

Siliciumbausteine für eine einstufige ^{18}F -Radiomarkierung von Peptiden für die PET-Bildgebung

Linjing Mu, Aileen Höhne, P. August Schubiger, Simon M. Ametamey,* Keith Graham, John E. Cyr, Ludger Dinkelborg, Timo Stellfeld, Ananth Srinivasan, Ulrike Voigtmann und Ulrich Klar*

Die Positronenemissionstomographie (PET) ist ein wichtiges Diagnoseverfahren in der modernen Neurologie,^[1a-c] Onkologie^[1f-j] und Kardiologie.^[1k,l] Die Anwendung kleiner ^{18}F -markierter Peptide für die diagnostische Bildgebung hat sich zu einem interessanten Gebiet in der Kernmedizin entwickelt.^[2] Allerdings erfordern die etablierten ^{18}F -Markierungsverfahren absoluten Wasserrauschluss und stark basische Reaktionsbedingungen sowie hohe Temperaturen, die für Biomoleküle wie Peptide und Proteine ungeeignet sind. Deshalb werden zur Markierung von Peptiden und Proteinen gewöhnlich geeignete ^{18}F -markierte prosthetische Gruppen eingesetzt. Dieser Ansatz erfordert jedoch eine mehrstufige Reaktionsfolge und ist zeitaufwendig.^[3] Wegen der kurzen Halbwertszeit des Isotops ^{18}F (110 min) und der chemischen Eigenschaften von Biomolekülen ist eine effizientere, einstufige Methode für die ortsspezifische Markierung unter milden Bedingungen wünschenswert.

Die hohe Silicium-Fluor-Bindungsenergie (135 kcal mol⁻¹; zum Vergleich: 116 kcal mol⁻¹ für C-F) und die experimentellen Ergebnisse von Whitmore et al.^[4] bewogen verschiedene Forschungsgruppen, eine Fluorsubstitution an Silicium für die ^{18}F -Markierung von Biomolekülen zu testen.^[5] Die ortsspezifische ^{18}F -Radiomarkierung konnte zwar erreicht werden, doch die meisten Methoden erfordern noch immer mindestens zwei Stufen. Kürzlich haben Choudhry et al. die Hydrolysebeständigkeit von vier Trialkylfluorsilanen evaluiert und daraufhin die stabilste Verbindung als Modellbaustein für die direkte ^{18}F -Markierung von Biomolekülen vorgeschlagen.^[6]

Schirmacher et al. berichteten ebenfalls über die direkte Radiomarkierung eines Organosilicium-modifizierten Peptids durch Isotopenaustausch,^[7a] sie erhielten aber überwiegend die nichtradioaktive ^{19}F -Verbindung und folglich ein Produkt mit relativ niedriger spezifischer Aktivität. Vor kurzem nutzte dieselbe Gruppe das hocheffektive Markierungsreagens *p*-(Di-*tert*-butylfluorsilyl)benzaldehyd für die Kupplung an N-terminal Aminooxyderivatisierte Peptide (N-AO-Peptide), um mit einer zweistufigen Methode hohe spezifische Aktivitäten zu erzielen.^[7b] Ting et al. berichteten über die ^{18}F -Markierung von Trialkoxysilanen unter Trägerzusatz mit mehreren Fluoratomen pro Siliciumatom;^[8] die Alkyltetrafluorosilicate waren mäßig stabil in wässrigen Medien.

Eine einstufige nucleophile ^{18}F -Fluorierung von Biomolekülen wie Peptiden ohne Trägerzusatz mithilfe von Silicium-Fluor-Chemie ist das Hauptziel unserer Studie. Damit das ^{18}F -Bildgebungsagens als PET-Sonde effizient ist, sollte die Si-F-Bindung unter physiologischen Bedingungen nicht gespalten werden. Weil die Hydrolysebeständigkeit der Silicium-Halogen-Bindung von den Substituenten am Siliciumatom bestimmt wird, synthetisierten wir eine Reihe difunktioneller Siliciumbausteine mit verschiedenen Substituenten, für die Fluorierung geeigneten Abgangsgruppen und Linkern für die nachfolgende Kupplung an ein Biomolekül. Modellfluorsilane wurden unter Verwendung von nichtradioaktivem Fluorid ($^{19}\text{F}^-$) ebenfalls präpariert. Diese Verbindungen wurden für Stabilitätsstudien und als Referenzverbindungen genutzt.

Die Amide **3a** und **3b** wurden aus den käuflichen Dimethyl- und Diisopropylsilylaminen **1a** bzw. **1b** hergestellt. Die Fluorierung von **3a** und **3b** mit $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ lieferte die Referenzverbindungen **I** und **II** (Schema 1).

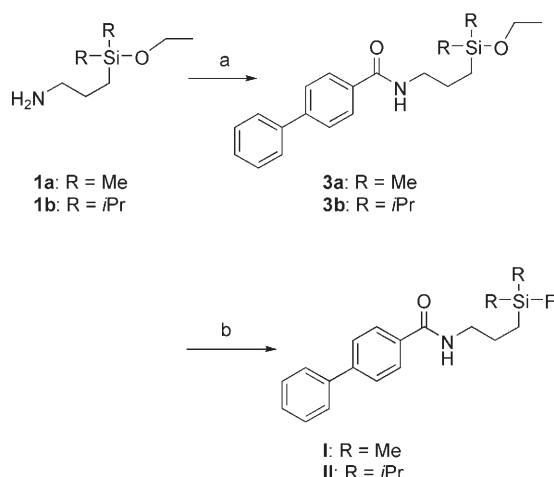
Schema 2 zeigt die Synthese von Silanderivaten mit Aryllinkern. Verbindung **5a** wurde durch nucleophile Substitution von Diisopropylchlorsilan mit einem π -Al-Komplex erhalten, der aus **4**, Isopropylmagnesiumbromid und *n*BuLi erzeugt wurde. **5b** wurde durch nucleophile Substitution von Di-*tert*-butylchlorsilan mit {4-[2-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yloxy)ethyl]phenyl}lithium synthetisiert, das in situ durch Metall-Halogen-Austausch des Bromids **4** mit *n*BuLi erzeugt wurde. Die Hydrolyse von **5b** mit KOH in EtOH lieferte das Silanol **6**. Mit Toluolsulfonsäure in Ethanol reagierten **5a**, **5b** und **6** zu den Alkoholen **7**, **8a** bzw. **8b**. Verbindung **7** wurde mit einer Jones-Oxidation in die Carbonsäure **9a** umgewandelt. **9b** wurde durch Oxidation von **9a** mit Pd/C in $\text{H}_2\text{O}/\text{CCl}_4$ erhalten. Die Di-*tert*-butyl-Derivate **10a** und **10b** waren in

[*] Dr. L. Mu,^[a] A. Höhne,^[a] Prof. Dr. P. A. Schubiger, Prof. S. M. Ametamey
Animal Imaging Center-PET
Zentrum für Radiopharmazeutische Wissenschaft ETH
PSI und USZ, ETH-Hönggerberg
D-CHAB IPW HCI H427
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 446-331-367
E-Mail: simon.ametamey@pharma.ethz.ch

Dr. K. Graham, Dr. J. E. Cyr, Dr. L. Dinkelborg, Dr. T. Stellfeld,
Dr. A. Srinivasan, Dr. U. Voigtmann, Dr. U. Klar
Bayer Schering Pharma AG
Global Drug Discovery, 13342 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-468-926-35
E-Mail: ulrich.klar@bayerhealthcare.com

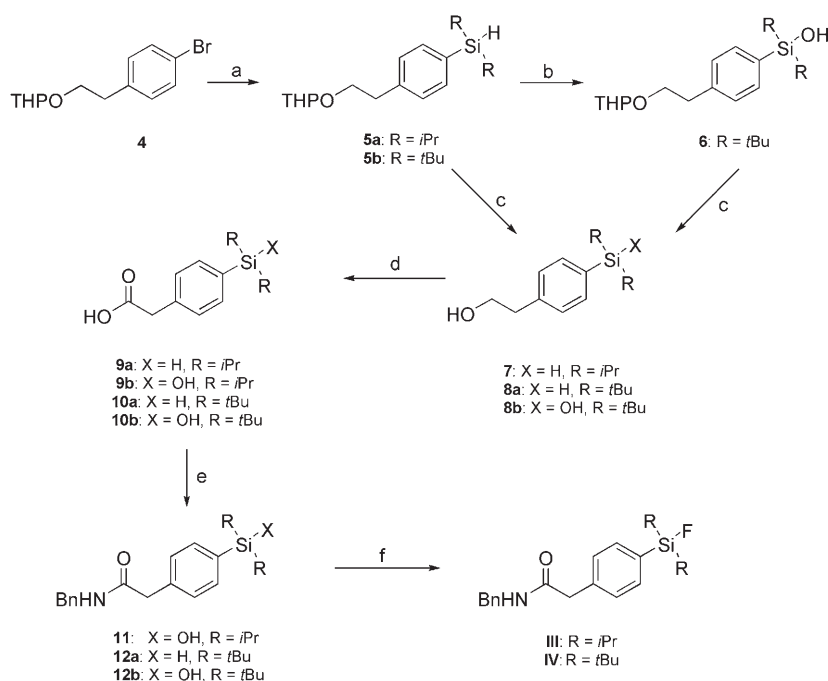
[†] Diese Autoren haben einen gleichwertigen Beitrag geleistet.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Schema 1. Synthese der Silanderivate mit Alkyllinker. a) Biphenyl-4-carbonylchlorid (**2**), NEt₃, Dioxan, RT, 1 h für **3a**, 61%; 1.5 h für **3b**, 55%; b) BF₃·OEt₂, Et₂O, Rückfluss, 15 min für **I**, 63%; 30 min für **II**, 97%.

guten Ausbeuten direkt durch Jones-Oxidation aus den Rohprodukten **8a** und **8b** zugänglich. Die Kupplung von **10a** oder **10b** mit Benzylamin unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC-HCl) lieferte die Amide **12a** bzw. **12b**. Verbindung **11** wurde aus **9a** in drei Schritten erhalten: Aktivierung der Säure mit *N*-Hydroxysuccinimid, Hydrolyse mit Pd/C in H₂O/



Schema 2. Synthese der Silanderivate mit Aryllinker. a) **5a**: *n*BuLi, *i*PrMgBr, THF, *i*Pr₂SiClH, 97%; **5b**: *n*BuLi, THF, *t*Bu₂SiClH, 74%; b) **6**: KOH, EtOH, 71%; c) **7**: *p*TsOH, EtOH, 93%; **8a** und **8b**: *p*TsOH, EtOH; d) **9a**: Jones-Reagens, Aceton, 69%; **9b**: Pd/C, H₂O, CCl₄ aus **9a** 69%; **10a**: aus **5b**, 1. *p*TsOH, EtOH, 2. Jones-Reagens, Aceton, Gesamtausbeute 80%; **10b**: aus **6**, 1. *p*TsOH, EtOH, 2. Jones-Reagens, Aceton, Gesamtausbeute 77%; e) **11**: beginnend mit **9a**, 1. NHS, EDC-HCl, CH₂Cl₂, 83%; 2. Pd/C, H₂O, CCl₄, 78%; 3. BnNH₂, CH₂Cl₂, 76%; **12a** und **12b**: EDC-HCl, BnNH₂, CH₂Cl₂, 66% für **12a** und 76% für **12b**; f) KF, crypt-222, AcOH, THF, 81% für Verbindung **III**, 98% für Verbindung **IV** aus **12a**. THP = Tetrahydropyran, Bn = Benzyl, Ts = Toluolsulfonyl.

CCl₄ und Amidierung mit Benzylamin. Die Fluorierung von **11** und **12a** mit Kaliumfluorid in Gegenwart von crypt-222 und Essigsäure führte zu den Verbindungen **III** und **IV**.

Schema 3 beschreibt den Radiomarkierungsschritt. ¹⁸F wurde in guten bis hohen Ausbeuten unter milden Bedingungen eingebaut (Tabelle 1). In den meisten Fällen verbes-



Schema 3. ¹⁸F-Markierung der Siliciumbausteine.

serte der Zusatz von Essigsäure die Radiomarkierungsausbeute signifikant. Zum Beispiel betrug der ¹⁸F-Einbau für das Diisopropylsilanol bei 65°C unter Zusatz von Essigsäure 90%, ohne Essigsäure hingegen nur 3% (Tabelle 1, Nr. 14 und 15). Die höheren Ausbeuten sind wahrscheinlich der Protonierung der Hydroxy- und Alkoxygruppen zuzuschreiben, die dadurch zu besseren Abgangsgruppen werden. Es ist nicht überraschend, dass mit Wasserstoff als Abgangsgruppe der Zusatz von Essigsäure keinen deutlichen Effekt auf die radiochemische Ausbeute hat (Tabelle 1, Nr. 22 und 23). Unter denselben Bedingungen gaben Di-*tert*-butylsilyl-Modellverbindungen mit Wasserstoff als Abgangsgruppe viel höhere radiochemische Ausbeuten als solche mit der Hydroxy-Abgangsgruppe (Tabelle 1, Nr. 16–23). Deshalb erhielt der Silanbaustein in den nachfolgenden Kupplungsreaktionen den Vorzug gegenüber dem Silanolbaustein. Wurde die Vorstufenmenge gemäß Nr. 10 in Tabelle 1 gesenkt, so resultierte eine vierfach niedrigere Ausbeute des ¹⁸F-Einbaus bei 30°C. Allerdings konnte der ¹⁸F-Einbau mit kleineren Mengen an Vorstufe durch Steigerung der Reaktionstemperatur auf 90°C von 19% auf 88% verbessert werden (Tabelle 1, Nr. 10 und 11). Für die Markierung der Diisopropyl-Derivate war eine Temperatur von 30°C ausreichend, die Di-*tert*-butyl-Derivate benötigten dagegen eine höhere Reaktions-

temperatur. Das zeitliche Fortschreiten der Hydrolyse der Fluorsilan-Modellverbindungen **I–IV** wurde bei pH 7.0 untersucht, und die Hydrolysehalbwertszeiten wurden berechnet (**I**: < 5 min, **II**: 12 h, **III**: 8 h, **IV**: ≥ 170 h).^[9] Die Modellverbindung **I** (R = Me) ist in wasserfreien organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril und Diethylether stabil, wird aber in Gegenwart von Wasser schnell hydrolysiert. Die Einführung sperriger Isopropyl- oder *tert*-Butyl-Gruppen wie in **II–IV** erhöhte die Hydrolysebeständigkeit beträchtlich. Diesen Resulta-

Tabelle 1: ^{18}F -Markierung von Silicium-Modellverbindungen.^[a]

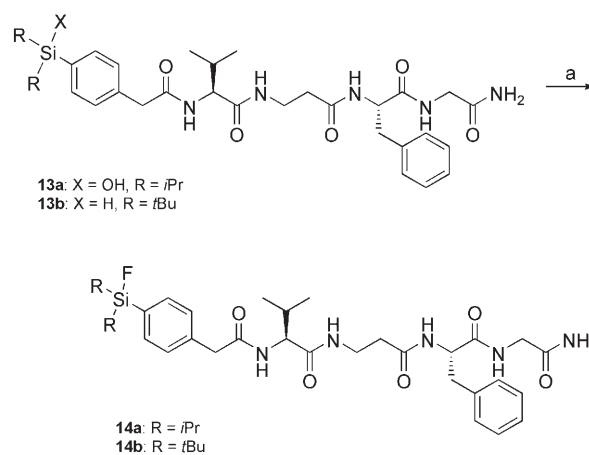
Nr.	Vorstufe (mg)	T [°C]	Essigsäure-Zusatz [μL]	Ums. [%] ^[b]
1	3a (5)	30	3	84
2	3a (5)	30	0	18
3	3a (5)	65	3	92
4	3a (5)	65	0	2
5	3b (5)	30	3	93
6	3b (5)	30	0	24
7	3b (5)	65	3	96
8	3b (5)	65	0	13
9	3b (3)	30	3	79
10	3b (1)	30	3	19
11	3b (1)	90	3	88
12	11 (5)	30	3	53
13	11 (5)	30	0	9
14	11 (5)	65	3	90
15	11 (5)	65	0	3
16	12b (5)	30	3	15
17	12b (5)	30	0	0
18	12b (5)	65	3	23
19	12b (5)	65	0	4
20	12a (5)	30	3	59
21	12a (5)	30	0	24
22	12a (5)	65	3	69
23	12a (5)	65	0	69

[a] Markierungsexperimente wurden in 300 μL DMSO für 15 min durchgeführt. [b] Bestimmung anhand des Radio-HPLC-Chromatogramms: Verhältnis der Radioaktivitätsfläche des Produkts zur gesamten Radioaktivitätsfläche.

ten zufolge scheint die sterische Hinderung durch R eine Schlüsselrolle für die Stabilisierung der Silicium-Fluor-Bindung zu spielen. Dagegen scheint der Linker einen geringeren sterischen Einfluss auf unsere Modellverbindungen auszuüben; Fluorsilane mit einem Aryllinker waren nicht hydrolysebeständiger als Derivate mit Alkyllinkern. Von allen getesteten Verbindungen zeigte das Fluorsilan **IV** mit *tert*-Butyl-Substituenten und dem Aryllinker die beste Hydrolysebeständigkeit.

Um den praktischen Nutzen der Siliciumbausteine zu testen, wurden die Säuren **9b** und **10a** nach einem Standard-Festphasenprotokoll^[10] mit einem Tetrapeptid gekuppelt. Die ^{18}F -Markierung der resultierenden Peptide wurde unter ähnlichen Bedingungen ausgeführt wie für die Modellverbindungen (Schema 4). Für die Verbindungen **13a** und **13b** wurde nach 15 min Reaktionszeit ungefähr 50 % ^{18}F -Einbau erzielt. Ein erster Stabilitätstest des silylsubstituierten Tetrapeptids **13b** verlief sehr vielversprechend. Nach zweistündiger Inkubation in Humanplasma wurden keine Zersetzungsprodukte beobachtet.

Eine Reihe difunktioneller Siliciumbausteine mit verschiedenen Linkern, Abgangsgruppen und Substituenten wurde synthetisiert und mit ^{18}F markiert. Die Hydrolysebeständigkeit des Fluorsilans scheint von der sterischen Hinderung am Siliciumzentrum abhängig zu sein. Der stabilste Baustein war erfolgreich in der Synthese eines ^{18}F -markierten Tetrapeptids, das eine für PET-Studien ausreichende Hydrolysebeständigkeit zeigt. In-vivo-PET-Bildgebungs- und Bioverteilungsstudien mit Peptiden, die unter Verwendung der neuen Methode mit ^{18}F markiert wurden, sind zurzeit im


Schema 4. ^{18}F -Markierung von Tetrapeptiden mit Siliciumbaustein.

a) $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}$, 5 mg crypt-222, 1 mg K_2CO_3 , 3 μL AcOH, 1 mg **13a** in 0.3 mL DMSO, 15 min, 90 °C, 53 % Umsetzung zu **14a**; $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}$, 5 mg crypt-222, 1 mg K_2CO_3 , 2 mg **13b** in 0.3 mL DMSO, 15 min, 65 °C, 45 % Umsetzung zu **14b**.

Gänge. Schlussfolgernd haben wir eine einzigartige Methode für die einstufige ^{18}F -Markierung von Biomolekülen über Siliciumbausteine unter milden Bedingungen entwickelt.

Eingegangen am 20. Dezember 2007,
veränderte Fassung am 20. Februar 2008
Online veröffentlicht am 21. Mai 2008

Stichwörter: Fluor · Isotopenmarkierung · Peptide · PET-Bildgebung · Silicium

- [1] a) F. Roesch, G. Gruender, M. Schreckenberger, G. Dannhardt, *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, *34*, 474–482; b) A. R. Troiano, A. J. Stoessl, *Bioimaging Neurodegener.* **2005**, 25–35; c) R. Sanchez-Pernaute, A.-L. Brownell, B. G. Jenkins, O. Isacson, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *207*, S251–S256; d) L. Cai, R. B. Innis, V. W. Pike, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 19–52; e) R. M. Cohen, *Mol. Imaging Biol.* **2007**, *9*, 204–216; f) J. R. Mercer, *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2007**, *10*, 180–202; g) N. Oriuchi, T. Higuchi, T. Ishikita, M. Miyakubo, H. Hanaoka, Y. Iida, K. Endo, *Cancer Sci.* **2006**, *97*, 1291–1297; h) D. Le Bars, *J. Fluorine Chem.* **2006**, *127*, 1488–1493; i) H. Fukuda, S. Furumoto, R. Iwata, K. Kubota, *Int. Congr. Ser.* **2004**, *1264* (PET and Molecular Imaging), 158–165; j) A. M. Scott, *Positron Emiss. Tomogr.* **2005**, 311–325; k) M. N. Maisey, *Nucl. Med. Commun.* **2000**, *21*, 234–236; l) S. Furst, *MTA* **1999**, *14*, 506–508, 510.
- [2] a) A. J. Fischman, J. W. Babich, H. W. Strauss, *J. Nucl. Med.* **1993**, *34*, 2253–2263; b) D. Blok, R. I. J. Feitsma, P. Vermeij, E. K. J. Pauwels, *Eur. J. Nucl. Med.* **1999**, *26*, 1511–1519; c) J. C. McAfee, R. D. Neumann, *Nucl. Med. Biol.* **1996**, *23*, 673–676; d) S. M. Okarvi, *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, *28*, 929–938; e) H. J. Wester, K. Hamacher, G. Stöcklin, *Nucl. Med. Biol.* **1996**, *23*, 365–372.
- [3] a) M. R. Kilbourn, C. S. Dence, M. J. Welch, C. J. Mathias, *J. Nucl. Med.* **1987**, *28*, 462–470; b) T. Toyokuni, J. C. Walsh, A. Dominguez, M. E. Phelps, J. R. Barrio, S. S. Gambhir, N. Satyamurthy, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1253–1259; c) G. Vaidyanathan, M. R. Zalutsky, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 352–356; d) S. Gohlke, H. H. Coenen, G. Stöcklin, *Appl. Radiat. Isot.* **1994**, *45*, 715–727; e) Y. Shai, K. L. Kirk, M. A. Channing, B. B. Dunn, M. A. Lesniak, R. C. Eastman, R. D. Finn, J. Roth, K. A.

- Jacobson, *Biochemistry* **1989**, 28, 4801–4806; f) L. Lang, W. C. Eckelman, *Appl. Radiat. Isot.* **1994**, 45, 1155–1163; g) K. Bruus-Jensen, T. Poethko, M. Schottelius, A. Hauser, M. Schwaiger, H.-J. Wester, *Nucl. Med. Biol.* **2006**, 33, 173–183.
- [4] N. S. Marans, L. H. Sommer, F. C. Whitmore, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 5127–5130.
- [5] a) J. C. Walsh, K. M. Akhoon, N. Satyamurthy, J. R. Barrio, M. E. Phelps, S. S. Gambhir, T. Toyokuni, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1999**, 42, S1–S3; b) L. G. Hutchins, A. L. Bosch, M. S. Rosenthal, R. J. Nickles, S. J. Gatley, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1985**, 36, 375–378.
- [6] U. Choudhry, R. Paul, S. C. Biagini, P. J. Blower, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, 34, S332.
- [7] a) R. Schirmacher, G. Brandtmoeller, E. Schirmacher, O. Thews, J. Tillmanns, T. Siessmeier, H. G. Bucholz, P. Bartenstein, B. Wängler, C. M. Niemeyer, K. Jurkschat, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 6193–6197; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6047–6050; b) E. Schirmacher, B. Wängler, M. Cypryk, G. Brandtmoeller, M. Schäfer, M. Eisenhut, K. Jurkschat, R. Schirmacher, *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 2085–2089.
- [8] R. Ting, M. J. Adam, T. J. Ruth, D. M. Perrin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13094–13095.
- [9] Für die Stabilitätsstudien wurde die Fluorsilan-Modellverbindung (2 mg) in Acetonitril/wässrigem Puffer (2:1, 1.5 mL, pH 7.0) bei 23 °C gelöst. Das Fortschreiten der Hydrolyse wurde mithilfe von Umkehrphasen-HPLC zu verschiedenen Zeitpunkten verfolgt.
- [10] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis—A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **2003**.