

**Gallium-68 und Fluor-18 markierte
Annexin V-Analoga zur Darstellung vulnerabler
Plaques der Koronargefäße mittels PET/CT**

Von der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Wilhelm-Universität
Bonn

zur
Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte

Dissertation

Vorgelegt von

Yasmin Hashlamun

Bonn 2016

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Hans Jürgen Biersack
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus Mohr

Tag der Promotion: 09.11.2016
Erscheinungsjahr 2016

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Stefan Guhlke für das interessante Thema und für entscheidende Diskussionen und Unterstützung während der Doktorarbeit. Seine wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich immer geschätzt.

Herrn Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Biersack danke ich für die Bereitstellung des Radionuklidlabors in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin und für die immer ausgesprochen angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre, die zu einer produktiven wissenschaftlichen Zusammenarbeit führte.

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und das Verständnis für unvorhergesehene Umstände, ebenso wie Frau Prof. Christa Müller und Herrn Prof. Dr. Werner Mader für die Übernahme der Prüfung.

Ebenso danke ich Herrn Dr. med. Dirk von Mallek, der mir ebenfalls ein Radionuklidlabor mit modernster Ausstattung im Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Dr. rer. nat. Christof Krummeich danke ich besonders für seine Zeit und Beratung.

Herrn Dr. rer. nat. Stefan Kürpig sei sehr für anregende Diskussionen und Überlegungen zu jeder Zeit gedankt.

Frau Dr. rer. nat. Marianne Engeser und ihrem Team an der Universität Bonn danke ich für die Messung meiner Proben am MS-Gerät und die bereichernden Diskussionen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch all meinen Kollegen und Kommilitonen sowohl in der Uniklinik als auch im Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte.

Meiner Schwester Dr. rer. nat. Basma Hansen danke ich herzlich für ihr Interesse an meiner Arbeit.

Für die Motivation, das Verständnis und die Geduld mit mir danke ich besonders meinem Mann Khaled und meinen drei Kindern Waleed, Lujain und Adam.

Mein größter Dank aber gilt Dr. rer. nat. Silvie Vrbka, die nie den Glauben an mich verloren hat.

Inhalt

1.	EINLEITUNG	8
1.1	Geschichte der Radiopharmazie	8
1.2	Positronen-Emissions-Tomographie	12
1.3	Produktion von Fluor-18.....	14
1.3.1	Elektrophile Fluorierung	14
1.3.2	Nukleophile Fluorierung	15
1.4	Nuklide aus dem Generator	16
1.5	Instabile atherosklerotische Plaque.....	16
1.6	Annexin V zur Apoptosedetektion	18
1.6.1	Annexin Radiotracer	19
1.7	Aluminium-Komplex-Chemie.....	20
1.8	Markierung von NOTA-Derivaten mit Al- ¹⁸ F-Komplex	23
2.	ZIELSETZUNG	25
3.	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1	Chemikalien	28
3.2	Materialien und Geräte	29
3.3	Analysenmethoden	30
3.3.1	(Radio)-HPLC	30
3.3.2	Radiodünnschichtchromatographie.....	30
3.4	Trennung einzelner Fraktionen mittels Size Exclusion Chromatographie	31
3.5	Bestimmung der Retentionszeiten	31
3.5.1	Bestimmung der Retentionszeiten der Chelatisierungsagenzien.....	31
3.5.2	Bestimmung der Retentionszeiten der Chelator-Amin-Komplexe.....	31
3.6	Verwendete Radionuklide	31
3.6.1	⁶⁸ Ga-Generatorelution.....	32
3.6.2	¹⁸ F-Fluorid-Zyklotronproduktion.....	32
3.7	Ausbeutenbestimmung	32
3.7.1	Bestimmung der radioaktiven Ausbeute mittels HPLC-Analyse	32
3.7.2	Bestimmung der radioaktiven Ausbeute mittels Dünnschichtchromatographie	33
3.7.3	Bestimmung der radioaktiven Ausbeute mittels C18-Kartusche	33
3.8	Markierungsreaktion	33
3.8.1	Markierung der Chelatisierungsagenzien mit ⁶⁸ Gallium.....	33
3.8.2	Markierung der Chelatisierungsagenzien mit Al- ¹⁸ F-Komplex	33
4.	EXPERIMENTELLES	35
4.1	Vorversuche	35
4.1.1	Vorbereitung von Puffern für verschiedene Zwecke	35

4.1. 2	HPLC-Retentionszeiten	35
4.1. 3	HPLC-Retentionszeiten der Chelatisierungsagenzien.....	36
4.1. 4	Hydrolyse der funktionellen Isothiocyanatgruppe (-N=C=S)	37
4.1. 5	Trennmethoden	38
4.1. 6	⁶⁸ Galliumkolloid.....	39
4.1. 7	Herstellung von ⁶⁸ Galliumkolloid und dessen Analyse mittels Size Exclusion Chromatographie (PD10-Säule) und Dünnschichtchromatographie (iTLC) .	39
4.1. 8	⁶⁸ Galliumkolloid und dessen Verhaltens bei Sterilfiltration.....	40
4.1. 9	⁶⁸ Galliumkolloid und dessen Analyse mittels Protein-beschichteten iTLC-Streifen	40
4.1. 10	Analyse von ⁶⁸ Ga-NOTA-NCS mittels Protein-beschichteten iTLC-Streifen	40
4.1. 11	Herstellung von Al- ¹⁸ F-Komplex	41
4.1. 12	Analyse von freiem ¹⁸ F-Fluorid mittels Size Exclusion Chromatographie (PD10-Säule).....	41
4.1. 13	Analyse einer Mischung von ¹⁸ F-Fluorid, Al- ¹⁸ F-Komplex, Al- ¹⁸ F-NOTA-NCS und Al- ¹⁸ F-NOTA-Hydrolyseprodukt mittels Size Exclusion Chromatographie (PD10-Säule).....	42
4.1. 14	Verschiebung des radioaktiven Peaks des ¹⁸ F-Fluorid und Al- ¹⁸ F-Komplexes in der HPLC	44
4.1. 15	Analyse von ¹⁸ F-Fluorid und Al- ¹⁸ F-Komplex mittels Dünnschichtchromatographie.....	44
4.1. 16	Analyse von Al- ¹⁸ F-NOTA-NCS mittels C18-SepPak-Kartusche	45
4.1. 17	Analyse von Al- ¹⁸ F-NOTA-NCS mittels Dünnschichtchromatographie.....	46
4.1. 18	Analyse des Proteins in DMF und MeCN/Wasser-Gemisch	46
4.1. 19	Möglichkeit der unspezifischen Einlagerung von ¹⁸ F-Fluorid durch das Protein	47
4.1. 20	Analyse des ¹⁸ F-Fluorid mittels SEC-Säule in der HPLC.....	48
4. 2	Markierung der Chelatisierungsagenzien mit den Radionukliden ⁶⁸ Gallium sowie ¹⁸ F-Fluorid.....	48
4.2. 1	Markierung mit ⁶⁸ Gallium.....	49
4.2. 2	Optimierung der ⁶⁸ Ga-Markierung	50
4. 3	Zusammenfassung der Dünnschichtanalytik auf unterschiedlichen DC-Platten in verschiedenen Fließmitteln	57
4. 4	Herstellung von Chelator-Amin-Konjugaten	59
4.4. 1	Optimierung der ⁶⁸ Ga-Markierung der Chelator-Amin-Konjugate hinsichtlich der Konjugatkonzentration	60
4.4. 2	Markierung der NOTA-Amin-Konjugate mit Al- ¹⁸ F-Komplex	61
4. 5	Post- und Pre-Konjugat-Markierung mit ⁶⁸ Gallium und Al- ¹⁸ F-Komplex	62

4.5. 1	Herstellung von Chelator-Protein-Konjugaten	63
4.5. 2	Markierung von Proteinen mit ⁶⁸ Gallium.....	63
4.5. 3	Suche nach dem optimalen Verhältnis NOTA-NCS zu Albumin	67
4.5. 4	Suche nach dem optimalen Verhältnis NOTA-NCS zu Annexin V.....	71
4. 6	Markierung von Proteinen mit Al- ¹⁸ F-Komplex	74
4.6. 1	Albumin.....	75
4.6. 2	Avidin.....	76
4.6. 3	Annexin V	77
4.6. 4	Massenspektrometrie.....	81
5.	DISKUSSION.....	86
5. 1	Chelatisierungsagenzien (Chelator-NCS)	86
5. 2	Pre- und Post-Konjugat-Markierungsmethode (Modellreaktionen mit Aminen)	91
5. 3	Versuche mit Proteinen.....	93
6.	ZUSAMMENFASSUNG	98
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	99
8.	LITERATURVERZEICHNIS	101

1. EINLEITUNG

1.1 Geschichte der Radiopharmazie

Der therapeutische Nutzen von Radioaktivität wurde zum Ende des 19. und zu Beginn des 20. Jahrhunderts entdeckt. Dabei kann die erste radiographische Aufnahme einer Hand als die Entdeckung des 19. Jahrhunderts angesehen werden. Diese medizinische Neuheit gelang 1895 Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923), der der erste Nobelpreisträger für Physik wurde. Den Nobelpreis für Physik erhielt er 1901 für die Entdeckung der nach ihm benannten Röntgenstrahlen.



Ein weiterer Meilenstein war die Entdeckung der Radioaktivität durch Antoine-Henri Becquerel. Diese beiden Entdeckungen waren der Grundstein für die Therapie unterschiedlicher Krankheiten durch die Bestrahlung der erkrankten Körperregionen mit Röntgenstrahlen von außen oder der Behandlung mit radioaktiven Substanzen von innen.

Chronologisch aufgeführt folgten:

Antoine-Henri Becquerel (1852-1908) untersuchte im Rahmen seiner Forschung Uranverbindungen und entdeckte zufällig ihre Fähigkeit Strahlung auszusenden [Lit 1]. Für diese Erkenntnis teilte er sich 1903 gemeinsam mit dem Ehepaar Curie den Nobelpreis für Physik für ihre Arbeiten zur Radioaktivität. Nach ihm wurde auch die Radioaktivitätseinheit *Becquerel* benannt, die heute als Standardeinheit zur Quantifizierung von Radioaktivität genutzt wird.

Marie Skłodowska Curie (1867-1934) erhielt 1903 (siehe oben) und 1911 jeweils den Nobelpreis für Physik und Chemie. Im Rahmen ihrer Doktorarbeit untersuchte sie zahlreiche uranhaltige Stoffe und entdeckte gemeinsam mit ihrem Ehemann Pierre Curie weitere radioaktive chemische Elemente wie z.B. Polonium, Radium und Thorium [Lit 2].

Nach ihr wurde auch die, heute nicht mehr so häufig verwendete, Radioaktivitätseinheit *Curie* benannt.

Ernest Rutherford (1871-1937) ist der Begründer des Begriffs Halbwertszeit, zusätzlich erkannte er, dass jeder Zerfall eines instabilen Isotops eine Transformation eines

Einleitung

Mutternuklids in ein Tochternuklid bedeutet, und dass jedes Element eine spezifische Halbwertszeit besitzt, und dass es verschiedene Arten des Zerfalls gibt: α , β , γ [Lit 3]. Den Nobelpreis für Chemie hat er 1908 bekommen.

Nachdem gerade behandelnde Radiologen ebenso wie bestrahlte Patienten an den Folgen der Radioaktivität starben, wurde 1903 die Notwendigkeit des Strahlenschutzes erkannt. Dabei erscheint ein Zahnarzt aus Boston, Williams H. Rollins, als Vorreiter des Strahlenschutzes, auf den er in seinen Anweisungen zu Strahlenschutz und Strahlenfolgen hinwies.

Im Jahre 1905 gründete sich in Berlin die Deutsche Röntgengesellschaft. Erste Strahlenschutzgesetze wurden 1913 mit einem Merkblatt erlassen, darin ging es vorrangig um den Schutz vor Strahlung durch Abschirmung [Lit 4, Lit 5].

1938 wurde die ICRP gegründet, die International Commission on Radiological Protections, welche Empfehlungen zur Dosis und zum Strahlenschutz herausgibt.

Ebenfalls 1938 gelang Otto Hahn (1879-1968, Nobelpreis für Chemie 1944) die Kernspaltung durch Bestrahlung von Uran mit Neutronen, wodurch Barium entstand. Seine Erkenntnisse haben die Kernchemie und Kernphysik nachhaltig geprägt [Lit 6].

Julius Robert Oppenheimer (1904-1967) beteiligte sich an der Entwicklung der Atombombe unter der Nutzung von Uran und Plutonium.

George de Hevesy (1885-1966) machte zusammen mit Friedrich Adolf Paneth (1887-1958) den Anfang zu Radiotracer-Experimenten. De Hevesy gilt als der Mann, der das Tracer-Prinzip einführte, durch das ein System beobachtet wird, ohne in dieses einzugreifen.

Der erste Bau eines Teilchenbeschleunigers im Sinne eines Zyklotrons gelang 1930 nach dem Beispiel von Ernest Lawrence [Lit 7], welcher anschließend 1932 zum Einsatz kam. 1943 konnten im Zyklotron ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F und ^{131}I gewonnen werden, ebenso wie längerlebige Radionuklide wie ^3H , ^{14}C , ^{35}S und ^{32}P .

Seit 1950 gibt es die Elution über das Nuklidgeneratorsystem $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. Das System funktioniert folgendermaßen: Im Generator befindet sich eine mit Aluminiumoxid gefüllte Säule. Dieses Aluminiumoxid ist mit ^{99}Mo , in Form von Molybdat (MoO_4^{2-}), beladen. Mit physiologischer Kochsalzlösung kann das entstehende $^{99\text{m}}\text{Tc}$ als Pertechnetat (TcO_4^-) von der Matrix eluiert werden. Diesen Vorgang nennt man auch „melken“.

Einleitung

^{99m}Tc wird seit 1972 für die Knochenszintigraphie in der Nuklearmedizin eingesetzt [Lit 8].

1978 kam erstmals ^{18}F (2- ^{18}F Fluor-Desoxy-Glukose) zum Einsatz [Lit 9]. Von dieser Entdeckung profitieren bis heute viele verschiedene Bereiche in der Medizin, die [^{18}F]-FDG zur Bildgebung des Zuckerstoffwechsels mittels Positronen-Emissions-Tomographie nutzen.

In nachfolgender Reihenfolge kamen die dazu notwendigen Geräte auf den Markt:

- 1903 Spinthariscop zur Sichtbarmachung von ionisierender α -Strahlung
- 1913 Geiger-Müller-Messer zur Überprüfung von möglicher Kontamination
- 1923 Autoradiographie früher zur DNA-Sequenzanalyse
- 1947 Szintillationsdetektor, Strahlungsmessgerät
- 1950 Scanner, Bildgeber in der Nuklearmedizin
- 1952 Gamma Kamera, Messung der Verteilung der γ -Strahlung
- 1962 PET-Scanner (PET/CT seit 1999)
- 1963 SPECT-Prototyp, häufig verwendet in der Kardiologie u.a.

Tabelle 1. 1 listet verschiedene Einsatzbereiche einiger Radionuklide in der Medizin auf.

Tabelle 1. 1: Einsatzgebiet ausgewählter Radionuklide

Radionuklid	Halbwertszeit	In der Medizin chemisch als	Einsatzgebiet
^{99m}Tc	6 h	z.B. Pertechnetat/Kit	Nuklearmedizinische Szintigraphie
^{123}I	13,2 h	z.B. IBZM	Parkinson, Neuroblastom
^{201}Tl	73,1 h	z.B. Chlorid	Myokard Szintigraphie
^{111}In	2,8 d	z.B. DTPA-Octreotid	Gastrointestinal-Tumoren
^{18}F	1,8 h	z.B. FDG	Tumore
^{11}C	0,34 h	z.B. Cholin	Onkologie, Kardiologie
^{131}I	8 d	z.B. NaI, MIBG	Neuroendokrine Tumoren
^{90}Y	267 d	z.B. DOTATOC, Zevalin ^R	Non-Hodgkin-Lymphom
^{177}Lu	6,7 d	z.B. DOTATATE	Neuroendokrine Tumoren
^{89}Sr	50,5 d	z.B. Chlorid	Knochenmetastasen
^{153}Sm	1,9 d	z.B. Samarium-153-EDTMP	Osteosarkom
$^{186/188}\text{Re}$	3,8 d	z.B. Bisphosphonat	Knochenmetastasen
^{223}Ra	11,4 d	Xofigo ^R	Prostatakrebs

Die Radionuklide können abhängig von ihrer Halbwertszeit und Strahlungsart unterschiedlich eingesetzt werden.

Dabei werden für die Radiodiagnostik Nuklide, insbesondere β -Strahler, mit einer Halbwertszeit von wenigen Minuten bis einigen Stunden und geeigneter Strahlungsart eingesetzt, um die Strahlenbelastung des Patienten während der Untersuchung zu minimieren.

Einleitung

Für die Radiotherapie werden Nuklide (insbesondere β -Strahler) mit einer Halbwertszeit von bis zu 10 Tagen eingesetzt, um einen möglichst hohen Therapieeffekt zu erhalten.

Als Vorreiter der Tracer-Methode gilt, wie oben in der Chronologie genannt, George de Hevesy, der 1913 begann, Radioaktivität nach Einsatz wieder aufzuspüren [Lit 10]. Dabei verwendete er das Bleiisotop ^{212}Pb und untersuchte damit u.a. die Selbstdiffusion von Bleiatomen in geschmolzenem Blei [Lit 11]. Bei *in-vivo*-Versuchen setzte er so geringe Mengen an Isotop ein, die keine Wirkung im Organismus erzeugten.

Ein radioaktiver Tracer ist eine Verbindung, mit der chemische und physiologische Prozesse im lebenden Organismus verfolgt werden können, ohne in den physiologischen Prozess einzugreifen, da die eingesetzten Isotope chemisch und physiologisch nicht unterschieden werden können und oft sehr geringe Stoffmengen verwendet werden können. Die Verteilung des radioaktiven Stoffes und dessen Weg im Körper kann durch die Strahlungsmessung in einem geeigneten Kamerasystem von außen beobachtet werden. Somit kann man Einblicke in verschiedene Stoffwechselprozesse erhalten. Das Prinzip des *metabolic trapping* wird besonders am ^{18}F FDG deutlich. ^{18}F FDG wird im Körper in Regionen mit erhöhter Stoffwechsellage gespeichert. Durch die Phosphorylierung des FDG in der Zelle kann der Rücktransport nur sehr langsam erfolgen. Durch den Austausch einer OH-Gruppe am C-2 kann das phosphorylierte FDG nicht weiter verstoffwechselt werden und wird so vermehrt in den Zellen eingelagert.

Die Bildung von metallorganischen Komplexen zur Gewinnung eines radiopharmazeutischen Wirkstoffs ist in der Radiopharmazie weit verbreitet. Häufig verwendet werden die [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Technetium Radiopharmaka wie Technetium-99m-Methyldiphosphonat zur Skelettszintigraphie oder Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) zur Nieren- und Herzsintigraphie [Lit 12], ohne die die nuklearmedizinische Routinediagnostik nicht vorstellbar wäre.

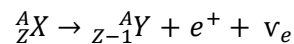
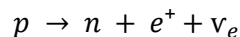
Aktuell stehen auch bei den PET-Radiopharmaka zur Verfügung, die bisher durch die Nichtmetalle Fluor-18, Kohlenstoff-11 und Stickstoff-13 repräsentiert waren, einige PET-Tracer, die über die Verwendung eines Chelatisierungsgenexes Radiometalle komplexieren [Lit 13 - Lit 18]. Dazu werden Radionuklide eingesetzt, die einen Kompromiss darstellen zwischen kurzer Halbwertszeit zur Sicherstellung der geringstmöglichen radioaktiven Belastung eines Patienten, und einer ausreichend langen Halbwertszeit, sodass genügend Zeit zur Herstellung und Verabreichung des Tracers gewährleistet wird. Aktuell ist das Gallium-68 das vielversprechendste unter den Radiometallen, das als Tochternuklid aus Germanium-68 entsteht und heute als Generatorkern vor Ort in nuklearmedizinischen

Einrichtungen bei Bedarf ähnlich dem Technetium-99m aus einem Radionuklidgenerator gewonnen werden kann.

1.2 Positronen-Emissions-Tomographie

Mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) können Stoffwechselprozesse im Körper auf molekularer Ebene dargestellt und eine quantitative Auswertung durchgeführt werden. Dem Patienten wird ein PET-Tracer, eine radioaktive Lösung, meist intravenös (*i.v.*) injiziert und mittels PET-Kamera die Verteilung im Körper beobachtet und ausgewertet [Lit 19, Lit 24]. Bei der PET wird der β^+ -Zerfall genutzt.

Positronenstrahler sind auf Grund des schlechten Protonen zu Neutronen Verhältnisses instabil, ein stabilerer Zustand kann durch die Kernumwandlung eines Protons (p) in ein Neutron (n), ein Positron (e^+) und ein Elektron-Neutrino (ν_e) erreicht werden.



Nach der *i.v.*-Applikation des radioaktiven Tracers wird die Verteilung durch eine PET-Kamera verfolgt. Das freigesetzte Positron ist ein positiv geladenes Teilchen mit der gleichen Masse und dem gleichen Spin eines Elektrons. Beim Zusammentreffen des Positrons und eines Elektrons kommt es zur sogenannten Annihilation, d.h. einer Vernichtung unter Ausstrahlung der zugehörigen Annihilationsenergie. Es entstehen zwei Gammaphotonen mit je 511 keV, die in einem Winkel von 180° zueinander abgestrahlt werden. Im PET treffen sie auf Szintillationskristalle und erzeugen dort Lichtblitze, die detektiert und in elektrische Signale umgewandelt werden können. Die Detektoren zeichnen das Ereignis des Zerfalls auf, wenn auf beide gegenüberliegenden Detektoren gleichzeitig ein Gammaphoton trifft (Koinzidenz).

In einem PET-Scanner sind etwa 30.000 der kleinen Kristalle in einem Detektorring angeordnet. Üblicherweise bestehen sie aus Lutetium- oder Gadolinium-Orthosilikaten.

Einleitung

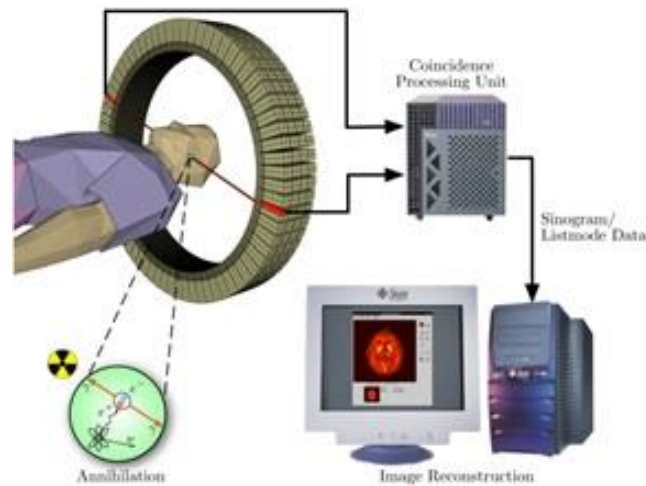


Abbildung 1. 1: Das Messprinzip des PET [Lit 20]

Das Radiopharmakon reichert sich hauptsächlich im erkrankten Gewebe mit erhöhter Stoffwechsellage an. Zum Beispiel haben Tumore einen erhöhten Zuckerstoffwechsel. Mit Hilfe eines Computers werden dreidimensionale Bilder der erkrankten Gewebe erzeugt. Als Tracer wird in dem Fall ein radioaktiver Zucker (^{18}F -FDG) verwendet und vom Körper ohne Unterschied zum natürlichen Zucker verstoffwechselt. Das Enzym Hexokinase phosphoryliert FDG anschließend innerhalb der Zelle. FDG kann allerdings von den Zellen nach der Phosphorylierung nicht weiter verstoffwechselt werden. Die Rückreaktion, die Dephosphorylierung von FDG-6-Phosphat zu FDG, erfolgt, mit Ausnahme der Leber, in allen Organen und im Tumorgewebe sehr langsam. Deshalb findet eine Anreicherung von FDG-6-Phosphat in den Zellen statt (*metabolic trapping*).

Besonders vorteilhaft ist, dass sich PET und Computertomografie kombinieren lassen (PET/CT). Moderne Geräte vereinen das PET und das CT in einem System, so dass eine einfache Fusion der Bilder ermöglicht wird. Durch die Überlagerung der Bilder können neben den Stoffwechselfvorgängen auch die Strukturen und Funktionen (Morphologie) des untersuchten Gewebes dargestellt werden.

Die für die PET verwendeten Radionuklide sind neutronenarme β^+ -Strahler. Hergestellt werden sie, indem stabile Atome mit geladenen Teilchen wie Protonen oder Heliumkernen im Zyklotron beschossen werden. Einige metallische PET-Radionuklide können über ein Generatorsystem gewonnen.

Die Radionuklide können an geeignete Peptide/Proteine oder andere organische Verbindungen gekoppelt werden, um gewünschte Bereiche im Körper darzustellen. Dabei muss bedacht werden, dass die Synthese und Qualitätskontrolle eines markierten Tracers in drei Halbwertszeiten beendet sein sollte, sodass eine ausreichend hohe spezifische Aktivität (A_s) des Radiotracers gesichert ist.

Einleitung

Die Aktivität einer radioaktiven Substanz bezeichnet die Zahl der radioaktiven Zerfälle pro Zeiteinheit. Die Aktivität wird in Becquerel [Bq] gemessen, 1 Bq entspricht einem Zerfall pro Sekunde. Veraltet ist die Angabe in der Einheit Curie [Ci] für die Aktivität. 1 Ci entspricht 3.7×10^{10} Bq.

Die spezifische Aktivität ist die Aktivität eines radioaktiven Stoffes bezogen auf die Masse und kann als Aktivität pro Gramm oder pro Mol eines Stoffes ausgedrückt werden.

Tabelle 1. 2 listet einige PET-Nuklide und deren physikalische Eigenschaften auf.

Tabelle 1. 2: Auswahl an PET-Nukliden [Lit 21, Lit 22]

Isotop	Halbwertszeit	Zerfallsart	$E_{\beta^+ \text{ max}}$ [keV]
$^{68}\text{Ga}^*$	68 min	β^+	1900
^{18}F	110 min	β^+	635
^{15}O	2,03 min	β^+	1720
^{11}C	20 min	β^+	960
^{13}N	10 min	β^+	1190

*Generatorkern

1. 3 Produktion von Fluor-18

Fluor-18 eignet sich mit seiner Halbwertszeit von ca. 109 Minuten und der maximalen β^+ -Energie von 635 keV sehr gut als Radionuklid für die Anwendung in der PET, da zum Einen die kurze Halbwertszeit eine geringe Strahlenbelastung des Patienten bewirkt und zum Anderen die geringe Positronenenergie eine höhere Auflösung der PET-Aufnahme durch eine im Vergleich niedrige Energie ermöglicht. Fluor-18 kann über verschiedene Reaktionen am Zyklotron in unterschiedlicher chemischer Form produziert werden.

Das zur Herstellung geeigneter PET-Tracer verwendete ^{18}F -Fluor kann sowohl als nukleophiles ^{18}F -Fluorid als auch als elektrophiles $^{18}\text{F}_2$ -Fluorgas erhalten werden. Tabelle 1. 3 stellt die beiden Formen gegenüber.

Tabelle 1. 3 Fluor-18 in verschiedenen chemischen Formen

Target	Vorläufer	Spezifische Aktivität	Zu erhalten als
$\text{Ne}[\text{F}_2]$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	0,037 GBq/ μmol	Elektrophil
H_2^{18}O	$[^{18}\text{F}]\text{aq}^*$	<740 GBq/ μmol	Nukleophil

*wässrig

1.3. 1 Elektrophile Fluorierung

Zur elektrophilen Reaktion wird notwendigerweise $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ verwendet. Es kann nicht trägerfrei produziert werden, da das $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -Molekül zu seiner Stabilisierung den Zusatz einer geringen Menge F_2 im Target benötigt und somit das $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ ein radioaktives und ein stabiles Fluoratom enthält. Das liegt daran, dass bei einem $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -Molekül nur ein Fluoratom auf Kohlenstoff übertragen wird. Das bedeutet für die radiochemische Ausbeute, dass im besten

Fall eine maximale Ausbeute von 50% möglich ist. Angewendet wird [^{18}F] F_2 aktuell nur, wenn eine nukleophile Fluorierung nicht möglich und eine hohe spezifische Aktivität nicht erforderlich ist. Dies war z.B. der Fall bei der Darstellung von L- ^{18}F -Fluor-DOPA. Diese Herstellungsmethode wird aber zurzeit durch einen neuen Nucleophilen-Tracer ersetzt [Lit 23].

1.3.2 Nukleophile Fluorierung

Über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion hergestelltes Fluor-18 stellt die Methode der Wahl des trägerarmen Radionuklids dar. In diesem Fall wird ^{18}O -angereichertes Wasser mit Protonen bestrahlt und Fluor-18 als Fluoridanion erhalten [Lit 25 - Lit 26].

Radionuklide kann man verwenden:

- Trägerfrei (carrier-free c.f.)
- Trägerarm (no-carrier-added n.c.a.)
- Geträgert (carrier-added c.a.)

„Träger“ bedeutet eine Isotope-Verunreinigung oder die Anwesenheit von stabilen Isotopen. Trägerfrei (carrier-free) stellt die ideale Situation dar. Dazu gehört das Verständnis zur spezifischen Aktivität. Die spezifische Aktivität wird berechnet als Gesamtaktivität pro Menge mit einer Einheit von GBq/mmol, GBq/ml oder GBq/g.

Unter trägerarmen Systemen (no-carrier-added) versteht man die Verwendung eines Radionuklids ohne bewussten Zusatz von einem stabilen Isotop. In natürlichen Elementen ist oft eine „Verunreinigung“ des Radioisotops mit stabilen Isotopen dieses Elementes zu erwarten. Das bedeutet, dass der Zustand der Trägerfreiheit nicht erreicht werden kann.

Bei Synthesevorschriften ist die Angabe „ohne zugesetzten Träger“ (no-carrier-added) üblich.

Geträgerte Synthesen (carrier-added) findet man naturgemäß bei der Verwendung von elektrophilem $^{18}\text{F}_2$, da zur Hälfte stabiles Fluor enthalten ist.

Ein Trägerzusatz ist üblicherweise nicht erwünscht, weil dadurch die spezifische Aktivität stark herabgesenkt wird. Eine hohe spezifische Aktivität ist notwendig, wenn toxische bzw. zentral wirksame Radiotracer verwendet werden, um unterhalb ihrer wirksamen Dosis-Konzentration zu bleiben.

Bei nukleophilen Substitutionsreaktionen werden organische Lösungsmittel wie Acetonitril (MeCN), *N,N*-Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt.

Zur nukleophilen Reaktion wird ^{18}F -Fluorid verwendet, welches trägerarm hergestellt werden kann und nach der Produktion als Anion in wässriger Lösung vorliegt. Da durch die hohe

Elektronegativität des Fluorids eine leichte Protonierung zu Fluorwasserstoff erfolgen kann, sollten für die Reaktion nur aprotische Lösungsmittel wie z.B. Acetonitril oder Dimethylformamid eingesetzt werden. Zusätzlich wird die Reaktion in einem basischen Milieu durchgeführt, um eine Protonierung während der Reaktion zu verhindern.

Eine direkte nukleophile Fluorierung setzt somit basisches Milieu ebenso wie thermische Stabilität der Tracer, die bei Proteinen nicht oft gegeben ist, voraus. Eine Umgehung dieser Bedingungen ist der Einsatz eines bereits mit ^{18}F -Fluorid markierten Prekursors sogenannter prosthetischer Gruppen. Bei Einsatz prosthetischer Gruppen wird eine Verbindung mit ^{18}F -Fluorid direkt fluoriert und anschließend z.B. mittels ^{18}F -Fluoralkylierung, ^{18}F -Fluoracylierung oder einer ^{18}F -Fluoramidierung, in einem zweiten Reaktionsschritt, eine indirekte Markierung durchgeführt.

1.4 Nuklide aus dem Generator

Generatorsysteme sind Mutter-Tochter-Nuklidsysteme, die gewährleisten, dass die Radionuklide fast ständig verfügbar sind. Dabei ist das Mutternuklid auf einer festen Matrix fixiert. Das Tochternuklid wird durch den Zerfall (Rückstoß) gelöst und kann in einer hohen chemischen Reinheit von der Matrix eluiert werden. Die Produktion des Mutternuklids erfolgt meist in Kernreaktoren. Für den idealen Gebrauch von Generatoren sollte das Mutternuklid eine längere Halbwertszeit haben als das Tochternuklid.

Ein prominentes Beispiel ist das System des $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generators mit einer kleinen Generatorsäule, einer hohen spezifischen Aktivität von Molybdän-99 und einem geringem Elutionsvolumen. Auf Grund der leichten Handhabung sind viele Szintigraphie-Tracer mit Tc-99m entwickelt worden.

Einige andere wichtige Positronenstrahler-produzierende Generatorsysteme zur Verwendung für die PET sind $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, $^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$, $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$. Das $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatorsystem besitzt eine Halbwertszeit von ca. 270 Tagen für das Mutternuklid und ca. 68 Minuten für das Tochternuklid. Die Halbwertszeit des Mutternuklids erlaubt die Verwendung des Generators für ca. 9 Monate. Durch verbesserte Reinigungsprozesse (post-processing) ist das Tochternuklid in hoher Reinheit erhältlich und somit annähernd frei von störenden Fremdmetallen.

1.5 Instabile atherosklerotische Plaque

Die häufigste Ursache von akuten Koronarsyndromen ist die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque der Koronargefäße. Mehrere Faktoren wie z.B. die Apoptose von glatten Muskelzellen führen zu einer Destabilisierung der Plaques. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Atherosklerose ein entscheidender Faktor bei der Entstehung

von Koronaren Herzkrankheiten und des Myokardinfarkts ist. Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, bei der es durch eine endotheliale Störung und eine subendotheliale Anhäufung von oxidiertem Cholesterin zu einer Aktivierung des Endothels mit darauffolgendem Einstrom von Monozyten in die Gefäßwand kommt [Lit 27 - Lit 29].

Die oxidativ veränderten Lipide werden von Makrophagen aufgenommen, diese werden dadurch zu sogenannten Schaumzellen, welche gemeinsam mit ebenfalls eingewanderten T-Zellen eine entzündliche Reaktion in der Intima verursachen. Durch die Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der Tunica media (mittlere Schicht von Arterien und Venen) und die Produktion von Kollagen kommt es zur Bildung einer fibrösen Kappe. In weiterer Folge kann es durch das Absterben von Zellen zur Bildung eines nekrotischen Kerns und durch die Produktion von Proteinasen zu einem Ausdünnen der Kappe kommen. Eine Plaqueruptur oder eine oberflächliche Erosion führt zum Kontakt zwischen dem Blut und dem stark gerinnungsaktivierenden Inhalt der Plaque. Dadurch kann es zur Bildung eines Thrombus kommen, welcher zu einem Gefäßverschluss und somit zur Entstehung eines akuten Koronarsyndroms führen kann.

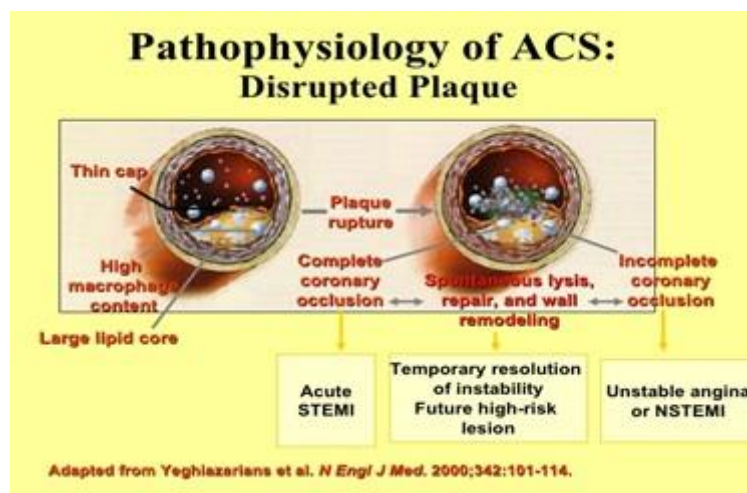


Abbildung 1. 2: Darstellung der Ruptur atherosklerotischer Plaques [Lit 30]

Inzwischen ist bekannt, dass die meisten Infarkte (ca. 60 - 80%) in Bereichen entstehen, die in den Monaten zuvor nicht signifikant stenosiert waren [Lit 31, Lit 32].

Diese und andere Ergebnisse haben dazu geführt, dass man sich auf die Suche nach dem Plaque-Typ macht, der besonders gefährdet ist zu rupturieren. Diese Plaques werden als „vulnerable Plaques“ bezeichnet. Es handelt sich um Fibroatherome mit großem nekrotischem Kern und einer dünnen fibrösen Kappe [Lit 33 - Lit 36].

Der nekrotische Kern entsteht durch Apoptose und Nekrose von Makrophagen. Die fibröse Kappe der Plaque, die den stark gerinnungsaktivierenden Inhalt der Plaque vom Blutfluss trennen soll, wird dünner und anstelle glatter Muskelzellen finden sich Makrophagen und

T-Lymphozyten. Verschiedene Faktoren wirken als Stressfaktoren auf die Kapazität der Kappe, die nun einreißen kann.

Die Plaqueruptur kann oft für die Entstehung eines Thrombus im Rahmen der Atherosklerose verantwortlich sein.

Auffällig in diesem Zusammenhang ist das Einsetzen der Apoptose, also des programmierten Zelltodes, die eine wichtige Rolle in der Destabilisierung von Plaques spielt, da instabile koronare Plaques vermehrt Apoptose zeigen [Lit 29, Lit 31, Lit 33, Lit 34, Lit 37 - Lit 39].

Zur Diagnose ist eine Technik notwendig, welche das Rupturrisiko realistisch beurteilt und an sich keine Vergrößerung des Risikos verursacht. Um das zu gewährleisten, werden bevorzugt nichtinvasive Techniken angewendet, wie z.B. Myokardperfusionsszintigraphie, Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT).

Eine weitere vielversprechende, nichtinvasive Methode ist die Darstellung mittels Positronen Emissions Tomographie (PET). Dazu wird mit der Radiomarkierung geeigneter Tracer, wie z.B. Annexin V eine Möglichkeit zur Verfügung gestellt, zelluläre und molekulare Stoffwechselprozesse zu identifizieren. Vulnerable Plaques und damit verbunden die Bewertung des Risikos der atherosklerotischen Komplikationen können zuverlässig dargestellt werden [Lit 40].

1.6 Annexin V zur Apoptosedetektion



Abbildung 1. 3: Struktur des Annexin V nach der Protein Data Bank

Annexin V ist ein Protein, welches zur Familie der Annexine gehört. Das Protein besteht aus 319 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 35800 Dalton. Alle Annexine weisen eine α -helikale Faltung auf. Die allgemeine Struktur der Annexine ist gekennzeichnet durch einen Annexinkern und einer kurzen, variablen N-terminalen Domäne. Der Annexinkern besteht aus vier sich wiederholenden Segmenten (die Ausnahme bildet Annexin VI mit acht),

die jeweils ca. 80 Aminosäuren lang sind. Zwischen den Helices befinden sich Ca^{2+} -Bindungsstellen. Annexin V enthält bis zu 22 Lysinreste [Lit 41, Lit 82].

Schon früh konnten dem Annexin V Eigenschaften nachgewiesen werden, die Einfluss auf die Verhinderung der Blutgerinnung haben [Lit 42]. Diese Wirkung entsteht unter anderem durch die Affinität des Annexin V, calciumabhängig an Phosphatidylserin zu binden. Phosphatidylserin ist ein Phospholipid, das sich auf der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen befindet [Lit 43 - Lit 45]. Durch diese Eigenschaften wird Annexin V zur Detektion der Apoptose, dem programmierten Zelltod, eingesetzt.

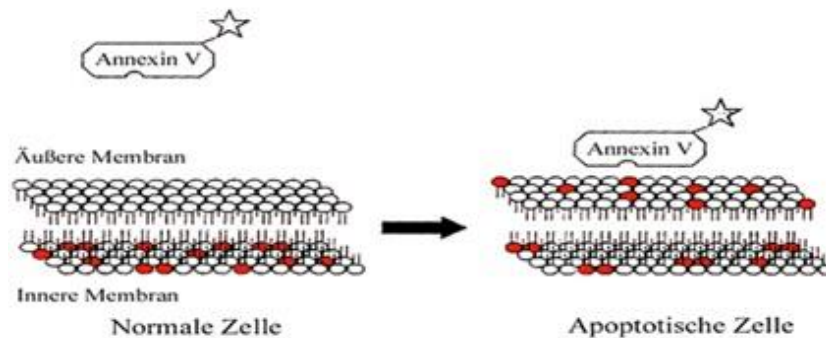


Abbildung 1. 4: Darstellung der Apoptosedetektion mittels Annexin V, Veränderung der Lipiddoppelschicht während der Apoptose unter Exposition von Phosphatidylserinen (rote Kreise) auf der äußeren Membran [Lit 46].

Eine fehlgeleitete oder auch vermehrte Apoptose tritt bei verschiedenen Erkrankungen wie beispielsweise Krebs, Autoimmunkrankheiten oder neurodegenerativen Erkrankungen auf [Lit 47].

Für die Detektion mit radioaktiven Tracern können verschiedene Aminosäurestellen des Annexin modifiziert werden und ein radioaktives Atom eingefügt werden [Lit 48, Lit 49].

1.6.1 Annexin Radiotracer

Aufgrund der bekannten Eigenschaften von Annexin V zur Apoptosedetektion wurde Annexin V bisher mit Fluorescein für die Durchflusszytometrie verwendet. Außerdem wurde es mit unterschiedlichen Radionukliden markiert wie z.B. $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , ^{11}C , ^{18}F oder ^{68}Ga für die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) oder für die Positronen-Emissions-Tomographie [Lit 50]. Besonders langlebig ist hier das metallische Nuklid $^{99\text{m}}\text{Tc}$ mit einer Halbwertszeit von 6 Stunden, und damit gut geeignet für die SPECT. Außerdem ist es dauerhaft und kostengünstig verfügbar durch den Bezug aus dem $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generator. Um einen geeigneten Tracer mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ herzustellen, gibt es zunächst die Methode der Bildung von $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Carbonylkomplexen. Dieser Precursor kann anschließend beispielsweise an das Histidin des his_6 -Annexin V binden [Lit 51].

Einleitung

Eine weitere Methode zur Bildung eines ^{99m}Tc -Annexin V-Tracers ist die Verwendung von HYNIC (Hydrazinnikotinamid). HYNIC ist ein bifunktionelles Chelatisierungsagens, das bei der Molekularen Bildgebung eingesetzt wird. Dabei konjugiert die Carbonsäure mit einer Aminogruppe des Annexins. Mit dem ^{99m}Tc bildet sich unter Zugabe eines Reduktionsmittels ein ^{99m}Tc -HYNIC-Chelatkomplex. Eine Apoptosedetektion mit ^{99m}Tc -Annexin V über die Chelatisierung des Radionuklids mit HYNIC wurde in der Literatur beschrieben [Lit 52, Lit 53].

1.7 Aluminium-Komplex-Chemie

Dreiwertige Aluminiumionen Al^{3+} komplexieren negativ geladene Ionen, abhängig von der Elektronegativität der Liganden [Lit 54].

Dabei bilden sich verschiedene Aluminiumverbindungen, die stark pH abhängig sind. Die freie Al^{3+} -Konzentration verändert sich drastisch mit unterschiedlichen pH-Werten (siehe unten) [Lit 55].

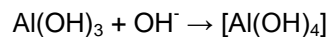
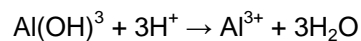


Abbildung 1. 5: Reaktion von Aluminiumhydroxid in sauren (pH-Wert <6) und in basischen (pH-Wert >9) Lösungen

Bei höheren pH-Werten (pH 9-10) wird der Al^{3+} /Wasser-Komplex deprotoniert und es bilden sich mehr dreiwertige Komplexe mit der OH-Gruppe. Möglich sind auch Komplexe der Art $(\text{HO})\text{AlF}_3^-$ und $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ [Lit 56].

Im wässrigen Milieu bestehen folgende Gleichgewichte abhängig vom pH-Wert der Lösung (siehe Abbildung 1. 6).

Einleitung

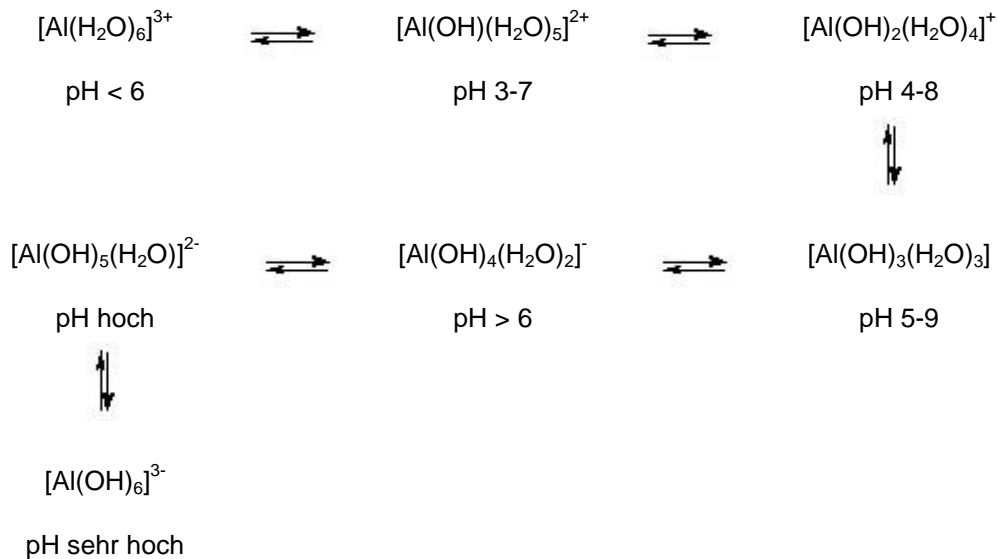
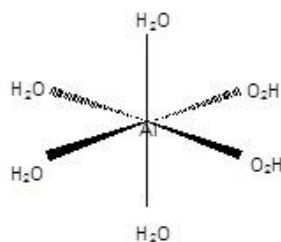


Abbildung 1. 6: Die wässrige Chemie der Kationensäure $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, die pH-Angaben beziehen sich auf eine 10^{-5} molare Lösung [Lit 57].

Aluminiumfluoride sind starke Lewis-Säuren, das heißt, das Aluminium-Zentrum reagiert im wässrigen Milieu zügig mit OH-Gruppen bzw. mit H_2O .

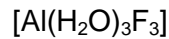
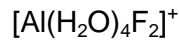
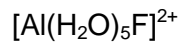
In neutraler wässriger Lösung (pH 6) bilden sich vorzugsweise Hexakoordinate, mit zwei Wassermolekülen in der Form $(\text{H}_2\text{O})_2\text{AlF}_4^-$ [Lit 54]. Deren geometrische Struktur wird am Beispiel der oktaedrischen Anordnung von $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ deutlich (siehe unten).



Bei niedrigeren pH-Werten entsteht durch die frei vorliegenden Protonen vermehrt HF. In der Gegenwart von Citraten, EDTA und Phosphaten, wird das Fluorid aus dem Al^{3+} Komplex verdrängt, da diese Chelatisierungsagenzien eine stärkere komplexierende Wirkung auf das Aluminium haben, da deren Komplexbildungskonstante höher ist als für Fluorid. In schwach sauren Lösungen ist mehr freies Al^{3+} in der Lösung, und weniger OH-Gruppen, daher bilden sich Al^{3+} -Komplexe mit Fluorid. Somit spielt der pH-Wert bei der Komplexbildungsreaktion eine wichtige Rolle, die bei der Reaktionsplanung nicht aus den Augen verloren werden sollte.

Einleitung

Durch Al-NMR- und F-NMR-Spektroskopie konnten folgende Strukturen bei einem pH von 5,25 festgestellt werden:



Bei einem pH von 3,24 - 4,40 überwogen Al-F und Al-F₂ in wässriger Lösung als Komplexe mit Wasser.

Bei der Verwendung von Puffern oder Lösungsmitteln ist zu beachten, dass Aluminium auch andere Komplexe, wie schon oben beschrieben, bilden kann. Die folgende Abbildung verdeutlicht z.B. die verschiedenen Komplexe von Al³⁺ mit Citronensäure.

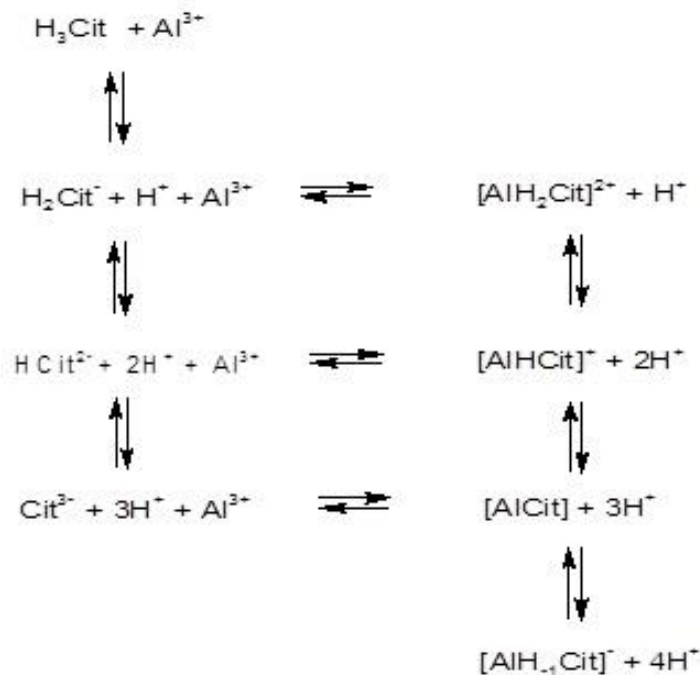


Abbildung 1. 7: Reaktionsschema der Komplexierung von Al³⁺ mit Citronensäure.

[Lit 58, Lit 59]

Die Bildung von Komplexen richtet sich nach dem pH-Wert, der Elektronegativität der Liganden und nach dem HSAB-Prinzip (Konzept der harten und weichen Säuren und Basen; engl. hard and soft acids and bases).

Das HSAB-Prinzip/Konzept wurde von Ralph G. Pearson 1963 beschrieben und lautet:

„Harte Säuren verbinden sich bevorzugt mit harten Basen und weiche Säuren verbinden sich bevorzugt mit weichen Basen.“

Betrachtet wird hierbei die Elektronegativität und die Polarisierbarkeit des Teilchens.

Tabelle 1. 4 verdeutlicht die Zuordnung der Elemente und Gruppen anhand einiger Beispiele.

Tabelle 1. 4: Einteilung in harte und weiche Säuren und Basen

Harte Säuren und ihre Eigenschaften	Harte Basen und ihre Eigenschaften	Weiche Säuren und ihre Eigenschaften	Weiche Basen und ihre Eigenschaften
geringe Elektronegativität, geringe Polarisierbarkeit	hohe Elektronegativität, geringe Polarisierbarkeit	Rel. hohe Elektronegativität, hohe Polarisierbarkeit	Rel. geringe Elektronegativität, hohe Polarisierbarkeit
z.B. H^+ , Al^{3+} , K^+ , Ga^{3+} , Fe^{3+} , Ca^{2+}	z.B. OH^- , F^- , SO_4^{2-}	z.B. Cu^+ , Ag^+ , I_2	z.B. I^- , SCN^- , R_2S

1. 8 Markierung von NOTA-Derivaten mit $Al-^{18}F$ -Komplex

2009 wurde die Methode der Markierung von NOTA-Derivaten mit $Al-^{18}F$ -Komplexen entwickelt [Lit 60]. Dabei ging es um die Herstellung geeigneter PET-Tracer im Bereich der Onkologie, welche mit einer neuartigen Aluminiumfluoridkomplexierung u.a. das bekannte ^{18}F FDG ablösen sollten. Fluorid bindet an viele Metalle, daher ist die Bildung eines Metall-Fluorid-Komplexes eine Möglichkeit zur Umgehung von nukleophilen Substitutionsreaktionen. Ein geeigneter Tracer entsteht über die Chelatisierung des Metall-Fluorid-Komplexes durch ein Chelatisierungsganz und der Kopplung an ein Biomolekül.

Diese Art der Markierung wurde in der folgenden Zeit durch die Markierung eines NOTA-Octreotid-Konjugates weiterentwickelt [Lit 61, Lit 62].

In einer weiteren Arbeit wurde z.B. die *in vivo* Stabilität von ^{68}Ga Gallium und ^{18}F -Fluorid markierten Antikörpern verglichen. Dabei wurde die Bioverteilung, bzw. die Aufnahme in Tumorzellen beobachtet im Unterschied zu der Aufnahme in inflammatorischen Läsionen. Die Aufnahme der markierten Antigene wurde verglichen mit der Aufnahme von ^{18}F -FDG in cancerogenen Zellen, welches vorwiegend bei Tumoren angewandt wird. Dazu wurden ein NOTA-Derivat (für $Al-^{18}F$ -Komplex) und DOTA-Derivat (für ^{68}Ga Gallium) markiert [Lit 63].

In einer weiteren Arbeit konnte demonstriert werden, dass eine komplette Umsetzung der Markierungsreaktion mit Aufreinigung in einer Gesamtzeit von 30 Minuten gelingt. Es gelang Ihnen das Produkt ohne zeitaufwendige chromatographische Trennung von nicht markiertem Peptid abzutrennen. Dies wurde am Beispiel eines NOTA-derivatisierten Peptids mit $Al-^{18}F$ -Komplex durchgeführt [Lit 64].

Einleitung

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Chelatisierung von Al-¹⁸F-Komplex durch ein geeignetes Chelatisierungsagens in einer „One-Pot“-Methode hohe radiochemische Ausbeuten in wässrigem Milieu erzielt [Lit 65, Lit 66]. Die gleiche Markierungsmethode konnte auch für die Markierung eines hitzeunempfindlichen Antikörpers bei einer Temperatur von 105 °C durchgeführt werden [Lit 67].

Mit Al-¹⁸F-Komplex markierte PET-Tracer könnten, unter anderem, bei verschiedenen Tumorerkrankungen angewendet werden. Dazu könnten je nach diagnostischer Notwendigkeit verschiedene Peptide an ein NOTA-Derivat gebunden und anschließend markiert werden. Mit dieser Methode konnte schon das Peptid Bombesin [Lit 68] sowie das prostata-spezifische Membran Antigen PSMA [Lit 69] mit hohen Ausbeuten markiert werden.

Markierung mit dem Al-¹⁸F-Komplex wurde auch in weiteren Arbeiten aufgegriffen und bildet eine der Grundlagen dieser Arbeit. Als geeignetes Chelatisierungsagens, das den Al-¹⁸F-Komplex chelatisieren sollte, wurde NOTA gewählt, nachdem die Markierung anderer Chelatisierungsagenzien mit Al-¹⁸F-Komplex scheiterte.

2. ZIELSETZUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein potentieller PET-Tracer zur Detektion atherosklerotischer Plaques entwickelt werden. Da kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit zunehmen und Komplikationen durch die Ruptur vulnerabler atherosklerotischer Plaques verursachen, werden Früherkennungsmaßnahmen benötigt, die dank der Bildgebung durch Positronen-Emissions-Tomografie (PET) nichtinvasiv erfolgen können. Somit kann selbst der Grad der Vulnerabilität durch molekulare Bildgebung bestimmt werden [Lit 40, Lit 70, Lit 71]. Aufgrund seiner bekannten Eigenschaft – Detektion von apoptotischen Zellen in atherosklerotischen Plaques – wurde das Protein Annexin V ausgewählt, das nach Radiomarkierung mit einem geeigneten PET-Nuklid als PET-Tracer eingesetzt werden könnte [Lit 14, Lit 50, Lit 72].

Die Markierung des Proteins Annexin V durch ein geeignetes PET-Radionuklid sollte über ein bifunktionelles Chelatisierungsagens erfolgen.

Bifunktionellen Chelatisierungsagencien kommen in dieser Arbeit eine bedeutende Rolle zu, da sie:

1. als Mittler (Linker) zwischen Protein und Radionuklid fungieren und die Radiomarkierung durch Komplexbildung des Chelatisierungsagences mit dem Radionuklid erfolgt
2. eine geeignete Kopplungsgruppe (z.B. eine Isothiocyanatgruppe in unserem Fall) dem Protein zur Verfügung stellt

In der Regel werden Proteine, die mit einem bifunktionellen Chelatisierungsagens gekoppelt werden, "unmittelbar" mit metallischen Radionukliden wie z.B. ⁶⁸Gallium markiert [Lit 17, Lit 73, Lit 74]. Die Markierung von Chelator-Protein-Konjugaten gelingt bei Nichtmetallen alternativ über prosthetische Gruppen, beispielsweise bei Verwendung von Radiohalogenen wie Iod-131 oder Fluor-18 [Lit 75]. Für derartige chemische Reaktionen, die häufig auch noch das Abspalten von Schutzgruppen erforderlich machen, sind in der Regel längere Reaktionszeiten nötig.

Außerdem benötigen die Reaktionen häufig erhöhte Temperaturen oder laufen typischerweise in organischen Lösungsmitteln ab, im Gegensatz zu einer üblicherweise in wässriger Lösung direkt ablaufenden Komplexbildungsreaktion. Im Falle der Markierung von Proteinen werden diese durch hohe Temperaturen sowie organische Lösungsmittel häufig denaturiert und somit biologisch inaktiv und binden nicht mehr an das zu detektierende

Zielsetzung

Biomolekül. Aus diesen Gründen sollte die Markierung des Annexins V durch Komplexbildung in wässriger Lösung erfolgen.

Eine Herausforderung ergab sich nun in der Hinsicht, dass die typischerweise zur Verfügung stehenden PET-Isotope ^{68}Ga Gallium und ^{18}F -Fluorid nur kurze Halbwertszeiten aufweisen (68 min bzw. 110 min). ^{68}Ga stellt ein metallisches Nuklid dar, welches in dieser Hinsicht die Markierungsstrategie erfüllt, jedoch mit einer Halbwertszeit von nur 68 Minuten möglicherweise nicht ideal kompatibel mit der Biokinetik des Annexins V ist. ^{18}F -Fluorid hingegen, mit einer Halbwertszeit von 110 Minuten kommt der Biokinetik entgegen, ist jedoch als Halogen typischerweise nicht in der beschriebenen Komplexreaktion einsetzbar.

Relativ neu ist eine Markierung des ^{18}F -Fluorid nicht über eine Substitutionsreaktion, sondern über Bildung eines Aluminium-Fluorid-Komplexes ($\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex), sodass ein metallähnlicher Charakter erzeugt wird [Lit 61, Lit 62, Lit 65, Lit 68, Lit 76 - Lit 80].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Isothiocyanatgruppe des Chelatisierungsagenzes und die Aminogruppe eines Lysinrestes des Proteins Annexin V unter Bildung eines Chelator-Protein-Konjugats miteinander gekoppelt werden. Als preisgünstigere Modellproteine sollten in Vorversuchen die Proteine Albumin und Avidin dienen.

Der Ablauf der Arbeit war daher wie folgt geplant:

1. Zunächst sollte die radioaktive Markierung verschiedener bifunktioneller Chelatisierungsagenzien p-SCN-Bn-NOTA, p-SCN-Bn-DOTA, p-SCN-Bn-Oxo-DO3A und p-SCN-Bn-PCTA sowohl mit ^{68}Ga als auch mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex im Hinblick auf die radiochemische Ausbeute untersucht und optimiert werden.
2. Anschließend sollten die Kopplungsreaktionen der einzelnen Chelatisierungsagenzien zunächst mit einfachen Modellaminen wie Dibutylamin und *n*-Butylamin untersucht werden. Auch hier sollten sowohl die Kopplungsreaktion als auch die Radiomarkierung optimiert werden.
3. Im Anschluss daran sollten die Modellproteine Albumin und Avidin mit geeigneten Chelatisierungsagenzien gekoppelt und hinsichtlich optimaler Radiomarkierungsbedingungen untersucht werden.

Zielsetzung

4. Schließlich sollte das Zielprotein Annexin V an geeignete Chelatisierungsagenzien gekoppelt und anschließend mit ^{68}Ga Gallium und Al- ^{18}F -Komplex markiert werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien

Tabelle 3. 1: Verwendete Substanzen

Substanzklasse	Substanz	Hersteller	Reinheit
Chelatisierungsagenzien	p-SCN-Bn-NOTA [1]*	Macrocyclics	94%
	p-SCN-Bn-DOTA [2]*	Macrocyclics	94%
	p-SCN-Bn-oxo-DO3A [3]*	Macrocyclics	94%
	p-SCN-Bn-PCTA [4]*	Macrocyclics	94%
Amine	Dibutylamin	Merck	97%
	<i>n</i> -Butylamin	Merck	97%
Proteine	BSA 66 kDa	Sigma Aldrich	98%
	HSA 66 kDa	Sigma Aldrich	97%
	Avidin Tetramer 66 kDa	Sigma Aldrich	97%
	Annexin V 35,8 kDa	abcam	98%
Nuklide	⁶⁸ Gallium	Generator IDB Holland	
	¹⁸ F-Fluorid	Eckert & Ziegler (Bonn), Zyklotron (Siemens)	
Puffer	Octansulfonsäure Natrium Salz	Merck	LiChropur
	Phosphorsäure	VWR	85%
	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth	≥99,5%,
	Phosphate Buffered Saline (PBS)	Merck	
	Natriumacetat	Carl Roth	≥98,5%
Aluminiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth	≥95%	
Citratpuffer pH 5	Carl Roth		
Ammoniumacetat (3M)	Merck	≥97%	
Lösungsmitteln	Dimethylformamid	Sigma Aldrich	Wasserfrei
	Acetonitril	VWR	HPLC-grade
	Wasser	VWR	HPLC-grade
	Methanol	Sigma Aldrich	Wasserfrei
Weitere Chemikalien	Salzsäure (1M HCl)	Merck	
	Ethanol	Carl Roth	96%
	Ammoniak	Carl Roth	30%
	Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich	99%
	Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth	99%
Natriumchloridlösung (0.9%)	B. Braun		

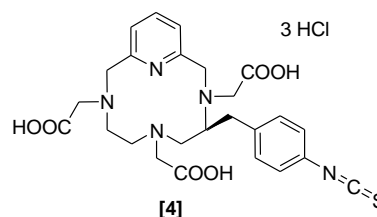
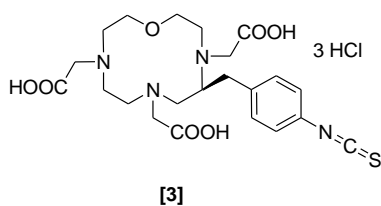
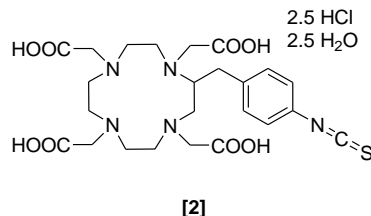
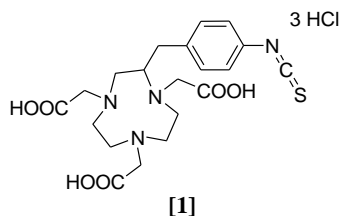
* Nachfolgend werden alle Chelatisierungsagenzien abgekürzt jeweils nur Chelator-NCS genannt oder NOTA-NCS usw.

[1] p-SCN-Bn-NOTA: $C_{19}H_{28}N_4O_6S \times 3 \text{ HCl}$; $M = 559,9 \text{ g/mol}$

[2] p-SCN-Bn-DOTA: $C_{24}H_{33}N_5O_8S \times 2,5 \text{ HCl} \times 2,5 \text{ H}_2\text{O}$; $M = 688,0 \text{ g/mol}$

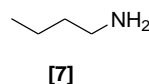
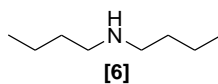
[3] p-SCN-Bn-oxo-DO3A: $C_{22}H_{30}N_4O_7S \times 3 \text{ HCl}$; $M = 603,9 \text{ g/mol}$

[4] p-SCN-Bn-PCTA: $C_{25}H_{29}N_5O_6S \times 3 \text{ HCl}$; $M = 637,0 \text{ g/mol}$



[6] Dibutylamin: $C_8H_{19}N$; $M = 129,2 \text{ g/mol}$

[7] *n*-Butylamin: $C_4H_{11}N$; $M = 73,14 \text{ g/mol}$



3. 2 Materialien und Geräte

Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Silica-Gel-Platten 60 F₂₅₄ und iTLC-Platten der Firma Macherey & Nagel ebenso wie GF-DC-Platten verwendet. Zur Messung des pH-Wertes kamen Neutralit pH-Messstäbchen mit einem pH-Bereich 5-10 und Alkalit pH-Messstäbchen mit einem pH-Bereich 0-6 zum Einsatz (beide Firma Merck). Alle Lösungen und Reaktionen wurden in nunc cryo-tube-vials 1 ml hergestellt und durchgeführt. Die HPLC-Anlage bestand aus zwei Kontron 322 Pump-Systemen und einem UV/Vis-Detektor (432 Kontron, Wellenlänge 254 nm) und einem NaI-Radiodetektor der Firma Raytest. Die computergestützte Kontrolle des Systeme wurde mit der Ramona-Software von Raytest durchgeführt. Die UV- und Radiosignale wurden mithilfe der Gina-Star-Software aufgezeichnet und integriert.

Bei Nutzung der C18-RP-Säule wurde eine R(eversed) P(hase)-C18-Säule von der Firma Agilent Technologies (LiChrosorb, RP-18, 200 x 4,6 mm, 5 µm) verwendet. Ebenso bei größeren Molekülen (Proteinen) eine C18 und eine C4-Säule der gleichen Firma (Nucleosil EC 250/4.6 300-5 C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, Partikelgröße 5 µm, Porenweite 300 Å), und Nucleosil 300-5 C₄, 250 mm x 4.6 mm, Partikelgröße 5 µm, Porenweite 300 Å).

Die Massenspektren wurden mittels eines MS-Geräts der Firma Bruker (Daltonik autoflex II MALDI-TOF/TOF) mit der verwendeten Matrix DHAP (2,5-Dihydroxyacetophenone) aufgenommen. Die radioaktiven Dünnschichtstreifen wurden mit einer miniGita der Firma Raytest ausgewertet. Der Gammacounter Wizard zur Messung kleinster radioaktiver Mengen war von der Firma Wallac. Das Aktivimeter Isomed 2000 war von der Firma Isomed.

Reinigung von Lösungen

Zur Aufreinigung von Lösungen und auch zu Ausbeutebestimmungen wurden C18_{ec}-SepPak light (weiter im Text nur als C18-Kartusche) von der Firma Waters eingesetzt, und PD10-Säulen zur Elution nach Größenausschluss (17-0851-01, Sephadex G-25 M), sowie spezielle SEC-Säulen (SEC-s2000, 500-100,000 Da, 5 µm, 145 Å, pH range: 2,5 – 7,5).

Der Galliumgenerator (⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-Generator) war von der Firma IDB Holland. ¹⁸F-Fluoridlieferungen wurden von von der Firma Eckert & Ziegler bezogen.

3.3 Analysenmethoden

3.3.1 (Radio)-HPLC

Die Probenaufgabe erfolgte durch einen Injektor mit einer 50 µl Probenschleife, indem ein Probenvolumen von 10 µl in den Injektor eingespritzt wurde. Die mobile Phase bestand üblicherweise aus einer Mischung aus Acetonitril (MeCN) und 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser. Die Trennung erfolgte mit Hilfe eines Gradienten. Die Flussgeschwindigkeit betrug, wenn nicht anders vermerkt, 1 ml/min.

3.3.2 Radiodünnschichtchromatographie

Die Radiodünnschichtchromatographie erlaubt eine schnelle Analyse der Position der Radioaktivität auf den DC-Streifen. Dazu wurden 2 µl Probenvolumen auf einen 2 x 10 cm Streifen einer DC-Platte aufgetragen und in einer mobilen Phase entwickelt.

3.4 Trennung einzelner Fraktionen mittels Size Exclusion Chromatographie

Zur Trennung der markierten Chelator-Protein-Konjugate von weiteren Bestandteilen der Reaktionslösung wurden PD10-Säulen verwendet. Diese Säulen trennen nach dem Größenausschluss (Size Exclusion) und zählen zur Gelchromatographie. Dabei werden große Moleküle zuerst von der Säule eluiert und kleine Moleküle zu einem späteren Zeitpunkt. Als Elutionsmittel wurde Wasser oder Pufferlösungen verwendet.

Die PD10-Säule wurde zuerst mit Wasser oder Pufferlösungen konditioniert und anschließend in 1 ml-Schritten eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden aufgefangen und zur Weiterreaktion verwendet. Dabei kann die zu trennende Lösung bereits markiert sein, oder auch erst nach der Trennung einzeln markiert werden.

3.5 Bestimmung der Retentionszeiten

3.5.1 Bestimmung der Retentionszeiten der Chelatisierungsagenzien

Zur Bestimmung der HPLC-Retentionszeiten der Chelatisierungsagenzien wurden 10 µl der in DMF oder MeCN gelösten Chelatisierungsagenzien in einer Konzentration von 3 mg/ml injiziert und unter Verwendung des Gradienten 1 (Fließmittel A: Wasser/0,1% (V/V) Trifluoressigsäure, Fließmittel B: 0% - 90% MeCN in Wasser) in 30 Minuten mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min analysiert.

3.5.2 Bestimmung der Retentionszeiten der Chelator-Amin-Komplexe

Die Reinigung der Chelator-Amin-Komplexe erfolgte mittels einer C18-Kartusche, die zuerst mit MeCN und anschließend Wasser (jeweils 10 ml) konditioniert wurde. Durch schrittweise Elution mit langsam steigenden MeCN-Konzentrationen in Wasser (10-50%) wurden Restprodukte, Edukte und freie Nuklide von dem Chelator-Amin-Komplex weitestgehend abgetrennt. Die Chelator-Amin-Konjugate wurden nach der Aufreinigung mittels HPLC analysiert und die Retentionszeiten bestimmt (siehe oben Kap. 3.5. 1).

3.6 Verwendete Radionuklide

Die Radionuklide ^{68}Ga Gallium mit einer Halbwertszeit von 68 Minuten und ^{18}F -Fluorid mit einer Halbwertszeit von 110 Minuten wurden in den Versuchen zur Markierung verwendet.

3.6.1 ^{68}Ga -Generatorelution

^{68}Ga -Lösung (bzw. $^{68}\text{Ga}^{3+}$) wurde aus einem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator erhalten. Das Mutternuklid ist $^{68}\text{Germanium}$ mit einer Halbwertszeit von 270 Tagen. Zur Elution des ^{68}Ga -Eluats aus dem Generator wurden 2 ml einer 0,6M HCl-Lösung verwendet. Die eluierte Aktivitätsmenge ist abhängig vom Alter des Generators. Es wurde eine saure ^{68}Ga -Lösung erhalten, die sofort gebrauchsfertig war.

Da Galliumgeneratoren von den Abmaßen relativ klein sind, können sie im Labor untergebracht werden, sodass die benötigten ^{68}Ga -Tracer jederzeit hergestellt werden können.

3.6.2 ^{18}F -Fluorid-Zyklotronproduktion

Das verwendete ^{18}F -Fluorid in wässriger Lösung wurde mittels einer $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ -Kernreaktion in einem Zyklotron (Siemens) gewonnen.

Für die ^{18}F -Fluorid-Markierung in dieser Arbeit wird eine Al- ^{18}F -Komplex-Lösung benötigt, die aus ^{18}F -Fluorid und Aluminiumacetat hergestellt wird. Die benötigte 2mM Aluminiumacetatlösung wurde hergestellt, indem 0,468 mg $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in 1 ml 0,1M Natriumacetatpuffer gelöst wurden.

3.7 Ausbeutenbestimmung

Die Bestimmung der Ausbeute der Radiomarkierung erfolgte sowohl mittels HPLC-Analyse als auch mittels Vermessung/Ablesung der Aktivität auf der DC-Platte, PD10-Säule oder C18-Kartusche mittels Gammacounter, Aktivimeter oder miniGita.

3.7.1 Bestimmung der radioaktiven Ausbeute mittels HPLC-Analyse

Nach Injektion einer Probe in die HPLC-Anlage konnten die Peakflächen sowohl im UV- als auch im Radiodetektor mittels eines Computerprogramms integriert werden. Die Integrale erlaubten eine Aussage über die Verteilung der Radioaktivität und damit über den Erfolg der Reaktion. Dabei wurde die Radioaktivität des markierten Produktes (Integrals) bezogen auf die Summe der Radioaktivität des freien Radionuklids (nur bedingt möglich bei ^{18}F -Fluorid) und der Radioaktivität der entstandenen Nebenprodukte. Zusätzlich konnten einzelne Peaks während des HPLC-Laufes aufgefangen werden und die Radioaktivitätsmenge der jeweiligen Fraktionen mittels Aktivimeter oder Gammacounter bestimmt und mit der injizierten Aktivität verglichen werden.

3.7.2 Bestimmung der radioaktiven Ausbeute mittels Dünnschichtchromatographie

2 µl der markierten Probe wurden auf einen Streifen einer Dünnschichtplatte aufgetragen und im ausgewählten Fließmittel entwickelt. Dieser Streifen wurden anschließend mit Hilfe verschiedener Messgeräte wie eines Aktivimeters, eines Gammaskpektrometers oder eines Gammacounters ausgewertet. Dazu wurde der Streifen in zwei oder auch mehrere Abschnitte geschnitten und die Radioaktivität auf dem jeweiligen Abschnitt vermessen. Die Dünnschichtstreifen konnten auch mithilfe eines DC-Scanners (miniGita) vermessen werden. Die Aktivitätsmengen auf den unterschiedlichen Abschnitten wurden in Relation gesetzt werden. Eine vorherige Identifikation der R_f -Werte der einzelnen Substanzen ist obligatorisch.

3.7.3 Bestimmung der radioaktiven Ausbeute mittels C18-Kartusche

Die C18-Kartusche wurde zunächst mit MeCN und anschließend mit Wasser (jeweils 10 ml) konditioniert und ein Aliquot der markierten Probe auf die Kartusche aufgetragen. Im Anschluss wurde die Kartusche mit 10 ml Wasser gespült, sodass freies ^{68}Ga von der Kartusche eluiert wird. Zur weiteren Aufreinigung wurde die Kartusche schrittweise mit einer MeCN-Wasser-Lösung (beginnend mit 10% MeCN) in steigenden Konzentrationen eluiert. Mit einer 20%igen bzw. 50%igen MeCN-Wasser-Lösung (jeweils 0,5 ml) wird das Hydrolyseprodukt bzw. Chelator-NCS erfolgreich eluiert.

Die einzelnen Eluate aus den Spülgängen wurden aufgefangen und im Aktivimeter bzw. Gammacounter gemessen. Ebenso wurden die Radioaktivität der Kartusche nach Aufgabe der Reaktionslösung und die Restaktivität auf der Kartusche nach allen Spülgängen gemessen.

3.8 Markierungsreaktion

3.8.1 Markierung der Chelatisierungsagenzien mit ^{68}Ga

3 mg des Chelator-NCS wurden in 1 ml DMF oder 1 ml MeCN gelöst. Ein Aliquot der Probe wurde mit der gewünschten Aktivitätsmenge (10-300 MBq) des sauren $^{68}\text{Ga}^{3+}$ -Eluats zur Markierung versetzt. Zur Einstellung des pH-Wertes von ca. 4 wurden HEPES-Puffer (4,8 g HEPES ad 10 ml H_2O) oder 3M Ammoniumacetatpuffer hinzugegeben. Die Markierung wurde entweder bei Raumtemperatur oder 90 °C durchgeführt.

3.8.2 Markierung der Chelatisierungsagenzien mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex

3 mg des Chelator-NCS werden in 1 ml DMF oder 1 ml MeCN gelöst. Ein Aliquot der Probe wurde mit der gewünschten Aktivitätsmenge (10-300 MBq) des ^{18}F -Fluorid-Eluats zur Markierung versetzt. Zur Herstellung des Aluminium- ^{18}F -Fluorid-Komplexes und zur Einstellung

Material und Methoden

des pH-Wertes von ca. 4 wurde 2mM Aluminiumacetatpuffer (siehe oben Kap. 3.6. 2) hinzugegeben. Die Markierung wurde entweder bei Raumtemperatur, 40 °C oder 90 °C durchgeführt.

4. EXPERIMENTELLES

4.1 Vorversuche

4.1.1 Vorbereitung von Puffern für verschiedene Zwecke

OSAP-Puffer

16 g Natrium-Salz der Octansulfonsäure
4,8 g H₃PO₄ (85%)
2,5 l Wasser

OSAP wird in der HPLC als Ionenpaarreagenz eingesetzt. Es sollte geprüft werden, ob der Peak der freien Aktivität bei einer Retentionszeit von 2 Minuten bei der Markierung mit Al-¹⁸F-Komplex freiem ¹⁸F-Fluorid (¹⁸F⁻) entspricht oder ob es sich um positiv geladene nicht umgesetzte Al-¹⁸F-Komplexionen handelt. Handelt es sich um Kationen, so sollte sich die Retentionszeit des Kations in der HPLC verzögern, da Kationen durch die hohe Lipophilie der Octansulfonatanionen bei R(eversed) P(hase)-Säulen als lipophiles Ionenpaar eluieren.

PBS-Puffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, engl. phosphate buffered saline), z.B. zur Konditionierung und Elution der PD10-Säulen.

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
12 mM Gesamt-Phosphat (HPO₄²⁻ und H₂PO₄⁻)
pH=7,4

HEPES-Puffer zur Markierung von Chelatisierungsagenzien und Konjugaten mit ⁶⁸Gallium

4,8 g 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
10 ml Wasser

4.1.2 HPLC-Retentionszeiten

Zunächst wurden die Retentionszeiten der Substanzen mittels HPLC-Chromatographie, die für die anschließende Markierungsreaktion zum Einsatz kommen, mittels zwei verschiedener Gradienten bestimmt. Dabei wurde eine R(eversed) P(hase)-C18-Säule der Firma Agilent Technologies eingesetzt. Zur Detektion wurde ein UV/Vis-Detektor (254 nm) verwendet. Für die genaue Beschreibung der Versuchsbedingungen siehe Kapitel Material und Methoden.

4.1.3 HPLC-Retentionszeiten der Chelatisierungsagenzien

Zuerst wurden die Retentionszeiten der Chelatisierungsreagenzien NOTA-NCS [1], DOTA-NCS [2], oxo-DO3A-NCS [3] und PCTA-NCS [4] bestimmt (siehe Tabelle 4. 1).

3 mg der Chelatisierungsagenzien wurden dazu in 1 ml DMF gelöst, und 10 µl der Lösung bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min injiziert. Als Fließmittel „A“ diente Wasser mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) und als Fließmittel „B“ Acetonitril (MeCN). Zwei verschiedene Gradienten wurden dazu verwendet:

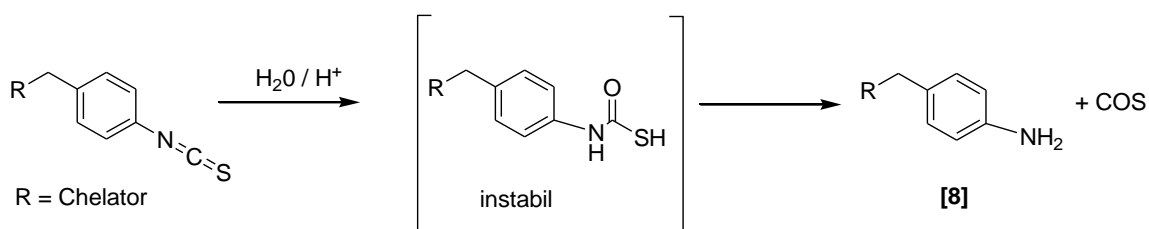
- Gradient 1: 0–90% MeCN in 30 Minuten
- Gradient 2: 30–60% MeCN in 30 Minuten

Tabelle 4. 1: Retentionszeiten der Chelatisierungsagenzien unter unterschiedlichen HPLC Bedingungen

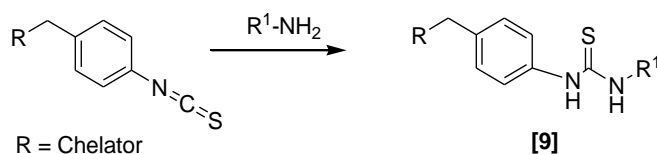
Chelatisierungsagenzien	Konzentration	Retentionszeit Gradient 1	Retentionszeit Gradient 2
NOTA-NCS [1]	3 mg/ml	18 min	13 min
DOTA-NCS [2]		19 min	13 min
oxo-DO3A-NCS [3]		16 min	11 min
PCTA-NCS [4]		21 min	14 min

Unter den untersuchten Bedingungen waren die Retentionszeiten der Chelatisierungsagenzien in der HPLC ähnlich. Die Verbindungen zeigten im ersten Gradienten einen UV-Peak bei 16-21 Minuten und im zweiten Gradienten bei 11-14 Minuten. Da sie auch im „gestreckten“ ersten Gradienten noch früh genug eluierten, wurden alle weiteren UV-Chromatogramme unter Verwendung des Gradienten 1 angefertigt.

4.1.4 Hydrolyse der funktionellen Isothiocyanatgruppe (-N=C=S)



Nach einer Markierungsreaktion bei erhöhten Temperaturen, sowohl mit ^{68}Ga llium als auch mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex, ist in der HPLC (sowohl im UV als auch im Radiokanal) ein Peak bei ca. 6.5 Minuten zu erkennen (Gradient 1). Dieser wird durch Hydrolyse der Isothiocyanatgruppe unter Entstehung des entsprechenden Anilins [8] gebildet. Der hydrolysierte Anteil an Chelatisierungsagenz steht für eine Kopplung an die Aminogruppe von Aminen/Proteinen nicht mehr zur Verfügung. Für die Kopplung des Chelatisierungsagenzes mit einer Aminogruppe (-NH₂/-NH-) zur Herstellung eines Thioharnstoffs [9] darf die Isothiocyanatgruppe nicht hydrolysieren.



Für den Verlauf dieser Arbeiten war es wichtig, geeignete Reaktionsbedingungen zu finden, die eine Hydrolyse der funktionellen Isothiocyanatgruppe der Chelatisierungsagenzien während der Markierung verhindern und somit die Weiterreaktion zum Thioharnstoffderivat [9] fördern.

Die Menge an gebildetem Hydrolyseprodukt variiert von Reaktion zu Reaktion. Im Allgemeinen wurde beobachtet, dass eine frisch vorbereitete Chelator-NCS-Stammlösung die Bildung des Hydrolyseprodukts reduziert. Insbesondere Temperatur und Lösungsmittel spielen eine wichtige Rolle. Bei höheren Temperaturen entsteht mehr Hydrolyseprodukt. Außerdem ist MeCN* als Lösungsmittel bei höheren Temperaturen im Hinblick auf das Hydrolyseprodukt unvorteilhafter als DMF.

Auch die Bildung des Galliumkolloids ist von der Temperatur abhängig. Hier wurde beobachtet, dass niedrigere Temperaturen der Bildung des Kolloids vorbeugen.

*Dennoch wurde meistens MeCN verwendet, da bei Markierungsversuchen mit Protein die Verwendung von MeCN einen höheren Anteil an organischem Lösungsmittel erlaubt.

Als illustratives Beispiel folgt ein Versuch einer gezielten Hydrolyse der funktionellen Isothiocyanatgruppe. Eine NOTA-NCS-Lösung von 25 μl (135 nmol, Stammlösung: 3 mg NOTA-NCS/ml DMF) wurde mit 25 μl eines MeCN-Wasser-Gemischs (1:1) versetzt und 15 (bzw. 30) Minuten bei 90 °C und pH 4 erhitzt. Diese Konditionen sollten die Bedingungen der Markierungsreaktion (sowohl mit ^{68}Ga als auch mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex) simulieren. Anschließend wurden 10 μl der Reaktionslösung zur HPLC-Analyse injiziert (siehe Abbildung 4. 1).

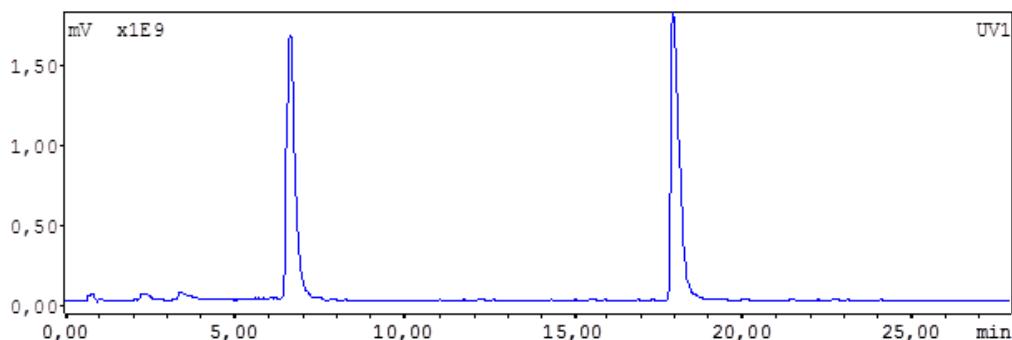


Abbildung 4. 1: UV-Chromatogramm der gezielten Hydrolyse von NOTA-NCS (15 Minuten, 90 °C, pH 4) bei Verwendung des Gradienten 1

Obiger Abbildung ist zu entnehmen, dass sich NOTA-NCS nach 15 Minuten Erhitzen bei 90 °C und pH 4 erheblich zersetzt. Bei ca. 6,5 Minuten befindet sich der Peak des NOTA-Hydrolyseprodukts. Bei ca. 18 Minuten befindet sich der Peak des NOTA-NCS. Nach 30 Minuten Erhitzen bei 90 °C und pH 4 wurde NOTA-NCS fast vollständig hydrolysiert (> 95%).

4.1.5 Trennmethode

R_f -Werte der Edukte in Dünnschichtchromatographie (iTLC) bei Verwendung des Fließmittels 0,9% NaCl

R_f von ^{68}Ga -NOTA-NCS

Diese Versuche erfolgten zur Bestätigung, dass ^{68}Ga -NOTA-NCS nicht wie markierte Chelator-Protein-Konjugate am Start des iTLC/DC-Streifens liegen bleibt ($R_f = 0$) und somit von markiertem Protein in der Ausbeutebestimmung unterscheidbar ist (siehe dazu auch Tabelle 4. 20 und Tabelle 4. 21).

NOTA-NCS (in DMF) wurde mit ^{68}Ga (ca. 300 MBq) für 15 Minuten bei 90 °C und pH 4 (eingestellt mit HEPES-Puffer) erhitzt. Diese Lösung wurde auf durch eine mit MeCN und

Wasser konditionierte C18-Kartusche gegeben und schrittweise zuerst mit 1M HCl, 10%iger MeCN-Wasser-Lösung und anschließend mit 50%iger MeCN-Wasser-Lösung eluiert (jeweils 0,5 ml).

Vom 50%igen MeCN-Wasser-Eluat wurde ein Aliquot der Lösung auf einen iTLC-Streifen aufgegeben und in 0,9% NaCl entwickelt. Danach wurde der Streifen bei $R_f \sim 0,5$ in zwei Teile geschnitten und im Gammacounter gemessen.

Sowohl ^{68}Ga -NOTA-NCS als auch Hydrolyseprodukt befanden sich auf dem oberen Abschnitt des iTLC-Streifens ($R_f > 0,5$). Somit sind sie eindeutig vom Protein unterscheidbar. Auf dem unteren Abschnitt ($R_f < 0,5$) befanden sich freies $^{68}\text{Gallium}$ und Galliumkolloid.

R_f von freiem $^{68}\text{Gallium}$

2 μl ^{68}Ga -Lösung (saures Eluat aus dem Generator, $^{68}\text{Ga}^{3+}$) wurden auf einen iTLC-Streifen aufgegeben und in 0,9% NaCl entwickelt. Der Streifen wurde bei $R_f \sim 0,5$ in zwei Teile geschnitten und im Gammacounter gemessen. Die gesamte Aktivität befand sich auf dem oberen Abschnitt ($R_f > 0,5$), d.h. dass es von markiertem Chelator-Protein-Konjugat unterschieden werden kann, da das Chelator-Protein-Konjugat sich von der Basislinie nicht wegbewegt ($R_f \sim 0$).

4.1.6 $^{68}\text{Galliumkolloid}$

Galliumkolloide sind große Moleküle, die leicht mit dem Protein bzw. Chelator-Protein-Konjugat verwechselt werden können, da sie sich in ihrem Verhalten auf der DC oder in Kartuschen ähneln. Daher wurde gezielt $^{68}\text{Galliumkolloid}$ hergestellt und das Verhalten beobachtet, um gute Trennmethode zu finden, die das Kolloid von dem Chelator-Protein-Konjugat unterscheidbar machen.

4.1.7 Herstellung von $^{68}\text{Galliumkolloid}$ und dessen Analyse mittels Size Exclusion Chromatographie (PD10-Säule) und Dünnschichtchromatographie (iTLC)

100 μl ^{68}Ga -Lösung (saures Eluat aus dem Generator, ca. 300 MBq) wurden mit 100 μl Natriumhydrogencarbonat, (50 mg Natriumhydrogencarbonat in 1 ml Wasser), auf einen basischen pH-Wert von 11 gebracht und anschließend 15 Minuten bei 90 °C erhitzt.

PD10-Säule: Ein Aliquot der Lösung wurde auf eine PD10-Säule aufgebracht und mit Wasser in 1 ml-Schritten eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden im Gammacounter oder Aktivimeter gemessen. Die Hauptaktivität (>90%) befand sich im ersten und zweiten Milliliter. Dies unterscheidet das Kolloid vom Chelator-Protein-Konjugat, da das Protein hauptsächlich im vierten Milliliter von der PD10-Säule eluiert wird (siehe Tabelle 4. 2 und Kapitel 4.6. 4).

iTLC: 2 µl der Reaktionsmischung wurden auf einen iTLC-Streifen aufgetragen und in 0,9% NaCl (Citratpuffer pH 5 oder in MeCN/Wasser 1:1) entwickelt. Anders als ^{68}Ga verblieb das Galliumkolloid immer am Start ($R_f \sim 0$). Damit war das Galliumkolloid mittels iTLC-Chromatographie schlecht vom Chelator-Protein-Konjugat zu unterscheiden, und es musste nach weiteren Trennmethoden gesucht werden.

4.1. 8 ^{68}Ga Galliumkolloid und dessen Verhaltens bei Sterilfiltration

Es wurde untersucht, ob Galliumkolloid mittels Sterilfiltration (0,22 µm) abfiltriert und somit abgetrennt werden kann (Proteine passieren 0,22 µm Filter). Dazu wurde Galliumkolloid in PBS-Puffer sterilfiltriert. Anschließend wurden Filter und Filtrat im Gammacounter gemessen. Dabei ergab sich, dass sich die Hauptaktivität (>98%) in der Lösung befand, sodass auch mit dieser Methode das Galliumkolloid nicht vom Protein unterschieden werden konnte.

4.1. 9 ^{68}Ga Galliumkolloid und dessen Analyse mittels Protein-beschichteten iTLC-Streifen

Eine erfolgreiche Trennung von Protein bzw. Chelator-Protein-Konjugat und Galliumkolloid konnte mithilfe einer mit HSA/0,9% NaCl beschichteten iTLC-Platte [Lit 81] erzielt werden.

Die Beschichtung und Trennung wurde folgenderweise durchgeführt:

iTLC-Streifen (Macherey & Nagel) wurden 30 Minuten lang in einer Lösung aus 5 mg Albumin (HSA) in 1 ml 0,9% NaCl gewässert. Anschließend wurden die beschichteten Streifen für kurze Zeit mit destilliertem Wasser gespült, getrocknet und bis zum Gebrauch bei 0-5 °C gelagert. Auf die beschichteten Streifen wurde ein Aliquot einer Reaktionsmischung, in der sich Galliumkolloid befand, aufgetragen und in Ethanol/Ammoniak/Wasser (2:1:5) entwickelt. Dabei blieb das Galliumkolloid ebenfalls wie freies ^{68}Ga am Start ($R_f \sim 0$) liegen. Zum Vergleich wurde eine ^{68}Ga -NOTA-Avidin-Lösung aufgetragen. Für das ^{68}Ga -markierte Protein ergab sich ein $R_f > 0,5$. Somit konnte Galliumkolloid von Chelator-Protein-Konjugat mit dieser Methode unterschieden werden.

4.1. 10 Analyse von ^{68}Ga -NOTA-NCS mittels Protein-beschichteten iTLC-Streifen

NOTA-NCS (in DMF) wurde mit ^{68}Ga (ca. 300 MBq) für 15 Minuten bei Raumtemperatur und pH 4 markiert. Die Lösung wurde auf einen mit HSA/0,9% NaCl behandelten iTLC-Streifen aufgetragen und in Ethanol/Ammoniak/Wasser (2:1:5) entwickelt. Der Streifen wurde bei $R_f \sim 0,5$ in zwei Teile geschnitten und im Gammacounter gemessen. ^{68}Ga -NOTA-NCS befand sich bei $R_f > 0,5$, genauso wie ^{68}Ga -NOTA-Protein-Konjugat. Das bedeutet, dass mit

dieser Methode nicht zwischen den beiden unterschieden werden konnte, somit wurde eine vorherige Trennung mithilfe einer PD10-Chromatographie notwendig.

Tabelle 4. 2: Zusammenfassung der Analyse der einzelnen Substanzen bei verschiedenen Trennmethode

Substanz	PD10-Säule ^a	iTLC ^b	beschichtete iTLC ^c	Sterilfilter
⁶⁸ Galliumkolloid	1.-2. ml	Unten	unten	geht durch
⁶⁸ Gallium	7.-9. ml	Oben	unten	geht durch
Chelator-Protein-Konjugat	3.-5. ml ^d	Unten	oben	geht durch
Chelator-NCS	5.-6. ml	Oben	oben	-
Hydrolyseprodukt	5.-6. ml	Oben	oben	-

^a Wasser

^b Citratpuffer (pH 5) oder 0,9% NaCl

^c Ethanol/Ammoniak/Wasser (2:1:5)

^d 4.ml = Hauptfraktion

4.1. 11 Herstellung von Al-¹⁸F-Komplex

Zur Herstellung des Al-¹⁸F-Komplexes wurde zunächst eine Aluminiumacetatlösung hergestellt (2mM Al³⁺-Lösung, pH~4,5; 0,468 mg AlCl₃·6 H₂O in 1 ml 0,1M Natriumacetatpuffer gelöst).

Zu 100 µl einer wässrigen ¹⁸F-Fluorid-Lösung (Aktivität von ca. 300 MBq) wurden 15-30 µl 2mM Aluminiumacetatlösung zugegeben. Die Reaktionszeit zur Bildung des Komplexes betrug 15-20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktionsausbeute wurde mittels Kartuschenaufreinigung sowie mittels DC-Chromatographie bestimmt. Während der Reaktionsoptimierung wurde festgestellt, dass die Reaktionsausbeute des Al-¹⁸F-Komplexes (ca. 70%) auch durch verlängerte Reaktionszeiten nicht gesteigert werden konnte.

4.1. 12 Analyse von freiem ¹⁸F-Fluorid mittels Size Exclusion Chromatographie (PD10-Säule)

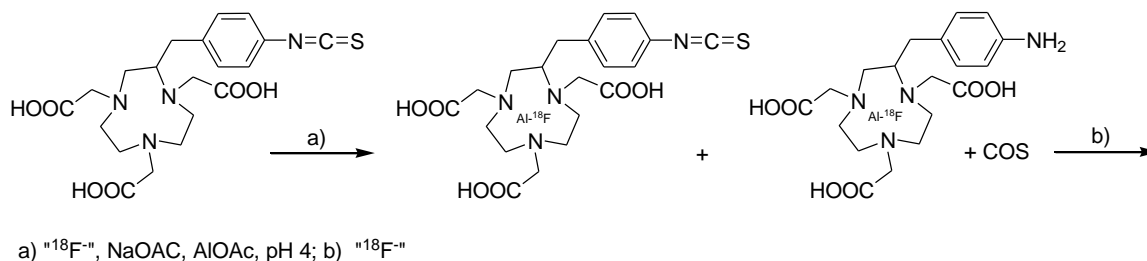
100 µl einer ¹⁸F-Fluorid-Lösung (Aktivität von ca. 3,6 MBq) wurden auf eine mit Wasser konditionierte PD10-Säule gegeben. Anschließend wurde mit Wasser in 1 ml-Schritten eluiert.

Tabelle 4. 3: Elution des freien ^{18}F -Fluorid von der PD10-Säule

Fraktion	Aktivität [MBq]
PD10-Säule vor der Elution	3,550
1. ml	---
2. ml	---
3. ml	---
4. ml	---
5. ml	0,003
6. ml	0,165
7. ml	1,174 (^{18}F -Fluorid)
8. ml	1,553 (^{18}F -Fluorid)
9. ml	0,420 (^{18}F -Fluorid)
10. ml	0,037
PD10-Säule nach der Elution	0,070

Wie erwartet wurde das freie ^{18}F -Fluorid von der PD10-Säule in den „späten“ Fraktionen (7-9. mL) eluiert. Dadurch, dass der Hauptanteil des Chelator-Protein-Konjugats in der 4. ml Fraktion eluiert wird, zeigt sich diese Methode für die Trennung bzw. Unterscheidung beiden Substanzen geeignet.

4.1. 13 Analyse einer Mischung von ^{18}F -Fluorid, $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex, $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -NOTA-NCS und $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -NOTA-Hydrolyseprodukt mittels Size Exclusion Chromatographie (PD10-Säule)



^{18}F -Fluorid-Lösung wurde zu $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex und $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -NOTA-NCS zugegeben, um zu beobachten, ob sich das Verhalten des freien ^{18}F -Fluorid auf der PD10-Säule verändert und die Elution dadurch beeinflusst wird.

NOTA-NCS (in DMF) wurde unter Zugabe von ^{18}F -Fluorid-Lösung (ca. 300 MBq) und 2 mM Aluminiumacetatpuffer bei pH 4 markiert. Die Markierung erfolgte durch 30 minütiges Erhitzen bei einer Temperatur von 90 °C. Danach wurde zusätzlich freies ^{18}F -Fluorid zugegeben und mittels DC-Chromatographie (Si60, MeCN/Wasser 1:1.) analysiert.

Tabelle 4. 4: DC-Chromatographie (Si60, MeCN/Wasser 1:1) einer Mischung von ^{18}F -Fluorid, $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex, $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -NOTA-NCS und $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -NOTA-Hydrolyseprodukt

DC Abschnitt	Aktivität [MBq]
Oben ($R_f > 0,5$) $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -NOTA-NCS / $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -NOTA-Hydrolyseprodukt*	0,43 (74,1%)
Unten ($R_f < 0,5$) $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex, ^{18}F -Fluorid	0,15 (25,9%)

*Zusätzlich nachgewiesen in der HPLC.

Danach wurde ein Teil der Lösung auf eine mit Wasser konditionierte PD10-Säule gegeben und mit Wasser eluiert. Die Aktivität in den aufgefangenen Fraktionen wurde im Aktivimeter gemessen (siehe Tabelle 4. 5).

Tabelle 4. 5: Analyse einer Mischung von ^{18}F -Fluorid, $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex, $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -NOTA-NCS und $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -NOTA-Hydrolyseprodukt mittels PD10-Chromatographie

Fraktion	Aktivität [MBq]	Substanz
PD10-Säule vor der Elution	4,835	
1 ml	---	
2 ml	---	
3 ml	---	
4 ml	0,005 (0,10%)	
5 ml	1,540 (31,9%)	NOTA-NCS, Hydrolyseprodukt
6 ml	1,997 (41,3%)	NOTA-NCS, Hydrolyseprodukt
7 ml	0,411 (8,5%)	^{18}F -Fluorid, $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex
8 ml	0,237 (4,9%)	^{18}F -Fluorid, $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex
9 ml	0,218 (4,5%)	^{18}F -Fluorid, $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex
10 ml	0,140 (2,9%)	^{18}F -Fluorid, $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex
PD10-Säule nach der Elution	0,203 (4,2%)	evtl. Reste von ^{18}F -Fluorid, $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex

$\text{Al-}^{18}\text{F}$ -NOTA-NCS und $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -NOTA-Hydrolyseprodukt befanden sich in der fünften und der sechsten Fraktion. Nach Auffangen dieser beiden Fraktionen wurde eine DC-Chromatographie (Si60, MeCN/Wasser 1:1) angefertigt. Die Aktivität befand sich auf dem oberen Abschnitt ($R_f > 0.5$), welche sowohl für das markierte Chelatisierungsagens als auch für das Hydrolyseprodukt charakteristisch ist. Außerdem wurde eine Probe mittels HPLC analysiert. Auch hier war der Aktivitätspeak des markierten NOTA-NCS bei 15 Minuten ebenso wie der Aktivitätspeak des markierten NOTA-Hydrolyseprodukts bei ca. 6,5 Minuten zu erkennen. In der siebten Fraktion befanden sich das freie ^{18}F -Fluorid sowie der $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex, ebenso wie in den Fraktionen acht, neun und zehn, wie mittels DC-Chromatographie ermittelt werden konnte.

4.1. 14 Verschiebung des radioaktiven Peaks des ^{18}F -Fluorid und $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplexes in der HPLC

Bei einer Retentionszeit von 2-3 Minuten findet sich ein Peak „freien“ Nuklids im radioaktiven Kanal der HPLC (Gradient 1). Ob es sich hierbei tatsächlich um freies ^{18}F -Fluorid oder um $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex oder möglicherweise um beides handelt, lässt sich feststellen, indem OSAP-Lösung als wässrige Phase des Fließmittels in der HPLC eingesetzt wird. Negative Ladung bleibt durch OSAP unbeeinflusst, positive Ladung wird neutralisiert.

In einem Markierungsversuch von NOTA-NCS mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex stellte sich heraus, dass die Radioaktivität, die normalerweise bei 2-3 Minuten in HPLC (bei Einsatz des Gradienten 1) zu beobachten ist, sich durch OSAP nun zu späteren Reaktionszeiten von etwa 10 Minuten verschiebt. Das liegt daran, dass OSAP ein lipophiles Ionenpaar mit dem positiv geladenen $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex bildet. Das bedeutet, dass es sich um den $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex handelt und nicht um freies ^{18}F -Fluorid, welches negativ geladen ist und daher kein Ionenpaar mit OSAP bildet.

4.1. 15 Analyse von ^{18}F -Fluorid und $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex mittels Dünnschichtchromatographie

Als Laufmittel für die DC-Chromatographie (Si60 oder iTLC) wurde MeCN gewählt. Zur Kontrolle wurde zunächst nur wässrige ^{18}F -Fluorid-Lösung aufgetragen und analysiert. Der DC-Streifen wurde dazu bei $R_f \sim 0,5$ in zwei Hälften geschnitten und im Gammacounter gemessen. Die gesamte Aktivität fand sich auf der unteren Hälfte des Streifens ($R_f < 0,5$). Analysiert man eine $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex-Lösung unter gleichen Bedingungen, wird ein fast identisches Verhalten beobachtet (siehe Tabelle 4. 6).

Tabelle 4. 6: Analyse von ^{18}F -Fluorid und $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex mittels DC-Chromatographie (Si60 oder iTLC, MeCN)

Substanz	Position auf der DC	R_f -Scanner
^{18}F -Fluorid	Unten	~0
$\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex	Unten	~0-0,2

Zwischen ^{18}F -Fluorid und $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex kann somit z.B. mittels C18-SepPak-Kartusche leicht und eindeutig unterschieden werden, da ^{18}F -Fluorid im Gegensatz zu $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex auf der Kartusche verbleibt.

4.1.16 Analyse von Al-¹⁸F-NOTA-NCS mittels C18-SepPak-Kartusche

Mit diesen Versuchen sollte ermittelt werden, ob Al-¹⁸F-NOTA-NCS von Al-¹⁸F-Komplex und von freiem ¹⁸F-Fluorid mittels C18-SepPak-Kartusche getrennt werden und somit analysiert werden kann.

NOTA-NCS (in DMF) wurde unter Zugabe von ¹⁸F-Fluorid-Lösung und 2mM Aluminium-acetatpuffer für 15 Minuten bei 90 °C und pH 4 erhitzt. Als Nachweis der erfolgreichen Reaktion und zur Ausbeutebestimmung wurde eine DC-Chromatographie (Si60) mit dem Fließmittel MeCN/Wasser (1:1) angefertigt. Die Aktivitäten der DC-Abschnitte wurden im Gammacounter gemessen. Ebenso wurde ein Aliquot der Lösung mittels C18-SepPak-Kartusche analysiert (siehe dazu Tabelle 4. 7, Tabelle 4. 20 und Tabelle 4. 21).

Tabelle 4. 7: Kartuschentrennung eines Al-¹⁸F-NOTA-NCS-Reaktionsgemisches

C18-SepPak-Kartusche	Aktivität auf der C18-Kartusche [MBq]	Substanz im Eluat	[%] im Eluat
vor der Elution	34,0 (100%)	Reaktionsmischung	100
Wasser (0,5 ml)	21,0 (61,8%)	Al- ¹⁸ F-Komplex	38,2
20% MeCN (0,5 ml)	19,8 (58,2%)	Al- ¹⁸ F-NOTA-Hydrolyseprodukt	3,6
50% MeCN (0,5 ml)	1,9 (5,6%)	Al- ¹⁸ F-NOTA-NCS	52,6

Durch Spülen mit Wasser wurde ungebundener Al-¹⁸F-Komplex von der C18-Kartusche eluiert. Eine DC-Chromatographie (Si60, MeCN/Wasser 1:1) dieser wässrigen Fraktion zeigte erwartungsgemäß Aktivität auf der unteren Hälfte ($R_f < 0.5$). Nach allen Spülgängen verblieb das freie ¹⁸F-Fluorid (5,6%) noch auf der C18-Kartusche. Durch HPLC-Analyse der einzelnen Fraktionen konnte nachgewiesen werden, dass in der 20%-MeCN/Wasser-Fraktion nur Al-¹⁸F-NOTA-Hydrolyseprodukt enthalten war, während in der 50%-MeCN/Wasser-Fraktion nur markiertes NOTA-NCS enthalten war. Damit konnte gezeigt werden, dass mittels einfacher SepPak-Kartuschentrennung markiertes NOTA-NCS von ¹⁸F-Fluorid und Al-¹⁸F-Komplex getrennt und unterschieden werden kann.

Darüber hinaus eignet sich die Methode zur Abtrennung des markierten Hydrolyseproduktes.

4.1. 17 Analyse von Al-¹⁸F-NOTA-NCS mittels Dünnschichtchromatographie

Von einer Al-¹⁸F-NOTA-NCS-Reaktionslösung wurde eine DC-Chromatographie (Si60, MeCN/Wasser 1:1) angefertigt. Tabelle 4. 8 listet die Positionen der Einzelbestandteile auf der DC-Platte auf.

Tabelle 4. 8: Position der radioaktiven Bestandteile auf der DC-Platte (Si60, MeCN/Wasser 1:1)

Substanz	Position auf der DC MeCN/Wasser 1:1	R _f
¹⁸ F-Fluorid	unten	<0.5
Al- ¹⁸ F-Komplex	unten	<0.5
Al- ¹⁸ F-NOTA-NCS	oben	>0.5
Al- ¹⁸ F-NOTA-Hydrolyseprodukt	oben	>0.5

Zwischen ¹⁸F-Fluorid/Al-¹⁸F-Komplex und Al-¹⁸F-NOTA-NCS/Al-¹⁸F-Hydrolyseprodukt kann somit leicht und eindeutig unterschieden werden.

4.1. 18 Analyse des Proteins in DMF und MeCN/Wasser-Gemisch

Bei welcher Konzentration organisches Lösungsmittel fällt das Protein aus?

Es ist bekannt, dass Proteine durch organische Lösungsmittel ausgefällt und denaturiert werden können. Im Folgenden sollte ermittelt werden, ob Protein, hier Albumin (HSA), durch die beiden organischen Lösungsmittel DMF bzw. MeCN bei Zugabe gleicher Volumina ausfällt.

Zu 300 µl HSA-Lösung (1 mg/ml) werden in 30 µl Schritten die organischen Lösungsmittel DMF bzw. MeCN zugegeben. Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 4. 9: Ausfällung des Proteins HSA in DMF und MeCN

Volumen [µl]	Volumen [%]	Zugabe DMF	Zugabe MeCN
30	~10	-	-
60	~15	-	-
90	~25	+	-
120	~30	+	-
150	~35	+	-
180	~40	+	+

+ HSA fällt aus, - HSA fällt nicht aus

Bei Zugabe von DMF ist das Protein bereits bei 90 µl, also zwischen 65 µl und 90 µl ausgefallen, das entspricht maximal 90 µl von 390 µl Wasser/DMF Lösung (300 µl davon ist Wasser) = 23% DMF. Bei MeCN ist das Protein erst bei Zugabe von 180 µl ausgefallen, somit fiel es zwischen 155 µl und 180 µl aus. Das macht einen Anteil von maximal 180 µl von 480 µl = 37,5%.

Dieses Ergebnis ist aussagekräftig nur für das Protein HSA mit seinem spezifischen Löslichkeitsverhalten.

4.1. 19 Möglichkeit der unspezifischen Einlagerung von ^{18}F -Fluorid durch das Protein

Bei der Elution des markierten Al- ^{18}F -NOTA-Protein-Konjugats mittels PD10-Chromatographie wurde festgestellt, dass das markierte Protein in den Fraktionen 3-5 zu finden ist (Fraktion 4 ist die Hauptfraktion). Die Tatsache, dass sich das Protein und Chelator-Protein-Konjugat nach der PD10-Chromatographie hauptsächlich in der 4. ml Fraktion befinden, wurde mittels MS (MALDI/TOF/TOF) nachgewiesen. Siehe dazu Kapitel 4.6. 4.

Mit den folgenden Versuchen sollte geprüft werden, ob eine radioaktive Fraktion in den 3.-5. ml eluiert werden kann, wenn man das Protein nicht mittels Chelator-NCS kovalent radioaktiv markiert, sondern ob das Protein in der Lage ist unspezifisch ^{18}F -Fluorid „einzulagern“. Dies würde unter Umständen falsche Ergebnisse der radioaktiven Markierung vortäuschen.

Zu 300 μl wässriger BSA-Lösung (1 mg/ml) wurden ^{18}F -Fluorid und 0,1M Natriumacetatlösung gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur und pH 4 wurde die Mischung mittels PD-Chromatographie analysiert (siehe Tabelle 4. 10).

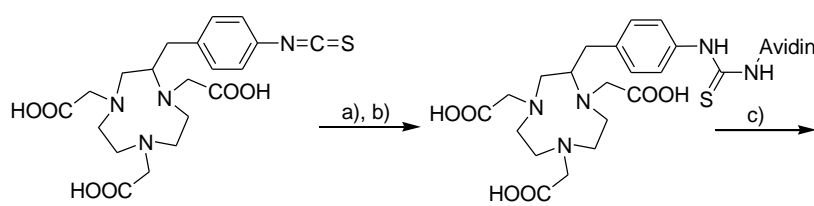
Tabelle 4. 10: Analyse der Protein-Lösung in Gegenwart von ^{18}F -Fluorid mittels PD10-Chromatographie

Fraktion	Aktivität [MBq]
PD10-Säule vor der Elution	5,712
1. ml	---
2. ml	---
3. ml	---
4. ml	---
5. ml	0,019
6. ml	0,058
PD10-Säule nach der Elution	5,626

Obige Tabelle verdeutlicht, dass der größte Anteil an Aktivität nach Elution der ersten sechs Milliliter noch auf der PD10-Säule verblieb. Diese Aktivität entspricht freiem ^{18}F -Fluorid bzw. Al- ^{18}F -Komplex. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Gefahr der unspezifischen Fluorideinlagerung durch das Protein vernachlässigbar klein ist.

Dieser Versuch wurde sowohl mit Avidin als auch mit Annexin V wiederholt.

4.1. 20 Analyse des ^{18}F -Fluorid mittels SEC-Säule in der HPLC



a) Avidin, DMF, H_2O ; b) PD10-Säule; c) Al- ^{18}F -Markierung

Avidin wurde mit NOTA-NCS 24 Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Anschließend wurde diese Lösung mittels PD10-Chromatographie im Wasser getrennt. Die 4. ml Fraktion (Proteinfraktion) wurde unter Zugabe von ^{18}F -Fluorid und 2mM Aluminiumacetatpuffer 60 Minuten bei Raumtemperatur und pH 4 inkubiert.

10 μl der Lösung wurden mittels HPLC (SEC-Säule, SEC-s2000, 500-100,000 Da, 5 μm , 145 \AA , pH Range: 2.5 - 7.5) analysiert - Fließmittel Natriumphosphatpuffer (pH 7, Flow von 1 ml/min).

Avidin selbst wurde bei einer Retentionszeit von 10-12 Minuten eluiert. Das freie ^{18}F -Fluorid ließ sich in der SEC-HPLC-Säule nicht finden, obwohl es in der Reaktionslösung mittels PD10-Chromatographie nachgewiesen wurde.

4. 2 Markierung der Chelatisierungsagenzien mit den Radionukliden ^{68}Ga Gallium sowie ^{18}F -Fluorid

Zur Validierung der Methodik sollte die Markierung der verschiedenen Chelatoren unter variierenden Bedingungen wie unterschiedliche Konzentrationen, pH-Werte, Temperaturen und Pufferlösungen vollzogen werden.

^{68}Ga Gallium ist ein etabliertes Isotop zur Markierung von Peptiden. In dieser Arbeit wurde es verwendet, um Vergleiche zu generieren, die hinsichtlich der Markierung mit Al- ^{18}F -Komplex von Nutzen sind.

4.2.1 Markierung mit ^{68}Ga

^{68}Ga wurde aus dem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator (IDB Holland) mit 2 ml 0,6 N HCl eluiert. Das Eluat ist sofort gebrauchsfertig.

3 mg der verschiedenen Chelator-NCS-Derivate (5,4 μmol NOTA-NCS, 4,7 μmol PCTA-NCS, 4,4 μmol DOTA-NCS, 5,0 μmol oxo-DO3A-NCS) wurden in 1 ml DMF gelöst. Zu 10-35 μl der in DMF gelösten Verbindung (53-185 nmol Chelator-NCS) wurden 200 μl des sauren $^{68}\text{Ga}^{3+}$ -Eluats mit einer Aktivität von ca. 300 MBq und ca. 110 μl HEPES-Puffer (4,8 g HEPES ad 10 ml H_2O) zur Einstellung eines pH-Wertes von pH 3,5-4 gegeben. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur 15 Minuten lang.

Die Optimierungsreaktionen zeigten, dass bei der ^{68}Ga -Markierung sehr hohe radiochemische Ausbeuten erzielt werden können (von > 90 %). Die Bestimmung der Ausbeuten erfolgte mittels HPLC-Chromatographie und Dünnschichtchromatographie.

Die Detektion der Radioaktivität erfolgte mittels eines Radiodetektors im Falle des HPLC-Systems oder eines Gammacounters bzw. eines Radiodünnschichtscanners im Falle der Dünnschichtchromatographie.

In Abbildung 4. 2 ist ein beispielhaftes Chromatogramm des Reaktionsgemisches mit NOTA-NCS dargestellt.

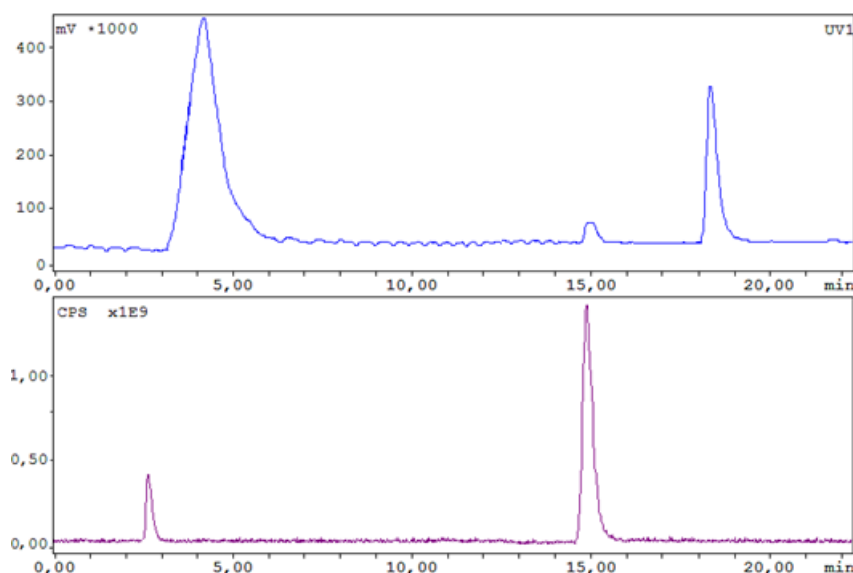


Abbildung 4. 2: ^{68}Ga -Markierung von NOTA-NCS bei Raumtemperatur

Oben: Detektion im UV-Kanal: der Peak bei ca. 18,5 Minuten zeigt NOTA-NCS. Bei ca. 15 Minuten liegt der Peak des Anteils an NOTA-NCS, der wahrscheinlich durch metallische

Verunreinigung in der Lösung gebildet wird. Das Signal bei ca. 4 Minuten wird durch DMF verursacht.

Unten: Detektion im Radiokanal: der Peak bei ca. 15 Minuten zeigt ^{68}Ga -NOTA-NCS, bei ca. 3,5 Minuten eluiert freies ^{68}Ga llium.

4.2.2 Optimierung der ^{68}Ga -Markierung

Bei der Markierungsreaktion der Chelatisierungsagenzien spielen verschiedene Parameter eine wichtige Rolle, z.B. die eingesetzte Stoffmenge des Chelatisierungsagenzes, der pH-Wert der zu markierenden Lösung und die Reaktionstemperatur.

Um die Markierungsreaktion zu optimieren, wurden diese Parameter verändert, dabei war immer nur einer der zu untersuchenden Parameter variabel, die anderen blieben konstant.

pH-Abhängigkeit

Zur Optimierung des pH-Wertes wurde eine konstante Chelatisierungsagenz-Stoffmenge von 132 nmol, eingesetzt. Bei weiteren Versuchen, mit PCTA-NCS, wurde die Chelatisierungsagenz-Stoffmenge auf 26 nmol reduziert.

Die Markierungsreaktionen erfolgten 15 Minuten bei 90 °C. Der jeweilige pH-Wert wurde mit HEPES-Puffer bzw. mit 3m Ammoniumacetatpuffer eingestellt.

Tabelle 4. 11: Radiochemische Ausbeuten (RA) der ^{68}Ga -Markierung von ausgewählten Chelatisierungsagenzien bei Veränderung des pH-Wertes

pH-Wert	NOTA-NCS (132 nmol)* RA [%]	oxo-DO3A-NCS (132 nmol)* RA [%]	PCTA-NCS (132 nmol)* RA [%]	PCTA-NCS (26 nmol)* RA [%]
2	-	-	-	nicht untersucht
2,5	25	19	25	nicht untersucht
3	79	71	80	78
3,5	92	79	90	nicht untersucht
4	90	84	91	80
4,5	81	73	85	nicht untersucht
5	60	55	64	57
5,5	49	42	42	nicht untersucht

* Stammlösung 3 mg/ml

Das Maximum der radiochemischen Ausbeute von NOTA-NCS und PCTA-NCS wird bei pH-Werten von 3,5 – 4 erreicht. Eine gute Ausbeute bei pH 4 konnte auch für oxo-DO3A-NCS beobachtet werden. In weiteren Versuchen mit PCTA-NCS (26 nmol) wurde die höchste Ausbeute ebenfalls bei pH 4 erzielt. Im Allgemeinen konnte festgestellt werden, dass sich die radiochemische Ausbeute in anderen pH-Bereichen stark verringert.

Bei den Restaktivitäten handelte es sich um ^{68}Ga llium, Galliumkolloid bzw. um Chelator-Hydrolyseprodukt. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte mittels Radio-HPLC und durch Analyse einer C18-SepPak-Kartusche zur Absicherung des Ergebnisses.

Stoffmengeabhängigkeit

Unter konstanten Reaktionsbedingungen (15 Minuten, 90 °C, pH 4) wurde die radiochemische Ausbeute bei Einsatz von Chelatisierungsagens-Stoffmengen von 53 nmol bis 185 nmol untersucht.

Tabelle 4. 12 gibt die radiochemische Ausbeute der Markierungsreaktion bei Veränderung der Chelatisierungsagens-Konzentration wieder.

Tabelle 4. 12: Radiochemische Ausbeute (RA) der ⁶⁸Ga-Markierung von ausgewählten Chelatisierungsagenzien bei Veränderung der Stoffmenge

Chelatisierungsagens-Stoffmenge [nmol]*	NOTA-NCS RA [%]	oxo-DO3A-NCS RA [%]	PCTA-NCS RA [%]	DOTA-NCS RA [%]
53	84	79	84	79
79	87	81	87	82
106	92	83	90	85
132	95	84	91	89
159	97	89	93	91
185	-	94	94	-

* Stammlösung 3 mg/ml

Die obige Tabelle zeigt, dass mit Erhöhung der eingesetzten Chelatisierungsagens-Stoffmenge die radiochemische Ausbeute steigt. Ab etwa 100 nmol hat man fast eine optimale Stoffmenge zur Markierung erreicht. Für alle Chelatisierungsagenzien wurde ein etwa gleiches Konzentrationsverhalten beobachtet.

Markierung bei Raumtemperatur (20 °C)

Dass die ⁶⁸Ga-Markierung der untersuchten Chelatisierungsagenzien auch bei Raumtemperatur [Lit 74, Lit 17] gelingt, wurde mittels folgenden Versuchs demonstriert. Die Durchführung bei Raumtemperatur hat die Vorteile, dass die Bildung des Chelator-Hydrolyseprodukts und des ⁶⁸Galliumkolloids weitgehend unterbunden wird. Bei höheren als physiologischen Temperaturen würden Proteine denaturieren, sodass ein Verlust der biologischen Aktivität befürchtet werden muss.

Die Markierung von NOTA-NCS und PCTA-NCS erfolgte unter konstanten Bedingungen. Die Reaktionsdauer betrug 15 Minuten und lief bei einem pH-Wert von 4. Dabei konnte eine radiochemische Ausbeute von über 80% erreicht werden.

Einen Vergleich der Ergebnisse der Markierung mit ⁶⁸Gallium bei Raumtemperatur und bei 90 °C gibt Tabelle 4. 13 wieder.

Tabelle 4. 13: Zusammenfassung der Ausbeutenbestimmung des ^{68}Ga -Chelator-NCS bei Raumtemperatur und 90 °C im Vergleich (15 Minuten, pH 4)

Chelator-NCS (26 nmol)*	Markierungstemperatur	Radiochemische Ausbeute [%]
PCTA-NCS	Raumtemperatur	80
PCTA-NCS	90 °C	80
NOTA-NCS	Raumtemperatur	82
NOTA-NCS	90 °C	82

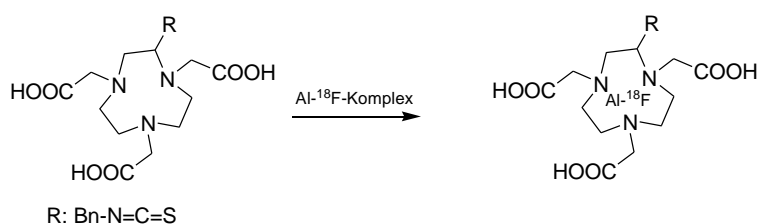
* Stammlösung 3 mg/ml

Zusammenfassung der ^{68}Ga -Markierung

Bezogen auf die Zielreaktion mit dem Protein Annexin V kann zusammengefasst werden, dass der optimale pH-Wert für die Markierung von NOTA-NCS bei 3,5-4 liegt. Die Markierungsreaktion bei Raumtemperatur liefert nach 15 Minuten genauso gute Ergebnisse wie bei 90 °C mit einer radiochemischen Ausbeute von über 90% bei Einsatz von 106 nmol NOTA-NCS. Auch die Markierung der anderen Chelatisierungsagenzien erreichen Ausbeuten von 83% bis 90%, jedoch bei einer Markierungstemperatur von 90 °C bei Einsatz von 106 nmol Chelator-NCS.

4.2.3 Markierung mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex

Die Ausbeutebestimmungen bei Verwendung des $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplexes und mittels HPLC-Analyse beziehen sich immer nur auf den freien $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Anteil und muss ggf. um freies ^{18}F -Fluorid korrigiert werden, da es auf der HPLC-C18-Säule bleibt und somit nicht bestimmt wird. Im Falle der Analytik mittels C18-SepPak-Kartusche bezieht sich die radiochemische Ausbeute sowohl auf das freie ^{18}F -Fluorid als auch auf den $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex, da hier die Aktivität, die auf der Kartusche verbleibt, gemessen werden konnte.



Zur Markierung der Chelatisierungsagenzien mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex wurden zu 100 μl ^{18}F -Fluorid-Lösung 2mM Aluminiumacetatpuffer (2,5–17,5 nmol Al^{3+}) und Chelator-NCS (53–185 nmol) gegeben. Der durch den Aluminiumacetatpuffer, Ammoniumacetatpuffer und Natriumcitratpuffer eingestellte pH-Wert betrug 4. Die Markierungsreaktion erfolgte bei einer Temperatur von 90 °C für 15 Minuten.

Tabelle 4. 14: Chelatisierungsagens-Markierung mit Al-¹⁸F-Komplex in verschiedenen Puffern bei Einsatz von Chelatisierungsagens-Stoffmengen von 53 bis 185 nmol

Chelatisierungsagens	Aluminiumacetatpuffer	Ammoniumacetatpuffer	Natriumcitratpuffer
NOTA-NCS	+	-	-
PCTA-NCS	-	-	-
DOTA-NCS	-	-	-
oxo-DO3A-NCS	-	-	-

+ = erfolgreiche Markierung, - = keine erfolgreiche Markierung

Eine Markierung mit Al-¹⁸F-Komplex gelang unter Einsatz verschiedener Puffer und verschiedener Chelatisierungsagens-Stoffmengen nur bei Verwendung des NOTA-NCS und Aluminiumacetatpuffers [Lit 60, Lit 61].

Al³⁺- bzw. Chelatisierungsagens-Konzentrationsabhängigkeit (Al-¹⁸F-Markierung)

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss des Puffers auf die Reaktionsausbeute untersucht. Dazu wurden unter sonst konstanten Bedingungen (Markierung 15 Minuten, 90 °C, pH 4) die Volumina der Zugabe von 2mM Aluminiumacetatpuffer variiert. Die Chelatisierungsagens-Stoffmenge von NOTA-NCS betrug 106 nmol (Stammlösung: 3 mg/ml).

Tabelle 4. 15: Al³⁺-Konzentrationsabhängigkeit der Markierung von NOTA-NCS mit Al-¹⁸F-Komplex

Zugabe / Stoffmenge Al ³⁺ [nmol]*	Radiochemische Ausbeute [%]
2,5	60
5	75,9
7,5	77,9
10	80,8
12,5	78,8
15	88,2
* Stammlösung: 0,468 mg AlCl ₃ ·6H ₂ O in 1 ml 0,1M Natriumacetatpuffer.	

Mit steigender Aluminiumkonzentration erhöht sich die radiochemische Ausbeute, welche bei ca. 10-15 nmol Al³⁺ fast ein Maximum erreicht.

In einer weiteren Versuchsreihe zur Optimierung der Reaktionsbedingungen (angesetzte Stoffmenge an NOTA-NCS) wurde die NOTA-NCS-Konzentration variiert (Markierung 15 Minuten, 90 °C, pH 4).

Tabelle 4. 16: Radiochemische Ausbeute (RA) der Al-¹⁸F-Markierung bei Konzentration von 3-20 nmol Al³⁺ und Veränderung der Konzentration des Chelatisierungs-agenzes

NOTA-NCS [nmol]**	RA in [%] (3 nmol Al ³⁺)*	RA in [%] (5 nmol Al ³⁺)*	RA in [%] (7,5 nmol Al ³⁺)*	RA in [%] (10 nmol Al ³⁺)*	RA in [%] (15 nmol Al ³⁺)*	RA in [%] (20 nmol Al ³⁺)*
5,3	36	-	-	-	-	-
7,9	37	-	-	-	-	-
10,6	40	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	43
15,9	41	-	-	-	-	-
26	43	-	-	-	53	63
40	-	-	-	-	-	67
53	-	49	53	59	59	69
79	-	72	74	76	77	-
92	-	-	-	-	-	75
106	-	76	78	80	88	79
132	-	78	80	83	88	80
159	-	79	82	85	-	-

* Stammlösung: 0,468 mg AlCl₃·6H₂O in 1 ml 0,1M Natriumacetatpuffer

**Stammlösung: 3 mg/ml

Die radiochemische Ausbeute erhöht sich mit der Konzentration des Chelatisierungs-agenzes. Die maximalen radiochemischen Ausbeuten wurden ab Konzentration 106 nmol erzielt.

Abbildung 4. 3 zeigt beispielhaft die Markierung von NOTA-NCS mit Al-¹⁸F-Komplex bei Einsatz der Parameter 10 nmol Al³⁺ und 106 nmol NOTA-NCS.

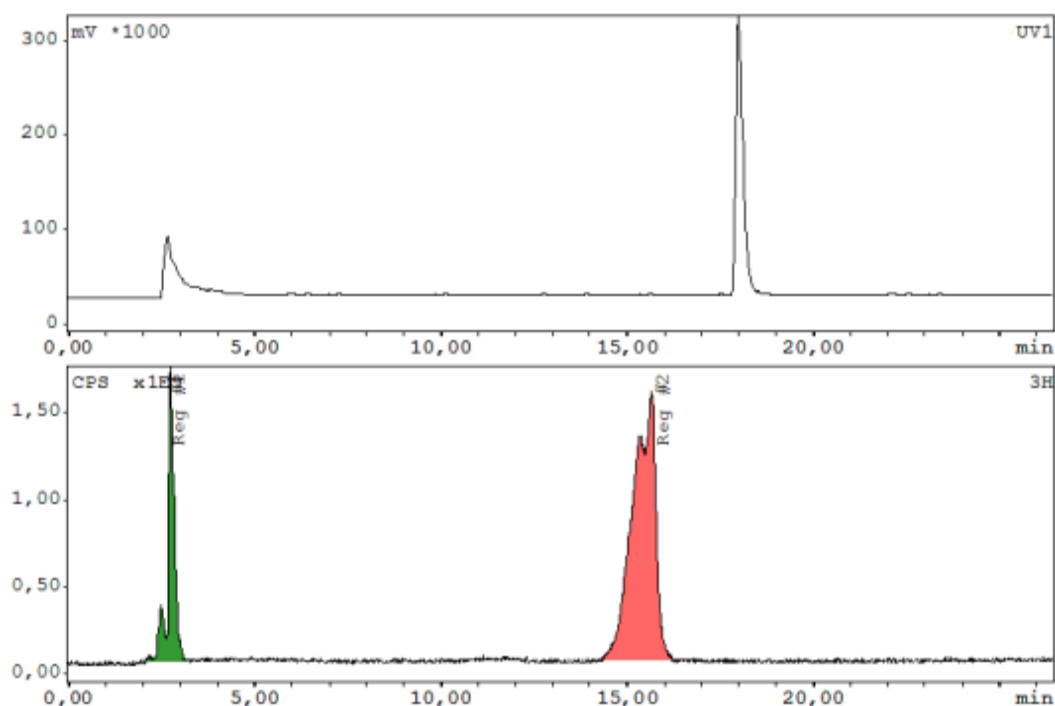


Abbildung 4. 3: Al-¹⁸F-Markierung von NOTA-NCS (15 Minuten, 90 °C, pH 4)

Oben: Detektion im UV-Kanal: bei ca. 18 Minuten eluiert NOTA-NCS. Das Signal bei ca. 3 Minuten wird durch Lösungsmittel verursacht.

Unten: Detektion im Radiokanal: bei ca. 15 Minuten wird $\text{Al-}^{18}\text{F-NOTA-NCS}$ eluiert, bei ca. 3 Minuten der freie $\text{Al-}^{18}\text{F-Komplex}$.

pH-Abhängigkeit der $\text{Al-}^{18}\text{F-NOTA-NCS}$ -Markierung

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes der Markierungsreaktion von $\text{Al-}^{18}\text{F-Komplex}$ und NOTA-NCS wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der alle Bedingungen konstant gehalten und nur der pH-Wert variiert wurde.

Dabei wurden pH-Werte von 2 bis 5 untersucht. Die Markierungstemperatur war $90\text{ }^\circ\text{C}$ bei einer Reaktionsdauer von 15 Minuten. Die eingesetzte Stoffmenge an NOTA-NCS betrug 106 nmol und 10 nmol an Al^{3+} .

Der Einfluss des pH-Wertes auf die radiochemische Ausbeute ist in der Tabelle 4. 17 dargestellt.

Tabelle 4. 17: Radiochemische Ausbeute des $\text{Al-}^{18}\text{F-NOTA-NCS}$ bei Veränderung des pH-Wertes (106 nmol* NOTA-NCS, 10 nmol Al^{3+} , 15 Minuten, $90\text{ }^\circ\text{C}$)**

pH-Wert	Radiochemische Ausbeute [%]
2	0
3,5	65
4	81
4,5	77
5	68
5,5	65

* Stammlösung: 3 mg/ml

** Stammlösung: 0,468 mg $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in 1 ml 0,1M Natriumacetatpuffer

Der optimale pH Wert für die Markierung von NOTA-NCS mit $\text{Al-}^{18}\text{F-Komplex}$ liegt bei 4.

Abbildung 4. 4 zeigt ein beispielhaftes Chromatogramm einer $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Markierung von NOTA-NCS (106 nmol NOTA-NCS, 10 nmol Al^{3+} , $90\text{ }^\circ\text{C}$, 15 Minuten, pH 4).

Experimentelles

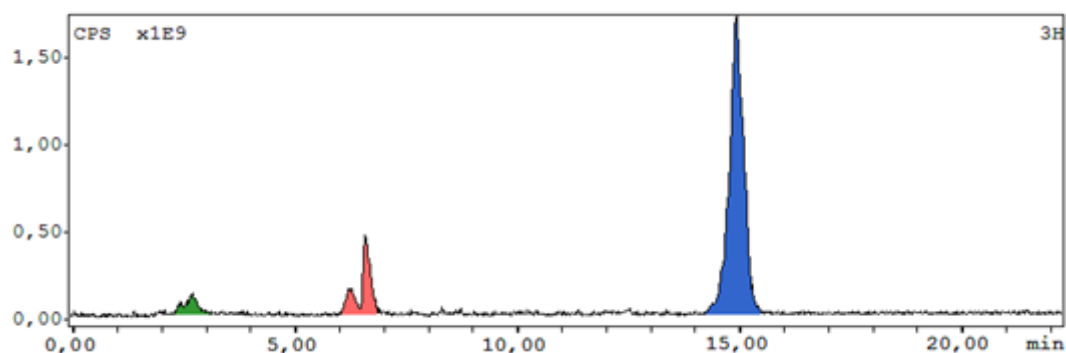


Abbildung 4. 4: Markierung von NOTA-NCS mit Al-¹⁸F-Komplex, pH 4, 90 °C, 15 Minuten

Radio-Kanal: Bei ca. 2,5 Minuten wird Al-¹⁸F-Komplex (4,3%) eluiert, bei ca. 6,5 Minuten findet sich Al-¹⁸F-NOTA-Hydrolyseprodukt (15,1%), und bei ca. 15 Minuten wird Al-¹⁸F-NOTA-NCS (80,6%) eluiert.

Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von Temperatur und Reaktionsdauer

In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob die Al-¹⁸F-Markierung von NOTA-NCS auch bei niedrigeren Temperaturen gute Ausbeuten liefern kann.

Diese Untersuchung wurde insbesondere deswegen durchgeführt, da Proteine keiner hohen Temperatur ausgesetzt werden können und 40 °C möglichst nicht überschritten werden sollten. Die Al-¹⁸F-Markierungen wurden hier bei einer Reaktionsdauer von 15 Minuten bis 90 Minuten variiert. Die Ausbeutebestimmung des Al-¹⁸F-NOTA-NCS erfolgte durch Analytik mittels C18-SepPak-Kartusche.

Tabelle 4. 18: Radiochemische Ausbeute von Al-¹⁸F-NOTA-NCS bei 40 °C (106 nmol* NOTA-NCS, 7,5 nmol Al³⁺, pH 4)**

Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
15	55
30	85
45	93
60	97
75	99
90	99

* Stammlösung: 3 mg/ml

** Stammlösung: 0,468 mg AlCl₃·6H₂O in 1 ml 0,1M Natriumacetatpuffer

Die Markierung bei 40 °C ergibt nach 15 Minuten Reaktionszeit eine Ausbeute von 55%. Mit Verlängerung der Reaktionsdauer erhöht sich auch die Ausbeute. Eine sehr gute Ausbeute wird schon nach 30 Minuten erreicht. Eine fast quantitative Umsetzung wurde ab

Experimentelles

Reaktionszeiten von ~45 Minuten erreicht. Hinsichtlich der relativ kurzen Halbwertszeiten des ^{18}F -Fluorids (109 min.) erscheinen die Reaktionszeiten von etwa 30-45 Minuten optimal.

Zum Vergleich folgt eine Tabelle, welche die Temperaturabhängigkeit der Reaktion verdeutlicht. Bei einer Reaktionsdauer von 45 Minuten und einer Zugabe von 5 nmol Al^{3+} bei Einsatz von 106 nmol NOTA-NCS wurde die Temperatur von 40-80 °C variiert.

Tabelle 4. 19: Radiochemische Ausbeute von $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -NOTA-NCS in Abhängigkeit von der Temperatur (106 nmol* NOTA-NCS, 5 nmol Al^{3+} , pH 4)**

Reaktionsdauer	Temperatur	Radiochemische Ausbeute [%]
45 Minuten	80 °C	93
	70 °C	91
	60 °C	90
	40 °C	88

* Stammlösung: 3 mg/ml

** Stammlösung: 0,468 mg $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in 1 ml 0,1M Natriumacetatpuffer

Der Einfluss der Temperatur macht sich bei der relativ hohen Konzentration von ~100 nmol an NOTA-NCS nur geringfügig bemerkbar. So wurden bei 40 °C noch Ausbeuten von über 80% erzielt.

Zusammenfassung der $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Markierung

Bezogen auf die Zielreaktion mit dem Protein Annexin V kann zusammengefasst werden, dass der optimale pH-Wert für die Markierung von NOTA-NCS bei 4 liegt. Die Reaktion lieferte bei einer Temperatur von 40 °C nach einer Markierungsdauer von 30 Minuten gute radiochemische Ausbeuten von über 80%. Weiterhin erreichte man mit 10 nmol Al^{3+} auch noch eine Ausbeute über 80%. Dabei spielte das Verhältnis Stoffmenge Al^{3+} zu Stoffmenge Chelatisierungsagens eine große Rolle. Bei niedrigeren NOTA-Konzentrationen ab 26 nmol konnten radiochemische Ausbeuten von etwa 60% erreicht werden.

4. 3 Zusammenfassung der Dünnschichtanalytik auf unterschiedlichen DC-Platten in verschiedenen Fließmitteln

In dieser Versuchsreihe wurden verschiedene bifunktionelle Chelatisierungsagenzien mit ^{68}Ga Gallium und zusätzlich NOTA-NCS mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex markiert und die einzelnen Edukte sowie die Produkte hinsichtlich ihres Laufverhaltens auf unterschiedlichen Dünnschichtmaterialien und in verschiedenen Fließmitteln untersucht.

Tabelle 4. 20 gibt die Positionen auf den Dünnschichtplatten wieder.

Tabelle 4. 20: Laufverhalten aller Bestandteile, Edukte und Produkte auf verschiedenen Platten und in verschiedenen Laufmitteln

Platte	⁶⁸ Ga ³⁺	¹⁸ F ⁻	Al- ¹⁸ F-Komplex	Hydrolyseprodukt ^{d)}	Chelator-NCS	Chelator-Amin-Konjugat	Chelator-Protein-Konjugat	⁶⁸ Ga-Kolloid
DC ^{a)} MeCN/H ₂ O 1:1	oben	Unten	unten	Oben	oben	oben	unten	Unten
iTLC ^{b)} MeCN/H ₂ O 1:1	unten			Oben	oben	oben		
GF-DC ^{c)} MeCN/H ₂ O 1:1	unten						unten	Unten
DC Citratpuffer pH 5	oben							
iTLC Citratpuffer pH 5	oben	Unten	oben	Oben	oben	oben	unten	Unten
GF-DC Citratpuffer pH 5	unten						unten	Unten
iTLC 0.9% NaCl	oben	Unten	unten	Oben	oben	oben	unten	Unten
HSA/0.9% NaCl iTLC ^{e)} EtOH/NH ₃ /H ₂ O 2:1:5	unten			Oben	oben		oben	Unten

^{a)} Klassische Dünnschichtplatte, beschichtet aus einer Kombination aus Silicagel 60 und einem Polymer Bindemittel.

^{b)} Instant Thin Layer Chromatography, ein bindemittelfreies Glasmikrofaser Chromatographie Papier, imprägniert mit Silicagel.

^{c)} Verwendet zur Unterscheidung zwischen markiertem Chelator-Protein und Galliumkolloid. Muster von Macherey & Nagel, bessere Trenneigenschaften, ähnlich der iTLC.

^{d)} Das Hydrolyseprodukt verhält sich auf den verschiedenen Platten genau wie der Chelator-NCS. Daher ist eine Unterscheidung nur durch eine Trennung mittels C18-Kartusche oder PD10-Säule möglich.

^{e)} iTLC-Platte wurde mit HSA/NaCl (0,9%) beschichtet. Die Trennung erfolgt mittels Ethanol/Ammoniak/Wasser im Verhältnis 2:1:5.

Tabelle 4. 21 gibt die Informationen über Elution von PD10-Säulen bzw. C18-SepPak Kartuschen und C18-HPLC-Säulen wieder.

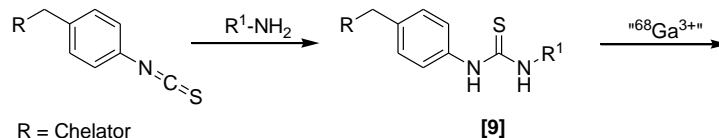
Tabelle 4. 21: Elution aller Bestandteile, Edukte und Produkte von der PD10-Chromatographie bzw. C18-SepPak-Kartusche und C18-HPLC

Trennmethode	⁶⁸ Ga ³⁺	¹⁸ F ⁻	Al- ¹⁸ F-Komplex	Hydrolyseprodukt	Chelator-NCS	Chelator-Amin-Konjugat	Chelator-Protein-Konjugat	⁶⁸ Ga-kolloid
PD10-Säule ^{a)}	7.-9.ml	7.-9.ml	7.-9.ml	5.-6.ml	5.-6.ml	5.-6.ml	3.-5.ml	1.-2.ml
C18-Seppak Kartusche	H ₂ O oder Citratpuffer pH 5	nicht eluierbar	H ₂ O	10-20% MeCN	50% MeCN	40-60% MeCN	nicht eluierbar	nicht eluierbar
HPLC, C18-Säule	2 min	nicht eluierbar	2 min	6,5 min	15 min	je nach Amin	nicht eluierbar	nicht eluierbar

^{a)} Als Elutionsmittel wurde Wasser oder 0,9% NaCl verwendet.

4.4 Herstellung von Chelator-Amin-Konjugaten

Konjugate mit den einfachen Aminen *n*-Butylamin und Dibutylamin wurden zunächst als Modellverbindung hinsichtlich der Optimierung der Reaktion mit dem Protein Annexin V untersucht.



Dazu wurden ein primäres Amin (*n*-Butylamin) bzw. ein sekundäres Amin (Dibutylamin) gewählt, welche in der Lage sind, mit der Isothiocyanatgruppe des Chelatisierungsagences zu reagieren. Die Amine bilden mit der Isothiocyanatgruppe des Chelatisierungsagences die entsprechenden Thioharnstoffderivate. Dabei wurden die Reaktionen mit NOTA-NCS, PCTA-NCS und oxo-DO3A-NCS durchgeführt. Die Thioharnstoffderivate wurden dann mit ⁶⁸Gallium markiert.

Tabelle 4. 23 stellt die angesetzten Mengen an Chelator-NCS dar.

Tabelle 4. 22: Angesetzte Mengen an Chelator-NCS zur Bildung der Chelator-Amin-Konjugate

Stammlösung [3 mg/ml DMF oder MeCN]	Angesetzte Menge an Chelator-NCS [nmol]
NOTA-NCS (5.4 µmol)	135
PCTA-NCS (4.7 µmol)	117
oxo-DO3A-NCS (5.0 µmol)	125

Folgende Chelator-Amin-Verhältnisse wurden eingesetzt (siehe Tabelle 4. 23). Der Nachweis der radiochemischen Ausbeute erfolgte mittels HPLC-Analytik bzw. Dünnschichtchromatographie.

Tabelle 4. 23: Radiochemische Ausbeute des ⁶⁸Ga-Chelator-Amin-Konjugats, vorbereitet in verschiedenen Verhältnissen (Kopplung: 60 Min., RT, pH 8,5; Markierung: 15 Min., 90 °C, pH 4)

Chelator-Amin-Konjugat	Chelatisierungsagens: Amin		
	1:1	1:2	2:5
	Radiochemische Ausbeute [%]		
PCTA-Dibutylamin	79 %	85 %	90 %
NOTA-Dibutylamin	86 %	85 %	93 %
oxo-DO3A-Dibutylamin	81 %	83 %	88 %
PCTA- <i>n</i> -Butylamin	83 %	84 %	89 %
NOTA- <i>n</i> -Butylamin	85 %	85 %	92 %
oxo-DO3A- <i>n</i> -Butylamin	79 %	83 %	88 %

In der obigen Tabelle sind die jeweils erzielten radiochemischen Ausbeuten dargestellt. Es konnten gute bis sehr gute radiochemische Ausbeuten erzielt werden. Als hauptsächliche

Experimentelles

Nebenprodukte wurden freies ^{68}Ga bzw. Galliumkolloid und Chelator-Hydrolyseprodukt beobachtet.

In der folgenden Abbildung sind beispielhafte Radiochromatogramme des ^{68}Ga -NOTA-NCS, ^{68}Ga -NOTA-*n*-Butylamin-Konjugats und ^{68}Ga -NOTA-Dibutylamin-Konjugats dargestellt.

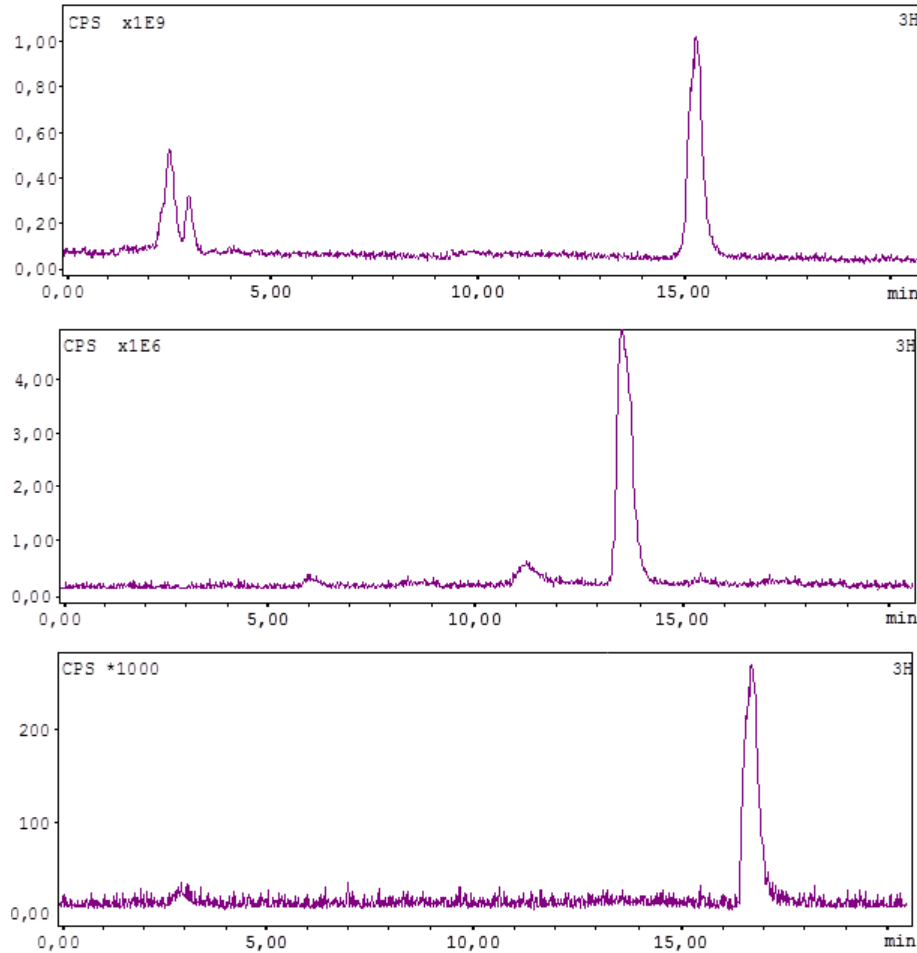
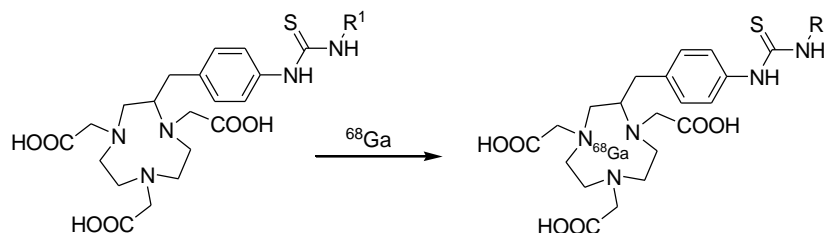


Abbildung 4. 5: ^{68}Ga -NOTA-NCS (oben), ^{68}Ga -NOTA-*n*-Butylamin-Konjugat (Mitte) und ^{68}Ga -NOTA-Dibutylamin-Konjugat (unten)

4.4. 1 Optimierung der ^{68}Ga -Markierung der Chelator-Amin-Konjugate hinsichtlich der Konjugatkonzentration



Dazu wurde eine Chelatisierungsagens-Stammlösung hergestellt aus 3 mg Chelator-NCS in 1 ml DMF (5,4 μmol NOTA-NCS, 4,7 μmol PCTA-NCS, 4,9 μmol oxo-DO3A-NCS). Ein

Experimentelles

Aliquot der Stammlösung (54-161 nmol NOTA-NCS, 47-118 nmol PCTA-NCS, 50-149 nmol oxo-DO3A-NCS) wurde mit dem Modellamin (*n*-Butylamin oder Dibutylamin) im Stoffmengenverhältnis (2:5) 60 Minuten bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Ohne Aufreinigung wurden 10 µl dieser Chelator-Amin-Konjugat-Lösung zu 25 µl 3M Ammoniumacetatpuffer oder 60 µl HEPES-Puffer (zur Einstellung des pH-Wertes auf 4) und 100 µl ⁶⁸Ga-Lösung mit einer Aktivität von ca. 300 MBq gegeben. Die Markierung erfolgte 15 Minuten lang bei 90 °C und pH 4.

Tabelle 4. 24 stellt die radiochemische Ausbeute des ⁶⁸Ga-PCTA-Dibutylamin-Konjugats, ⁶⁸Ga-NOTA-*n*-Butylamin-Konjugats und ⁶⁸Ga-oxo-DO3A-Dibutylamin-Konjugat in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Chelator-NCS dar. Die Ausbeutenbestimmung erfolgt mittels HPLC-Analyse.

Tabelle 4. 24: Radiochemische Ausbeuten (RA) der ⁶⁸Ga-Chelator-Amin-Konjugate in Abhängigkeit von der eingesetzten Chelator-NCS Stoffmenge (Kopplung: 60 Min., RT, pH 8,5; Markierung: 15 Min., 90 °C, pH 4)

PCTA-NCS [nmol]*	⁶⁸ Ga-PCTA-Dibutylamin-Konjugat RA [%]	NOTA-NCS [nmol]*	⁶⁸ Ga-NOTA- <i>n</i> -Butylamin-Konjugat RA [%]	oxo-DO3A-NCS [nmol]*	⁶⁸ Ga-oxo-DO3A-Dibutylamin Konjugat RA [%]
47	78	54	80	50	76
71	82	80	88	75	84
94	86	107	88	99	88
118	86	133	93	124	88
-	-	161	93	149	88

* Stammlösung 3 mg/ml

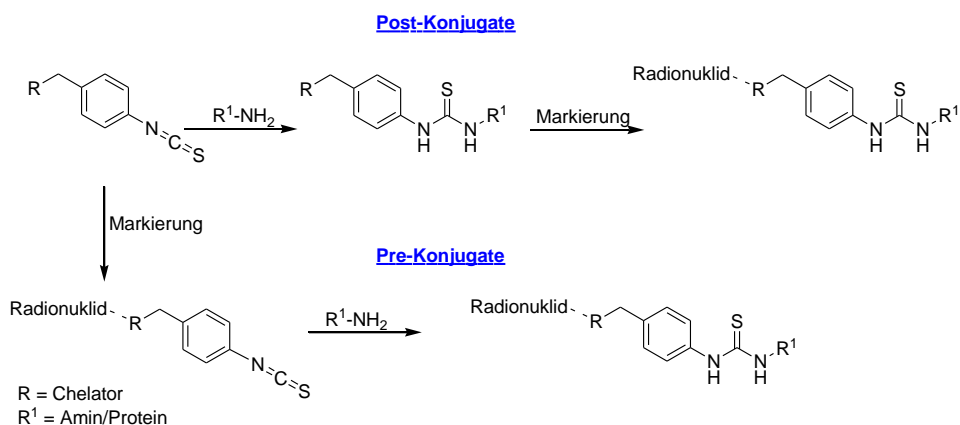
Die Höhe der radiochemischen Ausbeute korreliert proportional mit der zugegebenen Menge an Chelator-NCS, bis zum Erreichen eines Maximums. Die radiochemische Ausbeute erhöht sich mit Steigerung der Zugabe an Chelatisierungsagens nicht mehr. Es konnte eine maximale radiochemische Ausbeute von 86% (PCTA-NCS), 93% (NOTA-NCS) und 88% (oxo-DO3A-NCS) erzielt werden. Als hauptsächliche Nebenprodukte wurden freies ⁶⁸Gallium bzw. Galliumkolloid und Chelator-Hydrolyseprodukt beobachtet.

4.4. 2 Markierung der NOTA-Amin-Konjugate mit Al-¹⁸F-Komplex

Nach Herstellung des NOTA-Amin-Konjugats (135 nmol NOTA-NCS) und dem Modellamin Dibutylamin oder *n*-Butylamin (im Verhältnis 2:5, 60 Min., Raumtemperatur, pH 8,5) wurde ohne Aufreinigung des Konjugats zu 25 µl dieser Lösung 100 µl Al-¹⁸F-Komplex gegeben. Die Markierung lief 15 Minuten lang bei Raumtemperatur und pH 4. Die Markierungsausbeuten bei Raumtemperatur lagen zwischen 46% und 52%.

Ausgewertet wurde mittels Kartuschaufreinigung und HPLC-Analyse. Dabei wurde die Probe auf eine konditionierte C18-SepPak-Kartusche gegeben. Zunächst wurde der Al-¹⁸F-Komplex mit Wasser eluiert. Anschließend wurde das markierte NOTA-Amin-Konjugat mit 50%iger MeCN-Wasser-Lösung eluiert. Dabei blieb das freie ¹⁸F-Fluorid auf der C18-SepPak-Kartusche zurück.

4.5 Post- und Pre-Konjugat-Markierung mit ⁶⁸Gallium und Al-¹⁸F-Komplex (Reaktionen mit Proteinen)



Die Post-Konjugat-Markierungsmethode bedeutet im ersten Schritt die Kopplung des Chelatisierungsagences mit dem Protein. Erst nach der Kopplung wird das entstandene Chelator-Protein-Konjugat mit dem Radionuklid markiert.

Bei der Pre-Konjugat-Markierungsmethode wird zunächst der Chelator-NCS mit dem Radionuklid markiert und anschließend mit dem Protein gekoppelt.

Die Pre-Konjugat-Markierungsmethode hat den entscheidenden Nachteil, dass sowohl die Markierung als auch die Kopplung mit Radioaktivität erfolgen, also in zwei Arbeitsschritten, während bei der Post-Konjugat-Markierungsmethode nur ein radioaktiver Arbeitsschritt erfolgt, nämlich nur die Markierung. Die eingesetzten Radionuklide, sowohl ⁶⁸Gallium als auch ¹⁸F-Fluorid haben eine geringe Halbwertszeit. Ein möglichst später Einsatz des Radionuklids ist daher im Hinblick auf den fortschreitenden Zerfall wichtig.

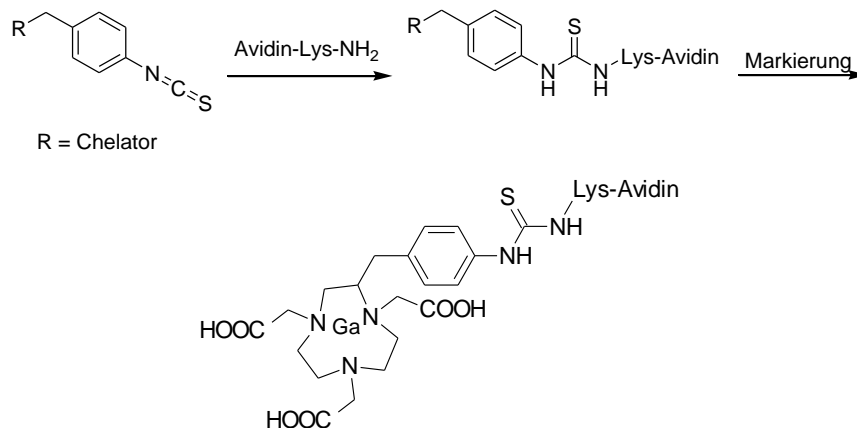
Die Pre-Konjugat-Markierungsmethode hat jedoch auch einen möglicherweise entscheidenden Vorteil, dass die Stoffmengen gering gehalten werden können. Im Grenzfall könnte radiomarkiertes bifunktionelles Chelatisierungsagencz mittels z.B. HPLC-Chromatographie vom unmarkierten bifunktionellen Chelatisierungsagencz getrennt und gereinigt werden. Somit bestünde die Möglichkeit einer strikten 1:1 Markierung von Radionuklid und Protein, welches strukturell die geringstmögliche Veränderung des Proteins bedeutet und somit höchste biologische Aktivität.

4.5.1 Herstellung von Chelator-Protein-Konjugaten

Die Bildung der Chelator-Protein-Konjugate erfolgte analog den Kopplungsreaktionen mit Aminen (siehe 4. 4). Dazu wurden verschiedene Chelator-Protein-Verhältnisse untersucht, wie 1:1, 2:1, 3:1 und 1:2 (Chelatisierungsagensatz zu Protein). Zur Bildung des Konjugats wurde Natriumhydrogencarbonat in Form des Feststoffs zur Einstellung des pH-Wertes von 8,5 hinzugegeben. In Tabelle 4. 34 und Tabelle 4. 40 sind abschließend alle Ergebnisse dieser Untersuchungen verschiedener Verhältnisse und Temperaturen (Raumtemperatur bzw. 40 °C) mit den Proteinen Albumin und Annexin V aufgelistet.

4.5.2 Markierung von Proteinen mit ⁶⁸Gallium

Post-Konjugat-Markierungsmethode



Avidin (in wässriger Lösung) wurde mit NOTA-NCS (in DMF oder MeCN) bis zu zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Die jeweilige NOTA-Avidin-Konjugatlösung wurde danach mit ⁶⁸Gallium (ca. 300 MBq) 15 Minuten bei Raumtemperatur und pH 4 markiert. Die markierte Lösung wurde mittels PD10-Chromatographie analysiert. Die Trennung erfolgte in 1 ml-Schritten mit Wasser als Elutionsmittel. Die Ausbeutenbestimmung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Die Detektion erfolgte mithilfe des Gammacounters nach Zerschneiden des DC-Streifens in zwei gleich große Abschnitte.

Das markierte NOTA-Avidin-Konjugat befand sich auf dem unteren Abschnitt der DC-Platte (Si60), genauer gesagt unmittelbar auf der Basislinie ($R_f = 0$), sowohl in MeCN/Wasser (1:1) als auch in NaCl (0,9%) oder Citratpuffer (pH 5). Davon gut zu unterscheiden ist das freie ⁶⁸Gallium, welches ebenso wie das markierte ungebundene NOTA-NCS und Hydrolyseprodukt auf dem oberen Abschnitt lag ($R_f > 0.5$). Ein möglicherweise gebildetes ⁶⁸Galliumkolloid befindet sich genau wie das markierte NOTA-Avidin-Konjugat auf dem

unteren Abschnitt der DC-Platte ($R_f < 0.5$). Trennen kann man das ^{68}Ga Galliumkolloid von dem Protein wirkungsvoll mittels PD10-Chromatographie.

Tabelle 4. 25 gibt die Positionen der ^{68}Ga Gallium markierten Bestandteile auf der iTLC bei Verwendung des Fließmittels 0.9% NaCl wieder.

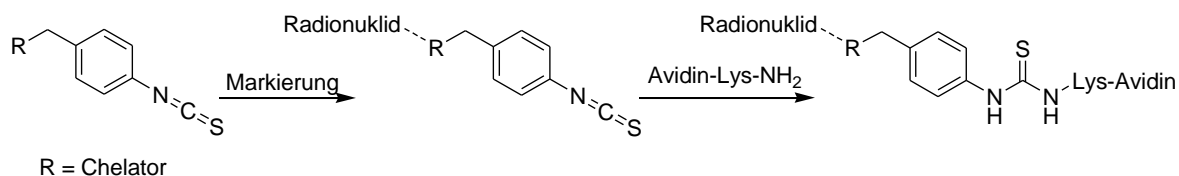
Tabelle 4. 25: NOTA-Avidin-Konjugat markiert mit ^{68}Ga Gallium

Bestandteil	Position
^{68}Ga Gallium	oben
^{68}Ga -NOTA-NCS	oben
^{68}Ga -NOTA-Hydrolyseprodukt	oben*
^{68}Ga -NOTA-Avidin	unten
^{68}Ga Galliumkolloid	unten*

*Durch die mildere Reaktionstemperatur bildet sich weder Hydrolyseprodukt noch Galliumkolloid.

Um das Chelator-Protein-Konjugat von allen möglichen Edukten/Nebenprodukten zu trennen, wurde die Lösung mittels PD10-Chromatographie aufgereinigt. Dabei wurde der größte Anteil an NOTA-Avidin-Konjugat in der 4. ml-Fraktion mit Wasser eluiert, während die anderen Bestandteile (wie z.B. ^{68}Ga Gallium oder ^{68}Ga -NOTA-NCS) erst später eluiert wurden.

Pre-Konjugat-Markierungsmethode



NOTA-NCS (in DMF oder MeCN), wurde mit ^{68}Ga Gallium bzw. $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex (ca. 300 MBq) und jeweiliger Pufferlösung (HEPES bei der Galliummarkierung oder Aluminiumacetatpuffer bei der Fluormarkierung) zur Einstellung des pH-Wertes auf 4 versetzt. Die Markierung wurde entweder bei Raumtemperatur oder bei 90 °C durchgeführt. Die Analyse der ^{68}Ga -Markierung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie oder HPLC-Analyse, die des mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -markierten Produkts mittels Dünnschichtchromatographie. Anschließend erfolgte entweder die Aufreinigung der markierten Lösung oder die Reaktionslösung wurde sogleich ohne weitere Aufreinigung mit dem Protein gekoppelt, wobei der pH-Wert durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat auf pH 8,5 eingestellt wurde.

Die Analytik bzw. Aufreinigung erfolgte mittels PD10-Chromatographie. Zur Ausbeutenbestimmung wurden die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen und dem verbleibenden Rest auf der PD10-Säule miteinander verglichen.

Pre-Konjugat-Markierung mit Aufreinigung

Hierzu wurden 134 nmol NOTA-NCS (Stammlösung: 3 mg/ml DMF bzw. MeCN) 15 Minuten bei Raumtemperatur und pH 4 mit ^{68}Ga -Lösung markiert (Ausbeute von > 85%). Die Aufreinigung der Lösung erfolgte mit einer C18-Kartusche oder mittels HPLC-Chromatographie.

C18-Kartusche: Die mit Wasser verdünnte Probe wurde auf die C18-Kartusche gegeben, welche zuvor mit MeCN und Wasser konditioniert wurde. Dann wurde mit Wasser gespült (0,5 ml), um freies ^{68}Ga zu eluieren. Danach wurde mit 20% MeCN/Wasser (0,5 ml) eluiert, um gegebenenfalls NOTA-Hydrolyseprodukt zu entfernen. Mit 50% MeCN/Wasser (0,5 ml) wurde NOTA-NCS eluiert. Evtl. gebildetes Galliumkolloid würde auf der Kartusche verbleiben. Die Aktivitäten der jeweiligen Fraktionen und in der C18-Kartusche wurden im Gammacounter vermessen.

HPLC-Chromatographie: Ein Aliquot des Reaktionsansatzes wurde in die HPLC injiziert und die Fraktion bei 15 Minuten, also markiertes NOTA-NCS, aufgefangen.

Zu 200 μl der aufgereinigten ^{68}Ga -NOTA-NCS-Lösung wurden 164 nmol Avidin (in 100 μl Wasser) gegeben und der pH-Wert mit Natriumhydrogencarbonat auf 8,5 eingestellt. Die Kopplungsreaktion erfolgte bis zu 75 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Ausbeute mittels DC-Chromatographie und HPLC-Analyse bestimmt.

Die Ausbeute des ^{68}Ga -NOTA-Avidin-Konjugats, nach einer C18-Kartuschenaufreinigung von ^{68}Ga -NOTA-NCS-Lösung ist in Tabelle 4. 26 dargestellt.

Tabelle 4. 26: Radiochemische Ausbeute des ^{68}Ga -NOTA-Avidin-Konjugats in Abhängigkeit von der Kopplungsdauer nach der Pre-Konjugat-Markierung und mit Kartuschenaufreinigung

Kopplungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute aus der DC/HPLC [%]
30	50
45	68
60	68
75	68

Es konnte eine maximale radiochemische Ausbeute von 68% erzielt werden, und zwar ist sie bereits bei einer Reaktionsdauer von 45 Minuten erreicht. Bei einer Verlängerung der Reaktionszeit bleibt diese radiochemische Ausbeute unverändert.

Pre-Konjugat Markierung ohne Aufreinigung

134 nmol NOTA-NCS (Stammlösung: 3 mg/ml DMF bzw. MeCN) wurden mit 100 µl ⁶⁸Gallium-Lösung 15 Minuten bei Raumtemperatur und pH 4 markiert (radiochemische Ausbeute von > 90%). Die Reaktionslösung wurde sodann ohne Aufreinigung mit 164 nmol Avidin (in 100 µl Wasser) bei pH 8,5 gekoppelt. Die Kopplungsreaktion erfolgte bis zu 90 Minuten bei Raumtemperatur. Alle 15 Minuten wurde eine Probe entnommen und mittels iTLC-Chromatographie (0.9% NaCl) analysiert.

Tabelle 4. 27: Radiochemische Ausbeute des ⁶⁸Ga-NOTA-Avidin-Konjugats in Abhängigkeit von der Kopplungsdauer nach der Pre-Konjugat-Markierung von NOTA-NCS und ohne Kartuschenaufreinigung

Kopplungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute aus der DC [%]
15	13
30	25
45	40
60	52
75	63
90	63

Es konnte eine maximale radiochemische Ausbeute von 63% erzielt werden, die bei einer Reaktionsdauer von 75 Minuten erreicht wurde.

Tabelle 4. 28: Zusammenfassung der Pre-Konjugat-Markierung von NOTA-NCS und anschließender Kopplung mit Avidin, mit und ohne Aufreinigung

Methode	Kopplungsdauer [min] / Gesamtreaktionszeit [min]*	Radiochemische Ausbeute [%]
Mit Aufreinigung	45 / 7+10+45*	68 (bezogen auf ⁶⁸ Ga-NOTA-NCS)
Ohne Aufreinigung	75 / 7+0+75*	63 (bezogen auf ⁶⁸ Ga ³⁺)

*Gesamtreaktionszeit: Markierung + Aufreinigung + Kopplung

Im direkten Vergleich führt die Pre-Konjugat-Markierungsmethode mit Aufreinigung zu einer leicht höheren maximalen Ausbeute. Durch die Aufreinigung nach der Markierung werden sowohl freies ⁶⁸Gallium als auch mögliches Galliumkolloid (bei höheren Temperaturen) von der Reaktionsmischung getrennt. Ohne Aufreinigung bleiben diese in der Lösung enthalten. Nach der Kopplung ist die Abtrennung des Galliumkolloids vom Chelator-Protein-Konjugat kompliziert. Daher erscheint eine Aufreinigung nach der Pre-Konjugat-Markierungsmethode bereits vor der Konjugatbildung sinnvoll.

4.5.3 Suche nach dem optimalen Verhältnis NOTA-NCS zu Albumin

Für die Kopplungsreaktion wird angestrebt, ein möglichst optimales Verhältnis an Protein zu Chelatisierungsagenz zu finden. Angesichts des hohen Preises von Annexin V war es wichtig, so wenig an Protein wie möglich, jedoch so viel wie nötig einzusetzen, um eine hohe Ausbeute bei der Konjugatbildung zu erzielen. Daher wurden Untersuchungen mit den Proteinen Albumin und Annexin V durchgeführt, die der Findung der optimalen Verhältnisse dienen.

Dabei sollte beachtet werden, dass sich das angegebene Verhältnis (siehe unten) bei den Post-Konjugat-Markierungen auf die eingesetzten Stoffmengen des nicht markierten NOTA-NCS beziehen (nicht auf das markierte NOTA-NCS). Bei den Pre-Konjugat-Markierungen bzw. in Fällen wo nur radioaktive Substanz vorgelegt wird, ist die Konzentration des stabilen nicht radioaktiven Reaktionspartners (in unserem Falle des Proteins) die ausschlaggebende Größe.

Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Protein-Konjugat mit ⁶⁸Gallium

Albumin (in wässriger Lösung) wurde mit NOTA-NCS (in MeCN) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Anschließend erfolgte die Auftrennung mittels PD10-Chromatographie. Die 4. ml Fraktion*, in der sich der Hauptteil des NOTA-Protein-Konjugats befindet, wurde mit ⁶⁸Gallium (ca. 300 MBq) bei pH 4 markiert.

*Aus wirtschaftlichen Gründen wurde nur die 4. ml-Fraktion untersucht, obwohl in der MS nachgewiesen wurde, dass sich auch ein geringer Anteil an Protein in der 3. und 5. ml Fraktion befinden (siehe dazu 4.6. 4).

4.5.3.1 Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Albumin im Verhältnis von 1:1 (Kopplung: bei RT, Markierung: bei RT, mit Aufreinigung)

167 nmol Albumin (in 100 µl Wasser) wurden mit 167 nmol NOTA-NCS (in 30 µl MeCN) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mittels PD10-Chromatographie aufgereinigt. Die 4. ml-Fraktion wurde mit ⁶⁸Gallium bis zu 75 Minuten bei Raumtemperatur und pH 4 markiert. Alle 15 Minuten wurde eine Probe entnommen und mittels iTLC-Chromatographie (0.9% NaCl) analysiert (siehe Tabelle 4. 29).

Ein HPLC-Lauf nach der Kopplungsreaktion wurde nicht gemacht, da sowohl die C18- als auch C4-Säulen für das große Protein nicht geeignet waren.

Tabelle 4. 29: Radiochemische Ausbeute des ^{68}Ga -NOTA-Albumin-Konjugats (1:1) nach der Post-Konjugat-Markierung, RT/RT, mit Aufreinigung

Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
15	38
30	70
45	78
60	84
75	84

Es konnte eine maximale radiochemische Ausbeute von 84% erzielt werden bei einer Markierungsdauer von 60 Minuten. Eine Verlängerung der Markierungszeit erhöht diese nicht mehr. Die restlichen 16% waren auf dem oberen Abschnitt der DC-Platte zu finden. Diese Aktivität kann nur dem ^{68}Ga entsprechen, da die Lösung vor der Markierung mittels PD10-Chromatographie aufgereinigt wurde und nur mit der Proteinfraction fortgefahren wurde. Eine schrittweise Elution der Lösung in der C18-Kartusche mittels zunächst Wasser und anschließend 10-50% MeCN/Wasser-Mischungen bestätigt, dass es sich tatsächlich um freies ^{68}Ga handelte.

4.5.3. 2 Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Albumin im Verhältnis von 1:1 (Kopplung: bei RT, Markierung: bei 40 ± 1 °C, mit Aufreinigung)

167 nmol Albumin (in 100 μl Wasser) wurden mit 167 nmol NOTA-NCS (in 30 μl MeCN) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mittels PD10-Chromatographie aufgereinigt. Die 4. ml-Fraktion wurde mit ^{68}Ga bis zu 40 Minuten bei 40 °C und pH 4 markiert. Alle 10 Minuten wurde eine Probe entnommen und mittels iTLC-Chromatographie (0.9% NaCl) analysiert.

Tabelle 4. 30: Radiochemische Ausbeute des ^{68}Ga -NOTA-Albumin-Konjugats (1:1) nach der Post-Konjugat-Markierung, RT/40 °C, mit Aufreinigung

Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
10	85
20	85
30	85
40	85

Es konnte eine maximale radiochemische Ausbeute von 85% erzielt werden bei einer Markierungsdauer von nur 10 Minuten. Eine Verlängerung der Markierungszeit erhöht diese nicht mehr.

4.5.3. 3 Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Albumin im Verhältnis von 2:1 (Kopplung: bei RT, Markierung: bei 40 ± 1 °C, mit Aufreinigung)

167 nmol Albumin (in 100 µl Wasser) wurden mit 334 nmol NOTA-NCS (in 60 µl MeCN) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mittels PD10-Chromatographie aufgereinigt. Die 4. ml-Fraktion wurde mit ^{68}Ga bis zu 40 Minuten bei 40 °C und pH 4 markiert. Alle 10 Minuten wurde eine Probe entnommen und mittels iTLC-Chromatographie (0.9% NaCl) analysiert.

Tabelle 4. 31: Radiochemische Ausbeute des ^{68}Ga -NOTA-Albumin-Konjugats (2:1) nach der Post-Konjugat-Markierung, RT/40 °C, mit Aufreinigung

Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
10	66
20	83
30	93
40	93

Es konnte eine maximale radiochemische Ausbeute von 93% erzielt werden bei einer Markierungsdauer von 30 Minuten. Eine Verlängerung der Markierungszeit erhöht diese nicht mehr.

4.5.3. 4 Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Albumin im Verhältnis von 3:1 (Kopplung: bei RT, Markierung: bei 40 ± 1 °C, mit Aufreinigung)

167 nmol Albumin (100 µl Wasser) wurden mit 501 nmol NOTA-NCS (in 90 µl MeCN) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mittels PD10-Chromatographie aufgereinigt. Die 4. ml-Fraktion wurde mit ^{68}Ga bis zu 30 Minuten bei 40 °C und pH 4 markiert. Alle 10 Minuten wurde eine Probe entnommen und mittels iTLC-Chromatographie (0.9% NaCl) analysiert.

Tabelle 4. 32: Radiochemische Ausbeute des ^{68}Ga -NOTA-Albumin-Konjugats (3:1) nach der Post-Konjugat-Markierung, RT/40 °C, mit Aufreinigung

Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
10	83
20	87
30	87

Es konnte eine maximale radiochemische Ausbeute von 87% erzielt werden bei einer Markierungsdauer von 20 Minuten. Eine Verlängerung der Markierungszeit erhöht diese nicht mehr.

4.5.3. 5 Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Albumin im Verhältnis von 1:2 (Kopplung: bei RT, Markierung: bei 40 ± 1 °C, mit Aufreinigung)

167 nmol Albumin (in 100 μ l Wasser) wurden mit 84 nmol NOTA-NCS (in 15 μ l MeCN) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mittels PD10-Chromatographie aufgereinigt. Die 4. ml-Fraktion wurde mit ^{68}Ga bis zu 30 Minuten bei 40 °C und pH 4 markiert. Alle 10 Minuten wurde eine Probe entnommen und mittels iTLC-Chromatographie (0.9% NaCl) analysiert.

Tabelle 4. 33: Radiochemische Ausbeute des ^{68}Ga -NOTA-Albumin-Konjugats (1:2) nach der Post-Konjugat-Markierung, RT/40 °C, mit Aufreinigung

Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
10	76
20	78

Es konnte eine maximale radiochemische Ausbeute von 78% erzielt werden bei einer Markierungsdauer von 20 Minuten. Eine Verlängerung der Markierungszeit erhöht diese nicht mehr.

Zusammenfassung der ^{68}Ga -Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Albumin-Konjugat

Tabelle 4. 34: Zusammenfassung der Post-Konjugat-Markierung mit ^{68}Ga in verschiedenen Verhältnissen Albumin zu NOTA-NCS nach Aufreinigung mittels PD10-Chromatographie

Verhältnis Albumin:NOTA-NCS (Markierungstemperatur)	Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
1:1 (Raumtemperatur)	15 / 30 / 45 / 60	38 / 70 / 78 / 84
1:1 (40 °C)	10	85
1:2 (40 °C)	10 / 20 / 30	66 / 83 / 93
1:3 (40 °C)	10 / 20	83 / 87
2:1 (40 °C)	10 / 20	76 / 78

Mit Erhöhung der Markierungsdauer ließ sich in allen Verhältnissen sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 40 °C eine Erhöhung der Ausbeute erzielen bis zum Erreichen eines Maximums. Die höchste radiochemische Ausbeute von 93% ergab sich bei einem Verhältnis von 1:2 (Albumin zu NOTA-NCS) bei einer Markierungstemperatur von 40 °C nach 30 Minuten Reaktionsdauer.

4.5.4 Suche nach dem optimalen Verhältnis NOTA-NCS zu Annexin V

In den folgenden Reaktionen wurde nach dem optimalen Verhältnis zwischen NOTA-NCS und dem Protein Annexin V gesucht.

Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Annexin V mit ^{68}Ga

Annexin V (in wässriger Lösung) wurde mit NOTA-NCS (in MeCN) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Anschließend erfolgte die Auftrennung mittels PD10-Chromatographie. Die 4. ml Fraktion, in der sich der Hauptteil des NOTA-Protein-Konjugats befindet, wurde mit ^{68}Ga (ca. 300 MBq) bei Raumtemperatur bzw. 40 °C und pH 4 markiert.

4.5.4.1 Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Annexin V im Verhältnis von 1:1 (Kopplung: bei RT, Markierung: bei RT, mit Aufreinigung)

164 nmol Annexin V (in 100 µl Wasser) wurden mit 164 nmol NOTA-NCS (in 30 µl MeCN) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Die Reaktionslösung wurde mittels PD10-Chromatographie aufgereinigt. Die 4. ml Fraktion wurde mit 100 µl ^{68}Ga bis zu 60 Minuten bei Raumtemperatur und pH 4 markiert. Alle 15 Minuten wurde eine Probe entnommen und mittels iTLC-Chromatographie (0.9% NaCl) analysiert (siehe Tabelle 4. 35).

Ein HPLC-Lauf nach der Kopplungsreaktion wurde nicht gemacht, da sowohl die C18- als auch C4-Säulen für das große Protein nicht geeignet waren.

Tabelle 4. 35: Radiochemische Ausbeute des ^{68}Ga -NOTA-Annexin V-Konjugats (1:1) nach der Post-Konjugat-Markierung, RT/RT, mit Aufreinigung

Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
15	50
30	90
45	90
60	90

Es konnte eine maximale radiochemische Ausbeute von 90% (nach 30 Minuten) erzielt werden.

4.5.4 2 Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Annexin V im Verhältnis von 1:1, (Kopplung: bei RT, Markierung: bei 40 ± 1 °C, mit Aufreinigung)

164 nmol Annexin V (in 100 µl Wasser) wurden mit 164 nmol NOTA-NCS (in 30 µl MeCN) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Die Reaktionslösung wurde mittels PD10-Chromatographie aufgereinigt. Die 4. ml Fraktion wurde mit 100 µl ^{68}Ga bis zu 30 Minuten bei 40 °C und pH 4 markiert. Alle 10 Minuten wurde eine Probe entnommen und mittels iTLC-Chromatographie (0.9% NaCl) analysiert.

Tabelle 4. 36: Radiochemische Ausbeute des ^{68}Ga -NOTA-Annexin V-Konjugats (1:1) nach der Post-Konjugat-Markierung, RT/40 °C, mit Aufreinigung

Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
10	67
20	90
30	90

Es konnte eine maximale radiochemische Ausbeute von 90% (nach 20 Minuten) erzielt werden.

4.5.4 3 Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Annexin V im Verhältnis von 2:1, (Kopplung: bei RT, Markierung: bei 40 ± 1 °C, mit Aufreinigung)

36 nmol Annexin V (in 50 µl Wasser) wurden mit 72 nmol NOTA-NCS (in 15 µl MeCN) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Die Reaktionslösung wurde mittels PD10-Chromatographie getrennt. Die 4. ml-Fraktion wurde mit 100 µl ^{68}Ga bis zu 30 Minuten bei 40 °C und pH 4 markiert. Alle 10 Minuten wurde eine Probe entnommen und mittels iTLC-Chromatographie (0.9% NaCl) analysiert.

Tabelle 4. 37: Radiochemische Ausbeute des ^{68}Ga -NOTA-Annexin V-Konjugats (2:1) nach der Post-Konjugat-Markierung, RT/40 °C, mit Aufreinigung

Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
10	78
20	96
30	98

Es konnte eine maximale radiochemische Ausbeute von 96-98% (nach 20-30 Minuten) erzielt werden.

**4.5.4 4: Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Annexin V im Verhältnis von 3:1
(Kopplung: bei RT, Markierung: bei 40 ± 1 °C, mit Aufreinigung)**

36 nmol Annexin V (in 50 µl Wasser) wurden mit 108 nmol NOTA-NCS (in 20 µl MeCN) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Die Reaktionslösung wurde mittels PD10-Chromatographie getrennt. Die 4. ml-Fraktion wurde mit 100 µl ^{68}Ga bis zu 40 Minuten bei 40 °C und pH 4 markiert. Alle 10 Minuten wurde eine Probe entnommen und mittels iTLC-Chromatographie (0.9% NaCl) analysiert.

Tabelle 4. 38: Radiochemische Ausbeute des ^{68}Ga -NOTA-Annexin V-Konjugats (3:1) nach der Post-Konjugat-Markierung, RT/40 °C, mit Aufreinigung

Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
10	53
20	84
30	93
40	93

Es konnte eine maximale radiochemische Ausbeute von 93% (nach 30 Minuten) erzielt werden.

**4.5.4 5: Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Annexin V im Verhältnis von 1:2
(Kopplung: bei RT, Markierung: bei 40 ± 1 °C, mit Aufreinigung)**

72 nmol Annexin V (in 50 µl Wasser) wurden mit 37 nmol NOTA-NCS (in 7 µl MeCN) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Die Reaktionslösung wurde mittels PD10-Chromatographie getrennt. Die 4. ml-Fraktion wurde mit 100 µl ^{68}Ga bis zu 30 Minuten bei 40 °C und pH 4 markiert. Alle 10 Minuten wurde eine Probe entnommen und mittels iTLC-Chromatographie (0.9% NaCl) analysiert.

Tabelle 4. 39: Radiochemische Ausbeute des ^{68}Ga -Annexin V-Konjugats (1:2) nach der Post-Konjugat-Markierung, RT/40°C, mit Aufreinigung

Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
10	30
20	47
30	63

Es konnte eine maximale radiochemische Ausbeute von 63% (nach 30 Minuten) erzielt werden.

Zusammenfassung der ⁶⁸Ga-Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Annexin V-Konjugat, vorbereitet in verschiedenen Verhältnissen

Tabelle 4. 40: Zusammenfassung der Post-Konjugat-Markierung mit ⁶⁸Gallium in verschiedenen Verhältnissen Annexin V zu NOTA-NCS

Verhältnis NOTA-NCS:Protein (Markierungstemperatur)	Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
1:1 (Raumtemperatur)	30	90
1:1 (40 °C)	10 / 20	67 / 90
2:1 (40 °C)	10 / 20 / 30	78 / 96 / 98
3:1 (40 °C)	10 / 20 / 30	53 / 84 / 93
1:2 (40 °C)	10 / 20 / 30	30 / 47 / 63

Die Post-Konjugat-Markierung bei einer Temperatur von ca. 40 °C im Verhältnis 2:1 (NOTA-NCS zu Protein) erzielt die höchsten Ausbeuten von 98%.

Zusammengefasst ließen sich für die Proteine (Albumin und Annexin V) bei der Post-Konjugat-Markierungsmethode (mit Aufreinigung) sehr gute Ergebnisse erzielen. Von großem Vorteil ist neben den guten radiochemischen Ausbeuten, dass nur ein Arbeitsschritt mit Radioaktivität erfolgt. Neben dem Arbeitsschutz bedeutet es auch ein Vorteil im Hinblick auf den radioaktiven Zerfall durch die natürliche Halbwertszeit.

4. 6 Markierung von Proteinen mit Al-¹⁸F-Komplex

Durch die Modell-Versuche mit ⁶⁸Gallium sowohl mit Albumin als auch mit Annexin V (siehe oben) sollte das beste Verhältnis (NOTA-NCS zu Protein) herausgefunden werden, um eine möglichst hohe radiochemische Ausbeute bei geringstmöglichem Einsatz des Proteins zu erzielen. Schon nach wenigen initialen Versuchen mit Al-¹⁸F-Komplex war festzustellen, dass die Reaktionen schlechtere Ausbeuten erzielten als die oben beschriebenen Reaktionen mit ⁶⁸Gallium (am Beispiel des NOTA-Albumin-Konjugats im für ⁶⁸Ga-Versuche optimalen Verhältnis 2:1, siehe 4.6. 1). Daher wurden bei den Versuchen mit Al-¹⁸F-Komplex höhere Chelatisierungsagens-Stoffmengen eingesetzt, um zu beobachten, ob man unter diesen Konditionen eine bessere radiochemische Ausbeute erzielen kann. Ausgegangen war von der Überlegung, dass mit steigendem NOTA-Anteil auch mehr NOTA-Moleküle an das Protein gebunden werden*, damit sollte sich die radiochemische Ausbeute erhöhen.

* In der Literatur [Lit 41, Lit 82, Lit 83, Lit 84] fand sich ein Hinweis darauf, dass sowohl Avidin als auch Annexin V mehrere Lysin-Moleküle enthalten und theoretisch mehrere NOTA-Moleküle binden können.

Dabei sollte beachtet werden, dass sich das angegebene Verhältnis (siehe unten) bei den Post-Konjugat-Markierungen auf die eingesetzten Stoffmengen des nicht markierten NOTA-NCS beziehen (nicht auf das markierte NOTA-NCS). Bei den Pre-Konjugat-Markierungen

bzw. in Fällen wo nur radioaktive Substanz vorgelegt wird, ist die Konzentration des stabilen nicht radioaktiven Reaktionspartners (in unserem Falle des Proteins) die ausschlaggebende Größe.

4.6.1 Albumin

4.6.1.1 Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Albumin-Konjugat mit Al-¹⁸F-Komplex im Verhältnis von 2:1 (Kopplung: bei RT, Markierung: bei RT, mit Aufreinigung)

80 nmol Albumin (in 100 µl Wasser) wurden mit 160 nmol NOTA-NCS (in 30 µl MeCN) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Mithilfe der PD10-Chromatographie wurde die NOTA-Albumin-Konjugat-Lösung in 1 ml Schritten mit Wasser aufgereinigt. Die 4. ml-Fraktion wurde unter Zugabe von 60 µl HEPES zur Einstellung des pH-Wertes auf 4 anschließend mit 100 µl Al-¹⁸F-Komplex (ca. 300 MBq) 60 Minuten bei Raumtemperatur und pH 4 markiert. Zur Kontrolle des Reaktionsablaufs wurde eine Probe entnommen und mittels DC-Chromatographie (Si60, MeCN/Wasser 1:1) analysiert.

Tabelle 4. 41: Radiochemische Ausbeute des Al-¹⁸F-NOTA-Albumin-Konjugats (2:1) nach der Post-Konjugat-Markierung, mit Aufreinigung

Position auf der DC MeCN/Wasser 1:1	Ausbeute [%]	Substanz
Oben ($R_f > 0.5$)	37,5	Al- ¹⁸ F-NOTA-NCS
Unten ($R_f < 0.5$)	62,5	Al- ¹⁸ F-NOTA-Albumin Al- ¹⁸ F-Komplex, ¹⁸ F-Fluorid

Auf dem unteren Abschnitt des DC-Streifens ($R_f < 0.5$) befand sich ein Anteil von 62,5%. Dies entspricht dem Al-¹⁸F-NOTA-Albumin-Konjugat, Al-¹⁸F-Komplex und dem freien ¹⁸F-Fluorid. Geht man davon aus, dass eine unter ähnlichen Bedingungen durchführende Kopplungsreaktion und daran folgende Markierungsreaktion mit ⁶⁸Gallium eine maximale radiochemische Ausbeute von 84-93 % ergibt (siehe Tabelle 4. 42), können wir hier bei den gesamten 62,5%, die unten auf der DC-Platte gefunden waren, dem Al-¹⁸F-NOTA-Albumin-Konjugat einen Anteil von 52-60 % zuordnen. Diese grobe Abschätzung repräsentiert allerdings den besten Fall, da wir davon ausgehen, dass die ⁶⁸Ga-Markierung und Al-¹⁸F-Markierung vergleichende Ausbeuten ergeben. Gehen wir davon aus, dass die Al-¹⁸F-Markierung eine schlechtere Ausbeute ergibt, was auch bei Al-¹⁸F-Markierung der Chelator-Amin-Konjugate (siehe Kapitel 4.4. 2) zu sehen war, könnte den Anteil an Al-¹⁸F-NOTA-Albumin-Konjugat sogar unter 50% liegen.

Tabelle 4. 42: Vergleichende Übersicht der Ausbeuten der ⁶⁸Ga-Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Albumin-Konjugat, vorbereitet unter ähnlichen Konditionen

Verhältnis NOTA-NCS:Albumin (Temperatur, Kopplung/Markierung)	Markierungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
1:1 (RT/RT)	60	84 ^A
2:1 (RT/40 °C)	30	93 ^B

^A Gleiche Markierungstemperatur (RT) wie bei der oben genannten Reaktion von NOTA-Albumin, allerdings in einem anderen Verhältnis vorbereitet.

^B Gleiches Verhältnis (2 zu 1) wie bei der oben genannten Reaktion von NOTA-Albumin, allerdings höhere Markierungstemperatur (40 °C).

4.6.2 Avidin

4.6.2.1 Pre-Konjugat-Markierung von NOTA-NCS mit Al-¹⁸F-Komplex und anschließender Kopplungsreaktion mit Avidin (150 nmol/ml) (Markierung: bei 90 °C, Kopplung: bei RT, mit Aufreinigung)

1072 nmol NOTA-NCS* (in 200 µl MeCN) wurden mit 100 µl Al-¹⁸F-Komplex (ca. 300 MBq) 15 Minuten bei 90 °C und pH 4 markiert. Der Reaktionsablauf wurde mittels HPLC-Analyse untersucht. Zu Kontrolle und weiterer Ausbeutebestimmung wurde eine konditionierte C18-Kartusche beladen.

*Hier wurde eine so hohe Menge an NOTA-NCS eingesetzt, um festzustellen, ob man eine bessere radiochemische Ausbeute erzielen kann, wenn sich mehrere NOTA-Moleküle an Avidin binden. In der Literatur [Lit 83, Lit 84] fand sich ein Hinweis darauf, dass Avidin mindestens ein Lysin pro Monomer enthält.

Tabelle 4. 43: Prozentuale Verteilung der Aktivität der Al-¹⁸F-NOTA-NCS-Lösung nach Aufreinigung in einer C18-Kartusche

Vorgang	Aktivität auf der C18-Kartusche [MBq]	Elution von	Prozentualer Anteil an eluierter Substanz
Kartusche nach Beladen	34,3	-	-
Nach Spülvorgang mit Wasser (0,5 ml)	30,77	Al- ¹⁸ F-Komplex	10,3
Nach Spülvorgang mit 20%iger MeCN-Lösung (0,5 ml)	24,95	Al- ¹⁸ F-NOTA-Hydrolyseprodukt	16,9
Nach Spülvorgang mit 50%iger MeCN-Lösung (0,5 ml)	1,34	Al- ¹⁸ F-NOTA-NCS	72,7

Mit dem 50%igen MeCN-Eluat wurden 72,7% an Aktivität eluiert. Diese Aktivität entspricht dem markierten NOTA-NCS. Die auf der Kartusche verbliebene Aktivität (1,34 MBq) entspricht dem freien ¹⁸F-Fluorid.

Die aufgereinigte Al-¹⁸F-NOTA-NCS-Lösung in 500 µl 50%iger MeCN/Wasser-Lösung wurde danach mit 90 nmol Avidin (in 100 µl Wasser) 60 Minuten bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Die Detektion der Aktivität in der Lösung erfolgte durch eine weitere Aufreinigung mittels einer C18-Kartusche.

Tabelle 4. 44: Ergebnis der Aktivität in der Lösung nach der Pre-Konjugat-Markierung von NOTA NCS und daran folgende Kopplung mit Avidin (150 nmol/ml)

SepPak C18	Aktivitätsanteil [%]	Bestandteil
C18-Kartusche nach dem Spülvorgang (100% MeCN)	50	Al- ¹⁸ F-NOTA-Avidin-Konjugat
Eluat	50	Al- ¹⁸ F-NOTA-NCS

Die radiochemische Ausbeute des Al-¹⁸F-NOTA-Avidin-Konjugats, nach der Pre-Konjugat-Markierung von NOTA-NCS und daran folgende Kopplung mit Avidin (150 nmol/ml) beträgt 50%.

4.6.3 Annexin V

4.6.3.1 Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Annexin V-Konjugat mit Al-¹⁸F-Komplex im Verhältnis von 29:1 (Kopplung: bei RT, Markierung: bei RT, mit Aufreinigung)

In der folgenden Versuchsreihe handelt es sich um eine prinzipielle Machbarkeitsstudie der post-Konjugat-Markierung mit Al-¹⁸F-Komplex, bei der ein nahezu 30facher Überschuss von NOTA-NCS zu Annexin V gewählt wurde. Dabei ist selbstverständlich, dass die biologische Aktivität des Annexins durch die Modifizierung der Lysine durch NOTA gegen Null geht.

1607 nmol NOTA-NCS* (in 200 µl MeCN) wurden mit 56 nmol Annexin V (in 60 µl Wasser) zwei Stunden bei Raumtemperatur und pH 8,5 gekoppelt. Ein Aliquot der Lösung wurde mittels einer PD10-Chromatographie aufgereinigt und die Bildung des NOTA-Annexin V-Konjugats mithilfe der Massenspektrometrie (MALDI/TOF/TOF) nachgewiesen (siehe dazu Kapitel 4.6. 4, Abbildung 4. 12).

* Die Struktur des Annexin V ist bekannt, in der Literatur [Lit 41, Lit 82] fand sich ein Hinweis darauf, dass Annexin V bis zu 22 Lysine enthält und theoretisch mehrere Moleküle NOTA binden kann.

Auch für das Protein Avidin ist es bekannt, mehrere NOTA Moleküle binden zu können (Lit 83, Lit 84). Um dies nachzuweisen, wurde ein NOTA-Avidin-Konjugat im Verhältnis 12 zu 1 (NOTA zu Protein) vorbereitet. Das hoch konjugierte Avidin-Derivat wurde mithilfe der Massenspektrometrie (MALDI/TOF/TOF) nachgewiesen (siehe dazu Kapitel 4.6. 4, Abbildung 4. 11).

Der Rest der Reaktionslösung, der nicht für MS-Nachweis verwendet wurde, wurde mittels einer PD10-Chromatographie aufgereinigt, um das überschüssiges NOTA-NCS zu entfernen. Die 4. ml Fraktion wurde unter Zugabe von 60 µl HEPES auf pH 4 eingestellt, und mit 100 µl Al-¹⁸F-Komplex (ca. 300 MBq) 60 Minuten bei Raumtemperatur markiert.

Da hier relativ hohe NOTA-NCS-Mengen eingesetzt wurden, bestand die Gefahr der Überladung der PD10-Säule. Um diese Problematik besser einzuschätzen und

Fehlinterpretationen zu vermeiden, wurde nach der Markierungsreaktion die 4. ml-Fraktion einer weiteren PD10-Chromatographie unterworfen und die 4. ml Fraktion zusätzlich mittels DC-Chromatographie (Si60, MeCN/Wasser 1:1) analysiert (siehe Tabelle 4. 45 und Tabelle 4. 46).

Tabelle 4. 45: Erste PD10-Chromatographie, nach Al-¹⁸F-Markierung von NOTA-Annexin V-Konjugat

PD10-Chromatographie	Aktivität [MBq]	Anteil [%]
PD10-Säule nach Probenaufgabe	0,146	100
4. ml	0,117	80,1
PD10-Säule nach der Elution der ersten 4. ml	0,021	14,4

In der 4. ml-Fraktion befand sich ein Anteil von 80% der Aktivität. Es bestand jedoch der Verdacht, dass die PD10-Säule überladen wurde und daher möglicherweise eine Mischung aus Al-¹⁸F-NOTA-NCS, Al-¹⁸F-NOTA-Annexin V-Konjugat, ¹⁸F-Fluorid und Al-¹⁸F-Komplex enthalten war.

Tabelle 4. 46: Ergebnis der DC-Chromatographie (Si60, MeCN/Wasser 1:1) der markierten 4. ml-Fraktion nach der ersten PD10-Chromatographie

Position auf der DC	Verteilung der Aktivität [%]
Oben ($R_f > 0,6$)	13,1
Unten ($R_f < 0,4$)	86,9

Auf dem unteren Abschnitt, auf dem sich das Al-¹⁸F-NOTA-Annexin V befindet (zusammen mit ¹⁸F-Fluorid und Al-¹⁸F-komplex), wurde einen Anteil von 87% an Aktivität gefunden. Die restliche Aktivität von 13,1% auf dem oberen Abschnitt entspricht dem nicht reagierten Al-¹⁸F-NOTA-NCS. Das bedeutet, dass die erste PD10-Chromatographie, wie erwartet, nicht erfolgreich war. Daher wurde eine weitere PD10-Chromatographie angefertigt, um eine bessere Auftrennung zu erreichen (siehe Tabelle 4. 47).

Tabelle 4. 47: Zweite PD10-Chromatographie aus dem 4. ml der ersten PD10-Säule-Elution

PD10-Chromatographie	Aktivität [MBq]	Anteil [%]
PD10-Säule nach Probenaufgabe	0,062	100
4. ml	0,033	53,2
PD10-Säule nach der Elution der ersten 4. ml	0,029	46,8

Wiedergefunden wurden 53,2% von 80,1%, die dem Al-¹⁸F-NOTA-Annexin V-Konjugat entsprechen. Von den verbliebenen 46,8% auf der PD10-Säule sind laut DC-Chromatographie (siehe Tabelle 4. 46) 13,1% an Al-¹⁸F-NOTA-NCS zu erwarten. In den restlichen 33,7% befinden sich ¹⁸F-Fluorid und Al-¹⁸F-komplex.

Zur Absicherung des Ergebnisses wurde die 4. ml-Fraktion zusätzlich mittels einer weiteren DC-Chromatographie (Si60, Acetonitril/Wasser 1:1) analysiert. Auf dem oberen Abschnitt

($R_f > 0,6$), auf dem sich das $\text{Al-}^{18}\text{F-NOTA-NCS}$ befindet, war keinen Anteil an Aktivität zu finden. Der untere Abschnitt ($R_f > 0,4$) ergab 100% des markierten NOTA-Annexin V-Konjugats. Die 53% an dem markierten NOTA-Annexin V-Konjugat (zweite PD10-Säule, Tabelle 4. 47) ließen sich somit bestätigen.

4.6.3. 2 Pre-Konjugat-Markierung von NOTA-NCS mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex und anschließender Kopplungsreaktion mit Annexin V (415 nmol/ml) (Markierung: bei 90 °C, Kopplung: bei RT, mit Aufreinigung)

1607 nmol NOTA-NCS (in 300 μl MeCN) wurden mit 100 μl $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex (ca. 300 MBq) 15 Minuten bei 90 °C und pH 4 markiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mittels C18-Kartusche, zunächst mit Wasser (0,5 ml) gefolgt von 20%iger MeCN/Wasser-Lösung (0,5 ml) und schließlich mit 50%iger MeCN/Wasser-Lösung (0,5 ml).

Tabelle 4. 48: C18-Kartuschenaufreinigung von $\text{Al-}^{18}\text{F-NOTA-NCS}$

Kartusche	Kartusche Aktivität [MBq]	Eluat Aktivität [MBq]
nach Beladen	123,9	100%
nach Spülen mit Wasser	109,7	11,46% ($\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex)
nach Spülen mit 20% MeCN	104,8	3,95% ($\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Hydrolyseprodukt)
Nach spülen mit 50% MeCN	4,89	76,3% ($\text{Al-}^{18}\text{F-NOTA-NCS}$)

Mit 100 μl der 50% MeCN/Wasser-Lösung wurde fortgefahren unter Zugabe von 83 nmol Annexin V (in 100 μl Wasser). Die Kopplungsreaktion erfolgte bis zu 105 Minuten bei Raumtemperatur und pH 8,5. Alle 15 Minuten wurde eine Probe entnommen und mittels DC-Chromatographie (Si60, MeCN/Wasser 1:1) analysiert.

Tabelle 4. 49: Radiochemische Ausbeute nach Pre-Konjugat-Markierung von NOTA-NCS mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ Komplex und anschließender Kopplungsreaktion mit Annexin V (415 nmol/ml)

Kopplungsdauer [min]	Radiochemische Ausbeute [%]
15	19,6
30	31,5
45	38,8
75	44,7
90	50,0
105	62,0

Die Höhe der radiochemischen Ausbeute korreliert proportional mit der Kopplungsdauer. Nach 105 Minuten blieb ein Anteil von 62% $\text{Al-}^{18}\text{F-NOTA-Annexin V}$ -Konjugats auf der DC-Platte unten liegen ($R_f < 0,5$). Der Rest der Aktivität, 38% auf dem oberen Abschnitt, entspricht dem nicht reagierten $\text{Al-}^{18}\text{F-NOTA-NCS}$.

Zur Absicherung des Ergebnisses wurde zusätzlich die Al-¹⁸F-NOTA-Annexin V-Konjugat-Lösung (nach 105 Minuten) auf eine weitere C18-Kartusche gegeben. In der eluierten Lösung (0-100% MeCN in Wasser) befand sich ein Anteil von 38%. Die restlichen 62% verblieben auf der Kartusche, was die 62% an Al-¹⁸F-NOTA-NOTA-Annexin V-Konjugat bestätigt.

4.6.3.3 Pre-Konjugat-Markierung von NOTA-NCS mit Al-¹⁸F-Komplex und anschließender Kopplungsreaktion mit Annexin V (135 nmol/ml) (Markierung: bei 90 °C, Kopplung: bei RT, mittels HPLC aufgereinigt)

1607 nmol NOTA-NCS (in 300 µl MeCN) wurden mit 100 µl Al-¹⁸F-Komplex (ca. 300 MBq) 15 Minuten bei 90 °C und pH 4 markiert. Anschließend wurden 50 µl der Lösung mittels HPLC (C18-Säule, Gradient 1) getrennt. Der Radiopeak (bei 15 Minuten) des markierten NOTA-NCS wurde aufgefangen (Ausbeute von 78%).

100 µl der aufgefangenen Lösung wurden mit 27 nmol Annexin V (in 100 µl Wasser) versetzt. Es folgte eine Zugabe von Natriumhydrogencarbonat zur Einstellung des pH-Wertes auf 8,5. Nach einer Reaktionsdauer von 60 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mittels DC-Chromatographie (Si60, MeCN/Wasser 1:1) analysiert. 55% der Aktivität verblieben bei R_f ~ 0 (auf der Basislinie) liegen, die restlichen 45% (Al-¹⁸F-NOTA-NCS) wurden auf dem oberen Abschnitt (R_f > 0,5) des DC-Streifens ermittelt.

Tabelle 4. 50: Radiochemische Ausbeute nach Pre-Konjugat-Markierung von NOTA-NCS mit Al-¹⁸F Komplex und anschließender Kopplungsreaktion mit Annexin V (135 nmol/ml)

Position auf der DC (MeCN/Wasser 1:1)	Verteilung der Aktivität [%]
Oben (R _f > 0,5)	45
Unten (R _f < 0,5)	55

Zur Bestätigung des Ergebnisses wurde diese Lösung mittels PD10-Säule chromatographiert und dabei in 1 ml Fraktionen mit Wasser eluiert. In der 4. ml-Fraktion befanden sich 52% der Aktivität. Die restlichen 3% verteilten sich auf die 3. und 5. ml-Fraktion. Eine DC-Chromatographie (Si60, MeCN/Wasser 1:1) der 4. ml-Fraktion ergibt 100% des markierten NOTA-Annexin V-Konjugats im unteren Abschnitt.

Da zuerst eine Aufreinigung/Trennung mittels HPLC erfolgte ist diese Methode sicherlich am besten geeignet, die biologische Aktivität des Annexin V zu erhalten, da hier nur trägerfrei Mengen (bei idealer HPLC-Chromatographie) an Al-¹⁸F-NOTA-NCS auf einen sehr großen Überschuss an Annexin V trifft und somit pro Annexin V-Molekül nur ein NOTA-Molekül

reagiert. Die radiochemische Ausbeute ließe sich vermutlich über höhere Annexin V-Konzentrationen noch steigern, ist jedoch mit ~55% bei der eingesetzten Annexin V-Konzentration von 135 nmol/ml schon durchaus zufriedenstellend.

Zusammenfassung der Al-¹⁸F-Pre- und Post-Konjugat-Markierung von NOTA-Protein-Konjugat

Tabelle 4. 51: Zusammenfassung der Pre-Konjugat-Markierung und Post-Konjugat-Markierung mit Al-¹⁸F-Komplex

Methode (Aufreinigung) Verhältnis NOTA-NCS:Protein bzw. Konzentration des Proteins	Kopplungsdauer, Temperatur	Markierungsdauer, Temperatur	RA [%]
Post-Konjugat (PD10-Säule) 2:1 (Albumin)	120 min., RT	60 min., RT	50
Post-Konjugat (2 x PD10-Säule) 29:1 (Annexin V)	120 min., RT	60 min., RT	53
Pre-Konjugat (HPLC) 135 nmol/L (Annexin V)	60 min., RT	15 min., 90 °C	55
Pre-Konjugat (C18-Kartusche) 150 nmol/ml (Avidin)	60 min., RT	15 min., 90 °C	50
Pre-Konjugat (C18-Kartusche) 415 nmol/L (Annexin V)	45 min, RT 75 min, RT 90 min, RT 105 min., RT	15 min., 90 °C	38,8 44,7 50 62

Nach der Pre-Konjugat- und der Post-Konjugat-Markierungsmethode sind die erreichten Ausbeuten bei der Markierung mit Al-¹⁸F-Komplex vergleichbar (50-60%). Eine Erhöhung der Ausbeute ließe sich mit Steigerung der Markierungsdauer erreichen, aber mit dem Nachteil des Verlustes an Aktivität durch die Halbwertszeit. Die radiochemische Ausbeute ließe sich vermutlich auch über höhere Annexin V-Konzentrationen noch steigern.

4.6. 4 Massenspektrometrie

Sowohl beide Proteine (Avidin und Annexin V) als auch die NOTA-Avidin/Annexin V-Konjugate wurden in der 3-5. ml Fraktion nach der PD10-Chromatographie mithilfe Massenspektrometrie (MALDI/TOF/TOF, mit DHAP als Matrix) nachgewiesen.

Einige beispielhafte MS-Spektren folgen:

Im Falle des Avidins (siehe Abbildung 4. 6) finden sich Massen von 15911 (Monomer), 31873 (Dimer), 47780 (Trimer) und 63544 (Tetramer).

Das Monomer mit einer Masse von 15911 ist in Abbildung 4. 6 vergrößert dargestellt, während die des Dimers, Trimers und des Teramers in Abbildung 4. 7 dargestellt sind.

Experimentelles

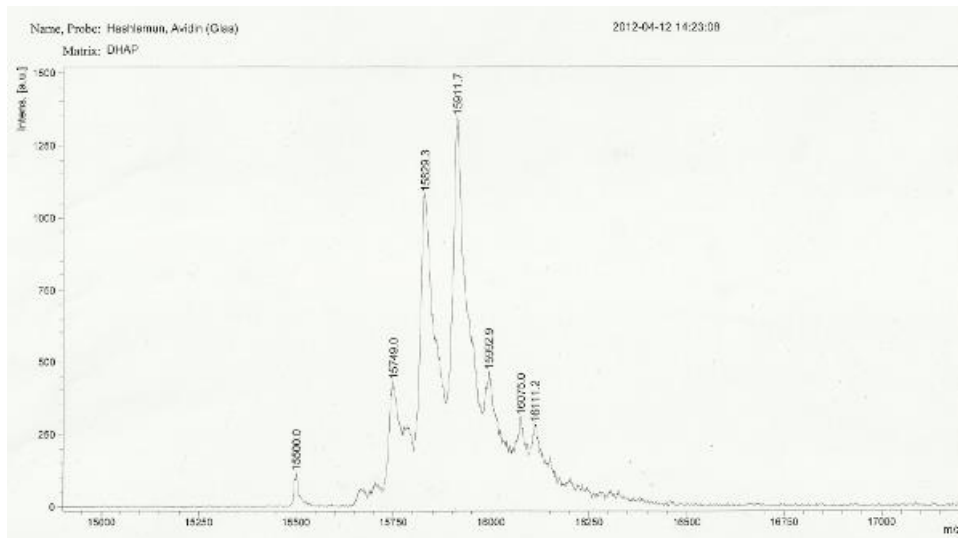


Abbildung 4. 6: Massenspektrum des Avidin-Monomers in der 4. ml Fraktion

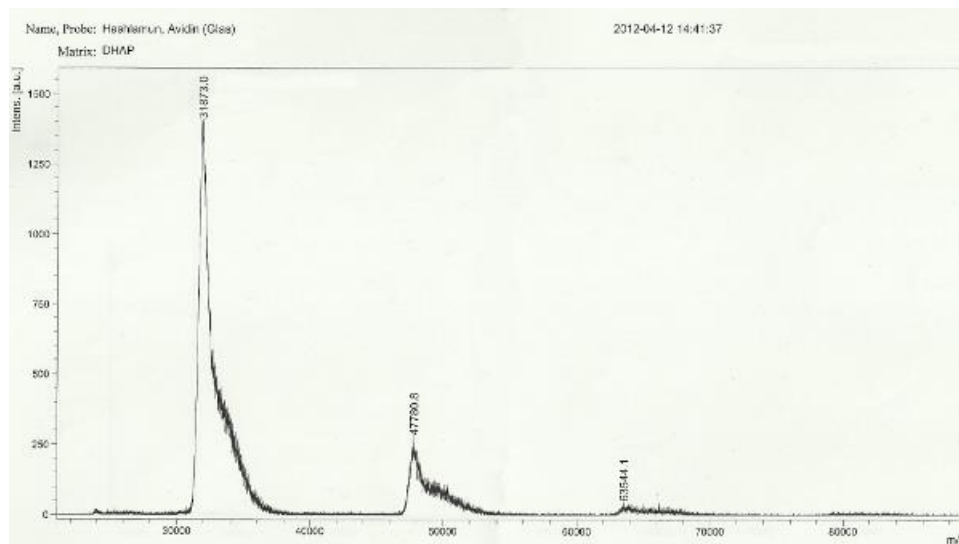


Abbildung 4. 7: Massenspektrum des Avidin-Dimers ($M=31873$), des Avidin-Trimers ($M=47780$) und des Avidin-Tetramers ($M=63544$)

Im Falle des Annexin V findet sich eine Masse von 35740 mit einer hohen Intensität in der 4. ml-Fraktion (Abbildung 4. 9). Ein geringer Anteil ist auch in der 3. ml (Abbildung 4. 8) und 5. ml (Abbildung 4. 10) vorhanden. Im 6. ml ist kein Annexin V mehr enthalten.

Experimentelles

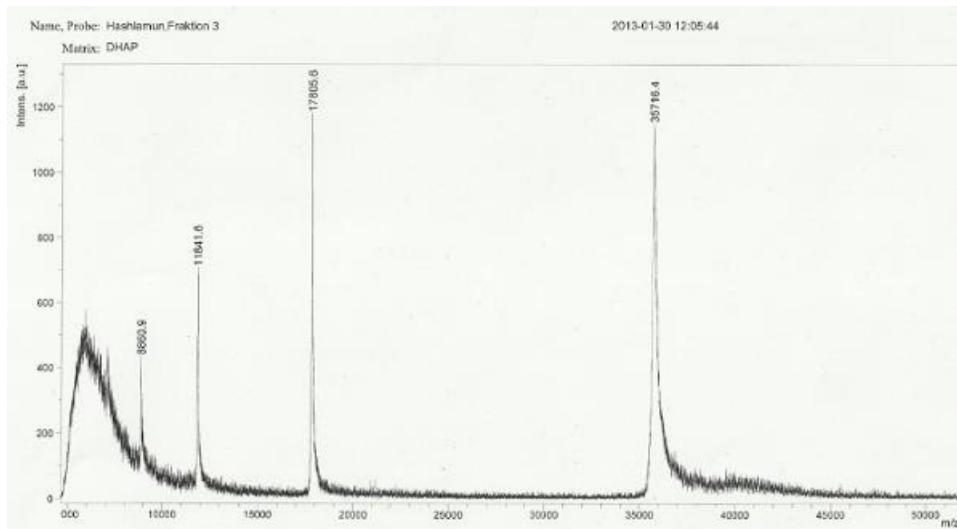


Abbildung 4. 8: Massenspektrum der 3. ml Fraktion von Annexin V mit einer Masse von 35716,4. Der Wert von 17805 entspricht der Masse M/2 wahrscheinlich ohne die Aminosäure Glycin, welche rein rechnerisch bei 17783 liegen müsste. Die Masse 11841 entspricht der Masse M/3 ohne Glycin, welche rein rechnerisch bei 11830 liegen müsste.

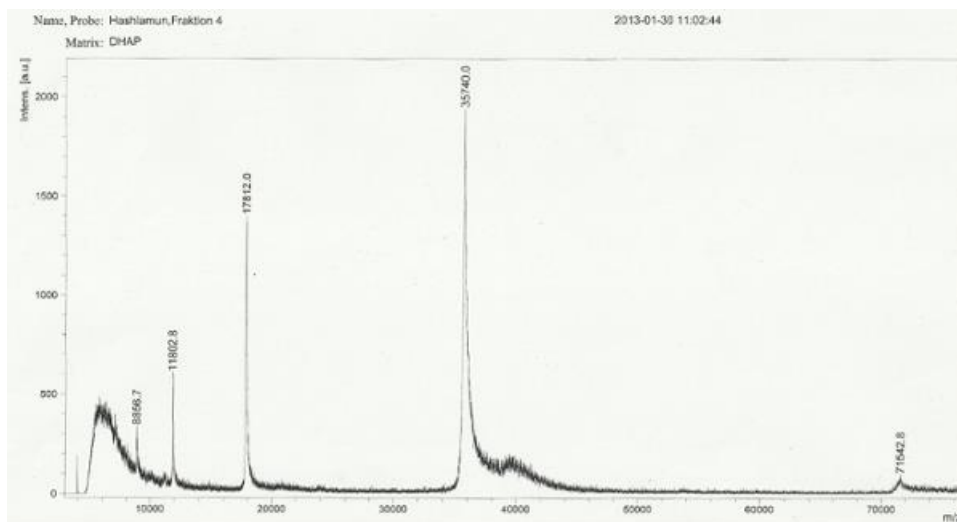


Abbildung 4. 9: Massenspektrum der 4. ml Fraktion von Annexin V mit einer Masse von 35740,0.

Experimentelles

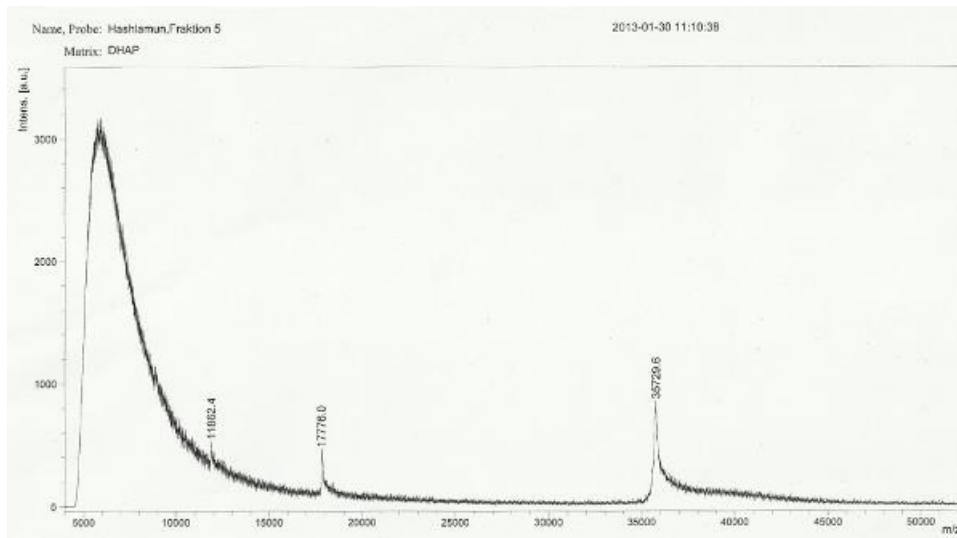


Abbildung 4. 10: Massenspektrum der 5. ml Fraktion von Annexin V mit einer Masse von 35729,6.

Im Vergleich zu der publizierten molaren Masse von Annexin V mit 35800 Da können die nicht ganz genauen wiedergefundenen Massen in dieser Größenordnung als Messfehler gewertet werden.

Die Bildung des NOTA-Avidin-Konjugats wurde ebenfalls mit MS nachgewiesen. Die Abbildung 4. 11 zeigt, dass Avidin 8-12 Moleküle NOTA-NCS* gebunden hat (pro Monomer des Proteins wurden 2-3 Moleküle NOTA gebunden), was einer maximalen Masse von 17227 entspricht.

*Avidin ist ein tetrameres Protein. Tetramer bedeutet, dass das Molekül aus vier identischen Monomeren besteht (jede Untereinheit hat ihre eigene biologische Aktivität).

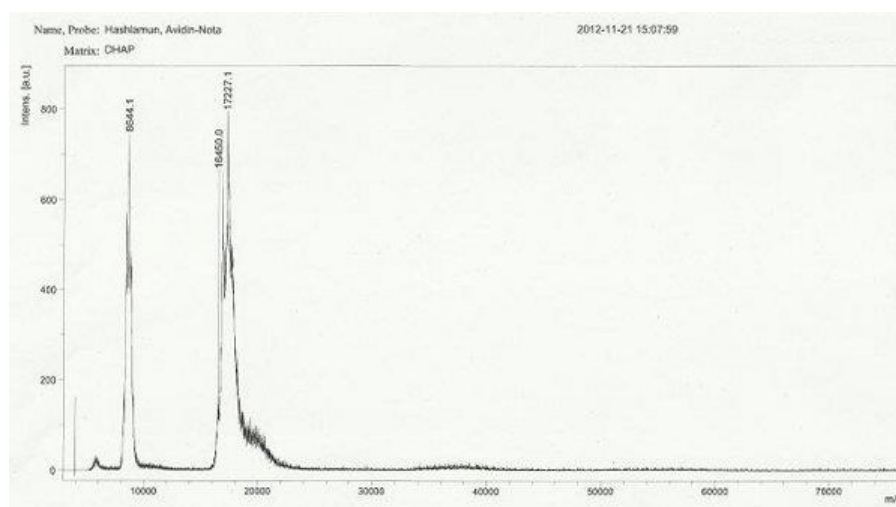


Abbildung 4. 11: Massenspektrum des NOTA-Avidin-Konjugates

Experimentelles

Die Bildung des NOTA-Annexin V-Konjugats wurde auch nachgewiesen. Abbildung 4. 12 zeigt, dass Annexin V 17 Moleküle NOTA-NCS gebunden hat, was einer Masse von 43564,6 entspricht.

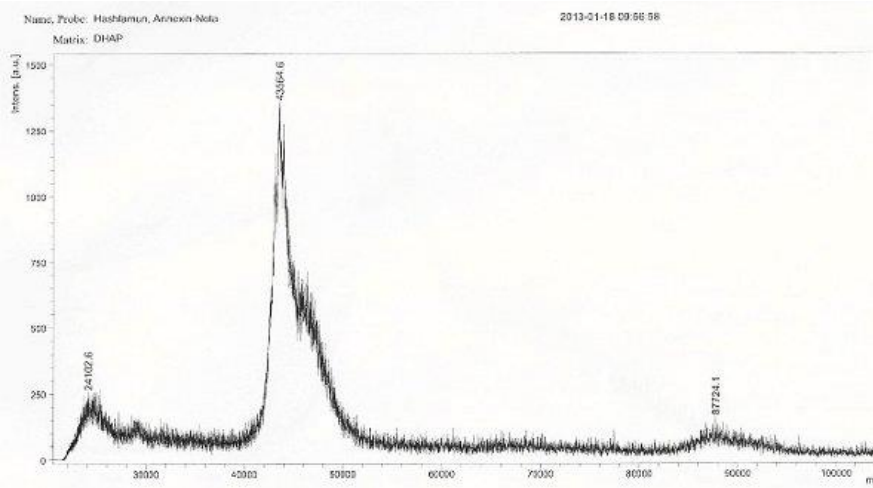


Abbildung 4. 12: Massenspektrum des NOTA-Annexin V-Konjugates

Dieses hoch konjugierte Derivat wurde in dem Versuch zur post-Konjugat-Markierung mit Al-¹⁸F eingesetzt, im Verhältnis von 29:1 NOTA-NCS zu Annexin V (s. Kapitel 4.6. 3).

5. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte als potentieller PET-Tracer ein mit den PET-Nukliden ^{18}F -Fluorid bzw. ^{68}Ga Gallium markiertes Annexin V-Derivat zur Detektion atherosklerotischer Plaques entwickelt werden.

Dazu wurde eine Auswahl an geeigneten bifunktionellen Chelatisierungsagenzien (als reaktive Funktionalität zum Annexin V wurde die Isothiocyanatgruppe gewählt) mit ^{68}Ga Gallium und ^{18}F -Fluorid markiert, und die zum Erhalt der optimalen radiochemischen Ausbeuten notwendigen Konditionen untersucht. ^{18}F -Fluorid sollte dabei nicht wie üblich kovalent gebunden werden, sondern als $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex chelatisiert werden.

Anschließend wurden die Kopplung der NCS-aktivierten Chelatisierungsagenzien (Chelator-NCS) an Amine und die Markierung der Chelator-Amin-Konjugate mit ^{68}Ga Gallium und $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex untersucht, wobei sowohl die Kopplungs- als auch die Radiomarkierungsbedingungen hinsichtlich optimaler Konditionen und Ausbeuten untersucht wurden.

Hierbei wurden zwei verschiedene Methoden angewendet und deren Vor- bzw. Nachteile miteinander verglichen:

1. Die Post-Konjugat-Markierungsmethode, bei der zunächst die Chelator-Amin-Konjugate gebildet wurden und im Anschluss daran die Radiomarkierung erfolgte.
2. Die Pre-Konjugat-Markierungsmethode, bei der zunächst die NCS-aktivierten Chelatisierungsagenzien radiomarkiert wurden und erst danach mit Modellaminen unter Bildung der Konjugate gekoppelt wurden.

Abschließend folgten Reaktionen mit Proteinen und deren Radiomarkierung. Dabei wurde unter verschiedenen Aspekten untersucht, welche der beiden oben genannten Methoden (Post- vs. Pre-Konjugat-Markierung) vorteilhafter ist. Der Aspekt der Anzahl radioaktiver Reaktionsschritte war dabei nicht alleine ausschlaggebend. Es musste auch der wirtschaftliche Gesichtspunkt eingebracht werden, da das zu verwendende Protein Annexin V sehr teuer ist, sollte es möglichst sparsam eingesetzt werden.

5.1 Chelatisierungsagenzien (Chelator-NCS)

Auf dem Weg der Radiomarkierung von Chelator-Protein-Konjugaten wurden zunächst die ausgewählten NCS-aktivierten Chelatisierungsagenzien mit ^{68}Ga Gallium bzw. $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex unter Erreichen hoher radiochemischer Ausbeuten markiert. Diese NCS-aktivierten Chelatisierungsagenzien dienen somit als Mittler (Linker) zwischen einem Protein

(hier Annexin V) und einem geeigneten PET-Radionuklid, da die Radiomarkierung durch Komplexbildung des Chelatisierungsagenzes mit dem Radionuklid erfolgt.

Im Rahmen der Arbeit wurden folgende Chelatisierungsagenzien gewählt: p-SCN-Bn-NOTA, p-SCN-Bn-PCTA, p-SCN-Bn-oxo-DO3A und p-SCN-Bn-DOTA.

Zur Optimierung der Markierungsreaktion wurden verschiedene Parameter untersucht, wie pH-Wert, Temperatur, Reaktionsdauer, Chelatisierungsagenz-Stoffmenge, Puffer und Puffer-Stoffmenge.

Die Markierung mit ^{68}Ga erwies sich für alle eingesetzten Chelatisierungsagenzien erfolgreich.

Die Markierung mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex gelang hingegen nur mit NOTA als Komplexlignand. Die zum Vergleich zu den anderen Liganden unterschiedliche Struktur des NOTA-Chelators ist für dieses Verhalten verantwortlich (NOTA ist das einzige Chelatisierungsagenz, das nicht die Struktur des Cyclododecanes hat). Bei Chelatisierungsagenzien ist bekannt, dass sie sehr selektiv an bestimmte Metall-Ionen binden, abhängig vor allem von der Größe des Ringes. Bei NOTA ist bekannt, dass die Kavität des Ringes für dreiwertige Metall-Ionen (Ga^{3+} , Al^{3+}) optimal ist. Sowohl Ga^{3+} als auch Al^{3+} bilden oktaedrische Komplexe mit einer pentadentaten Bindung ausgehend von den Elektronenpaaren der drei Stickstoffen und den drei Carboxylatgruppen des NOTA-Rings im Falle von Gallium und ausgehend von den drei Stickstoffen und zwei Carboxylatgruppen des NOTA-Rings für die Bindung des Aluminiumfluorids.

Andere Komplexlignanden als NOTA, die eine erfolgreiche Markierung von $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex gestatten, sind in der Literatur bisher nicht bekannt.

pH-Abhängigkeit

Da der pH-Wert bei der Chelatisierung eine wichtige Rolle spielt, wurde in entsprechenden Versuchsreihen der optimale pH-Wert der Markierungsreaktion ermittelt. Der pH-Wert beeinflusst die Komplexbildung, weil Liganden aufgrund ihrer freien Elektronenpaare auch als Basen wirken können. Bei niedrigen pH-Werten konkurrieren Wasserstoff-Ionen und Metall-Ionen um die Liganden, und die Komplexbildung wird erschwert. Ein höherer pH-Wert, bei dem nur wenige Wasserstoff-Ionen in der Lösung vorliegen, wirkt sich demnach positiv auf die Komplexbildung aus. Ein zu hoher pH-Wert bewirkt aber, dass die Metall-Ionen im alkalischen Milieu als Hydroxide ausfallen und somit keine Komplexe mehr bilden können.

D.h. der optimale pH-Wert bei der Chelatisierung sollte ein entscheidender Parameter der Reaktionsausbeute sein.

pH-Wert – ⁶⁸Ga-Markierung

Die Versuche zum pH-Wert bei der ⁶⁸Ga-Markierung zeigen deutlich, dass bei einem pH-Wert zwischen 3,5 und 4 die höchsten radiochemischen Ausbeuten erzielt werden konnten, und das unabhängig davon, welcher Komplexligand (Chelatisierungsagens) eingesetzt wurde. Bei einem pH-Wert von 4 erfolgten anschließend alle weiteren Markierungsreaktionen mit ⁶⁸Gallium.

pH-Wert – Al-¹⁸F-Markierung

Die pH-Abhängigkeit bei der Markierung mit Al-¹⁸F-Komplex ist ähnlich der Markierung mit ⁶⁸Gallium. Hier liegt der optimale pH-Wert zwischen 4 und 4,5. Bei diesem pH-Wert konnten die höchsten radiochemischen Ausbeuten erzielt werden. Daher erfolgten auch hier alle weiteren Markierungsreaktionen mit Al-¹⁸F-Komplex bei einem pH-Wert von 4.

Stoffmengenabhängigkeit – ⁶⁸Ga- und Al-¹⁸F-Markierung

Bei den Untersuchungen zur Stoffmengenabhängigkeit galt es, die optimal niedrigen Stoffmengen an Komplexliganden herauszufinden, die hohe radiochemische Ausbeuten ermöglichen. Dazu wurden die Konzentrationen immer weiter reduziert. Wie zu erwarten war, stieg mit Erhöhung der eingesetzten Chelatisierungsagens-Stoffmenge die radiochemische Ausbeute, bis zum Erreichen eines Maximums bzw. eines Plateaus. Für den Chelator NOTA-NCS wurde bei der ⁶⁸Ga-Markierung bei Einsatz von 159 nmol ein radiochemisches Ausbeutemaximum von 97% erreicht. Bei der Markierung mit Al-¹⁸F-Komplex wurde ein Maximum von 88% bei Einsatz von 106 nmol NOTA-NCS und 15 nmol Al³⁺ erreicht (als Vergleich: bei Einsatz von 106 nmol NOTA-NCS wurde unter den gleichen Konditionen bei einer ⁶⁸Ga-Markierung 92% erreicht). Die etwas geringere Ausbeute bei der Markierung mit Al-¹⁸F-Komplex lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass bei der Al-¹⁸F-Markierung auch das Risiko besteht, dass das Chelatisierungsagens die Al³⁺-Ionen aus der Al-¹⁸F-Komplex-Lösung chelatisiert, sodass überschüssiges Al³⁺ die radiochemische Ausbeute begrenzt.

Temperatur und Reaktionsdauer – ⁶⁸Ga-Markierung

Die Untersuchung der Reaktionstemperatur ergab, dass sich die radiochemische Ausbeute bei Raumtemperatur und bei 90 °C nicht unterschied. Die Markierungsreaktion bei Raumtemperatur liefert schon nach 15 Minuten Ausbeuten über 90% bei Einsatz von 106 nmol NOTA-NCS. Auch die Markierung der anderen Chelatisierungsagenzien gelang mit

radiochemisch hohen Ausbeuten von 83 bis 90% bei Einsatz von 106 nmol Chelator-NCS und bei Raumtemperatur.

Die Untersuchung der Reaktionszeit ergab das Maximum an radiochemischer Ausbeute nach 15 Minuten Markierungsdauer (sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 90 °C).

Temperatur und Reaktionsdauer – Al-¹⁸F-Markierung

Die Markierungsreaktion mit Al-¹⁸F-Komplex bei 90 °C lieferte nach 15 Minuten niedrigere Ausbeuten als die ⁶⁸Ga-Markierung, dabei spielt das Stoffmengenverhältnis Al³⁺ zu Chelatisierungssagenz eine wichtige Rolle.

Weiterhin wurde bei der Al-¹⁸F-Markierung die Temperatur von 40 °C untersucht, da in der Zielreaktion mit dem Protein Annexin V die Reaktionstemperatur zum Schutz der biologischen Aktivität des Proteins 40 °C nicht übersteigen sollte.

Anders als bei der Markierung mit ⁶⁸Gallium ergab die Markierung mit Al-¹⁸F-Komplex, dass sich die radiochemischen Ausbeuten bei 40 °C und 90 °C stark unterscheiden.

Bei 40 °C und Ansatz von 106 nmol NOTA-NCS und 7,5 nmol Al³⁺ wurde nach 15 Minuten eine Ausbeute von 55% erreicht, bei 90 °C aber 78%. Eine fast quantitative Umsetzung bei 40 °C wurde ab Reaktionszeiten von ca. 45 Minuten erreicht.

Puffer – Al-¹⁸F-Markierung

Bei der Markierung mit Al-¹⁸F-Komplex wurde zusätzlich die Pufferabhängigkeit untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass sich mit Steigerung der eingesetzten Pufferstoffmengen (Aluminiumacetatpuffer), bzw. der eingesetzten Al³⁺-Ionen, die radiochemische Ausbeute erhöht.

Liegt ein Überschuss an Aluminiumatomen (Verhältnis Al³⁺ zu Chelatisierungssagenz > 1) bei der Komplexbildung vor, besteht die Möglichkeit, dass das Chelatisierungssagenz freies Al³⁺ anstelle von Al-¹⁸F-Komplex inkorporiert. D.h. der Anteil an Al³⁺-Ionen sollte so gering wie möglich gehalten werden jedoch noch genug, um eine gute radiochemische Ausbeute erreichen zu können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nicht explizit untersucht, wie hoch der Anteil an freiem, nicht gebundenem ¹⁸F-Fluorid in der Al-¹⁸F-Komplexlösung war. Was aber feststeht, ist, dass eine Erhöhung der Al³⁺-Stoffmenge bis zu 15 nmol keine Reduktion der radiochemischen Ausbeuten verursachte (siehe unten), solange ein genügender Überschuss an Komplexligand (z.B. 106 nmol) vorlag.

Bei einer Stoffmenge von 106 nmol NOTA-NCS und einer Markierungstemperatur von 90 °C und nach 15 Minuten Reaktionszeit wurde bei Einsatz von 5 nmol Al³⁺ eine radiochemische Ausbeute von 76% erreicht, bei 7,5 nmol Al³⁺ 78%, bei 10 nmol Al³⁺ 80% und bei 15 nmol Al³⁺ 88%. Bei einer weiteren Erhöhung auf 20 nmol Al³⁺ sank die Ausbeute auf 80%.

Zusätzlich zu beachten ist, dass andere Puffer wie Natriumacetat, Natriumcitrat oder Ammoniumacetat eine Markierung mit Al-¹⁸F-Komplex verhinderten.

Zusammenfassend gelten für die Markierungsreaktion mit ⁶⁸Gallium folgende Reaktionsbedingungen als optimal:

1. pH-Wert: 3,5 - 4
2. Markierungsdauer und Markierungstemperatur: 15 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 90 °C
3. Chelatisierungsagens-Stoffmenge: ab 106 nmol (Stammlösung: 3 mg Chelatisierungsagens/ml MeCN bzw. DMF)

Zusammenfassend gelten für die Markierungsreaktion mit Al-¹⁸F-Komplex folgende Reaktionsbedingungen als optimal:

1. pH-Wert: 4 - 4,5
2. Markierungsdauer und Markierungstemperatur: 15 Minuten bei 90 °C*
3. Stoffmenge Al³⁺: ab 10 nmol (Stammlösung: 0,468 mg AlCl₃·6H₂O in 1 ml 0,1M Natriumacetatpuffer) bei einer eingesetzten Menge von 106 nmol NOTA-NCS (Stammlösung: 3 mg Chelatisierungsagens/ml MeCN bzw. DMF)**

*Für Proteine ist eine Temperatur von 90 °C nicht geeignet, da sie denaturieren können.

**Die Markierung mit Al-¹⁸F-Komplex gelang nur mit NOTA-NCS.

Hydrolyse der Isothiocyanatgruppe des Chelatisierungsagenzes

Bei Markierungsreaktionen unter erhöhten Temperaturen wurde nicht unerwartet die Hydrolyse der Isothiocyanatgruppe des Chelatisierungsagenzes beobachtet. Die Bildung des Hydrolyseprodukts ist prinzipiell unerwünscht, da erstens ein Teil des Chelatisierungsagenzes zur Bildung des Chelator-Amin(Protein)-Konjugats nicht mehr zur Verfügung steht und zweitens das Hydrolyseprodukt und das Chelatisierungsagens bei der Markierung in Konkurrenz stehen.

Zusammenfassend können folgende Faktoren zur Förderung der Hydrolyse der Isothiocyanatgruppe des Chelatisierungsagenzes beschrieben werden:

1. hohe Temperaturen während der Reaktion
2. zu basischer oder saurerer pH-Wert der Lösung
3. Stammlösungen des NCS-aktivierten Chelatisierungsagenzes bevorzugt in DMF statt MeCN

Galliumkolloid

Die Bildung von Galliumkolloid während der ^{68}Ga -Markierung erwies sich neben der Hydrolyse als ein weiteres Problem, vor allem bei den Reaktionen mit Proteinen. Eine effiziente Trennung von Protein und Galliumkolloid musste gefunden werden, da sich Kolloid und Protein bei vielen Trennmethode gleich verhielten. Daher wurde untersucht, welche Faktoren zu erhöhter Kolloidbildung führten. Die Bildung des Galliumkolloids ist von der Temperatur und dem pH-Wert abhängig, niedrigere Temperaturen und niedrige pH-Werte beugen der Bildung des Kolloids vor.

5.2 Pre- und Post-Konjugat-Markierungsmethode (Modellreaktionen mit Amin)

In dieser Versuchsreihe wurden zwei unterschiedliche Markierungswege untersucht – die Pre- und die Post-Konjugat-Markierungsmethode. Als Modellverbindungen dienten, hinsichtlich der Reaktion mit dem Protein Annexin V, die Amine n-Butylamin und Dibutylamin.

Bei der Post-Konjugat-Markierungsmethode wurden im ersten Schritt die NCS-aktivierten Chelatisierungsagenzien mit dem Amin gekoppelt und das entstandene Chelator-Amin-Konjugat mit dem Radionuklid im zweiten Schritt markiert.

Bei der Pre-Konjugat-Markierungsmethode wurden zunächst die NCS-aktivierten Chelatisierungsagenzien mit dem Radionuklid markiert und anschließend mit dem Amin gekoppelt.

Die Pre-Konjugat-Markierungsmethode hat den entscheidenden Nachteil, dass sowohl die Markierung als auch die Kopplung mit Radioaktivität erfolgen, während bei der Post-Konjugat-Markierungsmethode nur ein radioaktiver Arbeitsschritt erfolgt. Die eingesetzten Radionuklide, sowohl ^{68}Ga als auch ^{18}F -Fluorid haben eine geringe Halbwertszeit. Ein möglichst später Einsatz des Radionuklids ist daher im Hinblick auf den fortschreitenden Zerfall wünschenswert.

Bei dieser Versuchsreihe mit Aminen wurden im experimentellen Teil nur die Ergebnisse der

Post-Konjugat-Markierungsmethode vorgestellt, da sie bessere Ausbeuten lieferten.

Bei der Versuchsreihe mit Proteinen wird auf die Unterschiede (Vor- und Nachteile) der beiden Methoden noch einmal detaillierter eingegangen (siehe unten).

Zur Optimierung der Post-Konjugat-Markierung der Chelator-Amin-Konjugate wurden verschiedene Abhängigkeiten untersucht, wie z.B. Stoffmengenabhängigkeit, pH-Wert, Temperatur und Reaktionsdauer.

Stoffmengenabhängigkeit – ^{68}Ga - und $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Markierung

Analog zu den Markierungsreaktionen mit NOTA-NCS wurden die NOTA-Amin-Konjugate mit ^{68}Ga und $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex markiert.

Auch bei der Markierung der NOTA-Amin-Konjugate mit ^{68}Ga führte die Erhöhung der NOTA-Stoffmenge zur Erhöhung der radiochemischen Ausbeute deutlich und war völlig analog der Markierung der NCS-aktivierten Liganden.

^{68}Ga -NOTA-*n*-Butylamin-Konjugat erreichte bei einem Einsatz von 133 nmol NOTA-NCS nach 15 Minuten bei 90 °C eine radiochemische Ausbeute von 93%.

$\text{Al-}^{18}\text{F}$ -NOTA-*n*-Butylamin erreichte bei Einsatz von 80 nmol nach 15 Minuten bei Raumtemperatur eine radiochemische Ausbeute von 46% (im Vergleich: eine ^{68}Ga -Markierung unter gleichen Konditionen lieferte eine radiochemische Ausbeute von 88%). Die Ausbeute erhöhte sich bei einer Verlängerung der Markierungsdauer von 30 Minuten auf 56% und von 45 Minuten auf 60%.

pH-Wert, Temperatur und Reaktionsdauer – ^{68}Ga - und $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Markierung

Die Markierung sowohl mit ^{68}Ga als auch mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex erfolgt wie in den Vorversuchen bei einem pH-Wert von 4.

Die Markierungsdauer mit ^{68}Ga beträgt bei den Chelator-Amin-Konjugaten (bzw. Modellreaktionen mit Aminen) ebenfalls nur 15 Minuten bei Raumtemperatur oder 90 °C. Dabei wurden Ausbeuten bei der Markierung mit ^{68}Ga im Verhältnis 2:5 (Chelatisierungsagenz zu Amin) bei den verschiedenen Chelatisierungsagenzien von 88-93% erreicht. Bei der Markierung mit $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -Komplex lag die maximal erreichte radiochemische Ausbeute bei einer Markierungsdauer von 15-45 Minuten und bei Raumtemperatur zwischen 46% und 60%.

5.3 Versuche mit Proteinen

Galliumkolloid

Bei der ^{68}Ga -Markierung der Chelator-Protein-Konjugate trat das Problem der Bildung von ^{68}Ga -Galliumkolloid auf. Bildet sich dieses Kolloid, kann analytisch nur schwer zwischen dem Kolloid und dem Chelator-Protein-Konjugat unterschieden werden, sodass die Ermittlung der Ausbeute nicht zuverlässig möglich ist.

Daher musste eine Methode zur Unterscheidung von ^{68}Ga -Galliumkolloid und dem ^{68}Ga -Chelator-Protein-Konjugat gefunden werden. Aufgefallen war, dass sich sowohl dünnschichtchromatographisch (iTLC, Si 60) als auch auf Reversed Phase (C18)-Kartusche Galliumkolloid und Chelator-Protein-Konjugat gleich verhielten.

Die Trennung von Galliumkolloid und Chelator-Protein-Konjugat wurde mittels Protein-beschichteten iTLC-Streifen und Size-Exclusion-Chromatographie (PD10) durchgeführt.

1. Nach Literaturrecherche war mittels einer mit HSA/0,9% NaCl beschichteten iTLC im Fließmittel Ethanol/Ammoniak/Wasser (2:1:5) das Chelator-Protein-Konjugat auf dem oberen Abschnitt zu finden, während Galliumkolloid am Ursprung verblieb.
2. Es konnte mittels Size-Exclusion-Chromatographie (PD10) festgestellt werden, dass das Galliumkolloid in den ersten beiden Fraktionen eluiert wird, während das Konjugat zwischen der 3. und 5. Fraktion.

Löslichkeit des Proteins

Als ein Problem bei der Konjugatbildung stellte sich das Lösungsmittel der Chelatisierungsagens-Stammlösung heraus. Das organische Lösungsmittel DMF, welches zuerst gewählt wurde, um das Risiko der Hydrolysebildung zu verringern, fällte das Protein aus. Somit musste zunächst untersucht werden, bei welchem Anteil organisches Lösungsmittel DMF bzw. MeCN das Protein ausfällt. Es wurde festgestellt, dass hierbei MeCN besser toleriert wird und erst bei höheren Anteilen zur Fällung des Proteins führte. Bei MeCN ist das Protein erst bei Zugabe von 37,5% MeCN ausgefallen. Deswegen wurde MeCN als Lösungsmittel für die Chelatisierungsagens-Stammlösung gewählt.

Pre- und Post-Konjugat-Markierungsmethode - ^{68}Ga

Vergleicht man für die ^{68}Ga -Markierung die Ergebnisse des Proteins Avidin bzw. Annexin V ergibt sich folgendes Bild:

Bei der Pre-Konjugat-Markierungsmethode mit Aufreinigung nach dem ersten Schritt wird nach 45 Minuten Kopplungsdauer eine radiochemische Ausbeute von 68% erreicht. Bei der Pre-Konjugat-Markierungsmethode ohne Aufreinigung wurde eine maximale radiochemische Ausbeute von 63% nach einer Kopplungsdauer von 75 Minuten erreicht.

Der markierte Chelator-NCS kann im Falle der Pre-Konjugat-Markierung mittels C18-Kartuschenaufreinigung relativ rein erhalten werden. Das ist auch durch Trennung mittels HPLC-Chromatographie und Weiterverarbeitung der Produktfraktion möglich. Somit werden alle Edukte bzw. entstandene Nebenprodukte vom markierten Chelator-NCS entfernt. Freies Radionuklid sowie evtl. gebildetes Hydrolyseprodukt oder Galliumkolloid (bei der ^{68}Ga -Markierung) sind durch die Aufreinigung nicht mehr in der Lösung zur Kopplung mit dem Zielmolekül enthalten. Galliumkolloid bleibt auf der C18-Kartusche / HPLC-Säule zurück und freies Nuklid sowie das Hydrolyseprodukt werden in polareren Lösungen eluiert. Ohne solche vorherige Aufreinigung kann das Galliumkolloid mittels C18-Kartusche von dem Chelator-Protein-Konjugat nicht mehr getrennt werden, zudem verbliebe das Protein selbst auf der Kartusche.

Im Vergleich zur der Pre-Konjugat-Markierungsmethode wurden mit der Post-Konjugat-Markierungsmethode höhere Ausbeuten erzielt. Zusätzlich bestätigen die höheren radiochemischen Ausbeuten bei geringerer Reaktionsdauer den Schritt der Aufreinigung als Vorteil. Somit ist eine Aufreinigung nach dem ersten Schritt sinnvoll, um störende Edukte oder Substanzen aus der Lösung zu entfernen.

Bei der Post-Konjugat-Markierungsmethode mit Aufreinigung nach dem ersten Schritt benötigt man 30 Minuten für eine ^{68}Ga -Markierung, um eine radiochemischen Ausbeute von 90% zu erreichen. Bei der Post-Konjugat-Markierungsmethode ohne Aufreinigung wurden unter den gleichen Konditionen nach 30 Minuten 80% erreicht.

Pre- und Post-Konjugat-Markierungsmethode – Al- ^{18}F -Komplex

Vergleicht man für die Al- ^{18}F -Markierung die Ergebnisse des Proteins Avidin bzw. Annexin V ergibt sich folgendes Bild:

Bei der Al- ^{18}F -Markierung waren die Ausbeuten der Pre- und Post-Konjugat-Markierungsmethode mit Aufreinigung nach dem ersten Schritt vergleichbar. Die Ausbeuten lagen zwischen 38% und 62% bei einer Reaktionsdauer von 45-105 Minuten.

Bei dieser Versuchsreihe wurden im experimentellen Teil nur die Ergebnisse mit Aufreinigung vorgestellt, da sie bessere Ausbeuten lieferten.

Verhältnis Chelatisierungsagens zu Protein

Auch bei Verwendung von Al-¹⁸F-Komplex wirkte sich das Verhältnis Chelator-NCS zu Protein entscheidend auf die radiochemischen Ausbeute aus. Dazu wurden unterschiedliche Verhältnisse NOTA-NCS zu Protein untersucht. Dabei sollte beachtet werden, dass sich das angegebene Verhältnis bei den Post-Konjugat-Markierungen auf die eingesetzten Stoffmengen des nicht markierten NOTA-NCS beziehen (nicht auf das markierte NOTA-NCS). Bei den Pre-Konjugat-Markierungen bzw. in Fällen wo nur radioaktive Substanz vorgelegt wird, ist die Konzentration des stabilen nicht radioaktiven Reaktionspartners (in unserem Falle des Proteins) die ausschlaggebende Größe.

Bei der Post-Konjugat-Markierung mit ⁶⁸Gallium hatte sich das Stoffmengenverhältnis 2:1 (Chelator-NCS zu Protein) als das günstigste (sowohl für das Protein Albumin als auch für Avidin und Annexin V) herausgestellt. Die Post-Konjugat-Markierung bei einer Temperatur von ca. 40 °C im Verhältnis 2:1 erzielte die Ausbeuten von ca. 90% nach 30 Minuten Markierungsdauer.

Die hohen Ausbeuten von ca. 90%, die bei der Post-Konjugat-Markierung mit ⁶⁸Gallium erzielt werden konnten, ließen sich bei der Al-¹⁸F-Markierung nicht erreichen. Bei dem für ⁶⁸Gallium günstigsten Verhältnis von 2:1, ließen sich hier nur maximale Ausbeuten von 50% erzielen. Daher wurden höhere Chelatisierungsagens-Stoffmengen eingesetzt und die Ergebnisse der Massenspektroskopie hinzugezogen, um die Zahl der tatsächlich gebundenen NOTA-Moleküle an die Proteine zu ermitteln, da laut Literatur beide Proteine (Avidin und Annexin V) mehrere Lysine in der Struktur erhalten.

Ausgegangen war von der Überlegung, dass mit steigendem NOTA-Anteil auch mehrere NOTA-Moleküle an das Protein gebunden werden, damit sollte sich die radiochemische Ausbeute erhöhen. Dabei muss beachtet werden, dass sich die biologische Aktivität des Annexins durch die Modifizierung der Lysine durch NOTA verändern kann.

Selbst wenn alle Lysinreste der Proteine, was natürlich zu einem Totalverlust der biologischen Aktivität führen würde, mit NOTA-NCS konjugiert wären, ließe sich die radiochemische Ausbeute nicht deutlich über 50% steigern.

Als die am besten geeignete Methode im Hinblick auf die biologische Aktivität des Proteins Annexin^oV zeigte sich die Pre-Konjugat-Markierungsmethode mit Aufreinigung (HPLC-Chromatographie nach dem ersten Schritt), bei der nur trägerfreie Mengen an Al-¹⁸F-NOTA-

NCS zu einem großen Überschuss an Annexin V eingesetzt wurden, und somit pro Annexin V-Molekül nur ein NOTA-Molekül reagierte. Die radiochemische Ausbeute ließe sich vermutlich über höhere Annexin V-Konzentrationen noch steigern, ist jedoch mit ~55% bei der eingesetzten Annexin V-Konzentration von 135 nmol/ml schon durchaus zufriedenstellend.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Zielreaktion, nämlich die Markierung des Proteins Annexin V mit Al-¹⁸F-Komplex, gelang, wenn auch mit geringeren radiochemischen Ausbeuten als bei der ⁶⁸Ga-Markierung. Das kann damit erklärt werden, dass die NOTA-Kavität für das Gallium eine optimalere Größe hat als für den Al-¹⁸F-Komplex und desweiteren bei der Al-¹⁸F-Markierung auch das Risiko besteht, dass das Chelatisierungsgenz die Al³⁺-Ionen aus der Al-¹⁸F-Komplex-Lösung chelatisiert (Al³⁺-Ionen und Al-F-Komplex stehen in Konkurrenz), sodass überschüssiges Al³⁺ die radiochemische Ausbeute begrenzt.

Zusammenfassung der Vorteile und Nachteile der Pre- und Post-Konjugat-Markierungsmethode

Die Post-Konjugat-Markierung mit ⁶⁸Gallium lieferte im Vergleich zu der Pre-Konjugat-Markierung höhere Ausbeuten. Die Post-Konjugat-Markierungsmethoden sind für ⁶⁸Gallium daher vorteilhafter. Bei der Al-¹⁸F-Markierung waren die Ausbeuten der Pre- und Post-Konjugat-Markierung vergleichbar.

Die Markierungszeiten des Chelator-Protein-Konjugats (Post-Konjugat-Markierung) sind relativ lang (ca. 60 Minuten). Dem gegenüber steht eine kurze Markierungsdauer bei der Pre-Konjugat-Markierung, die nur 15 Minuten beträgt, aber einen weiteren radioaktiven Kopplungsschritt mit einer Dauer von 30-120 Minuten erforderlich macht.

Die Pre-Konjugat-Markierung hat insbesondere hinsichtlich der Markierung von Proteinen den Vorteil, dass bei der eigentlichen Radiomarkierung hohe Temperaturen eingesetzt werden können ohne Gefahr, das einzusetzende Ziel-Protein zu zerstören. Die Pre-Konjugat-Markierungsmethode hat jedoch auch einen möglicherweise entscheidenden Vorteil, dass die Stoffmengen gering gehalten werden können. Im Grenzfall könnte radiomarkiertes Chelatisierungsgenz mittels z. B. HPLC-Chromatographie vom nicht markierten Chelatisierungsgenz getrennt und gereinigt werden. Somit bestünde die Möglichkeit einer strikten 1:1 Markierung von Radionuklid und Protein, welches strukturell die geringstmögliche Veränderung des Proteins bedeutet und somit höchste biologische Aktivität.

Hauptvorteil der Post-Konjugat-Markierung ist der Ausbeutegewinn bedingt durch den Einsatz von Radioaktivität als abschließenden Schritt, während der Hauptvorteil der Pre-Konjugat-Markierung hier darin zu sehen ist, dass sämtliche Arbeitsschritte durch radioaktive Detektion leicht analysierbar sind.

Abschließend sind die Vor- und Nachteile der Post- und Pre-Konjugat-Markierungsmethode im Vergleich aufgelistet. Dies geschieht im Hinblick auf eine mögliche zukünftige Verwendung des NOTA-Annexin V-Konjugats als Tracer für Diagnostik in der Nuklearmedizin.

Tabelle 5. 1: Vor- und Nachteile der Pre- und Post-Konjugat-Markierung im Vergleich

Schritt	Post-Konjugat-Markierung		Schritt	Pre-Konjugat-Markierung	
	Vorteil	Nachteil		Vorteil	Nachteil
1. Kopplung	keine RA, längere RZ möglich	Aufreinigung PD10 ^B , keine RA-Detektion ^A	1. Markierung	günstige Aufreinigung (C18, HPLC), RA-Detektion, kurze RZ	RA schon im ersten Schritt
2. Markierung	RA-Detektion	längere RZ nicht möglich (da RA)	2. Kopplung	RA-Detektion	RA, längere RZ nicht möglich

RA = Radioaktivität, RZ = Reaktionszeit

^A als Nachweis nur MS möglich (Nachteil: Kosten, keine Aussage über die Ausbeute).

^B längere Aufreinigungszeit + arbeitsaufwändig

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die häufigste Ursache von akuten Koronarsyndromen ist die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque der Koronargefäße, wobei ca. 60 - 80% der Infarkte in Bereichen entstehen, die in den Monaten zuvor nicht signifikant stenosiert waren. Zur Diagnose der vulnerablen Plaques (ein Plaque-Typ, der besonders gefährdet ist zu rupturieren) werden vorzugsweise nichtinvasive Techniken angewandt, wie z.B. Myokardperfusionsszintigraphie, Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) oder Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Dazu wird ein radioaktiver Tracer benötigt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde als potentieller PET-Tracer ein mit den PET-Nukliden (^{18}F -Fluorid bzw. ^{68}Ga) markiertes Annexin V-Derivat entwickelt. Die Markierung des Proteins erfolgte über ein geeignetes bifunktionelles Chelatisierungsagens. ^{18}F -Fluorid wurde dabei nicht wie üblich kovalent gebunden, sondern als Aluminium-Fluorid-Komplex chelatisiert.

Zur Optimierung der Markierungsreaktion wurden verschiedene Parameter untersucht wie pH-Wert, Temperatur, Reaktionsdauer, Chelatisierungsagens-Stoffmenge, Puffer und Puffer-Stoffmenge. Weiterhin wurden auch unterschiedliche Trennmethoden bzw. Aufreinigungsmethoden untersucht.

Die Markierung mit ^{68}Ga erwies sich für alle eingesetzten Chelatisierungsagenzien erfolgreich. Die Markierung mit Al- ^{18}F -Komplex gelang hingegen nur mit NOTA-NCS als Komplexligand (die Isothiocyanatgruppe wurde als reaktive Funktionalität zum Annexin V gewählt). Dabei wurden zwei unterschiedliche Markierungswege untersucht (Pre- vs. Post-Konjugat-Markierungsmethode) und deren Vorteile bzw. Nachteile miteinander verglichen.

Als die am besten geeignete Methode im Hinblick auf die biologische Aktivität des Proteins Annexin V zeigte sich die Pre-Konjugat-Markierungsmethode mit Aufreinigung (HPLC-Chromatographie nach dem ersten Schritt), bei der nur trägerfreie Mengen an Al- ^{18}F -NOTA-NCS zu einem großen Überschuss an Annexin V eingesetzt wurden, und somit pro Annexin-Molekül nur ein NOTA-Molekül reagierte.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
μ	Mikro
ν_e	Elektron-Neutrino
Å	Ångström
aq	wässrig (aqueous)
A_s	spezifische Aktivität
Bq	Bequerel
BSA	Bovine Serum Albumine
bzw.	Beziehungsweise
c.a.	carrier added
c.f.	carrier free
Ci	Curie
cpm	counts per minute
cps	counts per seconds
CT	Computertomographie
d	Day
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
d.h.	das heißt
DHAP	2,5-Dihydroxyacetophenon
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DOTA-NCS (p-SCN-Bn-DOTA)	2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DOTATATE	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure-octreotat
DOTATOC	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure-octreotid
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
e^+	Positron
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTMP	Ethylendiamin-tetra(methylenphosphonsäure)
EtOH	Ethanol
FDG	Fluorodesoxyglukose
g	Gram
GBq	Gigabequerel
h	Hour
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinylethansäure
his	Histidin
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
HSA	Humanes Serum Albumin
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases
HYNIC	Hydrazinnikotinamid
IBZM	Iodobenzamid
iTLC-SG	Instant Thin Layer Chromatography Silica Gel
i.v.	Intravenös
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronvolt
LCMS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
Lys	Lysin
MALDI	Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation
Max.	Maximum
MBq	Megabequerel
MeCN	Acetonitril
mg	Milligramm

Abkürzungsverzeichnis

MIBG	Metaiodbenzylguanidin
min	Minuten
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mol	Mol
mmol	Millimol
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektroskopie
n	Neutron
n.c.a.	non carrier added
NCS	Isothiocyanat
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NOTA	1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-triaessigsäure
NOTA-NCS (p-SCN-Bn-NOTA)	2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triaessigsäure
OH	Hydroxy
OSAP	Puffer (Natriumsalz der Octansulfonsäure + Phosphorsäure+ Wasser)
Oxo-DO3A-NCS (p-SCN-Bn-Oxo-Do3A)	Oxa-4,7,10-tetraazacyclododecane-5-S-(4-isothiocyanatobenzyl)-4,7,10-triaessigsäure
p	Proton
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCTA-NCS (p-SCN-Bn-PCTA)	6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-4-S-(4-isothiocyanatobenzyl)-3,6,9-triaessigsäure
PD10	protein desalting column (Säulen zur Elution nach Größenausschluss)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PS	Phosphatidylserin
PSMA	Prostata-Spezifisches Membran Antigen
R _f	Retentionsfaktor
RA	radiochemische Ausbeute
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
RZ	Reaktionszeit
SEC	Size Exclusion Chromatography (Größenausschlusschromatographie)
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
s.u.	siehe unten
TFA	Trifluoressigsäure
TLC	Thin Layer Chromatography (Dünnschichtchromatographie)
TOF	Time of Flight
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
Vis	Visible, sichtbar
z.B.	zum Beispiel

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Lit 1. Becquerel H., Sur les radiations invisibles émises par les sels d'uranium, *Comptes Rendus de l'Académie des sciences*, **1896**, 122, 689-694
- Lit 2. Curie M., Rayons émis par les composés de l'uranium et du thorium, *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, **1898**, 126, 1101-1103.
- Lit 3. Rutherford E., The magnetic and electric deviation of the easily absorbed rays from radium, *Philosophical Magazine Series 6*, **1903**, 5(26), 177-187
- Lit 4. Schönberg A., Der Röhrenverbrauch bei Benutzung kleiner und großer Induktoren, *Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen*, Verlag Lucas Gräfe & Sillem, Hamburg, **1904-1905**
- Lit 5. F. Kirchberg, Die rechtliche Beurteilung der Röntgen- und Radiumschädigungen, *Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen* (Ergänzungsband 32), Verlag Lucas Gräfe & Sillem, Hamburg, **1914**
- Lit 6. Hahn O., Strassmann O., Über die Entstehung von Radiumisotopen aus Uran durch Bestrahlen mit schnellen und verlangsamteten Neutronen, *Die Naturwissenschaften*, **1938**, 26(46), 755-756
- Lit 7. Lawrence E. O., Livingston M. S., The production of high speed light ions without the use of high voltages, *Physical Review*, **1932**, 40, 19
- Lit 8. Glaubitt D., Schneider J., Marx E., Schäfer H., Gerhartz H., Eigenbrod R., Bone-marrow scintigraphy in patients with reticuloendothelial sarcoma, *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin*, **1972**, 78, 145-149
- Lit 9. Gallagher B. M., Fowler J. S., Gutterson N. I., MacGregor R. R., Wan C. N., Wolf A. P., Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [¹⁸F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, *Journal of Nuclear Medicine*, **1978**, 19(10), 1154-1161
- Lit 10. von Hevesy G., Paneth F., Die Löslichkeit des Bleisulfids und Bleichromats, *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, **1913**, 82(1), 323-328

Literaturverzeichnis

- Lit 11. von Hevesy G., Die Selbstdiffusion in geschmolzenem Blei, *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie*, **1920**, 26(17-18), 363-364
- Lit 12. Schicha H., Schober O., *Nuklearmedizin: Basiswissen und klinische Anwendung*, Schattauer Verlag, Stuttgart, **2013**
- Lit 13. Pandya D. N., Dale A. V., Kim J. Y., Lee H., Ha Y. S., An G. I., Yoo J., New macrobicyclic chelator for the development of ultrastable ^{64}Cu -radiolabeled bioconjugate, *Bioconjugate Chemistry*, **2012**, 23(3), 330-335
- Lit 14. Bauwens M., De Saint-Hubert M., Devos E., Deckers N., Reutelingsperger C., Mortelmans L., Himmelreich U., Mottaghy F. M., Verbruggen A., Site-specific ^{68}Ga -labeled Annexin A5 as a PET imaging agent for apoptosis, *Nuclear Medicine and Biology*, **2011** 38(3), 381-392
- Lit 15. Vosjan M. J., Perk L. R., Roovers R. C., Visser G. W., Stigter-van Walsum M., van Bergen En Henegouwen P. M., van Dongen G. A., Facile labelling of an anti-epidermal growth factor receptor nanobody with ^{68}Ga via a novel bifunctional desferal chelate for immuno-PET, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2011**, 38(4), 753-763
- Lit 16. Prasanphanich A. F., Nanda P. K., Rold T. L., Ma L., Lewis M. R., Garrison J. C., Hoffman T. J., Sieckman G. L., Figueroa S. D., Smith C. J., [^{64}Cu -NOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2] targeting vector for positron-emission tomography imaging of gastrin-releasing peptide receptor-expressing tissues, *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, **2007**, 104(30), 12462-12467
- Lit 17. Velikyan I., Maecke H., Langstrom B., Convenient preparation of ^{68}Ga -based PET-radiopharmaceuticals at room temperature, *Bioconjugate Chemistry*, **2008**, 19(2), 569-573
- Lit 18. Biddlecombe G. B., Rogers B. E., de Visser M., Parry J. J., de Jong M., Erion J. L., Lewis J. S., Molecular imaging of gastrin-releasing peptide receptor-positive tumors in mice using ^{64}Cu - and ^{86}Y -DOTA-(Pro1,Tyr4)-bombesin(1-14), *Bioconjugate Chemistry*, **2007**, 18(3), 724-730
- Lit 19. Saha G. B., *Physics and Radiobiology of Nuclear Medicine*, Springer, New York, **2001**

Literaturverzeichnis

- Lit 20. Deutsch Wikipedia, PET-Scan: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1067671>
- Lit 21. Browne E., Firestone R. B., Table of Radioactive Isotopes, John Wiley & Sons, Inc, New York **1986**
- Lit 22. Pfennig G., Klewe-Nebenius H., Seelmann-Eggebert W., Karlsruher Nuklidkarte, **1995**, Forschungszentrum Karlsruhe, Neue Ausgabe bei Marktdienste Haberbeck, Lage, **2006**
- Lit 23. Wagner F. M., Ermert J., Coenen H.H., Three-step, "one-pot" radiosynthesis of 6-fluoro-3,4-dihydroxy-L-phenylalanine by isotopic exchange, *Journal of Nuclear Medicine*, **2009**, 50(10), 1724-1729
- Lit 24. Ter-Pogossian M. M., Raichle M. E., Sobel B. E., Tomographie mit radioaktiv markierten Substanzen, *Spektrum der Wissenschaft*, **1980**, 12, 121-133
- Lit 25. Iwata R., Ido T., Brady F., [18F]fluoride production with a circulating [18O]water target, *Applied Radiation and Isotopes*, **1987**, 38(11), 979-984
- Lit 26. Huszár I., Weinreich R., Production of ^{18}F with an ^{18}O enriched water target, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **1985**, 93(6), 349-354
- Lit 27. Ross R., Atherosclerosis - an inflammatory disease, *New England Journal of Medicine*, **1999**, 340(2), 115-126
- Lit 28. Libby P., Ridker P. M., Hansson G. K., Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis, *Nature*, **2011**, 473(7347), 317-325
- Lit 29. Weber C., Noels H., Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options, *Nature Medicine*, **2011**, 17(11), 1410-1422
- Lit 30. Ahmad S. I., Principles of Coronary Disease Evaluation & Management, 2011
<http://de.slideshare.net/alshafipdk/dr-syed-imranppt>

Literaturverzeichnis

- Lit 31. Giroud D., Li J. M., Urban P., Meier B., Rutishauer W., Relation of the site of acute myocardial infarction to the most severe coronary arterial stenosis at prior angiography, *American Journal of Cardiology*, **1992**, 69(8), 729-732
- Lit 32. Zaman T., Agarwal S., Anabtawi A. G., Patel N. S., Ellis S. G., Tuzcu E. M., Kapadia S. R., Angiographic lesion severity and subsequent myocardial infarction, *American Journal of Cardiology*, **2012**, 110(2), 167-172
- Lit 33. Finn A. V., Nakano M., Narula J., Kolodgie F. D., Virmani R., Concept of vulnerable/unstable plaque, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **2010**, 30(7), 1282-1292
- Lit 34. Schwartz S. M., Galis Z. S., Rosenfeld M. E., Falk E., Plaque rupture in humans and mice, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **2007**, 27(4), 705-713
- Lit 35. Arbab-Zadeh A., Nakano M., Virmani R., Fuster V., Acute coronary events, *Circulation* **2012**, 125(9), 1147-1156
- Lit 36. Virmani R., Burke A. P., Farb A., Kolodgie F. D., Pathology of the vulnerable plaque, *Journal of the American College of Cardiology*, **2006**, 47(8 Suppl), C13-18
- Lit 37. Geng Y. J., Libby P., Evidence for apoptosis in advanced human atheroma; colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme, *American Journal of Pathology*, **1995**, 147(2), 251-266
- Lit 38. Berenson G. S., Srinivasan S. R., Bao W., Newman W. P., Tracy R. E., Wattigney W. A., Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults, *New England Journal of Medicine*, **1998**, 338, 1650-1656
- Lit 39. Clarke M. C., Figg N., Maguire J. J., Davenport A. P., Goddard M., Littlewood T. D., Bennett M. R., Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis, *Nature Medicine*, **2006**, 12(9), 1075-1080
- Lit 40. Davies J. R., Rudd J. H. F., Weissberg P. L., Narula J., Radionuclide imaging for the detection of inflammation in vulnerable plaques, *Journal of American College of Cardiology*, **2006**, 47(Suppl 8), C57-68

Literaturverzeichnis

- Lit 41. Eisenhut M., Haberkorn U., Molecular position of radiolabels and its impact on functional integrity of proteins, *Journal of Nuclear Medicine*, **2006**, 47(9), 1400-1402
- Lit 42. Reutelingsperger C. P., Hornstra G., Hemker H. C., Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord, *European Journal of Biochemistry*, **1985**, 151(3), 625-629
- Lit 43. Fadok V. A., Voelker D. R., Campbell P. A., Cohen J. J., Bratton D. L., Henson P. M., Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *Journal of Immunology*, **1992**, 148(7), 2207-2216
- Lit 44. Boersma H. H., Kietselaer B. L., Stolk L. M., Bennaghmouch A., Hofstra L., Narula J., Heidendal G. A., Reutelingsperger C. P., Past, present, and future of Annexin A5: from protein discovery to clinical applications, *Journal of Nuclear Medicine*, **2005**, 46(12), 2035-2050
- Lit 45. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C., A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression of early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V, *Journal of Immunological Methods*, **1995**, 184(1), 39-51
- Lit 46. van Engeland M., Nieland L. J., Ramaekers F. C., Schutte B., Reutelingsperger C. P., Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure, *Cytometry*, **1998**, 31(1), 1-9
- Lit 47. Hetts S. W., To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease, *Journal of the American Medical Association*, **1998**, 279(4), 300-307
- Lit 48. Yagle K. J., Eary J. F., Tait J. F., Grierson J. R., Link J. M., Lewellen B., Gibson D. F., Krohn K. A., Evaluation of ¹⁸F-Annexin V as a PET imaging agent in an animal model of apoptosis, *Journal of Nuclear Medicine*, **2005**, 46(4), 658-666
- Lit 49. Li X., Link J. M., Stekhova S., Yagle K. J., Smith C., Krohn K. A., Tait J. F., Site-specific labeling of Annexin V with F-18 for apoptosis imaging, *Bioconjugate Chemistry*, **2008**, 19(8): 1684-1688

Literaturverzeichnis

- Lit 50. Grierson J. R., Yagle K. J., Eary J. F., Tait J. F., Gibson D. F., Lewellen B., Link J. M., Krohn K. A., Production of [F-18]fluoroannexin for imaging apoptosis with PET, *Bioconjugate Chemistry*, **2004**, 15(2), 373-379
- Lit 51. Lin K. J., Wu C. C., Pan Y. H., Chen F. H., Fu S. Y., Chiang C. S., Hong J. H., Lo J. M., In vivo imaging of radiation-induced tissue apoptosis by $^{99m}\text{Tc}(\text{I})\text{-his}_6\text{-Annexin A5}$, *Annals of Nuclear Medicine*, **2012**, 26(3), 272-280
- Lit 52. Takei T., Kuge Y., Zhao S., Sato M., Strauss H. W., Blankenberg F. G., Tait J. F., Tamaki N., Time course of apoptotic tumor response after a single dose of chemotherapy: comparison with ^{99m}Tc -Annexin V uptake and histologic findings in an experimental model, *Journal of Nuclear Medicine*, **2004**, 45(12), 2083-2087
- Lit 53. van de Wiele C., Lahorte C., Vermeersch H., Loose D., Mervillie K., Steinmetz N. D., Vanderheyden J. L., Cuvelier C. A., Slegers G., Dierck R. A., Quantitative tumor apoptosis imaging using technetium-99m-HYNIC Annexin V single photon emission computed tomography, *Journal of Clinical Oncology*, **2003**, 21(18), 3483-3487
- Lit 54. Martin R. B., Ternary hydroxide complexes in neutral solutions of Al^{3+} and F^- , *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1988**, 155(3) 1194-1200
- Lit 55. Li L., The biochemistry and physiology of metallic fluoride: action, mechanism, and implications, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **2003**, 14(2), 100-114
- Lit 56. Andre J. P., Mäcke H., Kaspar A., Künnecke B., Zehnder M., Macko L., In vivo and in vitro ^{27}Al NMR studies of aluminum(III) chelates of triazacyclononane polycarboxylate ligands, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2002**, 88(1), 1-6
- Lit 57. Hollemann A. F., Wiberg E., *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, Walter de Gruyter Verlag & Co., Berlin, New York, **1995**
- Lit 58. Lopez-Quintela M. A., Knoche W, Veith J., Kinetics and thermodynamics of complex formation between aluminium(III) and citric acid in aqueous solution, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1*, **1984**, 80(8), 2313-2321

Literaturverzeichnis

- Lit 59. Matthias A., Aluminiumspezifizierung in Bodenlösungen mit Hilfe der ^{27}Al -NMR-Spektroskopie; der Ionenpaarchromatographie und einer membrangestützten Größenfraktionierungstechnik, Herbert Utz Verlag GmbH, München, **2002**
- Lit 60. McBride W. J., Sharkey R. M., Karacay H., D'Souza C. A., Rossi E. A., Laverman P., Chang C. H., Boerman O. C., Goldenberg D. M., A novel method of ^{18}F radiolabeling for PET, *Journal of Nuclear Medicine*, **2009**, 50(6), 991-998
- Lit 61. Laverman P., McBride W. J., Sharkey R. M., Eek A., Joosten L., Oyen W. J., Goldenberg D. M., Boerman O. C., A novel facile method of labeling octreotide with ^{18}F -fluorine, *Journal of Nuclear Medicine*, **2010**, 51(3), 454-461
- Lit 62. Laverman P., D'Souza C. A., Eek A., McBride W. J., Sharkey R. M., Oyen W. J., Goldenberg D. M., Boerman O.C., Optimized labeling of NOTA-conjugated octreotide with F-18, *Tumor Biology*, **2012**, 33(2), 427-434
- Lit 63. Schoffelen R., Sharkey R. M., Goldenberg D. M., Franssen G., McBride W. J., Rossi E. A., Chang C. H., Laverman P., Disselhorst J. A., Eek A., van der Graaf W. T., Oyen W. J., Boerman O.C., Pretargeted immuno-positron emission tomography imaging of carcinoembryonic antigen-expressing tumors with a bispecific antibody and a ^{68}Ga - and ^{18}F -labeled hapten peptide in mice with human tumor xenografts, *Molecular Cancer Therapeutics*, **2010**, 9(4), 1019-1027
- Lit 64. McBride W. J., D'Souza C. A., Sharkey R. M., Karacay H., Rossi E. A., Chang C. H., Goldenberg D. M., Improved ^{18}F labeling of peptides with a fluoride-aluminum-chelate complex, *Bioconjugate Chemistry*, **2010**, 21(7), 1331-1340
- Lit 65. D'Souza C. A., McBride W. J., Sharkey R. M., Todaro L. J., Goldenberg D. M., High-yielding aqueous ^{18}F -labeling of peptides via Al^{18}F chelation, *Bioconjugate Chemistry*, **2011**, 22(9), 1793-1803
- Lit 66. McBride W. J., Sharkey R. M., Goldenberg D. M., Radiofluorination using aluminum-fluoride (Al^{18}F), *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Research*, **2013**, 3(1), 36

Literaturverzeichnis

- Lit 67. McBride W. J., D'Souza C. A., Sharkey R. M., Goldenberg D.M., The radiolabeling of proteins by the [¹⁸F]AIF method, *Applied Radiation and Isotopes*, **2012**, 70(1), 200-204
- Lit 68. Dijkgraaf I., Franssen G. M., McBride W. J., D'Souza C. A., Laverman P., Smith C. J., Goldenberg D. M., Oyen W. J., Boerman O. C., PET of tumors expressing gastrin-releasing peptide receptor with an ¹⁸F-labeled bombesin analog, *Journal of Nuclear Medicine*, **2012**, 53(6), 947-952
- Lit 69. Malik N., Zlatopolskiy B., Machulla H. J., Reske S. N., Solbach C., One pot radiofluorination of a new potential PSMA ligand [Al¹⁸F]NOTA-DUPA-Pep, *Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **2012**, 55(9), 320-325
- Lit 70. Rudd J. H., Davies J. R., Weissberg P. L., Imaging of atherosclerosis - can we predict plaque rupture?, *Trends in Cardiovascular Medicine*, **2005**, 15(1), 17-24
- Lit 71. Korngold E. C., Jaffer F. A., Weissleder R., Sosnovik D. E., Noninvasive imaging of apoptosis in cardiovascular disease, *Heart Failure Reviews*, **2008**, 13(2), 163-173
- Lit 72. Toretsky J., Levenson A., Weinberg I. N., Tait J. F., Uren A., Mease R. C., Preparation of F-18 labeled Annexin V: a potential PET radiopharmaceutical for imaging cell death, *Nuclear Medicine and Biology*, **2004**, 31(6), 747-752
- Lit 73. Wängler C., Wängler B., Lehner S., Elsner A., Todica A., Bartenstein P., Hacker M., Schirrmacher R., A universally applicable ⁶⁸Ga-labeling technique for proteins, *Journal of Nuclear Medicine*, **2011**, 52(4), 586-591
- Lit 74. Kubíček V., Havlíčková J., Kotek J., Tirso G., Hermann P., Tóth E., Lukeš I., Gallium(III) Complexes of DOTA and DOTA-monoamide: Kinetic and thermodynamic studies, *Inorganic Chemistry*, **2010**, 49(23), 10960–10969
- Lit 75. Guhlke S., Coenen H. H., Stöcklin G., Fluoroacylation agents based on small n.c.a. [¹⁸F]fluorocarboxylic acids, *Applied Radiation and Isotopes*, **1994**, 45(6), 715–727
- Lit 76. McBride W. J., Goldenberg D. M., Sharkey R. M., Al¹⁸F labeling of affibody molecules, *Journal of Nuclear Medicine*, **2014**, 55(6), 1043-1044

Literaturverzeichnis

- Lit 77. Laverman P., McBride W. J., Sharkey R. M., Goldenberg D. M., Boerman O. C., Al¹⁸F labeling of peptides and proteins, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **2014**, 57(4), 219-223
- Lit 78. Liu S., Liu H., Jiang H., Xu Y., Zhang H., Cheng Z., One-step radiosynthesis of ¹⁸F-AIF-NOTA-RGD₂ for tumor angiogenesis PET imaging, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2011**, 38(9), 1732-1741
- Lit 79. Kiesewetter D. O., Guo N., Guo J., Gao H., Zhu L., Ma Y., Niu G., Chen X., Evaluation of an [(18)F]AIF-NOTA analog of exendin-4 for imaging of GLP-1 receptor in insulinoma, *Theranostics*, **2012**, 2(10), 999-1009
- Lit 80. Jacobson O., Zhu L., Ma Y., Weiss I. D., Sun X., Niu G., Kiesewetter D. O., Chen X., Rapid and simple one-step F-18 labeling of peptides, *Bioconjugate Chemistry*, **2011**, 22(3), 422-428
- Lit 81. Thrall J. H., Freitas J. E., Swanson D., Rogers W. L., Clare J. M., Brown M. L., Pitt B., Clinical comparison of cardiac blood pool visualization with technetium-99m red blood cells labeled in vivo and with technetium-99m human serum albumin, *Journal of Nuclear Medicine*, **1978**, 19(7), 796-803
- Lit 82. Perreault A., Knight J. C., Wang M., Way J., Wuest F., (18)F-Labeled wild-type Annexin V: Comparison of random and site-selective radiolabeling methods, *Amino Acids*, 2016, 48(1), 65-74
- Lit 83. Hnatowich D. J., Virzi F., Rusckowski M., Investigations of avidin and biotin for imaging applications, *Journal of Nuclear Medicine*, **1987**, 28(8):1294-1302
- Lit 84. Gitlin G., Bayer E. A., Wilchek M., Studies on the biotin-binding site of avidin. Lysine residues involved in the active site, *Biochemical Journal*, **1987**, 242(3), 923-926