

Institut für Neurowissenschaften und
Medizin Nuklearchemie (INM-5)

^{18}F -Markierung hochaffiner all-D-Peptide zur *in vivo* Diagnostik von β -Amyloid-Plaques

Melanie Cavani

**^{18}F -Markierung hochaffiner
all-D-Peptide zur *in vivo* Diagnostik
von β -Amyloid-Plaques**

Melanie Cavani

Berichte des Forschungszentrums Jülich; 4388
ISSN 0944-2952
Institut für Neurowissenschaften und Medizin
Nuklearchemie (INM-5)
Jül-4388

D 38 (Diss., Köln, Univ., 2015)

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

Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
52425 Jülich
Tel.: +49 2461 61-5220
Fax: +49 2461 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
www.fz-juelich.de/zb

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum vom Februar 2012 bis zum Februar 2015 am Institut für Neurowissenschaften und Medizin, INM-5: Nuklearchemie des Forschungszentrums Jülich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. H. Coenen.

Kurzzusammenfassung

Zur Entwicklung neuer selektiver Radiotracer, die eine *in vivo* Diagnostik mittels Positronen-Emissions-Tomographie von β -Amyloid-Plaques im Rahmen der Alzheimer-Krankheit ermöglichen, wurden im Zuge dieser Arbeit verschiedene Markierungsstrategien zur Radiofluorierung des all-D-Peptids D3 (Aminosäuresequenz: RPRTRLHTHRNR) verfolgt, welches in Voruntersuchungen geeignete Eigenschaften bezüglich der Affinität an β -Amyloid aufwies.

Eine Radiofluorierung mit Acylierungsreagenzien wurde durch die Erweiterung des Peptids am C-Terminus um eine Lysin-Einheit ermöglicht. Die prosthetische Gruppe Succinimidyl-4- ^{18}F fluorbenzoat konnte mit Ausbeuten von 41 - 60 % dargestellt und mit Testverbindungen erfolgreich, jedoch nicht mit dem gewünschten D3-Derivat konjugiert werden.

Zur alternativen Radiofluorierung mit thiol-reaktiven Gruppen wurde das Peptid um einen Cystein- statt Lysin-Rest erweitert. 4- ^{18}F Fluorbenzylmaleimid konnte über zwei verschiedene Synthesewege nur mit Ausbeuten unter 5 % hergestellt werden und wurde daher nicht weiter verwendet. Die Darstellung von 1-[3-(2- ^{18}F Fluorpyridin-3-oxyl)propyl]pyrrol-2,5-dion (^{18}F FPyME) gelang jedoch mittels einer dreistufigen Radiosynthese innerhalb von 110 Minuten mit einer radiochemischen Ausbeute von 2-20 %. Durch Entwicklung einer neuen Synthesestrategie über eine am Maleimid geschützte Zwischenstufe, wurde die Verbindung darüber hinaus in einer zweistufigen Radiosynthese innerhalb von nur 60 Minuten mit radiochemischen Ausbeuten von 20 ± 5 % erhalten. Eine Kopplung von ^{18}F FPyME gelang am all-D Peptid mit Ausbeuten von über 95 % innerhalb von 15 Minuten. Die Gesamtsynthesedauer bis zum radiofluorierten D3-Derivat betrug 120 Minuten.

Die erfolgreich mit Fluor-18 markierten D3-Derivate wurden ersten präklinischen *in vitro* Untersuchungen mittels Autoradiographie an Mäusegehirnschnitten unterzogen, welche von Tieren stammten, die β -Amyloid-Plaques ausgebildet hatten. Nach Optimierung der Inkubationsparameter zur Reduktion der Glasaffinität, wurde festgestellt, dass das entsprechende L-Enantiomer des radiofluorierten D3-Derivats keine Bindung am Gewebe aufzeigt. Das all-D Peptid D3 hingegen zeigt in einigen Regionen eine vermehrte Aufnahme in Gewebeareale mit β -Amyloid-Anreicherungen.

Abstract

For the Development of new selective radiotracers which can be used for *in vivo* imaging of β -Amyloid plaques in the context of Alzheimer's Disease by positron-emission-tomography this study aimed at the application of various strategies for ^{18}F -labelling of the all-D peptide D3 (sequence: RPRTRLHTHRNR). In previous reports D3 showed promising results for the affinity to β -Amyloid.

The labelling reaction with acylation agents required an extension of the original peptide with a lysine residue at the C-terminus. The prosthetic group succinimidyl-4- ^{18}F fluorobenzoate could be produced with a radiochemical yield of 41 - 60 %. While conjugation with various model compounds gave good results the coupling with the D3-derivative was not possible.

Through the extension of D3 with cysteine instead of lysine it was possible to use thiol-reactive prosthetic groups. For this 4- ^{18}F fluorobenzylmaleimide was prepared by two different synthetic routes. But neither one of them lead to a radiochemical yield above 5% so further use was neglected. The preparation of 1-[3-(2- ^{18}F fluoropyridine-3-oxyl)propyl]pyrrol-2,5-dione succeeded by a three-step radiosynthesis within 110 minutes and lead to a radiochemical of 2-20%. The development of a new strategy via the protection of the maleimide function allowed to perform the radiosynthesis in only two steps within 60 minutes and an overall radiochemical yield of about $20 \pm 5\%$. The following coupling with the all-D peptide could be done with yields of about 95% within 15 minutes. This, the synthesis of the radiofluorinated D3-derivative including all purification steps could be achieved within 120 minutes.

The successfully ^{18}F -labelled D3-derivative was used for further preclinical *in vitro* investigation by performing autoradiography of mouse brain slices which expressed β -Amyloid plaques. Optimisation of the parameters of incubation were done in order to reduce the affinity of the compounds to the glass surface. It could be determined that the L-enantiomer of the radiofluorinated D3-derivative showed no affinity to the tissue. However the all-D peptide showed an increased uptake at some tissue regions with enrichment of β -Amyloid.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Radionuklide für medizinische Anwendungen	1
1.2	Produktion von Fluor-18	4
1.3	Markierungsmethoden mit Fluor-18	6
1.3.1	Elektrophile Substitution	7
1.3.2	Nukleophile Substitution	8
1.3.3	Übergangsmetall-vermittelte Reaktionen zur ¹⁸ F-Fluorierung .	14
1.4	¹⁸ F-Markierung von Peptiden und Proteinen	16
1.4.1	¹⁸ F-Markierung mittels prosthetischer Gruppen	17
1.4.2	¹⁸ F-Markierung mittels Click-Chemie	20
1.4.3	Weitere ¹⁸ F-Markierungen von Peptiden	22
1.5	β -Amyloid-Peptide	23
1.6	Molekulare Bildung von β -Amyloid Plaques	25
1.7	β -Amyloid-bindende all-D-Peptide	27
2	Problemstellung	29
3	Ergebnisse und Diskussion	31
3.1	Peptidmarkierungen mit Acylierungsreagenzien	31
3.1.1	Synthese von SFB und dessen Kopplungsreaktionen	33
3.1.2	Synthese von [¹⁸ F]SFB und dessen Kopplungsreaktionen . . .	41
3.1.3	Reaktionen von anderen Succinimidylestern zur Funktionali- sierung von Peptiden	46
3.2	Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen	48
3.2.1	Synthese von FBM und dessen Kopplungsreaktionen	49

3.2.2	Synthese von [^{18}F]FBM	52
3.2.3	Synthese von FPyME und [^{18}F]FPyME	61
3.2.4	Kopplungsreaktionen von FPyME und [^{18}F]FPyME	72
3.2.5	Funktionalisierung von Peptiden mittels thiol-reaktiver Gruppen	75
3.2.6	SFB als thiol-reaktive Gruppe	77
3.3	Autoradiographische Bindungsstudien	77
4	Experimenteller Teil	85
4.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	85
4.2	Synthesen der Markierungsvorläufer und Referenzverbindungen	89
4.3	Radiosynthesen	109
4.3.1	Produktion von n.c.a. [^{18}F]Fluorid	109
4.3.2	Azeotrope Trocknung des n.c.a. [^{18}F]Fluorids	109
4.3.3	Radiosynthese von Succinimidyl-4- ^{18}F fluorbenzoat ([^{18}F]SFB) und dessen Kopplungsreaktionen	109
4.3.4	Radiosynthese von [^{18}F]FBM	116
4.3.5	Radiosynthese von [^{18}F]FPyME und dessen Kopplungs- reaktionen	118
4.3.6	Analytik der Radiosynthesen und Bestimmung der radioche- mischen Ausbeuten	119
4.3.7	Autoradiographie	120
4.3.8	Amyloid-Färbung mit Kongorot	121
5	Zusammenfassung	123
	Literaturverzeichnis	127
	Abkürzungsverzeichnis	136
	Strukturverzeichnis	141

1 Einleitung

1.1 Radionuklide für medizinische Anwendungen

Radionuklide finden in der Medizin ein breites Anwendungsspektrum über die Arzneimittelentwicklung bis hin zu *in vivo* diagnostischen Untersuchungen und zur inneren Strahlentherapie. Die Auswahl des entsprechenden Nuklids für die genannten Bereiche wird vor allen Dingen durch die Zerfallseigenschaften bestimmt.^[1] Für *in vitro* Untersuchungen werden überwiegend längerlebige, schwache β^- -Strahler eingesetzt, wie ^3H , ^{14}C oder ^{125}I .^[1] Bei Studien am lebenden Organismus hingegen finden kurzlebige Radionuklide Gebrauch, die auch außerhalb des Körpers erfasst und somit für bildgebende Verfahren *in vivo* genutzt werden können. Für diagnostische Anwendungen sollten nur Radionuklide verwendet werden, die keine korpuskulare Strahlung emittieren, da grundsätzlich die Strahlenexposition für den Körper möglichst gering gehalten werden soll.^[1] Dennoch decken Positronenstrahler aufgrund ihres messtechnischen Vorteils durch die Annihilationsstrahlung ein großes Feld der diagnostischen Radionuklide ab. Für therapeutische Zwecke kann zwischen externer und interner Strahlentherapie unterschieden werden. So werden beispielsweise für oberflächliche Tumore stark γ -emittierende Quellen wie ^{60}Co genutzt.^[1] Bei der internen Therapie werden pharmazeutisch geeignete Substanzen mit einem Radionuklid markiert, welches korpuskulare Strahlung mit einem hohem LET-Wert (Linearer-Energie-Transfer) emittiert. Dieser Wert beschreibt wie viel Energie pro Längeneinheit an das durchdrungene Gewebe abgegeben wird. So haben z. B. α -Strahler einen hohen LET-Wert, da das Teilchen auf einer relativ kurzen Wegstrecke seine komplette Energie an die umliegende Materie abgibt.

1 Einleitung

Die Einzelphotonen-Emissionstomographie (engl.: single photon emission computed tomography, SPECT) und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sind bildgebende Verfahren, mit welchen die regionale Erfassung von biochemischen Prozessen in einem lebenden Organismus ermöglicht wird. Bei SPECT-Untersuchungen werden Radionuklide verwendet, die durch Elektroneneinfang oder über einen Isomerenübergang einen stabileren Zustand erreichen und dabei möglichst nur Photonen einer bestimmten Energie aussenden. Die Energie dieser γ -Strahlung sollte mindestens 70 keV betragen, damit die Körperbarriere durchdrungen werden kann. Um aber auch die maximale Zählrohrbeute generell genutzter NaI(Tl)-Detektorkristalle ausnutzen zu können, sollte der Wert andererseits nicht über 250 keV liegen.^[1,2]

Für PET-Untersuchungen werden kurzlebige Positronenstrahler eingesetzt, welche sich in Bezug auf die Linie der β -Stabilität durch ihren Mangel an Neutronen im Kern auszeichnen. Die Umwandlung in einen stabileren Kern verläuft hier entweder über eine Elektroneneinfang-Reaktion oder durch die Emission eines Positrons. Das Positron ist das Antiteilchen des Elektrons. Sobald das Positron seine kinetische Energie durch Stöße und elektromagnetische Wechselwirkung verloren hat, kommt es zu einer Rekombination mit einem Elektron, woraufhin die beiden Teilchen annihilieren. Die dabei frei werdende Energie entspricht der Summe der Ruhmassen der beiden Teilchen (Äquivalenz von Masse und Energie: $e = mc^2 \Rightarrow 2m_e c^2 = 2 \cdot (9,11 \cdot 10^{-31} \text{ kg})c^2 = 1,022 \text{ MeV}$). Die Energie wird in der Regel in Form zweier Photonen unter einem Winkel von nahezu 180° ausgesandt, welche jeweils die Hälfte der Energie (511 keV) mit sich tragen.

Die Koinzidenzmessung dieser diametral korrelierten Vernichtungsquanten kann genutzt werden, um eine gute Lokalisierung der Körperverteilung des Radiotracers mit relativ hoher Ortsauflösung zu erreichen. Weiterhin ist eine Quantifizierung der Radioaktivität möglich, da die Zählrohrbeute eines Koinzidenzzweigs tiefenunabhängig ist und somit über Transmissionsmessungen um Streu- und Absorptionsverluste quantitativ korrigiert werden kann.^[3,4] Darüber hinaus können aufgrund dieser quantitativen Daten bei einer geeigneten Tracer-Kinetik durch Anwendung von entsprechender biomathematischer Modelle wichtige Informationen über physiologische und

1.1 Radionuklide für medizinische Anwendungen

biochemische Ereignisse erhalten werden. Insofern ist die PET der SPECT überlegen und der Nachteil korpuskularer Strahlung wird toleriert.^[1,5]

Bei der Radiomarkierung wird in der Regel zwischen authentischen und analogen Tracern unterschieden. Ein Radiotracer ist eine radioaktiv markierte, körpereigene oder körperfremde Substanz, die nach Einbringung in den lebenden Organismus am Stoffwechsel teilnimmt und durch den Einsatz minimaler Stoffmengen biochemische Gleichgewichte nicht verändert, wodurch Körperfunktionen gestört wären. Es bietet sich dadurch die Möglichkeit physiologische und pharmakologische Funktionen und Abläufe in einem lebenden Organismus nachvollziehen zu können. Markierungen mit isotopen Nukliden stellen authentische Tracer dar, deren (bio-)chemische Eigenschaften im Vergleich zum nicht markierten Molekül unverändert bleiben. Solche Markierungen können z. B. mit Kohlenstoff-11 ($T_{1/2} = 20,38$ min), Stickstoff-13 ($T_{1/2} = 9,96$ min) oder Sauerstoff-15 ($T_{1/2} = 2,03$ min) durchgeführt werden. Die Produktion der drei genannten Radionuklide erfolgt an kleinen Zyklotronen durch protoneninduzierten Kernreaktionen.^[1,5] Analoge Tracer sind mit nicht-isotopen Radionukliden markiert. Zum Beispiel wird Fluor-18 ($T_{1/2} = 109,7$ min) als Analogon für Wasserstoff, Selen-73 ($T_{1/2} = 7,15$ h) für Schwefel und Brom-76 ($T_{1/2} = 16,2$ h) sowie Iod-124 ($T_{1/2} = 4,15$ d) für Methylgruppen eingesetzt. Dabei ist zu beachten, dass die elektronischen und sterischen Eigenschaften der Nuklide die Charakteristik des Moleküls so wenig wie möglich verändern sollten.^[1] Das Generatorkernradionuklid Gallium-68 ($T_{1/2} = 67,63$ min) ist ein weiterer, häufiger genutzter Positronenstrahler für PET-Studien. Das langlebige Mutternuklid dieses Generatorkernradionuklids ist Germanium-68 ($T_{1/2} = 270,8$ d), welches über Hochenergiereaktionen oder über Spallationsprozesse hergestellt wird.^[1] Die Zerfalleigenschaften dieser wichtigsten Positronenstrahler sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Fluor-18 ist besonders attraktiv für PET-Messungen, da es im Vergleich zu anderen Positronenemitter ein Positron mit geringer Energie (635 keV) aussendet (siehe Tabelle 1.1) und daher ortsnah annihiliert. Die Weglänge, die das Positron zurücklegt (≤ 2 mm in Wasser) ist ähnlich der räumlichen Auflösung moderner PET-Kameras.^[6] Seine Halbwertszeit von 109,7 min erlaubt ausgedehntere Synthesen über mehrere

1 Einleitung

Stufen und Messungen über mehrere Stunden, wodurch auch Prozesse beobachtet werden können, die relativ langsam ablaufen. Ein weiterer Vorteil der vergleichsweise langen Halbwertszeit ist, dass mit Fluor-18 markierte Radiopharmaka über größere Entfernungen transportiert werden können.^[6] Die verschiedenen Produktionsrouten von Fluor-18 werden im folgendem Kapitel genauer erörtert.

Tabelle 1.1: Eigenschaften der wichtigsten Positronenemitter für PET-Studien.^[7,8]

Radionuklid	$E_{\beta^+, \max}$ [MeV]	$T_{1/2}$	Darreichungsform
^{11}C	0,96	20,38 min	kovalent gebunden
^{13}N	1,2	9,96 min	als Ammoniak oder kovalent gebunden
^{15}O	1,7	2,03 min	als Wasser, Kohlendioxid oder Kohlenmonoxid
^{18}F	0,64	109,7 min	kovalent gebunden oder als Anion zur Knochenbildung
^{68}Ga	1,9	67,63 min	komplexiert
^{76}Br	3,4	16,2 h	kovalent gebunden
^{124}I	2,1	4,15 d	kovalent gebunden

1.2 Produktion von Fluor-18

Für die Produktion von Fluor-18 sind verschiedene Kernreaktionen am Beschleuniger bekannt. Die am häufigsten genutzten Produktionsrouten sind in Tabelle 1.2 aufgelistet. Die Produktion mit Hilfe der $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion an ^{18}O -angereichertem Wasser ist die effektivste Methode zur Darstellung von Fluor-18 und liefert ^{18}F Fluorid in hohen molaren Aktivitäten ($600 \cdot 10^3 \text{ MBq}/\mu\text{mol}$). Unter optimierten Bedingungen kann ^{18}F Fluorid an Zyklotronen mit geringen Energien ($16 \rightarrow 3 \text{ MeV}$) und relativ kurzen Bestrahlungszeiten mit hohen Ausbeuten ($2,22 \text{ GBq}/\mu\text{Ah}$) erhalten werden.^[9] Nukleophiles ^{18}F Fluorid kann außerdem durch die Bestrahlung von natürlichem Wasser mit ^3He über die Kernreaktion $^{16}\text{O}(^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$ erhalten werden.

1.2 Produktion von Fluor-18

Die maximal beschriebene molare Aktivität von $50 \cdot 10^3$ MBq/ μ mol ist damit ebenfalls ausreichend hoch, jedoch sind die Ausbeuten nur gering (0,26 GBq/ μ Ah) und die benötigte Partikelenergie ($E_{3\text{He}} : 36 \rightarrow 0$) ist vergleichsweise groß.^[9] Die Kernreaktion $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ kann ebenfalls genutzt werden, um $[^{18}\text{F}]$ Fluorid in wässriger Lösung zu erhalten. Dabei kann eine Ausbeute von 0,30 MBq/ μ Ah und eine molare Aktivität von über $370 \cdot 10^3$ MBq/ μ mol erreicht werden.^[10]

Tabelle 1.2: Auswahl von Fluor-18 Produktionsrouten über unterschiedliche Kernreaktionen an verschiedenen Targetmaterialien. ^{nach[9]}

Reaktion	$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	$^{16}\text{O}(^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$	$^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$
Target	H_2^{18}O ^a	H_2O	Ne (200 μ mol F_2) ^b	$^{18}\text{O}_2$, Kr (50 μ mol F_2) ^c
Partikelenergie [MeV]	16 \rightarrow 3	36 \rightarrow 0	14 \rightarrow 0	16 \rightarrow 3
Produktform	$^{18}\text{F}_{\text{aq}}^-$	$^{18}\text{F}_{\text{aq}}^-$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$
Exp. Ausbeute [GBq/ μ Ah]	2.22	0.26	0.40	1.0
mol. Aktivität [MBq/ μ mol]	$\approx 600 \cdot 10^3$	$\approx 50 \cdot 10^3$	≈ 100	≈ 600

^a Ti-Target mit Ti-Fenster

^b Passiviertes Ni-Target

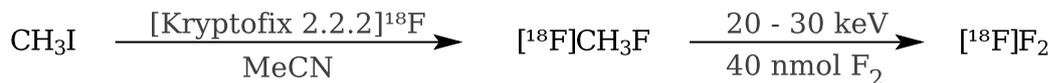
^c zwei Stufen Prozess, Al-Target

Während mit $[^{18}\text{F}]$ Fluorid nukleophile Reaktionen durchgeführt werden, wird für elektrophile Substitutionen im allgemeinen $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ benötigt. Bei den hauptsächlich verwendeten Targetmaterialien zur Produktion von elementaren $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ handelt es sich um ^{20}Ne - und ^{18}O -Gastargets. Die Kernreaktion am ^{18}O -Target liefert höhere Ausbeuten (1,0 GBq/ μ Ah). Die Produktion erfolgt in zwei Bestrahlungsschritten: Für den Aktivierungsschritt wird das Target mit $[^{18}\text{O}]\text{O}_2$ gefüllt und mit Protonen bestrahlt. Das angereicherte Gas wird dann aus dem Target entfernt, während das Fluor-18 an der Targetwand haftet. Anschließend wird für eine Austauschbestrahlung eine Fluor/Krypton-Mischung in das Target gefüllt. Bei einer zweiten Bestrah-

1 Einleitung

lung erfolgt ein Isotopenaustausch zwischen dem inaktiven Fluor und dem an der Targetwand absorbierten radioaktiven $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$.^[11]

Um die molare Aktivität von elektrophilen $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ zu erhöhen, d. h. die Menge des Trägers Fluor-19 zu verringern, kann eine elektrische Entladung an $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$ -methan durchgeführt werden, welches zuvor durch nukleophile Substitution mit ungeträgerten (engl.: no-carrier-added, n.c.a.) $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ an Iodmethan dargestellt worden ist (vgl. Schema 1.1). Molare Aktivitäten von bis zu 30 GBq/ μmol können auf diesem Wege erhalten werden.^[12] Jedoch können anhand dieser Methode nur geringe radiochemische Ausbeuten erhalten werden, was auf die mehrstufige Produktionsroute zurückzuführen ist. Ebenso werden für einige Anwendungen, wie z. B. von Rezeptorliganden, weitaus höhere molare Aktivitäten benötigt.^[9,12]



Schema 1.1: Darstellung von elektrophilem $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ über elektrische Entladung zur Erhöhung der molaren Aktivität.^[12]

Neben der Produktion durch Kernreaktionen an Beschleunigern kann Fluor-18 außerdem an Kernreaktoren durch die konsekutiven Kernreaktionen $^6\text{Li}(n,\alpha)^3\text{H}$ und $^{16}\text{O}(^3\text{H},n)^{18}\text{F}$ hergestellt werden. Diese Methode ist jedoch ineffektiv, da auch nach sehr langen Bestrahlungszeiten nur niedrige Aktivitäten erreicht werden können. Zusätzlich entsteht bei Nutzung dieser Produktionsroute etwa dieselbe Aktivitätsmenge an Tritium, was einer enormen Menge des langlebigen Radionuklids entspricht, die entsorgt werden muss.^[13]

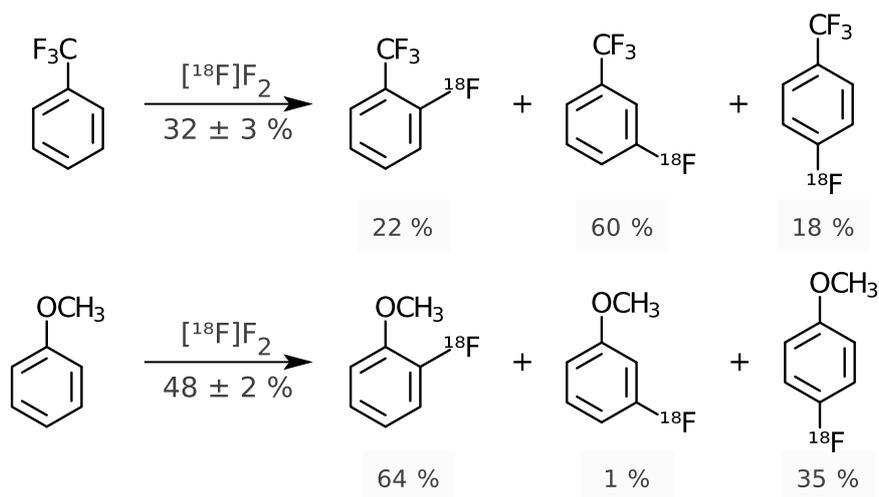
1.3 Markierungsmethoden mit Fluor-18

Wie schon im vorherigen Kapitel erwähnt, kann eine radioaktive Markierung mit Fluor-18 auf verschiedene Wege erfolgen. Abhängig von der vorliegenden Form der $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$ -Spezies, welche wiederum von der gewählten Produktionsroute abhängig ist, können elektrophile und nukleophile Substitutionen durchgeführt werden. Aus-

gehend davon können weitere Aufbausynthesen über verschiedene Zwischenstufen zur gewünschten ^{18}F -markierten Verbindung entwickelt werden.

1.3.1 Elektrophile Substitution

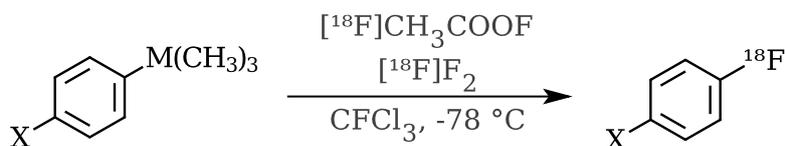
Durch den produktionsbedingten Trägerzusatz (engl.: carrier-added, c.a.) ist die Anwendung der elektrophilen Markierung mit $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ stark eingeschränkt. Das Maximum der radiochemischen Ausbeute (RCA) liegt bei 50 %, die jedoch praktisch nie erreicht wird, da jedes F_2 -Molekül höchstens ein ^{18}F -Atom enthält, wobei auch immer nur ein Atom als Elektrophil wirken kann. Aufgrund der hohen Reaktivität von elementarem Fluor ist dessen Handhabung aufwändig. Alternativ kommen daher weniger reaktive Verbindungen wie Xenondifluorid ($[^{18}\text{F}]\text{XeF}_2$)^[14,15] oder Acetylhypofluorid ($[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{COOF}$)^[16] zum Einsatz. Mit diesen elektrophilen Reagenzien können elektronenreiche Verbindungen wie Alkene oder Aromaten durch Additions- bzw. Substitutionsreaktionen markiert werden. Die hohe Reaktivität führt jedoch bei allen elektrophilen Agenzien zu wenig spezifischen Reaktionen und liefert teilweise viele Nebenprodukte (vgl. Schema ??).



Schema 1.2: Beispiele für die elektrophile Substitution von monosubstituierten Aromaten mit $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$. Angegeben sind die Gesamt- und relativen Ausbeuten an Positionsisomeren.^[9]

1 Einleitung

Daher erfordern Markierungsreaktionen über elektrophile Substitutionen eine intensive Aufarbeitung. Um die Regioselektivität der Fluorierung deutlich zu erhöhen, werden bevorzugt Fluorierungen über Demetallierungsreaktionen angewandt (vgl. Schema 1.3).^[9] Als organometallische Markierungsvorläufer kommen Aryltrimethylzinn-, Aryltrimethylgermanium- oder Aryltrimethylsilizium-Verbindungen in Frage, wobei der Oragnozinn-Rest die besten Ausbeuten liefert.^[9] Auch wenn der Einfluss des dirigierenden Restes im Aromaten durch den Einsatz der Demetallierungsreaktion reduziert werden kann, so können dennoch Positionsisomere beobachtet werden.^[9]



Schema 1.3: Regioselektive ^{18}F -Markierung von Aromaten durch elektrophile Fluor-demetallierung. (M = Sn, Ge, Si; X = OCH₃, CH₃, H, F, CF₃, NO₂)^[17]

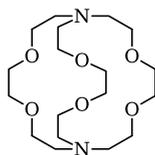
Die traditionelle c.a. elektrophile Substitution kommt z. B. dann in Frage, wenn die Darstellung eines Analogons zu einer endogenen Verbindung (z. B. Aminosäuren) erreicht werden soll, die bereits in hohen Konzentration im Körper vorliegt. Dabei ist es unabdingbar, dass die entsprechende fluorierte Verbindung nicht toxisch ist. So erfolgt beispielsweise die Routine-Produktion von 6- ^{18}F -Fluor-L-DOPA bis heute fast ausschließlich über elektrophile Radiofluorierungen.^[18-20]

1.3.2 Nukleophile Substitution

Die zur Zeit wichtigste Methode zur Darstellung von ^{18}F -markierten Verbindungen ist die nukleophile Substitution mit trägerarmem ^{18}F -Fluorid, welches nach der Produktion in wässriger Lösung vorliegt (vgl. Kapitel 1.2, Tabelle 1.2). Hiermit können Produkte mit hohen spezifischen Aktivitäten dargestellt werden, welche bei den meisten *in vivo* Anwendungen unabdingbar sind. Hohe spezifische Aktivitäten sind aus mehreren Gründen erforderlich: Einerseits sind geringe Massendosen gewünscht (weniger als 1-10 nmol^[6]), um, wie oben schon erwähnt, eine mögliche toxische Wirkung im Organismus zu verhindern, da biochemische Gleichgewichte

nicht beeinflusst werden, andererseits sind hohe spezifische Aktivitäten notwendig, um Reaktionen von nicht-radioaktiv fluorierten Verbindungen einzuschränken. Dies ist z. B. für Rezeptorliganden von großer Bedeutung, wenn diese Verbindungen an Rezeptoren anlagern, die nur in einer sehr geringen Dichte vorliegen. Ein hoher Trägeranteil, d. h. eine niedrige spezifische Aktivität, könnte zu einer hohen Rezeptorbelegung bis hin zur Sättigung führen, bei der nur wenige Liganden radioaktiv markiert sind. Somit wäre es nicht mehr möglich, eine Messung über die Bindung des Radiotracers an diesen Rezeptoren durchzuführen.^[6] Zusätzlich würden in diesem Fall physiologische Reaktionen ausgelöst werden, welche zweifellos ausgeschlossen werden müssen.

Da Fluorid sehr leicht protoniert werden kann, muss das produktionsbedingte vorhandene Wasser entfernt werden. Dies geschieht meist über eine azeotrope Destillation mit Acetonitril. Die anschließende nukleophile Markierung wird in einem aprotischen, polaren Lösungsmittel durchgeführt. Zur Aktivierung des [¹⁸F]Fluorids wird generell der Aminopolyether Kryptofix 2.2.2 (vgl. Schema 1.4) in Kombination mit Kaliumcarbonat oder -oxalat eingesetzt.^[21] In bestimmten Fällen zeigte jedoch Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAOH) zur Aktivierung Vorteile bezüglich der erreichten radiochemischen Ausbeute.^[22]

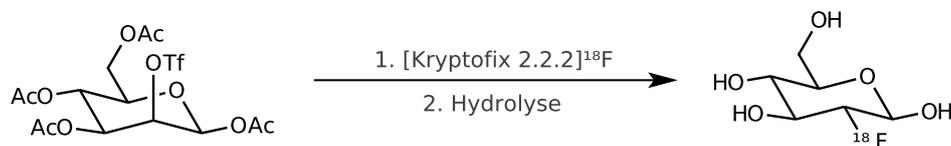


Schema 1.4: Struktur des Aminopolyether Kryptofix 2.2.2.

Die direkte nukleophile ¹⁸F-Fluorierung von aliphatischen Verbindungen in dipolar, aprotischen Lösungsmitteln verläuft nach dem S_N2-Mechanismus unter WALDEN-Umkehr. Die Reaktivität der ¹⁸F-Substitution nimmt demzufolge von primären zu tertiären Kohlenstoffatomen ab. Halogene oder Sulfonsäureester, wie Mesylat, Tosylat oder Triflat, eignen sich als Abgangsgruppen.^[9] Ein wichtiges Beispiel für die ¹⁸F-Markierung über die nukleophile Substitution nach dem S_N2-Mechanismus ist die Darstellung des zur Zeit meist genutzten PET-Tracers 2-[¹⁸F]Fluor-2-desoxy-D-

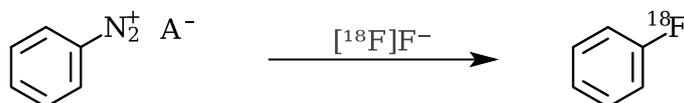
1 Einleitung

glucose (^{18}F]FDG) (vgl. Schema 1.5). Bei dem automatisierten Herstellungsverfahren werden in der Regel über 50 % radiochemische Ausbeute erzielt.^[9]



Schema 1.5: Nukleophile n.c.a. ^{18}F -Fluorierung und anschließende Hydrolyse des acetylierten Mannosetriflats zur Darstellung von ^{18}F]FDG.^[23]

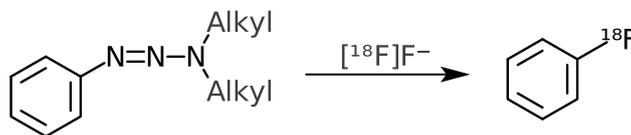
In der klassischen organischen Chemie ist die BALZ-SCHIEMANN Reaktion eine häufig genutzte Methode, um mit Fluor-substituierte aromatische Verbindungen darzustellen. Die Diazotierung mit anschließender thermischer oder photochemischer Zersetzung führt durch die Reaktion mit Fluorid oder BF_4^- -Anionen zu fluorierten Aromaten. Diese Reaktion wurde bei den ersten nukleophilen ^{18}F -Fluorierungsreaktionen mit n.c.a. $^{18}\text{F}]\text{F}^-$ eingesetzt^[24] (vgl. Schema 1.6), jedoch bringt der Mechanismus eine Reihe von Problemen mit sich. Durch die Nutzung von BF_4^- -Anionen als Gegenionen können nur geringe molare Aktivitäten erreicht werden und die maximale radiochemische Ausbeute liegt bei 25 %. Ein weiteres Problem ist, dass für die Darstellung der Diazoniumsalze, im Vergleich zu den geringen Mengen von n.c.a. ^{18}F]Fluorid, große Konzentrationen des Vorläufers benötigt werden. Weiterhin verläuft die Reaktion nach einem $\text{S}_{\text{N},\text{Ar}}1$ oder auch radikalischen Mechanismus. Dies führt dazu, dass viele Nebenreaktionen mit anderen Nukleophilen auftreten.^[20]



Schema 1.6: ^{18}F -Markierung von Aromaten über die Zersetzung von Diazoniumsalzen.^[20]

Die WALLACH-Reaktion bietet einen alternativen Syntheseweg zur Radiomarkierung mit ^{18}F]Fluorid (vgl. Schema 1.7).^[25] Diese Reaktion beruht auf der Spaltung von Aryltriazenen und einem anschließenden nukleophilen Angriff. Die Vorteile gegenüber der BALZ-SCHIEMANN-Reaktion bestehen darin, dass keine fluorierten Ge-

genionen genutzt werden müssen und eine Lagerung der Vorläufer möglich ist. Da das Zwischenprodukt dieser Reaktion ebenfalls ein Arylkation oder -radikal ist, werden aber auch hier zahlreiche Nebenprodukte gebildet.^[20]



Schema 1.7: WALLACH-Reaktion zur ^{18}F -Markierung von Aromaten.^[20]

Die nukleophile aromatische Substitution ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) spielt eine wichtige Rolle für die n.c.a. ^{18}F -Markierungen von Radiopharmaka. Die Reaktion benötigt einen mit mindestens einem elektronenziehenden Substituenten (z. B. NO_2 , CN oder COOR) aktivierten Aromaten in *ortho*- oder *para*-Position zur Abgangsgruppe. Dabei werden bevorzugt Nitrogruppen, Trimethylammoniumsalze oder Halogenide als Nukleofug genutzt.^[9,20] Die Reaktivitäten der genannten Abgangsgruppen sind in Tabelle 1.3 exemplarisch für zwei Reaktionen dargestellt.

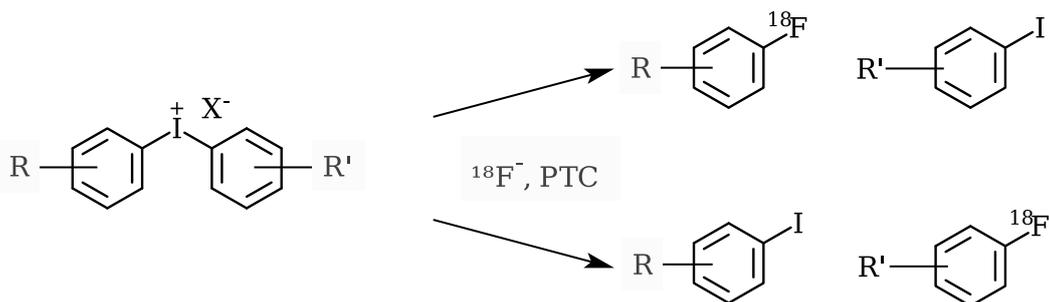
Tabelle 1.3: Radiochemische Ausbeute (in %) der aromatischen Substitution mit $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ in Abhängigkeit von der Abgangsgruppe für zwei aktivierende Substituenten. ^{nach[9]}

Substituent X	Abgangsgruppe Y					
	I	Br	Cl	F	NO_2	NR_3^+Tf^-
CN	-	33	24	70	73	68
NO_2	10	35	70	47	87	-

Diaryliodoniumsalze wurden kürzlich für Radiofluorierungen eingeführt und bieten eine noch effizientere Möglichkeit der nukleophilen Substitution, auch an elektronenreichen Aromaten und stellen daher attraktive Vorläufermoleküle für die ^{18}F -

1 Einleitung

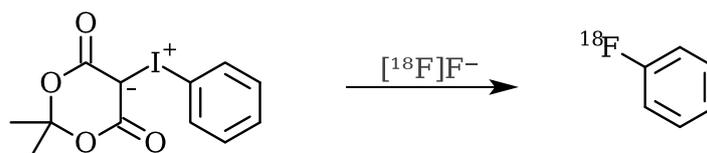
Markierung dar. Die Einführung von n.c.a. [^{18}F]Fluorid in ein symmetrisches Diaryliodoniumsalz führt zu einem ^{18}F -fluoriertem Aromaten und der entsprechenden Iod-Verbindung. Bei unsymmetrischen Verbindungen wird bevorzugt der elektronenärmere Aromat nukleophil angegriffen.^[26] Der Einsatz von Iodoniumsalzen wird dadurch limitiert, dass über diesen Synthesepfad nur kleine radiofluorierten Molekülen erhalten werden können.



Schema 1.8: Nukleophile aromatische ^{18}F -Fluorierung von Diaryliodoniumsalzen.

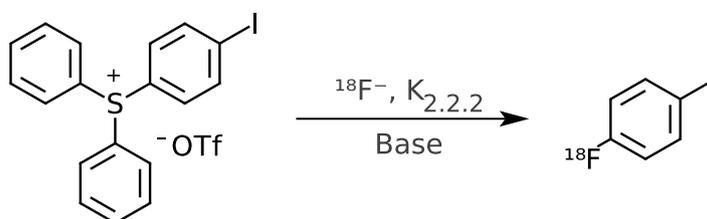
$\text{X}^- = \text{Cl}^-, \text{Br}^-, \text{I}^-, \text{Tos}^-, \text{TfO}^-$; $\text{R}/\text{R}' = \text{H}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{NO}_2, \text{CH}_3, \text{OCH}_3, \text{OR}$.^{nach[20]}

Weitere stabilere Iod(III)-Verbindungen, die zur Radiomarkierung eingesetzt werden können, sind Iodoniumylide.^[27] Diese Verbindungsklasse zeichnet sich dadurch aus, dass die positive Ladung am Iod intramolekular durch eine negative Ladung am Kohlenstoffatom kompensiert wird.^[28] In Schema 1.9 ist ein Beispiel einer solchen Radiofluorierung dargestellt. Der große Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auch komplexere, elektronenreiche Aromaten auf diesen Weg direkt mit Fluor-18 markiert werden können. Dies konnte z. B. von CARDINALE *et al.* am Beispiel der Radiosynthese des Norepinephrin- und Serotonin Transporter 3- bzw. 4-((^{18}F]Fluorophenoxy)phenylmethyl)piperidin (^{18}F]FPPMP) ausgehend von dem entsprechenden Iodoniumylid-Vorläufer mit Ausbeuten bis zu 45 % demonstriert werden.^[29] Durch die Bildung von zahlreichen inaktiven Nebenprodukten sowie von Regioisomeren wird die Aufreinigung des Produkts jedoch erschwert.^[29]



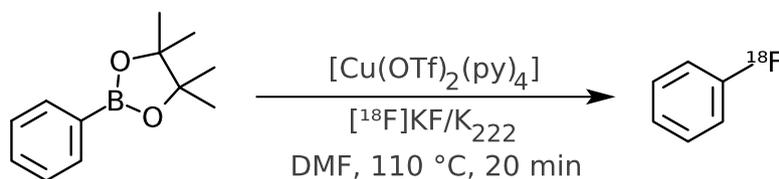
Schema 1.9: ^{18}F -Markierungsreaktion an einem Phenyliodoniumylid der Meldrumsäure. ^{nach}[27]

Von MU *et al.* wurde 2012 eine weitere Radiofluorierungsmethode zur nukleophilen aromatischen Substitution an hypervalenten Triarylsulfoniumsalzen vorgestellt.^[30] Diese Methode ermöglicht es auch, nicht aktivierte Aromaten mit Fluor-18 zu markieren. Ein Beispiel ist in Schema 1.10 dargestellt.



Schema 1.10: Synthese von 4- ^{18}F Fluoriodbenzol über die nukleophile aromatische Substitution eines Triarylsulfoniumsalz. ^{nach}[30]

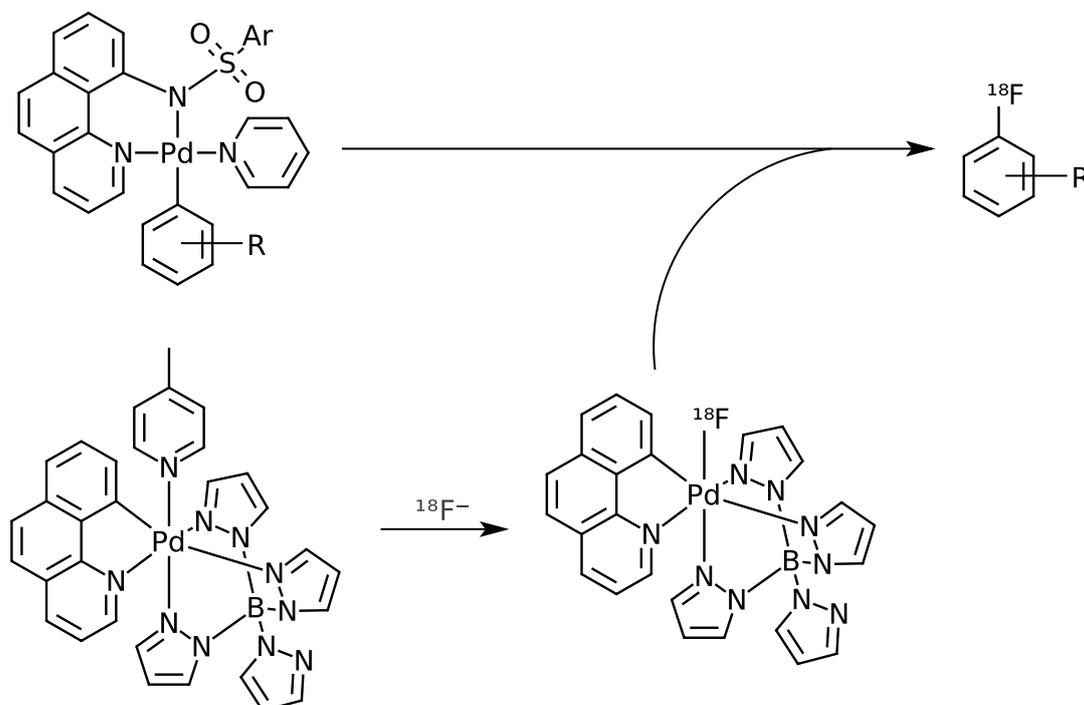
Eine weitere neuere Methode zur ^{18}F -Fluorierung an Aromaten über Boronsäureester wurde vor Kurzem von TREDWELL *et al.* vorgestellt (siehe Schema 1.11).^[31] Einer der größten Vorteile dieser Methode liegt darin, dass zur Aktivierung des Aromaten keine elektronenziehenden Gruppen mehr benötigt werden. Eine Vielzahl von kleinen Aromaten konnten mittels dieser Methode bereits mit guten radiochemischen Ausbeuten markiert werden.^[31]



Schema 1.11: Aromatische Cu(II)-vermittelte ^{18}F -Fluorierung von einem Pinakol-Boronsäureester. ^[31]

1.3.3 Übergangsmetall-vermittelte Reaktionen zur ^{18}F -Fluorierung

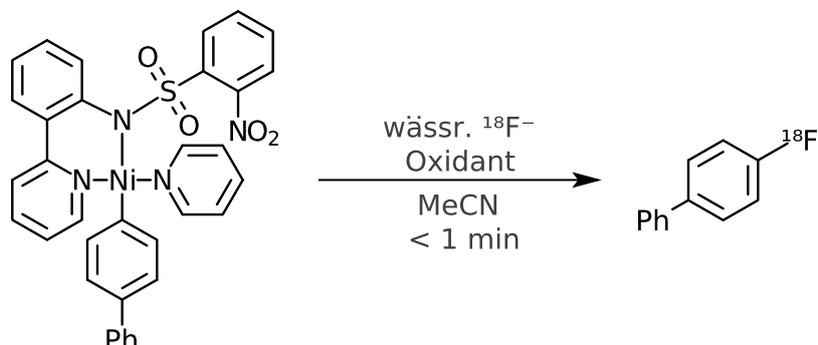
In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Methoden von Übergangsmetall-vermittelte Reaktionen zur Radiofluorierung genau untersucht. Die ersten Ansätze hierfür wurden 2011 von LEE *et al.* über eine Palladium-katalysierte elektrophile ^{18}F -Fluorierung vorgestellt, welche n.c.a. $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ als Startmaterial nutzt (vgl. Schema 1.12).^[32] Ein großer Nachteil dieser Methode liegt in der aufwendigen Synthese der Palladium-Komplexe, die nur unter sehr trockenen Bedingungen stabil sind.



Schema 1.12: Elektrophile Radiofluorierung von Aromaten über ^{18}F -markierte Pd-Komplexe. nach^[32]

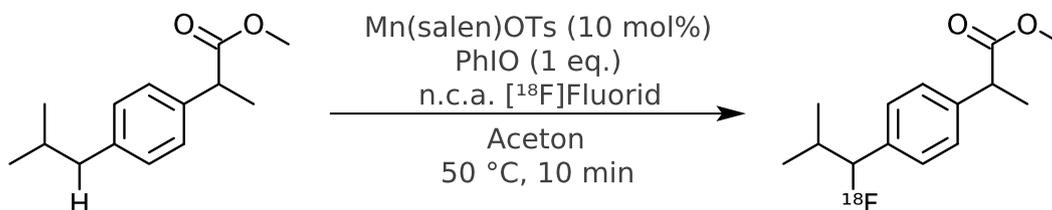
Die Methode wurde ebenso von LEE *et al.* modifiziert, indem weniger empfindliche Nickel-Komplexe entwickelt wurden (vgl. Schema 1.13).^[33] Der Nachteil hier besteht jedoch darin, dass die als Oxidationsmittel eingesetzte hypervalente Iodverbindung

instabil ist und ebenso wie die Pd-Komplexe unter extrem trockenen Bedingungen gehandhabt werden muss.



Schema 1.13: Nickel-vermittelte nukleophile Radiofluorierung zur Darstellung einfacher ^{18}F -markierter Aromaten. ^{nach}[33]

Vor Kurzem wurde von HUANG *et al.* eine Mangan-vermittelte Radiofluorierungsmethode ausgehend von n.c.a. [^{18}F]Fluorid an benzylicher Position berichtet.^[34] Als Katalysator für den Fluortransfer dient ein Mn(salen)OTs-Komplex, welcher eine direkte Markierung ermöglicht. Auf diese Weise konnte z. B. ein Ibuprofen-Ester mit Fluor-18 markiert werden (vgl. Schema 1.14).



Schema 1.14: Aliphatische ^{18}F -Fluorierung an der benzylichen Position eines Ibuprofen-Esters. ^{nach}[34]

Für die Radiofluorierungen von Peptiden und Proteinen spielen die hier vorgestellten Reaktionen an Arenen jedoch nur indirekt eine Rolle. Die meist harschen Reaktionsbedingungen erlauben weder Direktmarkierungen von labilen Biomolekülen noch Reaktionen in wässrigen Milieu, wodurch hier fast ausschließlich indirekte Syntheserouten verfolgt werden müssen. Diese werden in dem folgenden Kapitel genauer erläutert.

1.4 ^{18}F -Markierung von Peptiden und Proteinen

Die Radiomarkierung mit Fluor-18 von Peptiden stellt eine besondere Herausforderung dar. Im Gegensatz zu Fluor zeigt elektrophiles Iod eine hohe Reaktivität mit verschiedenen funktionellen Gruppen, welche in Proteinstrukturen zu finden sind. Dazu zählen in erster Linie der Phenylring des Tyrosins, der Imidazolring des Histamins sowie die Sulfhydryl-Gruppe von Cystein-Resten. Elektrophile Chlorierungen und Bromierungen können meist durch den Einsatz von Katalysatoren direkt auch an nicht aktivierten Aromaten erzielt werden.^[35] Eine direkte elektrophile Radiofluorierung hingegen ist kaum möglich. Von HEBEL *et al.* wurde über eine direkte Markierung mittels ^{18}F Acetylhypofluorid berichtet.^[36] Jedoch führten die Reaktionsbedingungen zur schnellen Oxidation von z. B. Methionin-Resten, was die Anwendbarkeit stark einschränkt. Zusätzlich hat die direkte elektrophile ^{18}F -Fluorierung den bereits beschriebenen Nachteil der produktionsbedingten Trägerzugabe.^[35-37]

Daher wird die Radiofluorierung von Peptiden und Proteinen meist über indirekte Syntheserouten verwirklicht. Das bedeutet, dass das Peptid nicht direkt markiert wird, sondern eine Kopplung mit bereits ^{18}F -markierten Gruppen durchgeführt wird. Solche Gruppen werden in der Radiochemie häufig als „prothetische Gruppen“ bezeichnet, vor allen Dingen solche die über Amine, Thiole oder Hydroxyfunktionen gekoppelt werden. Die Anwendungen dieses ^{18}F -Markierungspfads sind breit gefächert und können mit nahezu allen Molekülen realisiert werden, welche funktionelle Gruppen beinhalten, die eine Kopplung mit prothetischer Gruppen ermöglicht. Obwohl ursprünglich für die Derivatisierung von Peptiden bestimmt, wurde der Begriff der prothetischen Gruppe auch auf die Markierung von monomeren Verbindungen ausgedehnt und folglich ist der Übergang von prothetischen Gruppen zu Synthons fließend.^[9]

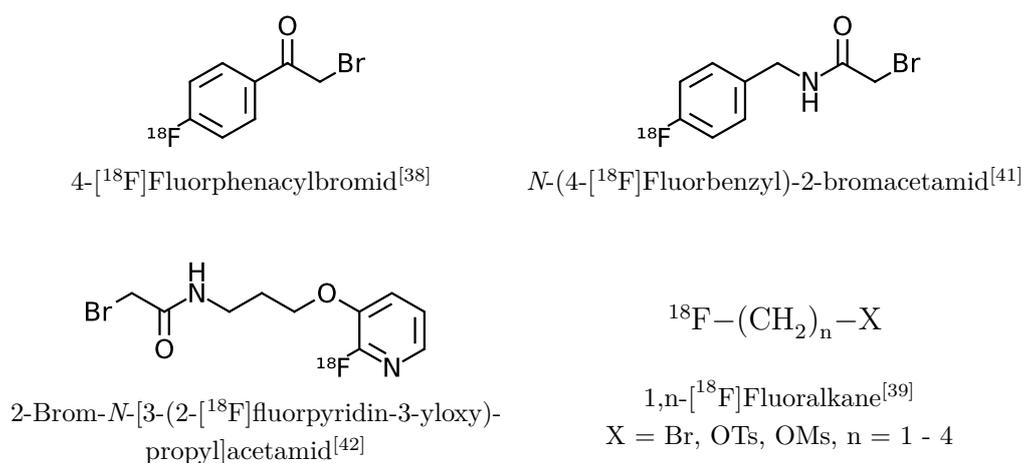
In den folgenden Abschnitten werden zunächst die klassischen prothetischen Gruppen vorgestellt, welche Acylierungs- und Alkylierungsreagenzien sowie thiolreaktive Gruppen umfassen. Weiterhin werden die Markierungsmöglichkeiten über die

sogenannte Click-Chemie erläutert und im Anschluss die neueren und vielversprechenden Möglichkeiten über Organofluorosinyl-Verbindungen und Aluminiumfluorid.

1.4.1 ^{18}F -Markierung mittels prosthetischer Gruppen

Alkylierungsreagenzien

Für die ersten Ansätze zur Radiomarkierung von Peptiden und Proteinen mit Fluor-18 erfolgte über Alkylierungsreagenzien. Nahezu zeitgleich wurden im Jahr 1987 von mehreren Gruppen Reagenzien vorgestellt mit denen eine ^{18}F -Fluoralkylierung an Peptiden erfolgreich durchgeführt wurde. Während KILBOURN *et al.* die dreistufige Synthese von 4- ^{18}F Fluorphenacylbromid präsentierten,^[38] wurde von BLOCK *et al.* über eine nukleophile Substitution von ^{18}F Fluorid an bifunktionalen Alkanen in nur einem Syntheseschritt das Alkylierungsreagenz erhalten.^[39] Obwohl diese Methode für alle Verbindungen die eine H-azide Gruppe beinhalten (wie z. B. Alkohol-, Amino-, Säure- und Thiofunktionen) vielfältig einsetzbar ist, findet diese heute im Gegensatz zu anderen Methoden zur Radiofluorierung von Peptiden allerdings weniger Beachtung.^[40] Nachteil der Alkylierungsreagenzien ist die benötigte hohe Peptid- oder Proteinkonzentration und die lange Reaktionszeit für die Konjugation an das Peptid, welche bis zu 60 Minuten dauern kann. In Schema 1.15 sind die erwähnten mit weiteren Alkylierungsreagenzien dargestellt.^[40]



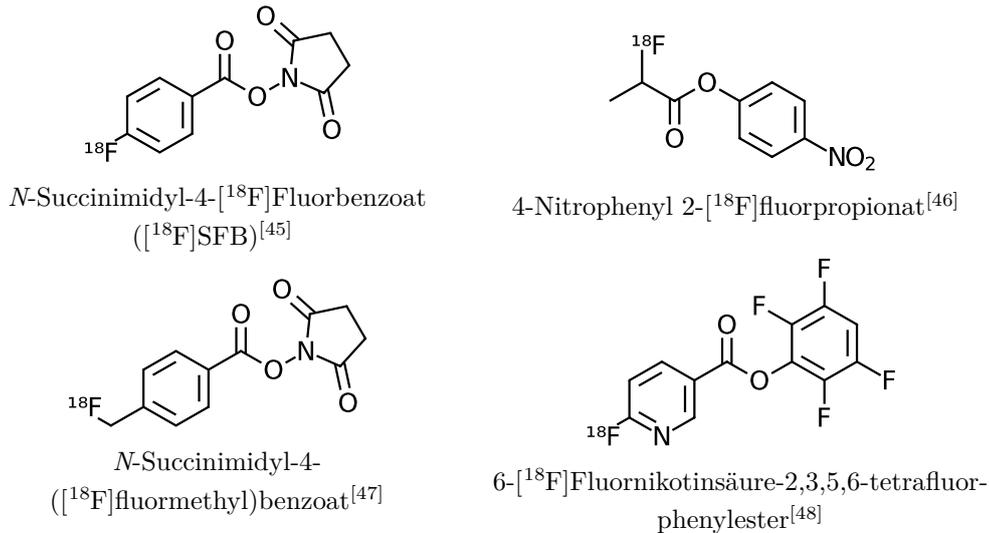
Schema 1.15: Alkylierungsreagenzien zur Radiofluorierung.

Acylierungsreagenzien

Die Ursprünge der Anwendung von aktivierten Estern als Acylierungsreagenzien liegen bei der Radiomarkierung mit anderen Halogeniden. BOLTON und HUNTER berichteten schon 1973 über den Einsatz von ^{125}I -markiertes *N*-Succinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl)propanat, welches als Alternative für die direkten Radioiodierungen von Proteinen eingesetzt werden kann. Die spezifischen Aktivitäten konnten so erhöht werden und es wurde gezeigt, dass die biologische Aktivität der Proteine nicht beeinflusst wird.^[43] Es wurde bisher eine Vielzahl von Proteinen mit dem BOLTON-HUNTER-Reagenz radiomarkiert. Auch eine mit Brom-77 markierte Form konnte zur Markierung genutzt werden, wenn auch mit geringeren radiochemischen Ausbeuten.^[35] Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden eine große Anzahl von weiteren aktivierten Estern zur Radiomarkierung entwickelt, welche sich in der Art der Aktivierung (z. B. Ester von *N*-Hydroxysuccinimid, 2-Chlor-4-nitrophenol oder 2,3,5,5-Tetrafluorphenol) oder in der Wahl des *Linkers* zwischen dem radiomarkierten Aromaten oder dem Ester unterscheiden.^[35]

Die ersten Versuche zur ^{18}F -Acylierung wurden bereits in 1988 durch BLOCK *et al.* über aliphatische [^{18}F]Fluorcarbonylsäureester durchgeführt.^[44] Jedoch wurde für diese Verbindungen hohe Substrat-Konzentrationen benötigt, um eine Konjugation an Amino-Funktionen zu ermöglichen. Von VAIDYANATHAN *et al.* wurde 1992 *N*-Succinimidyl-4- ^{18}F fluorbenzoat ([^{18}F]SFB) eingeführt, welches dem BOLTON-HUNTER-Reagenz ähnelt.^[45] Auch heute noch ist dies das meist genutzte Acylierungsreagenz für ^{18}F -Markierungen an freien Aminen. Der Vorteil von [^{18}F]SFB liegt in der hohen *in vivo* Stabilität der aromatischen C-F Bindung.^[46] Andere Alkylbasierte Systeme, wie 2- ^{18}F Fluorpropanat, zeigen hingegen eine hohe *in vivo* Stabilität bezüglich der Peptid-Konjugation.^[46] Als Alternative zu den aktivierten Estern können auch Säurechloride als Acylierungsmittel eingesetzt werden.^[35] Besitzt ein Peptid mehrere freie Aminofunktionen oder Funktionen ähnlicher Reaktivität sind die genannten Reagenzien weniger geeignet, da das Peptid an verschiedenen Stellen markiert werden könnte. Somit kommt es dann zu einer Produktmischung und auch eventuell zum Verlust der biologischen Aktivität.^[40]

1.4 ^{18}F -Markierung von Peptiden und Proteinen



Schema 1.16: Acylierungsreagenzien für die Radiomarkierung mit Fluor-18.

Der größte Nachteil dieser Fluorierungsreagenzien besteht allerdings darin, dass sie mit wenigen Ausnahmen mindestens drei Synthesestufen und eine aufwendige Reinigung über Hochdruckflüssigkeitschromatographie benötigen, wodurch lange Syntheszeiten entstehen, die bei einer Radiomarkierung mit kurzlebigen Nukliden nicht erwünscht sind.

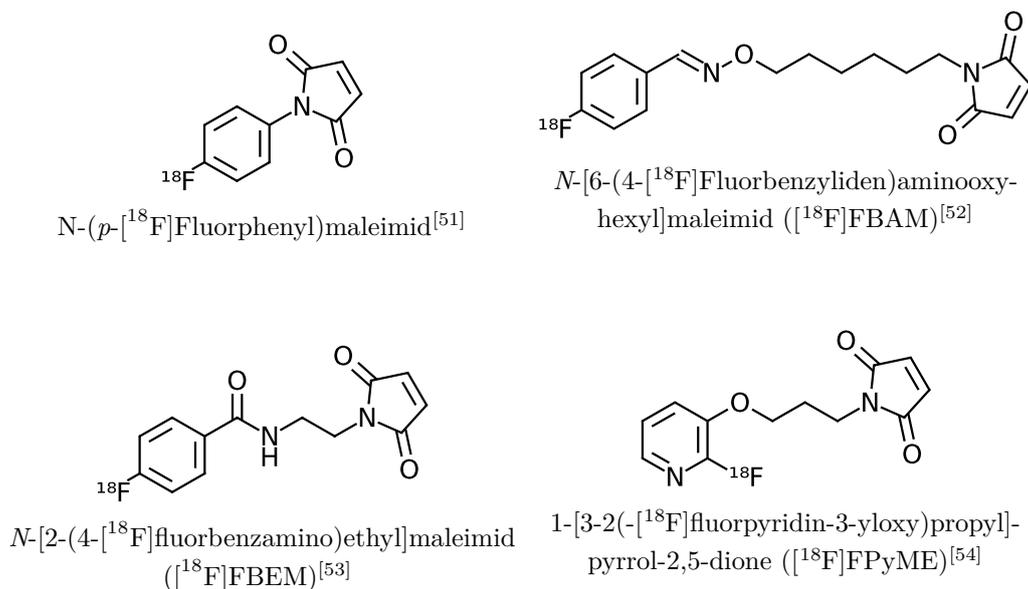
Thiol-reaktive Gruppen

Aufgrund des geringen Anteils von 1,7% von Cystein in natürlichen Peptiden^[40] ist der Einsatz von thiol-reaktiven Gruppen als Alkylierungsreagenz ohne Variation der Verbindungen oft nur bedingt möglich. Jedoch bietet die Radiomarkierung mit diesen prosthetischen Gruppe viele Vorteile, wodurch sie dennoch von besonderer Interesse ist. Zum Einen ist die chemoselektive Reaktion von Thiolen an α,β -ungesättigten Carbonyl-Derivaten (Maleimide) zu stabilen Thioethern sehr effizient und zum Anderen können schon bei sehr geringen Peptid-Konzentrationen ($< 1 \text{ mg/mL}$) und milden Reaktionsbedingungen gute Ausbeuten erzielt werden.^[49]

Als Alternative zur Maleimid-Kopplung kann auch die umgekehrte Strategie genutzt werden, in der ein mit Fluor-18 markiertes Thiol an ein, z. B. chloracetyliertes, Peptid gekoppelt wird.^[50] Zwar können auf diesem Weg auch ausreichend hohe

1 Einleitung

radiochemische Ausbeuten erreicht werden, jedoch werden verglichen mit anderen Reaktionsbedingungen für die Peptidkonjugation, sehr harte Reaktionsbedingungen benötigt ($> 70^\circ\text{C}$, pH 9-10), wodurch diese Methode sich nicht für labile Biomoleküle eignet.^[50]



Schema 1.17: Thiol-reaktive Gruppen zur Radiofluorierung von Peptiden und Proteinen.

1.4.2 ^{18}F -Markierung mittels Click-Chemie

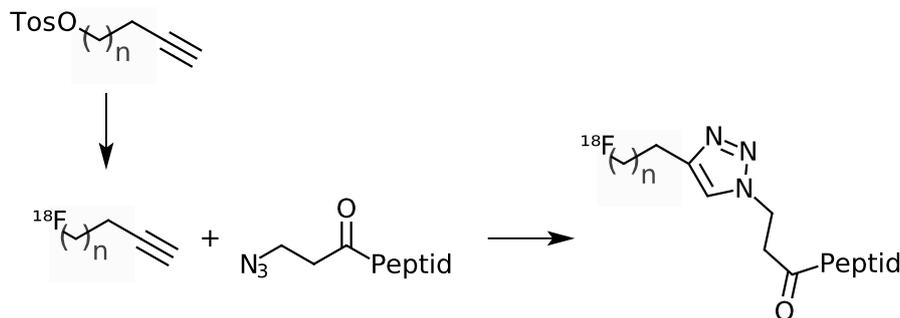
Im Jahr 2001 wurde von KOLB *et al.* ein neuartiges Konzept für organische Synthesen vorgestellt, die sogenannte „Click-Chemie“.^[55] Die charakteristischen Merkmale dieser Reaktionen werden unter den folgenden Kriterien zusammengefasst:

- Hohe Ausbeuten ohne Nebenprodukte (oder nur solche, die ohne chromatographische Verfahren entfernbar sind)
- Stereospezifische Reaktionen (aber nicht zwangsläufig enantioselektiv)
- Einfache Reaktionsbedingungen
 - unempfindlich gegen Wasser und Sauerstoff
 - gute Verfügbarkeit der Edukte
 - keine oder milde Lösungsmittel, welche leicht entfernt werden können
 - einfache Produktisolierung

1.4 ^{18}F -Markierung von Peptiden und Proteinen

Unter den Reaktionen, die diese Kriterien erfüllen können, finden sich z. B. Cycloadditionen und nukleophile Ringöffnungen.^[55] Die wohl bekannteste Click-Reaktion ist die Kupfer(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition, welche auch in den letzten Jahren eine größere Bedeutung als Methode zur Radiofluorierung gewonnen hat.^[40,56] Dies liegt zum Einen an den oben genannten vorteilhaften Eigenschaften, zum Anderen zeigte sich auch, dass der heterozyklische Triazol-Linker *in vivo* stabil und daher besonders interessant für den Einsatz zur Markierung von Biomolekülen ist.^[40]

Die ersten Synthesen und Anwendungen der Click-Chemie in der Radiopharmazie wurden von MARIK und SUTCLIFFE durchgeführt. Diese Arbeit beschreibt den Einsatz verschiedener [^{18}F]Fluoralkyne als Click-Bausteine für mit Aziden funktionalisierten Peptide (siehe Schema 1.18).^[57] In Tabelle 1.4 sind Beispiele für die Radiochemischen Ausbeuten dieses Markierungsansatzes wiedergegeben. GLASER und ÅRSTAD haben nahezu zeitgleich den umgekehrten Ansatz genutzt.^[58] Über den Tosylat-Vorläufer wurde 2- ^{18}F Fluorethylazid hergestellt, welches an einem mit einem terminalen Alkin modifizierten Peptid ebenfalls über die 1,3-dipolare Cycloaddition zur Reaktion gebracht wurde.^[58] Obwohl beide Konzepte ähnlich gute radiochemische Ausbeuten liefern, wird der Ansatz über ^{18}F -markierte Alkine häufiger in der Literatur beschrieben.^[59]



Schema 1.18: Markierung von Peptiden über die 1,3-dipolare Cycloaddition.^[57]

Tabelle 1.4: Click-Reaktionen von ω - ^{18}F Fluoralkinen Azid-funktionalisierten Peptiden. ^{nach}[56]

n ^a	Peptid	Radiochemische Ausbeute [%] ^{b,c}	Radiochemische Reinheit [%]
1	YGGFL	54	95
2	YGGFL	97	98
3	YGGFL	62	99
2	AGDLHVLR-Ebes-Lys	97	81
2	AGDLHVLR	99	86

^a Länge der ω - ^{18}F Fluoralkin-Kette (vgl. Schema 1.18).

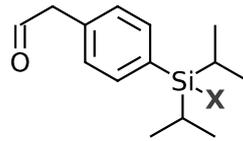
^b Die Durchführung aller Reaktionen erfolgte in einer Mischung aus DMF/Wasser/Acetonitril bei Raumtemperatur für 10 Minuten.

^c Die radiochemische Ausbeute basiert auf ω - ^{18}F Fluoralkinen.

Die Click-Reaktion bietet eine sehr effiziente Methode zur Radiofluorierung von Peptiden. Der Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, dass zunächst eine entsprechende Funktionalisierung des Peptids durchgeführt werden muss.

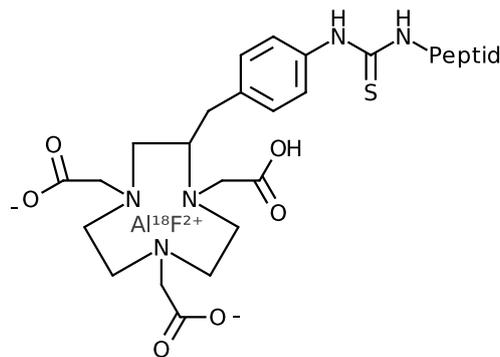
1.4.3 Weitere ^{18}F -Markierungen von Peptiden

Für eine einstufige ^{18}F -Radiomarkierung von Peptiden können auch Siliciumbausteine genutzt werden, welche besonders aufgrund der hohen Silizium-Fluor-Bindungsenergie von 135 kcal/mol (zum Vergleich C-F: 116 kcal/mol) in den letzten Jahren zunehmend an Interesse für die Radiofluorierung von Biomolekülen gewonnen haben.^[60] HÖHNE *et al.* berichteten z. B. über eine direkte, einstufige Radiomarkierung von Bombesin-Derivaten (14 Aminosäuren) an einem Di-*tert*-butylsilyl-Rest (vgl. Schema 1.19).^[61] Allerdings zeigte sich, dass diese relativ große und hydrophobe Gruppe den $\log P$ -Wert auf 1,3 erheblich erhöht (sonst -0.39) und somit auch die Aufnahme in der Galle und Leber.^[61] Daher scheint sich diese Methode eher für die Markierung größerer Biomoleküle zu eignen.^[40]



Schema 1.19: *p*-(Di-*tert*-butylsilyl)benzaldehyd als Baustein für die ^{18}F -Markierung.
 $\text{X} = \text{H}, \text{OH}, \text{F}$ (Abgangsgruppe).

Vor wenigen Jahren haben MCBRIDE *et al.* sich die starke Bindung von Fluorid zu Metallen zu Nutze gemacht, wobei der Al^{18}F -Komplex von einem Chelator, welcher an einem Peptid gebunden ist, komplexiert werden kann. *In vivo* Studien zeigen, dass die Bindung sehr stabil ist, da keine sichtbare Aufnahme von ^{18}F Fluorid in den Knochen zu beobachten ist.^[40,62,63] In Schema 1.20 ist beispielhaft ein Chelatkomplex mit NOTA wiedergegeben.



Schema 1.20: Al^{18}F im NOTA-Chelat komplexiert, welcher am Peptid gebunden ist.^[62]

Diese Methode scheint jedoch wiederum vorzugsweise nur für größere Biomoleküle geeignet zu sein. So zeigte schon die mit $\text{Al}^{18}\text{F}_2^+$ -markierte Verbindung von NOTA-PEG₂₈-A20FMDV2 mit 20 Aminosäuren erhebliche Veränderung in der Pharmakokinetik.^[64]

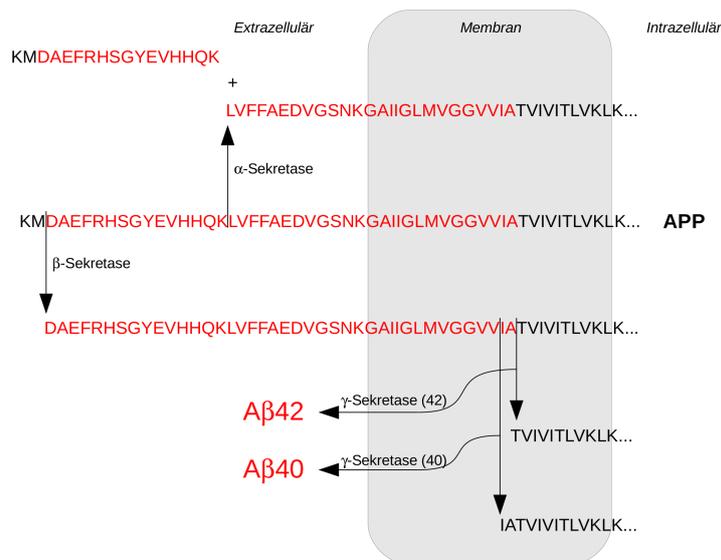
1.5 β -Amyloid-Peptide

Verschiedene neurogenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Huntington und Parkinson stehen in einem Zusammenhang zur Amyloidose. Als Amyloidose wird die

1 Einleitung

Anreicherung von Proteinen, die Amyloide, im Zellzwischenraum bezeichnet, welche in Form kleiner Fasern, den so genannten Fibrillen, vorliegen. Sie sind unlöslich und dazu äußerst stabil gegenüber dem Katabolismus.^[65] Diese abnormalen Ablagerungen wurden als erstes 1906 von ALOIS ALZHEIMER in Zusammenhang mit der Demenz untersucht und beschrieben, welche er als Fasern und Bündeln von Fibrillen bezeichnet und die heute Amyloid-Plaques genannt werden.^[66]

Von diesen Plaques konnten als Hauptkomponente β -Amyloid(A β) Peptide isoliert werden.^[67] Solche Peptide werden aber ebenso bei gesunden Menschen als Metabolit gefunden,^[68] wobei deren normale physiologische Wirkung noch nicht komplett verstanden ist.^[69] Untersuchungen an einem familiären Fall von Alzheimer ergaben, dass scheinbar durch eine Mutation die Bildung des zwei Aminosäure längeren A β 42, gegenüber dem normalen A β 40, bevorzugt stattfindet. A β 42 aggregiert schneller und verursacht dadurch vermutlich einen früheren Beginn der Demenz.^[68,70] Im Allgemeinen bilden sich A β durch den Abbau des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) mittels Proteasen, welche in diesem Fall Sekretasen genannt und in α -, β - und γ -Sekretasen unterteilt werden. Während β - und γ -Sekretasen die Bildung von Amyloiden herbeiführen, verhindert die α -Sekretase die Bildung mittels Spalten der A β -Domäne.^[70] Dieser Zusammenhang ist in Schema 1.21 dargestellt.



Schema 1.21: Schematische Darstellung der Spaltpunkte des APP durch α -, β - und γ -Sekretasen. Die A β -Domäne ist rot markiert. ^{nach^[70]}

1.6 Molekulare Bildgebung von β -Amyloid Plaques

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben sind Bildung und Ablagerung von β -Amyloid ($A\beta$) Plaques und Neurofibrillenbündel im Gehirn die Hauptcharakteristika der Alzheimer-Krankheit.^[71] Bisher beruhen Diagnosen auf der medizinischen Vorgeschichte, wie Gedächtnisverlust und dem Verlust anderer kognitiver Eigenschaften. Eine sichere Diagnose kann erst *post mortem* erfolgen. Diese basiert auf histochemischer Untersuchungen des Hirngewebes verstorbener Patienten, z. B. mittels Kongorot. Daher ist die Entwicklung einer empfindlichen und spezifischen molekularen Sonde, die eine Visualisierung und Diagnose am Patienten *in vivo* ermöglichen könnte, schon seit einigen Jahren ein großes Thema in der Erforschung der Alzheimer-Krankheit.

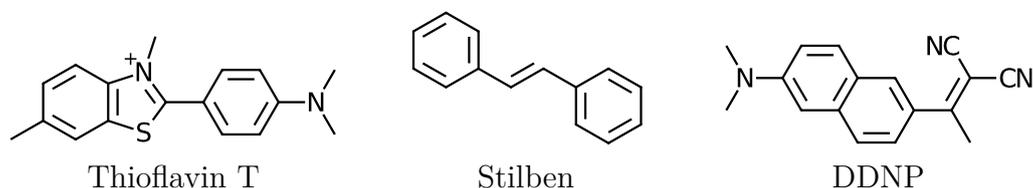
Tabelle 1.5: ^{11}C - und ^{18}F -markierte PET-Liganden für die *in vivo* Bildgebung von Amyloid-Plaques.^[72,73]

Ligand	Grundgerüst
$[^{11}\text{C}]\text{PIB}$	Thioflavin T
$[^{11}\text{C}]\text{BF227}$	Thioflavin T
$[^{11}\text{C}]\text{AZD2184}$	Thioflavin T
$[^{11}\text{C}]\text{SB13}$	Stilben
$[^{18}\text{F}]\text{3'-F-PIB}$	Thioflavin T
$[^{18}\text{F}]\text{BAY94-9172}$	Stilben
$[^{18}\text{F}]\text{FDDNP}$	DDNP

Für die Positronen-Emissions-Tomographie wurden bereits verschiedene kleinere Verbindungen mit Kohlenstoff-11 sowie mit Fluor-18 markiert und am Patienten eingesetzt, welche in Tabelle 1.5 zusammengefasst sind. Die meisten Strukturen stellen Derivate von Thioflavin T dar, welches ein histopathologisches Färbemittel für Amyloid-Plaques ist. Des Weiteren werden Stilben und der Fluoreszenzmarker

1 Einleitung

1,1-Dicyano-2-[6-(dimethylamino)naphthalen-2-yl]propen (DDNP) als Grundgerüste genutzt (Schema 1.22).^[73]



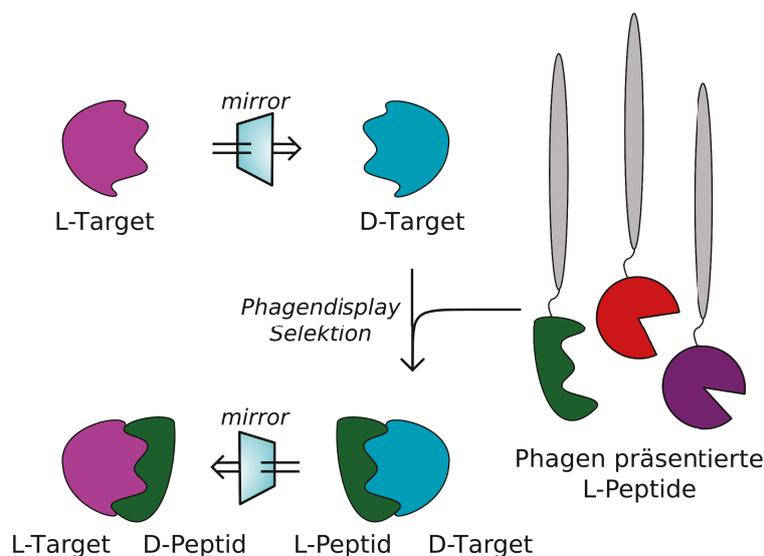
Schema 1.22: Grundgerüste von verschiedenen PET-Liganden zur *in vivo* Bildung von β -Amyloid Plaques.

Die Entwicklung von radiomarkierten Verbindungen, die an Plaques binden, startete jedoch mit der Markierung von Antikörpern und Peptidfragmenten, wobei der Fokus auf *in vitro* Untersuchungen mit Iod-125 und SPECT-Untersuchungen mit Iod-123 und Technetium-99m gelegt wurde.^[74–76] FRIEDLAND *et al.* haben z. B. Antikörper zu A β 28 mit Technetium-99 markiert, wobei der monoklonare Antikörper 10H3 der vielversprechendste war.^[76] Jedoch konnte nach der Verabreichung an Patienten bei der anschließenden SPECT-Untersuchung keine Aufnahme von ^{99m}Tc-10H3 im Gehirn festgestellt werden.^[76] Um die Bluthirnschrankgängigkeit von A β 40 zu erhöhen, nutzten WENGENACK *et al.* mit Putrescin modifizierte A β 40, welche eine höhere Permeabilität als das reine Peptid zeigten.^[77] Mittels der Markierung mit Iod-125 konnte an transgenen *APP/PS* Mäusen gezeigt werden, dass eine Aufnahme des Peptids möglich ist und sich dieses aber nur zu einem geringen Teil an A β anlagert.^[77,78] Eine Markierung der Serum Amyloid P Komponenten mit Iod-123 führte auch nicht zum gewünschten Erfolg, da auch hier keine Bluthirnschrankgängigkeit beobachtet werden konnte.^[78,79]

Vor wenigen Jahren wurde von JAHAN *et al.* verschiedene Derivate des sogenannten all-D Peptids D1 mit Fluor-18 markiert.^[80] Auf diese Peptide und die nachfolgenden Generationen wird im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen. Die Markierung dieser Substanzen war Objekt dieser Arbeit und wird in den Ergebnissen und Diskussionen näher erläutert.

1.7 β -Amyloid-bindende all-D-Peptide

Der Einsatz von Peptiden als diagnostische oder therapeutische Pharmaka wird dadurch eingeschränkt, dass natürliche Peptide im Allgemeinen aus enantiomeren L-Aminosäuren aufgebaut sind und so einem schnellen Katabolismus durch Proteasen unterliegen. Durch den Einsatz von Peptiden, die nur aus enantiomeren D-Aminosäuren aufgebaut sind, kann dieses Problem jedoch umgangen werden. Um einen geeigneten D-Peptidliganden zu erhalten, welcher sich selektiv an $A\beta$ anlagert, wurde von VAN GROEN *et al.* die Methode des Spiegelbildphagendisplays angewandt, dessen Vorgehen und Ergebnisse weiter unten erläutert werden.^[81] Das generelle Prinzip dieses Verfahren wurde als erstes von SCHUMACHER *et al.* beschrieben^[82] und ist in Schema 1.23 wiedergegeben.



Schema 1.23: Schematische Darstellung des Prinzips des Spiegelbildphagendisplays.
nach^[83]

Das „normale“ Phagen-Display ist eine Methode, bei der aus großen Bibliotheken verschiedene Peptide auf Oberflächen von Bakteriophagen präsentiert werden, um passende Bindungspartner für ausgewählte Zielmoleküle zu identifizieren.^[84] Das Spiegelbildphagendisplay wird nun dahingehend erweitert, dass nicht das ursprüngliche Targetmolekül in der Selektion verwendet wird, sondern das Spiegelbild. An

1 Einleitung

diesem Spiegelbild werden nun enantiomere L-Peptide selektiert, welche wiederum gespiegelt werden, um das D-Peptid zu erhalten, welches an das ursprüngliche Zielmolekül bindet.^[82,83]

Tabelle 1.6: Von VAN GROEN *et al.* an A β 42 identifizierte all-D Peptide.^[81]

Peptid	Aminosäuresequenz
D1	QSHYRHISPPQV
D2	GISWQQSHHLVA
D3	RPRLHTHRNR

Für die Identifikation von A β bindenden D-Peptiden wurde A β 42 aus enantiomeren D-Aminosäuren (D-A β) synthetisiert und als Target genutzt. Als Phagenbibliothek wurde eine gewählt, welche Peptidsequenzen aus insgesamt 12 Aminosäuren aufbaut. Theoretisch ergeben sich somit aus den proteinogenen Aminosäuren $2,2 \cdot 10^{16}$ mögliche Peptidaufbauten, jedoch sind über keine verfügbare Phagenbibliothek alle Peptide zugänglich. Die von VAN GROEN *et al.* verwendete Bibliothek kann nur ca. 10^{13} verschiedene Peptide abbilden, was lediglich 0,05 % der Möglichkeiten entspricht.^[81] Die drei identifizierten Peptide D1, D2 und D3 (vgl. Tabelle 1.6) können somit als affin bezeichnet werden, es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die affinste Form gefunden wurde. Zu diesen Peptiden wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen durchgeführt, um die Bindung an A β 42 zu überprüfen. Hierfür wurden diese Peptide mit dem Fluoreszenzmarker FITC markiert. *In vitro* zeigte sich, dass sie sich nicht an diffus verteilten A β anlagern, jedoch an dichteren Ablagerungen (z. B. Plaques), was wahrscheinlich am geringeren Anteil von A β 42 in den diffusen Ablagerungen liegt.^[81] Das Verhalten konnte auch bei *in vivo* Untersuchungen bestätigt werden, bei dem die FITC-markierten Peptide intracerebral verabreicht wurden.^[81] Das Peptid D3 zeigte hierbei besondere Eigenschaften: Neben der Möglichkeit der Visualisierung zeigte sich bei der oralen Verabreichung dieses Peptids an transgene Mäuse, dass die Anzahl der Plaques reduziert werden kann.^[85] Über einen möglichen Mechanismus dieser therapeutischen Wirkung wird zur Zeit jedoch noch diskutiert.^[85,86]

2 Problemstellung

Eine sichere Diagnose der Alzheimer-Krankheit, kann erst *post mortem* erfolgen. Diese beruht auf histochemischen Untersuchungen des Hirngewebes verstorbener Patienten bezüglich Amyloid-Plaques. Daher ist die Entwicklung einer empfindlichen und spezifischen molekularen Sonde wünschenswert, die eine Visualisierung und Diagnose am Patienten *in vivo* ermöglicht. Hierfür bietet sich die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) an. Bisher sind nur wenige Radioliganden für β -Amyloid klinisch evaluiert worden. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Radiomarkierung eines neuen potentiellen Liganden mit dem Positronenstrahler Fluor-18 zu realisieren und mit diesem erste präklinische Untersuchungen durchzuführen. Als zu markierenden Liganden wurde das all-D-Peptid D3 gewählt, welches mittels einer „Spiegelbildphagendisplay-Technik“ an A β 42 identifiziert wurde und aus insgesamt 12 Aminosäuren (RPRTRLHTHRNR) aufgebaut ist.

Da eine Direktmarkierung des Peptids mit Fluor-18 kaum möglich ist, kommt hier der Einsatz von prosthetischen Gruppen in Betracht. Hierfür war zunächst eine Auswahl potentieller Gruppen erforderlich. Da das Peptid sowohl für den Einsatz von Acylierungsreagenzien als auch von thiol-reaktiven Gruppen variiert werden muss, waren für die Kopplung beider Gruppen entsprechende Synthesestrategien zu entwickeln.

Eine ^{18}F -Markierung kann über die Acylierungsreaktion durch den Einsatz der prosthetischen Gruppe Succinimidyl-4- ^{18}F fluorbenzoat erreicht werden. Dies umfasst die Synthese eines entsprechenden Markierungsvorläufers für die mehrstufige Radiosynthese, sowie die Darstellung der nicht-radioaktiven Referenzverbindung. Mit Hilfe der inaktiven Verbindung sollten optimale Reaktionsbedingungen für die

2 Problemstellung

Kopplung an einem um einen Lysin-Rest erweiterten D3-Derivat entwickelt und anschließend auf die Radiosynthese übertragen werden.

Die Anwendung von Maleimiden ermöglicht hingegen die ^{18}F -Markierung über eine Michael-Addition an Sulfhydryl-Gruppen. Diese kann durch eine Erweiterung mit einem Cystein-Rest am D3-Peptid eingeführt werden. Die Darstellung von 4- ^{18}F Fluorbenzmaleimid als auch von 1-[3-(2- ^{18}F Fluorpyridin-3-oxyl)propyl]pyrrol-2,5-dion sind anhand verschiedener mehrstufiger Radiosynthesen möglich. Optimale Reaktionsbedingungen für die Addition dieser Verbindungen an die Thiol-Funktion sollten auch hier durch den Einsatz nicht-radioaktiver Referenzverbindungen ermöglicht werden, wobei diese auf die Radiosynthese übertragbar sein müssen.

Erfolgreich radiomarkierte D3-Derivate sollten abschließend für erste autoradiographische *in vitro* Bindungsstudien eingesetzt werden, um die Affinität an β -Amyloid-Plaques zu untersuchen und Aussagen über ihre potentielle pharmakologische Eignung als Radiodiagnostikum zu machen.

3 Ergebnisse und Diskussion

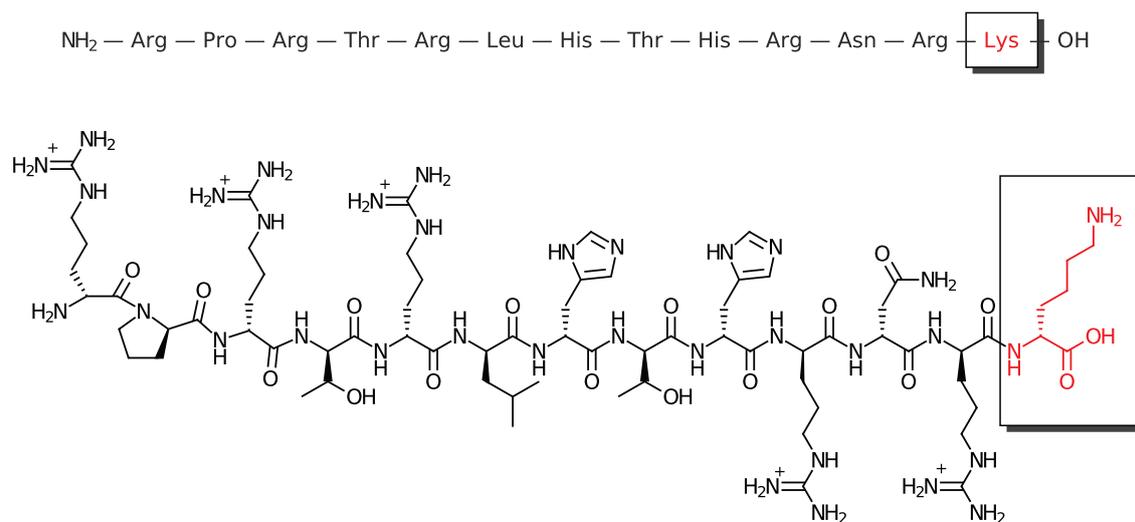
Wie in der Einleitung beschrieben, konnten mittels Spiegelbildphagendisplay sogenannte all-D Peptide identifiziert werden, welche sich selektiv an β -Amyloid-Plaques anlagern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen unternommen, diese Peptide mit Fluor-18 zu markieren, um eine radioaktive Sonde zu entwickeln, welche das Potential besitzt, eine *in vivo* Diagnostik der Plaques mittels Positronen-Emissions-Tomographie zu ermöglichen. Der Fokus lag dabei auf dem vielversprechenden D3-Peptid, für das auch eine therapeutische Wirkung nachgewiesen worden war.^[85] Da eine direkte Radiofluorierung dieses Peptids nicht möglich ist, sollte die Markierung mittels prosthetischer Gruppen erfolgen, wobei zunächst eine Variante über Acylierungsreagenzien angestrebt wurde. Im Anschluss wurden Versuche zu Reaktionen mit thiolreaktiven Gruppen durchgeführt. Des Weiteren wurden die erfolgreich markierten Derivate ersten präklinischen *in vitro* Untersuchungen unterzogen.

3.1 Peptidmarkierungen mit Acylierungsreagenzien

Die ersten Radiomarkierungen von Peptiden wurden mittels sogenannter prosthetischer Gruppen über aktivierte Carbonylster durchgeführt (vgl. Kapitel 1.4.1). Für diesen Reaktionsweg muss das entsprechende Peptid über eine freie Aminofunktion verfügen. Das D3-Peptid verfügt ausschließlich am N-Terminus über eine solche Funktionalität. Diese sollte jedoch möglichst unverändert bleiben, um die pharmakologische Wirksamkeit nicht zu beeinträchtigen. Es kann angenommen werden, dass eine Variation am C-Terminus keine Veränderung der Bindungseigenschaften her-

3 Ergebnisse und Diskussion

vorrufen. Diese Annahme beruht darauf, dass auch die Peptide, welche mit dem Fluoreszenzmarker FITC (Fluoresceinisothiocyanat) am C-Terminus markiert wurden, gute Bindungseigenschaften zeigen.^[81] Somit wurde für die folgenden Untersuchungen das Peptid an dieser Position um eine Lysin(k)-Einheit verlängert (D3-k, vgl. Schema 3.1).

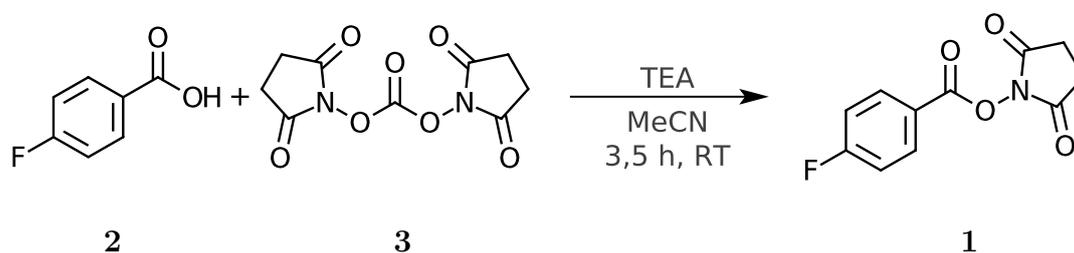


Schema 3.1: Verlängerung der Aminosäuresequenz des D3-Peptids um eine Lysin-Einheit.

Das Acylierungsreagenz Succinimidyl-4-^[18F]fluorbenzoat **1** (^[18F]SFB) stellt die zur Zeit meist genutzte prosthetische Gruppe zur Radiofluorierung von Peptiden dar und wurde daher in der vorliegenden Arbeit zunächst zur Radiomarkierung von D3-k in Betracht gezogen. Zusätzlich wurde dadurch die Möglichkeit gegeben die hier erzielten Ergebnisse besser mit denen von JAHAN *et al.* erzielten Ergebnisse zu vergleichen, welche die Radiofluorierung des D1-Peptids mittels dieser Methode erfolgreich durchgeführt hatten.^[80] Im Folgendem wird auf die Synthese von ^[18F]SFB sowie dessen Markierungsvorläufer und den inaktiven Referenzverbindungen eingegangen. Im Anschluss erfolgt eine Darstellung der Ergebnisse der Kopplungsexperimente mit verschiedenen Lysin-haltigen Verbindungen.

3.1.1 Synthese von SFB und dessen Kopplungsreaktionen

Die Synthese der inaktiven Referenzverbindung **1** erfolgte analog zu der Synthese von JOHNSTRÖM *et al.* und ist in Schema 3.2 dargestellt.^[87] Dabei wurde die entsprechende Carbonsäure **2** mit *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat **3** verestert, wobei **1** mit einer Ausbeute von 36 % erhalten wurde, was nur wenig unter der in der Literatur beschriebenen Ausbeute von 40 % liegt. Das Produkt wurde über Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie eindeutig identifiziert.



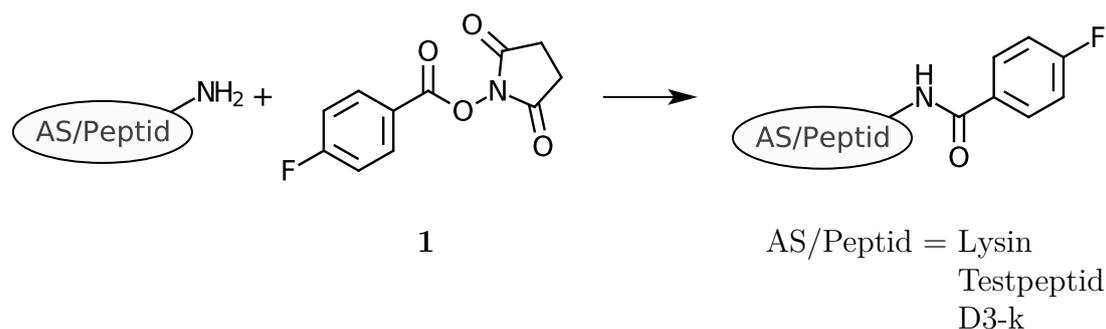
Schema 3.2: Reaktionsschema zur Synthese von SFB ausgehend von 4-Fluorbenzoesäure **2**.

Das so hergestellte SFB wurde für Voruntersuchungen von nicht-radioaktiven Kopplungsreaktionen an freiem Lysin und verschiedenen Peptiden genutzt, um eine prinzipielle Realisierbarkeit der Reaktionen zu demonstrieren. Des Weiteren wurden einerseits die so hergestellten Produkte genutzt, um ein geeignetes analytisches Verfahren zur Identifikation zu entwickeln, und andererseits wurden die optimalen Reaktionsbedingungen untersucht, welche auf eine Radiosynthese übertragbar sind. In Schema 3.3 ist das allgemeine Reaktionsschema für die Kopplung von SFB an einer Aminofunktion wiedergegeben.

Kopplungsreaktionen von SFB

Zunächst wurden die Kopplungsreaktionen von SFB an freiem Lysin untersucht, um allgemeine Reaktionsbedingungen zu ermitteln und diese dann auf die Reaktionen mit Peptiden übertragen zu können. Außerdem wurde mit Hilfe der hier gebildeten Produkte ein analytisches System zur Abtrennung und Identifizierung entwickelt.

3 Ergebnisse und Diskussion



Schema 3.3: Allgemeines Kopplungsschema für die Reaktion von SFB an einer Aminofunktion einer Aminosäure oder eines Peptids.

Beim Einsatz des BOLTON-HUNTER-Reagenz, welches über den selben funktionalisierten Ester an Aminofunktionen koppelt, wurde festgestellt, dass durch die Wahl des pH-Werts entweder die α -(N-Terminus) oder die ϵ -Aminogruppe (Lysin-Rest) bevorzugt reagiert.^[88] Bei pH 8,5 fand die Acylierung bevorzugt am Lysin-Rest statt, es wurde aber immer noch die Bildung einer Produktmischung beobachtet. Dieses Verhalten konnte beim Einsatz von [¹⁸F]SFB durch JOHNSTRÖM *et al.* bestätigt werden, wobei dort sogar ausschließlich die Bildung des an der ϵ -Aminogruppe acylierten Produkts beschrieben wurde.^[87] Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die folgenden vorgestellten Reaktionen zunächst ein Borat/Salzsäure-Puffer mit pH 8,5 gewählt.

Für die Durchführung der Reaktion wurde SFB in möglichst wenig Acetonitril gelöst und im geringen Überschuss (1,2:1) zu den im Puffer gelösten Lysin gegeben, so dass die Gesamtkonzentration 4 $\mu\text{mol/mL}$ betrug. Die Reaktionsmischung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) untersucht. Nach 30 Minuten konnte mittels DC kein freies SFB mehr identifiziert werden. In Abbildung 3.1 ist ein HPLC-Chromatogramm für die Produktlösung dieser Reaktion wiedergegeben. Zur Identifizierung des Produktsignals wurde dieses bei der Retentionszeit von 8,35 Minuten abgetrennt und getrocknet, um den Rückstand anschließend massenspektrometrisch zu untersuchen. Neben der Bildung von zwei unbekanntem Nebenproduk-

3.1 Peptidmarkierungen mit Acylierungsreagenzien

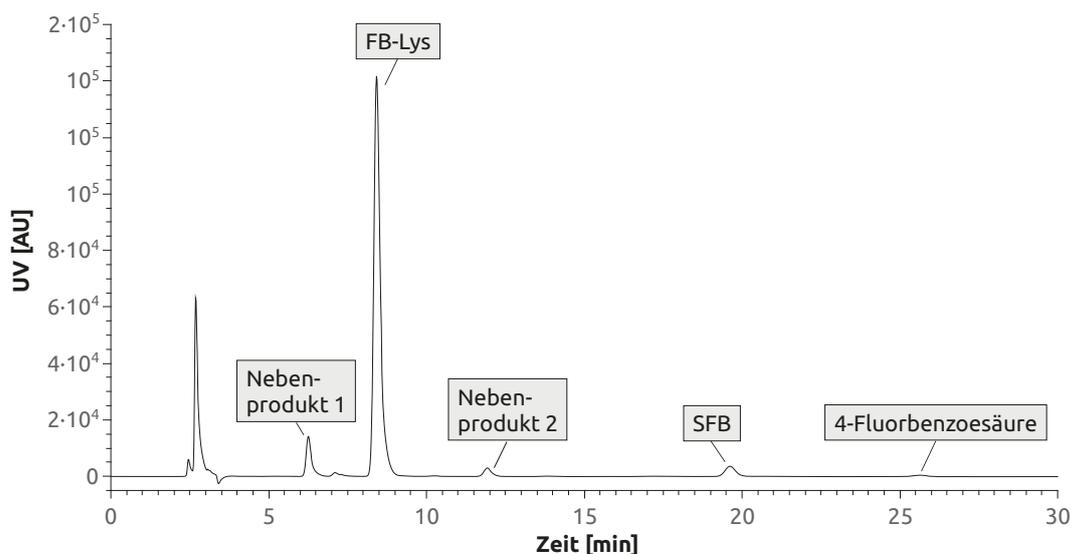


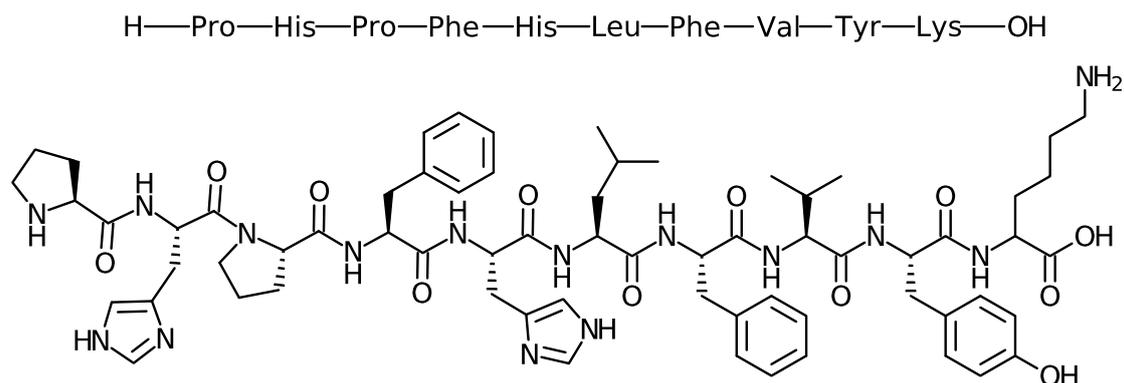
Abbildung 3.1: HPLC-Chromatogramm der Produktlösung der Reaktion von SFB mit Lysin nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten.

Säule: Kromasil 100-5 C18 (250 x 4,6 mm), $\lambda = 230$ nm, 1 mL/min

Laufmittel: Methanol/Wasser + TFA : 40/60 + 0,2 %

ten, konnten ebenso Spuren des Hydrolyseprodukts 4-Fluorbenzoesäure **2** mittels chromatographischen Vergleich mit einem gekauften Standard identifiziert werden. Bei dem Nebenprodukt mit einer Retentionszeit von 6,25 Minuten wurde angenommen, dass es sich dabei um das Kopplungsprodukt von SFB an der α -Aminogruppe des Lysins handelt, da es bei Reaktionen mit anderen Aminen nicht auftrat. Das zweite Nebenprodukt bei 12,0 Minuten konnte nicht identifiziert werden. Es muss sich dabei aber um ein Zersetzungsprodukt von SFB handeln, da dieses auch gebildet wurde, wenn SFB den gleichen Reaktionsbedingungen ohne Kopplungspartner ausgesetzt war. Dieser Peak wurde ebenfalls abgetrennt und massenspektrometrisch untersucht. Sein Hauptsignal wurde bei $[M+H]^+ = 279,1$ gefunden, jedoch konnte dieses Ergebnis keinem vorstellbaren Zersetzungsprodukt zugeordnet werden. Zusätzlich wurde die Reaktion auf ihre Kinetik hin untersucht. Hierfür wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ein Aliquot der Reaktionslösung entnommen und mittels HPLC untersucht. Es wurde festgestellt, dass nach etwa 15 Minuten nur noch ein

3 Ergebnisse und Diskussion



Schema 3.4: Das für die Untersuchungen der Kopplungsreaktionen mit SFB verwendete Testpeptid.

langsamer Anstieg der Ausbeute zu beobachten war. Daher wurde diese Reaktionszeit auch für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

Die Reaktionsbedingungen wurden auf die anschließende Reaktion von SFB mit einem Testpeptid übertragen, wobei lediglich die Konzentration mit $0,1 \mu\text{mol/mL}$ geringer gewählt wurde. Die Struktur des Peptids ist in Schema 3.4 dargestellt. Es wurde ausgewählt, da es eine ähnliche Größe (10 Aminosäuren) wie das D3-k (13 Aminosäuren) besitzt und am C-Terminus eine Lysin-Einheit trägt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass dieses Peptid keine Argininfunktionen besitzt, da Erfahrungswerte zeigen, dass diese Funktion die Kopplung mit SFB einschränken kann.^[89]

Für die Abtrennung des Kopplungsprodukts von dem ursprünglichen Peptid mittels HPLC, musste eine HPLC-Methode über einen einstufigen Gradienten entwickelt werden. Das entsprechende HPLC-Chromatogramm ist in Abbildung 3.2 wiedergegeben. Auch hier wurde der Produktpeak abgetrennt, getrocknet und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Im Gegensatz zu der Reaktion mit Lysin wurde hier innerhalb von 15 Minuten kein vollständiger Verbrauch von SFB festgestellt. Auch nach längeren Reaktionszeiten kam es zu keinem weiterem Anstieg der Ausbeuten. Für die Bestimmung der Ausbeute wurde angenommen, dass das Peptid keine weiteren Reaktionen neben der Bildung des gewünschten Produkts eingeht und somit der Verbrauch des Peptids gleichzeitig die Ausbeute des Kopplungsprodukts

3.1 Peptidmarkierungen mit Acylierungsreagenzien

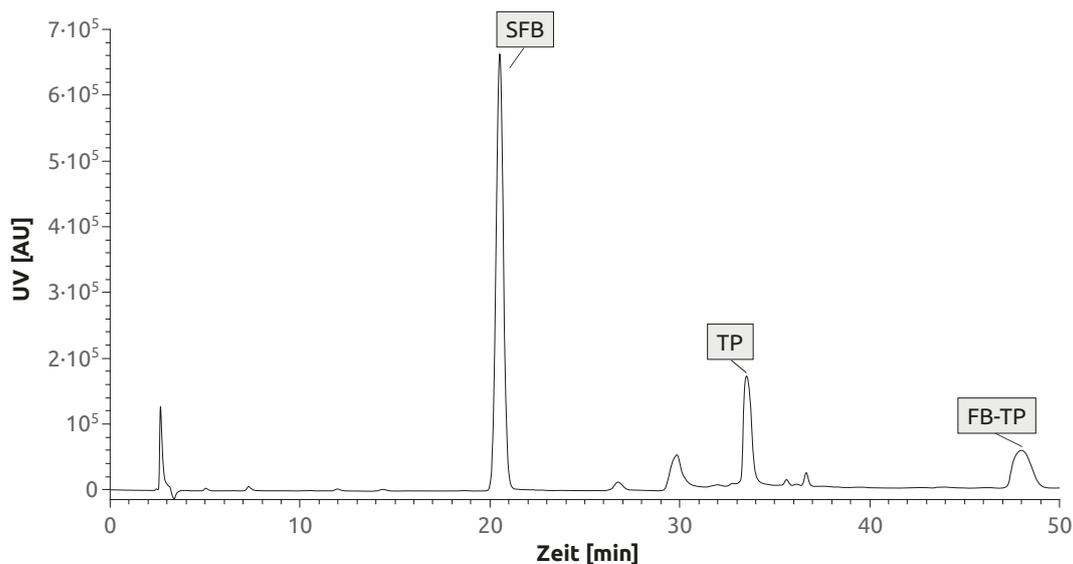


Abbildung 3.2: HPLC-Chromatogramm von der Produktlösung der Kopplungsreaktion von SFB mit TP nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten.

Säule: Kromasil 100-5 C18 (250 x 4,6 mm), $\lambda = 230$ nm, 1 mL/min

Laufmittel: Methanol/Wasser + TFA; 0-20 Minuten: 40/60 + 0,2%,

20-50 Minuten: 60/40 + 0,2%

darstellt. Der Verbrauch des Testpeptids konnte wiederum mittels einer Kalibriergeraden ermittelt werden. Die so bestimmte maximale Ausbeute betrug 63%.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Folgendem versucht, die Kopplung von SFB mit D3-k zu verwirklichen. Die Reaktionsbedingungen wurden wie oben beschrieben bis auf die Peptidkonzentrationen übernommen. Die Gesamtkonzentration von D3-k in der Reaktionslösung betrug $0,67 \mu\text{mol/mL}$. Das Ergebnis der HPLC-Untersuchung ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Das gewünschte Produkt wurde bei einer Retentionszeit von 15,95 Minuten abgetrennt und mittels Massenspektrometrie identifiziert. Das Spektrum zeigt für Peptide charakteristische Signale mit mehrfach geladenen Ionen und ist in Abbildung 3.4 wiedergegeben.

Die relativ kleine Fläche des Produktpeaks im HPLC-Chromatogramm (Abb. 3.3) lässt schon eine geringe Ausbeute vermuten. Ihre Bestimmung konnte bei dieser Reaktion ebenfalls nur indirekt erfolgen. Da das Peptid D3-k selber nur schwach chromophore Gruppen besitzt, konnte für diese Verbindung keine Kalibrationsgerade zur

3 Ergebnisse und Diskussion

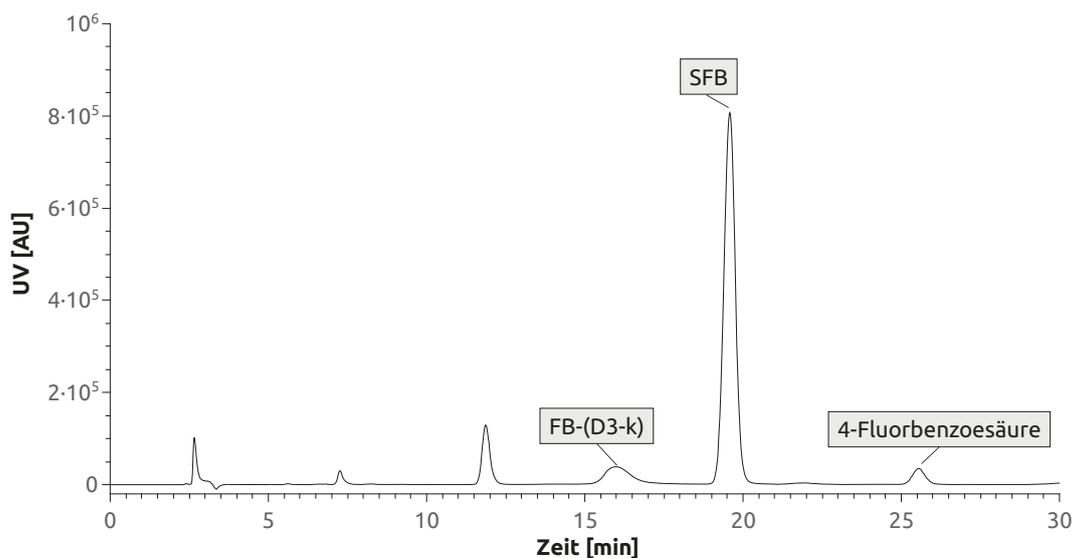


Abbildung 3.3: HPLC-Chromatogramm von der Produktlösung der Kopplungsreaktion von SFB mit D3-k nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten. Säule: Kromasil 100-5 C18 (250 x 4,6 mm), $\lambda = 230$ nm, 1 mL/min Laufmittel: Methanol/Wasser + TFA: 40/60 + 0,2%

Bestimmung des Zusammenhangs von Peakfläche und Konzentration erstellt werden. Daher wurde die Ausbeute nur abgeschätzt, indem angenommen wurde, dass die Kalibrationsgerade von SFB auch für das Kopplungsprodukt gilt, da die UV-Absorption des Produkts alleine durch das gebundene 4-Fluorbenzoat hervorgerufen wird. Bei Raumtemperatur wurde so eine maximale Ausbeute von etwa 3% ermittelt. Zur Verbesserung der Ausbeute wurde zunächst die Reaktionstemperatur auf 30-40°C erhöht, wobei die Ausbeute bis auf 11% anstieg. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur wurde allerdings beobachtet, dass die Ausbeuten wieder sinken.

Die durchgeführten HPLC-Messungen deuten darauf hin, dass bei Temperaturen über 40°C die Bildung der Nebenprodukte stark bevorzugt wird. Zum Einen wird das unbekannte Nebenprodukt bei einer Retentionszeit von 12 Minuten vermehrt gebildet, zum Anderen wird die Hydrolyse des aktivierten Esters stark beschleunigt. Da beides den Verlust von SFB bedingt, steht dieses nicht mehr für Kopplungsreaktionen mit dem Peptid zur Verfügung. Die Durchführung der Reaktion in einem organischen Lösungsmittel unter Zusatz einer Base, sollte die Hydrolyse verhindern.

3.1 Peptidmarkierungen mit Acylierungsreagenzien

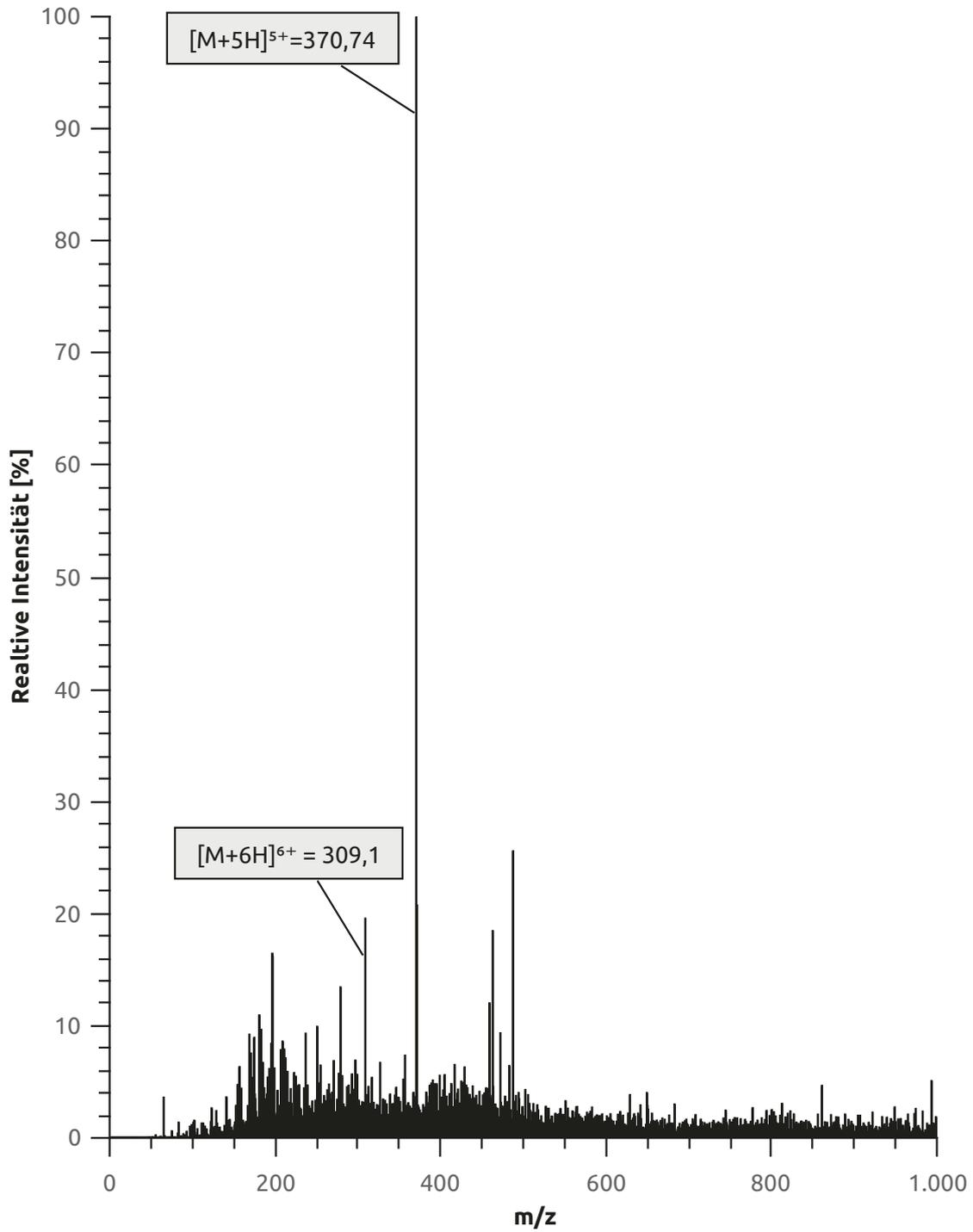


Abbildung 3.4: ESI-MS von dem Kopplungsprodukt FB-(D3-k) ($M = 1849$ g/mol).

3 Ergebnisse und Diskussion

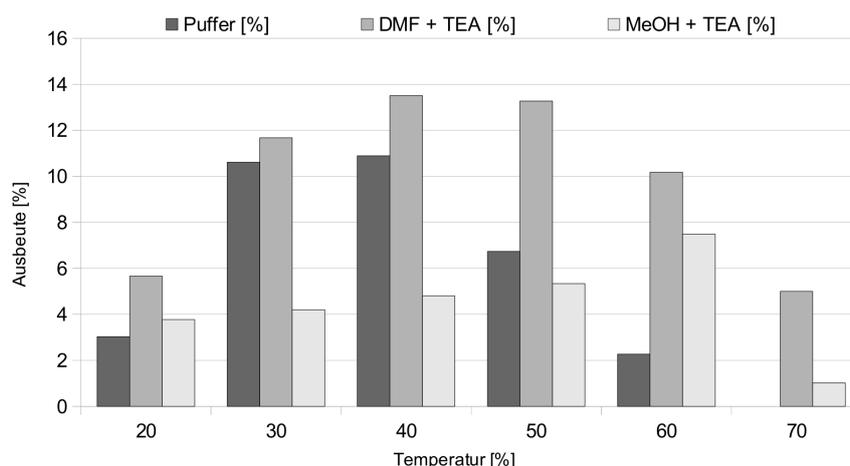


Abbildung 3.5: Abgeschätzte Ausbeuten des Kopplungsprodukts von SFB mit D3-k in unterschiedlichen Lösungsmitteln und bei unterschiedlichen Temperaturen.

Bei der Wahl dieses Reaktionswegs kann jedoch keine Aussage über die Selektivität der reagierenden Aminofunktionen durch die Einstellung des pH-Werts getroffen werden. Es wurde sowohl ein protisch als auch ein aprotisch polares Lösungsmittel gewählt (Methanol und Dimethylformamid(DMF)), welches jeweils mit etwa 1% Triethylamin versetzt wurde. In Methanol wurde die Hydrolyse wie erwartet nicht verhindert, aber deutlich reduziert. Jedoch konnte das Kopplungsprodukt FB-(D3-k) bei 60°C nur mit einer maximalen Ausbeute von etwa 7% erhalten werden. Bessere Ausbeuten wurden mit DMF als Lösungsmittel erzielt. Die Ausbeuten lagen hier zwischen 40 und 50°C aber auch nur bei ca. 13%, obwohl die Hydrolyse fast komplett ausgeschlossen werden konnte. Diese Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 3.5 zusammengefasst.

Zum Verständnis, warum die Ausbeuten deutlich geringer sind, wurden Untersuchungen mit Arginin vorgenommen, welches in großer Zahl in dem D3-Peptid vorkommt und eventuell einen störenden Einfluss auf die Reaktivität haben könnte.^[89] Dazu wurde zunächst untersucht, ob die Guanidin-Funktion des Arginins ebenfalls eine Reaktion mit SFB eingeht. Wurde Arginin unter den oben beschriebenen Bedingungen in Borat/Salzsäure-Puffer (pH 8,5) bei Raumtemperatur mit SFB zur Reak-

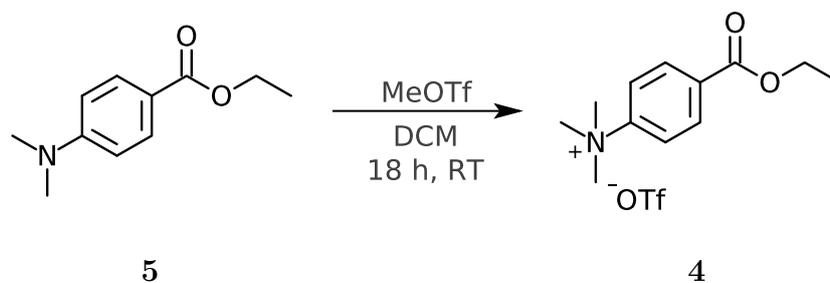
3.1 Peptidmarkierungen mit Acylierungsreagenzien

tion gebracht, wurde massenspektrometrisch nur ein Kopplungsprodukt gefunden. Dabei handelte es sich aber um das Produkt, bei dem SFB an der α -Aminogruppe gebunden ist. Diese Aussage wurde dadurch bestätigt, dass ein an dieser Position Boc-geschütztes Derivat keinerlei Reaktion mit SFB einging.

Daraufhin wurde untersucht, ob die Guanidinfunktionen einen Einfluss auf die Reaktivität des SFBs oder der ϵ -Aminogruppe des Lysins hat. Dafür wurde zunächst eine Versuchsreihe angesetzt, bei der die Ausbeute von FB-Lysin mit zunehmenden Arginin-Anteil (bis zum Verhältnis 1:5, welches im Peptid vorherrscht) untersucht wurde. Es wurde hierbei jedoch kein Zusammenhang festgestellt, da die Ausbeuten innerhalb des Fehlers gleich blieben. Im Anschluss wurde zudem noch untersucht, ob der zunehmende Anteil von Arginin einen Einfluss auf die Zersetzung von SFB in der Puffer-Lösung bewirkt. Dies wurde jedoch auch ausgeschlossen, da der verbliebene Anteil von SFB nach 15 Minuten Reaktionszeit unabhängig von der Arginin-Konzentration unverändert blieb.

3.1.2 Synthese von [^{18}F]SFB und dessen Kopplungsreaktionen

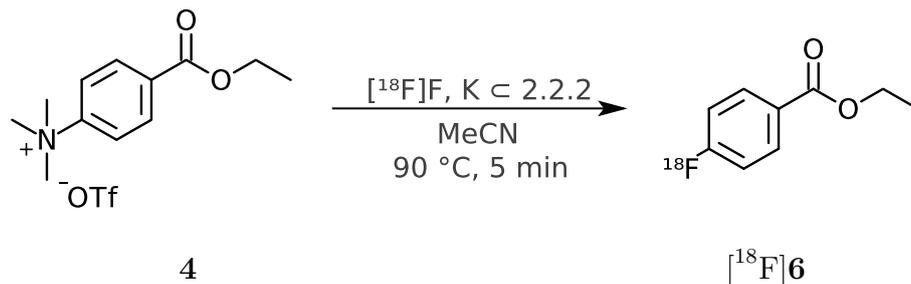
Auf der Basis der im vorherigen Abschnitt erläuterten Ergebnisse wurden die Radiosynthesen zur Darstellung von [^{18}F]FB-(D3-k) geplant und durchgeführt. Zunächst wurde die Synthese des Markierungsvorläufers **4** für die nukleophile Substitution mit [^{18}F]Fluorid durchgeführt. Diese erfolgte analog zu HAKA *et al.* und ist in Schema 3.5 dargestellt, welche die Methylierung zum Trimethylammoniumsalz **4** ausgehend von Ethyl-4-(Dimethylamino)benzoat **5** zeigt.^[90]



Schema 3.5: Synthese des Markierungsvorläufers für die Synthese von [^{18}F]SFB.

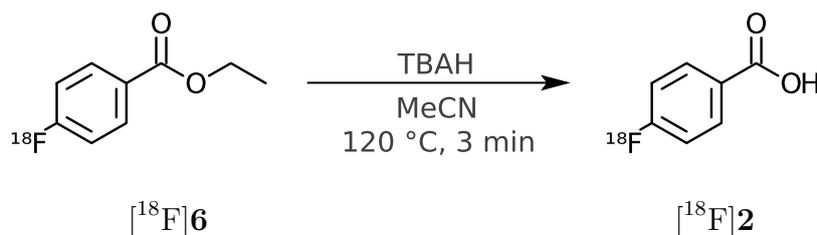
3 Ergebnisse und Diskussion

Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 86 % isoliert und mittels NMR und Massenspektrometrie identifiziert. Die Radiosynthese von [^{18}F]SFB erfolgte ausgehend von dem so synthetisierten Vorläufer **4** über eine dreistufige Syntheseroute nach JOHNSTRÖM *et al.*^[87] Der erste Schritt beinhaltete die nukleophile Substitution mit getrocknetem [^{18}F]Fluorid, wobei das Carbonat/Kryptofix[®]-Aktivatorsystem in Acetonitril genutzt wurde und ist in Schema 3.6 wiedergegeben.



Schema 3.6: Nukleophile Radiofluorierung von **4** zu Ethyl-4-[^{18}F]fluorbenzoat [^{18}F]**6**.

Anschließend folgte die Hydrolyse zur 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure ([^{18}F]**2**). Diese wurde mit quantitativen Ausbeuten durch die Zugabe von Trimethylammoniumhydroxid durchgeführt (vgl. Schema 3.7).

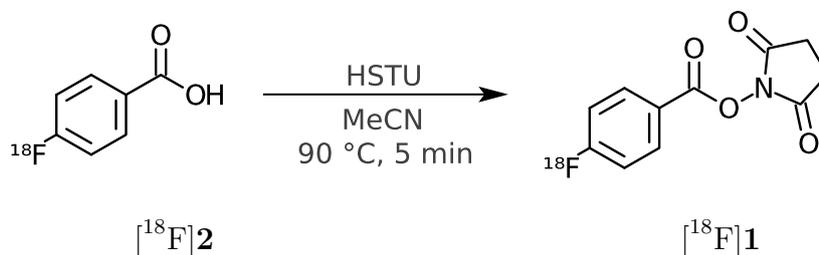


Schema 3.7: Basische Hydrolyse von Ethyl-4-[^{18}F]fluorbenzoat [^{18}F]**6** zu 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure [^{18}F]**2**.

Nach Trocknung des Zwischenprodukts erfolgte die Bildung des Succinimidylesters durch Zugabe von *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(*N*-succinimidyl)uroniumhexafluorphosphat (HSTU) (vgl. Schema 3.8). Die anschließende Reinigung erfolgte entweder über Festphasenextraktion oder HPLC. Die gesamte Synthesedauer betrug,

3.1 Peptidmarkierungen mit Acylierungsreagenzien

inklusive der Trocknung des [^{18}F]Fluorids, je nach anschließender Aufreinigungsmethode, 45 bis 70 Minuten. Die radiochemische Gesamtausbeute lag nach der Reinigung zwischen 41 und 60 %.



Schema 3.8: Veresterung von 4-[^{18}F]Fluorbenzoesäure mittels HSTU zum Koppelungsreagenz, dem Succinimidylester [^{18}F]1.

Für die Radiomarkierung mit [^{18}F]SFB wurden zunächst die Bedingungen aus den nicht-radioaktiven analogen Reaktionen übernommen. Die Reinigung des [^{18}F]SFB nach der Synthese beschränkte sich zunächst auf eine Festphasenextraktion (engl.: Solid Phase Extraktion, SPE). Bei Raumtemperatur konnte für die Kopplungsreaktion an Lysin nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten eine radiochemische Ausbeute von rund 28 % erhalten werden. Wurde die Reaktion in DMF mit 1 % Triethylamin durchgeführt, wurden jedoch Ausbeuten von bis zu 62 % erzielt. Die Gesamtkonzentration des Lysins betrug dabei jeweils 2,8 $\mu\text{mol}/\text{mL}$.

Die Reaktionen wurden ebenso für das Testpeptid wiederholt. Dabei wurde festgestellt, dass in wässriger Pufferlösung eine Produktbildung erst ab einer Konzentration von 3,9 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ beobachtet werden konnte. Die Ausbeuten wurden aber durch den Einsatz von DMF als Lösungsmittel deutlich verbessert. Hier war schon eine Konzentration von 0,39 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ausreichend, um Spuren des gewünschten Produkts zu bilden. Bei einer Erhöhung der Konzentration um das Zehnfache wurde die Ausbeute auf 50 % erhöht. Die gleichen Reaktionsbedingungen wurden auf die Kopplungsreaktion von [^{18}F]SFB mit D3-k zu übertragen. Dabei wurden Peptidkonzentrationen von 0,14 – 2,98 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ in verschiedenen Lösungsmitteln (Borat/Salzsäure-Puffer, DMF und Methanol mit jeweils 1 % Triethylamin) genutzt. Es kam jedoch

3 Ergebnisse und Diskussion

nicht zu einer Reaktion zwischen den beiden Komponenten. Diese Ergebnisse sind in in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

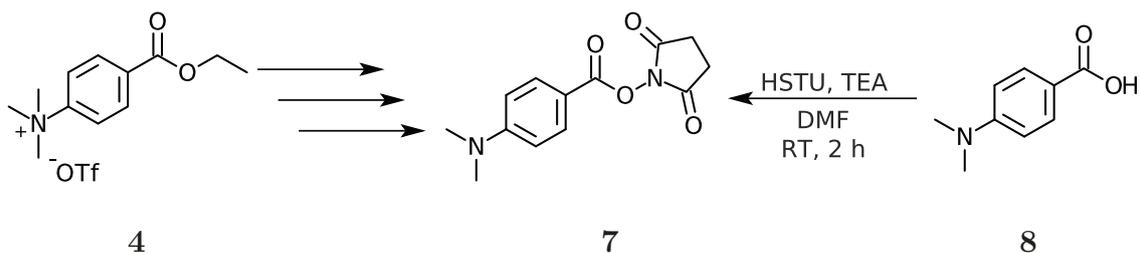
Tabelle 3.1: Maximale Ausbeuten der Kopplungsreaktionen zwischen [^{18}F]SFB und Lysin, TP oder D3-k bei Raumtemperatur und einer Reaktionszeit von 15 Minuten.

Aminosäure/Peptid	Konzentration [$\mu\text{mol/mL}$]	Lösungsmittel	RCA [%]
Lysin	2,8	Puffer (pH 8,5)	28
	2,8	DMF + TEA	62
TP	3,9	Puffer (pH 8,5)	<5
	0,4	DMF + TEA	<5
	3,9	DMF + TEA	50
D3-k	0,14 – 2,98	Puffer (pH 8,5)	0
	0,14 – 2,98	DMF + TEA	0

Zusätzlich zur Variation des Lösungsmittels und der Konzentrationen der Acylierungsreaktion, wurde auch die Reinigungsmethode mittels Festphasenextraktion variiert. Da dies nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde untersucht, welche möglichen Nebenreaktionen stattfinden, um diese gezielt vermeiden zu können. Es wurde festgestellt, dass sich aus dem Vorläufer **4** neben dem gewünschten Markierungsprodukt auch zusätzlich die entsprechende Dimethylamino-Verbindung bildet, welche sich im weiteren Syntheseverlauf analog zu dem Succinimidylester **7** umsetzt (vgl. Schema 3.9). Über eine einfache Reinigung mittels SPE konnte dieses Nebenprodukt nicht abtrennt werden. Während diese Verbindung die Reaktion von SFB mit Lysin und dem Testpeptid scheinbar nicht beeinflusste, kann es möglich sein, dass eine Kopplung von **7** mit D3-k bevorzugt stattfand, welches dann nicht mehr für die Reaktion mit [^{18}F]SFB zur Verfügung stand.

Die Reaktionen an D3-k wurden fortan nur mit HPLC-gereinigtem [^{18}F]SFB durchgeführt, um den Einfluss dieser Nebenreaktion ausschließen zu können. Jedoch führten auch diese Versuche nicht zur Bildung des gewünschten radiomarkierten Produkts. Um die Reaktionswahrscheinlichkeit von [^{18}F]SFB zu erhöhen, wurde die

3.1 Peptidmarkierungen mit Acylierungsreagenzien



Schema 3.9: Bei der Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ bildet sich ebenfalls die entsprechende Dimethylamino-Verbindung.

Reaktionslösung mit nicht radioaktivem SFB versetzt. 60 nmol Trägermaterial wurden mit $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ gemischt und zu dem in DMF gelösten D3-k ($c = 2,98 \mu\text{mol}/\text{mL}$) gegeben. Zwar kam es in einzelnen, Versuchen zu einer scheinbaren Produktbildung (siehe HPLC-Chromatogramm der Versuchslösung in Abbildung 3.6), jedoch wurden weitergehende Versuche aufgrund einer sehr unzuverlässigen Produktbildung verworfen.

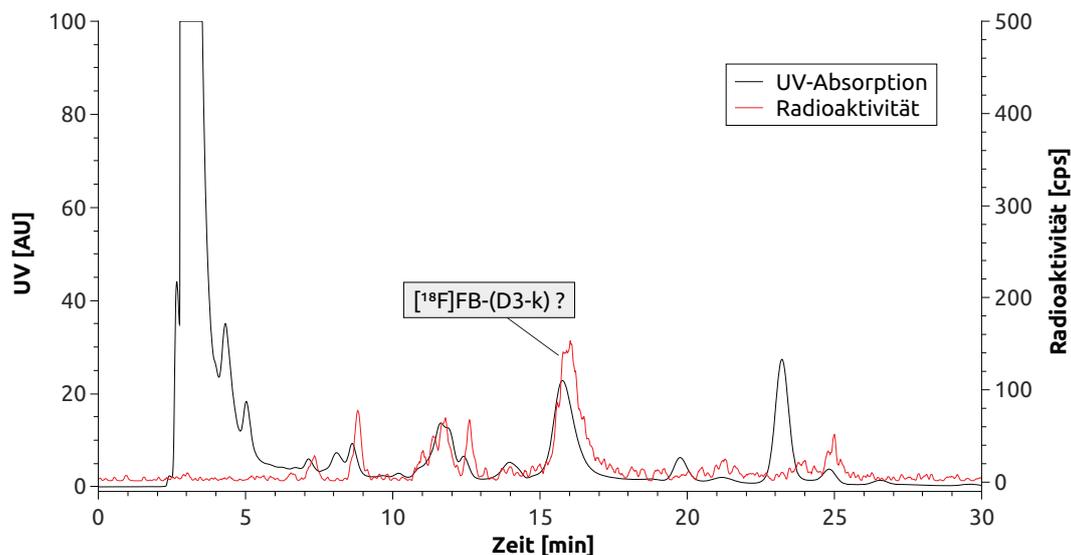
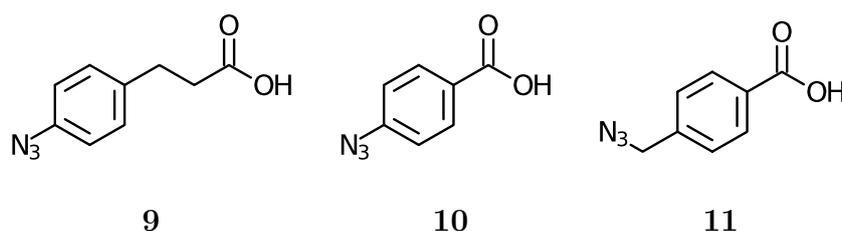


Abbildung 3.6: HPLC-Chromatogramm der Produktlösung eines Versuches bei der sich scheinbar das Kopplungsprodukt $[^{18}\text{F}]\text{FB}-(\text{D3-k})$ gebildet hat. Zur besseren Ansicht ist der UV-Kanal nur bis 100 AU abgebildet. Säule: Kromasil 100-5 C18 (250 x 4,6 mm), $\lambda = 230 \text{ nm}$, 1 mL/min Laufmittel: Methanol/Wasser + TFA: 40/60 + 0,2%

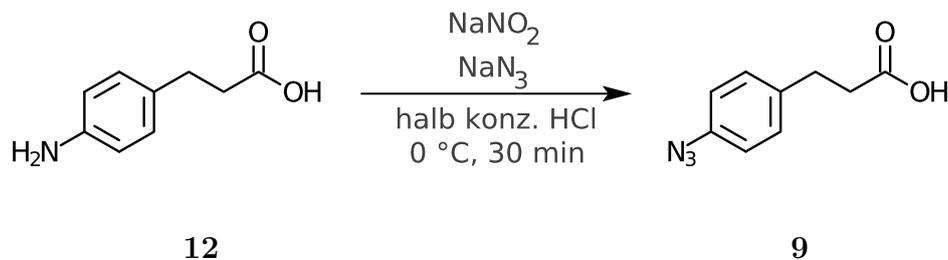
3.1.3 Reaktionen von anderen Succinimidylestern zur Funktionalisierung von Peptiden

Als alternatives Konzept wurde versucht das D3-k Peptid mit anderen Succinimidylestern zu funktionalisieren, um eine Click-Reaktion an diesem Peptid zu ermöglichen. Dafür wurden drei verschiedene Carbonsäuren ausgesucht, die eine Azidfunktion beinhalten (vgl. Schema 3.10). Des Weiteren wurden die Gruppen so gewählt, dass sie in einem geeigneten Wellenlängenbereich absorbieren, da das D3-k Peptid selbst nur schwer detektierbar ist, welches ein Absorptionsmaximum bei 196 nm besitzt. In diesem Wellenlängenbereich waren Messungen mittels HPLC aber nur schwer möglich, da durch den Zusatz von TFA zum Laufmittel die Detektionsgrenze bereits erreicht war. Durch das Einbringen einer aromatischen Funktion wurde somit der Aufbau eines analytischen chromatographischen Verfahrens vereinfacht.



Schema 3.10: Mögliche Carbonsäuren zur Funktionalisierung des Peptids D3-k.

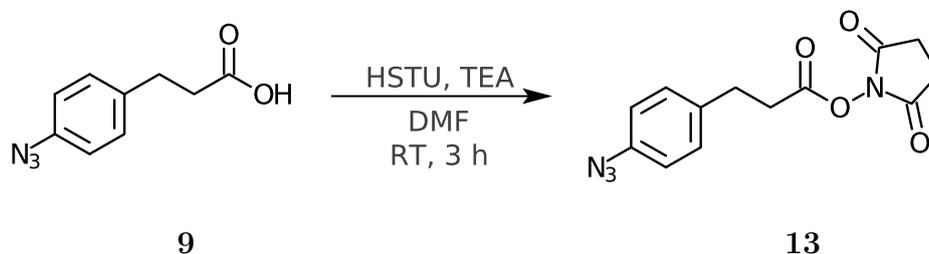
Die Synthese von **9** erfolgte durch Transformation einer Aminogruppe in ein Azid und ist in Schema 3.11 abgebildet. Sie wurde ähnlich der Reaktion von WALPOLE *et al.* durchgeführt^[105] und das Produkt wurde mittels NMR-Spektroskopie identifiziert und mit einer Ausbeute von 52 % erhalten.



Schema 3.11: Darstellung des Azids **9** aus dem entsprechendem Amin **12**.

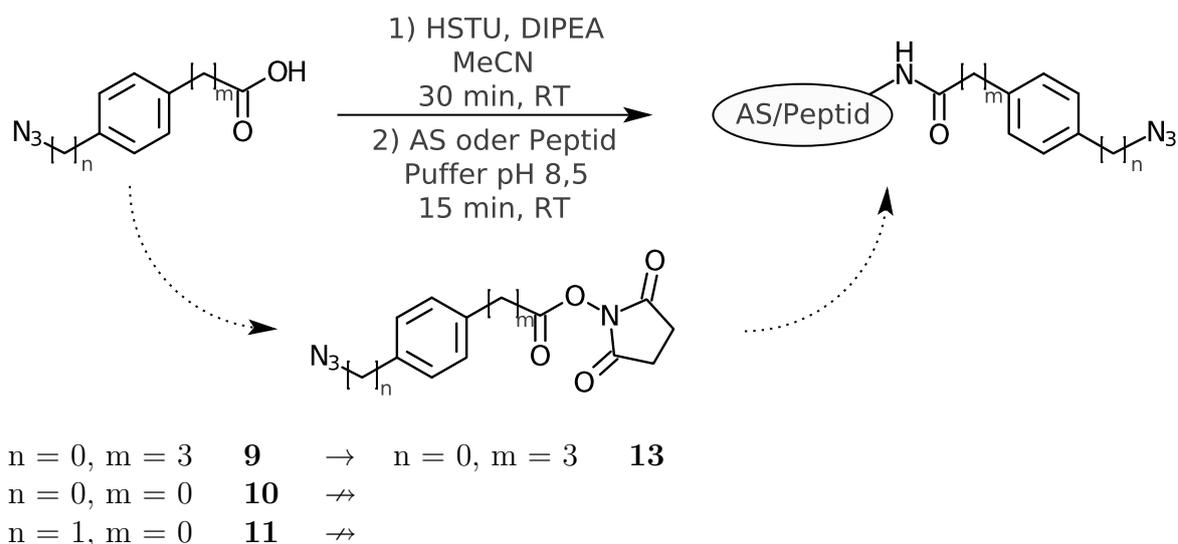
3.1 Peptidmarkierungen mit Acylierungsreagenzien

Der Succinimidylester von **9** wurde über eine literaturbekannte Synthese^[91] analog zu der Synthese von **7** durchgeführt, wie in Schema 3.12 dargestellt ist. Das Produkt wurde mit 61 % Ausbeute erhalten und mittels NMR-Spektroskopie identifiziert.



Schema 3.12: Synthese des Succinimidylesters **13** aus der entsprechenden Carbonsäure **9**.

Der aktivierte Ester wurde im Folgendem erfolgreich mit Lysin umgesetzt. Dazu wurde der Ester **13** im leichtem Überschuss zu einer Lysin-Lösung (1,2:1) in Borat/Salzsäure-Puffer (pH 8,5) gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur reagieren lassen. Alternativ wurde der Succinimidylester auch *in situ* hergestellt (vgl. Schema 3.13)^[92] Hierfür wird die Carbonsäure in Acetonitril gelöst und mit einem Überschuss HSTU sowie 5 % *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) versetzt.



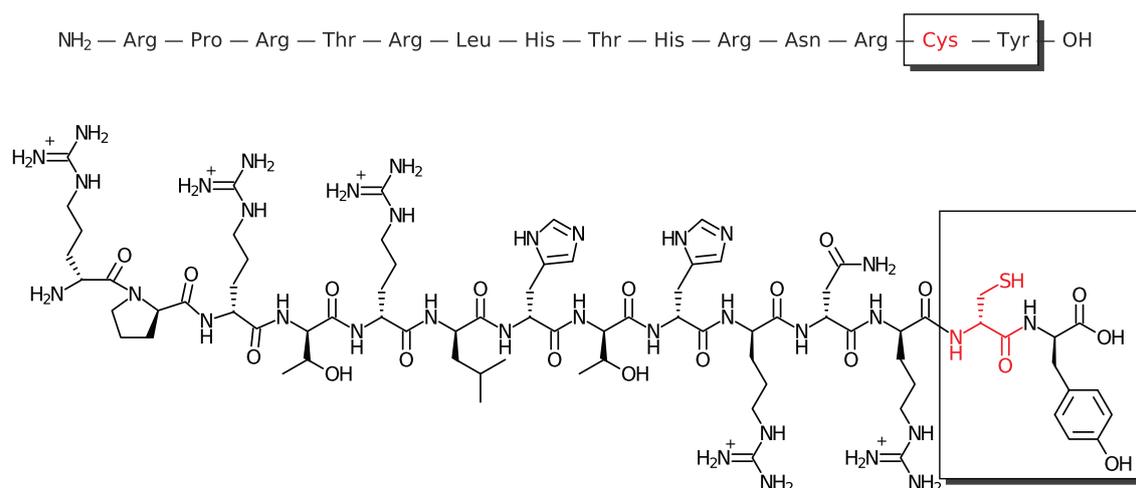
Schema 3.13: Synthesekonzept zur Funktionalisierung von Peptiden über einen *in situ* hergestellten Succinimidylester.

3 Ergebnisse und Diskussion

Nach 30 Minuten wurde diese Lösung wiederum zu der Lysin-Lösung gegeben und wieder für 15 Minuten reagieren lassen. Analog wurde auch mit den Azid-haltigen Carbonsäuren **10** und **11** verfahren. Die gewünschten Succinimidyl-Ester wurden auf diesem Weg allerdings nicht gebildet und somit auch nicht mit Lysin zur Reaktion gebracht. Daher wurde die Kopplungsreaktion mit D3-k nur mit **13** getestet, jedoch wurde das gewünschte Produkt nicht, wie unter den gleichen Bedingungen mit Lysin, gebildet.

3.2 Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen

Aufgrund der Ergebnisse der vorherigen Untersuchungen mit Acylierungsreagenzien wurde eine alternative Syntheseroute zur Radiomarkierung von D3 konzipiert. Das Peptid wurde dahingehend modifiziert, dass es anstelle von Lysin um eine Cystein(c)-Einheit verlängert wurde, was eine Radiofluorierung mit thiol-reaktiven Gruppen ermöglicht. Neben Cystein wurde das Peptid zusätzlich um eine Tyrosin(y)-Einheit erweitert, um eine chromophore Gruppe zu haben, die eine Detektion bei über 200 nm erlaubt, was die Entwicklung eines analytischen chromatographischen Systems erleichtert (vgl. Schema 3.14). Wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben, liegt der große Vorteil der thiol-reaktiven Gruppen darin, dass nur relativ gerin-



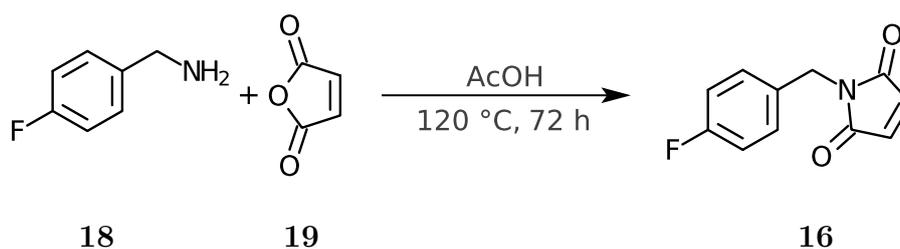
Schema 3.14: Das D3-Peptid wurde am C-Terminus um die zwei zusätzlichen Aminosäuren Cystein(c) und Tyrosin(y) verlängert (D3-cy).

3.2 Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen

ge Peptid-Konzentrationen benötigt werden, um eine quantitative Addition unter milden Bedingungen zu realisieren. In der vorliegenden Arbeit wurden literaturbekannte Gruppen verwendet, welche jedoch teilweise über neue Synthesestrategien synthetisiert wurden. Zunächst wird auf die Synthese von 4-Fluorbenzylmaleimid (FBM) **16**, dessen Vorläuferverbindung für die Radiosynthese sowie den Kopplungsreaktionen eingegangen. Im Anschluss wird die Synthese von 1-[3-(2-Fluorpyridin-3-oxyl)propyl]pyrrol-2,5-dion (FPyME) **17** sowie dessen Radiosynthese und Verhalten bei Additionen an Thiolen dargestellt.

3.2.1 Synthese von FBM und dessen Kopplungsreaktionen

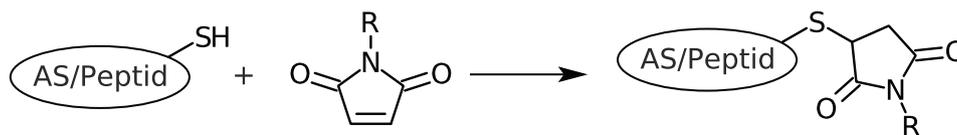
Die Synthese der inaktiven Referenzverbindung FBM **16** erfolgte nach einer literaturbekannten Synthese über eine nukleophile Substitution von 4-Fluorbenzylamin **18** an Maleinsäureanhydrid **19** und anschließenden intramolekularen Ringschluss im sauren Medium (vgl. Schema 3.15).^[93] Durch säulenchromatographische Reinigung wurde das Produkt als leicht gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 38 % isoliert und mittels NMR-Spektroskopie identifiziert. Diese Verbindung wurde genutzt, die Additionsreaktion zwischen der Thiofunktion des Cysteins im Peptid und dem Maleimid zu untersuchen. Der allgemeine Reaktionsweg über eine Michael-Addition ist in Schema 3.16 wiedergegeben.



Schema 3.15: Synthese von FBM über die Kondensationsreaktion von **18** und **19**.

Die Reaktionsbedingungen der Kopplung wurden als erstes an Glutathion (GSH) erarbeitet, wobei es sich um ein Tripeptid (Glutaminsäure, Cystein und Glycin) handelt. Hierfür wurden 10 µg GSH (30 nmol) in 1 mL Phosphat-Puffer (pH 8,5)

3 Ergebnisse und Diskussion



Schema 3.16: Allgemeine Reaktionsgleichung zur Michael-Addition zwischen einem Maleimid und einem Thiol.

gelöst und mit ebenfalls 30 nmol FBM versetzt. Nach 30 Minuten wurde die Reaktionslösung mittels HPLC untersucht. Ein Ausschnitt des entsprechenden Chromatogramms ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Zum Vergleich ist darin in rot das Chromatogramm von FBM wiedergegeben, woran ersichtlich wird, dass das Maleimid komplett verbraucht worden ist. Die zwei Peaks bei 9,15 und 10,23 Minuten wurden abgetrennt und massenspektrometrisch untersucht. Durch diese Untersuchungen stellte sich heraus, dass es sich bei beiden Peaks um das gewünschte Additionsprodukt handelt. Es kann angenommen werden, dass es sich bei den scheinbar zwei Produkten um Rotationsisomere handelt, die in Schema 3.17 dargestellt sind.

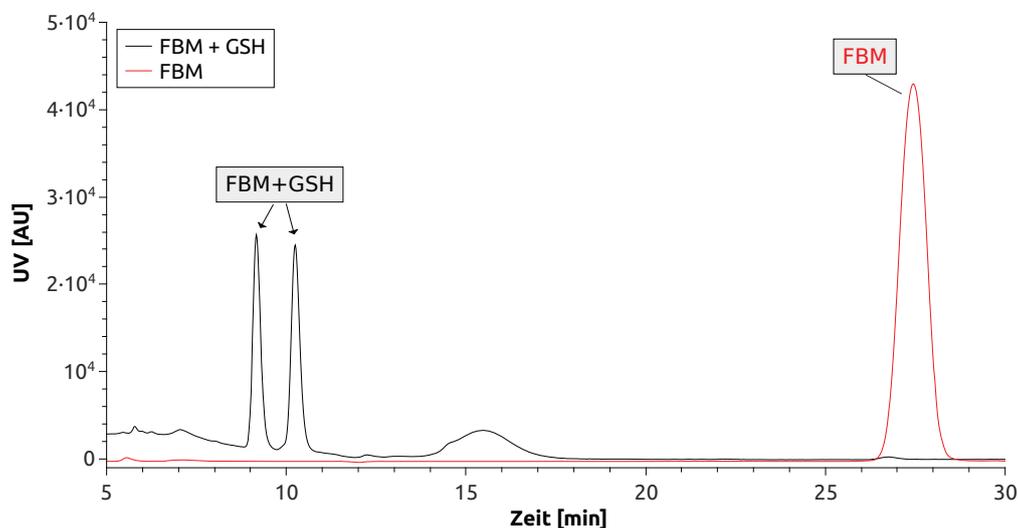
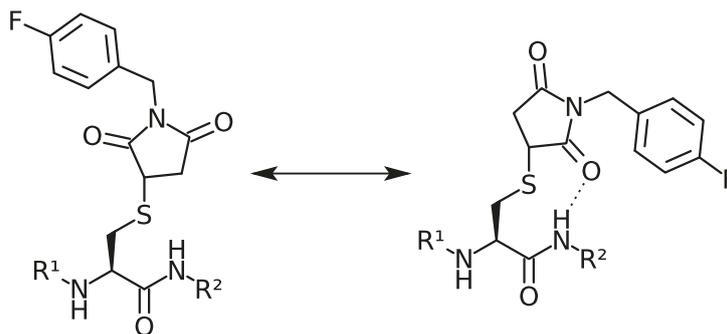


Abbildung 3.7: Ausschnitt aus dem HPLC-Chromatogramm der Produktlösung nach Reaktion zwischen FBM und Glutathion in Phosphat-Puffer (pH 8,5) bei Raumtemperatur nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten.

Kromasil 100-5 C18 (250 x 4,6 mm), $\lambda = 214$ nm, 1 mL/min
Laufmittel: Methanol/Wasser + TFA : 45/55 + 0,1 %

3.2 Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen



Schema 3.17: Mögliche Rotationsisomere des Kopplungsprodukts zwischen einem Maleimid und einem nicht terminalen Cystein.

Diese Annahme wurde zusätzlich dadurch bestätigt, dass nach einer Isolierung von einem der beiden Peaks und anschließender Reinjektion wieder zwei Peaks mit einem vergleichbar großen Flächenverhältnis gebildet wurden. Die gleiche Beobachtung wurde auch bei der Umsetzung von D3-cy gemacht, wobei für die ersten Untersuchungen an diesem Peptid, die all-L-Form verwendet wurde. Die Reaktionsbedingungen waren ähnlich zu denen mit GSH, allerdings wurde hier FBM im leichten Überschuss eingesetzt und der pH-Wert der eingesetzten Puffer-Lösung betrug 7,5. Wie in Abbildung 3.8 zu erkennen ist, werden auch hier zwei Produktpeaks erhalten, welche erneut durch massenspektrometrische Untersuchungen dem gewünschten Additionsprodukt zugeordnet werden konnten.

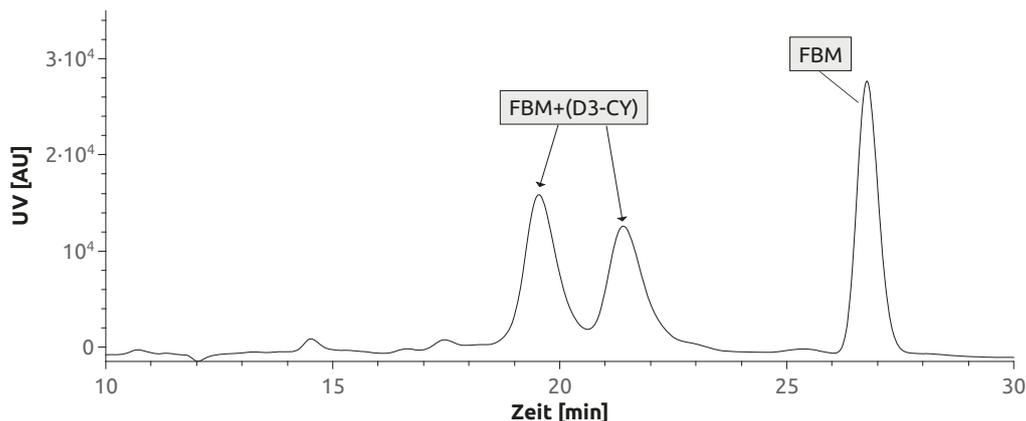


Abbildung 3.8: Ausschnitt aus dem HPLC-Chromatogramm der Produktmischung der Reaktion zwischen FBM und L-D3-CY nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten.

Säule: Kromasil 100-5 C18 (250 x 4,6 mm), $\lambda = 214$ nm, 1 mL/min
Laufmittel: Methanol/Wasser + TFA : 45/55 + 0,1 %

3 Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 3.9 sind die ESI-MS Spektren der beiden abgetrennten Peaks aufzeichnet, an welchen deutlich wird, dass es sich jeweils um das gewünschte Produkt handelt.

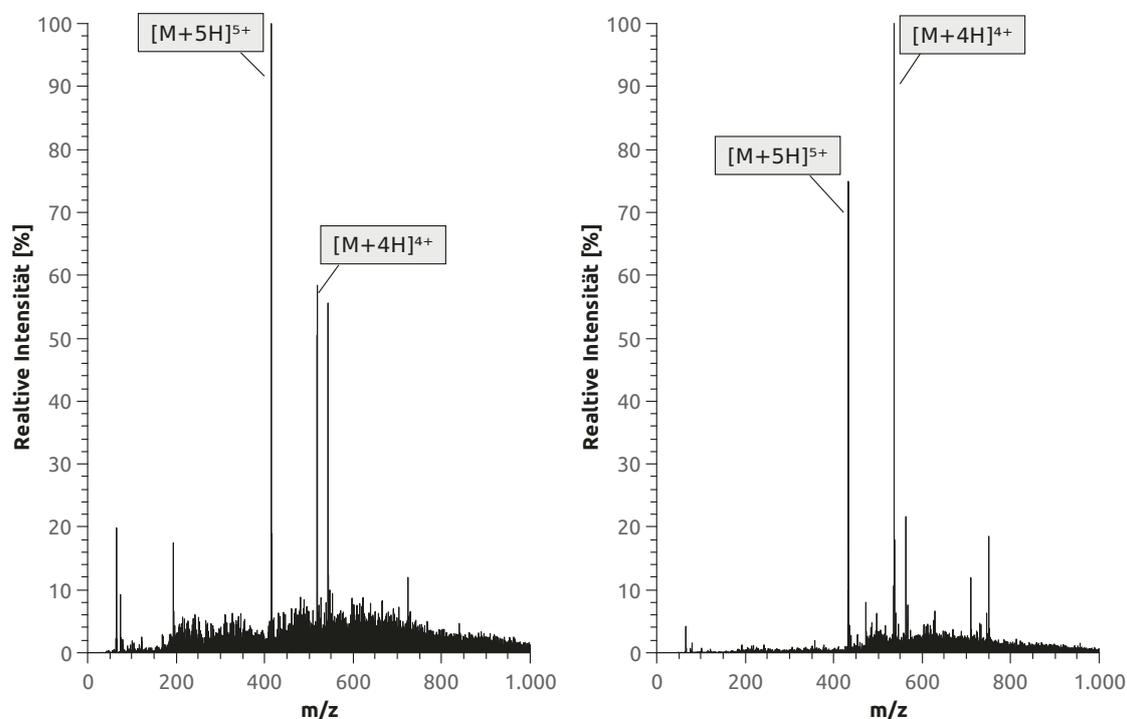


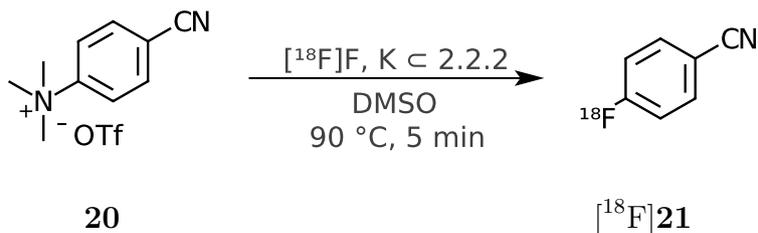
Abbildung 3.9: Massenspektren der beiden abgetrennten Peaks. Bei beiden Verbindungen handelt es sich um das gewünschte Kopplungsprodukt zwischen FBM und L-D3-cy ($M = 2071 \text{ g/mol}$, $[M+4H]^{4+} = 518, 75$, $[M+5H]^{5+} = 415, 20$).

3.2.2 Synthese von [¹⁸F]FBM

Dreistufige Synthese von [¹⁸F]FBM

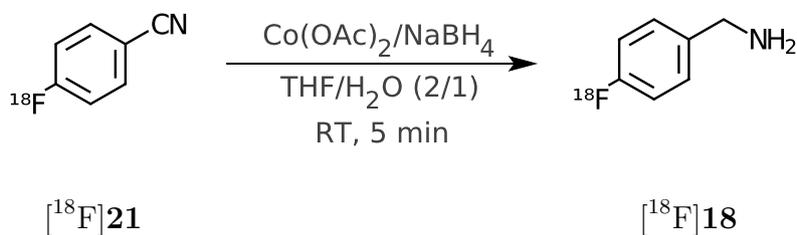
Die Radiosynthese von [¹⁸F]FBM erfolgte zunächst über insgesamt drei Stufen. Die Reaktionen bis zum 4-[¹⁸F]Fluorbenzylamin [¹⁸F]**18** erfolgten wie in der Literatur beschrieben über die Radiofluorierung von 4-[¹⁸F]Fluorbenzonnitril und anschließende Reduktion mittels Cobalt(II)acetat und Natriumborhydrid.^[94] Der erste Schritt, die Radiomarkierung, ist in Schema 3.18 wiedergegeben und beinhaltet die Radiofluorierung des Trimethylammonium-Vorläufers **20** zur Darstellung von

3.2 Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen



Schema 3.18: Radiofluorierung des Trimethylammonium-Vorläufers **20** zur Darstellung von 4-[¹⁸F]Fluorbenzonitril (**[¹⁸F]21**).

4-[¹⁸F]Fluorbenzonitril **[¹⁸F]21**. Die in früheren Arbeiten^[94] beschriebenen guten radiochemischen Ausbeuten von über 80% wurden auch in dieser Arbeit erreicht ($89 \pm 11\%$). Zur anschließenden Reduktion zum 4-[¹⁸F]Fluorbenzylamin (**[¹⁸F]FBA**, **[¹⁸F]18**) mit einer Mischung aus Cobalt(II)acetat und Natriumborhydrid, wurde das Markierungsprodukt **[¹⁸F]21** auf einer Kartusche fixiert und mittels einer Lösung von Tetrahydrofuran (THF) und Wasser (im Verhältnis 2:1) in ein Reaktionsgefäß eluiert, in welchem das Reduktionsmittel vorgelegt war. Die radiochemische Ausbeute der Reduktion betrug nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten $85 \pm 11\%$, welche etwas geringer sind als in der Literatur beschrieben ist ($> 95\%$).^[94]



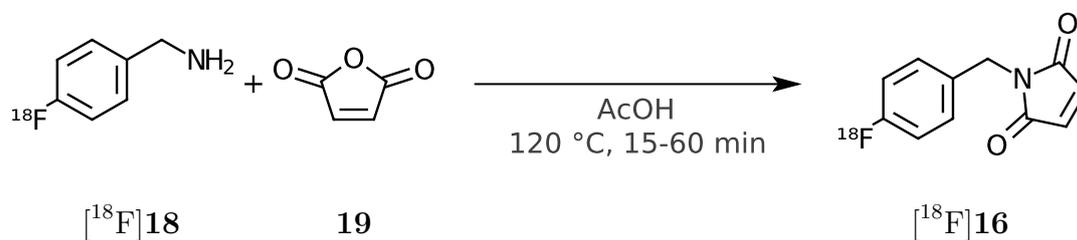
Schema 3.19: Reduktion des Nitrils **[¹⁸F]21** mittels einer Cobalt-katalysierten Reaktion mit Natriumborhydrid zum 4-[¹⁸F]Fluorbenzylamin (**[¹⁸F]18**).

Die anschließende Abtrennung der Feststoffe in der Reaktionsmischung wurde von KOSLOWSKY *et al.* mittels Filtration über ein Milliporefilter durchgeführt.^[94] Dies konnte jedoch nicht reproduziert werden, da der Feststoff den Filter komplett verstopfte, weshalb verschiedene Alternativen getestet wurden. Zum Einen wurde versucht, Lithiumaluminiumhydrid als Reduktionsmittel für die Darstellung des Amins

3 Ergebnisse und Diskussion

$[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$ einzusetzen. Jedoch konnte hier keine Ausbeute gefunden werden. Stattdessen wurde versucht, die Aufreinigung zu variieren. Anstelle der Filtration wurde zunächst eine Zentrifuge genutzt, um die festen Bestandteile der Reaktionslösung abzutrennen. Der dekantierte Überstand wurde anschließend nach der beschriebenen Methode von KOSLOWSKY *et al.* über eine Festphasenextraktion gereinigt.^[94] Auf diesem Weg wurden allerdings nur 16–20 % der Gesamtaktivität von $[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$ isoliert. Um die Reinigung zu optimieren, wurde ein Extraktionsverfahren mit Dichlormethan (DCM) verwendet. Dafür wurde die Reaktionsmischung mit etwas Triethylamin (TEA) versetzt und mit DCM gemischt. Die organische Phase wurde abgetrennt und es wurden 53–64 % $[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$ mit einer radiochemischen Reinheit von > 99 % isoliert. Diese Werte liegen in einem annehmbaren Bereich, da KOSLOWSKY *et al.* nach der Filtration und Festphasenextraktion auch nur etwa 60–70 % $[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$ auf der Kartusche fixieren konnten.^[94] Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde $[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$ ohne weitere Aufreinigung verwendet.

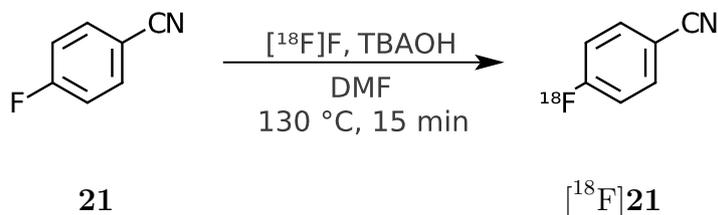
Der anschließende Syntheseschritt beinhaltet die Bildung von $[^{18}\text{F}]\mathbf{16}$ und ist in Schema 3.20 dargestellt. Hierfür wurde Maleinsäureanhydrid in Essigsäure gelöst und zum getrocknetem Zwischenprodukt $[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$ gegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 120 °C erhitzt und der Reaktionsfortschritt zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Eine Produktbildung wurde unter diesen Bedingungen bis zu einer Reaktionszeit von bis zu 60 Minuten jedoch nicht beobachtet. Zur Erhöhung der Reaktionswahrscheinlichkeit wurde die Reaktion durch Zugabe von Träger erneut durchgeführt. Dafür wurde im ersten Reaktionsschritt ein Isotopenaustausch an



Schema 3.20: Letzter Syntheseschritt der dreistufigen Darstellung von 4- $[^{18}\text{F}]$ Fluorbenzmaleimid $[^{18}\text{F}]\mathbf{16}$ (vgl. Schema 3.18 und 3.19).

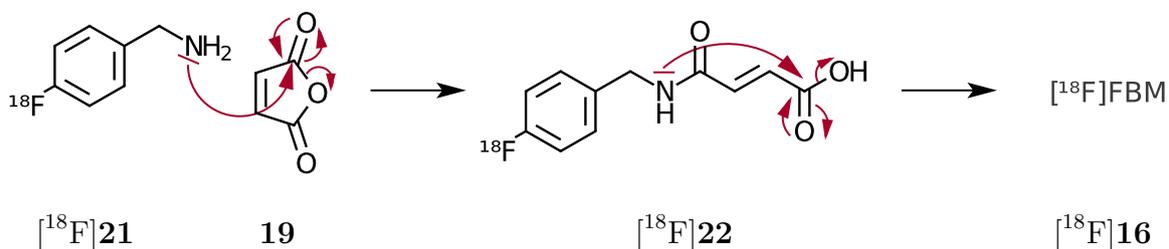
3.2 Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen

4-Fluorbenzonnitril durchgeführt, wobei das [^{18}F]Fluorid mit Hilfe von Tetrabutylammoniumhydroxid in DMF aktiviert wurde. Bei 130 °C und einer Reaktionszeit von 15 Minuten wurde [^{18}F]**21** mit einer radiochemischen Ausbeute von $80 \pm 12\%$ erhalten (vgl. Schema 3.21).



Schema 3.21: Isotopenaustausch an 4-Fluorbenzonnitril (**21**) zur Untersuchung der Radiosynthese von [^{18}F]FBM in einer geträgerten Variante.

Die Reduktion und anschließende Isolierung von [^{18}F]**18** wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt, und es wurden ähnliche Ausbeuten erhalten. Die Synthese von [^{18}F]FBM wurde ebenfalls unter den oben genannten Bedingungen wiederholt. Bei der geträgerten Variante wurden jedoch nach 15 Minuten nur Spuren ($\text{RCA} < 5\%$) der gewünschten Verbindung gebildet. Nach 60 Minuten Reaktionszeit erhöhte sich die radiochemische Ausbeuten auf 5 – 15%. Wie in Abbildung 3.10 zu erkennen ist, wurde aber bereits nach 15 Minuten ein Nebenprodukt bei einer Retentionszeit von 14,8 Minuten gemessen, welches $85 \pm 3\%$ der Gesamtaktivität entspricht. Mit Hinblick auf den Reaktionsmechanismus des letzten Reaktionsschritts wurde angenommen, dass es sich dabei um 3-(4-[^{18}F]Fluorbenzylcarbamoyl)propensäure ([^{18}F]FBCP) [^{18}F]**22** handelt (vgl. Schema 3.22). Die Herstellung eines nicht-radio-



Schema 3.22: Mechanismus der Reaktion zwischen [^{18}F]**18** und **19** zur Bildung von [^{18}F]**16** über das Zwischenprodukt [^{18}F]**22**.

3 Ergebnisse und Diskussion

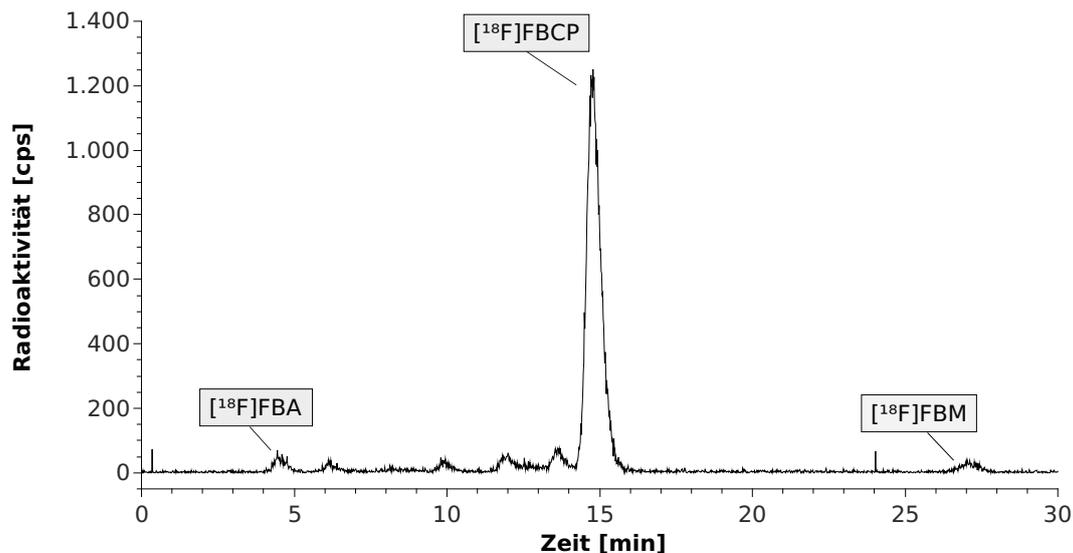


Abbildung 3.10: HPLC-Chromatogramm der Reaktionslösung des letzten Syntheseschritts zur Darstellung von $[^{18}\text{F}]\text{FBM}$ nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten.

Säule: Kromasil 100-5 C18 (250 x 4,6 mm), $\lambda = 214$ nm, 1 mL/min
Laufmittel: Methanol/Wasser + TFA : 45/55 + 0,1 %

aktiven Standards und anschließende Untersuchung mittels HPLC konnte dies bestätigen. Nach 60 Minuten reduzierte sich der Anteil von $[^{18}\text{F}]\mathbf{22}$ auf 30 – 60 %; dies einerseits durch Ringschluss unter Bildung von $[^{18}\text{F}]\text{FBM}$ aber auch durch die Zersetzung zu weiteren, jedoch unbekanntenen Nebenprodukten. Diese sind auch in Abbildung 3.10 zwischen 5 und 14 Minuten Retentionszeit bereits in Spuren zu erkennen.

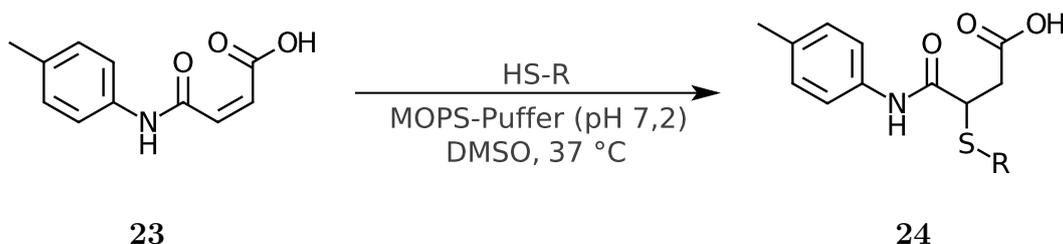
WAY *et al.* beschrieben für den letzten Syntheseschritt innerhalb von 30 Minuten Ausbeuten von 51 ± 14 %.^[95] Jedoch musste für dieses Ergebnis eine sehr hohe Temperatur gewählt werden (180 °C), welche weit über dem Siedepunkt von Essigsäure von 119 °C liegt. Dies bedeutet, dass die Synthese nur in druckstabilen Gefäßen durchgeführt und daher auch nur schwer automatisiert werden kann.

Nach einer Gesamtsynthesedauer von etwa 115 Minuten kann nach der in dieser Arbeit durchgeführten Synthese theoretisch eine maximale radiochemische Ausbeute von rund 7 % erreicht werden. Praktisch konnte dies aber nie realisiert werden, und

die Gesamtausbeute lag stets unter 1 %. Aufgrund dieser Ergebnisse und der daraus resultierenden schlechten Verfügbarkeit von [^{18}F]FBM wurde diese prosthetische Gruppe nicht für weitere Reaktionen eingesetzt.

3-(4-[^{18}F]Fluorbenzylcarbamoyl)propensäure als möglicher Reaktionspartner für die Thiofunktion

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, wurde bei der Synthese von [^{18}F]FBM hauptsächlich nur das Zwischenprodukt [^{18}F]**22** gebildet, welches mit einer guten radiochemischen Gesamtausbeute von bis zu knapp 40 % isoliert wurde. Daher wurde überlegt, ob sich diese Verbindung für weitere Reaktionen eignet. Von JHA *et al.* wurde eine Reaktion einer ähnlichen Verbindung mit Thiolen beschrieben, welche in Schema 3.23 dargestellt ist.^[96]



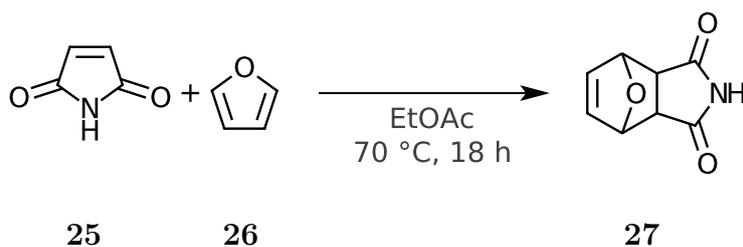
Schema 3.23: Reaktion zwischen der *N*-Arylmaleaminsäure **23** und Benzylmercaptan (R=Benzy).^{aus[96]}

Zunächst wurden Versuche mit der Fragestellung, ob mit der nicht-radioaktiven Form der Carbamoylpropensäure **22** Reaktionen an Thiolen realisierbar sind, durchgeführt. Diese Addition wurde am Beispiel von Glutathion ausgeführt. Für den Reaktionsaufbau wurden die von JHA *et al.* beschriebenen Reaktionsbedingungen übernommen, wobei statt dem MOPS-Puffer (3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure) ein Phosphat-Puffer mit demselben pH-Wert eingesetzt wurde. Auch nach Reaktionszeiten von bis zu 60 Minuten kam es jedoch zu keiner Umsetzung der Säure **22** mit dem Tripeptid. Es liegt daher nahe, dass diese Form der Reaktion nur mit Maleaminsäuren, welche direkt am Aromaten gebunden sind, durchgeführt werden können.

Vierstufige Radiosynthese für [¹⁸F]FBM

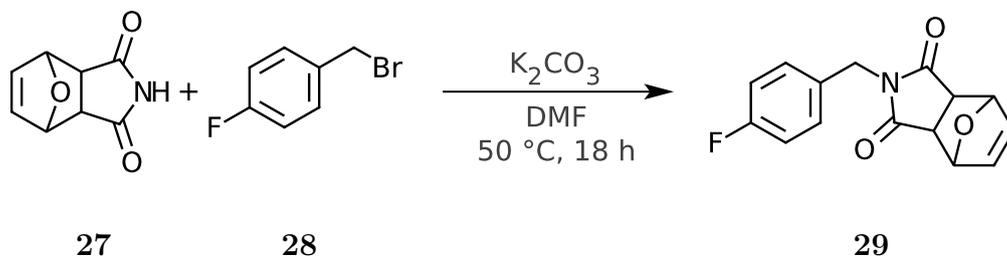
Da die Ausbeuten für die oben beschriebene dreistufige Radiosynthese von [¹⁸F]FBM nicht ausreichend sind, um weiterführende Reaktionen durchführen zu können, wurde ein neues Synthesekonzept für ein geschütztes Maleimid entwickelt. Dabei wurde zunächst ein mit Furan geschütztes Maleimid-Derivat gebildet und die entsprechenden nicht radioaktiven Referenzverbindungen sowie der Markierungsvorläufer synthetisiert.

Zur Schützung des reaktiven Alkens wurde Maleimid **25** mit Furan **26** über eine DIELS-ALDER-Reaktion umgesetzt. Die Synthese von 7-Oxabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonylimid **27** erfolgte ähnlich der Synthese von KWART *et al.*,^[97] jedoch wurde hier Ethylacetat statt Wasser als Lösungsmittel verwendet (vgl. Schema 3.24). Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 74 % isoliert (Literatur: 50 %) und über NMR-Spektroskopie identifiziert.



Schema 3.24: DIELS-ALDER-Reaktion zwischen Maleimid und Furan.

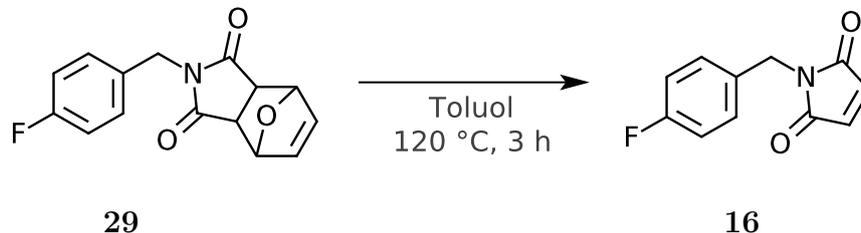
Anschließend folgte mit dieser Verbindung eine *N*-Alkylierung mit 4-Fluorbenzylbromid zu *N*-(4-Fluorbenzyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]-hept-5-en-2,3-dicarbonylimid **29**, welche in Schema 3.25 dargestellt ist (Ausbeute: 76 %).



Schema 3.25: *N*-Alkylierung zur Darstellung der Furan-geschützten Maleimid-Verbindung **29**.

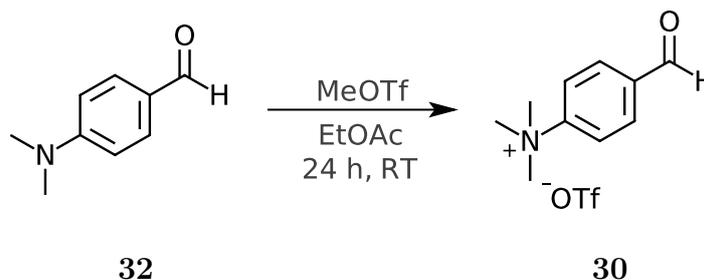
3.2 Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen

Wurde **29** in Toluol gelöst und für drei Stunden am Rückfluss erhitzt, wurde die Entschützung über die Retro-DIELS-ADDER-Reaktion zur Bildung von FBM quantitativ durchgeführt (vgl. Schema 3.26).



Schema 3.26: Retro-DIELS-ALDER Reaktion zur Bildung von FBM aus **29**.

Zur Übertragung der Reaktionen auf eine Radiosynthese wurde ein entsprechender Vorläufer gewählt, welcher schnell und einfach zum 4- ^{18}F Fluorbenzylbromid umgesetzt werden kann. Die Synthese wurde nach LEMAIRE *et al.* ausgehend von der Trimethylammonium-Vorläuferverbindung **30** zur Darstellung von 4- ^{18}F Fluorbenzaldehyd ^{18}F **31** durchgeführt. Die Herstellung des Vorläufers erfolgte analog zur Synthese von **4** nach HAKA *et al.* aus der entsprechenden Dimethylamino-Verbindung **32** (vgl. Schema 3.27).^[90] Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 84 % erhalten und wurde mittels NMR-Spektroskopie und ESI-MS charakterisiert.

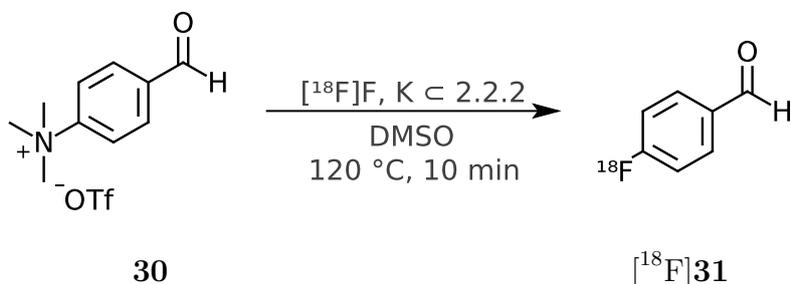


Schema 3.27: Synthese der Vorläuferverbindung für die Synthese von 4- ^{18}F Fluorbenzaldehyd (^{18}F **31**).

Die anschließende nukleophile Substitution mit n.c.a. ^{18}F Fluorid wurde unter Verwendung des Carbonat/Kryptofix[®]-Aktivatorsystems in DMSO durchgeführt. Die erhaltenden Ausbeuten unterlagen starken Schwankungen und bewegten sich

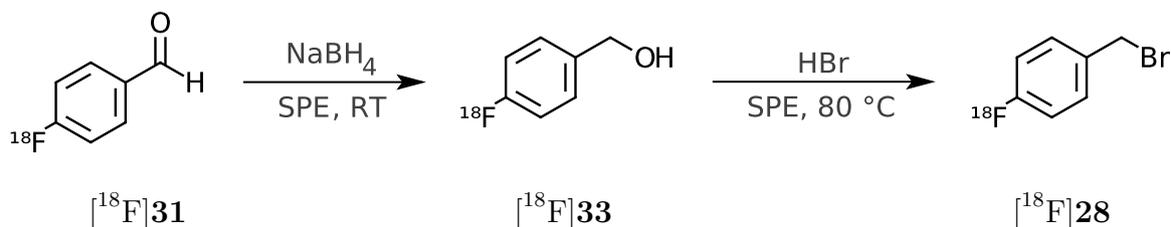
3 Ergebnisse und Diskussion

zwischen 48 und 80 %, während die von LEMAIRE *et al.* beschriebenen Ausbeuten bei 73 ± 4 % lagen.^[98] In Schema 3.28 ist das Reaktionsschema der Radiofluorierung wiedergegeben.



Schema 3.28: Radiofluorierung von **30** zur Darstellung von 4- $[^{18}\text{F}]$ Fluorbenzaldehyd ($[^{18}\text{F}]\mathbf{31}$).

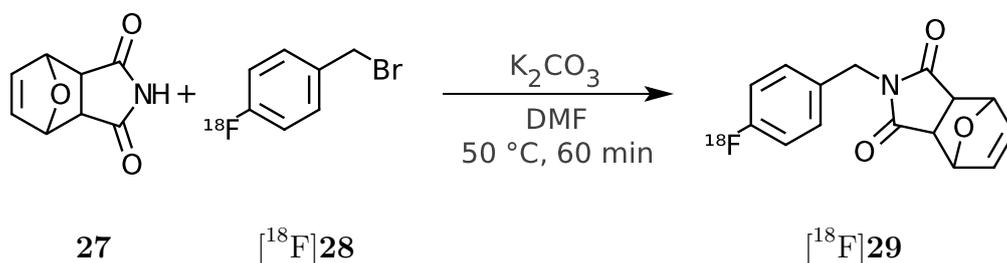
Die anschließende Reduktion zum Alkohol sowie eine darauf folgende Bromierung erfolgten ebenfalls nach LEMAIRE *et al.*, indem das Markierungsprodukt $[^{18}\text{F}]\mathbf{31}$ auf einer Kartusche fixiert wurde und die entsprechenden Reagenzien für die genannten Reaktionen über diese geleitet wurden.^[98,99] Zur Reduktion wurde eine wässrige Natriumborhydrid-Lösung genutzt, welche langsam über die feste Phase gegeben wurde. Im Anschluss wurde die Kartusche für die Bromierung in einem etwa $80\text{ }^\circ\text{C}$ heißem Luftstrom erwärmt. Die Bromwasserstoff-Lösung wurde langsam über die heiße Oberfläche gespült und das Produkt anschließend mit DMF eluiert. Die auf der C18-Kartusche stattfindenden Reaktionen sind in Schema 3.29 zusammengefasst. Auf diese Weise wurde die bromierte Verbindung $[^{18}\text{F}]\mathbf{28}$ mit 32 ± 10 % erhalten (Lit.: 64 ± 4 %^[98]).



Schema 3.29: Reduktion des Aldehyds $[^{18}\text{F}]\mathbf{31}$ zum Alkohol $[^{18}\text{F}]\mathbf{33}$ und anschließende Bromierung zu $[^{18}\text{F}]\mathbf{28}$.

3.2 Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen

Für die darauf folgende *N*-Alkylierung von **27** wurde das Eluat mit Kaliumcarbonat versetzt und das mit Furan geschützte Maleimid hinzu gegeben (vgl. Schema 3.30). Die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten auf die gewünschte Produktbildung untersucht. Jedoch konnten bei 50°C erst nach 60 Minuten Spuren (< 5%) von [¹⁸F]**29** identifiziert werden. Die Wahl einer höheren Reaktionstemperatur zur Beschleunigung der Reaktion war nicht möglich, da es dann zu einer teilweisen Entschützung der Maleimid-Funktion kam, welche unter den vorherrschenden Bedingungen zersetzt wurde.



Schema 3.30: *N*-Alkylierung von [¹⁸F]**28** zu [¹⁸F]**29** analog zur Synthese der nicht radioaktiven Referenzverbindung (vgl. Schema 3.25).

Aufgrund der niedrigen Ausbeuten von [¹⁸F]**29** waren die Untersuchung des folgenden Syntheseschritts, die Entschützung der Maleimid-Funktion (siehe Schema 3.26), kaum möglich. Es wurde zwar in Einzelfällen nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten mittels HPLC-Analyse Spuren eines Produkts erkannt, aber eine Bestimmung der radiochemischen Ausbeute oder Abtrennung des Produkts war nicht durchführbar. Daher wurden auch hier keine weiteren Reaktionen zum Kopplungsverhalten von [¹⁸F]FBM an Thiofunktionen untersucht.

Da die Radiosynthesen von [¹⁸F]FBM nicht zum gewünschten Erfolg geführt hatten, sollte im Folgendem eine andere thiol-reaktive Gruppe hergestellt werden, welche leichter verfügbar ist und dessen Radiosynthese bereits etablierter war.

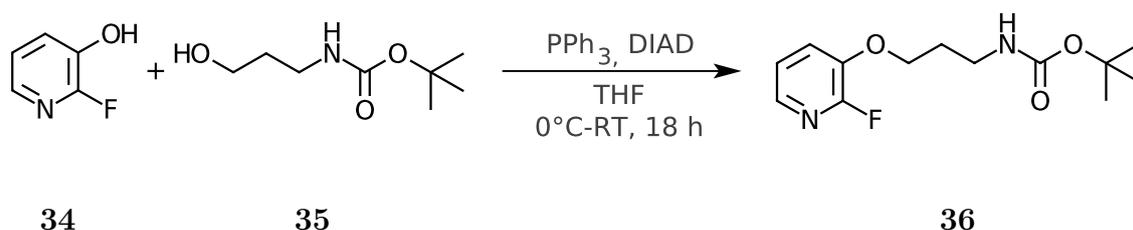
3.2.3 Synthese von FPyME und [¹⁸F]FPyME

1-[3-(2-[¹⁸F]Fluorpyridin-3-oxyl)propyl]pyrrol-2,5-dion ([¹⁸F]FPyME) wurde zuerst von DE BRUIN *et al.* synthetisiert und beschrieben sowie erfolgreich für Markierungs-

3 Ergebnisse und Diskussion

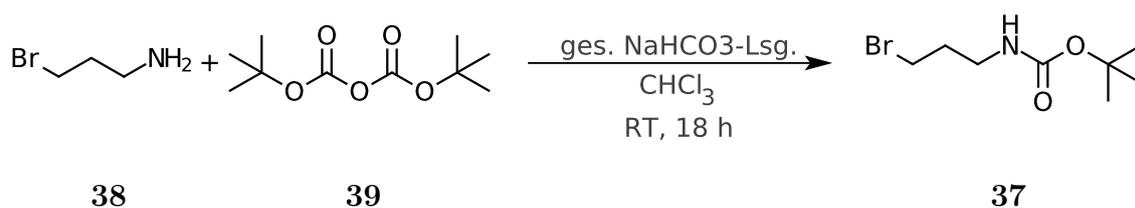
reaktionen an Cystein-Resten eingesetzt.^[54] Zunächst soll hier auf die Synthese der nicht-radioaktiven Referenzverbindung, dessen Additionsverhalten an Thiolen wie auch auf die Darstellung des Markierungsvorläufers eingegangen werden.

Nach DE BRUIN *et al.* erfolgte die Darstellung von FPyME über eine dreistufige Aufbausynthese ausgehend von 2-Fluor-3-hydroxypyridin **34**. Dieses wurde im ersten Reaktionsschritt mit 3-*N*-Boc-propan-1-ol **35** mittels einer MITSUNOBU-Reaktion zu dem entsprechenden Ether **36** umgesetzt (vgl. Schema 3.31).^[54]



Schema 3.31: MITSUNOBU-Reaktion zur Darstellung von **36**.

Die Ausbeuten dieser Reaktion fielen mit 3 % deutlich geringer aus als die in der Literatur angegebenen (40 %).^[54] Um höhere Ausbeuten zu erzielen, wurde die Veretherung mit Hilfe der bromierten Verbindung **37** ausgeführt. Diese Verbindung wurde zuvor nach einer literaturbekannten Synthese aus 3-Brompropylamin **38** und Di-*tert*-butyldicarbonat **39** synthetisiert (vgl. Schema 3.32).^[100] Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 91 % erhalten und mittels NMR-Spektroskopie identifiziert.

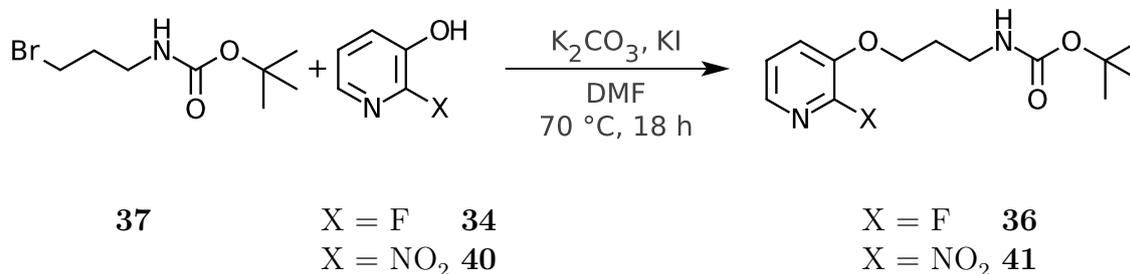


Schema 3.32: Boc-Schützung von 3-Brompropylamin **38** mittels Di-*tert*-butyldicarbonat **39**.

Eine Veretherung von **37** erfolgte zum Einen mit **34** aber auch zum Anderen mit der entsprechenden Nitro-Verbindung **40**, um so die für die Radiosynthese benötigte Vorläuferverbindung zu synthetisieren. Die Reaktion verlief unter basischen

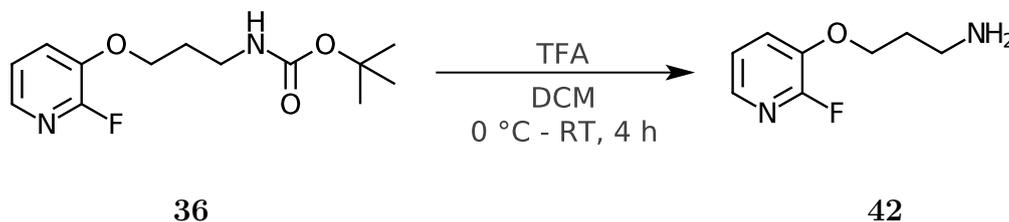
3.2 Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen

Bedingungen und wurde durch den Zusatz von Kaliumiodid katalysiert (vgl. Schema 3.33). Für das fluorierte Derivat wurde eine Ausbeute von 80 % erzielt, während für die Nitro-Verbindung 40 % erreicht wurden.



Schema 3.33: Basische Veretherung von **34** bzw. **40** mit **37**.

Die Entfernung der Boc-Schutzgruppe von **36** wurde mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan durchgeführt (vgl. Schema 3.34). Das freie Amin **42** wurde als TFA-Salz mit einer Ausbeute von 94 % (Literatur: 90 - 95 %^[54]) erhalten und mittels NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie identifiziert.

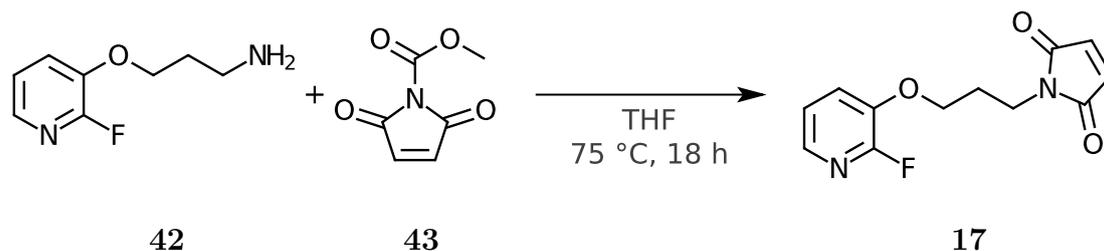


Schema 3.34: Entschützung von **36** zur Darstellung des freienamins **42**.

Die anschließende Kondensationsreaktion mit *N*-Methoxycarbonylmaleimid **43** ist in Schema 3.35 dargestellt. Das Produkt wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer Ausbeute von maximal 30 % gewonnen, während DE BRUIN *et al.* bei diesem Syntheseschritt eine Ausbeute von 75 % erhielten.

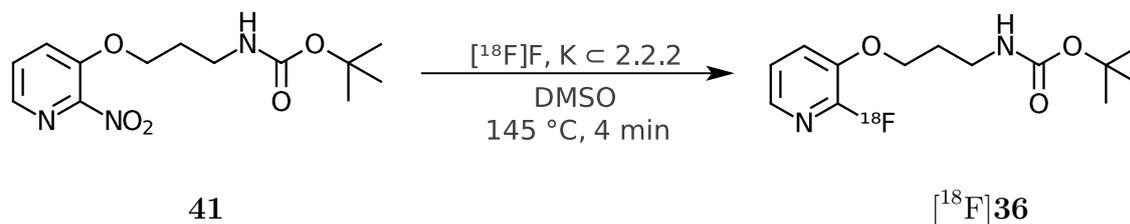
Über die in dieser Arbeit verwendete vierstufige Synthese konnte FPyME somit in einer Gesamtausbeute von 20 % erhalten werden. In der ursprünglich beschriebenen Synthese von DE BRUIN *et al.* wurden 29 % erzielt.^[54] Das so hergestellte FPyME wurde im Folgendem für Additionsreaktionen an Thiolen eingesetzt.

3 Ergebnisse und Diskussion



Schema 3.35: Kondensationsreaktion zwischen **43** und **42** zur Darstellung der thiolreaktiven prosthetischen Gruppe FPyME **17**.

Für die Radiosynthese wurde das in Schema 3.34 gezeigte Nitro-Derivat als Vorläuferverbindung für die nukleophile heteroaromatische Substitution mit [^{18}F]Fluorid eingesetzt. Als Aktivatorsystem wurde der Carbonat/Kryptofix[®]-Komplex in DMSO genutzt und nach vier Minuten Reaktionszeit wurde für das Produkt [^{18}F]**36** eine radiochemische Ausbeute von $85 \pm 5\%$ gemessen (Schema 3.36). Diese lagen höher als die von DE BRUIN *et al.* gemessenen Werte von 53 – 72%.^[54]

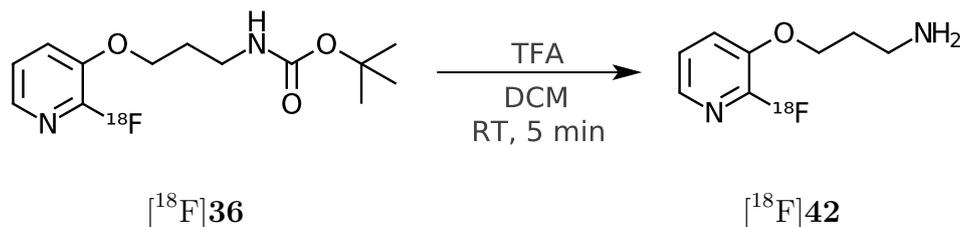


Schema 3.36: Radiomarkierung von **41** zur Darstellung von [^{18}F]**36**.

Nach einer Reinigung des Zwischenprodukts [^{18}F]**36** über eine C18-Festphasenextraktion wurde die Reduktion zum Amin durch Zugabe von Trifluoressigsäure in Dichlormethan durchgeführt (vgl. Schema 3.37). Von DE BRUIN *et al.* werden für die Entschützung quantitative Ausbeuten beschrieben. Die der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche schwankten stark. Zwar gelangen auch quantitative Umsetzungen, jedoch lagen die Ausbeuten teilweise nur bei 50%.

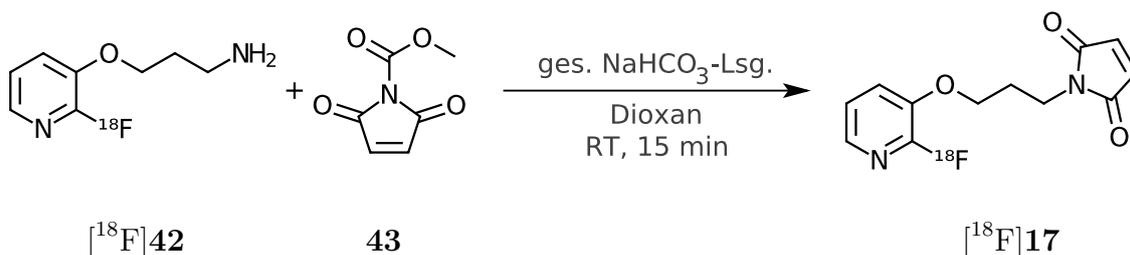
Die letzte Synthesestufe beschreibt die Darstellung der Zielverbindung [^{18}F]**17** durch Reaktion des Amins [^{18}F]**42** mit *N*-Methoxycarbonylmaleimid **43** in Dioxan unter Zusatz gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (vgl. Schema 3.38).

3.2 Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen



Schema 3.37: Boc-Entschützung zur Darstellung von 3-(2-[^{18}F]Fluorpyridin-3-oxyl)-propylamin [^{18}F]42.

Während DE BRUIN *et al.* über 90 % Ausbeute erhalten hatten, wurde mittels der in dieser Arbeit beschriebenen Synthese nur eine maximale Ausbeute von 30 % erreicht. Dies kann vermutlich darauf zurückzuführen sein, dass die Trifluoressigsäure nach der Entfernung der Schutzgruppe im zweiten Syntheseschritt nicht vollständig aus dem System entfernt werden konnte. Rückstände der Säure verhindern die Reaktion, da diese in einem leicht basischem Milieu abläuft.



Schema 3.38: Letzte Synthesestufe zur Darstellung von [^{18}F]FPyME aus dem Amin [^{18}F]42 (vgl. Schema 3.36 und 3.37).

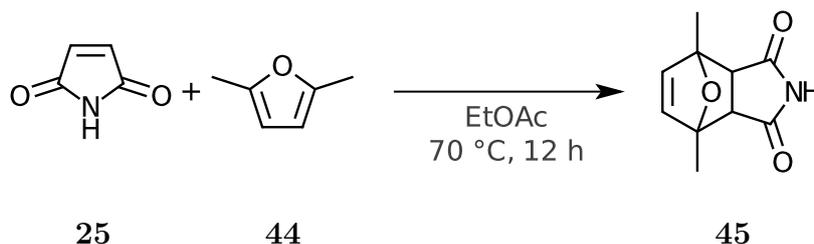
Das Endprodukt [^{18}F]17 wurde anschließend mittels HPLC gereinigt und konnte nur stark schwankenden Gesamtausbeuten von 2 bis 20 % nach einer gesamten Synthesezeit von ca. 110 Minuten gewonnen werden. Da die in der Literatur beschriebenen radiochemischen Ausbeuten von bis zu 37 %^[54] im Rahmen dieser Arbeit nicht erreicht werden konnten, wurde ein alternatives Synthesekonzept zur Darstellung von [^{18}F]17 entwickelt.

Die alternative Radiosynthese sollte über ein zweistufiges Verfahren über eine am Maleimid geschützte Zwischenstufe verwirklicht werden. Die Synthese des Vor-

3 Ergebnisse und Diskussion

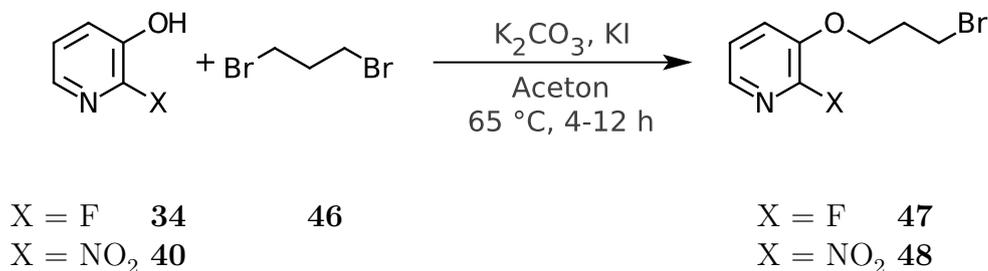
läufers erfolgte zusammen mit den inaktiven Referenzverbindungen, an welchen die generelle Realisierbarkeit der Reaktionen gezeigt wurde.

Zunächst erfolgte die Synthese von einem mit 2,5-Dimethylfuran geschütztem Maleimid über eine DIELS-ALDER-Reaktion (vgl. Schema 3.39), welche analog zu der in Schema 3.24 dargestellten Reaktion nach KWART *et al.* durchgeführt wurde.^[97] Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 33 % erhalten und mittels NMR-Spektroskopie identifiziert.



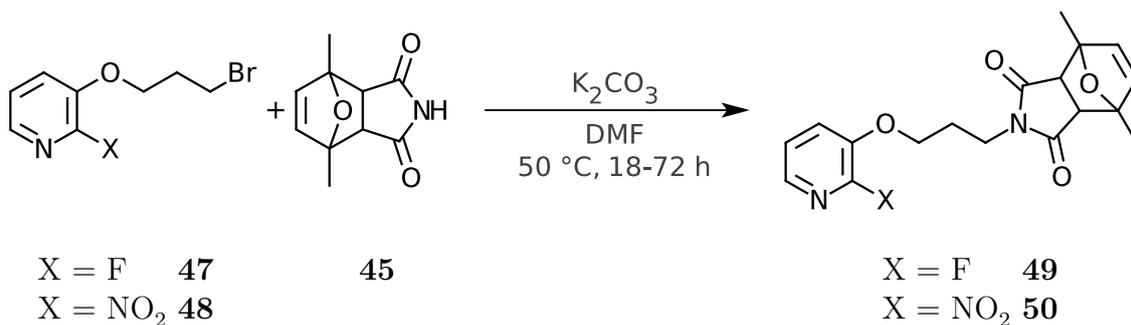
Schema 3.39: DIELS-ALDER-Reaktion zur Darstellung eines geschützten Maleimid-Bausteins.

Parallel zu dieser Synthese wurde 2-Fluor-3-hydroxypyridin **34** bzw. 3-Hydroxy-2-nitropyridin **40** mit 1,3-Dibrompropan **46** nach einer Vorschrift von YOU *et al.* verethert.^[101] Die Reaktion ist in Schema 3.40 wiedergegeben. Bei der Nitro-Verbindung lagen die Ausbeuten bei 51 %, während für die fluorierte Verbindung eine Ausbeute von 79 % erreicht wurde. Eine Charakterisierung dieser beiden Verbindungen wurde mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt. Diese Bromide wurden nun im weiteren Verlauf mit dem zuvor geschützten Maleimid-Baustein **45** umgesetzt (vgl. Schema



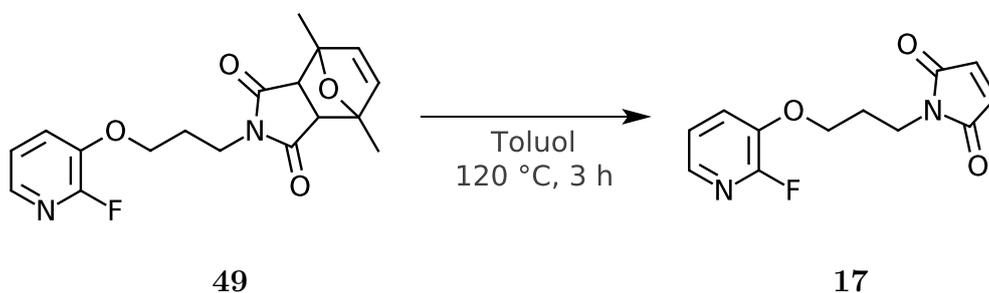
Schema 3.40: Veretherung von **34** bzw. **40** mit 1,3-Dibrompropan (**46**).

3.2 Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen



Schema 3.41: N-Alkylierung von **47** bzw. **48** mit **45** zur Darstellung des Vorläufers **50** für die Radiosynthese sowie der inaktiven Referenzverbindung **49**.

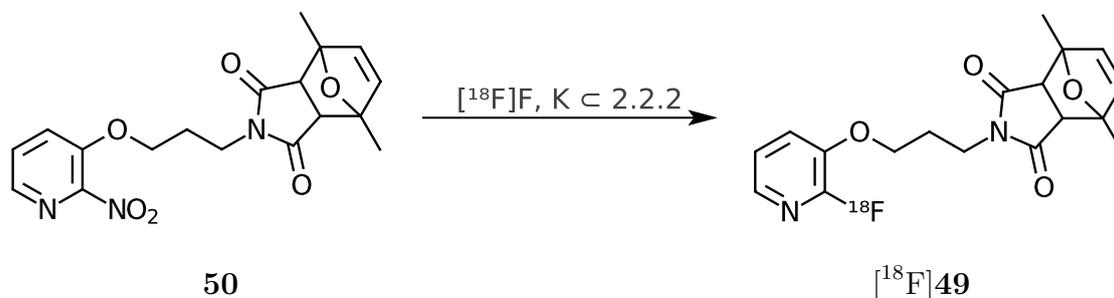
3.41). Die Produkte wurden mit einer Ausbeute von 67 % (**49**) bzw. 28 % (**50**) erhalten und sowohl mittels Massenspektrometrie als auch mit NMR-Spektroskopie identifiziert. Die fluorierte Verbindung **49** wurde in Toluol gelöst und drei Stunden am Rückfluss erhitzt (vgl. Schema 3.42), um die Durchführbarkeit der Entschützungsreaktion mittels einer Retro-DIELS-ALDER Reaktion zu demonstrieren. Reaktionskontrollen mittels DC zeigten, dass die Reaktion quantitativ abläuft und es wurden 95 % isoliert. Somit wurde ausgehend von 2-Fluor-3-hydroxypyridin insgesamt eine Ausbeute von 50 % erreicht, was auch eine Verbesserung der Synthese nach DE BRUIN *et al.* darstellt, wo FPyME über 3 Stufen mit einer Ausbeute von 29 % hergestellt wurde.



Schema 3.42: Entschützung der Maleimid-Funktion mittels einer Retro-DIELS-ALDER-Reaktion.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Radiosynthese sollte nun ausgehend von der Nitroverbindung **50** durchgeführt werden. Ihre Radiomarkierung wurde im Hinblick auf verschiedene Reaktionsparameter optimiert, und der allgemeine Reaktionsverlauf ist in Schema 3.43 wiedergegeben.



Schema 3.43: Allgemeines Reaktionsschema der Radiofluorierung von **50** zur Darstellung eines an der Maleimid-Funktion geschütztem $[^{18}\text{F}]\text{FPyME}$.

In den ersten Versuchen wurde das Lösungsmittel DMSO sowie die Reaktionszeit von 5 Minuten der Radiofluorierung von **41** übernommen, jedoch wurden die Reaktionstemperaturen variiert. Als Aktivatorsystem für das $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ wurde der Carbonat/Kryptofix[®]-Komplex genutzt.

Die Ausbeuten bei verschiedenen Reaktionstemperaturen sind in Abbildung 3.11 aufgetragen. Wie zu sehen ist, wurden bei einer Temperatur von 80 °C die besten radiochemischen Ausbeuten von $29 \pm 4\%$ erreicht. Die Reduktion der Ausbeute bei höheren Temperaturen wird darauf zurückgeführt, dass die Entschützung durch die Retro-DIELS-ALDER-Reaktion in den Vordergrund rückt. Das ungeschützte Maleimid wird jedoch durch die basischen Bedingungen der Radiomarkierung zersetzt. Dies konnten auch DE BRUIN *et al.* zeigen, die versucht hatten, eine direkte Markierung zur Darstellung von $[^{18}\text{F}]\text{FPyME}$ anhand der entsprechenden Nitroverbindung durchzuführen.^[54] Auch frühere Versuche der Direktmarkierung durch SHIUE *et al.* einer anderen Maleimid-haltigen Verbindung führten zu keiner Bildung des gewünschten Produkts.^[51]

Für die folgenden Untersuchungen der Markierung wurde daher eine Reaktionstemperatur von 80 °C eingesetzt. Als nächstes wurde der Einfluss des Lösungsmittels

3.2 Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen

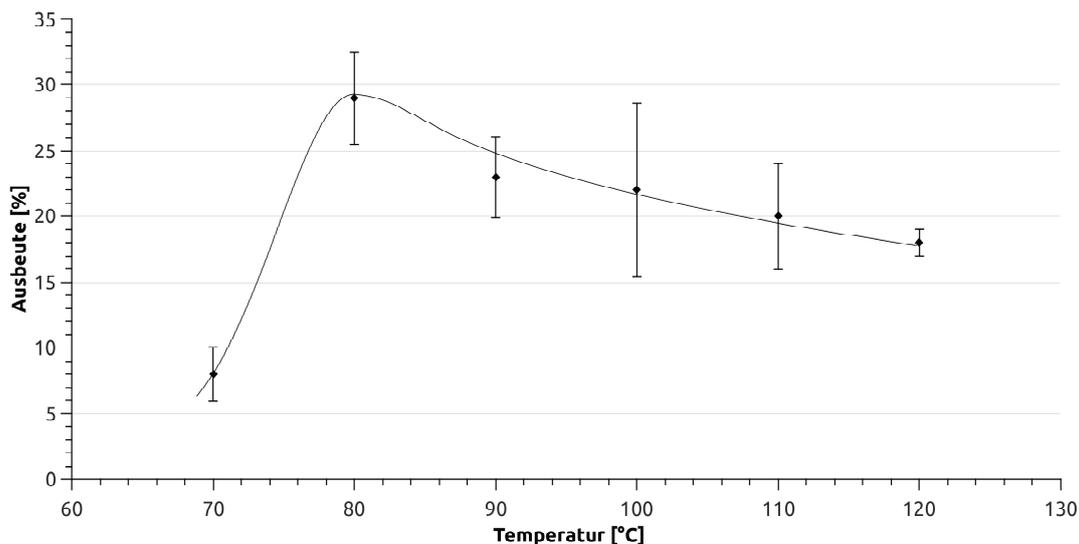


Abbildung 3.11: Radiochemische Ausbeuten der nukleophilen Substitution zu $[^{18}\text{F}]\mathbf{49}$ in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur. Die Reaktionszeit betrug 5 Minuten und die Konzentration des Vorläufers $14,6 \mu\text{mol}/500 \mu\text{L}$ DMSO; $n = 3$.

untersucht, wobei als Alternative zu Dimethylsulfoxid die beiden aprotisch polaren Lösungsmittel Acetonitril und Dimethylformamid getestet wurden. Wie in Abbildung 3.12 ersichtlich ist, wurden die besten radiochemischen Ausbeuten von ca. 29 % in DMSO erhalten. Beim Einsatz von DMF wurde nur eine Ausbeute von 19 % und in Acetonitril von 3 % gefunden.

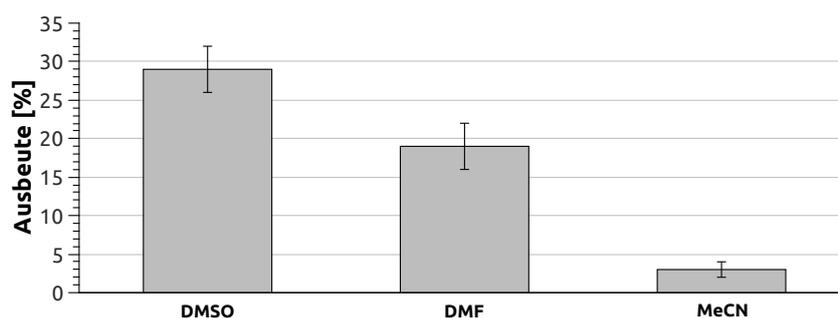


Abbildung 3.12: Radiochemische Ausbeuten der nukleophilen Substitution zu $[^{18}\text{F}]\mathbf{49}$ in Abhängigkeit vom gewählten Lösungsmittel. Die Konzentration des Vorläufers betrug jeweils $14,6 \mu\text{mol}/500 \mu\text{L}$ und die Reaktionstemperatur lag bei 80°C ; $n = 3$.

3 Ergebnisse und Diskussion

Zum Schluss wurde die Reaktion zusätzlich auf ihre Kinetik hin untersucht, um die optimale Reaktionszeit zu bestimmen. Hierfür wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ein Aliquot aus der Reaktionslösung entnommen und die Ausbeute mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Reaktion ist Abbildung 3.13 wiedergegeben. Die Sättigung der radiochemischen Ausbeute ist nach etwa 10 Minuten erreicht. Hinsichtlich dem Verlust durch den radioaktiven Zerfall kann die optimale Aktivitätsausbeute jedoch bereits nach etwa 5 Minuten erhalten werden.

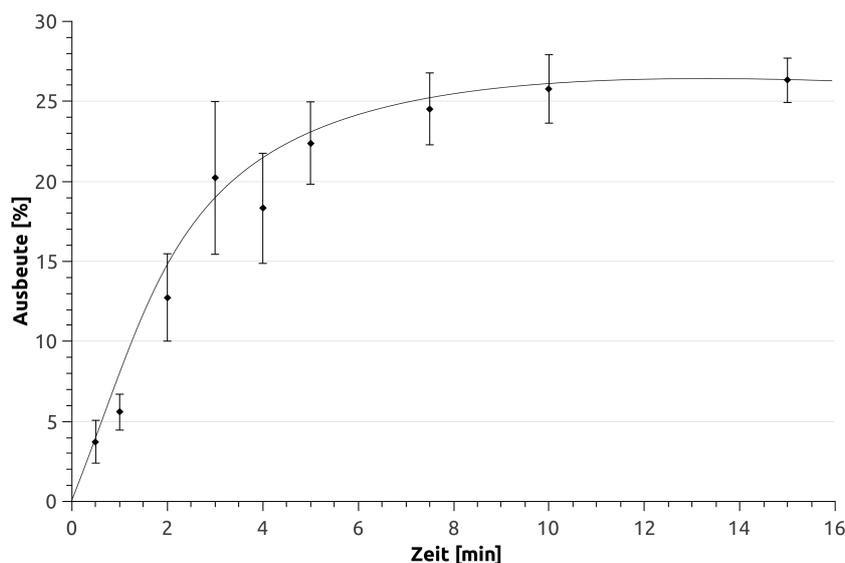
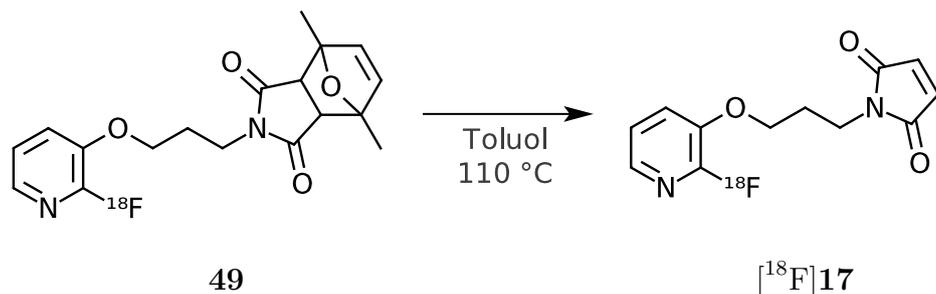


Abbildung 3.13: Zeitlicher Verlauf der radiochemischen Ausbeute der nukleophilen Substitution zu $[^{18}\text{F}]\mathbf{49}$ bei einer Temperatur von 80°C und einer Vorläuferkonzentration von $14,6\ \mu\text{mol}/500\ \mu\text{L}$ DMSO; $n = 3$.

Der nachfolgende Reaktionsschritt beinhaltete die Entschützung der Maleimid-Funktion (vgl. Schema 3.44). Da diese in einem nicht basischem Milieu durchgeführt werden sollte, wurde zur Entfernung des Kaliumcarbonats und zum Wechsel des Lösungsmittels eine Festphasenextraktion durchgeführt. Das Produkt $[^{18}\text{F}]\mathbf{49}$ wurde auf einer C18-Kartusche fixiert und dann mit einem leicht entfernbarem Lösungsmittel (z. B. Acetonitril oder Ethanol) eluiert. Nach der Trocknung des Eluats wurde der Rückstand in Toluol aufgenommen und auf 110°C erhitzt.

3.2 Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen



Schema 3.44: Retro-DIELS-ALDER-Reaktion als finaler Syntheseschritt zur Darstellung von [¹⁸F]17.

Zur Optimierung des letzten Reaktionsschritts wurden auch hier die Ausbeuten zu verschiedenen Reaktionszeitpunkten gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass die Entschützungsreaktion innerhalb von 15 Minuten quantitativ abläuft (vgl. Abbildung 3.14). Nach diesen Ergebnissen und Berücksichtigung des radioaktiven Zerfalls wurde für den zweiten Reaktionsschritt eine Zeit von 10 Minuten angesetzt.

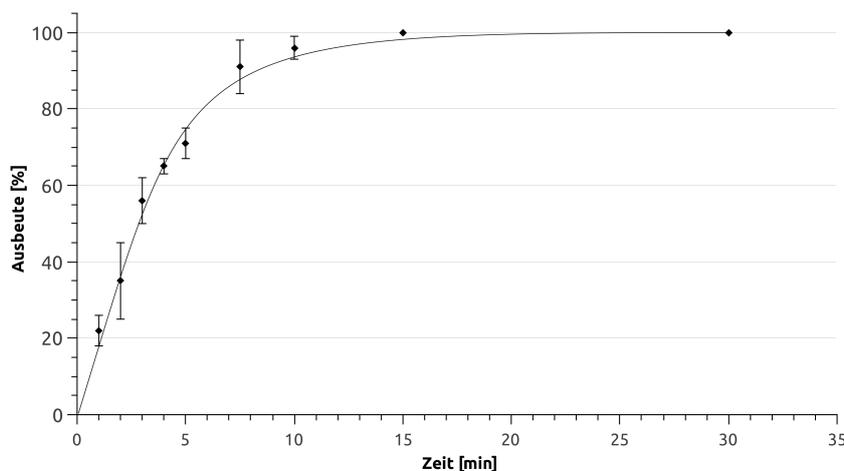


Abbildung 3.14: Ausbeuten von der Umsetzung von [¹⁸F]49 zu [¹⁸F]17 in Abhängigkeit von der Zeit bei einer Reaktionstemperatur von 110 °C; n = 3.

Zur weiteren Umsetzung von [¹⁸F]FPyME musste dieses über eine semipräparative Säule mittels HPLC gereinigt werden. Hierfür wurde die Reaktionslösung getrocknet und der Rückstand in etwas Methanol aufgenommen, welches auf die HPLC injiziert wurde. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 3.15 gezeigt.

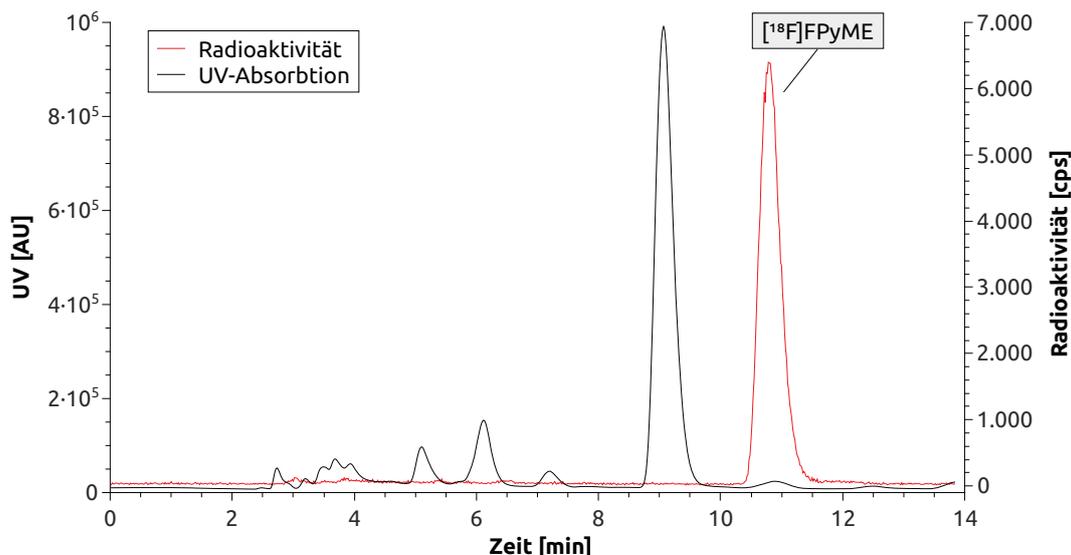


Abbildung 3.15: Chromatogramm der HPLC-Reinigung des Produkts $[^{18}\text{F}]\text{FPyME}$ aus der Reaktionsmischung.

Säule: Kromasil 100-5 C18 (250 x 10 mm), $\lambda = 214 \text{ nm}$, 4 mL/min

Laufmittel: Methanol/Wasser + TFA : 45/55 + 0,1 %

Mittels einer Kalibrationsgerade des inaktiven Standards FPyME wurde die molare Aktivität des so hergestellten $[^{18}\text{F}]\text{FPyME}$ bestimmt, welche zwischen 15 und 21 GBq/ μmol lag. Die Gesamtausbeute nach HPLC-Reinigung betrug $20 \pm 5 \%$ mit einer Synthesedauer von insgesamt 60 Minuten. Um die Synthese zu optimieren, wäre es denkbar, die beiden Reaktionsschritte in eine Eintopf-Synthese zu überführen. Hierfür müsste die Reaktionslösung nach der Markierung neutralisiert werden, um die anschließende Entschützung durchführen zu können. Dass eine Entschützung prinzipiell auch in DMSO realisierbar ist, wurde in einer Reaktion mit der nicht-radioaktiven Referenzverbindung **49** gezeigt. Nach einer Reaktionszeit von nur 30 Minuten bei $110 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde mittels DC nur das entschützte Produkt identifiziert. Weitere Untersuchungen der Möglichkeiten einer Eintopfsynthese, wie die Übertragung auf die Radiosynthese, sind noch erforderlich.

3.2.4 Kopplungsreaktionen von FPyME und $[^{18}\text{F}]\text{FPyME}$

Für die Reaktionen des Maleimids mit der Thiolgruppe wurden wie zuvor erst Testreaktionen mit der nicht-radioaktiven Verbindung durchgeführt. Die Reaktionsbe-

3.2 Peptidmarkierungen mit thiolreaktiven Gruppen

dingungen wurden ähnlich zu denen gewählt, wie sie auch schon für die Reaktion mit FBM genutzt wurden (vgl. Kapitel 3.2.1). Die Addition wurde für verschiedene Thiole untersucht: Cystein, Glutathion und (L-)D3-cy. Es wurden jeweils äquimolare Mengen von dem entsprechendem Thiol und FPyME in einem Phosphat-Puffer (pH 7,5) eingesetzt. Bei allen Reaktionen wurde innerhalb von 15 Minuten bei Raumtemperatur ein quantitativer Umsatz von FPyME gemessen. Die Produkte wurden über HPLC abgetrennt und massenspektrometrisch untersucht. Ebenso wie bei den Reaktionen mit FBM wurden auch hier jeweils zwei Produktpeaks identifiziert, wie in Abbildung 3.16 am Beispiel von der Reaktion von FPyME mit Cystein gezeigt wird.

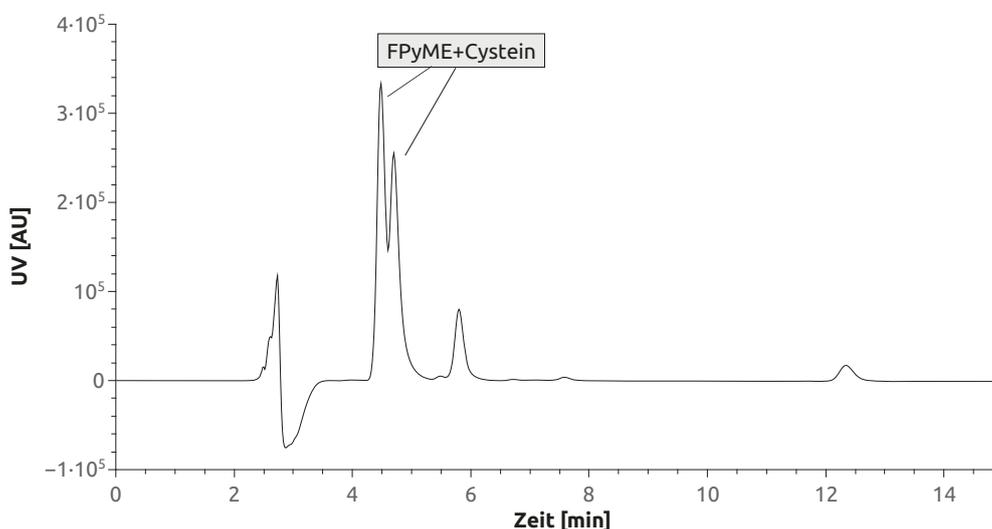


Abbildung 3.16: Chromatogramm der Produktlösung für die Reaktion zwischen FPyME und Cystein.

Säule: Kromasil 100-5 C18 (250 x 4,6 mm), $\lambda = 214$ nm, 1 mL/min
Laufmittel: Methanol/Wasser + TFA : 45/55 + 0,1 %

Für das Kopplungsprodukt zwischen den D3-Derivaten und FPyME musste ein alternatives chromatographisches System entwickelt werden, um eine Abtrennung des markierten Produkts vom ursprünglichen Peptid zu ermöglichen. Dies wurde über einen einstufigen Gradienten erreicht wie in Abbildung 3.17 am Beispiel der Reaktion mit D3-cy gezeigt wurde. Zum Vergleich ist hier auch eine Messung von FPyME aufgetragen, wodurch deutlich wird, dass sich dieses komplett umgesetzt

3 Ergebnisse und Diskussion

hatte. Auch hier kann das für die Additionsprodukte der Maleimide typische chromatographische Verhalten gemessen werden. Das Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung ist in Abbildung 3.18 wiedergegeben.

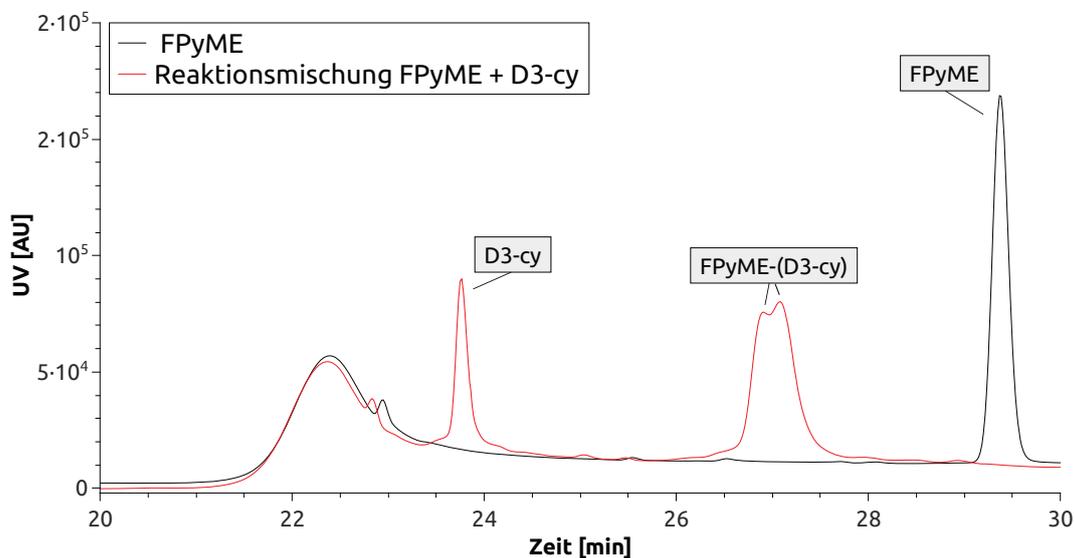


Abbildung 3.17: Ausschnitt aus dem HPLC-Chromatogramm der Produktlösung der Reaktion von FPyME mit D3-cy.

Säule: Kromasil 100-5 C18 (250 x 4,6 mm), 214 nm, 1 mL/min

Laufmittel: Methanol/Wasser + TFA : 0-15 Minuten: 20/80 + 0,1 %; 15-30 Minuten: 45/55 + 0,1 %

Aufgrund der guten Ergebnisse wurde direkt eine Übertragung der Reaktionsbedingungen auf die Radiosynthese durchgeführt. Dazu wurde die nach der HPLC-Reinigung erhaltende prosthetische Gruppe [^{18}F]FPyME getrocknet, in Acetonitril aufgenommen und mit jeweils 10 μg Peptid (D3-cy oder L-D3-cy) in Phosphat-Puffer (pH 7,5) versetzt. Nach 15 Minuten Reaktionszeit wurden für das all-D-Derivat eine radiochemische Ausbeute von über 95 % identifiziert. Für das L-Derivat von D3-cy lagen die Ausbeuten bei ca. 50 %. Jedoch gelang es nicht, die Produkte mittels HPLC quantitativ abzutrennen. Hierbei wurde teilweise ein Aktivitätsverlust um 80 % gemessen. Dies resultierte aus der sehr hohen Affinität zu Glas, wodurch ein Großteil des Produkts bereits bei der Injektion auf die HPLC-Anlage in der Glas-Spritze haften blieb.

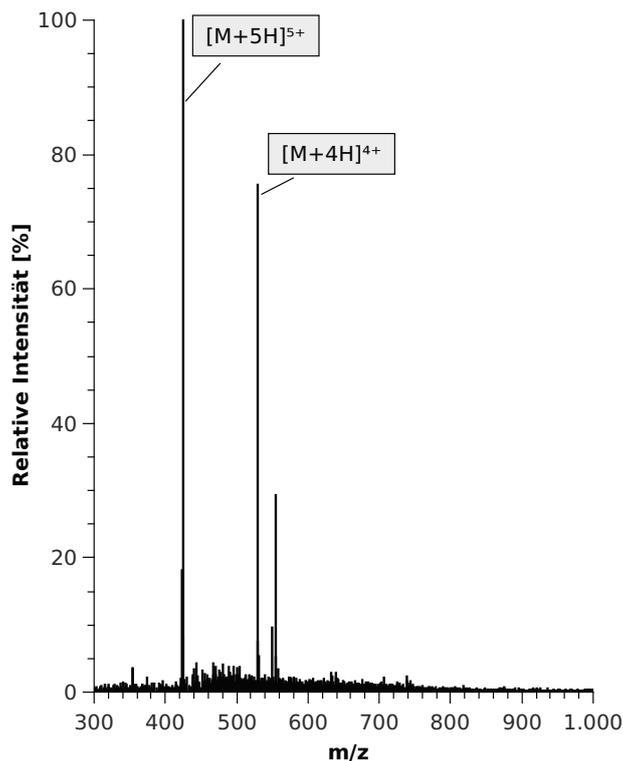


Abbildung 3.18: Massenspektrum der Lösung des abgetrennten Peaks von der Reaktion von FPyME mit D3-cy zur Identifikation des Produkts ($M = 2115 \text{ g/mol}$, $[M + 4H]^{4+} = 529,8$, $[M + 5H]^{5+} = 424$).

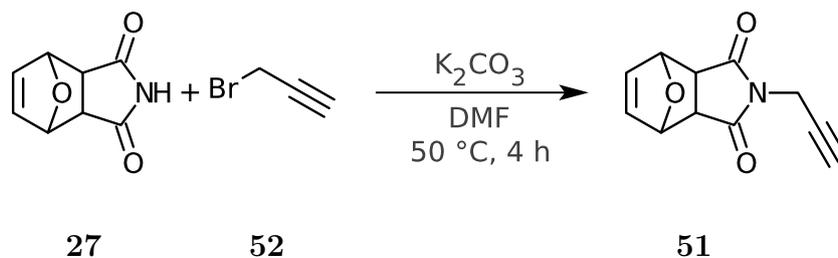
Insgesamt wurden sowohl D3-cy als auch L-D3-cy erfolgreich mit der thiol-reaktiven Gruppe $[^{18}\text{F}]\text{FPyME}$ markiert. Die Gesamtsynthesedauer, inklusive der Darstellung von $[^{18}\text{F}]\text{FPyME}$, betrug etwa 120 Minuten. Diese beiden Derivate wurden für präklinische *in vitro* Studien genutzt (siehe Kapitel 3.3).

3.2.5 Funktionalisierung von Peptiden mittels thiol-reaktiver Gruppen

Zur Ermöglichung weiterer Markierungsverfahren von Peptiden, welche eine Cystein-Funktion beinhalten, wurde eine Funktionalisierung mittels einer thiol-reaktiven Gruppe durchgeführt. Hier wurde zunächst eine Alkin-Funktion gewählt, welche die Möglichkeit bietet, Click-Reaktionen über eine 1,3-dipolare Cycloaddition an diesen Peptiden durchführen zu können.

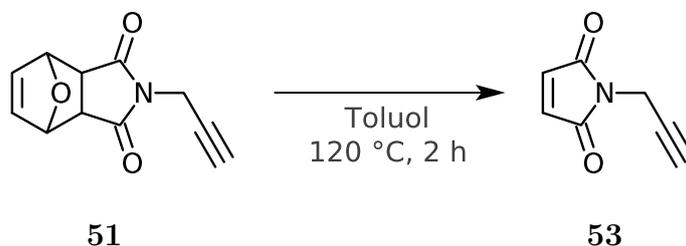
3 Ergebnisse und Diskussion

Schema 3.24 zeigte bereits die Darstellung des mit Furan geschützten Maleimids. Dieses wurde nach BINDER *et al.* mit Propargylbromid zur Darstellung von *N*-(Prop-2-in)-7-oxabicyclo[2.2.1]-hept-5-en-2,3-dicarbonylimid **51** eingesetzt (vgl. Schema 3.45). Das Produkt wurde mit einer guten Ausbeute von 84% erhalten und mittels NMR-Spektroskopie identifiziert.



Schema 3.45: Synthese von **51** über die *N*-Alkylierung von des Furan-geschütztem Maleimids **27**.

Das Maleimid wurde wiederum über eine anschließende Retro-DIELS-ALDER-Reaktion entschützt (vgl. Schema 3.46). Die Reaktion wurde mit einer Ausbeute von 81% durchgeführt und das Produkt mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert.

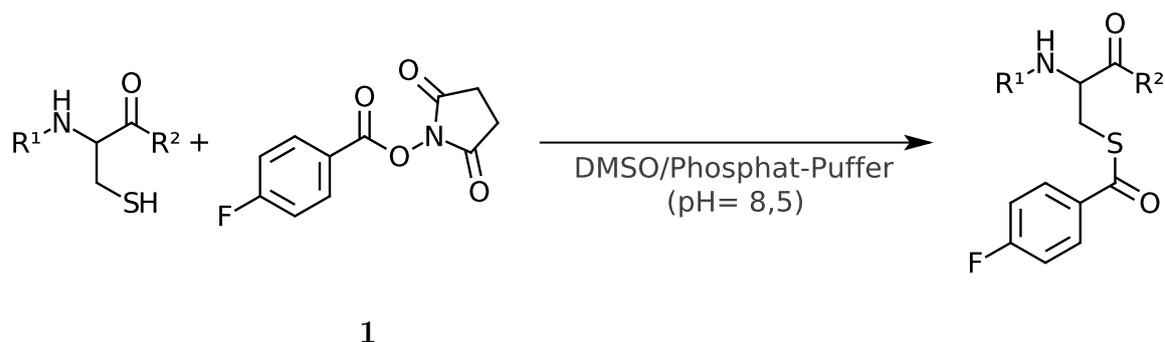


Schema 3.46: Retro-DIELS-ALDER-Reaktion zur Darstellung von *N*-(Prop-2-in)maleimid **53**.

N-(Prop-2-in)maleimid **53** sollte nun entsprechende genutzt werden um Peptide zu funktionalisieren. Dies konnte am Beispiel von Glutathion demonstriert werden. So wurden nach Zugabe von **53** zu Glutathion in einem äquimolaren Verhältnis bei einer Gesamtkonzentration von 30 nmol/100 μ L Signale der gesuchten Verbindung massenspektrometrisch identifiziert. Weitere Untersuchungen mit anderen Peptiden, sowie die weiteren Reaktionen mit (radio-)fluorierten Aziden erscheinen aufgrund der erzielten Ergebnisse sinnvoll und aussichtsreich

3.2.6 SFB als thiol-reaktive Gruppe

Obwohl das Acylierungsreagenz SFB ursprünglich für Reaktionen an Aminen bestimmt ist, weist dieses auch eine Reaktivität gegenüber Thiol-Funktionen auf. ABAD *et al.* konnten zeigen, dass auch eine Markierung mit diesem Aktivester an einem Cystein-Rest möglich ist, insbesondere wenn er sich im Peptid benachbart zu einem Arginin befindet (vgl. Schema 3.47).^[102]



Schema 3.47: Vereinfachtes Schema der Reaktion des Aktivesters SFB mit einer Cystein-Einheit. ^{nach}[102]

Da das D3-Derivat, welches mit Cystein und Tyrosin am C-Terminus verlängert wurde genau diese Eigenschaft aufweist, boten sich auch hier Untersuchungen an, um eine Markierung mit SFB am Thiol zu erhalten. Jedoch konnte unter den von ABAD *et al.* angegebenen Reaktionsbedingungen keine erfolgreiche Kopplung der inaktiven Referenzverbindung SFB an D3-cy erreicht werden.

3.3 Autoradiographische Bindungsstudien

Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften des D3-Peptids an β -Amyloid-Plaques wurden die mit $[^{18}\text{F}]\text{FPyME}$ radiomarkierten Derivate L-D3-cy und D3-cy (im Folgendem kurz: L- $[^{18}\text{F}]\text{D3-cy}$ bzw. $[^{18}\text{F}]\text{D3-cy}$) bei autoradiographischen *in vitro* Bindungsstudien eingesetzt. Zum Einsatz kamen Gehirnschnitte von APPSWE-Mäusen (Model 1349-T), welche hohe Konzentrationen von β -Amyloide exprimieren und dadurch eine hohe Anzahl von Plaques ausbilden. Zur Kontrolle wurden Schnitte

3 Ergebnisse und Diskussion

von PPSWE-Mäusen (Model 1349-W) genutzt, welche keine Plaques ausbilden. Zur Auswertung der autoradiographischen Untersuchungen wurden nach Abklingen der Radioaktivität Vergleichsfärbungen der Schnitte mit Kongorot durchgeführt.

Von den ^{18}F -markierten Derivaten des D3-Peptids wurden 30 bis 100 kBq Aktivität in einer Pufferlösung verdünnt, in welche die Mäusegehirnschnitte inkubiert wurden. Die Schnitte wurden gewaschen und auf Phosphor Imager Platten exponiert, welche je nach Aktivitätsmenge nach 2-3 Stunden an einem Phosphor Imager BAS-Reader ausgelesen wurden. Die ersten Messungen wurden in einem TRIS-Puffer jeweils für ^{18}F]D3-cy und L- ^{18}F]D3-cy durchgeführt. In Abbildung 3.19 und 3.20 sind die Ergebnisse abgebildet.

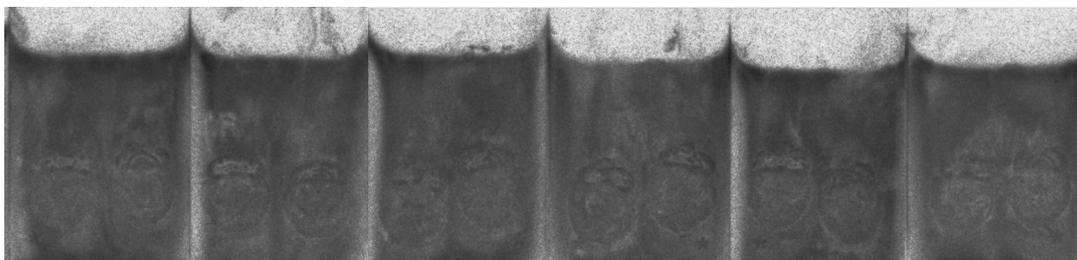


Abbildung 3.19: Autoradiographische Untersuchung von Mäusegehirnschnitten nach Inkubation in TRIS-Puffer mit ^{18}F]D3-cy.
(1-4: Amyloid-positiv; 5-6 Kontrolle)

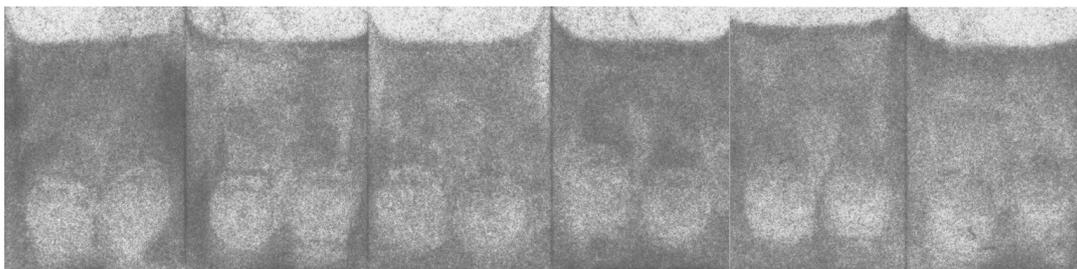


Abbildung 3.20: Autoradiographische Untersuchung von Mäusegehirnschnitten nach Inkubation in TRIS-Puffer mit L- ^{18}F]D3-cy.
(1-4: Kontrolle; 5-6: Amyloid-positiv)

Deutlich erkennbar ist die sehr hohe Glasaffinität dieser Verbindungen. Trotz mehrfachen Waschens der Objektträger nach der Inkubation in der Puffer-Lösung,

3.3 Autoradiographische Bindungsstudien

welche den Radioliganden enthielt, verblieb die Aktivität auf der Oberfläche. Das all-D-Peptid zeigt zusätzlich auch eine hohe Affinität am Gewebe. Die Gehirnschnitte heben sich kaum durch höhere oder niedrigere Aktivitäten von dem Rest des Objektträgers ab, was eine Interpretation außerordentlich erschwert (siehe Abb. 3.19). Während die L-enantiomere Verbindung zwar ein ähnliches Verhalten bezüglich der Glasaffinität zeigt, scheint dieses jedoch fast nicht am Gewebe zu binden. Theoretisch bietet dies den Vorteil, eine mögliche Bindung des Liganden an β -Amyloid-Plaques deutlicher zu erkennen, jedoch wurde in keiner Position am Gewebe eine vermehrte Aktivität beobachtet.

Damit sich die Mäusegehirnschnitte besser vom Glasuntergrund abheben, wurde zunächst die Wahl des Puffers variiert. Statt des zunächst eingesetzten TRIS-Puffers wurde ein PBS-Puffer genutzt. Wie in Abbildung 3.21 zu erkennen ist, heben sich die Schnitte unter diesen Bedingungen deutlicher ab. Eine weitere Erhöhung des Kontrastes konnte durch die Zugabe von Bovine Serum Albumin (BSA) erreicht werden, wie in Abbildung 3.22 deutlich wird.

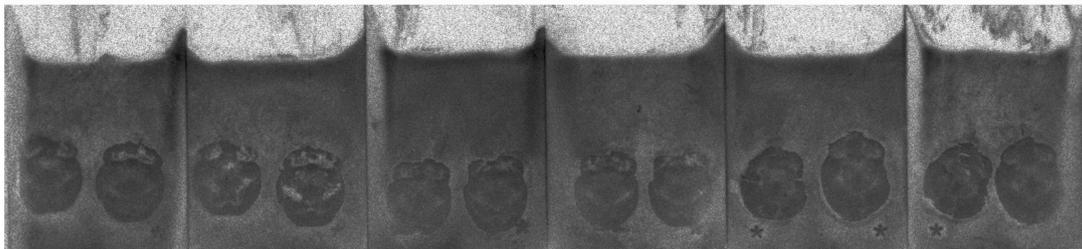


Abbildung 3.21: Autoradiographische Untersuchung von Mäusegehirnschnitten nach Inkubation in PBS-Puffer mit $[^{18}\text{F}]\text{D3-cy}$.
(1-4: Amyloid-positiv, 5-6: Kontrolle)

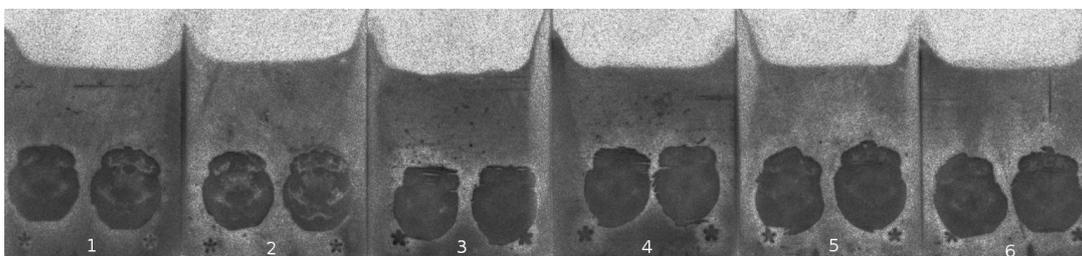


Abbildung 3.22: Autoradiographische Untersuchung von Mäusegehirnschnitten nach Inkubation in PBS-Puffer mit BSA und $[^{18}\text{F}]\text{D3-cy}$.
(1-4: Amyloid-positiv, 5-6: Kontrolle)

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Verbesserung bezüglich des Kontrastes des abzubildenden Gewebes in Abhängigkeit vom für die Inkubation gewählten Puffer ist auch nochmals in Abbildung 3.23 verdeutlicht. Der Grauwert der „Plattenschwärzung“ wurde für verschiedene Punkte einer Linie gemessen. Diese Linie wurde so gewählt, dass sie zur Hälfte innerhalb und zur anderen Hälfte außerhalb des Gewebes verläuft. Der Grauwert ist proportional zur Aktivität; je höher der Grauwert, desto niedriger die an diesem Punkt vorhandene Aktivität.

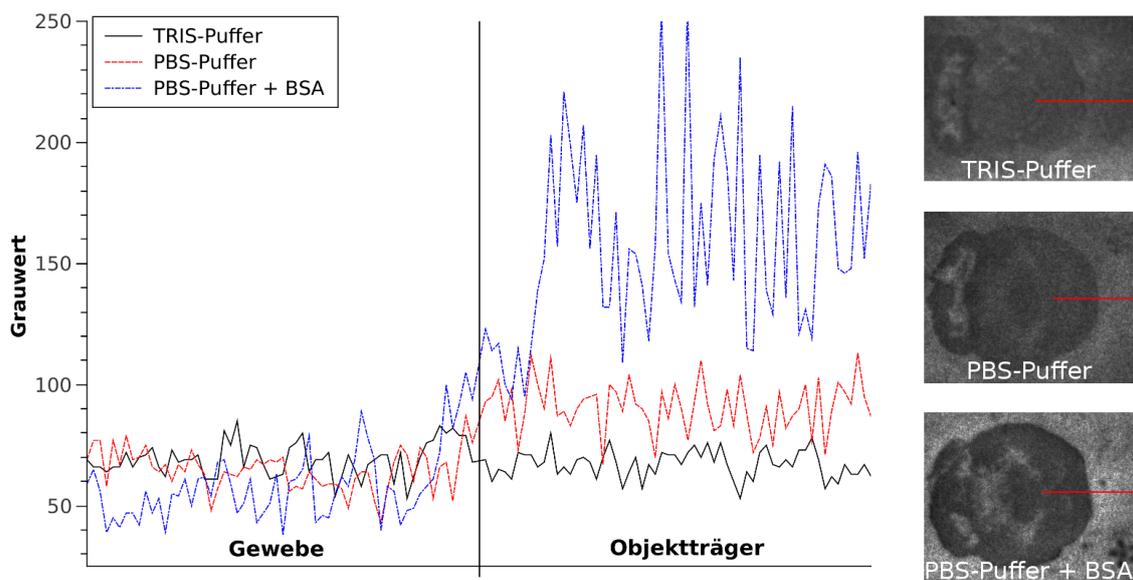


Abbildung 3.23: Bestimmung des relativen Kontrastes vom Gewebe zum Objektträger bei Verwendung verschiedener Puffer-Lösungen.

Für die L-Form wurde dieselbe Optimierung durchgeführt. Aber hier zeigte sich auch unter den variierten Bedingungen keine Änderung der Affinität zum Gewebe (vgl. Abbildung 3.24 und 3.25).

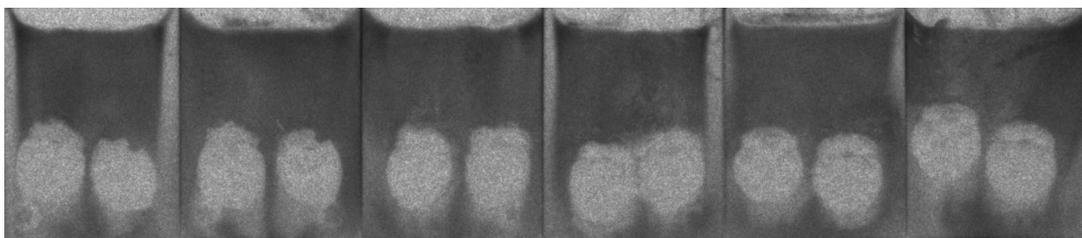


Abbildung 3.24: Autoradiographische Untersuchung von Mäusegehirnschnitten nach Inkubation in PBS-Puffer mit L-[¹⁸F]D3-cy. (1-4: Amyloid-positiv, 5-6: Kontrolle)

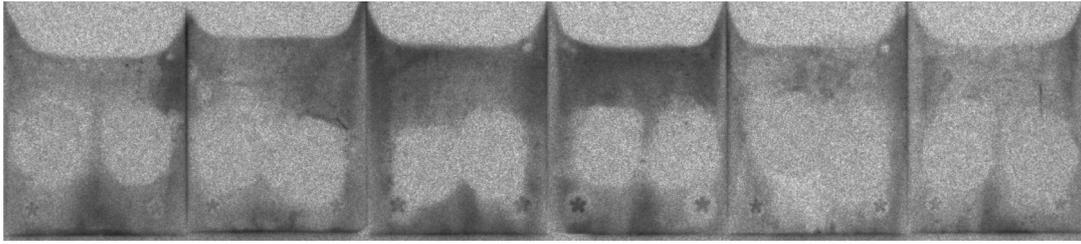


Abbildung 3.25: Autoradiographische Untersuchung von Mäusegehirnschnitten nach Inkubation in PBS-Puffer mit BSA und L-[¹⁸F]D3-cy. (1-4: Amyloid-positiv, 5-6: Kontrolle)

Zur optischen Visualisierung der β -Amyloid-Plaques wurden diese mit Kongorot eingefärbt. Ablagerungen können so mittels eines Mikroskops als rote Verfärbungen erkannt werden. Eine genaue Identifizierung ist allerdings erst mit kreuzpolarisiertem Licht möglich, wodurch es zu einer Grünfärbung der Amyloid-Ablagerungen kommt. In Abbildung 3.26 ist ein Beispiel für die Rotfärbung der β -Amyloide sowie deren Grünfärbung unter kreuzpolarisiertem Licht dargestellt.

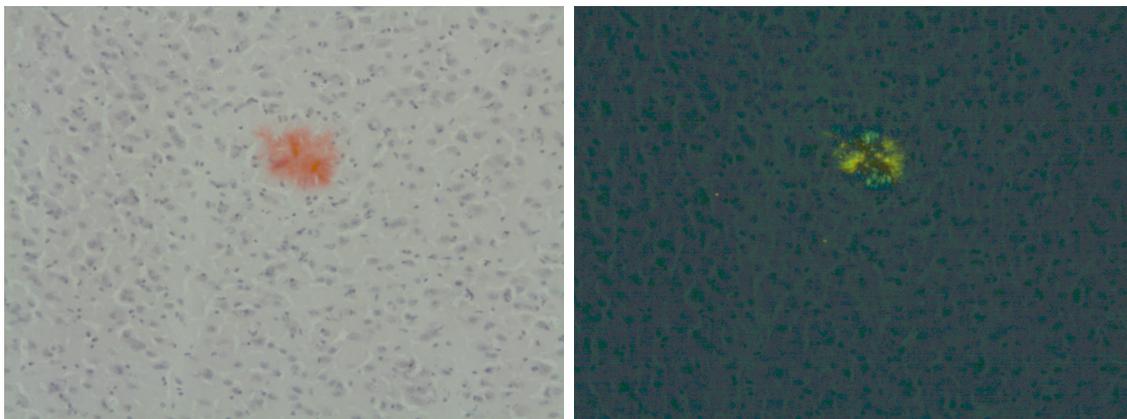


Abbildung 3.26: Beispiel einer mikroskopische Aufnahme eines Amyloid-Plaques in einem der Mäusegehirnschnitte in *normalem* (links) und kreuzpolarisiertem Licht (rechts).

Für den Vergleich der Autoradiographien mit der Kongorot-Färbung wurden insbesondere die Ergebnisse von [¹⁸F]D3-cy nach der Inkubation in PBS-Puffer mit Zusatz von BSA betrachtet, da hier der beste Kontrast zur Glasoberfläche erreicht werden konnte. Hierfür wurden auffällige Stellen in der Autoradiographie identifiziert, welche dann unter dem Mikroskop genau untersucht wurden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Teilweise ist eine vermehrte Aufnahme des Liganden an der Hirnrinde zu erkennen. In der Abbildung 3.27 ist dazu ein Beispiel wiedergegeben. Die markierten Ausschnitte zeigten durch eine intensivere Graufärbung eine höhere Aufnahme der Radioaktivität und damit eine höhere Bindung des Liganden. Diese Ausschnitte wurden genauer mittels Mikroskopie untersucht. In Abbildung 3.27 ist in dem links markierten Bereich eine deutliche Anreicherung des radiomarkierten Liganden zu beobachten. Dieser Ausschnitt wies auch bei der mikroskopischen Untersuchung eine deutliche Rotfärbung auf. Mittels polarisiertem Licht war in diesem Bereich übereinstimmend auch eine Grünfärbung zu erkennen, was die Anwesenheit von β -Amyloid belegt. Auch in dem rechts markierten Bereich lässt sich ein leichter Anstieg der gemessenen Aktivitätsmenge feststellen. Hier wurde ebenfalls durch mikroskopische Untersuchungen bestätigt, dass in diesem Ausschnitt β -Amyloide vermehrt zu finden sind.

JAHAN *et al.* führen autoradiographische *in vitro* Untersuchungen mit ^{18}F -markierten Derivaten des D1-Peptids an humanen Gehirnschnitten durch.^[80] Auch das D1-Peptid zeigt eine vermehrte Aufnahme in die Großhirnrinde. Ebenso wird eine vermehrte Aufnahme im Hippocampus beschrieben. Dies kann für die hier verwendeten D3-Derivate nicht berichtet werden. Teilweise kommt es bei den hier durchgeführten Messungen zu keiner bzw. deutlich weniger Aktivitätsanreicherung im Hippocampus (siehe Abbildung 3.22 und 3.27).

Zusammenfassend kann aufgrund der autoradiographischen Untersuchungen gesagt werden, dass an den Gebieten, wo eine vermehrte Aktivität im Vergleich zum restlichen Gewebe gemessen wurde, auch eine β -Amyloid-Anreicherung gefunden werden kann. Jedoch zeigte sich auch, dass deutlich mehr Gewebeareale A β -Plaques aufweisen, die mittels Kongorot identifiziert wurden, aber in den meisten Fällen keine vermehrte Bindung von [^{18}F]D3-cy zu beobachten war. Daher ist auch anzunehmen, dass bei einem potentiellen Einsatz als Radiotracer *in vivo* zwar eine Bindung gemessen werden kann, jedoch keine quantitative Aussage über das Ausmaß der Plaque-Ablagerungen getroffen werden kann. Ob [^{18}F]D3-cy überhaupt für *in vivo* Untersuchungen in Betracht gezogen werden kann, hängt zusätzlich aber noch

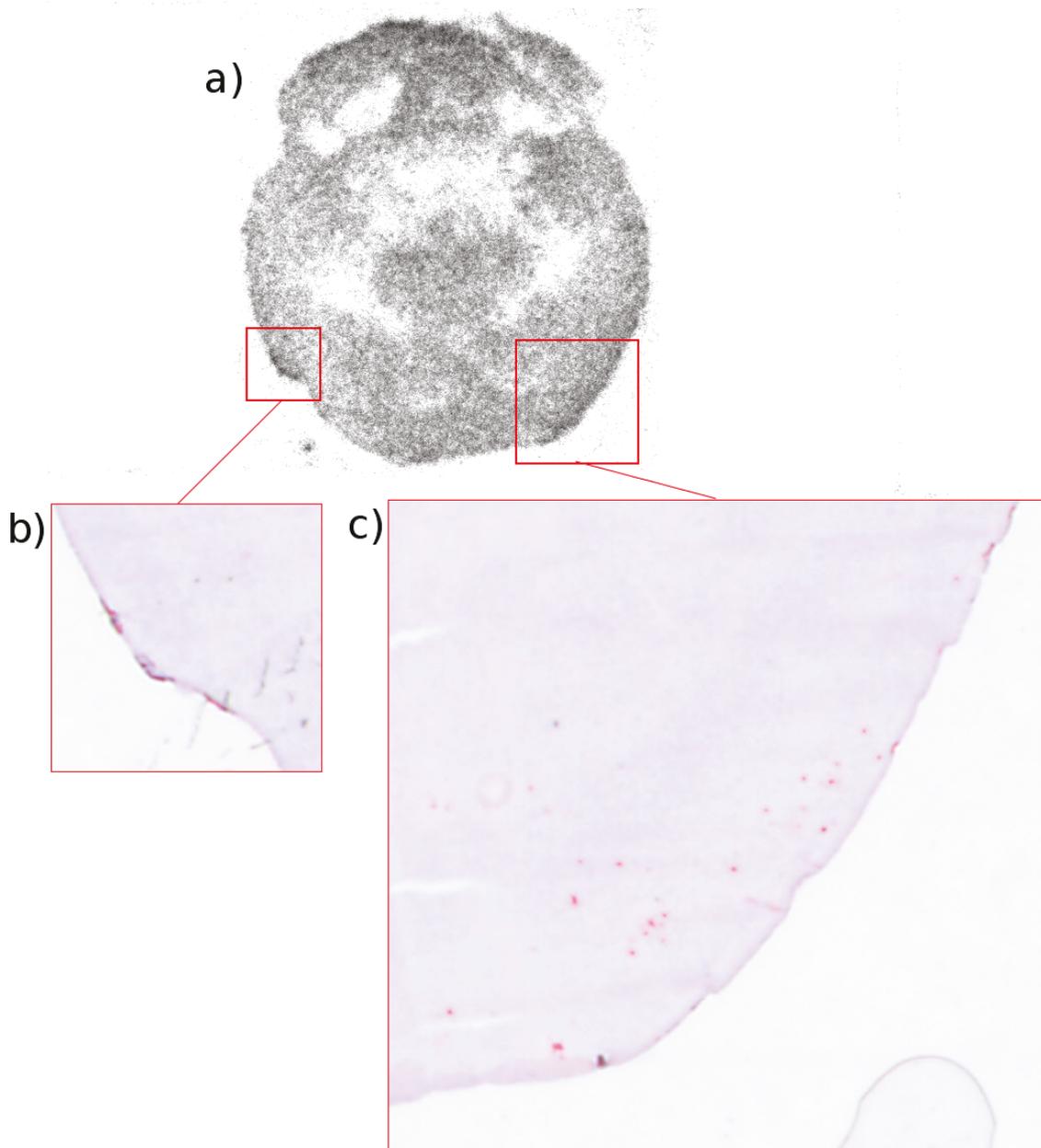


Abbildung 3.27: Beispiel eines Vergleichs zwischen Autoradiographie (Objektträger 2, linker Schnitt, siehe Abb. 3.21) und anschließender mikroskopischer Untersuchung. Markierte Bereiche in a) wiesen eine vermehrte Anreicherung der Aktivität auf. Vergrößerungen b) und c) sind entsprechende mikroskopischen Untersuchungen zur Identifikation möglicher β -Amyloide nach der Färbung mit Kongorot.

3 Ergebnisse und Diskussion

von anderen Faktoren ab, wie z. B. die Bluthirnschrankengängigkeit. Diese scheint zunächst sehr unwahrscheinlich, da Peptide nur sehr selten die Bluthirnschranke (engl.: blood brain barrier, BBB) überwinden können, da die typischen Voraussetzungen hierfür nicht erfüllt sind (z. B.: $\log D_{7,4} = 2,0 - 3,5$; $M < 500 \text{ Da}^{[103]}$). Für das D3-Peptid wurden jedoch von LIU *et al.* Experimente an einem *in vitro* Modell durchgeführt, wobei die Möglichkeit zur Überwindung der BBB über einen parazellulären Weg angenommen wurde.^[104] Für eine genauere Aufklärung der molekularen Transportermechanismen erscheinen noch zahlreiche weitergehende *ex vivo* oder *in vivo* Experimente an Tiermodellen notwendig.

4 Experimenteller Teil

4.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Das Peptid all-D D3-k wurde von *JPT Peptide Technologies GmbH* synthetisiert, das Lysin-haltige Testpeptid (PHPFHLLFVYK) wurde über *bachem AG* bezogen. Die anderen genutzten Peptide wurden von *Genaxxon Bioscience GmbH* hergestellt. Alle weiteren verwendeten Chemikalien sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben und wurden, wenn nicht anders erwähnt, ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Tabelle 4.1: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Reinheitsgrad	Lieferant
Aceton	p.a.	Merck
Acetonitril	trocken, 99,8 %	Sigma-Aldrich
Acetonitril	p.a.	Merck
3-(4-Aminophenyl)propionsäure	97 %	Sigma-Aldrich
L-Arginin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
L-Asparagin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
3-N-Boc-1-propanol	97 %	Sigma-Aldrich
3-Brompropylaminhydrobromid	98 %	Sigma-Aldrich
Boc-L-Arginin	mit 5-10 % n-Butanol verunreinigt	Sigma-Aldrich
Boc-L-Asparagin	98,5 %	Sigma-Aldrich
Boc-L-Lysin	99 %	Sigma-Aldrich

Tabelle 4.1: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Reinheitsgrad	Lieferant
4-(Chlormethyl)benzoesäure	95 %	Sigma-Aldrich
Chloroform	p.a.	Merck
Cobalt(II)acetat	99,995 %	Sigma-Aldrich
L-Cystein	97 %	Sigma-Aldrich
1,3-Dibrompropan	99 %	Sigma-Aldrich
Dichlormethan	p.a.	Merck
Diisopropylazodicarboxylat	98 %	Sigma-Aldrich
Diethylether	p.a.	Merck
4-(Dimethylamino)benzaldehyd	98 %	Sigma-Aldrich
4-(Dimethylamino)benzoat	98 %	Sigma-Aldrich
4-(Dimethylamino)benzotrinitril	98 %	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid	trocken, 99,8 %	Sigma-Aldrich
2,5-Dimethylfuran	99 %	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	> 99 %	Sigma-Aldrich
1,4-Dioxan	99,8 %	Sigma-Aldrich
<i>N,N'</i> -Disuccinimidylcarbonat	≥ 95 %	Sigma-Aldrich
Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat	99 %	Sigma-Aldrich
DPX, Einschlussmittel für die Histologie	-	Merck
Essigsäure	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Ethanol	p.a.	Merck
Ethylacetat	p.a.	Merck
Ethyl-4-(dimethylamino)benzoat	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
4-Fluorbenzoesäure	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
4-Fluorbenzylamin	97 %	Sigma-Aldrich
4-Fluorbenzylbromid	97 %	Sigma-Aldrich

Tabelle 4.1: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Reinheitsgrad	Lieferant
4-Fluorbenzonnitril	99 %	Sigma-Aldrich
2-Fluor-3-hydroxypyridin	k.a.	Fluorochem
Furan	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Glutathion, reduziert	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Hexan	p.a.	Merck
4,7,13,16,21,24-Hexaoxo-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosan (Kryptofix [®])	98 %	Sigma-Aldrich
3-Hydroxy-2-nitropyridin	97 %	Sigma-Aldrich
Kaliumcarbonat	p.a.	Merck
Kaliumiodid	p.a.	Merck
Kongorot	0,2 % in SD-3A-Alkohol, 80 %; gesättigt mit NaCl	Sigma-Aldrich
L-Lysin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
Maleimid	99 %	Sigma-Aldrich
Maleinsäureanhydrid	puriss, ≥ 95 %	Sigma-Aldrich
Mayers Hämotoxylin-Lösung	-	Sigma-Aldrich
Methanol	p.a.	Merck
Methyltrifluormethansulfonat	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
Natriumazid	purum p.a ≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Natriumborhydrid	99 %	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	p.a.	Merck
Natriumchlorid-Lösung (gesättigt)	SD-3A-Alkohol, 80 %	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat	p.a.	Merck
Natriumhydroxid-Lösung	1 % in SD-3A-Alkohol, 80 %; gesättigt mit NaCl	Sigma-Aldrich
Natriumnitrat	p.a.	Merck

Tabelle 4.1: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Reinheitsgrad	Lieferant
Natriumsulfat	p.a.	Merck
Propargylbromid	purum, 8 % in Toluol	Sigma-Aldrich
Tetrahydrofuran	$\geq 99,5 \%$	Sigma-Aldrich
Tetrabutylammoniumhydroxid	40 % in H ₂ O; 1,5 M	Fluka
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(<i>N</i> -succinimidyl)uroniumhexafluorophosphat (HSTU)	$\geq 99 \%$	Sigma-Aldrich
Toluol	p.a.	Merck
Triphenylphosphin	98,5 %	Fluka
Trifluoressigsäure	99 %	Sigma-Aldrich
Triethylamin	$\geq 99 \%$	Sigma-Aldrich
Xylol	p.a.	KMF Laborchemie
Zitronensäure	p.a.	Merck

NMR-Spektroskopie: Die ¹H-, ¹³C- und ¹⁹F-NMR Spektren wurden an einem *Bruker DPX Avance 200* der Firma *Bruker Bio Spin GmbH* (Rheinstetten, Deutschland) Spektrometer durchgeführt. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz angegeben.

Massenspektrometrie: Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden mittels Elektronensprayionisation (ESI) an einem *Surveyor MSQ* der Firma *Thermo Fisher Scientific GmbH* (Dreieich, Deutschland) durchgeführt.

Schmelzpunktbestimmung: Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mittels des *Melting Point B-540 Instruments* der Firma *Büchi Labortechnik* (Flawil, Schweiz).

Säulenchromatographie: Die Reinigung der Produkte mittels Säulenchromatographie erfolgte über Silicagel mittels Verwendung des *Reveleris Flash Chromatographiesystems* der Firma *Grace* (Breda, Niederlande).

4.2 Synthesen der Markierungsvorläufer und Referenzverbindungen

(Radio-)Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC): Für Untersuchungen mittels HPLC wurde eine Anlage bestehend aus der Pumpe *K-500* und dem Spektralphotometer *K-2500* der Firma *Knauer* (Berlin, Deutschland) sowie aus *EG & G Ortec Ace Mate Amplifier and Bias Supply* (Oak Ridge, USA) als Verstärker für einen NaI(Tl)-Detektorkristall.

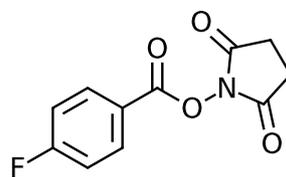
(Radio-)Dünnschichtchromatographie (DC): DC-Untersuchungen erfolgten auf mit Kieselgel beschichteten Aluminiumfolien (*Alugram Sil G/UV₂₅₄*) der Firma *Machery & Nagel* (Düren, Deutschland). Die Aktivitätsmessung wurde mittels einem *Instant IMAGER* der Firma *Packard* (Dreieich, Deutschland) durchgeführt.

Autoradiographie: Die Auswertung der Phosphor Imager Platten für die Autoradiographie erfolgte am *Phosphor Imager BAS 500* der Firma *Fujifilm* (Tokio, Japan) mit dazu gehöriger Software.

4.2 Synthesen der Markierungsvorläufer und Referenzverbindungen

Im Folgendem werden zunächst die Synthesen zur Darstellung der Markierungsvorläufer und nicht-radioaktiven Referenzverbindungen sowie deren Analogreaktionen mit entsprechenden Aminosäuren und Peptiden wiedergegeben. Die Synthesen erfolgten teilweise nach oder in Anlehnung an bereits bekannte Literatur. Zur Vollständigkeit sind die entsprechenden Synthesen hier angegeben und mit „aus“ oder „nach“ gekennzeichnet.

Succinimidyl-4-fluorobenzoat ^{aus[87]}



1

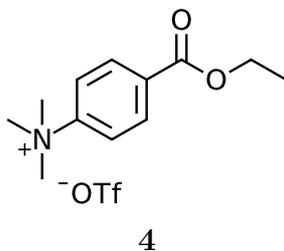
In 18 mL trockenem Acetonitril wurden 498 mg (3,6 mmol) 4-Fluorbenzoesäure und 905 mg (3,6 mmol) *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat gelöst und mit 0,5 mL (3,6 mmol)

4 Experimenteller Teil

Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 3,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und nach Entfernung des Lösungsmittels bei vermindertem Druck wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Dichlormethan, 100 %). Nach Abdampfen des Laufmittels konnte **1** als farbloser Feststoff gewonnen werden.

1	$C_{11}H_8FNO_4$
Ausbeute	315 mg (1,3 mmol, 36 %)
Schmelzpunkt	109,2°C
DC	$R_f = 0,22$ (Dichlormethan)
MS (ESI)	theor.: 237,18 g/mol; exp.: m/z 238,20 [M+H] ⁺
¹ H-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm) = 8,16-8,23 (m, 2H, 2×ArH), 7,18-7,27 (m, 2H, 2×ArH), 2,93 (s, 4H, CH ₂ -CH ₂).
¹⁹ F-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm) = -101,26.
¹³ C-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm) = 169,35, 164,32, 160,95, 133,41, 121,41, 116,35, 25,69.

Ethyl-4-(trimethylammonium)benzoat triflat ^{aus[80]}



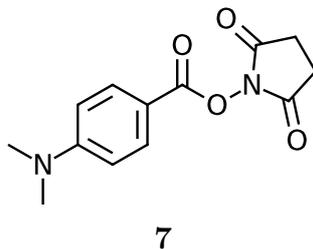
In 40 mL Dichlormethan wurden 1 g (5,18 mmol) Ethyl-4-(Dimethylamino)benzoat gelöst und mit 680 μ L (6,33 mmol) Methyltriflat versetzt. Nach 18 Stunden wurde das Volumen der Lösung um die Hälfte reduziert und langsam in eisgekühlten Diethylether gegeben. Der sich bildende farblose Niederschlag wurde abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

4	$C_{13}H_{19}F_3NO_4$
Ausbeute	1,59 g (4,44 mmol, 86 %)

4.2 Synthesen der Markierungsvorläufer und Referenzverbindungen

Schmelzpunkt	108,4°C
MS (ESI)	theor.: 208,28 g/mol; exp.: m/z 208,08 [M] ⁺
¹ H-NMR (DMSO)	δ (ppm) = 8,10 (q, 4H, 4×ArH), 4,32 (q, 2H, CH ₂), 3,69 (s, 9H, 3×N-CH ₃), 1,34 (t, 3H, CH ₃).
¹⁹ F-NMR (DMSO)	δ (ppm) = -78,16.

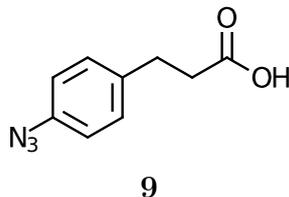
Succinimidyl-4-(dimethylamino)benzoat ^{nach[91]}



In 6 mL Dimethylformamid wurden 165 mg (1 mmol) 4-(Dimethylamino)benzoesäure und 360 mg (1 mmol) *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(*N*-succinimidyl)uroniumhexafluorophosphat (HSTU) gemischt und nach Zugabe von 142 µL Triethylamin zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von 10 mL 10 %iger Salzsäure konnte das Produkt **7** als farbloser Niederschlag erhalten werden, welcher abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet wurde.

7	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₄
Ausbeute	131 mg (0,5 mmol, 50 %)
Schmelzpunkt	208,2°C
MS (ESI)	theor.: 262,26 g/mol; exp.: m/z 263,13 [M+H] ⁺
¹ H-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm) = 7,98-8,03 (m, 2H, 2×ArH), 6,68-6,73 (m, 2H, 2×Ar-H), 3,11 (s, 6H, 2×N-CH ₃), 2,91 (s, 4H, CH ₂ -CH ₂).
¹³ C-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm) = 196,91, 161,94, 154,32, 132,59, 110,98, 40,12, 25,71.

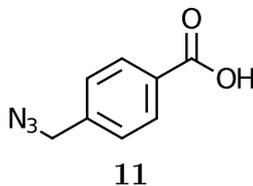
3-(4-Azidophenyl)propionsäure nach[105]



330 mg (2 mmol) 3-(4-Aminophenyl)propionsäure wurden in 2 mL halbkonzentrierter Salzsäure gelöst und auf 0°C abgekühlt. 138 mg (2 mmol) Natriumnitrat wurden in 1 mL Wasser gelöst und langsam dazu getropft. Anschließend wurden 143 mg (2,2 mmol) Natriumazid ebenfalls in 1 mL Wasser gelöst und tropfenweise hinzu gegeben. Nach etwa 30 Minuten unter Rühren wurde das Produkt als dunkelgelber Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

9	$C_9H_{10}N_3O_2$
Ausbeute	202 mg (1,05 mmol, 53 %)
Schmelzpunkt	102,8°C
1H -NMR ($CDCl_3$)	δ (ppm) = 10,04 (<i>s_{br}</i> , 1H, OH), 7,24 (d, 2H, $J = 8,4$, $2 \times ArH$), 7,00 (d, 2H, $J = 8,4$, $2 \times ArH$), 2,98 (t, 2H, $J = 7,5$, CH_2), 2,71 (t, 2H, $J = 7,5$, CH_2).
^{13}C -NMR ($CDCl_3$)	δ (ppm) = 179,11, 138,23, 136,90, 129,70, 119,20, 35,59, 29,93.

4-(Azidomethyl)benzoesäure nach[106]



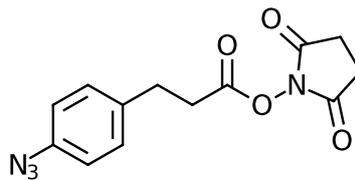
In 20 mL Ethanol wurden 302 mg (1,77 mmol) 4-(Chlormethyl)benzoesäure und 302 mg (4,65 mmol) Natriumazid gelöst und für etwa 18 Stunden unter Rückfluss auf 85°C erhitzt. Nachdem die Reaktionsmischung abgekühlt war, wurde sie mit

4.2 Synthesen der Markierungsvorläufer und Referenzverbindungen

20 mL Wasser und einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt und auf 0 °C gekühlt. Das Produkt wurde als farbloser Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

11	$C_8H_8N_3O_2$
Ausbeute	225 mg (1,3 mmol, 73 %)
Schmelzpunkt	133,9 °C
1H -NMR (DMSO)	δ (ppm) = 13,03 (<i>s_{br}</i> , 1H, OH), 7,99 (d, 2H, J = 8,14, 2×ArH), 7,51 (d, 2H, J = 8,14, 2×ArH), 4,59 (s, 2H, CH ₂).
^{13}C -NMR (DMSO)	δ (ppm) = 167,46, 141,10, 130,91, 130,17, 128,81, 53,55.

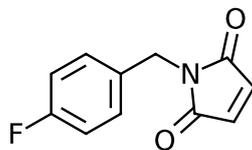
Succinimidyl-3-(4-azidophenyl)propanat ^{nach[91]}



13

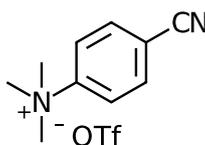
100 mg (0,51 mmol) der Verbindung **9** und 185 mg (0,51 mmol) HSTU wurden in 3 mL Dimethylformamid gelöst und mit 74 μ L Triethylamin gemischt. Nach 3 Stunden wurde die Lösung mit 10 %iger Salzsäure versetzt und der entstandene hellgelbe Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

13	$C_{13}H_{13}N_4O_4$
Ausbeute	90 mg (0,31 mmol, 61 %)
Schmelzpunkt	103,8 °C
1H -NMR (CDCl ₃)	δ (ppm) = 7,30-7,23 (m, 1H, 2×ArH), 7,03-6,98 (m, 2H, 2×ArH), 3,10-2,86 (m, 8H, 4×CH ₂).
^{13}C -NMR (CDCl ₃)	δ (ppm) = 169,15, 167,81, 138,54, 135,82, 129,75, 119,32, 32,64, 29,85, 25,60.

4-Fluorbenzylmaleimid nach[93]**16**

1,96 g (20 mmol) Maleinsäureanhydrid wurden in 10 mL Essigsäure gelöst. Anschließend wurde 1,85 mL (17 mmol) 4-Fluorbenzylamin tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung für zwei Tage auf 125 °C zum Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde eingeeengt und mit 50 mL Chloroform aufgenommen, sowie mit 20 mL Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Chloroform extrahiert, die organischen Phasen vereint und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie gereinigt (Ethylacetat/*n*-Hexan : 2/3). Das Produkt wurde nach Abdampfen des Lösungsmittels als beiger Feststoff erhalten.

16	$C_{11}H_8FNO_2$
Ausbeute	1,32 g (6,4 mmol, 38%)
DC	$R_f = 0,52$ (EtOAc/ <i>n</i> -Hexan : 2/3)
1H -NMR ($CDCl_3$)	δ (ppm) = 7,39-7,32 (m, 2H, 2×ArH), 7,06-6,97 (m, 2H, 2×ArH), 6,73 (s, 2H, CH=CH), 4,66 (s, 2H, CH_2).
^{19}F -NMR ($CDCl_3$)	δ (ppm) = -114,20.
^{13}C -NMR ($CDCl_3$)	δ (ppm) = 170,34, 162,37 (d), 134,24, 132,08 (d), 130,35 (d), 115,56 (d), 40,69.

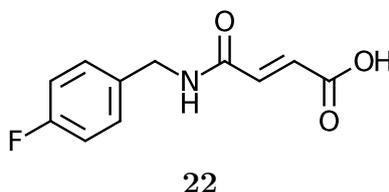
4-(Trimethylammonium)benzonitriltriflat nach[80]**20**

4.2 Synthesen der Markierungsvorläufer und Referenzverbindungen

In 15 mL Dichlormethan wurden 1,46 g (10 mmol) 4-(Dimethylamino)benzonnitril gelöst und tropfenweise mit 1,24 mL (11 mmol) Methyltriflat versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde eingengt und das Produkt mit der Zugabe von Diethylether ausgefällt. Der farblose Feststoff wurde abfiltriert, mit *n*-Hexan und Diethylether gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

20	$C_{11}H_{14}F_3N_2O_3S$
Ausbeute	2,4 g (7,74 mmol, 77%)
MS (ESI)	theor.: 161,22 g/mol; exp.: m/z 160,96 [M] ⁺
¹ H-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm) = 8,22 (s, 4H, 4×ArH), 3,66 (s, 9H, 3×CH ₃).
¹³ C-NMR (CDCl ₃) :	δ (ppm) = 150,75, 134,71, 122,63, 117,95 (d), 113,67, 53,83.

3-(4-Fluorbenzylcarbamoyl)propensäure



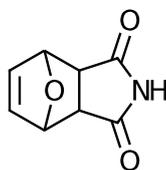
In 5 mL Tetrahydrofuran wurden 196 mg (2 mmol) Maleinsäureanhydrid gelöst und es wurden langsam 228 µL (1,99 mmol) Fluorbenzylamin hinzu gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend eingengt. Der Rückstand wurde mit Dichlormethan aufgenommen und mit 10%iger Zitronensäure und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt, um das Produkt als farblosen Feststoff zu erhalten.

22	$C_{11}H_{10}FNO_3$
Ausbeute	90 mg (0,4 mmol, 20%)
MS (ESI)	theor.: 223,20 g/mol; exp.: m/z 262,03 [M+K] ⁺

4 Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)	δ (ppm) = 9,4 (<i>s_{br}</i> , 1H, NH), 7,38-7,36 (m, 2H, 2×ArH), 7,17 (t, 2H, $J = 5,9$, 2×ArH), 6,45 (d, 1H, $J = 8,3$, CH=CH), 6,27 (d, 1H, $J = 8,2$, CH=CH), 4,39 (d, 2H, $J = 3,9$, CH_2).
$^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3)	δ (ppm) = -115,52.
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3)	δ (ppm) = 165,99 (d), 161,86 (d), 134,69 (d), 132,63, 132,10, 130,10, 115,97, 115,53, 42,39.

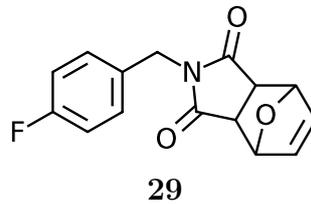
7-Oxabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonylimid ^{aus[97]}



27

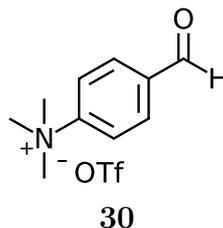
In 10 mL Ethylacetat wurden 1,25 mg (12,9 mmol) Maleimid und 5 mL Furan gelöst und über Nacht bei 70 °C gerührt. Das dabei entstehende farblose Produkt wurde abfiltriert, mit Ethylacetat gewaschen um anschließend im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet.

27	$\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_3$
Ausbeute	1,59 g (9,6 mmol, 74 %)
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO)	δ (ppm) = 11,17 (<i>s_{br}</i> , 1H, NH), 6,55 (t, 2H, $J = 0,9$, CH=CH), 5,14 (t, 2H, $J = 0,9$, 2×O-CH), 2,86 (d, 2H, $J = 2,4$, 2× C_tH).
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO)	δ (ppm) = 178,35, 136,96, 80,80, 48,91.

***N*-(4-Fluorbenzyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]-hept-5-en-2,3-dicarbonylimid**

In 15 mL Dimethylformamid wurden 1 g (6 mmol) **27** gelöst und mit 1,5 mL (12 mmol) 4-Fluorbenzylbromid versetzt. Zusätzlich wurden 1,7 g Kaliumcarbonat zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 50 °C gerührt. Es wurde mit 20 mL Wasser verdünnt und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser sowie gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde bei verminderten Druck entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan/Ethylacetat : 3/2). Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde das Produkt als blassgelber Feststoff erhalten.

29	$C_{15}H_{12}FNO_3$
Ausbeute	1,26 g (4,65 mmol, 76 %)
DC	$R_f = 0,3$ (EtOAc/ <i>n</i> -Hexan : 2/3)
1H -NMR ($CDCl_3$)	δ (ppm) = 7,36-7,29 (m, 2H, 2×ArH), 7,06-6,96 (m, 2H, 2×ArH), 6,53 (t, 2H, $J=0,9$, HC=CH), 5,30 (s, 2H, 2×O-CH), 4,62 (s, 2H, CH_2), 2,88 (s, 2H, 2× C_tH).
^{19}F -NMR ($CDCl_3$)	δ (ppm) = -114,36.
^{13}C -NMR ($CDCl_3$)	δ (ppm) = 175,88, 162,33 (d), 136,58, 131,35(d), 130,09(d), 115,43 (d) 80,96, 47,53, 41,75 (d).

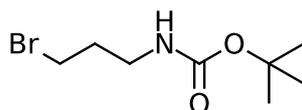
4-(Trimethylammonium)benzaldehydtriflat ^{nach[80]}

4 Experimenteller Teil

In 10 mL Ethylacetat wurden 1,5 g (14 mmol) 4-(Dimethylamino)benzaldehyd gelöst und mit 1,1 mL (10 mmol) Methyltriflat versetzt. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Produkt als farbloser Niederschlag abfiltriert, mit Ethylacetat gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

30	$C_{11}H_{15}F_3NO_4S$
Ausbeute	2,64 g (8,4 mmol, 84 %)
MS (ESI)	theor.: 164,22 g/mol; (m/z) 195,9 [M ⁺ +MeOH]
¹ H-NMR (DMSO)	δ (ppm) = 10,14 (s, 1H, -COH), 8,27-8,15 (m, 4H, 4×ArH), 3,69 (s, 9H, 3×N-CH ₃).
¹³ C-NMR (DMSO)	δ (ppm) = 192,58, 151,23, 137,26, 131,36, 122,17, 56,88.

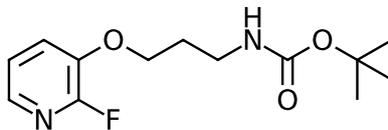
***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-3-brompropylamin** ^{aus[100]}



37

4,9 g (22,8 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat wurden zusammen mit 5 g (22,8 mmol) 3-Brompropylaminhydrobromid in 150 mL Chloroform gelöst und mit 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die Lösung wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel bei verminderten Druck entfernt und das Produkt als farbloses Öl erhalten.

37	$C_8H_{16}BrNO_2$
Ausbeute	4,94 g (20,76 mmol, 91 %)
DC	$R_f = 0,40$ (EtOAc/ <i>n</i> -Hexan : 1/9)
¹ H-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm) = 3,46 (t, 2H, J=6,5, N-CH ₂), 3,25 (t, 2H, J=6,5, Br-CH ₂), 2,04 (quintett, 2H, J=6,5, C-CH ₂ -C), 1,43 (s, 9H, 3×CH ₃).
¹³ C-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm) = 156,02, 85,16, 32,76, 30,79, 28,38, 27,39.

3-(2-Fluorpyridin-3-oxyl)propylcarbamidsäure-*tert*-butylester**36**

Die Synthese von **36** wurde über zwei verschiedene Syntheserouten durchgeführt:

Synthese 1:^{aus[54]} Unter inerten Bedingungen wurden 3 g (11,4 mmol) Triphenylphosphin in 60 mL Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 1,8 mL (11,4 mmol) Diisopropylazodicarboxylat langsam hinzu getropft. Nach 15 Minuten wurden 1,95 mL (11,4 mmol) 3-*N*-Boc-1-propanol und 600 mg (10,6 mmol) 2-Fluor-3-hydroxypyridin dazu gegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde eingengt, mit etwas Dichlormethan aufgenommen und mit 10 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, gesättigter Natriumchlorid-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und bei verminderten Druck wurde das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (*n*-Hexan/Ethylacetat : 1/1), um das Produkt nach Abdampfen des Lösungsmittels als hellgelbes Öl zu erhalten.

Synthese 2: In 40 mL Dimethylformamid wurden 1 g (9 mmol) 2-Fluor-3-Hydroxypyridin zusammen mit 3,2 g (13,5 mmol) **37**, 2,5 g Kaliumcarbonat und einer Spatelspitze Kaliumiodid gelöst und für etwa drei Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 20 mL Wasser zugesetzt, und es wurde mit Dichlormethan extrahiert. Danach wurde sowohl mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung als auch mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan/Ethylacetat : 1/1). Nach Entfernung des Eluenten unter vermindertem Druck wurde das Produkt als hellgelbes Öl gewonnen.

36C₁₃H₁₉FN₂O₃

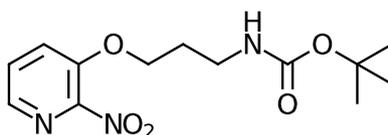
Ausbeute (Synthese 1)

97 mg (0,36 mmol, 3%)

4 Experimenteller Teil

Ausbeute (Synthese 2)	1,94 g (7,17 mmol, 80 %)
DC	$R_f = 0,5$ (EtOAc/ <i>n</i> -Hexan : 1/1)
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO)	δ (ppm) = 7,75-7,58 (m, 2H, 2 \times ArH), 7,33-7,26 (m, 1H, ArH), 6,91 (s, 1H, NH), 4,11 (t, 2H, $J = 6,2$, O-CH ₂), 3,16-3,06 (m, 2H, N-CH ₂), 1,87 (t, 2H, $J = 6,5$, C-CH ₂ -C), 1,38 (s, 9H, 3 \times CH ₃).
$^{19}\text{F-NMR}$ (DMSO)	δ (ppm) = -85,57.
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO)	δ (ppm) = 155,84 (d), 150,90, 142,23 (d), 137,08 (d), 123,90 (d), 123,08 (d), 77,99, 66,95, 37,17, 29,39, 28,68.

3-(2-Nitropyridin-3-oxyl)propylcarbamidsäure-*tert*-butylester



41

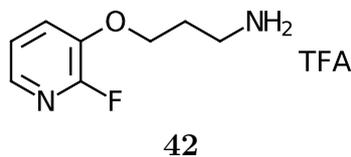
In 20 mL Dimethylformamid wurden 420 mg (3 mmol) 2-Nitro-3-hydroxypyridin und 1,07 g (4,5 mmol) **37** gelöst. Dazu wurden 830 mg Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid gegeben und über Nacht unter Rühren auf 70 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde mit etwa 40 mL Wasser verdünnt, mit Dichlormethan extrahiert und anschließend mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Lösung wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels wurde das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Hexan/Ethylacetat : 1/1) und nach Entfernung des Laufmittels als hellgelber Feststoff erhalten.

41	$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5$
Ausbeute	357 mg (1,2 mmol, 40 %)
DC	$R_f = 0,29$ (EtOAc/ <i>n</i> -Hexan : 1/1)
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO)	δ (ppm) = 8,13-8,10 (m, 1H, ArH), 7,57-7,55 (m, 2H, 2 \times ArH), 4,23 (t, 2H, $J = 5,9$, O-CH ₂), 3,35 (t, 2H, $J = 5,6$, N-CH ₂), 2,06 (t, 2H, $J = 6,2$, C-CH ₂ -C), 1,45 (s, 9H, 3 \times CH ₃).

4.2 Synthesen der Markierungsvorläufer und Referenzverbindungen

^{13}C -NMR (DMSO) δ (ppm) = 156,17, 147,18, 139,27, 128,74, 123,57, 79,42, 67,86, 37,76, 29,17, 28,37.

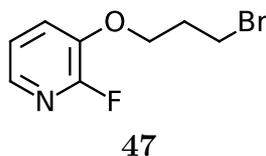
3-(2-Fluorpyridin-3-oxyl)propylamin (TFA-Salz) ^{nach[54]}



In 10 mL Dichlormethan wurden 285 mg (1,05 mmol) **36** gelöst und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. Es wurden 2 mL Trifluoressigsäure (TFA) hinzu getropft und für 5 Minuten gerührt bevor das Eisbad entfernt wurde. Nach 4 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Lösung eingeengt und durch konsekutive Zugabe von Dichlormethan wurde überschüssige TFA bei vermindertem Druck entfernt bis das Produkt als farbloser Feststoff (TFA-Salz) erhalten wurde.

41	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O} \cdot \text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$
Ausbeute	282 mg (0,99 mmol, 94 %)
MS (ESI)	theor.: 170,18 g/mol; exp.: m/z 170,95 [M+H] ¹
^1H -NMR (DMSO)	δ (ppm) = 7,77-7,760 (m, 2H, 2×ArH), 7,34-7,28 (m, 1H, ArH), 4,24-4,11 (m, 2H, O-CH ₂), 2,88 (s, 2H, N-CH ₂), 2,07 (quintett, 2H, J = 6,7, C-CH ₂ -C).
^{19}F -NMR (DMSO)	δ (ppm) = -73,86 (TFA), -85,64.
^{13}C -NMR (DMSO)	δ (ppm) = 155,53, 141,92, 137,33, 124,07, 123,11, 66,19, 36,52, 27,02.

3-(2-Fluorpyridin-3-oxyl)propylbromid ^{nach[101]}

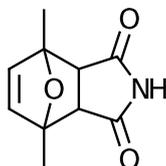


4 Experimenteller Teil

Zu einer Lösung von 1 g (8,85 mmol) 2-Fluor-3-hydroxypyridin und 6,1 g (44,25 mmol) Kaliumcarbonat in 20 mL Aceton wurden 3,6 mL (35,4 mmol) 1,3-Dibrompropan gegeben und für 12 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Reinigung (*n*-Hexan/Ethylacetat : 1/1) und destillativer Entfernung des Eluens als gelbes Öl erhalten.

47	C_8H_9BrFNO
Ausbeute	1,63 g (6,97 mmol, 79 %)
DC	$R_f = 0,76$ (EtOAc/ <i>n</i> -Hexan : 1/1)
1H -NMR (DMSO)	δ (ppm) = 7,77-7,62 (m, 2H, 2×Ar-H), 7,29 (ddd, 1H, $J = 7,9; 7,8; 0,9$, ArH), 4,22 (t, 2H, $J = 6,0$, O-CH ₂), 3,67 (t, 2H, $J = 6,5$, Br-CH ₂), 2,30 (quintett, 2H, $J = 6,3$, C-CH ₂ -C).
^{19}F -NMR (DMSO)	δ (ppm) = -85,44.
^{13}C -NMR (DMSO)	δ (ppm) = 142,19, 141,68, 137,41 (d), 124,12 (d), 123,05 (d), 67,11, 32,02, 31,15.

1,4-Dimethyl-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonylimid ^{nach[97]}



45

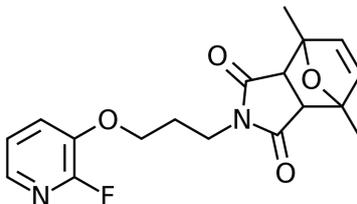
1 g (10,3 mmol) Maleimid wurden zusammen mit 6,6 mL Dimethylfuran in 25 mL Ethylacetat gelöst und für 12 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Produkt als farbloser Feststoff abfiltriert, mit Dichlormethan gewaschen und bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet.

45	$C_{10}H_{11}NO_3$
Ausbeute	660 mg (3,4 mmol, 33 %)
DC	$R_f = 0,38$ (EtOAc/ <i>n</i> -Hexan : 1/1)

4.2 Synthesen der Markierungsvorläufer und Referenzverbindungen

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO)	δ (ppm) = 11,10 (<i>s_{br}</i> , 1H, NH), 6,36 (<i>s</i> , 2H, HC=CH), 2,84 (<i>s</i> , 2H, 2×C _t H), 1,56 (<i>s</i> , 2H, 2×CH ₃).
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO)	δ (ppm) = 176,71, 141,12, 87,40, 53,92, 16,15.

***N*-[3-(2-Fluorpyridin-3-oxyl)propyl](1,4-dimethyl-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonylimid)**

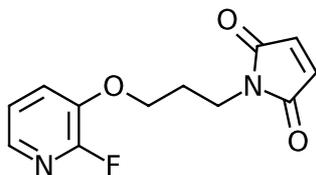


49

In 20 mL Dimethylformamid wurden 1,12 g (4,8 mmol) **47** sowie 430 mg (2,2 mmol) **45** gelöst und mit 718 mg Kaliumcarbonat versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für etwa 18 Stunden bei 50 °C gerührt und nach dem Abkühlen mit dem selben Volumen Wasser gemischt. Es wurde mit Dichlormethan extrahiert und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Lösung wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei verminderten Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Ethylacetat/*n*-Hexan : 3/2) und nach Entfernung des Eluenten als farbloser Feststoff erhalten.

49	$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{FN}_2\text{O}_4$
Ausbeute	510 mg (1,47 mmol, 67%)
DC	$R_f = 0,35$ (EtOAc/ <i>n</i> -Hexan : 3/2)
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO)	δ (ppm) = 7,56-7,72 (<i>m</i> , 1H, ArH), 7,59-7,49 (<i>m</i> , 1H, ArH), 7,28 (<i>ddd</i> , 1H, $J = 0,9; 4,8; 7,9$, ArH), 6,38 (<i>s</i> , 2H, HC=CH), 4,05 (<i>t</i> , 2H, $J = 6,1$, O-CH ₂), 3,58 (<i>t</i> , 2H, $J = 6,6$, N-CH ₂), 2,90 (<i>s</i> , 2H, 2×C _t H), 1,97 (<i>quintett</i> , 2H, $J = 6,3$, C-CH ₂ -C), 1,52 (<i>s</i> , 6H, 2×CH ₃).
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO)	δ (ppm) = 175,35, 142,30, 141,78, 141,05, 137,21 (<i>d</i>), 123,84 (<i>d</i>), 123,65 (<i>d</i>), 87,41, 66,50, 52,64, 35,23, 27,08, 16,10.

1-[3-(2-Fluorpyridin-3-oxyl)propyl]pyrrol-2,5-dion

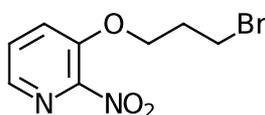


17

350 mg (1,01 mmol) **49** wurden in 5 mL Toluol gelöst und für 3 Stunden auf 120 °C zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt und das Produkt als farbloser Feststoff isoliert.

17	$C_{12}H_{11}FN_2O_3$
Ausbeute	241 mg (0,96 mmol, 95 %)
MS (ESI)	theor.: 250,23 g/mol; exp.: m/z 251,03 [M+H] ⁺
¹ H-NMR (DMSO)	δ (ppm) = 7,75-7,71 (m, 1H, ArH), 7,59 (ddd, 1H, J = 1,6; 8,0; 70,6, ArH), 7,28 (ddd, 1H, J = 0,9; 4,8; 7,9, ArH) 7,02 (s, 2H, HC=CH), 4,10 (t, 2H, J = 5,8, O-CH ₂), 3,62 (t, 2H, J = 6,6, N-CH ₂), 2,01 (quintett, 2H, J = 6,3, C-CH ₂ -C).
¹⁹ F-NMR (DMSO)	δ (ppm) = -85,45.
¹³ C-NMR (DMSO)	δ (ppm) = 177,53, 142,32, 141,81, 137,14 (d), 134,97, 123,72 (d), 123,06 (d), 67,16, 35,03, 27,86.

3-(2-Nitropyridin-3-oxyl)propylbromid ^{nach[101]}



48

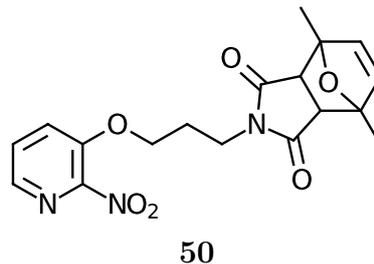
1 g (7,14 mmol) 3-Hydroxy-2-nitropyridin wurden zusammen mit 2,9 mL (28,6 mmol) 1,3-Dibrompropan und 4,9 g Kaliumcarbonat in 20 mL Aceton gemischt und für vier Stunden bei 65 °C zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde bei verminderten

4.2 Synthesen der Markierungsvorläufer und Referenzverbindungen

Druck entfernt und das Produkt nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung (Dichlormethan, 100 %) nach Abdampfen des Lösungsmittels als gelbes Öl erhalten.

48	$C_8H_9BrN_2O_3$
Ausbeute	956 mg (3,66 mmol, 51 %)
DC	$R_f = 0,74$ (DCM, 100 %)
1H -NMR (DMSO)	δ (ppm) = 8,13 (dd, 1H, $J = 1,3$; 4,5, ArH), 8,01 (dd, 1H, $J = 1,26$; 8,5, ArH), 7,81-7,74 (m, 1H, ArH), 4,35 (t, 2H, $J = 5,9$, O-CH ₂), 3,63 (t, 2H, $J = 6,5$, Br-CH ₂), 2,29 (quintett, 2H, $J = 6,2$, HC=CH).
^{13}C -NMR (DMSO)	δ (ppm) = 148,86, 146,49, 139,78, 130,01, 125,59, 67,80, 31,83, 30,90.

***N*-[3-(2-Nitropyridin-3-oxyl)propyl](1,4-dimethyl-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonylimid)**



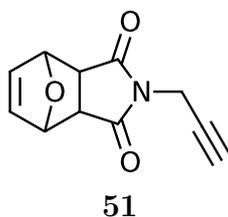
Zu einer Lösung aus 631 mg (2,42 mmol) **48**, 234 mg (1,21 mmol) **45** in 20 mL Dimethylformamid wurden 334 mg Kaliumcarbonat gegeben und für 72 Stunden bei 50 °C gerührt. Die Lösung wurde mit etwa der selben Menge Wasser gemischt und es wurde mit Dichlormethan extrahiert. Nach Waschen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei verminderem Druck entfernt. Zur Reinigung des Produkts wurde eine Säulenchromatographie durchgeführt (Ethylacetat/*n*-Hexan : 7/3). Das Produkt konnte nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels als farbloser Feststoff isoliert werden.

50	$C_{18}H_{19}N_3O_6$
Ausbeute	125 mg (0,34 mmol, 28 %)

4 Experimenteller Teil

DC	$R_f = 0,26$ (EtOAc/ <i>n</i> -Hexan : 3/2)
MS (ESI)	theor.: 273,12 g/mol; exp.: m/z 273,95 [M+H] ⁺
¹ H-NMR (DMSO)	δ (ppm) = 8,12 (d, 1H, J = 4,2, ArH), 7,90-7,74 (m, 2H, 2×ArH), 6,38 (s, 2H, HC=CH), 4,18 (t, 2H, J = 5,9, O-CH ₂), 3,54 (t, 2H, J = 6,5, N-CH ₂), 2,88 (s, 1H, C _t H), 1,95 (quintett, 2H, J = 6,1, C-CH ₂ -C), 1,50 (s, 6H, 2×CH ₃).
¹³ C-NMR (DMSO)	δ (ppm) = 175,33, 146,73, 141,05, 139,62, 130,06, 125,44, 87,40, 67,31, 52,65, 40,28, 35,06, 27,01, 16,11.

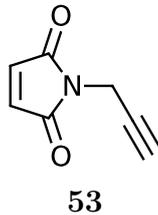
***N*-(Prop-2-in)-7-oxabicyclo[2.2.1]-hept-5-en-2,3-dicarbonylimid^[107]**



Eine Mischung aus 1,5 g (9 mmol) **27**, 1,65 mL Propargylbromid (80 % in Toluol, 18 mmol) und 2,5 g (18 mmol) Kaliumcarbonat in 20 mL Dimethylformamid wurden für vier Stunden auf 50 °C erhitzt. Im Anschluss wurde mit Wasser verdünnt und mit Dichlormethan extrahiert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt mittels Säulenchromatographie (Ethylacetat/*n*-Hexan : 1/1) gereinigt und nach Abdampfen des Lösungsmittels als farbloser Feststoff erhalten.

51	$C_{11}H_9NO_3$
Ausbeute	1,53 g (7,6 mmol, 84 %)
Schmelzpunkt	141 °C
¹ H-NMR (DMSO)	δ (ppm) = 6,58 (t, 2H, J = 0,8, CH=CH), 5,19 (t, 2H, J = 0,9, 2×O-CH), 4,15 (d, 2H, J = 2,5, CH ₂), 3,20 (t, 1H, J = 2,5, C≡H), 3,01 (s, 2H, 2×C _t H).
¹³ C-NMR (DMSO)	δ (ppm) = 175,80, 137,01, 80,82, 78,15, 74,13, 47,43, 27,70.

***N*-(Prop-2-in)maleimid^[107]**



Von der Verbindung **51** wurden 1,5 g (7,4 mmol) für 2 Stunden bei 120 °C in Toluol zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde bei verminderten Druck entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (Ethylacetat/*n*-Hexan : 1/1) gereinigt und als hell gelbes Öl erhalten.

53	$C_7H_5NO_2$
Ausbeute	816 mg (6,04 mmol, 81 %)
1H -NMR (DMSO)	δ (ppm) = 7,10 (s, 2H, HC=CH), 4,22 (d, 2H, J = 2,5, CH ₂), 3,22-3,20 (m, 1H, C≡H).
^{13}C -NMR (DMSO)	δ (ppm) = 170,26, 135,32, 78,69, 74,12, 26,80.

Kopplungsreaktionen der (prosthetischen) Gruppen mit verschiedenen Aminosäuren und Peptiden

Allgemeines Vorgehen: Die Aminosäuren oder Peptide wurden im entsprechendem Lösungsmittel gelöst und dann mit der gewünschten (prosthetischen) Gruppe versetzt, welche ebenfalls zuvor gelöst worden war. Die Lösung wurde ggf. temperiert und der Reaktionsfortschritt zu verschiedenen Zeitpunkten mittels HPLC-Analyse verfolgt. Lösungsmittel, Konzentrationen, Reaktionstemperaturen und -zeiten wurden dabei variiert und die untersuchten Bedingungen sind im Kapitel 3 genauer erläutert und diskutiert. Aus Tabelle 4.2 ist ersichtlich, welche Kopplungsgruppen für welche Aminosäuren oder Peptide untersucht wurden.

Tabelle 4.2: Zuordnung der verwendeten (prothetischen) Gruppen zu den getesteten Aminosäuren und Peptiden.

Prothetische Gruppe	Aminosäure oder Peptid
SFB 1	(Boc-)Lysin (Boc-)Arginin TP D3-k D3-cy [†]
Succinimidyl-3-(4-azido-phenyl)propanat 13	(Boc-)Lysin TP [†] L-D3-cy [†]
Succinimidyl-4-azido-benzoat 14	(Boc-)Lysin [†] TP [†] D3-k [†]
Succinimidyl-4-methyl-azidobenzoat 15	(Boc-)Lysin [†] TP [†] D3-k [†]
FBM 16	Cystein Glutathion (L-)D3-cy
FPyME 17	Cystein Glutathion (L-)D3-cy
N-(Prop-2-in)maleimid 53	Cystein Glutathion

[†] keine Reaktion beobachtet

4.3 Radiosynthesen

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

Das für die Markierungen verwendete n.c.a. [^{18}F]Fluorid wurde am JSW Babyzyklotron BC 1710 des Instituts für Neurowissenschaften und Medizin (INM-5: Nuklearchemie) des Forschungszentrum Jülich über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion mit 16,5 MeV Protonen an ^{18}O -angereichertem Wasser wie beschrieben dargestellt.^[108] Das n.c.a. [^{18}F]Fluorid wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

4.3.2 Azeotrope Trocknung des n.c.a. [^{18}F]Fluorids

Im Vorfeld jeder Radiosynthese wurde eine azeotrope Trocknung der [^{18}F]Fluorid-Lösung analog etablierter Verfahren^[21] durchgeführt. Dafür wurde zunächst eine Lösung aus 10 mg (26,5 μmol) Kryptofix[®] 2.2.2, 15 μL 1 M Kaliumcarbonat-Lösung und 0,8 mL Acetonitril hergestellt und zusammen mit der gewünschten Menge wässriger [^{18}F]Fluorid-Lösung in ein 5 mL Spitzkolben überführt. Die Lösung wurde bei 55 °C und einem Druck von 3 mbar eingengt und durch die zweimal wiederholte Zugabe 0,8 mL Acetonitril komplett getrocknet. Wurde als alternatives Aktivatorsystem Tetrabutylammoniumhydroxid eingesetzt, wurden 100 μL einer 2,5 %igen wässrigen Lösung zum [^{18}F]Fluorid gegeben. Die anschließende Trocknung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

4.3.3 Radiosynthese von Succinimidyl-4- ^{18}F fluorbenzoat ([^{18}F]SFB) und dessen Kopplungsreaktionen

Synthese von [^{18}F]SFB ^{aus[109]}

Es wurden 6,3 mg (25 μmol) **4** in 1 mL Acetonitril gelöst und zu dem mit Kryptofix[®] getrocknetem [^{18}F]Fluorid gegeben. Die Lösung wurde für 10 Minuten auf 90 °C erhitzt, anschließend 19,5 μL 1 M Tetrabutylammoniumhydroxid-Lösung in 0,3 mL Acetonitril dazu gegeben und für 3 Minuten die Temperatur auf 120 °C erhöht. Die Reaktionsmischung wurde im Wasserbad abgekühlt und anschließend bei vermin-

4 Experimenteller Teil

dertem Druck getrocknet. Für den letzten Reaktionsschritt wurden 12 mg HSTU in 1 mL Acetonitril gelöst, zum Rückstand gegeben und die Temperatur für 5 Minuten bei 90 °C gehalten. Das Rohprodukt wurde anschließend über verschiedene Verfahren der Festphasenextraktion gereinigt.

Allgemeines Vorgehen: Die Reaktionslösung wurde zunächst mit unterschiedlichen Lösungsmitteln mit verschiedenen Volumina verdünnt und anschließend über eine zuvor konditionierte Kartusche gegeben. Darauffolgend wurde diese mit einem entsprechendem Lösungsmittel gespült und im Luftstrom getrocknet. Als nächstes wurden die auf der Kartusche haftenden Produkte durch ausgewählte Lösungsmittel eluiert. Die dafür verwendeten Methoden sind in Tabelle 4.4 aufgelistet. Zusätzlich zur Festphasenextraktion wurde die Produktisolierung ebenfalls mittels HPLC über eine semipräparative Säule untersucht. Die Bedingungen hierfür sind in Tabelle 4.3 angegeben.

Tabelle 4.3: Reinigungsmethoden für [¹⁸F]SFB mittels HPLC.

Nr.	Säule	Laufmittel	Fluss	k'-Wert
1	Phenomenex Gemini C18 10 x 250 mm	MeCN/H ₂ O + TFA 35/65 + 0,2%	4 ml/min	5,64
2	Phenomenex Gemini C18 10 x 250 mm	MeCN/H ₂ O 40/60	4 ml/min	5,11

Kopplungsreaktionen von [¹⁸F]SFB

Die Kopplungsreaktionen von [¹⁸F]SFB wurden mit Lysin, einem Lysin-haltigen Testpeptid (TP) und D3-k, durchgeführt. Die dabei verwendeten Reaktionsbedingungen sind in den Tabellen 4.5 bis 4.7 wiedergegeben.

Allgemeines Vorgehen: Nach dem entsprechenden Reinigungsverfahren zur Produktisolierung des [¹⁸F]SFB wurde das Volumen bis zur Trockne reduziert, um den Rückstand im gewünschten Lösungsmittel und Volumen aufzunehmen. Diese Lösung wurde dann zu dem zuvor gelöstem Peptid oder der Aminosäure gegeben und ggf. temperiert. Zur Bestimmung der radiochemischen Ausbeute wurde die Reaktionslösung oder Aliquots davon mittels Radio-HPLC analysiert.

Tabelle 4.4: Verschiedene SPE-Methoden zur Reinigung des Rohprodukts vom [¹⁸F]SFB.

Nr.	Kartusche	Konditionierung	Verdünnung	Spülung	Eluierung
SPE 1-0	SepPak® C18	10 mL MeOH 10 mL H ₂ O	20 mL H ₂ O	5 mL H ₂ O	3 mL MeCN
SPE 1-I	SepPak® C18	10 mL MeOH 10 mL H ₂ O	15 mL H ₂ O	5 mL H ₂ O	2 mL MeCN
SPE 1-II	SepPak® C18	10 mL MeOH 10 mL H ₂ O	15 mL H ₂ O	5 mL H ₂ O	2 mL MeCN über SepPak® Alumina N
SPE 2-0	SepPak® C18	10 mL MeOH 5 %ige AcOH	20 mL 5 %ige AcOH	5 mL H ₂ O	3 mL MeCN
SPE 2-I	SepPak® C18	10 mL MeOH 5 %ige AcOH	20 mL 5 %ige AcOH	5 mL 10 % MeCN in H ₂ O	3 mL Et ₂ O
SPE 2-II	SepPak® C18	10 mL MeOH 5 %ige AcOH	8 mL 5 %ige AcOH	5 mL H ₂ O	3 mL DCM
SPE 3	Silica (600 mg)	8 mL EtOAc 8 mL <i>n</i> -Hexan	8 mL <i>n</i> -Hexan	5 mL <i>n</i> -Hexan	3 mL MeCN
Silica-Säule 1	Si 2 g	Acetonitril	-	-	10 mL MeCN (10 Fraktionen à 1 mL)
Silica-Säule 2	Si 2 g	DCM	-	-	10 mL DCM (10 Fraktionen à 1 mL)

Tabelle 4.5: Kopplungsreaktionen von [¹⁸F]SFB mit Lysin.

Reinigung	[¹⁸ F]SFB			Lysin			Reaktionsparameter		
	Lösungs- mittel	Volumen [μL]	Konzentration [mg/mL]	Lösungs- mittel	Volumen [μL]	Abs. Menge [mg]	SFB [μmol]	Zeit [min]	Temp.
SPE 1-0	MeCN	100	10,9	Puffer*	110	0,6	-	10	RT
SPE 1-0	MeCN	200	10,9	Puffer*	110	0,6	0,42	10	RT
SPE 1-0	MeCN	100	10,9	Puffer*	110	0,6	0,21	10	RT
SPE 1-0	MeCN	100	10	DMF [#]	200	2,0	-	5	RT
SPE 1-0	MeCN	100	10	DMF [#]	200	2,0	-	10	RT
SPE 1-0	MeCN	100	10	DMF [#]	200	2,0	-	15	RT
SPE 1-0	MeCN	100	10	DMF [#]	200	2,0	-	30	40°C

* Borat/HCl-Pufferlösung, pH = 8,5

[#] DMF mit 1 % Triethylamin

Tabelle 4.6: Kopplungsreaktionen von [¹⁸F]SFB mit dem Testpeptid.

[¹⁸ F]SFB		Testpeptid				Reaktionsparameter			
Reinigung	Lösungs- mittel	Volumen [μ L]	Konzentration [mg/mL]	Lösungs- mittel	Volumen [μ L]	Abs. Menge [mg]	SFB [μ mol]	Zeit [min]	Temp.
SPE 1-0	MeCN	50	1	Puffer*	50	0,05	-	15	RT
SPE 1-0	MeCN	50	10	Puffer*	50	0,50	-	15	RT
SPE 1-0	MeCN	50	1	DMF#	50	0,05	-	15	RT
SPE 1-0	MeCN	50	10	DMF#	50	0,50	-	15	RT
SPE 1-0	MeCN	50	5	DMF#	50	0,25	-	15	RT
SPE 1-0	MeCN	50	2,5	DMF#	50	0,125	-	15	RT
SPE 1-0	MeCN	50	1,25	DMF#	50	0,06	-	15	RT

* Borat/HCl-Pufferlösung, pH = 8,5

DMF mit 1 % Triethylamin

Tabelle 4.7: Kopplungsreaktionen von [¹⁸F]SFB mit dem Peptid D3-k.

Reinigung	[¹⁸ F]SFB		D3-k			Reaktionsparameter			
	Lösungs- mittel	Volumen [µL]	Konzentration [mg/mL]	Lösungs- mittel	Volumen [µL]	Abs. Menge [mg]	SFB [µmol]	Zeit [min]	Temp.
SPE 1-0	MeCN	100	1	DMF [#]	100	0,1	-	15	40°C
SPE 1-0	MeCN	100	1	DMF [#]	50	0,05	-	15	RT
SPE 1-0	MeCN	50	5	DMF [#]	50	0,25	-	15	40°C
SPE 1-0	MeCN	50	10	DMF [#]	50	0,5	-	15	RT
SPE 1-0	MeCN	100	1	Puffer*	50	0,05	-	10	RT
SPE 1-0	MeCN	100	1	Puffer*	50	0,05	0,04	10	RT
SPE 1-0	MeCN	100	10	Puffer*	50	0,5	-	15	40°C
SPE 1-0	MeCN	100	10	Puffer*	100	1	0,02	15	RT
SPE 1-0	MeCN	100	5	MeOH ^Δ	50	0,25	-	10	60°C
SPE 1-0	MeCN	100	10	MeOH ^Δ	50	0,5	-	10	60°C
Säule 1	MeCN	100	1	Puffer*	200	0,2	-	15	RT
Säule 2	MeCN	100	1	Puffer*	100	0,1	-	15	RT
Säule 2	MeCN	200	1	Puffer*	100	0,1	0,06	15	RT
SPE 3	MeCN	50	1	Puffer*	100	0,05	-	15	RT
SPE 3	MeCN	50	1	Puffer*	100	0,05	0,06	15	RT
SPE 2-1	MeCN	100	1	Puffer*	100	0,1	0,06	15	RT

4 Experimenteller Teil

* Borat/HCl-Pufferlösung, pH = 8,5

[#] DMF mit 1% Triethylamin^Δ MeOH mit 1% Triethylamin

Tabelle 4.7 (Fortsetzung): Kopplungsreaktionen von [¹⁸F]SFB mit dem Peptid D3-k.

Reinigung	[¹⁸ F]SFB		D3-k				Reaktionsparameter		
	Lösungs- mittel	Volumen [μL]	Konzentration [mg/mL]	Lösungs- mittel	Volumen [μL]	Abs. Menge [mg]	SFB [μmol]	Zeit [min]	Temp.
SPE 2-II	MeCN	150	1	Puffer*	100	0,1	-	45	RT
SPE 2-III	MeCN	150	1	Puffer*	100	0,1	0,06	60	RT
SPE 2-II	MeCN	150	1	MeOH ^Δ	100	0,1	-	15	60 °C
HPLC 2	MeCN	100	1	MeOH ^Δ	500	0,5	0,06	15	RT
HPLC 2	MeCN	100	0,1	Puffer*	1000	0,1	0,06	30	RT
HPLC 2	MeCN	100	1	Puffer*	100	0,1	-	15	RT
HPLC 2	MeCN	100	1	Puffer*	100	0,1	0,06	15	RT
HPLC 2	MeCN	150	1	Puffer*	800	0,5	0,6	15	RT
HPLC 1	MeCN	200	1	DMF [#]	400	0,4	0,5	15	RT
HPLC 1	MeCN	150	10	DMF [#]	50	0,5	0,06	45	RT
HPLC 1	MeCN	150	10	DMF [#]	50	0,5	0,06	15	RT
HPLC 1	MeCN	150	10	Puffer*	50	0,5	0,06	45	RT
HPLC 1	MeCN	150	1	DMF [#]	50	0,05	0,06	45	RT
HPLC 1	DMF**	25	-	trocken	-	0,25	-	15	RT
HPLC 1	DMF**	25	-	trocken	-	0,25	0,06	15	RT
HPLC 1	MeCN	50	10	DMF [#]	50	0,5	0,06	15	RT

* Borat/HCl-Pufferlösung, pH = 8,5

DMF mit 1 % Triethylamin

Δ MeOH mit 1 % Triethylamin

† nicht reproduzierbar

4.3.4 Radiosynthese von [^{18}F]FBM

Es wurde versucht, die Radiosynthese von [^{18}F]FBM über zwei verschiedene Synthesewege zu erzielen, welche im Folgendem einzeln vorgestellt werden. Die Ausbeuten der Zwischen-, Neben- und Endprodukte wurden mittels HPLC bestimmt, die entsprechenden Parameter der Trennungen sind in Tabelle 4.8 wiedergegeben.

[^{18}F]FBM - Synthese I ^{nach[94,95]}

Für die n.c.a. Radiosynthese von [^{18}F]FBM wurden 6 g (19 μmol) **20** in 500 μL Dimethylsulfoxid gelöst und zum mit Kryptofix[®] getrocknetem [^{18}F]Fluorid gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 15 Minuten auf 90 °C erhitzt. Alternativ wurde auch ein Isotopenaustausch durchgeführt. Dazu wurden 6 mg (50 μmol) 4-Fluorbenzonnitril in 1 mL Dimethylformamid zu dem mit Tetrabutylammoniumhydroxid getrocknetem [^{18}F]Fluorid gegeben und für 15 Minuten auf 130 °C erhitzt. Beide Reaktionslösungen wurde in 10 mL Wasser aufgenommen und über eine mit 10 mL Methanol und 10 mL Wasser konditionierte SepPak[®] C18 Kartusche gegeben, die mit 5 mL Wasser gespült und im Luftstrom getrocknet wurde. Das fixierte Zwischenprodukt wurde mit 1 mL Tetrahydrofuran eluiert. Zur anschließenden Reduktion des Nitrils wurde die Lösung zu einer Mischung aus 5 mg Cobalt(II)acetat und 10 mg Natriumborhydrid gegeben. Der sich bildende Feststoff wurde mittels verschiedener Verfahren entfernt:

- Zentrifuge: 5 Minuten, 5000 U/min; der Überstand wurde abdekantiert, mit 10 mL 0,01 M Natriumhydroxid verdünnt und über eine SepPak[®] C18 Kartusche geben, die mit 5 mL Wasser gespült und im Luftstrom getrocknet wurde. Das Zwischenprodukt 4-[^{18}F]Fluorbenzylamin ([^{18}F]FBA) wurde mit 1 mL Acetonitril eluiert und anschließend getrocknet.
- Alternativ wurde [^{18}F]FBA zweimal mit 1 mL Dichlormethan extrahiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend abdestilliert.

Tabelle 4.8: Parameter für die HPLC-Messungen der Zwischen-, Neben- und Endprodukten der Radiosynthese von [¹⁸F]FBM.
Verwendete Säule: Kromasil 100-5 C18 (250 x 4,6 mm).

Verbindung	MeOH/H ₂ O + TFA	k'-Wert
4-[¹⁸ F]Fluorbenzotrifluorid	45/55 + 0,1	3,35
4-[¹⁸ F]Fluorbenzylamin	45/55 + 0,1	0,65
3-(4-[¹⁸ F]Fluorobenzylcarbamoyl)propionsäure ([¹⁸ F] 22)	45/55 + 0,1	4,39
4-[¹⁸ F]Fluorbenzaldehyd	45/55 + 0,1	3,70
4-[¹⁸ F]Fluorbenzylbromid	45/55 + 0,1	26,56
N-(4-[¹⁸ F]Fluorbenzyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarboximid ([¹⁸ F] 29)	45/55 + 0,1	6,84
4-[¹⁸ F]Fluorbenzylmaleimid ([¹⁸ F] 16)	45/55 + 0,1	9,24

Zur Überführung des getrockneten [¹⁸F]FBA in das 4-[¹⁸F]Fluorbenzylmaleimid wurden 10 mg Maleinsäureanhydrid in 500 µL Essigsäure gelöst, zum Rückstand gegeben und für unterschiedliche Reaktionszeiten auf 120 °C erhitzt.

[¹⁸F]FBM - Synthese II teilweise nach[98]

7,8 mg (25 µmol) des Trimethylammonium-Vorläufers **30** wurden in 1 mL Dimethylsulfoxid gelöst und zu dem mit Kryptofix[®] getrockneten [¹⁸F]Fluorid gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 10 Minuten auf 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionslösung mit 10 mL Wasser verdünnt und über eine zuvor mit 10 mL MeOH und 10 mL Wasser konditionierten SepPak[®] C18 Kartusche gegeben, die mit 5 mL Wasser gespült und im Luftstrom getrocknet wurde. Zur Reduzierung des Aldehyds zum Alkohol wurden 3 mL einer wässrigen Natriumborhydrid-Lösung (6 mg/mL) langsam über die Kartusche gleitet. Die Kartusche wurde danach in einem 80 °C heißem Luftstrom erhitzt und es wurden 1 mL 48 %ige Bromwasserstoff-Lösung langsam darüber gegeben. Das Zwischenprodukt 4-[¹⁸F]Fluorbenzylbromid konnte mit 2 mL Dimethylformamid eluiert werden. Diese Lösung wurde mit 200 µL 1 M Kaliumcarbonat sowie 20 mg **27** für bis zu 60 Minuten auf 50 °C erhitzt. Nach

Ablauf der Reaktionszeit wurden 10 mL Wasser zur Reaktionslösung gegeben und diese wiederum über eine mit 10 mL Methanol und 10 mL Wasser konditionierte SepPak[®] C18 Kartusche. Nach Spülen mit 5 mL Wasser und Trocknung im Luftstrom wurde mit 2 mL Toluol eluiert. Das Eluat wurde für den letzten Reaktions-schritt für bis zu 60 Minuten auf 110 °C erhitzt.

4.3.5 Radiosynthese von [¹⁸F]FPyME und dessen Kopplungsreaktionen

Die Radiosynthese von [¹⁸F]FPyME ([¹⁸F]**17**) erfolgte ebenfalls über zwei unterschiedliche Routen. Die erste Route beschreibt die Synthese nach DE BRUIN *et al.* in 3 Syntheseschritten.^[54] Die zweite Route beschreibt eine neue Syntheseroute über eine am Maleimid geschützten radiofluorierten Verbindung in zwei Stufen. Die radiochemische Aufreinigung wurde mittels HPLC durchgeführt. Dabei wurde eine Kromasil 100-5 C18 (250 x 10 mm) Säule mit einem Laufmittelgemisch aus Methanol/Wasser (40/60) und 0,1 % Trifluoressigsäure verwendet ($k'_{17} = 4, 34$).

[¹⁸F]FPyME - Synthese I^[54]

5 mg (16,8 µmol) des Nitro-Vorläufers **41** wurden in 500 µL Dimethylsulfoxid gelöst und zu dem mit Kryptofix[®] getrocknetem [¹⁸F]Fluorid gegeben. Die Markierung erfolgte innerhalb von 4 Minuten bei 145 °C. Nachdem die Lösung abgekühlt war wurde diese mit 1 mL Wasser verdünnt und über eine zuvor mit 2 mL Ethanol und 10 mL Wasser konditionierte SepPak[®] C18 Kartusche gegeben, die mit 5 mL Wasser gespült und im Luftstrom getrocknet wurde. Das Zwischenprodukt [¹⁸F]**36** wurde mit 3 mL Dichlormethan in ein Reaktionsgefäß eluiert, in welchem 0,1 mL Trifluoressigsäure vorlagen, wodurch die Boc-Schutzgruppe entfernt und [¹⁸F]**42** erhalten wurde. Das Lösungsmittel wurde anschließend bei vermindertem Druck entfernt. Zu dem Rückstand wurden 25 mg (161 µmol) *N*-Methoxycarbonylmaleimid in 0,25 mL Dioxan gegeben und die Lösung mit 0,75 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Vor der Produktisolation mittels HPLC wurde eine weitere Kartuschenreinigung durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde hierfür mit 1 mL 1 M Salzsäure verdünnt und über eine konditionierte (s. o.) SepPak[®] C18 Kartusche gegeben

und das Rohprodukt [^{18}F]**17** mit 3 mL Dichlormethan eluiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei vermindertem Druck wurde der Rückstand in 200 μL Methanol aufgenommen und auf die HPLC aufgetragen.

[^{18}F]FPyME - Synthese II

In 0,5 μL Dimethylsulfoxid wurden 4 mg (14,6 μmol) **50** gelöst, zum mit Kryptofix[®] getrocknetem [^{18}F]Fluorid gegeben und für 5 Minuten auf 80 °C erwärmt. Die Reaktionslösung wurde im Wasserbad gekühlt und mit 3 mL 1 M Salzsäure verdünnt. Diese Lösung wurde über eine SepPak[®] C18 (konditioniert mit 2 mL Ethanol und 10 mL Wasser) geleitet. Die Kartusche wurde mit 5 mL Wasser gespült und im Luftstrom getrocknet. Das fixierte Zwischenprodukt [^{18}F]**49** wurde mit 2 mL Acetonitril eluiert und das Eluat wurde bei vermindertem Druck getrocknet. Der Rückstand wurde in 0,5 mL Toluol gelöst und auf 110 °C erhitzt. Nach 15 Minuten wurde die Reaktionsmischung abgekühlt und das Lösungsmittel wiederum entfernt. Der Rückstand wurde in etwa 200 μL Methanol gelöst und zur Reinigung auf die HPLC aufgetragen.

Kopplungsreaktionen von [^{18}F]FPyME

Die Lösung, welche nach der HPLC-Reinigung von [^{18}F]FPyME erhalten wurde, wurde bei 55 °C und vermindertem Druck getrocknet. [^{18}F]FPyME wurde in etwa 50 μL Acetonitril aufgenommen und zu jeweils 10 μg des Peptids D3-c, D3-cy oder L-D3-cy in 100 μL Phosphat-Puffer (pH 7,5) gegeben. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur war die Reaktion abgeschlossen.

4.3.6 Analytik der Radiosynthesen und Bestimmung der radiochemischen Ausbeuten

Die Bestimmung der Zusammensetzung der Reaktionslösungen sowie der radiochemischen Ausbeuten wurde mittels HPLC und/oder DC durchgeführt. Hierfür wurde jeweils ein Aliquot der Reaktionslösung zu den gewünschten Zeitpunkten entnommen und je nach Aktivitätsmenge mit verschiedenen Volumina Methanol (für

4 Experimenteller Teil

die DC) oder HPLC-Laufmittel verdünnt. Durch den Vergleich mit den entsprechenden nicht radioaktiven Standards wurden die Peaks bzw. Spots identifiziert.

Bestimmung der RCA mittels HPLC

Für die Bestimmung der RCA und Zusammensetzung der Reaktionslösung mittels HPLC wurde ein festgelegtes Volumen zur Analytik auf die HPLC-Säule injiziert. Am Ende der Messung wurde das gleiche Volumen des selben Aliquots hinter die HPLC-Säule injiziert, wodurch ein Peak erhalten wird, welcher der Gesamtaktivität der Analyselösung entspricht. Die RCA wurde als Verhältnis der zerfallskorrigierten Produktpeakaktivität zur Gesamtaktivität des aliquoten Referenzpeaks berechnet und in % angegeben.

Bestimmung der RCA mittels DC

Zur Bestimmung der Zusammensetzung der Reaktionslösung wurde 1 μL der Aliquotlösung auf die DC-Platte aufgetragen und diese dann anschließend mit dem entsprechenden Laufmittel entwickelt. Um flüchtige Substanzen ausschließen zu können, wurde zudem ein Referenzspot von ebenfalls 1 μL aufgetragen, welcher die Gesamtaktivität der Aliquotlösung darstellte. Aus den Verhältnissen der Integrale der Produktpeaks zur Gesamtaktivität des Referenzpunkts wurde die RCA bestimmt.

4.3.7 Autoradiographie

Die autoradiographischen Untersuchungen wurden zusammen mit der Radiopharmakologiegruppe des INM-5 des Forschungszentrums Jülich durchgeführt. Für die Verteilungsstudien im Hirngewebe der radiofluorierten D3-Derivate wurden transversale Gehirnschnitte mit 20 μm Dicke von Mäusen (Amyloid-positiv: APPSWE (Model #001349-T); Kontrollen: PPSWE (Model #001349-W) female mice; Tiere von *Taconic Europe*, Ry, Dänemark) verwendet, welche auf Objektträgern fixiert bei -80°C gelagert wurden. Die jeweils benötigten Schnitte wurden bei 37°C aufgetaut, getrocknet und anschließend für 5 Minuten in TRIS- oder PBS-Pufferlösung (ggf. mit BSA) ($\text{pH} = 7.4$) vorinkubiert. Zur Hauptinkubation wurden die Schnitte in eine Kammer mit 16 mL dieser Pufferlösung gegeben, welche mit etwa 1 mL der HPLC-

getrennten Fluor-18 markierten Peptidderivate versetzt wurde. Die Gesamtaktivität der verwendeten Lösungen betrug zwischen 30 und 100 kBq. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Objektträger zum Waschen für jeweils 1 Minute in zwei Bäder aus Pufferlösung getaucht und anschließend kurz mit Wasser gespült. Die Gehirnschnitte wurden im Anschluss bei 37°C für etwa 30 Minuten getrocknet. Die trockenen Schnitte wurden auf einem Träger befestigt, eine Phosphor Imager Platte aufgelegt (je nach Aktivitätsmenge 2-3 Stunden) und anschließend mit einem Phosphor Imager BAS-Reader ausgelesen.

4.3.8 Amyloid-Färbung mit Kongorot

Die Anfärbung der Amyloide in den verwendeten Gehirnschnitte wurde ebenso zusammen mit der Radiopharmakologiegruppe des INM-5 des Forschungszentrums Jülich durchgeführt.

Zur Visualisierung der Amyloid-Plaques wurden die für die Autoradiographie verwendeten Gehirnschnitte nach Abklingen der Aktivität mit Kongorot gefärbt. Im ersten Schritt wurden die Objektträger für 10 Minuten in *Mayers Hämotoxylin-Lösung* getaucht und anschließend für fünf Minuten unter Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Schnitte für 20 Minuten erst in eine Alkali-Natriumchlorid-Lösung (Zugabe von 4 mL 1%iger NaOH zu 40 mL Natriumchlorid-Lösung (SD-3A-Alkohol, 80%, gesättigt mit NaCl. Erst unmittelbar vor Verwendung ansetzen.) und dann nochmals für 20 Minuten in die Alkali-Kongorot-Lösung (Zugabe von 4 mL 1%iger NaOH zu 40 mL Kongorot-Lösung (0,2% in SD-3A-Alkohol, 80%, gesättigt mit NaCl. Innerhalb von 15 Minuten verwenden.) getaucht. Die Kongorot-Lösung wurde durch das Eintauchen (für jeweils 1 Minute) in 3 aufeinander folgenden Ethanol-Bädern abgewaschen und anschließend mit Xylol gespült. Das Gewebe wurde durch das Auftragen von Dibutylphthalat in Xylol (DPX) und Deckgläsern fixiert.

5 Zusammenfassung

Zu den Hauptcharakteristika der Alzheimer-Krankheit zählen die Bildung und Ablagerung von β -Amyloid-Plaques. Jedoch können diese zur Zeit erst *post mortem* mittels histochemischer Untersuchungen des Hirngewebes verstorbener Patienten nachgewiesen werden. Um eine *in vivo* Diagnostik der Plaques zu ermöglichen, ist es notwendig, eine molekulare Sonde zu entwickeln, die sich spezifisch an β -Amyloid anlagert. Durch die Einbringung eines β^+ -emittierenden Radionuklids in diese Sonde wäre damit eine Visualisierung mittels Positronen-Emissions-Tomographie *in vivo* möglich. Bisher sind nur wenige Radioliganden, die diesen Anforderungen entsprechen, klinisch evaluiert worden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, eine Radiomarkierung mit Fluor-18 von neuen potentiellen Liganden zu realisieren. Als zu markierender Ligand wurde das all-D-Peptid D3 ausgewählt, welches erfolgversprechende Eigenschaften bezüglich Diagnose und Therapie der Alzheimer-Krankheit aufweist.

Da eine direkte Markierung an Peptiden mit Fluor-18 kaum möglich ist, wurde eine Radiofluorierung mittels prosthetischer Gruppen angestrebt. Durch Variation von verschiedenen Aminosäuren Resten am C-Terminus des D3-Peptids konnten verschiedene Synthesestrategien entwickelt werden. Bei der Erweiterung mit einem Lysin-Rest war es möglich, Acylierungsreaktionen am Amin durchzuführen, während ein Cystein-Rest Reaktionen mit Maleimiden ermöglichte.

Als potentiell Acylierungsreagenz wurde das etablierte Succinimidyl-4- $[^{18}\text{F}]$ fluorbenzoat ausgewählt. Es erfolgte die Synthese eines nicht-radioaktiven Standards, welcher genutzt wurde, um in Voruntersuchungen die optimalen Reaktionsbedingungen an Aminen zu bestimmen. Eine Abtrennung und Identifikation der Kopplungs-

5 Zusammenfassung

produkte erfolgte mittels HPLC mit anschließender Massenspektrometrie. An Lysin konnten die besten Ausbeuten bei einer Reaktionszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur in einem Borat/HCl-Puffer (pH 8,5) erhalten werden. Eine Übertragung dieser Reaktionsbedingungen auf ein Lysin-haltiges Testpeptid zeigte ebenfalls sehr gute Ergebnisse. Bei dem Einsatz des D3-Derivats bestätigte sich dieses Verhalten jedoch nicht. Die maximalen Ausbeuten konnten hier erst zwischen 30 und 40 °C erhalten werden und lagen nur wenig über 10 %. Die Darstellung von Succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorbenzoat erfolgte über eine dreistufige Radiosynthese mit einer Gesamtausbeute von 41 bis 60 % nach etwa 70 Minuten. Mit dem radiomarkierten Aktivester wurden für die Acylierungsreaktion an Lysin maximale Ausbeuten von 62 % und am Testpeptid von 50 % erhalten. Ein Transfer der optimierten Bedingungen auf die Reaktion mit dem D3-Derivat führte nicht zur gewünschten Radiofluorierung. Durch Zugabe von Trägermaterial konnte in Einzelfällen eine Produktbildung beobachtet werden. Jedoch wurde dieses Syntheseverfahren aufgrund der unzuverlässigen Bildung und unsicherer Produktidentität verworfen.

Zur Realisierung einer Radiomarkierung an einem Cystein-Rest wurden zwei verschiedene Maleimide synthetisiert. Als erstes wurde 4-[¹⁸F]Fluorbenzylmaleimid als thiol-reaktive Gruppe in Betracht gezogen. Mittels des inaktiven Standards wurde mit Hilfe von Glutathion gezeigt, dass sich diese Verbindung quantitativ an Thiolen addiert. Die Übertragung der Reaktionsbedingungen auf ein um einen Cystein- sowie Tyrosin-Rest erweitertem D3-Derivat führte ebenso zu quantitativen Ausbeuten. Die Additionsprodukte wurden mittels HPLC und anschließender Massenspektrometrie identifiziert. Die Radiosynthese von 4-[¹⁸F]Fluorbenzylmaleimid erfolgte sowohl über einen dreistufigen als auch über einen vierstufigen Synthesepfad. Der erste Syntheseweg konnte ausschließlich als geträgerte Variante durchgeführt werden und lieferte innerhalb von 115 Minuten radiochemische Ausbeuten unter 5 %. Als Alternative wurde eine vierstufige Synthese ausgehend von 4-[¹⁸F]Fluorbenzaldehyd über die Bildung von 4-[¹⁸F]Fluorbenzylbromid und über die *N*-Alkylierung mit einem am Maleimid geschützten Baustein sowie anschließende Entschützung angestrebt. Da jedoch die Alkylierungsreaktion nur mit ungenügenden Ausbeuten durchführbar war, wurde auch dieser Syntheseweg wieder verworfen.

Die thiol-reaktive Gruppe 1-[3-(2-[^{18}F]Fluorpyridin-3-oxyl)propyl]pyrrol-2,5-dion ([^{18}F]FPyME) wurde als zweite Option in Betracht gezogen. Die erfolgreiche Synthese der inaktiven Referenzverbindung konnte im Vergleich zu der in der Literatur bekannten Synthese über eine zweistufige Synthese mit einem am Maleimid geschützten Derivat in Ausbeuten von 50 % gegenüber einer dreistufigen Synthese mit Ausbeuten von 29 % verbessert werden. Auch die Radiosynthese konnte über diesen Syntheseweg optimiert werden. Die ursprünglich dreistufige Darstellung mittels der nukleophilen Substitution mit [^{18}F]Fluorid an 3-(2-Nitropyridin-3-oxyl)propylcarbamidsäure-*tert*-butylester, anschließender Reduktion zum Amin und abschließender Kondensation zum Maleimid [^{18}F]FPyME führte in der vorliegenden Arbeit jedoch nur zu radiochemischen Ausbeuten von 2-20 % mit einer Synthesedauer von insgesamt 110 Minuten.

Über die Darstellung eines Nitro-Vorläufers eines mit 2,5-Dimethylfuran geschützten Maleimid-Derivats konnten nach der Optimierung der Reaktionsparameter für die nukleophile Substitution mit [^{18}F]Fluorid und für die anschließende Entschützung über eine Retro-DIELS-ALDER Reaktion eine Gesamtausbeute von $20 \pm 5\%$ innerhalb von 60 Minuten erreicht werden. Diese Syntheseroute bietet das Potential auf andere [^{18}F]Fluorpyridin-basierende Maleimid-haltige Gruppen übertragen werden zu können und diese ebenfalls in nur zwei Synthesestufen darzustellen. Zusätzlich ist die Weiterentwicklung dieses Markierungsverfahrens zu einer Eintopfsynthese denkbar. Für die Additionsreaktion am D3-Derivat wurden die optimierten Bedingungen der Reaktion mit 4-Fluorbenzylmaleimid übernommen und sie führten auch hier zu einer quantitativen Umsetzung. Die Übertragung auf die Radiosynthese bestätigte dieses Verhalten und führte zu radiochemischen Ausbeuten eines radiomarkierten D3-Derivats von über 95 %. Wurde jedoch das L-Enantiomer der Verbindung genutzt, lagen die Ausbeuten nur bei 50 %. Inklusive der HPLC-Reinigung betrug die Synthesezeit der ^{18}F -markierten D3-Derivate insgesamt etwa 120 Minuten. Die radiochemische Gesamtausbeute konnte nach der HPLC-Abtrennung nicht genau bestimmt werden, da ein Großteil der Aktivität aufgrund seiner hohen Glasaffinität in der verwendeten Spritze verloren ging.

5 Zusammenfassung

Die erfolgreich markierten D3-Derivate konnten somit für weitergehende präklinische *in vitro* Untersuchungen eingesetzt werden. In autoradiographischen Untersuchungen an horizontalen Schnitten von Mäusegehirnen, welche in hoher Konzentration β -Amyloid-Plaques ausgebildet hatten, zeigten diese Derivate jedoch eine hohe Glasaffinität. Um aussagekräftigere Abbildungen zu erhalten, musste eine Optimierung der Parameter bei der Inkubation durchgeführt werden. Die Verwendung von PBS-Puffer anstelle von TRIS-Puffer erhöhte den Kontrast vom Gewebe zum Glasuntergrund. Eine weitere Verbesserung des Kontrastes wurde durch die Zugabe von Rinderserumalbumin erzielt. Es wurde teilweise eine vermehrte Anreicherung der Aktivität, somit eine erhöhte Bindung des Radiotracers, an der Hirnrinde detektiert. An diesen Stellen wurden auch mittels Kongorot β -Amyloide detektiert. Jedoch war es nicht möglich, bei allen mit Kongorot gefärbten Anreicherungen ebenfalls eine Anreicherung des Peptids zu messen. Die Radiofluorierung der D3-Derivate zeigte in den autoradiographischen *in vitro* Bindungsstudien zwar eine Affinität zu β -Amyloiden, jedoch scheint diese nicht hoch genug zu sein, um alle β -Amyloid-Ablagerungen abzubilden. Aufgrund der hohen unspezifischen Bindung, u. a. an der Glasoberfläche, erhöht sich die Untergrundaktivität, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis nicht ausreichend hoch ist, um alle relevanten Bindungsstellen zu detektieren. Daraus folgt, dass für weiterführende *in vivo* Untersuchungen keine quantitative Aussage bezüglich der β -Amyloid-Anreicherung getroffen werden kann. Zudem stehen auch noch weitere *in vivo* bzw. *ex vivo* Untersuchungen zur Bluthirnschrankengängigkeit der D3-Peptide aus, die eine Voraussetzung zur Eignung der Tracer als Radiodiagnostika darstellt.

Literatur

- [1] S. M. Qaim, H. H. Coenen, *Pharmazie in unserer Zeit* **2005**, *6*, 460–466.
- [2] *The Clinical Applications of SPET*, (Hrsg.: P. H. Cox, M. Pillay), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, **1995**.
- [3] K. Wienhard, R. Wagner, W.-D. Heiss, *PET - Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie*, Springer Berlin Heidelberg, **1989**.
- [4] H. Herzog, F. Rösch, *Pharmazie in unserer Zeit* **2005**, *34*, 468–473.
- [5] P. W. Miller, N. J. Long, R. Vilar, A. D. Gee, *Angewandte Chemie* **2008**, *120*, 9136–9172.
- [6] L. Cai, S. Lu, V. W. Pike, *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 2853–2873.
- [7] J. Magill, G. Pfennig, J. Galy, *Karlsruher Nuklidkarte*, 7. Auflage, **2006**.
- [8] M. Bauser, L. Lehmann, *Chemie in unserer Zeit* **2012**, *46*, 80–99.
- [9] H. H. Coenen in *PET Chemistry - The Driving Force in Molecular Imaging*, (Hrsg.: P. A. Schubinger, L. Lehmann, M. Friebe), Springer Berlin Heidelberg, **2007**, S. 15–50.
- [10] G. Blessing, H. H. Coenen, K. Franken, S. M. Qaim, *Applied Radiation and Isotopes* **1986**, *37*, 1135–1139.
- [11] E. Hess, G. Blessing, H. H. Coenen, S. M. Qaim, *Applied Radiation and Isotopes* **2000**, *52*, 1431–1440.
- [12] J. Bergmann, O. Solin, *Nuclear Medicine and Biology* **1997**, *24*, 677–683.

Literatur

- [13] S. J. Gatley, W. J. Shaughnessy, *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* **1982**, *33*, 1325–1330.
- [14] G. Schrobblingen, G. Firnau, R. Chirakal, E. S. Garnett, *Journal of the Chemical Society Chemical Communications* **1981**, 198–199.
- [15] M. Constantinou, F. I. Aigbirhio, R. G. Smith, C. A. Ramsden, V. W. Pike, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 1780–1781.
- [16] G. W. M. Visser, C. N. M. Bakker, J. D. M. Herscheid, G. Brinkman, A. Hoekstra, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1984**, *21*, 1226.
- [17] H. H. Coenen, S. M. Moerlein, *Journal of Fluorine Chemistry* **1987**, *36*, 63–75.
- [18] H. H. Coenen, K. Franken, P. Kling, G. Stöcklin, *Applied Radiation and Isotopes* **1984**, *39*, 1243–1250.
- [19] E. F. J. de Vries, G. Luurtsema, M. Brüssermann, P. H. Elsinga, W. Vaalburg, *Applied Radiation and Isotopes* **1999**, *51*, 389–394.
- [20] H. H. Coenen, J. Ermert, *Current Radiopharmaceuticals* **2010**, *3*, 163–173.
- [21] H. H. Coenen, B. Klatter, A. Knöchel, M. Schüller, G. Stöcklin, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1986**, *23*, 455–466.
- [22] M.-R. Zhang, K. Kumata, K. Suzuki, *Tetrahedron* **2007**, *48*, 8632–8635.
- [23] K. Hamacher, H. H. Coenen, G. Stöcklin, *Journal of Nuclear Medicine* **1987**, *27*, 235–238.
- [24] R. M. Hoyte, S. S. Lin, D. R. Christman, H. L. Atkins, W. Hauser, A. P. Wolf, *Journal of Nuclear Medicine* **1971**, *12*, 280–286.
- [25] T. J. Tewson, M. J. Welch, *Journal of the Chemical Society Chemical Communications* **1979**, *24*.
- [26] T. L. Ross, J. Ermert, C. Hocke, H. H. Coenen, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 8018–8025.

- [27] N. Satyamurthy, J. R. Barrio, *Patent* **2009**, WO2010117435.
- [28] A. Varvoglis, *The Organic Chemistry of Polycoordinated Iodine*, VCH, New York, **1992**.
- [29] J. Cardinale, J. Ermert, S. Humpert, H. H. Coenen, *RSC Advances* **2014**, *4*, 17293–17299.
- [30] L. Mu, C. R. Fischer, J. P. Holland, J. Becaude, P. A. Schubiger, R. Schibli, S. M. Ametamey, K. Graham, T. Stellfeld, L. M. Dinkelborg, L. Lehmann, *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, *2012*, 889–892.
- [31] M. Tredwell, S. M. Preshlock, N. J. Taylor, S. Gruber, M. Huiban, J. Paschier, J. Mercier, C. Génicot, V. Gouverneur, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 7751–7755.
- [32] E. Lee, A. S. Kamlet, D. C. Powers, C. N. Neumann, G. B. Boursalin, T. Furuya, D. C. Choi, J. M. Hooker, T. Ritter, *Science* **2011**, *334*, 639–642.
- [33] E. Lee, J. M. Hooker, T. Ritter, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 17456–17458.
- [34] X. Huang, W. Liu, H. Ren, R. Neelamegam, J. M. Hooker, J. T. Groves, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 6842–6845.
- [35] D. S. Wilbur, *Bioconjugate Chemistry* **1992**, *3*, 433–470.
- [36] D. Hebel, K. Kirk, L. Cohen, V. Labroo, *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 619–622.
- [37] H.-J. Wester, M. Schottelius in, (Hrsg.: P. A. Schubinger, L. Lehmann, M. Friebe), Springer Berlin Heidelberg, **2007**, Kap. 4 Fluorine-18 Labeling of Peptides and Proteins, S. 79–111.
- [38] M. R. Kilbourn, C. S. Dence, M. J. Welch, C. J. Mathias, *Journal of Nuclear Medicine* **1987**, *28*, 462–470.
- [39] D. Block, H. H. Coenen, G. Stöcklin, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1987**, *24*, 1029–1042.

Literatur

- [40] D. E. Olberg, O. K. Hjelstuen, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1669–1679.
- [41] F. Dollé, F. Hinnen, F. Vaufrey, B. Tavitian, C. Crouzel, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1997**, *34*, 319–330.
- [42] B. Kuhnast, B. de Bruin, F. Hinnen, B. Tavitian, F. Dollé, *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*, 617–627.
- [43] A. E. Bolton, W. M. Hunter, *Biochemical Journal* **1973**, *133*, 529–539.
- [44] D. Block, H. H. Coenen, G. Stöcklin, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1988**, *25*, 185–200.
- [45] G. Vaidyanathan, M. R. Zalutsky, *Nuclear Medicine and Biology* **1992**, *19*, 275–281.
- [46] S. Guhlke, H. H. Coenen, G. Stöcklin, *Applied Radiation and Isotopes* **1994**, *45*, 715–727.
- [47] L. Lang, W. C. Eckelmann, *Applied Radiation and Isotopes* **1994**, *45*, 1155–1163.
- [48] D. E. Olberg, J. M. Arukwe, D. Grace, O. K. Hjelstuen, M. Solbakken, G. M. Kindberg, A. Cuthbertson, *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 1732–1740.
- [49] C. Hultsch, M. Berndt, R. Bergmann, F. Wuest, *Applied Radiation and Isotopes* **2007**, *65*, 818–826.
- [50] M. Glaser, H. Karlsen, M. Solbakken, J. Arukwe, F. Brady, S. K. Luthra, A. Cuthbertson, *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*, 1447–1453.
- [51] C.-Y. Shiue, A. P. Wolf, J. F. Hainfeld, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1989**, *26*, 287–289.
- [52] M. Berndt, J. Pietzsch, F. Wuest, *Nuclear Medicine and Biology* **2007**, *34*, 5–15.
- [53] W. Cai, X. Zhang, Y. Wu, X. Chen, *Journal of Nuclear Medicine* **2006**, *47*, 1172–1180.

- [54] B. de Bruin, B. Kuhnast, F. Hinnen, L. Yaouancq, M. Amessou, L. Johannes, A. Samson, R. Boisgard, B. Tavitian, F. Dollé, *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 406–420.
- [55] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [56] C. Mamat, T. Ramenda, F. Wuest, *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **2009**, *6*, 21–34.
- [57] J. Marik, J. L. Sutcliffe, *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 6681–6684.
- [58] M. Glaser, E. Arstad, *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *18*, 989–993.
- [59] M. Glaser, E. G. Robins, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2009**, *52*, 407–414.
- [60] L. Mu, A. Höhne, P. A. Schubiger, S. M. Ametamey, K. Graham, J. E. Cyr, L. Dinkelborg, T. Stellfeld, A. Srinivasan, U. Voigtmann, U. Klar, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 4922–4925.
- [61] A. Höhne, L. Mu, M. Honer, P. A. Schubiger, S. M. Ametamey, K. Graham, T. Stellfeld, S. Borkowski, D. Berndorff, U. Klar, U. Voigtmann, J. E. Cyr, M. Friebe, L. Dinkelborg, A. Srinivasan, *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 1871–1879.
- [62] W. J. McBride, M. R. Sharkey, H. Karacay, C. A. D’Souza, E. A. Rossi, P. Lavermann, C.-H. Chang, O. C. Boerman, D. M. Goldenberg, *The Journal of Nuclear Medicine* **2009**, *50*, 991–998.
- [63] W. J. McBride, M. R. Sharkey, D. M. Goldenberg, *EJNMMI Research* **2013**, *3*.
- [64] S. H. Hausner, N. Bauer, J. L. Sutcliffe, *Nuclear Medicine and Biology* **2014**, *41*, 43–50.
- [65] N. D. Hammer, X. Wang, B. A. McGuffie, M. R. Chapman, *Journal of Alzheimer’s Disease* **2008**, *13*, 407–419.

Literatur

- [66] A. Alzheimer, *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin* **1907**, *64*, 146–148.
- [67] G. G. Glenner, C. W. Wong, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1984**, *120*, 885–890.
- [68] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, *297*, 353–356.
- [69] J. Greenwald, R. Riek, *Structure* **2010**, *18*, 1244–1260.
- [70] C. Haass, *The EMBO Journal* **2004**, *23*, 483–488.
- [71] D. J. Selkoe, *Physiological Reviews* **2001**, *81*, 741–766.
- [72] K. Nagren, C. Halldin, J. O. Rinne, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2010**, *37*, 1575–1593.
- [73] M. Cui, *Current Medicinal Chemistry* **2014**, *21*, 82–112.
- [74] J. E. Maggio, E. R. Stimson, J. R. Ghilardi, C. J. Allen, C. E. Dahl, D. C. Whitcomb, S. R. Vigna, H. V. Vinters, M. E. Labenski, P. W. Mantyh, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89*, 5462–5466.
- [75] R. Friedland, R. Majocha, J. Reno, L. Lyle, C. Marotta, English, *Molecular Neurobiology* **1994**, *9*, 107–113.
- [76] R. P. Friedland, R. Kalaria, M. Berridge, F. Miraldi, P. Hedera, J. Reno, L. Lyle, C. A. Marotta, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1997**, *826*, 242–247.
- [77] T. M. Wengenack, G. L. Curran, J. F. Poduslo, *Nature Biotechnology* **2000**, *18*, 868–872.
- [78] A. Nordberg, *The Lancet Neurology* **2004**, *3*, 519–527.
- [79] R. P. Friedland, J. Shi, J. C. Lamanna, M. A. Smith, G. Perry, *Annals of the New York Academy of Sciences* **2000**, *903*, 123–128.
- [80] M. Jahan, S. Nag, R. Krasikova, U. Weber, A. Muhs, A. Pfeifer, C. Spenger, D. Willbold, B. Gulyás, C. Halldin, *Nuclear Medicine and Biology* **2012**, *39*, 315–323.

- [81] T. van Groen, I. Kadish, K. Wiesehan, S. A. Funke, D. Willbold, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 276–282.
- [82] T. N. M. Schumacher, L. M. Mayr, D. L. Minor Jr., M. A. Milhollen, M. W. Burgess, P. S. Kim, *Science* **1996**, *271*, 1854–1857.
- [83] S. A. Funke, D. Willbold, *Molecular BioSystems* **2009**, *5*, 783–786.
- [84] G. P. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315–1317.
- [85] S. A. Funke, T. van Groen, I. Kadish, D. Bartnik, L. Nagel-Steger, O. Brener, T. Sehl, R. Batra-Safferling, C. Moriscot, G. Schoen, A. H. C. Horn, A. Müller-Schiffmann, C. Korth, H. Sticht, D. Willbold, *Chemical Neuroscience* **2010**, *1*, 639–648.
- [86] O. O. Olubiyi, D. Frenzel, D. Bartnik, J. M. Glück, O. Brener, L. Nagel-Steger, S. A. Funke, D. Willbold, B. Strodel, *Current Medical Chemistry* **2014**, *21*, 1448–1457.
- [87] P. Johnström, N. G. Harris, T. D. Fryer, O. Barret, J. C. Clark, J. D. Pickard, A. P. Davenport, *Clinical Science* **2002**, *103*, 4S–8S.
- [88] G. Gaudriault, J.-P. Vincent, *Peptides* **1992**, *13*, 1187–1192.
- [89] F. Wüst, *private Mitteilung* **2013**.
- [90] M. S. Haka, M. R. Kilbourn, G. L. Watkins, S. A. Toorongian, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1989**, *27*, 823–833.
- [91] M. A. Carroll, R. Yan, *Patent* **2009**, *US 2009/0286992 A1*.
- [92] M. M. Dcona, D. Mitra, R. W. Goehe, D. A. Gewirtz, D. A. Lebman, M. C. T. Hartmann, *Chemical Communications* **2012**, *48*, 4755–4757.
- [93] X. Z. Zhao, K. Maddalo, M. Metifiot, S. J. Smith, B. C. Vu, C. Marchand, S. H. Hughes, Y. Pommier, T. R. Burke Jr, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 2986–2990.
- [94] I. Koslowsky, J. Mercer, F. Wuest, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 4730–4735.

- [95] J. Way, F. Wuest, *Nuclear Medicine and Biology* **2013**, *40*, 430–436.
- [96] A. Jha, C. Mukherjee, A. K. Prasad, V. S. Parmar, M. Vadaparti, U. Das, E. de Clercq, J. Balzarini, J. P. Stables, A. Shrivastav, R. K. Sharma, J. R. Dimmock, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 1510–1515.
- [97] H. Kwart, I. Burchuk, *Journal of the American Chemical Society* **1952**, *74*, 3094–3097.
- [98] C. Lemaire, L. Libert, A. Plenevaux, J. Aerts, X. Franci, A. Luxen, *Journal of Fluorine Chemistry* **2012**, *138*, 48–55.
- [99] C. Lemaire, S. Gillet, S. Guillouet, A. Plenevaux, J. Aerts, A. Luxen, *European Journal of Organic Chemistry* **2004**, *13*, 2899–2904.
- [100] Q. Meng, A. Slassi, R. S, *Patent* **1997**, *US005654431A*.
- [101] Y. You, M. Bio, A. Hossion, *Patent* **2013**, *W 2013/163321 A1*.
- [102] S. Abad, P. Nolis, J. D. Gispert, J. Spengler, F. Albericio, S. Rojas, J. R. Herance, *Chemical Communications* **2012**, *48*, 6228–6120.
- [103] V. W. Pike, *Trends in Pharmacological Sciences* **2009**, *30*, 431–440.
- [104] H. Liu, A. S. Funke, D. Willbold, *Rejuvenation Research* **2009**, *13*, 210–213.
- [105] C. S. J. Walpole, R. Wrigglesworth, S. Bevan, E. A. Campbell, A. Dray, I. F. James, K. J. Masdin, M. N. Perkins, J. Winter, *Journal of Medicinal Chemistry* **1993**, *36*, 2381–2389.
- [106] Z. Zhou, C. J. Fahrni, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 8862–8863.
- [107] W. H. Binder, C. Kluger, *Macromolecules* **2004**, *37*, 9321–9330.
- [108] S. M. Qaim, G. Stöcklin, *Radiochimica Acta* **1983**, *34*, 25–40.
- [109] G. Tang, W. Zeng, M. Yu, G. Kabalka, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2008**, *51*, 68–71.

Abkürzungsverzeichnis

μ	micro
A	Ampere
Aβ	β-Amyloid
APP	Amyloid-Precursor-Protein
AS	Aminosäure
AU	Absorption Unit
BBB	blood brain barrier
Bq	Becquerel
BSA	Bovine Serum Albumin
c.a.	carrier added
d	Deuteron
d	Tage
d	dublett (NMR)
d. h.	das heißt
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DDNP	1,1-Dicyano-2-[6-(dimethylamino)naphthalen-2-yl]propen
DIPEA	<i>N, N</i> -Diisopropylethylamine
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	et alii/aliae

EtOAc	Ethylacetat
eV	Elektronenvolt
exp.	experimentell
FBA	4-Fluorbenzylamin
FBCP	3-(4-Fluorbenzylcarbamoyl)propionsäure
FBM	4-Fluorbenzylamin
FDG	2-Fluor-2-desoxy-D-Glucose
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPyME	1-[3-(2-Fluorpyridin-3-oxyl)propyl]pyrrol-2,5-dion
G	Giga
GSH	Glutathion
h	Stunden
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HSTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(<i>N</i> -succinimidyl)uroniumhexafluorphosphat
k	kilo
L	Liter
LET	linear energy transfer
M	Mega
m	multiplett (NMR)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MeOTf	Methyltriflat
min	Minuten
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
n	Neutron
n.c.a.	no carrier added
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
p	Proton
PET	Positronen Emissions Tomographie

q	quadruplett (NMR)
RCA	radiochemische Ausbeute
RT	Raumtemperatur
s	singulett (NMR)
SFB	Succinimidyl-4-fluorbenzoat
SPE	solid phase extraction
SPECT	single photon emission computed tomography
t	triplett (NMR)
TBAH	Tetrabutylammoniumhydroxid
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
theor.	theoretisch
THF	Tetrahydrofuran
TP	Testpeptid
UV	Ultraviolettstrahlung
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

Strukturverzeichnis

- 1 Succinimidyl-4-fluorbenzoat (SFB)
- 2 4-Fluorbenzoesäure
- 3 *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat
- 4 Ethyl-4-(trimethylammonium)benzoattriflat
- 5 Ethyl-4-Dimethylaminobenzoat
- 6 Ethyl-4-fluorbenzoat
- 7 Succinimidyl-4-(dimethylamino)benzoat
- 8 4-(Dimethylamino)benzoesäure
- 9 3-(4-Azidiophenyl)propionsäure
- 10 4-Azidobenzoesäure
- 11 4-(Methylazido)benzoesäure
- 12 3-(4-Aminophenyl)propionsäure
- 13 Succinimidyl-3-(4-azidophenyl)propanat
- 14 Succinimidyl-4-azidobenzoat
- 15 Suciinimidyl-4-(azidomethyl)benzoat
- 16 4-Fluorbenzylmaleimid (FBM)
- 17 1-[3-(2-Fluorpyridin-3-oxyl)propyl]pyrrol-2,5-dion (FPyME)
- 18 4-Fluorbenzylamin
- 19 Maleinsäureanhydrid
- 20 4-(Trimethylammonium)benzotriflat
- 21 4-Fluorbenzotriflat

- 22 3-(4-Fluorbenzylcarbamoyl)propensäure
- 23 *N*-(*p*-Tolyl)maleaminsäure
- 24 3-*p*-Tolylcarbamoyl)-3-(benzylthio)propionsäure
- 25 Maleimid
- 26 Furan
- 27 7-Oxabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonylimid
- 28 4-Fluorbenzylbromid
- 29 *N*-(4-Fluorbenzyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]-hept-5-en-2,3-dicarbonylimid
- 30 4-(Trimethylammonium)benzaldehydtriflat
- 31 4-Fluorbenzaldehyd
- 32 4-(Dimethylamino)benzaldehyd
- 33 4-Fluorbenzalkohol
- 34 2-Fluor-3-Hydroxypyridin
- 35 3-*N*-Boc-propan-1-ol
- 36 3-(2-Fluorpyridin-3-oxyl)propylcarbamidsäure-*tert*-butylester
- 37 *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-3-brompropylamin
- 38 3-Brompropylamin
- 39 Di-*tert*-butyldicarbonat
- 40 3-Hydroxy-2-Nitropyridin
- 41 3-(2-Nitropyridin-3-oxyl)propylcarbamidsäure-*tert*-butylester
- 42 3-(2-Fluorpyridin-3-oxyl)propylamin
- 43 *N*-Methoxycarbonylmaleimid
- 44 2,5-Dimethylfuran
- 45 1,4-Dimethyl-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonylimid
- 46 1,3-Dibrompropan
- 47 3-(2-Fluorpyridin-3-oxyl)propylbromid
- 48 3-(2-Nitropyridin-3-oxyl)propylbromid

- 49** *N*-[3-(2-Fluorpyridin-3-oxyl)propyl](1,4-dimethyl-7-oxabicyclo-
[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonylimid)
- 50** *N*-[3-(2-Nitropyridin-3-oxyl)propyl](1,4-dimethyl-7-oxabicyclo-
[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonylimid)
- 51** *N*-(Prop-2-in)-7-oxabicyclo[2.2.1]-hept-5-en-2,3-dicarbonylimid
- 52** Propargylbromid
- 53** *N*-(Prop-2-in)maleimid

Danksagung

An erste Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. H. H. Coenen für die interessante Themenstellung, die Betreuung meiner Arbeit und für die sehr guten Arbeitsbedingungen in seinem Institut.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dirk Bier für seine stete Hilfsbereitschaft und seiner hervorragenden Betreuung meiner Arbeit. Ich danke ihm für viele hilfreiche Diskussionen, Ratschläge und Anregungen für allerlei Fragen und Probleme des Laboralltags. Ich danke auch für die Aufnahme von unendlich vieler Massenspektren.

Herrn Dr. Marcus Holschbach danke ich dafür, dass er stets ein offenes Ohr für die unterschiedlichsten Fragestellungen (insbesondere im Bereich der organischen Synthesechemie) hatte und immer gerne mit Rat zur Seite stand. Darüber hinaus danke ich ihm für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren.

Frau Annette Schulze danke ich herzlich für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der Autoradiographien sowie der Kongorot-Färbungen.

Ein weiterer Dank geht an die Zyklotronoperateure Manfred Holzgreve und Klaus Adrian für die regelmäßige und zuverlässige Produktion und Bereitstellung von Fluor-18.

Ebenso danke ich Herrn Frank Mergner, Herrn Stefan Spellerberg, Herrn Ingo Montag und Herrn Anton Fixmann für ihre steten Bemühungen zur Einhaltung der Strahlen- und Arbeitsschutzmaßnahmen. Herrn Karl-Heinz Riedel danke ich für die Hilfe in allen technischen Fragen und Angelegenheiten.

Für viele fachliche (und manchmal auch weniger fachliche) Diskussionen danke ich allen (Ex-)Doktoranden des INM-5, die mich auf meinem Weg begleitet haben. Ich habe alle sehr ins Herz geschlossen und ich freue mich, dass ich einige auch meine Freunde nennen darf.

Zusätzlich möchte ich mich auch bei der „Kaffeerunde“ bedanken. Ich danke den KollegInnen für die Unterstützung im Laboralltag und auch für die vielen unterhaltenden Gespräche und Diskussionen in den Pausen. Auch allen anderen Mitarbeitern des INM-5 danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut und für die schöne Zeit.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Meiner Mama Annette Homberg und ihrem Lebensgefährten Michael Kostal danke ich für die ununterbrochene Unterstützung in allen Lebenslagen, wobei ich es ihnen bestimmt nicht immer leicht gemacht habe. Insbesondere danke ich aber meinem besten Freund und Ehemann Santiago Cavani, der immer an mich geglaubt hat, an meiner Seite stand und auch in den stressigsten Phasen meine Launen ertragen hat. Danke für alles.

Ich versichere hiermit, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig 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 Anlehnung 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 Promotionsverfahren nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. H. H. Coenen betreut worden.

Jülich, im Juni 2015

Jül-4388
Juli 2015
ISSN 0944-2952

