



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

INSTITUT FÜR RADIOCHEMIE DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

ENTWICKLUNG UND EVALUIERUNG NEUER
METHODEN ZUR RADIOMARKIERUNG PEPTIDISCHER
TRACER MIT ^{18}F UND $^{99\text{m}}\text{Tc}$ FÜR DIE
NUKLEARMEDIZINISCHE DIAGNOSTIK

Dissertation

Kjerstin Bruus-Jensen

München

2006

Institut für Radiochemie
der Technischen Universität München

Entwicklung und Evaluierung neuer Methoden zur Radiomarkierung peptidischer Tracer mit ^{18}F und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ für die nuklearmedizinische Diagnostik

Kjerstin Bruus-Jensen

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. A. Türler

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. J. P. Wester

2. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke

Die Dissertation wurde am 18. 01. 2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 13. 02. 2006 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2002 bis Januar 2006 in der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn *Prof. Dr. H.J. Wester* angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. H.J. Wester* für die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten, für die vielen Ideen, die eine andere Betrachtungsweise ermöglichten, und den Gestaltungsfreiraum bei der Bearbeitung meines Themas. Die Diskussion der Ergebnisse und die Hilfestellung und die Ratschläge bei auftretenden Problemen trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei.

Bei Herrn *Prof. Dr. M. Schwaiger* möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit, meine Dissertation in einem motivierenden multidisziplinären Umfeld durchzuführen.

Für die Bereitstellung der $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -„Kits“ im Rahmen einer Kooperation bedanke ich mich bei der *Firma Mallinckrodt Medical B.V.* (Petten, Niederlande).

Meinen Laborkollegen Herrn *Dr. R. Haubner*, Frau *Dr. A. Hauser*, Herrn *Dr. G. Henriksen*, Herrn *Dr. B. Kühnast*, Herrn *Dr. N. Koglin*, Herrn *Dr. A. Modlinger*, Frau *Dr. R. Molls*, Herrn *S. Berger*, Herrn *W. Linke* und Herrn *T. Poethko* möchte ich herzlich danken für die gute Atmosphäre im Labor und die vielen Ratschläge und Ideen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. R. Alberto* und seinem Arbeitskreis an der Universität Zürich für die Ratschläge zur Arbeit mit dem ^{99m}Tc -Tricarbonyl-Komplex und der Ermöglichung einiger Experimente in ihren Labors.

Bei meiner Kollegin *Dr. M. Schottelius* möchte ich mich sowohl für die vielseitigen Hilfestellungen bei der praktischen Arbeit als auch bei der Anfertigung diverser Manuskripte bedanken. Auch ihr Zur-Verfügung-Stellen einiger Verbindungen verdient meinen besonderen Dank. Die Gespräche mit ihr haben stets den Laboralltag angenehm aufgelockert.

Frau *Prof. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke*, Frau *C. Bodenstein*, Frau *Dr. R. Beck*, Frau *Dr. F. Rau* und ihren nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen danke ich für die zeitraubende Hilfe bei der Durchführung der Biodistributionsexperimente.

Frau *Dr. A. Hauser* danke ich für die Hilfe bei der Durchführung zahlreicher Biodistributionsexperimente.

Für die Elution der Targetspülung und die Bereitstellung des ^{18}F danke ich Herrn *M. Herz*.

Dem ganzen Team des Heißlabors gilt mein Dank, da es mir die "Selbstbedienung" am ^{99m}Tc -Generator ermöglichte und so ein flexibles Arbeiten unterstützte.

Herrn *B. Cordes* vom Institut für Organische Chemie und Biochemie der TU München danke ich für die Durchführung der massenspektroskopischen Untersuchungen und die freundliche Hilfe bei der Auswertung.

Herrn *T. Poethko* danke ich außerordentlich für die vielseitige Unterstützung, vor allem die Einführung in die Radiofluorierung und die spezielle Auflockerung der Atmosphäre.

Für die Hilfe bei der Akquisition und Auswertung der γ -Kameraaufnahmen und das große Entgegenkommen bei der Terminplanung möchte ich mich bei Frau *S. Schachoff*, Frau *J. Grahneis* und ihren Kolleginnen und Kollegen bedanken.

Bei allen nicht namentlich genannten Kollegen bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung vieler Experimente und der freundlichen Atmosphäre in der Abteilung.

Für das intensive Korrekturlesen dieser Arbeit gilt mein Dank vor allem Herrn *Dr. N Koglin*, Herrn *Dr. A. Modlinger* und Frau *Dr. M. Schottelius*, und meiner Mutter.

Vielmals möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden dafür bedanken, dass sie mich auch als stressgeplagte Doktorandin ertragen haben und mir seelische Unterstützung zukommen ließen.

Abkürzungsverzeichnis

% iD/g	Prozent der injizierten Dosis (Aktivität) pro Gramm Gewebe
δ	chemische Verschiebung
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
AcOH	Essigsäure
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Eliminierung
Ar	Aromat, aromatisch
BFCA	<i>bifunctional coupling agent</i> , bifunktionseller Komplexbildner
BM	bioaktives Molekül
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Bq	Becquerel (Zerfälle/Sekunde)
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Cel-S-	Cellobiosyl-mercaptopropionyl
Ci	Curie (= $3.7 \cdot 10^{10}$ Bq)
CM	Carboxymethyl
CT	<i>computed tomography</i> , Computertomographie
d	Dublett
DADT	Diamindithiol
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Dde	(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-ethyl
DHP-HM-Harz	3,4-Dihydro-2H-pyran-2-yl-methoxymethyl-polystyrolharz
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecan- <i>N,N',N'',N'''</i> -tetraessigsäure
Dpr, dap	2,3-Diaminopropansäure
DTPA	Diethyltriaminpentaessigsäure
EC _{50,R}	<i>effective concentration</i> EC _{50,R} = EC ₅₀ (compound of interest)/EC ₅₀ ([¹²⁵ I]TOC)
EDDA	<i>N,N'</i> -Di-(2-essigsäure)-diaminoethan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
El	Elektrophil
EOB	<i>end of bombardment</i>
eq	Äquivalent
ESI	<i>electrospray ionization</i>

EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
fac	facial
FBA	4-Fluorbenzoesäure
FB-CHO	4-Fluorbenzaldehyd
FBOA	(4-Fluorbenzyliden)oximacetyl
FDG	2-Fluordeoxyglucose
FKS	fötales Kälberserum
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FP	Fluorpropionyl
Gluc	Glucose (Amadori gekuppelt): N-(1-Deoxy-D-fructosyl)
Gluc-S-	Glucosylsyl-mercaptopropionyl
G-Protein	<i>guanosin coupled protein</i>
h	Stunde(n)
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat
His ^α	N ^α -Carboxymethyl-histidin
His ^τ	N ^τ -Carboxymethyl-histidin, His(N ^τ -CM)-OH
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HYNIC	6-Hydrazin-nicotinsäure
i.v.	intravenös
IDA	Iminodiacetat
IgG	Immunglobulin G
J	Kopplungskonstante
K _{C2.2.2.}	Kryptofix; 4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo-[8.8.8]hexacosan
L	Ligand
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spektra</i>
logP _{ow}	Lipophilie = log(Verteilungskoeffizient) = log([Octanol]/[Wasser])
M	molar
m	Multiplett
MAG ₃	N-[N-[N-[mercaptoacetyl]glycyl]glycyl]glycine
Me	Methyl-
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Mesylat	Methansulfonat
min	Minute(n)
MLF	Peptidsequenz: Methionin-Leucin-Phenylalanin
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i> , Kernspintomographie

mRNA	messenger Ribonucleinsäure
Mtr	Maltotriose (Amadori gekuppelt)
MW	Molekulargewicht
n.c.a.	<i>no carrier added</i>
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Nosylat	4-Nitrotoloylsulfonat
NPPF	2-Fluorpropansäure-4-nitrophenylester
NT	Neurotensin
Nu	Nukleophil
p.i.	<i>post injection</i> (nach Injektion)
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglycol
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> , Positronenemissionstomographie
PG	<i>protection group</i> , Schutzgruppe
Pic	(Caboxymethyl-pyridin-2-yl-methylamino)essigsäure, 2-Picolylamindiessigsäure
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i>
PnAO	Propylenaminnoxim
ppm	<i>parts per million</i>
PPTS	Pyridinium-p-toluolsulfonat
RCA	radiochemische Ausbeute
RGD	Peptidsequenz: Arg-Gly-Asp
RINK-Amid-AM-Harz	4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)phenoxyacetamidonorleucylaminomethyl-Harz
ROI	<i>regions of interest</i>
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SAACs	<i>single amino acid chelates</i> , seitenketten-funktionalisierte Aminosäure (Lysin)
SFB	<i>N</i> -Succinimidyl-4-fluorbenzoesäureester
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SRIF	<i>Somatotropin-Release-Inhibiting-Factor</i>
sst	Somatostatinrezeptor
SST-14/-28	natives Somatostatin
t	Triplett
t _{1/2}	Halbwertszeit
TBTU	<i>O</i> -(1H-Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-tetrafluoroborat

tBu	<i>tert</i> -Butyl
tBuOH	<i>tert</i> -Butanol
TCP-Harz	Tritylchlorid-Polystyrol-Harz
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thr(ol)	Threoninol
TIBS	Triisobutylsilan
TOC	Tyr ³ -Octreotid
TOCA	Tyr ³ -Octreotat
TOCam	Tyr ³ -Octreotamid
Tosylat	4-Methylbenzolsulfonat
t _R	Retentionszeit (HPLC)
Triflat	Trimethylsulfonat
Trt	Triphenylmethyl-, Trityl-
TSTU	(<i>O</i> -(<i>N</i> -Succinimidyl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium)-tetrafluorborat
UV	Ultraviolett
VIP	<i>Vasoactive Intestinal Peptide</i>
α-MSH	<i>α</i> -Melanocyte-Stimulating Hormone

1	Einleitung	1
1.1	DAS TRACERKONZEPT UND SEINE BEDEUTUNG IN DER NUKLEARMEDIZIN	1
1.2	ALLGEMEINE GRUNDLAGEN ZU RADIOPHARMAKA	2
1.3	WAHL DES BIOAKTIVEN MOLEKÜLS FÜR DIE TUMORDIAGNOSTIK	3
1.3.1	<i>In vivo</i> -Verhalten von radiomarkierten Peptiden	4
1.3.2	Somatostatin und seine Rezeptoren	5
1.3.3	Klinische Anwendung von Somatostatinanaloga	7
1.3.4	Substance P und ihre Rezeptoren	8
1.4	DIAGNOSTISCHE METHODEN DER NUKLEARMEDIZIN	9
1.4.1	Single Photon Emission Computed Tomography - SPECT	9
1.4.2	Positron Emission Tomography - PET	11
1.5	WAHL DES RADIONUKLIDS UND DER MARKIERUNGSSTRATEGIE	14
1.5.1	Gesichtspunkte der Markierungsmethode	15
1.5.2	Produktion und Bereitstellung von ^{18}F	16
1.5.3	Reaktionen für die Radiofluorierung von Peptiden	17
1.5.4	^{18}F -Radiomarkierung von Peptiden mit prosthetischen Gruppen	18
1.5.5	Bereitstellung von $^{99\text{m}}\text{Tc}$	24
1.5.6	Methoden zur Peptidmarkierung mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$	25
2	Zielsetzung dieser Arbeit	31
3	Synthese der peptidischen Grundgerüste	33
3.1	FESTPHASENSYNTHESE VON OCTREOTID	34
3.2	FESTPHASENSYNTHESE VON OCTREOTAT UND SUBSTANCE P	36
3.3	FESTPHASENSYNTHESE VON OCTREOTATAMID	37
3.4	OXIDATION DER SULFIDE ZUR DISULFIDBRÜCKE	38
4	Radiofluorierung von Peptiden mittels Hydrazonbildung	39
4.1	HINTERGRUND DER HYDRAZONBILDUNG	39
4.2	WAHL UND DESIGN DER VORLÄUFER ZUR RADIOFLUORIERUNG	41
4.2.1	Die Hydrazinkomponente	41
4.2.2	Die Peptide	42
4.2.3	Die prosthetische Gruppe und ihr Radiofluorierungsvorläufer	43
4.3	SYNTHESE DER VORLÄUFER ZUR RADIOFLUORIERUNG UND $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MARKIERUNG	44
4.3.1	Synthese von <i>N</i> -Succinimidyl-6-(Boc-hydrazin)-nicotinsäureester	44
4.3.2	Synthese der 6-Hydrazin-nicotinsäureamid-konjugierten Peptide	45
4.3.3	Radiofluorierung der prosthetischen Gruppe - [^{18}F]FB-CHO	47
4.4	EVALUIERUNG DER RADIOFLUORIERUNG MITTELS HYDRAZONBILDUNG	48

4.4.1	<i>Wahl der Reaktionsbedingungen für alle Ansätze</i>	48
4.4.2	<i>Vorversuche mit [¹⁸F]FB-CHO und freier HYNIC-Säure</i>	49
4.4.3	<i>Abhängigkeit der Markierungsausbeute vom pH-Wert</i>	49
4.4.4	<i>Abhängigkeit der Markierungsausbeute von der Peptidkonzentration</i>	53
4.4.5	<i>Abhängigkeit der Markierungsausbeute von der Reaktionstemperatur</i>	54
4.4.6	<i>Untersuchung der Chemoselektivität der Hydrazonebildung</i>	55
4.4.7	<i>Vergleich der Hydrazonebildung zur ¹⁸F-Markierung von Peptiden mit der Oximbildung</i> ..	56
4.4.8	<i>Radiosynthese von [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-Peptiden</i>	57
4.5	UNTERSUCHUNG DER RADIOFLUORIERTEN HYDRAZONE	58
4.5.1	<i>Physikalische Eigenschaften der [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-Peptide</i>	58
4.5.2	<i>pH-Abhängigkeit der Stabilität der Hydrazonebindung</i>	58
4.5.3	<i>Stabilität von [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam in Serum</i>	61
4.5.4	<i>In vivo-Stabilität und -Verteilung von [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA</i>	62
4.6	^{99m}Tc-MARKIERUNG DER HYNIC-PEPTIDE	65
5	^{99m}Tc-Tricarboxyl-markierte Peptide	67
5.1	WAHL UND DESIGN DER MARKIERUNGSVORLÄUFER	67
5.2	SYNTHESE DER MARKIERUNGSVORLÄUFER	69
5.2.1	<i>Synthese von N^ε-Carboxymethyl-N^α-Fmoc-histidinmethylester</i>	69
5.2.2	<i>Synthese von His^ε-TOC und His^ε-TOCA</i>	70
5.2.3	<i>Gluc-Lys⁰(Pic)-TOCA</i>	71
5.3	^{99m}Tc(CO)₃-MARKIERUNG VON CHELATORFUNKTIONALISIERTEN PEPTIDEN	72
5.3.1	<i>Reduktion des Pertechnetats zu [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺</i>	72
5.3.2	<i>Abhängigkeit der Markierungsausbeuten von der Vorläuferkonzentration</i>	73
5.3.3	<i>Abhängigkeit der Markierungsausbeuten von weiteren Reaktionsparametern</i>	76
5.3.4	<i>Synthese und Isolierung ^{99m}Tc(CO)₃-markierter und glykosylierter Octreotidderivate</i>	77
5.4	IN VIVO-EVALUIERUNG ^{99m}Tc(CO)₃-MARKIERTER UND GLYKOSYLIERTER OCTREOTIDDERIVATE	79
5.4.1	<i>Biodistributionsexperimente</i>	79
5.4.2	<i>γ-Kamera-Aufnahmen im Tiermodell</i>	85
5.4.3	<i>Patientenstudie</i>	88
6	Zusammenfassung	93
7	Experimenteller Teil	97
7.1	ALLGEMEINE EXPERIMENTELLE BEDINGUNGEN	97
7.1.1	<i>Organische Synthese</i>	97
7.1.2	<i>¹⁸F-Radiomarkierung</i>	99
7.1.3	<i>^{99m}Tc-Radiomarkierung</i>	100
7.1.4	<i>In vivo-Studien</i>	101

7.2	MARKIERUNGSVORLÄUFER	101
7.2.1	<i>Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV).....</i>	101
7.2.2	<i>Synthese aminosäureähnlicher Bausteine.....</i>	106
7.2.3	<i>Synthese der peptidischen Vorläufer allgemein.....</i>	111
7.2.4	<i>Synthese der Peptid für die Markierung mit ^{18}F und $^{99\text{m}}\text{Tc}$.....</i>	112
7.2.5	<i>Synthese der Peptide für die Markierung mit $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)(\text{CO})_3]^+$</i>	113
7.3	^{18}F-MARKIERUNGEN VIA HYDRAZONBILDUNG	116
7.3.1	<i>Synthese der ^{19}F-Referenzverbindungen.....</i>	116
7.3.2	<i>Produktion von ^{18}F-Fluorid.....</i>	117
7.3.3	<i>Azeotropes Trocknen einer $[\text{}^{18}\text{F}]\text{Fluorid-Cryptat-Lösung}$.....</i>	118
7.3.4	<i>Radiosynthese von 4-$[\text{}^{18}\text{F}]\text{Fluorbenzaldehyd}$ ($[\text{}^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$).....</i>	118
7.3.5	<i>Kopplung von $[\text{}^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$ an HYNIC und HYNIC-funktionalisierte Peptide</i>	118
7.3.6	<i>Bestimmung der Chemoselektivität.....</i>	120
7.3.7	<i>Herstellung und Isolierung ^{18}F-markierter Peptide im mCi-Maßstab.....</i>	120
7.4	STABILITÄTSUNTERSUCHUNG DER $[\text{}^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-PEPTIDE}$.....	121
7.4.1	<i>Stabilität der Hydrazonbindung in Abhängigkeit vom pH-Wert.....</i>	121
7.4.2	<i>Serumstabilitätsuntersuchungen.....</i>	121
7.4.3	<i>In vivo-Stabilität und Biodistribution von $[\text{}^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$</i>	122
7.5	MARKIERUNG VON HYNIC-FUNKTIONALISIERTEN PEPTIDEN MIT $^{99\text{m}}\text{Tc}$.....	122
7.6	MARKIERUNG VON CHELATOR-FUNKTIONALISIERTEN PEPTIDEN MIT $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$.	123
7.6.1	<i>Synthese der $\text{Re}(\text{CO})_3$-Standards.....</i>	123
7.6.2	<i>Synthese von $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$</i>	124
7.6.3	<i>Markierung chelatorfunktionalisierter Peptide</i>	125
7.6.4	<i>Herstellung und Isolierung $^{99\text{m}}\text{Tc}$-markierter Peptide im mCi-Maßstab</i>	126
7.7	IN VIVO-EXPERIMENTE MIT $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$-MARKIERTEN OCTREOTIDDERIVATEN	126
7.7.1	<i>Biodistributionsstudie an einem AR42J-tumortragenden Mausmodell</i>	126
7.7.2	<i>γ-Kamera-Aufnahmen und Biodistribution am Rattenmodell.....</i>	127
7.8	PATIENTENSTUDIE	128
7.8.1	<i>Patientendaten</i>	128
7.8.2	<i>SPECT-Aufnahmen</i>	128
8	Anhang	129
9	Literaturverzeichnis.....	135

1 Einleitung

1.1 Das Tracerkonzept und seine Bedeutung in der Nuklearmedizin

Anfang des 20. Jahrhunderts erkannten Wissenschaftler das Potenzial radioaktiver Nuklide oder Verbindungen zur nicht-invasiven Darstellung physiologischer und biochemischer Prozesse^[1]. Heute kann man Radiotracer allgemein definieren als Zubereitungen, die sehr geringe Mengen eines oder mehrerer Radionuklide enthalten und deren Strahlungsaktivität diagnostisch oder therapeutisch genutzt wird. Mit ihnen kann man einen chemischen, biochemischen oder physiologischen Prozess verfolgen, ohne diesen in irgendeiner Weise zu beeinflussen. Dabei ist die empfindliche Detektierbarkeit von Radioaktivität ein besonderer Vorteil, da sie z.B. Messungen auch durch ein umgebendes Medium hindurch ermöglicht. Anwendung finden Radiotracer in verschiedenen Bereichen: z.B. zur Aufklärung chemischer und biochemischer Mechanismen sowie in der Nuklearmedizin^[2].

Die heutige Nuklearmedizin nahm ihren Anfang, als H. Blumgart und S. Weiss bereits 1927 für erste *in vivo*-Untersuchungen ²²Na zur Bestimmung des peripheren Diffusionsflusses einsetzten^[3], und G. de Hevesy bald darauf mit ³²P den Phosphor-Metabolismus bei Ratten beobachtete^[4], wofür er unter anderem 1943 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Das Besondere an diesen Experimenten bestand in der Möglichkeit, nicht nur rein morphologische Untersuchungen durchzuführen, sondern durch Verwendung entsprechender Tracer funktionelle Zusammenhänge *in vivo* darzustellen. Als Folge dieser Pionierarbeiten entwickelte sich das heutige Konzept der Radiotracer für die Nuklearmedizin: Im Gegensatz zu den rein morphologischen Darstellungen der MRI (magnetic resonance imaging, Kernspintomographie) und der CT (computed tomography, Computertomographie) können nuklearmedizinische Methoden zur Messung physiologischer Parameter dienen. Das Prinzip beruht auf der Verteilung eines Radiotracers im Körper bzw. seiner Anreicherung in einem Organ (z.B. Schilddrüse) oder der Ausscheidung daraus (z.B. Nierendurchfluss). Diese Vorgänge sind *in vivo* aufgrund der Strahlung des Radionuklids extern verfolgbar. Das wiederum erlaubt Rückschlüsse auf die Organfunktion, die regionale Durchblutung, auf metabolische Umsätze oder die Rezeptorverteilung und -dichte sowie pathologische Abweichungen.

1.2 Allgemeine Grundlagen zu Radiopharmaka

In der Nuklearmedizin eingesetzte Radiotracer (Radiopharmaka) kann man in zwei Hauptgruppen unterteilen: solche,

- deren Biodistribution allein auf ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften beruht, z.B. $^{131}\text{I}^-$, $^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ oder $^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{-Sestamibi}^{[5]}$;
- die aus zwei funktionellen Einheiten bestehen: dem Radionuklid und einem biologisch aktiven Molekül.

Tracer der zweiten Kategorie haben in den vergangenen Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit diesen Radiotracern, weshalb auf die erste Kategorie nicht weiter eingegangen wird. Das Biomolekül bestimmt die Organ- oder Funktionsspezifität des Radiotracers. Diese Spezifität beruht auf der Akzeptanz in einem bestimmten Stoffwechsel- bzw. Transportprozess oder der hohen Affinität zu einem Rezeptor oder Antigen^[6]. In den meisten Fällen, z.B. in der Onkologie, sollen sich Radiotracer im krankhaften Gewebe, in oder an biochemisch veränderten Zellen anreichern. Dies ist möglich, wenn die molekulare Zielstruktur für diese Radiopharmaka (z.B. Enzym, Rezeptor, Transporter oder Antigen) dort vermehrt ausgeschüttet, präsentiert oder exprimiert wird. Für die Herstellung solch komplexer Radiopharmaka ist zum Teil eine umfangreiche Synthese notwendig. Ein biologisch aktives Molekül muss chemisch so modifiziert werden, dass die Einführung eines radioaktiven Nuklids möglich und einfach durchführbar ist. Die Radiomarkierung besteht je nach Nuklid und Markierungsmethode aus mehreren Stufen. Vor der Entwicklung solcher Radiopharmaka bedarf es zunächst folgender Überlegungen:

- Welches ist ein geeigneter Ligand (bioaktives Molekül), um den zu untersuchenden physiologischen Prozess anzusprechen?
- Welches Bildgebungsverfahren (SPECT/PET) soll angewendet werden? Welches Radionuklid ist geeignet, und welche Radiomarkierungsmethode soll gewählt werden?

Die vorliegende Arbeit behandelt solch eine Entwicklung und in diesem Zusammenhang die Evaluierung neuer Markierungsmethoden für Peptide.

1.3 Wahl des bioaktiven Moleküls für die Tumordiagnostik

Weil Krebserkrankungen nach Herz-Kreislaufkrankungen eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland sind^[7], hat der Forschungsumfang für Diagnose und Therapie auf diesem Gebiet stark zugenommen. Die Nuklearmedizin spielt besonders bei der Diagnose und Therapiekontrolle bösartiger, zellulärer Veränderungen eine Rolle. Neben dem "Staging" von Tumoren, der Therapieüberwachung sowie der Detektion von Metastasen gewinnt auch die Radionuklidtherapie immer mehr an Bedeutung^[8].

Eine Möglichkeit für die nuklearmedizinische Untersuchung von Krebserkrankungen besteht in der Darstellung der erhöhten Stoffwechselaktivität bösartig veränderter Zellen. Zu diesem Zweck wird 2-[¹⁸F]Fluor-2-deoxyglucose ([¹⁸F]FDG) als Glucoseanalogon eingesetzt^[9,10,11]. Speziell für Hirntumore werden auch radiomarkierte Aminosäuren^[12] wie z.B. L-[Methyl-¹¹C]-methionin^[13] oder O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-tyrosin^[14,15,16] eingesetzt, die sich aufgrund von erhöhtem Aminosäuretransport in Tumorzellen anreichern.

Desweiteren werden bioaktive Moleküle verwendet, die spezifisch an Zelloberflächenrezeptoren binden. Hierzu zählen z.B. Neurotransmitter^[17,18] und speziell für die Onkologie monoklonale Antikörper und Peptide^[8,19]. Peptide weisen gegenüber Antikörpern entscheidende Vorteile auf:

- Wegen ihrer weit geringeren molekularen Masse zeigen Peptide eine schnellere Blutclearance und eine schnellere Ganzkörpereliminierung und somit einen geringeren Hintergrund beim Imaging^[19].
- Aufgrund ihrer geringen Größe diffundieren Peptide leichter ins Gewebe^[20].
- Peptide lösen selten eine Immunreaktion aus^[21,19].
- Peptide lassen sich synthetisch herstellen, was Modifikationen für eine günstigere Pharmakokinetik, eine höhere *in vivo*-Stabilität oder eine gesteigerte Selektivität ermöglicht. Außerdem werden dadurch Modifikationen zur Radiomarkierung erleichtert.
- Peptide können im Allgemeinen auch unter harschen Bedingungen, die möglicherweise für eine Radiomarkierung nötig sind, eine hohe Stabilität aufweisen^[21,22,23].

Nicht nur wegen dieser Vorteile gewinnen Peptide für die Diagnostik eine immer bedeutendere Rolle. Tumorzellen überexprimieren vielfach Rezeptoren für peptidische Hormone^[9], wie z.B. Somatostatin-^[24-26], Neurotensin-^[27,28] oder VIP-Rezeptoren^[29,30] (Vasoactive Intestinal Peptide), so dass dort deren Konzentration im Vergleich zu der auf

gesunden Zellen deutlich erhöht ist^[8,31]. Peptide können hoch affin zu ihren Zielstrukturen sein und dabei hohe Selektivität aufweisen^[32]. Beruhend auf der hohen Rezeptorexpression in Tumoren und der hohen Affinität der Peptide zu ihren Rezeptoren kann eine vermehrte Aktivitätsanreicherung durch radioaktiv markierte Peptide im kranken Gewebe erreicht werden. Hier soll nur auf Somatostatin- und Substance P-Analoga weiter eingegangen werden, da diese Peptide als Modell und Grundgerüst für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Evaluierungen dienen.

1.3.1 *In vivo*-Verhalten von radiomarkierten Peptiden

Essentielle Parameter der Pharmakokinetik einer Substanz für ihr Verhalten im Körper sind Absorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung (ADME-Parameter). Rezeptorbindende Radiotracer sollten zusätzlich eine hohe Spezifität für ihre Zielstruktur, eine niedrige nicht-spezifische Anreicherung und eine Pharmakokinetik aufweisen, die durch Wahl eines Radionuklids mit geeigneter Halbwertszeit eine optimale Darstellung des zu untersuchenden Prozesses ermöglicht^[21].

Vorraussetzung für die Entwicklung eines Peptid-Radiopharmakons ist, dass die Markierung die Rezeptoraffinität nicht beeinträchtigt. Die Markierung darf daher nicht im pharmakophoren Teil erfolgen. Sie sollte räumlich möglichst weit entfernt davon stattfinden, so dass auch keine sterische Hinderung eintreten kann^[33]. Eine hohe Rezeptoraffinität ermöglicht eine starke Anreicherung des Tracers im Zielgewebe. Da die Rezeptorbindung aufgrund der vergleichsweise geringen Zahl an Rezeptoren sättigbar ist, ist eine hohe spezifische Aktivität des Tracers wichtig^[34], zumal außerdem eine pharmakologische Reaktion durch aktive peptidische Tracer in größeren absoluten Mengen unbedingt zu vermeiden ist.

Neben einer hohen Rezeptoraffinität ist für ein gutes Tumor/Hintergrund-Verhältnis eine schnelle Blutclearance wünschenswert, die unter anderem von der Neigung eines Tracers zur Plasmaproteinbindung abhängt. In vielen Fällen ist die Blutclearance radiofluorierter Peptide schneller als die radiometallierter^[34,35]. Außerdem ist für die Tumordetektion im Bereich des Abdomen und aus dosimetrischen Gesichtspunkten (hohe intestinale Dosis) eine hepatobiliäre Ausscheidung von großem Nachteil. Die Tendenz zur Ausscheidung über die Leber korreliert mit der Lipophilie eines Tracers^[34,36,37]. Metallierte Peptide können aufgrund von Transchelatierung durch Proteine (Plasmaproteine oder Glutathion) zusätzlich eine Retention in der Leber erfahren. Obwohl die Ausscheidung über die Niere erwünscht ist, kann

auch in diesem Fall eine Anreicherung in der Niere durch die renale Wiederaufnahme von Verbindungen erfolgen. Die renale Retention von Peptiden beruht auf dem Modell der ladungsabhängigen Endozytose^[38] und nimmt mit steigender positiver Nettoladung zu. Andererseits kann eine positive Gesamtladung zu einer höheren effektiven Konzentration des Tracers an der negativ geladenen Zelloberfläche führen^[34].

Für eine hohe Aktivitätsakkumulation im Tumorgewebe ist es unabdingbar, dass der Tracer eine genügend hohe *in vivo*-Stabilität aufweist, damit das Konjugat aus peptidischem Vektor und radiomarkierter Gruppe intakt das rezeptorpositive Gewebe erreicht. Zudem ist im Fall einer intrakorporalen Spaltung des Tracers eine Interpretation der tomographischen Aufnahmen aufgrund des unbekanntem Verhaltens der Abbauprodukte unmöglich. Es ist von Vorteil für eine hohe Aktivitätsanreicherung im Tumorgewebe, wenn Tracer von den Zellen internalisiert und gegebenenfalls intrazellulär metabolisiert und akkumuliert werden. Obwohl auch die Internalisierung ein sättigbarer Prozess ist, zeigten Untersuchungen, dass bei einer zu geringen Ligandenmenge die Internalisierungsrate deutlich abfällt^[39].

Die meisten vorgenannten Effekte lassen sich nicht isoliert betrachten. Die Veränderung einer Eigenschaft kann mehrfache Auswirkungen bezüglich der Rezeptoraffinität, der Biodistribution und der Pharmakokinetik haben.

1.3.2 Somatostatin und seine Rezeptoren

Somatostatin (SST, Somatotropin-Release-Inhibiting-Factor (SRIF)) ist ein regulatorisches Peptid, welches vor allem von Zellen neuroendokrinen oder sekretorischen Ursprungs im Zentralen Nervensystem und in den meisten peripheren Organen, wie z.B. im endokrinen Pankreas, im Darm und in vermindertem Ausmaß auch in der Schilddrüse, den Nieren und den Nebennieren ausgeschüttet wird^[8,40,41]. Außerdem wird Somatostatin in geringen Mengen von vielen Tumorzelltypen, entzündlichen Zellen und Immunzellen auf äußere Aktivierung hin freigesetzt^[42]. Es gibt zwei native Formen des Somatostatins, das SST-14 und das SST-28, welches N-terminal 14 zusätzliche Aminosäuren trägt (siehe Abbildung 1.1)^[43]. SST-14 kommt vor allem im Pankreas, im Magen und in neuronalen Zellen vor, SST-28 dagegen insbesondere im Hirn.

Beide Somatostatine binden an eine aus fünf Subtypen bestehende Klasse von membranständigen Rezeptoren. Diese so genannten Somatostatinrezeptoren (sst1 - 5) gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren^[42]. Die sst1 - 5 sind im Menschen mit

unterschiedlicher Dichte im Hirn, im Darm, in der Hypophyse, der Bauchspeicheldrüse, den Nebennieren, den Nieren, der Schilddrüse, in neuroendokrinen und lymphatischen Zellen und auf Zellen des Immunsystems exprimiert^[42]. Die meisten sst-positiven Zellen exprimieren mehr als einen Rezeptorsubtyp^[42]. Mittels immunhistochemischer Methoden und mRNA-Analysen wurde ein komplexes, teils überlappendes Muster der Expression der einzelnen Subtypen (sst1 - 5) in Abhängigkeit von Zelltyp und Organismus gefunden^[44-46]. Auf Tumorzellen werden vor allem sst2 und sst5 exprimiert^[26,47,48]. Besonders vorteilhaft für bildgebende Verfahren ist die Eigenschaft vieler G-Protein gekoppelter Rezeptoren, nach Bindung von Agonisten als Rezeptor-Ligand-Komplex internalisiert zu werden. Dies stellt die Grundlage für mögliches intrazelluläres "Trapping" des Radionuklids bzw. der radiomarkierten Gruppe dar und ermöglicht ein hohes Tumor-Hintergrund-Verhältnis^[49].

Die Bindung von Somatostatin und seiner Analoga an die Somatostatinrezeptoren erfolgt über die „Erkennungssequenz“ aus Phe⁷, Trp⁸, Lys⁹ und Thr¹⁰ (siehe Abbildung 1.1), die zusammen eine β -Schleife bilden. In dieser Sequenz sind Trp⁸ und Lys⁹ essentiell für die Erkennung, während Phe⁷ und Thr¹⁰ durch ähnliche Aminosäuren wie Tyr bzw. Ser oder Val ersetzt werden können^[42].

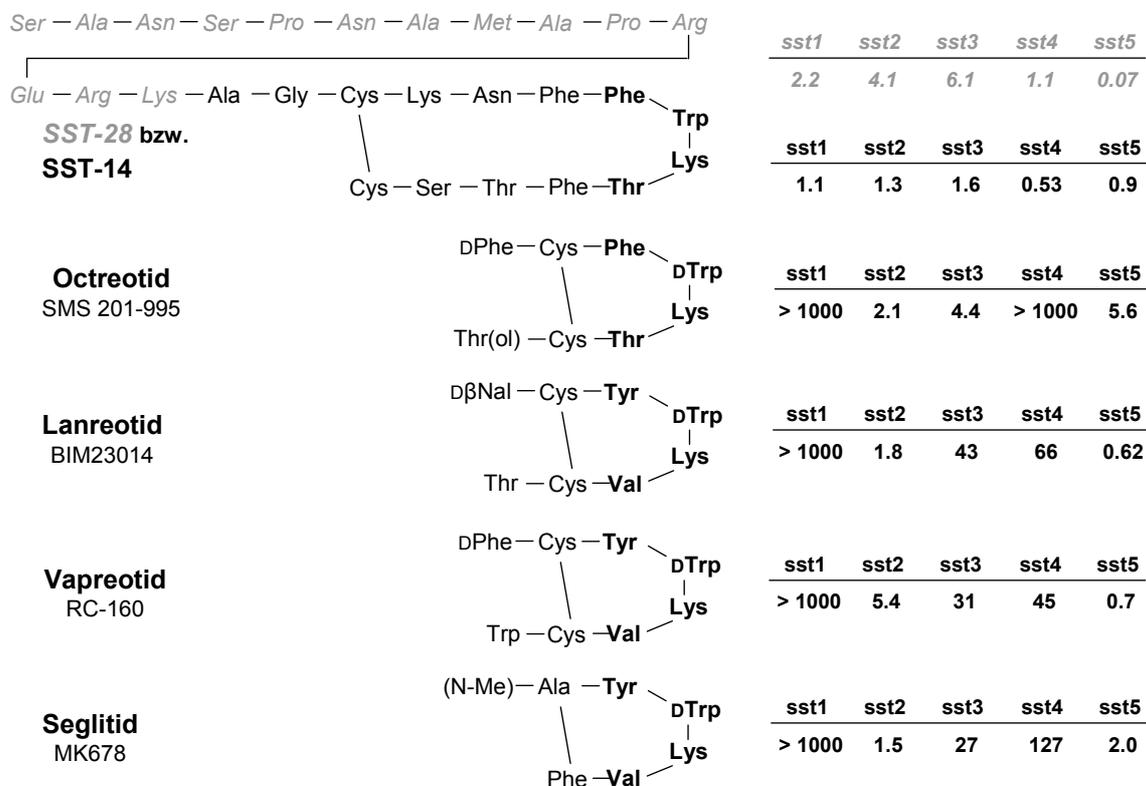


Abbildung 1.1: Die Peptidsequenzen von natürlichem Somatostatin (SST-14 und SST-28) sowie einiger Analoga mit ihren Affinitäten zu den Somatostatinrezeptorsubtypen sst1 – 5 (rechts, K_i [nM], gegen [¹²⁵I]-LLT SST-28)^[50,51].

1.3.3 Klinische Anwendung von Somatostatinanaloga

Im Rahmen des therapeutischen Einsatzes von Somatostatinanaloga wurden Derivate entwickelt, die eine höhere *in vivo*-Stabilität aufweisen als natürliches Somatostatin. In den meisten Fällen führten die Veränderungen der Peptidsequenz und -struktur zu einer erhöhten Selektivität für sst2 und sst5^[50,51] (Abbildung 1.1). In einigen Verbindungen, z.B. dem Octreotid^[52], wurde durch den Einbau von D-Phe¹ und D-Trp⁴ anstatt ihrer L-Analoga dem Abbau durch Peptidasen entgegengewirkt. Zusätzlich wurde aus gleichem Grund das C-terminale Thr durch den korrespondierenden Aminoalkohol Thr(ol) ersetzt. Die Konformationsstabilisierung der β -Schleife erfolgte durch eine Disulfidbrücke (Cys² und Cys⁷). Das metabolisch so stabilisierte Somatostatinderivat Octreotid (biologische Halbwertszeit ca. 90 min gegenüber 3 min^[42] von natürlichem Somatostatin) mit der Peptidsequenz D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol) wird zur Therapie von sst-positiven Tumoren eingesetzt^[8]. Wegen ihrer hohen Bindungsaffinität zu sst2 und sst5 wurden Octreotidderivate mit verschiedenen Radionukliden markiert und als Radiotracer zur Visualisierung sst-positiver Tumore mittels SPECT oder PET^[19,39,53] evaluiert. Für die Routine-sst-Szintigraphie hat sich Octreoscan ($[^{111}\text{In-DTPA}^0]$ Octreotid^[54], DTPA = Diethyltriaminpentaessigsäure, Mallinckrodt Inc.) trotz moderater Rezeptoraffinität (~ 22 nM) und hoher Nierenaufnahme in der klinischen Anwendung wegen seiner einfachen Radiomarkierung und seiner ansonsten sehr geeigneten Pharmakokinetik etabliert.

Alternativ wurde in der Sequenz des Octreotids das Phe³ durch ein Tyr³ ersetzt, um eine einfache Radioiodierungsmethode zu ermöglichen^[55]. Dieser Austausch der Aminosäuren bewirkte außerdem eine erhöhte Rezeptoraffinität und eine verbesserte Tumoranreicherung. Dies wurde bei der Entwicklung von DOTA-Tyr³-Octreotid (DOTA-TOC) ausgenutzt, welches mit Radionukliden wie ⁶⁸Ga oder ⁹⁰Y markiert für Diagnose und Radionuklidtherapie sst-positiver Tumore eingesetzt wird^[56-59].

In Affinitätsstudien zeigte sich, dass ein C-terminales Thr⁸ im Tyr³-Octreotat (TOCA) die Selektivität der Verbindung für den sst2-Rezeptor erhöht und die Affinität zum sst3-Rezeptor senkt^[60]. Außerdem wird die Tumoraufnahme und damit das Tumor/Organ-Verhältnis durch den Ersatz von Threoninol gegen Threonin gesteigert^[49,61,62]. Die reduzierte positive Gesamtladung von TOCA-Verbindungen aufgrund des *in vivo* deprotonierten C-Terminus sollte die Nierenanreicherung durch Verminderung der ladungsabhängigen Endozytose senken.

Durch Glykosylierung biologisch aktiver Peptide kann die Aufnahme in der Leber reduziert, die Ausscheidung über die Nieren gesteigert und die *in vivo*-Stabilität erhöht werden^[49,53,63,64]. Zusätzlich kann eine Glykosylierung, vor allem die mit Glucose, zumindest im Fall von Octreotidderivaten, eine Erhöhung der Tumoraufnahme bewirken^[49,64,53]. Studien zeigten, dass Glykosylierung am N-Terminus von TOC und Ersatz von Thr(ol) durch Thr einen synergistischen Effekt auf die Tumoraufnahme haben^[49,64]. Radiomarkierte Octreotidderivate wie Mtr-TOCA^[64,65] und Gluc-Lys([¹⁸F]fluorpropionyl)TOCA^[66], die von diesem Effekt profitieren, wurden in klinischen Studien mit vielversprechendem Ergebnis untersucht.

1.3.4 Substance P und ihre Rezeptoren

Substance P (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OH) ist ein Neuropeptid, das zur Familie der Tachykinine gehört und bevorzugt an den NK1-Rezeptor bindet. Es wird sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem als Neurotransmitter und Neuromodulator ausgeschüttet^[67] und spielt eine Rolle für das Schmerzempfinden sowie für die Vasodilatation^[68]. Die NK1-Rezeptoren werden vor allem auf Hirn- und Lymphzellen sowie Zellen der Blutgefäße, der glatten Magenmuskulatur, der Atemwege, des Thymus, der Schleimdrüsen und des Immunsystems exprimiert^[69].

Für die klinische Anwendung eines radiomarkierten Substance P-Derivats ist die hohe Rezeptorexpression auf Glioblastomen, aber auch in etwas geringerem Maße bei medullären Schilddrüsenkarzinomen, bei kleinzelligem Lungenkrebs, bei Pankreas- und bei Brustkrebs von Bedeutung. Außerdem werden NK1-Rezeptoren bei vielen Tumoren auf den tumoralen und den peritumoralen Blutgefäßen exprimiert und ermöglichen so eine indirekte Visualisierung der Krankheitsherde^[69]. Um diese Rezeptorverteilung auszunutzen, wurde von Breeman *et al.* ein vielversprechendes Substance P-Derivat entwickelt. Dieses wurde am N-Terminus, der für die biologische Aktivität nicht essentiell ist, mit [¹¹¹In-DTPA] markiert^[70]. Da Substance P ein hochwirksames Neuropeptid ist, muss die applizierte Peptidmenge sehr gering sein (bereits 2.5 – 5 µg zeigten bei Patienten eine ungewünschte, physiologische Wirkung). Da die Halbwertszeit von Substance P als Neuropeptid im Blut kurz ist ($t_{1/2} = \text{ca. } 3 - 4 \text{ min}$)^[70], stellt es folglich keine ideale Leitstruktur für einen Radiotracer dar. Allerdings kann Substance P aufgrund der vaskulären Rezeptorexpression Tumoren visualisieren, die keine anderen Rezeptoren exprimieren^[20]. Diese Anwendungsmöglichkeit stellt einen entscheidenden Vorteil zu anderen Neuropeptidanaloga dar.

1.4 Diagnostische Methoden der Nuklearmedizin

1.4.1 Single Photon Emission Computed Tomography - SPECT

Für die SPECT verwendete Nuklide zerfallen unter Abgabe von γ -Strahlung mit einer Energie zwischen 50 und 400 keV^[1,71]. Zur Detektion werden diese nach Auftreffen auf einen γ -Kamerakopf durch Interaktion mit einem NaI(Tl)-Kristall (Szintillator) in Lichtquanten umgewandelt, welche in Photomultipliern ein elektrisches Signal auslösen (Abbildung 1.2). Um die Quelle der γ -Strahlung lokalisieren zu können, muss jedem Photon eine Richtung zugeordnet werden. Dazu wird ein Bleikollimator vor dem Szintillator angebracht, der mit vielen parallelen Löchern versehen ist. So werden schräg auftreffende Photonen im Blei absorbiert (Abbildung 1.2, B), und nur senkrecht einfallende Photonen erreichen die Szintillatorschicht und erzeugen ein Signal (Abbildung 1.2, A). Aus diesem Signal wird computergestützt ein zweidimensionales Szintigramm erzeugt. Insgesamt treffen nur maximal 0.01 % aller γ -Quanten auf den Szintillator, was die Sensibilität der Methode stark herabsetzt^[71].

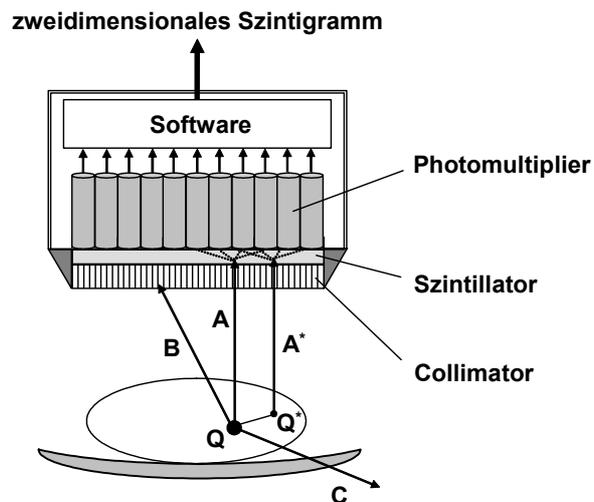


Abbildung 1.2: Vereinfachtes Schema zur Funktionsweise einer γ -Kamera (mit Q = Quelle der γ -Strahlung, Q* = imaginäre Quelle der γ -Strahlung, A = ungestreutes, signalauslösendes γ -Quant, A* = gestreutes, signalauslösendes γ -Quant, B = ungestreutes, im Kollimator absorbiertes γ -Quant, C = ungestreutes, nicht aufgefangenes γ -Quant)

Um die Ausbeute zu erhöhen, sind neuere γ -Kameras mit zwei oder mehr Detektoren ausgestattet, so dass ein Teil der in andere Richtungen ausgestrahlten γ -Quanten (Abbildung 1.2, C) zusätzlich aufgefangen werden kann. Ein Anteil der γ -Quanten wird allerdings durch Wechselwirkung mit Materie (Comptonstreuung), z.B. im Körper, unter Energieverlust abgelenkt. Wenn ein solches Quant den Kollimator passiert

(Abbildung 1.2, A*), scheint es einer örtlich anderen Quelle zu entstammen (Abbildung 1.2, Q*). Dieser Fehler kann durch einen Energiefilter ausgeglichen werden^[71].

Um eine dreidimensionale Darstellung der Radioaktivitätsverteilung zu erhalten, rotieren die Detektoren für einzelne Aufnahmen um den Körper des Patienten (siehe Abbildung 1.3). Mit dieser Methode kann man durch Kombination der einzelnen Projektionen ein Ganzkörperbild der Verteilung der Radiopharmaka im Körper mit einer Auflösung von bis zu 8 mm erhalten.

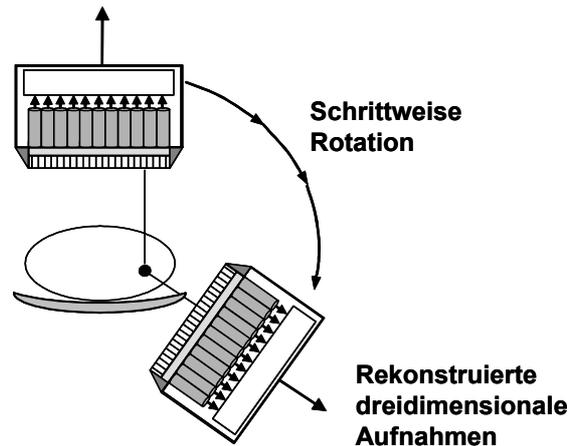


Abbildung 1.3: Vereinfachtes Schema zur Funktionsweise einer SPECT-Kamera zur Generierung dreidimensionaler Aufnahmen.

Zu den Nachteilen der SPECT zählen vor allem die geringe Sensitivität sowie die begrenzte räumliche Auflösung. Außerdem kann aus SPECT-Bildern keine Quantifizierung der Konzentration des Radionuklids vorgenommen werden^[1]. Der Vorteil der SPECT besteht in der guten Verfügbarkeit geeigneter Radionuklide.

In der Nuklearmedizin finden für die SPECT die in Tabelle 1.1 zusammengefassten Radionuklide die häufigste Anwendung.

Tabelle 1.1: Eigenschaften ausgewählter Radionuklide für die SPECT^[1,71,72]

Radionuklid	Gewinnung	Halbwertszeit [h]	γ -Energie [keV] (% Häufigkeit)
⁶⁷ Ga	Zyklotron	78.3	93 (40), 184 (24), 296 (22)
¹²³ I	Zyklotron	13.1	159 (83), 529 (1.1)
¹¹¹ In	Zyklotron	67.9	245 (94), 171 (91)
^{99m} Tc	Generator	6.0	140 (95)
²⁰¹ Tl	Zyklotron	73.5	167, 135

Für die SPECT wird ^{99m}Tc , das zu 95 % unter Abgabe eines γ -Quants zu ^{99g}Tc zerfällt, am häufigsten verwendet. Die weite Verbreitung lässt sich vor allem auf die gute Verfügbarkeit von [^{99m}Tc]Pertechnetat aus einem handelsüblichen $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generator^[73] (siehe Abbildung 1.10, S. 24) zurückführen, wodurch eine uneingeschränkte Vor-Ort-Herstellung von Radiopharmaka ermöglicht wird. Zudem sind die physikalischen Eigenschaften dieses Nuklids nahezu ideal für die SPECT. Die Halbwertszeit von 6.0 Stunden ist kompatibel mit der physiologischen Halbwertszeit und der Pharmakokinetik vieler Radiopharmaka und ermöglicht lange Messprotokolle. Der hohe Anteil an γ -Strahlung sowie ihre relativ niedrige Energie von 140 keV ermöglichen eine geringe Strahlenbelastung für den Patienten. Dennoch lassen sie eine gute externe Detektierbarkeit der γ -Strahlung aufgrund der quantitativen Gewebedurchdringung sowie eine gute räumliche Auflösung zu.

1.4.2 Positron Emission Tomography - PET

In der PET werden neutronenarme Radionuklide verwendet, die unter Abgabe eines Positrons (β^+) und eines Neutrinos (ν) zu einem Nuklid mit derselben Masse zerfallen, dessen Ordnungszahl aber um eins niedriger ist (z.B. ^{18}F wird zu ^{18}O). Das Positron legt im Körper unter Verlust seiner kinetischen Energie durch Interaktion mit der umgebenden Materie eine von seiner Energie abhängige Strecke von wenigen Millimetern zurück. Das abgebremste Positron vereinigt sich mit einem Elektron (e^-) zu einem Positronium. Anschließend werden die Massen der beiden Teilchen in elektromagnetische Strahlung umgewandelt. Diese so genannte Vernichtungsstrahlung (Annihilationsstrahlung) besteht aus zwei γ -Quanten, die aufgrund von Energie- und Impulserhaltung in einem Winkel von nahezu 180° und mit einer Energie von je 511 keV (Ruhemasse der beiden Teilchen, $E = mc^2$) emittiert werden (Abbildung 1.4). Durch den festen Emissionswinkel und der zeitlich koinzidenten Detektion der beiden Photonen ist der Strahlung ohne technischen Zusatzaufwand wie bei der SPECT eine Richtung zugeordnet (elektrische Kollimation)^[74].

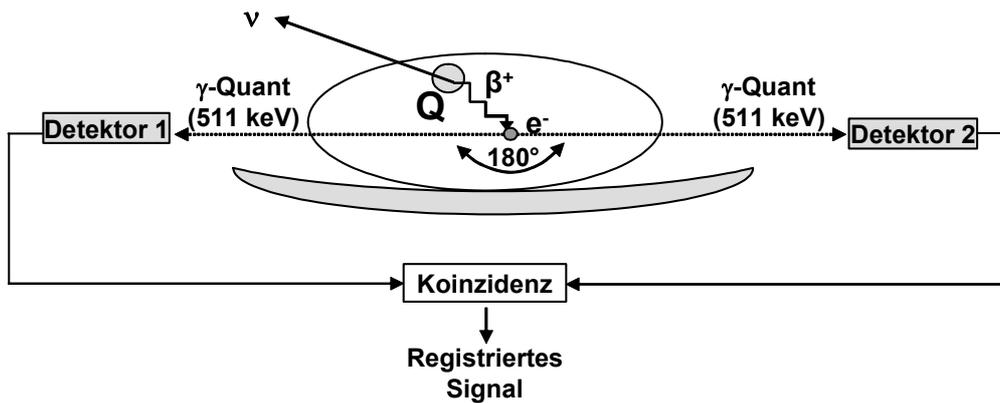


Abbildung 1.4: Vereinfachtes Schema des physikalischen Prinzips der PET mit Positronenvernichtung und γ - γ -Koinzidenz.

Zur Detektion wird eine große Zahl von einzelnen Detektoreinheiten ringförmig angeordnet, und jede einzelne wird fächerartig mit mehreren gegenüberliegenden in Koinzidenz geschaltet. Mehrere solcher Ringe werden nebeneinander angeordnet und so verbunden, dass auch schräg gegenüberliegende Detektoreinheiten in Koinzidenz geschaltet sind. Signale werden nur registriert, wenn im Abstand von einigen ns (Koinzidenzzeit) beide Photonen von gegenüberliegenden Detektoreinheiten registriert werden (Abbildung 1.5, A).

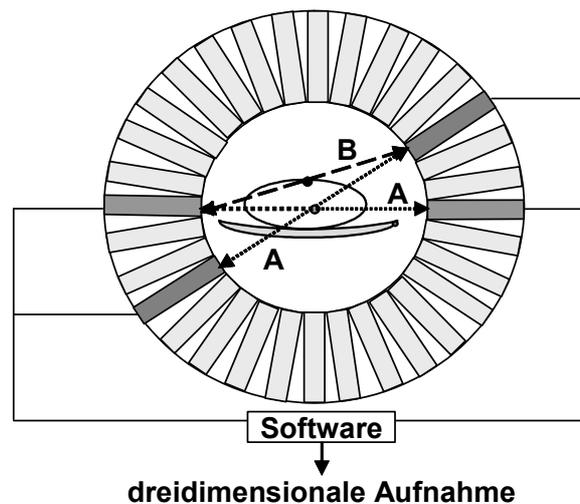


Abbildung 1.5: Zweidimensionales Schema eines Detektorringes zur Darstellung des Messprinzips der PET, mit echten Koinzidenzen (A) und zufälligen, unechten Koinzidenzen (B).

Durch computergestützte Auswertung erhält man eine dreidimensionale Darstellung der Aktivitätsverteilung im Körper mit einer Auflösung von bis zu ca. 1 mm^[71,74,75]. Fehler aufgrund "gestreuter" oder "zufälliger" Koinzidenzen (Abbildung 1.5, B) werden durch die Auswertungssoftware herausgerechnet^[76]. Vor allem die Größe der einzelnen Szintillatoren bestimmt die maximale Auflösung, während der Hintergrund, verursacht durch Streuung, von der Koinzidenzzeit abhängt.

Der größte Nachteil der PET besteht darin, dass nahezu alle verwendeten Radionuklide mit Hilfe eines Zyklotrons hergestellt werden müssen. Zudem ist die Energie der γ -Strahlung (511 keV) höher als die der SPECT-Nuklide. Somit sind generell höhere Strahlenbelastungen zu erwarten. Die meist kürzere Halbwertszeit der PET-geeigneten Radionuklide limitiert die Möglichkeiten zur Tracersynthese. Die Vorteile dieser Methode gegenüber der SPECT sind die höhere Auflösung und die exakte Quantifizierbarkeit der Radioaktivitätskonzentrationen. Außerdem ist die notwendige Aufnahmedauer bei PET-Scans im Vergleich zu SPECT-Aufnahmen kürzer.

Für die PET finden vor allem die in Tabelle 1.2 aufgelisteten Positronenstrahler Verwendung. Neben ihrer physikalischen Eigenschaften sind die wichtigsten Vor- und Nachteile der Radionuklide in Tabelle 1.2 angegeben.

Tabelle 1.2: Eigenschaften ausgewählter Positronenstrahler für die PET^[1,73]

Radionuklid	Halbwertszeit $t_{1/2}$	$E_{\beta, \max}$ [keV] (% β^+ -Zerfall)	Vorteile	Nachteile
^{11}C	20.4 min	960 (99.8)	Isotopentracer, hoher β^+ -Anteil	kurze $t_{1/2}$
^{13}N	10.0 min	1190 (100)	Isotopentracer, hoher β^+ -Anteil	sehr kurze $t_{1/2}$
^{15}O	2.0 min	1723 (99.9)	Isotopentracer, hoher β^+ -Anteil	sehr kurze $t_{1/2}$
^{18}F	110 min	635 (96.9)	hoher β^+ -Anteil, niedrige $E_{\beta, \max}$, hohe spez. Aktivität möglich, ausreichende $t_{1/2}$,	meist Analogtracer
^{64}Cu	12.7 h	655 (19.3)	niedrige $E_{\beta, \max}$, hohe spez. Aktivität möglich	niedriger β^+ -Anteil, zusätzlich β^- -Zerfall, lange $t_{1/2}$
^{68}Ga	68.3 min	1900 (90.0)	Generatorkern (aus ^{68}Ge)	hohe $E_{\beta, \max}$
^{124}I	4.2 Tage	2140 (25.0)	einziges längerlebige PET-Nuklid von Iod	niedriger β^+ -Anteil, lange $t_{1/2}$
^{94}Tc	4.9 h	820 (11.0)	geeignete $t_{1/2}$, Kombination mit ^{188}Re (und ^{99m}Tc) (β^-) für PET Therapiestudien	niedriger β^+ -Anteil

^{18}F nimmt aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften die Stellung des nahezu idealen PET-Nuklids ein: Es zerfällt zu fast 100 % unter Abgabe eines Positrons zu ^{18}O mit einer Halbwertszeit, die sogar mehrstufige Synthesen einschließlich Reinigung der Radiopharmaka erlaubt. Zudem eignet sich die Halbwertszeit für die Darstellung vieler, auch langsamerer physiologischer Prozesse. Die im Vergleich mit anderen PET-Nukliden niedrigste maximale β^+ -Energie minimiert die Strahlenbelastung für die Patienten und ermöglicht die beste Ortsauflösung (kurzer Weg des Positrons). ^{18}F kann auch an kleineren Zyklotrons produziert werden. Dennoch sind ^{18}F -markierte Radiopharmaka nicht allen

Kliniken oder Praxen zugänglich, sollte kein Zyklotron zur Bereitstellung/Lieferung im Haus oder in der Nähe (Satelliten-System) vorhanden sein^[1,22,74]. Um in einem solchen Fall trotzdem PET-Aufnahmen zu ermöglichen, kann auf ^{68}Ga aus einem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator und die dafür notwendige Markierungsschemie ausgewichen werden.

1.5 Wahl des Radionuklids und der Markierungsstrategie

Bei der Wahl des Radionuklids und der Markierungsmethode muss besonders berücksichtigt werden, dass die Bindungsfähigkeit des Pharmakophors an das Target sowie die Selektivität für das Target nicht verschlechtert werden. Werden bei der Markierung maßgebliche Eigenschaften des Moleküls verändert, wie z.B. durch Einführung einer Ladung oder einer besonders lipophilen bzw. hydrophilen Gruppe, wirkt sich dies auch auf die Biodistribution des Tracers aus. Vor allem bei kleineren Molekülen, aber auch bei Peptiden, ist der Einfluss der Modifikation, die für die Einführung eines Radionuklids notwendig ist, ausgeprägt^[21,31].

Grundsätzlich lassen sich die Radionuklide in zwei Gruppen unterteilen:

- kovalent gebundene Radionuklide (z.B. ^{18}F , ^{123}I , ^{11}C)
- chelatorgebundene Radiometalle (z.B. $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{68}Ga).

Innerhalb der ersten Kategorie spielen die isotopen Nuklide ^{11}C , ^{15}O und ^{13}N eine besondere Rolle, da sie bei der Radiomarkierung ihre kalten Analoga ersetzen können, so dass die Eigenschaften des bioaktiven Moleküls unbeeinflusst bleiben. Allerdings limitiert ihre kurze Halbwertszeit ihre klinische Anwendung im Hinblick sowohl auf Synthese und Reinigung des Radiotracers als auch auf das Spektrum der darstellbaren *in vivo*-Prozesse.

Die Halbwertszeit eines Radionuklids sollte auf die Pharmakokinetik des Tracers sowie auf die Kinetik des darzustellenden Prozesses unter Vermeidung einer länger anhaltenden Strahlenbelastung für Patienten abgestimmt sein^[77]. Dabei erweisen sich die Halbwertszeiten von ^{18}F und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ als gute Kompromisse (siehe Kapitel 1.2). Da auch ihre anderen physikalischen Eigenschaften diese Nuklide als besonders geeignet für *in vivo*-Imaging auszeichnen, ist die Entwicklung entsprechender Markierungsstrategien von großem Interesse. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf Peptidmarkierungen mit diesen beiden Nukliden.

1.5.1 Gesichtspunkte der Markierungsmethode

Für die klinische Routineanwendung muss die Radiomarkierung eines Tracers so einfach wie möglich sein und eine hohe radiochemische Ausbeute (RCA) sowie eine hohe chemische und radiochemische Reinheit ($\geq 97\%$) gewährleisten.

Für Radiofluorierungen bedeutet dies, möglichst wenige Synthesestufen, die Möglichkeit zur Automatisierung und die weitest gehende Vermeidung zeitaufwendiger HPLC-Reinigungsschritte oder deren Ersatz durch Festphasenextraktion.

Für die klinische Anwendung radiometallierter Peptidtracer sind fertige, kommerziell erhältliche, so genannte „Kits“ ideal, die alle zur Radiomarkierung nötigen Reagenzien enthalten und innerhalb von maximal 30 Minuten nach Zugabe der Radiometalllösung in einem Schritt zu einer injektionsfähigen Tracerlösung führen^[78]. Die Markierung sollte das stabile Produkt in einer nahezu quantitativen Ausbeute mit hoher spezifischer Aktivität liefern. Da im Idealfall auf eine abschließende Aufreinigung verzichtet wird, darf der peptidische Vorläufer nur in geringen Konzentrationen anwesend sein. Nur in solchen Fällen ist eine Applikation ohne pharmakologische und pharmakodynamische Effekte, welche durch die nicht markierte Trägersubstanz verursacht werden können, zu vermeiden. Die Menge an peptidischem Vorläufer, die Patienten appliziert werden kann, ist abhängig vom jeweiligen Zielrezeptor sowie dem Peptid. Um eine hohe spezifische Aktivität zu ermöglichen, muss die eingesetzte Menge an Markierungsvorläufer gering sein. Um dennoch eine hohe RCA zu ermöglichen, ist eine sehr effiziente Komplexierung des Radionuklids erforderlich. Es sollte ausschließlich ein Produkt ohne Isomere nach einer möglichst kurzen Reaktionszeit entstehen^[21].

Um Zersetzungen und unerwünschte Nebenreaktionen des Edukts zu vermeiden, sollte die Radiomarkierung auch unter milden Bedingungen hohe Ausbeuten liefern. Trotz dieser Anforderungen von Seiten der Radiochemie darf bei der Wahl der prosthetischen Gruppe bzw. des bifunktionellen Komplexbildners (BFCA) nicht der Einfluss auf das *in vivo*-Verhalten außer Acht gelassen werden.

1.5.2 Produktion und Bereitstellung von $^{18}\text{F}^-$

^{18}F wird heute in der Regel über eine $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Kernreaktion produziert, wobei hohe Mengen bis zu mehreren Curie mit spezifischen Aktivitäten bis zu 2×10^5 Ci/mmol (7400 TBq/mmol) in nicht-geträgerter Form (no-carrier-added, n.c.a.) erreicht werden können^[79,80]. Zur Produktion von ^{18}F wird ^{18}O -angereichertes Wasser in einem Metall-Target eingesetzt. Der Vorteil dieser Kernreaktion besteht im hohen Wirkungsquerschnitt, der damit verbundenen hohen Targetausbeute, der hohen spezifischen Aktivität sowie der relativ geringen erforderlichen Protonenenergie. Dazu eignen sich auch kleinere Zyklotrons. In der Routineproduktion wird das mit einem Inertgasstrom ausgetriebene [^{18}F]Fluorid auf einer Anionentauscher-Kartusche zwischenfixiert und anschließend eluiert, und dadurch von kationischen Verunreinigungen (z.B. Metalle aus dem Target) abgetrennt.

Fluoridionen sind in wässrigen Lösungen wenig reaktiv, da sie wegen ihrer hohen Ladungsdichte stark solvatisiert oder protoniert als flüchtige Flusssäure vorliegen. Um die Protonierung zu verhindern wird $^{18}\text{F}^-$ bereits in einer basischen Lösung vom Anionentauscher eluiert. In den meisten Fällen findet K_2CO_3 als Base Anwendung. Zusätzlich werden Kronenether oder Kryptanden zur Maskierung des Kaliums zugegeben. Diese Verbindungen fungieren auch als Phasentransferkatalysatoren und steigern die Löslichkeit von "KF" in dipolaren aprotischen Lösungsmitteln, die für die Fluorierungsreaktion verwendet werden. Auch die Verwendung von Tetraalkylammoniumionen als Gegenionen verhindert eine enge Ionenbindung. Die starke Solvatisierung des Fluorids durch Wassermoleküle wird durch vollständige Entfernung des Wassers in wiederholten Trocknungsschritten mit MeCN als Azeotrop vor weiteren Reaktionsschritten verhindert^[34,77]. Auf diesem Weg wird sozusagen ein "nacktes Fluoridion" erzeugt, das reaktiver und nukleophiler als ein solvatisiertes Fluoridion ist.

1.5.3 Reaktionen für die Radiofluorierung von Peptiden

Generell kann eine Radiofluorierung über einen elektrophilen Mechanismus mit $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ oder einen nukleophilen mit $^{18}\text{F}^-$ durchgeführt werden. Da bei der elektrophilen Fluorierung das ^{18}F - und das ^{19}F -Isotop aus $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ gleichwertig reagieren, beträgt die maximale radiochemische Ausbeute nur 50 %, und die synthetisierten Radiopharmaka sind stets geträgert. In den meisten Fällen werden jedoch hohe Anforderungen an die spezifische Aktivität peptidischer Tracer gestellt. Deshalb wird die elektrophile Fluorierung zur Markierung von Peptiden so gut wie nicht angewendet^[34].

Für die nukleophile ^{18}F -Fluorierung gibt es grundsätzlich zwei Strategien:

- eine nukleophile Substitution an einem aliphatischen Reaktionszentrum, die meist unter Inversion der Konfiguration am Reaktionszentrum nach einem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus verläuft^[80]. Da Fluorid ein schlechtes Nukleophil ist, ist für eine schnelle Reaktion eine gute Abgangsgruppe nötig. Dazu zählen Halogenide (I^- , Br^-) oder Sulfonate (Mesylat, Nosylat, Triflat, Tosylat).
- eine nukleophile aromatische Substitution, bei der die Abgangsgruppe ($-\text{NMe}_3^+$, $-\text{SMe}_2^+$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$) zusätzlich durch elektronenziehende Substituenten ($-\text{NO}_2 > -\text{CF}_3 > -\text{CN} > -\text{CHO} > -\text{COR} > -\text{COOR} > -\text{COOH} > -\text{Br} > -\text{I} > -\text{F}$) in ortho- und/oder para-Position aktiviert wird.

Als Lösungsmittel haben sich polare, aprotische Solventien wie Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF) oder Acetonitril (MeCN) bewährt.

Aufgrund der hohen Basizität von Fluorid müssen funktionelle Gruppen im Vorläufer mit aciden Protonen (Alkohole, Thiole, Amine, terminale Amide), die das nukleophile Fluoridion protonieren könnten, geschützt werden. Ebenso müssen Gruppen mit nukleophilem Charakter (Amine, Carboxyle, Thiole und Alkohole) geschützt sein^[77,80]. Da eine Vielzahl zu schützender funktioneller Gruppen in Peptiden vorhanden ist und nukleophile Fluorierungen nur unter sehr harschen Bedingungen effektiv ablaufen, ist eine direkte n.c.a. ^{18}F -Markierung von Peptiden nicht möglich^[34,77]. Um diese Schwierigkeit der ^{18}F -Markierung zu umgehen, wurde eine Vielzahl von prosthetischen Gruppen entwickelt.

1.5.4 ^{18}F -Radiomarkierung von Peptiden mit prosthetischen Gruppen

Prosthetische Gruppen sind kleine bifunktionelle Moleküle, die einerseits elektrophil sind, um eine nukleophile ^{18}F -Fluorierung zu ermöglichen, andererseits ein zweites reaktives Zentrum tragen, das für eine Reaktion der ^{18}F -markierten prosthetischen Gruppe mit einem Peptid zur Verfügung steht. Diese zweite funktionelle Gruppe kann elektrophilen Charakter haben und mit nukleophilen Gruppen im Peptid wie Amino-, Hydroxy- oder Thiolgruppen reagieren (Abbildung 1.6, I).

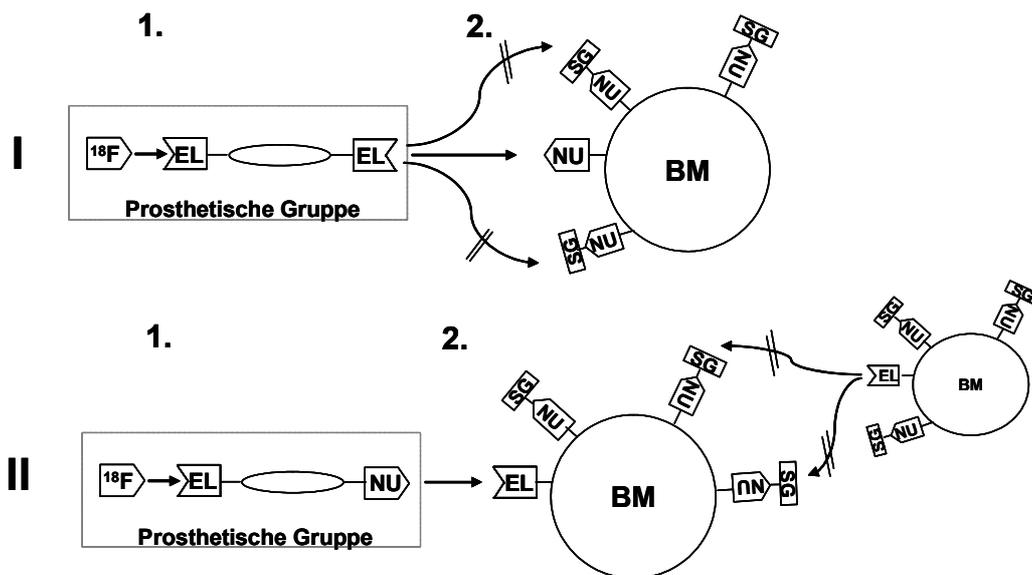


Abbildung 1.6: Strategien zur ^{18}F -Markierung von bioaktiven Molekülen (BM), insbesondere Proteinen und Peptiden mittels radiofluorierter prosthetischer Gruppen;
I: Konjugation an eine nukleophile Funktionen des BM über einen elektrophilen Angriff;
II: Konjugation an eine elektrophile Funktionen des BM über einen nukleophilen Angriff
 (Nu = nukleophile Gruppe, El = elektrophile Gruppe, SG = Schutzgruppe)

Da in Peptiden meist mehrere nukleophile Seitenketten vorkommen, ist für eine regioselektive Kupplung der prosthetischen Gruppe an das Peptid eine Schützung der anderen Gruppen notwendig. Dies wiederum erfordert einen Entschützungsschritt am Ende der Radiosynthese. Aus diesem Grund sind für die Konjugation einer radiofluorierten prosthetischen Gruppe an ein Peptid nach dieser Methode mindestens drei Schritte nötig: a) Die Radiofluorierung der prosthetischen Gruppe, b) die Kupplungsreaktion und c) die Entschützung des Peptids.

Alternativ kann die Kupplungsfunktion der prosthetischen Gruppe auch nukleophilen Charakter haben und mit einer elektrophilen Seitenkette, wie einer aktivierten Carboxylfunktion reagieren (Abbildung 1.6, II).

Die meisten prosthetischen Gruppen werden in einer zwei- bis dreistufigen Synthese mit Reaktionsdauern bis zu 100 min hergestellt. Um die Synthese radiofluorierter Peptide effizienter zu machen, bieten sich prinzipiell zwei Wege an: Entweder die Vereinfachung der Radiomarkierung der prosthetischen Gruppe oder die der Konjugation an das Peptid. Hierzu wurden chemoselektive Kupplungsreaktionen entwickelt (siehe 1.5.4.3). Diese Strategie erlaubt den Einsatz ungeschützter Peptide^[77].

1.5.4.1 Selten angewendete Radiofluorierungsmethoden

Zu den Markierungsreaktionen über eine elektrophile Funktion der prosthetischen Gruppe an eine nukleophile Seitenkette im Biomolekül zählen die selten angewendeten Fluoralkylierung und Fluorimidierung^[34,77] (Abbildung 1.7, I und II und Tabelle 1.3). Für beide Methoden müssen andere nukleophile Funktionen im Peptid geschützt sein. Diese beiden Reaktionstypen lassen in der Regel die Nettoladung des markierten Peptids unter physiologischen Bedingungen unverändert.

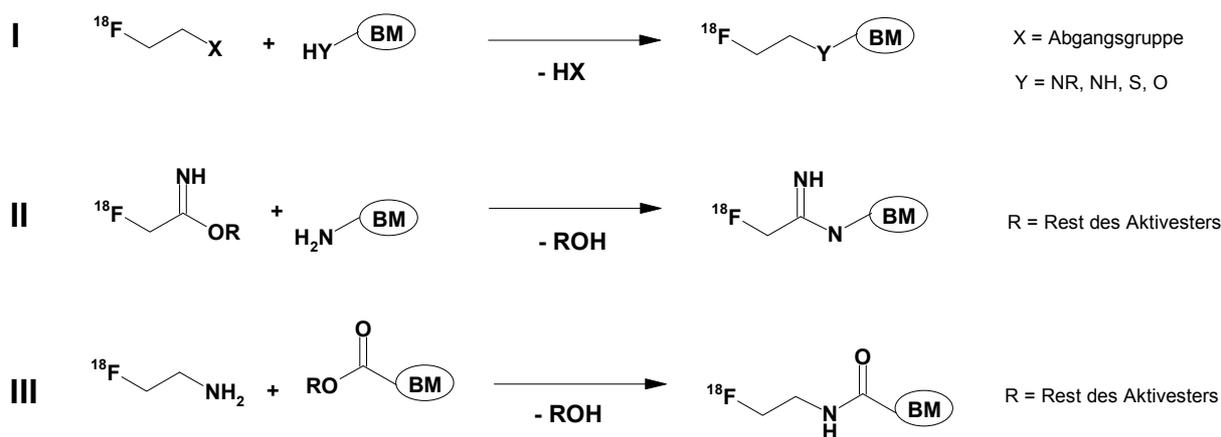


Abbildung 1.7: Allgemeine Reaktionsschemata einer ^{18}F Fluoralkylierung (I), einer ^{18}F Fluorimidierung (II) und einer ^{18}F Fluoramidierung (III) (BM = bioaktives Molekül).

Bei der Fluoramidierung dagegen greift eine nukleophile Funktion in der prosthetischen Gruppe eine elektrophile Funktion in einer Aminosäureseitenkette an (siehe Abbildung 1.7, III und Tabelle 1.3). Diese Reaktionsführung bietet den Vorteil, dass bei der Radiosynthese der prosthetischen Gruppe Schutzgruppen- und Aktivierungsschritte entfallen. Ein besonders wichtiger Vorteil dieser Methode ist, dass keine Hydrolyse des trägerfreien Reaktionspartners die radiochemische Ausbeute reduzieren kann. Nachteilig wirkt sich die Notwendigkeit der aufwendigen Schutzgruppenchemie aus, um Crosslinking auf Grund der Vielzahl nukleophiler Zentren im Peptid zu vermeiden^[34,77]. Aus diesem Grund wird dieser Konjugationstyp wenig angewendet.

Ein Ansatz, der die Mehrstufensynthese der prosthetischen Gruppen vermeidet, nutzt die Eigenschaft von stabilen Arylaziden wie z.B. 4-Azidophenancyl-[¹⁸F]fluorid^[81] oder 3-Azido-5-nitrobenzyl-[¹⁸F]fluorid^[82] aus, unter UV-Bestrahlung zu Arylnitrenen zu reagieren, welche wiederum vornehmlich an primäre Amine z.B. Lysin binden. Die radiochemische Ausbeute (RCA) der einstufigen Synthese von 4-Azidophenancyl-[¹⁸F]fluorid ist mit ca. 70 % nach ca. 15 Minuten Gesamtsynthesedauer zwar gut, die der photochemischen Konjugation mit maximal 30 % aber relativ niedrig.

Tabelle 1.3: Übersicht über die prosthetischen Gruppen zur [¹⁸F]Fluoramidierung, [¹⁸F]Fluoralkylierung und [¹⁸F]Fluorimidierung^[77]

Methoden	Anwendung	Kommentar
Fluoramidierung		Geschützte Aminofunktionen nötig
1-[4-(¹⁸ F]Fluormethyl)benzoyl]-1,4-diaminobutan	Insulin ^[83]	sperrige prosthetische Gruppe
2-[¹⁸ F]Fluorethylamin	Oxytocin ^[84]	
Fluorimidierung		selektiv für ε-Aminogruppen von Lysinseitenketten
3-[¹⁸ F]Fluor-5-nitrobenzimidomethylester	Testproteine ^[85]	Unzureichende Abtrennung vom Vorläufer 3,5-Dinitrobenzonitril
Fluoralkylierung		für kleinere Radiotracer weit verbreitet ^[77] Schutzgruppen für andere nukleophile Seitenketten nötig
3-Maleinimidobenzoesäure-4-[¹⁸ F]fluorbenzamid	Proteine ^[86]	thiolselektive Alkylierung begrenzte Zahl freier Thiolgruppen in Peptiden
N-(4-[¹⁸ F]Fluorphenyl)-maleinimid	Proteine ^[86]	thiolselektive Alkylierung begrenzte Zahl freier Thiolgruppen in Peptiden
1-[3-(2-[¹⁸ F]Fluoropyridin-3-yloxy)propyl]pyrrole-2,5-dione	Modellpeptid und Proteine ^[87]	thiolselektive Alkylierung begrenzte Zahl freier Thiolgruppen in Peptiden
N-(¹⁸ F]Fluorbenzyl)-2-bromoacetamid	PNA-Kette ^[88] (C-terminales Cystein)	thiolselektive Alkylierung begrenzte Zahl freier Thiolgruppen in Peptiden

1.5.4.2 Fluoracylierung

Als Radiofluorierungsmethode für Peptide hat nur die Fluoracylierung (siehe Abbildung 1.8) besondere Bedeutung und ist vielfach angewendet worden^[77]. Bei dieser Konjugation reagiert eine elektrophile Funktion in der prosthetischen Gruppe mit einer nukleophilen Funktion in einer Aminosäureseitenkette.

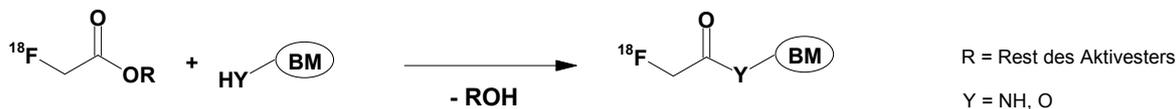


Abbildung 1.8: Allgemeines Reaktionsschema einer Fluoracylierung (BM = bioaktives Molekül).

Zur Acylierung einer Aminofunktion eines Peptids durch die prosthetische Gruppe werden neben *in situ*-Aktivierung des Carboxylats durch Kopplungsreagenzien wie Carbodiimide meist N-Succinimidyl oder Nitrophenyl-Aktivester eingesetzt. Da eine direkte Fluorierung solcher Aktivester allerdings nur ¹⁸F-markierte Säurefluoride liefert, ist der Einsatz nicht aktivierter Vorläufer notwendig. Zusätzlich zur mindestens zweistufigen Konjugationsreaktion führt dies zu einer meist dreistufigen Radiosynthese radiofluorierter Acylierungsreagenzien mit entsprechend notwendigen Reinigungsschritten: a) in einem ersten Schritt die Radiofluorierung eines geeigneten Vorläufers ohne freie Carboxylfunktion; b) anschließend die Freisetzung der Carbonsäure; c) und zuletzt die Veresterung zum Aktivester. Die anschließende Acylierung der Peptide liefert im Allgemeinen hohe Ausbeuten^[77]. Dadurch, dass die Fluoracylierung von Peptiden stets mehrstufig und zeitaufwendig ist, ist auch die maximal mögliche Produktausbeute begrenzt.

N-Succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorbenzoesäureester ([¹⁸F]SFB) wurde unter anderem zur Markierung von Peptiden wie [Nle⁴,D-Phe⁷]- α -MSH^[89], [Arg⁸ Ψ (CH₂NH)Arg⁹]-NT(8-13)^[90], Octreotid^[91] sowie PEG-yliertem RGD^[92] eingesetzt. Die am weitesten verbreitete, optimierte Synthese von [¹⁸F]SFB geht von 4-Trimethylammoniumbenzoesäure-ethylester Triflat aus, das nach Radiofluorierung und Ethylesterhydrolyse durch O-(N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-Tetramethyluronium Tetrafluorborat (TSTU) aktiviert wird (Gesamtsynthesedauer: 35 min, RCA: 50-60 %)^[81]. Kürzlich wurde eine neue Variante der Radiosynthese von [¹⁸F]SFB entwickelt, die [¹⁸F]Fluorbenzoesäure ausgehend von 4-Trimethylammonium-benzoesäure-*tert*-butylester Triflat mit Mikrowellenaktivierung in kürzeren Reaktionszeiten herstellt^[93]. Obwohl die hohe Stabilität der Fluor-Aromat-Bindung^[34] zu geringer Defluorierung des Tracers *in vivo* führt, erwiesen sich Größe und Lipophilie des [¹⁸F]SFB gerade zur Acylierung von Peptiden als nachteilig.

In solchen Fällen wird 2-[^{18}F]Fluorpropansäure-4-nitrophenylester ([^{18}F]NPF) als kleinere, weniger lipophile prosthetische Gruppe zur Fluoracylierung von Peptiden eingesetzt. Ihre dreistufige Radiosynthese gestaltet sich ähnlich komplex wie die des [^{18}F]SFB (Gesamtsynthesedauer: 100 min, RCA: ca. 60 %). [^{18}F]NPF wurde erfolgreich zur Radiofluorierung von Octreotid^[94], glykosyliertem Octreotid^[66] sowie glykosyliertem *cyclo*-RGD^[95] eingesetzt. Nebenreaktionen mit Tyrosin- und Histidinseitenketten bei ausbeutesteigernder HOBt-Katalyse limitieren die Einsatzmöglichkeiten von [^{18}F]NPF^[81].

N-Succinimidyl-4-(^{18}F fluormethyl)benzoesäureester wurde als einzige prosthetische Gruppe zur ^{18}F -Fluoracylierung mit einer einstufigen Synthese ausgehend von N-Succinimidyl-4-[(2,4-dinitroxyloxy)-methyl]-benzoesäureester entwickelt^[96]. Allerdings ist die RCA (18 % nach 35 Minuten) im Vergleich zu der des [^{18}F]SFB geringer. Außerdem ist diese Verbindung sterisch verhältnismäßig anspruchsvoll, lipophil und labil gegenüber Defluorierung *in vivo*^[97], was ihren Einsatz bisher auf rein wissenschaftliche Anwendungen beschränkt hat.

1.5.4.3 Chemoselektive Konjugation

Um definierte, radiomarkierte peptidische Tracer zu erhalten, sind für alle oben beschriebenen Methoden zur Konjugation prosthetischer Gruppen geschützte Peptide nötig. Der dadurch unumgängliche Entschützungsprozess lässt sich durch chemoselektive Konjugationen vermeiden. Bei chemoselektiven Reaktionen reagieren zwei funktionelle Gruppen in Anwesenheit anderer ungeschützter reaktiver Zentren ausschließlich miteinander. Zu diesem Zweck wird eine funktionelle Gruppe in den Peptidvorläufer eingeführt, die dann ohne Nebenreaktionen mit der prosthetischen Gruppe reagiert.

Eine solche chemoselektive Methode ist die Sonogashira-Reaktion zwischen Alkinen und Iodaromaten unter Pd-Katalyse. Dazu wurden 4-[^{18}F]Fluor-iodbenzol, z.B. mit einem alkinfunktionalisiertem Östrogenderivat, mit einer RCA von bis zu 88 % umgesetzt^[98]. Die Abtrennung des Pd-Katalysators könnte allerdings Probleme bereiten, was die Anwendungsmöglichkeit der Reaktion zur Radiopharmakaproduktion limitiert.

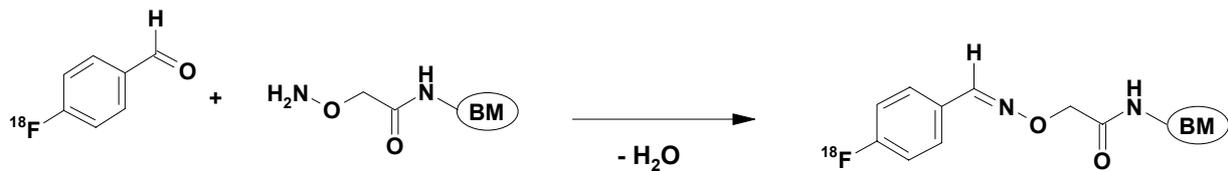


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der ^{18}F -Markierung via Oximbildung aus $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$ und einem mit Aminooxiessigsäure funktionalisierten bioaktiven Moleküls (BM)^[100].

Abbildung 1.9 zeigt schematisch die hoch selektive Oximbildung zwischen einer Carbonyl- und einer Aminooxifunktion^[99], die auch in wässrigem Medium möglich ist. Zur Radiofluorierung wurden Peptide wie RGD-Multimere^[100], glykosyliertes Octreotid^[101] und Minigastrin^[100] N-terminal mit einem Aminooxiacetylrest funktionalisiert und zur ^{18}F -Markierung mit 4- $[^{18}\text{F}]$ Fluorbenzaldehyd ($[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$) umgesetzt. Dabei zeigte sich, dass bei pH 2-3 höchste Konjugationsausbeuten von $> 90\%$ erzielt werden können. Die einstufige Radiosynthese der prosthetischen Gruppe erreicht eine RCA bis zu 70% nach einer Gesamtsynthesedauer von ca. 35 min. Die mittels Oximbildung ^{18}F -markierten Peptide zeigten eine hohe Stabilität *in vivo*. Diese chemoselektive Konjugationsmethode ermöglicht eine hohe RCA an radiofluoriertem Peptid (gesamt: $\leq 60\%$) durch eine zweistufige Markierungsstrategie^[102].

Vor kurzem wurde eine weitere chemoselektive Konjugationsstrategie entwickelt^[103]. Sie beruht auf einer Alkylierung eines chloressigsäurefunktionalisierten Peptids mit 3- $[^{18}\text{F}]$ Fluorpropanthiol. Die zweistufige Radiosynthese der prosthetischen Gruppe aus 3-Methansulfonsäure-tritylsulfanylpropylester erreichte Ausbeuten bis zu 70% und die Kupplung an ein Modellpeptid zeigte eine RCA $\leq 90\%$ nach einer Reaktionszeit von 30 min.

1.5.5 Bereitstellung von ^{99m}Tc

^{99m}Tc wird aus einem $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generator gewonnen (Abbildung 1.10). Das ^{99}Mo stammt entweder aus der Aufarbeitung von Spaltprodukten oder aus der $^{98}\text{Mo}(n,\gamma)^{99}\text{Mo}$ -Reaktion im Reaktor. Im Generator liegt das ^{99}Mo an Aluminiumoxid adsorbiert vor. Es zerfällt mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 66.7 \text{ h}$ zu 85 % zu ^{99m}Tc , das als Pertechnetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) mit Kochsalzlösung eluiert werden kann. 15 % des ^{99}Mo zerfallen direkt zu ^{99g}Tc im Grundzustand ($t_{1/2} = 2.13 \cdot 10^5 \text{ Jahre}$). Das so gewonnene Pertechnetat ist folglich nie trägerfrei^[104], wobei der Anteil an ^{99g}Tc davon abhängt, wie lange die letzte Elution des Generators zurückliegt. Die Totalkonzentration von Tc im Generatoreluat beträgt 10^{-6} - 10^{-7} M ^[78].

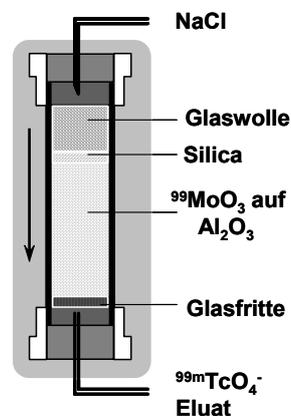


Abbildung 1.10: Funktionsweise und Bestandteile eines $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generators^[1]

^{99m}Tc muss über einen Chelator an ein bioaktives Molekül gekuppelt und in der entsprechenden Oxidationsstufe stabilisiert werden. Da Pertechnetat nicht komplexiert werden kann, muss es zunächst reduziert werden. Je nachdem, welche Oxidationsstufe erreicht werden soll, werden typischerweise Reduktionsmittel wie Zinn(II)chlorid oder Natriumborhydrid eingesetzt^[105]. Häufig wird während der Reduktion ein schwacher Chelator, z.B. Glucoheptonat, Mannitol oder Tricin, zur Stabilisierung des Technetiums in der entsprechenden Oxidationsstufe zugegeben. Dieser schwache Chelator wird im Folgeschritt durch den stärkeren ausgetauscht, wobei dies unter milderen Reaktionsbedingungen möglich ist.

1.5.6 Methoden zur Peptidmarkierung mit ^{99m}Tc

Da die ^{99m}Tc -Lösungen stark verdünnt sind, ist ein sehr effizienter Chelator nötig, um möglichst hohe Markierungsausbeuten zu erreichen. Grundsätzlich gibt es zwei Strategien zur Markierung von Peptiden mit ^{99m}Tc :

- Die direkte Komplexierung des reduzierten Technetiums durch Donoratome in den Seitenketten der Aminosäuren, z.B. Thiole aus reduzierten Disulfidbrücken oder Aminofunktionen, wird häufig bei Proteinen und monoklonalen Antikörpern angewendet^[21] und wurde bei einem Somatostatinderivat untersucht^[106]. Da im Allgemeinen wichtig ist, dass Produkte definierter Zusammensetzung entstehen, erweist sich diese direkte Markierung als weniger geeignet, weil der Bindungsmodus des Radionuklids variabel und nicht gesichert ist. Außerdem sollte angestrebt werden, dass bei der Markierung eine minimale Zahl an Isomeren entsteht, da diese unter Umständen voneinander abweichende Affinitäten zu den biologischen Zielstrukturen aufweisen^[78].
- Sinnvoller ist der Einsatz von definierten Chelatoren zur Bindung des Technetiums in verschiedenen Oxidationsstufen. Hierzu werden bifunktionelle Komplexbildner (BFCAs) verwendet, die zum einen das Metallatom stabil komplexieren und zum anderen eine funktionelle Gruppe tragen, mit der sie an ein Peptid gebunden werden können. Bei der Verwendung von Chelatoren zur Komplexierung von ^{99m}Tc sind zwei Varianten möglich:
 - Eine Möglichkeit ist die Komplexierung des Metallatoms und die anschließende Kopplung dieses Komplexes an das Peptid. Bei dieser Vorgehensweise erhält man einen definierten Komplex und vermeidet Nebenreaktionen mit Donoratomen des Peptids. Um ein einziges Konjugationsprodukt zu erhalten, muss das Peptid in den meisten Fällen geschützt sein, was wiederum einen anschließenden Entschützungsschritt erfordert. Diese Methode ist wegen ihrer Mehrstufigkeit für den klinischen Einsatz zu aufwendig^[21].
 - Nach demselben Prinzip funktioniert die möglichst einstufige ^{99m}Tc -Markierung von bereits chelatorfunktionalisierten Peptiden. Es gelten dieselben Voraussetzungen für die Wahl der BFCAs wie oben beschrieben. Auch auf diesem Weg entstehen definierte Komplexe. Um intakte Komplex-Peptid-Konjugate zu gewährleisten, müssen Methoden entwickelt werden, die eine effiziente Markierung der Peptide unter relativ milden Bedingungen ermöglichen^[21].

Für die klinische Anwendung sind so genannte „Kits“ ideal, die alle zur ^{99m}Tc -Markierung nötigen Reagenzien enthalten und innerhalb von maximal 30 Minuten nach Zugabe der Pertechnetatlösung in einem Schritt zu einer injektionsfähigen Tracerlösung führen (siehe Kapitel 1.5.1)^[78]. Die Markierung sollte das stabile Produkt in einer Ausbeute größer als 97 % mit hoher spezifischer Aktivität liefern.

Da die Größe des Metall-Chelator-Komplexes im Verhältnis zum Peptid nicht zu vernachlässigen ist, muss beachtet werden, dass sich die Biodistribution und auch die Pharmakokinetik des markierten Konjugats wesentlich verändern können, zumal auch zusätzliche Ladungen eine Rolle spielen. Die Wahl des Chelators bietet die Möglichkeit, Einfluss auf die Moleküleigenschaften des Tracers durch Variation von Ladung und Größe des Komplexes, seiner Lipophilie, seiner Stabilität etc. auszuüben und damit auf die pharmakokinetischen Eigenschaften des Tracers^[21].

Technetium-99m hat vor allem in den Oxidationsstufen +V und +I eine Bedeutung für die Markierung von Radiotracerern erlangt. Dabei finden Chelatoren nach dem N_xS_{4-x} -Prinzip, dem so genannten HYNIC- und dem $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Ansatz Anwendung.

1.5.6.1 Chelatoren für $^{99m}\text{Tc(V)}$ – das N_xS_{4-x} -Prinzip

Am häufigsten wurden verschiedene vierzählige N_xS_{4-x} -Chelatoren beschrieben, die $[\text{O}=\text{Tc}^{3+}]$ meist quadratisch planar koordinieren, während der Oxoligand eine axiale Position einnimmt (Abbildung 1.11)^[21]. Diese bisweilen oxidationslabilen Komplexe bilden größtenteils mehrere Isomere in Abhängigkeit von der Orientierung des Liganden zum Sauerstoffatom^[78]. Zudem führt die hohe Lipophilie vieler derartiger Komplexe zu einer hohen Leberaufnahme und einer bevorzugten hepatobiliären Ausscheidung der ^{99m}Tc -markierten Peptide. Hierzu wurde eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt, um durch Variation der Liganden die Eigenschaften eines solchen Komplexes zu verbessern^[21].

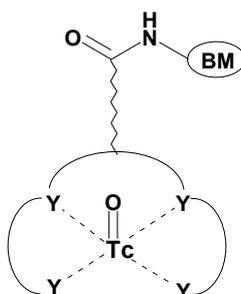


Abbildung 1.11: Allgemeines Schema für ^{99m}Tc -Komplexe nach dem N_xS_{4-x} -Prinzip

Zu den N_xS_{4-x} -Chelatoren zählen PnAO (Propylenaminnoxim, N_4)^[107], MAG_3 (N_3S , N-[N-[N-[(benzoylthio)acetyl]glycyl]glycyl]glycine)^[108], Tetramine (N_4), Diamindithiol (DADT, N_2S_2), Diamidedithiole (N_2S_2) und Triamidethiole (N_3S)^[21]. Häufig werden auch Tripeptide, z.B. Gly-Gly-Cys (N_3S) oder Asp-Lys-Cys (N_3S) für die Komplexierung des Metallatoms herangezogen. Diese Chelatoren haben zur Markierung verschiedener Peptide Anwendung gefunden^[21]: in einem Asp-Lys-Cys-*cyclo*-RGD-Derivat^[109], in Depreotid (P829, ein β -Dap-Lys-Cys-Octreotidderivat)^[110], in PnAO-Octreotid^[107] sowie in DADT-Bombesin^[111,112].

Einen weiteren interessanten Ansatz stellt das 3+1-Konzept dar: Hierbei wird das [$^{99m}Tc=O$]-Zentrum von einem dreizähligen und einem einzähligen Liganden komplexiert^[21,113]. Dieses "Mixed-Ligand"-Konzept ermöglicht eine bessere Abstimmung der Eigenschaften des Komplexes wie Lipophilie oder Ladung mit den Anforderungen an den Tracer. In vielen Fällen zeigen solche Komplexe in biologischem Medium die Tendenz zur Transchelatierung durch andere Donoratome^[114].

1.5.6.2 Der HYNIC-Ansatz

6-Hydrazin-nicotinsäure (HYNIC), über die Säurefunktion an Biomoleküle gebunden, kann über die Hydrazinfunktion als effizienter, einzähliger Chelator für ^{99m}Tc dienen. Um die oktaedrische Koordinationssphäre des Metallatoms abzusättigen und somit Transchelatierungen *in vivo* zu verhindern, ist ein Coligand nötig (Abbildung 1.12). Die Wahl des Coliganden stellt eine zusätzliche Modifikationsmöglichkeit der Biodistribution und der Pharmakokinetik des Tracers dar^[21].

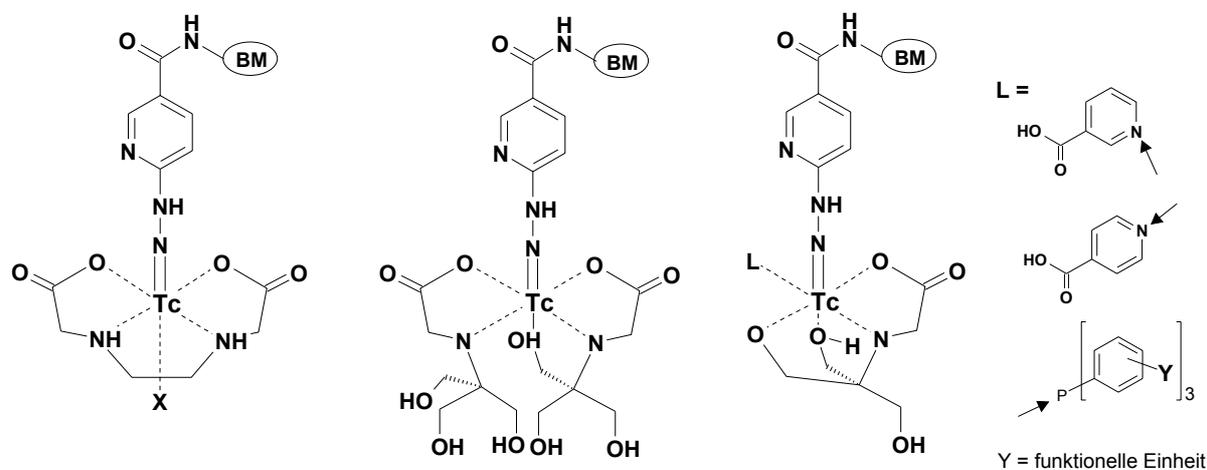


Abbildung 1.12: ^{99m}Tc -HYNIC-Komplexe mit verschiedenen Coliganden: EDDA, Tricin, Tricin und Coligand (v.l.n.r.; BM = bioaktives Molekül)^[115].

In diesem Zusammenhang hat sich EDDA (*N,N'*-di-(2-essigsäure)-diaminoethan) als vierbindiger, stabiler und relativ hydrophiler Coligand bei der ^{99m}Tc -Markierung von HYNIC-TOC bewährt^[116,117]. Allerdings sind die Markierungsausbeuten mit 60 - 70 % verhältnismäßig niedrig^[118]. Alternativ findet Tricin als Coligand Anwendung meist in Kombination mit einem weiteren einzähnigen Liganden (L), da bei Einsatz von Tricin allein zwei Tricinmoleküle die Koordinationssphäre des Technetiums absättigen. In diesem Fall entstehen mehrere Isomere und der Komplex ist in biologischem Medium labil gegenüber Transchelatierung^[118,119]. Für ternäre ^{99m}Tc -HYNIC/Tricin/L-Komplexe wurden viele einzähnige Liganden untersucht, am häufigsten Nicotinsäure^[116], Isonicotinsäure^[119], verschiedene Phosphine^[21], sowie ihre Derivate^[21,120].

HYNIC hat als Ligand zur ^{99m}Tc -Markierung verschiedener Peptide Anwendung gefunden: z.B. für TOC^[116-119], für Interleukin^[115], für Vitronectinrezeptorantagonisten^[121] und für MLF^[122]. Die Reduktion von Pertechnetat mit SnCl_2 kann *in situ* in Anwesenheit der Chelatoren durchgeführt werden und benötigt keine zweistufige Reaktionsführung. Dies ermöglichte die Entwicklung eines Kits zur ^{99m}Tc -Markierung von HYNIC-TOC mit EDDA als Coligand^[123].

1.5.6.3 Der $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Ansatz

Mit der von Alberto *et al.* beschriebenen, einstufigen Synthese des *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{X}_3$ -Komplexes ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{H}_2\text{O}$, $y = +1, -2$) in wässriger Lösung, bei der $\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$ als Reduktionsmittel und gleichzeitig als *in situ*-Quelle für CO fungiert^[124], gewann diese Strategie zur Technetiummarkierung von Peptiden an Bedeutung. Diese Neuerung erlaubte die Entwicklung eines „Kits“ zur Herstellung von $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$ für die Markierung mit ^{99m}Tc , das $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$ -Ausbeuten $> 97\%$ erreicht. Das $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$ -Ion weist in einem weiten pH-Bereich eine hohe Stabilität in wässriger Lösung auf. Während die Carbonyle fest an das Technetium gebunden sind, können die drei Wassermoleküle im $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$ -Markierungsvorläufer gegen Donoratome eines zwei- oder dreizähnigen Chelators ausgetauscht werden^[125,126]. Aus der Koordinationschemie von Tc(I) ist bekannt, dass es vor allem low-spin d^6 -konfigurierte, oktaedrische Komplexe bildet^[127]. Tc(I) zeigt eine hohe Affinität zu Stickstoffatomen als Donoratomen, vor allem zu aromatischen Stickstoffatomen^[27].

Die Wahl des geeigneten Chelators beeinflusst die Biodistribution sowie die Pharmakokinetik des Tracers z.B. durch Kompensation oder Überkompensation der positiven

Ladung der $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ -Einheit durch den Liganden. Eine Untersuchung der *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_{3-n}(\text{CO})_3\text{L}^n]$ -Komplexe (n = Dentizität des Liganden L) zeigte, dass vor allem Komplexe mit dreizähligen Chelatoren thermodynamisch stabil und kinetisch inert gegenüber Ligandenaustausch sind^[126]. Dagegen kann bei zweizähligen Liganden die freie Koordinationsstelle der nicht abgesättigten Koordinationssphäre des $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$, die nur durch ein labil gebundenes Wasser besetzt ist, durch funktionelle Gruppen in Proteinen *in vivo* besetzt werden. Das kann eine Retention des Komplexes im Blut sowie in den Ausscheidungsorganen wie Leber und Niere bewirken^[126]. Neben dem Einsatz von tridentaten Chelatoren kann die Sättigung der Koordinationssphäre auch nach dem (2+1)-Konzept erlangt werden^[128-130]. Dies erlaubt zudem eine höhere Flexibilität in der Abstimmung der physiologischen Eigenschaften des Komplexes.

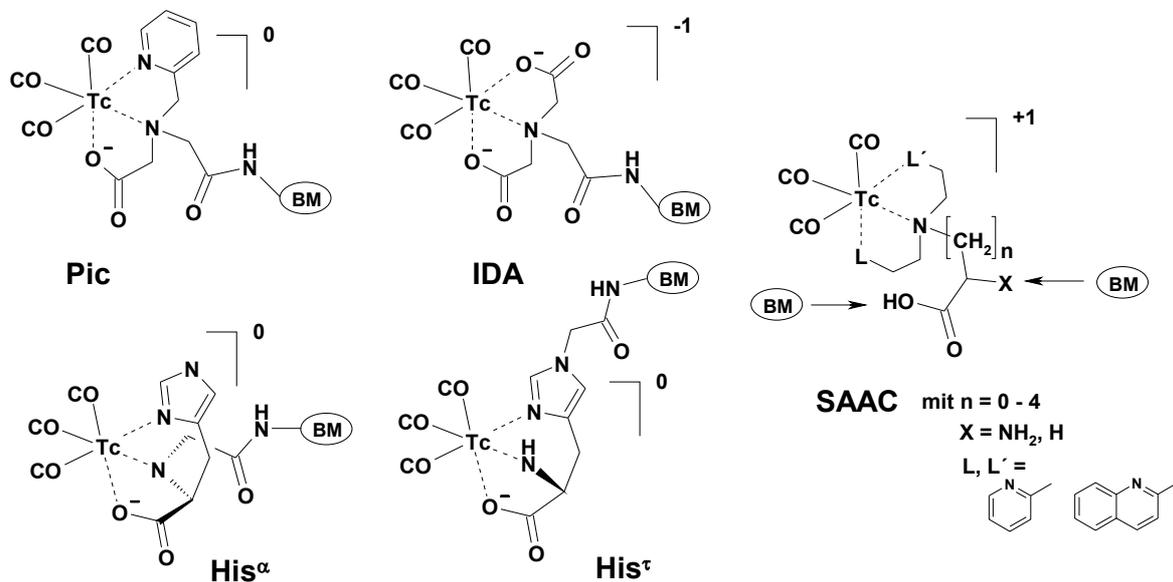


Abbildung 1.13: Exemplarische $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Komplexe mit tridentaten Chelatoren (BM = bioaktives Molekül, Erläuterungen siehe Text).

Wegen der höheren *in vivo*-Stabilität wurden in den vergangenen Jahren vermehrt tridentate Chelatoren für die $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Einheit entwickelt. Die wichtigsten sind in Abbildung 1.13 dargestellt: (Carboxymethyl-pyridin-2-yl-methylamino)essigsäure (2-Picolylamindiessigsäure = Pic = PADA)^[131,132], Iminodiacetat (IDA)^[133], so genannte SAACs (Single Amino Acid Chelates, seitenkettenfunktionalisiertes Lysin)^[134,135] sowie Histidinderivate (His $^\alpha$ ^[136] und His $^\tau$ ^[137]). Mit diesen BFCAs wurden verschiedene Peptide wie z.B. Octreotidderivate^[133,138,139], Neurotensin^[136,140], Minigastrin^[141], Neuropeptid Y^[142] und Bombesin^[143] funktionalisiert und erfolgreich mit $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ markiert.

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Radiofluorierte Peptide sind aufgrund der optimalen Nuklideigenschaften von Fluor-18^[1] wertvolle Tracer für die Positronenemissionstomographie (PET). Allerdings sind die meisten Radiofluorierungsmethoden für Peptide mehrstufig, zeitaufwendig und schwierig zu automatisieren. Daher konnten ¹⁸F-markierte Peptide für die PET zumeist nur in geringen radiochemischen Ausbeuten (RCA) dargestellt werden. Wie bereits in Kapitel 1.5.4.3 erläutert, bieten chemoselektive Reaktionen eine gute Möglichkeit, Radiofluorierungen von Peptiden für die Anwendung in der klinischen Routine effizienter zu machen. In diesem Zusammenhang hat sich die von Poethko *et al.* kürzlich entwickelte Oximibildung von aminooxifunktionalisierten Peptiden mit 4-^{[18}F]Fluorbenzaldehyd als bisher erfolgreichste Methode erwiesen^[100,101,102]. Sie ermöglicht in einer zweistufigen Radiosynthese in wässrigem Reaktionsmedium hohe Ausbeuten an ¹⁸F-markiertem Peptid bei Gesamtsynthesezeiten < 60 min.

Ein Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, eine weitere chemoselektive Radiofluorierungsmethode von Peptiden zu evaluieren. Diese Methode sollte auf der Konjugation zwischen einer Carbonylfunktion und einem Hydrazin mittels Hydrazonbildung beruhen. Die Hydrazonbildung wird schon länger zur Quantifizierung von Carbonylen in der Umwelt herangezogen und bewies in diesem Zusammenhang ihr Potenzial als chemoselektive Reaktion^[144,145], die mit hoher Ausbeute auch bei äußerst niedrigen Carbonylkonzentrationen quantitative Ausbeuten liefert.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde 6-Hydrazin-nicotinsäure (HYNIC) als Hydrazinkomponente verwendet und an verschiedene Peptide gekuppelt. Da HYNIC-funktionalisierte Peptide und Proteine bereits als Vorläufer zur Darstellung ^{99m}Tc-markierter Radiopharmaka klinischen Einsatz finden, ergibt sich die Möglichkeit, identische Vorläufer zur Produktion ¹⁸F- und ^{99m}Tc-markierter Tracer einzusetzen (siehe Kapitel 1.5.6.2). Diese zweifache Verwendbarkeit desselben HYNIC-funktionalisierten Vorläufers sollte hier ebenfalls getestet werden. Als Carbonylkomponente bot sich der bereits für die Radiofluorierung mittels Oximibildung verwendete 4-^{[18}F]Fluorbenzaldehyd an, da dieser Markierungsvorläufer innerhalb eines PET-Zentrums multifunktionell einsetzbar wäre (Oximilgation, Hydrazonbildung, Umsetzung zu Benzylhalogeniden als Alkylierungsvorstufe). Die Hydrazonbildung zwischen diesen beiden Reaktanden sollte hier bezüglich ihrer Effizienz unter den verschiedensten Reaktionsbedingungen evaluiert werden.

Wünschenswert war dabei, dass die Reaktion unter weniger sauren Bedingungen als die Oximbildung ebenso effizient abläuft und zu hohen RCA führt. Desweiteren sollte die Stabilität der Hydrazonbindung in verschiedenen Medien, wie Puffer bei verschiedenen pH-Werten, in Serum und *in vivo* untersucht werden. Da Hydrazone im sauren Medium gespalten werden können^[146-151], sollte die Möglichkeit einer intrazellulären Retention des Markierungsvorläufers nach Spaltung unter den sauren Bedingungen in den endosomalen und lysosomalen Kompartments^[150,152] bewertet werden.

Neben der Entwicklung einer neuen Methode zur Radiofluorierung von Peptiden sollte im Rahmen dieser Arbeit auch die Markierung von Peptiden nach der jüngst entwickelten ^{99m}Tc-Triaquatricarbonyl-Kation-Methode (*fac*-[^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺)^[125] untersucht werden. ^{99m}Tc ist aufgrund seiner Nuklideigenschaften und seiner breiten Verfügbarkeit aus ⁹⁹Mo/^{99m}Tc-Generatoren ein wichtiges Nuklid für die SPECT-Diagnostik. Die ^{99m}Tc(CO)₃-Einheit stellt aufgrund ihrer hohen Stabilität in wässrigem Medium, der einfachen Komplexierungsreaktion, die unter milden Bedingungen in quantitativer Weise erfolgen kann^[125], und ihrer Darstellbarkeit mittels einer "Kit"-Reaktion ein ideales Markierungsgagens für peptidische SPECT-Tracer dar.

Ein weiteres Ziel war es, einen neuen bifunktionalen Chelator, *N*^ε-Carboxymethyl-histidin (His(*N*^ε-CM)-OH, CM = Carboxymethyl)^[137], der den tridentaten Bindungsmodus von freiem Histidin an das ^{99m}Tc-Tricarbonylkation und gleichzeitig die Kupplung an Peptide ermöglicht, zu evaluieren. Dieser Chelator sollte gekoppelt an Tyr³-Octreotid (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol), TOC) und Tyr³-Octreotat (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr, TOCA) bezüglich seiner Komplexierungseffizienz untersucht werden.

Außerdem sollten die bereits zuvor initial evaluierten sst-Tracer Gluc-Lys⁰(His)TOC, Gluc-Lys⁰(His)TOCA und Gluc-Lys⁰(Pic)TOCA^[139] bezüglich ihres *in vivo*-Verhaltens weiterführend untersucht werden. Diese Tracer sind nach den bisher für radiofluorierte Tyr³-Octreotidderivate^[66] erfolgreich eingesetzten Konzepten mit einem trifunktionellen Linker versehen, der Peptidkupplung, Glycosylierung und Markierung erlaubt. Dafür war vor allem die Optimierung der Radiosynthese der Tracer wichtig. Gluc-Lys⁰(Pic)TOCA, welches sich in Internalisierungsstudien^[153] als vielversprechendes Derivat erwiesen hatte, sollte in einer ersten Studie an Patienten eingesetzt und bewertet werden.

3 Synthese der peptidischen Grundgerüste

Für die Radiofluorierung via Hydrazonbildung und zur ^{99m}Tc -Markierung über den HYNIC- oder den Tricarbonyl-Ansatz (siehe Kapitel 1.5.6) wurden verschiedene Peptide als Vorläufer synthetisiert und entsprechend funktionalisiert. Peptidsynthese kann entweder in Lösung oder nach dem 1963 von Merrifield entwickelten Konzept der Festphasenpeptidsynthese (solid phase peptide synthesis, SPPS) an einem polymeren Trägerharz durchgeführt werden^[154,155]. Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Peptide wurden ausschließlich mittels Festphasenpeptidsynthese dargestellt.

Bei der SPPS wird die C-terminale Aminosäure, die eine temporäre N^α -Schutzgruppe und, wenn nötig, eine orthogonale, permanente Seitenkettenschutzgruppe trägt, über einen Linker an ein polymeres Trägerharz gebunden. Durch wiederholtes Entfernen der N^α -Schutzgruppe und Kuppeln einer weiteren geschützten Aminosäure wird die Peptidkette schrittweise N-terminal verlängert. Der entscheidende Vorteil gegenüber der Synthese in Lösung liegt darin, dass überschüssige Reagenzien und Nebenprodukte durch Waschen und Filtrieren des peptidtragenden Harzes entfernt werden können. Je nach Weiterverwendung des Peptids kann die letzte N^α -Schutzgruppe vor der Abspaltung des Peptids vom Trägerharz entfernt oder daran belassen werden.

Für die SPPS werden funktionalisierte Polymerharze benötigt, die mechanisch stabil und gegenüber Lösungsmitteln und Reagenzien inert sind. In den meisten Fällen finden Polystyrolharze Anwendung, die unterschiedlich funktionalisiert sind. Die Art der Funktionalisierung hängt von der gewünschten Art der Abspaltung sowie der C-terminalen Funktion des Produktpeptids (z. B. Carboxylat, Amid, Alkohol oder Methylamid) ab.

Eine verbreitete Vorgehensweise für den Aufbau der Peptidsequenz ist die „Fmoc-Strategie“, die auch hier eingesetzt wurde^[156,157]. Dabei wurde als temporäre N^α -Schutzgruppe das basenlabile 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) verwendet, das mit einer 20 %igen Lösung von Piperidin in DMF selektiv abgespalten wird. Dabei werden unter Eliminierung von CO_2 die entschützte Aminosäure und Dibenzofulven frei, welches mit Piperidin ein Addukt bildet^[157-159].

Als permanente Seitenkettenschutzgruppen dienten säurelabile Gruppen wie *tert*-Butyl (tBu) für Hydroxyfunktionen von Tyrosin und Threonin, 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) an Arginin oder Triphenylmethyl- (Trityl-, Trt) für Thiolfunktionen an Cystein und Amidfunktionen von Glutamin, die bei der

sauren Abspaltung des Peptids vom Harz ebenfalls entfernt werden. Aminofunktionen von Lysin, die auch nach der Abspaltung des Peptids vom Harz geschützt bleiben sollten, wurden mit der basisch mit Hydrazinhydrat abspaltbaren Dde-Gruppe ((4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-ethyl) versehen.

Die seitenkettengeschützten Fmoc-Aminosäuren wurden kommerziell erworben und direkt in der Synthese eingesetzt. Damit die Knüpfung der Peptidbindung zwischen der N^α -Aminogruppe der an das Harz gebundenen Aminosäure und der Carboxylfunktion der nachfolgenden Fmoc-Aminosäure bei Raumtemperatur in 45 - 60 min quantitativ erfolgen kann, wurde ein Überschuss an Reagenzien von 1.5 eq, bezogen auf die reaktiven Gruppen am Harz, zugegeben. Zur Aktivierung der Säuregruppe wurden TBTU (O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-tetrafluoroborat) und HOBt (1-Hydroxy-benzotriazol) eingesetzt^[160,161]. Als Base wurde DIPEA (*N,N*-Diisopropylethylamin) verwendet, da diese sterisch gehinderte, tertiäre Base wenig Nebenreaktionen eingeht^[160] und keine vorzeitige Abspaltung der Fmoc-Gruppe bewirkt. In Lösung bildet sich als reaktive Spezies ein Obt-Aktivester der zu kuppelnden Fmoc-Aminosäure. Die Verwendung von TBTU, HOBt und DIPEA gewährleistet eine racemisierungsfreie Kupplung der Fmoc-Aminosäure an den harzgebundenen Peptidstrang^[160].

3.1 Festphasensynthese von Octreotid

Zur Synthese von Tyr³-Octreotid wurde ein 3,4-Dihydro-2H-pyran-2-ylmethoxymethyl-Polystyrolharz (DHP-HM-Harz)^[162] verwendet, an das primäre und sekundäre Alkoholgruppen unter Ausbildung einer Dihydropyranetherbindung, wie in Abbildung 3.1 dargestellt, gebunden werden können^[163]. Dieser Bindungstyp eignet sich hervorragend für die SPPS nach der Fmoc-Strategie, da er unter sauren Bedingungen gespalten wird und gegenüber Basen äußerst stabil ist.

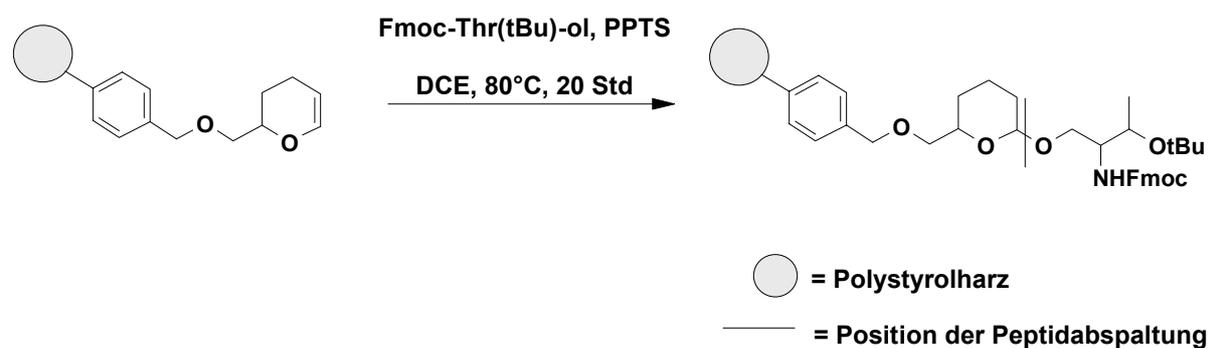


Abbildung 3.1: Kupplung eines Fmoc-Aminoalkohols an DHP-HM-Harz.

Zur Reduktion von Fmoc-Thr(tBu)-OH zum korrespondierenden Aminoalkohol wurden NaBH_4 , N-Methylmorpholin und Chlorameisensäureethylester eingesetzt^[164]. Der so synthetisierte Aminoalkohol wurde anschließend in einer Reaktionszeit von ca. 18 h an das DHP-HM-Harz gekuppelt, wobei Pyridinium-p-toluolsulfonat (PPTS) als Katalysator diente. Der Belegungsgrad des Harzes (siehe Kapitel 7.2.1) ist in hohem Maße von der Feuchtigkeitsmenge in der Reaktionslösung abhängig. Aus diesem Grund wurde absolutes Dichlorethan verwendet, und die Feststoffe sowie das Reaktionsgefäß wurden zuvor im Hochvakuum getrocknet. Die Reaktion selbst wurde unter Argon durchgeführt.

Der anschließende Aufbau der Peptidkette mit der Sequenz D-Phe-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Dde)-Thr(tBu)-Cys(Trt)-Thr(tBu)(ol) erfolgte nach der bereits beschriebenen Fmoc-Strategie mit HOBt, TBTU und DIPEA (siehe Kapitel 3)^[160]. Bei der Spaltung der säurelabilen Dihydropyranetherbindung mit Trifluoressigsäure (TFA) zur Abspaltung des Peptids vom Harz und der gleichzeitigen Entfernung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen können zwei Probleme auftreten:

- Einerseits kann im stark sauren Milieu auch die Etherbindung zwischen der Dihydropyranereinheit und dem Harz gespalten werden^[163]. Dies lässt sich dadurch vermeiden, dass die Konzentration an TFA vermindert wird. Aus diesem Grund wurde die Abspatlösung aus TFA im Verhältnis 1 : 1 mit Dichlormethan (DCM) verdünnt.
- Andererseits entstehen bei der sauren Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen reaktive Kationen (tBu^+ , Trt^+), die mit den funktionellen Gruppen des Peptids reagieren können^[165]. Um das zu vermeiden, werden *scavenger* wie hier Triisobutylsilan^[166,167] (TIBS) eingesetzt, die diese Kationen abfangen. Daher wurde als Abspatlösung statt TFA ein Gemisch aus TFA : H_2O : TIBS (95 : 2.5 : 2.5) verwendet und dieses mit DCM verdünnt. Um bei der Aufarbeitung der Peptide aus der Abspatlösung das TIBS vollständig zu entfernen, stellte sich das Ausfällen in Ether nach dem Einengen der Lösungsmittel im Vakuum als die erfolgreichste Methode heraus.

In den meisten Fällen wurden die Peptide nach der Abspaltung als Rohprodukt für weitere Reaktionen eingesetzt. Teilweise wurde die fertige Peptidsequenz auch am festen Trägerharz N-terminal weiterführend funktionalisiert und erst danach abgespalten. Weitere Details zur Funktionalisierung von TOC sind in Kapitel 5.2.2 beschrieben.

3.2 Festphasensynthese von Octreotat und Substance P

Für die Synthese von Peptiden mit einer C-terminalen Carboxylfunktion, wie Octreotat und Substance P, wurde ein Tritylchlorid-Polystyrol-Harz (TCP-Harz) verwendet. Das Harz besteht aus einem Polystyrolgerüst, welches mit Tritylchlorid funktionalisiert ist, woran die erste Fmoc-Aminosäure über die Carboxylgruppe durch eine nukleophile Substitution des Chlorids gekuppelt wird (siehe Abbildung 3.2).

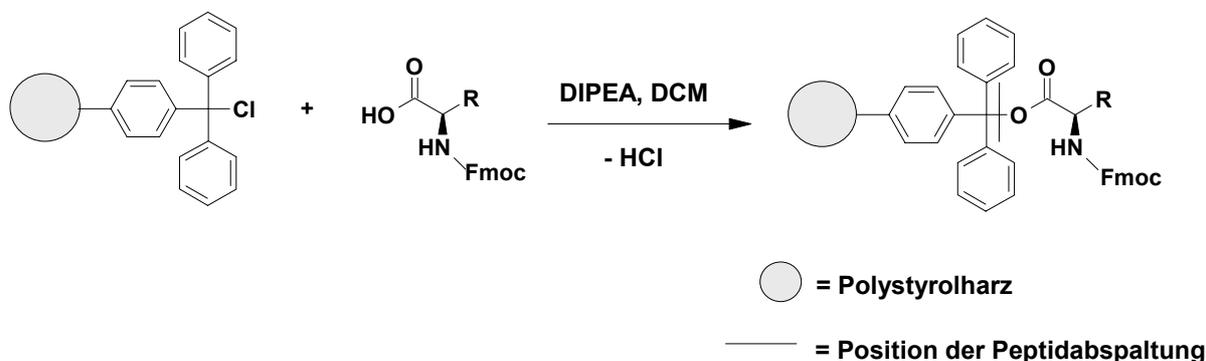


Abbildung 3.2: Kupplung einer Fmoc-Aminosäure an TCP-Harz.

Da das TCP-Harz hydrolyseempfindlich ist, wurde die Kupplung von Fmoc-Thr(tBu)-OH bzw. Fmoc-Met-OH in wasserfreiem DCM durchgeführt. Außerdem war eine Base (DIPEA) nötig, die die Carboxylgruppe deprotoniert und somit aktiviert. Zusätzlich diente die Base der Neutralisierung der entstehenden Salzsäure. Die anschließende Synthese der Peptidsequenz D-Phe-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Dde)-Thr(tBu)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-OH für Octreotat bzw. Arg(Pbf)-Pro-Lys(Dde)-Pro-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OH für Substance P^[168] am Harz erfolgte mittels Fmoc-Strategie analog der Synthese von Octreotid (siehe Kapitel 3 und 3.1)^[154-156,160,161].

Anders als beim Octreotid muss bei der Abspaltung von Peptiden von TCP-Harz die potentielle Spaltung der Bindung des Linkers an das Harz nicht berücksichtigt werden, weshalb das unverdünnte Gemisch aus TFA : H₂O : TIBS (95 : 2.5 : 2.5) als Abspalllösung eingesetzt wurde, womit gleichzeitig auch säurelabile Seitenkettenschutzgruppen entfernt wurden.

Im Fall von Octreotat wurde das Peptid nach Fertigstellung der Peptidsequenz auch am festen Trägerharz N-terminal weiterführend funktionalisiert und erst danach abgespalten. Weitere Details zu den Funktionalisierungen der beiden Peptide sind in den Kapitel 4.3.2 und 5.2 beschrieben.

3.3 Festphasensynthese von Octreotatamid

Für die Synthese von Peptiden mit einer C-terminalen Amidfunktion, wie Octreotatamid, wurde Rink-Amid-AM-Harz verwendet. Das Harz besteht aus einem Polystyrolgerüst, das eine Fmoc-geschützte Aminogruppe trägt. An diese wird nach Fmoc-Abspaltung die Carboxylgruppe der ersten Aminosäure unter Aktivierung durch HOBt und TBTU über eine Amidbindung gebunden (siehe Abbildung 3.2). Die Bindung zwischen dem polymeren Träger und der Aminogruppe ist säurelabil und wird bei der Peptidabspaltung gespalten, so dass ein C-terminales Amid entsteht.

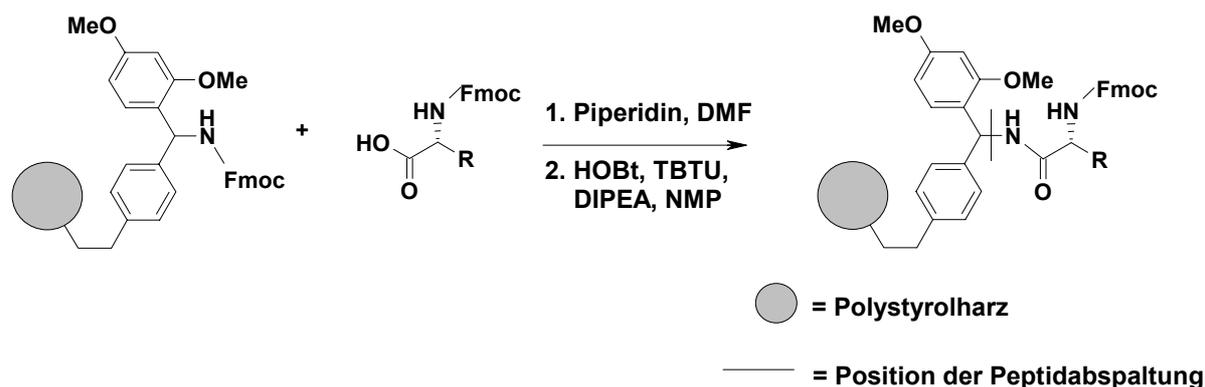


Abbildung 3.4: Kupplung einer Fmoc-Aminosäure an Rink-Amid-AM-Harz.

Ein Vorteil dieses Harzes besteht in der einfachen Belegungsreaktion, die vom Vorgehen her einem ersten Kupplungsschritt entspricht. Diese Reaktion ist nicht hydrolyseempfindlich und weitestgehend quantitativ. Für die Vervollständigung der Peptidsequenz D-Phe-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Dde)-Thr(tBu)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-NH₂ von Octreotatamid am Harz wurde die Fmoc-Strategie analog der Synthese von Octreotid angewendet (siehe Kapitel 3 und 3.1)^[154-156,160,161].

Anders als beim Octreotid ist bei der Abspaltung von Amid-Peptiden vom Rink-Amid-AM-Harz die Spaltung der Bindung des Linkers an das Harz erwünscht, um das C-terminale Amid zu generieren. Zur Abspaltung wurde wiederum ein Gemisch aus TFA : H₂O : TIBS (95 : 2.5 : 2.5) eingesetzt. Die Funktionalisierung von Octreotatamid wird in Kapitel 4.3.2 beschrieben.

3.4 Oxidation der Sulfide zur Disulfidbrücke

Bei Octreotidderivaten dient die Disulfidbrücke zwischen Cys² und Cys⁷ sowohl der Stabilisierung der Sekundärstruktur, als auch der Stabilisierung gegen den Abbau durch Proteasen *in vivo*. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen sollte die oxidative Bildung der Disulfidbrücke zur Cyclisierung der linearen Octreotidderivate unter milden Bedingungen durchgeführt werden. Die hierfür wohl mildeste, aber sehr langsame Methode ist die Oxidation durch Luftsauerstoff. Die hier verwendete Oxidationsmethode durch Wasserstoffperoxid in Tetrahydrofuran (THF) ist ähnlich mild, ermöglicht aber quantitative Disulfidbrückenbildung nach kürzeren Reaktionszeiten^[35].

Die Rohprodukte aus der Aufarbeitung der Abspatlösung vom Harz wurden direkt zur Disulfidbrückenbildung eingesetzt. Damit keine Dimer- bzw. Oligomerbildung bei der Disulfidbrückenbildung auftritt, muss die Reaktion in hoher Verdünnung durchgeführt werden. Bis zu Peptidkonzentrationen von 10 mM zeigte sich kein solches *Crosslinking*. Die Peptidlösung in mit 5mM Ammoniumacetat gepuffertem THF wurde durch Zugabe von gesättigter NaHCO₃-Lösung auf den optimalen pH-Wert von 7 - 7.5 eingestellt. Im Fall eines niedrigeren pH-Wertes wird die Oxidationsreaktion stark verlangsamt. Anhand von HPLC-Kontrollen zeigte sich, dass die Reaktion im Allgemeinen nach 30 bis 60 min abgeschlossen war. Diese Methode wurde zur Cyclisierung aller Octreotidderivate angewendet.

4 Radiofluorierung von Peptiden mittels Hydrazonbildung

4.1 Hintergrund der Hydrazonbildung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die chemoselektive Kondensation zwischen einer Hydrazin- und einer Carbonylfunktion, wie in Abbildung 4.1 und Abbildung 4.6 dargestellt, zur Radiofluorierung ungeschützter Peptide evaluiert.

Neben dem Einsatz der Hydrazonbildung zur Analytik^[144,145] ist diese Reaktion schon vielfach zur chemoselektiven Konjugation von niedermolekularen Wirkstoffen, Peptiden, Zuckern, Proteinen und Lipiden untereinander oder an entsprechend funktionalisierte Oberflächen oder makromolekulare Strukturen ausgenutzt worden^[146-151,169,170]. In den meisten Fällen wurden für diese Ligation als Carbonyl α -oxo-Aldehyde und als Hydrazinfunktion Hydrazide eingesetzt. Hydrazide bieten im Fall von Proteinen oder Peptiden den Vorteil, dass freie Carboxylgruppen durch Kondensation mit Hydrazin umfunktionalisiert werden können^[149]. Allerdings sind Hydrazide im Vergleich zu Hydrazinen elektronenärmer und somit weniger nukleophil. Der vermehrte Einsatz von Aldehyden beruht auf der im Vergleich zu Ketonen erhöhten Reaktivität dieser Carbonylgruppe, die bei α -oxo-Aldehyden durch die Nachbarschaft zum oxidierten α -Kohlenstoff zusätzlich zunimmt. Dadurch ist der Carbonylkohlenstoff elektronenärmer und deshalb leichter durch ein Nukleophil angreifbar^[151]. Es gibt jedoch auch Studien zur Bildung von Hydrazonen aus Ketonen^[147,150].

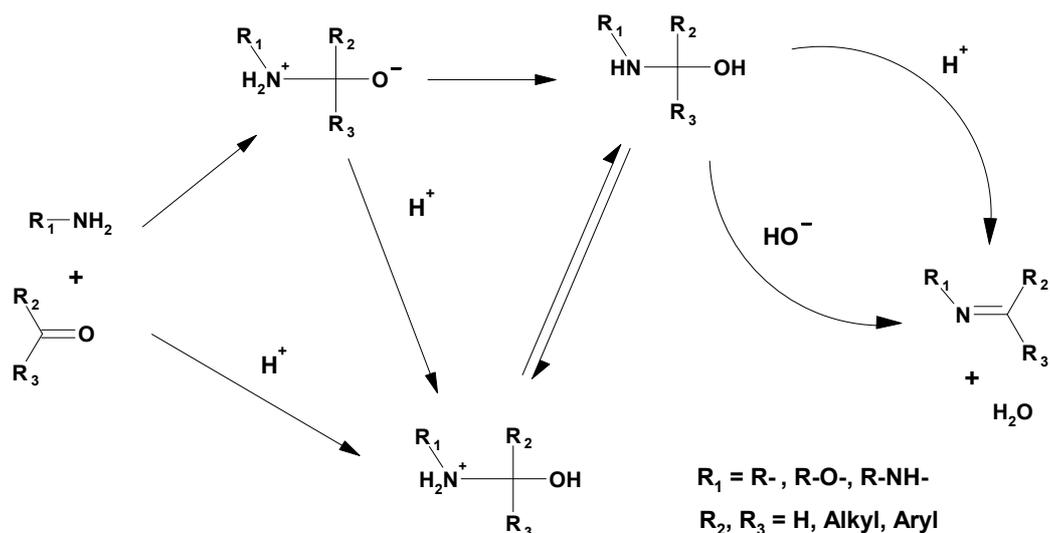


Abbildung 4.1: Vereinfachter Mechanismus der Kondensation eines Carbonyls mit einer primären Aminofunktion, einer Aminooxifunktion oder einer Hydrazinfunktion mit säure- und basenkatalysierten Schritten^[151].

Sowohl die Hydrazonbildung mit allen beschriebenen Ausgangsverbindungen als auch die Bildung von Iminen und Oximen erfolgt nach grundsätzlich demselben Mechanismus (siehe Abbildung 4.1)^[151], bei dem je nach Reaktanden und Reaktionsbedingungen ein anderer Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist^[151]. Die Bildung von Hydrazonen, Oximen und Iminen unterscheidet sich in der Basizität und der Nukleophilie der jeweiligen Aminkomponenten.

Die Hydrazonbildung ist eine säurekatalysierte Reaktion, bei der durch anfängliche Protonierung die Carbonylgruppe aktiviert und im letzten Schritt die Abspaltung von Wasser erleichtert wird. Der optimale pH-Wert für diese Reaktion liegt laut Literaturangaben in Abhängigkeit von den Reaktanden im Bereich zwischen 4.0 - 5.5^[148,149,151]. Hydrazine und Hydrazide sind gute Nukleophile, aber schwache Basen, weshalb sie in diesem pH-Bereich nicht protoniert werden. Amino- und Guanidinfunktionen dagegen sind unter diesen Bedingungen protoniert und deshalb nicht reaktiv^[148,151]. Diese Tatsache trägt zur Chemoselektivität der Hydrazonbildung bei. Sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit^[148], wenn auch nur in geringem Maße, als auch die Reaktionsausbeute^[149] steigen mit der Zunahme des Überschusses der Hydrazin-/Hydrazidkomponente. Zur Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit und der Ausbeute trägt außerdem der Einsatz eines wasserziehenden Lösungsmittels wie DMSO bei, da dadurch das Gleichgewicht zugunsten der Produkte verschoben werden kann^[148]. Allerdings ist die Hydrazonbildung auch in rein wässrigem Medium erfolgreich.

Da die Hydrazonbildung eine protonenkatalysierte Gleichgewichtsreaktion ist, ist sie ebenfalls unter Säurekatalyse reversibel. Hydrazone sind bei pH-Werten kleiner als 5 deutlich instabil und bilden ihre einzelnen Reaktanden wieder zurück, während sie bei neutralem und physiologischem pH-Wert stabil sind^[146-151]. Die Stabilität von Hydrazonen aus konjugierten und/oder aromatischen Aldehyden (vor allem mit elektronenziehenden Substituenten) ist besonders hoch^[149,171].

In dieser Arbeit war geplant, die Hydrazonbildung als ¹⁸F-Markierungsmethode zu nutzen, die im Vergleich zur Radiofluorierung mittels Oximbildung (siehe Kapitel 1.5.4.3) in einem weniger sauren pH-Bereich möglich sein sollte. Wegen ihrer Chemoselektivität und ihrer Anwendbarkeit in wässrigem, gepuffertem Medium unter milden Reaktionsbedingungen erschien die Hydrazonbildung zur Radiofluorierung von Biomolekülen vielversprechend.

4.2 Wahl und Design der Vorläufer zur Radiofluorierung

Für die Evaluierung der Hydrazonbildung als Methode zur Konjugation einer radiofluorierten, prosthetischen Gruppe mit Carbonylfunktion an ein mit einem Hydrazin funktionalisiertes Peptid mussten geeignete Markierungsvorläufer entwickelt werden.

4.2.1 Die Hydrazinkomponente

Zunächst stellte sich die Frage, welche Möglichkeiten der Einführung einer Hydrazinfunktion in ein Peptid gegeben sind. Die reduzierte Reaktivität von Hydraziden sprach gegen die Umfunktionalisierung einer Carbonsäuregruppe. Da 6-Hydrazin-nicotinsäure (HYNIC) eine freie Hydrazingruppe enthält und als guter Ligand für Technetium etabliert ist^[21,116], erschien es sinnvoll, die Verwendbarkeit von HYNIC zur Hydrazonbildung mit einer carbonyltragenden, prosthetischen Gruppe als Radiofluorierungsmethode zu untersuchen. Der Einsatz von HYNIC würde zudem erlauben, dieselben Peptidverbindungen sowohl zur Radiofluorierung als auch zur ^{99m}Tc-Markierung zu verwenden. Für die ^{99m}Tc-Markierung sind HYNIC-konjugierte Peptide, speziell HYNIC-TOC für die Kit-Zubereitung^[122,172], bereits zu Hydrazonen als Schutzgruppe umgesetzt worden. Da in Kits, die ohne Reinigungsschritt im Anschluss an die Radiomarkierung Patienten appliziert werden, ausschließlich höchst reine Markierungsvorläufer vorliegen dürfen, die HYNIC-Funktion aber mit weit verbreiteten Carbonylen, z.B. aus Weichmachern, Restverunreinigungen in Alkoholen, zu einem Gemisch an Vorläufern reagieren kann, wurde diese mit Carbonylen zu einheitlich geschützten Vorläufern umgesetzt^[171]. Diese Hydrazonschutzgruppe wird während der ^{99m}Tc-Markierung *in situ* unter schwach sauren Bedingungen (pH 4.5) gespalten^[172]. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Carbonyle auf ihre Effizienz als Schutzgruppe sowie ihre Spaltbarkeit *in situ* untersucht^[171,172]. Dabei stellte sich heraus, dass vor allem Hydrazone aus aromatischen Carbonylen eine ausreichende Stabilität aufweisen. Gleichzeitig zeigen sie eine genügend große Instabilität, um hohe Markierungsausbeuten zu ermöglichen. Diese Ergebnisse bestätigen die Anwendbarkeit von HYNIC zur Hydrazonbildung. In der vorliegenden Arbeit sollte die Übertragbarkeit dieser Reaktion auf den trägerfreien Fall der Radiofluorierung untersucht werden.

4.2.2 Die Peptide

Für die die Evaluierung der Markierungsmethode müssen Peptide folgende Anforderungen erfüllen:

- Sie sollten in einer großen Bandbreite von Reaktionsbedingungen (pH, Temperatur) stabil sein, um eine umfassende Optimierung der Hydrazonbildungseffizienz zu erlauben.
- Sie sollten sich auch mit einer sterisch anspruchsvollen Gruppe funktionalisieren lassen, ohne an biologischer Aktivität einzubüßen.
- Die *in vitro*- und *in vivo*-Eigenschaften der unmodifizierten Peptide bzw. deren radiomarkierter Analoga sollten hinreichend bekannt sein, damit nach Radiofluorierung eine Aussage über die Auswirkung der Einführung des Hydrazons getroffen werden kann.

Diese Voraussetzungen werden von Octreotidderivaten, vor allem Tyr³-Octreotidderivaten, erfüllt^[34,66,101,35]. Bei diesen Peptiden ist eine Funktionalisierung, z.B. durch HYNIC, am N-Terminus ohne Verringerung der Rezeptoraffinität möglich. Da Tyr³-Octreotat (TOCA) im Vergleich zu Tyr³-Octreotid (TOC) eine höhere Tumoraufnahme^[49,61,62] zeigt (siehe Kapitel 1.3.3), wurde es als eine Ausgangsverbindung ausgewählt. Zusätzlich sollte Tyr³-Octreotamid (TOCam), das eine noch höhere Rezeptoraffinität aufweist als TOCA, funktionalisiert werden^[173,174]. Die Tatsache, dass beide Peptide weniger lipophil sind als TOC, sollte sich hinsichtlich der Kompensation einer erhöhten Lipophilie durch Funktionalisierung und Markierung als vorteilhaft erweisen.

Um die universelle Anwendbarkeit der Markierungsmethode via Hydrazonbildung zu prüfen, wurde ein weiterer peptidischer Vorläufer radiofluoriert. Dazu wurde Substance P ausgewählt, ein bisher wenig untersuchter, aber vielversprechender peptidischer Tracer (siehe Kapitel 1.3.4)^[8,31]. Obwohl dieses Peptid nicht alle der oben aufgeführten Voraussetzungen erfüllt, eignet sich die Untersuchung der Radiofluorierung von Substance P zur Bestätigung der Universalität der Methode, da die Aminosäuresequenz dieses Peptid andere funktionelle Gruppen enthält als die der Tyr³-Octreotidderivate.

Alle ausgewählten Peptide wurden N-terminal mit HYNIC funktionalisiert, und anschließend wurde ihre Radiofluorierung mittels Hydrazonbildung evaluiert. In Abbildung 4.2 sind die für die Evaluierung der Radiomarkierung mittels Hydrazonbildung eingesetzten Peptide dargestellt.

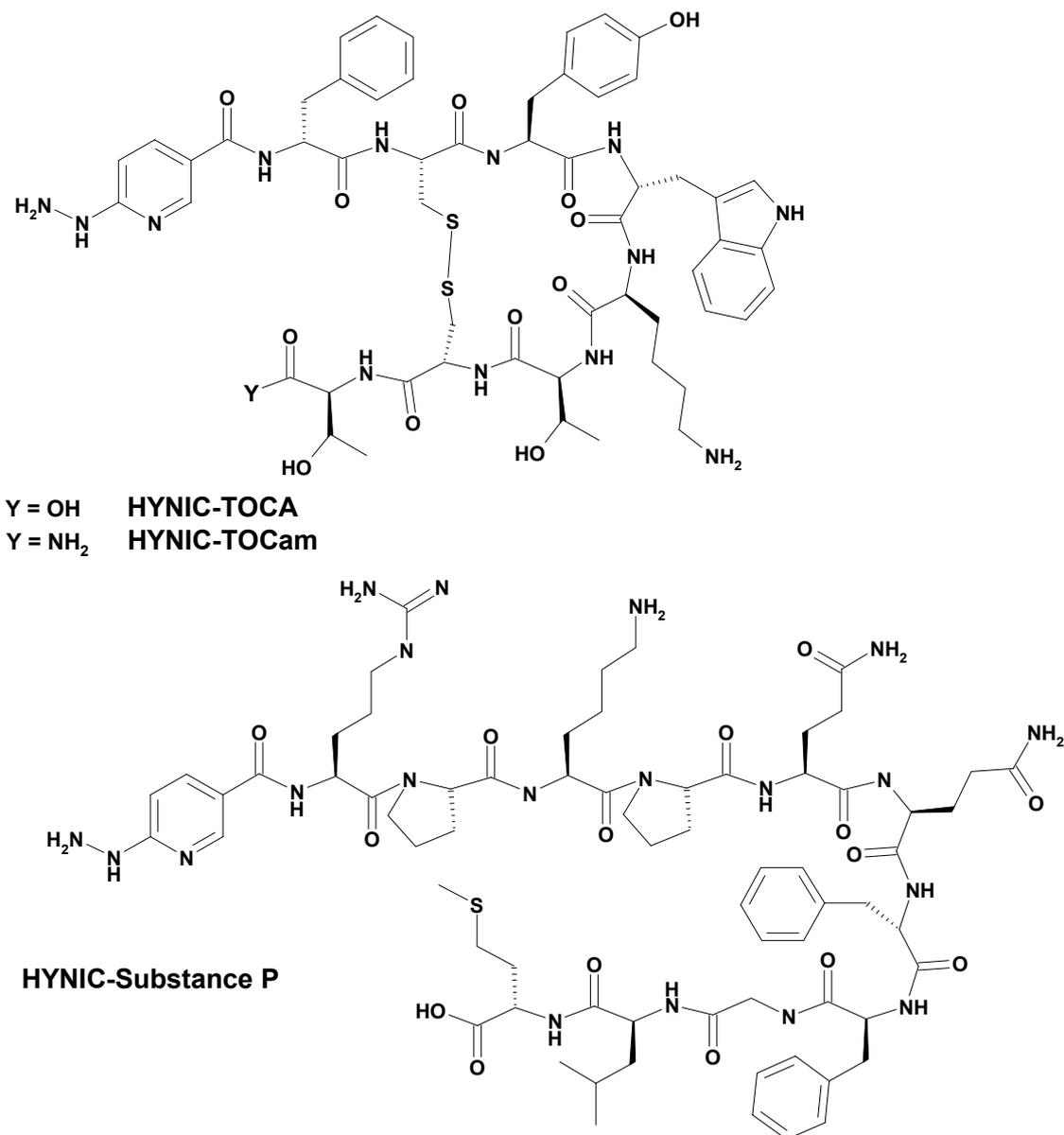


Abbildung 4.2: Die untersuchten, HYNIC-konjugierten Peptide: HYNIC-TOCA, HYNIC-TOCam und HYNIC-Substance P.

4.2.3 Die prosthetische Gruppe und ihr Radiofluorierungsvorläufer

Da für die Radiofluorierung wegen der relativ kurzen Halbwertszeit von ^{18}F eine kurze Reaktionszeit besonders wichtig ist, stellt die höhere Reaktivität von Aldehyden im Vergleich zu der von Ketonen einen entscheidenden Faktor dar. Außerdem ist die Stabilität der Hydrazone aus Aldehyden im Vergleich zu denen aus Ketonen in wässrigem Medium höher^[146]. Bei der Wahl des Aldehyds ist ferner die höhere Stabilität aromatischer ^{18}F -C-Bindungen im Vergleich zu aliphatischen^[34] zu berücksichtigen. ^{18}F -FB-CHO findet man unter anderem als Zwischenstufe eines Radiosyntheseweges von 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure (^{18}F -FBA)^[77]. Da ^{18}F -FB-CHO bereits zur chemoselektiven

Radiofluorierung mittels Oximbildung^[100] eingesetzt wurde und ein Vergleich der beiden Reaktionstypen nahe liegend und von großem Interesse ist, wurde diese prosthetische Gruppe auch für die hier durchgeführten Untersuchungen ausgewählt. Für die Radiofluorierung wurde die bereits evaluierte Methode ausgehend von 4-Formyl-*N,N,N*-trimethylanilinium Triflat als Vorläufer angewendet^[100,175].

4.3 Synthese der Vorläufer zur Radiofluorierung und ^{99m}Tc-Markierung

4.3.1 Synthese von N-Succinimidyl-6-(Boc-hydrazin)-nicotinsäureester

HYNIC wurde zunächst von Abrams *et al.* als Ligand für ^{99m}Tc entwickelt und zur Markierung von IgG eingesetzt^[176].

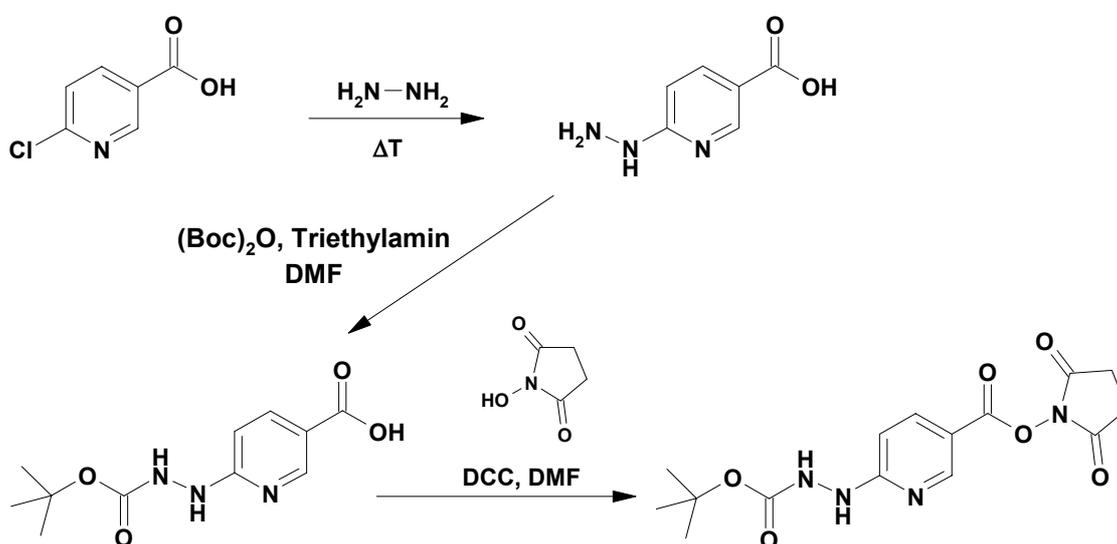


Abbildung 4.3: Synthese von N-Succinimidyl-6-(Boc-hydrazin)-nicotinsäureester (DCC = Dicyclohexylcarbodiimid).

Um eine effiziente Konjugation des Boc-geschützten HYNIC an ein chemisch und thermisch labiles Protein zu erreichen, wurde die Carbonsäure von Abrams *et al.* zum Succinimidyl-Aktivester umgesetzt und anschließend unter milden Bedingungen an ein Protein gekuppelt^[176]. Diese Aktivierung sollte auch hier für die Konjugation mit den ausgewählten Peptiden ausgenutzt werden. Aus diesem Grund wurde der N-Succinimidyl-6-(Boc-hydrazin)-nicotinsäureester (Succinimidyl-Boc-HYNIC) analog der von Abrams *et al.* beschriebenen Synthese^[176] mit ähnlich guten Ausbeuten synthetisiert (siehe Abbildung 4.3).

4.3.2 Synthese der 6-Hydrazin-nicotinsäureamid-konjugierten Peptide

Für die selektive Kupplung von Succinimidyl-Boc-HYNIC an den N-Terminus der cyclisierten Tyr³-Octreotiderivate sowie den von Substance P war die Schützung der Lysinseitenketten notwendig. Diese wurden bereits bei der Peptidsynthese Dde-seitenkettengesetzt eingebaut (siehe Kapitel 3).

Während der ersten Kupplungsreaktion von HYNIC an Lys⁵(Dde)-TOCam zeigte sich, dass trotz Aktivierung der Carboxylgruppe von HYNIC als Succinimidylester wegen der relativen Reaktionsträgheit der N^α-Aminogruppe im Vergleich zur N^ε-Aminofunktion von Lysinseitenketten bei Raumtemperatur keine Umsetzung erfolgte. Aus diesem Grund wurden die Konjugationen an Lys⁵(Dde)-TOCam, Lys⁵(Dde)-TOCA und Lys⁹(Dde)-Substance P bei einer erhöhten Temperatur von 60 °C und unter Zugabe von DIPEA als Base sowie HOBT zur zusätzlichen *in situ*-Aktivierung durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 4 bis 6 h konnte auf diesem Weg eine nahezu quantitative Umsetzung für alle Peptide erreicht werden. Die abschließende Reinigung mittels präparativer HPLC lieferte die HYNIC-funktionalisierten Peptide in Reinheiten > 96 %.

Bei allen drei HYNIC-funktionalisierten Peptiden zeigte sich nach einer längeren Lagerungszeit als Feststoff bei -70 °C eine unerwartete Veränderung: In den HPLC-Qualitätskontrollen, die im direkten Anschluss an die Reinigung nur einen Produktpeak gezeigt hatten, fanden sich im Fall der Octreotidderivate drei basisliniengetrennte Peaks im Verhältnis 26 : 72 : 2 für HYNIC-TOCam ($k_1' = 10.6$, $k_2' = 13.2$, $k_3' = 15.1$; Gradient: 20 - 40 % MeCN (0.1 % TFA) in 20 min), und im Verhältnis 71 : 23 : 6 für HYNIC-TOCA ($k_1' = 6.3$, $k_2' = 7.5$, $k_3' = 8.3$; Gradient: 20 - 70 % MeCN (0.1 % TFA) in 20 min). Im Fall von HYNIC-Substance P wurde eine ähnliche Veränderung festgestellt, allerdings fanden sich nur zwei Peaks im Verhältnis von 90 : 10 ($k_1' = 5.9$, $k_2' = 6.9$; Gradient: 20-70 % MeCN (0.1 % TFA) in 20 min) (siehe Abbildung 4.4). Die nahe liegende Erklärung, dass HYNIC mit weit verbreiteten Carbonylen (Weichmacher, Lösungsmittelverunreinigungen) zu Hydrazonen reagiert hatte, konnte durch massenspektrometrische Untersuchung der einzeln präparierten HPLC-Fractionen widerlegt werden. Alle Spektren zeigten neben wenigen, durch die ESI-Quelle verursachten, Fragmenten mit kleineren Massen ausschließlich die Masse der intakten, aber freien HYNIC-Peptide und lieferten keinen Hinweis auf Hydrazone.

Aus der Tatsache, dass die Massenspektren aller drei Peptide ausschließlich die Massen der intakten Verbindungen aufwiesen, konnte geschlossen werden, dass es sich um Isomere

handeln musste, deren Gleichgewichtseinstellung verhältnismäßig langsam war. Diese sollten durch die Konjugation mit HYNIC verursacht werden. Diese Hypothese wurde anschließend durch HPLC-"Reinjektionsexperimente" untersucht. Dazu wurden die einzelnen Fraktionen von HYNIC-TOCam und HYNIC-Substance P aus einem analytischen HPLC-Lauf präpariert und anschließend einzeln erneut injiziert. Es stellte sich heraus, dass tatsächlich ein Gleichgewicht zwischen den isolierten Verbindungen existiert, da jedes HPLC-Chromatogramm der reinjizierten Fraktionen Signale für alle drei bzw. beiden Isomeren aufwies. Dies bestätigt die Annahme einer langsamen Gleichgewichtseinstellung.

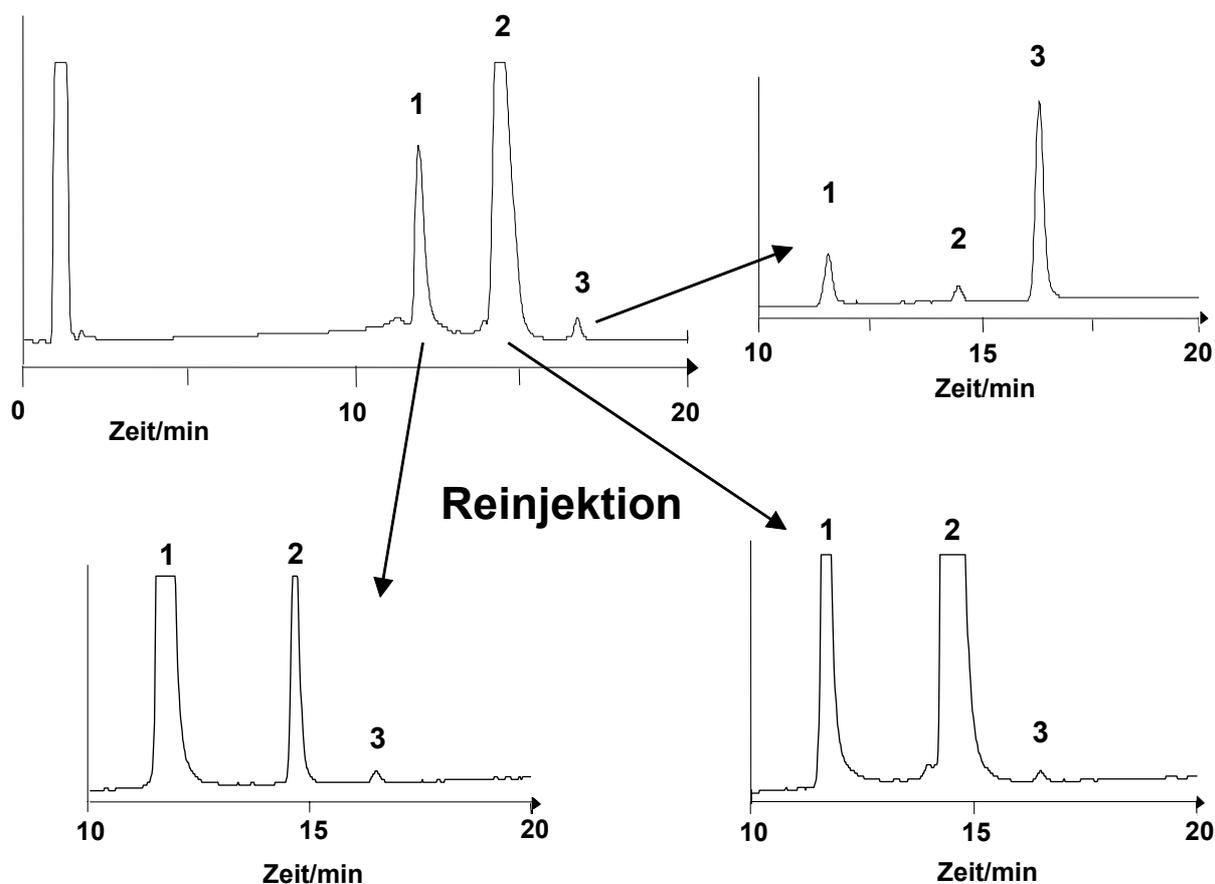


Abbildung 4.4: UV-HPLC-Chromatogramm des Reinjektionsexperiments von HYNIC-TOCam (Gradient: 20 - 40 % MeCN (0.1 % TFA) in 20 min, 220 nm).

Im Fall von HYNIC-Substance P wurden zusätzlich die reinjizierten Verbindungen erneut aufgefangen, und diese Fraktionen massenspektrometrisch untersucht. Wiederum wurden ausschließlich die Masse von HYNIC-Substance P und durch die ESI-Quelle verursachte Fragmente gefunden. Dabei wurde deutlich, dass die Fragmentierungsmuster der jeweils ersten und der jeweils zweiten Fraktionen vor und nach Reinjektion identisch waren. Diese Experimente bestätigten die Annahme, dass es sich bei den isolierten Verbindungen um Isomere handelt. In den untersuchten Markierungsreaktionen fand sich kein Einfluss dieser

Aufspaltung (siehe Kapitel 4.4.3 und Kapitel 4.6). Zudem zeigte die UV-Spur (220 nm) der HPLC-Chromatogramme der Radiofluorierungsansätze nur einen Peptidpeak. Erst bei pH-Werten > 6 entstanden erste kalte Nebenprodukte (≤ 25 % durchschnittlich) nach 10 minütiger Reaktion bei 90 °C. Bei der Radiofluorierung zeigten sich zudem sehr ähnliche Verläufe der Abhängigkeiten der Markierungsausbeute von freiem HYNIC und HYNIC-TOCA vom pH-Wert (siehe Kapitel 4.4).

4.3.3 Radiofluorierung der prosthetischen Gruppe - [^{18}F]FB-CHO

Als Vorläufer für [^{18}F]FB-CHO bietet sich 4-Formyl-*N,N,N*-trimethylanilinium Triflat an, da die *N,N,N*-Trimethylammoniumgruppe eine sehr gute Abgangsgruppe ist. Außerdem weist dieser Markierungsvorläufer gegenüber der Alternative, 4-Nitrobenzaldehyd, einen Vorteil auf: der geladene Vorläufer lässt sich zur Reinigung vom ungeladenen Produkt [^{18}F]FB-CHO gut abtrennen. Die direkte nukleophile ^{18}F -Fluorierung von 4-Formyl-*N,N,N*-trimethylanilinium Triflat unter Austausch der *N,N,N*-Trimethylammoniumgruppe gegen [^{18}F]Fluorid wurde bereits beschrieben^[100,175] und in dieser Arbeit unter leicht abgewandelten Bedingungen in DMSO durchgeführt (siehe Abbildung 4.5).



Abbildung 4.5: ^{18}F -Fluorierung von 4-Formyl-*N,N,N*-trimethylanilinium Triflat zu [^{18}F]FB-CHO.

Die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 90 °C bei gleichzeitiger Verkürzung der Reaktionszeit auf nur 5 min verringerte bei gleich bleibender Ausbeute die Menge der entstehenden Nebenprodukte. Bei diesen handelte es sich vor allem um 4-Formyl-*N,N*-dimethylanilin und um 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure ([^{18}F]FBA). Diese beiden Nebenprodukte machten eine Reinigung mittels Radio-HPLC unumgänglich. Versuche, eine Aufreinigungsmethode mittels eines Kartuschensystems zu etablieren, lieferten das Produkt meist mit Restverunreinigung durch 4-Formyl-*N,N*-dimethylanilin. Nach der Radio-HPLC-Präparation und der anschließenden Isolierung mittels Festphasenextraktion konnte [^{18}F]FB-CHO in einer nicht optimierten Gesamtsynthesedauer von durchschnittlich 45 min mit einer radiochemischen Reinheit von 99 % und einer RCA von 55 – 75 % (EOB = end of bombardment) in 200 - 500 μl MeCN hergestellt werden.

4.4 Evaluierung der Radiofluorierung mittels Hydrazonbildung

Zur Untersuchung, in wieweit sich die Hydrazonbildung zur Radiofluorierung von Peptiden eignet, wurde die Effizienz der Konjugation von [^{18}F]FB-CHO an HYNIC, HYNIC-TOCA sowie HYNIC-Substance P (Abbildung 4.6) für den trägerfreien Fall evaluiert. Dabei wurden die Markierungsbedingungen bezüglich pH-Wert, Peptidkonzentration und Reaktionstemperatur optimiert. Die Chemoselektivität der Hydrazonbildung für die gewählten Reaktionsbedingungen wurde ebenfalls untersucht.

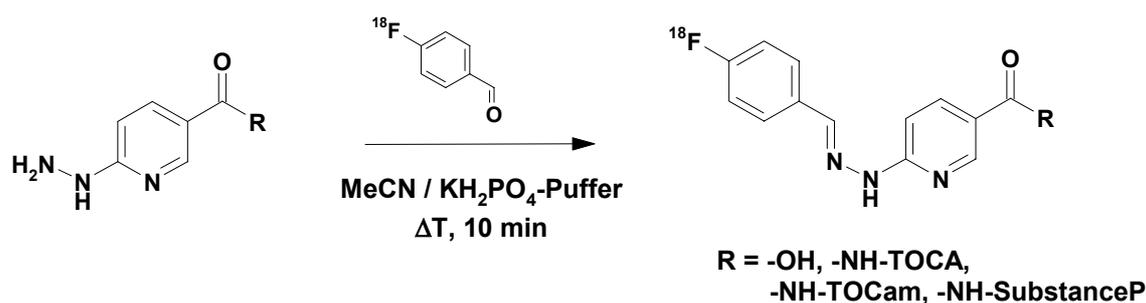


Abbildung 4.6: Reaktionsschema der Hydrazonbildung von [^{18}F]FB-CHO mit HYNIC und HYNIC-konjugierten Peptiden.

4.4.1 Wahl der Reaktionsbedingungen für alle Ansätze

Die Evaluierung der Hydrazonbildung als Methode zur Radiofluorierung von Peptiden wurde in Anlehnung an ähnliche Untersuchungen zur Oximbildung^[100,102] durchgeführt. Zur Einstellung des pH-Werts der Reaktionslösungen wurde ein 50 mM KH_2PO_4 -Puffer (eingestellt auf pH 0.5 - 4 mit H_3PO_4 und auf pH 5 - 9 mit KOH (1 M)) verwendet. Alle Reaktionsansätze bestanden aus 30 μl 50 mM KH_2PO_4 -Puffer, 10 μl der wässrigen Lösung von HYNIC bzw. HYNIC-funktionalisierten Peptid und 10 μl der [^{18}F]FB-CHO-Lösung in MeCN (0.4 - 6.0 MBq). Der exakte pH-Wert der Reaktionslösungen wurde mit einer pH-Elektrode bestimmt.

Da idealerweise die Reaktionszeiten einer Radiofluorierung trotz der für PET-Nuklide verhältnismäßig langen Halbwertszeit von ^{18}F möglichst kurz sein sollten, wurden die Ausbeuten bereits nach 10 min bestimmt. Allerdings sind in der Literatur für die Hydrazonbildung vielfach Reaktionszeiten $> 6 \text{ h}$ ^[148,149] beschrieben. Ebenso ist für eine Temperaturerhöhung von 25 °C auf 37 °C nur eine ca. 2fache Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit^[148] beobachtet worden. Für die hier durchgeführten Experimente wurde deshalb eine erhöhte Reaktionstemperatur gesucht, bei der im Allgemeinen noch keine temperaturbedingte Zersetzung von Peptiden zu erwarten ist. Die Reaktionsansätze wurden,

soweit nicht anders angegeben, 10 min im Ölbad erhitzt und anschließend auf Eis gestellt und zentrifugiert.

4.4.2 Vorversuche mit [^{18}F]FB-CHO und freier HYNIC-Säure

Anhand der Reaktion von [^{18}F]FB-CHO mit der freien HYNIC-Säure wurde die grundsätzliche Anwendbarkeit der Hydrazonbildung zur Radiofluorierung untersucht. Zusätzlich wurden durch diese Versuche die Reaktionsbedingungen für die Optimierung der Reaktion mit HYNIC-funktionalisierten Peptiden eingegrenzt.

In der Literatur wird für die Hydrazonbildung ein optimaler pH-Bereich von 4.0 - 5.5^[148,149,151] angegeben. Aus diesem Grund wurde für die ersten Untersuchungen der Reaktion ein 50 mM KH_2PO_4 -Puffer, pH 5, verwendet.

Bei der Umsetzung von [^{18}F]FB-CHO mit HYNIC-Säure (2.1 mM) entstand nach 10 min sowohl bei 70 °C als auch bei 90 °C ausschließlich ein radioaktives Produkt, bei dem es sich um das gewünschte Hydrazon handelte. Die Ausbeuten dieser ^{18}F -Markierung waren mit $65 \pm 4 \%$ bei 70 °C und mit $68 \pm 6 \%$ bei 90 °C vergleichbar hoch (siehe auch Abbildung 4.11). Da die Markierungsausbeute bei 90 °C ein wenig höher war, wurde diese Temperatur bei den folgenden Experimenten, soweit nicht anders angegeben, als Standardtemperatur gewählt. Die Ansätze mit einer HYNIC-Konzentration von 0.5 mM lieferten geringe Ausbeuten von $32 \pm 3 \%$ (siehe auch Abbildung 4.10). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Hydrazonbildung grundsätzlich zur Radiofluorierung geeignet ist. Die Reaktion ist schnell und vorteilhafterweise in wässrigem, gepuffertem Medium möglich.

4.4.3 Abhängigkeit der Markierungsausbeute vom pH-Wert

Nach diesen Vorversuchen wurde die Abhängigkeit der Markierungsausbeute vom pH-Wert im Bereich zwischen pH 0.5 und 8.0 evaluiert, wobei die pH-Elektrodenmessungen der Reaktionslösung als Grundlage dienten. Außerdem wurde die Übertragbarkeit der Hydrazonbildung auf die ^{18}F -Markierung von ungeschützten Peptiden HYNIC-TOCA und HYNIC-Substance P mit [^{18}F]FB-CHO untersucht. Aufgrund oben beschriebener Vorversuche wurden die folgenden Experimente mit einer HYNIC- bzw. HYNIC-Peptidkonzentration von 2.1 mM im Reaktionsansatz bei 90 °C durchgeführt.

Für die Hydrazonbildung von [^{18}F]FB-CHO mit freiem HYNIC und HYNIC-TOCA fanden sich, wie aus Abbildung 4.7 ersichtlich, dieselben Abhängigkeiten der

Reaktionsausbeuten vom pH-Wert: Im Bereich von pH 0.5 bis pH 5.0 für HYNIC und bis pH 5.5 für HYNIC-TOCA zeigte sich keine relevante Abweichung vom Durchschnittswert von 66 ± 6 % bzw. 67 ± 5 %. Allerdings sinkt die Ausbeute von $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC}$ mit $\text{pH} > 5.5$ langsamer ab als die von $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$. Diese pH-Abhängigkeiten widersprechen den von Chenevier et al. gefundenen Abhängigkeiten der Reaktionsgeschwindigkeiten vom pH-Wert, bei denen im stark Sauren die Protonierung der Hydrazinfunktion die Reaktion verlangsamt^[151]. Für die Markierung von HYNIC und HYNIC-TOCA sanken die Ausbeuten mit zunehmendem pH-Wert der Reaktionslösung schnell auf unter 10 % bei pH 7.7 bzw. 7 ab.

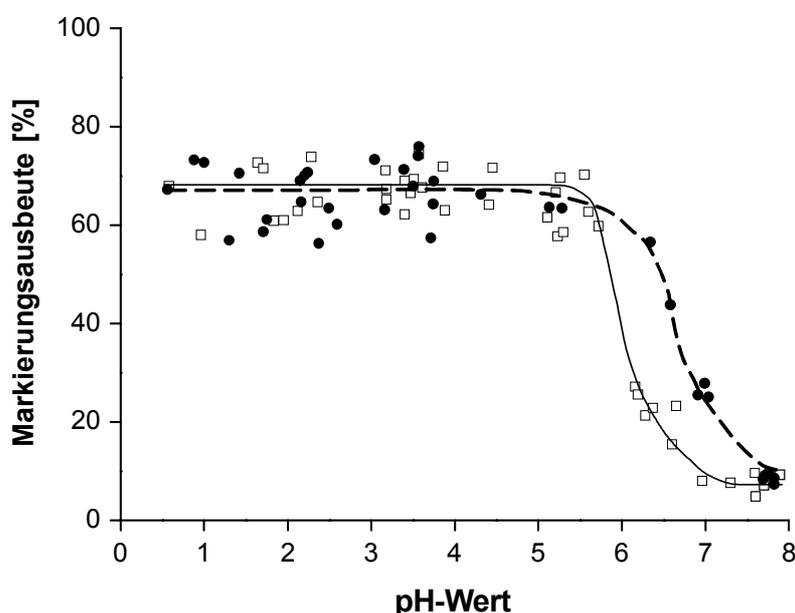


Abbildung 4.7: Abhängigkeit der Markierungsausbeute an $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC}$ (●) und $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$ (□) [%] vom pH-Wert zwischen 0.5 und 8 (Reaktionsbedingungen: 90°C , 10 min, 2.1 mM HYNIC- bzw. HYNIC-Peptidkonzentration).

Bei der Hydrazonbildung mit HYNIC und HYNIC-TOCA entstanden nur geringe Mengen an Nebenprodukten, die in der Summe einen Anteil von 2 % nicht überschritten. Eines dieser Nebenprodukte konnte als 4- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorbenzoesäure}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FBA}$) identifiziert werden, die durch *in situ*-Oxidation des Aldehyds in geringem Maße (≤ 1.5 %) entsteht. Ausnahmen stellen die Reaktionen von HYNIC im pH-Bereich > 6 dar: In diesem Bereich nimmt der Anteil an einem unidentifizierten, sehr hydrophilen, radioaktiven Nebenprodukt bis auf 10 % zu. Da dieser pH-Bereich für die Radiomarkierung aufgrund der geringen Ausbeute nicht relevant ist, wurde dieses Nebenprodukt nicht weiter untersucht. Bei der Reaktion von $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$ mit HYNIC-TOCA trat dagegen im Sauren ab $\text{pH} < 2$ ein Anteil von bis zu 5 %

an radioaktiven, unidentifizierten Nebenprodukten auf. Auch in diesem Fall ist der entsprechende pH-Bereich für eine Routinemarkierung von Peptiden nicht von Bedeutung.

Im Gegensatz zu den pH-Abhängigkeiten der ^{18}F -Markierung von HYNIC und HYNIC-TOCA zeigte die der Radiofluorierung von HYNIC-Substance P einen abweichenden Verlauf (siehe Abbildung 4.8). Grundsätzlich unterscheidet sich in diesem Fall die Hydrazonbildung durch die geringeren Ausbeuten von $56 \pm 9\%$ zwischen pH 3 und 5. Außerdem nahmen die Ausbeuten sowohl bei höheren als auch bei niedrigeren pH-Werten ab.

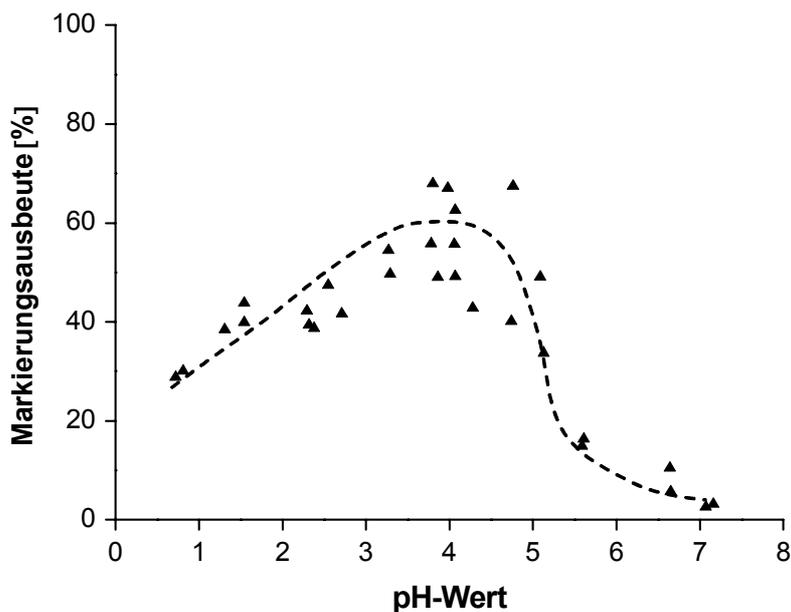


Abbildung 4.8: Markierungsausbeute an ^{18}F FB-CH=N-HYNIC-Substance P (\blacktriangle) [%] in Abhängigkeit vom pH-Wert zwischen 0.5 und 8 (Reaktionsbedingungen: 90°C , 10 min, 2.1 mM HYNIC-Substance P-Konzentration;).

Neben der niedrigeren Ausbeute bildeten sich während der Radiofluorierung von HYNIC-Substance P im Vergleich zu den Reaktionen von HYNIC und HYNIC-TOCA Nebenprodukten in höhere Zahl und Ausbeute. Dies wurde insbesondere für die Konjugation im sauren Bereich ($\text{pH} < 2$) beobachtet, wodurch der Abfall der Markierungsausbeute in diesem pH-Bereich verursacht wird.

Durch Vergleichsansätze mit ^{19}F FB-CHO konnten zwei maßgebliche Nebenprodukte mittels Massenspektrometrie identifiziert werden (siehe Abbildung 4.9):

- Ein im Vergleich mit dem Produkt hydrophileres Nebenprodukt (**I**, $k' = 8.3$ (22 – 50 % MeCN (0.1 % TFA) in 20 min)), das eine ähnliche pH-Abhängigkeit wie das Produkt zeigte, stellte sich als Sulfoxid, dem Oxidationsprodukt der Methioninseitenkette, heraus. Der Anteil dieses Nebenprodukts machte 0.5 – 4 % aus.

- Ein geringfügig lipophileres Nebenprodukt (**II**, $k' = 10.9$ (22 – 50 % MeCN (0.1 % TFA) in 20 min)), das ausschließlich im pH-Bereich ≤ 2 auftrat, konnte als Hydrolyseprodukt von Glutamin zu Glutaminsäure^[177] identifiziert werden. Der Anteil dieser Verbindung betrug bis zu 37 % bei pH 1 und übertraf damit den Anteil an gewünschtem Produkt. Da bei $\text{pH} \leq 2$ vermehrt Nebenprodukte bei der ^{18}F -Markierung von HYNIC-Substance P gefunden wurden, erscheint dieser pH-Bereich für Routineradiofluorierung von Peptiden zu sauer.

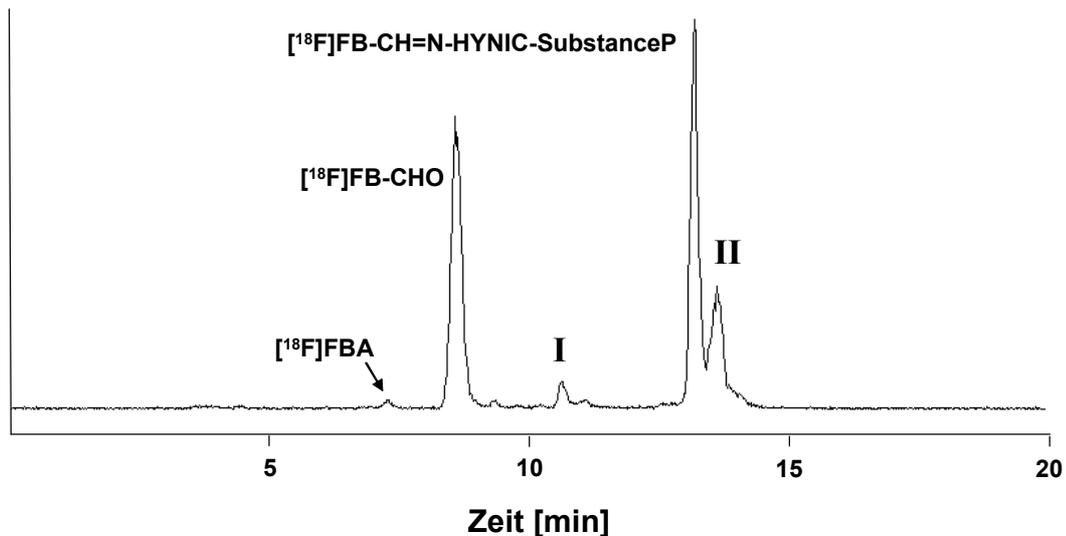


Abbildung 4.9: Radio-HPLC-Chromatogramm (22 – 50 % MeCN (0.1 % TFA) in 20 min) eines Radiofluorierungsansatzes von HYNIC-Substance P mit ^{18}F -FB-CHO bei pH 1.3 (Reaktionsbedingungen: 90°C , 10 min, 2.1 mM Peptidkonzentration).

Die Untersuchungen der pH-Abhängigkeit der Ausbeute der Reaktion von ^{18}F -FB-CHO mit HYNIC und HYNIC-funktionalisierten Peptiden bestätigten die Anwendbarkeit der Hydrazonbildung als Markierungsreaktion von Peptiden vor allem im pH-Bereich 4 - 5. Die mechanistisch ähnliche, sehr effiziente Oximbildung führt hingegen vor allem im Sauern ($\text{pH} \sim 2.5$) zu hohen Markierungsausbeuten. Im Fall von Substance P, welche im pH-Bereich ≤ 2 Nebenprodukte bildete, erscheint die Hydrazonbildung gegenüber der Oximbildung deutlich im Vorteil, da sie auch unter weniger sauren Bedingungen effizient abläuft.

4.4.4 Abhängigkeit der Markierungsausbeute von der Peptidkonzentration

Die Gültigkeit der für HYNIC gefundenen Abhängigkeit der Markierungsausbeute von der Peptidkonzentration wurde für HYNIC-funktionalisiertes TOCA über einen breiten Konzentrationsbereich (66.2 μM – 4.2 mM) untersucht. Hierzu wurden die Reaktionsansätze nach Standardmethode wie in Kapitel 4.4.1 und Kapitel 4.4.2 beschrieben angesetzt (30 μl 50 mM KH_2PO_4 -Puffer (pH 5), 10 μl Peptidlösung, 10 μl [^{18}F]FB-CHO-Lösung in MeCN) und 10 min auf 90 °C erhitzt.

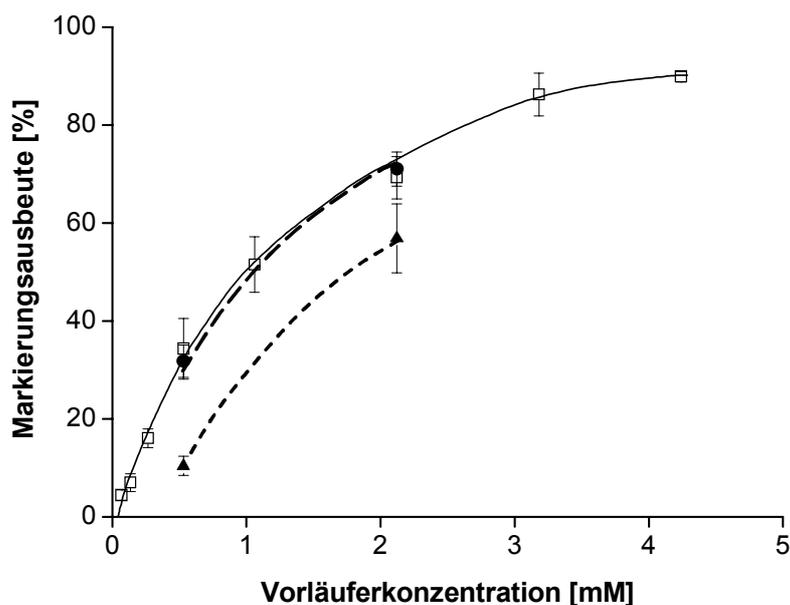


Abbildung 4.10: Markierungsausbeute an [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC (●), [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA (□) und [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-Substance P (▲) [%] in Abhängigkeit von der HYNIC- bzw. der HYNIC-Peptidkonzentration zwischen 66.3 μM und 4.2 mM (Reaktionsbedingungen: 90°C, 10 min, 50 mM KH_2PO_4 -Puffer (pH 5); Daten als $\bar{x} \pm \sigma$; n = 3).

Die Ergebnisse stimmen mit den im Vorversuch für HYNIC gefundenen Daten überein (siehe Kapitel 4.4.2). Wie aus Abbildung 4.10 ersichtlich, nimmt mit steigender Peptidkonzentration die Ausbeute an [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA kontinuierlich zu und erreicht bei 4.2 mM 90 ± 1 %. Höhere Peptidkonzentrationen wurden nicht untersucht, da die Anwendbarkeit der Hydrazonbildung für die Routinemarkierung zu berücksichtigen war, und hohe Peptidmengen im Widerspruch zu einer einfachen Aufreinigung am Ende der Radiosynthese stehen würden. Da die Aufreinigung mittels Festphasenextraktion von peptidischen Verbindungen häufig nicht möglich ist, wäre eine HPLC-Präparation bei großen Peptidmengen nahezu unumgänglich.

Auch die Radiomarkierung von HYNIC-Substance P wurde für die Peptidkonzentrationen 0.5 und 2.1 mM betrachtet. Hier spiegelt der niedrigere Verlauf der Kurve der Markierungsausbeute die schlechtere Markierbarkeit von HYNIC-Substance P im

Vergleich zu HYNIC und HYNIC-TOCA wider. Wie bereits bei den pH-Abhängigkeiten festgestellt, ist die Ausbeute bei 2.1 mM um 12 % und bei 0.5 mM sogar um 23 % niedriger als für HYNIC und HYNIC-TOCA.

4.4.5 Abhängigkeit der Markierungsausbeute von der Reaktionstemperatur

Die in Kapitel 4.4.1 beschriebenen Vorversuche mit HYNIC zeigten eine leichte Erhöhung der Markierungsausbeute bei einer Temperaturerhöhung von 70 °C auf 90 °C. Im nächsten Schritt sollte der Einfluss der Temperatur auf die Ausbeute der Hydrazonbildung über einen weiteren Bereich und für Peptide bei einer Konzentration von 2.1 mM untersucht werden. Hierzu wurde HYNIC-TOCA bei Reaktionstemperaturen von 24 - 90 °C mit [¹⁸F]FB-CHO unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 4.4.1 und Kapitel 4.4.2) umgesetzt.

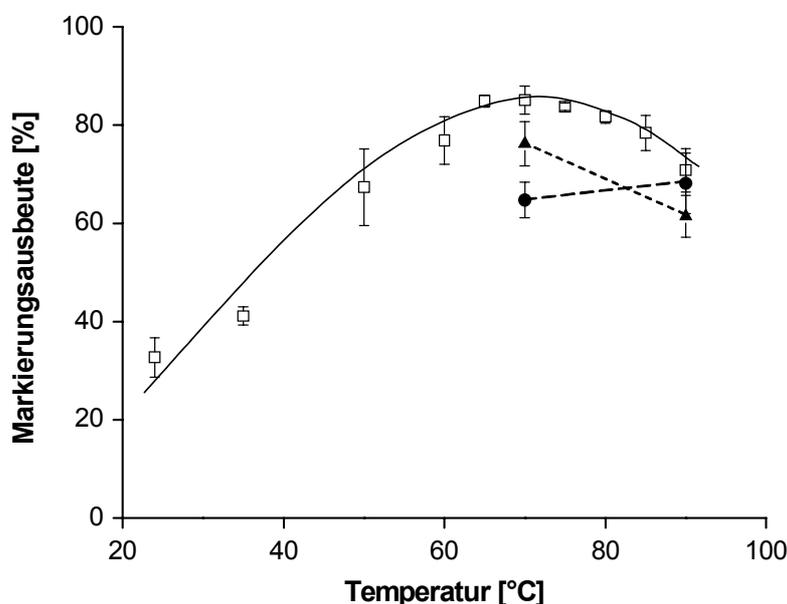


Abbildung 4.11: Markierungsausbeute an [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC (●), [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA (□) und [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-Substance P (▲) [%] in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur zwischen 24 °C und 90 °C (Reaktionsbedingungen: 2.1 mM, 10 min, 50 mM KH₂PO₄-Puffer (pH 5); Daten als $\bar{x} \pm \sigma$; n = 3).

Interessanterweise zeigte sich für die ¹⁸F-Markierung von HYNIC-TOCA mit steigender Temperatur ein anders Verhalten als nach den Vorversuchen mit HYNIC erwartet (siehe Abbildung 4.11). Die Ausbeute an [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA nimmt mit steigender Reaktionstemperatur bis auf 85 ± 3 % bei 70 °C zu. Bei höheren Temperaturen dagegen sinkt die Ausbeute wieder ohne Anzeichen einer Peptidzersetzung bzw. einer Zunahme an Nebenprodukten. Ein Grund für dieses Verhalten wurde gefunden durch den Vergleich der Markierungsausbeute eines Reaktionsansatzes bei 90 °C, der nach Beenden der Reaktion auf Eis gekühlt und zentrifugiert wurde (Standardvorgehensweise), und eines

Reaktionsansatzes, mit dem nicht so verfahren wurde. Zweiterer zeigte ca. 20 % mehr Ausbeute. Offensichtlich verdampft bei 90 °C ein Teil des [¹⁸F]FB-CHO, der bei der Ausbeutebestimmung des Ansatzes ohne Kühlung und Zentrifugation dann nicht berücksichtigt wurde, wodurch der Produktanteil höher erscheint. Dieser verdampfte Anteil des [¹⁸F]FB-CHO steht für die Reaktion nicht mehr zur Verfügung, wodurch das Absinken bei Reaktionstemperaturen > 70 °C erklärt wird. Bei 70 °C verdampft [¹⁸F]FB-CHO nicht oder in weitaus geringerem Umfang (Siedepunkt von 4-Fluorbenzaldehyd = 181 °C (758 mm Hg)). Da alle Standardansätze nach der Reaktion auf Eis gestellt wurden, wurde bei allen der gesamte Anteil an unreaktiertem [¹⁸F]FB-CHO detektiert.

Eine Abnahme der Ausbeute bei Temperaturen > 70 °C wurde auch für HYNIC-Substance P gefunden, wobei hier die Ausbeuten grundsätzlich ca. 10 % niedriger waren als die von HYNIC-TOCA.

4.4.6 Untersuchung der Chemoselektivität der Hydrazonbildung

Wie bereits gezeigt^[100], reagiert [¹⁸F]FB-CHO in Anwesenheit von Aminoxyessigsäure nicht mit den funktionellen Gruppen von Cystein, Lysin, Arginin, Serin und Histidin (pH 4, 60 °C, 25 min). In Abwesenheit der Aminoxyfunktion dagegen zeigte nur Cystein eine Reaktion mit dem Aldehyd.

Wie bei der Radiomarkierung von ungeschütztem HYNIC-TOCA und HYNIC-Substance P dargestellt, bildeten sich unter den jeweiligen Reaktionsbedingungen keine Nebenprodukte (< 1%), die auf eine Reaktion des [¹⁸F]FB-CHO mit einer funktionellen Gruppe der Aminosäureseitenketten, wie der des Lysins, Threonins, Arginins, Glutamins oder einer freien Carbonsäure schließen ließen.

Um die Reaktivität von [¹⁸F]FB-CHO gegenüber Histidin und Cystein unter den hier verwendeten Reaktionsbedingungen (Puffer pH 5, 90 °C, 10 min) zu untersuchen, wurden diese Aminosäuren in fünffachem Überschuss zu HYNIC (10.6 mM) sowohl in dessen Anwesenheit als auch dessen Abwesenheit mit [¹⁸F]FB-CHO umgesetzt. In Abwesenheit von HYNIC bildete sich nur mit Cystein ein radioaktives Produkt, mit bis zu 5 % Ausbeute. In Anwesenheit von HYNIC entstand dasselbe Nebenprodukt in geringerem Anteil von 0.5 - 2.5 % ohne eine damit einhergehende Verminderung der Produktausbeute. In Peptiden kommt allerdings selten freies Cystein vor, da es gewöhnlich, zu Disulfidbrücken oxidiert, zur Stabilisierung der Sekundärstruktur dient. Histidin zeigte dagegen keine Reaktivität

gegenüber [^{18}F]FB-CHO. Diese Ergebnisse sind ähnlich den Ergebnissen die mit Cystein bzw. Histidin, Aminoxyessigsäure und [^{18}F]FB-CHO beobachtet wurden^[100].

Da Arginin sowie die Glutamine die einzigen abweichenden Aminosäuren in Substance P von denen in TOCA sind, sollte ihre Relevanz für die geringere Radiomarkierungsausbeute von HYNIC-Substance P untersucht werden. Deshalb wurden Reaktionen mit diesen Aminosäuren und HYNIC wie oben beschrieben durchgeführt. Die funktionellen Gruppen beider Aminosäuren reagierten nicht mit [^{18}F]FB-CHO und führten auch nicht zu einer Verminderung der Konjugationsausbeute mit HYNIC.

Diese Experimente bestätigten die hohe Chemoselektivität der Hydrazonbildung, die den Einsatz ungeschützter Peptide ermöglicht.

4.4.7 Vergleich der Hydrazonbildung zur ^{18}F -Markierung von Peptiden mit der Oximbildung

Um die hier untersuchte Methode zur Radiofluorierung von Peptiden mit der Oximbildung besser vergleichen zu können, wurde die Markierungsausbeute von HYNIC-TOCA bei einer verlängerten Reaktionszeit von 15 min sowohl bei 90 °C als auch bei 70 °C unter Standardbedingungen bestimmt. Durch die längere Reaktionszeit konnte eine deutlich gesteigerte Ausbeute bei 90 °C von $82 \pm 3 \%$ gegenüber $67 \pm 5 \%$ erreicht werden. Die Ausbeuten bei 70 °C dagegen ließen sich nach 15 min gegenüber denen nach 10 min nur auf $89 \pm 1 \%$ steigern. Damit sind die Markierungsausbeuten der Hydrazonbildung und die der Oximbildung nach 15 min vergleichbar hoch (89% gegenüber $80 - 85 \%$). Somit stellt die Hydrazonbildung also eine gute Alternative zur chemoselektiven Radiofluorierung von Peptiden unter weniger sauren Bedingungen dar. Allerdings benötigt man für ähnliche Ausbeuten mittels Hydrazonbildung eine ca. vierfach höhere Peptidkonzentration als für die Oximbildung. Übertragen auf einen großen Maßstab von 200 – 400 MBq Produkt würde diese Peptidkonzentration keinen Verzicht auf eine abschließende Aufreinigung des Radiotracers erlauben. Durch eine Erhöhung der Aktivitätskonzentration an [^{18}F]FB-CHO im Kartuscheneluat, entweder durch Einsatz einer höheren Aktivitätsmenge oder durch Reduktion des Elutionsvolumens und daraus folgend einer Reduktion des Reaktionsvolumens der Peptidkonjugation, könnte die Menge an einzusetzendem Peptid allerdings vermindert werden. Für den Fall, dass sich eine Aufreinigung vollständig vermeiden ließe, müsste [^{18}F]FB-CHO in einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, z.B. Ethanol, zum Reaktionsansatz gegeben werden.

4.4.8 Radiosynthese von [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-Peptiden

Eine ^{18}F -Markierung von Peptiden mittels Hydrazonbildung für die Evaluierung der Tracer wurde nur für HYNIC-TOCA und HYNIC-TOCam in einem größeren Maßstab durchgeführt. Die Markierungsreaktion von [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA und [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam erfolgte unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Ergebnisse bei 70 °C, pH 5 (50 mM KH_2PO_4 -Puffer) und 2.1 mM Peptidkonzentration in 10 min. Anschließend wurde das Produkt mittels präparativer HPLC isoliert.

Bei der Optimierung der Isolierung der [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-Octreotidderivate erwies sich die Tendenz der Verbindungen, an den unterschiedlichsten Oberflächen wie Kunststoff, Kartuschenmaterial oder Glas adsorbiert zu werden, als größte Schwierigkeit. Die [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-Octreotidderivate konnten auch durch eine Erhöhung des Anteils an organischen Lösungsmitteln nicht wieder vollständig von den Oberflächen gelöst werden. Da bei der Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum stets ein Großteil der Aktivität im Kolben verblieb, wurde die Aufkonzentrierung mittels Festphasenextraktion durchgeführt, wodurch sich zudem eine Zeitersparnis ergab. Dabei konnte die beste Wiederfindungsrate (85 - 95 %) mit einer schwach hydrophoben, so genannten tC_2 -Kartusche (Waters) durch Elution mit einem EtOH-Volumen von bis zu 1 ml erzielt werden. Ähnlich wie bei der Festphasenextraktion des [^{18}F]FB-CHO ist auch bei dieser Synthesestufe die Aktivitätskonzentration des Produkts im Kartuscheneluat ein wichtiger Faktor, da sich hier die verabreichbare Menge EtOH limitierend auswirkt. Unter Vernachlässigung der Wiederfindungsrate ließ sich die Aktivitätskonzentration deutlich steigern, da dann ein Großteil des Produkts ($70 \pm 5 \%$) in einem sehr kleinen Volumen von weniger als 100 μl eluiert werden konnte. Mit dieser Methode konnten Radiochemische Ausbeuten an [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-Octreotidderivat bis zu 42 % (EOB) in durchschnittlich 110 min Gesamtreaktionszeit erreicht werden.

4.5 Untersuchung der radiofluorierten Hydrazone

Für die Untersuchungen der Lipophilie, der Stabilität in verschiedenen Medien und für eine initiale Biodistributionsuntersuchung wurden die ^{18}F -markierten HYNIC-funktionalisierten Octreotidderivate verwendet, da für Tyr³-Octreotide zahlreiche Referenzdaten vorliegen^[49,64,66,35]. Durch Vergleich mit den Literaturdaten konnte der Einfluss der Markierungsmethode nahezu isoliert betrachtet werden.

4.5.1 Physikalische Eigenschaften der [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-Peptide

Da der Vergleich der Lipophilien der [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-Octreotidderivate mit denen ähnlicher Verbindungen Informationen über die Auswirkungen der Markierungsmethode auf das *in vivo*-Verhalten der [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-Octreotidderivate^[34,36] liefern kann, wurde diese nach Standardmethoden^[35] als $\log P_{\text{ow}}$ (P_{ow} = Verteilungskoeffizient(Octanol/Wasser)) bestimmt. Für [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA wurde ein $\log P_{\text{ow}}$ von 1.49 ± 0.09 gefunden (siehe Tabelle 8.3, Anhang). Verglichen mit [^{125}I]TOCA ($\log P_{\text{ow}}$ von -0.77 ± 0.04) ist dieser Wert sehr hoch. Durch die Wahl eines geeigneten Aldehyds mit geladenen und/oder hydrophilen Gruppen oder durch Glykosylierung des Peptidgerüsts könnte die Lipophilie der [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-Peptide gesenkt werden, was einen vorteilhaften Einfluss auf die *in vivo*-Charakteristika des Tracers haben könnte.

4.5.2 pH-Abhängigkeit der Stabilität der Hydrazonbindung

Die Stabilität von Hydrazonen bei neutralen pH-Werten und ihre säurekatalysierte Hydrolyse ist in der Literatur vielfach beschrieben^[146-151], wobei die detailliertesten Untersuchungen für die Freisetzung von Doxorubicin, einem Keton, vorliegen^[147,150]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich diese Daten für [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam bestätigen lassen. Das konjugierte System von [^{18}F]FB-CHO in Kombination mit einem elektronenziehenden Substituenten in Paraposition sollte die Stabilität der daraus resultierenden Hydrazone erhöhen. Eine Instabilität der Hydrazonbindung bei pH-Werten < 7 könnte ein Aktivitäts-"Trapping" in Tumorzellen und damit eine Erhöhung des Tumor/Hintergrund-Verhältnisses beim Imaging mit ^{18}F -markierten Peptiden ermöglichen. Diese Möglichkeit der Akkumulation beruht auf der Annahme, dass die Hydrazonbindung des intakten Tracers nach Internalisierung durch den schwach sauren

pH-Wert in den endosomalen und lysosomalen Kompartments^[150,152] und im Mikroenvironment einiger Tumore^[178] gespalten wird. Der dadurch freigesetzte Aldehyd bzw. das Oxidationsprodukt, die Carbonsäure, sollte in der Zelle verbleiben und sich anreichern, da geladene Verbindungen zumeist eine verminderte Membranpermeabilität aufweisen^[49,179,180].

Die säurekatalysierte Rückreaktion des Hydrazons in die Einzelkomponenten wurde bei 37 °C über einen Zeitraum von 5 h verfolgt. Dazu wurden die Anteile an [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam, [¹⁸F]FB-CHO und [¹⁸F]FBA sowie die möglicher Verunreinigungen in den Proben bei pH 7.5, 5.5 und 4.0 nach je 5, 90, 180 und 300 min mittels Radio-HPLC bestimmt. Für diese Experimente wurde [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam wie in Kapitel 4.4.8 beschrieben synthetisiert und isoliert. Dabei wurde das Produkt im ethanolischen Kartuscheneluat mit einer Reinheit von 97 ± 1 % mit [¹⁸F]FB-CHO und [¹⁸F]FBA als Verunreinigungen erhalten. Über einen Zeitraum von 6 h bei RT nahm der Anteil dieser Verunreinigungen in dieser Referenzlösung um insgesamt 4 % zu. Für die Durchführung der Stabilitätsstudien wurde das ethanolische Kartuscheneluat mit [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam im Verhältnis 1 : 3 in Puffer (pH 7.5, 5.5 und 4.0; 50 mM KH₂PO₄-Puffer) gegeben.

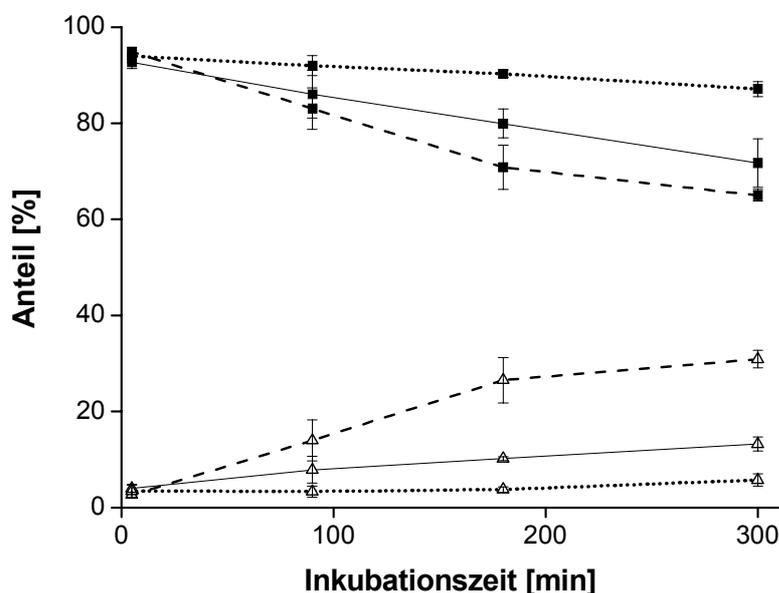


Abbildung 4.12: Hydrazonstabilität von [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam (■) und Freisetzung von [¹⁸F]FB-CHO (Δ) bei pH 7.5 (.....), pH 5.5 (—) und pH 4 (— —) nach 5, 90, 180 und 300 min Inkubation bei 37°C in 50 mM KH₂PO₄-Puffer (Daten als $\bar{x} \pm \sigma$; n = 3).

Abbildung 4.12 stellt die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam dar. In allen Experimenten nahm die Menge an intaktem Tracer mit der Zeit kontinuierlich ab und die von [¹⁸F]FB-CHO und [¹⁸F]FBA zu

(siehe Tabelle 8.1, Anhang). Allerdings waren deutliche Unterschiede im Ausmaß der Hydrazonspaltung in Abhängigkeit vom pH-Wert erkennbar. Das intakte, radiofluorierte Peptid zeigte bei pH 7.5, wie erwartet, eine hohe Stabilität. Nach 5 h waren noch 87 ± 1 % des intakten Tracers vorhanden. Neben den Hauptabbauprodukten $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$ (6 ± 1 %) und $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ (3 ± 1 %) waren vernachlässigbar geringe Mengen an unbekanntem Verunreinigungen detektierbar. Bei pH 5.5 blieb $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCam}$ zu 72 ± 5 % intakt. Bei pH 4 blieben nur 65 ± 1 % des Tracers unverändert, wogegen 31 ± 2 % $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$ freigesetzt wurden. Interessanterweise ließ sich bei pH 4 nur ca. 1 % $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ nachweisen, während bei pH 5.5 nach 5 h Inkubation nahezu äquivalente Mengen an $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$ (13 ± 1 %) und $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ (10 ± 2 %) gefunden wurden. Bei einer analogen Stabilitätsuntersuchung mit $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$ bei pH 5.5 und bei pH 4.0 stellte sich heraus, dass die Oxidationsstabilität nicht vom pH-Wert der Lösung abhängt (2 ± 1 % $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ bei pH 5.5 gegenüber 1 ± 0.5 % $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ bei pH 4.0). Offensichtlich spielt eine erhöhte Reaktivität des Aldehyds während der Hydrolyse des Hydrazons in Kombination mit dem pH-Wert für die Oxidation zur Carbonsäure eine Rolle. *In vivo* sollte der $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$ schnell durch Enzyme zur Carbonsäure oxidiert werden, und so nur ein Spaltprodukt auftreten^[181,182].

Die Ergebnisse der pH-Abhängigkeit der Hydrazonstabilität stehen im Einklang mit den Literaturangaben und bestärken die Annahme, dass die Spaltung von Hydrazonen unter endosomalen Bedingungen für eine intrazelluläre Aktivitätsretention genutzt werden kann. Diese Instabilität der Hydrazonbindung bei pH-Werten ≤ 5.5 eröffnet einen Weg zur zielgerichteten Freisetzung von radiomarkierten Fragmenten im Zielorgan. Diese Ergebnisse bestätigen außerdem die erhöhte Stabilität der Hydrazone aus aromatischen Aldehyden gegenüber denen aus Ketonen, bei denen nach 5 h ca. 54 % hydrolysiert sind^[147,150]. Allerdings erscheint die hier gefundene Instabilität von $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCam}$ für eine *in vivo*-Anwendung in Relation zur kurzen Halbwertszeit von ^{18}F zu langsam, da nach 90 min sogar bei pH 4 nur 14 ± 4 % $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$ freigesetzt wurden. Deshalb könnte durch Wahl einer geeigneten Carbonylkomponente die Instabilität der Hydrazonbindung erhöht werden. Dabei sollte allerdings die Stabilität bei neutralem pH unbeeinflusst bleiben.

4.5.3 Stabilität von [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam in Serum

Neben der Stabilität der Hydrazonbindung bei unterschiedlichen pH-Werten ist die Stabilität der markierten Peptide gegenüber Proteasen und anderen Enzymen von großem Interesse. Zunächst wurde das Verhalten von [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam in Humanserum bei 37 °C betrachtet. Wegen seiner C-terminalen Amidfunktion war für diesen Tracer eine erhöhte Stabilität zu erwarten. Nach Isolierung des radiomarkierten Peptids mittels Radio-HPLC und anschließendem Neutralisieren der Lösung wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Verbindung in Serum aufgenommen (n = 2).

Nach der 60 minütigen Inkubation der Proben bei 37 °C wurde der intakte Tracer mittels Festphasenextraktion isoliert. Dabei wurde das Produkt in 82 ± 3 % Ausbeute isoliert. 14 ± 0.3 % der Aktivität fanden sich im Kartuschendurchlauf wieder. Wegen des hohen Volumens des Eluats wurde eine zweite Festphasenextraktion mit einer Kartusche mit geringerer Füllmenge angeschlossen, bei der 16 ± 3 % Aktivitätsmenge auf der Kartusche blieben. Das führte zu einer Gesamtausbeute von 73 %. Insgesamt kann also deshalb nur eine Aussage über die Identität des Großteils der Aktivität getroffen werden.

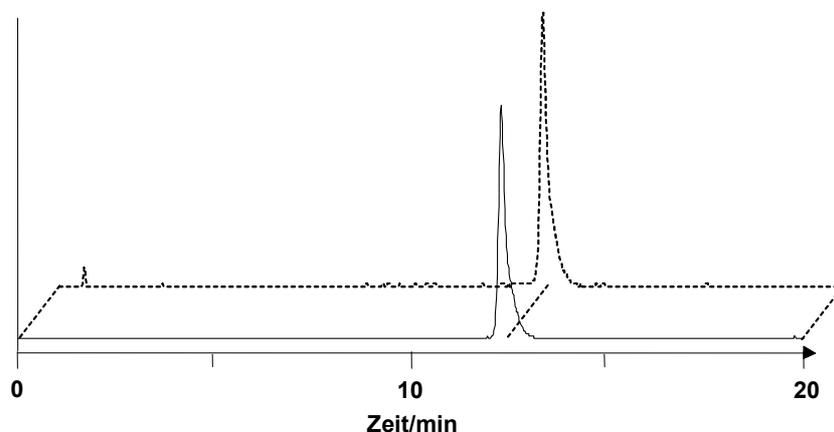


Abbildung 4.13: Radio-HPLC-Chromatogramm (Gradient: 20-70 % MeCN (0.1 % TFA) in 20 min) der Stabilitätsuntersuchung von [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam in Serum nach 60 min Inkubation bei 37 °C: — Blutprobe und --- Referenz [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam (Qualitätskontrolle).

Die HPLC-Chromatogramme beider Proben zeigten ausschließlich den Peak von [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam (siehe Abbildung 4.13). Dieses Experiment lieferte keine Hinweise auf eine Spaltung oder einen Abbau des ^{18}F -markierten Octreotidderivats, da kein Spaltprodukt des Tracers im Chromatogramm detektierbar ist und die Tendenz des intakten Tracers, an Oberflächen haften zu bleiben, bekannt ist (siehe Kapitel 4.4.8).

4.5.4 *In vivo*-Stabilität und -Verteilung von [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA

Nachdem kein Abbau von [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA in Serum beobachtbar war, wurde die Stabilität von [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA an nicht tumortragenden Black six-Mäusen untersucht. Die Mäuse ($n = 2$) wurden 30 min p.i. getötet und Blut, das sofort mit Heparin versetzt wurde, sowie Leber und Niere entnommen. Die Organe wurden in einem Dismembrator homogenisiert. Wegen der Aktivitätsverluste bei der Stabilitätsuntersuchung in Serum wurde bei diesem Metabolitenexperiment ein anderes Verfahren angewendet. Im ersten Extraktionsschritt wurde auf das Blut bzw. die homogenisierten Organe 20%iges MeCN in PBS gegeben und die Suspension intensiv vermischt. Der Zusatz von MeCN sollte die Extraktion von [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA erleichtern. Nach Zentrifugation wurden die Proteine aus dem Überstand durch Zugabe desselben Volumens MeCN gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurden diesem Überstand Proben für die HPLC-Analyse entnommen. Für das Blut konnte die Gesamtextraktionseffizienz auf diesem Wege auf $80 \pm 1\%$ gesteigert werden. Dies galt nicht für die Organproben, bei denen nur eine geringe Gesamtausbeute ($17 - 23\%$) erzielt wurde.

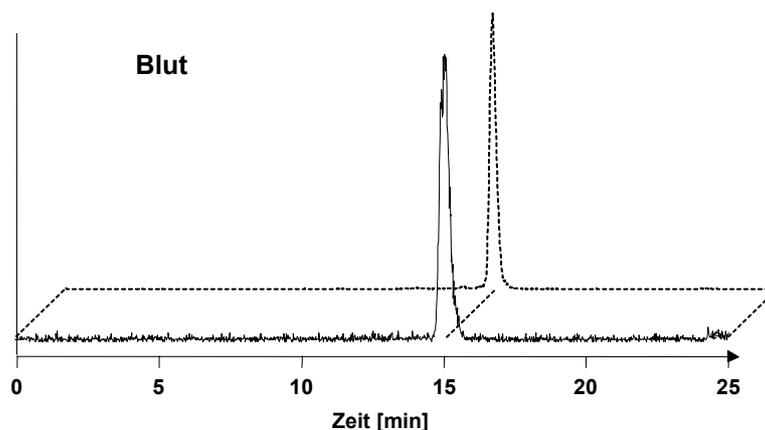


Abbildung 4.14: Radio-HPLC-Chromatogramm (Gradient: 1 - 20 min 22-50%, 20 - 25 min 100 % MeCN (0.1% TFA), 4 ml/min Fluss) der Metabolitenanalyse von [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA im Blut in Black six-Mäusen 30 min p.i. ($n = 2$): — Blutprobe und Referenz [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA.

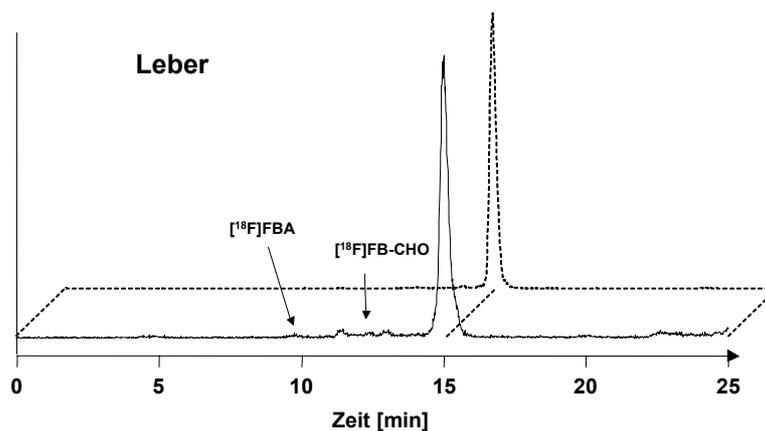


Abbildung 4.15: Radio-HPLC-Chromatogramm (Gradient: 1 - 20 min 22-50%, 20 - 25 min 100 % MeCN (0.1% TFA), 4 ml/min Fluss) der Metabolitenanalyse von $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$ in der Leber in Black six-Mäusen 30 min p.i. ($n = 2$): — Probe und Referenz $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$.

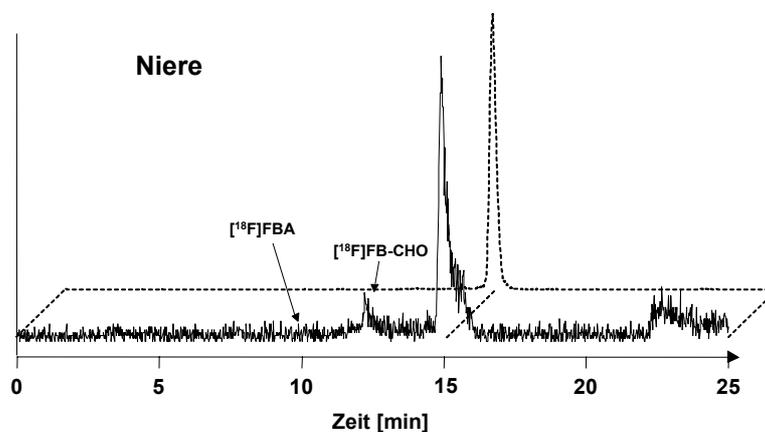


Abbildung 4.16: Radio-HPLC-Chromatogramm (Gradient: 1 - 20 min 22-50%, 20 - 25 min 100 % MeCN (0.1% TFA), 4 ml/min Fluss) der Metabolitenanalyse von $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$ in der Niere in Black six-Mäusen 30 min p.i. ($n = 2$): — Probe und Referenz $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$.

Die HPLC-Chromatogramme der beiden Blutproben zeigten keine Metaboliten von $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$ (siehe Abbildung 4.14 und Abbildung 8.1 im Anhang), wohingegen in den Chromatogrammen der Leber- (siehe Abbildung 4.15 und Abbildung 8.2 im Anhang) und der Nierenextrakte (siehe Abbildung 4.16 und Abbildung 8.3 im Anhang) sowohl $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$ (1 ± 0.5 % in der Leber bzw. 8 ± 1 % in der Niere) und $[^{18}\text{F}]\text{FBA}$ (1 ± 0.4 % in der Leber bzw. < 1 % in der Niere) als auch andere, unidentifizierte Metaboliten bis zu einem Gesamtanteil aller radioaktiven Abbauprodukte von 12 – 18 % gefunden wurden. Bei einem Teil der Metaboliten handelte es sich um sehr lipophile Verbindungen, die erst während des Spülens der HPLC-Säule eluiert werden konnte. Somit kann festgestellt werden, dass in den untersuchten Organen eine Metabolisierung nachgewiesen werden konnte.

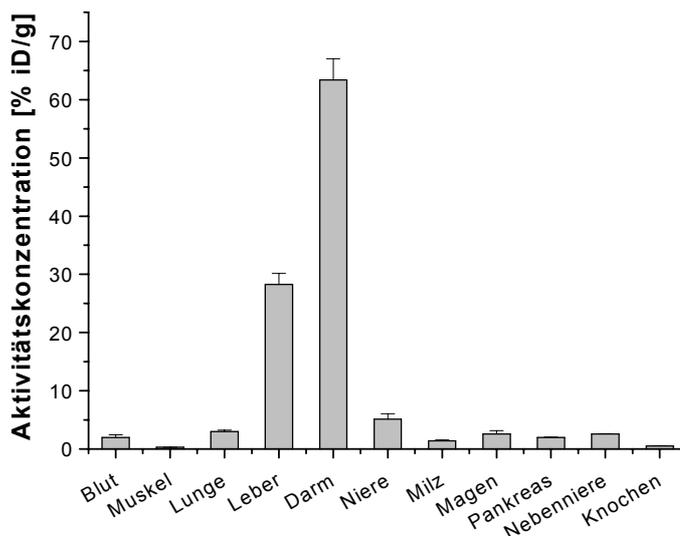


Abbildung 4.17: Biodistribution von $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$ in Black six-Mäusen ($n = 2$) 30 min p.i.; Daten in Prozent der injizierten Dosis [% iD/g] (Daten als $\bar{x} \pm \sigma$).

Die parallel durchgeführte, initiale Biodistributionsstudie ($n = 2$, 30 min p.i.) bestätigte die hohe Stabilität der aromatischen $^{18}\text{F-C}$ -Bindung gegenüber Defluorierung *in vivo* (Knochen: 0.5 ± 0.03 % iD/g). Ansonsten zeigten die Biodistributionsdaten deutlich die Auswirkung der hohen Lipophilie des Tracers (siehe Abbildung 4.17 und Tabelle 8.2, Anhang), die durch die zwei aromatischen Gruppen am N-Terminus bedingt ist. Die Aktivität wird fast ausschließlich hepatobiliär ausgeschieden bzw. akkumuliert (28 ± 2 % iD/g in der Leber und 63 ± 4 % iD/g im Darm gegenüber 5 ± 1 % iD/g in der Niere). Diese *in vivo*-Verteilung macht deutlich, dass zur Optimierung der Biodistribution die Lipophilie verringert werden muss, z.B. durch Einsatz einer Carbonylkomponente mit hydrophilen und/oder geladenen Gruppen. Alternativ könnte ein Zuckerrest zur Senkung der Lipophilie in das Molekül eingeführt werden. Im Fall von Cel-S-Dpr(FBOA)TOCA, ein mittels Oximbindung radiofluoriertes Octreotidderivat, wurde durch Anpassung der Größe des Zuckerrestes (Cellobiose gegenüber Glucose) der Einfluss des $[^{18}\text{F}]\text{FB-CHO}$ ausgeglichen^[101].

4.6 ^{99m}Tc -Markierung der HYNIC-Peptide

Wie bereits erwähnt, ist die mögliche Verwendung derselben HYNIC-funktionalisierten Peptide als Vorläufer sowohl für die hier entwickelte Radiofluorierungsmethode als auch für die ^{99m}Tc -Markierung^[171] ein entscheidender Vorteil.

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit neben der Evaluierung der Radiofluorierung via Hydrazonbildung auch die ^{99m}Tc -Markierung von HYNIC-TOCam getestet. Als Coligand wurde Ethylendiamindiessigsäure (EDDA) gewählt, da mit diesem Coliganden in einer einfachen Reaktion stabile Komplexe entstehen (siehe Abbildung 1.12). Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur mit geringen Mengen $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5 μg) bei pH 7.5 durchgeführt. Das Peptid wurde in einer Konzentration von 10 nM im 1 ml Ansatz eingesetzt^[118]. Nach 60 min Reaktionsdauer wurden die Ansätze mittels Radio-HPLC untersucht.

Die ^{99m}Tc -Markierung von HYNIC-TOCam zeigte sehr hohe Ausbeuten bis zu $82 \pm 2 \%$ (HPLC (22 – 42 % B in 20min): $k' = 7.2$). Diese Ausbeuten sind höher als die von Decristoforo *et al.* für HYNIC-TOC mit EDDA als Coligand gefundenen Ausbeuten von 63 %^[116,118]. Die Hauptverunreinigungen im Chromatogramm waren Pertechnetat (6 - 8 %) und eine unidentifizierte, hydrophilere Verbindung (6 - 10 %).

5 ^{99m}Tc -Tricarboxyl-markierte Peptide

5.1 Wahl und Design der Markierungsvorläufer

Die hier dargestellten Untersuchungen der ^{99m}Tc -Markierung von chelatorfunktionalisierten Peptiden mit $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ basieren auf den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten^[35,139] und sollen diese weiterführen. N^α -(1-Deoxy-D-fructosyl)-Lys⁰(N^ε-(carboxymethyl-pyridin-2-yl-methylamino)acetyl)-Tyr³-octreotat (Gluc-Lys⁰(Pic)-TOCA; siehe Abbildung 5.1) erwies sich nach ersten *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen als vielversprechend für die Diagnostik somatostatinrezeptorpositiver Tumore. Allerdings hatte sich gezeigt, dass für diese Verbindung erst ab einer Vorläuferkonzentration von 10^{-3} M Markierungsausbeuten > 80 % erhalten werden, wohingegen für das analoge N^α -(1-Deoxy-D-fructosyl)-Lys⁰(N^ε-(histidinyl)-Tyr³-octreotat (Gluc-Lys⁰(His)-TOCA) bei einer Konzentration von 10^{-4} M bereits Ausbeuten ≥ 90 % erzielt werden konnten. Dagegen wurden laut Literaturdaten bei der Reaktion von $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ mit 2-Picolylamindiessigsäure (Pic) bereits bei Konzentrationen von 10^{-6} M und damit geringeren als für Histamin (10^{-4} M) gute Ausbeuten erzielt^[126]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und inwieweit die Natur des Chelators oder die räumliche Nähe der Zuckereinheit Ursache für die unterschiedlichen Ausbeuten sind.

Zu diesem Zweck sollte ein weiterer dreizähliger Chelator synthetisiert und bezüglich seiner Markierungseffizienz evaluiert werden. Da bekannt ist, dass $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Komplexe mit dreizähligen Chelatoren stabiler sind als die Komplexe mit zweizähligen Liganden und zudem die unerwünschte zusätzliche Komplexierung durch Austausch des in der Koordinationssphäre des ^{99m}Tc verbliebenen, labil gebundenen Wassermoleküls mit funktionellen Gruppen anderer Biomoleküle unterbleibt^[126], war ein solcher tridentater Chelator von großem Interesse. Der von Pak *et al.* entwickelte His^τ-Chelator^[137] (N^τ -Carboxymethyl-histidin = His(N^τ -CM)-OH, CM = Carboxymethyl; siehe Kapitel 1.5.6.3, Abbildung 1.13 und Abbildung 5.1) erfüllt alle Voraussetzungen, die eine weitere Aufklärung der für die Verwendbarkeit als $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Chelator für den *in vivo*-Einsatz wichtigen Faktoren erlauben sollten: Durch Vergleich der Markierungseffizienz der drei peptidgebundenen Chelatoren, His, Pic und His^τ, sollten Rückschlüsse auf den Einfluss der Art und Zahl der koordinierenden Atome bzw. Funktionen gezogen werden. Da der His^τ-Chelator His(N^τ -CM)-OH das ^{99m}Tc über dieselben funktionellen Gruppen komplexiert wie Histidinyl in Gluc-Lys⁰(His)-TOCA, aber über eine zusätzliche Carbonsäurefunktion des

His^r zur Koordination verfügt, sollte der Vergleich dieser beiden Histidinchelatoren eine Aussage über den Einfluss der Dentizität erlauben.

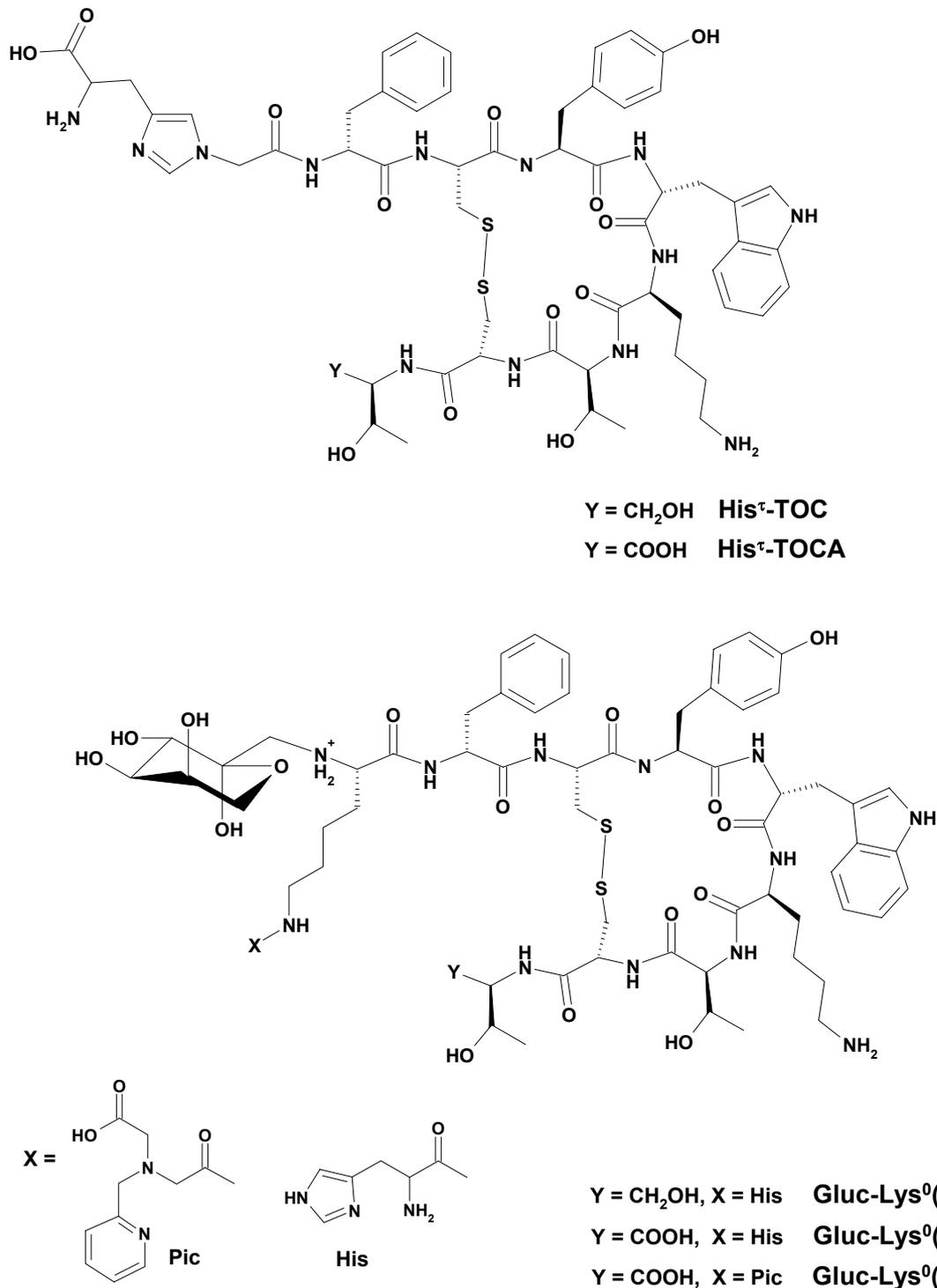


Abbildung 5.1: Die hier untersuchten Peptide: His^r-TOC, His^r-TOCA, Gluc-Lys⁰(His)-TOC, Gluc-Lys⁰(His)-TOCA und Gluc-Lys⁰(Pic)-TOCA.

Über die *N*^r-ständige Carboxymethylfunktion von His(*N*^r-CM)-OH ist dessen Konjugation an ein Peptid möglich. Für Markierungsuntersuchungen wurden

(2-(4-(2-Amino-2-carboxyethyl)-imidazol-1-yl)acetyl)-D-Phe¹-Tyr³-octreotid (His^τ-TOC) und (2-(4-(2-Amino-carboxyethyl)-imidazol-1-yl)acetyl)-D-Phe¹-Tyr³-octreotat (His^τ-TOCA) synthetisiert und radiomarkiert. Durch Vergleich der Markierungsausbeuten dieser beiden Vorläufer kann ein Einfluss der C-terminalen Carboxylgruppe auf die Komplexierungseffizienz untersucht werden. Der Vergleich dieser unglykosylierten Derivate mit glykosylierten Octreotidderivaten ermöglicht es, die Auswirkung der Zuckering auf die Radiomarkierung zu bestimmen.

Die initiale Evaluierung von N^{α} -(1-Deoxy-D-fructosyl)-Lys⁰(N^ε-([$^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)(\text{CO})_3$]histidinyl)-Tyr³-octreotid (Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)-TOC), Gluc-Lys⁰([$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$]His)-TOCA (Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)-TOCA) und Gluc-Lys⁰([$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$]Pic)-TOCA (Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)-TOCA) hatte vor allem für letztgenannten Tracer eine Biodistribution mit vorzugsweise renaler Ausscheidung, geringem abdominalen Hintergrund und Tumor/Organ-Verhältnissen > 1 gezeigt^[139]. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Optimierung der Radiosynthese von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)-TOCA sowie weitere *in vivo*-Evaluierungen dieses vielversprechenden Tracers durchgeführt.

5.2 Synthese der Markierungsvorläufer

5.2.1 Synthese von N^{τ} -Carboxymethyl- N^{α} -Fmoc-histidinmethylester

Der His^τ-Chelator wurde von Pak *et al.* als Ligand für $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ entwickelt^[137] und bereits zur Markierung von Biotin, Leucin-Enkephalin und Vitamin B₁₂ verwendet^[183].

Für die vorliegende Arbeit erfolgte die mehrstufige Synthese des Chelators analog der in der Literatur beschriebenen Reaktionsführung (Abbildung 5.2). Dabei wurden ähnliche Ausbeuten, wie in der Literatur angegeben, erzielt. Die Entfernung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe des N^{τ} -(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethyl)- N^{α} -Fmoc-histidinmethylester (Fmoc-His(N^{τ} -CM-tBu)-OMe) im letzten Schritt vor der Kupplung an die Peptide wurde dagegen in abgewandelter Form mit TFA durchgeführt.

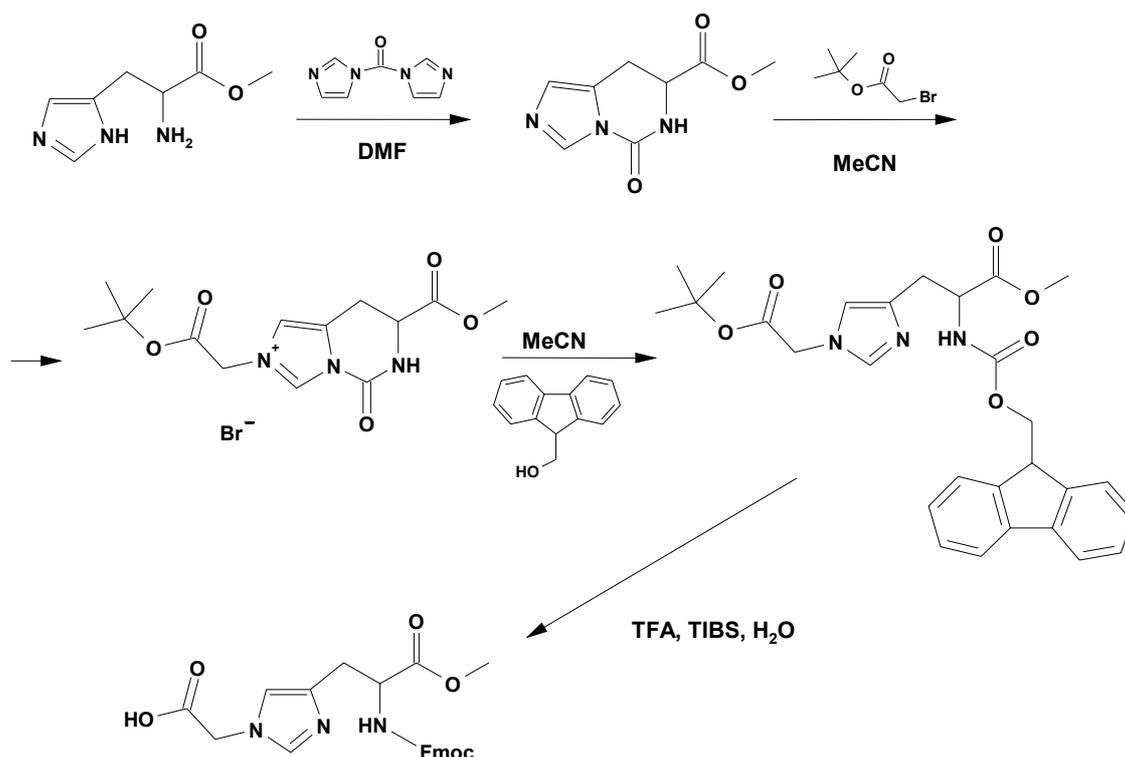


Abbildung 5.2: Syntheschema von Fmoc-His(*N*^ε-CM)-OMe.

5.2.2 Synthese von His^τ-TOC und His^τ-TOCA

Die Kupplung des *N*^ε-Carboxymethyl-*N*^α-Fmoc-histidinmethylester (Fmoc-His(*N*^ε-CM)-OMe) an Tyr³-Octreotid wurde in Lösung durchgeführt. In Vorversuchen hatte sich herausgestellt, dass die Konjugation mit den Standardkupplungsreagenzien HOBt, TBTU und DIPEA zu langsam war und geringe Ausbeuten lieferte. Die *N*^ε-ständige Carbonsäurefunktion des Fmoc-His(*N*^ε-CM)-OMe scheint weniger reaktiv zu sein als die von Standard-Fmoc-Aminosäuren, weshalb andere Aktivierungsreagenzien, die Kombination aus HOAt, DIC und Pyridin, und ein zweifacher Überschuss an Carbonsäurekomponente und Aktivierungsreagenzien gegenüber dem Peptid angewendet wurden. Auch unter Verwendung dieser Bedingungen war die Reaktion gemäß HPLC-Kontrolle erst nach 80 h abgeschlossen. Anschließend wurden die Fmoc- und die Dde-Schutzgruppen entfernt. Versuche, die Methylesterspaltung mit LiOH (0.2 M) in einem Gemisch aus MeOH und Wasser (2 : 1, v/v) zu erzielen, führten zur Zersetzung des Peptids. Ebenso erfolglos war die Esterspaltung mit Piperidin in DMF (1 : 1, v/v). Erfolgreich dagegen war die sehr milde Entschützungs-methode in Boratpuffer bei pH 8.5. Allerdings läuft diese Reaktion sehr langsam ab und war erst nach 7 Tagen beendet. Abschließend wurde das Peptid mittels präparativer HPLC gereinigt und mit einer Reinheit > 97% erhalten.

Als Alternative wurde die analoge Reaktion von Fmoc-His(*N*^ε-CM)-OMe und Tyr³-Octreotat am Trägerharz durchgeführt. Es wurden ebenfalls HOAt, DIC und Pyridin als Aktivierungsreagenzien eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass auch nach dieser Methode die Reaktion erst nach 6 Tagen beendet war. Nach der Abspaltung des Peptids vom Harz und der Cyclisierung wurden die Entschützungen analog denen von His^ε-TOC durchgeführt. His^ε-TOCA wurde nach Isolierung mittels präparativer HPLC mit einer Reinheit > 99 % erhalten.

5.2.3 Gluc-Lys⁰(Pic)-TOCA

Die Synthese von Gluc-Lys⁰(Pic)-TOCA wurde, aber mit geringfügigen Abwandlungen wie bereits beschrieben^[35,153], durchgeführt. So erfolgte die Kupplung von Lys⁰ am polymeren Trägerharz. Lys⁰ dient bei diesem Markierungsvorläufer als trifunktionaler Linker, um sowohl eine Glykosylierung als auch eine Funktionalisierung mit einem Chelator zu ermöglichen. Dieses Linker-Konzept wurde bereits bei radiofluorierten Octreotiden mit Lysin oder 2,3-Diaminopropansäure erfolgreich eingesetzt^[66,101]. Die Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen und die Cyclisierung des Peptids lieferten Fmoc-Lys⁰-TOCA(Dde). Im Folgeschritt wurde Picolyamindiessigsäure in Lösung unter Standardbedingungen mit HOBt, TBTU und DIPEA als Kupplungsreagenzien an die Seitenkettenaminofunktion von Lys⁰ gekuppelt.

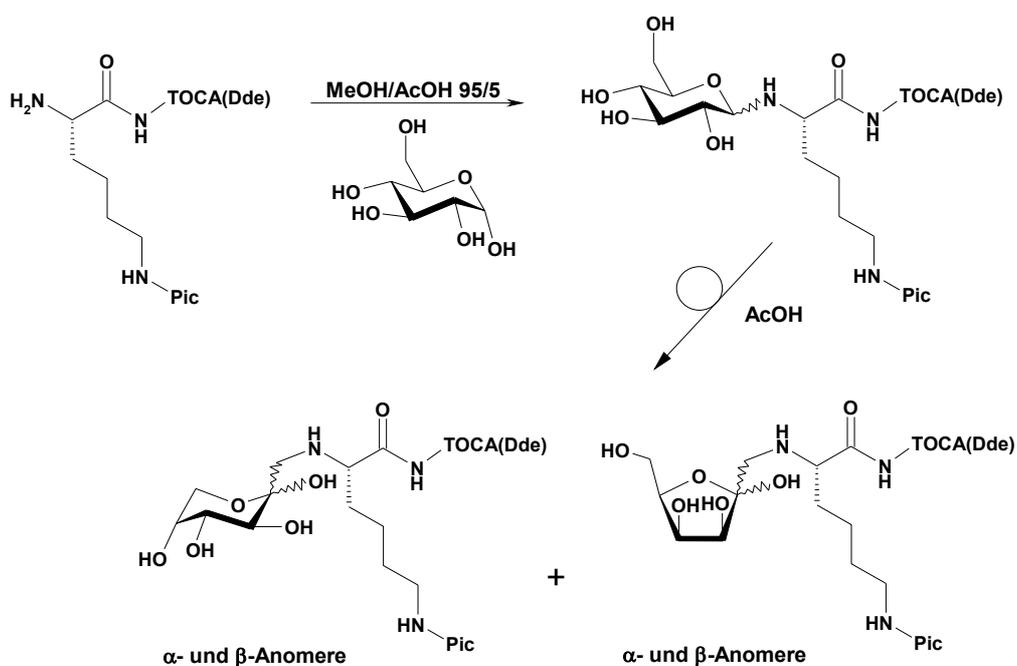


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der Glykosylierung von Lys⁰(Pic)-TOCA(Dde) mit Amadori-Umlagerung^[184].

Die Amadori-Reaktion zur Glykosylierung nach der Fmoc-Entschützung wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt^[35,185]. Mit dieser Reaktion lässt sich ein Zuckerrest an eine Aminogruppe knüpfen, wie hier an den N-Terminus eines Octreotidderivats. Dabei findet zunächst eine durch Essigsäure katalysierte Bindungsbildung zwischen der Aminogruppe und dem anomeren C-Atom einer Aldose, in diesem Fall Glucose, zum N-Glykosylamin statt. Anschließend lagert sich das entstandene Zwischenprodukt wie in Abbildung 5.3 dargestellt um, wobei sowohl von dem Fünfring- als auch dem Sechsringsisomeren das α - und das β -Anomere in verschiedenen Gleichgewichtskonzentrationen entstehen^[186]. Diese Isomeren ließen sich HPLC-analytisch nicht auftrennen. Laut HPLC-Kontrolle war die Reaktion nach 20 h beendet. Das glykosylierte Peptid konnte nach der Dde-Entschützung und Isolierung mittels präparativer HPLC mit einer Reinheit ≥ 99 % isoliert werden. Gluc-Lys⁰(His)-TOC und Gluc-Lys⁰(His)-TOCA wurden wie beschrieben synthetisiert^[35,153].

5.3 ^{99m}Tc(CO)₃-Markierung von chelatorfunktionalisierten Peptiden

Im ersten Schritt der Peptidmarkierung wird [^{99m}Tc]Pertechnetat zum ^{99m}Tc^I-Triaquatricarbonyl-Komplex reduziert. In der Peptidmarkierungsreaktion wird der [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺-Komplex dann unter Austausch der labil gebundenen Wassermoleküle durch die im Chelator vorhandenen Donoratome gebunden.

5.3.1 Reduktion des Pertechnetats zu [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺

Das Pertechnetat wurde mit physiologischer Kochsalzlösung aus dem ⁹⁹Mo/^{99m}Tc-Generator eluiert und in einem "IsoLink"-Kit (Mallinckrodt) durch Dikaliumborancarboxylat (K₂[H₃BCO₂]) als Reduktionsmittel und *in situ*-Carbonylquelle zu [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ umgesetzt. Um nach der Reaktion die Reduktionsmittel vollständig zu entfernen, wurde der Reaktionsansatz zunächst auf pH 5 - 6 angesäuert. Für die Umsetzung mit Peptiden wurde die Lösung dann auf pH 7.5 eingestellt. Die Qualitätskontrolle mittels Radio-HPLC zeigte, dass bei 90°C in 20 min [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺-Ausbeuten von 98 ± 0.4 % erzielt wurden. Es stellte sich heraus, dass mittels Reoxidation durch Luftsauerstoff die Ausbeute vermindert wird. Aus diesem Grund wurde die Reduktion in einem geschlossenen "Kit-Vial" mit entgasten Lösungsmitteln durchgeführt. Außerdem wurde die [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺-Lösung für die anschließende Peptidmarkierung unter Argon aufbewahrt. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahmen nahm während der Aufbewahrung der Lösung

über einen Zeitraum von ca. 8 h der Anteil an ^{99m}Tc -Tricarbonyl auf $92 \pm 1 \%$ ab. Diese Verminderung des Anteils an reaktiver Komponente wurde für die Ausbeutebestimmung der Peptidmarkierung berücksichtigt.

5.3.2 Abhängigkeit der Markierungsausbeuten von der Vorläuferkonzentration

Um die Einflüsse struktureller Veränderungen auf die Markierungseffizienz von chelatorfunktionalisierten Peptiden zu untersuchen, wurden die Markierungsausbeuten von His^τ-TOC und His^τ-TOCA mit ^{99m}Tc -Tricarbonyl in Abhängigkeit von der Vorläuferkonzentration mit den Ergebnissen analoger Untersuchungen mit Gluc-Lys⁰(Pic)-TOCA und Gluc-Lys⁰(His)-TOCA^[139] verglichen.

Das HPLC-Chromatogramm der „Kit“-Lösung nach der Reduktion des Pertechnetats wurde zur Bestimmung der Ausbeute an $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ durch Integration des Signals im Radioaktivkanal herangezogen. Der hier ermittelte Anteil an $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ diente als Grundlage für die Berechnung der Markierungsausbeute an markiertem Peptid.

Die Abhängigkeit der Ausbeute an ^{99m}Tc -markiertem Peptid von der Konzentration von His^τ-TOC und His^τ-TOCA im Reaktionsansatz wurde im Bereich 10^{-3} - 10^{-6} M ($n = 3$) untersucht. Dazu wurde die entsprechende Stammlösung vom Peptid jeweils 1 : 10 mit der Lösung aus der „Kit“-Reduktion verdünnt und 30 min auf 75 °C erhitzt.

Abbildung 5.4 zeigt die Abhängigkeit der Markierungsausbeute von der Peptidkonzentration für His^τ-TOC und His^τ-TOCA im Vergleich zu der von Gluc-Lys⁰(His)TOCA und Gluc-Lys⁰(Pic)TOCA^[139,153].

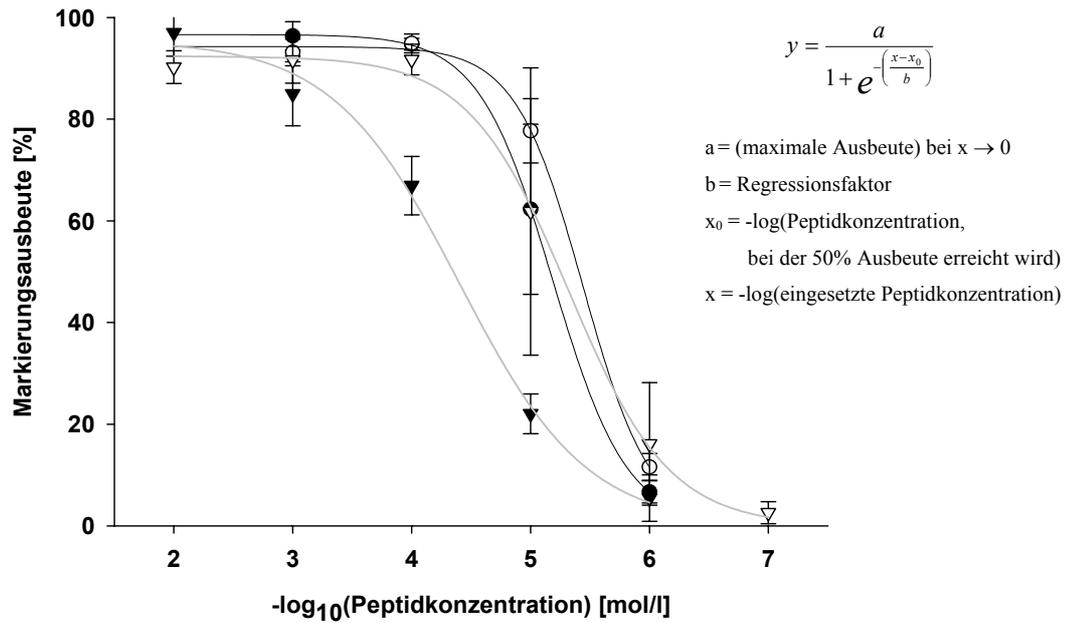


Abbildung 5.4: Markierungsausbeute [%] an [^{99m}Tc]His^T-TOC (— bzw. ○) und [^{99m}Tc]His^T-TOCA (— bzw. ●) (Kurven durch Regressionsrechnung bis 10⁻² M verlängert) im Vergleich zu der von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA (— bzw. ▼)^[153] und Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOCA (— bzw. ▽)^[153] bezogen auf den [^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺-Anteil an der Gesamtaktivität im Chromatogramm in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration (-log₁₀(Peptidkonzentration) [mol/l]), sigmoidale Regression, 30 min, 75 °C).

Die Verläufe der Kurven für die Markierungsausbeuten in Abhängigkeit von der Vorläuferkonzentration von His^T-TOC und His^T-TOCA zeigten einen im Rahmen der Fehlergrenzen sehr ähnlichen Verlauf (Abbildung 5.4). Mit diesen beiden Markierungsvorläufern lässt sich eine 50 %ige Ausbeute bei einer Konzentration von 4.0 μM bzw. 5.4 μM für His^T-TOC bzw. His^T-TOCA erzielen, im Vergleich zu 5.1 μM für Gluc-Lys⁰(His)TOCA und 40.5 μM für Gluc-Lys⁰(Pic)TOCA^[139,153]. Für die Maximalausbeuten von His^T-TOCA und His^T-TOC fanden sich nahezu identische Werte (95 ± 2 % gegenüber 96 ± 3 %). Da die Markierungsausbeuten von His^T-TOC und His^T-TOCA unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen sehr ähnlich waren, spielt offensichtlich der unter den Reaktionsbedingungen (pH ≥ 7.5) deprotonierte C-Terminus nur eine geringfügige Rolle.

In den HPLC-Chromatogrammen traten als Nebenprodukte vor allem Pertechetat und der [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺-Komplex auf. Die Menge an Pertechetat konnte nicht quantifiziert werden, da es mit dem [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺-Komplex coeluiert, sein Vorhandensein lässt sich in den meisten Fällen jedoch anhand einer Aufspaltung des Peaks erkennen.

Die für effiziente ^{99m}Tc-Markierungen nötigen Peptidmengen sind vor allem im Hinblick auf eine Routine-Produktion von ^{99m}Tc-markierten Peptiden von Bedeutung. Hierfür ist eine möglichst quantitative Reaktion bei äußerst niedrigen Peptidkonzentrationen

erwünscht ("Kit-Formulierung", siehe Kapitel 1.5.1 und Kapitel 1.5.6), damit eine zeitaufwendige Aufreinigung vermieden werden kann. Im Fall der hier untersuchten Verbindungen ist eine solche Kit-Produktion wahrscheinlich nicht möglich, da die notwendigen Markierungsausbeuten an $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{His}^{\tau}\text{-TOC}$ bzw. $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{His}^{\tau}\text{-TOCA}$ ($\geq 97\%$) nur bei Vorläuferkonzentrationen von 10^{-3}M erreicht wurden. Dadurch ist eine Abtrennung des Vorläufers im Anschluss an die Markierungsreaktion unumgänglich.

Wie aus Abbildung 5.4 ersichtlich, wurde für die beiden mit dem tridentaten $\text{His}(\text{N}^{\tau}\text{-CM})\text{-OH}$ -Chelator funktionalisierten Octreotidderivate interessanterweise eine Konzentrationsabhängigkeit gefunden, die in den Fehlergrenzen mit der des mit dem bidentaten Histidin funktionalisierten $\text{Gluc-Lys}^0(\text{His})\text{-TOCA}$ identisch ist^[139]. Somit zeigten alle Markierungsvorläufer mit Histidinderivaten als Chelatoren eine höhere Komplexierungseffizienz als $\text{Gluc-Lys}^0(\text{Pic})\text{-TOCA}$. Daraus lässt sich schließen, dass nicht die Zähigkeit des Chelators die Ursache für die geringeren Ausbeuten von $\text{Gluc-Lys}^0(\text{Pic})\text{-TOCA}$ ist, sondern vielmehr die unterschiedlichen Koordinationsfähigkeiten der bindenden Atome der beiden Chelortypen (Pyridin- gegenüber Imidazolstickstoff).

Da der Vergleich der drei mit Histidinderivaten funktionalisierten Peptide keine signifikant unterschiedlichen Ausbeuten zeigte, obwohl $\text{Gluc-Lys}^0(\text{His})\text{-TOCA}$ einen Zuckerrest trägt, lässt sich daraus schließen, dass der Zuckerrest in $\text{Gluc-Lys}^0(\text{His})\text{-TOCA}$ im Vergleich zu $\text{His}^{\tau}\text{-TOC}$ und $\text{His}^{\tau}\text{-TOCA}$ keinen relevanten Einfluss auf die Ausbeuten hat.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Art des Chelators die Haupteinflussgröße für die Effizienz der Markierung von Peptiden mit der $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Einheit darstellt. Neben der Art des Chelators kann allerdings auch die Komplexgeometrie eine Rolle spielen. Bei der Komplexierung bildet sich im Fall der Histidinderivate ein Sechsring und im Fall von His^{τ} ein weiterer Fünfring, während bei der Komplexierung durch Pic zwei Fünfringe entstehen. Dieser strukturelle Unterschied könnte einer der Einflussfaktoren sein, der für die deutlich geringeren Markierungsausbeuten von $\text{Gluc-Lys}^0(\text{Pic})\text{-TOCA}$ verantwortlich ist^[187].

$\text{His}(\text{N}^{\tau}\text{-CM})\text{-OH}$ -funktionalisierte peptidische Tracer lassen sich mit hohen Ausbeuten mit ^{99m}Tc unter relativ milden Bedingungen ohne Bildung relevanter Mengen an Nebenprodukten umsetzen.

5.3.3 Abhängigkeit der Markierungsausbeuten von weiteren Reaktionsparametern

Der Einfluss einer Erhöhung der Reaktionstemperatur von 75 °C auf 90 °C (30 min Reaktionsdauer) auf die Markierungsausbeute von His^τ-TOC und His^τ-TOCA wurde bei einer Vorläuferkonzentration von 10⁻⁵ M untersucht.

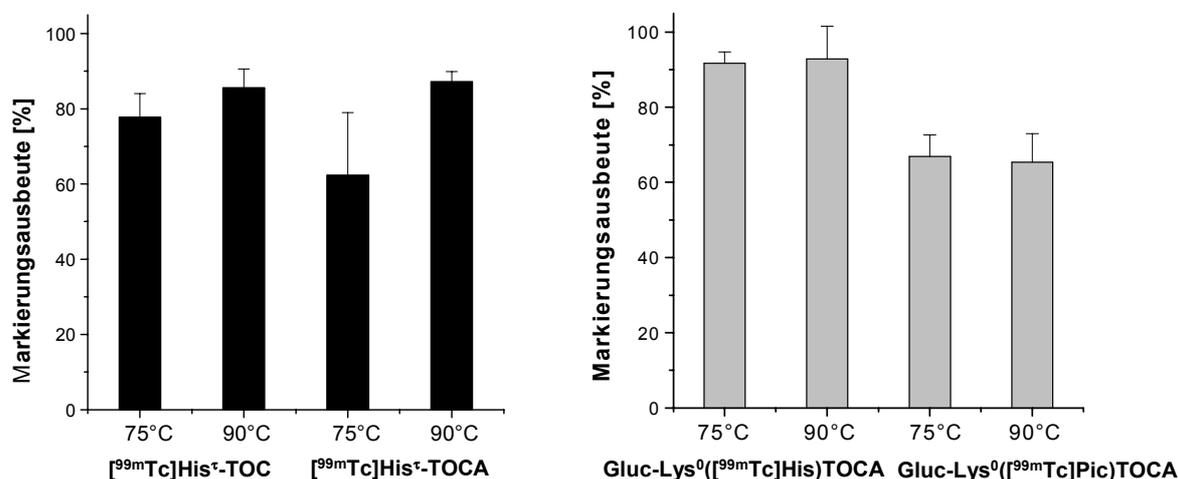


Abbildung 5.5: Abhängigkeit der Markierungsausbeute von His^τ-TOC und His^τ-TOCA (links, 10⁻⁵ M) im Vergleich zu Gluc-Lys⁰(His)-TOCA und Gluc-Lys⁰(Pic)-TOCA^[139] (rechts, 10⁻⁴ M) mit [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃] von der Reaktionstemperatur (30 min Reaktionszeit, n = 3).

Bei diesen beiden Octreotidderivaten ließ sich die Markierungsausbeute durch eine Temperaturerhöhung steigern (siehe Abbildung 5.5): So wurden bei 90 °C 86 ± 5 % statt 78 ± 6 % [^{99m}Tc]His^τ-TOC erhalten. Bei His^τ-TOCA war der Unterschied der Ausbeuten an ^{99m}Tc-markiertem Peptid noch ausgeprägter (87 ± 3 % gegenüber 62 ± 17 %). Trotz dieser Steigerung an Produktausbeute bleibt zu bedenken, dass nicht alle Markierungsvorläufer bei einer hohen Temperatur wie 90 °C stabil sind. So wurde neben einer Erhöhung des Produktanteils auch eine geringe Zunahme des Anteils an Nebenprodukten von 4 ± 2 % auf 10 ± 4 % gefunden.

Im Gegensatz dazu wurde für Gluc-Lys⁰(His)-TOCA und Gluc-Lys⁰(Pic)-TOCA^[139] ein anderes Verhalten beobachtet. Bei diesen Peptiden hatte die Reaktionstemperatur bei 10⁻⁴ M Konzentration der Peptide keinen Einfluss auf die Markierungsausbeute, wohingegen die dennoch beobachtete Abnahme an Tricarboxylkomplex in der Reaktionsmischung fast ausschließlich zu einer Zunahme an Nebenprodukten führte. Allerdings wurden diese Untersuchungen bei einer höheren Vorläuferkonzentration (10⁻⁴ M) durchgeführt.

Da bei der Komplexbildung der ^{99m}Tc(CO)₃-Einheit im Fall der hier untersuchten tridentaten Chelatoren neben den Aminofunktionen auch eine Carbonsäurefunktion beteiligt

ist, kann vermutet werden, dass der pH-Wert Auswirkung auf die Markierungsreaktion haben könnte. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des pH-Werts der Reaktionslösung auf die Ausbeute für Gluc-Lys⁰(Pic)-TOCA sowie für His^τ-TOC und His^τ-TOCA (10^{-4} M) evaluiert. Für alle drei untersuchten Peptide wurde im pH-Bereich 4 - 7 keine Korrelation zwischen dem pH-Wert der Reaktionslösung und der Markierungsausbeute gefunden. Unter diesen Reaktionsbedingungen (75 °C, 30 min, pH 4 - 7) schwankten die Markierungsausbeuten ohne Muster zwischen 24 und 66 %. Bei pH 7 - 8 erzielten His^τ-TOC und His^τ-TOCA reproduzierbar die zuvor angegebenen Ausbeuten von ~ 96 % bzw. ~ 95 % und Gluc-Lys⁰(Pic)-TOCA reproduzierbar ca. 67 % Ausbeute. Es ist davon auszugehen, dass die Protonierung der Carbonsäure und gegebenenfalls der Aminogruppen die Ausbeute reduziert. Die ^{99m}Tc -Markierungsreaktion wird am besten im pH-Bereich 7 - 8 durchgeführt, da dort die Ausbeuten sowohl höher als auch konstanter sind.

5.3.4 Synthese und Isolierung $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -markierter und glykosylierter Octreotidderivate

Für die biologische Evaluierung von Gluc-Lys⁰(^{99m}Tc)His)-TOC, Gluc-Lys⁰(^{99m}Tc)His)-TOCA und Gluc-Lys⁰(^{99m}Tc)Pic)-TOCA war es notwendig, die Radiosynthese und die Isolierung der Produkte zu optimieren, um präparative Ansätze z.B. für Patientenstudien zu ermöglichen. Während dieser Optimierung stellte sich heraus, dass bei den vorliegenden Peptiden die Übertragung der Bedingungen analytischer Ansätze auf größere Aktivitätsmengen nicht ohne Modifikationen realisierbar war:

Da das IsoLink-Kit für 1 ml Pertechnetatlösung ausgelegt ist, wird das Volumen der Reaktion mit dem Peptid sehr groß und damit die nötige Peptidmenge sehr hoch, wenn die gesamte $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ -Lösung eingesetzt wird (für zweckmäßige Ausbeuten mindestens eine Peptidkonzentration von 10^{-4} M). Um die benötigte Peptidmenge gering zu halten, wurden die im Kit enthaltenen Reagenzien halbiert, so dass anschließend die gesamte eingesetzte Aktivitätsmenge für die Umsetzung mit dem Peptid verwendet werden konnte. Zu diesem Zweck wurde der Inhalt in 100 µl entgaster Saline aufgelöst, und davon wurden wieder 50 µl entnommen.

Nach der 30 minütigen Reduktion des Pertechnetats bei 90 °C und der darauf folgenden 30 minütigen Umsetzung mit dem Peptid bei 75 °C wurde das radiomarkierte Produkt mittels semi-präparativer Radio-HPLC isoliert. Beim Entfernen der Lösungsmittel aus der Produktfraktion wurde eine Adsorption des Produkts am Glasgefäß beobachtet. Außerdem

zeigte die Qualitätskontrolle mittels Radio-HPLC der mit PBS formulierten Lösung radioaktive Verunreinigungen, die während des Einengens entstanden waren. Da eine vollständige Entfernung der HPLC-Laufmittel (H₂O mit 0.1 % TFA und MeOH) aus der Produktfraktion vor einer Patientenapplikation zwingend erforderlich ist, wurde eine Festphasenextraktion für die ^{99m}Tc-markierten Octreotidderivate etabliert. Die besten Ergebnisse wurden durch die Anwendung von Strata-X C18-Kartuschen der Firma Phenomenex erzielt. So wurden Extraktionsausbeuten von 97 ± 1 % in einem kleinem Volumen (0.5 – 1.0 ml 70 %igem EtOH (1 % 1 N HCl)) erreicht. Zudem entstehen sowohl beim Auftragen und Waschen als auch durch Zurückbleiben von ^{99m}Tc-markiertem Produkt auf der Kartusche keine nennenswerten Verluste. Generell ist eine Produktelution in minimalen Volumina von durchschnittlich 120 µl 70 %igem EtOH (1 % 1 N HCl) mit Ausbeuten von 83 ± 4 % möglich. Durch Verdünnen dieses kleinen Volumens ethanolischer Lösung mit 5 - 10 ml PBS (≤ 1 % EtOH in der fertigen Lösung) und anschließender Sterilfiltration konnte eine injektionsfertige Lösung hergestellt werden.

Durch diese Optimierung der Radiosynthese konnte Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)-TOCA in Mengen von bis 220 MBq mit einer RCA von bis zu 17 % binnen 4 h und einer radiochemischen Reinheit von 98 % hergestellt werden. Die lange Gesamtsynthesedauer wird vor allem von den 30 minütigen Reaktionszeiten und der zeitaufwendigen HPLC-Präparation verursacht (Vorlauf mit 100 % H₂O zur Auftragung auf die Säule und um ein Ausfallen der Salze aus dem Kit verhindern). Die Synthese ließe sich durch weitere Optimierung verkürzen.

5.4 *In vivo*-Evaluierung $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -markierter und glykosylierter Octreotidderivate

5.4.1 Biodistributionsexperimente

Die Biodistribution der drei glykosylierten, radiometallierten Octreotidderivate wurde in einem AR42J-tumortragenden (pankreatischer Rattentumor) Nacktmausmodell ($n = 5$) 120 min nach Injektion von 150 - 260 kBq untersucht. Die $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -markierten Tracer wurden zu diesem Zweck nach der oben beschriebenen Methode (siehe Kapitel 5.3.4) synthetisiert, isoliert und formuliert. Abschließend wurden HPLC-chromatographische Qualitätskontrollen durchgeführt. Die Quantifizierung in den einzelnen Organen erfolgte in Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm [% iD/g]. Dadurch erhält man einen massennormierten Wert für die Gewebeanreicherung.

5.4.1.1 Unspezifische Aufnahme und Exkretionsverhalten

Die Biodistributionsdaten sind zusammengefasst in Abbildung 5.6 (siehe auch Tabelle 8.4 im Anhang).

Die Aktivitätskonzentration im Blut war bei beiden untersuchten Tracern mit bidentatem Chelator 120 min p.i. verhältnismäßig hoch (Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOC: 3.2 ± 0.2 % iD/g und Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOCA: 2.2 ± 0.1 % iD/g), wohingegen Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA mit 0.8 ± 0.2 % iD/g eine deutlich geringere Aktivitätskonzentration im Blut zeigte. Diese schnellere Blutclearance beruht vermutlich auf der in Folge der abgesättigten Koordinationssphäre des Technetiums durch den dreizähligen Picolylamindiessigsäure-Liganden^[126] verminderten Interaktion mit Plasma- und anderen Proteinen. Bei allen Substanzen war die Aktivitätsanreicherung im Muskel sehr niedrig (zwischen 0.1 ± 0.05 % iD/g für Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA bis 0.3 ± 0.03 % iD/g für Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOC) und spiegelte denselben Trend wie im Blut wider: Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOC > Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOCA > Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA. Ein Passieren der Blut-Hirn-Schranke wurde (0.1 % iD/g im Hirn bei allen Derivaten) wegen der Hydrophilie und Größe der Peptide^[188] wie zu erwarten nicht beobachtet.

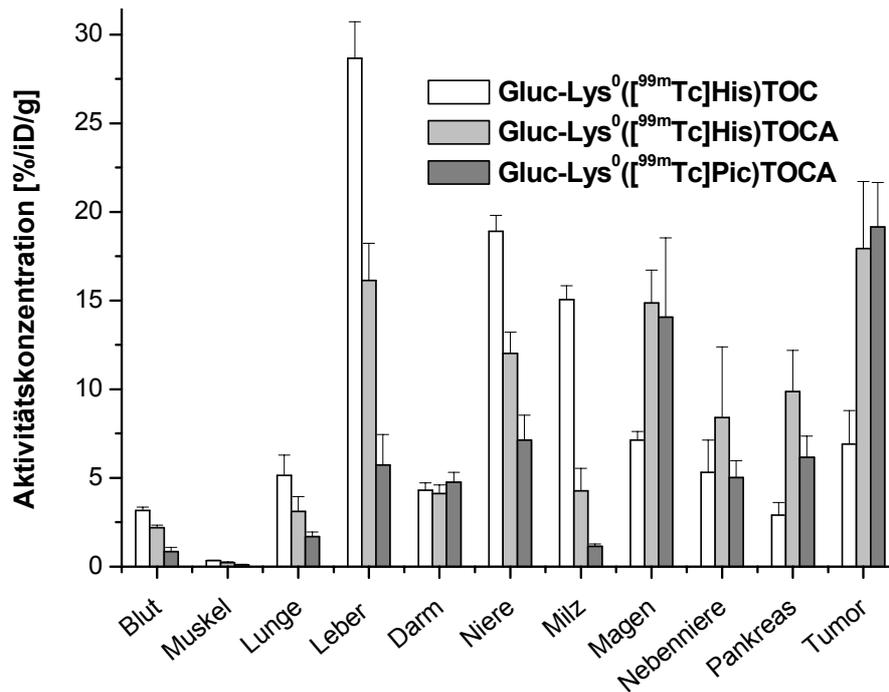


Abbildung 5.6: Biodistribution von $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{His})\text{TOC}$, $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{His})\text{TOCA}$ und $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ in AR42J-tumortragenden Nacktmäusen (n = 5) 120 min p.i.; Daten in Prozent der injizierten Dosis [% iD/g] (Daten als $\bar{x} \pm \sigma$).

Es ist davon auszugehen, dass aus den Komplexen freigesetztes ^{99m}Tc *in vivo* zu Pertechnetat oxidiert wird. Folglich kann man die Aktivitätsaufnahme in der Schilddrüse (für $^{99m}\text{TcO}_4^-$ vergleichbar selektiv wie für $^{123}, ^{131}\text{Iodid}$, siehe Schilddrüsenzintigraphie) als Maß für die *in vivo*-Stabilität der Komplexe ansehen. Die Schilddrüsenanreicherung der hier untersuchten ^{99m}Tc -Tracer (siehe Tabelle 8.4 im Anhang) sinkt in der Reihenfolge $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{His})\text{TOC}$ (107.2 ± 50.8 % iD/g) > $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{His})\text{TOCA}$ (41.4 ± 18.5 % iD/g) > $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ (11.5 ± 2.7 % iD/g) (= 0.3 – 0.03 % der injizierten Gesamtaktivität). Hierdurch wird deutlich, dass der tridentate Technetiumkomplex stabiler ist als der bidentate, und zwar sowohl gegenüber Freisetzung des Metalls als auch gegenüber zusätzlicher Koordinierung durch im Körper vorkommende Donoratome aus Proteinen.

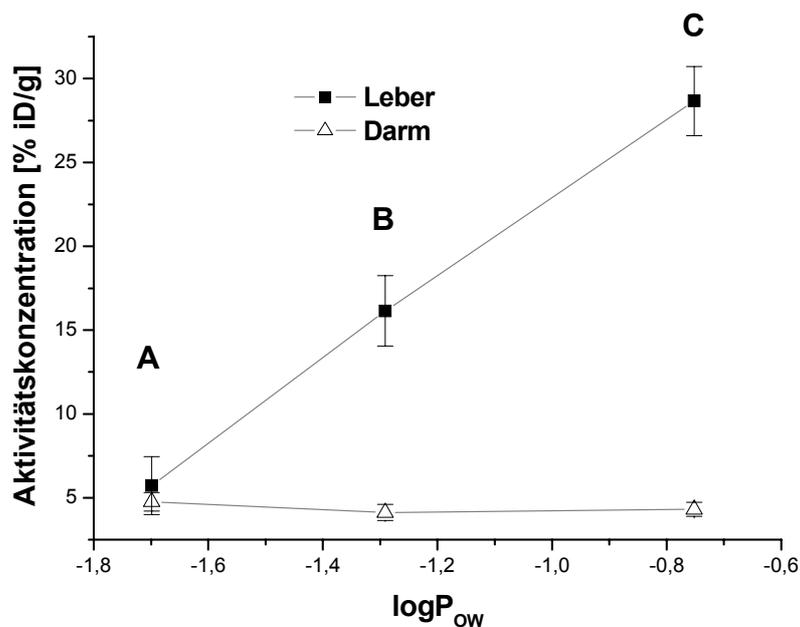


Abbildung 5.7: Korrelation der Lipophilie ($\log P_{ow}$) und der *in vivo*-Konzentration in Leber und Darm von AR42J-tumortragenden Nacktmäusen ($n = 5$, 120 min p.i.) von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA (A), Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOCA (B) und Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOC (C).

Es wurde in der Literatur bereits mehrfach gezeigt, dass eine Korrelation zwischen der Lipophilie radiomarkierter peptidischer Rezeptorliganden und dem Anteil hepatobiliärer Exkretion besteht und somit die Lipophilie Aussagen über das Exkretionsverhalten erlaubt^[34,36,37]. So zeigt hier die lipophilste Substanz, Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOC ($\log P_{ow} = -0,75 \pm 0,03$), mit $28,7 \pm 2,1$ % iD/g nach zwei Stunden die höchste Aktivitätsanreicherung in der Leber, während die hydrophilste Substanz, Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA ($\log P_{ow} = -1,70 \pm 0,02$), die niedrigste ($5,7 \pm 1,7$ % iD/g) Anreicherung aufwies (siehe Abbildung 5.7 und Tabelle 8.3, Anhang). Die Reduktion der Lipophilie durch die Glykosylierung trägt zur Verminderung der Leberaufnahme bei. Dass neben der gefundenen Korrelation zwischen Lipophilie und Leberaufnahme (siehe Abbildung 5.7), bei Verbindungen mit zweizähligen Liganden die unvollständige Koordinationssphäre des ^{99m}Tc und die daraus resultierende Koordination an Proteine (Plasmaproteine oder Glutathion) eine wichtige Rolle spielen muss, belegt der Vergleich mit radioiodierten Octreotidderivaten. So zeigte [¹²⁵I]Gluc-TOCA mit einem $\log P_{ow}$ von $-1,3 \pm 0,01$, der gleich dem von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOCA ist, nur eine Leberaufnahme von $0,8 \pm 0,1$ % iD/g nach 60 min p.i.^[35] (gegenüber $16,1 \pm 2,1$ % iD/g nach 120 min p.i.). Dass auch die Radioaktivitätskonzentration der ^{99m}Tc-markierten Derivate in der Leber dieselbe Tendenz aufwies wie die in der Schilddrüse und im Blut, d.h. eine höhere Anreicherung mit sinkender Sättigung der Koordinationssphäre des ^{99m}Tc-Kerns, bestätigt den Einfluss der freien Koordinationsstelle.

Bei hepatobiliärer Ausscheidung erwartet man eine zeitabhängige Abnahme der Aktivitätskonzentration in der Leber und einen gleichzeitigen Anstieg der Aktivitätsaufnahme im Darm (Leber-Darm-Passage). Frühere *in vivo*-Experimente mit radiomarkierten sst-Liganden zur Kinetik der hepatobiliären Ausscheidung zeigten, dass bereits 1 h nach Applikation die Radioaktivitätskonzentration im Darm häufig höher ist als die in der Leber^[35]. Die hier gefundenen Daten für die ^{99m}Tc-markierten Octreotidderivate entsprechen nicht diesem Verhalten (z.B. Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOC: Leber 28.7 ± 2.1 % iD/g; Darm 4.3 ± 0.4 % iD/g, siehe Abbildung 5.6). Daraus kann geschlossen werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Octreotidderivate eine Retention in der Leber erfahren. Es fand sich außerdem keine Abhängigkeit der Aktivitätskonzentration im Darm von der Lipophilie oder der Dentizität des Chelators.

Die verhältnismäßig hohe Anreicherung aller untersuchten Verbindungen in den Nieren spiegelt die vorzugsweise renale Ausscheidung wider. Interessanterweise fand sich auch hier dieselbe Reihenfolge der Aktivitätsanreicherung mit dem höchsten Wert für Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOC (18.9 ± 0.9 % iD/g) gegenüber Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOCA (12.0 ± 1.2 % iD/g) und Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA (7.1 ± 1.4 % iD/g). Somit zeigte diese lipophilste Verbindungen, Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOC, sowohl eine erhöhte hepatobiliäre Anreicherung als auch eine erhöhte renale Akkumulation.

Da die renale Retention von Peptiden nach dem Modell der ladungsabhängigen Endocytose^[38] für Peptide mit steigender positiver Nettoladung zunimmt, wirkt sich die N-terminale, positive Ladung der hier untersuchten glycosylierten Octreotidderivate, die durch die Amadorikupplung entsteht, negativ auf die Aktivitätskonzentration in der Niere aus^[189] und könnte eine Ursache für die hier gefundenen relativ hohen Nierenanreicherungen sein.

Da für Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOC in allen sst-rezeptornegativen Organen die höchste Konzentration gefunden wurde, kann man davon ausgehen, dass dieser Tracer eine sehr langsame Ganzkörperclearance aufweist. Grundsätzlich zeigten die beiden Histidinverbindungen in fast allen rezeptornegativen Organen eine höhere Aktivitätsanreicherung als Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA. Dieses Ergebnis verdeutlicht, welchen ausschlaggebenden Einfluss die freie Koordinationsstelle am ^{99m}Tc der Histidinderivate auf die Biodistribution und Pharmakokinetik der Tracer hat, und wie notwendig tridentate Chelatoren deshalb sind. Durch den Vergleich mit radioiodierten, glykosylierten Octreotidderivaten wird allerdings offensichtlich, dass die Haupteinflussgröße

für die unspezifische Aufnahme in rezeptornegativen Organen eher die Markierungsmethode als allgemeine Charakteristika der Verbindungen wie Lipophilie oder die Ladung ist. Grundsätzlich tragen auch andere Faktoren wie Ladungsverteilung, strukturelle Eigenschaften und metabolische Stabilität zur Biodistribution der Tracer bei.

5.4.1.2 Spezifische Anreicherung im sst-positiven Gewebe

Die Tumoranreicherungen der beiden Octreotatderivate sind vergleichbar hoch. So zeigt Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOCA einen Tumoruption von 17.9 ± 3.8 % iD/g und Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA einen von 19.2 ± 2.5 % iD/g, während der von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOC weniger als halb so groß ist (6.9 ± 1.9 % iD/g). Hier wird die Auswirkung der C-terminalen Oxidation deutlich, die zu erhöhter Affinität zu sst-Rezeptoren und gesteigerter Internalisierung der Peptide führt. Daraus ergibt sich die höhere Tumoranreicherung von Octreotaten. Dieses Ergebnis ist kongruent mit den Daten von Octreotiden und Octreotaten und ihrer radioiodierten Derivate, bei denen die Tumoranreicherung durch den Austausch von Thr⁸(ol) gegen Thr⁸ um das bis zu vierfache steigt^[49,61,62,35]. *In vitro*-Internalisierungsstudien an sst2-exprimierenden CHO-Zellen der hier untersuchten Tracer (gemessen gegen TOC) hatten gezeigt, dass Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA als einziges Derivat eine höhere maximale rezeptorvermittelte Internalisierung als [¹²⁵I]TOC erreichte (126.4 ± 6.1 % von [¹²⁵I]TOC), während Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOCA zwar eine geringere Internalisierung, aber eine höhere intrazelluläre Retention als Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA zeigte^[153]. Dieser Unterschied liefert eine mögliche Erklärung für die ähnlich hohen Tumoraufnahmen von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOCA und Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA.

Ähnlich verhält sich die Akkumulation in den anderen sst-rezeptorpositiven Organen Nebenniere und Pankreas: Allerdings sind die Werte von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]His)TOCA mit 8.4 ± 4.0 % iD/g in der Nebenniere und 9.9 ± 2.3 % iD/g im Pankreas höher als die der beiden anderen Verbindungen (siehe Abbildung 5.6).

Für die klinische Anwendung eines Tracers ist ein hinreichend hohes Tumor/Untergrund-Verhältnis (Kontrast) grundlegend. Tumore in Organen mit einem Tumor/Gewebe-Verhältnis ≤ 1 können nicht detektiert werden (in der Praxis: meist erst ab einem Verhältnis 3 : 1). Die Tumor/Organ-Verhältnisse von $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His})\text{TOC}$, $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His})\text{TOCA}$ und $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ sind für Blut, Leber, Darm, Magen, Niere, Lunge und Milz in Abbildung 5.8 dargestellt (siehe Tabelle 8.5, Anhang).

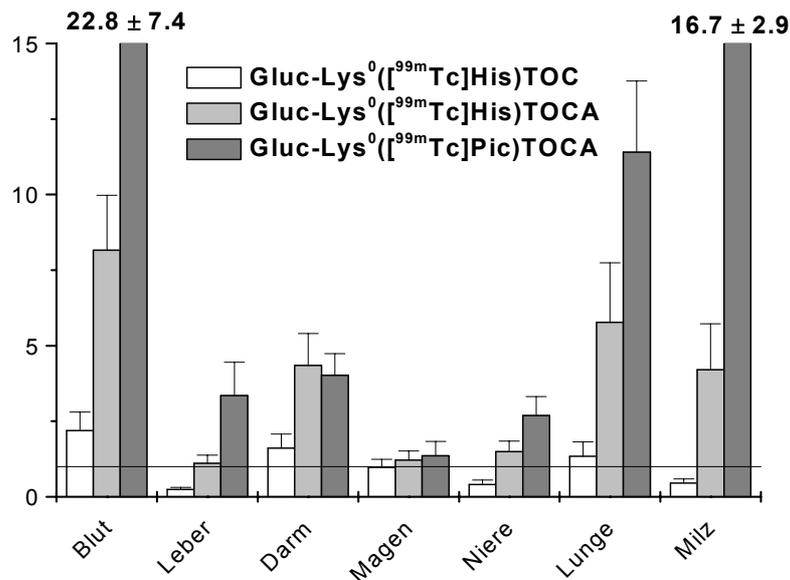


Abbildung 5.8: Tumor/Organ-Verhältnisse von $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His})\text{TOC}$, $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His})\text{TOCA}$ und $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ in AR42J-tumortragenden Nacktmäusen ($n = 5$, 120 min p.i.; Daten als $\bar{x} \pm \sigma$; Linie: $y = 1$).

Während die Tumor/Organ-Verhältnisse von $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His})\text{TOC}$ 120 min p.i. alle < 1 oder geringfügig über 1 lagen, wurden die besten Werte für $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ mit 22.8 ± 7.4 , 3.3 ± 1.1 , 4.0 ± 0.7 und 2.7 ± 0.6 für Blut, Leber, Darm bzw. Nieren gefunden. Besonders Leber und Darm sind für die Bildgebung als kritische Organe anzusehen, da eine Aktivitätsakkumulation in diesen Organen zu einem hohen Hintergrund im Abdomen beiträgt. Für die Nieren wurde bei allen drei Tracern ein relativ niedriges Verhältnis gefunden (0.4 - 2.7). Eine weitere Reduktion der Nierenanreicherung zur Erhöhung des Tumor/Nieren-Verhältnisses könnte durch Verringerung der positiven Nettoladung der Peptide, z.B. durch eine andere Glykosylierungsmethode^[49,101,189], erreicht werden.

Aus Abbildung 5.8 lässt sich erkennen, dass durch den Einsatz eines tridentaten Chelators in Kombination mit C-terminaler Oxidation eine deutliche Erhöhung der Tumor/Organ-Verhältnisse für diese Organe erzielt werden kann. Wesentlich ist, dass für die guten Tumor/Organ-Verhältnisse von $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ sowohl dessen hohe

Tumoranreicherung als auch die geringen Akkumulationen in rezeptornegativen Organen verantwortlich sind. Dagegen sind die Tumor/Organ-Verhältnisse von $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{His})\text{TOCA}$ mit 8.2 ± 1.8 , 1.1 ± 0.3 , 4.4 ± 1.1 und 1.5 ± 0.4 für Blut, Leber, Darm bzw. Nieren trotz ähnlichem Tumoruptake erheblich niedriger.

Die hier dargestellten Ergebnisse der Biodistribution verdeutlichen die Notwendigkeit eines tridentaten Chelators für die $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Markierung von Peptiden, um eine Reduktion der Retention in allen Organen, verursacht durch unspezifische Proteinassoziation, zu erreichen. Aus diesem Grund ist von den hier untersuchten Octreotidderivaten nur $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Pic})\text{-TOCA}$ als Tracer für eine weitere klinische Evaluierung geeignet. Auch Vergleiche mit bereits in Patientenstudien eingesetzten ^{99m}Tc -markierten Octreotidanaloga belegen dies: Während die Leberakkumulation von $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ relativ hoch ist im Vergleich zu anderen, vielversprechenden ^{99m}Tc -markierten Octreotidanaloga (z.B. $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{-EDDA/HYNIC-TOC}$ mit $\sim 1\% \text{ID/g}$ 240 min p.i.^[116]), zeigte $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ eine vergleichbare Nierenaufnahme zu der von $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{-EDDA/HYNIC-TOC}$ ($\sim 4.7\% \text{ID/g}$ 240 min p.i.).

5.4.2 γ -Kamera-Aufnahmen im Tiermodell

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Biodistribution und die Tumor/Organ-Verhältnisse von $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Pic})\text{-TOCA}$ im Mausmodell vielversprechend waren, wurden γ -Kamera-Aufnahmen mit diesem Tracer mit einer AR42J-tumortragenden männlichen Lewis Ratte gemacht ($n = 1$). Außerdem wurde anschließend die Biodistribution des Tracers nach 210 min p.i. in der Ratte bestimmt.

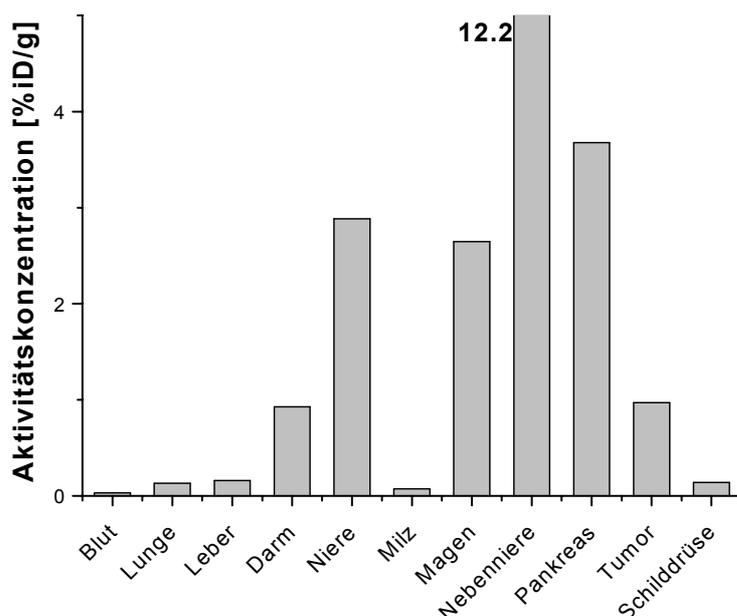


Abbildung 5.9: Biodistribution von Gluc-Lys⁰(^{99m}Tc)Pic)TOCA in einer AR42J-tumortragenden Lewis Ratte (210 min p.i.; [% iD/g]).

Im Biodistributionsexperiment (siehe Abbildung 5.9 und Tabelle 8.6, Anhang) zeigte Gluc-Lys⁰(^{99m}Tc)Pic)TOCA eine sehr niedrige Aktivitätskonzentration im Blut (0.03 % iD/g). In dieser Untersuchung wurde die Bevorzugung der renalen Exkretionsroute durch die erhöhte Traceranreicherung in der Niere (2.89 % iD/g) im Vergleich zur hepatobiliären Tracerakkumulation (Leber 0.16 % iD/g und Darm 0.93 % iD/g) bestätigt. Die sst-exprimierenden Organe Pankreas, Nebennieren und Magen^[190] weisen mit 3.7, 12.2 bzw. 2.6 % iD/g die höchsten Aktivitätsanreicherungen auf. Dagegen ist der Traceruptake in den Tumoren mit durchschnittlich 0.97 % iD/g gering (Tumor 1: 0.75% iD/g; Tumor 2: 1.06 % iD/g; Tumor 3: 1.11 % iD/g (siehe Abbildung 5.10)).

Tumor/nicht-Tumor-Verhältnisse von Gluc-Lys⁰(^{99m}Tc)Pic)TOCA 210 min p.i. lagen bei 29.3, 6.1, 1.1, 0.4, 0.3 und 0.3 für Blut, Leber, Darm, Magen, Pankreas und Nieren (siehe Tabelle 8.7, Anhang). Die Biodistribution von Gluc-Lys⁰(^{99m}Tc)Pic)TOCA in der Ratte (AR42J-Tumormodel) ist in der Literatur beschriebenen Biodistributionen^[133] sehr ähnlich: Die dort evaluierten Somatostatinrezeptor-Liganden, deren tridentate Chelatoren mit ^{99m}Tc(CO)₃ markiert wurden, zeigen 4 h p.i. (CA20948-Tumormodel) außer einer geringeren Nierenaufnahme (0.7 und 1.1 % iD/g für [^{99m}Tc]His^α-TOCA bzw. [^{99m}Tc]IDA-TOCA, siehe Abbildung 1.13, Kapitel 1.5.6.3) beinahe identische Biodistributionen wie Gluc-Lys⁰(^{99m}Tc)Pic)TOCA. Auch bei diesen Untersuchungen fanden sich 4 h p.i. Tumoraufnahmen zwischen 1 - 3 % iD/g bei allen untersuchten Derivaten. Dieser Vergleich gilt vorbehaltlich einer Vergleichbarkeit der verwendeten Tumormodelle.

Die Biodistribution eines Radiotracers in Ratten ist jedoch nicht vergleichbar mit der Biodistribution in Mäusen. Es finden sich im Allgemeinen geringere Aktivitätskonzentrationen sowohl in den Organen als auch im Tumor.

In Abbildung 5.10 ist die γ -Kamera-Aufnahme von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)-TOCA in einer AR42J-tumortragenden Ratte 90 min p.i. dargestellt.

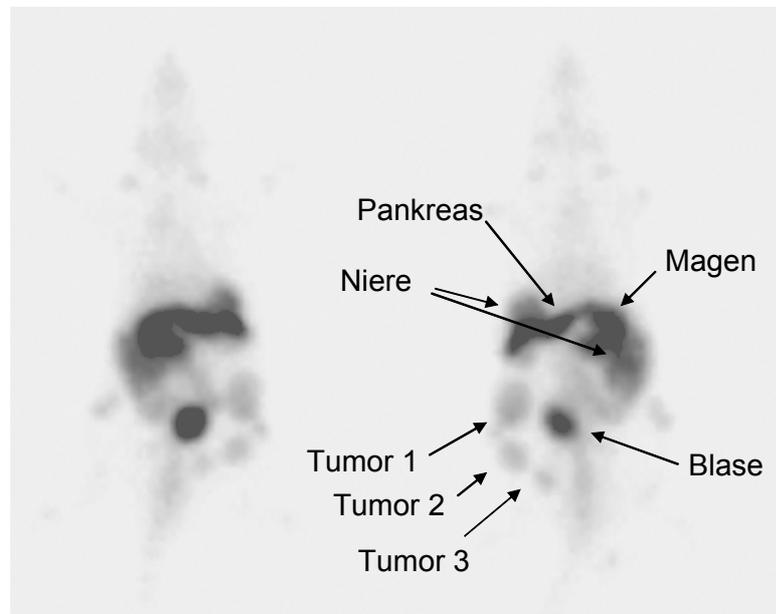


Abbildung 5.10: γ -Kameraaufnahme (ventral (links) und dorsal (rechts)) von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA in einer AR42J-tumortragenden Lewis Ratte (n = 1) 90 min p.i..

Neben einem niedrigen Hintergrund ist vor allem die Traceranreicherung in den sst-positiven Organen^[190] Magen und Pankreas sowie in den Nieren zu erkennen. Die hohe Aktivitätsanreicherung in der Blase weist auf die bevorzugte renale Ausscheidung des untersuchten Tracers hin. Die drei Tumore zeigen einen deutlichen Kontrast gegenüber dem umgebenden Gewebe und sind gut zu erkennen.

Die ROI-Analyse (Region-of-Interest) lieferte für die Tumor/nicht-Tumor-Verhältnisse von Blut bzw. Muskel, Magen, Pankreas und Nieren Werte von 8.0, 0.2, 0.2 und 0.2. Diese Werte sind im Vergleich zu den in der Biodistribution gefundenen Werten geringfügig niedriger: Das Tumor/nicht-Tumor-Verhältnis allerdings ist deutlich niedriger als das Tumor/Blut-Verhältnis bzw. Tumor/Muskel-Verhältnis (29.3 bzw. 139.4) aus der Biodistribution. Der Grund hierfür ist darin zu suchen, dass zwischen der γ -Kamera-Aufnahme 90 min p.i. und der Biodistribution 210 min p.i. die Clearance weiter fortgeschritten ist, wodurch sich das Tumor/nicht-Tumor-Verhältnis verbesserte.

5.4.3 Patientenstudie

Nachdem die Biodistributionsuntersuchung von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA in AR42J-tumortragenden Nacktmäusen vielversprechende Ergebnisse geliefert hatte, die mit dem bereits in Patientenstudien erfolgreich eingesetzten Tracer [^{99m}Tc]-EDDA/HYNIC-TOC vergleichbar sind, wurde das Potenzial von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA als SPECT-Tracer in ersten Patienten untersucht.

Zur Evaluierung des Potentials von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA als klinischem Tracer, wurden initiale γ -Kamera-Studien an zwei Patienten durchgeführt. Beide Patienten waren an metastasierenden Karzinomen des Dünndarms mit Metastasen u.a. in der Leber erkrankt. Von beiden Patienten wurden Ganzkörperaufnahmen (dorsal und ventral) jeweils 45 und 120 min p.i. und ein SPECT des oberen Abdomens gemacht. Bei Patient 2 wurde auch die Kinetik der Tracerverteilung von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA untersucht.

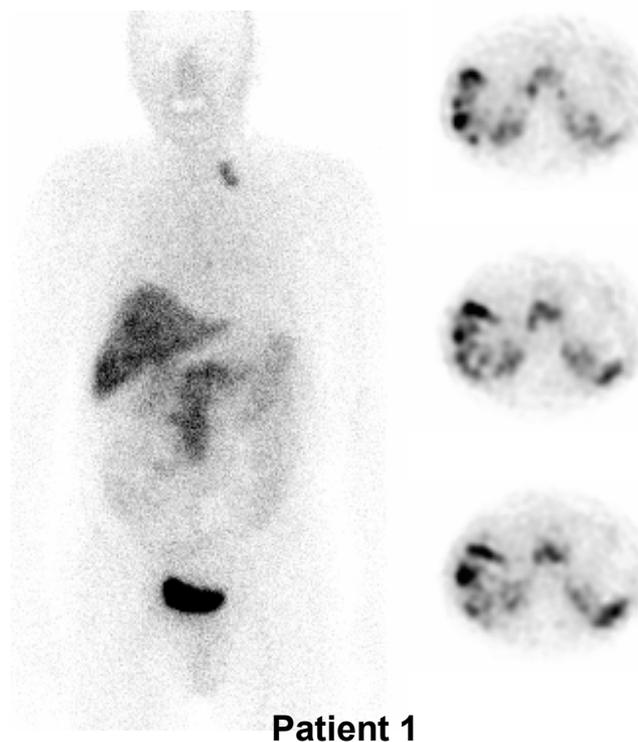


Abbildung 5.11: Planare, ventrale Ganzkörper- γ -Kameraaufnahme eines Patienten (männlich, 71 Jahre, mit einem Karzinom (rezidiv) des Dünndarms und Metastasen in der Leber, in den Lymphknoten, im Herz und im Skelett) 120 min nach i.v. Injektion von 114 MBq Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA in 6 ml PBS (links); SPECT (45'' pro Ansicht, 60 Schritte á 3°) des oberen Abdomen (rechts).

Bei beiden Patienten zeigten die Ganzkörperaufnahmen mit Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA 45 min p.i. und 120 min p.i. (Abbildung 5.11 und Abbildung 5.12) eine sehr geringe Traceranreicherung in normalem Gewebe. In der Schilddrüse wurde eine vernachlässigbare Aktivitätsaufnahme detektiert, was die hohe

Stabilität des dreizähligen ^{99m}Tc -Tricarboxyl-Komplexes mit 2-Picolylamindiessigsäure hervorhebt. Die Aktivitätsanreicherung in der Leber ist im Verhältnis zu den sst-positiven Organen und den Tumoren gering. Allerdings wird in den späteren Aufnahmen 120 min p.i. (siehe Abbildung 5.12, rechts) im Gegensatz zu den Aufnahmen 45 min p.i. (siehe Abbildung 5.12, links) auch der Dünndarm dargestellt. Ein Teil der in der frühen Phase in der Leber aufgenommenen Aktivität wird folglich hepatobiliär ausgeschieden und führt so zu der Aktivitätsaufnahme im Darm. Um den Hintergrund im Abdomen zu minimieren, sind frühe Scans ca. 60 min p.i. sinnvoll. Die Aktivitätskonzentration in den Nieren ist niedrig. Zusammen mit der hohen Aktivitätskonzentration in der Blase bestätigt dies die bevorzugt renale Ausscheidung von $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ im Patienten ohne ein größeres Ausmaß an Nierenakkumulation. In der Milz wurde, vergleichbar zu anderen sst-Tracern, ein physiologischer Uptake gefunden.

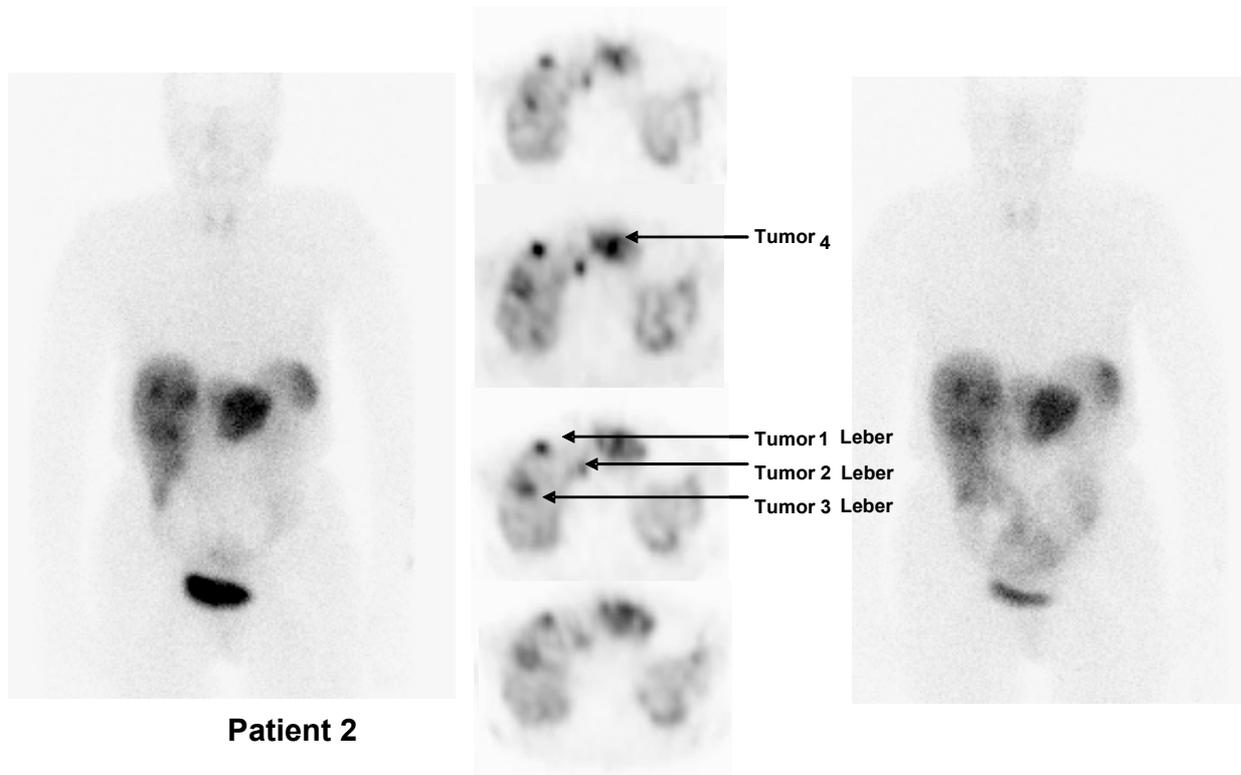


Abbildung 5.12: Planare, ventrale Ganzkörper- γ -Kameraaufnahme eines Patienten (weiblich, 71 Jahre, mit einem neuroendokrinen Karzinom mit unbekannter Lage des Primärtumors und extensiven Metastasen in der Leber) 45 min (links) und 120 min (rechts) nach i.v. Injektion von 178 MBq $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ in 6 ml PBS; SPECT (45° pro Ansicht, 60 Schritte a 3°) des oberen Abdomen (Mitte).

Bei beiden Patienten waren die mesenterialen und die Lebermetastasen trotz des geringfügigen, hepatobiliären Hintergrunds deutlich sichtbar und konnten gut identifiziert werden, da sie neben der Blase die höchste Aktivitätskonzentration aufwiesen. Zur

Tumorabgrenzung (45 min p.i.) sind aufgrund der höheren, frühen Tumor/Hintergrund-Verhältnisse, vor allem im Bereich des Abdomen, Aufnahmen bis 45 min p.i. bevorzugt.

In den SPECT-Schicht-Aufnahmen (Abbildung 5.11, rechts und Abbildung 5.12, Mitte) erfolgt die eindeutigste Tumorlokalisation. Damit lassen sich Tumore bis zu einer Größe von ca. 1 cm Durchmesser erkennen.

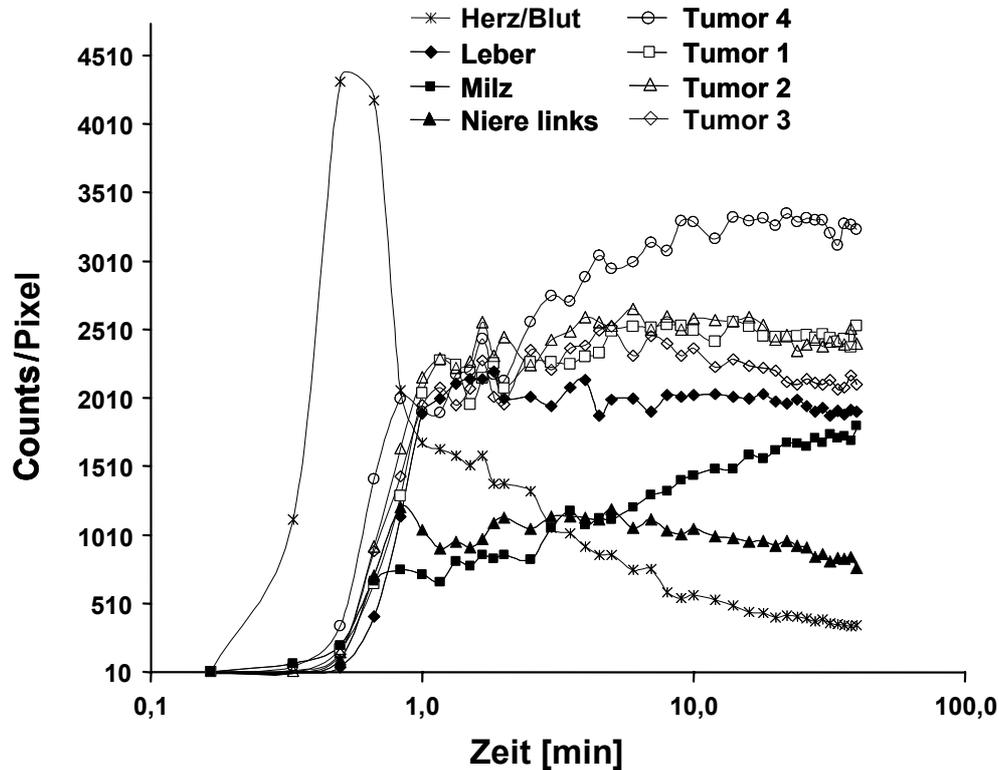


Abbildung 5.13: Anfängliche Tracerverteilung von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA in Patient 2 durch ROI-Analyse der dynamischen Serienaufnahme des oberen Abdomen während der ersten 45 min p.i. (logarithmische Auftragung).

Bei Patient 2 wurden zusätzlich die Kinetik der Verteilung und die Aufnahme von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA in den ersten 45 min p.i. durch eine dynamische Serienaufnahme des oberen Abdomen einschließlich Herz, Leber, Milz und Nieren mittels ROI-Analyse bestimmt (siehe Abbildung 5.13). Es wurde eine schnelle Blutclearance gefunden, weshalb bereits nach 10 - 15 min p.i. die niedrigste Aktivitätskonzentration und somit ein geringer Hintergrund erreicht waren. Eine schnelle renale Clearance war ebenfalls zu beobachten. Die maximale Leberaufnahme mit einem anschließenden Plateau war bereits nach ca. 2 min p.i. erreicht. Der physiologische Traceruptake in der Milz stieg über die Messdauer von 45 min kontinuierlich an. Die Aufnahme von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA in den Lebermetastasen erreichte bereits nach 1 - 2 min p.i. einen höheren Wert als die Aktivitätsanreicherung in den anderen Organen und stieg in den folgenden 10 min weiter an, d.h. die Tumoren zeigten im Verhältnis die höchste Aufnahme.

Anhand der Daten der initialen Verteilung von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA kann man erkennen, dass die Tracerverteilung bereits 15 min p.i. abgeschlossen ist, so dass auch frühe γ -Kamera-Aufnahmen aufgrund des zu erwartenden hinreichend hohen Tumor/Hintergrund-Kontrasts möglich sind.

Diese erfolgreiche γ -Kamerastudie, wie auch die gute Biodistribution im Mausmodell von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA demonstrieren die Eignung der hier eingesetzten Methoden zur Optimierung des *in vivo*-Verhaltens peptidischer Radiopharmaka. Während das Konzept des trifunktionalen Linkers eine zweifache N-terminale Funktionalisierung ermöglicht, reduziert der daran gebundene Zuckerrest die Lipophilie und führt zu bevorzugter renaler Ausscheidung. Die Markierung durch den $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Komplex ist effizient und führt zu stabilen Komplexen (niedrige Schilddrüsenanreicherung) durch Einsatz eines dreizähligen Chelators, z.B. Picolylamindiessigsäure, der die Proteinassoziation durch Transchelatierung minimiert. In Kombination mit dem Austausch des Picolylamindiessigsäure-Chelators durch den effizienteren, hydrophileren, hier initial untersuchten His(N^{ϵ} -CM)-OH-Chelator sollten sich diese Konzepte auch auf andere Peptide übertragen lassen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue chemoselektive Radiofluorierungsmethode, welche auf der Hydrazonbildung zwischen Hydrazinen und Carbonylen beruht, entwickelt und in Bezug auf die Markierungseffektivität, Chemoselektivität sowie die Stabilität der Hydrazonbindung *in vitro* und *in vivo* evaluiert.

Für die Untersuchung der Radiofluorierung durch Hydrazonbildung mit 4-[¹⁸F]Fluorbenzaldehyd ([¹⁸F]FB-CHO) wurden die HYNIC-funktionalisierten Somatostatinrezeptorliganden, HYNIC-TOCA und HYNIC-TOCam, sowie HYNIC-Substance P synthetisiert. Die Evaluierungen zeigten, dass sich die ¹⁸F-Markierung der ungeschützten, HYNIC-funktionalisierten Peptide mittels Hydrazonbildung zur Peptidmarkierung eignet. Die Markierungsreaktionen sind schnell (< 15 min), chemoselektiv und ermöglichen nach Optimierung bei 70 °C Ausbeuten bis zu 85 ± 3 % nach 10 min bzw. 89 ± 1 % nach 15 min. Ein wichtiger Vorteil gegenüber der chemoselektiven Oximbildung zwischen [¹⁸F]FB-CHO und aminooxifunktionalisierten Peptiden ist die Möglichkeit die Hydrazonbildung in wässrigem, gepuffertem Medium auch im milden pH-Bereich zwischen 4 und 5 zu nutzen. Im Gegensatz hierzu bedarf die Oximbildung stark saurer Bedingungen (pH ~ 2.5).

In Stabilitätsstudien wurde für [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA bzw. [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam keine Zersetzung in neutralen Puffern, in Serum oder *in vivo* (Blut) beobachtet. Bei pH < 5.5 zeigte sich eine Spaltung der ¹⁸F-Hydrazone in 4-[¹⁸F]Fluorbenzaldehyd und HYNIC-Peptid. Diese Instabilität könnte nach Internalisierung der Radiopeptide in Tumorzellen eine intrazelluläre Retention nach Spaltung unter den sauren, endosomal Bedingungen (pH 4 – 5) bewirken. Hierzu würde es ionischer, idealerweise anionischer ¹⁸F-fluorierter Carbonylkomponenten bedürfen, welche sowohl ein Verlassen der Carbonylkomponente nach intrazellulärer Spaltung durch passive Diffusion verhindern (interzellulärer Effekt) und gleichfalls die Lipophilie der markierten Derivate erniedrigen könnten (pharmakokinetischer Effekt). Die Optimierung sollte vorgenannte Eigenschaften der radiofluorierten Tracer verbessern ohne gleichzeitig die Stabilität oder die Markierungseffizienz negativ zu beeinflussen. Insgesamt stellt die ¹⁸F-Markierung von Peptiden mittels Hydrazonbildung eine effiziente, chemoselektive zwei-Stufen-Radiofluorierungsmethode dar und erlaubt den Einsatz ungeschützter Markierungsvorläufer.

Ferner konnte gezeigt werden, dass sich die mit HYNIC-funktionalisierten Peptide als Vorläufer sowohl für die ^{18}F - als auch die $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Markierung einsetzen lassen.

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war die Evaluierung der Radiomarkierung von sst-Liganden sowie glykosylierten sst-Liganden mittels der $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Methode in Abhängigkeit von strukturellen Parametern (C-terminale Carboxylfunktion, Glykosylierung), von der Dentizität und von der Art des Chelators. Ziel war auch die Optimierung des *in vivo*-Verhaltens der glykosylierten $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tracer. Für diese Zwecke wurden His^τ -TOC und His^τ -TOCA sowie $\text{Gluc-Lys}^0(\text{His})\text{TOC}$, $\text{Gluc-Lys}^0(\text{His})\text{TOCA}$ und $\text{Gluc-Lys}^0(\text{Pic})\text{TOCA}$ synthetisiert und evaluiert.

Die mit dem neuen tridentaten Chelator ($\text{His}(\text{N}^\tau\text{-CM})\text{-OH}$) funktionalisierten Peptide, His^τ -TOC und His^τ -TOCA, zeigten ähnliche Markierungsausbeuten in Abhängigkeit von der Vorläuferkonzentration (z.B. $\sim 95\%$ Ausbeute bei 10^{-4} M Peptidkonzentration, 30 min 75°C) wie $\text{Gluc-Lys}^0(\text{His})\text{TOCA}$. Unter sonst identischen Bedingungen war die Ausbeute an $\text{Gluc-Lys}^0([\text{99mTc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ unter denselben Bedingungen deutlich niedriger ($\sim 67\%$). Die Histidine erscheinen daher den 2-Picolylamindiessigsäurederivaten hinsichtlich Markierungseffizienz generell überlegen zu sein.

Anschließend wurde die Biodistribution von $\text{Gluc-Lys}^0([\text{99mTc}]\text{His})\text{TOC}$, $\text{Gluc-Lys}^0([\text{99mTc}]\text{His})\text{TOCA}$ und $\text{Gluc-Lys}^0([\text{99mTc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ im Mausmodell untersucht. $\text{Gluc-Lys}^0([\text{99mTc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ mit dem tridentaten Picolylamindiessigsäure-Chelator zeigte 120 min p.i. in allen Exkretionsorganen die niedrigste Aktivitätsanreicherung (0.8 - 7.1 % iD/g) im Tumor dagegen die höchste Retention ($19.2 \pm 2.5\%$ iD/g). Tracer mit dem bidentaten Histidin-Chelator zeigten dagegen aufgrund der ungesättigten Koordinationssphäre des Technetiums eine verlängerte Retention im Blut und in den Exkretionsorganen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit einer gesättigten Koordinationssphäre der $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tricarbonyl-Komplexe.

Aufgrund der vielversprechenden Biodistributionsergebnisse wurde $\text{Gluc-Lys}^0([\text{99mTc}]\text{Pic})\text{-TOCA}$ in ersten γ -Kamerastudien an zwei Patienten bewertet. In beiden Fällen wurde ein niedriger Hintergrund und geringe Traceraufnahme in den Ausscheidungsorganen detektiert. $\text{Gluc-Lys}^0([\text{99mTc}]\text{Pic})\text{-TOCA}$ wurde in den Tumoren stark angereichert und erlaubte eine klare Abgrenzung der Läsionen von umliegenden Gewebe. Aufgrund der schnellen Blutclearance, der schnellen renalen Ausscheidung und der schnellen Tumoraufnahme erscheint eine frühe Bildgebung bereits 15 min p.i. möglich.

Das untersuchte Gesamtkonzept zur Herstellung ^{99m}Tc -markierter Peptide, bestehend aus ^{99m}Tc -Tricarbonyl-Markierungsmethodik, Glycosylierung und Verwendung tridentater Chelatoren lieferte mit $\text{Gluc-Lys}^0([\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ einen vielversprechenden Tracer für die Somatostatinrezeptorzintigraphie. Weitere Optimierungen dieses Tracers und vergleichbarer Radiopharmaka, die auf die Verwendung eines effizienteren, weniger lipophilen tridentaten Chelators (His^τ -Chelator), auf den Einsatz einer alternativen Glykosylierungsmethode zur Reduktion der Gesamtladung und auf den Einbau eines kürzeren trifunktionalen Linkers abzielen sollten, könnten die Bereitstellung ^{99m}Tc -markierter peptidischer Tracer für den klinischen Einsatz weiter vorantreiben.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

7.1.1 Organische Synthese

Alle **organischen Reagenzien** und Lösungsmittel wurden bei SigmaAldrich bzw. Fluka (Taufkirchen, Deutschland), Alexis (Grünberg, Deutschland) oder Merck Eurolab (Darmstadt, Deutschland) erworben (Qualität p.a.). Die Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH = 7.4) wurde von Biochrom (Berlin, Deutschland) bezogen. DHP-HM-Harz und Rink-Amid-AM-Harz wurden über Novabiochem Merck Biosciences GmbH (Schwalbach, Deutschland), TCP-Harz über PepChem (Tübingen, Deutschland) bezogen. Fmoc-geschützte und andere Aminosäuren wurden entweder bei Novabiochem Merck Biosciences GmbH oder bei Bachem (Heidelberg, Deutschland) erworben. (Carboxymethyl-pyridin-2-yl-methylamino)essigsäure (2-Picolylamin-diessigsäure = Pic = PADA)^[35] und Lys³(Dde)-Substance P(Dde) (Arg-Pro-Lys(Dde)-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met) wurden von Frau Dr. Schottelius synthetisiert und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Ebenso waren N^α-(1-Deoxy-D-fructosyl)-Lys⁰(N^ε-histidinyl)-Tyr³-octreotid (Gluc-Lys⁰(His)-TOC) und N^α-(1-Deoxy-D-fructosyl)-Lys⁰(N^ε-histidinyl)-Tyr³-octreotat (Gluc-Lys⁰(His)-TOCA) bereits von Frau Dr. Schottelius synthetisiert worden^[35] und ausreichend vorhanden, so dass sie ohne erneute Synthese verwendet werden konnten.

Peptidsynthesen wurden in Schüttelgefäßen aus Glas mit einer Fritte durchgeführt. Diese wurden von einem mechanischen Schüttler (St. John Associates Inc., USA) bewegt.

Dünnschichtchromatographie wurde mit Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten der Firma Merck Eurolab durchgeführt. Die Detektion der Substanzen erfolgte anhand der UV-Absorption bei 254 nm mittels einer Fluotest UV-Lampe oder Anfärben mit Ninhydrin-Lösung (0.3 g Ninhydrin, 3 g Essigsäure, 100 ml EtOH) und anschließender Wärmebehandlung.

Flash-Chromatographie wurde unter Verwendung von Silica-Gel 60 (Korngröße 0.04 - 0.063 mm) der Firma Fluka (Taufkirchen, Deutschland) ausgeführt.

Für **analytische HPLC** wurden, soweit nicht anders angegeben, Nucleosil 100 C18-Säulen (5 µm, 125 x 4.0 mm) verwendet (Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland). Zur Durchführung wurde ein Gradienten-HPLC-System (S 2000 HPLC-Controller, S 1021 Solvent Delivery System und S 8111 Low Pressure Gradient Mixer von

Sykam GmbH, Fürstenfeldbruck, Deutschland) eingesetzt. Die Aufzeichnung der UV-Absorption erfolgte bei 220 nm mit einem UVIS 200 Photometer (LinearTM Instruments Corporation, Reno, USA). Die Datenaufnahme erfolgte mittels eines „Winnie“-Interface (raytest, Straubenhardt, Deutschland) und die Auswertung der UV-Daten erfolgte über die Winnie32-Software (raytest, Straubenhardt, Deutschland). Zur Elution der Substanzen wurden variable Gradienten der Eluenten A (H₂O mit 0.1 % TFA v/v) und B (MeCN mit 0.1 % TFA v/v) bei einem Fluss von 1ml/min verwendet. Die angegebenen k'-Werte berechnen sich nach:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad t_R = \text{Retentionszeit [min]}$$
$$t_0 = (\text{Totvolumen der Säule [ml]})/(\text{Fluss [ml/min]})$$

Präparative HPLC wurde mit dem oben genannten HPLC-System mit einer J'Sphere ODS-H80 (150 x 20 mm) Säule (YMC Europe GmbH, Schermbeck, Deutschland) bei einem Fluss von 10 ml/min und verschiedenen Gradienten der Eluenten A (H₂O mit 0.1 % TFA v/v) und B (MeCN mit 0.1 % TFA v/v) durchgeführt.

Massenspektren wurden durch Elektrospray-Ionisation (ESI) an einem LC-MS-System LCQ von Finnigan (Bremen, Deutschland) gegebenenfalls in Kombination mit einem Hewlett Packard Serie1100 HPLC System unter Verwendung von C-18-Säule (YMC ODS-A, 125 x 2.1 mm, 120 Å, 3 µm) und variablen Gradienten in 15 min aus A (H₂O mit 0.1 % Ameisensäure v/v) und B (MeCN mit 0.1 % Ameisensäure v/v) (Flussrate: 0.3 ml/min) erhalten.

NMR-Spektren wurden an einem AC250 Spektrometer (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen und mit einer UXNMR Version 3.1 (Bruker) prozessiert. Die chemischen Verschiebungen bei ¹H-Spektren wurden auf das Restprotonensignal von d₆-DMSO bei 2.5 ppm bzw. CDCl₃ bei 7.24 ppm, bei ¹³C-Spektren auf das ¹³C-Signal von d₆-DMSO bei 39.5 ppm bzw. CDCl₃ bei 77.0 ppm kalibriert.

Zentrifugationen bis 1.5 ml wurden in Eppendorf-Caps (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) an einer Biofuge 15 (Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) vorgenommen. Für größere Volumina wurde eine Megafuge 1.0 R (Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) verwendet.

7.1.2 ¹⁸F-Radiomarkierung

Der **Markierungsvorläufer** 4-Formyl-N,N,N-trimethylanilinium Triflat wurde von Hr. Poethko synthetisiert^[100,175] und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Analytische Radio-HPLC wurde auf einem Waters Gradienten HPLC System (1525 Binäre HPLC-Pumpe mit einem Waters 2487 Dual λ Absorbance Detektor und Breeze Software, Waters, Eschborn, Deutschland) durchgeführt. Radioaktivität wurde mittels eines NaI(Tl) Bohrloch-Szintillationszählers (EG&G Ortec, München, Deutschland), der an den Auslauf des UV-Detektors angeschlossen war, detektiert. Im Allgemeinen wurden eine Multosphere 100 C18-Säule (5 μ m, 125 x 4.6 mm, CS GmbH, Langerwehe, Germany) und verschiedene Gradienten B (MeCN mit 0.1 % TFA v/v) in A (H₂O mit 0.1 % TFA v/v) und mit einer konstanten Flussrate von 1 ml/min verwendet. **Präparative Radio-HPLC** wurde auf dem präparativen Sykam Gradienten HPLC System mit einem NaI(Tl) Bohrloch-Szintillationszähler (EG&G Ortec, München, Deutschland), der an den Auslauf des UV-Detektors angeschlossen war, durchgeführt. Eine Multosphere 100 C18-Säule (5 μ m, 250 x 10 mm, CS GmbH, Langerwehe, Deutschland) wurde mit einem Fluss von 5ml/min und verschiedenen Gradienten der Eluenten A (H₂O mit 0.1 % TFA v/v) und B (MeCN mit 0.1 % TFA v/v) eingesetzt.

Für die **Metabolitenanalyse** wurden ein Sykam Gradienten HPLC System (Sykam GmbH, Fürstfeldbruck, Deutschland) und ein Durchfluss-Szintillationsdetektor (Packard BioScience Company, Meriden, USA) benutzt. Zur Trennung wurde eine Multosphere 100 C18-Säule (5 μ m, 150 x 10 mm, CS GmbH, Langerwehe, Deutschland) verwendet (Gradient: 22 - 50 % B in 20 min (Flussrate: 4 ml/min)). Die Daten wurden mit einer FloOne Software (Radiomatic series 500TR, Packard BioScience Company, Meriden, USA) aufgezeichnet und analysiert.

Die Radioaktivitätsmessungen zur Bestimmung der Lipophilie und bei *in vitro*- sowie *in vivo*-Studien wurden mit einem 1480 Wizard 3 γ -Counter der Firma Wallac (Turku, Finnland) durchgeführt.

7.1.3 ^{99m}Tc -Radiomarkierung

^{99m}Tc]**Pertechnetat** wurde mit Kochsalzlösung (0.9 % w/v NaCl, DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland) entweder aus einem ElutecTM ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$)-Generator (Du Pont Pharma, Brüssel, Belgien) oder aus einem Ultratechnekow FM ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$)-Generator (Mallinckrodt Medical B.V., Petten, Niederlande) eluiert. Die Reduktion des ^{99m}Tc]**Pertechnetats** erfolgte mittels IsoLink-Kits (von Mallinckrodt Medical B.V. (Petten, Niederlande) im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation freundlicherweise von Herrn Dr. Ensing zur Verfügung gestellt). $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3](\text{NEt}_4)_2$ wurde von Prof. R. Alberto freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Da kein nichtradioaktives Tc-Isotop existiert, wurden als Ersatz die analogen Re-Verbindungen aus $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3](\text{NEt}_4)_2$ als kalte Standards synthetisiert, die zur HPLC-analytischen Identifikation der ^{99m}Tc -Tracer aufgrund der chemischen Ähnlichkeit der beiden Nuklide^[191] dienen sollten.

Für die **analytische Radio-HPLC** wurde ein das selbe HPLC-System (Fürstenfeldbruck, Deutschland) wie für analytische HPLC eingesetzt. Die Detektion der Aktivität erfolgte analog der Aufnahme von ^{18}F -HPLC-Chromatogrammen. Es wurde eine Multosphere 100 C18-Säule (5 μm , 125 x 4.0 mm, CS GmbH, Langerwehe, Deutschland) eingesetzt und zur Elution der Substanzen wurden variable Gradienten der Eluenten A (H_2O mit 0.1 % TFA (V/V)), B (MeCN mit 0.1 % TFA (v/v)) bzw. C (MeOH) mit einem Fluss von 1 ml/min verwendet. **Semi-präparative Radio-HPLC** wurde auf demselben HPLC-System durchgeführt unter Verwendung einer Multosphere 100 C18-Säule (5 μm , 150 x 8 mm, Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) und einer konstanten Flussrate von 3,6 ml/min mit verschiedenen Gradienten der Eluenten, A (H_2O mit 0.1 % TFA (v/v)) und C (MeOH).

7.1.4 *In vivo*-Studien

AR42J-Zellen wurden von ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) bezogen. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (Seromed, Berlin, Deutschland) mit 2 mM L-Glutamin (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und 10 % FKS (Seromed) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. BSA (bovine serum albumin) wurde von Sigma (St. Louis, USA) bezogen. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde ein CASY®1-TT Zellzähl- und Analysesystem (Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland) benutzt.

Nacktmäuse (CD1 nu/nu, weiblich, 6 - 8 Wochen), Black six-Mäuse (weiblich, 12 Wochen) und Lewis Ratten (männlich, 3 - 4 Wochen) wurden von Charles River WIGA GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Liquemin N 25000 (Natrium-Heparin) wurde bezogen von der Hoffmann - La Roche AG (Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Für Metabolitenuntersuchungen wurden in flüssigem Stickstoff eingefrorene Organe mit einem Mikro-Dismembrator (II) (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) homogenisiert.

7.2 Markierungsvorläufer

7.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: Belegung von DHP-HM-Harz mit Fmoc-Thr(tBu)-ol

Zunächst erfolgt unter Feuchtigkeitsausschluss ein Vorquellen des DHP-Harzes für 1 h in 10 ml/g 1,2-Dichlorethan. 3.5 eq (bezogen auf die freien funktionellen Gruppen des Harzes) Fmoc-Aminoalkohol und 1.86 eq vorher im Hochvakuum getrocknetes Pyridinium-p-toluolsulfonat (PPTS) werden nacheinander in Dichlorethan (7 ml/g) gelöst und zum Harz gegeben. Die Reaktionsmischung wird unter Feuchtigkeitsausschluss über Nacht unter Rückfluss gerührt. Anschließend werden 5 ml Pyridin zum Cappen der freien funktionellen Gruppen des Harzes zugegeben und das Gemisch bei RT 15 min gerührt. Dann wird das Harz abfiltriert und zweimal mit DMF und dreimal mit DCM gewaschen. Das belegte Harz wird im Exsikkator getrocknet. Die Belegung des DHP-HM-Harzes in mol/g Harz errechnet sich nach folgender Formel:

$$b = \left(\frac{M(\text{Harz}_{\text{belegt}}) - M(\text{Harz}_{\text{unbelegt}})}{MW(\text{Alkohol})} \right) / M(\text{Harz}_{\text{belegt}})$$

AAV 2: Belegung von TCP-Harz mit einer Fmoc-Aminosäure

1.5 eq (bezogen auf die freien funktionellen Gruppen des Harzes) Fmoc-Aminosäure und 1.25 eq DIPEA werden in wasserfreiem DCM (10 ml/g Harz) gelöst und auf das Harz gegeben. Die Suspension wird 5 min bei RT gerührt. Dann werden weitere 2.5 eq DIPEA zugefügt und die Reaktionsmischung 2 h bei RT gerührt. Zum Cappen freier funktioneller Gruppen am Harz werden dann 3 - 5 ml MeOH zugegeben und nochmals 20 min gerührt. Anschließend wird das Harz abfiltriert und mit DCM und DMF gewaschen. Dabei wird langsam die Konzentration an MeOH gesteigert, um eine Aggregation des Harzes zu verhindern. Das belegte Harz wird im Exsikkator getrocknet. Die Belegung des TCP-Harzes in mol/g Harz errechnet sich nach folgender Formel:

$$b = \left(\frac{M(\text{Harzbelegt}) - M(\text{Harzunbelegt})}{MW(\text{Aminosäure}) - MW(\text{HCl})} \right) / M(\text{Harzbelegt})$$

AAV 3: Belegung von Rink-Amid-AM-Harz mit einer Fmoc-Aminosäure

Nach 30 minütigem Vorquellen wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe des Harzes 5 min und noch mal 20 min mit 20 % (v/v) Piperidin in DMF abgespalten. Dann erfolgt die Belegung des Harzes nach dem Standardprotokoll für Festphasenpeptidsynthese (SPPS) mit 1.5 eq Fmoc-Thr(tBu)-OH (siehe Tabelle 7.1). In diesem Fall wird die Belegung des Harzes üblicherweise nicht bestimmt, sondern man geht von der maximal möglichen Belegung (laut Herstellerangabe) aus.

AAV 4: Standardpeptidsynthese am Harz^[156,157]

Für die Peptidkupplung am Polystyrolharz werden die einzelnen Schritte bis zur Vervollständigung der gewünschten Aminosäuresequenz wiederholt durchgeführt. Tabelle 7.1 fasst die durchzuführenden Schritte zusammen:

Tabelle 7.1: Einzelne Schritte der Aminosäurekupplung beim Aufbau linearer Peptide an der festen Phase

Reagenzien	Zeit [min]	Wiederholungen	Funktion
NMP	30	1	Quellen ^(a)
20 % (v/v) Piperidin in DMF	5	1	Fmoc-Abspaltung
20 % (v/v) Piperidin in DMF	20	1	Fmoc-Abspaltung
NMP	je 2-3	6	Waschen
Fmoc-Aminosäure, HOBt, TBTU, DIPEA bis pH 8.0 - 8.5, NMP	45-60	1	Kupplung
NMP	je 2-3	6	Waschen
DCM	je 2-3	3	Waschen ^(b)

^(a) nur nach einer Unterbrechung der Peptidsynthese über Nacht

^(b) nur vor einer Unterbrechung der Peptidsynthese über Nacht

Die Standardpeptidsynthese wird in NMP durchgeführt. Für die Kupplungsreaktion werden zunächst 1.5 eq der zu kuppelnden Fmoc-Aminosäure und 1.5 eq HOBt in NMP (ca. 10 ml/g Harz) gelöst (die Äquivalentangaben sind bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes). Nach kurzer Voraktivierung der Säure wird diese Lösung zum Harz gegeben, ebenso wie eine Lösung von 1.5 eq TBTU in NMP. Anschließend wird das Reaktionsgefäß kurz geschüttelt, um die Reagenzien mit dem Harz zu vermischen. Die Reaktionslösung wird dann mit ca. 3.5 eq DIPEA auf pH 8.5 eingestellt. Für die Kupplungsreaktion wird das Reaktionsgefäß 45 - 60 min bei RT geschüttelt.

AAV 5: Abspaltung eines Peptides vom DHP-HM-Harz

Nach fünfmaligem Waschen des Harzes mit DCM wird das Peptid vom DHP-HM-Harz unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen abgespalten. Dazu wird eine Mischung einer Lösung aus TFA : H₂O : TIBS (95 : 2.5 : 2.5 v/v/v) mit DCM im Verhältnis 1 : 1 verdünnt und auf das Harz gegeben. Nach 30 min Schütteln bei RT wird das Harz dreimal mit DCM gewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum eingengt. Nach Eintrübung der Lösung beim Einengen wird das Produkt mit Ether ausgefällt und im Exsikkator getrocknet.

AAV 6: Abspaltung von Peptiden vom TCP-Harz/Rink-Amid-AM-Harz

Vor der Abspaltung des Peptides vom TCP-/Rink-Amid-AM-Harz und der gleichzeitigen Entfernung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz fünfmal mit DCM gewaschen. Dann wird das Harz in einer Mischung aus TFA : H₂O : TIBS (95 : 2.5 : 2.5 v/v/v) 30 min bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Harz einmal mit oben genannter Mischung und zweimal mit DCM gewaschen, und die vereinigten Filtrate im Vakuum eingengt. Nach der Trübung der Lösung beim Einengen wird das Produkt mit Ether ausgefällt und im Exsikkator getrocknet.

AAV 7: Cyclisierung von Tyr³-Octreotid-Derivaten

Das abgespaltene Peptid wird in THF (ca. 50 ml/300 µg Peptid) suspendiert. Zu dieser Suspension wird so lange 5 mM NH₄OAc-Lösung gegeben, bis die Lösung klar wird. Anschließend wird der pH-Wert mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung auf 7 eingestellt. Nach Zugabe von 30 %igem H₂O₂ (100 µl/300 µg Peptid) wird die Lösung bei RT gerührt. Das Ende der Reaktion wird mittels HPLC bestimmt, wobei die Reaktion in den meisten Fällen nach 1 h beendet ist. Daraufhin wird die Lösung im Vakuum eingengt und anschließend lyophilisiert.

AAV 8: Fmoc-Entschützung in Lösung

Das Fmoc-geschützte Peptid oder die Fmoc-geschützte Aminosäure wird in DMF (800 µl/200 mg Edukt) gelöst. Es wird Piperidin (200 µl/200 mg Edukt) zugegeben, und die Mischung 10 - 20 min bei RT gerührt (HPLC-Kontrolle). Das Produkt wird in Ether ausgefällt und im Exsikkator getrocknet.

AAV 9: Entschützung säurelabiler Schutzgruppen in Lösung

Das säurelabil geschützte Peptid oder die säurelabil geschützte Aminosäure wird in einer Lösung aus TFA : H₂O : TIBS im Verhältnis 95 : 2.5 : 2.5 (v/v/v, 1 ml/200 mg Edukt) gelöst. Das Gemisch wird in Abhängigkeit von der Art der Schutzgruppen 15 - 400 min bei RT gerührt (HPLC-Kontrolle). Dann wird das Produkt in Ether ausgefällt und im Exsikkator getrocknet.

AAV 10: Dde-Entschützung in Lösung

Das Dde-geschützte Peptid wird in DMF : Hydrazinhydrat 98 : 2 (v/v, 1 ml/100 mg Edukt) gelöst und 10 min bei RT gerührt (HPLC-Kontrolle). Anschließend wird das Produkt in Ether ausgefällt und im Exsikkator getrocknet.

AAV 11: Kupplung von Carbonsäuren an Peptide mit HOBt/TBTU/DIPEA in Lösung

Die Carbonsäure (1.5 eq bezogen auf das Peptid) wird mit 1.5 eq HOBt und 1.5 eq TBTU in DMF (1 ml/200 mg Peptid) gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird mit 3.5 eq DIPEA auf 8-8.5 eingestellt. Nach 10 minütiger Voraktivierung der Carboxylkomponente wird das Peptid in 1 ml/200 mg DMF langsam zugetropft. Das Ende der Reaktion wird mittels HPLC bestimmt. Dann wird das Produkt in Ether ausgefällt und im Exsikkator getrocknet.

AAV 12: Kupplung von Carbonsäuren an Peptide mit HOAt/DIC/Pyridin

Die Carbonsäure (1.5 eq bezogen auf das Peptid bzw. die Äquivalentangaben bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes) wird mit 1-2 eq HOAt, 1-2 eq DIC und 1-3 eq Pyridin in 1 ml DMF 10 min voraktiviert. Nach 10 minütiger Voraktivierung der Carboxylkomponente wird das Peptid in 1 ml/200 mg DMF langsam zugetropft bzw. die Lösung auf das Harz gegeben und die Reaktionslösung unter Durchmischung bei RT reagieren gelassen. Das Ende der Reaktion wird mittels HPLC bzw. Kaisertest bestimmt. Im Fall einer Reaktion in Lösung wird das Produkt in Ether ausgefällt und im Exsikkator getrocknet. Im Fall einer Reaktion am Harz wird nach Standardmethode weiterverfahren.

AAV 13: Kupplung von Succinimidyl-Boc-HYNIC an Peptide

Das Peptid, Succinimidyl-Boc-HYNIC (1.5 eq bezogen auf das Peptid) und HOBt (1.5 eq) werden in DMF (1 ml/ 50 mg Peptid) gelöst, und die Lösung mit ca. 2.5 eq DIPEA auf pH 8.5 eingestellt. Anschließend wird die Reaktionslösung bei 60 °C gerührt. Das Ende der Umsetzung wird mittels HPLC-Kontrolle bestimmt. Das Produkt wird dann in Ether ausgefällt und im Exsikkator getrocknet.

AAV 14: N-terminale Glykosylierung von Peptiden via Amadori-Reaktion^[35,184,185]

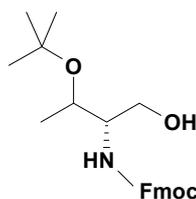
Das N^α-terminal ungeschützte Peptid wird mit 10 eq Glucose in MeOH : AcOH 95 : 5 (1 ml/100 mg Peptid) gelöst, wobei sich der Zucker erst beim Erwärmen löst. Das Reaktionsgemisch wird anschließend auf 60 °C erhitzt und für 16 - 24 h gerührt. Dabei wird das Reaktionsende mittels HPLC bestimmt. Das Produkt wird dann in Ether ausgefällt und im Exsikkator getrocknet.

AAV 15: Bestimmung der Lipophilie (logP_{ow})

Das zu untersuchende Peptid wird mittel HPLC isoliert und das Volumen der Produktfraktion bzw. des Eluats der Kartusche reduziert. Anschließend wird diese Lösung mit ca. 4 kBq radiomarkiertem Peptid (ca. 10 µl) mit PBS-Puffer auf 500 µl verdünnt, und dann mit 500 µl 1-Octanol versetzt (n = 6). Das Gemisch wird 3 min gevortext und anschließend 6 min bei 14500 g zentrifugiert. Von jeder Phase werden Aliquots von 100 µl entnommen, und die Aktivität wird im γ-Counter gemessen. Der P_{OW}-Wert errechnet sich nach:

$$P_{OW} = \frac{[A_{Octanol}]}{[A_{PBS}]}$$

P_{OW} = Verteilungskoeffizient zwischen Octanol- und wässriger Phase
[A_{Octanol}] = Konzentration in Octanol
[A_{PBS}] = Konzentration in Puffer (PBS)

7.2.2 Synthese aminosäureähnlicher Bausteine**7.2.2.1 Fmoc-Thr(tBu)-ol^[163]**

Es wurden 2.78 g Fmoc-Thr(tBu)-OH (7 mmol) in 100 ml THF bei -10 °C gelöst und unter Trübung N-Methylmorpholin (772 µl, 7 mmol) und Chlorameisensäureethylester (666 µl, 7 mmol) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei -10 °C gerührt und anschließend mit NaBH₄ (794 mg, 21 mmol) versetzt. Daraufhin wurden 120 ml MeOH im Laufe von 45 min langsam zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 0 °C gerührt. Nach 3 h wurden unter Aufklaren der Lösung 100 ml 1 M HCl zugefügt. Die organischen Lösungsmittel wurden im Vakuum abgedampft, und die verbleibende wässrige Phase wurde dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄

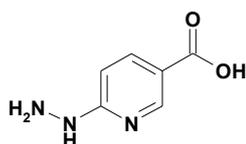
getrocknet und im Vakuum eingeengt. Als Rohprodukt wurde ein hellgelbes Öl erhalten, das mittels Flash-Chromatographie (EE : Hexan, 70 : 30) gereinigt wurde. Das Produkt wurde als klares, zähes Öl erhalten (2.06 g, Ausbeute: 77 %).

MW: 383.5 g/mol; C₂₃H₂₉NO₄, R_f(EE) = 0.81

m/z = 406.1 ([M+Na]⁺)

¹H-NMR (CDCl₃; 250 MHz): δ (ppm) 1.16 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, CHCH₃), 1.20 (9H, s, tBu), 2.88 (1H, breit, OH), 3.61 (1H, breit, CHCH₂OH), 3.66 (2H, breit, CHCH₂OH), 3.94 (1H, m, CHCH₃), 4.22 (1H, t, *J* = 6.8 Hz, CHCH₂CO), 4.40 (2H, m, CHCH₂CO), 5.28 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, NH), 7.30 (2H, d, *J* = 7.4 Hz, Ar-H), 7.38 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, Ar-H), 7.59 (2, d, *J* = 7.4 Hz, Ar-H), 7.74 (2H, d, *J* = 7.4 Hz, Ar-H).

7.2.2.2 6-Hydrazin-nicotinsäure (HYNIC)^[176]

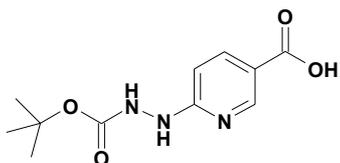


Wie von Abrams *et al.*^[176] beschrieben, wurde 6-Chlornicotinsäure (8.0 g, 50.8 mmol) zu 80 % Hydrazinhydrat (35.0 ml, 930.0 mmol) gegeben und für 4 h bei 100 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, und der entstandene weiße Feststoff in Wasser gelöst. Diese Lösung wurde mit konzentrierter HCl bis pH 5.5 angesäuert. Der dabei ausgefallene Niederschlag wurde mit 95 % EtOH und Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als gelbes Pulver erhalten (7.5 g, Ausbeute: 96 %).

MW = 153.1 g/mol, C₆H₇N₃O₂, R_f = 0.73 (EE (1 % Essigsäure))

¹H-NMR (d₆-DMSO, 250 Hz): δ (ppm) 6.7 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, Ar-H), 7.8 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.9 Hz, Ar-H), 8.3 (1H, s, NH), 8.5 (1H, d, *J* = 2.3, Ar-H).

7.2.2.3 6-(Boc-hydrazin)-nicotinsäure (Boc-HYNIC)^[176]

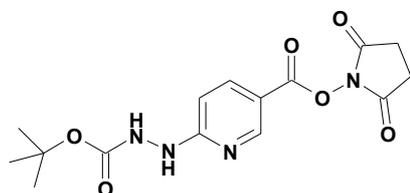


Zu einer Lösung von 6-Hydrazin-nicotinsäure (3.0 g, 20.0 mmol) und Triethylamin (3.3 ml, 24.0 mmol) in DMF (22.0 ml) wurde Di-*tert*-butyl-dicarbonat (4.6 g, 20.0 mmol) gegeben. Nach ca. 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Suspension homogen. Nach weiteren 18 h Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie gereinigt (EE (1 % Essigsäure)). Das Produkt wurde als weißes Pulver erhalten (3.8 g, Ausbeute: 75 %).

MW = 253.1 g/mol, C₁₁H₁₅N₃O₄, R_f = 0.86 (EE (1 % Essigsäure))

¹H-NMR (d₆-DMSO, 250 Hz): δ (ppm) 1.4 (9H, s, CH₃), 6.5 (1H, d, J = 8.5 Hz, Ar-H), 7.9 (1H, d, J = 9.2, Ar-H), 8.6 (1H, s, Ar-H).

7.2.2.4 N-Succinimidyl-6-(Boc-hydrazin)-nicotinsäureester Succinimidyl-Boc-HYNIC^[176]



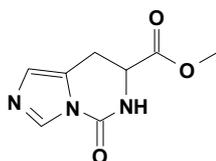
Zu einer Lösung von Boc-HYNIC (2.3 g, 9.0 mmol) und *N*-Hydroxysuccinimid (1.0 g, 9.0 mmol) in DMF (23.0 ml) wurde eine Lösung von Dicyclohexylcarbodiimid (1.9 g, 9.0 mmol) in DMF (8.0 ml) hinzugefügt, und die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 60 min wurde die Lösung trüb. Nach 20 h Reaktionszeit wurde das Reaktionsgemisch abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedunstet. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie (EE) und Umkristallisation aus EE/Hexan gereinigt. N-Succinimidyl-6-(Boc-hydrazin)-nicotinsäureester wurde als weißes Pulver erhalten (1.8 g, Ausbeute: 56 %).

MW = 350.1 g/mol, C₁₅H₁₈N₄O₆, R_f = 0.70 (EE)

HPLC (20 – 70 % B in 20 min): t_R = 7.0 min, k' = 5.1

¹H-NMR (d₆-DMSO, 250 Hz): δ (ppm) 1.4 (9H, s, CH₃), 2.9 (4H, s, CH₂), 6.6 (1H, d, J = 8.6 Hz, Ar-H), 8.1 (1H, d, J = 2.4, 7.2, Ar-H), 8.7 (1H, s, Ar-H).

**7.2.2.5 5-Oxo-5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,5-c]pyrimidin-7-carbonsäuremethylester
(His-OMe-Harnstoff)^[137]**

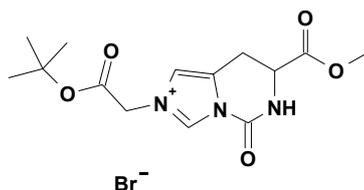


Zunächst wurde einer Lösung von L-Histidinmethylester (3.06 g, 13.0 mmol) in DMF (90.0 ml) Carbonyldiimidazol (2.07 g, 13.0 mmol) hinzugefügt. Nach ca. 24 h bei 70 °C wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 1 M NaHCO₃-Lösung aufgenommen und die wässrige Phase mit DCM ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisieren aus MeCN aufgereinigt und lieferte hellbraune Nadeln (1.8 g, Ausbeute: 73 %).

MW = 195.1 g/mol, C₈H₉N₃O₃, R_f = 0.22 (EE)

¹³C-NMR (d₁-CDCl₃, 250 Hz): δ (ppm) 23.8, 53.6, 53.9, 125.1, 126.9, 135.6, 148.7, 170.7.

**7.2.2.6 2-(2-tert-Butoxy-2-oxoethyl)-7-methoxycarbonyl-5-oxo5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,5-c]-pyrimidin-2-ium Bromid
(His(N⁺-CM-tBu)-OMe-Harnstoffbromid)^[137]**



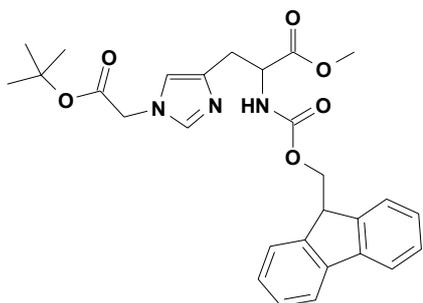
Eine Lösung von Histidin-OMe-Harnstoff (705 mg, 3,62 mmol) und 2-Bromessigsäure-*tert*-butylester (1.60 ml, 10.85 mmol) in MeCN (40 ml) wurde 24 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde 3 mal mit Ether und 2 mal mit THF gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt (1.68 g) wurde ohne weitere Aufreinigung in der Folgereaktion eingesetzt.

MW = 310.1 (+ 79.9) g/mol, C₁₄H₂₀N₃O₅Br, R_f = 1.0 (EE)

m/z = 310.0 ([M]⁺); 254.2 ([M-(*tert*-Butyl)+H]⁺)

¹H-NMR (D₂O, 250 Hz): δ (ppm) 1.5 (9H, s, CH₃), 3.6 (2H, m, CH₂CH), 3.9 (3H, s, OCH₃), 4.9 (1H, m, CHCOO), 5.2 (2H, s, COO-CH₂-N), 7.5 (1H, s, Im-H), 9.5 (1H, s, Im-H).

7.2.2.7 *N^ε-(2-tert-Butoxy-2-oxoethyl)-N^α-Fmoc-histidinmethylester*
(Fmoc-His(N^ε-CM-tBu)-OMe)^[137]



Zu einer Lösung aus His(*N^ε*-CM-tBu)-OMe-Harnstoffbromid (Rohprodukt 1.5 g, ca. 3.30 mmol) und 9-Fluorenmethanol (1.77 g, 9.0 mmol) in MeCN (80 ml) wurde DIPEA (757 μ l, 4.42 mmol) hinzugefügt. Nach 30 h Reaktionszeit bei RT wurde die Lösung mit 1 M HCl neutralisiert und die Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und mit H₂O ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Das hellgelbe Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (EE), was als Produkt ein weißes Pulver lieferte (769 mg, Ausbeute: 46 %).

MW = 505.2 g/mol, C₂₈H₃₁N₃O₆, R_f = 0.35 (EE)

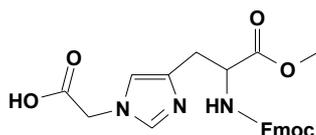
HPLC (30 – 80 % B in 15 min): t_R = 9.9 min; k' = 7.6;

m/z = 506.2 ([M+H]⁺); 1010.9 ([2M+H]⁺); 450.2 ([M-(*tert*-Butyl)+2H]⁺)

¹H-NMR (d₁-CDCl₃, 250 Hz): δ (ppm) 1.5 (9H, s, CH₃), 3.1 (2H, dd, *J* = 4.5, 5.5 Hz, CH₂CH), 3.7 (3H, s, OCH₃), 4.3 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, CHCOO), 4.4 (2H, m, CH₂-Ar), 4.5 (2H, s, COO-CH₂-N), 6.4 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, NH), 6.7 (1H, s, Im-H), 7.3 – 7.5 (5H, m, Ar-H, Im-H), 7.6 (2H, dd, *J* = 6.5, 6.6 Hz, Ar-H), 7.8 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, Ar-H).

7.2.2.8 *N^ε-(Carboxymethyl)-N^α-Fmoc-histidinmethylester (Fmoc-His(N^ε-CM)-OMe)*

Die *tert*-Butyl-Schutzgruppe von Fmoc-His(*N^ε*-CM-tBu)-OMe (300 mg, 0.6 mmol)



wurde nach AAV 9 entfernt. Nach 6 ½ h Reaktionszeit (HPLC-Kontrolle) wurde das Lösungsmittelgemisch im Vakuum entfernt, und das Produkt mit Ether gewaschen. Das

erhaltene Rohprodukt wurde lyophilisiert und anschließend ohne Aufreinigung zur Kupplung an Peptide verwendet.

MW = 449.2 g/mol, C₂₄H₂₃N₃O₆,

HPLC (30 – 80 % B in 15 min): t_R = 6.3 min; k' = 4.8

m/z = 450.3.2 ([M+H]⁺); 488.2 ([M+K]⁺).

7.2.3 Synthese der peptidischen Vorläufer allgemein

7.2.3.1 Tyr³-Lys⁵(Dde)-Octreotid (TOC(Dde)):

Nach AAV 1 wurde DHP-HM-Harz (1.31 g, 1 mmol bezogen auf die funktionelle Gruppen) mit Fmoc-Thr(tBu)-ol (1.45 g, 3.8 mmol) belegt. Nach dem Trocknen im Exsikkator wurden 1.54 g belegtes Harz erhalten (Harz-Belegung: 0.46 mmol/g). Daran wurde der Aufbau der Aminosäuresequenz D-Phe-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Dde)-Thr(tBu)-Cys(Trt) analog AAV 4 durchgeführt.

Anschließend an die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe der letzten Aminosäure, wurde das Peptid, unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen, vom Harz entsprechend AAV 5 abgespalten (HPLC (30 – 80 % B in 15 min): t_R = 4.7 min; k' = 3.7). Die darauf folgende Cyclisierung nach AAV 7 und anschließendes Lyophilisieren aus tBuOH lieferte Tyr³-Lys⁵(Dde)-Octreotid als Rohprodukt.

MW: 1198.5 g/mol; C₅₉H₇₈N₁₀O₁₃S₂

HPLC (30 – 80 % B in 15 min): t_R = 5.3 min; k' = 4.7

m/z = 1199.6 ([M+H]⁺); 1221.7 ([M+Na]⁺).

7.2.3.2 Tyr³-Lys⁵(Dde)-Octreotat (TOCA(Dde)):

Gemäß AAV 2 wurde TCP-Harz (2.00 g, 2.2 mmol bezogen auf die funktionelle Gruppen) mit Fmoc-Thr(tBu)-OH (1.31 g, 3.3 mmol) belegt. Nach dem Trocknen im Exsikkator wurden 2.70 g belegtes Harz erhalten (Harz-Belegung: 0.72 mmol/g). Daran wurde der Aufbau der Aminosäuresequenz H₂N-D-Phe-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Dde)-Thr(tBu)-Cys(Trt) nach AAV 4 durchgeführt. Zur weiteren Umsetzung wurde das Peptid am Harz belassen.

Alternativ wurde, anschließend an die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe der letzten Aminosäure, das Peptid, unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen, vom Harz entsprechend AAV 6 abgespalten (HPLC (10 – 60 % B in 15 min): t_R = 16.6 min;

$k' = 5.7$). Die darauf folgende Cyclisierung nach **AAV 7** und anschließendes Lyophilisieren aus tBuOH lieferte Tyr³-Lys⁵(Dde)-Octreotat als Rohprodukt.

MW: 1212.5 g/mol; C₅₉H₇₆N₁₀O₁₄S₂

HPLC (30 – 80 % B in 15 min): $t_R = 5.9$ min, $k' = 5.4$

$m/z = 1213.6$ ([M+H]⁺), 1235.7 ([M+Na]⁺).

7.2.3.3 Tyr³-Lys⁵(Dde)-Octreotamid (TOCam(Dde)):

Nach **AAV 3** wurde Rink-Amid-AM-Harz (2.0 g, 0.90 mmol bezogen auf die funktionelle Gruppen) mit Fmoc-Thr(tBu)-OH (0.54 g, 1.36 mmol) belegt. Der Aufbau der Aminosäuresequenz H₂N-DPhe-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-DTrp-Lys(Dde)-Thr(tBu)-Cys(Trt) wurde nach **AAV 4** durchgeführt. Anschließend an die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe der letzten Aminosäure, wurde das Peptid, unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen, vom Harz entsprechend **AAV 6** abgespalten (HPLC (30 – 80 % B in 15 min): $t_R = 4.7$ min; $k' = 2.6$) Die darauf folgende Cyclisierung nach **AAV 7** und anschließendes Lyophilisieren aus tBuOH lieferte Tyr³-Lys⁵(Dde)-Octreotamid als Rohprodukt.

MW: 1211.5 g/mol; C₅₉H₇₇N₁₁O₁₃S₂

HPLC (30 – 80 % B in 15 min): $t_R = 8.5$ min, $k' = 6.4$

$m/z = 1212.4$ ([M+H]⁺), 1234.75 ([M+Na]⁺).

7.2.4 Synthese der Peptid für die Markierung mit ¹⁸F und ^{99m}Tc

7.2.4.1 6-Hydrazin-nicotinsäureamid-D-Phe¹-Tyr³-octreotat (HYNIC-TOCA)

TOCA(Dde) (90 mg, 0.07 mmol), Succinimidyl-Boc-HYNIC (39 mg, 0.11 mmol) und HOBt (17 mg, 0.11 mmol) wurden nach **AAV 13** unter Zugabe von DIPEA (30 μ l, 0.18 mmol) in 6 h umgesetzt (HPLC-Kontrolle (30 – 80 % B in 15 min): $t_R = 11.1$ min, $k' = 7.5$). Die anschließende Boc-Entschützung erfolgte gemäß **AAV 9** (HPLC (30 – 80 % B in 15 min): $t_R = 9.0$ min, $k' = 6.7$). Nach der Dde-Entschützung gemäß **AAV 10**, wurde das Produkt mittels HPLC präpariert.

MW: 1183.5 g/mol; C₅₅H₆₉N₁₃O₁₃S₂

HPLC (22 – 50 % B in 20 min): $t_R = 9.0$ min, $k' = 6.5$

$m/z = 1184.4$ ([M+H]⁺); 1206.4 ([M+Na]⁺); 593.1 ([(M+2H)/2]²⁺).

7.2.4.2 6-Hydrazin-nicotinsäureamid-D-Phe¹-Tyr³-octreotatamid (HYNIC-TOCam)

TOCam(Dde) (50 mg, 0.04 mmol) wurde mit Succinimidyl-Boc-HYNIC (34 mg, 0.09 mmol) HOBt (14 mg, 0.09 mmol) und DIPEA (31 μ l, 0.18 mmol) 5.5 h gemäß **AAV 13** umgesetzt (HPLC (30 – 80 % B in 15 min): $t_R = 11.0$ min, $k' = 8.0$). Die anschließende Boc-Entschützung erfolgte nach **AAV 9** (HPLC (30 – 80 % B in 15 min): $t_R = 9.1$ min, $k' = 6.5$). Nach der Dde-Entschützung gemäß **AAV 10** wurde das Produkt mittels präparativer HPLC isoliert.

MW: 1182.5 g/mol; C₅₅H₇₀N₁₄O₁₂S₂

HPLC (22 – 50 % B in 20 min): $t_R = 7.3$ min, $k' = 5.2$

m/z = 1183.5 ([M+H]⁺), 1205.5 ([M+Na]⁺), 592.5 ([M+2H]/2)²⁺.

7.2.4.3 6-Hydrazin-nicotinsäureamid-Arg¹-Substance P (HYNIC-Substance P)

Lys³(Dde)-Substance P (67 mg, 0.04 mmol), Succinimidyl-Boc-HYNIC (24 mg, 0.07 mmol) und HOBt (10 mg, 0.07 mmol) wurden analog **AAV 13** nach Zugabe von DIPEA (25 μ l, 0.26 mmol) umgesetzt (6 h) (HPLC-Kontrolle (20 – 70 % B in 20 min): $t_R = 11.6$ min, $k' = 8.6$). Anschließend an die Reinigung des Zwischenprodukts mittels präparativer HPLC erfolgte die Dde-Entschützung gemäß **AAV 10** (HPLC 20 - 70 % B in 20 min): $t_R = 9.5$ min, $k' = 6.9$). Nach der Boc-Entschützung nach **AAV 9**, wurde das Produkt nochmals mittels HPLC präpariert.

MW: 1481.8 g/mol; C₆₉H₁₀₃N₂₁O₁₄S

HPLC (22 – 50 % B in 15 min): $t_R = 9.3$ min, $k' = 7.5$

m/z = 1482.7 ([M+H]⁺); 1504.7 ([M+Na]⁺); 742.2 ([M+2H]/2)²⁺.

7.2.5 Synthese der Peptide für die Markierung mit [^{99m}Tc(OH₂)(CO)₃]⁺

7.2.5.1 (2-(4-(2-Amino-carboxyethyl)-imidazol-1-yl)acetyl)-D-Phe¹-Tyr³-octreotid (His^r-TOC)

TOC(Dde) (122 mg, 0.10 mmol) wurde mit Fmoc-His(N^r-CM)-OMe (150 mg, 0.30 mmol), HOAt (41 mg, 0.30 mmol), DIC (46.5 μ l, 0.30 mmol) und Pyridin (24 μ l, 0.3 mmol) in DMF gemäß **AAV 12** innerhalb von 120 min bei RT umgesetzt (HPLC-Kontrolle (35 – 65 % B in 15 min): $t_R = 11.6$ min; $k' = 11.6$). Das Zwischenprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Anschließend erfolgte die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe in 20 min gemäß **AAV 8** (HPLC: 10 – 50 % B in 15 min) $t_R = 14.4$ min, $k' = 10.4$). Die Dde-Entschützung wurde entsprechend **AAV 10** durchgeführt (HPLC (10 – 50 % B in 15 min): $t_R = 10.3$ min, $k' = 7.4$). Für die Methylesterspaltung wurde das Peptid in 6 ml Natriumborat-Puffer (100 mM, pH 8.5) und 2 ml MeOH gelöst und bei RT mehrere Tage gerührt (HPLC-Kontrolle). Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC isoliert.

MW: 1229.5 g/mol; $C_{57}H_{75}N_{13}O_{14}S_2$

HPLC (15 – 45 % B in 15 min): $t_R = 9.4$ min; $k' = 6.2$

$m/z = 1230.7$ ($[M+H]^+$); 1252.7 ($[M+Na]^+$); 616.2 ($[(M+2H)/2]^{2+}$).

7.2.5.2 (2-(4-(2-Amino-carboxyethyl)-imidazol-1-yl)acetyl)-D-Phe¹-Tyr³-octreotat (His^τ-TOCA)

Nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde TOCA am TCP Harz (0,15 mmol) mit Fmoc-His(*N*^τ-CM)-OMe (145 mg, 0.29 mmol), HOAt (40 mg, 0.29 mmol), DIC (45 μ l, 0.29 mmol) und Pyridin (36 μ l, 0.45 mmol) gemäß **AAV 12** in 8 Tagen umgesetzt. Die Abspaltung des Peptids vom TCP-Harz wurde gemäß **AAV 6** ohne vorherige Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durchgeführt (HPLC-Kontrolle (35 – 65 % B in 15 min): $t_R = 12.3$ min; $k' = 10.7$).

Das aus der Cyclisierung des linearen Peptids gemäß **AAV 7** erhaltene Produkt (HPLC-Kontrolle (35 – 65 % B in 15 min): $t_R = 11.9$ min; $k' = 10.3$) wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe nach **AAV 8** abgespalten (HPLC-Kontrolle (35 – 65 % B in 15 min): $t_R = 4.8$ min; $k' = 4.3$), und die Dde-Entschützung wurde entsprechend **AAV 10** durchgeführt (HPLC (15 – 45 % B in 15 min): $t_R = 9.6$ min, $k' = 6.9$). Für die Methylesterspaltung wurde das Peptid in 6 ml Natriumborat-Puffer (100 mM, pH 8.5) und 1 ml MeOH gelöst und bei RT 8 Tage gerührt (HPLC-Kontrolle). Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC isoliert.

MW: 1243.5 g/mol; $C_{57}H_{73}N_{13}O_{15}S_2$

HPLC (15 – 45 % B in 15 min): $t_R = 9.4$ min; $k' = 6.6$

$m/z = 1244.8$ ($[M+H]^+$); 1266.6 ($[M+Na]^+$); 623.2 ($[(M+2H)/2]^{2+}$)

7.2.5.3 *Fmoc-Lys⁰-Tyr³-Lys⁵(Dde)-Octreotat (Fmoc-Lys-TOCA(Dde))*

An harzgebundenes, vollständig geschütztes TOCA (0.1 mmol) wurde analog **AAV 4** Fmoc-Lys(Boc)-OH (70.0 mg, 0.15 mmol) gekuppelt. Nach der Kupplung wurde das Peptid nach **AAV 6** vom Harz abgespalten. Das Rohprodukt wurde anschließend nach **AAV 7** cyclisiert und ohne Aufreinigung weiter umgesetzt.

MW: 1562.7 g/mol; C₈₀H₉₈N₁₂O₁₇S₂

HPLC: (40 – 100 % B in 15 min) t_R = 8.2 min, k' = 6.7.

7.2.5.4 *N^α-(1-Deoxy-D-fructosyl)-Lys⁰(N^ε-(carboxymethyl-pyridin-2-yl-methylamino)acetyl)- Tyr³-octreotat (Gluc-Lys⁰(Pic)-TOCA).*

Die Kupplung von (2-Pyridylmethyl)iminodiessigsäure (Pic; 56 mg, 0.25 mmol) an Fmoc-Lys⁰-TOCA(Dde) (130 mg, 0.083 mmol) wurde entsprechend **AAV 11** durchgeführt. Das hellbraune Rohprodukt wurde ohne Aufreinigung weiter umgesetzt (HPLC: (40 - 100 % B in 15 min) t_R = 8.8 min, k' = 7.3). Anschließend an die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe gemäß **AAV 8** (HPLC (40 – 100 % B in 15 min): t_R = 4.4 min, k' = 3.5) wurde das Lys(Pic)TOCA(Dde)-Rohprodukt (≈ 0.083 mmol) mit Glucose (150 mg, 0.83 mmol) nach **AAV 14** umgesetzt. Laut HPLC-Kontrolle (30 – 80 % B in 15 min: t_R = 9.2 min; k' = 6.9) war die Reaktion nach 15 Stunden beendet. Ohne Aufreinigung des Zwischenprodukts wurde die Dde-Entschützung von Gluc-Lys⁰(Pic)TOCA(Dde) analog **AAV 10** durchgeführt, und das Produkt mittels präparativer HPLC isoliert.

MW: 1544.6 g/mol; C₇₁H₉₆N₁₄O₂₁S₂

HPLC (10 – 60 % B in 15 min): t_R = 12.5 min; k' = 9.0

m/z = 1545.6 ([M+H]⁺); 1567.5 ([M+Na]⁺); 773.7 ([M+2H]²⁺)

7.3 ¹⁸F-Markierungen via Hydrazonbildung

7.3.1 Synthese der ¹⁹F-Referenzverbindungen

AAV 16: Hydrazonbildung der ¹⁹F-Referenzverbindungen

HYNIC bzw. HYNIC funktionalisiertes Peptid (1 eq) wurden in 50 mM KH₂PO₄-Puffer (mit NaOH auf pH 5.05 eingestellt) gelöst und eine Lösung von 4-Fluorbenzaldehyd (1 - 3 eq) in MeCN im Verhältnis 3:2 (v/v) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde erhitzt und die Ausbeute mittels HPLC-Analytik bestimmt.

7.3.1.1 6-(N-(4-fluoro-benzylidene))hydrazon-nicotinsäureamid (FB-CH=N-HYNIC)

FB-CH=N-HYNIC wurde nach AAV 16 aus HYNIC (7.0 mg, 0.05 mmol) und 4-Fluorbenzaldehyd-Lösung (11 µl, 0.10 mmol) synthetisiert. Das Reaktionsgemisch wurde 90 min bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde der Produktpeak mittels präparativer HPLC isoliert.

MW = 259.1 g/mol; C₁₃H₁₀N₃O₂F

HPLC (24 – 35 % B in 15 min): t_R = 5.6 min, k' = 3.7

m/z = 260.2 ([M+H]⁺); 541.4 ([2M+Na]⁺)

¹H-NMR (d₆-DMSO, 250 Hz): 7.3 (3H, m, Ar-H), 7.8 (2H, dd, J = 5.7, 8.3, Ar-H), 8.1 (2H, m, Ar-H), 8.6 (1H, d, J = 2.0 Hz, HC=N), 11.6 (1H, s, NH).

7.3.1.2 6-(N-(4-fluoro-benzylidene))hydrazon-nicotinsäureamid-Tyr³-Octreotat (FB-CH=N-HYNIC-TOCA)

FB-CH=N-HYNIC-TOCA wurde aus HYNIC-TOCA (0.3 mg, 0.2 µmol) und 4-Fluorbenzaldehyd (0.5 µmol, in MeCN) nach AAV 16 hergestellt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei 70 °C gerührt. Der Produktpeak wurde mittels HPLC isoliert.

MW = 1289.5 g/mol; C₆₂H₇₂N₁₃O₁₃S₂F

HPLC (22 – 50 % B in 20min): t_R = 13.5 min, k' = 9.8

m/z = 1290.4 ([M+H]⁺); 1312.3 ([M+Na]⁺); 646.1 ([M+2H]/2]²⁺).

7.3.1.3 6-(N-(4-fluoro-benzylidene))hydrazon-nicotinsäureamid-Tyr³-Octreotamid (FB-CH=N-HYNIC-TOCam)

HYNIC-TOCam (1.2 mg, 1.02 μmol) wurde nach **AAV 16** mit 4-Fluorbenzaldehyd (1.02 μmol) umgesetzt (100 min bei 90 °C). Der Produktpeak wurde mittels HPLC isoliert.

MW = 1288.5 g/mol; C₆₂H₇₃N₁₄O₁₂S₂F

HPLC (22 – 50 % B in 20min): t_R = 13.5 min, k' = 9.0

m/z = 1289.4 ([M+H]⁺); 1311.3 ([M+Na]⁺); 645.6 ([M+2H]/2)²⁺.

7.3.1.4 6-(N-(4-fluoro-benzylidene))hydrazon-nicotinsäureamid-Substance P (FB-CH=N-HYNIC-Substance P)

FB-CH=N-HYNIC-Substance P wurde nach **AAV 16** aus HYNIC-Substance P (0.18 mg, 0.1 μmol) und 4-Fluorbenzaldehyd (0.1 μmol) synthetisiert. Das Reaktionsgemisch wurde 5 h bei 70 °C reagieren gelassen. Der Produktpeak wurde mittels HPLC isoliert.

MW = 1587.8 g/mol; C₇₆H₁₀₆N₂₁O₁₄SF

HPLC (22 – 50 % B in 20min): t_R = 12.8 min, k' = 7.3

m/z = 1588.9 ([M+H]⁺); 795.4 ([M+2H]/2)²⁺.

7.3.2 Produktion von ¹⁸F-Fluorid

Das verwendete ¹⁸F-Fluorid wurde über eine ¹⁸O(p,n)¹⁸F Kernreaktion aus ¹⁸O-angereichertem (> 98%) [¹⁸O]H₂O mit einem 11 MeV Protonenstrahl am hauseigenen RDS-112 Zyklotron (Siemens/CTI, Knoxville, TN) hergestellt. Die Dicke des Wassertargets in Strahlrichtung betrug 3.4 mm. Nach Ende der Bestrahlung wurde der Targetinhalt mittels eines Heliumgasstroms herausgedrückt, um das [¹⁸F]Fluorid von Verunreinigungen (z.B. Silberionen aus dem Target) mittels einer Anionenaustauschsäule (Dowex 1 x 8-200 Ion-exchange Harz in der Carbonatform (Aldrich)) zu befreien und das ¹⁸O-angereicherte Wasser zurückzugewinnen. Das [¹⁸F]Fluorid wurde anschließend mit 400 μl einer 60 mM K₂CO₃-Lösung eluiert.

7.3.3 Azeotropes Trocknen einer [¹⁸F]Fluorid-Cryptat-Lösung

Zu einer Lösung von Kryptofix 2.2.2. (10 mg, 26 µmol) in 250 µl trockenem MeCN in einem konischen Vial (Reactivial, V = 2.5 ml) wurde das [¹⁸F]Fluorid (185 – 1000 MBq) in K₂CO₃-Lösung (60 mM, 100-200 µl) hinzugefügt. Die Lösungsmittel wurden bei 110 °C unter einem schwachen Argonstrom abgedampft. Dieser azeotrope Trocknungsschritt wurde mindestens dreimal unter Zugabe von je 300 µl trockenem MeCN wiederholt.

7.3.4 Radiosynthese von 4-[¹⁸F]Fluorbenzaldehyd ([¹⁸F]FB-CHO)

Das getrocknete Kryptat ([K₂2.2.2.]⁺/¹⁸F⁻) wurde mit einer Lösung von 4-Formyl-N,N,N-trimethylanilinium Triflat (3.0 mg, 9.6 µmol) in 150 µl trockenem DMSO aufgenommen und im geschlossenen Vial 5 min bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde der [¹⁸F]FB-CHO mittels präparativer HPLC (30 – 40 % B in 30 min) gereinigt. Die Produktfraktion wurde mit Wasser verdünnt (max. 7 % MeCN im Endvolumen) und [¹⁸F]FB-CHO wurde auf einer Strata X Kartusche (33 µm, 60 mg/3ml; Phenomenex, Torrance, USA) fixiert. Nach dem Waschen mit 10 ml Wasser wurde der [¹⁸F]FB-CHO in einem möglichst kleinen Volumen (0.1 - 0.5 ml) MeCN von der Kartusche eluiert.

Gesamt-RCA: 52 – 77 % (~ 45 min, EOB), R_f = 0.69 (EE : Hexan (1 : 1)).

7.3.5 Kopplung von [¹⁸F]FB-CHO an HYNIC und HYNIC-funktionalisierte Peptide

AAV 17: Hydrazonbildung zur ¹⁸F-Markierung

Es wurden 30 µl eines 50 mM KH₂PO₄-Puffers (eingestellt auf pH 0.5 - 4 mit konzentrierter H₃PO₄ und auf pH 5-9 mit KOH (1 M)), 10 µl einer wässrigen Lösung von HYNIC bzw. HYNIC-Peptid (soweit nicht anders angegeben: 106 nmol/10 µl) und 10 µl der [¹⁸F]FB-CHO-Lösung (0.4 - 6.0 MBq) in MeCN zusammengegeben. Das Gemisch wurde 10 min auf 90 °C (soweit nicht anders angegeben) erhitzt, anschließend auf Eis gestellt. Daraufhin wurden die Reaktionsansätze kurz zentrifugiert. Die Identifikation der Produkte erfolgte durch Coinjektion der ¹⁹F-Referenzverbindungen, die vollständig charakterisiert wurden. Die Markierungsausbeuten wurden mittels Integration der entsprechenden HPLC-Chromatogramme bestimmt (siehe Tabelle 7.2). Der pH-Wert wurde mit einer Glaselektrode im Anschluss an die Reaktion gemessen.

Tabelle 7.2: Retentionszeiten und k' -Werte der ^{18}F -markierten Verbindungen im Radioaktivitätskanal.

Verbindung	Gradient (Fluss 1 ml/min)	Retentionszeit [min]	k'
$[^{18}\text{F}]$ FBA	22 – 50 % B in 20 min	7.9	6.2
	24 – 35 % B in 15 min	6.7	5.1
	37 % B isokratisch	3.1	1.8
$[^{18}\text{F}]$ FB-CHO	22 – 50 % B in 20 min	9.3	7.5
	24 – 35 % B in 15 min	8.1	6.4
	37 % B isokratisch	4.5	3.1
$[^{18}\text{F}]$ FB-CH=N-HYNIC	24 – 35 % B in 15 min	6.0	4.5
$[^{18}\text{F}]$ FB-CH=N-HYNIC-TOCA	22 – 50 % B in 20 min	15.4	13.1
$[^{18}\text{F}]$ FB-CH=N-HYNIC-TOCam	22 – 50 % B in 20 min	15.5	13.2
	37 % B isokratisch	3.6	2.3
$[^{18}\text{F}]$ FB-CH=N-HYNIC-Substance P	22 – 50 % B in 20 min	13.1	11.0

7.3.5.1 Abhängigkeit der Markierungsausbeute vom pH-Wert

Die Abhängigkeit der Markierungsausbeute vom pH-Wert wurde für HYNIC, HYNIC-TOCA und HYNIC-Substance P im Bereich von pH 0.5 - 8 nach **AAV 17** untersucht.

7.3.5.2 Abhängigkeit der Markierungsausbeute von der Vorläuferkonzentration

Für die Bestimmung der Abhängigkeit der Markierungsausbeute von der Vorläuferkonzentration wurden HYNIC-TOCA in Konzentrationen von 212, 159, 106, 53, 26.5, 13.25, 6.63 und 3.31 nmol/10 μl , HYNIC und HYNIC-Substance P in Konzentrationen von 106 und 26.5 nmol/10 μl eingesetzt. Die Reaktion wurde gemäß **AAV 17** durchgeführt.

7.3.5.3 Abhängigkeit der Markierungsausbeute von der Reaktionstemperatur

Die Abhängigkeit der Markierungsausbeute von der Reaktionstemperatur wurde für HYNIC-TOCA im gesamten Bereich zwischen 24 und 90 $^{\circ}\text{C}$, für HYNIC und HYNIC-Substance P nur bei 70 $^{\circ}\text{C}$ und 90 $^{\circ}\text{C}$ betrachtet. Dazu wurden Reaktionen nach **AAV 17** angesetzt.

7.3.6 Bestimmung der Chemoselektivität

Um die Reaktivität von [^{18}F]FB-CHO gegenüber funktionellen Gruppen in/ohne Anwesenheit von HYNIC zu testen, wurden 30 μl 50 mM KH_2PO_4 -Puffer (pH 5), 10 μl einer [^{18}F]FB-CHO-Lösung in MeCN (0.4 - 6.0 MBq) und 10 μl einer Lösung von Arg, Cys, Gln beziehungsweise His (530 nmol/10 μl 50 mM KH_2PO_4 (pH 1)) zusammengegeben. Alternativ wurden 5 μl einer Lösung von Arg, Cys, Gln beziehungsweise His (530 nmol/5 μl 50 mM KH_2PO_4 (pH 1)) mit 5 μl einer HYNIC-Lösung (106 nmol/5 μl) (statt der 10 μl Aminosäurelösung) eingesetzt. Die Reaktionsmischungen wurden 10 min bei 90 °C erhitzt, und anschließend auf Eis gekühlt. Daraufhin wurden die Reaktionsansätze kurz zentrifugiert. Die Markierungsausbeuten und die Menge an Nebenprodukten wurden mittels Integration der entsprechenden HPLC-Chromatogramme (24 – 35 % B in 15 min) bestimmt.

7.3.7 Herstellung und Isolierung ^{18}F -markierter Peptide im mCi-Maßstab

HYNIC-TOCA bzw. HYNIC-TOCam (0.5 - 1.5 mg) wurde in 150 - 400 μl 0.5 mM KH_2PO_4 -Puffer (pH 5.0) gelöst, und 50 - 150 μl [^{18}F]FB-CHO-Lösung in MeCN (50 - 180 MBq) wurden hinzugefügt. Die Lösung wurde dann 10 min auf 70 °C erhitzt. Das Produkt wurde mittels präparativer Radio-HPLC isoliert (22 – 50 % B in 20 min). Die Produktfraktion wurde mit Wasser auf ein Endvolumen von 20 ml verdünnt, und das Produkt auf einer tC_2 -Kartusche (Sep Pak light, Waters, Eschborn, Deutschland) fixiert. Nach dem Waschen mit 10 ml H_2O wurde das Produkt mit einem kleinstmöglichen Volumen EtOH eluiert (50 – 200 μl). Falls erforderlich, wurde das Volumen dieser Lösung unter einem schwachen Argonstrom reduziert.

7.4 Stabilitätsuntersuchung der [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-Peptide

7.4.1 Stabilität der Hydrazonbindung in Abhängigkeit vom pH-Wert

Um die Stabilität der Hydrazonbindung in wässrigem Medium bei verschiedenen pH-Werten zu untersuchen, wurden 30 µl einer [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam-Lösung (ethanolisches Eluat von der tC₂-Kartusche) mit 90 µl eines 50 mM KH₂PO₄-Puffers verdünnt. Der pH-Wert wurde mittels einer Glas-Elektrode bestimmt und gegebenenfalls mit 0.01 N HCl bzw. NaOH auf pH 4.0, 5.5 bzw. 7.5 eingestellt. Die Lösung wurde daraufhin bei 37 °C inkubiert. Nach 5, 90, 180 und 300 min wurden Proben entnommen und mittels Radio-HPLC analysiert (37 % B isokratisch). Die Anteile an intaktem Tracer sowie [¹⁸F]FB-CHO und 4-[¹⁸F]Fluorbenzoesäure ([¹⁸F]FBA) wurden durch Integration der korrespondierenden HPLC-Chromatogramme bestimmt.

7.4.2 Serumstabilitätsuntersuchungen

Aus der Produktfraktion der Präparation von [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam wurden für dieses Experiment die Lösungsmittel im Vakuum vollständig entfernt. Der Tracer (480 - 1220 kBq) wurde in Blutserum (600 µl) wieder aufgenommen, das durch Zentrifugation (6 min, 1350 g) einer Blutprobe in einem EDTA-Röhrchen gewonnen wurde. Die Probe wurde 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf einer RP-Kartusche (Waters, Eschborn, Deutschland) fixiert. Die Elution erfolgte mit 1 ml MeCN (0.1 % TFA (v/v)). Zur Reduktion des Eluatvolumens wurde eine zweite Festphasenextraktion mit einer RP-Kartusche (Strata X (33 µm, 30 mg / 1 ml; Phenomenex, Torrance, USA) durchgeführt. Das Eluat wurde mit H₂O verdünnt und mittels Radio-HPLC (0-4 min 0 %, 4-10 min 20 % und 10-30 min 20-70 % B, 1 ml Flussrate) analysiert, wobei das Eluat minutenweise aufgefangen und im γ-Counter gemessen wurde. Zusätzlich wurden 20 µl Proben vor und nach der Extraktion sowie vor der Injektion auf die HPLC genommen und diese zur Bilanzierung ebenfalls im γ-Counter gemessen. Ebenso wurde die verbliebene Aktivität auf der Kartusche bestimmt. Zur Berechnung der Gesamtausbeute wurden die enthaltenen Aktivitätsmengen von allen Proben zueinander ins Verhältnis gesetzt (*Ausbeute = Aktivitätsmenge im Überstand bzw. in der Injektionslösung / eingesetzte Aktivitätsmenge*). Zusätzlich wurde die Gesamtausbeute bestimmt (*Gesamtausbeute = Aktivitätsmenge in der Injektionslösung / Aktivitätsmenge im Serum*).

7.4.3 *In vivo*-Stabilität und Biodistribution von [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA

Das [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA enthaltende ethanolische Eluat der tC₂-Kartusche wurde mit PBS (3 % BSA) verdünnt, so dass die Endkonzentration an EtOH 3 % nicht überschritt. Für *in vivo*-Stabilitätsuntersuchungen wurden 4.5 bzw. 8.5 MBq [¹⁸F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA in 150 µl PBS (3 % BSA, pH 7.4) in die Schwanzvene von "Black six"-Mäusen (n = 2) injiziert. Nach 30 min wurden die Tiere abgetötet und die Organe entnommen. Die Organe bzw. Teile der Organe (Leber) wurden einzeln gewogen und im γ -Counter gegen die Aktivitätsstandards vermessen. Das gesammelte Blut wurde mit 25 µl Natrium-Heparin vermischt. Dieses Gemisch wurde mit demselben Gesamtvolumen an 20 %igem MeCN in PBS versetzt und 5 min bei 2500 g zentrifugiert. Zur Fällung der Proteine wurden die Überstände mit dem 0.8fachen Volumen an MeCN verdünnt und 5 min bei 12200 g zentrifugiert. Leber und Niere wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, mechanisch homogenisiert und in 1 ml 20 %igem MeCN in PBS gut suspendiert. Anschließend wurde die Suspension 5 min bei 3800 g zentrifugiert. Zur Fällung der Plasmaproteine wurden alle Überstände mit dem 0.8fachen Volumen an MeCN verdünnt und erneut 5 min bei 3800 g zentrifugiert. Zur Bestimmung der Extraktionseffizienz wurden von allen Proben jeweils das Pellet und ein Aliquot des Überstands der ersten sowie der zweiten Zentrifugation im γ -Counter gemessen und die enthaltenen Aktivitätsmengen zueinander ins Verhältnis gesetzt (*Extraktionseffizienz = Aktivitätsmenge im Überstand / eingesetzte Aktivitätsmenge*). Zusätzlich wurde die Gesamt-Extraktionseffizienz bestimmt (*Gesamt-Extraktionseffizienz = Aktivitätsmenge im Überstand nach der zweiten Fällung / Aktivitätsmenge vor der Fällung*). Zur Quantifizierung möglicher Metabolite wurden Proben vom Überstand der einzelnen Organe mittels Radio-HPLC (Gradient: 1 - 20 min 22-50%, 20 - 25 min 100 % B, 4 ml/min Flussrate) analysiert.

7.5 Markierung von HYNIC-funktionalisierten Peptiden mit ^{99m}Tc

Zu 500 µl einer EDDA-Lösung (10 mg/ml in PBS, pH 7.5) wurden 10 µl der Peptidlösung (10.6 nmol/10 µl in Wasser), 5 µl frische SnCl₂*2H₂O-Lösung (1 mg/ml 0.1 N HCl) und 500 µl frisch eluiertes ^{99m}TcO₄⁻ (50 – 100 MBq) gegeben^[118]. Dieses Reaktionsgemisch wurde anschließend 60 min bei RT inkubiert und dann mittels analytischer Radio-HPLC untersucht.

[^{99m}Tc-EDDA]HYNIC-TOCam: HPLC (22 – 42 % B in 20min): t_R = 9.4 min, k' = 7.2

7.6 Markierung von chelator-funktionalisierten Peptiden mit



7.6.1 Synthese der $\text{Re}(\text{CO})_3$ -Standards

AAV 18: Synthese der $\text{Re}(\text{CO})_3$ -Referenzverbindungen

Das jeweilige chelatorfunktionalisierte Peptid (1 eq) wurde mit $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3](\text{NEt}_4)_2$ (1 eq) in MeOH gelöst, und die Lösung 90 - 120 min auf 60 °C erhitzt. Anschließend wurden das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, das Produkt mittels analytischer HPLC (siehe Tabelle 7.3) präpariert und massenspektrometrisch identifiziert.

7.6.1.1 *Gluc-Lys⁰([Re(CO)₃X]His)TOC (X = H₂O, Br, Cl)*

Gluc-Lys⁰(His)TOC (14.3 mg, 10.0 μmol) wurde nach AAV 18 mit $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3](\text{NEt}_4)_2$ (7.42 mg, 10.0 μmol) für 3 ½ h bei 60 °C umgesetzt. Der Produktpeak wurde mittels präparativer HPLC isoliert.

MW = 1732.6 g/mol; C₇₀H₉₅N₁₅O₂₁S₂Re

HPLC (45 – 60 % C in 20min): t_R = 8.9 min, k' = 6.9

m/z = 1732.6 ([M]⁺); 867.0 ([M+H]/2)²⁺.

7.6.1.2 *Gluc-Lys⁰([Re(CO)₃X]His)TOCA (X = H₂O, Br, Cl)*

Gluc-Lys⁰(His)TOCA (15.0 mg, 10.0 μmol) wurde analog AAV 18 mit $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3](\text{NEt}_4)_2$ (7.5 mg, 10.0 μmol) für 3 h bei 60 °C umgesetzt. Der Produktpeak wurde mittels präparativer HPLC isoliert.

MW = 1746.9 g/mol; C₇₀H₉₃N₁₅O₂₂S₂Re

HPLC (45 – 60 % C in 20min): t_R = 10.3 min, k' = 8.1

m/z = 1746.5 ([M]⁺); 874.1 ([M+H]/2)²⁺.

7.6.1.3 *Gluc-Lys⁰([Re(CO)₃Pic]TOCA*

Zur Synthese des Standards wurde Gluc-Lys⁰(Pic)TOCA (20.0 mg, 13.0 μmol) mit [Re(CO)₃Br₃](NEt₄)₂ (10.0 mg, 13.0 μmol) nach **AAV 18** 3 ½ h bei 60 °C umgesetzt. Der Produktpeak wurde mittels präparativer HPLC isoliert.

MW = 1814.6 g/mol; C₇₄H₉₅N₁₄O₂₄S₂Re

HPLC (45 – 60 % C in 20min): t_R = 15.2 min, k' = 12.5

m/z = 1815.5 ([M+H]⁺); 908.5 ([M+2H]/2)²⁺.

7.6.1.4 *[Re(CO)₃]His^τ-TOC*

His^τ-TOC (1.1 mg, 0.75 μmol) und [Re(CO)₃Br₃](NEt₄)₂ (0.56 mg, 0.75 μmol) wurden gemäß **AAV 18** für 3 h bei 60 °C reagieren gelassen. Der Produktpeak wurde mittels analytischer HPLC isoliert.

MW = 1499.4 g/mol; C₆₀H₇₄N₁₃O₁₇S₂Re

HPLC (45 – 60 % C in 20min): t_R = 10.5 min, k' = 8.1

m/z = 1500.6 ([M+H]⁺); 751.0 ([M+2H]/2)²⁺.

7.6.1.5 *[Re(CO)₃]His^τ-TOCA*

His^τ-TOCA (0.1 μmol aus einer Stammlösung) wurde mit [Re(CO)₃Br₃](NEt₄)₂ (0.1 μmol aus einer Stammlösung) analog **AAV 18** 2 h bei 60 °C umgesetzt. Der Produktpeak wurde mittels analytischer HPLC isoliert.

MW = 1513.4 g/mol; C₆₀H₇₂N₁₃O₁₈S₂Re

HPLC (45 – 60 % C in 20min): t_R = 12.0 min, k' = 9.5

m/z = 1514.6 ([M+H]⁺); 758.1 ([M+2H]/2)²⁺.

7.6.2 **Synthese von [^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺**

0.1-1 ml frisch aus dem ⁹⁹Mo-^{99m}Tc-Generator eluierter Pertechnetatlösung (185 - 1850 MBq, kein Ersteluat) wurde mit entgaster Kochsalzlösung auf 1ml aufgefüllt und in IsoLink-Kit gefüllt. Dieses wurde anschließend 20 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch mit 0.1 M HCl unter Argonatmosphäre auf pH 5 - 6 angesäuert, kurze Zeit bei RT stehengelassen und dann mit 0.1 M NaOH auf pH 7.5 eingestellt.

HPLC (0-3 min 0 % C, 3.1-9 min 25 % C, 9.1-20 min 33-100 % C; Flussrate 0.5 ml): t_R (Pertechnetat) = 3.4 min, k' (Pertechnetat) = 0.2; t_R ($[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$) = 8.2 min, k' ($[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$) = 1.9; RCA [$^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$): 98 ± 0.4 %.

7.6.3 Markierung chelatorfunktionalisierter Peptide

AAV 19: Markierungsreaktion mit $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

Eine Peptidlösung (Konzentration 10^{-6} - 10^{-1} M) wird unter Argonatmosphäre zur $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ -Lösung gegeben (1/9; v/v). Diese Lösung wird 30 min auf 75 bzw. 90 °C erhitzt. Markierungskontrolle sowie Ausbeutebestimmungen erfolgen mittels Radio-HPLC (Gradient: 45 – 60 % C in 20 min, siehe Tabelle 7.3).

Tabelle 7.3: Retentionszeiten und k' -Werte der ^{99m}Tc -markierten Peptide im Radioaktivitätskanal (Gradient: 45 - 60 % C in 20 min)

	Vorläufer		$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Komplex		Re(CO) ₃ -Komplex	
	t_R [min]	k'	t_R [min]	k'	t_R [min]	k'
Gluc-Lys ⁰ (His)TOC	3.2	1.8	9.6	7.5	8.9	6.9
Gluc-Lys ⁰ (His)TOCA	3.3	1.9	11.0	8.7	10.3	8.1
Gluc-Lys ⁰ (Pic)TOCA	4.6	3.1	15.7	12.9	15.2	12.5
His ^τ -TOC	3.7	2.3	10.9	8.5	10.5	8.1
His ^τ -TOCA	4.4	2.8	12.5	9.9	12.0	9.5

7.6.3.1 Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit

His^τ-TOC und His^τ-TOCA (Konzentration 10^{-5} – 10^{-2} M) wurden analog **AAV 19** mit einer frischen $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ -Lösung bei 75 °C umgesetzt. Die aus der Auswertung mittels Integration der Radio-HPLC-Chromatogramme erhaltenen Daten der Markierungsausbeuten wurden anschließend mittels sigmoidaler Regression (SigmaPlot) gefittet.

7.6.3.2 Untersuchung der Temperaturabhängigkeit

His^τ-TOC und His^τ-TOCA (10^{-4} M) wurden analog **AAV 19** mit einer frischen $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ -Lösung bei 90 °C umgesetzt. Die Ausbeuten wurden mittels Integration der Radio-HPLC-Chromatogramme erhalten.

7.6.3.3 Untersuchung der pH-Abhängigkeit

Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA (10⁻³ M), His^τ-TOC und His^τ-TOCA (10⁻⁴ M) wurden analog **AAV 19** mit einer frischen [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺-Lösung bei 75 °C umgesetzt, wobei der pH-Wert der Reaktionslösung auf pH 4, 5, 6, 7 bzw. 7.5 mit 0.1 M HCl bzw. 0.1 M NaOH eingestellt wurde. Die Ausbeuten wurden mittels Integration der Radio-HPLC-Chromatogramme erhalten.

7.6.4 Herstellung und Isolierung ^{99m}Tc-markierter Peptide im mCi-Maßstab

Zu 360 µl einer frischen [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺-Lösung (500 - 1800 MBq, siehe Kapitel 7.6.2) wurden 40 µl einer 10⁻³ M Peptid-Lösung in PBS gegeben, und diese Mischung wurde 30 min bei 75 °C erhitzt. Das ^{99m}Tc-markierte Produkt wurde mittels präparativer Radio-HPLC (2 min 0 %, 8 min 45 % und 20 min 45 – 60 % C) isoliert. Zur Aufkonzentration bzw. Entfernung der Lösungsmittel aus der Produktfraktion wurde diese mit 40 ml Wasser (max. 10 % MeOH) verdünnt und das markierte Peptid auf einer Strata X Kartusche (33 µm, 30 mg / 1 ml; Phenomenex, Torrance, USA) fixiert. Nach dem Waschen mit 10 ml H₂O, wurde das Produkt mit 70 % EtOH (1 % 1N HCl) in einem kleinstmöglichen Volumen (ca. 80 µl) eluiert und gegebenenfalls mit PBS oder anderen Lösungsmitteln auf das gewünschte Volumen (Gesamthanolgehalt < 5 %) verdünnt. Die Qualitätskontrolle der fertigen Lösung erfolgte mittels HPLC (Gradient 45 - 60% C in 20 min).

7.7 *In vivo*-Experimente mit ^{99m}Tc(CO)₃-markierten Octreotidderivaten

7.7.1 Biodistributionsstudie an einem AR42J-tumortragenden Mausmodell

7.7.1.1 Tumormodell

Für die Biodistributionsexperimente wurden pankreatische Rattentumorzellen (AR42J) verwendet, die sst2 überexprimieren. Zur Tumoringokulation wurden die Zellen mit 1 mM EDTA in PBS aus den Kulturflaschen gelöst, zentrifugiert und in serumfreiem Medium resuspendiert. Die Zellkonzentration in der Suspension betrug ca. 3·10⁶ Zellen/100 µl Serum. Je 100 µl der Suspension wurden Nacktmäusen (weiblich, 6-8 Wochen, n = 5) subkutan in die Flanke injiziert. Zehn Tage nach der Tumortransplantation hatten die Tumoren eine Masse von 150 – 500 mg, und die Mäuse wurden im Experiment eingesetzt.

7.7.1.2 Durchführung des Biodistributionsexperiments

Für die Biodistributionsstudien wurden 100 µl (150 - 260 kBq) der ^{99m}Tc -markierten Peptide, die wie in Kapitel 7.6.4 beschrieben markiert wurden, in PBS (pH = 7.4) in die Schwanzvene der AR42J-tumortragenden Nacktmäuse injiziert. Die Aktivität wurde in allen Spritzen vor und nach der Injektion bestimmt. Nach 120 min wurden die Mäuse (n = 5) abgetötet und die Organe entnommen. Die Organe wurden anschließend einzeln gewogen und im γ -Counter gegen die Aktivitätsstandards vermessen. Bei der Auswertung wurde das Verhältnis der Differenz der Aktivität in den Spritzen vor und nach der Injektion bei jeder Maus zur selben Differenz beim Standard ermittelt. Die Counts des Standards wurden zur Korrektur mit eben diesem Verhältnis multipliziert. Der so erhaltene Wert ging in die weitere Auswertung mit ein. Die Quantifizierung in den einzelnen Organen erfolgte in Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm [% iD/g]. Dadurch erhält man einen massennormierten Wert für die Gewebeanreicherung.

7.7.2 γ -Kamera-Aufnahmen und Biodistribution am Rattenmodell

7.7.2.1 Tumormodell

Für die Studie wurden pankreatische Rattentumorzellen (AR42J) verwendet, die sst2 überexprimieren. Für die Etablierung der Tumore wurde ein 2 x 2 mm AR42J-Tumorstück (20 Tage) von einer Nacktmaus in die Flanke einer Lewis Ratte (3-6 Wochen) transplantiert. Nach 16 d waren drei getrennte Tumoren entwickelt.

7.7.2.2 γ -Kamera-Aufnahmen und Biodistributionsexperiment

Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA (250 µCi in 400µl PBS-Lösung, max. 2% Ethanol) wurde in die Schwanzvene einer AR42J-tumortragenden Lewisratte injiziert. Die Ratte wurde 90 min p.i. mit einer Mischung aus Ketavet (100 mg/ml Ketaminhydrochloride, Pharmacia Upjohn, Erlangen, Deutschland) und Rompun (2% Xylazinhydrochloride, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Die γ -Kamera-Aufnahmen wurden mit einer Vertex MCD^{PET-AC} Kamera (ADAC Laboratories BV, Schiphol, Netherlands) (15 min, Medium-Energy General Purpose Collimator) durchgeführt. Die Ratte wurde direkt auf den Kollimator gelegt. Die dorsalen und ventralen Aufnahmen wurden nacheinander gemacht. Die Region-of-Interest-Analyse (ROI) wurde mit einem ADAC Multiple Region Programm Pegasys-X durchgeführt.

3.5 h p.i. wurde die Ratte abgetötet und die Organe wurden entnommen, einzeln gewogen und im γ -Counter gegen die Aktivitätsstandards vermessen. Bei der Auswertung wurde das Verhältnis der Differenz der Aktivität in den Spritzen vor und nach der Injektion ermittelt. Die Counts des Standards wurden zur Korrektur mit eben diesem Verhältnis multipliziert. Die Quantifizierung in den einzelnen Organen erfolgte in Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm [% iD/g]. Dadurch erhält man einen massennormierten Wert für die Gewebeanreicherung.

7.8 Patientenstudie

7.8.1 Patientendaten

Der erste Patient (männlich, 71 Jahre) litt unter einem Karzinom des Dünndarms (rezidiv) mit bekannten Leber-, Lymphknoten-, Herz- und Skelettmastasen. Der zweite Patient (weiblich, 71 Jahre) litt unter einem Karzinom mit unbekannter Lage des Primärtumors und extensiven Metastasen in der Leber. Beide Patienten waren einer palliativen Entfernung der abdominalen Tumormassen unterzogen worden.

7.8.2 SPECT-Aufnahmen

Zwei Patienten wurde 114 MBq bzw. 178 MBq Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA in 6 ml PBS (pH = 7.4) i.v. injiziert. γ -Kameraimaging wurde mit einer Skylight Zwei-Kopf-Kamera (ADAC Laboratories BV, Schiphol, Netherlands) unter Verwendung eines low-energy, high resolution-Kollimators mit einem Energiefenster bei 140 keV und einer Fensterweite von 20 % durchgeführt. Die initiale Tracerverteilung von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA wurde mittels dynamischen Serienaufnahmen des oberen Abdomen einschließlich Herz, Leber, Milz und Nieren während der ersten 45 min p.i. (5 x 60", 5 x 120", 4 x 300" pro Aufnahme) und anschließender Region-of-Interest-Analyse (ROI) mit einem ADAC Multiphase Curve Programm ermittelt. Ganzkörperaufnahmen (dorsal und ventral) wurden jeweils 45 und 120 min p.i. durchgeführt. In der Zwischenzeit wurde ein SPECT (45" pro Ansicht, 60 Schritte à 3°) des oberen Abdomen aufgenommen.

8 Anhang

Tabelle 8.1: Hydrazonstabilität von [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam und Freisetzung von [^{18}F]FB-CHO und [^{18}F]FBA bei pH 7.5, pH 5.5 und pH 4 nach 5, 90, 180 und 300 min Inkubation 37°C in 50 mM KH_2PO_4 -Puffer (Daten als $\bar{x} \pm \sigma$; n = 3).

pH-Wert		Anteil [%] nach			
		5 min	90 min	180 min	300 min
4.0	[^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam	94.9 \pm 0.8	83.0 \pm 4.3	70.8 \pm 4.6	65.0 \pm 1.2
	[^{18}F]FB-CHO	2.7 \pm 0.5	14.0 \pm 4.3	26.5 \pm 4.7	30.9 \pm 1.8
	[^{18}F]FBA	0.4 \pm 0.7	0.8 \pm 1.3	0.5 \pm 0.6	1.5 \pm 2.2
5.5	[^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam	92.7 \pm 1.3	86.0 \pm 5.0	80.0 \pm 3.0	71.7 \pm 5.0
	[^{18}F]FB-CHO	4.0 \pm 0.8	7.9 \pm 2.8	10.2 \pm 0.4	13.2 \pm 1.5
	[^{18}F]FBA	1.5 \pm 0.5	3.2 \pm 1.6	6.5 \pm 1.2	9.6 \pm 2.2
7.5	[^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCam	94.0 \pm 1.3	92.0 \pm 2.1	90.3 \pm 0.8	87.1 \pm 1.5
	[^{18}F]FB-CHO	3.4 \pm 1.3	3.3 \pm 1.1	3.7 \pm 0.6	5.7 \pm 1.3
	[^{18}F]FBA	0.4 \pm 0.6	2.1 \pm 1.1	2.3 \pm 0.5	2.9 \pm 0.9

Tabelle 8.2: Biodistribution von [^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA in Black six-Mäusen (n = 2) 30 min p.i.; Daten als $\bar{x} \pm \sigma$ [% iD/g].

Organ	[^{18}F]FB-CH=N-HYNIC-TOCA
Blut	1.97 \pm 0.49
Muskel	0.29 \pm 0.03
Lunge	2.98 \pm 0.28
Leber	28.25 \pm 1.89
Darm	63.39 \pm 3.61
Niere	5.11 \pm 0.95
Milz	1.38 \pm 0.20
Magen	2.57 \pm 0.60
Pankreas	1.99 \pm 0.05
Nebenniere	2.60 \pm 0.04
Knochen	0.54 \pm 0.03

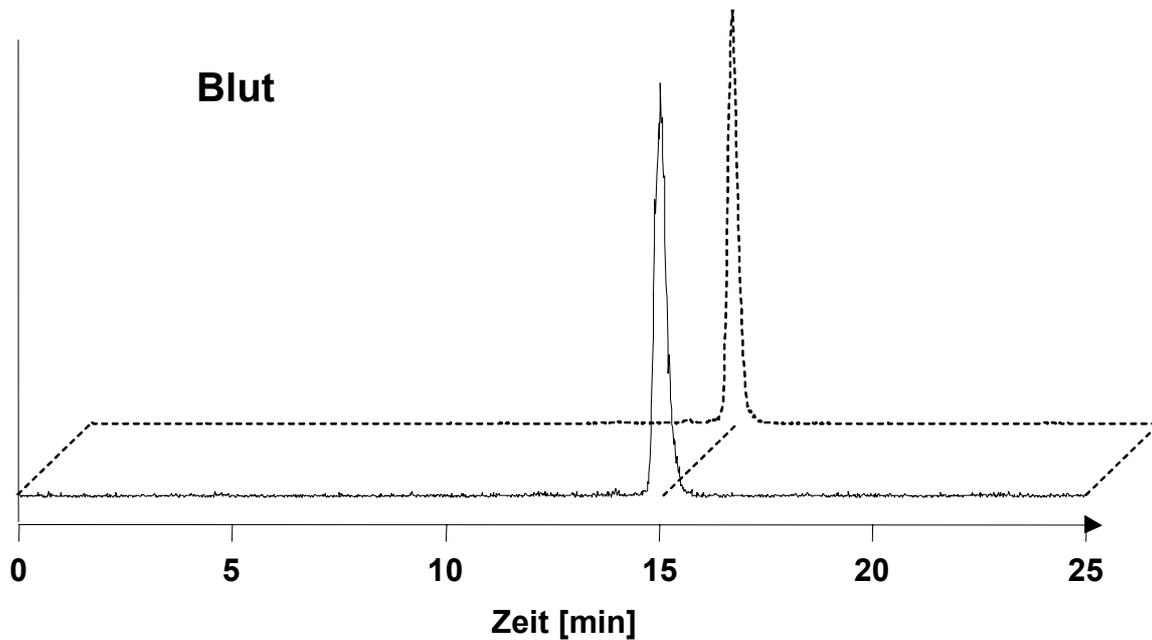


Abbildung 8.1: Radio-HPLC-Chromatogramm (Gradient: 1 - 20 min 22-50%, 20 - 25 min 100 % MeCN (0.1% TFA), 4 ml/min Fluss) der Metabolitenanalyse von $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$ im Blut in Black six-Mäusen 30 min p.i. (n=2): — Blutprobe und Referenz $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$.

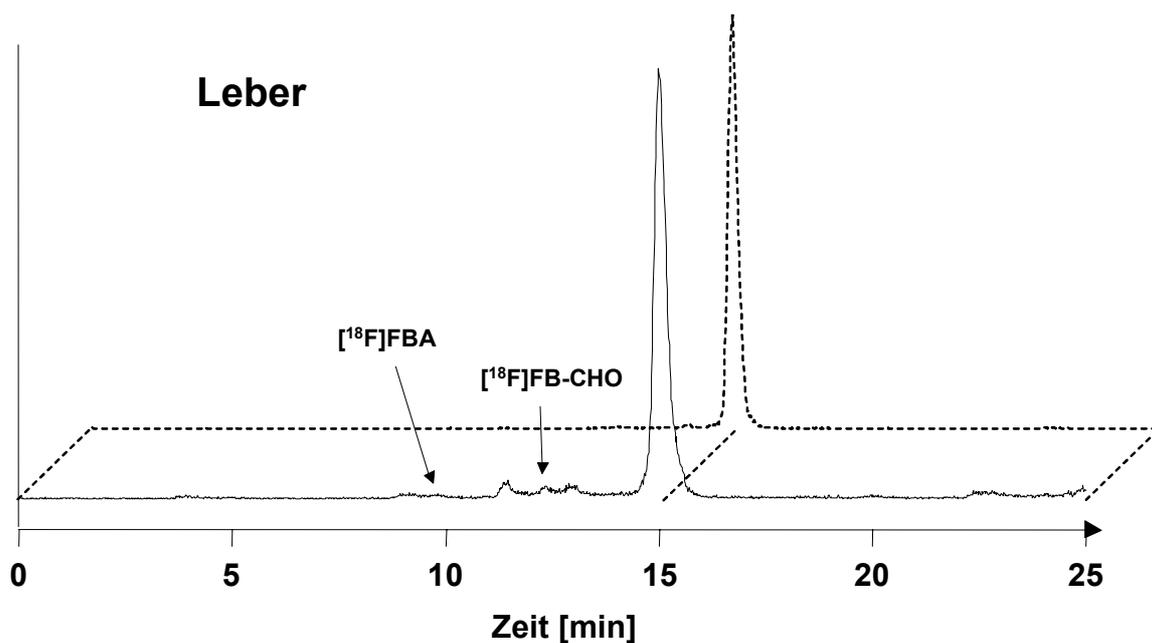


Abbildung 8.2: Radio-HPLC-Chromatogramm (Gradient: 1 - 20 min 22-50%, 20 - 25 min 100 % MeCN (0.1% TFA), 4 ml/min Fluss) der Metabolitenanalyse von $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$ in der Leber in Black six-Mäusen 30 min p.i. (n=2): — Leberprobe und Referenz $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$.

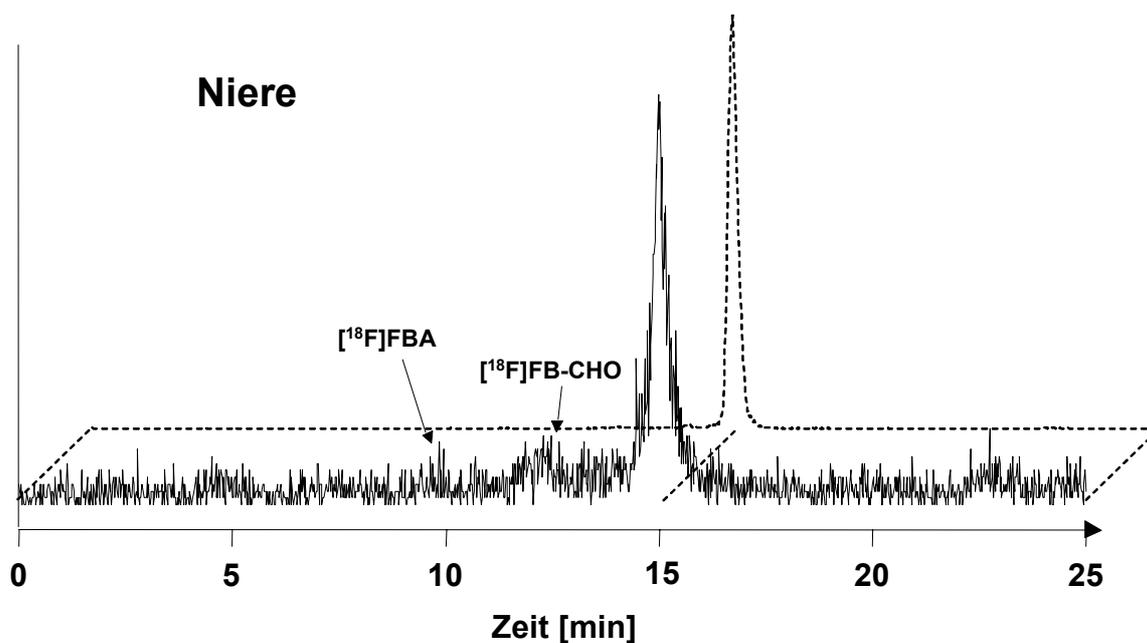


Abbildung 8.3: Radio-HPLC-Chromatogramm (Gradient: 1 - 20 min 22-50%, 20 - 25 min 100 % MeCN (0.1% TFA), 4 ml/min Fluss) der Metabolitenanalyse von $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$ in der Niere in Black six-Mäusen 30 min p.i. ($n=2$): — Nierenprobe und Referenz $[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$.

Tabelle 8.3: Lipophilie $\log P_{\text{ow}}$ (P_{ow} = Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten)

	P_{ow}	$\log P_{\text{ow}}$
$[^{18}\text{F}]\text{FB-CH=N-HYNIC-TOCA}$	31.3 ± 6.7	1.49 ± 0.09
Gluc-Lys 0 ($[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His}$)TOC	0.18 ± 0.01	-0.75 ± 0.03
Gluc-Lys 0 ($[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His}$)TOCA	0.05 ± 0.01	-1.29 ± 0.01
Gluc-Lys 0 ($[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Pic}$)TOCA	0.02 ± 0.01	-1.70 ± 0.02

Tabelle 8.4: Biodistributionsdaten von $\text{Gluc-Lys}^0([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His})\text{TOC}$, $\text{Gluc-Lys}^0([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His})\text{TOCA}$ und $\text{Gluc-Lys}^0([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ in AR42J-tumortragenden Mäusen ($n = 5$) 120 min p.i.; Daten als $\bar{x} \pm \sigma$ [% iD/g].

Organ	$\text{Gluc-Lys}^0([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His})\text{TOC}$	$\text{Gluc-Lys}^0([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His})\text{TOCA}$	$\text{Gluc-Lys}^0([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$
Blut	3.16 ± 0.20	2.20 ± 0.15	0.84 ± 0.25
Muskel	0.33 ± 0.03	0.23 ± 0.04	0.10 ± 0.03
Lunge	5.14 ± 1.15	3.11 ± 0.84	1.68 ± 0.27
Leber	28.7 ± 2.1	16.2 ± 2.1	5.72 ± 1.73
Darm	4.30 ± 0.42	4.12 ± 0.48	4.76 ± 0.56
Niere	18.9 ± 0.9	12.0 ± 1.2	7.13 ± 1.40
Milz	15.1 ± 0.8	4.27 ± 1.26	1.14 ± 0.13
Magen	7.14 ± 0.47	14.9 ± 1.8	14.1 ± 4.5
Nebenniere	5.31 ± 1.82	8.40 ± 3.99	5.02 ± 0.95
Pankreas	2.90 ± 0.71	9.87 ± 2.32	6.17 ± 1.18
Tumor	6.92 ± 1.89	17.9 ± 3.8	19.2 ± 2.5
Hirn	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.10 ± 0.05
Schilddrüse	107 ± 51	41.4 ± 18.5	11.5 ± 2.7

Tabelle 8.5: Tumor/Organ-Verhältnisse von $\text{Gluc-Lys}^0([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His})\text{TOC}$, $\text{Gluc-Lys}^0([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His})\text{TOCA}$ und $\text{Gluc-Lys}^0([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$ in AR42J-tumortragenden Nacktmäusen ($n = 5$), 120 min p.i.; Daten als $\bar{x} \pm \sigma$.

Organ	$\text{Gluc-Lys}^0([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His})\text{TOC}$	$\text{Gluc-Lys}^0([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{His})\text{TOCA}$	$\text{Gluc-Lys}^0([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Pic})\text{TOCA}$
Blut	2.19 ± 0.61	8.16 ± 1.81	22.82 ± 7.4
Muskel	34.1 ± 6.0	78.6 ± 21.6	190 ± 62
Lunge	1.34 ± 0.47	5.77 ± 1.97	11.4 ± 2.4
Leber	0.24 ± 0.07	1.11 ± 0.27	3.35 ± 1.10
Darm	1.61 ± 0.47	4.35 ± 1.05	4.02 ± 0.71
Niere	0.41 ± 0.14	1.49 ± 0.35	2.69 ± 0.63
Milz	0.46 ± 0.13	4.20 ± 1.52	16.7 ± 2.9
Magen	0.97 ± 0.27	1.21 ± 0.30	1.36 ± 0.47

Tabelle 8.6: Biodistributionsdaten von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA in einer AR42J-tumortragenden Lewis Ratte 210 min p.i. [% iD/g] (n = 1).

Organ	Gluc-Lys ⁰ ([^{99m} Tc]Pic)TOCA
Blut	0,03
Muskel	0,01
Lunge	0,13
Leber	0,16
Dünndarm	1,45
Blinddarm	0,14
Dickdarm	1,10
Darm Mittelwert	0,93
Niere	2,89
Milz	0,07
Magen	2,65
Nebenniere	12,2
Pankreas	3,68
Tumor 1	0,75
Tumor 2	1,06
Tumor 3	1,11
Tumor Mittelwert	0,97
Schilddrüse	0,14

Tabelle 8.7: Tumor/Organ-Verhältnisse von Gluc-Lys⁰([^{99m}Tc]Pic)TOCA in einer AR42J-tumortragenden Lewis Ratte 210 min p.i.; [% iD/g], (n = 1).

Organ	Gluc-Lys ⁰ ([^{99m} Tc]Pic)TOCA
Blut	29
Muskel	139
Lunge	7
Leber	6
Dünndarm	< 1
Blinddarm	7
Dickdarm	< 1
Darm gesamt	1
Niere	<1
Milz	13
Magen	< 1
Nebenniere	< 1
Pankreas	< 1
Schilddrüse	7

9 Literaturverzeichnis

- [1] Hrsg.: HN Wagner, Jr, Z Szabo, JW Buchanan; Principles of nuclear medicine; WB Saunders Company, Philadelphia, **1995**.
- [2] Römpp Chemie Lexikon; 9te Auflage (Hrsg.: J Falbe, M Regitz), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**.
- [3] MD Kamen; Isotopic tracers in biology: Applications to clinical research. 3rd edition, (Hrsg.: MD Kamen), Academic Press, New York, **1957**.
- [4] G Hevesy; Adventures in radioisotope research: The collected papers of George Hevesy. Pergamon Press, New York, **1962**.
- [5] MJ Abrams, A Davison, AG Jones, DE Costello, H Pang; Synthesis and characterization of hexakis(alkyl isocyanide) and hexakis(aryl isocyanide) complexes of technetium(I). *Inorg Chem*, **1983**, 22, 2798-800.
- [6] Hrsg.: MJ Welch, CS Redvanly; Handbook of radiopharmaceuticals - radiochemistry and application. John Wiley & Sons, West Sussex, **2003**.
- [7] Todesursachen in Deutschland; Fachserie 12 Reihe 4, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, **2003**.
- [8] JC Reubi; Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocrine Reviews*, **2003**, 24, 389-427.
- [9] O Warburg, F Wind, E Neglers; On the metabolism of tumors in the body. In: Metabolism of tumors. (Hrsg.: O Warburg) Constable, London, **1930**, 254-70.
- [10] O Warburg; On the origin of cancer cells. *Science*, **1956**, 123, 309-14.
- [11] R Hustinx, A Alavi; Tumor imaging. In: Handbook of radiopharmaceuticals - radiochemistry and application. (Hrsg.: MJ Welch, CS Redvanly) John Wiley & Sons, West Sussex, **2003**, 629-42.
- [12] PL Jager, W Vaalburg, J Pruijm, EG deVries, KJ Langen, DA Piers; Radiolabeled amino acids: Basic aspects and clinical applications in oncology. *J Nucl Med*, **2001**, 42, 432-45.
- [13] K Ishiwata, K Kubota, M Murakami, T Sasaki, S Ishii, M Senda; Re-evaluation of amino acid PET studies: Can the protein synthesis rate in brain and tumor tissues be measured in vivo? *J Nucl Med*, **1993**, 34, 1936-43.
- [14] P Heiss, S Mayer, M Herz, H J Wester, M Schwaiger, R Senekowitsch-Schmidtke; Investigation of transport mechanism and uptake kinetics of O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine in vitro and in vivo. *J Nucl Med*, **1999**, 40, 1367-73.
- [15] HJ Wester, M Herz, WA Weber, P Heiss, R Senekowitsch-Schmidtke, M Schwaiger, G Stöcklin; Synthesis and radiopharmacology of O-(2-[¹⁸F]fluorethyl)-L-tyrosine for tumor imaging. *J Nucl Med*, **1999**, 40, 205-12.
- [16] WA Weber, HJ Wester, AL Grosu, M Herz, B Dzewas, HJ Feldmann, MK Molls, G Stöcklin, M Schwaiger; O-(2-[¹⁸F]fluorethyl)-L-tyrosine and l-[methyl-¹¹C]methionine uptake in brain tumors: initial results of a comparative study. *Eur J Nucl Med*, **2000**, 27, 542-9.
- [17] M Laruelle; Imaging synaptic neurotransmission with *in vivo* binding competition techniques: A critical review. *J Cereb Blood Flow Metab*, **2000**, 20, 423-51.
- [18] P Bartenstein; Dopaminergic, GABA/benzodiazepine, and opiate system. *Nuklearmedizin*, **2004**, 43, 33-42.

- [19] SM Okarvi; Peptide-based radiopharmaceuticals: Future tools for diagnostic imaging of cancers and other diseases. *Med Res Rev*, **2004**, *24*, 357-97.
- [20] LC Knight; Radiolabelled peptides for tumor imaging. In: Handbook of radiopharmaceuticals – radiochemistry and application. (Hrsg.: MJ Welch, CS Redvanly) John Wiley & Sons, West Sussex, **2003**, 643-84.
- [21] S Lui, DS Edwards; ^{99m}Tc -labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. *Chem Rev*, **1999**, *99*, 2235-68.
- [22] SM Okarvi; Recent progress in fluorine-18 labelled peptide radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med*, **2001**, *28*, 929-38.
- [23] JG McAfee, RD Neumann; Radiolabeled peptides and other ligands for receptors overexpressed in tumor cells for imaging neoplasms. *Nucl Med Biol*, **1996**, *23*, 673-6.
- [24] JC Reubi; In vitro identification of vasoactive intestinal peptide receptors in human tumors: Implications for tumor imaging. *J Nucl Med*, **1995**, *36*, 1825-35.
- [25] JC Schaer, B Waser, G Mengod, JC Reubi; Somatostatin receptor subtypes sst_1 , sst_2 , sst_3 and sst_5 expression in human pituitary, gastroentero-pancreatic and mammary tumors. *Int J Cancer*, **1997**, *70*, 530-7.
- [26] PA Eden, JE Taylor; Somatostatin receptor subtype gene expression in human and rodent tumors. *Life Sci*, **1993**, *53*, 85-90.
- [27] R Waibel, I Novak-Hofer, R Schibli, P Bläuenstein, E Garcia-Garayoa, R Schwarzbach, K Zimmermann, R Pellikka, O Gasser, A Blanc, M Brühlmeier, PA Schubiger; Radiopharmaceuticals for targeted tumor diagnosis and therapy. *Chimia*, **2000**, *54*, 683-9.
- [28] JP Vincent; Neurotensin receptors: Binding properties, transduction pathways, and structure. *Cell Molec Neurobiol*, **1995**, *15*, 501-12.
- [29] JC Reubi; In vitro identification of vasoactive intestinal peptide receptors in human tumors: Implications for tumor imaging. *J Nucl Med*, **1995**, *36*, 1846-53.
- [30] JC Reubi; In vivo identification of VIP receptors in human tumors: Potential clinical application. *Ann NY Acad Sci*, **1996**, *805*, 753-9.
- [31] A Heppeler, S Froidevaux, AN Eberle, HR Maecke; Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides. *Curr Med Chem*, **2000**, *7*, 971-94.
- [32] AJ Fischman, JW Babich, HW Strauss; A ticket to ride: Peptide radiopharmaceuticals. *J Nucl Med*, **1993**, *34*, 2253-63.
- [33] G Stöcklin, SM Qaim, F Rösch; The impact of radioactivity on medicine. *Radiochimia Acta*, **1995**, *70/71*, 249-72.
- [34] G Stöcklin, HJ Wester; Strategies for radioligand development – peptides for tumor targeting. In: Positron Emission Tomography: A critical assessment of recent trends. (Hrsg.: B Gulyas, HW Müller-Gärtner) Kluwer Academic Publishers, Netherlands, **1998**, 57-90.
- [35] M Schottelius; New radiolabelled somatostatin receptor ligands for diagnosis and therapy; Dissertation, TU München **2002**.
- [36] M Schottelius, HJ Wester, JC Reubi, R Senekowitsch-Schmidtke, M Schwaiger; Improvement of pharmacokinetics of radioiodinated Tyr(3)-octreotide by conjugation with carbohydrates. *Bioconjugate Chem*, **2002**, *13*, 1021-30.
- [37] HJ Wester, J Brockmann, F Rösch, W Wutz, H Herzog, P Smith-Jones, B Stolz, C Bruns, G Stöcklin; PET-pharmacokinetics of ^{18}F -octreotide: A comparison with ^{67}Ga -DFO and ^{86}Y -DTPA-octreotide. *Nucl Med Biol*, **1997**, *24*, 275-86.

- [38] TM Behr, DM Goldenberg, W Becker; Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. *Eur J Nucl Med*, **1998**, *25*, 201-12.
- [39] WA Breeman, M deJong, DJ Kwekkeboom, R Valkema, WH Bakker, PP Kooij, TJ Visser, EP Krenning; Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: Basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *Eur J Nucl Med*, **2001**, *28*, 1421-9.
- [40] YC Patel; in: *Basic and clinical aspects of neuroscience*. (Hrsg.: C Weil, EE Mueller, MO Thorner) Springer-Verlag, Berlin, **1992**, *4*, 348ff.
- [41] S Reichlin; Somatostatin. *N Engl J Med*, **1983**, *309*, 1495-556.
- [42] YC Patel; Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*, **1999**, *20*, 157-98.
- [43] L Pradayrol, H Jörnvall, V Mutt, A Ribet; N-terminally extended somatostatin: The primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett*, **1980**, *109*, 55-8.
- [44] YC Patel; Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest*, **1997**, *20*, 348-67.
- [45] JF Bruno, Y Xu, J Song, M Berelowitz; Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology*, **1993**, *133*, 2561-7.
- [46] T Resine, GI Bell; Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocr Rev*, **1995**, *16*, 427-42.
- [47] JC Reubi, B Waser, JC Schaer, JA Laissue; Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med*, **2001**, *28*, 836-46.
- [48] JC Reubi, JC Schaer, JA Laissue, B Waser; Somatostatin receptors and their subtypes in human tumors and in peritumoral vessels. *Metabolism*, **1996**, *45 Suppl*, 39-41.
- [49] M Schottelius, JC Reubi, V Eltschinger, M Schwaiger, HJ Wester; N-Terminal sugar conjugation and C-terminal Thr-for-Thr(ol) exchange in radioiodinated Tyr³-octreotide: Effect on cellular ligand trafficking in vitro and tumor accumulation in vivo. *J Med Chem*, **2005**, *48*, 2778-89.
- [50] YC Patel, CB Srikant; Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). *Endocrinology*, **1994**, *135*, 2814-7.
- [51] YC Patel, M Greenwood, R Panetta, N Hukovic, S Grigorakis, LA Robertson, CB Srikant; Molecular biology of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism*, **1996**, *45*, 31-8
- [52] W Bauer, U Briner, W Doepfner, R Haller, R Huguenin, P Marbach, TJ Petcher, J Pless; SMS 201-995: A very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci*, **1982**, *31*, 1133-40.
- [53] HJ Wester, M Schottelius, T Poethko, K Bruus-Jensen, M Schwaiger; Radiolabeled carbohydrate somatostatin analogs: A review of the current status. *Cancer Biother Radiopharm*, **2004**, *19*, 231-44.
- [54] WH Bakker, EP Krenning WA Breeman, LJ Hofland, P Marbach, J Pless, P Pralet, B Stolz, JW Koper, SW Lamberts, TJ Visser; [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]-octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor-positive tumors: Synthesis, radiolabeling and in vitro validation. *Life Sci*, **1991**, *49*, 1583-91.
- [55] EP Krenning, WA Breeman, PP Kooij, JS Lameris, WH Bakker, JW Koper, L Ausema, JC Reubi, SW Lamberts; Localisation of endocrine-related tumors with radioiodinated analogues of somatostatin. *Lancet*, **1989**, *333*, 242-4.

- [56] GJ Meyer, H Mäcke, J Schuhmacher, WH Knapp, M Hofmann; ⁶⁸Ga-Labelled DOTA-derivatised peptide ligands. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2004**, *31*, 1097-104.
- [57] M Henze, J Schuhmacher, P Hipp, J Kowalski, DW Becker, J Doll, HR Mäcke, M Hofmann, J Debus, U Haberkorn; PET imaging of somatostatin receptors using [⁶⁸Ga]-DOTA-D-Phe¹-Tyr³-octreotide: First results in patients with meningiomas. *J Nucl Med*, **2001**, *42*, 1053-6.
- [58] B Stolz, G Weckbecker, PM Smith-Jones, R Albert, F Raulf, C Bruns; The somatostatinreceptor-targeted radiotherapeutic [⁹⁰Y-DOTA-D-Phe¹-Tyr³]octreotide (⁹⁰Y-SMT 487) eradicates experimental rat pancreatic CA 20948 tumours. *Eur J Nucl Med*, **1998**, *25*, 668-74.
- [59] D Bushnell, T O'Dorisio, Y Menda, T Carlisle, P Zehr, M Connolly, M Karwal, S Miller, S Parker, H Bouterfa; Evaluating the clinical effectiveness of ⁹⁰Y-SMT 487 in patients with neuroendocrine tumors. *J Nucl Med*, **2003**, *44*, 1556-60.
- [60] JC Reubi, JC Schaer, B Waser, S Wenger, A Heppeler, JS Schmitt, HR Maecke; Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes sst1-sst5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med*, **2000**, *27*, 273-82.
- [61] M deJong, WA Breeman, WH Bakker, PP Kooij, BF Bernard, TJ Hofland, TJ Visser, A Srinivasan, MA Schmidt, JL Erion, JE Bugaj, HR Maecke, EP Krenning; Comparison of (111)In-labeled somatostatin analogues for tumor scintigraphy and radionuclide therapy. *Cancer Res*, **1998**, *58*, 437-41.
- [62] D Storch, M Behe, MA Walter, J Chen, P Powell, R Mikoljczak, HR Mäcke; Evaluation of [^{99m}Tc/EDDA/HYNIC⁰]octreotide derivatives compared with [¹¹¹In-DOTA⁰,Tyr³,Thr⁸]octreotide and [¹¹¹In-DTPA⁰]octreotide: Does tumor or pancreas uptake correlate with the rate of internalization? *J Nucl Med*, **2005**, *46*, 1561-9.
- [63] M Marastoni, S Spisani, R Tomatis; Synthesis and biological activity of D-glucopyranosyl peptide T derivatives. *Arzneimittelforschung*, **1994**, *44*, 984-7.
- [64] HJ Wester, M Schottelius, K Scheidhauer, JC Reubi, I Wolf, M Schwaiger; Comparison of radioiodinated TOC, TOCA and Mtr-TOCA: the effect of carbonylation on the pharmacokinetics. *Eur J Nucl Med*, **2002**, *29*, 28-38.
- [65] A Stahl, G Meisetschläger, M Schottelius, K Bruus-Jensen, K Scheidhauer, M Schwaiger; [¹²³I]Mtr-TOCA, a radioiodinated and carbonylated analogue of octreotide: Scintigraphic comparison with [¹¹¹In]octreotide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2005**, *33*, 45-52.
- [66] HJ Wester, M Schottelius, K Scheidhauer, M Meisetschläger, M Herz, JC Reubi, M Schwaiger; PET imaging of somatostatin receptors: Design, synthesis and preclinical evaluation of a novel ¹⁸F-labelled, carbonylated analogue of octreotide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2003**, *30*, 117-22.
- [67] RA Nicoli, C Schenker, SE Leeman; Substance P as a transmitter candidate. *Annu Rev Neurosci*, **1980**, *3*, 227-68.
- [68] T Hökfelt, B Pernow, J Wahren; Substance P: A pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med*, **2001**, *249*, 27-41.
- [69] IM Hennig, JA Laissue, U Horisberger, JC Reubi; Substance-P receptors in human primary neoplasm: Tumoral and vascular localization. *Int J Cancer*, **1995**, *61*, 786-92.
- [70] WA Breeman, MP VanHagen, HA Visser-Wisselaar, ME van der Pluijm, JW Koper, B Setyono-Han, WH Bakker, DJ Kwekkeboom, MP Hazenberg, SW Lamberts, TJ Visser, EP Krenning; In vitro and in vivo studies of substance P receptor expression in rats with the new analog [Indium-111-DTPA-Arg¹]substance P. *J Nucl Med*, **1996**, *37*, 108-17.

- [71] MV Green, J Seidel; Single photon imaging. In: Nuclear medicine – diagnosis and therapy. (Hrsg.: JC Harbert, WC Eckelman, RD Neumann); Thieme Verlag, New York, **1996**, 87-120.
- [72] W Seelmann-Eggebert, G Pfennig, H Muenzel, H Klewe-Nebenius; Nuklidkarte. Kernforschungszentrum, Karlsruhe, 5. Auflage, Gersbach u. Sohn Verlag, München, **1981**.
- [73] P Richards; Radioactive Pharmaceuticals Symposium No. 6 Conf 651111. Oak Ridge, TN:US Atomic Energy Commission **1966**, 155.
- [74] K Wienhard, R Wagner, WD Heiss; PET – Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie. Springer Verlag, Berlin, **1989**.
- [75] FH Fahey; Instrumentation in positron emission tomography. *Neuroimag Clin N Am*, **2003**, *13*, 659-69
- [76] EM Rohren, TG Turkington, RE Coleman; Clinical application of PET in oncology. *Radiology*, **2004**, *231*, 305-10.
- [77] HJ Wester; ¹⁸F: Labeling chemistry and labeled compounds. In: Handbook of nuclear chemistry. (Hrsg.: A Vértes, S Nagy, Z Klencsár) Kluwer Academic Publishers, Netherlands, **2003**, *4*, 167-209.
- [78] S Lui, DS Edwards, JA Barrett; ^{99m}Tc labeling of highly potent small peptides. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 621-36.
- [79] SE Snyder, MR Kilbourn; Chemistry of fluorine-18 radiopharmaceuticals. In: Handbook of radiopharmaceuticals – radiochemistry and application. (Hrsg: MJ Welch, CS Redvanly) John Wiley & Sons, West Sussex, **2003**, 195-227.
- [80] NS Mason, CA Mathis; Radiohalogens for PET imaging. In: Positron Emission Tomography – basic science and clinical practice. (Hrsg.: PE Valk, DL Bailey, DW Townsend, MN Maisey) Springer Verlag, London, **2003**, 217-36.
- [81] HJ Wester, K Hamacher, G Stöcklin; A comparative study of n.c.a. fluorine-18 labeling of proteins via acylation and photochemical conjugation. *Nucl Med Biol*, **1996**, *23*, 365-72.
- [82] CW Lange, HF VanBrocklin, S Taylor; Photoconjugation of 3-azido-5-nitrobenzyl-¹⁸F]fluoride to an oligonucleotide aptamer. *J Label Compd Radiopharm*, **2002**, *45*, 257-68.
- [83] Y Shai, KL Kirk, MA Channing, BB Dunn, MA Lesniak, RC Eastman, RD Finn, J Roth, KA Jacobson; ¹⁸F-labeled insulin: A prosthetic group methodology for incorporation of a positron emitter into peptides and proteins. *Biochemistry*, **1989**, *28*, 4801-6.
- [84] M Jelinski, K Hamacher, HH Coenen; C-Terminal ¹⁸F-fluoroethylamidation exemplified on [Gly-OH⁹]oxytocin. *J Label Compd Radiopharm*, **2002**, *45*, 217-29.
- [85] MR Kilbourn, CS Dence, MJ Welch, CJ Mathias; Fluorine-18 labeling of proteins. *J Nucl Med*, **1987**, *28*, 462-70.
- [86] SY Shuie, AP Wolf, JF Hainfeld; Synthesis of ¹⁸F-labelled N-(4-[¹⁸F]fluorophenyl)maleimid and its derivatives for labelling monoclonal antibody with ¹⁸F. *J Label Compd Radiopharm*, **1989**, *26*, 287-9.
- [87] B deBruin, B Kühnast, F Hinnen, L Yaouancq, M Amessou, L Johannes, A Samson, R Boisgard, B Tavitian, F Dolle; 1-[3-(2-[¹⁸F]Fluoropyridin-3-yloxy)propyl]pyrrole-2,5-dione: Design, synthesis, and radiosynthesis of a new [¹⁸F]fluoropyridine-based maleimide reagent for the labeling of peptides and proteins. *Bioconjugate Chem*, **2005**, *16*, 406-420.
- [88] B Kühnast, F Dolle, F Vaufrey, F Hinnen, C Crouzel, B Tavitian; Fluorine-18 labeling of oligonucleotides bearing chemically-modified ribose-phosphate backbones. *J Label Compd Radiopharm*, **2000**, *43*, 837-48.

- [89] G Vaidyanathan, MR Zalutsky; Fluorine-18-labeled [Nle⁴,D-Phe⁷]- α -MSH, an α -melanocyte stimulating hormone analogue. *Nucl Med Biol*, **1997**, *24*, 171-8.
- [90] R Bergmann, M Scheunemann, C Heichert, P Mading, H Wittrisch, M Kretzschmar, H Rodig, D Tourwe, K Iterbeke, K.Chavatte, D Zips, JC Reubi, B Johannsen; Biodistribution and catabolism of ¹⁸F-labeled neurotensin(8-13) analogs. *Nucl Med Biol*, **2002**, *29*, 61-72.
- [91] ED Hostetler, WB Edwards, CJ Anderson, MJ Welch; Synthesis of 4-[¹⁸F]fluorobenzoyl octreotide and biodistribution in tumour-bearing Lewis rats. *J Label Compds Radiopharm*, **1999**, *42*, S720-2.
- [92] X Chen, R Park, Y Hou, V Khankaldyyan, I Gonzales-Gomez, M Tohme, JR Bading, WE Laug, PS Conti; MicroPET imaging of brain tumor angiogenesis with ¹⁸F-labeled PEGylated RGD peptide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2004**, *31*, 1081-9.
- [93] F Wust, C Hultsch, R Bergmann, B Johannsen, T Henle; Radiolabelling of isopeptide N^ε-(γ -glutamyl)-L-lysine by conjugation with N-succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorobenzoate. *Appl Radiat Isot* **2003**, *59*, 43-8.
- [94] S Guhlke, HJ Wester, C Bruns, G Stocklin; (2-[¹⁸F]fluoropropionyl-(D)Phe¹)-octreotide, a potential radiopharmaceutical for quantitative somatostatin receptor imaging with PET: Synthesis, radiolabeling, *in vitro* validation and biodistribution in mice. *Nucl Med Biol*, **1994**, *21*, 819-25.
- [95] R Haubner, HJ Wester, WA Weber, C Mang, SI Ziegler, SL Goodman, R Senekowitsch-Schmidtke, H Kessler, M Schwaiger; Noninvasive imaging of $\alpha_v\beta_3$ integrin expression using ¹⁸F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res* **2001**, *61*, 1781-5.
- [96] L Lang, WC Eckelman; One-step synthesis of ¹⁸F-labeled [¹⁸F]-N-succinimidyl-4-(fluoromethyl)benzoate for protein labeling. *Appl Radiat Isot*, **1994**, *45*, 1155-63.
- [97] Y Magata, L Lang, DO Kiesewetter, EM Jagoda, MA Channing, WC Eckelman; Biologically stable [¹⁸F]-labeled benzylfluoride derivatives. *Nucl Med Biol*, **2000**, *27*, 163-8.
- [98] FR Wust, T Kniess; Synthesis of 4-[¹⁸F]fluoroiodobenzene and its application in sonogashira cross-coupling reactions. *J Label Compd Radiopharm*, **2003**, *46*, 699-713.
- [99] K Rose; Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J Am Chem Soc*, **1994**, *116*, 30-3.
- [100] T Poethko, M Schottelius, G Thumshirn, U Hersel, M Herz, G Henriksen, H Kessler, M Schwaiger, HJ Wester; Two-step methodology for high-yield routine radiohalogenation of peptides: ¹⁸F-labeled RGD and octreotide analogs. *J Nucl Med*, **2004**, *45*, 892-902.
- [101] M Schottelius, T Poethko, M Herz, JC Reubi, H Kessler, M Schwaiger, HJ Wester; First ¹⁸F-labeled tracer suitable for routine clinical imaging of sst receptor-expressing tumors using Positron Emission Tomography. *Clin Cancer Res*, **2004**, *10*, 3593-606.
- [102] T Poethko, M Schottelius, G Thumshirn, M Herz, R Haubner, G Henriksen, H Kessler, M Schwaiger, HJ Wester; Chemoselective pre-conjugate radiohalogenation of unprotected mono- and multimeric peptides *via* oxime formation. *Radiochim Acta*, **2004**, *92*, 317-27.
- [103] M Glaser, H Karlsen, M Solbakken, F Arukwe, F Brady, SK Luthra, A Cuthbertson; ¹⁸F-fluorothiols: A new approach to label peptides chemoselectively as potential tracers for Positron Emission Tomography. *Bioconjugate Chem*, **2004**, *15*, 1447-53.
- [104] ZB Alfassi, F Groppi, ML Bonardi, JJ de Goeij; On the "artificial" nature and the "carrier-free" nature of ^{99m}Tc from ⁹⁹Mo/^{99m}Tc generators. *Appl Radiat Isot*, **2005**, *63*, 37-40.

- [105] WC Eckelman, J Steigman, CH Paik; Radiopharmaceutical chemistry. In: Nuclear medicine – diagnosis and therapy. (Hrsg.: JC Harbert, WC Eckelman, RD Neumann) Thieme Verlag, New York, **1996**, 213-65.
- [106] H Kolan, J Li, ML Thakur; Sandostatin labeled with ^{99m}Tc : in vitro stability, in vivo validity and comparison with ^{111}In -DTPA-octreotide. *Pept Res*, **1996**, *9*, 144-50.
- [107] T Maina, B Stolz, R Albert, C Bruns, P Koch, HR Maecke; Synthesis, radiochemistry and biological evaluation of a new somatostatin analogue (SDZ 219-387) labelled with technetium-99m. *Eur J Nuc Med*, **1994**, *21*, 437-44.
- [108] AR Fritzberg, S Kasina, D Eshima, DL Johnson; Synthesis and biological evaluation of technetium-99m MAG_3 as a hippuran replacement. *J Nucl Med*, **1986**, *27*, 111-6.
- [109] R Haubner, F Buchertseifer, M Bock, H Kessler, M Schwaiger, HJ Wester; Synthesis and biological evaluation of a ^{99m}Tc -labelled cyclic RGD peptide for imaging the $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin. *Nuklearmedizin*, **2004**, *1*, 26-32.
- [110] DA Pearson, J Lister-James, WJ McBride, DM Wilson, LJ Martel, ER Civitello, JE Taylor, BR Moyer, RT Dean; Somatostatin receptor-binding peptides labeled with technetium-99m: Chemistry and initial biological studies. *J Med Chem*, **1996**, *39*, 1361-71.
- [111] KE Baidoo, KS Lin, Y Zhan, P Finley, U Scheffel, HN Wagner; Design, synthesis, and initial evaluation of high-affinity technetium bombesin analogues. *Bioconjugate Chem*, **1998**, *9*, 218-25.
- [112] KS Lin, A Luu, KE Baidoo, H Hashemzadeh-Gargari, MK Chen, K Brenneman, R Pili, M Pomper, MA Carducci, HN Wagner; A new high affinity technetium-99m-bombesin analogue with low abdominal accumulation. *Bioconjugate Chem*, **2005**, *16*, 43 – 50.
- [113] HJ Pietzsch, H Spies, S Hoffmann; Lipophilic technetium complexes. VI. Neutral oxotechnetium(V) complexes with monothiole/tridentate dithiole coordination. *Inorg Chim Acta*, **1989**, *165*, 163-6.
- [114] S Seifert, A Drews, A Gupta, HJ Pietzsch, H Spies, B Johansson; Stability studies on (99m)technetium(III) complexes with tridentate/monodentate thiol ligands and phosphine ('3+1+1' complexes). *Appl Radiat Isot*, **2000**, *53*, 431-8.
- [115] HJ Rennen, JE van Eerd, WJ Oyen, FH Corstens, DS Edwards, O Boerman; Effect of coligand variation on the in vitro characteristics of Tc-99m-labeled interleukin-8 in detection of infection. *Bioconjugate Chem*, **2002**, *13*, 370-7.
- [116] C Decristoforo, L Melendez-Alafort, JK Sosabowski, SJ Mather; ^{99m}Tc -HYNIC-[Tyr³]-octreotide for imaging somatostatin-receptor-positive tumors: Preclinical evaluation and comparison with ^{111}In -octreotide. *J Nucl Med*, **2000**, *41*, 1114-9.
- [117] C Decristoforo, SJ Mather, W Cholewinski, E Donnemiller, G Riccabona, R Moncayo; ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC: a new ^{99m}Tc -labelled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor-positive tumors: First clinical results and intra patient comparison with ^{111}In -labelled octreotide derivatives. *Eur J Nucl Med*, **2000**, *27*, 1318-25.
- [118] C Decristoforo, SJ Mather; Preparation, ^{99m}Tc -labeling, and in vitro characterization of HYNIC and N_3S modified RC-160 and [Tyr³]octreotide. *Bioconjugate Chem*, **1999**, *10*, 431-8.
- [119] C Decristoforo, SJ Mather; ^{99m}Tc -Technetium-labelled peptide-HYNIC conjugates: Effect of lipophilicity and stability on biodistribution. *Nucl Med Biol*, **1999**, *26*, 389-96.
- [120] A Purohit, S Lui, CE Ellars, D Casebier, SB Haber, DS Edwards; Pyridine-containing 6-hydrazinonicotinamide derivatives as potential bifunctional chelators for ^{99m}Tc -labeling of small biomolecules. *Bioconjugate Chem*, **2004**, *15*, 728-37.

- [121] S Lui, DS Edwards, MC Ziegler, AR Harris, SJ Hemmingway, JA Barrett; ^{99m}Tc -labeling of a hydrazinonicotinamide conjugated vitronectin receptor antagonist useful for imaging tumors. *Bioconjugate Chem*, **2001**, *12*, 624-9.
- [122] SR Banerjee, KP Maresca, L Francesconi, J Valliant, JW Babich, J Zubieta; New directions in the coordination chemistry of ^{99m}Tc : A reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. *Nucl Med Biol*, **2005**, *32*, 1-20.
- [123] E Guggenberg, R Mikolajczak, B Janota, G Riccabona, C Decristoforo; Radiopharmaceutical development of a freeze-dried kit formulation for the preparation of [^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-D-Phe¹, Tyr³]-octreotide, a somatostatin analog for tumor diagnosis. *J Pharm Sci*, **2004**, *93*, 2497-506.
- [124] R Alberto, K Ortner, N Wheatley, R Schibli, AP Schubiger; Synthesis and properties of boranocarbonate: A convenient in situ CO source for the aqueous preparation of [$^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3$]⁺. *J Am Chem Soc*, **2001**, *123*, 3135-6.
- [125] R Alberto, R Schibli, A Egli, AP Schubiger; A novel organometallic aqua complex of technetium for labeling of biomolecules: Synthesis of [$^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3$]⁺ from [$^{99m}\text{TcO}_4$] in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. *J Am Chem Soc*, **1998**, *120*, 7987-8.
- [126] R Schibli, R La Bella, R Alberto, E Garcia-Garayoa, K Ortner, U Abram, PA Schubiger; Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -tricarbonyl complexes: A hint for the future functionalization of biomolecules. *Bioconjugate Chem*, **2000**, *11*, 345-51.
- [127] J Baldas; The coordination chemistry of technetium. *Adv Inorg Chem*, **1994**, *41*, 2-123.
- [128] K Ortner, M Kündig, S Mundweiler, R Alberto; The mixed ligand [2+1] approach: An easier way of labeling the [$\text{M}(\text{CO})_3$]⁺ core (M = $^{99,99m}\text{Tc}$, Re). *J Label Compd Radiopharm*, **2001**, *44*, Suppl 1 S504-6.
- [129] S Mundweiler, M Kündig, K Ortner, R Alberto; A new [2+1] mixed ligand concept based on [$\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3$]⁺: A basic study. *Dalton Trans*, **2004**, 1320-8
- [130] R Alberto, JK Pak, D van Staveren, S Mundweiler, P Benny; Mono-, bi-, or tridentate ligands? The labeling of peptides with ^{99m}Tc -carbonyls. *Biopolymers*, **2004**, *76*, 324-33.
- [131] R Schibli, R Alberto, R LaBella, PA Schubiger, U Abram, K Ortner; In vivo and in vitro evaluation of bifunctional chelators for labeling with *fac*-[$\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3$]⁺. *J Label Compd Radiopharm*, **1999**, *42*, Suppl 1 S228-30.
- [132] R La Bella, E Garcia-Garayoa, M Langer, P Bläuenstein, AG Beck-Sickinger, PA Schubiger; In vitro and in vivo evaluation of a $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -labeled bombesin analogue for imaging of gastrin releasing peptide receptor-positive tumors. *Nucl Med Biol*, **2002**, *29*, 553-60.
- [133] R Schibli, PA Schubiger; Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med*, **2002**, *29*, 1529-42.
- [134] SR Banerjee, MK Levadala, N Lazarova, L Wei, JF Valliant, KA Stephenson JW Babich, KP Maresca, J Zubieta; Bifunctional single amino acid chelates (SAAC) for labeling of biomolecules with the $\{^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\}^{+1}$ and $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}^{+1}$ cores. The crystal and molecular structures of [$\text{ReBr}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{C}_5\text{H}_4\text{N})$], [$\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)_2\text{NH}\}$]Br, [$\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}\}$]Br, [$\text{Re}(\text{CO})_3\{\text{X}(\text{Y})\text{NCH}_2\text{-CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\}$]Br, (X = Y = 2-pyridylmethyl; X = 2-pyridylmethyl, Y = 2-(1-methylimidazolyl)methyl; X = Y = 2-(1-methylimidazolyl)methyl, [$\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)\text{NH}(\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S})\}$] and [$\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)\text{N}(\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S})(\text{CH}_2\text{CO}_2)\}$]. *Inorg Chem*, **2002**, *41*, 6417-25.

- [135] KA Stephenson, SR Banerjee, T Besanger, OO Sogbein, MK Levadala, N McFarlane, JA Lemon, DR Boreham, KP Maresca, JD Brennan, JW Babich, J Zubieta, JF Valliant; Bridging the gap between in vitro and in vivo imaging: Isostructural Re and ^{99m}Tc complexes for correlating fluorescence and radioimaging studies. *J Am Chem Soc*, **2004**, *126*, 8598-9.
- [136] A Egli, R Alberto, L Tannahill, R Schibli, U Abram, A Schaffland, R Waibel, D Tourwé, L Jeannin, K Iterbeke, PA Schubiger; Organometallic ^{99m}Tc -aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity. *J Nucl Med*, **1999**, *40*, 1913-7.
- [137] JK Pak, P Benny, B Spingler, K Ortner, R Alberto; N^ε-functionalization of metal and organic protected L-histidine for highly efficient, direct labeling of biomolecules with $[\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$. *Chem Eur J*, **2003**, *9*, 2053-61.
- [138] M Marmion, R Alberto, J Bugaj, L Chinen, M Schmidt, A Srinivasan; Preparation and biodistribution of $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{His}^0, \text{Tyr}^3]\text{octreotate}$. *J Label Compd Radiopharm*, **1999**, *42*, Suppl. 1 S231-3.
- [139] K Bruus-Jensen; Synthese und erste Evaluierung ^{99m}Tc -markierter Derivate von Octreotid. Diplomarbeit, TU München, **2001**.
- [140] E Garcia-Garayoa, P Bläuenstein, M Bruehlmeier, A Blanc, K Iterbeke, P Conrath, D Tourwé, PA Schubiger; Preclinical evaluation of a new, stabilized neurotensin(8-13) pseudopeptide radiolabeled with ^{99m}Tc . *J Nucl Med*, **2002**, *43*, 374-83.
- [141] E von Guggenberg, M Behe, TM Behr, M Saurer, T Seppi, C Decristoforo; ^{99m}Tc -labeling and in vitro and in vivo evaluation of HYNIC- and (N α -His)acetic acid-modified [D-Glu¹]-minigastrin. *Bioconjugate Chem*, **2004**, *15*, 864-71.
- [142] M Langer, R La Bella, E Garcia-Garayoa, AG Beck-Sickinger; ^{99m}Tc -labeled neuropeptide Y analogues as potential tumor imaging agents. *Bioconjugate Chem*, **2001**, *12*, 1028-34.
- [143] R La Bella, E Garcia-Garayoa, M Bähler, P Bläuenstein, R Schibli, P Conrath, D Tourwé, PA Schubiger; A ^{99m}Tc (I)-postlabeled high affinity bombesin analogue as a potential tumor imaging agent. *Bioconjugate Chem*, **2002**, *13*, 599-604.
- [144] S Houdier, M Legrand, D Boturyn, S Croze, E Defranq, J Lhomme; A new fluorescent probe for sensitive detection of carbonyl compounds. *Anal Chim Acta*, **1999**, *382*, 253-6.
- [145] S Houdier, S Perrier, E Defranq, M Legrand; A new fluorescent probe for sensitive detection of carbonyl compounds: sensitivity improvement and application to environmental water samples; *Anal Chim Acta*, **2000**, *412*, 221-33.
- [146] U Beyer, T Roth, P Schumacher, G Maier, A Unold, AW Frahm, HH Fiebig, C Unger, F Kratz; Synthesis and in vitro efficacy of transferrin conjugates of the anticancer drug chlorambucil. *J Med Chem*, **1998**, *41*, 2701-8.
- [147] Y Bae, S Fokushima, A Harada, K Kataoka; Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: Polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change. *Angew Chem Int Ed*, **2003**, *42*, 4640-3.
- [148] J Shao, JP Tam; Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone and thiazolidine Linkages. *J Am Chem Soc*, **1995**, *117*, 3894-9.
- [149] TP King, SW Zhao, T Lam; Preparation of protein conjugates via intermolecular hydrazone linkages. *Biochemistry*, **1986**, *25*, 5774-9.
- [150] OL Padilla De Jesus, HR Ihre, L Gagne, JM Fréchet, FC Szoka; Polyester dendritic systems for drug delivery applications: In vitro and in vivo evaluation. *Bioconjugate Chem*, **2002**, *13*, 453-61.

- [151] P Chenevier, L Bourel-Bonnet, D Roux; Chemical characterization of α -oxohydrazone ligation on colloids: Toward grafting molecular addresses on biological vectors. *J Am Chem Soc*, **2003**, *125*, 16261-70.
- [152] I Mellman, R Fuchs, A Helenius; Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann Rev Biochem*, **1986**, *55*, 663-700.
- [153] K Bruus-Jensen, M Schottelius, K Scheidhauer, M Schwaiger, HJ Wester; Comparison of carbohydrated octreotide derivatives bearing different chelators for labelling with $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. *Eur J Nucl Med*, submitted.
- [154] RB Merrifield; Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc*, **1963**, *85*, 2149-54.
- [155] JM Steward, JD Young; in: *Solid Phase Peptide Synthesis*; Freeman & Co., San Francisco, **1969**.
- [156] GB Fields, RL Noble; Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pep Protein Res*, **1990**, *35*, 161-214.
- [157] LA Carpino, GY Han; 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J Org Chem*, **1972**, *37*, 3404-9.
- [158] RAM O'Ferral; β -Elimination of 9-fluorenylmethanol in aqueous solution: An *E1cB* mechanism. *J Chem Soc (B)*, **1970**, 260-8.
- [159] RAM O'Ferral, β -Elimination of 9-fluorenylmethanol in solutions of methanol and t-butyl alcohol; *J Chem Soc (B)*, **1970**, 268-74.
- [160] R Knorr, A Trzeciak, W Bannwarth, G Gillessen; New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett*, **1989**, *30*, 1927-30.
- [161] F Albericio, LA Carpino; Coupling reagents and activation. *Methods Enzymol*, **1997**, *289*, 104-25.
- [162] LA Thompson, J Ellman; Straightforward and general method for coupling alcohols to solid supports. *Tetrahedron Lett*, **1994**, *35*, 9333-5.
- [163] E Lohof; Dissertation, TU München **1998**.
- [164] G Kokotos; A convenient one-pot conversion of N-protected amino acids and peptides into alcohols. *Synthesis*, **1990**, 299-301.
- [165] M Bodanszky; in: *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Heidelberg, **1984**, 180-1.
- [166] DA Pearson, M Blanchette, ML Baker, CA Guindon; Trialkylsilanes as scavengers of trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett*, **1989**, *30*, 2739-42.
- [167] A Metha, R Jaouhari, TJ Benson, KT Douglas; Improved efficiency and selectivity in peptide synthesis: Use of triethylsilane as a carbocation scavenger in deprotection of t-butyl esters and t-butoxycarbonyl-protected sites. *Tetrahedron Lett*, **1992**, *33*, 5441-44.
- [168] Synthese durchgeführt von Fr. Dr. M Schottelius und Produkt freundlicherweise zur weiteren Verwendung zur Verfügung gestellt.
- [169] L Bourel-Bonnet, D Bonnet, F Malingue, H Gras-Masse, O Melnyk; Simultaneous lipidation of a characterized peptide mixture by chemoselective ligation. *Bioconjugate Chem*, **2003**, *14*, 494-9.
- [170] DJ O'Shannessy, M Wilchek; Immobilization of glycoconjugates by their oligosaccharides: Use of hydrazido-derivatized matrices. *Anal Biochem*, **1990**, *191*, 1-8

- [171] TD Harris, M Sworin, N Williams, M Rjopadhye, PR Damphousse, D Glowacka, MJ Poirier, K Yu; Synthesis of stable hydrazones of a hydrazinonicotinyl-modified peptide for the preparation of ^{99m}Tc -labeled radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chem*, **1999**, *10*, 808-14.
- [172] DS Edwards, S Lui, AR Harris, MJ Poirier, BA Ewels; ^{99m}Tc -labeling of hydrazones of a hydrazinonicotinamide conjugated cyclic peptide; *Bioconjugate Chem*, **1999**, *10*, 803-7.
- [173] JK Rueter, RH Mattern, L Zhang, J Taylor, B Morgan, D Hoyer, M Goodman; Syntheses and biological activities of sandostatin analogs containing stereochemical changes in position 6 or 8. *Biopolymers*, **2000**, *53*, 497-505.
- [174] M Schottelius, F Rau, M Schwaiger, HJ Wester; Comparative evaluation of ^{111}In -DOTA- and carbohydrated ^{125}I Tyr³-octreotide carboxyamides and octreotate. *J Label Compd Radiopharm*, **2003**, *46*, Suppl 1 S397.
- [175] MH Haka, MR Kilbourn, GL Watkins, SA Toorongian; Aryltrimethylammonium trifluoromethanesulfonates as precursors to aryl ^{18}F fluorides: Improved synthesis of ^{18}F GBR-13119. *J Label Compds Radiopharm*, **1989**, *27*, 823-33.
- [176] MJ Abrams, M Juweid, CI tenKate, DA Schwartz, MM Hauser, FE Gaul, AJ Fucello, RH Rubin, HW Strauss, AJ Fischman; Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabelled via the hydrazin nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rat; *J Nucl Med*, **1990**, *31*, 2022-8.
- [177] L Heller, A Becher, A Beck, F Müller; On the problem of utilization of infused amino acid solutions. *Klin Wochenschr*, **1967**, *45*, 317-8.
- [178] F Tannock, D Rotin; Acid pH in tumors and its potential therapeutic exploitation. *Cancer Res*, **1989**, *49*, 4373-84.
- [179] JR Duncan, MT Stephenson, HP Wu, CL Anderson; Indium-111-diethylene-triaminepentaacetic acid-octreotide is delivered in vivo to pancreatic, tumor cell, renal, and hepatocyte lysosomes. *Cancer Res*, **1997**, *57*, 659-71.
- [180] LA Bass, MV Lanahan, JR Duncan, JL Erion, A Srinivasan, MA Schmidt, CJ Anderson; Identification of the soluble in vivo metabolites of indium-111-diethylene-triaminepentaacetic acid-D-Phe¹-octreotide. *Bioconjugate Chem*, **1998**, *9*, 192-200.
- [181] AA Klyosov; Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenases toward aliphatic, aromatic, and fused polycyclic aldehydes. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 4457-67.
- [182] AE Mutlib, P Dickenson, SY Chen, RJ Espina, JS Daniels, LS Gan; Bioactivation of benzylamine to reactive intermediates in rodents: Formation of glutathione, glutamate, and peptide conjugates. *Chem Res Toxicol*, **2002**, *15*, 1190-207.
- [183] DR van Staveren, S Mundweiler, U Hoffmanns, JK Pak, B Spingler, N Metzler-Nolte, R Alberto; Conjugation of a novel histidine derivative to biomolecules and labelling with $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)(\text{CO})_3]^+$. *Org Biomol Chem*, **2004**, *2*, 2593-603.
- [184] H Paulsen, KW Pflughaupt; in: The carbohydrates: Chemistry and biochemistry, (Hrsg.: W Pigman, D Horton) Academic Press, New York, **1980**, 899-907.
- [185] R Albert, P Marbach, W Bauer, U Briner, G Fricker, C Bruns, J Pless; SDZ CO 611: A highly potent glycosylated analogue of somatostatin with improved oral activity. *Life Sci*, **1993**, *53*, 517-25.
- [186] HS Isbell, HL Frush; Mutarotation, hydrolysis, and rearrangement reactions of glycosylamines. *J Org Chem*, **1958**, *23*, 1309-19.
- [187] R Alberto; persönliche Mitteilung

- [188] DD Dishino, MJ Welch, MR Kilbourn, ME Reichle; Relationship between lipophilicity and brain extraction of C-11-labeled radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.* **1983**, *24*, 1030-8.
- [189] M Schottelius, F Rau, JC Reubi, M Schwaiger, HJ Wester; Modulation of pharmacokinetics of radioiodinated sugar-conjugated somatostatin analogues by variation of peptide net charge and carbohydrate chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 429-37.
- [190] JF Bruno, Y Xu, J Song, M Berelowitz; Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology*, **1993**, *133*, 2561-7.
- [191] MK Dewanjee; The chemistry of ^{99m}Tc -labeled radiopharmaceuticals. *Semin Nucl Med.* **1990**, *20*, 5-27.