

**Entwicklung von Radiotracern für die radiopharmakologische
Charakterisierung von Eph-Rezeptoren**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Chemiker Marc Pretze

geboren am 1. September 1983 in Königs Wusterhausen

eingereicht am 13. Februar 2014

Die Dissertation wurde in der Zeit von März 2010 bis März 2013 im
Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Steinbach
Prof. Dr. Thomas L. Mindt

Tag der Verteidigung: 17. Juni 2014

„Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.“, Albert Einstein.

Inhalt

1. Einleitung und Zielstellung	1
1.1 Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) für die Tumordiagnostik	1
1.2 Fluor-18 – Eigenschaften, Herstellung und Anwendung	2
1.3 Zielstellung	5
2. Literaturübersicht	7
2.1 Die 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition.....	7
2.2 Die Familie der Eph-Rezeptoren.....	10
2.3 Die Eph-Rezeptoren bei Krebs.....	11
3. Ergebnisse und Diskussion	15
3.1 Entwicklung eines Radiotracers basierend auf einem niedermolekularen intrazellulären Eph-Inhibitor	15
3.1.1 Nicht-radioaktive Synthesen von Präkursoren und Referenzsubstanzen.....	15
3.1.2 Radiomarkierung des Präkursors 41 für den niedermolekularen Radiotracer [¹⁸ F] 7	28
3.1.3 Radiopharmakologische Evaluierung des Imidazopurinderivats [¹⁸ F] 7	30
3.2 Entwicklung eines Radiotracers basierend auf dem gegen den extrazellulären EphB2-Rezeptor gerichteten Peptid SNEWILPRLPQH.....	33
3.2.1 Radiomarkierung von SNEW-Peptiden mit den etablierten Markierungsbausteinen [¹⁸ F]SFB und [¹⁸ F]FBAM.....	33
3.2.1.1 Übersicht über verschiedene Markierungsbausteine	33
3.2.1.2 Markierung eines SNEW-Peptids mit [¹⁸ F]SFB	35
3.2.1.3 Markierung eines SNEW-Peptids mit [¹⁸ F]FBAM	36
3.2.2 Entwicklung einer selektiven und irreversiblen ¹⁸ F-Markierungsstrategie für das SNEW-Peptid	39
3.2.2.1 Entwicklung des Markierungsbausteins [¹⁸ F]BFP – 1-(But-3-ynyl)-4-(3-[¹⁸ F]fluorpropyl)piperazin ([¹⁸ F] 57)	39
3.2.2.2 Entwicklung der Radiosynthese des Markierungsbausteins [¹⁸ F] 57	43
3.2.2.3 Radiomarkierung von Aminosäuren mittels [¹⁸ F] 57	47
3.2.3 Anwendung von [^{18/19} F] 57 zur Markierung von SNEW-Peptiden.....	50
3.2.3.1 Nicht-radioaktive Synthese der Referenzsubstanz 67	50
3.2.3.2 Radiomarkierung des SNEW-Peptids mittels [¹⁸ F] 57 in Lösung.....	51
3.2.3.3 Radiopharmakologische Evaluierung des SNEW-Peptids [¹⁸ F] 67	53
3.2.3.4 Der Einfluss des Kupferkatalysators auf die Natur der SNEW-Peptide	55
3.2.3.5 Markierung von SNEW-Peptid 66 mit [¹⁸ F] 57 unter Einsatz von Cu/C	56
3.2.3.6 Markierung von SNEW-Peptid 66 an der Festphase mittels 57	57
3.2.3.7 Radiomarkierung von SNEW-Peptiden an der Festphase mittels [¹⁸ F] 57	60
3.2.4 Verbesserte Radiosynthese von SNEW-Peptiden durch Austausch der Funktionalitäten für die Huisgen-Cycloaddition – Entwicklung des	

Inhaltsverzeichnis

Markierungsbausteins [^{18}F]AFP – 1-(3-Azidopropyl)-4-(3-fluorpropyl)-piperazin ([^{18}F]75).....	65
3.2.4.1 Radiomarkierung von Aminosäuren mittels [^{18}F]75	69
3.2.4.2 Radiomarkierung eines SNEW-Peptids mittels [^{18}F]75	70
3.2.4.3 Radiopharmakologische Evaluierung des SNEW-Peptids [^{18}F]82	71
3.2.4.4 Entwicklung eines Radiotracers basierend auf dem extrazellulär-bindenden peptidischen EphA2-Inhibitor SWLAYPGAVSYR unter Nutzung von [^{18}F]75	74
4. Zusammenfassung und Ausblick.....	79
5. Experimenteller Teil	84
5.1 Allgemeine Arbeitstechniken und Geräte.....	84
5.1.1 Geräte und Materialien.....	84
5.1.2 Chemikalien und Lösungen.....	84
5.1.3 Chemische Synthesen	86
5.1.4 Radiochemische Synthesen.....	86
5.1.5 Modulsynthese für radioaktive Markierungsbausteine.....	87
5.1.6 Radiodünnschichtchromatographie.....	87
5.1.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	88
5.1.8 Peptidsynthese am Syntheseautomaten.....	89
5.1.9 Manuelle Synthese von Peptiden nach der Festphasenmethode	91
5.1.10 Kaisertest	91
5.1.12 Bestimmung der Lipophilie/Hydrophilie.....	92
5.2 Biochemische Arbeitstechniken	92
5.2.1 In-vitro-Stabilitätsuntersuchungen.....	92
5.2.1 In-vitro-Zellassoziations-Experimente	93
5.2.3 In-vivo-Experimente – Kleintier-PET	93
5.3 Spezielle Arbeitsvorschriften	94
5.3.1 Darstellung der Ausgangssubstanzen	94
5.3.2 Synthesen von niedermolekularen Verbindungen und Markierungsbausteinen.....	95
5.3.3 Darstellung der Referenzaminoäuren	123
5.3.4 Darstellung der Präkursorpeptide	126
5.3.5 Darstellung der Referenzpeptide	133
5.4 Markierungsexperimente.....	140
5.4.1 ^{18}F -markierter niedermolekularer Radiotracer.....	140
5.4.2 ^{18}F -Markierungsbausteine	141
5.4.3 ^{18}F -markierte Aminosäuren	143
5.4.4 ^{18}F -markierte Peptide	146
6. Anhang	153
6.1 HPLC Chromatogramme des niedermolekularen Radiotracers [^{18}F]7	153
6.2 HPLC Chromatogramme der Markierungsbausteine.....	154
6.3 HPLC Chromatogramme der ^{18}F -markierten Aminosäuren	155

Inhaltsverzeichnis

6.4 HPLC Chromatogramme der ¹⁸ F-markierten Peptide	156
7. Literatur	159
Übersicht der wichtigsten Verbindungen dieser Arbeit	168
Abkürzungsverzeichnis	170
Veröffentlichungen	173
Danksagung	175
Eidesstattliche Erklärung	176
Versicherung	176

1. Einleitung und Zielstellung

1.1 Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) für die Tumordiagnostik

Der Chemiker GEORGE DE HEVESY gilt als Pionier der Nuklearmedizin, da er bereits 1924 Knochenuntersuchungen mittels radioaktiver Isotope des Bleis durchführte [1]. Kurz darauf untersuchte R. H. STEVENS maligne Lymphome mittels intravenöser Injektion von Radiumchlorid [2]. Im Jahre 1932 erfand ERNEST LAWRENCE das Zyklotron und ermöglichte damit den Zugang zu verschiedensten kurzlebigen Radionukliden [3]. Basierend auf dem Konzept von CASSEN *et al.* [4] im Jahre 1951, entwickelte HAL O. ANGER 1958 die erste Gammakamera, mit der es möglich wurde, die Verteilung von Radiotracern in einem lebenden Organismus in kurzer Zeit bildlich darzustellen [5].

Die moderne Positronen-Emissions-Tomographie (PET) beruht auf diesen Errungenschaften und hat in jüngster Vergangenheit an Bedeutung für die Nuklearmedizin, Radiopharmakaentwicklung und klinische Forschung gewonnen [6, 7]. Die PET ermöglicht die Funktionsdiagnostik von Organen und Untersuchung von molekularen Wechselwirkungen wie Bioverteilung, Pharmakokinetik, Physiologie und Tracer-Rezeptor- bzw. Tracer-Enzym-Wechselwirkungen *in vitro* und *in vivo* [8]. Dazu werden biologisch aktive oder pharmakologisch relevante Moleküle als PET-Radiopharmaka entwickelt, die mit kurzlebigen Positronenstrahlern wie ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga oder ^{124}I markiert sind. Solche Radiopharmaka werden in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} bis 10^{-12} mol/l intravenös appliziert, wodurch *in vivo* weder ein pharmazeutischer noch ein toxischer Effekt hervorgerufen wird (Tracer-Prinzip) [9].

Die Detektion dieser Tracer beruht auf der Tatsache, dass Positronenemitter sich durch das Aussenden von Positronen stabilisieren und diese Positronen im Gewebe auf ihre Antiteilchen (Elektronen) treffen. Dabei kommt es zur Annihilation (Paarvernichtung) unter Aussendung zweier Gammaquanten mit der Energie von 511 keV im Winkel von nahezu 180° (Abbildung 1). Treffen diese beiden Quanten zeitgleich auf zwei Detektoren des Detektorrings der PET-Kamera, werden diese mittels Photomultiplier verstärkt und geben ein Signal, welches dann von einem Computer durch komplexe iterative Verfahren in ein zweidimensionales Bild umgerechnet wird (Abbildung 1) [10]. Dieser Vorgang wiederholt sich so oft, bis ein dreidimensionales Bild aus vielen zweidimensionalen erstellt werden kann. Dabei beträgt die Messzeit für ein Kleintier-PET einige Minuten bei einer räumlichen Auflösung von etwa 2,5 mm bei Verwendung von Fluor-18 [11, 12].

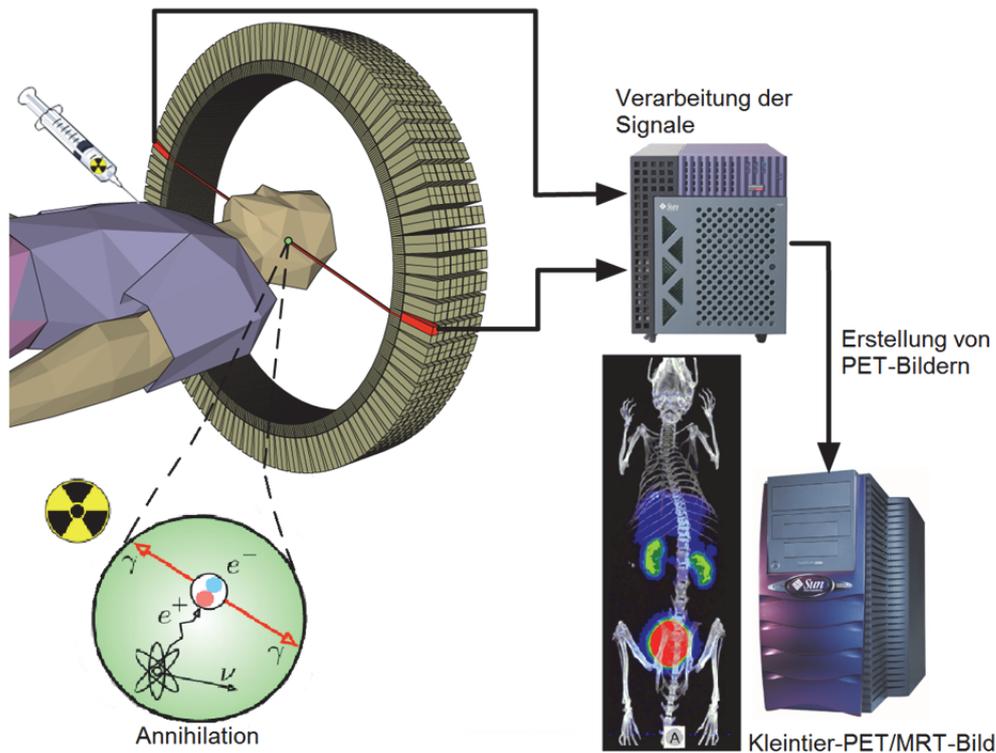


Abbildung 1: Aufbau eines PET-Systems [13] und Kleintier-PET/MRT-Aufnahme [14]

1.2 Fluor-18 – Eigenschaften, Herstellung und Anwendung

Fluor-18 ist eines von 18 Isotopen des Elements Fluor, dessen einziges nicht radioaktives Isotop Fluor-19 ist [15]. Fluor-18 wurde 1937 von SNELL *et al.* [16] entdeckt, besitzt eine Halbwertszeit von 109,8 min und stabilisiert sich zu 3% durch Elektroneneinfang und zu 97% durch β^+ -Umwandlung. Dabei wird eine Energie von 0,635 MeV erreicht [15]. Diese Eigenschaften machen Fluor-18 zu einem optimalen Radionuklid für die PET, weil die geringe kinetische Energie der Positronen zu einer geringen Reichweite im Gewebe führt (max. 2 mm in Wasser), bevor es zur Paarvernichtung mit einem Elektron kommt.

Für die Markierung von biologisch relevanten Molekülen mit Fluor-18 gibt es verschiedene Ansätze. Die Fluor-18-Inkorporation in aliphatische Systeme geschieht durch Substitution von Sulfonatgruppen wie Mesylat, Tosylat oder Nosylat und seltener gegen Bromid und Iodid. Zur nucleophilen Substitution von Aromaten mittels Fluor-18 werden dagegen Trimethylammonium-, Nitro- oder Iodoniumverbindungen verwendet [17].

Die Elektronegativität des Fluoratoms (4,0 nach Pauling) und die Bindungslänge einer Fluor-Kohlenstoff-Bindung sind ähnlich der Sauerstoff-Kohlenstoff-Einfachbindung. Dadurch führt ein Austausch von Hydroxygruppen oder Wasserstoffatomen gegen Fluoratome zu biologisch ähnlich wirksamen Fluor-substituierten Molekülen und ist

damit bioisoster [8]. Der elektronische Unterschied kann sich sowohl günstig als auch ungünstig auf das pharmakokinetische Verhalten und die Bindungsaffinität von Radiotracer auswirken. So werden im Molekül in der Nähe zum Fluor-Atom befindliche basische funktionelle Gruppen je nach Grad der Fluorierung in ihrer Basizität verringert, wodurch eine verbesserte Membrangängigkeit der Verbindung und somit eine höhere Akkumulation im gewünschten Gewebe erreicht wird [18]. Durch ein Fluoratom an reaktiven Stellen im Molekül wird dieses stabilisiert und dessen Metabolisierung häufig eingeschränkt oder verlangsamt. Eine enzymatische Defluorierung an Alkylketten in vivo kann durch die Wahl der Kettenlänge verlangsamt oder bestenfalls verhindert werden [19]. Weiterhin kann eine Fluormethylgruppe durch Austausch ihrer Wasserstoffatome gegen Deuteriumatome vor Defluorierung geschützt werden [6].

Positronen-emittierende organische Radionuklide kommen in der Natur nicht vor und werden hauptsächlich mit einem Zyklotron hergestellt. Als Methode der Wahl für die Herstellung von ^{18}F hat sich die Bestrahlung von mit ^{18}O -angereicherten Targets (flüssig oder gasförmig) mit Protonen geringer Energie ($< 16\text{ MeV}$) durchgesetzt. Die dabei ablaufende Kernreaktion lautet $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$.

Reines ^{18}F hat eine theoretisch maximale spezifische Aktivität von $63\text{ TBq}/\mu\text{mol}$ [6]. Für die nucleophile Substitution an Aliphaten und Aromaten wird $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ verwendet. Dieses wird durch die Bestrahlung eines Targets mit ^{18}O -angereichertem Wasser ($[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$) hergestellt. Es entsteht eine Lösung aus $[^{18}\text{F}]\text{HF}$ in ^{18}O -Wasser, wobei das $[^{18}\text{F}]\text{HF}$ dissoziiert und eine starke Hydrathülle ausbildet [20]. Da die Reaktion ungeträgert (n.c.a.) verläuft, können bis zu 75% der theoretisch möglichen spezifischen Aktivität von $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ erhalten werden [21].

Für eine elektrophile Substitution an Aromaten wird $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ verwendet. Dieses wird durch Bestrahlung eines $[^{18}\text{O}]\text{O}_2$ -haltigen Targets hergestellt. Das entstandene Fluor-18 schlägt sich an der Wandung des Targets nieder und wird anschließend kurz mit $[^{19}\text{F}]\text{F}_2$ versetzt und als $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ aus dem Target geleitet. Durch das geträgerte (c. a.) $[^{18/19}\text{F}]\text{Fluor}$ werden für daraus hergestellte Radiotracer nur relativ geringe spezifische Aktivitäten erreicht. Diese finden jedoch Anwendung als Stoffwechselsubstrate für Metabolismusuntersuchungen. Abhängig von der Reaktionsart werden meist nur maximal 50% der hergestellten Aktivität des entstandenen $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ als radiochemische Ausbeute erreicht, da bei der sich anschließenden Umsetzung ein $[^{18}\text{F}]\text{Fluoratom}$ als Fluorid der Reaktion entzogen wird [10].

Der Vorteil von Tracern mit einer hohen spezifischen Aktivität besteht darin, dass weniger nicht-radioaktive, chemisch identische Substanz vorliegt, die anstelle der

radioaktiven Substanz eventuell Rezeptoren oder Enzyme absättigen würde. Für „low-density“-Rezeptoren im Hirn spielt dies z.B. eine große Rolle [6, 22].

Die Einführung von [¹⁸F]Fluorid in biologisch aktive Verbindungen erfährt ständig neue Wege durch unkonventionelle Reaktionen [23, 24]. Da eine hohe spezifische Aktivität und radiochemische Ausbeute wichtig für weitere Untersuchungen ist, wird versucht, die Moleküle direkt mit Fluor-18 zu markieren, auch um Zeit zu sparen. Ist dies nicht möglich, werden robuste Moleküle entwickelt, die zunächst radiofluoriert werden. Diese sogenannten Markierungsbausteine können im Vergleich zu vielen empfindlichen biologisch aktiven Verbindungen die harschen Synthesebedingungen (hohe Temperaturen, organische Lösungsmittel) der Radiomarkierung überstehen und werden danach unter milden, im günstigsten Fall physiologischen Bedingungen schnell mit den betreffenden biologisch aktiven Verbindungen zur Reaktion gebracht.

Diese ¹⁸F-markierten biologisch aktiven Substanzen können als Radiotracer eingesetzt werden. Es gibt jedoch nur wenige Tracer, die heutzutage als Radiopharmaka angewendet werden. Fast 95% aller PET-Untersuchungen weltweit beruhen auf dem Einsatz von 2-Desoxy-2-[¹⁸F]fluor-D-glucose ([¹⁸F]FDG), wobei der erhöhte Glucose-Stoffwechsel bei Tumoren, verursacht durch eine erhöhte Expression des Glucosetransporters 1 sowie des Enzyms Hexokinase eine bedeutende Rolle spielt. [¹⁸F]FDG wird dadurch verstärkt in Tumorgewebe aufgenommen.

Ein weiterer etablierter Radiotracer ist O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-tyrosin ([¹⁸F]FET), welches durch einen erhöhten Aminosäure-Stoffwechsel bei Tumoren eine Tumorrakkumulation zeigt und sich dadurch besser für zerebrale Untersuchungen eignet als [¹⁸F]FDG [25].

Neben einem erhöhten Stoffwechsel weisen Tumore meist auch hochregulierte Rezeptor- und Enzymexpressionen auf. Dazu zählt z.B. die Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Die genaue Adressierung einzelner Subtypen dieser Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wäre ein guter Ansatz zur Tumor-spezifischen Diagnostik und Therapie [26]. Daher ist es wichtig neue Rezeptor-spezifische Radiotracer zu entwickeln.

1.3 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, Peptide einerseits und niedermolekulare Verbindungen andererseits auf der Basis von literaturbekannten Inhibitoren zu synthetisieren, die eine hohe Affinität zu ausgewählten Eph-Rezeptoren aufweisen (Abschnitt 2.2). Diese zu entwickelnden Verbindungen sollten strukturell so verändert werden, dass eine Markierung mit Fluor-18 ermöglicht wird, um selektive Radiotracer für die Charakterisierung und Diagnostik von Eph-Rezeptor-überexprimierenden Tumorzellen zu erhalten.

Niedermolekulare Verbindungen

- Ein Ansatz beschäftigte sich mit der Synthese von niedermolekularen, ^{18}F -markierten Verbindungen für die intrazelluläre Kinase-Domäne der Eph-Rezeptoren, bei dem ein Inhibitor von hoher Affinität zu Eph-Rezeptoren und geringer Subtyp-Selektivität als Grundstruktur ausgewählt wurde. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Tumoren verschiedene Eph-Rezeptoren exprimieren und schon ein überexprimierter Subtyp ausreichen könnte, um eine Anreicherung des Radiotracers zu gewährleisten.

Peptid-basierende Verbindungen

- Der zweite Ansatz hingegen sollte die bioorthogonale ^{18}F -Markierung von Eph-selektiven Peptiden für die extrazelluläre Ligandbindungsdomäne verfolgen. Hypothetisch wäre es denkbar, dass sich Peptide mit Eph-selektiven Aminosäuremotiven als Radiotracer für Tumore eignen könnten. Diese Peptide müssen nicht erst durch die Zellmembran gelangen, um sich an Eph-Rezeptor-überexprimierenden Zellen anzureichern und blockieren die extrazelluläre Ligandbindungsdomäne der Eph-Rezeptoren antagonistisch. Es bestehen jedoch Hinweise in der Literatur, dass bestimmte Peptid-Eph-Rezeptor-Komplexe internalisiert werden und sich somit in den Tumorzellen anreichern.

Es sollte vergleichend betrachtet werden, welcher der Ansätze sich als geeigneter und vielversprechender in Hinblick auf Synthese, Selektivität, Affinität und radiopharmakologischen Eigenschaften der potentiellen Radiotracer herausstellt.

Zur Markierung der Eph-selektiven Peptide finden sich in der Literatur zahlreiche Anwendungen von Markierungsbausteinen wie *N*-Succinimidyl-4-¹⁸F-fluorbenzoat (¹⁸F]SFB) und *N*-(6-(4-¹⁸F]Fluorbenzyliden)aminoxyhexyl)maleinimid (¹⁸F]FBAM), welche auch in dieser Arbeit Anwendung fanden (Vgl. Abschnitte 3.2.1.2 und 3.2.1.3). Der Vorteil von ¹⁸F]FBAM ist seine Selektivität in Bezug auf Thiolgruppen und die Verfügbarkeit mit Hilfe einer automatisierten Synthese.

Weiterhin sollten bioorthogonale Markierungsbausteine für die Cu-katalysierte 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition entwickelt werden, die simpel und kostengünstig zu synthetisieren sind, automatisiert mit Fluor-18 markiert werden können, dabei hohe radiochemische Ausbeuten liefern und anschließend möglichst unter physiologischen Bedingungen schnell und bequem mit biologisch aktiven Makromolekülen zur Reaktion gebracht werden können.

Die konventionellen Markierungsbausteine sollten danach mit den bioorthogonalen Markierungsbausteinen verglichen werden.

Im Hinblick auf das biologische Verhalten und die Eigenschaften der markierten Eph-affinen Peptide, sollte bei der Anwendung der Huisgen-Cycloaddition die Rolle der Cu-Spezies untersucht werden, welche für die Einführung der bioorthogonalen Markierungsbausteine essentiell sind.

Schlussendlich sollten radiopharmakologische Untersuchungen zur Eignung der ¹⁸F-markierten, Eph-affinen Peptide und niedermolekularen Verbindungen angestrengt werden, die unter anderem deren Stabilitäten, Zellbindungen und -aufnahmen sowie metabolisches Verhalten *in vitro* und *in vivo* näher beleuchten sollten.

2. Literaturübersicht

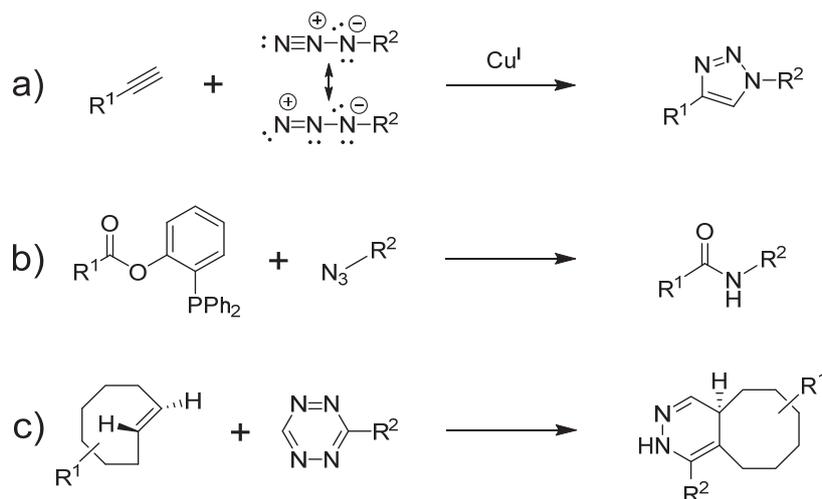
2.1 Die 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition

ROLF HUISGEN bezeichnete ARTHUR MICHAEL als Entdecker der Synthese eines 1,2,3-Triazols, welches im Jahre 1893 aus Phenylazid und Acetylendicarbonsäureester dargestellt wurde [27]. Die Reaktion von Stickstoffwasserstoffsäure mit Acetylen zum unsubstituierten 1,2,3-Triazol wurde erstmals von DIMROTH und FESTER 1910 durchgeführt [28]. Diese Art von Reaktionen wurde 1963 von HUISGEN ausführlich als 1,3-dipolare Cycloaddition beschrieben [29]. Ein Reaktionspartner enthält die Azidfunktion, welche eine nur über zwitterionische All-Oktett-Grenzformeln beschreibbare, ambivalente 1,3-dipolare reaktive Spezies darstellt, d.h. sie besitzt nucleophilen und elektrophilen Charakter [30]. Alkine werden als weitere Reaktionspartner eingesetzt und stellen in diesem Fall das Dipolarophil dar [31]. Die Triebkraft zur Bildung der entsprechenden Triazole ist laut HUISGEN die energetische Stabilisierung der Azide [29].

Bei der unkatalysierten Huisgen-Reaktion reagieren organische Azide selektiv mit Alkinen bei Temperaturen um 200°C zu 1,2,3-Triazolen unter Bildung der beiden 1,4- und 1,5-disubstituierten Regioisomere. Diese Reaktion ist dadurch aber nicht für Radiomarkierungen einsetzbar.

Im Jahr 2002 führten die Gruppen um SHARPLESS [32] und MELDAL [33] unabhängig voneinander eine Optimierung mit Cu(I)-Katalysatoren für die 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition ein. Kupfer-katalysiert verläuft sie dabei nicht nur wesentlich schneller und bei milden Temperaturen ab, sondern es wird auch ausschließlich das 1,4-Regioisomer des 1,2,3-Triazols gebildet (Schema 1). Auch Kupfer-freie selektive Reaktionen wie die Staudinger-Ligation [17] und die Tetrazin-Click-Reaktion [34] sind bekannt (Schema 1). Diese drei Namensreaktionen sind bioorthogonal.

Das Konzept der Bioorthogonalität trifft auf alle Reaktionen zu, die innerhalb von lebenden Systemen ablaufen, ohne dabei biochemische Prozesse zu stören [35]. Durch ihre hohe Chemoselektivität bilden bioorthogonale Reaktionen keine Nebenprodukte mit anderen in der Natur vorkommenden Funktionalitäten. Bei bioorthogonalen Reaktionen werden starke kovalente Bindungen zwischen den Reaktionspartnern ausgebildet und die Reaktionen profitieren von einer schnellen Kinetik. Dies impliziert eine Anwendung der bioorthogonalen Reaktionen mit kurzlebigen Radionukliden und zusätzlich prinzipiell eine (Radio-)Markierung in vivo [36].

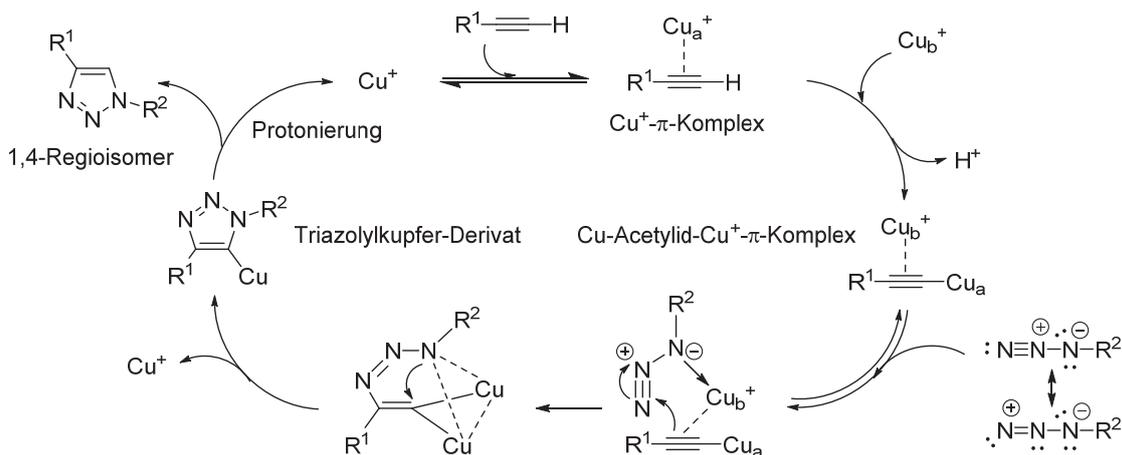


Schema 1: Allgemeine Syntheschemata von bioorthogonalen Reaktionen

a) Huisgen-Cycloaddition, b) spurlose Staudinger-Ligation, c) Tetrazin-Click-Reaktion

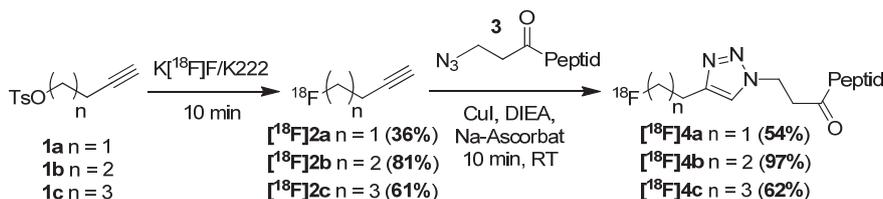
Der Mechanismus der Kupfer-katalysierten Huisgen-Cycloaddition ist bis dato unaufgeklärt. Es wurde angenommen, dass sich das Cu(I) zunächst terminal an das Alkin anlagert und ein Kupfer(I)acetylid bildet. Quantenchemische Berechnungen bestätigten diese Annahme und sagten überdies hinaus einen nicht-konzertierten Mechanismus über eine sechsgliedrige Cu-Spezies voraus [37]. Neuere Untersuchungen mittels kontinuierlicher Durchflussanalyse lieferten jedoch Hinweise, dass sich das Cu(I) zunächst an das Azid anlagert [38]. Mittlerweile wurde der Mechanismus von WORREL *et al.* mittels Isotopenanreicherung durch ^{63}Cu insoweit aufgeklärt, dass mindestens zwei Kupferatome im katalytischen Zyklus eine Rolle spielen (Schema 2) [39]. Im ersten Schritt lagert sich ein Kupferion über eine π -Bindung an die Alkin-funktionalität und bildet ein π -Cu-Komplex. Im zweiten Schritt kommt es zu einer weiteren Cu- π -Bindung unter terminaler Umlagerung des ersten Kupferions und es bildet sich ein σ -Cu-Acetylid- π -Cu-Komplex. Erst dann findet die Bindung eines Azids an das π -Cu-Acetylid statt.

Mit der Einführung der Cu-Katalyse gewann die Reaktion, die wegen ihrer Eigenschaften weithin auch als Click-Reaktion bezeichnet wird, enorme Beliebtheit und wurde in verschiedensten Gebieten der Chemie angewandt [40, 41].



Schema 2: Vermuteter Mechanismus der kupfer-katalysierten 1,3-dipolaren Huisgen-Cycloaddition mit zwei Kupferionen

Die ersten Anwendungen der Huisgen-Cycloaddition in der Fluor-18-Chemie wurden von KOLB *et al.* [42] und MARIK und SUTCLIFFE 2006 vorgestellt (Schema 3), bei der nach den Bedingungen, wie sie von MELDAL *et al.* [33] beschrieben wurden, Fluor-18-markierte Alkine $[^{18}\text{F}]2\mathbf{a-c}$ mit einem Azid-funktionalisiertem Modellpeptid $\mathbf{3}$ zur Reaktion gebracht wurden [43].



Schema 3: Radiomarkierung eines Peptids mittels Huisgen-Cycloaddition [43]

Die zweite Anwendung wurde von SIRION *et al.* 2007 beschrieben, bei der verschiedene biologisch relevante Moleküle wie das Thymidin-Derivat $\mathbf{5}$ (Abbildung 2) unter den Bedingungen radiomarkiert wurden, wie sie von SHARPLESS *et al.* [32] beschrieben wurden (CuSO_4 /Natriumascorbat in wässrigen *t*-BuOH-Lösungen) [44].

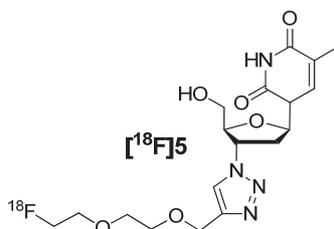


Abbildung 2: ^{18}F -markiertes Thymidin-Derivat $[\mathbf{18F}]5$

Bis zum heutigen Tag sind zahlreiche (> 50 Arbeiten) erschienen [45], in denen mittels 1,3-dipolarer Huisgen-Cycloaddition kleine organische Moleküle [46], Peptide [47] bis

hin zu Oligonucleotiden und Proteinen [48] mit Fluor-18 markiert und teilweise auch für PET-Untersuchungen verwendet wurden. Weiterhin werden immer häufiger Liganden (TBTA, BTAA, BTES) verwendet, die das Kupferkation der Oxidationstufe +1 stabilisieren, Nebenreaktionen vermeiden, die Huisgen-Cycloaddition beschleunigen sowie die eingesetzte Stoffmenge an Kupferverbindungen drastisch senken [49-52].

2.2 Die Familie der Eph-Rezeptoren

Die Eph-Rezeptoren und ihre Ephrin-Liganden bilden die größte Gruppe in der Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), die zu den Transmembran-Proteinen zählen [53]. Eph bedeutet Erythropoietin-produzierende, humane, hepatozelluläre Karzinomzelllinie. Die dazugehörigen Liganden der Eph-Rezeptoren sind die Ephrine (Eph Familie Rezeptor interagierende Proteine). Die Eph-Rezeptoren werden in die zwei Klassen EphA und EphB eingeteilt und auch die Ephrine sind in A- und B-Klassen unterteilt [54].

Die transmembranständigen Eph-Rezeptoren und ihre Liganden kommen ubiquitär im Körper vor und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Zellbindung, Beweglichkeit der Zelle, Aggregation, Gewebeneubildung, Segmentierung und Migration, sowie bei der Angiogenese. Am aktivsten sind die Eph-Rezeptoren bei der embryonalen Entwicklung [55, 56]. In adultem Gewebe ist die Eph-Rezeptor Expression zumeist herunterreguliert [57]. Einzig im Hirn und in proliferierenden Endothelzellen findet sich eine erhöhte Eph-Rezeptor-Dichte. Durch die Bindung der Ephrin-Liganden einer Zelle an die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne der Eph-Rezeptoren einer anderen Zelle erfolgt eine Aktivierung der Eph-Rezeptoren. Eine weitere Aktivierung der Eph-Rezeptoren erfolgt durch die Bindung von ATP an die intrazelluläre Kinase-Bindungsdomäne. Dabei setzt eine Konformationsänderung vom Ephrin-Eph-Rezeptor-Komplex ein, an deren Ende eine intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung und die Weiterleitung des Signals an Src-Kinasen, sowie kleine GTPasen der Rho- oder Ras- Familie und stattfindet [58].

Während die EphrinA-Liganden lediglich über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) mit der Zellmembran verbunden sind, besitzen die EphrinB-Liganden ebenfalls eine intrazelluläre Domäne. Durch die Cystein-reiche Region und Fibronectin Typ III-Strukturen in den Eph-Rezeptoren findet nach einer Dimerisierung von Eph und Ephrin eine zusätzliche Bildung von Heterotetrameren mit den spiegelbildlichen Dimeren der Eph-Rezeptoren und Ephrine statt und ermöglicht somit eine gegenläufige Signalübertragung vom Rezeptor hin zu den EphrinB-Liganden, bei denen eine ähnliche Signalübertragung stattfindet wie bei den Eph-Rezeptoren [59]. Diese gegenläufige Signalübertragung ist auch bei den EphrinA-Liganden möglich, hängt

aber zum Teil von transmembranen Corezeptoren und Adapterproteinen ab und verläuft anders als bei den Eph-Rezeptoren. Der Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt [58].

2.3 Die Eph-Rezeptoren bei Krebs

Die Eph-Rezeptoren spielen bei pathophysiologischen Prozessen wie der Tumorentwicklung (Karzinogenese), Tumorangiogenese, Apoptose oder Metastasierung eine große Rolle [53, 60]. Sie werden in verschiedenen humanen Tumoren dysreguliert [61-63]. Da sie im gesunden Gewebe selten überexprimiert sind, stellen einige Eph-Rezeptoren spezifische Targets dar, um ganz bestimmte Tumorentitäten im Körper des Menschen nachzuweisen.

Der EphB2-Rezeptor

Speziell der EphB2-Rezeptor ist in verschiedenen soliden Tumoren des Magen- [64], Darm- [65], Eierstock- [66], Brust- [67], Prostata- [68] und Hirnkrebses [69] überexprimiert. Das besondere ist, dass gerade Tumore im frühen Stadium vermehrt den EphB2-Rezeptor exprimieren, da dieser wichtig für den Prozess der Autophagozytose ist, bei der die Zelle fehlerhafte und schädliche Proteine selbstständig abbaut [70]. Diese Überexpression wird jedoch mit fortschreitendem Tumorstadium herunterreguliert. Der EphB2-Rezeptor wurde als Target in der Krebsforschung [71] für die Tumordiagnostik [72] untersucht und eine bildliche Darstellung mittels radiomarkierter EphB2-affiner Moleküle oder Peptide könnte eine verbesserte Früherkennung von Tumoren oder Metastasen zulassen.

Der EphA2-Rezeptor

Die Visualisierung des EphA2-Rezeptors ist ein weiterer vielversprechender Ansatz für die Tumordiagnostik [73, 74]. Er wird unter anderem in Prostata- [75], Brust-, Darm-, Lungen- und Eierstockkrebs [76], sowie beim Melanom [53] überexprimiert. Desweiteren geht mit einer erhöhten EphA2-Expression eine erhöhte Malignität einher [60]. Eine Studie hat gezeigt, dass eine induzierte EphA2-Überexpression bei epithelialen, humanen Brustzellen zu einer onkogenen Transformation und Invasivität der Zellen führen kann [77]. Präklinische Studien unter Verwendung von Maustumormodellen haben ergeben, dass bei Inhibition des EphA2-Rezeptors die Tumoren langsamer wachsen und weniger zur Bildung von Metastasen neigen [78, 79]. Somit ist der EphA2-Rezeptor ebenfalls ein geeignetes Target für die

Tumordiagnostik [80, 81], was durch die Entwicklung von radiomarkierten EphA2-affinen Verbindungen erreicht werden sollte.

Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten für die Adressierung von Eph-Rezeptoren (Abbildung 3). Einerseits besteht die Möglichkeit einer Bindung an der extrazellulären Domäne durch Peptide, Proteine oder Antikörper. Andererseits werden kleine Moleküle verwendet [82], die durch die Zellmembran hindurch diffundieren und anschließend an die intrazelluläre Kinasedomäne binden [83-85]. Andere Bindungsdomänen, an denen eine Blockierung der Eph-Rezeptoren vorgenommen werden kann, sind die sushi-Domäne, transmembrane Segmente oder das sterile alpha Motiv (SAM) von zwei benachbarten Eph-Rezeptoren. Weiterhin könnte über die Bindungsdomäne FN von Amyloid- β (A β) oder über die zytoplasmatischen Signalproteine, die eine SH2-Domäne besitzen (eine spezifische Proteininteraktionsdomäne zur Erkennung von Peptiden mit phosphoryliertem Tyrosin), eine Adressierung von Eph-Rezeptoren ermöglicht werden [62]. Auch die Anbindung an die PDZ-Domäne (eine peptidsequenzspezifische Proteininteraktionsdomäne) wurde bereits untersucht [86]. Zu den Inhibitoren zählen neutralisierende Antikörper, Protein-/Partikel-fusionierte lösliche Eph/Ephrine, lösliche Eph/Ephrine, Mimetika, Peptidantagonisten, Multitarget-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren [83] sowie selektive Kinase-Inhibitoren [87, 88].

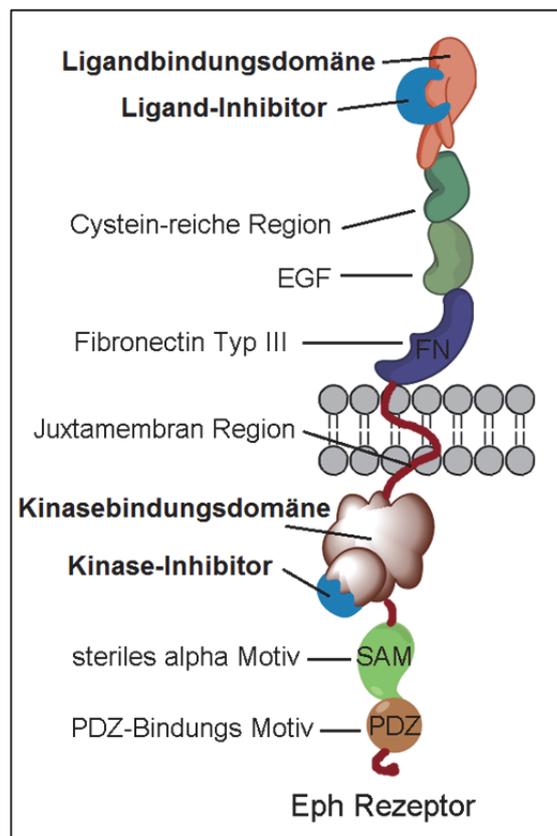


Abbildung 3: Aufbau der Eph-Rezeptoren und mögliche Positionen zur Inhibition

Wichtige Eph-affine Aminosäuresequenzen

Zellen, die den EphB4-Rezeptor exprimieren, wurden bereits durch ^{64}Cu -markierte Peptide mit TNYL-RAW-Sequenz bildlich dargestellt. In-vivo-Untersuchungen zeigten aber eine geringe Tumorrakkumulation sowie eine geringe Stabilität der Peptide [89].

Für den EphB2-Rezeptor besteht die Möglichkeit einer Adressierung durch Peptide, welche die Aminosäureschlüsselsequenz SNEW besitzen (Abbildung 4) [90].

Für den EphA2-Rezeptor wurden sehr affine Peptide mit den Peptidsequenzen YSA [63] und SWLAY [91] gefunden. Für die letzten drei Sequenzen existieren bisher noch keine Daten, die deren Eignung als Radiotracer belegen würden. Der einzige extrazelluläre Ansatz eines ^{64}Cu -markierten Antikörpers für die bildliche Darstellung von Zellen, die den EphA2-Rezeptor exprimieren, wurde von CAI *et al.* im Jahre 2007 vorgestellt [92].

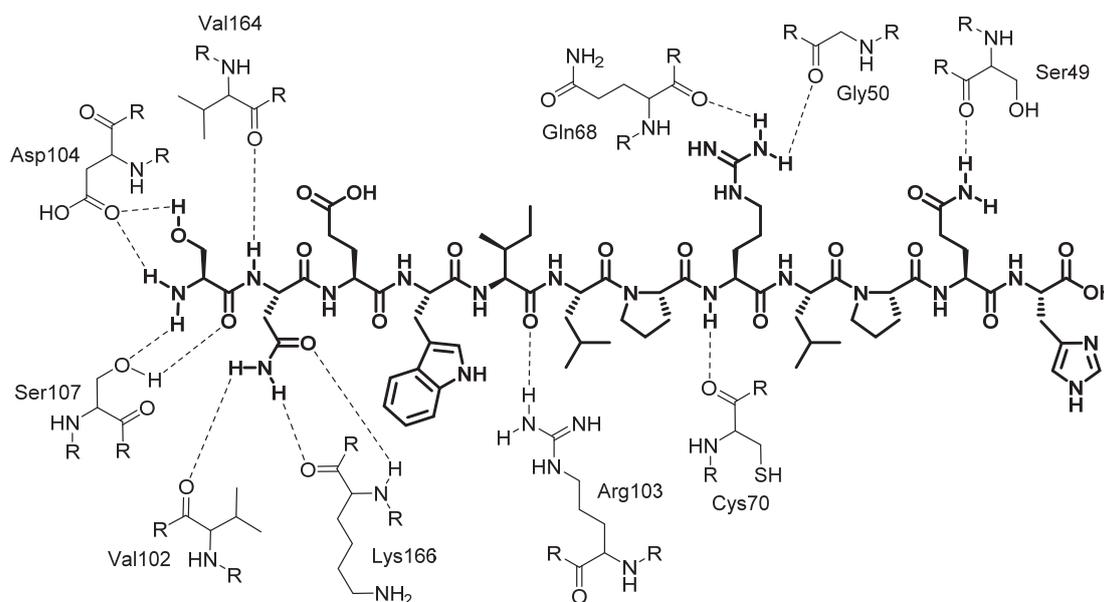


Abbildung 4: SNEW-Peptid mit ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen kleiner 4 Å (gestrichelte Linien) zur extrazellulären Kinasedomäne des EphB2-Rezeptors [90]

Wichtige Eph-affine niedermolekulare Substanzen

Eph-Rezeptoren besitzen intrazelluläre Bindungsdomänen, welche mit affinen Molekülen adressiert werden können. Kleine Moleküle sind meist in der Lage durch Diffusion oder aktive Transportmechanismen durch die Zellmembran zu gelangen und an den intrazellulären Teil der Rezeptoren anzudocken [84, 93]. Es wurden bereits viele verschiedene, hochaffine Inhibitoren entwickelt, welche mit IC_{50} -Werten im nano- bis pikomolaren Bereich an die verschiedenen Eph-Rezeptoren binden [85, 93]. Darunter gibt es einige Moleküle die sehr selektiv nur an einen einzigen Eph-Rezeptor binden [94], die meisten sind jedoch unselektiv für die einzelnen Eph-Subtypen.

LAFLEUR *et al.* [83] untersuchten die Verbindungsklasse der Imidazopurine [95]. Die höchsten Affinitäten wurden für Verbindung **6** gefunden (Abbildung 5). Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass **6** zu fast allen Eph-Rezeptoren hohe Affinitäten aufweist (Tabelle 1). Aus diesem Fakt heraus ließe sich diese Verbindung als Breitband-Inhibitor zur Anwendung bringen.

Der Eph-Inhibitor wurde von LAFLEUR *et al.* einer umfassenden Strukturoptimierung unterzogen. Als wichtigste Strukturmerkmale für die hohe Affinität des Inhibitors haben sich die wasserstoffbrückenbildende Imid-Funktion im Imidazopuringerüst und der 2'-methyl-5'-hydroxy-substituierte Phenylring herausgestellt. Weiterhin bildet das Sauerstoffatom des 2''-methoxy-substituierten Phenylringes eine Wasserstoffbrückenbindung aus (Abbildung 5).

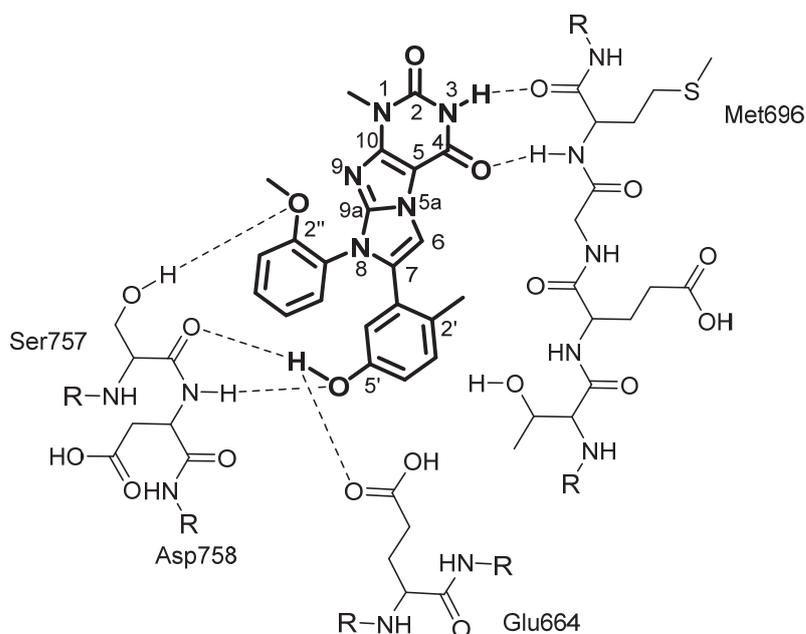


Tabelle 1: Affinität des Eph-Rezeptor-Inhibitors **6** für verschiedene Kinasen

Kinasen	IC_{50} [nM]
EphA1	2,9
EphA2	2,3
EphA3	40
EphA4	3,3
EphA5	3,0
EphA7	1118
EphA8	4,5
EphB1	1,1
EphB2	1,2
EphB3	15
EphB4	1,6

Abbildung 5: Original-Inhibitor **6** von LAFLEUR *et al.* mit ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien) zur ATP-Bindungstasche der intrazellulären Kinasedomäne des EphB4-Rezeptors

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Entwicklung eines Radiotracers basierend auf einem niedermolekularen intrazellulären Eph-Inhibitor

In dieser Arbeit wurde für die Entwicklung eines Radiotracers von einem Eph-Inhibitor von den Arbeiten von Lafleur *et al.* ausgegangen [83]. Für die Einführung von [^{18}F]Fluorid wurden solche Stellen im Molekül ausgewählt, welche die Wasserstoffbrückenbildung am wenigsten beeinflussen. Daher wurde zum einen die Markierung des Inhibitors am Stickstoffatom N-1 des Imidazopuringerüsts gewählt und zum anderen die Markierung durch Ersatz der Methoxygruppe des Phenylrings (Abbildung 6) durch eine Fluorpropoxygruppe.

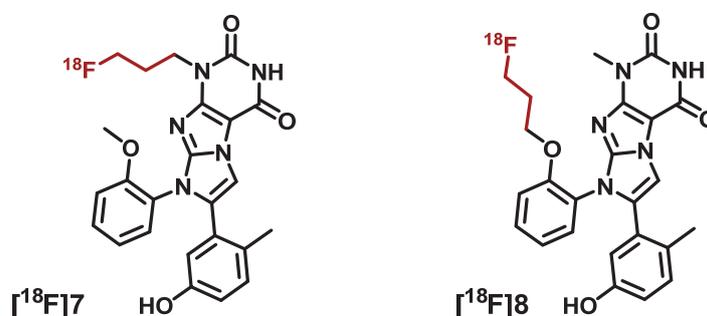
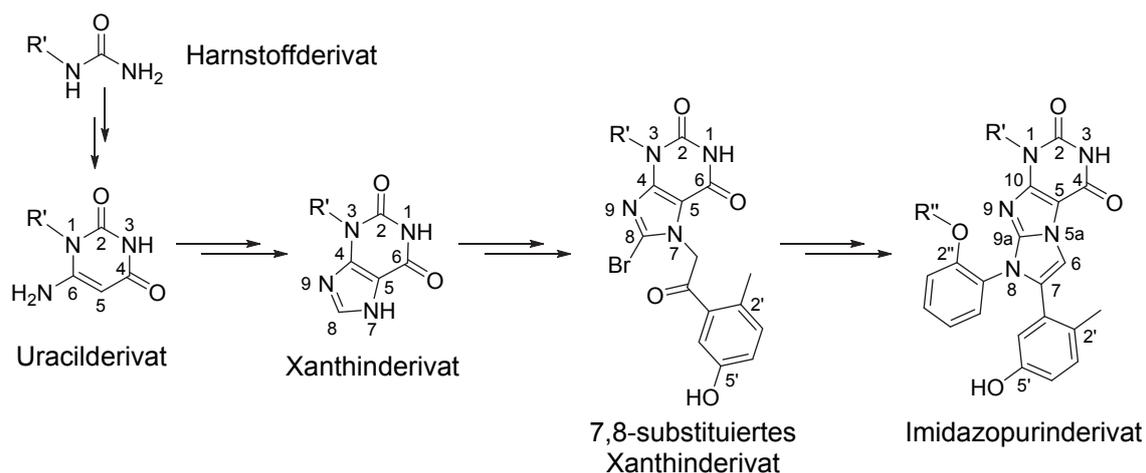


Abbildung 6: Mögliche Markierungspositionen für die potentiellen Radiotracer $[^{18}\text{F}]7$ am Stickstoffatom N-1 des Imidazopurinderivats und für $[^{18}\text{F}]8$ durch Ersatz der Methoxyfunktion am Phenylring

3.1.1 Nicht-radioaktive Synthesen von Präkursoren und Referenzsubstanzen

Ein allgemeines Synthesekonzept für den Aufbau der Präkursoren und Referenzsubstanzen ist in Schema 4 dargestellt. Demnach sollten ausgehend von Harnstoffderivaten die entsprechenden Uracilderivate hergestellt werden, die weiter zu Xanthinderivaten umgesetzt werden. Diese Xanthinderivate sollten weiter substituiert werden, um einen Ringschluss zu den Imidazopurinderivaten zu ermöglichen. Zuletzt sollten aus diesen Imidazopurinderivaten die Präkursoren und Referenzsubstanzen synthetisiert werden.



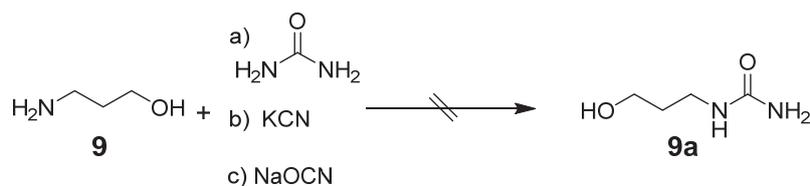
Schema 4: Konzept zur Synthese der Imidazopyridinderivate [^{18}F]7 und [^{18}F]8

Synthese eines N-1-substituierten Uracilderivates für die Synthese von [^{18}F]7

Die Synthese der Xanthinderivate für die Entwicklung der Präkursoren und potentiellen Radiotracer startete mit der Synthese des Uracilgerüsts mittels klassischer TRAUBE'scher Purinsynthese und wurde mit ähnlichen Reagenzien, Farbreaktionen und Reinigungsschritten vollzogen, wie schon 1900 beschrieben [96].

Die Synthese führt vom Aufbau des Uracilgerüsts hin zum anschließenden Ringschluß zum Imidazopyridinderivat. Für die anschließende Radiomarkierung des Imidazopyridinderivats zum Produkt [^{18}F]7 wurde in das Harnstoffderivat bereits bei Synthesebeginn eine funktionalisierte Alkylkette am Stickstoffatom N-1 der Uracileinheit eingeführt. Dies sollte durch die Synthese eines unsymmetrischen Harnstoffderivats erreicht werden. Dabei wurden mehrere Methoden angewandt:

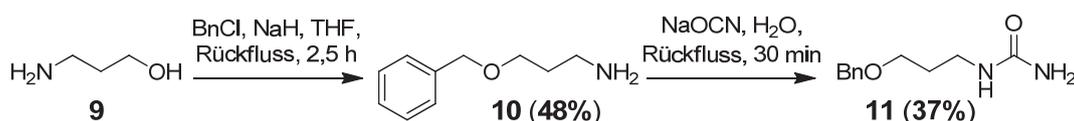
- Ein direkter Umsatz von 3-Aminopropan-1-ol (**9**) mit Harnstoff (a) oder mit Kaliumcyanid (b) nach MIYAHARA *et al.* [97] lieferte kein Produkt (Schema 5).
- Auch der Umsatz von 3-Aminopropan-1-ol (**9**) mit Natriumcyanat (c) nach KIRMSE und BUSCHHOFF oder PAPESCH und SCHRÖDER lieferte kein Produkt [98].



Schema 5: Versuch der direkten Synthese eines N-substituierten Harnstoffderivats

Daher wurde ein Umweg über das vorherige Schützen der Hydroxygruppe von 3-Aminopropan-1-ol (**9**) angestrebt. Das Schützen mittels MOM-Cl unter Verwendung

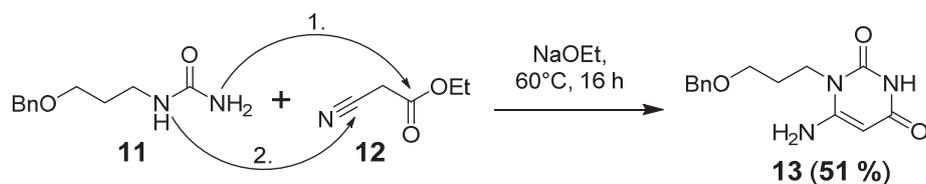
von Natriumhydrid erwies sich wegen einer zu geringen Ausbeute von weniger als 20% als ungenügend. Das Schützen der OH-Gruppe nach HU *et al.* [99] mittels Benzylchlorid unter Zugabe von Natriumhydrid ergab das gewünschte O-Benzyl-geschützte Produkt **10** in höherer Ausbeute (Schema 6). Zur Steuerung der Reaktion hin zur O-Alkylierung wurde die Nucleophilie der Alkoholfunktion in **9** erhöht, indem das reaktivere Natriumalkoholat mittels Natriumhydrid erzeugt wurde.



Schema 6: Synthese des Harnstoffderivats **11** für den Aufbau des Uracilgerüsts

Das O-Benzyl-geschützte Aminopropanol-Derivat **10** wurde anschließend, angelehnt an KRAVCHENKO *et al.* [100], mit Natriumcyanat umgesetzt und das gewünschte alkylierte Harnstoffderivat **11** mit 37% Ausbeute erhalten.

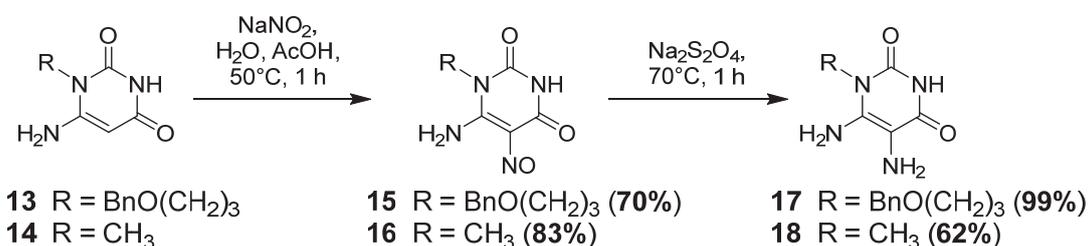
Anschließend wurde versucht, über zwei verschiedene Wege vom N-substituierten Harnstoffderivat **11** zum Uracilderivat **13** zu gelangen. Die Synthese unter Verwendung von Cyanessigsäure und anschließendem Erwärmen in Natronlauge nach TRAUBE lieferte kein Produkt [96]. Alternativ fand BAUM heraus, dass bei Umsetzung mit Cyanessigsäureethylester die intermediär entstehenden alkyl-substituierten Cyanacetylharnstoffe in alkalischem Medium bevorzugt zu einem Ringschluss tendieren [101]. Eine Reaktion von **11** mit Cyanessigsäureethylester in einer Natriumethanolat-Lösung als Kondensationsreagenz nach NATHAN und BOGERT lieferte dann ausschließlich und mit 51% Ausbeute das gewünschte N-1-substituierte Uracilderivat **13** (Schema 7) [102]. Bei dieser Kondensation liegt ein nicht konzertierter Mechanismus zu Grunde, bei dem zunächst das weniger sterisch anspruchsvolle, Harnstoff-NH₂ von **11** mit dem Carboxylkohlenstoff des Cyanessigsäureethylesters unter Abspaltung von Ethanol zum entsprechenden Ureid reagiert (Reaktionsschritt 1) und dann ein intramolekularer Ringschluss folgt (Reaktionsschritt 2), bei dem die sekundäre NH-Gruppe des Ureids am Nitril-Kohlenstoffatom des Intermediates angreift [98, 101].



Schema 7: Synthese des Uracilderivats **13**

Synthese der Xanthinderivate für die Präkursoren und Referenzsubstanzen von [^{18}F]7 und [^{18}F]8

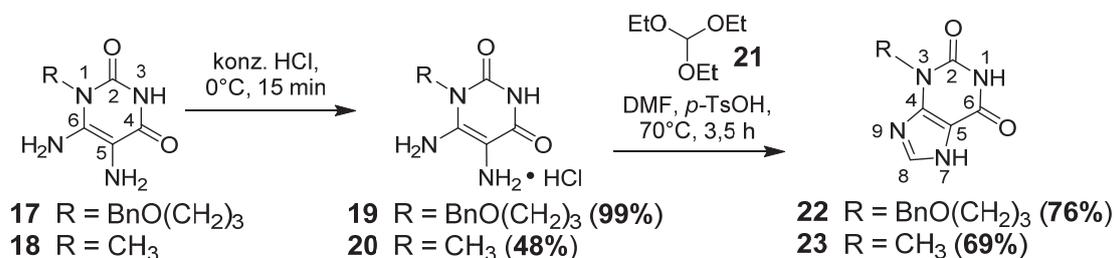
Im weiteren Syntheseverlauf wurden für die Synthese der Präkursoren und Referenzen für [^{18}F]7 das eigens synthetisierte Uracilderivat **13** und für [^{18}F]8 das kommerziell erhältliche Uracilderivat **14** verwendet. Zunächst wurden die Uracilderivate **13** und **14** nach TRAUBE [96] mittels Natriumnitrit an der 5-Position des Ringes nitrosiert und anschließend die Nitrosouracile **15** und **16** mittels Natriumdithionit zu den entsprechenden Diaminen **17** und **18** reduziert (Schema 8).



Schema 8: Funktionalisierung der Uracilderivate für die Xanthinsynthese

Dabei ist zu beachten, dass diese Diamine an Luft instabil sind und daher in die jeweiligen Hydrochloride **19** und **20** überführt werden müssen (Schema 9) [103].

Anschließend erfolgte der Ringschluss der Diamine **19** und **20** zu den entsprechenden Xanthinderivaten **22** und **23**. Eine Formylierung des Stickstoffatoms N-5 von **20** mit Ameisensäure nach TRAUBE mit anschließender Überführung in das Natriumsalz und Kondensation lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse für den Ringschluss zum Xanthinderivat **23** (Schema 9) [96]. Bei der eleganteren Methode von BALSSA *et al.* [104] wurde nicht Ameisensäure als Kohlenstoffquelle der C-8-Position des Xanthinderivats verwendet, sondern Orthoameisensäuretriethylester (**21**) im schwach sauren Milieu in Gegenwart von *p*-Toluensulfonsäure. Dies führte zu guten Ausbeuten der entsprechenden Xanthinderivate **22** (76%) und **23** (69%) (Schema 9).

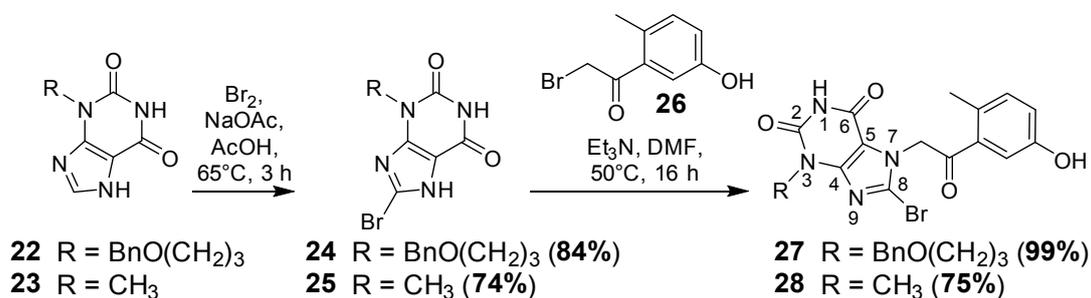


Schema 9: Synthese der Xanthinderivate **22** und **23**

Weitere Funktionalisierung der Xanthinderivate für Präkursor- und Referenzvorstufen

Für die Synthese der Vorstufen **6** und **31** für die Präkursoren und Referenzsubstanzen mussten die 3-substituierten Xanthinderivate **22** und **23** weiter funktionalisiert werden. Zunächst wurde angelehnt an FISCHER [105] und BARALDI und BONNAIRE [106] eine Bromierung des Kohlenstoffatoms C-8 mit elementarem Brom in Gegenwart von Natriumacetat durchgeführt. Die daraus erhaltenen, schwach rötlich-braunen 8-Brom-xanthinderivate **24** und **25** wurden anschließend mit 1,5 Äquivalenten des nach LAFLEUR *et al.* [83] synthetisierten α -Bromacetophenons **26** umgesetzt und führten zu hervorragenden Ausbeuten der 7,8-substituierten Xanthinderivate **27** (99%) und **28** (75%) für den Ringschluss (Schema 10).

Dabei führt das Bromatom des Acetophenons zu einer erhöhten positiven Partialladung am α -CH₂-Kohlenstoffatom. Somit greift das sekundäre Amin in 7-Position der bromierten Xanthinderivate **24** und **25** nach einem S_N2-Mechanismus bevorzugt an diesem α -Kohlenstoffatom an. Entstehender Bromwasserstoff wurde mittels Triethylamin abgefangen. Vom 8-Bromxanthinderivat **24** wurden Einkristalle erhalten, von denen eine Röntgeneinkristallstrukturanalyse angefertigt wurde (Abbildung 7).



Schema 10: Funktionalisierung der Xanthinderivate **22** und **23** hin zu den Vorstufen **27** und **28** für den Ringschluss

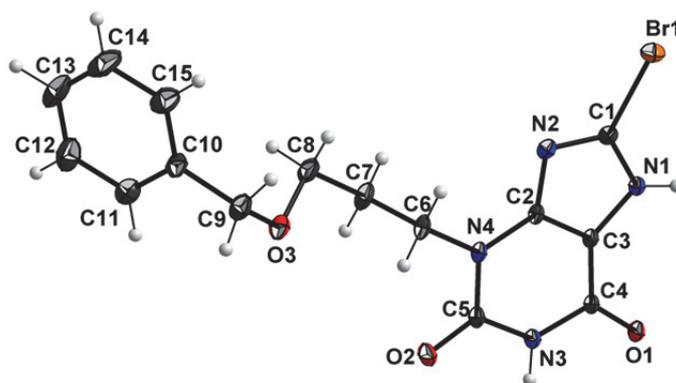
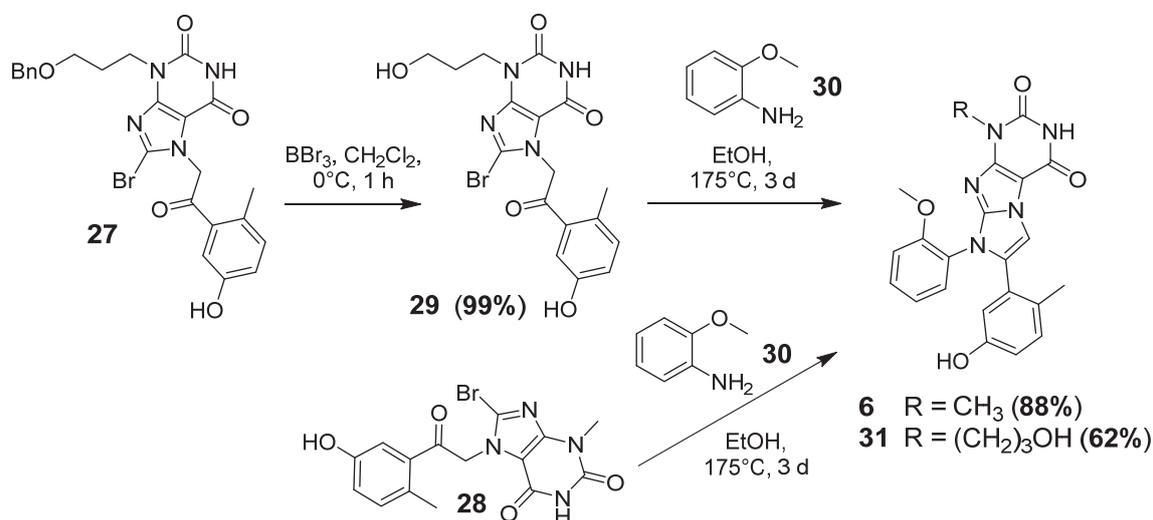


Abbildung 7: Lösung der Röntgeneinkristallstrukturanalyse von Verbindung **24**

Bis zur Darstellung der Vorstufen für den Ringschluss, sind die Synthesen für die beiden Derivate **27** und **28** analog zueinander durchgeführt worden. Für eine weitere Funktionalisierung zu den Präkursoren für die Radiomarkierungen und zu den Fluor-19-Referenzsubstanzen wurden nun verschiedene Syntheserouten verfolgt. Für das Derivat [^{18}F]**7**, welches eine ^{18}F -Propyleinheit am Stickstoffatom N-1 des Imidazopuringerüsts besitzt, wurde nun zunächst die Benzylschutzgruppe selektiv mittels Bortribromid entfernt [107]. Anschließend wurde der Ringschluss mit den Derivaten **28** und **29** durch Umsetzung mit 2-Methoxyanilin (**30**) durchgeführt (Schema 11), um sowohl die Vorstufe **31** als auch den literaturbekannten Originalinhibitor **6** zu erhalten [83]. In Abbildung 8 ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **31** dargestellt. Im Spektrum sind im Aromatenbereich die typischen Signale für die Phenylgruppen und das Imid-NH zu sehen. Im Aliphatenbereich finden sich die beiden Singulets der zwei Methylgruppen sowie die zwei Triplets und ein Multipllett der Propylkette wieder.



Schema 11: Entschützen der Vorstufe **27** und anschließender Ringschluss zu den Imidazopurinderivaten **6** und **31**

Dabei musste ein 20facher Überschuss des Anilins **30** eingesetzt und in einem Druckgefäß bei 175°C gearbeitet werden, um die vollständige Umsetzung des Edukts **29** nach drei Tagen zu erhalten. Bei Verwendung von 4–8 Äquivalenten des Anilins **30** erfolgte die vollständige Umsetzung des Edukts **29** erst nach sieben Tagen. Weiterhin wurde auch festgestellt, dass nach mehr als drei Tagen bei 175°C eine langsame Zersetzung der Edukte **28** und **29** und Produkte **6** und **31** zu einem sehr hydrophilen Nebenprodukt eintrat, was zu schlechterer Ausbeute an **31** von lediglich 16% führte. Geringere Temperaturen von 100°C und drei Tage Reaktionszeit führten zu keinem Umsatz des Anilins **30** mit den Edukten **28** und **29**. In Tabelle 2 und sind die Optimierungsversuche dieser Reaktion aufgelistet.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 2: Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Imidazopurine **6**, **31** und **39**

Edukt	Produkt	LM	Anilin [Äq.]	Zusatz	T [°C]	t [d]	Ausbeute
28	6	EtOH	30 (4)	-	175	2	88%
29	31	EtOH	30 (4)	-	175	7	16%
29	31	EtOH	30 (8)	-	175	7	58%
29	31	EtOH	30 (20)	-	175	3	62%
28	39	EtOH	34 (4)	-	175	5	-
28	39	EtOH	34 (4)	DIPEA, NH ₄ OH	175	4	-
28	39	EtOH	34 (4)	PPh ₃ , DEAD	100	2	-
28	39	EtOH	34 (4)	<i>p</i> -TsCl	160	1	-
28	39	<i>n</i> -BuOH	34 (4)	-	200	5	11% ^a
28	39	EtOH	34 (5)	AlCl ₃	175	3	62%

^aoffenkettiges Zwischenprodukt **38**

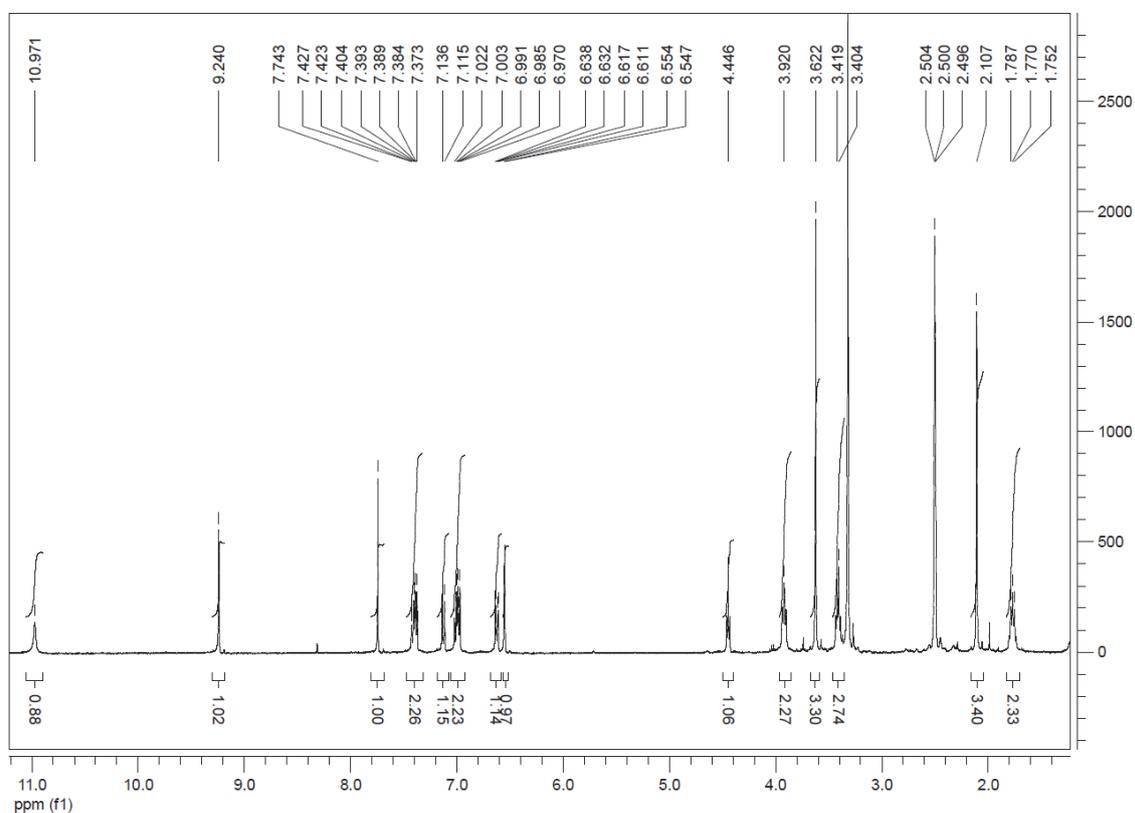
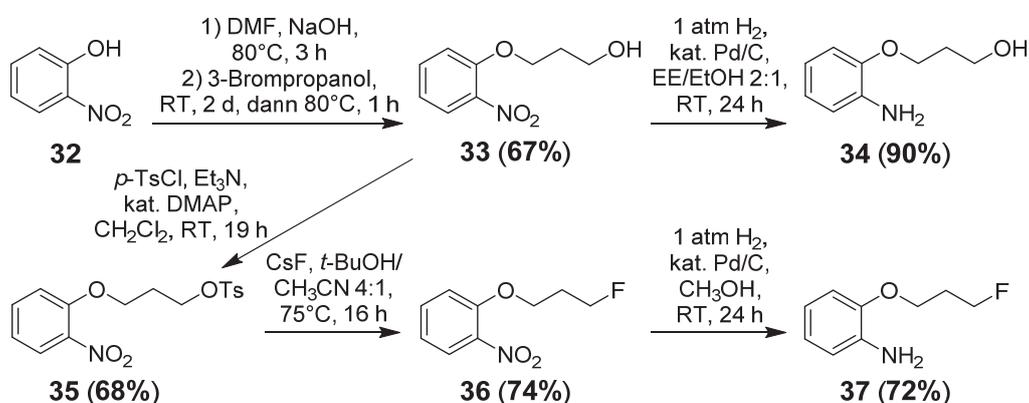


Abbildung 8: ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **31** aufgenommen in DMSO

Synthese von Anilinderivaten für [¹⁸F]8

Für die Synthese des Präkursors und der Referenzsubstanz von [¹⁸F]8 wurde zunächst aus 2-Nitrophenol (**32**) und 3-Brompropanol unter Zusatz von Natriumhydroxid 3-(2-Nitrophenoxy)-propan-1-ol (**33**) synthetisiert, welches anschließend katalytisch mittels Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre zum Anilinderivat **34** reduziert wurde (Schema 12) [108].

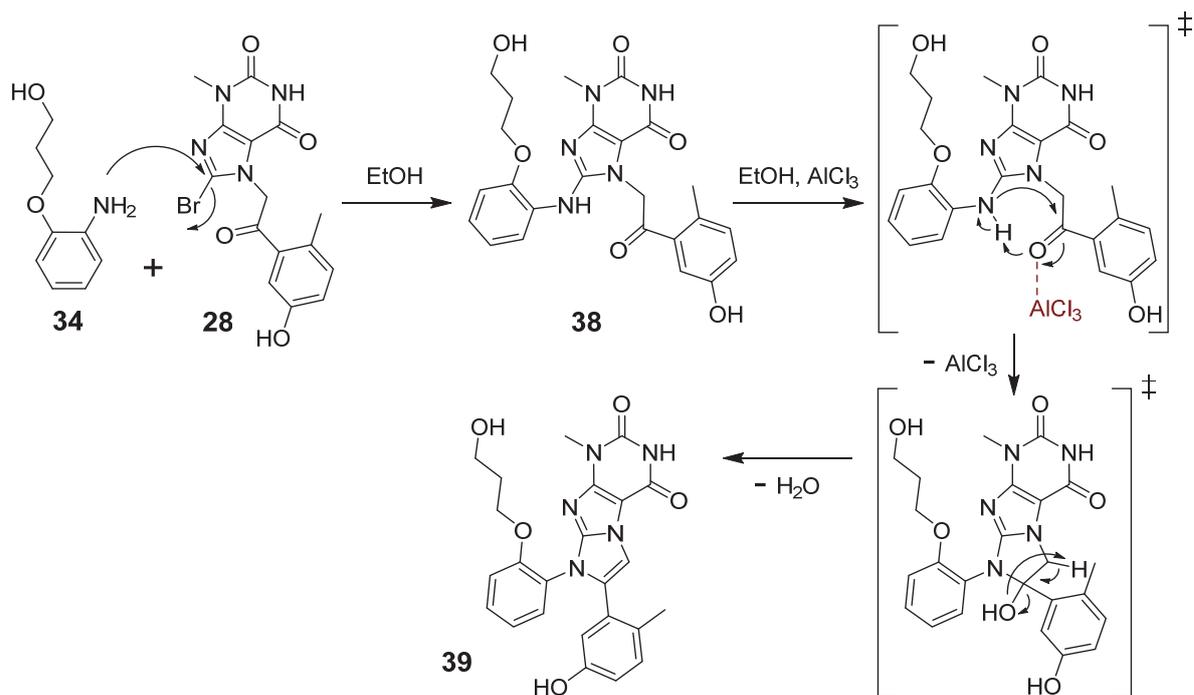
Des Weiteren wurde aus Derivat **33** mittels *p*-Tosylchlorid Verbindung **35** dargestellt und anschließend unter Verwendung von Cäsiumfluorid in die fluorierte Verbindung **36** überführt, aus welcher zuletzt mittels katalytischer Hydrierung das Anilinderivat **37** erhalten wurde.



Schema 12: Synthese der Anilinderivate **34** und **37** als Zwischenprodukte für Präkursor und Referenz von [¹⁸F]8

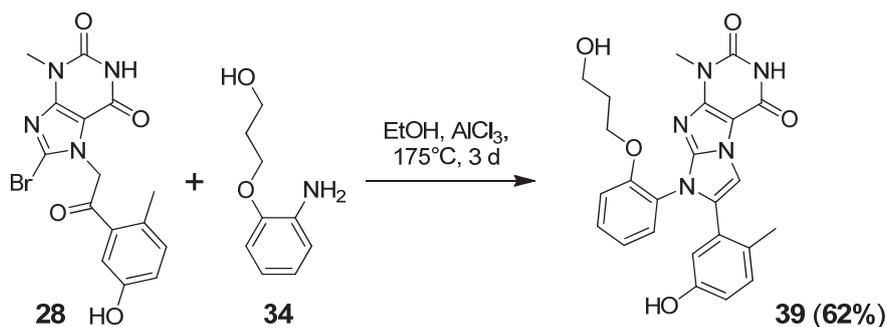
Synthese der Präkursorvorstufe **39** für [¹⁸F]8

Das Anilinderivat **34** wurde dann mit Verbindung **28** bei 175°C in Ethanol umgesetzt, wobei nach mehreren Tagen Reaktionszeit kein Produkt laut Dünnschichtanalyse entstanden war. Der Einsatz von Mikrowellenbedingungen (30–300 Watt) brachte keinen Erfolg. Die Verwendung von Basen wie DIPEA oder Säuren wie *p*-Toluensulfonsäure lieferte nicht das gewünschte Produkt. Auch Mitsunobu-Bedingungen mit PPh₃ und DEAD nach BARALDI *et al.* [109] führten nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Erst bei Temperaturen von 200°C in *n*-Butanol kam es zur Bildung des offenkettigen Intermediates **38** (Schema 13). Der Ringschluss von **38** wurde darauf mit doppelt stöchiometrischem Einsatz der Lewis-Säure Aluminiumchlorid bei 175°C in Ethanol erreicht (Schema 13).



Scheme 13: Vermuteter Mechanismus der optimierten Eintopf-Synthese zum Imidazopyridinderivat **39**. Rot dargestellt ist die durch eine Lewis-Säure vermittelte Katalyse von Intermediat **38** zu **39**

Anschließend wurde die Synthese von **39** so optimiert, dass die Reaktion von **28** und **34** zur intermediären Verbindung **38** und deren anschließender Ringschluss in einer Eintopf-Synthese mit Aluminiumchlorid und einem Überschuss von Anilinderivat **34** (5 Äquivalente) abläuft (Schema 14). Dadurch wurde die Ausbeute des Imidazopyridinderivats **39** deutlich gesteigert (62%).



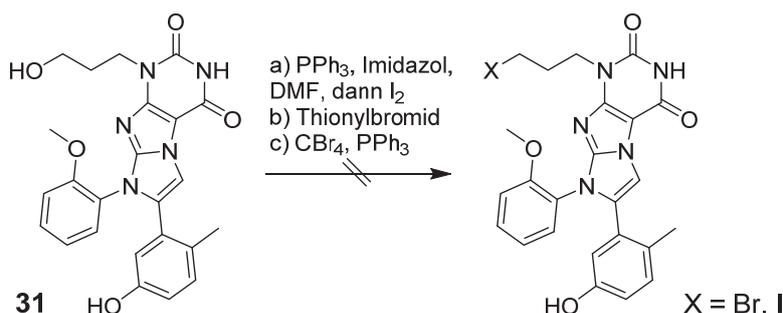
Scheme 14: Optimierte Eintopf-Synthese von **28** zu **39** unter Zuhilfenahme einer Lewis-Säure

Synthese des Präkursors von [¹⁸F]**7**

Für die genaue Identifizierung der radiofluorierten Verbindungen müssen nicht-radioaktive Referenzsubstanzen hergestellt werden, deren Laufverhalten sowohl in HPLC-Analysen als auch in der Dünnschichtchromatographie mit den radiomarkierten

Substanzen verglichen werden. Ursache ist, dass die radiomarkierten Substanzen in so geringen Mengen vorhanden sind, dass ein Nachweis lediglich durch die Detektion der γ -Strahlung möglich ist. Diese nicht-radioaktiven Referenzsubstanzen werden entweder direkt aus den Präkursoren hergestellt oder – im idealen Fall – indirekt modular aus Bausteinen oder Stufen ausgehend von der Präkursorsynthese.

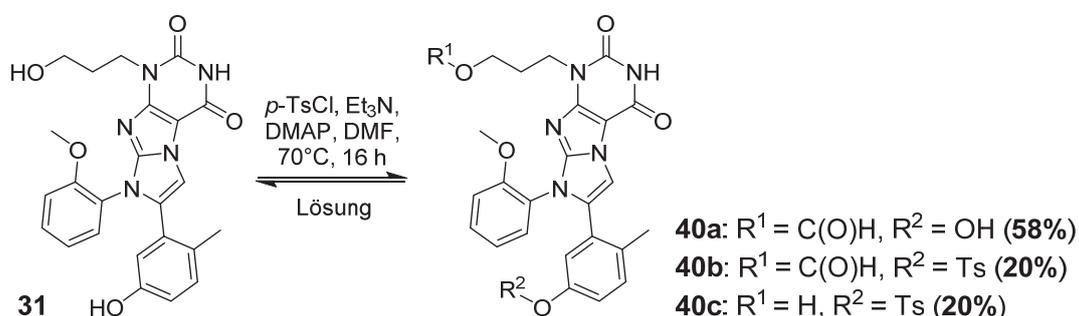
Zunächst wurde versucht, selektiv die primäre Hydroxygruppe von **31** zu halogenieren (Schema 15), um sie anschließend eine Tosylgruppe mittels Silbertosylat einzuführen oder mit Silberfluorid in die Referenzsubstanz zu überführen. Eine Methode nach HUNTER *et al.* [110], die der APPEL-Reaktion ähnelt und bei der primäre OH-Gruppen direkt iodiert werden (a), lieferte lediglich die unveränderten Ausgangsstoffe. Selbst eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50°C bzw. das Wechseln des Lösungsmittels von Dichlormethan zu Acetonitril oder DMF lieferte kein Produkt. Andere Versuche einer direkten Bromierung mit Thionylbromid (b) [111] oder eine APPEL-Reaktion mit Tetrabromkohlenstoff und PPh₃ (c) führten nicht zu den gewünschten γ -Brompropylderivaten.



Schema 15. Versuch zur Halogenierung der γ -Hydroxypropylgruppe von Verbindung **31**

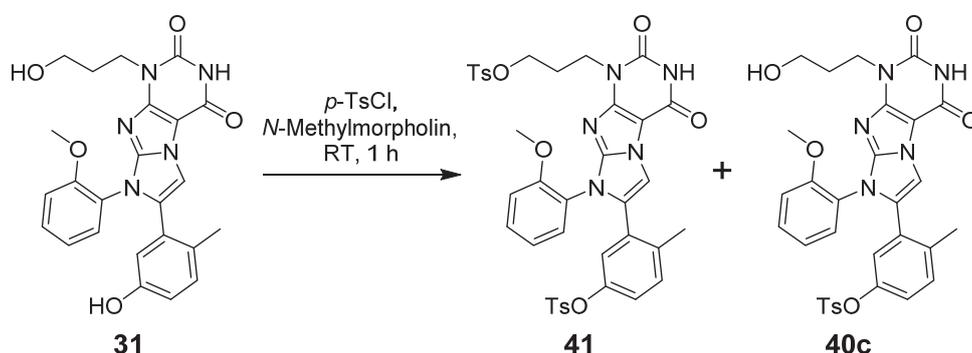
Eine Reaktion von **31** mit *p*-Tosylchlorid wurde zunächst nicht als ideal angesehen, da beide Hydroxygruppen in den entsprechenden Molekülen tosyliert werden können. Letztlich wurde aber doch der Versuch dieser Tosylierung unternommen. Wie sich herausstellte, kommt es zu einer selektiven Fluorierung von Präkursor **41** an der Alkylkette unter S_N2-Bedingungen. Die Tosylgruppe am aromatischen Ring reagiert nicht. Außerdem fungiert die aromatische Tosylgruppe als Schutzgruppe und kann nach der Fluorierung unter basischen Bedingungen abgespalten werden. Die Reaktion wurde zuerst in DMF unter Verwendung von Triethylamin zum Abfangen des Chlorwasserstoffs durchgeführt. Dabei wurde jedoch festgestellt, dass die aliphatische Hydroxygruppe durch eine Reaktion mit DMF zu Verbindung **40a** formyliert wurde (Schema 16). Diese isolierte Verbindung **40a** war in Lösung nicht stabil und zersetzte sich wieder, wobei Ausgangsverbindung **31** erhalten wurde. Weiterhin wurden die Derivate **40b** und **40c** durch eine Tosylierung an der Hydroxygruppe des Phenylrings

erhalten und wurden mittels NMR- und MS-Analysen nachgewiesen. Sie konnten jedoch nicht mittels Säulenchromatographie voneinander getrennt werden.



Schema 16: Nebenreaktion des Hydroxypropylderivats **31** in DMF

Um die Formylierung zu verhindern, wurde als Lösungsmittel *N*-Methylmorpholin verwendet, welches auch gleichzeitig den Einsatz von Triethylamin hinfällig machte (Schema 17). Verbindung **31** wurde in *N*-Methylmorpholin bei Raumtemperatur mit 2 Äquivalenten *p*-Tosylchlorid umgesetzt und es entstanden das am Phenylring monotosylierte Derivat **40c** als Hauptprodukt (30%) und das ditosylierte Produkt **41** mit nur 18% Ausbeute. Bei Verwendung von 4,2 Äquivalenten *p*-Tosylchlorid und nach 1 Stunde Reaktionszeit wurde ein vollständiger Umsatz vom Edukt **31** zum gewünschten ditosylierten Präkursor **41** mit 77% Ausbeute erzielt, wobei das monotosylierte Nebenprodukt **40c** mit nur 10% Ausbeute erhalten wurde. In Abbildung 9 ist das ^1H -NMR-Spektrum von Präkursor **41** abgebildet. Das Signal der Phenyl-OH-Gruppe von Verbindung **31** bei 9,24 ppm ist nicht mehr vorhanden. Dafür sind die zusätzlichen Signale der beiden Tosylgruppen (vier Dubletts im Aromatenbereich sowie zwei Singulets im Aliphatenbereich) zu finden.



Schema 17: Synthese des Präkursors **41** unter Verwendung von *N*-Methylmorpholin

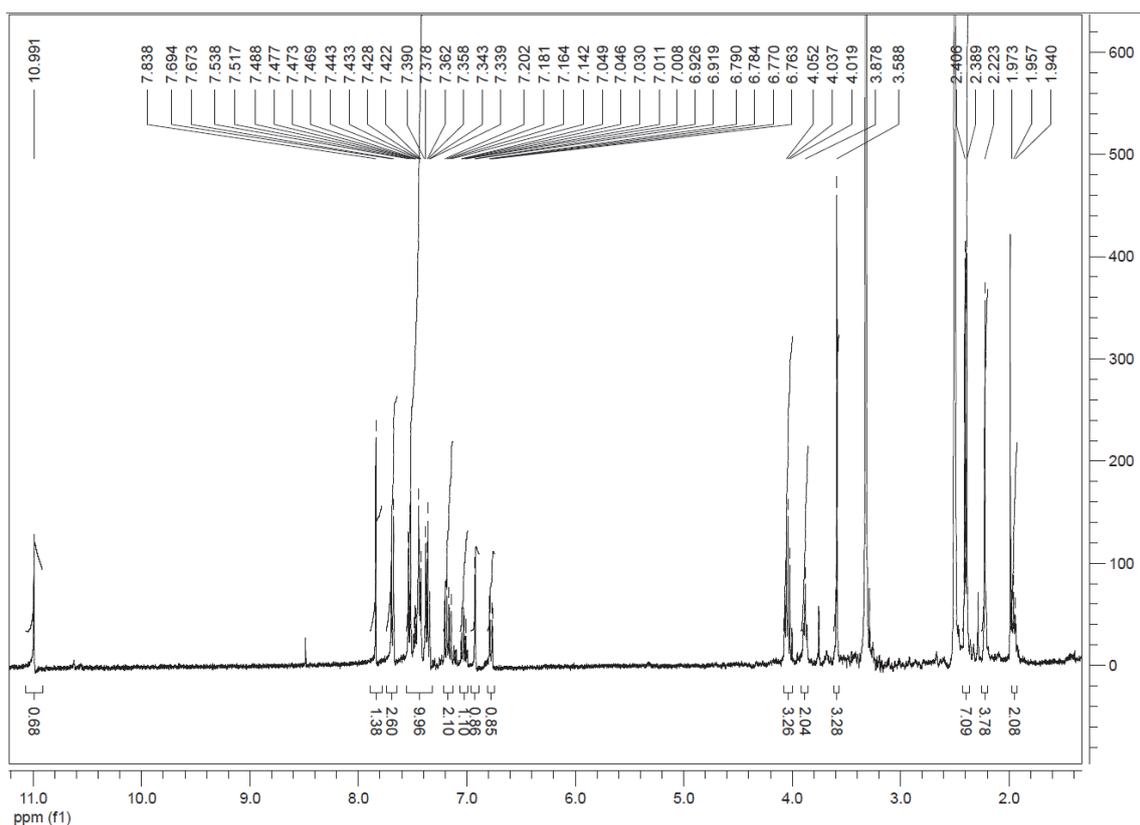
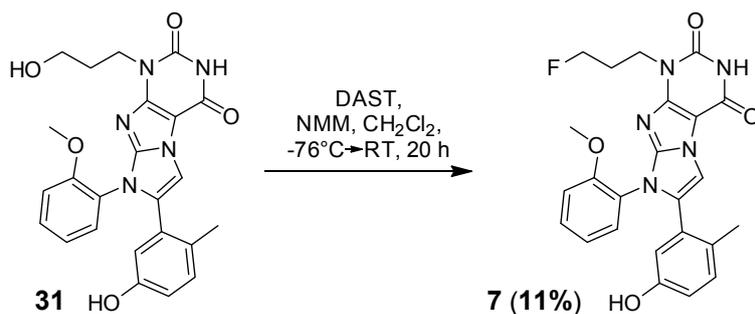


Abbildung 9: ^1H -NMR-Spektrum von Präkursor **41** aufgenommen in DMSO

Synthese der Referenzsubstanzen von [^{18}F]**7** und [^{18}F]**8**

Ziel der weiteren Umsetzungen ist die Synthese der Referenzsubstanz von [^{18}F]**7**. Zunächst wurde versucht, Präkursor **41** zu fluorieren. In einem Gemisch aus *t*-Butanol und Acetonitril wurden CsF oder TBAF eingesetzt. Dabei wurden weder bei Raumtemperatur noch bei erhöhter Temperatur von 70°C Fluorierungen beobachtet. Es trat lediglich eine Detosylierung zur ursprünglichen Hydroxygruppe an der Alkylkette ein. Daher wurde anstelle von **41** die Präkursorvorstufe **31** verwendet und mit frischem DAST bei -76°C in *N*-Methylmorpholin umgesetzt. Dabei kam es zur Fluorierung an der aliphatischen OH-Gruppe. Referenzsubstanz **7** wurde mit 11% Ausbeute isoliert. Eine Bestimmung des logD Wertes in PBS-Puffer bei pH 7,3 ergab $2,22 \pm 0,16$ ($n = 9$). In Abbildung 10 ist das ^1H -NMR-Spektrum von Referenzsubstanz **7** dargestellt. Im Aliphatenbereich findet sich eine typische Aufspaltung der CH_2 -Gruppe in Nachbarschaft zum Fluoratom bei 4,48 ppm. Wegen der höheren Elektronegativität des Fluoratoms gegenüber dem Sauerstoffatom der Hydroxygruppe der Ausgangsverbindung **31**, ist das Signal der mittleren CH_2 -Gruppe der Propylkette entschirmt und um 0,16 ppm tieffeldverschoben.



Schema 18: Synthese der Referenzsubstanz **7** mittels DAST

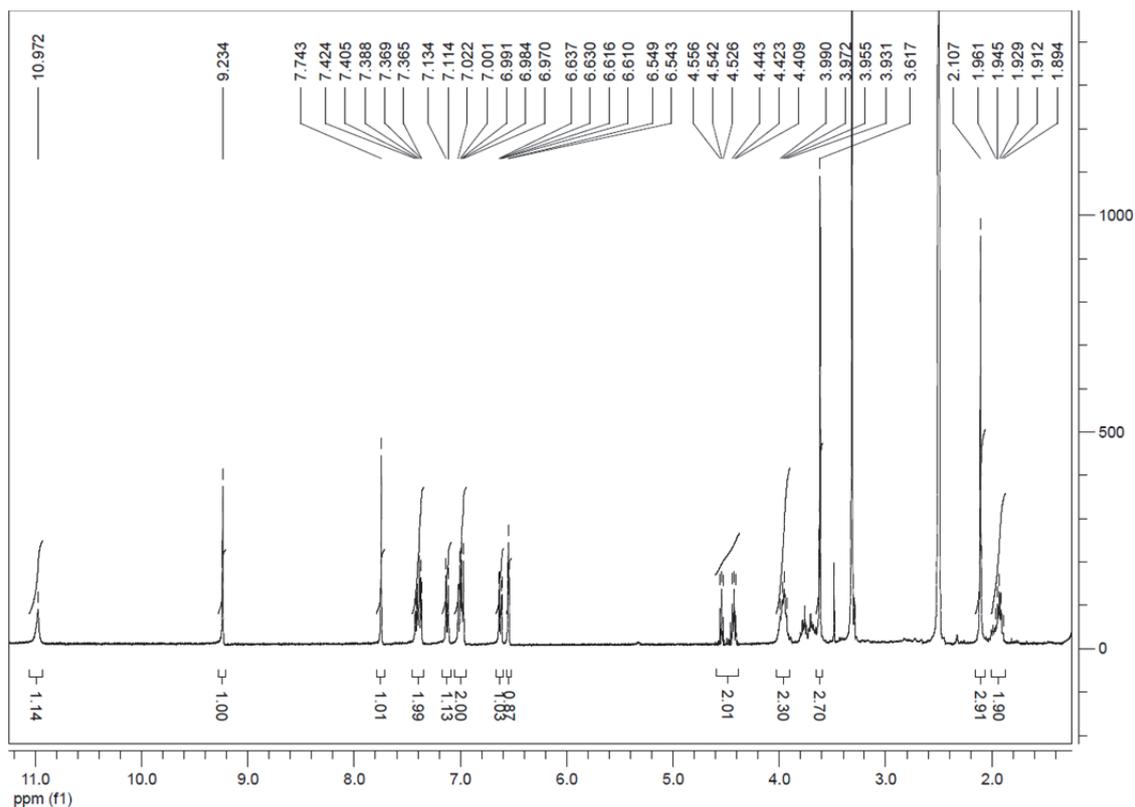
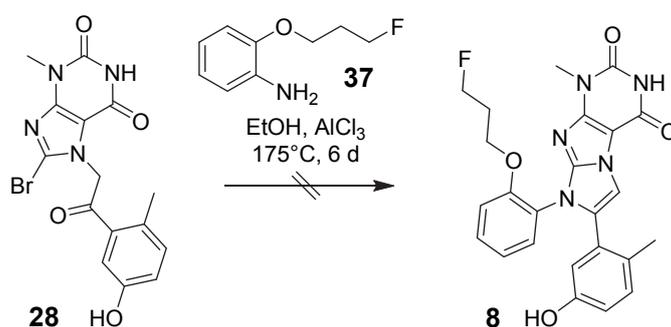


Abbildung 10: ¹H-NMR-Spektrum von Referenzsubstanz **7** aufgenommen in DMSO

Für die Synthese der Referenzverbindung **8** des zweiten Radiotracers [¹⁸F]**8** wurde zuerst versucht, Verbindung **28** analog zur Synthese von Verbindung **39** direkt mit 2-(3-Fluorpropoxy)phenylamin (**37**) umzusetzen (Schema 19) [108]. Im Gegensatz zum Anilinderivat **34** konnte auch durch Verwendung von 6 Äquivalenten Aluminiumchlorid bei 175°C nach 6 Tagen kein Umsatz des Fluor-substituierten Derivats **37** zur Referenzsubstanz **8** erzielt werden. Chromatographisch gereinigte Fraktionen der Reaktionsmischung zeigten bei NMR-Analysen Signale für den Einbau des Anilins, jedoch weder Signale, die der Alkylkette entsprechen, noch spezifische Fluorkopplungen. Dies weist darauf hin, dass die Fluorpropylkette unter diesen Reaktionsbedingungen nicht stabil ist und daher dieser Syntheseweg ungeeignet ist.

Eine Synthese der Referenzsubstanz **8** könnte jedoch analog zur Synthese der Referenzsubstanz **7** über die Reaktion von Verbindung **39** mit DAST erfolgen.



Schema 19: Versuch der Synthese für die nicht-radioaktive Referenzsubstanz **8** mittels 2-(3-Fluorpropoxy)-phenylamin (**37**)

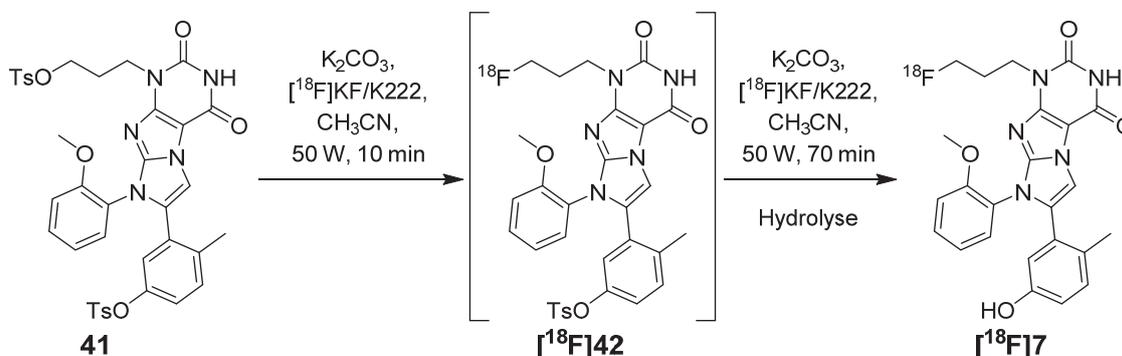
3.1.2 Radiomarkierung des Präkursors **41** für den niedermolekularen Radiotracer [^{18}F]**7**

Die Voraussetzung war nun geschaffen für eine Markierung des Präkursors **41**. Um optimale Bedingungen für die Radiomarkierung vom Präkursor **41** mit [^{18}F]Fluorid zu finden, wurden Präkursorkonzentration, Temperatur sowie Lösungsmittel variiert. Zum Ausloten verschiedener Markierungsbedingungen mit [^{18}F]Fluorid wurde die klassische Variante mit [^{18}F]KF/K₂CO₃/K222 und auch [^{18}F]TBAF jeweils in Kombination mit der Mikrowellentechnik angewendet.

Bei der Umsetzung von **41** mit [^{18}F]TBAF in *t*-Butanol und Acetonitril und Reaktionszeiten von jeweils 10 Minuten wurde keine Umsetzung bei Raumtemperatur oder mit 15 Watt und 30 Watt beobachtet. Bei 70 Watt nach 10 Minuten wurde ein neuer Spot auf dem Radio-DC ($R_f = 0,55$; Laufmittel: CHCl₃/CH₃OH 9:1, Kieselgel-Platte) beobachtet, der aber lipophiler als Referenz **7** ($R_f = 0,37$) war. Eine Verlängerung der Reaktionszeit bis zu 60 Minuten bei 70 Watt brachte lediglich eine ^{18}F -Inkorporation von 5% unter Bildung des lipophileren Zwischenprodukts [^{18}F]**42**, welches offenbar noch eine Tosylgruppe am Phenylring besaß.

Deswegen wurde als nächstes [^{18}F]KF/K222/K₂CO₃ in Acetonitril für die Radiomarkierung von **41** angewendet. Nach 10 Minuten Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde bereits die Bildung von [^{18}F]**42** mit dem höheren R_f -Wert von 0,55 bei Radio-DC-Analysen beobachtet, aber auch die schwächere Bildung eines Produktes ($R_f = 0,37$), dessen R_f -Wert mit der der Referenzsubstanz **7** übereinstimmte. Nach 10 Minuten bei 30 Watt war die Ausbildung des hydrophilen Spots ($R_f = 0,37$) etwas stärker. Nach 10 Minuten bei 100 Watt waren beide Spots nicht mehr detektierbar, wahrscheinlich wurden die Moleküle durch die starke thermische Belastung zersetzt.

Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 40 Minuten bei 30 Watt brachte eine Umsetzung von $[^{18}\text{F}]\text{KF}$ mit Präkursor **41** zu $[^{18}\text{F}]\text{7}$ mit 10% und zu $[^{18}\text{F}]\text{42}$ mit 5%. Nach 70 Minuten bei 50 Watt führten die Reaktionsbedingungen zu vollständiger Umwandlung der Zwischenstufe $[^{18}\text{F}]\text{42}$ zu $[^{18}\text{F}]\text{7}$ mit einem Einbau von $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ von 13% (Schema 20). Dabei wurde mittels Radio-DC zu unterschiedlichen Zeitpunkten (10, 20, 30, 40 min) beobachtet, dass zuerst die Radiofluorierung an der Alkylkette stattfindet und anschließend durch die stark basischen Bedingungen eine Detosylierung des Phenylringes erreicht wird, da zunächst nach 10 Minuten das lipophilere Zwischenprodukt $[^{18}\text{F}]\text{42}$ bei Radio-DC-Analysen ($R_f = 0,55$) stärker erkennbar ist, sich aber nach 40 Minuten in das hydrophilere $[^{18}\text{F}]\text{7}$ ($R_f = 0,37$) umwandelt, dessen Laufverhalten mit der Referenz **7** in DC-Analysen (Abbildung 11) und HPLC-Analysen (Abbildung 12) übereinstimmt.



Schema 20: Vermuteter Ablauf der Radiomarkierung und Schutzgruppenabspaltung vom Präkursor **41** zu Radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{7}$

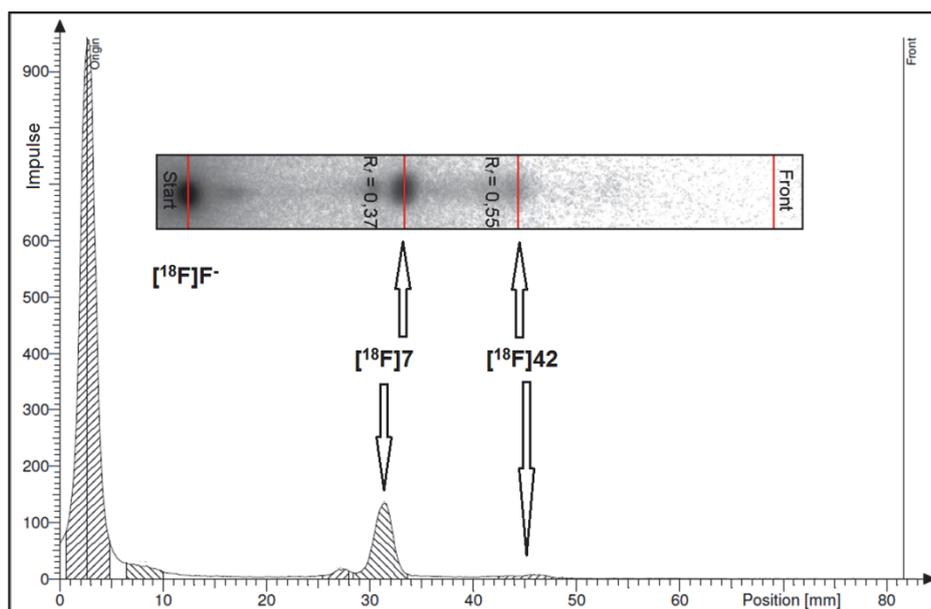


Abbildung 11: Radio-DC-Analyse (Eluent: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1, Kieselgel) der Reaktionsmischung von $[^{18}\text{F}]\text{7}$ ($R_f = 0,37$) und $[^{18}\text{F}]\text{42}$ ($R_f = 0,55$) nach 40 min bei 50 Watt

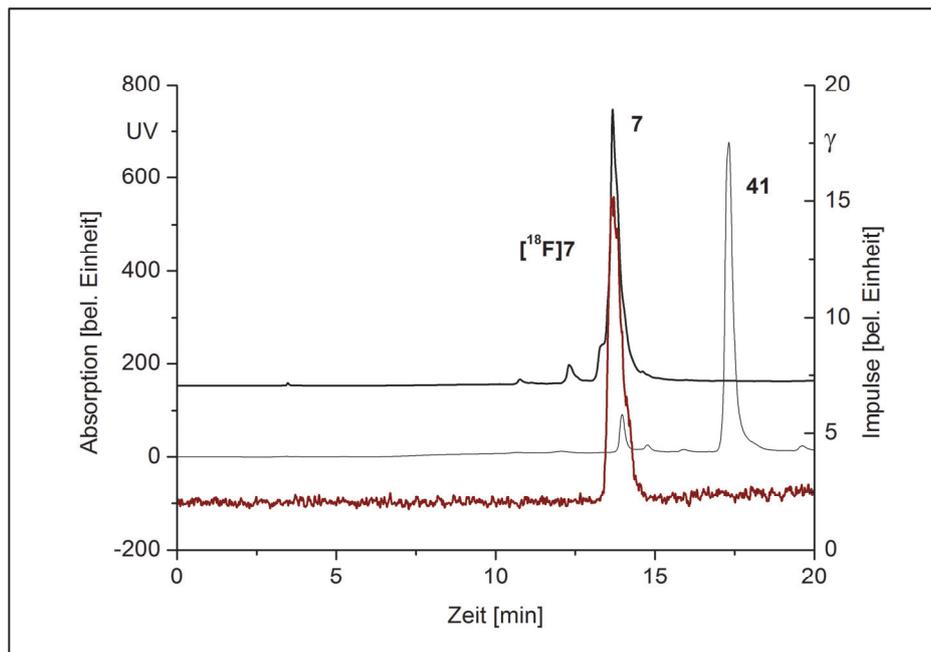


Abbildung 12: (Radio-)HPLC Chromatogramme vom gereinigten $[^{18}\text{F}]\mathbf{7}$ (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 13,7$ min), Referenz **7** (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 13,7$ min) und des Präkursors **41** (UV-Spur, dünne Linie, $t_R = 17,4$ min)

Reinigung von $[^{18}\text{F}]\mathbf{7}$

Zunächst wurde eine Reinigung für $[^{18}\text{F}]\mathbf{7}$ unter Verwendung von zwei Chromafix® C18 ec-Kartuschen durchgeführt. Dazu wurden die Kartuschen mit Wasser konditioniert und die Reaktionslösung von $[^{18}\text{F}]\mathbf{7}$ mit 3 ml Wasser verdünnt und auf die Kartuschen aufgetragen. Dann wurden die Kartuschen mit 20 ml Wasser eluiert, um nicht umgesetztes $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ zu entfernen und anschließend mit Druckluft getrocknet. Die abgetrennte Verbindung $[^{18}\text{F}]\mathbf{7}$ und ein geringer Rest von $[^{18}\text{F}]\mathbf{42}$ wurden danach mit 0,9 ml Methanol eluiert.

Anschließend wurde $[^{18}\text{F}]\mathbf{7}$ mittels semi-präparativer HPLC ($t_R = 22,5$ min; Gradient 5, vgl. Abschnitt 4.1.7) gereinigt ($[^{18}\text{F}]\mathbf{42}$ $t_R = 30,5$ min) und für nachfolgende radiopharmakologische Experimente getrocknet. Ausgehend von 2,50–5,08 GBq $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ beträgt die radiochemische Ausbeute 21–69 MBq (1,0–6,0% d. c.) mit einer spezifischen Aktivität von $10,3 \pm 5,1$ GBq/ μmol .

3.1.3 Radiopharmakologische Evaluierung des Imidazopurinderivats $[^{18}\text{F}]\mathbf{7}$

Ein wichtiges Kriterium, um einen Radiotracer später in vivo zum Einsatz bringen zu können, ist seine Stabilität in Blutplasma. Diese Untersuchung ist wichtig, um Radiodefleurierungsreaktionen und die Stabilität des potentiellen Radiotracers $[^{18}\text{F}]\mathbf{7}$ gegen Enzyme abschätzen zu können. Diese Stabilitätsuntersuchungen werden in vitro durchgeführt. Dazu wurde eine Lösung des semipräparativ gereinigten und

getrockneten [^{18}F]7 in 200 μl E153-Infusionslösung bei 37°C für zwei Stunden in 1,5 ml Rattenplasma inkubiert. Währenddessen durchgeführte Radio-DC- (1, 30, 60, 120 min) und HPLC-Analysen (60, 120 min) zeigten keine Radiodefлуorierung oder sonstige Metabolisierung von [^{18}F]7 in vitro.

Erste Zelloassoziationsexperimente (Vgl. Abschnitt 4.2.1) wurden durchgeführt, um die Affinität des neuen Radiotracers zu testen. Dazu wurden A375-Melanomzellen verwendet, welche mit einem EphA2- und GFP-codierendem Plasmid transfiziert wurden [112]. Die daraus resultierende Überexpression des EphA2-Rezeptors dieser A375^{EphA2}-Zellen wurde durch eine relative Quantifizierung mittels Western-Blot nachgewiesen. Gleichzeitig wurden unveränderte A375-Zellen als Referenz sowie A375^{mock}-Zellen mitgeführt. Die A375^{mock}-Zellen enthielten nur ein GFP-Gen nicht aber das EphA2-Gen, um eine erfolgreiche Transfektion nachzuweisen.

Die gereinigte und getrocknete Verbindung [^{18}F]7 wurde mit zweimal 100 μl Ethanol in Zellmedium gelöst, die Lösung dann zu den oben genannten Zellen gegeben und mit diesen 5–120 Minuten bei 37°C inkubiert. Weiterhin wurden Proben von den Zellüberständen nach 60 und 120 Minuten mittels Radio-HPLC- und Radio-DC-Analysen untersucht. Diese bestätigten, dass [^{18}F]7 in unveränderter Form vorlag. Somit wird eine Metabolisierung von [^{18}F]7 in vitro ausgeschlossen.

Eine zweite Versuchsreihe mit der Zelllinie wurde vorher mit dem Originalinhibitor **6** ($c = 50 \mu\text{M}$) inkubiert [83], um die Aufnahme von [^{18}F]7 zu hemmen und so eine spezifische Bindung an den EphA2-Rezeptor nachzuweisen. Der Originalinhibitor **6** wurde für die Hemmversuche verwendet, da er vermutlich eine bessere Bindung zum EphA2-Rezeptor hat, als das strukturell modifizierte Imidazopurinderivat [^{18}F]7. Nicht aufgenommene Aktivität wurde anschließend von den Zellen gewaschen und das Verhältnis von Protein zu Aktivität bestimmt.

Es wurde festgestellt, dass eine Zelloassoziation von [^{18}F]7 bei allen drei Zelllinien stattgefunden hat (Abbildung 13). Dabei wurde die meiste Aktivität in den transfizierten A375^{EphA2}-Zellen nachgewiesen ($138 \pm 26\%$ ID/mg Protein). Auch die nicht-transfizierten A375-Zellen ($80 \pm 17\%$ ID/mg Protein) und die A375^{mock}-Zellen ($62 \pm 6\%$ ID/mg Protein) zeigten eine Bindung.

Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede bei der Hemmung der Zelloassoziation von [^{18}F]7 durch Original-Inhibitor **6** in den drei Zelllinien nachgewiesen werden, womit eine spezifische Aufnahme bzw. Bindung von [^{18}F]7 an den überexprimierten EphA2-Rezeptor der A375^{EphA2}-Zellen ausgeschlossen wird. Folglich ist die Zelloassoziation unspezifischer Natur und wahrscheinlich von Diffusionsprozessen oder anderen Transportwegen geprägt.

Trotz der erhöhten Aufnahme von [^{18}F]7 bei den transfizierten A375^{EphA2}-Zellen lassen die radiopharmakologischen Untersuchungen, insbesondere die Hemmversuche, den Schluss zu, dass das Imidazopurinderivat [^{18}F]7 als ein spezifischer Radiotracer für die bildliche Darstellung des EphA2-Rezeptors in Tumoren ungeeignet ist.

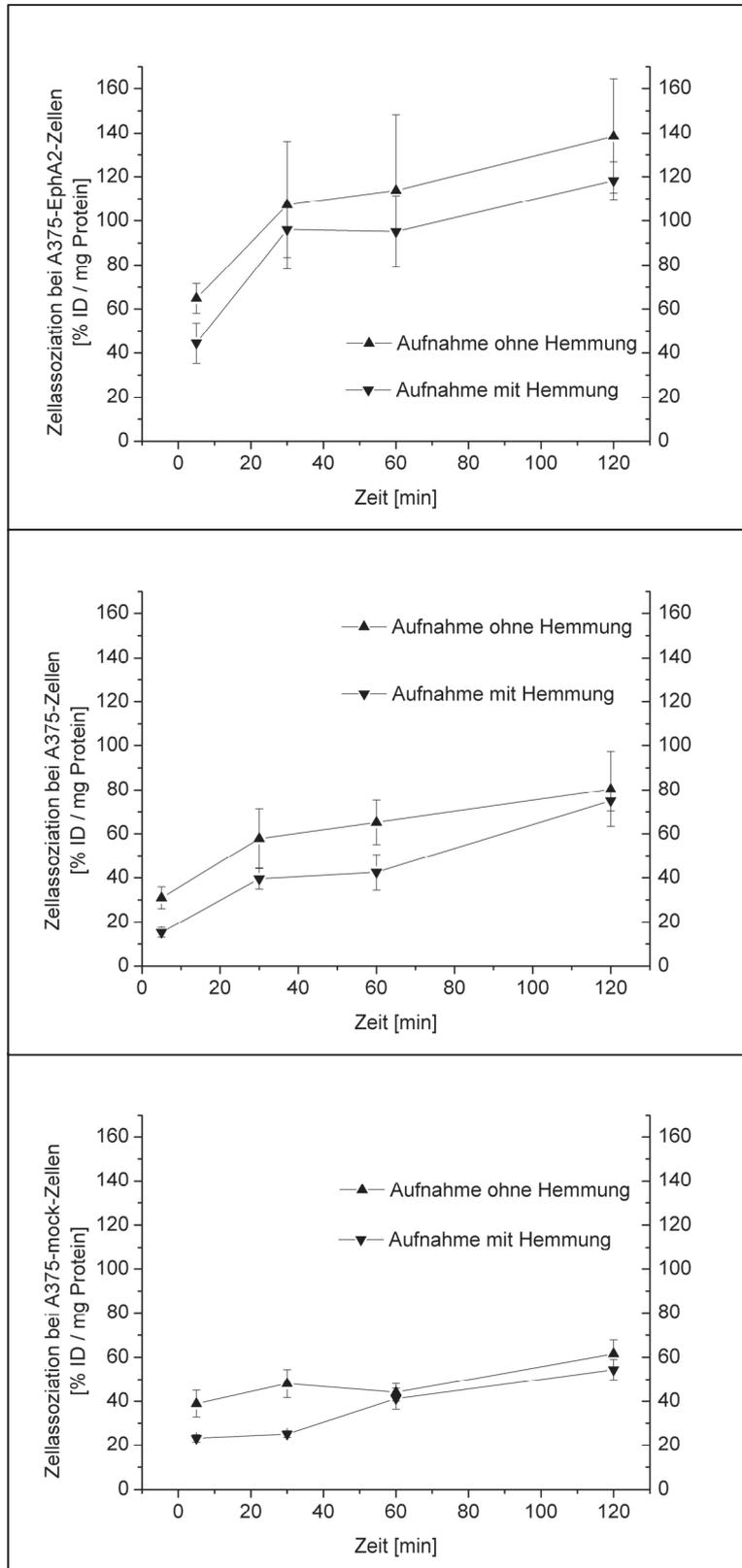


Abbildung 13: Zellassoziationsexperimente von [^{18}F]7 bei 37°C (\blacktriangle). Hemmversuche mit Original-Inhibitor **6** (c = 50 μM) (\blacktriangledown) (n = 3)

3.2 Entwicklung eines Radiotracers basierend auf dem gegen den extrazellulären EphB2-Rezeptor gerichteten Peptid SNEWILPRLPQH*

Die Zellaufnahme von kleinen, pharmakologisch relevanten Molekülen hängt stark von deren physikochemischen Eigenschaften ab. Im Falle der Eph-Rezeptoren müssen die niedermolekularen Moleküle entweder durch einfache Diffusion oder aktive Transportmechanismen zur intrazellulären Kinasedomäne (ATP-Bindungstasche) der Zelle gelangen. Innerhalb der Zelle können die niedermolekularen Verbindungen über Transportmechanismen auch wieder aus der Zelle hinaus transportiert werden, bevor sie an das gewünschte Target binden können. Dies wäre ungünstig für eine gewünschte intrazelluläre Akkumulation des Tracers. Bei extrazellulären Zielen können komplexere Moleküle zum Einsatz kommen. Sie können eine höhere Molmasse, einen höheren sterischen Anspruch und auch Ladungen besitzen. Für die extrazelluläre Ligandbindungsdomäne des Eph-Rezeptors kommen z.B. Peptide, Proteine oder Antikörper in Frage [113, 114], weiterhin aber auch kleine pharmakologisch relevante Moleküle [82].

Für den EphB2-Rezeptor gibt es affine, antagonistisch wirkende Peptide mit der Peptidsequenz SNEW, die sich am N-Terminus befindet (Vgl. Abschnitt 2.3). Sie ist für die hohen Wechselwirkungen mit der extrazellulären Bindungstasche des EphB2-Rezeptors und daher für die Affinität und Selektivität verantwortlich [90]. SNEW-Peptide sollten daher so derivatisiert werden, dass eine Radiomarkierung mit Fluor-18 am C-Terminus ermöglicht wird, um so einen neuen potentiellen Radiotracer zu erhalten.

3.2.1 Radiomarkierung von SNEW-Peptiden mit den etablierten Markierungsbausteinen [¹⁸F]SFB und [¹⁸F]FBAM

3.2.1.1 Übersicht über verschiedene Markierungsbausteine

Gegenwärtig ist eine weite Spanne von kleinen Markierungsbausteinen mit sehr unterschiedlich, die (bio-)chemischen Eigenschaften beeinflussenden Charakteristika der zu markierenden biologisch relevanten Makromoleküle zugänglich (Abbildung 14). Sie sind in den meisten Fällen spezifisch für funktionelle Gruppen in biologisch aktiven Verbindungen. Bisher existiert kein universell anwendbarer Markierungsbaustein und Markierungsstrategien müssen für fast jedes Peptid neu ausgearbeitet werden.

*Peptidsequenz – Einbuchstabencode der Aminosäurenomenklatur (Abkürzungsverzeichnis)

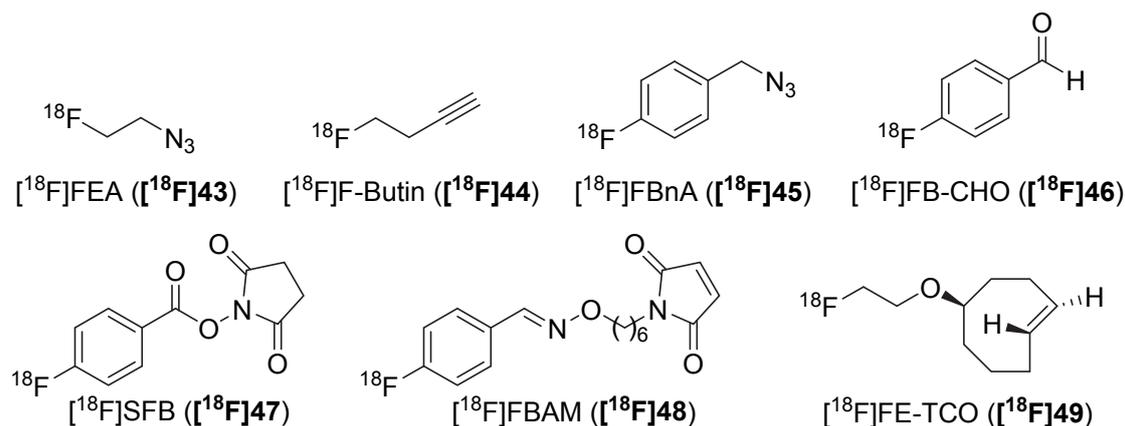


Abbildung 14: Ausgewählte Fluor-18-Markierungsbausteine zur milderen Radiomarkierung

Ansätze für die Radiofluorierung von z.B. Lysin-funktionalisierten Peptiden oder des N-Terminus' mit dem hervorragend ausgearbeiteten und am meisten angewandten Markierungsbaustein $[^{18}\text{F}]$ SFB [115-118] und von Cystein-beinhaltenen Peptiden mittels $[^{18}\text{F}]$ FBAM [119-121], der zu den Maleinimid-basierten Markierungsbausteinen zählt, wurden in der Literatur beschrieben.

Eine Radiomarkierung von Peptiden und Proteinen in wässrigen Medien mit aromatischen Markierungsbausteinen wie $[^{18}\text{F}]$ FB-CHO $[^{18}\text{F}]46$, $[^{18}\text{F}]$ SFB $[^{18}\text{F}]47$, $[^{18}\text{F}]$ FBnA $[^{18}\text{F}]45$ oder $[^{18}\text{F}]$ FBAM $[^{18}\text{F}]48$ ist aufgrund ihrer hohen Lipophilie oder ihrer geringen Regio- bzw. Chemoselektivität in Bezug auf funktionelle Gruppen unzureichend [120].

- Bei Einsatz von $[^{18}\text{F}]$ SFB $[^{18}\text{F}]47$ ist bekannt, dass primäre Amine mit Seitenketten wie die des Lysins markiert werden, aber auch der N-Terminus. Jedoch fehlt es an Selektivität zwischen den Aminogruppen, wenn der pH-Wert nicht verändert werden kann. Weiterhin neigt $[^{18}\text{F}]$ SFB zur Zersetzung unter physiologischen und basischen pH-Bedingungen [122]. Eine Strategie zur selektiven Peptidmarkierung mit automatisch synthetisiertem $[^{18}\text{F}]$ SFB an nur einer der vorher beschriebenen Positionen wurde kürzlich, unter Verwendung einer Schutzgruppenstrategie, mittels Festphasenpeptidsynthese entwickelt [122].
- Daneben ist es für Markierungen mit $[^{18}\text{F}]$ FBAM $[^{18}\text{F}]48$ wie auch mit anderen Markierungsreagenzien wichtig, dass die bioaktiven Verbindungen nur eine funktionelle Gruppe für die Markierung enthalten, wie die Thiolgruppe für $[^{18}\text{F}]$ FBAM, um die Selektivität bei der Markierung zu gewährleisten. Jedoch gibt es auch hier Hinweise zur Bildung von *E/Z*-Isomeren und optischen Isomeren aufgrund der Oxim-Gruppe des $[^{18}\text{F}]$ FBAM [121].

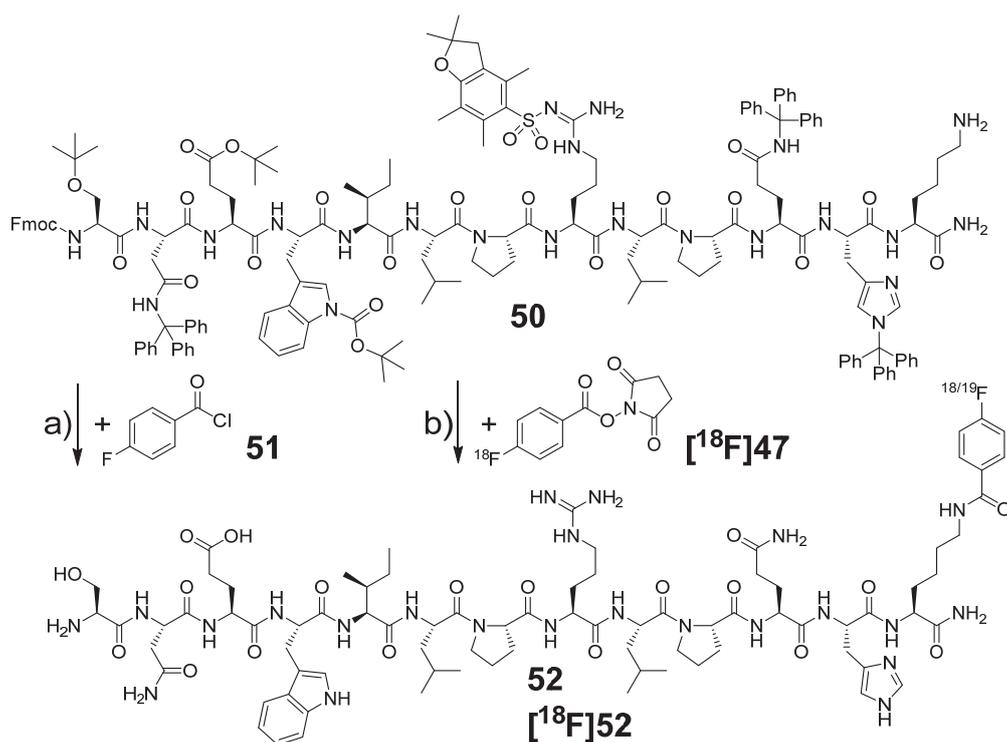
- Ein Nachteil des bioorthogonalen Bausteins [^{18}F]FE-TCO [^{18}F]49 neben seines hohen sterischen Anspruchs ist, dass sich bei Radiomarkierung generell zwei Regioisomere ergeben, die zu unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften führen können [34]. Dies ist besonders wichtig bei der Markierung von kleineren Molekülen wie Oligopeptiden

3.2.1.2 Markierung eines SNEW-Peptids mit [^{18}F]SFB

Der N-Terminus des SNEW-Peptids muss für die Affinität zum Rezeptor unversehrt bleiben. Daher wurde die robuste und vielversprechende Methode der Festphasenmarkierung für eine [^{18}F]SFB-Markierung eines SNEW-Peptids adaptiert. Ein SNEW-Peptid wurde zunächst an der Festphase aufgebaut und ist am C-Terminus mit einem N^{ϵ} -Alloc-geschützten L-Lysin derivatisiert, um das geschützte Peptid SNEWILPRLPQHK zu erhalten. Anschließend wurde die Alloc-Schutzgruppe der Lysin-Seitenkette, die orthogonal zu anderen am Peptidyl-Harz vorliegenden Schutzgruppen ist, Palladium-katalysiert mittels $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ entschützt, um das Peptid **50** mit freier Lysinseitenkette an der Festphase zu erhalten. Daraus wurde die nicht-radioaktive Referenzsubstanz **52** erfolgreich mittels 4-Fluorbenzoylchlorid (**51**) synthetisiert (Schema 21).

Die Radiomarkierung des Peptids **50** wurde an der Festphase mit [^{18}F]SFB [^{18}F]47 durchgeführt, das erhaltene SNEW-Peptid [^{18}F]52 danach von der Festphase abgespalten und mittels semipräparativer HPLC gereinigt [122]. Das [^{18}F]SFB-markierte SNEW-Peptid [^{18}F]52 wurde mit einer nur geringen RCA = $5 \pm 2\%$ (d. c.) mit einer absoluten Aktivität von 15–36 MBq und einer RCR $\geq 95\%$ nach 153 min Synthesezeit erhalten [122].

Die robuste Methode der Festphasenmarkierung wurde erfolgreich für die Radiosynthese von [^{18}F]52 angewandt. Eine Anwendung von [^{18}F]SFB für die Markierung des SNEW-Peptids **50** war wegen der geringen Ausbeute und radiochemischen Reinheit jedoch nicht praktikabel.



Schema 21: Synthese der Referenzsubstanz **52** und des Radiotracer $[^{18}\text{F}]\mathbf{52}$

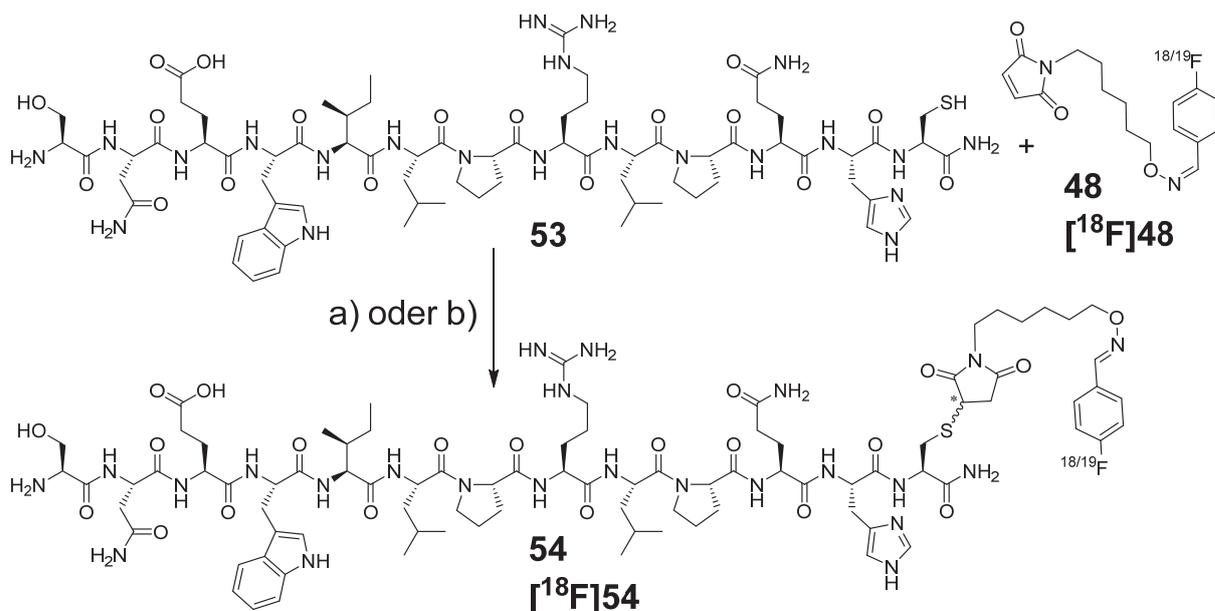
(a) DMF, Et₃N, 50°C, 1 h (nicht-radioaktive Synthese)

(b) H₂O/DMF/Sørensen-Phosphat-Puffer (0,15 M, pH 7,0) (1:2:1), 50°C, 50 min (Radiosynthese)

3.2.1.3 Markierung eines SNEW-Peptids mit $[^{18}\text{F}]\text{FBAM}$

Aufgrund der Ergebnisse, die mit $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ erhalten wurden, wurde die Markierungsmethode mit dem am Forschungszentrum etablierten Markierungsbaustein $[^{18}\text{F}]\text{FBAM}$ $[^{18}\text{F}]\mathbf{48}$ untersucht. Mittels Fmoc-basierter Festphasenpeptidsynthese und Rink-Amid-MBHA-Harz wurde ein SNEW-Peptid aufgebaut, welches C-terminal mit L-Cystein derivatisiert ist, um SNEWILPRLPQHC **53** zu erhalten. Das Peptid wurde mittels Reagenz K (Vgl. Abschnitt 4.1.8) vom Harz abgespalten, mittels präparativer HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Zur Darstellung des Referenzpeptids **54** wurde SNEW-Peptid **53** mit nicht-radioaktiven FBAM **48** umgesetzt (Schema 22). Dabei wurde mittels HPLC-Analyse ein fast vollständiger Umsatz des Präkursors **53** beobachtet. Das erhaltene Rohpeptid **54** wurde mit präparativer HPLC gereinigt, anschließend lyophilisiert und mittels Massenspektrometrieanalyse als Referenzsubstanz **54** verifiziert (Abbildung 15).



Schema 22: Synthese der Referenzsubstanz **54** und des Radiotracer $[^{18}\text{F}]\mathbf{54}$. (a) und (b) Sørensen-Phosphat-Puffer (pH 7,2), CH_3CN , 60°C , 1 h

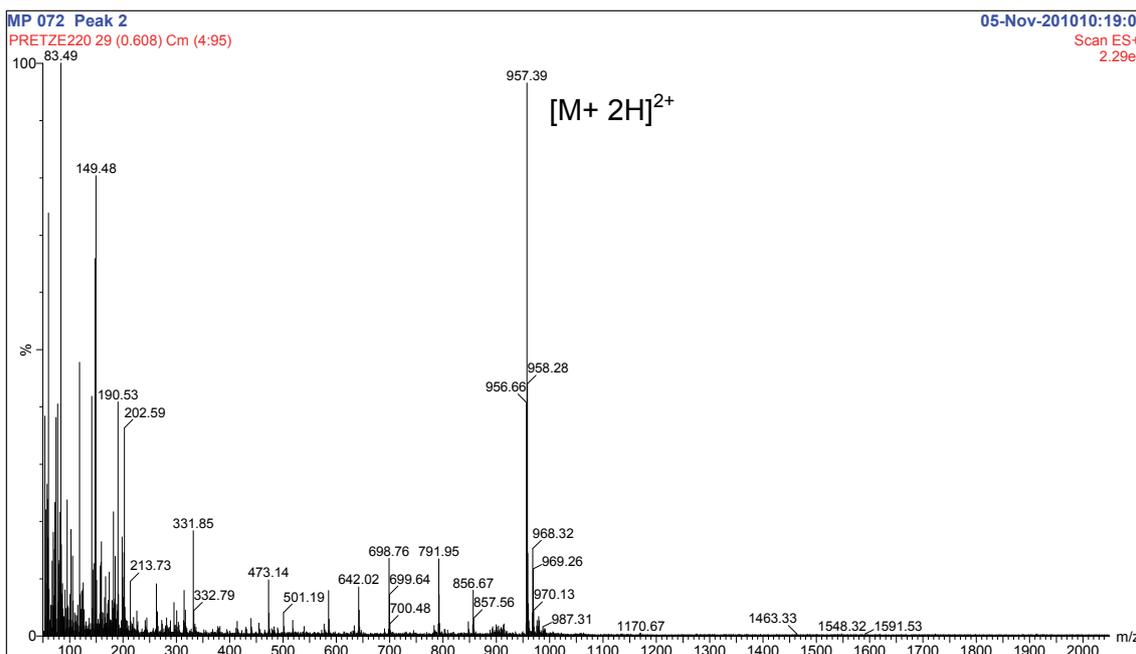


Abbildung 15: Massenspektrum des Peptids **54** – MS (ESI+): m/z : 957 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$

Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\mathbf{54}$

Für die anschließende Radiosynthese wurde der Markierungsbaustein $[^{18}\text{F}]\text{FBAM}$ $[^{18}\text{F}]\mathbf{48}$ mittels Modulsynthese automatisch hergestellt [123]. Das Peptid **53** wurde in $100\ \mu\text{l}$ Sørensen-Phosphat-Puffer gelöst und mit $100\ \mu\text{l}$ des in Acetonitril gelösten Markierungsbausteins $[^{18}\text{F}]\mathbf{48}$ versetzt und für 1 Stunde bei 60°C geschüttelt. Die

anschließenden HPLC-Analysen zeigten bei drei Versuchen Umsatzraten von [¹⁸F]FBAM ≥ 90%. Die Retentionszeit von [¹⁸F]**54** (t_R = 11,2 min, Gradient 1) stimmt mit der von **54** überein (Vgl. Abschnitt 6.4).

*Radiopharmakologische Evaluierung des Peptids [¹⁸F]**54***

Um erste Aussagen über die Stabilität des Peptids [¹⁸F]**54** treffen zu können, wurden Stabilitätsuntersuchungen mit Glycin/HCl-Puffer (pH 2,0), Trypsin und Rattenplasma durchgeführt. Dazu wurden 100 µl von [¹⁸F]**54** in Sørensen-Phosphat-Puffer mit 400 µl der jeweiligen Untersuchungsmedien versetzt und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Stabilitätsuntersuchung von [¹⁸F]**54** bei 37°C für 1 h

Aktivität [¹⁸ F] 54	Untersuchungsmatrix	Intaktes Peptid nach Inkubation
33 MBq	Glycin/HCl (pH 2,0)	7%
20 MBq	Trypsin (c = 0,1 mM)	16%
27 MBq	Chymotrypsin (c = 0,1 mM)	32%
4 MBq	Rattenplasma	15%

Im Allgemeinen sind Metaboliten von Peptiden etwas hydrophiler und sollten daher eine geringere Retentionszeit als das Ausgangspeptid bei RP-HPLC-Analysen zeigen. Im Gegensatz dazu, wurde jedoch in allen Stabilitätsuntersuchungen ein lipophilerer Metabolit gefunden, der sich mit ≥ 70% der Gesamtaktivität gebildet hatte. Ausgehend von diesem Befund wurde auch die nicht-radioaktive Referenzsubstanz **54** mit Trypsinlösung versetzt und es wurde der gleiche lipophilere Metabolit gefunden. Massenspektrometrische Untersuchungen zeigten ein Signal von m/z = 638, welches der zweifachen Masse von FBAM entspricht. Somit kam es zur Rückreaktion unter wahrscheinlicher Dimerisierung von FBAM. Dieser Versuch bestätigt Hinweise aus der Literatur, dass die Michael-Addition ein reversibler Prozess ist [124, 125].

Das Peptid [¹⁸F]**54** hat eine sehr geringe Stabilität in allen untersuchten Medien gezeigt und ist somit für eine In-vivo-Anwendung nicht geeignet.

Nach Auswertung von HPLC-Analysen wurde beobachtet, dass bei längerer Lagerung des von der Festphase abgespaltenen Peptids **53** bei -65°C eine neues, lipophileres Produkt entsteht, welches nicht mehr die gewünschten Reaktionseigenschaften besaß, um die Michael-Addition mit dem Markierungsbaustein einzugehen. Höchstwahrscheinlich ist durch Oxidation das Disulfid-Dimer entstanden. Um die Disulfid-Bindung zu reduzieren und damit wieder das reaktionsfähige Peptid **53** zurückzugewinnen, wurde das Dipeptid mit Tris-(carboxyethyl)-phosphan (TCEP,

0,02 M) versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Reaktion lag wieder **53** vor, welches seine ursprüngliche Retentionszeit besaß und wieder über seine zu einer Michael-Addition befähigte SH-Gruppe verfügte.

3.2.2 Entwicklung einer selektiven und irreversiblen ^{18}F -Markierungsstrategie für das SNEW-Peptid

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Markierung mit ^{18}F SFB und ^{18}F FBAM in Bezug auf die Stabilität von ^{18}F **54** war es notwendig, eine neue Strategie zur Markierung des SNEW-Peptids auszuarbeiten. Es sollte eine selektive, schnelle und irreversible Reaktion angewendet werden. Dazu wurde die 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition ausgewählt, die in der Literatur auch als Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) bezeichnet wird. Von den dabei gebildeten 1,2,3-Triazolen ist bekannt, dass sie Peptidbindungen imitieren und so markierte Peptide in ihrer biologischen Aktivität unter Umständen nicht sehr stark verändern [126] und deren biologische Stabilität erhöhen können [127].

Es soll jedoch darauf aufmerksam gemacht werden, dass die gewählte Huisgen-Cycloaddition zwar irreversibel ist, doch nach den Literaturangaben und den in dieser Dissertation dargestellten Ergebnissen den Ansprüchen einer Click-Reaktion nicht zwingend genügt, wenn die Definition zugrunde gelegt wird, die KOLB *et al.* seinerzeit für eine Click-Reaktion aufgestellt haben [128]. Charakteristisch für die „Click“-Chemie sind hohe Ausbeuten, geringe, nicht störende Nebenprodukte, die ohne chromatographische Trennung entfernt werden können, milde Reaktionsbedingungen und eine modulare und breite Anwendung [128]. Auch ein verwendeter Katalysator sollte leicht vom Produkt abzutrennen sein.

Die Optimierung der Bedingungen für die Huisgen-Cycloaddition ist für jede neue Anwendung sorgfältig zu untersuchen und das Verhältnis der Reaktionspartner in Bezug auf Katalyse- und Komplexbildungsreagenzien genauestens einzustellen. Gerade bei Radiomarkierungen mit Fluor-18, bei denen mit geringen Stoffmengen (im pikomolaren Bereich) gearbeitet wird, haben das Verhältnis der Reaktionspartner und der zeitliche Ablauf der Markierungsreaktion enormen Einfluss auf das Gelingen der Reaktion.

3.2.2.1 Entwicklung des Markierungsbausteins ^{18}F BFP – 1-(But-3-ynyl)-4-(3- ^{18}F fluorpropyl)piperazin (^{18}F 57)

Die Entwicklung eines neuen Markierungsbausteins für die Huisgen-Cycloaddition wurde unter dem Aspekt durchgeführt, dass er folgende positive Eigenschaften für die Markierung von Peptiden haben sollte:

- möglichst niedrige Molmasse, um das Peptid nur gering zu verändern und andererseits gute Handhabung bei Radiosynthesen zu gewährleisten
- eine hohe Hydrophilie im Hinblick auf Proteinmarkierung, um Konjugation unter physiologischen Bedingungen durchzuführen
- einfache und kostengünstige Ausgangsstoffe
- unkomplizierte Syntheseprozedur
- leichte Kartuschenreinigung durch unterschiedliche Eigenschaften von Präkursor und Markierungsbaustein
- gute Abgangsgruppe für hohe radiochemische Ausbeuten
- Entwicklung einer automatischen Modulsynthese

Alle diese Eigenschaften wurden bei der Entwicklung des neuen Markierungsbausteins [¹⁸F]BFP (**[¹⁸F]57**) berücksichtigt und vereint (Schema 23) [129].

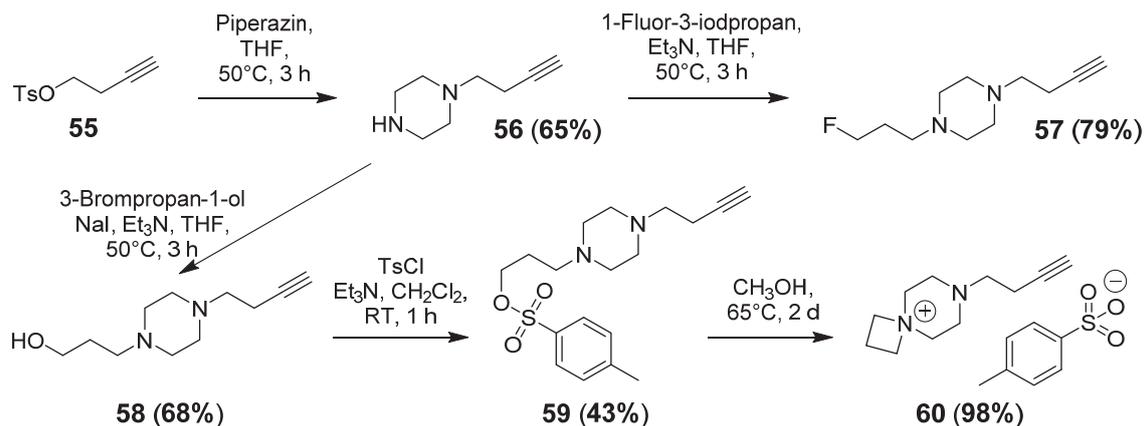
Synthese der Referenzsubstanz 57

Um dem Markierungsbaustein hydrophile Eigenschaften zu verleihen, wurde Piperazin als Grundgerüst ausgewählt. Im ersten Schritt wurde 4-Tosyloxybut-1-in (**55**) mit 3,5 Äquivalenten Piperazin zur Verbindung **56** umgesetzt (Schema 23). Das sekundäre Amin greift dabei als Nucleophil in einer S_N2-Reaktion am Kohlenstoff an, der als Abgangsgruppe das Tosylat besitzt. Ein Teil des Piperazins wirkt als Base und fängt die entstehende Sulfonsäure ab. Der hohe Überschuss an Piperazin führt dazu, dass nur das Monomer **56** entsteht. Bei geringerer Stoffmenge an Piperazin entstand auch vermehrt das Dimer 1,4-Di(but-3-ynyl)piperazin.

Durch Reaktion von **56** mit 1-Fluor-3-iodpropan wurde im nächsten Schritt bereits die nicht-radioaktive Referenzsubstanz **57** in einer hohen Ausbeute von 79% erhalten.

Das sekundäre Amin von **56** greift nucleophil an und der entstehende Iodwasserstoff wird mittels Triethylamin abgefangen. Das flüssige, gelbliche Produkt **57** besitzt eine Dichte von etwa 1,1 g/ml und ist im Wässrigen leicht basisch (pH ~ 8). Eine Bestimmung des logD Wertes in PBS-Puffer bei pH 7,5 ergab 0,31 ± 0,03 (n = 3) und zeigt daher eine gute Hydrophilie. In Abbildung 16 ist das ¹H-NMR-Spektrum von **57** dargestellt. Die typische Aufspaltung des Signals der CH₂-Gruppe in Nachbarschaft zum Fluoratom ist erkennbar. Des Weiteren ist ein Doppeltriplett der CH₂-Gruppe in Nachbarschaft zur Alkinfunktion und ein einwertiges Triplet der terminalen CH-Gruppe vorhanden.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 23: Syntheseroute für nicht-radioaktive Referenzsubstanz **57** von [¹⁸F]BFP und Präkursor **60**

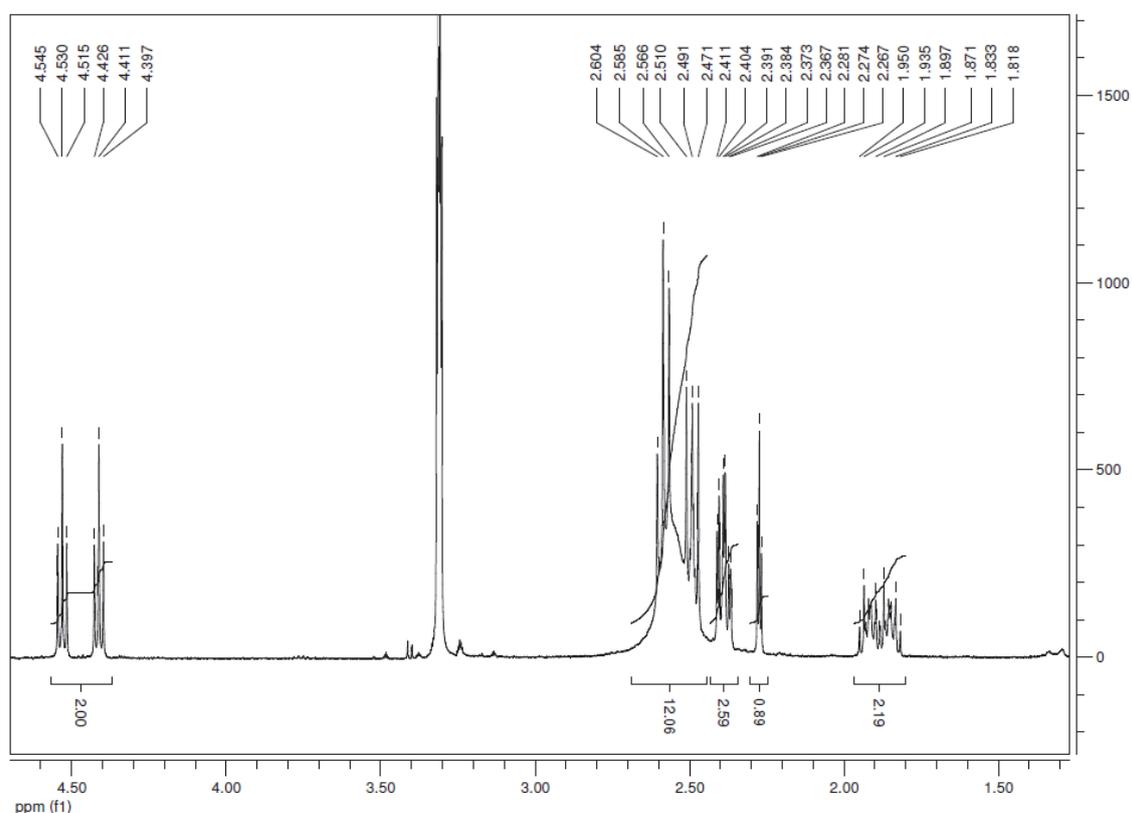


Abbildung 16: ¹H-NMR-Spektrum von Referenzsubstanz **57** aufgenommen in CD₃OD

Synthese des Präkursors **60** für die Radiomarkierung

In Schema 23 ist dargestellt, dass Verbindung **56** auch als Ausgangsstoff für den Präkursor **60** dient. In einer Finkelstein-Reaktion wird Natriumiodid mit Brompropanol umgesetzt und nach einer kurzen Reaktionszeit **56** hinzugegeben.

Die daraus erhaltene Hydroxyverbindung **58** wird anschließend mit *p*-Tosylchlorid zur Einführung der Abgangsgruppe für die Radiomarkierung umgesetzt. Beim Versuch der

Isolierung von Verbindung **59** wurde bereits beim Entfernen des Lösungsmittels beobachtet, dass sie ein starkes Bestreben aufweist, die Spiroverbindung **60** in Form des Tosylatsalzes zu bilden. In der Literatur finden sich Protokolle, in denen hohe Temperatur und Chloroform benutzt wird, um Spiroverbindungen herzustellen [130]. Bei der Verwendung von polaren Lösungsmitteln geschieht die Bildung des Spirosalzes sogar noch besser. Um diesen Prozess zu vervollständigen, wird die Verbindung **59** zwei Tage in Methanol erwärmt und anschließend mit Toluol gefällt. Das so erhaltene Salz **60** ist bei -18°C über Monate stabil und lagerbar. Von Präkursor **60** wurden Einkristalle erhalten, von denen eine Röntgeneinkristallstruktur angefertigt wurde (Abbildung 17). In dieser wird ersichtlich, dass tatsächlich eine Spiroverbindung als Salz vorliegt. Dieser Präkursor **60** ist infolge der Ringspannung in idealer Weise zur Einführung von $[^{18}\text{F}]$ Fluorid unter Öffnung des Ringes und damit zur Radiosynthese des Zielproduktes $[^{18}\text{F}]\mathbf{57}$ geeignet. Weiterhin besteht statistisch zweimal die Möglichkeit des nucleophilen Angriffs mit $[^{18}\text{F}]$ Fluorid und das Ammoniumsalz ist eine hervorragende Abgangsgruppe. Außerdem kann Spirosalz **60** simpel von $[^{18}\text{F}]\mathbf{57}$ durch geschickte Wahl von Kartuschen abgetrennt werden (siehe Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\mathbf{57}$).

In Abbildung 18 ist das ^1H -NMR-Spektrum von Präkursor **60** dargestellt. Im Aromatenbereich sind die beiden Dupletts des Tosylats zu sehen. Im Aliphatenbereich ist zum einen das Triplet der beiden gegenüberliegenden CH_2 -Gruppen des Vierrings spezifisch für Verbindung **60** und zum anderen ist das Singulett der CH_3 -Gruppe vom Tosylat erkennbar.

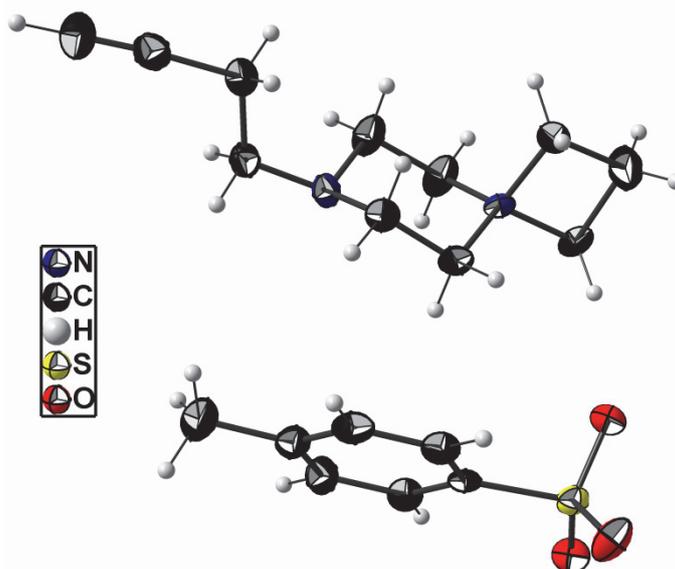


Abbildung 17: Lösung der Röntgeneinkristallstrukturanalyse von Verbindung **60**

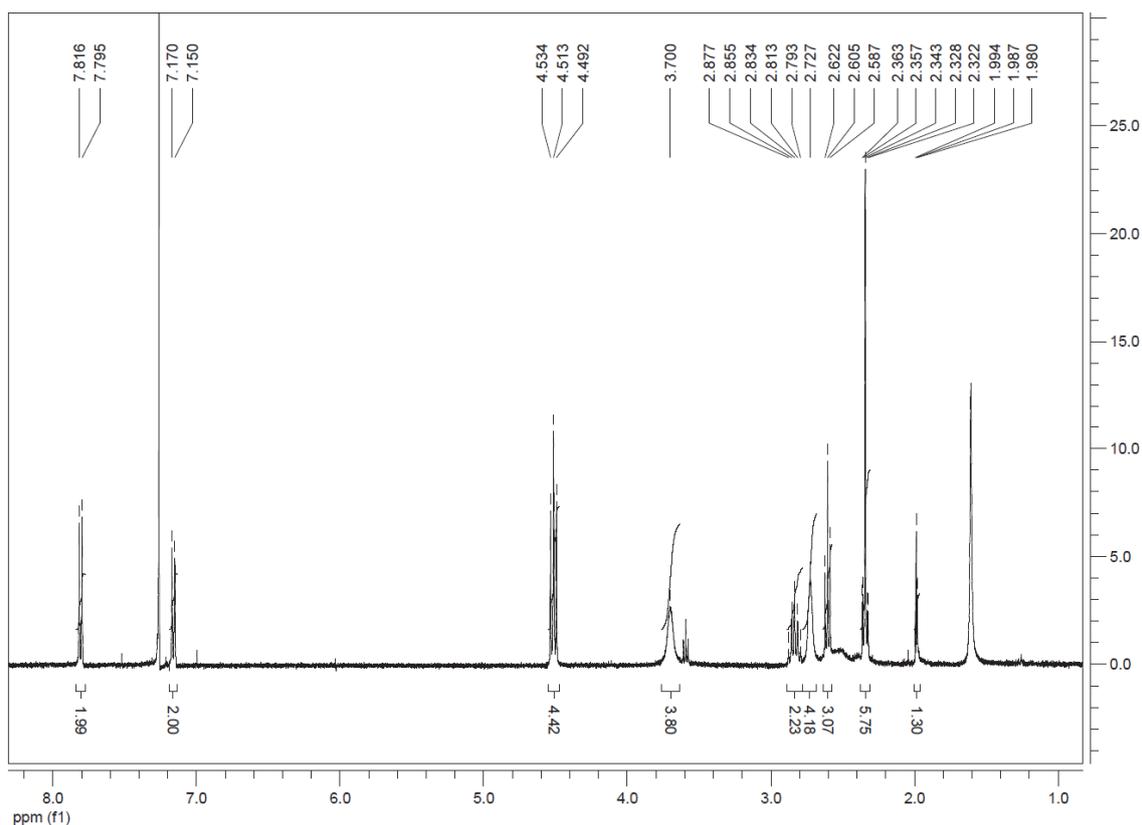
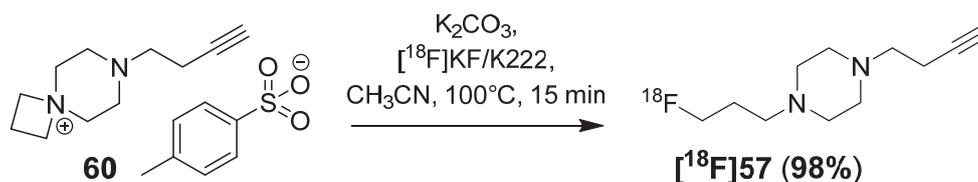


Abbildung 18: ^1H -NMR-Spektrum von Präkursor **60** aufgenommen in CDCl_3

3.2.2.2 Entwicklung der Radiosynthese des Markierungsbausteins [^{18}F]**57**

Manuelle Radiosynthese für [^{18}F]**57**

Manuelle Radiomarkierungen wurden durchgeführt (Schema 24), um die optimalen Reaktionsbedingungen herauszuarbeiten. Die Bedingungen aus der Diplomarbeit von GROßE-GEHLING wurden im Wesentlichen übernommen und für die Radiomarkierung von **60** eingesetzt [130]. Bei drei manuellen Versuchen in 500 μl Acetonitril bei 100°C nach 15 Minuten wurden Umsatzraten von [^{18}F]Fluorid von über 98% erzielt (Schema 24). Die Einwaage des Präkursors **60** wurde variiert (1–5 mg) und eine optimale Masse von 3 mg gefunden. Durch die erzielten hohen Umsätze waren keine weiteren Optimierungen nötig. Die Erwartungen wurden bestätigt, dass die Spiroverbindung **60** durch die Ringspannung ein idealer Reaktionspartner für die Einführung von [^{18}F]Fluorid ist.



Schema 24: Radiosynthese des Markierungsbausteins [^{18}F]BFP [^{18}F]**57**

Zur Ausarbeitung einer Kartuschenreinigung für [¹⁸F]BFP [**¹⁸F**]**57** wurden zunächst unterschiedliche C-18 Kartuschen verwendet (CHROMAFIX® C18, Waters Sep-Pak® Light C18, Merck LiChrolut® RP-18e, Phenomenex Strata® C18-T). Dafür wurde die Reaktionslösung eingeeignet, 5 ml Wasser zugegeben und auf eine Kartusche aufgetragen. Durch Elution mit 12 ml Wasser gelang es, restlichen Präkursor **60** und nicht umgesetztes [¹⁸F]Fluorid zu entfernen. Anschließend wurde [¹⁸F]BFP [**¹⁸F**]**57** mittels Ethanol eluiert mit radiochemischen Reinheiten von 84–99%. Die spezifische Aktivität betrug jedoch nicht mehr als 2 GBq/μmol. Weiterhin wurden geringe Aktivitäten an unumgesetzten [¹⁸F]Fluorid in den Produkteluaten gefunden, wenn Strata® C18-T- und Sep-Pak® Light C18-Kartuschen verwendet wurden.

Zur weiteren Verbesserung der (radio-)chemischen Reinheit und Erhöhung der spezifischen Aktivität von [¹⁸F]BFP, wurde eine Kartuschenreinigung mit LiChrolut® Kieselgel-Kartuschen untersucht. Dazu wurde die Reaktionslösung mit 2 ml Acetonitril verdünnt, auf die Kieselgel-Kartuschen aufgetragen und mit 3 ml Acetonitril gespült, um lipophile Verunreinigungen zu entfernen. [¹⁸F]BFP wurde dann mit einer Mischung aus 1,5 ml Acetonitril/Wasser (v:v = 1:1) mit radiochemischen Reinheiten ≥ 97% eluiert (Abbildung 19). Unumgesetzter Präkursor **60** und [¹⁸F]Fluorid blieben dabei auf der Kartusche zurück. Die spezifische Aktivität betrug bei dieser Methode 7 ± 4 GBq/μmol ausgehend von 2–6 GBq [¹⁸F]Fluorid.

Die Reinigung mittels Kieselgelkartuschen erwies sich daher als Methode der Wahl. Das Lösungsmittel vom Elutionsprozess wurde anschließend bei 90°C im Stickstoffstrom entfernt. Dabei fiel auf, dass die Verbindung [**¹⁸F**]**57** beim Verdampfen des Ethanols sehr flüchtig war, aber bei Verwendung von Acetonitril/Wasser als Eluat in der optimierten Kartuschenreinigung nur sehr geringe Aktivitätsverluste auftraten.

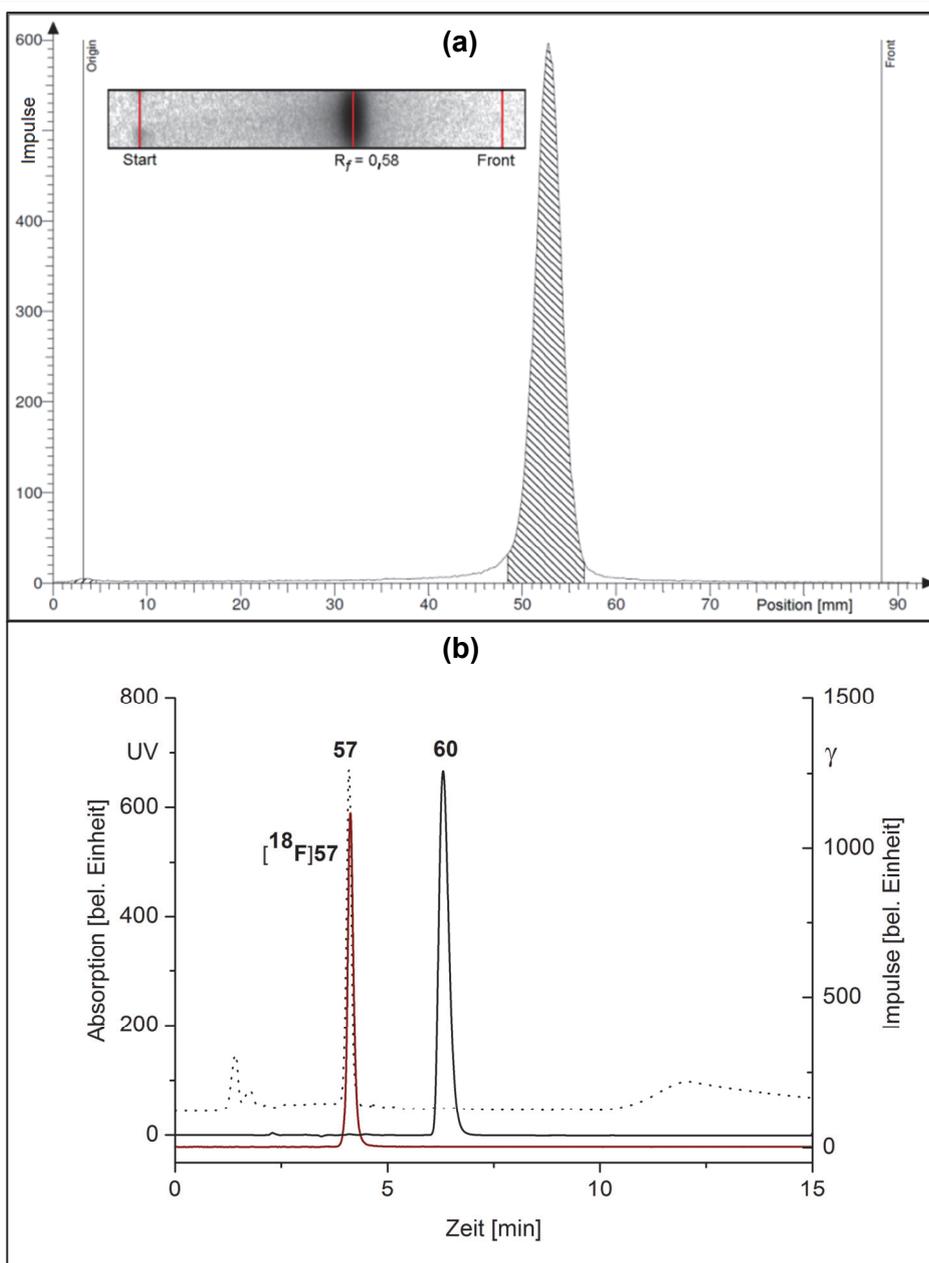


Abbildung 19: (a) Radio-DC (Eluent: CH₃OH) von gereinigtem [¹⁸F]BFP [¹⁸F]57; (b) (Radio-)HPLC Chromatogramme des Endprodukts [¹⁸F]BFP ([¹⁸F]57) (γ-Spur, rote Linie, $t_R = 4,2$ min), Referenzsubstanz **57** (UV-Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,2$ min) und des Präkursors **60** (UV-Spur, durchgehende Linie, $t_R = 6,5$ min)

Entwicklung einer Modulsynthese für Verbindung [¹⁸F]57

Nachdem in manuellen Radiosynthesen optimale Bedingungen für die Synthese und Reinigung des Markierungsbausteins bestimmt wurden, wurde eine Modulsynthese geplant und umgesetzt. Der Vorteil einer Modulsynthese besteht im Wesentlichen im geringeren Aufwand bei der Durchführung und die Möglichkeit mit höheren Aktivitäten arbeiten zu können, da die Module durch die PET-Boxen sehr stark abgeschirmt sind. Somit wird die Herstellung von Markierungsbausteinen einfacher und sicherer.

Die Ergebnisse der manuellen Synthesen wurden auf das automatische Synthesemodul TracerLab F_{XFN} übertragen (Vgl. Abschnitt 4.1.5). Dabei wurden in einer Gesamtssynthesezeit von etwa 40 Minuten ausgehend von 4 ± 2 GBq [¹⁸F]Fluorid $1 \pm 0,5$ GBq [¹⁸F]BFP erhalten. Die RCA (Gesamtausbeute) von $31 \pm 9\%$ (d. c., n = 8) von [¹⁸F]57 im Vergleich zu dem sehr hohen ¹⁸F-Umsatz kann mit einem Aktivitätsverlust im Modul durch Adsorption von [¹⁸F]Fluorid an Gefäßwänden und Schläuchen, Waschen, Elution und anschließender, manueller Trocknung erklärt werden. Bei der manuellen Synthese lag die Gesamtausbeute bei $50 \pm 10\%$ bei gleicher Synthesezeit.

Diese Ausbeuten zur Radiosynthese von [¹⁸F]57 sind vergleichbar mit der Synthese von [¹⁸F]FBAM (40 min, 29% RCA, d. c.) [123]. Im Gegensatz dazu wird [¹⁸F]SFB in einer fast doppelt so langen Zeitspanne von 70 Minuten mit 25–38% radiochemischer Ausbeute (d. c.) synthetisiert [120].

In Abbildung 20 ist der Aufbau des Synthesemoduls für die in der Arbeit verwendeten Markierungsbausteine [¹⁸F]AFP und [¹⁸F]BFP mit den verwendeten Gefäßen, Ventilen und Schläuchen dargestellt. Das Programm und die Bedienung von TRACERlab F_{XFN} wurde angepasst. Die maßgebliche Veränderung war eine direkte Schlauchverbindung zwischen Ventil 14 und 17, um die Reaktionsmischung auf der Kieselgelkartusche zu fixieren. Bemerkenswert ist, dass die [¹⁸F]Fluorid-trocknung (etwa 20 min) am meisten Zeit verbraucht, während die folgende Reaktion innerhalb von 15 Minuten abläuft und der anschließende Reinigungsschritt 3 Minuten dauert.

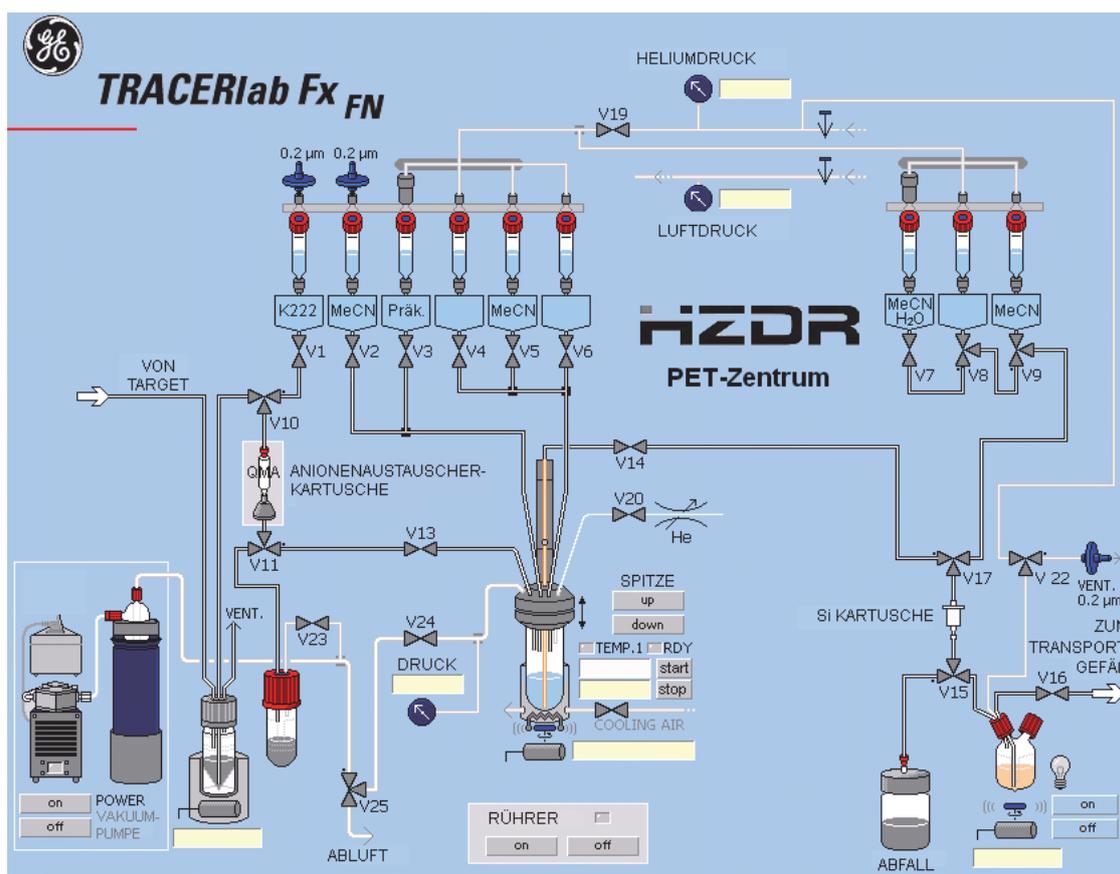


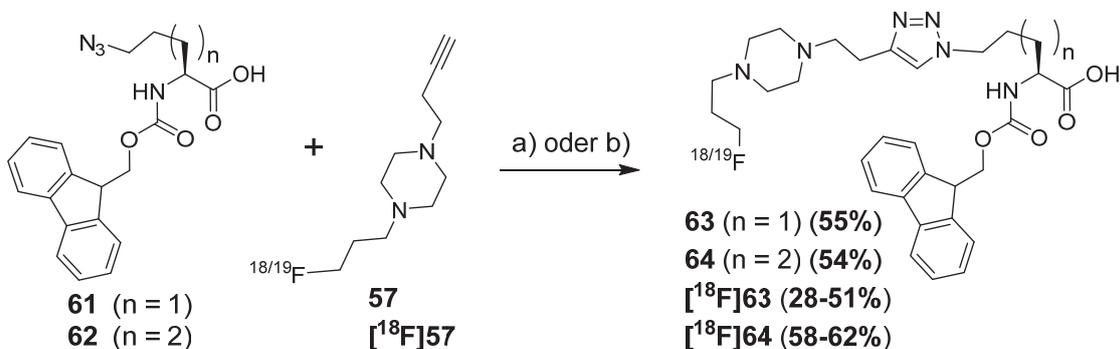
Abbildung 20: Modulaufbau für die automatischen Synthesen der Markierungsbausteine [^{18}F]AFP und [^{18}F]BFP

In der Literatur finden sich Untersuchungen im Hinblick auf die metabolische Stabilität von kovalent primär gebundenem Fluor an Kohlenstoff in Alkylketten [19] und von sekundär gebundenem Fluor an Cyclobutylderivaten [131]. Im Allgemeinen steigt die Radiodefлуорierung *in vitro* und auch *in vivo* von Fluorethyl- über Fluorpropyl- zu Fluormethylgruppen. Um abschätzen zu können, wie stabil die Fluorpropylkette des Markierungsbausteins [^{18}F]BFP ist, wurden Stabilitätsuntersuchungen *in vitro* durchgeführt. Eine Lösung von [^{18}F]57 in PBS-Puffer (pH 7,5) wurde dazu bei 37°C für 60 Minuten mit Rattenplasma und -blut versetzt. Danach durchgeführte Radio-DC- und HPLC-Analysen zeigten keine Radiodefлуорierung oder andere Metabolisierung von [^{18}F]57, 99% der Substanz lagen unverändert vor.

3.2.2.3 Radiomarkierung von Aminosäuren mittels [^{18}F]57

Nachdem die Radiomarkierung von [^{18}F]BFP erfolgreich etabliert war und auch die metabolische Stabilität *in vitro* gezeigt wurde, wurde das Potential zur Markierung von Azid-funktionalisierten Aminosäuren mittels Huisgen-Cycloaddition untersucht. Zunächst wurden diese Azid-funktionalisierten Derivate nach verschiedenen Synthese-

routen hergestellt [132]. Diese Aminosäuren enthalten eine Azid-funktionalisierte Alkylkette, die bei späterem Einbau in Peptide aus dem Molekül herausragt und so sterisch weniger gehindert ist. Fmoc-Azido-L-norvalin (Anv) **61** und Fmoc-Azido-L-norleucin (Anl) **62** wurden zu diesem Zwecke synthetisiert und mit **57** in Gegenwart von Kupfersulfat und Natriumascorbat umgesetzt, um die nicht-radioaktiven Referenzsubstanzen zu erhalten (Schema 25).



Schema 25: Reaktion von **57** und $[^{18}\text{F}]\mathbf{57}$ mit N^α -Fmoc- N^0 -azido-L-amino-säuren **61** und **62**.

(a) *t*-BuOH/H₂O/CH₃CN (1:1:1), RT, 2 d, CuSO₄, Na-ascorbat

(b) DMF/Tris-HCl Puffer, 60°C, 1 h, TBTA, CuSO₄, Na-ascorbat (1,2:1:10) (Radiosynthese)

Nachdem die Bildung der Referenzsubstanzen **63** und **64** mittels MS-Analysen (Abbildung 22, Abbildung 23) bestätigt waren, wurden die Reaktionen von **61** und **62** mit $[^{18}\text{F}]\text{BFP}$ in Gegenwart von TBTA [50], Kupfersulfat und Natriumascorbat durchgeführt und der Verlauf mittels Radio-HPLC- und Radio-DC-Analysen verfolgt (Abbildung 21). TBTA wird als Komplexbildner eingesetzt, welcher Kupfer der Oxidationstufe +1 stabilisiert und dieses dadurch länger für die Reaktion verfügbar macht. Es wurden radiochemische Ausbeuten bei der Reaktion von $[^{18}\text{F}]\text{BFP}$ mit Fmoc-Anv **61** zu $[^{18}\text{F}]\mathbf{63}$ mit 28–51% ($n = 3$) erzielt und von $[^{18}\text{F}]\text{BFP}$ mit Fmoc-Anl **62** zu $[^{18}\text{F}]\mathbf{64}$ mit 58–62% ($n = 3$).

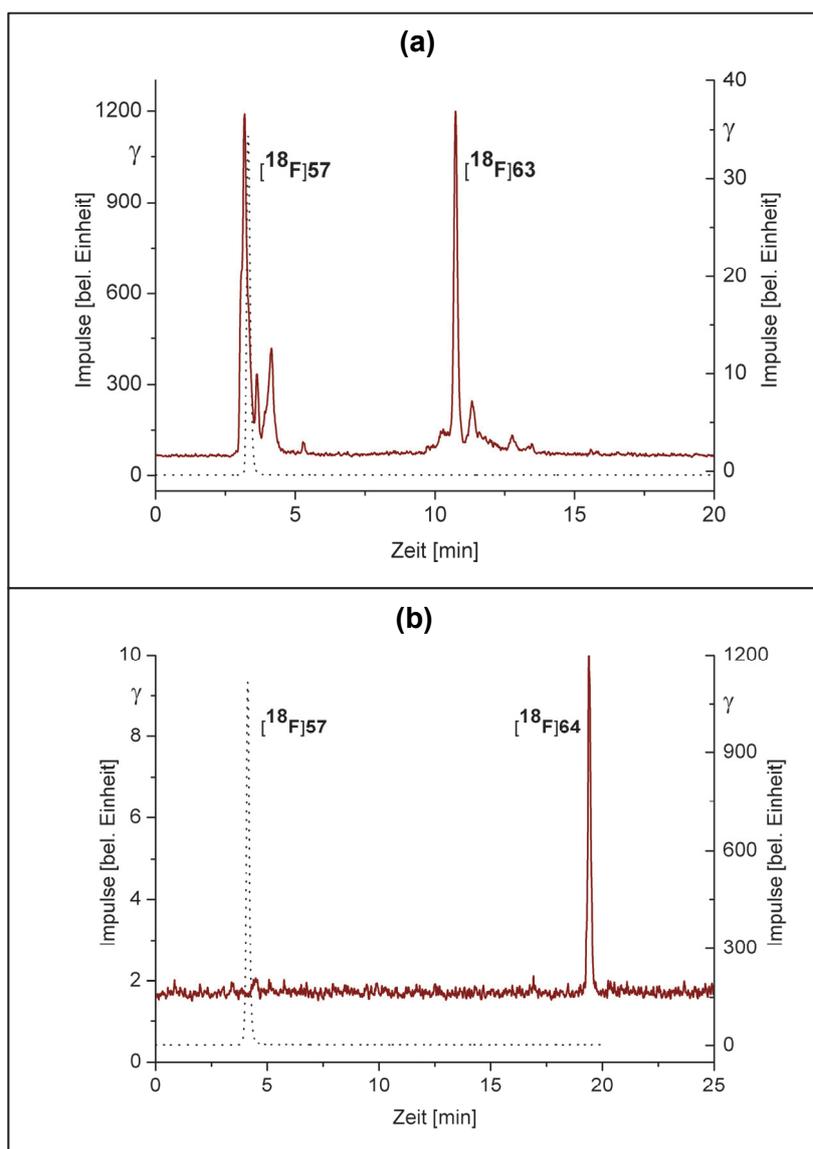


Abbildung 21: Radio-HPLC Chromatogramme (a) von $[^{18}\text{F}]\text{BFP } [^{18}\text{F}]\text{57}$ (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 3,3$ min) und von der Reaktionslösung von $[^{18}\text{F}]\text{BFP } [^{18}\text{F}]\text{63}$ (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 10,7$ min); (b) von $[^{18}\text{F}]\text{BFP } [^{18}\text{F}]\text{57}$ (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,2$ min) und von gereinigtem $[^{18}\text{F}]\text{BFP } [^{18}\text{F}]\text{64}$ (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 19,8$ min)

Diese erfolgreichen Ergebnisse bilden die Grundlage für die Markierung von Peptiden, da die entsprechenden Aminosäuren **61** und **62** leicht zugänglich sind, mittels Festphasenpeptidsynthese sehr einfach in Peptide eingebaut werden können und somit den Zugang zu Azid-funktionalisierten Peptiden für die Huisgen-Cycloaddition ermöglichen. Aufgrund der höheren Ausbeuten bei der Huisgen-Cycloaddition, wurde jedoch nur Fmoc-Anl **62** bei den Peptidsynthesen verwendet.

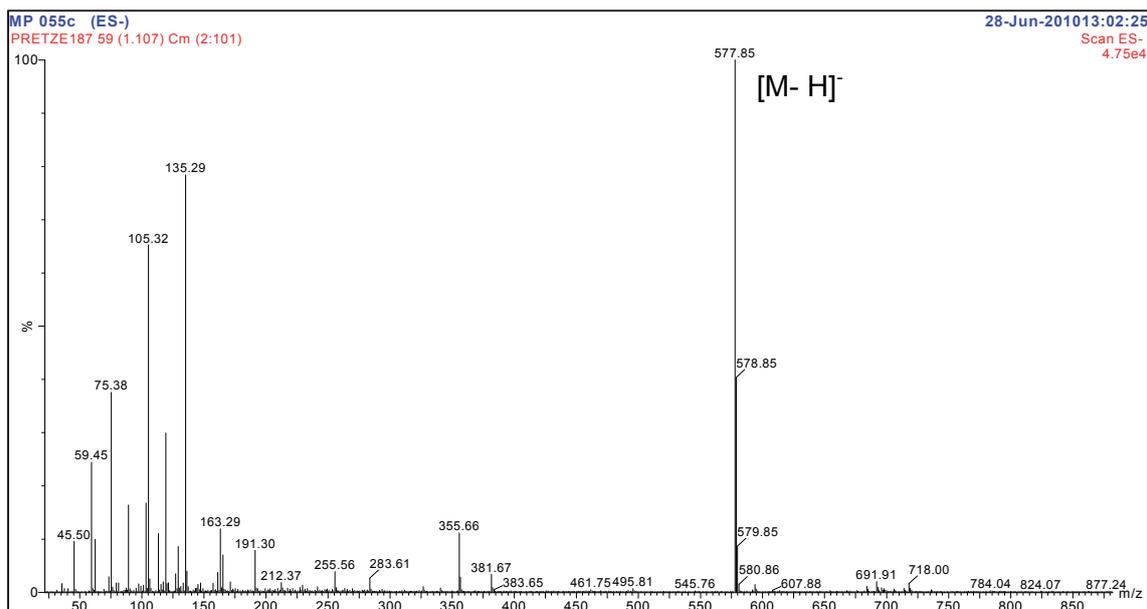


Abbildung 22: Massenspektrum von Aminosäure 63 – MS (ESI-): m/z : 577 [M - H]⁻

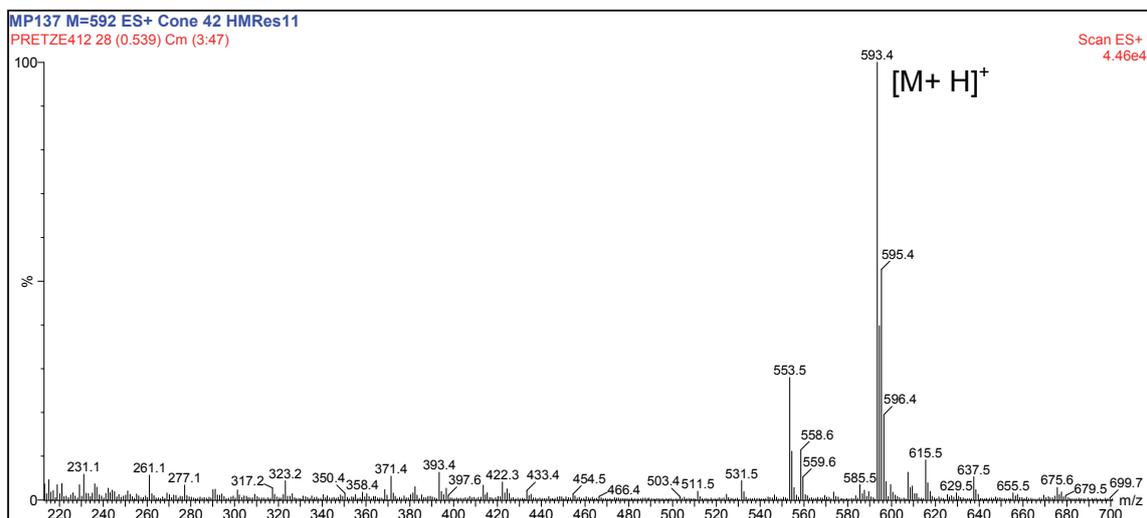


Abbildung 23: Massenspektrum von Aminosäure 64 – MS (ESI+): m/z : 593 [M + H]⁺

3.2.3 Anwendung von [^{18/19}F]57 zur Markierung von SNEW-Peptiden

3.2.3.1 Nicht-radioaktive Synthese der Referenzsubstanz 67

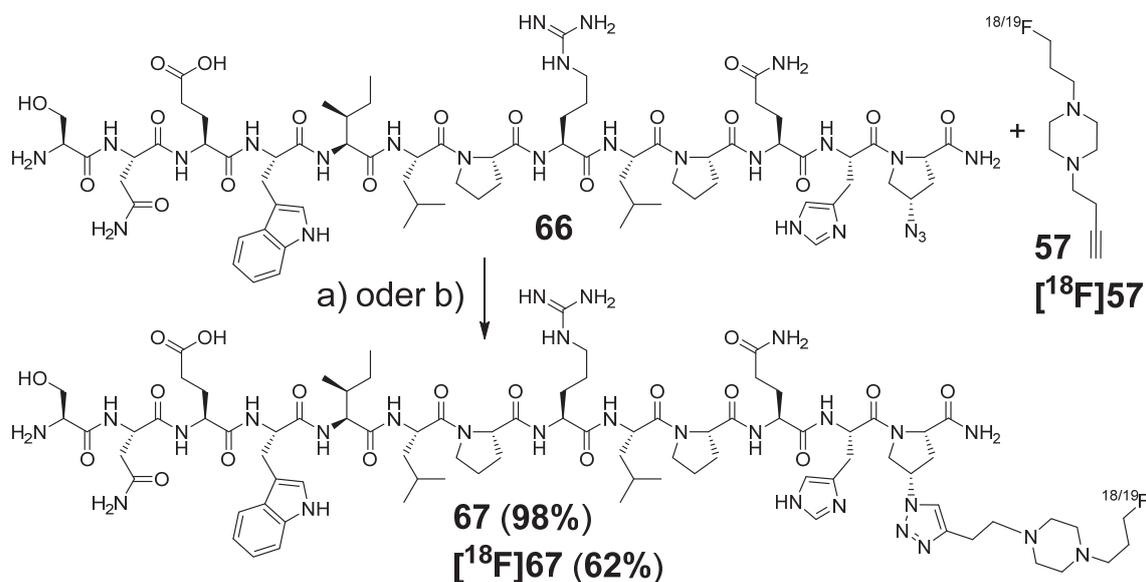
Da die Huisgen-Cycloaddition von [¹⁸F]BFP mit Beispiel-Aminosäuren erfolgreich war, folgte als nächster Schritt die Synthese und Radiomarkierung von SNEW-Peptiden mittels [¹⁸F]BFP. Das SNEW-Peptid besitzt seine wichtigsten Aminosäuren für die Affinität zum EphB2-Rezeptor am N-Terminus [90], deshalb wurde auch hier ausschließlich die Derivatisierung mit Azid-funktionalisierten Aminosäuren am C-Terminus durchgeführt.

Zuerst wurde das Präkursor-SNEW-Peptid 66 mit 4-(S)-azido-L-prolyl-Rest (Azp) (65) hergestellt. Dazu wurde das Rink-Amid-Harz manuell mit Azp 65 beladen

(Abschnitt 4.1.9). Anschließend wurde die automatische Peptidsynthese von SNEWILPRLPQH-Azp **66** durchgeführt.

Peptid **66** wurde anfangs mit Reagenz K [133] vom Harz abgespalten, doch auch die alternative Abspaltreagenz TFA/TIS/H₂O (v:v = 95:2,5:2,5) wurde erfolgreich angewendet [134]. Die Abspaltung mittels TFA/TIS/H₂O bei Raumtemperatur dauert mit vier Stunden etwas länger, ist aber bequemer in der Handhabung. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC und anschließender Lyophilisierung wurde Peptid **66** für weitere Versuche bei -65°C gelagert. Die Identität des Peptids wurde mittels massenspektrometrischer Auswertung bestätigt.

Als nächstes wurde die selektive Huisgen-Cycloaddition angewendet. Für die Herstellung der nicht-radioaktiven Referenz wurde lyophilisiertes **66** in Phosphatpuffer gelöst. Dann wurde BFP **57** im Überschuss zur Reaktionslösung gegeben und anschließend Kupfersulfat und Natriumascorbat. Die Lösung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, anschließend filtriert und durch präparative HPLC gereinigt. Die Ausbeute von **67** lag bei 98% und die Identität von **67** wurde massenspektrometrisch bestätigt (Vgl. Abschnitt 3.2.3.4, Abbildung 27).



Schema 26: Syntheseroute zu SNEW-Peptid **67**/[¹⁸F]**67**. (a) Puffer/Ethanol (1:1), RT, 30 min, CuSO₄, Na-ascorbat; (b) Puffer, 60°C, 1 h, TBTA, CuSO₄, Na-ascorbat (6:1:10) (Radiosynthese)

3.2.3.2 Radiomarkierung des SNEW-Peptids mittels [¹⁸F]**57** in Lösung

Die Bedingungen aus den Beispielmarkierungen der Aminosäuren (Abschnitt 3.2.2.3) wurden jetzt auf die Markierung von Peptid **66** übertragen. So wurden TBTA, Kupfersulfat und Natriumascorbat im Stoffmengenverhältnis 6:1:10 (mol:mol) zu einer Lösung aus SNEW-Peptid **66** (1 Äquivalent) in Sørensen-Phosphat-Puffer (pH 7,2) und

[¹⁸F]BFP [¹⁸F]**57** (Schema 26) gegeben. Zur weiteren Optimierung wurden die Reaktionszeiten (10, 30, 60 min) sowie die Temperatur (RT, 40, 50, 60°C) und die Masse an Peptid **66** (100–600 µg) variiert. Die Bildung von [¹⁸F]**67** wurde mittels Radio-HPLC und Radio-DC kontrolliert.

Tabelle 4: Optimierung der Radiomarkierungsbedingungen für [¹⁸F]**67**

Masse [µg] Peptid 66	T [°C]	Umsatz von [¹⁸ F] 57			RCR	Ausbeute [¹⁸ F] 67 (d. c.)
		10 min	30 min	60 min		
250	25		17%			
280	40		31%			
500	40	7%	16%			
500	60	11%	24%	39%	90%	17%
580	60	7%	8%	19%		
170	60			76%		
120	50			72%		
100	50			51%	83%	22%
190	50			57%	57%	23%
170	60			91%	>98%	62% ^a

^aZugabe von TBTA und Reinigung mittels SEC

Optimale Reaktionsbedingungen wurden bei Peptidkonzentrationen zwischen 0,3–0,5 mg/ml bei 60°C für 60 Minuten gefunden (Tabelle 4). Bei höheren Peptidkonzentrationen bildeten sich mehr unlösliche Rückstände in der Reaktionsmischung, welche wahrscheinlich als Triazol-Kupfer-Spezies anzusehen sind [44].

Eine Reinigung des markierten Peptids [¹⁸F]**67** vom Präkursorpeptid **66** durch semi-präparative HPLC war möglich, jedoch erwies sich die Trennung von [¹⁸F]**67** wegen ähnlicher Retentionszeiten von [¹⁸F]**57** und [¹⁸F]**67** ($t_R = 3,3$ min für [¹⁸F]**57** und 3,8 min für [¹⁸F]**67**, Gradient 6) als problematisch (Vgl. Abschnitt 3.2.3.4, Abbildung 28). Daher wurde eine Trennung mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt, welche aufgrund der unterschiedlichen molaren Massen des Markierungsbausteins [^{18/19}F]BFP (M = 198 g/mol) im Gegensatz zum markierten Peptid (M = 1825 g/mol) möglich war. [¹⁸F]**67** wurde mit radiochemischer Gesamtausbeute von 26–87 MBq (RCA = 51–58%) und > 95% radiochemischer Reinheit erhalten (n = 3).

3.2.3.3 Radiopharmakologische Evaluierung des SNEW-Peptids [^{18}F]67

Zunächst wurde die Stabilität von [^{18}F]67 in vitro für eine Anwendung als Radiotracer untersucht, indem es eine Stunde lang mit Rattenplasma bei 37°C inkubiert wurde. Danach waren noch $\geq 81\%$ von [^{18}F]67 in der Lösung vorhanden, was durch Radio-HPLC-Analysen bestätigt wurde. Im Gegensatz zum [^{18}F]FBAM-markierten Peptid [^{18}F]54 (Vgl. Abschnitt 3.2.1.3), erwies sich das SNEW-Peptid [^{18}F]67 als stabiler (Abbildung 24).

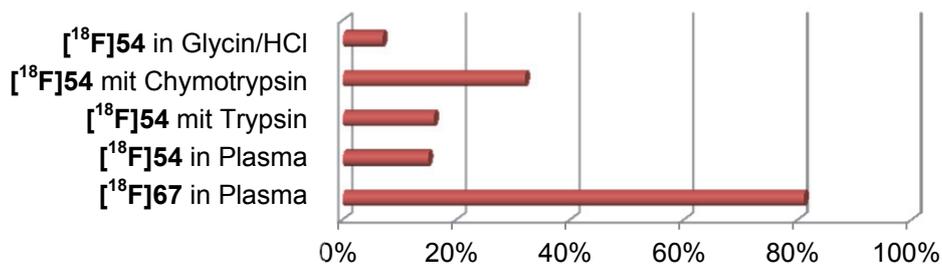


Abbildung 24: Vergleich der In-vitro-Stabilitätsuntersuchungen von [^{18}F]54 und [^{18}F]67

Erste Kleintier-PET-Untersuchungen* wurden mittels einer Wistar-Ratte (14 MBq [^{18}F]67, intravenöse Injektion) durchgeführt und ergab, dass die meiste Aktivität von [^{18}F]67 im Blut, der Leber und auch in den Lungen verblieb. Weiterhin ist auf den PET-Aufnahmen in Abbildung 26 zu erkennen, dass sich [^{18}F]67 zunächst im Nierencortex anreichert (1 min p. i.) und danach sehr schnell in die Nierenbecken transportiert wird (5 min p. i.), was auf einen sehr schnellen Abbau von [^{18}F]67 in vivo hinweist. Zusätzlich war nach zwei Stunden eine Anreicherung der Aktivität in den Knochen zu erkennen (Abbildung 25). Eine Radiodefleurierung der [^{18}F]Fluorpropylkette des Markierungsbausteins [^{18}F]57 wurde bei In-vitro-Untersuchungen nicht nachgewiesen (Vgl. Abschnitt 3.2.2.2). Trotzdem zeigten die PET-Aufnahmen eine Knochenanreicherung nach 120 Minuten durch [^{18}F]Fluorid, somit können Radiodefleurierungsprozesse nicht ausgeschlossen werden.

Durch die erhaltenen Ergebnisse wurde nachgewiesen, dass sich [^{18}F]67 nicht wie ein „normales“ Peptid verhielt, sondern einer Art Aggregation unterlag und deshalb ungeeignet für eine biologische Untersuchung in vivo ist.

*Die PET-Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Ralf Bergmann durchgeführt.

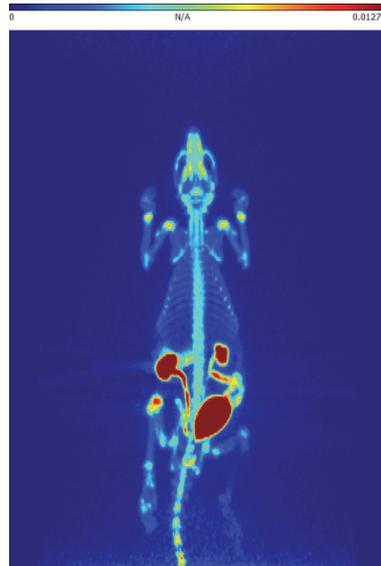


Abbildung 25: MIP von $[^{18}\text{F}]67$ in einer Wistar Ratte nach 120 min

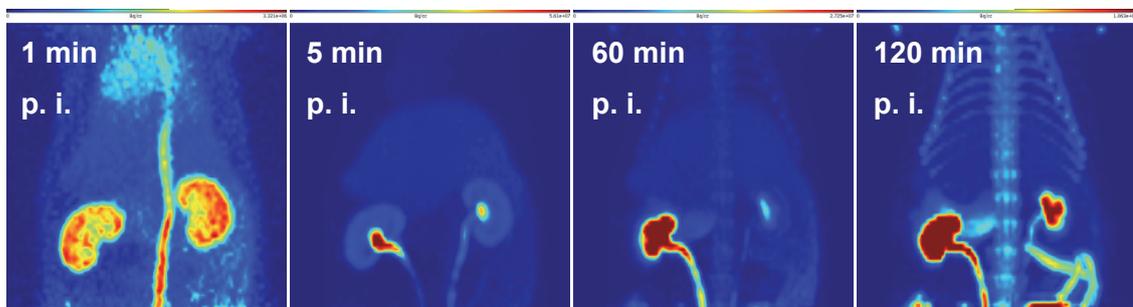


Abbildung 26: PET-Aufnahmen der Bioverteilung von $[^{18}\text{F}]67$ in einer Wistar Ratte

3.2.3.4 Der Einfluss des Kupferkatalysators auf die Natur der SNEW-Peptide

In der Literatur finden sich zahlreiche Anwendungen der Huisgen-Cycloaddition auch in Bezug auf Peptide [47, 135-138]. Problematisch sind die bei der CuAAC verwendeten Kupferionen, welche schon in geringen Konzentrationen als Zellgift wirken können und dadurch In-vivo-Untersuchungen oder In-vivo-Anwendungen unmöglich machen. Sie können außerdem durch funktionelle Gruppen in Peptiden komplexiert werden und zu veränderten physiologischen Eigenschaften führen. Daher muss darauf geachtet werden, dass die Kupferspezies nach der Reaktion komplett entfernt werden. In den meisten Veröffentlichungen zur Radiomarkierung mit Hilfe der CuAAC finden sich jedoch keine biologischen Anwendungen. Meist wird auch nicht erwähnt, ob die zytotoxischen Kupferionen von den Peptiden abgetrennt werden konnten oder es findet sich generell keine Angabe zum Kupfergehalt in den Peptiden. Laut der meisten Publikationen soll schon eine Reinigung mittels HPLC zur Abtrennung des Kupferions aus dem Endprodukt führen. In verschiedenen Veröffentlichungen finden sich nicht einmal HPLC-Chromatogramme als Nachweis, ob die erhaltenen radiomarkierten Peptide eine typische Retentionszeit zeigen (Vgl. Abschnitt 3.2.3.6, Tabelle 5) [138].

Es ist bekannt, dass bestimmte Aminosäuren wie Histidin, N-terminales Serin, Arginin oder Lysin oder Peptidsequenzen wie His-X-His-X Kupfer sehr gut komplexieren [139]. Im Azidoprolin-derivatisierten SNEW-Peptid **67** befinden sich mit Ausnahme von Lysin diese kupferkomplexierenden Aminosäuren. Außerdem ist die Peptidsequenz His-Azp-Triazol-FP in **67** vorhanden. Von Triazolen ist bekannt, dass sie Cu(I) gut komplexieren [50, 140-142]. Weiterhin kann die Piperazin-Einheit des Markierungsbausteins als schwacher Komplexbildner für Cu(II) dienen [143]. Versuche zur Komplexierung von Cu(II) mit

BFP verliefen jedoch negativ. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen, könnte das SNEW-Peptid [^{18}F]**67** durchaus Kupferspezies komplexiert haben und in aggregierter Form vorliegen. Die geringe Retention in der HPLC und die Lungenaufnahme der Aktivität eine Minute nach der Injektion bekräftigen diese Annahme.

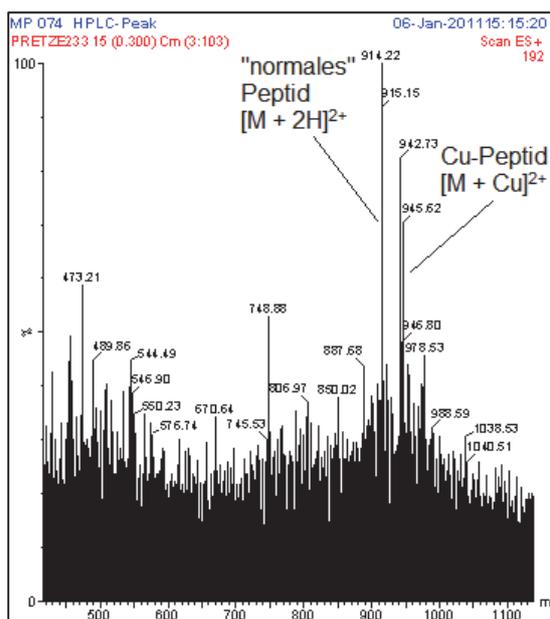


Abbildung 27: Teil des Massenspektrums von Peptid **67** nach Reaktion mit BFP in Lösung, welches eine Cu-Spezies von **67** enthält

Es existiert eine Veröffentlichung, in der das radiomarkierte Peptid ebenfalls kaum eine Retention in der HPLC zeigt [144]. Die Chromatogramme aus dieser Literaturquelle sind mit den Chromatogrammen der (Radio-)Markierung von Präkursorpeptid **66** mit [$^{18/19}\text{F}$]BFP in Lösung vergleichbar (Abbildung 28). Auch dort besitzt das vermeintlich gereinigte Peptid keine Retention in der HPLC, wie es auch bei **67**/[^{18}F]**67** der Fall ist. Aufgrund dieser Fakten wurde das lyophilisierte, blassgrüne Referenzpeptid **67** erneut untersucht und es wurde ein Peak im Massenspektrum gefunden (Abbildung 27), der darauf schließen lässt, dass Kupfer im Peptid enthalten ist.

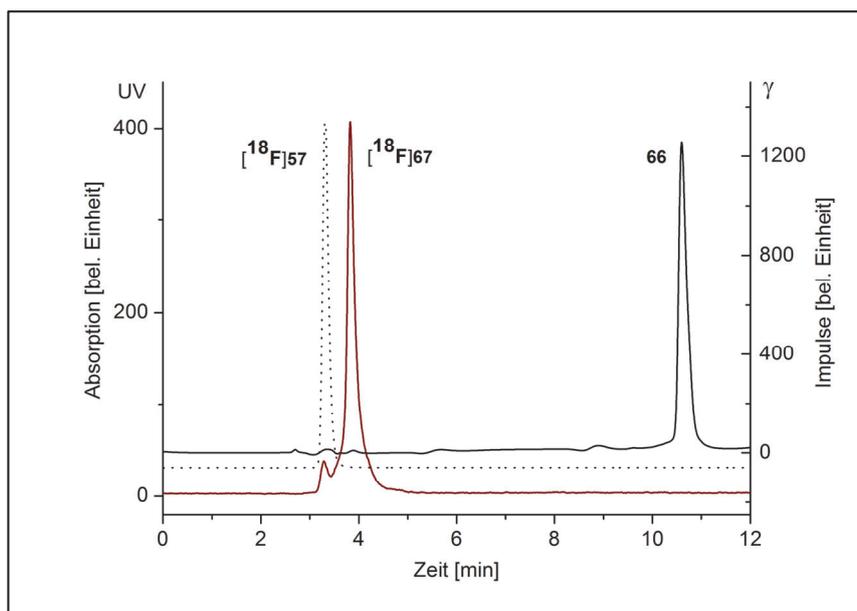


Abbildung 28: (Radio)-HPLC Chromatogramme (Gradient 6) ohne Kupferentfernung von Peptid [^{18}F]**67** (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 3,8$ min), Präkursorpeptid **66** (UV-Spur, Linie, $t_R = 10,7$ min) und [^{18}F]BFP [^{18}F]**57** (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 3,3$ min)

3.2.3.5 Markierung von SNEW-Peptid **66** mit [^{18}F]**57** unter Einsatz von Cu/C

Damit das SNEW-Peptid **67** biologisch wirksam ist, muss das für die Katalyse wirksame Cu^+ nach der Huisgen-Cycloaddition entfernt werden. Dazu sind normale HPLC- und Kartuschenreinigungen ungeeignet.

In der Literatur wurde die Möglichkeit beschrieben, die Reaktion von Aziden mit Alkinen über einen vermeintlich heterogenen Ansatz zu bewerkstelligen [145, 146]. Kupfer ist dort als $\text{CuO}/\text{Cu}_2\text{O}$ an Aktivkohle gebunden und die Cu(I) -Spezies dient dabei wiederum als Katalysator für die Huisgen-Cycloaddition. Bei kleinen organischen Molekülen wurde diese Methode erfolgreich angewendet. Es findet sich auch ein Patent in der Literatur, in dem die Arbeit von Lee *et al.* [146] aufgegriffen wird und Cu/C als Katalysator für die Huisgen-Cycloaddition bei DNS-Markierungen verwendet wird.

Basierend auf diesem Patent wurde eine Mischung aus Cu/C und C18-Phase im Verhältnis m:m = 1:1 hergestellt. Von diesem Gemisch wurden 100 μg in eine

Spritzenfritte gegeben und mit SNEW-Peptid **66** in 100 μl Puffer vermischt. Dann wurde [$^{18/19}\text{F}$]BFP [$^{18/19}\text{F}$]**57** in 100 μl Puffer dazugegeben und für 10 Minuten bei 30 Watt unter Mikrowellenbedingungen erwärmt. Die Pufferlösung wurde dann von der Festphase eluiert und mit 200 μl Puffer nachgespült. Anschließend erfolgte eine Untersuchung der $^{18/19}\text{F}$ -markierten SNEW-Peptide mittels HPLC, doch auch bei dieser Methode zeigte weder [^{18}F]**67** noch Referenz **67** eine Retention. Generell wurde kein UV-Signal später als 5 Minuten in den Chromatogrammen beobachtet. Das Präkursorpeptid **66** besitzt eine Retentionszeit von $t_{\text{R}} = 16,3$ Minuten (Gradient 2). Somit hat nicht nur [$^{18/19}\text{F}$]**67** Kupferionen aus der Festphase komplexiert, sondern wahrscheinlich auch das Präkursorpeptid **66**.

Eine Untersuchung von Cu/C-basierenden Huisgen-Cycloadditionen aus dem Jahre 2010 bestätigt den Übergang von Kupfer in die flüssige Phase und belegt überdies hinaus sogar, dass Azide Kupfer stärker komplexieren als Alkine [38]. Dies eröffnete zusätzlich die Vermutung, dass der angenommene Mechanismus der Huisgen-Reaktion nicht nur über einen Alkin-Cu-Komplex verläuft. Die Ergebnisse ließen außerdem die Vermutung zu, dass die entstandenen und untersuchten Triazole Kupfer noch besser aus der Aktivkohle lösen, als die Alkine und Azide [38][38][38][38][36, 37]. Es wurde überdies vermutet, dass ein homogener Mechanismus vorliegt [38], im Gegensatz zu den Arbeiten von LIPSHUTZ *et al.* und LEE *et al.* [145, 146].

3.2.3.6 Markierung von SNEW-Peptid **66** an der Festphase mittels **57**

Einer der Vorteile von Festphasensynthesen liegt darin, dass die Peptide bis auf die reaktive Stelle fast vollkommen geschützt vorliegen und deswegen hohe Temperaturen sowie organische Lösungsmittel angewendet werden können. Als weiterer Effekt kommt hinzu, dass das Erhitzen unter Mikrowellenbedingungen sich positiv auf die Synthese auswirkt. Die Dipolmomente der Peptidbindungen richten sich im elektrischen Feld der Mikrowellen aus, was zu einer Deaggregation und zu einem starren Peptidrückgrat führt. Reaktionspartner müssen weniger sterische Anforderungen überwinden, um mit dem Peptid zu reagieren [147]. Nach einer kurzen Abspaltphase und semi-präparativer Reinigung sowie Trocknung im Vakuum bei 40°C wird das gereinigte Peptid in gängigen Injektionslösungen formuliert und der pH-Wert für radiopharmakologische Zwecke angepasst.

Es wurde ein neuer Reinigungsweg entwickelt, der die Entfernung von Kupfer aus dem markierten SNEW-Peptid beinhaltet. Zunächst wurde Referenzpeptid **67** direkt an der Festphase synthetisiert, ohne das mit Azp derivatisierte Präkursorpeptid **66** vorher vom Harz zu spalten. Dazu wurden die vorher optimierten Bedingungen für eine Markierung

mit BFP benutzt. Lediglich das Lösungsmittel bestand hierbei aus einer Mischung aus DMF und Puffer im Verhältnis 1:1.

Die folgende HPLC-Analyse des abgespaltenen Produkts zeigte jedoch keine Unterschiede in der Retention im Vergleich zur BFP-Markierung in Lösung (Vgl. Abschnitt 3.2.3.4, Abbildung 28), was immer noch darauf hinwies, dass Kupfer im Peptid enthalten ist. Das lyophilisierte Produkt **67** war jedoch farblos und Kupfer konnte durch MS-Analysen nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 29).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde das harzgebundene Peptid **67** nach der Huisgen-Cycloaddition mit BFP mit starken Komplexbildnern wie EDTA und Phenanthrolin versetzt und bei 40°C für 30 Minuten erwärmt, zeigte jedoch nach Abspaltung weiterhin die für ein Peptid ungewöhnlich geringe Retentionszeit.

Nachdem Peptid **67** mit Bispidin (BIS, hervorragender Komplexbildner für Cu) [148] erwärmt und anschließend vom Harz abgespalten wurde, zeigte Peptid **67** tatsächlich eine höhere Retentionszeit in der präparativen HPLC ($t_R = 14,1$ min, Gradient 2, Abbildung 30) als das unbehandelte Peptid **67** ($t_R = 5,4$ min). Weiterhin wurde mittels ICP-MS der Kupfergehalt der mit Bispidin behandelten Peptide bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass pro Molekül Peptid nur 0,012–0,017 Atome Kupfer vorhanden sind. Die Peptide sind damit praktisch kupferfrei. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

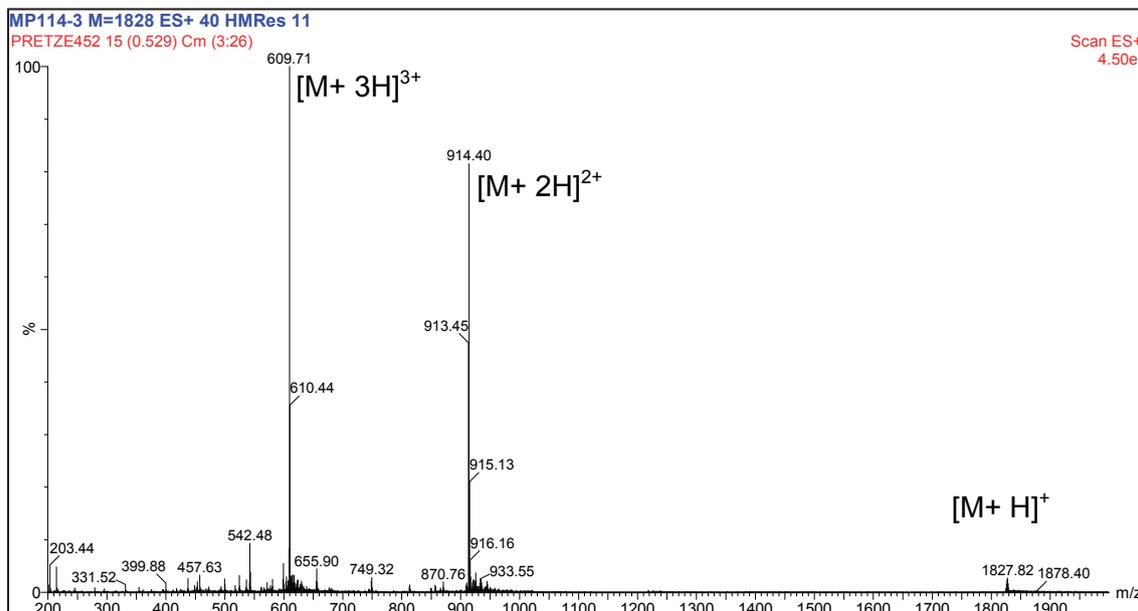


Abbildung 29: Massenspektrum des mit Bispidin behandelten, kupferfreien Peptids **67**
MS (ESI+): m/z : 1828 $[M+H]^+$, 914 $[M+2H]^{2+}$, 610 $[M+3H]^{3+}$

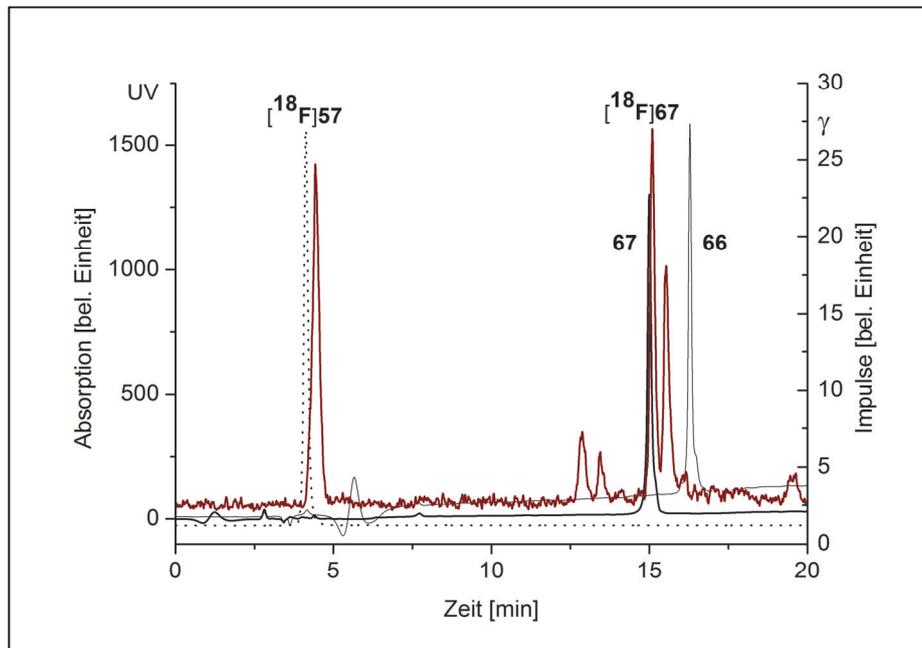


Abbildung 30: (Radio)-HPLC Chromatogramme (Gradient 2) nach Kupferentfernung von [^{18}F]67 (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 15,1$ min), Referenz 67 (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 15,0$ min), Präkursorpeptid 66 (UV-Spur, dünne Linie, $t_R = 16,3$ min) und [^{18}F]BFP [^{18}F]57 (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,2$ min)

Tabelle 5: Reinigungsbedingungen und Kupfergehalt für die Peptide 67, 69, 71, 82 und 84

Peptid-Herstellung	Reinigung	t_R [min] präp. HPLC ^a	MS-Signal [m/z]	ICP-MS [$m_{\text{Cu}}/m_{\text{Peptid}}$]	$n_{\text{Cu}}/n_{\text{Peptid}}$
67 (Lösung)	HPLC	5,4	943 [M+Cu] ²⁺	n. b. (blassgrün)	n. b.
67 (Harz)	HPLC	5,4	1828 [M+H] ⁺	n. b. (farblos)	n. b.
67 (Harz)	HPLC + BIS	14,1	1828 [M+H] ⁺	611 $\mu\text{g/g}$	1 : 57
69 (Harz)	HPLC + BIS	13,3	1842 [M+H] ⁺	692 $\mu\text{g/l}^b$	1 : 50
71 (Harz)	HPLC + BIS	13,3	1814 [M+H] ⁺	501 $\mu\text{g/g}$	1 : 70
82 (Harz)	HPLC + BIS	14,6	1929 [M+H] ⁺	426 $\mu\text{g/g}$	1 : 77
84 (Harz)	HPLC + BIS	15,2	1652 [M+H] ⁺	469 $\mu\text{g/g}$	1 : 82

^aGradient 2, ^bPeptid in Wasser gelöst c = 1 g/ml, BIS (Bispidin)

3.2.3.7 Radiomarkierung von SNEW-Peptiden an der Festphase mittels [¹⁸F]57

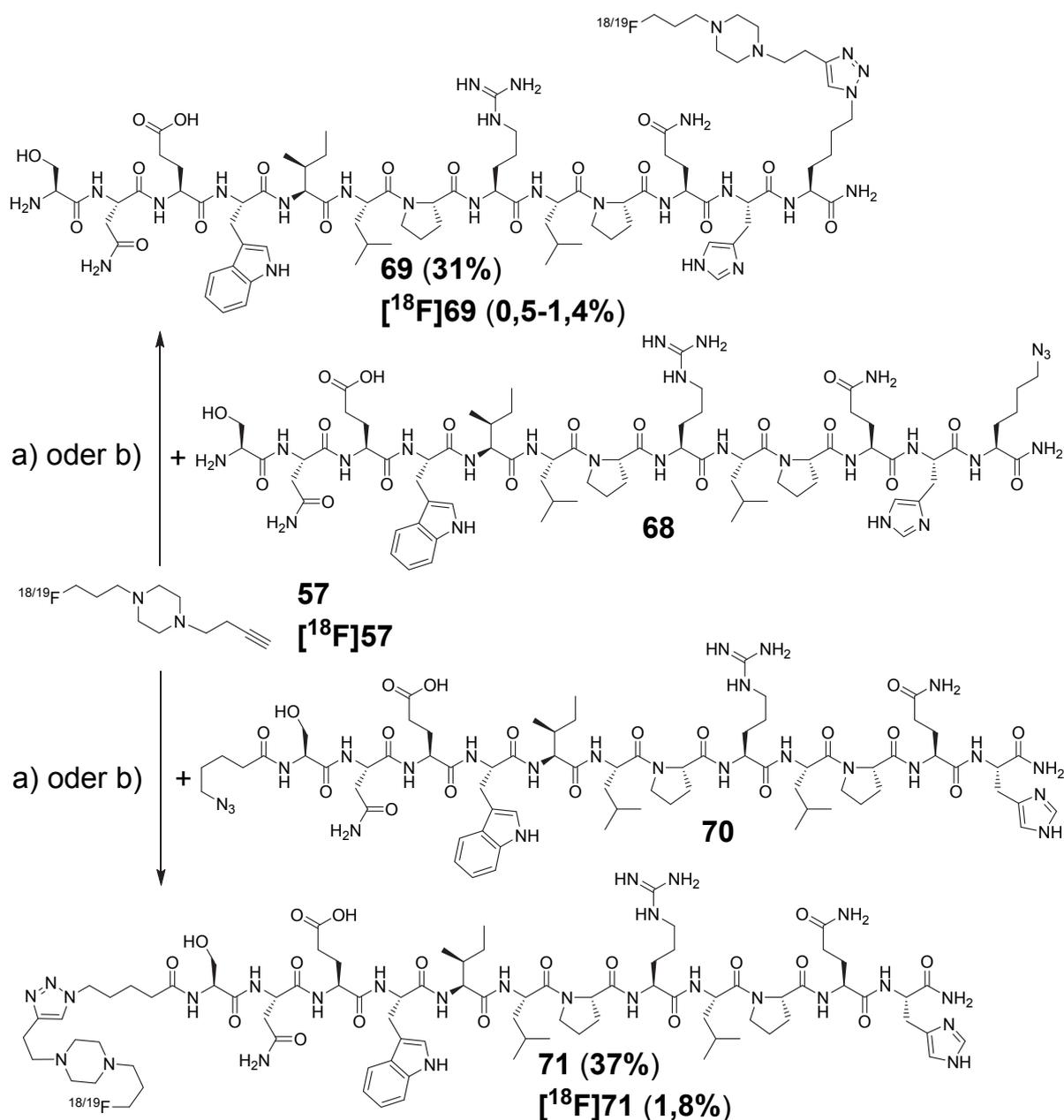
Aufbauend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen wurde eine neue Markierungsstrategie entwickelt, welche die Huisgen-Cycloaddition mit am Harz gebundenen Präkursorpeptid **66** mit [¹⁸F]BFP [¹⁸F]57 beinhaltet, gefolgt von einem Waschschrift mit DMF und H₂O, Behandlung mit Bispidin (2 Äquivalente im Verhältnis zu eingesetztem CuSO₄) in Methanol und DMF, einem zweiten Waschschrift mit DMF und H₂O sowie eine Abspaltung von der Festphase mittels TFA/TIS im Verhältnis 9:1.

Die Synthese des nicht-radioaktiven Referenzpeptids **67** an der Festphase war bei 40°C nach mindestens 2 Tagen vollständig, wenn Alkin/Azid/TBTA/CuSO₄/Na-ascorbat im Stoffmengenverhältnis 10:1:6:1:10 (mol:mol) eingesetzt wurden und in DMF und Tris/HCl Puffer (pH 8,0) im Verhältnis 1:1 geschüttelt wurden. Trotzdem zeigten die folgenden Radiosynthesen mit [¹⁸F]BFP [¹⁸F]57 sehr geringe Ausbeuten für [¹⁸F]67 (0,4%, d. c.; bezogen auf eingesetztes [¹⁸F]BFP) (Vgl. Abschnitt 3.2.3.6, Abbildung 30). Eine höhere Reaktionstemperatur (90°C), der Einsatz von Mikrowellenbedingungen (50, 90 W) für geringeren sterischen Anspruch [147], längere Reaktionszeiten (60, 120 min) und höhere Startaktivitäten (3–6 GBq [¹⁸F]BFP) zeigten keine signifikanten Veränderungen in der radiochemischen Ausbeute.

Die unbefriedigenden Ausbeuten von [¹⁸F]57 bei der Radiomarkierung könnten als Ursache die schlecht zugängliche Azidfunktionalität des Azidoprolins im Präkursorpeptid **66** haben. Das Azidoprolin befindet sich sehr nah am Rink-Amid-MBHA-Harz und ist daher sterisch weniger zugänglich.

Deshalb wurden zwei neue modifizierte SNEW-Peptidpräkursoren **68** und **70** synthetisiert (Schema 27):

- Peptid **68** wurde aufgebaut, indem Harz für die Festphasenpeptidsynthese mit N^ε-Azido-L-norleucin (**62**) beladen wurde, statt mit 4-(S)-Azido-L-prolin (**65**). Die Azidofunktion ist hier erstens nicht mehr am starren 5-Ring des Prolins fixiert und durch die Alkylkette wird eine größere Distanz zum Rink-Amid-Harz gewährleistet.
- Das zweite Peptid **70** wurde ebenfalls mittels Festphasenpeptidsynthese aufgebaut, anschließend nur die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und am Harz mit einer Azidopentanamidoeinheit am N-Terminus versehen. Die Azidfunktionalität in **70** besitzt eine vergrößerte Distanz zum Rink-Amid-MBHA-Harz im Vergleich zu **66** und **68**, führt aber durch Modifizierung des N-Terminus‘ höchstwahrscheinlich zu einem Verlust von Affinität zum EphB2-Rezeptor. Daraufhin wurden die Präkursorpeptide **68** und **70** sowie die mit BFP synthetisierten nicht-radioaktiven Referenzen **69** und **71** nach den optimierten Bedingungen von **67** an der Festphase synthetisiert.



Schema 27: Syntheseroute für markierte SNEW-Peptide **69**/ ^{18}F **69** und **71**/ ^{18}F **71** mit BFP **57**/ ^{18}F **57**. DMF/Puffer, TBTA, Na-ascorbat, CuSO_4 (a) 40°C , 2 d; (b) 50 Watt, 1 h (Radiosynthese)

Mittels MS-Analysen wurden die von der Festphase abgespaltenen Referenzpeptide **69** und **71** verifiziert (Abbildung 31, Abbildung 32). Radiomarkierungen der Peptidpräkursoren **68** und **70** mit ^{18}F BFP zeigten für die radiomarkierten Peptide ^{18}F **69** und ^{18}F **71** keine signifikant höheren radiochemischen Ausbeuten (^{18}F **69**: 0,5–1,4%, d. c.; ^{18}F **71**: 1,8%, d. c.; bezogen auf eingesetztes ^{18}F BFP) (Schema 27). Die zugehörigen Chromatogramme befinden sich im Anhang. Die Radiomarkierungen der SNEW-Peptide ^{18}F **67**, ^{18}F **69** und ^{18}F **71** mittels ^{18}F BFP gelangen lediglich mit sehr geringen radiochemischen Ausbeuten (0,4–1,8%, d. c.).

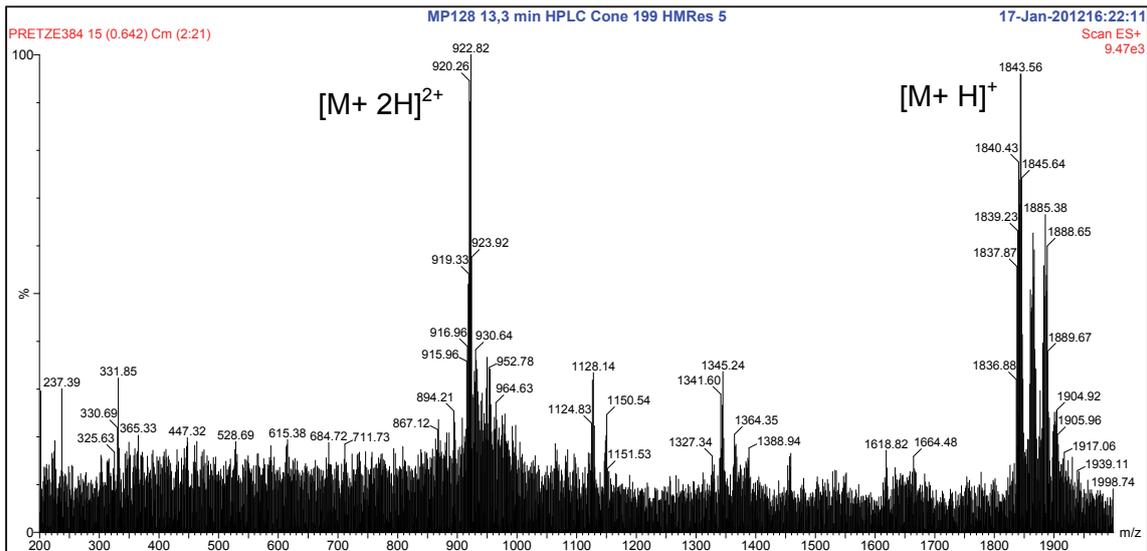


Abbildung 31: Massenspektrum von Peptid 69 – MS (ESI+): m/z : 1842 $[M + H]^+$, 922 $[M + 2H]^{2+}$

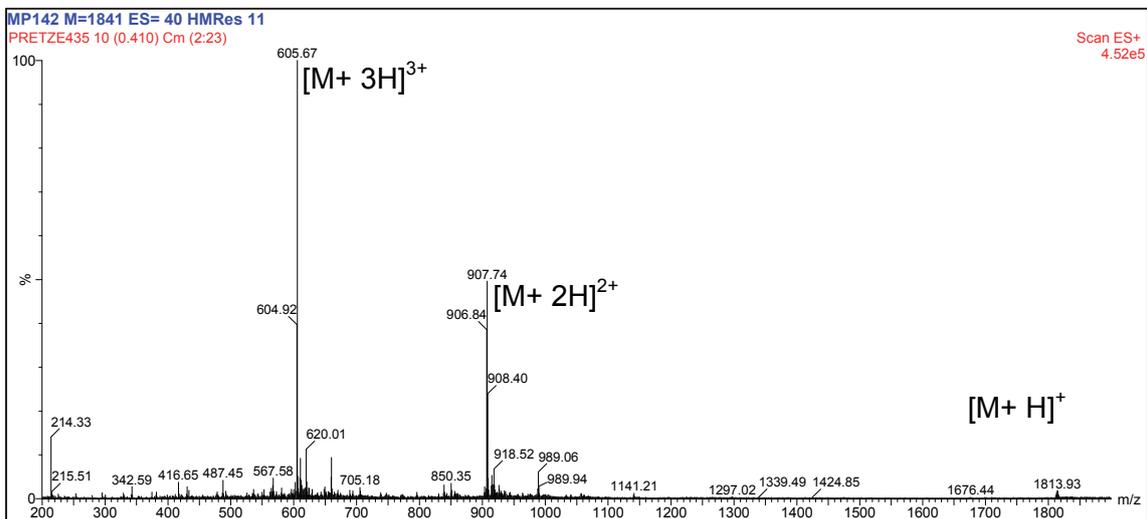


Abbildung 32: Massenspektrum von 71 – MS (ESI+): m/z : 1814 $[M + H]^+$, 908 $[M + 2H]^{2+}$, 605 $[M + 3H]^{3+}$

In der Literatur finden sich zahlreiche wichtige Faktoren, die das Gelingen der Huisgen-Cycloaddition stark beeinflussen und mit den eigenen gefundenen Ergebnissen korrelieren [49]. Zu beachten sind danach die folgenden Bedingungen:

- Alkin im Überschuss zum Azid ist bevorzugt
- Basisches Milieu (pH ~ 8) ist besser als neutrales oder saures Milieu
- Cu(I)-stabilisierende Liganden wie TBTA schützen Peptide/Proteine vor löslichen Kupferspezies
- Liganden für die Cu(I)-Stabilisierung im Überschuss zu Cu werden bevorzugt [49]
- TCEP stellt Alternative für die Cu(II)-Reduktion dar, Na-ascorbat kann Proteine zerstören, aliphatische Azide werden von TCEP nur in geringem Maße reduziert

- Alkine mit elektronenziehenden Gruppen sind reaktiver [33]
- Bei Radiomarkierungen muss Kupfer im Überschuss zum Alkin verwendet werden [149]
- Die Konzentration der Peptide sollte relativ hoch sein.

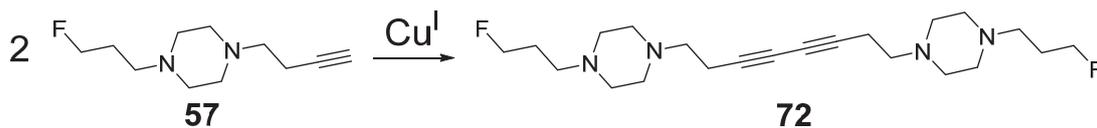
All diese Punkte sollten eingehalten werden, damit die Huisgen-Cycloaddition funktioniert. In den nicht-radioaktiven Markierungen der Peptide mit BFP wurde das Stoffmengenverhältnis von Alkin/Azid/TBTA/CuSO₄/Na-ascorbat auf 10:1:6:1:10 (mol:mol) optimiert und hohe Ausbeuten erzielt.

Bei den Radiomarkierungen mit [¹⁸F]BFP [¹⁸F]57 müsste demnach das Stoffmengenverhältnis von Alkin/Azid/TBTA/CuSO₄/Na-ascorbat auf 1:0,1:5:4:10 (mol:mol) eingestellt werden bei einer Peptidkonzentration von etwa 4 µmol/ml. Bei den radioaktiven Markierungen mit [¹⁸F]BFP [¹⁸F]57 liegt das Alkin jedoch nur in pikomolaren Stoffmengen vor und steht damit in sehr großem Unterschuss zum Azid, was die geringen radiochemischen Ausbeuten erklären könnte.

Das Hauptproblem neben der Kupfer-Entfernung bei den Reaktionen mit [¹⁸F]BFP ist die Bildung eines Nebenprodukts zusätzlich zum gewünschten Peptid. Es wurde herausgefunden, dass die Glaserkupplung [150] der Hauptreaktionsweg vom Alkin [¹⁸F]BFP bei sehr geringen Konzentrationen darstellt (Schema 28), dieses scheinbar mit sich selbst reagiert und in nur geringem Maße die Huisgen-Cycloaddition eingeht. Dieser Befund stimmt mit Berichten aus der Literatur überein, dass das Cu-Acetylid bei geringen Konzentrationen womöglich einen anderen Reaktionsweg eingeht [33, 49]. Daher wurde in einer Testreaktion nicht-radioaktives BFP 57 unter den Bedingungen der Glaserkupplung [151] zur Reaktion gebracht und resultierte in der Bildung des BFP-Diins 72 (Schema 28) als Nebenprodukt mit einer Ausbeute von 11%. Mittels MS-Analysen wurde die Bildung des Diins bestätigt (Abbildung 33). Das unbekannte Nebenprodukt der Radiomarkierung mit [¹⁸F]57 wurde mit dem BFP-Diin 72 mittels (Radio-)DC-Analysen verglichen (R_f = 0,27 in Methanol) und als [¹⁸F]72 identifiziert.

Die Ursachen für die geringen Ausbeuten bei der Markierung mit [¹⁸F]BFP sind also:

- Alkin ist im Unterschuss zum Azid
- Nebenproduktbildung durch Dimerisierung



Schema 28: Glaserkupplungsprodukt 72 von BFP 57

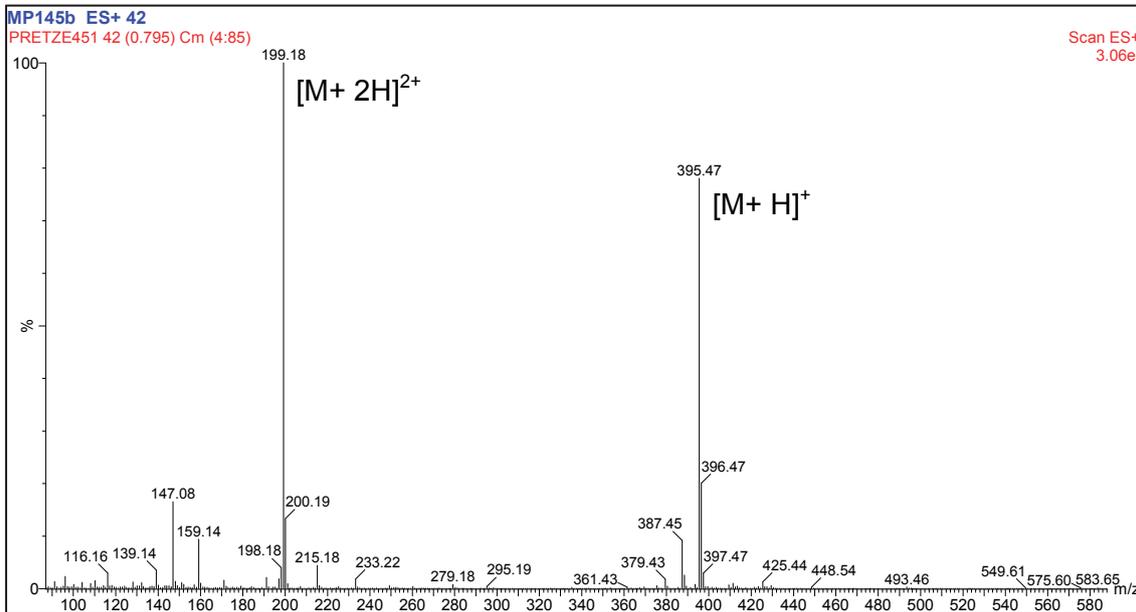


Abbildung 33: Massenspektrum von BFP-Dimer 72 – MS (ESI+): m/z : 395 [M + H]⁺, 199 [M + 2H]²⁺

Stabilitätsuntersuchungen der Peptide [¹⁸F]67, [¹⁸F]69 und [¹⁸F]71

Es wurden Stabilitätsuntersuchungen mit den ¹⁸F-markierten Peptiden in vitro durchgeführt. Dazu wurden die Peptide [¹⁸F]67, [¹⁸F]69 und [¹⁸F]71 semi-präparativ gereinigt, anschließend bei 40°C im Vakuum getrocknet und in 100 µl PBS-Puffer (pH 7,5) gelöst. Die Pufferlösungen wurden dann mit 400 µl Rattenplasma oder Rattenblut bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die radiomarkierten SNEW-Peptide waren allesamt zu ≥ 80% intakt und es wurden bis zu drei entstandene Metaboliten in anschließenden HPLC Analysen beobachtet. Somit sind alle mit BFP markierten SNEW-Peptide wesentlich stabiler als das FBAM-markierte Peptid [¹⁸F]54.

3.2.4 Verbesserte Radiosynthese von SNEW-Peptiden durch Austausch der Funktionalitäten für die Huisgen-Cycloaddition – Entwicklung des Markierungsbausteins [¹⁸F]AFP – 1-(3-Azidopropyl)-4-(3-fluorpropyl)-piperazin ([¹⁸F]75)

Bei der Radiomarkierung mit [¹⁸F]BFP [¹⁸F]57 hat sich die Dimerbildung des Markierungsbausteines bei pikomolaren Konzentrationen, die bei Radiomarkierungen generell auftreten, als die Hauptursache für die geringen radiochemischen Ausbeuten herausgestellt. Um dieses Phänomen zu umgehen, wurden die bei der Huisgen-Cycloaddition reagierenden funktionellen Gruppen vertauscht. Es wurde ein Markierungsbaustein entwickelt, der eine Azid-Funktionalität besitzt und im Gegenzug eine Alkin-Funktionalität in Peptide eingeführt.

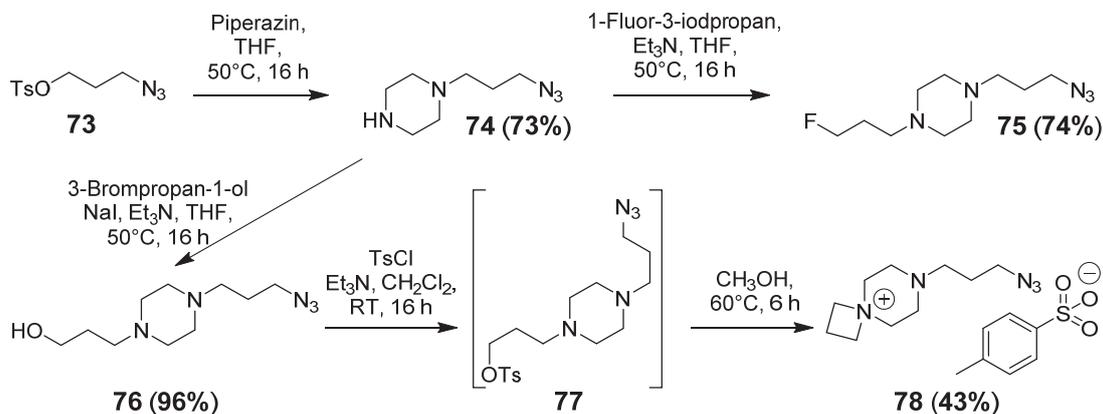
Analog zur Synthese des Präkursors **60** und der nicht-radioaktiven Referenzsubstanz **57** von [¹⁸F]BFP wurde der Azid-funktionalisierte Markierungsbaustein 1-(3-Azidopropyl)-4-(3-fluorpropyl)piperazin – AFP (**75**) entwickelt (Schema 29) [129] Dieser Markierungsbaustein **75** und sein entsprechender Präkursor **78** sollten ähnliche Vorteile wie BFP **57** besitzen (Vgl. Abschnitt 3.2.2.1). Der Markierungsbaustein AFP sollte sich ebenso durch eine hohe Hydrophilie auszeichnen, um biologisch aktive Verbindungen unter physiologischen Bedingungen markieren zu können. Weiterhin sollte sich der Präkursor **78** genauso gut radiofluorieren und bequem durch Kartuschenreinigung vom Markierungsbaustein abtrennen lassen. Durch die Azid-funktionalisierte Seitenkette sollte AFP ebenfalls wie BFP für die Anwendung der bioorthogonalen Huisgen-Cycloaddition und desweiteren auch für den Einsatz bei der Staudinger-Ligation (Vgl. Abschnitt 2.1) geeignet sein. Strukturbedingt ist jedoch eine Reaktion analog zur Glaser-Kupplung ausgeschlossen.

Synthese der Referenzsubstanz 75 und des Präkursors 78

Für die Synthese von AFP **75** wurde im ersten Schritt 3-Azidopropyltosylat (**73**) nach DE FREITAS *et al.* [152] hergestellt und mit Piperazin im Überschuss behandelt, um Verbindung **74** (73%) zu erhalten (Schema 29). Als nächstes wurde Derivat **74** mit 1-Fluor-3-iodopropan umgesetzt, um die nicht-radioaktive Referenz **75** (74%) zu erhalten (Abbildung 34).

Zur Synthese des Präkursors **78** wurde **74** mit 3-Brompropanol behandelt. Dadurch wurde Verbindung **76** mit annähernd quantitativer Ausbeute zu erhalten (Schema 29). Anschließend wurde **76** mit *p*-Tosylchlorid zur Reaktion gebracht. In diesem Fall war es

nicht möglich, Derivat **77** zu isolieren. Deswegen wurde das Lösungsmittel sofort entfernt, das Rohprodukt **77** umgehend in Methanol gelöst und bei 60°C über einen Zeitraum von 6 Stunden gerührt. Nach Reinigung mittels RP-18 Säulenchromatographie und anschließender Lyophilisation wurde der angestrebte Spiroprekursor **78** mit einer Ausbeute von 43% erhalten.



Schema 29: Syntheseroute für die nicht-radioaktive Referenzsubstanz **75** und für Präkursor **78**

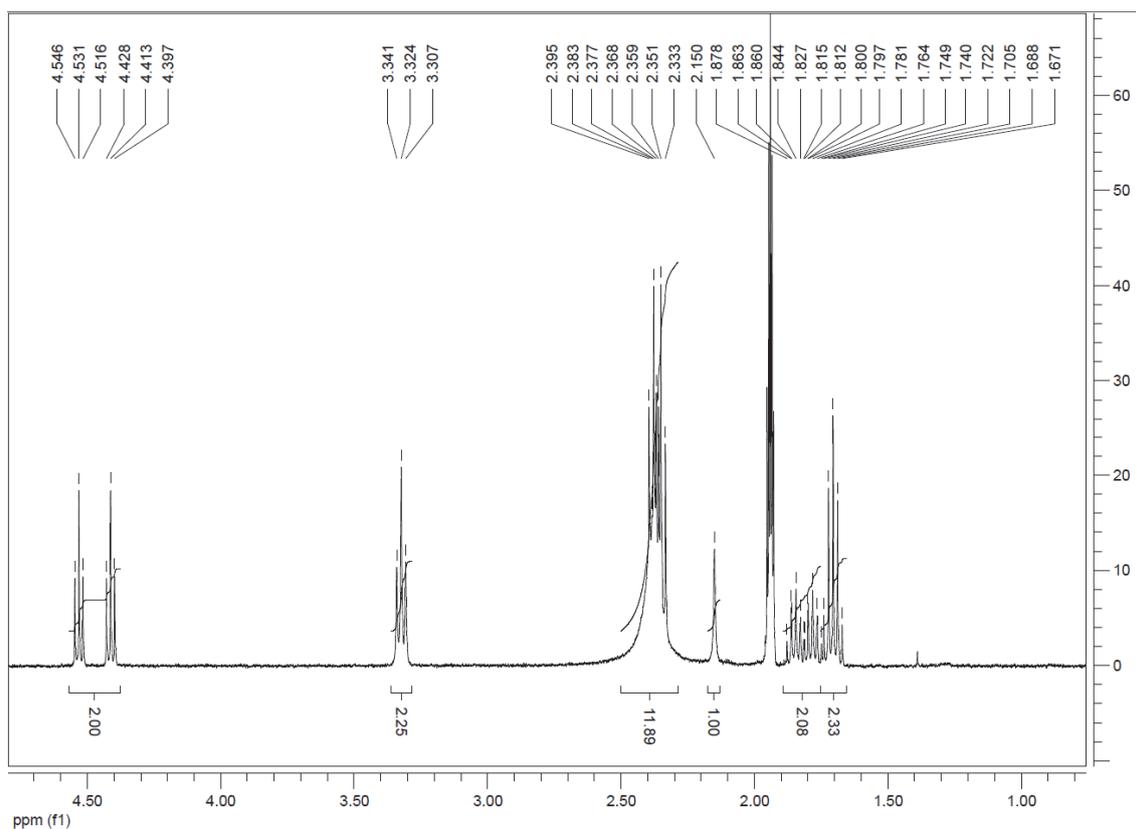


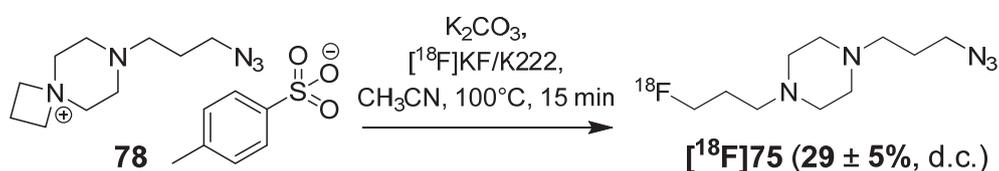
Abbildung 34: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Referenzsubstanz **75** aufgenommen in CD_3CN

Auch der Azid-funktionalisierte Markierungsbaustein AFP **75** weist eine hohe Hydrophilie auf ($\log D = 0,70 \pm 0,01$ ($n = 3$), PBS-Puffer pH 7,5) (Vergleich: $\log D = 0,31$

für BFP), welche Radiomarkierungen in wässrigen Medien ermöglicht. In Abbildung 34 ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Referenzsubstanz **75** dargestellt. Die typische Aufspaltung des Signals der CH_2 -Gruppe in Nachbarschaft zum Fluoratom ist erkennbar. Des Weiteren ist ein Triplett der CH_2 -Gruppe in Nachbarschaft zur Azidfunktion sehr tieffeldverschoben. Im Vergleich zum Spektrum von BFP **57** fehlt das einwertige Triplett der terminalen CH -Gruppe.

Entwicklung einer Modulsynthese für $[^{18}\text{F}]\mathbf{75}$

Analog zu $[^{18}\text{F}]\text{BFP}$ wurde eine automatisierte Modulsynthese für $[^{18}\text{F}]\text{AFP}$ $[^{18}\text{F}]\mathbf{75}$ entwickelt (Schema 30) [129].



Schema 30: Radiosynthese des Markierungsbausteins $[^{18}\text{F}]\text{AFP}$

Für die Reaktion der Spiroverbindung **78** mit $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ wurde wie bei der Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\mathbf{57}$ ein automatisches Synthesemodul mit gleichem Aufbau benutzt. Die Radiomarkierung verlief unter den gleichen Bedingungen wie bei $[^{18}\text{F}]\mathbf{57}$ in wasserfreiem Acetonitril bei 100°C innerhalb 15 Minuten. Radio-DC-Analysen der Reaktionsmischung zeigten unter diesen Bedingungen mehr als 95% Umsatz von $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ zu $[^{18}\text{F}]\text{AFP}$ $[^{18}\text{F}]\mathbf{75}$ ($n = 19$). Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit einer LiChrolut® Si-Kartusche gereinigt. Nicht umgesetzte Spiroverbindung **78** und Spuren von $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ verblieben dabei auf der Festphase. Verbindung $[^{18}\text{F}]\mathbf{75}$ wurde mit 1,5 ml einer Mischung aus Acetonitril und Wasser im Verhältnis 1:1 eluiert und danach im Stickstoffstrom bei 90°C getrocknet. Die automatische Synthese wurde in einer Gesamtsynthesezeit von etwa 40 Minuten durchgeführt. Die radiochemische Gesamtausbeute von $[^{18}\text{F}]\mathbf{75}$ betrug $29 \pm 5\%$ ($n = 19$, d. c.) mit einer radiochemischen Reinheit $\geq 97\%$, was durch Radio-HPLC- und Radio-DC-Analysen (Abbildung 35) bestätigt wurde und in guter Übereinstimmung mit zuvor durchgeführten manuellen Synthesen steht. Startaktivitäten von 1–18 GBq $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ lieferten 0,5–4,2 GBq $[^{18}\text{F}]\mathbf{75}$ ($A_s = 10 \pm 8 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$).

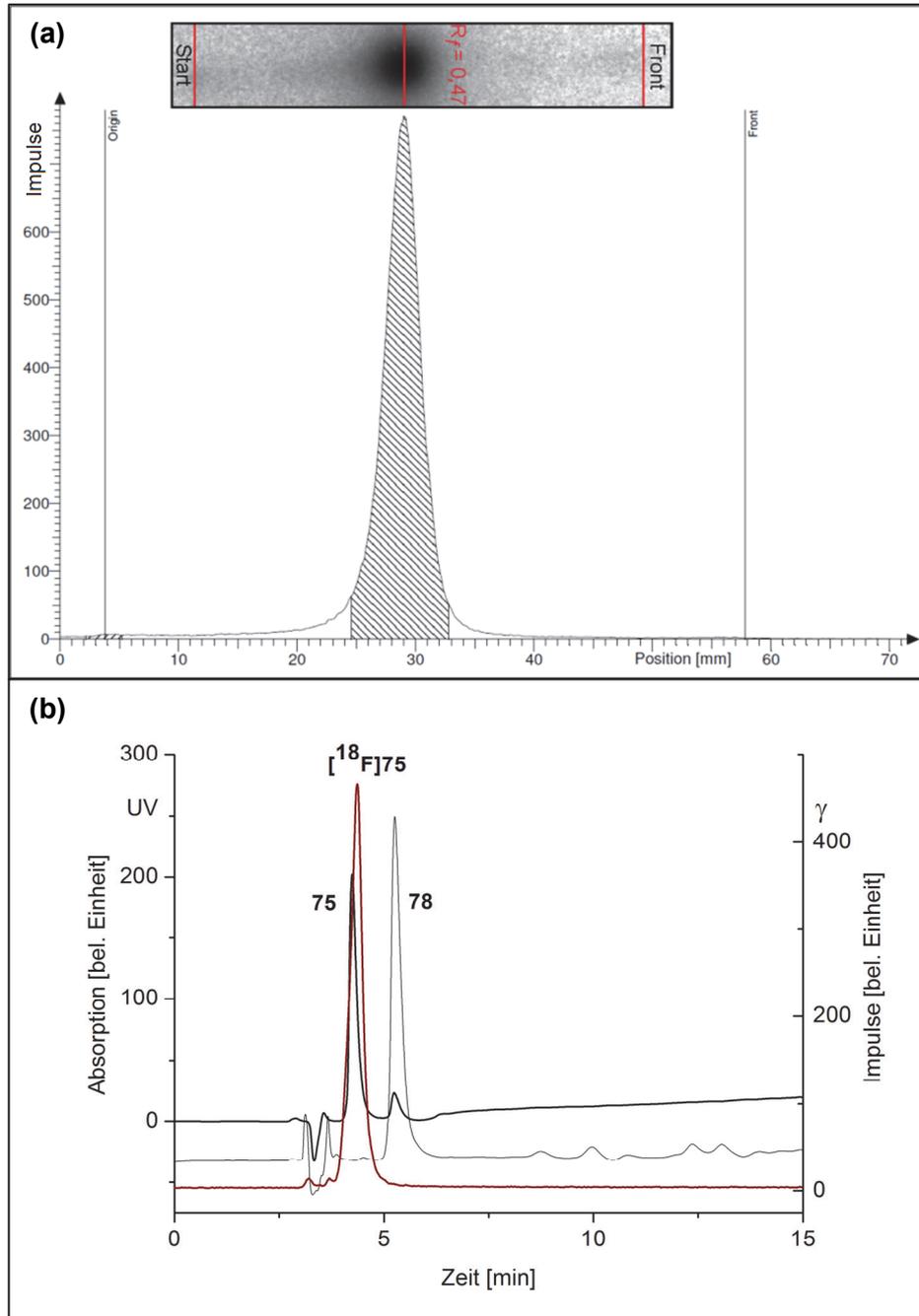
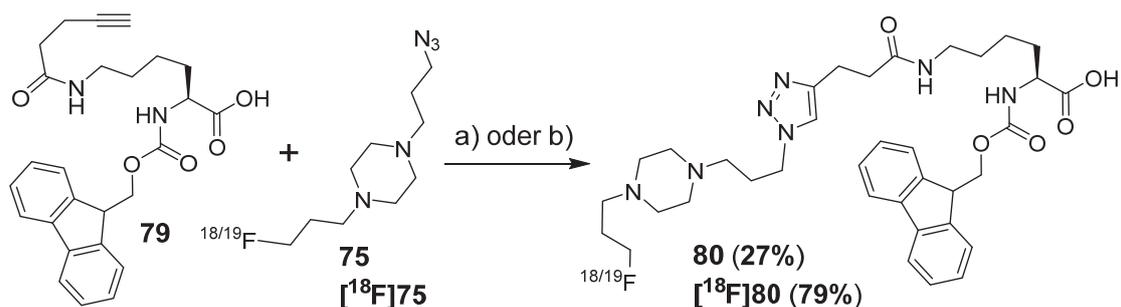


Abbildung 35: (a) Radio-DC (Eluent: Methanol, Kieselgel) von gereinigtem $[^{18}\text{F}]\text{75}$ ($R_f = 0,47$); (b) (Radio-)HPLC Chromatogramme von $[^{18}\text{F}]\text{75}$ (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 4,4$ min), Referenz **75** (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 4,2$ min) und des Präkursors **78** (UV-Spur, dünne Linie, $t_R = 5,3$ min)

3.2.4.1 Radiomarkierung von Aminosäuren mittels [^{18}F]75

Der Einsatz von AFP für die Huisgen-Cycloaddition setzt voraus, dass biologisch aktive Moleküle mit Alkin-Funktionen versehen werden [132]. Um einen späteren Einsatz für die Umsetzung mit [$^{18/19}\text{F}$]AFP zu gewährleisten, wurde daher N^α -Fmoc-L-lysin mit Pent-4-insäure umgesetzt, um das leicht zugängliche N^α -Fmoc- N^ϵ -(pent-4-inamido)-L-lysin (Fmoc-Pal) (**79**) zu erhalten [153]. Das Aminosäurederivat **79** kann mittels Festphasenpeptidsynthese in Peptide eingebaut werden und ermöglicht selektive Markierungen mit Hilfe der Huisgen-Cycloaddition. Analog zu [^{18}F]BFP wurde die Markierung von **79** ($t_R = 22,0$ min) mit [^{18}F]AFP [^{18}F]75 durchgeführt (Abbildung 36). Das Huisgen-Cycloaddukt [^{18}F]80 ($t_R = 19,4$ min) wurde nach 60 Minuten mit einer radiochemischen Ausbeute von 79% (d. c., ausgehend von [^{18}F]75) unter Mikrowellenbedingungen bei 50 Watt erhalten (Schema 31). Für die Identifizierung des radiomarkierten Produkts wurde die nicht-radioaktive Referenz **80** durch die Reaktion von AFP (**75**) mit Verbindung **79** in einer Lösung aus DMF/THF mit CuI und DIPEA für 16 Stunden mit 27% Ausbeute synthetisiert.



Schema 31: Reaktion von **75** und [^{18}F]75 mit Aminosäure Fmoc-Pal **79**. (a) DMF/THF (1:1), 37°C, 16 h, CuI, DIPEA (1:50); (b) DMF/Tris-HCl Puffer, 50 Watt, 1 h, TBTA, CuSO₄, Na-ascorbat (Radiosynthese)

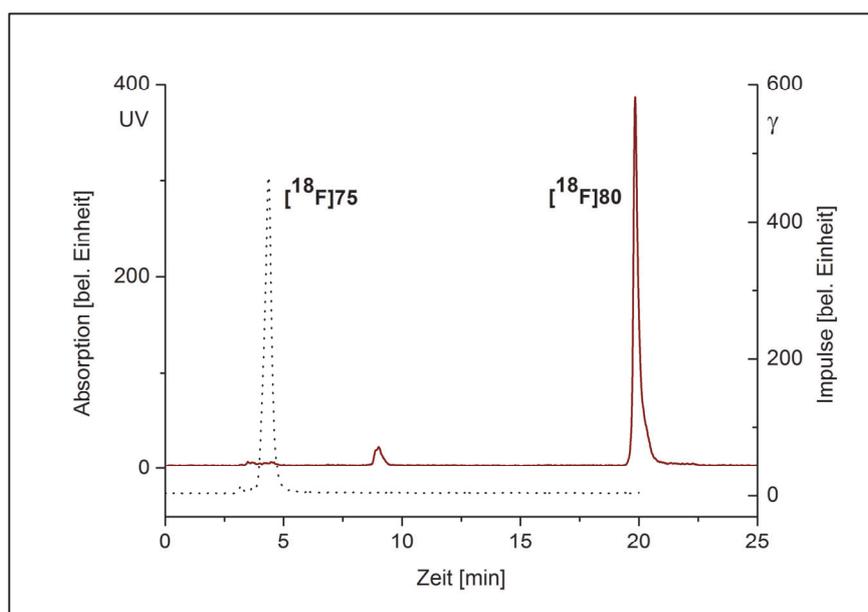
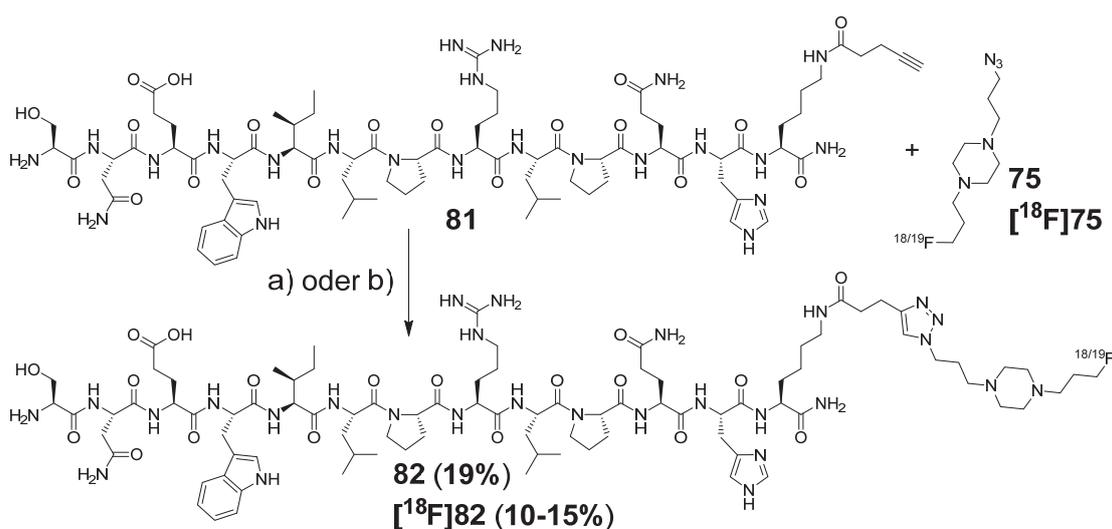


Abbildung 36: Radio-HPLC Chromatogramme von [^{18}F]AFP [^{18}F]75 (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,4$ min) und von Aminosäure [^{18}F]80 (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 19,4$ min)

3.2.4.2 Radiomarkierung eines SNEW-Peptids mittels [^{18}F]75

Nachdem die erfolgreiche Radiomarkierung des Alkin-funktionalisierten Lysins **79** mit [^{18}F]AFP durchgeführt wurde, konnte die Synthese eines neuen modifizierten SNEW-Peptidpräkursors **81** durchgeführt werden, welcher am C-Terminus die Alkin-funktionalisierte Aminosäure Pal enthielt (Schema 32). Laut Literatur sind Alkin-funktionalisierte Peptide, die sich an einer Festphase befinden, nicht in der Lage, die Glaserkupplung einzugehen [33]. Daher wurde ausgehend von mit **79** beladenem Rink-Amid-MBHA-Harz das Präkursorpeptid SNEWILPRLPQH-Pal **81**, sowie die nicht-radioaktive Referenzsubstanz **82** mittels AFP **75** an der Festphase mit 19% Ausbeute synthetisiert (Bedingungen vgl. Abschnitt 3.2.3.7). Die erfolgreiche Synthese von **82** wurde mittels MS-Analyse nachgewiesen (Abbildung 38).

Die Radiomarkierung des Peptidpräkursors **81** mit [^{18}F]AFP (Schema 32) zeigte eine zehnfach höhere radiochemische Ausbeute im Vergleich zu Radiomarkierungen mit [^{18}F]BFP unter gleichen Bedingungen (Abbildung 37). Die radiochemische Ausbeute wurde sogar noch erhöht, wenn Peptid/TBTA/CuSO₄/Na-ascorbat im Stoffmengenverhältnis 1:8:7:10 (mol:mol) mit geringen Volumina an Lösungsmittel (10 mg Harz **81** in 270–300 μL DMF/H₂O) verwendet wurde. TBTA musste mindestens mit 1,1 Äquivalenten zu CuSO₄ eingesetzt werden, was wichtig für hohe radiochemische Ausbeuten war. Beim Einsatz von weniger als einem Äquivalent TBTA sank die Ausbeute drastisch. Schließlich wurden radiochemische Ausbeuten von Peptid [^{18}F]**82** zwischen 40–170 MBq (10–15%, d. c.) mit radiochemischen Reinheiten $\geq 98\%$ und spezifischen Aktivitäten zwischen 5–10 GBq/ μmol erreicht.



Schema 32: Syntheseweg zu den markierten SNEW-Peptiden **82** und [^{18}F]**82** mit AFP **75** und [^{18}F]**75**. DMF/Puffer, TBTA, Na-ascorbat, CuSO₄ (a) 40°C, 3 d; (b) 50 Watt, 1 h (Radiosynthese)

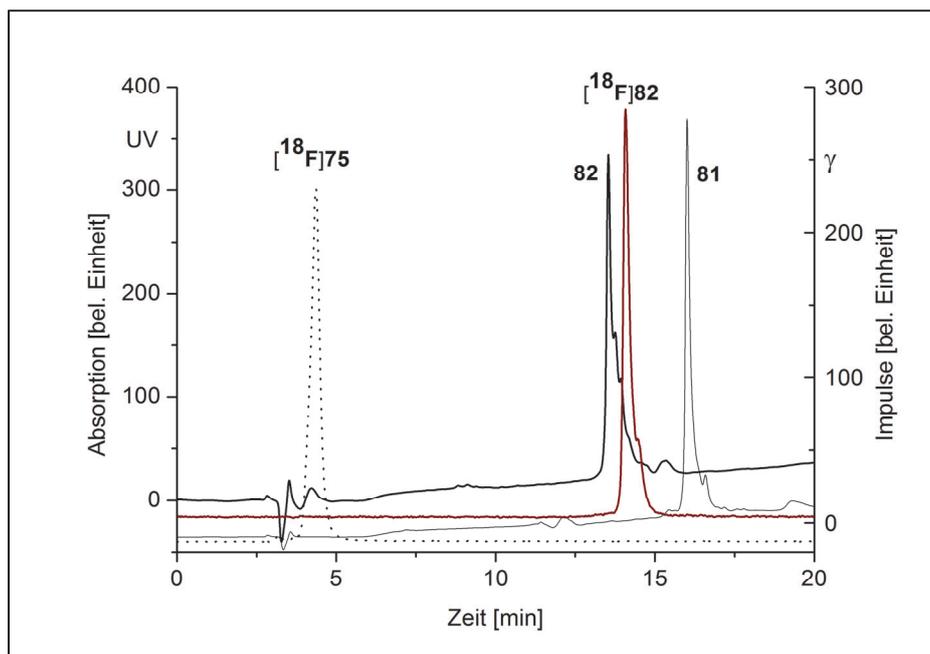


Abbildung 37: (Radio)-HPLC Chromatogramme von Peptid [^{18}F]82 (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 14,1$ min), Referenz 82 (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 13,9$ min), Präkursorpeptid 81 (UV-Spur, dünne Linie, $t_R = 15,2$ min) und [^{18}F]AFP [^{18}F]75 (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,2$ min)

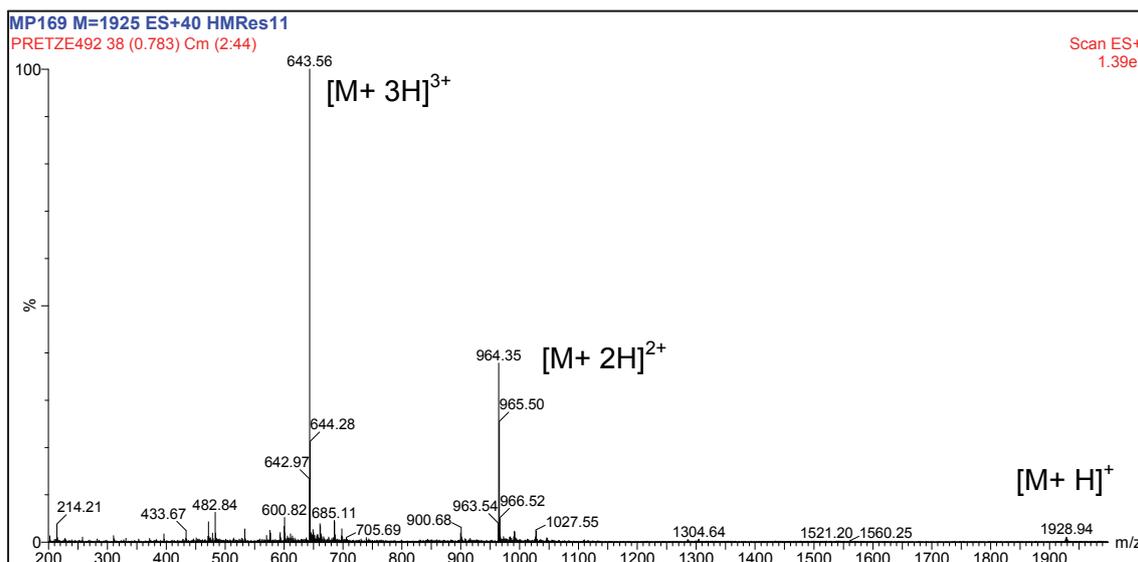


Abbildung 38: Massenspektrum von Peptid 82
MS (ESI+): m/z : 1929 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 965 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, 644 $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$

3.2.4.3 Radiopharmakologische Evaluierung des SNEW-Peptids [^{18}F]82

Die Stabilitätsuntersuchung von [^{18}F]82 wurde in vitro in Rattenplasma und Rattenblut durchgeführt. Dabei waren laut HPLC-Untersuchung nach einer Stunde bei 37°C noch über 80% des Peptids [^{18}F]82 intakt. Vier hydrophilere Metaboliten ($t_R = 4,6; 6,0; 8,0$ und 9,7 min, Gradient 2) wurden mit einem Anteil von weniger als

20% beobachtet, bei denen es sich nicht um [^{18}F]Fluorid handelte. Somit wurde nachgewiesen, dass keine Radiodefлуорierung stattfindet.

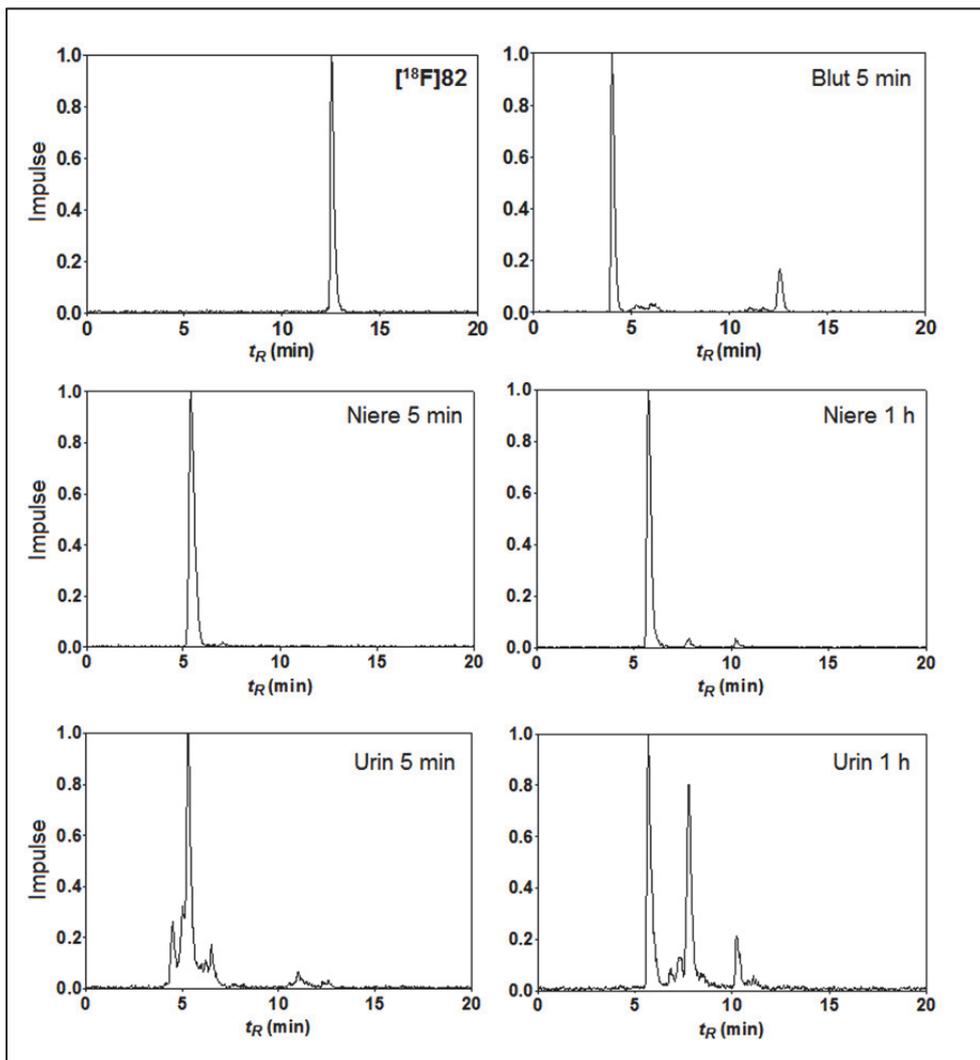


Abbildung 39: Repräsentative HPLC-Chromatogramme (Gradient 4) der Metabolitenanalyse von [^{18}F]82 in arteriellem Blut, Nieren und Urin nach intravenöser Injektion in eine Wistar Ratte (γ -Spur)

Daraufhin wurden Bioverteilungs- und Metabolitenanalysen von [^{18}F]82 in vivo mittels Wistar Ratten in vivo durchgeführt* (Abbildung 39).

[^{18}F]82 zeigte eine schnelle Blutclearance einhergehend mit renaler Eliminierung. Die Bioverteilung zeigte, dass ein Großteil der Aktivität nach 5 Minuten in den Nieren zu finden war. Es wurden lediglich 17% intaktes Peptid [^{18}F]82 im Blut nach 5 Minuten nachgewiesen und nach einer Stunde wurde keine Aktivität mehr im Blut gefunden. Die Metabolitenanalyse des Urins ergab, dass [^{18}F]82 einer schnellen Metabolisierung in vier Hauptmetaboliten in vivo unterliegt ($t_R = 4,6; 5,4; 7,8$ und $10,2$ min, Gradient 4).

* Die PET-Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Ralf Bergmann durchgeführt.

Der hydrophile Metabolit ($t_R = 4,6$ min) scheint eine sehr geringe molare Masse zu besitzen, ist aber eindeutig kein $[^{18}\text{F}]$ Fluorid, da keine Knochenanreicherung in den Wistar Ratten sichtbar war (Abbildung 40).

Die beobachteten Metaboliten von $[^{18}\text{F}]$ 82 könnten durch die Proteolyse des Peptids an der Position von Arginin oder Serin durch Plasmapeptidasen erklärt werden [154].

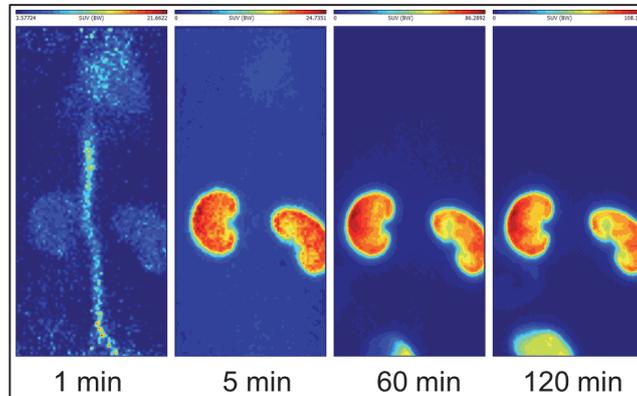


Abbildung 40: Maximal-Intensitäts-Darstellungen eines repräsentativen PET-Experimentes nach 1, 5, 60 und 120 min einer intravenösen Injektion von $[^{18}\text{F}]$ 82 in eine Wistar Ratte

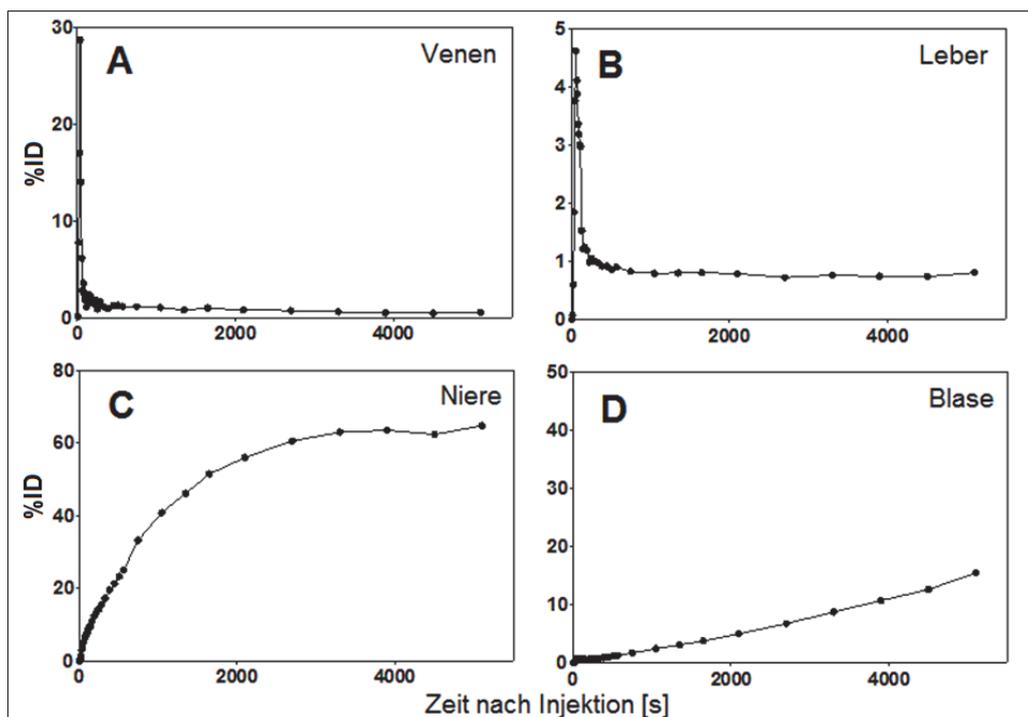


Abbildung 41: Zeitaktivitätskurven (90 min) in Blut (A) und Leber (B) in SUV sowie in Niere (C) und Urin (D) in % ID in einer Wistar Ratte nach intravenöser Injektion von $[^{18}\text{F}]$ 82

Nach 90 Minuten wurde die meiste Aktivität in der Blase (15% ID) und den Nieren (65% ID) gefunden (Abbildung 41), was offenbar mit der Metabolisierung des Peptides einhergeht. Allgemeinen Untersuchungen zufolge akkumulieren die Nieren Peptide in den Tubuli des Cortex nach glomerulärer Filtration [155]. Die schnelle Blutclearance von $[^{18}\text{F}]$ 82 ist ein Ergebnis der schnellen Nierenakkumulation und anschließender

Eliminierung in den Urin. Die Aktivität der Leber (1% ID) bleibt hingegen über den gemessenen Zeitraum niedrig und konstant (Abbildung 41). Diese Ergebnisse zeigen, dass [¹⁸F]82 auf dieser Entwicklungsstufe nicht als Radiotracer geeignet ist, um den EphB2-Rezeptor bildlich darzustellen [14].

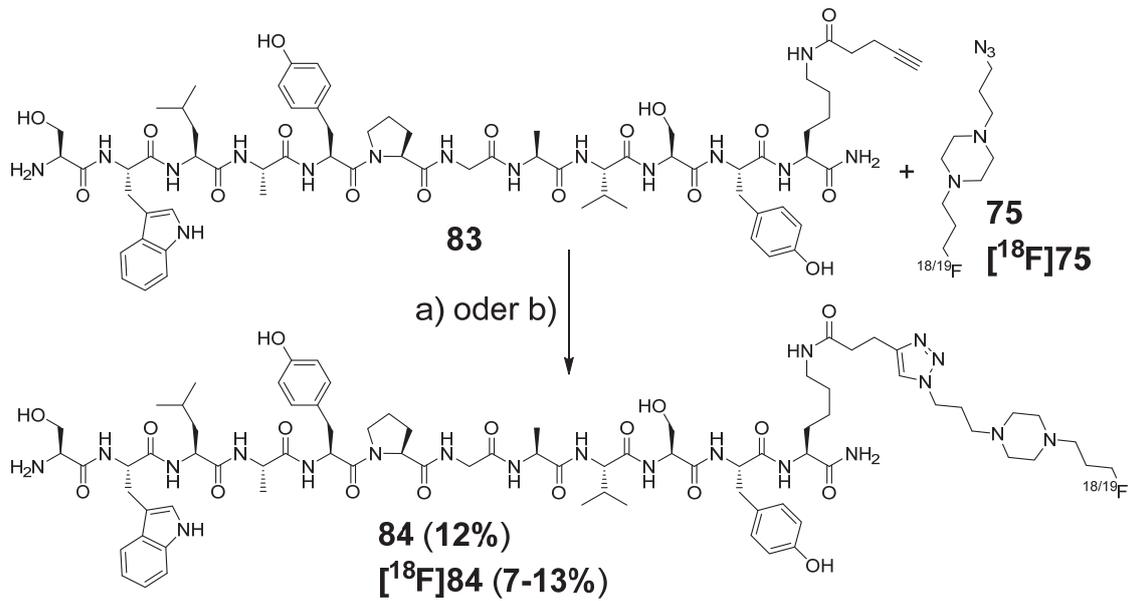
Die Konsequenz aus den Ergebnissen der radiopharmakologischen Untersuchung von [¹⁸F]82 ist, dass weitere Verbesserungen durchgeführt werden müssten, welche die In-vivo-Stabilität des Peptids drastisch erhöhen im Hinblick z.B. auf die biologische Halbwertszeit. Das kann beispielsweise durch die Einführung von D-Aminosäuren, PEGylierung oder der Methylierung von Peptidbindungen erfolgen.

3.2.4.4 Entwicklung eines Radiotracers basierend auf dem extrazellulär-bindenden peptidischen EphA2-Inhibitor SWLAYPGAVSYR* unter Nutzung von [¹⁸F]75

Neben dem EphB2-Rezeptor ist auch der EphA2-Rezeptor als Target von Interesse, der bereits mit dem Imidazopurinderivat [¹⁸F]7 an der A375^{EphA2}-Zelllinie untersucht wurde (Vgl. Abschnitt 3.1.3). Es könnte bei erfolgreichen Zellosoziationsversuchen die Rezeptorbindung des extrazellulären Peptid-Liganden [¹⁸F]84 mit dem intrazellulärem Liganden [¹⁸F]7 verglichen und bewertet werden.

Dementsprechend wurde auch ein SWLAY-Peptid [¹⁸F]84 (Vgl. Abschnitt 2.3) [91, 113] erfolgreich mit Fluor-18 markiert (Schema 33). Das Peptid [¹⁸F]84 bindet mit der Peptidsequenz SWLAY an den EphA2-Rezeptor (IC₅₀ = 1,5 µM), der in zahlreichen Tumorentitäten überexprimiert ist [91]. Dazu wurde in ähnlicher Weise vorgegangen wie bei der Radiosynthese der SNEW-Peptide (Vgl. Abschnitt 3.2.4.2). Zunächst wurde das SWLAY-Peptid 83 mittels automatisierter Peptidsynthese ausgehend vom Rink-Harz, das mit N^α-Fmoc-N^ε-(Pent-4-inamido)-L-lysin (79) beladen wurde (Vgl. Abschnitt 3.2.4.1), synthetisiert und desweiteren die nicht-radioaktive Referenz 84 (12% Ausbeute) mit AFP hergestellt (Bedingungen Vgl. Abschnitt 3.2.3.7). Laut Literatur sind auch beim SWLAY-Peptid die N-terminalen Aminosäuren wichtiger für die Affinität zum EphA2-Rezeptor als die C-terminalen Aminosäuren [91], weswegen eine Markierung am C-Terminus bevorzugt wurde. Dabei wurde am SWLAY-Peptid 83 bewusst die Aminosäure Arginin (R) am C-Terminus ausgelassen, da diese Aminosäure ein Erkennungsmotiv für bestimmte Peptidasen ist. Diese Veränderung in der Peptidsequenz sollte eine erhöhte In-vivo-Stabilität zur Folge haben. Das von der festen Phase abgespaltene Peptid 84 wurde mittels MS-Analyse untersucht und nachgewiesen (Abbildung 42).

*Peptidsequenz – Einbuchstabencode der Aminosäurenomenklatur (Abkürzungsverzeichnis)



Schema 33: Syntheseweg zu den SWLAY-Peptid **84** und $[^{18}\text{F}]\text{84}$ mit AFP **75** und $[^{18}\text{F}]\text{75}$. DMF/Puffer, TBTA, Na-ascorbat, CuSO_4 (a) 40°C , 3 d (nicht-radioaktive Synthese); (b) 70 Watt, 1 h (Radiosynthese)

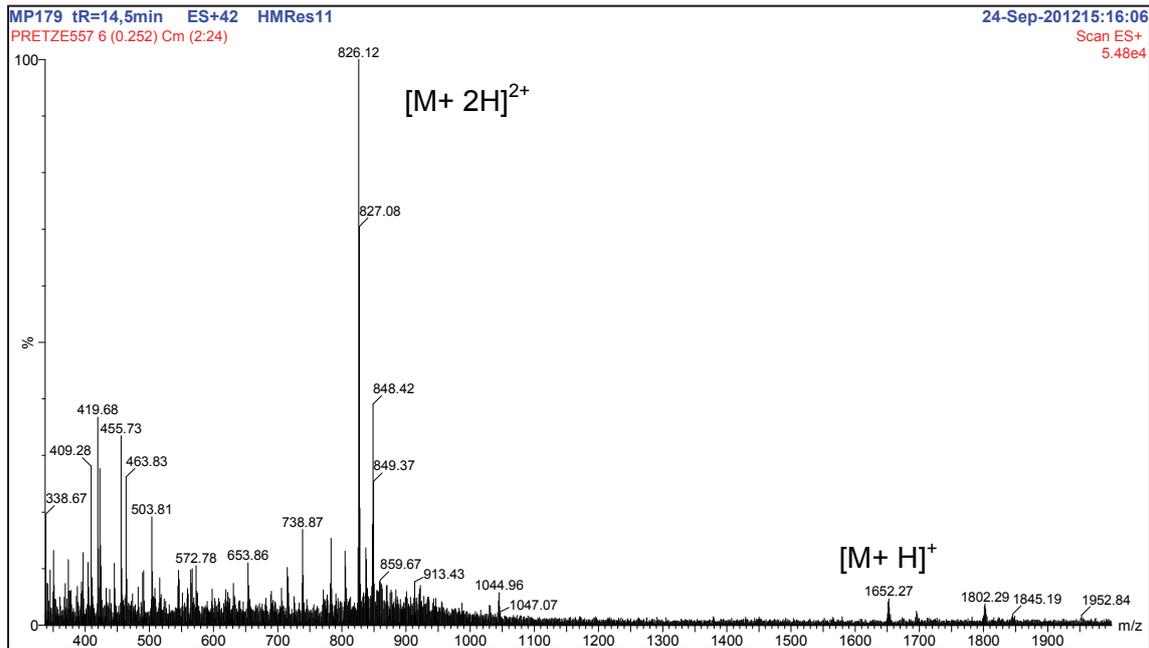


Abbildung 42: Massenspektrum von Peptid **84** – MS (ESI+): m/z : 1652 [M + H]⁺, 826 [M + 2H]²⁺

Radiomarkierung des SWLAY-Peptids 83

Für die Radiomarkierung von Peptid **83** wurde von Bedingungen ausgegangen, wie sie für die SNEW-Peptide angewandt wurden (Vgl. Abschnitt 3.2.4.2). Diese Bedingungen wurden weiter optimiert.

Das Stoffmengenverhältnis von Peptid/TBTA/CuSO₄/Natriumascorbat wurde angepasst auf 1:5:4:10 (mol:mol) und die Mikrowellenleistung wurde für eine Stunde auf 70 Watt erhöht. Dadurch wurde eine Umsetzung von [¹⁸F]AFP [¹⁸F]**75** von 64–82% erreicht. Das so erhaltene aktive Peptidyl-Harz wurde nach der Markierungsreaktion zur Entfernung des Kupfers mit Bispidin und zur Abspaltung von [¹⁸F]**84** mit TFA/TIS behandelt. Anschließend wurde das abgespaltene Produkt mittels semipräparativer HPLC gereinigt und das Elutionsmittel im Vakuum bei 40°C entfernt. Die Endaktivität des Produkts [¹⁸F]**84** betrug 36–140 MBq (RCA = 7–13%, d. c., A_S = 5 GBq/μmol, n = 3) (Abbildung 43).

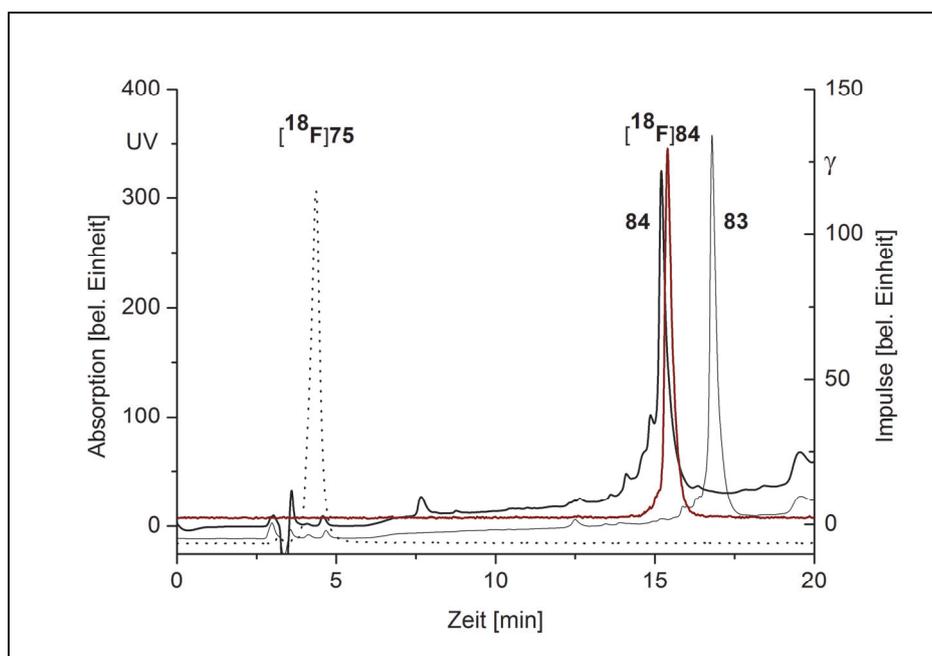


Abbildung 43: (Radio)-HPLC Chromatogramme von Peptid [¹⁸F]**84** (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 15,2$ min), Referenzsubstanz **84** (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 15,1$ min), Präkursorpeptid **83** (UV-Spur, dünne Linie, $t_R = 16,6$ min) und [¹⁸F]AFP [¹⁸F]**75** (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,2$ min) (Gradient 2)

Radiopharmakologische Evaluierung von [¹⁸F]84

Es wurden erste Zellassoziationsexperimente *in vitro* durchgeführt, um die extrazelluläre Bindung des neuen potentiellen Radiotracers zu testen. Dazu wurden A375^{EphA2}-Zellen in Zellmedium verwendet, auf welche [¹⁸F]84 in PBS-Puffer aufgetragen wurde. Die Zellen wurden anschließend 5–120 Minuten bei 37°C inkubiert. Mittels HPLC-Analyse wurde nachgewiesen, dass [¹⁸F]84 im Zellmedium nach 60 Minuten keine Metabolisierung zeigt. Nicht aufgenommene Aktivität wurde anschließend von den Zellen gewaschen und die verbliebene Aktivität mittels COBRA Gamma-Zähler gemessen. Daraus wurde das Verhältnis von Protein zu Aktivität bestimmt.

Dabei wurde festgestellt, dass keine spezifische Zellassoziation von [¹⁸F]84 stattgefunden hat (Abbildung 44).

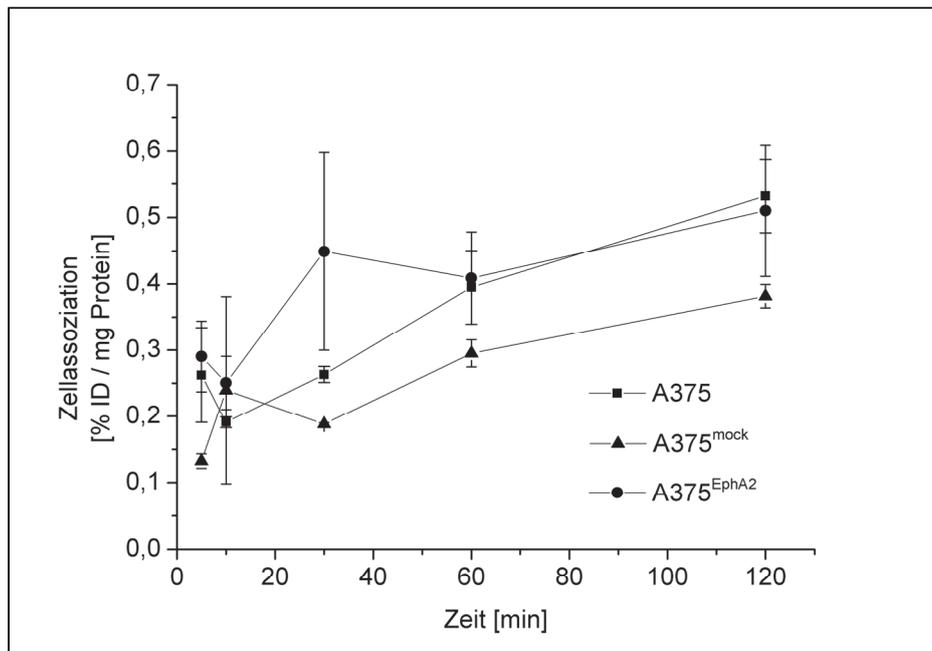


Abbildung 44: Zellassoziationsexperimente mit [¹⁸F]84 bei 37°C innerhalb von 120 min

Die Stabilitätsuntersuchung von [¹⁸F]84 wurde *in vitro* in Rattenplasma durchgeführt. Dabei war laut HPLC [¹⁸F]84 bereits nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37°C sämtliche Aktivität in einen hydrophileren Metaboliten ($t_R = 10,8$ min) umgewandelt worden (Vgl. Retentionszeit [¹⁸F]84: $t_R = 15,2$ min).

Weiterhin wurde ein erstes Bioverteilungsexperiment mit [^{18}F]84 unter Verwendung weißer Fellmäuse durchgeführt.* Dazu wurden 8 MBq von [^{18}F]84 intravenös in die Schwanzvene der Fellmaus injiziert (Abbildung 45). Die PET-Aufnahmen zeigen nach 45 Minuten eine Anreicherung der Aktivität in den Nieren und der Blase. Weiterhin lassen die maximalen Intensitätsprojektionen erkennen, dass sich Aktivität in geringem Maße in der Leber, der Gallenblase und dem Darm befindet. Somit unterliegt das SWLAY-Peptid [^{18}F]84 einer ähnlichen renalen Eliminierung wie die SNEW-Peptide.

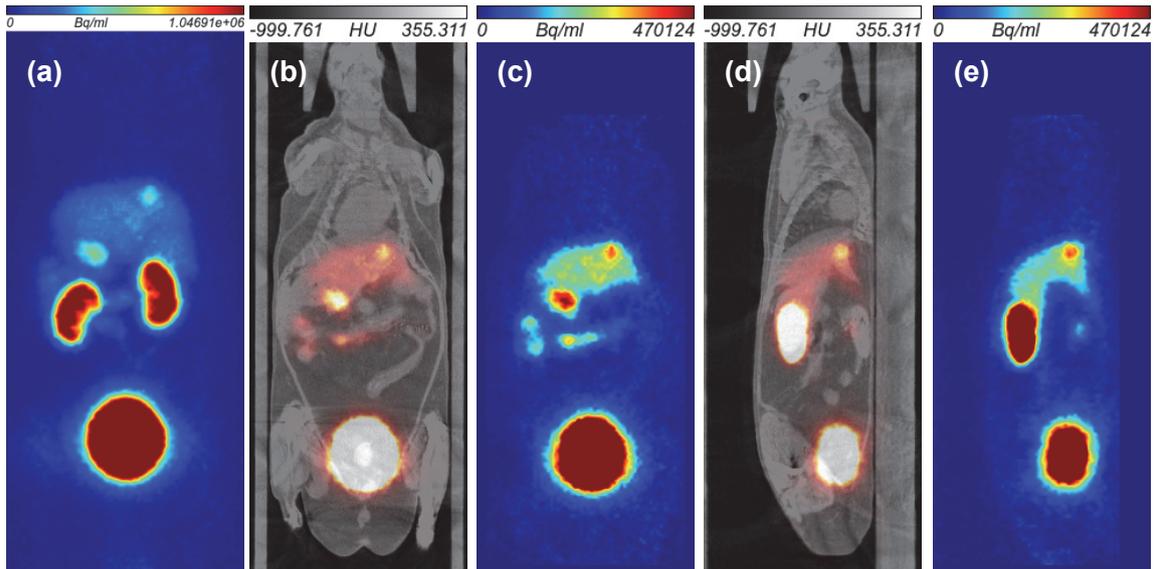


Abbildung 45: PET und MRT Bilder von [^{18}F]84 in einer weißen Fellmaus 45 min nach der Injektion. (a) Maximal-Intensitäts-Projektion (b) PET/MRT coronal (c) PET coronal (d) PET/MRT sagittal (e) PET sagittal

Die Ergebnisse zeigen, dass das SWLAY-Peptid [^{18}F]84 nicht als Radiotracer geeignet ist, da es in vivo instabil ist und keine Zellassoziation nach 120 Minuten zeigt. Somit ist dieses untersuchte radiomarkierte Peptid durch seine Instabilität und geringe Affinität gegenüber A375^{EphA2}-Zellen vorerst nicht für In-vivo-Diagnostik von Tumoren geeignet.

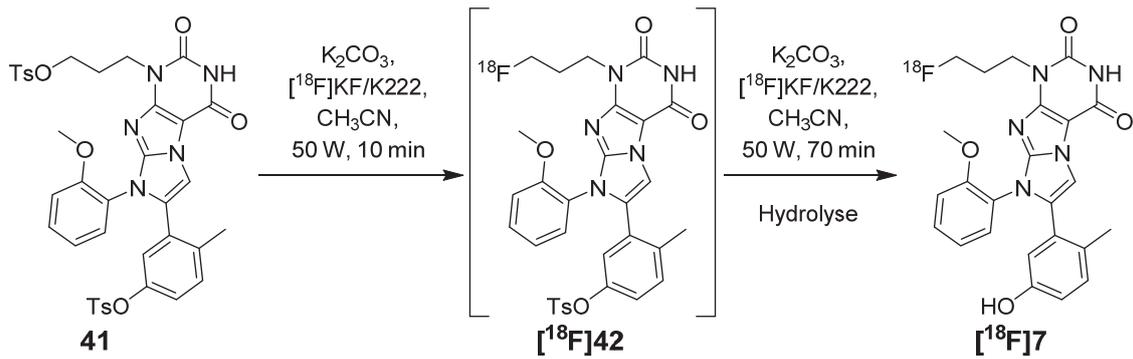
* Die PET-Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Ralf Bergmann durchgeführt.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Zur Untersuchung von Krankheiten wie Parkinson oder Alzheimer und im Rahmen der Krebsforschung werden hochselektive Pharmaka verwendet, welche mit Radionukliden markiert werden, um mittels PET oder SPECT eine Funktionsdiagnostik des Krankheitsbildes zu ermöglichen. Insbesondere in der Krebsforschung werden zunehmend Peptide oder Proteine verwendet, die sich hoch selektiv an oder in den Krebszellen anreichern sollen. Da die radioaktive Markierung solcher makromolekularen Verbindungen milde und selektive Bedingungen erfordert, ist es notwendig, geeignete Markierungsmethoden zu entwickeln. Es müssen also Markierungsbausteine entwickelt werden, welche die harschen Bedingungen einer Radiomarkierung überstehen und im Anschluss unter physiologischen Bedingungen selektive Reaktionen mit den pharmakologisch relevanten Verbindungen eingehen (Prelabeling-Prinzip).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden grundlegende Arbeiten für zwei ^{18}F -Fluorierungsagenzien durchgeführt, sowie ein Versuch zur Nutzung kleiner Moleküle als Radiotracer. Dabei wurden Peptide und kleine Moleküle mit Fluor-18 markiert, welche auf selektiven extra- und intrazellulären Inhibitoren für Eph-Rezeptoren basieren. Von den Eph-Rezeptoren ist bekannt, dass sie in diversen Tumoren dysreguliert sind und daher ein geeignetes Target für die Tumordiagnostik und Therapie darstellen.

Auf Basis eines kleinen Moleküls, welches ein intrazellulärer Eph-Rezeptor-Inhibitor ist, wurden zwei Präkursoren für ein ^{18}F -Markierung entwickelt, wobei zwei Möglichkeiten zur Markierung in Betracht gezogen wurden, um die Affinität zur Kinase-Domäne der Eph-Rezeptoren nicht zu stark beeinflussen. Präkursor **41** mit der Tosyloxypropylkette am Stickstoffatom N-3 des Imidazopuringerüsts wurde erfolgreich mit Fluor-18 radiomarkiert (RCA = 3,5–6,0%, d. c., $A_S = 10,3 \pm 5,1 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$) (Schema 34).



Schema 34: Vermuteter Ablauf der Radiofluorierung und Schutzgruppenabspaltung vom Präkursor **41** zu Radiotracer **[¹⁸F]7**

Dieser neue potentielle Radiotracer **[¹⁸F]7** zeigte eine außergewöhnlich hohe Stabilität in vitro (99% nach 120 min in Rattenplasma) und wurde an der Melanomzelllinie A375 auf seine Zellaufnahmeigenschaften untersucht. Erste Zellstudien mit A375^{EphA2}-Zellen zeigen eine Bindung der Aktivität ($138 \pm 26\%$ ID/mg Protein) nach 120 Minuten. Signifikante Hemmungen der Aufnahme von **[¹⁸F]7** unter Verwendung des Original-Inhibitors **6** konnten nicht nachgewiesen werden; damit ist diese Substanz nicht zur Visualisierung des EphA2-Rezeptors geeignet.

Die Radiomarkierung von Peptiden und Proteinen ist weiterhin eine große Herausforderung in der Radiopharmazie. Bis heute gibt es keinen universellen Markierungsbaustein für diese Biomakromoleküle und die Radiomarkierung muss unter den meisten Umständen für ein spezielles Peptid oder Protein angepasst werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide, SNEW-Peptide (EphB2-selektiv) und SWLAY-Peptide (EphA2-selektiv), enthalten Aminosäureschlüsselsequenzen am N-Terminus, welche durch ihre Affinität an die extrazelluläre Bindungsdomäne der jeweiligen Eph-Rezeptoren binden.

In ersten Markierungsversuchen wurde ein SNEW-Peptid mit Lysin am C-Terminus funktionalisiert und selektiv mit $[^{18}F]SFB$ **[¹⁸F]47** an der festen Phase markiert. Dabei wurden jedoch nur geringe Ausbeuten ($RCA = 5 \pm 2\%$; d. c.) von Peptid **[¹⁸F]52** erzielt. Deswegen wurde ein SNEW-Peptid mit Cystein am C-Terminus funktionalisiert und erfolgreich mit $[^{18}F]FBAM$ **[¹⁸F]48** radiomarkiert. Das entstandene Peptid **[¹⁸F]54** zeigte bei In-vitro-Stabilitätsuntersuchungen jedoch die rasche Bildung eines lipophileren Nebenproduktes, was mit der Reversibilität der Michael-Addition erklärt werden kann. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden neue, robuste und bioorthogonale Markierungsmethoden entwickelt, die auf der Huisgen-Cycloaddition beruhen und bei

denen die Markierungsbausteine über selektive Reaktionen in die betreffenden Peptide eingeführt wurden.

Daher wurden zwei neue Markierungsbausteine 1-(3-Azidopropyl)-4-(3-[^{18}F]fluorpropyl)piperazin (^{18}F AFP) (^{18}F 75) und 1-(But-3-ynyl)-4-(3-[^{18}F]fluorpropyl)piperazin (^{18}F BFP) (^{18}F 57) entwickelt. Sie können bequem aus einfachen Ausgangssubstanzen synthetisiert und anschließend mit hohen radiochemischen Ausbeuten radiofluoriert werden. Die Synthese der Präkursoren und der nicht-radioaktiven Referenzen war unkompliziert. Diese Markierungsbausteine sind sehr hydrophil und können in wässrigen Medien unter physiologischen Bedingungen durch die Huisgen-Cycloaddition zu Markierungszwecken von Biomakromolekülen eingesetzt werden. Weiterhin wurde eine schnelle und robuste automatisierte Synthese für ^{18}F 57 und ^{18}F 75 entwickelt. Eine einfache Trennung der Markierungsbausteine von den Reaktionsmischungen wurde durch Kartuschen realisiert. LogD-Werte und In-vitro-Stabilitätsuntersuchungen bestätigten günstige Eigenschaften und eine hohe Stabilität von beiden Markierungsbausteinen. Die Markierungseigenschaften von ^{18}F 57 und ^{18}F 75 wurden zunächst erfolgreich mit hohen radiochemischen Ausbeuten an Azid- und Alkin-funktionalisierten Aminosäuren getestet. In einem Folgeschritt wurden die Azid- und Alkin-funktionalisierten Aminosäuren mittels Festphasenpeptidsynthese in Peptide eingebaut, um somit die Peptide für die selektive Huisgen-Cycloaddition zugänglich machen.

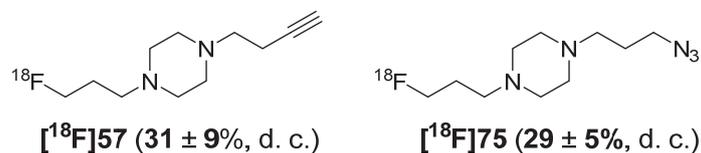


Abbildung 46: Markierungsbausteine BFP ^{18}F 57 und AFP ^{18}F 75 für die CuAAC

Zunächst wurde ^{18}F BFP an verschiedenen Azid-funktionalisierten SNEW-Peptiden angewandt. Bei der Kupfer-katalysierten Huisgen-Cycloaddition wurde festgestellt, dass es in Lösung zu einer Komplexbildung oder Aggregation des Kupferions durch das SNEW-Peptid kam, sich dadurch die Struktur des SNEW-Peptids änderte und somit die pharmakologischen Eigenschaften änderte. Das so erhaltene ^{18}F -markierte SNEW-Peptid war für In-vivo-Untersuchungen nicht geeignet. Daher wurde eine Festphasenmarkierungsstrategie von SNEW-Peptiden mit ^{18}F BFP ausgearbeitet, bei der nach erfolgter Cycloaddition die restliche Cu-Spezies mit Hilfe des starken Cu(II)-Komplexbildners Bispidin vom SNEW-Peptid entfernt wurde. Die so erhaltenen kupferfreien, ^{18}F -markierten SNEW-Peptide ^{18}F 67, ^{18}F 69 und ^{18}F 71 wurden mit Rattenplasma auf ihre In-vitro-Stabilität untersucht und zeigten nach einstündiger

Inkubation bei 37°C noch 95% intaktes Peptid. Dennoch waren die erhaltenen radiochemischen Ausbeuten der SNEW-Peptide nur sehr gering (0,4–1,8%, d. c.). Dies lag an einer unerwarteten Nebenreaktion, der Glaserkupplung, die zu einer Dimerisierung des Markierungsbausteins [¹⁸F]57 zu ([¹⁸F]BFP)₂ ([¹⁸F]72) führte und [¹⁸F]BFP somit der Radiomarkierung der SNEW-Peptide entzogen wurde. Außerdem ist es für die Huisgen-Cycloaddition von Vorteil, wenn das Alkin im Überschuss zum Azid vorliegt, was bei dieser Radiomarkierungsmethode nicht der Fall war.

Daraus schlussfolgernd, wurde das Markierungsagenz [¹⁸F]75 entwickelt, bei dem eine Azidgruppe vorliegt, wodurch [¹⁸F]75 die Glaserkupplung nicht eingehen kann. Mit [¹⁸F]75 wurde das Alkin-funktionalisierte SNEW-Peptid 81 markiert und das radiomarkierte SNEW-Peptid [¹⁸F]82 mit 10fach höheren radiochemischen Ausbeuten (10–15%, d. c.) erhalten. Auch [¹⁸F]82 wurde mit Hilfe von Bispidin von überschüssigen Cu-Spezies getrennt und zeigte ähnliche In-vitro-Stabilitäten (≥ 80% nach 60 min in Rattenplasma) wie die anderen mit [¹⁸F]BFP markierten SNEW-Peptide. Die metabolische Stabilität des SNEW-Peptids [¹⁸F]82 wurde in Wistar Ratten untersucht. Fünf Minuten nach der intravenösen Injektion von [¹⁸F]82 waren nur noch 17% intaktes SNEW-Peptid im Blutkreislauf der Ratten vorhanden. Die meiste Aktivität wurde nach einer Stunde in den Nieren und in der Blase gefunden. Davon entnommene Proben zeigten vier hydrophilere Metaboliten, bei denen es sich jedoch nicht um [¹⁸F]Fluorid handeln konnte, da auf Kleintier-PET-Bildern keine Knochenanreicherung zu erkennen war. Es wurde festgestellt, dass das SNEW-Peptid [¹⁸F]82 nicht als Radiotracer geeignet ist, da es einer sehr schnellen Metabolisierung unterliegt.

Eine weitere in dieser Arbeit untersuchte Peptidsequenz ist SWLAY. Das SWLAY-Peptid zeigt laut Literatur eine Affinität und Selektivität zum EphA2-Rezeptor. Auch dieses SWLAY-Peptid wurde mittels [¹⁸F]AFP [¹⁸F]75 erfolgreich radiomarkiert. Das daraus erhaltene SWLAY-Peptid [¹⁸F]84 wurde mit ähnlichen radiochemischen Ausbeuten (7–13%, d. c.) hergestellt, wie das analog mit [¹⁸F]AFP markierte SNEW-Peptid [¹⁸F]82. Es wurden radiopharmakologische Untersuchungen durchgeführt, wobei [¹⁸F]84 an den gleichen A375-Zelllinien getestet wurde, wie das Imidazopurinderivat [¹⁸F]7. Bei drei unabhängigen Versuchen wurden Zellassoziationen unter 1% ID/mg Protein beobachtet. Damit fand keine Zellbindung des EphA2-selektiven SWLAY-Peptids [¹⁸F]84 statt. Bei Kleintier-PET-Untersuchungen zeigte [¹⁸F]84 eine schnelle Metabolisierung.

Die Eingangs aufgestellte Hypothese, dass sich die untersuchten radiomarkierten, Eph-affinen SNEW- und SWLAY-Peptide als mögliche Radiotracer für Eph-Rezeptor-überexprimierende Tumorzellen eignen könnten, wurde somit widerlegt. Weitergehende Experimente zur Stabilisierung der Peptide sind notwendig.

Wichtigstes Ergebnis ist die Entwicklung und die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten des Markierungsbausteines [^{18}F]AFP. Dieser eignet sich in besonderem Maße für die Markierung von Alkin-funktionalisierten Peptiden. Auch die Entfernung von Cu-Spezies mittels Bispidin von den Peptiden ist ein sehr wichtiger Schritt in Hinblick auf die saubere Isolierung und In-vivo-Anwendung von mittels Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition markierten ^{18}F -Radiotracer. Die Markierung von weiteren Peptiden über diese robuste Methode ist denkbar und vielversprechend.

Das Imidazopurinderivat [^{18}F]**8**, welches sich durch eine [^{18}F]Fluorpropoxygruppe am Phenylring von Original-Inhibitor **6** auszeichnet, muss noch hergestellt werden. Daher steht eine radiopharmakologische Charakterisierung dieser Substanz noch aus.

Um höhere Ausbeuten bei der Radiomarkierung der Imidazopurinderivate zu erreichen, wurde anstelle des Tosylpräkursors **41** auch ein entsprechender Nosylatpräkursor entwickelt. Die Radiomarkierung mit [^{18}F]Fluorid steht ebenfalls noch aus.

Eine abschließende Gegenüberstellung der beiden Ansätze, entweder Peptide als Radiotracer zu verwenden, die affin zur extrazellulären Bindungsdomäne von Eph-Rezeptoren sind oder niedermolekulare Verbindungen als Radiotracer zu verwenden, welche affin zur intrazellulären Kinasedomäne von Eph-Rezeptoren sind, ist nicht möglich. Dies setzt unter anderem die Stabilität der Peptide unter Erhalt ihrer Selektivität und Affinität voraus.

5. Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Arbeitstechniken und Geräte

5.1.1 Geräte und Materialien

Gerät / Material	Hersteller / Bezeichnung
Anionenaustauscherkartusche QMA C18 Kartusche Aktivimeter	Waters / Sep-Pak® Light Accel™ Plus Macherey-Nagel / Chromafix® 240 mg Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH / Isomed 1000
Diffraktometer Elementaranalyse	Bruker APEX-II CCD Hekatech GmbH / EuroVektor CHNS- Elementaranalysator - EuroEA 3000
Gamma-Zähler ICP-MS Kieselgel Kieselgelkartusche Massenspektrometer	COBRA II, Canberra-Packard, Dreieich Perkin Elmer / Elan 9000, Quadrupol Merck / Kieselgel 60, 40 - 63 µm Merck / LiChrolut® Silica Gel Micromass / Quattro-LC Bruker / Autoflex II TOF/TOF
NMR-Spektroskop Peptidsyntheseautomat Radio-DC-Scanner Radiosynthesemodul Schmelzpunktmessgerät Zyklotron	Varian / Inova-400 CEM / Microwave Peptide Synthesizer Fuji / BAS2000 GE / TRACERlab Fx _{FN} TSO-Gerätebau / Nagema / Rapido Ion beam application (IBA) / Cyclone 18/9

5.1.2 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien	Hersteller / Bezeichnung
Rink-Amid-MBHA-Harz Beladungsgrad 0,6 mmol/g	Novabiochem
N-Fmoc-geschützte Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen für die SPPS Ala, Arg(Pbf), Asn(Trt), Cys(Trt), Gln(Trt), Glu(tBu), Gly, His(Trt), Ile, Leu, Pro, Ser(tBu), Trp(Boc), Tyr(tBu), Val	Bachem

DMEM ohne Glucose (Biochrom Katalognr. F0405)

- DMEM Flüssigmedien ohne D-Glucose
- mit 3,7 g/l NaHCO₃, ohne L-Glutamin

Kaisertestlösungen

Lösung 1: 1 g Ninhydrin in 20 ml Ethanol

Lösung 2: 80 g Phenol in 20 ml Ethanol

Lösung 3: 0,4 ml wässrige KCN-Lösung (1 mM) in 20 ml Pyridin

Kryptofixlösung (86%)

- 500 mg Kryptofix® K2.2.2 in 30 ml Acetonitril lösen

- 92,3 mg K_2CO_3 in 7 ml Wasser lösen

- Gemisch auf 50 ml mit Acetonitril auffüllen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS - phosphate buffered saline) (pH 7,5)

- 8 g Natriumchlorid

- 0,2 g Kaliumchlorid

- 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat

- 0,24 Kaliumdihydrogenphosphat

- auf 1 l dest. Wasser auffüllen

Calcium-Bindungspuffer (pH 7,5)

- 150 mmol/l NaCl

- 20 mmol/l HEPES

- 1,2 mmol/l $MgCl_2$

- 1,3 mmol/l $CaCl_2$

PBS- ("minus") (zur Inkubation von Zellen mit nicht-radioaktiver Substanz)

- PBS-Lösung (10x) ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}

- Biochrom Katalognr. L 1835

- mit dest. Wasser auf 1x PBS verdünnen

PBS++ (zum Waschen der Zellen vor Lyse)

- 1x PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+}

Sørensen-Glycin/HCl-Puffer (pH 2,0)

- 7,505 g Glycin

- 5,85 g NaCl

- zusammengeben und mit 1 l dest. Wasser lösen

- 52 ml davon für 100 ml Pufferlösung verwenden

- mit 48 ml 0,1 M HCl auffüllen

Sørensen-Phosphatpuffer (pH 7,4)

- 9,1 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1 l dest. Wasser lösen
- 18,2 ml für 100 ml Pufferlösung verwenden
- 11,9 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat in 1 l dest. Wasser lösen
- 81,8 ml verwenden

Tris/HCl-Puffer 0,5 M (pH 8.0)

- 6,06 g Tris in 100 ml dest. Wasser lösen
- pH-Wert mit 1 M HCl einstellen

5.1.3 Chemische Synthesen

Um den Fortschritt der Reaktionen zu beobachten, wird Dünnschichtchromatographie in geeigneten Lösungsmittelgemischen in LM-gesättigter Atmosphäre betrieben. Als Lösungsmittel eignet sich vorzugsweise Petrolether und Ethylacetat. Die Detektion der Komponenten erfolgt unter Zuhilfenahme einer UV-Lampe (254 nm). Außerdem wird eine Ninhydrinlösung für die Anfärbung von Verbindungen benutzt, welche nicht UV-aktiv sind aber freie Aminogruppen besitzen. Die Ninhydrinlösung kann weiterhin für die qualitative Analyse von Aminosäuren verwendet werden [156]. Die Reinigung der Produkte erfolgt mittels Säulenchromatographie und Kieselgel 60 (40–63 µm) der Firma Merck oder mittels Kugelrohrdestillation. Alle verwendeten Glasgeräte sind handelsübliche Normschliffgeräte. Reaktionen unter Inertgasatmosphäre wurden mittels Schlenk-Technik durchgeführt.

5.1.4 Radiochemische Synthesen

Zunächst wird eine Anionenaustauscherkartusche (Waters, QMA) für die [¹⁸F]Fluorid-Aufnahme konditioniert, indem sie mit 5 ml 1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit 10 ml destilliertem Wasser gespült wird. Das n.c.a. [¹⁸F]Fluorid wird im Zyklotron über die ¹⁸O(*p,n*)¹⁸F Reaktion hergestellt und gelangt in Wasser gelöst über das computergesteuerte Radionuklid-Transportsystem (RATS) in die Synthesebox. Das [¹⁸F]Fluorid-haltige Targetwasser wird über die zuvor konditionierte Anionenaustauscherkartusche gegeben und das adsorbierte [¹⁸F]Fluorid mit einer Kryptofix K222/K₂CO₃-Lösung oder einer 4,5%igen TBAOH-Lösung in ein Reaktionsgefäß eluiert. Die Lösung wird bei 100°C im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt und das [¹⁸F]Fluorid mindestens dreimal durch azeotrope Destillation mit je 1 ml Acetonitril von restlichem Wasser befreit. Nach der Trocknung wird der Markierungspräkursor in trockenem Acetonitril oder einem Gemisch aus *tert*-Butanol

und Acetonitril aufgenommen und zum [^{18}F]Fluorid gegeben. Das Reaktionsgefäß wird fest verschraubt und bei Wärme für bestimmte Zeit gerührt. Zur Optimierung der Radiosynthese werden verschiedene Temperaturen, Mikrowellenbedingungen und unterschiedliche Lösungsmittel wie DMSO, Acetonitril oder DMF bei verschiedenen Reaktionszeiten verwendet. Die Optimierung der Konzentration an eingesetztem Präkursor wurde ebenfalls durchgeführt.

5.1.5 Modulsynthese für radioaktive Markierungsbausteine

Im Modul befinden sich zwei Reaktoren, wobei einer beheizbar ist, 9 Vorratsgefäße, über die nacheinander Lösungsmittel oder Präkursoren zum jeweiligen Reaktor zugeführt werden, eine HPLC und ein Kartuschensteckplatz für die Reinigung der Markierungsbausteine, sowie ein Auffanggefäß für den gereinigten, fertigen Markierungsbaustein.

Zunächst wird das am Zyklotron produzierte [^{18}F]Fluorid in das Modul geleitet und von einer mit 1 M NaHCO_3 -Lösung aktivierten QMA Kartusche adsorbiert. Als nächstes erfolgt die Elution des [^{18}F]Fluorids in das beheizbare Reaktionsgefäß mit 1,5 ml einer Kryptofix K222/ K_2CO_3 -Lösung aus dem Vorratsgefäß 1 mittels Stickstoff. Nun wird bei 95°C im Stickstoffstrom das Fluorid getrocknet. Dazu wird aus Vorratsgefäß 2 Acetonitril zum Reaktor zugegeben, um eine azeotrope Destillation durchzuführen. Ist das Fluorid getrocknet, d.h. weitestgehend von Wasser befreit (kleiner als 1000 ppm H_2O) [157], wird eine Lösung des jeweiligen Präkursors ins Reaktionsgefäß aus Vorratsgefäß 3 gegeben und für die vorher bestimmte Zeit bei definierter Temperatur reagiert. Ist die Reaktion abgeschlossen, wird das Reaktionsgemisch zur Reinigung über die Kieselgel-Kartusche geleitet. Anschließend wird der Markierungsbaustein mittels verschiedener Elutionsmittel aus den Vorratsgefäßen 7 bis 9 unabhängig von anderen Substanzen im Reaktionsgemisch von der Kartusche in ein Auffanggefäß eluiert und steht dann für folgende Radiomarkierungen zur Verfügung. Alle Reagenzlösungen und Lösungsmittels werden im Modul mittels Stickstoff transportiert. Die Temperatur des Reaktionsgefäßes wurde mit Stickstoff reguliert.

5.1.6 Radiodünnschichtchromatographie

Die geringe Konzentration der radioaktiven Substanzen führt dazu, dass herkömmliche Dünnschichtchromatographie mit Detektion durch UV-Anregung oder Färbemittel unmöglich sind. Stattdessen wird der Radio-Dünnschichtchromatographiescanner BAS2000 zur Quantifizierung der Produkte und des [^{18}F]Fluorids verwendet. Dazu werden Proben auf eine herkömmliche Dünnschichtchromatographie-Alufolie aufgetragen und mit einem vorher durch die nicht-radioaktive Referenzsubstanz

bestimmten Laufmittelgemisch (z.B. Petrolether:Ethylacetat) eluiert. Danach wird die Folie wenige Sekunden auf eine Imaging-Platte gelegt und wieder entfernt. Die dabei emittierte Strahlung regt Elektronen in den mit Europium dotierten Bariumfluoridkristallen der Platte an. Im Scanner erfolgt eine sekundäre Anregung, bei der die Elektronen unter Aussendung von Licht wieder in den Grundzustand zurückkehren. Diese Lichtquanten werden detektiert und quantifiziert. Die Bestimmung der radiochemischen Ausbeute erfolgt mit der Auswertungssoftware „Aida Array Compare v4.10“.

5.1.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Weil die Fluor-18-markierten Substanzen nur im piko- bis nanomolaren Bereich dargestellt werden, wird eine Charakterisierung mittels gängiger Analysemethoden wie NMR, IR und UV unmöglich und eine Messung mit MS stark eingeschränkt. Stattdessen werden Referenzsubstanzen mit Fluor-19 dargestellt, die mit den radioaktiven Substanzen über die Retentionszeiten in einem HPLC-Lauf verglichen werden können (Tabelle 6).

Tabelle 6: HPLC-System und Parameter

Gerät	Hersteller / Bezeichnung
HPLC-System, analytisch	Elite LaChrom/VWR Hitachi
HPLC-System, semipräparativ	Jasco
HPLC-System, präparativ	Alpha Crom, Varian Prostar/Prepstar
UV-Diodenarray-Detektor	
Aktivitätsdetektor	Raytest / Gabi
Stationäre Phase, analytisch	Aqua C18 100A, Phenomenex 250 x 4,6 mm Nucleosil 100-5C18 Nautilus, Macherey-Nagel 250 x 4,6 mm Nucleosil Standard C18 100Å 7µ, Macherey-Nagel, 250 x 4,6 mm
Stationäre Phase, semi-präparativ	Nucleosil Standard C18 100Å 7µ, Macherey-Nagel, 250 x 16 mm
Für In-vivo-Experimente	Zorbax 300SB-C18 5 µm, 250 x 9,4 mm
Stationäre Phase, präparativ	Varian Dynamax Microsorb 60-8 C18 250 x 21,4 mm
Mobile Phase	Acetonitril + 0,1% TFA, Wasser + 0,1% TFA
Elutionsart	isokratisch, Gradient (für Peptide/Aminosäuren)
Flussrate	1 ml/min (analytisch), 2–4 ml/min (semipräp.), 15–20 ml/min (präparativ)
Injektionsvolumen	1–100 µl (analytisch), 100–1000 µl (semipräp.), 500–5000 µl (präparativ)
Wellenlänge	254 nm, 220 nm

Tabelle 7: Gradient 1 für Peptid [¹⁸F]54

Zeit [min]	0	10	10	12	20
% H ₂ O	80	50	20	80	80
% CH ₃ CN	20	50	80	20	20

Tabelle 9: Gradient 3 für 43

Zeit [min]	0	1	10	16	17
% H ₂ O	90	90	30	10	90
% CH ₃ CN	10	10	70	90	10

Tabelle 11: Gradient 5 für [¹⁸F]7

Zeit [min]	0	1	18	25	26
% H ₂ O	90	90	10	10	90
% CH ₃ CN	10	10	90	90	10

Tabelle 8: Gradient 2 für Peptide

Zeit [min]	0	1	17	18	25
% H ₂ O	90	90	55	10	10
% CH ₃ CN	10	10	45	90	90

Tabelle 10: Gradient 4 für In-vivo-Experimente

Zeit [min]	0	15	16	20
% H ₂ O	80	50	10	10
% CH ₃ CN	20	50	90	90

Tabelle 12: Gradient 6 für 67 in Lösung

Zeit [min]	0	12	13	14
% H ₂ O	90	60	5	95
% CH ₃ CN	10	40	95	5

5.1.8 Peptidsynthese am Syntheseautomaten

Die Peptide werden über die Fmoc-Festphasenpeptidsynthese am Peptidsyntheseautomat hergestellt. Das dafür verwendete Rink-Amid-MBHA-Harz ist durch seinen Benzhydrylamin-Linker (Abbildung 47) säurelabil, was durch den elektronenziehenden Effekt eines zusätzlichen Acetamido-Spacer am Harz erreicht wird [158].

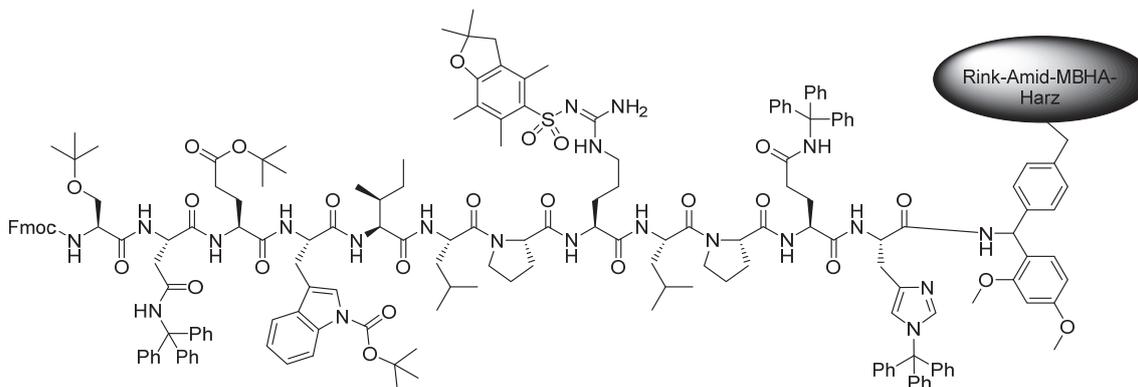


Abbildung 47: Darstellung der Bindungsstelle zwischen SNEW-Peptid mit Schutzgruppen für die SPPS und dem Rink-Amid-MBHA-Harz

Der Vorteil der Fmoc-basierten Peptidsynthese besteht darin, dass keine starken Säuren wie TFA verwendet werden, die die Leitungen des Syntheseautomaten schädigen könnten, wie es bei der Boc-basierten Peptidsynthese der Fall ist. Der Syntheseautomat ermöglicht es, Peptide in Maßstäben von 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM etc. herzustellen. Dazu werden 0,2 M Lösungen von Fmoc-geschützten

Aminosäuren mit den jeweiligen Seitenketten-schutzgruppen in DMF hergestellt und an den Automaten angebracht. Weiterhin wird der Automat mit Aktivator (0,45 M HBTU in DMF), Aktivatorbase (DIPEA in NMP) und Fmoc-Entschützungsreagenz (20% Piperidin in DMF, 0,1 M HOBt) versehen. Ein entsprechendes Harz (Rink-Amid) wird in DMF gequollen und ebenfalls an den Automaten angebracht. Die vollständige Synthese dauert etwa 8 Stunden für ein 12mer. Zunächst wird das vorgequollene Harz, welches ebenfalls eine Fmoc-Schutzgruppe enthält, mit dem Entschützungsreagenz (zweimal 7 ml) entschützt und mehrmals mit DMF gewaschen. Die Peptidsynthese erfolgt vom C-Terminus aus. Dazu werden 2,5 ml (5 Äq.) der Lösung der ersten Aminosäure entnommen und zu der Suspension des Harzes gegeben. Nun folgt die Aktivierung unter Zugabe von 1 ml HBTU-Lösung und anschließender Zugabe von 0,5 ml Aktivatorbase. Die Kupplung an das Harz erfolgt bei 90°C unter Mikrowellenbedingungen innerhalb von 45 Minuten. Danach wird wieder mit DMF gewaschen um Reste von unumgesetzten Reagenzien zu entfernen. Dann beginnt der nächste Zyklus mit Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe und Zugabe der nächsten Aminosäure. Bestimmte Aminosäuren erfordern andere Zyklenbedingungen. Histidin kann bei 90°C tautomerisieren, daher wird eine Kupplung bei lediglich 50°C durchgeführt. Der Kupplungsschritt für Arginin wird doppelt ausgeführt werden, um eine hohe Ausbeuten sicherzustellen.

Ist das Peptid fertig hergestellt, erfolgt normalerweise eine Entschützung der Seitenketten und Abspaltung vom Harz mittels TFA. Zunächst wird hier nur die finale Entschützung der letzten Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus automatisiert durchgeführt.

Der Erfolg der Fmoc-gestützten SPPS ist durch verschiedene Nebenreaktionen beim Entschützen der Seitenketten mittels TFA beeinträchtigt. Die meisten dieser Nebenreaktionen betreffen die Aminosäuren Trp, Tyr, Met und Cys. Daher wurden Abspaltreagenzien geschaffen, deren Bestandteile solche Nebenreaktionen unterdrücken, indem sie reaktive Zwischenstufen und Radikale abfangen.

Die Entschützung der Seitenketten und Abspaltung vom Harz wird manuell mit Reagenz K, einem Gemisch aus TFA/Thioanisol/H₂O/Phenol/EDT im Verhältnis v:v = 82,5:5:5:5:2,5 durchgeführt [133]. Eine umgänglichere Alternative stellt das Abspaltreagenz TFA/TIS/H₂O im Verhältnis v:v = 95:2,5:2,5 dar [134, 159]. Das getrocknete Harz wird in einer Spritzenfritte mit Luerstopfen für 1,5–4 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Abspaltreagenz versetzt. Die Lösung wird danach durch die Fritte in ein Falcon-Röhrchen filtriert und das Harz zweimal mit TFA (1 ml) nachgespült. Anschließend wird TFA aus dem Filtrat mittels Stickstoffstrom abgedampft. Dann wird eiskalter Diethylether zur Lösung des Peptides gegeben und das ausgefallene Peptid

wird über eine weitere Spritzenfritte filtriert und an der Luft getrocknet. Das Rohpeptid wird danach mittels präparativer HPLC und geeignetem Gradienten gereinigt, zuletzt lyophilisiert und bei -65°C gelagert.

5.1.9 Manuelle Synthese von Peptiden nach der Festphasenmethode

Werden spezielle, selbst hergestellte Fmoc-geschützte Aminosäuren verwendet, wird eine manuelle Synthese der automatisierten Synthese vorangestellt, um Reagenzverluste zu minimieren. Dazu wird das entsprechende Harz zunächst von Hand zweimal mittels Entschützungsreagenz (40% Piperidin/DMF) bei 40°C entschützt (Fmoc-SG) und gewaschen. Die entsprechende Stoffmenge der zu kupplenden Aminosäure wird in DMF gelöst und mit dem Aktivator HOBt und HBTU versetzt. Danach wird Aktivatorbase DIPEA zugegeben, die gesamte Lösung in einer Spritzenfritte zum entschützten Harz gegeben und bei 40°C für 4 Stunden geschüttelt. Nach der Kupplung wird das Harz mehrmals gewaschen. Wenn das Harz vollständig mit Aminosäure beladen ist, kann das Synthesemodul damit beladen werden. Es wird dazu in DMF vorgequollen und die Masse der Aminosäure ohne Fmoc-Schutzgruppe im Automaten eingegeben. Die Peptidsynthese startet wie am unbeladenen Harz mit der Entschützung der α -Aminofunktion (Fmoc-SG) und anschließender Aktivierung und Kupplung.

5.1.10 Kaisertest

Um festzustellen, ob die manuelle Kupplung an das Harz vollständig abgelaufen ist, wird der Kaisertest durchgeführt. Bei diesem Test werden freie Aminogruppen nachgewiesen, die sich an unvollständig beladenem Harz befinden. Dazu werden ein paar Kügelchen des Harzes entnommen und nacheinander mit jeweils 3 Tropfen der Kaisertest-Lösungen 1 (Kaliumcyanid in einer wässrigen Pyridinlösung), 2 (~6% Ninhydrin in Ethanol) und 3 (~80% Phenol in Ethanol) versetzt. Anschließend reagiert die Suspension 5 Minuten bei 120°C ohne Schütteln. Sind freie Aminogruppen vorhanden (positiver Test), färbt sich die Lösung dunkelblau, weil der Farbstoff Ruhemanns Blau gebildet wird. Sind keine freien Aminogruppen mehr vorhanden (negativer Test), bleibt die Lösung gelblich. Zum Vergleich wird immer eine Blindprobe ohne Harz mitgeführt. Wenn noch freie Aminogruppen am Harz vorhanden sind, wird die Kupplung unvollständig und wird unter den gleichen Bedingungen wie bei der ersten Kupplung wiederholt.

5.1.12 Bestimmung der Lipophilie/Hydrophilie

Die Lipophilie einer pharmakologisch aktiven Substanz ist ein fundamentaler physikochemischer Parameter. Deshalb sind logP/logD-Bestimmungen [160] wichtig und relevant um Struktur-Aktivitäts-Beziehungen in der medizinischen Chemie und der Radiopharmazie vorherzusagen [161]. Die Lipophilie von markierten Verbindungen kann verändert werden, wenn ein entsprechender Markierungsbaustein verwendet wird. Vorhersagen können mit dem Programm ChemBioDraw13.0 getroffen werden [162]. Errechnete ClogP-Werte für die Markierungsbausteine wurden experimentell als logD-Wert bestätigt. Dazu wurde nach der Scheidetrichtermethode eine definierte Stoffmenge an nicht radioaktiver Referenzsubstanz in ein 1:1-Gemisch aus *n*-Octanol und 0,1 M PBS-Puffer bei pH 7,5 gegeben und 10 Minuten lang kräftig geschüttelt. Danach wurde aus jeder der beiden Phasen das gleiche Probenvolumen per HPLC analysiert ($n = 3$) und die jeweilige Konzentration an Substanz in der Probe durch den Vergleich mit einer vorher erstellten Kalibriergerade bestimmt. Der logP-Wert ergibt sich danach aus der folgenden Gleichung:

$$\log P = \frac{C_{n\text{-Octanol}}}{C_{\text{Wasser}}}$$

5.2 Biochemische Arbeitstechniken

5.2.1 In-vitro-Stabilitätsuntersuchungen

Um die In-vitro-Stabilität und das Verhalten der radiomarkierten Verbindungen für In-vivo-Untersuchungen vorherzusagen zu können, werden vorab Experimente in vitro durchgeführt. Dazu werden Wistar-Ratten Blut und Plasma entnommen und für In-vitro-Untersuchungen zur Verfügung gestellt.* Das Rattenblut wird 1:1 mit Ficoll Paque Puffer (pH 7,5) versetzt.

Für die Stabilitätsuntersuchungen werden die zu untersuchenden, gereinigten und getrockneten Radiotracer in 100 µl PBS-Puffer (pH 7,5) oder E153-Injektionslösung gelöst. Anschließend werden 400 µl Rattenplasma bzw. Rattenblut zu der PBS-Lösung gegeben und 60 bzw. 120 Minuten bei 37°C erwärmt. Analytische HPLC-Läufe und Radio-DCs werden alle 20 Minuten durchgeführt.

* Durchgeführt von Frau Regina Herrlich

5.2.1 In-vitro-Zellassoziations-Experimente

Um die Assoziation zu den Eph-Rezeptoren und die Zellbindung oder -aufnahme der neu entwickelten, potentiellen Radiotracer zu untersuchen werden In-vitro-Experimente an Zellkulturen durchgeführt.*

Am Forschungszentrum wurden A375-Zelllinien entwickelt, welche bestimmte Eph-Rezeptoren überexprimieren. Dabei handelt es sich um A375^{EphB4}-überexprimierende [85, 163] und A375^{EphA2}-überexprimierende Zellen [112].

Die Zellexperimente werden so angelegt, dass gleichzeitig Untersuchungen bei 37°C und 4°C durchgeführt werden, sowie mit und ohne Aufnahmehemmung durch die unveränderten Originalinhibitoren.

Für die Blockierung der Rezeptoren werden die Zellen zunächst 5 min mit den Original-Inhibitoren in PBS-Puffer inkubiert. Danach wird das PBS bzw. das Zellmedium abgesaugt und 250 µl DMEM ohne Glukose mit dem jeweiligen Radiotracer zugegeben und für 5, 10, 30, 60 und 120 min inkubiert. Danach werden die Zellen auf Eis gekühlt und das Medium mit dem restlichen, nicht aufgenommenen Radiotracer abgesaugt. Die Zellen werden dann dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und 30 min mit je 500 µl NaOH-SDS lysiert. Anschließend werden je 250 µl Zelllysate in COBRA-Röhrchen gegeben und die enthaltene Aktivität gemessen. Als Referenz dient dabei 25 µl Medium mit Radiotracer in 225 µl NaOH-SDS. Zweimal 25 µl Zelllysate wird als Doppelbestimmung für die Bestimmung des Verhältnisses von Radiotracer zu Protein verwendet und mittels BCA-Assay ausgewertet.

5.2.3 In-vivo-Experimente – Kleintier-PET

Die Tierexperimente und Einrichtungen wurden nach den deutschen Richtlinien für Tierschutz geprüft. In-vivo-Stabilitätstests und Kleintier-PET Experimente wurden mit 5–8 Wochen alten männlichen Wistar Ratten durchgeführt.†

Der Radiotracer wird intravenös injiziert (1 ml, 30% Albumin/E153-Lösung) während das Tier unter Anästhesie steht (Luft mit 7% Desfluran und 30% Sauerstoff). Für Stabilitätsuntersuchungen der Radiotracer werden arterielle Blutproben nach 3, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten aus der rechten Oberschenkelarterie entnommen. Das Plasma wird durch Zentrifugieren (3 min, 13000 UPM) abgetrennt gefolgt von einer Präzipitation der Plasmaproteine mit eiskaltem Methanol (1,5 Teile pro 1 Teil Plasma). Anschließend werden die Überstände mittels Radio-HPLC analysiert.

* Die Zellassoziationsexperimente wurden von Frau Catharina Heinig durchgeführt.

† Die PET-Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Ralf Bergmann durchgeführt.

5.3 Spezielle Arbeitsvorschriften

5.3.1 Darstellung der Ausgangssubstanzen

Die Ausgangssubstanzen werden über den Chemikalienhandel bezogen oder in Anlehnung an folgende Literatur synthetisiert.

7-(5-Hydroxy-2-methylphenyl)-8-(2-methoxyphenyl)-1-methyl-1*H*-imidazo[1,2-*f*]purin-2,4(3*H*,8*H*)-dion (**6**) [83]

3-(Benzyloxy)propan-1-amin (**10**) [99]

2-Brom-1-(5-hydroxy-2-methylphenyl)ethanon (**26**) [83]

8-Brom-7-(2-(5-hydroxy-2-methylphenyl)-2-oxoethyl)-3-methyl-1*H*-purin-2,6(3*H*,7*H*)-dion (**28**) [108]

3-(2-Nitrophenoxy)propan-1-ol (**33**) [164]

3-(2-Aminophenoxy)propan-1-ol (**34**) [164]

4-(*para*-Toluensulfonyloxy)-1-butin (**55**) (Et₃N statt Pyridin) [165]

N^α-Fmoc-*N*^δ-azido-L-norvalin (Anv) (**61**) [166, 167]

N^α-Fmoc-*N*^ε-azido-L-norleucin (Anl) (**62**) [168]

N^α-Fmoc-(4*S*)-4-azido-L-prolin (Azp) (**65**) [169]

3-Azidopropyltosylat (**73**) [152]

1-(3-Azidopropyl)-4-(3-fluorpropyl)-piperazin (AFP) (**75**) [129]

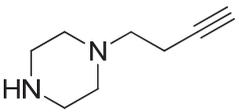
7-(3-Azidopropyl)-7-aza-4-azoniaspiro[3.5]nonan-4-methylbenzonsulfonat (**78**) [129]

N^α-Fmoc-*N*^ε-(pent-4-inamido)-L-lysin (Pal) (**79**) [153]

5.3.2 Synthesen von niedermolekularen Verbindungen und Markierungsbausteinen

1-(But-3-in-1-yl)piperazin (**56**)

Zu einer Lösung aus 7,56 g (87,78 mmol) Piperazin in 70 ml THF werden 6,1 ml (43,89 mmol) Triethylamin zugetropft. Dann werden 9,76 g (43,89 mmol) 4-(Toluensulfonyloxy)-1-butin (**55**) langsam zugetropft und die Lösung bei 50°C für 3 h gerührt. Es entsteht ein farbloser Niederschlag der abfiltriert und mit 70 ml THF gewaschen wird. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt durch Säulenchromatographie (EE → CH₃OH) gereinigt. **56** wird als blassgelbes Öl erhalten.

	Ausbeute:	3,92 g (65%)
	Summenformel:	C ₈ H ₁₄ N ₂
	Molmasse:	138,21 g/mol
	berechnet:	C: 69,52% H: 10,20%
	gefunden:	C: 69,30% H: 10,17%
		gelbliches Öl
DC:		R _f = 0,13 (CH ₃ OH)

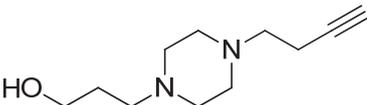
¹H-NMR (CD₃CN, 400 MHz): δ [ppm] = 2.75–2.73 (m, 4H, Pip-H-3,5), 2.46 (t, ³J = 7.8 Hz, 2H, NCH₂), 2.36–2.31 (m, 4H, Pip-H-2,6), 2.31 (dd, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.15 (t, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, CH).

¹³C-NMR (CD₃CN, 101 MHz): δ [ppm] = 84.1 (C_{quart}), 70.1 (CH), 58.4 (NCH₂), 55.0 (Pip-C-2,6), 46.8 (Pip-C-3,5), 17.1 (NCH₂CH₂).

MS (ESI +): m/z (%) = 139 (100) [M + H]⁺

3-(4-(But-3-ynyl)piperazin-1-yl)propan-1-ol (**58**)

Zu einer Lösung aus 2,92 g (21,13 mmol) 1-(But-3-in-1-yl)piperazin (**56**) in 20 ml THF werden 320 mg (2,11 mmol) Natriumiodid und 3,5 ml (25,36 mmol) Triethylamin gegeben. Dann werden langsam 3 ml (35,92 mmol) 3-Brompropanol zugetropft und bei 50°C für 3 h gerührt. Das Lösungsmittel wird verdampft, danach wird Wasser zum Rückstand gegeben und dieser 3 x mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt durch Säulenchromatographie (CH₃OH) gereinigt. **58** wird als farbloser Feststoff erhalten.

	Ausbeute:	2,84 g (68%)
	Summenformel:	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O
	Molmasse:	196,29 g/mol
	berechnet:	C: 67,31% H: 10,27%
	gefunden:	C: 67,30% H: 10,01%
	Smp:	94–97°C
DC:	R _f = 0,42 (CH ₃ OH)	

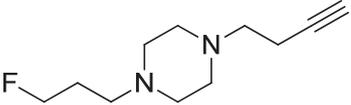
¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ [ppm] = 3.62 (t, ³J = 5.2 Hz, 2H, OCH₂), 2.59 (t, ³J = 5.8 Hz, 2H, NCH₂CH₂C≡CH), 2.52 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂), 2.67–2.45 (m, 8H, Pip-H), 2.39 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.28 (t, ³J = 2.7 Hz, 1H, CH), 1.77–1.71 (m, 2H, OCH₂CH₂).

¹³C-NMR (CD₃OD, 101 MHz): δ [ppm] = 106.2 (C_{quart}), 70.6 (CH), 61.7 (OCH₂), 58.0 (NCH₂CH₂C≡CH), 56.8 (OCH₂CH₂CH₂), 53.8 (Pip-C-2,6), 53.4 (Pip-C-3,5), 30.0 (OCH₂CH₂), 17.2 (NCH₂CH₂).

MS (ESI +): m/z (%) = 197 (100) [M + H]⁺

1-(But-3-ynyl)-4-(3-fluorpropyl)piperazin (BFP) (57)

Zu einer Lösung aus 1,00 g (7,23 mmol) 1-(But-3-in-1-yl)piperazin (**56**) in 10 ml THF werden 0,6 ml (7,20 mmol) 1-Fluor-3-iodpropan und 1,0 ml (7,20 mmol) Triethylamin langsam getropft. Dann wird bei 50°C für 3 h im Dunkeln gerührt. Das Lösungsmittel wird verdampft und der Rückstand durch Säulenchromatographie (EE) gereinigt. Es wird ein gelbes Öl erhalten.

	Ausbeute:	1,13 g (79%)
	Summenformel:	C ₁₁ H ₁₉ F N ₂
	Molmasse:	198,28 g/mol
	berechnet:	C: 66,63% H: 9,66%
	gefunden:	C: 66,51% H: 9,70%
	DC:	R _f = 0,56 (CH ₃ OH)
	log P berechnet:	0,70
	log P gefunden:	0,69 (dest. H ₂ O)
	log D gefunden:	0,31 ± 0,03 (PBS-Puffer, pH 7,47)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 4.49 (dt, ³J_{H,F} = 47.2 Hz, ³J = 6.0 Hz, 2H, FCH₂), 2.60 (t, ³J = 5.5 Hz, 2H, NCH₂CH₂C≡CH), 2.57–2.38 (m, 8H, Pip-H), 2.44 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, FCH₂CH₂CH₂), 2.38 (dt, ³J = 7.1 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 1.97 (t, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, CH), 1.94–1.81 (m, 2H, FCH₂CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 101 MHz): δ [ppm] = 82.9 (C_{quart}), 82.7 (d, ¹J_{C,F} = 164.3 Hz, FCH₂), 69.1 (CH), 57.1 (NCH₂CH₂C≡CH), 54.4 (d, ³J_{C,F} = 5.5 Hz, FCH₂CH₂CH₂), 53.2 (Pip-C-2,6), 53.0 (Pip-C-3,5), 28.8 (d, ²J_{C,F} = 19.8 Hz, FCH₂CH₂), 16.9 (NCH₂CH₂).

¹⁹F-NMR (CDCl₃, 376 MHz): δ [ppm] = -220.4

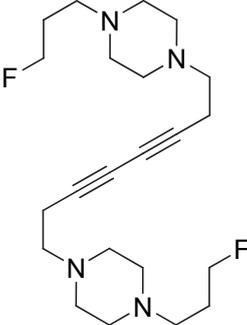
MS (ESI +): m/z (%) = 221 (100) [M + Na]⁺

Analytische HPLC: t_R = 4,2 min (Gradient 2)

t_R = 4,9 min (isokratisch 60% CH₃CN/40% H₂O)

1,8-Bis(4-(3-fluorpropyl)piperazin-1-yl)octa-3,5-diin (BFP-Dimer) (72)

Zu einer Lösung aus 45 mg (0,23 mmol) BFP **57** in 4 ml DMF werden 6 mg (0,02 mmol) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ gegeben und 3 d bei 40°C gerührt. Das Lösungsmittel wird verdampft und der Rückstand durch Säulenchromatographie (EE → EE:CH₃OH 5:1) gereinigt. Das Produkt **72** wird als oranger Feststoff erhalten.

	Ausbeute:	10 mg (11%)
	Summenformel:	C ₂₂ H ₃₆ F ₂ N ₄
	Molmasse:	394,54 g/mol
	berechnet:	C: 66,63% H: 9,66%
	gefunden:	C: 66,51% H: 9,74%
	Smp:	68–70°C
	DC:	R _f = 0,27 (CH ₃ OH)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 4.48 (dt, ³J_{H,F} = 47.2 Hz, ³J = 5.9 Hz, 4H, FCH₂), 2.61–2.41 (m, 24H, Pip-H, FCH₂CH₂CH₂, NCH₂CH₂C≡CH), 1.95–1.82 (m, 4H, NCH₂CH₂), 1.47–1.44 (m, 4H, FCH₂CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 101 MHz): δ [ppm] = 82.7 (d, ¹J_{C,F} = 164.3 Hz, FCH₂), 76.0 (CH₂C≡C), 66.1 (CH₂C≡C), 56.8 (NCH₂), 54.4 (d, ³J_{C,F} = 5.5 Hz, FCH₂CH₂CH₂), 53.2 (Pip-C-2,6), 52.9 (Pip-C-3,5), 28.1 (d, ²J_{C,F} = 19.7 Hz, FCH₂CH₂), 16.9 (NCH₂CH₂).

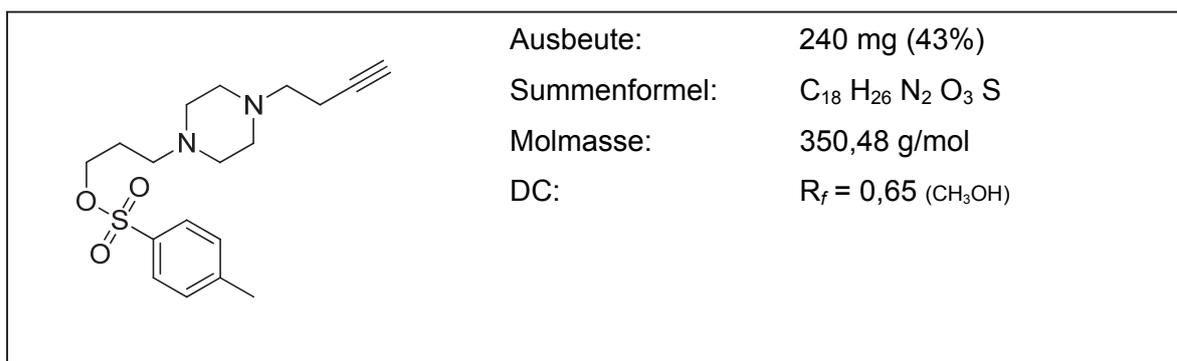
¹⁹F-NMR (CDCl₃, 376 MHz): δ [ppm] = -220.6

MS (ESI +): m/z (%) = 395 (30) [M + H]⁺, 198 (100) [M + 2H]²⁺

Analytische HPLC: t_R = 3,3 min (isokratisch 60% CH₃CN/40% H₂O)

3-(4-(But-3-ynyl)piperazin-1-yl)propyl-*para*-toluensulfonat (59)

Zu einer Lösung aus 310 mg (1,58 mmol) 3-(4-(But-3-ynyl)piperazin-1-yl)propan-1-ol (**58**) in 5 ml CH₂Cl₂ werden 0,9 ml (6,32 mmol) Triethylamin und 330 mg (1,74 mmol) *para*-Toluensulfonsäurechlorid gegeben und 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum bei 25°C entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie (EE:CH₃OH 10:1 → 6:1) gereinigt. Das Produkt wird als blassgelbes Öl erhalten, neigt aber bereits zur Cyclisierung.



¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 7.79 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, H_{ortho}), 7.34 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H, H_{meta}), 4.09 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H, OCH₂), 2.60 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, NCH₂CH₂C≡CH), 2.72–2.57 (m, 8H, Pip-H), 2.48 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.38 (dt, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 1.97 (t, ⁴J = 2.6 Hz, 1H, CH), 1.96–1.91 (m, 2H, OCH₂CH₂).

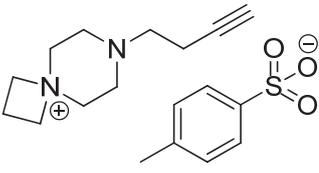
¹³C-NMR (CDCl₃, 101 MHz): δ [ppm] = 130.1 (OTs_{para}), 129.7 (OTs_{ipso}), 128.1 (OTs_{meta}), 127.2 (OTs_{ortho}), 82.9 (C_{quart}), 69.2 (CH), 57.1 (OCH₂), 55.6 (NCH₂CH₂C≡CH), 53.3 (Pip-C-3,5), 53.0 (Pip-C-2,6), 43.4 (OCH₂CH₂CH₂), 30.0 (OCH₂CH₂), 24.5 (CH₃), 16.9 (NCH₂CH₂).

MS (ESI +): m/z (%) = 179 (100) [M - OTs]⁺

MS (ESI -): m/z (%) = 171 (100) [OTs]⁻

7-(But-3-ynyl)-7-aza-4-azoniaspiro[3.5]nonan-*para*-toluensulfonat (60)

Eine Lösung aus 240 mg (0,68 mmol) 3-(4-(But-3-ynyl)piperazin-1-yl)propyl-*para*-toluensulfonat (**59**) in 5 ml CH₃OH wird 2 d bei 65°C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 3 ml Toluol versetzt. Der dabei ausfallende Niederschlag wird abfiltriert und mit Toluol und Petrolether gewaschen. Das Produkt wird als blassgelber Feststoff erhalten und im Exsikkator getrocknet.

	Ausbeute:	100 mg (98%)
	Summenformel:	(C ₁₁ H ₁₉ N ₂ ⁺)·(C ₇ H ₇ O ₃ S ⁻)
	Molmasse:	350,48 g/mol
	berechnet:	C: 61,69% H: 7,48%
	gefunden:	C: 61,54% H: 7,55 %
	Smp:	150–151°C
		blassgelber Feststoff
DC:	R _f = 0,07 (CH ₃ OH)	

¹H-NMR (CD₃CN, 400 MHz): δ [ppm] = 7.60 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, H_{ortho}), 7.15 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H, H_{meta}), 4.14 (t, ³J = 8.3 Hz, 4H, H-1,3), 3.44–3.37 (m, 4H, H-5,9), 2.69–2.60 (m, 4H, H-6,8), 2.58 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, NCH₂CH₂C≡CH), 2.56–2.48 (m, 2H, H-2), 2.34 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2,33 (s, 3H, CH₃), 2.20 (t, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, CH).

¹³C-NMR (CD₃CN, 101 MHz): δ [ppm] = 146.9 (OTs_{para}), 139.4 (OTs_{ipso}), 129.3 (OTs_{meta}), 126.6 (OTs_{ortho}), 83.3 (C_{quart}), 70.6 (CH), 60.2 (NCH₂CH₂C≡CH), 56.3 (C-1,3), 47.6 (C-5,6,8,9), 21.2 (CH₃), 17.3 (NCH₂CH₂), 14.4 (C-2).

MS (ESI +): m/z (%) = 179 (100) [M - OTs]⁺

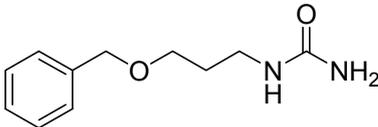
MS (ESI -): m/z (%) = 171 (100) [OTs]⁻

Tabelle 13: Kristalldaten und Strukturfeinanalyse für **60**

Empirische Formel	$(C_{11}H_{19}N_2^+) \cdot (C_7H_7O_3S^-)$
Molmasse	350,48
Temperatur	173 K
Wellenlänge λ	0,71073 Å
Kristallsystem	triklin
Raumgruppe	$P \bar{1}$
	a = 9,666(2) Å b = 9,802(2) Å c = 10,209(2) Å
Volumen	897,6(3) Å ³
Z	2
Dichte (berechnet)	1,297 g/cm ³
Absorptionskoeffizient	0,20 mm ⁻¹
F(000)	376
Kristallmaße [mm]	0,19 x 0,05 x 0,05
Scanbereich Θ	2,6–28,5°
Index Reichweite	-12 ≤ h ≤ 12, -12 ≤ k ≤ 12, -13 ≤ l ≤ 13
Gemessene Reflexe	17223
Unabhängige Reflexe	4234 [R(int) = 0,051]
Vollständigkeit zu Θ	97,8 %
Absorptionskorrektur	Bruker-Nonius SADABS
Max. und min. Transmission	0,990 und 0,963
Verfeinerungsmethode	Volle-Matrix kleinste-Quadrate auf F^2
Daten / Beschränkung / Parameter	4234 / 0 / 219
Qualität vom Fit auf F^2	1,13
R Indices (gesamte Daten)	R1 = 0,048; wR2 = 0,155

1-(3-(Benzyloxy)propyl)harnstoff (11)

Zu einer Lösung aus 2,35 g (14,22 mmol) 1-(3-(Benzyloxy)propan-1-amin (**10**) in 10 ml dest. H₂O bei pH 8,0 unter Argonatmosphäre werden bei 100°C 1,11 g (17,07 mmol) Natriumcyanat innerhalb von 10 min in 5 Portionen zugegeben. Dann wird bei 110°C für 20 min gerührt und anschließend auf RT gekühlt. Die entstandene Emulsion wird über Nacht stehen gelassen. Nicht umgesetztes 1-(3-(Benzyloxy)propan-1-amin setzt sich am Boden ab. Im wässrigen Überstand fällt nach Ankratzen das Produkt aus und wird mit der wässrigen Phase dekantiert und mit wenig kaltem Wasser gewaschen. **11** wird als farbloser, glänzender Feststoff in reiner Form erhalten.

	Ausbeute:	1,10 g (37%)
	Summenformel:	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂
	Molmasse:	208,26 g/mol
	berechnet:	C: 63,44% H: 7,74%
	gefunden:	C: 60,76% H: 7,39%
	Smp:	80–82°C
	DC:	R _f = 0,44 (EE:CH ₃ OH 6:1)

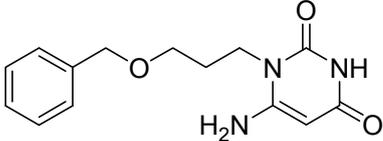
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.40–7.27 (m, 5H, H_{arom}), 4.99 (br s, 1H, NH), 4.61 (br s, 2H, NH₂), 4.49 (s, 2H, CH₂Ph), 3.58 (t, ³J = 5.7 Hz, 2H, NCH₂), 3.28 (t, ³J = 6.1 Hz, 2H, OCH₂), 1.83–1.77 (m, 2H, NCH₂CH₂)

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 158.8 (C=O), 138.1 (C_{ipso}), 128.5 (C_{meta}), 127.8 (C_{para}), 127.7 (C_{ortho}), 73.1 (CH₂Ph), 68.5 (OCH₂), 38.8 (NCH₂), 29.7 (NCH₂CH₂)

MS (ESI +): m/z (%) = 231 (100) [M + Na]⁺, 209 (35) [M + H]⁺

6-Amino-1-(3-(benzyloxy)propyl)pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion (13)

1,86 g (80,7 mmol) Natrium wird unter Argonatmosphäre in absolutem Ethanol (100 ml) gelöst. Zu dieser Lösung werden 5,60 g (26,9 mmol) 1-(3-(Benzyloxy)propyl)harnstoff (11) und 6,09 g (53,8 mmol) Cyanessigsäureethylester gegeben und 16 h bei 60°C gerührt. Es entsteht ein oranger Niederschlag, der bei anschließender Zugabe von konz. HCl auf pH ~ 3 wieder in Lösung geht, wobei ein farbloser Niederschlag aus NaCl entsteht. Dieser wird abfiltriert und mit Ethanol (10 ml) und EE (20 ml) gewaschen. Das Filtrat wird eingengt, bis ein rotbraunes Öl verbleibt. Dieses wird mit EE (50 ml) trituriert und mit Eis gekühlt, wobei das Produkt als blassgelber Niederschlag ausfällt. Dieses wird abfiltriert und mit EE gewaschen. Es wird ein blassgelber Feststoff in reiner Form erhalten. Restliches Produkt fällt im Tiefkühlschrank aus. Nicht ausgefallenes Produkt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt (EE → EE:CH₃OH 10:1). Das dabei erhaltene gelbe Öl wird mit EE trituriert, gefiltert und das Produkt **13** als blassgelber Feststoff erhalten.

	Ausbeute:	3,8 g (51%)
	Summenformel:	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃
	Molmasse:	275,3 g/mol
	berechnet:	C: 61,08% H: 6,22%
	gefunden:	C: 56,93% H: 5,64%
	Smp:	171–173°C
DC:	R _f = 0,30 (EE:CH ₃ OH 6:1)	

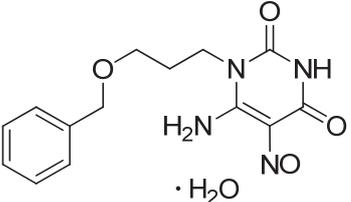
¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 10.30 (s, 1H, NH), 7.37–7.26 (m, 5H, H_{arom}), 6.73 (s, 2H, NH₂), 4.53 (s, 1H, CH), 4.44 (s, 2H, CH₂Ph), 3.82 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, NCH₂), 3.46 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H, OCH₂), 1.83–1.77 (m, 2H, NCH₂CH₂)

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 162.2 (C=O), 155.6 (CNH₂), 151.1 (C=O), 138.3 (C_{ipso}), 128.1 (C_{meta}), 127.4 (C_{ortho}), 127.3 (C_{para}), 75.4 (CH), 71.8 (CH₂Ph), 67.0 (OCH₂), 38.2 (NCH₂), 27.7 (NCH₂CH₂)

MS (ESI +): m/z (%) = 298 (40) [M + Na]⁺, 276 (30) [M + H]⁺

6-Amino-1-(3-(benzyloxy)propyl)-5-nitrosopyrimidin-2,4(1H,3H)-dion (15)

Zu einer Suspension aus 1,46 g (5,30 mmol) des Uracil-Derivates **13** in 30 ml dest. Wasser und 12 ml Essigsäure (95%) werden 548 mg (7,95 mmol) NaNO₂ gegeben und 1 h bei 50°C gerührt. Die Lösung wird über Nacht bei 4°C gelagert, der erhaltene violette Feststoff abfiltriert und mit Eiswasser gewaschen. Der Feststoff wird 3 h bei 80°C im Trockenrohr im Hochvakuum getrocknet und das Produkt **15** wird in reiner Form als hygroskopischer, rosa Feststoff erhalten, der an der Luft wieder violett wird.

	Ausbeute:	1,13 g (70%)
	Summenformel:	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ O ₄
	Molmasse:	304,30 g/mol
	berechnet:	C: 52,17% H: 5,63%*
	gefunden:	C: 52,03% H: 5,42%
	Smp:	118–120°C
DC:	R _f = 0,34 (EE:CH ₃ OH 6:1)	

* Die Elementaranalyse vom violetten Produkt berechnet für ein Mol Kristallwasser

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 13.34 (s, 1H, NH₂), 11.48 (s, 1H, NH), 9.06 (s, 1H, NH₂), 7.35–7.25 (m, 5H, H_{arom}), 4.42 (s, 2H, CH₂Ph), 3.88 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, NCH₂), 3.48 (t, ³J = 6.1 Hz, 2H, OCH₂), 1.83–1.77 (m, 2H, NCH₂CH₂)

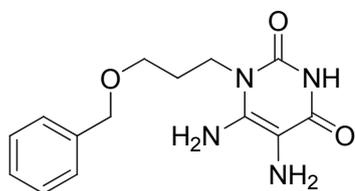
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 160.3 (C=O), 151.1 (CNH₂), 148.8 (C=O), 138.8 (CN=O), 138.3 (C_{ipso}), 128.2 (C_{meta}), 127.5 (C_{ortho}), 127.4 (C_{para}), 71.9 (CH₂Ph), 67.1 (OCH₂), 38.1 (NCH₂), 26.5 (NCH₂CH₂)

MS (ESI +): m/z (%) = 327 (50) [M + Na]⁺, 305 (100) [M + H]⁺

MS (ESI -): m/z (%) = 303 (100) [M - H]⁻

5,6-Diamino-1-(3-(benzyloxy)propyl)pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion (17)

Zu einer Suspension aus 1,13 g (3,71 mmol) des Uracil-Derivates **15** in 20 ml dest. Wasser werden 1,14 g (5,57 mmol) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ portionsweise zugegeben und 1 h bei 70°C gerührt. Zur schwach rosa Lösung wird erneut soviel $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ gegeben, bis die Farbe in blassgrün umschlägt. Nach weiteren 30 min rühren wird die Lösung auf die Hälfte eingeeengt und abgekühlt. Der entstandene blassgrüne Niederschlag wird abfiltriert, mit 50 ml Eiswasser gewaschen und bei 90°C getrocknet. Das Produkt **17** wird in reiner Form als blassgrüner Feststoff erhalten und neigt zur Zersetzung, daher wird es sofort in das entsprechende Hydrochlorid **19** umgewandelt.



Ausbeute:	1,12 g (99%)
Summenformel:	$\text{C}_{14} \text{H}_{18} \text{N}_4 \text{O}_3$
Molmasse:	290,32 g/mol
Smp:	261–262°C (Zersetzung)
DC:	$R_f = 0,14$ (EE: CH_3OH 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 10.53 (s, 1H, NH), 7.37–7.26 (m, 5H, H_{arom}), 6.09 (s, 2H, NH_2), 4.45 (s, 2H, CH_2Ph), 3.86 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, NCH_2), 3.47 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, OCH_2), 2.83 (s, 2H, NH_2), 1.84–1.77 (m, 2H, NCH_2CH_2)

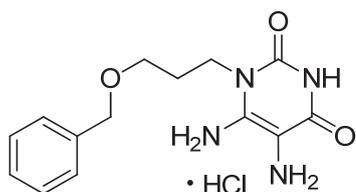
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 159.6 (C=O), 149.3 (CNH_2), 145.4 (C=O), 138.4 (C_{ipso}), 128.2 (C_{meta}), 127.6 (C_{ortho}), 127.4 (C_{para}), 96.3 (NCC=O), 71.9 (CH_2Ph), 67.1 (OCH_2), 30.7 (NCH_2), 28.0 (NCH_2CH_2)

MS (ESI +): m/z (%) = 313 (20) [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 291 (100) [$\text{M} + \text{H}$] $^+$

MS (ESI –): m/z (%) = 289 (40) [$\text{M} - \text{H}$] $^-$

5,6-Diamino-1-(3-(benzyloxy)propyl)pyrimidin-2,4(1H,3H)-dionhydrochlorid (19)

Bei 0°C werden 1,12 g (3,86 mmol) des Diaminouracil-Derivates **17** zu 15 ml HCl (37%) gegeben und 1 h bei RT gerührt. Die Lösung wird bei 35°C und 50 mbar eingengt und der verbliebene Rest bei 50°C im Vakuum getrocknet. Das Produkt **19** wird in reiner Form als hygroskopischer, blassroter Feststoff erhalten, der bei 110°C violett wird.



Ausbeute:	1,27 g (99%)
Summenformel:	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃ · HCl
Molmasse:	326,78 g/mol
Smp:	128–130°C (Zersetzung)
DC:	R _f = 0.00 (EE:CH ₃ OH 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 11.14 (s, 1H, NH), 9.31 (s, 3H, NH₃⁺), 7.64 (s, 2H, NH₂), 7.37–7.26 (m, 5H, H_{arom}), 4.44 (s, 2H, CH₂Ph), 3.91 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, NCH₂), 3.48 (t, ³J = 6.2 Hz, 2H, OCH₂), 1.84–1.77 (m, 2H, NCH₂CH₂)

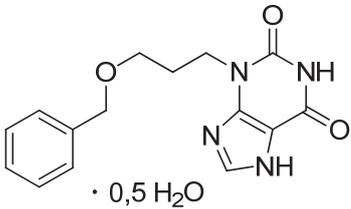
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 158.7 (C=O), 149.9 (CNH₂), 149.5 (C=O), 138.4 (C_{ipso}), 128.2 (C_{meta}), 127.5 (C_{ortho}), 127.4 (C_{para}), 83.0 (NCC=O), 71.9 (CH₂Ph), 67.0 (OCH₂), 39.5 (NCH₂), 27.6 (NCH₂CH₂)

MS (ESI +): m/z (%) = 313 (20) [M + Na - HCl]⁺, 291 (100) [M + H - HCl]⁺

MS (ESI -): m/z (%) = 325 (20) [M - H]⁻, 289 (40) (M - H - HCl)⁻, 37 (20) [³⁷Cl]⁻, 35 (10) [³⁵Cl]⁻

3-(3-(Benzyloxy)propyl)-1H-purin-2,6(3H,7H)-dion (22)

Zu 2,0 g (6,12 mmol) des Diaminouracil-Derivates **19** in 30 ml wasserfreiem DMF werden unter Argonatmosphäre 2,29 ml (13,77 mmol) Orthoameisensäuretriethylester getropft und 150 mg (0,79 mmol) *para*-Toluensulfonsäuremonohydrat gegeben und 3,5 h bei 70°C gerührt. Anschließend werden 10 ml eiskaltes Wasser zur rosa Lösung gegeben und diese über Nacht bei 4°C gelagert. Der entstandene blassrote Niederschlag wird filtriert und mit dest. Wasser gewaschen. Das Produkt **22** wird bei 90°C getrocknet und als blassroter Feststoff in reiner Form erhalten.

	Ausbeute:	1,4 g (76%)
	Summenformel:	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₃
	Molmasse:	300,31 g/mol
	berechnet:	C: 58,24% H: 5,54%*
	gefunden:	C: 58,60% H: 5,28%
	Smp:	241–242°C
DC:	R _f = 0,51 (EE:CH ₃ OH 4:1)	

* Die Elementaranalyse vom Produkt berechnet für ein halbes Mol Kristallwasser

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 13.47 (s, 1H, NHCH), 11.07 (s, 1H, NHC=O), 8.01 (s, 1H, CH), 7.35–7.25 (m, 5H, H_{arom}), 4.41 (s, 2H, CH₂Ph), 4.03 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, NCH₂), 3.49 (t, ³J = 6.1 Hz, 2H, OCH₂), 1.97–1.90 (m, 2H, NCH₂CH₂)

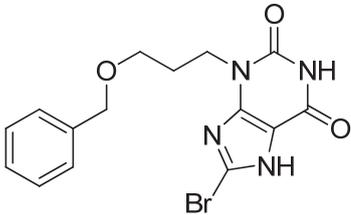
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 154.7 (C=O), 150.8 (C=O), 149.3 (CH), 140.5 (NCN), 138.5 (C_{ipso}), 128.2 (C_{meta}), 127.4 (C_{ortho}), 127.3 (C_{para}), 106.9 (NCC=O), 71.9 (CH₂Ph), 67.4 (OCH₂), 39.8 (NCH₂), 27.9 (NCH₂CH₂)

MS (ESI +): *m/z* (%) = 323 (40) [M + Na]⁺, 301 (100) [M + H]⁺

MS (ESI –): *m/z* (%) = 299 (100) [M - H]⁻

3-(3-(Benzyloxy)propyl)-8-brom-1H-purin-2,6(3H,7H)-dion (24)

Zu einer Lösung aus 710 mg (2,36 mmol) des Purin-Derivates **22** und 321 mg (4,72 mmol) Natriumacetat in 25 ml Eisessig werden 144 μ l (2,83 mmol) Brom getropft und 3 h bei 65°C gerührt. Anschließend werden bei 0°C 20 ml ges. NaHCO₃-Lösung langsam zugegeben und 3 x mit je 20 ml EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mittels MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Das Rohprodukt wird mit wenig Dichlormethan umkristallisiert und das Produkt **24** als blassgelber Feststoff in reiner Form erhalten. Unumgesetztes Brom wird mit wässriger Thiosulfat-Lösung vernichtet.

	Ausbeute:	750 mg (84%)
	Summenformel:	C ₁₅ H ₁₅ N ₄ O ₃ Br
	Molmasse:	379,21 g/mol
	berechnet:	C: 47,51% H: 3,99%
	gefunden:	C: 47,34% H: 3,87%
	Smp:	214–216°C
	DC:	R _f = 0,64 (EE:CH ₃ OH 4:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 11.16 (s, 1H, NHC=O), 7.35–7.26 (m, 5H, H_{arom}), 4.41 (s, 2H, CH₂Ph), 3.97 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, NCH₂), 3.48 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, OCH₂), 1.95–1.90 (m, 2H, NCH₂CH₂)

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 156.1 (CBr), 154.3 (C=O), 151.1 (C=O), 139.1 (C_{ipso}), 128.8 (C_{meta}), 128.1 (C_{ortho}), 128.0 (C_{para}), 80.0 (NCC=O), 79.3 (NCN), 72.6 (CH₂Ph), 68.0 (OCH₂), 39.9 (NCH₂), 28.4 (NCH₂CH₂)

MS (ESI +): m/z (%) = 403 (97) [M + Na, ⁸¹Br]⁺, 401 (100) [M + Na, ⁷⁹Br]⁺,
381 (53) [M + H, ⁸¹Br]⁺, 379 (55) [M + H, ⁷⁹Br]⁺

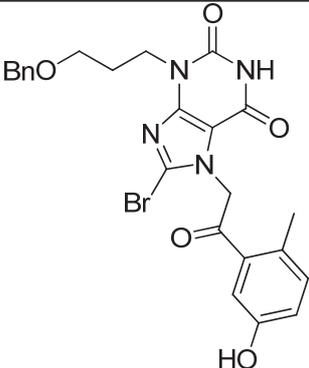
MS (ESI –): m/z (%) = 379 (100) [M - H, ⁸¹Br]⁻, 377 (97) [M - H, ⁷⁹Br]⁻

Tabelle 14: Kristalldaten und Strukturfeinanalyse für **24**

Empirische Formel	C ₁₅ H ₁₅ Br N ₄ O ₃
Molmasse	379,22
Temperatur	173(2) K
Wellenlänge λ	0.71073 Å
Kristallsystem	triklin
Raumgruppe	P $\bar{1}$
	a = 5,5984(1) Å b = 11,0930(2) Å c = 12,6395(3) Å
Volumen	765,22(3) Å ³
Z	2
Dichte (berechnet)	1,646 g/cm ³
Absorptionskoeffizient	2,707 mm ⁻¹
F(000)	384
Kristallmaße [mm]	0,30 x 0,23 x 0,22
Scanbereich Θ	3,26–40,57°
Index Reichweite	-10 ≤ h ≤ 9, -20 ≤ k ≤ 20, -23 ≤ l ≤ 23
Gemessene Reflexe	44798
Unabhängige Reflexe	9784 [R(int) = 0,0215]
Vollständigkeit zu Θ	99,5 %
Absorptionskorrektur	Bruker-Nonius SADABS
Max. und min. Transmission	0,5873 und 0,4973
Verfeinerungsmethode	Volle-Matrix kleinste-Quadrate auf F^2
Daten / Beschränkung / Parameter	9784 / 0 / 208
Qualität vom Fit auf F^2	1,029
Finale R Indizes [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0,0296; wR2 = 0,0759
R Indices (gesamte Daten)	R1 = 0,0450; wR2 = 0,0808

3-(3-(Benzyloxy)propyl)-8-brom-7-(2-(5-hydroxy-2-methylphenyl)-2-oxoethyl)-1H-purine-2,6(3H,7H)-dion (27)

Zu einer Lösung aus 930 mg (2,45 mmol) des 8-Brom-Purin-Derivates **24** in wasserfreiem DMF werden 500 μ l (3,75 mmol) Et₃N gegeben und 843 mg (3,68 mmol) des α -Bromacetophenon in DMF langsam zugetropft und 16 h bei 50°C gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf Kieselgel aufgetragen und mittels Säulenchromatographie gereinigt (CHCl₃ \rightarrow CHCl₃:EE 3:2 \rightarrow EE). Das Produkt **27** wird anschließend in EE umkristallisiert und als blassgelber Feststoff erhalten.

	Ausbeute:	1,3 g (99%)
	Summenformel:	C ₂₄ H ₂₃ N ₄ O ₅ Br
	Molmasse:	526,37 g/mol
	berechnet:	C: 54,66% H: 4,40%
	gefunden:	C: 54,72% H: 4,41%
	Smp:	172–173°C
DC:	R _f = 0,18 (EE)	

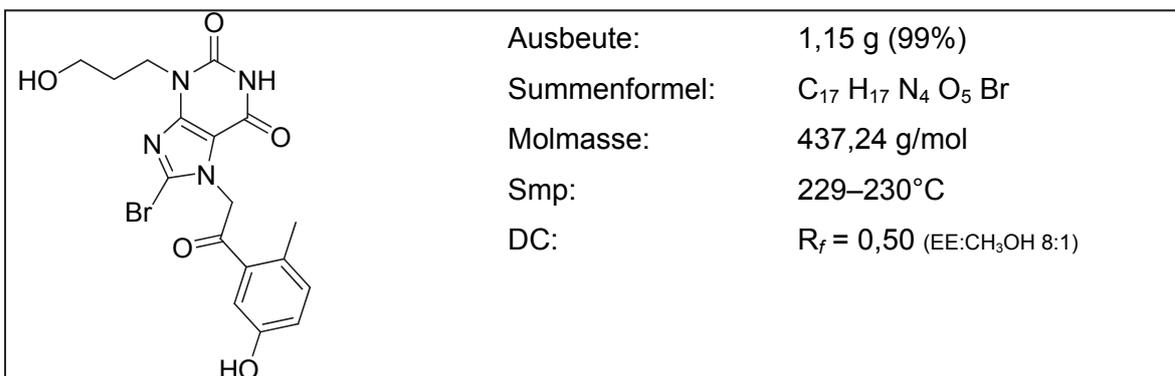
¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 11.32 (s, 1H, NH), 9.74 (s, 1H, OH), 7.37–7.27 (m, 6H, H_{arom}), 7.18 (d, ³J_{3,4} = 8.3 Hz, 1H, H-3), 6.96 (dd, ³J_{3,4} = 8.3 Hz, ⁴J_{4,6} = 2.5 Hz, 1H, H-4), 5.70 (s, 2H, CH₂C=O), 4.43 (s, 2H, CH₂Ph), 4.02 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, NCH₂), 3.51 (t, ³J = 6.0 Hz, 2H, OCH₂), 2.29 (s, 3H, CH₃), 1.99–1.91 (m, 2H, NCH₂CH₂)

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 194.1 (CH₂C=O), 155.4 (C-5), 154.1 (C=O), 150.2 (C=O), 148.7 (NCN), 138.4 (C_{ipso}), 134.6 (C-1), 133.0 (C-3), 129.2 (C-2), 128.2 (C_{meta}), 128.0 (CBr), 127.5 (C_{ortho}), 127.3 (C_{para}), 119.7 (C-4), 115.5 (C-6), 109.0 (NCC=O), 71.9 (CH₂Ph), 67.3 (OCH₂), 54.3 (CH₂C=O), 39.2 (NCH₂), 27.8 (NCH₂CH₂), 19.7 (CH₃)

MS (ESI +): m/z (%) = 551 (90) [M + Na, ⁸¹Br]⁺, 549 (100) [M + Na, ⁷⁹Br]⁺,
527 (83) [M + H, ⁸¹Br]⁺, 529 (80) [M + H, ⁷⁹Br]⁺

8-Brom-7-(2-(5-hydroxy-2-methylphenyl)-2-oxoethyl)-3-(3-hydroxypropyl)-1H-purin-2,6(3H,7H)-dion (29)

Zu einer Lösung aus 1,38 g (2,64 mmol) des 8-Brom-Purin-Derivates **27** in wasserfreiem CH₂Cl₂ werden bei 0°C 7,4 ml (7,36 mmol) BBr₃ (1 M in CH₂Cl₂) getropft und 1 h bei 0°C gerührt. Anschließend wird dest. H₂O zum Reaktionsabbruch zugegeben und der ausfallende Niederschlag über eine Büchi Membranfritte abgetrennt und abwechselnd mit CH₂Cl₂ und H₂O gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt **29** wird als farbloser Feststoff in reiner Form erhalten.



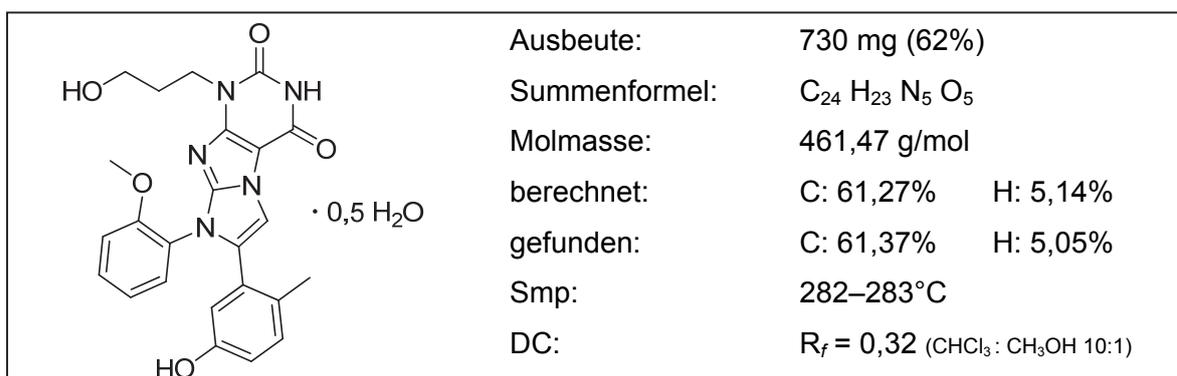
¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 11.33 (s, 1H, NH), 9.73 (s, 1H, HOPh), 7.35 (d, ⁴J_{4,6} = 2.5 Hz, 1H, H-6), 7.18 (d, ³J_{3,4} = 8.3 Hz, 1H, H-3), 6.96 (dd, ³J_{3,4} = 8.3 Hz, ⁴J_{4,6} = 2.5 Hz, 1H, H-4), 5.71 (s, 2H, CH₂C=O), 3.97 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, NCH₂), 3.51 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H, OCH₂), 2.29 (s, 3H, CH₃) 1.85–1.78 (m, 2H, NCH₂CH₂)

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 194.6 (CH₂C=O), 155.4 (C-5), 154.1 (C=O), 150.2 (C=O), 148.7 (NCN), 134.5 (C-1), 133.0 (C-3), 129.2 (C-2), 128.0 (CBr), 119.7 (C-4), 115.5 (C-6), 109.0 (NC=O), 58.5 (OCH₂), 54.3 (CH₂C=O), 38.7 (NCH₂), 31.0 (NCH₂CH₂), 19.8 (CH₃)

MS (ESI +): *m/z* (%) = 461 (25) [M + Na, ⁸¹Br]⁺, 459 (23) [M + Na, ⁷⁹Br]⁺,
439 (100) [M + H, ⁸¹Br]⁺, 437 (97) [M + H, ⁷⁹Br]⁺

7-(5-Hydroxy-2-methylphenyl)-1-(3-hydroxypropyl)-8-(2-methoxyphenyl)-1H-imidazo[1,2-f]purin-2,4(3H,8H)-dion (31)

Zu einer Lösung aus 1,15 g (2,64 mmol) des 8-Brom-Purin-Derivates **29** in 40 ml absolutem Ethanol werden 5,8 ml (52,8 mmol) 2-Methoxyanilin gegeben und 3 d bei 175°C in einem Druckgefäß gerührt. Nach 3 d tritt langsam eine Zersetzung des Produkts ein. Anschließend wird die Reaktionslösung auf Kieselgel aufgetragen und mittels Säulenchromatographie gereinigt (EE → EE:CH₃OH 20:1). Das Produkt **31** wird als blassgelber Feststoff erhalten.



* Die Elementaranalyse vom Produkt berechnet für ein halbes Mol Kristallwasser

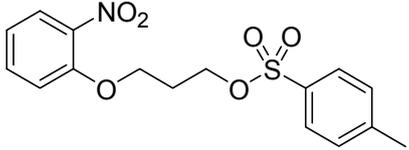
¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 10.97 (s, 1H, NH), 9.73 (s, 1H, HOPh), 7.74 (s, 1H, CH), 7.42–7.37 (m, 2H, H-4', H-6'), 7.12 (d, ³J_{3,4} = 8.3 Hz, H-3), 7.00–6.97 (m, 2H, H-3',5'), 6.62 (dd, ³J_{3,4} = 8.3 Hz, ⁴J_{4,6} = 2.5 Hz, 1H, H-4), 6.55 (d, ⁴J_{4,6} = 2.5 Hz, 1H, H-6), 4.45 (t, ³J = 5.4 Hz, 1H, HOCH₂), 3.92 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, NCH₂), 3.62 (s, 3H, OCH₃), 3.41 (dt, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, ³J_{HO,H} = 5.4 Hz, 2H, HOCH₂), 2.11 (s, 3H, CH₃), 1.80–1.74 (m, 2H, NCH₂CH₂)

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 154.7 (C-2'), 154.5 (C=O), 153.4 (C-5), 152.4 (C(N)₃), 150.8 (C=O), 147.3 (NCN), 131.8 (C=CPh), 130.9 (C-3), 130.8 (C-4'), 129.5 (C-5'), 127.8 (C-1), 127.7 (C-1'), 122.3 (C-2), 120.7 (C-6'), 117.9 (C-4), 116.3 (C-3'), 112.8 (C-6), 106.3 (CH), 99.1 (NCC=O), 58.4 (OCH₂), 55.6 (OCH₃), 38.7 (NCH₂), 30.9 (NCH₂CH₂), 18.7 (CH₃)

MS (ESI +): m/z (%) = 484 (100) [M + Na]⁺, 462 (45) [M + H]⁺

3-(2-Nitrophenoxy)propyl-4-methylbenzensulfonat (35)

300 mg (1,52 mmol) 3-(2-Nitrophenoxy)propan-1-ol (**33**) werden in 4 ml CH₂Cl₂ gelöst. Dazu werden 0,42 ml (3,04 mmol) Triethylamin, 32 mg (0,26 mmol) DMAP und 579 mg (3,04 mmol) Tosylchlorid gegeben und die Reaktionsmischung bei RT für 19 h gerührt. Anschließend werden 13 ml gesättigte NaHCO₃-Lösung zugegeben und mit der Lösung 30 min stark gerührt. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird 2 x mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt (CHCl₃/EE 40:1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

	Ausbeute:	363 mg (68%)
	Summenformel:	C ₁₆ H ₁₇ N O ₆ S
	Molmasse:	351,37 g/mol
	berechnet:	C: 54,69% H: 4,88%
	gefunden:	C: 54,65% H: 4,95%
	Smp:	114–116°C
	DC:	R _f = 0,64 (CHCl ₃ :EE 10:1)

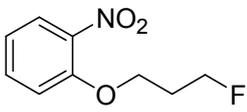
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.84 (dd, ³J_{3,4} = 8.1 Hz, ⁴J_{3,5} = 1.7 Hz, 1H, H-3), 7.73 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, TsO_{ortho}), 7.52 (ddd, ³J_{5,6} = 8.4 Hz, ³J_{4,5} = 7.4 Hz, ⁴J_{5,3} = 1.7 Hz, 1H, H-5), 7.21 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H, TsO_{meta}), 7.03 (ddd, ³J_{3,4} = 8.1 Hz, ³J_{4,5} = 7.4 Hz, ⁴J_{4,6} = 1.1 Hz, 1H, H-4), 6.98 (dd, ³J_{5,6} = 8.4 Hz, ⁴J_{4,6} = 1.1 Hz, 1H, H-6), 4.28 (t, ³J = 5.8 Hz, 2H, TsOCH₂), 4.10 (t, ³J = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.21–2.15 (m, 2H, OCH₂CH₂)

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.6 (C=O), 152.1 (C-1), 145.0 (C_{ipso}), 134.4 (C-2, C_{para}), 132.7 (C-5), 129.9 (C_{meta}), 128.0 (C_{ortho}), 125.9 (C-3), 120.6 (C-4), 114.4 (C-6), 66.7 (TsOCH₂), 64.6 (OCH₂), 28.9 (OCH₂CH₂), 21.8 (CH₃)

MS (ESI+): m/z (%) = 373 (100) [M + Na]⁺

1-(3-Fluorpropoxy)-2-nitrobenzen (36)

268 mg (0,76 mmol) **35** werden in 15 ml *t*-BuOH/CH₃CN 4:1 gelöst und erwärmt. Dazu werden 462 mg (3,04 mmol) Cäsiumfluorid gegeben. Die Lösung wird bei 75°C für 16 h gerührt. Anschließend werden 15 ml dest. H₂O zugegeben. Die wässrige Phase wird 3 x mit CH₂Cl₂ und 1 x mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt (CHCl₃). Das Produkt wird als blassgelbes Öl erhalten.

	Ausbeute:	112 mg (74%)
	Summenformel:	C ₉ H ₁₀ F N O ₃
	Molmasse:	199,18 g/mol
	DC:	R _f = 0,704 (CHCl ₃ /EE 8:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.84 (dd, ³J_{3,4} = 8.1 Hz, ⁴J_{3,5} = 1.6 Hz, 1H, H-3), 7.57–7.48 (dt, ³J_{4,5} = 7.8 Hz, ⁴J_{3,5} = 1.6 Hz, 1H, H-5), 7.09 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, H-6), 7.04 (dt, ³J_{4,5} = 7.8 Hz, ⁴J_{4,6} = 0.8 Hz, 1H, H-4), 4.69 (dt, ³J_{H,F} = 47.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 2H, FCH₂), 4.24 (t, ³J = 5.9 Hz, 2H, OCH₂), 2.22 (dq, ⁴J_{H,F} = 26.4 Hz, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 2H, FCH₂CH₂)

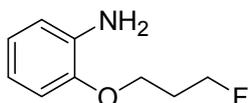
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 152.3 (C-1), 134.3 (C-2,5), 125.8 (C-3), 120.6 (C-4), 114.6 (C-6), 80.4 (d, ¹J_{C,F} = 164.5 Hz, FCH₂), 65.1 (d, ³J_{C,F} = 4.9 Hz, OCH₂), 30.3 (d, ²J_{C,F} = 20.1 Hz, FCH₂CH₂),

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -223.9

MS (ESI+): *m/z* (%) = 222 (100) [M + Na]⁺

1-(3-Fluorpropoxy)-2-aminobenzen (37)

In einem ausgeheizten und mit Argon gespülten Schlenk-Gefäß werden 142 mg (0,71 mmol) **36** in 5 mL CH₃OH gelöst und mit 1 atm H₂ unter Zugabe von Pd/C als Katalysator über 24 h bei Raumtemperatur versetzt. Nach beendeter Reaktion wird der Katalysator abfiltriert, das Filtrat über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird als blass bräunliches Öl erhalten.



Ausbeute:	86 mg (72%)
Summenformel:	C ₉ H ₁₂ F N O
Molmasse:	169,20 g/mol
DC:	R _f = 0,87 (EE:CH ₃ OH)

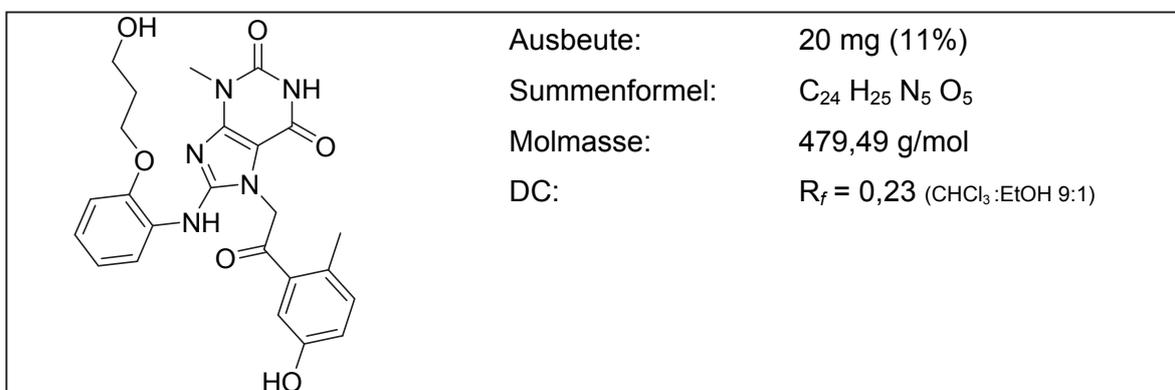
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.84–6.79 (m, 4H, H_{arom}), 5.09 (s, 2H, NH₂), 4.63 (dt, ²J_{H,F} = 47.1 Hz, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, 2H, FCH₂), 4.13 (t, ³J = 6.1 Hz, 2H, OCH₂), 2.19 (dq, ³J_{H,F} = 26.1 Hz, 2H, FCH₂CH₂)

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -222.2

MS (ESI+): *m/z* (%) = 170 (30) [M + H]⁺

7-(2-(5-Hydroxy-2-methylphenyl)-2-oxoethyl)-8-((2-(3-hydroxypropoxy)phenyl)-amino)-3-methyl-1*H*-purin-2,6(3*H*,7*H*)-dion (38)

150 mg (0,38 mmol) 8-Brom-7-(2-(5-hydroxy-2-methylphenyl)-2-oxoethyl)-3-methyl-1*H*-purin-2,6(3*H*,7*H*)-dion (**28**) werden zusammen mit 256 mg (1,53 mmol) 3-(2-Aminophenoxy)propan-1-ol (**34**) und 300 mg Molekularsieben in 10 mL *n*-Butanol suspendiert und in einem verschließbaren Glasgefäß mit Überdruckventil auf 200°C erhitzt. Nach 5 d wird das Reaktionsgemisch abgekühlt. Nach dem Abkühlen ist ein Niederschlag ausgefallen, der filtriert und mit kaltem Wasser gewaschen wird. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit viel Ethanol erhitzt und nachgewaschen. Die säulenchromatographische Trennung mit CHCl₃/EtOH 15:1 ergibt das Produkt als hellbeigen Feststoff.



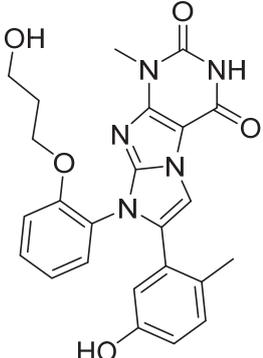
¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 11.83 (s, 1H, 1-NH), 9.67 (s, 1H, Ph-OH), 8.26 (s, 1H, Ph-NH), 7.76 (d, ³J_{4,6} = 8.1 Hz, 1H, H-6), 7.34 (d, ⁴J = 1.3 Hz, 1H, H-3), 7.15 (d, ³J_{4,6} = 8.1 Hz, 1H, H-4), 7.05–7.04 (m, 2H, H-3',5'), 6.96–6.92 (m, 2H, H-4',6'), 5.69 (s, 2H, (CO)CH₂), 4.50 (t, ³J = 5.1 Hz, 1H, OH), 4.06 (t, ³J = 6.2 Hz, 2H, OCH₂), 3.48–3.44 (m, 2H, HOCH₂), 3.33 (s, 3H, NCH₃), 2.28 (s, 3H, CH₃), 1.82–1.76 (m, 2H, HOCH₂CH₂)

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 195.5 (CH₂C=O), 155.2 (C-2'), 153.7 (C=O), 150.9 (C-5), 150.8 (C(N)₃), 149.5 (C=O), 149.2 (NCN), 135.2 (C-1), 132.8 (C-1'), 128.5 (C-3), 127.9 (C-2), 123.8 (C-5'), 121.4 (C-4), 120.5 (C-4'), 119.3 (C-6), 115.6 (C-6'), 112.6 (C-3'), 102.4 (NCC=O), 65.7 (OCH₂), 57.3 (HOCH₂), 51.6 (CH₂C=O), 31.9 (NCH₃), 28.5 (OCH₂CH₂), 19.8 (CH₃)

MS (ESI +): *m/z* (%) = 503 (100) [M + Na]⁺

7-(5-Hydroxy-2-methylphenyl)-8-(2-(3-hydroxypropoxy)phenyl)-1-methyl-1H-imidazo[2,1-f]purin-2,4(3H,8H)-dion (39)

Zu einer Lösung aus 330 mg (0,84 mmol) des 8-Brom-Purin-Derivats **28** in 10 ml absolutem Ethanol werden 760 mg (4,55 mmol) 3-(2-Aminophenoxy)propan-1-ol (**34**) und 224 mg (1,68 mmol) AlCl₃ gegeben und 3 d bei 175°C in einem Druckgefäß gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf Kieselgel aufgetragen und mittels Säulenchromatographie gereinigt (CHCl₃:CH₃OH 15:1). Das Produkt **39** wird mit Et₂O nochmals gewaschen und als blassgelber Feststoff erhalten.

	Ausbeute:	240 mg (62%)
	Summenformel:	C ₂₄ H ₂₃ N ₅ O ₅
	Molmasse:	461,47 g/mol
	berechnet:	C: 62,46% H: 5,02%
	gefunden:	C: 61,80% H: 4,97%
	Smp:	303–304°C
DC:	R _f = 0,31 (CHCl ₃ :EtOH 8:1)	

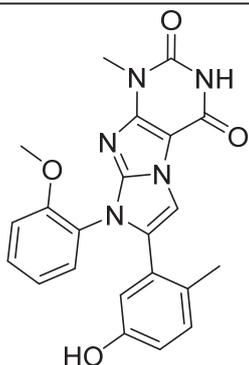
¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 10.97 (s, 1H, NH), 9.25 (s, 1H, HOPh), 7.74 (s, 1H, CH), 7.39 (dt, ³J_{4',5'} = 8.4 Hz, ⁴J_{4',6'} = 1.7 Hz, 1H, H-4'), 7.31 (dd, ³J_{5',6'} = 7.8 Hz, ⁴J_{4',6'} = 1.7 Hz, 1H, H-6') 7.15 (d, ³J_{3,4} = 8.3 Hz, H-3), 6.99–6.94 (m, 2H, H-3',5'), 6.63 (dd, ³J_{3,4} = 8.3 Hz, ⁴J_{4,6} = 2.6 Hz, 1H, H-4), 6.59 (d, ⁴J_{4,6} = 2.6 Hz, 1H, H-6), 4.41 (t, ³J = 5.4 Hz, 1H, HOCH₂), 4.03–3.92 (m, 2H, PhOCH₂), 3.33–3.32 (m, 2H, HOCH₂), 3.27 (s, 3H, NCH₃), 2.10 (s, 3H, CH₃), 1.69–1.64 (m, 2H, OCH₂CH₂)

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 154.6 (C-2'), 154.2 (C=O), 153.4 (C-5), 152.8 (C(N)₃), 151.1 (C=O), 147.6 (NCN), 131.8 (C=CPh), 130.9 (C-1), 130.8 (C-3), 129.7 (C-2), 127.9 (C-4'), 127.6 (C-1'), 122.4 (C-5'), 120.4 (C-6'), 117.9 (C-4), 116.3 (C-3'), 113.3 (C-6), 106.4 (CH), 99.0 (NCC=O), 65.3 (OCH₂), 57.1 (HOCH₂), 31.8 (OCH₂CH₂), 28.8 (NCH₃), 18.8 (CH₃)

MS (ESI +): m/z (%) = 484 (100) [M + Na]⁺, 462 (60) [M + H]⁺

7-(5-Hydroxy-2-methylphenyl)-8-(2-methoxyphenyl)-1-methyl-1*H*-imidazo[1,2-*f*]-purin-2,4(3*H*,8*H*)-dion (6)

200 mg (0,51 mmol) des 8-Brom-Purin-Derivats **28** und 251 mg (2,04 mmol) *o*-Methoxyanilin (**30**) werden in 3 ml absolutem Ethanol suspendiert und in einem verschließbaren Glasgefäß mit Überdruckventil auf 175°C erhitzt. Nach 2 d wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur gekühlt und der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und mit Wasser und Ethylacetat gewaschen. Das Produkt wird als farbloser Feststoff erhalten.



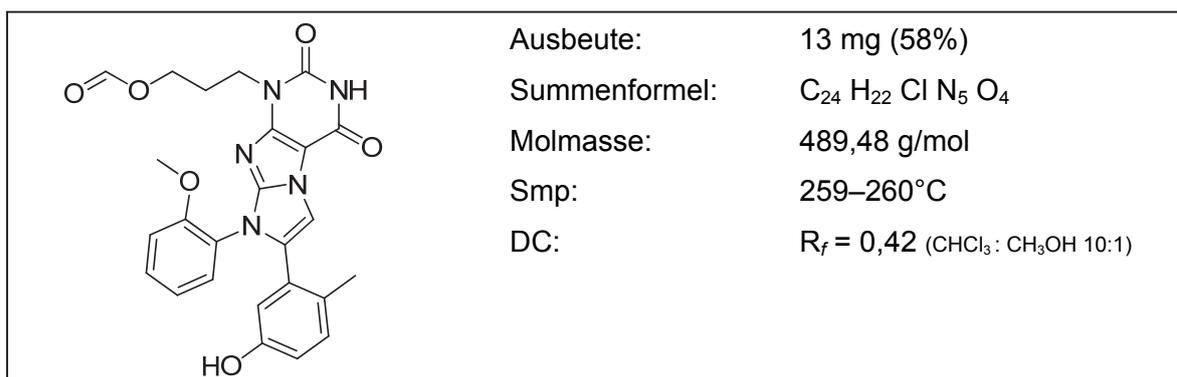
Ausbeute:	187 mg (88%)
Summenformel:	C ₂₂ H ₁₉ N ₅ O ₄
Molmasse:	417,42 g/mol
DC:	R _f = 0,07 (CHCl ₃ : EtOH 95:5)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 10.99 (s, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, OH), 7.74 (s, 1H, CH), 7.43–7.39 (m, 2H, H-4',6'), 7.11 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, H-3), 7.03–6.97 (m, 2H, H-3',5'), 6.62 (dd, ³J_{3,4} = 8.4 Hz, ⁴J_{4,6} = 2.5 Hz, 1H, H-4), 6.55 (d, ⁴J_{4,6} = 2.5 Hz, 1H, H-6), 3.61 (s, 3H, OCH₃), 3.30 (s, 3H, NCH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃)

MS (ESI +): *m/z* (%) = 440 (100) [M + Na]⁺

3-(7-(5-Hydroxy-2-methylphenyl)-8-(2-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-2,3,4,8-tetrahydro-1H-imidazo[2,1-f]purin-1-yl)propylformiat (40a)

Zu einer Lösung von 80 mg (0,17 mmol) des Purin-Derivates **31** in 5 ml DMF werden 70 mg (0,37 mmol) Tosylchlorid, 5 mg (0,04 mmol) DMAP und 50 μ l (0,37 mmol) Et₃N gegeben und 16 h bei 70°C gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf Kieselgel aufgetragen und mittels Säulenchromatographie gereinigt (EE \rightarrow EE:CH₃OH 10:1). **40a** wird als blassgelber Feststoff erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 10.99 (s, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, HOPh), 8.12 (s, 1H, O=CH), 7.75 (s, 1H, CH), 7.43–7.37 (m, 2H, H-4',6'), 7.12 (d, ³J_{3,4} = 8.5 Hz, H-3), 7.02–6.97 (m, 2H, H-3',5'), 6.62 (dd, ³J_{3,4} = 8.5 Hz, ⁴J_{4,6} = 2.5 Hz, 1H, H-4), 6.55 (d, ⁴J_{4,6} = 2.5 Hz, 1H, H-6), 4.10 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H, OCH₂), 3.97 (t, ³J = 6.7 Hz, 2H, NCH₂), 3.62 (s, 3H, OCH₃), 2.11 (s, 3H, CH₃), 2.02–1.95 (m, 2H, NCH₂CH₂)

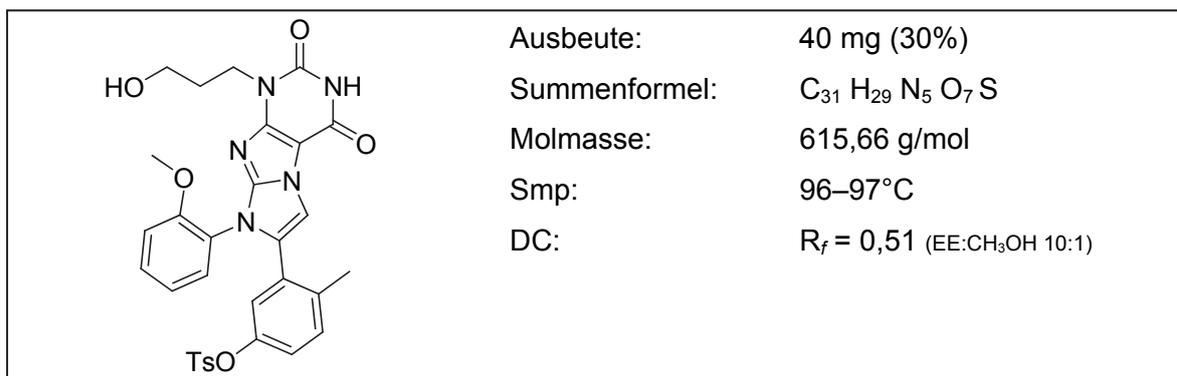
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 162.0 (O=CH), 154.7 (C-2'), 154.5 (C=O), 153.4 (C-5), 152.3 (C(N)₃), 150.8 (C=O), 147.3 (NCN), 131.8 (C=CPh), 130.9 (C-3), 130.8 (C-4'), 129.5 (C-5'), 127.8 (C-1), 127.7 (C-1'), 122.3 (C-2), 120.7 (C-6'), 117.9 (C-4), 116.3 (C-3'), 112.8 (C-6), 106.3 (CH), 99.2 (NCC=O), 61.3 (OCH₂), 55.6 (OCH₃), 35.7 (NCH₂), 26.8 (NCH₂CH₂), 18.7 (CH₃)

MS (ESI +): *m/z* (%) = 512 (100) [M + Na]⁺, 490 (15) [M + H]⁺

MS (ESI –): *m/z* (%) = 488 (100) [M - H]⁻

3-(1-(3-Hydroxypropyl)-8-(2-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-2,3,4,8-tetrahydro-1H-imidazo[2,1-f]purin-7-yl)-4-methylphenyl-4-methylbenzensulfonat (40c)

Zu einer Lösung von 100 mg (0,22 mmol) des Purin-Derivates **31** in 5 ml NMM werden 126 mg (0,66 mmol) Tosylchlorid gegeben und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit Wasser verdünnt, der Niederschlag filtriert und mit Et₂O gewaschen. Der Niederschlag und die organischen Phasen werden vereint und mittels Säulenchromatographie gereinigt (PE → PE:EE 1:2 → 1:5 → 1:10). **40c** wird als blassgelber Feststoff erhalten.



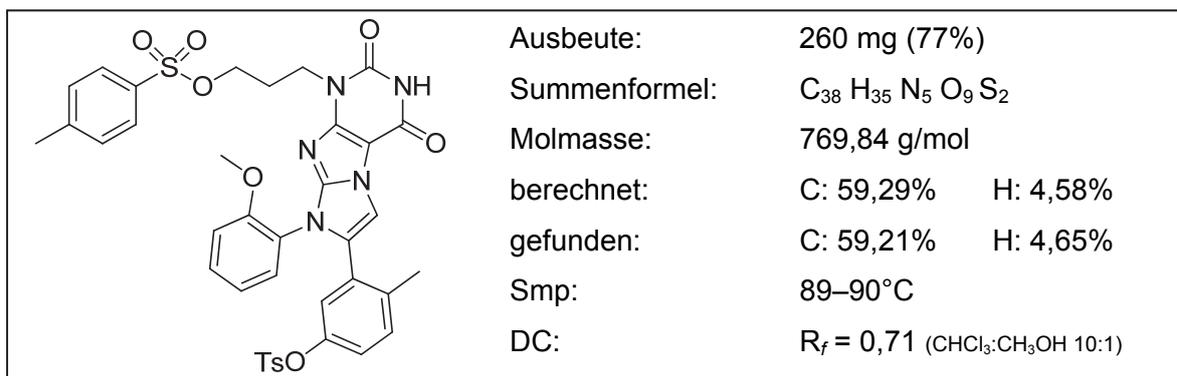
¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 11.00 (s, 1H, NH), 7.82 (s, 1H, CH), 7.52 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, H_{ortho}), 7.46–7.44 (m, 1H, H-6'), 7.43 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H, H_{meta}), 7.37 (dd, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H-4'), 7.19–7.14 (m, 2H, H-3',5'), 7.03 (dt, ³J_{3,4} = 7.7 Hz, ⁵J_{3,6} = 1.1 Hz, H-3), 6.93 (d, ³J_{4,6} = 2.6 Hz, 1H, H-6), 6.77 (dd, ³J_{3,4} = 8.4 Hz, ⁴J_{4,6} = 2.6 Hz, 1H, H-4), 4.44 (t, ³J = 5.4 Hz, 1H, H_{OCH₂}), 3.92 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, NCH₂), 3.60 (s, 3H, OCH₃), 3.40 (dt, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, ³J_{HO,H} = 5.4 Hz, 2H, H_{OCH₂}), 2.42 (s, 3H, PhOTs-CH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃), 1.80–1.73 (m, 2H, NCH₂CH₂)

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = 155.9 (C-2'), 154.6 (C=O), 154.4 (C-5), 152.3 (C(N)₃), 148.8 (C=O), 147.9 (NCN), 147.3 (PhTsO_{para}), 138.9 (C-1), 132.6 (C=CPh), 132.3 (PhTsO_{ipso}), 131.7 (C-3), 131.0 (PhTsO_{meta}), 130.4 (C-5'), 129.9 (C-2,4'), 129.3 (PhTsO_{ortho}), 125.9 (C-1'), 124.0 (C-4,5'), 123.0 (C-6'), 121.8 (C-3'), 113.6 (C-6), 108.0 (CH), 100.6 (NCC=O), 58.8 (OCH₂), 56.4 (OCH₃), 40.4 (NCH₂), 31.8 (NCH₂CH₂), 21.7 (TsOCH₃), 19.7 (CH₃)

MS (ESI +): m/z (%) = 616 (30) [M + H]⁺

3-(8-(2-Methoxyphenyl)-2,4-dioxo-1-(3-(tosyloxy)propyl)-2,3,4,8-tetrahydro-1H-imidazo[2,1-f]purin-7-yl)-4-methylphenyl-4-methylbenzensulfonat (41)

Zu einer Lösung von 200 mg (0,44 mmol) des Purin-Derivates **31** in 5 ml NMM werden 350 mg (1,84 mmol) Tosylchlorid gegeben und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf 0°C gekühlt und mit Wasser verdünnt, der Niederschlag filtriert und mit Et₂O gewaschen. Der Niederschlag und die organischen Phasen werden vereint und mittels Säulenchromatographie gereinigt (PE → PE:EE 1:2 → 1:5 → 1:10). Das Produkt **41** wird als blassgelber Feststoff erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 10.95 (s, 1H, NH), 7.79 (s, 1H, CH), 7.64 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, H_{ortho}), 7.48 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, PhOTs-H_{ortho}), 7.46–7.43 (m, 1H, H-6'), 7.39 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H, PhOTs-H_{meta}), 7.32 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, H_{meta}), 7.31–7.29 (m, 1H, H-4'), 7.16–7.10 (m, 2H, H-3',5'), 6.98 (dt, ³J_{3,4} = 8.0 Hz, ⁵J_{3,6} = 0.9 Hz, H-3), 6.88 (d, ³J_{4,6} = 2.6 Hz, 1H, H-6), 6.73 (dd, ³J_{3,4} = 8.0 Hz, ⁴J_{4,6} = 2.6 Hz, 1H, H-4), 4.01 (t, ³J = 6.3 Hz, 1H, TsOCH₂), 3.83 (t, ³J = 6.5 Hz, 2H, NCH₂), 3.54 (s, 3H, OCH₃), 2.36 (s, 3H, PhOTs-CH₃), 2.35 (s, 3H, Ts-CH₃), 2.18 (s, 3H, CH₃), 1.93–1.90 (m, 2H, NCH₂CH₂)

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = 156.0 (C-2'), 154.2 (C=O), 154.0 (C-5), 151.9 (C(N)₃), 148.9 (C=O), 147.9 (NCN), 147.3 (PhTsO_{para}), 146.3 (TsO_{para}), 138.9 (C-1), 132.6 (C=CPh), 132.3 (PhTsO_{ipso}, TsO_{ipso}), 131.6 (C-3), 131.0 (PhTsO_{meta}), 130.9 (TsO_{meta}), 130.5 (C-5'), 130.0 (C-2), 129.3 (PhTsO_{ortho}), 129.2 (C-4'), 128.6 (TsO_{ortho}), 126.6 (C-5'), 125.9 (C-1'), 124.0 (C-4), 123.2 (C-6'), 121.8 (C-3'), 113.7 (C-6), 107.9 (CH), 100.6 (NCC=O), 69.6 (OCH₂), 56.4 (OCH₃), 40.3 (NCH₂), 28.2 (NCH₂CH₂), 21.7 (2x TsOCH₃), 19.8 (CH₃)

MS (ESI +): m/z (%) = 770 (90) [M + H]⁺, 598 (15) [M - OTs]⁺

Analytische HPLC: t_R = 17,4 min (Gradient 5)

7-(5-Hydroxy-2-methylphenyl)-1-(3-fluorpropyl)-8-(2-methoxyphenyl)-1H-imidazo[1,2-f]purin-2,4(3H,8H)-dion (7)

Zu einer Lösung von 150 mg (0,33 mmol) des Purin-Derivates **31** in 5 ml NMM und 5 ml CH₂Cl₂ werden bei -76°C 200 µl (1,51 mmol) DAST langsam in 20 µl Schritten zugegeben und über Nacht 20 h bei langsamer Erwärmung auf RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung zu eiskaltem dest. H₂O gegeben und 3 x mit CHCl₃ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaHCO₃-Lösung und mit H₂O gewaschen. Die organische Phase wird auf Kieselgel aufgetragen und mittels Säulenchromatographie gereinigt (CHCl₃ → CHCl₃:CH₃OH 30:1 → 20:1 → 10:1). Das Produkt **7** wird als blassgelber Feststoff erhalten.

	Ausbeute:	30 mg (10%)
	Summenformel:	C ₂₄ H ₂₂ F N ₅ O ₄
	Molmasse:	463,46 g/mol
	berechnet:	C: 62,20% H: 4,78%
	gefunden:	C: 62,01% H: 4,88%
	Smp:	194–195°C
	DC:	R _f = 0,37 (CHCl ₃ :CH ₃ OH 9:1)
log P berechnet:	3,16	
log D gefunden:	2,22 ± 0,16 (PBS-Puffer, pH 7,27)	

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 9.23 (s, 1H, HOPh), 7.74 (s, 1H, CH), 7.41–7.37 (m, 2H, H-4',6'), 7.12 (dd, ³J_{3,4} = 8.0 Hz, ⁴J_{3,6} = 1.7 Hz, 1H, H-3), 7.02–6.97 (m, 2H, H-3',5'), 6.61 (dd, ³J_{3,4} = 8.0 Hz, ⁴J_{4,6} = 2.7 Hz, 1H, H-4), 6.54 (d, ⁴J_{4,6} = 2.7 Hz, 1H, H-6), 4.48 (dt, ³J_{H,F} = 47.3 Hz, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, 2H, FCH₂), 3.96 (t, ³J = 6.2 Hz, 2H, NCH₂), 3.64 (s, 3H, OCH₃), 2.11 (s, 3H, CH₃), 1.94–1.93 (m, 2H, NCH₂CH₂)

¹⁹F-NMR (CDCl₃, 376 MHz): δ [ppm] = -220.8

MS (ESI +): m/z (%) = 464 (10) [M + H]⁺

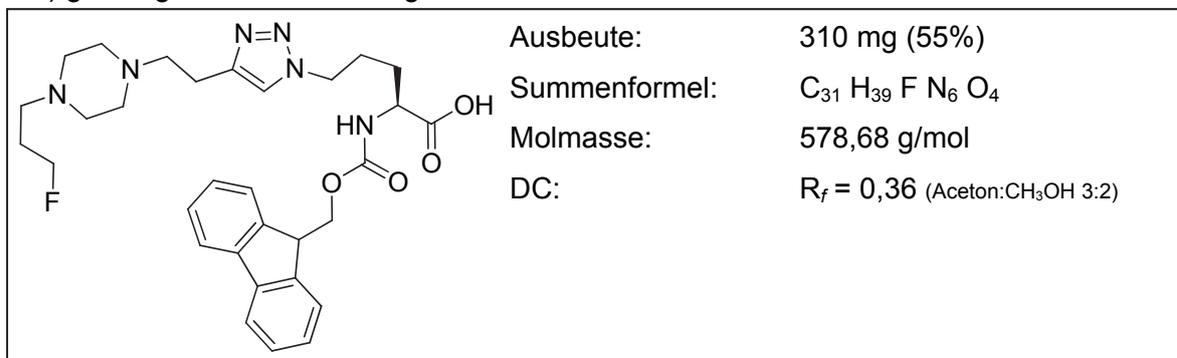
MS (ESI -): m/z (%) = 462 [M - H]⁺

Analytische HPLC: t_R = 13,7 min (Gradient 5)

5.3.3 Darstellung der Referenzamino­säuren

(S)-2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-5-(4-(2-(4-(3-fluorpropyl)-piperazin-1-yl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentansäure (63)

Zu einer Lösung aus 370 mg (0,97 mmol) *N*-Fmoc-azido-L-norvalin **61** in 6 ml eines Gemisches aus *tert*-Butanol, Wasser und Acetonitril im Verhältnis 1:1:1 werden 192 mg (0,97 mmol) BFP **57**, 24 mg (0,09 mmol) CuSO₄·5 H₂O und 192 mg (0,97 mmol) Natriumascorbat zugegeben. Dann wird bei RT für 48 h gerührt. Der Feststoff wird abfiltriert und mit kaltem Aceton gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie (Aceton → Aceton:Methanol 2:1) gereinigt. **63** wird als oranges Öl erhalten.



¹H-NMR (D₂O, 400 MHz): δ [ppm] = 7.79 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-H-4/5), 7.75 (s, 1H, H-Triazol), 7.67 (dd, ³J = 7.8 Hz, ³J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-H-1/8), 7.38 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, Fmoc-H-3/6), 7.30 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-H-2/7), 4.46 (dt, ³J_{H,F} = 47.4 Hz, ³J = 5.9 Hz, 2H, FCH₂), 4.38 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, H-δ), 4.30 (dd, ³J = 6.7 Hz, ³J = 6.5 Hz, 2H, OCH₂), 4.21 (t, ³J = 6.8 Hz, 1H, Fmoc-H/9), 4.06 (dd, ³J = 7.7 Hz, ³J = 7.4 Hz, 1H, H-α), 2.86 (t, ³J = 7.9 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.65 (t, ³J = 8.0 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 2.61–2.41 (m, 8H, Pip-H), 2.48 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, FCH₂CH₂CH₂), 1.93–1.77 (m, 4H, H-β/γ), 1.68–1.61 (m, 2H, FCH₂CH₂)

¹³C-NMR (Aceton-D₆, 101 MHz): δ [ppm] = 161.6 (O(C=O)N), 145.1 (Fmoc-C-1'/8'), 144.2 (Fmoc-C-4'/5'), 142.1 (CH₂C=C), 128.5 (Fmoc-C-3/4/5/6), 128.0 (Fmoc-C-2/7), 126.2 (CH₂C=C), 120.8 (Fmoc-C-1/8), 82.2 (d, ¹J_{C,F} = 163.6 Hz, FCH₂), 67.1 (CH₂O), 56.6 (C-α), 53.9 (d, ³J_{C,F} = 5.7 Hz, FCH₂CH₂CH₂), 50.7 (Pip-C), 50.3 (NCH₂), 48.1 (C-δ), 32.6 (Fmoc-C-9), 29.1 (C-β), 28.9 (CH₂C=C), 26.7 (d, ²J_{C,F} = 20.4 Hz, FCH₂CH₂), 22.2 (C-γ)

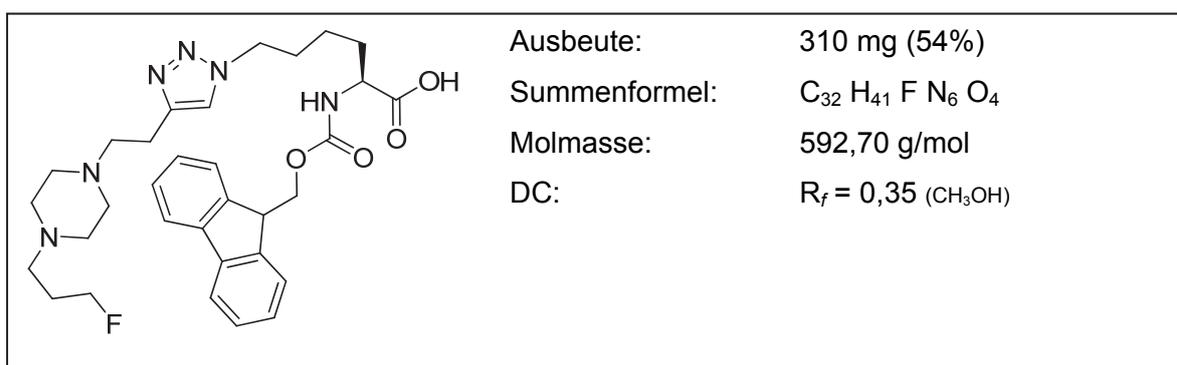
¹⁹F-NMR (D₂O, 376 MHz): δ [ppm] = -222.2

MS (ESI +): *m/z* (%) = 602 (30) [M + Na]⁺, 579 (70) [M + H]⁺

Analytische HPLC: *t_R* = 10,7 min (Gradient 3)

(S)-2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-5-(4-(2-(4-(3-fluorpropyl)-piperazin-1-yl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hexansäure (64)

Zu einer Lösung aus 400 mg (0,97 mmol) *N*-Fmoc- ϵ -azido-L-norleucin **62** in 15 ml eines Gemisches aus *tert*-Butanol, Wasser und Acetonitril im Verhältnis 1:1:1 werden 370 mg (0,97 mmol) BFP **57**, 24 mg (0,09 mmol) CuSO₄·5 H₂O und 192 mg (0,97 mmol) Natrium-Ascorbat zugegeben. Dann wird bei RT für 48 h gerührt. Der Feststoff wird abfiltriert und das Filtrat eingengt und mit Ethylacetat trituriert. Der entstandene Feststoff wird abfiltriert und das Filtrat mittels Säulenchromatographie gereinigt (EE → EE:CH₃OH 2:1 → 1:2). **64** wird als oranges Öl erhalten.



¹H-NMR (Aceton-D₆, 400 MHz): δ [ppm] = 7.86 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-H-4/5), 7.82 (s, 1H, H-Triazol), 7.71 (t, ³J = 6.6 Hz, 2H, Fmoc-H-1/8), 7.41 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-H-3/6), 7.33 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-H-2/7), 6.94–6.90 (m, 1H, NH), 4.55 (dt, ³J_{H,F} = 47.4 Hz, ³J = 5.6 Hz, 2H, FCH₂), 4.42–4.33 (m, 3H, CH₂O, H- α), 4.23 (t, ³J = 6.9 Hz, 1H, Fmoc-C-9), 3.80–3.76 (m, 2H, H- ϵ), 3.46–3.21 (m, 8H, Pip-H, CH₂CH₂C=), 3.13–3.03 (m, 4H, NCH₂, CH₂C=), 1.95–1.84 (m, 6H, FCH₂CH₂, H- β / δ), 1.42–1.37 (m, 2H, H- γ)

¹³C-NMR (Aceton-D₆, 101 MHz): δ [ppm] = 161.6 (O(C=O)N), 145.1 (Fmoc-C-1'/8'), 144.2 (Fmoc-C-4'/5'), 142.1 (CH₂C=C), 128.5 (Fmoc-C-3/4/5/6), 128.0 (Fmoc-C-2/7), 126.2 (CH₂C=C), 120.8 (Fmoc-C-1/8), 82.2 (d, ¹J_{C,F} = 163.6 Hz, FCH₂), 67.1 (CH₂O), 56.6 (C- α), 53.9 (d, ³J_{C,F} = 5.7 Hz, FCH₂CH₂CH₂), 50.7 (Pip-C), 50.3 (NCH₂), 48.1 (C- ϵ), 32.6 (Fmoc-C-9), 29.1 (C- β), 28.9 (CH₂C=C), 26.7 (d, ²J_{C,F} = 20.4 Hz, FCH₂CH₂), 23.3 (C- δ), 22.2 (C- γ)

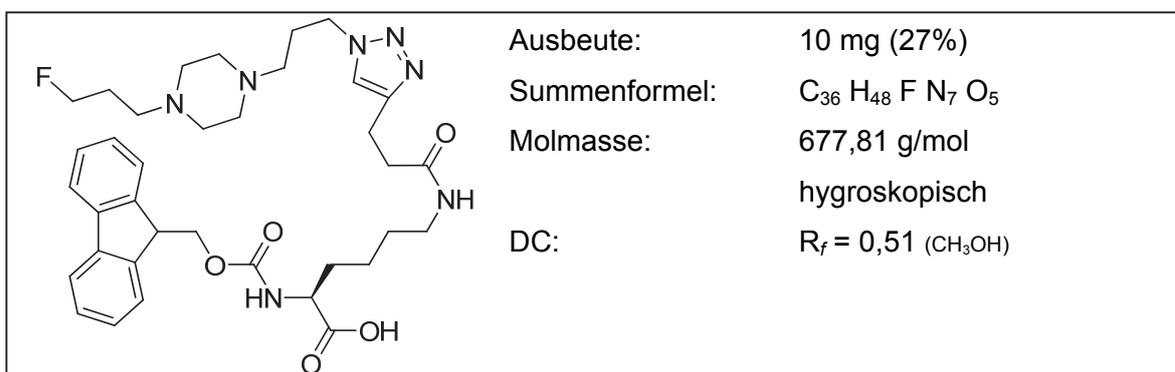
¹⁹F-NMR (Acetone-D₆, 376 MHz): δ [ppm] = -222.0

MS (ESI+): *m/z* (%) = 593 (40) [M + H]⁺

Analytische HPLC: *t*_R = 19,7 min (Gradient 2)

(S)-(9H-Fluoren-9-yl)methyl-1-amino-6-(3-(1-(3-(4-(3-fluorpropyl)-piperazin-1-yl)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)-1-oxohexan-2-ylcarbammat (80)

Zu einer Lösung aus 52 mg (110 μmol) *N*-Fmoc- ϵ -(pent-4-inamido)-L-lysin **79** in 2 mL DMF/THF 1:1 werden 4,2 mg (11 μmol) CuI, 12,8 mg (60 μmol) AFP **75** und 95 μl (560 μmol) DIPEA gegeben und bei 37°C für 16 h geschüttelt. Dann werden 5 mL Wasser dazugegeben und das Produkt mit 2 x 5 mL EE extrahiert. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt mittels präparativer HPLC gereinigt. Das Produkt **80** wird nach Lyophilisation als blassgelber Feststoff erhalten.



¹H-NMR (Aceton-D₆, 400 MHz): δ [ppm] = 7.86 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc-H-4/5), 7.73 (dd, $^3J = 7.1$ Hz, $^3J = 4.0$ Hz, 2H, Fmoc-H-1/8), 7.68 (s, 1H, H-Triazol), 7.41 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, Fmoc-H-3/6), 7.32 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, Fmoc-H-2/7), 7.22 (s, 1H, NHCO), 6.84 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, NHCOO), 4.54 (dt, $^3J_{\text{H,F}} = 47.4$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz, 2H, FCH₂), 4.46 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂O), 4.34 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H- α), 4.26–4.19 (m, 3H, CH₂N₃, Fmoc-H-9), 3.26–3.05 (m, 12H, Pip-H, 2 x NCH₂), 2.95 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, H- ϵ), 2.80 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 2H, CH₂C=), 2.51 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, CH₂CO), 1.89–1.77 (m, 4H, H- β , CH₂CH₂F), 1.49–1.40 (m, 6H, H- γ/δ /CH₂CH₂N₃)

¹³C-NMR (Aceton-D₆, 101 MHz): δ [ppm] = 157.2 (O(C=O)N), 145.1 (Fmoc-C-1'/8'), 145.0 (Fmoc-C-4'/5'), 142.1 (CH₂C=C), 128.5 (Fmoc-C-3/4/5/6), 128.0 (Fmoc-C-2/7), 126.2 (CH₂C=C), 120.8 (Fmoc-C-1/8), 81.4 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 163.9$ Hz, FCH₂), 67.2 (CH₂O), 54.5 (C- α), 53.2 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 6.0$ Hz, FCH₂CH₂CH₂), 51.2 (CH₂CH₂CH₂N₃), 50.7 (CH₂N₃), 48.0 (Pip-C), 39.1 (C- ϵ), 35.4 (Fmoc-C-9), 31.9 (CH₂CO), 30.5 (C- β/δ), 29.1 (CH₂CH₂N₃), 26.6 (CH₂C=C), 26.5 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 20.9$ Hz, FCH₂CH₂), 23.5 (C- γ)

¹⁹F-NMR (Aceton-D₆, 376 MHz): δ [ppm] = -222.2

MS (ESI+): m/z (%) = 678 (100) [M + H]⁺

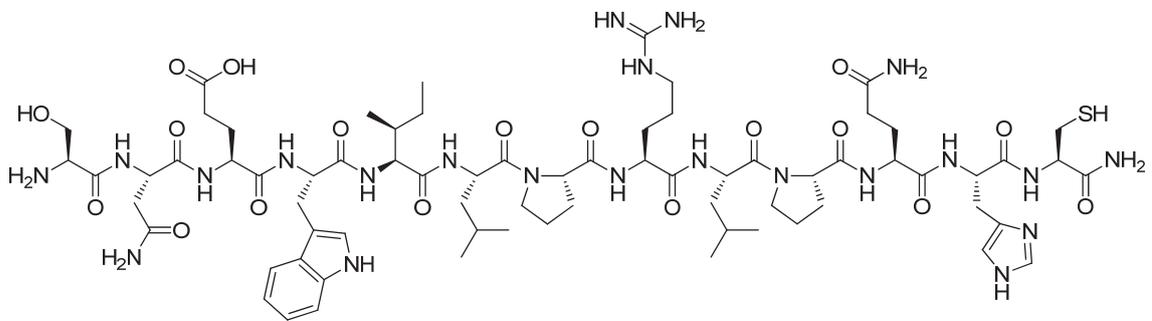
Analytische HPLC: $t_R = 19,3$ min (Gradient 2)

5.3.4 Darstellung der Präkursorpeptide

SNEWILPRLPQHC (53)

Das SNEW-Peptid **53** wird ausgehend von 83 mg Rink-Amid-MBHA-Harz nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift im Abschnitt 5.1.8 zur chemischen Synthese von Peptiden am Peptidsynthesizer dargestellt. Das reine Peptid **53** wird als farbloses Pulver nach präparativer HPLC-Reinigung und anschließender Lyophilisation erhalten.

Ausbeute:	17,30 mg (22%)	HPLC: analyt.: $t_R = 7,1$ min
Summenformel:	$C_{71} H_{110} N_{22} O_{18} S$	Gradient 1
Molmasse:	1591,83 g/mol	

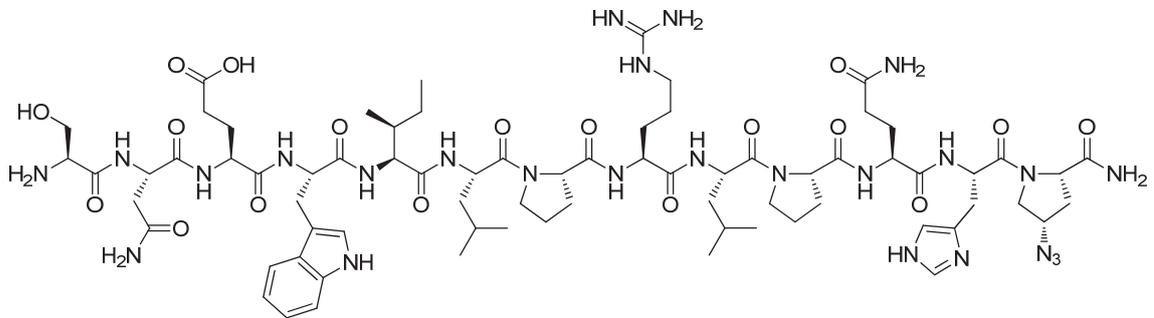


MS (ESI+): m/z (%) berechnet: 1592; gefunden: 1593 (2) $[M + H]^+$,
808 (20) $[M + H + Na]^{2+}$, 797 (100) $[M + 2H]^{2+}$

SNEWILPRLPQH-Azp (66)

Das SNEW-Peptid **66** wird ausgehend von 275 mg mit *N*-Fmoc-(4*S*)-4-Azido-L-prolin-beladenem Rink-Amid-MBHA-Harz nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift im Abschnitt 5.1.8 und 5.1.9 zur chemischen Synthese von Peptiden am Peptidsynthesizer dargestellt. Das reine Peptid **66** wird als farbloses Pulver nach präparativer HPLC-Reinigung und anschließender Lyophilisation erhalten.

Ausbeute:	14,32 mg (9%)	HPLC präp.: $t_R = 10,7$ min
Summenformel:	$C_{73} H_{111} N_{25} O_{18}$	analyt.: $t_R = 10,6$ min (Gradient 6)
Molmasse:	1626,82 g/mol	$t_R = 16,3$ min (Gradient 2)

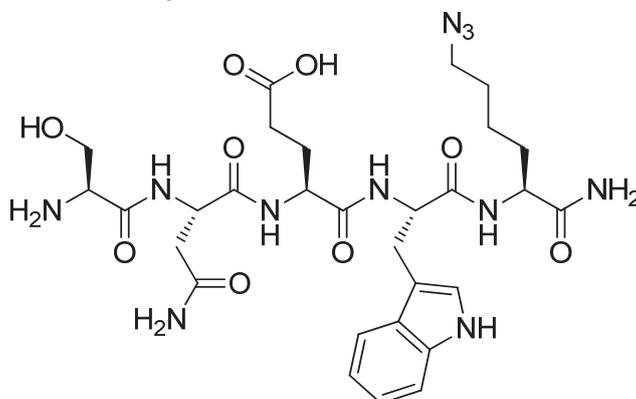


MS (ESI+): m/z (%) berechnet: 1626; gefunden: 814 (50) $[M + 2H]^{2+}$

SNEW-AnI (83)

Das Peptid SNEW-AnI **85** wird ausgehend von 176 mg mit *N*-Fmoc- ϵ -azido-L-norleucin-beladenem Rink-Amid-MBHA-Harz nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift im Abschnitt 5.1.8 und 5.1.9 zur chemischen Synthese von Peptiden am Peptidsynthesizer dargestellt. Die Abspaltung von 44 mg Harz erfolgt mit Reagenz K. Das reine Peptid **85** wird als farbloses Pulver nach präparativer HPLC-Reinigung und anschließender Lyophilisation erhalten.

Ausbeute:	3,02 mg (7%)	HPLC präp.: $t_R = 12,4$ min
Summenformel:	C ₂₉ H ₄₁ N ₁₁ O ₉	Gradient 2
Molmasse:	687,69 g/mol	



¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 12.04 (s, Glu-OH), 10.79 (s, 1H, Trp-NH), 8.66 (m, 2H, *N*-NH₂), 8.16–8.11 (m, 4H, NH), 7.74 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, Trp-H_{meta}), 7.55 (m, 2H, NH₂), 7.31 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 1H, Trp-H_{ortho-N}), 7.15 (m, 1H, Trp-CH_{arom}), 7.07 (m, 1H, Trp-H_{para}), 7.04 (m, 2H, NH₂), 6.97 (t, ³*J* = 7.4 Hz, 1H, Trp-H_{meta-N}), 5.48 (s, 1H, Ser-OH), 4.65–4.60 (m, 1H, Glu-CH), 4.50–4.45 (m, 1H, Asn-CH), 4.19–4.15 (m, 2H, N₃-CH₂), 3.77–3.72 (m, 1H, Lys-CH), 3.67–3.62 (m, 1H, Ser-CH), 3.30–3.27 (m, 1H, Trp-CH), 3.18–3.01 (m, 2H, Trp-CH₂), 2.62–2.57 (m, 2H, Ser-CH₂), 2.19–2.15 (m, 2H, Asn-CH₂), 1.86–1.82 (m, 2H, Glu-CH₂C=O), 1.72–1.63 (m, 2H, Glu-CHCH₂), 1.52–1.45 (m, 4H, N₃-CH₂CH₂CH₂CH₂), 1.32–1.20 (m, 2H, N₃-CH₂CH₂CH₂CH₂)

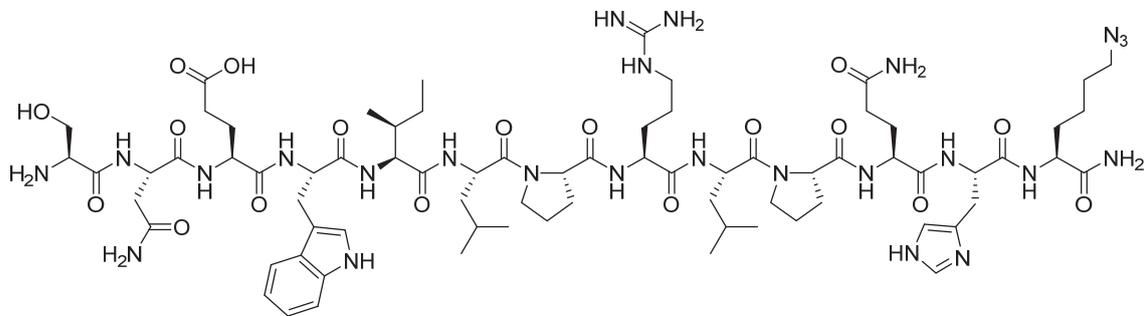
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 173.8, 173.2, 171.3, 171.0, 170.9, 170.7, 166.6 (7x C=O), 135.9 (Trp-C_{ipso}), 127.1 (Trp-C_{ortho}), 123.5 (Trp-NCH), 120.7 (Trp-C_{meta}), 118.2 (Trp-C_{para}), 118.1 (Trp-C_{meta-N}), 111.2 (Trp-C_{ortho-N}), 109.9 (Trp-NCHCH), 60.3 (Ser-CH₂), 54.2 (N₃-CH₂), 53.7, 52.3, 52.1, 50.4, 49.7 (Asn, Glu, Lys, Ser, Trp-CH), 36.7 (Asn-CH₂), 31.3 (Glu-CH₂COOH), 29.9 (N₃-CH₂CH₂), 27.8 (Trp-CH₂), 27.0, 26.9 (Glu-CHCH₂, Lys-CHCH₂), 22.4 (Lys-CHCH₂CH₂)

MS (ESI +): *m/z* (%) berechnet: 687; gefunden: 710 (10) [M + Na]⁺, 688 (100) [M + H]⁺

SNEWILPRLPQH-Anl (68)

Das SNEW-Peptid **68** wird ausgehend von 86 mg mit *N*-Fmoc- ϵ -azido-L-norleucin-beladenem Rink-Amid-MBHA-Harz nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift im Abschnitt 5.1.8 und 5.1.9 zur chemischen Synthese von Peptiden am Peptidsynthesizer dargestellt. Die Abspaltung vom Harz erfolgt mit TFA:TIS:H₂O. Das reine Peptid **68** wird als farbloses Pulver nach präparativer HPLC-Reinigung und anschließender Lyophilisation erhalten.

Ausbeute:	6,5 mg (26%)	HPLC präp.: $t_R = 15,4$ min
Summenformel:	C ₇₄ H ₁₁₅ N ₂₅ O ₁₈	analyt.: $t_R = 17,2$ min
Molmasse:	1642,86 g/mol	Gradient 2

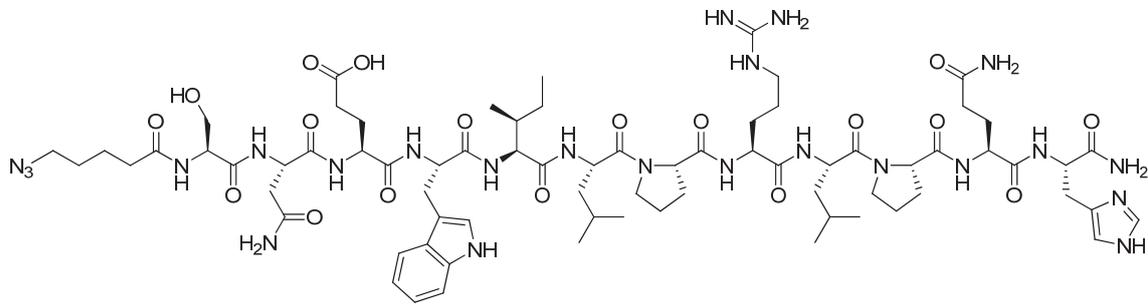


MS (ESI +): m/z (%) berechnet: 1642; gefunden: 1643 (10) [M + H]⁺,
822 (100) [M + 2H]²⁺, 549 (30) [M + 3H]³⁺

N-(5-Azidopentanamido)-SNEWILPRLPQH (70)

112 mg von zu 59% SNEWILPRLPQH-Peptid (25 μmol) beladenem Rink-Amid-MBHA-Harz wird mit 24 mg (100 μmol) 5-Azidopentansäuresuccinimidylester in 1 ml DMF bei 40°C für 3 d geschüttelt. Die Abspaltung vom Harz erfolgt mit TFA:TIS:H₂O. Das reine Peptid **70** wird als farbloses Pulver nach präparativer HPLC-Reinigung und anschließender Lyophilisation erhalten.

Ausbeute:	117 mg Harz (99%)	HPLC präp.: $t_R = 16,4$ min
Summenformel:	C ₇₃ H ₁₁₂ N ₂₄ O ₁₈	analyt.: $t_R = 18,4$ min
Molmasse:	1613,82 g/mol	Gradient 2



MS (ESI +): m/z (%) berechnet: 1613; gefunden: 1614 (10) [M + H]⁺,
808 (100) [M + 2H]²⁺, 546 (30) [M + Na + 2H]³⁺

SNEWILPRLPQH- ϵ -(pent-4-inamido)-Lys (81)

Das SNEW-Peptid **81** wird ausgehend von 430 mg mit N^α -Fmoc- N^ϵ -(pent-4-inamido)-L-lysin-beladenem Rink-Amid-MBHA-Harz nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift im Abschnitt 5.1.8 und 5.1.9 zur chemischen Synthese von Peptiden am Peptidsynthesizer dargestellt. Es werden 629 mg Harz erhalten. Die Probeabspaltung von 31 mg Harz erfolgt mit TFA:TIS:H₂O. Das reine Peptid **81** wird als farbloses Pulver nach präparativer HPLC-Reinigung und anschließender Lyophilisation erhalten.

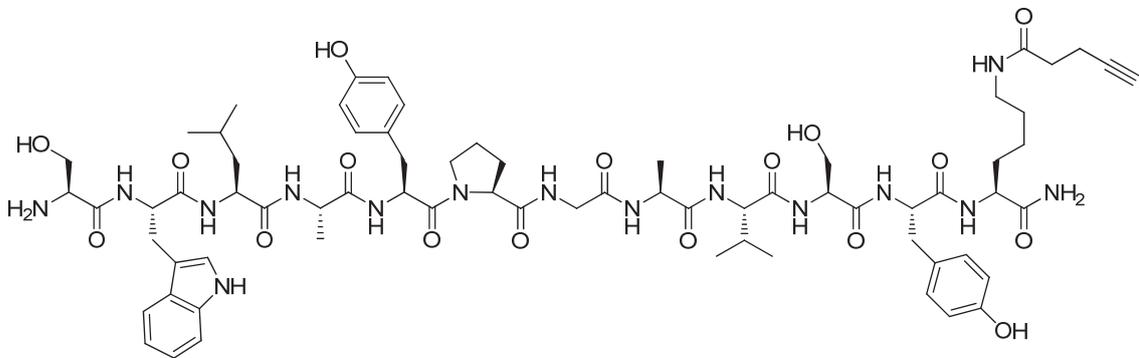
Ausbeute:	3,5 mg (11%)	HPLC präp.: $t_R = 15,6$ min (15 ml/min)
Summenformel:	C ₇₉ H ₁₂₁ N ₂₃ O ₁₉	analyt.: $t_R = 15,2$ min
Molmasse:	1696,95 g/mol	Gradient 2

MS (ESI +): m/z (%) berechnet: 1697; gefunden: 1698 (100) [M + H]⁺,
850 (100) [M + 2H]²⁺, 566 (30) [M + 3H]³⁺

SWLAYPGAVSY- ϵ -(pent-4-inamido)-Lys (83)

Das SWLAY-Peptid **83** wird ausgehend von 170 mg mit N^α -Fmoc- N^ϵ -(pent-4-inamido)-L-lysin-beladenem Rink-Amid-MBHA-Harz nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift im Abschnitt 5.1.8 und 5.1.9 zur chemischen Synthese von Peptiden am Peptidsynthesizer dargestellt. Es werden 224 mg Harz erhalten. Die Probeabspaltung von 23 mg Harz erfolgt mit TFA:TIS:H₂O. Das reine Peptid **83** wird als farbloses Pulver nach präparativer HPLC-Reinigung und anschließender Lyophilisation erhalten.

Ausbeute:	2,3 mg (10%)	HPLC präp.: $t_R = 15,5$ min (10 ml/min)
Summenformel:	C ₇₀ H ₉₇ N ₁₅ O ₁₇	analyt.: $t_R = 16,6$ min
Molmasse:	1420,61 g/mol	Gradient 2



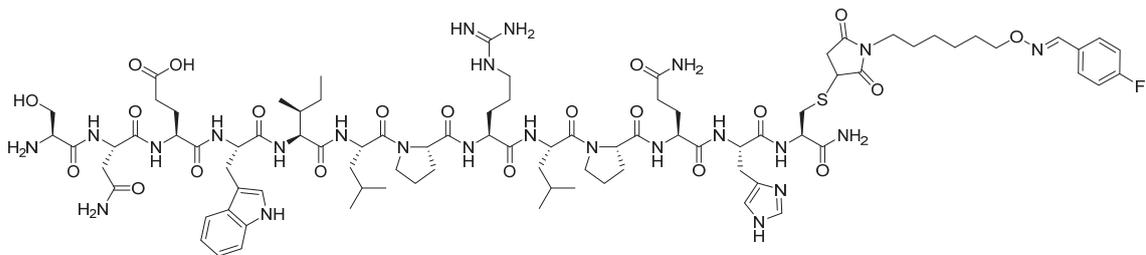
MS (ESI +): m/z (%) berechnet: 1420; gefunden: 1421 (30) [M + H]⁺,
711 (90) [M + 2H]²⁺

5.3.5 Darstellung der Referenzpeptide

SNEWILPRLPQHC-FBAM (54)

Zu einer Lösung aus 4,70 mg (2,95 μ mol) SNEWILPRLPQHC **53** in 100 μ l 0,1 M Sørensen-Phosphat-Puffer mit pH 7,4 werden 1,50 mg (4,71 μ mol) FBAM **48** in 100 μ l CH_3CN gegeben und 2 h bei 60°C gerührt. Anschließend wird die Lösung mittels präparativer HPLC gereinigt und das Peptid **54** durch Lyophilisation als farbloses Pulver erhalten.

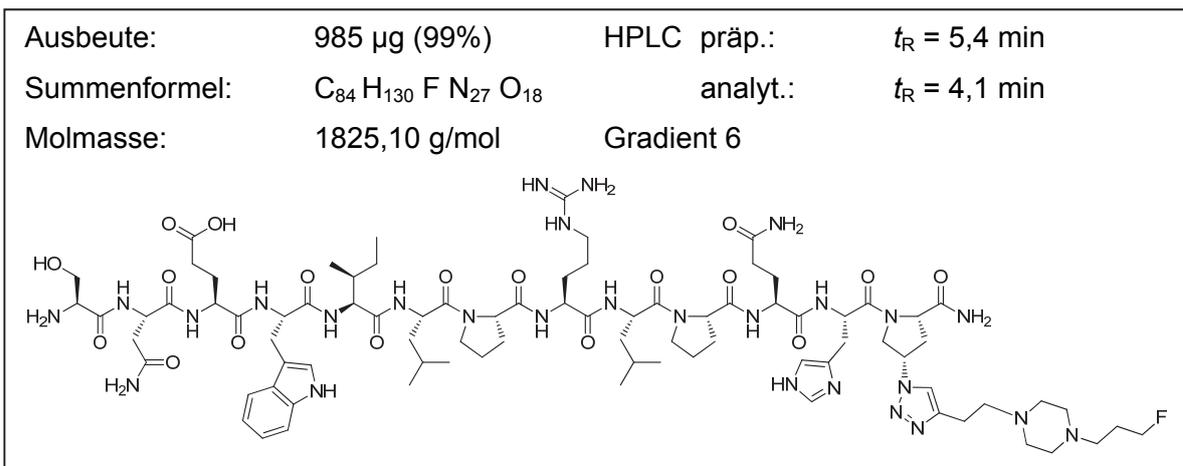
Ausbeute:	4,05 mg (72%)	HPLC analyt.:	$t_R = 11,1$ min
Summenformel:	$\text{C}_{88} \text{H}_{129} \text{F} \text{N}_{24} \text{O}_{21} \text{S}$	Gradient 1	
Molmasse:	1910,18 g/mol		



MS (ESI +): m/z (%) berechnet: 1910; gefunden: 1911 (2) $[\text{M} + \text{H}]^+$,
956 (100) $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$

SNEWILPRLPQH-4-(triazoly-FP)-Pro (67) in Lösung

Zu einer Lösung aus 900 µg (0,55 µmol) SNEWILPRLPQH-Azp **66** in 400 µl 0,1 M Sørensen-Phosphat-Puffer mit pH 7,4 werden 164 µg (0,83 µmol) BFP **57** in 100 µl Ethanol gegeben. Dazu werden 50 µl 0,6 M Natriumascorbat-Lösung und 50 µl 0,4 M CuSO₄-Lösung gegeben und 30 min bei RT geschüttelt. Anschließend wird die Lösung mittels präparativer HPLC gereinigt und das Peptid **67** durch Lyophilisation als blassgrünes Pulver erhalten.

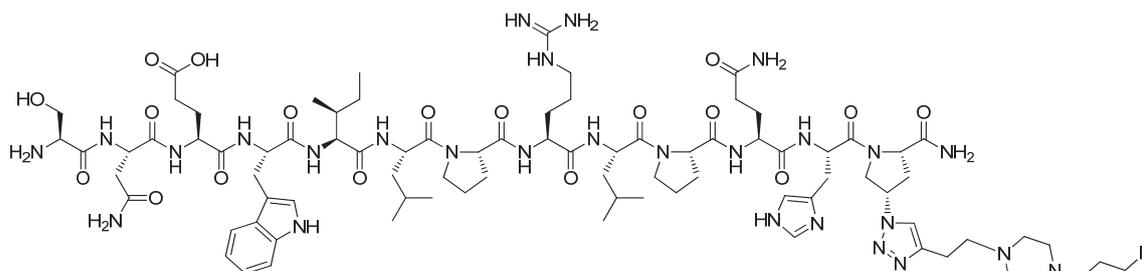


MS (ESI +): m/z (%) berechnet: 1824; gefunden: 945 (80) [M + ⁶³Cu]²⁺, 943 (70) [M + ⁶⁵Cu]²⁺, 913 (100) [M + 2H]²⁺

SNEWILPRLPQH-4-(triazoly-FP)-Pro (67) an Festphase

Zu einer 30 min gequollenen Suspension aus 5 mg (3,07 µmol) SNEWILPRLPQH-Azp am Harz **66** in 400 µl DMF und 600 µl H₂O werden 17 mg (85,86 µmol) BFP **57** und 24,5 mg (98 µmol) CuSO₄·5 H₂O und 122 mg (616 µmol) Natriumascorbat gegeben und 24 h bei 90°C geschüttelt. Das Harz wird gewaschen und 60 min bei 50°C mit einer Lösung aus 92 mg (150 µmol) Bispidin in 1 ml DMF/CH₃OH 1:1 geschüttelt. Die blaue Lösung wird entfernt und das Harz abermals gewaschen. Anschließend wird das Harz mit TFA/TIS/H₂O versetzt und für 3,5 h bei RT geschüttelt und das erhaltene Rohpeptid mittels präparativer HPLC gereinigt. Das lyophilisierte Peptid **67** wird als farbloses Pulver erhalten.

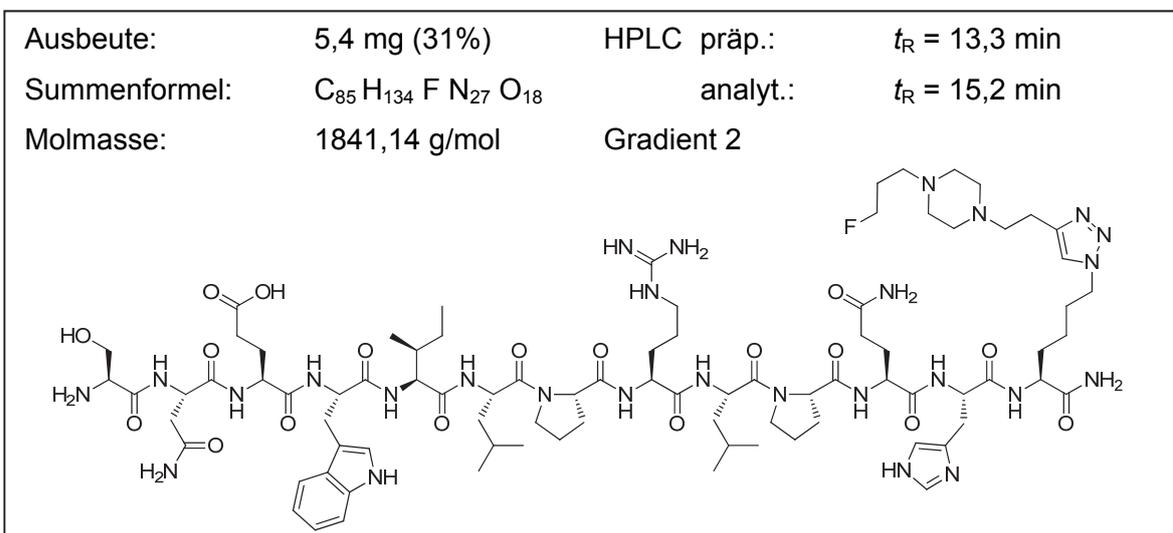
Ausbeute:	2,05 mg (37%)	HPLC präp.:	t _R = 14,1 min
Summenformel:	C ₈₄ H ₁₃₀ F N ₂₇ O ₁₈	analyt.:	t _R = 15,0 min
Molmasse:	1825,10 g/mol	Gradient 2	



MS (ESI +): *m/z* (%) berechnet: 1824; gefunden: 913 (100) [M + 2H]²⁺,
609 (70) [M + 3H]⁺

SNEWILPRLPQH-N^ε-(triazolyl-FP)-Lys (69)

Zu einer 30 min gequollenen Suspension aus 100 mg (9,65 μmol) SNEWILPRLPQH-Anl am Harz **68** in 1 ml DMF werden 9,57 mg (48,27 μmol) BFP **57** und eine Lösung aus 12,1 mg (48,27 μmol) CuSO₄·5 H₂O und 12,8 mg (24,13 μmol) TBTA in 1 ml DMF/H₂O 1:1 gegeben. Zu den vereinigten Lösungen werden 8,8 mg (96,50 μmol) Natriumascorbat gegeben und 3 d bei 50°C geschüttelt. Das Harz wird gewaschen und 1 h bei 50°C mit einer Lösung aus 41,41 mg (67,55 μmol) Bispidin in 6 ml DMF/CH₃OH/H₂O 1:1:1 geschüttelt. Die blaue Lösung wird entfernt und das Harz abermals gewaschen. Anschließend werden 40 mg Harz mit TFA/TIS/H₂O versetzt und für 3,5 h bei RT geschüttelt und das erhaltene Rohpeptid mittels präparativer HPLC gereinigt. Das lyophilisierte Peptid **69** wird als farbloses Pulver erhalten.



MS (ESI +): *m/z* (%) berechnet: 1840; gefunden: 1841 (90) [M + H]⁺,
921 (100) [M + 2H]²⁺

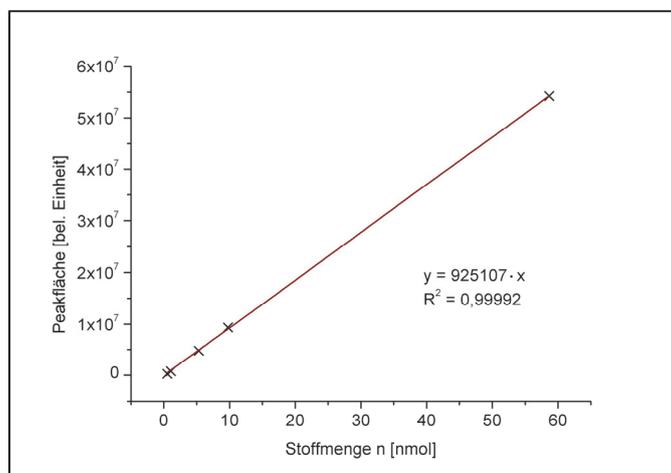
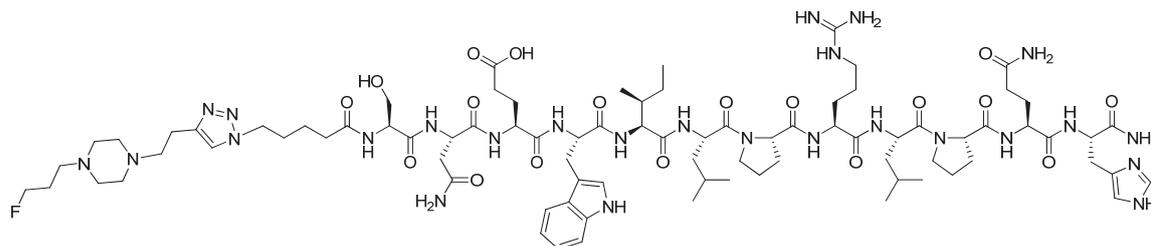


Diagramm 1: Kalibriergerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von **69**

***N*-(5-(Triazolyl-FP)-pentanamido)-SNEWILPRLPQH (71)**

Zu einer 30 min gequollenen Suspension aus 23,6 mg (8,41 μmol) *N*-(5-Azido-pentanamido)-SNEWILPRLPQH am Harz **70** in 1 ml DMF werden 16,6 mg (84,1 μmol) BFP **57** und eine Lösung aus 2,1 mg (8,41 μmol) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 200 μl H_2O gegeben und anschließend 4,5 mg (8,41 μmol) TBTA und 16,6 mg (84,1 μmol) Natriumascorbat trocken zugegeben und in der Mikrowelle für 225 min bei 50 W erwärmt. Danach wird die Suspension 2 d bei 40°C geschüttelt. Das Harz wird gewaschen und 30 min bei 40°C mit einer Lösung aus 10,6 mg (16,82 μmol) Bispidin in 6 ml DMF/ CH_3OH / H_2O 1:1:1 geschüttelt. Die blaue Lösung wird entfernt und das Harz abermals gewaschen. Anschließend werden 40 mg Harz mit TFA/TIS/ H_2O versetzt und für 3,5 h bei RT geschüttelt und das erhaltene Rohpeptid mittels präparativer HPLC gereinigt. Das lyophilisierte Peptid **71** wird als farbloses Pulver erhalten.

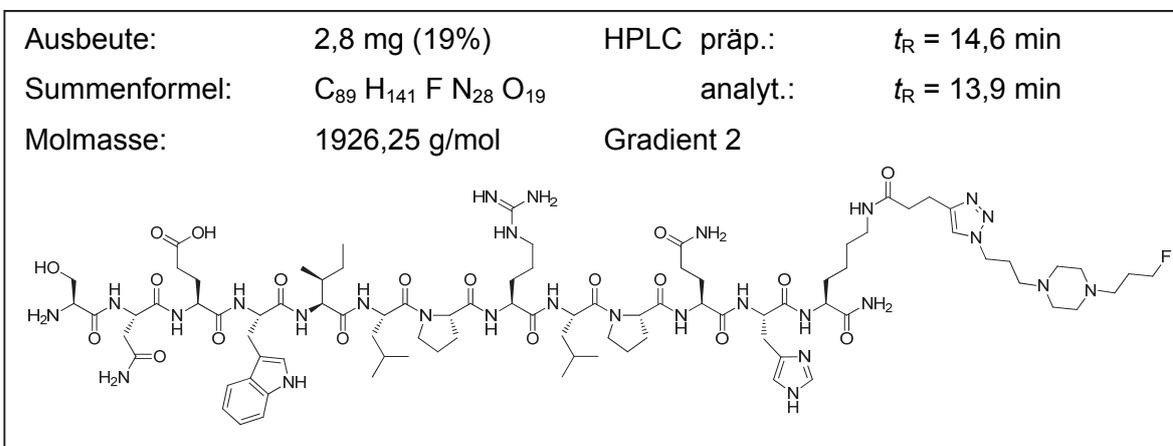
Ausbeute:	5,6 mg (37%)	HPLC präp.:	$t_R = 13,4$ min
Summenformel:	$\text{C}_{84} \text{H}_{131} \text{F} \text{N}_{26} \text{O}_{18}$	analyt.:	$t_R = 15,4$ min
Molmasse:	1812,10 g/mol	Gradient 2	



MS (ESI +): m/z (%) berechnet: 1812; gefunden: 1813 (2) $[\text{M} + \text{H}]^+$,
907 (75) $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, 605 (100) $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$

SNEWILPRLPQH-N^ε-(3-(triazoly-FP)-propanamido)-Lys (82)

Zu einer 30 min gequollenen Suspension aus 33 mg (11,4 μmol) SNEWILPRLPQH-N^ε-(pent-4-inamido)Lys am Harz **81** in 1,2 ml THF werden 99 μl (570 μmol) DIPEA, 4,3 mg (22,8 μmol) CuI und 5,2 mg (22,8 μmol) AFP **75** gegeben und 3 d bei RT geschüttelt. Das Harz wird gewaschen und 30 min bei 40°C mit einer Lösung aus 27,9 mg (45,6 μmol) Bispidin in 3 ml DMF/CH₃OH/H₂O 1:1:1 geschüttelt. Die Lösung wird entfernt und das Harz abermals gewaschen. Anschließend werden 26 mg Harz mit 1 ml TFA/TIS/H₂O versetzt und für 3,5 h bei RT geschüttelt und das erhaltene Rohpeptid mittels präparativer HPLC gereinigt. Das lyophilisierte Peptid **82** wird als farbloses Pulver erhalten.



MS (ESI +): m/z (%) berechnet: 1926; gefunden: 1927 (100) [M + H]⁺, 964 (100) [M + 2H]²⁺, 643 (30) [M + 3H]³⁺

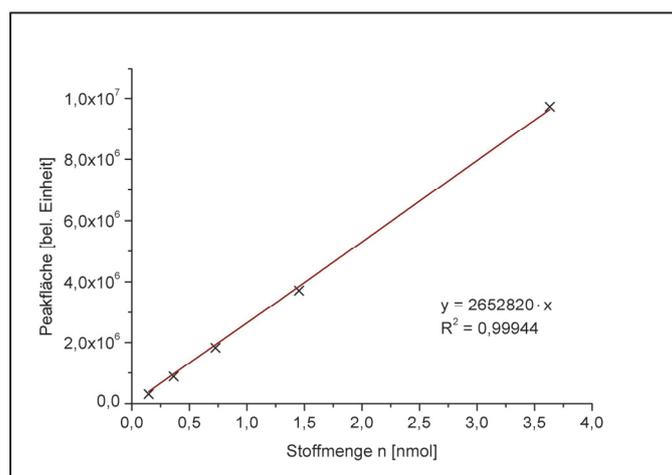
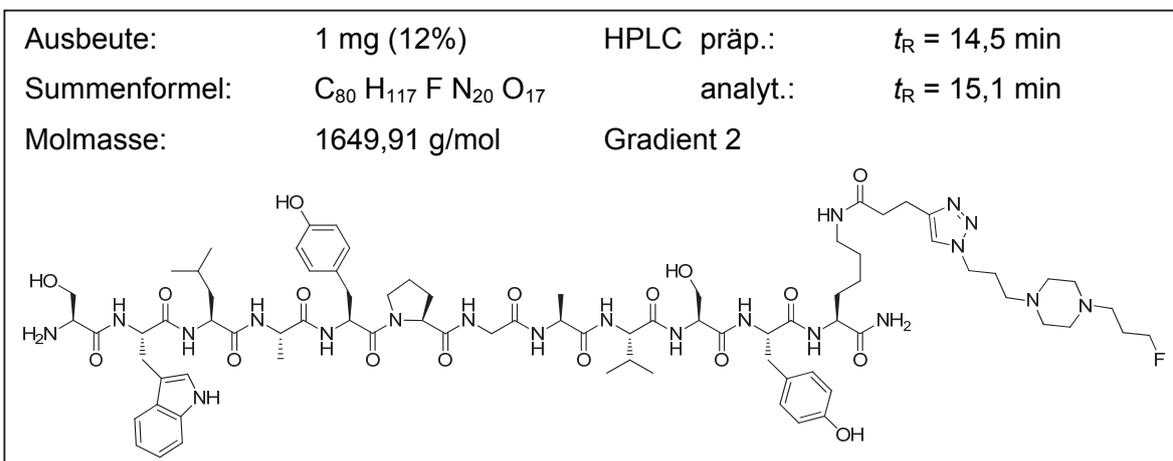


Diagramm 2: Kalibriergerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von **82**

SWLAYPGAVSY-N^ε-(3-(triazolyl-FP)propanamido)-Lys (84)

Zu einer 30 min gequollenen Suspension aus 53 mg (9,3 μmol) SWLAYPGAVSY-N^ε-(pent-4-inamido)Lys am Harz **83** in 1 ml DMF werden 4,9 mg (9,3 μmol) TBTA, 2,3 mg (9,3 μmol) CuSO₄·5 H₂O in 200 μl H₂O, 18,5 mg (93,4 μmol) Natriumascorbat und 21,4 mg (93,4 μmol) AFP **75** gegeben und 3 d bei 40°C geschüttelt. Das Harz wird gewaschen und 30 min bei 40°C mit einer Lösung aus 23,0 mg (37,5 μmol) Bispidin in 3 ml DMF/CH₃OH/H₂O 1:1:1 geschüttelt. Die Lösung wird entfernt und das Harz abermals gewaschen. Anschließend werden 32 mg Harz mit 2 ml TFA/TIS/H₂O versetzt und für 4 h bei RT geschüttelt und das erhaltene Rohpeptid mittels präparativer HPLC gereinigt. Das lyophilisierte Peptid **84** wird als farbloses Pulver erhalten.



MS (ESI +): m/z (%) berechnet: 1650; gefunden: 1651 (10) [M + H]⁺,
826 (100) [M + 2H]²⁺

5.4 Markierungsexperimente

5.4.1 ^{18}F -markierter niedermolekularer Radiotracer

7-(5-Hydroxy-2-methylphenyl)-1-(3- ^{18}F fluorpropyl)-8-(2-methoxyphenyl)-1*H*-imidazo[1,2-*f*]purin-2,4(3*H*,8*H*)-dion (^{18}F 7)

3 mg (3,89 μmol) des Präkursors **41** in 300 μl CH_3CN werden zu entsprechend Abschnitt 5.1.4 getrocknetem ^{18}F Fluorid gegeben und bei 50 W für 70 min erhitzt. Dann wird die Reaktionslösung von ^{18}F 7 mit 3 ml H_2O verdünnt und auf 2 x Chromafix® C18 ec-Kartuschen aufgetragen, die vorher mit H_2O konditioniert wurden. Dann werden die Kartuschen mit 20 ml Wasser eluiert und die gereinigte Verbindung ^{18}F 7 mit 0,9 ml Methanol eluiert. Anschließend wird ^{18}F 7 mittels semipräparativer HPLC gereinigt und im Vakuum bei 50°C getrocknet.

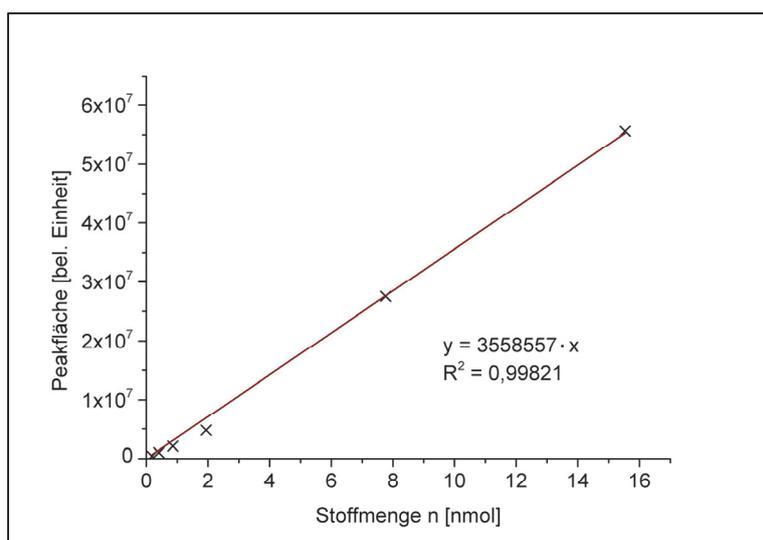
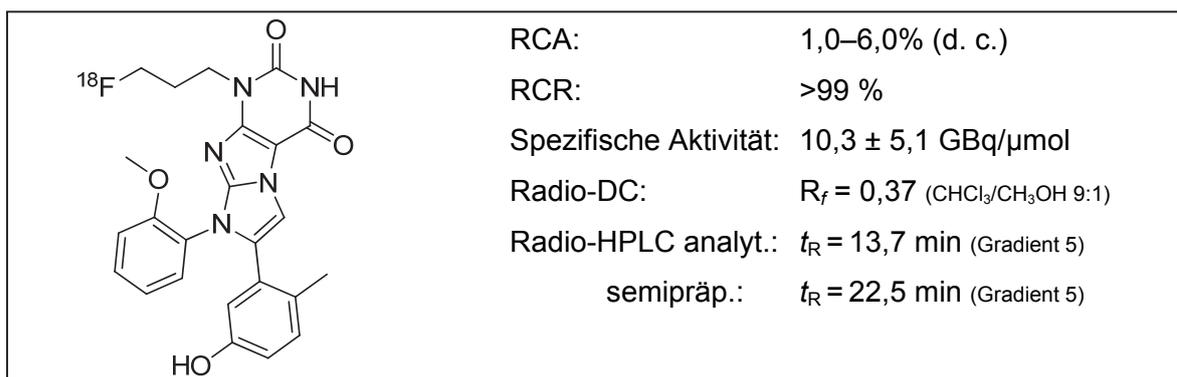


Diagramm 3: Kalibriergerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von ^{18}F 7

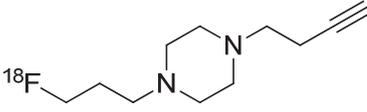
5.4.2 ¹⁸F-Markierungsbausteine

1-(But-3-ynyl)-4-(3-[¹⁸F]fluorpropyl)piperazin ([¹⁸F]BFP) ([¹⁸F]57)

Nach der allgemeinen Vorschrift einer Modulsynthese in Abschnitt 5.1.5 wird der Markierungsbaustein [¹⁸F]BFP aus dem entsprechenden Präkursor **60** hergestellt. Dazu wird das Modul wie folgt bestückt:

Vorratsgefäß	Inhalt
1	1,5 ml K222-Lösung
2	3 ml CH ₃ CN
3	3 mg (8,56 µmol) 60 in 0,5 ml CH ₃ CN
5	2 ml CH ₃ CN
7	1,5 ml CH ₃ CN/H ₂ O 1:1
9	3 ml CH ₃ CN

Eine LiChrolut® Kieselgelkartusche wird mit 5 ml CH₃CN aktiviert, um eine Kartuschenreinigung durchzuführen. Die Reaktionslösung wird mit 2 ml CH₃CN verdünnt, auf die Kartusche gegeben und mit 3 ml CH₃CN eluiert. Dann wird mit 1,5 ml CH₃CN/H₂O 1:1 der reine Markierungsbaustein in ein Auffanggefäß eluiert. Der Präkursor **60** und unumgesetztes ¹⁸F-Fluorid verbleiben auf der Kartusche. Die Startaktivität an [¹⁸F]Fluorid beträgt 4 ± 2 GBq und die Endaktivität von [¹⁸F]57 in 1,5 ml Eluat beträgt 1 ± 0,5 GBq. Das Eluat wird anschließend bei 90°C im Stickstoffstrom getrocknet. Die Synthesezeit beträgt etwa 40 min ab der Adsorption des [¹⁸F]Fluorids auf der QMA Kartusche.

	RCA:	31 ± 9 % (d. c., S.A., n = 8)
	RCR:	>98 % (n = 40)
	Spezifische Aktivität:	7 ± 4 GBq/µmol
	Radio-DC:	R _f = 0,56 (CH ₃ OH)
	Radio-HPLC:	t _R = 4,2 min (Gradient 2)

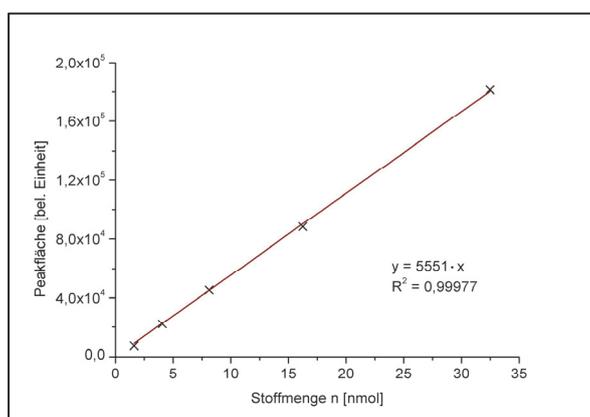


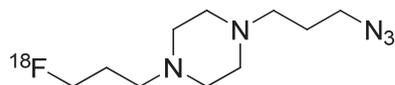
Diagramm 4: Kalibriergerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von [¹⁸F]BFP

1-(3-Azidopropyl)-4-(3-[¹⁸F]fluorpropyl)piperazin ([¹⁸F]AFP) ([¹⁸F]75)

Nach der allgemeinen Vorschrift einer Modulsynthese in Abschnitt 5.1.5 wird der Markierungsbaustein [¹⁸F]AFP aus dem entsprechenden Präkursor **78** hergestellt. Dazu wird das Modul wie folgt bestückt:

Vorratsgefäß	Inhalt
1	1,5 ml K222-Lösung
2	3 ml CH ₃ CN
3	3 mg (7,86 µmol) 78 in 0,5 ml CH ₃ CN
5	1 ml CH ₃ CN
7	1,5 ml CH ₃ CN/H ₂ O 1:1
9	4 ml CH ₃ CN

Eine LiChrolut® Kieselgelkartusche wird mit 5 ml CH₃CN aktiviert, um eine Kartuschenreinigung durchzuführen. Die Reaktionslösung wird mit 1 ml CH₃CN verdünnt, auf die Kartusche gegeben und mit 4 ml CH₃CN eluiert. Dann wird mit 1,5 ml CH₃CN:H₂O 1:1 der reine Markierungsbaustein in ein Auffanggefäß eluiert. Der Präkursor **78** und unumgesetztes ¹⁸F-Fluorid verbleiben auf der Kartusche. Die Startaktivität an [¹⁸F]Fluorid beträgt 10 ± 5 GBq und die Endaktivität von [¹⁸F]**75** in 1,5 ml Eluat beträgt 2,5 ± 1,0 GBq. Das Eluat wird anschließend bei 90°C im Stickstoffstrom getrocknet. Die Synthesezeit beträgt etwa 40 min ab der Adsorption des [¹⁸F]Fluorids auf der QMA Kartusche.



RCA:	29 ± 5% (d. c., S.A., n = 19)
RCR:	> 97 % (n = 10)
Spezifische Aktivität:	10 ± 8 GBq/µmol
Radio-DC:	R _f = 0,47 (CH ₃ OH)
Radio-HPLC:	t _R = 4,4 min (Gradient 2)

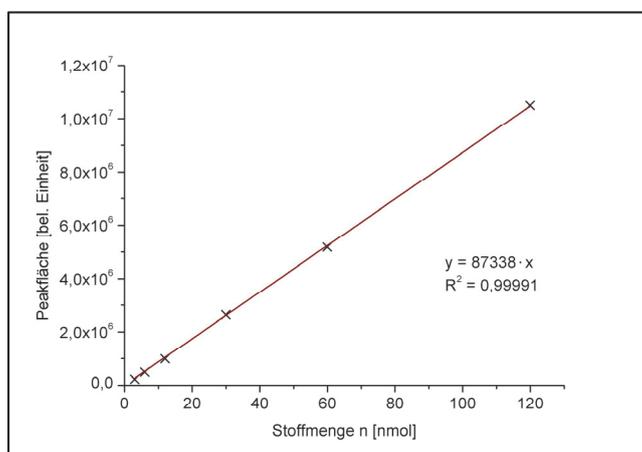
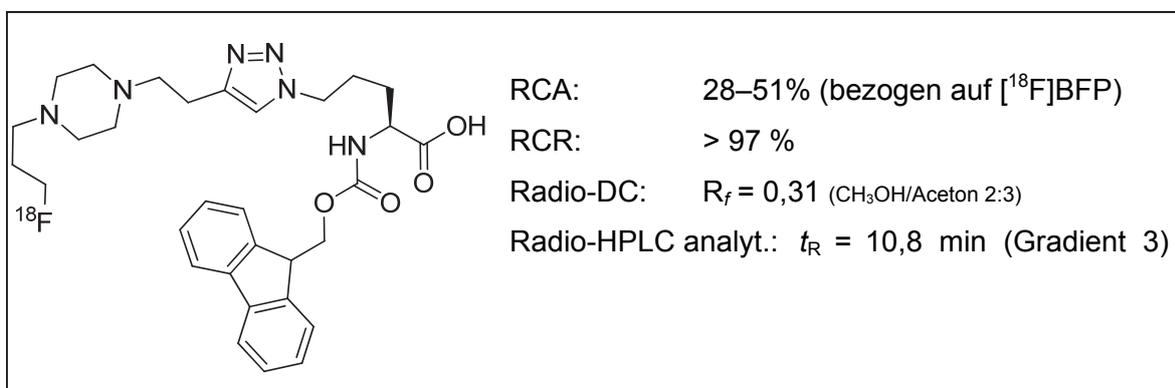


Diagramm 5: Kalibrierkurve zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von [¹⁸F]AFP

5.4.3 ^{18}F -markierte Aminosäuren

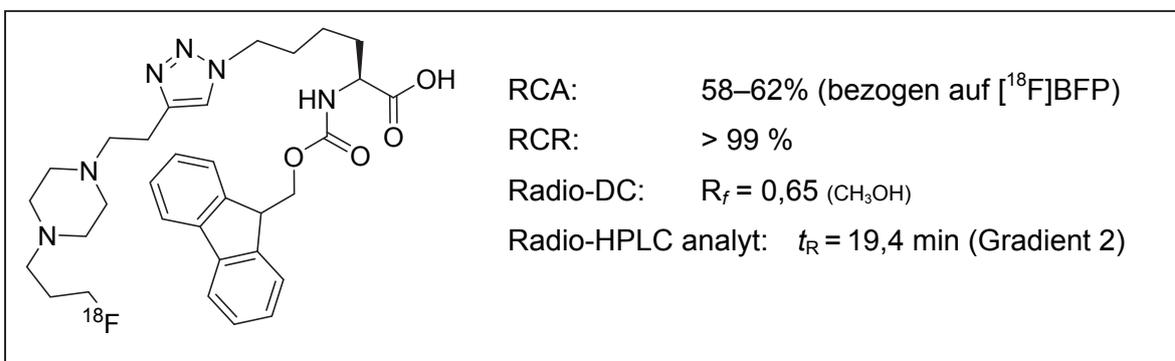
(S)-2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-5-(4-(2-(4-(3- ^{18}F fluorpropyl)-piperazin-1-yl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentansäure (^{18}F 63)

Zu einer Lösung von 5 mg (13,14 μmol) N^α -Fmoc- N^δ -azido-L-norvalin (**61**) in 200 μl *tert*-Butanol werden 50–200 MBq ^{18}F 57 in 200 μl EtOH gegeben. Anschließend erfolgt die Zugabe von 50 μl 0,6 M Natriumascorbat-Lösung und 50 μl 0,4 M CuSO_4 -Lösung. Es wird 1 h bei 60°C geschüttelt. Mittels Radio-DC und analytischer HPLC wird der Fortschritt der Reaktion beobachtet.



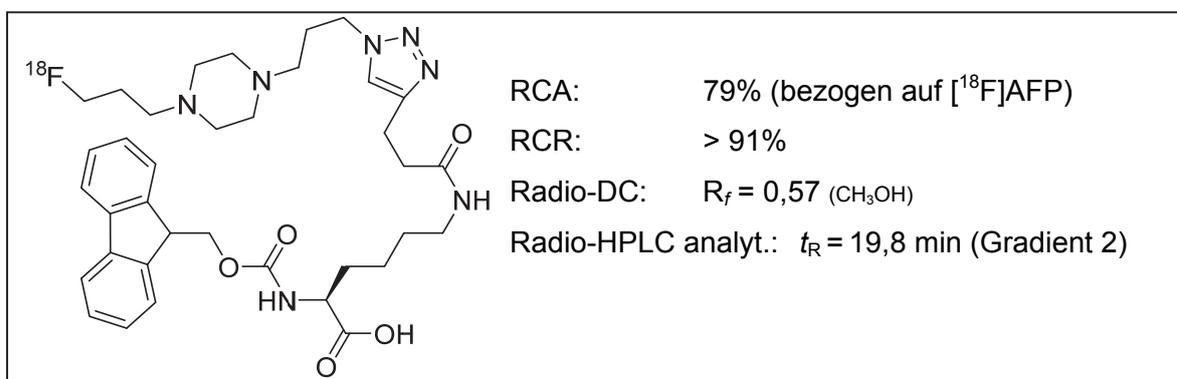
(S)-2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-5-(4-(2-(4-(3-[¹⁸F]fluorpropyl)piperazin-1-yl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hexansäure ([¹⁸F]64)

Zu einer Lösung von 4,45 mg (6,2 µmol) *N*^α-Fmoc-*N*^ε-azido-L-norleucin (**62**) in 100 µl DMF werden 3,4 mg (6,4 µmol) TBTA in 100 µl DMF, 1,3 mg (5,2 µmol) CuSO₄·5 H₂O in 100 µl H₂O und 21,4 mg (10,8 µmol) Natriumascorbat in 100 µl H₂O in dieser Reihenfolge zugegeben. Der getrocknete Markierungsbaustein [¹⁸F]**57** (~500 MBq) wird in 200 µl Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und zur Reaktion gegeben und bei 60°C für 60 min geschüttelt. Der Umsatz vom Markierungsbaustein [¹⁸F]BFP wird mittels Radio-DC und Radio-HPLC verfolgt.



(S)-(9H-Fluoren-9-yl)methyl-1-amino-6-(3-(1-(3-(4-(3-[¹⁸F]fluorpropyl)-piperazin-1-yl)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)-1-oxohexan-2-ylcarbamate ([¹⁸F]80)

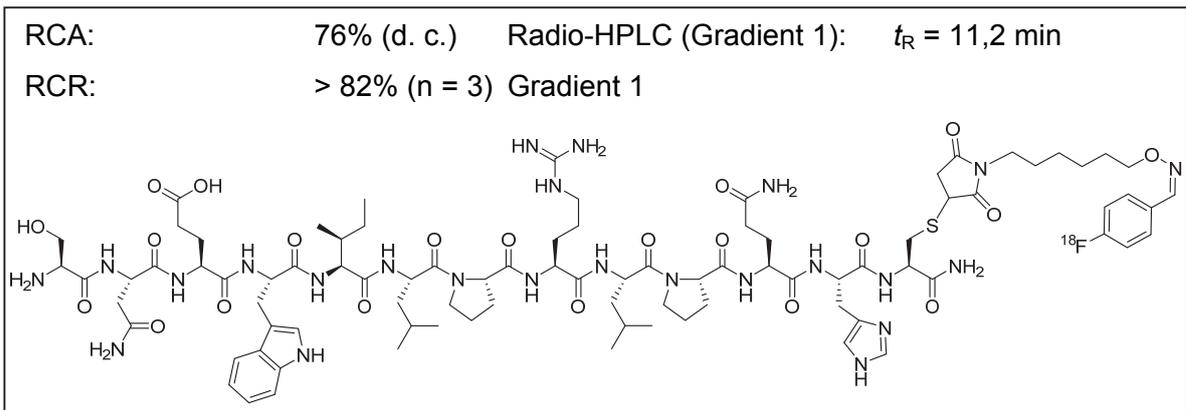
Zu einer Lösung von 4,95 mg (5,0 µmol) *N*^α-Fmoc-*N*^ε-(pent-4-inamido)-L-lysin (**79**) in 100 µl DMF werden 1,06 mg (2,0 µmol) TBTA in 42 µl DMF, 0,13 mg (0,5 µmol) CuSO₄·5 H₂O in 25 µl H₂O und 0,99 mg (5,0 µmol) Natriumascorbat in 21 µl H₂O in dieser Reihenfolge zugegeben. Anschließend wird der getrocknete Markierungsbaustein [¹⁸F]**75** (~1 GBq) in 200 µl Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und zur Reaktion gegeben und bei 50 W für 60 min erhitzt. Der Umsatz vom Markierungsbaustein [¹⁸F]AFP [¹⁸F]**75** wird mittels Radio-DC und Radio-HPLC verfolgt.



5.4.4 ^{18}F -markierte Peptide

SNEWILPRLPQHC- ^{18}F FBAM (^{18}F 54)

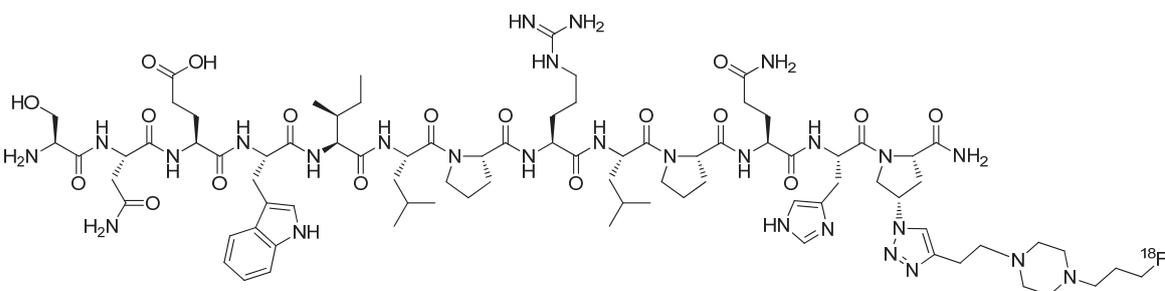
Zu einer Lösung aus 0,47 mg (0,29 μmol) SNEWILPRLPQHC **53** in 100 μl 0,1 M Sørensen-Phosphat-Puffer (pH 7,4) werden 350 MBq ^{18}F FBAM ^{18}F 48 in 100 μl CH_3CN gegeben und 1 h bei 60°C geschüttelt. Mittels Radio-DC und analytischer HPLC wird der Fortschritt der Reaktion beobachtet.



SNEWILPRLPQH-4-(triazoly- ^{18}F FP)-Pro (^{18}F 67) an Festphase

In einem Spritzenfilter werden zu einer Suspension von 5 mg (307 nmol) SNEWILPRLPQH-Azp am gequollenen Harz **66** in 100 μl DMF 510 μg (960 nmol) TBTA gegeben. Dann werden 480 μg (1,92 μmol) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ zugegeben und anschließend 5,61 mg (28,3 μmol) Natriumascorbat in 100 μl Tris/HCl-Puffer (pH 8,0). Der getrocknete Markierungsbaustein ^{18}F 57 (770 MBq) wird mit 150 μl DMF/ H_2O 1:1 aufgenommen und zur Reaktion gegeben und für 1 h bei 50 W erwärmt. Die Reaktionslösung wird anschließend aus der Spritzenfritte gedrückt und das verbliebene Harz mit 2 ml DMF und 2 ml H_2O gewaschen. Dann wird eine Lösung aus 2,4 mg (4 μmol) Bispidin in 150 μl 1:1:0,1 $\text{CH}_3\text{OH}/\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ auf das Harz gegeben und für 20 min bei 50 W erwärmt. Das Peptidyl-Harz wird erneut mit 2 ml DMF und 2 ml H_2O gewaschen und anschließend mit 400 μl TFA/TIS für 60 min bei 30 W abgespalten. Das Rohprodukt wird von der Spritzenfritte eluiert und das Harz mit 100 μl TFA/TIS gewaschen. Die Eluate werden vereinigt und das Produkt ^{18}F 67 wird mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum bei 50°C entfernt.

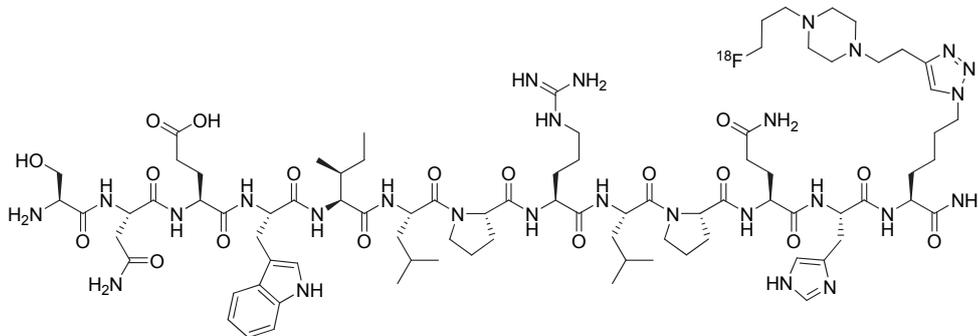
RCA:	1,4 MBq (0,4%, d. c.)	Radio- semipräp.:	$t_R = 20,4 \text{ min}$
RCR:	> 98%	HPLC analyt.:	$t_R = 15,1 \text{ min}$
Spezifische Aktivität:	4 GBq/ μmol	Gradient 2	



SNEWILPRLPQH-N^ε-(triazolyl-[¹⁸F]FP)-Lys ([¹⁸F]69)

In einem Spritzenfilter werden zu einer Suspension von 12,81 mg (790 nmol) SNEWILPRLPQH-AnI am gequollenen Harz **68** in 200 µl DMF 1,1 mg (2 µmol) TBTA gegeben. Dann werden 125 µg (500 nmol) CuSO₄·5 H₂O in 25 µl H₂O zugegeben und anschließend 1,98 mg (10 µmol) Natriumascorbat in 37 µl H₂O. Der getrocknete Markierungsbaustein [¹⁸F]**57** (456–964 MBq) wird in 100 µl Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und zur Reaktion gegeben und für 1 h bei 90 W erwärmt. Die Reaktionslösung wird anschließend aus der Spritzenfritte gedrückt und das verbliebene Harz mit 2 ml DMF und 2 ml H₂O gewaschen. Dann wird eine Lösung aus 3,06 mg (5 µmol) Bispidin in 300 µl 1:1:0,1 CH₃OH/DMF/H₂O auf das Harz gegeben und für 20 min bei 30 W erwärmt. Das Peptidyl-Harz wird erneut mit 2 ml DMF und 2 ml H₂O gewaschen und anschließend mit 600 µl TFA/TIS für 20 min bei 30 W abgespalten. Das Rohprodukt wird von der Spritzenfritte eluiert und das Harz mit 300 µl TFA/TIS gewaschen. Die Eluate werden vereinigt und das Produkt [¹⁸F]**69** wird mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

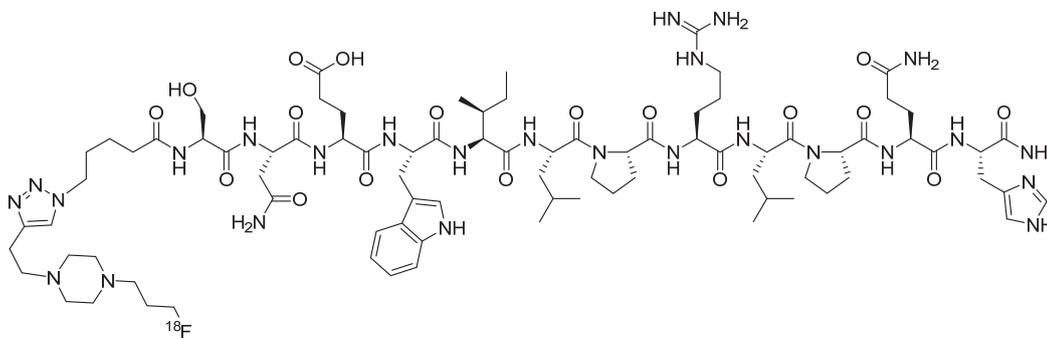
RCA:	1,3–4,0 MBq (0,5–1,4%, d. c.)	Radio- semipräp.:	t _R = 20,5 min
RCR:	> 98%	HPLC analyt.:	t _R = 14,8 min
Spezifische Aktivität:	~1,2 GBq/µmol (n = 2)	Gradient 2	



***N*-(5-(Triazolyl-[¹⁸F]FP)-pentanamido)-SNEWILPRLPQH ([¹⁸F]71)**

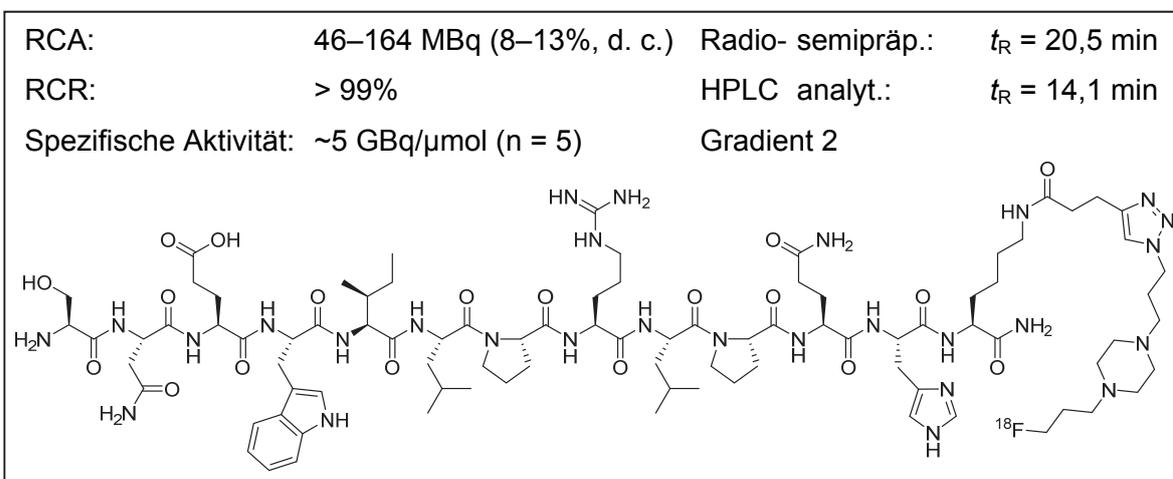
In einem Spritzenfilter werden zu einer 30 min gequollener Lösung aus 5 mg (309 nmol) *N*-(5-Azidopentanamido)-SNEWILPRLPQH am Harz **70** in 80 µl DMF 1,7 mg (3,2 µmol) TBTA gegeben. Dann werden 200 µg (800 nmol) CuSO₄·5 H₂O zugegeben und anschließend 1,6 mg (8 µmol) Natriumascorbat. Der getrocknete Markierungsbaustein [¹⁸F]**57** (1,76 GBq) wird mit 100 µl Tris/HCl-Puffer (pH 9,0) aufgenommen und zur Reaktion gegeben und für 1,5 h bei 50 W erwärmt. Die Reaktionslösung wird anschließend aus der Spritzenfritte gedrückt und das verbliebene Harz mit 2 ml DMF und 2 ml H₂O gewaschen. Dann wird eine Lösung aus 7,8 mg (10 µmol) Bispidin in 1 ml 1:1:0,1 CH₃OH/DMF/H₂O auf das Harz gegeben und für 20 min bei 30 W erwärmt. Das Peptidyl-Harz wird erneut mit 2 ml DMF und 2 ml H₂O gewaschen und anschließend mit 600 µl TFA/TIS für 30 min bei 30 W abgespalten. Das Rohprodukt wird von der Spritzenfritte eluiert und das Harz mit 300 µl TFA/TIS gewaschen. Die Eluate werden vereinigt und das Produkt [¹⁸F]**71** wird mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

RCA:	12,5 MBq (1,8%, d. c.)	Radio-	semipräp.:	<i>t_R</i> = 20,5 min
RCR:	> 98%	HPLC	analyt.:	<i>t_R</i> = 15,6 min
Spezifische Aktivität:	~5 GBq/µmol	Gradient 2		



SNEWILPRLPQH-N^ε-(3-(triazolyli-[¹⁸F]FP)-propanamido)-Lys ([¹⁸F]82)

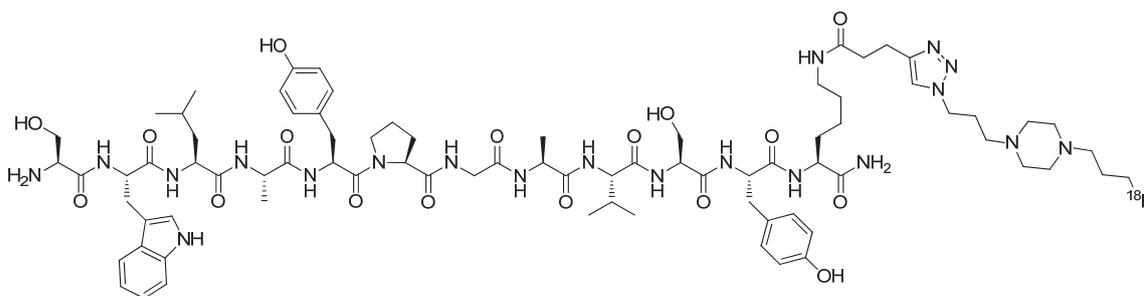
In einem Spritzenfilter werden zu einer 30 min gequollener Lösung aus 12 mg (710 nmol) SNEWILPRLPQH-N^ε-(pent-4-inamido)-Lys am Harz **81** in 150 µl DMF 2,7 mg (5 µmol) TBTA gegeben. Dann werden 1,2 mg (4,95 µmol) CuSO₄·5 H₂O in 10 µl H₂O und anschließend 1,4 mg (7,07 µmol) Natriumascorbat in 10 µl H₂O zugegeben. Der getrocknete Markierungsbaustein [¹⁸F]**75** (2,30–3,34 GBq) wird mit 100 µl Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und zur Reaktion gegeben und für 1 h bei 50 W erwärmt. Die Reaktionslösung wird anschließend aus der Spritzenfritte gedrückt und das verbliebene Harz mit 2 ml DMF und 2 ml H₂O gewaschen. Dann wird eine Lösung aus 7,8 mg (10 µmol) Bispidin in 1 ml 1:1:0,1 CH₃OH/DMF/H₂O auf das Harz gegeben und für 20 min bei 30 W erwärmt. Das Peptidyl-Harz wird erneut mit 2 ml DMF und 2 ml H₂O gewaschen und anschließend mit 700 µl TFA/TIS für 30 min bei 30 W abgespalten. Das Rohprodukt wird von der Spritzenfritte eluiert und das Harz mit 300 µl TFA/TIS gewaschen. Die Eluate werden vereinigt und das Produkt [¹⁸F]**82** wird mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.



SWLAYPGAVSY-N^ε-(3-(triazolyl-[¹⁸F]FP)-propanamido)-Lys ([¹⁸F]84)

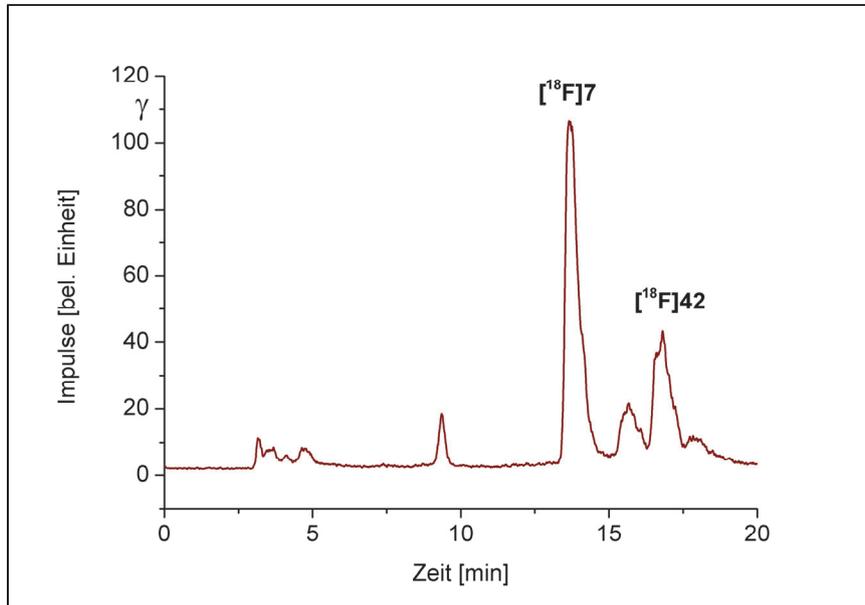
In einem Spritzenfilter werden zu einer 30 min gequollener Lösung aus 12 mg (710 nmol) SWLAYPGAVSY-N^ε-(pent-4-inamido)Lys am Harz **83** in 150 µl DMF 2,34 mg (4,4 µmol) TBTA gegeben. Der getrocknete Markierungsbaustein [¹⁸F]**75** (1,42–3,21 GBq) wird mit 150 µl Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und zur Reaktion gegeben. Dann werden 0,88 mg (3,52 µmol) CuSO₄·5 H₂O in 10 µl H₂O und anschließend 1,74 mg (8,79 µmol) Natriumascorbat in 10 µl H₂O zugegeben und für 1 h bei 70 W erwärmt. Die Reaktionslösung wird anschließend aus der Spritzenfritte gedrückt und das verbliebene Harz mit 2 ml DMF und 2 ml H₂O gewaschen. Dann wird eine Lösung aus 5 mg (8,2 µmol) Bispidin in 1 ml 1:1:0,1 CH₃OH/DMF/H₂O auf das Harz gegeben und für 20 min bei 30 W erwärmt. Das Peptidyl-Harz wird erneut mit 2 ml DMF und 2 ml H₂O gewaschen und anschließend mit 600 µl TFA/TIS für 30 min bei 30 W abgespalten. Das Rohprodukt wird von der Spritzenfritte eluiert und das Harz mit 400 µl TFA/TIS gewaschen. Die Eluate werden vereinigt und das Produkt [¹⁸F]**84** wird mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

RCA:	36–140 MBq (7–13%, d. c.)	Radio- semipräp.:	t _R = 21,5 min
RCR:	> 99%	HPLC analyt.:	t _R = 15,2 min
Spezifische Aktivität:	~5 GBq/µmol (n = 3)	Gradient 2	

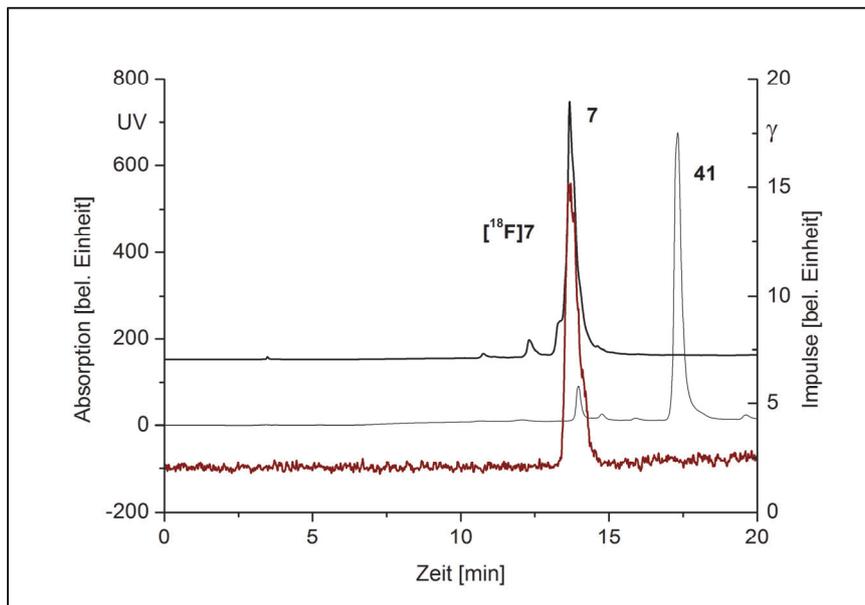


6. Anhang

6.1 HPLC Chromatogramme des niedermolekularen Radiotracers [^{18}F]7

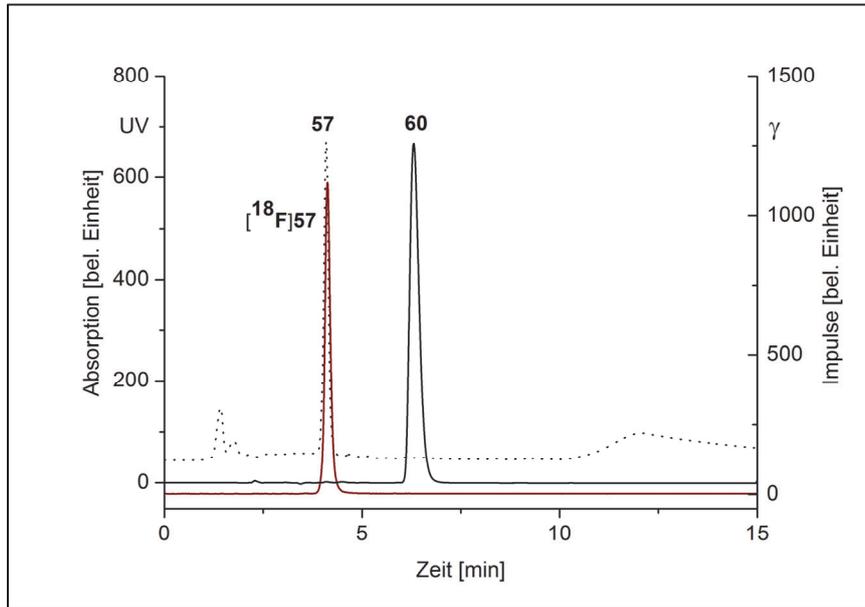


Repräsentatives Radio-HPLC Chromatogramm von der Radiosynthese von [^{18}F]7 (γ -Spur, $t_R = 13,7$ min, Reaktionsmischung, vermutliches Intermediat [^{18}F]42, $t_R = 17,0$ min)

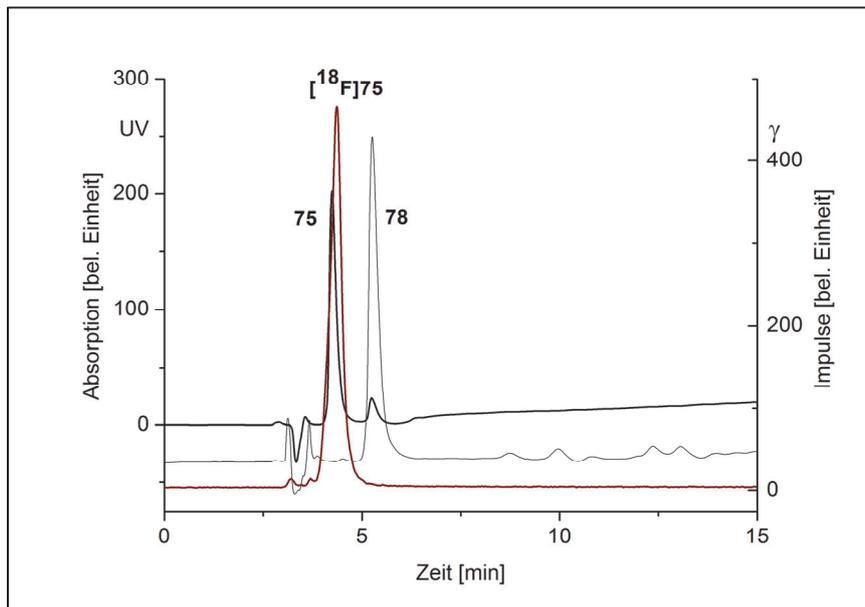


Repräsentative (Radio-)HPLC Chromatogramme vom gereinigten [^{18}F]7 (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 13,7$ min), Referenzsubstanz 7 (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 13,7$ min) und des Präkursors 41 (UV-Spur, dünne Linie, $t_R = 17,4$ min)

6.2 HPLC Chromatogramme der Markierungsbausteine

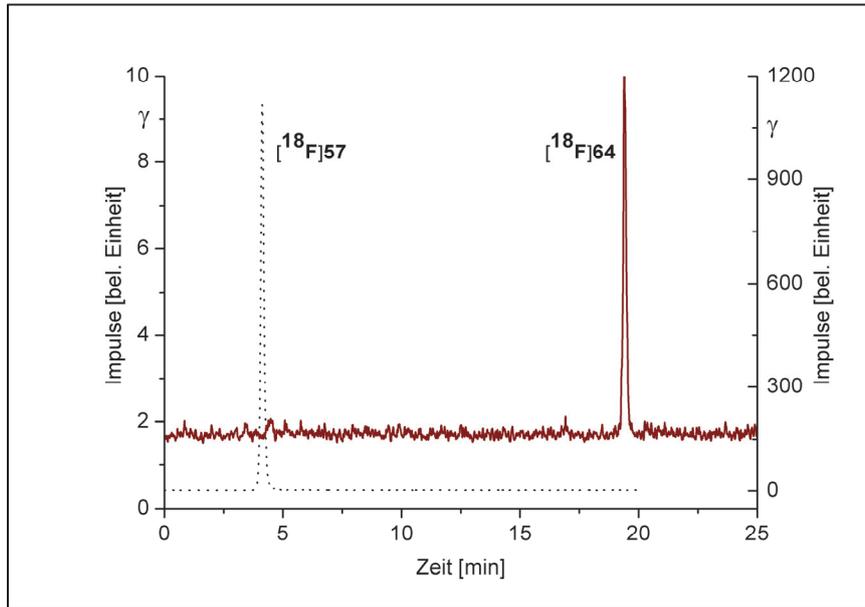


Repräsentative (Radio-)HPLC Chromatogramme von der Herstellung von $[^{18}\text{F}]\text{BFP } [^{18}\text{F}]\text{57}$ (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 4,2$ min), Referenzsubstanz **57** (UV-Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,2$ min) und des Präkursors **60** (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 6,5$ min)

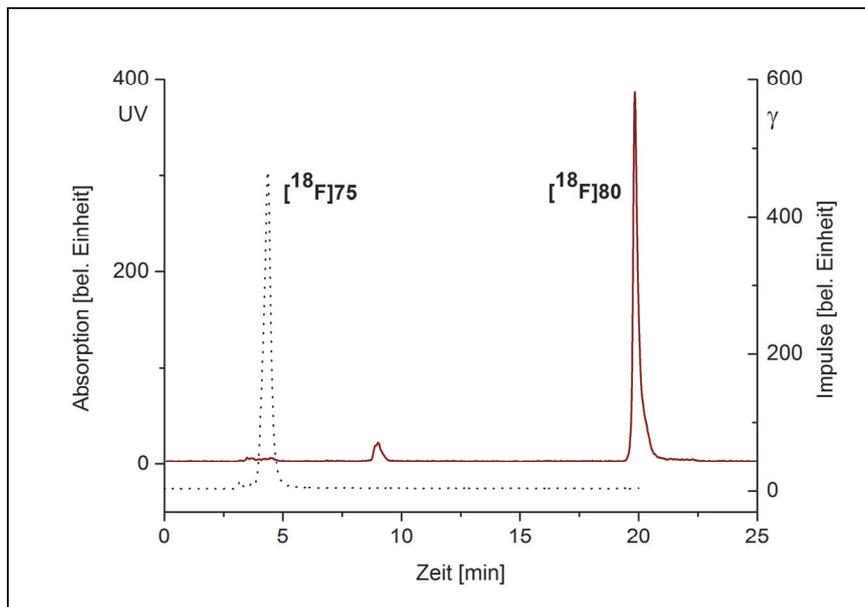


Repräsentative (Radio-)HPLC Chromatogramme von der Herstellung von $[^{18}\text{F}]\text{AFP } [^{18}\text{F}]\text{75}$ (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 4,4$ min), Referenzsubstanz **75** (UV-Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,2$ min) und des Präkursors **78** (UV-Spur, dünne Linie, $t_R = 5,3$ min)

6.3 HPLC Chromatogramme der ^{18}F -markierten Aminosäuren

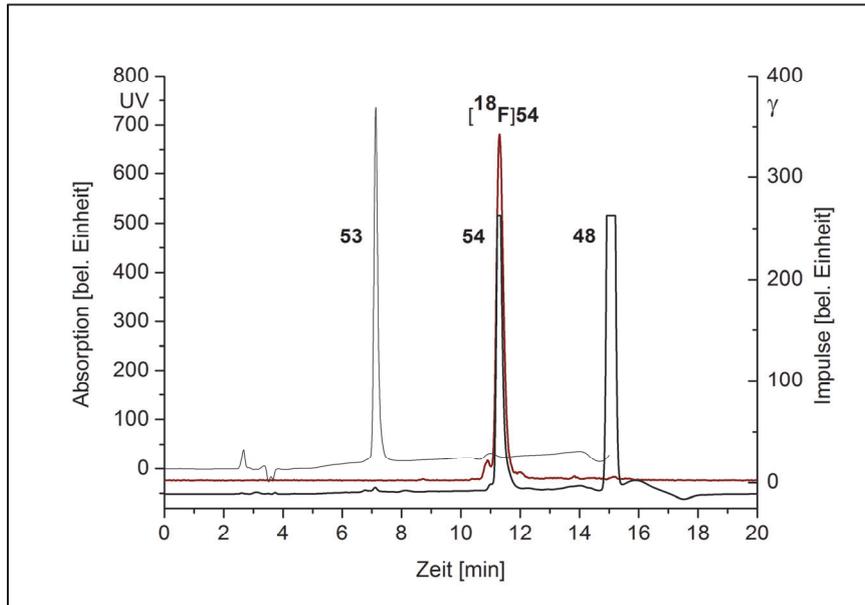


Repräsentative Radio-HPLC Chromatogramme von [^{18}F]BFP [^{18}F]57 (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,2$ min) und von der radiomarkierten Aminosäure [^{18}F]64 (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 19,8$ min)

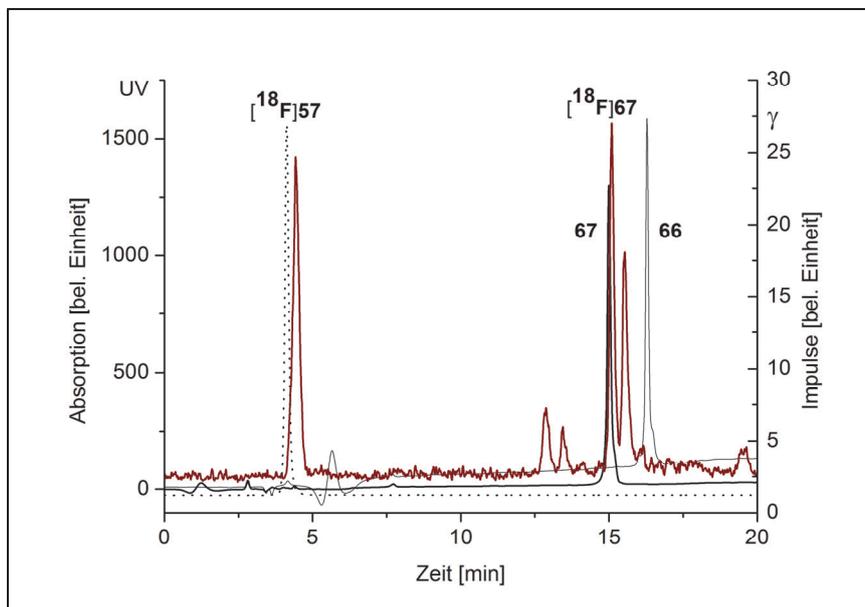


Repräsentative Radio-HPLC Chromatogramme von [^{18}F]AFP [^{18}F]75 (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,4$ min) und von der radiomarkierten Aminosäure [^{18}F]80 (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 19,4$ min)

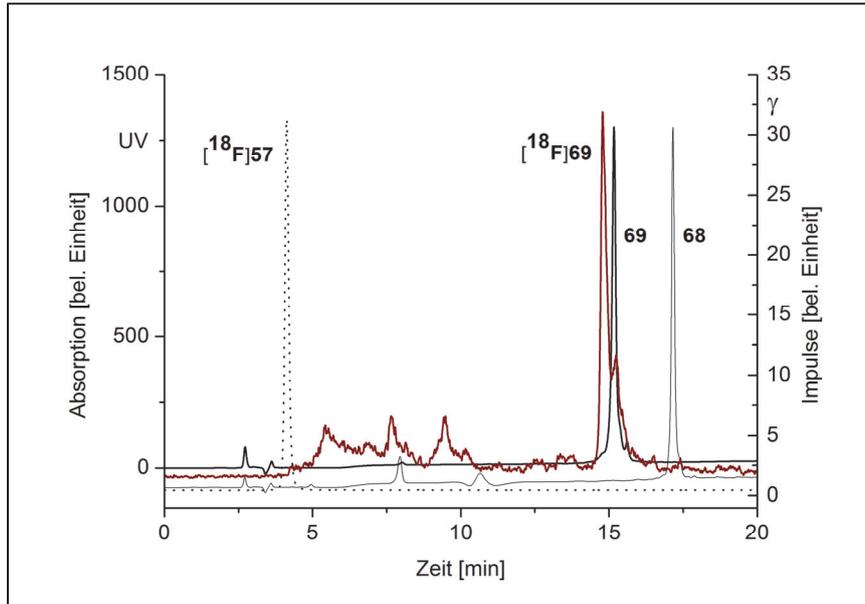
6.4 HPLC Chromatogramme der ^{18}F -markierten Peptide



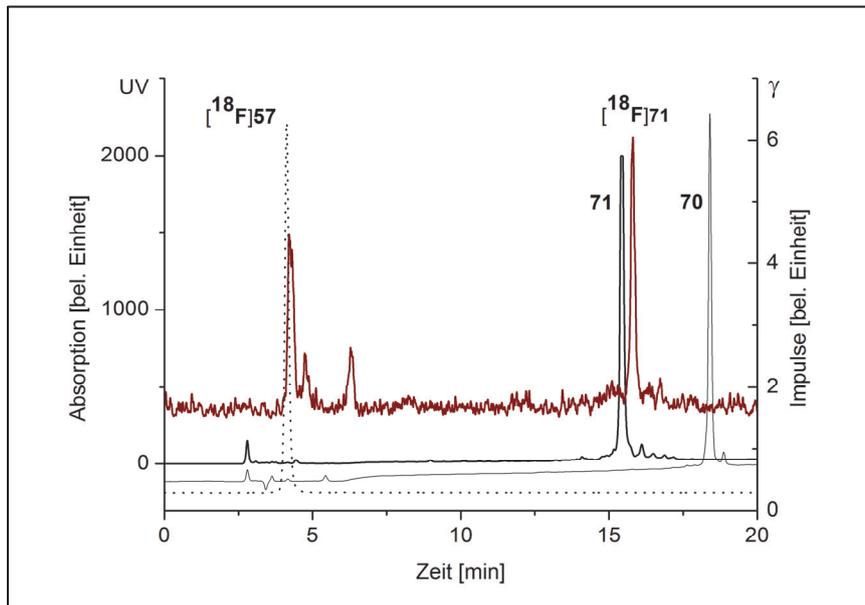
Repräsentative (Radio)-HPLC Chromatogramme von SNEW- Peptid $[^{18}\text{F}]\mathbf{54}$ (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 11,2$ min), Referenzsubstanz **54** (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 11,1$ min), Präkursorpeptid **53** (UV-Spur, dünne Linie, $t_R = 7,1$ min) und FBAM **48** (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 15,1$ min)



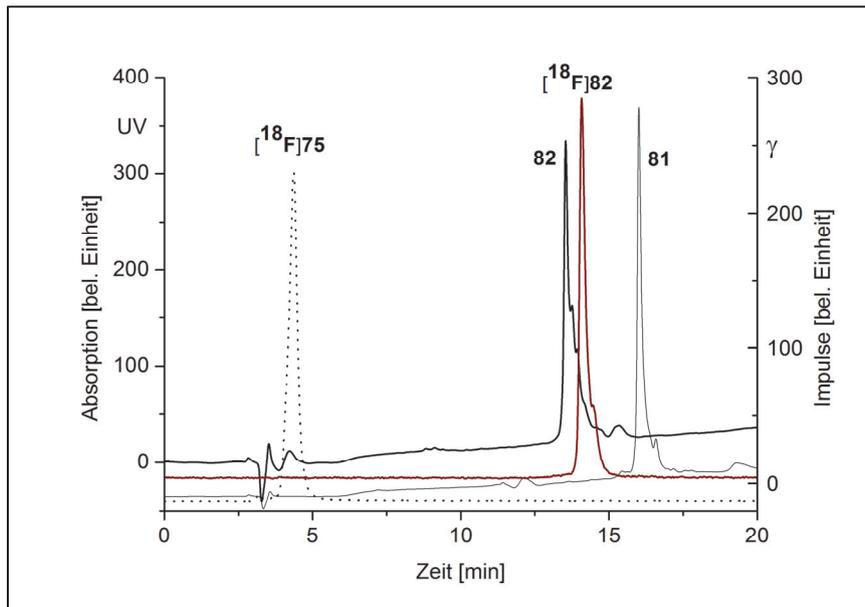
Repräsentative (Radio)-HPLC Chromatogramme von Peptid SNEWILPRLPQH-4-(Triazolyl)- $[^{18}\text{F}]\text{FP}$ -Pro $[^{18}\text{F}]\mathbf{67}$ (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 15,1$ min), Referenzsubstanz **67** (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 15,0$ min), Präkursorpeptid **66** (UV-Spur, dünne Linie, $t_R = 16,3$ min) und $[^{18}\text{F}]\text{BFP}$ $[^{18}\text{F}]\mathbf{57}$ (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,2$ min)



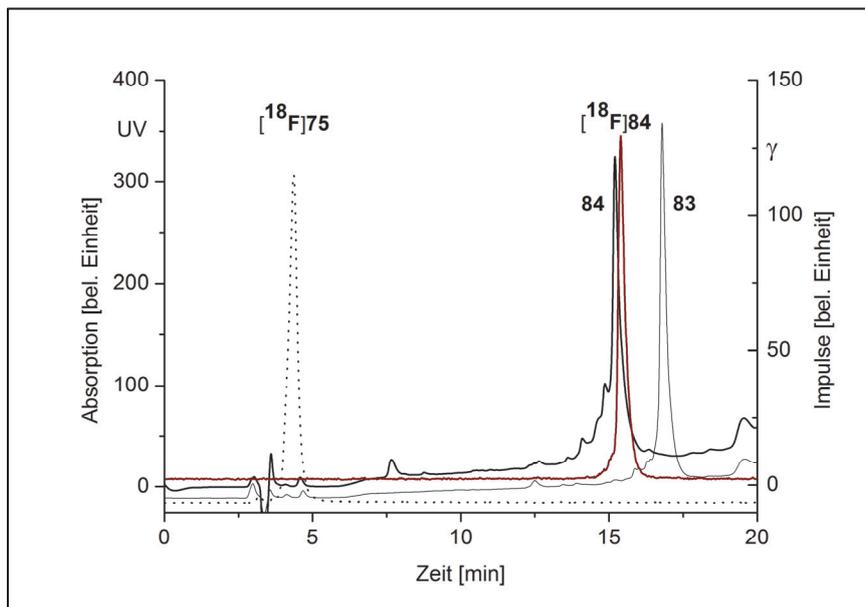
Repräsentative (Radio)-HPLC Chromatogramme von Peptid SNEWILPRLPQH- N^{ϵ} -(Triazolyl- $[^{18}\text{F}]$ FP)-Lys $[^{18}\text{F}]$ 69 (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 14,8$ min), Referenzsubstanz 69 (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 15,2$ min), Präkursorpeptid 68 (UV-Spur, dünne Linie, $t_R = 17,2$ min) und $[^{18}\text{F}]$ BFP $[^{18}\text{F}]$ 57 (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,2$ min)



Repräsentative (Radio)-HPLC Chromatogramme von Peptid N-(5-(Triazolyl- $[^{18}\text{F}]$ FP)-pentanamido)-SNEWILPRLPQH $[^{18}\text{F}]$ 71 (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 15,6$ min), Referenzsubstanz 71 (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 15,4$ min), Präkursorpeptid 70 (UV-Spur, dünne Linie, $t_R = 18,4$ min) und $[^{18}\text{F}]$ BFP $[^{18}\text{F}]$ 57 (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,2$ min)



Repräsentative (Radio)-HPLC Chromatogramme von Peptid SNEWILPRLPQH- N^{ϵ} -(3-(Triazolyl- ^{18}F)FP)-propanamido-Lys ^{18}F 82 (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 14,1$ min), Referenzsubstanz 82 (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 13,9$ min), Präkursorpeptid 81 (UV-Spur, dünne Linie, $t_R = 15,2$ min) und ^{18}F AFP ^{18}F 75 (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,2$ min)



Repräsentative (Radio)-HPLC Chromatogramme von Peptid SWLAYPGAVSY- N^{ϵ} -(3-(Triazolyl- ^{18}F)FP)-propanamido-Lys ^{18}F 84 (γ -Spur, rote Linie, $t_R = 15,2$ min), Referenzsubstanz 84 (UV-Spur, fette Linie, $t_R = 15,1$ min), Präkursorpeptid 83 (UV-Spur, dünne Linie, $t_R = 16,6$ min) und ^{18}F AFP ^{18}F 75 (γ -Spur, gepunktete Linie, $t_R = 4,2$ min)

7. Literatur

1. Agency, I. A. E. "Cyclotron Produced Radionuclides: Principles and Practice" IAEA Austria, Wien 2008, 465. Auflage, 9–20, 230.
2. Stevens, R. H. *Am. J. of Roentg.* **16** (1926) 155.
3. Lawrence, E. O. Method and apparatus for the acceleration of ions. **US1948384** (1932).
4. Cassen, B.; Curtis, L.; Reed, C.; Libby, R. Instrumentation for ^{131}I use in medical studies. *Nucleonics* **9** (1951) 46–50.
5. Anger, H. O. Scintillation Camera. *Rev. Sci. Instrum.* **29** (1958) 27–33.
6. Cai, L.; Lu, S.; Pike, V. W. Chemistry with [^{18}F]Fluoride Ion. *Eur. J. Org. Chem.* **2008** (2008) 2853–2873.
7. Phelps, M. E. "PET Molecular Imaging and Its Biological Applications" Springer, New York 2004, 1. Auflage, 621.
8. Tressaud, A.; Haufe, G. "Fluorine and Health: Molecular Imaging, Biomedical Materials and Pharmaceuticals" Elsevier Science & Technology, Amsterdam, Oxford 2008, 1. Auflage, 4 ff, 816.
9. Bauser, M.; Lehmann, L. Positronen-Emissions-Tomographie. *Chem. Unserer Zeit* **46** (2012) 80–99.
10. Lasne, M.-C.; Perrio, C.; Rouden, J.; Barré, L.; Roeda, D.; Dolle, F.; Crouzel, C. Chemistry of β^+ -Emitting Compounds Based on Fluorine-18. *Top. Curr. Chem.* **222** (2002) 201–258.
11. Cho, Z.-H.; Son, Y.-D.; Kim, H.-K.; Kim, K.-N.; Oh, S.-H.; Han, J.-Y.; Hong, I.-K.; Kim, Y.-B. A Hybrid PET-MRI: An Integrated Molecular-Genetic Imaging System with HRRT-PET and 7.0-T MRI. *Int. J. Imaging Syst. Technol.* **17** (2007) 252–265.
12. Beckmann, N.; Kneuer, R.; Gremlich, H. U.; Karmouty-Quintana, H.; Blé, F. X.; Müller, M. In vivo mouse imaging and spectroscopy in drug discovery. *NMR Biomed.* **20** (2007) 154–185.
13. Langner, J. Masterarbeit, "Development of a Parallel Computing Optimized Head Movement Correction Method in Positron Emission Tomography", angefertigt im Forschungszentrum Dresden-Rossendorf, TU Dresden, 2003.
14. Pretze, M.; Kuchar, M.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Pietzsch, J.; Mamat, C. An Efficient Bioorthogonal Strategy Using CuAAC-Click for Radiofluorinations of SNEW Peptides and the Role of Copper-Depletion. *ChemMedChem* **8** (2013) 935–945.
15. Magill, J.; Pfennig, G.; Galy, J. "Karlsruher Nuklidkarte" Marktdienste Haberbeck, 2006, 7. Auflage,
16. Snell, A. H. Minutes of the Pasadena Meeting 1936: A new radioactive isotope of fluorine. Proceedings of the American Physical Society. *Phys. Rev.* **51** (1937) 143.
17. Mamat, C.; Flemming, A.; Köckerling, M.; Steinbach, J.; Wuest, F. R. Synthesis of Benzoate-Functionalized Phosphanes as Novel Building Blocks for the Traceless Staudinger Ligation. *Synthesis* **19** (2009) 3311–3321.
18. Böhm, H. J.; Banner, D.; Bendels, S.; Kansy, M.; Kuhn, B.; Müller, K.; Obst-Sander, U.; Stahl, M. Fluorine in Medicinal Chemistry. *ChemBioChem* **5** (2004) 637–643.
19. Lee, K. C.; Lee, S.-Y.; Choe, Y. S.; Chi, D. Y. Metabolic Stability of [^{18}F]Fluoroalkylbiphenyls. *Bull. Korean Chem. Soc.* **25** (2004) 1225–1230.
20. Vlasov, V. M. Fluoride ion as a nucleophile and a leaving group in aromatic nucleophilic substitution reactions. *J. Fluorine Chem.* **61** (1993) 193–216.
21. Füchtner, F.; Preusche, S.; Maeding, P.; Zessin, J.; Steinbach, J. Factors affecting the specific activity of [^{18}F]fluoride from a [^{18}O]water target. *Nuklearmedizin* **47** (2008) 116–119.
22. Langer, O.; Gulyás, B.; Sandell, J.; Laszlovszky, I.; Kiss, B.; Domány, G.; Ács, T.; Farde, L.; Halldin, C. Radiochemical Labelling of the Dopamine D₃ Receptor Ligand RGH-1756. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **43** (2000) 1069–1074.
23. Schirmacher, R.; Wängler, C.; Schirmacher, E. Recent Developments and Trends in ^{18}F -Radiochemistry: Syntheses and Applications. *Mini-Rev. Org. Chem.* **4** (2007) 317–329.
24. Mamat, C.; Ramenda, T.; Wuest, F. R. Recent Applications of Click Chemistry for the Synthesis of Radiotracers for Molecular Imaging. *Mini-Rev. Org. Chem.* **6** (2009) 21–34.

25. Wester, H. J.; Merz, M.; Weber, W.; Heiss, P.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Schwaiger, M.; Stöcklin, G. Synthesis and Radiopharmacology of O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-Tyrosine for Tumor Imaging. *J. Nucl. Chem.* **40** (1999) 205–212.
26. Wester, H. J. Entwicklung von PET-Tracern zur In-vivo-Charakterisierung der Tumorbiologie. *Nuklearmedizin* **27** (2004) 218–225.
27. Michael, A. Ueber die Einwirkung von Diazobenzolimid auf Acetylen-dicarbon säuremethylester. *J. Prakt. Chem.* **48** (1893) 94–95.
28. Dimroth, O.; Fester, G. Triazol und Tetrazol aus Stickstoffwasserstoffsäure. *Chem. Ber.* **43** (1910) 2219–2223.
29. Huisgen, R. 1,3-Dipolare Cycloadditionen. *Angew. Chem.* **75** (1963) 604–637.
30. Beyer, H.; Walter, W. "Lehrbuch der Organischen Chemie" S. Hirzel Verlag, Stuttgart, Leipzig 1998, 23. Auflage, 788 ff, 1176.
31. Brückner, R. "Advanced Organic Chemistry: Reaction Mechanisms" Harcourt/Academic Press, Massachusetts 2001, 1, 504 ff, 636.
32. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective „Ligation“ of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem.* **114** (2002) 2708–2711.
33. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **67** (2002) 3057–3064.
34. Keliher, E. J.; Reiner, T.; Thurber, G. M.; Upadhyay, R.; Weissleder, R. Efficient ¹⁸F-Labeling of Synthetic Exendin-4 Analogues for Imaging Beta Cells. *Chem. Open* **1** (2012) 177–183.
35. Pretze, M.; Pietzsch, D.; Mamat, C. Recent trends in bioorthogonal click-radiolabeling reactions using fluorine-18. *Molecules* **18** (2013) 8618–8665.
36. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonale Chemie - oder: in einem Meer aus Funktionalität nach Selektivität fischen. *Angew. Chem.* **121** (2009) 7108–7133.
37. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2004) 210–216.
38. Fuchs, M.; Goessler, W.; Pilger, C.; Kappe, C. O. Mechanistic Insights into Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions using Continuous Flow Conditions. *Adv. Synth. Catal.* **352** (2010) 323–328.
39. Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **340** (2013) 457–460.
40. Gil, M. V.; Arévalo, M. J.; López, Ó. Click Chemistry - What's in a Name? Triazole Synthesis and Beyond. *Synthesis* **2007** (2007) 1589–1620.
41. Lahann, J. "Click Chemistry for Biotechnology and Material Science" Wiley, Chichester 2009, 1, 411.
42. Kolb, H. C.; Walsh, J. C.; Chen, K. Click chemistry method for synthesizing molecular imaging probes. **WO2006/116629(A2)** (2006).
43. Marik, J.; Sutcliffe, J. L. Click for PET: rapid preparation of [¹⁸F]fluoropeptides using Cu^I catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition. *Tetrahedron Lett.* **47** (2006) 6681–6684.
44. Sirion, U.; Kim, H. J.; Lee, J. H.; Seo, J. W.; Lee, B. S.; Lee, S. J.; Oh, S. J.; Chi, D. Y. An efficient F-18 labeling method for PET study: Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition of bioactive substances and F-18-labeled compounds. *Tetrahedron Lett.* **48** (2007) 3953–3957.
45. SciFinder-Suche (05. Februar 2013)
46. Maschauer, S.; Prante, O. A series of 2-O-trifluoromethylsulfonyl-D-mannopyranosides as precursors for concomitant ¹⁸F-labeling and glycosylation by click chemistry. *Carbohydr. Res.* **344** (2009) 753–761.
47. Li, Z.-B.; Wu, Z.; Chen, K.; Chin, F. T.; Chen, X. Click Chemistry for ¹⁸F-Labeling of RGD Peptides and microPET Imaging of Tumor Integrin $\alpha_v\beta_3$ Expression. *Bioconjugate Chem.* **18** (2007) 1987–1994.
48. Ramenda, T.; Knies, T.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Wuest, F. Radiolabelling of proteins with fluorine-18 via click chemistry. *Chem. Comm.* (2009) 7521–7523.
49. Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 3192–3193.

-
50. Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **6** (2004) 2853–2855.
 51. Kuboyama, T.; Nakahara, M.; Yoshino, M.; Cui, Y.; Sako, T.; Wada, Y.; Imanishi, T.; Obika, S.; Watanabe, Y.; Suzuki, M.; Doi, H. Stoichiometry-focused ¹⁸F-labeling of alkyne-substituted oligodeoxynucleotides using azido [¹⁸F]fluoromethyl)benzenes by Cu-catalyzed Huisgen reaction. *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 249–255.
 52. Besanceney-Webler, C.; Jiang, H.; Zheng, T.; Feng, L.; Soriano del Amo, D.; Wang, W.; Klivansky, L. M.; Marlow, F. L.; Liu, Y.; Wu, P. Increasing the efficacy of bioorthogonal click reactions for bioconjugation: a comparative study. *Angew. Chem.* **123** (2011) 8201–8206.
 53. Mosch, B.; Reissenweber, B.; Neuber, C.; Pietzsch, J. Eph Receptors and Ephrin Ligands: Important Players in Angiogenesis and Tumor Angiogenesis. *J. Oncol.* **2010** (2010)
 54. Lisle, J. E.; Mertens-Walker, I.; Rutkowski, R.; Herington, A. C.; Stephenson, S. A. Eph receptors and their ligands: Promising molecular biomarkers and therapeutic targets in prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1835** (2013) 243–257.
 55. Gale, N. W.; Yancopoulos, G. D. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* **13** (1999) 1055–1066.
 56. Pasquale, E. B. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* **133** (2008) 38–52.
 57. Holder, N.; Klein, R. Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development* **126** (1999) 2033–2044.
 58. Xi, H. Q.; Wu, X. S.; Wei, B.; Chen, L. Eph receptors and ephrins as targets for cancer therapy. *J. Cell Mol. Med.* **16** (2012) 2894–2909.
 59. Janes, P. W.; Nievergall, E.; Lackmann, M. Concepts and consequences of Eph receptor clustering. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23** (2012) 43–50.
 60. Pasquale, E. B. Eph receptors and eprins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **10** (2010) 165–180.
 61. Surawska, H.; Ma, P. C.; Salgia, R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15** (2004) 419–433.
 62. Noberini, R.; Lamberto, I.; Pasquale, E. B. Targeting Eph receptors with peptides and small molecules: progress and challenges. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23** (2012) 51–57.
 63. Wang, S.; Placzek, W. J.; Stebbins, J. L.; Mitra, S.; Noberini, R.; Koolpe, M.; Zhang, Z.; Dahl, R.; Pasquale, E. B.; Pellicchia, M. Novel targeted system to deliver chemotherapeutic drugs to EphA2-expressing cancer cells. *J. Med. Chem.* **55** (2012) 2427–2436.
 64. Davalos, V.; Dopeso, H.; Velho, S.; Ferreira, A. M.; Cirnes, L.; Díaz-Chico, N.; Bilbao, C.; Ramírez, R.; Rodríguez, G.; Falcón, O.; León, L.; Niessen, R. C.; Keller, G.; Dallenbach-Hellweg, G.; Espín, E.; Armengol, M.; Plaja, A.; Perucho, M.; Imai, K.; Yamamoto, H.; Gebert, J. F.; Díaz-Chico, J. C.; Hofstra, R. M.; Woerner, S. M.; Seruca, R.; Schwartz Jr., S.; Arango, D. High EphB2 mutation rate in gastric but not endometrial tumors with microsatellite instability. *Oncogene* **26** (2004) 308–311.
 65. Battle, E.; Henderson, J. T.; Beghtel, H.; van den Born, M. M. W.; Sancho, E.; Huls, G.; Meeldijk, J.; Robertson, J.; van de Wetering, M.; Pawson, T.; Clevers, H. β -Catenin and TCF Mediate Cell Positioning in the Intestinal Epithelium by Controlling the Expression of EphB/EphrinB. *Cell* **111** (2002) 251–263.
 66. Wu, Q.; Suo, Z.; Kristensen, G. B.; Baekelandt, M.; Nesland, J. M. The prognostic impact of EphB2/B4 expression on patients with advanced ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **102** (2006) 15–21.
 67. Wu, Q.; Suo, Z.; Risberg, B.; Karlsson, M. G.; Villman, K.; Nesland, J. M. Expression of EphB2 And EphB4 in Breast Carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* **10** (2004) 26–33.
 68. Dong, J. T. Prevalent Mutations in Prostate Cancer. *J. Cell Biochem.* **97** (2006) 433–447.
 69. Nakada, M.; Niska, J. A.; Miyamori, H.; McDonough, W. S.; Wu, J.; Sato, H.; Berens, M. E. The Phosphorylation of EphB2 Receptor Regulates Migration and Invasion of Human Glioma Cells. *Cancer Res.* **64** (2004) 3179–3185.
 70. Kandouz, M.; Haidara, K.; Zhao, J.; Brisson, M.-L.; Batist, G. The EphB2 tumor suppressor induces autophagic cell death via concomitant activation of the ERK1/2 and PI3K pathways. *Cell Cycle* **9** (2010) 398–407.
-

71. Chaudhari, A.; Mahfouz, M.; Fialho, A. M.; Yamada, T.; Granja, A. T.; Zhu, Y.; Hashimoto, W.; Schlarb-Ridley, B.; Cho, W.; Das Gupta, T. K.; Chakrabarty, A. M. Cupredoxin-Cancer Interrelationship: Azurin Binding with EphB2, Interference in EphB2 Tyrosine Phosphorylation, and Inhibition of Cancer Growth. *Biochemistry* **46** (2007) 1799–1810.
72. Nakada, M.; Niska, J. A.; Tran, N. L.; McDonough, W. S.; Berens, M. E. EphB2/R-Ras Signaling Regulates Glioma Cell Adhesion, Growth, and Invasion. *Am. J. Pathol.* **167** (2005) 565–576.
73. Wykosky, J.; Debinski, W. The EphA2 receptor and EphrinA1 ligand in solid tumors: function and therapeutic targeting. *Mol. Cancer Res.* **6** (2008) 1795–1806.
74. Ireton, R. C.; Chen, J. EphA2 Receptor Tyrosine Kinase as a Promising Target for Cancer Therapeutics. *Curr. Cancer Drug Targets* **5** (2005) 149–157.
75. Wang, X. D.; Reeves, K.; Luo, F. R.; Xu, L. A.; Lee, F.; Clark, E.; Huang, F. Identification of candidate predictive and surrogate molecular markers for dasatinib in prostate cancer: rationale for patient selection and efficacy monitoring. *Genome Biol.* **8** (2007) R255.
76. Landen, C. N.; Kinch, M. S.; Sood, A. K. EphA2 as a target for ovarian. *Expert Opin. Ther. Targets* **9** (2005) 1179–1187.
77. Zelinski, D. P.; Zantek, N. D.; Stewart, J. C.; Irizarry, A. R.; Kinch, M. S. EphA2 Overexpression Causes Tumorigenesis of Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.* **61** (2001) 2301–2306.
78. Duxbury, M. S.; Ito, H.; Zinner, M. J.; Ashley, S. W.; Whang, E. E. EphA2: a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* **23** (2004) 1448–1456.
79. Landen, C. N., Jr.; Chavez-Reyes, A.; Bucana, C.; Schmandt, R.; Deavers, M. T.; Lopez-Berestein, G.; Sood, A. K. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res.* **65** (2005) 6910–6918.
80. Tandon, M.; Vemula, S. V.; Mittal, S. K. Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics. *Expert Opin. Ther. Targets* **15** (2011) 31–51.
81. Biao-Xue, R.; Xi-Guang, C.; Shuan-Ying, Y.; Wei, L.; Zong-Juan, M. EphA2-dependent molecular targeting therapy for malignant tumors. *Curr. Cancer Drug Targets* **11** (2011) 1082–1097.
82. Tognolini, M.; Incerti, M.; Hassan-Mohamed, I.; Giorgio, C.; Russo, S.; Bruni, R.; Lelli, B.; Bracci, L.; Noberini, R.; Pasquale, E. B.; Barocelli, E.; Vicini, P.; Mor, M.; Lodola, A. Structure-activity relationships and mechanism of action of Eph-ephrin antagonists: interaction of cholanic acid with the EphA2 receptor. *ChemMedChem* **7** (2012) 1071–1083.
83. Lafleur, K.; Huang, D.; Zhou, T.; Cafilisch, A.; Nevado, C. Structure-Based Optimization of Potent and Selective Inhibitors of the Tyrosine Kinase Erythropoietin Producing Human Hepatocellular Carcinoma Receptor B4 (EphB4). *J. Med. Chem.* **52** (2009) 6433–6446.
84. Bardelle, C.; Coleman, T.; Cross, D.; Davenport, S.; Kettle, J. G.; Ko, E. J.; Leach, A. G.; Mortlock, A.; Read, J.; Roberts, N. J.; Robins, P.; Williams, E. J. Inhibitors of the tyrosine kinase EphB4. Part 2: structure-based discovery and optimisation of 3,5-bis substituted anilinopyrimidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18** (2008) 5717–5721.
85. Mamat, C.; Mosch, B.; Neuber, C.; Köckerling, M.; Bergmann, R.; Pietzsch, J. Fluorine-18 Radiolabeling and Radiopharmacological Characterization of a Benzodioxolylpyrimidine-based Radiotracer Targeting the Receptor Tyrosine Kinase EphB4. *ChemMedChem* **7** (2012) 1991–2003.
86. Hock, B.; Böhme, B.; Karn, T.; Yamamoto, T.; Kaibuchi, K.; Holtrich, U.; Hollands, S.; Pawson, T.; Rübtsamen-Waigmann, H.; Strebhardt, K. PDZ-domain-mediated interaction of the Eph-related receptor tyrosine kinase EphB3 and the ras-binding protein AF6 depends on the kinase activity of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95** (1998) 9779–9784.
87. Miyazaki, Y.; Nakano, M.; Sato, H.; Truesdale, A. T.; Stuart, J. D.; Nartey, E. N.; Hightower, K. E.; Kane-Carson, L. Design and effective synthesis of novel templates, 3,7-diphenyl-4-amino-thieno and furo-[3,2-c]pyridines as protein kinase inhibitors and in vitro evaluation targeting angiogenetic kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17** (2007) 250–254.

-
88. Caligiuri, M.; Molz, L.; Liu, Q.; Kaplan, F.; Xu, J. P.; Majeti, J. Z.; Ramos-Kelsey, R.; Murthi, K.; Lievens, S.; Tavernier, J.; Kley, N. MASPIT: Three-Hybrid Trap for Quantitative Proteome Fingerprinting of Small Molecule-Protein Interactions in Mammalian Cells. *Chem. Biol.* **13** (2006) 711–722.
89. Xiong, C.; Huang, M.; Zhang, R.; Song, S.; Lu, W.; Flores, L., 2nd; Gelovani, J.; Li, C. In vivo small-animal PET/CT of EphB4 receptors using ⁶⁴Cu-labeled peptide. *J. Nucl. Med.* **52** (2011) 241–248.
90. Chrencik, J. E.; Brooun, A.; Recht, M. I.; Nicola, G.; Davis, L. K.; Abagyan, R.; Widmer, W.; Pasquale, E. B.; Kuhn, P. Three-dimensional Structure of the EphB2 Receptor in Complex with an Antagonistic Peptide Reveals a Novel Mode of Inhibition. *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 36505–36513.
91. Mitra, S.; Duggineni, S.; Koolpe, M.; Zhu, X.; Huang, Z.; Pasquale, E. B. Structure-activity relationship analysis of peptides targeting the EphA2 receptor. *Biochemistry* **49** (2010) 6687–6695.
92. Cai, W.; Ebrahimnejad, A.; Chen, K.; Cao, Q.; Li, Z. B.; Tice, D. A.; Chen, X. Quantitative radioimmunoPET imaging of EphA2 in tumor-bearing mice. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **34** (2007) 2024–2036.
93. Chang, Q.; Jorgensen, C.; Pawson, T.; Hedley, D. W. Effects of dasatinib on EphA2 receptor tyrosine kinase activity and downstream signalling in pancreatic cancer. *Brit. J. Cancer* **99** (2008) 1074–1082.
94. Stroylov, V. S.; Rakitina, T. V.; Novikov, F. N.; Stroganov, O. V.; Chilova, G. G.; Lipkin, A. V. Novel fragment-like inhibitors of EphA2 obtained by experimental screening and modelling. *Mendeleev Commun.* **20** (2010) 263–265.
95. Lafleur, K.; Dong, J.; Huang, D.; Cafilisch, A.; Nevado, C. Optimization of inhibitors of the tyrosine kinase EphB4. 2. Cellular potency improvement and binding mode validation by X-ray crystallography. *J. Med. Chem.* **56** (2013) 84–96.
96. Traube, W. Der synthetische Aufbau der Harnsäure, des Xanthins, Theobromins, Theophyllins und Caffeins aus der Cyanessigsäure. *Chem. Ber.* **33** (1900) 3035–3056.
97. Miyahara, M.; Nakadate, M.; Kamiya, S. Cyclization of (2-Hydroxyethyl)urea Derivatives to Give 3-Nitroso-2-oxazolidinones under Usual Nitrosation Conditions. *Chem. Pharm. Bull.* **33** (1985) 497–502.
98. Papesch, V.; Schroeder, E. F. Synthesis of 1-mono- and 1,3-disubstituted 6-aminouracils. Diuretic activity. *J. Org. Chem.* **16** (1951) 1879–1890.
99. Hu, X. E.; Cassady, J. M. Selective O-Benzoylation of Aminoalkanols. *Synth. Commun.* **25** (1995) 907–913.
100. Kravchenko, A. N.; Maksareva, E. Y.; Belyakov, P. A.; Sigachev, A. S.; Chegaev, K. Y.; Lyssenko, K. A.; Lebedev, O. V.; Makhova, N. N. Synthesis of 2-monofunctionalized 2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.0]octane-3,7-diones. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **52** (2003) 192–197.
101. Baum, F. Zur Kenntnis der Traubeschen Pyrimidin-synthese. *Chem. Ber.* **41** (1908) 532–540.
102. Nathan, A. H.; Bogert, M. T. The Synthesis of Some 3-(β-Hydroxyethyl)-pyrimidines and of a 3-(β-Hydroxyethyl)-uric Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **63** (1941) 2567–2569.
103. Müller, C. E. General Synthesis and Properties of 1-Monosubstituted Xanthines. *Synthesis* (1993) 125–128.
104. Balssa, F.; Bonnaire, Y. Easy preparative scale syntheses of labelled xanthines: caffeine, theophylline and theobromine. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **50** (2007) 33–41.
105. Fischer, E. Ueber das Purin und seine Methylderivate. *Chem. Ber.* **31** (1898) 2550–2574.
106. Baraldi, P. G.; Preti, D.; Tabrizi, M. A.; Fruttarolo, F.; Romagnoli, R.; Zaid, N. A.; Moorman, A. R.; Merighi, S.; Varani, K.; Borea, P. A. New Pyrrolo[2,1-f]purine-2,4-dione and Imidazo[2,1-f]purine-2,4-dione Derivatives as Potent and Selective Human A3 Adenosine Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **48** (2005) 4697–4701.
107. Punna, S.; Meunier, S.; Finn, M. G. A Hierarchy of Aryloxide Deprotection by Boron Tribromide. *Org. Lett.* **6** (2004) 2777–2779.
108. Kinski, E. Diplomarbeit. *Entwicklung einer Synthesestrategie für die Radiofluorierung eines Eph-Rezeptor-Inhibitors für die Tumordiagnostik mittels PET* (2012) Hochschule Zittau/Görlitz.
-

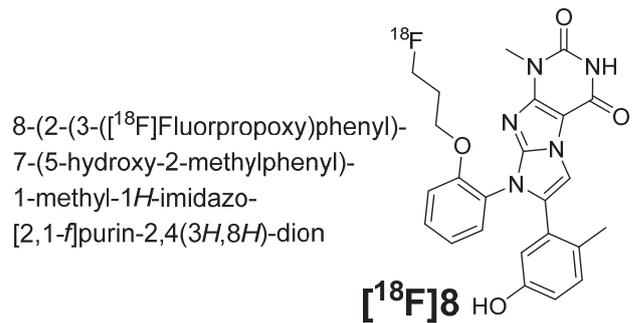
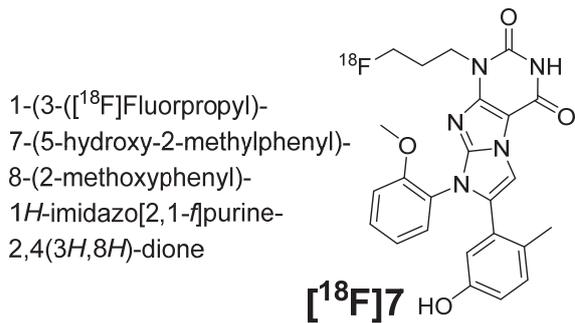
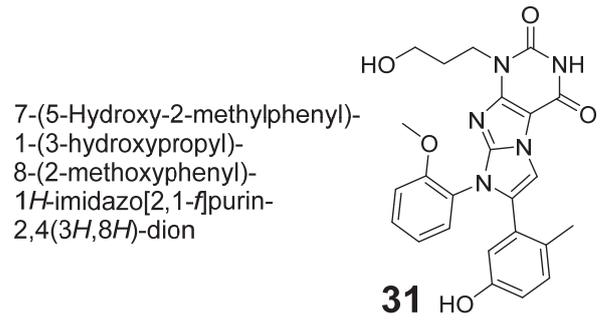
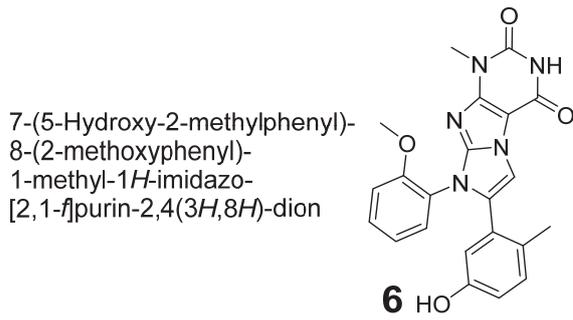
-
109. Baraldi, P. G.; Preti, D.; Tabrizi, M. A.; Romagnoli, R.; Saponaro, G.; Baraldi, S.; Botta, M.; Bernardini, C.; Tafi, A.; Tuccinardi, T.; Martinelli, A.; Varani, K.; Borea, P. A. Structure–activity relationship studies of a new series of imidazo[2,1-f]purinones as potent and selective A₃ adenosine receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **16** (2008) 10281–10294.
110. Hunter, C.; Jackson, R. F. W.; Rami, H. K. Efficient synthesis of protected β-phenylethylamines, enantiomerically pure protected β-phenyl-α-benzylethylamines and β-phenyl-α-isopropylethylamines using organozinc chemistry. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (2000) 219–223.
111. Kurono, M.; Yamaguchi, T.; Usui, T.; Fukushima, M.; Mizuno, K.; Matsubara, A. Antidiabetic Spiro-3-Heteroazolidines. **US4740517** (1988).
112. Reissenweber, B. Dissertation, "Der Einfluss der Hypoxie auf die Expression und Synthese verschiedener Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden beim malignen Melanom", angefertigt im Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, TU Dresden, 2012.
113. Koolpe, M.; Dail, M.; Pasquale, E. B. An ephrin mimetic peptide that selectively targets the EphA2 receptor. *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 46974–46979.
114. Koolpe, M.; Burgess, R.; Dail, M.; Pasquale, E. B. EphB Receptor-binding Peptides Identified by Phage Display Enable Design of an Antagonist with Ephrin-like Affinity. *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 17301–17311.
115. Mäding, P.; Füchtner, F.; Wüst, F. Module-assisted synthesis of the bifunctional labelling agent *N*-succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB). *Appl. Radiat. Isot.* **63** (2005) 329–332.
116. Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R. Labeling Proteins with Fluorine-18 Using *N*-Succinimidyl 4-[¹⁸F]Fluorobenzoate. *Int. J. Radiat. Appl. Instr. B* **3** (1992) 275–281.
117. Glaser, M.; Årstad, E.; Luthra, S. K.; Robins, E. G. Two-step radiosynthesis of [¹⁸F]*N*-succinimidyl-4-fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB). *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **52** (2009) 327–330.
118. Bejot, R.; Elizarov, A. M.; Ball, E.; Zhang, J.; Miraghaie, R.; Kolb, H. C.; Gouverneur, V. Batch-mode microfluidic radiosynthesis of *N*-succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorobenzoate for protein labelling. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **54** (2011) 117–122.
119. Hultsch, C.; Berndt, M.; Bergmann, R.; Wuest, F. Radiolabeling of multimeric neurotensin(8-13) analogs with the short-lived positron emitter fluorine-18. *Appl. Radiat. Isot.* **65** (2007) 818–826.
120. Wuest, F.; Köhler, L.; Berndt, M.; Pietzsch, J. Systematic comparison of two novel, thiol-reactive prosthetic groups for ¹⁸F labeling of peptides and proteins with the acylation agent succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB). *Amino Acids* **36** (2009) 283–295.
121. Kaptj, J.; Kniess, T.; Wuest, F.; Mercer, J. R. Radiolabeling of phosphatidylserine-binding peptides with prosthetic groups *N*-[6-(4-[¹⁸F]fluorobenzylidene)-aminooxyhexyl]maleimide ([¹⁸F]FBAM) and *N*-succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB). *Appl. Radiat. Isot.* **69** (2011) 1218–1225.
122. Kuchar, M.; Pretze, M.; Kniess, T.; Steinbach, J.; Pietzsch, J.; Löser, R. Site-selective radiolabeling of peptides by ¹⁸F-fluorobenzoylation with [¹⁸F]SFB in solution and on solid phase: a comparative study. *Amino Acids* **43** (2012) 1431–1443.
123. Kniess, T.; Kuchar, M.; Pietzsch, J. Automated radiosynthesis of the thiol-reactive labelling agent *N*-[6-(4-[¹⁸F]fluorobenzylidene)aminooxyhexyl]maleimide ([¹⁸F]FBAM). *Appl. Radiat. Isot.* **69** (2011)
124. Shi, B.; Greaney, M. F. Reversible Michael addition of thiols as a new tool for dynamic combinatorial chemistry. *Chem. Commun.* (2005) 886–888.
125. Baldwin, A. D.; Kiick, K. L. Tunable degradation of maleimide-thiol adducts in reducing environments. *Bioconjug. Chem.* **22** (2011) 1946–1953.
126. Pedersen, D. S.; Abell, A. 1,2,3-Triazoles in Peptidomimetic Chemistry. *Eur. J. Org. Chem.* **13** (2011) 2399–2411.
127. Valverde, I. E.; Bauman, A.; Kluba, C. A.; Vomstein, S.; Walter, M. A.; Mindt, T. L. 1,2,3-Triazoles as amide bond mimics: triazole scan yields protease-resistant peptidomimetics for tumor targeting. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52** (2013) 8957–8960.
128. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click-Chemie: diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen. *Angew. Chem.* **113** (2001) 2056–2075.
-

129. Pretze, M.; Mamat, C. Automated preparation of [^{18}F]AFP and [^{18}F]BFP: Two novel bifunctional ^{18}F -labeling building blocks for Huisgen – Click. *J. Fluorine Chem.* **150** (2013) 25–35.
130. Grosse-Gehling, P.; Wuest, F. R.; Peppel, T.; Köckerling, M.; Mamat, C. [^{18}F]1-(3-fluoropropyl)piperazines as model compounds for the radiofluorination of pyrido[2,3-d]pyrimidines. *Radiochim. Acta* **99** (2011) 365–373.
131. Franck, D.; Knies, T.; Steinbach, J.; Zitzmann-Kolbe, S.; Friebe, M.; Dinkelborg, L. M.; Graham, K. Investigations into the synthesis, radiofluorination and conjugation of a new [^{18}F]fluorocyclobutyl prosthetic group and its in vitro stability using a tyrosine model system. *Bioorg. Med. Chem.* **21** (2013) 643–652.
132. Johansson, H.; Pedersen, D. S. Azide- and Alkyne-Derivatized α -Amino Acids. *Eur. J. Org. Chem.* **23** (2012) 4267–4281.
133. King, D. S.; Fields, C. G.; Fields, G. B. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein. Res.* **36** (1990) 255–266.
134. Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, M. L.; Guindon, C. A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **30** (1989) 2739–2742.
135. Hausner, S. H.; Marik, J.; Karen, M.; Gagnon, J.; Sutcliffe, J. L. In Vivo Positron Emission Tomography (PET) Imaging with an $\alpha_v\beta_6$ Specific Peptide Radiolabeled using ^{18}F -“Click Chemistry: Evaluation and Comparison with the Corresponding 4- [^{18}F]Fluorobenzoyl- and 2- [^{18}F]Fluoropropionyl-Peptides. *J. Med. Chem.* **51** (2008) 5901–5904.
136. Glaser, M.; Solbakken, M.; Turton, D. R.; Pettitt, R.; Barnett, J.; Arukwe, J.; Karlsen, H.; Cuthbertson, A.; Luthra, S. K.; Årstad, E. Methods for ^{18}F -labeling of RGD peptides: comparison of aminooxy [^{18}F]fluorobenzaldehyde condensation with ‘click labeling’ using 2- [^{18}F]fluoroethylazide, and S-alkylation with [^{18}F]fluoropropanethiol. *Amino Acids* **37** (2009) 717–724.
137. Iddon, L.; Leyton, J.; Indrevoll, B.; Glaser, M.; Robins, E. G.; George, A. J.; Cuthbertson, A.; Luthra, S. K.; Aboagye, E. O. Synthesis and in vitro evaluation of [^{18}F]fluoroethyl triazole labelled [Tyr^3]octreotate analogues using click chemistry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21** (2011) 3122–3127.
138. Thonon, D.; Kech, C.; Paris, J.; Lemaire, C.; Luxen, A. New Strategy for the Preparation of Clickable Peptides and Labeling with 1-(Azidomethyl)-4- [^{18}F]fluorobenzene for PET. *Bioconjugate Chem.* **20** (2009) 817–823.
139. Chikira, M. DNA-fiber EPR spectroscopy as a tool to study DNA-metal complex interactions: DNA binding of hydrated Cu(II) ions and Cu(II) complexes of amino acids and peptides. *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008) 1016–1024.
140. Xiang, J.; Yin, Y.-G.; Mei, P. Cu(II)-assisted oxidation of quinoline-2-carbaldehyde hydrazone to give [1,2,3]triazolo[1,5- α]quinoline: The first example of Cu(I) complex containing [1,2,3]triazolo-ligand. *Inorg. Chem. Commun.* **10** (2007) 1168–1171.
141. Monkowius, U.; Ritter, S.; König, B.; Zabel, M.; Yersin, H. Synthesis, Characterisation and Ligand Properties of Novel Bi-1,2,3-triazole Ligands. *Eur. J. Inorg. Chem.* **29** (2007) 4597–4606.
142. Zheng, Z.-B.; Wu, R.-T.; Li, J.-K.; Sun, Y.-F. Hydrothermal syntheses and structural characterization of four complexes with in situ formation of 1,2,3-triazole-4-carboxylate ligand. *J. Mol. Struct.* **928** (2009) 78–84.
143. Pagano, J. M.; Goldberg, D. E.; Fernelius, W. C. A thermodynamic study of Homopiperazine, Piperazine and N-(2-Aminoethyl)-piperazine and their complexes with copper(II) ion. *J. Phys. Chem.* **65** (1961) 1062–1064.
144. Gill, H. S.; Marik, J. Preparation of ^{18}F -labeled peptides using the copper(I)-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition. *Nat. Protoc.* **6** (2011) 1718–1725.
145. Lipshutz, B. H.; Taft, B. R. Heterogeneous copper-in-charcoal-catalyzed click chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006) 8235–8238.
146. Lee, C.-T.; Huang, S.; Lipshutz, B. H. Copper-in-Charcoal-Catalyzed, Tandem One-Pot Diazo Transfer-Click Reactions. *Adv. Synth. Catal.* **351** (2009) 3139–3142.
147. Collins, J. M.; Leadbeater, N. E. Microwave energy: a versatile tool for the biosciences. *Org. Biomol. Chem.* **5** (2007) 1141–1150.

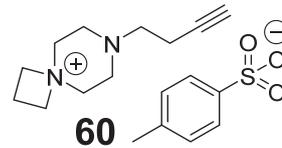
-
148. Juran, S.; Walther, M.; Stephan, H.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Kraus, W.; Emmerling, F.; Comba, P. Hexadentate Bispidine Derivatives as Versatile Bifunctional Chelate Agents for Copper(II) Radioisotopes. *Bioconjugate Chem.* **20** (2009) 347–359.
149. Li, J.; Shi, L.; Jia, L.; Jiang, D.; Zhou, W.; Hu, W.; Qi, Y.; Zhang, L. Radiolabeling of RGD peptide and preliminary biological evaluation in mice bearing U87MG tumors. *Bioorg. Med. Chem.* **20** (2012) 3850–3855.
150. Glaser, C. Beiträge zur Kenntnis des Acetylnylbenzols. *Chem. Ber.* **2** (1869) 422–424.
151. Yin, K.; Li, C.-J.; Li, J.; Jia, X.-S. CuI-catalyzed homocoupling of terminal alkynes to 1,3-diyne. *Appl. Organomet. Chem.* **25** (2011) 16–20.
152. Pereira de Freitas, R.; Iehl, J.; Delavaux-Nicot, B.; Nierengarten, J.-F. Synthesis of fullerene building blocks bearing alkyne or azide groups and their subsequent functionalization by the copper mediated Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition. *Tetrahedron* **64** (2008) 11409–11419.
153. Galibert, M.; Dumy, P.; Boturnyn, D. One-pot approach to well-defined biomolecular assemblies by orthogonal chemoselective ligations. *Angew. Chem.* **48** (2009) 2614–2617.
154. Jain, R. K. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *J. Control. Release* **53** (1998) 49–67.
155. Löfberg, H.; Grubb, A. O. Quantitation of gamma-trace in human biological fluids: indications for production in the central nervous system. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **39** (1979) 619–626.
156. Becker, H. G. O.; Domschke, G.; Berger, W.; Schwetlick, K. "Organikum" VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1986, 16, ss71,
157. Aerts, J.; Voccia, S.; Lemaire, C.; Giacomelli, F.; Goblet, D.; Thonon, D.; Plenevaux, A.; Warnock, G.; Luxen, A. Fast production of highly concentrated reactive [¹⁸F] fluoride for aliphatic and aromatic nucleophilic radiolabelling. *Tetrahedron Lett.* **51** (2010) 64–66.
158. Bernatowicz, M. S.; Daniels, S. B.; Köster, H. A Comparison of Acid Labile Linkage Agents for the Synthesis of Peptide C-Terminal Amides. *Tetrahedron Lett.* **30** (1989) 4645–4648.
159. Fields, C. G.; Fields, G. B. Minimization of Tryptophan Alkylation following 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Solid-Phase Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **34** (1993) 6661–6664.
160. OECD "Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method" OECD Publishing, 1995,
161. Wilson, A. A.; Jin, L.; Garcia, A.; DaSilva, J. N.; Houle, S. An admonition when measuring the lipophilicity of radiotracers using counting techniques. *Appl. Radiat. Isot.* **54** (2001) 203–208.
162. Viswanadhan, V. N.; Ghose, A. K.; Reyanar, G. R.; Robins, R. K. Atomic Physicochemical Parameters for Three Dimensional Structure Directed Quantitative Structure-Activity Relationships. 4. Additional Parameters for Hydrophobic and Dispersive Interactions and Their Application for an Automated Superposition of Certain Naturally Occurring Nucleoside Antibiotics. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **29** (1989) 163–172.
163. Neuber, C. Dissertation, "Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden als molekulare Schnittstelle zwischen Melanomzellen und Tumor-assoziierten inflammatorischen Zellen", angefertigt im Helmholtz-Zentrum Dresden Rossendorf, TU Dresden, 2013.
164. Que, E. L.; Chang, C. J. A Smart Magnetic Resonance Contrast Agent for Selective Copper Sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 15942–15943.
165. Kim, D. H.; Choe, Y. S.; Choi, J. Y.; Choi, Y.; Lee, K.-H.; Kim, B.-T. 17-[4-(2-[¹⁸F]Fluoroethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-6-thia-heptadecanoic Acid: A Potential Radiotracer for the Evaluation of Myocardial Fatty Acid Metabolism. *Bioconjugate Chem.* **20** (2009) 1139–1145.
166. Isaad, A. L. C.; Barbetti, F.; Rovero, P.; D'Ursi, A. M.; Chelli, M.; Chorev, M.; Papini, A. M. N^ε-Fmoc-Protected ω-Azido- and ω-Alkynyl-L-amino Acids as Building Blocks for the Synthesis of "Clickable" Peptides. *Eur. J. Org. Chem.* (2008) 5308–5314.
167. Roth, S.; Thomas, N. R. A Concise Route to L-Azidoamino Acids: L-Acidoalanine, L-Azidohomoalanine and L-Azidonorvaline. *Synlett* **4** (2010) 607–609.
168. Holland-Nell, K.; Meldal, M. Maintaining Biological Activity by Using Triazoles as Disulfide Bond Mimetics. *Angew. Chem.* **123** (2011) 5310–5312.
-

169. Klein, L. L.; Li, L.; Chen, H.-J.; Curty, C. B.; DeGoey, D. A.; Grampovnik, D. J.; Leone, C. L.; Thomas, S. A.; Yeung, C. M.; Funk, K. W.; Kishore, V.; Lundell, E. O.; Wodka, D.; Meulbroek, J. A.; Alder, J. D.; Nilius, A. M.; Larteye, P. A.; Plattnerf, J. J. Total Synthesis and Antifungal Evaluation of Cyclic Aminohexapeptides. *Bioorg. Med. Chem.* **8** (2000) 1677–1696.

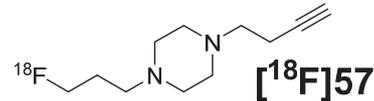
Übersicht der wichtigsten Verbindungen dieser Arbeit



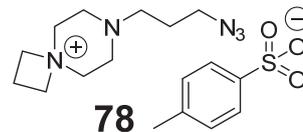
7-(But-3-ynyl)-7-aza-4-azoniaspiro-
[3.5]nonan-*para*-toluensulfonat



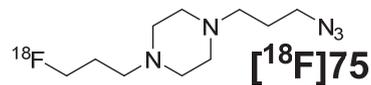
[¹⁸F]BFP - 1-(But-3-ynyl)-4-
(3-[¹⁸F]fluoropropyl)piperazin

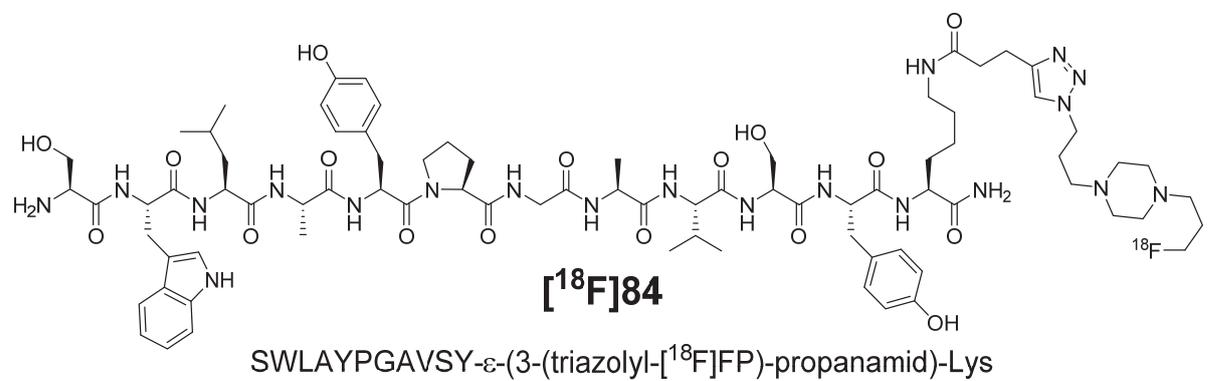
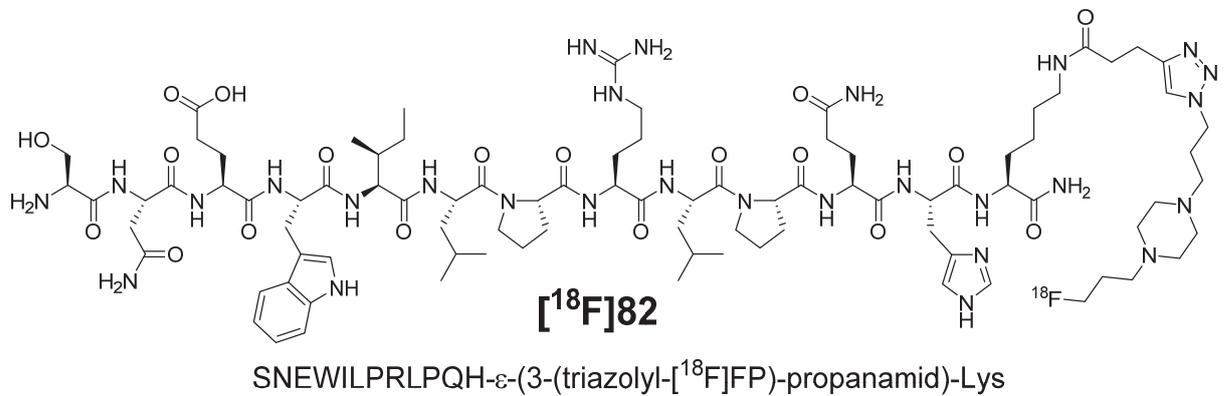
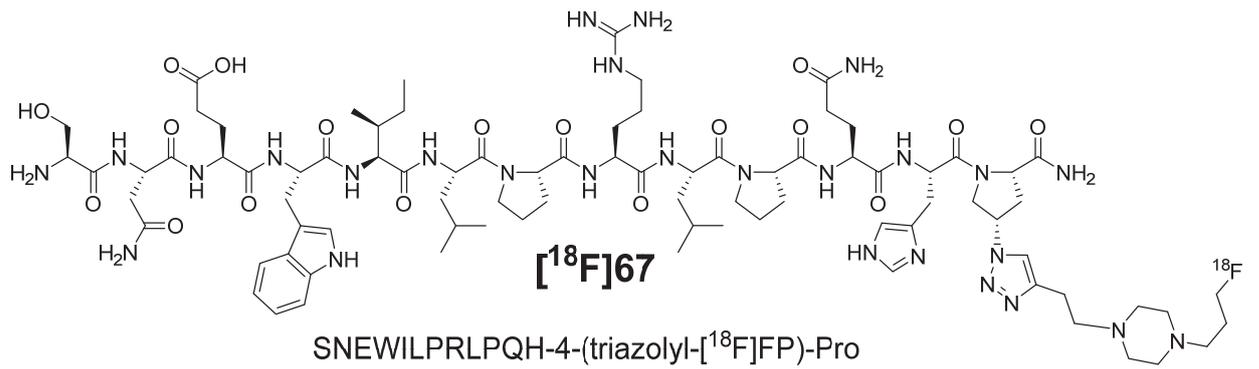
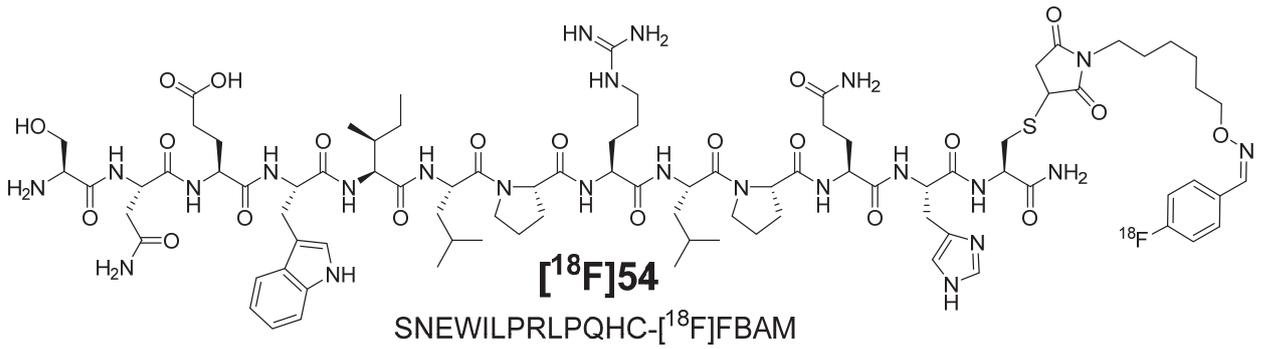


7-(3-Azidopropyl)-7-aza-4-azoniaspiro-
[3.5]nonan-4-methylbenzonsulfonat



[¹⁸F]AFP - 1-(3-Azidopropyl)-4-
(3-[¹⁸F]fluoropropyl)piperazin





Abkürzungsverzeichnis

AcOH	Essigsäure
AgOTs	Silbertosylat
AP	applizierte Dosis
Äq.	Äquivalent
β^+	Positron
Bn	Benzyl-
BTAA	2-(4-((Bis((1- <i>tert</i> -butyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)-methyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)essigsäure
BTES	2-(4-((Bis((1- <i>tert</i> -butyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)-methyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)ethansulfonsäure
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -Butanol
<i>t</i> -BuOK	Kalium- <i>tert</i> -butanolat
c. a.	carrier added (geträgert)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
d. c.	decay-corrected (zerfallskorrigiert)
DC	Dünnschichtchromatogramm/-chromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIEA	Diethylamin
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E153	Elektrolyt-Infusionslösung 153 Berlin-Chemie
EA	Elementaranalyse
EDT	Ethylendithiol
EE	Ethylacetat
FBAM	<i>N</i> -(6-(4-Fluorbenzyliden)aminooxyhexyl)maleinimid
[¹⁸ F]FDG	2-Desoxy-2-[¹⁸ F]fluor-D-glucose
[¹⁸ F]FET	O-(2-[¹⁸ F]Fluorethyl)-L-tyrosin
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
FP	4-(3-Fluorpropyl)-piperazin-1-yl)ethyl-
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HBTU	O-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol

Abkürzungsverzeichnis

ICP	induktiv gekoppeltes Plasma
ID	injizierte Dosis
LM	Lösungsmittel
MIP	maximale Intensitätsprojektion
MOM-Cl	Chlormethylmethylether
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
n. b.	nicht bestimmt
n.c.a.	no-carrier added (ungeträgert)
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz
OMs	Mesylat- (Methylsulfonat-)
OTs	Tosylat- (4-Methylbenzensulfonat-)
p. i.	post injection
PBS-Puffer	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Petrolether
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PSC	präparative Säulenchromatographie
RCR	radiochemische Reinheit
RCA	radiochemische Ausbeute
RT	Raumtemperatur
SFB	Succinimidyl-4-fluorbenzoat
SNEW	Einbuchstabencode für wichtige Aminosäuresequenz
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis (Festphasenpeptidsynthese)
SUV	Standardized Uptake Value = Aktivitätskonzentration [Bq/ml] * Normierungswert / applizierte Aktivität [Bq]
SWLAY	Einbuchstabencode für wichtige Aminosäuresequenz
TBAF	<i>tetra</i> -Butylammoniumfluorid
TBAOH	<i>tetra</i> -Butylammoniumhydroxid
TBSCI	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TBTA	Tris(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TCEP	Tris-(carboxyethyl)-phosphan
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Watt	Leistung der Mikrowellenstrahlung

Aminosäuren

Ala (A)	Alanin
Arg (R)	Arginin
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Asparaginsäure
Cys (C)	Cystein
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutaminsäure
Gly (G)	Glycin
His (H)	Histidin
Ile (I)	Isoleucin
Leu (L)	Leucin
Lys (K)	Lysin
Met (M)	Methionin
Phe (F)	Phenylalanin
Pro (P)	Prolin
Ser (S)	Serin
Thr (T)	Threonin
Trp (W)	Tryptophan
Tyr (Y)	Tyrosin
Val (V)	Valin

Spezielle Aminosäuren

Anl	N^{ϵ} -Azido-L-norleucin
Anv	N^{δ} -Azido-L-norvalin
Azp	4-(S)-Azido-L-prolin
Pal	N^{ϵ} -(Pent-4-inamido)-L-lysin

Veröffentlichungen

Reviews:

„Cross-Coupling Reactions as Valuable Tool for the Preparation of PET Radiotracers”

Marc Pretze, Philipp Große-Gehling, Constantin Mamat, *Molecules* **2011**, 16, 1129.

„Recent trends in bioorthogonal Click-radiolabeling reactions using Fluorine-18”

Marc Pretze, Doreen Pietzsch, Constantin Mamat, *Molecules* **2013**, 18, 8618.

Publikationen:

„Synthesis and Radiofluorination of Iodophenyl Esters as Tool for the Traceless Staudinger Ligation“

Marc Pretze, Anke Flemming, Martin Köckerling, Constantin Mamat, *Z.Naturforsch.B* **2010**, 65b, 1128.

„The traceless Staudinger ligation with fluorine-18: a novel and versatile labeling technique for the synthesis of PET-radiotracers”

Marc Pretze, Frank Wuest, Tim Peppel, Martin Köckerling, Constantin Mamat, *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 6410.

„Site-selective radiolabeling of peptides by ¹⁸F-fluorobenzoylation with [¹⁸F]SFB in solution and at solid phase - a comparative study“

Manuela Kuchar, Marc Pretze, Torsten Kniess, Jörg Steinbach, Jens Pietzsch, Reik Loeser, *Amino Acids* **2012**, 43, 1431.

“Automated preparation of [¹⁸F]AFP and [¹⁸F]BFP: Two novel bifunctional ¹⁸F-labeling building blocks for Huisgen – Click”

Marc Pretze, Constantin Mamat, *J. Fluorine Chem.* **2013**, 150, 25. *Synfacts.* **2013**, 9, 820.

“An Efficient Bioorthogonal Strategy Using CuAAC-Click for Radiofluorinations of SNEW Peptides and the Role of Copper-Depletion”

Marc Pretze, Manuela Kuchar, Ralf Bergmann, Jörg Steinbach, Jens Pietzsch, Constantin Mamat, *ChemMedChem* **2013**, 8, 935.

Tagungsbeiträge:

„Entwicklung und Radiofluorierung von Phosphanen zur Markierung bioaktiver Verbindungen mittels spurloser Staudinger-Ligation“

17. Jahrestagung AG Radiochemie / Radiopharmazie in Schellerhau – 2009 (Vortrag)

„Radiofluorination via traceless Staudinger Ligation“

18. ISRS in Edmonton/Kanada – 2009 (Poster)

„Radiofluorierte bioaktive Verbindungen für die Tumordiagnostik und deren Analytik“

6. Workshop RCA & 23. SAAGAS in Dresden-Rossendorf – 2010 (Vortrag)

„Design and synthesis of novel radiolabelled peptide-based Eph receptor inhibitors for PET“

19. ISRS in Amsterdam/Niederlande – 2011 (Poster)

„Radiolabeling of modified recombinant epidermal growth factor (EGF) by Huisgen-Click reaction for multimodal imaging and therapy of tumors“

Doreen Pietzsch, Marc Pretze, Constantin Mamat, Birgit Mosch, Jörg Steinbach, Jens Pietzsch

7th Conference on Recombinant Protein Production in Laupheim – 2013 (Poster)

„Radiomarkierung von Eph-selektiven Imidazopurinen für die radiopharmakologische Charakterisierung von Eph Rezeptoren“

21. Jahrestagung AG Radiochemie / Radiopharmazie in Pamhagen (AT) – 2013 (Vortrag)

Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörg Steinbach an der TU Dresden für seine Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertation und für sein Vertrauen in mich.

Herrn Dr. Constantin Mamat danke ich herzlich und vielmals für seine erstklassige Betreuung und konstruktiven Gespräche und für das hervorragende Arbeitsklima am Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf. Er hat an mich geglaubt und mich nicht nur gelehrt, sondern auch darüber hinaus an meinen Eigenschaften gefeilt. Durch ihn bin ich auch um einen Freund reicher.

Herrn Prof. Dr. Jens Pietzsch danke ich für die Bereitstellung von Arbeitskräften für die biologischen Evaluierungen und die konstruktiven Gespräche hinsichtlich der biologischen Evaluierungen und Veröffentlichungen.

Herrn Dr. Reik Löser danke ich sehr für seine konstruktive Kritik und aufmerksame Bearbeitung beim Verfassen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Torsten Knieß danke ich für seine wichtigen Hinweise im Bereich der Radiosynthesen.

Frau Dr. Birgit Mosch danke ich speziell für die Planung der biologischen Versuche.

Frau Dr. Christin Neuber und Frau Dr. Bettina Reißerweber danke ich für die Entwicklung der in dieser Arbeit genutzten Zelllinien und dem freundlichen Mittagessen.

Frau Dr. Silke Fähnemann danke besonders ich für die Synthese des Bispidin-Derivats.

Herrn Dr. Ralf Bergmann, Frau Andrea Suhr und Frau Regina Herrlich danke ich für die Planung und Durchführung der In-vivo-Untersuchungen.

Frau Catharina Heinig danke ich besonders für die Durchführung der In-vitro-Experimente.

Frau Elisa Kinski danke ich für ihre hervorragenden Erkenntnisse im Rahmen ihrer Diplomarbeit im Hinblick auf die Synthese der niedermolekularen Verbindungen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Radiopharmazeutische und Chemische Biologie danke ich für die interessanten Gespräche in Hinblick auf die organischen und radiochemischen Synthesen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Peggy Wecke für die Durchführung der Massenspektrometrie und gemeinsame Urlaubstage, Herrn Tilow Krauß für Gespräche auf dem Boden der Tatsachen und Herrn Waldemar Herzog für die nette Zusammenarbeit im organischen Labor und die Synthesen einiger wichtiger Verbindungen.

Aufrichtiger Dank geht an meine Familie und Freunde, die immer an mich geglaubt haben, vor allem an meine Freundin Doreen, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand, nach der Arbeit nicht an Arbeit denkt und mit der ich zusammen viele Abenteuer fernab der Arbeit erleben darf.

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Jörg Steinbach und Dr. Constantin Mamat in der Zeit von März 2010 bis März 2013 im Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung im Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf angefertigt.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der Fassung vom 23. Februar 2011 an.

Bisherige erfolglose Promotionsverfahren haben nicht stattgefunden.

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.



Dresden, 9. Juli 2014

Marc Pretze