^{18}F-Click-Radiomarkierung polymerer Trägersysteme zur *ex vivo*- und *in vivo*-Evaluierung

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie, Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Achim Reibel

geb. in Ludwigshafen am Rhein

Mainz 2015

D 77

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Holger Frey

1. Berichterstatter: [redacted]
2. Berichterstatter: [redacted]

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2015

Zusammenfassung

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein leistungsstarkes, nicht-invasives, bildgebendes Verfahren in der Nuklearmedizin und hat darüber hinaus zunehmende Bedeutung in der Arzneistoffentwicklung. Zur Verbesserung des therapeutischen Index von niedermolekularen Pharmaka werden vermehrt Wirkstofftransportsysteme eingesetzt. Eine Klasse dieser Wirkstofftransportsysteme sind Liposomen. Die Weiterentwicklung der klassischen Liposomen sind sogenannte „Stealth"-Liposomen, die eine Polyethylenglykol (PEG)-Korona zur Herabsetzung der Erkennung und Ausscheidung tragen. Zur (Weiter-)Entwicklung und deren *in vivo*-Evaluierung bietet die PET die Möglichkeit, die Auswirkungen von strukturellen Anpassungen auf die pharmakokinetischen Eigenschaften solcher Transportsysteme zu untersuchen. Zur Evaluierung neuartiger, cholesterolverankerter, linear-hyperverzweigter Polyglycerole (Ch-PEG-*hb*PG) als sterisch stabilisierende Polymere in Liposomen wurden diese im Rahmen dieser Arbeit mit der prosthetischen Gruppe ^{18}F-TEG-N_3 über kupferkatalysierte Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC) in sehr hohen Ausbeuten radiomarkiert. Zum systematischen Vergleich des *in vivo*-Verhaltens wurde ebenfalls ein cholesterolbasiertes lineares PEG (Ch-PEG) mit CuAAC nahezu quantitativ radiomarkiert. Als drittes Element wurde die Direktmarkierung von Cholesterol mit [^{18}F]F^- entwickelt. Diese drei Verbindungen wurden zuerst separat als Einzelkomponenten und anschließend, in Liposomen formuliert, in Tierstudien an Mäusen hinsichtlich ihrer initialen Pharmakokinetik und Biodistribution untersucht. Dabei zeigte sich ein ähnliches Verhalten der neuartigen Ch-PEG-*hb*PG-Derivate zu den bekannten Ch-PEG, mit dem Vorteil der Multifunktionalität an den hyperverzweigten Strukturen. Die liposomalen Strukturen mit der neuartigen sterischen Stabilisierung wiesen eine erhöhte Blutzirkulationszeit und vorteilhafte Blut-zu-Leber- und Blut-zu-Lunge-Verhältnisse im Vergleich zu den linear stabilisierten Analoga auf.

Eine weitere Klasse von Wirkstofftransportsystemen sind polymere Trägersysteme wie pHPMA. Alkinfunktionalisierte Polymere konnten in zwei verschiedenen Größen (~12 und 60 kDa) mittels CuAAC in sehr hohen Ausbeuten mit der prosthetischen Gruppe ^{18}F-TEG-N_3 radiomarkiert werden. Bicyclononinderivate der gleichen Größen konnten ohne Kupferkatalyse über ringspannungsvermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition (SPAAC) mikrowellengestützt markiert werden und stehen somit zur *in vivo*-Untersuchung hinsichtlich des Einflusses der Markierungsart zur Verfügung.

Abstract

Positron Emission Tomography (PET) is a powerful and non-invasive tool in nuclear medical imaging with additionally increasing relevance in drug delivery. The often poor therapeutic index of small molecules as therapeutics can be improved by using drug delivery systems (DDS). One class of the various drug delivery systems available are liposomes. An improvement of the classical liposomes was the attachment of linear polyethylene glycol (PEG) to yield in "stealth" liposomes which show decreased detection and clearance in the body. In terms of development and refinement of such systems, PET can be used to image the pharmacokinetic properties *in vivo* and it is possible to correlate the impact of structural changes to the biodistribution of the investigated DDS. To evaluate novel, linear-hyperbranched polyglycerols with a cholesterol anchor (Ch-PEG-*hb*PG) as sterically stabilizing polymers for liposomes, radiolabeling with the prosthetic group ^{18}F-TEG-N_3 has been done via the copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition reaction (CuAAC) in nearly quantitative yields and is shown in this thesis. As part of a systematic study, cholesterol anchored linear PEG (Ch-PEG) was also radiolabeled via CuAAC in very high yields. Direct labeling of cholesterol with [^{18}F]F$^-$ was also established. Each of these three derivatives was investigated in animal studies itself, focusing on initial pharmacokinetics and biodistribution using mice as the biological environment. The subsequent evaluation of their liposomal formulations was done. The novel Ch-PEG-*hb*PG showed comparable behavior to the known Ch-PEG while having the advantage of multifunctionality due to the hyperbranched structure. Liposomal formulations containing the linear-hyperbranched polyglycerols showed enhanced retention in blood and advantageous blood-to-liver and blood-to-lung ratios in comparison to the linear shielded liposomes.

Another class of drug delivery systems are polymeric carriers like pHPMA. Two different sizes (~12 and 60 kDa) functionalized with alkynes were radiolabeled in very high yields with the prosthetic group ^{18}F-TEG-N_3 applying CuAAC. Bicyclononyne derivatives of HPMA-polymers, also having the same two sizes, were radiolabeled via microwave-assisted reactions without copper catalysis utilizing the strain-promoted alkyne-azide cycloaddition (SPAAC). These four differently sized and labeled HPMA-based polymers are available for *in vivo* animal studies to investigate whether there is an influence on the biodistribution due to the radiolabel or not.

Man merkt nie, was schon getan wurde,
man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.

Marie Curie (1867 – 1934)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Wirkstofftransportsysteme 1

1.1.1 Liposomen 3

1.1.2 HPMA-basierte Polymere 9

1.2 Positronen-Emissions-Tomographie (PET) 13

1.3 Strategien zur Radiomarkierung mittels Fluor-18 20

1.3.1 Direkte nukleophile ^{18}F-Radiomarkierung 20

1.3.2 Indirekte ^{18}F-Radiomarkierung 21

2. Problemstellung und Zielsetzung 25

2.1 ^{18}F-Radiomarkierung von Cholesterol und Polyether-funktionalisierten Cholesterolderivaten zur *in vivo*-Evaluierung 26

2.2 ^{18}F-Radiomarkierung von HPMA-basierten Polymeren mittels CuAAC und SPAAC 28

3. Experimentalteil 29

3.1 Reagenzien und Geräteausstattung 29

3.2 Organische Synthesen 31

3.2.1 Methansulfonsäure 3β-cholesterylester (1) 31

3.2.2 3-Fluorocholest-5-en (2) 31

3.2.3 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl-4-*p*-toluolsulfonat (3) 32

3.2.4 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethanol (4) 33

3.2.5 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-4-*p*-toluolsulfonat (5) 33

3.3 Polymersynthesen 35

3.3.1 Cholesterol-basierte Polymere 35

3.3.2 HPMA-basierte Polymere 37

3.4 Fluor-18 Radiomarkierungen 39

3.4.1 Radiomarkierung von ^{18}F-TEG-N_3 / [^{18}F]FETos 39

3.4.2 Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (^{18}F-a) 42

3.4.3 Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (^{18}F-b) 43

3.4.4 3-[^{18}F]Fluorocholest-5-en (9) 44

3.4.5 Kupferkatalysierte HPMA-Click-Markierung 45

3.4.6 Katalysatorfreie HPMA-Click-Markierung 46

3.5 Liposomenpräparation 47

3.6 Tierversuche 49

3.6.1 *Ex vivo*-Biodistributionsstudien 49

3.6.2 *In vivo*-µPET-Studien 49

4. Ergebnisse und Diskussion 51

4.1 Organische Synthesen 51

4.1.1 Methansulfonsäure 3β-cholesterylester (1) 51

4.1.2 3-Fluorocholest-5-en (2) 51
4.1.3 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl-4-*p*-toluolsulfonat (3) 52
4.1.4 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethanol (4) 53
4.1.5 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-4-*p*-toluolsulfonat (5) 53
4.2 Radiochemische Experimente 57
4.2.1 Radiomarkierung von ^{18}F-TEG-N_3 / [^{18}F]FETos 57
4.2.2 Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (^{18}F-a) 58
4.2.3 Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (^{18}F-b) 64
4.2.4 3-[^{18}F]Fluorocholest-5-en (9) 70
4.2.5 3-[^{18}F]Fluorethylcholest-5-en (10) 73
4.2.6 Kupferkatalysierte HPMA-Click-Markierung 74
4.2.7 Katalysatorfreie HPMA-Click-Markierung 77
4.3 Liposomenpräparation 81
4.4 Tierversuche 85
4.4.1 µPET-Bildgebung 86
4.4.2 *Ex vivo*-Biodistributionsstudien 89

5. Zusammenfassung und Ausblick 99

6. Anhang 103
6.1 Literaturverzeichnis 103
6.2 Abkürzungsverzeichnis 113
6.3 Abbildungsverzeichnis 115
6.4 Tabellenverzeichnis 117

7. Eidesstattliche Erklärung 119

1. Einleitung

Im Bereich der klinischen Anwendung findet sich eine breite, jährlich wachsende Anzahl an Arzneistoffen bzw. Wirkstoffmolekülen. Eines der Hauptziele in der Arzneistoffentwicklung ist die Steigerung des therapeutischen Index, um das Verhältnis der Effizienz zur Toxizität eines Medikaments so hoch wie möglich zu gestalten. Ein Großteil der eingesetzten Wirkstoffe weist aufgrund von schneller Ausscheidung nur eine kurze Retention in der Blutbahn auf. Somit ist die Möglichkeit einer Anreicherung im Ziel-/Tumorgewebe nicht mehr gegeben und zum Erreichen des gewünschten Effektes muss die applizierte Dosis erhöht werden, woraus wiederum ein Anstieg der Nebenwirkungen resultiert.
Um diesen Nachteil bei niedermolekularen (Chemo-)Therapeutika zu überwinden, wurde in den letzten Jahrzehnten eine Vielfalt an höhermolekularen Wirkstofftransportsystemen mit verlängerter Blutzirkulationszeit für den Einsatz in der Krebs-, Entzündungs- und Infektionstherapie entwickelt.

1.1 Wirkstofftransportsysteme

Die verschiedenen biopharmazeutischen Prozesse, welche die Pharmakokinetik eines Wirkstoffes beschreiben, werden häufig unter dem Akronym LADME (*engl.* Liberation: Freisetzung; Absorption: Aufnahme; Distribution: Verteilung; Metabolism: Metabolismus und Excretion: Ausscheidung) zusammengefasst und beschrieben. Jeder der einzelnen Prozesse kann das pharmakokinetische Profil des Pharmazeutikums beeinflussen. Dabei spielen die physikochemischen Eigenschaften, die Darreichungsform und -art, die patientenspezifische Anatomie bzw. Physiologie sowie die Metabolisierungs- und Exkretionswege eine entscheidende Rolle.[1]

Verschiedene Wirkstofftransportsysteme (*engl*. drug delivery systems, DDS), die aus lipid- oder polymerbasierten Nanopartikeln bestehen, können zur Verbesserung der pharmakologischen und therapeutischen Eigenschaften für die parenterale Applikation beitragen.[2] Systeme wie (PEGylierte) Liposomen, Polymere, Mizellen, Nanopartikel und Antikörper wurden für das Tumortargeting entwickelt und evaluiert. Die Wirkstoffe sind dabei an diese Strukturen konjugiert, also kovalent gebunden oder eingelagert.[3]

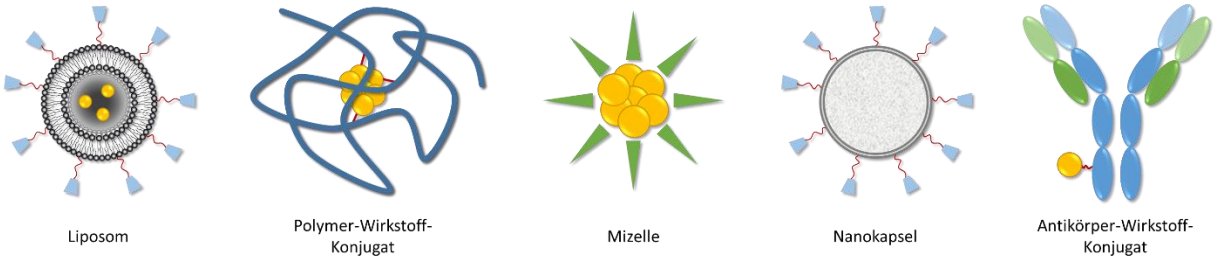


Abbildung 1: Überblick einiger klinisch relevanter Wirkstofftransportsysteme.

Mit Hilfe eines optimalen Designs kann ein Drug Delivery-System im Vergleich zum freien Wirkstoff diverse Vorteile bieten. Einige solcher Wirkstofftransportsysteme sind in Abbildung 1 dargestellt. Diese Vorzüge sind sowohl der Schutz des Medikaments vor vorschnellem Abbau oder frühzeitiger Ausscheidung als auch das Verhindern von Wechselwirkungen zwischen dem Wirkstoff und dem gesunden Gewebe zur Verringerung von Nebenwirkungen. Eine Erhöhung der Aufnahme im Zielgewebe sowie die Kontrolle der Pharmakokinetik und Bioverteilung zeichnen ein bestmögliches Wirkstofftransportsystem aus.[4]

Generell kann bei nanodimensionalen Trägersystemen zwischen aktivem und passivem Targeting unterschieden werden. Das aktive Targeting beruht auf der Bindung von hoch spezifischen Liganden (Targeting-Vektoren) an auf dem Zielgewebe überexprimierten Rezeptoren. Das Zielgewebe kann in Tumorzellen oder in sich in der Angiogenese befindliche Endothelzellen unterteilt werden. Die verwendeten Targeting-Vektoren sind an der Oberfläche des Wirkstofftransportsystems angebunden und ermöglichen so den zielgerichteten Transport des ebenfalls kovalent gebundenen oder eingelagerten niedermolekularen Arzneistoffs zu den Zielzellen.[5]
Passives Targeting beruht auf der Anreicherung von Nanocarriern im Tumorinterstitium aufgrund von fenestrierten Kapillaren und verminderter Lymphdrainage im Tumorgewebe. Matsumura und Maeda[6] entdeckten 1986 dieses später als EPR-Effekt (*engl.* enhanced permeability and retention: erhöhte(s) Durchlässigkeit und Rückhaltevermögen) bezeichnete Phänomen. Schematisch ist die Funktionsweise des EPR-Effektes in Abbildung 2 dargestellt.

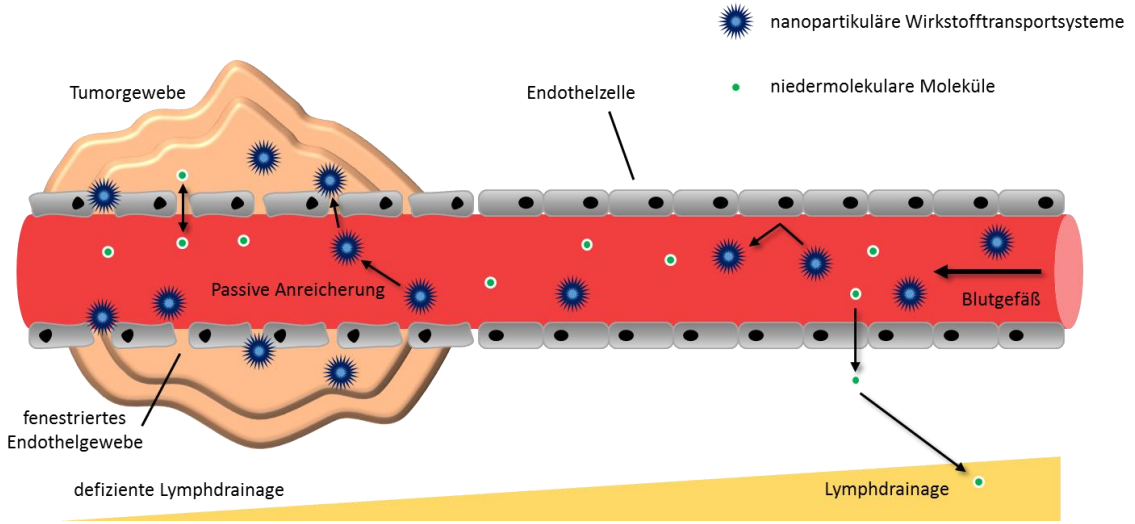


Abbildung 2: Schematische Darstellung des EPR-Effekts.

Die pathophysiologischen Zustände in soliden Tumoren weichen von denen in gesundem Gewebe ab. Die exzessive Angiogenese und die daraus resultierende Hypervaskularisierung zur Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff führt zu einer defekten Endothelstruktur der Blutgefäße. In Kombination mit der verminderten bzw. defekten Lymphdrainage wird makromolekularen Systemen die Anreicherung im Zwischenraum des Tumors ermöglicht. Bei kleinen Molekülen ist eine solche Akkumulation nicht möglich, da die Diffusion der Anreicherung entgegenwirkt. In gesundem Gewebe ist diese Retention nanodimensionierter Transportsysteme aufgrund der intakten Endothelschicht der Blutgefäße nicht möglich.[7]

1.1.1 Liposomen

Unter den vielen neuartigen Wirkstofftransportsystemen repräsentieren Liposomen eine fortgeschrittene Technologie, um aktive Substanzen an den Zielort zu transportieren. Es befinden sich bereits mehrere Formulierungen in der klinischen Anwendung.[8]

Die Bezeichnung „Liposom“ ist aus dem Griechischen, von „lípos“ Fett und „sóma“ Körper, abgeleitet. Es handelt sich dabei um eine hohlkugelförmige Anordnung einer Doppelmembran aus Lipiden (vgl. Abbildung 3). Erstmals beschrieben wurden die im Elektronenmikroskop entdeckten Strukturen von Alec D. Bangham im Jahr 1961 und daraufhin publiziert im Jahr 1964.[9,10] Die Bezeichnung dieser „phospholipid spherules“ als Liposomen erfolgte erst später durch Sessa und Weissmann.[11]

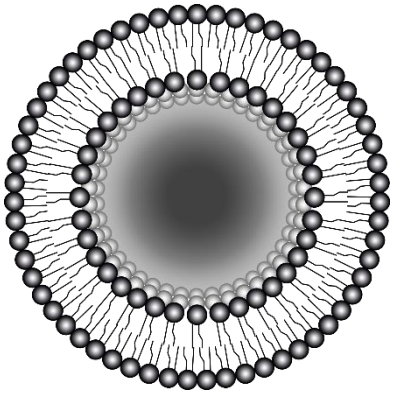


Abbildung 3: Schema eines in wässriger Lösung aus Phospholipiden geformten Liposoms.

Das Besondere an solchen liposomalen Strukturen ist ihre Zusammensetzung, die sie biokompatibel und bioabbaubar macht. Der wässrige Kern wird von einer oder mehreren Doppelmembranschichten aus natürlichen oder synthetischen Lipiden umschlossen. Liposomen, die aus natürlichen Phospholipiden bestehen, sind aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Zellmembranen biologisch inert, nur schwach immunogen und besitzen eine niedere intrinsische Toxizität. Ein großer Vorteil ist die Möglichkeit der Einlagerung von Substanzen verschiedener Lipophilie. Während stark lipophile Wirkstoffe in der Lipiddoppelmembran eingelagert werden, können hydrophile Substanzen im wässrigen Kern eingeschlossen werden. Man kann Liposomen nach ihrer Lamellarität (uni-, oligo-, multi-lamellar), Größe (klein, mittel oder groß) und Präparationsmethode klassifizieren. Unilamellare Vesikel bestehen aus nur einer Doppelmembranschicht, während oligo- und multilamellare Liposomen mehrere Schichten aus Doppelmembranen aufweisen.[8]

Eigenschaften wie die Größe, Ladung und eine eventuell vorhandene Abschirmung spielen bei der intravenösen Applikation von Liposomen eine erhebliche Rolle in der Bioverteilung. Konventionelle Liposomen zeigen nach der Opsonisierung (Bindung von speziellen Plasmaproteinen, sog. Opsoninen, an der Liposomenoberfläche) eine rasche Aufnahme durch das Mononukleäre Phagozytensystem (MPS) und werden dadurch schnell aus der Blutbahn entfernt. Während man sich diesen Effekt zur Behandlung von Infektionen im MPS und zur Aufnahme von Immunmodulatoren durch Makrophagen auch zu Nutze machen kann,[12,13] ist eine schnelle Blutclearance für Wirkstofftransportsysteme unerwünscht. Liposomen, die positiv oder negativ geladene Phospholipide in ihrer Doppelmembran integriert haben, werden wesentlich schneller aus der Blutbahn entfernt und in der Leber aufgenommen als Liposomen ohne Nettoladung.[14] Ebenso verstärkt sich mit zunehmender Größe der Liposomen der Grad der

Opsonisierung und damit die Geschwindigkeit der Eliminierung aus der Blutbahn.[15] Ein weiterer über das Komplementsystem vermittelter Weg zur Erkennung von Liposomen läuft über den sogenannten Membranangriffskomplex (*engl*. membrane attack complex, MAC), der eine etwa 10 nm große Pore in der Liposomendoppelmembran bildet und so zur Freisetzung des Wirkstoffs beiträgt. Des Weiteren sind Lipoproteine hoher und niederer Dichte (HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein) in den Transfer von liposomalen Lipiden auf die Serumlipoproteine beteiligt, was wiederum zu einer Destabilisierung des Liposoms und der Freisetzung des Cargos führt. Durch das Zusetzen von Cholesterol, einem natürlichen Bestandteil der eukaryotischen Zellmembran, kann die Lipidpackung verdichtet und damit die Transferrate der Lipide drastisch reduziert werden.[16]

Sterisch stabilisierte („Stealth") Liposomen

Um die Blutzirkulationszeit von Liposomen zu erhöhen und damit das passive Targeting zu ermöglichen, wurden verschiedene Oberflächenmodifikationen zur Steigerung der Hydrophilie untersucht. Aus Gründen der Einfachheit bzw. Kostenersparnis hat sich als prominentestes Beispiel für eine polymere sterische Stabilisierung von Liposomen die sogenannte PEGylierung weit verbreitet. Dabei werden Polyethylenglykolketten kovalent an Lipidanker (Cholesterol oder Phospholipide) gebunden und diese Amphiphile in der Doppelmembran der Liposomen eingelagert. Die damit verbundene Erhöhung der Hydrophilie auf der Oberfläche in Kombination mit der sterischen Abschirmung führt zu einer stark reduzierter MPS Aufnahme und zu verlängerter Zirkulationszeit in der Blutbahn. Die PEG-Ketten auf der Oberfläche der Liposomen führen auch zu einer verminderten Aggregation und einer erhöhten Stabilität der Formulierungen. Solche sterisch stabilisierten Vesikel wurden daraufhin als „Stealth" Liposomen bezeichnet.[8,17] Die Verlängerung der Blutzirkulationszeit ist abhängig von der Länge bzw. des Molekulargewichtes der PEG-Ketten und dem Einbaugrad in der Liposomenmembran.[18]
Ein wesentlicher Nachteil des linearen Polyethylenglykols ist der Mangel an funktionalisierbaren Gruppen, insbesondere wenn Methoxy-PEG als abschirmendes Polymer verwendet wird. Als vielversprechende Alternative dazu bieten sich sehr gut wasserlösliche hyperverzweigte Polyglycerole (*engl.* hyperbranched polyglycerol: *hb*PG) an. Die verzweigte Struktur erhöht den sterischen Anspruch, die vielen endständigen

Hydroxylgruppen erhöhen die Hydrophilie und ermöglichen weitere Funktionalisierung. Es wurde bereits gezeigt, dass *hb*PG eine gegenüber PEG erhöhte Proteinrepulsion aufweist.[19,20] Maruyama *et al*. belegten die verlängerte Blutzirkulationszeit von Liposomen, die mit phosphatidylverankerten Polyglycerololigomeren auf der Oberfläche versehen waren.[21] Zudem ist das als ABC (*engl*. accelerated blood clearance) bezeichnete immunogene Phänomen, welches bei wiederholter intravenöser Applikation von PEGylierten Nanocarriern den Effekt der verlängerten Blutzirkulation aufheben kann, bei mehrmaliger Gabe von PG-abgeschirmten Liposomen nicht zu beobachten.[22]

Ein synthetischer Ansatz zur Darstellung von linear-hyperverzweigten Polyetherlipiden wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frey (Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) präsentiert (vgl. Abbildung 4).

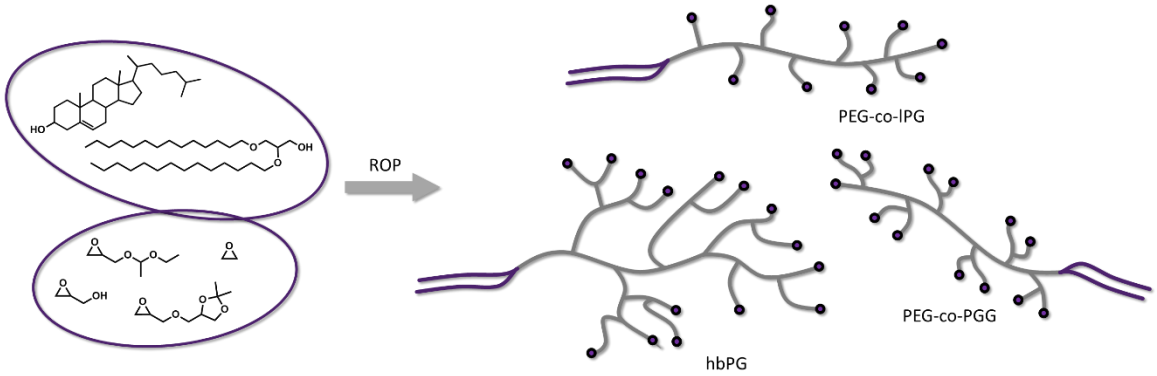


Abbildung 4: Überblick verschiedener Architekturen von polyetherbasierten Lipiden die durch oxoanionische Ringöffnungspolymerisation (ROP) synthetisiert werden.

Dabei kann ausgehend von Cholesterol oder einem Dialkylglycerylether als Initiator mittels oxoanionischer Ringöffnungspolymerisation unterschiedlicher Epoxide eine Vielzahl an verschiedenen Architekturen mit variabler Anzahl an Hydroxylgruppen synthetisiert werden.[23–25] Kürzlich wurden Liposomen mit linear-hyperverzweigter Abschirmung in humanem Serumalbumin mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht und es wurde keine Aggregation gefunden.[26] Ebenfalls wurden kürzlich solche Liposomen über duale Zentrifugation hergestellt und nachträglich modifiziert.[27]

Liposomenpräparation

Verschiedene Herstellungsverfahren werden zur Präparation von Liposomen angewandt.[10] Darunter befindet sich auch die Dünnfilm-Hydratationsmethode, bei der ein dünner Lipidfilm mit wässriger Lösung rehydriert wird. Daraus resultieren große multilamellare Vesikel (LMV: large multilamellar vesicles). Die zuvor in organischem Lösemittel gelösten Lipide werden mittels Stickstoff- bzw. Argonstrom oder am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit und bilden dabei einen dünnen Lipidfilm aus. Um diese LMV in unilamellare Liposomen zu überführen, wird die Lösung einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Dabei entstehen kleine unilamellare Vesikel von 15 - 50 nm Durchmesser (SUV: small unilamellar vesicles). Da die genauen Bedingungen der Ultraschallbehandlung nur sehr schwer reproduzierbar sind, ist die Extrusion der Lipidmischung durch definierte Porengrößen ein geeignetes Mittel, um Liposomen mit Durchmessern nahe der Porengröße herzustellen (vgl. Abbildung 5).[28]

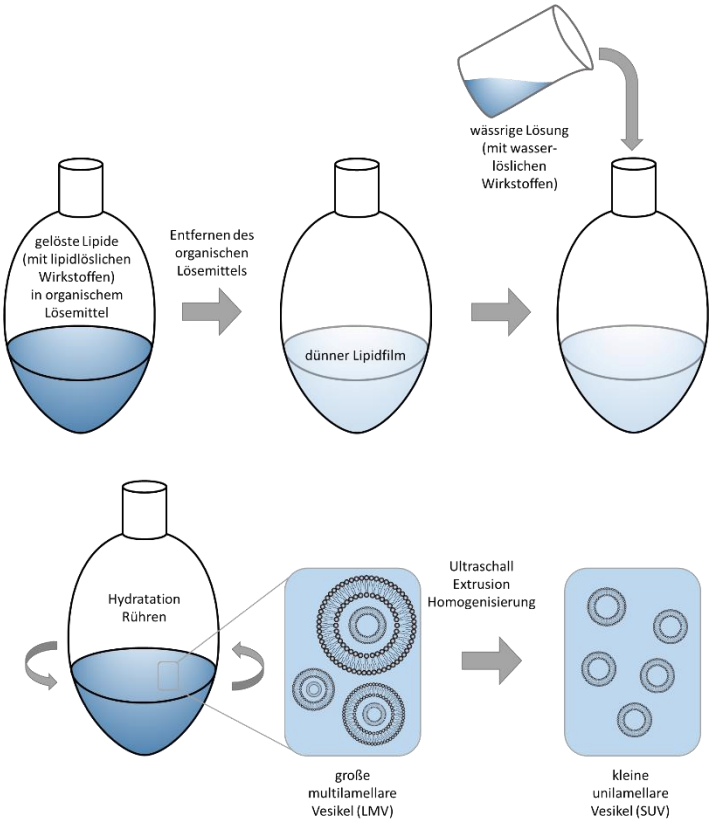


Abbildung 5: Überblick zur Präparation kleiner unilamellarer Vesikel (SUV) mittels Dünnfilm-Hydratationsmethode.

Radioaktiv markierte Liposomen

Viele Methoden zur Markierung von Liposomen mit diagnostischen oder therapeutischen Radionukliden wurden seit deren Entdeckung entwickelt. Diagnostische Radiolabel können dazu verwendet werden, um die Liposomen mittels Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT: single-photon emission computed tomography) oder Positronen-Emissions-Tomographie (PET) im Körper von Menschen oder Versuchstieren nicht-invasiv zu verfolgen. Der Einsatz dieser bildgebenden Methoden zur Darstellung der Aufnahme und Bioverteilung *in vivo* bietet Forschern ein hervorragendes Werkzeug in der Wirkstofftransportentwicklung. Die Anbindung von therapeutischen Radionukliden birgt großes Potential in Hinsicht auf die Krebstherapie.[29]

Die bereits veröffentlichten Methoden der Markierung von Liposomen können grob in vier Ansätze unterteilt werden: *Passive Einlagerung*, *Markierung der Membran*, *Oberflächenchelatisierung* und *remote loading-Verfahren*.
Bei der *passiven Einlagerung* wird das Radionuklid während der Herstellung der Liposomen zugeführt. Das oftmals komplexierte Radionuklid wird zur Pufferlösung gegeben und im wässrigen Kern eingeschlossen. Diese Methode wird wenig benutzt, da die Einschlusseffizienz stark von der Liposomengröße abhängt (< 10 % bei d = 100 nm) und mit dem eingeschlossenen Volumen korreliert.
Bei der *Markierung der Membran* sind die Radionuklide mit der Membran verbunden oder in der Lipiddoppelmembran eingelagert. Die Radioisotope können entweder an vorgeformte Liposomen konjugiert werden oder an Lipide gebunden sein, die während der Präparation in die Membran eingelagert werden. Alternativ dazu kann ein hydrophiles, radiomarkiertes Molekül zu vorgeformten Liposomen gegeben werden, das aufgrund seiner hohen Affinität zur Lipiddoppelmembran in diese eingelagert wird.
Die *Oberflächenchelatisierung* bietet die Möglichkeit fertig geformte Liposomen, in die Lipid-Chelator-Konjugate eingelagert sind, mit Radiometallen nachträglich zu markieren. Hierbei ist eine hohe Komplexstabilität erforderlich, um Trans-Chelatisierung und Trans-Metallierung zu unterbinden. Die Markierungsbedingungen dürfen nicht zu harsch sein, um das Liposom während der Markierung nicht zu zerstören. Des Weiteren wird bei der Komplexierung von Radiometallen oftmals eine Ladung eingebracht, was die Bioverteilung der Liposomen beeinflussen kann.

Das *remote loading-Verfahren* beschreibt eine aktive Beladung des wässrigen Liposomenkerns mit Radionukliden. Ein Ionophor oder lipophiler Chelator transportiert das Radionuklid über die Membran eines vorgeformten Liposoms. In dessen Innerem wird das Nuklid von einem eingeschlossenen hydrophilen Chelator aufgenommen. Um hohe Einschlusseffizienzen zu erreichen, muss die Affinität des Radionuklids zu dem lipophilen Chelator kleiner sein als zu dem eingelagerten Chelator.

Zur Bildgebung von Liposomen mittels SPECT werden die Radionuklide ^{67}Ga ($t_{1/2}$: 78,3 h), ^{111}In ($t_{1/2}$: 2,81 d), ^{123}I ($t_{1/2}$: 13,2 h) und ^{99m}Tc ($t_{1/2}$: 6,0 h) verwendet. Als PET-Nuklide finden ^{18}F ($t_{1/2}$: 109,7 min), ^{64}Cu ($t_{1/2}$: 12,7 h) und ^{124}I ($t_{1/2}$: 4,15 d) Anwendung.[30] In Hinsicht auf ^{18}F-markierte Liposomen wurde 2-[^{18}F]Fluordesoxyglucose mittels passiver Einlagerung mit einer Effizienz von ca. 10 % eingeschlossen.[31–34] Die direkte Markierung und Inkorporation eines fluorierten Lipids [^{18}F]Fluorodipalmitin in die Lipiddoppelmembran wurde gezeigt.[35,36] Als amphiphiles Molekül wurde 1-[^{18}F]Fluoro-3,6-dioxatetracosan zur *in vivo*-Verfolgung liposomaler Systeme verwendet.[37,38] Die Bildgebung von Liposomen wurde ebenfalls mit einem radiofluorierten Cholesterylether erreicht.[39]

1.1.2 HPMA-basierte Polymere

Neben Liposomen, Nanopartikeln und Antikörper-Konjugaten haben sich auch Polymere als Wirkstofftransportsysteme etabliert. Helmut Ringsdorf schlug 1975 das Konzept eines pharmakologisch aktiven, polymeren Trägersystems mit mehreren Funktionalitäten vor. Dieses synthetische Polymer sollte an sich wasserlöslich sein oder die Löslichkeit durch konjugierte Moleküle vermittelt bekommen. Zusätzlich sollten Wirkstoffe und Targeting-Vektoren angebunden sein, um das polymere Trägersystem an das Zielgewebe zu adressieren und dort den Wirkstoff freizusetzen (vgl. Abbildung 6).[40]

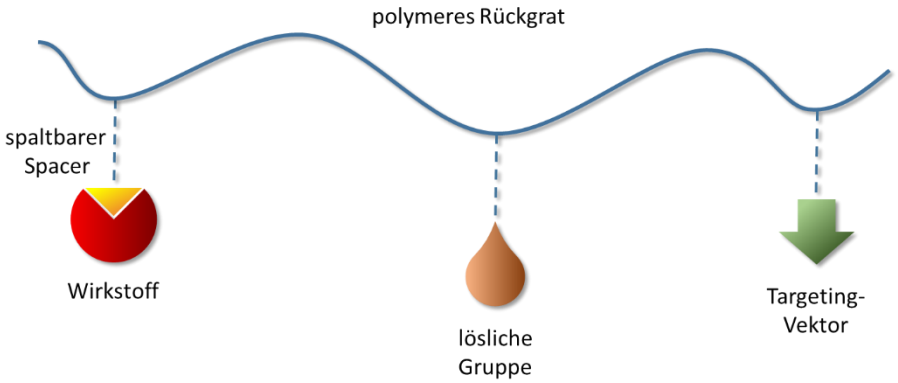


Abbildung 6: Modell eines synthetischen, polymeren Wirkstofftransportsystems mit pharmakologischer Aktivität nach H. Ringsdorf.

Ein auf dieses Modell zutreffendes System ist das in den 70er Jahren entwickelte pHPMA, poly-[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid], welches zuerst als Plasmaexpander untersucht wurde.[41,42] In präklinischen Tests zeigte sich keine Toxizität bei relevanten Dosen und ein nicht immunogenes Verhalten. Das Polymerrückgrat ist biokompatibel, allerdings nicht bioabbaubar.[43] Um die Ausscheidung dennoch gewährleisten zu können, wurden die meisten HPMA-Copolymere mit einem Molekulargewicht kleiner 40 kDa synthetisiert. Das obere Limit der renalen Ausscheidungsgrenze von pHPMA wurde bestimmt und liegt bei etwa 45 kDa.[44] Im Jahr 1994 wurden erstmals klinische Versuche mit polymeren Therapeutika gestartet. Es handelte sich dabei um ein mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin konjugiertes HPMA-Copolymer. Die Toxizität des Doxorubicins wurde durch die Anbindung an das HPMA-Polymergerüst erheblich herabgesetzt.[45] Weitere HPMA-Chemotherapeutika-Copolymere folgten.[46]

Die Art der Polymerisation hat einen erheblichen Einfluss auf die Breite der Molmassenverteilung bzw. den Polymerisationsgrad. Ein Maß für diese Verteilung bietet der Polydispersitätsindex (PDI). Der PDI wird aus dem Quotienten aus Gewichtsmittel der Molmasse ($\bar{M}_w$) und dem Zahlenmittel der Molmasse ($\bar{M}_n$) berechnet. Für monodisperse Polymere (z.B. Peptide) ergibt sich ein Wert von 1,0. Für synthetische, mittels freier radikalischer Polymerisation hergestellter Polymere liegt der Wert idealerweise bei rund 2,0. Ein Großteil der HPMA-Copolymere wurde nach der oben erwähnten freien radikalischen Polymerisation hergestellt.[41] Für die Zulassung eines Polymer-Wirkstoff-Konjugats zu klinischen Versuchen müssen bestimmte Spezifikationen des Molgewichtes und der Polydispersität erfüllt werden. Dazu wird die

Größenausschlusschromatographie angewandt, um eng verteilte Polymerfraktionen in größerem Maßstab zu erhalten.[43]

Als Alternativen bieten sich kontrollierte bzw. lebende freie radikalische Polymerisationstechniken für die Polymersynthese zu medizinischen Anwendungen an, mit denen enge Molmassenverteilungen erreicht werden können. Eine solche Technik ist die RAFT-Polymerisation (*engl*. reversible addition-fragmentation chain transfer, (Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragung).[47] Neben dem Vorteil der engen Molmassenverteilung (PDI < 1,2) können definierte Endgruppen und Architekturen erhalten werden und es besteht eine hohe Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen.

Die Kombination der RAFT-Polymerisation mit einem Pentafluorphenylmethacrylat-Reaktivester als Kettentransfer-Agens erlaubt nach Abschluss der Polymerisation eine polymeranaloge Umsetzung des Vorläufer-Polymers.[48,49] Das erhaltene Vorläufer-Polymer kann mit verschiedenen aminfunktionalisierten Strukturen derivatisiert werden, um so Targeting-Vektoren, Therapeutika oder funktionelle Gruppen (z.B. zur Radiomarkierung) einzubringen. Die finale Absättigung mit 2-Hydroxypropylamin liefert dann die gewünschten HPMA-Copolymere (vgl. Abbildung 7).

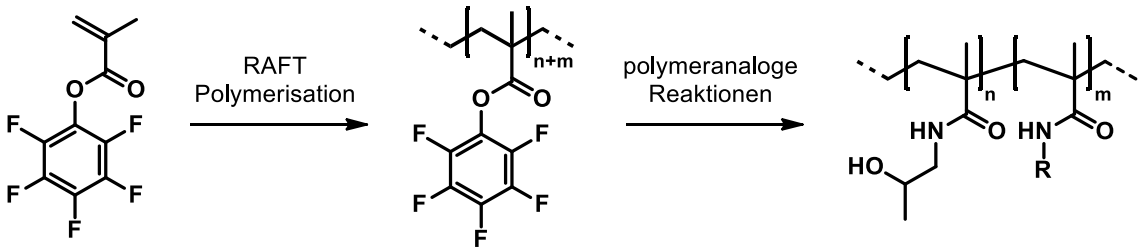


Abbildung 7: Syntheseprinzip der RAFT-Polymerisation mit Aktivesteransatz und anschließender polymeranaloger Reaktion, R: beliebige Funktionalisierung.

Dieser Ansatz wurde bereits mehrfach erfolgreich zur Synthese multifunktioneller HPMA-basierter Polymere umgesetzt.[50–53]

Radioaktiv markierte HPMA-basierte Polymere

Die meisten HPMA-basierten Polymere in Tiermodellen oder Menschen wurden bisher mit Kontrastmitteln (z.B. chelatisiertes Gd^{3+}) und MRT oder mittels γ-Emittern wie ^{123}I ($t_{1/2}$: 13,2 h) und SPECT untersucht.[54–57] Auch ^{99m}Tc ($t_{1/2}$: 6,9 h) wurde zur Entwicklung von Wirkstofftransportsystemen mittels SPECT eingesetzt.[58,59]

Für die Positronen-Emissions-Tomographie fanden bisher die Radiomarkierung und teilweise Evaluierung *in vivo* mit ^{64}Cu ($t_{1/2}$: 12,7 h), $^{72/74}As$ ($t_{1/2}$: 26,0 h bzw. 17,77 d) und ^{18}F ($t_{1/2}$: 109,7 min) statt.[60–65]

Dabei wurde gezeigt, dass eine sorgfältige Untersuchung *in vivo* unerlässlich ist, wenn das polymere Trägersystem durch Anbindung von Wirkstoffen (z.B. Doxorubicin), Targeting-Strukturen (z.B. Folsäure), Molekülen/Chelatoren zur Bildgebung oder PEGylierung variiert wird. Die chemische Veränderung der polymeren Trägersysteme wirkt sich dabei teilweise enorm auf die Bioverteilung aus.

1.2 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Nicht-invasive, bildgebende Verfahren sind in den letzten Jahrzehnten immer populärer und zugänglicher in der klinischen und präklinischen Anwendung geworden. Generell kann, je nach erhaltener Information, zwischen struktureller und funktioneller Bildgebung unterschieden werden. In der strukturellen Bildgebung werden die zu untersuchenden Gewebetypen hochauflösend dargestellt, so dass morphologische Veränderungen aufgrund von Krankheiten oder Verletzungen sichtbar gemacht werden können. Zu diesen Methoden zählen unter anderem Sonographie (Ultraschall), Magnetresonanztomographie (MRT) und die auf Röntgenstrahlen basierende Computertomographie (CT). Die optische Bildgebung, die auf Fluoreszenz- oder Biolumineszenz basiert, spielt in der klinischen Anwendung bisher eine untergeordnete Rolle, da nur die oberen 1-2 cm des Gewebes dargestellt werden können. Im Gegensatz dazu ist die funktionelle Bildgebung in der Lage, dynamische Prozesse auf molekularer Ebene (molekulare Bildgebung) und damit Stoffwechselwege und physiologische Aktivität abzubilden. Damit können Erkrankungen bereits vor der morphologischen Veränderung des Gewebes erkannt werden. Zu diesen funktionell bildgebenden Verfahren zählen die nuklearmedizinischen Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT: single-photon emission computed tomography), die auch bei der Entwicklung von Wirkstoffen oder deren Transportsystemen wertvolle Informationen über die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik liefern. Die Fusion aus struktureller und funktioneller Bildgebung ermöglicht die jeweiligen Vorteile miteinander zu kombinieren. Dies ist mit Kombinationsgeräten, wie dem PET/MR oder PET/CT und SPECT/CT, möglich. Insbesondere in der Arzneistoffentwicklung sind Kleintiervarianten dieser Geräte von zunehmender Bedeutung.[66–68]

In der folgenden Tabelle 1 sind kurz die Merkmale der hier erwähnten bildgebenden Verfahren vergleichend aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht ausgewählter bildgebender Verfahren in der präklinischen Anwendung (entnommen aus James und Gambhir[67]).

Technik	zeitliche Auflösung	räumliche Auflösung	Penetrations-tiefe	Sensitivität	basiert auf
Sonografie	s - min	10-100 µm (Oberfläche) 1-2 mm (wenige cm Tiefe)	mm - cm	mit Microbubbles (~10^{-12} M)	hochfrequentem Schall
CT	min	50-200 µm	ohne Limit	nicht bestimmt	Röntgenstrahlung
MRT	min - h	25-100 µm	ohne Limit	10^{-3}-10^{-5} M	Magnetfeld
SPECT	min	1-2 mm	ohne Limit	10^{-10}-10^{-11} M	γ-Strahlung
PET	s - min	1-2 mm	ohne Limit	10^{-11}-10^{-12} M	γ-Strahlung

Die bildgebenden Verfahren nutzen verschiedene Interaktionen von Energie mit Gewebe, um den Körper dadurch nicht-invasiv darzustellen. Während einige Technologien, wie die Sonographie, CT und MRT, nur auf Energie-Gewebe-Interaktionen beruhen, benötigen PET und SPECT die Applikation von radioaktiven Stoffen, deren Zerfall detektiert und damit das Bild generiert wird.[66]

Die Entwicklung der auf Radioaktivität basierten molekularen Bildgebung geht auf das Tracer-Prinzip von George de Hevesy zurück. Für „seine Arbeit zur Benutzung von Isotopen als Tracer in chemischen Prozessen“ erhielt er 1943 den Nobelpreis für Chemie.[69] Das Tracer-Prinzip beschreibt den Einsatz von radioaktiv markierten Substanzen, die der Struktur von natürlichen Molekülen gleichen. Aufgrund der eingesetzten radioaktiven Isotope können die Bioverteilung oder die zu untersuchenden biologischen Stoffwechselwege nachvollzogen werden. Da die Stoffmengen der eingesetzten Tracer vernachlässigbar gering sind, wird der Stoffwechselweg nicht beeinflusst, sondern nur durch die Detektion der emittierten Strahlung verbildlicht. Man unterscheidet dabei zwischen isotopen Tracern und Analogtracern. Bei isotopen Tracern ist das radioaktiv markierte Molekül chemisch identisch zu dem ursprünglich zu untersuchenden Biomolekül. Ein inaktives Atom wird aber durch ein radioaktives Isotop ersetzt. Analogtracer unterscheiden sich in ihrer Struktur vom Originalmolekül aufgrund der Einführung des Radioisotops, wodurch die physiologischen Eigenschaften verändert sein können. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität und nicht-limitierten Untersuchungstiefe haben nuklearmedizinische Bildgebungsverfahren wie PET und SPECT in der Arzneistoffentwicklung zunehmende Bedeutung.

Die Positronen-Emissions-Tomographie ist eine nuklearmedizinische, nicht-invasive Technik zur quantitativen, dreidimensionalen und zeitlich aufgelösten Bildgebung. Dazu wird ein biologisch aktives Molekül mit einem Positronen-emittierenden Radioisotop markiert und damit biochemische Prozesse bzw. die Bioverteilung *in vivo* gemessen und verbildlicht. Hierfür werden nur minimale Stoffmengen (Picomol) des Radiopharmakons benötigt, die die Pharmakologie nicht beeinträchtigen, sondern nur abbilden (vgl. Tracer-Prinzip S. 14). Die pathologischen Veränderungen können mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie schon vor der morphologischen Veränderung detektiert werden und erlauben damit eine wesentlich frühere Diagnostik und Kontrolle des Krankheitsverlaufes.[66,70]

Für die Anwendung in der PET werden Positronenemitter, also neutronenarme bzw. protonenreiche Nuklide, benötigt. Diese neutronenarmen Kerne stabilisieren sich durch die Umwandlung eines Protons in ein Neutron unter der Emission eines Positrons (β^+ oder e^+) und eines Elektronneutrinos (ν_e). Das Positron ist das Antiteilchen des Elektrons, besitzt die gleiche Masse und den gleichen Spin, aber die entgegengesetzte Ladung (positiv) und erhielt seinen Namen vom „positiven Elektron“. Aufgrund des Gewinns an Bindungsenergie der Nukleonen (Protonen und Neutronen) wird zusätzlich zum Positron und Elektronneutrino noch Energie Q frei.[71–73]

$$ {}^{A}_{Z}X_{N} \rightarrow {}_{Z-1}{}^{A}Y_{N+1} + \beta^+ + \nu_e + Q \qquad (1) $$

$$ {}^{1}_{1}p^+ \rightarrow {}^{1}_{0}n + \beta^+ + \nu_e \qquad (2) $$

Abbildung 8: β^+-Umwandlung auf Nuklid- (1) und Nukleonenebene (2).

Nachdem das Positron emittiert wurde, hat das Tochternuklid eine um eins kleinere Ordnungszahl Z. Um die Ladung des Atoms auszugleichen, muss ein Hüllenelektron abgestoßen werden. Damit die β^+-Umwandlung stattfinden kann, muss das Tochternuklid mindestens zwei Elektronenmassen leichter sein als das Mutternuklid. Nur unter dieser Bedingung kann die β^+-Umwandlung stattfinden, ansonsten erfolgt die Konkurrenzreaktion, der Elektroneneinfang (*engl*. electron capture: EC oder ε).[74]

Die emittierten Positronen weisen ein kontinuierliches Spektrum an Energie, bis hin zu einer Maximalenergie, auf. Sie können entsprechend ihrer kinetischen Energie eine gewisse Reichweite im Gewebe zurücklegen und verlieren dabei aufgrund von (un-)elastischen Stößen und Streuungen ihre Energie. Durch den Verlust an kinetischer Energie nimmt die Wahrscheinlichkeit der Annihilation zu. Dabei treffen das Positron

und sein Antiteilchen, das Elektron, aufeinander und rekombinieren. Die entstandene Vernichtungsstrahlung besteht aus zwei 511 keV Gammastrahlen, die im 180° Winkel zueinander ausgesandt werden, um die Impulserhaltung zu gewährleisten (vgl. Abbildung 9). Die Energie der γ-Strahlen entspricht nach $E = m\,c^2$ der Ruhemasse der beiden Partikel. Die Koinzidenzmessung dieser Vernichtungsstrahlung ist die Basis zur Bildgebung mittels PET.

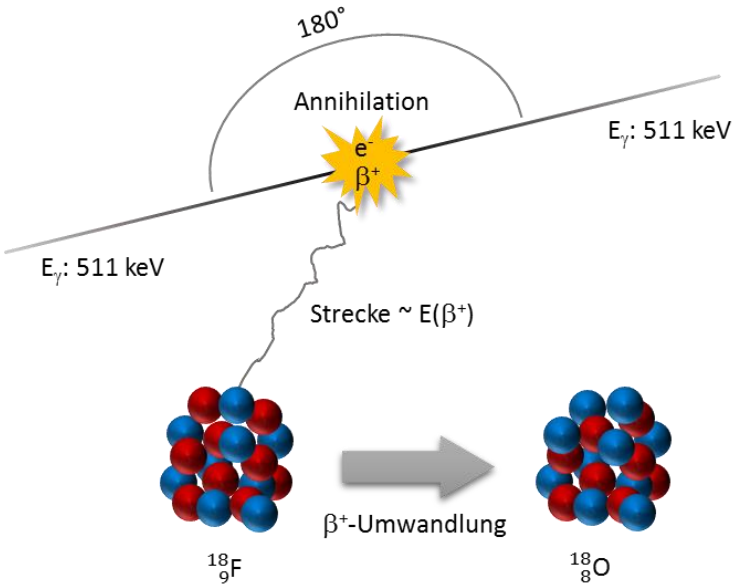


Abbildung 9: Prinzip der Annihilation nach Umwandlung von Fluor-18 in Sauerstoff-18 unter Positronenemission.

Es besteht zu etwa einem Drittel die Möglichkeit, dass keine direkte Annihilation erfolgt, sondern eine extrem kurzlebige Spezies mit einer mittleren Lebensdauer von ca. 10^{-10} s, das Positronium (Ps), entsteht. Dabei handelt es sich um ein wasserstoffähnliches exotisches Atom, das in zwei Zuständen vorliegen kann: Das para-Positronium (Singulett) mit entgegengesetzten Spins von Positron und Elektron oder das ortho-Positronium (Triplett) mit parallelen Spins. Während das para-Positronium ebenfalls in zwei entgegengesetzten 511 keV γ-Strahlen zerfällt, bilden sich beim ortho-Positronium drei γ-Quanten, deren Gesamtenergie 1022 keV beträgt, welche sich auf die einzelnen Photonen verteilt. Die Wahrscheinlichkeit des Zerfalls unter Ausbildung von drei γ-Quanten liegt aufgrund von Umwandlungsprozessen von ortho-Ps in para-Ps bei < 1%.
Die von den Positronen im Gewebe zurückgelegte Strecke ist proportional zu ihrer kinetischen Energie und dies bedeutet gleichzeitig, dass der Ort der Annihilation außerhalb des Kerns liegt. Da mittels PET aber der Ort der Annihilation und nicht der Ort des radioaktiven Nukleus bestimmt wird, ergibt sich eine gewisse örtliche Unschärfe. Je

höher die initiale kinetische Energie eines Positrons ist, desto schlechter wird also die Auflösung. Zusätzlich limitierend wirkt, dass nicht alle emittierten Photonenpaare genau im 180°-Winkel ausgesendet werden. Aufgrund von vorhandenem Restimpuls des Positrons oder Elektrons kann sich der Winkel verschieben. Durch diese beiden Effekte ist ein unteres physikalisches Limit der örtlichen Auflösung in der Positronen-Emissions-Tomographie definiert.[74,75]

In Tabelle 2 sind einige wichtige PET-Nuklide und deren Halbwertszeit ($t_{1/2}$) mit der jeweiligen Häufigkeit an β^+-Umwandlungen und der maximalen Energie der Positronen aufgeführt. Des Weiteren ist die maximale Reichweite in Wasser angegeben, die einen ungefähren Eindruck der Tiefe der Gewebepenetration der Positronen liefert, wobei unterschiedliche Gewebstypen natürlich verschiedene Dichten und damit verschiedene Reichweiten aufweisen. Die Kernreaktionen der häufigsten Produktionswege sind ebenfalls dargestellt.

Tabelle 2: Überblick einiger wichtiger Positronenemitter in der PET.[76]

Nuklid	**$t_{1/2}$**	**Umwandlungsart [Häufigkeit %]**		**$E_{\beta^+,max}$**	**max. Reichweite in H_2O**	**Produktion**
^{11}C	20,30 min	β^+ EC	99,8 0,2	0,96 MeV	3,8 mm	$^{10}B(d,n)^{11}C$ $^{14}N(p,\alpha)^{11}C$
^{13}N	9,96 min	β^+	100	1,19 MeV	5,0 mm	$^{12}C(d,n)^{13}N$ $^{16}O(p,\alpha)^{13}N$
^{15}O	2,03 min	β^+ EC	99,9 0,1	1,73 MeV	7,6 mm	$^{14}N(d,n)^{15}O$ $^{15}N(p,n)^{15}O$
^{18}F	109,65 min	β^+ EC	96,9 3,1	0,63 MeV	2,2 mm	$^{18}O(p,n)^{18}F$
^{68}Ga	67,71 min	β^+ EC	89,1 10,9	1,90 MeV	13,6 mm	$^{68}Ge/^{68}Ga$-Generator
^{72}As	1,1 d	β^+ EC	87,8 12,2	1,12 MeV	4,8 mm	$^{72}Ge(p,n)^{72}As$ $^{72}Ge(d,2n)^{72}As$
^{76}Br	16,7 h	β^+ EC	66,5 33,5	3,60 MeV	15,5 mm	$^{76}Se(p,n)^{76}Br$ $^{75}As(^3He,3n)^{76}Br$
^{86}Y	14,7 h	β^+ EC	31,4 68,6	1,18 MeV	5,3 mm	$^{86}Sr(p,n)^{86}Y$
^{124}I	4,17 d	β^+ EC	23,0 77,0	2,14 MeV	9,7 mm	$^{124}Te(p,n)^{124}I$

Werden die beiden 511 keV Photonen der Vernichtungsstrahlung durch zwei gegenüberliegende Detektoren innerhalb eines sehr kleinen Zeitfensters (wenige Nanosekunden) detektiert, spricht man dabei von Koinzidenzmessung (vgl. Abbildung 10).

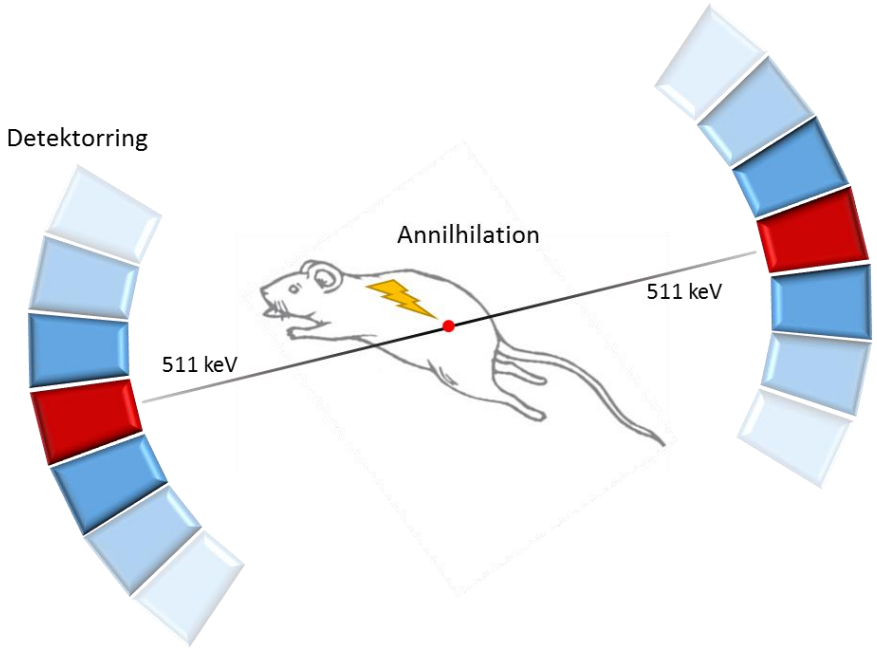


Abbildung 10: Prinzip der Koinzidenzmessung zweier 511 keV γ-Quanten in der Positronen-Emissions-Tomographie.

Aus der Detektion der Gammastrahlen ergibt sich eine Verbindungslinie, auf der der Ort der Annihilation liegt. Typischerweise sind die Detektoren ringförmig als Vollring-Blockdetektoren um das zu untersuchende Objekt angeordnet und fungieren als Einzel-Event-Detektoren. Liegen die gemessenen Events im Koinzidenzzeitfenster, werden sie als solche erkannt und gespeichert. Die dreidimensionale Darstellung der Aktivitätsverteilung wird durch Rekonstruktionsverfahren bewerkstelligt, die sich auf Daten aus unterschiedlichen Blickwinkeln beziehen. Es gibt drei verschiedene Koinzidenzfälle:

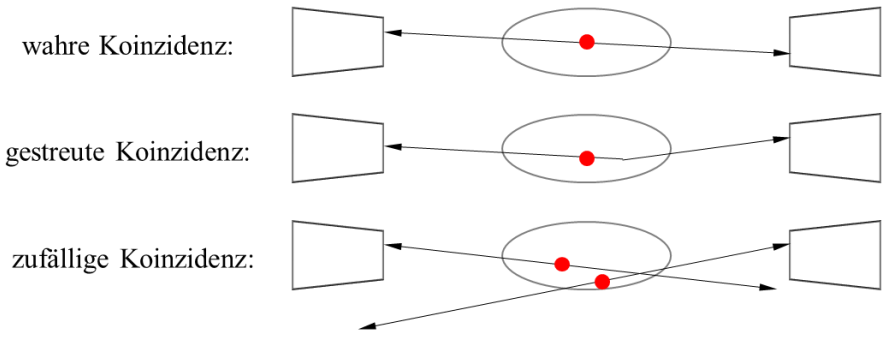


Abbildung 11: Schematische Darstellung drei verschiedener Koinzidenzfälle.

Die wahre Koinzidenz tritt auf, wenn die beiden γ-Quanten von einer einzelnen Annihilation ohne Streuung detektiert werden. Die gestreute Koinzidenz ist auch eine wahre Koinzidenz, jedoch wird eins der beiden (oder beide) Photonen vor der Detektion durch den Compton-Effekt gestreut. Zufällige Koinzidenz findet dann statt, wenn innerhalb des Koinzidenzzeitfensters jeweils ein γ-Quant aus zwei verschiedenen Annihilationen detektiert wird (vgl. Abbildung 11). Diese zufälligen Koinzidenzfälle sind allerdings statistisch über die Zeit verteilt und nur solche, die innerhalb des definierten Zeitfensters liegen, verfälschen die Messergebnisse.[77] Um eine Schwächungskorrektur durchführen zu können, wird neben der Emissionsmessung auch eine Transmissionsmessung des Patienten durchgeführt. Dabei rotiert eine Punkt- oder Linienquelle, die Photonen einer Energie von 511 keV emittiert, um den zu untersuchenden Körper. Durch den Vergleich mit einer Transmissionsmessung ohne Patient kann die Absorption der γ-Quanten im Körper bestimmt und bei der Rekonstruktion zur Schwächungskorrektur benutzt werden.[78]

Gegenwärtig werden typischerweise Detektoren aus Szintillationskristallen (BGO: Bismutgermanat, GSO: Germaniumorthosilikat, LSO: Lutetiumorthosilikat) in Kombination mit Photomultipliern verwendet. Das Szintillatormaterial ist verantwortlich für die Umwandlung der ionisierenden Energie der 511 keV γ-Quanten in Licht, das dann vom Photomultiplier detektiert und verstärkt wird. Wichtig für die Detektorsensitivität ist die Abschwächungseffizienz des Szintillationskristalls. Die Energieauflösung des Detektors wird über die Lichtausbeute des Szintillators definiert und die Lebensdauer des Fluoreszenzübergangs beeinflusst die Zählrate des Detektors. Diese drei physikalischen Eigenschaften sind am wichtigsten für die Leistungsfähigkeit eines PET-Detektors.[79]

1.3 Strategien zur Radiomarkierung mittels Fluor-18

Aufgrund seiner nuklearen und chemischen Eigenschaften ist Fluor-18 ein nahezu ideales Positronen-emittierendes Radionuklid. Es wird normalerweise am Zyklotron über die Kernreaktionen $^{18}O(p,n)^{18}F$ oder $^{20}Ne(d,\alpha)^{18}F$ hergestellt. Die Halbwertszeit von 109,7 min erlaubt mehrstufige Radiosynthesen sowie die Bildgebung mittels PET über mehrere Stunden. Die Radiopharmaka können aufgrund der Halbwertszeit von knapp zwei Stunden an nuklearmedizinische Einrichtungen oder Kliniken geliefert werden, falls kein Zyklotron vorhanden ist. Durch die für einen Positronenemitter niedere maximale Positronenenergie von 635 keV ist die Strahlendosis im Gewebe, verglichen mit anderen diagnostischen Nukliden, klein. Die niedere Energie und damit kurze Reichweite im Gewebe ermöglicht eine hohe räumliche Auflösung in der Bildgebung. Ebenfalls ist der Anteil an β^+-Umwandlung mit 96,9 % sehr hoch (vgl. Tabelle 2, S. 17). Die Radiomarkierung organischer Verbindungen mit Fluor-18 kann nukleophil über $[^{18}F]F^-$ oder elektrophil mittels molekularem $[^{18}F]F_2$ erfolgen und bietet aufgrund der verschiedenen Markierungsstrategien ein breites Anwendungsfeld. Oftmals wird aufgrund der ähnlichen Van-der-Waals-Radien ein Fluor-Wasserstoff-Austausch oder aufgrund der vergleichbaren Bindungslängen und Elektronegativitäten ein Fluor-Hydroxy-Austausch durchgeführt.[80]

1.3.1 Direkte nukleophile ^{18}F-Radiomarkierung

Die am häufigsten durchgeführte direkte ^{18}F-Radiomarkierung ist die aromatische und aliphatische nukleophile Substitution mit $[^{18}F]F^-$. Ausgehend von $[^{18}F]$Fluorid ohne zugesetztem Träger (no carrier added, n.c.a.) bietet sich die Möglichkeit Tracer mit hohen spezifischen Aktivitäten zu synthetisieren. Das nach der Bestrahlung von hochangereichertem $[^{18}O]H_2O$ in Wasser vorliegende $[^{18}F]F^-$ ist aufgrund seiner hohen Ladungsdichte von einer Hydrathülle umgeben und wegen seiner hohen Basizität tendiert es zur $[^{18}F]$HF-Bildung. Des Weiteren zeigt n.c.a. $[^{18}F]F^-$ bevorzugt Adhäsion oder Absorption an Wänden von Reaktionsgefäßen. Daher muss die Nukleophilie und Löslichkeit des Fluoridions erhöht und die Bildung von Fluorwasserstoff vermieden werden. Durch das Entfernen des Wassers und das Benutzen von dipolaren aprotischen Lösemitteln (MeCN, DMSO, DMF,…) wird die Protonierung vermindert und somit mehr Fluorid für die Reaktion zur Verfügung gestellt. Die Reaktivität und Löslichkeit wird durch Verwendung von großen und weichen Kationen wie Rb^+ oder Cs^+ erhöht. Die

Anwendung von Kryptaten mit Kaliumionen (Kryptofix 2.2.2) oder Tetrabutylammoniumsalzen als Phasentransferkatalysatoren sind weit verbreitete Methoden zur Erhöhung der Nukleophilie durch die Präsentation eines „nackten“ Fluoridanions. Nukleophile Radiofluorierungen von aliphatischen Verbindungen laufen über den S_N2-Mechanismus ab. Dabei werden oftmals Halogene (Brom, Iod) oder Sulfonsäureester (Tosylate, Mesylate, Triflate) synthetisch als Abgangsgruppen in die Vorläufermoleküle eingeführt.[80]

Das mit Abstand meisteingesetzte PET-Radiopharmakon ist 2-Desoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glukose ([^{18}F]FDG), mit dem der regionale Glukosemetabolismus gemessen werden kann.

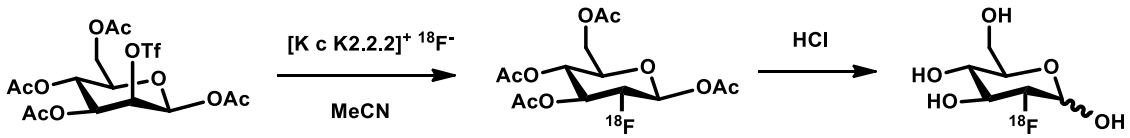


Abbildung 12: Darstellung von 2-Desoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glukose ([^{18}F]FDG).[81]

Aufgrund der hohen Stabilität der ^{18}F-Aryl-Bindung wird die nukleophile aromatische Substitution zur Einführung von Fluor-18 in Radiopharmaka mit elektronendefizitären aromatischen Systemen verwendet. Zusätzlich zur Abgangsgruppe (z.B. NO_2, F, Cl, Br, I, $(CH_3)_3N^+$, $(CH_3)_2S^+$) sollte in der ortho- oder para-Position dazu eine aktivierende Gruppe (z.B. CN, CHO, COR, COOR, NO_2) vorhanden sein, um hohe radiochemische Ausbeuten zu erzielen.[80]

Zur scheinbar widersprüchlichen nukleophilen Fluorierung elektronenreicher Aromaten können substituierte Diaryliodoniumsalze als Markierungsvorläufer eingesetzt werden, die neben den iodierten Nebenprodukten die ^{18}F-markierten Arene ergeben.[82]

1.3.2 Indirekte ^{18}F-Radiomarkierung

Die direkte Markierung von Vorläufermolekülen mit [^{18}F]Fluorid ist nicht immer möglich oder einfach zugänglich. Die Gründe dafür können in der Basen- oder Temperaturlabilität der Markierungsvorläufer liegen, da direkte Fluorierungen oftmals unter harschen Bedingungen stattfinden. Des Weiteren können mehrere funktionelle Gruppen oder komplexe Moleküle (wie z.B. polymere Systeme) hinderlich bei der Direktmarkierung sein. In diesen Fällen kann auf die Radiomarkierung mittels prosthetischer Gruppen (sog.

Synthons) zurückgegriffen werden. Dabei handelt es sich um kleine Moleküle, die unter den Bedingungen der Direktmarkierung gut zu fluorieren sind. In einem zweiten Reaktionsschritt, der mildere Bedingungen erlaubt, wird das Synthon mit der eigentlich zu untersuchenden Verbindung zur Reaktion gebracht.
Radiomarkierungen generell und im Besonderen die Synthese von radiofluorierten Verbindungen stellen aufgrund der geringen eingesetzten Stoffmenge sowie der besonderen Chemie des Fluors spezielle Ansprüche an die Reaktionsführung. Die Zielsetzung ist es dabei immer, das Radionuklid so spät wie möglich in das zu markierende Molekül einzubringen und wenn mehrstufige Radiosynthesen nicht vermieden werden können, diese so schnell und effizient wie möglich durchzuführen.

Ein Beispiel dieser vielseitigen und mannigfaltigen prosthetischen Gruppen ist das [^{18}F]Fluorethyltosylat ([^{18}F]FETos) zur Einführung von Fluorethylgruppen in Verbindungen mit Amin-, Thiol- oder Hydroxy-Gruppen (vgl. Abbildung 13). Es kann in automatisierten Synthesen hergestellt und mittels HPLC oder Festphasenextraktionskartuschen aufgereinigt werden (vgl. auch Kapitel 3.4.1.2). Alternative 1,2-disubstituierte Edukte zur Einführung einer [^{18}F]Fluorethylgruppe sind die Dibrom- oder Dimesylderivate.[80]

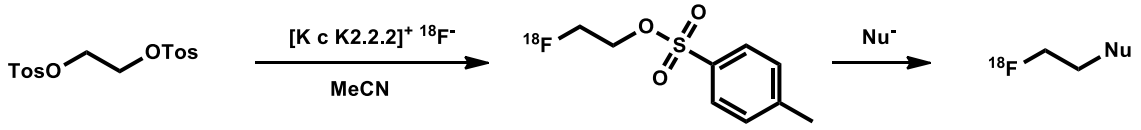


Abbildung 13: Beispiel zur [^{18}F]Fluorethylierung einer nukleophilen Gruppe mittels [^{18}F]FETos.

Kolb, Finn und Sharpless definierten 2001 den Ausdruck der „Click“-Chemie. Dabei soll es sich um die heteroatomverbrückte Verknüpfung (C-X-C) zweier Verbindungen mit breiter Anwendung und sehr hohen Ausbeuten handeln. Die Reaktionen sollen stereospezifisch sein und unter milden Reaktionsbedingungen mit idealerweise leicht erhältlichen Edukten ablaufen sowie in Produkten resultieren, die unter physiologischen Bedingungen stabil sind. Eventuell anfallende Nebenprodukte sollen nicht störend sein und auch die Produktisolierung soll einfach vonstattengehen.[83]
Unter Ligationsmethoden dieses Typs fällt auch die auf der Huisgen 1,3-dipolaren Cycloaddition basierende, kupferkatalysierte 1,2,3-Triazolbildung von Alkinen mit Aziden (CuAAC: kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition). Während die thermische

Addition ein Gemisch aus 1,4- und 1,5-Addukten ergibt, liegt bei der Cu(I)-katalysierten Cycloaddition die Regioselektivität alleine auf Seiten des 1,4-Regioisomers und die Reaktionsrate ist bis zu 10^7-fach erhöht (vgl. Abbildung 14).[84,85]

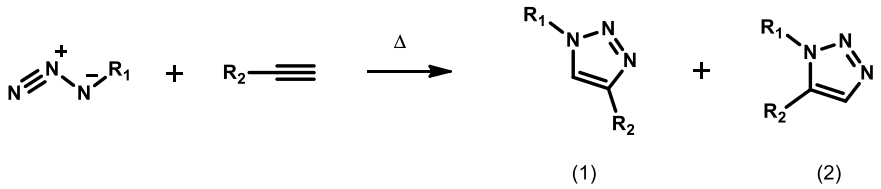


Abbildung 14: Thermische 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkinen mit terminalen Aziden zu disubstituierten 1,2,3-Triazolen, (1): 1,4-Regioisomer, (2): 1,5-Regioisomer.

Um den Kupfer(I)-Katalysator zur Verfügung zu stellen, besteht die Möglichkeit, direkt Cu(I)-Salze (z.B. CuI) einzusetzen oder diese *in situ* durch Reduktion von Cu(II) (z.B. $CuSO_4$ mit Natriumascorbat), Oxidation von elementarem Cu(0) oder Komproportionierung von Cu(0) und Cu(II) darzustellen. Die Hauptvorteile der *in situ*-Methode liegen in der Toleranz gegenüber sauerstoffhaltiger Atmosphäre und der Möglichkeit der Verwendung von wässrigen Lösemittelsystemen. Zur Radiomarkierung mittels prosthetischer Gruppen bietet die CuAAC vielseitige Möglichkeiten, insbesondere auch mit Fluor-18, das wahlweise an der Alkin- oder Azidkomponente gebunden sein kann (vgl. auch Kapitel 3.4.1.1).[86,87]

Eine weitere Möglichkeit der Konjugation mittels Click-Chemie ist die kupferfreie, ringspannungsgetriebene Cycloaddition von Cyclooctinderivaten mit Aziden (SPAAC: spannungsvermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition, vgl. Abbildung 15). Der Vorteil in Hinsicht auf biologische Anwendungen liegt darin, dass kein zytotoxisches Kupfer in der Reaktionslösung vorliegt. Die Abtrennung davon erübrigt sich damit.

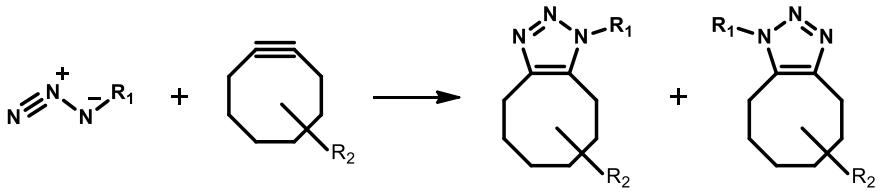


Abbildung 15: Beispielhafte Darstellung von ringspannungsvermittelter 1,3-dipolarer Cycloaddition.

Zur Erhöhung der Reaktionsrate wurde das Cyclooctin auf verschiedene Art und Weise derivatisiert. Populär ist das Dibenzocyclooctin (DIBO) oder Derivate der zweiten Generation, wie das in der ortho-Position zur Dreifachbindung doppelt fluorierte DIFO

(Difluorocyclooctin). Die hohe Lipophilie und der sterische Anspruch der DIBO-Verbindungen, bzw. der hohe synthetische Aufwand der DIFO-Derivate sind nicht zu vernachlässigende Nachteile. Bicyclo[6.1.0]noninderivate (BCN, vgl. auch Kapitel 3.3.2) vereinen exzellente Reaktionsraten mit einer einfachen Synthese und geringer Lipophilie und sind aufgrund dessen für die Radiomarkierung mittels Fluor-18 tragender prosthetischer Gruppen sehr gut geeignet.[88,89]

2. Problemstellung und Zielsetzung

Das Interesse an Wirkstofftransportsystemen (*engl.* drug delivery systems, DDS) ist ein wichtiges und stetig wachsendes Feld in der medizinischen Anwendung. Zwei sich bereits in der Anwendung befindende DDS sind Liposomen und Polymere. Während in Liposomen hydrophile Substanzen im Inneren und hydrophobe in der Lipiddoppelmembran eingelagert werden können, bieten Polymere die Möglichkeit eines kovalent gebundenen Polymer-Wirkstoff-Konjugates. Es besteht bei mizellenbildenden Polymeren aber auch die Möglichkeit, Wirkstoffe aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen im Mizellenkern einzulagern. Um das pharmakodynamische Verhalten solcher Systeme *in vivo* zu untersuchen, ist die funktionelle Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomographie außerordentlich geeignet. Mit Hilfe dieses bildgebenden Verfahrens besteht die Möglichkeit die Auswirkungen von strukturellen Veränderungen der Wirkstofftransportsysteme auf die Bioverteilung direkt zu evaluieren und somit angestrebte Weiterentwicklungen zu verfolgen.

Der größte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Optimierung von ^{18}F-Click-Radiomarkierungen von zwei Polyether-funktionalisierten Cholesterol-derivaten. Weiterhin wurde eine Direktmarkierung von Cholesterol mit Fluor-18 entwickelt und diese drei Systeme wurden *in vivo* mittels Positronen-Emissions-Tomographie hinsichtlich ihrer Bioverteilung an gesunden Mäusen untersucht. Ebenfalls wurden *ex vivo*-Biodistributionsstudien durchgeführt. Zusätzlich wurden diese drei Verbindungen in die Doppelmembranen von Liposomen eingebunden und jedes der drei liposomalen Systeme wurde ebenfalls in Tierstudien evaluiert. Die detaillierte Zielsetzung des ersten und größten Teils der hier vorliegenden Arbeit ist in Kapitel 2.1 näher dargelegt.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Fluor-18-Radiomarkierung von HPMA-basierten Polymeren. Untersucht wurden 1,3-dipolare Cycloadditionsreaktionen an verschieden funktionalisierten Polymeren zweier unterschiedlicher Größen. Die Reaktionen wurden unter Kupferkatalyse bzw. ringspannungsgetrieben durchgeführt. Eine vertiefende Darlegung der Zielsetzung befindet sich in Kapitel 2.2.

2.1 ^{18}F-Radiomarkierung von Cholesterol und Polyether-funktionalisierten Cholesterolderivaten zur *in vivo*-Evaluierung

Die PEGylierung von Liposomen ist ein weit verbreitetes und gut untersuchtes Verfahren, um die Blutzirkulationszeit von Vesikeln zu erhöhen (vgl. Kapitel 1.1.1). Das zumeist verwendete methoxyPEG (mPEG) trägt als Endgruppe eine Methoxyfunktion und weist aufgrund seiner linearen Struktur keine weiteren funktionellen Gruppen auf. Dieser Nachteil ist bei hyperverzweigten Polyethern, wie dem hier untersuchten Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$, aufgrund der vielen zur Verfügung stehenden Hydroxylgruppen aufgehoben. Somit wird eine Derivatisierung ermöglicht, um z.B. Zielstrukturen oder ein Radiolabel anzubringen. Weiterhin sind die Hydrophilie und der sterische Anspruch durch diese hyperverzweigten Polyglycerole im Vergleich zu linearem PEG erhöht. Zu untersuchen ist hierbei, ob sich neben dem Vorteil der Multifunktionalität auch die bekannte Stabilisierung und Abschirmung bei den hyperverzweigten Polyethern zeigt. Vor allem ist aber das pharmakokinetische Verhalten des Polymers an sich interessant, da es sich um eine neuartige, noch nicht *in vivo* untersuchte, Struktur handelt.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist demnach die Untersuchung des hyperverzweigten Polyglycerolpolymers *in vivo* mittels Positronen-Emissions-Tomographie und *ex vivo* durch Biodistributionsstudien an Mäusen. Der Vergleich mit bekannten Strukturen, wie dem linearen, cholesterolverankerten PEG-Derivat Ch-PEG$_{27}$, soll anschließend erfolgen. Dazu bedarf es einer radioaktiven Markierungsstrategie für beide Strukturen. Von Vorteil ist eine Polyether-ähnliche Struktur des radioaktiven Labels, da diese der Struktur des Polymers entspricht und somit nur einen unwesentlichen Einfluss ausüben sollte. Dafür bietet sich das Radionuklid Fluor-18 mit seinen außergewöhnlichen physikalischen Eigenschaften und dem Vorteil der kovalenten Anbindung an. Es wird somit keine Ladung, wie z.B. bei den meisten chelatisierten Radiometallen, eingebracht, welche die Bioverteilung beeinflussen würde. Die Halbwertszeit des ^{18}F liegt mit 109,7 min in einem Bereich, der auch mehrstufige und längere Synthesen erlaubt und der Anteil an β^+-Zerfall ist mit 97% sehr hoch. Um eine möglichst schnelle und quantitative Umsetzung zu erreichen, soll die Fokussierung auf die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkinen mit Aziden erfolgen. Dazu werden die beiden Polymere Ch-PEG$_{27}$ und Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$ mit einer Alkingruppe zu Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-C≡CH (**a**) und Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-C≡CH (**b**) funktionalisiert. Um die Fluor-18-Radiomarkierungen

durchzuführen, wird die prosthetische Gruppe ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) verwendet und unter Triazolbildung an die Polymere „geklickt“.

Die daraus resultierenden Markierungsprodukte **^{18}F-a** und **^{18}F-b** werden in Wildtyp-Mäusen mittels PET und Biodistribution auf ihre Pharmakokinetik hin untersucht. Nach dem Erhalt dieser Ergebnisse werden **^{18}F-a** und **^{18}F-b** in Liposomendoppelmembranen eingelagert, um die abschirmenden Eigenschaften gegenüberstellen zu können.

Um diese sterisch stabilisierten Liposomen mit konventionellen Liposomen in einen Kontext setzen zu können, soll eine Fluor-18-Radiomarkierung von Cholesterol als universelles Markierungstool für liposomale Strukturen entwickelt werden. Das radioaktive Cholesterol soll separat, sowie in Liposomen eingebunden, in Mäusen untersucht werden, um abschließend einen systematischen Vergleich anstellen zu können.

In Abbildung 16 ist das konzeptionelle Design der drei verschiedenen Liposomenformulierungen gezeigt. Während die sterisch stabilisierten Liposomen im oberen Teil (links: Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-C≡CH (**b**); rechts: Ch-PEG_{27}-CH_2-C≡CH (**a**)) dargestellt sind, ist das konventionelle Liposom ohne abschirmendes Polymer im unteren Drittel der Grafik verbildlicht. Die einzelnen Verbindungen (Cholesterol, Ch-PEG_{27}-CH_2-C≡CH (**a**) und Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-C≡CH (**b**)) zur radioaktiven Markierung sind in der Legende schematisch aufgeführt.

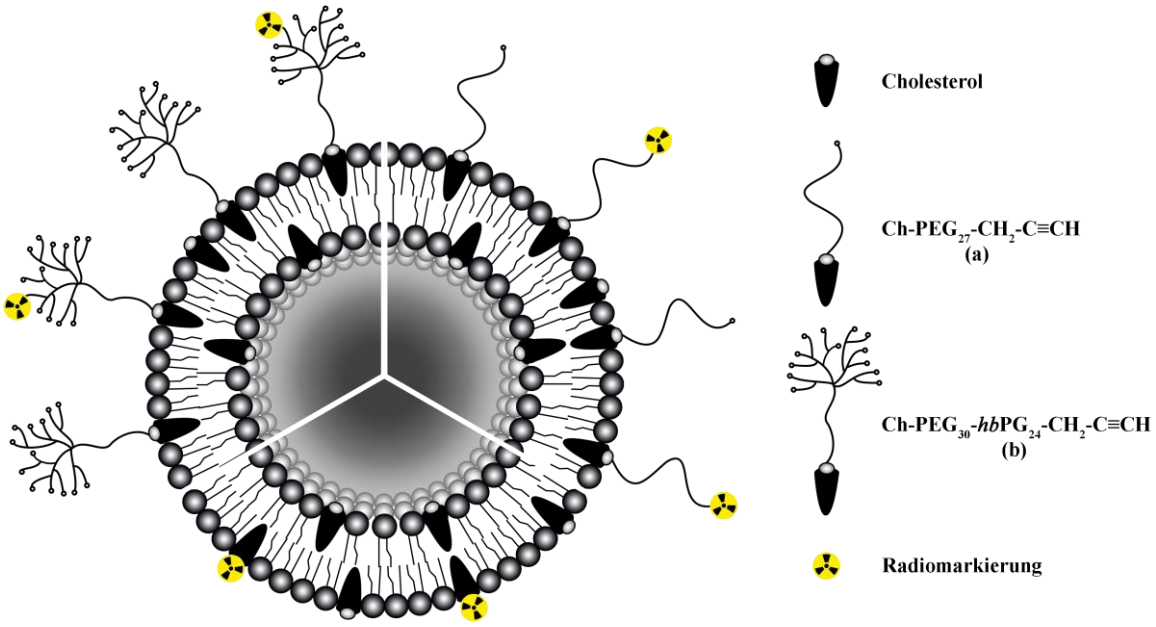


Abbildung 16: Konzeptionelles Design der drei Liposomenformulierungen mit drei verschiedenen Lipiden: Cholesterol, lineares Polyethylenglykol mit Cholesterolanker (Ch-PEG_{27}-CH_2-C≡CH, **a**) und cholesterolverankerte linear-hyperverzweigte Polyether (Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-C≡CH, **b**); alle drei Lipide wurden mit Fluor-18 radiomarkiert; zwecks Übersicht sind Polymerketten oder Radiomarkierungen nicht im Inneren des Liposoms gezeigt und nicht maßstabsgetreu gezeichnet.

2.2 ^{18}F-Radiomarkierung von HPMA-basierten Polymeren mittels CuAAC und SPAAC

In der medizinischen Anwendung zeigen auf HPMA basierende polymere Systeme ein vielversprechendes Verhalten als Wirkstofftransportsysteme. In einigen Vorarbeiten wurde verschiedenartiges pHPMA (Homopolymere, statistische Copolymere und Blockcopolymere) mit Fluor-18 radiomarkiert und *in vivo* auf ihre Struktur-Wirkungsbeziehungen hin untersucht. Es wurden jeweils nieder- und höhermolekulare Polymere, die unter und über der renalen Ausscheidungsgrenze liegen, mittels PET erforscht. Darunter waren auch erste Markierungsstudien von alkinfunktionalisierten, niedermolekularen Homopolymeren (M_w: 12 kDa), die mittels kupferkatalysierter 1,3-dipolarer Cycloaddition mit Fluor-18 radiomarkiert wurden. Im Vergleich mit zuvor durchgeführten Untersuchungen an tyraminfunktionalisierten HPMA-Polymeren, die mittels [^{18}F]FETos markiert wurden, zeigten sich in PET-Studien Unterschiede in der Bioverteilung aufgrund der Markierungsmethode.[90]

Um diesen Umstand näher zu untersuchen, wird die Fluor-18-Radiomarkierung mittels kupferkatalysierter Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) auf ein höhermolekulares Homopolymer (M_w: 60 kDa) ausgeweitet. Zusätzlich dazu werden nieder- und höhermolekulare HPMA-Homopolymere, die mit einem Cyclooctinderivat (Bicyclononin, BCN) umgesetzt werden, durch ringspannungsgetriebene Cycloaddition (SPAAC) radiomarkiert.

In späteren Tierversuchsstudien an tumortragenden Ratten sollen die mittels CuAAC und SPAAC radiomarkierten nieder- und höhermolekularen HPMA-Homopolymere mit den bereits evaluierten [^{18}F]FETos markierten Polymeren verglichen werden. Dabei soll ein besonderes Augenmerk auf eventuelle Unterschiede in der Bioverteilung und Tumoranreicherung aufgrund der verschiedenartigen Markierungsstrategien gelegt werden.

3. Experimentalteil

3.1 Reagenzien und Geräteausstattung

Alle Reagenzien und Lösemittel wurden, falls nicht anders deklariert, von Acros oder Sigma-Aldrich erworben und ohne weitere Verarbeitung eingesetzt. Trockene Lösemittel wurden über Molekularsieben gelagert. Deuterierte Lösemittel wurden von Deutero, absolutes Ethanol von Merck bezogen. Vorgefertigte Trockengemische zur Herstellung von PBS Pufferlösung wurden von Thermo Scientific erworben. DOPC, der Mini-Extruder, die Polycarbonatmembranen und Filter wurden bei Avanti Polar Lipids gekauft. Fluor-18 wurde in ^{18}O-angereichertem Targetwasser vom Institut für Radiologie des Universitätsklinikums Tübingen geliefert.

^{1}H NMR Spektren (300 MHz und 400 MHz) wurden an einem Bruker AC300 oder Bruker AMX400, ^{19}F NMR Spektren (400 MHz) an einem Bruker DRX-400 aufgenommen. Alle Spektren beziehen sich auf interne Referenzen, die von verbliebenen Protonensignalen der deuterierten Lösemittel stammen.

Die ESI-Massenspektren wurden mit einer QTof Ultima 3-Micromass von Waters und die FD-Massenspektren mit einem MAT95-Spektrometer von Finnigan aufgenommen.

Für die Radiosynthesen wurde ein Merck LaChrom HPLC System welches ein Interface D-7000, programmierbarem Autosampler L-7250, Pumpe L-7100 (2x), UV Detektor L-7400, Säulenofen L-3000 mit manuellem Rheodyne-Ventil und Gabi Star (Raytest) zur Aktivitätsmessung beinhaltet, verwendet. Radio-DCs wurden mittels Packard Instant Imager analysiert. In *ex vivo*-Studien wurden die Fluor-18 Aktivitäten in einem automatisierten γ-Counter (Perkin-Elmer 2470 Wizard²) bestimmt.

Die mikrowellengestützten Reaktionen wurden mit einer CEM Discover LabMate Labormikrowelle ausgeführt.

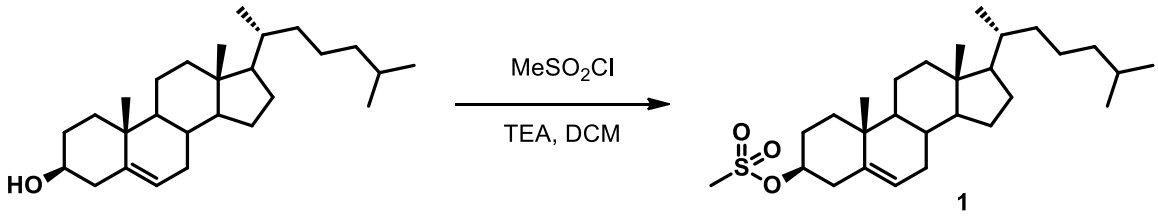
Normalphasen-Dünnschichtchromatographien wurden auf Merck TLC silica gel 60 F254, Umkehrphasen-Dünnschichtchromatographien auf Merck TLC silica gel 60 RP-18 F254s durchgeführt.

Das semiautomatische Modul zur Synthese der radiofluorierten prosthetischen Gruppen beinhaltet ein mittels Peltier-Elementen geheiztes Reaktionsgefäß mit Magnetrührer, Temperatursensor sowie Aktivitätsdetektor. Die Lösemittel wurden unter Heliumstrom entfernt und der Unterdruck wurde mit Hilfe eines Ventils automatisch geregelt. Die

integrierte HPLC beinhaltete eine Knauer K-501 Pumpe, einen Knauer K-2501 UV-Detektor und einen in Serie geschalteten Radiodetektor (Novo, Deutschland).

3.2 Organische Synthesen

3.2.1 Methansulfonsäure 3β-cholesterylester (1)



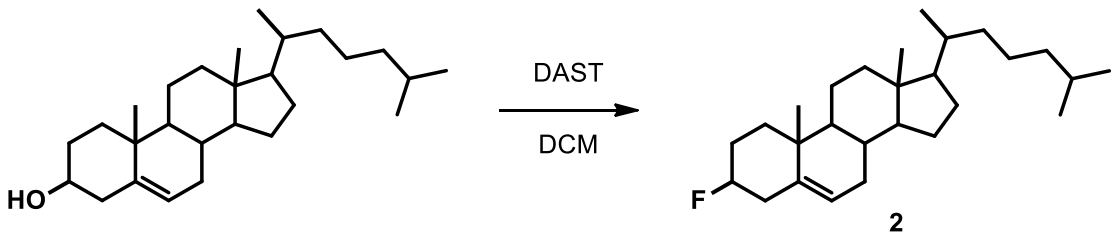
Methansulfonsäure 3β-cholesterylester (**1**) wurde nach einer Vorschrift von Sun *et al*. dargestellt.[91] Zu einer Lösung von 1 g (2,6 mmol) Cholesterol in 15 mL trockenem Dichlormethan bei 0 °C wurden 0,55 mL (3,88 mmol) abs. Triethylamin unter Rühren zugegeben. Anschließend wurden 213 µL (2,72 mmol) Methansulfonylchlorid in 1 mL DCM langsam zugegeben. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und die Reaktionsmischung für weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in 3 mL DCM aufgenommen, unter Zugabe von 15 mL MeOH ausgefällt und mittels Vakuumfiltration gesammelt. Das Lösemittel des Filtrats wurde noch einmal eingeengt und durch die Aufnahme des Rohprodukts mit MeOH wurde eine zweite Fraktion an Produkt als farbloser Feststoff gewonnen.

Ausbeute: 0,871 g, 72 %

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5,43 (m, 1H); 4,50 (m, 1H); 3,01 (s, 3H); 2,50 (m, 2H); 2,08-0,82 (m, 38H); 0,67 (s, 3H)

FD-MS: 464,4

3.2.2 3-Fluorocholest-5-en (2)



Zu einer Lösung von 500 mg (1,29 mmol) Cholesterol in 10 mL trockenem DCM bei 5 °C wurde unter Rühren und inerter He-Atmosphäre langsam 264 µL (2 mmol) DAST (Diethylaminoschwefeltrifluorid) in 5 mL trockenem DCM zugegeben. Das Eisbad wurde

nach 40 min entfernt und nach einer weiteren Stunde Reaktionszeit bei RT mit 10 mL H_2O gequencht. Nach zweimaligem Waschen der organischen Phase mit Wasser wurde diese über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Um **2** als weißen Feststoff zu gewinnen, wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch mit *n*-Hexan als mobile Phase aufgereinigt.

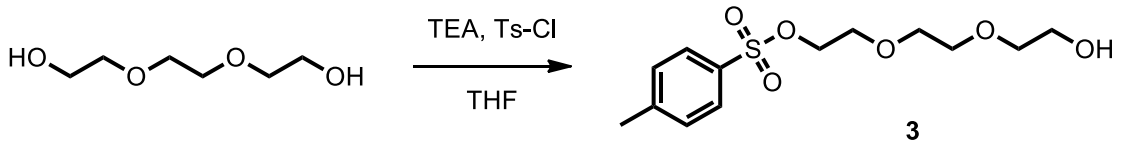
Ausbeute: 249 mg, 50 %

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5,40 (m, 1H); 4,50-4,26 (dm, 1H); 2,44 (t, 2H); 2,06-0,80 (m, 38H); 0,68 (s, 3H)

^{19}F NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ -168.91 (s)

FD-MS: 388,4

3.2.3 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl-4-*p*-toluolsulfonat (3)



3

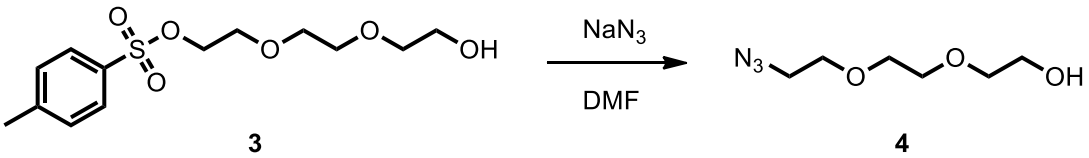
Zu einer Lösung von 5 g (33,3 mmol, 2 äq.) Triethylenglykol in 30 mL trockenem THF unter Inertgas wurde 3,53 g (34,9 mmol, 2,1 äq.) Triethylamin zugegeben. Unter Kühlung der Reaktionslösung auf 0 °C wurde langsam unter Rühren 3,16 g (16,65 mmol, 1 äq.) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in 10 mL THF zugegeben. Nach 16 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde die Suspension vakuumfiltriert und das Lösemittel nach dem Trocknen über Na_2SO_4 am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Aufreinigung mit EA:MeOH (4:1) als mobile Phase ergab **3**.

Ausbeute: 3,51 g, 69 %

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7,79 (m, 2H); 7,35 (m, 2H); 4,16 (m, 2H); 3,72-3,58 (m, 10H); 2,68 (s, 1H); 2,44 (s, 3H)

FD-MS: 609,5 [2M+1]; 913,3 [3M+1]

3.2.4 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethanol (4)



3 4

Zu einer Lösung von 3,51 g (11,53 mmol, 1 äq.) **3** in 30 mL trockenem DMF wurde unter Rühren in kleinen Portionen 1,87 g (28,83 mmol, 2,5 äq.) Natriumazid zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde die Reaktionslösung für 16 h auf 160 °C erhitzt. Im Anschluss wurde das Lösemittel im Hochvakuumrotationsverdampfer entfernt und eine säulenchromatographische Aufreinigung mit EA:MeOH (4:1) als mobile Phase durchgeführt.

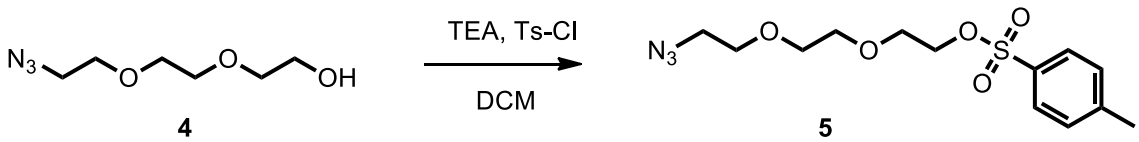
Ausbeute: 1,38 g, 68 %

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,72–3,58 (m, 10H); 3,36 (t, 2H); 2,68 (s, 1H)

FT-IR (cm^{-1}; liquid film): 3417 (-OH); 2871; 2108 ($-N_3$)

FD-MS: 198,5 $[M+Na]^+$

3.2.5 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-4-*p*-toluolsulfonat (5)



4 5

Zu einer Lösung von 2,06 g (11,7 mmol) **4** in 10 mL Dichlormethan wurde unter Rühren 2,38 g (23,5 mmol) Triethylamin zugegeben. Während der Kühlung der Reaktionslösung auf 0 °C wurde 3,36 g (17,6 mmol) Tosylchlorid zugegeben und nach Erwärmung auf Raumtemperatur für weitere 16 h gerührt. Nach Zugabe von 15 mL Dichlormethan wurde die organische Phase mit 15 mL HCl (3% in H_2O) und gesättigter Kochsalzlösung extrahiert. Nach Trocknung über Na_2SO_4 wurde das DCM am Rotationsverdampfer entfernt und **5** wurde als farbloses Öl nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit EA:*n*Hex (1:2,5) als mobile Phase erhalten.

Ausbeute: 2,89 g, 75 %

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7,79 (m, 2H); 7,35 (m, 2H); 4,16 (m, 2H); 3,70 (m, 2H); 3,64 (m, 2H); 3,60 (s, 4H); 3,36 (t, 2H); 2,44 (s, 3H)

FT-IR (cm^{-1}; liquid film): 2871, 2109 ($-N_3$)

ESI-MS: 352,1 [M+Na]; 368,1 [M+K]

3.3 Polymersynthesen

3.3.1 Cholesterol-basierte Polymere

3.3.1.1 Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-C≡CH (a)

Die Synthesen der beiden Polymere Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-C≡CH (**a**) und Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-C≡CH (**b**) (vgl. Abbildung 17) wurde von Frau Dr. Sophie Müller aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Frey (Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt.[25]

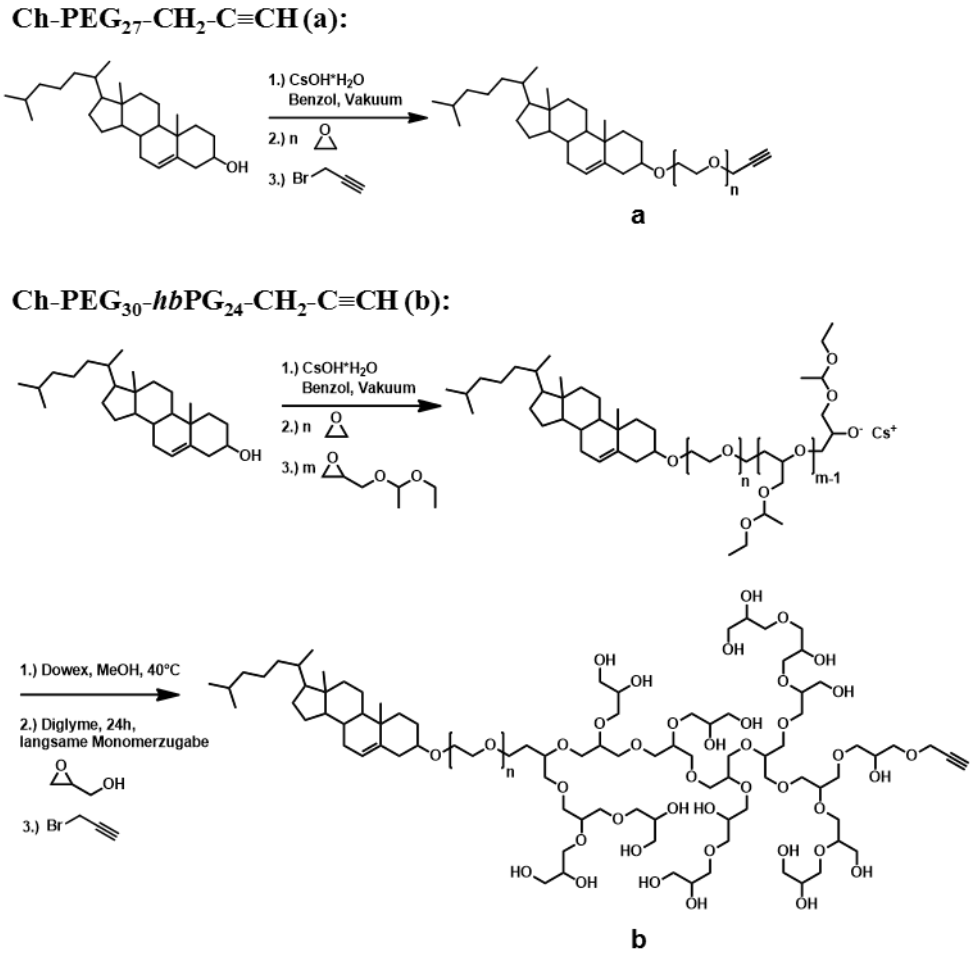


Abbildung 17: Syntheseschema der Polymere Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-C≡CH (**a**) und Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-C≡CH (**b**), der hyperverzweigte Teil des Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-C≡CH ist nicht maßstabsgetreu gezeichnet.

Kurz zusammengefasst wurde Cholesterol (0,4 mg, 1,0 mmol), Cäsiumhydroxid Monohydrat (148 mg, 0,88 mmol) und Benzol in einen Schlenkkolben gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt, um das Cäsiumalkoxid (85 % Deprotonierungsgrad) zu generieren. Das Salz wurde unter

Vakuum bei 90 °C für 24 h getrocknet und anschließend mit trockenem THF via Kryotransfer versetzt. Ethylenoxid (2,2 mL, 44 mmol) wurde zuerst in eine Messampulle kryotransferiert und anschließend in den Schlenkkolben mit der Initiatorlösung überführt. Die Reaktionsmischung wurde nach Erreichen der Raumtemperatur auf 60 °C erhitzt und die Polymerisation für 12 h unter Vakuum durchgeführt. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz mit Propargylbromid (0,2 mL, 1,85 mmol) versetzt und für weitere 12 h gerührt. Abschließend wurde das Lösemittel unter Vakuum entfernt und das Produkt in kaltem Ether ausgefällt.

Ausbeute: ~ 70 %

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5,32 (s, 1H); 4,20 (d, 2H); 3,80-3,40 (Polyether Rückgrat); 3,15 (s, 1H); 2,43 (t, 1H); 2,27-0,82 (C*H*$_2$, C*H* Cholesterol); 0,66 (s, 3H)

$M_{n,NMR}$: 1600 g/mol; $M_{n,GPC}$: 1500 g/mol

M_w/M_n: 1,13

cmc: 7,9 mg/L (Ringtensiometer)

R_h: 6,9 nm (dynamische Lichtstreuung)

3.3.1.2 Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-C≡CH (b)

Das Polymer Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-C≡CH (**b**) (vgl. Abbildung 17) wurde nach Literaturvorschrift von Frau Dr. Sophie Müller synthetisiert und mit Propargylbromid funktionalisiert.[92,93]

$M_{n,NMR}$: 3520 g/mol; $M_{n,GPC}$: 1550 g/mol

Das mittels GPC bestimmte Molekulargewicht ($M_{n,GPC}$) wird aufgrund der globulären Struktur des Moleküls und des damit einhergehenden hydrodynamischen Radius im Vergleich zu den verwendeten PEG Standards unterschätzt.

cmc: 11,0 mg/L (Ringtensiometer)

R_h: 6,9 nm (dynamische Lichtstreuung)

3.3.2 HPMA-basierte Polymere

Die Synthesen der Polymere **c**, **d**, **e** und **f** (vgl. Abbildung 18) wurden von Frau Dipl.-Chem. Annette Kelsch aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Zentel (Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt.[94]

Es wurden N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (HPMA)-basierte Homopolymere mit Alkin- bzw. Cyclooctinkomponenten (COT) als Funktionalisierung synthetisiert. Dazu wurde die RAFT-Polymerisation mit Reaktivesteransatz verfolgt. Anschließend wurden in polymeranalogen Reaktionen die funktionellen Gruppen und das 2-Hydroxypropylamin eingeführt. Von beiden unterschiedlich funktionalisierten Polymeren wurde je ein kleines (M_w ~ 12.000) sowie ein großes Polymer (M_w ~ 60.000) hergestellt (vgl. Tabelle 3). Die Größen wurden so gewählt, dass die renale Ausscheidungsgrenze unter- bzw. überschritten wird.

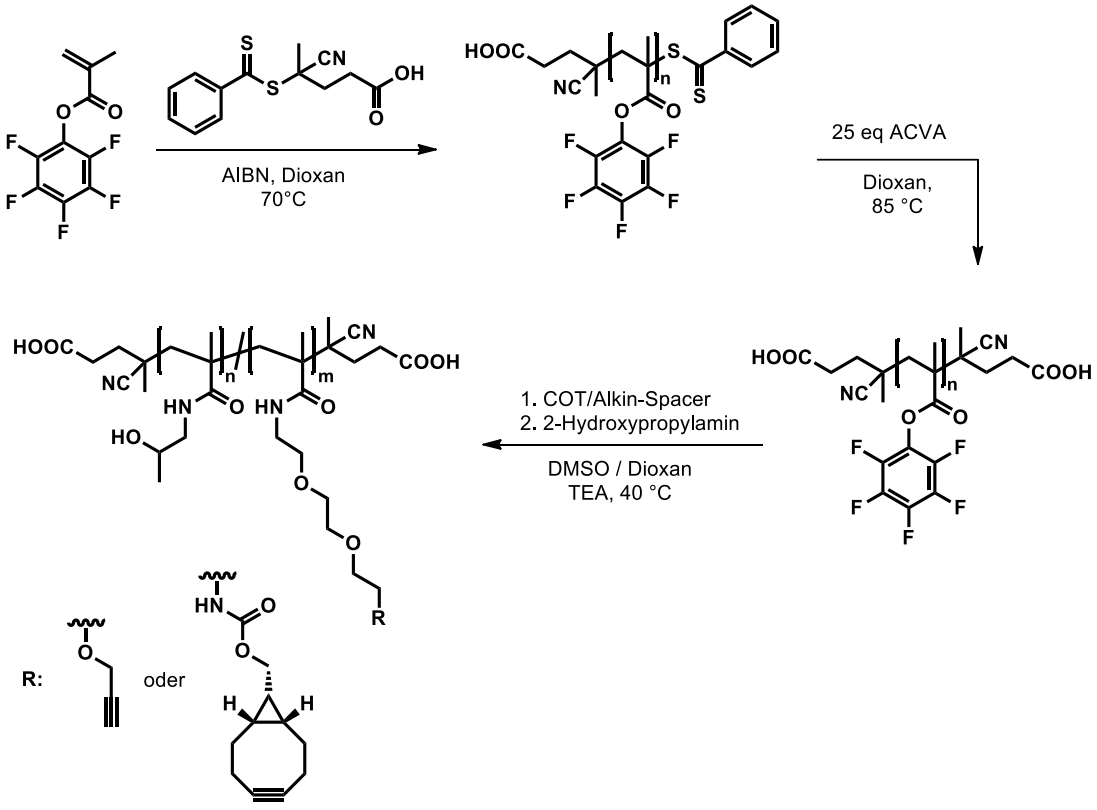


Abbildung 18: Syntheseschema der alkin- bzw. COT-funktionalisierten HPMA-Polymere.

Die Übersicht der verschiedenen Polymere ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Übersicht der HPMA-basierten Polymere mit Alkin- oder COT-Funktionalisierung.

Bezeichnung	M_w	Đ	Einbau COT/Alkin
c (kl. Alkin)	12.000	1,26	3 %
d (gr. Alkin)	60.000	1,42	3 %
e (kl. COT)	12.500	1,26	3 %
f (gr. COT)	61.000	1,42	3 %

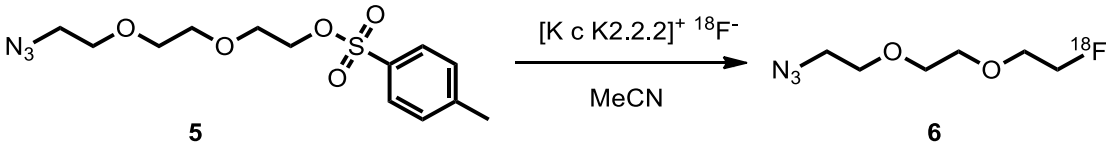
Es wurde sich bewusst für das Bicyclo[6.1.0]nonin (BCN)-derivat mit Triethylenglykol-Spacer *N*-(1R,8S,9S)-bicyclo[6.1.0]non-4-in-9-ylmethyloxycarbonyl 1,8-diamino-3,6-dioxaoctan (BCN-POE_3-NH_2, SynAffix) entschieden. Die Umsatzrate zur Ausbildung von Triazolen ist wesentlich größer als die des Cyclooctins, dem kleinsten, bei Raumtemperatur stabilen Cyclooctin. Das Bicyclononinderivat hat eine ähnliche Reaktivität wie das sehr prominente Dibenzocyclooctin (DIBO), ist aber wesentlich weniger lipophil und sterisch anspruchsvoll.[89] Ein weiterer positiver Aspekt, welcher sich aufgrund der C_S-Symmetrie des Cyclooctinderivats ergibt, ist die Bildung nur eines Regioisomers während der Cycloaddition.[88] Um die Überstruktur des gut wasserlöslichen HPMA-Polymers nicht zu stark zu beeinflussen, wurde sich aus den aufgeführten Gründen für die Funktionalisierung mittels des BCN-Derivats entschieden.

Um den Vergleich der SPAAC-Reaktion zur kupferkatalysierten CuAAC-Reaktion ziehen zu können, wurden die gleichen Vorläuferpolymere auch mit der Alkinkomponente mit Triethylenglykol-Spacer (H_2N-TEG-CH_2-C≡CH) umgesetzt. Der Spacer ist identisch zu jenem des BCN-Derivates, wodurch sich der potentielle Einfluss nivellieren sollte.

3.4 Fluor-18 Radiomarkierungen

3.4.1 Radiomarkierung von ^{18}F-TEG-N$_3$ / [^{18}F]FETos

3.4.1.1 1-Azido-2(2-(2-[^{18}F]fluoroethoxy)ethoxy)ethan (6)



5 **6**

Das Click-Synthon (**6**) (abgekürzt: ^{18}F-TEG-N$_3$) wurde an einem semiautomatischen, selbstgebauten Modul synthetisiert. Hierzu wurde die Vorgehensweise aus der Promotion von D. Moderegger[90] weiterentwickelt. Eine alternative Synthese wurde kürzlich von Rokka *et al.* publiziert.[95] Das zugehörige Bedienfeld des Moduls ist in Abbildung 19 zu sehen.

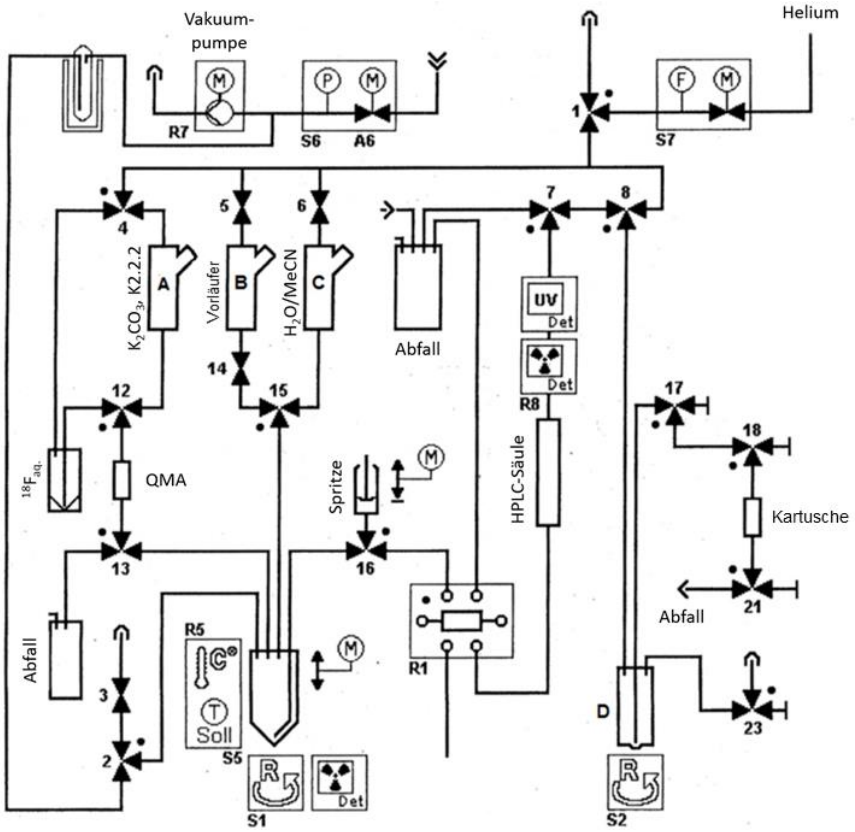


Abbildung 19: Bedienfeld des semiautomatischen Moduls zur Synthese von ^{18}F-TEG-N$_3$.

Vor dem Start der Synthese wurde das Vorratsgefäß A mit einer Lösung aus 15-16 mg Kryptofix 222 und 15 µL K_2CO_3 (1 M) in 1 mL trockenem MeCN befüllt. In Vorratsgefäß B wurde der Markierungsvorläufer **5** (9-10 mg (27,3-30,4 µmol) in 1 mL

trockenem MeCN) und in Vorratsgefäß C eine 1:1 (v/v) Mischung (1 mL) von MeCN und Millipore-Wasser gefüllt. Die Sep-Pak QMA light (130 mg, Waters) wurde mit 10 mL K_2CO_3 (1 M), 10 mL Millipore-Wasser und 20 mL Luft konditioniert und in das Modul eingesetzt. Die Lichrolut EN-Kartusche (200 mg, 3 mL PP-Röhrchen, Merck) wurde mit einem Stempel versehen und mit 10 mL MeCN, gefolgt von 10 mL Millipore-Wasser und 20 mL Luft konditioniert. Nach der Befüllung der Kühlfalle mit flüssigem Stickstoff und des Auffanggefäßes D mit 35 mL Millipore-Wasser, wurde das wässrige [^{18}F]Fluorid (705-11600 MBq) in die Apparatur eingespannt und die Synthese gestartet. Mittels Überdruck (Helium) wurde die Lösung über die QMA-Kartusche geführt und dabei das [^{18}F]Fluorid auf der Kartusche retiniert. Mit Hilfe der Kryptofix/Kaliumcarbonat-Lösung aus dem Vorratsgefäß A wurde das [^{18}F]F^- in das Reaktionsgefäß eluiert und dort durch azeotrope Destillation getrocknet. Dazu wurden der Druck und der Heliumstrom bei gleichzeitigem Heizen auf 80 °C schrittweise reduziert. Nach Abschluss der Trocknungsschritte und dem Abkühlen auf 40 °C wurde der Vorläufer aus Vorratsgefäß B in das Reaktionsgefäß geleitet und bei 90 °C für 10 min erhitzt. Nach erneutem Abkühlen auf 40 °C wurde die Quenchlösung aus Vorratsgefäß C zugegeben und die Reaktionslösung mittels einer 5 mL-Spritze in den Loop bzw. das Rheodyne-Ventil der HPLC (R1) überführt. Um das ^{18}F-TEG-N_3 (RCA ~ 85-90%) von [^{18}F]Fluorid und dem nicht umgesetzten Präkursor abzutrennen, wurde die gequenchte Reaktionsmischung auf einer semipräparativen Luna C18(2) bei 4 mL/min MeCN:H_2O (1:1, v/v) aufgereinigt. ^{18}F-TEG-N_3 wurde bei t_R ~ 6-8 min abgetrennt und dabei in das Auffanggefäß D geleitet. Die anschließende Fixierung auf der Lichrolut EN-Kartusche sowie das darauffolgende Trocknen durch einen Heliumstrom waren die finalen Schritte der Modulsynthese.

Die Lichrolut EN-Kartusche wurde daraufhin entnommen und mit 1,5 mL trockenem Diethylether in ein Reactivial mit Magnetrührstab eluiert. Dabei wurde ein Unterdrucksystem bei p = 850 mbar verwendet (vgl. Abbildung 20). Nach der Elution der Kartusche wurde der Ether bei p = 850 mbar, 10 mL/min He-Strom und 40 °C innerhalb von 10 min entfernt, sodass das einsatzbereite Click-Synthon ^{18}F-TEG-N_3 nach ca. 60 min zur Verfügung stand.

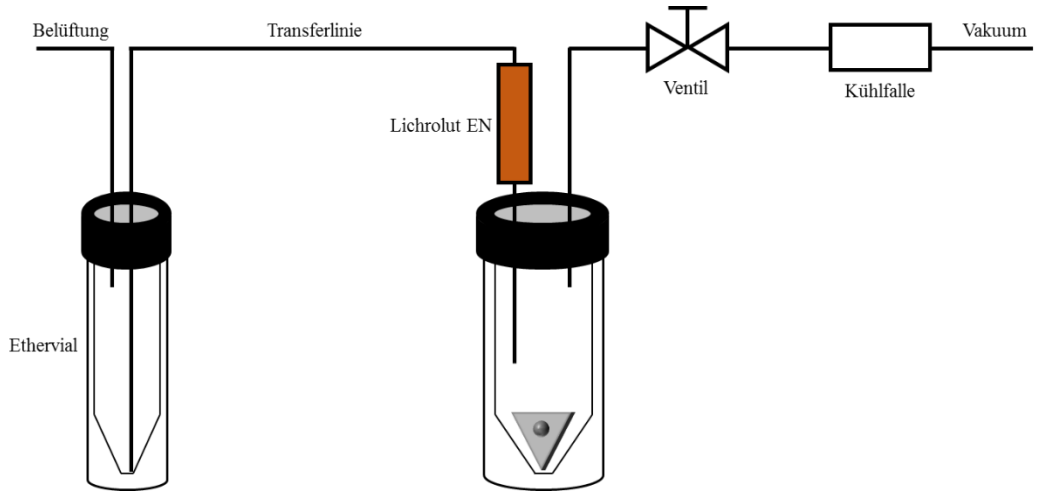
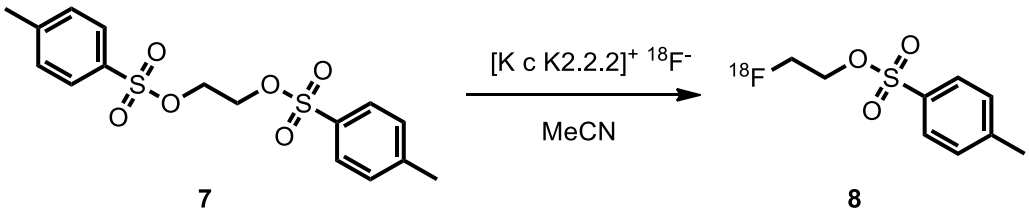


Abbildung 20: Aufbau der Unterdruckeinheit zum Eluieren der Kartusche.

3.4.1.2 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat (8)



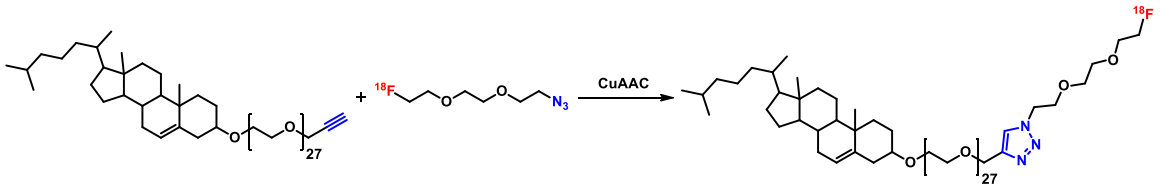
7 **8**

Ein weiteres Markierungssynthon, 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat (FETos, **8**), zur Fluorethylierung wurde ebenfalls am semiautomatischen Synthesemodul hergestellt.

Das Bedienfeld aus Abbildung 19 gilt auch für diese Synthese, allerdings mit einigen Variationen. Die Bestückung der Vorratsgefäße A und C sowie die Konditionierung der Sep-Pak QMA light wurden analog zu der Synthese von **6** durchgeführt. Im Vorratsgefäß B wurde der Markierungsvorläufer Ethylenditosylat (**7**) (4-8 mg (10,8-21,6 µmol) in 1 mL trockenem MeCN) vorgelegt. Zum Fixieren von **8** wurde eine Strata-X Kartusche (200 mg, 3 mL PP-Röhrchen, Phenomenex) verwendet, die zuvor mit einem Stempel versehen und mit 10 mL MeCN, gefolgt von 10 mL Millipore-Wasser und 20 mL Luft konditioniert wurde. Im Anschluss wurde die Kühlfalle mit flüssigem Stickstoff sowie das Auffanggefäß D mit 40 mL Millipore-Wasser befüllt, das wässrige [^{18}F]Fluorid (449-11790 MBq) in die Apparatur eingespannt und die Synthese gestartet. Die Trocknung erfolgte analog zur Synthese von **6**. Nach Abschluss der Trocknungsschritte und dem Abkühlen auf 40 °C wurde der Vorläufer **7** aus Vorratsgefäß B in das Reaktionsgefäß geleitet und bei 88 °C für 3 min erhitzt. Nach erneutem Abkühlen auf

40 °C wurde die Quenchlösung aus Vorratsgefäß C zugegeben und die Reaktionslösung mittels 5 mL-Spritze in den Loop bzw. das Rheodyne-Ventil der HPLC (R1) überführt. Um das [^{18}F]FETos von [^{18}F]Fluorid und dem nicht umgesetzten Präkursor abzutrennen, wurde die gequenchte Reaktionsmischung auf einer semipräparativen Lichrospher 100 RP 18 EC 5µ bei 4 mL/min MeCN:H_2O (1:1, v/v) aufgereinigt. [^{18}F]FETos wurde bei t_R ~ 9,5-12,5 min abgetrennt und dabei in das Auffanggefäß D geleitet. Die anschließende Fixierung auf der Strata-X Kartusche sowie das darauffolgende Trocknen durch einen Heliumstrom waren die finalen Schritte der Modulsynthese. Die zerfallskorrigierte radiochemische Ausbeute des kartuschengebundenen [^{18}F]FETos lag bei 44-55 %. Nach Entnahme der Kartusche aus dem Modul konnte diese mit organischen Lösemitteln (DMF, Dioxan, THF,...) eluiert werden, um das [^{18}F]FETos (**8**) im benötigten Lösemittel vorliegen zu haben.

3.4.2 Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (^{18}F-a)



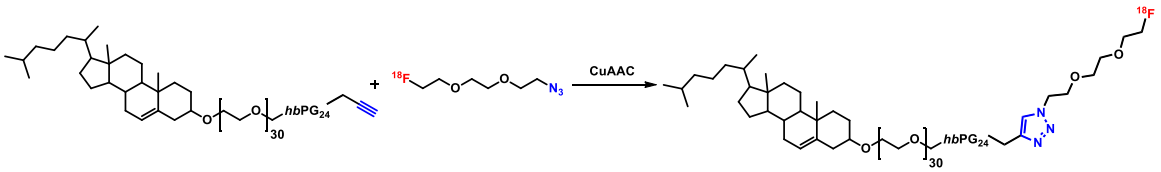
Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-C≡CH (**a**) ^{18}F-TEG-N$_3$ (**6**) Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**)

Die Radiomarkierung des amphiphilen Polymers Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-C≡CH (**a**) mittels CuAAC wurde in einem Reacti-Vial mit Magnetrührstab und Schraubdeckel mit Septum durchgeführt. Eine Lösung von 8,8 mg (5,5 µmol) **a** in 880 µL PBS wurde direkt in das mit **6** überzogene Vial (vgl. Kapitel 3.4.1) gegeben. Nach Zugabe von 320 µL PBS, 12,5 µL DMSO und 15 µL (15 µmol) $CuSO_4$ wurde die Reaktion unter Zugabe von 22,5 µL Natriumascorbat (49,4 mg in 100 µL PBS) und durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min durchgeführt. Die radiochemischen Ausbeuten (RCA > 95 %) wurden mittels Dünnschichtchromatographie mit EA:*n*Hex (1:1) als mobile Phase bestimmt (R_f(^{18}F-a): 0; R_f(6): 0,8).

Nach dem Erkalten der Reaktionslösung wurde das Kupfer durch Festphasenextraktion entfernt. Dazu wurde eine leere 3 mL SPE-Kartusche mit 600 mg Chelex 100 (200 – 400 mesh, Bio-Rad) und je einer 20 µm PTFE-Fritte ober- und unterhalb des Säulenmaterials befüllt und mit einem Stempel versehen. Konditioniert wurde die Kartusche mit 0,8 mL HCl (1 M), 5 mL H_2O, 0,8 mL NaOH (1 M), 5 mL H_2O gefolgt

von 10 mL Luft. Um **^{18}F-a** von der Kartusche zu eluieren, wurde diese mit 7 mL abs. EtOH gespült. Die erfolgreiche Abtrennung des Kupfers wurde durch das Versetzen eines Aliquots mit gesättigter Natriumsulfid-Lösung bestätigt. Die nun kupferfreie, aber immer noch wässrige, ethanolische Lösung wurde mit Hilfe einer Natriumsulfat-Kartusche getrocknet. Dazu wurde eine 6 mL-SPE-Kartusche zu zwei Dritteln mit trockenem Natriumsulfat befüllt, umschlossen von je einer 20 µm PTFE-Fritte. Ein Stempel und ein 0,45 µm PTFE-Filter wurden auf die Kartusche gesteckt. Im Anschluss an die Trocknung des Lösemittels durch die selbstgepackte Kartusche wurde mit 1 mL abs. EtOH und 10 mL Luft gespült. Das Eluat wurde in einem Kolben aufgefangen und das Lösemittel am Miniatur-Rotationsverdampfer entfernt, um das radiomarkierte **^{18}F-a** zu erhalten.
Ein Überblick der durchgeführten Reaktionen findet sich in Kapitel 4.2.2.

3.4.3 Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (^{18}F-b)

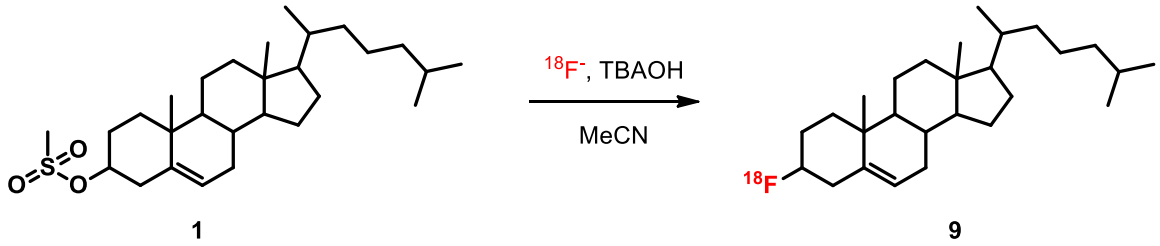


Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-C≡CH (**b**) ^{18}F-TEG-N$_3$ (**6**) Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**)

Die Radiomarkierung des linear-hyperverzweigten Polymers Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-C≡CH (**b**) wurde ähnlich der Synthese von ^{18}F-a (vgl. Kapitel 3.4.2) durchgeführt.
Dazu wurde eine Lösung von 1 mg (0,28 µmol) **b** in 100 µL PBS in einem Reacti-Vial mit Magnetrührstab und Schraubdeckel mit Septum vorgelegt. Nach Zugabe weiterer 500 µL PBS, 20 µL (20 µmol) $CuSO_4$ und **6** in 400 µL EtOH, wurde die Reaktion mit 40 µL Natriumascorbat (49,4 mg in 100 µL PBS) versetzt und auf 70 °C für 15 min unter Rühren erhitzt. Die radiochemischen Ausbeuten (RCA > 95 %) wurden mittels Dünnschichtchromatographie mit EA:*n*Hex (1:1) als mobile Phase bestimmt (R_f(^{18}F-b): 0; R_f(6): 0,8). Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionslösung ähnlich zu 3.4.2 mittels Chelex 100 (200 – 400 mesh, Bio-Rad) von Kupfer befreit. Es wurde jedoch nach dem Auftragen der Reaktionslösung nur mit 1 mL abs. EtOH gespült und anschließend über eine selbstgepackte Natriumsulfatkartusche (3 mL SPE-Kartusche, zu 2/3 mit Na_2SO_4 gefüllt, je eine 20 µm PTFE-Fritte über und unter Na_2SO_4, 0,45 µm PTFE-Filter) getrocknet. Auch die Na_2SO_4-Kartusche wurde mit 1 mL abs. EtOH und 10 mL Luft gespült. Nach dem abschließenden Entfernen des Lösemittels am Miniatur-

Rotationsverdampfer wurde **^{18}F-b** erhalten. Ein Überblick der durchgeführten Reaktionen findet sich in Kapitel 4.2.3.

3.4.4 3-[^{18}F]Fluorocholest-5-en (9)



1 **9**

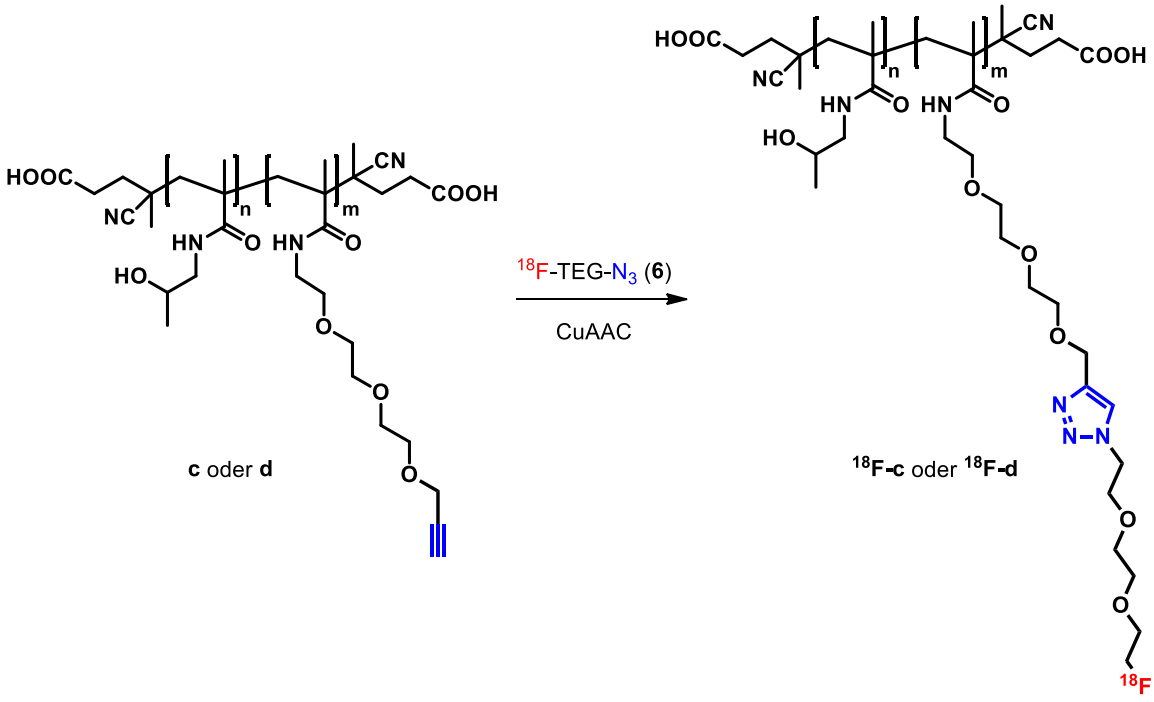
Zur Radiomarkierung des mesylierten Cholesterolvorläufers **1** wurde [^{18}F]Fluorid auf einer Waters QMA light Sep-Pak-Kartusche (konditioniert mit 10 mL K_2CO_3 (1 M), 10 mL Millipore-Wasser und 20 mL Luft) fixiert. Nach Elution der Aktivität mit 0,9 mL (52 µmol) TBAOH in MeOH in ein mit Septum verschlossenes Reacti-Vial mit Magnetrührer wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck und Heliumstrom entfernt (260 mbar, 85 °C, 200 mL/min He). Verbleibendes Wasser wurde mittels azeotroper Destillation durch das Zugeben von 1 mL MeCN (3x) unter obigen Bedingungen entfernt. Nach dem Abschluss der Trocknungsschritte wurde **1** (9,3 mg, 20 µmol) in 1 mL MeCN direkt in das Trockenvial überführt und dieses für 20 min auf 120 °C erhitzt. Während des Abkühlens (5 min in kaltem Wasserbad) wurde die Lösung mit 1 mL 2-Propanol gequencht. Die radiochemische Ausbeute wurde mittels RP-DC (Merck TLC Silica Gel 60 RP-18 F254s) mit *i*PrOH:MeCN (4:1) als mobile Phase bestimmt (R_f($^{18}F^-$): 0; R_f(9): 0,4) (vgl. Kapitel 4.2.4).

Zur Isolierung von **9** wurde eine semipräparative HPLC (Synergi 4u MAX-RP 80A 250x10 mm; 3 mL/min; 0-12 min: 100% B, 12-13 min Gradient auf 5% B; A: H_2O, B: *i*PrOH:MeCN (80:20)) durchgeführt (t_R(9): 6,5 min; t_R($^{18}F^-$): 18 min). Das Lösemittel der gesammelten Fraktion wurde innerhalb von 10 min am Miniatur-Rotationsverdampfer entfernt (schrittweise Reduktion des Drucks, Start bei 200 mbar, 45 °C).

3-[^{18}F]Fluorocholest-5-en (**9**) wurde mit Hilfe der Referenzverbindung **2** via HPLC und RP-DC identifiziert. Um **9** in eine injizierbare PBS-Lösung zu überführen, wurde ein Lösungsvermittler ((2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (45 % (w/v) Lösung in Wasser)) zugegeben. Für die Liposomenpräparation wurde kein Lösungsvermittler verwendet.

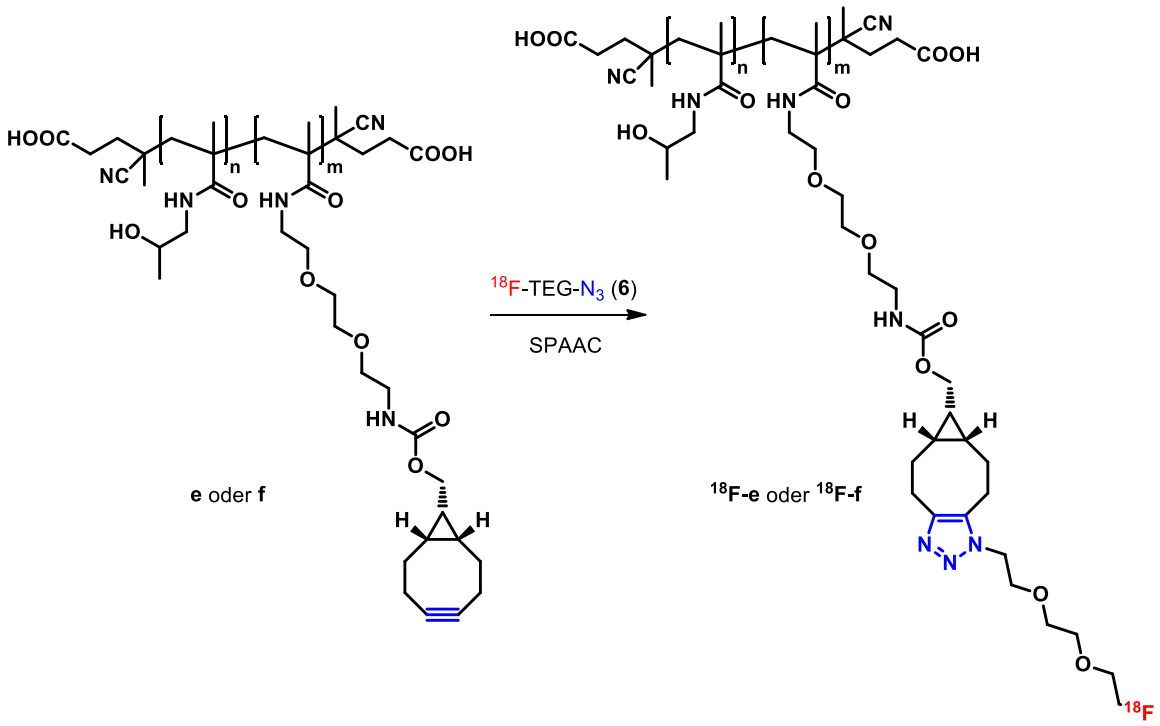
Ein Überblick der durchgeführten Reaktionen findet sich in Kapitel 4.2.4.

3.4.5 Kupferkatalysierte HPMA-Click-Markierung



Die kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) des kleinen (**c**) sowie des großen (**d**) HPMA-Homopolymers (vgl. Tabelle 3) mit Alkinfunktionalisierung wurde in einem Reacti-Vial mit Magnetrührstab, Septum und Schraubdeckel durchgeführt. Dazu wurde eine Lösung von 1 mg Polymer (**c** oder **d**) in 0,1 mL PBS mit 800 µL PBS, 100 µL **6** in DMSO, 20 µL $CuSO_4$ (20 µmol) und 40 µL Na-Ascorbat (49,4 mg in 100 mL PBS) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 20 min unter Rühren auf 70 °C erhitzt. Die radiochemischen Ausbeuten wurden mittels DC mit EA:*n*Hex (1:1) als mobile Phase bestimmt (R_f(^{18}F-c/^{18}F-d: 0; R_f(6): 0,8) und lagen bei 95 %. Zur Aufreinigung mittels HPLC wurden 3 HiTrap Desalting Columns (GE Healthcare) in Reihe mit 0,9 % NaCl als mobile Phase (1 mL/min) verwendet (t_R(^{18}F-c/^{18}F-d: 6,1 min; t_R(6): 12,8 min). Ein Überblick der durchgeführten Reaktionen findet sich in Kapitel 4.2.6 (Tabelle 9).

3.4.6 Katalysatorfreie HPMA-Click-Markierung



Die spannungsvermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition (SPAAC) des kleinen (**e**) sowie großen (**f**) HPMA-Homopolymers mit Cyclooctinfunktionalisierung (vgl. Tabelle 3) wurde mikrowellengestützt durchgeführt. Dazu wurde eine Lösung von 3 mg Polymer (**e** oder **f**) in 100 µL PBS in ein Mikrowellenreagenzglas mit Magnetrührstäbchen und PTFE-Deckel gegeben und mit 800 µL PBS aufgefüllt. Anschließend wurde **6** in 100 µL DMSO zugegeben und die Reaktion im „discover"-Modus unter Druckluftkühlung gestartet. Folgende Parameter wurden bei der Mikrowelle eingestellt: 1 min ramp, 10 min hold, P_{max}: 50 W, T_{max}: 120 °C, p_{max}: 18 bar. Nach dem Abkühlen der Reaktion wurde die radiochemische Ausbeute mittels DC mit EA:*n*Hex (1:1) als mobile Phase bestimmt ((R_f(^{18}F-e/^{18}F-f: 0; R_f(6): 0,8), RCA(^{18}F-e: 52 %; ^{18}F-f: 96 %)). Zur Aufreinigung mittels HPLC wurden 3 HiTrap Desalting Columns (GE Healthcare) in Reihe mit 0,9 % NaCl als mobile Phase (1 mL/min) verwendet (t_R(^{18}F-c/^{18}F-d: 6,1 min; t_R(6): 12,8 min). Ein Überblick der durchgeführten Reaktionen findet sich in Kapitel 4.2.7 (Tabelle 10 und Tabelle 11).

3.5 Liposomenpräparation

Die Liposomen wurden durch die Dünnfilm-Hydratationsmethode (*thin-film hydration method*) mit anschließender Extrusion präpariert. Eine Lösung von DOPC in Ethanol, Cholesterol in Ethanol und dem radiomarkierten Copolymer (**^{18}F-a** oder **^{18}F-b**) in Ethanol bzw. [^{18}F]Fluorocholesten (**9**) wurden bei molaren Verhältnissen von 60:35:5 mol% oder 60:20:20 mol% gemischt. Ziel war es, das Verhältnis von Lipid zu Cholesterol im Liposom konstant zu halten. Aufgrund der cholesterolverankerten Polymere **a** und **b** blieb das Gesamtverhältnis von Lipid zu Cholesterol bei 60:40 mol%. Das Lösemittel wurde am Miniatur-Rotationsverdampfer entfernt, um einen dünnen Film des Gemischs auf der Kolbenoberfläche zu erhalten. Dazu wurde der Druck schrittweise, beginnend bei 250 mbar und 45°C Wasserbadtemperatur, reduziert. Nachdem das Lösemittel entfernt war, wurde der Lipidfilm mit 1 mL PBS rehydriert, um die finalen Lipidzusammensetzungen, zusammengefasst in Tabelle 4 (S. 48), zu erhalten. Die Suspension wurde im Ultraschallbad bei 50 °C für 10 min behandelt. Anschließend wurden die so erhaltenen Liposomen in einem Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids) 11x über eine 400 nm und danach 11x über eine 100 nm Polycarbonatmembran extrudiert. Daraufhin wurden die daraus resultierenden, kleinen, unilamellaren Vesikel über die Größenausschlusschromatographie aufgereinigt, um die Liposomen von nicht inkorporierten kleinen Molekülen abzutrennen. Hierfür wurde eine leere 6 mL SPE-Kartusche mit ~0,5 g Sephadex G75 (in PBS suspendiert) und 20 µm PTFE-Fritten über und unter dem Füllmaterial gepackt. Nach dem Auftragen des extrudierten Gemischs auf die Säule, wurden je 0,5 mL Fraktionen gesammelt, indem schrittweise 0,5 mL PBS Puffer zugegeben wurde. Die Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde im Aktivimeter bestimmt und die für die Tierversuche verwendeten Fraktionen wurden nach dem Abklingen der Aktivität (i.d.R. nach 24 h) in der dynamischen Lichtstreuung vermessen.

Tabelle 4: Zusammensetzung verschiedener liposomaler Formulierungen mit Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**), Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) und [^{18}F]Fluorocholesten (**9**).

	mol. Verhältnisse (DOPC:Cholesterol:Polymer)	DOPC (mg)	Polymer (mg)	Cholesterol (mg)
^{18}F-a	60:20:20	13.13 (16.7µmol)	8.8 (5.5µmol)	2.15 (5.5µmol)
^{18}F-b	60:35:5	2.62 (3.3µmol)	1.0 (0.28µmol)	0.75 (1.9µmol)
	60:20:20	2.62 (3.3µmol)	4.0 (1.12µmol)	0.43 (1.12µmol)
9	60:40:0	10.51 (13.4µmol)	-	3.45 (8.9µmol)

3.6 Tierversuche

Es wurden *ex vivo*-Biodistributionsstudien sowie µPET-Aufnahmen zur biologischen Evaluierung an männlichen C57bl6J (black six) Mäusen (Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Das Körpergewicht lag zwischen 20,8 und 28,6 g. Es wurden die Verbindungen Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**), Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) und [^{18}F]Fluorocholesten (**9**) sowie deren liposomale Formulierungen untersucht. Die Tiere wurden in der Tierversuchseinrichtung der Johannes Gutenberg-Universität gehalten. Alle Experimente wurden von der regionalen Ethikkommission genehmigt und in Einklang mit dem deutschen Gesetz für Tierschutz sowie den UKCCCR Richtlinien durchgeführt.[96]

3.6.1 *Ex vivo*-Biodistributionsstudien

Für die *ex vivo*-Biodistributionsstudien wurden die ^{18}F-markierten Verbindungen in PBS Puffer (2,45-8,64 MBq) intravenös (i.v.) in eine Schwanzvene als Bolusinjektion (100-150 µL) verabreicht. Die Radiomarkierungen erfolgten analog zu den Kapiteln 3.4.2, 3.4.3 und 3.4.4, die Liposomenpräparation dieser Verbindungen nach Kapitel 3.5.
60 min nach der Injektion (p.i.) wurden die Tiere getötet und verschiedene Organe (Lunge, Blut, Leber, Milz, Nieren, Skelettmuskel, Herz, Urin, Dünndarm (Jejunum) und Hoden) entnommen. Nach dem Wiegen der Proben wurde die Aktivität in einem automatisierten γ-Counter (Perkin Elmer 2470 Wizard²) bestimmt, um daraus den Prozentsatz der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (%ID/g) zu berechnen. Die einzelnen Ergebnisse werden in Kapitel 4.4.2 gezeigt und diskutiert.

3.6.2 *In vivo*-µPET-Studien

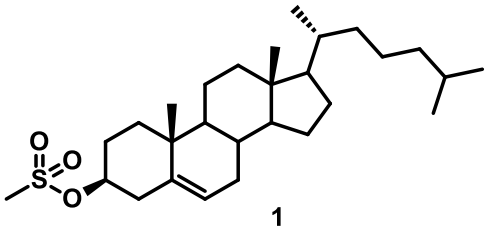
Für die *in vivo*-µPET-Studien wurden die Mäuse mit Isofluran (2,5 %) anästhesiert und die Applikation der ^{18}F-markierten Verbindungen (4,74 ± 1,24 MBq) erfolgte über intravenöse Bolusinjektion (in 100-150 µL BS Puffer) in eine Schwanzvene. Die Radiomarkierungen erfolgten analog den Kapiteln 3.4.2, 3.4.3 und 3.4.4, die Liposomenpräparation dieser Verbindungen nach Kapitel 3.5. Die Bildgebung wurde an einem Focus 120 Kleintier-PET (Siemens/Concorde, Knoxville, USA) durchgeführt. Während der µPET-Aufnahmen waren die Mäuse auf dem Bauch liegend, Kopf voran (HFP: head first prone) positioniert. Die dynamischen PET-Messungen über 60 min

wurden in Listmode aufgezeichnet. Diese Listmode-Daten wurden in 19 Frames (3x 20 s, 3x 60s, 3x 120s, 10x 300s) unterteilt und mittels FBP (filtered back projection) Algorithmus mit Totzeitkorrektur rekonstruiert. Eine Streuungskorrektur wurde nicht angewandt. Die einzelnen Ergebnisse werden in Kapitel 4.4.1 gezeigt und diskutiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Organische Synthesen

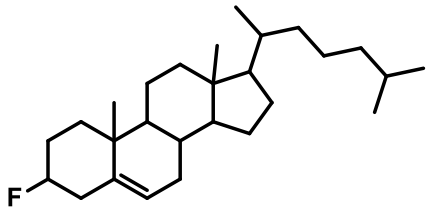
4.1.1 Methansulfonsäure 3β-cholesterylester (1)



1

Der Methansulfonsäure 3β-cholesterylester (**1**) wurde nach Sun et al.[91] und wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, dargestellt. Cholesterol und Triethylamin wurden in Dichlormethan gelöst und mit Methansulfonylchlorid umgesetzt. Das Produkt wurde durch die Zugabe von Methanol ausgefällt. Es war keine weitere säulenchromatographische Aufreinigung notwendig.

4.1.2 3-Fluorocholest-5-en (2)



2

Das 3-Fluorocholest-5-en (**2**) wurde durch Umsetzung von Cholesterol in Dichlormethan mit Diethylaminoschwefeltrifluorid nach Kapitel 3.2.2 hergestellt. Der Reaktionsführung sowie die säulenchromatographische Aufreinigung mit *n*-Hexan als mobile Phase verliefen problemlos. In Abbildung 21 ist ein HPLC-Diagramm der Referenzverbindung **2** zu sehen. Aufgrund der schlechten UV-Absorption wurde zur Aufnahme des Chromatogramms eine Wellenlänge $\lambda = 210$ nm eingestellt. Bei der verwendeten HPLC-Säule handelte es sich um eine semipräparative Phenomenex Luna C18(2) 250 x 10 mm. Als mobile Phase wurde ein isokratisches Gemisch aus *i*PrOH:MeCN:H_2O (80:18:2) bei einer Flussrate von 3 mL/min verwendet. Die Referenzverbindung **2** wies eine Retentionszeit von t_R: 7 min auf. Das bei t_R: 3,2 min auftretende Artefakt ist

lösemittelbasiert und steht im Zusammenhang mit der hohen Grundabsorption von *i*PrOH und MeCN bei der verwendeten Wellenlänge.

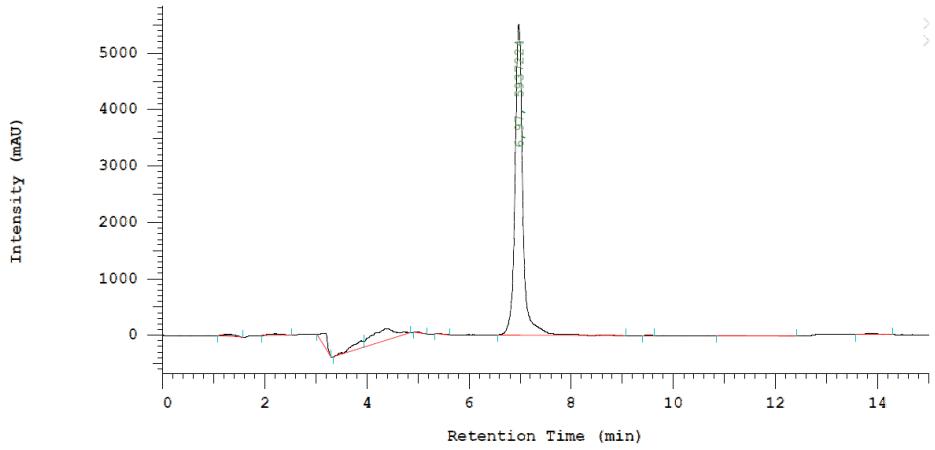
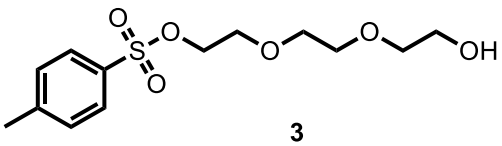


Abbildung 21: HPLC-Diagramm der Referenzverbindung 3-Fluorocholest-5-en (**2**).

4.1.3 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl-4-*p*-toluolsulfonat (3)

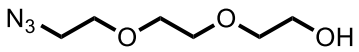


3

Die Darstellung von 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl-4-*p*-toluolsulfonat (**3**) aus Triethylenglykol und Triethylamin in trockenem Tetrahydrofuran wurde durch die Zugabe von 0,5 Äquivalenten *p*-Toluolsulfonsäurechlorid nach Kapitel 3.2.3 erreicht. Nach der Filtration, zum Abtrennen des Triethylammoniumchlorids sowie dem Entfernen des Lösemittels wurde das Reaktionsgemisch mittels Säulenchromatographie mit Ethylacetat:Methanol (4:1) als mobile Phase aufgereinigt.

Da bei der Ditosylierung mit anschließender Monoazidierung kein Produkt isoliert werden konnte, wurde die Monotosylierung mit anschließender Azidierung und erneuter Monotosylierung zum Produkt **5** durchgeführt. Alternativ könnte man auch 2-(2-(2-Chloroethoxy)ethoxy)ethanol azidieren und anschließend tosylieren, um sich einen Syntheseschritt zu ersparen.

4.1.4 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethanol (4)



4

Zur Synthese von 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethanol (**4**) wurde **3** mit Natriumazid in trockenem DMF nach Kapitel 3.2.4 umgesetzt. Nach dem Erhitzen und anschließendem Entfernen des Lösemittels unter Hochvakuum wurde das Produkt **4** mittels Säulenchromatographie mit Ethylacetat:Methanol (4:1) als mobile Phase aufgereinigt. Im IR-Spektrum (vgl. Abbildung 22) ist deutlich die Azidschwingung ($\tilde{\upsilon}$ = 2108 cm^{-1}) sowie die breite OH-Schwingung ($\tilde{\upsilon}$ = 3417 cm^{-1}) zu erkennen.

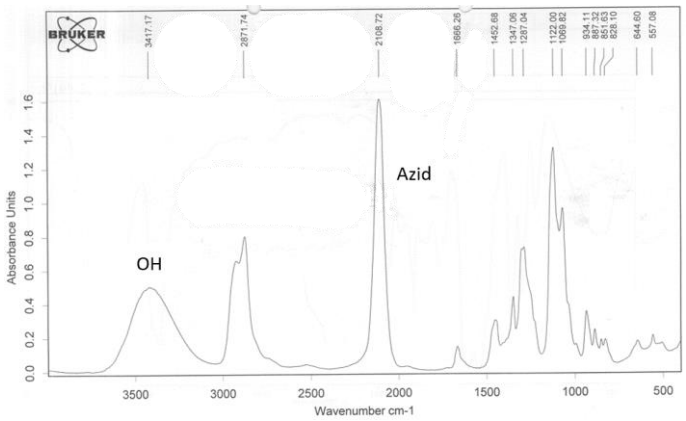
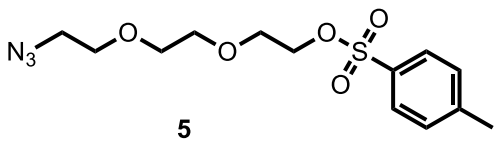


Abbildung 22: IR-Spektrum von 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethanol (4).

4.1.5 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-4-*p*-toluolsulfonat (5)



5

Der finale Vorläufer **5** zur Radiomarkierung mit Fluor-18 wurde analog zu Kapitel 3.2.5 hergestellt. Dazu wurde **4** mit Triethylamin in Dichlormethan mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid umgesetzt. Nach der Entfernung des Lösemittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt **5** säulenchromatographisch mit Ethylacetat:*n*-Hexan (2:5) als mobile Phase aufgereinigt. Im IR-Spektrum (vgl. Abbildung 23) ist klar zu erkennen, dass die breite OH-Bande (ehemals $\tilde{\upsilon}$= 3417 cm^{-1},

vgl. Abbildung 22) aufgrund der Tosylierung nicht mehr vorhanden ist, während die Azidschwingung weiterhin prominent bei $\tilde{\upsilon}$= 2107 cm^{-1} auftritt.

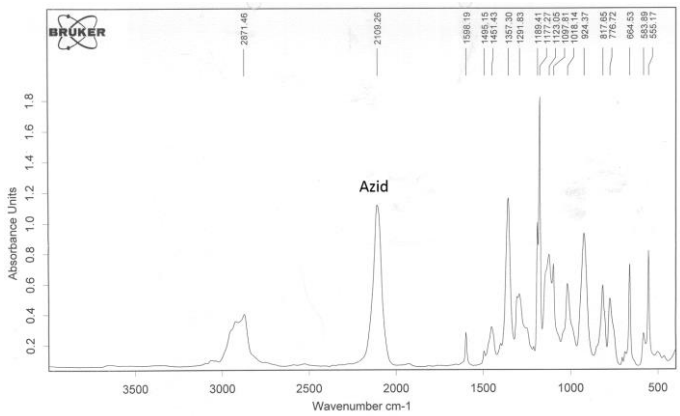


Abbildung 23: IR-Spektrum von 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxyethyl-4-*p*-toluolsulfonat (5).

In Abbildung 24 ist ein HPLC-Diagramm des Markierungsvorläufers **5** gezeigt. Es wurde eine analytische Phenomenex Luna C18(2) (4,6 x 250 mm, 5 µ) HPLC-Säule mit H_2O und MeCN als mobile Phase verwendet. Der angewandte Gradient ist in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: HPLC-Gradient zu *Abbildung 24*.

Zeit / min	**% H_2O**	**% MeOH**
0	50	50
10	5	95
20	5	95
22	50	50
25	50	50

Als Absorptionswellenlänge wurde $\lambda = 220$ nm gewählt, um auch schwach UV-aktive Verunreinigungen zu detektieren. Es konnte eine Reinheit von 97 % bestimmt werden.

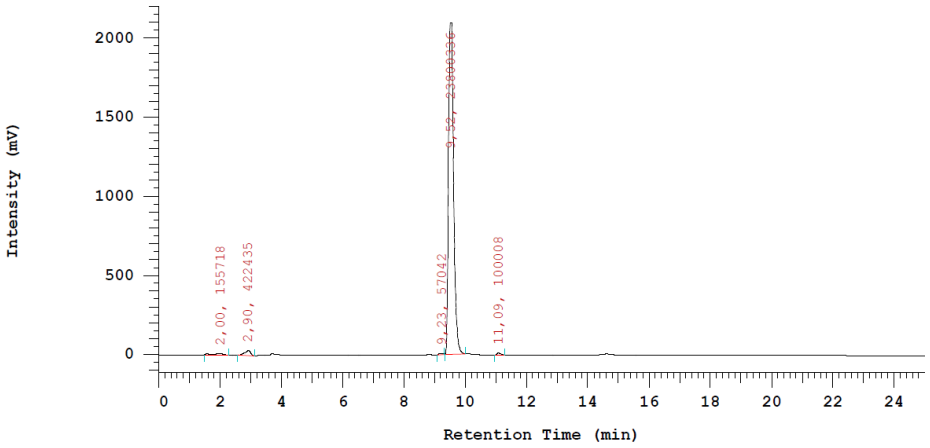


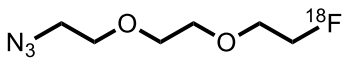
Abbildung 24: HPLC-Diagramm von 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxyethyl-4-*p*-toluolsulfonat (5) mit einer Reinheit von 97 %.

4.2 Radiochemische Experimente

4.2.1 Radiomarkierung von ^{18}F-TEG-N_3 / [^{18}F]FETos

Die semiautomatische Modulsynthese bietet diverse Vorteile gegenüber der manuellen Synthese. Zuerst wäre der Vorteil der reduzierten Strahlenexposition aufgrund der permanenten Abschirmung und Steuerung des Moduls am Computer zu nennen. Es muss nur anfänglich das Modul mit [^{18}F]Fluorid bestückt und am Ende der Synthese die Kartusche entnommen werden. Bei manuellen Synthesen sind die einzelnen Syntheseschritte mit den Händen durchzuführen, wobei zumindest diese der Strahlung ausgesetzt sind. Der Abstand zur Radioaktivität kann bei dieser Modulsynthese also erhöht und die Aufenthaltsdauer erheblich reduziert werden. Auch der anfallende Abfall ist durch die Wiederverwendbarkeit gegenüber einer manuellen Synthese verringert. Aufgrund der freien Programmierbarkeit des Syntheseablaufs und der Reaktionsparameter lässt sich das Modul gut an die jeweils optimierten Reaktionsbedingungen anpassen. Die hohe Reproduzierbarkeit von Modulsynthesen bietet neben der relativen Zeitersparnis einen beim praktischen Arbeiten nicht zu unterschätzenden Aspekt. Dem Experimentator erlaubt die modulgestützte Synthese (ca. 60 min), Vorbereitungen für weiterführende Versuche zu treffen, was im Kontext der radioaktiven Umwandlung vorteilhaft ist.

4.2.1.1 1-Azido-2(2-(2-[^{18}F]fluoroethoxy)ethoxy)ethan (6)



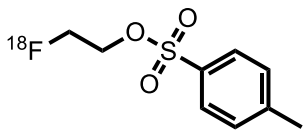
6

Zur Synthese des Click-Synthons ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) am semiautomatischen Modul wurde wie in Kapitel 3.4.1.1 beschrieben verfahren. Das azeotrop getrocknete [^{18}F]Fluorid wurde in MeCN mit dem Vorläufer **5** zur Reaktion gebracht und über die semipräparative HPLC abgetrennt. Nach der Fixierung auf einer Lichrolut EN Kartusche, konnte das fertige Click-Synthon **6** nur mit Diethylether quantitativ eluiert werden, welcher nachfolgend wieder entfernt wurde. Die Wahl der Kartusche fiel auf die Lichrolut EN, da diese das ^{18}F-TEG-N_3 am besten (nahezu quantitativ) fixierte. Diese Methode bietet die Möglichkeit der freien Lösemittelwahl für die anschließend durchgeführten

Cycloadditionsreaktionen, da **6** nach dem Entfernen des Ethers in verschiedensten Lösemitteln aufgenommen werden kann.

Aufgrund der leichten Flüchtigkeit des Diethylethers wurde der in Abbildung 20 (S. 41) gezeigte Aufbau zum Entfernen des Lösemittels verwendet, um die Gefahr einer Kontamination zu minimieren.

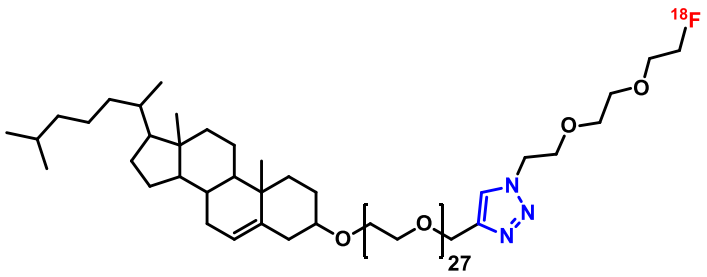
4.2.1.2 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat (8)



8

Die Synthese des 2-[^{18}F]Fluorethyltosylats (**8**) wurde nach Kapitel 3.4.1.2 ebenfalls am semiautomatischen Modul durchgeführt. Das azeotrop getrocknete [^{18}F]Fluorid wurde zusammen mit Ethylenditosylat in Acetonitril zur Reaktion gebracht und mittels semipräparativer HPLC abgetrennt. Nach der Fixierung auf einer Strata-X Kartusche konnte das fertige [^{18}F]FETos mittels verschiedener organischer Lösemittel (DMF, Dioxan, THF,...) eluiert und für Fluoralkylierungsreaktionen eingesetzt werden. Da die Fixierung auf der Strata-X Kartusche zu einem hohen Prozentsatz erfolgte, konnte die Elution mit dem für die Folgereaktion benötigten Lösemittel durchgeführt werden. Somit war die erneute Entfernung des Lösemittels nicht nötig.

4.2.2 Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (^{18}F-a)



^{18}F-a

Die Synthese des Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**) wurde nach den optimierten Reaktionsbedingungen aus Kapitel 3.4.2 durchgeführt. Das lineare Polymer Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-C≡CH (**a**) wurde in PBS unter Zusatz einer kleinen Menge DMSO mit ^{18}F-TEG-N$_3$ (**6**) kupferkatalysiert umgesetzt. Der für diese Reaktion benötigte Katalysator Kupfer(I)

wurde *in situ* durch Reduktion des Kupfer(II)sulfats mittels Natriumascorbat hergestellt. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Kupfer mittels Festphasenextraktion entfernt, um die Verbindung **^{18}F-a** für Injektionszwecke oder zur Liposomenpräparation verwenden zu können.

4.2.2.1 Markierungsreaktionen

Um die optimalen Reaktionsbedingungen für die Radiomarkierung des Polymers Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-C≡CH (**a**) mit ^{18}F-TEG-N$_3$ (**6**) zu erhalten, wurden einzelne Parameter, wie die eingesetzte Stoffmenge, das Lösemittel und die Lösemittelzusammensetzung, die Kupfer- und Natriumascorbatkonzentration, das Verhältnis von Kupfer zu Natriumascorbat sowie die Reaktionstemperatur und –dauer, untersucht. Ziel dieser Experimente war eine radiochemische Ausbeute > 95 %, um auf die Aufreinigung von **^{18}F-a** von **6** verzichten zu können sowie möglichst hohe Aktivitätsmengen von **^{18}F-a** zu erhalten, mit denen weiterführende Versuche durchgeführt werden konnten. Zusammengefasst sind die Ergebnisse der durchgeführten Reaktionen in Tabelle 6.

Tabelle 6: Überblick der durchgeführten CuAAC-Reaktionen von Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-C≡CH (**a**) mit ^{18}F-TEG-N$_3$ (**6**) zu **^{18}F-a** bei 70 °C für 15 min (* 10 min), n: Anzahl der durchgeführten Reaktionen, RCA: radiochemische Ausbeute (mit DC bestimmt, bei Mehrfachbestimmungen als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD)), Bei Mehrfachbestimmungen ist die Aktivität (A) als Bereich und in Klammern als MW ± SD angegeben.

m(a) [mg]	**Lösemittel V_{ges}: 1 mL**	**$CuSO_4$ [µmol]**	**Na-Asc. [µmol]**	**A (6) [MBq]**	**n**	**RCA [%]**	**Bemerkungen**
0,44	PBS:EtOH (6:4)	10	50	274,3	1	51	+10 µL DMSO
		20	100	33 - 1334 (403 ± 540)	4	55 ± 26	-
				239,4	1	51	+10 µL DMSO
	PBS:EtOH (7:3)	20	100	33,16	1	68	-
0,88	PBS:EtOH (6:4)	20	100	152 - 1643 (757 ± 573)	5	55 ± 25	-
		10	37.5	160,4	1	70	+12,5 µL DMSO
				130,4	1	72	+7,5 µL DMSO
		15	75	302,3	1	60	+10 µL DMSO
		20	100	252,7	1	61	+7,5 µL DMSO
				160 - 184 (172 ± 12)	2	81 ± 9	+10 µL DMSO
	PBS	10	50	115 - 628 (375 ± 209)	3	69 ± 22	-
1	PBS:EtOH (5:5)	20	100	55 - 130 (90 ± 26)	6	70 ± 30*	-
				48,8	1	42*	PBS pH 6,5
8,8	PBS	15	56.3	224 - 1678 (1091 ± 626)	3	97 ± 0,5	+12,5 µL DMSO

Nach den Vorerfahrungen der kupferkatalysierten Cycloaddition des linear-hyperverzweigten Polymers Ch-PEG$_{40}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**, vgl. 4.2.3) wurde mit einem Lösemittelgemisch aus PBS und Ethanol begonnen. Es wurden bei Einwaagen von 0,44 mg(0,275 µmol), 0,88 mg (0,55 µmol) und 1 mg (0,625 µmol) **a** teilweise zwar hohe Ausbeuten erreicht, die Reaktionen verliefen jedoch nicht reproduzierbar. Vor allem beim Einsatz von hohen Aktivitäten, deren Verwendung für die anschließende Liposomenpräparation oder die Tierversuche notwendig war, konnten keine der bei niedrigen Aktivitäten erreichten Ausbeuten wiederholt werden.
Beispielhaft zeigt dies eine Reaktion in PBS:EtOH (6:4) mit 0,88 mg Polymereinwaage, 20 µmol $CuSO_4$ und 100 µmol Na-Ascorbat (vgl. Tabelle 6). Bei einer Startaktivität von 163 MBq konnte eine radiochemische Ausbeute von 96 % nach 15 min erreicht werden. Bei einem Einsatz von 1,123 GBq sank diese auf 36 % ab.
Häufig war in Zusammenhang mit niedrigen Ausbeuten ein rotbrauner Niederschlag in der Reaktionslösung zu beobachten. Es handelte sich dabei um Kupfer(I)oxid. Bei näherer Betrachtung der Reaktionsbedingungen wurde deutlich, dass, wie bei der Herstellung dünner Cu_2O-Filme von Dong *et al*.,[97] alle Parameter gegeben waren. Kupfer(I)oxid kann durch die Reduktion von $CuSO_4$ mit Na-Ascorbat in Gegenwart von NaOH entstehen. In PBS-Puffer (pH 7,4) liegen Natriumionen im leicht basischen Milieu vor. Durch die Reduktion des Cu(II) zu Cu(I) mittels Na-Ascorbat und der leicht erhöhten Temperatur sind alle nötigen Voraussetzungen gegeben, um die Reaktion ablaufen zu lassen. Wie in Kapitel 4.2.3 diskutiert, hat sich zuvor aber herausgestellt, dass PBS-Puffer die Reaktionsausbeute gegenüber Millipore-Wasser wesentlich erhöht. Um die Löslichkeit der einzelnen Ionen zu erhöhen, wurde auf den Zusatz von Ethanol, in dem das ^{18}F-TEG-N_3 gelöst war, verzichtet. Hierfür wurde nach dem Entfernen des Ethers, der zur Elution des Click-Synthons von der Kartusche benötigt wird, auf den Zusatz von EtOH verzichtet. Die einzelnen Reaktionskomponenten wurden stattdessen direkt in das Reacti-Vial, welches das Synthon **6** enthielt, gegeben.

Um die Bildung des Kupfer(I)oxids zu verhindern, wurde untersucht, ob die Herabsetzung des pH-Wertes der PBS-Lösung zielführend ist. Dazu wurde der pH-Wert mittels HCl auf 6,5 gesenkt. Die Reaktionsausbeute lag dabei nur bei 42 % (vgl. Tabelle 6, vorletzte Zeile). Daraufhin wurde dieser Ansatz verworfen.
Wie von Hong *et al*. empfohlen, sollte der pH-Bereich bei kupferkatalysierten Alkin-Azid-Cycloadditionen zwischen 6,5 und 8 liegen.[98] Ein anderer Ansatz ist die Zugabe

eines Cu-stabilisierenden Liganden, z.B. Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA). Durch diesen Liganden sollen eventuell auftretende, reaktive Sauerstoffspezies abgefangen werden, welche durch ascorbatvermittelte Reduktion des O_2 in Lösung entstehen können. Um die Aufreinigung des Reaktionsgemisches nicht durch ein weiteres Reagenz zu komplizieren, wurde auf stabilisierende Liganden, wie THPTA, verzichtet. Die Beimischung von Lösungsvermittlern, wie DMSO, kann sich ebenfalls vorteilhaft auf die Reaktionsausbeute auswirken.

Die Umstellung des Lösemittelsystems auf PBS ohne Ethanolzusatz, zusammen mit der Reduktion der zugesetzten Menge an Kupfer und Na-Ascorbat, verhinderte das Auftreten des Cu_2O-Niederschlags, löste jedoch nicht das Problem der schwankenden Ausbeuten beim Einsatz hoher Aktivitäten.

Durch die Erhöhung der Einwaage des Polymers auf 8,8 mg (5,5 µmol) und den Zusatz von geringen Mengen DMSO (12,5 µL) wurde dieses Problem jedoch gelöst und es wurden radiochemische Ausbeuten > 95 %, unabhängig der eingesetzten Aktivitätsmenge, erzielt.

4.2.2.2 Bestimmung der radiochemischen Ausbeute

Die radiochemischen Ausbeuten wurden mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. Dazu wurden DC-Platten von Merck (TLC silica gel 60 F254) benutzt. Als mobile Phase wurde ein 1:1 (v/v) Gemisch von Ethylacetat und *n*-Hexan gewählt. Aufgrund der Größe und Polarität des Polymers Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-^{18}F (**^{18}F-a**) blieb dieses auf der Startlinie liegen, wobei das Click-Synthon ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) einen $R_f \sim 0{,}8$ aufwies (vgl. Abbildung 25). Mit der benutzten Laufmittelmischung zeigte das ^{18}F-TEG-N_3 eine symmetrische Geometrie und keine Schlierenbildung auf der DC. Um falsch positive Ergebnisse der durchgeführten Reaktionen auszuschließen, wurde das Click-Synthon immer separat neben den Reaktionszeitpunkten aufgetragen. Es wurden auch Reaktionen unter Abwesenheit je eines Reaktionspartners (Polymer, Kupfer, Na-Ascorbat) durchgeführt, um zu belegen, dass unter keinen Umständen das ^{18}F-TEG-N_3 zersetzt, defluoriert bzw. modifiziert wird und somit seinen Retentionsfaktor ändert. Vor allem bei der Defluorierung würde, aufgrund der hohen Affinität von Fluorid zu Silicium und der Ladung, das $[^{18}F]F^-$ auf der Startlinie retiniert werden und damit zu einem falsch positiven Ergebnis führen.

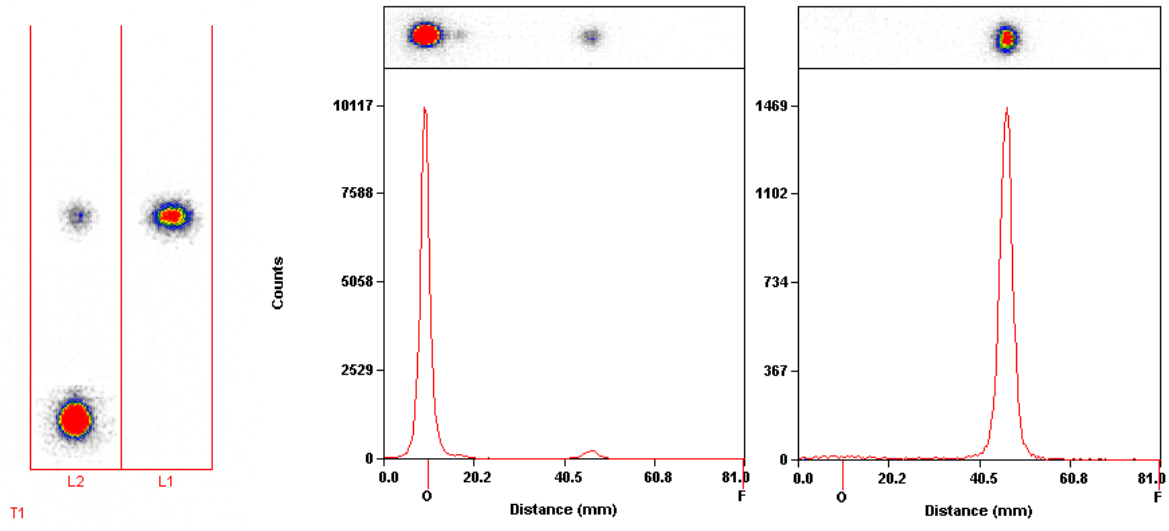


Abbildung 25: Radio-DC: Aufsicht (Links): Reaktionsgemisch (L2) RCA 95 % und Synthon ^{18}F-TEG-N_3 (L1), Aktivitätsprofil (L2) des Reaktionsgemischs (Mitte) und des ^{18}F-TEG-N_3 (L1) (Rechts), mobile Phase EA:*n*Hex (1:1).

4.2.2.3 Kupferabtrennung und Trocknung

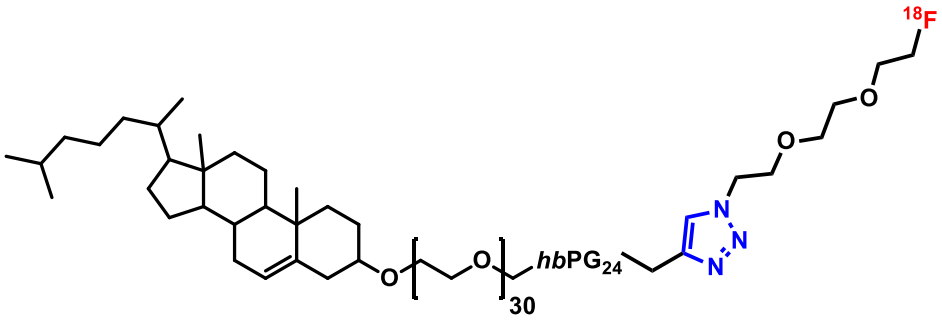
Wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, wurde das Kupfer aus der CuAAC-Reaktion auf einer mit Chelex 100 gepackten SPE-Kartusche retiniert. Dabei wurde das radiomarkierte Polymer nicht auf der Säule zurückgehalten und es konnte im Anschluss das Lösemittel entfernt werden, um das kupferfreie Produkt zu erhalten. Neben der optischen Prüfung auf Blaufärbung wurde bei der Etablierung der Abtrennung durch Zugabe von gesättigter Na_2S-Lösung zu den Elutionsfraktionen getestet, ob das Kupfer auf der Säule verblieb. Durch das Ausbleiben des schwarzen Niederschlags von CuS/Cu_2S konnte dies gezeigt werden.

Zuerst wurde die Cu-Resin (Triskem) getestet. Dieses Säulenmaterial ist dazu bestimmt, Kupferisotope aus bestrahlten Nickel- oder Zinktargets abzutrennen und hat daher eine hohe Affinität und Selektivität zu Kupferionen. Nach dem Packen und Konditionieren (mit 8 M HCl und Millipore-Wasser) der Kartusche wurde das Reaktionsgemisch aufgetragen und mit wenig Wasser gespült. Das Kupfer wurde zurückgehalten, was gut an der Entfärbung des Durchbruchs erkennbar war. Das markierte Polymer wurde allerdings auch zu ca. 40 % zurückgehalten und ließ sich nur mit organischen Lösemitteln (EtOH, MeCN) wieder eluieren. Dabei wurde allerdings auch das Kupfer von der Säule gespült. Somit konnte keine Trennung von Kupfer und markiertem Polymer erreicht werden, ohne signifikante Mengen des radiomarkierten Cholesterolderivats zu verlieren.

Daraufhin wurde das Säulenmaterial Chelex 100 getestet, wobei es sich um kovalent auf einem Styrol/Divinylbenzol-Copolymer gebundene Iminodiessigsäuregruppen handelt. Es gehört damit zu den schwach sauren Kationenaustauscherharzen und zeigt dabei eine hohe Selektivität für Schwermetallionen. Zur Konditionierung wurde 1 M HCl, gefolgt von Millipore-Wasser, gefolgt von 1 M NaOH und wieder Millipore-Wasser benutzt. Die Salzsäure eignet sich dafür, um eventuelle metallische Rückstände von dem Säulenmaterial zu entfernen. Dabei geht die Na^+-Form des Materials in eine H^+-Form über. Zur Neutralisation wurde mit Wasser gewaschen, um anschließend durch NaOH erneut die Na^+-Form herzustellen und mit Wasser wieder neutral zu waschen. Kurz vor der Benutzung wurde das Wasser mit Luft von der Säule gedrückt, um bei der anschließenden Trocknung über die Na_2SO_4-Kartusche kein zusätzliches Wasser entfernen zu müssen. Zur vollständigen Retention des Kupfers wurden ca. 600 mg des Säulenmaterials benötigt. Im Gegensatz zum Cu-Resin blieb das radiomarkierte Polymer nicht auf dem Säulenmaterial zurück bzw. konnte es getrennt vom Kupfer mittels abs. EtOH in ausreichendem Ausmaß (> 90 %) zurückgewonnen werden. Die aufgereinigte Lösung wurde zu Testzwecken tropfenweise mit Na_2S-Lösung versetzt. Es war keine Schwarzfärbung, die auf den Niederschlag von CuS, bzw. Cu_2S hinweisen würde, zu beobachten. Das benutzte Chelex 100 wurde mit 1 M HCl gespült und das Eluat mit Natriumsulfidlösung versetzt. Bereits beim ersten Tropfen war ein deutlicher, schwarzer Niederschlag zu beobachten. Dadurch wurde die Funktion der selbstgepackten Kartusche zum Entfernen des Kupfers bestätigt.

Nach dem Entfernen des Kupfers, wurde die Reaktionslösung über eine selbstgepackte Na_2SO_4-Kartusche (vgl. Kapitel 3.4.2) getrocknet. Unter die Kartusche wurde ein 0,45 µm PTFE-Filter angebracht, so dass die Lösung filtriert und mitgeschlepptes Natriumsulfat zurückgehalten wurde. Anschließend wurde die getrocknete, ethanolische Lösung am Miniatur-Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit.

4.2.3 Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (^{18}F-b)



^{18}F-b

Die Synthese des Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) wurde nach den optimierten Synthesebedingungen aus Kapitel 3.4.3 hergestellt. Dazu wurde das linear-hyperverzweigte Polymer Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-C≡CH (**b**) in einer 6:4 (v/v) Mischung aus PBS und EtOH mit ^{18}F-TEG-N$_3$ (**6**) unter Kupferkatalyse umgesetzt. Der Cu(I)-Katalysator wurde dazu *in situ* durch die Reduktion des Cu(II)-Salzes CuSO$_4$ mittels Natriumascorbat hergestellt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Kupfer mit Hilfe der Festphasenextraktion entfernt. Daraufhin konnte das Produkt **^{18}F-b** nach dem Entfernen des Ethanols zur Liposomenpräparation oder direkten Tierversuchsstudien eingesetzt werden.

4.2.3.1 Markierungsreaktionen

Um mit optimalen Reaktionsbedingungen radiochemische Ausbeuten > 95 % zu erreichen, wurden verschiedene Reaktionsparameter, wie die Stoffmenge, das Lösemittel und die Lösemittelzusammensetzung, die Kupfer- und Natriumascorbatkonzentration sowie das Verhältnis von Kupfer zu Na-Ascorbat und die Reaktionstemperatur und -dauer, untersucht. Diese Zielsetzung wurde verfolgt, um **^{18}F-b** nicht von **6** aufreinigen zu müssen sowie möglichst hohe Aktivitätsmengen von **^{18}F-b** für Folgeexperimente zu erhalten. Neben der konventionellen Reaktionsführung in einem Heizblock wurden ebenso mikrowellengestützte Reaktionen untersucht. Zusammengefasst sind die konventionellen Reaktionen in Tabelle 7, die mikrowellengestützten Reaktionen in Tabelle 8.

Tabelle 7: Überblick der durchgeführten CuAAC-Reaktionen von Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-C≡CH (**b**) mit ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) zu **^{18}F-b**. Reaktionszeit 15 min (* 10 min), n: Anzahl der durchgeführten Reaktionen, RCA: radiochemische Ausbeute (mit DC bestimmt, bei Mehrfachbestimmungen als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD)), Bei Mehrfachbestimmungen ist die Aktivität (A) als Bereich und in Klammern als MW ± SD angegeben.

T [°C]	Lösemittel V_{ges}: 1 mL	$CuSO_4$ [µmol]	Na-Asc. [µmol]	A (6) [MBq]	n	RCA [%]	Bemerkungen
40	H_2O:DMSO (9:1)	60	600	25,9	1	48	
	PBS:H_2O:DMSO (7:2:1)			26,4	1	88	
				26,4	1	80	+ 5 µmol THPTA
	PBS:H_2O:DMSO (2:2:6)			900	1	44	
60	PBS:DMSO (4:6)	20	100	52,7	1	86	
70	PBS:DMSO (4:6)	20	100	84,7	1	97	
	PBS:DMSO (5:5)			33,5	1	95*	
	PBS:EtOH (4:6)			23,6	1	90*	
	PBS:EtOH (5:6)			86,8 - 361 (251,4 ± 118,5)	3	85 ± 8*	V_{ges}: 1,1 mL
	PBS:EtOH (7:7)			98,7	1	91*	V_{ges}: 1,4 mL
	PBS:EtOH (6:6)			320	1	82*	V_{ges}: 1,2 mL
	H_2O:EtOH (1:9)			123	1	55*	
	PBS:EtOH (5:5)	-	100	112	1	0*	
		20	100	63,3 – 75,7 (69,5 ± 6,2)	2	81 ± 1*	
	PBS:MeOH (2:8)	20	100	136	1	88	
			150	82,9	1	88	
	PBS:MeOH (4:6)	20	100	29,0 – 70,2 (47,5 ± 17,1)	3	87 ± 8	
	PBS:MeOH (3:7)			26,7	1	90	
	PBS:EtOH (5:5)			75,6	1	93	
	PBS:EtOH (6:4)			350 - 2543 (1650 ± 802)	4	90 ± 7	

Begonnen wurde die Untersuchung der CuAAC-Reaktion in Millipore-Wasser mit der Zugabe des Click-Synthons **6** in 100 µL DMSO. Das Volumen wurde bei 1 mL konstant gehalten, ebenso wie die Temperatur von 40 °C und die $CuSO_4$- (60 µmol) sowie Na-Ascorbat-Stoffmenge (600 µmol). Durch den Austausch von Wasseranteilen mit Puffer (PBS) konnte die Reaktionsausbeute deutlich von 48 % auf 88 % gesteigert werden. Hohe Anteile an DMSO in der Reaktionslösung reduzierten die Ausbeuten wieder. Eine Erhöhung der Temperatur von 60 auf 70 °C war zielführend, bei gleichzeitiger Reduktion der Stoffmenge an Kupfer und Ascorbat auf 20 bzw. 100 µmol. Das Verhältnis von Kupfer zu Ascorbat wurde dabei von 1:10 auf 1:5 reduziert. Sehr gute radiochemische Ausbeuten (97 bzw. 95 %) wurden für ein Verhältnis von PBS zu DMSO (4:6) und (5:5) bei 70 °C, 20 µmol $CuSO_4$ und 100 µmol Na-Ascorbat und einer Reaktionszeit von 15 bzw. 10 min erreicht.

Die relativ hohen Anteile an DMSO zeigten sich jedoch als problematisch bei der Aufreinigung des **^{18}F-b** bzw. der Entfernung des Lösemittels. Aufgrund des hohen Siedepunktes von DMSO (189 °C) war es nicht möglich, dieses in angemessener Zeit zu entfernen. Vor der Bildung eines Lipidfilms zur Liposomenpräparation, bzw. der Formulierung einer injektionsfertigen Lösung, war es jedoch zwingend notwendig, organische Lösemittel am Miniatur-Rotationsverdampfer zu entfernen. Die Dünnschicht-Hydratationsmethode zur Präparierung von Liposomen funktioniert nur nach der Entfernung von organischen Lösemitteln, da die amphiphilen Lipide sonst keine Doppelmembran ausbilden würden. Aufgrund dieser Tatsache musste das Lösemittelsystem auf leichter flüchtige Lösemittel umgestellt werden. Dazu wurden Testreaktionen mit Methanol, Ethanol oder Acetonitril durchgeführt. Während Methanol und Ethanol in Kombination mit PBS-Puffer ähnlich gute Ergebnisse lieferten, senkte sich die radiochemische Ausbeute unter der Anwendung von MeCN erheblich (vgl. Tabelle 8, S. 67). Aufgrund der Toxizität von MeOH wurde sich für das Lösemittelsystem PBS:EtOH entschieden. Sämtliche Komponenten der Reaktion wurden dazu in PBS-Puffer gelöst, bis auf das ^{18}F-TEG-N_3, welches in EtOH aufgenommen wurde. Die optimierten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 7 in der untersten Zeile aufgeführt.
Zur Negativkontrolle wurde auf die Zugabe des Kupfers verzichtet, wobei wie erwartet keine Reaktionsausbeute erreicht werden konnte.

In Tabelle 8 sind die mikrowellengestützten Reaktionen zusammengefasst. Die Mikrowelle wurde im „discover“ Modus betrieben, d.h. das Glasgefäß wurde mittels PTFE-Deckel verschlossen. Zusätzlich wurde das Reaktionsgefäß permanent mit Druckluft gekühlt, was eine höhere Energiedeposition zulässt. Die Angaben der Reaktionsparameter, wie Temperatur (T), Leistung (P) oder Druck (p) sind jeweils limitierende Parameter. Das heißt, beim Erreichen des Temperatur- oder Drucklimits wird die Leistung der Mikrowelle gedrosselt, während die maximal zugeführte Energie dem P_{max}-Wert entspricht. Je nach Zusammensetzung des Lösemittels wird das Temperaturlimit innerhalb der Reaktionszeit teilweise jedoch nicht erreicht. Die Betriebszeit der Mikrowelle teilt sich in zwei Abschnitte, „ramp“ und „hold“. Während die „ramp“-Zeit zur Erwärmung der Reaktionslösung auf die Reaktionstemperatur dient, wird während der „hold“-Phase die Temperatur gehalten, wobei oftmals die eingestrahlte Leistung reduziert wird. Nachdem die Reaktionszeit verstrichen ist, wird das

Reaktionsgefäß mittels Druckluft abgekühlt, bevor das Reaktionsgefäß geöffnet werden kann.

Tabelle 8: Überblick der durchgeführten mikrowellengestützten CuAAC-Reaktionen von Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-C≡CH (**b**) mit ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) zu **^{18}F-b**. Reaktionszeit 1 min ramp + 3 min hold (* 1 min ramp + 5 min hold), p_{max}: 18 bar, n: Anzahl der durchgeführten Reaktionen, RCA: radiochemische Ausbeute (mit DC bestimmt, bei Mehrfachbestimmungen als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD)), Bei Mehrfachbestimmungen ist die Aktivität (A) als Bereich und in Klammern als MW ± SD angegeben.

T_{max} [°C]	Lösemittel V_{ges}: 1 mL	$CuSO_4$ [µmol]	Na-Asc. [µmol]	A (6) [MBq]	RCA [%]	n	Bemerkungen
100	PBS:H_2O:DMSO (2:2:6)	60	600	15,3	33	1	P_{max}: 150W
	PBS:H_2O:DMSO (8:1:1)	20	200	14,1	94	1	
	PBS:H_2O:DMSO (3:1:6)			13,7 - 123,9 (68,8 ± 55,1)	92 ± 4	2	
				93,9	71	1	P_{max}: 150W; 0,5 mg b
		10	100	79,3	76	1	P_{max}: 150W
	PBS:DMSO (4:6)	20	100	70,2	95	1	
				66,8 - 143,6 (103,6 ± 36,8)	84 ± 11	4	P_{max}: 60W
				27,1 - 108,8 (63,1 ± 28,1)	58 ± 32	5	P_{max}: 50W
90	PBS:DMSO (4:6)	20	100	14,5 - 95,9 (56,7 ± 33,3)	65 ± 33	3	P_{max}: 50W
		40	200	71,7	96	1	P_{max}: 50W, 2 mg b
80	PBS:MeCN (4:6)	20	100	43,7	39	1	P_{max}: 50W
				43,8	24*	1	
		40	200	87,1	27	1	
70	PBS:MeCN (4:6)	20	50	79,1	14	1	P_{max}: 50W

Auch bei den mikrowellengestützten Reaktionen wurden Lösemittelzusammensetzung, Stoffmengen und Verhältnisse von $CuSO_4$ und Na-Ascorbat sowie die Einwaage des Polymers Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-C≡CH (**b**) variiert. Dabei wurde auf Basis der Vorerfahrungen durch die konventionelle Markierung vorgegangen. Bei der Entnahme der Reaktionsgefäße nach der Mikrowellenbehandlung wurde festgestellt, dass bei hoher Leistung, trotz Rühren, anscheinend Siedeverzüge in der Reaktionslösung stattfanden. Das war an abgeschiedenen Rückständen auf der Glasoberfläche oberhalb des Meniskus der Reaktionslösung zu erkennen. Daraufhin wurde die maximal eingestrahlte Leistung der Mikrowelle reduziert.

Um die Möglichkeit der Defluorierung des Click-Synthons ^{18}F-TEG-N_3 durch Mikrowellenstrahlung auszuschließen, wurde ohne Zusatz von Polymer **b**, aber mit allen

anderen Reaktionspartnern, eine Blindprobe durchgeführt (nicht gezeigt in Tabelle 8). Dabei konnte keine Defluorierung beobachtet werden.

Aufgrund der stark schwankenden radiochemischen Ausbeuten, bei wenig Zeitersparnis gegenüber der schnell ablaufenden konventionellen Reaktionsführung, wurde auf den Einsatz der Mikrowelle zur Radiomarkierung verzichtet.

4.2.3.2 Bestimmung der radiochemischen Ausbeute

Die Bestimmung der radiochemischen Ausbeute mittels Dünnschichtchromatographie wurde analog zu Kapitel 3.4.3 durchgeführt. Die Ergebnisse und Diskussionen in Kapitel 4.2.2.2 gelten auch hier.

Zusätzlich zur Analytik mittels Radio-DC konnte für **^{18}F-b** eine HPLC-Analytik etabliert werden. Mit klassischen HPLC-Säulen (C18) sowie SEC-Säulen konnte keine geeignete Methode gefunden werden. Erfolgreich war die Nutzung zweier monolithischer Säulen (Onyx Monolithic C18, 4,6 x 100, 100 Å, Phenomenex) in Reihe, mit H_2O:MeCN (75:25) als mobile Phase und 2 mL/min Durchfluss. Die Wellenlänge des UV-Detektors wurde auf 205 nm eingestellt, da in den Molekülen keine chromophoren Gruppen vorhanden sind. Mittels des Radiodetektors konnte das ^{18}F-TEG-N_3 mit t_R: 3,85 min (vgl. Abbildung 26) und das Produkt **^{18}F-b** mit t_R: 2,12 min (vgl. Abbildung 27, S. 69) detektiert werden.

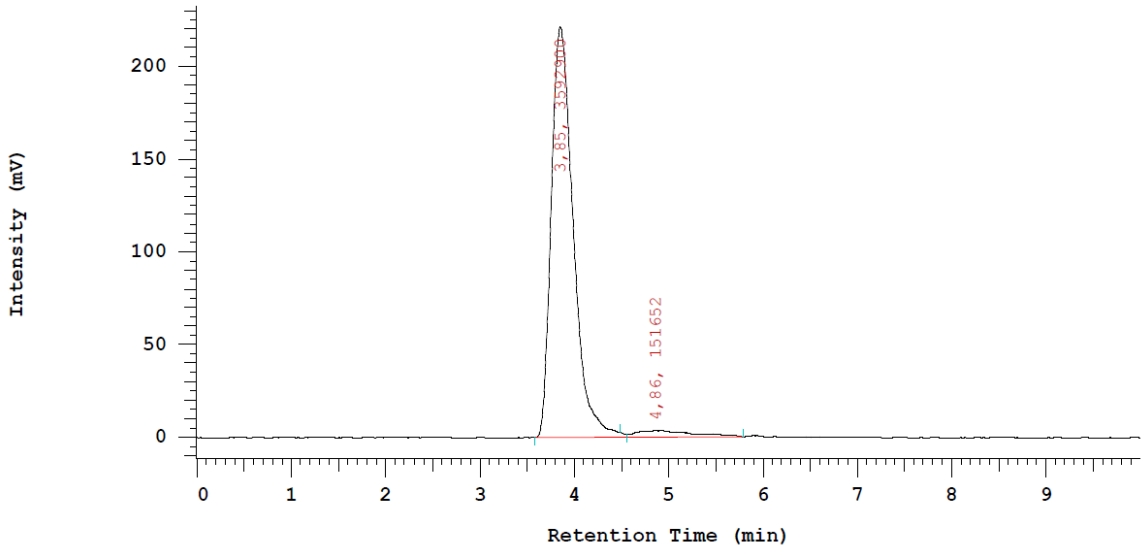


Abbildung 26: Radio-HPLC Diagramm des Click-Synthons ^{18}F-TEG-N_3 (**6**), 2x Onyx Monolithic C18, 2 mL/min H_2O:MeCN (75:25), t_R (**6**): 3,85 min.

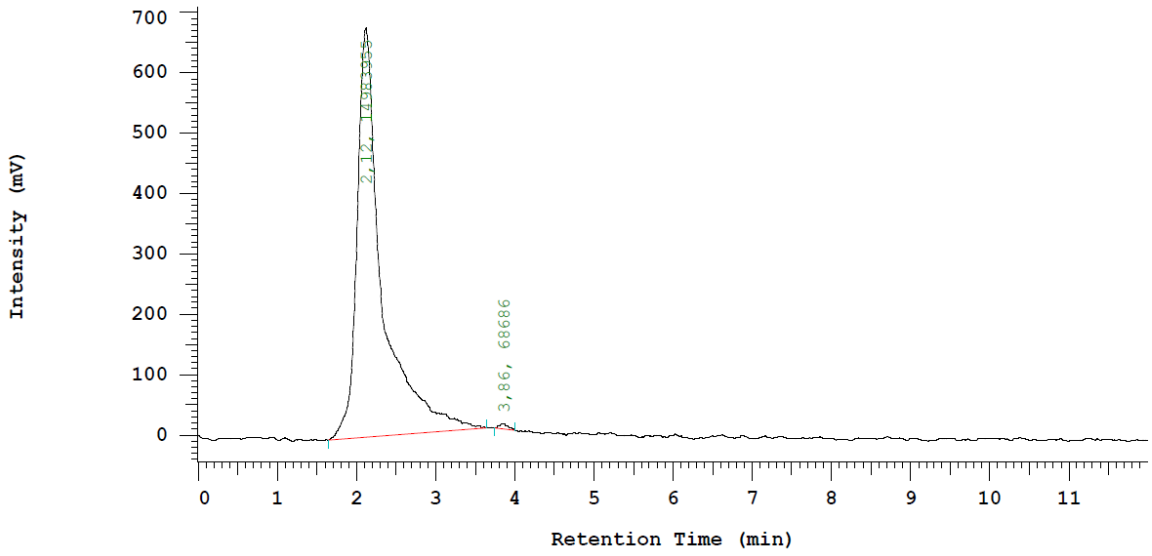


Abbildung 27: Radio-HPLC Diagramm des Click-Produkts Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**), 2x Onyx Monolithic C18, 2 mL/min H_2O:MeCN (75:25), t_R (**^{18}F-b**): 2,12 min, RCA > 98 %.

In Abbildung 27 liegt die radiochemische Ausbeute der Reaktion nach 15 min Reaktionszeit bei > 98 %. Minimale Reste des ^{18}F-TEG-N_3 sind bei t_R: 3,86 min noch zu erkennen. Im Vergleich dazu, lieferte die Radio-DC des gleichen Versuchs eine RCA von 93 %. Es war nur durch die Nutzung dieser isokratischen Laufmittelbedingungen und der Verwendung zweier Onyx-Säulen in Reihe möglich eine Trennung der beiden Komponenten zu erreichen. Bei anderen Bedingungen überlagerten sich die beiden Edukte. Aufgrund dieser Laufmittelbedingungen ließ sich eine kleine Schulter des Click-Synthons bei t_R: 4,86 min (vgl. Abbildung 26, S. 68) nicht vermeiden.

4.2.3.3 Kupferabtrennung und Trocknung

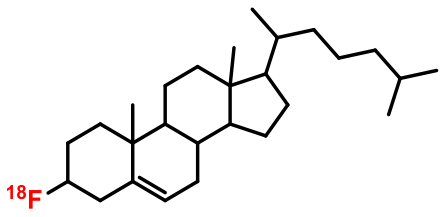
Die Kupferabtrennung und Trocknung wurde analog zu Kapitel 3.4.3 durchgeführt. Die Ergebnisse und Diskussionen aus Kapitel 4.2.2.3 gelten auch hier.

4.2.3.4 Abtrennung des Click-Synthons ^{18}F-TEG-N_3

Um bei unzureichenden radiochemischen Ausbeuten (< 95%) das Produkt **^{18}F-b** zu isolieren, wurde ein kartuschengestütztes Aufreinigungsverfahren entwickelt. Hierfür wurde eine Sep-Pak Silica Plus Long Kartusche (Waters) verwendet. Durch Verwendung dieser Kartusche war es möglich, die Reaktionslösung direkt aufzutragen, ohne dass ein Durchbruch zu beobachten war. Durch das Spülen der Kartusche mit 2 mL einer 1:1-

Mischung aus EA:*n*Hex (v/v) konnte das Markierungssynthon **6** eluiert werden. Nach dem Trocknen mit 20 mL Luft wurde das Produkt **^{18}F-b** mittels 5 mL MeOH elutiert.
Andere getestete Kartuschen, wie die Sep-Pak Silica light (Waters) waren ungeeignet, da die Menge an Säulenmaterial zu klein war. Mit Alumina- und C18-Kartuschen konnte keine Auftrennung erreicht werden. Bei der Verwendung von Lichrolut EN Kartuschen, die zur Fixierung des Click-Synthons **6** bei der Synthese verwendet wurden (vgl. Kapitel 3.4.1.1), konnte das Produkt **^{18}F-b** nicht in ausreichenden Mengen zurückgewonnen werden. Mit der hier entwickelten Methode ist es also möglich, auch bei niedrigeren Ausbeuten (< 95%), die radiochemische Reinheit von **^{18}F-b** auf ein gewünschtes Maß zu erhöhen.

4.2.4 3-[^{18}F]Fluorocholest-5-en (9)



9

Die Synthese des 3-[^{18}F]Fluorocholest-5-en (**9**) wurde nach Kapitel 3.4.4 durchgeführt. Dazu wurde der mesylierte Cholesterolvorläufer **1** in Acetonitril mit [^{18}F]Fluorid direkt markiert. Die radiochemische Ausbeute wurde mittels RP-DC bestimmt (vgl. Abbildung 28).

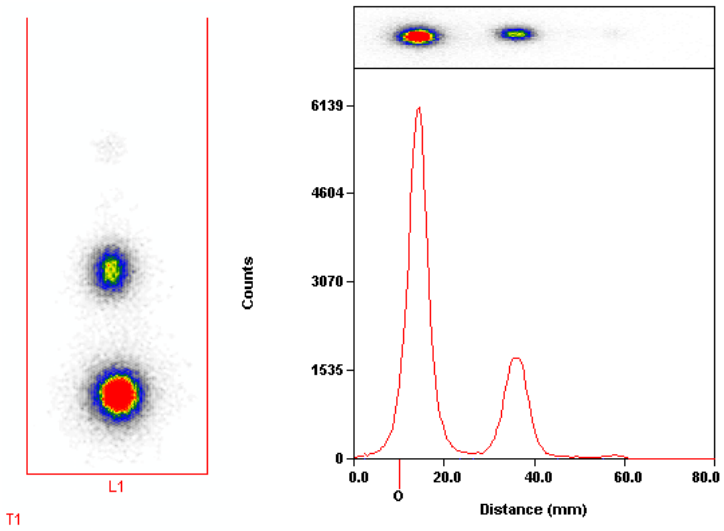


Abbildung 28: Radio-RP-DC: Aufsicht (Links): Reaktionsgemisch aus [^{18}F]Fluorid R_f: 0 und 3-[^{18}F]Fluorocholest-5-en (**9**) R_f: 0,4. RCA 25 %, Aktivitätsprofil des Reaktionsgemischs (Rechts), mobile Phase *i*PrOH:MeCN (4:1).

Die Abtrennung des [^{18}F]Fluorocholestens (**9**) zur weiteren Verarbeitung in Folgeversuchen wurde mittels semipräparativer HPLC, wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben, durchgeführt. Aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit von **9** in Wasser konnte die Reaktionslösung nicht mit Wasser gequencht werden und auf konventionelle Weise per HPLC oder Kartusche aufgereinigt werden. Schon die Zugabe von kleinen Mengen Wasser führte zu Trübung und Niederschlägen. Durch Quenchen der Reaktionslösung mit *i*PrOH konnte die Bildung von Niederschlägen verhindert werden. Wie bei Duncan *et al.*[99] zur Trennung von Gesamtcholesterol per HPLC beschrieben, wurde eine mobile Phase aus *i*PrOH und MeCN eingesetzt. Um die Peakschärfe und Retentionszeit zu optimieren, wurde allerdings ein Verhältnis *i*PrOH:MeCN 4:1 (v/v) verwendet. Die HPLC wurde mit 100 % iPrOH:MeCN (4:1) gestartet. Nachdem das [^{18}F]Fluorocholesten von der Säule gespült war, wurde mittels eines Gradienten der Wasseranteil auf 95 % erhöht, um das nicht umgesetzte [^{18}F]Fluorid zu eluieren. In Abbildung 29 ist ein Radio-HPLC-Chromatogramm dieser Abtrennung gezeigt. Allerdings wurde die Aufnahme zu früh beendet, wodurch der Fluoridpeak (t_R: 18,7 min) nicht vollständig zu sehen ist.

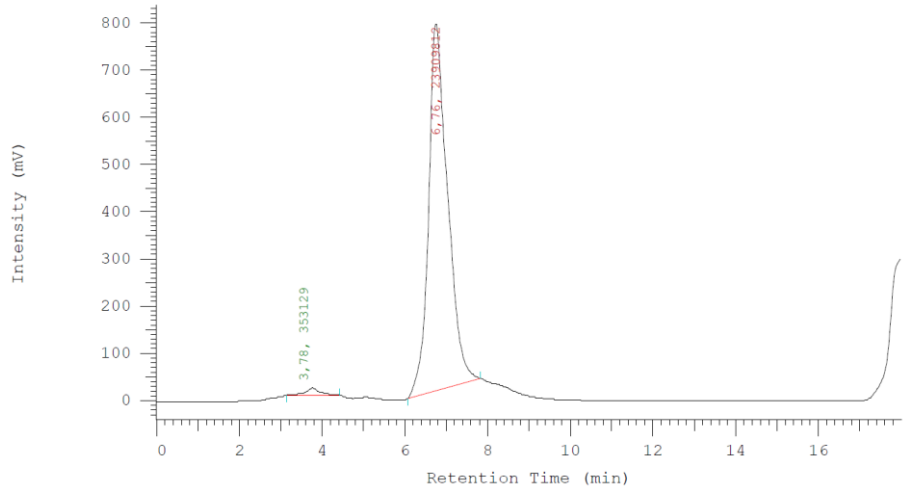


Abbildung 29: Radio-HPLC zur Abtrennung von [^{18}F]Fluorocholesten t_R: 6,7 min von [^{18}F]Fluorid t_R: 18,7 min (abgeschnitten).

Abbildung 30 zeigt eine Radio-HPLC mit schlechten radiochemischen Ausbeuten (~ 5 %), hier wurde aber über die komplette Laufzeit von 28 min aufgezeichnet und das [^{18}F]Fluorid ist als dominanter Peak bei t_R: 18,7 min zu erkennen.

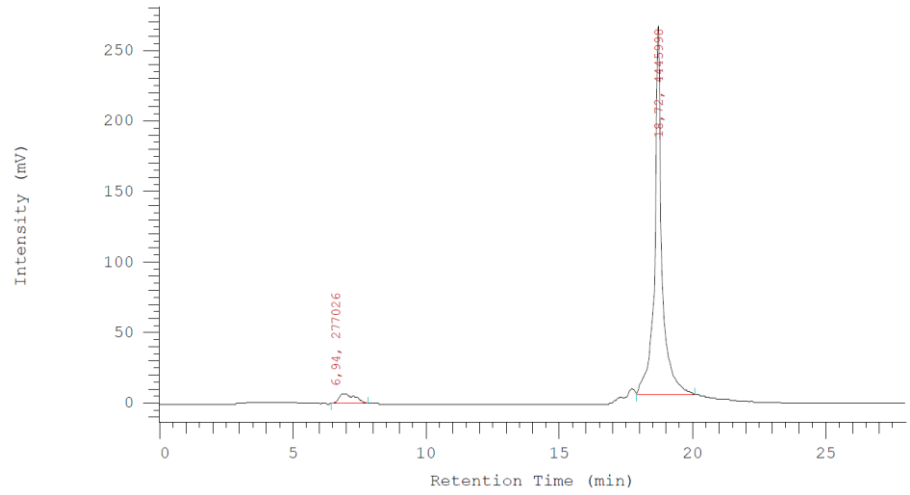


Abbildung 30: Radio-HPLC mit schlechten Ausbeuten von [^{18}F]Fluorocholesten t_R: 6,9 min, [^{18}F]Fluorid t_R: 18,7 min.

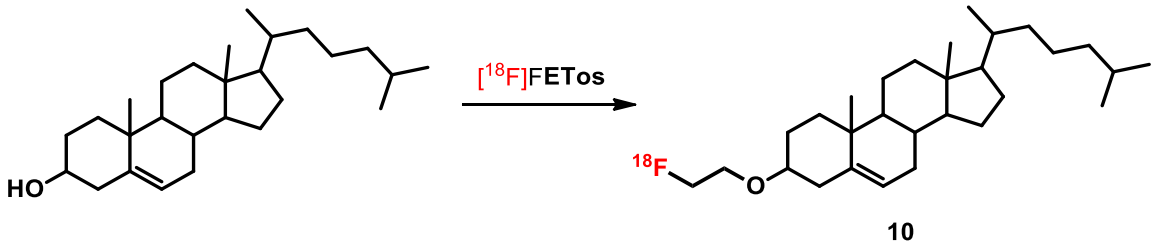
Nach der Abtrennung des [^{18}F]Fluorocholestens wurde das 2-Propanol-Acetonitril-Lösemittelgemisch am Miniatur-Rotationsverdampfer entfernt. Um **9** für Tierversuche in eine injizierbare Form zu überführen, wurden dem PBS-Puffer einige Tropfen Lösungsvermittler ((2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin) zugegeben und die Lösung einer kurzen Ultraschallbehandlung unterzogen. Es handelt sich bei Cyclodextrinen um zyklische α-1-4-verknüpfte Glukoseoligomere mit unterschiedlicher Kettenlänge (α: 6, β: 7, γ: 8) und daraus resultierend unterschiedlichen Hohlraumgrößen zur Aufnahme von

unpolaren organischen Molekülen. Das β-Cyclodextrin besteht demnach aus 7 Glukoseeinheiten, wobei das 2-Hydroxypropylderivat erhöhte Wasserlöslichkeit zeigt und sich für die Aufnahme von Cholesterol sehr gut eignet.[100,101]

Zur Liposomenpräparation wurde **9** nicht mit Lösungsvermittler versetzt, sondern nach dem Entfernen des Lösemittels wurde eine ethanolische Lösung des Lipids DOPC und Cholesterols in den Kolben gegeben und erneut das Lösemittel entfernt, um einen dünnen Film zu bilden. Da **9** anschließend nach Zugabe des PBS-Puffers unter Ultraschallbehandlung und Extrusion in die Liposomendoppelmembran eingelagert werden sollte, wäre es kontraproduktiv gewesen, einen Lösungsvermittler einzubringen.

Als alternativer Markierungsvorläufer wurde unter den gleichen Bedingungen, aber aus Gründen der Löslichkeit in DMF, das kommerziell erhältliche Cholesterylchlorid (3β-Chlorocholest-5-en) getestet. Die radiochemischen Ausbeuten lagen jedoch deutlich unter denen des mesylierten Vorläufers **1**, so dass dieser Markierungsweg gewählt wurde.

4.2.5 3-[^{18}F]Fluorethylcholest-5-en (10)



10

Die Synthese des 3-[^{18}F]Fluorethylcholest-5-en (**10**) sollte wie oben dargestellt über die Reaktion der prosthetischen Gruppe 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat (**8**) mit Cholesterol erreicht werden. [^{18}F]FETos wurde dazu nach Kapitel 3.4.1.2 hergestellt. Es wurden unterschiedliche Stoffmengen des Cholesterols in verschiedenen Lösemitteln, Basen und Temperaturen untersucht (n = 46).

Als Lösemittel wurden DMF, Dioxan, THF und Dioxan-THF-Mischungen getestet. Die eingesetzten Basen (in Äquivalenten zum Cholesterol zwischen 0,3 und 6) waren NaOH, LDA und NaH. Es wurden Temperaturen zwischen 70 und 140 °C und Aktivitäten des [^{18}F]FETos von 1,37 bis 245,0 MBq mit Reaktionszeiten bis 15 min verwendet. Zur Deprotonierung der Hydroxylfunktion des Cholesterols wurde dieses mit der jeweiligen Base vorinkubiert.

Trotz dieser großen Varianz an Reaktionsparametern konnte kein [^{18}F]Fluorethylcholesten (**10**) nachgewiesen werden. Ein Grund dafür könnte die sterisch anspruchsvolle Abgangsgruppe des Markierungssynthons [^{18}F]FETos, das Tosylat, in Kombination mit der vorliegenden Konformation des Cholesterols sein (vgl. Abbildung 31). Unter den basischen Bedingungen war die Hydrolyse des Synthons zu 2-[^{18}F]Fluorethanol kinetisch günstiger.

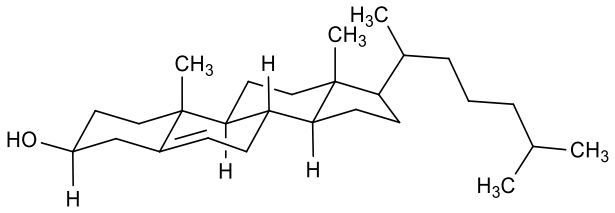
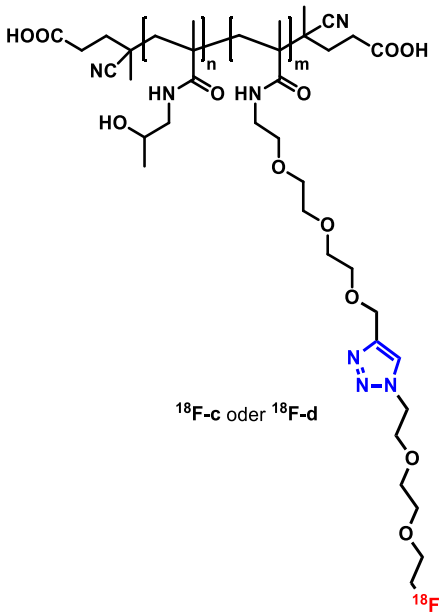


Abbildung 31: Konformation des Cholesterols (3β-Hydroxycholest-5-en).

Da kein Produkt hergestellt werden konnte, wurde von dieser Markierungsvariante Abstand genommen und die Direktmarkierung des mesylierten Cholesterolvorläufers **1** nach Kapitel 3.4.4 etabliert (Ergebnisse und Diskussion in Kapitel 4.2.4).

4.2.6 Kupferkatalysierte HPMA-Click-Markierung



Die kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition des kleinen (**c**) sowie des großen (**d**) alkinfunktionalisierten HPMA-Homopolymers mit ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) zu **^{18}F-c** bzw. **^{18}F-d** wurde nach optimierten Reaktionsbedingungen (vgl. Kapitel 3.4.5) durchgeführt. Eine Zusammenfassung der untersuchten Markierungsreaktionen ist in Tabelle 9 zu finden.

Tabelle 9: Überblick konventioneller CuAAC-Reaktionen von ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) und alkinfunktionalisierten HPMA Polymeren **c** (M_w: 12000) und **d** (M_w: 60000) zu **^{18}F-c** und **^{18}F-d**, Einwaage (c oder d): 1 mg, n($CuSO_4$): 20 µmol, n(Na-Ascorbat): 100 µmol, Reaktionszeit t: 20 min, radiochemische Ausbeute (RCA) mit DC bestimmt.

Polymer	**T [°C]**	**Lösemittel V_{ges}: 1 mL**	**A (6) [MBq]**	**RCA [%]**
^{18}F-c (M_w: 12000)	50	PBS	283,0	54
	70	PBS	164,6	75
		PBS:DMSO (9:1)	130,3	96
^{18}F-d (M_w: 60000)	50	PBS	277,4	72
		PBS:DMSO (9:1)	59,5	93
	70	PBS	168,7	95
		PBS:DMSO (9:1)	136,6	94

Beide Polymere, **^{18}F-c** und **^{18}F-d**, wurden bei zwei verschiedenen Temperaturen (50 und 70 °C) auf ihre Reaktionskinetik hin untersucht. In Tabelle 9 sind nur die Ausbeuten nach 20 min Reaktionszeit aufgetragen. Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass beide Polymere in PBS-Puffer gut zu markieren sind. Durch Zusatz von 100 µL DMSO konnten die Reaktionsausbeuten weiter gesteigert werden, bis hin zu nahezu quantitativen Markierungsresultaten. Zur Vereinheitlichung der Reaktionsparameter wurden 70 °C als optimale Reaktionstemperatur angenommen, obwohl für das große Polymer **d** auch 50 °C ausreichend wären. Zu beobachten ist, dass die Markierung des kleineren Polymers **c** im Vergleich zum größeren Polymer **d** mit schlechteren Ausbeuten bei gleichen Bedingungen verläuft. Bei 70 °C in PBS-Puffer konnte das Polymer **c** innerhalb von 20 min zu 75 %, das Polymer **d** zu 95 % markiert werden.

Die radiochemischen Ausbeuten (RCA) wurden mittels Radio-DC bestimmt. Es wurde das gleiche System wie bei den cholesterolbasierten Polymeren verwendet. Die mobile Phase war EA:*n*Hex (1:1), wobei das Produkt **^{18}F-c** oder **^{18}F-b** (R_f: 0) auf der Startlinie verblieb und das Click-Synthon **6** einen R_f von 0,8 aufwies.

Die Abtrennung wurde mittels drei in Reihe geschalteter HiTrap Desalting Columns und isotoner Kochsalzlösung als Laufmittel, bei einer Flussrate von 1 mL/min, durchgeführt. Diese Säulen basieren auf der Größenausschlusschromatographie, daher erfährt das Polymer weniger Retention und wird vor der radiofluorierten, prosthetischen Gruppe **6** eluiert. Es wurden drei Kartuschen in Reihe geschaltet, um eine Basislinientrennung zu erreichen. Auch bei einer RCA > 95 % wurde das radiomarkierte Polymer mit dieser Technik abgetrennt, um das DMSO der Reaktionslösung zu entfernen und das

radiofluorierte pHPMA in einer injizierbaren Lösung vorliegen zu haben. Zu beachten ist die limitierte Druckbelastbarkeit dieser fertig gepackten Kartuschen. Ab einem Druck von ca. 15 bar ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Polypropylen-Ummantelung mechanischen Schaden erleidet und die Säulen dann aufgrund von Leckage nicht mehr zu gebrauchen sind. Der neben der Flussrate auch von der benutzten HPLC abhängige (systemische) Arbeitsdruck lag bei 7 bar. Um die Stabilität der einzelnen Kartuschen zu erhöhen, wurde ein mechanisches Stützgerüst aus Aluminiumplatten mit Bohrungen konstruiert (vgl. Abbildung 32), womit bis zu drei HiTrap-Kartuschen fixiert werden können. Diese Fixierung stützt den sensiblen Bereich zwischen roter Kappe und durchsichtiger Kartuschenhülle und verhindert so das Aufbrechen des Verbindungsteils bei erhöhtem Druck oder bei eventuell auftretenden Druckspitzen.

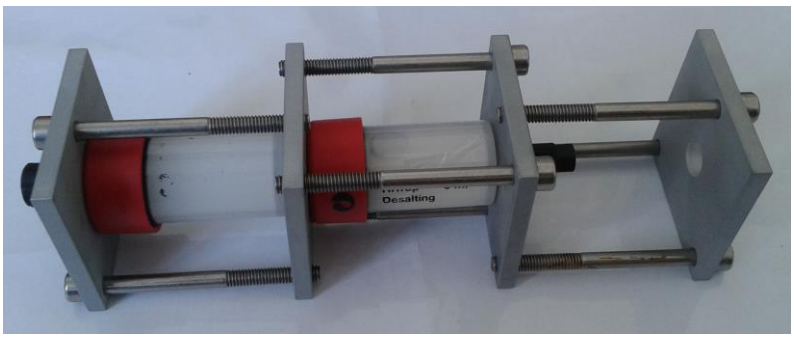


Abbildung 32: Stützgerüst für bis zu drei HiTrap-Kartuschen.

In Abbildung 33 ist ein repräsentatives HPLC-Diagramm einer Reaktion mit radiochemischer Ausbeute von ~ 35 % gezeigt. Das obere Diagramm stellt die UV-Absorption bei 254 nm dar, das untere die gemessene Aktivität. Die gesammelten Fraktionen zwischen 5 und 8 Minuten (je 1 mL) können direkt zu weiteren Versuchen eingesetzt werden.

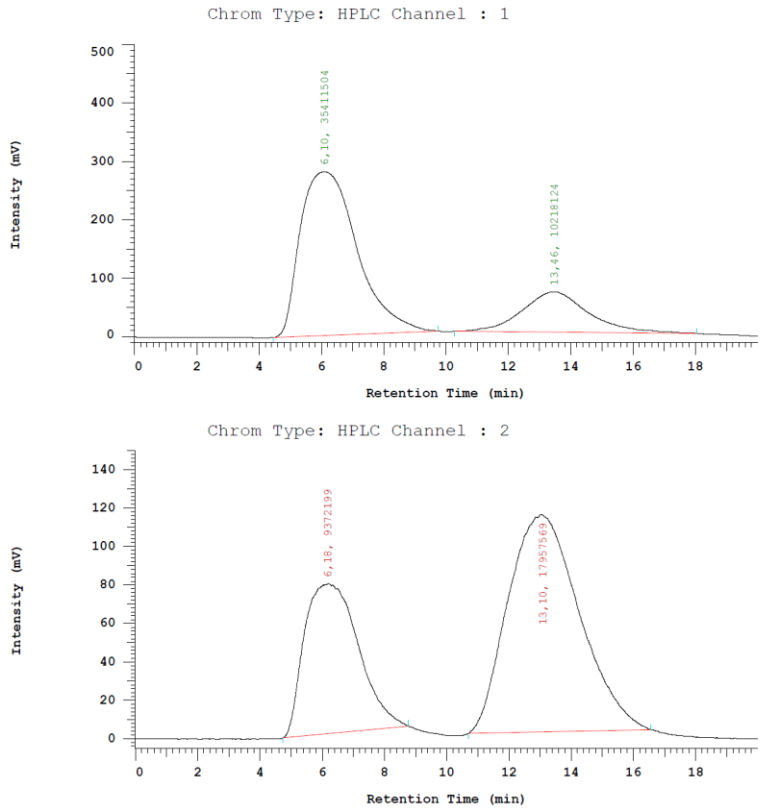
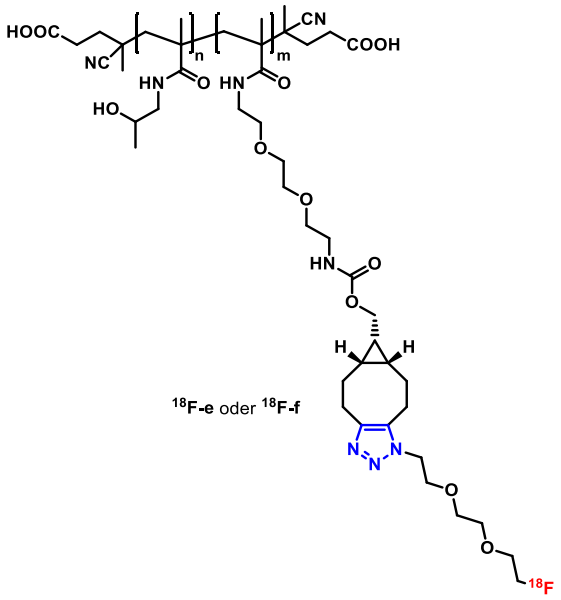


Abbildung 33: UV- (oben, 254 nm) und Radio- (unten) HPLC-Diagramme eines HPMA-Polymers mit RCA ~ 35 %, t_R(^{18}F-c/^{18}F-d): 6,1 min, t_R(^{18}F-TEG-N_3 (6)): 13,1 min.

4.2.7 Katalysatorfreie HPMA-Click-Markierung



Die ringspannungsgetriebene Alkin-Azid-Cycloaddition (SPAAC) zwischen dem kleinen (**e**) und großen (**f**) cyclooctinfunktionalisiertem Polymer mit ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) wurde mit

den optimierten Bedingungen (vgl. Kapitel 3.4.6) durchgeführt. Eine Zusammenfassung der durchgeführten Reaktionen zur Optimierung der Markierung ist in Tabelle 10 (konventionell) und Tabelle 11 (mikrowellengestützt) gezeigt.

Tabelle 10: Überblick konventioneller SPAAC-Reaktionen von ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) und COT-funktionalisierten HPMA Polymeren **e** (M_w: 12500) und **f** (M_w: 61000) zu **^{18}F-e** und **^{18}F-f**, Einwaage (**e** oder **f**): 1 mg, Reaktionszeit t: 20 min, radiochemische Ausbeute (RCA) mittels DC bestimmt.

Polymer	**T [°C]**	**Lösemittel V_{ges}: 1 mL**	**A (6) [MBq]**	**RCA [%]**
^{18}F-e (M_w: 12500)	40	PBS	103,5	2
	60		76,4	5
	80		73,7	10
	100		70,3	9
	120		54,6	22
	80	MeOH	20,2	3
		DMSO:MeOH (8:2)	32,9	0
	100	H_2O:MeOH (8:2)	27,6	1
^{18}F-f (M_w: 61000)	60	PBS:DMSO (9:1)	16,7	32
	70		92,0	46
	100		13,0	83
	120		12,0	83

Zur Radiomarkierung des kleinen COT-funktionalisierten Polymers **e** wurde unter konventioneller Erhitzung des Reaktionsgemischs in PBS-Puffer bei verschiedenen Temperaturen die Reaktionskinetik untersucht (vgl. Tabelle 10). Die radiochemischen Ausbeuten nach 20 min bei Temperaturen zwischen 40 und 100 °C lagen bei 2 - 10 %. Auch durch den Wechsel des Lösemittels zu Methanol oder DMSO:MeOH- bzw. DMSO:H_2O-Mischungen konnte die radiochemische Ausbeute (0 - 3 %) nicht verbessert werden. Mit 22 °% RCA wurde bei konventioneller Erhitzung der beste Wert bei 120 °C in PBS-Puffer erreicht.

Bessere Ergebnisse konnten für das große COT-funktionalisierte Polymer (**e**) erzielt werden. Während bei Temperaturen von 60 und 70 °C die radiochemischen Ausbeuten moderat waren (32 - 46 %), wurden bei 100 bzw. 120 °C gute Markierungsumsätze von 83 % in PBS:DMSO (9:1) erreicht.

Um eventuell bessere Markierungsergebnisse zu erlangen, wurden die Markierungsreaktionen in der Labormikrowelle untersucht (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11: Überblick mikrowellengestützter SPAAC-Reaktionen von ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) und COT-funktionalisierten HPMA Polymeren **e** (M_w: 12500) und **f** (M_w: 61000) zu **^{18}F-e** und **^{18}F-f**, Reaktionszeit: 1 min ramp + t_{hold}, p_{max}: 18 bar, radiochemische Ausbeute (RCA) mittels DC bestimmt.

Polymer	Einwaage [mg]	Lösemittel V_{ges}: 1 mL	T_{max} [°C]	P_{max} [W]	A (6) [MBq]	t_{hold} [min]	RCA [%]	Bemerkungen
^{18}F-e (M_w: 12500)	1	DMSO	140	300	6,3	5	28	Geruch
				150	12,5		11	
		PBS:MeOH (8:2)	100	150	16,0		24	
		PBS:MeOH (10:1)	120	100	11,3	10	39	1,1 mL
					9,5	15	42	
		PBS:DMSO (1:1)			60,9	5	10	NS + Geruch
		PBS:DMSO (1:9)		50	48,6	5	10	
		PBS:DMSO (9:1)			99,6	10	5	
	3				39,9		52	
^{18}F-f (M_w: 61000)	1	PBS:DMSO (9:1)	120	50	18,7	10	96	
	2				168,7		35	
	3				28,4		99	

Hierbei wurde wieder zuerst das kleine cyclooctinfunktionalisierte HPMA-Polymer **e** untersucht. Erste Markierungsstudien in DMSO zeigten, dass zu viel Energie in die Reaktionslösung eingestrahlt wurde. Nach Beendigung der Reaktionen war beim Öffnen des Reaktionsgefäßes ein unangenehmer Geruch, der von Zersetzungsprodukten des DMSO herrührte, bemerkbar. Unter Einfluss von Mikrowellenstrahlen kann das Dimethylsulfoxid in Methylsulfid, Dimethyldisulfid, Bismethylthiomethan, Wasser und Formaldehyd zersetzt werden.[102] Nach dem Herabsetzen der maximal eingestrahlten Leistung auf 50 Watt blieb dieses Phänomen aus. Geeignetere Lösemittel hinsichtlich der radiochemischen Ausbeute waren PBS:MeOH- oder PBS:DMSO-Mischungen. Durch die Erhöhung der Einwaage des Polymers **e** von 1 auf 3 mg konnten die besten radiochemischen Ausbeuten von 52 % in PBS:DMSO (9:1) bei einer Reaktionszeit von 10 min erreicht werden.

Für das große COT-funktionalisierte HPMA-Polymer **f** konnten bei 3 mg Einwaage unter den gleichen Bedingungen sogar im Rahmen der Messgenauigkeit quantitative Markierungsergebnisse von 99 % erreicht werden. In der Testreihe mit Einwaagen zwischen 1 - 3 mg zeigt die Reaktion mit 2 mg eine deutlich verringerte radiochemische Ausbeute von nur 35 %. Da diese Reaktionen nur einfach durchgeführt wurden, ist es

notwendig, durch Mehrfachbestimmungen eine statistisch relevantere Aussage treffen zu können.

Ebenso wie bei der kupferkatalysierten Click-Markierung zeigte sich auch bei der ringspannungsgetriebenen Cycloaddition, dass das kleinere HPMA-basierte Polymer **e**, im Vergleich zum größeren **f**, schlechtere Ausbeuten bei gleichen Bedingungen lieferte. Da die verschiedenen Funktionalisierungen ausgehend von den gleichen Vorläuferpolymeren getätigt wurden sowie der Einbaugrad bei jeweils 3 % lag, lässt sich nur über den Grund spekulieren. Bei gleicher Einwaage (3 mg) liegt aufgrund des geringeren Molekulargewichtes das kleine HPMA-Polymer **e** (M_w: 12500 g/mol, n = 240 nmol) von der Stoffmenge her ungefähr im fünffachen Überschuss gegenüber dem großen Derivat **f** (M_w: 61000 g/mol, n = 49,2 nmol) vor. Bezieht man die größere Kettenlänge (und damit mehr Wiederholungseinheiten) des großen Polymers mit in die Betrachtung ein, nivelliert sich der Überschuss aufgrund der Stoffmenge durch die erhöhte Anzahl an funktionellen Gruppen pro großem Polymer. Aufgrund dieser Betrachtung sollte die Markierungskinetik prinzipiell ähnlich schnell ablaufen. Die Voraussetzungen für solch eine Annahme sind gleiches Verhalten der Löslichkeit und der Präsentation der funktionellen Gruppen bzw. die Ausbildung von gleichen Überstrukturen im Lösemittel.

4.3 Liposomenpräparation

Die Präparation der Liposomen wurde nach Kapitel 3.5 durchgeführt. Dazu wurde das Phospholipid DOPC und Cholesterol in Ethanol gelöst und mit dem jeweiligen radiomarkierten Polymer Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a)** oder Ch-PEG_{30}-hbPG_{24}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) oder [^{18}F]Fluorocholesten (**9**) nach den molaren Verhältnissen aus Tabelle 4 (Kapitel 3.5) gemischt. Hierfür wurden Stammlösungen von DOPC in Ethanol und Cholesterol in Ethanol hergestellt und das entsprechende Volumen entnommen. Die Wahl des Phospholipids fiel auf DOPC (Dioleoylphosphatidylcholin), um keine Lipidmischung mit verschiedenen Kohlenwasserstoffkettenlängen, sondern ein definiertes Lipid ohne Nettoladung bei physiologischen Bedingungen zu verwenden.

Das Verhältnis von DOPC zu Cholesterol wurde durch die Cholesterolverankerung der beiden Polymere konstant bei 60:40 gehalten. Für die ersten Tierversuche wurde die Liposomenpräparation mit 5 mol% Polymer, 35 mol% Cholesterol und 60 mol% DOPC gestartet. Wie in Kapitel 4.4 diskutiert, wurde der Anteil des Polymers nach den ersten Ergebnissen auf 20 mol% erhöht, während der Anteil von Cholesterol auf 20 mol% reduziert wurde. Der Gesamtcholesterolgehalt wurde somit bei 40 mol% konstant gehalten. Die zugesetzten Mengen von Cholesterol und DOPC wurden auf Basis der eingewogenen Polymermenge zur Radiomarkierung berechnet. Im Falle des hyperverzweigten Polyglycerolderivats **^{18}F-b** wurde beim Verhältnis DOPC:Cholesterol:Polymer (60:20:20) nach der Radiomarkierung (1 mg **b** eingesetzt) noch 3 mg nicht-markiertes Polymer **b** zugegeben, um eine Gesamteinwaage von 4 mg zu erreichen.

Zusammen mit der radioaktiven Komponente (**^{18}F-a**, **^{18}F-b** oder **9**) wurde das Gemisch in einem 10 mL-Spitzkolben am Miniatur-Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Insbesondere bei Lösungen des linear-hyperverzweigten Polyether-basierten Lipids **b** musste bei dem Entfernen des Lösemittels auf starke Schaumbildung geachtet werden.

Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde 1 mL PBS-Puffer zugegeben und der verschlossene Kolben für 10 min bei 50 °C in ein im Dauerbetrieb laufendes Ultraschallbad gehängt. Das Ultraschallbad wurde mit einer Bleiabschirmung versehen, um die Dosisbelastung zu minimieren.

Nach Ablauf der zehn Minuten wurde die Suspension in einer 1 mL gasdichten Hamiltonspritze des Mini-Extruders (Avanti Polar Lipids) aufgenommen. In Abbildung 34 sieht man den prinzipiellen Aufbau des Mini-Extruders.

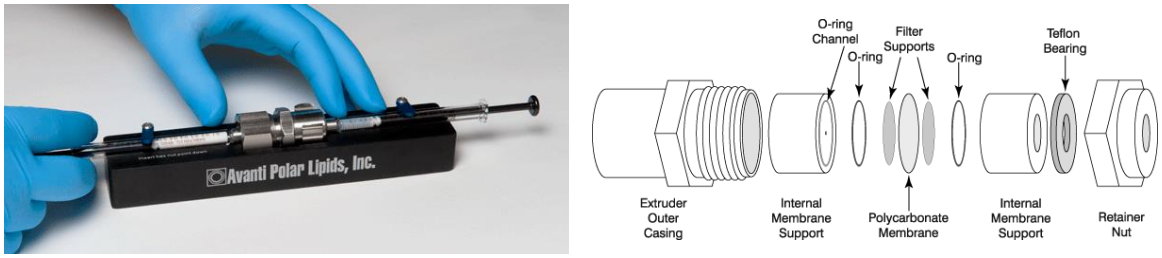


Abbildung 34: Mini-Extruder (links) mit Explosionszeichnung (rechts) des Aufbaus (Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Avanti Polar Lipids Inc.).[103]

Dieser besteht aus einem beheizbaren Metallblock, der gleichzeitig zur Fixierung der Spritzen und der Stahlverschraubung dient. Rechts und links dieser Stahlverschraubung, die Tefloneinsätze enthält, werden die gasdichten Spritzen eingesetzt. Die Membran, deren Porengröße im Endeffekt die Liposomengröße bestimmt, sitzt innerhalb der Tefloneinsätze, umgeben von zwei Unterstützungsfiltern. O-Ringe dichten die Filter und die Membran nach außen hin ab. Vor dem Einsetzen der Filter und Membranen sind diese mit dem benutzten Puffer zu befeuchten, um das Totvolumen bei der Extrusion möglichst klein zu halten. Beim Zusammenbau des Extruders ist darauf zu achten, dass die Membran keine Falten an den Grenzflächen zu den O-Ringen bildet und die Verschraubung handfest zugedreht wird. Die Edelstahlnuss muss mit einer flachen Seite nach unten in den Extruder gesetzt werden. Der Einsatz der Hamilton-Spritzen muss mit Vorsicht durchgeführt werden, da die Löcher, in die die Kanülen eingeführt werden müssen, sehr klein sind. Des Weiteren sollte darauf geachtet werden, dass beim Einsetzten und Entnehmen der Spritzen diese nicht gegen den Uhrzeigersinn gedreht werden (Blickrichtung von hinten auf die Spritze). Dabei kann sich die Verschraubung der Kanüle lösen und Flüssigkeit austreten. Um das zu verhindern, wurden die Spritzen beim Einsetzen und Entnehmen leicht im Uhrzeigersinn gedreht.

Um ein mögliches Verstopfen der 100 nm Membran zu vermeiden, wurde zuerst über eine 400 nm Membran extrudiert. Das wurde elf Mal durchgeführt, da mit jeder Extrusion der Suspension die Größenverteilung der Liposomen homogener wird. Es wurde immer eine ungerade Anzahl an Durchgängen gewählt, um die extrudierte Suspension in der

zweiten, unbenutzten Spritze aufzunehmen und somit eventuelle Verunreinigungen (größere Partikel oder Fremdmaterial) nicht mitzuführen. Da das Auseinanderbauen der Verschraubung und der Wechsel der Membran mit einem erhöhten Kontaminationsrisiko verbunden ist, wurden zwei Extruder verwendet. Der erste wurde mit der 400 nm Membran, der zweite mit der 100 nm Membran bestückt. Nach elfmaliger Extrusion über die 400 nm Membran wurde die Hamiltonspritze mit der Liposomenlösung entnommen und in den zweiten Extruder (100 nm Membran) eingesetzt. Nach Beendigung der Extrusion wurde der Inhalt der gasdichten Spritze auf die selbstgepackte Größenausschlusssäule (Sephadex G-75) aufgetragen, um niedermolekulare Verunreinigungen abzutrennen. Im Anschluss wurden Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 0,5 mL gesammelt. Ober- und unterhalb des Säulenmaterials wurde eine Fritte angebracht, was die Definition des Fraktionsvolumens erheblich vereinfachte. Durch wiederholte Auftragung von 0,5 mL PBS-Puffer wurden auch nur Fraktionen von 0,5 mL Volumen gesammelt, weil der Durchfluss der Säule stoppte, sobald der Meniskus der Flüssigkeit die obere Fritte erreicht hatte. Die einzelnen Fraktionen wurden im Aktivimeter vermessen und Fraktion 3 oder 4 wurde zu Tierversuchszwecken verwendet. Welche Parameter bei der Applikation beachtet werden müssen, wird in Kapitel 4.4 diskutiert.

Einen Tag nach den durchgeführten Versuchen war die Aktivität der für die Tierversuche verwendeten Fraktionen abgeklungen und es wurden dynamische Lichtstreuexperimente durchgeführt, um die Größe der Liposomen zu bestimmen. Dies wurde dankenswerterweise von Frau Dipl.-Chem. Sabine Gietzen (AK Prof. Dr. Schmidt, Institut für Physikalische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt. Die Ergebnisse der Lichtstreuversuche sind bei den zugehörigen Tierversuchen in Kapitel 4.4 angegeben und diskutiert.

4.4 Tierversuche

Die *in vivo*-PET- und *ex vivo*-Biodistributionsstudien an black six-Mäusen wurden nach Kapitel 3.6 durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Polymere Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**) und Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) sowie das [^{18}F]Fluorocholesten (**9**) untersucht. Zusätzlich wurden diese drei radiomarkierten Verbindungen auch in die Doppelmembranen von Liposomen integriert (vgl. Liposomenpräparation Kapitel 3.5). Die liposomalen Strukturen wurden ebenfalls via PET und Biodistribution analysiert. Die einzelnen Ergebnisse sowie der Vergleich untereinander sind in den folgenden Unterkapiteln gezeigt.

Ein limitierender Faktor bei Tierversuchen mit Mäusen ist das maximale Injektionsvolumen. Mäuse mit einem Körpergewicht zwischen 20 und 30 g haben ein durchschnittliches Blutvolumen von 1,8 - 2,4 mL.[104] Gerade in Hinsicht auf makromolekulare Systeme, die mittels Größenausschlusschromatographie aufgereinigt wurden, kann es sich als schwierig erweisen, die nötige Volumenaktivität zu erreichen. Laut Workman *et al*. liegt das maximale intravenöse Bolusinjektionsvolumen von Mäusen bei 10 mL/kg Körpergewicht.[96] Das entspricht bei oben angenommenem Gewicht einem Volumen von 200 - 300 µL. Nach dem Setzen des Venenkatheters wurde dieser mit ca. 50 µL Heparinlösung gespült, damit er nicht durch die Blutgerinnung verschlossen wurde. Ebenso wurde der Venenzugang nach Applikation des Radiotracers mit weiteren 50 -100 µL isotoner Kochsalzlösung gespült. Nach Abzug dieses zusätzlich injizierten Volumens (~100 - 150 µL) verbleiben für die Verabreichung des Radiotracers je nach Gewicht der Maus etwa 100 - 150 µL. In diesem Volumen muss ausreichend Aktivität für die PET-Messung oder die Detektion nach der Biodistribution vorhanden sein. Je nach Beschaffenheit des Radiotracers verbleibt eine gewisse Restaktivität in der zur Injektion verwendeten Spritze. Neben diesen Faktoren muss zusätzlich der Zeit- und damit Aktivitätsverlust durch den Transport einkalkuliert werden.

Natürlich ist die benötigte Menge der Aktivität neben der Messdauer auch von der Halbwertszeit des Radionuklids abhängig. Bei PET-Messungen ist ebenso der prozentuale Anteil an β^+-Umwandlungen des Nuklids relevant, da nur die aus der Annihilation entstandenen γ-Quanten detektiert werden. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen im Zeitraum von einer Stunde durchgeführt. Da Fluor-18 eine Halbwertszeit von 109,7 min (β^+: 97 %)[105] hat, sind nach 60 min ca. 32 % der Startaktivität zerfallen.

4.4.1 µPET-Bildgebung

Zur Untersuchung der initialen Kinetik der verschiedenen Verbindungen *in vivo* wurden über 60 min dynamische PET-Aufnahmen, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, durchgeführt. Zur Darstellung wurde die coronale Maximumintensitätsprojektion (MIP) eines frühen (0 - 3 min) und eines späten (50 - 60 min) Zeitpunkts gewählt. Dazu wurden die betroffenen Frames aufsummiert.

In Abbildung 35 sind diese MIPs der drei Verbindungen Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**), Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) und [^{18}F]Fluorocholesten (**9**) für frühe (obere Zeile) und späte Zeitpunkte (untere Zeile) dargestellt.

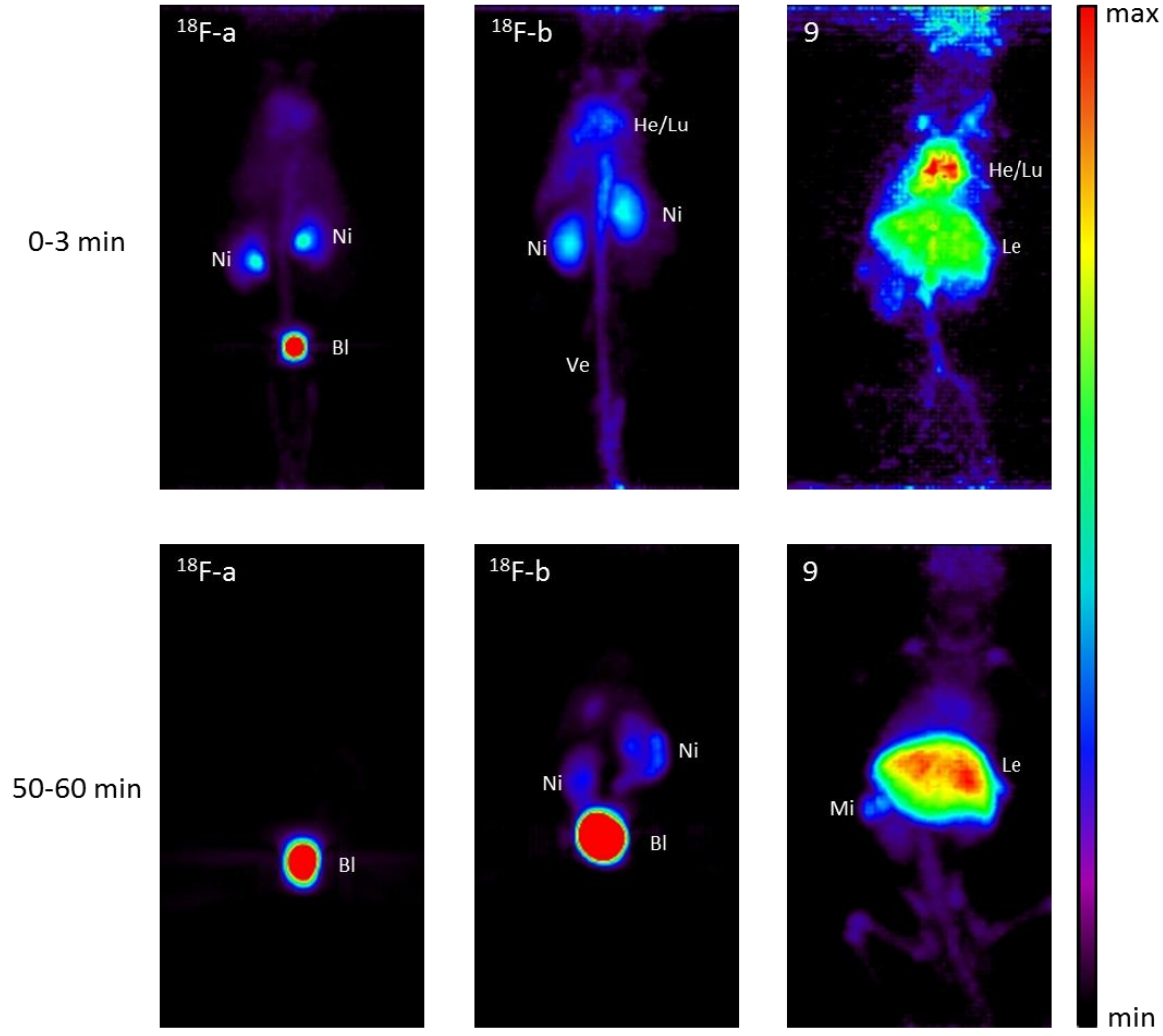


Abbildung 35: Coronale MIPs der Ganzkörperverteilung für frühe (0-3 min) und späte (50-60 min) Zeitpunkte von Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**), Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) und [^{18}F]Fluorocholesten (**9**) in C57bl6J-Mäusen; Ni: Niere, Bl: Blase, He: Herz, Lu:Lunge, Ve: Vene, Le: Leber, Mi: Milz.

In der linken Spalte ist deutlich zu erkennen, dass das lineare Polymer **^{18}F-a** bereits im frühen Zeitfenster fast nur noch in den Nieren und der Blase aufzufinden ist. Bereits nach einer Stunde ist es komplett renal ausgeschieden, die Aktivität ist nur noch in der Blase zu finden. In der mittleren Spalte ist der linear-hyperverzweigte Polyether **^{18}F-b** gezeigt, welcher anfänglich neben den Nieren noch in der Vene und den gut durchbluteten Organen Herz und Lunge zu detektieren ist. Im späten Zeitrahmen zeigt sich auch hier die fast vollständige renale Ausscheidung. Beide mizellar vorliegenden Polymere **^{18}F-a** und **^{18}F-b** werden aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit und geringen Größe bereits nach kurzer Zeit über die Niere ausgeschieden, wobei das hyperverzweigte Polymer eine langsamere Kinetik aufweist. Es kann festgestellt werden, dass sowohl das lineare als auch das linear-hyperverzweigte Polymer nicht vom Mononukleären Phagozytensystem (MPS) aufgenommen werden. Es wäre ansonsten eine Anreicherung in der Leber und Milz zu beobachten.
Eine gänzlich andere Körperverteilung kann bei dem fluorierten Cholesterolderivat **9** (dargestellt in der rechten Spalte) beobachtet werden. Im frühen Zeitfenster ist neben dem Herz und der Lunge bereits eine beträchtliche Aufnahme in der Leber zu beobachten. Knapp eine Stunde nach Injektion dominiert die hepatische Anreicherung. Die Akkumulation in der Leber war aufgrund der Hydrophobizität von **9** und der Bildung von Gallensäuren als Endprodukte des Cholesterolstoffwechsels erwartet worden. Zusätzlich ist Aktivität in der Milz nachzuweisen und es kann eine leichte Defluorierung anhand des Knochenuptakes von [^{18}F]F$^-$ beobachtet werden.

Im Vergleich zu diesen Beobachtungen ist in Abbildung 36 die liposomale Formulierung der oben gezeigten Verbindungen zu den gleichen Zeitpunkten dargestellt. Abgekürzt sind die Verbindungen als **^{18}F-a Lipo**, **^{18}F-b Lipo** und **9 Lipo**, entsprechend dem in die Doppelmembran eingelagerten Molekül. Die molaren Verhältnisse vor der Liposomenpräparation lagen bei DOPC:Cholesterol:Polymer (60:20:20) für das lineare Polymer **^{18}F-a** und das linear-hyperverzweigte Polyglycerol **^{18}F-b**. Für das radiofluorierte Cholesten **9** lag das Verhältnis bei DOPC:Cholesterol (60:40) unter Zusatz von **9** (vgl. Kapitel 3.5, Tabelle 4).
Die Bioverteilung der liposomalen Formulierungen divergiert im Vergleich hierzu stark. Die Liposomen mit der linearen Stabilisierung (**^{18}F-a Lipo**) zeigen zu Beginn der Untersuchung (0-3 min), ebenso wie die linear-hyperverzweigt abgeschirmten liposomalen Systeme (**^{18}F-b Lipo**), eine Anreicherung in den Venen und gut

durchbluteten Organen, wie dem Herz und der Lunge. Auch die klassischen Liposomen ohne stabilisierende Polymere (**9 Lipo**) zeigen initial eine ähnliche Aktivitätsverteilung.

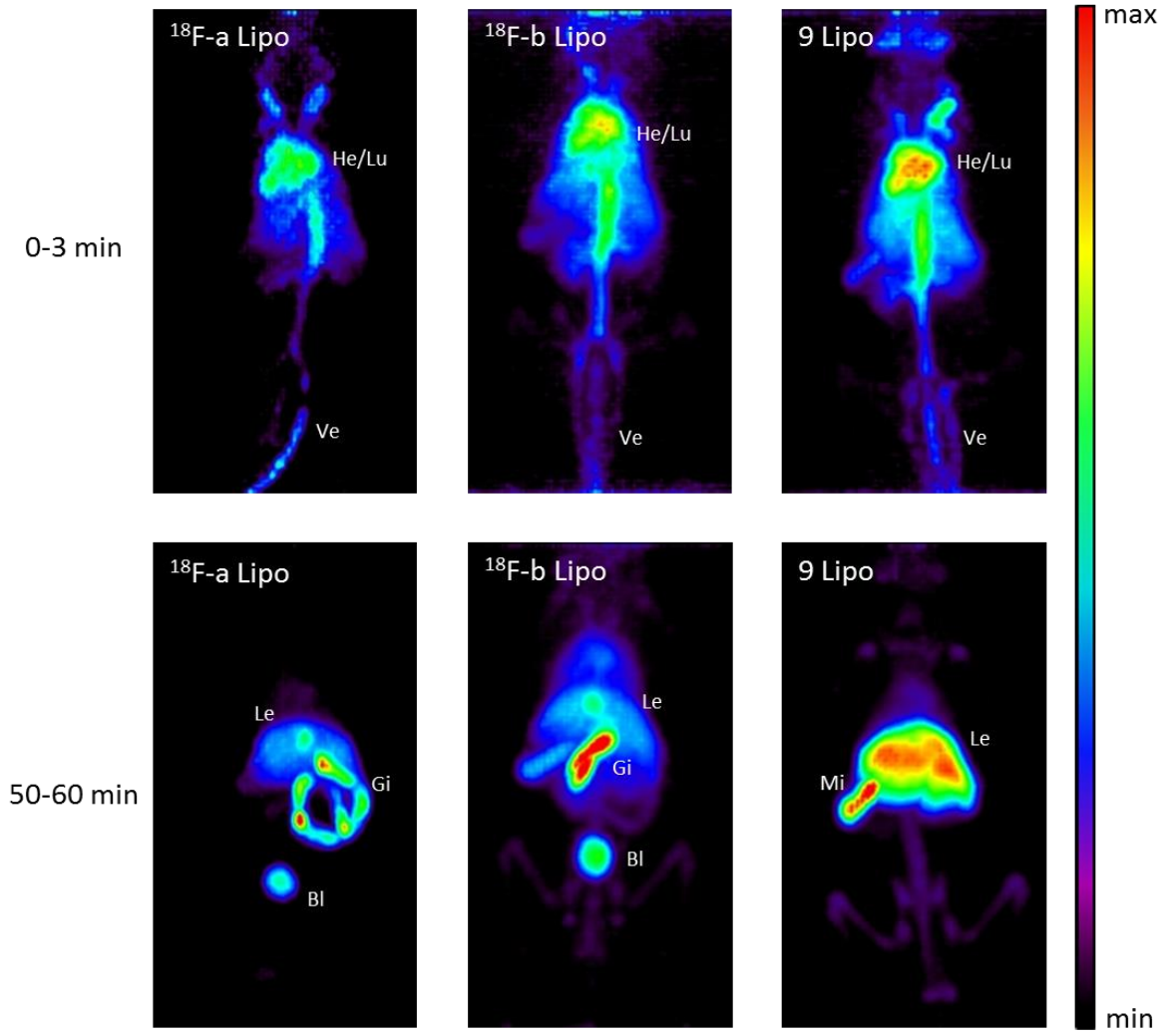


Abbildung 36: Coronale MIPs der Ganzkörperverteilung für frühe (0-3 min) und späte (50-60 min) Zeitpunkte der liposomalen Formulierungen von Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F Lipo 20 mol% (**^{18}F-a Lipo**), Ch-PEG_{30}-$hbPG_{24}$-CH_2-triazol-TEG-^{18}F Lipo 20 mol% (**^{18}F-b Lipo**) und [^{18}F]Fluorocholesten Lipo (**9 Lipo**); He: Herz, Lu: Lunge, Ve: Vene, Le: Leber, Gi: Gastrointestinaltrakt, Bl: Blase, Mi: Milz.

Im späten Zeitfenster (50-60 min) ist eine deutlich verringerte renale Ausscheidung der linear (**^{18}F-a Lipo**) und linear-hyperverzweigt (**^{18}F-b Lipo**) stabilisierten Liposomen im Vergleich zu den einzeln untersuchten Polymeren (**^{18}F-a** und **^{18}F-b**) zu erkennen. Bei 0-3 min ist eine Anreicherung in der Blase noch nicht zu beobachten. Dies spricht für eine erfolgreiche Inkorporation der sterisch stabilisierenden Polymere, aber auch für eine leichte Degradation der Liposomen, da die Liposomen an sich zu groß für den renalen Ausscheidungsweg sind. Die mittels DLS bei 30, 60, 90, 120 und 150° bestimmten

hydrodynamischen Radien lagen bei 46 nm für **^{18}F-a Lipo** und 83 nm für das **^{18}F-b Lipo**. Neben der Aufnahme in der Leber zeigte sich auch der Gastrointestinaltrakt. Bei **^{18}F-b Lipo** ist zusätzlich verbliebene Aktivität in den gut durchbluteten Organen Herz und Lunge zu erkennen. Das klassische Liposom (**9 Lipo**) ohne Abschirmung zeigt die Hauptmenge der Aktivität in der Leber und Milz, was für eine Erkennung und Aufnahme über das MPS spricht. Der hydrodynamische Radius lag für das **9 Lipo** bei 200 nm. Es trat wieder leichte Defluorierung auf, die sich durch die Darstellung des Skeletts verdeutlichte.

Die verschiedenen Größen der Liposomen und ihre Auswirkungen werden im folgenden Kapitel diskutiert.

4.4.2 *Ex vivo*-Biodistributionsstudien

Zur Quantifizierung der Aktivitätsmengen in den einzelnen Organen wurden 60 min nach der Injektion *ex vivo*-Biodistributionen nach Kapitel 3.6.1 durchgeführt.

Nachdem die Organe der Tiere gewogen und im automatisierten γ-Counter vermessen wurden, musste der erhaltene Wert der Zählrate (CPM: counts per minute) in Aktivität (in kBq) umgerechnet werden. Um diese Korrelation durchzuführen, wurde eine Kalibrationskurve mit Fluor-18 aufgenommen (vgl. Abbildung 37).

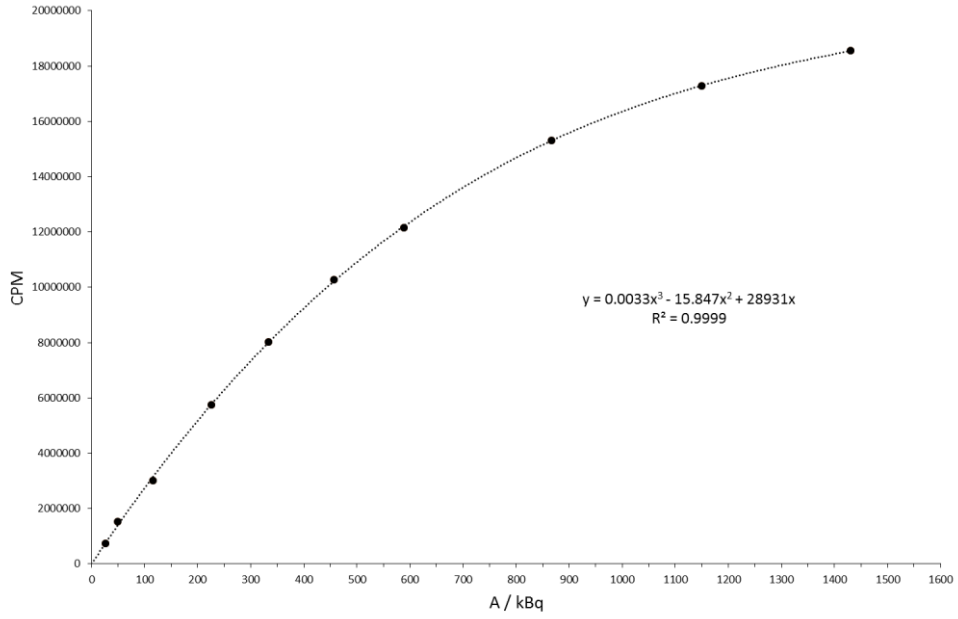


Abbildung 37: Kalibrationskurve des automatisierten γ-Counters mit Fluor-18.

Man erkennt deutlich, dass die Linearität nur für geringe Aktivitäten gültig ist und mit zunehmender Aktivität abnimmt. Nach Lösung der Gleichung nach x, konnten die erhaltenen CPM-Werte in Aktivitäten in kBq umgerechnet werden.
Der so erhaltene Aktivitätswert wurde auf den Zeitpunkt der Injektion zerfallskorrigiert und anschließend auf 1 g Gewebe normiert. Im finalen Schritt wurde diese genormte und korrigierte Aktivität durch die injizierte Gesamtaktivität geteilt und mit einhundert multipliziert, um den Wert der prozentualen injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (%ID/g Gewebe) zu erhalten. Durch diesen Wert können die einzelnen Ergebnisse gut miteinander verglichen werden.

In Abbildung 38 sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der einzelnen Organe von den Verbindungen Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**), Ch-PEG$_{30}$-hbPG$_{24}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) und [^{18}F]Fluorocholesten (**9**) 60 min nach Injektion gezeigt.

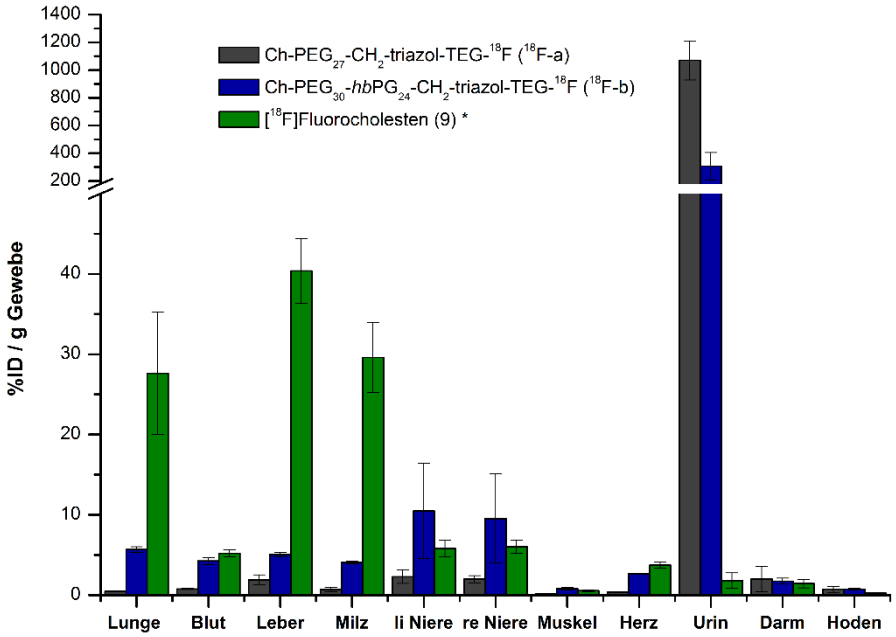


Abbildung 38: Ex vivo-Biodistributionsdaten (n=3) 60 min p.i. von männl. C57bl6J-Mäusen in %ID/g Gewebe der Verbindungen Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**), Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) und [^{18}F]Fluorocholesten (**9**), Fehler sind als Standardabweichung des Mittelwertes angegeben, Sternchen bedeutet n=2.

Wie bereits in den µPET-Aufnahmen festgestellt, wird das PEGylierte Cholesterol **^{18}F-a** rasch über die Nieren ausgeschieden und ist nach einer Stunde fast nur noch im Urin (1070 %ID/g) zu detektieren. Ähnlich, aber mit verzögerter Pharmakokinetik, zeigt sich das linear-hyperverzweigte Polymer **^{18}F-b**. Neben dem hohen Wert im Urin (306 %ID/g),

ist aufgrund des renalen Ausscheidungsweges noch Aktivität in den Nieren (~10 %ID/g) zu finden. Zusätzlich befinden sich im Blut und den gut durchbluteten Organen, wie Herz und Lunge, noch ca. 5 %ID/g. Eine ähnliche Aufnahme ist in Milz und Leber zu detektieren. Im Skelettmuskel des Femurs, in den Hoden und im Darm ist nahezu keine Aktivität von **^{18}F-a** oder **^{18}F-b** nachzuweisen. Während sich die beiden Polymere von der Bioverteilung her ähneln, verhält sich das [^{18}F]Fluorocholesten (**9**) erheblich anders. Die höchsten Aufnahmewerte sind in der Leber (40 %ID/g), der Milz (30 %ID/g) und der Lunge (28 %ID/g) zu erkennen, während im Urin (2 %ID/g) nahezu keine Aktivität zu detektieren ist. Leicht erhöhte Werte sind in den Nieren (~6 %ID/g), im Blut (5 %ID/g) und im Herzen (4 %ID/g) vorzufinden. Der hohe Leberwert kann aufgrund der Hydrophobizität und des Gallensäurestoffwechsels erklärt werden. Des Weiteren ist hauptsächlich die Leber an der Lipoproteinaufnahme (HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein) beteiligt. In Lipoproteinen wird Cholesterol im Körper gebunden und transportiert.[106] Auch die Milz spielt im Fettstoffwechsel eine, wenn auch noch nicht ganz aufgeklärte, Rolle.[107]

Lungenalveolen sind mit einer grenzflächenaktiven Substanz (pulmonary surfactant: surface active agent) ausgekleidet, deren Hauptaufgabe darin besteht, die Oberflächenspannung an der Wasser/Luft-Grenzfläche zu reduzieren, um einen Alveolenkollaps zu verhindern.[108] Diese pulmonale grenzflächenaktive Substanz besteht neben Phospholipiden bei Mäusen auch zu knapp 10 % aus Cholesterol.[109] Eine Möglichkeit, die beobachtete Anreicherung in der Lunge zu erklären, ist die Aufnahme des Cholesterolanalogons [^{18}F]Fluorocholesten in die für die Produktion der pulmonalen grenzflächenaktiven Substanz zuständigen Lungenzellen. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der hohen Aufnahme in der Lunge wäre die ungenügende Lösungsvermittlung durch das zugesetzte 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin. Aufgrund der hohen Lipophilie des [^{18}F]Fluorocholesten könnte es in den kleinen Lungenkapillaren zu einer Ablagerung kommen und damit die hohe Aufnahme erklärt werden.
Der Skelettmuskel des Femurs sowie der entnommene Dünndarm und die Hoden zeigen für keine der drei Verbindungen eine erhöhte Akkumulation von Relevanz.
In Abbildung 39 ist der Vergleich der Biodistributionsdaten 60 min p.i. des linear-hyperverzweigten Polyethers Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) mit den beiden liposomalen Verbindungen (**^{18}F-b Lipo 5%** und **^{18}F-b Lipo 20%**) gezeigt. Die Zusammensetzung des Lipid-/Polymergemisches lag vor der Ultraschallbehandlung und

Extrusion anfänglich bei DOPC:Cholesterol:Polymer (60:35:5). Wie in der Abbildung deutlich zu erkennen ist, unterscheidet sich die Bioverteilung des **^{18}F-b Lipo 5%** von den Werten des Polymers **^{18}F-b** hauptsächlich in der Aufnahme in der Milz (19 gegen 4 %ID/g) und Leber (10 gegen 5 %ID/g). Der Blutwert der Liposomen hat sich gegenüber dem linear-hyperverzweigten Polymer verdoppelt (~8 gegen 4 %ID/g). Unerwartet hoch gestaltete sich die Anreicherung im Urin (221 %ID/g), was wiederum für eine rasche renale Ausscheidung von **^{18}F-b** bzw. eine Instabilität der Liposomen spricht. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde darauf geschlossen, dass das **^{18}F-b** durch seine anspruchsvolle Sterik nicht ausreichend in die Liposomendoppelmembran inkorporiert wurde. Dadurch war der abschirmenden Effekt zu gering und die Liposomen wurden degradiert. Bei diesem Abbau der Liposomen würde somit **^{18}F-b** frei werden und wie zuvor gezeigt (vgl. Abbildung 35 und Abbildung 38) der renalen Ausscheidung unterliegen. Es bestünde auch die Möglichkeit, dass die Verankerung in der Liposomenmembran nicht stabil genug ist und das Polymer **^{18}F-b** herausgelöst und anschließend renal ausgeschieden wird. Die Abtrennung der Liposomen von dem eventuell noch (mizellar) vorliegenden Polymer **^{18}F-b** wurde mittels SEC durchgeführt und über DLS bestätigt.

Daraufhin wurde der Zusatz des Polymers **b** vor der Ultraschallbehandlung und Extrusion von 5 auf 20 mol% erhöht. Bei gleichzeitiger Reduktion des Cholesterolgehalts von 35 auf 20 mol% wurde der Gesamtcholesterolanteil bei 40 mol% konstant gehalten.

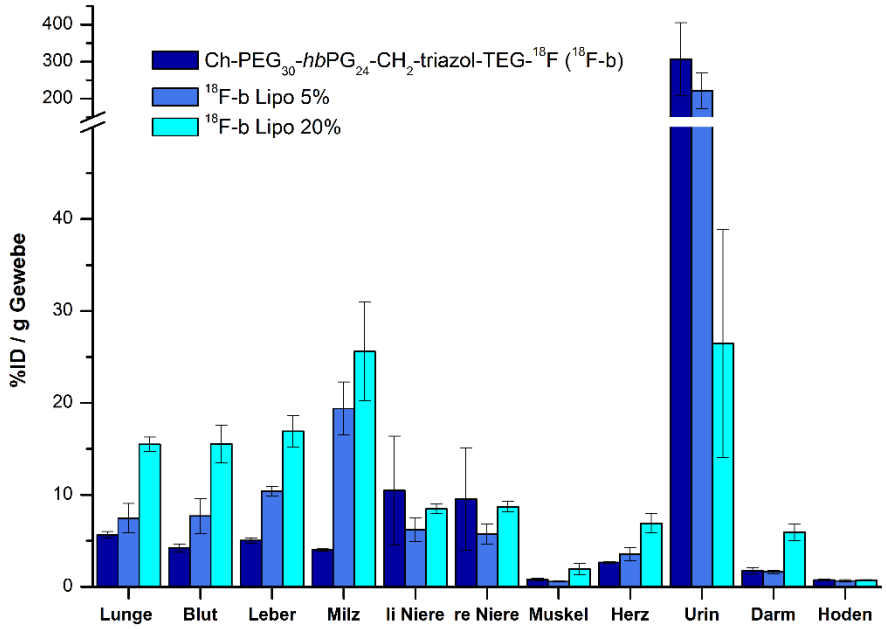


Abbildung 39: *Ex vivo*-Biodistributionsdaten (n=3) 60 min p.i. von männl. C57bl6J-Mäusen in %ID/g Gewebe der Verbindungen Ch-PEG_{30}-*hb*PG_{24}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) und den liposomalen Formulierungen mit 5 und 20 mol% Polymerzugabe (R_H: 86 bzw. 83 nm), Fehler sind als Standardabweichung des Mittelwertes angegeben.

In Abbildung 39 ist klar ersichtlich, dass diese Erhöhung der Polymerzugabe auf die biologische Verteilung Einfluss ausübt. Die daraus resultierenden Liposomen **^{18}F-b Lipo 20%** hatten einen zu **^{18}F-b Lipo 5%** (R_H: 86 nm) vergleichbaren hydrodynamischen Radius von 83 nm. Die erhaltenen Werte für das Blut (15,6 %ID/g) und die gut durchbluteten Organe, wie die Lunge (15,5 %ID/g) und das Herz (7 %ID/g), sind deutlich erhöht und zeigen eine erhöhte Blutzirkulationszeit auf. Ebenso ist die Anreicherung im Urin von 221 %ID/g (**^{18}F-Lipo 5%**) erheblich auf 26,5 %ID/g zurückgegangen. Das deutet auf einen erhöhten Einbau in die Liposomendoppelmembran mit daraus resultierender höherer Stabilität hin. Allerdings sind die Biodistributionsdaten der Leber (17 %ID/g) und Milz (25,6 %ID/g) ebenfalls erhöht, was für eine Aufnahme der Liposomen durch das MPS spricht. Die Biodistributionsdaten im Darm sind bei **^{18}F-b Lipo 20%** (6 %ID/g) knapp viermal so hoch, wie bei den anderen beiden Datensätzen **^{18}F-b** und **^{18}F-b Lipo 5%** (je 1,6 %ID/g). Verglichen mit den PET-Aufnahmen erscheint dieser Wert dennoch zu niedrig, was wahrscheinlich in der Entnahme des Darmabschnittes begründet liegt.

Nachfolgend (Abbildung 40) ist der Vergleich des linearen Polymers Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**) mit der liposomalen Formulierung (**^{18}F-a Lipo 20%**) gezeigt.

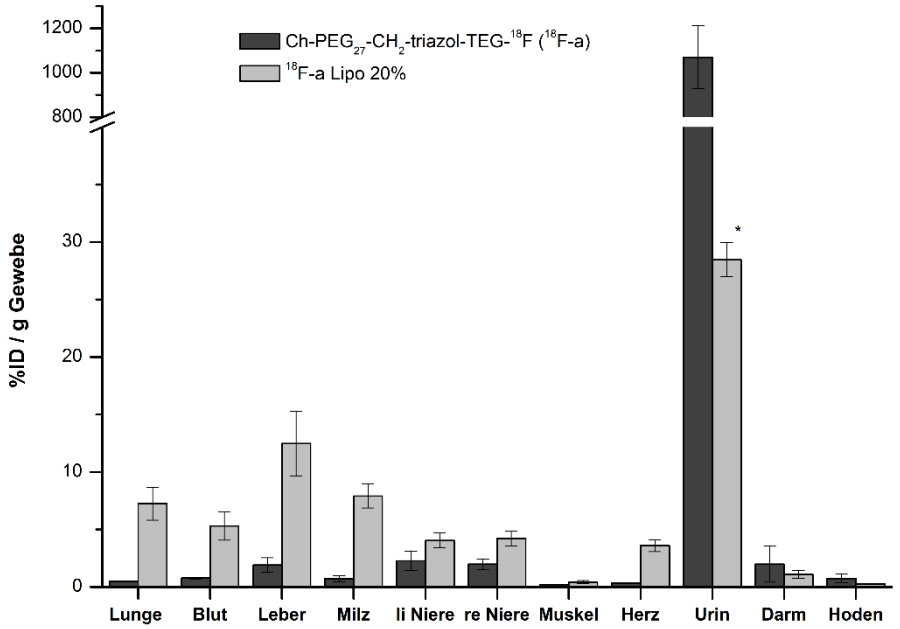


Abbildung 40: *Ex vivo*-Biodistributionsdaten (n=3) 60 min p.i. von männl. C57bl6J-Mäusen in %ID/g Gewebe der Verbindungen Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**) und der liposomalen Formulierung mit 20 mol% Polymerzugabe (**^{18}F-a Lipo 20%**, R_H: 46 nm), Fehler sind als Standardabweichung des Mittelwertes angegeben, Sternchen bedeutet n=2.

Dynamische Lichtstreumessungen ergaben einen hydrodynamischen Radius von 46 nm für **^{18}F-a Lipo 20%**. Auch in dieser Grafik ist eine Veränderung der Bioverteilung ersichtlich. Die renale Exkretion ist stark reduziert (1070 gegen 28,5 %ID/g). Da die Liposomen auch in diesem Fall zu groß sind, um über die Nieren ausgeschieden zu werden, muss wieder von einer ungenügenden Stabilisierung und damit dem Abbau der Liposomen ausgegangen werden. In den gut durchbluteten Organen Lunge (7 %ID/g) und Herz (3,6 %ID/g) ist ebenso wie im Blut (5,3 %ID/g) eine Erhöhung der Werte festzustellen, was eine erhöhte Zirkulation der Liposomen im Blut aufzeigt. Die Aufnahme über das Mononukleäre Phagozytensystem zeigt sich in der Leber (12,5 %ID/g) und der Milz (7,9 %ID/g). Die Gewebeaktivität in den Nieren hat sich bei der Applikation der liposomalen Formulierung gegenüber des linearen Polymers in etwa verdoppelt (4 gegen 2,2 %ID/g).

Nachstehend ist in Abbildung 41 das [^{18}F]Fluorocholesten (**9**) mit dem [^{18}F]Fluorocholesten im Liposom (**9 Lipo**) verglichen.

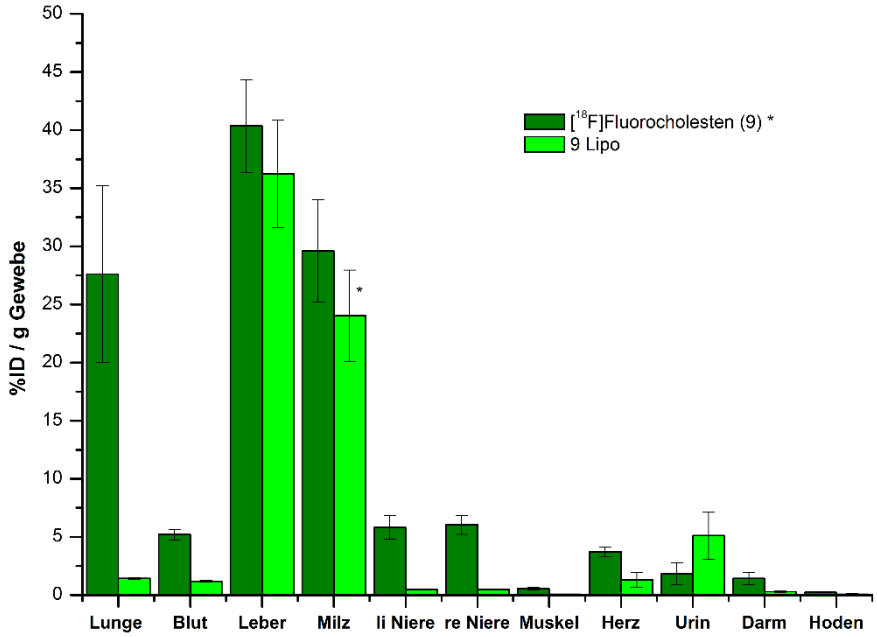


Abbildung 41: *Ex vivo*-Biodistributionsdaten (n=3) 60 min p.i. von männl. C57bl6J-Mäusen in %ID/g Gewebe der Verbindungen [^{18}F]Fluorocholesten (**9**) und der liposomalen Formulierung [^{18}F]Fluorocholesten (**9 Lipo**, R_H: 204 nm), Fehler sind als Standardabweichung des Mittelwertes angegeben, Sternchen bedeutet n=2.

Die dynamischen Lichtstreuexperimente ergaben einen hydrodynamischen Radius von 204 nm für die Liposomen. Der auffälligste Unterschied in der Bioverteilung zeigt sich in der Lunge. Die Aufnahme von **9** in der Lunge (29 %ID/g) ist im Liposom (1,4 %ID/g) fast nur noch auf Höhe des Blutwertes (1,2 %ID/g). Diese Ergebnisse stützen die Überlegungen zur Aufnahme des [^{18}F]Fluorocholestens (**9**) in die pulmonale grenzflächenaktive Substanz der Lunge bzw. die Löslichkeitsprobleme in den Lungenkapillaren, weil das liposomal gebundene **9** dieses Verhalten nicht zeigt. Die dominanten Werte von **9 Lipo** in der Leber (36 %ID/g) und der Milz (24 %ID/g) zeugen von einer raschen MPS-Aufnahme. Die Anreicherung im Herzen (1,3 %ID/g) ist ähnlich der des Blutes. Während in den Nieren nur sehr geringfügig Aktivität nachzuweisen war, wurde im Urin etwa 5 %ID/g Gewebe detektiert. Da in den dynamischen PET-Aufnahmen (vgl. Abbildung 36) eine leichte Defluorierung anhand der Knochenaufnahme zu beobachten war, ist davon auszugehen, dass es sich in der Blase um [^{18}F]Fluorid handelt, da normalerweise lipophile Substanzen die Niere nicht passieren.

Abschließend sind in Abbildung 42 die Biodistributionswerte der drei untersuchten Liposomensysteme (linear abgeschirmt: **^{18}F-a Lipo 20%**, linear-hyperverzweigt abgeschirmt: **^{18}F-b Lipo 20%** sowie konventionell: **9 Lipo**) nach 60 min p.i. verglichen.

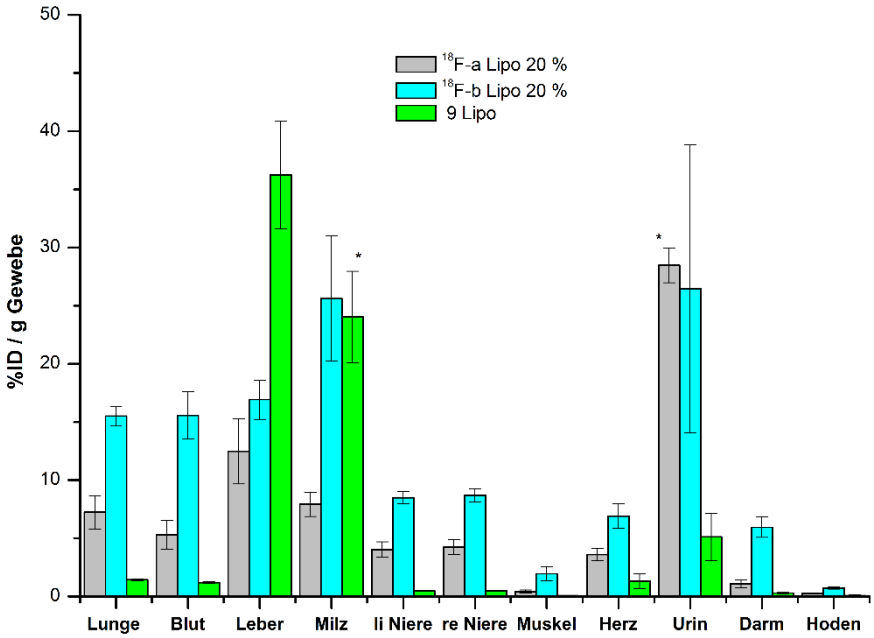


Abbildung 42: Vergleich der *ex vivo*-Biodistributionsdaten (n=3) 60 min p.i. von männl. C57bl6J-Mäusen in %ID/g Gewebe der untersuchten liposomalen Systeme (**^{18}F-a Lipo 20%** (R_H: 46 nm), **^{18}F-b Lipo 20%** (R_H: 83 nm) und **9 Lipo** (R_H: 204 nm)), Fehler sind als Standardabweichung des Mittelwertes angegeben, Sternchen bedeutet n=2.

Es ist klar zu erkennen, dass die linear-hyperverzweigt abgeschirmten Liposomen (**^{18}F-b Lipo 20%**) den höchsten Wert im Blut (15,6 %ID/g) und den gut durchbluteten Organen wie Lunge (15,5 %ID/g) und Herz (7 %ID/g) aufweisen. Danach folgen die linear abgeschirmten Liposomen (**^{18}F-a Lipo 20%**) mit den Werten für Blut (5 %ID/g), Lunge (7 %ID/g) und Herz (3,6 %ID/g). Die konventionellen Liposomen (**9 Lipo**) sind nach einer Stunde fast nicht mehr im Blut, der Lunge und dem Herz nachzuweisen (1,2-1,4 %ID/g), sondern sind fast vollständig in der Leber (36 %ID/g) und Milz (24 %ID/g) aufgenommen. Vergleicht man die beiden sterisch stabilisierten Liposomensysteme in den anderen Organen, dann ist die generell leicht erhöhte Aufnahme der linear-hyperverzweigten Liposomen in der Leber (17 gegen 12,5 %ID/g), den Nieren (8,6 gegen 4,1 %ID/g) und dem Darm (6 gegen 1,1 %ID/g) zu beobachten. Die Anreicherung in der Milz (25,6 %ID/g) ist gegenüber dem linear stabilisierten System (8 %ID/g) deutlich erhöht. Die Ausscheidung der stabilisierenden Polymere über die Niere ist in etwa vergleichbar und resultiert in einer Aktivität im Urin von 26,5 (**^{18}F-b Lipo 20%**) bzw.

28,5 %ID/g (**^{18}F-a Lipo 20%**). Eine Akkumulation im Muskel (1,9 gegen 0,4 %ID/g) ist minimal und die Hoden zeigen keine relevante Aufnahme.

Vergleicht man die Blut-zu-Organ-Verhältnisse der beiden unterschiedlich abgeschirmten Liposomen, sind die Blut-zu-Leber-Werte deutlich höher (0,92 zu 0,43) bei den linear-hyperverzweigten Liposomen (vgl. Abbildung 43). Ebenfalls hinsichtlich der Blut-zu-Lungen-Verhältnisse sind die linear-hyperverzweigt abgeschirmten Liposomen gegenüber den PEGylierten leicht im Vorteil (1 zu 0,73). Die Blut-zu-Milz-Verhältnisse weisen ähnliche Werte auf (0,61 gegen 0,67).

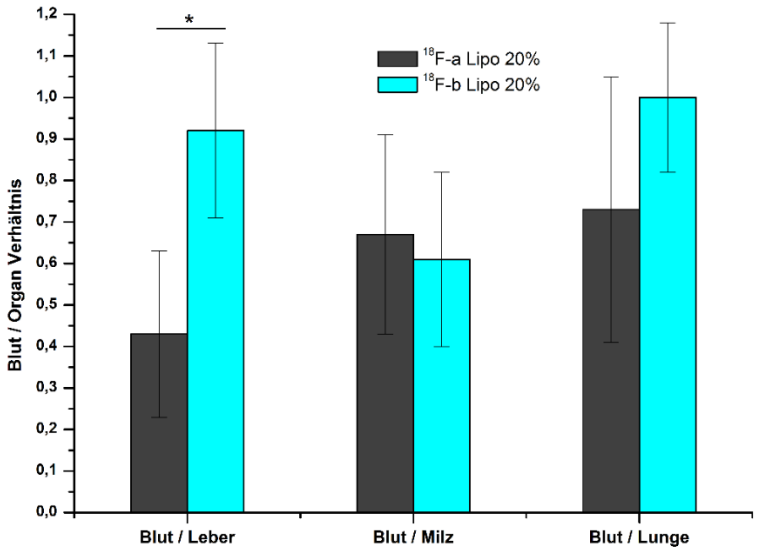


Abbildung 43: Blut-zu-Organ-Verhältnisse aus *ex vivo*-Biodistributionsdaten der liposomalen Formulierungen Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a Lipo 20%**, dunkelgrau) und Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b Lipo 20%**, cyan), Fehler wurden durch Fehlerfortpflanzung der Standardabweichung berechnet, Sternchen bedeutet $P < 0,05$.

Zusammenfassend zeigen diese Verhältnisse neben der generell höheren Konzentration im Blut das vorteilhaftes *in vivo*-Verhalten der linear-hyperverzweigten Abschirmung gegenüber den linear abgeschirmten Liposomen.

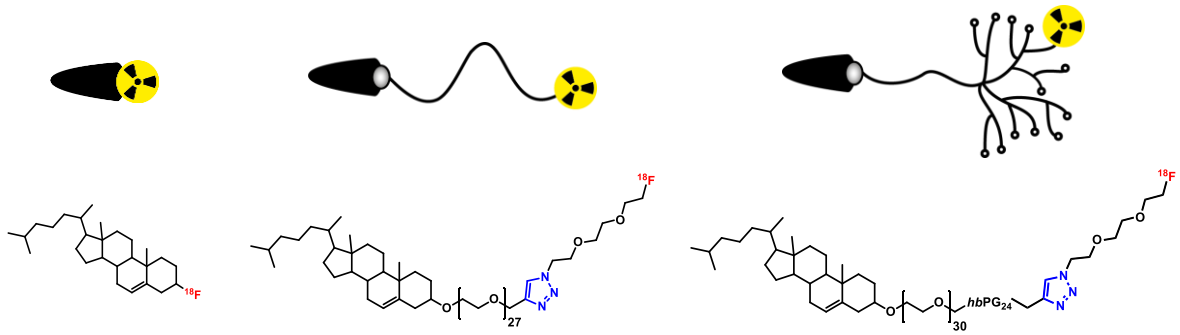
Die abweichenden Radien der verschiedenen Liposomensysteme waren in diesem Ausmaß nicht erwartet worden. Jede der drei liposomalen Formulierungen wurde auf die gleiche Art und Weise behandelt. Zuerst wurde die Suspension im Ultraschallbad bei 50 °C für 10 min beschallt, danach 11 x über eine 400 nm Membran und anschließend 11 x über eine 100 nm Membran extrudiert. Die Membranen wurden absichtlich so gewählt, um finale Liposomen mit einem Durchmesser um die 100 nm zu erhalten. Trotz unterschiedlicher Mengen an zugesetztem linear-hyperverzweigtem Polymer Ch-PEG$_{30}$-

hbPG_{24}-CH_2-C≡CH (**b**) sind die Liposomen **^{18}F-b Lipo 5%** und **^{18}F-b Lipo 20%** auch von ähnlicher Größe (86 und 83 nm). Das linear abgeschirmte Liposom **^{18}F-a Lipo 20%** ist mit einem hydrodynamischen Radius von 46 nm fast nur halb so groß, während das nicht stabilisierte, konventionelle Liposom **9 Lipo** einen Radius von 204 nm aufweist. Das deutet darauf hin, dass das Vorhandensein und die Art der Abschirmung einen erheblichen Einfluss auf die Größenverteilung der mittels Extrusion präparierten Liposomen haben. Die klassischen Liposomen ohne Abschirmung haben eine höhere Flexibilität und können sich beim Durchtreten der Membranporen abflachen. Daraus resultieren die größeren Durchmesser der nicht abgeschirmten Vesikel. Die Membrangrößen des Mini-Extruders müssen in Zukunft dementsprechend angepasst werden, um homogenere Größen der Liposomen zu erhalten. Bei nanopartikulären Systemen spielt die Größe und Art der Abschirmung eine ganz entscheidende Rolle in der Bioverteilung und Blut-Clearance. Vesikel mit einem hydrodynamischen Radius über 200 nm werden deutlich schneller aus dem Blut entfernt als Partikel unter 100 nm, unabhängig davon, ob sie abgeschirmt sind oder nicht.[110]

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zur Entwicklung und vor allem der *in vivo*-Evaluierung von polymeren Wirkstofftransportsystemen mittels Positronen-Emissions-Tomographie sind innovative Markierungsmethoden vonnöten. Die dadurch mit Positronen-Emittern markierten Makromoleküle können nicht-invasiv im lebenden Organismus hinsichtlich ihrer pharmakokinetischer Eigenschaften untersucht und optimiert werden. Die alleinige physikochemische Charakterisierung solcher Systeme ermöglicht keine hinreichende Vorhersage des Verhaltens *in vivo* und ist in der Wirkstofftransportentwicklung daher nicht ausreichend. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Radiomarkierung verschiedener Polymere bzw. Moleküle und deren *in vivo*-Evaluierung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Polyether-basierte Lipide und Cholesterol mittels Fluor-18 radiomarkiert (vgl. Abbildung 44). Von besonderem Interesse war dabei das über anionische Ringöffnungspolymerisation hergestellte linear-hyperverzweigte Polyglycerol (**b**). Ihr *in vivo*-Verhaltens sollte geklärt und mit bekannten Strukturen, wie dem linearen Cholesterol-Polyethylenglykol-Konjugat (**a**), verglichen werden.



3-[^{18}F]Fluorocholest-5-en (**9**)

Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**)

Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**)

Abbildung 44: Darstellung und Bezeichnung der drei radiofluorierten Cholesterolderivate.

Zur Markierung der beiden amphiphilen Polymere (**^{18}F-a** und **^{18}F-b**) wurde die kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition angewandt. Dazu wurden das lineare Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-C≡CH (**a**) und das linear-hyperverzweigte Ch-PEG$_{30}$-*hb*PG$_{24}$-CH$_2$-C≡CH (**b**) mit der prosthetischen Gruppe ^{18}F-TEG-N$_3$ (**6**) unter Kupferkatalyse radiomarkiert. Es konnten durch Optimierung der Reaktionsbedingungen in beiden Fällen radiochemische

Ausbeuten über 95 % erzielt werden. Die Abtrennung des Kupfers sowie die Analytik mittels der Radiodünnschichtchromatographie und Radio-HPLC wurden entwickelt. Das 3-[^{18}F]Fluorocholest-5-en (**9**) konnte über die Direktmarkierung des mesylierten Vorläufers unter optimierten Bedingungen in radiochemischen Ausbeuten von 25 % erhalten werden. Die Analytik mittels Radio-DC und die Analytik und Abtrennung mittels Radio-HPLC wurden etabliert. Alle drei Verbindungen konnten für die Anwendung in Tierstudien formuliert werden und wurden hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik (PET und *ex vivo*-Biodistribution) über 60 min an männlichen black six Mäusen untersucht. Dabei zeigten die Polymere **^{18}F-a** und **^{18}F-b** eine rasche renale Ausscheidung. Die ersten *in vivo*-Ergebnisse wiesen also durchaus ein vergleichbares Verhalten des linear-hyperverzweigten Polyglycerols mit der des linearen Polyethylenglykols auf. Das ^{18}F-Cholesten (**9**) wurde hauptsächlich in der Leber, der Milz und der Lunge aufgenommen.

Um zu untersuchen, ob der bekannte abschirmende Effekt von PEG-Ketten bei Liposomen auch auf das neue hyperverzweigte System zutrifft, wurden die jeweiligen Liposomen präpariert. Zum Vergleich dieser beiden sterisch-stabilisierten liposomalen Formulierungen mit klassischen, nicht abgeschirmten Liposomen wurde 3-[^{18}F]Fluorocholesten in Liposomendoppelmembranen eingelagert. Die drei verschiedenen liposomalen Strukturen sind fusioniert in Abbildung 45 dargestellt.

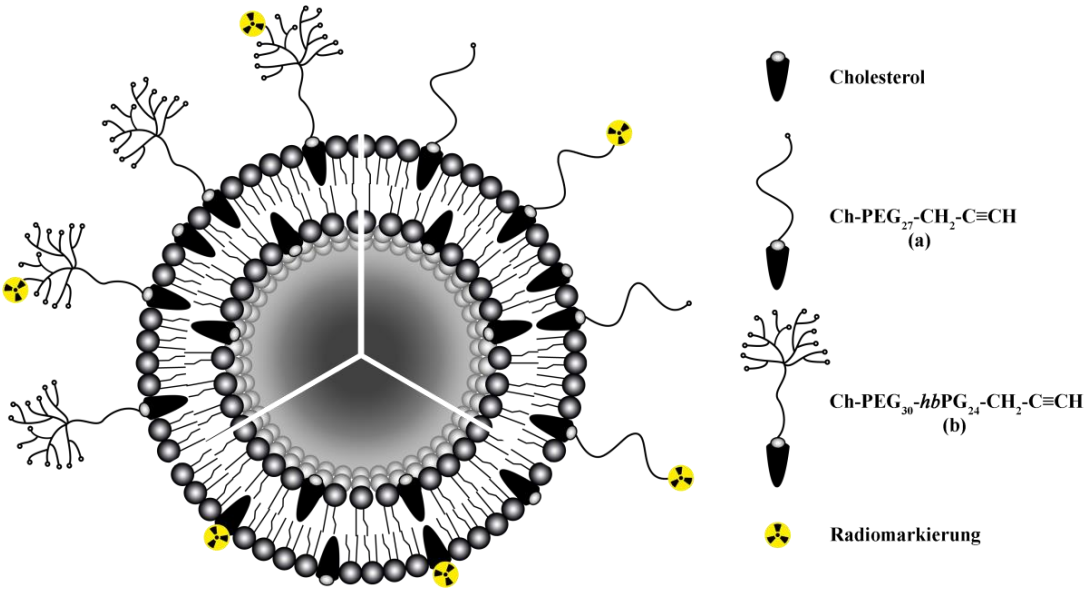


Abbildung 45: Konzeptionelles Design der drei Liposomenformulierungen; zwecks Übersicht sind Polymerketten oder Radiomarkierungen nicht im Inneren des Liposoms gezeigt und nicht maßstabsgetreu gezeichnet.

Durch Zugabe von DOPC und Cholesterol zu den radiomarkierten Derivaten wurden durch die Dünnfilm-Hydratationsmethode mit anschließender manueller Extrusion Liposomen hergestellt und anschließend über die Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Beim Vermessen der drei verschiedenen Liposomensysteme zeigte sich in der dynamischen Lichtstreuung, dass die hydrodynamischen Radien recht stark variierten. Dies war zu beobachten, obwohl in allen Fällen die Membrangrößen (400 nm, anschließend 100 nm) bei der Extrusion identisch gewählt wurden. Es ergaben sich hydrodynamische Radien von 46 nm (lineares PEG), 83 nm (linear-hyperverzweigtes PG) und 204 nm für die konventionellen Liposomen. In den Tierstudien (*in vivo*-PET und *ex vivo*-Biodistribution) zeigten die klassischen Liposomen hauptsächlich eine Anreicherung in der Leber und Milz durch eine MPS-vermittelte Aufnahme. Die beiden sterisch-stabilisierten Liposomen unterlagen einer ähnlichen Pharmakokinetik, wobei die linear-hyperverzweigten Liposomen gegenüber den linearen eine erhöhte Blutkonzentration zeigten. Im Kontext von Wirkstofftransportsystemen ist das ein vorteilhaftes Verhalten. Die Aufnahme in der Leber war ebenfalls gegenüber den linear abgeschirmten Liposomen leicht erhöht. Final konnte ein vergleichbares, bis leicht vorteilhaftes Verhalten der Liposomen mit der neuartigen linear-hyperverzweigten Abschirmung in Bezug auf Blut-zu-Organ-Werten gegenüber den PEGylierten Liposomen festgestellt werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse bieten die Möglichkeit für weiterführende Untersuchungen. Zum einen könnten die Membrangrößen des Extruders an das jeweilige System (keine Abschirmung, lineare Abschirmung, hyperverzweigte Abschirmung) individuell angepasst werden, um Liposomen mit untereinander besser vergleichbaren Durchmessern zu erhalten. Zum anderen könnten andere Phospholipide eingesetzt werden, um die Stabilität und damit die Blutzirkulationszeit der Liposomen zu erhöhen. Weitere Ansatzpunkte sind die Möglichkeit, dialkylverankerte Polyether-basierte Lipide anstelle der cholesterolverankerten zu verwenden oder die Architektur der Verzweigung zu variieren. Nachdem die Stabilität der Liposomen erhöht wurde, sollte das längerfristige Ziel die kovalente Anbindung von Targeting-Vektoren an die Polyetherstrukturen und/oder die Einlagerung von Wirkstoffen in die Liposomen sein.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit lag in der Click-Radiomarkierung von HPMA-basierten Polymeren, die mittels Reaktivesteransatz und RAFT mit anschließender polymeranaloger Umsetzung dargestellt wurden. Hierfür wurde der kupferkatalysierte (CuAAC) sowie ringspannungsgetriebene (SPAAC) Markierungsansatz verfolgt und die Polymere dementsprechend funktionalisiert (vgl. Abbildung 46).

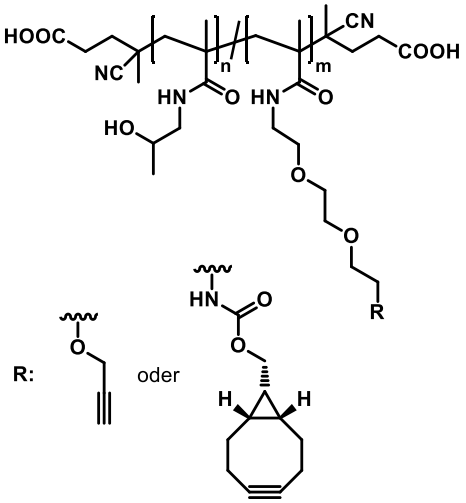


Abbildung 46: Strukturen der HPMA-basierten Polymere zur CuAAC- und SPAAC-Radiomarkierung mittels ^{18}F-TEG-N_3.

Es wurden jeweils ein kleines (~12 kDa) und ein großes (~60 kDa) Polymer synthetisiert, um in späteren *in vivo*-Versuchen unter und über der renalen Ausscheidungsgrenze zu liegen. Die Radiofluorierung erfolgte auch hierbei über die prosthetische Gruppe ^{18}F-TEG-N_3. Bei der CuAAC konnte in konventionellen Markierungsstudien mit beiden HPMA-Polymeren unter optimierten Bedingungen eine radiochemische Ausbeute über 95 % erreicht werden. Dies gelang auch für die mikrowellengestützte SPAAC-Reaktion des großen Polymers. Die beste radiochemische Ausbeute des kleinen pHPMA wurde ebenfalls mikrowellengestützt mit 52 % erreicht. Für alle vier Derivate wurde die Abtrennung und Formulierung des Produkts erfolgreich durchgeführt.

Die etablierten Radiomarkierungen der vier pHPMA-Systeme ermöglichen weitere Schritte, etwa die Komplettierung der begonnenen Stabilitätsstudien *in vitro* sowie die anschließende Durchführung von Tierversuchsstudien (PET und *ex vivo*-Biodistribution) an tumortragenden Ratten. Die daraus resultierenden Ergebnisse sollen mit vorherigen Studien ([^{18}F]Fluorethylierung der gleichen HPMA-Polymeren[90]) hinsichtlich des Einflusses der Markierungsart auf die Bioverteilung verglichen werden. Im optimalen Fall sind keine oder nur sehr marginale Unterschiede festzustellen.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

(1) Uchizono, J. A. Application of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in the Design of Controlled Delivery Systems. In *Design of Controlled Release Drug Delivery Systems*; McGraw-Hill, 2006; pp. 1–41.

(2) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science* **2004**, *303*, 1818–1822.

(3) Lammers, T.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Storm, G. Drug Targeting to Tumors: Principles, Pitfalls and (pre-) Clinical Progress. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 175–187.

(4) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751–760.

(5) Danhier, F.; Feron, O.; Préat, V. To Exploit the Tumor Microenvironment: Passive and Active Tumor Targeting of Nanocarriers for Anti-Cancer Drug Delivery. *J. Control. Release* **2010**, *148*, 135–146.

(6) Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392.

(7) Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor Vascular Permeability and the EPR Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review. *J. Control. Release* **2000**, *65*, 271–284.

(8) Immordino, M. L.; Dosio, F.; Cattel, L. Stealth Liposomes: Review of the Basic Science, Rationale, and Clinical Applications, Existing and Potential. *Int. J. Nanomedicine* **2006**, *1*, 297–315.

(9) Bangham, A. D.; Horne, R. W. Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 660–IN10.

(10) Dua, J. S.; Rana, A. C.; Bhandari, A. K. Liposome: Methods of Preparation and Applications. *Int. J. Pharm. Stud. Res.* **2012**, *3*, 14–20.

(11) Sessa, G.; Weissmann, G. Phospholipid Spherules (liposomes) as a Model for Biological Membranes. *J. Lipid Res.* **1968**, *9*, 310–318.

(12) Agrawal, A. K.; Gupta, C. . Tuftsin-Bearing Liposomes in Treatment of Macrophage-Based Infections. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *41*, 135–146.

(13) Basu, M.; Lala, S. Macrophage Specific Drug Delivery in Experimental Leishmaniasis. *Curr. Mol. Med.* **2004**, *4*, 681–689.

(14) Levchenko, T. S.; Rammohan, R.; Lukyanov, A. N.; Whiteman, K. R.; Torchilin, V. P. Liposome Clearance in Mice: The Effect of a Separate and Combined Presence of Surface Charge and Polymer Coating. *Int. J. Pharm.* **2002**, *240*, 95–102.

(15) Harashima, H.; Sakata, K.; Funato, K.; Kiwada, H. Enhanced Hepatic Uptake of Liposomes Through Complement Activation Depending on the Size of Liposomes. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 402–406.

(16) Ishida, T.; Harashima, H.; Kiwada, H. Liposome Clearance. *Biosci. Rep.* **2002**, *22*, 197–224.

(17) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 36–48.

(18) Allen, T. M.; Hansen, C.; Martin, F.; Redemann, C.; Yau-Young, A. Liposomes Containing Synthetic Lipid Derivatives of Poly(ethylene Glycol) Show Prolonged Circulation Half-Lives in Vivo. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1991**, *1066*, 29–36.

(19) Yeh, P.-Y. J.; Kainthan, R. K.; Zou, Y.; Chiao, M.; Kizhakkedathu, J. N. Self-Assembled Monothiol-Terminated Hyperbranched Polyglycerols on a Gold Surface: A Comparative Study on the Structure, Morphology, and Protein Adsorption Characteristics with Linear Poly(ethylene Glycol)s. *Langmuir* **2008**, *24*, 4907–4916.

(20) Siegers, C.; Biesalski, M.; Haag, R. Self-Assembled Monolayers of Dendritic Polyglycerol Derivatives on Gold That Resist the Adsorption of Proteins. *Chem Eur J* **2004**, *10*, 2831–2838.

(21) Maruyama, K.; Okuizumi, S.; Ishida, O.; Yamauchi, H.; Kikuchi, H.; Iwatsuru, M. Phosphatidyl Polyglycerols Prolong Liposome Circulation in Vivo. *Int. J. Pharm.* **1994**, *111*, 103–107.

(22) Abu Lila, A. S.; Nawata, K.; Shimizu, T.; Ishida, T.; Kiwada, H. Use of Polyglycerol (PG), instead of Polyethylene Glycol (PEG), Prevents Induction of the Accelerated Blood Clearance Phenomenon against Long-Circulating Liposomes upon Repeated Administration. *Int. J. Pharm.* **2013**, *456*, 235–242.

(23) Hofmann, A. M.; Wurm, F.; Frey, H. Rapid Access to Polyfunctional Lipids with Complex Architecture via Oxyanionic Ring-Opening Polymerization. *Macromolecules* **2011**, *44*, 4648–4657.

(24) Hofmann, A. M.; Wurm, F.; Hühn, E.; Nawroth, T.; Langguth, P.; Frey, H. Hyperbranched Polyglycerol-Based Lipids via Oxyanionic Polymerization: Toward Multifunctional Stealth Liposomes. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 568–574.

(25) Müller, S. S. Polyether-Based Lipids and Copolymers: From Biomedical Applications to Thermoresponsive Materials, Johannes Gutenberg-Univerität Mainz, 2014.

(26) Mohr, K.; Müller, S. S.; Müller, L. K.; Rusitzka, K.; Gietzen, S.; Frey, H.; Schmidt, M. Evaluation of Multifunctional Liposomes in Human Blood Serum by Light Scattering. *Langmuir* **2014**, *30*, 14954–14962.

(27) Fritz, T.; Hirsch, M.; Richter, F. C.; Müller, S. S.; Hofmann, A. M.; Rusitzka, K. A. K.; Markl, J.; Massing, U.; Frey, H.; Helm, M. Click Modification of Multifunctional Liposomes Bearing Hyperbranched Polyether Chains. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 2440–2448.

(28) Lasic, D. D. *Liposomes in Gene Delivery*; CRC Press, 1997.

(29) Phillips, W. T.; Goins, B. A.; Bao, A. Radioactive Liposomes. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, *1*, 69–83.

(30) Petersen, A. L.; Hansen, A. E.; Gabizon, A.; Andresen, T. L. Liposome Imaging Agents in Personalized Medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 1417–1435.

(31) Hühn, E.; Buchholz, H.-G.; Shazly, G.; Maus, S.; Thews, O.; Bausbacher, N.; Rösch, F.; Schreckenberger, M.; Langguth, P. Predicting the in Vivo Release from a Liposomal Formulation by IVIVC and Non-Invasive Positron Emission Tomography Imaging. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *41*, 71–77.

(32) Efferth, T.; Langguth, P. Transport Processes of Radiopharmaceuticals and -Modulators. *Radiat. Oncol.* **2011**, *6*, 59.

(33) Oku, N. Delivery of Contrast Agents for Positron Emission Tomography Imaging by Liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *37*, 53–61.

(34) Oku, N.; Tokudome, Y.; Tsukada, H.; Kosugi, T.; Namba, Y.; Okada, S. In Vivo Trafficking of Long-Circulating Liposomes in Tumour-Bearing Mice Determined by Positron Emission Tomography. *Biopharm. Drug Dispos.* **1996**, *17*, 435–441.

(35) Marik, J.; Tartis, M. S.; Zhang, H.; Fung, J. Y.; Kheirolomoom, A.; Sutcliffe, J. L.; Ferrara, K. W. Long-Circulating Liposomes Radiolabeled with [^{18}F]fluorodipalmitin ([^{18}F]FDP). *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34*, 165–171.

(36) Emmetiere, F.; Irwin, C.; Viola-Villegas, N. T.; Longo, V.; Cheal, S. M.; Zanzonico, P.; Pillarsetty, N.; Weber, W. A.; Lewis, J. S.; Reiner, T. ^{18}F-Labeled-Bioorthogonal Liposomes for in Vivo Targeting. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 1784–1789.

(37) Urakami, T.; Akai, S.; Katayama, Y.; Harada, N.; Tsukada, H.; Oku, N. Novel Amphiphilic Probes for [18F]-Radiolabeling Preformed Liposomes and Determination of Liposomal Trafficking by Positron Emission Tomography. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6454–6457.

(38) Urakami, T.; Kawaguchi, A. T.; Akai, S.; Hatanaka, K.; Koide, H.; Shimizu, K.; Asai, T.; Fukumoto, D.; Harada, N.; Tsukada, H.; Oku, N. In Vivo Distribution of Liposome-Encapsulated Hemoglobin Determined by Positron Emission Tomography. *Artif. Organs* **2009**, *33*, 164–168.

(39) Jensen, A. T. I.; Binderup, T.; Andresen, T. L.; Kjær, A.; Rasmussen, P. H. PET Imaging of Liposomes Labeled with an [^{18}F]-Fluorocholesteryl Ether Probe Prepared by Automated Radiosynthesis. *J. Liposome Res.* **2012**, *22*, 295–305.

(40) Ringsdorf, H. Structure and Properties of Pharmacologically Active Polymers. *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* **2007**, *51*, 135–153.

(41) Kopeček, J.; Baĉilová, H. Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]—I. Radical Polymerization and Copolymerization. *Eur. Polym. J.* **1973**, *9*, 7–14.

(42) Sprincl, L.; Exner, J.; Stěrba, O.; Kopecek, J. New Types of Synthetic Infusion Solutions. III. Elimination and Retention of Poly-[N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide] in a Test Organism. *J. Biomed. Mater. Res.* **1976**, *10*, 953–963.

(43) Duncan, R. Development of HPMA Copolymer-Anticancer Conjugates: Clinical Experience and Lessons Learnt. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1131–1148.

(44) Seymour, L. W.; Duncan, R.; Strohalm, J.; Kopecek, J. Effect of Molecular Weight (Mw) of N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymers on Body Distribution and Rate of Excretion after Subcutaneous, Intraperitoneal, and Intravenous Administration to Rats. *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, *21*, 1341–1358.

(45) Loadman, P. M.; Bibby, M. C.; Double, J. A.; Al-Shakhaa, W. M.; Duncan, R. Pharmacokinetics of PK1 and Doxorubicin in Experimental Colon Tumor Models with Differing Responses to PK1. *Clin. cancer Res.* **1999**, *5*, 3682.

(46) Duncan, R.; Vicent, M. J. Do HPMA Copolymer Conjugates Have a Future as Clinically Useful Nanomedicines? A Critical Overview of Current Status and Future Opportunities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 272–282.

(47) Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living Radical Polymerization by the RAFT Process. *Aust. J. Chem.* **2005**, *58*, 379.

(48) Eberhardt, M.; Mruk, R.; Zentel, R.; Théato, P. Synthesis of Pentafluorophenyl(meth)acrylate Polymers: New Precursor Polymers for the Synthesis of Multifunctional Materials. *Eur. Polym. J.* **2005**, *41*, 1569–1575.

(49) Eberhardt, M.; Théato, P. RAFT Polymerization of Pentafluorophenyl Methacrylate: Preparation of Reactive Linear Diblock Copolymers. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 1488–1493.

(50) Barz, M.; Tarantola, M.; Fischer, K.; Schmidt, M.; Luxenhofer, R.; Janshoff, A.; Theato, P.; Zentel, R. From Defined Reactive Diblock Copolymers to Functional HPMA-Based Self-Assembled Nanoaggregates. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3114–3118.

(51) Barz, M.; Luxenhofer, R.; Zentel, R.; Kabanov, A. V. The Uptake of N-(2-Hydroxypropyl)-Methacrylamide Based Homo, Random and Block Copolymers by Human Multi-Drug Resistant Breast Adenocarcinoma Cells. *Biomaterials* **2009**, *30*, 5682–5690.

(52) Hemmelmann, M.; Knoth, C.; Schmitt, U.; Allmeroth, M.; Moderegger, D.; Barz, M.; Koynov, K.; Hiemke, C.; Rösch, F.; Zentel, R. HPMA Based Amphiphilic Copolymers Mediate Central Nervous Effects of Domperidone. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 712–717.

(53) Nuhn, L.; Barz, M.; Zentel, R. New Perspectives of HPMA-Based Copolymers Derived by Post-Polymerization Modification. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 607–618.

(54) Julyan, P. J.; Seymour, L. W.; Ferry, D. R.; Daryani, S.; Boivin, C. M.; Doran, J.; David, M.; Anderson, D.; Christodoulou, C.; Young, A. M.; Hesslewood, S.; Kerr, D. J. Preliminary Clinical Study of the Distribution of HPMA Copolymers Bearing Doxorubicin and Galactosamine. *J. Control. Release* **1999**, *57*, 281–290.

(55) Wang, Y.; Ye, F.; Jeong, E.-K.; Sun, Y.; Parker, D. L.; Lu, Z.-R. Noninvasive Visualization of Pharmacokinetics, Biodistribution and Tumor Targeting of poly[N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide] in Mice Using Contrast Enhanced MRI. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1208–1216.

(56) Lu, Z.-R.; Ye, F.; Vaidya, A. Polymer Platforms for Drug Delivery and Biomedical Imaging. *J. Control. Release* **2007**, *122*, 269–277.

(57) Lu, Z.-R. Molecular Imaging of HPMA Copolymers: Visualizing Drug Delivery in Cell, Mouse and Man. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 246–257.

(58) Yuan, J.; Miao, C.; Peng, F.; Zeng, X.; Guo, H.; Wang, X.; Liao, S.; Xie, X. Synthesis and Characterization of poly(HPMA)-APMA-DTPA-^{99m}Tc for Imaging-Guided Drug Delivery in Hepatocellular Carcinoma. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *127*, 4549–4556.

(59) Yuan, J. C.; Xie, X. L.; Zeng, X. W.; Guo, H. Y.; Miao, C. P. Tumor Targeting of HPMA Copolymer Conjugates Containing Sulfadiazine Groups. *Chinese Chem. Lett.* **2012**, *23*, 875–878.

(60) Herth, M. M.; Barz, M.; Jahn, M.; Zentel, R.; Rösch, F. $^{72/74}$As-Labeling of HPMA Based Polymers for Long-Term in vivo PET Imaging. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5454–5458.

(61) Herth, M. M.; Barz, M.; Moderegger, D.; Allmeroth, M.; Jahn, M.; Thews, O.; Zentel, R.; Rösch, F. Radioactive Labeling of Defined HPMA-Based Polymeric Structures Using [^{18}F]FETos for in vivo Imaging by Positron Emission Tomography. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1697–1703.

(62) Allmeroth, M.; Moderegger, D.; Biesalski, B.; Koynov, K.; Rösch, F.; Thews, O.; Zentel, R. Modifying the Body Distribution of HPMA-Based Copolymers by Molecular Weight and Aggregate Formation. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2841–2849.

(63) Allmeroth, M.; Moderegger, D.; Gündel, D.; Koynov, K.; Buchholz, H.; Mohr, K.; Rösch, F.; Zentel, R.; Thews, O. HPMA-LMA Copolymer Drug Carriers in Oncology: An in vivo PET Study to Assess the Tumor Line-Specific Polymer Uptake and Body Distribution. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 3091–3101.

(64) Allmeroth, M.; Moderegger, D.; Gündel, D.; Buchholz, H.-G.; Mohr, N.; Koynov, K.; Rösch, F.; Thews, O.; Zentel, R. PEGylation of HPMA-Based Block Copolymers Enhances Tumor Accumulation in vivo: A Quantitative Study Using Radiolabeling and Positron Emission Tomography. *J. Control. Release* **2013**, *172*, 77–85.

(65) Schieferstein, H.; Kelsch, A.; Reibel, A.; Koynov, K.; Barz, M.; Buchholz, H.-G.; Bausbacher, N.; Thews, O.; Zentel, R.; Ross, T. L. ^{18}F-Radiolabeling, Preliminary Evaluation of Folate-pHPMA Conjugates via PET. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 1396–1405.

(66) Rudin, M.; Weissleder, R. Molecular Imaging in Drug Discovery and Development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 123–131.

(67) James, M. L.; Gambhir, S. S. A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiol. Rev.* **2012**, *92*, 897–965.

(68) De Kemp, R. A.; Epstein, F. H.; Catana, C.; Tsui, B. M. W.; Ritman, E. L. Small-Animal Molecular Imaging Methods. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51 Suppl 1*, 18S – 32S.

(69) The Nobel Prize in Chemistry 1943 http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1943/.

(70) Phelps, M. E. Positron Emission Tomography Provides Molecular Imaging of Biological Processes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 9226–9233.

(71) Rösch, F. *Nuclear- and Radiochemistry Volume 1: Introduction*; de Gruyter: Berlin/Boston, 2014.

(72) Loveland, W.; Morrissey, D. J.; Seaborg, G. T. *Modern Nuclear Chemistry*; Wiley: New Jersey, 2006.

(73) Lieser, K. H. *Einführung in Die Kernchemie*; 3., neubea.; VCH Weinheim, 1991.

(74) Bailey, D. L.; Townsend, D. W. *Positron Emission Tomography*; Valk, P. E.; Maisey, M. N., Eds.; Springer, 2005.

(75) Saha, G. B. *Basics of PET Imaging Physics, Chemistry, and Regulations*; Springer, 2005.

(76) *Handbook of Nuclear Chemistry - Volume 4: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Science*; Rösch, F., Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Niederlande, 2003.

(77) Lewellen, T. K. Recent Developments in PET Detector Technology. *Phys. Med. Biol.* **2008**, *53*, R287–R317.

(78) Herzog, H.; Rösch, F. PET- Und SPECT-Technik: Chemie Und Physik Der Bildgebung. *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, *34*, 468–473.

(79) Humm, J. L.; Rosenfeld, A.; Del Guerra, A. From PET Detectors to PET Scanners. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 1574–1597.

(80) Ross, T. L.; Wester, H. J. ^{18}F: Labeling Chemistry and Labeled Compounds. In *Handbook of Nuclear Chemistry*; Vértes, A.; Nagy, S.; Klencsár, Z.; Lovas, R. G.; Rösch, F., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2011; pp. 2021–2071.

(81) Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Stöcklin, G. Efficient Stereospecific Synthesis of No-Carrier-Added 2-[^{18}F]-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Using Aminopolyether Supported Nucleophilic Substitution. *J. Nucl. Med.* **1986**, *27*, 235–238.

(82) Ross, T. L.; Ermert, J.; Hocke, C.; Coenen, H. H. Nucleophilic ^{18}F-Fluorination of Heteroaromatic Iodonium Salts with No-Carrier-Added [^{18}F]fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8018–8025.

(83) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click-Chemie: Diverse Chemische Funktionalität Mit Einer Handvoll Guter Reaktionen. *Angew. Chemie* **2001**, *113*, 2056–2075.

(84) Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin, V. V; Van der Eycken, E. A Microwave-Assisted Click Chemistry Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles via a copper(I)-Catalyzed Three-Component Reaction. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4223–4225.

(85) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. CuI-Catalyzed Alkyne-Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *European J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 51–68.

(86) Schieferstein, H.; Ross, T. L. A Polar ^{18}F-Labeled Amino Acid Derivative for Click Labeling of Biomolecules. *European J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 3546–3550.

(87) Ross, T. L. The Click Chemistry Approach Applied to Fluorine-18. *Curr. Radiopharm.* **2010**, *3*, 202–223.

(88) Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. a; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. Readily Accessible Bicyclononynes for Bioorthogonal Labeling and Three-Dimensional Imaging of Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 9422–9425.

(89) Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Dommerholt, J.; Dirks, a T. J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. Bioconjugation with Strained Alkenes and Alkynes. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805–815.

(90) Moderegger, D. Radiolabeling of Defined Polymer Architectures with Fluorine-18 and Iodine-131 for Ex Vivo and in Vivo Evaluation: Visualization of Structure-Property Relationships, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2012.

(91) Sun, Q.; Cai, S.; Peterson, B. R. Practical Synthesis of 3beta-Amino-5-Cholestene and Related 3beta-Halides Involving I-Steroid and Retro-I-Steroid Rearrangements. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 567–570.

(92) Hofmann, A. M.; Wurm, F.; Frey, H. Rapid Access to Polyfunctional Lipids with Complex Architecture via Oxyanionic Ring-Opening Polymerization. *Macromolecules* **2011**, *44*, 4648–4657.

(93) Hofmann, A. M.; Wurm, F.; Hühn, E.; Nawroth, T.; Langguth, P.; Frey, H. Hyperbranched Polyglycerol-Based Lipids via Oxyanionic Polymerization: Toward Multifunctional Stealth Liposomes. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 568–574.

(94) Kelsch, A. Synthese und Charakterisierung von HPMA-stabilisierten Kolloiden, sowie deren Evaluierung in-vitro und in-vivo, 2015.

(95) Rokka, J.; Snellman, A.; Zona, C.; La Ferla, B.; Nicotra, F.; Salmona, M.; Forloni, G.; Haaparanta-Solin, M.; Rinne, J. O.; Solin, O. Synthesis and Evaluation of a ^{18}F-Curcumin Derivate for B-Amyloid Plaque Imaging. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 2753–2762.

(96) Workman, P.; Aboagye, E. O.; Balkwill, F.; Balmain, A.; Bruder, G.; Chaplin, D. J.; Double, J. A.; Everitt, J.; Farningham, D. A. H.; Glennie, M. J.; Kelland, L. R.; Robinson, V.; Stratford, I. J.; Tozer, G. M.; Watson, S.; Wedge, S. R.; Eccles, S. A. Guidelines for the Welfare and Use of Animals in Cancer Research. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 1555–1577.

(97) Dong, J.; Xu, H.; Zhang, F.; Chen, C.; Liu, L.; Wu, G. Synergistic Effect over Photocatalytic Active Cu_2O Thin Films and Their Morphological and Orientational Transformation under Visible Light Irradiation. *Appl. Catal. A Gen.* **2014**, *470*, 294–302.

(98) Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G. Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 9879–9883.

(99) Duncan, I. W.; Culbreth, P. H.; Burtis, C. A. Determination of Free, Total, and Esterified Cholesterol by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* **1979**, *162*, 281–292.

(100) Gould, S.; Scott, R. C. 2-Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin (HP-Beta-CD): A Toxicology Review. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1451–1459.

(101) Williams III, R. O.; Mahaguna, V.; Sriwongjanya, M. Characterization of an Inclusion Complex of Cholesterol and Hydroxypropyl-B-Cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *46*, 355–360.

(102) Mésangeau, C.; Yous, S.; Pérès, B.; Lesieur, D.; Besson, T. Pictet–Spengler Heterocyclizations via Microwave-Assisted Degradation of DMSO. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2465–2468.

(103) Avanti Polar Lipids, Inc. http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=185&Itemid=193.

(104) Barbee, R. W.; Perry, B. D.; Ré, R. N.; Murgo, J. P. Microsphere and Dilution Techniques for the Determination of Blood Flows and Volumes in Conscious Mice. *Am. J. Physiol.* **1992**, *263*, R728–R733.

(105) International Atomic Energy Agency. Cyclotron Produced Radionuclides : Physical Characteristics and Production Methods. *Tech. Reports Ser. No. 468* **2009**, 106–116.

(106) Lee, C.-H.; Olson, P.; Evans, R. M. Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic Diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Endocrinology* **2003**, *144*, 2201–2207.

(107) Fatouros, M.; Bourantas, K.; Bairaktari, E.; Elisaf, M.; Tsolas, O.; Cassioumis, D. Role of the Spleen in Lipid Metabolism. *Br. J. Surg.* **1995**, *82*, 1675–1677.

(108) Creuwels, L. A. J. M.; van Golde, L. M. G.; Haagsman, H. P. Review The Pulmonary Surfactant System : Biochemical and Clinical Aspects. *Lung* **1997**, *175*, 1–39.

(109) Veldhuizen, R.; Nag, K.; Orgeig, S.; Possmayer, F. The Role of Lipids in Pulmonary Surfactant. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1998**, *1408*, 90–108.

(110) Owens, D. E.; Peppas, N. a. Opsonization, Biodistribution, and Pharmacokinetics of Polymeric Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2006**, *307*, 93–102.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

ABC	accelerated blood clearance
ACVA	4,4′-Azobis(4-cyanovaleric acid) (4,4′-Azobis(4-cyanovaleriansäure)
AIBN	Azobisisobutyronitril
BCN	Bicyclo[6.1.0]nonin
BGO	Bismutgermanat
Bq	Becquerel
Ch	Cholesterol
cmc	critical micelle concentration (kritische Mizellenkonzentration)
COT	Cyclooctin
CT	Computertomographie
CuAAC	kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DC / TLC	Dünnschichtchromatopgraphie / thin layer chromatography
DCM	Dichlormethan
DDS	Drug delivery systems (Wirkstofftransportsysteme)
DIBO	Dibenzocyclooctin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPC	1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin
EA	Ethylacetat
EC oder ε	electron capture (Elektroneneinfang)
ESI-MS	Elektrosprayionisationsmassenspektrometrie
EtOH	Ethanol
FD-MS	Felddesorptionsmassenspektrometrie
FETos	Fluorethyltosylat
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometrie
GPC/SEC	Gelpermeationschromatographie / size exclusion chromatography
GSO	Germaniumorthosilikat
*hb*PG	hyperbranched polyglycerol (hyperverzweigtes Polyglycerol)
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoprotein hoher Dichte)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatography)
HPMA	N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid
IC	internal conversion (innere Konversion)
i.d.R.	in der Regel
*i*PrOH	Isopropanol (2-Propanol)
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein niederer Dichte)
LSO	Lutetiumorthosilikat
µPET	Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie
MAC	membrane attack complex (Membranangriffskomplex)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
MRT	Magnetresonanztomographie

*n*Hex	*n*-Hexan
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
p.i.	post injection (nach Injektion)
PP	Polypropylen
Ps	Positronium
PTFE	Polytetrafluorethylen
RAFT	reversible addition-fragmentation chain transfer (Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragung)
RCA	radiochemische Ausbeute
R_f	Retentionsfaktor
R_H	hydrodynamischer Radius
RP-DC	reversed phased (Umkehrphasen)-Dünnschichtchromatographie
RT	Raumtemperatur
SPAAC	spannungsvermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SPECT	Single-photon emission computed tomography (Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie)
TBA(O)H	Tetrabutylammoniumhydroxid
TEA	Triethylamin
TEG	Triethylenglykol
THF	Tetrahydrofuran
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin
Tos/Ts	Tosyl (*p*-Toluolsulfonyl)
t_R	Retentionszeit

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick einiger klinisch relevanter Wirkstofftransportsysteme. 2

Abbildung 2: Schematische Darstellung des EPR-Effekts. 3

Abbildung 3: Schema eines in wässriger Lösung aus Phospholipiden geformten Liposoms. 4

Abbildung 4: Überblick verschiedener Architekturen von polyetherbasierten Lipiden die durch oxoanionische Ringöffnungspolymerisation (ROP) synthetisiert werden. 6

Abbildung 5: Überblick zur Präparation kleiner unilamellarer Vesikel (SUV) mittels Dünnfilm-Hydratationsmethode. 7

Abbildung 6: Modell eines synthetischen, polymeren Wirkstofftransportsystems mit pharmakologischer Aktivität nach H. Ringsdorf. 10

Abbildung 7: Syntheseprinzip der RAFT-Polymerisation mit Aktivesteransatz und anschließender polymeranaloger Reaktion, R: beliebige Funktionalisierung. 11

Abbildung 8: β^+-Umwandlung auf Nuklid- (1) und Nukleonenebene (2). 15

Abbildung 9: Prinzip der Annihilation nach Umwandlung von Fluor-18 in Sauerstoff-18 unter Positronenemission. 16

Abbildung 10: Prinzip der Koinzidenzmessung zweier 511 keV γ-Quanten in der Positronen-Emissions-Tomographie. 18

Abbildung 11: Schematische Darstellung drei verschiedener Koinzidenzfälle. 18

Abbildung 12: Darstellung von 2-Desoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glukose ([^{18}F]FDG).[81] 21

Abbildung 13: Beispiel zur [^{18}F]Fluorethylierung einer nukleophilen Gruppe mittels [^{18}F]FETos. 22

Abbildung 14: Thermische 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkinen mit terminalen Aziden zu disubstituierten 1,2,3-Triazolen, (1): 1,4-Regioisomer, (2): 1,5-Regioisomer. 23

Abbildung 15: Beispielhafte Darstellung von ringspannungsvermittelter 1,3-dipolarer Cycloaddition. 23

Abbildung 16: Konzeptionelles Design der drei Liposomenformulierungen mit drei verschiedenen Lipiden: Cholesterol, lineares Polyethylenglykol mit Cholesterolanker (Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-C≡CH, **a**) und cholesterolverankerte linear-hyperverzweigte Polyether (Ch-PEG$_{30}$-hbPG$_{24}$-CH$_2$-C≡CH, **b**); alle drei Lipide wurden mit Fluor-18 radiomarkiert; zwecks Übersicht sind Polymerketten oder Radiomarkierungen nicht im Inneren des Liposoms gezeigt und nicht maßstabsgetreu gezeichnet. 27

Abbildung 17: Syntheseschema der Polymere Ch-PEG$_{27}$-CH$_2$-C≡CH (**a**) und Ch-PEG$_{30}$-hbPG$_{24}$-CH$_2$-C≡CH (**b**), der hyperverzweigte Teil des Ch-PEG$_{30}$-hbPG$_{24}$-CH$_2$-C≡CH ist nicht maßstabsgetreu gezeichnet. 35

Abbildung 18: Syntheseschema der alkin- bzw. COT-funktionalisierten HPMA-Polymere. 37

Abbildung 19: Bedienfeld des semiautomatischen Moduls zur Synthese von ^{18}F-TEG-N$_3$. 39

Abbildung 20: Aufbau der Unterdruckeinheit zum Eluieren der Kartusche. 41

Abbildung 21: HPLC-Diagramm der Referenzverbindung 3-Fluorocholest-5-en (**2**). 52

Abbildung 22: IR-Spektrum von 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethanol (4). 53

Abbildung 23: IR-Spektrum von 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxyethyl-4-p-toluolsulfonat (5). 54

Abbildung 24: HPLC-Diagramm von 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxyethyl-4-p-toluolsulfonat (5) mit einer Reinheit von 97 %. 55

Abbildung 25: Radio-DC: Aufsicht (Links): Reaktionsgemisch (L2) RCA 95 % und Synthon ^{18}F-TEG-N$_3$ (L1), Aktivitätsprofil (L2) des Reaktionsgemischs (Mitte) und des ^{18}F-TEG-N$_3$ (L1) (Rechts), mobile Phase EA:nHex (1:1). 62

Abbildung 26: Radio-HPLC Diagramm des Click-Synthons ^{18}F-TEG-N$_3$ (**6**), 2x Onyx Monolithic C18, 2 mL/min H$_2$O:MeCN (75:25), t_R (**6**): 3,85 min. 68

Abbildung 27: Radio-HPLC Diagramm des Click-Produkts Ch-PEG_{30}-$hbPG_{24}$-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**), 2x Onyx Monolithic C18, 2 mL/min H_2O:MeCN (75:25), t_R (**^{18}F-b**): 2,12 min, RCA > 98 %. 69

Abbildung 28: Radio-RP-DC: Aufsicht (Links): Reaktionsgemisch aus [^{18}F]Fluorid R_f: 0 und 3-[^{18}F]Fluorocholest-5-en (**9**) R_f: 0,4. RCA 25 %, Aktivitätsprofil des Reaktionsgemischs (Rechts), mobile Phase iPrOH:MeCN (4:1). 71

Abbildung 29: Radio-HPLC zur Abtrennung von [^{18}F]Fluorocholesten t_R: 6,7 min von [^{18}F]Fluorid t_R: 18,7 min (abgeschnitten). 72

Abbildung 30: Radio-HPLC mit schlechten Ausbeuten von [^{18}F]Fluorocholesten t_R: 6,9 min, [^{18}F]Fluorid t_R: 18,7 min. 72

Abbildung 31: Konformation des Cholesterols (3β-Hydroxycholest-5-en). 74

Abbildung 32: Stützgerüst für bis zu drei HiTrap-Kartuschen. 76

Abbildung 33: UV- (oben, 254 nm) und Radio- (unten) HPLC-Diagramme eines HPMA-Polymers mit RCA ~ 35 %, t_R(^{18}F-c/^{18}F-d): 6,1 min, t_R(^{18}F-TEG-N_3 (6)): 13,1 min. 77

Abbildung 34: Mini-Extruder (links) mit Explosionszeichnung (rechts) des Aufbaus (Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Avanti Polar Lipids Inc.).[103] 82

Abbildung 35: Coronale MIPs der Ganzkörperverteilung für frühe (0-3 min) und späte (50-60 min) Zeitpunkte von Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**), Ch-PEG_{30}-$hbPG_{24}$-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) und [^{18}F]Fluorocholesten (**9**) in C57bl6J-Mäusen; Ni: Niere, Bl: Blase, He: Herz, Lu:Lunge, Ve: Vene, Le: Leber, Mi: Milz. 86

Abbildung 36: Coronale MIPs der Ganzkörperverteilung für frühe (0-3 min) und späte (50-60 min) Zeitpunkte der liposomalen Formulierungen von Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F Lipo 20 mol% (**^{18}F-a Lipo**), Ch-PEG_{30}-$hbPG_{24}$-CH_2-triazol-TEG-^{18}F Lipo 20 mol% (**^{18}F-b Lipo**) und [^{18}F]Fluorocholesten Lipo (**9 Lipo**); He: Herz, Lu: Lunge, Ve: Vene, Le: Leber, Gi: Gastrointestinaltrakt, Bl: Blase, Mi: Milz. 88

Abbildung 37: Kalibrationskurve des automatisierten γ-Counters mit Fluor-18. 89

Abbildung 38: Ex vivo-Biodistributionsdaten (n=3) 60 min p.i. von männl. C57bl6J-Mäusen in %ID/g Gewebe der Verbindungen Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**), Ch-PEG_{30}-$hbPG_{24}$-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) und [^{18}F]Fluorocholesten (**9**), Fehler sind als Standardabweichung des Mittelwertes angegeben, Sternchen bedeutet n=2. 90

Abbildung 39: Ex vivo-Biodistributionsdaten (n=3) 60 min p.i. von männl. C57bl6J-Mäusen in %ID/g Gewebe der Verbindungen Ch-PEG_{30}-$hbPG_{24}$-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) und den liposomalen Formulierungen mit 5 und 20 mol% Polymerzugabe (R_H: 86 bzw. 83 nm), Fehler sind als Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. 93

Abbildung 40: Ex vivo-Biodistributionsdaten (n=3) 60 min p.i. von männl. C57bl6J-Mäusen in %ID/g Gewebe der Verbindungen Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**) und der liposomalen Formulierung mit 20 mol% Polymerzugabe (**^{18}F-a Lipo 20%**, R_H: 46 nm), Fehler sind als Standardabweichung des Mittelwertes angegeben, Sternchen bedeutet n=2. 94

Abbildung 41: Ex vivo-Biodistributionsdaten (n=3) 60 min p.i. von männl. C57bl6J-Mäusen in %ID/g Gewebe der Verbindungen [^{18}F]Fluorocholesten (**9**) und der liposomalen Formulierung [^{18}F]Fluorocholesten (**9 Lipo**, R_H: 204 nm), Fehler sind als Standardabweichung des Mittelwertes angegeben, Sternchen bedeutet n=2. 95

Abbildung 42: Vergleich der ex vivo-Biodistributionsdaten (n=3) 60 min p.i. von männl. C57bl6J-Mäusen in %ID/g Gewebe der untersuchten liposomalen Systeme (**^{18}F-a Lipo 20%** (R_H: 46 nm), **^{18}F-b Lipo 20%** (R_H: 83 nm) und **9 Lipo** (R_H: 204 nm)), Fehler sind als Standardabweichung des Mittelwertes angegeben, Sternchen bedeutet n=2. 96

Abbildung 43: Blut-zu-Organ-Verhältnisse aus ex vivo-Biodistributionsdaten der liposomalen Formulierungen Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a Lipo 20%**, dunkelgrau) und Ch-PEG_{30}-$hbPG_{24}$-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b Lipo 20%**, cyan), Fehler wurden durch Fehlerfortpflanzung der Standardabweichung berechnet, Sternchen bedeutet P < 0,05. 97

Abbildung 44: Darstellung und Bezeichnung der drei radiofluorierten Cholesterolderivate. 99

Abbildung 45: Konzeptionelles Design der drei Liposomenformulierungen; zwecks Übersicht sind Polymerketten oder Radiomarkierungen nicht im Inneren des Liposoms gezeigt und nicht maßstabsgetreu gezeichnet. 100

Abbildung 46: Strukturen der HPMA-basierten Polymere zur CuAAC- und SPAAC-Radiomarkierung mittels ^{18}F-TEG-N_3. 102

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht ausgewählter bildgebender Verfahren in der präklinischen Anwendung (entnommen aus James und Gambhir[67]). 14

Tabelle 2: Überblick einiger wichtiger Positronenemitter in der PET.[76] 17

Tabelle 3: Übersicht der HPMA-basierten Polymere mit Alkin- oder COT-Funktionalisierung. 38

Tabelle 4: Zusammensetzung verschiedener liposomaler Formulierungen mit Ch-PEG_{27}-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-a**), Ch-PEG_{30}-$hbPG_{24}$-CH_2-triazol-TEG-^{18}F (**^{18}F-b**) und [^{18}F]Fluorocholesten (**9**). 48

Tabelle 5: HPLC-Gradient zu Abbildung 24. 54

Tabelle 6: Überblick der durchgeführten CuAAC-Reaktionen von Ch-PEG_{27}-CH_2-C≡CH (**a**) mit ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) zu **^{18}F-a** bei 70 °C für 15 min (* 10 min), n: Anzahl der durchgeführten Reaktionen, RCA: radiochemische Ausbeute (mit DC bestimmt, bei Mehrfachbestimmungen als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD)), Bei Mehrfachbestimmungen ist die Aktivität (A) als Bereich und in Klammern als MW ± SD angegeben. 59

Tabelle 7: Überblick der durchgeführten CuAAC-Reaktionen von Ch-PEG_{30}-$hbPG_{24}$-CH_2-C≡CH (**b**) mit ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) zu **^{18}F-b**. Reaktionszeit 15 min (* 10 min), n: Anzahl der durchgeführten Reaktionen, RCA: radiochemische Ausbeute (mit DC bestimmt, bei Mehrfachbestimmungen als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD)), Bei Mehrfachbestimmungen ist die Aktivität (A) als Bereich und in Klammern als MW ± SD angegeben. 65

Tabelle 8: Überblick der durchgeführten mikrowellengestützten CuAAC-Reaktionen von Ch-PEG_{30}-$hbPG_{24}$-CH_2-C≡CH (**b**) mit ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) zu **^{18}F-b**. Reaktionszeit 1 min ramp + 3 min hold (* 1 min ramp + 5 min hold), p_{max}: 18 bar, n: Anzahl der durchgeführten Reaktionen, RCA: radiochemische Ausbeute (mit DC bestimmt, bei Mehrfachbestimmungen als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD)), Bei Mehrfachbestimmungen ist die Aktivität (A) als Bereich und in Klammern als MW ± SD angegeben. 67

Tabelle 9: Überblick konventioneller CuAAC-Reaktionen von ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) und alkinfunktionalisierten HPMA Polymeren **c** (M_w: 12000) und **d** (M_w: 60000) zu **^{18}F-c** und **^{18}F-d**, Einwaage (c oder d): 1 mg, n($CuSO_4$): 20 µmol, n(Na-Ascorbat): 100 µmol, Reaktionszeit t: 20 min, radiochemische Ausbeute (RCA) mit DC bestimmt. 75

Tabelle 10: Überblick konventioneller SPAAC-Reaktionen von ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) und COT-funktionalisierten HPMA Polymeren **e** (M_w: 12500) und **f** (M_w: 61000) zu **^{18}F-e** und **^{18}F-f**, Einwaage (**e** oder **f**): 1 mg, Reaktionszeit t: 20 min, radiochemische Ausbeute (RCA) mittels DC bestimmt. 78

Tabelle 11: Überblick mikrowellengestützter SPAAC-Reaktionen von ^{18}F-TEG-N_3 (**6**) und COT-funktionalisierten HPMA Polymeren **e** (M_w: 12500) und **f** (M_w: 61000) zu **^{18}F-e** und **^{18}F-f**, Reaktionszeit: 1 min ramp + t_{hold}, p_{max}: 18 bar, radiochemische Ausbeute (RCA) mittels DC bestimmt. 79

7. Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Univ.-Prof. Dr. F. Rösch in der Zeit vom 01.01.2012 bis zum 28.01.2015 am Institut für Kernchemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Ich versichere, dass ich die Arbeit selbst durchgeführt und keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Achim Reibel
Mainz, Januar 2015