



KINOLIINIRUNKOISTEN FIBROPLASTIEN
AKTIVAATIOPROTEIININ ESTÄJIEN (FAPI)
KÄYTTÖ SYÖVÄN PET-KUVANTAMISESSA

Lotta Uusitalo
Pro Gradu-tutkielma
Radiofarmaseuttinen kemia
Kemian laitos
Turun yliopisto
Huhtikuu 2022

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

TURUN YLIOPISTO

Kemian Laitos

Lotta Uusitalo: Kinoliinirunkoisten fibroblastien aktivaatioproteiinin estäjien (FAPI) käyttö syövän PET-kuvantamisessa

Pro Gradu-tutkielma, 32 s.

Huhtikuu 2022

Syövän PET-kuvantaminen on yleistynyt viimeisen vuosikymmenen aikana paljon ja uusien, syöpäspesifien, PET-merkkiaineiden kysyntä on tämän vuoksi kasvussa. Uusien merkkiaineiden kehitystä hidastaa se, että syövän syntymekanismia tai kehitystä ei tunneta vielä täysin ja tämän vuoksi kohdespesifisten PET-merkkiaineiden valmistus on ollut haastavaa.

Viime vuosien aikana niin klassinen lääkekehitys kuin PET-radiolääkekehitys ovat kiinnostuneet fibroblastien aktivaatioproteiinin inhibiittoreista (FAPI). FAPI:t toimivat estäjinä fibroblastien aktivaatioproteiinille, jota esiintyy elimistössä aikuisilla fibroottisessa kudoksessa, kasvaimissa sekä tietyissä autoimmuunisairauksissa, mutta ei terveessä kudoksessa.

FAPI:en etuna on se, että ne ovat spesifisiä fibroblastien aktivaatioproteiineille, joita ei esiinny terveessä kudoksessa. Tutkimuksissa on havaittu, että FAP:ia ilmentäviä syöpiä on useita, esimerkiksi paksusuolen ja haiman syövät sekä keskushermoston glioblastoomat. Kinoliinirunkoisia FAPI-merkkiaineita on tutkittu ^{68}Ga -, ^{177}Lu -, ^{125}I - ja ^{131}I -leimattuina, muttei suoraan kinoliinirunkoon tehdyllä ^{18}F -leimauksella. ^{68}Ga -leimatulla FAPI:lla tehdyt vertailututkimukset [^{18}F]FDG:n kanssa ovat olleet hyvin lupaavia.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli valmistaa kinoliinirunkoinen FAPI ja leimata se käyttämällä elektrofiilistä ^{18}F -fluorausmenetelmää. ^{18}F -radioleiman olisi tarkoitus olla suoraan kiinni kinoliinirungossa, koska se olisi metabolisesti pysyvämpi. Toistaiseksi ei ole saatu valmistettua trimetyylitinattua leimauslähtöainetta, mutta leimausreaktiota on tutkittu kinoliinirunkoisella mallimolekyylillä.

Avainsanat: fibroblastien aktivaatioproteiinien estäjä, elektrofiilinen ^{18}F -leimaus, positroniemissiotomografia, kinoliinirakenne

Sisällysluettelo

1 JOHDANTO	1
1.1 Positroniemissiotomografia	1
1.1.1 PET-merkkiaineiden ominaisuudet	2
1.1.2 Fluori-18:n ominaisuudet ja käyttö PET-merkkiaineissa	3
1.1.3 Fluori-18 leimausreaktiot	5
1.2 Syövän kuvantaminen positroniemissiotomografian avulla	7
1.2.1 Aineenvaihdunnan muutosta hyödyntävät PET-merkkiaineet	8
1.3 Fibroblastien toiminta ja vaikutukset elimistössä	9
1.3.1 FAP:n ilmentyminen sairauksissa sekä terveessä kudoksessa	11
1.4 FAPI:en käyttö PET-merkkiaineena	11
1.4.1 Kinoliinirungon vaikutus FAPI:in	12
1.4.2. ⁶⁸ Ga-, ¹²⁵ I- ja ¹³¹ I-leimatut FAPI:t	13
1.4.3. Fluori-18:lla leimatut FAPI:t	15
1.5 Tutkimuksen tarkoitus	16
2. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	16
2.1. Lähtöaineen synteesi	17
2.2. Radioleimaus	18
3. JOHTOPÄÄTÖKSET	19
4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	19
4.1. Yleiset menetelmät	19
4.2. Lähtöaineen synteesi	20
4.2.1. Dimetyyliketoglutaraatti (2)	20
4.2.2. Dimetyylibromoketoglutaraatti (3)	20
4.2.3. Dimetyyli-2-ketoglutagonaatti (4)	20
4.2.4. 5-bromikinoliini-2,4-diesteri (5)	21
4.2.5. 5-bromikinoliini-2,4-dikarboksylihappo (6)	21
4.2.6. 5-bromikinoliini-2,4-monokarboksylihappo (7)	21
4.2.7. (S)-tert-butyyl 2-(2-karbamoyylipyrrolidin-1-yyli)-2-oksoetylikarbamaatti (8)	22
4.2.8. (S)-tert-butyyl 2-(2-syanopyrrolidin-1-yyli)-2-oksoetylikarbamaatti (9)	22
4.2.9. (S)-1-(2-amonoasetyyli)pyrrolidiini-2-karbannitriili-4-metyylibentseenisulfonaatti (10)	23
4.2.10. Mallimolekyylin stanylointireaktio (14)	23
4.2.10. Mallimolekyylin fluorausreaktio (15)	23
4.3. Radiokemian yleiset menetelmät	24
4.4. Radioleimaus	25
5. VIITTEET	26

Lyhenneluettelo

AADC	Aromaattisten aminohappojen dekarboksylaasi; Aromatic Aminoacid Decarboxylase
AgOTf	Hopeatriflaatti
A _m	Molaarinen aktiivisuus
BBB	Veriaivoeste; Blood Brain Barrier
Boc. glysiini	N-(tert-Butoksikarbonyyli)glysiini
c.a.	Kantaja lisätty, Carrier Added
CAF	Syöpäsidedekudossolut; Cancer-associated Fibroblasts
CDCl ₃	Trikloori(deuterium)metaani
CH ₃ CN	Asetonitriili
CF ₄	Tetrafluorimetaani
CH ₃ F	Fluorimetaani
CH ₃ I	Jodimetaani
DAT	Dopamiinin kuljettaja; Dopamine Transporter
DCM	Dikloorimetaani
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylietyyliamiini
DMF	<i>N,N</i> -Dimetyyliformamidi
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DOTA	2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-Tetraatsasyklo-oktododekaani-1,4,7,10 tetrayyli)tetraetikkahappo
DPP	Dipeptidyylipeptidaasi
EC	Elektronin sieppaus; Electron Capture
EOB	Säteilytyksen loppu; End of Bombardment
EtOAc	Etyyliasetatti
FAP	Fibroblastien aktivaatioproteiini
FAPI	Fibroblastien aktivaatioproteiinien inhibitori
FDG	2-deoksi-2-[¹⁸ F]fluori-D-glukoosi
FDOPA	6-[¹⁸ F]fluori- <i>L</i> -DOPA
F-DPA	<i>N,N</i> -dietyyli-2-[4-(2-fluorifenyyli)-5,7-dimetyylipyratsoli[1,5- <i>a</i>]pyrimidiini-3-asetamidi
GLUT	Glukoosin kuljettaja; Glucose Transporter
HATU	1-[Bis(dimetyyliamino)metyleeni]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridiinium 3-oksidi heksafluorifosfaatti

Hex	Heksaani
HF	Vetyfluoridi
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia; High-performance Liquid Chromatography
Kryptofix®2.2.2.	4,7,13,16,21,24-Heksaoksa-1,10-diatsabisyklo[8.8.8]heksakosaani
LiOTf	Litiumtriflaatti
MK	Magneettikuvaus
n.c.a.	Ei-kantajalisätty, Non-carrier Added
NET	Neuroendogriininen kasvain; Neuro Endocrinic Tumors
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi; Nuclear Magnetic Resonance
NOTA	1,4,7-triatsasyklononaani-1,4,7-trietikka happo
PET	Positroniemissiotomografia
(PPh ₃) ₂ PdCl ₂	Bis(trifenyylifosfiini)palladium(II)kloridi
PTC	Faasinsiirtokatalyytti, Phase Transfer Catalyst
RCY	Radiokemiallinen saanto; Radiochemical Yield
TFA	Trifluoretikkahappo; Trifluoroacetic Acid
THF	Tetrahydrofuraani
TLC	Ohutlevykromatografia; Thin Layer Chromatography
TT	Tietokonetomografia

1 JOHDANTO

1.1 Positroniemissiotomografia

Positroniemissiotomografia (PET) on lääketieteellinen kuvantamismenetelmä, jossa hyödynnetään lyhytikäisiä positroniemittoivia radionuklideja. PET-kuvantamisen avulla voidaan tutkia biologisia rakenteita ja aineenvaihduntaa reaaliaikaisesti *in vivo*. Kuvantamismenetelmänä se on kajoamaton ja hyvin herkkä. PET-kuvantaminen perustuu positroniemissioon. Kun lyhytikäinen radionuklidi hajoaa β^+ -hajoamisella, emittoituu matalaenerginen positroni. Positronin kohdatessa elektronin tapahtuu annihilaatio, jossa syntyy kaksi saman energistä 511 keV:n gammakvanttia. Gammakvantit lähtevät 180° kulmassa toisistaan pois päin ja PET-laitteen gammailmaisimet havaitsevat ne.¹

PET-kuvantaminen perustuu radioaktiivisessa hajoamisessa syntyvien gamma kvanttien havaitsemiseen ja yleisimmin käytetyt radionuklidit ovat suhteellisen lyhytikäisiä. Taulukossa 1 on esitetty yleisimpiä PET-tutkimuksissa käytettyjä radionuklideja sekä niiden tärkeimpiä ominaisuuksia mm. puoliintumisaika ($t_{1/2}$) ja positronien maksimienergia. PET-radionuklidien tulisi olla mahdollisimman puhtaita positronisäteilijöitä ja niiden positronien maksimienergian tulisi olla verrattain matala. Mitä alhaisempi maksimienergia on, sitä lyhyemmän matkan positroni kulkee väliaineessa, ja sitä parempi paikkaresoluutio saavutetaan PET-kuvantamisessa.²

Taulukko 1. Yleisimpiä PET-merkkiaineissa käytettyjä β^+ -hajoavia radionuklideja.^{3,4}

Radionuklidi	Puoliintumisaika [min.]	Positronin maksimi- energia [MeV]	Vedessä kuljettu matka ka. (mm)	Hajoaminen
^{11}C	20,4	0,96	0,3	99 % β^+ 1 % elektronin sieppaus
^{15}O	2,10	1,72	1,5	100 % β^+
^{18}F	110	0,64	0,2	97 % β^+ 3 % elektronin sieppaus
^{68}Ga	68,0	1,89	1,9	88 % β^+ 11 % elektronin sieppaus

1.1.1 PET-merkkiaineiden ominaisuudet

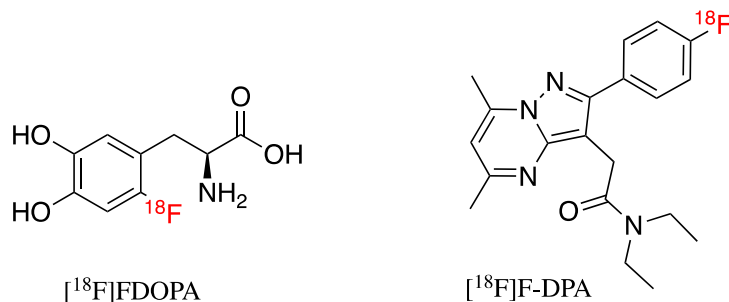
PET-merkkiaineille on paljon samoja vaatimuksia kuin klassisille lääkeainemolekyyleille, kuten korkea kohdespesifisyys ja haitallisten aineenvaihdunnan tuotteiden vähäisyys. Riippuen PET-merkkiaineen kohteesta lipofiilisyys sekä molekyylipaino voivat olla keskeisiä tekijöitä. Keskushermoston kuvantamiseen käytettävät molekyylit ovat usein pienikokoisia ja verrattain lipofiilisiä. Klassisille lääkeaineille on määritetty suuntaa antava molekyylipaino ($M < 450$ Da) sekä polaarille pinta-alalle vähimmäiskoko (90 Å). Molekyylit, jotka täyttävät nämä arvot läpäisevät veriaivoesteen todennäköisemmin ja näitä samoja raja-arvoja voidaan soveltaa myös radiolääkemolekyyleille.⁵ Merkkiaineiden tulee olla myös hyvin kohdespesifejä, jotta niiden antama PET-kuva on tarkka ja luotettava.

Kaikkein merkittävin ominaisuus, jota PET-merkkiaineelta vaaditaan, on riittävän korkea molaarinen aktiivisuus (A_m). PET-merkkiaineen tulee toimia vain diagnostisesti, ei terapeutisesti.⁶ Radiomerkkiaineen molaarinen aktiivisuus kertoo näytteen aktiivisuuden ainemääräyksikköissä,⁷ eli mitä korkeampi näytteen A_m on, sitä useampi molekyyleistä sisältää radioaktiivisen leiman. Korkea molaarinen aktiivisuus on ehdoton vaatimus erityisesti, kun kuvannettavan kohteen määrä elimistössä on alhainen esim. keskushermoston reseptorit tai kun radiomerkkiaine on hyvin potenti.

Kun kuvannettavana kohteena on puolestaan aineenvaihdunnan tuote tai reseptori, jonka tuotanto elimistössä on lisääntynyt tai niitä on luonnostaan paljon, korkea molaarinen aktiivisuus ei ole yhtä kriittinen tekijä.⁸ Korkea molaarinen aktiivisuus mahdollistaa esimerkiksi sen, että PET-merkkiaineita voidaan käyttää ainemäärällisesti vähemmän. Tämän ansiosta voidaan käyttää molekyylejä jotka ovat hyvinkin myrkyllisiä, kuten karfentaniiliä.⁹ Alhainen molaarinen aktiivisuus johtaa kohteen saturoitumiseen ei-radioaktiivisella molekyylillä ja näin vaikuttaa PET-kuvan laatuun heikentävästi.

6-^[18F]fluori-*L*-DOPA (^[18F]FDOPA) (kuva 1) on dopamiinin analogi ja sitä on käytetään tutkittaessa esimerkiksi Parkinsonin tautia potilailla, koska merkkiaineen avulla voidaan kuvantaa aivojen tyvitumakkeita.¹⁰ Myöhemmissä tutkimuksissa on havaittu, että ^[18F]FDOPA:n avulla voidaan kuvantaa ja tutkia myös neuroendokriinisiä kasvaimia

(NET).¹¹ [¹⁸F]FDOPA on hyvä esimerkki radiomerkkiaineesta, jota valmistetaan edelleen sekä elektrofiilisellä että nukleofiilisellä ¹⁸F-fluorauksella. Elektrofiilisella ¹⁸F-fluoraksella saavutettava molaarinen aktiivisuus jää alle 1 GB/μmol.¹²



Kuva 1. [¹⁸F]FDOPA:n ja [¹⁸F]F-DPA:n rakennekaavat

Vuonna 2019 julkaistussa tutkimuksessa¹³ puolestaan tarkasteltiin molaarisen aktiivisuuden vaikutusta Parkinsonin taudin kuvantamisessa hiirillä *N,N*-dietyyli-2-[4-(2-[¹⁸F]fluori)fenyyli]-5,7-dimetyylipyratsoli[1,5-*a*]pyrimidiini-3-asetamidi ([¹⁸F]F-DPA) (kuva 1) merkkiaineen avulla. Tutkittavia hiiriä kuvattiin [¹⁸F]F-DPA:lla jonka molaarinen aktiivisuus oli 990 GBq/μmol (nukleofiilinen ¹⁸F-fluoraus) sekä 9 GBq/μmol (elektrofiilinen ¹⁸F-fluoraus). Tulokseksi saatiin, että matalammalla molaarisella aktiivisuudella kuvannettavan kohteen saturoituminen oli suurempaa kuin korkean molaarisen aktiivisuuden [¹⁸F]F-DPA:lla. Silti matalammankin molaarisenaktiivisuuden [¹⁸F]F-DPA:lla pystyttiin havaitsemaan merkittävä ero PET-kuvissa muuntogeenisten hiirien ja terveiden verrokkien välillä.

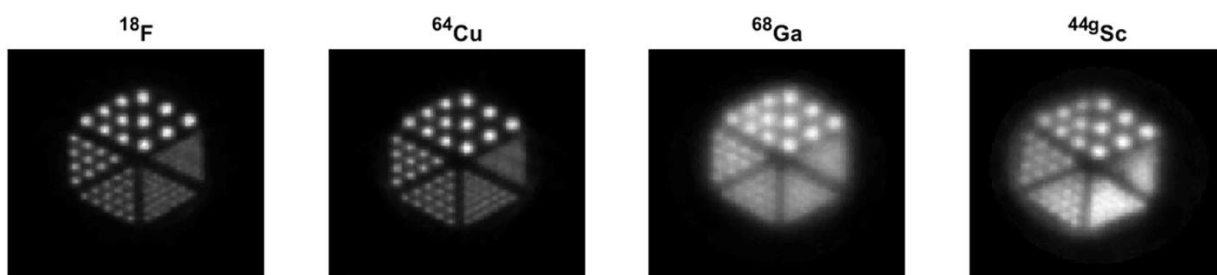
1.1.2 Fluori-18:n ominaisuudet ja käyttö PET-merkkiaineissa

Fluori on alkuaineista elektronegatiivisin ja se pystyy muodostamaan vetysidoksia. Sen atomin koko on pieni ja se muodostaa vahvan kovalenttisen sidoksen hiilen kanssa. Fluori voi toimia myös bioisosteerinä hapelle sekä vedylle. Fluori- ja happimolekyylien koko ja elektronegatiiviset ominaisuudet ovat hyvin samankaltaiset kun taas vedyllä ja fluorilla valenssielektronien ominaisuudet ovat samanlaiset.¹⁴ Näiden ominaisuuksien ansiosta ¹⁸F-leima ei muuta radiomerkkiaineen kokoa merkittävästi vaikka vaikuttaakin sen kemiallisiin tai biologisiin ominaisuuksiin. Fluorin kyky muodostaa vahva kovalenttinen

sidos aromaattiseen hiileen lisää ^{18}F - leimattujen merkkiaineiden biologista puoliintumisaikaa, koska tällöin merkkiaine ei ole altis entsymaattiselle defluorinaatiolle.

Fluori-18 on laajalti käytetty radionuklidi PET-tutkimuksessa, koska sen biologiset, kemialliset sekä fysikaaliset ominaisuudet ovat sopivat PET-kuvantamiselle. Sen puoliintumisaika (109,8 min.) on verrattain pitkä muihin PET-tutkimuksessa käytettäviin radionuklideihin. Tämän lisäksi fluori-18:n positronin maksimienergia on matala (Taulukko 1.). Fluori-18 voidaan tuottaa hiukkaskiihdyttimellä joko ^{18}O -rikastetusta vedestä tai $[^{18}\text{O}]\text{O}_2$ -kaasusta ydinreaktiolla $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$.¹⁴

Gallium-68 on radiometalli, jonka puoliintumisaika on noin puolet fluori-18:n puoliintumisajasta. Se on laajalti käytetty radiometalli, joka liitetään merkkiainemolekyyleihin kelaattoriosan avulla. Yleisesti käytettyjä kelaattoreja ovat mm. 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-Tetraatsytklo-oktododekaani-1,4,7,10 tetrayyli)tetraetikka-happo (DOTA) sekä 1,4,7-triatsytklononaani-1,4,7-trietikka happo (NOTA).¹⁵ Gallium-68:n ja fluori-18:n emittoimien positronien maksimienergiat on esitetty taulukossa 1. josta voidaan nähdä, että gallium-68:n emittoiman positronin maksimienergia on lähes kolminkertainen verrattuna fluori-18:n emittoiman positronin maksimienergiaan. Kuvassa 2 on esitetty visuaalisesti, miten gallium-68 ja fluori-18 kuvaresoluutiot eroavat toisistaan. Kuvannettaessa pieniä kohteita, esim. pieniä kasvaimia, korostuu hyvän paikkaresoluution merkitys.



Kuva 2. Kuvassa on esitetty fluori-18:n, kupari-64:n, gallium-68:n ja skandium-44g:n kuvanlaadun erot rekonstruktoiduissa tilaresoluutio harjoitusmallikuvissa (spatial resolution phantom).¹⁶

1.1.3 Fluori-18 leimausreaktiot

Fluori-18 voidaan liittää leimattavaan yhdisteen nukleofiilisellä substituutilla, jolloin leimauslähtöaineena toimii $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ -ioni tai elektrofiilisellä additiolla, jolloin leimausreaktioissa käytetään $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -kaasua tai muuta elektrofiilistä ^{18}F -fluorausreagenssia. Näiden kahden menetelmän merkittävin ero on se, että nukleofiilinen ^{18}F -fluorausreaktio on kantajalisäämätön (non-carrier added; n.c.a.) kun taas elektrofiilinen ^{18}F -fluorausreaktio on kantajalisätty. (carrier added; c.a.). Tämä tarkoittaa sitä, että elektrofiilisessä ^{18}F -fluorauksessa joudutaan käyttämään ei-radioaktiivista F_2 -kaasua kantajakaasuna elektrofiilisen leimausreagenssin valmistuksessa, jolloin saavutettava molaarinen aktiivisuus laskee merkittävästi. Saavutettavasta alhaisemmasta molaarisesta aktiivisuudesta huolimatta, elektrofiilistä ^{18}F -fluorauksta tarvitaan edelleen sellaisten yhdisteiden leimaamiseen, joiden leimaaminen nukleofiilisesti on hyvin hankalaa tai mahdotonta.

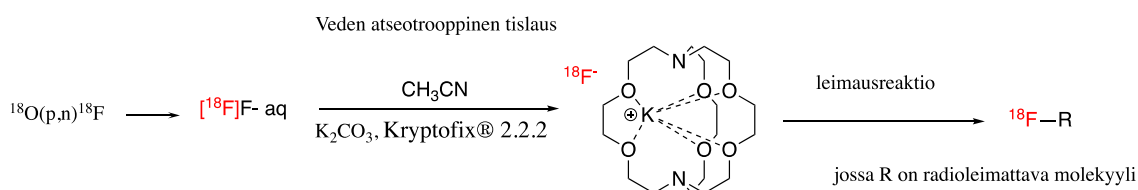
Viimeisen vuosikymmenen aikana on kehitetty uusia leimausmenetelmiä, jotka mahdollistavat nukleofiilisen ^{18}F -fluorauksen elektrofiiliseen rakenteeseen molekyylissä. Kyseessä on siirtymämetallivälitteinen ^{18}F -fluoraus.¹⁷ Käyttämällä siirtymämetallikomplekseja ^{18}F -fluorauksessa, voidaan vaikuttaa leimattavan merkkiaineen tai ^{18}F -fluoridin elektronisiin ominaisuuksiin. Leimausreaktioissa on käytetty palladiumia¹⁸, kuparia¹⁹, nikkeliä²⁰ sekä ruteniumia²¹.

Nukleofiilinen ^{18}F -fluoraus

Nukleofiilistä $[^{18}\text{F}]\text{fluoridia}$ valmistetaan ^{18}O -rikastetusta vedestä, joten $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ saadaan hiukkaskiihdyttimeltä vesiliuoksessa. Fluorin elektronitiheys on suuri, joten se muodostaa veden kanssa paljon vetysidoksia.²² $[^{18}\text{F}]\text{fluoridi}$ on käytännössä ympäröity vesimolekyyleillä, eikä fluoridi-ioni ole tällöin reaktiivinen, joten ennen kuin $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$:a voidaan käyttää leimausreaktioissa, täytyy se aktivoida poistamalla vesi. $[^{18}\text{F}]\text{fluoridin}$ aktivoimiseen (Kaava 1.) käytetään usein atseotrooppista tislausta. Menetelmässä vesi haihdutetaan pois asetonitriilin avulla ja $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ siirretään vesifaasista orgaaniseen faasiin.

$[^{18}\text{F}]\text{fluoridin}$ siirrossa faasista toiseen käytetään faasinsiirto-katalyyttiä (Phase transfer catalyst; PTC) kuten Kryptofix®2.2.2. tai kruunueetteriä 18-kruunu-6:tta.²³ PTC:ssä on

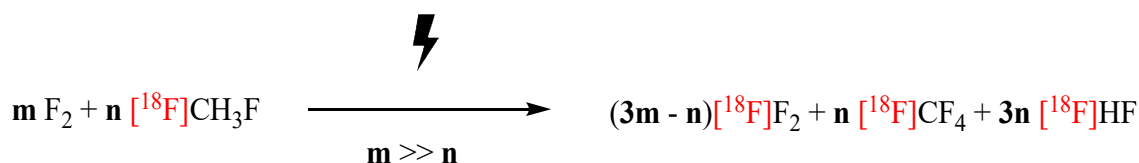
pehmeä keskusligandi, esim. kalium-ioni, jonka kanssa $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ voi muodostaa kompleksin. Kun vesi on poistettu reaktioseoksesta ja $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ on siirretty orgaaniseen faasiin, voi leimausreaktio tapahtua.¹⁴ $[^{18}\text{F}]\text{fluoridi-ioni}$ reagoi helposti myös protonilähteiden kanssa muodostaen $[^{18}\text{F}]\text{HF}$:a joka on ei-toivottu sivutuote. $[^{18}\text{F}]\text{HF}$:n syntyminen voidaan ehkäistä tekemällä reaktio polaarissa aproottisessa liuotuksessa kuten asetonitriilissä (CH_3CN), dimetyylisulfoksidissa (DMSO) tai tetrahydrofuraanissa (THF).¹⁴



Kaava 1. $[^{18}\text{F}]\text{fluoridi-ionin}$ aktivointi veden atseotrooppisen tislauksen avulla

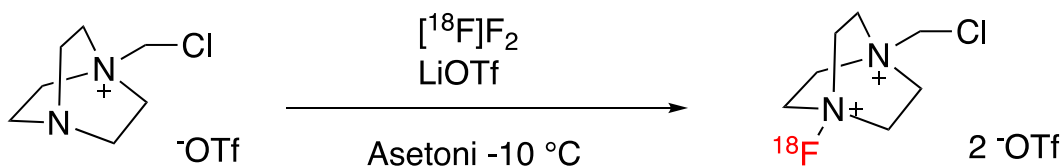
Elektrofiilinen ^{18}F -fluoraus

Aikaisemmin $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$:ta valmistettiin käyttämällä ydinreaktiossa $[^{18}\text{O}]\text{O}_2$ -kaasua tai ^{20}Ne -kaasua, jolloin säteilytyksen lopuksi $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ siirrettiin kuumakemiakammioon ja käytettiin elektrofiilisessä leimausreaktiossa. Menetelmän heikkoutena oli saatavan $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$:n matala molaarinen aktiivisuus (0,05 – 0,1 GBq/ μmol).²⁴ Myöhemmin kehitetyllä niin kutsutulla post-target-menetelmällä²⁵ (Kaava 2) voidaan valmistaa $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -kaasua korkeammalla molaarisella aktiivisuudella lähtien liikkeelle $[^{18}\text{F}]\text{fluoridista}$. Menetelmässä valmistetaan ensin $[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{F}$ nukleofiilisellä ^{18}F -fluorauksella aktivoitusta $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$:sta ja CH_3I :sta. $[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{F}$ ja tunnettu määrä F_2 -kaasua sekoitetaan keskenään ja seokseen johdetaan korkeajännitteinen sähköpurkaus, jolloin muodostuu $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -kaasua. Korkeajännitteinen sähköpurkaus (n. 30 kV) hajottaa kaasut atomeiksi, jonka jälkeen atomin uudelleen järjestäytyvät muodostaen erilaisia ^{18}F -leimattuja yhdisteitä. Nämä yhdisteet ovat esitetty kaavassa 2. Saatavan $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -kaasun saanto on kohtuullinen, kun reaktiossa käytettävän ei-radioaktiivisen fluorikaasun määrä (m) on huomattavasti suurempi kuin $[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{F}$:n (n). Post-target-menetelmällä valmistettavan $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -kaasun molaarinen aktiivisuus voi olla jopa 50 GBq/ μmol .²⁵



Kaava 2. ^{18}F F₂:n valmistus post-target menetelmällä²⁵

Fluorikaasu on erittäin reaktiivinen ja se reagoi voimakkaasti ja onkin leimausreagenssina vähemmän selektiivinen verrattuna nukleofiilisessä ¹⁸F-fluorauksessa käytettävään [¹⁸F]fluoridiin. [¹⁸F]F₂:n aggressiiviset reaktiot johtavat yleensä ei-toivottuihin sivutuotteisiin, joiden puhdistaminen vie aikaa.²⁶ Ongelma on ratkaistu kehittämällä elektrofiiliseen ¹⁸F-fluoraukseen vähemmän reaktiivisia leimauslähtöaineita elektrofiiliseen ¹⁸F-fluoraukseen. Selectfluorin (*bis*)triflaatti on hyvä esimerkki tällaisesta leimauslähtöaineesta. Sen selektiivisyys on parempi kuin fluorikaasulla ja sen lähtöaine on saatavilla kaupallisesti ja sen käsittely on suhteellisen helppoa.²⁷ Kun Selectfluorin leimauksessa käytetään post-target-menetelmällä valmistettua [¹⁸F]F₂:ta, saavutetaan leimatulle merkkiaineelle lopussa kohtalainen molaarinen aktiivisuus (20 GBq/μmol).²⁶ Kaavassa 3. on esitetty [¹⁸F]Selectfluorin (*bis*)triflaatin leimausreaktio.



Kaava 3. Selectfluorin (*bis*)triflaatin leimausreaktio [¹⁸F]F₂ -kaasulla

1.2 Syövän kuvantaminen positroniemiisiotomografian avulla

PET-kuvantaminen on kehittynyt nopeasti viimeisten vuosikymmenien aikana ja tarjonnut uudenlaisen *in vivo* -kuvantamismenetelmän tietokonetomografian (TT), magneettikuvauksen (MK), röntgenkuvantamisen sekä ultraäänitutkimuksen lisäksi. Kun vuonna 1976 havaittiin²⁸, että 2-deoksi-2-¹⁸Ffluoriglukoosia ([¹⁸F]FDG) voidaan käyttää kasvainten kuvantamiseen, on siitä tullut kolmessa vuosikymmenessä yksi maailman käytetyimmistä PET-merkkiaineista.²⁹ Vuonna 2019 suurin osa (90 %) [¹⁸F]FDG:llä tehdyistä kuvantamisista olivat syöpäkuvantamisia.³⁰

[¹⁸F]FDG:n ja muiden PET-merkkiaineiden käyttö syöpädiagnostiikassa on kasvanut viimeisten vuosikymmenten aikana ja uusia PET-merkkiaineita kehitetään jatkuvasti. Silti yhtenä suurimpana haasteena on ollut kehittää riittävän kohdespesifisiä merkkiaineita. Yksi merkittävimmistä syistä on se, että syöpään ja sen kehittymiseen liittyy vielä paljon osa-alueita, joita ei ymmärretä.³¹ Kohdespesifimpien merkkiaineiden avulla diagnosointi olisi luotettavampaa ja varmempaa jo varhaisessa taudinvaiheessa. Tällöin myös hoidon aloitus syövän varhaisessa vaiheessa olisi mahdollista sekä hoidon seuranta parempaa.

Tämän hetken tärkein kehityskohde syöpäkuvantamista ajatellen, on kehittää menetelmiä, joiden avulla kasvaimet voidaan havaita mahdollisimman aikaisessa vaiheessa sekä seurata sairauden kulkua ja hoidon onnistumista. Tutkimukset ovat osoittaneet, että jos syöpä tunnistetaan jo ensimmäisessä vaiheessa, on potilaan viiden vuoden henkiinjäämismahdollisuus yli 90 %.³² Syövän ensimmäisellä vaiheella (tai *in situ* vaiheella) tarkoitetaan syövä vaihetta, jossa syöpäkudos ei ole levinnyt vielä muihin kudoksiin.³³ Keinot, joilla isotooppilääketiede voi nopeuttaa syövän aikaista toteamista ovat mm. uusien ja spesifiempien merkkiaineiden kehittäminen. Tällä hetkellä laajalti käytössä olevan [¹⁸F]FDG:n toiminta perustuu syöpäkudoksen tai kasvaimen lisääntyneeseen glykolyysiin.³⁴

1.2.1 Aineenvaihdunnan muutosta hyödyntävät PET-merkkiaineet

L-DOPA on aminohappo, joka toimii katekoliamiineiksi luokiteltujen hermoston välittäjäaineiden lähtöaineena. Näitä välittäjäaineita on mm. dopamiini, adrenaliini sekä noradrenaliini. Fluori-18:lla leimatun [¹⁸F]FDOPA:n biokemialliset ja kineettiset ominaisuudet ovat samankaltaiset kuin *L*-DOPA:lla.³⁵ [¹⁸F]FDOPA voidaan käyttää neuroendokriinisten syöpien ja kasvaimien kuvantamiseen sekä keskushermoston kuvantamiseen. Esimerkiksi Parkinsonin tauti on yksi sairauksista, jonka kuvantamiseen [¹⁸F]FDOPA:a on käytetty jo pitkään.³⁶ Merkkiaineen käyttö perustuu neuroendokriinisten kasvaimien tai keskushermoston solujen kohonneeseen aromaattisten aminohappojen dekarboksylaasin (AADC; aromatic amino acid decarboxylase) aktiivisuuteen.³⁷

Koska fluoriatomi (1,47 Å) on melko saman kokoinen kuin vety (1,20 Å)³⁸, [¹⁸F]FDOPA:n sisäänotto soluihin tai metabolia soluissa ei eroa mitenkään *L*-DOPA:sta. Merkkiaine kulkeutuu soluun dopamiinin kuljetusproteiinin (DAT; dopamine transporter) avulla, ja biosynteesireitti jatkuu AADC:n katalysoimana jolloin [¹⁸F]FDOPA muutetaan 4-(2-aminoetyyli)-5-[¹⁸F]fluoribentseeni-1,2-dioliksi ([¹⁸F]fluoridopamiini).³⁵

Toisin kuin [¹⁸F]FDOPA:n tapauksessa [¹⁸F]FDG:n kertyminen kuvannettavaan kohteeseen perustuu lisääntyneen aineenvaihdunnan lisäksi [¹⁸F]FDG:n muuttuneeseen biosynteesireittiin. [¹⁸F]FDG:n rakenne on lähes sama kuin glukoosimolekyylillä. [¹⁸F]FDG ero on 2-asemassa olevan hydroksyyliyhmän korvautuminen ¹⁸F-atomilla. Hydroksyyliyhmän korvautuminen fluorilla ei vaikuta merkkiaineen sisäänottoon soluun eikä heksokinaasin katalysoimaan fosforylointiin, mutta sitä pidemmälle solu ei pysty [¹⁸F]FDG:ta hyödyntämään, jolloin se kertyy soluun.³⁹

Vaikka glukoosiaineenvaihdunnan muutos on merkittävä tekijä syöpäkudoksessa, ei se ole riittävän valikoiva. Glukoosi pääsee soluun solukalvon glukoosin kuljettaja proteiinien avulla. Nämä GLUT-proteiinit ovat hyvin samankaltaisia, mutta niiden ilmentyminen vaihtelee jonkun verran kudosten välillä.

Tutkimuksissa on ilmentynyt, että kuljetusproteiinit GLUT-1 sekä GLUT-3 esiintyvät runsaammin syöpäkudoksissa kuin muut kuljetusproteiinit.⁴⁰ GLUT-proteiinit ovat samoja mitä terveessä kudoksessa esiintyy ja niiden toiminta on samalainen, joten [¹⁸F]FDG:tä ei voida pitää erityisen kohdespesifisenä syöpämerkkiaineena. Syövän lisäksi kudoksen glukoosiaineenvaihduntaan voivat vaikuttaa niin rasitus, tulehdus kuin luonnollinen metaboliakin. Aivokasvaimien kuvantaminen [¹⁸F]FDG:llä on puolestaan haastavaa, koska kasvaimen kerääntyneen merkkiaineen antama vaste hukkuu taustaan, sillä myös aivojen pääasiallinen energianlähde on glukoosi.

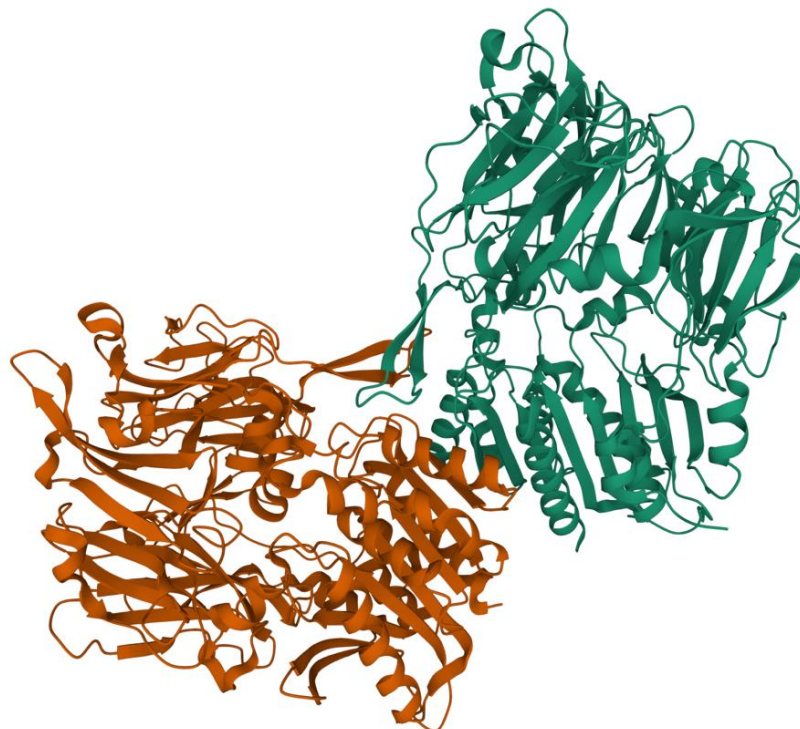
1.3 Fibroblastien toiminta ja vaikutukset elimistössä

Fibroblastit ovat sukkulan mallisia soluja, jotka tuottavat sidekudosta.⁴¹ Ne huolehtivat elimistössä soluväliaineen muodostumisesta, säätelevät leukosyyttien kehitystä ja epiteelin erilaistumista, sekä osallistuvat haavojen parantumiseen tuottamalla kollageenia

ja muita soluväliaineissa tarvittavia yhdisteitä. Fibroblastit vastaavatkin arpikudoksen muodostumisesta niin parantuvissa haavoissa kuin kudoksen fibroosissa.^{42,43}

Vaikka fibroblasteja esiintyvät laajalti elimistössä, on niiden tutkiminen *in vivo* haastavaa. Syynä on se, että toistaiseksi ei ole löydetty hyvää ja luotettavaa solutason bioilmaisinta, jonka avulla fibroblasteja voisi tunnistaa elimistöstä.⁴⁴ Yksi mahdollinen bioilmaisim fibroblasteille on niiden toimintaa aktivoiva proteiini FAP (fibroblastien aktivaatioproteiini) joka kuuluu seriiniproteaasien perheeseen ja on noin 95 kDa solukalvon pinnan glykoproteiini.⁴⁵ Rakenne on esitetty kuvassa 6. FAP:lle spesifinen molekyyli on sen estäjä eli fibroblastien aktivaatioproteiinien inhibiittori (FAPI).

FAP kuuluu dipeptidyylipeptidaasi (DPP) 4 -proteiiniperheeseen johon kuuluu FAP:n lisäksi kolme muuta entsyymiä: DPP 4, 8 ja 9.⁴⁶ FAP:n tunnistamista elimistössä on tutkittu mm. immunohistokemian avulla käyttäen FAP:n monoklonaalisia vasta-aineita sekä FAP:n inhibiittoreita niin elinten fibroosin tutkimuksessa kuin syövän hoidossa ja tutkimuksessa.^{47,48,49}



Kuva 3. Fibroblastien aktivaatioproteiini alpha. Aertgeerts et al. ovat saaneet molekyylin kiderakenteen käyttämällä röntgenkristallografiaa. (PDB ID: 1Z68)⁵⁰

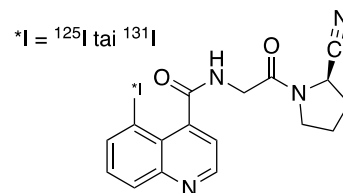
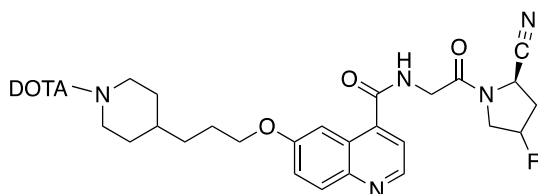
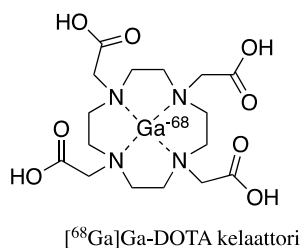
1.3.1 FAP:n ilmentyminen sairauksissa sekä terveessä kudoksessa

Tutkimukset ovat osoittaneet, että aikuisilla terve kudos ei juurikaan ilmennä FAP:ia. On kuitenkin havaittu, että alkionkehityksen eri vaiheissa FAP:n määrä saattaa kohota kudoksen kehittyessä.⁵¹ Fibroblastien ja syövän yhteyttä on tutkittu ja on löydetty fibroblastien alatyyppejä: syöpäsidekudossolut (cancer-associated fibroblasts; CAFs).⁵² Toistaiseksi ei ole vielä täysin selvää, miten syöpäsidekudossolujen ja terveiden fibroblastien toiminta eroaa toisistaan, ja mihin kaikkeen syöpäsidekudossolut voivat vaikuttaa syövän synnyssä.^{44,53} Keskushermostosta ei ole löydetty syöpäsidekudossoluja, mutta aivojen pahanlaatuisten kasvaimien, esim. glioblastoomien on todistettu ilmentävän FAP:ia.⁵⁴

Toisaalta huomioitavaa on myös se, että kohonnut FAP:n pitoisuus ei automaattisesti viittaa syöpään tai edes kasvaimeen. Tämä johtuu siitä, että syöpäkudoksessakin ilmentyvä FAP on suurella todennäköisyydellä fibroblastien tuottamaa, eikä syöpäsolujen.⁴⁵ FAP:n pitoisuus voi olla kohonnut myös muista tekijöistä. Tämä onkin yksi tekijä, miksi FAP:ia ei voida pitää täysin luotettavana bioilmaisimena syövälle ainakaan potilailla joilla on jokin autoimmuunisairaus tai inflammatio käynnissä.^{55,56} Tekijöitä, jotka voivat johtaa FAP:n kohonneeseen ilmentymiseen syövän lisäksi ovat haavan parantuminen,⁵⁷ fibroottiset sairaudet, kuten maksakirroosi tai haimafibroosi^{55,58}, tai reumaperäinen niveltulehdus⁵⁹.

1.4 FAPI:en käyttö PET-merkkiaineena

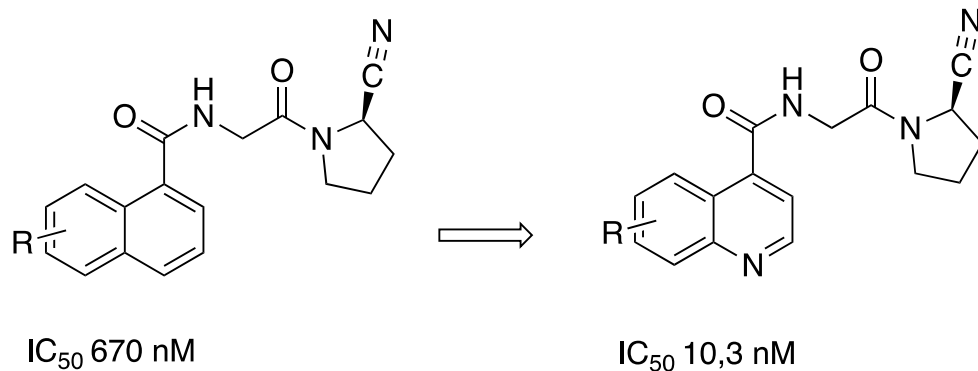
Tällä hetkellä terapeuttisessa käytössä ei ole yhtään FAP-estäjää (FAPI), jolla olisi alhainen FAP-affiniteetti ja se olisi selektiivinen dipeptidyylipeptidaasi 4:lle sekä propyylioligopeptidaasille.⁶⁰ Klassinen lääkekehitys on tutkinut mm. kinoliinirunkoisia FAPI:a⁶⁰ ja PET-tutkimuksen osalta FAPI:a on tutkittu ⁶⁸Ga, ¹⁷⁷Lu, ¹²⁵I ja ¹³¹I leimattuina^{61,62}. Edellä mainittuja radioinuklideja, Lu-177 lukuunottamatta, on käytetty FAPI-PET-merkkiaineiden tutkimuksissa. ¹⁷⁷Lu leimattua FAPI-02:ta (rakenne esitetty kuvassa 9.) on tutkittu terapeuttisena lääkeaineena. Lu-177 hajoaa β^- -emission kautta joten sitä ei voida käyttää PET-kuvantamisessa, mutta sen säteilyenergiaa voidaan hyödyntää paikallisesti sädehoitona.⁶³



Kuva 4. ⁶⁸Ga-, ¹²⁵I- ja ¹³¹I-leimattuja FAPI-yhdisteitä

1.4.1 Kinoliinirungon vaikutus FAPI:in

IC₅₀ -arvo kertoo lääkeaineen tai inhibiittorin konsentraation, jossa entsyymin toiminta-aktiivisuus laskee puoleen alkuperäisestä.⁶⁴ Tutkimuksissa on havaittu, että kinoliinirakenne laskee FAPI:en IC₅₀ -arvoa huomattavasti.⁶⁰ Tutkimuksissa ei ole toistaiseksi pystytty osoittamaan, mitä vuorovaikutuksia 4-kinoliinirunkoisen FAPI:n ja FAP:n välille syntyy.⁶⁰ Kun IC₅₀-arvo pienenee FAPI:n rakenteen muuttuessa, on mahdollista, että typen lisääminen rengasrakenteeseen parantaa molekyylin sitoutumista. IC₅₀ -arvo on merkittävä muuttuja erityisesti klassisten lääkemolekyylien tapauksessa, koska IC₅₀ -arvon laskiessa, voidaan lääkettä käyttää määrällisesti vähemmän mutta saavuttaa edelleen sama vaste. PET-merkkiaineiden tapauksessa IC₅₀ -arvolla ei ole sinällään merkitystä, koska PET-merkkiaineet ovat diagnostisia, eivätkä terapeuttisia. Toisaalta arvon pienentyminen voi viitata siihen, että molekyyliin sitoutuminen paranee entsyymin aktiiviseen kohtaan. Tämä puolestaan olisi PET-merkkiaineidenkin kannalta hyvä, koska parempi sitoutuminen lisää kohdespesifisyyttä ja parantaa PET-kuvantamista.

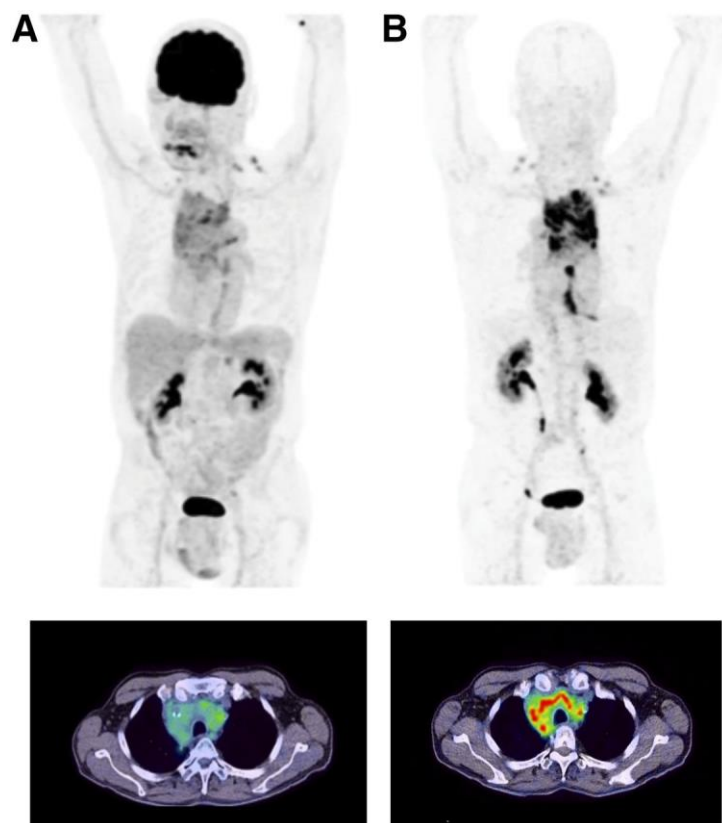


Kuva 5. Kinoliinirungon lisäämisen vaikutus IC_{50} arvoon FAPI:ssa.

1.4.2. ^{68}Ga -, ^{125}I - ja ^{131}I -leimatut FAPI:t

Useat tutkimusryhmät ovat tutkineet kinoliinirunkoisia FAPI-merkkiaineita mm. ^{68}Ga -leimattuna.⁶¹ Jotta FAPI:in voidaan liittää gallium tai muu radiometalli, on käytettävä kelaattoria, joka nostaa merkkiaineen molekyyliainetta huomattavasti. Loktev et al. vertaili [^{177}Lu]FAPI-02 ja [^{125}I]FAPI-01 eroavaisuuksia, kun molekyyliä käytettiin terapeutisiin tarkoituksiin. Tutkimuksessa todettiin, että FAPI-01 jodi-125:llä leimattuna on huonompi, koska jodatun yhdisteen biologinen puoliintumisaika on lyhyempi verrattuna lutetium-177:lla leimattuun FAPI-02:een.⁶² Tutkimuksesta ei voida päätellä, onko FAPI-01 huonompi vai parempi PET-merkkiaine kuin FAPI-02, koska vertailu perustui vain aktiivisuus kertymään eikä molekyylin sitoutumiseen kohteeseen. Pidempi biologinen puoliintumisaika parantaa PET-kuvaa, koska tällöin merkkiaine on pidempään kiinnittyneenä kohteeseensa ennen kuin se hajoaa.

Gallium-68:lla leimattua FAPI-02:ta on puolestaan tutkittu prekliinisissä kokeissa mm. hiirillä ja tulokset ovat olleet lupaavia: FAPI-02 on kohdespesifinen ja se siirtyy nopeasti pois sydän- ja verenkiertoelimistöstä kohteeseen. Merkkiaineen sisäänotto kasvaimen on runsasta, mutta ei muihin kudoksiin ja se poistuu elimistöstä munuaisten ja virtsarakon kautta.⁶² [^{68}Ga]FAPI-02:n kertymistä ja spesifisyyttä on verrattu [^{18}F]FDG:hen. Kuten kuvasta 10. voi huomata, [^{68}Ga]FAPI-02 sisäänotto on huomattavasti kohdennetumpaa kuin [^{18}F]FDG:n. FAPI-02:lla kuvannettaessa, sisäänotto kasvaimen alueella on selkeää, kun taas [^{18}F]FDG kertyy enimmäkseen aivoihin sekä munuaisiin.



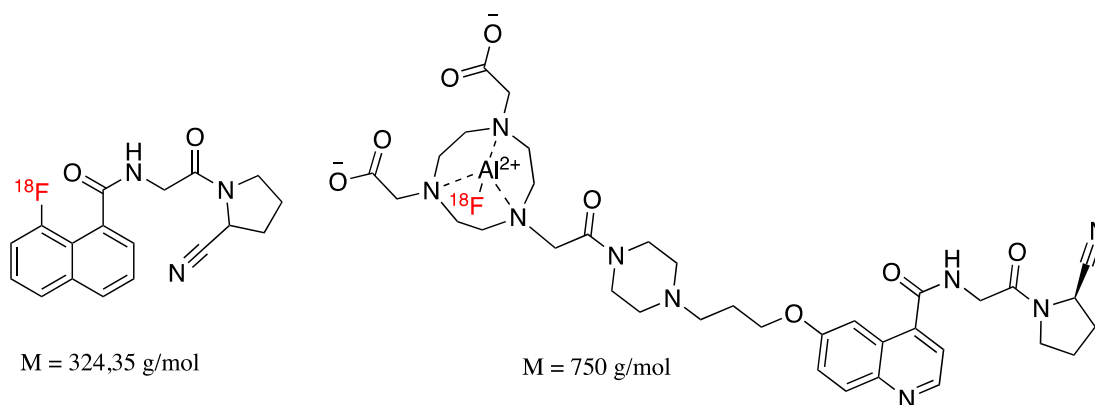
Kuva 6. Kuvassa on esitetty potilaan PET/TT:n maksimi-intensiteetti projektio (ylempi) sekä transaksiaalisesta suunnasta (alempi). Kuvissa A kuvantaminen on suoritettu käyttämällä [^{18}F]FDG:ta kun taas kuvissa B merkkiaineena toimi [^{68}Ga]FAPI-02. Kuvan potilaalla on paikallisesti edennyt keuhkojen adenokarsinoma. Kuva on artikkelista Loktev et al. ja julkaistu oikeuksien haltijan luvalla.⁶²

^{68}Ga -leimatun FAPI-02-merkkiaineen molekyyli­massa on n. 940 g/mol ja jodileimatun FAPI-01-merkkiaineen molekyyli­massa on 432 g/mol. Molempien merkkiaineiden molekyyli­painot ovat verrattain korkeita verrattuna klassisiin pienmolekyyli­isiin PET-merkkiaineisiin, jotka ovat yleensä ^{11}C - tai ^{18}F -leimattuja. Korkea molekyyli­paino vaikeuttaa molekyylien kyky läpäistä veriaivoeste. Karkea yleistys on, että radiomerkkiaineiden ja lääkemolekyylien tulisi olla molekyyli­painoltaan alle 500 Da ja niiden polaarisuuden olla alhainen, jos niiden kohteena on keskushermosto.⁶⁵ ^{68}Ga -leimatuissa merkkiaineissa molekyyli­painoa nostaa sekä galliumin kohtalainen molekyyli­paino (69,7 g/mol sekä radiometallin kelatoiva osa. Jodi-leimatuissa merkkiaineissa molekyyli­painoa nostaa jodin suuri atomipaino (126,9 g/mol).

Gallium- ja jodi merkkiaineita vertailtaessa tulee huomioida se, että I-125 ja I-131 eivät ole PET-radionuklideja, vaan niiden käyttö on painottunut radioterapiaan.⁶⁶ I-131 hajoaa β^- hajoamisen kautta ja I-125 elektronin sieppauksen (EC; electron capture).⁶⁷ Molempien radioisotooppien hajoamisessa syntyvä gammasäteily on korkeaaenergiaa ja sopii käytettäväksi radioterapiassa. Gallium-68 on positronisäteilijä, joten sen käyttö PET-merkkiaineissa on mahdollista.

1.4.3. Fluori-18:lla leimatut FAPI:t

¹⁸F-leimattu FAPI-01 (kuva 11) on kiinnostava ja lupaava PET-merkkiaine. Sen molekyylipaino on melko pieni (verrattuna radiometalleilla leimattuihin FAPI-merkkiaineisiin) ja ¹⁸F:n ominaisuudet ovat suotuisat PET-kuvantamiseen mm. sen hyvän paikkaresoluution sekä verrattain pitkän puoliintumisajan ansiosta.⁶⁸



FAPI-01 ¹⁸F-leimattuna

FAPI-74 leimattu alumiini[¹⁸F]fluoridilla

Kuva 7. Fluori-18 leimattu FAPI-01 sekä FAPI-74, jossa ¹⁸F-leima on yhdistetty kinoliinirunkoon alumiini[¹⁸F]fluoridina 1,4,7-triatsyklononaani-*N,N',N'*-trietikka happo kelaattorilla (NOTA).

Gallium-68:een verrattuna fluori-18:n alhaisempi positronin maksimienergia olisi mm. PET-kuvan paikkaresoluution kannalta parempi. Myös radiomerkkiaineen molekyylipaino on pienempi, käytettäessä fluori-18:aa, jolloin merkkiaineen veriaivoesteen läpäisevyys olisi ainakin teoriassa parempi. Fluori-18 voidaan liittää suoraan FAPI:n kinoliinirunkoon joko elektrofiilisellä tai siirtymämetallivälitteisellä ¹⁸F-fluorauksella. Fluori-18 voidaan liittää kinoliinirunkoon myös epäsuorasti: hydroksiiliryhmään metoksina tai kelaattorin avulla alumiinifluoridina⁶⁹ (kuva 11. Al[¹⁸F]F-FAPI-74). Fluorin liittäminen ”metoksihännän” avulla laskee merkkiaineen metabolista pysyvyyttä verrattuna, jos fluori olisi kiinni suoraan kinoliinirungossa.

Alumiinifluoridin käyttö puolestaan nostaa merkkiaineen molekyylipainoa kuten Ga-68 leimatun FAPI:n tapauksessa, koska alumiinifluoridi vaatii kelaattorin. Vuonna 2021 julkaistussa tutkimuksessa Naka et al. esittelivät lyhyen ja automatisoidun ”one pot” -synteesimenetelmän. Synteesi kestää kokonaisuudessa keskiarvolta 30 minuuttia ja radiokemiallinen saanto synteesissä on noin 40 % ja radiokemiallinen puhtaus yli 97 %. $\text{Al}[^{18}\text{F}]\text{F-FAPI-74}$:n molaarinen aktiivisuus oli $220 \pm 45 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ riippuen alun (32 – 40 GBq) radioaktiivisuudesta.⁶⁹

Kuvannettaessa syöpäkudosta, jossa merkkiaineen kohteena on FAP, tilanne on päinvastainen verrattuna esimerkiksi aivojen reseptorikuvanatamiseen: kuvannettavaa kohdetta esiintyy paljon kudoksessa, jolloin korkea molaarinen aktiivisuus ei ole välttämättömyys. Tällaisissa tilanteissa elektrofiilinen ^{18}F -fluoraus on hyvin toimiva leimausreaktio. Leimausmenetelmällä saavutetaan kohtalainen molaarinen aktiivisuus sekä huomattavasti miedommat reaktio-olosuhteet kuin siirtymämetallivälitteisellä ^{18}F -fluorauksella: reaktioaika on lyhyempi, reaktiolämpötila on matalampi sekä pH on korkeampi (reaktioolosuhteet pH-neutraalimmat).

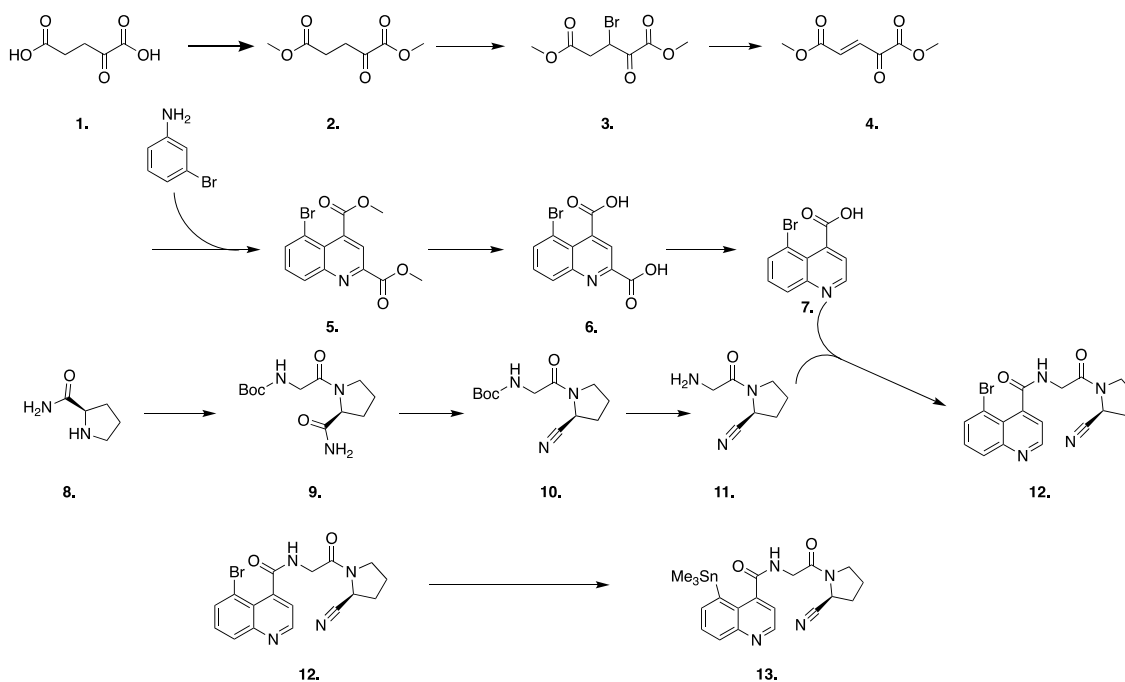
1.5 Tutkimuksen tarkoitus

Pro-gradututkimuksessa oli tarkoitus valmistaa 5-trimetylistanyyli-FAPI-01 ja pyrkiä leimaamaan se käyttämällä elektrofiilistä ^{18}F -fluorausta. Tarkoituksena oli myös tutkia ^{18}F FAPI-01 radiokemiallisia ominaisuuksia. Tutkimuksen lähtökohta oli pyrkiä kehittämään uutta ja kohdespesifisempää (vertaa ^{18}F FDG) syöpämerkkiaineryhmää jonka valmistaminen olisi yksinkertaista, nopeaa ja toistettavaa. Kinoliinirunkoiset FAPI:t ovat osoittautuneet potenteiksi radiomerkkiaineiksi ^{68}Ga ja $\text{Al}[^{18}\text{F}]\text{F}$ leimattuina. Tämän tiedon valossa tutkimuksen haluttiin keskittyvän siihen, miten kinoliinirunkoisen FAPI:n radiomerkkiaineen ominaisuudet muuttuisivat, jos ^{18}F -leima tehtäisiin suoraan aromaattiseen rakenteeseen. Hypoteesina oli mm. se, että FAPI:n molekyylipainon laskiessa olisi radiomerkkiaineen helpompi ylittää veriaivoeste.

2. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

2.1. Lähtöaineen synteesi

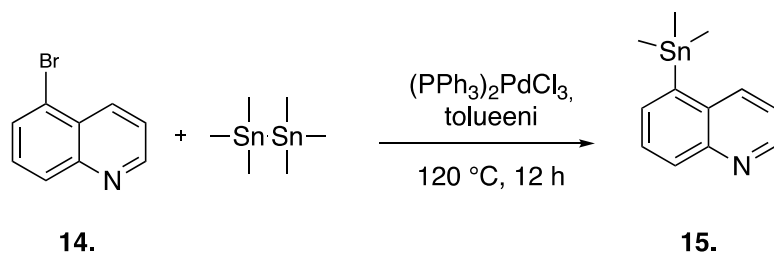
Synteesi toteutettiin Jansen et al. toteuttaman tutkimuksen pohjalta.⁷⁰ Tutkimuksessa valmistettavan trimetyylitinatun leimauslähtöaineen synteesi vaatii vielä optimointia. Leimauslähtöaineen (13.) ja sitä vastaavan stabiilin fluoratun referenssin synteesireittejä kokeiltiin ensin pienemmillä ainemäärillä (100 mg mittakaavassa). Kun reaktio suurennettiin (>1 g mittakaavassa) havaittiin tuotteen kanssa ongelmia. Mitä isommassa skaalassa leimauslähtöainetta tai referenssiyhdistettä valmistetaan, sitä enemmän ilmeni saostumisongelmia. Käytännössä tuotteen liukoisuus orgaanisiin liuottimiin aleni huomattavasti ja tämä vaikeutti merkittäväällä tavalla tuotteen silikakromatografista puhdistamista. Reaktio haluttaisiin tehdä suuressa mittakaavassa, koska synteesireitti sisältää monta vaihetta ja osan reaktioiden saannot ovat alhaiset (< 20 %).



Kaava 4. Lähtöaineen synteesi

Radioleimauksissa käytetty mallimolekyylä (kaava 5 molekyyli 14) stannyloitiin käyttämällä heksametyyliditinaa jolloin saatiin leimauslähtöaine (kaava 5 molekyyli 15) Mallimolekyylillä havaittiin samoja saostumisongelmia kuin varsinaisella leimauslähtöaineella. Radioleimauksessa käytettäviä olosuhteita kokeiltiin myös ei-radioaktiivisen Selectfluor fluoritetraboraatin avulla, kun mallimolekyylä 15 valmistettiin ei-radioaktiivinen fluorattu referenssiyhdiste. Referenssiyhdisteen ja stannyloidun

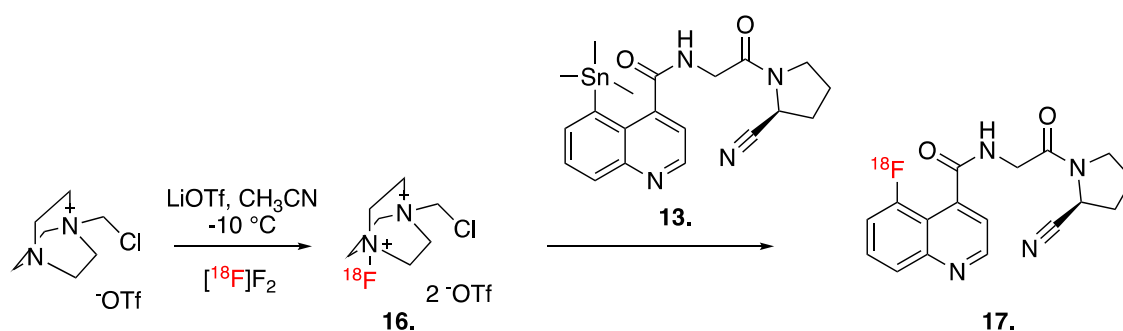
yhdisteen **15** puhdistaminen silikakromatografialla osoittautui haastavaksi, koska reaktio tehtiin hyvin pienessä mittakaavassa.



Kaava 5. Mallimolekyylin stannylointireaktio

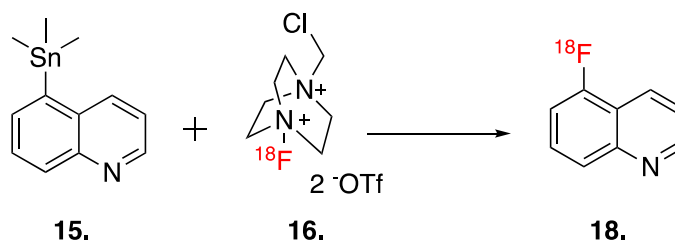
2.2. Radioleimaus

Alkuperäinen suunnitelma radioleimauksesta on esitetty kaavassa 6. Koska molekyyliä **13** ei toistaiseksi ole pystytty syntetisoimaan, tutkittiin kinoliinirungon radiokemiallista käyttäytymistä.



Kaava 6. FAPI-radiomerkkiaineen suunniteltu radioleimausreitti

Kinoliinirungon radiokemiallista käyttäytymistä tutkittiin kaupallisesti saatavilla olevan mallimolekyylin avulla (kaava 7. molekyyli **15**).



Kaava 7. Mallimolekyylin leimausreitti

Radioleimausreaktio [^{18}F]Selectfluor *bistriflaatilla* toteutettiin kolme kertaa. Taulukossa 4. on esitetty leimauksen radiokemialliset saannot, sekä molaariset aktiivisuudet. Koska leimatulle molekyylille ei tehty minkäänlaista puhdistusta, ei radikokemiallista puhtautta pyritty määrittämään radioHPLC:n avulla.

Taulukko 2. Mallimolekyylin radiokemialliset tulokset

	Radiokemiallinen saanto (RCY) [%]	Molaarinen aktiivisuus (A_m) [GBq/ μmol]
reaktio 1.	14,6	2,21
reaktio 2.	11,1	3,08
reaktio 3.	14,3	2,18

3. JOHTOPÄÄTÖKSET

Trimetyylitinatun lähtöaineen orgaaninen synteesi vaatii optimointia. Yksi merkittävä syy siihen, miksei molekyylillä **13** ole saatu valmistettua on se, että reaktiossa D (kaava 4) syntyy kahta isomeeriä, joiden erottaminen silikakromatografisesti on haastavaa. Yksi mahdollinen vaihtoehto reaktion parantamiselle olisi hankkia molekyylillä **7** kaupallisesti. Tämä lyhentäisi synteesireittiä huomattavasti.

Mallimolekyylin radioleimauksessa käytetyn [^{18}F]Selectfluor *bistriflaatin* alkuaktiivisuus oli melko alhainen (3 GBq) ja se selittää myös saavutetut alhaiset molaariset aktiivisuudet (taulukko 4). Radiokemialliset saannot olivat myös verrattain alhaiset. Radiokemiallista saantoa voidaan parantaa pidentämällä reaktioaikaa 15 minuutista \rightarrow 20 - 30 minuuttiin sekä lisäämällä lämmitystä ja liuottimen määrää. Liuottimen lisäys paransi reagenssien liuokoisuutta.

4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1. Yleiset menetelmät

Sekä stannyloitu mallimolekyylillä, että FAPI-leimauslähtöaine valmistettiin kaupallisesti saatavilla olevista lähtöaineista. Reaktioita seurattiin TLC-kromatografian avulla, ja välituotteet sekä lopputuotteet karakterisoitiin NMR-spektroskopiolla Bruker Avance-III

500MHz -laitteella. Raakatuotteet puhdistettiin pylväskromatografisesti ja tuotteen erottuvuutta seurattiin TLC-kromatografian avulla.

4.2. Lähtöaineen synteesi

4.2.1. Dimetyyliketoglutaraatti (2)

α -Ketoglutaraattihappo (10g, 68 mmol) ja kuiva metanoli (100 ml) sekoitettiin keskenään jäähauteessa (-5 °C) argonilmakehässä. Kun aineet olivat sekoittuneet keskenään, lisättiin tionyylikloridi (10 ml, 138 mmol) ja seos haihdutettiin välittömästi kuiviin pyöröhaihduttajalla. Tuote oli keltaista öljyä, ja saanto oli kvantitatiivinen (~12 g). Tuotetta käytettiin sellaisenaan seuraavaan synteisiin ilman puhdistusta. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz CDCl_3) δ 3.90 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.18 (t, 1H), 2.70 (t, 1H).

4.2.2. Dimetyylibromoketoglutaraatti (3)

Dimetyyli- α -ketoglutaraatti (kaava 4 molekyyli 1.) (~12 g, 69 mmol) liuotettiin dimetyylikloridiin (300 ml) ja liuokseen lisättiin bromia (5,4 ml, 105 mmol) jonka jälkeen seosta refluksoititiin 3 h. Refluksoinnin jälkeen nesteet haihdutettiin pois pyöröhaihduttajalla ja tuotteeksi saatiin oranssia öljyä. Saanto kvantitatiivinen (~ 16 g) Tuotetta käytettiin sellaisenaan seuraavaan synteisiin ilman puhdistusta. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz CDCl_3) δ 5.42 (q, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.40-3.33 (dd, 1H), 3.10-3.05 (dd, 1H)

4.2.3. Dimetyyli-2-ketoglutagonaatti (4)

Dimetyyli-2-bromi- α -ketoglutaraatti (~16 g, 63,5 mmol) (kaava 7. molekyyli 2.) liuotettiin dietyylieetteriin (400 ml) ja liuokseen lisättiin trietyyliamiinia (10,4 ml, 74,6 mmol). Seos muuttui sameaksi ja seosta sekoitettiin huoneenlämmössä 30 min. Seos suodatettiin useita kertoja, jotta TEA · HBr suola (persikanvärinen) saatiin erotettua pois. Suodatettu tuote oli kirkkaankeltaista nestettä ja se haihdutettiin kuiviin saaden kirkkaan keltaista kiinteää tuotetta. Kvantitatiivinen saanto (10,72 g) puhdistamattomalle tuotteelle. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz CDCl_3) δ 7.64 (d, 1H) 7.00 (d, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.87 (s, 3H).

4.2.4. 5-bromikinoliini-2,4-diesteri (5)

Dimetyyli-2-ketoglutakonaatti (1g, 5,8 mmol) ja 3-bromianiliini (530 μ l, 4,8 mmol) sekoitettiin keskenään dikloorimetaanissa (n. 50 ml) 30 minuutin ajan huoneen lämmössä. Seokseen lisättiin p-tolusulfonihappoa (184 mg, 4,8 mmol) happokatalyyttiä. Seosta refluksoitettiin 60 °C 24 h huoneilmassa. Refluksoinnin jälkeen reaktio pysäytettiin uuttamalla seosta kolmesti kylläisellä NaHCO₃. Seosta uutettiin kerran 0,1 M HCl:lla. Orgaaniset kerrokset yhdistettiin ja kuivattiin MgSO₄:lla, jonka jälkeen seos suodatettiin ja orgaaninen liuotin haihdutettiin pois. Raakatuote puhdistettiin silikakolonilla liuottimena EtOAc/Heksaani. Saanto 413 mg, 26,2 m-% ¹H NMR (500 MHz CDCl₃) δ 8.78 (d, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.85 (dd, 1H), 4.13 (s, 3H), 4.09 (s, 3H)

4.2.5. 5-bromikinoliini-2,4-dikarboksylihappo (6)

5-bromikinoliini-2,4-diesteri (459 g, 1,42 mmol) liuotettiin 50/50 liuokseen tetrahydrofuraania ja vettä. Liuokseen lisättiin 3 eq NaOH:a 2 M (2 ml, 4,26 mmol), ja tuotetta sekoitettiin n. 45 min. Tuotetta seurattiin TLC:n avulla. (TLC ajettiin 20 % EtOAc/Hex. -liuoksessa) Kun lähes kaikki tuote oli reagoinut, THF/H₂O -liuos haihdutettiin, ja jäännös liuotettiin pieneen määrään vettä. Tuote saostettiin ulos lisäämällä 6M HCl:a (700 μ l, 4,26) Sakka suodatettiin ja pestiin pienellä määrällä kylmää vettä. Bromisubstituoitu tuote oli rusehtavan keltaista. Saanto 103 mg, 24,6 m-% ¹H NMR (500 MHz CDCl₃) δ 8.51 (d, 1H), 8.44 (brs, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.81 (dd, 1H)

4.2.6. 5-bromikinoliini-2,4-monokarboksylihappo (7)

5-bromikinoliini-2,4-dikarboksylihappo (103 mg, 0,349 mmol) ja vesi laitettiin paineputkeen (15 ml tai 35 ml) ja putki suljettiin huolellisesti teflonisella korkilla. Putki asetettiin öljyhauteeseen, jonka jälkeen sekoitus aloitettiin ja lämpötila nostettiin 205 °C. Seoksen annettiin reagoida n. 6–8 h, jonka jälkeen lämpötilaa laskettiin hitaasti n. 10 °C/20 min. Kun lämpötila laskettiin hitaasti, tuote uudelleenkiteytyi oikein. Kun putken lämpötila oli saavuttanut huoneenlämmön, monokarboksylihapon vesiliuos suodatettiin, ja tuotetta pestiin pienellä määrällä vettä. (27 mg, 31 m-%) Tuotetta ei puhdistettu. ¹H NMR (500 MHz DMSO-*d*₆) δ 9.04 (d, 1H), 8.68 (d, 1H), 8.32 (s, 1H)

4.2.7. (S)-tert-butyyl 2-(2-karbamoyylipyrrolidin-1-yyli)-2-oksoetyylikarbamaatti (8)

Boc. glysiini (5,45 g, 31,11 mmol) ja DIPEA (4,35 ml, 24,97 mmol) sekoitettiin keskenään dikloorimetaanissa (80 ml) jonka jälkeen seokseen lisättiin HATU:a (12,48 g, 32,82 mmol) liuotettuna dimetyyliformamidiin (DMF) (20 ml). Seosta sekoitettiin huoneenlämmössä noin 10 min., jonka jälkeen liuokseen lisättiin *L*-prolinamidia (5,10 g, 44,69 mmol), DIPEA (9,3) ja DCM (20ml). Lisäys tehtiin vasta kun kaikki HATU oli liuennut seokseen. Seosta sekoitettiin 5 h huoneen lämmössä, jonka jälkeen seokseen lisättiin isopropanolia ja dikloorimetaania suhteessa 1:1 (80 ml). Seosta pestiin 1 M HCl:llä kahdesti ja sen jälkeen kylläisellä natriumbikarbonaatilla sekä keittosuolaliuoksella kerran. Orgaaninen kerros kuivattiin magnesium sulfaatilla ja raakatuote haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttajalla, jolloin muodostui keltaista öljyä. Raakatuote liuotettiin ylimäärään etyyliasetaattia ja uudelleen kiteytettiin siitä. Viikonlopun jälkeen tuote oli kiteytynyt ja se suodatettiin. Kiteet olivat puhtaan valkoisia (4,26 g, 56,3 m-%) Muuta puhdistusta tuotteelle ei tehty. ¹H NMR (500 MHz DMSO-*d*₆) δ 7.23 (s, 1H), 6.93 (s, 1H) 4.29 (dd, 1H), 3.74 (d, 2H), 3.42 (dd, 2H), 1.75-1.84 (m, 2H), 1.86-1.99 (m, 2H)

4.2.8. (S)-tert-butyyl 2-(2-syanopyrrolidin-1-yyli)-2-oksoetyylikarbamaatti (9)

Reaktio tehtiin argonilmakehässä, jotta reaktio-olosuhteet olisivat mahdollisimman vedettömät. (S)-tert-butyyl-2-(2-karbamoyylipyrrolidin-1-yyli)-2-oksoetyylikarbamaatti (4,26 g, 17,5 mmol) liuotettiin kuivaan tetrahydrofuraaniin (THF) (15 ml). Reaktioseos oli jäähauteessa. Liuokseen lisättiin pyrimidiini (8,9 ml, 110,48 mmol), jonka jälkeen trifluoretikkahappoanhydridi (TFA anhydridi) (2,56 ml, 18,42 mmol) sekoitettiin kuivaan dikloorimetaaniin (7 ml). Jäähaude poistettiin ja liuosta sekoitettiin 1,5 h huoneen lämmössä, jonka jälkeen liuos haihdutettiin pyöröhaihduttajalla kuiviin ja saatiin kellertävää öljyä. Tuote liuotettiin etyyliasetaattiin jonka jälkeen sitä pestiin kolmesti 2 M suolahapolla (3x50ml). Vesifaasit yhdistettiin ja niitä uutettiin kahdesti pienellä määrällä etyyliasetaattia (2x15ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin ja niitä pestiin kylläisellä natriumbikarbonaatti/keittosuola liuoksella (50 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin magnesium sulfaatilla ja suodatettiin. Etyyliasetaatti haihdutettiin pois ja saatiin kellertävä öljy, joka uudelleen kiteytettiin dietyylieetteristä. Tuote on valkoista haituvaa (2,25 g, 57,14 m-%). Tuote ei ole UV-aktiivinen.

^1H NMR (500 MHz CDCl_3) δ 5.39 (br s, 1 H), 4.79 (d, 0,9H), 4.66 (d, 0,1H), 4.15 (dd, 0,1H), 4.04 (dd, 0,9H), 3.99 (m, 0,1H), 3.89 (dd, 0,9), 3.64 – 3.60 (m, 1H), 3.49 – 3.45 (m, 1H), 2.35 – 2.22 (m, 3H), 1.47 (s, 9H)

4.2.9. (S)-1-(2-amonoasetyyli)pyrrolidiini-2-karbannitriili-4-metylibentseenisulfonaatti (10)

(S)-tert-butyyl 2-(2-syanopyrrolidin-1-yyli)-2-oksoetylikarbamaatti (0,1545g, 0,610 mmol) liuotettiin 7 ml asetonitriiliä. Liuokseen lisättiin *p*-tolusufonihapon monohydraattia (0,174 g, 1,10 mmol) ja seosta sekoitettiin huoneen lämmössä 24 h. Sekoituksen jälkeen asetonitriililiuos haihdutettiin pois ja raakatuote liuotettiin dietyylieetteriin ja uudelleen kiteytettiin pakkasesta. Tuote oli valkoista räkää. Saanto 1,4 g 85 % ^1H NMR (500 MHz $\text{DMSO}-d_6$) 7.72 (d, 2H), 5.3 (d, 0,1H), 4.47 (d, 0,9H), 4.15 (d, 0,1H), 3.91 (d, 0,9H), 3.53 (dd, 0,1H), 3.21 (d, 0,9H), 2.03 (m, 2H), 1.98 (m, 2H) 1.61 (m, 2H)

4.2.10. Mallimolekyylin- stannylointireaktio (14)

5-bromikinoliini (2,0 g, 9,61 mmol) ja $(\text{PPh}_3)\text{PdCl}_3$ (0,674g, 0,960 mmol) lisättiin reaktioastiaan ja niitä kuivattiin typpivirtauksella noin 15 min. ajan. Kuiva tolueni (50 ml) lisättiin reaktioastiaan. Reaktioon muodostettiin typpi-ilmakehä. Heksametyyliditinaa (1,66 ml, 8,00 mmol) lisättiin seokseen, jolloin reaktioseos muuttui mustaksi. Reaktioseosta refluksoitettiin 12 h 120 °C. Reaktio pysäytettiin lisäämällä vettä sekä etyyliasetaattia ekvivalentit määrät. Rusehtavan mustaa sakkaa uutettiin kolmesti vedellä ja kylläisellä keittosuolaliuoksella. Orgaaninen faasi haihdutettiin kuiviin ja se puhdistettiin käyttämällä silikakromatografiaa. Pylväskromatografia valmistettiin EtOAc : Hex. 10 % kantaliuokseen. Tuotteen saaminen koloniin oli haastavaa tuotteen kokkareisen olomuodon vuoksi. Ajoliuoksena silikapylväessä käytettiin 10 % EtOAc:Hex liuosta. Tuote tuli ulos toisessa fraktiossa. ($R_f=0,12$) Saanto 1,5 g, 53 % ^1H NMR (500 MHz CDCl_3) δ 8.95 (dd, 1H), 8.14 (d, 1H), 8.10 (d, 1H), 7.72 (m, 2H), 7.45 (dd, 1H)

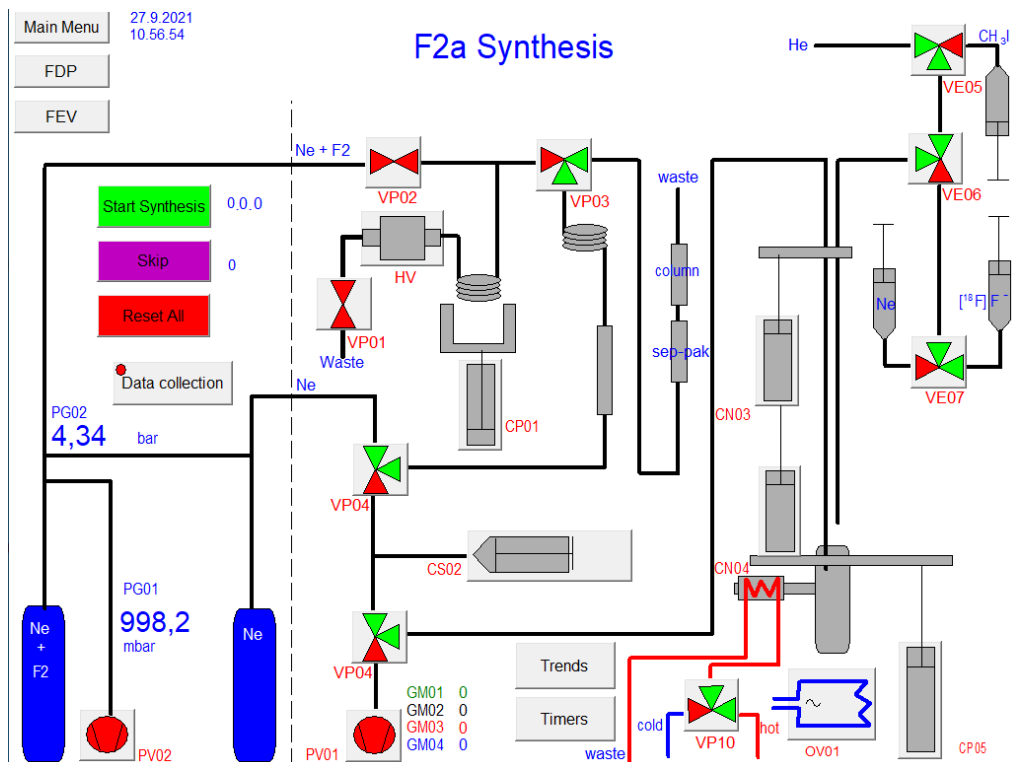
4.2.10 Mallimolekyylin fluorausreaktio (15)

5-trimetyylitinakinoliini (75 mg, 0,293 mmol) ja hopeatriflaatti (102 mg, 0,593 mmol) sekoitettiin 2 ml kuivaa asetonia, jonka jälkeen reaktioon lisättiin Selectfluorin

bis(triflaattia) (105 mg, 0,296 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 40 min 50 °C. Raakatuote pyrittiin puhdistamaan pylväskromatografisesti, mutta lopulta puhdistettiin HPLC:n avulla.

4.3. Radiokemian yleiset menetelmät

[¹⁸F]Selectfluorin *bis*(triflaatti) valmsitettiin automatisoidun synteetilaitteen avulla [¹⁸F]F₂-kaasusta. [¹⁸F]F₂-kaasu valmistettiin post-target-menetelmällä.²⁵ Kaikki esitetyt radioaktiivisuusarvot ovat puoliintumisaikakorjattuja säteilytyksen loppuajankohtaan. Radioleimauksen onnistuminen, molaariset aktiivisuude määritettiin valmistetun referenssimolekyylin avulla. Radiokemiallinen puhtaus määritettiin radioHPLC:n avulla isokraattisella analyysimetodilla. Raakatuotteen radioaktiivisuuden arvot määritettiin radioHPLC:n avulla isokraattisella metodilla. RadioHPLC:ta kerättiin leimaantunut tuote ja sen radioaktiivisuus mitattiin. Kaikki ilmoitetut radioaktiivisuusarvot ovat puoliintumisaikakorjattuja säteilytyksen päättymishtekeen (EOB).



Kuva 8. [¹⁸F]F₂ laitteen ohjaus näyttö

Isokraattisessa analyysimenetelmässä käytettiin Phenomenexin Gemini C18 kolonia (5 µm, 250 x 4,6 mm, 110 Å) ja VWR Hitachin L-2130 HPLC-pumppua ja VWR Hitachin L-2400 UV-detektoria. Radioaktiivisuuden havaitsemiseen käytettiin NaI-kidetuikeilmaisinta. Ajoliuoksina käytettiin 0,1 % TFA asetonitriilissä : 0,1 % TFA vesiliuoksessa (1:4). Virtausnopeus oli 1 ml/min. ja UV-detektorin aallonpituus 250 nm.

4.4. Radioleimaus

$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ valmistettiin syklotronilla ydinreaktion $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ mukaisesti ^{18}O -rikastetusta vedestä. $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ kuivattiin atseotrooppisesti tislaamalla kaavan 1. mukaisesti. Kuivauksen jälkeen metyylijodidi ja kuiva $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ reagoivat ja muodostunut $[^{18}\text{F}]\text{fluorimetaani}$ puhdistettiin kaasukromatografisesti. Puhdas $[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{F}$ johdettiin korkeajännitepurkauskammioon. Sähköpurkauksen jännite oli 32.5 – 31 kV ja purkaus kesti 10 s. Kaavassa 2. on esitetty post-target-menetelmällä tuotetun $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -kaasun valmistusmenetelmän periaate. Syntynyt $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -kaasu kuplitettiin huoneenlämmössä reaktioastiaan, jossa oli Selectfluor *bis*(triflaatin) lähtöainetta asetoniin liuotettuna. Valmiin $[^{18}\text{F}]\text{Selectfluorin}$ *bis*(triflaatin) aktiivisuus oli 2,98 GBq.

Taulukko 3. $[^{18}\text{F}]\text{Selectfluorin}$ *bis*(triflaati)lla tehdyt leimausreaktiot

reaktio	$[^{18}\text{F}]\text{Selectfluor}$ V [µl]	$[^{18}\text{F}]\text{Selectfluor}$ A [MBq]	Leimauslähtöaine m [mg]	Leimauslähtöaine n [µmol]	AgOTf m[mg]	AgOTf n[mol]
1.	200	820	4,6	16	8,1	32
2.	200	790	5,2	18	5,8	23
3.	350	1200	5,1	18	10	40
4.		39				

Taulukossa 5. esitettyjen reaktioiden reaktiot tapahtuivat 50 °C ja liuottimena toimi asetoni ($V_{\text{asetoni}} = V_{[^{18}\text{F}]\text{Selectfluor}}$).

5. VIITTEET

1. Vallabhajosula S. Molecular imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT. Springer Berlin Heidelberg; **2009**, 5–8 .
2. Ametamey SM, Honer M, Schubiger PA. Molecular imaging with PET. *Chem Rev.* **2008**, 108: 1501–16.
3. Sandler DDHMAPP, editor. Practical FDG Imaging: A Teaching File. Springer New York; **2004**,.
4. R.A. Phaneuf, R.K. Janev MSP. Recommended data. *At Data Fusion.* **1987**, 5: ORNL-6090.
5. Van De Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G, Chretien JR, Raevsky OA. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *J Drug Target.* **1998**, 6: 151–65.
6. Phelps ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**, 97: 9226–33.
7. Coenen HH, Gee AD, Adam M, *et al.* Consensus nomenclature rules for radiopharmaceutical chemistry — Setting the record straight. *Nucl Med Biol.* **2017**, 55: v–xi.
8. Sergeev M, Lazari M, Morgia F, *et al.* Performing radiosynthesis in microvolumes to maximize molar activity of tracers for positron emission tomography. *Commun Chem.* **2018**, 1: 10.
9. Dannals RF, Ravert HT, James Frost J, Wilson AA, Donald Burns H, Wagner HN. Radiosynthesis of an opiate receptor binding radiotracer: [¹¹C]carfentanil. *Int J Appl Radiat Isot.* **1985**, 36: 303–6.
10. Garnett ES, Firnau G, Nahmias C. Dopamine visualized in the basal ganglia of living man. *Nature.* **1983**, 305: 137–8.
11. Becherer A, Szabó M, Karanikas G, *et al.* Imaging of advanced neuroendocrine tumors with ¹⁸F-FDOPA PET. *J Nucl Med.* **2004**, 45: 1161–7.
12. Forsback S, Eskola O, Haaparanta M, Bergman J, Solin O. Electrophilic synthesis of 6-[¹⁸F]fluoro-L-DOPA using post-target produced [¹⁸F]F₂.

Radiochim Acta. **2008**, 96: 845–8.

13. Keller T, López-Picón FR, Krzyczmonik A, *et al.* Comparison of high and low molar activity TSPO tracer [¹⁸F]F-DPA in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* **2020**, 40: 1012–20.
14. Jacobson O, Kiesewetter DO, Chen X. Fluorine-18 radiochemistry, labeling strategies and synthetic routes. *Bioconjug Chem.* **2015**, 26: 1–18.
15. Berry DJ, Ma Y, Ballinger JR, *et al.* Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris(hydroxypyridinone) ligands. *Chem Commun (Camb).* **2011**, 47: 7068.
16. Ferguson S, Jans HS, Wuest M, Riauka T, Wuest F. Comparison of scandium-44 g with other PET radionuclides in pre-clinical PET phantom imaging. *EJNMMI Phys.* **2019**, 6: 1–14.
17. Liang SH, Vasdev N. C(sp³)-¹⁸F Bond Formation by Transition-Metal-Based [¹⁸F]Fluorination. *Angew Chemie - Int Ed.* **2014**, 53: 11416–8.
18. Lee E, Kamlet AS, Powers DC, *et al.* A fluoride-derived electrophilic late-stage fluorination reagent for PET imaging. *Science (80-)*. **2011**, 334: 639–42.
19. Tredwell M, Preshlock SM, Taylor NJ, *et al.* A General Copper-Mediated Nucleophilic ¹⁸F Fluorination of Arenes. *Angew Chemie.* **2014**, 126: 7885–9.
20. Lee E, Hooker JM, Ritter T. Nickel-mediated oxidative fluorination for PET with aqueous [¹⁸F] fluoride. *J Am Chem Soc.* **2012**, 134: 17456–8.
21. Beyzavi MH, Mandal D, Strebl MG, *et al.* ¹⁸F-Deoxyfluorination of Phenols via Ru π -Complexes. *ACS Cent Sci.* **2017**, 3: 944–8.
22. Dong WK, Jeong HJ, Seok TL, Sohn MH, Katzenellenbogen JA, Dae YC. Facile nucleophilic fluorination reactions using tert-alcohols as a reaction medium: Significantly enhanced reactivity of alkali metal fluorides and improved selectivity. *J Org Chem.* **2008**, 73: 957–62.
23. Cai L, Lu S, Pike VW. Chemistry with [¹⁸F]fluoride ion. *European J Org Chem.* **2008**,: 2853–73.
24. Casella V, Ido T, Wolf AP, Fowler JS, MacGregor RR, Ruth TJ. Anhydrous F-18 labeled elemental fluorine for radiopharmaceutical preparation. *J Nucl Med.*

- 1980, 21: 750–7.
25. Bergman J, Solin O. Fluorine-18-labeled fluorine gas for synthesis of tracer molecules. *Nucl Med Biol.* **1997**, 24: 677–83.
 26. Teare H, Robins EG, Kirjavainen A, *et al.* Radiosynthesis and evaluation of [¹⁸F]Selectfluor bis(triflate). *Angew Chemie - Int Ed.* **2010**, 49: 6821–4.
 27. Banks RE, Mohialdin-Khaffaf SN, Lal GS, Sharif I, Syvret RG. 1-Alkyl-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane salts: a novel family of electrophilic fluorinating agents. *J Chem Soc Chem Commun.* **1992**,: 595–6.
 28. Ido T, Wan C -N, Casella V, *et al.* Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs. ¹⁸F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and ¹⁴C-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J Label Compd Radiopharm.* **1978**, 14: 175–83.
 29. Farwell MD, Pryma DA, Mankoff DA. PET/CT imaging in cancer: Current applications and future directions. *Cancer.* **2014**, 120: 3433–45.
 30. Young L. PET/CT drives PET scan volume to new heights - IMV Medical Information Division. *I.* **2019**,: 1. <https://imvinfo.com/pet-ct-drives-pet-scan-volume-new-heights/> (accessed March 7, 2022).
 31. BARBARA S. HULKA. Cancer Screening Degrees of Proof and Practical Application. *Am Cancer Soc.* **1988**, 62: 1776–80.
 32. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, *et al.* The case for early detection. *Nat Rev Cancer 2003 34.* **2003**, 3: 243–52.
 33. Finger PT. Cancer staging. *Clin. Ophthalmic Oncol. Basic Princ. Diagnostic Tech. Second Ed.* **2014**,:69–75.
 34. Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol.* **1927**, 8: 519.
 35. Pretze M, Wängler C, Wängler B. 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA: A Well-Established Neurotracer with Expanding Application Spectrum and Strongly Improved Radiosyntheses. *Biomed Res Int.* **2014**, 2014.
 36. Barrio JR, Huang SC, Phelps ME. In vivo assessment of neurotransmitter biochemistry in humans. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **1988**, 28: 213–30.
 37. LA W, J P, L F, *et al.* Comprehensive expression analysis of L-dopa

- decarboxylase and established neuroendocrine markers in neoadjuvant hormone-treated versus varying Gleason grade prostate tumors. *Hum Pathol.* **2007**, 38: 161–70.
38. Bondi A. Van der waals volumes and radii. *J Phys Chem.* **1964**, 68: 441–51.
 39. Pauwels EKJ, Ribeiro MJ, Stoot JHMB, McCready VR, Bourguignon M, Mazière B. FDG Accumulation and Tumor Biology. *Nucl Med Biol.* **1998**, 25: 317–22.
 40. Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, *et al.* Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* **1990**, 170: 223–30.
 41. Ross R, Benditt EP. Wound healing and collagen formation. V. Quantitative electron microscope radioautographic observations of proline-H₃ utilization by fibroblasts. *J Cell Biol.* **1965**, 27: 83–106.
 42. Parsonage G, Filer AD, Haworth O, *et al.* A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol.* **2005**, 26: 150–6.
 43. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano: Regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2002**, 3: 349–63.
 44. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* **2006**, 6: 392–401.
 45. Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1990**, 87: 7235–9.
 46. Hamson EJ, Keane FM, Tholen S, Schilling O, Gorrell MD. Understanding fibroblast activation protein (FAP): Substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. *Proteomics - Clin Appl.* **2014**, 8: 454–63.
 47. Park JE, Lenter MC, Zimmermann RN, Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J Biol Chem.* **1999**, 274: 36505–12.
 48. Wang XM, Yu DMT, McCaughan GW, Gorrell MD. Fibroblast activation protein increases apoptosis, cell adhesion, and migration by the LX-2 human

- stellate cell line. *Hepatology*. **2005**, 42: 935–45.
49. Busek P, Mateu R, Zubal M, Kotackova L, Sedo A. Targeting Fibroblast activation protein in cancer - Prospects and caveats. *Front Biosci - Landmark*. **2018**, 23: 1933–68.
 50. Aertgeerts K, Levin I, Shi L, *et al*. Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein α . *J Biol Chem*. **2005**, 280: 19441–4.
 51. Levy MT, McCaughan GW, Abbott CA, *et al*. Fibroblast activation protein: A cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. *Hepatology*. **1999**, 29: 1768–78.
 52. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - Bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. **2004**, 4: 839–49.
 53. Rønnev-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: Importance of the stromal reaction. *Physiol Rev*. **1996**, 76: 69–125.
 54. Röhrich M, Floca R, Loi L, *et al*. FAP-specific PET signaling shows a moderately positive correlation with relative CBV and no correlation with ADC in 13 IDH wildtype glioblastomas. *Eur J Radiol*. **2020**, 127: 109021.
 55. Levy MT, McCaughan GW, Marinos G, Gorrell MD. Intrahepatic expression of the hepatic stellate cell marker fibroblast activation protein correlates with the degree of fibrosis in hepatitis C virus infection. *Liver*. **2002**, 22: 93–101.
 56. Scanlan MJ, Raj BKM, Calvo B, *et al*. Molecular cloning of fibroblast activation protein α , a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1994**, 91: 5657–61.
 57. Mathew S, Scanlan MJ, Mohan Raj BK, *et al*. The gene for fibroblast activation protein α (FAP), a putative cell surface-bound serine protease expressed in cancer stroma and wound healing, maps to chromosome band 2q23. *Genomics*. **1995**, 25: 335–7.
 58. Cohen SJ, Alpaugh RK, Palazzo I, *et al*. Fibroblast activation protein and its relationship to clinical outcome in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. **2008**, 37: 154–8.

59. Bauer S, Jendro MC, Wadle A, *et al.* Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther.* **2006**, 8: 1–11.
60. Jansen K, Heirbaut L, Cheng JD, *et al.* Selective inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) with a (4-quinolinoyl)-glycyl-2-cyanopyrrolidine scaffold. *ACS Med Chem Lett.* **2013**, 4: 491–6.
61. Lindner T, Loktev A, Altmann A, *et al.* Development of quinoline-based theranostic ligands for the targeting of fibroblast activation protein. *J Nucl Med.* **2018**, 59: 1415–22.
62. Loktev A, Lindner T, Mier W, *et al.* A Tumor-Imaging Method Targeting Cancer-Associated Fibroblasts. *J Nucl Med.* **2018**, 59: 1423–9.
63. Dash A, Pillai MRA, Knapp FF. Production of ^{177}Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options. *Nucl Med Mol Imaging (2010).* **2015**, 49: 85–107.
64. Offermanns S, Rosenthal W, editors. IC50 Values BT - Encyclopedia of Molecular Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; **2008**;611.
65. Pike VW. Considerations in the Development of Reversibly Binding PET Radioligands for Brain Imaging. *Curr Med Chem.* **2016**, 23: 1818.
66. Al Aamri M, Ravichandran R, Binukumar JP, Al Balushi N. Therapeutic applications of radioactive ^{131}I iodine: Procedures and incidents with capsules. *Indian J Nucl Med.* **2016**, 31: 176.
67. Livechart - Table of Nuclides - Nuclear structure and decay data n.d. <https://www-nds.iaea.org/relnsd/vcharthtml/VChartHTML.html> (accessed December 15, 2021).
68. Sanchez-Crespo A. Comparison of Gallium-68 and Fluorine-18 imaging characteristics in positron emission tomography. *Appl Radiat Isot.* **2013**, 76: 55–62.
69. Naka S, Watabe T, Lindner T, *et al.* One-pot and one-step automated radio-synthesis of [^{18}F]AlF-FAPI-74 using a multi purpose synthesizer: a proof-of-concept experiment. *EJNMMI Radiopharm Chem.* **2021**, 6: 1–12.
70. Jansen K, Heirbaut L, Cheng JD, *et al.* Selective Inhibitors of Fibroblast

Activation Protein (FAP) with a (4-Quinolinoyl)-glycyl-2-cyanopyrrolidine Scaffold. *ACS Med Chem Lett.* **2013**, 4: 491–6.