

Institut für Neurowissenschaften und Medizin
Nuklearchemie (INM-5)

Entwicklung von Kupplungsmethoden mit neuen Markierungsbausteinen zur Synthese ^{18}F -markierter PSMA- selektiver Liganden und argininreicher all-D Peptide

Swen Humpert

Jül-4425

**Entwicklung von Kupplungsmethoden mit neuen
Markierungsbausteinen zur Synthese ^{18}F -markierter
PSMA-selektiver Liganden und argininreicher all-D
Peptide**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Swen Humpert

aus Stolberg

2020

Berichtersteller/in:

Prof. Dr. Bernd Neumaier

Prof. Dr. Ines Neundorf

Tag der mündlichen Prüfung:

30.04.2020

Institut für Neurowissenschaften und Medizin
Nuklearchemie (INM-5)

Entwicklung von Kupplungsmethoden mit neuen Markierungsbausteinen zur Synthese ^{18}F -markierter PSMA- selektiver Liganden und argininreicher all-D Peptide

Swen Humpert

Berichte des Forschungszentrums Jülich
Jül-4425 · ISSN 0944-2952
Institut für Neurowissenschaften und Medizin
Nuklearchemie (INM-5)

D 38 (Diss. Köln, Univ., 2020)

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**,
which permits unrestricted use, distribution, and



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

Kurzzusammenfassung

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist zu einem unverzichtbaren Bestandteil in der klinischen Forschung und Diagnostik geworden, da sie die *in vivo*-Beobachtung physiologischer Prozesse auf molekularer Ebene ermöglicht. Eine Voraussetzung für die Durchführung klinischer PET-Messungen ist die Entwicklung und Produktion spezifischer Radiotracer, die im Körper selektiv mit Targetstrukturen wie Tumoren oder Rezeptorsystemen wechselwirken. In der PET ist ^{18}F das am häufigsten eingesetzte Radionuklid. Die direkte Markierung mit [^{18}F]Fluorid erfordert jedoch harsche Reaktionsbedingungen und ist oft nicht für empfindliche Biomoleküle geeignet. In diesem Fall stellen indirekte Methoden unter Verwendung von radiomarkierten Bausteinen eine gute, wenn auch zeitaufwändige und daher weniger effiziente Alternative dar.

Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung und praktische Anwendung von neuen Methoden zur indirekten Radiomarkierung von Peptiden. Wichtige Zielmoleküle, deren Markierung im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden sollte, waren PSMA-selektive Liganden und argininreiche, vollständig D-enantiomere Peptide (D3 und RD2). Ersteres wird für die Detektion des Prostatakarzinoms eingesetzt und das Potential der beiden letzteren Peptide zur ursächlichen Behandlung der Alzheimer-Krankheit wird aktuell untersucht.

In dieser Arbeit wurde die Synthese von zwei verschiedenen Markierungsbausteinen und deren Möglichkeiten zur Kopplung an Biomoleküle evaluiert. Zur Konjugation des vielversprechenden Synthons (Z)-2-[^{18}F]Fluorhex-1-en-1-yl(phenyl)iodoniumtosylat (^{18}F]FHexI⁺) wurden zunächst verschiedene palladiumkatalysierte Kreuzkupplungsreaktionen mit strukturell einfachen Modellverbindungen untersucht. Nach der Radiosynthese von [^{18}F]FHexI⁺ im wässrigen Milieu konnten im Anschluss daran sowohl die Sonogashira-Kupplung als auch die Suzuki-Kupplung als Eintopfreaktion in dem Medium durchgeführt werden, in dem auch die Herstellung von [^{18}F]FHexI⁺ stattfand.

Da die Sonogashira-Kupplung die besten Ergebnisse lieferte, wurde die Methode anschließend schrittweise anhand aminosäurebasierter Modellverbindungen wie beispielsweise alkinmodifizierter Lysinderivate evaluiert und weiter optimiert, wobei für die Konjugation mit [^{18}F]FHexI⁺ RCA von 38 – 88 % erhalten wurden. Die Methode lieferte schließlich in einer Eintopfsynthese das ^{18}F -markierte Konjugat eines Glu-C(O)-Lys basierten PSMA-Liganden in einer isolierten radiochemischen Gesamtausbeute von 35 %. Auch konnte ein radiofluoriertes

RD2-Derivat nach HPLC-Reinigung des [¹⁸F]FHexI⁺-Synthons in einer isolierten radiochemischen Gesamtausbeute von ca. 5-10 % erhalten werden. Beide Tracer wiesen allerdings eine ausgeprägte *in vivo* Defluorierung auf, so dass sich beide Radiokonjugate nicht für PET Untersuchungen eigneten.

Daher wurde im Weiteren als alternatives Synthon 2-[¹⁸F]Fluor-5-iodpyridin ([¹⁸F]FIPy) zur Konjugation evaluiert. Der Synthesebaustein wurde durch nukleophile Substitution eines Ammoniumtriflat-Vorläufers gefolgt von einer Festphasenextraktion (SPE) schnell und in ca. 80 % RCA erhalten. Die folgende Pd-katalysierte chemoselektive S-Arylierung wurde im Hinblick auf eine möglichst geringe Vorläufermenge optimiert. Aufgrund der unzureichenden chemischen Reinheit nach der SPE musste [¹⁸F]FIPy zur Markierung des all-D Peptids zunächst mittels HPLC gereinigt werden, so dass das Markierungsprodukt schließlich in ca. 40 % isolierter Gesamt-RCA erhalten werden konnte. Bei Verwendung höherer Vorläufermengen wurden jedoch selbst nach einer einfachen SPE-Reinigung des Synthons in einem leicht zu automatisierenden Prozess hohe isolierte Gesamt-RCA von ca. 55 % sowohl für einen Glu-C(O)-Cys-basierten PSMA-Liganden als auch für ein D3-Derivat erhalten. Die Tracer waren *in vivo* stabil und werden gegenwärtig präklinisch evaluiert.

Abstract

Positron emission tomography (PET) is an indispensable tool in clinical research and diagnostics for the visualization of physiological and pathophysiological processes at the molecular level *in vivo*. For different clinical examinations, PET requires radiolabeled, tailor-made molecules, so called radiotracers, specifically targeting selected molecular structures. The development and efficient production of these tracers is therefore an essential task in PET research. Direct radiolabeling approaches with ^{18}F , one of the most suitable radionuclides for PET, require harsh reaction conditions and are often not applicable for sensitive biomolecules. However, indirect methods using radiolabeled building blocks are well suited as alternatives although they are more time consuming due to multi step syntheses and thus less effective.

The aim of this work was the further development and application of novel indirect radiolabeling methods for peptides. Accordingly, two different peptides have been used for radiolabeling. Radiolabeled PSMA-selective ligands and arginine-rich, fully D-enantiomeric peptides (D3 and RD2) should be prepared in this work. PSMA-selective peptidomimetics are currently being used for the detection of prostate carcinoma and the D-enantiomeric peptides in Alzheimer's research since they potentially enable a causal treatment of this disease which is otherwise not possible so far.

For the conjugation of the promising synthon (Z)-2- ^{18}F fluorohex-1-en-1-yl(phenyl)iodonium tosylate (^{18}F FHexI⁺), various Pd-catalyzed cross-coupling reactions were first investigated using structurally simple coupling partners. After radiosynthesis of ^{18}F FHexI⁺ under aqueous conditions starting from ^{18}F fluoride, subsequently both, the Sonogashira coupling and the Suzuki coupling reaction were carried out as a one-pot reaction directly in the initial labelling mixture.

As the Sonogashira coupling provided the highest yields, this conjugation reaction was then evaluated and optimized step by step using amino acid-based model compounds, resulting in RCYs of 38 – 88 % for the coupling with ^{18}F FHexI⁺. The method finally afforded the Glu-C(O)-Lys based PSMA ligand in a one-pot synthesis and, after HPLC purification of the synthon, a RD2-derived peptide in a RCY of approx. 35 % and in an isolated total RCY of approx. 5-10 %, respectively. However, both tracers exhibited a high *in vivo* defluorination rate making them unsuitable as PET tracers.

Next, 2- ^{18}F fluoro-5-iodopyridine (^{18}F FIPy) was investigated as an alternative synthon. This radiolabeled building block was rapidly prepared in high RCY by nucleophilic substitution of

an ammoniumtriflate precursor and purification by solid phase extraction (SPE). The subsequent Pd-catalyzed S-arylation was optimized with respect to the precursor amount. Due to an insufficient chemical purity, low concentrations of all-D peptides could only be labeled with ^{18}F after HPLC purification of the labeling building block [^{18}F]FIPy in an isolated total RCY of approx. 40 %. However, using a higher amount of peptide precursor, even after straightforward SPE purification of the synthon, a high total isolated RCY of approximately 55 % was obtained for both, the Glu-C(O)-Cys based PSMA ligand and the D3 derivative. Additionally, this process is amenable to automation. The tracers were stable *in vivo* and are currently under evaluation in preclinical studies.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Bernd Neumaier. Durch die interessante Fragestellung, seine Unterstützung, sein Mitwirken an der Arbeit und die Gestaltung des Arbeitsplatzes war es mir möglich unter besten Bedingungen spannende Forschung zu betreiben und mich wissenschaftlich weiter zu entwickeln.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Professor Dr. Sebastian M. Schmidt für die Förderung als „Vernetzungsdoktorand“ bedanken. Die enge Kooperation mit exzellenten Forschern hat mein Forschungsprojekt stark bereichert; Prof. Dr. Dieter Willbold und Dr. Lothar Gremer (ICS-6), Prof. Dr. Karl-Josef Langen und Dr. Antje Willuweit (INM-4), Prof. Dr. Alexander Drzezga (INM-2 und UK Köln) und Prof. Dr. Heike Endepols (UK Köln).

Zudem möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Ines Neundorf für ihre Unterstützung als Zweitbetreuerin und Zweitgutachterin bedanken.

Großer Dank gilt ebenfalls Dr. Dirk Bier und Dr. Marcus Holschbach für ihre zahllosen Ratschläge, welche meine Arbeit maßgeblich mit beeinflusst haben.

Ein weiterer Dank gilt Herr PD Dr. Boris Zlatopolskiy, der durch sein reges Interesse und seine Denkanstöße ebenfalls meine Arbeit bereichert hat.

Für die Durchführung der biologischen Evaluation der Tracer und dafür, dass ich mit den Ergebnissen meine Arbeit aufwerten durfte möchte ich mich bei Prof. Dr. Heike Endepols und Dr. Antje Willuweit bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit, die tatkräftige Unterstützung und das tolle Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Kollegen des INM-5 bedanken.

Und zuletzt danke ich Christina von ganzem Herzen für all die Jahre, in denen sie mir den Rücken gestärkt hat und für noch vieles mehr.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Radiotracer in den Lebenswissenschaften	1
1.2 Entwicklung von Radiotracern	4
1.3 Radiomarkierungsstrategien mit ¹⁸ F	7
1.3.1 Elektrophile Radiofluorierung	7
1.3.2 Nukleophile Radiofluorierung niedermolekularer Verbindungen	9
1.3.3 Nukleophile Radiofluorierung von Biopolymeren	15
1.3.4 Indirekte Radiofluorierung	19
1.3.4.1 Indirekte Radiofluorierung unmodifizierter Biomoleküle	20
1.3.4.2 Indirekte Radiomarkierung modifizierter Biomoleküle	23
1.4 Biologische Targets in der molekularen Bildgebung	28
1.4.1 PSMA	28
1.4.2 Proteinaggregation und Neurodegeneration	30
1.5 All-D Peptide	32
1.6 Molekulare Bildgebung bei der Alzheimer-Krankheit	34
2. Zielsetzung	38
3. Ergebnisse und Diskussion	39
3.1 Evaluation alternativer palladiumkatalysierter Kreuzkupplungsreaktionen mit [¹⁸ F]FHexI ⁺	39
3.1.1 Heck-Kreuzkupplungsreaktion mit [¹⁸ F]FHexI ⁺	40
3.1.2 Stille-Kreuzkupplung mit FHexI ⁺	42
3.1.3 Suzuki-Kreuzkupplung mit FHexI ⁺	45
3.1.4 Palladiumkatalysierte C-H-Arylierung von Tryptophanderivaten	46
3.2 Indirekte Radiofluorierung von Biomolekülen mit [¹⁸ F]FHexI ⁺ mittels Sonogashira-Kupplung	49
3.2.1 Entwicklung und Evaluation aminreaktiver Alkinlinker mittels lysinbasierter Modellverbindungen	50
3.2.1.1 Synthese lysinbasierter Modellverbindungen	51
3.2.1.2 Radiomarkierung lysinbasierter Modellverbindungen	54
3.2.1.3 Synthese von Glu-C(O)-Lys basierten Markierungsvorläufern	56
3.2.1.4 Radiomarkierung von Glu-C(O)-Lys basierten Markierungsvorläufern	57
3.2.1.5 Downscaling der Vorläufermenge zur Radiomarkierung von [¹⁸ F] 26	63
3.2.2 Synthese und Radiomarkierung von Modellverbindungen für nicht-aminreaktive Linker ..	66
3.2.2.1 Synthese und Radiomarkierung von N-(4-Ethynylphenyl)acetamid	67
3.2.2.2 Synthese und Radiomarkierung einer Propargylglycinbasierten Modellverbindung ..	67
3.2.2.3 Synthese und Radiomarkierung eines Alkin-funktionalisierten Thiols	68
3.2.2.4 Synthese und Radiomarkierung eines argininhaltigen Testpeptids	69
3.3. <i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Beurteilung des potentiellen PSMA-Tracers [¹⁸ F] 26 (PSMA-206)	72
3.4 Radiomarkierung von RD2 mit [¹⁸ F]FHexI ⁺ mittels Sonogashira-Kupplung	75

3.5 Radiomarkierung von RD2 mit ^{68}Ga	78
3.6 Indirekte Radiomarkierung von Biomolekülen mit ^{18}F Fluoriodpyridin	84
3.6.1 Radiomarkierung mit ^{18}F FIPy mittels Sonogashira-Kupplung.....	84
3.6.2 Radiomarkierung mit ^{18}F FIPy mittels S-Arylierung.....	87
3.6.2.1 Downscaling der notwendigen Vorläufermenge	87
3.6.3 Radiomarkierung von Glu-C(O)-Cys durch S-Arylierung mit ^{18}F FIPy.....	89
3.6.4 Radiomarkierung von all-D Peptiden durch S-Arylierung mit ^{18}F FIPy	92
4. Experimentalteil	96
4.1 Allgemeines.....	96
4.2 Organisch-präparative Synthesen.....	98
4.3 Radiochemie.....	120
4.3.1 Allgemeines.....	120
4.3.2 Bestimmung der radiochemischen Ausbeute	121
4.3.3 Vorschriften zur Radiomarkierung.....	122
4.3.4 <i>In vitro</i> Stabilitätstests	132
4.3.5 Analytische HPLC-Systeme	135
5. Zusammenfassung	136
6. Literaturverzeichnis.....	140
Anhang:	149
NMR-Spektren	149
Massenspektren der all-D Peptide.....	151
Chromatogramme	154
Verschiedenes.....	158
Abkürzungen	159

1. Einleitung

1.1 Radiotracer in den Lebenswissenschaften

In den Lebenswissenschaften nehmen radioaktiv markierte Verbindungen einen hohen Stellenwert ein. Der erste Einsatz von Radioaktivität zur Beobachtung eines lebenden biologischen Systems (*in vivo*) wurde bereits 1923 durch George de Hevesy beschrieben. Mit der Verfolgung der Aufnahme und Verteilung von Blei-Ionen in Pflanzen mithilfe des Radioisotops Blei-212 wurde gleichzeitig auch der Grundstein für die Verwendung von Radiotracern in der heutigen Nuklearmedizin gelegt. Die Bedeutung dieser ersten Anwendung des Tracerprinzips spiegelt sich auch in der Würdigung dieser Arbeiten durch die Verleihung des Nobelpreises an de Hevesy im Jahr 1943 wider [1]. Bei einem Tracer handelt es sich im Allgemeinen um einen Spürstoff (engl. to trace: verfolgen), mit dessen Hilfe physiologische Prozesse nachverfolgt werden können. Dazu müssen zwei wichtige Kriterien erfüllt sein: Erstens muss der Tracer mit geeigneten Methoden von außen beobachtbar sein und zweitens darf der Tracer den zu beobachtenden Prozess nicht durch seine Anwesenheit beeinflussen. Um *in vivo* Prozesse von außen beobachten zu können, eignen sich Radionuklide besonders gut. Radionuklide können Photonenstrahlung emittieren, die in der Lage ist, Materie zu durchdringen. Eine Besonderheit radioaktiver Tracer ist zudem, dass diese in der Regel in unwägbareren Mengen vorliegen (im subnanomolaren Bereich) und somit die chemischen Gleichgewichte *in vivo* nicht beeinflussen. Dennoch lässt sich ihre Pharmakokinetik aufgrund der emittierten radioaktiven Strahlung nachweisen.

In den klassischen bildgebenden Verfahren, die im klinischen Alltag eingesetzt werden, werden nur strukturelle, morphologische Veränderungen erfasst, die z.B. durch Unterschiede des Gewebes in ihrer Transmission von Röntgenstrahlung (Röntgen, Computertomographie) oder Kernspinresonanz (Magnetresonanztomographie) erfasst werden. Im Gegensatz dazu kommen in der molekularen Bildgebung Radiotracer zum Einsatz, die es ermöglichen, biochemische Prozesse nicht-invasiv auf molekularer Ebene darzustellen. Durch die Wechselwirkung des Radiotracers mit unterschiedlichen molekularen Targets kommt es zu einer charakteristischen räumlichen Verteilung des Tracers im Körper, die Rückschlüsse auf physiologische Prozesse ermöglicht. Abweichungen von dieser Normalverteilung des Tracers *in vivo* lassen in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung Rückschlüsse auf pathophysiologische Veränderungen zu, bevor klinische Symptome oder morphologische Veränderungen auftreten. Physiologische

Vorgänge, die sich mit Hilfe von Radiotracer nachverfolgen lassen, sind metabolische Prozesse, wie etwa der Abbau von Glukose (Traubenzucker), Transportvorgänge, wie z.B. die Aufnahme von Aminosäuren oder aber die Bindung an Rezeptoren.

Die hierfür verwendeten Radiotracer können sich aus mehreren Bausteinen zusammensetzen. Für einen gegebenen biologischen Prozess wird ein Molekül eingesetzt, das mit dem Target des Prozesses spezifisch interagiert (Pharmakophor). Das Prinzip ist in Abb. 1 am Beispiel einer Rezeptorbindung illustriert. Die pharmakophore Gruppe passt dabei zu dem biologischen Ziel wie ein Schlüssel zum Schloss. Zusätzlich wird ein Radionuklid an diese pharmakophore Gruppe gekoppelt, wobei ggf. ein Bindeglied oder Abstandshalter zum Einsatz kommen. Der Tracer verteilt sich und reichert sich aufgrund der spezifischen Wechselwirkung an der Zielstruktur an. Der Ort, an dem die Strahlung emittiert wurde, kann durch Messung von außen lokalisiert werden.

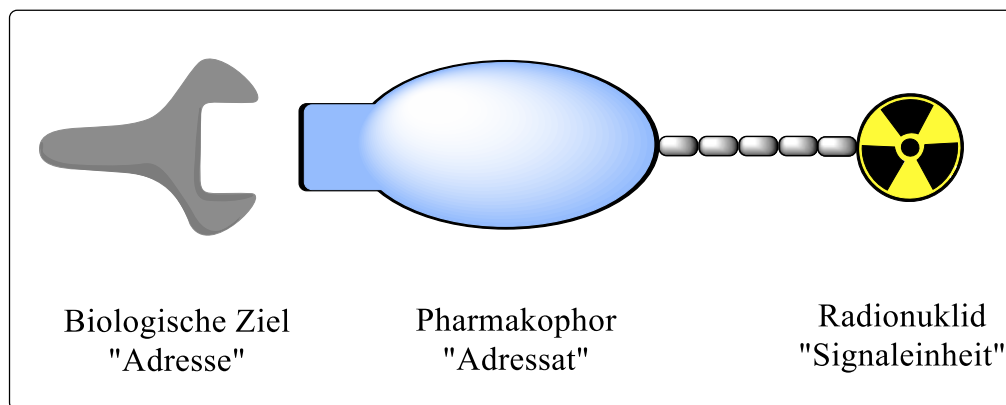
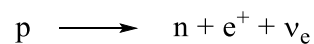


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Radiotracers für die Bildgebung

Grundlegend lassen sich zwei wichtige Messverfahren für Radiotracer unterscheiden. Die **Single Photon Computed Emission Spectroscopy (SPECT)** ist eine Weiterentwicklung der Szintigraphie. Hier kommen Gammastrahler, bevorzugt mit niedrigen Photonenenergien von etwa 150 keV (in diesem Energiebereich weisen die eingesetzten Detektoren die höchste Empfindlichkeit auf), zum Einsatz. Eine Gammakamera, versehen mit einem Kollimator, registriert den Anteil der Strahlung, der senkrecht auf den Detektor fällt. Durch Rotation der Kamera um den Patienten und anschließender Bildrekonstruktion kann auf die dreidimensionale Verteilung des Radiotracers geschlossen werden.

Ein anderes Messprinzip verfolgt die **Positronen-Emissions-Tomographie (PET)**. Die hier verwendeten Radionuklide besitzen im Vergleich zu stabilen Nukliden eines Elements einen

Protonenüberschuss. Der Atomkern stabilisiert sich durch radioaktiven Zerfall. Dabei wird ein Proton in ein Neutron gemäß folgender Gleichung umgewandelt:



Durch die Umwandlung werden, wie in Abb. 2 am Beispiel ^{18}F illustriert, ein Positron, das Antiteilchen des Elektrons, sowie ein Neutrino emittiert. Das Positron wird mit einer hohen kinetischen Energie aus dem Atomkern gesendet und danach im umgebenden Gewebe abgebremst. Nach vollständiger Abbremsung kann es sich schließlich mit einem Elektron aus seiner Umgebung verbinden. Dabei entsteht ein Positronium, in dem in Analogie zum Atom ein Proton des ^1H -Kerns formal durch ein Positron ersetzt ist. Das Positronium ist instabil und zerfällt praktisch augenblicklich. Dabei vernichten sich Positron und Elektron, Teilchen und Antiteilchen, gegenseitig. Dieser Vorgang wird auch Annihilation genannt.

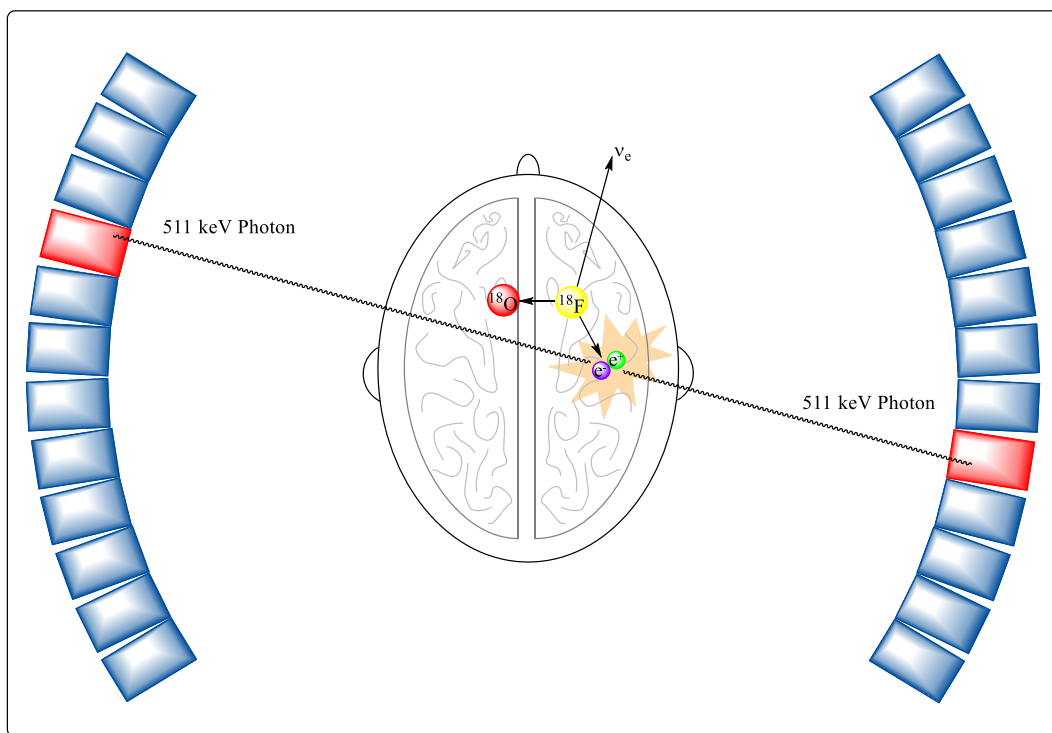


Abb. 2: Messprinzip der Positronen-Emissions-Tomographie

Die Masse der beiden Teilchen wird entsprechend der Äquivalenz von Energie und Masse ($E = mc^2$) in zwei Photonen mit jeweils 511 keV Energie umgewandelt. Aufgrund der Impulserhaltung werden die Photonen in einem Winkel von annähernd 180° zueinander emittiert, wodurch die PET-Messung erst ermöglicht wird. Diese Strahlung wird im PET-Scanner durch ringförmig angeordnete Detektoren in einer Koinzidenzschaltung detektiert.

Dabei wird angenommen, dass zwei praktisch zeitgleiche Messereignisse denselben Ursprung haben und die Annihilation aufgrund des 180° -Winkels auf der Verbindungslinie der jeweiligen Detektoren (line of response) liegen muss. Aus diesen Linien kann durch computergestützte Bildrekonstruktion eine Projektion der Aktivitätsverteilung erhalten werden, die die dreidimensionale Verteilung der Radioaktivität wiedergibt. Im Gegensatz zur SPECT wird bei der PET somit kein Kollimator benötigt, um eine Richtungsinformation zu erhalten. Dies hat eine bedeutend höhere Empfindlichkeit zur Folge. Durch eine vorherige Absorptionskorrektur mit einem langlebigen Positronenemitter wie beispielsweise des Mutter/Tochter-Paares $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ kann die Aktivität zudem quantifiziert werden kann.

1.2 Entwicklung von Radiotracern

Für die Markierung von Radiotracern für die PET steht eine Reihe von Positronen-emittierenden Radionukliden zur Auswahl. Die wichtigsten PET-Nuklide sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Sie müssen einerseits passende Zerfallseigenschaften aufweisen. Dabei sind die Halbwertszeit, die Positronen-Emissionsenergie und die Wahrscheinlichkeit der Positronen-Emission von entscheidender Bedeutung für die klinische Anwendung. Auch sind die chemischen Eigenschaften der Radionuklide für die Tracerentwicklung entscheidend.

Tabelle 1: Wichtige "Standard PET-Nuklide"[2]

Radionuklid	$T_{1/2}$	$E_{\beta_{\max}}$	β -Intensität
^{11}C	20,4 min	960 keV	99,8%
^{13}N	10,0 min	1198 keV	99,8%
^{15}O	2,0 min	1732 keV	99,9%
^{18}F	109,8 min	634 keV	96,7%
^{68}Ga	67,6 min	1899 keV	87,7%

Für die in der organischen Chemie grundlegenden Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff ist mit den Radionukliden ^{11}C , ^{15}O und ^{13}N jeweils ein Positronen-emittierendes Radionuklid vorhanden. Da sich alle Nuklide eines Elements, abgesehen von vernachlässigbaren Isotopeneffekten, chemisch gleich verhalten, ist es mit diesen Radionukliden theoretisch möglich, markierte Biomoleküle mit identischem Verhalten zu synthetisieren. Durch die kurze Halbwertszeit von ^{13}N und ^{15}O ist dies in der Praxis allerdings nur auf sehr einfache Moleküle, wie etwa ^{15}O Wasser oder ^{13}N Ammoniak beschränkt, die

sich in sehr kurzer Zeit synthetisieren lassen. Die Halbwertszeit von ^{11}C mit 20 Minuten erlaubt bereits die Synthese komplex aufgebauter Tracer ausgehend von ausgereiften, schnell durchführbaren Markierungsreaktionen, beispielsweise die Methylierung von Heteroatomen mit [^{11}C]Methyliodid [3].

Das „Arbeitspferd“ der Positronen-Emissions-Tomographie stellt zweifelsfrei ^{18}F mit seinen idealen Eigenschaften für die PET-Bildgebung dar. Seine im Vergleich zu den zuvor genannten Radionukliden längere Halbwertszeit von beinahe 2 Stunden erlaubt mehrstufige, zeitaufwändige Synthesen. Der jeweilige radiofluorierte Tracer kann in einer zentralen Produktionsstätte hergestellt, umliegenden Kliniken zur Verfügung gestellt und dort für aufeinander folgende Messungen mehrerer Patienten eingesetzt werden. Zudem können langsam ablaufende biologische Prozesse beobachtet werden, da der Tracer seinen Zielort erreicht, bevor er vollständig zerfallen ist. Die Halbwertszeit ist jedoch andererseits kurz genug, um die Strahlenexposition für den Patienten gering zu halten. ^{18}F zerfällt praktisch ausschließlich unter Aussendung eines Positrons ohne zusätzliche störende Gamma-Strahlung. Die Energie des emittierten Positrons ist die niedrigste unter den „Standard-PET-Isotopen“, was die beste Ortsauflösung zur Folge hat. Chemisch betrachtet ist Fluor ein eher seltener Bestandteil von natürlich vorkommenden organischen Stoffen, obwohl es einen höheren Anteil an der Erdkruste hat als beispielsweise Kohlenstoff oder Stickstoff. Es wird jedoch in zunehmendem Maße in der Wirkstoffforschung eingesetzt. Während 1970 nur ca. 2 % aller pharmazeutischen Wirkstoffe ein Fluoratom enthielten, waren es 2014 bereits etwa 25 % [4]. Fluor ist mit Wasserstoff isosterisch, das heißt, ihre Van-der-Waals-Radien sind sehr ähnlich (H: 1,20 Å, F: 1,35 Å). Somit kann Fluor zumindest formal ein Wasserstoff ersetzen. Die hohe Elektronegativität von Fluor (EN=3,98) verändert jedoch bei Substitution von Wasserstoff (EN =2,2) die elektronischen Eigenschaften eines Moleküls. Dadurch können sich beispielsweise pKs-Werte oder Dipolmomente ändern. Zudem steigert Fluor die Lipophilie und ist im Gegensatz zu Wasserstoff ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor [5]. Somit können die pharmakologischen Eigenschaften anders als bei ^{11}C , ^{13}N und ^{15}O ggf. deutlich von der Stammverbindung abweichen. An „kleinen“ Zyklotronen für medizinische Anwendungen lassen sich routinemäßig bis zu 900 GBq ^{18}F pro Bestrahlung produzieren [6]. Zum Vergleich beträgt eine Patientendosis [^{18}F]FDG, dem Standardtracer der PET, circa 300 MBq (0,3 GBq) [7].

Neben ^{11}C und ^{18}F hat ^{68}Ga ebenfalls einen hohen Stellenwert in der klinischen PET-Diagnostik erlangt. Die Zerfallseigenschaften sind jedoch im Vergleich zu ^{18}F weniger vorteilhaft.

Insbesondere die hohe Positronenenergie und die daraus folgende schlechtere Ortsauflösung sind nachteilig. Die im Vergleich zu ^{18}F kürzere Halbwertszeit bringt weitere Einschränkungen mit sich. Als Radiometall wird ^{68}Ga durch Komplexierung in Tracer eingebaut. Das ermöglicht zwar einfache, einstufige Markierungsreaktionen, aber der Einbau von Chelatoren hat großen Einfluss auf die Struktur des Zielmoleküls und verändert dessen Eigenschaften, insbesondere bei niedermolekularen Verbindungen, in großem Ausmaß. Trotz allem findet es bevorzugt in kleinen klinischen Einrichtungen Anwendung, da die Produktion von ^{68}Ga kein Zyklotron vor Ort erfordert. Mithilfe eines Nuklidgenerators kann ^{68}Ga aus dem Zerfall von langlebigem ^{68}Ge gewonnen werden. Diese Nuklidgeneratoren sind kommerziell erhältlich, platzsparend, können leicht transportiert werden und ermöglichen so einen viel einfacheren Zugang zu Radiotracern im Vergleich zur Anschaffung und dem Betrieb eines Beschleunigers.

Ein wichtiger Parameter bei Radiomarkierungen ist ihre radiochemische Ausbeute (RCA). Anders als eine chemische Ausbeute ist diese definiert als „...die Menge der Aktivität im Produkt ausgedrückt als Prozentsatz (%) der Startaktivität in dem betrachteten Prozess (bspw. Synthese, Abtrennung). Beide Angaben müssen sich auf dasselbe Radionuklid beziehen und zerfallskorrigiert werden, bevor Berechnungen angestellt werden“ (übersetzt aus dem Englischen) [8]. In der Praxis finden sich allerdings unterschiedliche Methoden, diese Größe zu bestimmen. Laut dieser Definition ist es daher ausdrücklich notwendig, im Einzelfall anzugeben, wie diese Ausbeute bestimmt wurde. Wird das Produkt einer Radiosynthese gereinigt und von radioaktiven Nebenprodukten abgetrennt und steht damit für direkte Anwendungen am Patienten zur Verfügung, spricht man von isolierter RCA. Die Angabe erfasst alle eventuell auftretenden Verluste während einer Synthese und ist somit am aussagekräftigsten. Um bei der Entwicklung und Optimierung einer Radiosynthese den Erfolg zu beurteilen, wird häufig auf die zeitaufwändige Isolierung des Produktes verzichtet. Man benutzt stattdessen chromatographische Verfahren wie die Radio-Dünnschichtchromatographie (Radio-DC) oder die Radio-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Radio-HPLC), um den Produktgehalt aus einem kleinen Teil des Reaktionsgemisches (Aliquot) analytisch zu bestimmen. In beiden Fällen ist die Bezeichnung radiochemische Ausbeute zulässig [8,9]. Bei letzterem muss den häufig auftretenden Adsorptionseffekten, insbesondere von nicht umgesetzten ^{18}F Fluorid, Beachtung geschenkt werden, da dadurch die Produktverteilung in der Lösung nicht der tatsächlichen Produktverteilung im Reaktionsgefäß entspricht. Daher werden in der Literatur zur Abgrenzung alternative Begriffe wie radiochemischer Umsatz (RCU) oder Radioinkorporation verwendet - eine exakte, offizielle Definition fehlt jedoch. Häufig handelt es sich ebenfalls um den analytisch bestimmten Anteil des Produktes in einem

Aliquot der Produktlösung, wobei ggf. auftretende Adsorptionseffekte nicht berücksichtigt werden. Daher können im Einzelfall die Radioinkorporation und die RCA deutlich voneinander abweichen (für Beispiele siehe [10-12]). Obwohl beide Begriffe nicht definiert sind, finden sie regelmäßig Anwendung, etwa für Optimierungsstudien, da sie am einfachsten zu bestimmen sind. Für den anwendungsorientierten Nutzer wiederum ist die tatsächlich zu erwartende Menge eines isolierten Radiotracers am Ende einer Synthese von größter Bedeutung. Daher wird in einigen Fällen anstelle einer RCA eine (effektive) Ausbeute ohne Zerfallskorrektur angegeben. Eine regelmäßig berichtete „nicht zerfallskorrigierte RCA“ kann es jedoch definitionsgemäß nicht geben. Beim Vergleich von Radiosynthesen muss somit also auf unterschiedliche, eventuell nicht vergleichbaren Angaben geachtet werden.

1.3 Radiomarkierungsstrategien mit ^{18}F

Da sich Isotope eines Elementes chemisch praktisch nicht voneinander unterscheiden, gelten ganz allgemein dieselben Gesetzmäßigkeiten für organisch-präparative Reaktionen mit stabilem ^{19}F und Radiomarkierungsreaktionen mit radioaktivem ^{18}F . Auch wenn das Reaktionsverhalten gleich ist, ergeben sich Besonderheiten in der Reaktionsführung durch die kurze Halbwertszeit von ^{18}F sowie die extrem niedrigen Konzentrationen, wenn kein stabiles ^{19}F als sogenannter Träger zugesetzt wird (engl. **no carrier added**, n.c.a). Daher haben sich spezielle Arbeitstechniken und Reaktionswege durchgesetzt, die sich in der Praxis bewährt haben. Dennoch wird ständig nach neuen, effizienteren Methoden und Verfahren gesucht, um die Verfügbarkeit von schon vorhandenen Radiotracern zu vereinfachen oder Verbindungen, die bisher unzugänglich waren, synthetisch zur Verfügung zu stellen. Aus chemischer Sicht lassen sich diese Methoden in elektrophile und nukleophile Reaktionsmechanismen, sowie direkte und indirekte Reaktionstypen einteilen.

1.3.1 Elektrophile Radiofluorierung

Elektrophile Radiofluorierungsmethoden basieren auf $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ als Radiofluorierungsagens. Damit können Olefine mittels elektrophiler Addition und Aromaten mittels elektrophiler Substitution markiert werden. $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ erhält man üblicherweise durch die Bestrahlung von mit ^{18}O -angereicherten Sauerstoff oder mit Neon gefüllten Gastargets am Zyklotron über die jeweiligen Kernreaktionen $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ oder $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$. Während der Bestrahlung werden die

erzeugten ^{18}F -Atome teilweise von der Targetwand adsorbiert. Um diese unerwünschte Aktivitätsadsorption zu vermeiden, wird dem Targetgas eine geringe Menge $[^{19}\text{F}]\text{F}_2$ zugesetzt, so dass sich durch Isotopenaustausch gasförmiges $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ bildet [13]. Durch den notwendigen Zusatz von Träger werden nur geringe spezifische beziehungsweise molare Aktivitäten erzielt. Das bedeutet, dass die Aktivität pro Masse, beziehungsweise Stoffmenge gering ist. Bei gegebener benötigter Aktivität wird somit mehr nicht radioaktive Substanz appliziert. Dadurch kann in einigen Fällen der zu beobachtende physiologische Prozess jedoch bereits beeinflusst werden, was im Widerspruch zum Tracerprinzip steht. Die maximal erreichbare Ausbeute ist zudem auf 50 % reduziert, da statistisch immer nur ein ^{18}F -Atom pro F_2 -Molekül vorhanden sein kann. Die Hälfte der produzierten Aktivität geht unweigerlich nach erfolgter elektrophiler Substitution in Form von $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ als Nebenprodukt verloren. Ein weiterer Nachteil von F_2 ist seine hohe Reaktivität und eine damit einhergehende geringe Selektivität. Daher treten bei der Reaktion häufig komplexe Produktgemische auf, deren Produkte strukturell sehr ähnlich und damit schwierig voneinander zu trennen sind.

Um die Selektivität zu erhöhen, werden metallorganische Abgangsgruppen eingesetzt. Der direkte Vergleich einer Reihe *para*-substituierter Aromaten beispielsweise zeigt zunehmende Markierungsausbeuten in der Reihe $\text{Si}(\text{CH}_3)_3 < \text{Ge}(\text{CH}_3)_3 < \text{Sn}(\text{CH}_3)_3$ [14]. Das Konzept wurde unter anderem eingesetzt, um 6- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor-L-DOPA}$ in 25 % RCA herzustellen (Abb. 3.). Dieser wichtige Tracer bildet das dopaminerge System ab und wird beispielsweise zur Darstellung von neuroendokrinen Tumoren und Veränderungen des Dopaminhaushaltes bei der Parkinson-Krankheit eingesetzt. Der Tracer wird im Folgenden mehrfach als Beispiel herangezogen, um an dieser Modellverbindung die Weiterentwicklung der Radiomarkierungsmethoden aufzuzeigen.

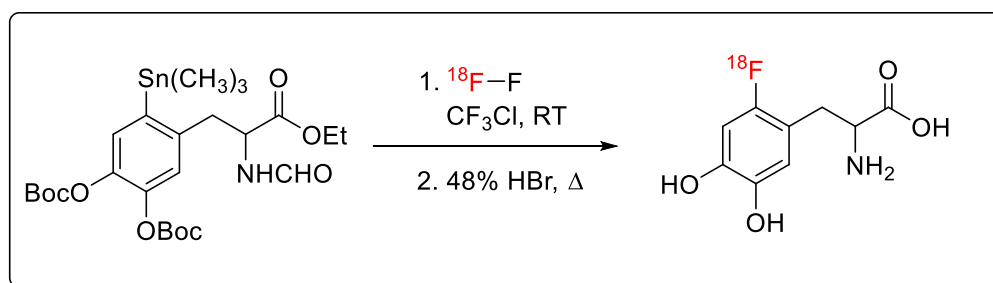


Abb. 3: Elektrophile Radiofluorierung von 6- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor-L-DOPA}$

1.3.2 Nukleophile Radiofluorierung niedermolekularer Verbindungen

Aufgrund der zuvor genannten Nachteile hat die elektrophile Radiofluorierung zunehmend an Bedeutung verloren. An ihre Stelle sind nukleophile Methoden getreten. Nukleophiles ^{18}F wird in der Form von ^{18}F Fluorid in hohen Ausbeuten durch die Bestrahlung von ^{18}O -angereichertem Wasser mittels der $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion erhalten. Ein Zusatz von Träger ist nicht notwendig, wodurch sehr hohe molare Aktivitäten erreicht werden [13]. Das ^{18}F Fluorid liegt nach der Bestrahlung in wässriger Lösung als Anion vor. Aufgrund seiner hohen Ladungsdichte bildet sich eine Hydrathülle um das Fluoridion aus, wodurch die Nukleophilie des Fluorid-Anions deutlich abgeschwächt wird. Eine Aktivierung des Fluorids durch die Entfernung dieser Hydrathülle ist daher die Voraussetzung für eine erfolgreiche Substitutionsreaktion. Konventionell erfolgt dies durch eine Kombination von Anionenaustauschchromatographie und azeotroper Trocknung [9]. Die gesamte Füllung des Targets wird über einen kleinen Anionenaustauscher geleitet. Dabei wird das angereicherte Wasser abgetrennt und kann zurückgewonnen werden. ^{18}F Fluorid wird auf der Anionenaustauscherkartusche fixiert und wird anschließend mit einer geringen Menge einer Base, in der Regel mit Carbonat-Anionen, die in Acetonitril und Wasser gelöst sind, in ein Trocknungsgefäß eluiert. Langlebige Radiometalle, die bei der Bestrahlung durch Kernreaktionsprodukte aus dem Targetmaterial oder Verunreinigungen im ^{18}O Wasser als radioaktive Nebenprodukte entstehen (z.B. ^{48}V über die Kernreaktion $^{48}\text{Ti}(\text{p},\text{n})^{48}\text{V}$ in einem Titan-Target), werden vom Anionenaustauschermaterial retiniert und sind somit nicht mehr als radionuklidische Verunreinigung im Endprodukt enthalten [15]. Die ^{18}F -haltige Lösung wird im Anschluss unter Schutzgas bei vermindertem Druck verdampft. In mehreren Schritten wird mit Acetonitril das Wasser vollständig azeotrop abdestilliert, bis trockenes Fluorid zurück bleibt. Basen mit weichen Kationen wie Cs^+ oder Phasentransferkatalysatoren wie Tetraalkylammonium-salze oder Kaliumkomplexe mit Aminopolyether Kryptofix® 2.2.2 ($[\text{K}2.2.2]$) werden bevorzugt eingesetzt. Einerseits erhält man dadurch einen Fluoridkomplex mit hoher Reaktivität, in dem sogenanntes „nacktes“ Fluorid vorliegt. Andererseits wird die Löslichkeit des Fluorids in den für die folgende Markierungsreaktion verwendeten aprotischen organischen Lösungsmitteln erhöht [16,17]. Der gesamte Trockenprozess dauert zwischen 20 und 30 Minuten.

Durch den radioaktiven Zerfall von ^{18}F gehen bei der klassischen Methode bis zu 20 % der Ausgangsaktivität verloren. Daher wurde und wird nach schnelleren alternativen Trocknungsmethoden gesucht. Bei der „Münchner Methode“ wird das ^{18}F Fluorid noch auf

dem Anionentauscher durch Spülen mit trockenem Acetonitril von Wasserresten befreit und anschließend mit einer wasserfreien Lösung aus Kryptofix®/KOH in Acetonitril eluiert. Auf dem Anionenaustauscher wird dabei das stark basische Hydroxid gegen Carbonat ausgetauscht und gleichzeitig Fluorid eluiert. Die dabei erhaltene Lösung aus $[K\text{-}2.2.2]CO_3/^{18}F$ kann direkt ohne Verdampfungsschritt zur Radiomarkierung eingesetzt werden. Der Prozess dauert dabei nur etwa drei Minuten. Als kritisch zu betrachten ist jedoch die hohe Menge an $[K\text{-}2.2.2]OH$, die benötigt wird, um eine zufriedenstellende Wiederfindungsrate des $[^{18}F]$ Fluorids zu erreichen. Wird zudem die Kapazität des Ionentauschers überschritten, gelangt überschüssiges Hydroxid in die Reaktionslösung, so dass ein sehr basisches Reaktionsmedium entsteht, was sich nachteilig auf die Reaktionsausbeute auswirken kann. So konnten für die Synthese von $[^{18}F]$ Fluorethyltyrosin (FET) auf der Produktionsskala im Vergleich zur konventionellen Methode nur mit einem deutlich höheren Vorläufereinsatz vergleichbare RCA erreicht werden. Für empfindliche Radiomarkierungen, vor allem mit basenempfindlichen Vorläufern, scheint daher die Münchner Methode nur bedingt geeignet zu sein [18].

Einen ähnlichen Ansatz mit weniger harschen Reaktionsbedingungen verfolgt die „Minimalistische Methode“. Auch hier wird das Fluorid zunächst auf einem Anionentauscher fixiert und mit wasserfreiem Methanol von Wasserresten befreit. Die anschließende Elution erfolgt jedoch mit einer Lösung eines geeigneten Markierungsvorläufers, der eine ionische Onium-Gruppe beinhaltet. Hierdurch kann auf den Zusatz von Base vollständig verzichtet werden. Das leicht flüchtige Methanol kann in kürzester Zeit verdampft werden, wodurch der gesamte Prozess ebenfalls lediglich drei Minuten in Anspruch nimmt. Zusätzlich zu der Zeitersparnis konnten vor allem mit basenempfindlichen Markierungsvorläufern deutlich höhere RCA erzielt werden. So wurde etwa für 4- $[^{18}F]$ Fluorbenzaldehyd, einem vielseitigen Markierungsbaustein, eine Ausbeute von 65 – 75 % erreicht. Mit konventionellen Bedingungen, die auf dem System $[K\text{-}2.2.2]CO_3$ basieren, konnte demgegenüber nur eine Ausbeute von 30 – 55 % erzielt werden [19].

Die eigentliche Radiomarkierung findet im Anschluss an die Trocknung statt. Da Fluorid unter wasserfreien Bedingungen eine starke Base ist, müssen dazu die protischen funktionellen Gruppen im Zielmolekül im Vorfeld geschützt und nach der Markierung wieder entschützt werden. Darunter fallen beispielsweise Carbonsäuren, Alkohole, Phenole, primäre und sekundäre Amine und Thiole. Da in biologisch aktiven Verbindungen üblicherweise eine oder mehrere dieser funktionellen Gruppen vorhanden sind, ist die Einführung von Schutzgruppen in der Regel nicht zu vermeiden. Abhängig von der angestrebten Markierungsposition lassen

sich zwei grundsätzliche Reaktionstypen unterscheiden. Wird das ^{18}F in einer aliphatischen Position in das Zielmolekül eingebaut, verläuft die Reaktion nach einem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus. Dazu wird am Markierungsvorläufer in der gewünschten Position eine geeignete Abgangsgruppe platziert. Es kommen dieselben Abgangsgruppen wie in der organisch-präparativen Chemie in Frage. Dazu gehören Halogene (Br, I). Sulfonate wie etwa Toluolsulfonat (-OTs), Methylsulfonat (-OMs) oder Trifluormethylsulfonat (-OTf) haben sich als besonders gute Abgangsgruppen bewährt. Abb. 4 zeigt die Radiomarkierung von 2- ^{18}F Fluordesoxyglucose (^{18}F FDG), dem „Arbeitspferd“ der PET. Als radiomarkiertes Derivat des Traubenzuckers bildet es dessen Stoffwechsel ab, welcher in einer Vielzahl von Prozessen im Körper involviert ist und daher ebenfalls für eine Vielzahl von medizinischen Fragestellungen relevant ist - allen voran in der Tumordiagnostik. Zu beachten ist die Inversion des Stereozentrums in der 2-Position bedingt durch eine Walden-Umkehr während der $\text{S}_{\text{N}}2$ Reaktion.

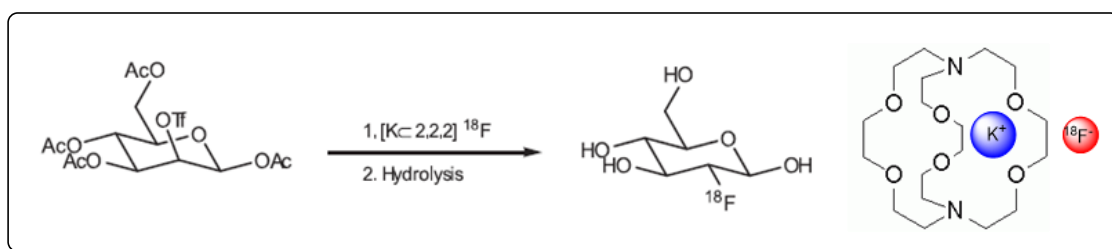


Abb. 4: Links: Radiomarkierung von 2- ^{18}F Fluordesoxyglucose. Rechts: $[\text{K}-2.2.2]^{18}\text{F}$ -Komplex

Falls die Zielverbindung es zulässt, wird eine Radiomarkierung in aromatischer Position oft bevorzugt. Grund hierfür ist die höhere Bindungsdissoziationsenergie der $\text{C}_{\text{sp}2}\text{-F}$ Bindung im Vergleich zu aliphatischen $\text{C}_{\text{sp}3}\text{-F}$ Bindung. Man verspricht sich hierdurch eine höhere Stabilität des Tracers *in vivo* gegenüber Defluorierung. Die Reaktion verläuft in einem $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ Mechanismus. Als klassische Abgangsgruppen kommen stark elektronenziehende Gruppen wie Nitro- ($-\text{NO}_2$) oder Trimethylammoniumgruppen ($-\text{N}^+\text{Me}_3$) zum Einsatz. Zufriedenstellende Ausbeuten werden allerdings nur für elektronenarme Aromaten erhalten. Da viele interessante Zielverbindungen jedoch elektronenreich sind, stellte dies lange eine große radiochemische Herausforderung dar. Um in diesen Fällen eine Fluorierung zu ermöglichen, müssen geeignete Markierungsvorläufer durch zusätzliche, elektronenziehende Gruppen aktiviert werden. Nach der Markierung müssen diese elektronenziehenden Gruppen dann wieder entfernt oder umgewandelt werden, um die ursprünglich gewünschte Zielverbindung zurück zu erhalten. Daraus ergeben sich komplexe, mehrstufige Synthesen. Dies soll wiederum an einer

automatisierten Synthese von n.c.a. [^{18}F]FDOPA verdeutlicht werden (Abb. 5) [20]. Die elektronenziehende Aldehydgruppe in *ortho*-Position zur Trimethylammonium-Abgangsgruppe aktiviert im ersten Reaktionsschritt den Aromaten für die nukleophile Fluorierung. In den weiteren Schritten wird dann FDOPA aufgebaut, indem der Aldehyd zum Alkohol reduziert, der Alkohol zum Iodid substituiert und das Iodid mithilfe einer chiralen Phasentransferkatalyse zum geschützten FDOPA alkyliert wird. Bemerkenswerterweise ist die RCA dieser 5-stufigen Synthese mit 36 % höher als die der zuvor gezeigten (geträgerten) elektrophilen Synthese.

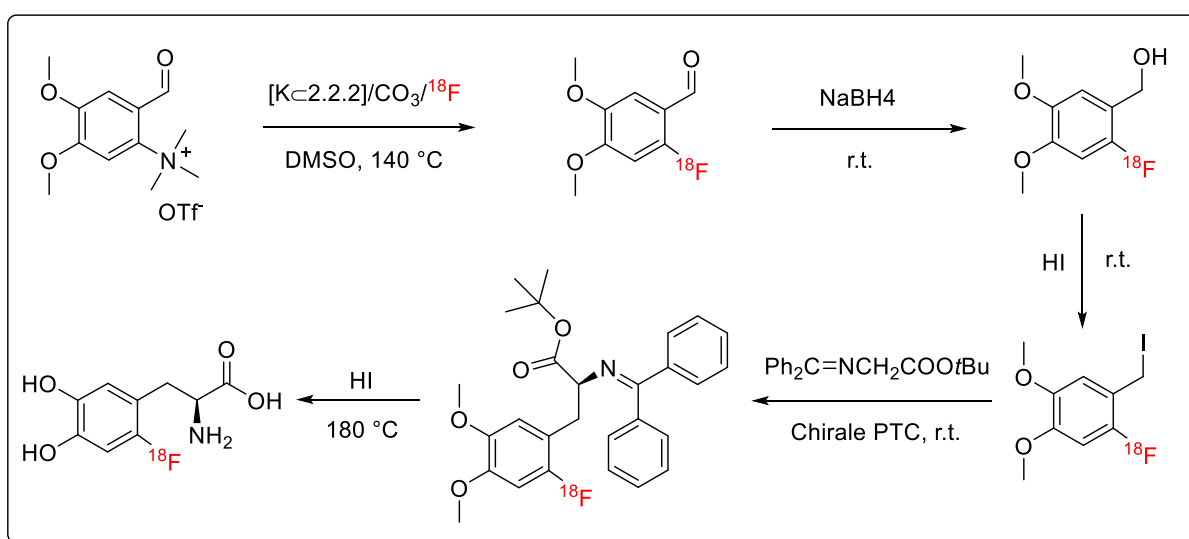


Abb. 5: Automatisierte Aufbausynthese von n.c.a. [^{18}F]FDOPA

Da die nukleophile Radiofluorierung an Bedeutung gewonnen hat, wurde bereits früh nach Möglichkeiten gesucht, um elektronenreiche Aromaten direkt zu markieren. Eine Auswahl der dabei entwickelten Methoden ist in Abb. 6 zusammengefasst. Pike und Aighirho nutzen hierbei 1995 zum ersten Mal aus, dass Diaryliodoniumsalze mit Nucleophilen zu substituierten Aromaten reagieren [21]. Dabei entsteht jedoch beim Einsatz unsymmetrischer Iodoniumsalze ein Produktgemisch. Durch geeignete Wahl der Substituenten kann die Produktverteilung beeinflusst werden, wobei Gruppen mit Substituenten in *ortho*-Position bevorzugt fluoriert werden. Unglücklicherweise wird bei dieser Methode jedoch wiederum die elektronenarme Gruppe bevorzugt. 2007 setzten Ross et al. daher Aryl(thienyl)iodonium-salze als Markierungsvorläufer ein. Durch den stark elektronenreichen Thiophen-Substituenten konnten mit dieser Methode auch elektronenreiche Aromaten radiofluoriert werden [22]. Die verwendeten Aryl(thienyl)iodonium-salze sind allerdings in der Praxis anspruchsvoll

herzustellen und zeigen häufig eine geringe Stabilität, weshalb die Methode hauptsächlich für einfache Markierungsbausteine, wie z.B. [^{18}F]Fluorphenol eingesetzt wird [23]. 2014 zeigten Ichiishi et al., dass synthetisch leichter zugängliche, stabile Mesityl(aryl)iodonium-salze vielversprechende Markierungsvorläufer sind. Unter Cu-Katalyse findet die Radiofluorierung an dem sterisch weniger gehinderten Aromaten unabhängig von dessen elektronischen Eigenschaften statt. Für eine Reihe von Modellverbindungen konnten analytisch hohe radiochemischen Umsätze (RCU) bestimmt werden. Die isolierte Ausbeute für bspw. [^{18}F]FDOPA betrug jedoch weniger als 1 %, während der RCU zu 38 % bestimmt wurde. Dies zeigt, dass diese Methode zwar im kleinen Maßstab hervorragende Ergebnisse liefert, jedoch ein up-scaling der Methode zu sehr geringen und damit praktisch nicht nutzbaren Ausbeuten führt [10].

Neben den auf Iodonium-Salzen basierenden Anwendungen wurde in den vergangenen Jahren über eine Reihe von weiteren Übergangsmetall-katalysierten Methoden berichtet. 2011 und 2012 wurden kurz nacheinander zwei Pd-katalysierte Radiofluorierungen beschrieben. Cardinale et al. gelang so die Markierung von Aryltriflaten mithilfe eines Pd-Katalysators. Allerdings lief diese Reaktion nur unter Zugabe von Träger in ausreichenden Ausbeuten ab [24]. Lee et al. hingegen konnten auf einen Trägerzusatz verzichten. Dazu wurde zunächst mit Hilfe eines Palladiumkatalysators [^{18}F]Fluorid zu einem elektrophilen Fluorierungsreagenz umgepolt und anschließend auf einen Palladiumkomplex als Markierungsvorläufer übertragen [25]. Es konnten verschiedene Tracer im Labormaßstab hergestellt werden. Allerdings sind die Palladiumverbindungen äußerst empfindlich und können nur aufwändig unter Schutzatmosphäre gehandhabt werden. Daher hat die Methode keinen Einzug in die klinische Routineproduktion gefunden. Die in derselben Arbeitsgruppe 2012 entwickelten einstufig markierbaren Nickel(II)-Komplexe waren hingegen stabil und konnten bemerkenswerterweise mit einer wässrigen [^{18}F]Fluorid-Lösung bei Raumtemperatur innerhalb einer Minute umgesetzt werden und lieferten nach reduktiver Eliminierung die ^{18}F -markierten Produkte [26]. Die Methode konnte nach weiteren Optimierungen für die Produktion von klinisch relevanten Tracern eingesetzt werden, jedoch stellte sich dabei heraus, dass aufgrund der hohen Hydrolyseempfindlichkeit des eingesetzten Oxidationsmittels (eine hypervalente Iodoniumverbindung) eine automatisierte Routineanwendung in der Praxis nicht möglich ist [27]. Mit der 2014 von Tredwell et al. vorgestellten kupfervermittelten Radiofluorierung von Arylboronpinacolestern haben sich die Möglichkeiten in der PET-Chemie nachhaltig verändert. Die dazu verwendeten Arylboronpinakolester-Vorläufer sind stabil gegenüber Sauerstoff und Hydrolyse. Da diese Stoffklasse häufig in der organisch-präparativen Chemie zum Einsatz

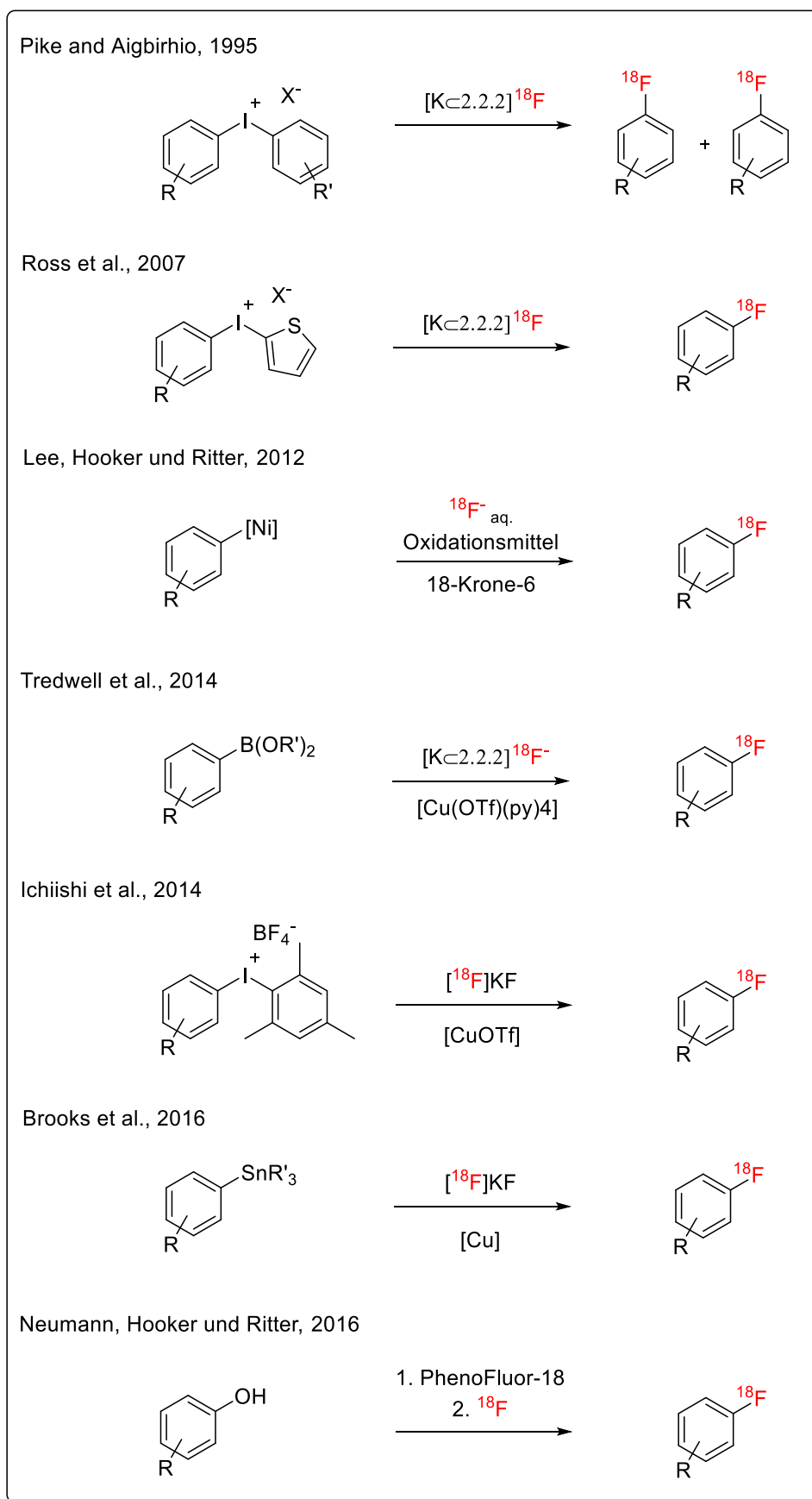


Abb. 6: Entwicklung von Methoden zur Radiofluorierung von elektronenreichen Aromaten mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid

kommt, sind die Methoden zur Synthese von geeigneten Markierungsvorläufern weit entwickelt und eine Vielzahl von Boronpinakol-Synthesebausteinen sogar kommerziell erhältlich. Mit der Methode kann ein breites Spektrum von elektronenreichen, -neutralen und -armen Aromaten mithilfe des etablierten Systems [K₂C₂F₅]¹⁸F in guten RCA radiofluoriert werden [28]. 2015 wurde das Konzept auf freie Arylboronsäuren [29] sowie 2016 auf Arylstannane übertragen [30]. In einer darauf aufbauenden Arbeit wurde der positive Effekt von alkoholischen Lösungsmitteln auf die Kupfer-vermittelte Radiofluorierung gefunden. Mit dem dabei entwickelten allgemeinen Protokoll gelang es in vielen Fällen, elektronenreiche Aromaten mit 80 - 99 % RCU zu markieren, wobei sogar ungeschützte Phenole und Indole ohne Einschränkungen toleriert wurden [31]. Durch ihr breites Anwendungsspektrum und die milden Reaktionsbedingungen eignen sich die Kupfer-vermittelten Methoden gut für die Entwicklung bisher unzugänglicher Tracer und die effiziente Produktion bereits etablierter Tracer, sodass sie zusammenfassend aktuell in vielen Fällen die Methode der Wahl darstellen. Dies wird erneut am Beispiel [¹⁸F]FDOPA deutlich, welches mittels der kupfervermittelten Destannylierung in einer zweistufigen, automatisierten Synthese mit einer RCA von 54 % erhalten wurde [32].

1.3.3 Nukleophile Radiofluorierung von Biopolymeren

Unter Biopolymeren versteht man große Moleküle, welche im lebenden Organismus aus vielen kleinen Untereinheiten aufgebaut werden. Darunter fallen beispielsweise die aus Nukleotiden aufgebauten Nucleinsäuren, aus Zuckern aufgebauten Polysaccharide oder aber die aus Aminosäuren (AS) aufgebauten Peptide (< 50 As) und Proteine (> 50 As). Bei der Entwicklung von neuen pharmazeutischen Wirkstoffen sind insbesondere letztere von wachsender Bedeutung. Peptidbasierte Wirkstoffe zur Behandlung von beispielsweise Krebserkrankungen, Infektionen, Osteoporose, Diabetes und AIDS sind in klinischen Studien evaluiert worden [33]. Trotz einiger Herausforderungen wie etwa geringer Membranpermeation, geringer biologischer Halbwertszeit und geringer *in vivo*-Stabilität stellen Peptide, Affibody und Antikörper interessante Zielverbindungen Entwicklung zur Entwicklung von PET-Tracern dar [34].

Im Hinblick auf ihre Radiomarkierbarkeit unterscheiden sich Biopolymere von kleinen Molekülen. Prinzipiell sind zwar dieselben (nukleophilen) Markierungsreaktionen denkbar. Voraussetzung ist jedoch, dass das Biomolekül die harschen Reaktionsbedingungen, wie hohe Temperaturen von oft mehr als 100 °C, ein aprotisches Lösungsmittel und ein häufig basisches Reaktionsgemisch unbeschadet überstehen muss. In der Regel ist dies wegen der

Empfindlichkeit der Biomoleküle nicht der Fall. Gleichzeitig gelten dieselben Einschränkungen bezüglich der funktionellen Gruppen wie bei der direkten Markierung. Von den 20 natürlichen Aminosäuren tragen jedoch 13 protische funktionelle Gruppen in ihrer Seitenkette, die eine direkte Radiofluorierung behindern. Eine Schutzgruppenstrategie ähnlich wie bei kleinen Molekülen ist hingegen nur sehr eingeschränkt auf Peptide übertragbar. Der Grund hierfür liegt in der Synthese der Peptide, üblicherweise mittels Festphasensynthese nach Merrifield, welche selbst besondere Anforderungen an die verwendeten Schutzgruppen stellt.

Da die harschen Reaktionsbedingungen häufig nicht toleriert werden, wurde beispielsweise versucht, die notwendige Reaktionstemperatur zu senken, indem als Markierungsposition stark aktivierte Aromaten verwendet wurden [11]. Die besten Ergebnisse wurden wie in Abb. 7 gezeigt, mit 3-Cyano-4-trimethylammoniumbenzamid-Vorläufern erzielt. Als Modellpeptid konnte so beispielsweise ein radiomarkiertes Bombesin-Derivat in einer moderaten isolierter RCA von 20 % bei nur 70 °C erhalten werden. Dieses Peptid enthielt jedoch keine empfindlichen Aminosäuren wie etwa Cystein oder Lysin in seiner Sequenz. Für ein cysteinhaltiges Modellpeptid wurde hingegen erst bei 90 °C eine hohe Inkorporation von ^{18}F beobachtet, für ein lysinhaltiges Peptid wurde selbst bei erhöhten Temperaturen kein zufriedenstellendes Ergebnis erhalten. Aufgrund der relativen Häufigkeit von insbesondere Lysin in Peptiden und Proteinen ist diese Methode somit auf eine kleine Gruppe von Peptiden beschränkt.

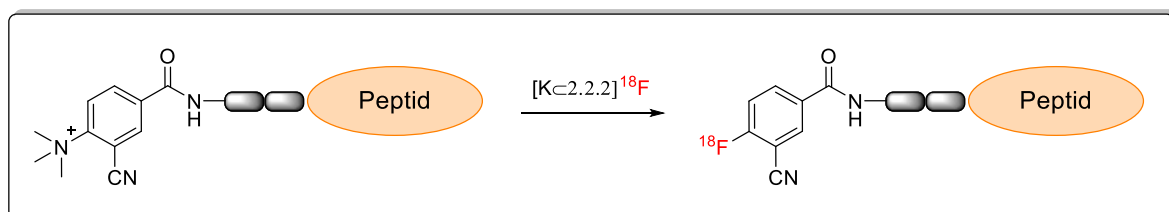


Abb. 7: Direkte aromatische nukleophile Substitution mit $[^{18}\text{F}]$ Fluorid an stark aktivierten Aromaten

Einen alternativen Ansatz abseits von der konventionellen Kohlenstoff-Fluor Bindungsknüpfung stellen Fluoridakzeptoren dar. Darunter versteht man Elemente, die mit Fluor mittels geringer Aktivierungsenergie Bindungen mit gleichzeitig hoher Dissoziationsenergie ausbilden wie etwa Bor (732 kJ/mol), Silizium (576 kJ/mol) oder Aluminium (675 kJ/mol) sowie Phosphor (405 kJ/mol) [35]. Durch die geringe Aktivierungsenergie erfordern diese im Gegensatz zur C–F Bindungsknüpfung vergleichsweise milde Reaktionsbedingungen. Als anorganische Elemente (mit Ausnahme von

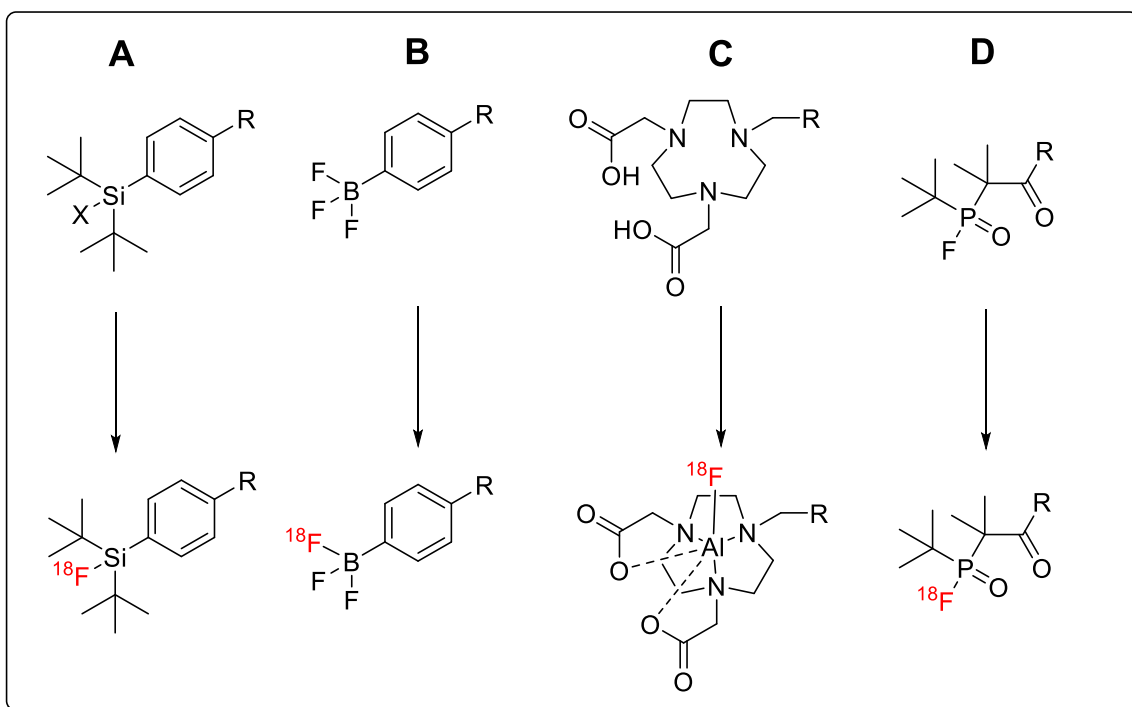


Abb. 8: Radiofluorierung mittels Fluoridakzeptor-Bausteinen

Phosphor) müssen diese Akzeptoren in Form von geeigneten Fluorid-Akzeptor-Gruppen in die Biomoleküle eingebaut werden.

Im Falle von Silizium ist die Silizium-Fluor-Bindungsenergie zwar hoch, die Bindung ist gleichzeitig jedoch stark polarisiert und daher anfällig für eine Hydrolyse. Daher wurde bereits 1985 in ersten Studien nach Verabreichung von [^{18}F]Trimethylsilylfluorid bei Ratten eine starke Aufnahme von Aktivität in die Knochen festgestellt, was ein deutliches Indiz für eine Defluorierung durch Hydrolyse darstellt [36]. Einfache Silylfluoride zeigten sich somit ungeeignet für einen Einsatz *in vivo*. Durch die Arbeitsgruppe Schirmacher konnte 2006 jedoch gezeigt werden, dass einige sterisch abgeschirmte Silylverbindungen im Serum stabil sind. *In vivo* konnte dies jedoch nur bei Di-*tert*-butylphenyl[^{18}F]fluorsilan bestätigt werden. Auf dieser Struktur basiert der Baustein für den SIFA-Ansatz (**S**ilicon-**f**luoride **a**ceptor, Abb. 8, Methode A) [37]. Mit den sterisch anspruchsvollen Resten geht jedoch eine hohe Lipophilie der Tracer einher, was sich negativ auf die pharmakokinetischen Eigenschaften auswirken kann. Durch hydrophile Linker wie etwa Polyethylenglycol-Ketten (PEG) oder quaternäre Ammoniumverbindungen wird versucht, dies zu kompensieren. Als Abgangsgruppe ermöglicht Fluorid eine besonders schonende, direkte Markierung bei Raumtemperatur. Durch diesen direkten Isotopenaustausch werden naturgemäß, abhängig von der notwendigen Vorläufermenge, häufig nur moderate spezifische Aktivitäten erreicht. Alternativ werden Silane (Si-H), Silanole (Si-OH) oder Alkoxysilane (Si-OR) eingesetzt. Die benötigten

Temperaturen liegen hier häufig höher, zudem erfordern letztere saure Reaktionsbedingungen zur Aktivierung der Abgangsgruppen. Im Gegenzug kann der Markierungsvorläufer vom radiofluorierten Tracer getrennt werden, sodass hohe molare Aktivitäten erreicht werden. Mithilfe des SIFA-Ansatzes konnte eine Reihe von Peptiden markiert werden, beispielsweise das Somastatin-Analogon ^{18}F -SiFAlin-TATE, ein Tracer für neuroendokrine Tumore, welcher innerhalb von lediglich 30 Minuten mit 42 % RCA synthetisiert werden kann [38].

Die außerordentlich hohe Bindungsenergie von Bor und Fluor wurde 2005 erstmals von der Arbeitsgruppe Perrin zur Markierung von Biomolekülen ausgenutzt [39]. Zunächst wurden dazu noch Boronsäureester, wie aus der organisch-präparativen Chemie bekannt, mit $^{18}\text{F}]\text{KHF}_2$ zu den entsprechenden Kalium-aryltrifluorboraten umgesetzt. Die Reaktion verlief bemerkenswerterweise in wässrigem Medium bei Raumtemperatur und moderatem pH innerhalb einer Stunde. Die Methode erfordert jedoch zwingend den Zusatz von Träger, um $^{18}\text{F}]\text{KHF}_2$ zu generieren. Es wurde gezeigt, dass der Tracer in neutralem Medium nicht defluoriert. In den darauffolgenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der direkte Isotopenaustausch an Aryltrifluorboraten (Abb. 8, Methode B) ebenfalls zu ^{18}F -Trifluorboraten führt [40]. Eine Besonderheit liegt hier in dem Vorhandensein von insgesamt drei Fluoratomen pro Molekül, welche theoretisch alle durch ^{18}F ausgetauscht werden können. Daher ist formal eine höhere molare Aktivität im Produkt, verglichen mit der des vom Zyklotron gelieferten $^{18}\text{F}]\text{Fluorids}$, möglich. Üblicherweise geht man jedoch davon aus, dass rein statistisch betrachtet eine Mehrfachmarkierung ausgeschlossen ist. Im Widerspruch dazu wurde jedoch durch eine Kombination aus hoher Startaktivität, niedriger Vorläufermenge (10 nmol) sowie sehr kleinen Reaktionsvolumina eine herausragend hohe molare Aktivität von 555 GBq/ μmol erhalten. Diese ist etwa 10-fach höher als die für C-F Radiofluorierungen üblicherweise möglich sowie etwa 100-fach höher als bei klassischen B-F-Markierungen. Dieser Ansatz wird daher auch „stoichiometric leverage“ (stöchiometrischer Hebel) genannt [40].

Eine Aluminium-vermittelte Radiofluorierung wurde erstmals 2009 von der Arbeitsgruppe McBride beschrieben. In einem ersten Reaktionsschritt wird dabei zunächst aus Al^{3+} und wässrigem $^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ $\text{Al}^{18}\text{F}]\text{F}^{2+}$ gebildet. Da Aluminium jedoch keine stabilen Bindungen mit Kohlenstoff eingeht, wird dieses im Anschluss mittels eines geeigneten Chelators durch Komplexierung an den Tracer gebunden. Verschiedene Chelatoren wurden untersucht. Dabei wurde gefunden, dass AlF-Komplexe mit dem makrozyklischen Chelator 1,4,7-Triazacyclononan-N,N',N''-trissigsäure (NOTA) (Abb. 8, Methode C) im Serum kaum ^{18}F frei setzen [41]. Wie auch die Bortrifluorid-Methode verläuft die Reaktion ebenfalls bei

moderatem pH von ca. 4 in wässrigem Medium, ist jedoch mit etwa 15 Minuten Reaktionszeit deutlich schneller. Zudem verlangt die Bildung von [¹⁸F]AlF-Komplexen keinen Zusatz von Träger, somit können im Allgemeinen hohe molare Aktivitäten erreicht werden. Nachteilig ist hingegen die hohe Reaktionstemperatur von ca. 100 °C. Zahlreiche Studien mittels [¹⁸F]AlF-NOTA markierten Peptiden zeigen, dass die Methode sehr vielversprechend für die Entwicklung neuer PET Tracer ist. Trotz des vergleichsweise großen Einflusses der NOTA-Gruppe auf die Struktur bleibt die Affinität der Peptide dabei häufig erhalten. Das einfache Reaktionsschema dieser Methode erlaubt in einigen Fällen sogar eine simple Radiomarkierung mittels vorbereiteter Markierungs-Kits in kurzer Zeit mit guten Ausbeuten [42].

Zusätzlich zu diesen drei bereits etablierten Fluoridakzeptoren wurde kürzlich ein phosphorbasierter Markierungsbaustein vorgestellt (Abb. 8, Methode D) [43]. Obwohl Phosphor ein relativ häufiges Element in Biomolekülen ist, kann es jedoch nicht in seiner üblichen biochemischen Form, dem (poly)Phosphat, markiert werden. Stattdessen wird, ähnlich wie auch beim SIFA- beziehungsweise Aryltrifluorborat-Ansatz, ein Organophosphinfluorid durch Isotopenaustausch radiomarkiert. *In vitro*-Untersuchungen zeigten, dass der Baustein stabil gegenüber Hydrolyse sowie Metabolisierung ist. Die Reaktionsbedingungen sind äußerst mild. So werden bereits bei Raumtemperatur in wässriger oder organischer Lösung bei neutralem pH gute Ausbeuten erhalten. Es konnte durch die Radiomarkierung eines RGD-basierten Peptides (>30 % RCA) sowie von humanem Serumalbumin als Modellprotein (>5 % RCA) gezeigt werden, dass diese neue Methode zukünftig viel Potential zur Herstellung von Radiotracer für *in vivo*-Anwendungen bietet.

Zusammenfassend bieten Fluoridakzeptoren sehr gute Möglichkeiten, sind jedoch nicht ohne Nachteile. So werden für Silizium-, Bor- und Phosphor-basierte Bausteine in der Regel geträgerte Produkte erhalten. Im Falle von Aluminium wird eine große strukturelle Veränderung durch den Chelator sowie ggf. eines Bindeglieds bewirkt, zudem werden hohe Temperaturen für die Markierung benötigt.

1.3.4 Indirekte Radiofluorierung

Trotz der Fortschritte bei der direkten Markierung von Biomolekülen, insbesondere durch Fluoridakzeptoren, ist die indirekte Radiomarkierung weiterhin von großer Bedeutung. Die grundlegende Überlegung besteht darin, den oft harschen Fluorierungsschritt von der eigentlichen Markierung des Tracers zu trennen. So können für beide Schritte ohne Abstriche

ideale Reaktionsbedingungen verwendet werden. Dabei kommen kleine Moleküle zum Einsatz, welche häufig als Synthon oder als prosthetische Gruppe bezeichnet werden. Beide Bezeichnungen sind jedoch nicht eindeutig. So versteht man unter dem Begriff Synthon versteht man in der Retrosynthese einen konzeptionellen Baustein. In der Biochemie gibt es hingegen ebenfalls prosthetische Gruppen, wobei damit organische Einheiten gemeint sind, welche als Cofaktoren für die katalytische Aktivität von Enzymen unerlässlich sind. In der Radiochemie sind hingegen Bausteine zur Radiomarkierung gemeint. Grundlegend wird an einem bifunktionellen kleinen Molekül eine erste funktionelle Gruppe zur Einführung des [¹⁸F]Fluorids in den Baustein genutzt. Dabei kommen alle zuvor gezeigten Markierungsstrategien zur direkten Radiofluorierung zum Einsatz. Die zweite funktionelle Gruppe wird im nächsten Schritt zur Kopplung beziehungsweise Konjugation des markierten Bausteins an das Zielmolekül eingesetzt. Das Synthon wird so gewählt, dass die Konjugationsreaktion unter möglichst milden Reaktionsbedingungen verlaufen kann, namentlich bei niedriger Temperatur in wässrigem Medium und bei neutralem pH-Wert. Abhängig davon, an welche funktionelle Gruppe im Peptid die Konjugation erfolgen soll, steht eine Vielzahl von Reaktionen zur Verfügung.

1.3.4.1 Indirekte Radiofluorierung unmodifizierter Biomoleküle

Bei dieser indirekten Radiomarkierung von unmodifizierten Biomolekülen werden reaktive, natürlich in Peptiden vorkommende funktionelle Gruppen für die Konjugation verwendet. Einerseits können Biomoleküle damit ohne vorherige chemische Modifikation indirekt markiert werden. Dies ist besonders bei sehr großen Molekülen, die nicht chemisch synthetisiert werden können, wie etwa Antikörpern, von Vorteil. Andererseits steigt mit der Größe des Moleküls die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere funktionelle Gruppen vorhanden sind, die potentiell als Reaktionspartner geeignet sind. Die Markierung kann in diesem Falle an mehreren Stellen erfolgen und es wird unter Umständen ein Gemisch aus radiomarkierten Verbindungen erhalten.

Da die überwiegende Mehrheit der Biomoleküle Amine in Form des N-Terminus und häufig zusätzlich in Form von Lysin-Resten tragen, ist die Acylierung dieser Amine eine häufig verwendete Strategie zur indirekten Markierung von Biomolekülen. Aus der Vielzahl von verfügbaren Synthonsen ist N-Succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorbenzoat ([¹⁸F]SFB) wohl das am häufigsten verwendete (Abb. 9, oben) [44]. Dieses aktivierte Fluorbenzoesäurederivat

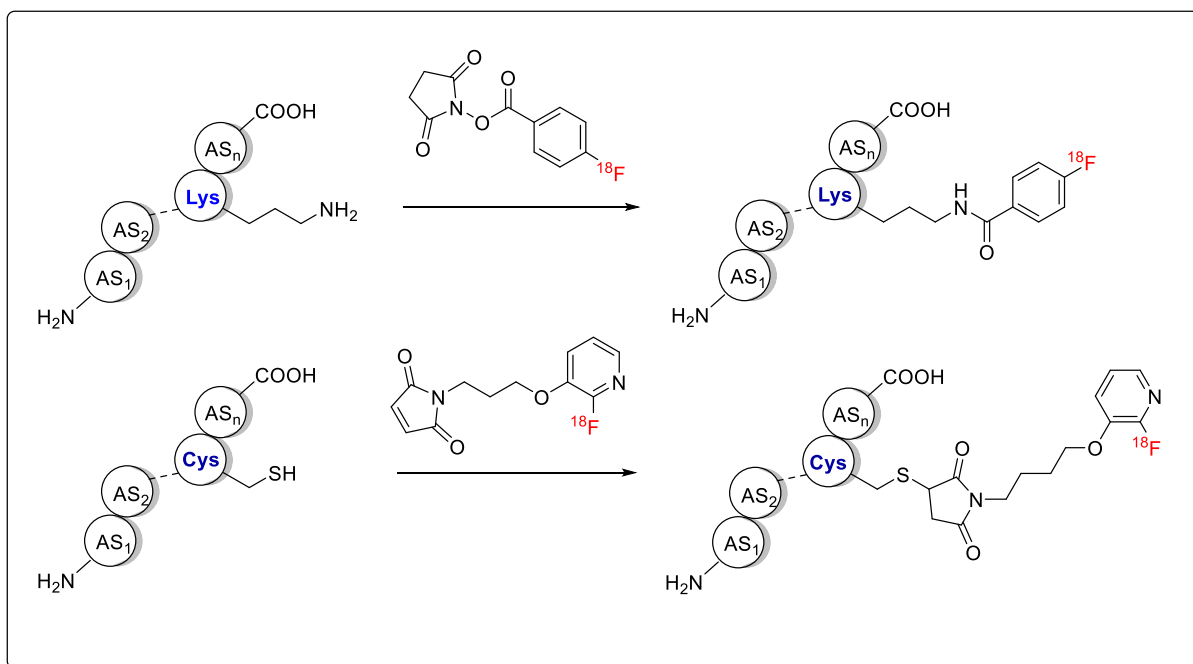


Abb. 9: Nicht selektive indirekte Radiomarkierung am Beispiel des Amin-reaktiven [^{18}F]SFB (oben) sowie des Thiol-reaktiven [^{18}F]FPyMe (unten)

wurde 1991 von Vaidanathan und Zalutsky erstmalig vorgestellt [45]. Die ursprüngliche Synthese verlief über 3 Stufen in 100 Minuten mit einer moderaten RCA von 25 % und wurde darauf folgend ständig weiterentwickelt. Zuerst verwendet wurde [^{18}F]SFB zur Markierung eines monoklonalen Antikörpers mit 40-60 % Ausbeute. Die Konjugation verläuft unter ausreichend milden Bedingungen, um die Integrität des Antikörpers zu erhalten. Daher konnte der Tracer erfolgreich für *in vivo* Untersuchungen eingesetzt werden. Peptide können zwischenzeitlich mittels [^{18}F]SFB routinemäßig markiert werden. So wird in der Literatur die vollautomatische Synthese eines [^{18}F]SFB-markierten RGD-Peptids auf einem kommerziell erhältlichen Synthesemodul beschrieben [46]. Aufgrund des breiten Anwendungsspektrums von [^{18}F]SFB wurden weitere, leichter zugängliche ^{18}F -markierte Aktivester entwickelt. Der analog reagierende [^{18}F]Fluornikotinsäure-tetrafluorphenylester ([^{18}F]F-Py-Tfp) lässt sich beispielsweise mit 60-70 % Ausbeute in einer einstufigen Synthese in lediglich 10 Minuten Reaktionszeit deutlich effizienter produzieren und mit Kopplungsausbeuten von >90 % an Peptid-Modellverbindungen konjugieren [47]. Problematisch bleibt, wie oben beschrieben, die häufig geringe Regioselektivität der Amin-reaktiven Synthese.

Im Gegensatz zu Aminen kommen Thiole ausschließlich in Form von Cystein-Resten in Biomolekülen vor. Daher erlauben thiolreaktive prosthetische Gruppen eine chemoselektive Radiomarkierung. In kleineren Peptiden ist aufgrund der relativen Seltenheit von Cystein oft nur ein einzelnes Cystein vorhanden oder kann andernfalls selektiv als Modifikation

hinzugefügt werden. In diesem Fall läuft die Konjugation sogar vollständig regioselektiv ab. Thiole sind starke Nukleophile und können beispielsweise durch Michael-Addition oder S-Alkylierung unter Ausbildung von Thioethern konjugiert werden. Im Fall der Michael-Addition stellen Maleimide die reaktivsten Michael-Akzeptoren dar [48]. Daher basiert eine Vielzahl von prosthetischen Gruppen insbesondere auf der Maleimid-Leitstruktur (s. Abb.9), angefangen 1989 mit der Synthese von 1-(4-[¹⁸F]Fluorphenyl)-pyrrol-2,5-dion ([¹⁸F]TPPD) und N-[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydropyrrol-1-yl)-phenyl]-4-[¹⁸F]fluorbenzamid ([¹⁸F]DDPFB) und die Konjugation von letzterem an ein Fab'-Antikörperfragment [49]. Neben einer Vielzahl von Maleimid-basierten Synthonen wurden alternativ Michael-Akzeptoren in Form von Vinylsulfonen wie [¹⁸F]DEG-VS sowie Methylsulfonoxadiazole ([¹⁸F]FPOS) oder Bromacetamid-Derivate als Bausteine zur Markierung mittels nukleophiler Substitution entwickelt. Eine (unvollständige) Auswahl von Thiol-reaktiven prosthetischen Gruppen ist in zusammengefasst.

Tabelle 2: Thiol-reaktive prosthetische Gruppen [49-57]

	Publikation	Herstellung Synthon			Konjugation		
		HPLC-Reinigung	Stufen	Dauer	RCA		
<u>Maleimide</u>							
[¹⁸ F]TPPD	Shiu, 1989	ja	4	100 min	ca. 15%	-	-
[¹⁸ F]DDPFB	Shiu, 1989	ja	3	70 min	ca. 10%	-	50%
[¹⁸ F]FBEM	Cai, 2006	ja	3	150 min	13 ± 5 %	20 min	90%
[¹⁸ F]FDG-MHO	Wüst, 2008	ja	3 ^a	85 min	23 - 35 %	10 min	38-95 %
[¹⁸ F]FBAM	Kapty, 2011	ja	2	40 min	29 ± 4 %	20 -60 min	> 95 %
[¹⁸ F]BAMPy	Moore, 2015	ja	2	80 min	20%	80 min	30%
[¹⁸ F]FPyMe	Cavani, 2016	ja	2	60 min	20 - 25 %	60 min	64 - 75 %
<u>Andere</u>							
N-(4-[¹⁸ F]fluorobenzyl)-2-bromoacetamide	Koslowsky, 2008	ja	3	60 min	4%	30 min	36%
[¹⁸ F]DEG-VS	Wu, 2014	ja	1	35 min	35 ± 6 %	35 min	95%
[¹⁸ F]FPOS	Chiotellis, 2016	nein	1	60 min	27 ± 6 %	15 min	quant.

a: Incl. [¹⁸F]FDG-Synthese, basierend auf 60 % RCA / 40 min b: geschätzte Synthesedauer mit optimaler ¹⁸F-Trocknung

Anhand dieser Aufstellung werden die beiden größten Schwachpunkte der thiolreaktiven Synthone deutlich. Obwohl in vielen Fällen die Konjugation schnell und mit zufriedenstellenden Ausbeuten verläuft, ist einerseits die RCA des radiomarkierten Maleimids

selbst bei modernen Synthesewegen gering und die Synthese zumeist mehrstufig und langwierig. Die schlechte Verfügbarkeit des Synthons schränkt daher die effektive Ausbeute des finalen Tracers deutlich ein. Zudem erfordert die überwiegende Mehrheit der Reaktionen eine HPLC-Reinigung des Synthons nach der Radiofluorierung, was aus praktischer Sicht aufwändig und damit zu Syntheseverlusten führt.

Eine im Zuge dieser Arbeit aufgegriffene Neuerung stellt die palladiumkatalysierte S-Arylierung dar. Erste Reaktionen dieser Art sind seit 1979 bekannt [58]. Das synthetische Konzept konnte 2014 von der Arbeitsgruppe Buchwald zur Cystein-Biokonjugation unter milden Bedingungen eingesetzt werden [59]. Darauf aufbauend konnte die Arbeitsgruppe Messaoudri zeigen, dass die von Buchwald entwickelten Aminobiphenyl-basierten (Prä-)Katalysatoren [60] sich zur äußerst effizienten S-Arylierung von Thiozuckern, Peptiden und Proteinen eignen [61,62]. Die Methode wurde 2018 von Omrane erstmals zur Radiomarkierung von kleinen, cysteinhaltigen Biomolekülen mit [^{18}F]Fluoriodpyridin ([^{18}F]FIPy) angewendet [63]. Die Herstellung des [^{18}F]FIPy erfolgt schnell, in guter RCA von ca. 70 % und erfordert keine HPLC-Reinigung. Die anschließende Konjugation an Cystein bzw. das cysteinhaltige Pseudopeptid Glutathion lieferte in vielen Fällen praktisch quantitative RCU. Untersuchungen eines mit [^{18}F]FIPy markierten Tracers zeigten, dass das Konjugat *in vivo* stabil war. Die Methode stellt somit eine attraktive Alternative zu bestehenden thiol-reaktiven Strategien dar.

1.3.4.2 Indirekte Radiomarkierung modifizierter Biomoleküle

Neben den genannten Verfahren gibt es eine Reihe von chemoselektiven Konjugationsreaktionen mittels in biogenen Molekülen abwesender funktionellen Gruppen. Dieser Ansatz erfordert daher im Vorfeld eine (möglichst selektive) Funktionalisierung des Biomoleküls. Beispiele möglicher Modifikationen und der dazu gehörenden Markierungsbausteine sind in Abb. 10 abgebildet.

Zur indirekten Radiomarkierung von Biomolekülen hat die Cycloaddition von Aziden oder Alkinen die höchste Popularität erlangt [64]. Obwohl dieser Reaktionstyp bereits 1963 entdeckt wurde [65], fand er lange Zeit wenig Beachtung aufgrund der langen Reaktionszeiten und hohen Reaktionstemperaturen. Erst die voneinander unabhängige Entwicklung einer milden und rasch

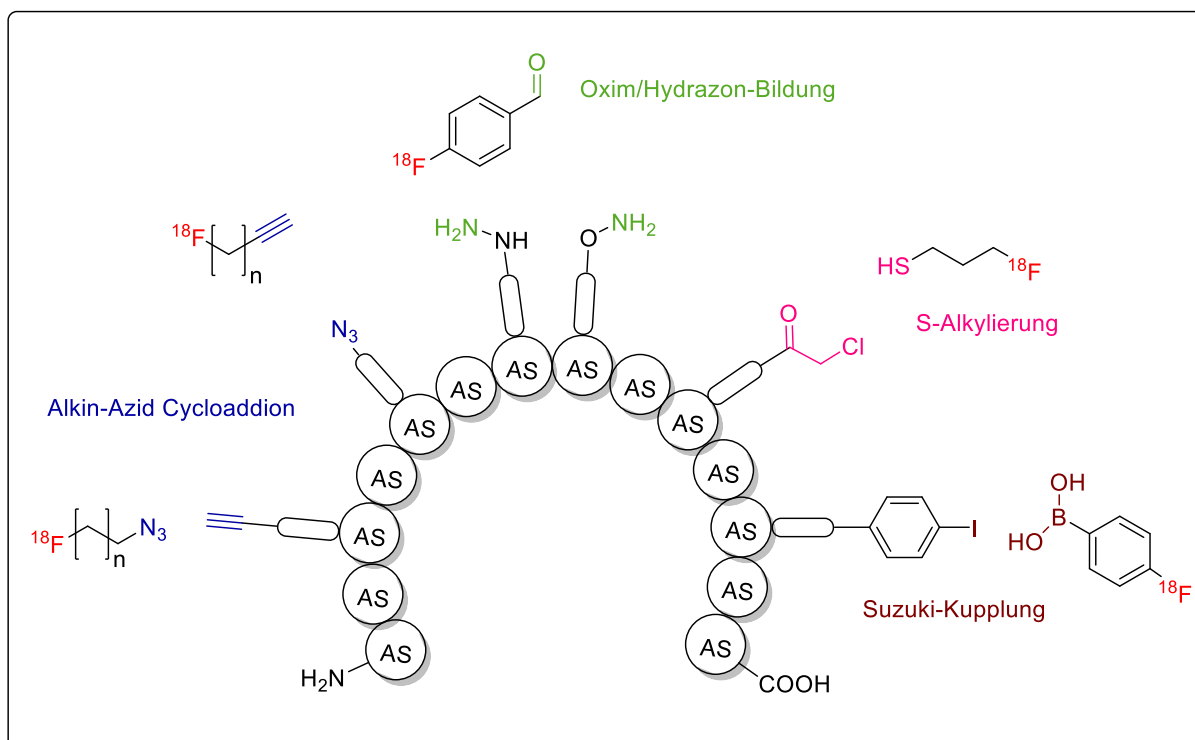


Abb. 10: Chemoselektive indirekte Radiofluorierung von funktionalisierten Peptiden.

verlaufenden kupferkatalysierten Variante 2002 durch Sharpless [66] und Meldal [67] ermöglichte ihren Einsatz in der Biochemie. Die Reaktion entspricht den von Sharpless aufgestellten Kriterien der „Click-Chemie“ [68]. Damit sind äußerst effiziente Reaktionen gemeint, die beispielsweise unter hoher Triebkraft und Atomeffizienz hohe Ausbeuten mit wenig Nebenprodukten liefern, sich leicht reinigen lassen und vorzugsweise in Wasser stattfinden. Die Kupferkatalysierte 1,3-dipolare Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) ist der bekannteste Vertreter dieser Klasse und wird daher fälschlich oft einfach als „die“ Click-Reaktion bezeichnet. Da das durch Verknüpfung gebildete Triazol *in vivo* stabil ist, fand die Reaktion schnell erstmalig Eingang in die Radiochemie zur Konjugation von ^{18}F -markierten Alkinen mit Azid-funktionalisierten Peptiden mit RCA von 54-99 % [69]. Im umgekehrten Fall ist die Konjugation von ^{18}F -markierten Aziden an alkinfunktionalisierte Peptide ebenfalls möglich. Die Methode wird permanent weiter entwickelt. Auf den Zusatz des potentiell giftigen Kupferkatalysators kann beispielsweise durch reaktive 1,3-Dipole wie Nitriloxide oder durch unter Ringspannung stehende Cyclooctinderivate verzichtet werden [70,71].

Bereits vor dem Aufkommen der Click-Reaktion wurde nach möglichst einfachen, 2-stufigen Markierungsstrategien gesucht. Zwei miteinander eng verwandte Verfahren, basierend auf der Konjugation von [^{18}F]Fluorbenzaldehyd ([^{18}F]FB-CHO), wurden 2004 vorgestellt. Dieses Synthon lässt sich in einer einstufigen Synthese in guten RCA von 52-77 % herstellen und ohne

aufwändige HPLC isolieren. Die anschließende Kopplung mit Aminoxy-funktionalisierten Peptiden unter Bildung eines Oxims liefert radiomarkierte RGD- sowie Octreotid-Derivate innerhalb von 15 Minuten bei 60 °C in Ausbeuten von 70-90 % [72]. Der benötigte pH-Wert von 2-3 und die erhöhte Temperatur stellen jedoch eine Einschränkung für sensible Biomoleküle dar. Die analoge Reaktion mit Hydrazid-funktionalisierten Vorläufern unter Ausbildung eines Hydrazons erfolgt hingegen bei neutralem pH und ist bei Raumtemperatur möglich, wobei die besten Ausbeuten ebenfalls bei 60 °C beobachtet wurden. BSA sowie ein RGD-Derivat konnten mit dieser Methode in ca. 90 % Ausbeute markiert werden [73,74]. Die mittels beider Methoden erhaltenen Konjugate waren *in vivo* stabil. Bemerkenswerterweise erlaubt eine Modifikation der Biomoleküle mit Hydrazinonicotinsäure (HINIC) sowohl eine ¹⁸F-Markierung mit [¹⁸F]FB-CHO als auch eine Markierung mit ^{99m}Tc, so dass dieser Rest sowohl zur Herstellung eines PET- als auch SPECT-Tracers geeignet ist [75].

Für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist die Konjugation mittels palladiumkatalysierter Kreuzkupplungsreaktionen. Dazu wird üblicherweise 4-[¹⁸F]Fluorbrombenzol bzw. das homologe 4-[¹⁸F]Fluoriodbenzol ([¹⁸F]FIB) eingesetzt. Dieser Ansatz kann als allgemeine Methode zur milden und effizienten Einführung der [¹⁸F]Fluorphenyl-Gruppe betrachtet werden [76]. Die Vielseitigkeit von Kreuzkupplungen macht diesen Reaktionstyp auch für die Radiochemie interessant. Beispiele zur Synthese von ¹⁸F-markierten Tracern mittels Kreuzkupplungen von [¹⁸F]FIB sind die Stille-Kupplung [77], die Suzuki-Kupplung [78], die Hartwig-Buchwald-Kupplung [79] sowie die Sonogashira-Kupplung [80] (Abb. 11). In der Regel wurde [¹⁸F]FIB zur Synthese von kleinen Molekülen eingesetzt. Eine Ausnahme bildet die Radiomarkierung eines Bombesin-Peptides mit [¹⁸F]FIB mittels der Sonogashira Reaktion [81]. Ein umgekehrtes Schema wurde durch Modifikation von Peptiden mit der iodhaltigen unnatürlichen Aminosäure 4-Iodphenylalanin und anschließender Suzuki-Kupplung mit 4-[¹⁸F]Fluorphenylboronsäure gezeigt (Abb.10) [82].

Für die Synthese von [¹⁸F]Fluoriodbenzol steht eine Reihe verschiedener Substitutionsreaktionen zur Verfügung. Allerdings kommt der Abtrennung von iodhaltigen Nebenprodukten hierbei eine besondere Bedeutung zu, da diese sonst ebenfalls als Konjugationspartner fungieren und somit durch die strukturell enge Verwandtschaft die finale Isolierung des Tracers erschweren. Eine effiziente Synthese ist ausgehend von Triarylsulfoniumsalzen möglich und liefert mit ca. 90 % nahezu quantitative Umsätze. Nachteile dieser Synthesemethode sind die lange Synthesedauer von 60 Minuten und die Bildung von Iodbenzol als Nebenprodukt, welches mittels HPLC abgetrennt werden muss [83].

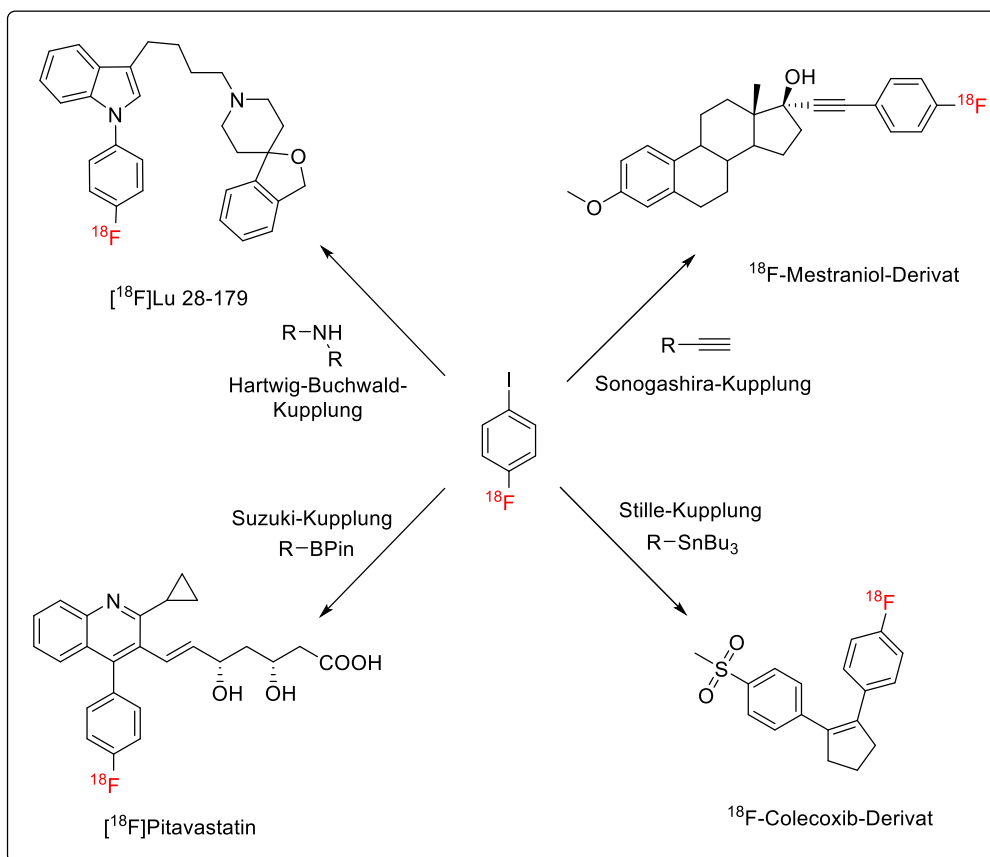


Abb. 11: Beispiele zur Synthese von Radiotraceren mittels Kreuzkupplungsreaktionen ausgehend von $[^{18}\text{F}]\text{FIB}$

Als Alternative zu $[^{18}\text{F}]\text{Fluoriodbenzol}$ wurde kürzlich $[^{18}\text{F}]\text{Fluoriodpyridin}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$) vorgestellt, das analog zu $[^{18}\text{F}]\text{FIB}$ in einer Reihe von Kreuzkupplungsreaktionen eingesetzt werden kann [63]. Ausgehend von Ammoniumvorläufern werden ca. 70 % RCA innerhalb von lediglich 20 Minuten erhalten. Der entscheidende Vorteil in der Herstellung dieses Bausteins liegt darin, dass dieser schnell und einfach mittels Festphasenextraktion isoliert werden kann. Dadurch kann es in hoher radiochemischer Reinheit erhalten und anschließend direkt zur Markierung kleiner Biomoleküle eingesetzt werden.

Eine völlig neue Klasse an Radiomarkierungsbausteinen stellen Fluorvinylidoniumsalze dar. Aus der organisch-präparativen Chemie ist bekannt, dass sich diese hypervalenten Iodverbindungen anstelle von Halogeniden in Kreuzkupplungen verwenden lassen. Die synthetische Darstellung erfolgt durch die nukleophile Addition von Fluorid an alkinsubstituierte Iodoniumsalze, wobei sich selektiv das jeweilige Z-Isomer bildet. Als Fluoridquelle dient dabei üblicherweise Flusssäure in hohem Überschuss [84]. In einer für radiochemische Anwendungen wegweisenden Arbeit konnten erfolgreich Alkalimetallfluoride in substöchiometrischen Mengen Flusssäure ersetzen [85]. Durch eine umfangreiche Weiterentwicklung dieses Ansatzes wurden in einer vorangegangenen Arbeit erstmalig ^{18}F -markierte Fluorvinylidoniumsalze

ausgehend von den etablierten Systemen $K[2.2.2]^{18}F$ sowie $TBA^{18}F$ dargestellt [85]. Dabei war die Verwendung von wässrigen organischen Lösungsmitteln ausschlaggebend für eine erfolgreiche Radiomarkierung. Beste Ausbeuten wurden in DMSO als organischem Lösungsmittel erhalten, wobei eine starke Abhängigkeit der Ausbeute vom Wasseranteil mit einem Maximum bei circa 30 % beobachtet wurde. Dies steht bemerkenswerterweise in starkem Widerspruch zu den zuvor beschriebenen konventionellen Methoden, welche in aller Regel zur Knüpfung einer ^{18}F -Kohlenstoff-Bindung strikt wasserfreie Bedingungen erfordern. Folglich können Radiomarkierungsreaktionen direkt ausgehend von dem bestrahlten $[^{18}O]$ Wasser durchgeführt werden, ohne $[^{18}F]$ Fluorid vorher aufwändig durch Fixierung und anschließende azeotrope Trocknung vorzubereiten. Dies vereinfacht und beschleunigt die Markierungsreaktion erheblich.

Aus insgesamt neun untersuchten Iodoniumsalzen mit unterschiedlichen Substituenten an der Dreifachbindung, am Arylrest sowie unterschiedlicher Gegenionen wurde schließlich das *n*-Butyl substituierte 2- $[^{18}F]$ Fluorhex-1-en-1yl(phenyl)iodoniumtosylat ($[^{18}F]FHexI^+$) zur Verwendung als neues Synthon zur Radiomarkierung ausgewählt. Der unverzweigte *n*-Butylrest lieferte die besten RCA und ermöglichte gleichzeitig eine effiziente Abtrennung des Markierungsproduktes nach der Konjugation. Tosylat als Gegenion zeigte dabei die höhere Stabilität und bedeutend bessere molare Aktivitäten verglichen mit dem Tetrafluoroborat. Durch die direkte Verwendung von bestrahltem $[^{18}O]$ Wasser konnte unter den optimierten Bedingungen $[^{18}F]FHexI^+$ innerhalb von lediglich 10 Minuten Synthesezeit mit 60 % RCA erhalten werden.

Auch wurde in dieser Arbeit als Proof of Principle die Konjugation von $[^{18}F]FHexI^+$ mittels einer Kreuzkupplungsreaktion untersucht. Dazu wurde das Synthon in einer Sonogashira-Kupplung mit Hex-1-in gekoppelt (Abb. 12). Im Gegensatz zu anderen Synthonsen musste $[^{18}F]FHexI^+$ nach dem Markierungsschritt nicht isoliert werden. Die Konjugation wurde stattdessen als Eintopfreaktion direkt im Reaktionsgemisch der ersten Stufe durchgeführt und verlief dabei rasch bei Raumtemperatur. Die milden Reaktionsbedingungen der Sonogashira-Kupplung erscheinen grundsätzlich sehr gut auf die Markierung von Biomolekülen übertragbar zu sein. Falls die Methode von der äußerst einfach aufgebauten Hexin-Modellverbindung auf hochfunktionalisierte Moleküle transferiert werden kann, ergäbe sich daraus ein bemerkenswert einfaches Markierungsprotokoll für Biomoleküle direkt ausgehend von wässrigem $[^{18}F]$ Fluorid. Durch die Vielseitigkeit von Kreuzkupplungsreaktionen ergeben sich zudem weitere Möglichkeiten für die Konjugation von ^{18}F -markierten Iodoniumsalzen.

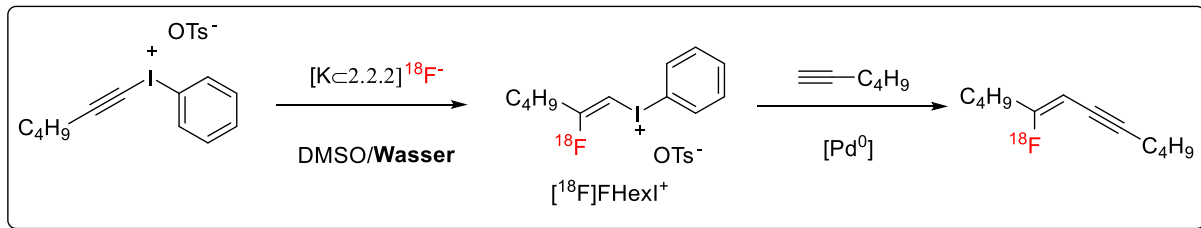


Abb. 12: Radiomarkierung von $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ und anschließende Konjugation mittels Sonogashira-Kupplung

1.4 Biologische Targets in der molekularen Bildgebung

Wichtige biologische Prozesse, welche zur molekularen Bildgebung eingesetzt werden, sind beispielweise der mittels $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ verfolgbare Metabolismus von Glukose, der aktive Transport von Aminosäuren wie beispielsweise $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ oder der mit $[^{18}\text{F}]\text{FDOPA}$ visualisierbare Dopaminhaushalt. Im Folgenden sollen zwei bisher unerwähnte, jedoch für diese Arbeit besonders relevante biologische Zielstrukturen näher erläutert werden.

1.4.1 PSMA

Bei dem **p**rostataspezifischen **M**embranantigen (PSMA) handelt es sich um ein membrangebundenes Glykoprotein mit der Funktion einer Carboxypeptidase. PSMA katalysiert die Abspaltung von C-terminalen Glutaminsäureresten, Substrate sind beispielsweise der Neurotransmitter N-Acetyl-aspartyl-glutamat (NAAG) oder Folsäurepolyglutamat. Je nach Kontext findet sich daher auch die Bezeichnung Glutamatcarboxypeptidase II, NAAG Peptidase oder Folat-Hydrolase [86,87]. Namensgebend für PSMA ist die hohe Expression im Prostatagewebe. Im Prostatakarzinom (PCa), der zweithäufigsten krebbedingten Todesursache bei Männern [88], ist die Enzymaktivität im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe noch einmal bis zu 10-fach höher [89]. Daher eignet sich PSMA als Biomarker für diese Erkrankung und ermöglicht eine Prognose des Krankheitsverlaufs [90].

Mit dem Ziel, durch Modulation der Glutamatfreisetzung neuroprotektive Wirkstoffe zu finden, wurde nach hochaffinen niedermolekularen Leitstrukturen als Inhibitoren für PSMA gesucht. Durch Untersuchung der Struktur-Aktivitätsbeziehung wurde so ausgehend vom NAAG als natürlichem Substrat zunächst das in Abb. 13 gezeigte Phospinat und letztlich die Glu-C(O)-X

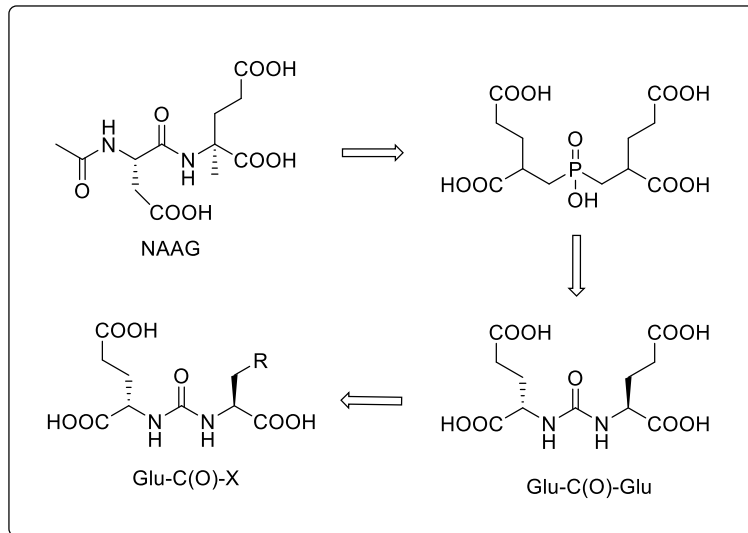


Abb. 13: Rationales Design von PSMA-Inhibitoren

Leitstruktur durch Kozikovski et al. identifiziert [91,92]. Unter den untersuchten Verbindungen zeigte Glu-C(O)-Cys dabei die höchste Hemmung.

Frühe Tracer zur Bildgebung von PSMA mittels SPECT basierten auf Antikörpern, die mit langlebigen Nukliden wie ^{131}I oder ^{111}In markiert wurden [93]. Diese wiesen jedoch wie für Antikörper typische träge Pharmakodynamik auf. Zur Bildgebung von PSMA mittels PET haben sich in den vergangenen Jahren aufgrund der idealen Zerfallseigenschaften ^{18}F -markierte Radiotracer zunehmend durchsetzen können [94]. Der erste ^{18}F -markierte PSMA-Tracer, [^{18}F]DCFBC basierte noch auf der von Kozikovski gefundenen Glu-C(O)-Cys Leitstruktur [95]. Der überwiegenden Mehrheit der Tracer der „2.Generation“ liegt jedoch die Glu-C(O)-Lys Leitstruktur zugrunde, wie etwa bei [^{18}F]DCFPyL, dem ersten klinisch etablierten ^{18}F -Tracer für PSMA [96]. Lysin ermöglicht einerseits eine einfache, aber stabile Modifikation über sein Seitenkettenamin, andererseits kann durch die längere und flexiblere Kohlenstoffkette die zumeist hydrophobe Modifikation der Seitenkette besser mit einer hydrophoben Bindungstasche in der Nähe der Glutamat-Bindungsstelle des PSMA interagieren, wodurch sich die Bindungseigenschaften verbessern [97]. Neben der Bildgebung dient PSMA ebenfalls als Zielstruktur für die Radionuklidtherapie. Das Enzym internalisiert den Tracer analog zum strukturell verwandten Transferrin-Rezeptor [98], so dass das Glu-C(O)-Lys Pharmakophor in Kombination mit dem Therapienuklid ^{177}Lu zur Behandlung des PCa eingesetzt werden kann [99].

1.4.2 Proteinaggregation und Neurodegeneration

Neurodegenerative Erkrankungen sind durch ein fortschreitendes Absterben von Neuronen sowie der pathologischen Ablagerung von Proteinen charakterisiert [100]. Die aus fehlgefalteten Proteinen bestehenden Aggregate liegen zumeist in β -Faltblatt-Konformation vor. Neurodegenerative Erkrankungen lassen sich anhand ihrer klinischen Symptome, wie dem Grad des kognitiven Abbaus oder motorischer Störungen einteilen. Eine weitere Möglichkeit zur Klassifizierung geht von der molekularen Pathologie aus. So lassen sich die Proteinaggregate des Tau-Proteins, β -Amyloids ($A\beta$) oder α -Synucleins unterscheiden. Bei der pathologischen Veränderung spricht man entsprechend von Tauopathie, Amyloidose oder α -Synucleinopathie [100]. Zu den neurodegenerativen Erkrankungen, die mit fehlgefalteten Proteinen verbunden sind, zählen beispielsweise die Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-Krankheit sowie amyotrophe Lateralsklerose (ALS) oder Prionenerkrankungen.

Die häufigste neurodegenerative Erkrankung stellt die Alzheimer-Krankheit dar. Sie ist gleichzeitig auch die häufigste Ursache für Demenz. Der Name geht auf Alois Alzheimer zurück, der 1907 erstmals einen Zusammenhang von (nach damaliger Definition) präseniler Demenz und pathologischen Veränderungen des Gehirns beschrieb [101]. Die Erkrankung zeichnet sich durch einen häufig erst spät einsetzenden Verlust der kognitiven Fähigkeiten aus. Insbesondere eine Orientierungslosigkeit in Raum und Zeit sind ein typisches Symptom, zudem ist etwa Sprache, Erinnerung und das Erkennen von Gegenständen und Personen beeinträchtigt [102]. Die Zahl der Erkrankten wurde für 2012 weltweit auf etwa 24 Millionen geschätzt. Zudem wird vermutet, dass sich diese Zahl bis 2040 etwa alle 20 Jahre verdoppeln wird [103].

Die Ursache für die Alzheimer-Krankheit ist Gegenstand intensiver Forschung, jedoch bisher nicht genau bekannt. Sicher ist, dass an der krankhaften Veränderung zwei Proteine beteiligt sind. Zum einen lagert sich innerhalb der Zelle hyperphosphoryliertes Tau-Protein in Form sogenannter neurofibrillärer Bündel (tangles) ab. Unabhängig davon bilden sich im Zellzwischenraum charakteristische Ablagerungen aus β -Amyloid. Diese Plaques genannten Ablagerungen sind das bekannteste Merkmal der Alzheimer-Krankheit und galten seit der Einführung der Amyloid-Kaskaden-Theorie vor 25 Jahren lange Zeit als ursächlich für die Erkrankung [104]. β -Amyloid Peptide werden durch das Zusammenspiel mehrerer Enzyme, sogenannter Sekretasen, aus dem Amyloid-Precursor-Protein (APP) freigesetzt. APP ist ein Transmembranprotein, dessen biologische Funktion nicht vollständig aufgeklärt ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass aus APP mithilfe von α -Sekretase erzeugte lösliche Proteine

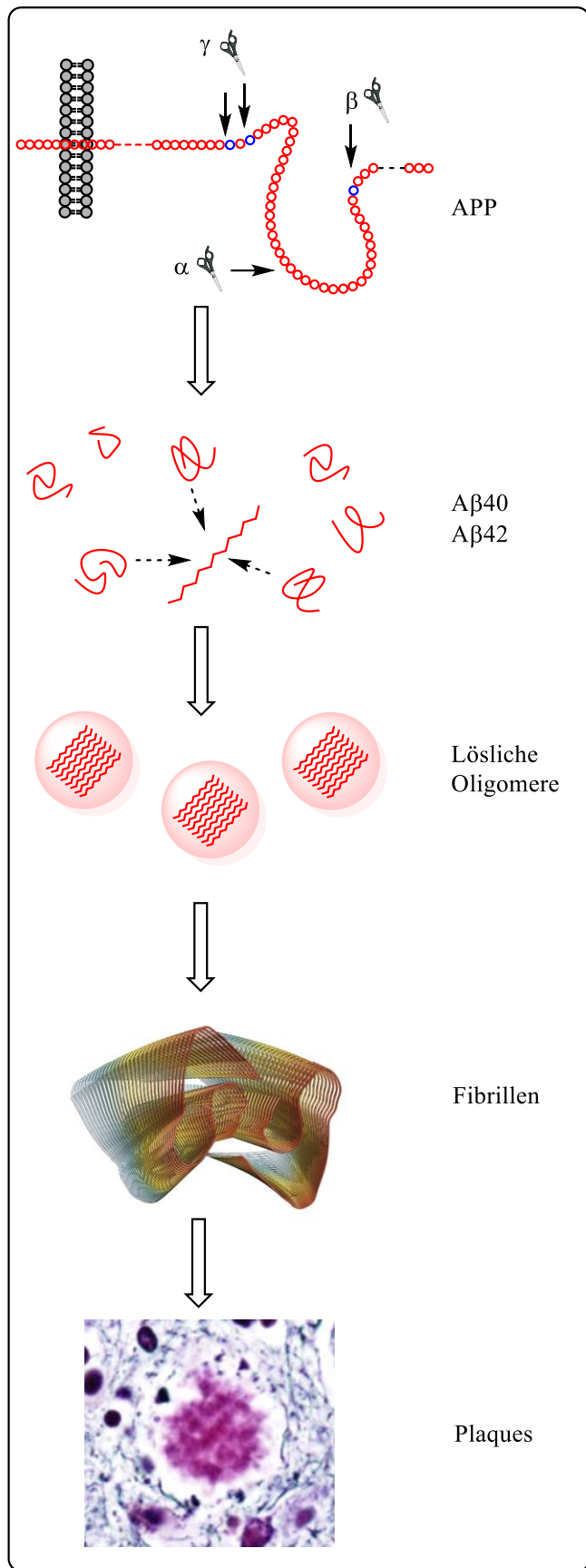


Abb. 14: Grundlegendes Schema der möglichen Aggregation von Beta-Amyloid

(sAPP α) vermehrt nach einem Hirntrauma erzeugt werden und neuroprotektive Eigenschaften aufweisen [105]. Da die α -Sekretase innerhalb der A β -Sequenz das Protein spaltet, wird dies als nicht-amyloidogener Pfad beschrieben. Dementgegen steht der amyloidogene Pfad, wobei unter Beteiligung von β -Sekretase und γ -Sekretase, Beta-Amyloid mit 40 (A β 40) beziehungsweise 42 (A β 42) Aminosäuren erzeugt wird.

Durch Aggregation mehrerer dieser Peptide werden metastabile Stapel aus β -Faltblatt-Strukturen gebildet, sogenannte Oligomere. Dieser Prozess ist konzentrationsabhängig, jedoch auch noch nicht vollständig verstanden [106]. Einmal gebildete Aggregate wirken jedoch als Kristallisationskerne für weitere Aggregation und erleichtern diese darauffolgend. Durch die Ansammlung großer Mengen Amyloids bilden sich schließlich Plaques als unter dem Mikroskop mit histologischen Methoden sichtbare Strukturen. Entgegen der langjährigen Meinung zeigen neuere Ergebnisse allerdings mehr und mehr, dass diese Plaques nicht die Ursache für die Alzheimer-Krankheit sind, sondern vermutlich nur ein weiteres Symptom darstellen. Beispielsweise korreliert die

Menge der Plaques nicht mit der Schwere der kognitiven Defizite. Stattdessen werden lösliche Oligomere als toxische Zwischenstufe des Aggregationsprozesses in den Fokus gerückt und für den Neuronenverlust verantwortlich gemacht. Durch ihre in Zellexperimenten nachgewiesene Neurotoxizität könnten sie eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit einnehmen [107].

1.5 All-D Peptide

Vor dem Hintergrund des hohen gesellschaftlichen Schadens, der finanziellen Last für das Gesundheitswesen von geschätzt mehr als 1 Milliarde US-Dollar und der stark steigenden Prognose der Inzidenz der Alzheimer-Krankheit ist es nicht überraschend, dass die Erforschung dieser Erkrankung einen hohen Stellenwert einnimmt. Trotz intensiver Forschung ist es aber bisher nicht gelungen, Therapien zu entwickeln, die den Fortschritt der Erkrankung aufhalten oder sogar vollständig zum Stillstand bringen können. Neben der rein symptomatischen Therapie, beispielsweise mittels Cholinesterasehemmern oder NMDA-Rezeptor Antagonisten, lassen sich die Amyloid-adressierenden kausalen Therapieansätze in drei grundlegende Strategien einteilen: (i) Eine reduzierte Produktion von A β , beispielsweise durch Modulation der beteiligten Sekretasen, (ii) eine erhöhte Eliminierung von gebildetem A β und (iii) Unterbinden der Aggregation von A β oder Destabilisierung von Oligomeren [103]. Dabei haben peptidbasierte Therapieoptionen an Bedeutung gewonnen. Problematisch ist bei den natürlicherweise aus L-Aminosäuren aufgebauten Peptiden die geringe *in vivo* Stabilität aufgrund enzymatischer Spaltung durch Proteasen. Andererseits sind aus D-Aminosäuren aufgebaute Peptide stabil gegenüber diesem Abbau [108]. Daher stellen vollständig aus D-Aminosäuren aufgebaute Peptide, sogenannte all-D Peptide, besonders attraktive Targeting-Strukturen in der Wirkstoffforschung dar. Eine der Möglichkeiten zur Identifizierung peptidbasierter Liganden ist das 1990 entwickelte Phagen-Display [109]. Dazu wird eine Bibliothek aus einer Vielzahl genetisch veränderter Bakteriophagen (kurz: Phage) angefertigt. Jede einzelne Phage ist so modifiziert, dass sie ein bestimmtes Peptid auf ihrer Oberfläche trägt (präsentiert). Aus dieser Bibliothek können aus der Vielzahl der Phagen jene isoliert werden, welche mit ihrem präsentierten Peptid eine affine Bindung an das Zielprotein ausbilden. Aus dem Genom der Phage kann anschließend die Sequenz des präsentierten affinen Peptids bestimmt werden.

Eine Phage kann jedoch immer nur die natürlichen L-Peptide präsentieren, somit werden auch nur L-Peptide als Liganden erhalten. Um D-Peptide zu selektieren, wurde die Methode daher zum Spiegelbild-Phagen-Display weiterentwickelt (Abb. 15) [108]. Dazu wird zunächst das Spiegelbild des Zielproteins (D-Protein) synthetisiert und im Anschluss ein natürliches L-Peptid als affiner Ligand erhalten. Unter der Annahme, dass keine weiteren chiralen Kofaktoren zur Bindung beitragen, muss im umgekehrten Fall der gespiegelte D-Ligand affin für das ursprüngliche Zielprotein sein.

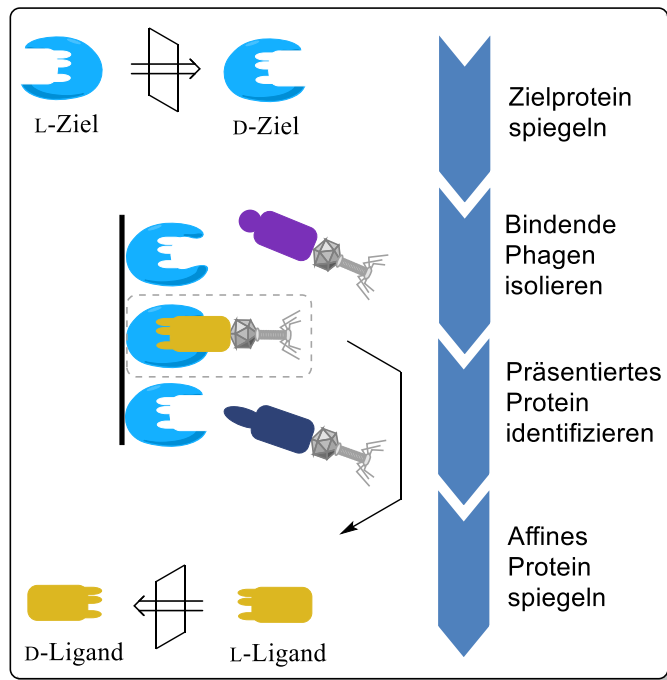


Abb. 15: Funktionsprinzip des Spiegelbild-Phagen-Displays

Mithilfe des Phagen-Displays mit $A\beta_{42}$ als Target wurden mehrere affine all-D Peptide identifiziert, angefangen 2003 mit D-Pep (später D1 genannt) [110,111]. Vorläufiger Endpunkt war das argininreiche Peptid D3. Dessen Bindungseigenschaften wurden zunächst *in vitro* und *in vivo* anhand fluoreszenzmarkierter Derivate untersucht [112]. Dabei zeigte sich, dass D3 an Plaques, bestehend aus $A\beta_{42}$, bindet, nicht jedoch an diffuse Amyloidablagerungen, welche überwiegend aus $A\beta_{40}$ aufgebaut sind.

Neben den reinen Bindungseigenschaften ist die Penetration der Blut-Hirn-Schranke (BHS) eine weitere Voraussetzung, damit der Tracer *in vivo* seinen mutmaßlichen Wirkort im zentralen Nervensystem erreicht. D3 war in *in vitro*-Versuchen in der Lage, ein Modell der BHS zu durchdringen. Als wahrscheinlicher Mechanismus hierfür wird ein Transport mittels adsorptionsvermittelter Transzytose vermutet [113]. Ermöglicht wird dies durch die insgesamt fünf Argininreste in der Aminosäuresequenz. Die stark basische Guanidin-Gruppe des Arginins ist unter physiologischen Bedingungen positiv geladen, somit trägt D3 eine hohe positive Nettoladung. Dieses Strukturmotiv teilt D3 mit vielen anderen Vertretern der Klasse der zellpenetrierenden Peptiden [114]. Mithilfe von Tritium-markiertem D3 konnte im Mausmodell eine rasche, wenn auch sehr geringe Aufnahme von max. 0.2 % ID/g ins Gehirn bestätigt werden [115]. Durch *in silico*-Methoden konnte zielgerichtet mittels Umstellung der

Aminosäuresequenz mit RD2 ein weiteres stark an A β -bindendes D3-Derivat entwickelt werden [116].

Noch bedeutender als der Nutzen der entwickelten all-D Peptide als molekulare Marker ist ihr therapeutisches Potential. *In vitro* wird die Bildung von A β Fibrillen unterdrückt, die Menge von löslichen Oligomeren und damit ihre zytotoxischen Eigenschaften werden reduziert [117-119]. Für D3 konnte nachgewiesen werden, dass die toxischen löslichen Oligomere in nicht toxische, hochmolekulare Proteinaggregate ohne fibrilläre Struktur überführt werden, ohne dabei die Monomerkonzentration zu erhöhen [120]. Obwohl D3 und RD2 ähnliche Affinitäten im unteren einstelligen mikromolaren Bereich aufweisen, war dieser Effekt bei RD2 noch ausgeprägter [121]. Des Weiteren konnte *in vivo* im Alzheimer-Mausmodell gezeigt werden, dass eine Behandlung sowohl mit D3 als auch RD2 zu einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten der Mäuse führte [120,121]. Somit stellen diese all-D Peptide einen aussichtsreichen Ansatz für die Therapie der Alzheimer-Krankheit dar. Dabei wird im Gegensatz zu vielen anderen Therapieansätzen nicht eine Reduktion der A β -Monomerkonzentration angestrebt. Stattdessen ist das Ziel eine Unterbrechung einer prionenartigen exponentiellen Aggregation der unausweichlich vorhandenen A β -Monomere [122]. Das Konzept befindet sich aktuell in einer klinischen Phase-II Studie zur Therapie der Alzheimer-Krankheit.

1.6 Molekulare Bildgebung bei der Alzheimer-Krankheit

Zur frühzeitigen Diagnose der Alzheimer-Krankheit kann die PET eine wertvolle Ergänzung zur gängigen klinischen Diagnose anhand (anfangs subtiler) kognitiver Defizite darstellen. Da sich einmal abgestorbene Neurone nicht regenerieren, ist der durch neurodegenerative Erkrankungen angerichtete Schaden irreparabel. Obwohl momentan keine ursächliche Behandlung der Alzheimer-Krankheit möglich ist, unterstützt eine Früherkennung die Forschung zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien, da die PET die Untersuchung von Patienten ab einem sehr frühen Krankheitsstadium ermöglicht. Somit ist die Evaluation des Therapieerfolgs über einen langen Zeitraum möglich. Für die Detektion von fehlgefalteten Proteinen stehen verschiedene Tracerklassen zur Verfügung. So unterscheidet man A β - oder Tau-selektive Tracer. Wie in Abb. 16 dargestellt reichern sich diese Tracer in Zonen mit hohem Plaque bzw. Tau-Load an. Zusätzlich sollten diese Zonen auch durch einen Hypometabolismus gekennzeichnet sein, der sich mit Hilfe einer [¹⁸F]FDG Messung abbilden lässt. In Abb. 16 kann man erkennen, dass der Hypometabolismus eng mit den Tau-Ablagerungen korreliert,

während sich die A β -Ablagerungen mehr oder weniger diffus über das gesamte Gehirn verteilen [123].

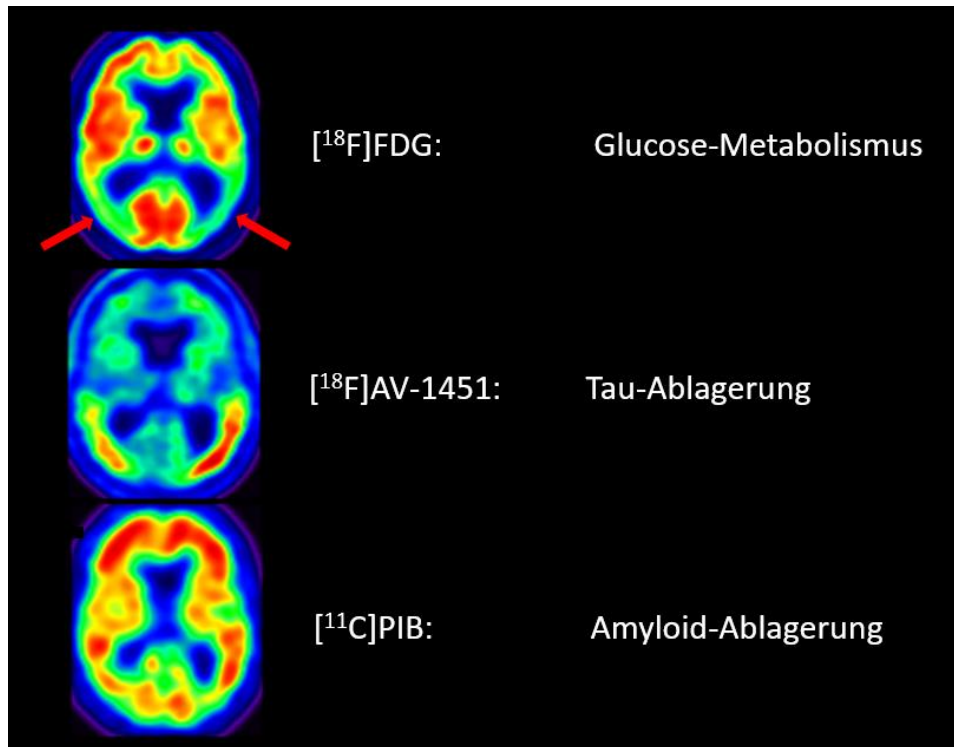


Abb. 16: Multi-Tracer PET-Studie eines Patienten mit Alzheimer-Krankheit. Die roten Pfeile markieren den Bereich des deutlichen Glucose-Hypometabolismus, der mit der Anreicherung der Tau-Tracers [¹⁸F]AV-1451 korreliert, nicht jedoch mit der diffusen Anreicherung des A β -Tracers [¹¹C]PIB. Abbildung zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Drzezga, Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Uniklinik Köln.

Zur Bildgebung von A β wurde eine Reihe von Radiotracer entwickelt, wovon drei ¹⁸F-markierte Tracer als Radiopharmaka eine Zulassung nach AMG durch das BfArM erhalten haben. Teilweise weisen diese Tracer eine Benzothiazol-Leitstruktur auf, wie beispielsweise in der [¹¹C]Pittsburgh Compound B, die als Goldstandard der Amyloid-Bildgebung angesehen werden kann [124], oder seinem ¹⁸F-markierten Analogon [¹⁸F]Flutemetamol. Beide Verbindungen sind Abkömmlinge des Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin T, welcher seit langem zur histologischen Färbung von Amyloid, beispielsweise zur post-mortem Diagnose der Alzheimer-Krankheit eingesetzt wird. Weitere erfolgreiche Tracer basieren auf der trans-Stilben Leitstruktur, welche ebenfalls eine hohe Affinität für Amyloid aufweisen [125]. Diesen Tracern ist gemeinsam, dass sie aufgrund ihrer planaren Struktur an die β -Faltblatt Strukturen in Amyloidplaques binden können [126]. Aufgrund ihrer Lipophilie weisen sie jedoch auch eine hohe unspezifische Bindung auf. Da zudem die Anzahl dieser Plaques nach neueren

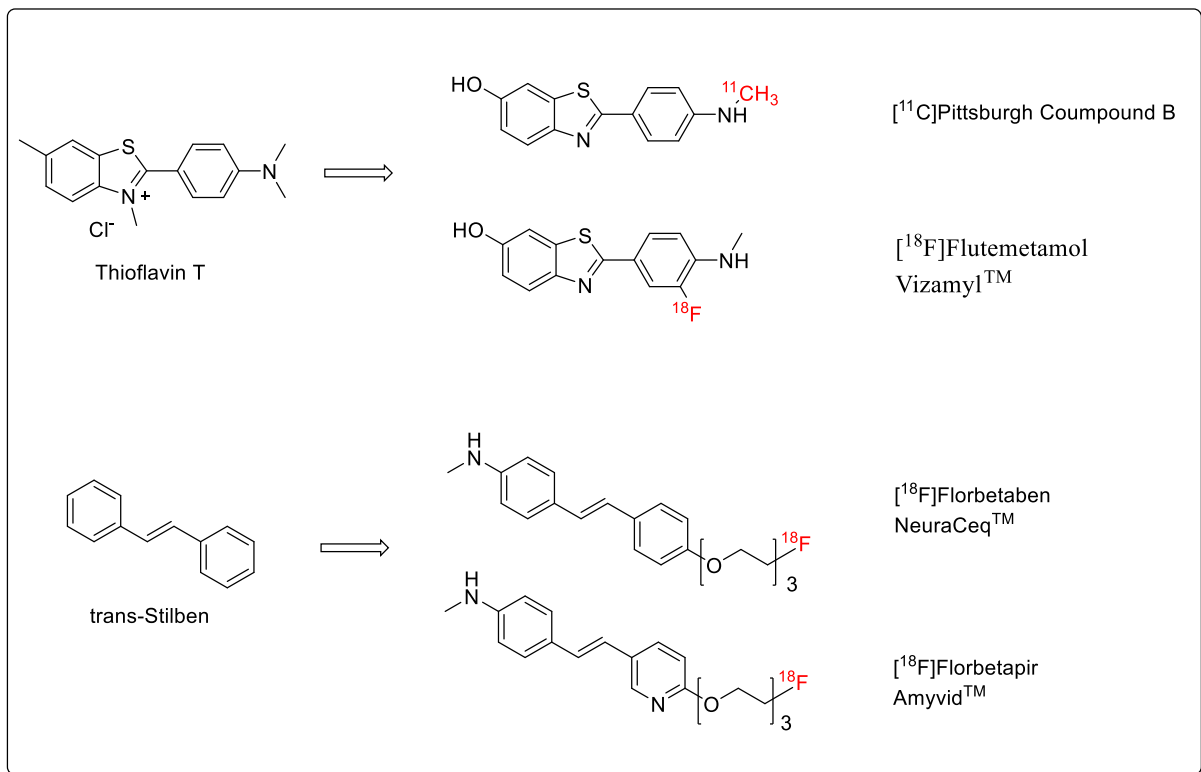


Abb. 17: Etablierte Tracer zur PET-Bildgebung von Beta-Amyloid

Erkenntnissen kein verlässliches Indiz für die Schwere der Alzheimer-Krankheit ist, sind alle diese Tracer zur Früherkennung suboptimal geeignet. Von besonderem Interesse ist daher die Möglichkeit, neurotoxische lösliche Oligomere als molekulares Target mit radiomarkierten Sonden zu erfassen. Dazu konnte zwar 2016 erstmals ein hierfür affiner Antikörper für die PET-Bildgebung innerhalb des Gehirns eingesetzt werden [127].

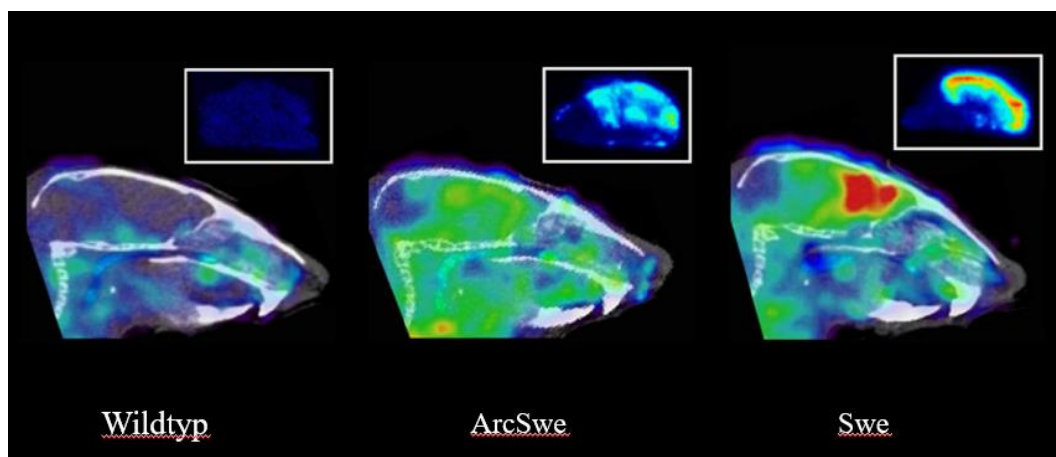


Abb. 18: PET-CT Studie sowie *ex vivo* Autoradiographie (Kasten) mit dem Antikörper-Tracer $[^{124}\text{I}]8\text{D3-F}(\text{ab}')_2\text{-h158}$ an 18 Monate alten Tieren. Links: Wildtyp (keine Traceraufnahme). Mitte und rechts: Alzheimer-Mausmodell mit der ArcSwe bzw. der Swe-Mutation sowie deutlich erkennbarer Akkumulation des Tracers. Abbildung entnommen aus [127].

Aufgrund der sehr langsamen Pharmakokinetik von Antikörpern ist dies jedoch nur mit langlebigen Positronen-Emittern möglich. Als Markierungsnuklid fungierte in diesem Fall ^{124}I mit einer Halbwertszeit von mehr als 4 Tagen und allgemein sehr unvorteilhaften Zerfallseigenschaften. ^{18}F -Markierte Tracer für A β Oligomere stehen hingegen trotz ihres großen Potentials bisher nicht zur Verfügung.

2. Zielsetzung

Die Radiomarkierung von empfindlichen Biomolekülen mit ^{18}F zur Verwendung als PET-Tracer wird häufig durch einen zweistufigen Markierungsprozess erzielt. Hierbei werden zunächst niedermolekulare Markierungsbausteine radiofluoriert. Durch Kupplungsreaktionen werden diese anschließend an eine pharmakophore Gruppe konjugiert. Diese Methoden müssen eine Reihe von Anforderungen erfüllen. Einerseits sollte die effektive Ausbeute des Markierungsbausteins hoch sein. Dies erfordert eine kurze Reaktionszeit, hohe RCA sowie eine zeitsparende Aufarbeitung. Die Konjugation an Biomoleküle sollte chemoselektiv, schnell, unter milden Reaktionsbedingungen sowie in hoher Ausbeute verlaufen.

Zwei kürzlich neu entwickelte Bausteine erscheinen hierfür sehr gut geeignet zu sein. Das neue $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ kann direkt ausgehend von bestrahltem Targetwasser mit hoher RCA markiert und anschließend mittels Kreuzkupplungsreaktionen, potentiell als Eintopfsynthese ohne jegliche weitere Reinigung, selektiv an entsprechend funktionalisierte Biomoleküle konjugiert werden. Das ebenfalls neu entwickelte $[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$ kann hingegen mithilfe des minimalistischen Ansatzes, durch Elution von wasserfreiem $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ von einem Anionenaustauscher mit einem Oniumsalz-Vorläufer, ebenfalls schnell und in hoher RCA synthetisiert werden. Die Reinigung erfolgt mittels einfacher Festphasenextraktion. Zur Konjugation an Biomoleküle erscheint dabei insbesondere die Pd-katalysierte S-Arylierung vielversprechend zu sein.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Kupplungsmethoden für diese neuen Bausteine zunächst anhand von einfachen Modellverbindungen, beispielsweise Aminosäurederivaten, zur Anwendungsreife zu entwickeln. Anschließend sollten die Methoden zur Markierung von Glu-C(O)-X Peptidomimetika eingesetzt werden, um Radiotracer zur PET-Bildgebung des Prostatakarzinoms zu erhalten und eine biologische Evaluation zu ermöglichen.

Schließlich sollten die in Jülich entwickelten all-D Peptide mit hoher Affinität für beta-Amyloid radiomarkiert werden. Diese sind von großem Interesse als Leitstruktur zur Entwicklung von Radiotracern zur Bildgebung von β -Amyloid im Gehirn von Alzheimer Patienten. Die vielversprechendsten Vertreter der all-D Peptide, genannt „D3“ und „RD2“, besitzen als gemeinsames Merkmal eine argininreiche Sequenz und ließen sich bisher nicht zufriedenstellend mit ^{18}F radiomarkieren. Im Gegensatz zu etablierten Tracern versprechen radiomarkierte Analoga dieser Peptide durch ihre geringere Lipophilie eine höhere Spezifität. Zudem wird möglicherweise erstmalig eine PET-Bildgebung von A β auf Grundlage der löslichen, neurotoxischen Oligomere mit ^{18}F ermöglicht. Die peptidbasierten Tracer wären damit besser zur Früherkennung der Alzheimer-Krankheit geeignet und könnten so einen wichtigen Beitrag zur Therapieforschung für diese Erkrankung liefern.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Evaluation alternativer palladiumkatalysierter Kreuzkupplungsreaktionen mit $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$

Neben der Sonogashira-Reaktion sind weitere Kreuzkupplungsreaktionen mit Fluoralkenyl(phenyl)iodoniumsalzen aus der Literatur bekannt (Abb. 19). Allen Reaktionen gemein ist jedoch eine lange Reaktionszeit, wobei die Stille-Kupplung mit vier Tagen Reaktionszeit besonders lange dauert [128]. Die Heck-Reaktion weist eine schlechte Stereoselektivität auf [128], sodass sich ein strukturell eng verwandtes und entsprechend aufwändig zu trennendes Produktgemisch bildet. Für eine Suzuki-Kupplung findet sich nur ein Beispiel für ein (E)-Fluorvinyl(aryl)iodoniumsalz. Hierbei ist die Chemoselektivität ungünstig und es wird bevorzugt der Arylrest übertragen [129].

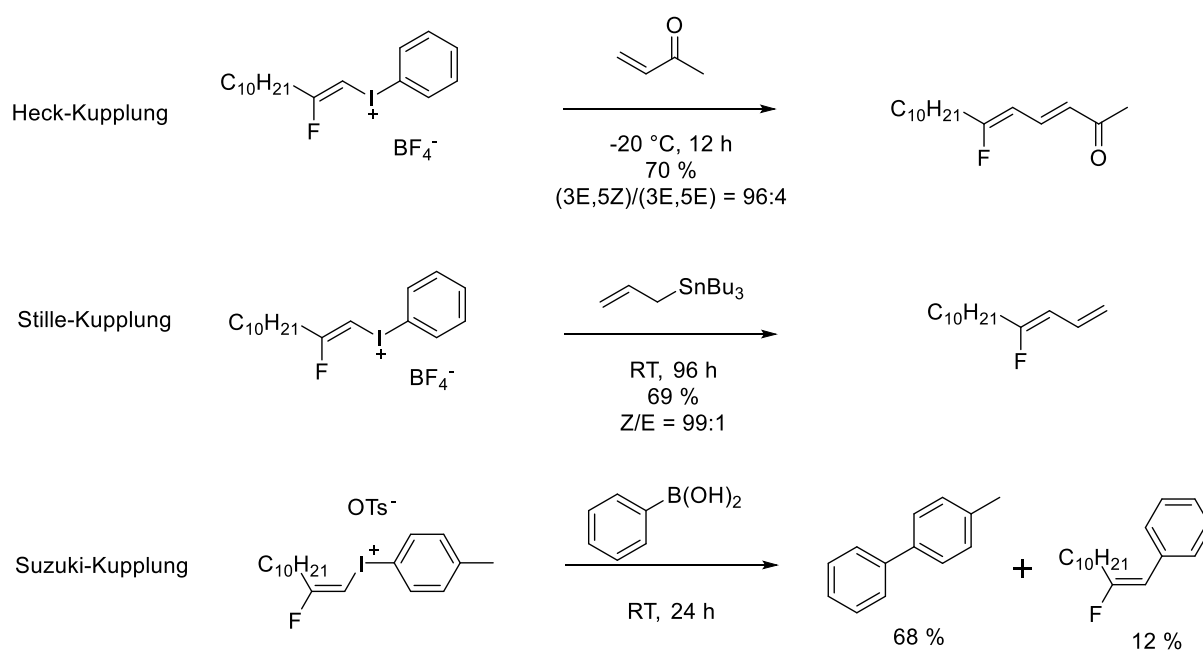


Abb. 19: Organisch-präparative Kreuzkupplungsreaktionen mit Fluorvinyliodoniumsalzen

Auch wenn die gezeigten Reaktionen zunächst scheinbar weniger gut geeignet für radiochemische Anwendungen erscheinen, können sich aufgrund der extrem geringen Konzentration des radioaktiven Reaktionspartners in n.c.a.-Radiosynthesen (niedriger nM Bereich) beispielsweise Ausbeuten und insbesondere Reaktionszeiten deutlich von organisch-präparativen Synthesen unterscheiden. Daher sollten die oben genannten und in Abb. 19

gezeigten Reaktionen als weitere Möglichkeiten zur Kreuzkupplung von FHexI^+ untersucht werden.

3.1.1 Heck-Kreuzkupplungsreaktion mit $[\text{}^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$

Als Modellreaktion wurde die in Abb. 20 dargestellte Heck-Kupplung von FHexI^+ und Acrylsäuremethylester untersucht. Dazu sollte zunächst die ^{19}F -Referenz synthetisiert werden, um mittels DC und HPLC die Identität des Markierungsproduktes zu bestätigen.

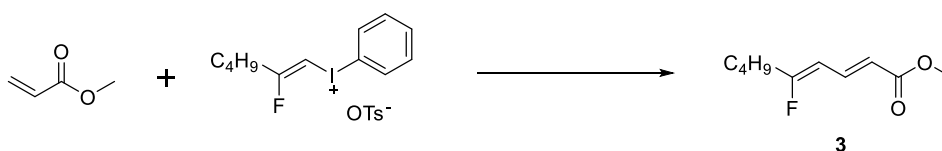


Abb. 20: Heck-Kupplung mit FHexI^+ . Reaktionsbedingungen: $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, KI , NaHCO_3 , DMF/Wasser , ca. $-15\text{ }^\circ\text{C}$, 12 h, 46 %.

Nach der Aufreinigung des Standards mittels Flash-Chromatographie wurde bei der dünnschichtchromatographischen Analyse nur eine Spezies detektiert. Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden ebenfalls keine Verunreinigungen gefunden. Die HPLC-Analyse der Standards zeigt jedoch zwei sehr eng beieinander eluierende Komponenten im Verhältnis 92:8. Da bereits beschrieben war, dass die Heck-Reaktion weniger stereospezifisch ist, handelt es sich dabei möglicherweise um Stereoisomere. Daher wurde eine zweite Synthese der ^{19}F -Referenz durchgeführt, wobei durch eine höhere Reaktionstemperatur von $30\text{ }^\circ\text{C}$ die Bildung des unerwünschten Stereoisomers begünstigt werden sollte. Es wurden erneut zwei Peaks erhalten, diesmal in einem Verhältnis von 25:75 (s. Abb. 21). Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurde anhand der $^3\text{J}_{\text{H-F}}$ Kopplung des C-4 Vinylprotons eine der HPLC entsprechende Produktverteilung von $(2E,4E)\text{-3}$ und $(2E,4Z)\text{-3}$ gefunden, was eine Zuordnung der Peaks ermöglicht.

Zudem wurden beide Komponenten mittels analytischer HPLC getrennt und mittels ESI-MS untersucht. Es wurden für beide Peaks identische Molekülpeaks gefunden, es liegt damit nahe, dass es sich um die vermuteten Isomere handelt.

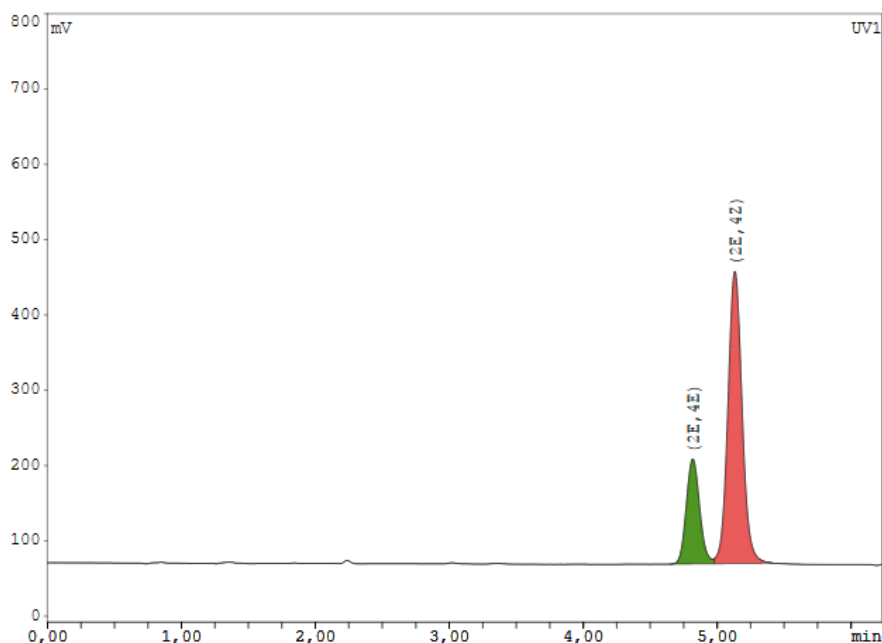


Abb. 21: HPLC-Chromatogramm der Stereoisomere von Verbindung 3. HPLC-Bedingungen: Phenomenex Synergy Hydro RP 5 μ 4.6x250, 70% MeCN/Wasser, 1.5 mL/min, λ =254 nm

Die Reaktionsbedingungen für die darauf folgende Radiomarkierung waren analog zu der Synthese des Standards (s. Abb. 22), [^{18}F]FHexI $^+$ wurde zuvor isoliert. Sie Synthese lieferte einerseits nur eine moderate RCA von 27 ± 2 %. Obwohl die Reaktion ebenfalls bei ca. -10 °C durchgeführt wurde, betrug das Verhältnis der beiden Isomere 65:35. Somit ist die Stereoselektivität bedeutend schlechter als bei der Standardsynthese. Bei Raumtemperatur wurde zwar eine mit 37 % etwas bessere RCA gefunden, jedoch bildet sich praktisch eine 1:1-Mischung der Isomere. Daher wurden höhere Temperaturen nicht systematisch untersucht. Andererseits ergab eine Reaktion bei -29 °C (Xylol/Trockeneis) lediglich eine RCA von unter 2 %, daher wurden niedrigere Reaktionstemperaturen ebenfalls nicht weiter verfolgt.

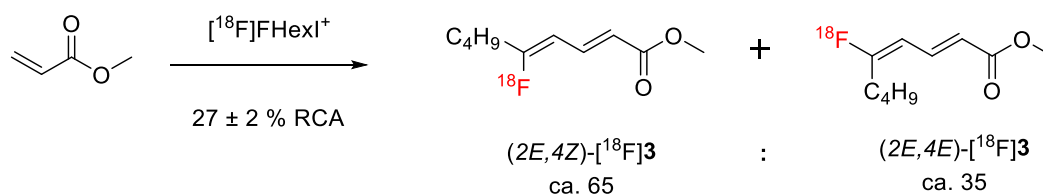


Abb. 22: Produktverteilung bei der Radiomarkierung von [^{18}F]**4**. Reaktionsbedingungen: 4 μL Acrylsäuremethylester, 50 μg Pd(OAc) $_2$, 50 μg KI, 50 μg NaHCO $_3$, DMF/Wasser 4:1, ca. -10 °C, 15 min.

Wie in Abb. 21 zu sehen, ist bereits eine Trennung der beiden Isomere für die untersuchte, strukturell eher einfache Modellverbindung nur gerade noch bis zur Basis möglich. Bei

steigender Molekülgröße ist davon auszugehen, dass dies zunehmend schwieriger wird. Eine befriedigende Isolierung biologisch relevanter Tracer scheint daher besonders herausfordernd. Zusätzlich ist eine Reaktion bei Temperaturen unterhalb der Raumtemperatur ungünstig, da eine temperaturgesteuerte, exakte Kühlung technisch betrachtet deutlich aufwändiger zu erzielen ist als eine Erwärmung. Aus diesen Gründen erscheint die Heck-Reaktion mit FHexI^+ ungeeignet für eine praktische Anwendung für Radiomarkierungen zu sein.

3.1.2 Stille-Kreuzkupplung mit FHexI^+

Die Stille-Kupplung ist von besonderem Interesse, da im Gegensatz zur Heck-, Suzuki- und Sonogashira-Kupplung (abgesehen von dem Palladiumkatalysator) keine weiteren Zusätze notwendig sind - insbesondere keine Base. Damit sind die Reaktionsbedingungen der Kreuzkupplung besonders mild. Als Modellreaktion wurde die in Abb. 23 gezeigte Stille-Kupplung zwischen FHexI^+ und Phenyltributylstannan untersucht. Auch hier wurde zunächst die ^{19}F -Referenz synthetisiert. Die Reaktion wurde in Anlehnung an Yoshida et al [128] durchgeführt. Im Gegensatz zur Heck-Kupplung wurde hierbei ausschließlich die Bildung des (Z)-Isomers beobachtet.

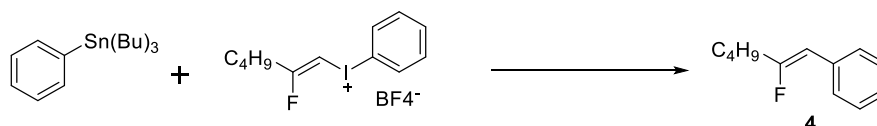


Abb. 23: Stille-Kupplung von FHexI^+ mit Phenyltributylstannan. Reaktionsbedingungen: $\text{Pd}[\text{P}(\text{Ph})_3]_4$, DMF, 30 °C, 72 h, 41 %.

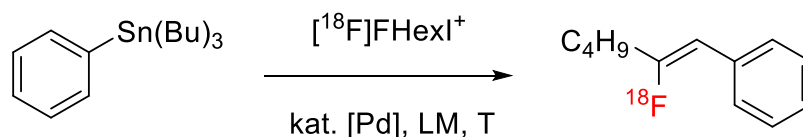
Die Radiomarkierung wurde ausgehend von isoliertem, wasserfreiem $^{18}\text{F}\text{FHexI}^+$ durchgeführt. Zunächst wurden in Vorversuchen geeignete Reaktionsbedingungen erarbeitet. Dazu wurden mit DMF, DMSO, THF, *t*-BuOH und MeCN gängige polare organische Lösungsmittel bei 30, 50 und 70 °C getestet. Es wurde vor allem die Bildung eines unpolaren Nebenproduktes beobachtet. Dieses Nebenprodukt bildet sich ebenfalls, wenn kein Stannylvorläufer in der Reaktion vorhanden ist, und konnte auch nach einer sauren Aufarbeitung der Reaktion weiterhin beobachtet werden. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um ein Zersetzungsprodukt von $^{18}\text{F}\text{FHexI}^+$ und nicht um ein Katalysator- $^{18}\text{F}\text{FHexI}^+$ -Addukt. Bei DMF, DMSO und MeCN überwog die Bildung des Nebenproduktes bei weitem und

t-BuOH lieferte ein Produktgemisch. Nur in THF wurde überwiegend das gewünschte Produkt [¹⁸F]4 gebildet. Bei 70 °C war die Reaktion nach 10 min beendet.

Die anschließende systematische Optimierung der Reaktionsbedingungen (s. Tabelle 3) wurde mit dem Vergleich unterschiedlicher etherischer Lösungsmittel begonnen (Eintrag 1-4). Am besten geeignet war hierbei Dioxan. Im Hinblick auf die aufwändige Trocknung des [¹⁸F]FHexI⁺ und eine mögliche Eintopfreaktion wurde getestet, ob die Reaktion auch in Gegenwart von Wasser funktioniert. Dazu wurde schrittweise der Wasseranteil von 2 % bis auf 50 % erhöht (Eintrag 5-9). Dabei wurde sogar eine positive Wirkung von Wasser beobachtet. Das Maximum lag bei 10 % Wasser, wobei eine um insgesamt 9 Prozentpunkte höhere Ausbeute gefunden wurde. Bei einer weiteren Erhöhung des Wassergehaltes wurde jedoch zunehmend der sehr unpolare Stannylvorläufer im Reaktionsmedium unlöslich, was sich zunächst in steigenden Standardabweichungen und zuletzt in stark abnehmender RCA widerspiegelte. Im Weiteren wurde die Katalysatormenge, ausgehend von 50 µg, im Bereich zwischen 5 und 1500 µg variiert (Eintrag 10-15). Eine Reduktion war problemlos möglich, eine Erhöhung der Katalysatormenge führte jedoch zu kontinuierlich sinkenden RCA. Zuletzt konnte die Temperatur ohne nennenswerten Einfluss auf 100 °C erhöht, sowie auf 30 °C gesenkt werden (Eintrag 16 und 17). Für höher funktionalisierte Moleküle ist sicherlich eine Reaktionstemperatur von 30 °C von Vorteil. Insgesamt ist die Reaktion in Dioxan und Wasser somit sehr robust im Hinblick auf den Wassergehalt, die verwendete Katalysatormenge sowie die Temperatur und es werden in vielen Fällen RCA von mehr als 60 % erhalten.

Zuletzt wurde versucht, analog zur Sonogashira-Reaktion, auch die Stille-Kupplung als Eintopfsynthese durchzuführen. Dazu wurde in einem ersten Reaktionsschritt zunächst [¹⁸F]FHexI⁺, ausgehend von Hexinyl(Phenyl)iodoniumtosylat, durch nukleophile Addition von [¹⁸F]Fluorid radiomarkiert (vgl. Abb. 12). Zu dem abgekühlten Reaktionsgemisch wurden dann die weiteren Reaktanden in der zuvor ermittelten optimierten Menge zugesetzt. Da sich bereits aus der ersten Stufe Wasser (sowie DMSO) im Reaktionsgemisch befand, wurde reines Dioxan als zusätzliches Lösungsmittel verwendet. Trotz der guten Ergebnisse in der Optimierungsstudie konnten in einer Eintopfsynthese leider nur Spuren des gewünschten Produktes gefunden werden (2-3 %, n=2). Dies ist im Vergleich zu der Sonogashira-Reaktion ein deutlicher Nachteil. Daher wurde die Stille-Kupplung trotz ihrer Effizienz in der Zweitopfsynthese und besonders milden Reaktionsbedingungen nicht weiter für die Markierung von Biomolekülen favorisiert.

Tabelle 3: Optimierung der Stille Kupplung mit $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$



Eintrag	Lösungsmittel	Katalysator- menge [μg]	T [$^\circ\text{C}$]	RCA ^a
1	THF	50	70	$51 \pm 3 \%$
2	Diglyme	50	70	$19 \pm 4 \%$
3	MTBE	50	70	$44 \pm 3 \%$
4	Dioxan	50	70	$59 \pm 2 \%$
5	2 % Wasser /Dioxan	50	70	$62 \pm 1 \%$
6	4 % Wasser /Dioxan	50	70	$63 \pm 3 \%$
7	10 % Wasser /Dioxan	50	70	$68 \pm 1 \%$
8	20 % Wasser /Dioxan	50	70	$64 \pm 7 \%$ ^b
9	50 % Wasser /Dioxan	50	70	$34 \pm 2 \%$ ^b
10	10 % Wasser/Dioxan	5	70	$68 \pm 1 \%$
11	10 % Wasser/Dioxan	20	70	$68 \pm 1 \%$
12	10 % Wasser/Dioxan	100	70	$67 \pm 1 \%$
13	10 % Wasser/Dioxan	200	70	$61 \pm 2 \%$
14	10 % Wasser/Dioxan	500	70	$56 \pm 2 \%$
15	10 % Wasser/Dioxan	1500	70	$43 \pm 1 \%$
16	10 % Wasser/Dioxan	50	30	$65 \pm 1 \%$
17	10 % Wasser/Dioxan	50	100	$63 \pm 1 \%$

Variierter Parameter rot hervorgehoben. Reaktionsbedingungen: $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ isoliert mittels HPLC, 2,5 μL $\text{PhSn}(\text{Bu})_3$, 500 μL ^aAusbeute mittels Radio-DC aus dem Reaktionsgemisch bestimmt, unlösliches $^{18}\text{F} \leq 2 \%$, $n = 3$, ^bLöslichkeit des $\text{PhSn}(\text{Bu})_3$ überschritten

3.1.3 Suzuki-Kreuzkupplung mit FHexI⁺

Die Suzuki-Kupplung ist die am häufigsten eingesetzte Methode, um Übergangsmetall-katalysiert Kohlenstoff–Kohlenstoff-Bindungen zu knüpfen. Gründe hierfür sind die milden Reaktionsbedingungen, die herausragende Toleranz funktioneller Gruppen, sowie der Einsatz unbedenklicher und ungiftiger Bororganischer Verbindungen [130]. Als einziges Beispiel für eine Suzuki-Kupplung mit Fluorvinyliodoniumsalzen zeigt die in Abb. 19 dargestellte Kupplung von (E)-(2-Fluordodec-1-en-1-yl(*p*-toluyl)iodoniumtosylat mit Phenylboronsäure leider eine sehr ungünstige Chemoselektivität, sodass bevorzugt der Arylrest anstelle des Fluorvinylrestes auf die Boronsäure übertragen wurde [129]. Als mögliche Ursache werden entweder der Einfluss des stark elektronenziehenden Fluorsubstituenten oder die zueinander *cis*-ständigen Kohlenstoffsubstituenten diskutiert. Dies wird damit begründet, dass bei der Kupplungsreaktion von *trans*-Styryl(aryl)iodoniumsalzen bevorzugt der Vinylrest übertragen wird [129,131]. Sollte letztere Annahme zutreffen, könnte sich für FHexI⁺ mit seinen ebenfalls *trans*-ständigen Kohlenstoffsubstituenten somit ein anderes Bild ergeben. Daher wurde als Modellreaktion die Kupplung von [¹⁸F]FHexI⁺ und Phenylboronsäure untersucht. Für diese Reaktion wurde dasselbe Produkt wie zuvor bei der Stille-Kupplung erhalten, somit musste die ¹⁹F-Referenz nicht eigens synthetisiert werden.

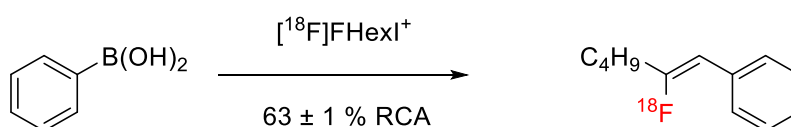


Abb. 24: Suzuki-Kupplung von [¹⁸F]FHexI⁺ und Phenylboronsäure. Reaktionsbedingungen: 2,5 mg PhB(OH)₂, 20 μmol K₂CO₃, Pd(OAc)₂ + PPh₃, 500 μL 25 % Wasser/DMF.

Bei der Radiomarkierung wurden die Startbedingungen in Anlehnung an die oben genannte von Yoshida durchgeführte Reaktion gewählt (s. Abb. 24) [129]. Dabei wurde auf Anhieb eine gute RCA von 62 ± 1 % erhalten. Die Basenstoffmenge wurde daraufhin, wie in Abb. 25 dargestellt, im Bereich von 2 bis 60 μmol untersucht, wobei nur ein sehr schwach ausgeprägtes Ausbeute-Maximum im Bereich um 20 μmol gefunden wurde. Aufgrund der guten Ergebnisse von etherischen Lösungsmitteln wurde die Reaktion ebenfalls in THF/Wasser durchgeführt,

wodurch die RCA auf 74 ± 2 % gesteigert werden konnte. Die isolierte Ausbeute, bezogen auf das eingesetzte $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$, betrug in einem Einzelversuch 72 %.

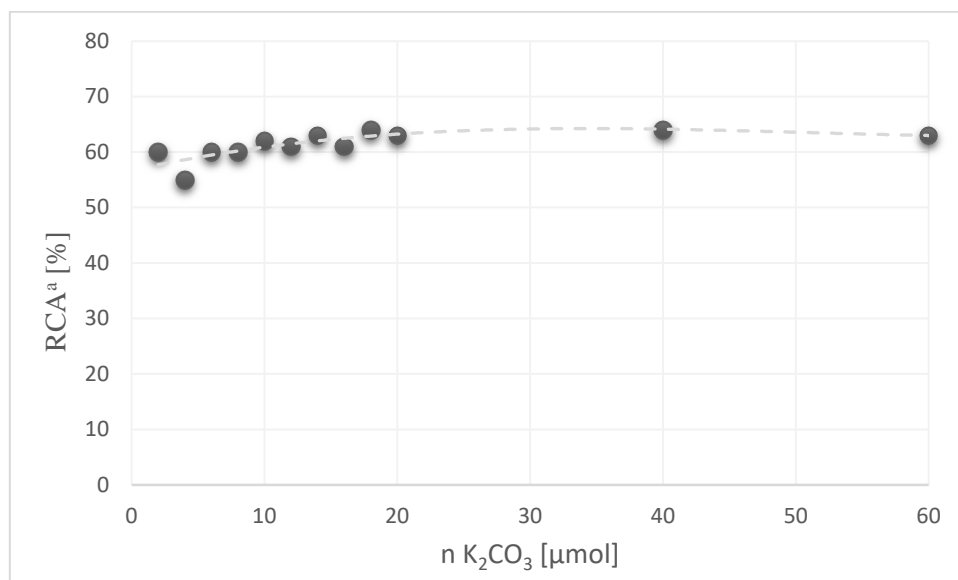


Abb. 25: Basenabhängigkeit der Suzuki-Reaktion. Reaktionsbedingungen: 2,5 mg PhB(OH)₂, Pd(OAc)₂ + PPh₃, 500 μL 25 % Wasser/DMF. ^aRCA bestimmt mittels Radio-DC, unlösliches ¹⁸F > 10 %, n=1.

Nachdem die Vorversuche auf Basis von isoliertem $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ gute Ergebnisse lieferte, wurde mit den gefunden Reaktionsbedingungen ebenfalls die Möglichkeit einer Eintopfsynthese untersucht. Dazu konnten ähnlich wie auch bereits bei der Sonogashira-Reaktion der Markierungsvorläufer, Katalysator und die Base direkt als Lösung in das abgekühlte Reaktionsgemisch nach der Markierung von $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ gegeben werden. Die RCA für die Konjugation war in diesem Fall allerdings mit 35 bzw. 39 % (n=2) geringer als zuvor bei der Sonogashira-Reaktion.

3.1.4 Palladiumkatalysierte C-H-Arylierung von Tryptophanderivaten

Eine potentiell sehr effiziente Möglichkeit Biomoleküle mit FHexI⁺ zu konjugieren, stellt die palladiumkatalysierte C-H Aktivierung des Indolrings in Tryptophan dar. Eine solche Reaktion wurde erstmals von Grimster et al. beschrieben [132] und stellt eine Abwandlung der Fujiwara-Moritani-Kupplung dar. Bei der Reaktion wird Pd^{II} zu Pd⁰ reduziert und anschließend durch

ein Oxidationsmittel reoxidiert. Dieser Reaktionstyp konnte zur Modifikation tryptophanhaltiger Peptide mit Aryliodiden an der Doppelbindung in der C2-Position eingesetzt werden [133]. Die Reaktion kann daher als eine oxidative Variante der Heck-Kupplung betrachtet werden.

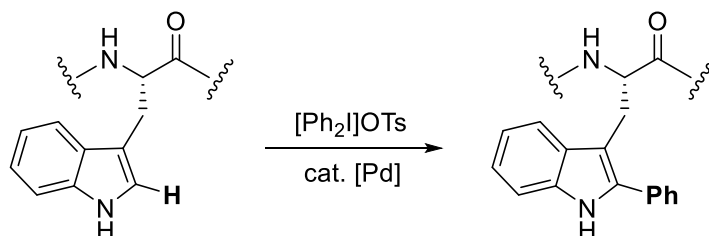


Abb. 26: Palladiumkatalysierte C-H Aktivierung von Indolderivaten unter Verwendung von Diaryliodoniumsalzen

Um den Einsatz von häufig übergangsmetallbasierten Oxidationsmitteln wie etwa Ag^{I} oder Cu^{II} zu umgehen, setzte die Arbeitsgruppe Ackermann, wie in Abb. 26 dargestellt, anstelle von Aryliodiden Iodoniumsalze ein, welche gleichzeitig als Arylhalogenid und Oxidationsmittel fungieren [134]. Falls sich diese Reaktion von Diaryliodoniumsalzen auf $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ übertragen ließe, stünde damit eine Methode zur direkten Radiomarkierung tryptophanhaltiger Biopolymere ohne eine vorhergehende Vorläufersynthese zur Verfügung. Dazu wurde als Modellreaktion die in Abb. 27 gezeigte Kupplung von FHexI^+ und dem geschützten Dipeptid Ac-Trp-Gly-OMe untersucht.

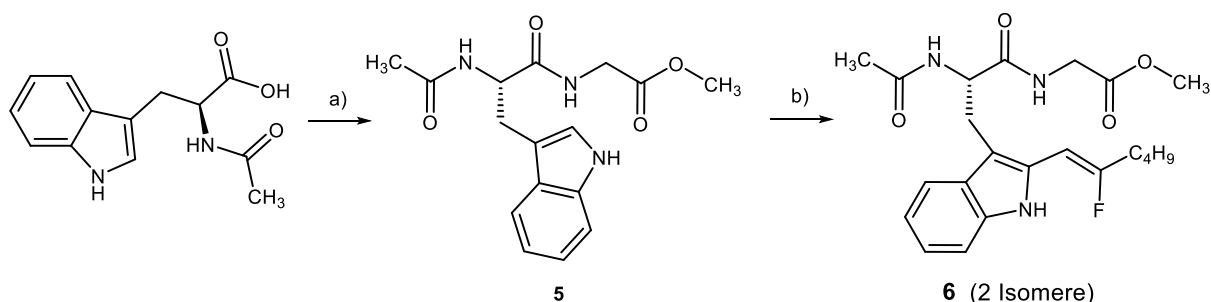


Abb. 27: Synthese des Modellpeptids und der ^{19}F -Referenz. Reaktionsbedingungen: a) EDC·HCl, HOBt, DIPEA, Gly-OMe.HCl, 0 °C-RT, 16 h, 75 %; b) FHexI^+ , $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, DMF/ H_2O , RT, 20 h, 23 %.

Die Kupplung zum Dipeptid wurde ausgehend von Ac-Trp-OH in Lösung mithilfe des Kupplungsreagenz EDC·HCl und HOBt erreicht. Im Gegensatz zu der häufig praktisch quantitativen Reaktion von Diaryliodoniumsalzen ergab die Reaktion mit FHexI^+ im Anschluss

das gewünschte Konjugat jedoch nur in 23 %-iger Ausbeute. Ähnlich wie zuvor die Heck-Kupplung mit Methylacrylat, wurde zudem erneut die Bildung von zwei Produkten mit praktisch identischen ESI-MS Massenspektren beobachtet, die sich bereits mittels Flash-Chromatographie voneinander trennen ließen. Das polare Produkt wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ durch seine $^3\text{J}_{\text{H-F}}$ Kopplungskonstante von 20,7 Hz dem *E*-Isomer zugeordnet, das unpolare Isomer mit 40,5 Hz dem *Z*-Isomer. Das Verhältnis *E/Z* betrug 38/62.

Tabelle 4: Übersicht der erfolglos untersuchten Reaktionsparameter zur Radiomarkierung mit $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ mittels palladiumkatalysierter C-H-Aktivierung von Tryptophan

Eintrag	Lösungsmittel	Katalysator	T	Zusatz
1	H ₂ O	Pd(OAc) ₂	RT	
2	H ₂ O	Pd(OAc) ₂	40 °C	
3	DMF/H ₂ O 1:4	Pd(OAc) ₂	RT	
4	DMF/H ₂ O 1:4	Pd(OAc) ₂	40 °C	
5	MeCN/H ₂ O 1:1	Pd(OAc) ₂	RT	
6	MeCN/H ₂ O 1:1	Pd(OAc) ₂	40 °C	
7	DMF/H ₂ O 1:1	Pd(OAc) ₂	RT	
8	DMF/H ₂ O 1:1	Pd(OAc) ₂	40 °C	
9	MeCN/H ₂ O 1:1	[MeCN] ₂ PdCl ₂	40 °C	
10	MeCN	[MeCN] ₂ PdCl ₂	40 °C	
11	DMF/H ₂ O 1:1	[MeCN] ₂ PdCl ₂	40 °C	
12	DMF	[MeCN] ₂ PdCl ₂	40 °C	
13	MeCN/H ₂ O 1:1	Pd(tppts) ₄	40 °C	
14	MeCN	Pd(tppts) ₄	40 °C	
15	MeCN/H ₂ O 1:1	Pd(OAc) ₂	40 °C	1 eq. FHexI ⁺
16	HOAc	Pd(OAc) ₂	40 °C	Cu(OAc) ₂
17	H ₂ O	Pd(OAc) ₂	40 °C	Cu(OAc) ₂
18	DMF/H ₂ O 1:3	Pd(OAc) ₂	40 °C	Cu(OAc) ₂
19	DCE	Pd(OAc) ₂	40 °C	Cu(OAc) ₂

Tppts: Tri-(natrium-meta-sulfonatophenyl)-phosphan

Von Ackermann et al. wurde Palladiumacetat als idealer Katalysator identifiziert, ebenfalls konnte Bis(acetonitril)palladiumdichlorid ($[\text{MeCN}]_2\text{PdCl}_2$) verwendet werden. Als Lösungsmittel kamen beispielsweise Wasser, DMF, Essigsäure und Dichlorethan (DCE) mit Erfolg zum Einsatz [134]. Auf dieser Grundlage wurden die in Tabelle 4 zusammengefassten Markierungsbedingungen gewählt. Für die Radiosynthese wurde zunächst $^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ nach der Markierung mittels SPE aufgereinigt, durch azeotrope Trocknung mit Acetonitril von Wasserresten befreit und in DMF gelöst. Unter Verwendung von Aliquoten dieser Lösung wurden zunächst verschiedene wässrige Lösungsmittel mit Palladiumacetat als Katalysator getestet (Eintrag 1-8). Aufgrund der langen Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurden die Markierungen jeweils auch bei 40 °C durchgeführt. Da in keinem Fall das gewünschte Produkt gebildet wurde, wurde im Folgenden der Katalysator durch den Pd^{II} -Katalysator $[\text{MeCN}]_2\text{PdCl}_2$ (Eintrag 9-12) sowie den wasserlöslichen Pd^0 -Katalysator $\text{Pd}(\text{tppts})_4$ (Eintrag 13 und 14) ersetzt, wodurch jedoch ebenfalls kein Markierungsprodukt erhalten wurde. Maßgeblich für den bisher nicht möglichen Transfer der modifizierten Fujiwara-Moritani-Kupplung in die Radiochemie könnte die veränderte Stöchiometrie bei der Radiosynthese sein, da das Iodoniumsalz gleichzeitig die Rolle des Oxidationsmittels übernimmt. Um dies zu überprüfen, wurde eine Synthese mit einer äquimolaren Menge $^{19}\text{F}]\text{FHexI}^+$ unter Zusatz von $^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ durchgeführt, was wiederum erfolglos blieb (Eintrag 15). Dabei handelt es sich um eine präparative Synthese im Mikromaßstab, die nur durch Radiotracer nachverfolgt wird. Die zu erwartende Reaktionsgeschwindigkeit ist demensprechend ähnlich langsam und die Ausbeute so gering wie in der Synthese der ^{19}F -Referenz. Praktisch konnten nach 20 min jedoch nicht einmal Spuren der Zielverbindung nachgewiesen werden. Daher wurde zuletzt auf das von Grimster et al. [132] verwendete Oxidationsmittel Kupfer(II)acetat in unterschiedlichen Lösungsmitteln zurückgegriffen (Eintrag 16-19). Leider waren auch diese Ansätze erfolglos, sodass das Konzept der Markierung von Tryptophan mittels $^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ unter C-H Aktivierung verworfen werden musste.

3.2 Indirekte Radiofluorierung von Biomolekülen mit $^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ mittels Sonogashira-Kupplung

Trotz der zum Teil erfolgreich getesteten alternativen Kreuzkupplungen stellt die Sonogashira-Kupplung die erfolversprechendste Strategie für die indirekte Radiofluorierung mittels $^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ dar. Im Gegensatz zur Heck-Kupplung ist die Reaktion stereoselektiv. Die

verwendeten endständigen Alkinvorläufer sind im Gegensatz zu Stannylvorläufern für die Stille-Kupplung deutlich weniger toxisch. Die Radiomarkierung kann wie auch die Suzuki-Kupplung als Eintopfsynthese durchgeführt werden und liefert zudem für die Modellverbindung bessere Ausbeuten. Zuletzt bietet eine Alkinfunktionalisierung mehr Möglichkeiten zur Variation und liefert damit wahrscheinlich insgesamt eine kleinere Linker-Markierungs-Struktur als (aromatisch substituierte) Boronsäuren.

3.2.1 Entwicklung und Evaluation aminreaktiver Alkinlinker mittels lysinbasierter Modellverbindungen

Im Hinblick auf die geplante Markierung von Peptiden ist es naheliegend, die Markierung mittels $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ auf der Basis von Aminosäuren, den Bausteinen der Peptide, schrittweise weiter zu entwickeln. Dabei fiel die Wahl aus mehreren Gründen zunächst auf Lysin. Eine Alkinfunktionalisierung mittels aminreaktiver Reagenzien an der reaktiven, sterisch ungehinderten ϵ -Aminfunktion der Seitenkette stellt einen erfolgversprechenden Ansatz dar. Zudem findet sich Lysin als Teil der Glu-C(O)-Lys Leitstruktur wieder (s. Abb. 28). Hierbei handelt es sich um Peptidomimetika, bei denen die α -Aminogruppen von Glutaminsäure und Lysin über eine Harnstoffbindung verknüpft sind. Daher kann diese Leitstruktur als weiterer Zwischenschritt bei dem Transfer der Methode, ausgehend vom strukturell sehr einfachen Kohlenwasserstoff Hexin über Aminosäuren, hin zu sehr komplex aufgebauten Peptiden angesehen werden. Zudem wurden auf Grundlage dieser Leitstruktur bereits eine Reihe von PSMA-spezifischen Liganden sowohl zur Diagnostik ([96,135,136]) als auch zur Therapie des Prostatakarzinoms entwickelt [137]. Eine Markierung dieser Leitstruktur ermöglicht somit durch den direkten Vergleich der Eigenschaften dieser Tracer Rückschlüsse auf die biologischen Eigenschaften des $[^{18}\text{F}]\text{Fluorhexen-Radiolabels}$.

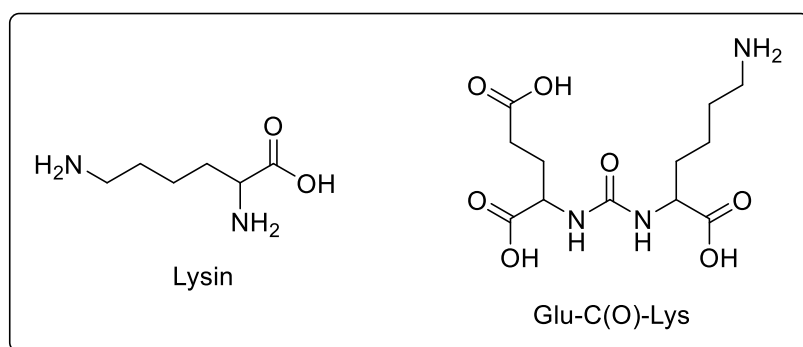


Abb. 28: Strukturen von Lysin sowie der PSMA-adressierenden Leitstruktur Glu-C(O)-Lys

3.2.1.1 Synthese lysinbasierter Modellverbindungen

α -Aminosäuren sind in der Lage, Metalle wie etwa Kupfer zu komplexieren. Die Sonogashira-Reaktion stützt sich jedoch auf gleich zwei Metallkatalysatoren, Pd(0) sowie Cu(I). Um einen eventuell störenden Einfluss der Aminosäurefunktion zunächst auszuschließen, wurde daher zuerst ein Lysinderivat sowohl mit geschütztem α -Amin als auch mit geschützter Carbonsäure als Markierungsvorläufer synthetisiert (s. Abb. 29). Ausgehend von kommerziell erhältlichen N^α -Boc- N^ϵ -Cbz-Lysin-Dicyclohexylaminsalz (Boc-Lys(Z).DCHA) wurde die Carbonsäure dazu zunächst als *tert*-Butylester geschützt und anschließend das Seitenkettenamin durch Hydrierung entschützt. Die Alkinfunktionalisierung sollte mit einem möglichst kleinen Linker erfolgen, um später die Eigenschaften potentieller Tracer wenig zu verändern. Eine einfache Alkylierung von Aminen, beispielsweise mit Propargylbromid, führt jedoch häufig durch Mehrfachalkylierung zu Nebenprodukten. Eine mögliche Alternative stellt die Umsetzung mit einem Carbonsäurederivat zum entsprechenden Amid dar, wobei eine Mehrfachfunktionalisierung ausgeschlossen ist. Dabei fiel die Wahl auf Propiolsäure, da sie die

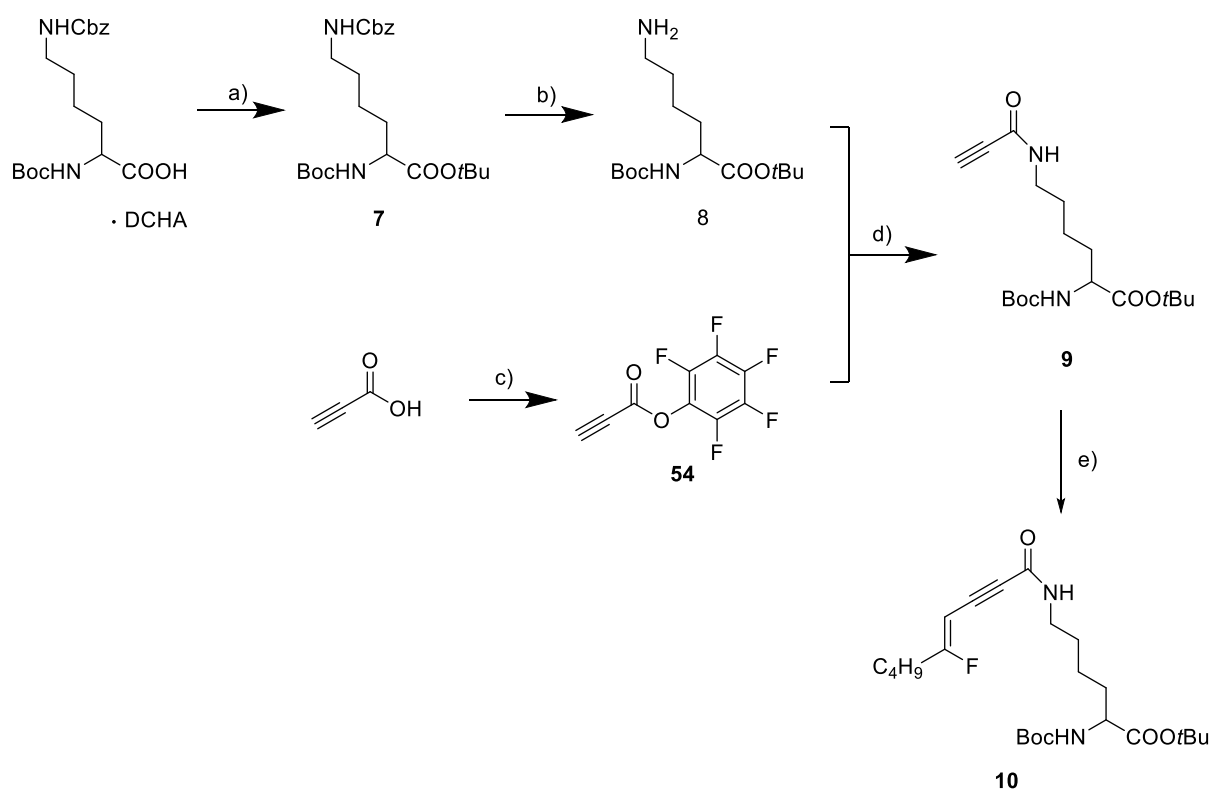


Abb. 29: Synthese der Lysin-Modellverbindung 10. Reaktionsbedingungen: a) *t*BuBr, K_2CO_3 , TBAB, DMA, 55 °C, 3 h, 72 %; b) H_2 , 10 % Pd/C, EtOAc, RT, 2 h, quantitativ; c) Propiolsäure, Pentafluorphenol, DCC, DCM, RT, 71 %; d) DMF, 20 °C, 2h, 90 %; e) Pd(OAc)₂, PPh₃, CuI, TEA, DMF, FHexI⁺, RT, 15 min, 65 %.

kürzeste Alkensäure darstellt. Die Synthese des Propargylamids erfolgte zunächst analog einer beschriebenen Methode ausgehend von Methylpropiolat [138]. Die erhaltene Ausbeute war mit lediglich 20 % jedoch nur gering. Ein reaktiveres Propargylsäurederivat stellt das entsprechende Säurechlorid dar. Dieses Reagenz kann aufgrund der gleichzeitigen Bildung von Chlorpropensäuren bei der Synthese jedoch nicht in Reinform erhalten werden. Daher wurde Propiolsäure in einer Steglich-Veresterung mit Pentafluorphenol zum entsprechenden Aktivester umgesetzt [139]. Die Aufarbeitung des Produktes gelang anstelle von Säulenchromatographie mittels Sublimation bei 2 mbar und 50 °C direkt aus dem öligen Rohprodukt und lieferte analytisch reine Kristalle. Dadurch konnte die beschriebene Ausbeute von 33-52 % auf 71 % gesteigert werden. Dieses Verfahren gestattet zudem eine einfache und kostengünstige Herstellung großer Mengen des Aktivesters. Damit konnte das Amin **8** zum Markierungsvorläufer **9** mit einer Ausbeute von 90 % umgesetzt werden. Zuletzt erfolgte die Synthese der ¹⁹F-Referenz **10** analog durch die Sonogashira-Kupplung mit FHexI⁺.

Zusätzlich sollte anhand einer weiteren Modellverbindung überprüft werden, ob die Sonogashira-Kupplung freie Carbonsäuren toleriert. Der Grund hierfür war, bei der geplanten Markierung der Glu-C(O)-Lys Leitstruktur möglichst auf einen zusätzlichen Reaktionsschritt

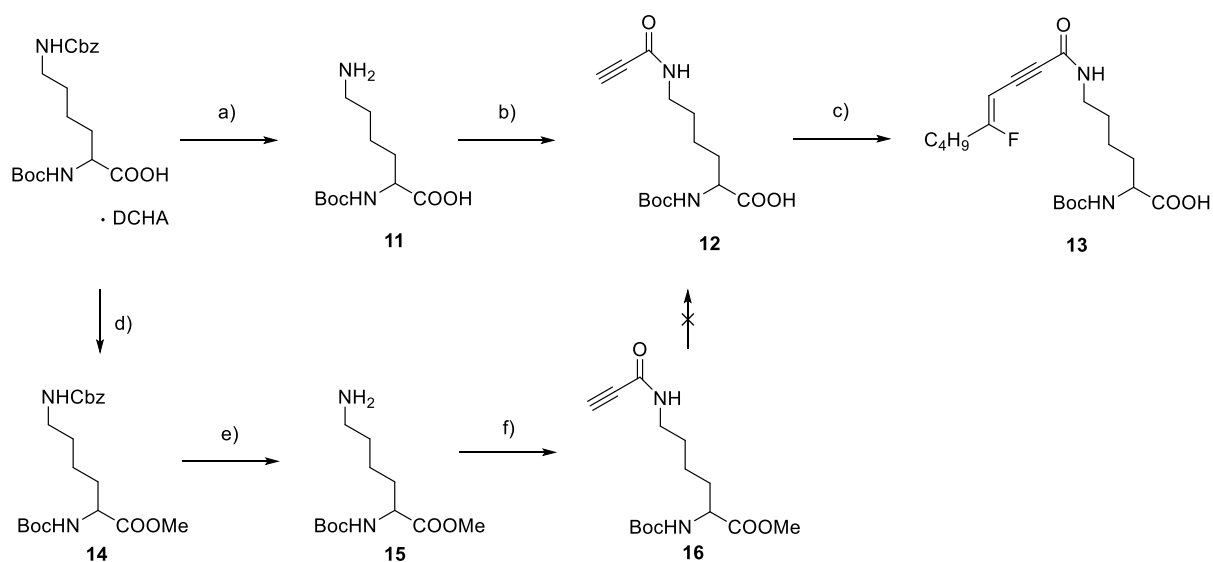


Abb. 30: Synthese der Lysin-Modellverbindung **13**: Reaktionsbedingungen: a) H₂, 10 % Pd/C, EtOAc, r.t., 2 h, 95 %; b) Pentafluorphenylpropiolat, DIPEA, DMF, -40 °C - RT, 4h, 52 %; c) Pd(OAc)₂, PPh₃, CuI, TEA, DMF, FHexI⁺, RT, 15 min, 27 %; d) 1. HCl, 2. Cs₂CO₃, MeI, DMF, RT, ü.N. quantitativ; e) H₂, Pd/C, EtOH, 1 h, quantitativ; f) Pentafluorphenylpropiolat, DMF, 20 °C, 2 h, 87 %.

zur Entschützung der Carbonsäuren verzichten zu können. Dazu wurde, wie in Abb. 30 dargestellt, ein Derivat der Verbindung **10** mit freier Carbonsäure synthetisiert (Verbindung **13**).

Ausgehend von Boc-Lys(Z).DCHA wurde durch Hydrierung das ebenfalls kommerziell erhältlichen Boc-Lys-OH hergestellt. Bei der darauffolgenden Amidierung wurde eine Base zugesetzt, um der Protonierung des Amins durch die Carbonsäure entgegen zu wirken. Zunächst wurde hierzu 1 Stoffmengenäquivalent N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA bzw. Hünig-Base) zugesetzt. Während der portionsweisen Zugabe des Pentafluorphenylpropiolats bei Raumtemperatur verfärbte sich das Reaktionsgemisch jedoch augenblicklich tiefbraun. Die weitere Zugabe erfolgte daher bei -20 °C. Dennoch konnte letztlich kein Produkt isoliert werden. Erst bei -40 °C konnte die Amidierung ohne vorzeitige Zersetzung durchgeführt werden, wobei jedoch nur vergleichsweise moderate 52 % Ausbeute erhalten wurden. Alternativ zur starken Hünig-Base wurde in einer weiteren Synthese zunächst das Lysin mit Natriumbicarbonat in das Natriumsalz überführt und dieses anschließend zum Amid umgesetzt. Aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit des Natriumsalzes musste die Reaktion in einer Suspension durchgeführt werden. Die Ausbeute war hierbei jedoch mit 40 % geringer.

In einer alternativen Syntheseroute zur Herstellung des Markierungsvorläufers **12** sollte daher zunächst die Carbonsäure als Methylester geschützt werden, um eine bessere Amidierung ohne Zusatz einer Base zu ermöglichen. Sowohl die Methylierung als auch die darauf folgende Hydrierung verliefen quantitativ. Die Amidierung des Methyllesters ergab mit 87 % eine deutlich bessere Ausbeute als die der freien Carbonsäure. Die Verseifung von Verbindung **16** gestaltete sich allerdings unerwartet schwierig. Mehrere Versuche, den Methylester mit dem milden, jedoch gleichzeitig effizienten System Lithiumhydroxid/THF/Wasser [140] zu spalten, waren nicht erfolgreich. Das Edukt wurde nur langsam verbraucht, ohne dass letztlich das gewünschte Produkt isoliert werden konnte. Eine Verseifung unter harscheren Bedingungen mit Kaliumhydroxid lieferte ebenfalls nicht das gewünschte Produkt. Aus diesem Grund musste letztlich wieder auf die ursprüngliche Syntheseroute zurückgegriffen werden. Ausgehend vom Markierungsvorläufer **12** wurde zuletzt erneut die ¹⁹F-Referenzverbindung durch Konjugation mit FHexI⁺ synthetisiert.

Eine weitere Möglichkeit zur Alkinfunktionalisierung von Aminen stellt die Reaktion mit (käuflichem) Propargylchloroformiat zum entsprechenden Propargylcarbammat (N-Propargyloxycarbonyl, Poc) dar. Die Reaktion wurde beispielsweise zur Synthese und Evaluation von Enzyminhibitoren auf Basis lysinhaltiger Tripeptide verwendet [141]. Durch

das zusätzliche Sauerstoffatom ist der Poc-Linker nur minimal länger als das Propargylamid. Daher sollte seine Tauglichkeit ebenfalls überprüft werden. Dazu wurden wiederum, wie in Abb. 31 dargestellt, zwei Lysin-derivate mit geschützter und freier Carbonsäure sowie ihre entsprechenden ^{19}F -Referenzen synthetisiert.

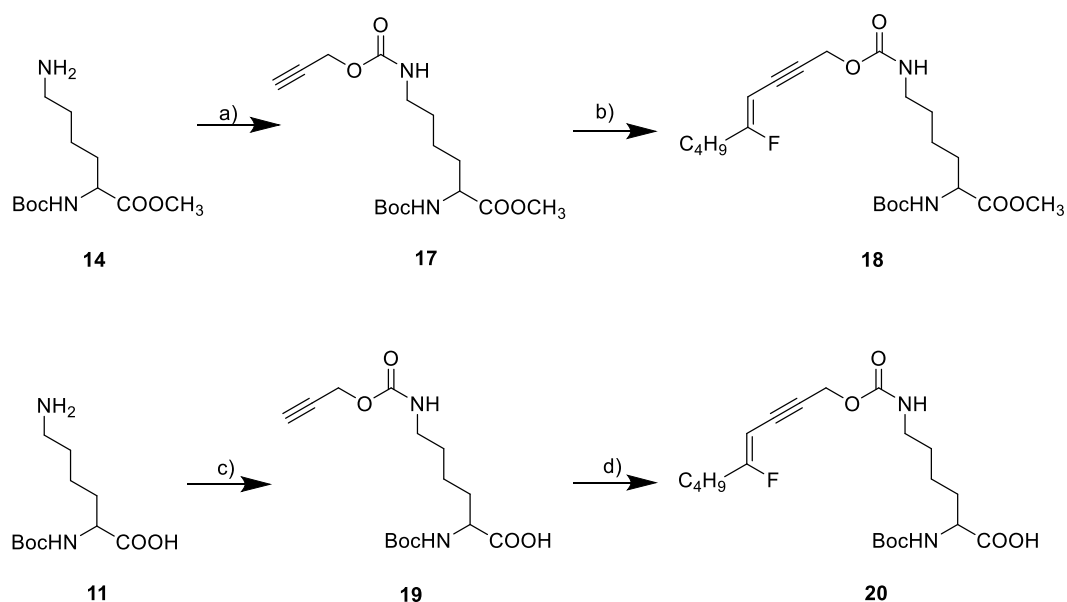


Abb. 31: Synthese der Lysin-Modellverbindungen **18** und **20**: Reaktionsbedingungen: a) Propargylchloroformiat, DIPEA, DCM, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ - RT., 16 h, 76 %; b) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PPh_3 , CuI , TEA, DMF, FHexI^+ , r.t., 15 min, 38 %; c) Propargylchloroformiat, 1 M NaOH_{aq} , THF, RT, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ - RT, 16 h, 68 %; d) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PPh_3 , CuI , TEA, DMF, FHexI^+ , r.t., 15 min, 33 %.

3.2.1.2 Radiomarkierung lysinbasierter Modellverbindungen

Die Radiomarkierung der vier synthetisierten Lysin-derivate erfolgte analog zu der beschriebenen Radiomarkierung der Hexin-Modellverbindung, bei der die RCA bei $63 \pm 10\%$ lag [85]. Zunächst sollten die Markierungsausbeuten aller Vorläufer unter diesen allgemeinen Markierungsbedingungen ermittelt werden, um Rückschlüsse auf ihre Reaktivität ziehen zu können. Eine Optimierung der Reaktionsbedingungen sollte zu einem späteren Zeitpunkt erst für medizinisch relevantere Verbindungen erfolgen.

In der Eintopfsynthese erfordert die Sonogashira-Kupplung keine Isolierung des Markierungssynthons. Daher wurde die RCA für die Konjugation rechnerisch aus der Ausbeute der ersten Stufe und der Gesamtausbeute bestimmt. Die RCA für $^{18}\text{F}\text{FHexI}^+$ wurde mittels eines sehr kleinen Aliquots aus dem Reaktionsgemisch mittels Radio-DC bestimmt. Durch das

wässrig-organische Reaktionsmedium ist die Löslichkeit sowohl des [^{18}F]Fluorid, als auch der Markierungsprodukte hoch ($\geq 90\%$), sodass Adsorptionseffekte vernachlässigt werden konnten.

Nachdem der Reaktor abgekühlt wurde, konnten der Markierungsvorläufer sowie die weiteren Reaktanden beziehungsweise Katalysatoren direkt in den Reaktor gegeben werden. Nach der vorgegebenen Reaktionszeit wurde die Markierungsreaktion durch Zugabe von Trifluoressigsäure und Wasser beendet. Da auch in diesem Fall keine nennenswerten Adsorptionseffekte beobachtet wurden, konnte die Ausbeute erneut aus Aliquoten des verdünnten Rohprodukts mittels HPLC bestimmt werden. Die RCA der Sonogashira-Kupplung wurde anschließend aus der Gesamt-RCA und der RCA des [^{18}F]FHexI $^+$ bestimmt.

Tabelle 5: RCA der lysinbasierten Modellverbindungen

Reaction scheme: An alkyne-lysine derivative (represented by a circle labeled 'Lys' attached to a triple bond) reacts with [^{18}F]FHexI $^+$ to form a 18F-labeled alkene-lysine derivative (represented by a circle labeled 'Lys' attached to a double bond with a C $_4$ H $_9$ group and a red ^{18}F atom).

	Verbindung	RCA ^a
10		88 ± 5 %
13		69 ± 3 % ^b
18		53 ± 8 %
20		38 ± 10 % ^b

Reaktionsbedingungen: Eintopfreaktion, [^{18}F]FHexI $^+$ wurde nach der Markierung ohne Aufreinigung weiter verwendet; Zugabe von: 14 μmol Alkinvorläufer, 2 mg CuI sowie 18 μL N(Et) $_3$ in 400 μL DMF, 0,5 mg Pd(OAc) $_2$ sowie 1,3 mg PPh $_3$ in 500 μL DMF, 30 °C, 10 min. ^aRCA mittels HPLC aus dem Reaktionsgemisch bestimmt, unlösliches $^{18}\text{F} \leq 10\%$, $n \geq 3$. ^b14 μmol N(Et) $_3$ zusätzlich hinzugefügt.

Es ließen sich alle vier Lysinderivate erfolgreich markieren. Damit konnte gezeigt werden, dass diese Methode grundsätzlich auch für funktionalisierte (Bio-)Moleküle geeignet ist. Aus

Tabelle 5 wird ersichtlich, dass in beiden Fällen die freie Carbonsäure toleriert wurde, jedoch ergaben die entsprechenden Ester jeweils etwas höhere RCA. Als Linker erscheint das Propargylamid, aufgrund der 66 % höheren Ausbeute für die Ester beziehungsweise mit einer Steigerung um 82 % fast doppelt so gutem Ergebnis für die Carbonsäuren, bedeutend besser geeignet zu sein und übertrifft dabei Hexin als ursprüngliche Modellverbindung. Neben den elektronischen Unterschieden beider Alkinlinker könnte eine Spaltung des Carbamats unter den Reaktionsbedingungen für dessen schlechtere Markierbarkeit verantwortlich sein. Strukturell sind Propargylcarbamate eng verwandt mit den häufig als Schutzgruppe verwendeten Allylcarbamaten. Letztere finden wiederum häufig Anwendung in Form der Alloc-Schutzgruppen für Amine. Die Spaltung erfolgt typischerweise durch Pd⁰-Katalysatoren. Tatsächlich findet die Poc-Gruppe ebenfalls, wenn auch selten, Anwendung als Schutzgruppe [142]. Die Spaltung erfolgt typischerweise mit Tetrathiomolybdat, allerdings findet sich auch ein Beispiel zur bioorthogonalen Abspaltung der Poc-Gruppe mittels Pd⁰ [143]. Die Halbwertszeit der Abspaltungsreaktion betrug jedoch 6 h bei 37 °C, weshalb zweifelhaft ist, dass dieser Effekt während der nur 15 Minuten dauernden Radiosynthese maßgeblich zum Tragen kommt.

3.2.1.3 Synthese von Glu-C(O)-Lys basierten Markierungsvorläufern

Nachdem durch die Markierung der Lysinderivate gezeigt werden konnte, dass [¹⁸F]FHexI⁺ zur Markierung von komplexeren Molekülen geeignet ist, sollten die Ergebnisse auf die Synthese von Glu-C(O)-Lys basierten Markierungsvorläufern übertragen werden (Abb. 32). Das Harnstoffgerüst **21** wurde nach Maresca et al. [87] durch Kupplung von H-Glu(*t*Bu)-*O**t*Bu und H-Lys(Cbz)-*O**t*Bu mit Triphosgen und anschließender Hydrogenolyse synthetisiert. Als Linker wurde im Hinblick auf die vorausgegangenen Versuche erneut das Seitenkettenamin des Lysins mit Pentafluorphenylpropiolat zum Propargylamid **23** umgesetzt. Da Carbonsäuren in den vorangegangenen Versuchen toleriert wurden, jedoch geringere RCA ergaben, sollten sowohl eine direkte Markierung der Säure als auch die Markierung des Esters mit anschließender Entschützung getestet werden. Dazu wurde zunächst die ¹⁹F-Referenz des (tris)*tert*-Butylethers **25** durch Konjugation mit FHexI⁺ hergestellt. Eine Entschützung des Konjugats mit Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan lieferte erfolgreich die freie Säure **26** und sollte somit auch im Rahmen der Radiomarkierung möglich sein. Damit wurde gleichzeitig die ¹⁹F-Referenz für die direkte Markierung der freien Carbonsäure erhalten.

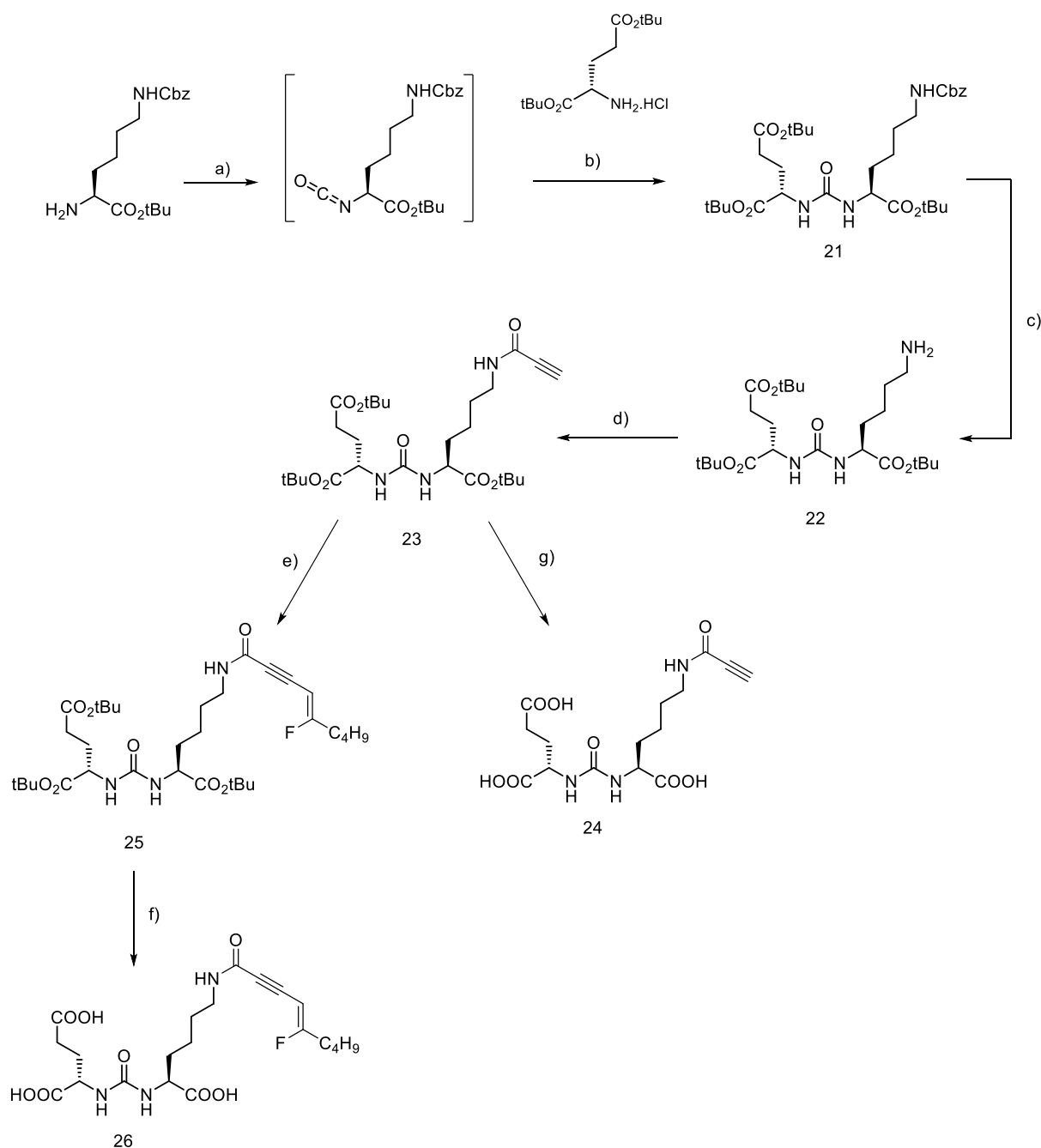


Abb. 32: Synthese der Glu-C(O)-Lys Markierungsvorläufer und ¹⁹F-Referenz. Reaktionsbedingungen: a) Triphosgen, DIPEA, DCM, 0 °C, 2.5 h; b) DIPEA, DCM, 0 °C, 45 min, 78 %; c) H₂, 10 % Pd/C, EtOH, 16 h, 99 %; d) Pentafluorphenylpropiolat, DIPEA, DMF, -10 °C to RT, 2 h, 87 %; e) Pd(OAc)₂, PPh₃, CuI, TEA, DMF, FHexI⁺, RT, 15 min 70 %; f) TFA, H₂O, TIPS (95:2.5:2.5), RT, 1 h, 57 %; g) TFA, H₂O, TIPS (95:2.5:2.5), RT, 1 h, 57 %, 99 %.

3.2.1.4 Radiomarkierung von Glu-C(O)-Lys basierten Markierungsvorläufern

Im ersten Schritt wurden die beiden Harnstoff-Vorläufer **23** und **24** unter den allgemeinen Reaktionsbedingungen mit [¹⁸F]FHexI⁺ konjugiert. Dabei zeigte sich entgegen dem Trend aus

den vorherigen Lysin-Derivaten, dass die direkte Konjugation der ungeschützten Carbonsäure mit $61 \pm 6 \%$ sogar eine bessere RCA liefert als die des tert-Butylesters mit $47 \pm 7\%$ (s. Abb. 33). Die geplante zweistufige Markierung des Esters mit anschließender Entschützung wurde damit obsolet. Damit konnte der PSMA-Tracer $[^{18}\text{F}]\mathbf{26}$ (PSMA-206), ausgehend von $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$, in einer zweistufigen Radiosynthese mit einer isolierten Gesamt-RCA von $30 \pm 2 \%$ erhalten werden. Die isolierte RCA weicht nur geringfügig von der analytisch bestimmten RCA ab. Hierfür sind vor allem Verluste beim Transfer der Probe verantwortlich. Es zeigt sich erneut, dass bei dieser Reaktion Adsorptionseffekte vernachlässigbar sind.

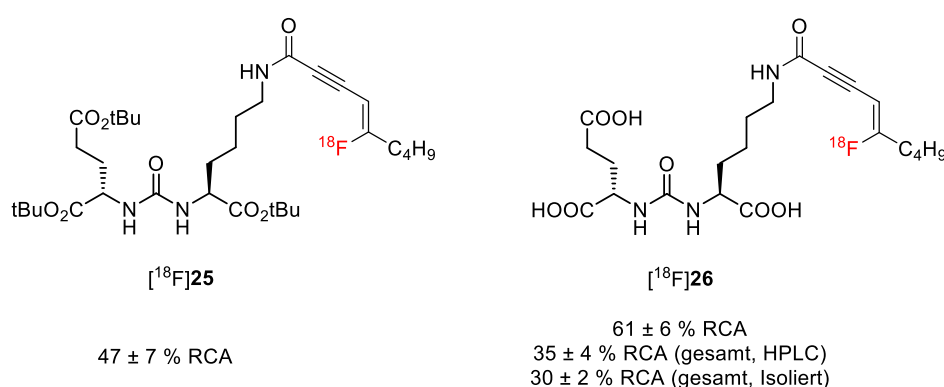
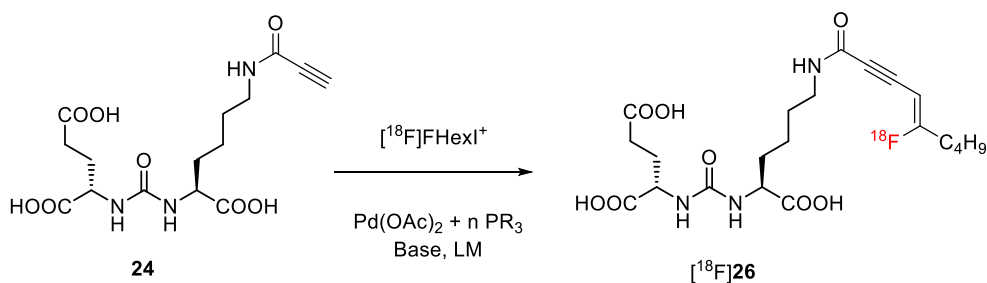


Abb. 33: Radiomarkierungsausbeute der Glu-C(O)-Lys Vorläufer unter den allgemeinen Reaktionsbedingungen (siehe Tabelle 5).

Aufgrund der klinischen Relevanz und der strukturellen Ähnlichkeiten zu Peptiden sollten die Reaktionsbedingungen auf der Basis von $[^{18}\text{F}]\mathbf{26}$ optimiert werden. Dazu wurden die grundlegenden Parameter wie Katalysator, Base und Lösungsmittel untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Eine elementare Rolle in Kreuzkupplungen übernimmt der Katalysator. Unter den ursprünglichen Reaktionsbedingungen wird aus Palladiumacetat als Präkatalysator und Triphenylphosphin als Ligand sowie Reduktionsmittel ein aktiver Pd^0 -Katalysator gebildet und anschließend zum Reaktionsgemisch gegeben. Um in diesem Fall Pd^{II} zu Pd^0 zu reduzieren, sind wie in Abb. 34 dargestellt mindestens zwei Äquivalente Phosphinligand notwendig. Eine stabile Pd^0 -spezies bildet sich allerdings erst nach Zugabe von zwei weiteren Äquivalenten Ligand [144].

Tabelle 6: Optimierung der Reaktanden für die Sonogashira-Kupplung



Eintrag	Katalysator	Base	Lösungsmittel ^a	RCA ^b
1	Pd(OAc) ₂ + 2 PPh ₃	TEA	DMF	61 ± 6
2	Pd(OAc) ₂ + 3 PPh₃	TEA	DMF	54 ± 2
3	Pd(OAc) ₂ + 4 PPh₃	TEA	DMF	61 ± 2
4	Pd(OAc) ₂ + 2 PPh ₃	TEA	DMF/H₂O	51 ± 6
5	Pd(OAc) ₂ + 2 PPh ₃	TEA	MeCN/H₂O	48 ± 3
6	Pd(OAc) ₂ + 2 tppts	TEA	H ₂ O	73 ± 6
7	Pd(OAc) ₂ + 4 tppts	TEA	H ₂ O	67 ± 9
8	Pd(OAc) ₂ + 4 tppts	DIPEA	H ₂ O	57 ± 6
9	Pd(OAc) ₂ + 4 tppts	NaOH	H ₂ O	34 ± 2
10	Pd(OAc) ₂ + 4 tppts	KHCO₃	H ₂ O	48 ± 9

Reaktionsbedingungen: 14 µmol Vorläufer, 125 µmol Base, 2 mg CuI, 30 °C, 10 min. ^a Zugefügtes Lösungsmittel zur zweiten Stufe, ^b RCA bestimmt mittels HPLC, unlösliches ¹⁸F > 10 %, n=3

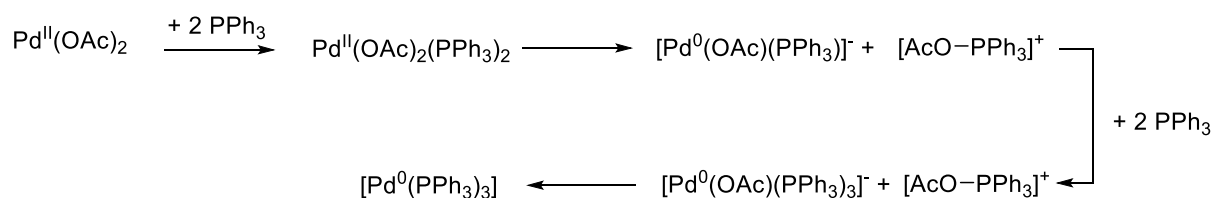


Abb. 34: Bildung des Palladium⁰-Katalysators für die Sonogashira-Reaktion aus Pd^{II} und PPh₃

Daher wurde das stöchiometrische Verhältnis von Pd(OAc)₂ und PPh₃ in der Radiomarkierung schrittweise erhöht (Eintrag 1-3). Sowohl ein Verhältnis von 1:2 als auch 1:4 lieferte identische RCA, ein Verhältnis von 1:3 war minimal schlechter. Insgesamt scheint die Stöchiometrie von Präkatalysator und Ligand jedoch keinen nennenswerten Einfluss auf die Markierungsausbeute zu haben.

Als nächstes wurde versucht, den Anteil an organischem Lösungsmittel zu senken. Dies hat zwei Gründe: Einerseits ist ein möglichst hoher Wasseranteil vorteilhaft im Hinblick auf die Markierung von Biomolekülen - andererseits erschweren organische Lösungsmittel die finale Reinigung. Durch Überladungseffekte und die hohe Elutionskraft verschlechtert sich die Trennleistung bei der HPLC-Aufreinigung des Produkts. Eine Erhöhung des Wasseranteils war allerdings nachteilig. Acetonitril weist im Vergleich zu DMF eine höhere Löslichkeit für Kupfer(I)iodid auf. Die Markierungsausbeute verbesserte sich dadurch jedoch nicht. Problematisch könnte neben der Löslichkeit von CuI auch die Löslichkeit des Palladiumkatalysators sein. Daher wurde das sehr lipophile Triphenylphosphin durch Tri-(natrium-meta-sulfonatophenyl)phosphan (tppts), einem wasserlöslichen Phosphinliganden, ersetzt. Dadurch konnte auf ein zusätzliches organisches Lösungsmittel verzichtet werden. Ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:2 lieferte leicht bessere RCA, verglichen mit einem Verhältnis von 1:4 (Einträge 6 und 7). Die Katalysatorlösung war jedoch instabil, es bildete sich innerhalb kurzer Zeit elementares Palladium, erkennbar zunächst an einer dunklen Trübung, die vollständig in einen schwarzen, feindispersen Niederschlag überging. Im Gegensatz dazu war Pd(tppts)₄ über 2-4 Stunden stabil und wurde daher aus praktischen Gründen weiter verwendet, um eine reproduzierbare Aktivität des Katalysators zu gewährleisten. Die Herstellung von Pd(tppts)₄ erfolgte erneut durch Reduktion von Pd(OAc)₂ *in situ* in Wasser als Lösungsmittel. Aufgrund des überwiegend wässrigen Reaktionsmediums, das sich daraus ergibt, ist die Reaktion nicht länger auf organische Basen beschränkt (Eintrag 8-10). Dennoch lieferte Triethylamin die besten Ergebnisse. Als alternative Aminbase war DIPEA weniger gut geeignet. Anorganische Basen wie Natriumhydroxid und Kaliumhydrogencarbonat konnten zwar verwendet werden, jedoch war insbesondere bei Natriumhydroxid die Ausbeute bedeutend niedriger.

Auf Grundlage der vorher in Eintrag 7 ermittelten idealen Reaktanden wurden als nächstes deren Stoffmengen optimiert. Die Optimierung der Basenmenge ist in *Abb. 35* dargestellt. Diese wurde im Bereich zwischen 7,5 und 200 µL variiert. Bei 60 µL deutet sich zwar ein schwaches Maximum an, die Ausbeute ist jedoch gemessen an der Standardabweichung nicht signifikant

erhöht. Da andererseits Triethylamin vor der Aufreinigung neutralisiert werden muss und die dabei entstehenden Salze, insbesondere bei hoher Basenmenge, die Reinigung des Produkts erschweren, wurden im Weiteren die eingangs verwendeten 18 μL TEA eingesetzt.

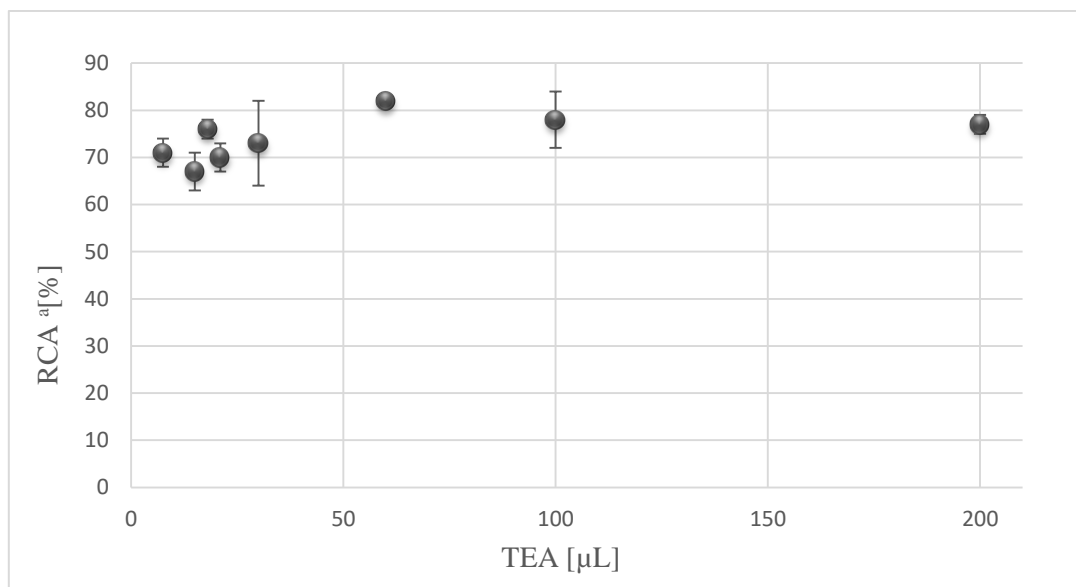


Abb. 35: Basenabhängigkeit der RCA für die Sonogashira-Kupplung. Reaktionsbedingungen: 14 μL Vorläufer **24**, 22 μmol Pd(tppts)₄, 2 mg CuI, 30 °C, 10 min. ^aAusbeute bestimmt mittels HPLC, n=3

Neben der Steigerung der RCA ist bei der Optimierung eine Verringerung der Katalysatormenge wünschenswert. Da Kupfer und insbesondere Palladium toxische Eigenschaften besitzen, gibt es für die Anwendung strenge Grenzwerte. So ist beispielsweise bei Arzneimitteln für humane Anwendung die maximale Menge an Palladium auf 10 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ beschränkt [145]. Trotz der Aufreinigung des Tracers nach der Synthese ist es daher vorteilhaft, die primär eingesetzte Metallmenge so gering wie möglich zu halten. Reduziert man die Menge an Kupfer (Tabelle 7) ausgehend von 2 mg, wird jedoch eine Abnahme der RCA beobachtet. Aufgrund der (selbst in Acetonitril) geringen Löslichkeit von CuI erfordert eine Erhöhung der Menge jedoch ein größeres Volumen der konzentrierten Stammlösung (Eintrag 4). Dadurch erhöht sich einerseits unerwünscht der Anteil des organischen Lösungsmittels, andererseits fällt im überwiegend wässrigen Medium das darin unlösliche CuI ohnehin weitestgehend erneut wieder aus und erschwert so die Reinigung des Produktes. Aus diesen Gründen und im Hinblick auf die Toxizität von Kupfer wurde eine Erhöhung der Kupfermenge über 4 mg hinaus nicht weiter verfolgt. Die in Tabelle 8 gezeigte Optimierung der Menge des Palladiumkatalysators

zeigt, ähnlich wie auch zuvor die Basenmenge, im Bereich von 5 bis 45 μmol im Rahmen der Standardabweichung keinen deutlichen Einfluss auf die RCA.

Tabelle 7: Abhängigkeit der RCA von der eingesetzten Menge CuI

Eintrag	CuI [mg]	RCA ^a
1	0.5	61 \pm 3
2	1	73 \pm 2
3	2	76 \pm 2
4	4 ^b	80 \pm 2

Bed.: 14 μmol Vorläufer, 18 μL TEA, 22 μmol Pd(tppts)₄, CuI gelöst in 100 μL MeCN, 30 °C, 10 min.
^aAusbeute bestimmt mittels HPLC, n=3, ^b 200 μL MeCN benötigt

Tabelle 8: Abhängigkeit der RCA von der eingesetzten Stoffmenge Pd(tppts)₄

Eintrag	Pd(tppts) ₄ [μmol]	RCA ^a
1	5	77 \pm 2
2	11	74 \pm 1
3	22	76 \pm 2
4	45	83 \pm 3

Bed.: 14 μmol Vorläufer, 18 μL TEA, 2 mg CuI, 30 °C, 10 min.
^aAusbeute bestimmt mittels HPLC, n=3

Zuletzt wurde unter den zuvor optimierten Bedingungen die Reaktionskinetik in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur untersucht. Die Reaktion wurde bisher bei 30 °C durchgeführt. Dies ist die niedrigste Temperatur, die sich ohne aktive Kühlung unabhängig von der Raumtemperatur konstant einhalten lässt. Basierend darauf wurden Reaktionen bei 15 °C, 30 °C sowie 45 °C durchgeführt und in kurzen Zeitabständen Proben entnommen (s.

Tabelle 9). Es wurde bemerkenswerterweise die maximale RCA selbst bei 15 °C bereits zum Zeitpunkt der ersten Probennahme nach 3 Minuten erreicht, danach blieb sie konstant.

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass die Sonogashira-Kupplung von [¹⁸F]FHexI⁺ mit dem Alkinvorläufer **24** äußerst robust ist. Die Menge der Base und Katalysatoren kann ebenso wie die Reaktionszeit und Reaktionstemperatur in einem großen Bereich variiert werden. Experimentelle Abweichungen, beispielsweise bei der Dosierung der Reaktanden, haben daher nur einen geringen Einfluss. Unter den optimierten Reaktionsbedingungen konnte die isolierte

Tabelle 9: Abhängigkeit der RCA von der Reaktionszeit und Temperatur

T	Reaktionszeit				
	3 min	6 min	10 min	15 min	20 min
15 °C	74 ± 1	73 ± 4	72 ± 3	72 ± 3	72 ± 7
30 °C	76 ± 4	77 ± 4	75 ± 5	75 ± 1	76 ± 2
45 °C	77 ± 8	77 ± 7	76 ± 7	76 ± 4	75 ± 3

Reaktionsbedingungen: 14 µmol Vorläufer, 18 µL TEA, 22 µmol Pd(tppts)₄, CuI gelöst in 100 µL MeCN, aAusbeute bestimmt mittels HPLC, n=3

radiochemische Ausbeute von zuvor 30 ± 2 % auf 35 ± 2 % gesteigert werden. Der Einsatz eines wasserlöslichen Phosphinliganden ermöglicht die Verwendung eines überwiegend wässrigen Reaktionsmediums für die Konjugation, was einerseits ideal zur Markierung von Biomolekülen ist und andererseits die Isolierung des Produktes, gerade bei sehr polaren Verbindungen, deutlich vereinfacht. Zudem konnte die gesamte Reaktionszeit um 10 Minuten reduziert werden. Die radiochemische Reinheit des Tracers war in allen Fällen > 99 % und die molare Aktivität nach einer Synthese für *in vivo*-Untersuchungen betrug 25 GBq/µmol bei einer Produktaktivität von 970 MBq (n=1).

3.2.1.5 Downscaling der Vorläufermenge zur Radiomarkierung von [¹⁸F]26

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich der PSMA-Tracer **26** in guter Ausbeute unter milden Bedingungen radiomarkieren lässt, sollte zuletzt für ein peptidtaugliches Markierungsprotokoll die benötigte Vorläufermenge reduziert werden. So entsprächen die bisher eingesetzten 14 µmol Markierungsvorläufer bei der geplanten Radiomarkierung des all-D Peptids RD2 einer Masse von circa 25 mg. Neben dem nicht unerheblichen Aufwand für die Synthese der Peptide, bzw. deren Kosten bei Auftragssynthesen, könnte durch derart hohe Vorläufermengen die Reaktion gestört und die Aufreinigung des Radiotracers deutlich erschwert werden.

Zunächst wurde die Vorläufermenge in der Eintopfsynthese entsprechend den zuvor optimierten Bedingungen reduziert. Angefangen bei 4 µmol ging die RCA merklich zurück, bei 1,4 µmol wurde mit 7 ± 3 % RCA nur noch etwa ein Fünftel der ursprünglichen Ausbeute erreicht. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist eine in Abb. 36 gezeigte konkurrierende Reaktion von nicht umgesetztem Alkiniodonium-Vorläufer aus der ersten Stufe

bei einer Eintopfsynthese. Dadurch wird in der zweiten Stufe zusätzliches Alkin umgesetzt, was gerade bei geringen Vorläufermengen die verfügbare Menge für die gewünschte Reaktion mit $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ noch einmal weiter reduziert.

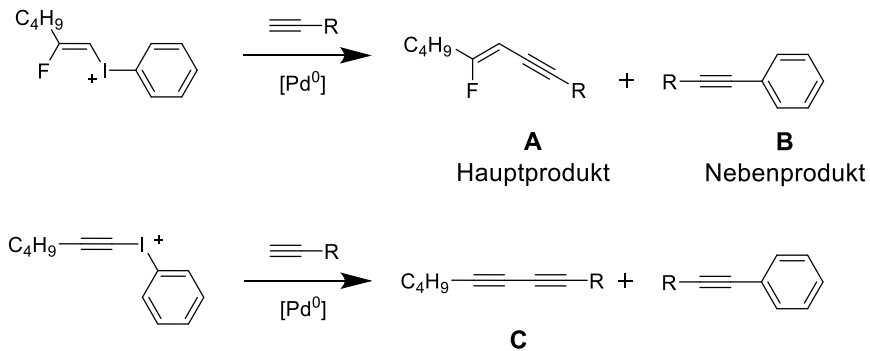


Abb. 36: Konkurrierende Reaktionen bei der Sonogashira-Kupplung mittels Eintopfsynthese

Ein deutliches Anzeichen für das Auftreten beider gezeigten Reaktionen ist in einem präparativen Chromatogramm der Aufreinigung des Reaktionsgemisches sichtbar (Abb. 37). Das Nebenprodukt des Typs B tritt aufgrund der nicht vollständig chemoselektiven Reaktion stets auch in geringen Mengen bei der Synthese der ^{19}F -Referenz auf und kann daher isoliert und identifiziert werden. Bei der Eintopf-Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\mathbf{26}$ wurde das Nebenprodukt

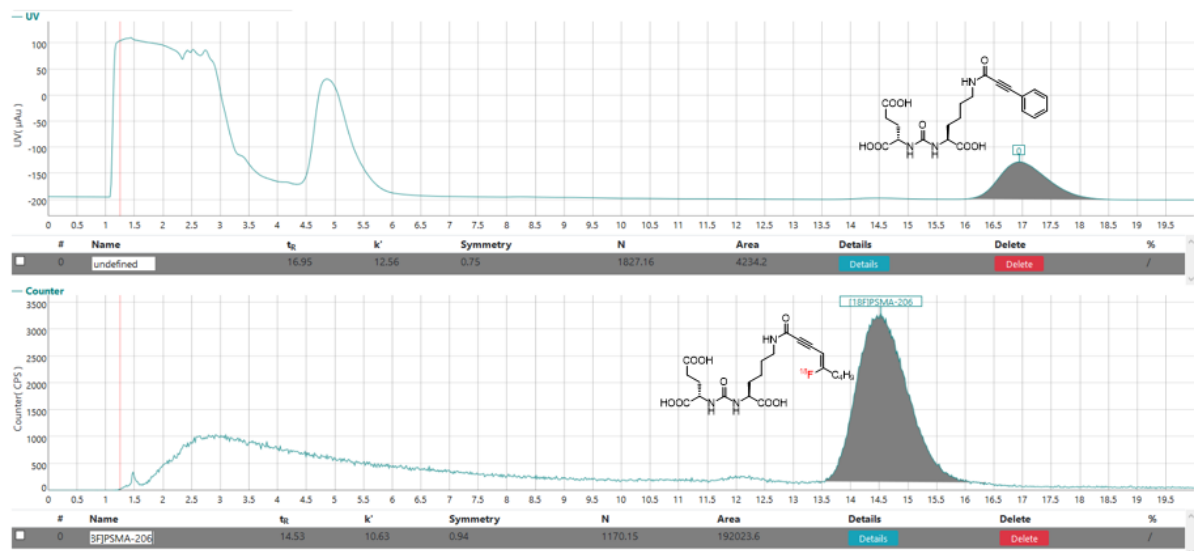


Abb. 37: Chromatogramm der semipräparativen Aufreinigung von $[^{18}\text{F}]\mathbf{26}$ nach der Radiosynthese. HPLC-Bedingungen: Phenomenex Synergy Hydro-RP, 10 x 250 mm, 27,5 % MeCN, 0,1 % TFA, 7,4 mL/min

vom Typ B bei der Isolierung mittels HPLC im UV-Kanal beobachtet. Aufgrund der n.c.a.-Bedingungen kann dieser, relativ betrachtet, große Anteil jedoch nur aus der Reaktion des Alkiniodoniumsalz stammen.

Um dennoch die Vorläufermenge reduzieren zu können, muss daher $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ nach der Reaktion von seinem verbliebenen Vorläufer abgetrennt werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten ist dies jedoch nur mittels HPLC möglich. Dazu war ein Zusatz von 0,1 % Trifluoressigsäure zum Laufmittel notwendig, um scharfe Peaks zu erhalten. Es konnte eine Trennung bis zur Basislinie erreicht werden, was die Isolierung theoretisch ermöglicht, in der Praxis allerdings fehleranfällig sein dürfte. Es wurde jedoch eine starke Erhöhung der Retention sowie der Auflösung zwischen beiden Iodoniumsalzen bei steigender TFA-Konzentration beobachtet - vermutlich aufgrund der stärkeren Bildung von Ionenpaaren. Im Hinblick auf die limitierte pH-Stabilität der C18-modifizierten stationären Phase der HPLC-Säule war die Konzentration auf maximal 0,3 % beschränkt. Die Auflösung verbesserte sich derart weit, dass wiederum durch eine Erhöhung des Anteils organischen Lösungsmittels die Retentionszeit stark verkürzt werden konnte. Dadurch ergab sich eine robuste Trennung innerhalb von lediglich 7 Minuten. (Abb. 57). Durch den Zusatz von TFA zum Laufmittel findet wahrscheinlich, analog zur Ionenpaarchromatographie, parallel ein Anionenaustausch statt, sodass nach der Trennung $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ -Trifluoacetat erhalten wird. Im Vorfeld wurde jedoch bereits gefunden, dass das Gegenion keinen Einfluss bei der Sonogashira-Reaktion hat.

Mit HPLC-gereinigtem $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ wurde unter Verwendung von 100 nmol Vorläufer erneut eine Optimierungsstudie durchgeführt (Tabelle 10). Nach einer anfänglichen Reduzierung des ohnehin im Reaktionsmedium sehr schlecht löslichen Kupferiodids konnte durch geringere Mengen des Palladiumkatalysators eine starke Steigerung der RCA erreicht werden (Eintrag 2-5). Mit 59 % wurde hierbei, trotz der sehr geringen Vorläufermenge, eine vergleichbare Ausbeute erhalten, wie zuvor unter Verwendung von 14 μmol des Alkins in der Eintopfsynthese. Bei einer weiteren Reduzierung der Kupfermenge zeigte die RCA eine leicht sinkende Tendenz (Eintrag 6-8). Die im letzten Schritt untersuchte Zusammensetzung von Wasser und Acetonitril zeigte hingegen keinen relevanten Einfluss, sodass der Anteil an organischem Lösungsmittel bei späteren Anwendungen der Löslichkeit der Zielverbindung angepasst werden kann.

Tabelle 10: Optimierung der Radiomarkierung unter Verwendung niedriger Vorläufermengen

Eintrag	Pd(tppts) ₄ [nmol]	CuI [μg]	MeCN/H ₂ O [V:V]	RCA ^a
1	550	2000	25 %	21 ± 3
2	550	500	25 %	30 ± 4
3	275	500	25 %	52 ± 3
4	138	500	25 %	54 ± 3
5	68	500	25 %	59 ± 3
6	68	750	25 %	57 ± 2
7	68	250	25 %	52 ± 3
8	68	125	25 %	45 ± 1
9	68	500	12.5 %	53 ± 3
10	68	500	37.5 %	48 ± 4
11	68	500	50 %	53 ± 2

Reaktionsbedingungen: 100 nmol Vorläufer, 400 μL Lösungsmittel, 30 °C, 10 min.^a RCA bestimmt mittels HPLC, unlösliches ¹⁸F ≤ 5 % n ≥ 3

3.2.2 Synthese und Radiomarkierung von Modellverbindungen für nicht-aminreaktive Linker

Alle bisher untersuchten Linker wurden über ein primäres Amin in die Modellverbindungen eingeführt. Bei den all-D Peptiden ist jedoch ein freier N-Terminus wichtig für das Bindungsverhalten, da die Affinität unter anderem maßgeblich von der Nettoladung der Peptide abhängig ist. Für D3 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Affinität in der Reihe D3_{COOH} < D3_{COONH₂} = cD3 < cD3_r zunimmt [119]. Zwar bestünde die Möglichkeit, die Sequenz des zu markierenden Peptides C-terminal mit einem Lysin zu verlängern, um dieses dann über das Seitenkettenamin mit dem Linker zu funktionalisieren, dies könnte jedoch einen unnötig großen Einfluss auf die Struktur des Tracers haben. Daher wurden Möglichkeiten zur direkten C-terminalen Alkinfunktionalisierung gesucht.

3.2.2.1 Synthese und Radiomarkierung von *N*-(4-Ethynylphenyl)acetamid

Als primäres Amin könnte *p*-Ethynylanilin durch Amidierung des C-Terminus zur Alkinfunktionalisierung verwendet werden. Im Gegensatz zu unverzweigten Aminen wie beispielsweise Propargylamin erleichtert der Benzolring die Detektierbarkeit mittels UV-Detektoren durch seine hohe Absorption, was sowohl für die Modellverbindung als auch für eine spätere Anwendung für Peptide in der Praxis vorteilhaft sein könnte. Bei der in Abb. 38 skizzierten Synthese wurde zunächst das käufliche *p*-Ethynylanilin durch Acylierung zum Amid umgesetzt. Der Markierungsvorläufer wurde daraufhin zur ^{19}F -Referenz **28** umgesetzt. Die Radiomarkierung unter den nicht-optimierten, allgemeinen Reaktionsbedingungen (vgl. Tabelle 5) gelang mit 42 ± 8 % RCA (HPLC, $n=3$).

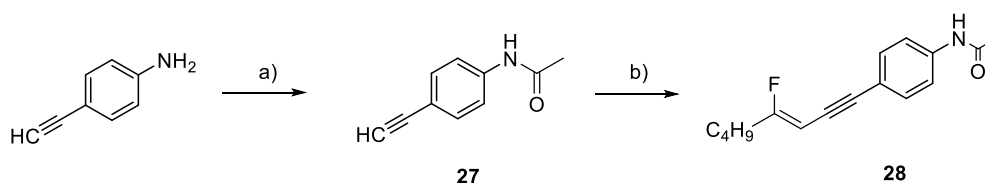


Abb. 38: Synthese der *p*-Ethynylanilinbasierten Modellverbindung **28**. Reaktionsbedingungen: a) (Ac)₂O, DCM, RT, 6 h, 97 %; b) Pd(OAc)₂, PPh₃, CuI, TEA, DMF, FH₆I⁺, RT, 15 min, 42 %.

3.2.2.2 Synthese und Radiomarkierung einer Propargylglycinbasierten Modellverbindung

Eine elegante Möglichkeit zur Alkinfunktionalisierung von Peptiden stellt die nicht in der Natur vorkommende Aminosäure Propargylglycin dar. Mittels Standardpeptidsynthese kann diese Aminosäure in beliebiger Position innerhalb der gesamten Sequenz eines Peptides zur Alkin-Modifikation eingesetzt werden. Das dazu bei der üblichen Fmoc-basierten SPPS benötigte *N*- α -(Fluorenylmethoxycarbonyl)-propargylglycin (Fmoc-Pra-OH) ist kommerziell als *L*- sowie *D*-Enantiomer erhältlich. Ein mit Propargylglycin modifiziertes Peptid wurde von der Arbeitsgruppe Wüst mittels Sonogashira-Kupplung mit 4- ^{18}F Fluoriodbenzol (^{18}F FIB) radiomarkiert [81].

Als geeignete Modellverbindung wurde racemisches Ac-Pra-OBn (**31**) mittels der in Abb. 39 gezeigten Malonestersynthese, ausgehend von Diethylacetamidomalonat, synthetisiert und anschließend zur ^{19}F -Referenzverbindung **32** umgesetzt. Unter den nicht-optimierten, allgemeinen Markierungsbedingungen konnte das Propargylglycinmodell mit einer RCA von 51 ± 6 % mit ^{18}F FH₆I⁺ konjugiert werden. Durch die gute Markierungsausbeute, seine

Vielseitigkeit und die Eignung zur Festphasen-Peptidsynthese stellt Propargylglycin einen vielversprechenden Linker zur Alkinfunktionalisierung von Peptiden dar.

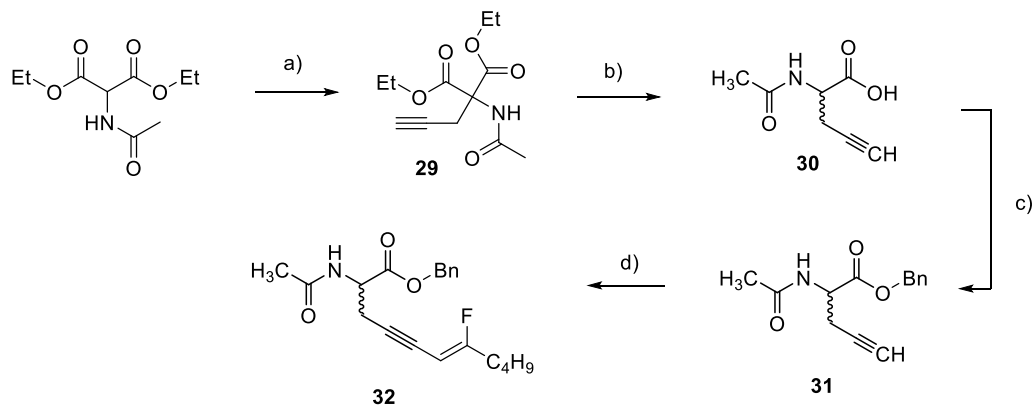


Abb. 39: Synthese der Propargylglycin Modellverbindung 32. Reaktionsbedingungen: a) Cs_2CO_3 , Propargylbromid, MeCN, 18 h, 90 %; b) KOH, MeOH/ H_2O , Rückfluss, 4 h, 69 %; c) BnBr, Cs_2CO_3 , DMF, RT, 4 h, 94 %; d) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PPh_3 , CuI, TEA, DMF, FHexI^+ , RT, 15 min, 42 %.

3.2.2.3 Synthese und Radiomarkierung eines Alkin-funktionalisierten Thiols

Eine weitere Möglichkeit zur Einführung eines Alkinlinkers in Biopolymere ist der Thiolrest des Cysteins. Thiole sind starke Nukleophile und können durch eine einfache Alkylierung beispielsweise mit Propargylbromid mit einem Alkin substituenten versehen werden. Um die Radiomarkierung zu untersuchen, wurde bei dem in Abb. 40 gezeigten Glu-C(O)-Cys-Derivat **33** zunächst die Carbonsäuren entschützt und der Markierungsvorläufer anschließend zur ^{19}F -Referenz **35** umgesetzt. Die Konjugation des Vorläufers **34** mit $[\text{F}^{18}]\text{FHexI}^+$ ergab den potentiellen PSMA-Ligand $[\text{F}^{18}]\text{35}$ mit einer RCA von 55 ± 7 % (HPLC, $n=3$).

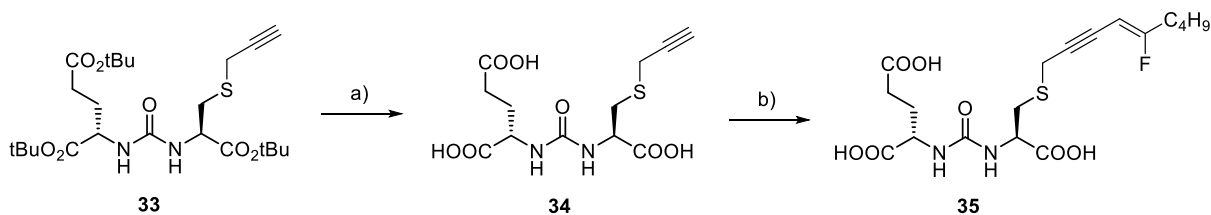


Abb. 40: Synthese der cysteinbasierten Modellverbindung 35. Reaktionsbedingungen: a) TFA, H_2O , TES (95:2.5:2.5), 2 h, 93 %; b) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PPh_3 , CuI, TEA, DMF, RT, 15 min, 18 %.

3.2.2.4 Synthese und Radiomarkierung eines argininhaltigen Testpeptids

Anhand des Glu-C(O)-Lys Peptidomimetikums **26** konnten alle notwendigen Voraussetzungen zur Radiomarkierung von Biopolymeren durch die Sonogashira-Kupplung mit $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ geschaffen werden. In einer vorangegangenen Arbeit war jedoch Cavani die Radiomarkierung des argininreichen all-D Peptids D3 durch Acylierung mit N-Succinimidyl-4- $[^{18}\text{F}]\text{fluorbenzoat}$ ($[^{18}\text{F}]\text{SFB}$) nicht möglich [146]. Obwohl dabei die Strategie an einem Modellpeptid ohne Argininreste erfolgreich getestet werden konnte, war bereits die Darstellung der ^{19}F -Referenz für die Konjugation an D3 kaum möglich. Eine von Richter et al. beschriebene Radiomarkierung eines zellpenetrierenden, argininreichen Phosphopeptids mit $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ unter konventionellen Bedingungen war ebenfalls mit isolierten RCA von 2-4 % wenig erfolgreich [12]. Deutlich bessere Ergebnisse wurden hier durch die Verwendung eines mikrofluidischen Reaktors erzielt. Diese Arbeitstechnik ist jedoch sehr komplex, stellt in sich eine Herausforderung dar und konnte sich daher nicht in der Praxis durchsetzen. Diese Beispiele demonstrieren, dass argininhaltige Peptide besonders anspruchsvoll hinsichtlich ihrer Radiomarkierung sind. Aus diesem Grund sollte vor einer Markierung von all-D Peptiden mit $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ zunächst anhand einer argininhaltigen Modellverbindung überprüft werden, ob dessen Guanidgruppe bei der Reaktion toleriert wird und inwiefern dazu die Reaktionsbedingungen angepasst werden müssen. Dazu fiel die Wahl auf ein Dipeptid aus einem N-terminalen Arginyl, das mit Propargylglycin gekuppelt und gleichzeitig alkinfunktionalisiert wurde (s. Abb. 41). Das Modellpeptid entspräche damit den letzten beiden Aminosäuren eines möglichen Propargylglycin-funktionalisierten RD2.

Um die Carbonsäure des Propargylglycins für die darauf folgende Peptidkopplung zu schützen, wurde diese mit Methanol und Thionylchlorid verestert. Die anschließende Peptidkupplung von Fmoc-Arg(Pbf)-OH mit HATU und DIPEA verlief praktisch quantitativ. Bei der Entschützung bildete sich jedoch durch eine intramolekulare Lactambildung ein Nebenprodukt, welches nicht durch einfache Säulenchromatographie abgetrennt werden konnte. Daher wurde die Synthese wiederholt, wobei der Methylester durch einen Benzylester ersetzt wurde, um eine Isolierung des finalen Dipeptids zu vereinfachen. Die Synthese des Propargylglycinbenzylesters war jedoch im Gegensatz zum Methylester problematisch. Die Veresterung mit Benzylalkohol und Thionylchlorid gab in mehreren Synthesen nur sehr geringe und schlecht reproduzierbare Ausbeuten, obwohl diese Reaktionen für das sehr eng verwandte Allylglycin mit guter Ausbeute beschrieben wurden [147]. Eine Fischer-Veresterung in Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure, Molekularsieb oder durch azeotrope Destillation lieferte

ebenfalls nicht den Benzylester. Daher wurde in einer dreistufigen Syntheseroute zunächst das Amin des Propargylglycins mit Boc geschützt, um die Carbonylgruppe selektiv mit Benzylbromid alkylieren zu können. Im Anschluss wurde die Boc-Gruppe wieder entfernt, wobei der Benzylester insgesamt mit 71 % Ausbeute erhalten wurde. Die Entschützung nach der praktisch quantitativen Peptidkupplung verlief mit 31 % nur in geringer Ausbeute, jedoch konnte H-Arg-Pra-OBn von seinem Nebenprodukt isoliert werden. Zuletzt wurde das Modellpeptid zum Markierungsstandard umgesetzt.

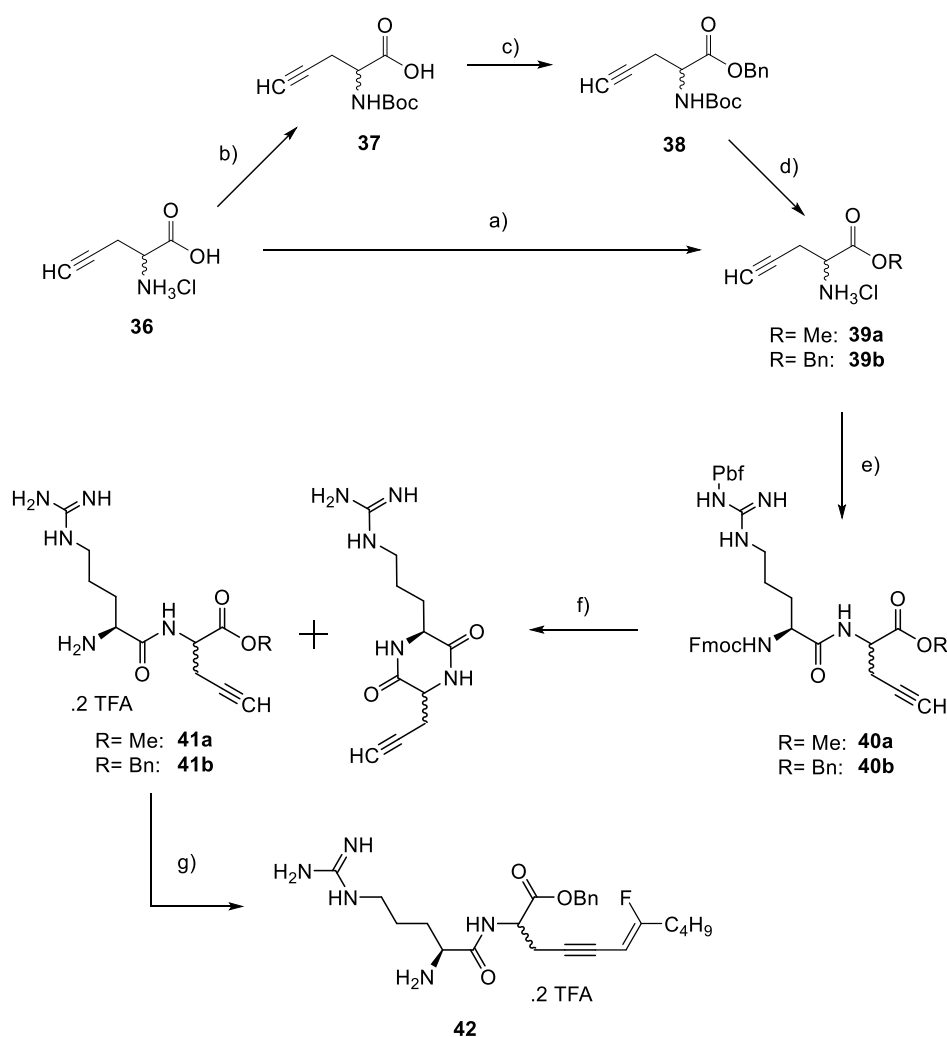
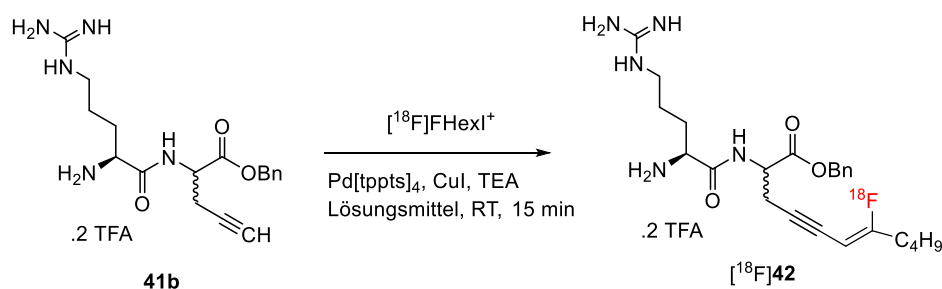


Abb. 41: Synthese eines Arginyl-testpeptids. Reaktionsbedingungen: a) ROH, SOCl_2 , $0^\circ\text{C} - 60^\circ\text{C}$, R=Me: 85 %, R= Bn: 0-25 % b) $(\text{Boc})_2\text{O}$, Na_2CO_3 , MeCN/ H_2O , $0^\circ\text{C} - \text{RT}$, 18 h, 96 %; c) Cs_2CO_3 , BnBr, DMF, RT, 16 h, 81 %; d) 4M HCl/Diocan, $0^\circ\text{C} - \text{RT}$, 1h, 88 %; e) Fmoc-Arg(Pbf)-OH, HATU, DIPEA, DMF, RT, 90 min, R=Me: 95 %, R=Bn: 98 %; f) 1. 20 % Piperidin/DMF, 30-60 min, 2. TFA/ H_2O 95:5, RT, 2 h, R=Me: Produkt nicht isolierbar, R=Bn: 31 %; g) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PPh_3 , CuI, TEA, DMF, FHexI^+ , RT, 20 min, 65 %.

Bei der anschließenden Radiomarkierung wurde eine Vorläufermenge von 100 nmol eingesetzt. Dazu wurden die Bedingungen zur Radiomarkierung des PSMA-Liganden [^{18}F]26 mit niedriger Vorläufermenge übernommen (s. Tabelle 11, Eintrag 1). Da bekannt ist, dass Guanidiniumverbindungen Übergangsmetalle wie etwa Kupfer komplexieren [148], wurde jedoch zunächst die Kupfermenge auf 2 mg erhöht. Obwohl sich zuvor Acetonitril/Wasser

Tabelle 11: Optimierung der Radiomarkierung von [^{18}F]42 mit niedriger Vorläufermenge



Eintrag	Vorläufer [nmol]	CuI [mg]	TEA [μL]	Lösungsmittel [% v/v]	RCA ^a
1	100	2	18	H ₂ O/MeCN 75:25	-
2	100	2	18	DMF/H₂O 97:3	34 ± 3
3	100	0,5	18	DMF/H ₂ O 97:3	36 ± 1
4	100	0,5	18	DMF/MeCN 50:50	43 ± 2
5	100	0,5	18	DMF/MeCN 12:88	47 ± 2
6	100	0,5	18	MeCN/H₂O 95:5	39 ± 2
7	100	0,5	18	MeCN/H₂O 50:50	16 ± 1
8	50	0,5	18	DMF/H ₂ O 97:3	61 ± 2
9	50	0,2	18	DMF/H ₂ O 97:3	58 ± 2
10	50	0,1	18	DMF/H ₂ O 97:3	51 ± 2
11	50	0,5	9	DMF/H ₂ O 97:3	70 ± 1
12	50	0,5	4,5	DMF/H ₂ O 97:3	68 ± 2

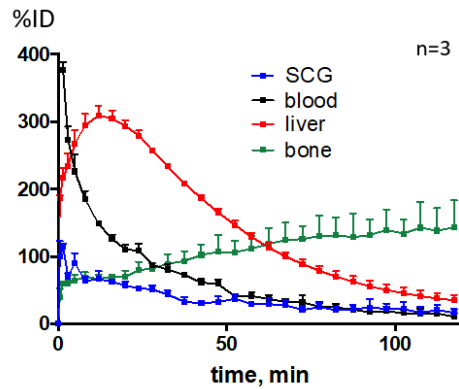
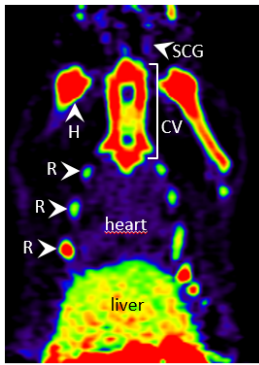
Reaktionsbedingungen: 400 μL Lösungsmittel, 68 μmol Pd[tppts]₄, [^{18}F]FHexI⁺ isoliert mittels HPLC. ^aRCA bezogen auf isoliertes [^{18}F]FHexI⁺, bestimmt mittels Radio-DC, unlösliches $^{18}\text{F} \leq 10\%$, n=3

als optimales Lösungsmittel gezeigt hat, wurde bei dieser Reaktion keine Produktbildung beobachtet. Nach weiteren Vorversuchen zeigte sich, dass die Markierung hingegen in DMF möglich war und die Kupfermenge hierin erneut reduziert werden konnte (Eintrag 2 und 3). Der Vergleich unterschiedlicher Lösungsmittel (Eintrag 4-7) zeigt, dass DMF teilweise durch Acetonitril ersetzt werden kann, Acetonitril und insbesondere Acetonitril/Wasser ohne DMF jedoch schlechtere RCA ergaben. Im Weiteren wurde mit DMF als Lösungsmittel die Vorläufermenge noch einmal weiter reduziert, wodurch überraschenderweise die Ausbeute sogar gesteigert werden konnte. Nachdem der Einfluss der Menge des Kupfers und des Triethylamins untersucht worden war (Eintrag 8-12), konnte unter optimierten Bedingungen eine RCA von 70 ± 1 % unter Verwendung von lediglich 50 nmol Vorläufer erhalten werden (Eintrag 11). Damit wurde einerseits gezeigt, dass die Sonogashira-Reaktion grundsätzlich Guanidinreste toleriert, andererseits konnte bestätigt werden, dass Propargylglycin gut als Linker zur Markierung von Peptiden durch Sonogashira-Reaktion mit $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ geeignet ist.

3.3. *In vitro*- und *in vivo*-Beurteilung des potentiellen PSMA-Tracers $[^{18}\text{F}]\mathbf{26}$ (PSMA-206)

Um die Stabilität des mit $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ markierten Tracers zu untersuchen, wurde exemplarisch der potentielle PSMA-Ligand **26** untersucht. Eine in Phosphatpuffer inkubierte Probe (pH 7.2 bei 37 °C) zeigte nach 6 Stunden weiterhin eine radiochemische Reinheit von > 99%, somit kann der Tracer auch in Phosphatpuffer über weitere Strecken transportiert werden. Nach einer manuellen Synthese konnte der Tracer dem Institut für Radiochemie und Experimentelle Molekulare Bildgebung (Uniklinik Köln) für *in vivo*-Untersuchungen an gesunden Ratten zur Verfügung gestellt werden.

Eine Beurteilung der Bindungseigenschaften ist durch die natürliche Expression von PSMA in bestimmten Nervenknotten möglich. Wie aus Abb. 42 ersichtlich, wurde jedoch vor allem eine kontinuierlich ansteigende Aufnahme von Aktivität in den Knochen beobachtet, was ein deutliches Anzeichen für eine Defluorierung ist. Der Tracer ist somit *in vivo* nicht stabil. Eine mögliche Erklärung liegt in der Kombination aus der 2-Fluorhex-1-en-1-yl-Gruppe sowie des über die Dreifachbindung konjugierten Carbonylkohlenstoffs. Die sich daraus ergebende Struktur stellt einen Michael-Akzeptor dar und könnte daher anfällig für einen nukleophilen Angriff sein.



60-120 min:
 SCG: 25.5 ± 5.9 %ID
 Background: 6.4 ± 1.7 %ID
 TBR: 4.0 ± 0.6 %ID
 Knochen: 161.7 ± 18.7
 Leber: 69.6 ± 5.3 %ID

CV: cervical vertebrae (Halswirbel) SCG: superior cervical Ganglion
 H: humerus (Oberarmknochen) TBR: target-to-background ratio
 R: Rippe

Abb. 42: PET-Studie von PSMA-206 an gesunden Ratten. Deutlich ist die rasche Defluorierung, die sich als Aktivitätsakkumulation in den Knochen bemerkbar macht. Abbildung zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Heike Endepols, Institut für Radiochemie und Experimentelle Molekulare Bildgebung, Uniklinik Köln.

Um der Ursache für die Defluorierung auf den Grund zu gehen und zukünftig alternative Linkerstrukturen evaluieren zu können, wurde nach einem *in vitro*-Modell für die Defluorierung gesucht. Dazu wurde zunächst die Stabilität des Tracers in Rattenserum untersucht. Die Ergebnisse eines typischen Verlaufs sind in Abb. 43 dargestellt. Im Serum wurde über einen Zeitraum von zwei Stunden praktisch keine Abnahme der radiochemischen Reinheit entdeckt, wobei die Wiederfindungsrate nach der Proteinfällung mit Acetonitril mit ca. 80-100 % stets hoch war.

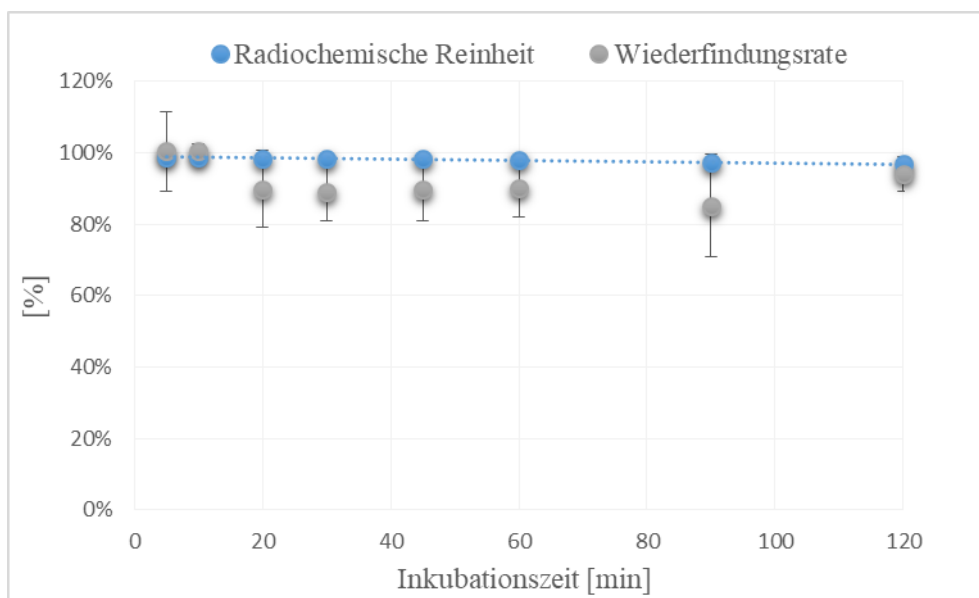


Abb. 43: Stabilität von $[^{18}\text{F}]\text{26}$ in Rattenserum

Vergleichbare Ergebnisse wurden in nicht abgebildeten Stabilitätstests mit Leber- und Lungenmikrosomen gefunden. Diese bilden primär das Cytochrom P450 System ab und stellen ein etabliertes *in vitro*-System für den Phase-I Metabolismus dar. Eine mögliche Ursache für die fehlende Reproduzierbarkeit der Defluorierung *in vitro* könnte die Beteiligung einer frostempfindlichen Komponente sein. Die Inkubationsmedien wie Serum oder Mikrosomenpräparate werden durch Tiefkühlung haltbar gemacht. Dadurch könnten besonders empfindliche Proteine ihre biologische Aktivität verlieren. Daher wurden zuletzt Stabilitätstests in frisch entnommenem (humanen) Vollblut durchgeführt. Hierbei wurde ebenfalls kein Metabolit des Tracers entdeckt. Im Gegensatz zu den vorherigen Tests war die Wiederfindungsrate jedoch bei nur etwa 20-60 %, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass zwar ein Metabolit gebildet wird, durch Co-Fällung bei der Entfernung der Proteine jedoch unentdeckt bleibt. Sowohl für den negativ geladenen Radioliganden als auch für Fluorid-Ionen wurde eine ausgeprägte Adsorption an Proteine beobachtet. Durch eine eigens zu diesem Zweck

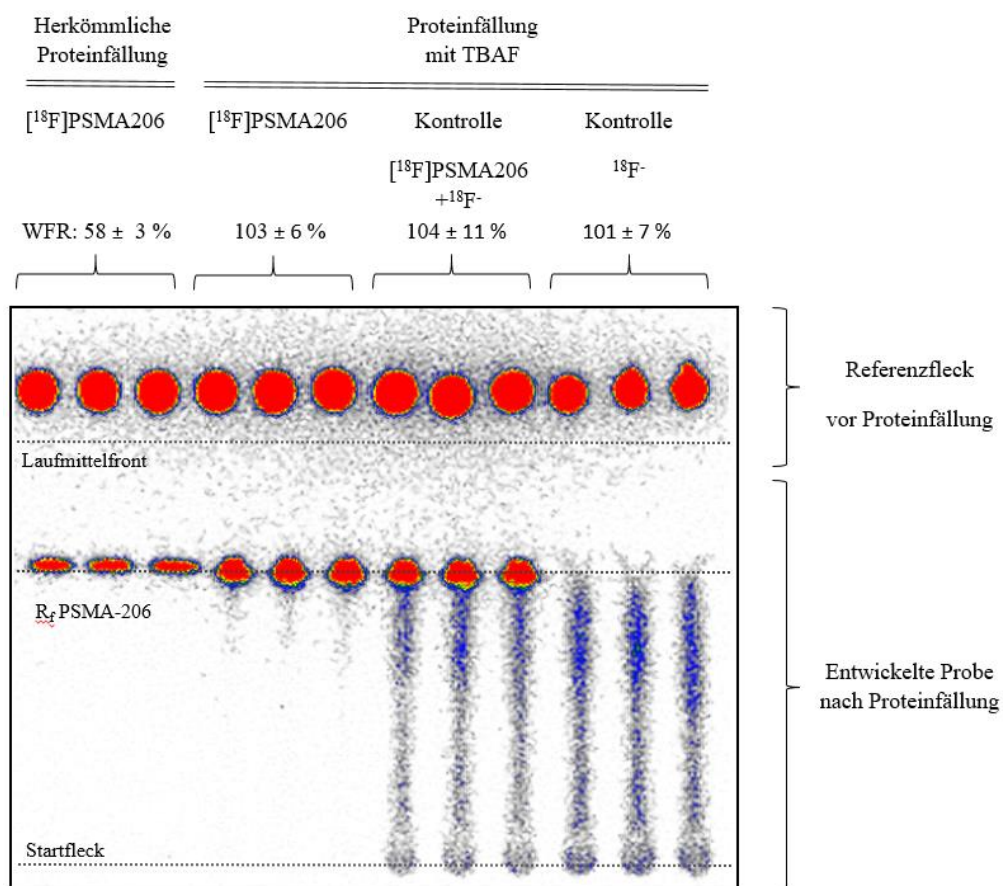


Abb. 44: Radio-DC eines Stabilitätstests von PSMA-206 nach 120 min Inkubation bei 37 °C in Vollblut mit herkömmlicher Proteinfällung (links), Proteinfällung mit TBAF (Mitte links), sowie Kontrollversuche zur Bestimmung der Wiederfindungsrate nach der modifizierten Proteinfällung (rechts)

entwickelte modifizierte Proteinfällung unter Zusatz von Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) konnte jedoch eine Wiederfindungsrate von etwa 100 %, sowohl für den Radioliganden, als auch für [^{18}F]Fluorid erzielt werden (s. Abb. 44). In einem Kontrollversuch wurde zudem bei einer Mischung aus Radioligand und [^{18}F]Fluorid das zugesetzte Verhältnis der beiden Aktivitäten korrekt auf der Radio-DC wieder gefunden. Somit kann mit dieser Methode grundsätzlich [^{18}F]Fluorid in Vollblut sicher identifiziert und auch quantifiziert werden. Dennoch wurde nach 120 Minuten Inkubation in Vollblut ebenfalls keine Defluorierung des PSMA-206 beobachtet.

Zusammenfassend steht somit im Rahmen der Möglichkeiten kein geeignetes *in vitro*-Modell für die Defluorierung von PSMA-206 zur Verfügung. Da im Mikrosomenassay keine Metabolisierung beobachtet wurde, konnte eine Beteiligung von Cytochrom P450 nicht nachgewiesen werden. Eine substitutionsartige Reaktion durch Nucleophile konnte zumindest im Serum und frischen Vollblut nicht beobachtet werden.

3.4 Radiomarkierung von RD2 mit [^{18}F]FHexI $^{+}$ mittels Sonogashira-Kupplung

Nachdem alle notwendigen Voraussetzungen für die Radiomarkierung von argininreichen Peptiden geschaffen werden konnten, wurde die Synthese des in Abb. 45 dargestellten, mit D-Propargylglycin modifizierten RD2-Derivats in Auftrag gegeben. Abgesehen von seiner guten Eignung für die SPPS stellt das Konjugat aus Propargylglycin und FHexI $^{+}$ keinen Michael-Akzeptor dar, wodurch eine Verbesserung der Stabilität *in vivo* erwartet wurde.

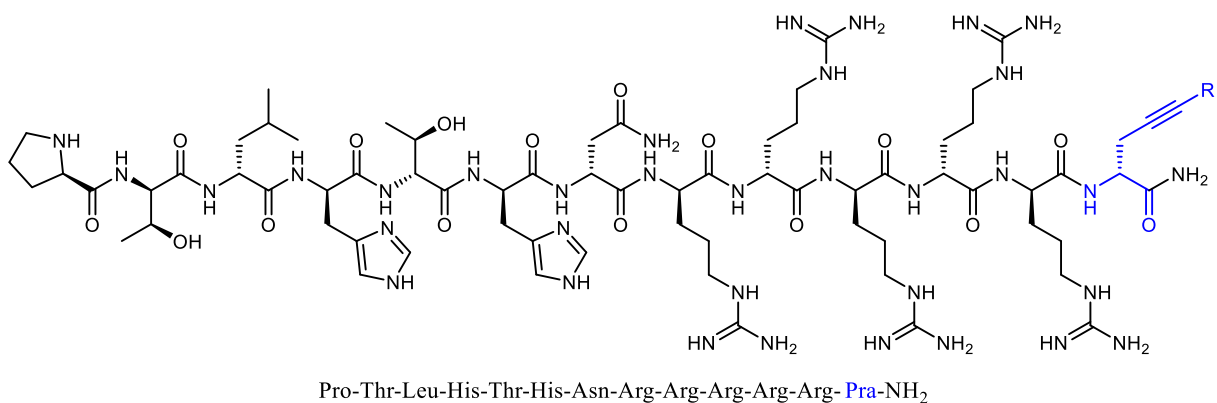


Abb. 45: Leitstruktur des Markierungsvorläufers H-RD2-Pra-NH $_2$ (R=H) und des Konjugats mit FHexI $^{+}$ **43** (R=2-Fluorhex-1-en-1-yl) (Pra-Linker hervorgehoben in blau).

Wie in allen vorangegangenen Radiosynthesen musste auch für H-RD2-Pra-NH₂ zunächst die ¹⁹F-Referenz H-RD2-Pra(FHex)-NH₂ (**43**) synthetisiert werden. Nach der Umsetzung des Peptids mit FHexI⁺ konnte jedoch zunächst nicht das gewünschte Produkt nachgewiesen werden. Im Rohprodukt wurde mittels ESI-MS ausschließlich das unkonjugierte Peptid gefunden. Aufgrund der geringen UV-Absorption des Peptids, verglichen mit der anderer Reaktanden, und des schwer abzuschätzenden Einflusses der Fluorhexenylgruppe auf die Lipophilie der RD2-Leitstruktur konnte mittels HPLC kein Peak einem möglichen Produkt zugeordnet werden. Daher wurde unüblicherweise zunächst versucht, das Peptid zu markieren, um mithilfe radioaktiver Produkte im Aktivkanal der HPLC in Frage kommende Retentionszeiten des Konjugats zu finden. Mithilfe eines gebildeten Aktivprodukts in einem sinnvollen Elutionsbereich konnten daraufhin bei der Synthese des ¹⁹F-Referenzverbindung Spuren des gewünschten Konjugats gefunden und isoliert werden. Mittels MALDI-MS konnte das Produkt mit einer geringen Abweichung < 5 ppm der Zielverbindung zugeordnet werden. Eine Quantifizierung der Ausbeute konnte jedoch aufgrund der geringen (nicht zuverlässig wägbaren Masse) nicht durchgeführt werden.

Die zuvor ausführlich an Modellverbindungen optimierten Markierungsbedingungen sollten daraufhin möglichst zielstrebig auf RD2 angewendet werden. Die Radiomarkierung fand zunächst unter den für das Modell-Dipeptid **41b** optimierten Bedingungen in DMF statt. Hierbei wurde überraschenderweise jedoch nur eine sehr geringe Bildung des Produktes beobachtet, sodass selbst nach 2 Stunden Reaktionszeit die RCA bei weniger als 10 % lag. Hingegen waren die zuvor bei dem Downscaling der Vorläufermenge des PSMA-206 entwickelten wässrigen Bedingungen deutlich besser geeignet. Aufgrund der bekannt hohen Affinität der argininreichen Peptide für Glas wurde auf die typischerweise verwendeten Reaktoren aus Borosilikatglas verzichtet und die Reaktion stattdessen in Mikrozentrifugenröhrchen aus Polypropylen durchgeführt (Eppendorf Tubes). Obwohl für das stark positiv geladene Peptid keine starke Wechselwirkung mit PP erwartet wurden, konnten in einigen Fällen relevante Mengen der Aktivität nicht aus dem Reaktor überführt werden. Daher wurden im Folgenden alle radiochemischen Ausbeuten isoliert bestimmt, wobei 35 ± 7 % RCA, bezogen auf das eingesetzte Aliquot des mittels HPLC isolierten [¹⁸F]FHexI⁺, ermittelt wurde (n=6). Damit war es möglich, eine für *in vivo*-Untersuchungen ausreichende Menge [¹⁸F]RD2-Pra(FHex) zu synthetisieren.

Zuletzt musste eine Methode gefunden werden, um die produktthaltige HPLC-Fraktion nach der Isolierung des Tracers in eine geeignete, injektionsfähige Lösung zu überführen. Zudem muss die Konzentration des Tracers möglichst hoch sein, da das maximale Injektionsvolumen für *in vivo*-Experimente bei Mäusen auf lediglich 150 μL begrenzt ist. Für diese Formulierung kann beispielsweise eine Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) an einer unpolaren stationären Phase durchgeführt werden. Das verdünnte Produkt wird durch eine SPE-Kartusche geleitet, darauf fixiert und kann zuletzt mit Ethanol eluiert werden. Das Ethanol wird danach verdampft und das Produkt in einer injektionsfähigen Lösung wieder aufgenommen. Es war jedoch auf mehreren getesteten SPE-Kartuschen (Sep Pak C-18, Oasis HLB, Strata-X) für eine zufriedenstellende Elution des Produkts die Zugabe einer Säure (Essigsäure oder TFA) notwendig, wodurch nach dem Verdampfen des Eluats, trotz der Zugabe von Puffer, ein inakzeptabel niedriger pH-Wert erhalten wurde. Erst später wurde gefunden, dass eine Elution mit Methanol ohne Additiv möglich war. In diesem Fall kommt für eine Anwendung *in vivo* jedoch der vollständigen Entfernung des giftigen Methanols besondere Bedeutung zu. Eine alternative Methode zur Formulierung stellt das direkte Einengen der gesamten HPLC-Fraktion bis zur Trockene dar. Dies ist beispielsweise mithilfe eines kleinen Rotationsverdampfers innerhalb von ca. 10 – 15 Minuten möglich und dauert somit nicht wesentlich länger als eine Festphasenextraktion. Im Anschluss kann das Produkt direkt in der gewünschten Matrix aufgenommen werden. Bei der Verwendung eines normalen Glaskolbens konnte jedoch nur etwa die Hälfte der Aktivität mittels des erforderlichen geringen Volumens aus dem Kolben überführt werden, was erneut die hohe Affinität von RD2 für Glas unterstreicht. Erwartungsgemäß ist dieser Effekt unter n.c.a Bedingungen besonders ausgeprägt. Um die Adsorption zu verringern, wurde daher die Oberfläche des Glases durch eine sogenannte bake-on Silikonisierung modifiziert. Dazu wird eine dünne Schicht aus Silikonöl bei hohen Temperaturen teilweise pyrolysiert, wobei sich kovalente Bindungen zwischen Silikonfragmenten und Silanolgruppen auf der Glasoberfläche ausbilden [149]. Das Ergebnis ist eine äußerst dünne, nicht mit Lösungsmitteln abwaschbare, permanente Silikonschicht auf der Glasoberfläche. Damit ließ sich die Adsorption von [^{18}F]RD2-Pra(FHex) deutlich verringern, jedoch nicht vollständig verhindern. Herausfordernd bleibt die hohe Anforderung an die Aktivitätskonzentration. Mit dem zur Verfügung stehenden Gesamtvolumen von lediglich ca. 300 μL konnte dennoch mit $87 \pm 6 \%$ ($n=7$) der Großteil des Tracers nach dem Eindampfen erneut aus dem Glaskolben überführt werden. In drei aufeinanderfolgenden Synthesen konnte für [^{18}F]RD2-Pra(FHex) ([^{18}F]43) eine effektive Ausbeute von $6 \pm 2 \%$ mit einer RCR von $> 95 \%$ erhalten werden. Die Gesamtdauer der Synthese, inklusive der

Formulierung, betrug 80 – 85 Minuten. Die Synthese eignete sich, um nach manueller Synthese das radiomarkierte RD2-Derivat für *in vivo*-Untersuchungen im Alzheimer-Mausmodell zur Verfügung zu stellen. Die Isolierung des Tracers erfolgte dabei auf einer analytischen HPLC-Säule um die Produktfraktion möglichst klein und damit schnell verdampfbar zu halten.

In der in Abb. 46 gezeigten PET-Studie wurden jedoch ähnlich wie bei den PSMA-Liganden eine starke Aktivitätsaufnahme in den Knochen beobachtet. Wie an der Zeit-Aktivitäts-Kurve erkennbar, nimmt die Aktivität im Knochen im Laufe der Messung kontinuierlich zu, sodass auch das Konjugat von [^{18}F]FHexI $^+$ und Propargylglycin defluoriert wird. Der Tracer ist daher nicht für die Bildgebung von beta-Amyloid Ablagerungen geeignet.

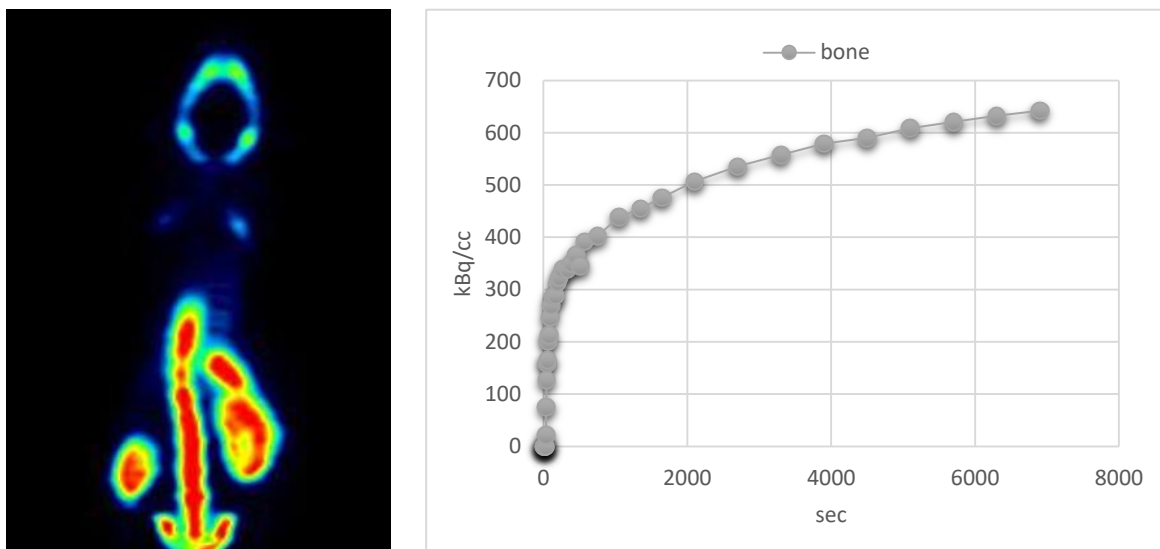


Abb. 46: PET-Studie mit [^{18}F]RD2-Pra(FHex) in einer Maus (Wildtyp). Links: PET-Aufnahme 110 – 120 min. Deutlich zu erkennen ist die Anreicherung von Aktivität in Knochen (Schädel, Wirbelsäule, Becken). Rechts: Zeit-Aktivitäts-Kurve im Knochen. Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Antje Willuweit, Forschungszentrum Jülich, Institut für Neurowissenschaften und Medizin: INM-4.

3.5 Radiomarkierung von RD2 mit ^{68}Ga

Nachdem die Radiomarkierung von RD2 mit [^{18}F]FHexI $^+$ zwar erfolgreich war, jedoch keinen stabilen Tracer *in vivo* ergab, wurde nach alternativen Markierungsstrategien gesucht. Parallel zu der Suche nach einem besser geeigneten Markierungskonzept mit ^{18}F stellt eine Markierung mit ^{68}Ga einen erfolgversprechenden Ansatz dar. Die hohe Positronenenergie des ^{68}Ga und damit verbunden die geringe Ortsauflösung ist zwar gerade bei PET Messungen im (sehr

kleinen) Mausmodell von Nachteil, demgegenüber steht jedoch ein potentiell weniger komplizierter Ansatz für einen richtungsweisenden D-Peptid-basierten Amyloidtracer. Zur Markierung mit ^{68}Ga wird ein Vorläufer benötigt, welcher mit einem geeigneten Chelator funktionalisiert wird. Für Radiomarkierungen mit ^{68}Ga gibt es im Vergleich zu ^{18}F eine geringere Anzahl kritischer Reaktionsparameter. Diese sind zudem überwiegend von der Art des verwendeten Chelators abhängig und weniger von dem Pharmakophor. Daher findet die Radiomarkierung mit ^{68}Ga häufig unter vergleichbaren Bedingungen statt. Es sind üblicherweise nur vereinzelte Anpassungen der Reaktionsbedingungen an die Leitstruktur notwendig. Dazu zählen im Wesentlichen der in einem engen Rahmen wählbare pH-Wert sowie die Temperatur. Zudem kann die Wahl des Puffers einen Einfluss haben. Üblicherweise werden die besten Ergebnisse mit 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) beziehungsweise Acetat-Puffer erhalten [150].

Um im Vorfeld grundsätzlich die Machbarkeit der Markierung von RD2 mit ^{68}Ga zu untersuchen, bevor ein Peptidvorläufer angefertigt wird, wurde auf eine geringe Restmenge (1 mg) des in Abb. 47 gezeigten RD2-Derivats zurückgegriffen. Dieser Vorläufer ist jedoch in zweierlei Hinsicht nicht optimal geeignet. Einerseits wurde für seinen ursprünglichen Verwendungszweck eine 6-Carboxyfluoresceinyl-Gruppe (FAM) als Fluoreszenzmarker hinzugefügt, was eine deutliche strukturelle Veränderung bewirkt. Andererseits ist DOTA als Chelator für Ga^{3+} zwar grundsätzlich geeignet, aufgrund der hohen benötigten Temperatur für die Inkorporation des Gallium werden jedoch besser zugeschnittene Chelatoren bevorzugt [151].

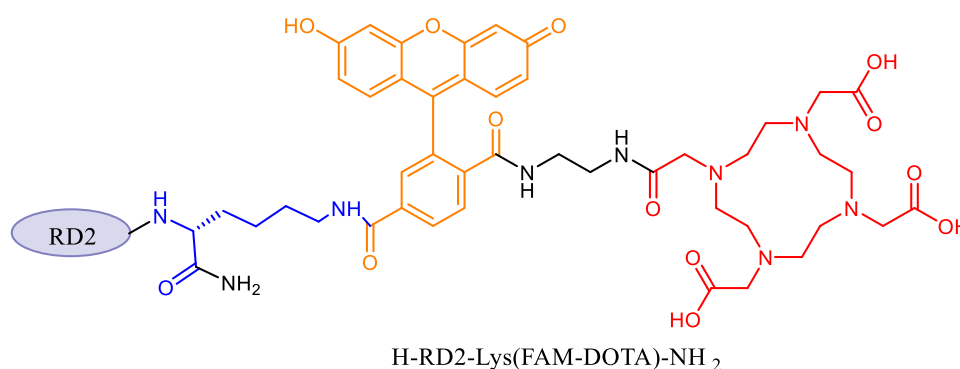


Abb. 47: Markierungsvorläufer zur vorläufigen Untersuchung von RD2 mit ^{68}Ga . Die Modifikation beinhaltet einen Lysin-Linker (blau), einen nicht zur Radiomarkierung benötigten FAM-Fluoreszenzmarker (orange) sowie den cyclischen DOTA-Monoamid-Chelator (rot)

Das Gallium-68 für die Vorversuche stammt aus einem alten Generator, dessen empfohlene Standzeit von üblicherweise 6-12 Monaten bei weitem überschritten war und der daher nicht mehr zur Produktion von Tracern unter GMP-Bedingungen eingesetzt werden konnte. Pro Elution konnten dennoch zwischen 50 und 100 MBq Aktivität erhalten werden. Aufgrund des hohen Alters war das Eluat jedoch mit erheblichen Mengen des langlebigen Mutternuklids ^{68}Ge verunreinigt ($T_{1/2}$: 270 d). In dieser Form konnte aufgrund des Risikos der langfristigen Kontamination der Laborgeräte nicht mit dem Eluat markiert werden. Es ist zudem davon auszugehen, dass noch weitere (metallische) Verunreinigungen vorhanden waren. Es ist bekannt, dass solche Metallionen eine Radiomarkierung empfindlich stören können [152]. Daher wurde der Generator über mehrere Tage hinweg regelmäßig gespült, um die Verunreinigungen weitestgehend zu reduzieren. Zudem wurde das Gallium vor der Radiomarkierung mit einer Methode, basierend auf Ionenchromatographie und acetonischer Salzsäure als Elutionsmittel, vorbehandelt, um das ^{68}Ga weiter aufzureinigen [153]. In diesem Prozess wird das Generatoreluat auf einem starken Kationentauscher fixiert, mit 80 % Aceton/0,15 M HCl gewaschen und anschließend mit 97,6 % Aceton/0,05 M HCl das ^{68}Ga eluiert. Dadurch konnten alle langlebigen Verunreinigungen entfernt werden. Jedoch wurde mittels Radio-DC neben ionischem $^{68}\text{Ga}^{3+}$ eine weitere unbekannte Spezies in wechselnden Anteilen gefunden. Für die Vorversuche wurde dies allerdings in Kauf genommen. Nach dieser Vorbehandlung erfolgte die Radiomarkierung unter Standardbedingungen in Anlehnung an [153] in HEPES-Puffer bei pH 4 – 4,5 und 95 °C für 10 Minuten. Mittels RP-HPLC wurde ein Markierungsprodukt mit minimal höherer Retention als der Vorläufer mit ca. 50 % RCA gefunden. Bei einer separaten Synthese der ^{nat}Ga -Referenz im Micromaßstab (50 µg) wurde ebenfalls ein Produkt mit geringfügig höherer Retention im UV-Kanal beobachtet. Mittels ESI-MS wurden in der Probe mehrere Peaks mit hoher relativer Intensität gefunden, die dem Galliumkomplex zugeordnet werden konnten (z.B. $[\text{M}+6\text{H}+\text{MeCN}]^{6+}$, $[\text{M}+6\text{H}+2\text{MeCN}]^{6+}$, $[\text{M}+5\text{H}+\text{MeCN}]^{5+}$). Bei dem Aktivprodukt handelt es sich somit wahrscheinlich um den gewünschten Galliumkomplex. Aufgrund der äußerst limitierten Menge an Vorläufer konnte die Referenzverbindung jedoch nicht in ausreichender Menge für eine vollständige Charakterisierung hergestellt werden.

Ermutigt durch die Vorversuche wurde der in Abb. 48 gezeigte, eigens zur Markierung mit ^{68}Ga konzipierte Vorläufer in Auftrag gegeben. Als Chelator wurde 2,2',2''-(1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triyl)triessigsäure (NOTA) ausgewählt. Er besitzt verglichen mit DOTA eine nochmals deutlich höhere thermodynamische Stabilität ($\log K_{(\text{DOTA})}$: 21,3; $\log K_{(\text{NOTA})}$: 31,0) und lässt sich bereits bei Raumtemperatur markieren [151]. Der Chelatkäfig

wurde mit Lysin als Linker über eine der Carbonsäuren des NOTA in Form von NOTA-Monoamid an RD2 gebunden.

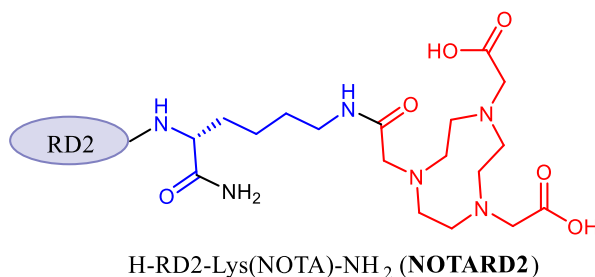


Abb. 48: Markierungsvorläufer für die Radiomarkierung mit ⁶⁸Ga. Als Modifikation wurde über einen Lysin-Linker (blau) der NOTA-Chelator als Monoamid eingeführt (rot).

Die Synthese der ^{nat}Ga-Referenzverbindung Ga-NOTARD2 erfolgte durch Umsetzung des Markierungsvorläufers mit einem Überschuss [^{nat}Ga]GaCl₃ in HEPES-Puffer. Der Umsatz war bereits nach vier Minuten quantitativ, die Reinigung erfolgte über eine SPE. Mittels MALDI-MS konnte die Identität des gewünschten Produktes mit einer geringen Abweichung von < 5 ppm bestätigt werden.

Die Radiomarkierung für die Liefersynthesen erfolgte in Anlehnung an eine Methode zur automatisierten Synthese ⁶⁸Ga-markierter Tracer mittels eines auf Natriumchlorid basierten Konzentrationsschritts [154]. Durch die unterschiedlichen Methoden zur Aufarbeitung des ⁶⁸Ga-Generatoreluats sowie die Variationen am NOTA-Chelator, die durch die Kupplung an das Zielmolekül entstehen (NOTA-Monoamid, NODAGA, CNODA, NODASA,...), finden sich in der Literatur abweichende Bedingungen zur Markierung von NOTA mit ⁶⁸Ga. So sind beispielsweise erfolgreiche Markierungen zwischen pH 3,2 und pH 4,9, bei Temperaturen zwischen 22 °C und 95 °C innerhalb von 5 – 30 Minuten beschrieben [155-158]. Daher sollten die grundlegenden Reaktionsparameter zunächst in diesem Bereich überprüft werden. Für die Verwendung des Galliumtracers für *in vivo*-Untersuchungen wurde ⁶⁸Ga aus einem GMP-konformen Generator aus der Uniklinik Köln verwendet¹. Aufgrund der aufwändigen Logistik waren Lieferungen jedoch auf ein Mindestmaß beschränkt. Die Optimierung wurde daher in Form von Einzelversuchen mit Aliquoten des erhaltenen ⁶⁸Ga nach dem Konzentrationsschritt durchgeführt. Die Bestimmung des Umsatzes erfolgt mittels Normalphase-

¹ Mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Klaus Schomäcker, AG Radiochemie, Radiopharmazie und Strahlenbiologie, Uniklinik Köln.

Dünnschichtchromatographie mit Citratpuffer pH 5.5/15 % MeOH als Laufmittel. Dabei zeigt nicht umgesetztes Ga^{3+} durch Bildung von Ga-Citrat einen hohen R_f -Wert, Markierungsprodukte verbleiben auf der Startlinie. Die Ergebnisse sind in Abb. 49 zusammengefasst. Bei 95 °C findet in HEPES ein vollständiger Umsatz unabhängig des pH-Wertes innerhalb von 10 Minuten statt. Für den Acetatpuffer wurde mit 95 % ein nur unwesentlich geringer Umsatz erhalten. Erst bei 37 °C wurde ein Einfluss des pH-Wertes beobachtet. Es wurden in einem breiten pH-Bereich gute Umsätze von ca. 80 % beobachtet, wobei pH 4,5 mit 96 % besonders heraussticht. Erst bei für Markierungen mit ^{68}Ga ungewöhnlich hohen pH-Werten oberhalb von 6,3 ging der Umsatz deutlich zurück. Die Produktion des Tracers für die biologische Evaluation wurde daher bei pH 4,5 in HEPES-Puffer durchgeführt. Um die Reaktion zu beschleunigen und einen vollständigen Umsatz des Galliums sicher zu stellen, wurde die Temperatur jedoch bei 95 °C belassen.

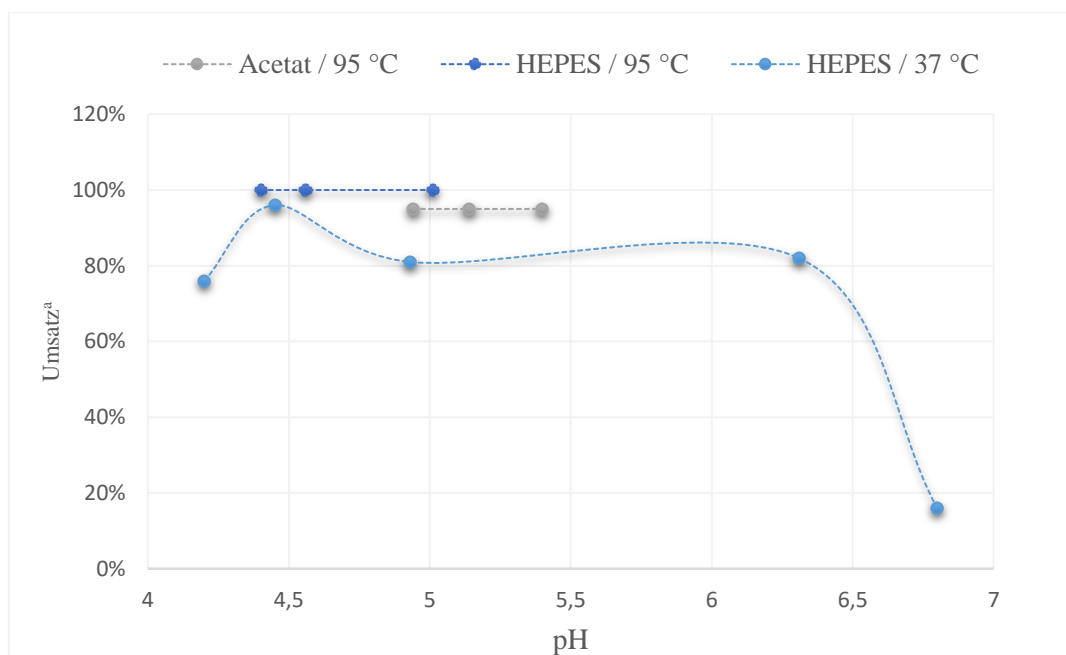


Abb. 49: Abhängigkeit des Umsatzes von $^{68}\text{Ga}^{3+}$ bei der Markierung von RD2-Lys(DOTA) von den Parametern Temperatur, pH und Puffersubstanz. Reaktionsbedingungen: 20 $\mu\text{g/mL}$ Vorläufer, 1 mL 1,5 M HEPES, 0,5 mL ^{68}Ga (5 M NaCl pH 0,5) 10 min (95 °C) ^aUmsatz bestimmt mittels Radio-DC, unlösliches $^{68}\text{Ga} < 5 \%$, $n=1$.

Ausgehend von ca. 600 MBq erhaltener ^{68}Ga -Startaktivität konnten in sechs Synthesen 124 ± 30 MBq [^{68}Ga]Ga-NOTARD2 nach 30 minütiger Synthese erhalten werden. Dies entspricht lediglich einer RCA von $28 \pm 7 \%$. Einerseits trägt dazu der durch unvollständige

Elution der Aktivität bei der NaCl-basierten Aufarbeitung des Eluats anfallende Verlust von 20 – 30 % bei, andererseits findet im Gegensatz zu den Vorversuchen mit Aliquoten der Gesamtaktivität kein vollständiger Umsatz des ^{68}Ga statt. Da bis auf die Menge des eingesetzten Generatoreluats alle weiteren Parameter konstant gehalten wurden, lag die Vermutung nahe, dass eventuelle metallische Verunreinigungen in dem Eluat selbst die Reaktion beeinflussen. Um dem entgegen zu wirken, wurde die im Vergleich zu anderen Synthesen ohnehin bereits hohe Vorläufermenge von 100 μg (50 nmol) auf die maximal mögliche Menge von 300 μg erhöht. Darüber hinaus können pharmakologische Effekte des Peptids nicht mehr ausgeschlossen werden, da nach einer Reinigung mittels SPE der Vorläufer ebenfalls im finalen Produkt enthalten bleibt. Diese Maßnahme führte jedoch zu keiner Verbesserung des Umsatzes und es wurde weiterhin freies ^{68}Ga nach Beendigung der Reaktion gefunden.

Problematischer als die unerwartet geringe, jedoch für die geplanten Versuche ausreichende Tracerausbeute war die in einigen Fällen geringe radiochemische Reinheit von 80 – 99 % (91 ± 7 %). Trotz der Aufreinigung mittels SPE stellte ionisches $^{68}\text{Ga}^{3+}$ die Hauptverunreinigung dar. Eine mögliche Erklärung besteht in einer Komplexierung von Ga^{3+} durch die Arginyle des RD2, ähnlich wie zuvor für Kupfer diskutiert. Dadurch könnte freies Gallium in Form von labilen Komplexen bei der SPE verschleppt und unter analytischen Bedingungen, bspw. Chelatisierung mit Citrat auf der Radio-DC erneut als „freies“ Gallium detektiert werden.

Zusammenfassend stellt die Radiomarkierung von RD2 mit ^{68}Ga keine zufriedenstellende Alternative zur Markierung mit ^{18}F dar. Durch die Größe des $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators und den zeitaufwändigen Transport (ca. 60-80 Minuten) ist die Startaktivität stark limitiert. Die erforderliche Vorläufermenge ist unerwartet hoch. Die nach einer SPE-Reinigung erhaltene effektive molare Aktivität ist daher durch im Produkt vorhandenen Vorläufer als „Pseudoträger“ sehr niedrig. Die erhaltene RCA ist verglichen mit vielen in der Literatur bekannten ^{68}Ga -Markierungen verhältnismäßig gering und das Endprodukt weist nach einer SPE Reinigung in manchen Fällen nur eine unzufriedenstellende RCR auf.

Trotz der nicht optimalen Voraussetzungen war eine vorläufige biologische Evaluation des ^{68}Ga -Markierten RD2-Derivates möglich und lieferte richtungsweisende Erkenntnisse. In den in Abb. 50 abgebildeten *ex vivo*-Autoradiographien wurde beispielweise eine Lokalisation von Tracer im Gehirn festgestellt, die gut mit der schematische Anordnung des ventrikulären Systems des Gehirns sowie der Position der Ventrikel auf den Mikroskopieaufnahmen der Schnitte korreliert. Innerhalb des kurzen Zeitfensters, dessen Beobachtung die Halbwertszeit

von ^{68}Ga zulässt könnten daher die Ventrikel einen möglichen ersten Schritt bei der Aufnahme der Peptide ins Gehirn darstellen.

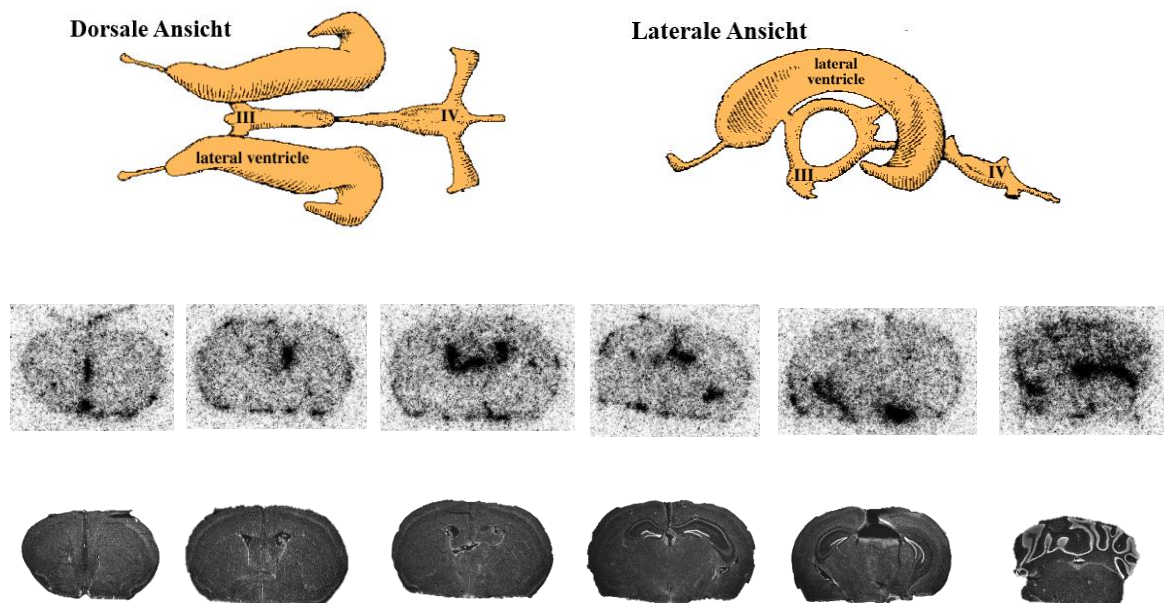


Abb. 50: Ex vivo Autoradiographie mit $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTARD2}$. Oben: Schematische Darstellung der Anordnung der Hirnventrikel. Mitte: Autoradiographie. Unten: Mikroskopie der Hirnschnitte. Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Antje Willuweit, Forschungszentrum Jülich, Institut für Neurowissenschaften und Medizin: INM-4.

3.6 Indirekte Radiomarkierung von Biomolekülen mit $[^{18}\text{F}]\text{Fluoriodpyridin}$

3.6.1 Radiomarkierung mit $[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$ mittels Sonogashira-Kupplung

Ebenso wie zuvor bei $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ handelt es sich bei dem kürzlich entwickelte $[^{18}\text{F}]\text{Fluoriodpyridin}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$) um einen vielseitigen Markierungsbaustein für Pd-katalysierte Kreuzkupplungen. Da unter anderem auch eine Sonogashira-Reaktion erfolgreich an Phenylacetylen als Modellverbindung demonstriert wurde, erschien es daher prinzipiell möglich, den bestehenden, alkinmodifizierten RD2-Markierungsvorläufer mit $[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$ als alternatives Syntheton zu markieren.

Bei der Synthese der ^{19}F -Referenz für die Konjugation von FIPy an RD2 war die Identifizierung und Isolierung des Produktes, wie auch bereits zuvor bei der analogen Reaktion mit FHexI^+ , nicht direkt möglich. Die Sonogashira-Reaktion mit Peptiden in Lösung scheint ganz allgemein problematisch zu sein - zumindest im „präparativen“ Maßstab von einigen Milligramm. Dies wird ebenfalls ersichtlich an der von der Arbeitsgruppe Wüst beschriebenen, vergleichbaren

Kupplungsreaktion zwischen dem eng verwandten [^{18}F]Fluoriodbenzol und einem Propargylglycin-funktionalisiertem Bombesinderivat [81]. Dort wurde ebenfalls für die Reaktion des Peptids mit [^{19}F]FIB eine geringe Ausbeute von lediglich 9 % erhalten und dies obwohl es sich verglichen mit RD2 um ein deutlich kürzeres, argininfreies Peptid handelt. Die dort angewandten Reaktionsbedingungen wurden für RD2 hinsichtlich des Lösungsmittels, des Katalysators und der Temperatur variiert. Es konnte jedoch in keinem Fall das gewünschte Konjugat gefunden werden. Daher sollten, wie bereits zuvor, durch eine Radiomarkierung in Frage kommende Produkte identifiziert werden, um die Isolierung zu erleichtern.

Die Synthese von [^{18}F]FIPy erfolgt, wie in Abb. 51 dargestellt, in der von Omrane entwickelten einstufigen Synthese, ausgehend von dem DABCO-Ammonium-Vorläufer 1-(5-Iodpyridin-2-yl)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan-1-iumtriflat. Die Trocknung des wässrigen [^{18}F]Fluorid nach der Bestrahlung im Zyklotron geschieht mittels der „Minimalistischen Methode“. Nach einer Reinigung mittels SPE wird [^{18}F]FIPy mit einer RCA von $77 \pm 7 \%$ ($n=12$) innerhalb von 25 Minuten mit einer radiochemischen Reinheit von $> 97 \%$ erhalten.

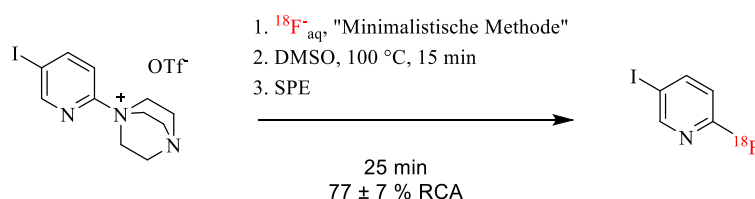


Abb. 51: Synthese von [^{18}F]FIPy

Es zeigte sich, dass bei der Konjugation an RD2 erst bei einer hohen Temperatur von 85 °C polare, radioaktive Produkte im Aktivkanal der HPLC zu finden waren. In einer geträgerten Radiosynthese wurden diese isoliert. Es konnte jedoch mittels Massenspektroskopie keine Komponente dem gewünschten Konjugat zugeordnet werden. Bei einem daraufhin durchgeführten Kontrollversuch ohne Peptid-Vorläufer wurden die polaren, radioaktiven Produkte ebenfalls beobachtet. Daher liegt es nahe, dass es sich dabei um polare Zersetzungsprodukte des Radiofluorierungssynthons handeln.

Um nachzuvollziehen, ob sich das Reaktionsverhalten von [^{18}F]FIPy entgegen der ursprünglichen Annahme grundlegend von [^{18}F]FIB unterscheidet oder ob die bisher erfolglose Konjugation eher der RD2 Leitstruktur geschuldet ist, wurden die Sonogashira-Reaktionen mit beiden Synthonsen, wie in Abb. 52 gezeigt, verglichen. Dazu wurde die Radiomarkierung der

bereits zuvor eingesetzten Propargylglycin-Modellverbindung Ac-Pra-OBn (**31**) mit [^{18}F]FIPy zum Konjugat **45** mit der von Way et al. beschriebenen Synthese von [^{18}F]FPhPA über [^{18}F]FIB [159] gegenübergestellt.

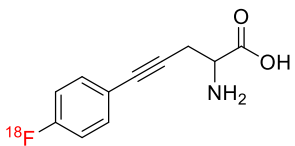
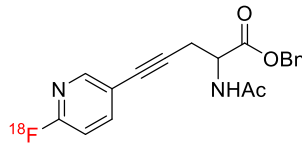
		
Reaktionsbedingungen:	[^{18}F]FPhPA	[^{18}F] 45
a) Wüst et al.	93 ± 2 %	2 %
b) Angepasst		69 ± 8 %

Abb. 52: Vergleich der RCA für die Sonogashira-Reaktion von [^{18}F]FIB und [^{18}F]FIPy anhand von Propargylglycin-Modellverbindungen. RCA mittels HPLC bestimmt, unlösliches $^{18}\text{F} < 5\%$ Reaktionsbedingungen: a) Pd(OAc) $_2$, CuI, TEA, DMF/H $_2$ O, 60 °C, 15 min; b) Pd(tppts) $_4$, CuI, TEA, DMF/H $_2$ O, 40 °C, 10 min.

Während die Reaktion mit [^{18}F]FIB eine beinahe quantitative RCA ergibt, konnte die strukturell ähnliche Modellverbindung **45** unter identischen Bedingungen mit lediglich 2 % RCA praktisch nicht mit [^{18}F]FIPy markiert werden. Da dennoch ein vollständiger Umsatz des Synthons beobachtet wurde, scheint der Pyridin-basierte Markierungsbaustein unter den Reaktionsbedingungen Nebenreaktionen zu durchlaufen. Daher wurden weitere Markierungen bei niedriger Temperatur und dem zuvor mit gutem Erfolg verwendeten Katalysator Pd(tppts) $_4$ durchgeführt. Hierbei konnten deutlich bessere RCA von 69 ± 8 % (n=4) für [^{18}F]**45** erhalten werden. Auch unter diesen Reaktionsbedingungen wurde jedoch für die Konjugation von [^{18}F]FIPy an RD2 nicht das gewünschte radiomarkierte Peptid erhalten.

Insgesamt war die Sonogashira-Kupplung von [^{18}F]FIPy mit RD2 damit nicht erfolgreich. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass Fluoriodbenzol und Fluoriodpyridin nicht wie zuvor vermutet gleich reagieren. Andererseits konnte unter abgewandelten Reaktionsbedingungen die Sonogashira-Kupplung von geschütztem Propargylglycin als Modellverbindung mit [^{18}F]FIPy in guter RCA durchgeführt werden, mit RD2 hingegen nicht. Die (argininreiche) Struktur von RD2 scheint somit auch bei dieser Reaktion hinderlich zu sein.

3.6.2 Radiomarkierung mit [¹⁸F]FIPy mittels S-Arylierung

3.6.2.1 Downscaling der notwendigen Vorläufermenge

Die S-Arylierung wurde zuvor bereits mit gutem Erfolg zur Markierung peptidähnlicher Moleküle verwendet. Daher schien dieser Reaktionstyp potentiell vielversprechend zur Markierung von Peptiden wie beispielsweise RD2 zu sein. Nachteilig ist jedoch der dazu notwendige Einsatz von hohen Vorläufermengen. Zuvor wurde durch Omrane bei der S-Arylierung von Glutathion bei Reduzierung der Vorläufermenge von 3 µmol auf 1 µmol eine Abnahme des RCU beobachtet. Dem konnte zunächst durch eine Steigerung der Katalysatormenge von 2 %_{mol} auf letztlich 20 %_{mol} entgegen gewirkt werden. Unterhalb von 0,5 µmol Markierungsvorläufer war dies jedoch nicht mehr erfolgreich, der RCU reduzierte sich auf 16 % [63].

Aus diesem Grund war es notwendig, die Reaktionsbedingungen in einem ersten Schritt hinsichtlich der Vorläufermenge zu optimieren. Dazu wurde als Modellreaktion erneut die Konjugation von [¹⁸F]FIPy und Glutathion untersucht. Bei niedrigen Vorläufermengen wurden in Vorversuchen keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten. Dies wird deutlich an der starken Varianz der RCA unter den ursprünglichen Reaktionsbedingungen (Tabelle 12, Eintrag 1). Bei Reaktionen mit niedriger RCA wurde bei der Bilanzierung der Aktivität eine sehr geringe Wiederfindungsrate der Aktivität nach der HPLC beobachtet. Mittels Gradientenelution wurde zudem ein äußerst spät eluierendes (> 80 % MeCN) und somit sehr unpolares Aktivprodukt auf der HPLC beobachtet. Dabei könnte es sich um den an den Katalysator gebundenen [¹⁸F]FIPy handeln. Die zuvor beobachtete Zunahme des RCU durch eine Erhöhung der Katalysatormenge könnte daher eine mögliche Folge des steigenden Anteils des an den Katalysator gebundenen Synthons sein, welches unter Umständen nicht von der HPLC eluiert wurde. Als mögliche Ursache für die variierende, teils geringe RCA kommt eine Oxidation des Glutathion (GSH) zum Disulfid (GSSH) in Frage. Wie in Abb. 53 dargestellt ist die Reaktionsrate (bzw. deren Halbwertszeit) stark von dem pH-Wert des Mediums abhängig. Extrapoliert man den aus der Literatur entnommen linearen

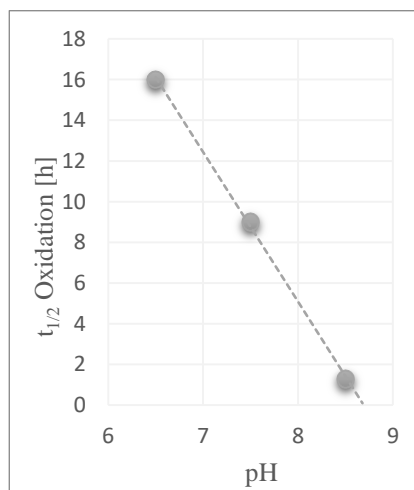
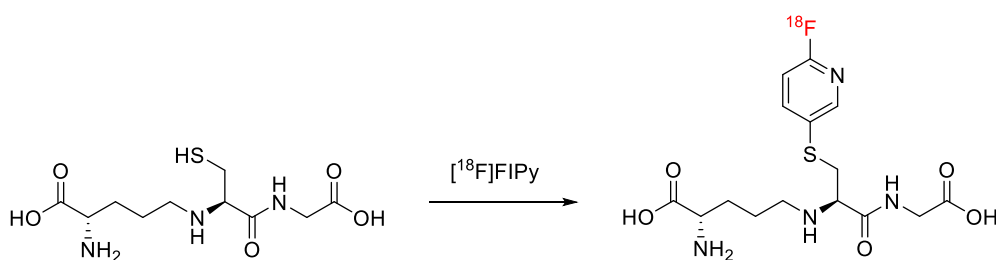


Abb. 53: Oxidation von Glutathion in Abhängigkeit des pH-Wertes

Verlauf der Halbwertszeit [160], sollte bereits im Bereich um ca. pH 9 eine sofortige Oxidation stattfinden. Bei den ursprünglichen Bedingungen zur Radiomarkierung unter Zugabe von mehreren Äquivalenten von Triethylamin als Base beträgt der pH-Wert jedoch mehr als 10. Für hohe Vorläufermengen stellt möglicherweise der Eintrag des an der Reaktion beteiligten Sauerstoffs den limitierenden Faktor dar, sodass die Radiomarkierung dennoch erfolgreich verläuft. Bei der Radiosynthese mit sehr geringen Vorläufermengen ist dies hingegen nicht mehr gegeben. Bereits geringe Restmengen Sauerstoff oder scheinbar kleine Abweichungen bei der Durchführung wie etwa zeitliche Verzögerungen bei der Radiosynthese können dann zu einer an der RCA bemerkbaren vorzeitigen Oxidation des Vorläufers führen und daher ebenfalls eine mögliche Erklärung für die von Omrane abweichenden Ergebnisse sein. Es kann auf den Zusatz eines basischen Additivs allerdings nicht verzichtet werden, da der eingesetzte Präkatalysator Xantphos Pd G3 durch eine baseninduzierte Eliminierung eines Carbazol-Liganden in seine katalytisch aktive Form überführt wird [61]. Aus diesem Grund wurde anstelle von stöchiometrischen Mengen der relativ starken Base Triethylamin ein Phosphatpuffer mit genau definiertem pH-Wert eingesetzt. Dem lag die Vermutung zu Grunde, dass bei annähernd neutralem pH-Wert einerseits Glutathion hinreichend stabil gegenüber einer Oxidation zum Disulfid ist, andererseits jedoch eine ausreichende Aktivierung des Präkatalysators ermöglicht wird. Tatsächlich scheinen die guten sowie reproduzierbaren RCA unter Verwendung von Phosphatpuffer bei pH 7,3 (Eintrag 2) diese Annahme zu bestätigen. Unter diesen Bedingungen wurde trotz weiterer Reduzierung der Vorläufermenge (Eintrag 3 und 4) dennoch eine zufriedenstellende RCA erhalten. Der Zusatz von Ascorbat, um einer Oxidation weiter entgegen zu wirken, hatte allerdings einen negativen Einfluss. Der pH-Wert des Puffers konnte ohne deutlich erkennbaren Einfluss in den schwach sauren Bereich gesenkt oder auf pH 7,8 erhöht werden. Beim Vergleich unterschiedlicher Lösungsmittel (Eintrag 4 und 8 – 10) wurde Acetonitril als besonders gut geeignet gefunden. Damit konnte die Vorläufermenge mit einer vertretbaren Abnahme der RCA auf $74 \pm 4\%$ noch einmal deutlich auf 33 nmol reduziert werden. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass unter den optimalen Bedingungen die Reaktion bereits nach einer Minute abgeschlossen ist. Unter den optimierten Bedingungen ist somit mit kleinsten Vorläufermengen eine rasche Radiomarkierung mit reproduzierbar hoher Ausbeute möglich.

Tabelle 12: Downscaling der Vorläufermenge für die S-Arylierung



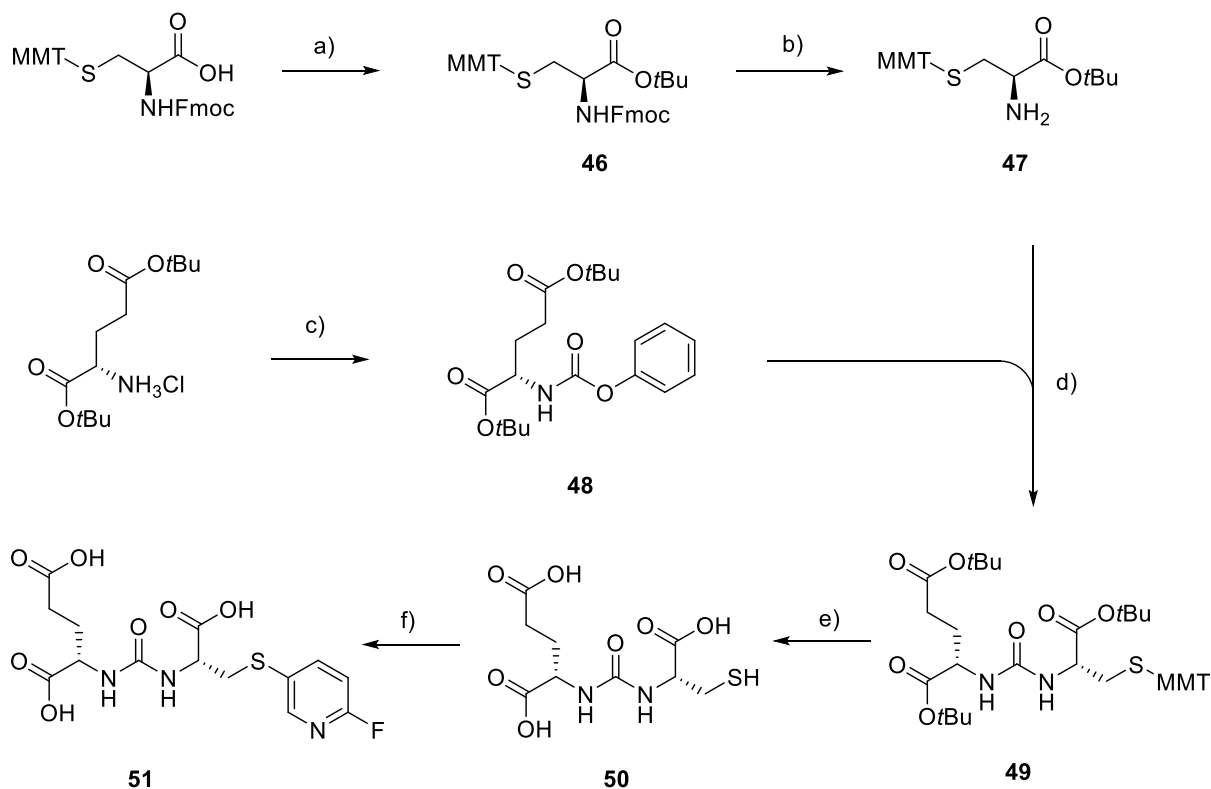
Eintrag	Base	Lösungsmittel	Vorläufermenge	Bemerkung	RCA ^a
1	TEA	THF	500 nmol		40 ± 29
2	Phosphat pH 7,3	THF	500 nmol		94 ± 5
3	Phosphat pH 7,3	THF	333 nmol		83 ± 17
4	Phosphat pH 7,3	THF	167 nmol		76 ± 12
5	Phosphat pH 7,3	THF	167 nmol	100 µg Ascorbat	57 ± 11
6	Phosphat pH 6,7	THF	167 nmol		70 ± 6
7	Phosphat pH 7,8	THF	167 nmol		68 ± 7
8	Phosphat pH 7,3	DMF	167 nmol		85 ± 4
9	Phosphat pH 7,3	MeOH	167 nmol		86 ± 2
10	Phosphat pH 7,3	MeCN	167 nmol		94 ± 1
11	Phosphat pH 7,3	MeCN	66 nmol		76 ± 25
12	Phosphat pH 7,3	MeCN	33 nmol		74 ± 4
13	Phosphat pH 7,3	MeCN	167 nmol	1 min Reaktion	95 ± 1

Reaktionsbedingungen: 120 µL Wasser + 120 µL Lösungsmittel, 0,5 mg Xantphos Pd G3, 6 min, 30 °C, Zugabe von Glutathion erfolgt stets zuletzt a) HPLC, unlösliches ¹⁸F < 5 %, n ≥ 3

3.6.3 Radiomarkierung von Glu-C(O)-Cys durch S-Arylierung mit [¹⁸F]FIPy

Der PSMA-Ligand Glu-C(O)-Cys wurde bereits zuvor von Omrane erfolgreich mit [¹⁸F]FIPy mittels S-Arylierung radiomarkiert. Die RCA bei einer automatisierten Synthese war jedoch mit 9 % eher gering [63]. Aufgrund der vielversprechenden *in vivo*-Eigenschaften sollte der Tracer weiter evaluiert werden. Dazu erscheinen die besonders milden Reaktionsbedingungen gut geeignet, die im Zuge dieser Arbeit zur Optimierung der Reaktionsbedingungen entwickelt wurden. Zudem stand aufgrund von ungelösten Problemen bei der Synthese des

Markierungsvorläufers und der ^{19}F -Referenz durch Omrane eine vollständige Isolierung und Charakterisierung aus.



*Abb. 54: Synthese des Markierungsvorläufers und der ^{19}F -Referenz des Glu-Urea-Cys PSMA-Liganden **51**. Reaktionsbedingungen: a) tert-butyltrichloracetimidat, BF_3 , DCM, 4 h, 87 %; b) 25% Piperidin/DCM, 4 h, 95 %; c) Chlorameisensäurephenylester, Pyridin, THF, 0°C – RT, 2 h, 90 %; d) DMSO, RT – 60°C , 20 h, 73 %; e) TFA/TIPS/ H_2O (90:5:5), RT, 2 h, 70 %; f) 2-Fluor-5-iodopyridin, THF/ H_2O , TEA, Xantphos Pd G3, RT, 2 h, 33 %.*

Da die ursprünglich durchgeführte Kupplung des Harnstoffs mit Triphosgen nicht erfolgreich war, wurde auf die in Abb. 54 gezeigte Synthese des Vorläufers und der ^{19}F -Referenz ausgewichen. Zur Synthese des Harnstoffgerüsts wurde zunächst ausgehend von di-tert-butyl-L-Glutaminat und Chlorameisensäurephenylester das Phenylcarbamat **48** synthetisiert und anschließend weiter mit dem Cysteinderivat **47** zum Harnstoff **49** umgesetzt. Bei der darauf folgenden Entschützung mit TFA sowie TIPS und Wasser (95:2.5:2.5) als Scavenger wurde wie auch zuvor durch Omrane die Bildung eines tert-butylierten Nebenproduktes mittels ESI-MS beobachtet [63]. Problematisch ist dabei vermutlich die verglichen mit einem tert-

Butylester unter sauren Bedingungen deutlich labilere MMT-Schutzgruppe des Thiols. Bei der sauren Entschützung wird deshalb sehr schnell die Sulfhydryl-Gruppe freigesetzt, welche im weiteren Verlauf der Reaktion als starkes Nucleophil mit den bei der Entschützung der Carbonsäure entstehenden tert-butyl-Kationen reagiert. Dass sich diese Nebenreaktion nicht durch einen großen Überschuss des ebenfalls thiolhaltigen Scavengers DODT zurückdrängen ließ, deutet auf eine intramolekulare Reaktion des benachbarten Thiols und des *tert*-Butylesters des Cysteins hin. Eine Entschützung des vermutlich gebildeten *S*-*t*Bu-Ether ist zwar grundsätzlich möglich, erfordert jedoch nach heutigem Erkenntnisstand beispielsweise den Einsatz von äußerst giftigen Quecksilber(II)-Verbindungen oder eine aufwändige, dreistufige Synthese über ein Nitrophenylsulfenyl-derivat [161,162]. Zielführender erschienen eine Erhöhung der Konzentration von TIPS und Wasser sowie eine niedrige Konzentration des Substrats (10 mM), um die Nebenreaktion weitestgehend zu verhindern. Hiernach wurde Massenspektroskopisch das bisher günstigste Verhältnis von Produkt und tert-butyliertem Nebenprodukt gefunden. Die Trennung des vollständig entschützten Harnstoffs **50** von dem Nebenprodukt war problemlos mittels RP-Flash-Chromatographie möglich und lieferte eine gute Ausbeute von 70 %. Die Synthese der ¹⁹F-Referenz lieferte mit 33 % Ausbeute ein deutlich schlechteres Ergebnis als die von Al-Shuaeeb berichteten, häufig praktisch quantitativen Ausbeuten für die S-Arylierung von Cysteinderivaten [62]. Bei der Reaktion ist vermutlich eine Anpassung der Basenmenge an die drei Carbonsäuren des Harnstoffs **50** notwendig, um bei der Reaktion einen optimalen pH-Wert zu erhalten. Da die erhaltene Menge des ¹⁹F-Referenz jedoch ausreichend für eine vollständige Charakterisierung war, wurde diese letzte Reaktionsstufe nicht optimiert.

Die Radiomarkierung des Glu-C(O)-Cys-Vorläufers erfolgte im Anschluss, wie zuvor die Markierung von Glutathion in Acetonitril und Phosphatpuffer nach Reinigung des [¹⁸F]FIPy mittels SPE. Durch die sauren Eigenschaften des Glu-C(O)-Cys Vorläufers und dessen vergleichsweise hohe eingesetzte Menge wird im Gegensatz zu Markierung von Glutathion die Kapazität des Phosphatpuffers überschritten und es stellt sich ein unerwünscht niedriger pH-Wert ein. Um dies zu vermeiden, wäre beispielsweise die Synthese eines (basischen) Glu-Urea-Cys-Natriumsalzes als Markierungsvorläufer denkbar. Um jedoch nicht die Bildung von Disulfiden zu riskieren, wurde die stabile, freie Säure zur Markierung eingesetzt und durch Zugabe von 0,66 Stoffmengenäquivalenten Triethylamin der pH-Wert im Reaktionsmedium als letzter Schritt schwach alkalisch (ca. pH 8) eingestellt. Das finale Produkt wurde mittels HPLC isoliert. Die erhaltene isolierte Gesamt-RCA in der manuellen Synthese für den PSMA-Liganden [¹⁸F]**51** betrug 55 ± 3 % (n=6) bei einer Synthesedauer von 60 Minuten. Der Tracer

wurde mit einer RCR von > 99 % erhalten, die molare Aktivität bei den Synthesen für *in vitro*- sowie *in vivo*-Experimente betrug 60 ± 15 GBq/ μmol (377 – 1428 MBq Produktaktivität, EOS). Damit wurden weitere biologische Evaluationen wie die Bestimmung der Bindungseigenschaften *in vivo* im Ganglien-Modell gesunder Ratten, im Tumor-Mausmodell sowie *in vitro* in Zellkulturen ermöglicht.

3.6.4 Radiomarkierung von all-D Peptiden durch S-Arylierung mit [^{18}F]FIPy

Für die S-Arylierung konnte vorläufig auf eine geringe Restmenge von RD2, das mit einem zusätzlichen D-Cystein am C-Terminus modifiziert wurde, zurückgegriffen werden (s. Abb. 55). Die Synthese der entsprechenden ^{19}F -Referenz erfolgte ausgehend von 300 nmol Peptidvorläufer direkt durch eine mit einem molaren Überschuss an [^{19}F]FIPy geträgerte Aktivsynthese unter den zuvor für Glutathion optimierten Bedingungen. Das gewünschte Konjugat konnte somit isoliert und, nachdem das Produkt abgeklungen war, mittels MALDI-MS mit einer Abweichung < 5 ppm identifiziert werden. Nachdem die Bedingungen zur Isolierung des Konjugats bekannt waren und zusätzlicher Vorläufer zur Verfügung stand, konnte RD2cFPy in wägbaren Mengen mit einer Ausbeute von 44 % dargestellt werden.

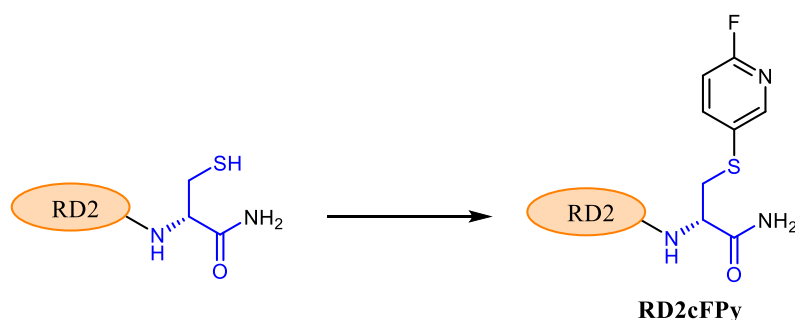


Abb. 55: S-Arylierung von H-RD2c-NH₂ mit Fluoridopyridin. Cystein-Linker dargestellt in blau.

Die Radiosynthese wurde zunächst mit Aliquoten des [^{18}F]FIPy nach einer Aufreinigung mittels SPE untersucht. Es wurde für die Konjugation eine mäßige RCA von 20 ± 4 % (n=3) erhalten. Bei zwei darauf folgenden Testsynthesen des Tracers für die Anwendung (unter Verwendung des gesamten Synthons) wurden hingegen nur 8 % beziehungsweise 5 % erhalten. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist eine potentiell ungenügende chemische Reinheit der Zwischenstufe nach der SPE-Reinigung. Bei der Verwendung von Aliquoten

werden Verunreinigungen ebenfalls reduziert und üben somit einen weniger negativen Einfluss aus. Daher wurde das [^{18}F]FIPy nach der SPE unverdünnt mittels HPLC untersucht. Die radiochemische Reinheit kann dabei aufgrund von Überladungseffekten des Radioaktivitätsdetektors nicht ermittelt werden, jedoch wurde eine Verunreinigung im UV-Kanal beobachtet, die dicht hinter dem Markierungsbaustein eluiert (vgl. Abb. 60). Obwohl ohne größeren experimentellen Aufwand keine quantitative Aussage möglich ist, legt der Vollausschlag des Detektors nahe, dass es sich hierbei um eine vergleichsweise hohe Menge dieser Substanz handeln sollte. Ähnlich wie auch bei der Synthese von [^{18}F]FIB könnte es sich dabei möglicherweise um ein strukturell verwandtes, iodhaltiges Nebenprodukt handeln, welches bei der S-Arylierung mit dem Synthion konkurrieren kann. Da bei allen bisherigen Anwendungen der S-Arylierung stets vergleichsweise hohe Vorläufermengen eingesetzt wurden (beispielsweise 20 μmol bei der Markierung des PSMA-Liganden Glu-Urea-Cys) oder das Synthion aliquotiert wurde, wurde diese chemische Verunreinigung zuvor toleriert. Eine Beseitigung der chemischen Verunreinigung durch Optimierung der SPE erschien aufgrund der ähnlichen Retention auf der vergleichsweise viel leistungsstärkeren HPLC nicht möglich. Daher wurde für die Peptidmarkierung das [^{18}F]FIPy in den darauf folgenden Synthesen mittels HPLC von allen Verunreinigungen befreit, wobei eine RCA des Synthions von $69 \pm 4\%$ ($n=10$) isoliert wurde. Die HPLC-Trennung liefert somit nur geringfügig schlechtere Ausbeuten als die SPE ($77 \pm 7\%$, $n=12$) und dauert nur circa acht Minuten länger (t_{R} : 6,5 min). Die Konjugation an RD2c ergab danach, trotz lediglich 300 nmol eingesetzten Peptidvorläufer, eine sehr gute isolierte RCA von $63 \pm 5\%$ ($n=7$), was einer isolierten Gesamt-RCA für [^{18}F]RD2cFPy von $40 \pm 7\%$ ($n=7$) bezogen auf das eingesetzte [^{18}F]Fluorid entspricht. Die Synthese dauert insgesamt ca. 65 Minuten.

Die Retentionszeit des markierten Peptids konnte bei der finalen Isolierung durch die gezielte Veränderung der Konzentration von TFA selektiv beeinflusst werden. Durch eine geringfügige Reduzierung der Konzentration von ursprünglich 0,1 % auf 0,075 % konnte die Retentionszeit um ca. 2-3 Minuten reduziert und damit in einen „leeren“ Bereich des Chromatogramms verschoben werden. Dadurch war die Abtrennung eines polaren radioaktiven Nebenprodukts problemlos innerhalb einer sehr kurzen Retentionszeit möglich (vgl. Abb. 62). Zuvor häufig beobachtete Matrixeffekte, etwa durch ionische Komponenten in der Probe (beispielsweise Phosphat), welche die Retention der arginireichen Peptide sehr stark beeinflussen, wurden durch eine Stufengradienten eliminiert. Zu diesem Zweck wurde die HPLC-Säule mit 100 % Wasser/TFA äquilibriert und die mit TFA und Wasser verdünnte Probe aufgetragen. Unter diesen Bedingungen bleibt das markierte Peptid auf der stationären Phase fixiert, störende

Matrixbestandteile werden hingegen eluiert. Nach 90 Sekunden wird das Produkt durch Wechsel des Laufmittels isokratisch eluiert, wobei sich ein scharfer Produktpeak ergibt. Die RCR des Tracers betrug danach > 95 %, wobei die Hauptverunreinigung mit ca. 3 % bei der Qualitätskontrolle stets unmittelbar vor dem Tracer eluiert (vgl. Abb. 66). Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein RD2-Fragment, bei dem bei der Peptidsynthese eine Arginin-Kupplung nicht erfolgreich war. Aufgrund der fünf aufeinander folgenden Arginyle summiert sich der geringe Anteil des Peptids, der eine Sequenz überspringt, zu einem gemeinsamen (markierbaren) Produkt. Diese Verunreinigung kann auf einer analytischen HPLC identifiziert werden. Mittels der tendenziell weniger leistungsstarken, semipräparativen HPLC kann es jedoch offenbar weder nach der Peptidsynthese noch nach der Radiomarkierung abgetrennt werden.

Die molare Aktivität konnte erst zu einem späteren Zeitpunkt bestimmt werden, als mehr Vorläufer und damit wägbare Mengen der ^{19}F -Referenz verfügbar waren. Dies ist aufgrund der Affinität im micromolaren Bereich und der hohen Konzentration von A β im Alzheimer-Mausmodell jedoch ohnehin weniger relevant als beispielsweise in Rezeptor-Bindungsstudien. Es konnte lediglich nach einer Synthese von [^{18}F]RD2cFPy eine molare Aktivität von 9 GBq/ μmol (123 MBq Produkt, EOS) ermittelt werden. Der Palladiumgehalt des Produktes wurde nachträglich mittels ICP-MS ermittelt und betrug 167 ± 67 ng (n=3) pro Gesamtcharge und liegt damit beispielweise weit unter dem zulässigen Grenzwert von 10 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ der europäischen Arzneimittelagentur [145]. Mit der S-Arylierung ist es damit sehr effizient möglich, in manuellen Synthesen ausreichende Produktaktivitäten eines markierten all-D

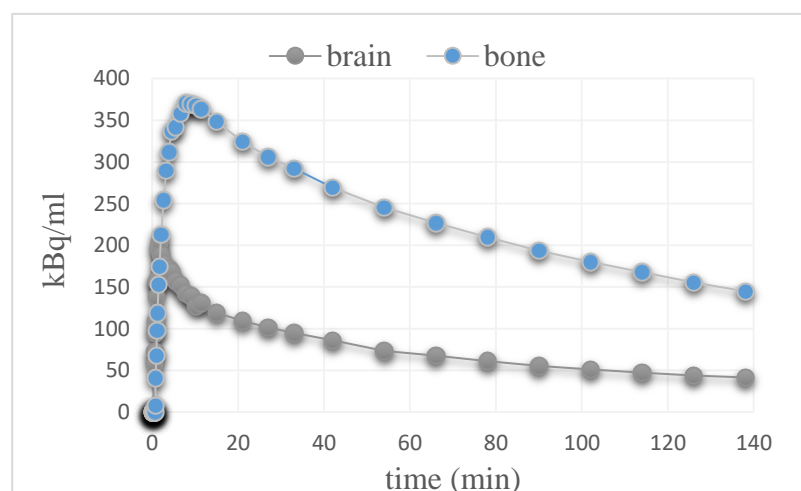
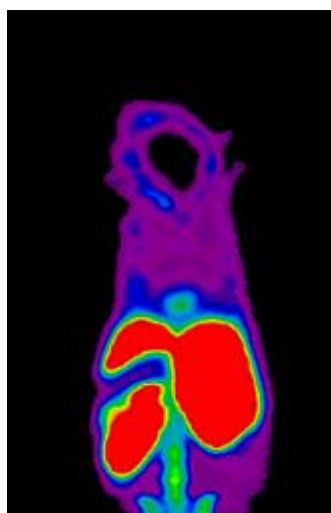


Abb. 56: PET-Studie mit [^{18}F]RD2cFPy im Alzheimer-Mausmodell (APPswePS1dE9). Links: PET-Aufnahme 40 min p.i. Rechts: Zeit-Aktivitäts-Kurve in Gehirn und Knochen. Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Antje Willuweit, Forschungszentrum Jülich, Institut für Neurowissenschaften und Medizin: INM-4).

Peptids für *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zur Verfügung zu stellen. Die erste Evaluierung im Alzheimer-Mausmodell mittels PET zeigt, dass der Tracer *in vivo* stabil ist (s. Abb. 56). Es wird lediglich eine geringe Aufnahme in den Knochen beobachtet, der Verlauf ist jedoch rückläufig, sodass nicht von einer (deutlichen) Defluorierung auszugehen ist. Die Aufnahme des Tracers ins Gehirn ist jedoch ebenfalls gering. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen aus älterer Studien mit Tritium-markierten D3 [163]. Weitere Untersuchungen sind geplant.

In Hinblick auf eine mögliche Automatisierung der Radiomarkierung von all-D Peptiden ist das bisherige Syntheschema unter Anwendung von zwei Trennschritten mittels HPLC allerdings schwer umsetzbar. Aus diesem Grund wurde zuletzt getestet, ob durch die Verwendung einer höheren Menge des Peptidvorläufers die Isolierung von [¹⁸F]FIPy anstelle der HPLC ebenfalls mittels SPE analog zur Synthese von [¹⁸F]Glu-Urea-Cys(FPy) möglich ist. Anstelle von RD2 sollte D3 radiomarkiert werden, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den zuvor erwähnten Tritiumstudien mit D3 zu ermöglichen. Es konnte unter Verwendung von 5 mg Peptid (H-D3c-NH₂, 3 µmol) in der vereinfachten Synthese eine isolierte Gesamt-RCA von 55-57 % (n=2) nach 60 Minuten Synthesedauer erhalten werden. Bei der Isolierung des Tracers mittels HPLC wurden jedoch deutlich mehr chemische Verunreinigungen in UV-Kanal beobachtet als nach der Isolierung des [¹⁸F]FIPy mittels HPLC. Insbesondere eine zuvor nicht vorhandene, unmittelbar nach dem Tracer eluierende UV-Verunreinigung erschwert die Isolierung des Radiotracers. Eine Verringerung des Anteils des org. Lösungsmittels reichte in diesem Fall jedoch bereits aus, um die Basislinientrennung von der Verunreinigung zu ermöglichen, sodass in diesem Fall eine sehr gute RCR von >99 % erreicht wurde. Die bei der Synthese des RD2-derivats beobachtete typische radioaktive Verunreinigung (Summenprodukt durch Auslassen einer Argininkupplung) wird hier durch die unterschiedliche Sequenz von D3 nicht gefunden. In beiden Fällen war die RCR des Produktes sehr hoch, es wurde im Peakschnitt, abgesehen vom Träger und Injektionspeak, keine weitere Verunreinigung im UV-Kanal beobachtet. Die molare Aktivität wurde mit 110-120 GBq/µmol (430 MBq bzw. 670 MBq Produkt EOS, n=2) bestimmt. Mithilfe dieser vereinfachten Synthese sollte die Adaption der Synthese hin zu einem automatisierten Prozess deutlich leichter möglich sein.

4. Experimentalteil

4.1 Allgemeines

Lösungsmittel wurden im Allgemeinen bei VWR gekauft. Lösungsmittel für die HPLC, wasserfreie Lösungsmittel sowie andere Chemikalien wurden bei Sigma Aldrich gekauft. Wasser zur HPLC und Radiomarkierung stammt aus einer ELGA Purelab Reinstwasseranlage Typ I (> 17 M Ω cm). Peptide wurden bei peptides&elephants synthetisiert. Alle Lösungsmittel und Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Präparative Flash-Säulenchromatographie wurde an einem Grace Reveleris™ Chromatographiesystem mit Büchi FlashPure (Si-60, 40 μ m) oder Grace Resolv™ (C18, 40 μ m) Kartuschen durchgeführt. Dünnschichtchromatographie wurde entweder auf unmodifizierten Si-60-Platten mit Fluoreszenzindikator (Sigma Aldrich) oder auf C18-modifizierten Platten mit Fluoreszenzindikator (Merck) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Absorption oder durch Färben mit Kaliumpermanganat, Ninhydrin oder Molybdätophosphorsäure. Radioaktive Komponenten wurden mittels eines Packard Instant Imagers detektiert.

Das HPLC-System bestand aus einer Knauer Smartline 1000 Pumpe, einem Knauer Smartline 2020 UV-Detektor, sowie einem Szintillationsdetektor, bestehend aus einem Harschaw 3'' NaI Bohrlochkristall, einem Ortec Model 276 Photomultiplier sowie einem ACE Mate Spektroskopiesystem. Die Probenaufgabe erfolgte mittels eines Rheodyne 6-Wegeventils mit 20 μ L Probenschleife. Ein zusätzliches baugleiches Ventil wurde zwischen dem Ausgang der HPLC-Säule und den Detektoren eingebaut. Zur Bestimmung der Totzeit wurde Thioharnstoff verwendet. Der Laufzeitunterschied zwischen UV-Detektor und Aktivdetektor beträgt 9 Sekunden bei einer Flussrate von 1 mL/min.

Das semipräparative HPLC-System bestand aus einer Merck Hitachi L-6000 Pumpe, einem Knauer K-2500 Detektor, einem Rheodyne 6-Wegeventil sowie einem Geiger-Müller Zählrohr (Eigenbau).

Radioaktivität wurde an einem Curiementor 2 (PTW) gemessen.

Kernresonanzspektren wurden an folgenden Geräten gemessen:

¹ H-NMR:	Bruker Avance 200 (200 MHz)
	Varian Inova (400 MHz)
	Bruker Avance III HD (600 MHz)
¹³ C-NMR:	Bruker Avance 200 (50 MHz)
	Varian Inova (101 MHz)
	Bruker Avance III HD (151 MHz)
¹⁹ F-NMR:	Bruker Avance 200 (188 MHz)
	Varian Inova (376 MHz)
	Bruker Avance III HD (565 MHz)

Die Verschiebung wird in ppm, relativ zum Lösungsmittelpeak, angegeben [164].

Hochauflösende Massenspektren wurden auf einem FTICR “LTQ FT Ultra” (Thermo Fisher Scientific, Germany) des Zentralinstituts für Engineering, Elektronik und Analytik (ZEA-3) gemessen. Einfache Massenspektren wurden auf einem Finnigan Automass Multi III gemessen.

MALDI-Massenspektren wurden auf einem LTQ-Orbitrap XL Hybrid Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) mit einer MALDI Ionisationsquelle (Thermo Fisher Scientific) des ZEA-3 aufgenommen. Zur Probenpräparation wurden 1 µL der Probe mit 9 µL Matrix (α -Cyano-4-hydroxymethylsäure, 5 mg/mL in 50 % MeCN_{aq}, 0,1 % TFA) gemischt. 1 µL der Präparation wurde auf einem Edelstahl MALDI-Target (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen und luftgetrocknet. Die Daten wurden im positiven Modus im Bereich m/z 800 – 2000 aufgezeichnet.

Silikonisierung und Silanisierung von Glasgefäßen

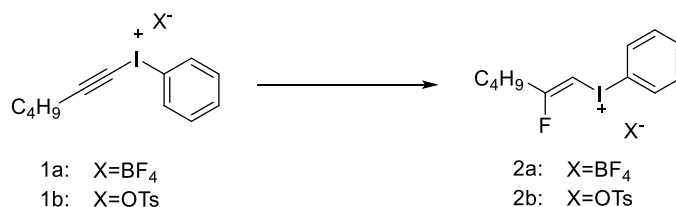
Zur Bake-on Silikonisierung von kleineren Glasoberflächen zur Vermeidung von Adsorptionseffekten wurde das Glas mithilfe eines saugfähigen Papiertuches mit einer möglichst dünnen, homogenen Schicht Silikonöl (Polydimethylsiloxan, Sigma Aldrich) eingerieben. Die Schicht wurde mit saugfähigem Papier solange verteilt, bis keine sichtbaren

Silikonölrreste erkennbar waren („schlierenfrei“). Anschließend wurde das Glasgerät bei 310 °C im Ofen für 12 Minuten erhitzt und langsam bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Glasware wurde mehrfach mit Petrolether, Aceton und Methanol gespült und an der Luft getrocknet [165].

Falls eine Bake-on Silikonisierung nicht möglich war (bspw. für große oder unzugängliche Glasoberflächen), wurde stattdessen die Glasoberfläche durch Silanisierung modifiziert. Dazu wurde das Glas für 10 Minuten mit einer frisch angesetzten Lösung aus 5 % Dichlordimethylsilan in Dichlormethan behandelt. Anschließend wurde gründlich mit Methanol gespült, das Glasgerät zunächst an der Luft getrocknet und danach für 2 Stunden bei 100 °C im Trockenschrank getrocknet.

Die erfolgreiche Beschichtung konnte nur qualitativ durch die fehlende Benetzbarkeit mit Wasser überprüft werden.

4.2 Organisch-präparative Synthesen



Die Synthese der folgenden bekannten Verbindungen erfolgte nach den angegebenen Vorschriften. Die ¹H NMR Spektren entsprechen der Literaturangabe.

1a

Ochiai et al. [166]

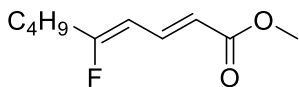
1b

Kitamura und Stang [167]

2a und 2b

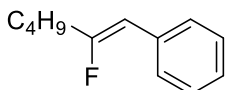
Yoshida und Hara [84]

Methyl-(2*E*,4*Z*)-5-fluornona-2,4-dienoat (3)



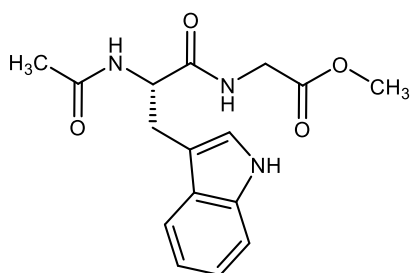
In einem Rundkolben unter Argon wurden Acrylsäuremethylester (107 mg, 1,25 mmol, 2,5 Äq.), Pd(OAc)₂ (5,6 mg), KI (4,2 mg) und NaHCO₃ (50 mg, 0,6 mmol, 1,2 Äq.) in 1,5 mL DMF gelöst und auf -20 °C gekühlt. Verbindung **2a** (195 mg, 0,5 mmol, 1 Äq.) wurde in einer Portion hinzugefügt und die Mischung über Nacht bei -20 °C gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter Ammoniumchloridlösung wurde der entstandene Niederschlag mit Wasser gelöst und dreimal mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und aufkonzentriert. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (Si-60, EtOAc/PE 1:40) ergab das gewünschte Produkt als ein farbloses Öl (43 mg, 46 %). R_f=0.38 (EA/PE 1:40); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.57 (dd, J= 15.6 Hz, J=11.4 Hz, 1H), 5.79 (d, J=15.6 Hz, 1H), 5.41 (ddd, J= 33.5 Hz, J=11.4 Hz, J=0.6 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.27 (dt, J=17.5 Hz, J=7.5 Hz, 2H), 1.52 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 0.92 (t, J=7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.5, 167.05 (d, ¹J_{CF}=274.8 Hz), 136.85 (d, ³J_{CF}=6.7 Hz), 118.79 (d, ⁴J_{CF}= 3.4 Hz), 105.12 (d, ²J_{CF}= 11.2 Hz), 51.62, 32.22 (d, ²J_{CF}=24.9 Hz), 28.07 (d, ⁴J_{CF}=0.9 Hz), 22.15, 13.83; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ - 92.19; HRMS (ESI) berechnet für C₁₀H₁₆O₂F ([M+H]⁺): 187.11288 gefunden: 187.11293

(*Z*)-(2-Fluorhex-1-en-1-yl)benzol (4)



An einer Schlenkline wurden unter Argon die Verbindung **2a** (233 mg, 0,49 mmol, Tributylphenylstannan (270 mg, 0,74 mmol, 1,5 Äq) und Pd[P(Ph)₃]₄ (28 mg, 5 mol-%) in entgastem DMF gelöst und für 72 Stunden bei 30 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung versetzt und anschließend mit 30 mL Ether verdünnt. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser sowie mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (100 % PE) lieferte das Produkt als farbloses Öl (35 mg, 41 %). R_f: 0.54 (100 % PE). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.47 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.23 (m, 1H), 5.48 (d, J=39.6 Hz, 1H), 2.35 (m, 2H), 1.63 (m, 2H), 0.97 (t, J=7.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) 161.30 (d, ¹J_{CF} =266.7), 128.43, 128.29, 128.26 (d, ³J_{CF} =7.3 Hz), 126.58 (d, ⁴J_{CF} =2.2 Hz), 105.65 (d, ²J_{CF} =8.2 Hz), 32.80 (d, ²J_{CF}=26.6 Hz), 28.49, 22.07, 13.82; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -100.63.

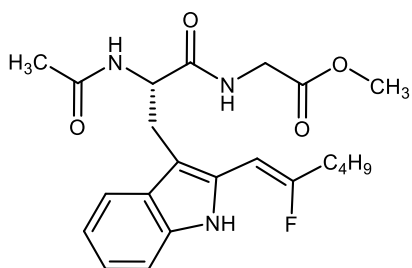
Methyl-acetyl-L-tryptophylglycinat (5)



Eine Lösung aus N-Acyl-L-tryptophan (1,18 g, 4,79 mmol) und HOBt-Hydrat (0,81 g, 5,30 mmol, 1,1 Äq.) in 8 mL DMF wurde auf 0 °C abgekühlt bevor EDC.HCl (1,00 g, 5,30 mmol, 1,1 Äq.) zugegeben wurde. Die Mischung wurde für 40 Minuten gerührt, anschließend eine Lösung aus Glycinmethylester-Hydrochlorid (0,60 g, 4,79 mmol, 1 Äq.)

und DIPEA (0,678 g, 5,30 mmol, 1,1 Äq.) in 8 mL DMF zugesetzt, die Mischung für weitere 10 Minuten bei 0 °C gehalten und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer aufkonzentriert und das resultierende Öl in DCM aufgenommen. Es wurde zunächst mit 10 % wässriger Zitronensäure, dann mit gesättigter wässriger NaHCO₃ und zuletzt mit gesättigter wässriger NaCl gewaschen und anschließend die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (Si-60, Gradient 0 % - 5 % MeOH/DCM) lieferte das Produkt als weißen Feststoff (1,14 g, 75 %). R_f=0,41 (5 % MeOH/DCM). Smp.: 120 – 122 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.61 (dt, J= 7.8 Hz, J= 0.9 Hz, 1H), 7.34 (dt, J=8.1 Hz, J=0.9 Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.10 (ddd, J=8.1 Hz, J=7.1 Hz, J=1.1 Hz, 1H), 7.03 (ddd, J=8.0 Hz, J=7.0 Hz, J=1.1 Hz, 1H), 4.74 (dd, J=8.0 Hz, J=5.9 Hz, J=1 Hz, 1 H), 3.91 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.31 (m, 1H), 3.12 (m, 1H), 1.92 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 173.23, 171.79, 170.15, 136.63, 127.47, 123.14, 120.97, 118.36, 117.84, 110.86, 109.59, 54.13, 51.18, 40.50, 27.53, 21.13; MS (ESI) berechnet für C₁₆H₂₀N₃O₄([M+H]⁺): 318.14 gefunden: 318.29.

Methyl-(S)-(2-acetamido-3-(2-(2-fluorhex-1-en-1-yl)-1H-indol-3-yl)propanoyl)glycinat (6)



Verbindung **5** (30 mg, 95 µmol), Verbindung **2a** (52 mg, 133 µmol, 1,4 Äq.) und Pd(OAc)₂ (0,2 mg, 1 mol%) wurden in 1,5 mL Wasser und 1,5 mL DMF gelöst und für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 0,5 M HCl verdünnt, dreimal mit Ether extrahiert, die organische Phase mit gesättigter wässriger

NaCl gewaschen und zuletzt mit Natriumsulfat getrocknet. Die Aufreinigung mittel Flash-Chromatographie (Si-60, 2 % MeOH/DCM) lieferte zwei isomere Produkte.

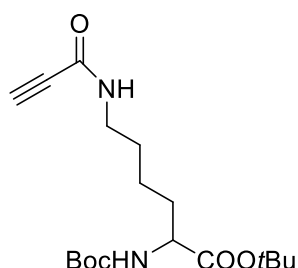
6a (*Z*-Isomer): 6,2 mg, 19 %; $R_f=0,28$ (2,5 % MeOH/DCM); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 7.54 (dt, $J=7.8$ Hz, $J=0.9$ Hz, 1H), 7.34 (dt, $J=8.1$, $J=0.9$ Hz, 1H), 7.07 (ddd, $J=8.2$, $J=7.1$, $J=1.2$, 1H), 6.99 (ddd, $J=8.0$ Hz, $J=7.1$ Hz, $J=1$ Hz, 1H), 5.87 (d, $^3\text{J}_{\text{H-F}}=40.7$ Hz, 1H), 4.63 (t, $J=6.9$ Hz, 1H), 3.81 (q, 17.5 Hz, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.26 (m, 1H), 3.11 (m, 1H), 2.45 (m, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.65 (dd, $J=11.0$, $J=4.4$, 2H), 1.47 (dd, $J=15.0$, $J=7.4$ Hz, 2H), 0.99 (t, $J=7.3$, 3H), $^{19}\text{F NMR}$ (376 MHz, CD_3OD) δ -104.21; MS (ESI) berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{FN}_3\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 418.21 gefunden: 418.38.

6b (*E*-Isomer): 3,8 mg, 10 %). $R_f=0,24$ (2,5 % MeOH/DCM); 7.55 (m, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.07 (ddd, $J=8.1$ Hz, $J=7.1$ Hz, $J=1.2$ Hz, 1H), 7.00 (ddd, $J=8.0$ Hz, $J=7.1$ Hz, $J=1.0$ Hz, 1H), 6.25 (d, $^3\text{J}_{\text{H-F}}=20.5$ Hz, 1H), 4.68 (t, $J=6.9$ Hz, 1H), 3.83 (q, $J=17.6$ Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.26 (m, 1H), 3.04 (m, 1H), 2.55 (m, 2H), 1.88 (s, 3H), 1.59 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 0.88 (t, $J=7.4$ Hz, 3H); $^{19}\text{F NMR}$ (376 MHz, CD_3OD) δ -98.37; MS (ESI) berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{FN}_3\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 418.21 gefunden: 418.26.

Die Synthese der folgenden bekannten Verbindungen erfolgte nach den angegebenen Vorschriften. Die $^1\text{H NMR}$ Spektren entsprechen der Literaturangabe.

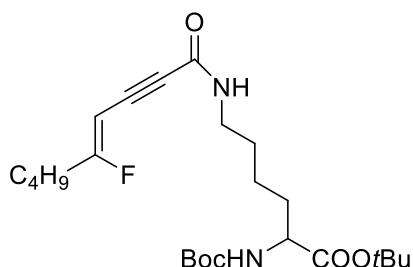
7, 8 und 11:	Zlatopolskiy et al. [168]
14 und 15:	Rosowsky et al. [169]
17:	Wan et al. [170]
19:	Nguyen et al. [171]
21 und 22:	Maresca et al. [87]

Tert-Butyl-N²-(tert-butoxycarbonyl)-N⁶-propioloyllysinate (9)



Zu einer Lösung aus Verbindung **7** (0,43 g, 1,42 mmol) in 2 mL DMF wurde bei Raumtemperatur portionsweise über 5 Minuten Pentafluorphenylpropiolat (0,32 g, 1,36 mmol) hinzugegeben und die Lösung für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde mit Wasser verdünnt und dreimal mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Die finale Aufreinigung erfolgte mittels Flash-Chromatographie (Si-60, EtOAc/PE 1:2). Das Produkt wurde in Ether gelöst und durch Zugabe von Petrolether als weißer Feststoff ausgefällt (0,45 g, 90 %). Smp.: 101 °C, R_f: 0.28 (Si60, EtOAc/PE 1:2), ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 6.38 (br s, 1H), 5.08 (br d, J= 7.5 Hz, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.27 (dq, J=6.0 Hz J=1.5Hz, 2H), 2.77 (s, 1H), 1.73-1.41 (m, 24 H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 171.87, 155.60, 152.30, 82.02, 79.79, 77.49, 73.09, 53.56, 39.64, 32.82, 28.48, 28.37, 28.03, 22.51. HRMS (ESI) berechnet für C₁₈H₃₁N₂O₅: 355.22275, gefunden: 355.22282.

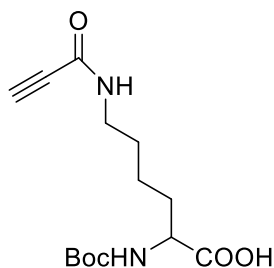
Tert-Butyl-(Z)-N²-(tert-butoxycarbonyl)-N⁶-(5-fluoronon-4-en-2-inoyl)lysinate (10)



Pd(OAc)₂ (5,9 mg, 26 μmol) und PPh₃ (13,8 mg, 52 μmol) wurden in 5 mL DMF gelöst und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Katalysatorlösung wurden anschließend CuI (13,4 mg, 70 μmol), Triethylamin (92 μL, 0,66 mmol), Verbindung **9** (190 mg, 0,53 mmol) und Verbindung **2a** (173 mg, 0,44 mmol) gegeben und die Mischung im Anschluss für 15 Minuten gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde gesättigte NH₄Cl-Lösung hinzugegeben, der entstandene Niederschlag mit Wasser gelöst und dreimal mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (Si-60, EtOAc/PE 1:2, dann: C18, MeOH/Wasser 8:2) lieferte das Produkt als farbloses Öl (130 mg, 65 %). R_f: 0.41 (Si60, EtOAc/PE 1:2), R_f: 0.25 (C18, MeOH/water 8:2), ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 6.05 (br s, 1H), 5.05 (br d, J= 8.5 Hz), 4.86 (d, ¹J_{H-F}= 34.5 Hz, 1H), 4.14 (m, 1H), 3.28 (q, J=6.2 Hz, 2 H), 1.56-1.23 (m, 28 H), 0,89 (t, J=7.1 Hz, 3H) ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 174.04 (d, ¹J_{CF}=211.1 Hz), 170.62, 155.55, 153.51, 86.84 (d, ³J_{CF}=5.8 Hz), 85.74 (d, ²J_{CF}=14.2 Hz), 82.01, 79.76, 77.69 (d, ⁴J_{CF}=3.2 Hz), 53.68, 39.66, 32.83, 32.05 (d, ²J_{CF}=23.5 Hz), 28.78, 28.40, 28.07, 27.81 (d, ³J_{CF}=1.1 Hz), 22.58, 21.97, 13.72; ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃) δ -80.04

(d, J=214 Hz). HRMS (ESI) berechnet für C₂₄H₄₀FN₂O₅ ([M+H]⁺): 455.29158, gefunden: 455.29177

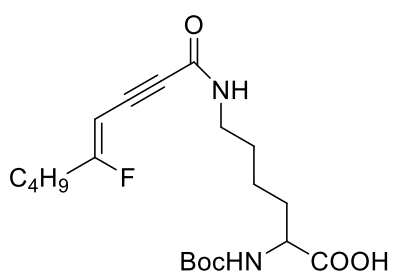
N²-(tert-Butoxycarbonyl)-N⁶-propioloyllysin (**12**)



Eine Suspension aus Boc-Lys-OH (0,83 g, 3,40 mmol) und DIPEA (575 μ L, 3,40 mmol) in 10 mL DMF und 20 mL MeOH wurde auf -40 °C gekühlt und Pentafluorpropiolat (**54**, 0,88 g, 3,72 mmol) in einer Portion hinzugefügt. Die Mischung wurde eine weitere Stunde bei -40 °C gerührt, anschließend innerhalb von 2 Stunden auf Raumtemperatur gebracht und dort eine Stunde weiter gerührt. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wurde mit 1 M HCl auf circa 2-3 eingestellt bevor die Mischung dreimal mit Ether extrahiert wurde. Die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (Si-60, MeOH/HOAc/DCM 5:1:94), gefolgt von der Gefriertrocknung aus Acetonitril, ergab als Produkt ein weißes, hygroskopisches Pulver (0,52 g, 51 %). R_f: 0.26 (MeOH/HOAc/DCM 4:1:95) ¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ 4.02 (m, 1H), 3.50 (s, 1H), 3.17 (t, J=6.9 Hz, 1H), 1.78 (m, 1H), 1.67-1.26 (m, 15H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄) δ 176.17, 158.14, 154.67, 80.46, 78.25, 75.60, 54.72, 40.38, 32.39, 29.56, 28.72, 24.23; HRMS berechnet für C₁₄H₂₃N₂O₅ ([M+H]⁺): 299.16015, gefunden: 299.16018

(Z)-N²-(tert-Butoxycarbonyl)-N⁶-(5-fluornon-4-en-2-inoyl)lysin (**13**)

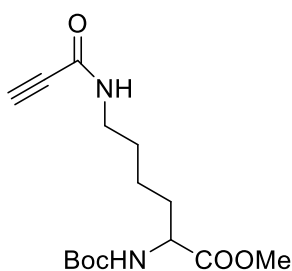
Pd(OAc)₂ (7,5 mg, 33 μ mol) und PPh₃ (18 mg, 67 μ mol) wurden in 5 mL DMF gelöst und 10



Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Katalysatorlösung wurden anschließend CuI (20 mg, 105 μ mol), Triethylamin (200 μ L, 1,43 mmol), Verbindung **11** (0,20 mg, 0,67 mmol) und Verbindung **2a** (275 mg, 0,70 mmol) gegeben und die Mischung im Anschluss für 15 Minuten gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde gesättigte NH₄Cl-Lösung hinzugegeben, der entstandene Niederschlag mit Wasser gelöst und dreimal mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (Si-60, MeOH/HOAc/DCM 2:1:97, dann: C18, MeOH/Wasser 65:35) lieferte das Produkt als farbloses Öl (70 mg, 27 %). R_f: 0.31 (Si-60, MeOH/HOAc/DCM 2:1:97), R_f: 0.20 (C18, MeOH/0,1 % HOAc_{aq} 65:35), ¹H NMR (200 MHz, MeOH-d₄) δ 5.09 (d, J=33.5 Hz, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.18

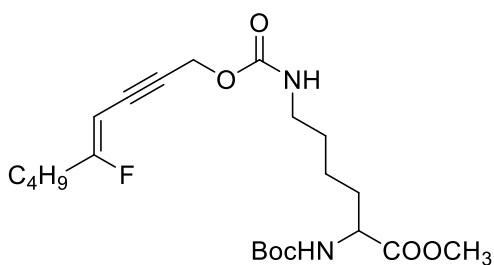
(t, J=6.5 Hz, 2H), 2.30 (dt, J=18.0, J=7.2, 2H), 1.72-1.36 (m, 19 H), 0.90 (t, J=7.1 Hz, 3H); ^{13}C NMR (50 MHz, MeOH- d_4) δ 173.61 ($^1J_{\text{CF}}=276.7$ Hz), 174.83, 156.79, 154.32, 86.05 (d, $^3J_{\text{CF}}=5.6$ Hz), 85.12 (d, $^2J_{\text{CF}}=13.6$ Hz), 79.10, 77.68 (d, $^4J_{\text{CF}}=3.4$ Hz), 53.39, 39.07, 31.54, 31.07, 28.32, 27.64 (d, $^3J_{\text{CF}}=0.9$ Hz), 27.39, 22.91, 21.57, 12.64; ^{19}F NMR (188 MHz, MeOH- d_4) δ -82.83; HRMS (ESI) berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{FN}_2\text{O}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 399.22898, gefunden: 399.22898

Methyl- N^2 -(tert-butoxycarbonyl)- N^6 -propioloyllysinsäure (16)



Zu einer Lösung von Verbindung **15** (0,74 g, 2,84 mmol) in 3 mL DMF wurde bei Raumtemperatur in einer Portion Pentafluorphenylpropiolat (**54**, 0,73 g, 3,12 mmol, 1,1 Äq) gegeben und diese für 45 Minuten gerührt und anschließend mit Wasser verdünnt. Die Mischung wurde dreimal mit Ether extrahiert, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (Si-60, EtOAc:PE 1:1) lieferte das Produkt als schwach gelbes Öl (0,77 g, 87 %). R_f : 0.16 (Si-60, EtOAc/PE 1:1); ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 6.42 (br s, 1H), 5.13 (m, 1H), 4.24 (m, 1H), 3.71 (s, 3H) 3.26 (q, J= 6.4 Hz, 2H), 2.78 (s, 1H), 1.8-1.31 (m, 15H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 173..27, 155.61, 152.37, 80.07, 77.52, 73.19, 53.11, 52.42, 39.57, 32.54, 28.51, 28.39, 22.62; MS (ESI) berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 313.18, gefunden: 313.19

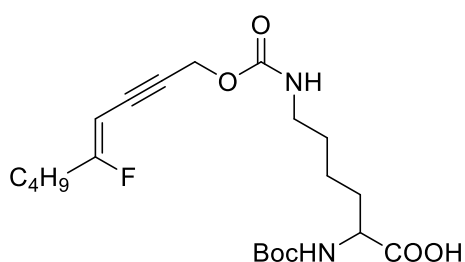
Methyl-(Z)- N^2 -(tert-butoxycarbonyl)- N^6 -(((5-fluornon-4-en-2-in-1-yl)oxy)carbonyl)lysinsäure (18)



$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (9,2 mg, 41 μmol) und PPh_3 (21,4 mg, 82 μmol) wurden in 7 mL DMF gelöst und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Katalysatorlösung wurden anschließend CuI (25 mg, 132 μmol), Triethylamin (171 μL , 1,22 mmol), Verbindung **11** (0,34 mg, 0,99 mmol) und Verbindung **2a** (0,32 g, 0,82 mmol) gegeben und die Mischung im Anschluss für 15 Minuten gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde gesättigte NH_4Cl -Lösung hinzugegeben, der entstandene Niederschlag mit Wasser gelöst und dreimal mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und am

Rotationsverdampfer eingeengt. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (Si-60, EtOAc/PE 1:2, dann: C18, MeOH/Wasser 75:25) lieferte das Produkt als gelbes Öl (137 mg, 38 %). R_f: 0.38 (Si60,EtOAc/PE 1:2), R_f: 0.18 (C18, MeOH/water 75:25) ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5.11-4.71 (m, 5 H), 4.25 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.15 (dd, J=12.9 Hz, 6.6 Hz, 2H), 2.21 (dt, J=17.3 Hz, J=7.2 Hz, 2H), 1.15-1.27 (m, 19H), 0.88 (t, J=7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (50 MHz,CDCl₃) δ 170.76 (d, ¹J_{CF}=272.8 Hz), 173.35, 155.81, 155.54, 87.20 (d, ³J_{CF}=5.7 Hz), 86.74 (d, ²J_{CF}=14.5 Hz), 80.00, 78.69 (d, ⁴J_{CF}=3.5 Hz), 53.38, 53.23, 52.37, 40.73, 32.37, 31.82 (d, ²J_{CF}=24.2 Hz), 29.36, 28.39, 27.93 (d, ³J_{CF}=1.1Hz), 22.43, 21.99, 13.74 ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃) δ -86.71; HRMS (ESI) berechnet für C₂₂H₃₆FN₂O₆ ([M+H]⁺): 443.25519, gefunden: 443.25553.

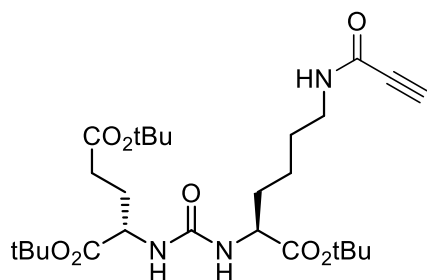
(Z)-N²-(tert-butoxycarbonyl)-N⁶-(((5-fluornon-4-en-2-in-1-yl)oxy)carbonyl)lysin 20



Pd(OAc)₂ (10,3 mg, 46 μmol) und PPh₃ (24,1 mg, 92 μmol) wurden in 10 mL DMF gelöst und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Katalysatorlösung wurden anschließend CuI (28 mg, 147 μmol), Triethylamin (346 μL, 2,48 mmol), Verbindung **19** (0,36 g, 1,10 mmol) und Verbindung **2a** (0,36 g, 0,92 mmol) gegeben und die Mischung im Anschluss für 15 Minuten gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde gesättigte NH₄Cl-Lösung hinzugegeben, der entstandene Niederschlag mit Wasser gelöst und dreimal mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (Si-60, MeOH/HOAc/DCM 2:1:97, dann: C18, MeOH/ 0,1 % HOAc_{aq} 65:35) lieferte das Produkt als farbloses Öl (128 mg, 33 %). R_f: 0.48 (Si60, MeOH/HOAc/DCM 2:1:97), R_f: 0.30 (C18, MeOH/0,1 % HOAc_{aq} 65:35) ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 9.47 (br s, 1H), 6.31 (m, 1H), 5.22, (m, 1H), 4.79 (d, J=33.5 Hz, 1H), 4.79 (s, 2H), 4.17 (m, 1H), 3.17 (m, 2H), 2.21 (dt, J=17.1, J=7.2 Hz, 2H), 1.95-1.18 (m, 19H), 0.88 (t, J=7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (50 MHz,CDCl₃) δ 176.58, 170.76 (d, ¹J_{CF}=272.9 Hz), 157.14, 155.99, 87.09 (d, ³J_{CF}=5.6 Hz), 86.73 (d, J=14.5 Hz), 80.22, 78.75 (d, ⁴J_{CF}=3.6 Hz), 53.47, 53.20, 40.67, 32.00, 31.81 (d, ²J_{CF}=24.2 Hz), 29.29, 28.38, 27.92 (d, ³J_{CF}=1.1 Hz), 22.38, 21.98, 13.73; ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃) δ -86.54 (d, J=46.1 Hz); HRMS (ESI) berechnet für C₂₁H₃₃FN₂O₆Na ([M+Na]⁺): 451.22149, gefunden: 451.22148.

Di-tert-butyl-(((S)-1-(tert-butoxy)-1-oxo-6-propiolamidohexan-2-yl)carbamoyl)-L-glutamat (23)

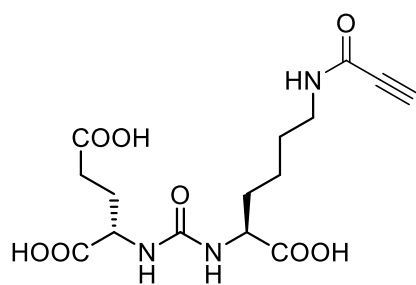
Verbindung **22** (2,44 g, 5,00 mmol) wurde in 20 mL DMF gelöst, DIPEA (850 mg, 6,57 mmol)



hinzugefügt und auf -10 °C gekühlt. Eine Lösung aus Pentafluorphenylpropiolat (**54**, 1,28 g, 5,50 mmol) in 1,5 mL DMF wurde zügig hinzuge tropft und die Reaktion weitere 30 Minuten bei -10 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung langsam auf Raumtemperatur gebracht und

weitere 2 Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer eingengt, mit 20 mL 0,25 M HCl verdünnt und dreimal mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und erneut eingengt. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (SI-60, EtOAc/PE 1:1) lieferte das Produkt als weißen, klebrigen Schaum. Um Lösemittelreste zu entfernen, wurde der Schaum aus MeCN gefriertrocknet und im Anschluss als weißes, stark hygroskopisches Pulver erhalten (2,35 g, 87 %). R_f: 0.29 (EtOAc/PE 1:1) ¹H NMR (200 MHz, MeOH-d₄) δ 6.41 (1H), 6.37 (1H), 4.22 (m, 2H) 3.58 (s, 1H), 3.25 (t, J=6.7 Hz, 2H), 2.35 (m, 2H), 2.18-1.35 (m, 35H); ¹³C NMR (50 MHz, MeOH-d₄) δ 173.83, 173.71, 173.43, 159.89, 154.64, 82.77, 82.58, 81.70, 78.30, 75.64, 54.74, 54.14, 40.36, 33.16, 32.46, 29.60, 28.96, 28.36, 28.32, 28.29, 23.85; HRMS (ESI) berechnet für: C₂₇H₄₆N₃O₈ ([M+H]⁺): 540.32794 , gefunden: 540.32819

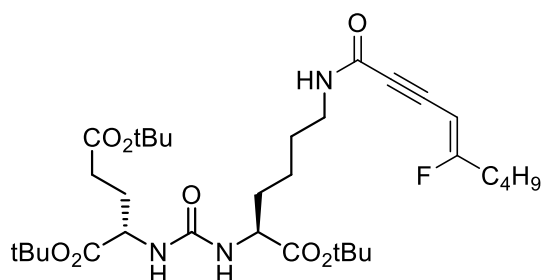
(((S)-1-Carboxy-5-propiolamidopentyl)carbamoyl)-L-glutaminsäure (24)



Verbindung **23** (1,00 g, 1,85 mmol) wurde in 20 mL einer Mischung aus TFA/TIPS/Wasser (95:2,5:2,5) gelöst und bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt, in Acetonitril aufgenommen und erneut eingengt. Das Produkt wurde nach einer Gefriertrocknung aus Wasser als weißes, stark

hygroskopisches Pulver erhalten (0,68 g, 99 %). ¹H NMR (200 MHz, D₂O) δ 4.15 (m, 2H), 3.36 (s, 1H), 3.15 (t, J=6.5 Hz, 2H), 2.42 (t, J=7.2 Hz, 2H), 2.18 – 1.15 (m, 8H); ¹³C NMR (50 MHz, D₂O) δ 177.19, 177.00, 176.17, 159.27, 154.32, 76.37, 75.93, 53.13, 52.52, 39.43, 30.55, 30.03, 27.44, 26.26, 22.28; HRMS (ESI) berechnet für C₁₅H₂₂N₃O₈ ([M+H]⁺): 372.14014, gefunden: 372.14031

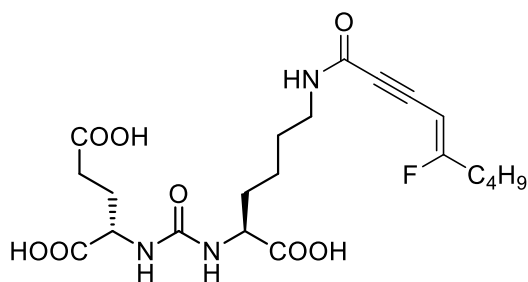
Di-tert-butyl-(((S)-1-(tert-butoxy)-6-((Z)-5-fluornon-4-en-2-inamido)-1-oxohexan-2-yl)carbamoyl)-L-glutamat (25)



Pd(OAc)₂ (2,8 mg, 13 μmol) und PPh₃ (6,5 mg, 25 μmol) wurden in 3 mL DMF gelöst und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Katalysatorlösung wurden anschließend CuI (7,6 mg, 40 μmol), Triethylamin (52 μL, 0,37 mmol), Verbindung **23** (150 mg, 0,28 mmol) und

Verbindung **2a** (110 mg, 0,28 mmol) gegeben und die Mischung im Anschluss für 15 Minuten gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde gesättigte NH₄Cl-Lösung hinzugegeben, der entstandene Niederschlag mit Wasser gelöst und dreimal mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (Si-60, EtOAc/PE 4:6, dann: C18, MeOH/Wasser 80:20) lieferte das Produkt als farbloses Öl (125 mg, 70 %). R_f: 0.44 (Si60, EtOAc/PE 1:1); R_f: 0.24 (C18, MeOH/water 80:20) ¹H NMR (200 MHz, MeOH-d₄) δ 6.40 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 5.19 (d, J=33.7 Hz, 1H), 4.19 (m, 2H), 3.23 (t, J=6.7 Hz, 2H), 2.34 (m, 4H), 2.16 - 1.3 (m, 39H), 0.95 (t, J=7.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, MeOH-d₄) δ 174.97 (d, J=276.7 Hz), 173.87, 173.75, 173.47, 159.94, 155.69, 86.47 (d, ²J_{CF}=13.6 Hz), 82.79, 82.60, 81.72, 79.06 (d, ⁴J_{CF}=3.5 Hz), 54.77, 54.18, 40.39, 33.19, 32.66 (d, ²J_{CF}=23.6 Hz), 32.49, 29.68, 29.00, 28.98 (d, ³J_{CF}=1.0 Hz), 28.36, 28.31, 28.29, 23.87, 22.93, 13.99; ¹⁹F NMR (188 MHz) δ -82.82 ;HRMS (ESI) berechnet für: C₃₃H₅₄FN₃O₈ ([M+Na]⁺): 662.37872 gefunden: 662.37859.

(((S)-1-Carboxy-5-((Z)-5-fluornon-4-en-2-inamido)pentyl)carbamoyl)-L-glutaminsäure (26, PSMA-206)



Verbindung **25** (38 mg, 57 μmol) wurde in einer Mischung aus TFA/TIPS/Wasser (95:2,5:2,5) gelöst und bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt, in Acetonitril aufgenommen und erneut eingengt. Das Produkt wurde nach Aufreinigung mittels

semipräparativer HPLC (Phenomenex Hydro-RP 10μ, 10x250 mm, 35 % MeCN, 0.1 % TFA, 4.7 mL/min) als farbloses Öl erhalten (15 mg, 57 %). ¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ 5.12

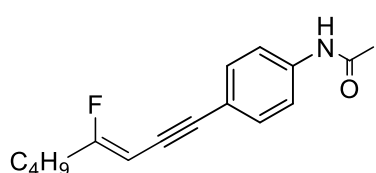
(d, J= 33.6, 1H), 4.29 (ddd, J=18.2, 8.2, 4.9 Hz, 2H), 3.22 (t, J=6.8 Hz, 2H), 2.46 – 2.28 (m, 4H), 2.21 - 2.08 (m, 1H), 1.95 – 1.79 (m, 2H), 1.73 - 1.61 (m, 1H) , 1.60 – 1.48 (m, 4H), 1.48 – 1.32 (m, 4H), 0.94 (t, 7.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄) δ 176.49, 176.44, 175.88, 175.01 (d, ¹J_{CF}=276.7 Hz), 160.14, 155.73, 87.34 (d, ³J_{CF}=5.7 Hz), 86.44 (d, ²J_{CF}=13.6 Hz), 79.11 (d, ⁴J_{CF}=3.4 Hz), 53.95, 53.52, 40.50, 33.13, 32.66 (d, ²J_{CF}=5.7 Hz), 31.11, 29.66, 28.98, 28.86, 23.94, 22.92, 13.97; ¹⁹F NMR (376 MHz, MeOH-d₄) δ -82.92 (m) ; HRMS (ESI) berechnet für: C₂₁H₃₁FN₃O₈ ([M+H]⁺): 472.20897, erhalten: 472.20940

Die Synthese der folgenden bekannten Verbindungen erfolgte nach den angegebenen Vorschriften. Die ¹H NMR Spektren entsprechen der Literaturangabe.

27:	Chan et al. [172]
29, 30 und 36:	Medran et al. [173]
37:	Kuru et al. [174]
38:	Chen et al. [175]
39a:	Wolf et al. [176]
46 und 47	Omrane [63]

Verbindung **33** wurde mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. Boris Zlatopolskiy zur Verfügung gestellt (Institut für Radiochemie und Experimentelle Molekulare Bildgebung, Uniklinik Köln)

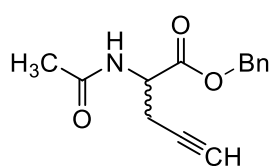
(Z)-N-(4-(4-Fluorct-3-en-1-in-1-yl)phenyl)acetamid (28)



Pd(OAc)₂ (5,2 mg, 23 μmol) und PPh₃ (12 mg, 46 μmol) wurden in 5 mL DMF gelöst und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Katalysatorlösung wurden anschließend CuI (14 mg, 74 μmol), Triethylamin (100 μL, 0,71 mmol), Verbindung **28** (79 mg, 0,50 mmol) und Verbindung **2a** (160 mg, 0,41 mmol) gegeben und die Mischung im Anschluss für 15 Minuten gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde gesättigte NH₄Cl-Lösung hinzugegeben, der entstandene Niederschlag mit Wasser gelöst und dreimal mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (Si-60, EtOAc/PE 3:7, dann: C18, MeOH/Wasser 75:25) lieferte das

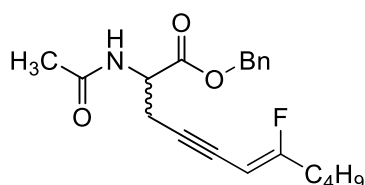
Produkt als weißen Feststoff (55 mg, 42 %). Smp.: 165 °C (Zersetzung) R_f: 0.46 (Si60, EtOAc/PE 1:1); R_f: 0.24 (C18, MeOH/water 80:20). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.46 (d, J=8.6 Hz, 2H), 7.37 (d, 8.7 Hz, 2H), 4.99 (d, 33.6 Hz, 1H), 2.28 (dt, J=17.1, 7.4 Hz, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.52 (m, 2H) 1.38 (dq, J=14.3, 7.2 Hz, 2H), 0.92 (t, J=7.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.66 (d, ¹J_{CF}=271.8), 168.57, 137.83, 132.28, 119.43, 119.15, 92.69 (d, ³J_{CF}=5.5 Hz) 87.61 (d, ²J_{CF}=14.7 Hz), 81.53 (d, ⁴J_{CF}= 2.8 Hz), 31.11 (d, ²J_{CF}=24.5 Hz), 28.11, 24.67, 22.07, 13.81; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): -87.74 (s); HRMS (ESI) berechnet für C₁₆H₁₈ONFNa ([M+Na]⁺: 282.12646, gefunden: 282.12647

Benzyl-2-acetamidopent-4-inoat (31)



Zu einer Lösung aus N-Acetylpropargylglycin (**30**, 310 mg, 2,00 mmol) in 20 mL DMF wurde Cs₂CO₃ (651 mg, 2,00 mmol) gegeben und die Suspension im Anschluss für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde Benzylbromid (237 µL, 2,40 mmol) hinzugefügt und die Mischung für weitere 2,5 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, das übrig gebliebene Öl mit EtOAc und Wasser verdünnt und zwei weitere Male die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt als weißer Feststoff erhalten (460 mg, 94 %). R_f: 0.20 (EtOAc/PE 1:2), ¹H NMR (200 MHz, D₂O) δ 7.34 (s, 5H), 6.43 (br d, J=6.9 Hz, 1H), 5.20 (m, 2H), 4.79 (dt, J=7.9, 4.7 Hz, 1H), 2.77 (dd, J=4.7, 2.6 Hz, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.99 (t, J=2.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 170.39, 169.92, 135.14, 128.68, 128.60, 128.35, 78.55, 71.76, 67.67, 50.80, 23.14, 22.52. HRMS (ESI) berechnet für C₁₄H₁₅NO₃Na ([M+Na]⁺): 268.09442, gefunden: 268.09440

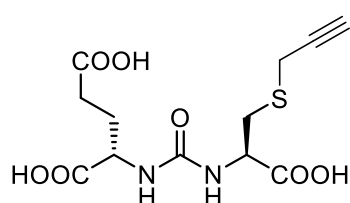
Benzyl-(Z)-2-acetamido-7-fluorundec-6-en-4-inoat (32)



Pd(OAc)₂ (5,2 mg, 23 µmol) und PPh₃ (12 mg, 46 µmol) wurden in 5 mL DMF gelöst und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Katalysatorlösung wurden anschließend CuI (14 mg, 73 µmol), Triethylamin (100 µL, 0,71 mmol), Verbindung **31** (122 mg, 0,50 mmol) und Verbindung **2a** (160 mg, 0,41 mmol) gegeben und die Mischung im Anschluss für 15 Minuten gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde gesättigte NH₄Cl-Lösung hinzugegeben, der entstandene Niederschlag mit Wasser gelöst und dreimal mit Ether

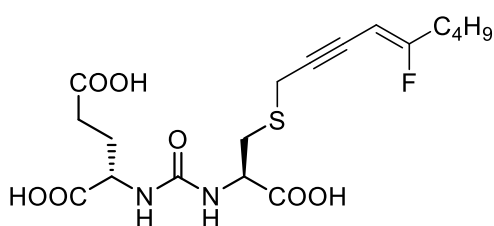
extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (Si-60, EtOAc/PE 1:3, dann: semipräparative HPLC (Phenomenex Hydro-RP 10 μ , 10x250 mm, 65 % MeCN, 9,4 mL/min) und anschließende Gefriertrocknung aus Acetonitril ergab ein weißes Pulver als Produkt (73 mg, 42 %). Smp.: 63 – 64 °C; R_f: 0.25 (EtOAc/PE 1:2). ¹H NMR (600 MHz, MeOH-d₄) δ 7.42 – 7.28 (m, 5H), 5.19 (dd, J= 32.6, 12.3 Hz, 2H), 4.81 (d, J=34.2 Hz, 1H), 4.62 – 4.57 (m, 2H), 2.83 (d, 1.6 Hz, 2H), 2.23 (dt, J= 17.6, 7.4 Hz, 2H), 2.00 (s, 3 H), 1.51 – 1.44 (m, 2H), 1.40 – 1.31 (m, 2H), 0.93 (t, J=7.3 Hz, 3 H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOH-d₄) δ 173.36, 171.86, 170.95 (d, ¹J_{CF}=269.8 Hz), 137.11, 129.55, 129.29, 129.21, 88.80 (d, ³J_{CF}=5.5 Hz), 88.13 (d, ²J_{CF}=14.5 Hz), 76.27 (d, ⁴J_{CF}=3.5 Hz), 68.18, 53.20, 32.41 (d, 2J_{CF}=24.5 Hz), 29.19, 23.37, 22.94, 22.26, 14.03; ¹⁹F NMR (565 MHz, MeOH-d₄) δ -91.38; HRMS (ESI) berechnet für C₂₀H₂₄FNO₃Na ([M+Na]⁺): 368.16324 , gefunden: 368.16309.

(((R)-1-Carboxy-2-(prop-2-in-1-ylthio)ethyl)carbamoyl)-L-glutaminsäure (34)



Verbindung **33** (318 mg, 0,64 mmol) wurde in 2 mL TFA/TIPS/Wasser (95:2,5:2,5) aufgenommen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer eingengt und TFA-Reste wurden durch mehrmalige Zugabe von Wasser und erneutes Einrotieren entfernt. Die Gefriertrocknung aus Wasser lieferte das Produkt als weißes, stark hygroskopisches Pulver (196 mg, 93 %). ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.54 (dd, J=7.7 Hz, J=4.7 Hz, 1H), 4.28 (dd, J= 9.7 Hz, J=5.1 Hz, 1H), 3.38 (dd, J=2.5 Hz, J=1.0 Hz, 2H), 3.25 (m, 1H), 3.10 (m, 1H), 2.67 (t, J=2.6 Hz, 1H), 2.52 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.19 (m, 1H), 1.98 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 177.26, 176.17, 174.94, 158.94, 80.10, 72.45, 52.91, 52.55, 32.67, 30.02, 26.25, 18.95; MS (ESI) berechnet für C₁₂H₁₇N₂O₇S ([M+H]⁺): 333.07, gefunden: 333.10.

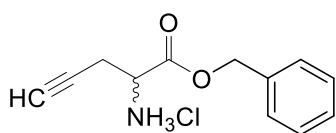
(((R)-1-Carboxy-2-(((Z)-5-fluornon-4-en-2-in-1-yl)thio)ethyl)carbamoyl)-L-glutaminsäure (35)



Pd(OAc)₂ (2,0 mg, 9 μmol) und PPh₃ (5,2 mg, 20 μmol) wurden in 2 mL DMF gelöst und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Katalysatorlösung wurden anschließend CuI (7,6 mg, 27 μmol), Triethylamin (40 μL, 0,29 mmol),

Verbindung **34** (64 mg, 0,19 mmol) und Verbindung **2a** (64 mg, 0,17 mmol) gegeben und die Mischung im Anschluss für 15 Minuten gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand auf C18 einrotiert und mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt (Gradient, 40 – 70 % MeOH/0,5 % HOAc_{aq}). Die eingegangene Produktfraktion wurde für 24 Stunden bei < 0,05 mbar getrocknet und das Produkt als leicht gelber, lackartiger Feststoff erhalten (15 mg, 18 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.50 (br s, 3H), 6.56 (d, J=7.9 Hz, 1H), 6.43 (d, J=7.8, 1H), 5.13 (d, J=35.6 Hz, 1H), 4.35 (d, J=5.6 Hz, 1H), 4.10 (d, 5.1 Hz, 1H), 3.55 (s, 2H), 2.95 (ddd, J=19.9 Hz, J=13.5 Hz, J=5.5 Hz, 2H), 2.26 (m, 4H), 1.91 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.43 (m, 2H), 1.29 (m, 2H), 0.87 (t, J=7.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 174.09, 173.75, 172.82, 169.52 (d, ¹J_{CF}=270.2 Hz), 156.98, 89.36 (d, ³J_{CF}=5.2 Hz), 87.17 (d, ²J_{CF}=13.1 Hz), 75.24 (d, ³J_{CF}=3.6 Hz), 52.82, 52.11, 33.66, 30.74 (²J_{CF}=23.9 Hz), 29.92, 27.59, 27.42, 21.36, 20.20, 13.54; ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ – 88.54; HRMS (ESI) berechnet für C₁₈H₂₆O₇N₂FS ([M+H]⁺): 433.14393, gefunden: 433.14384.

Benzyl-2-aminopent-4-inoat Hydrochlorid (39b)

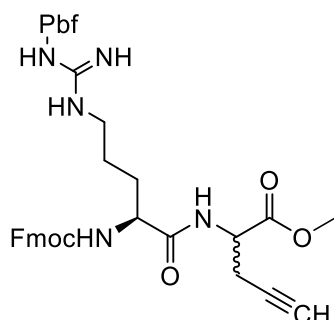


Verbindung **35** (1,16 g, 3,82 mmol) wurde unter Argon bei 0 °C mit 4 M HCl/Dioxan (6mL) versetzt und gerührt bis die Gasentwicklung beendet war. Nach 60 Minuten zeigte die DC den

vollständigen Umsatz des Edukts. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer eingengt, in EtOH aufgenommen und durch langsame Zugabe von Ether das Produkt als weißer Feststoff gefällt (0,81 g, 88 %). ¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ 7.38 (m, 5H), 5.31 (m, 2H), 4.33 (t, J=5.3 Hz, 1 H), 2.93 (qdd, J=17.7 Hz, J=5.3 Hz, J=2.7 Hz, 2H), 2.65 (t, 2.7 Hz); ¹³C NMR (101 MHz, MeOH-d₄) δ 168.85, 136.27, 129.77, 129.67, 76.76, 75.35, 69.44,

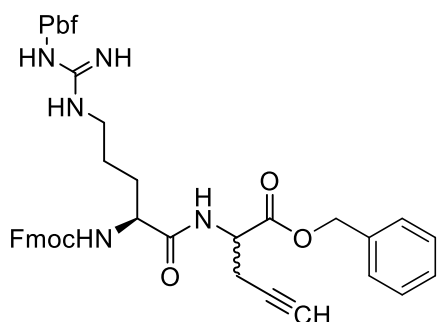
52.65, 21.24; HRMS (ESI) berechnet für C₁₂H₁₄NO₂ ([M-Cl]⁺): 204.10191, gefunden: 204.10184

Fmoc-Arg(Pbf)-Pra-OMe (40a)



Fmoc-Arg(Pbf)-OH (0,51g, 79 mmol) und HATU (0,35g, 0,79 mmol, 1 Äq.) wurden in 3 mL DMF gelöst und DIPEA (134 µL, 0,79 mmol, 1,0 Äq) bei Raumtemperatur hinzugefügt. Die Lösung wurde 3 Minuten gerührt und anschließend eine Lösung aus H-Pra-OMe (**39a**, 315 mg, 2,48 mmol, 1,05 Äq) in 1,5 mL DMF in einer Portion zugefügt. Nach 90 Minuten wurde die Reaktionslösung mit Wasser versetzt und dreimal mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Nach der Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (SI-60, 2 % MeOH/DCM) wurde das ölige Produkt mit Ether versetzt und mit Ultraschall behandelt. Die Suspension wurde erneut am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt, wobei das Produkt als weißer Feststoff erhalten wurde (0,57 g, 95 %). NMR-Spektren: siehe Appendix; HRMS (ESI) berechnet für C₄₀H₄₈N₅O₈S ([M+H]⁺): 758.32181, gefunden: 758.32210.

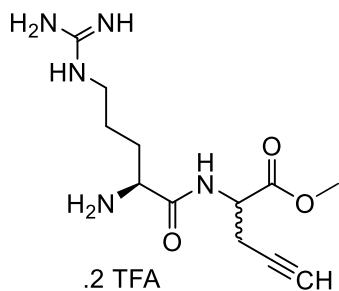
Fmoc-Arg(Pbf)-Pra-OBn TFA-Salz (40b)



Fmoc-Arg(Pbf)-OH (1,13 g, 1,74 mmol) und HATU (0,67 g, 1,75 mmol, 1 Äq.) wurden in 3 mL DMF gelöst und DIPEA (298 µL, 1,75 mmol, 1,0 Äq) bei Raumtemperatur hinzugefügt. Die Lösung wurde 8 Minuten gerührt und anschließend eine Lösung aus H-Pra-OBn.HCl (**39b**, 420 mg, 1,75 mmol, 1,00 Äq) in 1,5 mL DMF in einer Portion zugefügt. Nach 60 Minuten wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaCl-Lösung verdünnt und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Nach der Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (Si-60, Gradient 60 – 100 % EtOAc/PE) wurde das ölige Produkt mit Ether versetzt und mit Ultraschall behandelt. Die Suspension wurde erneut am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt, wobei das Produkt als weißer Feststoff erhalten wurde (1,42 g,

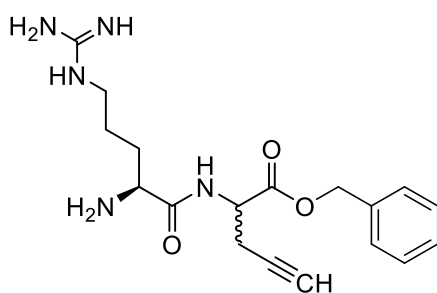
98 %). NMR-Spektren: siehe Appendi; HRMS (ESI) berechnet für $C_{46}H_{51}N_5O_8S$ ($[M+H]^+$):834.35311, gefunden: 834.35274.

H-Arg-Pra-OMe TFA-Salz (41a)



Verbindung **40a** (1,70 g, 2,25 mmol) wurde in 16 mL DMF gelöst, mit 4 ml Piperidin versetzt und 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde anschließend am Rotationsverdampfer bei 40 °C und < 2 mbar zu einem zähflüssigen Öl eingengt. Der Rundkolben wurde anschließend im Eisbad gekühlt, 750 μ L Wasser vorgelegt und anschließend 15 mL TFA zugesetzt. Die entstandene Suspension wurde mit Ultraschall behandelt und anschließend bei Raumtemperatur 90 Minuten gerührt. Die tief-violette Lösung wurde danach am Rotationsverdampfer auf ca. 5 mL eingengt und langsam in 50 mL eisgekühlten Ether eingetropt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Ether im Ultraschallbad gewaschen und erneut abzentrifugiert. Im Rohprodukt konnte mittels ESI-MS das Produkt nachgewiesen werden (ca. 50 % rel. Intensität), jedoch war aufgrund der sehr ähnlichen Retention des Laktam-Nebenproduktes (ca. 75 % rel. Intensität) auf C18 die Isolierung mittels Flash-Chromatographie (C18) nicht erfolgreich.

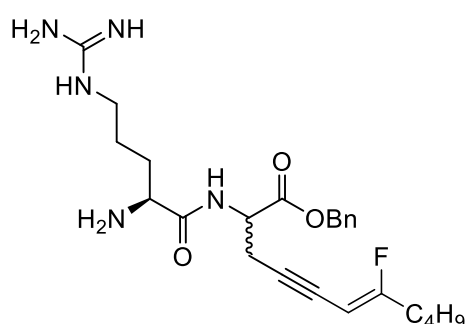
H-Arg-Pra-OBn.2TFA-Salz (41b)



Verbindung **40a** (834 mg, 1,00 mmol) wurde in 16 mL DMF gelöst, mit 4 ml Piperidin versetzt und 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde anschließend am Rotationsverdampfer bei 40 °C und < 2 mbar zu einem zähflüssigen Öl eingengt. Der Rundkolben wurde anschließend im Eisbad gekühlt, 0,5 mL Wasser vorgelegt und anschließend 9,5 mL TFA zugesetzt. Die Lösung wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend langsam in 120 mL eisgekühlten Ether eingetropt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, zweimal mit Wasser versetzt und die entstandene Suspension erneut abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde jeweils abdekantiert und mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt (C18, MeCN/0,1 % TFA_{aq} 25:75). Die Produktfraktion wurde am Rotationsverdampfer aufkonzentriert und anschließend aus Wasser gefriergetrocknet. Das Produkt wurde als weißes Pulver erhalten (185 mg, 31 %). $R_f=0,17$ (C18, MeCN/0,5 % TFA_{aq} 4:6). 1H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.43 (m, 5H), 5.24 (m,

2H), 4.74 (m, 1H), 4.08 (q, J=6.9 Hz, 1 H), 3.16 (t, 7.0 Hz, 1H), 3.01 (t, J=7 Hz, 1H), 2.82 (m, 2H), 2.43 (dt, J=13.5 Hz, J= 2.6 Hz, 1H), 1.88 (m, 2H), 1.61 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O , Mischung der Diastereomere, Signale nicht zugeordnet) δ 171.08, 170.94, 169.47, 169.35, 163.13, 162.77, 156.57, 134.94, 128.83, 128.80, 128.75, 128.47, 128.28, 117.78, 114.88, 79.18, 78.84, 72.45, 72.14, 68.22, 68.11, 52.66, 52.48, 51.80, 51.72, 40.31, 40.26, 28.00, 23.51, 23.17, 20.83, 20.51; ^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -75.58; HRMS berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{N}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 360.20302, gefunden: 306.20252

H-Arg-Pra(FHex)-OBn.2TFA (42)

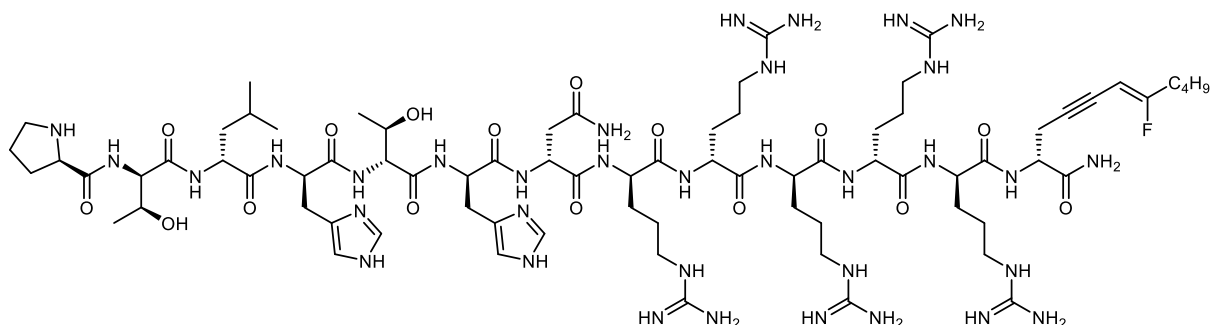


Zur Herstellung des Katalysators wurden 1,1 mg $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ sowie 2,6 mg PPh_3 in 1 mL DMF gelöst und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Parallel wurden Verbindung **129** (59 mg, 0,10 mmol), CuI (20,8 mg, 0,11 mmol) und TEA (19 μL , 0,14 mmol) in 1 mL DMF gelöst, mit der Katalysatorlösung versetzt und zuletzt Verbindung **2a** (47 mg, 0,12 mmol) hinzugefügt.

Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit 50 mL Wasser und 150 μL TFA verdünnt und über eine Waters Sep Pak C18 Plus Long Kartusche geleitet. Das Produkt wurde mit 3 mL MeCN eluiert, zusammen mit 280 mg C18 Silika einrotiert und mittels Flash-Chromatographie mit Dryload (Gradient, MeOH/0,1 % TFA_{aq} 20 – 70 %) isoliert. Die produktthaltige Fraktion wurde bis zur Trockene einrotiert, in Wasser aufgenommen und nach Gefriertrocknung als weißes Pulver erhalten (45 mg, 65 %). $R_F=0,32$ (MeOH/0,5 % TFA_{aq} 70:30). ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.22 (m, 5H), 5.18 (m, 1H), 5.02 (m, 1H), 4.63 (m, 2H), 4.09 (dt, J=12.9 Hz, J=6.5 Hz, 1H), 3.12 (t, J=6.9 Hz, 1H), 3.01 (td, J=6.9 Hz, J=1.7 Hz, 1H), 2.83 (m, 2H), 2.04 (dt, J=16.2 Hz, J=7.2 Hz, 2H), 1.88 (dt, J=15.5 Hz, J=6.6 Hz, 2H), 1.63 (m, 2H), 1.28 (m, 2H), 1.15 (m, 2H), 0,76 (t, J=7.3 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O , Mischung der Diastereomere, Signale und $J_{\text{C-F}}$ -Kopplung nicht zugeordnet) δ 171.34, 171.32, 170.88, 169.31, 169.20, 168.67, 168.64, 163.22, 162.86, 162.51, 162.16, 156.72, 156.65, 128.37, 128.11, 128.06, 87.52, 87.47, 87.40, 87.34, 86.72, 86.64, 86.58, 86.50, 75.95, 75.92, 75.69, 75.65, 67.72, 67.58, 52.61, 52.43, 52.19, 51.99, 40.39, 40.32, 31.07, 30.83, 28.12, 28.05, 27.49, 23.51, 23.22, 22.11, 21.75, 21.49, 21.47, 13.11; ^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -75.55 (s, 9F), -89.42 (s, 1F); MS (ESI) berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{FN}_5\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 460.27, gefunden: 460.28

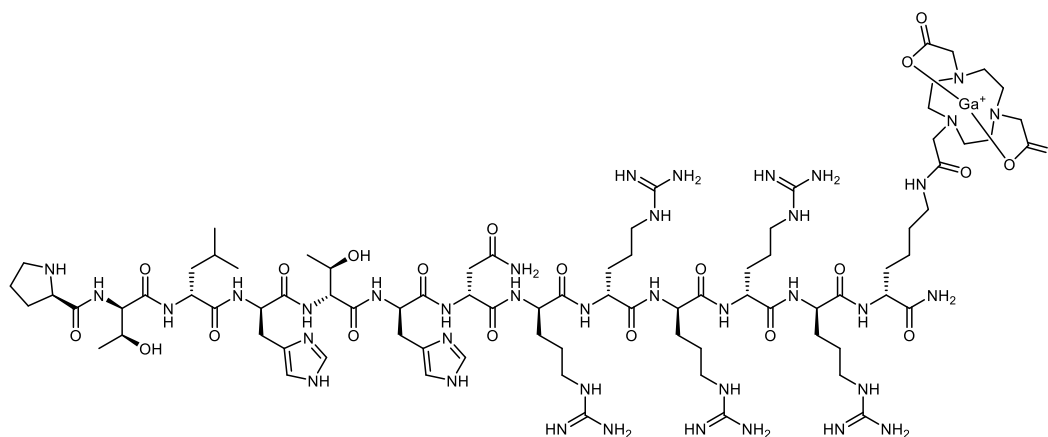
H-Pro-Thr-Leu-His-Thr-His-Asn-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Pra(FHex)-NH₂

(H-RD2-Pra(FHex)-NH₂, 43)



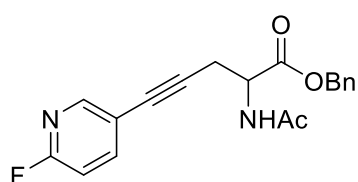
Zur Herstellung des Katalysators wurden 1,1 mg Pd(OAc)₂ sowie 2,6 mg PPh₃ in 1 mL DMF gelöst und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Parallel wurden Verbindung **H-RD2-Pra-NH₂** (1,6 mg) und CuI (1,3 mg) in 100 µL DMF gelöst, mit TEA (5 µL) versetzt und für 3 Minuten gerührt. Zu der Mischung wurden 50 µL der Katalysatorlösung sowie Verbindung **2a** (0,27 mg in 50 µL DMF) pipettiert und für 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden erneut 50 µL einer frischen, identischen Katalysatorlösung sowie mehr von Verbindung **2a** (0,27 mg in 50 µL DMF) hinzugefügt und erneut 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 40 °C und < 2mbar aufkonzentriert, der Rückstand mit 0,5 % TFA_{aq} versetzt und mit Ultraschall suspendiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert und der Überstand in zwei Portionen mittels HPLC gereinigt (Phenomenex Synergy Hydro-RP 5µ 4.6x250 mm, 22 % MeCN, 0,1 % TFA, 1,0 mL/min, t_R=12-13 min). Die Produktfraktion wurde gefriergetrocknet und anschließend für 24 Stunden im Exsikkator über Orangegel getrocknet. Die Ausbeute konnte aufgrund der unwägbaren Masse nicht bestimmt werden. MS (MALDI-Orbitrap) berechnet für C₇₆H₁₃₀N₃₄O₁₆F ([M+H]⁺): 1794.0383, gefunden: 1794,0315 (-3,44 ppm).

H-ptlhthnrrrrrk(NOTA-Ga)-NH₂ (Ga-NOTARD2, 44)



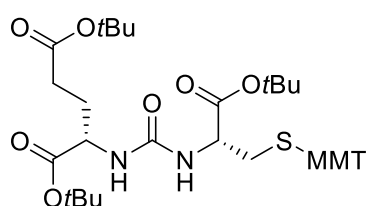
Eine Lösung aus H-RD2-Lys(NOTA)-NH₂ (1,0 mg) in HEPES-Puffer (1 M, pH 3,9 eingestellt mit HCl, 1,8 mL) wurde mit GaCl₃ in 0,6 M HCl (10 mg, gelöst in 0,6 M HCl) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 4 Minuten konnte mittels HPLC kein Edukt mehr gefunden werden. Das Reaktionsgemisch wurde mit 10 mL Wasser verdünnt und über eine Waters Sep-Pak C18 light geleitet. Die Kartusche wurde mit 2 mL Wasser gewaschen und anschließend mit 2 mL 30 % MeCN_{aq} eluiert. Das Produkt wurde nach Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten (ca. 0,5 mg). MS (MALDI-Orbitrap) berechnet für C₈₃H₁₄₆N₃₈O₂₁Ga ([M]⁺): 2080.0781, gefunden: 2080.0693 (- 4,2 ppm).

Benzyl-2-acetamido-5-(6-fluorpyridin-3-yl)pent-4-inoat (45)



Unter Argon wurden Verbindung **31** (100 mg, 0,41 mmol), 2-Fluor-5-Iodpyridin (109 mg, 0,49 mmol, 1,2 Äq), CuI (8 mg, 42 µmol) und PdPPh₃Cl₂ in 4 mL Ether gelöst, mit Diethylamin (210 µL, 2,04 mmol, 5 Äq) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Silica versetzt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Die Aufreinigung mittels Dryload (Si-60, (EtOAc/PE 1:1) lieferte das Produkt als farbloses Öl (76 mg, 69 %). R_f=0,21 (Si-60, EtOAc/PE 1:1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (br d, J=2,0Hz, 1H), 7.58 (m, 1H), 7.31 (m, 5H), 6.81 (d, J=8.4Hz, J=2.9 Hz, 1H), 6.51 (d, J=7.4, 1H), 5.22 (dd, J=44.8 Hz, J=12.2 Hz, 2H), 4.86 (m, 1H), 2.99 (d, 4.9 Hz, 2H), 2.05 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.44, 169.92, 162.52 (d, ¹J_{C-F}=242.0 Hz), 150.63 (d, ³J_{C-F}=15.2 Hz), 143.88 (d, ³J_{C-F}=8.3 Hz), 135.10, 128.69, 128.64, 128.39, 117.88 (d, ⁴J_{C-F}=4.9 Hz), 109.29 (d, ²J_{C-F}=37.9 Hz), 87.43 (d, ⁵J_{C-F}=1.0 Hz), 79.00, 67.63, 51.02, 23.51, 23.15; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ - 66.20; MS (ESI) berechnet für C₁₉H₁₈N₂O₃F ([M+H]⁺): 341.13, gefunden: 341.22.

Di-tert-butyl-(((R)-1-(tert-butoxy)-3-(((4-methoxyphenyl)diphenylmethyl)thio)-1-oxopropan-2-yl)carbamoyl)-L-glutamat (49)

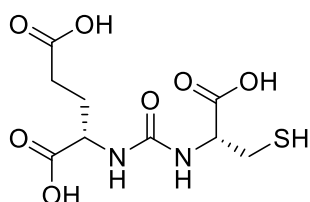


Glu(*t*Bu)-OtBu.HCl (1,09 g (95 % Reinheit), 3,50 mmol, 1.0 Äq) wurde in THF (7 mL) und Pyridin (845 µL, 10,5 mmol, 3 Äq.) gelöst und die Mischung auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Phenylchloroformiat (590 mg, 3,77 mmol, 1,07 Äq) über 5 Minuten hinzugegeben, die Mischung für weitere 5 Minuten bei dieser Temperatur gerührt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 2 Stunden

zeigte die DC den vollständigen Umsatz des Edukts an. Das Reaktionsgemisch wurde zweimal mit 10 % Zitronensäure_{aq}, zweimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, sowie mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das Phenylcarbammat **48** wird nach 72 Stunden bei < 0,1 mbar als leicht gelbes, zähes Wachs erhalten und ohne weitere Reinigung für die nächste Stufe eingesetzt (1,215 g, 92 %). R_F=0,66 (EtOAc/PE 1:3); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35 (m, 2H), 7.20 (m, 1H), 7.14 (m, 2H), 5.69 (d, J=8.1 Hz, 1H), 4.32 (m, 1H), 2.37 (m, 2H), 2.19 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.46 (s, 9H).

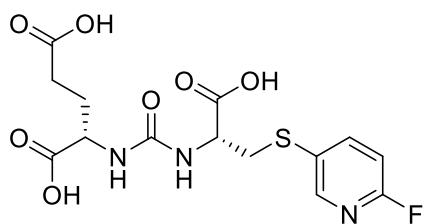
Das Phenylcarbammat **48** (1,195 g, 3,15 mmol) wurde in 5 mL DMSO gelöst und bei Raumtemperatur eine Lösung aus Verbindung **47** (1,42 g, 3,16 mmol, 1,0 Äq.) in 5 mL DMSO tropfenweise über 5 Minuten hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde anschließend bei 60 °C über Nacht gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Nach der Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (Si-60, EtOAc/PE 1:4) wurde das Produkt als farbloser, wachsartiger Feststoff erhalten (1,705 g, 66 % über beide Stufen). R_F=0,36 (EtOAc/PE 1:3). Das ¹H und ¹³C NMR entspricht der Literaturangabe [63].

(((R)-1-Carboxy-2-mercaptoethyl)carbamoyl)-L-glutaminsäure (**50**)



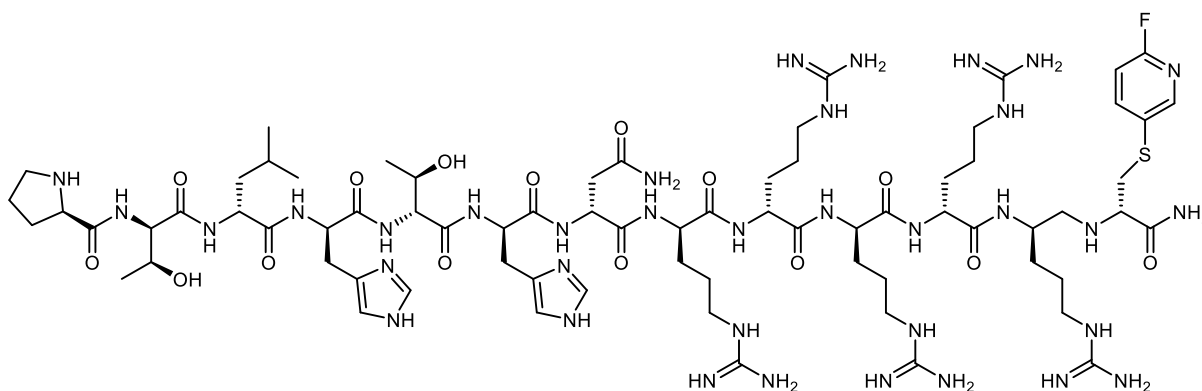
Zu einer Lösung aus TFA/TIPS/Wasser (90:5:5, 130 mL) wurde unter Argon portionsweise Verbindung **49** (805 mg, 1,10 mmol) über 5 Minuten hinzugefügt. Die Suspension wurde über zwei Stunden stark gerührt und anschließend im Rotationsverdampfer auf wenige mL eingengt. Durch Zugabe von Hexan wurde das Rohprodukt ausgefällt und anschließend wurde es mit Ultraschall behandelt. Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Der übrige Feststoff wurde in 0,1 % TFA_{aq} gelöst und mittels Flash-Chromatographie (C18, MeCN/0,1 % TFA_{aq} 5:95) aufgereinigt. Die Produktfraktion wurde am Rotationsverdampfer aufkonzentriert, mit 2 mL Wasser verdünnt und nach Gefriertrocknung als weißes, hygroskopisches Pulver erhalten (223 mg, 70 %). ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.51 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.28 (dd, J = 9.1 Hz, J = 5.1 Hz, 1H), 2.98 (m, 2H), 2.51 (t, J = 7.3 Hz), 2.19 (m, 1H), 1.98 (m, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 177.21, 176.15, 174.43, 159.04, 54.84, 52.50, 29.99, 26.18, 25.80. HRMS (ESI) berechnet für C₉H₁₄N₂O₈S ([M+H]⁺): 295.05945; gefunden: 295.05961.

(((R)-1-Carboxy-2-((6-fluoropyridin-3-yl)thio)ethyl)carbamoyl)-L-glutaminsäure (51)



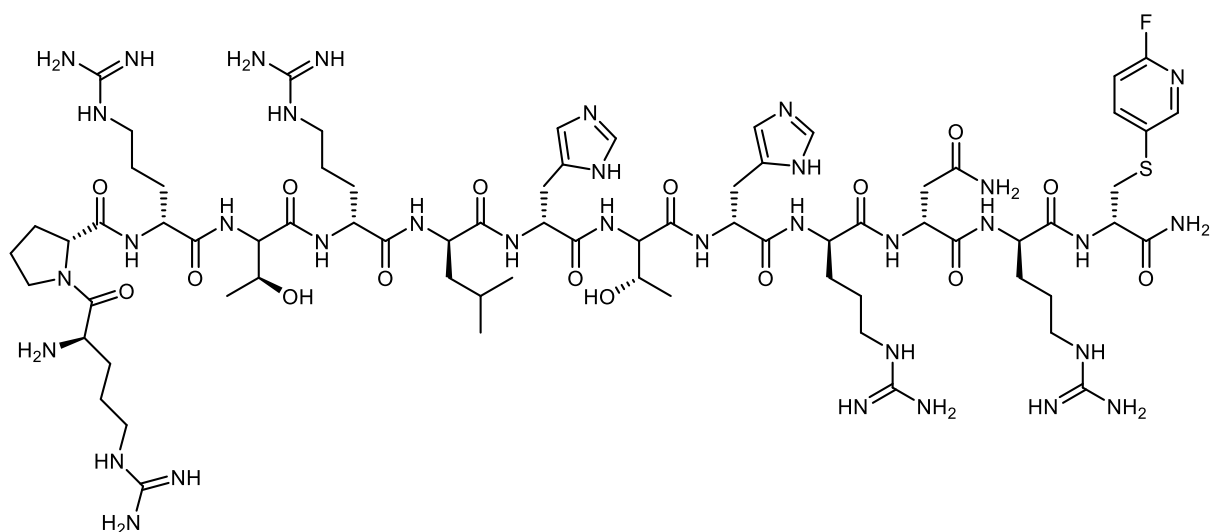
THF und Wasser wurden unmittelbar vor der Synthese durch Einleiten eines kräftigen, feinverteilten Heliumstroms für 2-3 Minuten entgast. In einem Weaton® V-Vial wurden unter Argon Verbindung **50** (50 mg, 169 μmol) sowie Xantphos Pd G3 (1,6 mg, 1 mol-%) vorgelegt. Nach Zugabe von 0,5 mL entgastem THF, sowie 0,5 mL entgastem Wasser, wurde der pH Wert des Reaktionsgemisches durch schrittweise Zugabe von TEA (insg. 60 μL) schwach alkalisch eingestellt. Die Reaktionslösung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das THF im Argonstrom unter reduziertem Druck entfernt, die Reste mit HPLC-Laufmittel verdünnt und mit TFA angesäuert. Die inhomogene Suspension wurde im Ultraschallbad fein verteilt und anschließend direkt in jeweils zwei Portionen mittels HPLC aufgereinigt (Phenomenex Synergy Hydro-RP 10 μ , 10x250, 15 % MeCN, 0.1 % TFA, 7.4 mL/min, t_{R} = 10.3-12.0 min). Die Produktfraktion wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, anschließend mit 0,5 mL Wasser verdünnt und nach Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten (22 mg, 33 %). ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.22 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.05 (ddd, J = 8.6 Hz, J = 7.4 Hz, J = 2.6 Hz, 1H), 7.05 (dd, J = 8.6 Hz, J = 1.7 Hz, 1H), 4.42 (dd, J = 7.3 Hz, J = 4.5 Hz, 1H), 4.18 (dd, J = 8.8 Hz, J = 5.2 Hz, 1H), 3.44 (dd, J = 14.6 Hz, J = 4.5 Hz, 1H), 3.32 (dd, J = 14.6 Hz, J = 7.3 Hz, 1H), 2.45 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.17 – 2.05 (m, 1H), 2.00 – 1.86 (m, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 177.15, 175.81, 174.17, 162.79 (d, J = 241.3 Hz), 158.44, 149.52 (d, J = 13.3 Hz), 146.31 (d, J = 8.9 Hz), 128.61 (d, J = 4.4 Hz), 110.63 (d, J = 36.5 Hz), 53.05, 52.35, 36.48, 29.86, 26.38 ^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -72.12; HRMS (ESI) berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_7\text{SF}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 390.07657; gefunden: 390.07673.

H-ptlhthnrrrrrc(FPy)-NH₂ (RD2cFPy, 52)



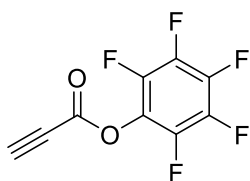
In einem 2 mL Eppendorfvlial wurde Xantphos Pd G3 vorgelegt und in 100 μ L entgastem THF gelöst. 6 μ L TEA sowie H-RD2c-NH₂ (5 mg), gelöst in 100 μ L entgastem Wasser, wurden hinzugegeben und die zweiphasige Mischung durch Zugabe von 100 μ L MeCN homogenisiert. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur 70 Minuten geschüttelt, bis mittels HPLC der vollständige Umsatz von H-RD2c-NH₂ beobachtet wurde. Der Anteil an organischem Lösungsmittel wurde im Argonstrom unter reduziertem Druck entfernt. Der wässrige Rest wurde mit 0,5 % TFA_{aq} verdünnt und in einer Portion mittels HPLC aufgereinigt (Phenomenex Synergy Hydro-RP 10 μ , 10x250 mm, Stufengradient: 0-1,5 min: 0,075 % TFA_{aq}; 1,5 min – 15 min: 15 % MeCN/0,075 % TFA_{aq}, 7,4 mL/min, t_R = 6,6 – 8,2 min). Die produktthaltige Fraktion wurde am Rotationsverdampfer aufkonzentriert, in 600 μ L Wasser aufgenommen und nach Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten (2,3 mg, 44 % bezogen auf RD2.5TFA-Salz). MS (MALDI-Orbitrap) berechnet für C₇₃H₁₂₃N₃₅O₁₆SF ([M+H]⁺): 1796.9586, gefunden: 1796.9505 (-4,5 ppm).

H-rprtrlhthrrc(FPy)-NH₂ (D3cFPy, 53)



Die Synthese sowie die Reinigung wurden analog zur Synthese von Verbindung **52**, ausgehend von 7,5 mg H-D3c-NH₂, durchgeführt. Das Produkt wurde als weißes Pulver erhalten (2,50 mg, 32 % bezogen auf D3.5TFA). MS (MALDI-Orbitrap) berechnet für C₇₃H₁₂₃N₃₅O₁₆SF ([M+H]⁺): 1796.9586, gefunden: 1796.9597 (+ 0,6 ppm)

Pentafluorphenylpropiolat (54)



In Anlehnung an Inoue et al. [139]. Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 7,79 g, 37,7 mmol) und Pentafluorphenol (5,00 g, 27,2 mmol) wurden in DCM (120 mL) vorgelegt. Dazu wurde bei Raumtemperatur in einer Portion Propiolsäure (2,31 g, 33,0 mmol) zugesetzt, woraufhin sich sofort weißer Niederschlag bildete. Die Suspension wurde für weitere drei Stunden gerührt, der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer eingengt, bis ein braunes Öl erhalten wurde. Das Rohprodukt wurde durch Sublimation am Rotationsverdampfer bei 45 °C und 10 mbar aufgereinigt. Dabei schieden sich in einem zwischengeschalteten, leicht gekühlten NS29/32 Glasrohr analytisch reine, klare Kristalle ab (4,54 g, 71 %). Die NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.

4.3 Radiochemie

4.3.1 Allgemeines

N.c.a. [^{18}F]Fluorid wurde mittels der $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion an ^{18}O -angereichertem Wasser in einem 1.3 mL Titantarget des JSW BC 1710 Zyklotrons beziehungsweise in einem 1.6 mL Silbertarget des GE PETtrace des INM-5 erzeugt. Die Targetladung wurde nach der Bestrahlung gegebenenfalls mit Reinstwasser verdünnt und ohne weitere Aufreinigung direkt zur Radiomarkierung eingesetzt.

Allgemein wurden Radiomarkierungsreaktionen in Wheaton V-Vials (zwischenzeitlich DWK Life Science), versehen mit einem PTFE-Magnetrührfisch und verschlossen mittels Silikonseptum, durchgeführt. Für Reaktionen unter Inertbedingungen wurden unter Argon alle Komponenten mittels Einwegspritzen (BBraun Injekt®) und Stahlkanülen (BBraun) zugegeben bzw. entnommen. Die Reaktionsgefäße wurden in einem Aluminiumblock mit passenden Bohrlöchern unter Rühren erwärmt. Die angegebenen Reaktionstemperaturen entsprechen der Temperatur des Heizblocks. Markierungsreaktionen in Eppendorf-Vials wurden in einem Thermoshaker durchgeführt und moderat bei 600 – 800 rpm geschüttelt.

Radiomarkierungen mit ^{68}Ga wurden in einem 5 mL Kunststoffreaktor mit eingebauter Steigleitung (Scintomics) durchgeführt. Der Reaktor wurde in einem Heizbad mit NaCl-Lösung erwärmt. Die Reaktionstemperatur entspricht der Temperatur des Heizbads. Das

Reaktionsgemisch wurde durch Einleiten eines geringen Argonstroms durchmischt. Alle Lösungen und Reaktanden wurden ohne Kontakt zu metallischen Bauteilen (bspw. Stahlkanülen, Metallspatel) gehandhabt.

Kartuschen zur SPE mit unpolarer stationärer Phase wurden durch Spülen mit mehreren Säulenvolumina Ethanol, gefolgt von mehreren Säulenvolumina Reinwasser, konditioniert.

Radio-DC-Platten wurden bei Kammersättigung entwickelt. Die Identität des Produkts wurde bei UV-aktiven Substanzen durch die gleichzeitige Entwicklung des Standards zugeordnet. Dazu wurde die Substanz nach der Entwicklung anhand der UV-Absorption lokalisiert und nachträglich mit Aktivität für den DC-Aktivitätsdetektor markiert. Bei Substanzen ohne UV-Absorption wurde der Rf-Wert des Standards unter identischen Bedingungen bestimmt und mit den Aktivprodukten verglichen. Die Startlinie und Laufmittelfront wurden nach der Entwicklung der Platte am Rand mit verdünnter Aktivitätslösung markiert.

Zur Bestimmung der molaren Aktivität wurde eine Kalibriergerade der ^{19}F -Referenz für die HPLC angefertigt. Dazu wurden in der Regel mindestens drei bis vier Messpunkte mit Konzentrationen im Bereich von 50 bis 1 $\mu\text{g/mL}$ verwendet.

4.3.2 Bestimmung der radiochemischen Ausbeute

Zur Bestimmung der RCA mittels DC wurde die Aktivitätsverteilung auf der Platte gemessen und alle detektierten Komponenten einer Bahn integriert. Die RCA ergibt sich aus dem Quotienten der Counts im Produktpeak, sowie der Gesamt-counts aller integrierten Peaks. Eine Zerfallskorrektur ist aufgrund der parallelen Messung über die gesamte Platte nicht erforderlich. Um zu überprüfen, ob sich in der Probe flüchtige Komponenten befinden, wurde im Einzelfall die Platte direkt nach der Entwicklung ausgemessen. Anschließend wurde die Platte getrocknet, einige Zeit offen liegen gelassen und erneut gemessen. Falls keine Veränderung der Produktverteilung zu beobachten war, wurde die Anwesenheit flüchtiger radioaktiver Komponenten ausgeschlossen.

Zur Bestimmung der RCA mittels HPLC wurde ein Probenaliquot auf die HPLC injiziert. Dabei wurde mindestens das dreifache Volumen der Probenschleife injiziert. Die Bestimmung der Gesamtaktivität des Aliquots erfolgte über das zusätzliche HPLC-Ventil, wobei ein zweites, gleich großes Aliquot an der Säule vorbei, direkt in den Radiodetektor transportiert wurde und somit verlustfrei detektiert wurde. Diese Referenzinjektion erfolgte in der Regel direkt nachdem

die Probe auf die Säule injiziert wurde - der Referenzpeak eluiert daher innerhalb der Totzeit. Die Fläche der Produkte sowie des Referenzpeaks wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Retentionszeiten auf den Zeitpunkt $t_R=0$ zerfallskorrigiert. Die RCA ist der Quotient aus der zerfallskorrigierten Fläche des Produktes und des Referenzpeaks. In regelmäßigen Abständen wurde mithilfe eines Bypasses anstelle einer Säule sichergestellt, dass die Probenvolumina beider Ventile identisch sind.

Das Endprodukt wurde bei beiden zuvor genannten Methoden mit einer geeigneten Lösung verdünnt, sodass eine homogene, möglichst wässrige Lösung erhalten wurde, um eine gute Löslichkeit aller (radioaktiver) Komponenten zu erreichen (beispielsweise HPLC-Eluens). Metallkatalysatoren wurden durch Zugabe von möglichst geringen Mengen TFA gequench und anschließend wurde die Produktlösung verdünnt. Zur Bestimmung der danach an der Gefäßwand adsorbierten Aktivität, wurde die Gesamtaktivität des Reaktionsgefäßes gemessen, der Reaktor entleert und erneut ausgemessen. Von der verbliebenen Aktivität wird angenommen, dass sie adsorbiert ist.

Zur Bestimmung der isolierten RCA wurde das gesamte Reaktionsgemisch nach der Markierung auf geeignete Weise verdünnt und möglichst quantitativ auf die HPLC aufgegeben. Die Produktfraktion wurde gesammelt, dessen Aktivität im Curimeter gemessen und nach Zerfallskorrektur auf einen gemeinsamen Zeitpunkt ins Verhältnis zur eingesetzten Startaktivität gesetzt.

4.3.3 Vorschriften zur Radiomarkierung

Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ (Labormaßstab)

Ein Aliquot der bestrahlten $[^{18}\text{F}]\text{Fluoridlösung}$ (10 - 20 MBq) wurde in ein 5 mL V-Vial, befüllt mit einer Lösung aus KHCO_3 und Kryptofix 2.2.2 (1 M, 5 μL , 5 μmol), überführt und mit Reinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 150 μL aufgefüllt. Dazu wurde eine Lösung aus Verbindung **1b** (5 mg) in 300 μL DMSO gegeben und das Reaktionsgefäß für 10 Minuten unter Rühren auf 75 °C erhitzt und anschließend für 2 Minuten im Wasserbad abgekühlt.

Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ (Produktionsmaßstab)

Falls die vom Zyklotron erhaltene Aktivitätskonzentration des Targetwassers nicht für die Synthese der benötigten Produktaktivität ausreichte, wurde die $[^{18}\text{F}]$ Fluorid-haltige Lösung auf einem Anionentauscher, bestehend aus 20 mg Macherey-Nagel PS- HCO_3 (1,45 x 30 mm, Eigenbau, s. Abb. 71), fixiert und anschließend mit einer Lösung aus 5 μL KHCO_3 , Kryptofix 2.2.2 (1 M) und 145 μL Wasser ein ein 5 mL Wheaton V-Vial mit Magnetrührfisch eluiert. Dazu wurde eine Lösung aus 5 mg Vorläufer **1b**, gelöst in 300 μL DMSO, gegeben und der Reaktor unter Rühren auf 75 °C erhitzt.

Der Anionentauscher wurde anschließend regeneriert (Wasser, EtOH, Wasser, ges. NaHCO_3 , Wasser, je 2-3 mL) und konnte danach erneut verwendet werden.

Isolierung von $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$

Nach beendeter Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 0,5 – 1,5 mL Wasser verdünnt (1 bzw. 2 mL Injektionsloop) und auf eine HPLC injiziert (Phenomenex Synergy Hydro-RP 10 μ , 10x250, 30 % MeCN/0,3 % TFA_{aq} , 9,4 mL/min). Die Produktfraktion wurde mit 20 mL Wasser verdünnt und über eine Waters Sep-Pak C18 plus short Kartusche geleitet. Die Kartusche wurde im Anschluss mit 2 mL Wasser gewaschen, mit Argon ausgeblasen und mit einer Mischung aus 1 mL MeCN und 5 μL TFA eluiert. Die Zugabe von TFA ist essentiell für eine Elution des Produkts. Das Lösungsmittel wurde im Argonstrom unter reduziertem Druck entfernt und $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ im gewünschten Lösungsmittel für die Folgereaktion aufgenommen.

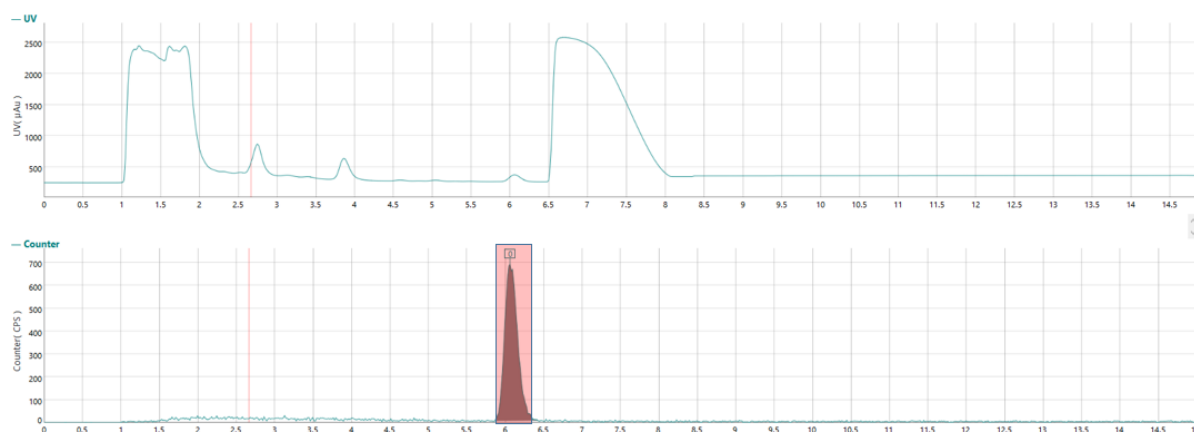


Abb. 57: Beispielchromatogramm für die Isolierung von $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ mittels HPLC. Der rot unterlegte Bereich wurde gesammelt.

Heck-Kupplung von Methylacrylat und [¹⁸F]FHexI⁺

[¹⁸F]FHexI⁺ wurde nach der allgemeinen Vorschrift synthetisiert, mittels HPLC isoliert und zuletzt in Wasser aufgenommen. In einem 2 mL Eppendorf-Vial mit Magnetrührfisch wurden unter Luft 4 µL Methylacrylat, 300 µL DMF, 50 µL KI-Lösung (1 mg/mL DMF), 50 µL Pd(OAc)₂-Lösung (1 mg/mL DMF), 50 µL einer KHCO₃-Lösung (1 M) und 50 µL Wasser vorgelegt. Zuletzt wurde ein kleines Aliquot von [¹⁸F]FHexI⁺ hinzugefügt (1-5 MBq, ca. 1-10 µL). Das Reaktionsgemisch wurde in einem Eis/NaCl Kühlbad bei -10 °C für 15 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde mit 20 µL TFA gequenchet, mit Laufmittel verdünnt und mittels HPLC untersucht.

Suzuki-Kupplung von Phenylboronsäure und [¹⁸F]FHexI⁺

Methode A: [¹⁸F]FHexI⁺ wurde nach der allgemeinen Vorschrift synthetisiert, mittels HPLC isoliert und zuletzt in THF aufgenommen. In einem 2 mL Eppendorf-Vial wurden unter Luft 4 mg Phenylboronsäure, 375 µL THF, 115 µL Wasser, 10 µL K₂CO₃ (1 M), sowie 10 µL einer frisch angesetzten Katalysatorlösung, bestehend aus 2.0 mg Pd(OAc)₂ und 2,4 mg PPh₃ in 1 mL DMF, gefolgt von einem Aliquot von [¹⁸F]FHexI⁺ (1-5 MBq, ca. 1-10 µL) vorgelegt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten sanft geschüttelt. Die Reaktion wurde mit 20 µL TFA gequenchet, mit Laufmittel verdünnt und mittels HPLC untersucht.

Methode B: [¹⁸F]FHexI⁺ wurde nach der allgemeinen Vorschrift synthetisiert. In dem abgekühlten Reaktor wurden nacheinander 1 mL THF, 40 µL 1 M K₂CO₃, 500 µL einer frisch angesetzten Katalysatorlösung, bestehend aus 2.0 mg Pd(OAc)₂ und 2,4 mg PPh₃ in 1 mL THF, sowie 100 µL MeCN zur Homogenisierung des zweiphasigen Gemisches gegeben und die Mischung für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit 20 µL TFA gequenchet, mit Laufmittel verdünnt und mittels HPLC untersucht.

Optimierung der Stille-Kupplung von Tributylphenylstannan und [¹⁸F]FHexI⁺

[¹⁸F]FHexI⁺ wurde nach der allgemeinen Vorschrift synthetisiert, mittels HPLC isoliert und zuletzt in THF aufgenommen. In ein 2 mL Eppendorf-Vial wurden Lösungsmittel und eine

Lösung aus Pd(PPh₃)₄ (10 mg/mL DMF) zusammen mit 2,5 µL Tributylphenylstannan vorgelegt. Zuletzt wurde ein Aliquot von [¹⁸F]FHexI⁺ (1-5 MBq, ca. 1-10 µL) zugefügt und das Reaktionsgemisch für 10 Minuten bei der gegebenen Temperatur sanft geschüttelt. Die Reaktion wurde mit 20 µL TFA gequencht, mit Laufmittel verdünnt und mittels HPLC untersucht.

Eintopf-Sonogashira Reaktion mit [¹⁸F]FHexI⁺ (allgemeine Reaktionsbedingungen)

Für die Katalysatorlösung wurden 1,0 mg Pd(OAc)₂ und 2,6 mg PPh₃ in 1 mL DMF gelöst und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung hat eine geringe Stabilität und wurde unmittelbar verbraucht oder verworfen. [¹⁸F]FHexI⁺ wurde nach der allgemeinen Vorschrift synthetisiert. Zu dem abgekühlten Reaktionsgemisch wurden eine Lösung des Alkin-Vorläufers (14 µmol), 2 mg CuI sowie 18 µL TEA in 400 mL DMF, gefolgt von 500 µL der Katalysatorlösung, hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 10 Minuten bei 30 °C gerührt. Durch Zugabe von 100 µL einer 20 %igen Lösung von TFA in MeCN wurde die Suspension in eine klare, braune Lösung überführt, mit HPLC-Laufmittel verdünnt und mittels HPLC untersucht (s. Tabelle 13).

Optimierte Radiosynthese von [¹⁸F]26 mittels Sonogashira-Kupplung mit [¹⁸F]FHexI⁺

Für die Katalysatorlösung wurden unter Luft in einem 2 mL Eppendorf-Vial mit Magnetrührfisch 1,0 mg Pd(OAc)₂ und 10,7 mg tppts in 1 mL Wasser mithilfe von Ultraschall gelöst und anschließend für 30 Minuten gerührt. Die zunächst hellgelbe Lösung färbte sich erst orange und zuletzt tief rot-violett. Selten wurde eine zögerliche Reaktion des Katalysators beobachtet, sodass diese nach 30 Minuten nicht beendet war. Es wurden jedoch keine Unterschiede bemerkt, wenn die Katalysatorlösung bei der Zugabe noch orange war. [¹⁸F]FHexI⁺ wurde nach der allgemeinen Vorschrift synthetisiert. Zu dem abgekühlten Reaktionsgemisch wurden eine Lösung aus Vorläufer **24** (5,2 mg, 14 µmol) in 400 µL Wasser, gefolgt von einer Lösung aus 2 mg CuI in 100 µL Acetonitril, 60 µL TEA sowie 0,5 mL der Katalysatorlösung gegeben. Die Mischung wurde für 10 Minuten bei 30 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 30 µL TFA homogenisiert, mit HPLC-Laufmittel auf ein Endvolumen von 2 mL verdünnt und auf die HPLC gegeben (Phenomenex Synergy

Hydro RP 10 μ , 10x250 mm, 27,5 % MeCN, 10 mL/min; s. Abb. 58). Die Produktfraktion wurde mit 40 mL Wasser verdünnt und über eine Waters Sep-Pak C18 plus short Kartusche geleitet. Die Kartusche wurde mit 5 mL Wasser gewaschen, mit Argon ausgeblasen und mit 1,5 mL Ethanol eluiert. Das Ethanol wurde bei 70 °C im Argonstrom unter reduziertem Druck verdampft und das Produkt in isotonischer NaCl-Lösung aufgenommen.

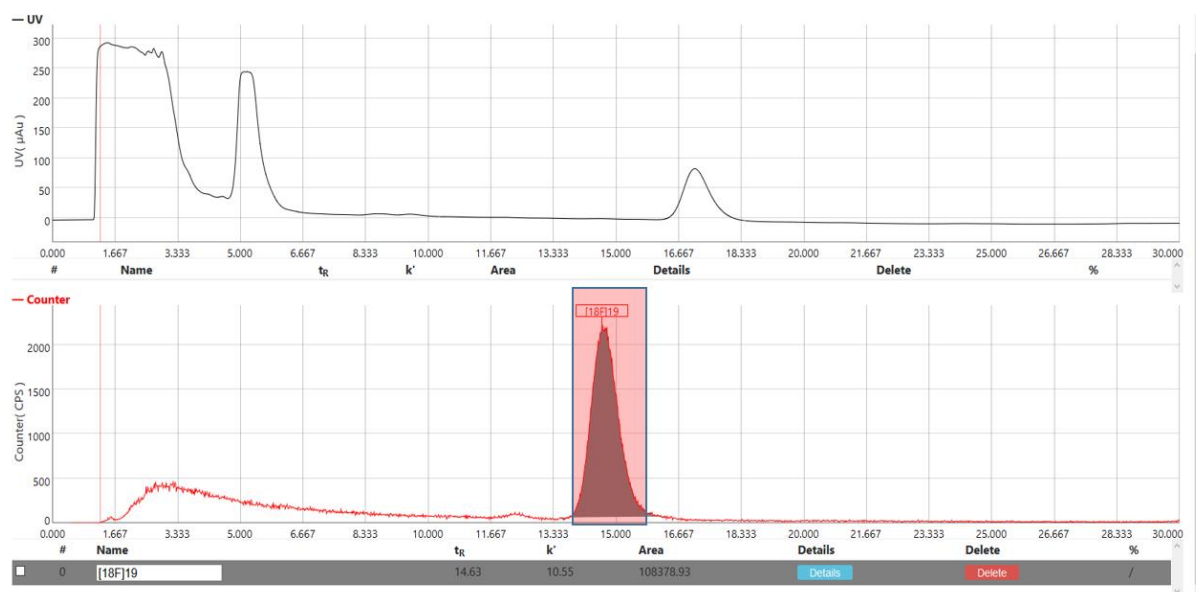


Abb. 58: Beispielchromatogramm für die Isolierung von $[^{18}\text{F}]26$. Der rot unterlegte Bereich wurde gesammelt.

Downscaling der Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]26$ durch Sonogashira-Kupplung mit $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$

$[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ wurde nach der allgemeinen Vorschrift synthetisiert, mittels HPLC isoliert und zuletzt in Wasser aufgenommen. Die Katalysatorlösung wurde wie zuvor in der Eintopfsynthese hergestellt. In einem 2 mL Eppendorf-Vial wurden eine wässrige Stammlösung des Markierungsvorläufers **24** (0,37 mg/mL, 100 μL , 100 nmol) zusammen mit weiterem Lösungsmittel vorgelegt, um ein finales Volumen von 400 μL zu erhalten. Dazu wurden eine Stammlösung aus CuI (5 mg/mL MeCN), 18 μL TEA und die Katalysatorlösung gegeben. Zuletzt wurde ein Aliquot von $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ zugesetzt (1-10 μL). Die Reaktion wurde für 10 Minuten bei 30 °C sanft geschüttelt, im Anschluss mit 20 μL TFA und 180 μL MeCN verdünnt und mittels HPLC untersucht.

Radiosynthese von [^{18}F]RD2-Pra(FHex) (**43**)

Für die Katalysatorlösung wurden unter Luft in einem 2 mL Eppendorf-Vial mit Magnetrührfisch 1,0 mg Pd(OAc) $_2$ und 10,7 mg tppts in 1 mL Wasser mithilfe von Ultraschall gelöst und anschließend für 30 Minuten gerührt. In einem weiteren 2 mL Eppendorf-Vial wurden 240 μg H-RD2-Pra-NH $_2$ in 100 μL Wasser vorgelegt. [^{18}F]FHexI $^+$ wurde mittels HPLC isoliert, in 300 μL Wasser aufgenommen und zu dem Peptid gegeben. Zuletzt wurden eine Stammlösung von CuI (5 mg/mL MeCN, 25 μL) sowie 12,5 μL der Katalysatorlösung hinzu gegeben und das Gemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur sanft geschüttelt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 100 μL einer 20 %igen TFA-Lösung in MeCN homogenisiert und auf die HPLC injiziert (Phenomenex Aeris Peptide XB-C18, 4,6x250 mm, 21 % MeCN/0,1 % TFA $_{\text{aq}}$ 1,5 ml/min, vgl. Abb. 59). Die Produktfraktion wurde in einem silikonisierten 10 mL Spitzkolben aufgefangen und am Rotationsverdampfer bei 40 °C unter reduziertem Druck bis zur Trockene eingengt. Das Produkt wurde mit dreimal 100 μL isotonomischer PBS aus dem Kolben überführt und als für Tierversuche injektionsfähige Lösung erhalten.

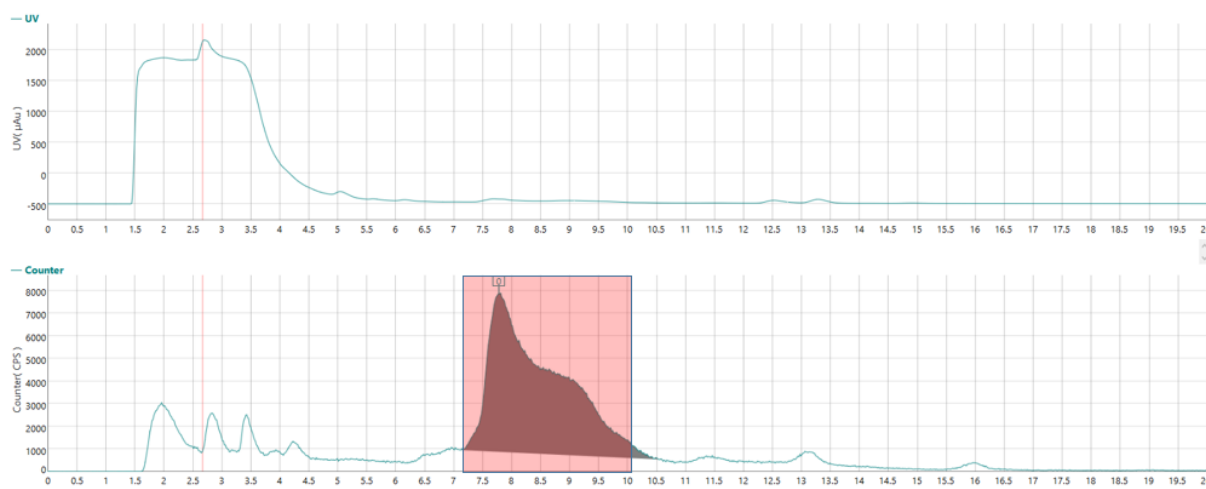


Abb. 59: Beispielchromatogramm für die Isolierung von [^{18}F]43. Der rot unterlegte Bereich wurde gesammelt. Durch die Charakteristik des GM-Zählrohrs (Detektorparalyse) erscheint der Peak verzerrt und die Peakfläche entspricht nicht der Produktverteilung.

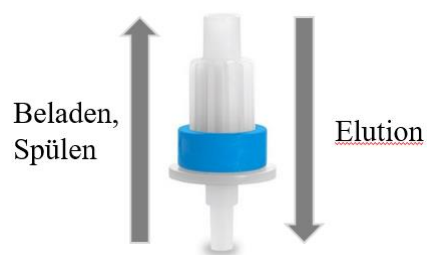
Radiosynthese von [^{68}Ga]Ga-NOTARD2 ([^{68}Ga]44)

Das Eluat des ^{68}Ga -Generators (ca. 6 mL) wurde mit ca. 4 mL Wasser verdünnt und über eine Macherey-Nagel PS-H $^+$ (m) geleitet. Im Reaktor wurden HEPES Puffer (1,5 M) pH 5,5, 100 μL

5 M NaOH sowie 300 µg NOTARD2 vorgelegt und für 3 Minuten bei 95 °C vorgeheizt. Die SCX-Kartusche wurde mit 1,5 mL 5.5 M NaCl direkt in den Reaktor eluiert und die Mischung anschließend weitere 10 Minuten erhitzt. Der Inhalt des Reaktors wurde in eine Spritze, befüllt mit 10 mL Wasser, aufgezogen, der Reaktor mit weiteren 5 mL Wasser gespült und über eine konditionierte Waters C18 Sep-Pak light Kartusche geleitet. Diese wurde mit 2 mL Wasser gewaschen und anschließend mit 1 mL MeOH eluiert. Das Methanol wurde bei 60 °C im Argonstrom unter reduziertem Druck abgedampft und das Produkt in isotonischer PBS aufgenommen, um eine für Tierversuche geeignete Injektionslösung zu erhalten.

Radiosynthese von [¹⁸F]Fluoriodpyridin

Die [¹⁸F]Fluorid-haltige Lösung wurde mit Reinstwasser auf ca. 1 – 2 mL verdünnt und anschließend durch Unterdruck von „unten“ (männliche Seite) über eine unkonditionierte Waters QMA Carb light (130 mg) Kartusche geleitet. Aus derselben Richtung wurde die Kartusche mit 3 mL wasserfreiem Methanol gespült. Die Elution des wasserfreien [¹⁸F]Fluorid erfolgte von „oben“ (weibliche Seite) durch 4 mg 1-(5-Iodpyridin-2-yl)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan-1-iumtriflat, gelöst in 500 µL wasserfreiem Methanol, in ein 5 mL Weaton V-Vial mit Magnetrührer. Das Methanol wurde bei 60 °C und 250 mbar im Argonstrom für 5 Minuten abgedampft. Anschließend wurden 500 µL wasserfreies DMSO in den Reaktor gegeben und die Reaktion für 15 Minuten unter Rühren auf 100 °C erhitzt.



Isolierung von [¹⁸F]FIPy

Methode A – SPE: Nach beendeter Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 2-3 mL Reinstwasser verdünnt und anschließend in eine 20 mL Einwegspritze, gefüllt mit 15 mL Wasser, aufgezogen. Die Lösung wurde über eine konditionierte Phenomenex Strata-X (30 mg) Kartusche geleitet, anschließend mit 2 mL Wasser gewaschen und mit Argon ausgeblasen. Die Elution von der Kartusche erfolgte durch Acetonitril.

Methode B – HPLC: Nach beendeter Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 1,2 mL Wasser verdünnt und auf die HPLC gegeben (Phenomenex Gemini C18 110 Å, 10x250 mm, 50 %

MeCN/Wasser, 7,4 mL/min, vgl. Abb. 60). Die Produktfraktion wurde mit 30 mL Wasser verdünnt und analog zur SPE-Reinigung reformuliert.

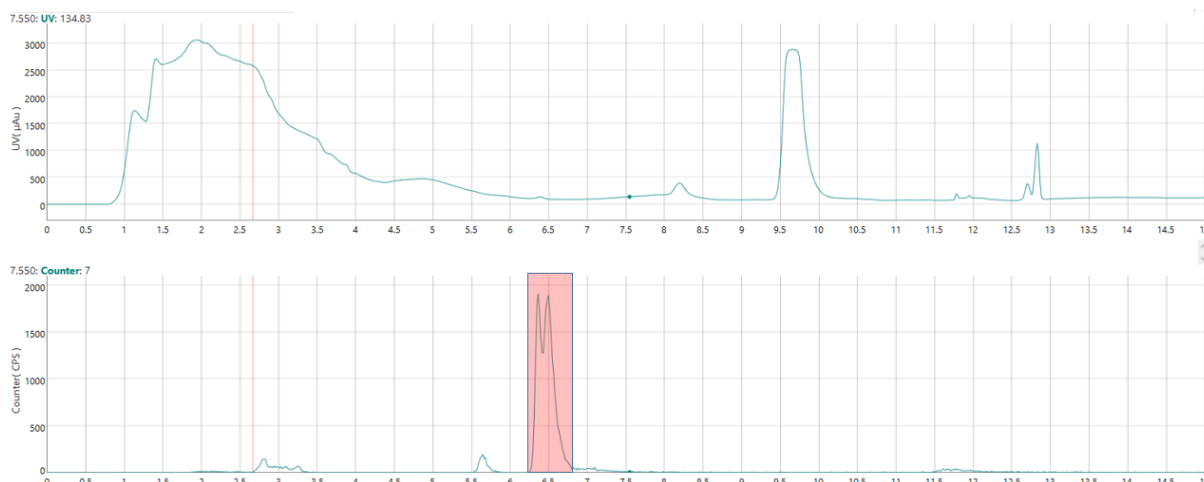


Abb. 60: Beispielchromatogramm zur Isolierung von $[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$. Der rot unterlegte Bereich wurde gesammelt. Durch die Charakteristik des GM-Zählrohrs (Detektorparalyse) erscheint der Peak geteilt und entspricht nicht der Produktverteilung.

Downscaling der S-Arylierung von Glutathion mit $[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$

$[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$ wurde nach der allgemeinen Vorschrift synthetisiert und mittels SPE aufgereinigt. In ein 2 mL Eppendorf-Vial wurden unter Luft das organische Lösungsmittel, Wasser und/oder wässriger Phosphatpuffer, eine Stammlösung aus Xantphos Pd G3 (20 mg/mL in org. Lösungsmittel), eine Stammlösung aus Glutathion (10 mg/mL) und unmittelbar danach ein Aliquot von $[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$ gegeben, sodass das Endvolumen ca 250 μL betrug. Das Reaktionsgemisch wurde für 6 Minuten bei Raumtemperatur sanft geschüttelt, anschließend mit einer 20%igen Lösung aus TFA in MeCN versetzt, mit HPLC-Laufmittel verdünnt und mittels HPLC analysiert (Phenomenex Aeris PEPTIDE 5 μm XB-C18, 4.6x250 mm, 13 % MeCN, 0,1 % TFA, 1,5 mL/min, $k=1,9$).

Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{Glu-Urea-Cys}(\text{FPy})$ ($[^{18}\text{F}]\mathbf{51}$)

$[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$ wurde nach der allgemeinen Vorschrift synthetisiert, mittels SPE isoliert und mit 300 μL MeCN langsam von der Strata-X Kartusche in ein 2 mL Eppendorf-Vial eluiert. Unter Luft wurde der Vorläufer **50** (6 mg, 20 μmol), gelöst in 300 μL Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,8), zugefügt, gefolgt von einer Lösung aus Xantphos Pd G3 (25 μL , 20 mg/mL MeCN). Zuletzt

wurde der pH-Wert durch die Zugabe von 6 μL TEA (43 μmol) leicht basisch eingestellt und das Reaktionsgefäß für 5 Minuten sanft geschüttelt. Die Lösung wurde mit 1,2 mL 0,5 % iger H_3PO_4 verdünnt und auf die HPLC gegeben (Phenomenex Gemini C18 110 Å, 10x250 mm, 15 % MeCN/0,17 % $\text{H}_3\text{PO}_{4(\text{aq})}$, 6,0 mL/min, vgl. Abb. 61). Die Produktfraktion wurde mit 30 mL Wasser verdünnt und über eine konditionierte Waters Oasis HLB Plus Short Kartusche geleitet. Die Kartusche wurde mit 2 mL Wasser gewaschen und mit Argon ausgeblasen. Die Elution erfolgte durch 2 mL einer Mischung aus EtOH/isotonische NaCl/Wasser (10:7:3). Die ersten 200 – 300 μL enthielten kein Produkt und wurden verworfen. Der Rest wurde bei 60 °C im Argonstrom unter reduziertem Druck eingengt (ca. 10 min bei 40 mbar) bis das Ethanol vollständig verdampft war ($< 1\%$ vol im Endprodukt). Der geringe wässrige Rückstand wurde auf 500 μL mit Reinstwasser aufgefüllt und der pH-Wert durch Zugabe von 2,5 μL Phosphatpuffer (BBraun, 1 M, pH 7,4) stabilisiert, um eine (annähernd) isotonische, pH-neutrale Produktformulierung, geeignet für Tierversuche, zu erhalten.

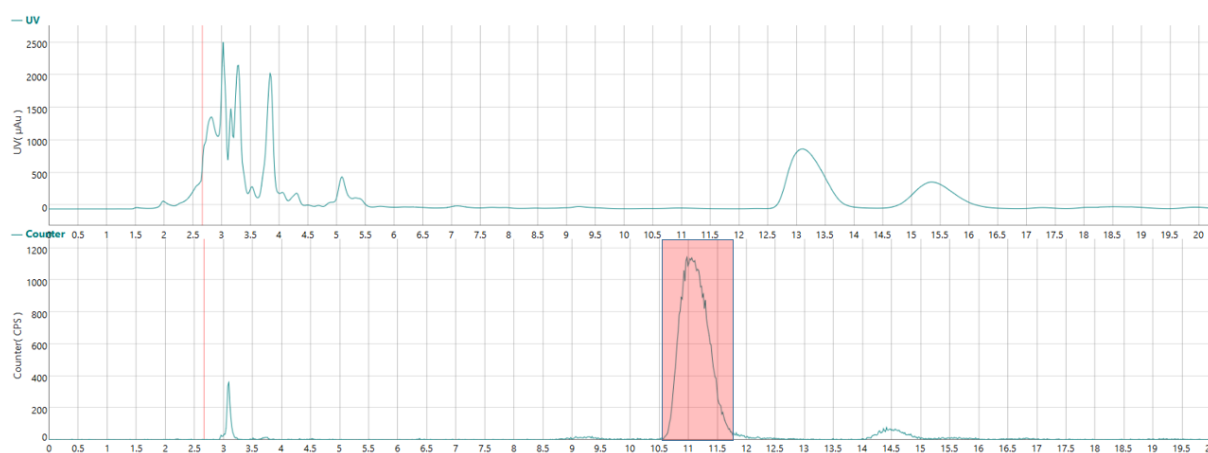


Abb. 61: Beispielchromatogramm für die Isolierung von $[^{18}\text{F}]\text{Glu-Urea-Cys}(\text{FPy})$. Der rot unterlegte Bereich wurde gesammelt. Durch die Charakteristik des GM-Zählrohrs (Detektorparalyse) entspricht die Peakfläche nicht der Produktverteilung.

Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{RD2cFPy}$ ($[^{18}\text{F}]\text{52}$)

$[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$ wurde nach der allgemeinen Vorschrift synthetisiert, anschließend mittels HPLC isoliert und mit 200 μL MeCN sehr langsam von der Kartusche in ein 2 mL Eppendorf-Vial eluiert. Dazu wurden unter Luft 200 μL Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,8), eine Lösung aus Xantphos Pd G3 (25 μL , 20 mg/mL MeCN) und zuletzt eine Lösung aus 500 μg H-RD2c- NH_2 in 20 μL Wasser gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit 1,2 mL 0,5 % TFA_{aq} verdünnt und auf die HPLC gegeben

(Phenomenex Synergy Hydro-RP 10 μ , 10x250mm, Stufengradient: 0-1,5 min: 100 % 0,075 % TFA_{aq}; 1,5 min – 15 min: 15 % MeCN/0,075 % TFA_{aq}, 7,4 mL/min, vgl. Abb. 62). Die Produktfraktion wurde mit 50 mL Wasser verdünnt und anschließend über eine Water Sep-Pak C18 light Kartusche geleitet. Die Kartusche wurde mit 5 mL Wasser gewaschen, mit Argon ausgeblasen und anschließend mit 0,5 mL MeOH in ein 2 mL Eppendorf-Vial eluiert. Das Methanol wurde im Eppendorf-Vial im Argonstrom bei 40 °C unter vermindertem Druck abgedampft und der Rückstand in isotonischer PBS aufgenommen, um eine für Tierversuche injektionsfähige Produktlösung zu erhalten.

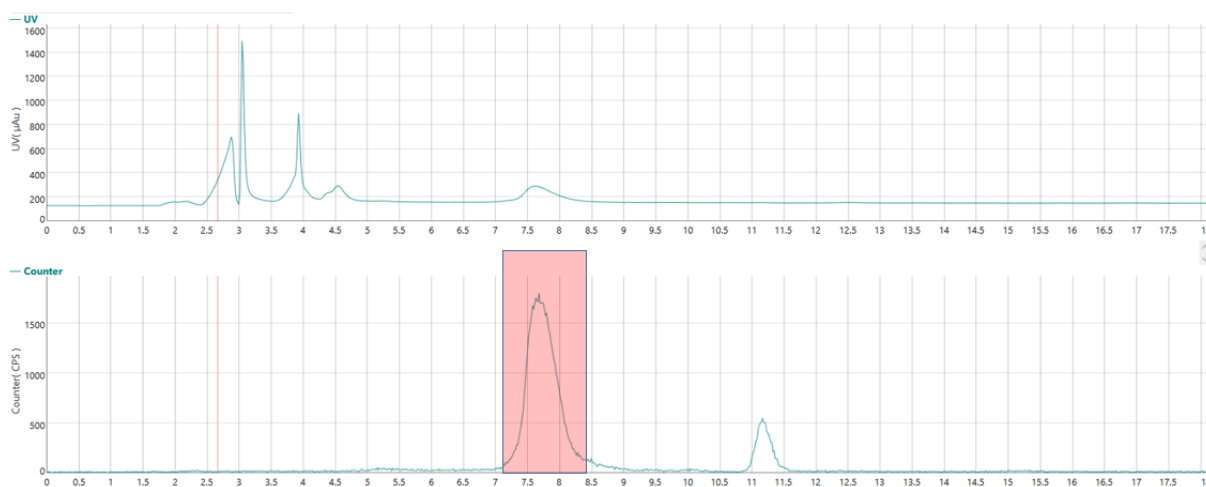


Abb. 62: Beispielchromatogramm für die Isolierung von $[^{18}\text{F}]\text{RD2cFPy}$. Der rot unterlegte Bereich wurde gesammelt. Durch die Charakteristik des GM-Zählrohrs (Detektorparalyse) entspricht die Peakfläche nicht der Produktverteilung.

Vereinfachte Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{D3cFPy}$ ($[^{18}\text{F}]\text{53}$)

$[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$ wurde nach der allgemeinen Vorschrift synthetisiert, mittels SPE isoliert und mit 300 μL MeCN langsam von der Strata-X Kartusche in ein 2 mL Eppendorf-Vial eluiert. Unter Luft wurde H-D3c-NH₂ (5,0 mg, 3 μmol), gelöst in 300 μL Phosphatpuffer (0,1 M, BBraun, pH 7,4), hinzu gegeben, gefolgt von einer Lösung aus Xantphos Pd G3 (25 μL , 20 mg/mL MeCN). Das Reaktionsgefäß wurde für 12 Minuten sanft geschüttelt. Die Lösung wurde mit 1,2 mL 0,5% TFA verdünnt und auf die HPLC gegeben (Phenomenex Synergy Hydro-RP 10 μ , 10x250mm, Stufengradient: 0-1,5 min: 100 % 0,075 % TFA_{aq}; 1,5 min – 15 min: 13 % MeCN/0,075 % TFA_{aq}, 7,4 mL/min, vgl. Abb. 63). Die Reformulierung der Produktfraktion erfolgte identisch wie bei der Synthese von $[^{18}\text{F}]\text{RD2cFPy}$.

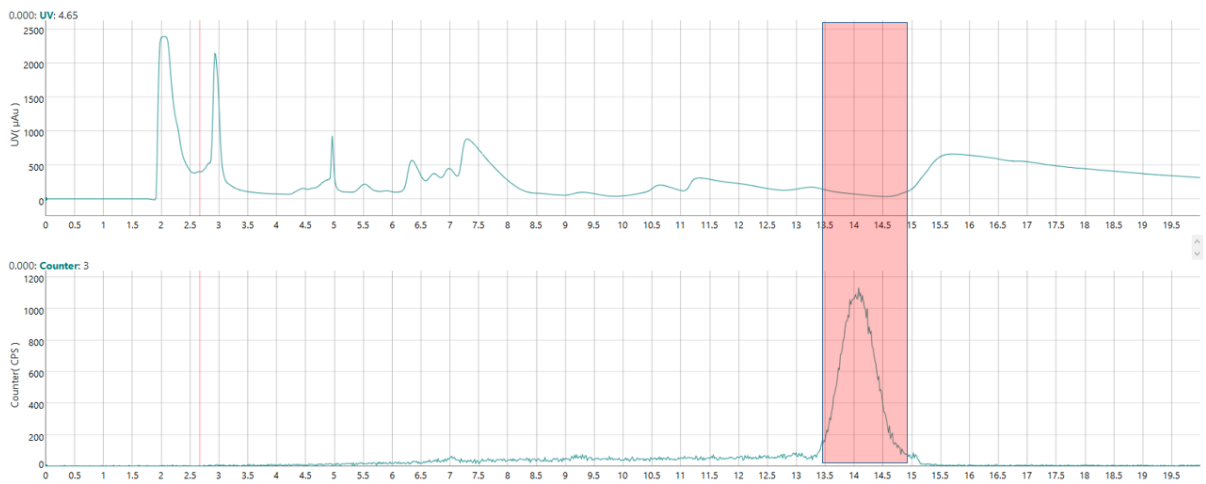


Abb. 63: Beispielchromatogramm für die Isolierung von $[^{18}\text{F}]\text{D3cFPy}$ nach Isolierung des $[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$ mittels SPE. Der rot unterlegte Bereich wurde gesammelt. Durch die Charakteristik des GM-Zählrohrs (Detektorparalyse) entspricht die Peakfläche nicht der Produktverteilung.

4.3.4 *In vitro* Stabilitätstests

Für Stabilitätstests wurde der Tracer isoliert, mittels SPE formuliert und der Ethanol nach der Elution der SPE-Kartusche im Argonstrom unter reduziertem Druck entfernt bis nur noch das Restwasser übrig blieb.

Stabilitätstests in Medium

Je 1 mL des Inkubationsmediums (Plasma oder Vollblut) wurde in 2 mL Eppendorf-Vials bei 37 °C im Thermoshaker bei 400 rpm für 5 Minuten vorinkubiert. Ein Aliquot des Tracers (1-2 µL) wurde hinzu zugefügt und die Mischung weiter geschüttelt. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden 100 µL des Mediums abgenommen und davon 2,50 µL mit einer Eppendorfpipette auf eine DC Platte oberhalb der späteren Laufmittelfront als Referenz zur Bilanzierung der Aktivität getüpfelt. Von dem restlichen Aliquot wurden zur Proteinfällung 80 µL in ein weiteres Eppendorf-Vial überführt und mit 240 µL MeCN versetzt. Das Eppendorf-Vial wurde für 2 Minuten mittels Vortex intensiv geschüttelt und danach der Niederschlag für 2 Minuten bei 20000 g (beziehungsweise relative centrifugal force, rcf) abzentrifugiert. Vom Überstand wurden mit einer Eppendorfpipette erneut 2,50 µL auf den Startfleck der DC-Platte getüpfelt. Nach beendeter Inkubation wurde die DC-Platte entwickelt. Die Radiochemische Reinheit ergibt sich aus dem Verhältnis der Produktaktivität einer Bahn zur Gesamtaktivität der Bahn.

Die Wiederfindungsrate ist der Quotient der Gesamtaktivität der Bahn und des Referenzflecks, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (hier: 4).

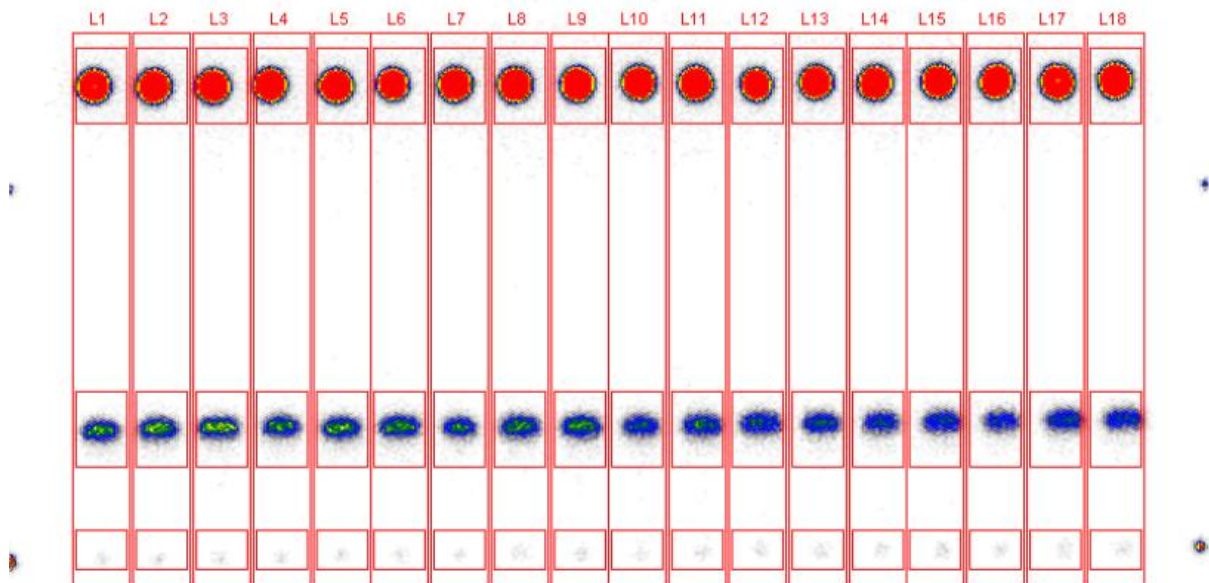


Abb. 64: Beispiel einer DC-Analyse der Serumstabilität von $[^{18}\text{F}]\mathbf{26}$. Dreifachbestimmungen pro Zeitpunkt. Von links nach rechts: 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min.

Mikrosomen-Essay

In einem 2 mL Eppendorf-Vial wurden alle Stammlösungen in der angegebenen Reihenfolge nacheinander vorgelegt:

Komponente	Volumen Stammlösung	Konzentration im Essay
Mikrosomen	130 μL	0,8 mg/mL Proteinkonzentration
Na-Phosphatpuffer 1 M, pH 7,4	670 μL	
MgCl ₂	50 μL	3,3 mM
NADP	50 μL	1,3 mM
Glukose-6-Phosphat	50 μL	3,3 mM
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	50 μL	0,4 U

Das Essay wurde im Thermoshaker bei 400 rpm für 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert und ein Aliquot des Tracers hinzu pipettiert (1-2 µL). Die Auswertung erfolgte analog zu den Stabilitätstests in Medium mittels DC. Die Proteinfällung erfolgte durch Zugabe des selben Volumens MeCN (Verdünnungsfaktor: 2).

4.3.5 Analytische HPLC-Systeme

Verwendete Säulen:

A	Phenomenex Synregy Hydro-RP 5 µm 80 Å 4.6x250 mm
B	CS Multokrom C18 100-5, 4.6x250 mm
C	Phenomenex Gemini 5 µm C18 110 Å, 4.6x250 mm
D	Luna 5 µm PFP(2) 100 Å, 4.6x250 mm
E	Phenomenex Aeris PEPTIDE 5 µm XB-C18, 4.6x250 mm
F	Phenomenex Kinetex 5 µm F5 100 Å, 4.6x250 mm

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten HPLC-Systeme

Verbindung	Säule	Laufmittel	Flussrate	k
3	A	70 % MeCN	1,0 mL/min	2,8 (2E/4E) 3,1 (2E/4Z)
4	B	75 % MeCN	1,25 mL/min	3,0
6	B	50 % MeCN, 0,2 % HOAc	1,0 mL/min	2,6 (E) 3,0 (Z)
10	C	85 % MeCN	2,0 mL/min	3,8
13	D	65 % MeCN, 0,1 % TFA	1,5 mL/min	3,6
18	A	50 % MeCN	1,5 mL/min	3,0
20	A	65 % MeCN, 0,1 % TFA	1,5 mL/min	3,0
25	A	75 % MeCN, 0,1 % TFA	1,5 mL/min	3,7
26	A	35 % MeCN, 0,1 % TFA	1,5 mL/min	4,1
28	A	50 % MeCN, 0,1 % TFA	1,5 mL/min	6,0
32	A	65 % MeCN, 0,1 % TFA	2,0 mL/min	3,5
35	A	65 % MeCN, 0,1 % TFA	1,5 mL/min	4,2
42	A	40 % MeCN, 0,1 % TFA	1,5 mL/min	2,5
43	A	21 % MeCN, 0,1 % TFA	1,0 mL/min	6,5
44	E	12 % MeCN, 0,1 % TFA	1,0 mL/min	2,7
45	B	50 % MeCN	1,25 mL/min	3,7
51	F	15 % MeCN, 0,1 %	1,5 mL/min	3,8
52	A	15 % MeCN, 0,1 % TFA	1,0 mLmin	3,6
53	E	15 % MeCN, 0,1 % TFA	1,0 mLmin	3,8

5. Zusammenfassung

Die molekulare Bildgebung mittels der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist zu einem unverzichtbaren Bestandteil in der klinischen Diagnostik geworden. Eine essentielle Voraussetzung für die Durchführung dieser Technik sind radioaktiv markierte (Bio)-Moleküle, die auch Radiotracer genannt werden. Diese Radiotracer sind in den meisten Fällen mit dem Radionuklid Fluor-18 markiert, da es über ideale Zerfallseigenschaften im Hinblick auf Energie und Halbwertszeit verfügt. Die Radiomarkierung erfolgt in der Regel ausgehend von wässrigem [^{18}F]Fluorid. Diese erfordert jedoch zumeist harsche Reaktionsbedingungen mit hohen Temperaturen und basischem, wasserfreiem Reaktionsmilieu, was häufig inkompatibel mit empfindlichen Biopolymeren wie Peptiden oder Antikörpern ist. Für die ^{18}F -Markierung von basen- und temperaturempfindlichen Verbindungen werden daher oft zweistufige Markierungsverfahren angewendet, bei denen zunächst ein kleiner, bifunktionseller Baustein mit ^{18}F markiert wird. Nach der Markierung mit ^{18}F wird dieser in einem zweiten Reaktionsschritt unter milden Bedingungen an das Biomolekül konjugiert. Das hierzu zur Verfügung stehende Methodenspektrum ist trotz jahrzehntelanger Forschung jedoch immer noch stark limitiert. Die oft als Synthon oder auch prosthetische Gruppe bezeichneten Markierungsbausteine erfordern häufig eine Isolierung nach ihrer Synthese, die in den meisten Fällen mit HPLC-Methoden oder durch Festphasenextraktion. Durch das längere Syntheschema ergeben sich dabei Ausbeuteverluste.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung chemoselektiver sowie effizienter Kupplungsmethoden von neuen Synthons an Biopolymere. Damit sollten einerseits ^{18}F -markierte PSMA-selektive Liganden für die Visualisierung des Prostata-Karzinoms sowie andererseits radiomarkierte All-D-Peptide als neue Tracer für die Detektion von β -Amyloid-Ablagerungen und -Oligomeren im Gehirn zur Verfügung gestellt werden.

Mit dem kürzlich entwickelten Synthon, (Z)-2-[[^{18}F]Fluorhex-1-en-1-yl(phenyl)-iodoniumtosylat ($[\text{}^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$), stand ein neuer Markierungsbaustein zur Verfügung, der sich unter wässrigen Bedingungen herstellen lässt. Dies ermöglicht die Verwendung eines bemerkenswert einfachen Markierungsprotokolls, das ausgehend von ^{18}F -haltigem Targetwasser den Baustein in sehr kurzer Zeit von ca. 10 min liefert, ohne die sonst für nukleophile Substitutionsreaktionen notwendige vorherige Fixierung auf einem Anionenaustauscher und nachfolgender azeotroper Trocknung. Für die Konjugation von

[¹⁸F]FHexI⁺ an verschiedene Modellverbindungen wurden unterschiedliche Pd-katalysierte Kreuzkupplungsreaktionen untersucht.

Durch eine modifizierte Fujiwara-Moritani-Kupplung von FHexI⁺ an Tryptophan konnte das entsprechende Konjugationsprodukt einer nicht radioaktiven Synthese in geringer Ausbeute erhalten werden. In den entsprechenden Radiosynthesen wurde das gewünschte Produkt jedoch nicht beobachtet. Die verwandte Heck-Kupplung mit Acrylsäuremethylester lieferte nur ein Gemisch aus *E*- und *Z*-Isomeren. Beide Kupplungsreaktionen waren damit für die Radiomarkierung ungeeignet. Die Stille-Kupplung mit Tributylphenylstannan lieferte mit isoliertem [¹⁸F]FHexI⁺ das entsprechende ¹⁸F-markierte Phenyl-Konjugat unter sehr milden Reaktionsbedingungen, ohne Base, stereoselektiv und robust in hohen radiochemischen Ausbeuten (RCA) von ca. 70 %. Allerdings konnte die Reaktion nicht als Eintopfreaktion durchgeführt werden. Die Suzuki-Kupplung zwischen Phenylboronsäure und isoliertem [¹⁸F]FHexI⁺ ergab ebenfalls hohe RCA von ca. 70 % für das reine *Z*-Isomer. Hierbei war zudem eine Eintopfsynthese möglich, die jedoch zu einer Verringerung der Ausbeute führte. Somit stellt letztlich die bereits in einer früheren Arbeit untersuchte Sonogashira-Reaktion mit [¹⁸F]FHexI⁺ die effizienteste Kupplungsmethode dar.

Um die Sonogashira-Reaktion auf funktionalisierte Biomoleküle zu übertragen, wurden insgesamt acht aminosäurebasierte Modellverbindungen mit unterschiedlichen Linkern mit einem terminalen Alkin funktionalisiert und anschließend mit [¹⁸F]FHexI⁺ konjugiert. Auch in diesen Fällen gelang die Synthese ohne zusätzlichen Reinigungsschritt in einer Eintopfsynthese mit radiochemischen Konjugationsausbeuten von 38 – 88 %. Die Effizienz des optimierten Markierungsprotokolls konnte auch durch die Radiomarkierung eines selektiven Liganden für das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) zur Detektion des Prostatakarzinoms demonstriert werden. Dieser wurde ausgehend von wässrigem [¹⁸F]Fluorid als Eintopfsynthese in einer isolierten gesamten RCA von 35 % innerhalb von 35 Minuten synthetisiert.

Peptidmarkierungen erfordern häufig, bedingt durch die aufwändige Synthese und damit eingeschränkte Verfügbarkeit der Peptide, die Verwendung einer möglichst geringen Vorläufermenge. Für die Konjugation an den PSMA-Liganden sowie an ein Arginyl-Dipeptid war dies jedoch erst nach vorheriger Reinigung des Synthons mittels HPLC möglich. Das argininreiche all-D Peptid „RD2“, das sich potentiell für die Behandlung der Alzheimer-Krankheit durch die Eliminierung von beta-Amyloid-Oligomeren eignet, konnte hierbei in einer RCA von ca. 35 % mit [¹⁸F]FHexI⁺ konjugiert werden. Beide klinisch relevanten Tracer wurden

in PET-Studien eingesetzt. Sie zeigten jedoch eine ausgeprägte *in vivo*-Defluorierung, so dass sie sich letztlich nicht als PET-Tracer eignen.

Die Radiomarkierung eines NOTA-modifizierten Peptides mit ^{68}Ga wurde als alternative Markierungsstrategie untersucht. Auch wenn die Radiosynthese nach Optimierung der Reaktionsparameter prinzipiell erfolgreich war, lieferte sie vergleichsweise geringe RCA und niedrige radiochemische Reinheit. Zudem war die verfügbare Aktivitätsmenge verglichen mit ^{18}F geringer und ^{68}Ga ist aufgrund seiner nachteiligen Zerfalleigenschaften (hohe β^+ -Energie und kurze Halbwertszeit) für die PET-Bildgebung nicht optimal geeignet. Der Tracer wurde dennoch zur präliminären *in vivo* Evaluation eingesetzt und lieferte wertvolle Erkenntnisse über einen möglichen Aufnahmemechanismus von arginylreichen all-D Peptiden ins Gehirn.

Mit 2- ^{18}F Fluor-5-iodpyridin (^{18}F FIPy) wurde ein weiteres vielversprechendes Syntheton zur ^{18}F -Markierung von Biomolekülen untersucht. Mithilfe der „minimalistischen Methode“ wird ^{18}F Fluorid zeitsparend ohne azeotrope Destillation durch Elution mit einem Onium-Markierungsvorläufer von einem Anionenaustauscher gewaschen und kann im Anschluss in das ^{18}F -markierte Produkt überführt werden. Dadurch wurde ^{18}F FIPy nach anschließender Reinigung mittels Festphasenextraktion in hohen RCA von ca. 80 % erhalten. Die Sonogashira-Kupplung an RD2 mit ^{18}F FIPy anstelle von ^{18}F FHexI⁺ war nicht erfolgreich. Alternativ stellt die Pd-katalysierte S-Arylierung von cysteinhaltigen Biomolekülen eine effiziente, chemoselektive neue Methode zur indirekten Radiomarkierung mit ^{18}F FIPy dar. Die Reaktionsbedingungen hierfür wurden zunächst anhand des cysteinhaltigen Tripeptids Glutathion als Modellverbindung hinsichtlich möglichst geringer Vorläufermengen für eine Peptidmarkierung optimiert. Dabei konnten durch den Einsatz von wässrigem Phosphatpuffer und Acetonitril bei neutralem pH-Wert nach nur einer Minute eine praktisch quantitative Konjugation erreicht werden.

Mit der Methode wurde anschließend ^{18}F FIPy an einen cysteinhaltigen PSMA-spezifischen Liganden konjugiert. Der PSMA-selektive Radiotracer wurde in einer hervorragenden Gesamt-RCA von 55 % isoliert, wodurch präklinische Untersuchungen möglich waren. Die Kupplung von geringen Peptidmengen mit ^{18}F FIPy erforderte jedoch statt der SPE- eine HPLC-Reinigung, da chemische Verunreinigungen die Konjugationsausbeuten drastisch reduzierten. Ausgehend von 300 nmol eines um einen Cysteinrest erweiterten RD2-Derivats wurde das markierte Peptid ^{18}F RD2cFPy mit einer Gesamt-RCA von ca. 40 % synthetisiert. Das Produkt wurde nach ca. 60 min Synthese in einer sehr hohen chemischen sowie radiochemischen Reinheit (>97 %) erhalten. Zuletzt konnte im Hinblick auf eine bessere Automatisierbarkeit

durch eine erhebliche Steigerung der Peptidmenge auf 3 μmol die HPLC-Reinigung des $[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$ durch eine SPE-Reinigung ersetzt werden. Das Protokoll lieferte $[^{18}\text{F}]\text{D3cFPy}$, ein Isomer des zuerst markierten RD2-Derivats, in einer hohen isolierten RCA von ca. 55 %.

Beide radiomarkierten PET-Tracer, $[^{18}\text{F}]\text{RD2cFPy}$ sowie $[^{18}\text{F}]\text{D3cFPy}$, die auf der all-D Peptidstruktur basieren, befinden sich aktuell in der biologischen Evaluation. PET-Messungen von $[^{18}\text{F}]\text{RD2cFPy}$ zeigen zudem, dass das Konjugat metabolisch stabil ist. Zusammenfassend ermöglicht die S-Arylierung mit $[^{18}\text{F}]\text{FIPy}$ die chemoselektive Radiomarkierung von thiolhaltigen Biomolekülen in hoher Ausbeute. Die Methode stellt hinsichtlich ihrer ihres simplen, 2-stufigen Reaktionsschemas, der kurzen Reaktionszeiten und ihrer sehr hohen RCA eine deutliche Verbesserung gegenüber hierzu etablierten Peptid-Markierungsprotokollen wie etwa der Thiol-Maleimid-Kupplung dar.

6. Literaturverzeichnis

1. Myers W. Georg Charles de Hevesy: the father of nuclear medicine. In; 1979
2. NuDat 2.7, National Nuclear Data Center, Brookhave National Laboratory, verfügbar online: <https://www.nndc.bnl.gov/nudat2/>, (aufgerufen am: 09.10.2019)
3. Miller PW, Long NJ, Vilar R et al. Synthesis of ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , and ^{13}N radiolabels for positron emission tomography. *Angewandte Chemie International Edition* 2008; 47: 8998-9033
4. Wang J, Sánchez-Roselló M, Aceña JL et al. Fluorine in pharmaceutical industry: fluorine-containing drugs introduced to the market in the last decade (2001–2011). *Chemical reviews* 2013; 114: 2432-2506
5. Park BK, Kitteringham NR. Effects of fluorine substitution on drug metabolism: pharmacological and toxicological implications. *Drug metabolism reviews* 1994; 26: 605-643
6. Eberl S, Eriksson T, Svedberg O et al. High beam current operation of a PETtraceTM cyclotron for ^{18}F – production. *Applied Radiation and Isotopes* 2012; 70: 922-930
7. Brix G, Lechel U, Glatting G et al. Radiation exposure of patients undergoing whole-body dual-modality ^{18}F -FDG PET/CT examinations. *Journal of Nuclear Medicine* 2005; 46: 608-613
8. Coenen HH, Gee AD, Adam M et al. Consensus nomenclature rules for radiopharmaceutical chemistry—Setting the record straight. *Nuclear medicine and biology* 2017; 55: v-xi
9. Wester H. *Pharmaceutical radiochemistry (I)*. Munich Molecular Imaging Handbook Series, ed HJ Wester 2010; 1
10. Ichiishi N, Brooks AF, Topczewski JJ et al. Copper-catalyzed [^{18}F] fluorination of (mesityl)(aryl) iodonium salts. *Organic letters* 2014; 16: 3224-3227
11. Beaud J, Mu L, Karamkam M et al. Direct one-step ^{18}F -labeling of peptides via nucleophilic aromatic substitution. *Bioconjugate chemistry* 2009; 20: 2254-2261
12. Richter S, Bouvet V, Wuest M et al. ^{18}F -Labeled phosphopeptide-cell-penetrating peptide dimers with enhanced cell uptake properties in human cancer cells. *Nuclear medicine and biology* 2012; 39: 1202-1212
13. Hess E, Blessing G, Coenen H et al. Improved target system for production of high purity [^{18}F] fluorine via the ^{18}O (p, n) ^{18}F reaction. *Applied radiation and isotopes* 2000; 52: 1431-1440
14. Coenen H, Moerlein S. Regiospecific aromatic fluorodemetalation of group IVb metalloarenes using elemental fluorine or acetyl hypofluorite. *Journal of fluorine chemistry* 1987; 36: 63-75
15. Gillies JM, Najim N, Zweit J. Analysis of metal radioisotope impurities generated in [^{18}O] H_2O during the cyclotron production of fluorine-18. *Applied radiation and isotopes* 2006; 64: 431-434
16. Gatley SJ, Shaughnessy WJ. Production of ^{18}F -labeled compounds with ^{18}F – produced with a 1-MW Research reactor. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* 1982; 33: 1325-1330
17. Coenen HH, Colosimo M, Schüller M et al. Preparation of NCA [^{18}F]- CH_2BrF via aminopolyether supported nucleophilic substitution. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 1986; 23: 587-595
18. Wessmann S, Henriksen G, Wester H-J. Cryptate mediated nucleophilic ^{18}F -fluorination without azeotropic drying. *Nuklearmedizin* 2012; 51: 1-8
19. Richarz R, Krapf P, Zarrad F et al. Neither azeotropic drying, nor base nor other additives: a minimalist approach to ^{18}F -labeling. *Organic & biomolecular chemistry* 2014; 12: 8094-8099
20. Libert LC, Franci X, Plenevaux AR et al. Production at the Curie level of no-carrier-added 6- ^{18}F -fluoro-L-dopa. *Journal of Nuclear Medicine* 2013; 54: 1154-1161
21. Pike VW, Aigbirhio FI. Reactions of cyclotron-produced [^{18}F] fluoride with diaryliodonium salts—a novel single-step route to no-carrier-added [^{18}F] fluoroarenes. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1995, DOI: 2215-2216
22. Ross TL, Ermert J, Hocke C et al. Nucleophilic ^{18}F -fluorination of heteroaromatic iodonium salts with no-carrier-added [^{18}F] fluoride. *Journal of the American Chemical Society* 2007; 129: 8018-8025
23. Ross TL, Ermert J, Coenen HH. Synthesis of no-carrier-added 4- ^{18}F Fluorophenol from 4-benzyloxyphenyl-(2-thienyl) iodonium bromide. *Molecules* 2011; 16: 7621-7626

24. Cardinale J, Ermert J, Kügler F et al. Carrier-effect on palladium-catalyzed, nucleophilic ¹⁸F-fluorination of aryl triflates. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 2012; 55: 450-453
25. Lee E, Kamlet AS, Powers DC et al. A fluoride-derived electrophilic late-stage fluorination reagent for PET imaging. *Science* 2011; 334: 639-642
26. Lee E, Hooker JM, Ritter T. Nickel-mediated oxidative fluorination for PET with aqueous [¹⁸F] fluoride. *Journal of the American Chemical Society* 2012; 134: 17456-17458
27. Zlatopolskiy BD, Zischler J, Urusova EA et al. A Practical One-Pot Synthesis of Positron Emission Tomography (PET) Tracers via Nickel-Mediated Radiofluorination. *ChemistryOpen* 2015; 4: 457-462
28. Tredwell M, Preshlock SM, Taylor NJ et al. A general copper-mediated nucleophilic ¹⁸F fluorination of arenes. *Angewandte Chemie International Edition* 2014; 53: 7751-7755
29. Mossine AV, Brooks AF, Makaravage KJ et al. Synthesis of [¹⁸F] arenes via the copper-mediated [¹⁸F] fluorination of boronic acids. *Organic letters* 2015; 17: 5780-5783
30. Makaravage KJ, Brooks AF, Mossine AV et al. Copper-mediated radiofluorination of arylstannanes with [¹⁸F] KF. *Organic letters* 2016; 18: 5440-5443
31. Zischler J, Kolks N, Modemann D et al. Alcohol-enhanced Cu-mediated radiofluorination. *Chemistry—A European Journal* 2017; 23: 3251-3256
32. Zarrad F, Zlatopolskiy B, Krapf P et al. A practical method for the preparation of ¹⁸F-labeled aromatic amino acids from nucleophilic [¹⁸F] fluoride and stannyl precursors for electrophilic radiohalogenation. *Molecules* 2017; 22: 2231
33. Lien S, Lowman HB. Therapeutic peptides. *Trends in biotechnology* 2003; 21: 556-562
34. Morris O, Fairclough M, Grigg J et al. A review of approaches to ¹⁸F radiolabelling affinity peptides and proteins. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 2019; 62: 4-23
35. Burke BP, Clemente GS, Archibald SJ. Boron-¹⁸F containing positron emission tomography radiotracers: advances and opportunities. *Contrast media & molecular imaging* 2015; 10: 96-110
36. Rosenthal M, Bosch A, Nickles R et al. Synthesis and some characteristics of no-carrier added [¹⁸F] fluorotrimethylsilane. *The International journal of applied radiation and isotopes* 1985; 36: 318-319
37. Schirmacher R, Bradtmöller G, Schirmacher E et al. ¹⁸F-labeling of peptides by means of an organosilicon-based fluoride acceptor. *Angewandte Chemie International Edition* 2006; 45: 6047-6050
38. Ilhan H, Lindner S, Todica A et al. Biodistribution and first clinical results of ¹⁸F-SiFA lin-TATE PET: a novel ¹⁸F-labeled somatostatin analog for imaging of neuroendocrine tumors. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2019, DOI: 1-11
39. Ting R, Adam MJ, Ruth TJ et al. Arylfluoroborates and alkylfluorosilicates as potential PET imaging agents: high-yielding aqueous biomolecular ¹⁸F-labeling. *Journal of the American Chemical Society* 2005; 127: 13094-13095
40. Liu Z, Li Y, Lozada J et al. Stoichiometric Leverage: Rapid ¹⁸F-Aryltrifluoroborate Radiosynthesis at High Specific Activity for Click Conjugation. *Angewandte Chemie International Edition* 2013; 52: 2303-2307
41. McBride WJ, Sharkey RM, Karacay H et al. A novel method of ¹⁸F radiolabeling for PET. *Journal of nuclear medicine* 2009; 50: 991-998
42. Kumar K, Ghosh A. ¹⁸F-AIF labeled peptide and protein conjugates as positron emission tomography imaging pharmaceuticals. *Bioconjugate chemistry* 2018; 29: 953-975
43. Hong H, Zhang L, Xie F et al. Rapid one-step ¹⁸F-radiolabeling of biomolecules in aqueous media by organophosphine fluoride acceptors. *Nature communications* 2019; 10
44. Kuchar M, Pretze M, Kniess T et al. Site-selective radiolabeling of peptides by ¹⁸F-fluorobenzoylation with [¹⁸F] SFB in solution and on solid phase: a comparative study. *Amino acids* 2012; 43: 1431-1443
45. Vaidyanathan G, Zalutsky MR. Labeling proteins with fluorine-18 using N-succinimidyl 4-¹⁸F-fluorobenzoate. *International journal of radiation applications and instrumentation Part B Nuclear medicine and biology* 1992; 19: 275-281

46. Thonon D, Goblet D, Goukens E et al. Fully automated preparation and conjugation of N-succinimidyl 4-[18 F] fluorobenzoate ([18 F] SFB) with RGD peptide using a GE FASTlab™ synthesizer. *Molecular Imaging and Biology* 2011; 13: 1088-1095
47. Olberg DE, Arukwe JM, Grace D et al. 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: 1732-1740
48. Nair DP, Podgorski M, Chatani S et al. The thiol-Michael addition click reaction: a powerful and widely used tool in materials chemistry. *Chemistry of Materials* 2013; 26: 724-744
49. Shiue CY, Wolf A, Hainfeld J. Synthesis of 18F-labelled N-(p-[18F] fluorophenyl) maleimide and its derivatives for labelling monoclonal antibody with 18F. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 1989; 26: 287-289
50. Cai W, Zhang X, Wu Y et al. A thiol-reactive 18F-labeling agent, N-[2-(4-18F-fluorobenzamido) ethyl] maleimide, and synthesis of RGD peptide-based tracer for PET imaging of $\alpha\beta3$ integrin expression. *Journal of Nuclear Medicine* 2006; 47: 1172-1180
51. Kaptj J, Knies T, Wuest F et al. Radiolabeling of phosphatidylserine-binding peptides with prosthetic groups N-[6-(4-[18F] fluorobenzylidene) aminoxyhexyl] maleimide ([18F] FBAM) and N-succinimidyl-4-[18F] fluorobenzoate ([18F] SFB). *Applied Radiation and Isotopes* 2011; 69: 1218-1225
52. Moore TM, Akula MR, Kabalka GW. Fluorine-18 Radiochemistry: A Novel Thiol-Reactive Prosthetic Group, [18F] FBAMPy. *Natural Science* 2016; 8: 1
53. Cavani M, Bier D, Holschbach M et al. Efficient synthesis of [18F] FPyME: A new approach for the preparation of maleimide-containing prosthetic groups for the conjugation with thiols. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 2017; 60: 87-92
54. Chiotellis A, Sladojevich F, Mu L et al. Novel chemoselective 18 F-radiolabeling of thiol-containing biomolecules under mild aqueous conditions. *Chemical Communications* 2016; 52: 6083-6086
55. Wu Z, Li L, Liu S et al. Facile Preparation of a Thiol-Reactive 18F-Labeling Agent and Synthesis of 18F-DEG-VS-NT for PET Imaging of a Neurotensin Receptor-Positive Tumor. *Journal of Nuclear Medicine* 2014; 55: 1178-1184
56. Koslowsky I, Shahhosseini S, Wilson J et al. Automated radiosynthesis of N-(4-[18F] fluorobenzyl)-2-bromoacetamide: an F-18-labeled reagent for the prosthetic radiolabeling of oligonucleotides. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals: The Official Journal of the International Isotope Society* 2008; 51: 352-356
57. Wuest F, Berndt M, Bergmann R et al. Synthesis and application of [18F] FDG-maleimidehexyloxime ([18F] FDG-MHO): a [18F] FDG-based prosthetic group for the chemoselective 18F-labeling of peptides and proteins. *Bioconjugate chemistry* 2008; 19: 1202-1210
58. Murahashi S, Yamamura M, Yanagisawa K et al. Stereoselective synthesis of alkenes and alkenyl sulfides from alkenyl halides using palladium and ruthenium catalysts. *The Journal of Organic Chemistry* 1979; 44: 2408-2417
59. Vinogradova EV, Zhang C, Spokoyny AM et al. Organometallic palladium reagents for cysteine bioconjugation. *Nature* 2015; 526: 687
60. Bruno NC, Niljianskul N, Buchwald SL. N-Substituted 2-aminobiphenylpalladium methanesulfonate precatalysts and their use in C-C and C-N cross-couplings. *The Journal of organic chemistry* 2014; 79: 4161-4166
61. Bruneau A, Roche M, Hamze A et al. Stereoretentive Palladium-Catalyzed Arylation, Alkenylation, and Alkynylation of 1-Thiosugars and Thiols Using Aminobiphenyl Palladacycle Precatalyst at Room Temperature. *Chemistry—A European Journal* 2015; 21: 8375-8379
62. Al-Shuaeeb RAA, Kolodych S, Koniev O et al. Palladium-Catalyzed Chemoselective and Biocompatible Functionalization of Cysteine-Containing Molecules at Room Temperature. *Chemistry—A European Journal* 2016; 22: 11365-11370
63. Omrane A. Entwicklung von neuen Radiofluorierungsmethoden für die effiziente Produktion von klinisch relevanten PET-Tracern [Dissertation]: Universität zu Köln; 2018
64. Kettenbach K, Schieferstein H, Ross TL. 18F-labeling using click cycloadditions. *BioMed research international* 2014; 2014

65. Huisgen R. 1, 3-dipolar cycloadditions. Past and future. *Angewandte Chemie International Edition in English* 1963; 2: 565-598
66. Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV et al. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* 2002; 41: 2596-2599
67. Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase:[1, 2, 3]-triazoles by regiospecific copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of organic chemistry* 2002; 67: 3057-3064
68. Kolb HC, Finn M, Sharpless KB. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition* 2001; 40: 2004-2021
69. Marik J, Sutcliffe JL. Click for PET: rapid preparation of [18F] fluoropeptides using CuI catalyzed 1, 3-dipolar cycloaddition. *Tetrahedron Letters* 2006; 47: 6681-6684
70. Zlatopolskiy BD, Kandler R, Kobus D et al. Beyond azide–alkyne click reaction: easy access to 18 F-labelled compounds via nitrile oxide cycloadditions. *Chemical Communications* 2012; 48: 7134-7136
71. Carpenter RD, Hausner SH, Sutcliffe JL. Copper-free click for PET: Rapid 1, 3-dipolar cycloadditions with a fluorine-18 cyclooctyne. *ACS medicinal chemistry letters* 2011; 2: 885-889
72. Poethko T, Schottelius M, Thumshirn G et al. Two-step methodology for high-yield routine radiohalogenation of peptides: 18F-labeled RGD and octreotide analogs. *Journal of Nuclear Medicine* 2004; 45: 892-902
73. Chang YS, Jeong JM, Lee Y-S et al. Preparation of 18F-human serum albumin: a simple and efficient protein labeling method with 18F using a hydrazone-formation method. *Bioconjugate chemistry* 2005; 16: 1329-1333
74. Lee Y-S, Jeong JM, Kim HW et al. An improved method of 18F peptide labeling: hydrazone formation with HYNIC-conjugated c (RGDyK). *Nuclear medicine and biology* 2006; 33: 677-683
75. Wester H, Schottelius M. Fluorine-18 labeling of peptides and proteins. In *PET Chemistry*: Springer; 2007:79-111
76. Wuest F. Fluorine-18 labeling of small molecules: the use of 18 F-labeled aryl fluorides derived from no-carrier-added [18 F] fluoride as labeling precursors. In *PET Chemistry*: Springer; 2007:51-78
77. Wüst FR, Höhne A, Metz P. Synthesis of 18 F-labelled cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors via Stille reaction with 4-[18 F] fluoroiodobenzene as radiotracers for positron emission tomography (PET). *Organic & biomolecular chemistry* 2005; 3: 503-507
78. Yagi Y, Kimura H, Arimitsu K et al. The synthesis of [18 F] pitavastatin as a tracer for hOATP using the Suzuki coupling. *Organic & biomolecular chemistry* 2015; 13: 1113-1121
79. Wuest F, Kniess T. Synthesis of 18F-labelled sigma-2 receptor ligands for positron emission tomography (PET) via lateN-arylation with 4-[18F] fluoroiodobenzene. *J Label Compd Radiopharm* 2005; 48: 31-43
80. Wüst FR, Kniess T. Synthesis of 4-[18F] fluoroiodobenzene and its application in sonogashira cross-coupling reactions. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals: The Official Journal of the International Isotope Society* 2003; 46: 699-713
81. Way JD, Bergman C, Wuest F. Sonogashira cross-coupling reaction with 4-[18 F] fluoroiodobenzene for rapid 18 F-labelling of peptides. *Chemical Communications* 2015; 51: 3838-3841
82. Gao Z, Gouverneur Vr, Davis BG. Enhanced aqueous Suzuki–Miyaura coupling allows site-specific polypeptide 18F-labeling. *Journal of the American Chemical Society* 2013; 135: 13612-13615
83. Way JD, Wuest F. Automated radiosynthesis of no-carrier-added 4-[18F] fluoroiodobenzene: a versatile building block in 18F radiochemistry. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 2014; 57: 104-109
84. Yoshida M, Hara S. Stereoselective Synthesis of (Z)-2-Fluoro-1-alkenyl (phenyl) iodonium Tetrafluoroborates. *Organic letters* 2003; 5: 573-574

85. Humpert S. Z-[18F]Fluoroalkenyliodonium salts as novel prosthetic groups for palladium mediated cross coupling reactions in radiochemistry [Masterarbeit]: Fachhochschule Aachen; 2016
86. Lapidus RG, Tiffany CW, Isaacs JT et al. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) enzyme activity is elevated in prostate cancer cells. *The Prostate* 2000; 45: 350-354
87. Maresca K, Hillier S, Femia F et al. A series of halogenated heterodimeric inhibitors of prostate specific membrane antigen (PSMA) as radiolabeled probes for targeting prostate cancer. *Journal of medicinal chemistry* 2008; 52: 347-357
88. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018; 68: 394-424
89. Silver DA, Pellicer I, Fair WR et al. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clinical cancer research* 1997; 3: 81-85
90. Ross JS, Sheehan CE, Fisher HA et al. Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 2003; 9: 6357-6362
91. Nan F, Bzdega T, Pshenichkin S et al. Dual function glutamate-related ligands: discovery of a novel, potent inhibitor of glutamate carboxypeptidase II possessing mGluR3 agonist activity. *Journal of medicinal chemistry* 2000; 43: 772-774
92. Kozikowski AP, Nan F, Conti P et al. Design of remarkably simple, yet potent urea-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II (NAALADase). *Journal of medicinal chemistry* 2001; 44: 298-301
93. Smith-Jones PM, Vallabhajosula S, Navarro V et al. Radiolabeled monoclonal antibodies specific to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen: preclinical studies in nude mice bearing LNCaP human prostate tumor. *Journal of Nuclear Medicine* 2003; 44: 610-617
94. Werner RA, Derlin T, Lapa C et al. 18F-Labeled, PSMA-Targeted Radiotracers: Leveraging the Advantages of Radiofluorination for Prostate Cancer Molecular Imaging. *Theranostics* 2020; 10: 1
95. Mease RC, Dusich CL, Foss CA et al. N-[N-[(S)-1, 3-Dicarboxypropyl] carbamoyl]-4-[18F] fluorobenzyl-L-cysteine,[18F] DCFBC: a new imaging probe for prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 2008; 14: 3036-3043
96. Chen Y, Pullambhatla M, Foss CA et al. 2-(3-ureido)-pentanedioic acid,[18F] DCFPyL, a PSMA-based PET imaging agent for prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 2011; 17: 7645-7653
97. Barinka C, Byun Y, Dusich CL et al. Interactions between human glutamate carboxypeptidase II and urea-based inhibitors: structural characterization. *Journal of medicinal chemistry* 2008; 51: 7737-7743
98. Ghosh A, Heston WD. Understanding prostate-specific membrane antigen and its implication in prostate cancer. In *The Oncogenomics Handbook*: Springer; 2005:597-615
99. Kulkarni H, Weineisen M, Mueller D et al. First clinical results with Lu-177 PSMA-TUM1 for the treatment of castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 2014; 55: 10-10
100. Kovacs GG. Concepts and classification of neurodegenerative diseases. In *Handbook of clinical neurology*: Elsevier; 2018:301-307
101. al A. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Zentralbl Nerven Psych* 1907; 18: 177-179
102. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine* 2004; 10: S10
103. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 2011; 7: 137
104. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256: 184-186
105. Plummer S, Van den Heuvel C, Thornton E et al. The neuroprotective properties of the amyloid precursor protein following traumatic brain injury. *Aging and disease* 2016; 7: 163

106. Nag S, Sarkar B, Bandyopadhyay A et al. Nature of the amyloid- β monomer and the monomer-oligomer equilibrium. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286: 13827-13833
107. Lublin AL, Gandy S. Amyloid- β Oligomers: Possible Roles as Key Neurotoxins in Alzheimer's Disease. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine* 2010; 77: 43-49
108. Schumacher TN, Mayr LM, Minor DL et al. Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display. *Science* 1996; 271: 1854-1857
109. Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 1990; 249: 386-390
110. Wiesehan K, Buder K, Linke RP et al. Selection of D-amino-acid peptides that bind to Alzheimer's disease amyloid peptide A β 1-42 by mirror image phage display. *Chembiochem* 2003; 4: 748-753
111. Van Groen T, Wiesehan K, Funke SA et al. Reduction of Alzheimer's Disease Amyloid Plaque Load in Transgenic Mice by D3, ad-Enantiomeric Peptide Identified by Mirror Image Phage Display. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery* 2008; 3: 1848-1852
112. van Groen T, Kadish I, Wiesehan K et al. In vitro and in vivo Staining Characteristics of Small, Fluorescent, A β 42-Binding d-Enantiomeric Peptides in Transgenic AD Mouse Models. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery* 2009; 4: 276-282
113. Liu H, Funke SA, Willbold D. Transport of Alzheimer disease amyloid- β -binding d-amino acid peptides across an in vitro blood-brain barrier model. *Rejuvenation research* 2010; 13: 210-213
114. Zorko M, Langel Ü. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced drug delivery reviews* 2005; 57: 529-545
115. Jiang N, Frenzel D, Schartmann E et al. Blood-brain barrier penetration of an A β -targeted, arginine-rich, d-enantiomeric peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2016; 1858: 2717-2724
116. Olubiyi O, Frenzel D, Bartnik D et al. Amyloid aggregation inhibitory mechanism of arginine-rich D-peptides. *Current medicinal chemistry* 2014; 21: 1448-1457
117. Wiesehan K, Stöhr J, Nagel-Steger L et al. Inhibition of cytotoxicity and amyloid fibril formation by a D-amino acid peptide that specifically binds to Alzheimer's disease amyloid peptide. *Protein Engineering, Design & Selection* 2008; 21: 241-246
118. Klein AN, Ziehm T, Tusche M et al. Optimization of the all-D peptide D3 for A β oligomer elimination. *PloS one* 2016; 11: e0153035
119. Ziehm T, Brener O, van Groen T et al. Increase of positive net charge and conformational rigidity enhances the efficacy of d-enantiomeric peptides designed to eliminate cytotoxic A β species. *ACS chemical neuroscience* 2016; 7: 1088-1096
120. Funke SA, van Groen T, Kadish I et al. Oral treatment with the D-enantiomeric peptide D3 improves the pathology and behavior of Alzheimer's disease transgenic mice. *ACS chemical neuroscience* 2010; 1: 639-648
121. van Groen T, Schemmert S, Brener O et al. The A β oligomer eliminating D-enantiomeric peptide RD2 improves cognition without changing plaque pathology. *Scientific reports* 2017; 7: 16275
122. Willbold D, Kutzsche J. Do We Need Anti-Prion Compounds to Treat Alzheimer's Disease? *Molecules* 2019; 24: 2237
123. Bischof GN, Jessen F, Fliessbach K et al. Impact of tau and amyloid burden on glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Annals of clinical and translational neurology* 2016; 3: 934-939
124. Battle MR, Buckley CJ, Smith A et al. Utility of Pmod Image Quantification Software for Processing [11C] PiB and [18F] Flutemetamol Images for SUVR Quantitation on the Centiloid Scale. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 2016; 12: P126
125. Kung HF, Lee C-W, Zhuang Z-P et al. Novel stilbenes as probes for amyloid plaques. *Journal of the American Chemical Society* 2001; 123: 12740-12741
126. Jovalekic A, Koglin N, Mueller A et al. New protein deposition tracers in the pipeline. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* 2017; 1: 11
127. Sehlin D, Fang XT, Cato L et al. Antibody-based PET imaging of amyloid beta in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature communications* 2016; 7: 10759

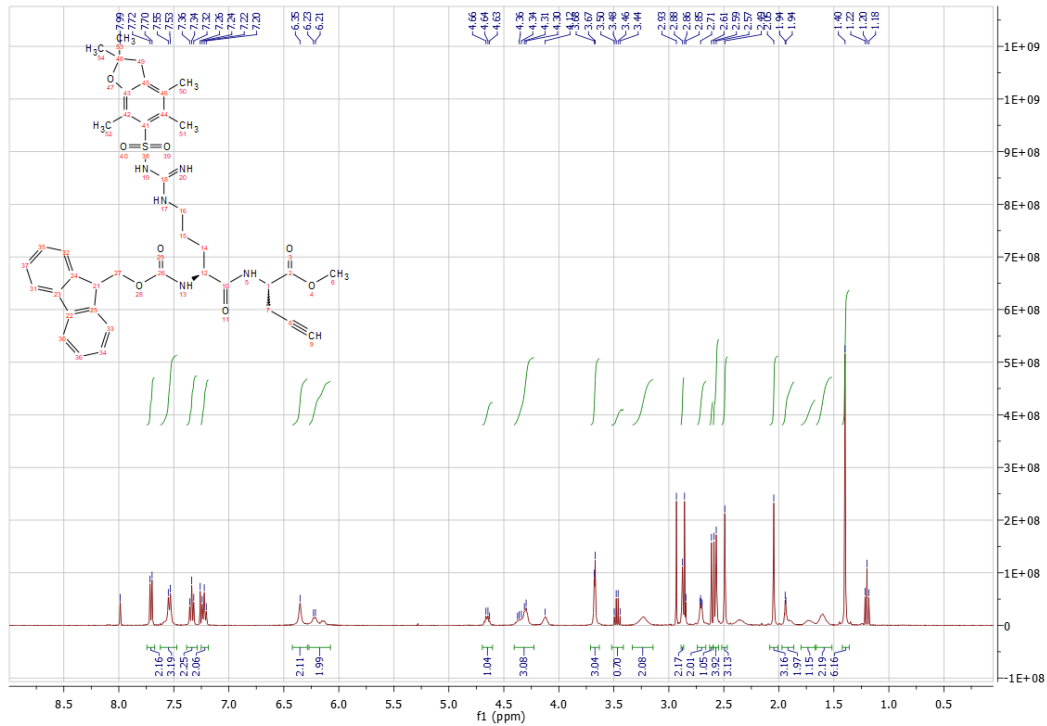
128. Yoshida M, Komata A, Hara S. Stereoselective synthesis of fluoroalkenes via (Z)-2-fluoroalkenyliodonium salts. *Tetrahedron* 2006; 62: 8636-8645
129. Yoshida M, Ota D, Fukuhara T et al. Regio- and stereoselective synthesis of fluoroalkenes and fluoroalkadienes. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 2002, DOI: 384-389
130. Lennox AJ, Lloyd-Jones GC. Selection of boron reagents for Suzuki–Miyaura coupling. *Chemical Society Reviews* 2014; 43: 412-443
131. Kang S-K, Lee H-W, Jang S-B et al. Palladium-catalyzed cross-coupling of organoboron compounds with iodonium salts and iodanes. *The Journal of organic chemistry* 1996; 61: 4720-4724
132. Grimster NP, Gauntlett C, Godfrey CR et al. Palladium-Catalyzed Intermolecular Alkenylation of Indoles by Solvent-Controlled Regioselective C–H Functionalization. *Angewandte Chemie International Edition* 2005; 44: 3125-3129
133. Ruiz-Rodríguez J, Albericio F, Lavilla R. Postsynthetic modification of peptides: chemoselective C-arylation of tryptophan residues. *Chemistry—A European Journal* 2010; 16: 1124-1127
134. Zhu Y, Bauer M, Ackermann L. Late-Stage Peptide Diversification by Bioorthogonal Catalytic C–H Arylation at 23° C in H₂O. *Chemistry—A European Journal* 2015; 21: 9980-9983
135. Giesel FL, Cardinale J, Schäfer M et al. 18 F-Labelled PSMA-1007 shows similarity in structure, biodistribution and tumour uptake to the theragnostic compound PSMA-617. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2016; 43: 1929-1930
136. Zlatopolskiy BD, Endepols H, Krapf P et al. Discovery of 18F-JK-PSMA-7, a PET Probe for the Detection of Small PSMA-Positive Lesions. *Journal of Nuclear Medicine* 2019; 60: 817-823
137. Kulkarni H, Singh A, Niepsch K et al. PSMA radioligand therapy (PRLT) of metastatic castration-resistant prostate cancer: first results using the PSMA Inhibitor 617. *Journal of Nuclear Medicine* 2016; 57: 139-139
138. [Anonym]. PROCESS FOR PREPARING N-H OR N-ALKYL 2-PROPYNAMIDE. In: Boehringer Ingelheim International G, Boehringer Ingelheim International Trading Co LTD, Deng D et al eds; 2014
139. Inoue M, Miyazaki K, Ishihara Y et al. Total synthesis of ciguatoxin and 51-hydroxyCTX3C. *Journal of the American Chemical Society* 2006; 128: 9352-9354
140. Dayal B, Salen G, Toome B et al. Lithium hydroxide/aqueous methanol: mild reagent for the hydrolysis of bile acid methyl esters. *Steroids* 1990; 55: 233-237
141. Chakrabarty SP, Ramapanicker R, Mishra R et al. Development and characterization of lysine based tripeptide analogues as inhibitors of Sir2 activity. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2009; 17: 8060-8072
142. Isidro-Llobet A, Alvarez M, Albericio F. Amino acid-protecting groups. *Chemical reviews* 2009; 109: 2455-2504
143. Weiss JT, Dawson JC, Fraser C et al. Development and bioorthogonal activation of palladium-labile prodrugs of gemcitabine. *Journal of medicinal chemistry* 2014; 57: 5395-5404
144. Amatore C, Carre E, Jutand A et al. Rates and mechanism of the formation of zerovalent palladium complexes from mixtures of Pd(OAc)₂ and tertiary phosphines and their reactivity in oxidative additions. *Organometallics* 1995; 14: 1818-1826
145. Use CfMPfH. Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts or metal reagents. London, European Medicines Agency 2008, DOI:
146. Cavani M. 18F-Markierung hochaffiner all-D-Peptide zur in vivo Diagnostik von β-Amyloid-Plaques [Dissertation]: Universität zu Köln; 2015
147. Boyle TP, Bremner JB, Coates JA et al. Synthesis of novel N-protected hydrophobic phenylalanines and their application in potential antibacterials. *European journal of medicinal chemistry* 2009; 44: 1001-1009
148. Bienemann O, Hoffmann A, Herres-Pawlis S. (Guanidine) copper complexes: structural variety and application in bioinorganic chemistry and catalysis. *Reviews in Inorganic Chemistry* 2011; 31: 83-108
149. Reuter B, Petersen C. Syringe Siliconization Trends, methods, analysis procedures. *TechnoPharm* 2012; 2: 238-244

150. Bauwens M, Chekol R, Vanbilloen H et al. Optimal buffer choice of the radiosynthesis of ⁶⁸Ga-Dotatoc for clinical application. *Nuclear medicine communications* 2010; 31: 753-758
151. Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chemical Society Reviews* 2014; 43: 260-290
152. Velikyan I. ⁶⁸Ga-based radiopharmaceuticals: production and application relationship. *Molecules* 2015; 20: 12913-12943
153. Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP et al. Processing of generator-produced ⁶⁸Ga for medical application. *Journal of Nuclear Medicine* 2007; 48: 1741-1748
154. Mueller D, Klette I, Baum RP et al. Simplified NaCl based ⁶⁸Ga concentration and labeling procedure for rapid synthesis of ⁶⁸Ga radiopharmaceuticals in high radiochemical purity. *Bioconjugate chemistry* 2012; 23: 1712-1717
155. Xu B, Li X, Yin J et al. Evaluation of ⁶⁸Ga-labeled MG7 antibody: A targeted probe for PET/CT imaging of gastric cancer. *Scientific reports* 2015; 5: 8626
156. Gijss M, Dammico S, Warnier C et al. Gallium-68-labelled NOTA-oligonucleotides: an optimized method for their preparation. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 2016; 59: 63-71
157. Salvé M, Avohou HT, Monbaliu JCM et al. NOTA-PRGD2 and NODAGA-PRGD2: Bioconjugation, characterization, radiolabelling, and design space. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 2018; 61: 487-500
158. Poschenrieder A, Schottelius M, Schwaiger M et al. Preclinical evaluation of [⁶⁸Ga]NOTA-pentixafor for PET imaging of CXCR4 expression in vivo—a comparison to [⁶⁸Ga]pentixafor. *EJNMMI research* 2016; 6: 70
159. Way JD, Wang M, Hamann I et al. Synthesis and evaluation of 2-amino-5-(4-[¹⁸F]fluorophenyl)pent-4-ynoic acid ([¹⁸F]FPhPA): A novel ¹⁸F-labeled amino acid for oncologic PET imaging. *Nuclear medicine and biology* 2014; 41: 660-669
160. Kalebic T, Kinter A, Poli G et al. Suppression of human immunodeficiency virus expression in chronically infected monocytic cells by glutathione, glutathione ester, and N-acetylcysteine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88: 986
161. NISHIMURA O, KITADA C, FUJINO M. New method for removing the Sp-methoxybenzyl and St-butyl groups of cysteine residues with mercuric trifluoroacetate. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1978; 26: 1576-1585
162. Pastuszak JJ, Chimiak A. tert-Butyl group as thiol protection in peptide synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* 1981; 46: 1868-1873
163. Jiang N, Leithold LH, Post J et al. Preclinical pharmacokinetic studies of the tritium labelled D-Enantiomeric peptide D3 developed for the treatment of Alzheimer's disease. *PloS one* 2015; 10: e0128553
164. Fulmer GR, Miller AJ, Sherden NH et al. NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* 2010; 29: 2176-2179
165. Funke S, Matilainen J, Nalenz H et al. Optimization of the bake-on siliconization of cartridges. Part II: Investigations into burn-in time and temperature. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2016; 105: 209-222
166. Ochiai M, Kunishima M, Sumi K et al. Reaction of alkynyltrimethylsilanes with a hypervalent organoiodine compound: A new general synthesis of alkynyliodonium salts. *Tetrahedron letters* 1985; 26: 4501-4504
167. Kitamura T, Stang PJ. Improved synthesis of alkynylphenyliodonium arylsulfonates (RC₆H₄SO₂Ar). *The Journal of Organic Chemistry* 1988; 53: 4105-4106
168. Zlatopolskiy BD, Radzom M, Zeeck A et al. Synthesis and Precursor-Directed Biosynthesis of New Hormaomycin Analogues. *European journal of organic chemistry* 2006; 2006: 1525-1534
169. Rosowsky A, Forsch RA, Freisheim JH et al. Methotrexate analogs. 22. Synthesis, dihydrofolate reductase affinity, cytotoxicity, and in vivo antitumor activity of some putative degradation products of methotrexate-poly (L-lysine) conjugates. *Journal of medicinal chemistry* 1984; 27: 888-893

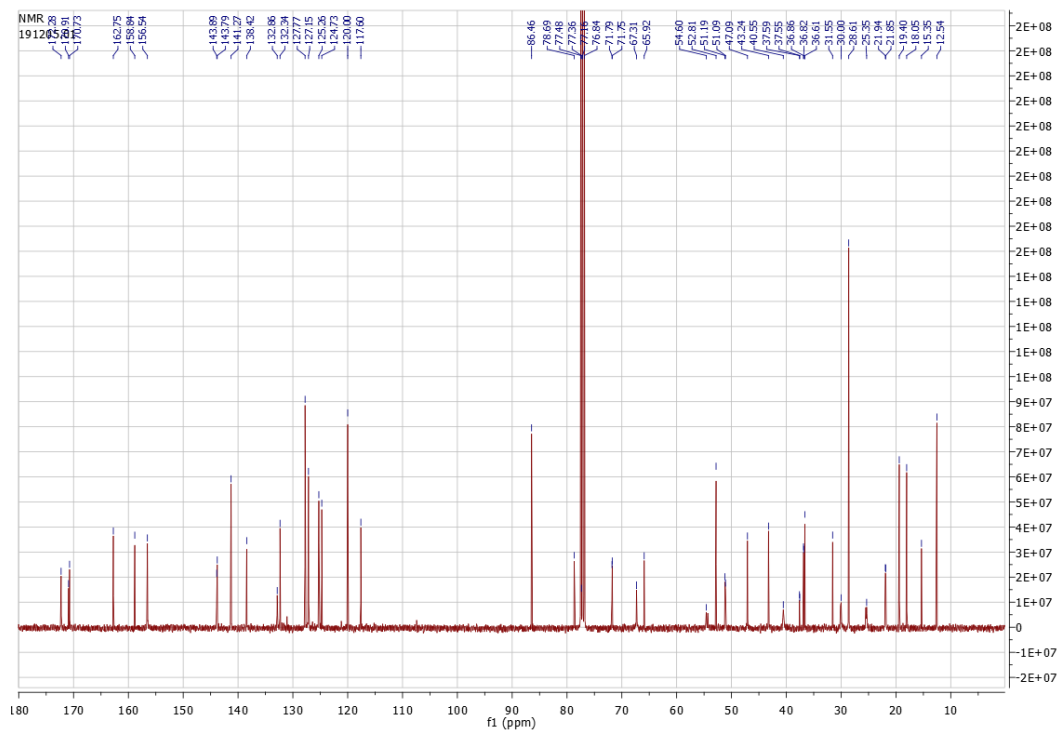
170. Wan W, Huang Y, Wang Z et al. A facile system for genetic incorporation of two different noncanonical amino acids into one protein in *Escherichia coli*. *Angewandte Chemie International Edition* 2010; 49: 3211-3214
171. Nguyen DP, Lusic H, Neumann H et al. Genetic encoding and labeling of aliphatic azides and alkynes in recombinant proteins via a pyrrolysyl-tRNA synthetase/tRNACUA pair and click chemistry. *Journal of the American Chemical Society* 2009; 131: 8720-8721
172. Chan W-K, Ho C-M, Wong M-K et al. Oxidative amide synthesis and N-terminal α -amino group ligation of peptides in aqueous medium. *Journal of the American Chemical Society* 2006; 128: 14796-14797
173. Medran NS, Villalba M, Mata EG et al. Gold-Catalyzed Cycloisomerization of Alkyne-Containing Amino Acids: Controlled Tuning of C–N vs. C–O Reactivity. *European Journal of Organic Chemistry* 2016; 2016: 3757-3764
174. Van Nieuwenhze MS, V. Brun, Y., Kuru, E. D-ala-d-ala-based dipeptides as tools for imaging peptidoglycan biosynthesis. In: *Corporation IURAT ed*; 2015
175. Chen Y, Li Z, Liu Y et al. Identification of novel and selective non-peptide inhibitors targeting the polo-box domain of polo-like kinase 1. *Bioorganic chemistry* 2018; 81: 278-288
176. Wolf LB, Tjen KC, ten Brink HT et al. Palladium-Catalyzed Cyclization Reactions of Acetylene-Containing Amino Acids. *Advanced Synthesis & Catalysis* 2002; 344: 70-83

Anhang:
 NMR-Spektren
 Verbindung 40 a

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)

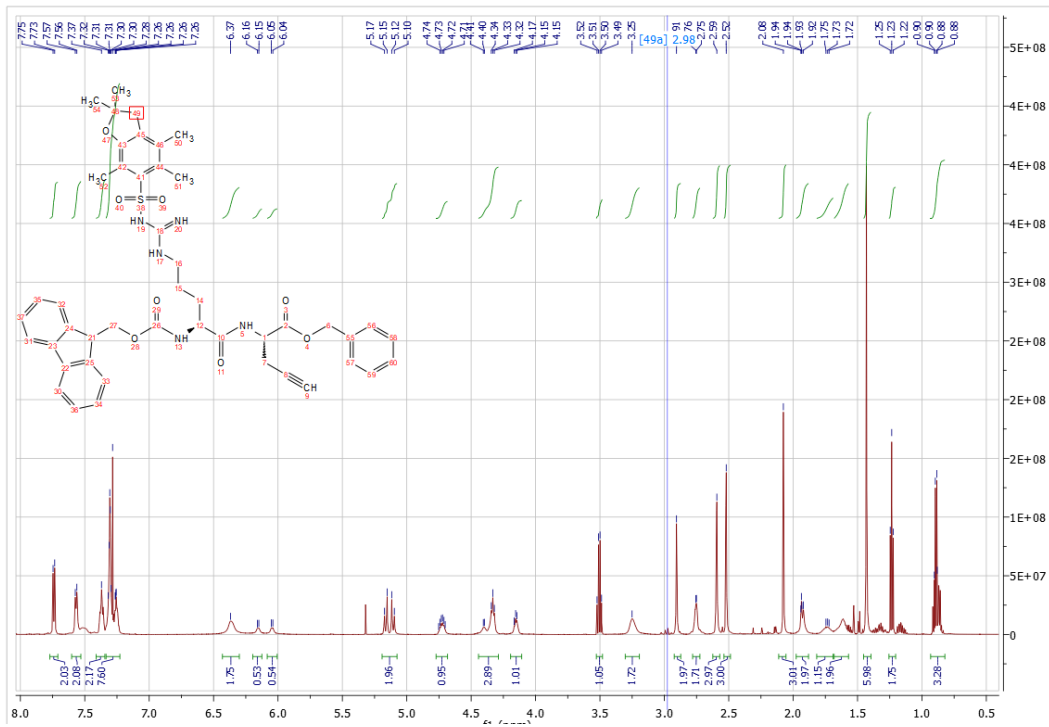


^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)

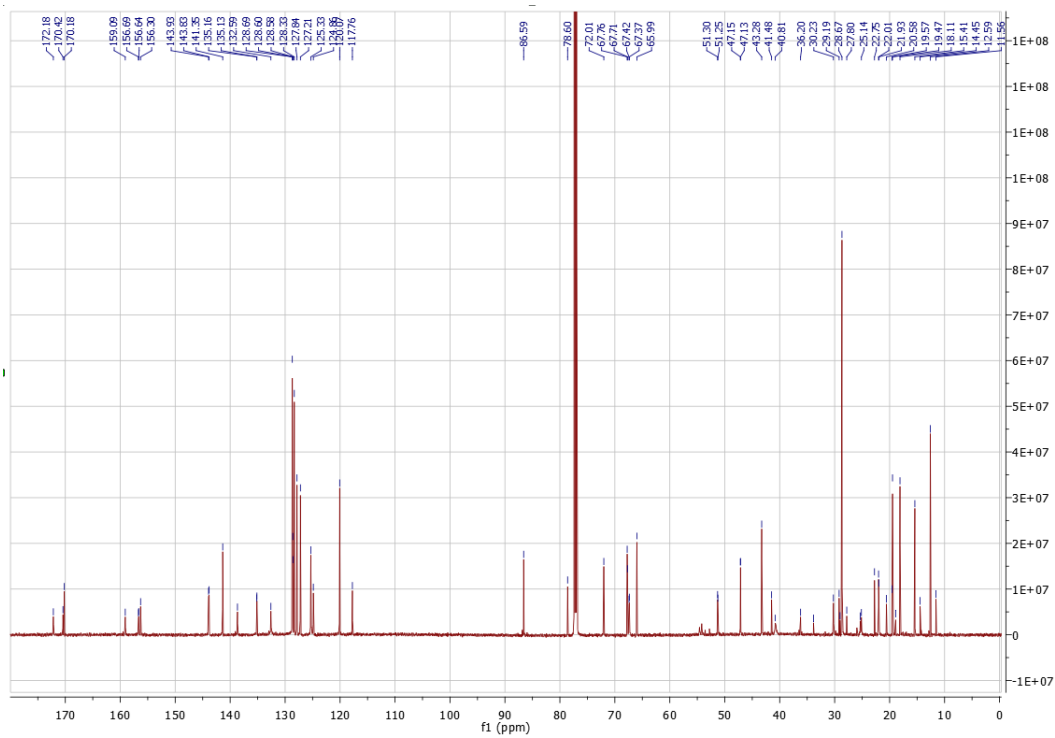


Verbindung 40b

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃)



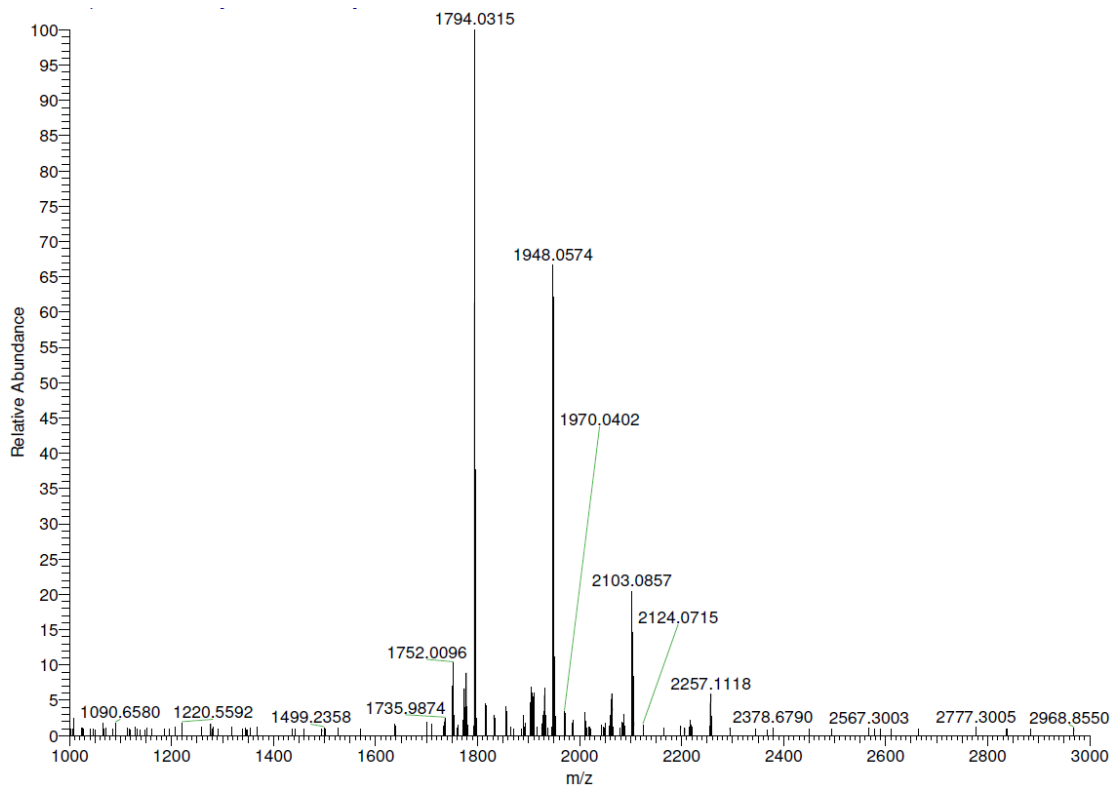
¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃)



Massenspektren der all-D Peptide

RD2-Pra(FHex) (43)

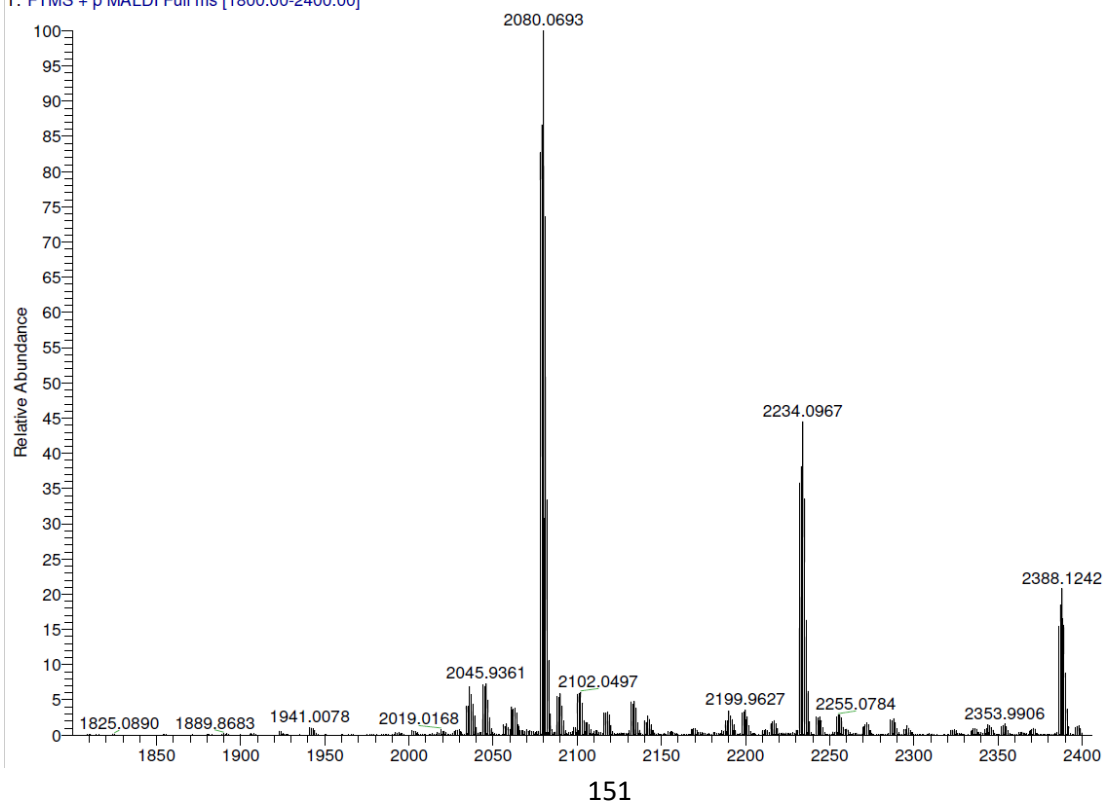
MALDI-Orbitrap:



Ga-NOTARD2 (44)

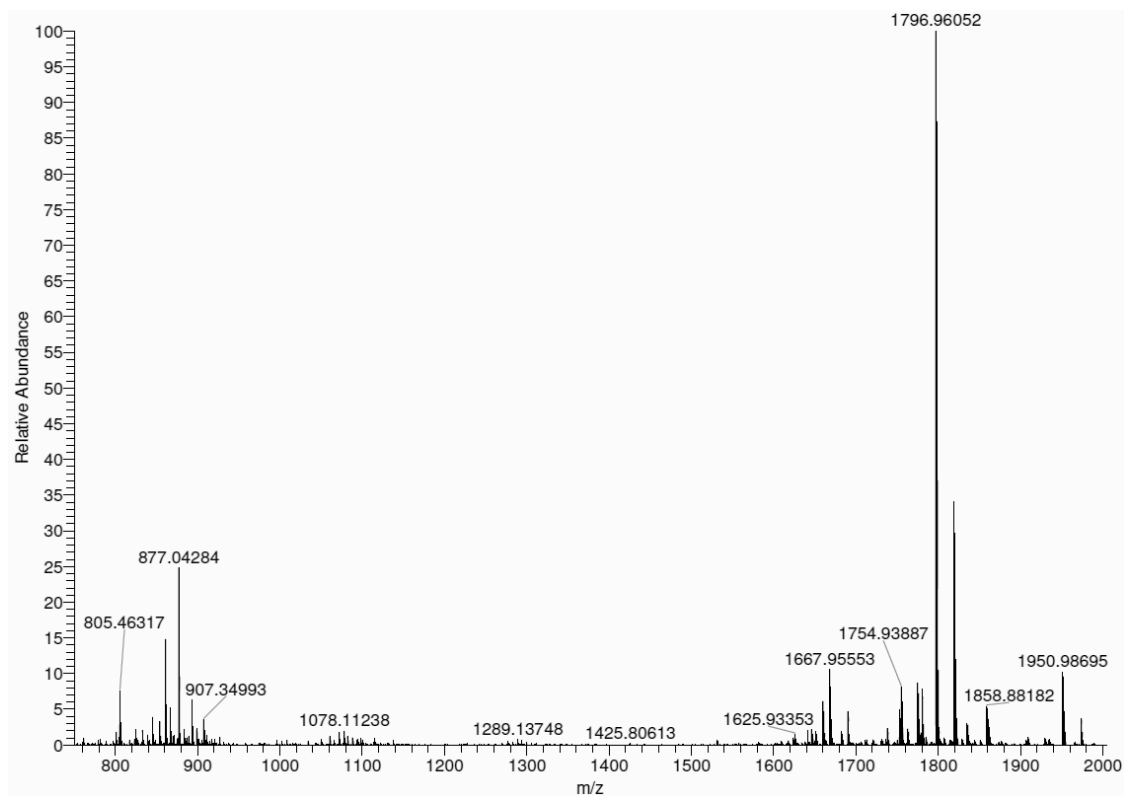
MALDI-Orbitrap

180952_MALDI_RD2-DOTA(Ga)_1800-2400_O23 #1-20 RT: 0.00-1.81 AV: 20 NL: 1.54E6
T: FTMS + p MALDI Full ms [1800.00-2400.00]

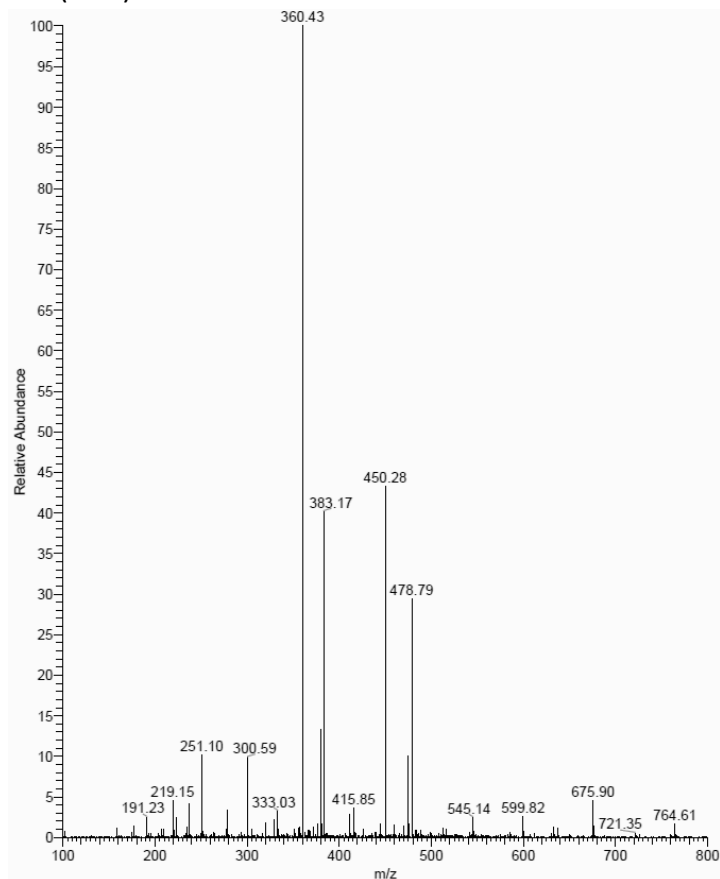


RD2cFPy (52):

MALDI-Orbitrap



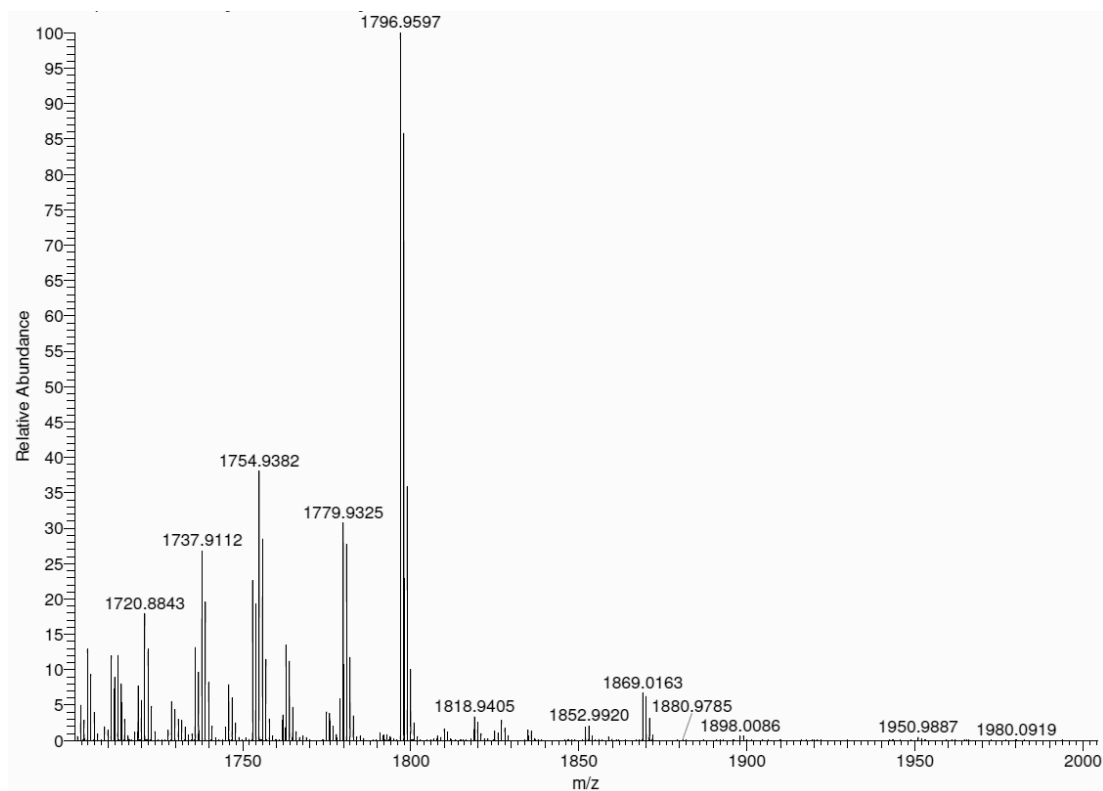
MS (ESI+)



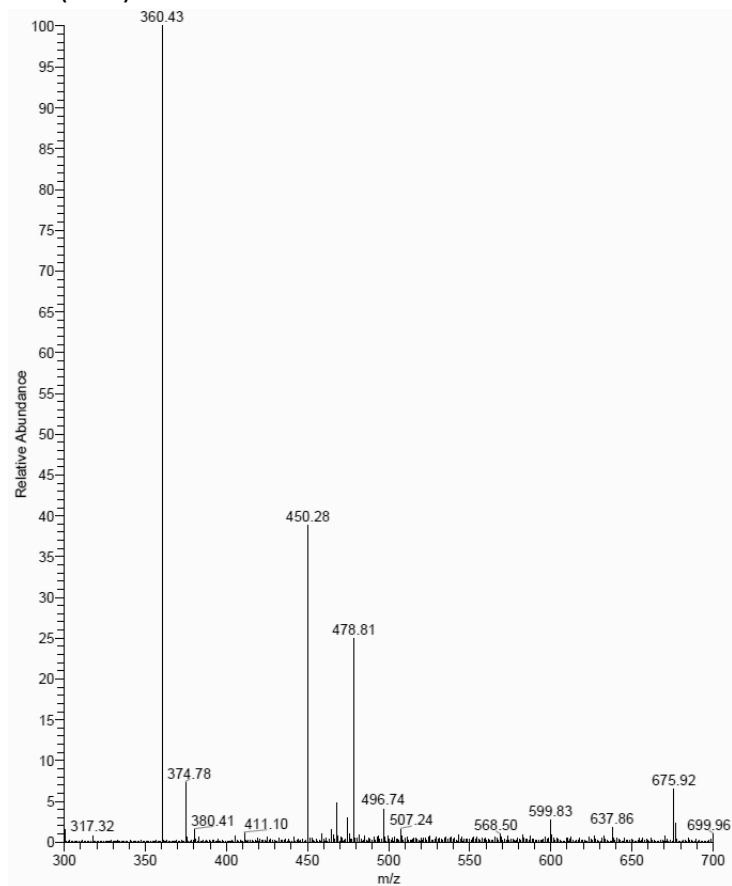
	berechnet gefunden	
	m/z	m/z
$[M+5H]^{5+}$	360,20	360,43
$[M+5H+TFA]^{5+}$	383,00	383,17
$[M+4H]^{4+}$	449,99	450,28
$[M+4H+TFA]^{4+}$	478,49	478,79
$[M+3H+2TFA]^{3+}$	675,65	675,90

D3cFPy (53)

MALDI-Orbitrap



MS (ESI+)



	berechnet	gefunden
	m/z	m/z
$[M+5H]^{5+}$	360,20	360,43
$[M+5H+TFA]^{5+}$	383,00	n.d.
$[M+4H]^{4+}$	449,99	450,28
$[M+4H+TFA]^{4+}$	478,49	478,81
$[M+3H+2TFA]^{3+}$	675,65	675,92

Chromatogramme

Zum Nachweis der Identität der Tracer für biologische Untersuchungen wurden diese isoliert, mit der ^{19}F -Referenz aufgestockt („gespiked“) und mittels HPLC die Retentionszeit verglichen. Dabei ist der von der Flussrate abhängige Laufzeitunterschied zwischen UV- und Radioaktivitätsdetektor von ca. 0,15 min bei 1 mL/min zu beachten.

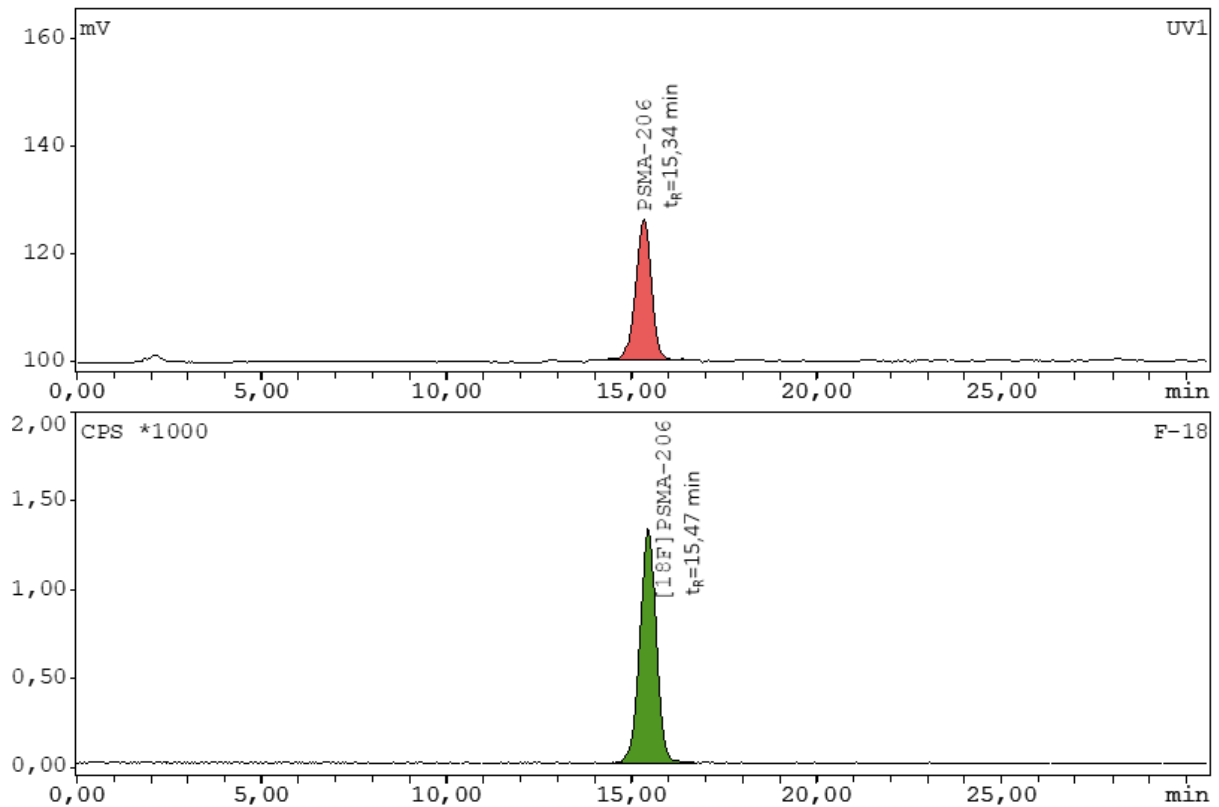


Abb. 65: Isoliertes [^{18}F]PSMA-206 ([^{18}F]26) koinjiziert mit Standard, HPLC-Bedingungen: Phenomenex Synergy Hydro-RP 5 μ , 4.6x250 mm, 30 % MeCN, 0,1 % TFA, 1,25 mL/min, $\lambda=240$ nm

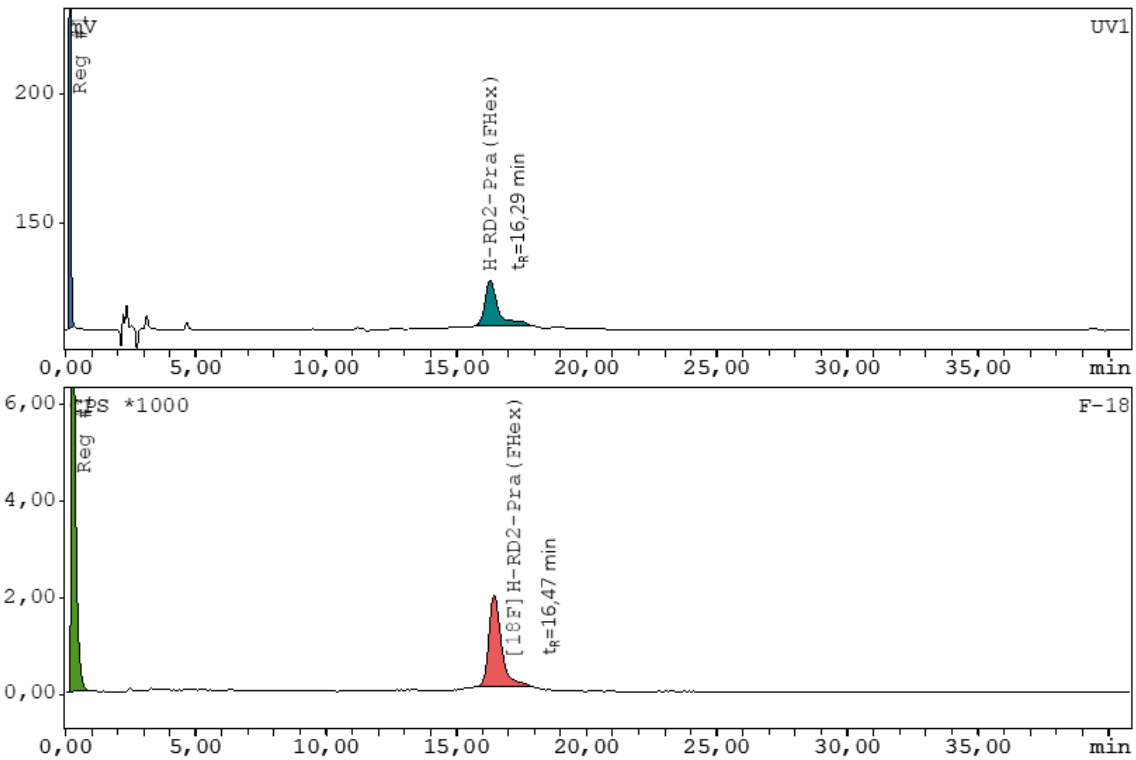


Abb. 66: $[^{18}\text{F}]\text{RD2-Pra}(\text{FHex})$ ($[^{18}\text{F}]\text{43}$) koinjiziert mit Standard, HPLC-Bedingungen: Phenomenex Synergy Hydro-RP 5 μ , 4.6x250 mm, 21 % MeCN, 0,1 % TFA, 1,0 mL/min, $\lambda = 214$ nm.

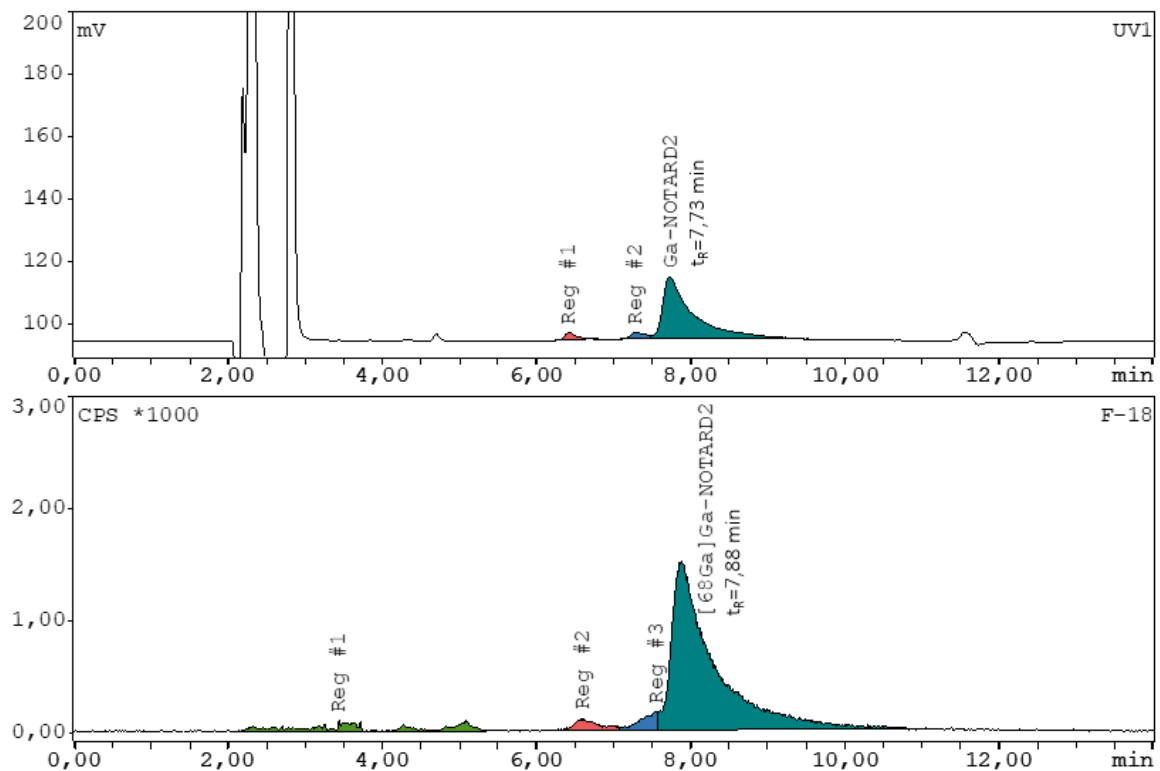


Abb. 67: Isoliertes $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTARD2}$ ($[^{68}\text{Ga}]\text{44}$) koinjiziert mit Standard. HPLC-Bedingungen: Phenomenex Aeris 5 μ Peptide XB-C18, 4.6x250 mm, 15 % MeCN, 0,1 % TFA, 1,0 mL/min, $\lambda = 214$ nm. Bei Reg #1 und Reg #2 handelt es sich um Artefakte bedingt durch die Probenmatrix, welche bei Gradientenelution nicht beobachtet werden (s.u.)

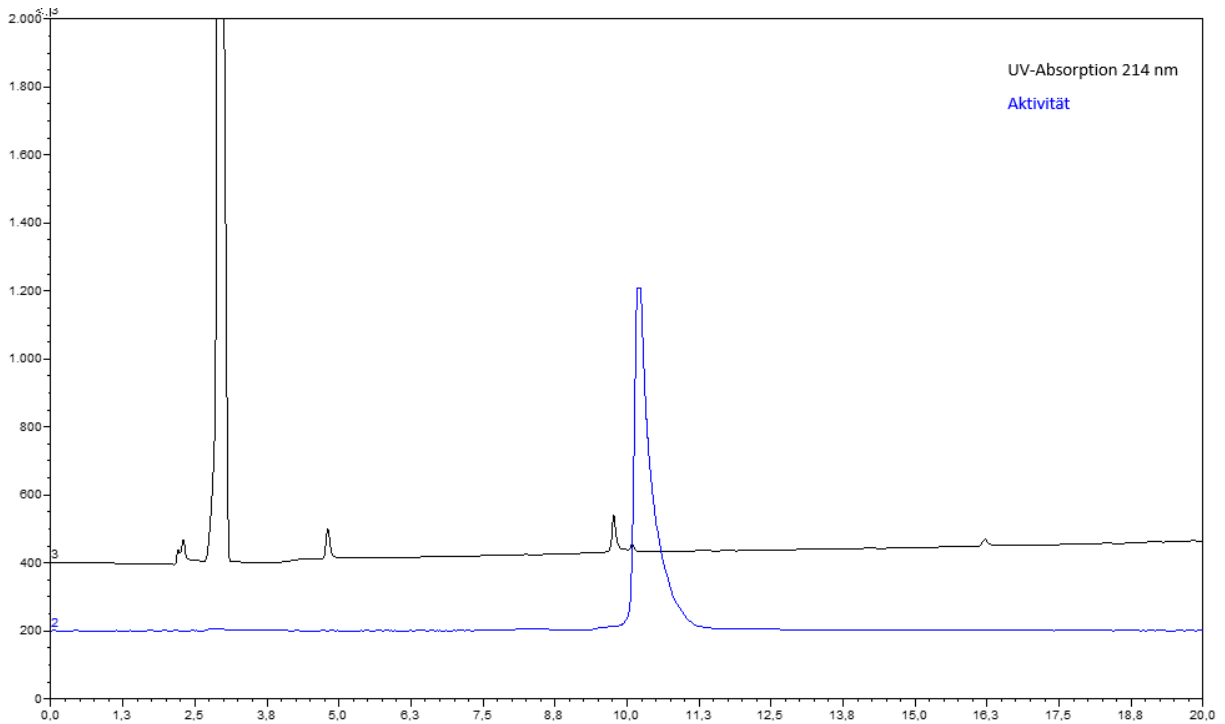


Abb. 68: Isoliertes $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTARD2}$ ($[^{68}\text{Ga}]\mathbf{44}$). HPLC-Bedingungen: Phenomenex Kinetex C18 evo 5μ , 4.6×250 mm, Gradientenelution (A/B): A 0,1 % TFA/Wasser, B 0,1 % TFA /MeCN. 0 min: 0 % B, 30 min: 60 % B, 1 mL/min. Schwarz: UV-Absorption bei $\lambda=214$ nm, blau: Radiodetektor.

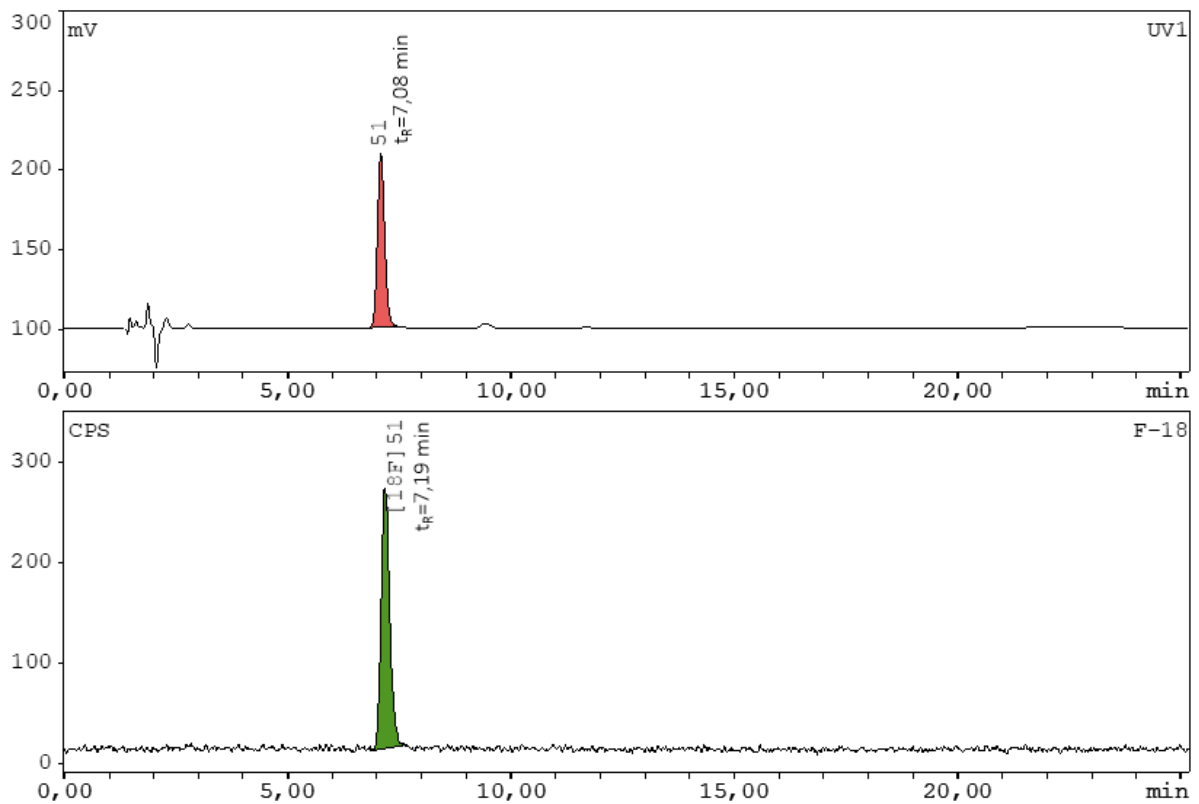
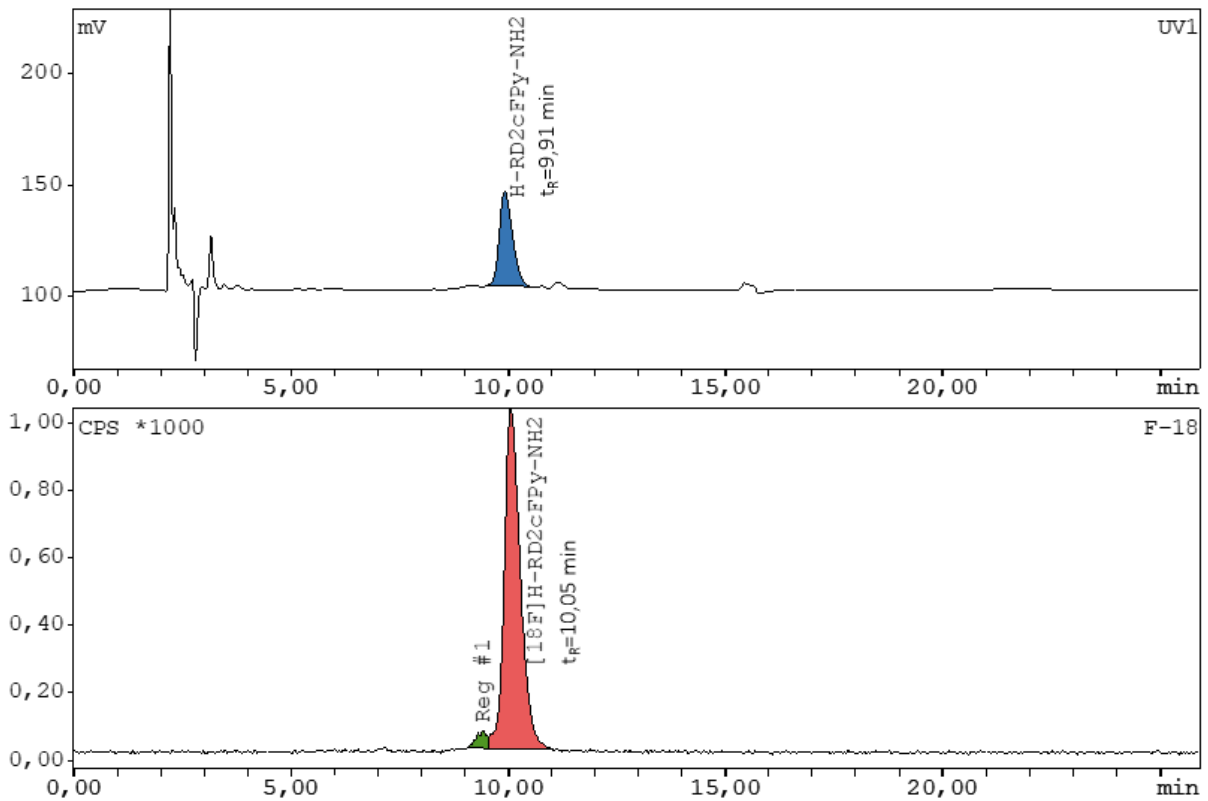


Abb. 69: Isoliertes $[^{18}\text{F}]\text{Glu-Urea-Cys}$ ($[^{18}\text{F}]\mathbf{51}$) koinjiziert mit Standard, HPLC-Bedingungen: Phenomenex Kinetex F5 5μ , 4.6×250 mm. 15 % MeCN, 0,1 % TFA, 1,5 mL/min, $\lambda=254$ nm.



Isoliertes [^{18}F]RD2cFPy ([^{18}F]52) koinjiziert mit Standard. HPLC-Bedingungen: Phenomenex Synergy Hydro-RP 5 μ , 4.6x250 mm, 15 % MeCN, 0,1 % TFA, 1,0 mL/min, $\lambda=214$ nm

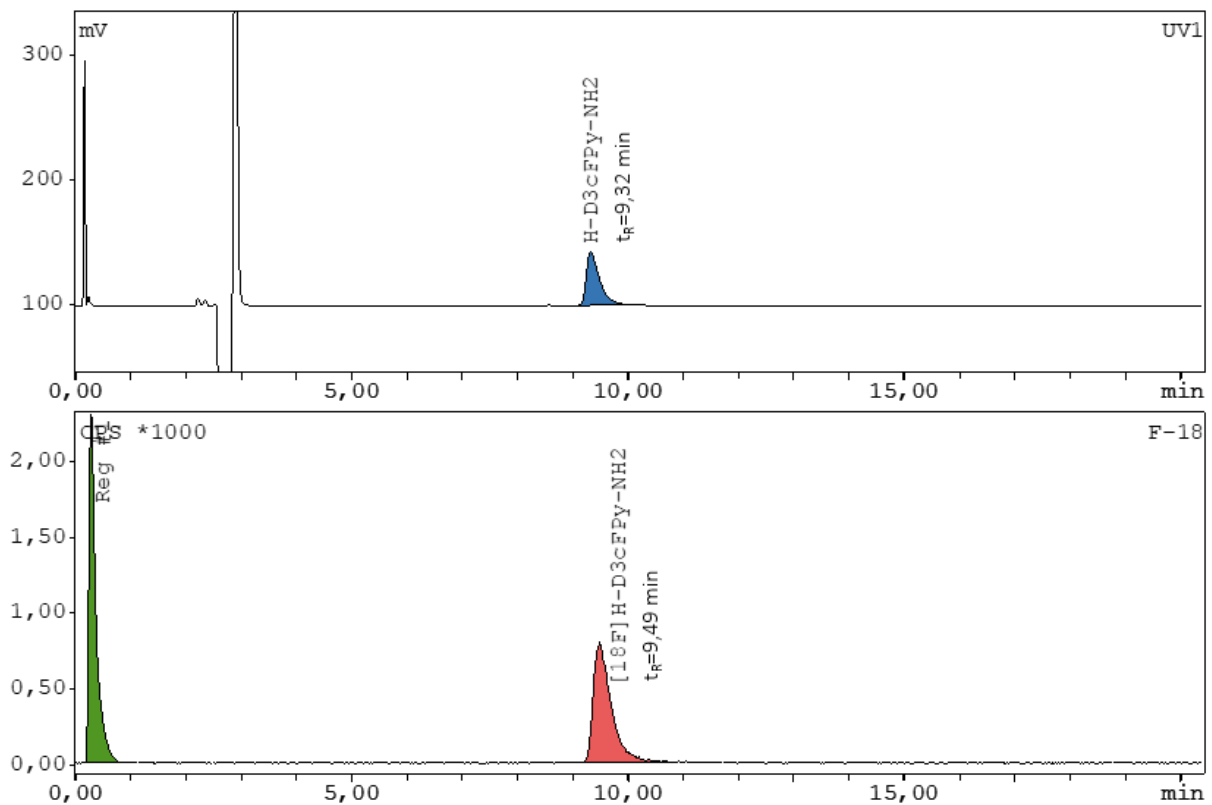


Abb. 70: Isoliertes [^{18}F]D3cFPy ([^{18}F]53) koinjiziert mit Standard. HPLC-Bedingungen: Phenomenex Aeris 5 μ m Peptide XB-C18, 4.6x250 mm, 15 % MeCN, 0,1 % TFA, 1,0 mL/min, $\lambda=214$ nm

Verschiedenes

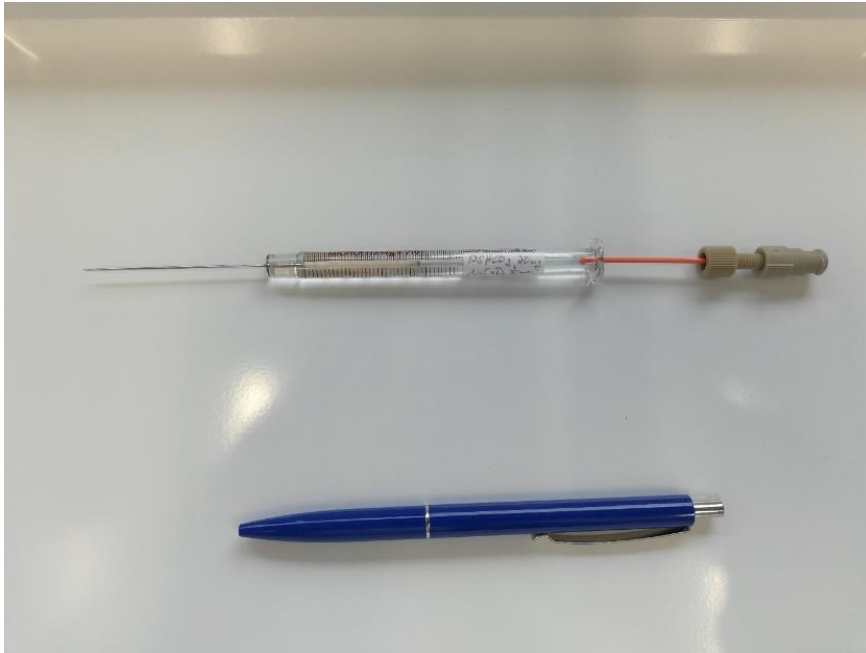


Abb. 71: Zur Radiomarkierung von $[^{18}\text{F}]\text{FHexI}^+$ zur Konzentration des $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ verwendeter Micro-Anionentauscher (20 mg Macherey Nagel PS-HCO₃) auf Basis einer 100 µL Hamilton-Spritze. Das Resin wird durch Fritten (PTFE) eingeschlossen.

Abkürzungen

A β	beta-Amyloid
Alloc	Allyloxycarbonyl
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Cbz	Benzyloxycarbonyl
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
DC	Dünnschichtchromatographie
DCHA	Dichclohexylamin
DCM	Dichlormethan
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DODT	2,2'-(Ethylenedioxy)diethanethiol
DOPA	Levodopa (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin)
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC.HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid HCl-Salz
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
FAM	6-Carboxyfluorescein
FDG	2-Fluor-2-desoxy-D-glucose
FHexI	(Z)-2-Fluorhex-1-en-1-yl(phenyl)iodonium
FIB	4-Fluoriodbenzol
FIPy	2-Fluor-5-iodpyridin
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High performance liquid chromatography - <i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie</i>
HRMS	High resolution mass spectrometry - <i>Hochauflösende Massenspektrometrie</i>
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionisation - <i>Matrixunterstützte Laser-Desorption/ionisation</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
n.c.a.	no carrier added - <i>ohne Trägerzusatz</i>
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy - <i>Kernresonanzspektroskopie</i>
NOTA	2,2',2''-(1,4,7-triazacyclononan-1,4,7-triyl)triessigsäure

OTf	Triflat
OTs	Tosylat
PE	Petrolether
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Ph	Phenyl
Poc	Propargylaxycarbonyl
Pra	Propargylglycin
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
RCA	Radiochemische Ausbeute
RCR	Radiochemische Reinheit
RCU	Radiochemischer Umsatz
RP	reversed Phase - <i>Umkehrphase</i>
SFB	N-Succinimidyl-4-fluorbenzoat
SPE	Solid phase extraction - <i>Festphasenextraktion</i>
SPECT	Single photon emission computed tomography - <i>Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie</i>
SPPS	Solid phase peptide synthesis - <i>Festphasenpeptidsynthese</i>
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
<i>t</i> BuOH	<i>tert</i> -Butanol
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
tppts	Tri-(natrium-meta-sulfonatophenyl)-phosphan
WFR	Wiederfindungsrate

Erklärung nach §4, Abs. 9 der Prüfungsordnung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Professor Dr. Bernd Neumaier betreut worden."

Jülich, 26.02.2020

Swen Humpert

Teilpublikationen:

S. Humpert, B. Zlatopolskiy, M. Holschbach, B. Neumaier; Preparation of [¹⁸F]fluoroalkenyliodonium salts and their application for radiolabelling by Sonogashira coupling reactions (Poster), 20th European Symposium on Organic Chemistry, Köln, Deutschland, 2.-6. Jul 2017

S. Humpert, B. Zlatopolskiy, M. Holschbach, B. Neumaier; Preparation of [¹⁸F]fluoroalkenyliodonium salts and their application for radiolabeling by Sonogashira coupling reaction (Poster), 33rd Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Wien, Östereich, 21.-25. Okt. 2017

S. Humpert, D. Bier, M. Holschbach, B. Zlatoposkiy, B. Neumaier; Preparation of [¹⁸F]fluoroalkenyliodonium salts and their application for radiolabeling by cross coupling reactions (Vortrag), 23rd International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, Peking, China, 26.-31- Mai 2019

S. Humpert, M. A. Omrane, H. Endepols, J. Zischler, J. Ermert, B. D. Zlatopolskiy, B. Neumaier; Palladium-catalyzed chemoselective S-arylation for the preparation of ¹⁸F-labeled biomolecules (Vortrag), JCF Frühjahrssymposium 2020, Köln, Deutschland, 25.-28.03.2020

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Swen Humpert
Geburtsdatum und -ort: 29.10.1986 in Stolberg, Rheinland
Staatsangehörigkeit: deutsch

Studium und Ausbildung:

02/2017-heute Promotionsstudium bei Prof. Dr. Bernd Neumaier am Institut für Neurowissenschaften und Medizin, Nuklearchemie (INM-5), Forschungszentrum Jülich

09/2014-8/2016 Fachhochschule Aachen Standort Jülich: Internationaler Masterstudiengang Nuclear Applications. Abschluss: M.Sc. (Vertiefung Nuclear Chemistry) mit der Note 1,2 und Auszeichnung mit der Ehrenplakette der FH Aachen
Thema der Masterarbeit: „Z-[¹⁸F]Fluoroalkenyliodonium salts as novel prosthetic groups for palladium mediated cross coupling reactions in radiochemistry”

09/2011-8/2014 Fachhochschule Aachen Standort Jülich: Bachelorstudiengang Angewandte Chemie. Abschluss: B.Sc. mit der Note 1,1 und Auszeichnung mit der Ehrenplakette der FH Aachen
Thema der Bachelorarbeit: „Stereospezifische Markierung von D- und L-3-[¹⁸F]Fluor- α -methyltyrosin mittels Isotopenaustausch“

09/2008-01/2011 Ausbildung zum Chemielaboranten im Forschungszentrum Jülich mit praktischem Anteil im Institut für Neurowissenschaften und Medizin: INM-5. Abschluss mit der Note „sehr gut“

09/2003-06/2006 Mies-van-der-Rohe-Schule Aachen, Berufskolleg für Technik. Abschluss: Abitur mit der Note 3,0

Berufserfahrung:

01/2011-01/2017 Forschungszentrum Jülich, Institut für Neurowissenschaften und Medizin: INM-5, Chemielaborant (studienbegleitend, 15-19 h/Woche) im Bereich Radiopharmakaentwicklung

Jül-4425 • Juli 2020
ISSN 0944-2952

Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft

