the eluent was directly loaded onto a short silica column (0.5x2.5 cm, 1 g silica), eluted with 1 mL MeCN, diluted in 15 mL water and loaded on a HLB PRiME Light. The labeled product was then eluted with 500 μ L of MeCN.

2.3.1.3.2 Synthesis of [18 F]**3a-k** by amine-conjugation - General procedure (GP2):

To [18 F]**2** in 450 μ L MeCN was added the respective amine (10 μ mol) in MeCN (50 μ L). The mixture was stirred at 40-110 $^{\circ}$ C for 10-20 min in MeCN or DMF as indicated (see Scheme 7).

2.3.1.3.3 Synthesis of [18 F]**JK-PSMA15**:

[18 F]**JK-PSMA15** was synthesized by direct elution of [18 F]fluoride (6.9 GBq) previously loaded onto an anion exchange resin (PS-HCO₃-45 mg) with a solution of the radiolabeling precursor **1a** (12 mg) in 1 mL MeCN/*t*BuOH (1:4) into a vial, followed by flushing the cartridge with 1 mL MeCN. The solution was diluted with water (35 mL) and passed through a SPE cartridge (Oasis[®] HLB Plus Short). The cartridge was washed with 6 mL of 5% acetone in water and briefly dried in a stream of argon. [18 F]**2a** was eluted from the cartridge with 1.5 mL MeCN. The solvent was removed under reduced pressure at 100 $^{\circ}$ C before (*t*Bu)₂Glu-CO-Lys(*t*Bu) (10 μ mol) in 500 μ L MeCN was added. The vial was equipped with a septum cap and heated under stirring at 60 $^{\circ}$ C for 15 min. Then, 500 μ L of conc. HCl was added and the mixture was stirred for another 15 min at 60 $^{\circ}$ C. The resulting solution was purified on a semi-preparative HPLC column (Hydro-RP, 250x10.5 mm; MeCN/H₂O/TFA = 20/80/0.1; 8 mL/min; *t*_R = 8-9 min). The collected fraction was diluted with water to 35 mL, passed through a SPE cartridge (Oasis[®] HLB Plus Short) and washed with 10 mL water. [18 F]**JK-PSMA15** was eluted into a vial with 1.5 mL MeOH and the solvent was removed under reduced pressure in a stream of argon at 60 $^{\circ}$ C. 450 μ L 0.9% NaCl solution containing 4.5 mg sodium ascorbate were then added to obtain [18 F]**JK-PSMA15** (980 MBq) in the final formulation ready for injection. The isolated radiochemical yield in this exemplary preparation amounted to 14% (n.d.c.) in a total synthesis time of 90 min. The radiochemical purity was at least 97%, with a molar activity of 99 GBq/ μ mol.

2.3.1.3.4 Synthesis of [18 F]**6a-c** under “click” conditions - General procedure (GP3):

To [18 F]**7f** in 50 μ L H₂O or MeCN was added (in this order) 50 μ L of 0.2 M aq. CuSO₄, L-histidine (3.9 mg, 25 μ mol) in H₂O (50 μ L), sodium ascorbate (9.8 mg, 50 μ mol) in H₂O (50 μ L) and finally the respective azide (10 μ mol) in H₂O or MeCN (50 μ L). If necessary, the reaction volume was adjusted to 400 μ L by addition of H₂O (200 μ L). The mixture was stirred at 60 $^{\circ}$ C for 15 min and analysed by HPLC.

2.3.1.3.5 Synthesis of [¹⁸F]JK-PSMA16

85% H₃PO₄ (400 µL) was added and the mixture was stirred for another at 60 °C for 5 min. The resulting solution was isolated by SPE (HLB Plus Short), washed with water (10 mL) and eluted with 1 mL MeOH. [¹⁸F]JK-PSMA16 was then isolated as an aliquot on analytical HPLC.

2.3.1.3.6 Synthesis of [¹⁸F]JK-PSMA17

85% H₃PO₄ (400 µL) was added and the mixture was stirred for another at 60 °C for 5 min. The resulting solution was isolated by SPE (HLB Plus Short), washed with water (10 mL) and eluted with 1 mL MeOH. [¹⁸F]JK-PSMA17 was then isolated as an aliquot on analytical HPLC.

2.3.1.4 HPLC Analysis

For determination of radiochemical yield (RCY), reaction mixtures were diluted 1:1 (v/v) with water to dissolve any [¹⁸F]fluoride adsorbed onto the reaction vessel walls. HPLC analyses were carried out on a Dionex Ultimate® 3000 HPLC system and a DAD UV -detector coupled in series with a Berthold NaI detector. A "Multokrom 100-5", 250×4.6 mm column was used. UV and radioactivity detectors were connected in series, giving a time delay of 0.1–0.2 min depending on the flow rate. ¹⁸F-Labeled compounds were identified by co-injection of the unlabeled reference compounds using HPLC.

2.3.1.5 Determination of carrier content

The amount of non-radioactive carrier was determined from the peak area in UV–HPLC chromatograms using an UV absorbance/concentration calibration curve. To overcome any issues concerning the limit of quantification (LOD), the solutions of radiolabeled products obtained after HPLC purification were allowed to stand at ambient temperature for at least 24 h, concentrated under reduced pressure, and the residues were re-dissolved in the appropriate HPLC eluents (200 µL). 100 µL of the resulting solution was injected into the HPLC system (20 µL loop, equals 10% of total carrier content). The peak area was determined, and the amount of carrier was calculated according to the calibration curve.

2.3.1.6 Experimental animals

Animal experiments were carried out in accordance with the EU directive 2010/63/EU and the German Animal Welfare Act (TierSchG, 2006), and were approved by regional authorities (Ministry for Environment, Agriculture, Conservation and Consumer Protection of the State of North Rhine-Westphalia, license number 84-02.04.2015.A240). Four healthy female Long Evans rats (311–370 g) were used. Rats were housed in groups of 2–3 in individually ventilated cages (NexGen Ecoflo, Allentown Inc., Allentown, NJ, USA) under controlled ambient conditions (22 ± 1 °C and $55 \pm 5\%$ relative humidity). Food and water were available at all times.

2.3.1.7 *in vivo* PET experiments

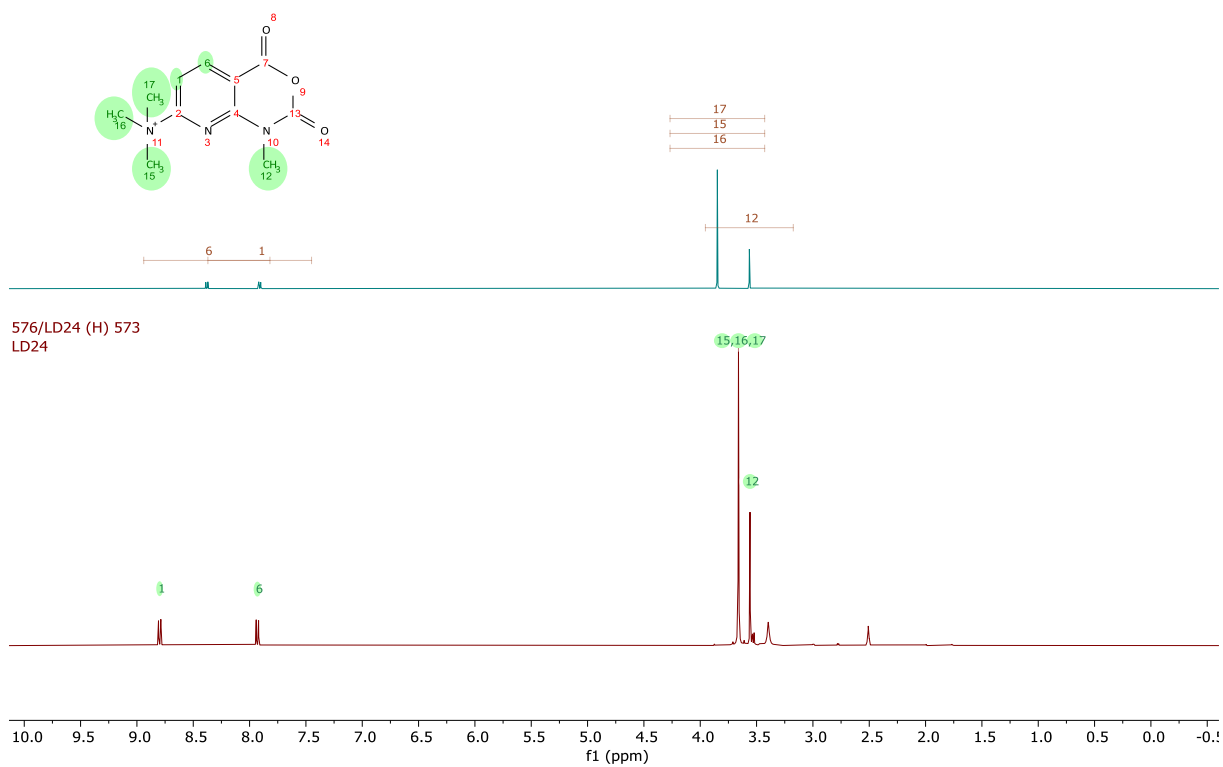
Prior to PET measurements, animals were anesthetized [initial dosage: 5% isoflurane in O₂/air (3:7), then reduction to 2%], and a catheter for tracer injection was inserted into the lateral tail vein. Rats were placed on an animal holder (Equipment Vétérinaire Minerve, Esternay, France), and fixed with a tooth bar in a respiratory mask. Dynamic PET scans in a list mode were performed using a Focus 220 micro PET scanner (CTI-Siemens, Germany) with a resolution at a center of field of view of 1.4 mm. Data acquisition started with injection of [¹⁸F]JK-PSMA-15 (54–69 MBq in 500 µl i.v.; n=3), continued for 120 min and was followed by a 10 min transmission scan using a ⁵⁷Co point source. For PSMA blocking, 2-(phosphonomethyl)pentanedioic acid (2-PMPA; 23 mg/kg; n=1) was added directly to the radiotracer solution. Breathing rate was monitored and kept around 60/min by adjusting the isoflurane concentration (1.5–2.5%). Body temperature was maintained at 37 °C by a feedback-controlled system. After the scan, the rat was returned to its home cage. Following Fourier rebinning, images were reconstructed using an iterative OSEM3D/MAP procedure (Qi et al., 1998; Phys Med Biol 43, 1001-1013) resulting in voxel sizes of 0.38×0.38×0.80 mm. The 120 min measurement was divided in time frames of the following size: a) 2×60 min, b) 4×30 min, c) for time-activity curves: 2×1 min, 2×2 min, 6×4 min, 18×5 min. Post-processing and image analysis was performed with VINCI 4.72 (Max-Planck-Institute for Metabolism Research, Cologne, Germany). Frames were Gauss-Filtered (1 mm FWHM), intensity-normalized to injected dose and corrected for body weight (SUV_{bw}). To this end, every frame was divided by injected dose and multiplied by body weight times 100. Time-activity curves were established for the superior cervical ganglion (SCG), blood (taken from the lumen of the left ventricle), liver and sternum. For SCGs, the signal-to-background ratio and edge contrast were determined, while resolution was calculated for the first pair of DRGs (described in detail in Zlatopolskiy et al., 2019).

2.3.1.8 NMR-spectra

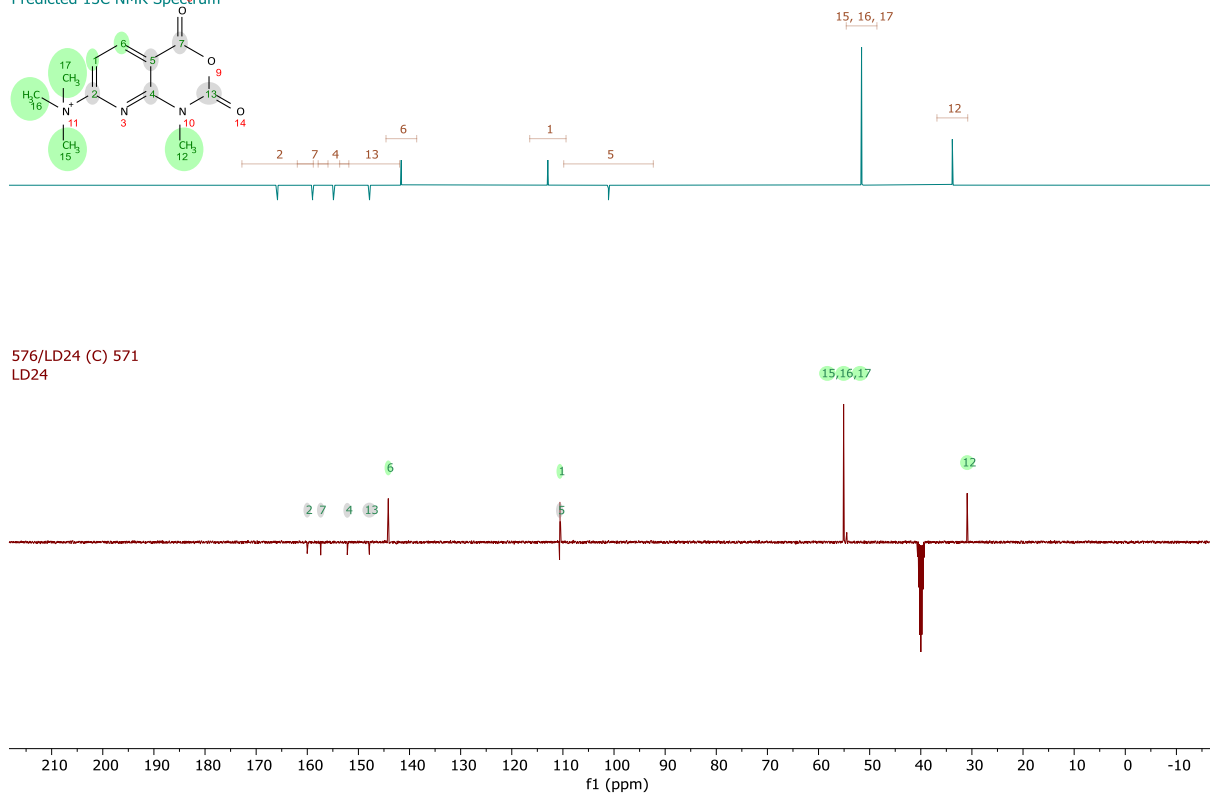
Whenever reasonable, assignments of the experimental signals are suggested for the corresponding nuclides and compared with the predicted assignments/spectra using Mestrelab Mnova v14. In any case, suggested assignments are based on structure-aware-elucidation of the corresponding parent compounds.

2.3.1.8.1 Compound 1a

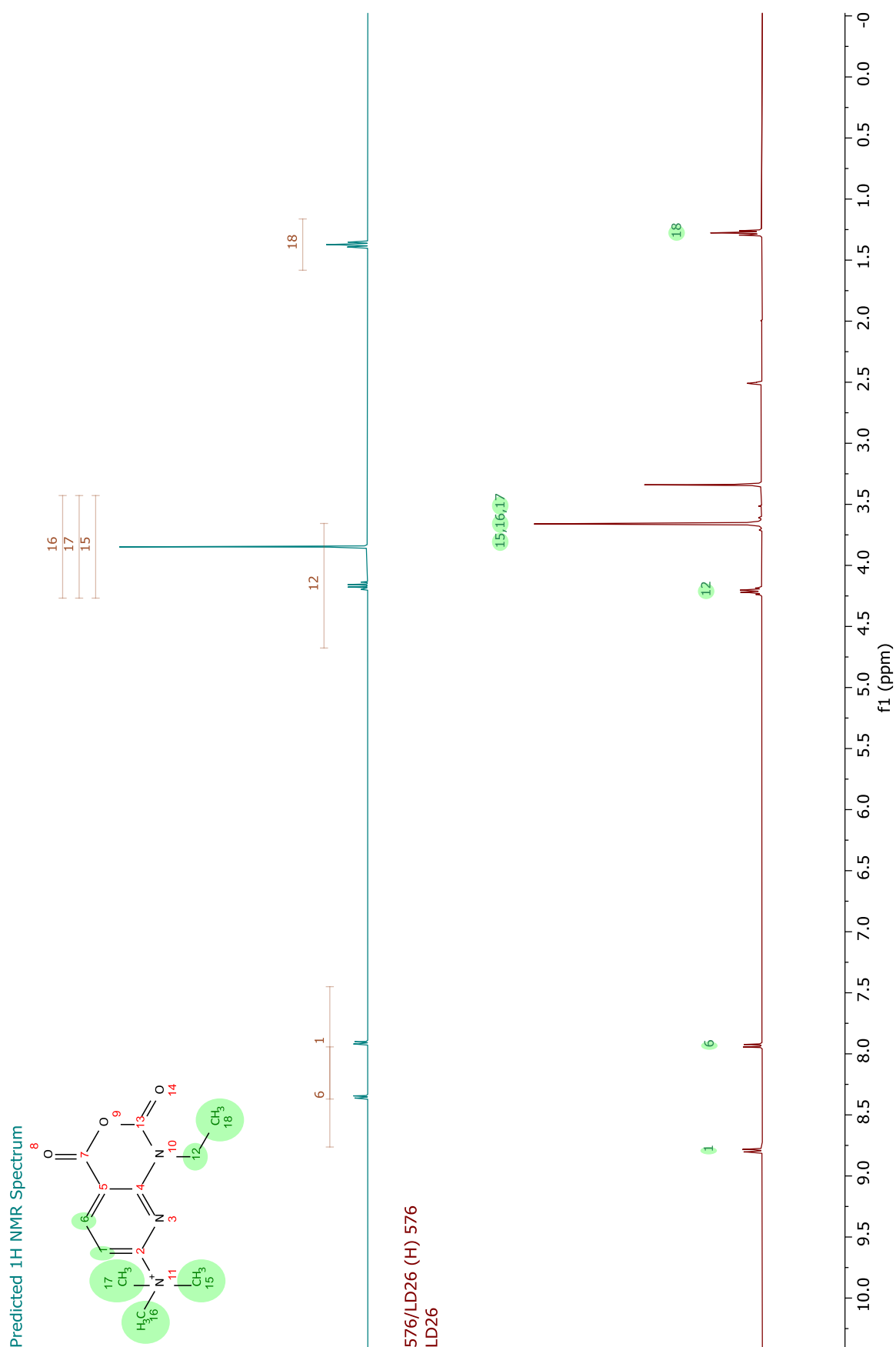
Predicted ¹H NMR Spectrum



Predicted ¹³C NMR Spectrum



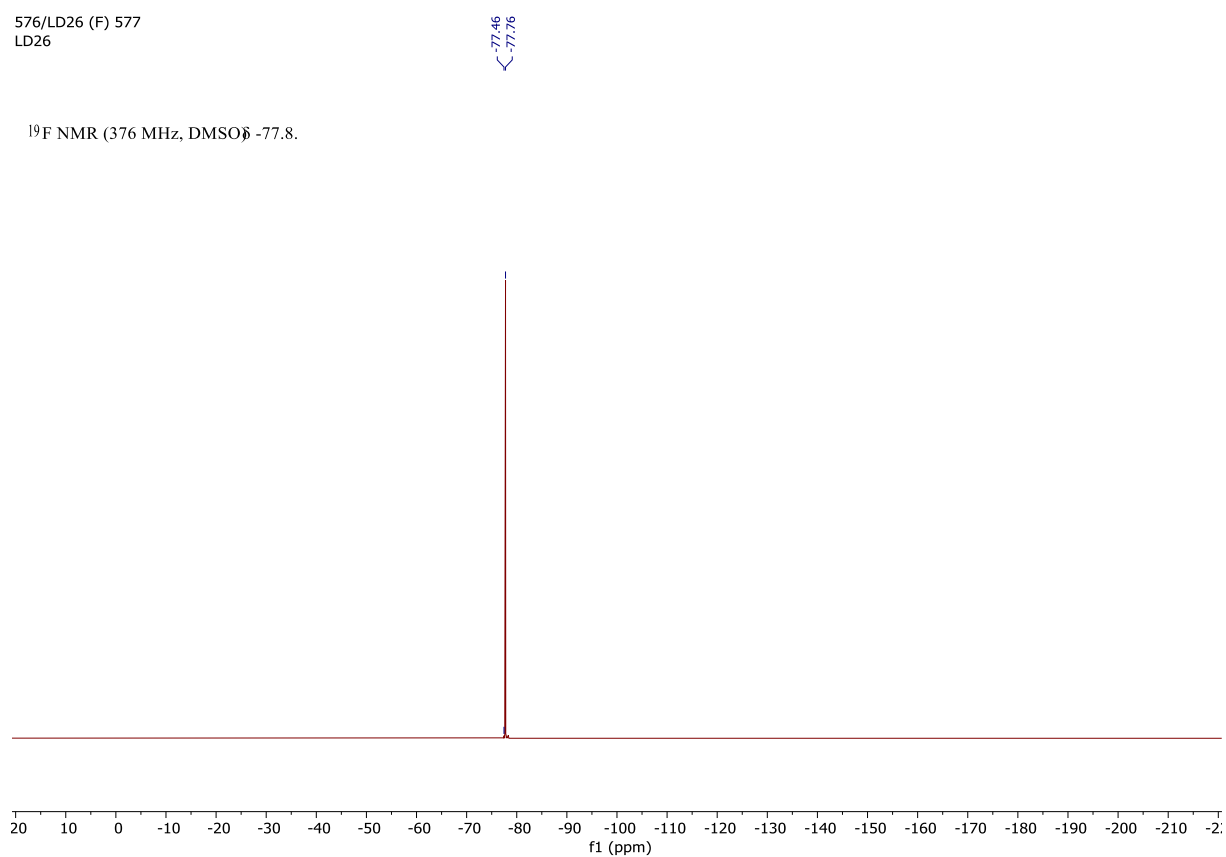
2.3.1.8.2 Compound **1b**



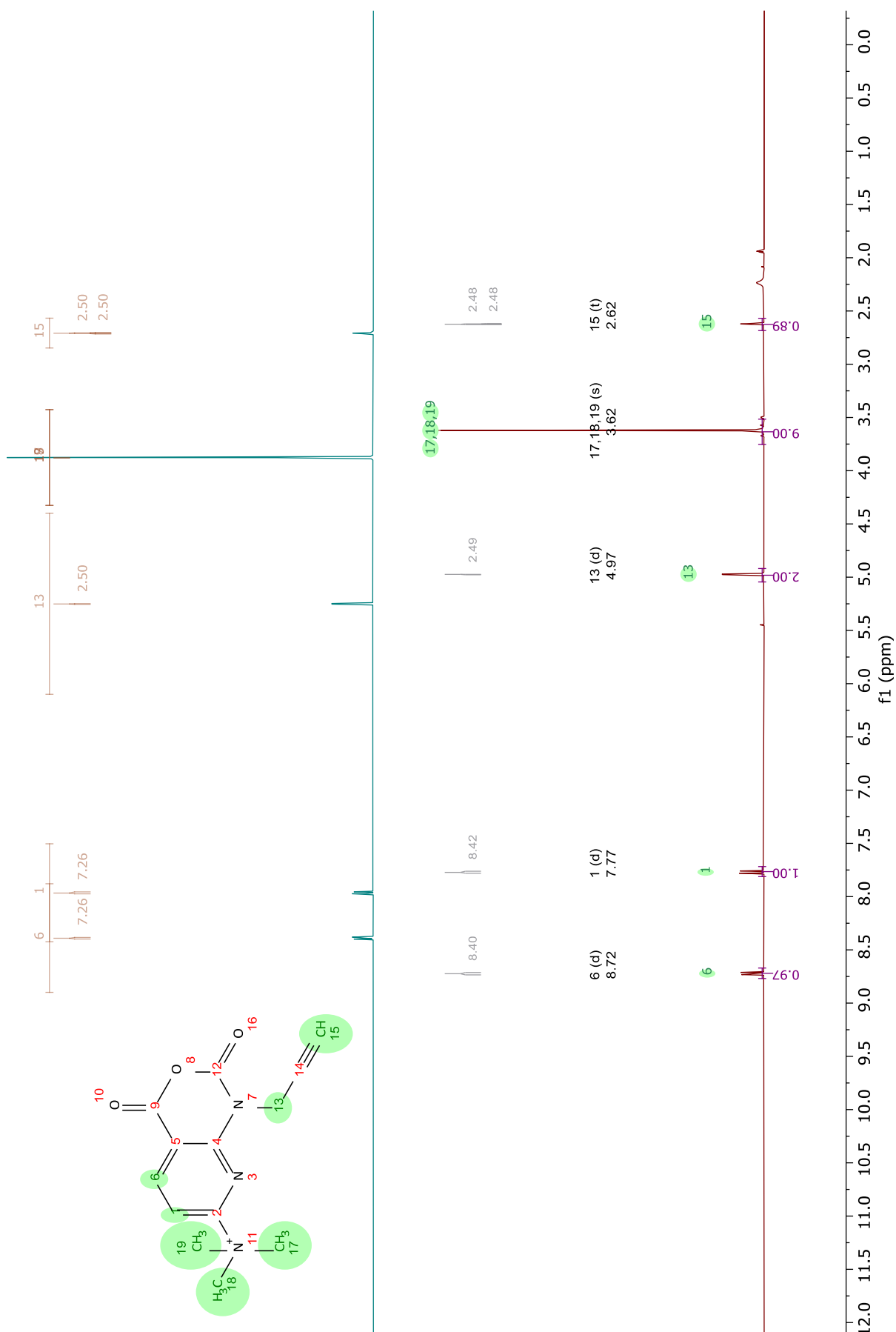


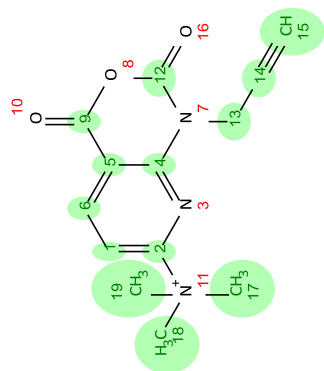
576/LD26 (F) 577
LD26

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) -77.8.



2.3.1.8.3 Compound 1c





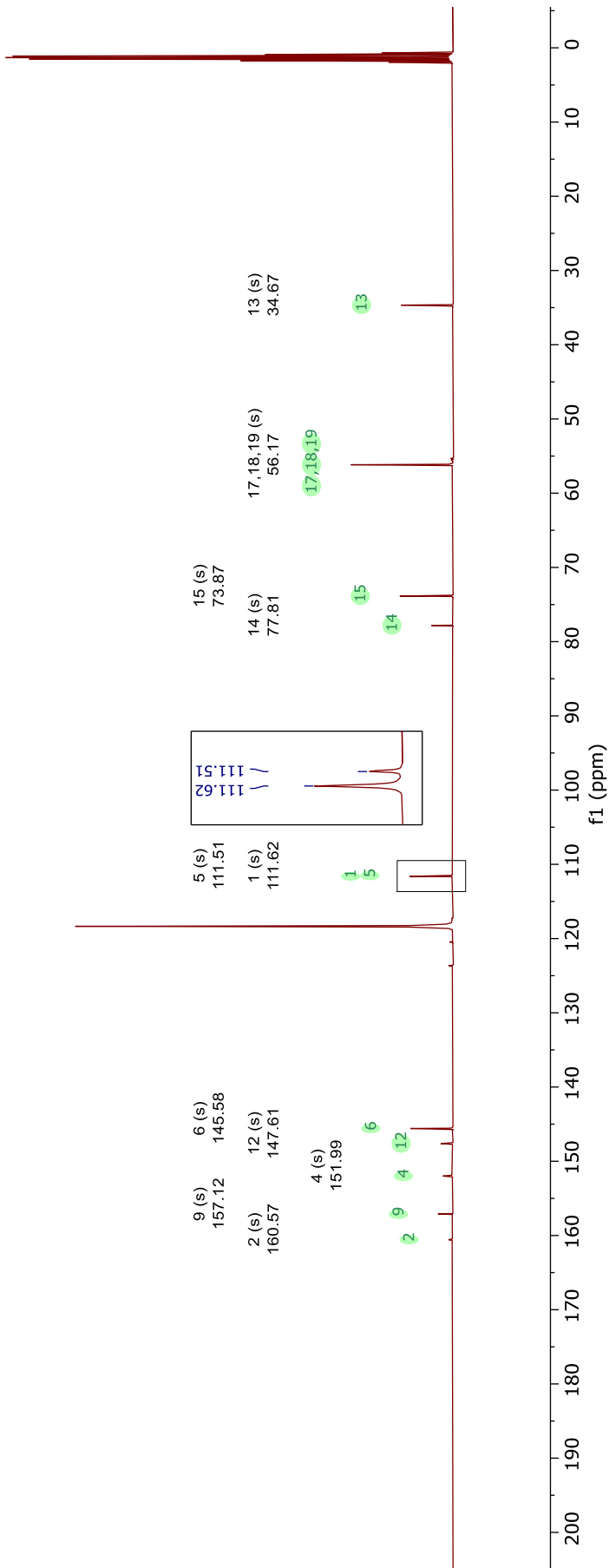
17, 18, 19

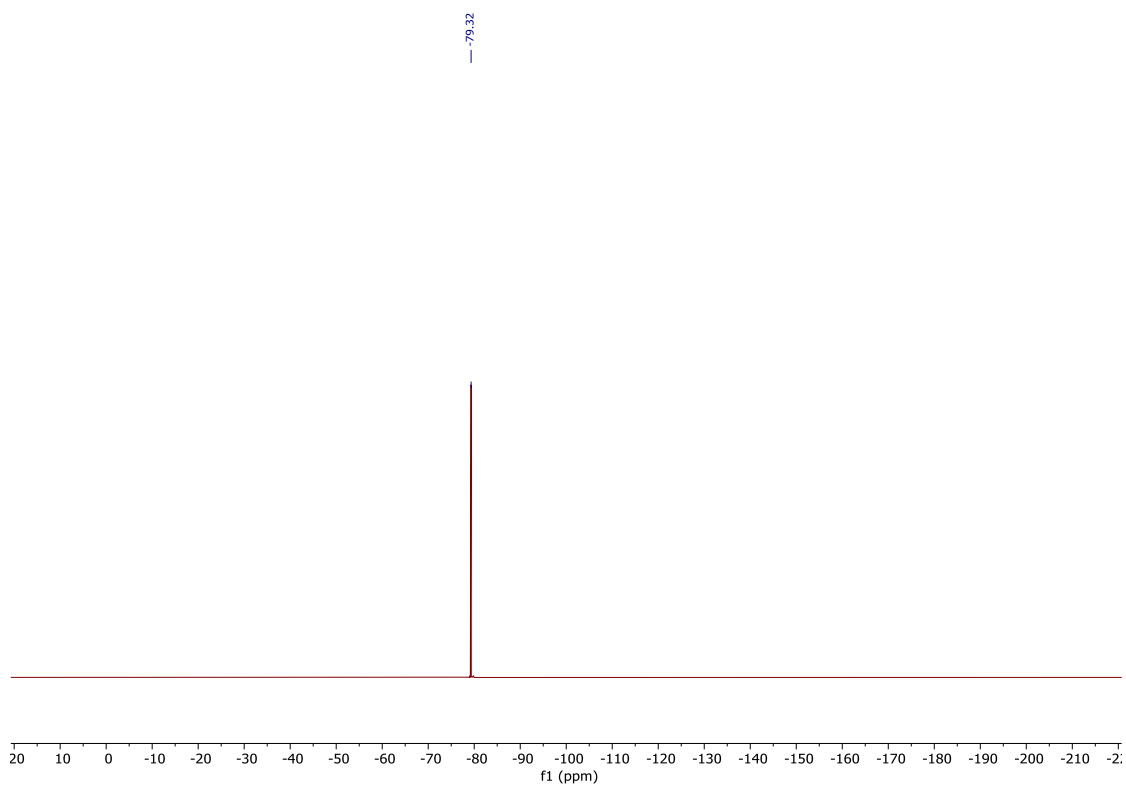
13

14 15

5

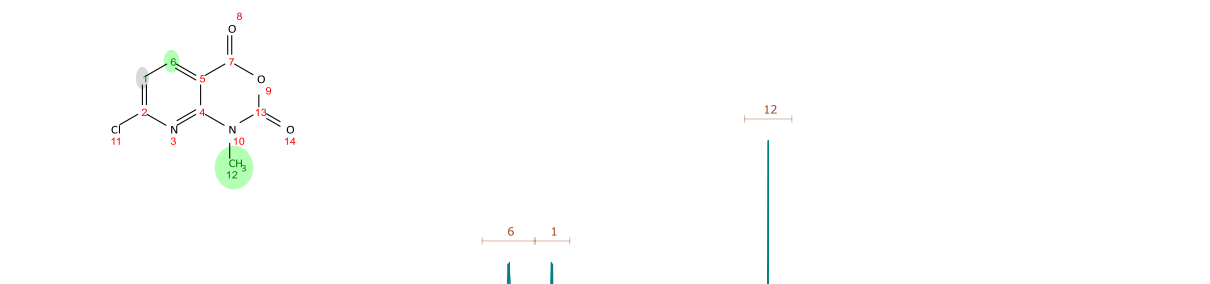
2 9 4 12 6



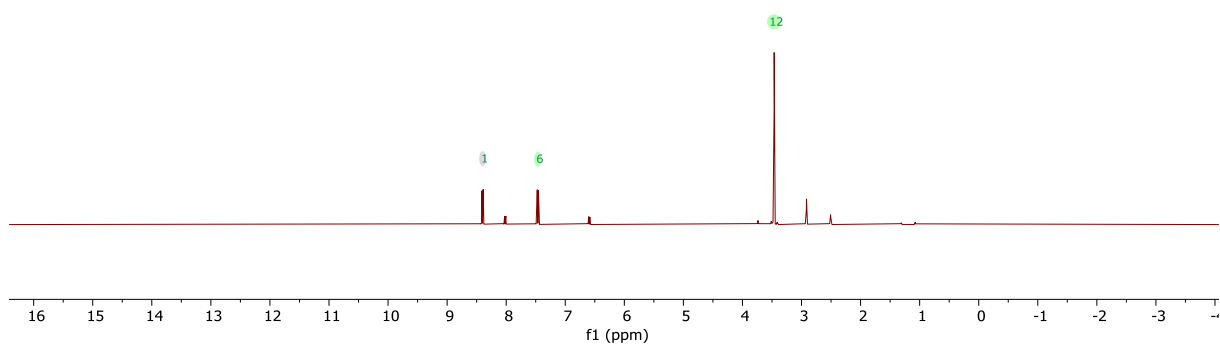


2.3.1.8.4 Compound 2a

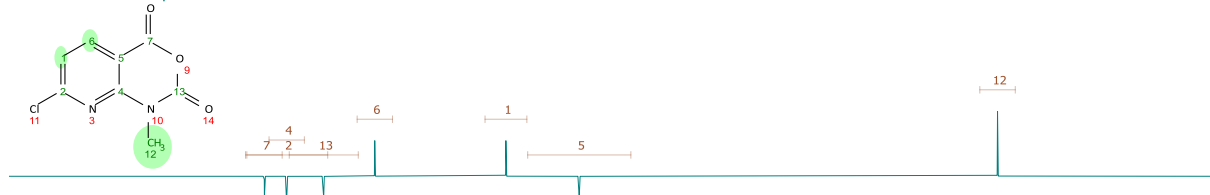
Predicted ¹H NMR Spectrum



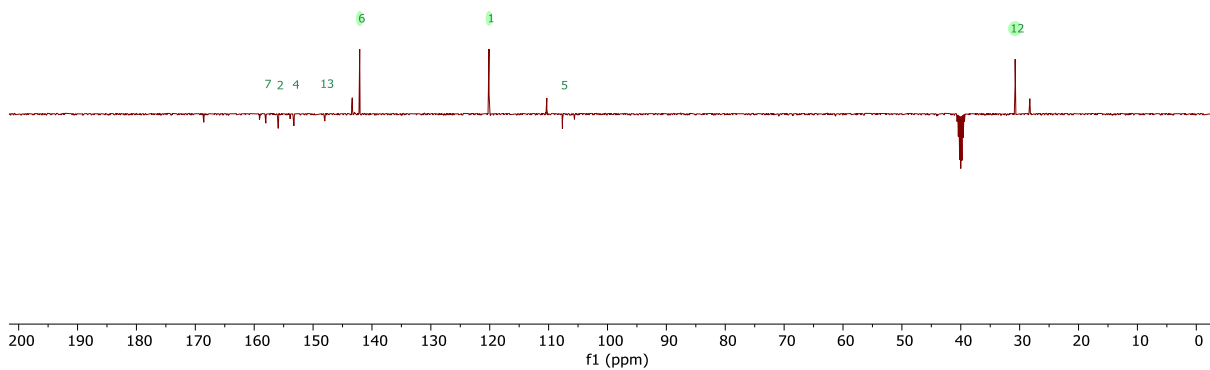
551/LD15 (H)
LD15



Predicted ¹³C NMR Spectrum

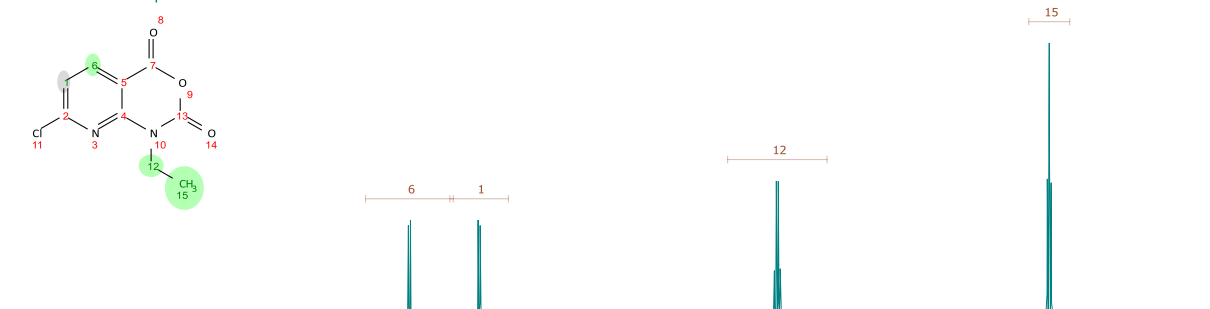


551/LD15 (C)
LD15

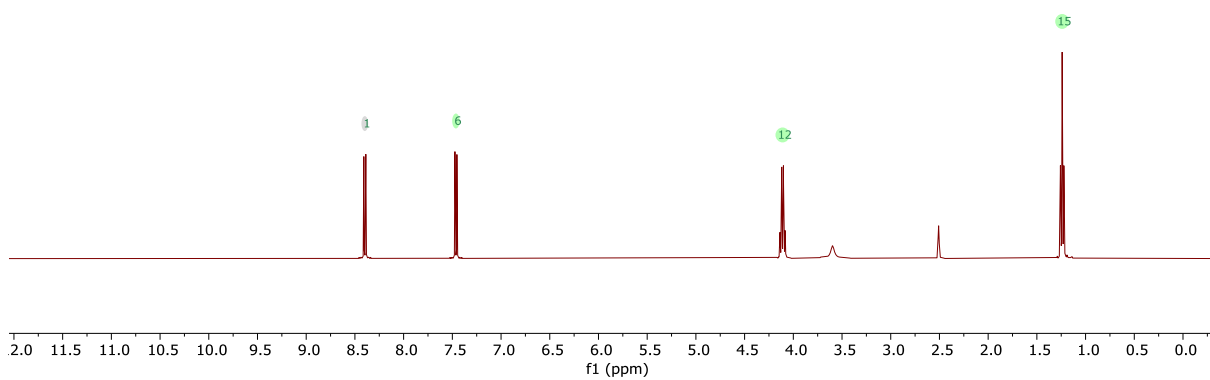


2.3.1.8.5 Compound 2b

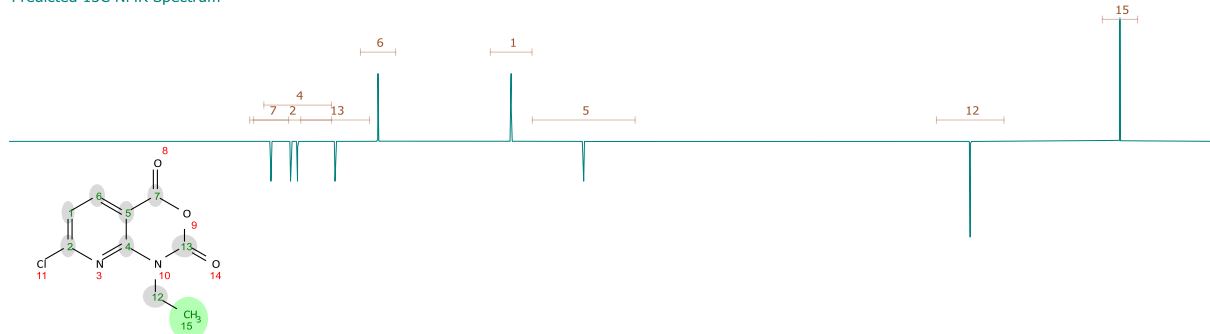
Predicted ¹H NMR Spectrum



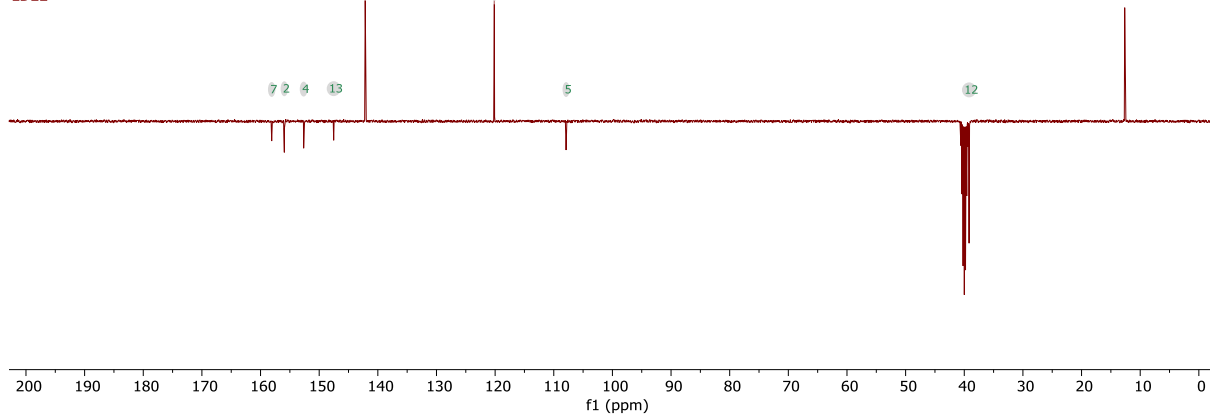
552/LD22 (H) 566
LD22



Predicted ¹³C NMR Spectrum

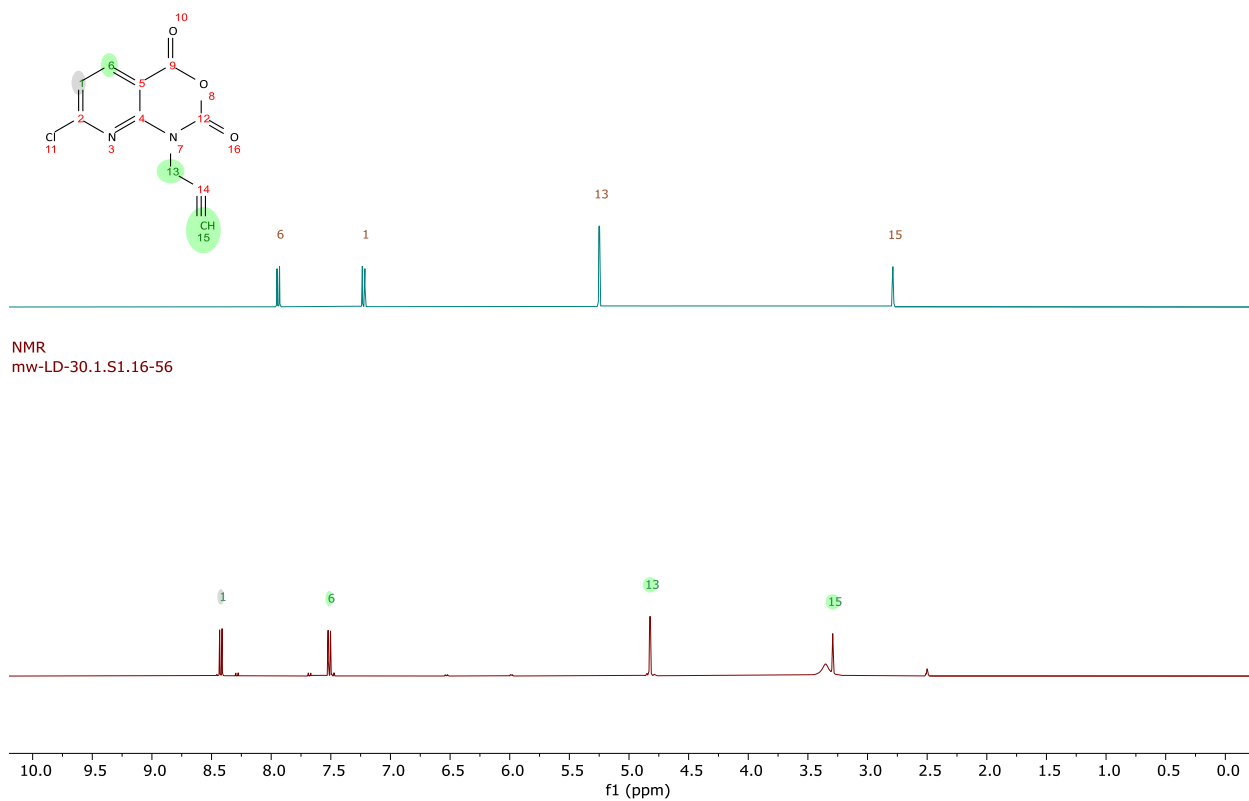


552/LD22 (C) 567
LD22

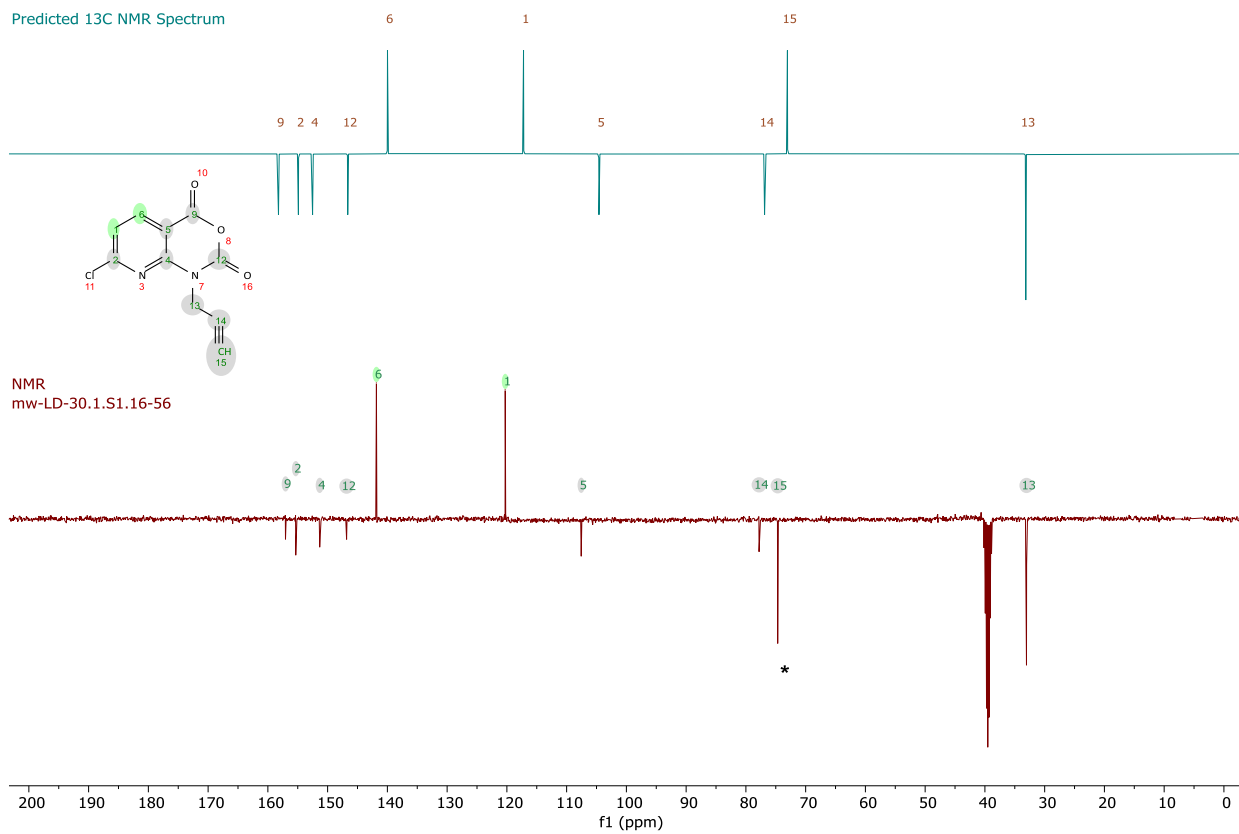


2.3.1.8.6 Compound 2c

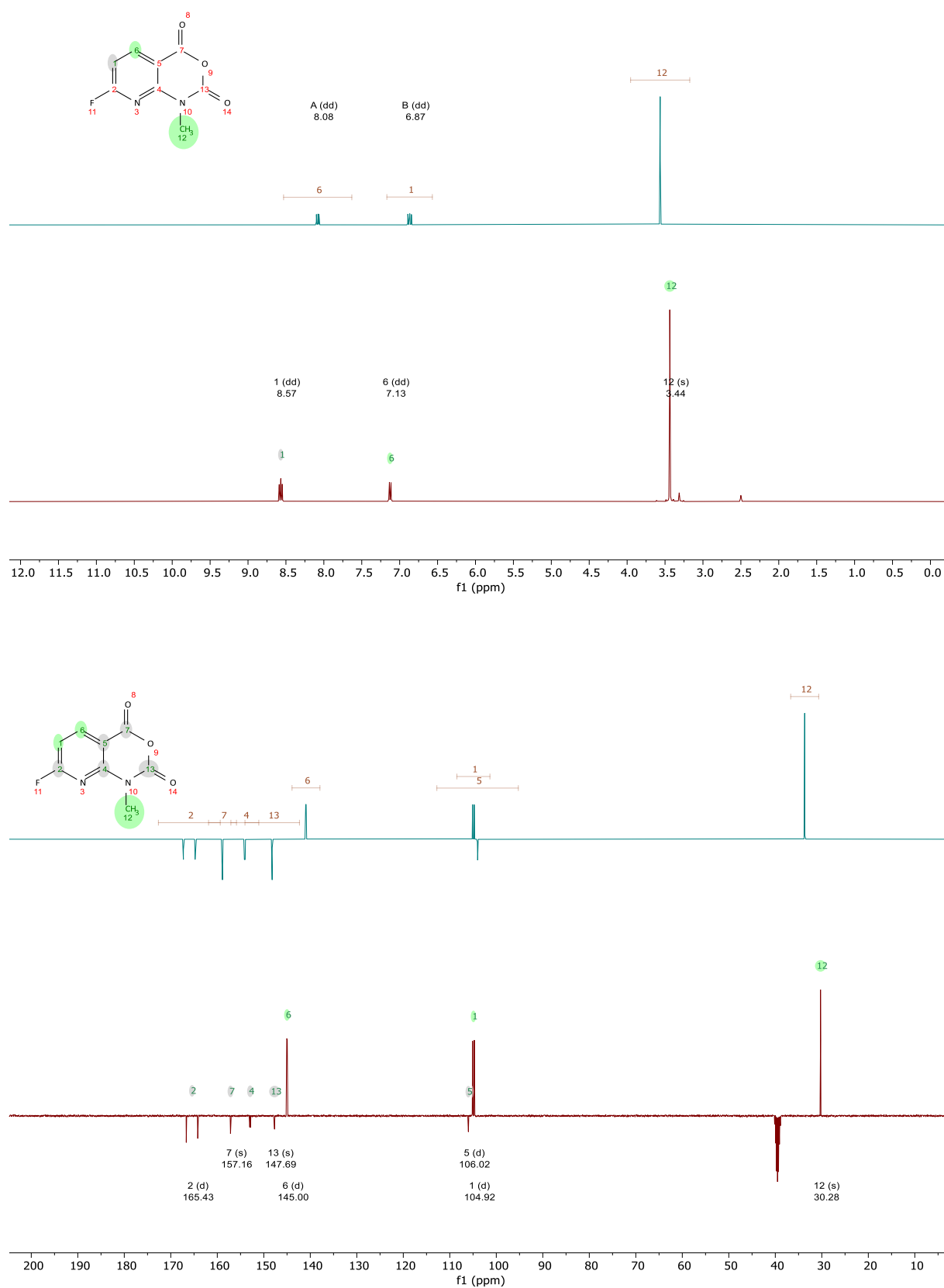
Predicted ¹H NMR Spectrum



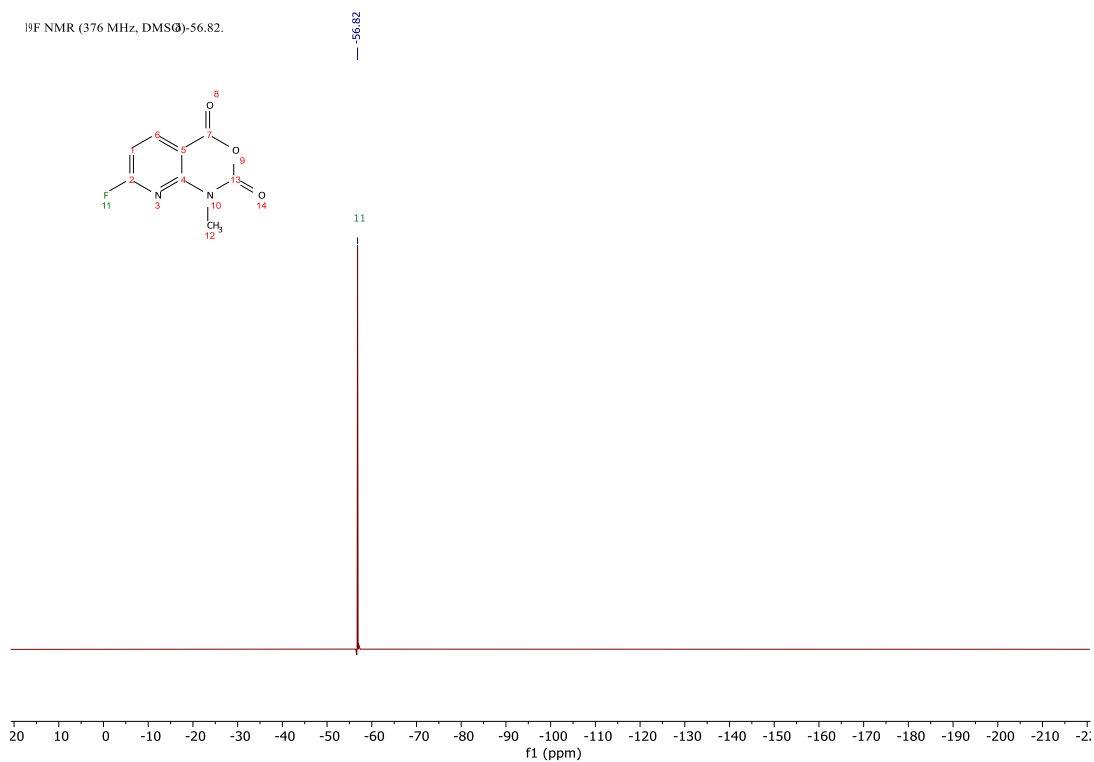
Predicted ¹³C NMR Spectrum



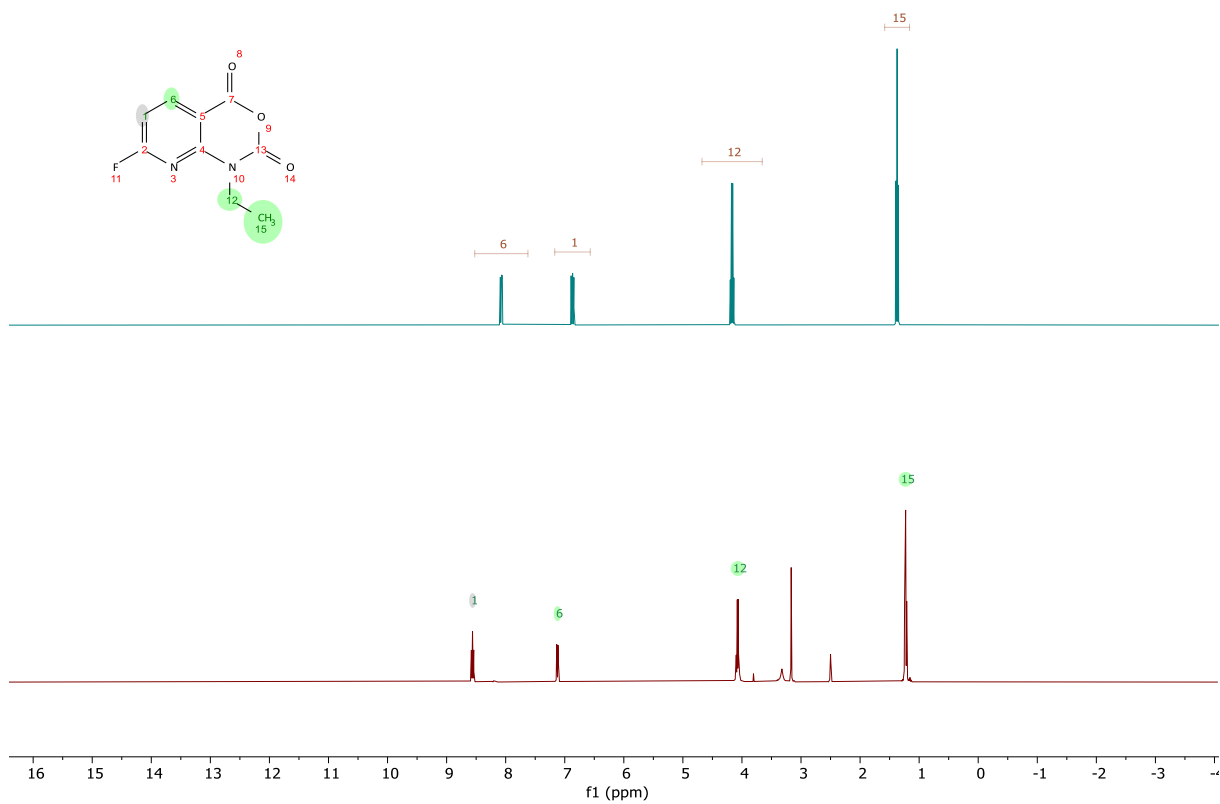
2.3.1.8.7 Compound 2d

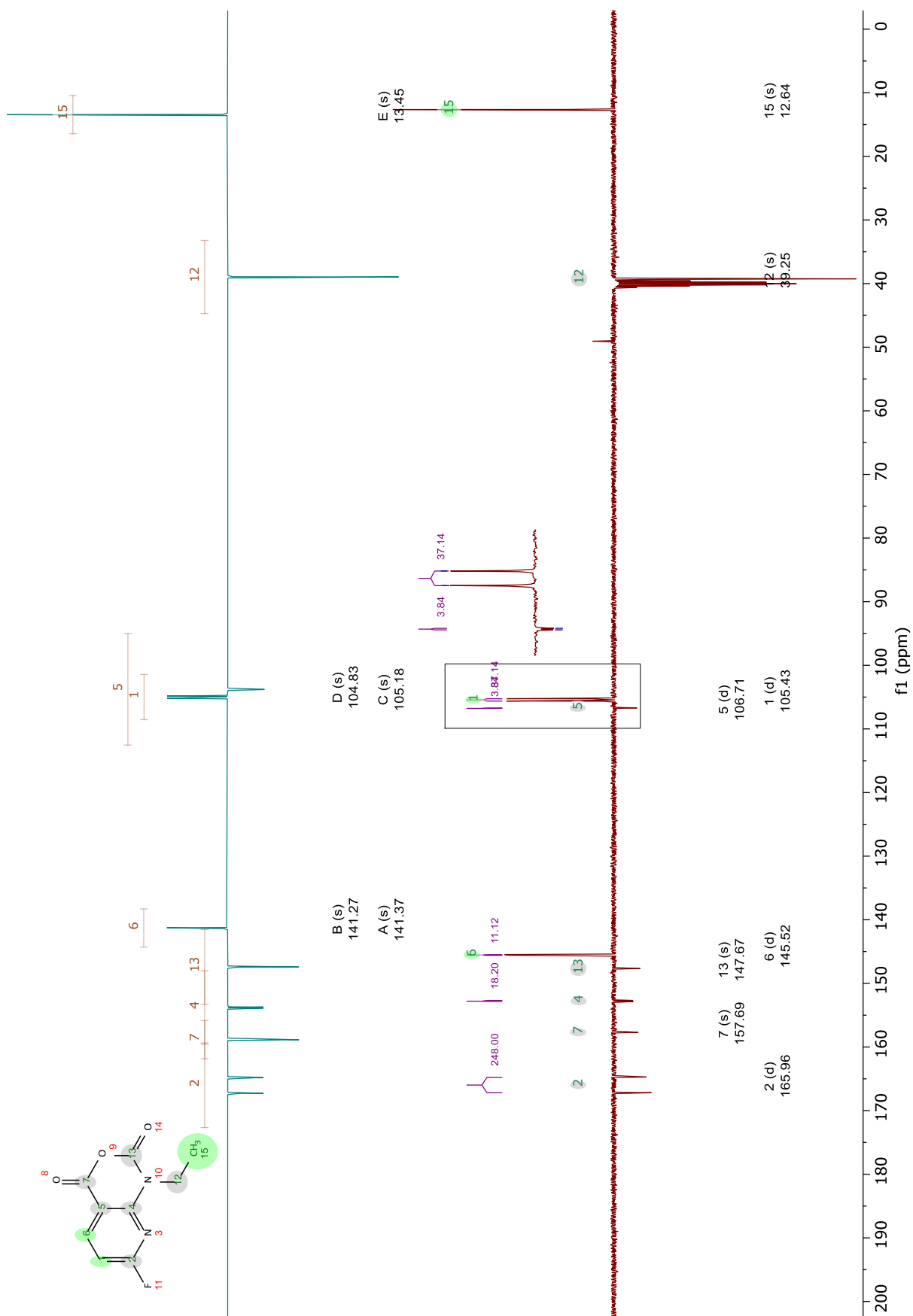


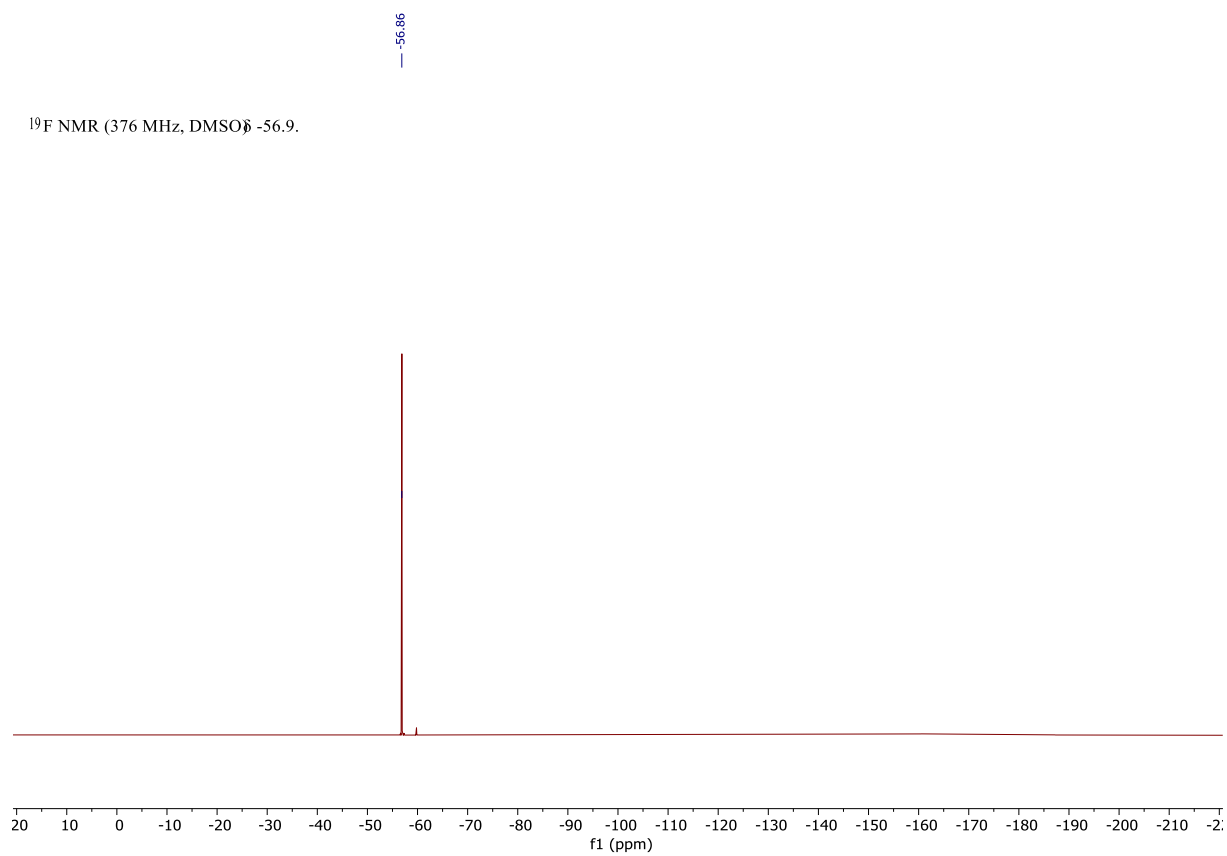
¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆)-56.82.



2.3.1.8.8 Compound 2e

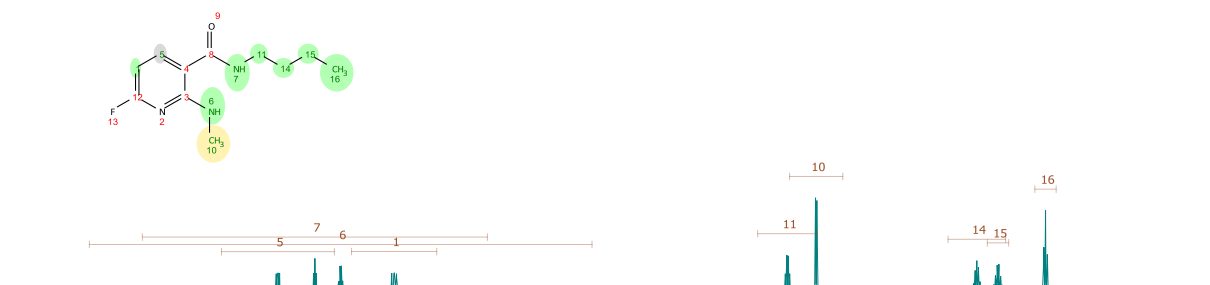




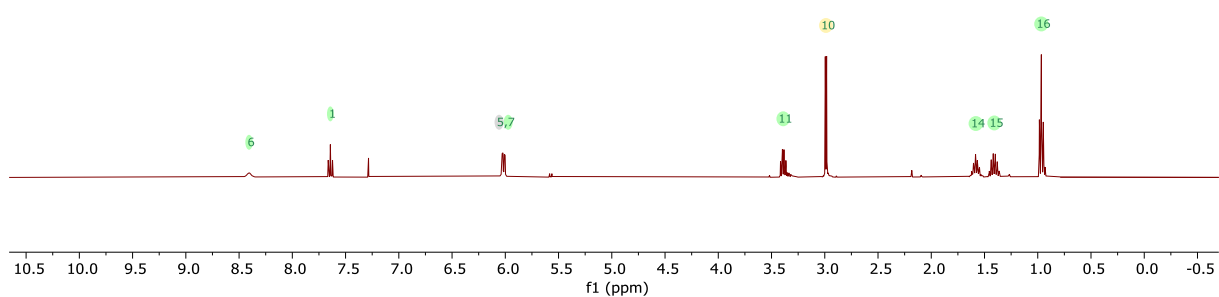


2.3.1.8.9 Compound 3a

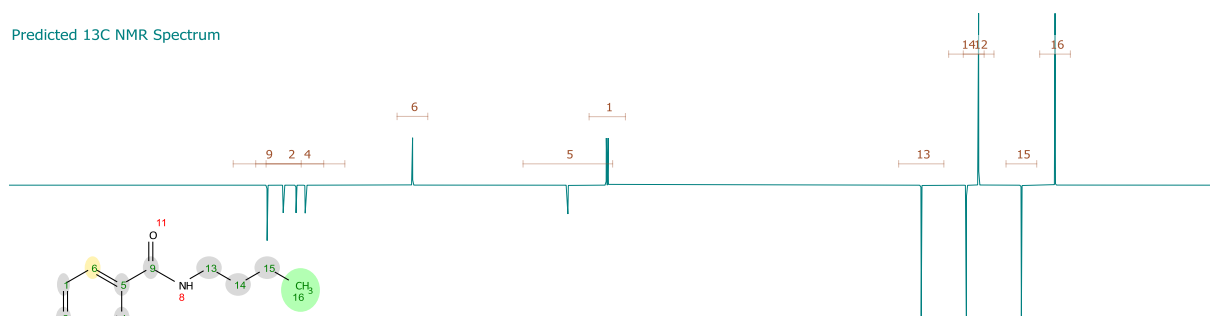
Predicted ¹H NMR Spectrum



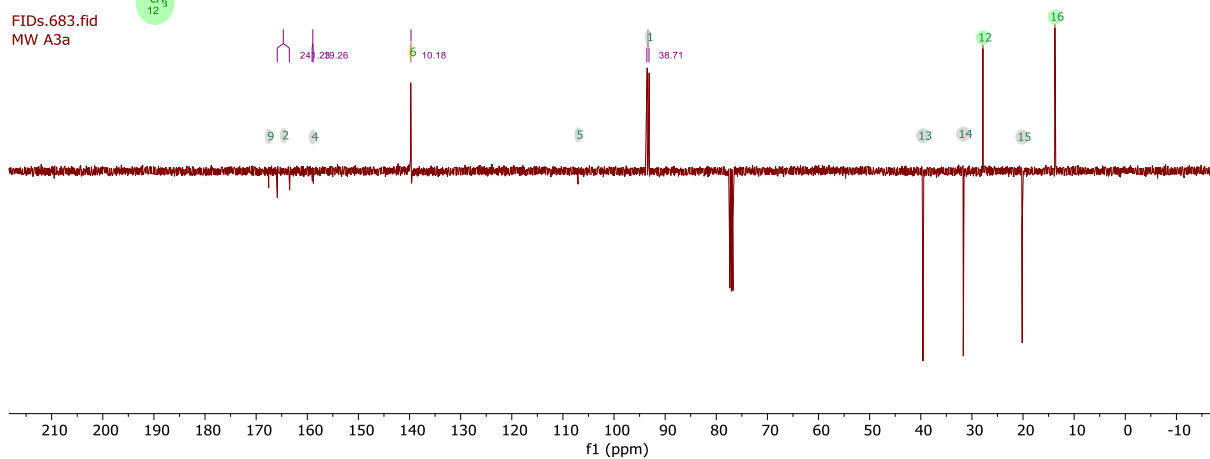
FIDs.649.fid
MW A3a



Predicted ¹³C NMR Spectrum



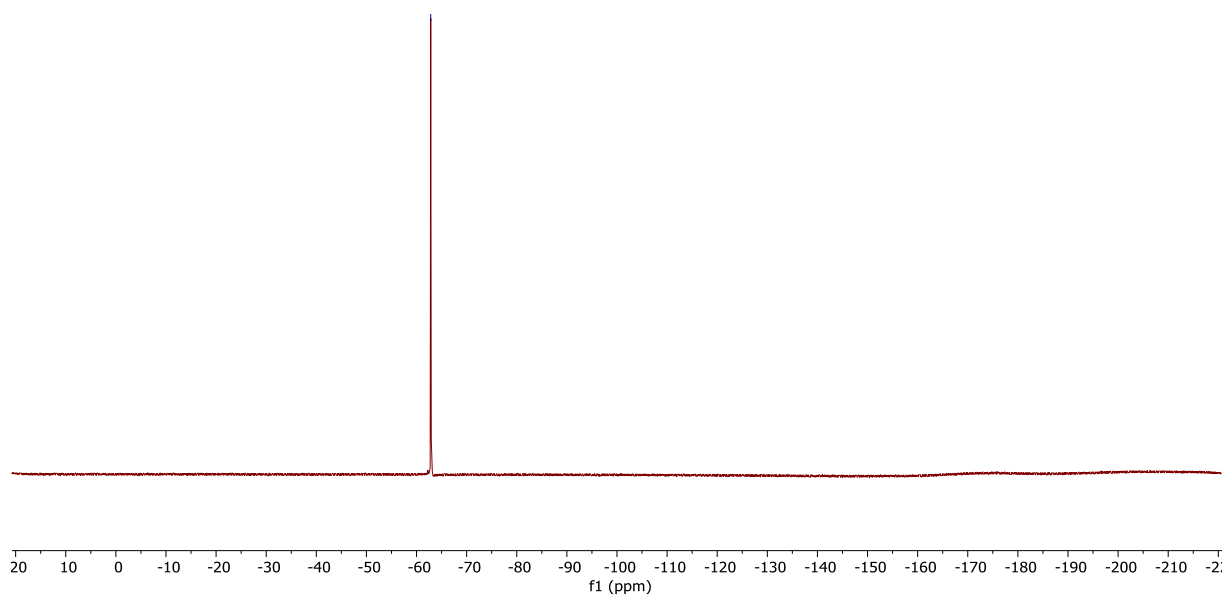
FIDs.683.fid
MW A3a



FIDs.648.fid
MW A3a

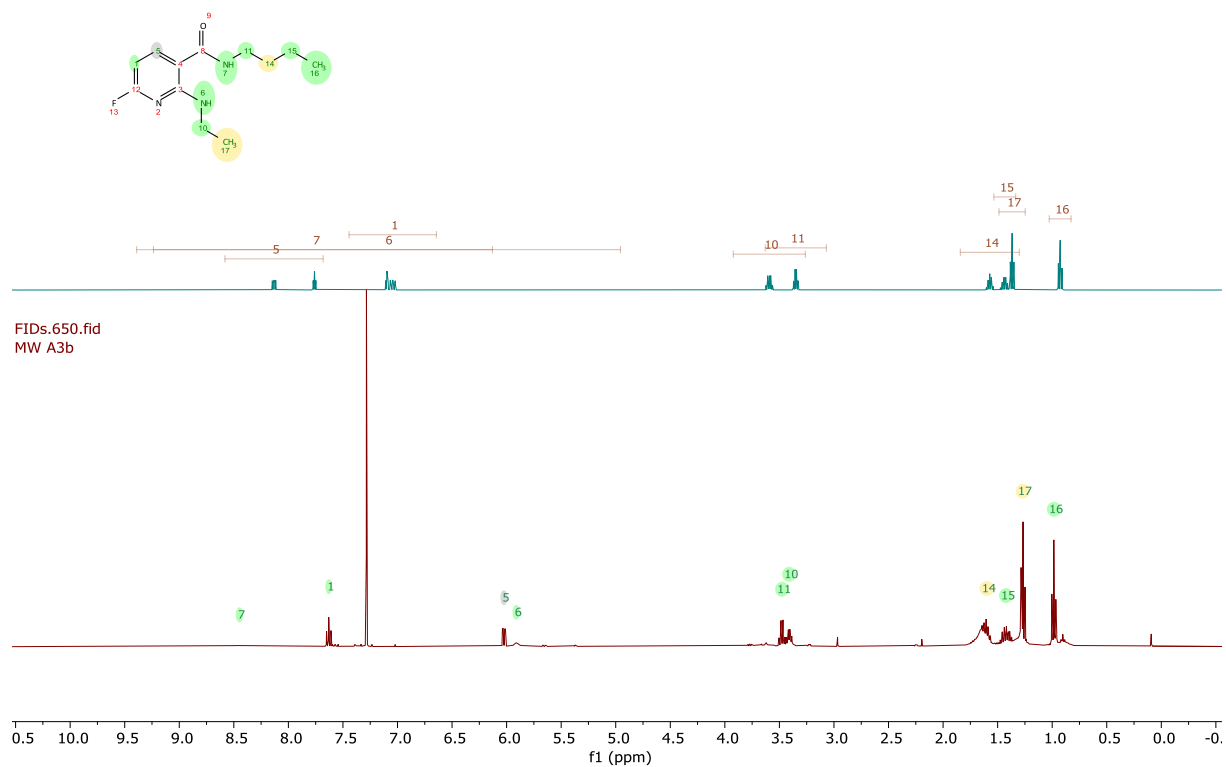
-62.83

^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -62.8.

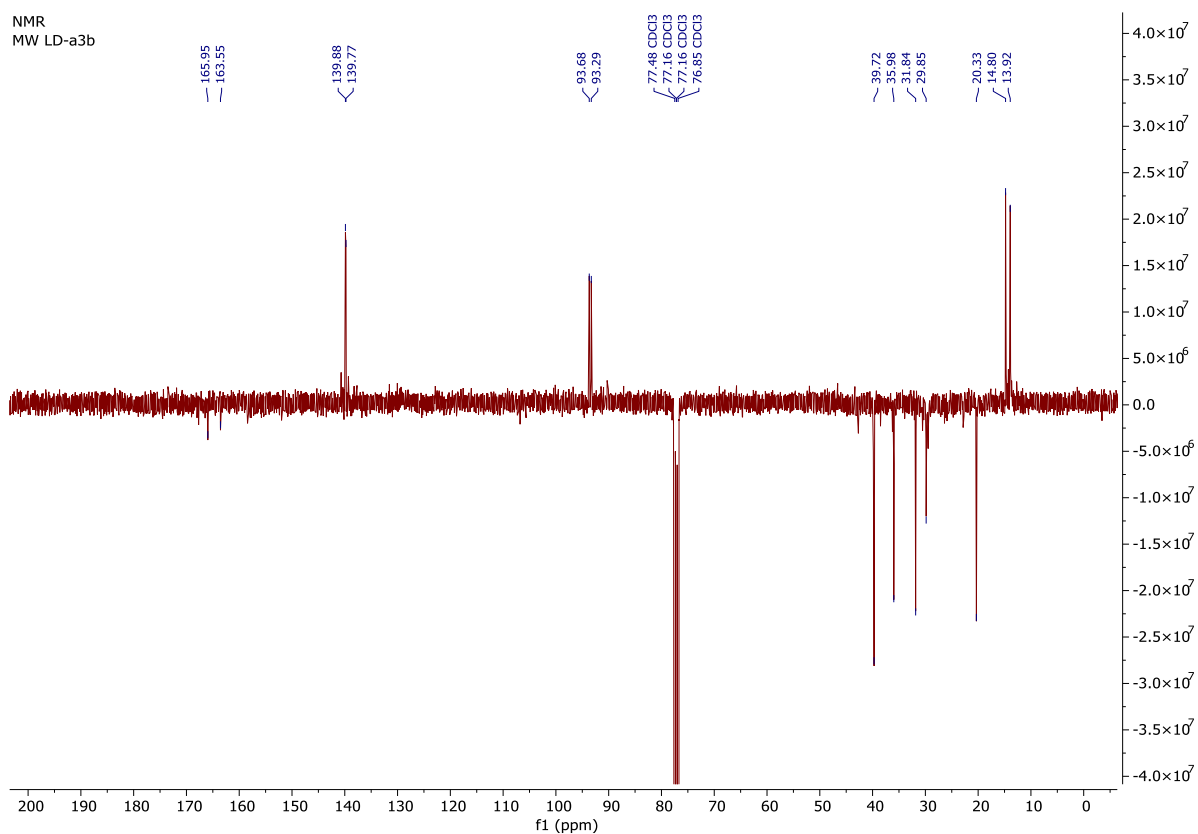


2.3.1.8.10 Compound **3b**

Predicted ^1H NMR Spectrum

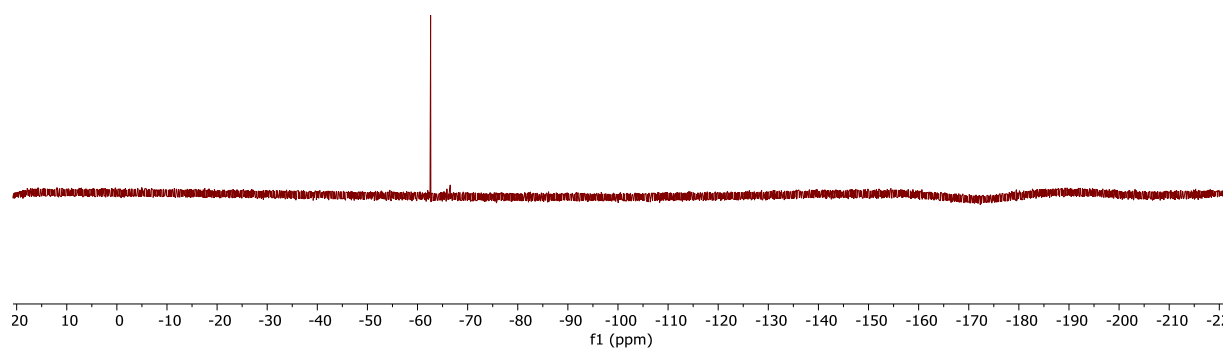


FIDs.650.fid
MW A3b



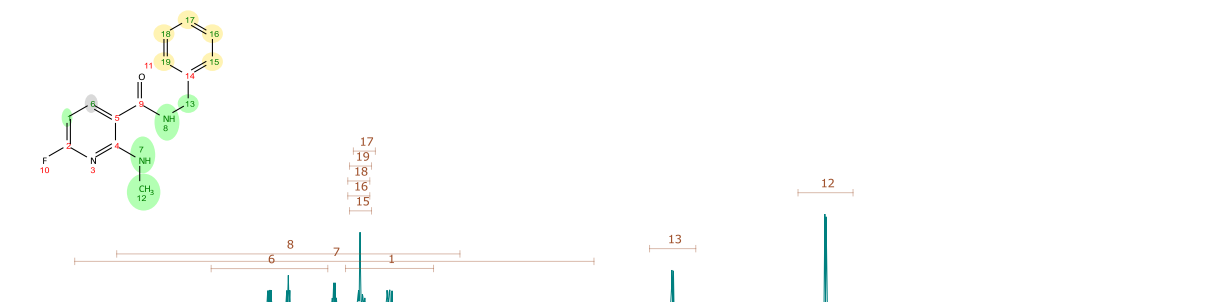
FIDs.651.fid
MW A3b

¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -62.6.

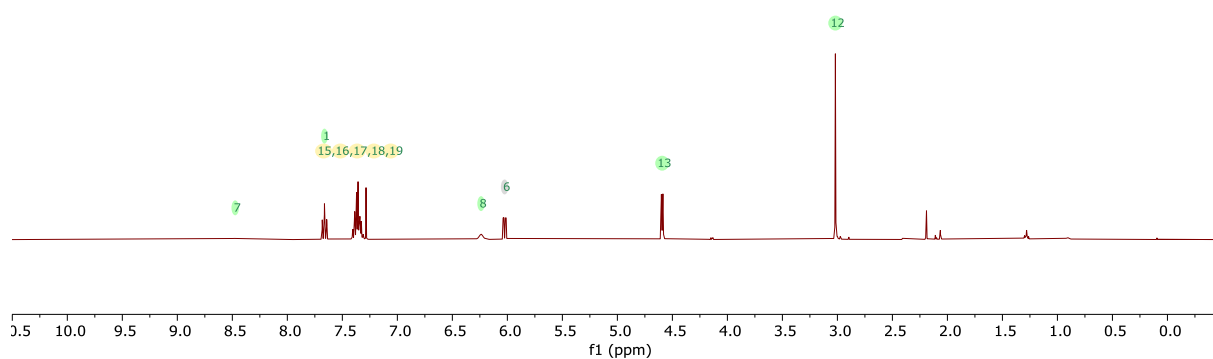


2.3.1.8.11 Compound 3c

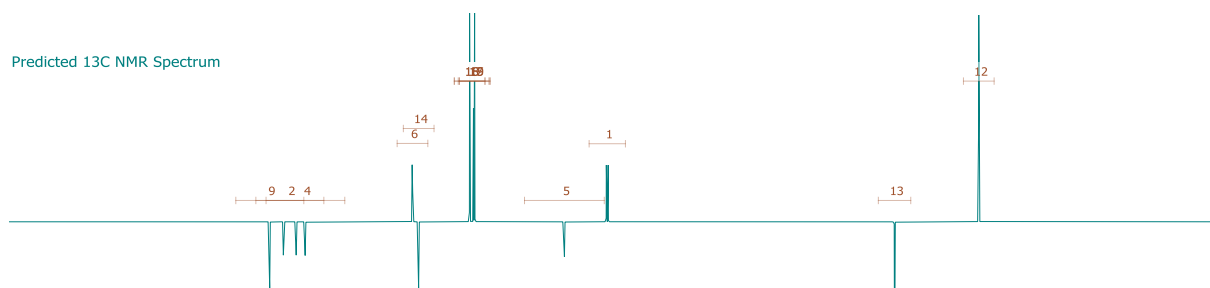
Predicted ¹H NMR Spectrum



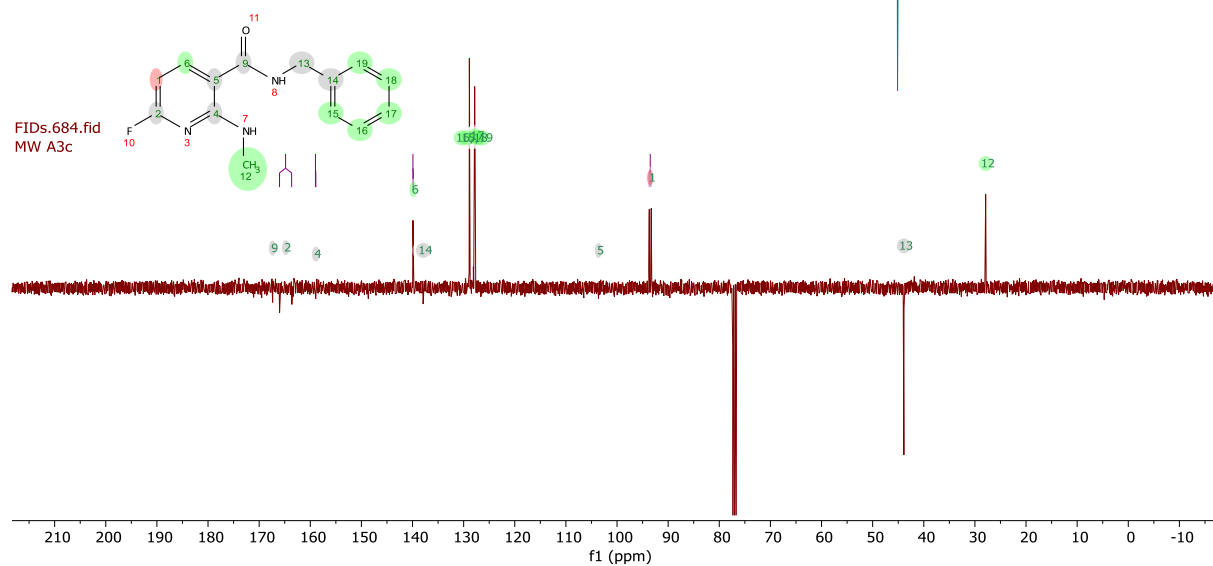
FIDs.652.fid
MW A3c



Predicted ¹³C NMR Spectrum

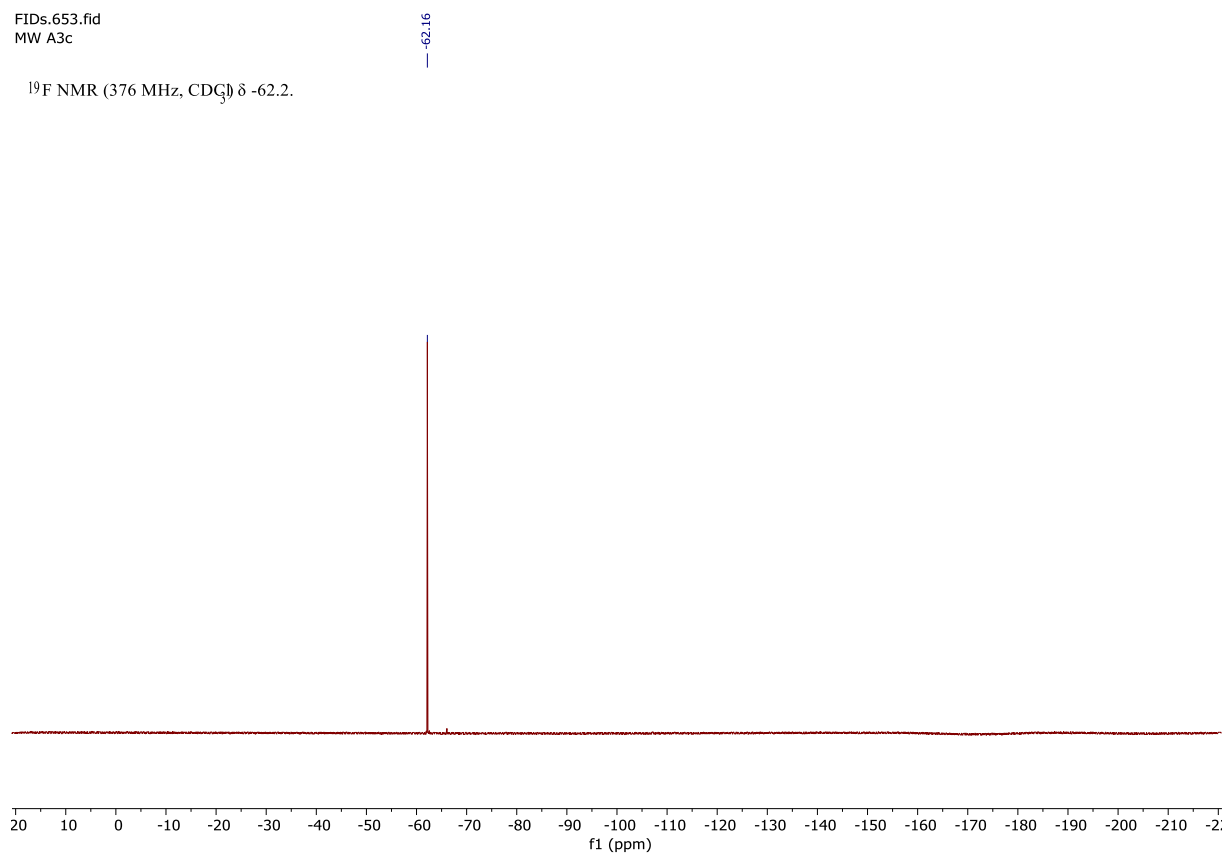


FIDs.684.fid
MW A3c



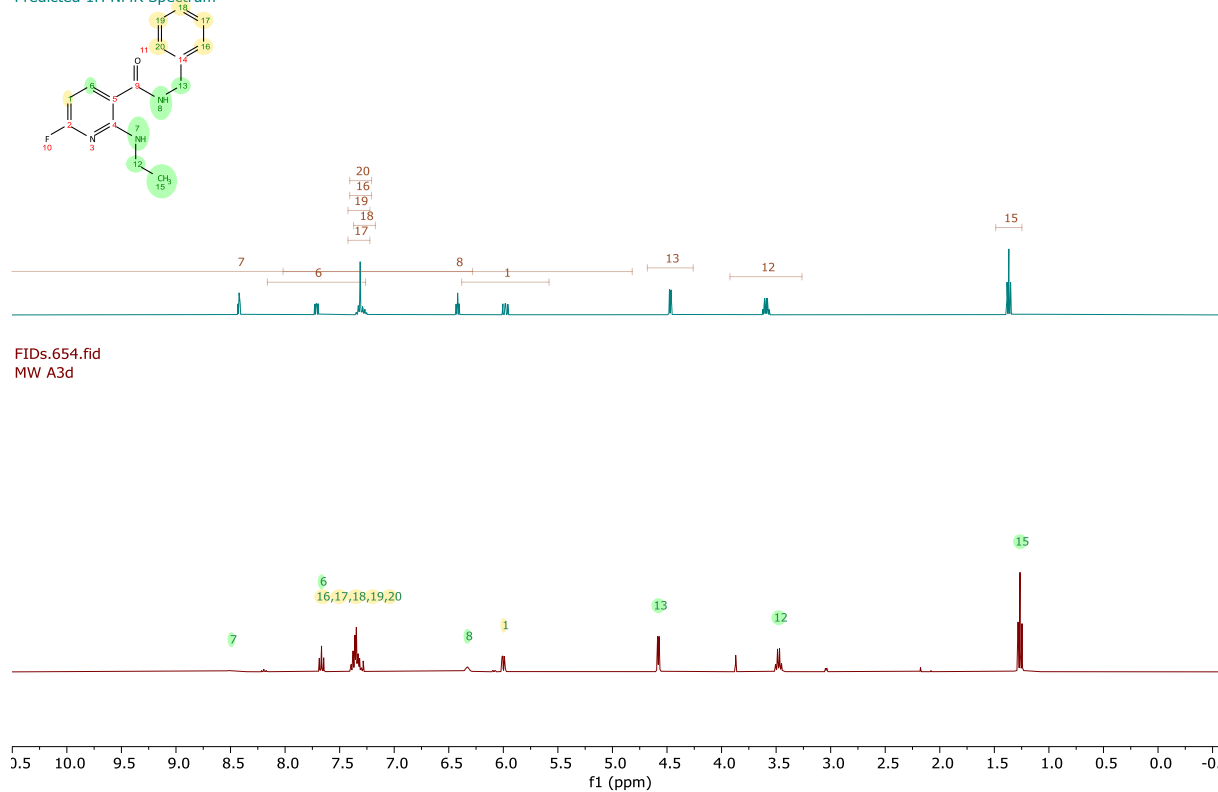
FIDs.653.fid
MW A3c

^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -62.2.



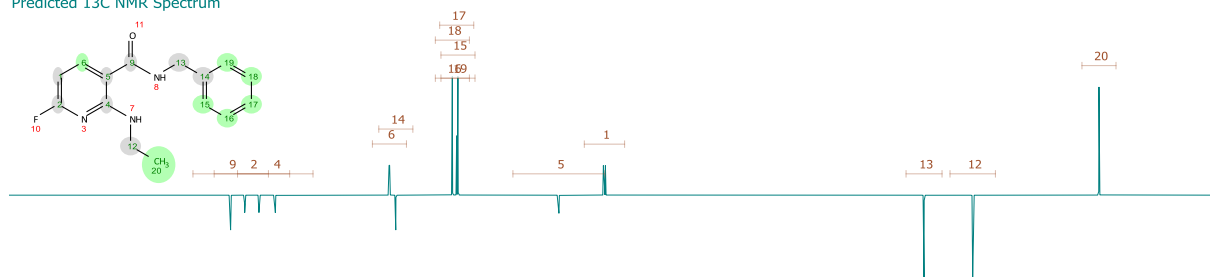
2.3.1.8.12 Compound 3d

Predicted ^1H NMR Spectrum

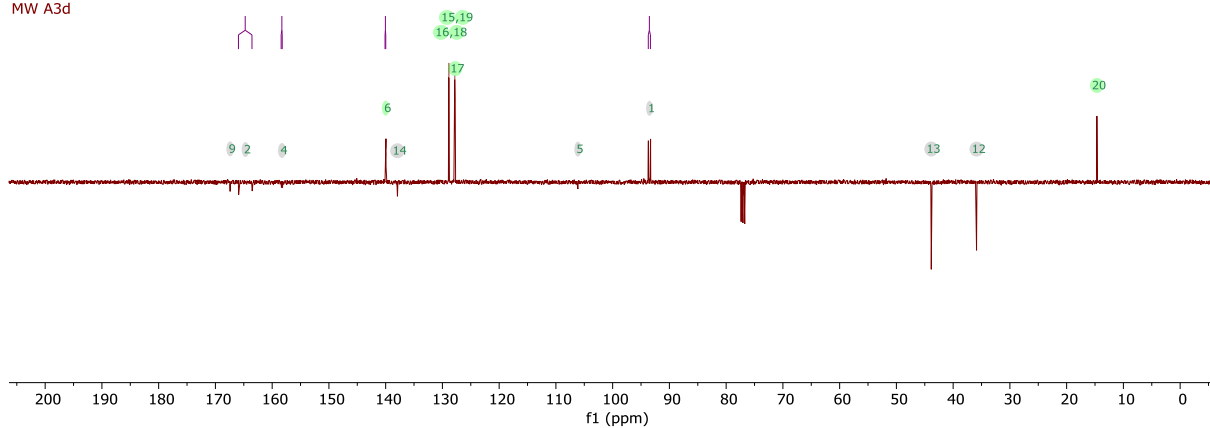


FIDs.654.fid
MW A3d

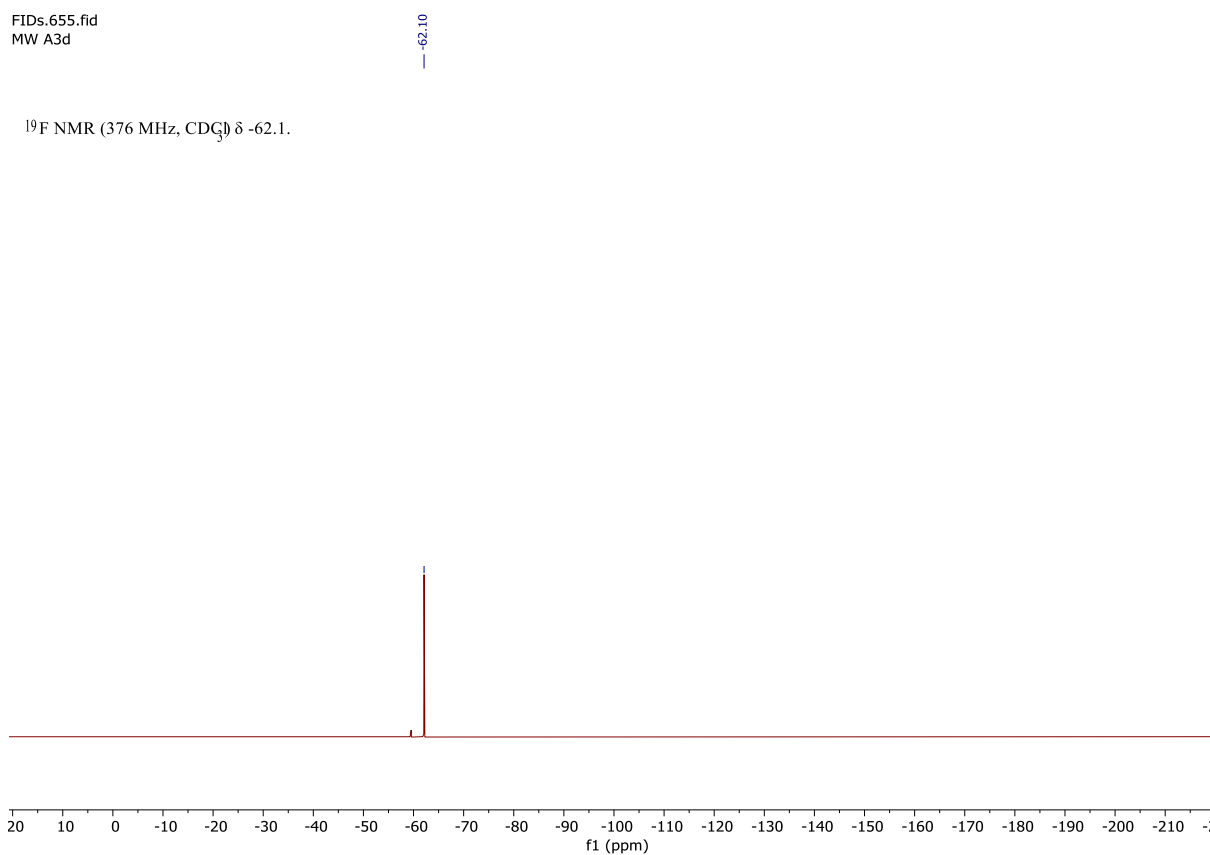
Predicted ^{13}C NMR Spectrum



FIDs.685.fid
MW A3d



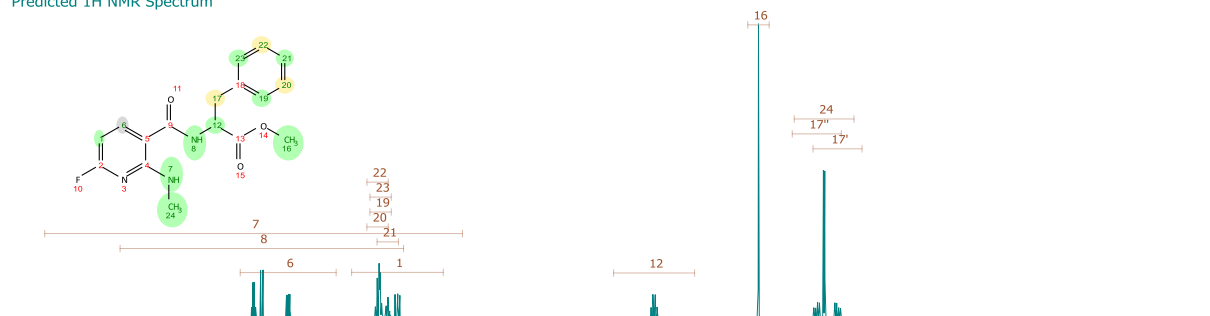
FIDs.655.fid
MW A3d



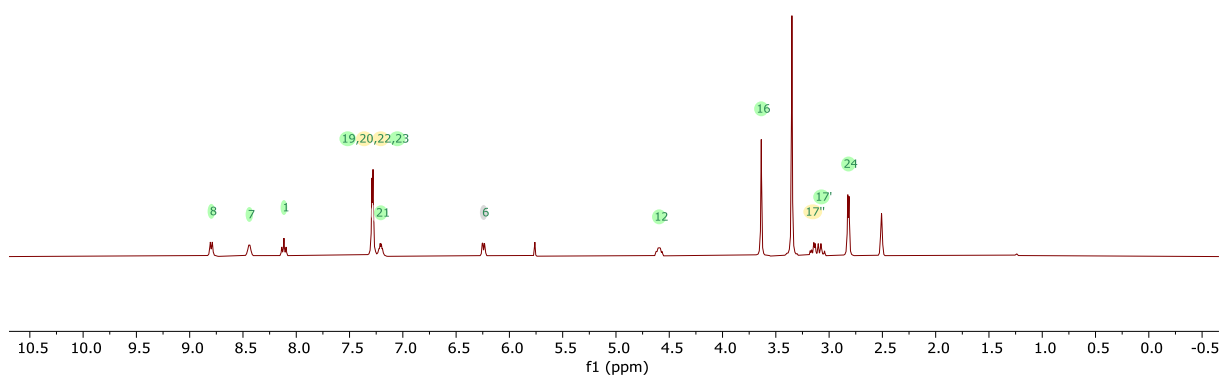
^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -62.1.

2.3.1.8.13 Compound 3e

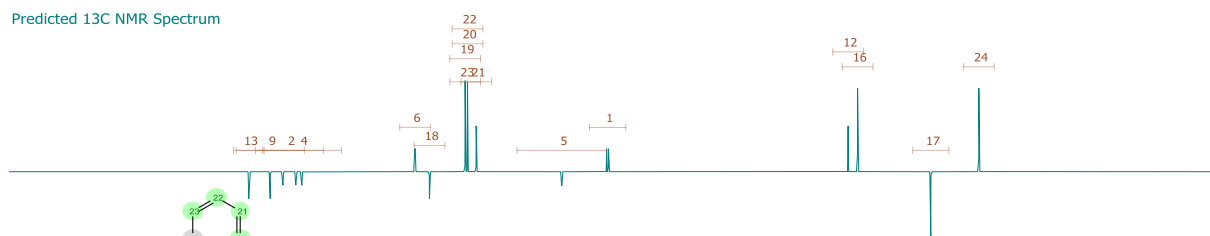
Predicted ¹H NMR Spectrum



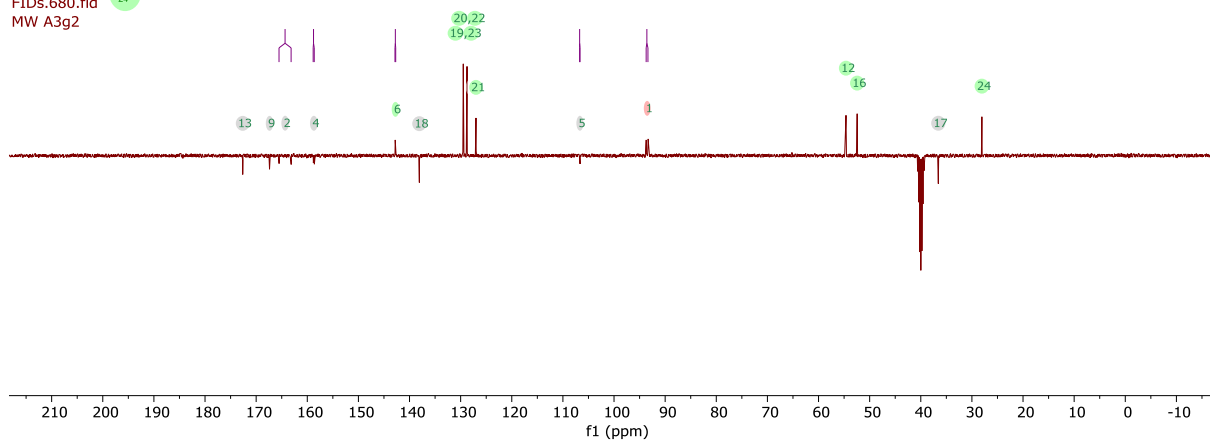
FIDs.679.fid
MW A3g2



Predicted ¹³C NMR Spectrum



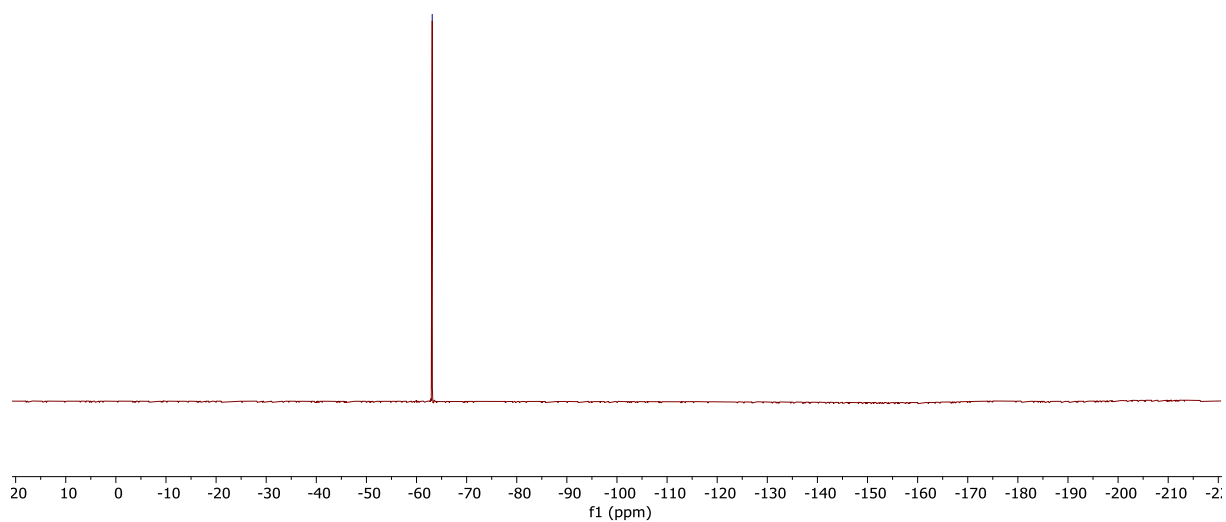
FIDs.680.fid
MW A3g2



FIDs.678.fid
MW A3g2

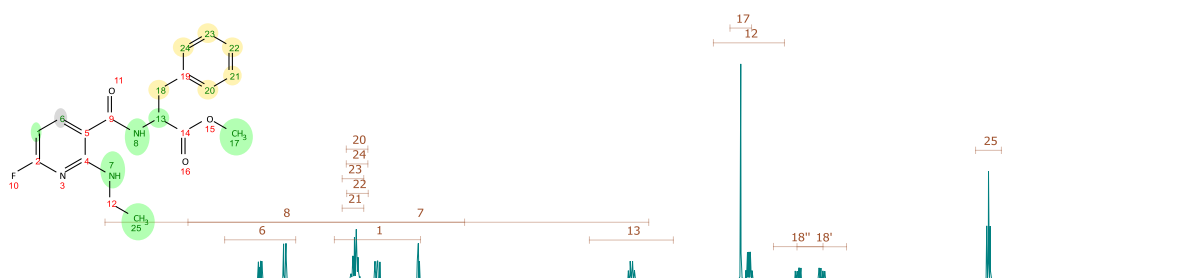
-63.13

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) -63.1.

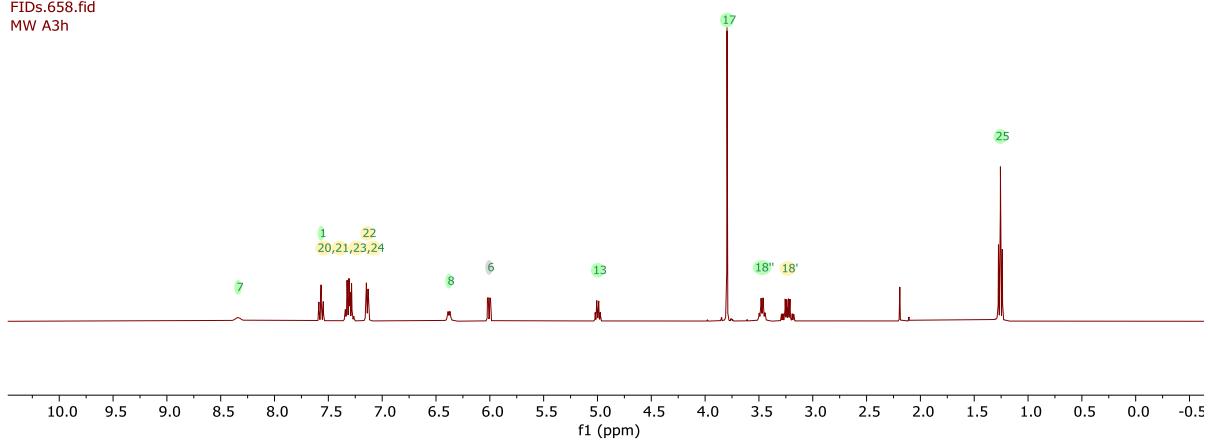


2.3.1.8.14 Compound 3f

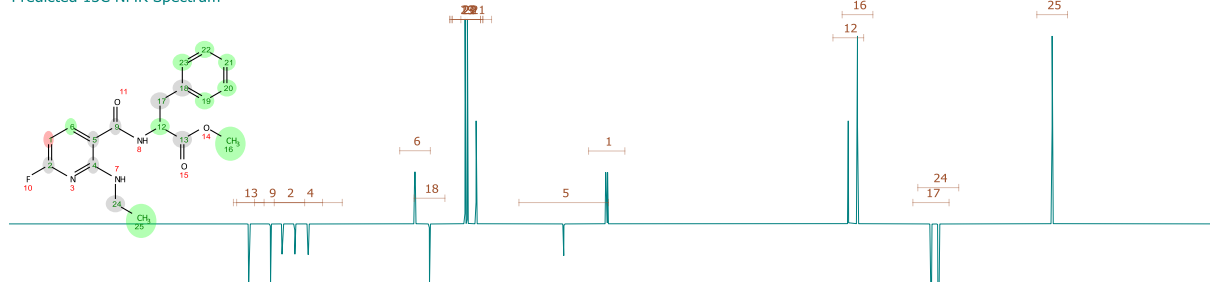
Predicted ^1H NMR Spectrum



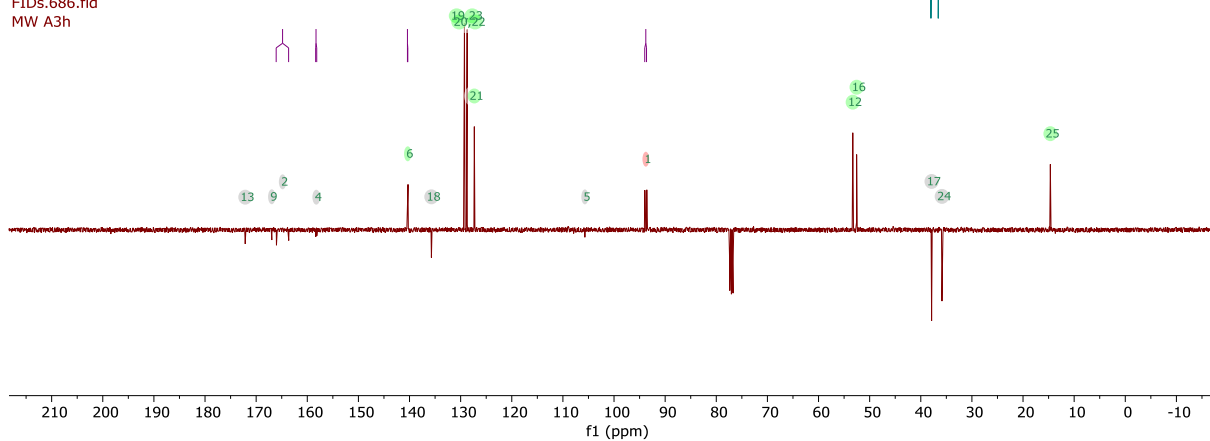
FIDs.658.fid
MW A3h



Predicted ^{13}C NMR Spectrum

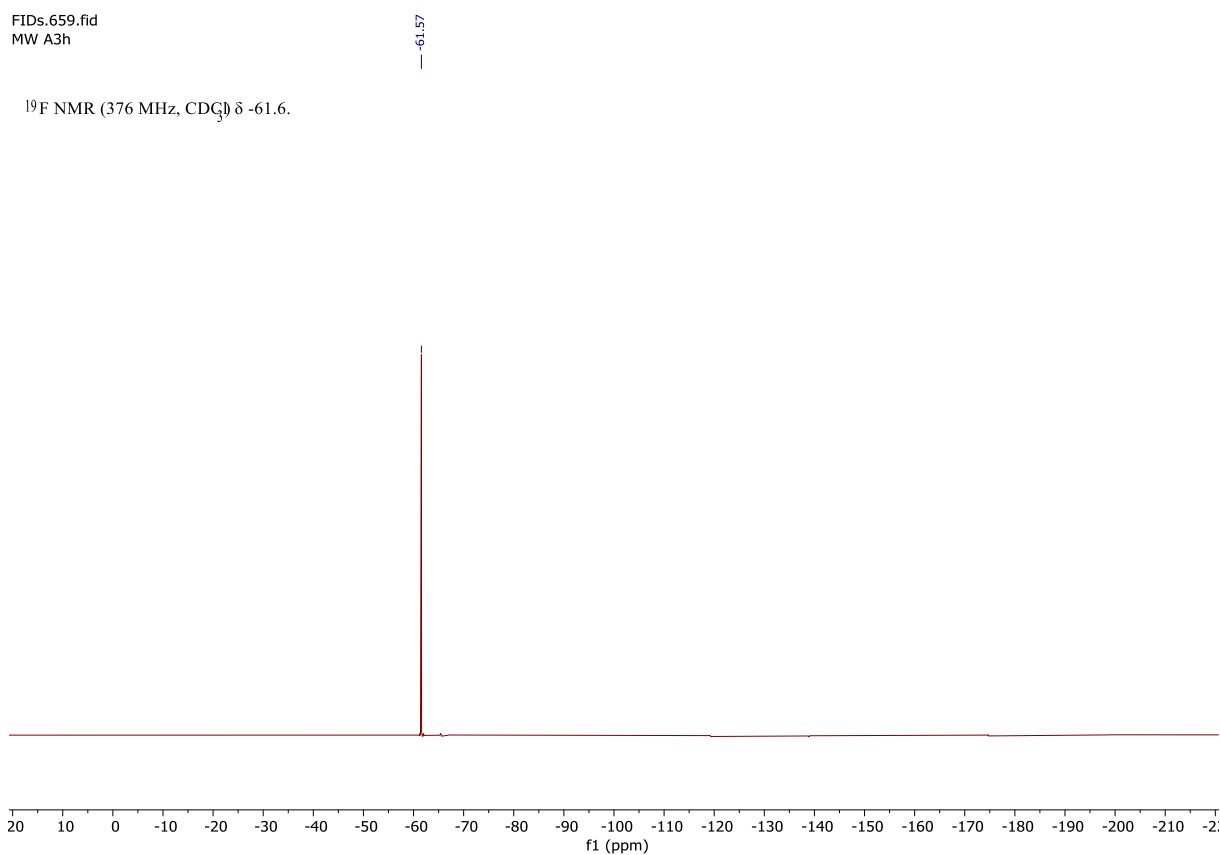


FIDs.686.fid
MW A3h



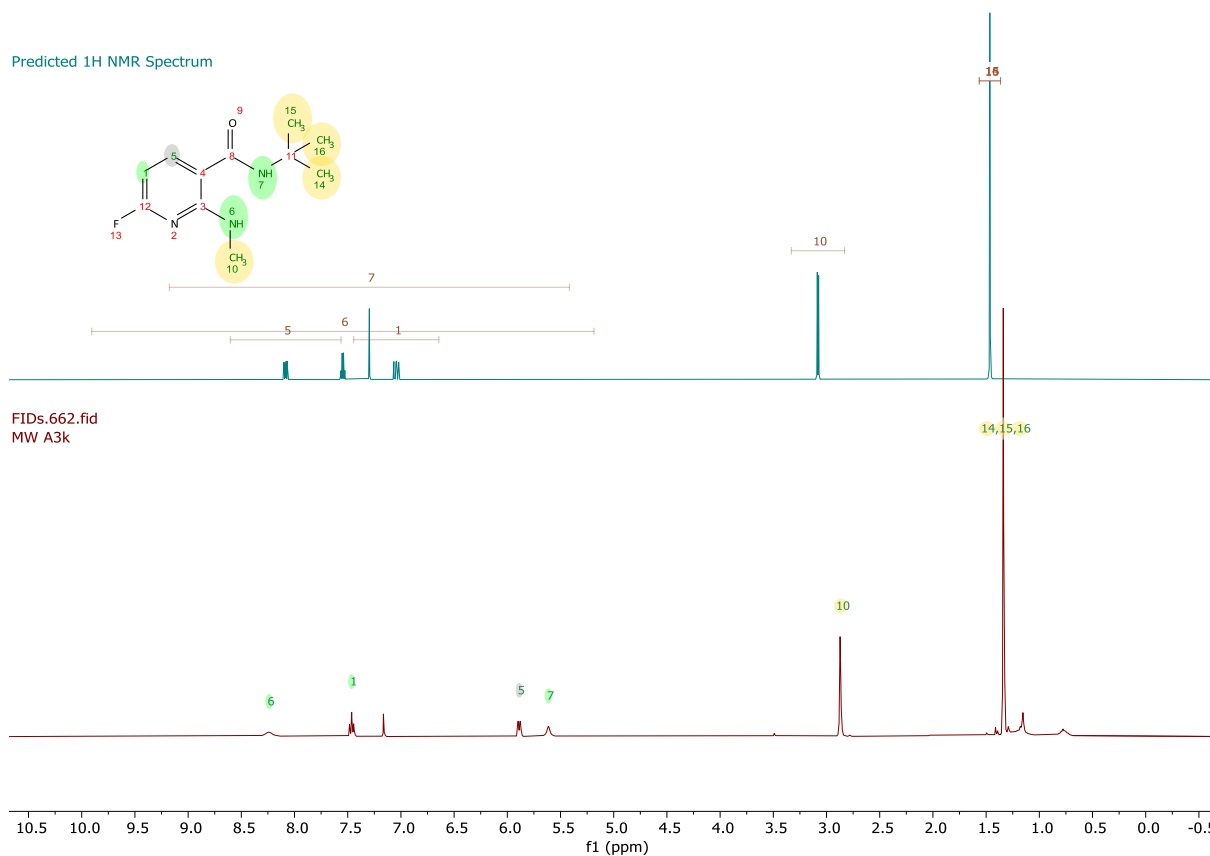
FIDs.659.fid
MW A3h

^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -61.6.

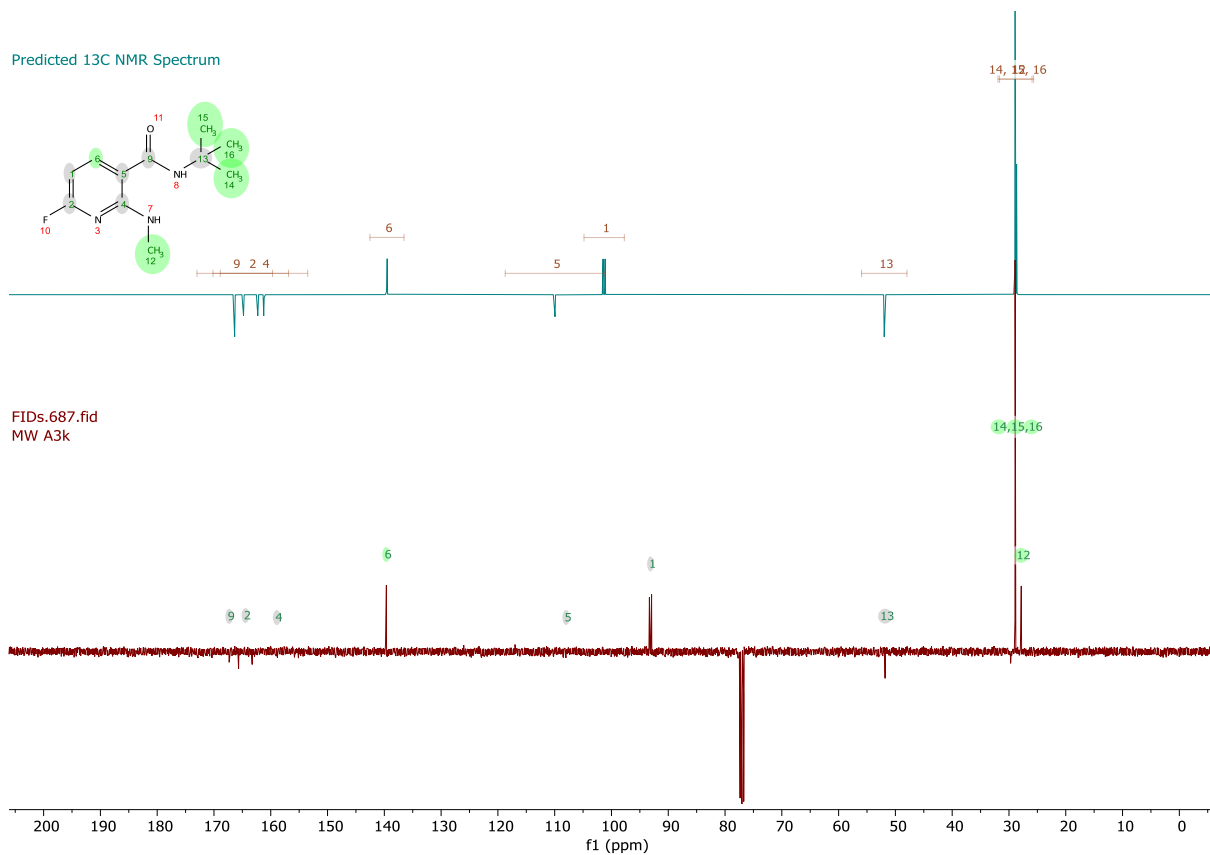


2.3.1.8.15 Compound **3g**

Predicted ¹H NMR Spectrum

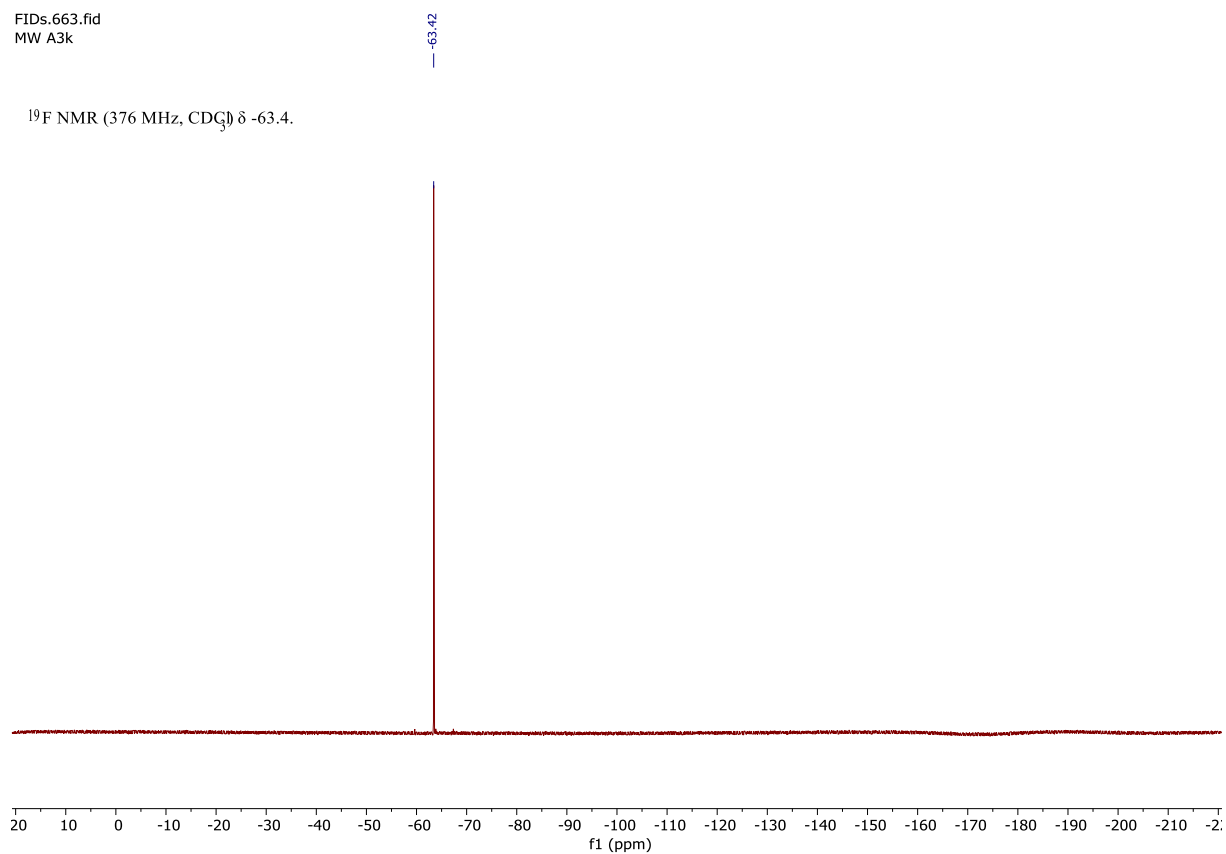


Predicted ¹³C NMR Spectrum



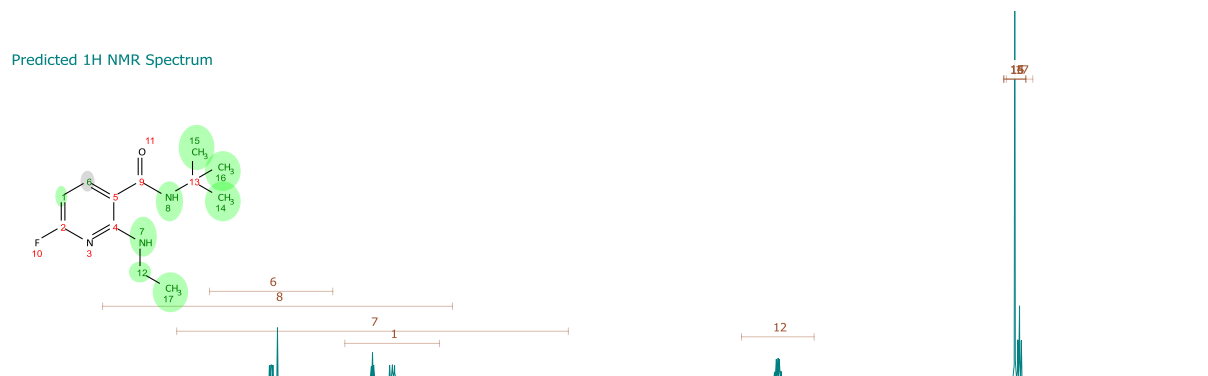
FIDs.663.fid
MW A3k

^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -63.4.

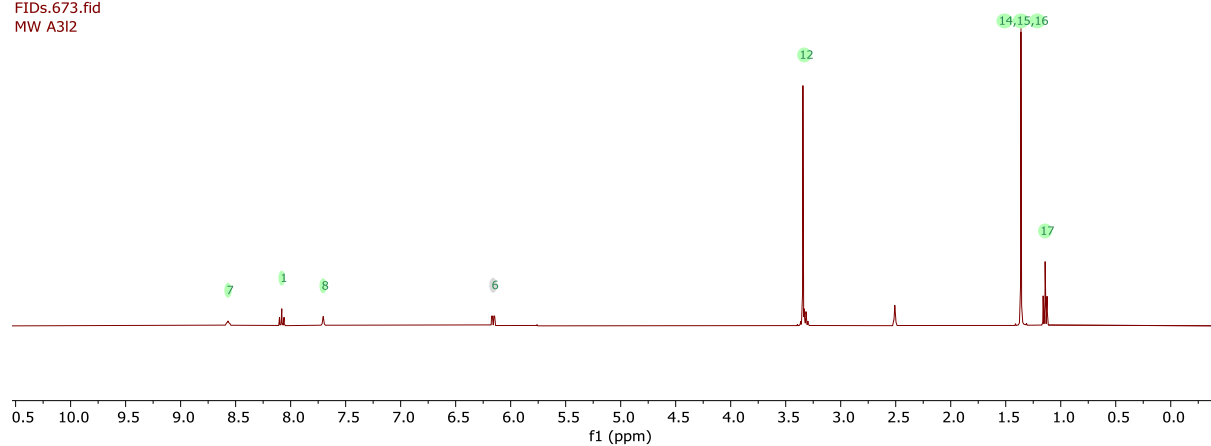


2.3.1.8.16 Compound 3h

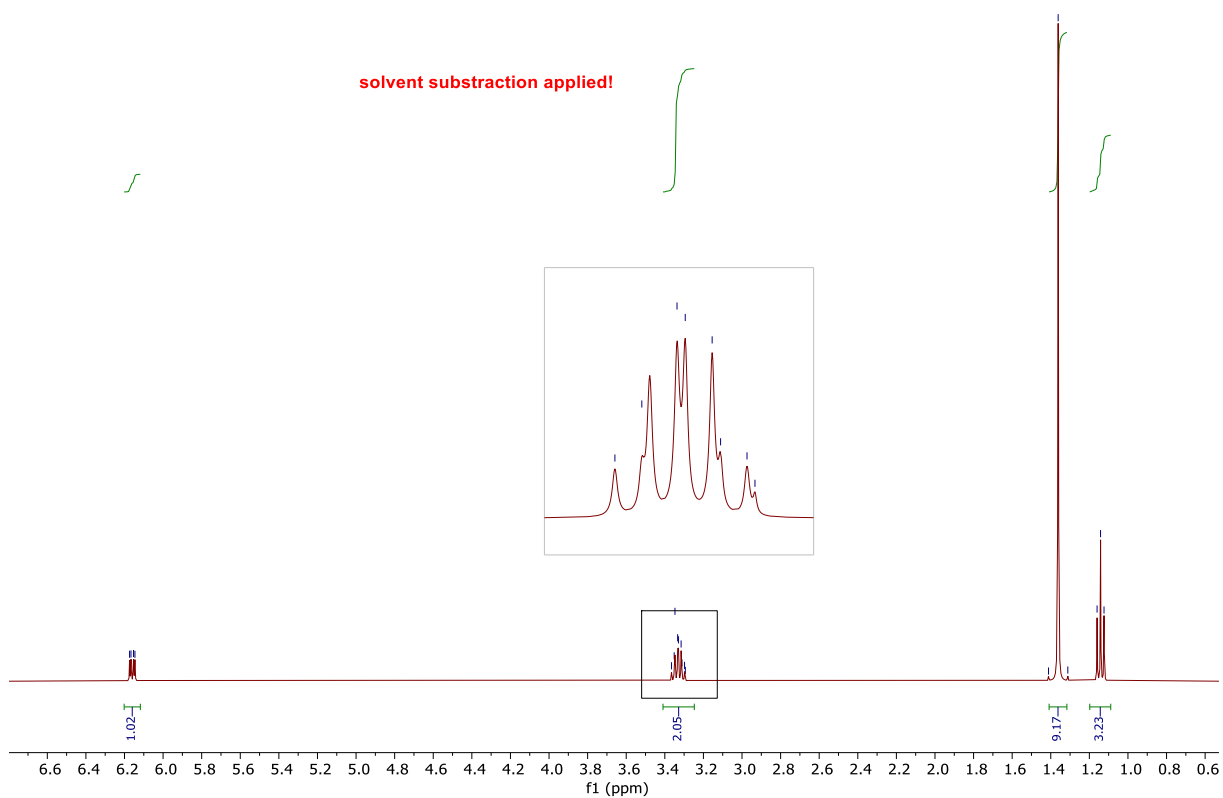
Predicted ^1H NMR Spectrum



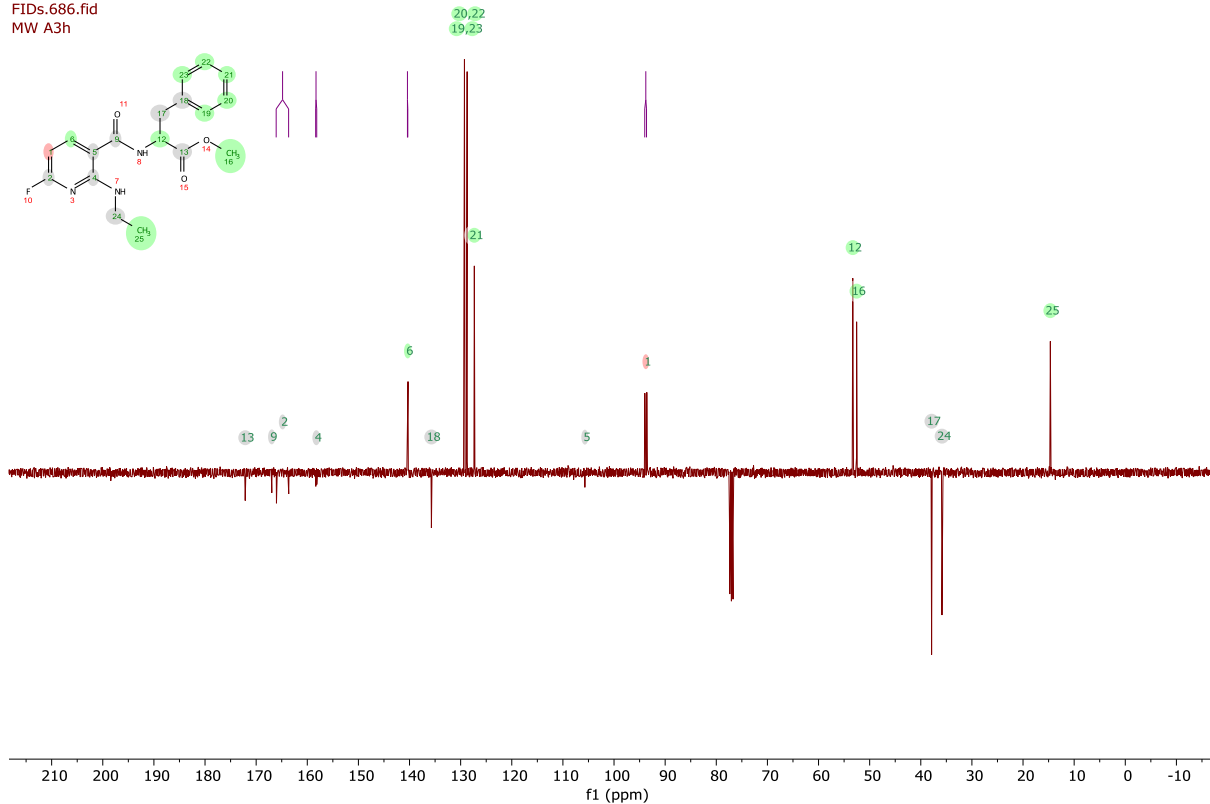
FIDs.673.fid
MW A3l2



FIDs.673.fid
MW A3I2

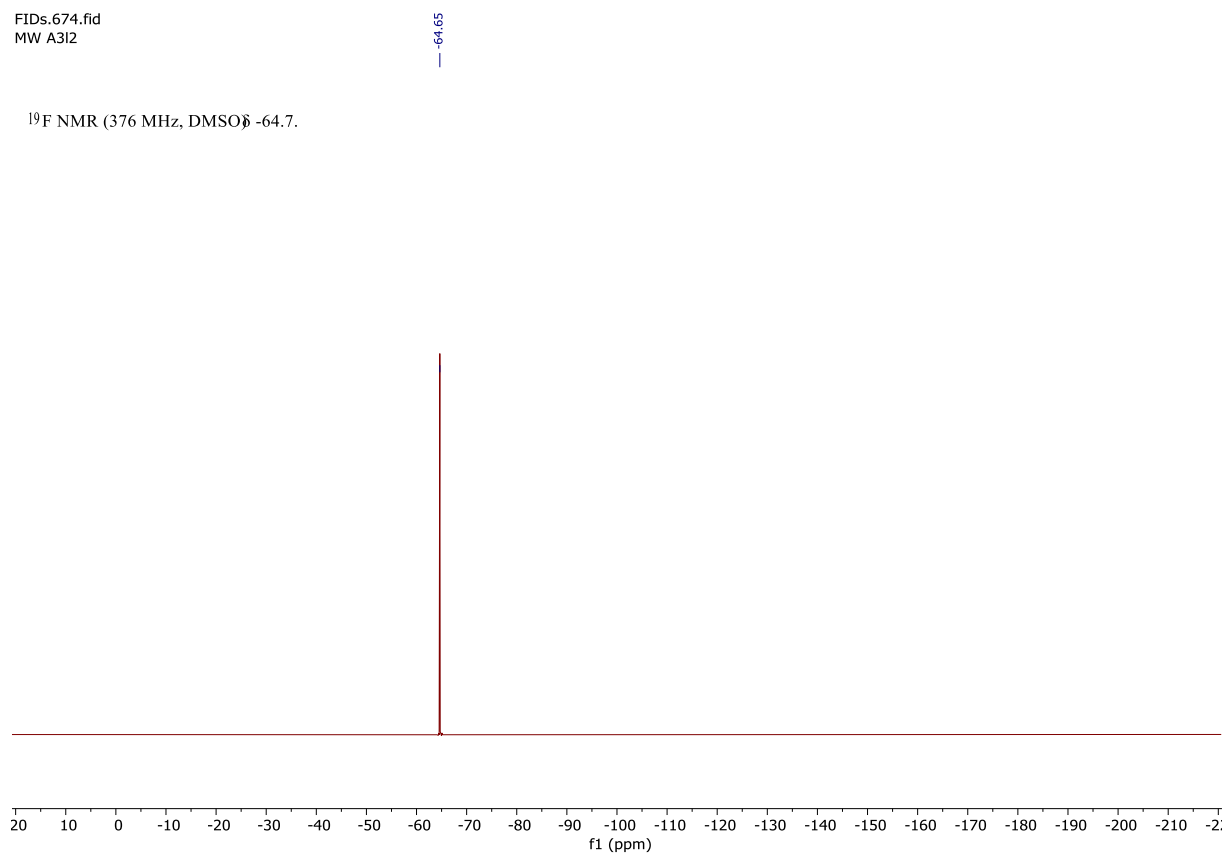


FIDs.686.fid
MW A3h



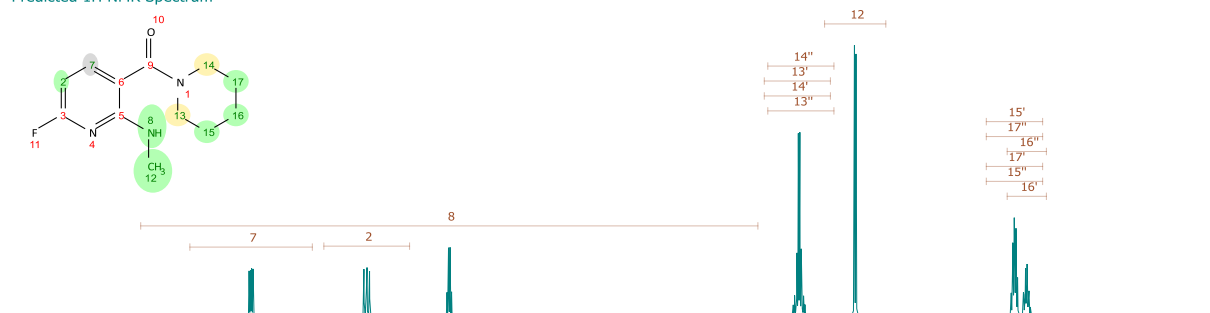
FIDs.674.fid
MW A312

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) -64.7.

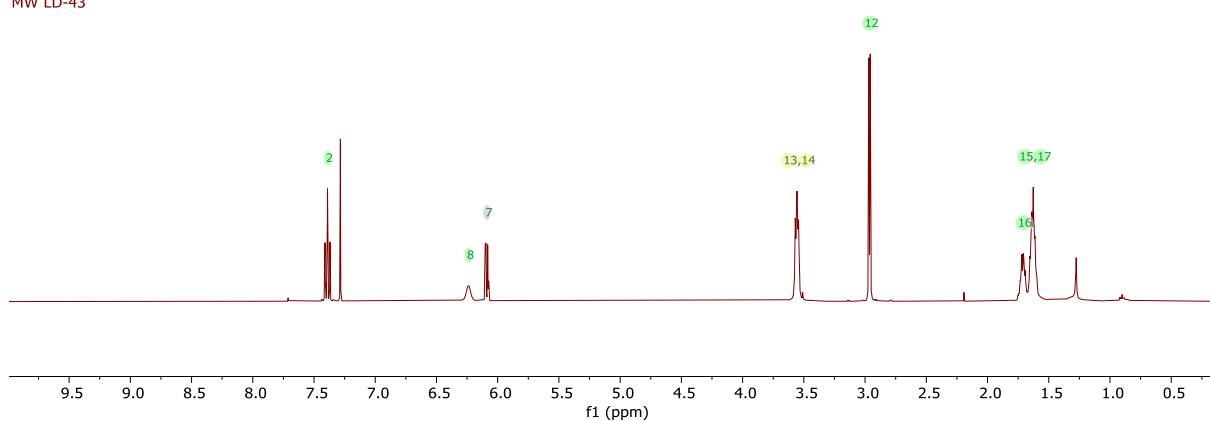


2.3.1.8.17 Compound 3i

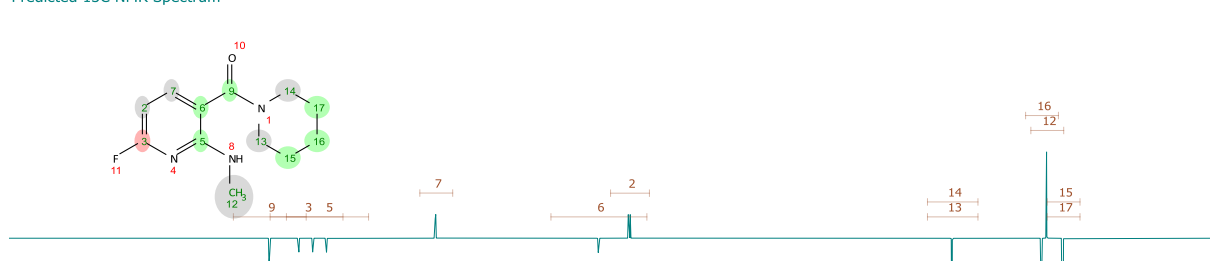
Predicted ¹H NMR Spectrum



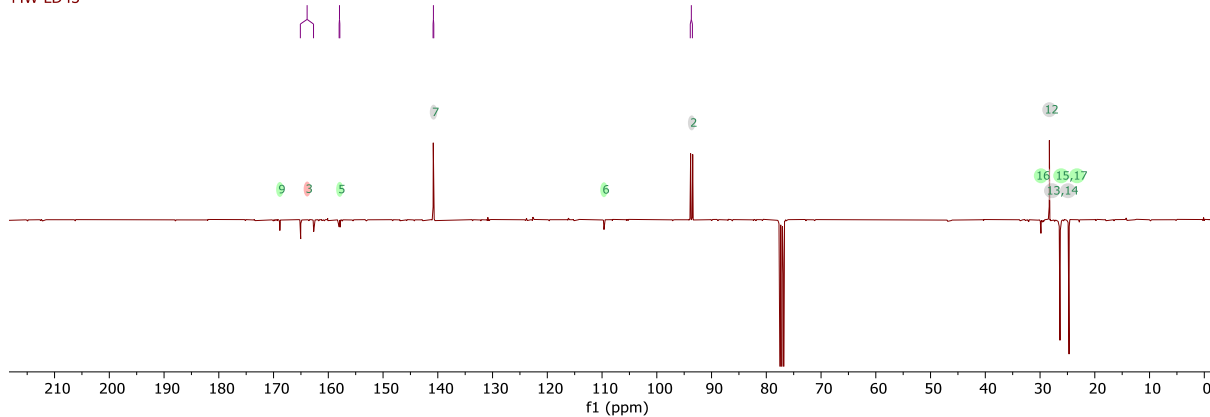
FIDs.643.fid
MW LD-43



Predicted ¹³C NMR Spectrum

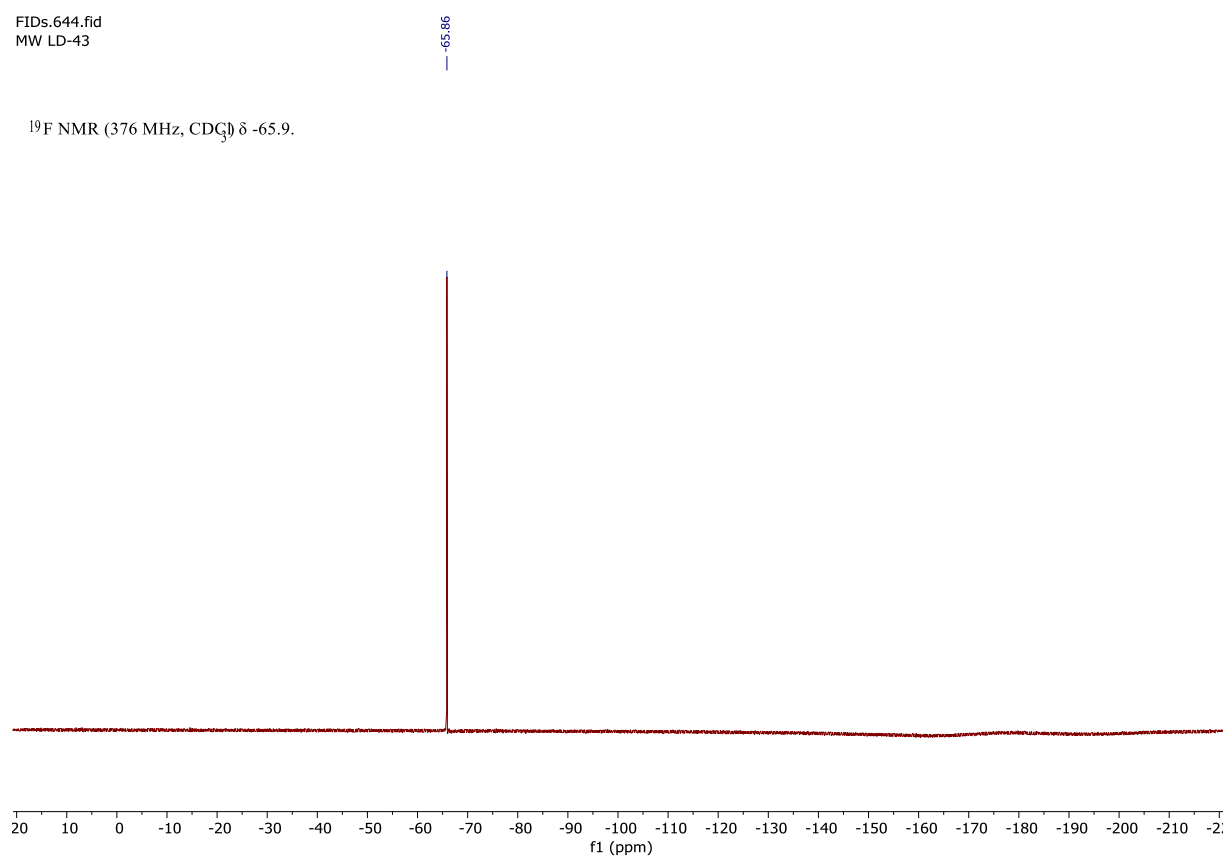


FIDs.667.fid
MW LD43



FIDs.644.fid
MW LD-43

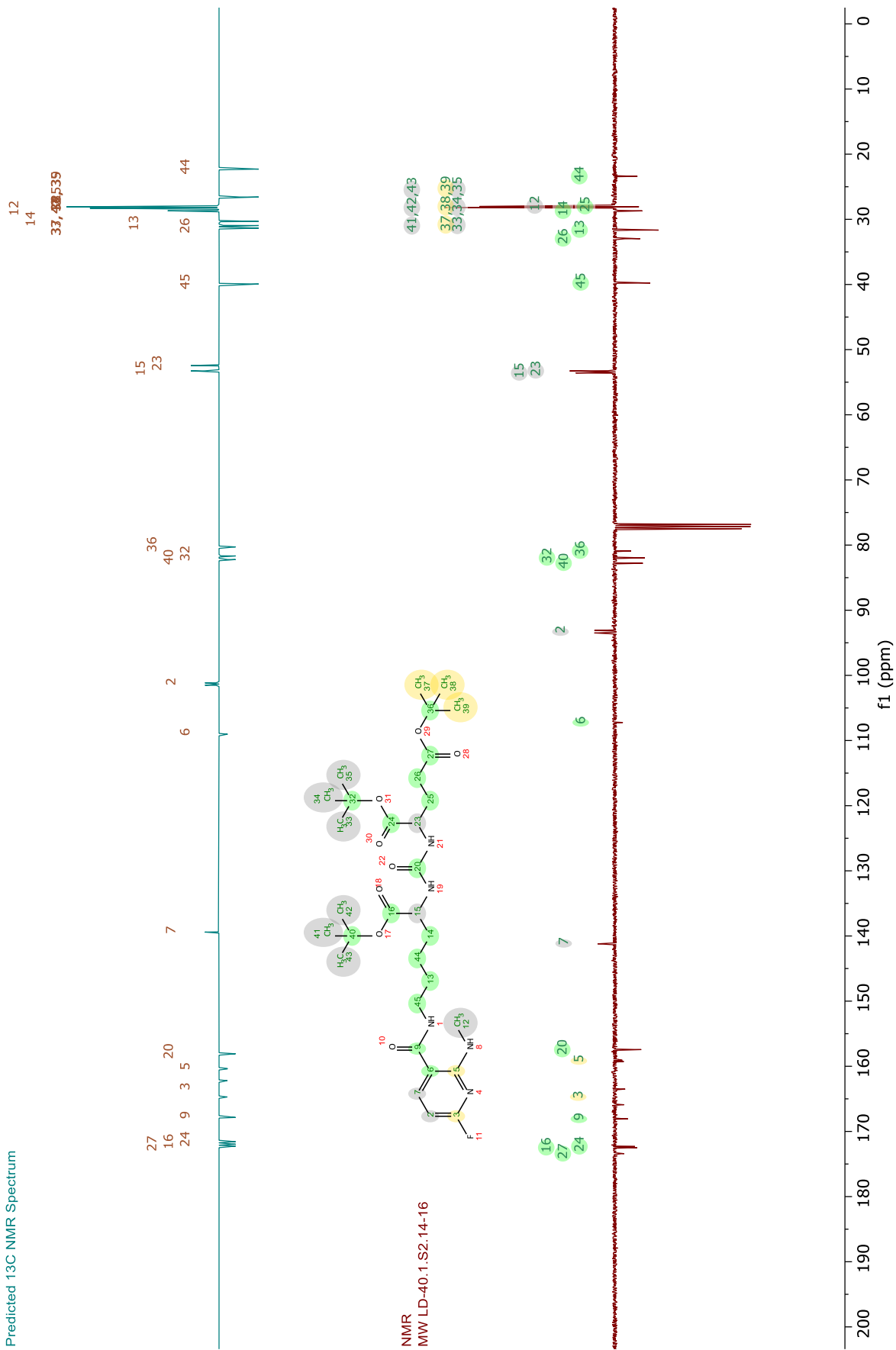
^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -65.9.



2.3.1.8.18 Compound **3j**

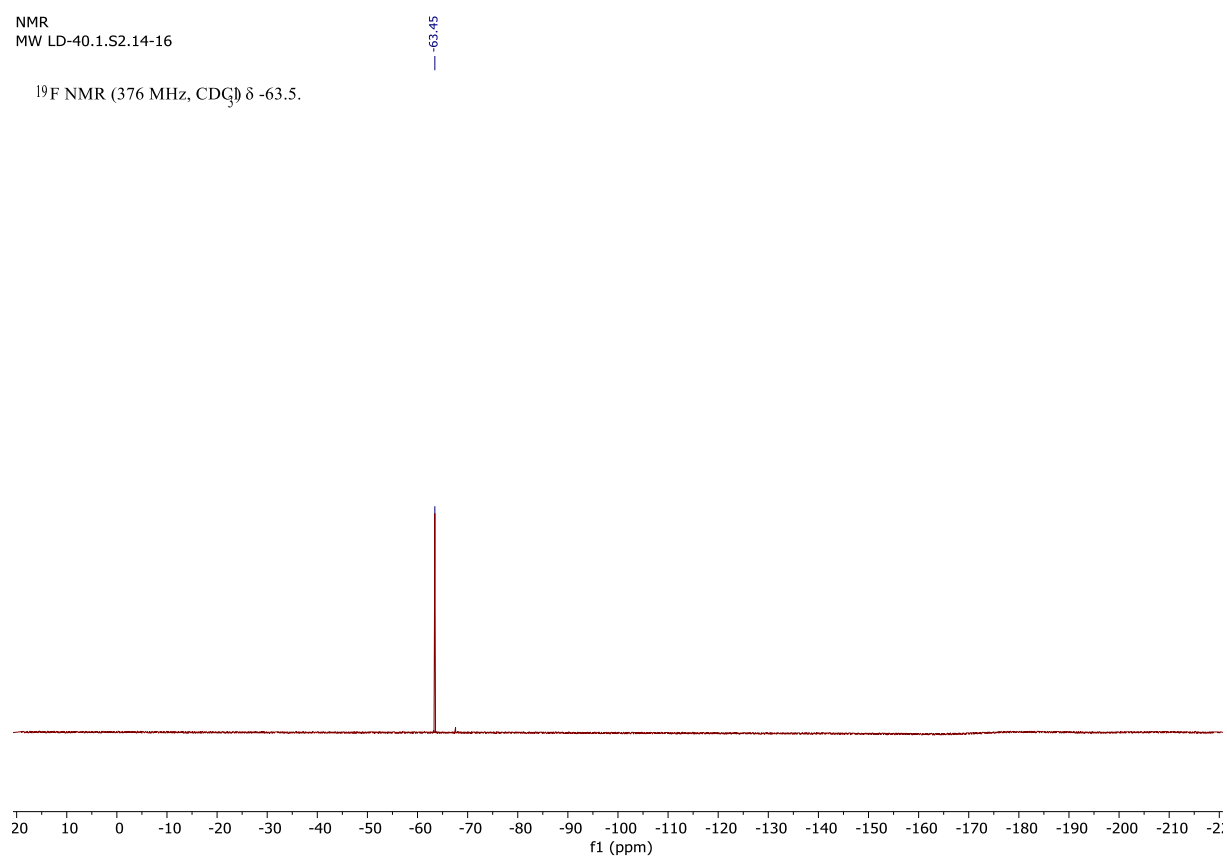


Predicted ¹³C NMR Spectrum

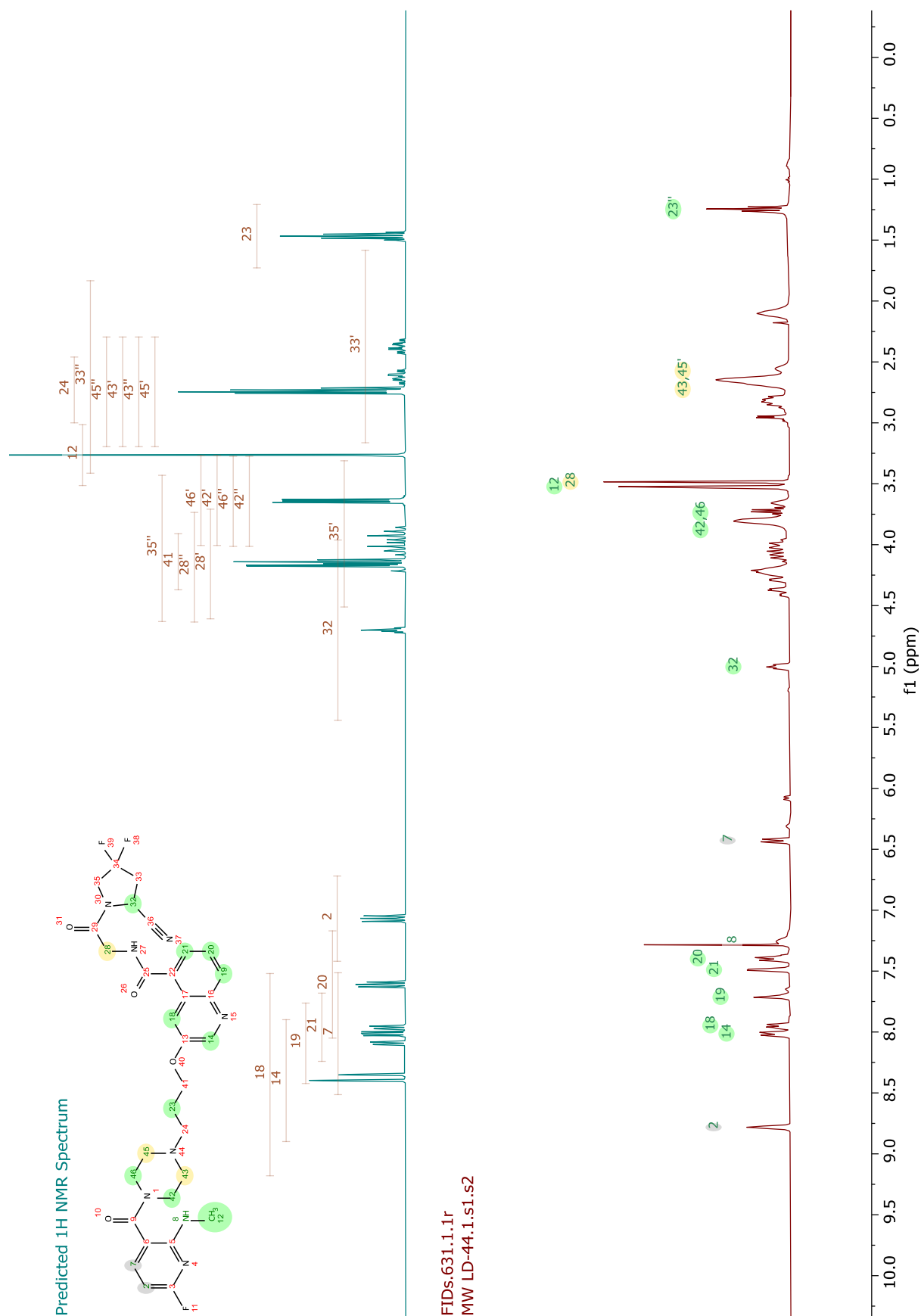


NMR
MW LD-40.1.S2.14-16

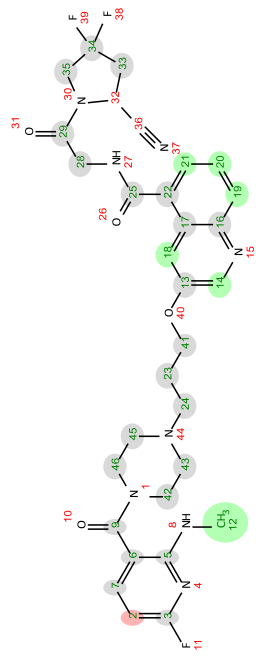
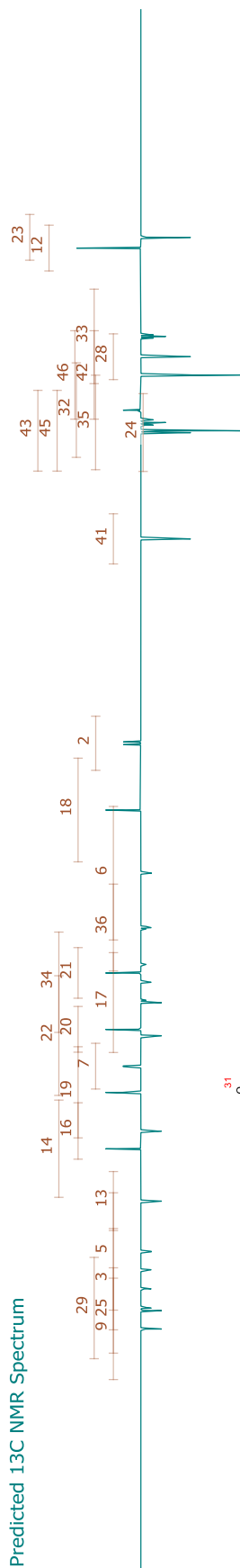
^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -63.5.



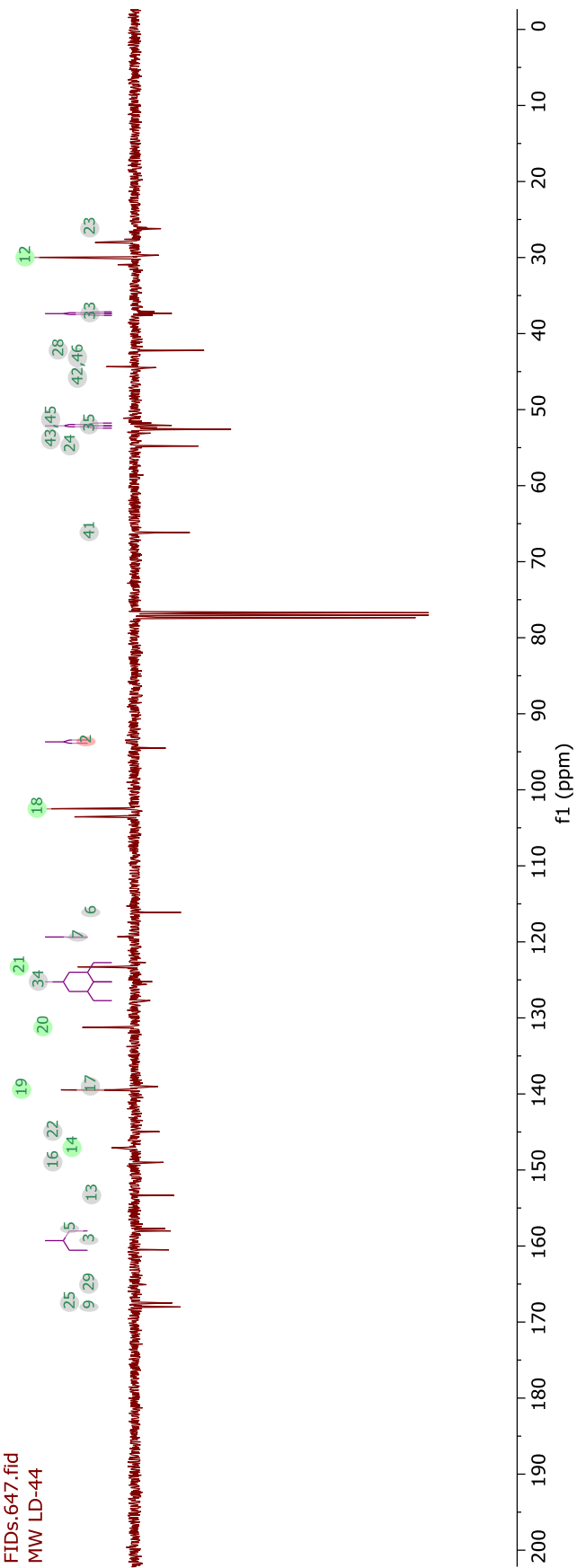
2.3.1.8.19 Compound **3k**



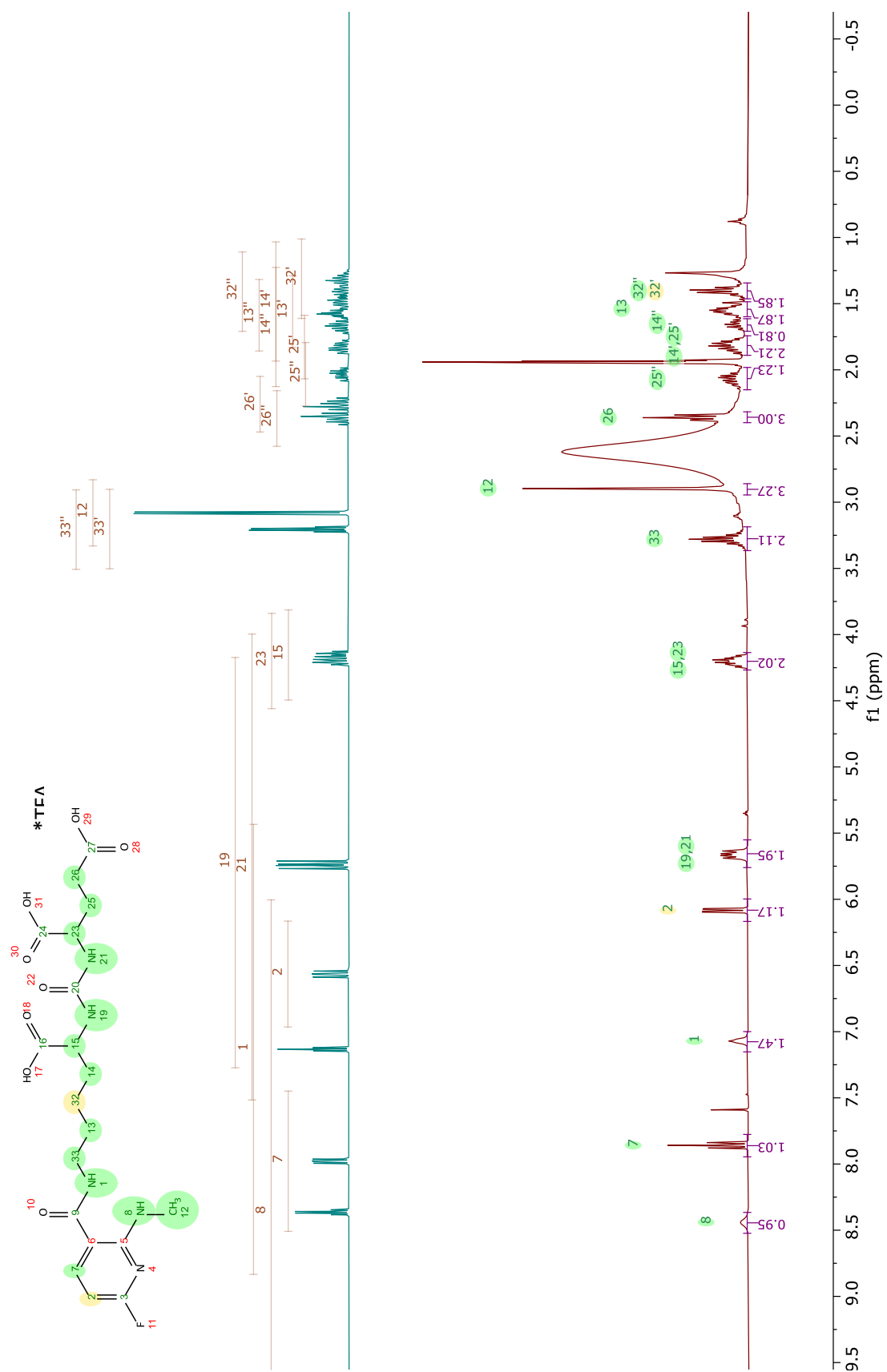
Predicted ¹³C NMR Spectrum



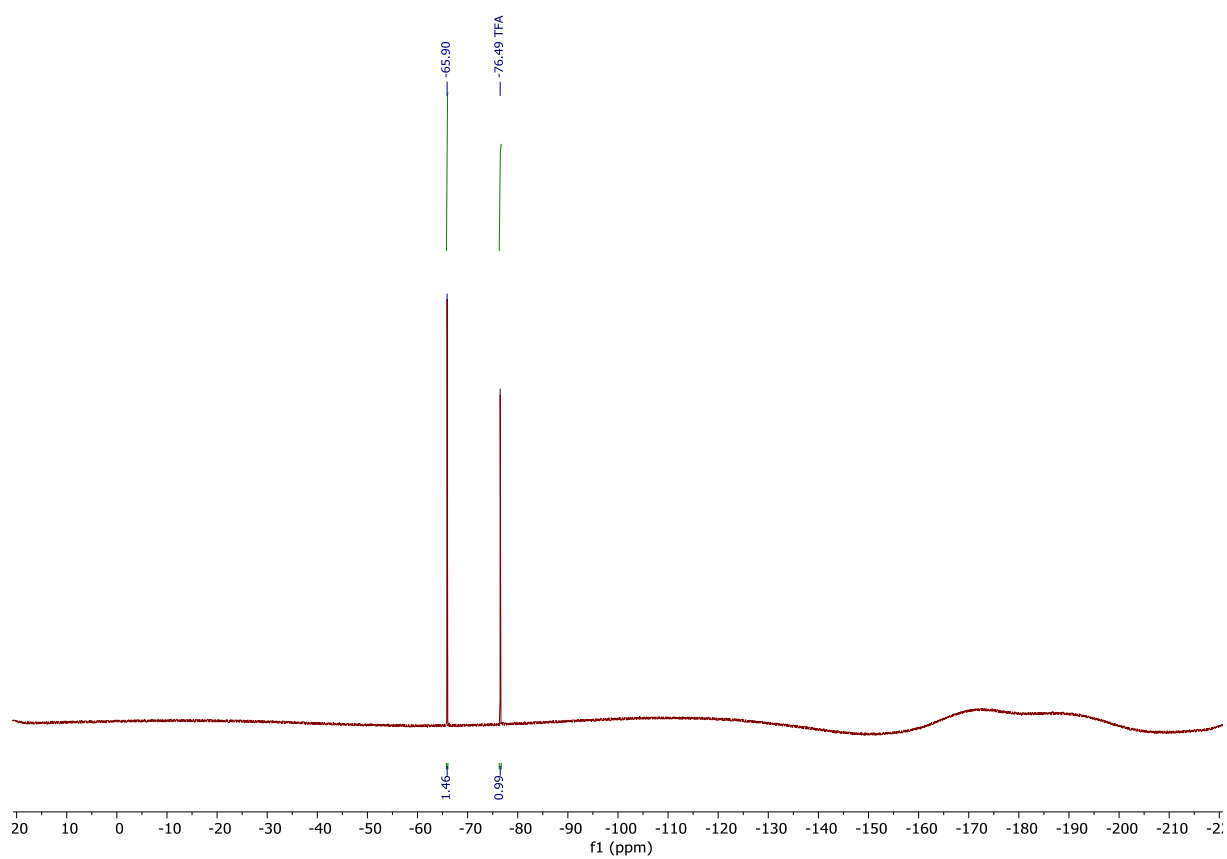
FIDs.647.fid
MW LD-44



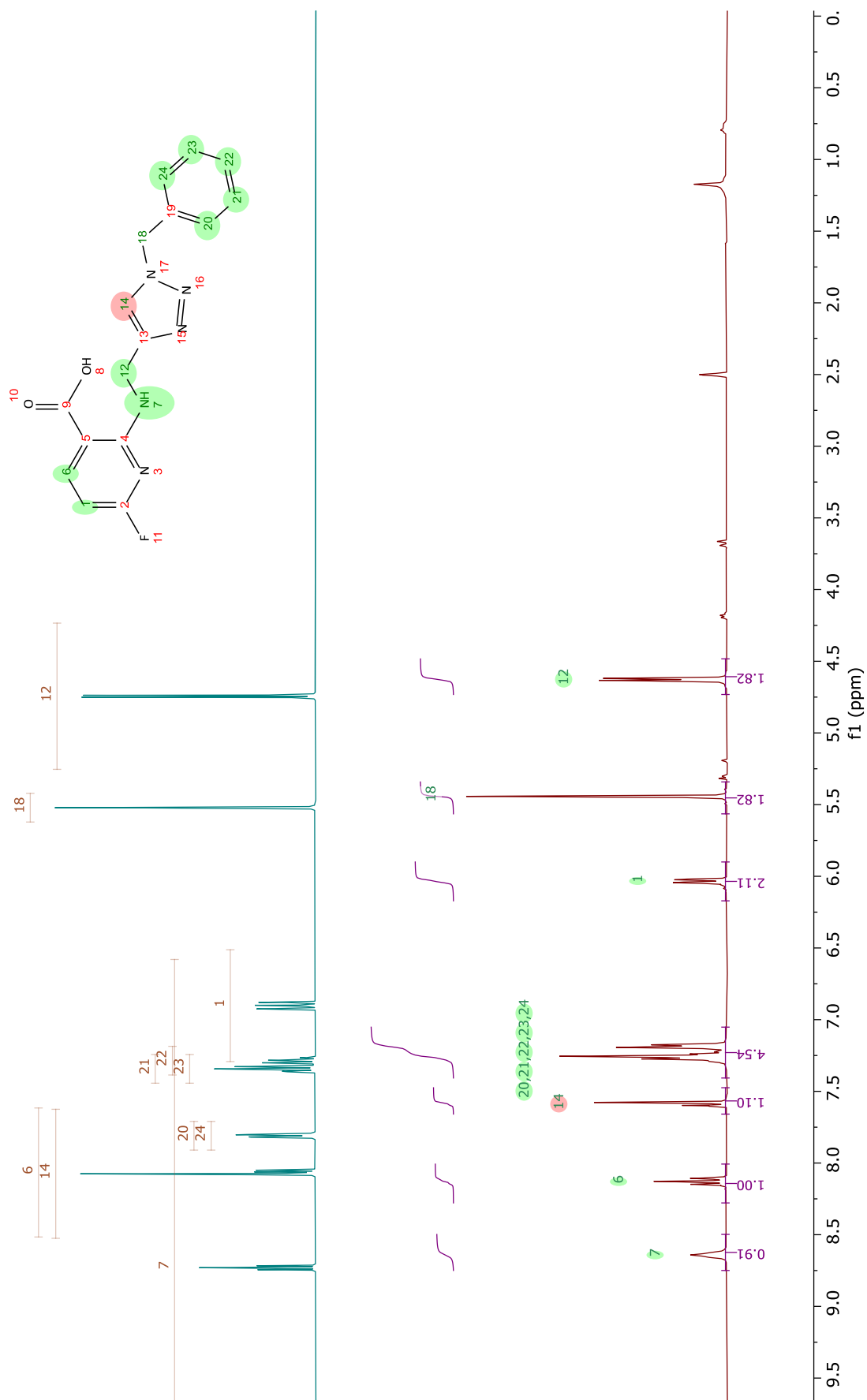
2.3.1.8.20 Compound JK-PSMA15

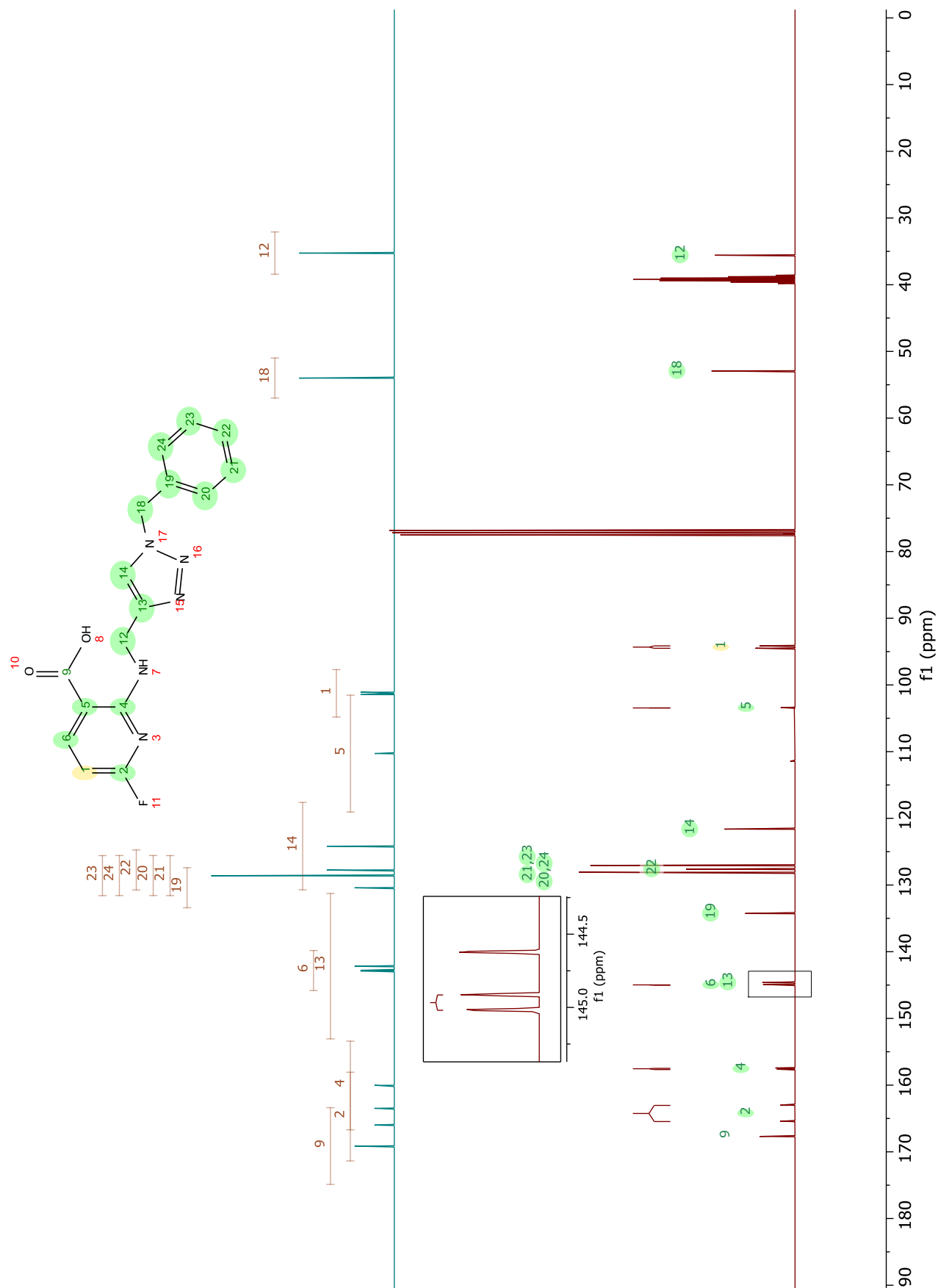


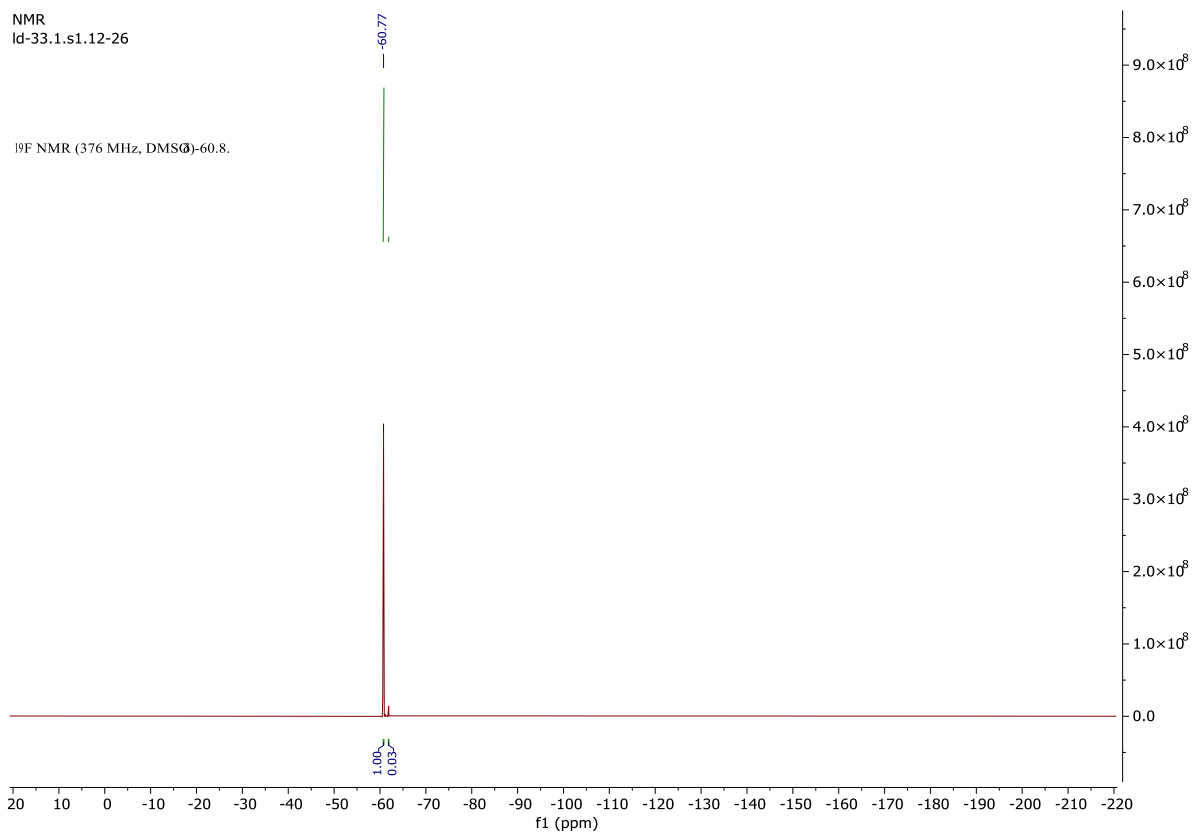




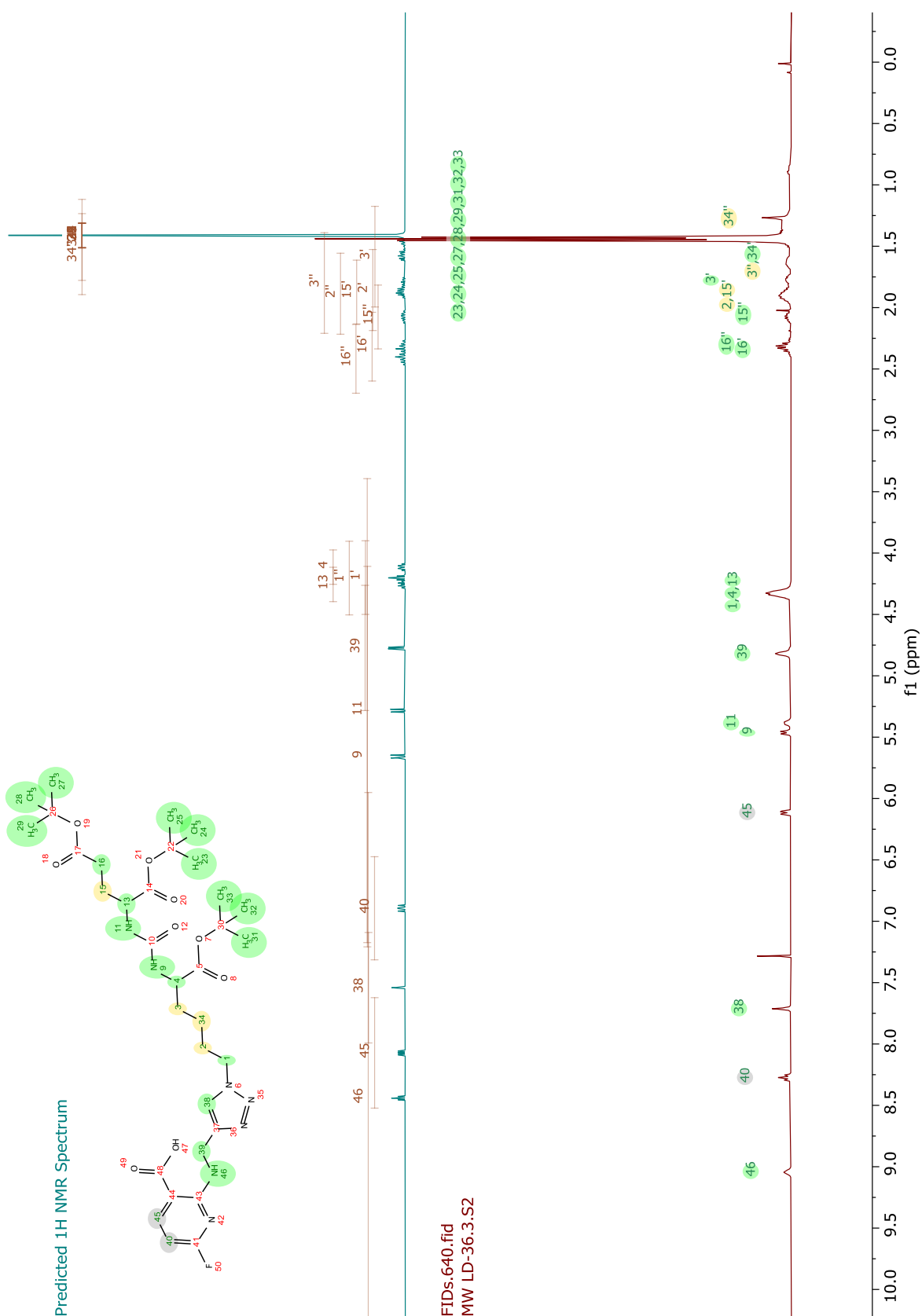
2.3.1.8.21 Compound **6a**



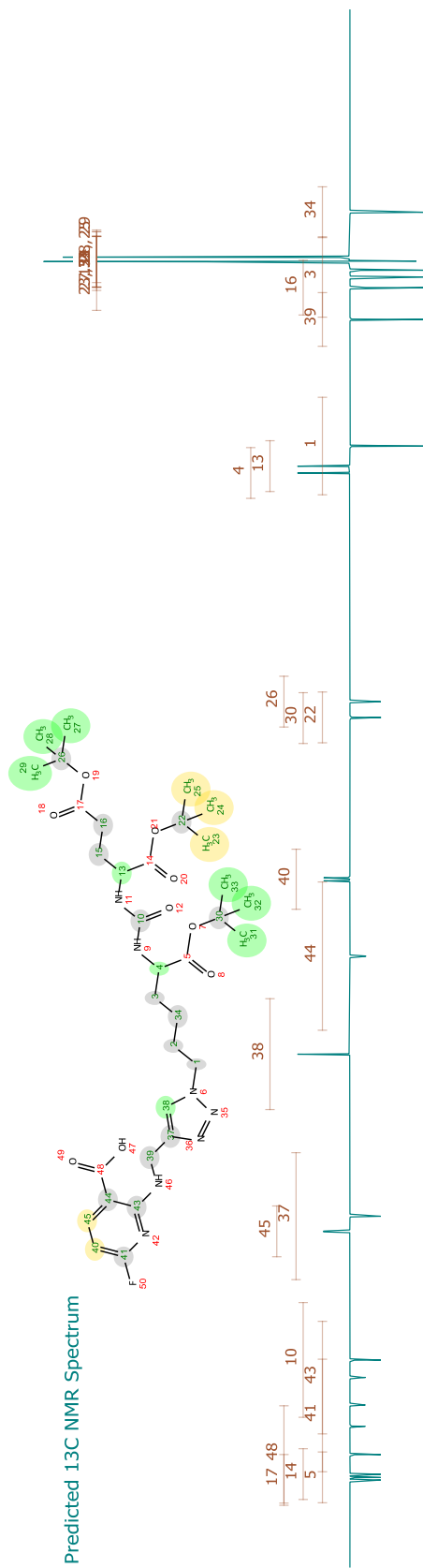




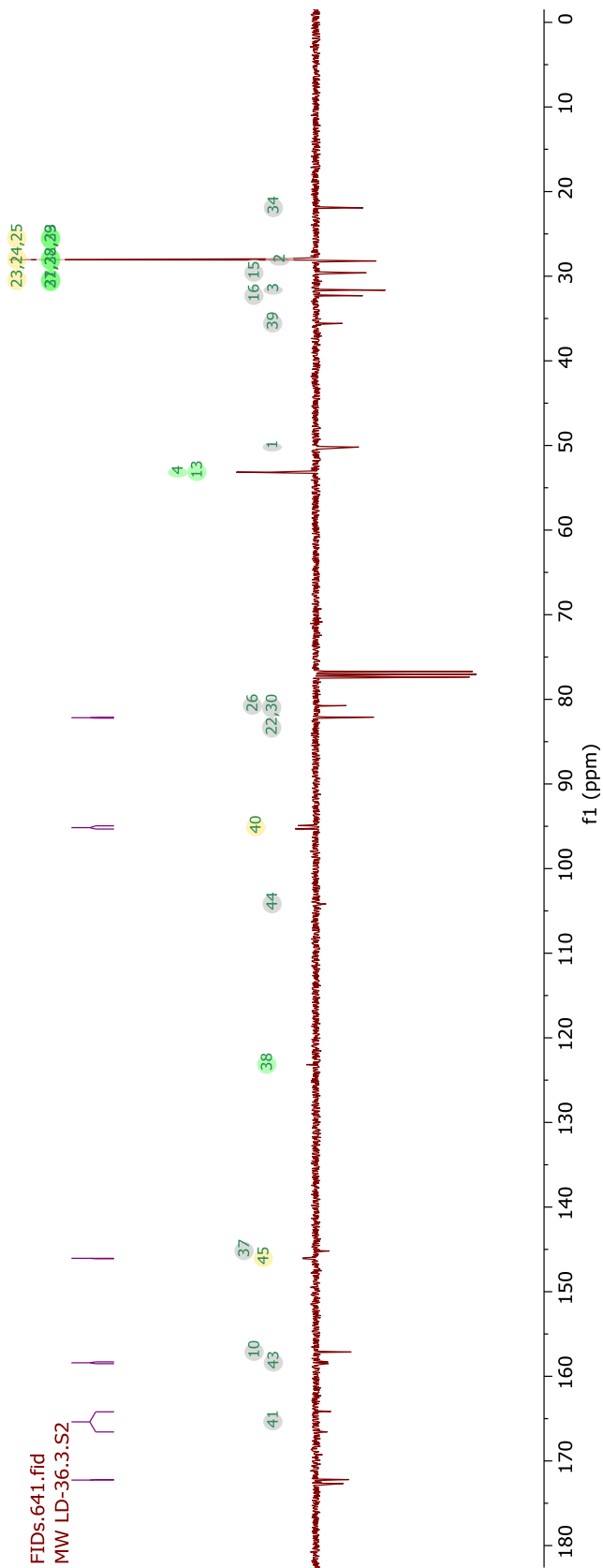
2.3.1.8.22 Compound **6b**



Predicted ¹³C NMR Spectrum

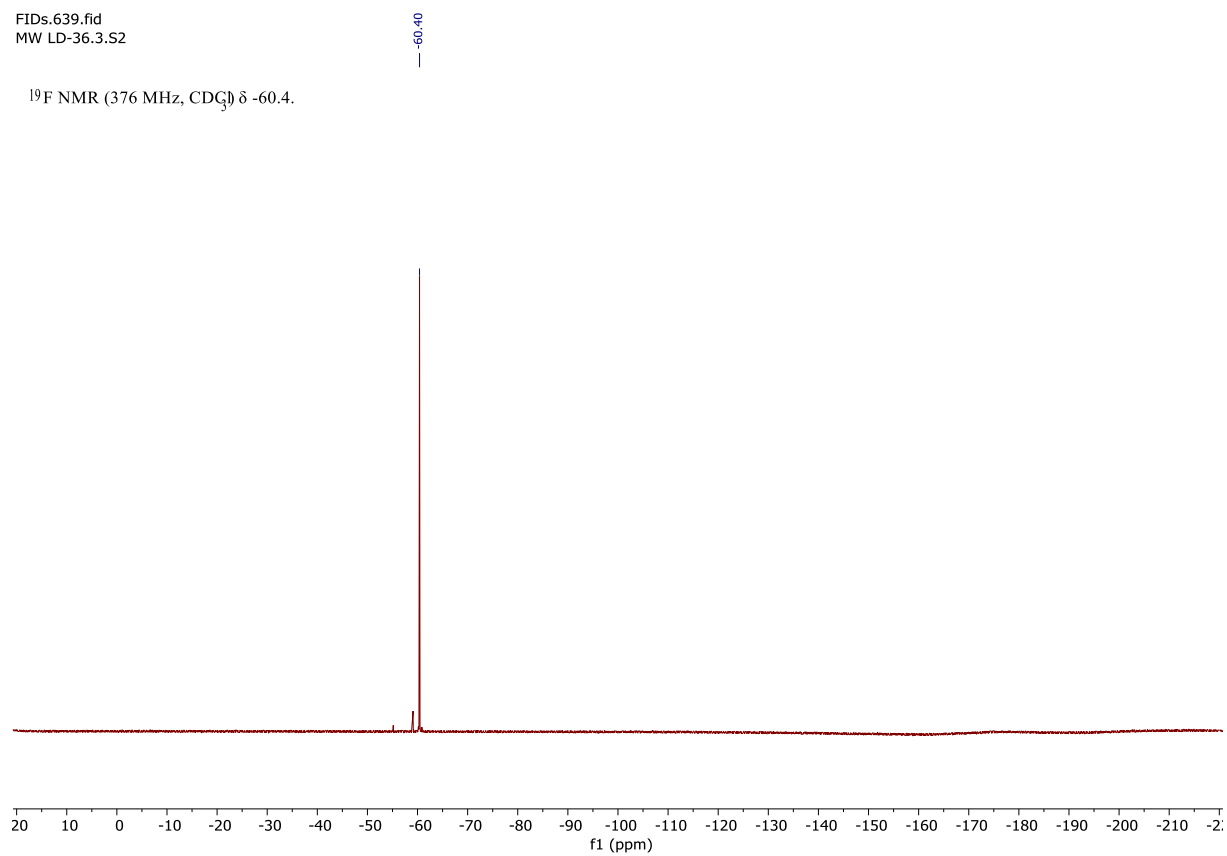


FIDs.641.fid
MW LD-36.3.S2

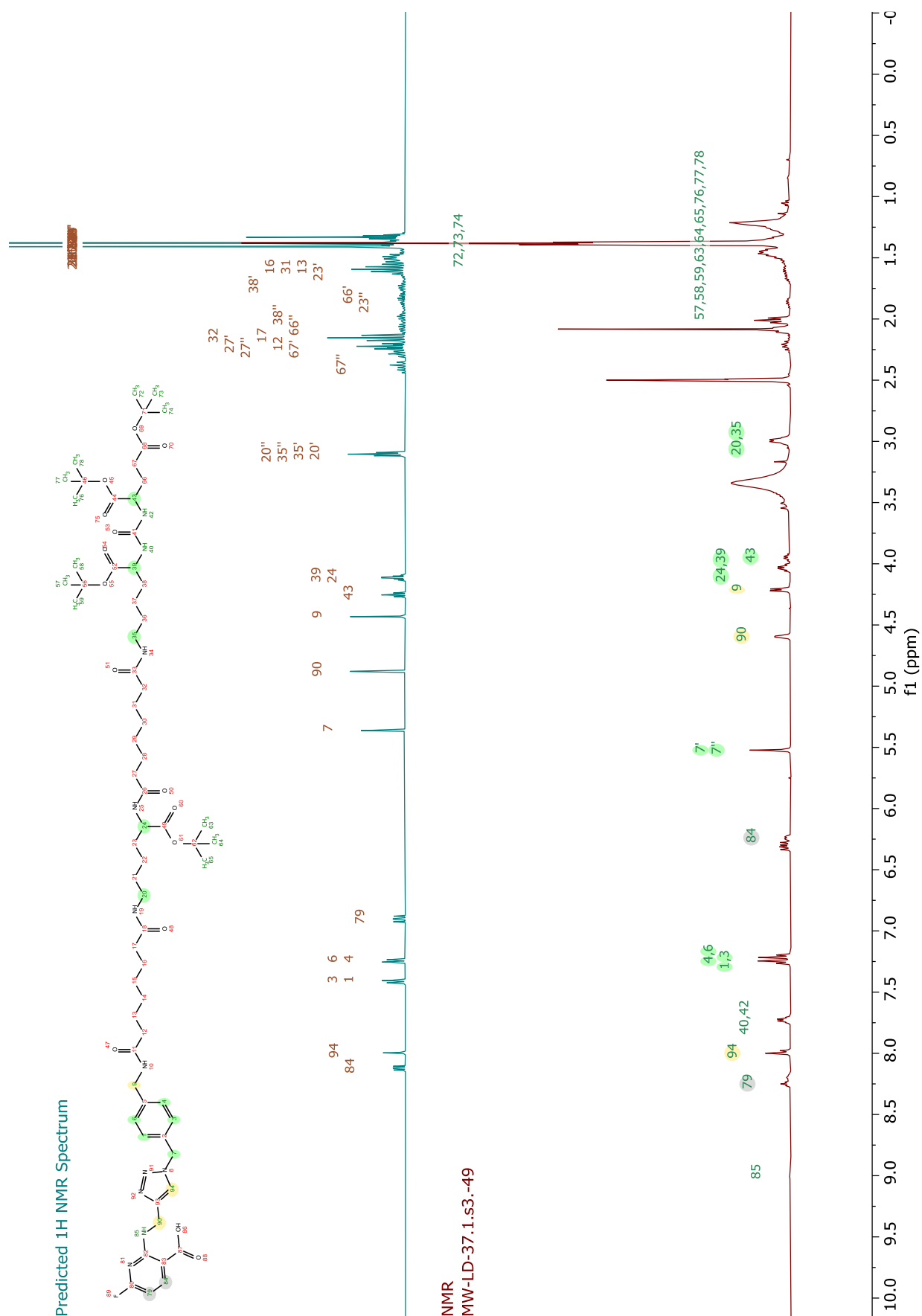


FIDs.639.fid
MW LD-36.3.S2

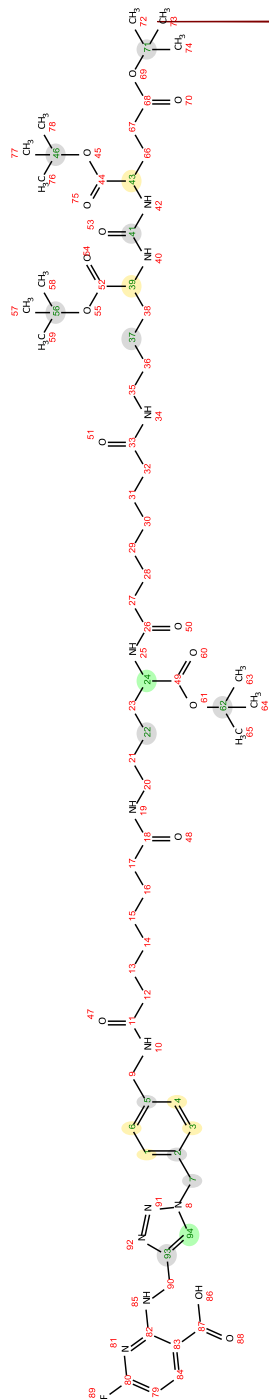
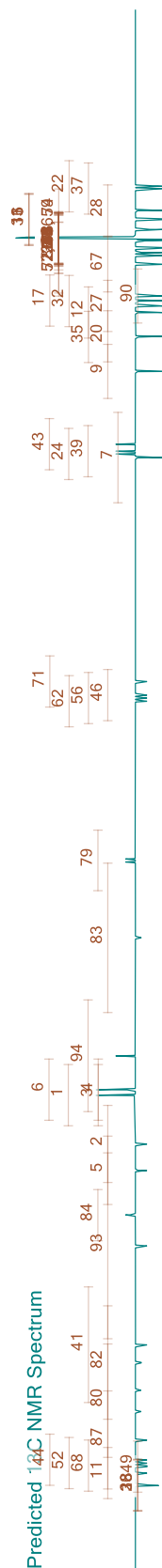
^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -60.4.



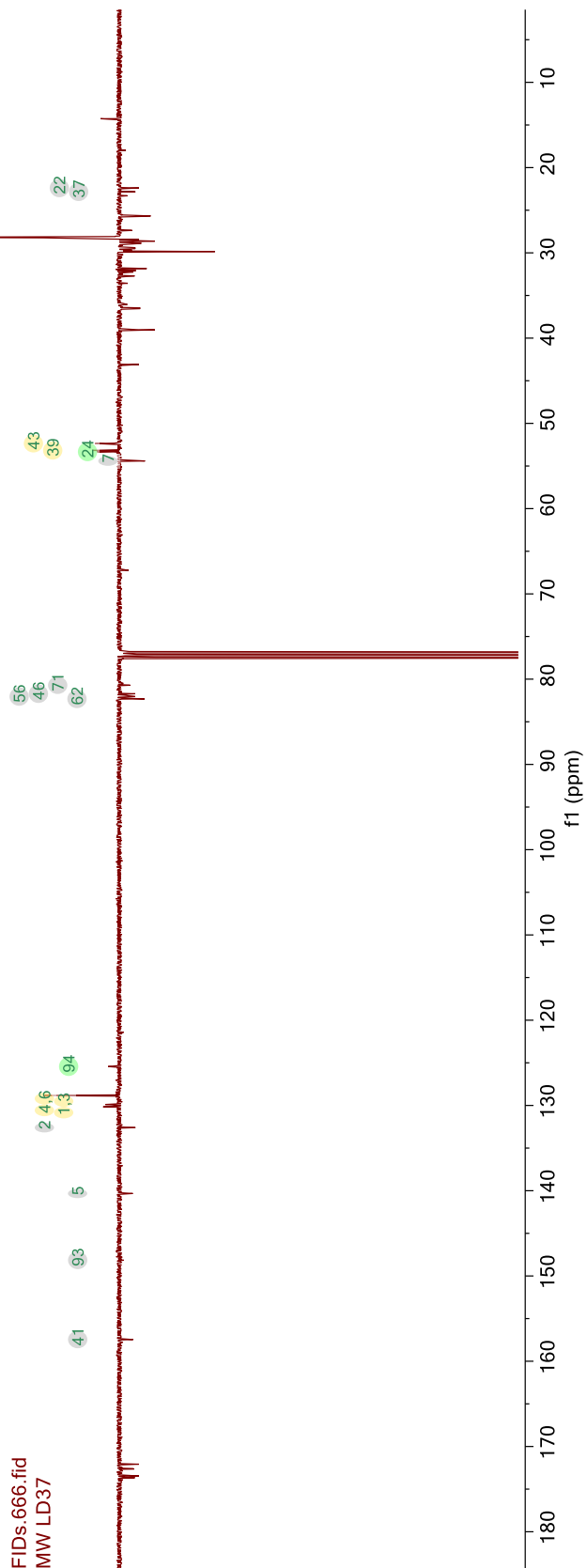
2.3.1.8.23 Compound 6c



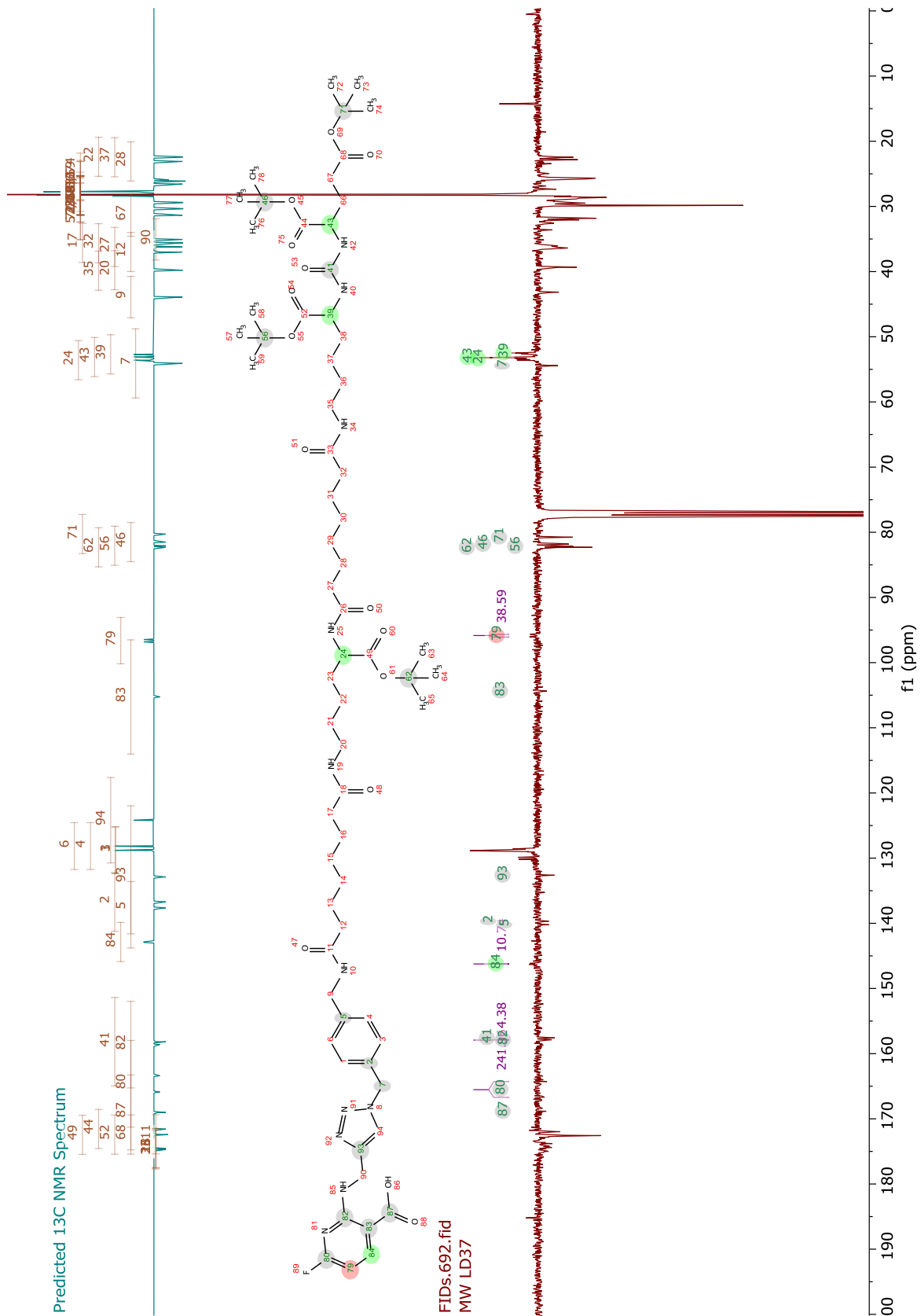
Predicted ¹³C NMR Spectrum



FIDs.666.fid
MW LD37

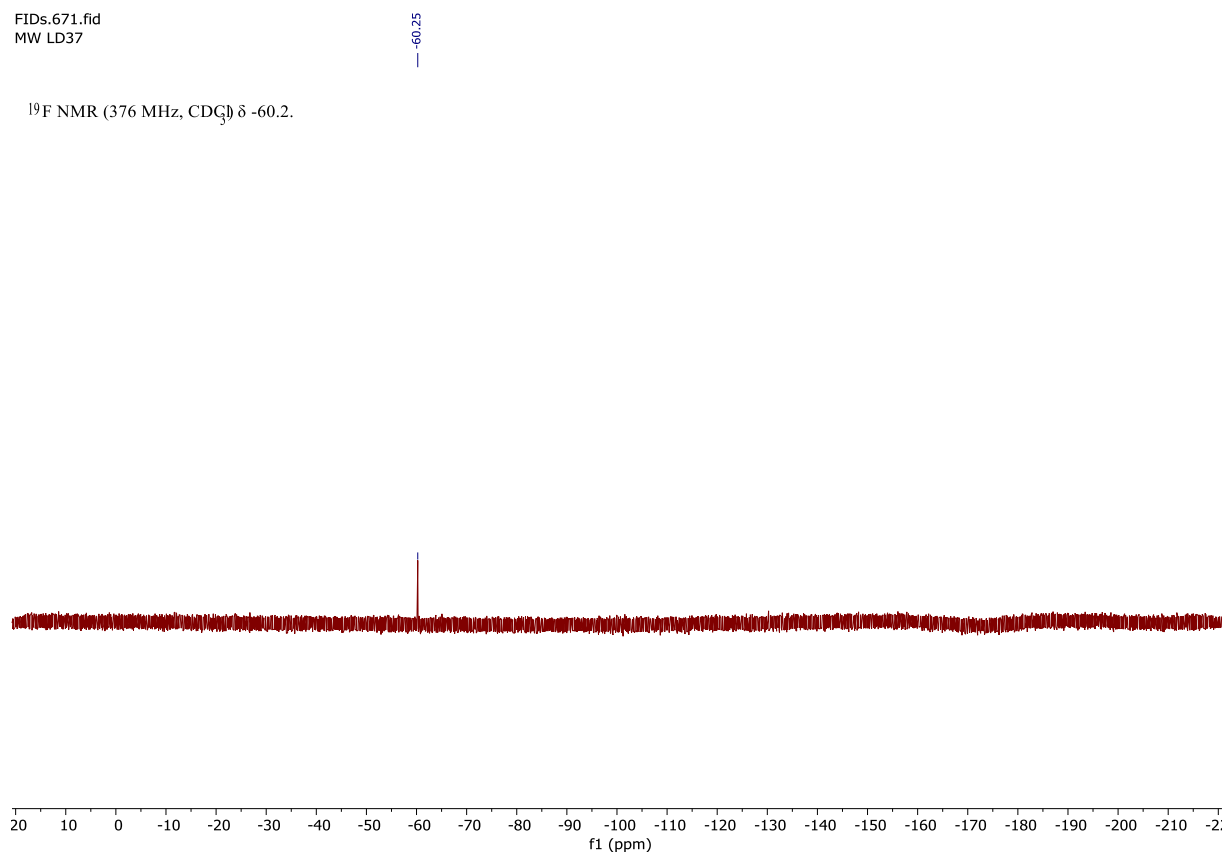


Predicted ¹³C NMR Spectrum



FIDs.671.fid
MW LD37

^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -60.2.



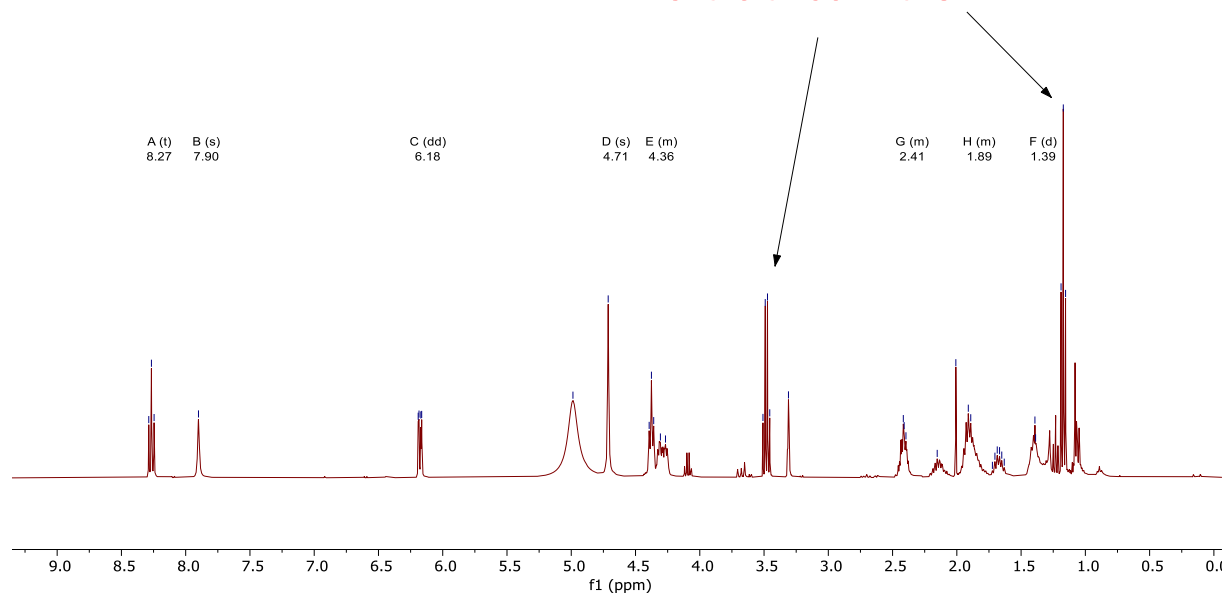
2.3.1.8.24 Compound JK-PSMA16

Rar\$DRa15060.2509.710.fid
MW LD-35

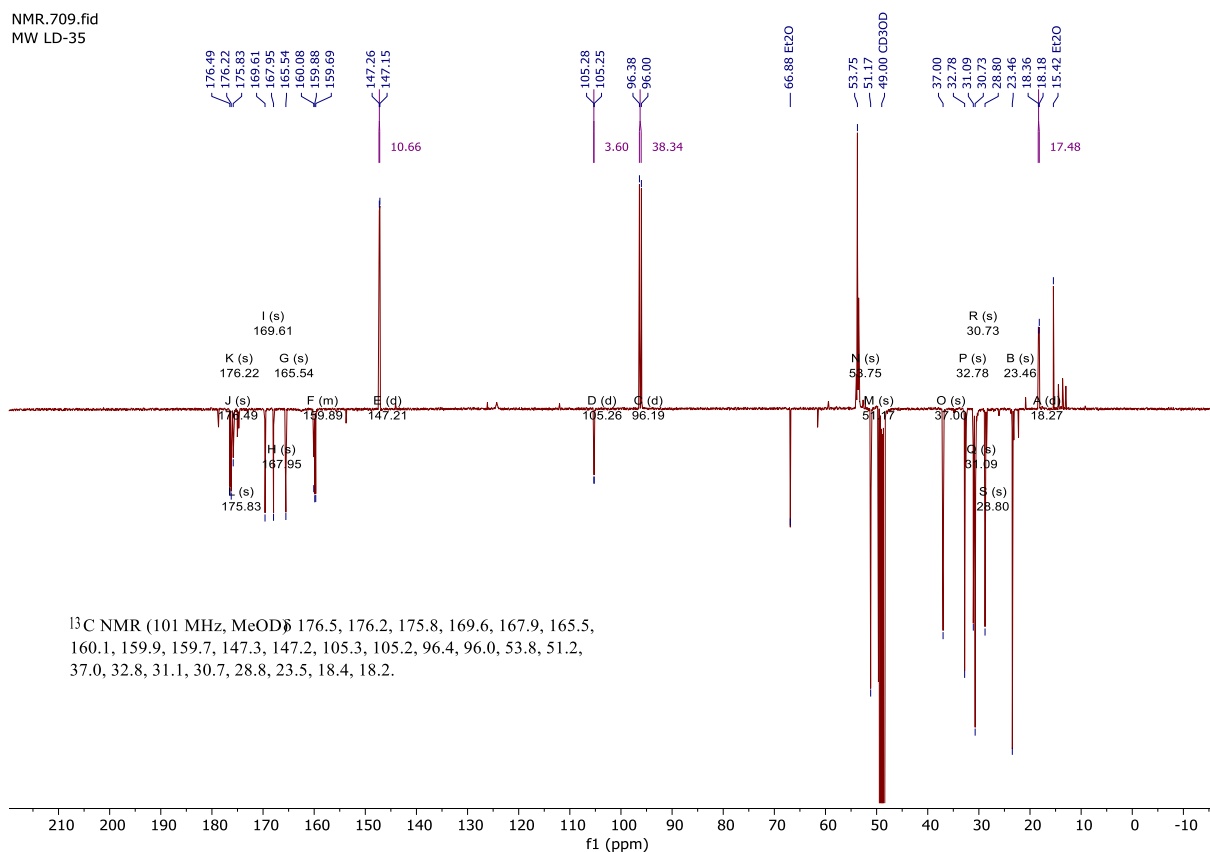


^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.27 (t, t_f = 8.3 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 6.18 (dd, 8.3, 2.6 Hz, 1H), 4.71 (s, 3H), 4.45 – 4.19 (m, 4H), 2.49 – 2.29 (m, 2H), 2.26 – 1.53 (m, 7H), 1.39 (d, 3H).

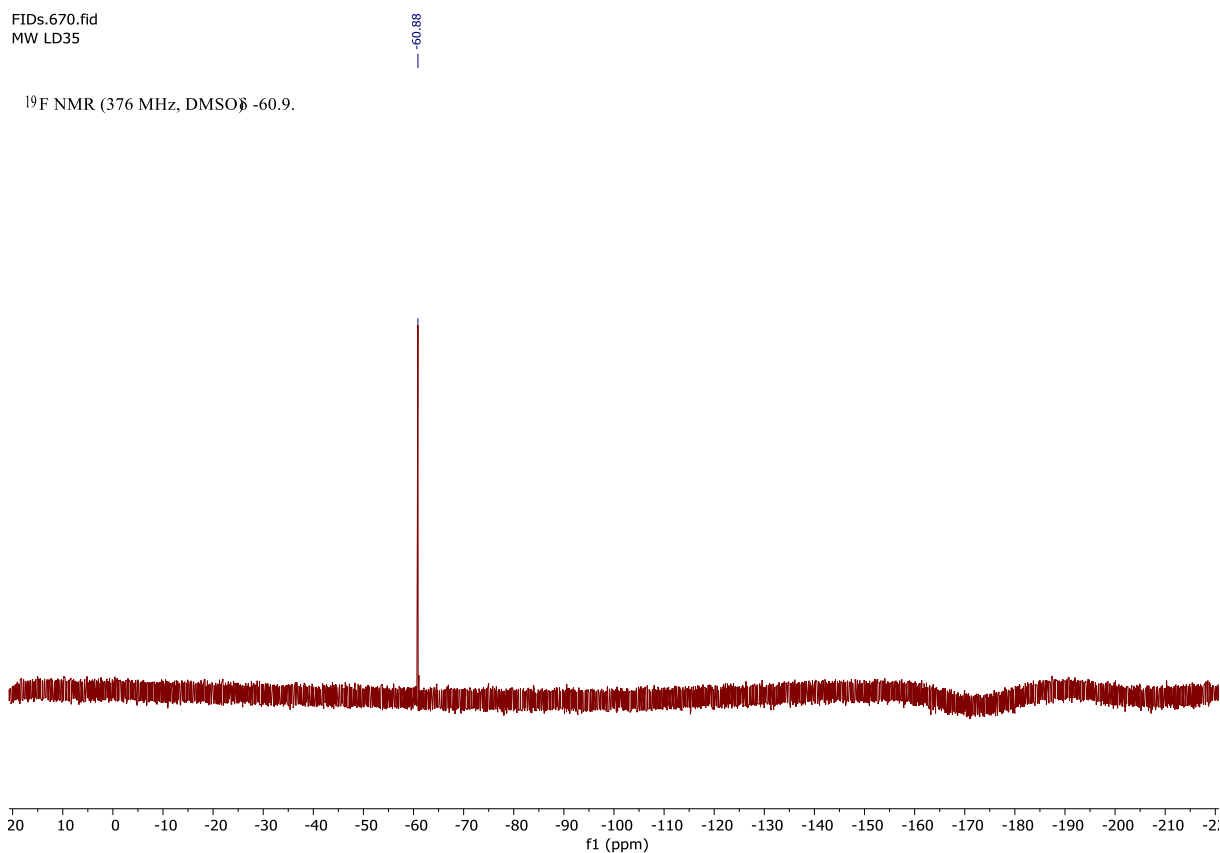
enthält noch Et₂O!



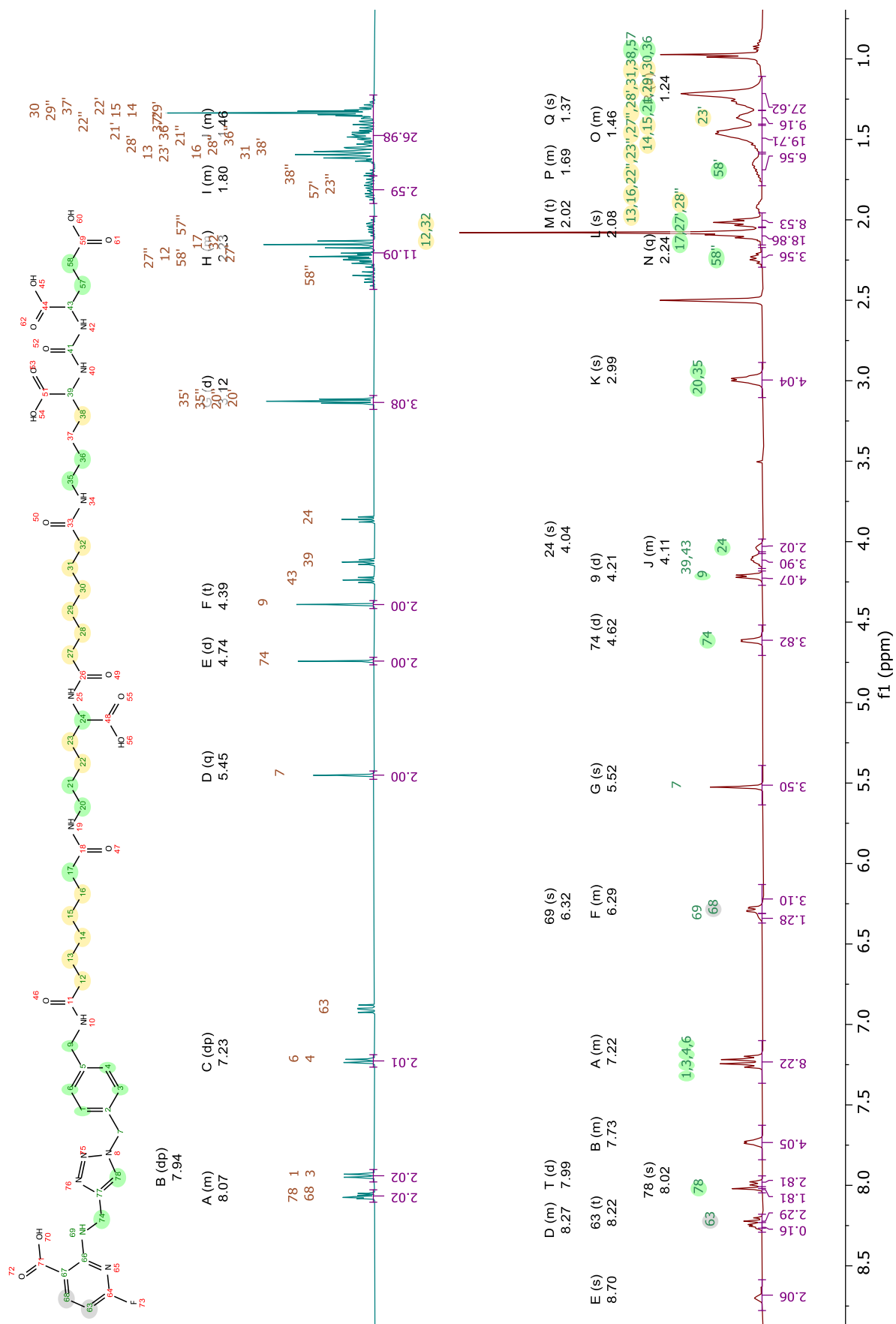
NMR.709.fid
MW LD-35

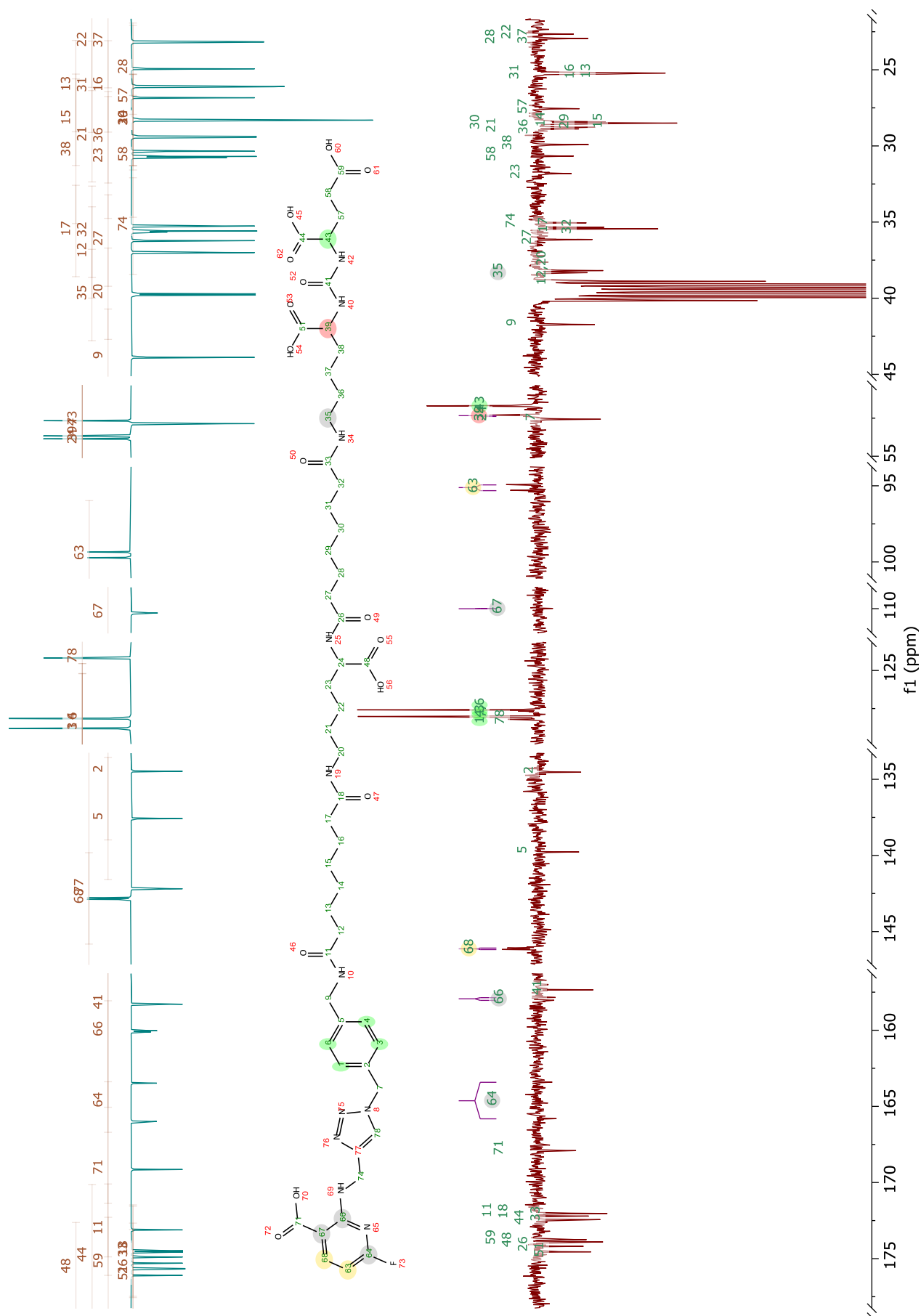


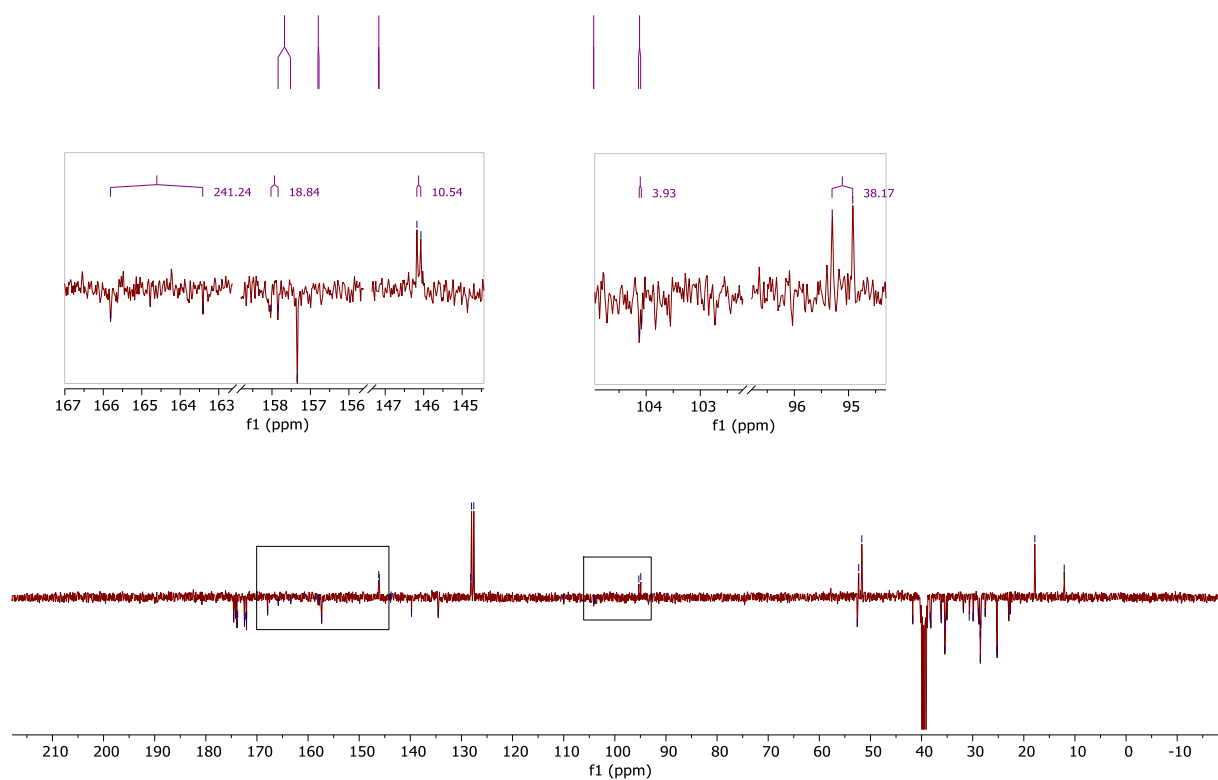
FID.670.fid
MW LD35



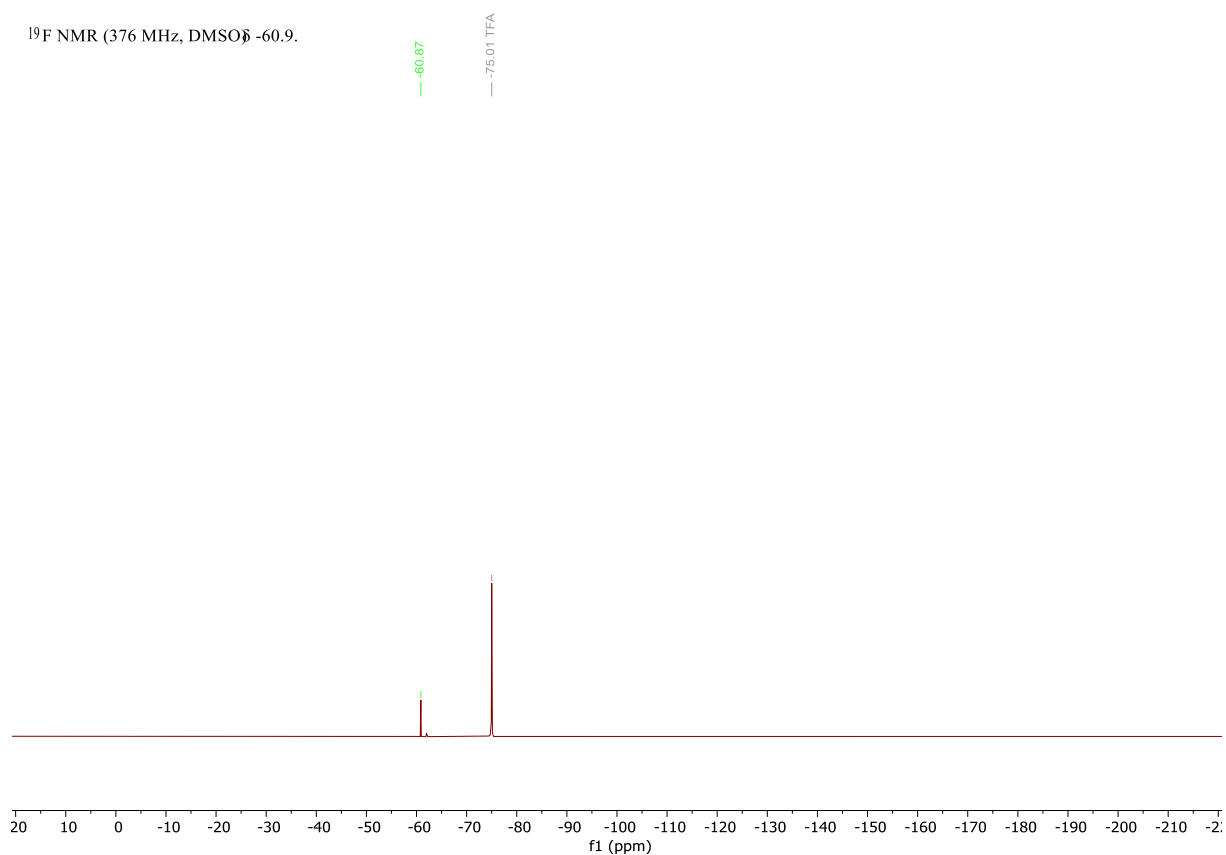
2.3.1.8.25 Compound JK-PSMA17







¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) -60.9.

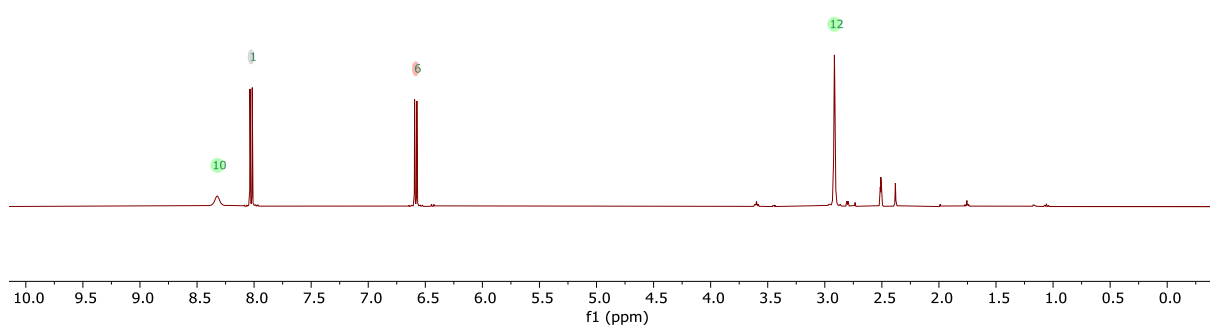


2.3.1.8.26 Compound 7a

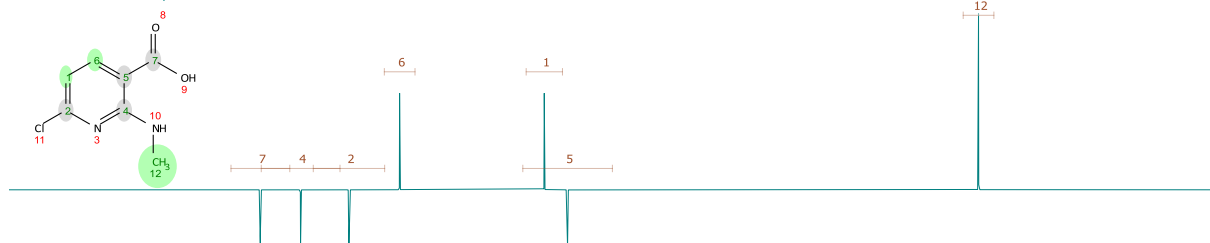
Predicted ¹H NMR Spectrum



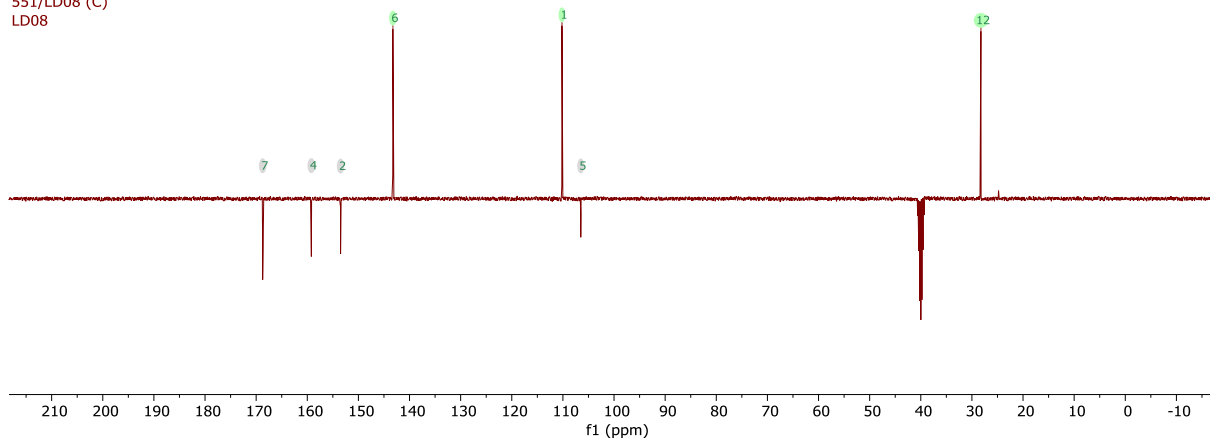
551/LD08 (H)
LD08



Predicted ¹³C NMR Spectrum



551/LD08 (C)
LD08

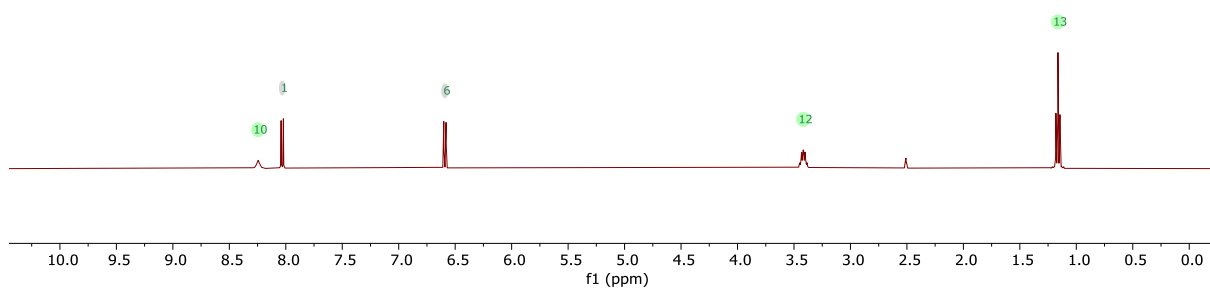


2.3.1.8.27 Compound **7b**

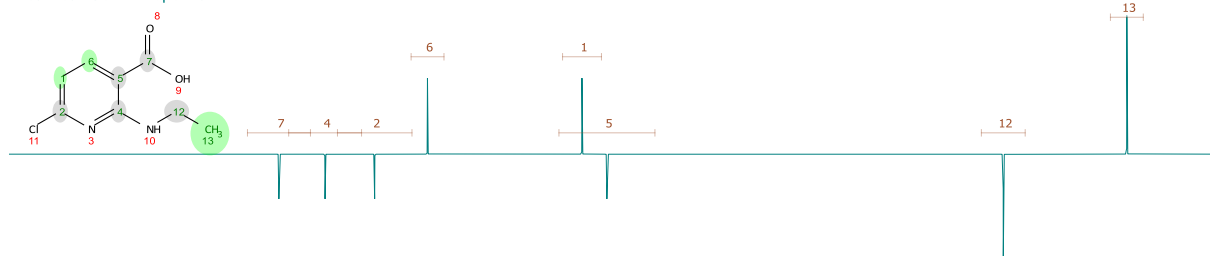
Predicted ¹H NMR Spectrum



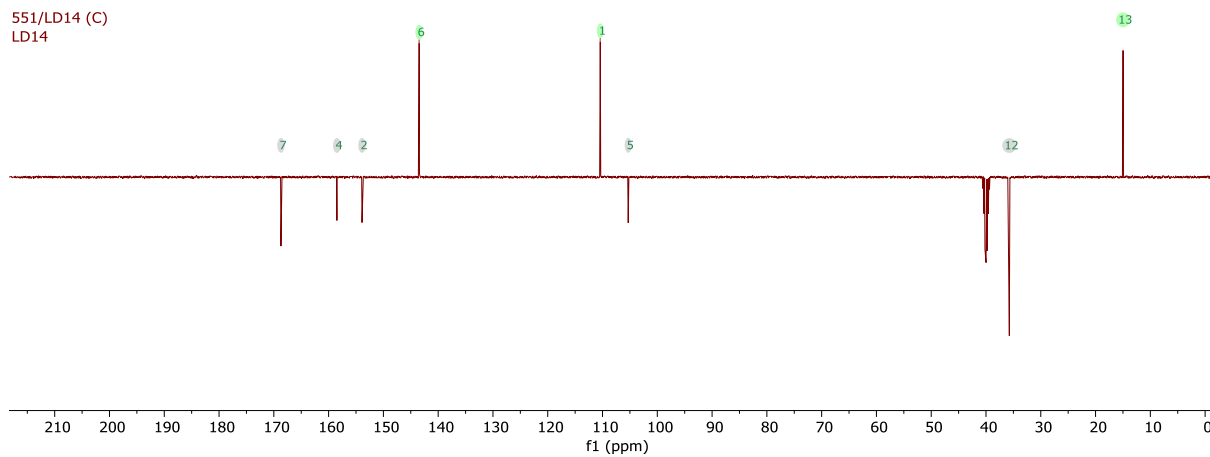
551/LD14 (H)
LD14



Predicted ¹³C NMR Spectrum

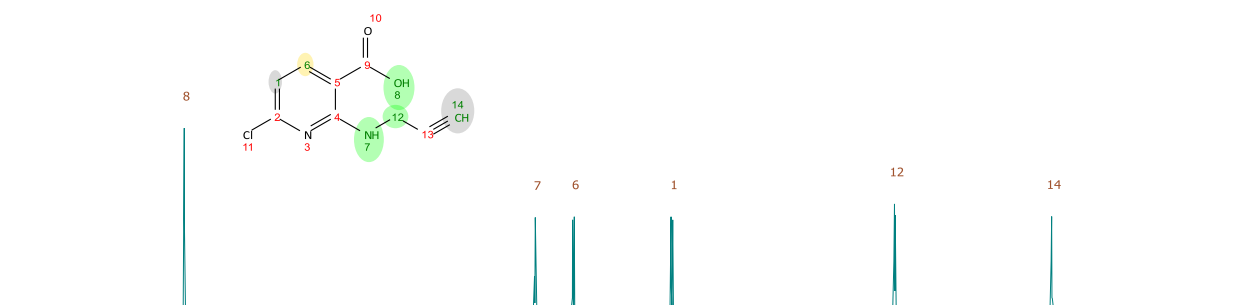


551/LD14 (C)
LD14

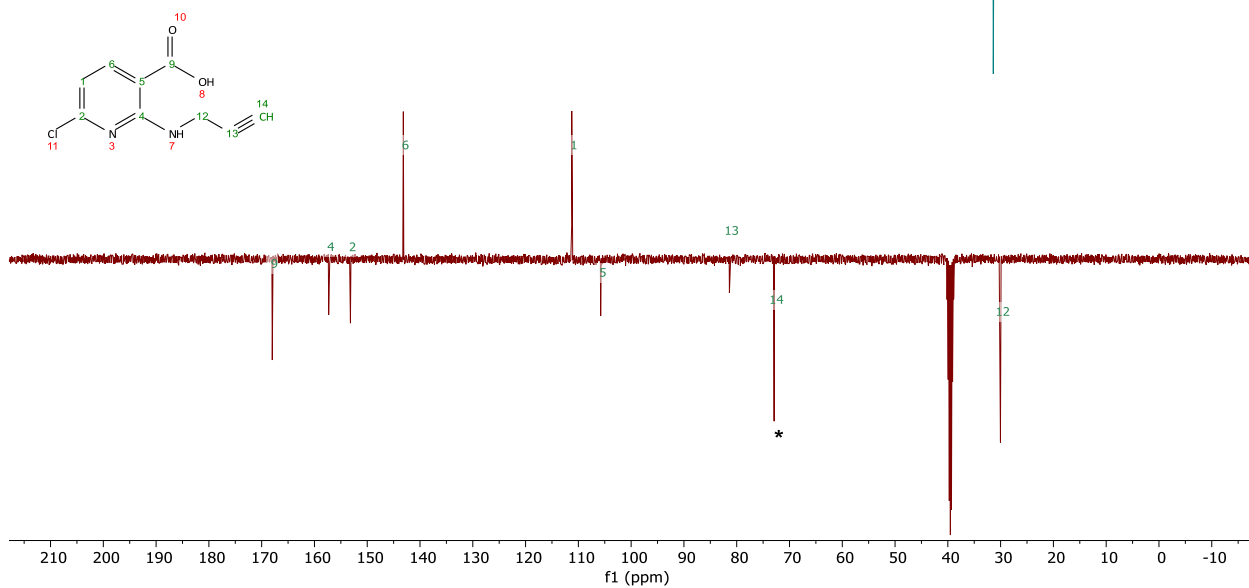
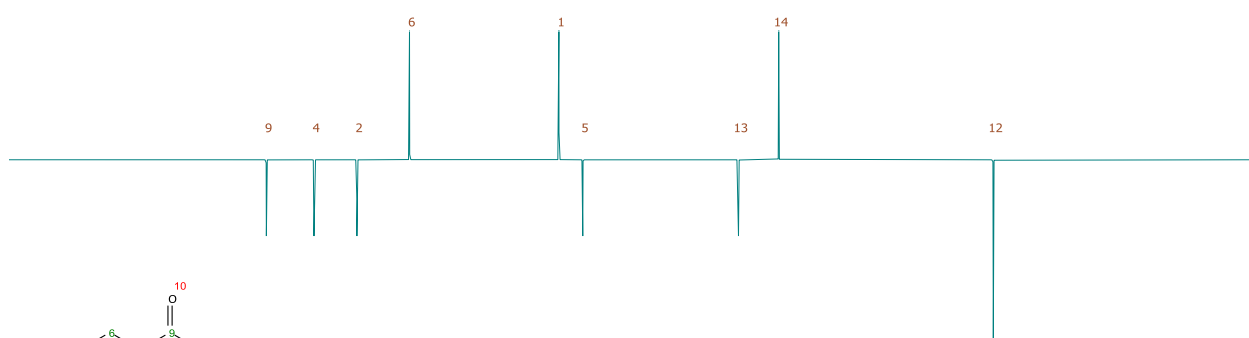
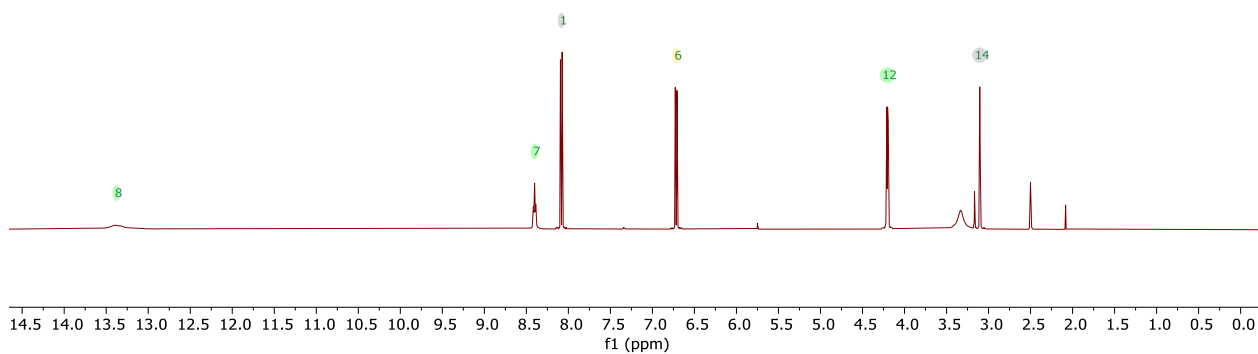


2.3.1.8.28 Compound 7c

Predicted ¹H NMR Spectrum



NMR
mw-LD-11.3.s1.2-10

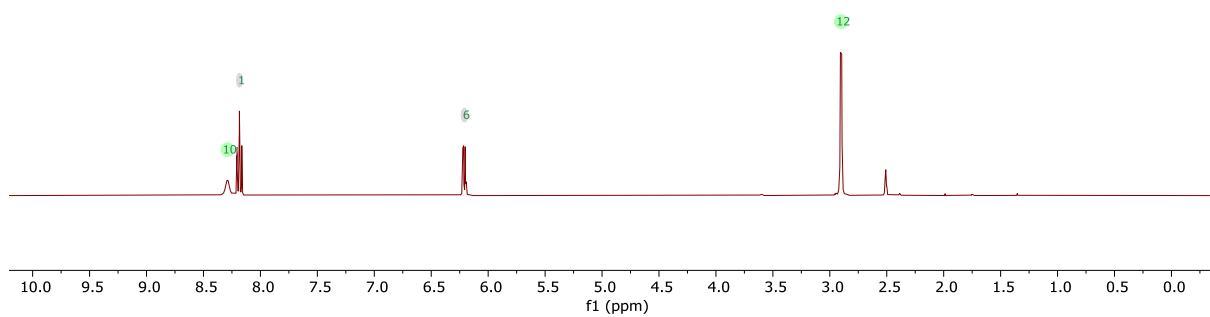


2.3.1.8.29 Compound 7d

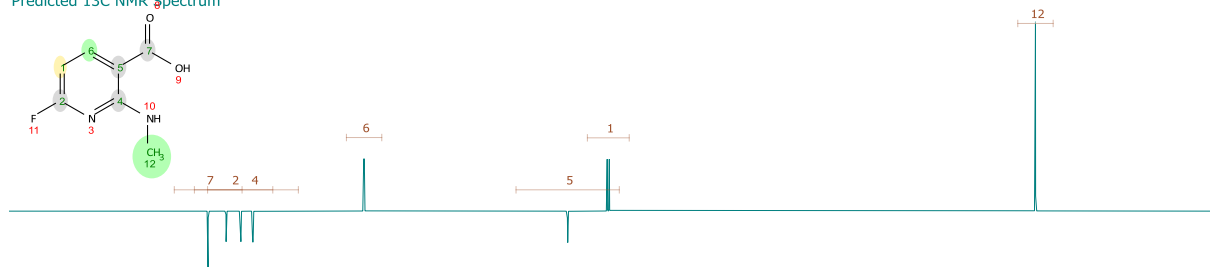
Predicted ¹H NMR Spectrum



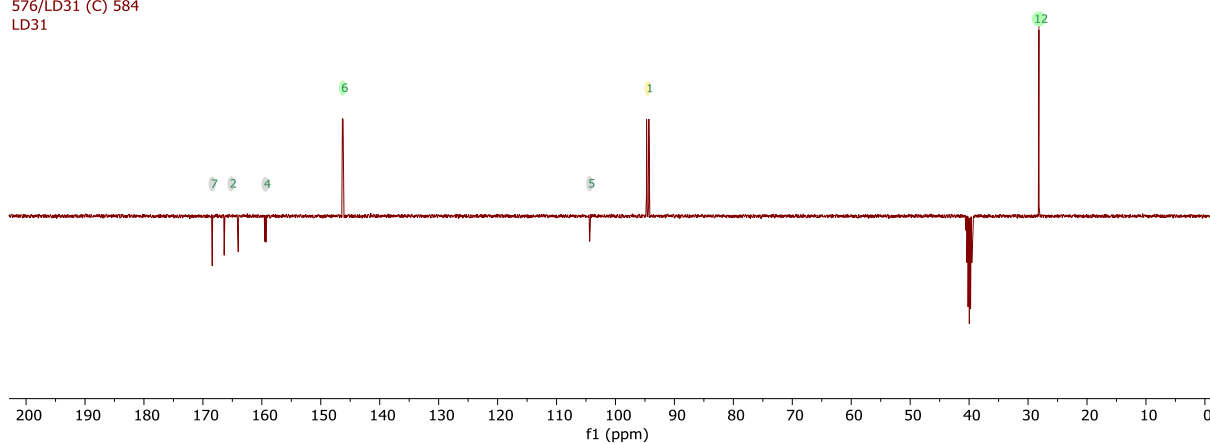
576/LD31 (H) 586
LD31



Predicted ¹³C NMR Spectrum

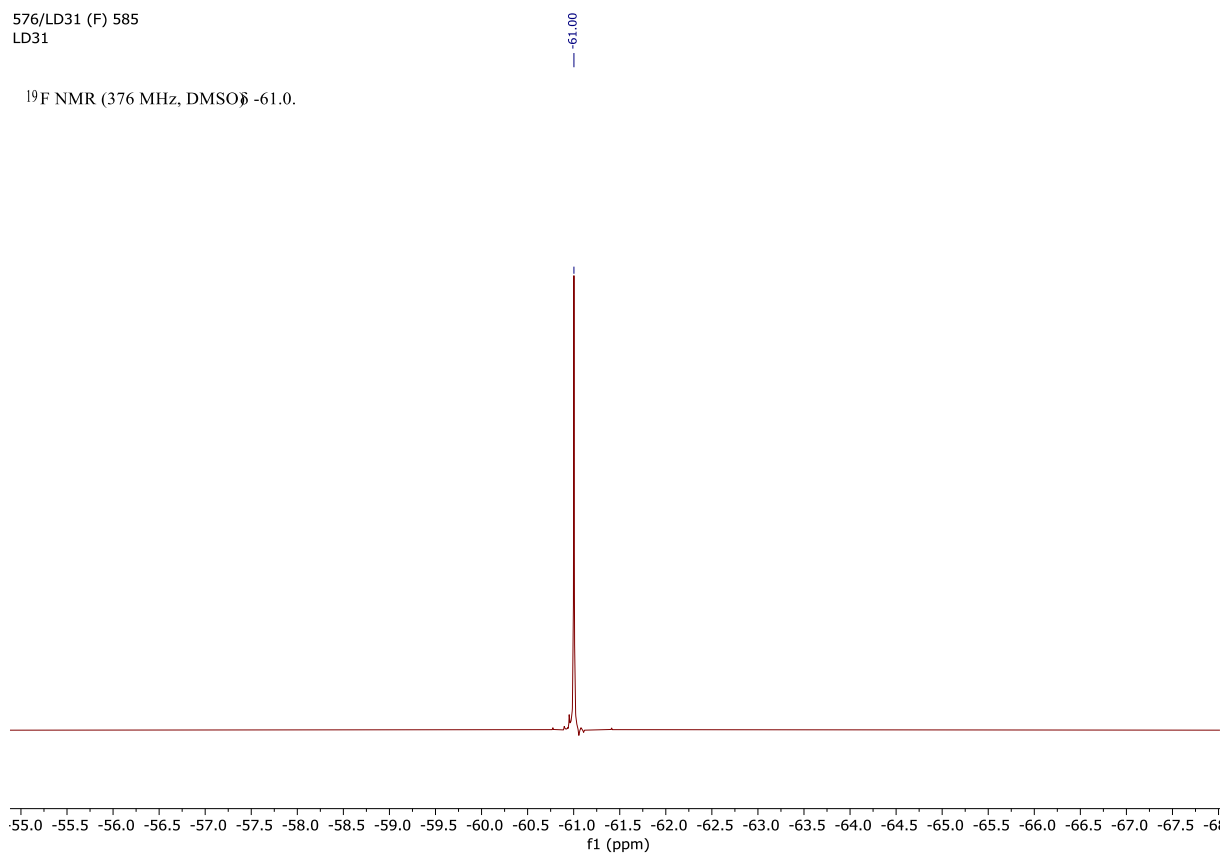


576/LD31 (C) 584
LD31



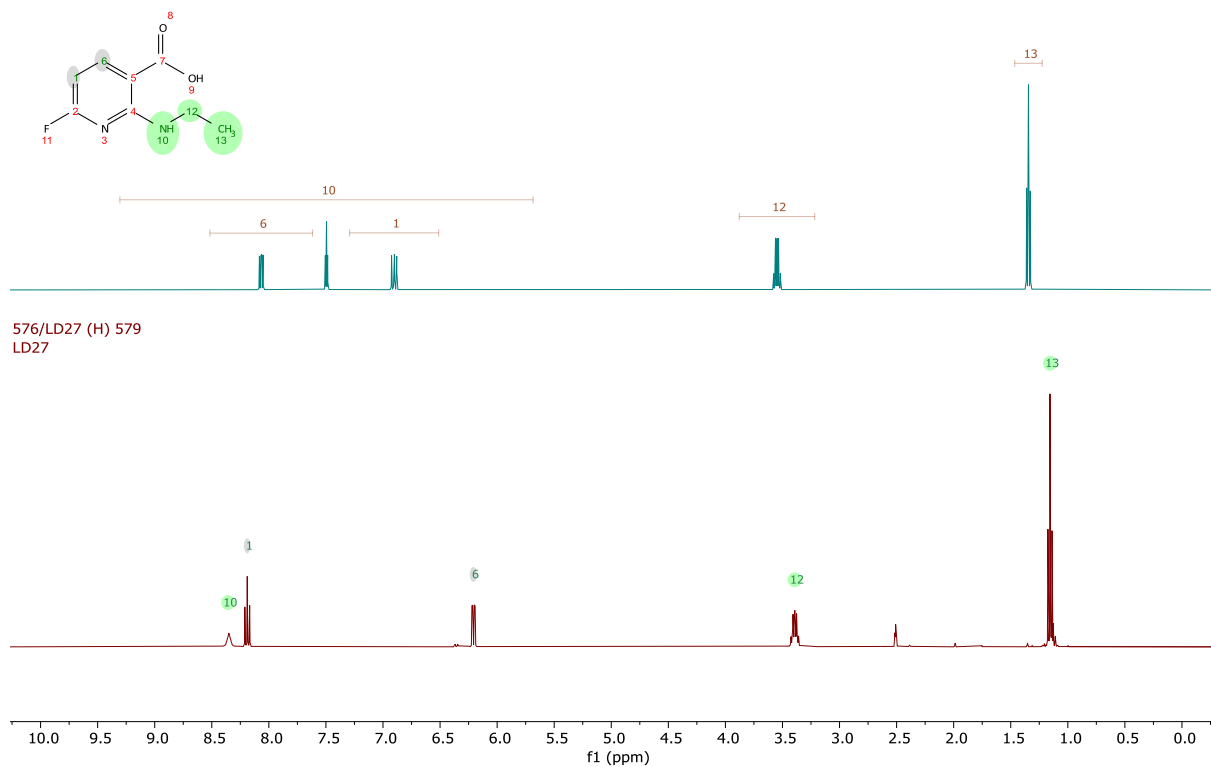
576/LD31 (F) 585
LD31

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) -61.0.

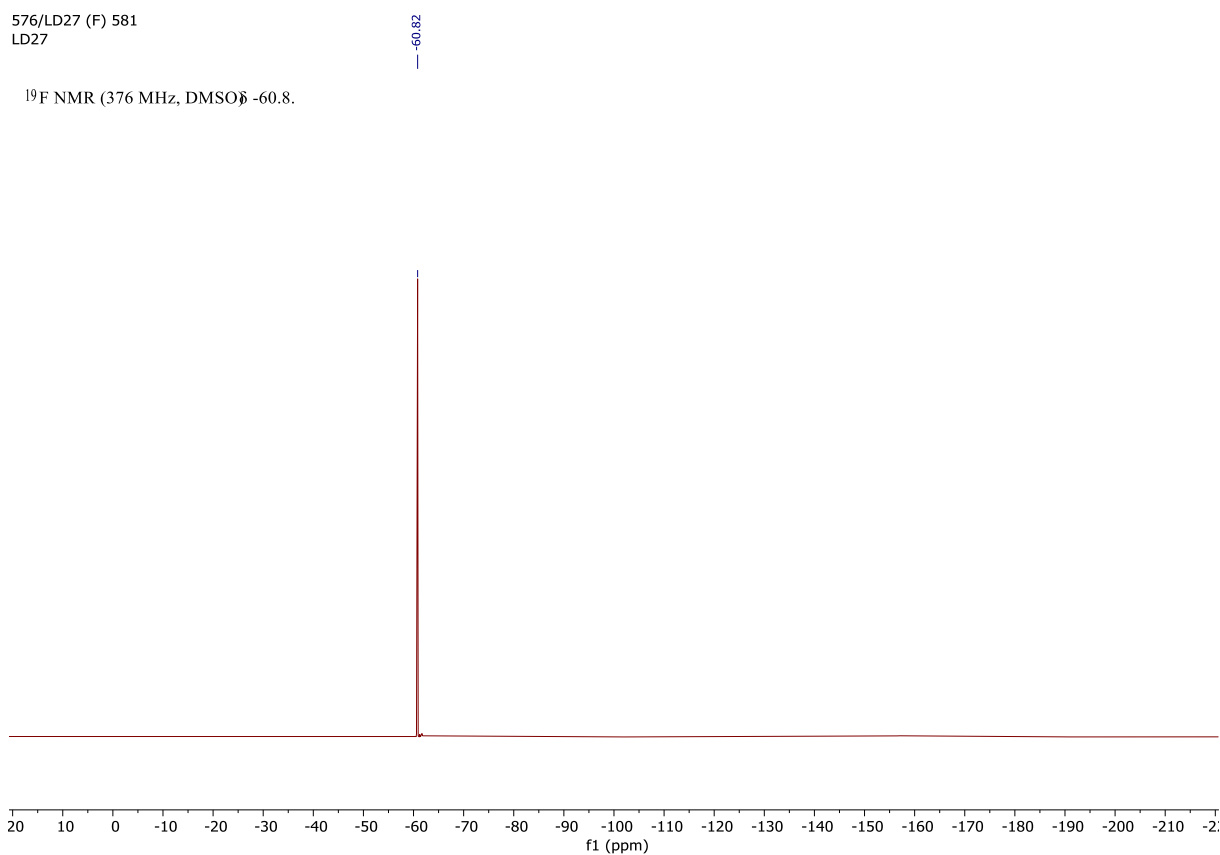
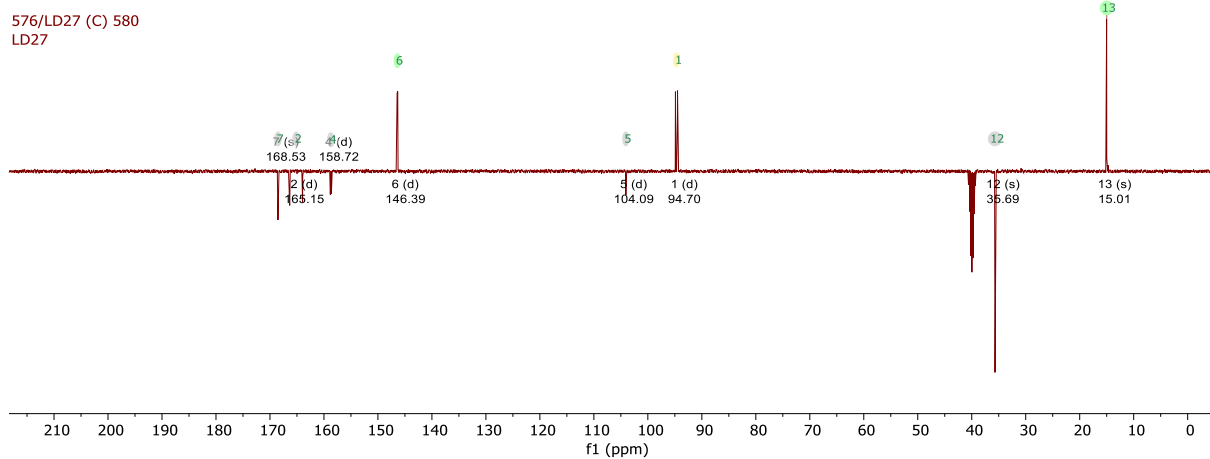
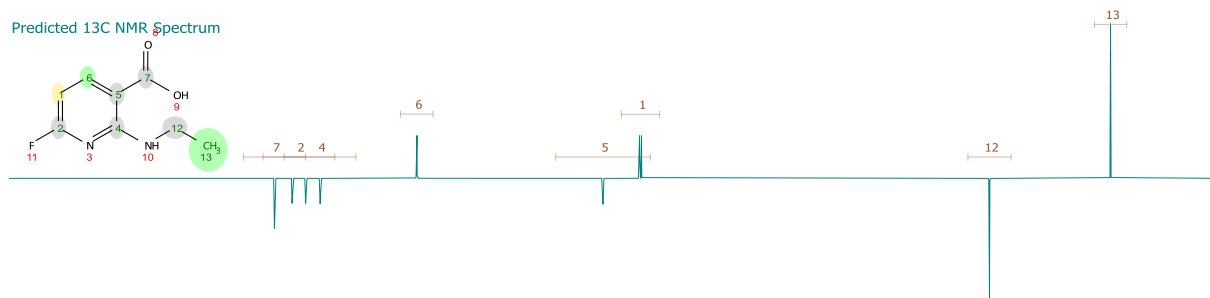


2.3.1.8.30 Compound 7e

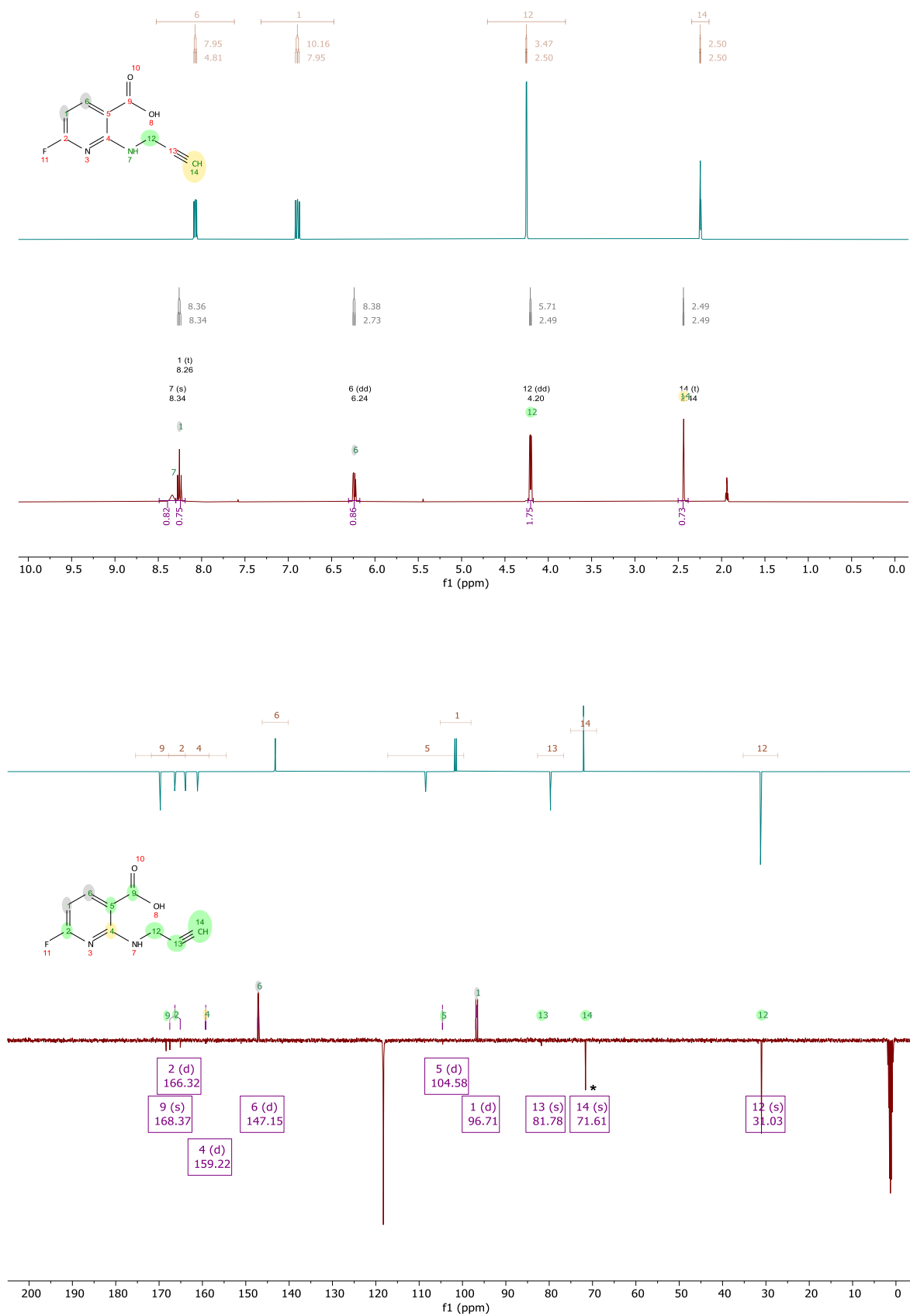
Predicted ^1H NMR Spectrum

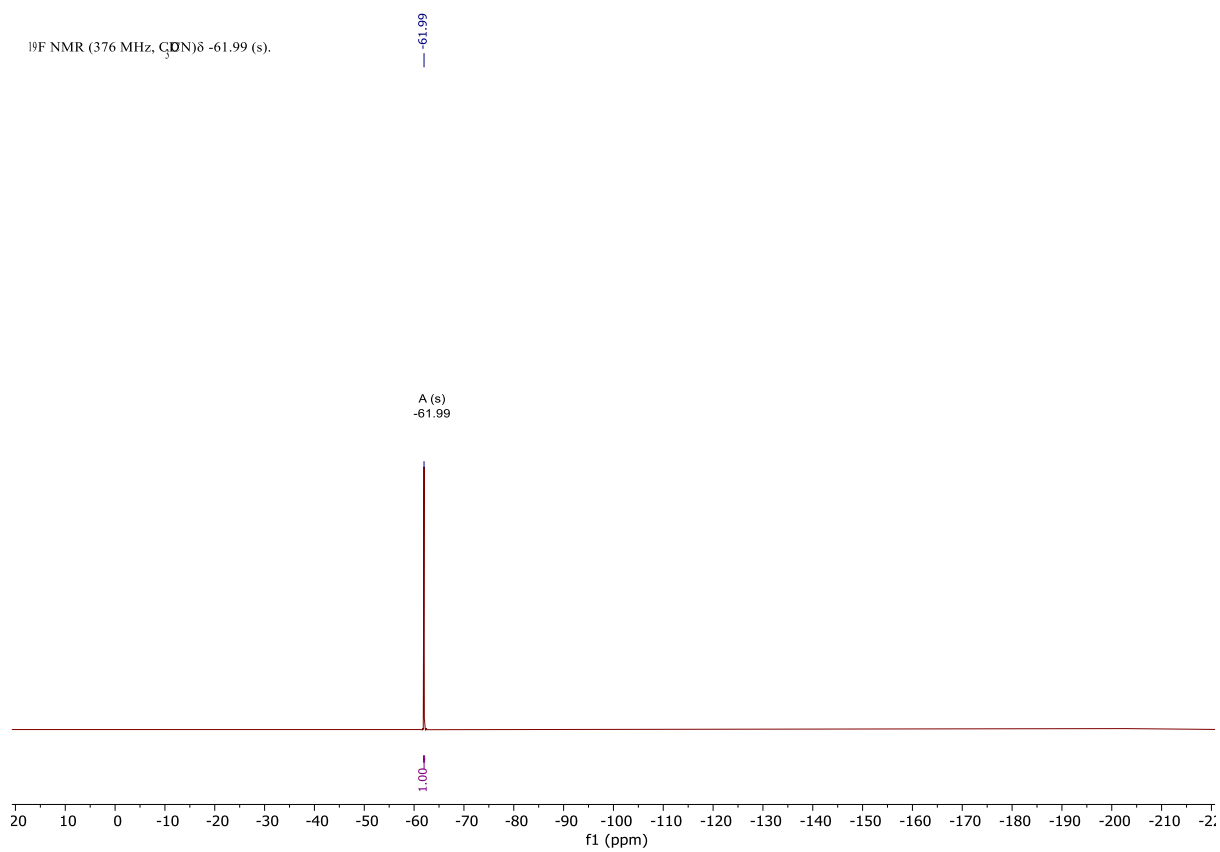


576/LD27 (H) 579
LD27



2.3.1.8.31 Compound 7f





3 Zusammenfassende Diskussion

3.1 Radiosynthese und Evaluation ^{18}F -markierter Dopamin D_4 -Rezeptorantagonisten

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Radiosynthese und Evaluation neuer, ^{18}F -markierter D_4 -Rezeptorliganden, darunter solche mit Strukturmotiven, die sich wesentlich von etablierten Leitstrukturen unterscheiden. Die Radiosynthese der D_4R -Liganden sollte dabei, durch die Anwendung aktueller „Late-stage“-Markierungsstrategien, die Automatisierbarkeit für die klinische Produktion ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden die kürzlich veröffentlichten D_4R -Liganden **I**, **II** und **IV**, sowie die in der Literatur bisher nicht beschriebene Verbindung **III**, ausgewählt (Abbildung 17). D_4R -Ligand **I** weist die Elemente traditioneller Leitstrukturen (wie L-745.870,^{133, 210} FAUC 113/213,^{211, 212} ABT-724^{213, 214}) auf, in denen Phenylpiperazin über einen Methylen-Linker mit einem bizyklischen Heteroaromaten verknüpft ist. Als Ergänzung wurde Verbindung **III** im späteren Verlauf der Arbeit mit einbezogen, um den Einfluss des zusätzlichen Methylen-Linkers auf die Bindungseigenschaften des Liganden zu evaluieren. D_4R -Liganden **II** & **IV** wurden wegen ihrer unkonventionellen Strukturen als Gegenentwurf zu den etablierten D_4 -Leitstrukturen ausgewählt.

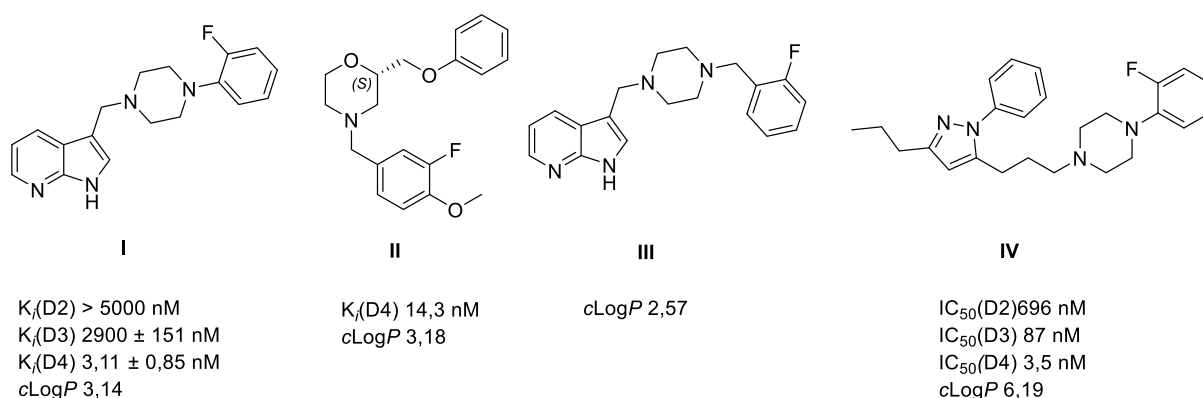


Abbildung 17: Ausgewählte D_4R -spezifische Rezeptorliganden für die Radiofluorierung. Angegeben sind die Bindungskonstanten der jeweils zugrundeliegenden Literatur.^{136, 137, 215} cLogP Werte wurden mit ChemDraw v16.0.0 berechnet.

3.1.1 Synthese und Bindungsstudien der Referenzverbindungen **I-IV**

Die Referenzverbindungen **I-IV** wurden durch reduktive Aminierung der entsprechenden Aldehyde mit 2-Fluorphenylpiperazin, 2-Fluorbenzylpiperazin sowie (S)-2-(Phenoxymethyl)morpholin hergestellt und *In-vitro*-Bindungsstudien an humanen Dopaminrezeptoren unterzogen (Tabelle 5).

Das gemeinsame Synthon 7-Azaindol-3-carbaldehyd der Verbindungen **I** & **III** wurde ausgehend von 7-Azaindol entweder über *Vilsmeier-Haack Formylierung*²¹⁶ oder in einer *Duff-Reaktion*²¹⁷ hergestellt. Das Synthon (Aldehyd) der Verbindung **IV** wurde ausgehend von γ -Butyrolacton und Pentan-2-on entsprechend einer Patentvorschrift²¹⁵ hergestellt, wobei die finale Oxidation zum Aldehyd, anders als in der Patentvorschrift, über *Dess-Martin-Periodinan* erfolgte.

Der entsprechende Aldehyd (3-Fluor-4-methoxybenzaldehyd) als Synthon für **II** ist kommerziell erhältlich. Das chirale Morpholinoxid musste dagegen in einer 8-stufigen Synthese, ausgehend von Benzaldehyd und 2-Aminoethanol (*Dean-Stark*), aufgebaut werden. Chiralität wurde zunächst durch Addition an (*R*)-Epichlorhydrin eingeführt. Die Inversion der Stereoinformation (*Walden-Umkehr*) erfolgte, nach Rückbildung des Epoxids (Elimination von HCl), durch intermolekularen Angriff unter Bildung eines (*S*)-Morpholins. Die *Mitsunobu*-Reaktion zur Einführung des Phenoleters konnte interessanterweise sehr effektiv mit Ultraschall (@ 40 kHz) beschleunigt werden (Adaption einer veröffentlichten Methode von LEPORE et al.²¹⁸). Die mit Benzaldehyd eingeführte Benzylschutzgruppe vereinfachte als Chromophor die Reaktionskontrolle (Monitoring) sowie Aufarbeitung und Isolation der Intermediate. Da die Abspaltung der Benzylgruppe nach Einführung des Phenoleters allerdings sehr ineffizient (5% Ausbeute) war und die *Mitsunobu*-Veretherung mit entschütztem Morpholin keinen Umsatz zeigte, musste nach der Benzylspaltung die *N*-Boc-Schutzgruppe eingeführt werden. Trotz der wenig effizienten Schutzgruppenstrategie konnte die Referenzverbindung **II** in einer Gesamtausbeute von 13% isoliert werden (bezogen auf Benzaldehyd).

I-IV zeigten in den Bindungsstudien eine hohe Affinität für den D₄-Rezeptor mit K_i Werten von 4,1 - 18 nM und, abgesehen von **IV**, erhöhte D₄R-Selektivität (Tabelle 5).

Tabelle 5: Bindungsaffinitäten und Subtyp-Selektivitäten der Liganden **I-IV** zu den humanen Dopaminrezeptoren D₁₋₅:

	K _i ± SD [nM] ^a			
	I	II	III	IV
hD ₁ R ^b	7300 ± 1100	4800 ± 1300	18000 ± 2800	290 ± 7,1
hD ₅ R ^b	51000 ± 4900	8100 ± 1800	71000 ± 20000	1000 ± 0
hD ₂ Rlong ^c	1400 ± 710	470 ± 110	14000 ± 710	40 ± 4,2
hD ₂ Rshort ^c	960 ± 480	450 ± 120	14000 ± 2100	27 ± 6,4
hD ₃ R ^c	2400 ± 920	3600 ± 920	36000 ± 9900	59 ± 9,2
hD _{4,4} R ^c	4,1 ± 1,5	13 ± 4,2	18 ± 7,1	6,4 ± 0,6
hD _{4,4} R (Literatur)	3,11 ± 0,85 ¹³⁷	14,3 ²¹⁹	-	-
cLogP ^d	3,14	3,18	2,57	6,19

^a K_i Werte wurden in zwei unabhängigen Experimenten ermittelt (jeweils n = 3); ^b [³H]SCH 23990; ^c [³H]Spiperon; ^d (ChemDraw v16.0.0.82).

	K _i (hD _{4.4} R)	Ratio K _i / K _i (hD _{4.4} R)				
	[nM]	hD ₁ R	hD ₅ R	hD _{2R} long	hD _{2R} short	hD ₃ R
I	4.1 ± 1.5	1800	12000	340	230	590
II	13 ± 4.2	370	620	36	35	280
III	18 ± 7.1	1000	3900	780	780	2000
IV	6.4 ± 0.6	45	160	6.3	4.2	9.2

Aufgrund der geringen D₄R-Selektivität und der hohen Lipophilie (cLogP = 6,19), wurde **IV** nicht weiter evaluiert.

3.1.2 Synthese der Markierungsvorläufer und Radiosynthesen von [¹⁸F]**I** & [¹⁸F]**II**

Zur Kupfer(II)-vermittelten „Late-stage“-Radiomarkierung nach ZISCHLER et al.²²⁰ mussten die entsprechenden Boronsäure(pinakolester) (R-BPin) als Markierungsvorläufer hergestellt werden. Hierzu wurden die entsprechenden Aldehyde, für die reduktive Aminierung mit 2-Boronsäurepinakolesterphenylpiperazin (2-BPin-phenylpiperazin), hergestellt. Für das gemeinsame Strukturelement 2-Fluorphenylpiperazin der Verbindungen **I** & **IV** stand das kommerziell erhältliche N¹-Boc-4-(2-BPin-phenyl)piperazin als Markierungssyntheton zur Verfügung.

Während die Referenzverbindungen **I** & **IV** durch reduktive Aminierung mit 2-Fluorphenylpiperazin problemlos zugänglich waren,¹³⁸ konnte die Synthese der Markierungsvorläufer mit (2-BPin-phenyl)piperazin nicht analog umgesetzt werden. Bereits gegenüber den vergleichsweise milden Bedingungen der Entschützung (25% TFA in DCM, 1 h, r.t.) von N¹-Boc-4-(2-BPin-phenyl)piperazin, erwies sich der *ortho*-BPin-Substituent als außergewöhnlich labil. Aus nachfolgender reduktiver Aminierung mit den entsprechenden Aldehyden konnten die gewünschten Markierungsvorläufer daher nicht isoliert werden. Auch alternative Synthesewege (*Miyaura-Borylierung*²²¹ oder Lithiierung-Borylierung) blieben erfolglos.

Da die Kupfer(II)-vermittelte Radiomarkierung von N¹-Boc-4-(2-BPin-phenyl)piperazin das Markierungsprodukt N¹-Boc-2-[¹⁸F]**FPP** (*tert*-Butyl-4-(2-[¹⁸F]fluorphenyl)piperazin-1-carboxylat) in radiochemischen Ausbeuten von 60-80% lieferte und die nachfolgende Entschützung mit TFA zu 2-[¹⁸F]**FPP** quantitativ verlief, konnte [¹⁸F]**I** dennoch durch reduktive Aminierung von 2-[¹⁸F]**FPP** mit 7-Azaindol-3-carbaldehyd in einer radiochemischen Ausbeute von 7% innerhalb von 90 min erhalten werden.¹³⁸

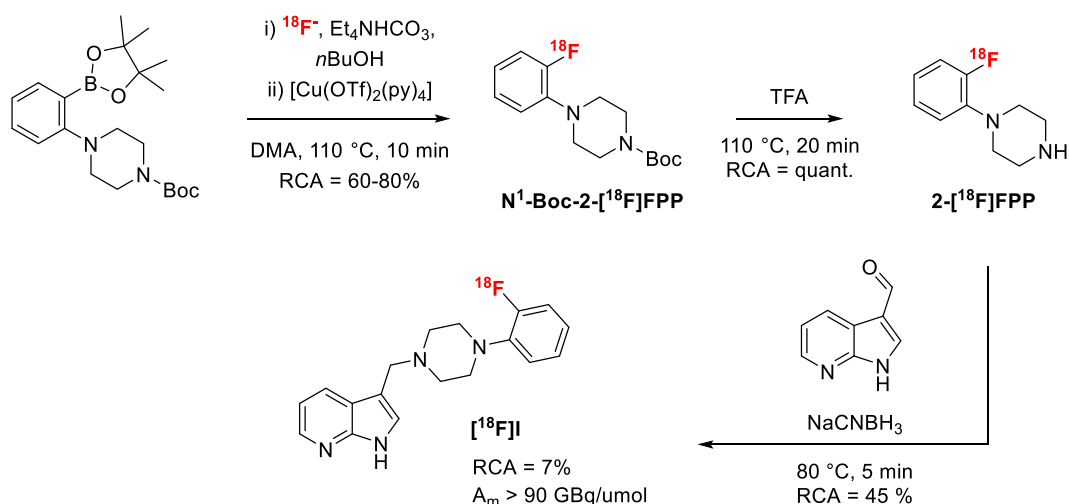


Abbildung 18: Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{I}$ in drei Stufen unter Anwendung der Alkohol-unterstützten, Cu(II)-vermittelten Radiofluorierung nach ZISCHLER et al.^{138, 220}

Die für 2-BPin-phenylpiperazin beobachtete *ortho*-Labilität der Boronsäure-Gruppe zeigte sich in geringerem Ausmaß auch für 2-BPin-benzylpiperazin. Während die Synthese von 2-BPin-benzylpiperazin durch reduktive Aminierung von (2-Formylphenyl)boronsäure mit *N*¹-Boc-Piperazin das Rohprodukt in guten Umsätzen lieferte, konnte die Verbindung nicht säulenchromatographisch isoliert werden. Auch der direkte Einsatz des Rohprodukts in der reduktiven Aminierung mit 7-Azaindol-3-carbaldehyd ermöglichte keine Isolation des Markierungsvorläufers. Da für $[^{18}\text{F}]\text{III}$ keine geeignete Markierungsstrategie oder ein entsprechendes Markierungssyntheton für eine alternative Radiosynthese analog zu $[^{18}\text{F}]\text{I}$ zur Verfügung stand, wurde $[^{18}\text{F}]\text{III}$ trotz der vielversprechenden Bindungseigenschaften (*in vitro*) nicht weiter evaluiert.

Die Synthese des Markierungsvorläufers für $[^{18}\text{F}]\text{II}$ erfolgte analog zur Synthese der Referenzverbindung **II** durch reduktive Aminierung des chiralen Morpholinoxids mit kommerziell erhältlicher 5-Formyl-2-methoxybenzylboronsäure.¹³⁸

Die Kupfer(II)-vermittelte Radiomarkierung nach ZISCHLER et al.²²⁰ lieferte $[^{18}\text{F}]\text{II}$ in einer radiochemischen Ausbeute von 66%.

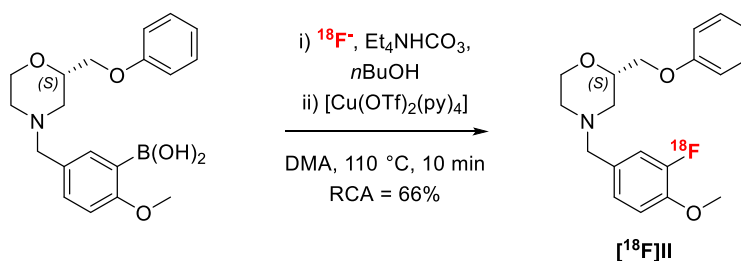


Abbildung 19: Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{II}$ unter Anwendung der Alkohol-unterstützten, Cu(II)-vermittelten Radiofluorierung nach ZISCHLER et al.^{138, 220}

3.1.3 *In-vitro*-Autoradiographie von [^{18}F]I & [^{18}F]II

Ein zu hoher Anteil unspezifischer Bindung ist ein häufiger Grund für das Scheitern auch hochspezifischer D_4R -Radioliganden in der Bildgebung D_4R -Radioliganden. In dieser Arbeit wurde die unspezifische Bindung als jener Anteil der Totalbindung festgelegt, welcher sich nicht durch einen Überschuss nicht-radioaktiver Referenzverbindung verdrängen ließ, (der Begriff Verdrängung wird hier und nachfolgend synonym für „Inhibition“ gebraucht). In den *In-vitro*-Autoradiographien an Ratten-Hirnschnitten wurden entsprechend neben der Totalbindung (Inkubation der Hirnschnitte mit Radioligand), die unspezifische Bindung durch Inkubation mit dem Radioligand in Gegenwart von 1-5 μmol der Referenzverbindung I oder II dargestellt.

Zu diesem Zweck wurde der Radioligand [^{18}F]I mit molaren Aktivitäten von $>90 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ hergestellt. Um diese hohen molaren Aktivitäten bei einer Syntheszeit von 100-150 min (ab EOB bis Inkubation der Hirnschnitte) zu erreichen, wurde die Radiomarkierung mit Startaktivitäten von 15-25 GBq automatisiert durchgeführt. Nachfolgende *N*-Boc-Entschützung sowie reduktive Aminierung mit 7-Azaindol-3-carbaldehyd wurden mit einem Aliquot (ca. 1 GBq) manuell durchgeführt. [^{18}F]I wurde schließlich für die anschließende *In-vitro*-Autoradiographie über semi-präparative HPLC isoliert.

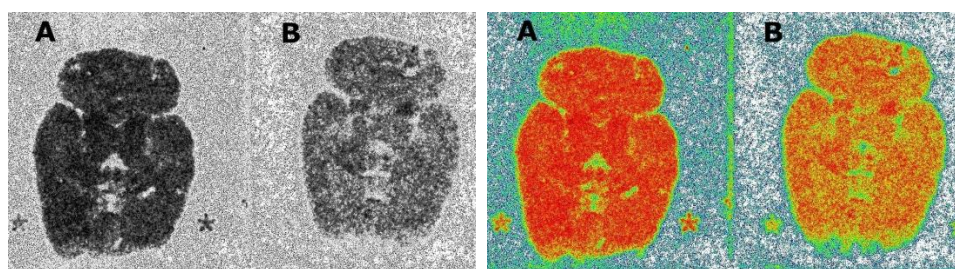


Abbildung 20: *In-vitro*-Autoradiographie an horizontalen Rattenhirnschnitten mit 2,31 kBq/mL (A) [^{18}F]I (Totalbindung) oder (B) [^{18}F]I in Konkurrenz mit 5 μmol I (unspezifische Bindung). Gezeigt sind jeweils identische Autoradiographien in schwarz-weiß (links) und in Falschfarben (rechts).

In drei unabhängigen Experimenten konnte in den *In-vitro*-Autoradiographien keine (signifikante) regionspezifische Anreicherung in den Hirnschnitten festgestellt werden. Hingegen wurde ein inakzeptabel hoher Anteil an unspezifischer Bindung ($>90\%$) gefunden, die nicht durch I (5 μmol) verdrängt werden konnte. Aufgrund dieser Eigenschaften musste [^{18}F]I für eine Bildgebung der D_4R -Verteilung als ungeeignet bewertet werden.

[^{18}F]II konnte aufgrund der schnellen „Late-stage“-Radiomarkierung aus manuellen Radiosynthesen mit molaren Aktivitäten von $>80 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ über semi-präparative HPLC isoliert werden. *In-vitro*-Autoradiographien mit [^{18}F]II an horizontalen und sagittalen Rattenhirnschnitten zeigten ebenfalls

einen hohen Anteil an unspezifischer Bindung von 70% in den Sagittalschnitten und bis 89% in den Horizontalschnitten (Abbildung 21).

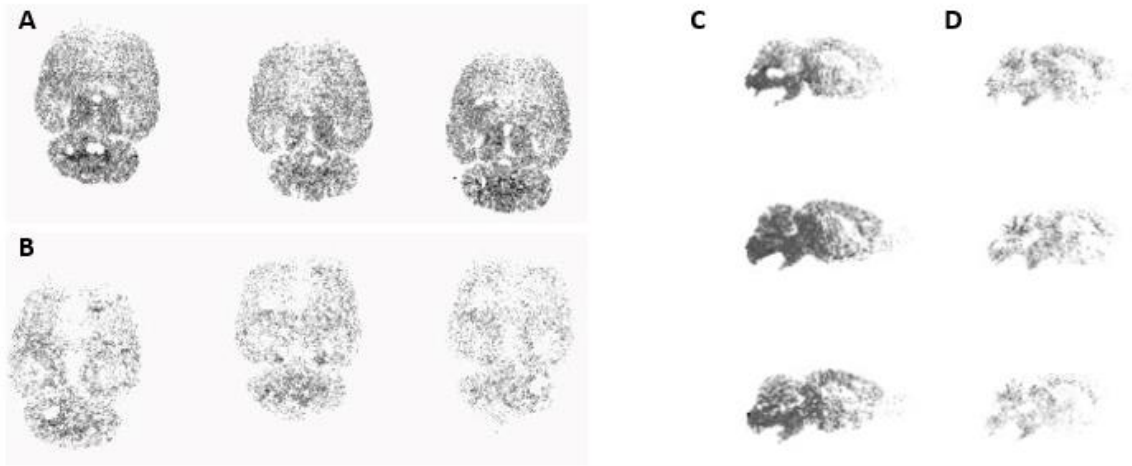


Abbildung 21: *In-vitro*-Autoradiographie an horizontalen (A&B) und sagittalen (C&D) Rattenhirnschnitten mit 2.31 kBq/mL (A&C) [^{18}F]II (Totalbindung) oder (B&D) [^{18}F]II in Konkurrenz mit 5 μmol II (unspezifische Bindung).

Anders als [^{18}F]I, konnte allerdings eine spezifische Anreicherung, insbesondere in den inneren Strukturen des Cerebellums sowie in den Colliculi und mit geringerer Intensität im Cortex festgestellt werden. Bemerkenswert ist die Übereinstimmung der regiospezifischen Anreicherung, mit den von KÜGLER et al. veröffentlichten *In-vitro*-Autoradiographien des D_4 -Radioliganden [^{18}F]FPBP.¹³¹

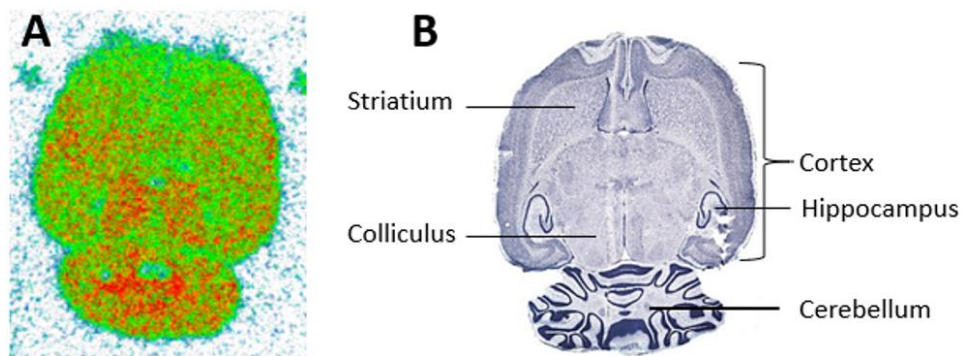


Abbildung 22: (A) *In-vitro*-Autoradiographie mit [^{18}F]II (gezeigt ist die Totalbindung eines Horizontalschnitts). (B) Histologischer Horizontalschnitt des Rattenhirns, eingefärbt mit Kresylviolett.

3.1.4 Zusammenfassung

Für eine Bestätigung der Resultate von KÜGLER et al. durch strukturell ungleiche D₄-Radioliganden sind Leitstrukturen, basierend auf dem chiralen Morpholinoxid [¹⁸F]II, prinzipiell gut geeignet. Die in vorliegender Arbeit vorgestellten und bereits veröffentlichten Ergebnisse der *In-vitro*-Autoradiographien mit [¹⁸F]II sollten bei zukünftigen Fragestellungen, mit Bezug auf die Bildgebung von D₄-Radioliganden, berücksichtigt werden. Trotz der vergleichsweise geringen D₄-Selektivität und dem hohen Anteil an unspezifischem Bindungsprofil von [¹⁸F]II, konnte die Eignung des chiralen Pharmakophors als neue Leitstruktur für D₄-Radioliganden gezeigt werden. Die einfache Kupplung des chiralen Morpholin-Kerns mit Aldehyden über reduktive Aminierung oder mit Nukleophilen über die *Mitsunobu*-Reaktion, bietet zudem die Möglichkeit eines Screenings von weiteren potenziellen D₄-Radioliganden.

3.2 Radiosynthese und Evaluation des ^{18}F -markierten Serotonin-5-HT_{2A}-Rezeptorliganden [^{18}F]R91150

In der vorliegenden Arbeit wurde eine vereinfachte „Late-stage“-Radiosynthese von [^{18}F]R91150 unter Anwendung moderner Radiofluorierungsmethoden (vgl. Kapitel 1.3) etabliert. In ersten *In-vitro*-Bindungsstudien des Tracers, konnte seine Eignung für die *In-vivo*-PET-Bildgebung gezeigt werden.

3.2.1 Synthese der Referenzverbindung R91150

Als Markierungsvorläufer für die Cu(II)-vermittelte Radiofluorierung musste der entsprechende Boronsäurepinakolester hergestellt werden. Ausgehend von kommerziell erhältlichem Benzylpiperidin-4-on ist nach Methylierung (Methylolithium) und Transformation der Hydroxy-Gruppe zu Acetamid (*Ritter-Reaktion*) das *N*¹-Benzyl-, *N*²-Acetyl- geschützte 4-Methyl-4'-aminopiperidin zugänglich. Die orthogonale Schutzgruppenstrategie erlaubt prinzipiell den Aufbau der Zielstruktur an beiden Stickstoffen unter Bewahrung der jeweils anderen Schutzgruppe (Abbildung 23). Die drastischen Bedingungen, die eine *N*-Acyl-Spaltung erfordern (konz. HCl, 100 °C, 2-3 d), machten es allerdings unbedingt erforderlich diese Schutzgruppe möglichst frühzeitig abzuspalten (kein Produkt konnte isoliert werden, wenn Fluor-4-propoxybenzol vor der *N*-Acyl-Spaltung eingeführt wurde). Die von MÜHLHAUSEN et al. adaptierte Synthese¹⁹² lieferte R91150 in einer Gesamtausbeute von 3%.

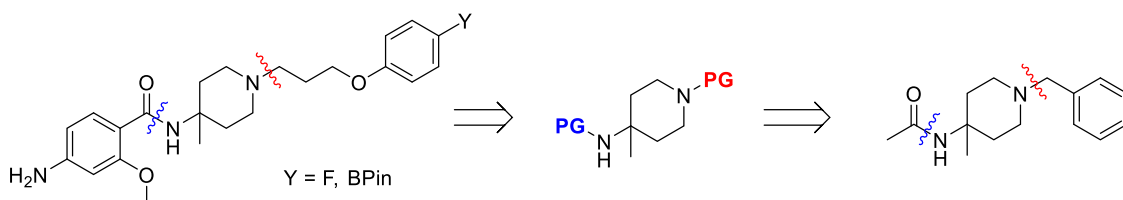


Abbildung 23: Mögliche Schutzgruppenstrategien bei der Synthese von R91150 und dem Markierungsvorläufer. Die drastischen Bedingungen der *N*-Acyl-Spaltung werden nach Einführung des „Y“-*para*-Propoxybenzols nicht toleriert.

3.2.2 Synthese des Markierungsvorläufers und „Late-stage“-Radiofluorierung

Analog konnte der Markierungsvorläufer in vergleichbarer Ausbeute hergestellt werden, wobei auf die *N*-Boc-Entschützung, aufgrund der angenommenen besseren Stabilität und Haltbarkeit der geschützten Verbindung, zunächst verzichtet wurde. Die Cu(II)-vermittelte (Alkohol-unterstützte) Radiofluorierung nach ZISCHLER et al.²²⁰ lieferte *N*-Boc-[^{18}F]R91150 mit einer analytischen RCY von 10-15% in 10 min. Das markierte Intermediat wurde auf einer C18-Kartusche fixiert und für die Entschützung direkt mit 33% Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan (DCM) eluiert. Mit einer

Synthesezeit von 60 min (inkl. Isolation über semi-präparative HPLC) konnte [^{18}F]R91150 in einer radiochemischen Ausbeute von 10% ($n = 3$) und einer molaren Aktivität von 70 GBq/ μmol isoliert werden.

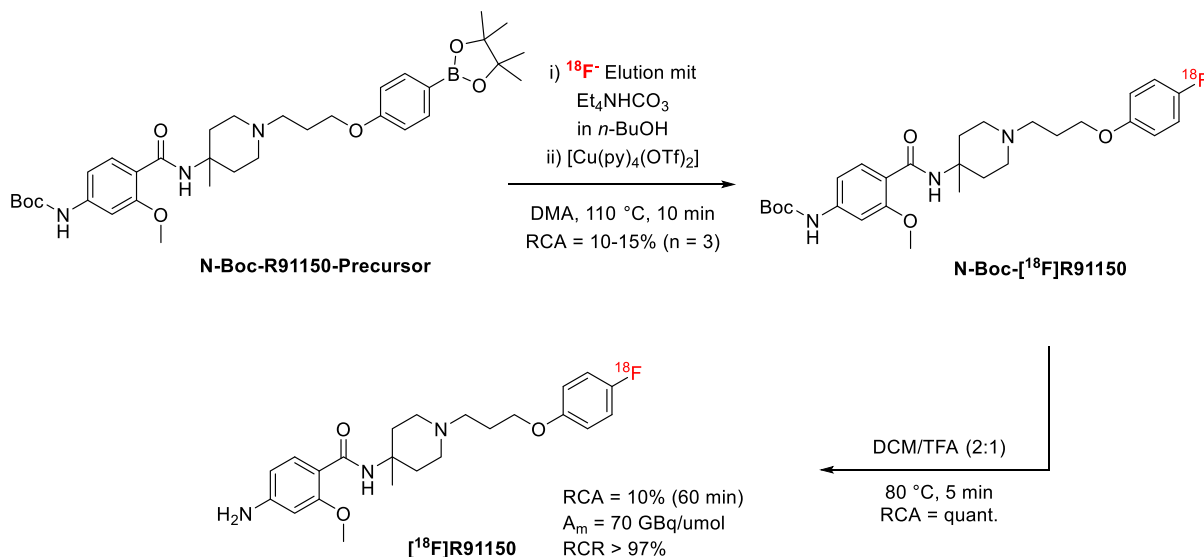


Abbildung 24: “Late-stage” Radiosynthese von [^{18}F]R91150. Cu(II)-vermittelte Radiofluorierung nach ZISCHLER et al. und anschließende *N*-Boc-Entschützung. *Analytische Ausbeute (radio-HPLC).

3.2.3 *In-vitro*-Autoradiographie von [^{18}F]R91150

Anschließende *In-vitro*-Autoradiographien mit [^{18}F]R91150 an horizontalen und sagittalen Rattenhirnschnitten zeigten in drei unabhängigen Experimenten regiospezifische Anreicherung im Cortex (70-76 % der Totalbindung mit stärkerer Anreicherung in der Lamina V²²²), Tuberculum olfactorium sowie in den caudalen Bereichen des Striatums (33-50%; Abbildung 25). Das Bindungsmuster steht in sehr guter Übereinstimmung mit dem anderer spezifischer 5-HT_{2A}-Liganden (wie (*R*)-[^{18}F]MH.MZ¹⁷¹, [^{18}F]MDL100,907^{173, 187} oder [^{18}F]Altanserin^{167, 168}). Hohe 5-HT_{2A}-Expression in diesen Regionen wurde bereits durch Studien, unter Anwendung der *In-situ*-Hybridisierung, nachgewiesen.²²³ Keinerlei spezifische Anreicherung (0%) wurde dagegen, in Übereinstimmung mit zahlreichen immunohistologischen und autoradiographischen Studien,²²⁴⁻²²⁶ im Cerebellum festgestellt.

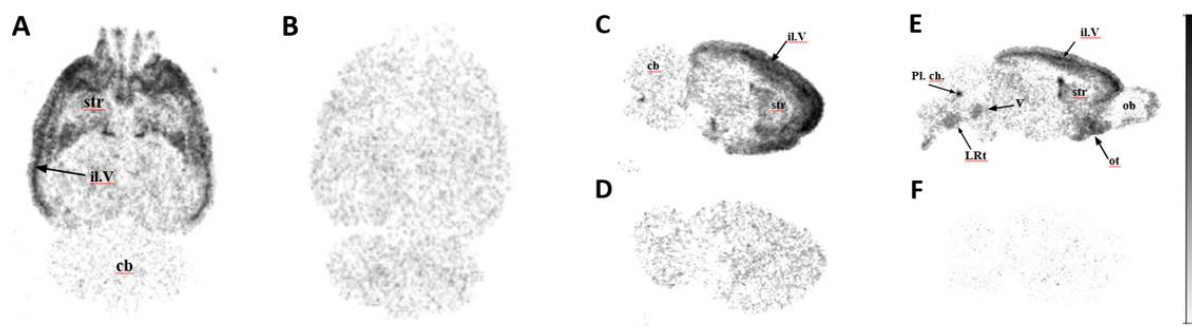


Abbildung 25: *In-vitro*-Autoradiographie von horizontalen (A-B) und sagittalen (C-F) Rattenhirnschnitten mit [¹⁸F]R91150 (A,C,E: Totalbindung) und in Konkurrenz mit R91150 (B,D,F: unspezifische Bindung). Regiospezifische Anreicherung in Lamina V (il.V) des Cortex und in caudalen Teilen des Striatums (str). Abkürzungen: Cerebellum (cb), Lamina V (il.V), Striatum (str), Tuberculum olfactorium (ot), Lateral reticular nucleus (LRt), Nervus trigeminalus (V). Die abgebildeten Autoradiographien stammen aus drei unabhängigen Experimenten (A&B, C&D, E&F).

Die unspezifische Bindung wurde durch Inhibition mit 1 µmol R91150 ermittelt. Die 5-HT_{2A}-spezifische Bindung von [¹⁸F]R91150 wurde in Konkurrenz (competition assay) mit den 5-HT_{2A}-spezifischen Pharmazeutika Altanserin, *R*(+)-Lisurid und *S*(-)-Lisurid evaluiert. Lediglich *S*(-)-Lisurid konnte die spezifische Bindung nicht in dem selben Ausmaß verdrängen wie R91150, was als Hinweis auf eine geringere 5-HT_{2A}-Spezifität dieses Enantiomers gewertet wurde ((*R,S*)-Lisurid $K_i = 2.0^{227}$).

Tabelle 6: Quantifizierung des Bindungsverhaltens von [¹⁸F]R91150. Inhibition durch bekannte, 5-HT_{2A}-adressierende Verbindungen belegt das spezifische Bindungsverhalten von [¹⁸F]R91150.

	R91150	Altanserin	<i>R</i> (+)-Lisurid	<i>S</i> (-)-Lisurid
	1 µM		2 µM	
Cortex	70,5 ±3,8	70,6 ±3,2	75,6 ±5,5	52,7 ±2,6
Striatum	34,3 ±12,5	32,9 ±12,6	49,9 ±13,7 ^b	32,4 ±4,5
Cerebellum	0	0	0	0

3.2.4 Zusammenfassung

Die Radiosynthese des Serotonin 5-HT_{2A}-Liganden [¹⁸F]R91150 konnte durch die Anwendung moderner „Late-stage“-Radiofluorierungsmethoden erheblich vereinfacht werden. Die Synthesezeit der ursprünglichen 6-Stufen-Radiosynthese wurde von 190 min auf 60 min verkürzt und die radiochemischen Ausbeuten konnten von <5% auf 14% erhöht werden. Somit war erstmals die Evaluation dieses Tracers durch *In-vitro*-Autoradiographien möglich. In den Autoradiographien konnte das spezifische Bindungsverhalten von [¹⁸F]R91150 mit klar abgegrenzter, regionspezifischer Anreicherung gezeigt werden. Einige Vorteile von [¹⁸F]R91150 gegenüber etablierten 5-HT_{2A}-Radioliganden (wie die Abwesenheit hirngängiger Radiometaboliten gegenüber [¹⁸F]Altanserin oder die geeignetere Halbwertszeit gegenüber ([¹¹C]MDL100,907) rechtfertigen eingehendere Studien mit [¹⁸F]R91150 in Hinblick auf eine klinische Anwendung.

3.3 Neue prosthetische Gruppen für die indirekte Radiofluorierung

Wie bereits diskutiert (vgl. Kapitel 1.3.3), erfordern direkte Substitutionsmethoden in der ^{18}F -Chemie normalerweise Reaktionsbedingungen (pH-Werts, Temperatur), die nicht mit physiologischen Bedingungen von Biomolekülen (Peptide, Proteine, Oligonukleotide etc.) kompatibel sind. Allerdings bedingt gerade der komplexe und daher empfindliche Aufbau solcher Biomoleküle die für eine Bildgebung interessante Target-Spezifität. Hier zeigt sich ein nicht unwesentlicher Nachteil der direkten Radiofluorierungsmethoden, der eine stetige Begleiterscheinung der direkten Radiofluorierung ist (vgl. 1.3.2).^{54, 63} Für solche empfindlichen Verbindungen ist die indirekte Markierungsstrategie unter Verwendung einer prosthetischen Gruppe häufig der erfolgversprechendste Ansatz. Neben Peptiden und Proteinen werden prosthetische Gruppen insbesondere auch zur indirekten Markierung von PSMA-spezifischen Liganden eingesetzt.^{61-63, 228, 229} Amin-reaktive prosthetische Gruppen wie ^{18}F SFB konnten sich in den letzten 10-20 Jahren bewähren und werden bereits vielfach zur indirekten Radiomarkierung eingesetzt.^{56-60, 63} Mit 6- ^{18}F Fluornicotinsäuretetrafluorphenylester ^{18}F FPy-TFP wurde schließlich auch eine direkte Markierung des Aktivesters möglich, wodurch dieses Markierungssyntheton in nur einer Stufe zugänglich ist. Mit der optimierten Radiosynthese von ^{18}F FPy-TFP wurde von BASULI et al. kürzlich demonstriert, dass auch mit indirekten Methoden eine schnelle und einfache Radiofluorierung von empfindlichen Biomolekülen möglich ist.⁶⁴⁻⁶⁶ Eine andere Innovation, über die BASULI et al. 2018 als „Radiofluorination on the Sep-Pak“²³⁰ (nachfolgend „On-cartridge“) berichtet haben, greift die Idee einer Radiomarkierung direkt auf der SPE-Kartusche auf, wodurch die ^{18}F SFB-Radiosynthese deutlich optimiert werden konnte.²³⁰

Mit dem vorrangigen Ziel automatisierte Radiosynthesen von klinisch relevanten PET-Tracern (etablierte sowie potenzielle) zu optimieren oder erst zu ermöglichen, wurden in der vorliegenden Arbeit Azaisatosäureanhydride hinsichtlich ihrer Eignung als prosthetische Gruppen für die indirekte Radiofluorierung evaluiert. Die strukturverwandten Isatosäureanhydride sind bekannt für ihre Reaktivität gegenüber Nukleophilen. Unter Freisetzung von CO_2 reagieren sie mit Aminen, Alkoholen und Thiolen zu den entsprechenden Carbonsäureamiden bzw. (Thio-) Estern.²³¹ Die für die nukleophile Substitution zugängliche *ortho*-Position des Pyridins steht auch bei den Azaisatosäureanhydriden für eine Substitution zur Verfügung. Gleichzeitig bieten diese „verkappten“ 2-Aminonikotinsäuren die bivalente Funktionalität eines Aktivesters und substituierten Amins, ohne die Notwendigkeit einer Schutzgruppenstrategie. Eine *N*-Funktionalisierung mit endständigem Alkin oder Azid sollte zudem die Konjugationsmöglichkeit über CuAAC ermöglichen.

3.3.1 Synthese der Markierungsvorläufer

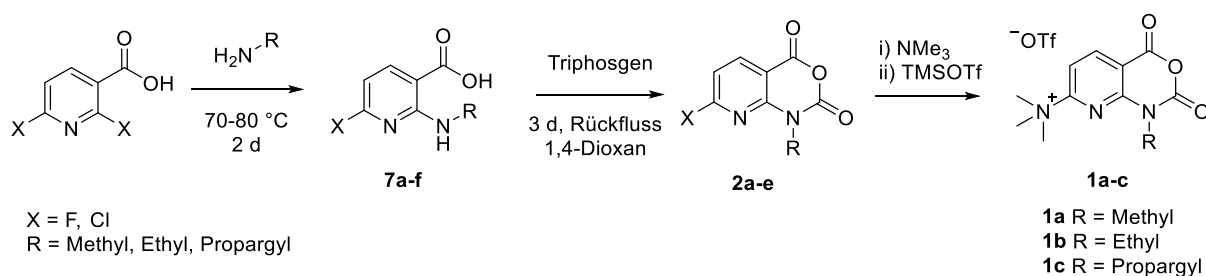


Abbildung 26: Synthese der *N*-substituierten Markierungsvorläufer **1a-c**.

Da die Radiofluorierung an diesen gemischten Anhydriden bisher nicht bekannt war, wurden zunächst aufgrund der guten Verfügbarkeit von Methyl- und Ethylamin, *N*-Methyl- und *N*-Ethyl-substituierte *N,N,N*-Trimethylammoniumtriflat-Markierungsvorläufer hergestellt. Hierzu wurde 2,6-„Dihalo“-nikotinsäure mit einem Überschuss des jeweiligen Amins *N*-substituiert und mit Triphosgen zum Anhydrid umgesetzt. Die nukleophile aromatische Substitution mit Trimethylamin (NMe_3) und anschließende Metathese mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) lieferte die Markierungsvorläufer **1a-c** (Abbildung 26). Kristallstrukturbestimmung aus Einkristallen der Verbindung **1c** bestätigte die erwartete Struktur.

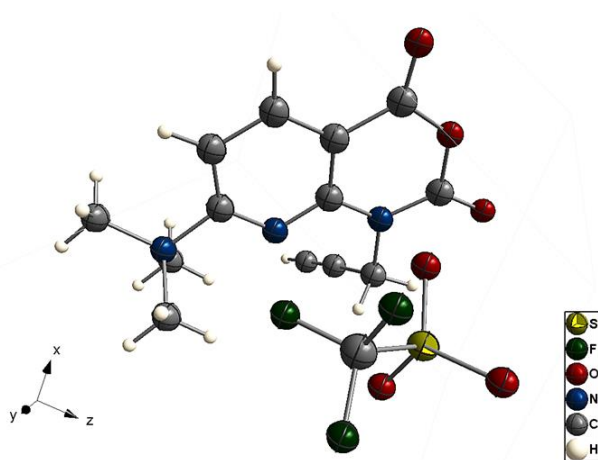


Abbildung 27: Röntgenkristallstrukturbestimmung des Markierungsvorläufers *N,N,N*-Trimethyl-2,4-dioxo-1-(prop-2-yn-1-yl)-1,4-dihydro-2*H*-pyrido[2,3-*d*][1,3]oxazin-7-ammoniumtriflat **1c**.

Die Radiofluorierung der Triflate **1a-c** wurde zunächst nach den bekannten Methoden „Low-base“ von RICHARZ et al.³³ und „On-cartridge“ von BASULI et al.²³⁰ durchgeführt. Mit der Methode nach RICHARZ et al.³³ waren die beobachteten radiochemische Ausbeuten von 10-60% schwer zu reproduzieren und die Bildung von Radionebenprodukten erschwerte die Isolation des Markierungsprodukts. Nach dem „On-cartridge“-Ansatz von BASULI et al. (2018)²³⁰ wird [^{18}F]Fluorid auf einer Anionenaustauscherkartusche (Chromafix 30-PS- HCO_3) fixiert und diese mit wasserfreiem Acetonitril (6 mL) gespült. Eluiert wird mit

dem *N,N,N*-Trimethylammoniumtriflat-Markierungsvorläufer (10 mg), gelöst in 1,0 mL Acetonitril (MeCN):*tert*-Butanol(*t*-BuOH) (1:4). Mit dieser Methode konnten 60-80% ($n > 20$) der Aktivität von der Kartusche eluiert werden (Abbildung 28). Mit der analytischen Radio-HPLC konnte dabei ausnahmslos das jeweilige Markierungsprodukt nachgewiesen werden, dessen chemische Identität mit der Referenzverbindung verifiziert wurde (HPLC). Versuche zur Optimierung der Elutionseffizienz blieben erfolglos. Weder durch Variation der Vorläufermenge, Konzentration, Elutionsgeschwindigkeit noch durch Nachelution mit frischer Vorläufer-/Elutionslösung konnte die Elutionseffizienz gesteigert werden. Tatsächlich konnte die restliche Aktivität auch nicht von der Festphase gelöst werden, wenn das Sorbens aus der Kartusche gelöst und in der Elutionslösung erhitzt wurde. Versuche zur Optimierung der Elutionsgeschwindigkeit waren aufgrund der manuellen Handhabung schwierig zu quantifizieren und haben keine eindeutige Korrelation zur Elutionseffizienz zeigen können. Eine Elutionsgeschwindigkeit von ca. 0,5 mL/min wurde als optimaler Richtwert ermittelt.

3.3.2 Radiosynthesen der Amin-reaktiven Azaisatosäureanhydride

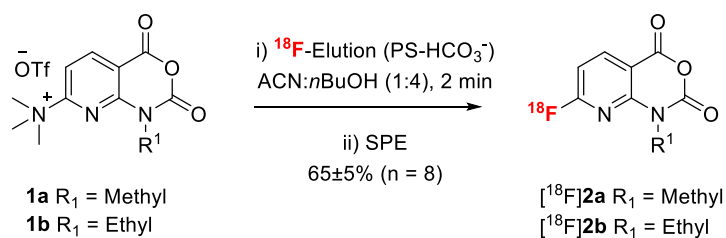


Abbildung 28: „On-cartridge“-Radiofluorierung der Azaisatosäureanhydride $[^{18}\text{F}]\text{2a-b}$.

Für nachfolgende Konjugation mit Aminen (bzw. Aziden) sollte ein möglichst effizientes SPE-Protokoll etabliert werden, um den Markierungsvorläufer von dem Markierungsprodukt abzutrennen. Eine Testreihe mit SPE-Systemen verschiedener Hersteller ergab, dass eine effiziente Rückgewinnung des Markierungsprodukts $[^{18}\text{F}]\text{2}$ mit Festphasen möglich ist, deren Retention durch lipophile und hydrophile Wechselwirkungen bestimmt wird (Abbildung 29). Kartuschen mit höherer Beladung (>300 mg, „Short“) waren am effektivsten (80-90% Rückgewinnung), benötigen allerdings ein Elutionsvolumen von 2-3 mL. Da ein zusätzlicher Schritt zum Entfernen des Lösungsmittels in einem automatisierten Prozess problematisch wäre, wurde als alternative Methode die Elutionslösung zunächst auf eine kurze Säule mit Kieselgel (200 mg) geladen, mit 1 mL Acetonitril eluiert und in 10 mL H_2O verdünnt. Aus der wässrigen Lösung konnte nun auch mit den „kleinen“-Varianten der SPE-Kartuschen (ca. 30-130 mg, „Light“) eine vergleichbare Effizienz erreicht werden. Das geringere Elutionsvolumen von nur 0,5 mL ermöglicht den direkten Einsatz zur Konjugation mit Aminen.

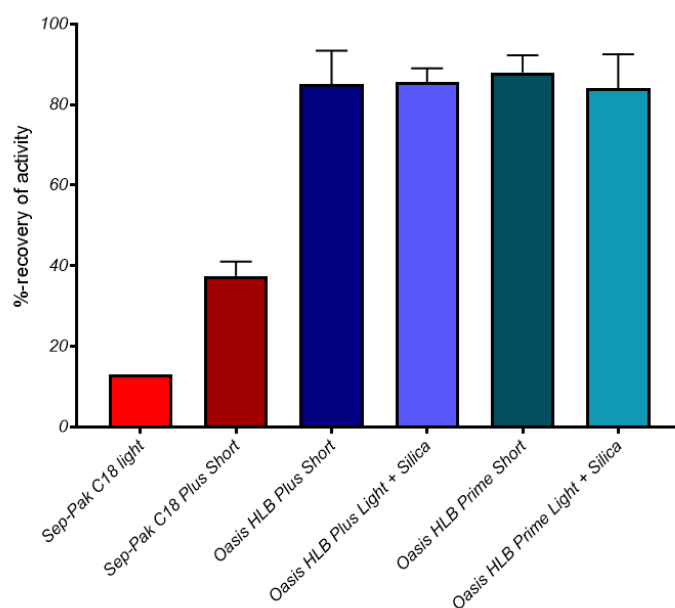


Abbildung 29: Evaluation geeigneter Festphasen (HLB, **H**ydrophilic-**L**ipophilic **B**alance) zur Isolation der Markierungsprodukte. Sorbensbeladung: Short > Light.

Die Stabilität des Markierungssynthons [^{18}F]**2a** wurde in gepufferten Lösungen mit verschiedenen pH-Werten untersucht (Abbildung 30).

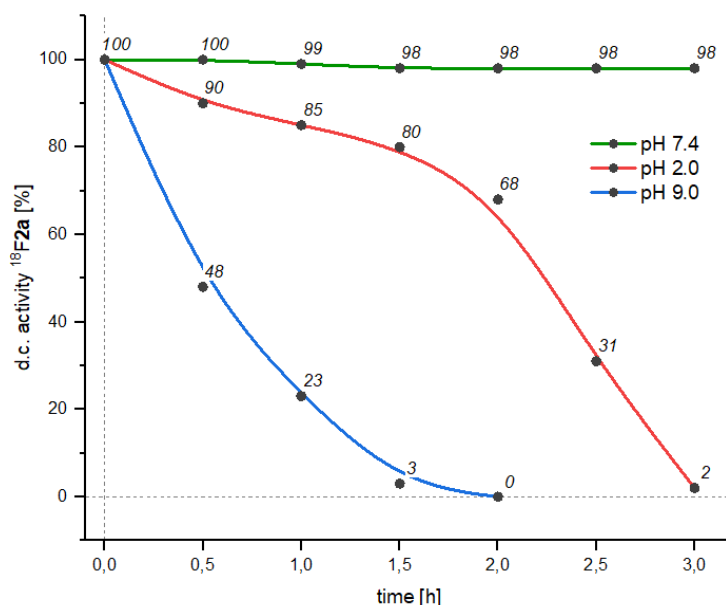


Abbildung 30: Stabilität von [^{18}F]**2a** bei pH 7,4 (grün), 2,0 (rot) und 9,0 (blau) über 3 h bei 20 °C. Die Prozentuale Aktivität von [^{18}F]**2a** wurde über Radio-HPLC ermittelt und zerfallskorrigiert. Reaktionsbedingungen: Puffer: pH 2,0: 30 mM Zitronensäure, 8 mM HCl, 61 mM NaCl; pH 7,4: 50 mM TRIS HCl; pH 9,0: 50 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{Na}_2\text{HCO}_3$ (n=1).

[^{18}F]**2a** war über drei Stunden bei physiologischem pH-Wert stabil. Während nach einer Stunde bei pH 2,0 noch 85% von [^{18}F]**2a** intakt waren, zeigte sich bei pH 9,0 die erwartete Reaktivität gegenüber Nukleophilen, die in Gegenwart von Hydroxid-Ionen zur Bildung der freien Carbonsäure führt.

Die Konjugation von [^{18}F]**2a** mit verschiedenen Aminen wurde bei Temperaturen von 40-110 °C evaluiert. Annähernd quantitative radiochemische Umsätze (RCY > 96%) konnten mit sterisch wenig anspruchsvollen Aminen (*n*-Butylamin, Benzylamin) beobachtet werden. *n*-Butylamin wurde wegen seiner strukturellen Analogie zur Aminosäure Lysin und den ähnlichen *pK*s Werten (10,6 für *n*-Butylamin und 10,5 ($\epsilon\text{-NH}_2$) für Lysin),^{232, 233} als Modellamin ausgesucht, um einen Eindruck zu gewinnen, ob die Konjugation auch mit typischen PSMA-Bindungsmotiven wie dem Glu-C(O)-Lys kompatibel ist. Überraschenderweise lieferte auch die Konjugation mit sekundären Aminen wie Piperidin oder dem Piperazin-Linker des Fibroblasten-Aktivierungsprotein-Inhibitors „FAPI-Pipz“ noch moderate RCA von 30 % bzw. 40 % (Abbildung 31).

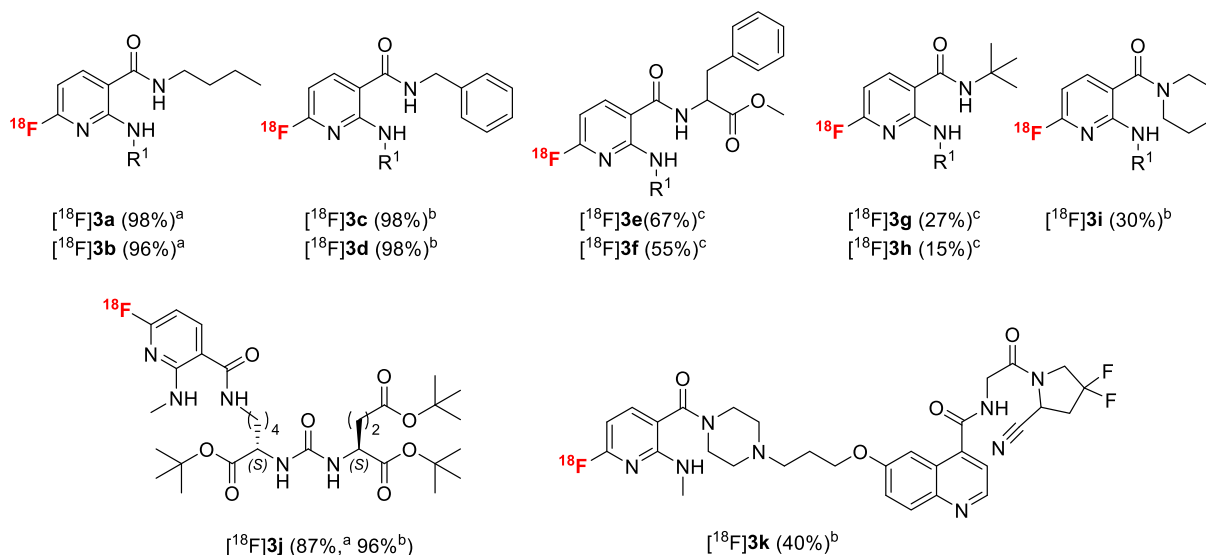
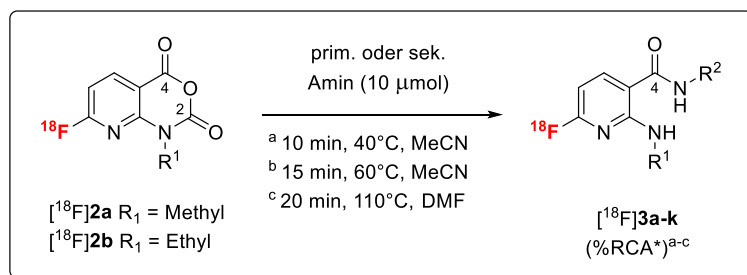


Abbildung 31: Konjugationsprodukte [¹⁸F]**3a-k** aus der Reaktion von [¹⁸F]**2a-b** mit verschiedenen Modellaminen. Reaktionsbedingungen: a) 40 °C, 10 min, MeCN, b) 60 °C, 15 min, MeCN, c) 110 °C, 20 min, DMF. *Analytische Ausbeute.

Ähnlich gute radiochemische Umsätze wie mit *n*-Butylamin konnten auch mit (*t*Bu)₂Glu-C(O)-Lys(*t*Bu) erzielt werden. Der *t*Bu-geschützte PSMA-Ligand [¹⁸F]**3j** konnte somit innerhalb von 10-15 min mit RCYs von 80-96% erhalten werden. Der neue PSMA-spezifische Ligand [¹⁸F]JK-PSMA-15 wurde schließlich nach Entschützung mit 7 M H₃PO₄ oder 6 M HCl in einer Gesamtsynthesedauer von 50-70 min mit nicht-zerfallskorrigierten Ausbeuten von 16±3% (n = 5) erhalten.

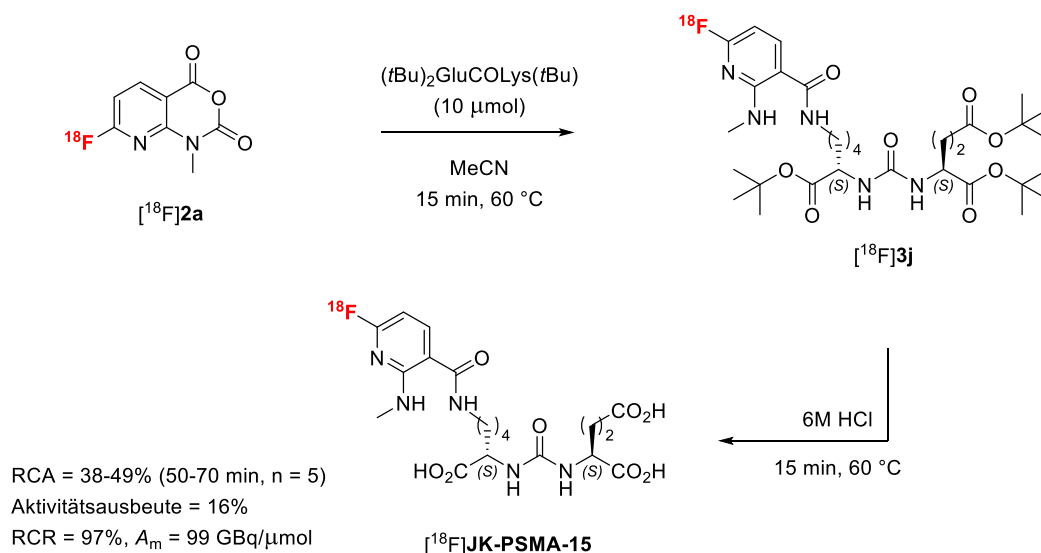


Abbildung 32: Radiosynthese des neuen PSMA-spezifischen Liganden $[^{18}\text{F}]\mathbf{JK-PSMA-15}$.

3.3.3 *In-vivo*-PET-Evaluation von $[^{18}\text{F}]\mathbf{JK-PSMA-15}$

Das PSMA-spezifische Bindungsverhalten von $[^{18}\text{F}]\mathbf{JK-PSMA-15}$ wurde in *In-vivo*-PET-Studien an gesunden Ratten (Ganglien-Tumor-Modell, vgl. 1.4.2.3) am Institut für Radiochemie und Experimentelle Molekulare Bildgebung der Uniklinik Köln durchgeführt. Aus einer manuellen Radiosynthese wurde $[^{18}\text{F}]\mathbf{JK-PSMA-15}$ mit einer Aktivität von 1,1 GBq und einer radiochemischen Reinheit von 97% isoliert. Die natürliche PSMA-Expression der Ganglien wurde nacheinander an zwei Ratten mit $[^{18}\text{F}]\mathbf{JK-PSMA-15}$, sowie an einer Ratte mit $[^{18}\text{F}]\mathbf{JK-PSMA-15}$ unter Inhibition mit 2-PMPA (spezifischer PSMA Inhibitor) dargestellt (Abbildung 33).

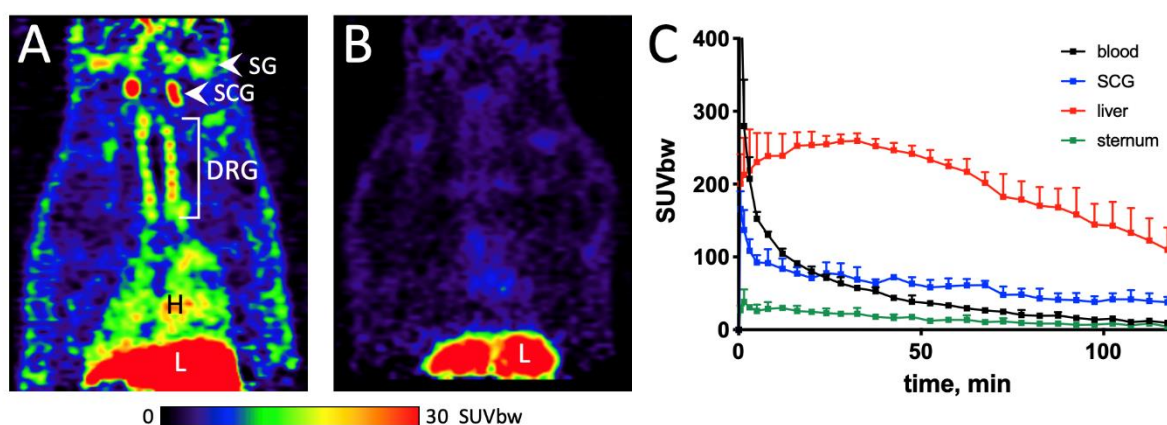


Abbildung 33: Bioverteilung von $[^{18}\text{F}]\mathbf{JK-PSMA-15}$ in gesunden Ratten. (A) Horizontaler Blick auf den Thorax/Rücken der Ratte, Summenbild 60-120 min p.i. (B) $[^{18}\text{F}]\mathbf{JK-PSMA-15}$ unter Inhibition mit 2-PMPA. (C): Tracer Uptake (SUV_{bw}) in unterschiedlichem Gewebe 60 – 120 min p.i. Abkürzungen DRG: Spinalganglien; H: Herz; L: Leber; SCG: Ganglion cervicale superius; SG: Speicheldrüse.

[¹⁸F]JK-PSMA-15 zeigte in den *In-vivo*-Bindungsstudien eine spezifische Anreicherung in den PSMA-positiven Ganglien mit hohem Signal-Hintergrund-Verhältnis. Die spezifische Anreicherung des Tracers wurde durch 2-PMPA vollständig verdrängt. Eine Anreicherung in den Knochen, wie sie bei Defluorierung des Tracers zu beobachten wäre, konnte nicht festgestellt werden. Im direkten Vergleich mit den etablierten PSMA Tracern [¹⁸F]JK-PSMA-7 und [¹⁸F]DCFPyL zeigt [¹⁸F]JK-PSMA-15 eine höhere Anreicherung im Ganglion cervicale superius. Diese ersten *In-vivo*-Resultate sprechen für eine hervorragende Eignung des neuen PSMA Tracer für die *In-vivo*-Bildgebung von kleinen, PSMA-positiven Läsionen.

3.3.4 Radiosynthese einer prosthetischen Gruppe für die „Click“-Chemie

Die „On-cartridge“-Radiofluorierung des *N*-Propargyl-Markierungsvorläufers **1c** führte entgegen der Erwartung nicht zu dem entsprechenden markierten Azaisatosäureanhydrid. Stattdessen wurde ausnahmslos die freie *N*-Propargyl-funktionalisierte Nikotinsäure [¹⁸F]**7f** in vergleichbaren radiochemischen Ausbeuten wie [¹⁸F]**2** isoliert (RCA = 65±5%).

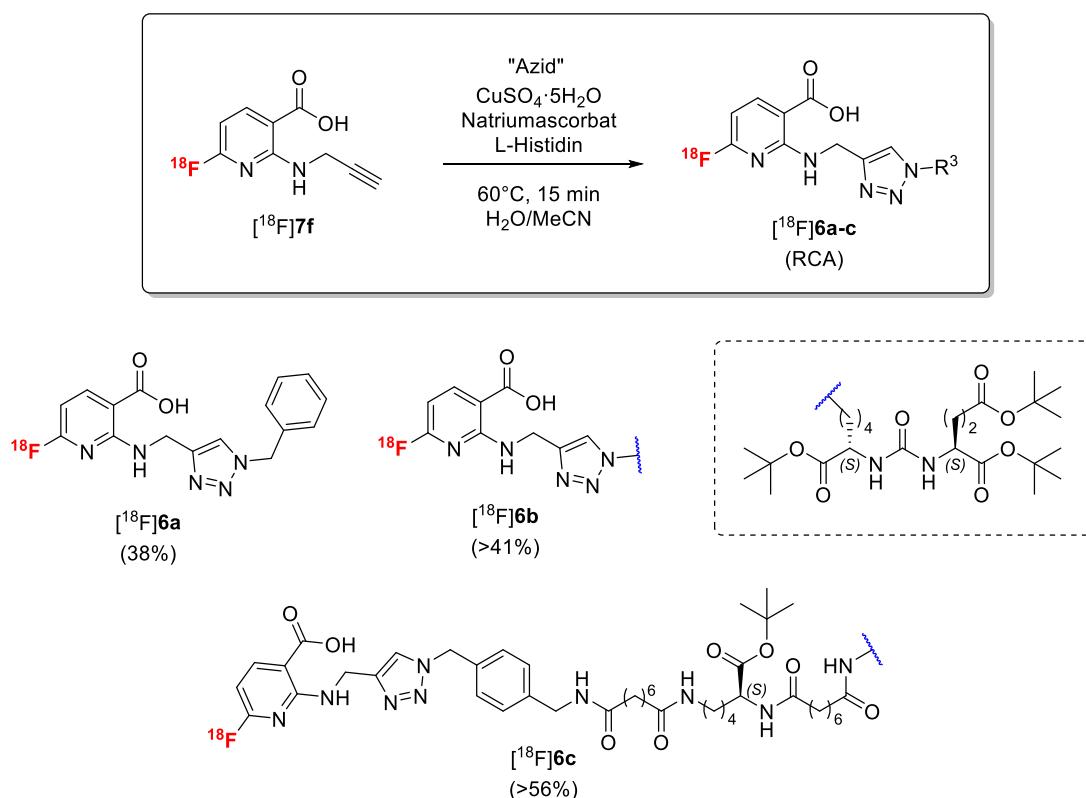


Abbildung 34: Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) von [¹⁸F]**7f** mit unterschiedlichen Aziden. Reaktionsbedingungen: [¹⁸F]**7f** in MeCN (25 µL), 25 µL aq. 0,2 M CuSO₄·5H₂O, L-Histidin (2 mg, 13 µmol) in H₂O (25 µL), 25 µL aq. Na-Ascorbat (5 mg, 25 µmol) in H₂O, 5 µmol Azid in 25 µL MeCN ([¹⁸F]**6a**) oder in 100 µL 1:1 MeCN/ H₂O ([¹⁸F]**6b-c**), 60 °C, 15 min.

Die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) von [^{18}F]**7f** mit Benzylazid lieferte das entsprechende Triazol in einer RCA von 38% innerhalb von 15 min. Durch Konjugation mit zwei weiteren Glu-C(O)-Lys basierten Liganden konnten nach Entschützung der *t*Bu-Gruppen mit 7 M H_3PO_4 die PSMA-Tracer [^{18}F]JK-PSMA-16 und [^{18}F]JK-PSMA-17 in Aktivitätsausbeuten von 21% bzw. 27% innerhalb von 45 min erhalten werden.

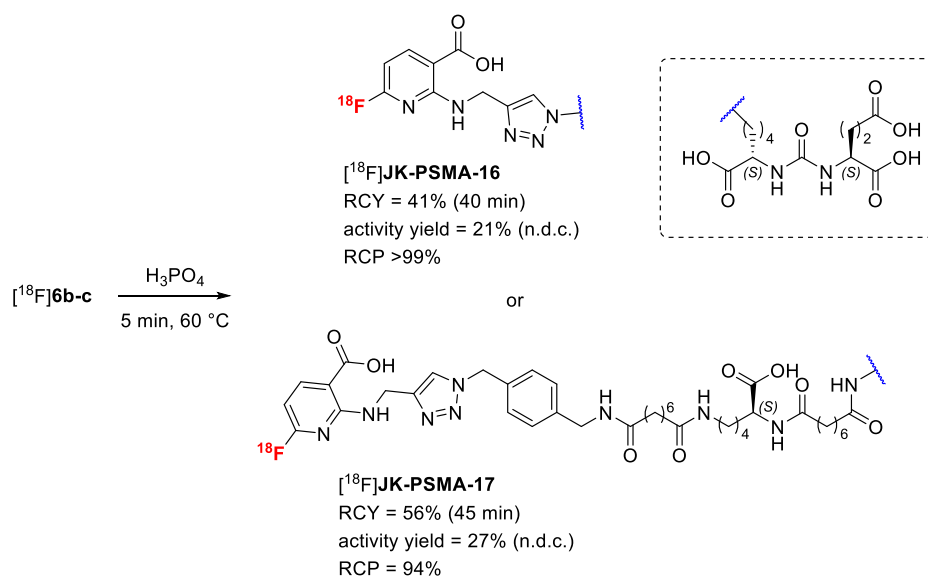


Abbildung 35: Entschützung von [^{18}F]**6b-c** liefert die neuen PSMA-Tracer [^{18}F]JK-PSMA-16 und [^{18}F]JK-PSMA-17.

Um die Eignung der neuen, „clickbaren“ prosthetischen Gruppe für die indirekte Radiomarkierung von Biomolekülen zu evaluieren, wurden vorläufige Versuche zur Optimierung der Reaktionsbedingungen der „Click“-Reaktion, insbesondere hinsichtlich einer niedrigeren Reaktionstemperatur durchgeführt.

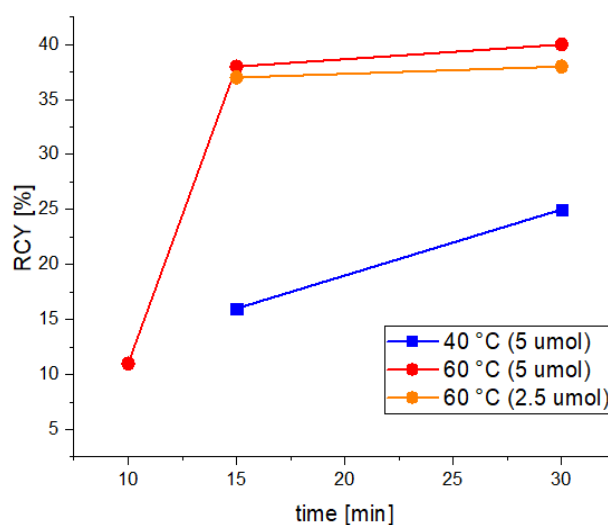


Abbildung 36: Optimierung der Reaktionsbedingungen der CuAAC von [^{18}F]**7f** mit Benzylazid unter Variation der Reaktionstemperatur, -zeit und Vorläufermenge ($n = 1$).

Eine verringerte Reaktionstemperatur wirkte sich deutlich negativ auf die radiochemische Ausbeute aus. Dagegen war der Einfluss der Vorläufermenge sowie eine Verlängerung der Reaktionszeit von 15 min auf 30 min nur bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C signifikant. Für eine Anwendung des Markierungssynthons [^{18}F]**7f** zur indirekten Radiofluorierung kann die verringerte radiochemische Ausbeute in Anbetracht dieser einfachen Markierungsmethode unter Umständen in Kauf genommen werden. Dennoch zeigen diese vorläufigen Ergebnisse das Potential dieser neuen Methode zur indirekten Radiofluorierung.

3.3.5 Zusammenfassung

Azaisatosäureanhydride wurden erstmals als potenzielle prosthetische Gruppen für die indirekte ^{18}F -Markierung evaluiert. Die neuen Amin-reaktiven Markierungsbausteine 7- ^{18}F Fluor-1-methyl-2*H*-pyrido[2,3-*d*][1,3]oxazin-2,4(1*H*)-dion ([^{18}F]**2a**) und 7- ^{18}F Fluor-1-ethyl-2*H*-pyrido[2,3-*d*][1,3]oxazin-2,4(1*H*)-dion [^{18}F]**2b** sowie die „clickbare“ Nikotinsäure 6- ^{18}F Fluor-2-(prop-2-yn-1-ylamino)nikotinsäure ([^{18}F]**7f**) konnten „On-cartridge“ mit der Elution des [^{18}F]Fluorids ohne Bildung von Radionebenprodukten markiert werden, die die weitere Reinigung stören könnten. Ein einfaches Protokoll zur Festphasenextraktion wurde etabliert, welches die Isolation der Markierungsbausteine in 5-10 min ermöglicht und zudem eine Übertragung auf automatisierte Synthesysteme erlaubt. Nach der Isolation über SPE werden die neuen Markierungsbausteine in Ausbeuten von 60-70 % in 10-15 min erhalten und können direkt zur Konjugation mit Aminen ([^{18}F]**2**) oder in Click-Reaktionen eingesetzt werden. Die Aminkonjugation mit [^{18}F]**2** lieferte annähernd quantitative Ausbeuten (RCA >86 %) mit sterisch ungehinderten Aminen, aber zumindest moderate radiochemische Ausbeuten (RCA = 15-67 %) auch mit sekundären Aminen. Der Einsatz von [^{18}F]**2a** bei der Radiosynthese des neuen PSMA-Tracers [^{18}F]JK-PSMA-15 qualifiziert die Amin-reaktiven Azaisatosäureanhydride für den Einsatz als prosthetische Gruppen.

Im direkten Vergleich mit bereits bekannten ^{18}F -markierten prosthetischen Gruppen wie *N*-Succinimidyl-4-([^{18}F]fluorbenzoat [^{18}F]SFB und 6- ^{18}F Fluornicotinsäure-tetrafluorphenylester [^{18}F]FPy-TFP haben die hier vorgestellten, auf Azaisatosäureanhydrid basierenden Markierungsbausteine, den Vorteil, dass sie über die „On-cartridge“-Methode sehr schnell zugänglich sind und keine säulenchromatographische Aufreinigung erforderlich ist.

Mit [^{18}F]JK-PSMA-15 wurde ein neuer Tracer zur Darstellung von kleinen PSMA positiven Läsionen entwickelt. In den *in-vivo*-PET-Studien an gesunden Ratten im Ganglien-Tumor-Modell war die Qualität der Bildgebung von [^{18}F]JK-PSMA-15 vergleichbar mit den klinisch etablierten PSMA-Tracern [^{18}F]JK-PSMA-7 und [^{18}F]DCFPyL. Die „clickbare“ *N*-Propargyl-Nikotinsäure [^{18}F]**7f** wurde in „Click“-Reaktionen

mit Glu-C(O)-Lys basierenden Liganden umgesetzt, womit zwei weitere neue PSMA-Tracer, [^{18}F]JK-PSMA16 und [^{18}F]JK-PSMA17, erhalten wurden. Für die indirekte Radiofluorierung von empfindlichen Biomolekülen bietet die vorläufig optimierte „Click“-Reaktion mit [^{18}F]**7f** das Potential für eingehendere Optimierungsstudien der Reaktionsbedingungen.

4 Literaturverzeichnis

1. Beuthien-Baumann, B., PET-Basics. *Radiologe* **2018**, 58 (5), 487-500.
2. Kirsch, M.; Wannez, S.; Thibaut, A.; Laureys, S.; Brichant, J. F.; Bonhomme, V., Positron Emission Tomography: Basic Principles, New Applications, and Studies Under Anesthesia. *Int Anesthesiol Clin* **2016**, 54 (1), 109-28.
3. Vaquero, J. J.; Kinahan, P., Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging Systems. *Annu Rev Biomed Eng* **2015**, 17, 385-414.
4. Townsend, D. W.; Carney, J. P. J.; Yap, J. T.; Hall, N. C., PET/CT Today and Tomorrow. *Journal of Nuclear Medicine* **2004**, 45 (1 suppl), 4S-14S.
5. Townsend, D. W., Positron emission tomography/computed tomography. *Semin Nucl Med* **2008**, 38 (3), 152-66.
6. Welsh, J. S., Beta decay in science and medicine. *Am J Clin Oncol* **2007**, 30 (4), 437.
7. Harpen, M. D., Positronium: review of symmetry, conserved quantities and decay for the radiological physicist. *Med Phys* **2004**, 31 (1), 57-61.
8. Rahmim, A.; Zaidi, H., PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges. *Nucl Med Commun* **2008**, 29 (3), 193-207.
9. Petegnief, Y.; Aubineau-Laniece, I.; Kerrou, K.; Jourdain, J. R.; Talbot, J. N., Advanced radionuclide detection techniques for in vitro and in vivo animal imaging. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **2001**, 47 (3), 443-51.
10. Phelps, M. E.; Hoffman, E. J.; Mullani, N. A.; Ter-Pogossian, M. M., Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography. *J Nucl Med* **1975**, 16 (3), 210-24.
11. Derenzo, S. E.; Choong, W. S.; Moses, W. W., Monte Carlo calculations of PET coincidence timing: single and double-ended readout. *Phys Med Biol* **2015**, 60 (18), 7309-38.
12. Pizzichemi, M.; Polesel, A.; Stringhini, G.; Gundacker, S.; Lecoq, P.; Tavernier, S.; Paganoni, M.; Auffray, E., On light sharing TOF-PET modules with depth of interaction and 157 ps FWHM coincidence time resolution. *Phys Med Biol* **2019**, 64 (15), 155008.
13. Park, H.; Lee, S.; Ko, G. B.; Lee, J. S., Achieving reliable coincidence resolving time measurement of PET detectors using multichannel waveform digitizer based on DRS4 chip. *Phys Med Biol* **2018**, 63 (24), 24nt02.
14. Groch, M. W., Radioactive decay. *Radiographics* **1998**, 18 (5), 1247-56; quiz 1245-6.
15. M., D.; K., K.; M., S., *Nuklearmedizin: Basis- wissen und klinische Anwendung*. 8 ed.; Schattauer: Stuttgart, 2017; p 480.

16. Cates, J. W.; Levin, C. S., Advances in coincidence time resolution for PET. *Phys Med Biol* **2016**, *61* (6), 2255-64.
17. Han, S.; Li, Y.; Li, Y.; Zhao, M., Diagnostic efficacy of PET/CT in bone tumors. *Oncol Lett* **2019**, *17* (5), 4271-4276.
18. Lameka, K.; Farwell, M. D.; Ichise, M., Positron Emission Tomography. *Handb Clin Neurol* **2016**, *135*, 209-227.
19. Schaart, D. R.; Ziegler, S.; Zaidi, H., Achieving 10 ps coincidence time resolution in TOF-PET is an impossible dream. *Med Phys* **2020**, *47* (7), 2721-2724.
20. Surti, S.; Karp, J. S., Update on latest advances in time-of-flight PET. *Phys Med* **2020**, *80*, 251-258.
21. Torres Espallardo, I., PET/CT: underlying physics, instrumentation, and advances. *Radiologia* **2017**, *59* (5), 431-445.
22. Zheng, Y.; Jin, C.; Cui, H.; Dai, H.; Yan, J.; Han, P.; Hsu, B., Improved image resolution on thoracic carcinomas by quantitative ^{18}F -FDG coincidence SPECT/CT in comparison to (18)F-FDG PET/CT. *J Biomed Res* **2019**, *34* (4), 309-317.
23. Myers, W. G.; Bigler, R. E.; Graham, M. C., PET tomography in studies of distributions of 7.6-min potassium-38 in the dog heart. *Eur J Nucl Med* **1984**, *9* (6), 272-7.
24. Serdons, K.; Verbruggen, A.; Bormans, G. M., Developing new molecular imaging probes for PET. *Methods* **2009**, *48* (2), 104-11.
25. Harper, D. B.; O'Hagan, D., The fluorinated natural products. *Natural Product Reports* **1994**, *11* (0), 123-133.
26. Damont, A.; Roeda, D.; Dollé, F., The potential of carbon-11 and fluorine-18 chemistry: illustration through the development of positron emission tomography radioligands targeting the translocator protein 18 kDa. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* **2013**, *56* (3-4), 96-104.
27. Cole, E. L.; Stewart, M. N.; Littich, R.; Hoareau, R.; Scott, P. J., Radiosyntheses using fluorine-18: the art and science of late stage fluorination. *Curr Top Med Chem* **2014**, *14* (7), 875-900.
28. Clark, J. C.; Silvester, D. J., A cyclotron method for the production of fluorine-18. *Int J Appl Radiat Isot* **1966**, *17* (3), 151-4.
29. Tilbury, R. S.; Dahl, J. R.; Mamacos, J. P.; Laughlin, J. S., Fluorine-18 production for medical use by helium-3 bombardment of water. *Int J Appl Radiat Isot* **1970**, *21* (5), 277-81.
30. Coenen, H. H.; Ermert, J., ^{18}F -labelling innovations and their potential for clinical application. *Clinical and Translational Imaging* **2018**, *6* (3), 169-193.
31. Ermert, J.; Neumaier, B., The Radiopharmaceutical Chemistry of Fluorine-18: Nucleophilic Fluorinations. 2019; pp 273-283.

32. Wright, J. S.; Kaur, T.; Preshlock, S.; Tanzey, S. S.; Winton, W. P.; Sharninghausen, L. S.; Wiesner, N.; Brooks, A. F.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H., Copper-mediated late-stage radiofluorination: five years of impact on preclinical and clinical PET imaging. *Clinical and Translational Imaging* **2020**, 8 (3), 167-206.
33. Richarz, R.; Krapf, P.; Zarrad, F.; Urusova, E. A.; Neumaier, B.; Zlatopolskiy, B. D., Neither azeotropic drying, nor base nor other additives: a minimalist approach to ^{18}F -labeling. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, 12 (40), 8094-8099.
34. Zischler, J.; Kolks, N.; Modemann, D.; Neumaier, B.; Zlatopolskiy, B. D., Alcohol-Enhanced Cu-Mediated Radiofluorination. *Chemistry – A European Journal* **2017**, 23 (14), 3251-3256.
35. Pretze, M.; Wängler, C.; Wängler, B., 6- ^{18}F fluoro-L-DOPA: a well-established neurotracer with expanding application spectrum and strongly improved radiosyntheses. *Biomed Res Int* **2014**, 2014, 674063.
36. Luxen, A.; Guillaume, M.; Melega, W. P.; Pike, V. W.; Solin, O.; Wagner, R., Production of 6- ^{18}F fluoro-L-dopa and its metabolism in vivo--a critical review. *Int J Rad Appl Instrum B* **1992**, 19 (2), 149-58.
37. Leung, K., L-3,4-Dihydroxy-6- ^{18}F fluorophenylalanine. In *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD), 2004.
38. Lemaire, C.; Guillaume, M.; Cantineau, R.; Plenevaux, A.; Christiaens, L., An approach to the asymmetric synthesis of l-6- ^{18}F fluorodopa via NCA nucleophilic fluorination. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes* **1991**, 42 (7), 629-635.
39. Lemaire, C.; Gillet, S.; Guillouet, S.; Plenevaux, A.; Aerts, J.; Luxen, A., Highly Enantioselective Synthesis of No-Carrier-Added 6- ^{18}F Fluoro-L-dopa by Chiral Phase-Transfer Alkylation. *European Journal of Organic Chemistry* **2004**, 2004 (13), 2899-2904.
40. Kuik, W. J.; Kema, I. P.; Brouwers, A. H.; Zijlma, R.; Neumann, K. D.; Dierckx, R. A.; DiMagno, S. G.; Elsinga, P. H., In vivo biodistribution of no-carrier-added 6- ^{18}F -fluoro-3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (^{18}F -DOPA), produced by a new nucleophilic substitution approach, compared with carrier-added ^{18}F -DOPA, prepared by conventional electrophilic substitution. *J Nucl Med* **2015**, 56 (1), 106-12.
41. Ross, T. L.; Ermert, J.; Hocke, C.; Coenen, H. H., Nucleophilic ^{18}F -Fluorination of Heteroaromatic Iodonium Salts with No-Carrier-Added ^{18}F Fluoride. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (25), 8018-8025.
42. Krüll, J.; Heinrich, M. R., ^{18}F Fluorine-Labeled Pharmaceuticals: Direct Aromatic Fluorination Compared to Multi-Step Strategies. *Asian Journal of Organic Chemistry* **2018**, 8 (5), 576-590.
43. Luurtsema, G.; Boersma, H. H.; Schepers, M.; de Vries, A. M. T.; Maas, B.; Zijlma, R.; de Vries, E. F. J.; Elsinga, P. H., Improved GMP-compliant multi-dose production

- and quality control of 6-[^{18}F]fluoro-L-DOPA. *EJNMMI Radiopharm Chem* **2017**, *1* (1), 7.
44. Tredwell, M.; Preshlock, S. M.; Taylor, N. J.; Gruber, S.; Huiban, M.; Passchier, J.; Mercier, J.; Génicot, C.; Gouverneur, V., A General Copper-Mediated Nucleophilic ^{18}F Fluorination of Arenes. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53* (30), 7751-7755.
 45. Taylor, N. J.; Emer, E.; Preshlock, S.; Schedler, M.; Tredwell, M.; Verhoog, S.; Mercier, J.; Génicot, C.; Gouverneur, V., Derisking the Cu-Mediated ^{18}F -Fluorination of Heterocyclic Positron Emission Tomography Radioligands. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139* (24), 8267-8276.
 46. Lam, P. Y. S.; Clark, C. G.; Saubern, S.; Adams, J.; Averill, K. M.; Chan, D. M. T.; Combs, A., Copper Promoted Aryl/Saturated Heterocyclic C-N Bond Cross-Coupling with Arylboronic Acid and Arylstannane. *Synlett* **2000**, *2000* (05), 0674-0676.
 47. Li, L.; Zhang, Z., Development and Applications of the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) as a Bioorthogonal Reaction. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2016**, *21* (10).
 48. Pretze, M.; Kuchar, M.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Pietzsch, J.; Mamat, C., An efficient bioorthogonal strategy using CuAAC click chemistry for radiofluorinations of SNEW peptides and the role of copper depletion. *ChemMedChem* **2013**, *8* (6), 935-45.
 49. Testa, C.; Papini, A. M.; Chorev, M.; Rovero, P., Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC)-Mediated Macrocyclization of Peptides: Impact on Conformation and Biological Activity. *Curr Top Med Chem* **2018**, *18* (7), 591-610.
 50. Presolski, S. I.; Hong, V. P.; Finn, M. G., Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation. *Curr Protoc Chem Biol* **2011**, *3* (4), 153-162.
 51. Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G., Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48* (52), 9879-83.
 52. Inoue, N.; Onoda, A.; Hayashi, T., Site-Specific Modification of Proteins through N-Terminal Azide Labeling and a Chelation-Assisted CuAAC Reaction. *Bioconjug Chem* **2019**, *30* (9), 2427-2434.
 53. Merck >Conjugation Chemistry-Azides, Alkynes and Other Reagents > Copper Click Chemistry.
<https://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistry-products.html?TablePage=121567663> (accessed 14.02.2021).
 54. Jacobson, O.; Kiesewetter, D. O.; Chen, X., Fluorine-18 radiochemistry, labeling strategies and synthetic routes. *Bioconjug Chem* **2015**, *26* (1), 1-18.
 55. Krishnan, H. S.; Ma, L.; Vasdev, N.; Liang, S. H., ^{18}F -Labeling of Sensitive Biomolecules for Positron Emission Tomography. *Chemistry - A European Journal* **2017**, *23* (62), 15553-15577.

56. Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R., Synthesis of N-succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate, an agent for labeling proteins and peptides with ¹⁸F. *Nat Protoc* **2006**, *1* (4), 1655-61.
57. Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R., Fluorine-18-labeled [Nle⁴,d-Phe⁷]-α-MSH, an α-melanocyte stimulating hormone analogue. *Nuclear Medicine and Biology* **1997**, *24* (2), 171-178.
58. Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R., Fluorine-18 labeled chemotactic peptides: a potential approach for the PET imaging of bacterial infection. *Nucl Med Biol* **1995**, *22* (6), 759-64.
59. Vaidyanathan, G.; Bigner, D. D.; Zalutsky, M. R., Fluorine-18-labeled monoclonal antibody fragments: a potential approach for combining radioimmunoscinigraphy and positron emission tomography. *J Nucl Med* **1992**, *33* (8), 1535-41.
60. Vaidyanathan, G.; Bigner, D. D.; Zalutsky, M. R., Fluorine-18-Labeled Monoclonal Antibody Fragments: A Potential Approach for Combining Radioimmunoscinigraphy and Positron Emission Tomography. *Journal of Nuclear Medicine* **1992**, *33* (8), 1535-1541.
61. Olberg, D. E.; Arukwe, J. M.; Grace, D.; Hjelstuen, O. K.; Solbakken, M.; Kindberg, G. M.; Cuthbertson, A., One Step Radiosynthesis of 6-[¹⁸F]Fluoronicotinic Acid 2,3,5,6-Tetrafluorophenyl Ester ([¹⁸F]F-Py-TFP): A New Prosthetic Group for Efficient Labeling of Biomolecules with Fluorine-18. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53* (4), 1732-1740.
62. Malik, N.; Machulla, H.-J.; Solbach, C.; Winter, G.; Reske, S. N.; Zlatopolskiy, B., Radiosynthesis of a new PSMA targeting ligand ([¹⁸F]FPy-DUPA-Pep). *Applied Radiation and Isotopes* **2011**, *69* (7), 1014-1018.
63. Van Der Born, D.; Pees, A.; Poot, A. J.; Orru, R. V. A.; Windhorst, A. D.; Vugts, D. J., Fluorine-18 labelled building blocks for PET tracer synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (15), 4709-4773.
64. Basuli, F.; Zhang, X.; Woodroffe, C. C.; Jagoda, E. M.; Choyke, P. L.; Swenson, R. E., Fast indirect fluorine-18 labeling of protein/peptide using the useful 6-fluoronicotinic acid-2,3,5,6-tetrafluorophenyl prosthetic group: A method comparable to direct fluorination. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2017**, *60* (3), 168-175.
65. Basuli, F.; Zhang, X.; Jagoda, E. M.; Choyke, P. L.; Swenson, R. E., Facile room temperature synthesis of fluorine-18 labeled fluoronicotinic acid-2,3,5,6-tetrafluorophenyl ester without azeotropic drying of fluorine-18. *Nuclear Medicine and Biology* **2016**, *43* (12), 770-772.
66. Basuli, F.; Zhang, X.; Phelps, T. E.; Jagoda, E. M.; Choyke, P. L.; Swenson, R. E., Automated Synthesis of Fluorine-18 Labeled CXCR4 Ligand via the Conjugation with Nicotinic Acid N-Hydroxysuccinimide Ester (6-[¹⁸F]SFPy). *Molecules (Basel, Switzerland)* **2020**, *25* (17), 3924.

67. Brady, Z.; Taylor, M. L.; Haynes, M.; Whitaker, M.; Mullen, A.; Clews, L.; Partridge, M.; Hicks, R. J.; Trapp, J. V., The clinical application of PET/CT: a contemporary review. *Australasian Physics & Engineering Sciences in Medicine* **2008**, *31* (2), 90-109.
68. Gowrishankar, G.; Hardy, J.; Wardak, M.; Namavari, M.; Reeves, R. E.; Neofytou, E.; Srinivasan, A.; Wu, J. C.; Contag, C. H.; Gambhir, S. S., Specific Imaging of Bacterial Infection Using 6"-¹⁸F-Fluoromaltotriose: A Second-Generation PET Tracer Targeting the Maltodextrin Transporter in Bacteria. *Journal of Nuclear Medicine* **2017**, *58* (10), 1679-1684.
69. Dippel, R.; Boos, W., The Maltodextrin System of Escherichia coli: Metabolism and Transport. *Journal of Bacteriology* **2005**, *187* (24), 8322-8331.
70. Christensen, T. N.; Andersen, P. K.; Langer, S. W.; Fischer, B. M. B., Prognostic Value of ¹⁸F-FDG-PET Parameters in Patients with Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis and Review of Current Literature. *Diagnostics (Basel)* **2021**, *11* (2).
71. Jacene, H. A., FDG PET for Assessment of Autologous Stem Cell Transplantation. *Semin Nucl Med* **2021**.
72. Minoshima, S.; Mosci, K.; Cross, D.; Thientunyakit, T., Brain [¹⁸F]FDG PET for Clinical Dementia Workup: Differential Diagnosis of Alzheimer's Disease and Other Types of Dementing Disorders. *Semin Nucl Med* **2021**.
73. Pellegrino, S.; Fonti, R.; Pulcrano, A.; Del Vecchio, S., PET-Based Volumetric Biomarkers for Risk Stratification of Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Diagnostics (Basel)* **2021**, *11* (2).
74. Warburg, O., On the Origin of Cancer Cells. *Science* **1956**, *123* (3191), 309-314.
75. Boers, J.; de Vries, E. F. J.; Glaudemans, A.; Hospers, G. A. P.; Schröder, C. P., Application of PET Tracers in Molecular Imaging for Breast Cancer. *Curr Oncol Rep* **2020**, *22* (8), 85.
76. Chételat, G.; Arbizu, J.; Barthel, H.; Garibotto, V.; Law, I.; Morbelli, S.; van de Giessen, E.; Agosta, F.; Barkhof, F.; Brooks, D. J.; Carrillo, M. C.; Dubois, B.; Fjell, A. M.; Frisoni, G. B.; Hansson, O.; Herholz, K.; Hutton, B. F.; Jack, C. R., Jr.; Lammertsma, A. A.; Landau, S. M.; Minoshima, S.; Nobili, F.; Nordberg, A.; Ossenkoppele, R.; Oyen, W. J. G.; Perani, D.; Rabinovici, G. D.; Scheltens, P.; Villemagne, V. L.; Zetterberg, H.; Drzezga, A., Amyloid-PET and ¹⁸F-FDG-PET in the diagnostic investigation of Alzheimer's disease and other dementias. *Lancet Neurol* **2020**, *19* (11), 951-962.
77. Lotan, E.; Friedman, K. P.; Davidson, T.; Shepherd, T. M., Brain ¹⁸F-FDG-PET: Utility in the Diagnosis of Dementia and Epilepsy. *Isr Med Assoc J* **2020**, *22* (3), 178-184.
78. Mattoli, M. V.; Treglia, G.; Calcagni, M. L.; Mangiola, A.; Anile, C.; Trevisi, G., Usefulness of Brain Positron Emission Tomography with Different Tracers in the Evaluation of Patients with Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (18).

79. Ricci, M.; Cimini, A.; Chiaravalloti, A.; Filippi, L.; Schillaci, O., Positron Emission Tomography (PET) and Neuroimaging in the Personalized Approach to Neurodegenerative Causes of Dementia. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (20).
80. Suppiah, S.; Didier, M. A.; Vinjamuri, S., The Who, When, Why, and How of PET Amyloid Imaging in Management of Alzheimer's Disease-Review of Literature and Interesting Images. *Diagnostics (Basel)* **2019**, *9* (2).
81. Mota, F.; Ordonez, A. A.; Firth, G.; Ruiz-Bedoya, C. A.; Ma, M. T.; Jain, S. K., Radiotracer Development for Bacterial Imaging. *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *63* (5), 1964-1977.
82. Li, Z.-B.; Wu, Z.; Cao, Q.; Dick, D. W.; Tseng, J. R.; Gambhir, S. S.; Chen, X., The Synthesis of ^{18}F -FDS and Its Potential Application in Molecular Imaging. *Molecular Imaging and Biology* **2008**, *10* (2), 92-98.
83. Li, J.; Zheng, H.; Fodah, R.; Warawa, J. M.; Ng, C. K., Validation of 2- ^{18}F -Fluorodeoxysorbitol as a Potential Radiopharmaceutical for Imaging Bacterial Infection in the Lung. *Journal of Nuclear Medicine* **2018**, *59* (1), 134-139.
84. Ru, J.; Li, P.; Wang, J.; Zhou, W.; Li, B.; Huang, C.; Li, P.; Guo, Z.; Tao, W.; Yang, Y.; Xu, X.; Li, Y.; Wang, Y.; Yang, L., TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines. *J Cheminform* **2014**, *6*, 13.
85. Roskoski, R., Jr., Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacol Res* **2019**, *144*, 19-50.
86. Pollastri, M. P., Overview on the Rule of Five. *Curr Protoc Pharmacol* **2010**, Chapter 9, Unit 9.12.
87. Lipinski, C. A., Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol* **2004**, *1* (4), 337-41.
88. Giménez, B. G.; Santos, M. S.; Ferrarini, M.; Fernandes, J. P., Evaluation of blockbuster drugs under the rule-of-five. *Pharmazie* **2010**, *65* (2), 148-52.
89. Chen, X.; Li, H.; Tian, L.; Li, Q.; Luo, J.; Zhang, Y., Analysis of the Physicochemical Properties of Acaricides Based on Lipinski's Rule of Five. *J Comput Biol* **2020**, *27* (9), 1397-1406.
90. Baell, J.; Congreve, M.; Leeson, P.; Abad-Zapatero, C., Ask the experts: past, present and future of the rule of five. *Future Med Chem* **2013**, *5* (7), 745-52.
91. Lever, S. Z.; Fan, K.-H.; Lever, J. R., Tactics for preclinical validation of receptor-binding radiotracers. *Nuclear Medicine and Biology* **2017**, *44*, 4-30.
92. W. Pike, V., Considerations in the Development of Reversibly Binding PET Radioligands for Brain Imaging. *Current Medicinal Chemistry* **2016**, *23* (18), 1818-1869.
93. Sterns, R. H.; Silver, S. M.; Hix, J. K., Urea for hyponatremia? *Kidney International* **2015**, *87* (2), 268-270.

94. Cornford, E. M.; Braun, L. D.; Oldendorf, W. H.; Hill, M. A., Comparison of lipid-mediated blood-brain-barrier penetrability in neonates and adults. *Am J Physiol* **1982**, *243* (3), C161-8.
95. Smith, Q. R., A Review of Blood-Brain Barrier Transport Techniques. In *The Blood-Brain Barrier: Biology and Research Protocols*, Nag, S., Ed. Humana Press: Totowa, NJ, 2003; pp 193-208.
96. Sykes, B. D.; Hull, W. E., Drug-protein binding: recent advances in methodology: nuclear magnetic resonance. *Ann N Y Acad Sci* **1973**, *226*, 60-8.
97. Steyn, S. J.; Varma, M. V. S., Cytochrome-P450-Mediated Drug-Drug Interactions of Substrate Drugs: Assessing Clinical Risk Based on Molecular Properties and an Extended Clearance Classification System. *Mol Pharm* **2020**, *17* (8), 3024-3032.
98. Yu, X.; Chu, Z.; Li, J.; He, R.; Wang, Y.; Cheng, C., Pharmacokinetic Drug-drug Interaction of Antibiotics Used in Sepsis Care in China. *Curr Drug Metab* **2020**.
99. Bylund, D. B.; Murrin, L. C., Radioligand saturation binding experiments over large concentration ranges. *Life Sciences* **2000**, *67* (24), 2897-2911.
100. Maguire, J. J.; Kuc, R. E.; Davenport, A. P., Radioligand binding assays and their analysis. *Methods Mol Biol* **2012**, *897*, 31-77.
101. Schütz, W., The pharmacological basis of receptor binding. *Wien Klin Wochenschr* **1991**, *103* (15), 438-42.
102. Davenport, A. P.; Russell, F. D., Radioligand Binding Assays: Theory and Practice. In *Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development*, Mather, S. J., Ed. Springer Netherlands: Dordrecht, 1996; pp 169-179.
103. Keller, T.; López-Picón, F. R.; Krzyczmonik, A.; Forsback, S.; Takkinen, J. S.; Rajander, J.; Teperi, S.; Dollé, F.; Rinne, J. O.; Haaparanta-Solin, M.; Solin, O., Comparison of high and low molar activity TSPO tracer [¹⁸F]F-DPA in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **2020**, *40* (5), 1012-1020.
104. Keck, T. M.; Burzynski, C.; Shi, L.; Newman, A. H., Beyond Small-Molecule SAR. Elsevier: 2014; pp 267-300.
105. Bylund, D. B.; Toews, M. L., Radioligand binding methods: practical guide and tips. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **1993**, *265* (5), L421-L429.
106. Lahti, R. A.; Roberts, R. C.; Cochrane, E. V.; Primus, R. J.; Gallager, D. W.; Conley, R. R.; Tamminga, C. A., Direct determination of dopamine D4 receptors in normal and schizophrenic postmortem brain tissue: a [³H]NGD-94-1 study. *Molecular Psychiatry* **1998**, *3* (6), 528-533.
107. Sergeev, M.; Lazari, M.; Morgia, F.; Collins, J.; Javed, M. R.; Sergeeva, O.; Jones, J.; Phelps, M. E.; Lee, J. T.; Keng, P. Y.; Van Dam, R. M., Performing radiosynthesis

- in microvolumes to maximize molar activity of tracers for positron emission tomography. *Communications Chemistry* **2018**, *1* (1).
108. Sergeev, M.; Lazari, M.; Morgia, F.; Collins, J.; Javed, M. R.; Sergeeva, O.; Jones, J.; Phelps, M. E.; Lee, J. T.; Keng, P. Y.; van Dam, R. M., Performing radiosynthesis in microvolumes to maximize molar activity of tracers for positron emission tomography. *Communications Chemistry* **2018**, *1* (1), 10.
 109. Link, J. M.; Shoner, S. C.; Krohn, K. A., Sources of carrier F-19 in F-18 fluoride. *AIP Conference Proceedings* **2012**, *1509* (1), 61-65.
 110. Missale, C.; Nash, S. R.; Robinson, S. W.; Jaber, M.; Caron, M. G., Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* **1998**, *78* (1), 189-225.
 111. Terai, M.; Usuda, S.; Maeno, H., [Dopamine receptors]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **1984**, *29* (12 Suppl), 1328-37.
 112. Seeman, P., Schizophrenia and dopamine receptors. *Eur Neuropsychopharmacol* **2013**, *23* (9), 999-1009.
 113. Seeman, P., Brain dopamine receptors. *Pharmacol Rev* **1980**, *32* (3), 229-313.
 114. Sealfon, S. C.; Olanow, C. W., Dopamine receptors: from structure to behavior. *Trends Neurosci* **2000**, *23* (10 Suppl), S34-40.
 115. Missale, C.; Nash, S. R.; Robinson, S. W.; Jaber, M.; Caron, M. G., Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **1998**, *78* (1), 189-225.
 116. Goldberg, L. I., Dopamine: receptors and clinical applications. *Clin Physiol Biochem* **1985**, *3* (2-3), 120-6.
 117. Dziedzicka-Wasylewska, M., Brain dopamine receptors--research perspectives and potential sites of regulation. *Pol J Pharmacol* **2004**, *56* (6), 659-71.
 118. Beaulieu, J. M.; Gainetdinov, R. R., The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* **2011**, *63* (1), 182-217.
 119. Beaulieu, J. M.; Espinoza, S.; Gainetdinov, R. R., Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol* **2015**, *172* (1), 1-23.
 120. Baldessarini, R. J.; Tarazi, F. I., Brain dopamine receptors: a primer on their current status, basic and clinical. *Harv Rev Psychiatry* **1996**, *3* (6), 301-25.
 121. Böhm, S., Dopaminerge Systeme. In *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2016; pp 147-150.
 122. Rivera, A.; Peñafiel, A.; Megías, M.; Agnati, L. F.; López-Téllez, J. F.; Gago, B.; Gutiérrez, A.; de la Calle, A.; Fuxe, K., Cellular localization and distribution of dopamine D4 receptors in the rat cerebral cortex and their relationship with the cortical dopaminergic and noradrenergic nerve terminal networks. *Neuroscience* **2008**, *155* (3), 997-1010.

123. Defagot, M.; Falzone, T.; Low, M.; Grandy, D.; Rubinstein, M.; Antonelli, M., Quantitative analysis of the dopamine D4 receptor in the mouse brain. *Journal of Neuroscience Research* **2000**, *59*.
124. Levey, A.; Hersch, S.; Rye, D.; Sunahara, R.; Niznik, H. B.; Kitt, C. A.; Price, D. L.; Maggio, R.; Brann, M. R.; Ciliax, B., Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *90*, 8861-5.
125. De La Garza II, R.; Madras, B. K., [3H]PNU-101958, a D4 dopamine receptor probe, accumulates in prefrontal cortex and hippocampus of non-human primate brain. *Synapse* **2000**, *37* (3), 232-244.
126. Lahti, R.; Roberts, R.; Cochrane, E.; Primus, R.; Gallager, D.; Conley, R.; Tamminga, C., Direct determination of dopamine D₄ receptors in normal and schizophrenic postmortem brain tissue: a [³H]NGD-94-1 study. *Molecular Psychiatry* **1998**, *3*, 528-533.
127. Defagot, M.; Antonelli, M., Autoradiographic Localization of the Putative D4 Dopamine Receptor in Rat Brain. *Neurochemical research* **1997**, *22*, 401-7.
128. Mansour, A.; Watson, S. In *Dopamine Receptor Expression in the Central Nervous System*, 2006.
129. Khan, Z. U.; Gutiérrez, A.; Martín, R.; Peñafiel, A.; Rivera, A.; de la Calle, A., Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience* **2000**, *100* (4), 689-699.
130. Prante, O.; Tietze, R.; Hocke, C.; Löber, S.; Hübner, H.; Kuwert, T.; Gmeiner, P., Synthesis, Radiofluorination, and In Vitro Evaluation of Pyrazolo[1,5-a]pyridine-Based Dopamine D₄ Receptor Ligands: Discovery of an Inverse Agonist Radioligand for PET. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51* (6), 1800-1810.
131. Kügler, F.; Sihver, W.; Ermert, J.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Prante, O.; Coenen, H. H., Evaluation of ¹⁸F-Labeled Benzodioxine Piperazine-Based Dopamine D₄ Receptor Ligands: Lipophilicity as a Determinate of Nonspecific Binding. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54* (24), 8343-8352.
132. Prante, O.; Hocke, C.; Löber, S.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Kuwert, T., Tissue distribution of radioiodinated FAUC113: assessment of a pyrazolo(1,5-a) pyridine based dopamine D₄ receptor radioligand candidate. *Nuklearmedizin* **2006**, *45* (1), 41-8.
133. Gazi, L.; Bobirnac, I.; Danzeisen, M.; Schüpbach, E.; Langenegger, D.; Sommer, B.; Hoyer, D.; Tricklebank, M.; Schoeffter, P., Receptor density as a factor governing the efficacy of the dopamine D₄ receptor ligands, L-745,870 and U-101958 at human recombinant D_{4.4} receptors expressed in CHO cells. *British Journal of Pharmacology* **1999**, *128* (3), 613-620.
134. Kilbourn, M. R., ¹¹C- and ¹⁸F-Radiotracers for In Vivo Imaging of the Dopamine System: Past, Present and Future. *Biomedicines* **2021**, *9* (2), 108.

135. Willmann, M.; Ermert, J.; Neumaier, B., ¹⁸F-Markierte Phenylpiperazine als neue Struktur motive für spezifische Dopamin D₄-Rezeptorliganden. *Nuklearmedizin* **2019**, 58 (02), V73.
136. Witt, J. O.; Mccollum, A. L.; Hurtado, M. A.; Huseman, E. D.; Jeffries, D. E.; Temple, K. J.; Plumley, H. C.; Blobaum, A. L.; Lindsley, C. W.; Hopkins, C. R., Synthesis and characterization of a series of chiral alkoxymethyl morpholine analogs as dopamine receptor 4 (D₄R) antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2016**, 26 (10), 2481-2488.
137. Oh, S. J.; Lee, K. C.; Lee, S. Y.; Ryu, E. K.; Saji, H.; Choe, Y. S.; Chi, D. Y.; Kim, S. E.; Lee, J.; Kim, B. T., Synthesis and evaluation of fluorine-substituted 1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine derivatives for dopamine D₄ receptor imaging. *Bioorg Med Chem* **2004**, 12 (21), 5505-13.
138. Willmann, M.; Ermert, J.; Prante, O.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Neumaier, B., Radiosynthesis and evaluation of ¹⁸F-labeled dopamine D₄-receptor ligands. *Nuclear Medicine and Biology* **2021**, 92, 43-52.
139. Van Tol, H. H.; Bunzow, J. R.; Guan, H. C.; Sunahara, R. K.; Seeman, P.; Niznik, H. B.; Civelli, O., Cloning of the gene for a human dopamine D₄ receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* **1991**, 350 (6319), 610-4.
140. Zhao, A. L.; Zhao, J. P.; Zhang, Y. H.; Xue, Z. M.; Chen, J. D.; Chen, X. G., Dopamine D₄ receptor gene exon III polymorphism and interindividual variation in response to clozapine. *Int J Neurosci* **2005**, 115 (11), 1539-47.
141. Seeman, P., Dopamine receptor sequences. Therapeutic levels of neuroleptics occupy D₂ receptors, clozapine occupies D₄. *Neuropsychopharmacology* **1992**, 7 (4), 261-84.
142. Prus, A. J.; Wise, L. E.; Pehrson, A. L.; Philibin, S. D.; Bang-Andersen, B.; Arnt, J.; Porter, J. H., Discriminative stimulus properties of 1.25mg/kg clozapine in rats: Mediation by serotonin 5-HT₂ and dopamine D₄ receptors. *Brain Res* **2016**, 1648 (Pt A), 298-305.
143. Liao, I. M.; Chen, J. C., Lack of dopamine D₄ receptor participation in mouse hyperdopaminergic locomotor response. *Behav Brain Res* **2021**, 396, 112925.
144. Kulkarni, S. K.; Ninan, I., Dopamine D₄ receptors and development of newer antipsychotic drugs. *Fundam Clin Pharmacol* **2000**, 14 (6), 529-39.
145. Jann, M. W.; Grimsley, S. R.; Gray, E. C.; Chang, W. H., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clozapine. *Clin Pharmacokinet* **1993**, 24 (2), 161-76.
146. Ewald, H. L.; Mors, N. P.; Rosenberg, R., [Dopamine D₄-receptor variants, schizophrenia and clozapine therapy]. *Ugeskr Laeger* **1996**, 158 (25), 3601-3.
147. Durcan, M. J.; Rigdon, G. C.; Norman, M. H.; Morgan, P. F., Is clozapine selective for the dopamine D₄ receptor? *Life Sci* **1995**, 57 (18), P1275-83.
148. Coward, D. M., General pharmacology of clozapine. *Br J Psychiatry Suppl* **1992**, (17), 5-11.

149. Schmitt, J.; Wingen, M.; Ramaekers, J.; Evers, E.; Riedel, W., Serotonin and Human Cognitive Performance. *Current pharmaceutical design* **2006**, *12*, 2473-86.
150. Barnes, N. M.; Sharp, T., A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **1999**, *38* (8), 1083-152.
151. Zhang, G.; Stackman, R. W., The role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in memory and cognition. *Frontiers in Pharmacology* **2015**, *6* (225).
152. Kroeze, W. K.; Roth, B. L., The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis. *Biological psychiatry* **1998**, *44* (11), 1128-42.
153. Cohen, H., Anxiolytic effect and memory improvement in rats by antisense oligodeoxynucleotide to 5-hydroxytryptamine-2A precursor protein. *Depression and anxiety* **2005**, *22* (2), 84-93.
154. Meltzer, H. Y., The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* **1999**, *21* (2 Suppl), 106s-115s.
155. David, D. J.; Gardier, A. M., [The pharmacological basis of the serotonin system: Application to antidepressant response]. *Encephale* **2016**, *42* (3), 255-63.
156. Fakhoury, M., Revisiting the Serotonin Hypothesis: Implications for Major Depressive Disorders. *Mol Neurobiol* **2016**, *53* (5), 2778-2786.
157. Meltzer, H. Y., New Trends in the Treatment of Schizophrenia. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **2017**, *16* (8), 900-906.
158. Venzi, M.; David, F.; Bellet, J.; Cavaccini, A.; Bombardi, C.; Crunelli, V.; Di Giovanni, G., Role for serotonin_{2A} (5-HT_{2A}) and _{2C} (5-HT_{2C}) receptors in experimental absence seizures. *Neuropharmacology* **2016**, *108*, 292-304.
159. López-Giménez, J. F.; González-Maeso, J., Hallucinogens and Serotonin 5-HT_{2A} Receptor-Mediated Signaling Pathways. *Curr Top Behav Neurosci* **2018**, *36*, 45-73.
160. López-Giménez, J. F.; Mengod, G.; Palacios, J. M.; Vilaró, M. T., Selective visualization of rat brain 5-HT_{2A} receptors by autoradiography with [³H]MDL 100,907. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **1997**, *356* (4), 446-454.
161. Böhm, S., Seroton(in)erge Systeme. In *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2016; pp 141-145.
162. García-Bea, A.; Miranda-Azpiaz, P.; Muguruza, C.; Marmolejo-Martinez-Artesero, S.; Díez-Alarcia, R.; Gabilondo, A. M.; Callado, L. F.; Morentin, B.; González-Maeso, J.; Meana, J. J., Serotonin 5-HT_{2A} receptor expression and functionality in postmortem frontal cortex of subjects with schizophrenia: Selective biased agonism via Gα_{i1}-proteins. *European Neuropsychopharmacology* **2019**, *29* (12), 1453-1463.
163. Erritzoe, D.; Rasmussen, H.; Kristiansen, K. T.; Frokjaer, V. G.; Haugbol, S.; Pinborg, L.; Baaré, W.; Svarer, C.; Madsen, J.; Lublin, H.; Knudsen, G. M.; Glenthøj,

- B. Y., Cortical and Subcortical 5-HT_{2A} Receptor Binding in Neuroleptic-Naive First-Episode Schizophrenic Patients. *Neuropsychopharmacology* **2008**, 33 (10), 2435-2441.
164. Blin, J.; Sette, G.; Fiorelli, M.; Bletry, O.; Elghozi, J. L.; Crouzel, C.; Baron, J. C., A Method for the In Vivo Investigation of the Serotonergic 5-HT₂ Receptors in the Human Cerebral Cortex Using Positron Emission Tomography and ¹⁸F-Labeled Setoperone. *Journal of Neurochemistry* **1990**, 54 (5), 1744-1754.
 165. Crouzel, C.; Venet, M.; Irie, T.; Sanz, G.; Boullais, C., Labeling of a serotonergic ligand with ¹⁸F: [¹⁸F]setoperone. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1988**, 25 (4), 403-414.
 166. Lemaire, C.; Cantineau, R.; Guillaume, M.; Plenevaux, A.; Christiaens, L., Fluorine-18-altanserine: A radioligand for the study of serotonin receptors with PET: Radiolabeling and in vivo biologic behavior in rats. *Journal of Nuclear Medicine* **1991**, 32 (12), 2266-2272.
 167. Biver, F.; Lotstra, F.; Monclus, M.; Dethy, S.; Damhaut, P.; Wikler, D.; Luxen, A.; Goldman, S., In vivo binding of [¹⁸F]altanserine to rat brain 5HT₂ receptors: A film and electronic autoradiographic study. *Nuclear Medicine and Biology* **1997**, 24 (4), 357-360.
 168. Kroll, T.; Elmenhorst, D.; Matusch, A.; Wedekind, F.; Weisshaupt, A.; Beer, S.; Bauer, A., Suitability of [¹⁸F]Altanserine and PET to Determine 5-HT_{2A} Receptor Availability in the Rat Brain: In Vivo and In Vitro Validation of Invasive and Non-Invasive Kinetic Models. *Molecular Imaging and Biology* **2013**, 15 (4), 456-467.
 169. Ito, H.; Nyberg, S.; Halldin, C.; Lundkvist, C.; Farde, L., PET imaging of central 5-HT_{2A} receptors with carbon-11-MDL 100,907. *Journal of Nuclear Medicine* **1998**, 39 (1), 208-214.
 170. Lundkvist, C.; Halldin, C.; Ginovart, N.; Nyberg, S.; Swahn, C. G.; Carr, A. A.; Brunner, F.; Farde, L., [¹¹C]MDL 100907, a radioligand for selective imaging of 5-HT_{2A} receptors with positron emission tomography. *Life Sciences* **1996**, 58 (10), PL187-PL192.
 171. Debus, F.; Herth, M. M.; Piel, M.; Buchholz, H.-G.; Bausbacher, N.; Kramer, V.; Lüddens, H.; Rösch, F., ¹⁸F-Labeling and evaluation of novel MDL 100907 derivatives as potential 5-HT_{2A} antagonists for molecular imaging. *Nuclear Medicine and Biology* **2010**, 37 (4), 487-495.
 172. Herth, M. M.; Kramer, V.; Piel, M.; Palner, M.; Riss, P. J.; Knudsen, G. M.; Rosch, F., Synthesis and in vitro affinities of various MDL 100907 derivatives as potential ¹⁸F-radioligands for 5-HT_{2A} receptor imaging with PET. *Bioorg Med Chem* **2009**, 17 (8), 2989-3002.
 173. Mühlhausen, U.; Ermert, J.; Herth, M. M.; Coenen, H. H., Synthesis, radiofluorination and first evaluation of (+/-)-[¹⁸F]MDL 100907 as serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonist for PET. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* **2009**, 52 (1-2), 6-12.
 174. Ren, H.; Wey, H. Y.; Strebl, M.; Neelamegam, R.; Ritter, T.; Hooker, J. M., Synthesis and imaging validation of [¹⁸F]MDL100907 enabled by Ni-mediated fluorination. *ACS Chemical Neuroscience* **2014**, 5 (7), 611-615.

175. Erritzoe, D.; Ashok, A. H.; Searle, G. E.; Colasanti, A.; Turton, S.; Lewis, Y.; Huiban, M.; Moz, S.; Passchier, J.; Saleem, A.; Beaver, J.; Lingford-Hughes, A.; Nutt, D. J.; Howes, O. D.; Gunn, R. N.; Knudsen, G. M.; Rabiner, E. A., Serotonin release measured in the human brain: a PET study with [^{11}C]CIMBI-36 and d-amphetamine challenge. *Neuropsychopharmacology* **2020**, *45* (5), 804-810.
176. Ettrup, A.; da Cunha-Bang, S.; McMahon, B.; Lehel, S.; Dyssegaard, A.; Skibsted, A. W.; Jørgensen, L. M.; Hansen, M.; Baandrup, A. O.; Bache, S.; Svarer, C.; Kristensen, J. L.; Gillings, N.; Madsen, J.; Knudsen, G. M., Serotonin $_{2A}$ Receptor Agonist Binding in the Human Brain with [^{11}C]Cimbi-36. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **2014**, *34* (7), 1188-1196.
177. Prabhakaran, J.; Underwood, M. D.; Kumar, J. S. D.; Simpson, N. R.; Kassir, S. A.; Bakalian, M. J.; Mann, J. J.; Arango, V., Synthesis and in vitro evaluation of [^{18}F]FECIMBI-36: A potential agonist PET ligand for 5-HT $_{2A/2C}$ receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *25* (18), 3933-3936.
178. Mertens, J.; Terriere, D.; Sipido, V.; Gommeren, W.; Janssen, P. M. F.; Leysen, J. E., Radiosynthesis of a new radioiodinated ligand for serotonin-5HT $_2$ -receptors, a promising tracer for γ -emission tomography. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1994**, *34* (9), 795-806.
179. Terriere, D.; Janssen, P. M. F.; Gommeren, W.; Gysemans, M.; Mertens, J. J. R.; Leysen, J. E., Evaluation of radioiodo-4-amino-N-[1-[3-(4-fluorophenoxy)-propyl]-4-methyl-4-piperidinyl]-5-iodo-2-methoxybenzamide as a potential 5HT $_2$ receptor tracer for SPE(C)T. *Nuclear Medicine and Biology* **1995**, *22* (8), 1005-1010.
180. Abi-Dargham, A.; Zea-Ponce, Y.; Terriere, D.; Al-Tikriti, M.; Baldwin, R. M.; Hoffer, P.; Charney, D.; Leysen, J. E.; Laruelle, M.; Mertens, J.; Innis, R. B., Preclinical evaluation of [^{123}I]R93274 as a SPECT radiotracer for imaging 5-HT $_{2A}$ receptors. *European Journal of Pharmacology* **1997**, *321* (3), 285-293.
181. Catafau, A. M.; Danus, M.; Bullich, S.; Llop, J.; Perich, J.; Cunningham, V. J.; Plaza, P.; Penengo, M. M.; Eersels, J. L. H.; Squassante, L.; Ros, D.; Barbanoj, M., Characterization of the SPECT 5-HT $_{2A}$ Receptor Ligand ^{123}I -R91150 in Healthy Volunteers: Part 1—Pseudoequilibrium Interval and Quantification Methods. *Journal of Nuclear Medicine* **2006**, *47* (6), 919-928.
182. Catafau, A. M.; Danus, M.; Bullich, S.; Nucci, G.; Llop, J.; Abanades, S.; Cunningham, V. J.; Eersels, J. L. H.; Pavia, J.; Farre, M., Characterization of the SPECT 5-HT $_{2A}$ Receptor Ligand ^{123}I -R91150 in Healthy Volunteers: Part 2—Ketanserin Displacement. *Journal of Nuclear Medicine* **2006**, *47* (6), 929-937.
183. Travis, M. J.; Busatto, G. F.; Pilowsky, L. S.; Mulligan, R.; Acton, P. D.; Gacinovic, S.; Mertens, J.; Terrière, D.; Costa, D. C.; Ell, P. J.; Kerwin, R. W., 5-HT $_{2A}$ receptor blockade in patients with schizophrenia treated with risperidone or clozapine. A SPET study using the novel 5-HT $_{2A}$ ligand ^{123}I -5-I-R-91150. *British Journal of Psychiatry* **1998**, *173*, 236-241.
184. Schins, A.; Van Kroonenburgh, M.; Van Laere, K.; D'Haenen, H.; Lousberg, R.; Crijns, H.; Eersels, J.; Honig, A., Increased cerebral serotonin-2A receptor binding in

- depressed patients with myocardial infarction. *Psychiatry Research - Neuroimaging* **2005**, 139 (2), 155-163.
185. Melse, M.; Tan, S. K. H.; Temel, Y.; Van Kroonenburgh, M. J. P. G.; Leentjens, A. F. G., Changes in 5-HT_{2A} receptor expression in untreated, de novo patients with Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease* **2014**, 4 (2), 283-287.
 186. Murphy, D. G. M.; Daly, E.; Schmitz, N.; Toal, F.; Murphy, K.; Curran, S.; Erlandsson, K.; Eersels, J.; Kerwin, R.; Ell, P.; Travis, M., Cortical serotonin 5-HT_{2A} receptor binding and social communication in adults with Asperger's syndrome: An in vivo SPECT study. *American Journal of Psychiatry* **2006**, 163 (5), 934-936.
 187. Mühlhausen, U.; Ermert, J.; Herth, M. M.; Coenen, H. H., Synthesis, radiofluorination and first evaluation of (±)-[¹⁸F]MDL 100907 as serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonist for PET. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2008**, 52 (1), 6-12.
 188. Naughton, M.; Mulrooney, J. B.; Leonard, B. E., A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders. *Human Psychopharmacology* **2000**, 15, 397-415.
 189. Perry, E. K.; Perry, R. H.; Candy, J. M.; Fairbairn, A. F.; Blessed, G.; Dick, D. J.; Tomlinson, B. E., Cortical serotonin-S₂ receptor binding abnormalities in patients with Alzheimer's disease: Comparisons with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* **1984**, 51 (3), 353-357.
 190. Dean, B.; Hayes, W., Decreased frontal cortical serotonin_{2A} receptors in schizophrenia. *Schizophrenia Research* **1996**, 21 (3), 133-139.
 191. Rodríguez, J. J.; Noristani, H. N.; Verkhatsky, A., The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* **2012**, 99 (1), 15-41.
 192. Mühlhausen, U.; Ermert, J.; Coenen, H. H., Synthesis, labelling and first evaluation of [¹⁸F]R91150 as a serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonist for PET. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2009**, 52 (1), 13-22.
 193. Barnes, B.; Kraywinkel, K.; Nowossadeck, E.; Schönfeld, I.; Starker, A.; Wienecke, A.; Wolf, U., Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut: 2016.
 194. Koch-Institut, R.; Krebs in Deutschland 2015/2016. Robert Koch-Institut: 2019.
 195. Ghosh, A.; Heston, W. D. W., Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* **2004**, 91 (3), 528-539.
 196. Van Der Sar, E. C. A.; Van Kalmthout, L. M.; Lam, M. G. E. H., PSMA PET/CT in primary prostate cancer diagnostics: an overview of the literature. *Tijdschrift voor Urologie* **2020**, 10 (6-7), 101-108.
 197. Donswijk, M. L.; van Leeuwen, P. J.; Vegt, E.; Cheung, Z.; Heijmink, S. W. T. P. J.; van der Poel, H. G.; Stokkel, M. P. M., Clinical impact of PSMA PET/CT in primary

- prostate cancer compared to conventional nodal and distant staging: a retrospective single center study. *BMC Cancer* **2020**, *20* (1), 723.
198. Afshar-Oromieh, A.; Haberkorn, U.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Zechmann, C. M., [⁶⁸Ga]Gallium-labelled PSMA ligand as superior PET tracer for the diagnosis of prostate cancer: comparison with ¹⁸F-FECH. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2012**, *39* (6), 1085-1086.
 199. Afshar-Oromieh, A.; Zechmann, C. M.; Malcher, A.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Linhart, H. G.; Holland-Letz, T.; Hadaschik, B. A.; Giesel, F. L.; Debus, J.; Haberkorn, U., Comparison of PET imaging with a ⁶⁸Ga-labelled PSMA ligand and ¹⁸F-choline-based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2014**, *41* (1), 11-20.
 200. Horoszewicz, J. S.; Leong, S. S.; Kawinski, E.; Karr, J. P.; Rosenthal, H.; Chu, T. M.; Mirand, E. A.; Murphy, G. P., LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* **1983**, *43* (4), 1809-18.
 201. Weineisen, M.; Simecek, J.; Schottelius, M.; Schwaiger, M.; Wester, H. J., Synthesis and preclinical evaluation of DOTAGA-conjugated PSMA ligands for functional imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. *EJNMMI Res* **2014**, *4* (1), 63.
 202. Weineisen, M.; Schottelius, M.; Simecek, J.; Baum, R. P.; Yildiz, A.; Beykan, S.; Kulkarni, H. R.; Lassmann, M.; Klette, I.; Eiber, M.; Schwaiger, M.; Wester, H. J., ⁶⁸Ga- and ¹⁷⁷Lu-Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *J Nucl Med* **2015**, *56* (8), 1169-76.
 203. Schottelius, M.; Wurzer, A.; Wissmiller, K.; Beck, R.; Koch, M.; Gorpas, D.; Notni, J.; Buckle, T.; van Oosterom, M. N.; Steiger, K.; Ntziachristos, V.; Schwaiger, M.; van Leeuwen, F. W. B.; Wester, H. J., Synthesis and Preclinical Characterization of the PSMA-Targeted Hybrid Tracer PSMA-I&F for Nuclear and Fluorescence Imaging of Prostate Cancer. *J Nucl Med* **2019**, *60* (1), 71-78.
 204. Piron, S.; Verhoeven, J.; Descamps, B.; Kersemans, K.; De Man, K.; Van Laeken, N.; Pieters, L.; Vral, A.; Vanhove, C.; De Vos, F., Intra-individual dynamic comparison of ¹⁸F-PSMA-11 and ⁶⁸Ga-PSMA-11 in LNCaP xenograft bearing mice. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 21068.
 205. Kranzbühler, B.; Salemi, S.; Umbricht, C. A.; Müller, C.; Burger, I. A.; Sulser, T.; Eberli, D., Pharmacological upregulation of prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate cancer cells. *Prostate* **2018**, *78* (10), 758-765.
 206. Kelly, J.; Amor-Coarasa, A.; Ponnala, S.; Nikolopoulou, A.; Williams, C., Jr.; Schlyer, D.; Zhao, Y.; Kim, D.; Babich, J. W., Trifunctional PSMA-targeting constructs for prostate cancer with unprecedented localization to LNCaP tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2018**, *45* (11), 1841-1851.
 207. Cardinale, J.; Schäfer, M.; Benešová, M.; Bauder-Wüst, U.; Leotta, K.; Eder, M.; Neels, O. C.; Haberkorn, U.; Giesel, F. L.; Kopka, K., Preclinical Evaluation of ¹⁸F-PSMA-1007, a New Prostate-Specific Membrane Antigen Ligand for Prostate Cancer Imaging. *J Nucl Med* **2017**, *58* (3), 425-431.

208. Endepols, H.; Morgenroth, A.; Zlatopolskiy, B. D.; Krapf, P.; Zischler, J.; Richarz, R.; Muñoz Vásquez, S.; Neumaier, B.; Mottaghy, F. M., Peripheral ganglia in healthy rats as target structures for the evaluation of PSMA imaging agents. *BMC Cancer* **2019**, *19* (1), 633.
209. Presolski, S. I.; Hong, V.; Cho, S.-H.; Finn, M. G., Tailored Ligand Acceleration of the Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Reaction: Practical and Mechanistic Implications. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (41), 14570-14576.
210. Kulagowski, J. J.; Broughton, H. B.; Curtis, N. R.; Mawer, I. M.; Ridgill, M. P.; Baker, R.; Emms, F.; Freedman, S. B.; Marwood, R.; Patel, S.; Patel, S.; Ragan, C. I.; Leeson, P. D., 3-[[4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl]methyl]-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine: An Antagonist with High Affinity and Selectivity for the Human Dopamine D₄ Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39* (10), 1941-1942.
211. Löber, S.; Hübner, H.; Gmeiner, P., Azaindole derivatives with high affinity for the dopamine D₄ receptor: Synthesis, ligand binding studies and comparison of molecular electrostatic potential maps. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999**, *9* (1), 97-102.
212. Löber, S.; Hübner, H.; Utz, W.; Gmeiner, P., Rationally Based Efficacy Tuning of Selective Dopamine D₄ Receptor Ligands Leading to the Complete Antagonist 2-[4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-ylmethyl]pyrazolo[1,5-*a*]pyridine (FAUC 213). *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, *44* (17), 2691-2694.
213. Brioni, J. D.; Moreland, R. B.; Cowart, M.; Hsieh, G. C.; Stewart, A. O.; Hedlund, P.; Donnelly-Roberts, D. L.; Nakane, M.; Lynch, J. J.; Kolasa, T.; Polakowski, J. S.; Osinski, M. A.; Marsh, K.; Andersson, K.-E.; Sullivan, J. P., Activation of dopamine D₄ receptors by ABT-724 induces penile erection in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101* (17), 6758-6763.
214. Cowart, M.; Latshaw, S. P.; Bhatia, P.; Daanen, J. F.; Rohde, J.; Nelson, S. L.; Patel, M.; Kolasa, T.; Nakane, M.; Uchic, M. E.; Miller, L. N.; Terranova, M. A.; Chang, R.; Donnelly-Roberts, D. L.; Namovic, M. T.; Hollingsworth, P. R.; Martino, B. R.; Lynch, J. J.; Sullivan, J. P.; Hsieh, G. C.; Moreland, R. B.; Brioni, J. D.; Stewart, A. O., Discovery of 2-(4-Pyridin-2-ylpiperazin-1-ylmethyl)-1*H*-benzimidazole (ABT-724), a Dopaminergic Agent with a Novel Mode of Action for the Potential Treatment of Erectile Dysfunction. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47* (15), 3853-3864.
215. Kong, J. Y.; Park, W. K.; Cho, H.; Jeong, D.; Choi, G.; Koh, H. Y.; Kim, S. H.; Pae, A. N.; Cho, Y. S.; Cha, J. H. Piperazinyl-propyl-pyrazole derivatives as dopamine D₄ receptor antagonists, and pharmaceutical compositions containing the same. 2007.
216. Yadav, R. R.; Battini, N.; Mudududdla, R.; Bharate, J. B.; Muparappu, N.; Bharate, S. B.; Vishwakarma, R. A., Deformylation of indole and azaindole-3-carboxaldehydes using anthranilamide and solid acid heterogeneous catalyst via quinazolinone intermediate. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (17), 2222-2225.
217. Jia, H.; Dai, G.; Weng, J.; Zhang, Z.; Wang, Q.; Zhou, F.; Jiao, L.; Cui, Y.; Ren, Y.; Fan, S.; Zhou, J.; Qing, W.; Gu, Y.; Wang, J.; Sai, Y.; Su, W., Discovery of (S)-1-(1-(Imidazo[1,2-*a*]pyridin-6-yl)ethyl)-6-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)-1*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyrazine (Volitinib) as a Highly Potent and Selective

- Mesenchymal–Epithelial Transition Factor (c-Met) Inhibitor in Clinical Development for Treatment of Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57 (18), 7577-7589.
218. Lepore, S. D.; He, Y., Use of Sonication for the Coupling of Sterically Hindered Substrates in the Phenolic Mitsunobu Reaction. *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, 68 (21), 8261-8263.
 219. Witt, J. O.; McCollum, A. L.; Hurtado, M. A.; Huseman, E. D.; Jeffries, D. E.; Temple, K. J.; Plumley, H. C.; Blobaum, A. L.; Lindsley, C. W.; Hopkins, C. R., Synthesis and characterization of a series of chiral alkoxymethyl morpholine analogs as dopamine receptor 4 (D₄R) antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **2016**, 26 (10), 2481-2488.
 220. Zischler, J.; Kolks, N.; Modemann, D.; Neumaier, B.; Zlatopolskiy, B. D., Alcohol-Enhanced Cu-Mediated Radiofluorination. *Chemistry* **2017**, 23 (14), 3251-3256.
 221. Ishiyama, T.; Murata, M.; Miyaura, N., Palladium(0)-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Alkoxydiboron with Haloarenes: A Direct Procedure for Arylboronic Esters. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, 60 (23), 7508-7510.
 222. Weber, E.; Andrade, R., Htr2a Gene and 5-HT_{2A} Receptor Expression in the Cerebral Cortex Studied Using Genetically Modified Mice. *Frontiers in Neuroscience* **2010**, 4 (36).
 223. Pompeiano, M.; Palacios, J. M.; Mengod, G., Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Molecular Brain Research* **1994**, 23 (1), 163-178.
 224. Pazos, A.; Cortés, R.; Palacios, J. M., Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res* **1985**, 346 (2), 231-49.
 225. Pazos, A.; Probst, A.; Palacios, J. M., Serotonin receptors in the human brain—IV. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors. *Neuroscience* **1987**, 21 (1), 123-139.
 226. Xu, T.; Pandey, S. C., Cellular localization of serotonin(2A) (5HT(2A)) receptors in the rat brain. *Brain research bulletin* **2000**, 51 (6), 499-505.
 227. Jensen, A. A.; Halberstadt, A. L.; Märcher-Rørsted, E.; Odland, A. U.; Chatha, M.; Speth, N.; Liebscher, G.; Hansen, M.; Bräuner-Osborne, H.; Palner, M.; Andreasen, J. T.; Kristensen, J. L., The selective 5-HT_{2A} receptor agonist 25CN-NBOH: Structure-activity relationship, in vivo pharmacology, and in vitro and ex vivo binding characteristics of [³H]25CN-NBOH. *Biochemical Pharmacology* **2020**, 177, 113979.
 228. Schirmacher, R.; Wängler, B.; Bailey, J.; Bernard-Gauthier, V.; Schirmacher, E.; Wängler, C., Small Prosthetic Groups in ¹⁸F-Radiochemistry: Useful Auxiliaries for the Design of ¹⁸F-PET Tracers. *Semin Nucl Med* **2017**, 47 (5), 474-492.
 229. Jacobson, O.; Kiesewetter, D. O.; Chen, X., Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjugate Chemistry* **2015**, 26 (1), 1-18.

230. Basuli, F.; Zhang, X.; Jagoda, E. M.; Choyke, P. L.; Swenson, R. E., Rapid synthesis of maleimide functionalized fluorine-18 labeled prosthetic group using “radio-fluorination on the Sep-Pak” method. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2018**, *61* (8), 599-605.
231. Coppola, G. M., The Chemistry of Isatoic Anhydride. *Synthesis* **1980**, *1980* (07), 505-536.
232. Hall, H. K., Correlation of the Base Strengths of Amines¹. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, *79* (20), 5441-5444.
233. Oregioni, A.; Stieglitz, B.; Kelly, G.; Rittinger, K.; Frenkiel, T., Determination of the pK_a of the N-terminal amino group of ubiquitin by NMR. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1), 43748.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Neumaier, der mir die Möglichkeit eröffnet hat, an seiner Forschung teilzunehmen und am INM-5 zu promovieren. Ich bin ihm für das entgegengebrachte Vertrauen sehr dankbar.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. J. Ermert, danke ich für die spannende Themenauswahl sowie die geduldige und umfassende Betreuung der Arbeit.

PD. Dr. B. Zlatopolskiy danke ich vor allem für den anregenden und respektvollen wissenschaftlichen Diskurs, der mit ihm jederzeit möglich war.

Herrn Prof. Dr. H. G. Schmalz danke ich für die Bereitschaft, meine Arbeit zu begutachten und mich in der Disputation zu prüfen.

Frau Prof. Dr. I. Neundorf möchte ich ebenfalls für ihre Bereitschaft danken, mich in der Disputation zu prüfen.

Herrn Dr. P. Krapf danke ich für die vielen unterhaltsamen und informativen Gespräche zwischendurch.

Herrn Dr. J. Zischler gilt mein Dank für die Einführung in die Methoden der Radiochemie und dafür, dass er sein Know-How sehr detailliert an mich vermittelt hat.

Herrn Dr. D. Bier möchte ich mich herzlich für seine sehr intensiven Bemühungen bei der Klärung wissenschaftlicher Fragen danken.

Herrn Dr. M. Holschbach möchte ich für die Unterstützung bei problematischen Synthesen danken. Seine Erfahrung auf dem Gebiet war immer eine große Hilfe.

Frau Prof. Dr. H. Endepols danke ich für ihren Einsatz bei den PET-Messungen und dafür, dass sie sich stets Zeit genommen hat mir mit ihrer Expertise zu helfen.

Frau Dr. B. Drewes danke ich für ihre Geduld mit meinen NMR-Proben.

Frau A. Schulze und Frau M. Brugger bin ich dankbar für die Durchführung der vielen *In-vitro*-Versuche, deren Planung bei meinen Radiosynthesen bestimmt nicht leichtgefallen ist.

Frau C. Vonhoegen danke ich für ihre Hilfe beim Ausfüllen der Stundenzettel. Dank ihrer Hilfe schaffe ich das nun auch allein.

Deklaration des eigenen Beitrags der dieser Arbeit zugrundeliegenden Veröffentlichungen und Manuskripte

A. *Radiosynthesis and evaluation of ^{18}F -labeled dopamine D_4 -receptor ligands.*

M. Willmann, J. Ermert*, O. Prante, H. Hübner, P. Gmeiner, B. Neumaier, *Nuclear Medicine and Biology* **2021**, 92, 43-52. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2020.07.004

Das Konzept dieser Publikation wurde zusammen mit aller Autoren erarbeitet und erstellt. Die experimentelle Umsetzung erfolgte durch M. Willmann, mit Ausnahme der *In-vitro*-Bindungsstudien, die durch O. Prante und seinem Team an der Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Erlangen sowie der *In-vitro*-Autoradiographien, die durch Annette Schulze und Dirk Bier am INM-5 (Forschungszentrum Jülich) durchgeführt wurden. Die Erstellung des Manuskripts erfolgte unter gemeinsamer Beteiligung aller Autoren.

B. *Radiosynthesis and biological evaluation of [^{18}F]R91150, a selective 5-HT_{2A} receptor antagonist for PET-imaging*

Michael Willmann, Julian Hegger, Bernd Neumaier*, Johannes Ermert.

Das Konzept dieses Manuskripts wurde maßgeblich im Kollektiv aller Autoren erarbeitet und erstellt. Die experimentelle Umsetzung erfolgte durch M. Willmann und J. Hegger, der im Rahmen einer Bachelorarbeit durch M. Willmann betreut wurde. *In-vitro*-Autoradiographien wurden durch Annette Schulze und Dirk Bier am INM-5 (Forschungszentrum Jülich) durchgeführt, Die Erstellung des Manuskripts erfolgte unter gemeinsamer Beteiligung der Autoren M. Willmann, B. Neumaier, J. Ermert.

C. *Fast indirect ^{18}F -labeling via new prosthetic groups - Radiosynthesis and in vivo PET studies of the new PSMA specific Tracer [^{18}F]JK-PSMA15*

Michael Willmann, Benedikt Gröner, Lisa Donnerstag, Elizaveta A. Urusova, Heike Endepols, J. Ermert, Bernd Neumaier, Boris Zlatopolskiy*

Das Konzept dieses Manuskripts wurde maßgeblich im Kollektiv aller Autoren erarbeitet und erstellt. Die experimentelle Umsetzung erfolgte durch M. Willmann und L. Donnerstag (Markierung der Modellamide) und B. Gröner (Synthese und Aufreinigung einiger Referenzverbindungen). *In-vivo*-PET-Studien wurden am Institut für Radiochemie und Experimentelle Molekulare Bildgebung der Uniklinik Köln durch H. Endepols und Kollegen durchgeführt. Die Erstellung des Manuskripts erfolgte unter

gemeinsamer Beteiligung der Autoren M. Willmann, B. Neumaier, J. Ermert, B. Zlatopolskiy und H. Endepols.

Erklärung zur Dissertation
gemäß der Promotionsordnung vom 12. März 2020

„Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne die Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere an Eides statt, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen und eingebundenen Artikeln und Manuskripten - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine Veröffentlichung der Dissertation vor Abschluss der Promotion nicht ohne Genehmigung des Promotionsausschusses vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Ordnung sind mir bekannt. Darüber hinaus erkläre ich hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten der Universität zu Köln gelesen und sie bei der Durchführung der Dissertation zugrundeliegenden Arbeiten und der schriftlich verfassten Dissertation beachtet habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen. Ich versichere, dass die eingereichte elektronische Fassung der eingereichten Druckfassung vollständig entspricht.“

Teilpublikationen:

A. Radiosynthesis and evaluation of ^{18}F -labeled dopamine D4-receptor ligands.

M. Willmann, J. Ermert*, O. Prante, H. Hübner, P. Gmeiner, B. Neumaier, Nuclear Medicine and Biology 2021, 92,

43-52. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2020.07.004

Received 29 June 2020, Accepted 9 July 2020, Available online 16 July 2020.

B. Radiosynthesis and biological evaluation of [^{18}F]R91150, a selective 5-HT_{2A} receptor antagonist for PET imaging

Michael Willmann, Julian Hegger, Bernd Neumaier*, Johannes Ermert.

Manuskript in Revision, ACS Medicinal Chemistry Letters

C. Fast indirect ^{18}F -labeling via new prosthetic groups - Radiosynthesis and in vivo PET studies of the new PSMA specific Tracer [^{18}F]JK-PSMA-15

Michael Willmann, Benedikt Gröner, Lisa Donnerstag, Elizaveta A. Urusova, Heike Endepols, J. Ermert, Bernd, Neumaier, Boris Zlatopolskiy*

Manuskript in Bearbeitung, European Journal of Medicinal Chemistry

28.02.2021



Datum, Name und Unterschrift

Jül-4431 • Dezember 2021
ISSN 0944-2952

Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft

