

Positronenemissionstomographie (PET) und Mikrofluidiksysteme: ein methodischer Durchbruch auf der Mikroskala**

Hélène Audrain*

Stichwörter:

Mikrofluidik · Mikroreaktoren ·
Positronenemissionstomographie · Radiochemie ·
Tracer

Die Positronenemissionstomographie (PET) ist eine leistungsfähige nichtinvasive Technik zur Untersuchung physiologischer Parameter am lebenden Menschen und am Tier (Durchblutungsuntersuchungen, Glucosemetabolismus, Rezeptoreigenschaften, Wirkstoffverteilung).^[1] Die Methode erfordert die vorherige Gabe eines bildgebenden Tracers, der mit einem kurzlebigen Radioisotop markiert ist (z.B. ¹⁸F, $t_{1/2} = 109.7$ min; ¹¹C, $t_{1/2} = 20.4$ min; ¹³N, $t_{1/2} = 9.96$ min; ¹⁵O, $t_{1/2} = 2.07$ min). Daraus ergibt sich die Bedingung, dass der Reaktionsprozess (Reaktion + Aufreinigung + Formulierung + Qualitätskontrolle) schnellstmöglich beendet sein muss. Da die chemischen Reaktionen auf der Mikro- oder Nanoskala ausgeführt werden, sind spezielle Ausrüstungen und Methoden wie Miniaturreaktoren und Injektionsschleifentechniken („loop methods“) nötig.^[2] Außerdem benötigt der Umgang mit Radioaktivität besondere Sicherheitsvorkehrungen, z.B. bleiabgeschirmte Computerterminals. Da die PET ein relativ neues Feld der Chemie ist, sind die Techniken zur Synthese von radioaktiv markierten Tracern noch längst nicht ausgereift. Die Aufgabe besteht darin,

ein computergesteuertes, kompaktes System zur Erzeugung von Radiotracer zu entwickeln, das außerdem den Strahlenschutzanforderungen genügt.

Eine mögliche Lösung bieten Lab-on-a-Chip-Techniken (LOC-Techniken) mit speziell für die PET entwickelten Komponenten. Die vor einigen Jahren eingeführten Mikrofluidiksysteme,^[3] die aus einem Netzwerk von mikrometergroßen Kanälen aufgebaut sind (10–500 µm), dienen als Miniaturreaktoren für chemische und biologische Reaktionen. Vorteile sind das geringe Probevolumen und der geringe Reagenzienverbrauch, beschleunigte Reaktionen und damit schnellere Analysen, hohe Reproduzierbarkeit und mögliche Automation – genau diejenigen Eigenschaften also, die bei der Synthese von Radiotraceren wichtig sind. Allerdings sind die konventionellen Apparaturen, die sich derzeit in Gebrauch befinden, nicht immer den benötigten Materialmengen angepasst, was die Aufgabe oft unnötig kompliziert macht. Eine Miniaturisierung der Materialmengen durch Verwendung von Mikrochips oder Mikroreaktoren könnte daher helfen, insbesondere den Zeitbedarf für die Präparation der Radiotracer zu verringern.

Dieses Highlight stellt die Ergebnisse zweier Forschungsgruppen vor, die Mikrochiptechniken mit PET-Anwendungen kombiniert haben. Es werden zwei unterschiedliche Vorgehensweisen zur Anwendung der LOC-Technik in der Synthese von 2-Desoxy-2-[¹⁸F]fluor-D-glucose (2-[¹⁸F]FDG) beschrieben. Auch andere organische Verbindungen

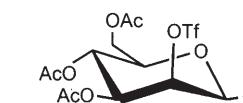
mit möglichen Anwendungen in der PET wurden mithilfe von Mikrofluidiktechniken synthetisiert. Ein Beispiel einer solchen Synthese, die Gas-flüssig-Carbonylierung mit einem Palladium(0)-Katalysator, wird am Ende des Highlights ebenfalls beschrieben.

Mikrotechnologische Verfahren haben sich in mehreren Anwendungen und Bereichen bewährt, z.B. für Kristallisationen,^[4] in der Wirkstoffentwicklung^[5] und in diversen organischen Synthesen.^[6] Gegenüber konventionellen Labortechniken bieten sich folgende Vorteile: 1) Sehr geringe Flüssigkeitsmengen können gehandhabt werden; 2) vergrößerte spezifische Oberflächen führen zu erhöhten Masse- und Wärmetransfereffizienzen und damit zu beschleunigten Reaktionen (wichtig für den Umgang mit Radioisotopen); 3) höhere Produktselektivitäten; 4) kleine Reaktionsvolumen. Hinzu kommen praktische Vorteile wie der geringe Platzbedarf der Apparaturen und eine vereinfachte Abschirmung.

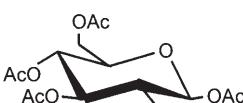
Zur Synthese von 2-[¹⁸F]FDG (Schema 1), dem am häufigsten eingesetzten PET-Tracer zur Tumor-Bildgebung in der Onkologie,^[7] verwendeten Gillies et al.^[8] einen denkbar einfachen Mikroreaktor, bestehend aus drei übereinandergeklebten Natronkalk-Glasplatten mit drei Einlassöffnungen, einer Mischkammer, in der die Reaktion stattfindet, und einem Auslass (Abbildung 1). Zwei solcher Reaktoren wurden in Reihe geschaltet und mit Flüssigkeitsreservoirs verbunden, die die gelösten Ausgangsverbindungen enthielten. Die beiden Reaktionsstufen

[*] Dr. H. Audrain
PET-Center
Aarhus University Hospital
Nørrebrogade 44, Bygning 10
8000 Aarhus C (Dänemark)
Fax: (+ 45) 8949-3020
E-Mail: helene@pet.auh.dk

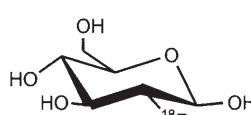
[**] Dank gilt Professor Troels Skrydstrup für hilfreiche Ratschläge und Glaxo-Smith-Kline für finanzielle Unterstützung.



[¹⁸F]KF/Kryptofix2.2.2
K₂CO₃ in DMF



NaOMe
MeOH



2-[¹⁸F]FDG

Schema 1.

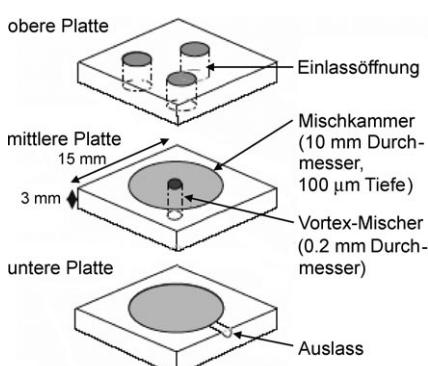


Abbildung 1. Aufbau eines Dreiplatten-Mikroreaktors mit Zuläufen, Reaktor und Ablauf.^[8]

wurden nacheinander in den beiden Mikroreaktoren ausgeführt, bei einem kontinuierlichen Zufluss der Reaktanten (Abbildung 2). Der erste Reaktor war mit zwei Reservoirs verbunden: Reservoir 1 enthielt [¹⁸F]Fluorid (aus einem Cyclotron; 500 MBq) und eine Mischung aus KF, Kryptofix 2.2.2 und K₂CO₃ (Kryptofix 2.2.2 = 4,7,13,16-, 21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]-hexacosan) in Dimethylformamid (DMF), Reservoir 2 enthielt das geschützte Mannosetrifluormethansulfonat in DMF. (Acetonitril, das normalerweise als Lösungsmittel für die FDG-Synthese verwendet wird, ist mit der aus Polymermaterial gefertigten Mikroapparatur unverträglich.) Der Inhalt bei-

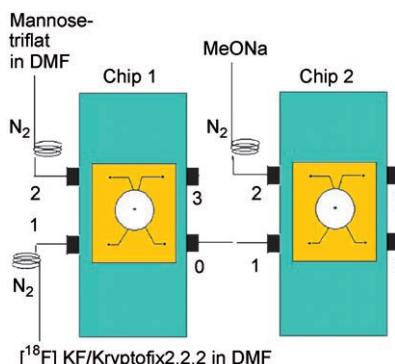


Abbildung 2. Experimenteller Aufbau zur Synthese von 2-[¹⁸F]FDG in einem Mikroreaktor. Chip 1: Radiomarkierung des Mannosetrifluormethansulfonats; Chip 2: Hydrolyse zum 2-[¹⁸F]FDG.^[8]

der Reservoirs wurde hydrodynamisch mithilfe einer Stickstoffströmung (250 $\mu\text{L s}^{-1}$) in den ersten Reaktor geleitet, wo die Fluorierung stattfand. Die geschützte [¹⁸F]Fluordesoxyglucose wurde anschließend in den zweiten Reaktor geleitet, wo sie durch eine Natriummethanolat-Lösung aus Reservoir 3 zum 2-[¹⁸F]FDG hydrolysiert wurde. Die Synthese benötigte nur wenige Sekunden bei einer radiochemischen Ausbeute von 50%. Daneben wurden 20–30% der nichthydrolysierten Zwischenstufe und 10–20% an nichtumgesetztem [¹⁸F]Fluorid erhalten.

In einer anderen Arbeit beschrieben Quake, Tseng und Mitarbeiter^[9] die Synthese von 2-[¹⁸F]FDG mithilfe eines wesentlich komplexeren Aufbaus. Die gesamte Synthese, einschließlich der Aufkonzentrierung der [¹⁸F]Fluorid-Ionen über einer Anionenaustauschersäule, des Lösungsmittelaustauschs von Wasser durch Acetonitril, der Fluorierung des Mannosetriflates, des erneuten Lösungsmittelaustauschs von Acetonitril durch Wasser und der sauren Hydrolyse, wurde in einer einzigen Mikrofluidikapparatur ausgeführt, die nicht größer ist als eine Pennymünze (Abbildung 3). Die digital überwachte Apparatur enthält ein winziges Netzwerk von Kanälen, die mit mikromechanischen Ventilen, Rotationspumpen zur Mischung der Komponenten und Affinitätssäulen ausgerüstet sind. Die Chips wurden im Mehrschichtverfahren durch weiche Lithographie gefertigt.^[10] Die integrierten Mikroventile verhindern Kreuzkontaminationen der Reagentien

und mögliche Leckverluste zwischen den Prozessschritten. (Beides sind mögliche Probleme bei Durchflussapparaturen wie dem von Gillies et al. entwickelten System.) Mit dieser Mikrofluidikapparatur gelang die Herstellung von 2-[¹⁸F]FDG mit 7.4 MBq ausgehend von [¹⁸F]Fluorid mit 27 MBq (aus einem Cyclotron). Dies ist eine ausreichende Menge für die Bildgebung bei Mäusen. Eine typische Synthese dauerte 14 Minuten und lieferte das 2-[¹⁸F]FDG in 38% Ausbeute mit einer radiochemischen Reinheit von 97.6%.

Vergleicht man beide Ansätze, so lässt sich feststellen, dass die von Quake und Mitarbeitern verwendete Apparatur eine höhere Betriebssicherheit bei mehrstufigen Prozessen bietet, dafür aber technisch aufwändig ist. Die von Gillies et al. beschriebene Vorrichtung ist vom Aufbau her einfacher und bietet den Vorteil, mehr [¹⁸F]Fluorid aufzunehmen zu können, sodass höhere Dosen von 2-[¹⁸F]FDG erhältlich sind.

Zum Vergleich mit diesen Techniken kann der Synthesearmat GE-Tracerlab MX, der in unserem PET-Zentrum in Aarhus in Betrieb ist, etwa 25–40 GBq 2-[¹⁸F]FDG innerhalb von 25 Minuten mit einer radiochemischen Ausbeute von 75–80% und einer radiochemischen Reinheit von ca. 99% produzieren.^[11] Dabei kann nur eine Synthese pro Instrument pro Tag ausgeführt werden, da radioaktive Rückstände im System eine Gesundheitsgefährdung des Bedienungspersonals bedeuten, sodass zwischen den Arbeiten eine Wartezeit zum Abklingen der Radioaktivität nötig ist.

Beide hier vorgestellten Arbeiten belegen, dass der Einsatz von Mikrofluidiktechniken zur Synthese eines wichtigen Radiotracers für schnelle onkologische PET-Tests genutzt werden kann. Allerdings sind weitere Optimierungen erforderlich, um Ausbeute und Reinheit von Radiotracern zu erhöhen, bevor ein Routineeinsatz infrage kommt.

Die Verwendung von [¹¹C]CO bietet einen interessanten Zugang zu einer Reihe von PET-Radiotracern wie Amiden, Estern, Lactamen und Lactonen. Da Kohlenmonoxid schwer in Lösung geht, ist die Synthese solcher Verbindungen schwierig, insbesondere wenn die Reaktionen im kleinen Maßstab

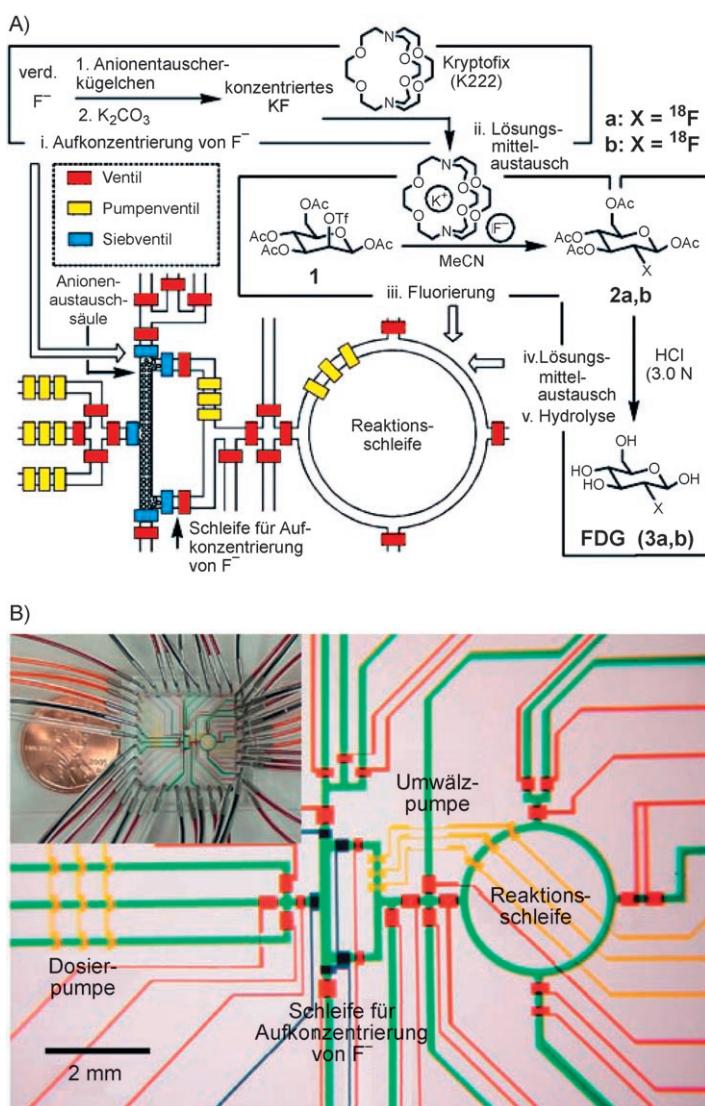


Abbildung 3. A) Abfolge der fünf sequenziellen chemischen Prozesse, die zur Synthese von 2-[¹⁸F]FDG benötigt werden. B) Mikroskopische Aufnahme der Mikroreaktorschaltung. Einschub: Photographie der Apparatur und Größenvergleich mit einer Pennymünze.^[9]

durchgeführt werden. Långström und Mitarbeiter haben dieses Problem mithilfe einer Hochdruckmethode gelöst, die [¹¹C]CO-Gas in Gegenwart eines Palladium(0)-Katalysators in Mikroautoklaven einsetzt.^[12] Die spezielle Ausstattung verhindert allerdings einen routinemäßigen Einsatz dieser Technik, weshalb die Suche nach einem einfacheren Ansatz zur Synthese von [¹¹C]CO-markierten Radiotracern im Gange ist.^[13]

Miller et al. haben kürzlich die Möglichkeit aufgezeigt, Mikroreaktoren für katalytische Gas-flüssig-Carbonylierungen einzusetzen.^[14] Entscheidend hierbei waren zwei spezielle Eigenschaften des Mikrosystems, die eine er-

höhte CO-Löslichkeit bewirken: 1) eine vergrößerte Grenzfläche zwischen Gas- und Flüssigphase und 2) ein erhöhter CO-Druck innerhalb des Systems. Beide Faktoren ermöglichen schnellere Reaktionen und höhere Ausbeuten als bei konventionellen Batch-Verfahren unter Druck. Eine Lösung aus einem Arylhalogenid und einem Palladiumkatalysator in Benzylamin wurde in Form einer stabilen Ringströmung in ein Mikrofluidiksystem mit einem 5 Meter langen Reaktionskanal injiziert. Ein konstanter CO-Fluss (kontrolliert mit einem Masseflussregler) wurde dann im Chip beigemischt, und unter Erhitzen wurde das entsprechende *N*-Benzylbenzamid während einer Verweilzeit

von 2 Minuten erzeugt. Die Ausbeuten betrugen 46 bis 58 % und sind deutlich höher als bei der Hochdruckmethode über einen Zeitraum von 10 Minuten. Dies zeigt klar das Potenzial solcher Mikroreaktorprozesse auf. Es ist davon auszugehen, dass weitere Optimierungen der Reaktionsbedingungen und Katalysatoren zu noch besseren Carbonylierungsausbeuten führen werden. Die nächste Entwicklungsstufe wird in der Anwendung dieser Technik auf Carbonylierungen mit [¹¹C]CO bestehen.

Mithilfe der hier beschriebenen Mikrofluidiktechniken ist es gelungen, den radioaktiven Tracer 2-[¹⁸F]FDG in brauchbaren Mengen zu synthetisieren, was den möglichen Einsatz dieser Methoden in der PET aufzeigt. Was die Synthese speziell dieses Tracers betrifft, sind die derzeit im Einsatz befindlichen Synthesearmaten möglichen LOC-Techniken natürlich überlegen (besonders was den Kostenaufwand betrifft), allein die Tatsache aber, dass Mikrofluidiksysteme die Herstellung eines solchen Tracers ermöglichen, erschließt potenzielle Anwendungen in der Radiochemie. Ganz generell dürfte die rasante Entwicklung im Bereich der Mikrochips zu vielen weiteren Anwendungen in der Chemie führen.^[15] Die Herausforderung besteht nun darin, erste Einsatzmöglichkeiten dieser Technik zu finden. Zum Beispiel wäre es denkbar, [¹¹C]-Methylierungen, eine der Schlüsselreaktionen in der PET-Chemie zur Synthese von Radioliganden der Neurorezeptoren, oder Carbonylierungen mit [¹¹C]CO in Mikrofluidikreaktoren auszuführen. Wichtig wäre außerdem, die Fertigungsmethoden für Mikrofluidikchips zu vereinfachen. In jedem Fall hat eine kleine Revolution bereits begonnen, und es wird aufregend sein, die zukünftige Entwicklung zu verfolgen.

Online veröffentlicht am 7. Februar 2007

- [1] a) T. G. Turkington, *J. Nucl. Med. Technol.* **2001**, *29*, 4–11; b) R. Nutt, *Mol. Imaging Biol.* **2002**, *4*, 11–26; c) M. E. Phelps, *Annu. Rev. Nucl. Part. Sci.* **2002**, 303–338; d) J. S. Fowler, Y. S. Ding, N. D. Volkow, *Semin. Nucl. Med.* **2003**, *33*, 14–27; e) S. J. Gatley, N. D. Volkow, J. S. Fowler, Y. S. Ding, J. Logan, G. J.

- Wang, A. N. Gifford, *Drug Dev. Res.* **2003**, *59*, 194–207; f) W. A. Weber, *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 3282–3292; g) C. M. Lee, L. Farde, *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 310–316.
- [2] A. A. Wilson, A. Garcia, L. Jin, S. Houle, *Nucl. Med. Biol.* **2000**, *27*, 529–532.
- [3] R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4262–4264; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4130–4132.
- [4] a) C. L. Hansen, E. Skordalakes, J. M. Berger, S. R. Quake, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16531–16536; b) C. Hansen, S. R. Quake, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 538–544.
- [5] B. H. Weigl, R. L. Bardell, C. R. Cabral, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 349–377.
- [6] P. Watts, S. J. Haswell, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 235–246.
- [7] G. J. Kelloff, J. M. Hoffman, B. Johnson, H. I. Scher, B. A. Siegel, E. Y. Cheng, B. D. Cheson, J. O'Shaughnessy, K. Z. Guyton, D. A. Mankoff, L. Shankar, S. M. Larson, C. C. Sigman, R. L. Schilsky, D. C. Sullivan, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 2785–2808.
- [8] a) J. M. Gillies, C. Prenant, G. N. Chimon, G. J. Smethurst, W. Perrie, I. Hamblett, B. Dekker, J. Zweit, *Appl. Radiat. Isot.* **2006**, *64*, 325–332; b) J. M. Gillies, C. Prenant, G. N. Chimon, G. J. Smethurst, B. A. Dekker, J. Zweit, *Appl. Radiat. Isot.* **2006**, *64*, 333–336.
- [9] C. C. Lee, G. Sui, A. Elizarov, C. J. Shu, Y. S. Shin, A. N. Dooley, J. Huang, A. Daridon, P. Wyatt, D. Stout, H. C. Kolb, O. N. Witte, N. Satyamurthy, J. R. Heath, M. E. Phelps, S. R. Quake, H. R. Tseng, *Science* **2005**, *310*, 1793–1796.
- [10] J. W. Hong, V. Studer, G. Hang, W. F. Anderson, S. R. Quake, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 435–439.
- [11] C. Mosdzianowski, C. Lemaire, B. Lauricella, J. Aerts, J.-L. Morelle, F. Gobert, M. Herman, A. Luxen, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1999**, *42*, S515–S516.
- [12] a) T. Kihlberg, B. Långström, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9201–9205; b) O. Rahman, T. Kihlberg, B. Långström, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 474–478; c) O. Itsenko, B. Långström, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2244–2249.
- [13] a) E. D. Hostettler, H. D. Burns, *Nucl. Med. Biol.* **2002**, *29*, 845–848; b) H. Audrain, L. Martarello, A. Gee, D. Bender, *Chem. Commun.* **2004**, 558–559.
- [14] P. W. Miller, N. J. Long, A. J. De Mello, R. Vilar, J. Passchier, A. Gee, *Chem. Commun.* **2006**, 546–548.
- [15] K. Jähnisch, V. Hessel, H. Löwe, M. Baerns, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 410–451; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 406–446.