



Purinerginen järjestelmä radiolääkekehityksen kohteena

Krista Heikkilä

Pro Gradu-tutkielma

Radiofarmaseuttinen kemia

Kemian laitos

Turun yliopisto

Maaliskuu 2021

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin

OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

Heikkilä Krista: Purinerginen järjestelmä radiolääkekehityksen kohteena

Pro Gradu -tutkielma, 53 sivua, 13 liitettä.

Kemia

Maaliskuu 2021

PET-kuvantaminen on käytännöllinen kuvantamismenetelmä, sillä se on kajoamaton ja monipuolinen. Siinä hyödynnetään positroniemittovia radionuklideja, joista paljon huomiota osakseen on kerännyt fluori-18 PET-kuvantamiseen sopivien ominaisuuksiensa ansiosta. Fluori-18:lla on leimattu paljon erilaisia merkkiaineita käyttäen leimauslähtöaineena nukleofiilistä [¹⁸F]fluoridia tai elektrofiilistä [¹⁸F]F₂-kaasua. Tyypillisesti ¹⁸F-leimausmenetelmät onkin jaettu nukleofiiliseen ja elektrofiiliseen fluoraukseen. Tuoreimpia kehitettyjä leimausmenetelmiä, esimerkiksi elektronirikkaiden areenien leimaamiseen, ovat siirtymämetallivälitteiset ¹⁸F-fluorausreaktiot. Niillä on ¹⁸F-fluorattu rakenteita, jotka ovat ennen olleet lähes mahdottomia leimata. Eräs fenolien ¹⁸F-fluoraukseen sopiva siirtymämetalli on rutenium, jolla on todistettusti kyetty leimaamaan myös useita eri funktionaalisia ryhmiä sisältäviä fenoleita hyvällä radiokemiallisella puhtaudeella ja saannolla.

Purinergisiä P2X₇-reseptoreita on havaittu löytyvän useista solutyypeistä ympäri kehoa. Tärkeimpiä niistä ovat mm. immuunipuolustuksen sekä keskus- että ääreishermoston solut. Keskushermostolliset sairaudet saattavat muuttaa hermosolujen muotoa ja toimintaa. P2X₇-reseptorin avulla on voitu mallintaa näihin soluihin vaikuttavien sairauksien toimintaa ja etenemistä muun muassa PET-kuvantamalla. P2X₇-reseptorin antagonistit ovat tähän hyödyllinen väline. Useiden adamantaanijohdannaisien on todettu olevan potentteja ja selektiivisiä antagonisteja P2X₇-reseptorille, minkä ansiosta kiinnostus niiden käyttöön lääkeaineina ja PET-kuvantamiseen sopivina merkkiaineina on kasvanut. 2-kloori-5-[¹¹C]metoksi-*N*-((3,5,7-trifluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidi ([¹¹C]SWM139) on tälläkin hetkellä käytössä oleva merkkiaine, joka on innoittanut vastaavien molekyylien tutkimusta.

Työn tarkoituksena oli syntetisoida eräs mielenkiintoinen adamantaanijohdannainen, 2-kloori-5-fluori-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidi referenssiyhdisteeksi ja prekursoriksi 2-kloori-5-hydroksi-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidi. Prekursori haluttiin ¹⁸F-fluorata ruteniumkompleksivälitteisesti. Ruteniumvälitteiseen ¹⁸F-fluoraukseen käytettiin erilaisia [¹⁸F]fluoridin aktivointimenetelmiä ja reaktiolämpötiloja. 2-kloori-5-[¹⁸F]fluori-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin ruteniumvälitteinen ¹⁸F-fluoraus ei onnistunut.

Avainsanat: PET-kuvantaminen, fluori-18, siirtymämetallivälitteinen ¹⁸F-fluoraus, P2X₇-reseptori, adamantaanijohdannainen

Sisällysluettelo

1	Johdanto.....	1
2	Kirjallisuuskatsaus.....	2
2.1	Fluorin isotoopit lääketieteellisessä kemiassa	2
2.1.1	PET-kuvantaminen	3
2.2	Fluori-18:n tuottaminen	4
2.3	¹⁸ F-fluoraus	5
2.3.1	Nukleofiilinen ¹⁸ F-fluoraus	5
2.3.2	Elektrofiilinen ¹⁸ F-fluoraus	6
2.3.3	Siirtymämetallien käyttö ¹⁸ F-fluorauksissa	7
2.3.3.1	Palladium	7
2.3.3.2	Nikkeli	8
2.3.3.3	Kupari	8
2.3.3.4	Hopea	9
2.3.3.5	Rutenium.....	10
2.4	P2X-reseptoriperhe.....	11
2.5	P2X ₇ -reseptori.....	12
2.5.1	P2X ₇ -reseptorin antagonistit	14
2.5.1.1	Adamantyylibentsamidiyhdisteet.....	15
2.5.1.2	P2X ₇ -reseptorin antagonistit PET-kuvantamisessa.....	17
3	Tutkimusosa	18
3.1	Työn tarkoitus ja taustaa.....	18
3.2	Materiaalit, kemikaalit ja yleiset menetelmät	20
3.2.1	Kemikaalit.....	20
3.2.2	Materiaalit ja menetelmät	20
3.3	2-kloori-5-hydroksi- <i>N</i> -((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)-bentsamidin ja 2-kloori-5-fluori- <i>N</i> -((3-fluoriadamantaan-1-yyli)-metyyli)bentsamidin synteesi.....	21
3.3.1	Metyyliadamantaanikarboksylaatin synteesi	22
3.3.2	Metyyli-3-hydroksiadamantaanikarboksylaatin synteesi.....	23

3.3.3	Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksyylaatin synteesi	24
3.3.4	Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksyylihapon synteesi	25
3.3.5	3-fluoriadamantaanikarboksiamidin synteesi	26
3.3.6	(3-fluoriadamantaan-1-yyli)metamiinin synteesi	27
3.3.7	2-kloori-5-hydroksi- <i>N</i> -((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin synteesi	28
3.3.8	Referenssin, 2-kloori-5-fluori- <i>N</i> -((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin synteesi	29
3.4	Ruteniumkompleksivälitteiset ¹⁸ F-fluoraukset	30
3.4.1	Atseotrooppinen [¹⁸ F]fluoridin kuivaus	31
3.4.2	[¹⁸ F]fluoridin aktivointi QMA-patruunalla	32
3.4.3	2-kloori-5-hydroksibentsoehapon [¹⁸ F]fluoraus	33
3.5	Laskukaavat	34
3.6	Tulokset ja niiden tarkastelu	34
3.6.1	Lähtöaine- 8 ja referenssiyhdisteen 9 synteesi	34
3.6.1.1	Lähtöaineen 8 synteesi	35
3.6.1.2	Referenssiyhdisteen 9 synteesi	36
3.6.2	Lähtöaineen 8 ruteniumvälitteiset ¹⁸ F-fluoraukset	36
3.6.2.1	Lähtöaineen 8 ¹⁸ F-fluoraus atseotrooppisesti kuivatulla [¹⁸ F]fluoridilla	37
3.6.2.2	Lähtöaineen 8 ¹⁸ F-fluoraus QMA-patruunalla aktivoitulla [¹⁸ F]fluoridilla	40
3.6.2.3	2-kloori-5-hydroksibentsoehapon ¹⁸ F-fluoraus	44
4	Johtopäätökset	45
5	Viitteet	46
6	Liitteet	54

Lyhenneluettelo

A-740003	<i>N</i> -(1-(((cyanoimino)(5-quinolinyliamino)methyl)amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide, <i>N</i> -(1-(((syanoimino)(5-kinolinyyliamino)metyyli)amino)-2,2-dimetyylipropyyli)-2-(3,4-dimetoksifenyli)asetamidi
AZD9056	<i>N</i> -(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-adamantan-1-yl)methyl)-2-chloro-5-(3-((3-hydroxypropyl)amino)propyl)benzamide, <i>N</i> -(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-adamantaan-1-yyli)metyyli)-2-kloori-5-(3-((3-hydroksi-propyyli)amino)propyyli)bentsamidi
ADP	adenosinediphospate, adensiinidifosfaatti
A_m	molar activity, molaarinen aktiivisuus
ATP	adenosinetriphospate, adensiinitrifosfaatti
BzATP	2',3'- <i>O</i> -(4-benzoyl-benzoyl)adenosine-5'-triphosphate, 2',3'- <i>O</i> -(4-bentsoyyli-bentsoyyli)adenosiini-5'-trifosfaatti
CDI	1,1'-carbonyldiimidazole, 1,1'-karbonyylidi-imidatsoli
(COCl)₂	oxalyl chloride, oksalylikloridi
DCM	dichloromethane, dikloorimetaani
DMSO	dimethyl sulfoxide, dimetyylisulfoksidi
Et₃N	triethyl amine, trietyyliamiini
EtOAc	ethylacetate, etyyliaetaatti
EtOH	ethanol, etanoli
FDG	2-fluoro-2-deoxy- <i>D</i> -glucose, 2-fluori-2-deoksi- <i>D</i> -glukoosi
[¹⁸F]FDOPA	6-[¹⁸ F]fluoro-L-DOPA, 6-[¹⁸ F]fluori-L-DOPA
H₂SO₄	sulfuric acid, rikkihappo
HCl	hydrochlorid acid, suolahappo
HNO₃	nitric acid, typpihappo
^{iPr}ImCl	1,3- <i>bis</i> (2,6-diisopropylphenyl)imidazoliumchloride, 1,3- <i>bis</i> (2,6-diisopropyylifenyli)imidatsoliumkloridi
K222	Kryptofix222, 4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosane, 4,7,13,16,21,24-heksaoksa-1,10-diazabisyklo[8.8.8]heksaeikosaani
K₂C₂O₄	potassium oxalate, kaliumoksalaatti
KN-62	1-(<i>N,O-bis</i> (5-isoquinolinesulfonyl)- <i>N</i> -methyl-L-tyrosyl)-4-phenylpiperazine, 1-(<i>N,O-bis</i> (5-isokinoliinisulfonyyli)- <i>N</i> -metyyli-L-tyrosyyli)-4-fenyylipiperatsiini
LiAlH₄	lithium aluminium hydride, litiumalumiinihydridi
MeCN	acetonitrile, asetonitriili
MeOH	methanol, metanoli

MgSO₄	magnesium sulfate, magnesiumsulfaatti
MRI	magnetic resonance imaging, magneettikuvaus
MS	multiple sclerosis, multippeliskleroosi
NaHCO₃	sodium bicarbonate, natriumvetykarbonaatti
NaCO₃	sodium carbonate, natriumkarbonaatti
NaOH	sodium hydroxide, natriumhydroksidi
NH₄OH	ammonium hydroxide, ammoniumhydroksidi
NMR	nuclear magnetic resonance, ydinmagneettiresonanssi
RCY	radiochemical yield, radiokemiallinen saanto
RT	room temperature, huoneenlämpö
SMW139	2-chloro-5-methoxy- <i>N</i> -((3,5,7-trifluoroadamantan-1-yl)methyl)bentsamide 2-kloori-5-metoksi- <i>N</i> -((3,5,7-trifluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidi
SPE	solid-phase extraction, kiinteäfaasiuutto
THF	tetrahydrofuran, tetrahydrofuraani
TLC	thin layer chromatography, ohutkerroskromatografia
PET	positron emission tomography, positroniemissiotomografia
UV	ultraviolet, ultravioletti

1 Johdanto

Positroniemissiotomografia (PET) on hyödyllinen ja nykyisin paljon käytetty kuvantamismenetelmä. Menetelmässä hyödynnetään positroniemittoivia radionuklideja, joista eniten käytössä ovat mm. hiili-11, typpi-13, happi-15 ja fluori-18. Muitakin radionuklideja voidaan hyödyntää, mutta niiden käyttö on vähäisempää. Jo aiemmin mainituista eniten PET-kuvantamisessa käytetty radionuklidi on fluori-18 monien hyvien ominaisuuksiensa takia. Näitä ovat esimerkiksi sen puoliintumisaika (109,8 min) ja alhainen positronin maksimienergia (635 keV).

P2X₇-reseptori on ionikanavareseptori, joka kuuluu P2X-purinoreseptorien perheeseen. P2X₇-reseptoreita esiintyy läpi ääreis- ja keskushermoston ja niillä on havaittu olevan yhteys erilaisten ääreis- ja keskushermostollisten sairauksien välillä. P2X₇-reseptorin on todettu muuttavan muotoaan hermostollisissa sairauksissa ja muodonmuutos aiheuttaa myös reseptorin toiminnan muuttumisen. Eräässä tutkimuksessa 2-kloori-5-metoksi-*N*-((3,5,7-trifluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin (SMW139) huomattiin sitoutuvan hyvin P2X₇-reseptoriin, vaikka sairauden myötä reseptorin muoto olisi muuttunut. Tämän havainnon jälkeen SMW139:n sitoutumista P2X₇-reseptoriin tutkittiin PET-kuvantamisen avulla valmistamalla ¹¹C-leimattua merkkiainetta [¹¹C]SMW139.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli syntetisoida SMW139:ia muistuttava referenssiyhdiste 2-kloori-5-fluori-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidi ja valmistaa ¹⁸F-fluorauksella lähtöaineesta 2-kloori-5-hydroksi-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidista, 2-kloori-5-[¹⁸F]fluori-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidi ruteniumvälitteisellä radioleimauksella. Ruteniumkompleksin on todettu sopivan emäksisiä sivuryhmiä sisältävien fenolien ¹⁸F-fluoraukseen.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Fluorin isotoopit lääketieteellisessä kemiassa

Fluorin ainoa stabiili isotooppia, fluori-19:ää, hyödynnetään paljon lääketieteellisessä kemiassa, koska sillä on useita hyviä ominaisuuksia. Fluori on kooltaan pieni ja sen Van der Waalsin säde (1,47 Å) on lähellä vedyn vastaavaa (1,20 Å).¹ Fluorilla on myös alkuaineista suurin elektronegatiivisuus, joka aiheuttaa hiilen ja fluorin välisille sidoksille suuren dipolimomentin.² Vaikka fluori on kooltaan hieman vetyä suurempi, sen on havaittu jäljittelevän vetyä monissa hiilyhdisteissä. Se ei aiheuta yhdisteisiin steeristä estettä, joka saattaisi vaikeuttaa mm. yhdisteen sitoutumista elimistössä. Fluorin on huomattu myös muuttavan molekyylin fysiokemiallisia ominaisuuksia mm. vähentämällä yhdisteen emäksisyyttä tai lisäämällä sen rasvaliukoisuutta.¹

Perinteisessä lääketieteellisessä kemiassa pyritään mallintamaan luonnosta löytyviä molekyyliä tai niiden johdannaisia. Nämä luonnosta löytyvät yhdisteet eivät usein sisällä fluoria tai sitä on niissä hyvin vähän. Fluorin käyttö yleistyi, kun havaittiin, että jopa yhden fluoriatomin lisääminen biologisesti aktiivisiin luonnonyhdisteisiin sai aikaan muuttuneen farmakologisen vaikutuksen. Yhdisteiden metabolinen pysyvyys kasvaa, jos niihin liitetään fluoria, sillä fluori estää soluhengityksen vaikutuksia molekyyliin. Rasvaliukoisuuden lisääntyminen parantaa molekyylin solukalvonläpäisevyyttä, sillä solukalvo on fosfolipidikaksoiskalvo. Fluori lisää myös molekyylin sitoutumisaffiniteettia sen kohdeproteiiniin, joka voi olla esim. solukalvon reseptori.¹

Fluorilla on stabiilin isotoopin lisäksi useita radioaktiivisia isotooppeja. Fluori-18:n on yksi näistä radioaktiivisista isotoopeista ja sen puoliintumisaika on 109,8 min, sillä on alhainen positronin maksimienergia (635 keV) ja se puoliintuu sekä 97 %:sesti positroniemissiona että 3 %:sesti elektronikaappauksella. Fluori-18:n pidempi puoliintumisaika, verrattuna esimerkiksi hiili-11:een (20,4 min), mahdollistaa jopa monimutkaisten, radiosynteettisten tekniikoiden käytön ja sen kuljettamisen kuvauspaikalle muualta. Alhainen positronin maksimienergia mahdollistaa korkean resoluution, joka on hyödyksi tarkan sitoutumispaikan etsinnässä. Näitä fluori-18:n ominaisuuksia hyödynnetään paljon mm. PET-kuvantamisessa.³

2.1.1 PET-kuvantaminen

PET on kuvantamismenetelmä, joka on herkkä, soveltuu pehmytkudoksen kuvantamiseen, mahdollistaa korkean resoluution ja on todella monikäyttöinen.⁴ PET-kuvantamisessa hyödynnetään merkkiaineita, jotka sisältävät radionuklidin, joka emittoi positronin. Tämä emittoitunut positroni menettää energiaansa vuorovaikuttamalla ympäröivän kudoksen kanssa, jolloin positroni lopulta annihiloituu. Annihilaatiossa syntyy kaksi gammakvanttia, jotka sinkoavat vastakkaisiin suuntiin. Gammakvantit liikkuvat samalla nopeudella, jolloin PET-laitteen detektori havaitsee nämä lähes yhtä aikaa detektorille saapuvat kvantit.⁵

PET-kuvantamisessa käytettävä injisoitavan radiolääkkeen määrä on niin pieni, yleensä pikomooleja, että radiolääke itsessään ei häiritse niitä biologisia prosesseja, joita sen avulla kuvannetaan.⁶ Käytettävän radiolääkkeen valintaan vaikuttavat monet asiat, joista tärkein huomioon otettava ominaisuus on radionuklidin puoliintumisaika, sillä se rajoittaa käytettävän radiolääkkeen synteisiä ja sen tulisi sopia käytetyn radiolääkkeen metabolianopeuteen elimistössä. Muita huomionarvoisia ominaisuuksia ovat mm. positronin maksimienergia, radionuklidin kemialliset ominaisuudet ja saatavuus eli radionuklidin tuotantotapa.⁶

Yleisimmin käytetyt lyhytikäiset positroneja emittoivat radionuklidit PET-kuvantamisessa ovat hiili-11, typpi-13, happi-15 sekä fluori-18⁵, joita voidaan tuottaa syklotronilla. Radionuklideja voidaan käyttää radiolääkkeissä pysyvien ytimien tilalla muuttamatta molekyylien ominaisuuksia. Usein kuitenkin radiolääkkeissä vety voidaan korvata fluori-18:lla, koska vedyllä ei ole radioaktiivista isotooppia, joka voitaisiin havaita ihmiskehon ulkopuolella. Taulukossa 1 on esitetty edellä mainittujen radionuklidien muutamia yleisiä ominaisuuksia.⁷

Taulukko 1. Lyhytikäiset positroniemittoivat radionuklidit PET-kuvantamiseen.^{6,7}

Radionuklidi	$T_{1/2}$	Hajoaminen positroniemissiolla (%)	Positronin maksimienergia (MeV)
¹¹ C	20,4 min	β^+ (99)	0,96
¹³ N	10,0 min	β^+ (100)	1,19
¹⁵ O	2,0 min	β^+ (100)	1,72
¹⁸ F	109,7 min	β^+ (97)	0,64

2.2 Fluori-18:n tuottaminen

Fluori-18:aa voidaan tuottaa syklotronilla useilla eri menetelmillä ja käytetyn menetelmän mukaan fluori-18:aa saadaan joko [¹⁸F]fluoridina ([¹⁸F]F⁻) vesiliuoksessa tai [¹⁸F]F₂-kaasuna. Syklotronissa saadaan ¹⁸O(p,n)¹⁸F-ydinreaktiolla aikaan [¹⁸F]fluoridia, kun pommitetaan happi-18:lla rikastettua vettä protoneilla. Tästä reaktiosta saatua [¹⁸F]fluoridia voidaan hyödyntää nukleofiilisessä radioleimauksessa. [¹⁸F]fluoridia saadaan helposti tuotettua korkealla molaarisella aktiivisuudella (A_m).^{2,8}

[¹⁸F]F₂-kaasua voidaan hyödyntää elektrofiilisiin radioleimauksiin. Sitä voidaan tuottaa joko perinteisemmällä tavalla, jossa neon-20:tä pommitetaan deuteriumeilla, ydinreaktiolla ²⁰Ne(d,α)¹⁸F tai ydinreaktiolla ¹⁸O(p,n)¹⁸F, jossa tuotanto tapahtuu syklotronissa pommittamalla [¹⁸O]O₂-kaasua protoneilla. Kun jälkimmäisellä reaktiolla tuotetaan [¹⁸F]F₂-kaasua, tulee [¹⁸O]O₂-kaasun joukkoon lisätä myös kantajakaasu, ¹⁹F-F₂. Kantajakaasun lisääminen kuitenkin laskee fluorattavan yhdisteen molaarista aktiivisuutta. Koska jokaisesta [¹⁸F]F₂-kaasumolekyylistä vain toinen fluoriatomi voi reagoida halutun yhdisteen kanssa, tällöin saatava teoreettinen radiokemiallisen saannon maksimi voi olla vain 50 %.^{2,8}

Kuten on jo aiemmin mainittu sekä elektrofiiliseen fluoraukseen sopiva [¹⁸F]F₂-kaasu että nukleofiiliseen fluoraukseen sopiva [¹⁸F]fluoridi voidaan tuottaa useilla eri menetelmillä erilaisista lähtöaineista. Lähtöaineesta ja menetelmästä riippuen lopputuloksena saavat molaariset aktiivisuudet vaihtelevat. Korkeimmat molaariset aktiivisuudet saadaan tuottamalla [¹⁸F]fluoridia. Eri ydinreaktiolla tuotettuja korkeimpia molaarisia aktiivisuuksia on kirjattu taulukkoon 2.

Taulukko 2. Korkeimpia tuotettuja molaarisia aktiivisuuksia.

Käytetty ydinreaktio	Tuote	Korkein tuotettu A _m (GBq/μmol)	Viite
²⁰ Ne(d,α) ¹⁸ F	[¹⁸ F]F ⁻	370	9
¹⁸ O(p,n) ¹⁸ F	[¹⁸ F]F ⁻	43 000	10
¹⁸ O(p,n) ¹⁸ F	[¹⁸ F]F ₂	55	11
²⁰ Ne(d,α) ¹⁸ F	[¹⁸ F]F ₂	0,37	12

Näiden tilalla voidaan käyttää myös halogeeneja, joista paras on jodi, vaikka sulfonaattien esterit ovat yleisesti parempia. Myös ryhmän sijainnilla on vaikutusta substituution onnistumisen kannalta.^{8,15} Esimerkiksi paljon PET-kuvantamisessa käytetty [¹⁸F]FDG, 2-[¹⁸F]fluori-2-deoksi-*D*-glukoosi¹⁶ voidaan tuottaa nukleofiilisellä [¹⁸F]fluorauksella.¹⁷

Aromaattisten yhdisteiden nukleofiilinen ¹⁸F-fluoraus tehdään S_NAr-mekanismilla. Nukleofiilisen ¹⁸F-fluorauksen onnistumiseksi aromaattisessa renkaassa tulee olla, *orto*- tai *para*-asemassa, jokin elektroneja puoleensavetävä ryhmä. Tällaisia ovat mm. -NO₂-, -CF₃-, -CN- ja -CHO-ryhmät.⁸ Näiden ryhmien lisäksi nukleofiilisen aromaattisen substituution onnistumiseksi tarvitaan usein myös korkeita reaktiolämpötiloja sekä polaarisia, aproottisia liuottimia. Näitä ei tarvita alifaattisten yhdisteiden nukleofiilisessä fluorauksessa.¹⁵ Aromaattisella nukleofiilisellä ¹⁸F-fluorauksella voidaan tuottaa esimerkiksi 6-[¹⁸F]fluori-L-DOPA:a ([¹⁸F]FDOPA).¹⁸

2.3.2 Elektrofiilinen ¹⁸F-fluoraus

Elektrofiilisessä fluorauksessa käytetään [¹⁸F]F₂-kaasua. [¹⁸F]F₂-kaasulla, joka reagoi kationin (F⁺) lailla, voidaan fluorata elektronirikkaita lähtöaineita kuten alkeeneja, aromaattisia renkaita tai karbanioneja. Reaktiomekanismit elektrofiiliselle ¹⁸F-fluoraukselle ovat aromaattinen substituutioreaktio (S_EAr) ja alkeeneilla additioreaktio. Vaikka reaktiot ovat nopeita ja yksinkertaisia, heikon paikkaselektiivisyyden vuoksi reaktiossa muodostuu useita sivutuotteita. [¹⁸F]F₂-kaasu reagoi kiivaasti ja siksi sen käyttö ei vaadi korkeita lämpötiloja. Reaktiivisuutensa takia [¹⁸F]F₂-kaasun käyttö fluorauksessa ei ole spesifinen menetelmä ja usein synnyttää myös paljon ei-toivottuja sivutuotteita sitoutumalla fluorattavan yhdisteen kaikkiin mahdollisiin nukleofiilisiin kohtiin,¹⁹ josta seuraa haastavat puhdistukset.²⁰

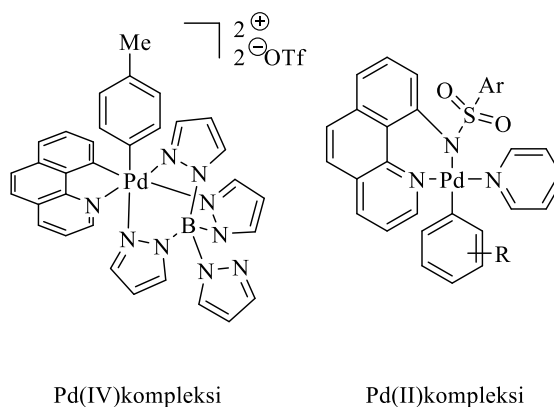
[¹⁸F]F₂-kaasua voidaan myös jatkokäsitellä, jotta synteetin paikkaselektiivisyys ja radiokemiallinen saanto kasvavat.⁸ Toinen vaihtoehto vaikuttaa reaktion paikkaselektiivisyyteen on valita reaktioon sopiva hyvä lähtevä ryhmä. Esimerkiksi selektiivisessä elektrofiilisessä aromaattisen renkaan fluorauksessa vaaditaan renkaan aktivaatio ja hyvä, helposti lähtevä ryhmä. Tällaisia käytettyjä ryhmiä ovat mm. germanium⁸, erilaiset elohopeaa sisältävät ryhmät^{12,21}, alkyloitu tina¹² sekä boorihapot²² että -esterit²³. Näistä jälkimmäiset ovat nykyisin eniten käytetyt lähtevät ryhmät elektrofiilisessä ¹⁸F-fluorauksessa. Kolmas mahdollisuus vaikuttaa reaktion paikkaselektiivisyyteen on käyttää vähemmän reaktiivisia fluorausreagensseja [¹⁸F]F₂-kaasun sijaan. Tällaisia reagensseja ovat mm. *N*-fluoriyhdisteet esim. *N*-[¹⁸F]fluoribentseenisulfonimidi ja [¹⁸F]Selectfluorin *bis*(triflaatti), 1-kloorimetyyli-4-[¹⁸F]fluori-1,4-diatsoniabisyklo[2.2.2]oktaani *bis*(tetrafluoriboraatti). Paljon PET-kuvantamisessa käytettyjä yhdisteitä 2-[¹⁸F]fluori-L-tyrosiinia ja 6-[¹⁸F]fluori-3,4-dihydroksi-L-fenyylalaniinia, voidaan tuottaa elektrofiilisellä additioreaktiolla.^{8,15}

2.3.3 Siirtymämetallien käyttö ^{18}F -fluorauksissa

Aromaattisten rengasrakenteiden fluorausta on tehty alun perin Balz–Schiemann-reaktiolla, jonka ongelmana on siinä käytetty hyvin räjähdysherkkä ja myrkyllinen areenidiatsonium.²⁴ Yksinkertaisia aromaattisia rengasrakenteita on voitu fluorata myös $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ -metodilla. Tämän metodin haasteena on se, että renkaassa tulee olla sekä hyvä lähtevä ryhmä että elektroneja puoleensavetävä ryhmä ja usein synteesi vaatii todella rajut reaktio-olosuhteet, mikä usein luo haasteita radioleimattavien lähtöaineiden syntetisoinnissa. $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ -metodilla ^{18}F -fluoraus ei edes onnistu aktivoimattomaan bentseenirenkaaseen eikä elektronirikkaaseen yhdisteeseen.^{25,26} Siirtymämetallien käyttö ^{18}F -fluorauksissa on osoittautunut toimivaksi ratkaisuksi $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ -metodin haasteisiin.¹⁵ ^{18}F -fluorauksessa käytettyjä siirtymämetalleja ovat mm. palladium^{27,28}, nikkeli^{29–31}, kupari^{32,33}, hopea^{34–36} ja rutenium^{37,38}. Siirtymämetallivälitteisen ^{18}F -fluorauksen etuja ovat matalammat reaktiolämpötilat kuin perinteisissä ^{18}F -fluorausmenetelmissä, lähtöaineiden pysyvyys huoneenlämmössä ja mahdollisuus hyödyntää menetelmää useille erilaisille yhdisteille.²⁵

2.3.3.1 Palladium

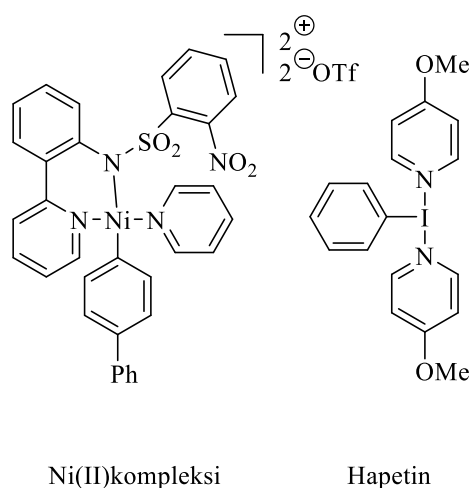
Palladium oli ensimmäisiä siirtymämetalleja, joita alettiin tutkia ^{18}F -fluorauksessa, sillä palladiumia oli käytetty jo paljon erilaisiin orgaanisiin synteeseihin.³⁹ Ensimmäinen palladiumkompleksia tutkinut ryhmä oli Lee et al.⁴⁰ vuonna 2011. Vuonna 2013 Ritter et al.²⁷ julkaisivat tutkimuksen, jossa oli tarkoitus kehittää aiemmin tutkittujen palladium(II)kompleksivälitteisten synteisien⁴¹ radiokemiallista saantoa. Tässä tutkimuksessa käytettiin palladium(IV)kompleksia ja sillä saatiin tuotettua haluttua lopputuotetta riittävällä radiokemiallisella saannolla. Ongelmaksi muodostui kuitenkin käytettyjen palladiumkompleksien epäkäytännöllisyys, koska kompleksin käyttö vaatii inertit olosuhteet, jonka vuoksi myös radioleimattavien lähtöaineiden synteetit saattoivat muodostua haastaviksi. Myös leimattavan yhdisteen jotkin sivuryhmät aiheuttivat ongelmaa, sillä leimaus ei onnistunut, jos yhdiste sisälsi nukleofiilisiä, emäksisiä sivuryhmiä kuten amiineja. Kuvassa 2 on esitetty ^{18}F -fluorauksissa käytettyjen palladiumkompleksien rakenteet.



Kuva 2. Palladiumkompleksien rakenteet.

2.3.3.2 Nikkeli

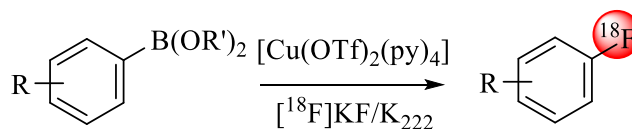
Nikkelin käyttöä ^{18}F -fluorauksissa alettiin tutkia, koska se on halvempi kuin aiemmin käytetty palladium ja sen ajateltiin ylittävän palladiumin käytössä havaitut haasteet. Ritter et al.²⁹ vuonna 2012 käyttivät nikkelikompleksia yhdessä hapettimen kanssa ^{18}F -fluorauksissa. Kuvassa 3 on esitetty nikkelikompleksin ja sen kanssa tarvittavan hapettimen rakenteet. Tällä tavalla leimaamisen etuja olivat mm. menetelmän yksivaiheisuus, toimiminen huoneenlämmössä, huomattavasti korkeammat radiokemialliset saannot kuin palladiumia käytettäessä ja, ettei nikkelikompleksi ollut lainkaan kosteusherkkä, joten ^{18}F fluoridia voitiin hyödyntää suoraan vesiliuoksessaan ilman kuivaamista. Menetelmä ei kuitenkaan toiminut tertiäärisille amiineille. Myöhemmin vuonna 2016 Ritter et al.³⁰ tekivät uuden tutkimuksen nikkelin käytöstä ja onnistuivat aryyliboorihappojen ja niiden estereiden ^{18}F -radioleimauksissa nikkeli(II) σ -aryylikompleksilla. Vaikka tällä menetelmällä voitiin ^{18}F -radioleimata myös emäksisissä olosuhteissa, jäi tämän menetelmän ongelmaksi kuitenkin edelleen toimimattomuus esimerkiksi Lewisin emäkselle.



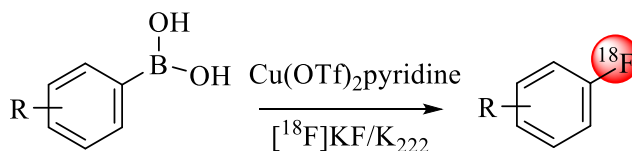
Kuva 3. Nikkelikompleksin ja käytetyn hapettimen rakenne.

2.3.3.3 Kupari

Muilla aiemmin tutkituilla siirtymämetalleilla kuten palladiumilla ja nikkelillä oli yksi yhteinen ongelma. Niiden komplekseja ei ollut kaupallisesti saatavilla, mikä vaikeutti tuotantoprosessien yksinkertaistamista. Kuitenkin kuparin tetrakis(pyridiini)kupari(II) triflaattia on saatavana kaupallisena ja sen avulla vuonna 2014 Gouverneur et al.³² onnistuivat pinakoli-johdettujen aryylibooriestereiden ^{18}F -fluorauksessa. Menetelmän etuna oli sen monipuolisuus elektronirikkaiden ja -köyhien molekyylien leimaamisessa ja useiden eri funktionaalisten ryhmien sietokyky. Menetelmä ei kuitenkaan kestänyt suojaamattomia alkoholeja eikä emäksiä. Prekursoreina voidaan kuitenkin käyttää aryyliboorihappoja⁴² ja trialkyylitinattuja areeneja.⁴³ Kuvassa 4 on esitetty kupari(II)kompleksin käyttö aryylibooriestereiden ja -happojen ^{18}F -fluorausreaktioissa.



Gouverneur, 2014

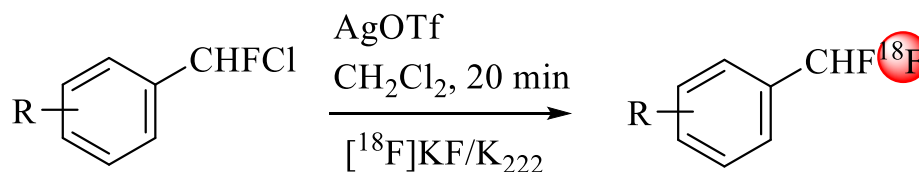


Scott, 2015

Kuva 4. Kupari(II)kompleksin käyttö aryylibooriestereiden ja -happojen ^{18}F -fluorausreaktioissa, mukailtu sekä Gouverneur et al.³² että Scott et al.⁴² tutkimuksista.

2.3.3.4 Hopea

Vuonna 2010 Gouverneur et al.³⁴ havaitsivat, että hopeatriflaattia voidaan lisätä [^{18}F]Selectfluorin bis(triflaattilla) tehtäviin aryylistanniinien ^{18}F -fluorauksiin. Hopean lisääminen reaktioon nopeutti sitä ja nosti lopullista saantoa. Tällä menetelmällä voitiin tuottaa myös kliinisesti merkittävää radiolääkettä: [^{18}F]FDOPA. Gourverneur et al.³⁵ vuonna 2016 havaitsivat, että hopea(I)kompleksilla voitiin ^{18}F -fluorata useita erilaisia tolueenin halogeenijohdannaisia. Parhaiten tällä menetelmällä saatiin leimattua sellaisia yhdisteitä, joissa oli bromia. Vaikka reaktio-olosuhteet olivat lempeät, menetelmän haasteeksi jäi tuotteiden matala molaarinen aktiivisuus. Kuvassa 5 on esitetty reaktiokaavio yhdelle tolueenin halogeenijohdannaisen ^{18}F -fluorausreaktioista. Myöhemmin vuonna 2017 Lu et al.³⁶ onnistuvat ^{18}F -fluorata hopeavälitteisesti tyydyttymättömiä karbamaatteja. Menetelmällä fluoraus tapahtuu intramolekulaarisesti muodostuvaan rengasrakenteeseen hyödyntäen radikaalireaktiota, jolla sidosten migraatio saadaan aikaan. Kohdemolekyylin fluoraus ja syklistointi eivät kuitenkaan onnistu, jos molekyyli sisältää elektroniköyhän kaksoissidoksen.

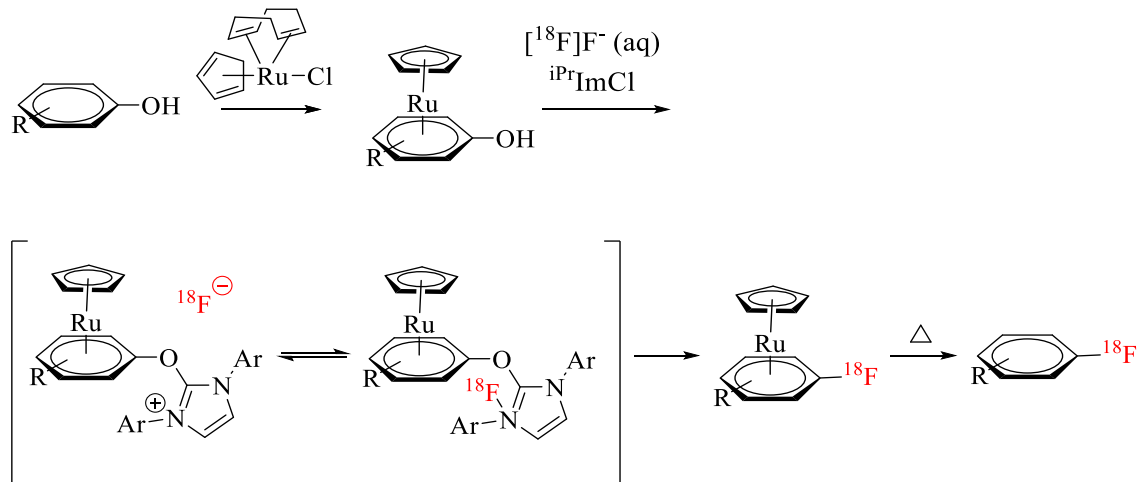


Kuva 5. ^{18}F -fluorausreaktioesimerkki tolueenin halogeenijohdannaiseen hopea(I)kompleksivälitteisesti. Mukailtu Gouverneur et al.³⁵ tutkimuksesta.

2.3.3.5 Rutenium

Rutenium on yksi uusimmista siirtymämetalleista, joita on käytetty ^{18}F -fluorauksessa. Usein fenolien ^{18}F -deoksifluorauksen ongelma on ollut reaktiomekanismi, jonka kautta reaktiot tapahtuvat. Aromattisten nukleofiilisten substituutioreaktioiden reaktiomekanismeja on kaksi, joista molemmat mekanismit ovat kaksivaiheisia.⁴⁴ Mekanismit ovat joko additio–eliminaatio tai eliminaatio–additio. Kaksivaiheisuudesta koitua ongelma on molemmissa reaktioissa syntyvä korkeaenerginen intermediaatti, jonka aiheuttama negatiivinen varaus tulee stabiloida jollakin elektroneja puoleensavetävällä ryhmällä.⁴⁵ Kuitenkin Ritter et al.⁴⁶ vuonna 2016 onnistuivat fenolien fluorauksessa yksivaiheisella keskitetyllä nukleofiilisellä aromaattisella substituutioreaktiolla ($\text{cS}_{\text{N}}\text{Ar}$). Tutkimuksessa käytettiin fluoraukseen PhenoFluor-fluorausreagenssia, mutta sitä ei kuitenkaan voitu hyödyntää suoraan fluori-18:n synteeseihin, sillä tällä mekanismilla fluoria tarvittiin ylimäärin, mikä ei fluori-18:n syntetiikassa onnistu.

Vuonna 2017 Ritter et al.³⁷ onnistuivat fenolin ^{18}F -deoksifluorauksessa ruteniumkompleksilla. Tällä menetelmällä onnistuttiin jopa suuria funktionaalisia ryhmiä sisältävien ja elektronirikkaiden fenolien ^{18}F -fluorauksessa. Ruteniumilla voidaan fluorata myös *ortho*-substituoituja ja amiineja sisältäviä molekyyliä. Ruteniumvälitteinen ^{18}F -fluoraus tapahtuu ruteniumkompleksin ja fenolin bentseenirenkaan välille muodostuvan η^6 - π -koordinaatiosidoksen kautta. Koordinaatiosidoksen toimintaperiaate on esitetty kuvassa 6. Ruteniumkompleksin etuja ovat sen hyvä kosteuden sietokyky ja se, ettei ruteniumkompleksin käyttö vaadi inerttiä ilmakehää. Menetelmän heikkous on korkea lämpötila, joka tarvitaan irrottamaan ruteniumkompleksi ja 1,3-*bis*(2,6-diisopropyyli)imidatsoliumkloridi ($^{\text{iPr}}\text{ImCl}$) [^{18}F]fluoriareenista.⁴⁷ Seuraavana vuonna, 2018 Ritter et al.³⁸ ^{18}F -fluorasivat ruteniumilla onnistuneesti myös polypeptidiketjuja. Huomattavinta oli, että fluorauksella voitiin liittää fluori suoraan vedyn tilalle.



Kuva 6. Ruteniumkompleksin koordinaatiosidoksen toimintaperiaate. Ruteniumkompleksin käyttö vaatii 1,3-bis(2,6-diisopropyylifenyyl)imidatsoliumkloridin ($iPrImCl$). Mukailtu Ritter et al.³⁷ tutkimuksesta.

2.4 P2X-reseptoriperhe

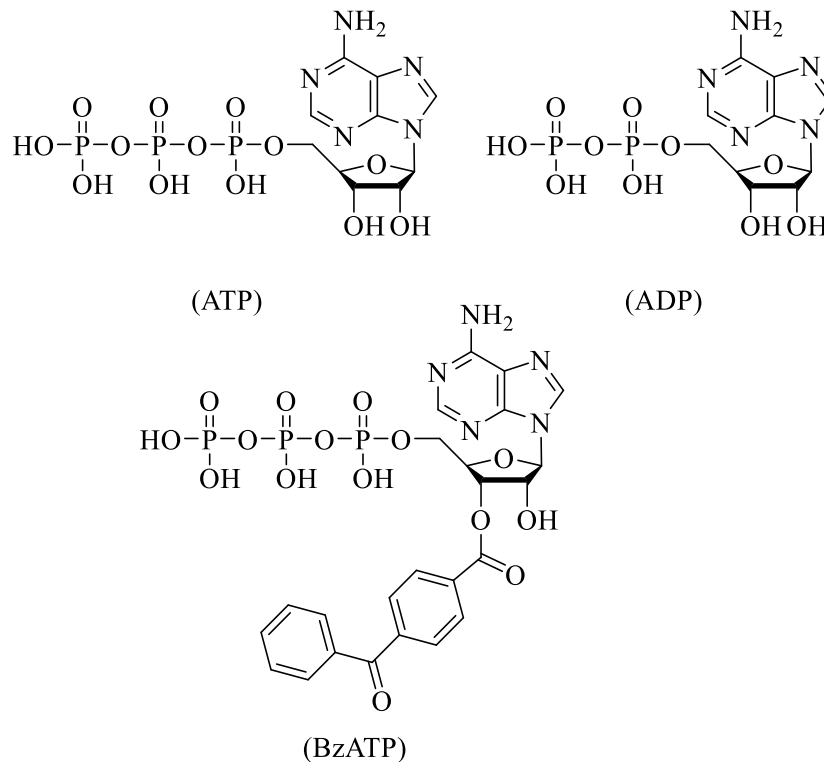
Purinergisiin P2-reseptoreihin kuuluvat P2X- ja P2Y-reseptorit. Näistä kahdesta, P2X-reseptorit muodostavat seitsemän eri reseptoria (P2X₁₋₇) sisältävän reseptoriperheen. Näitä reseptoreita on löydetty paljon mm. keskushermoston hermosoluista ja gliasoluista.⁴⁸ Taulukossa 3 on esitetty P2X-reseptorien esiintyvyys eri osissa hermostoa. P2X-reseptorit koostuvat kolmesta alayksiköstä. Suurin osa näistä reseptoreista on homo-oligomeerejä, eli niiden kaikki alayksiköt ovat identtisiä. Tämän reseptoriperheen alayksikköjen aminohapposekvenssit ovat 40–55 %:sesti identtiset kaikilla muilla paitsi P2X₇-reseptorilla, joka siis eroaa muista perheen reseptoreista eniten.⁴⁹

Taulukko 3. P2X-reseptorien esiintyvyys hermoston eri osissa.⁴⁹

Kudos	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₆	P2X ₇
Sympaattiset hermosolut	x	x	x	x	x	x	x
Parasympaattiset hermosolut		x	x	x	x		
Sensoriset hermosolut	x	x	x	x	x	x	x
Enteeriset hermosolut		x	x	x			x
Keskushermosto		x		x		x	x
Näköhermot		x	x	x	x		x

P2X-reseptorit ovat valikoimattomia ligandivälitteisiä ionikanavia eli ne kuljettavat ioneja, mm. Ca²⁺, K⁺ ja Na⁺, soluihin ja sieltä pois.⁵⁰ P2X-reseptorien pääasiallisena ligandina toimii adensiinitrifosfaatti (ATP), vaikka jotkin näistä reseptoreista voivat sitoa myös ATP:n johdannaista adensiinidifosfaattia (ADP).⁵¹ Myös

2',3'-*O*-(4-bentsoyyli-bentsoyyli)adenosiini-5'-trifosfaatin (BzATP) on todettu toimivan agonistina useille P2X-perheen reseptoreille.⁵² Kuvassa 7 on esitetty ATP:n, ADP:n ja BzATP:n rakenteet. Reseptorit reagoivat ATP:n konsentraation muutoksiin solunulkoisessa tilassa. Reseptorien toiminta voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen (aktivointi-, herkistymis- ja inaktivointivaihe). Aktivointivaiheessa sisäänpäin suuntautuvan virran nopea nousu tapahtuu, kun ATP sitoutuu reseptoriin. Herkistymisvaiheessa ATP:n ollessa sitoutuneena reseptoriin, alkaa hidas hajoaminen, joka loppuu, kun ATP irtoaa reseptorista (inaktivointivaihe). P2X-reseptoreiden ATP:n herkkyys sekä aktivoitumisen että inaktivoitumisen kinetiikka vaihtelevat reseptoreiden välillä esim. P2X₁-reseptori reagoi ATP:n konsentraation muutoksiin jo nanomoolitasolla, mutta P2X₇-reseptori vasta korkeilla mikromoolitasoilla.^{51,53}



Kuva 7. ATP:n, ADP:n ja BzATP:n rakenteet.

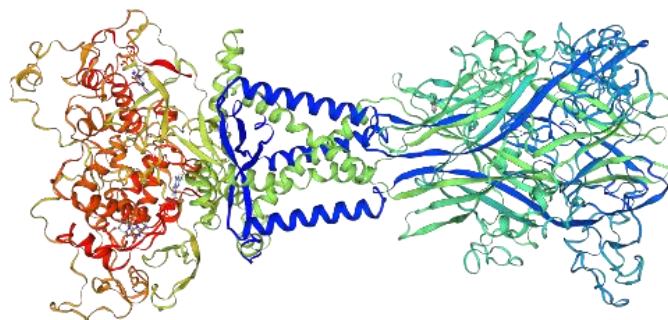
2.5 P2X₇-reseptori

P2X₇-reseptori kuuluu P2X-reseptorien perheeseen. Tätä reseptoria on löydetty sekä keskushermostosta mikrogli-, astrosyytti- ja Schwannin soluista, että useista eri immuunipuolustuksen soluista mm. erytrosyyteistä, lymfosyyteistä ja fibroblasteista. P2X₇-reseptori muuttaa solun sisäpuolista kaliumkonsentraatiota, mikä saa aikaan moniportaisen toimintaketjun, joka aktivoi hermostollisia välittäjäaineita mm. sytokiineja.⁵⁴ Kuten on jo aiemmin mainittu P2X₇-reseptorin toiminta perustuu suuriin, mikromoolitason, ATP:n konsentraatioiden muutoksiin solunulkoisessa tilassa.⁵⁵ P2X₇-reseptorilla on todettu olevan rooli myös elimistön tulehdusvasteessa, sillä normaaleissa olosuhteissa, terveillä henkilöillä, ATP:n

pitoisuudet ovat alhaiset ja P2X₇-reseptori ei aktivoitu. Jos solunulkoisessa tilassa ATP:n pitoisuus nousee, aiheutuu se usein jostakin sairaudesta ja tällöin P2X₇-reseptori aktivoituu.⁵⁶

P2X₇-reseptorin rakenne eroaa hieman P2X-perheen muista reseptoreista. Kaikilla perheen reseptoreilla on kolme alayksikköä, joista ne koostuvat. Niillä kaikilla on myös solukalvon yli ulottuvat, kaksi transmembraanidomeenia ja niiden solun sisäpuolella sijaitseva C-terminaalinen peptidiketju. Kuitenkin P2X₇-reseptoreilla tämä solun sisäpuolinen peptidiketju on huomattavasti pidempi kuin muilla P2X-perheeseen kuuluvilla reseptoreilla. P2X₇-reseptorin C-terminaalinen peptidiketju on 239 aminohappoa pitkä, kun muilla perheen reseptoreilla sen pituus on vain 27-129 aminohappoa. Kuvassa 8 on esitetty P2X₇-reseptorin 3D-mallinnettu molekyyli rakenne. P2X₇-reseptorin vaste ATP:n konsentraation muutoksiin voi syntyä kahdella eri tavalla riippuen altistuksen pituudesta. Jos altistuminen suurelle ATP:n pitoisuudelle on lyhyt, on P2X₇-reseptorin vaste nopea sisäänpäin suuntautuva virta. Jos altistuminen kestää pitkään tai altistumisia tapahtuu usein, on vaste huokoistuminen. Huokoistuessaan reseptori voi päästää solukalvonsa läpi huomattavasti ioneja suurempia molekyyliä, jopa 800–900 Da suuruisia.^{57,58} Huokoistumisen seurauksena lopulta aiheutuu solukuolema. Kuitenkaan muut P2X-perheen reseptorit eivät kykene huokoistumaan, sillä ne reagoivat ATP:n muutoksiin solunulkoisessa tilassa jo selkeästi matalammilla konsentraatioilla.⁵⁹ Eräs ero P2X₇-reseptorin ja muiden P2X-perheen muiden reseptorien välillä on myös BzATP, jonka on huomattu olevan pääasiallista agonistia, jopa 10–30 kertaa, potentimpi.^{56,58} BzATP sitoutuu myös muihin P2X-perheen reseptoreihin, mutta se ei ole läheskään yhtä potenti muille verrattuna P2X₇-reseptoriin.⁵²

P2X₇-reseptorin on todettu olevan usein yliedustettuna soluissa, jotka muuttuvat erilaisten neurologisten sairauksien takia. Tällaisia sairauksia ovat esim. multippeliskleroosi (MS), Alzheimerin tauti ja Huntingtonin tauti.⁵⁹ Esimerkiksi MS-taudissa P2X₇-reseptorin muodon on myös havaittu muuttuneen. Muodonmuutoksen on arvioitu lisänneen taudin ilmaantuvuuden todennäköisyyttä. Hiirillä on havaittu, että P2X₇-reseptorin toiminnan estäminen antagonistilla vähentää aivoinfarktien laajuutta ja neurologisten oireiden ilmaantumista. Näiden tulosten perusteella P2X₇-reseptorin kiinnostavuus tutkimuskohteena on kasvanut. Kiinnostusta herättäviä seikkoja ovat antagonistien käyttö mahdollisina lääke- tai kuvantamisaineina.⁵⁶



Kuva 8. P2X₇-reseptorin 3D-mallinnettu molekyyli rakenne.⁶⁰

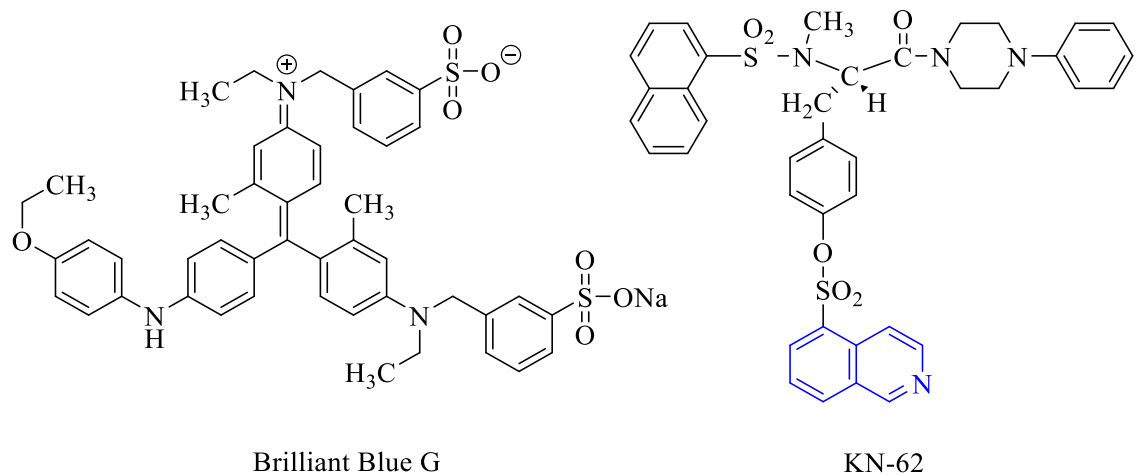
2.5.1 P2X₇ -reseptorin antagonistit

P2X₇-reseptorien tutkimus lääkekohteena on kasvanut ja sille on pyritty löytämään mahdollisia antagonisteja. Antagonistin tärkeimmät ominaisuudet ovat niiden selektiivisyys tutkitulle reseptorille, tässä P2X₇-reseptori, ja hyvä sitoutumiskyky. Ennen varsinaisten selektiivisten antagonistien löytymistä tutkittiin useita erilaisia ATP:n johdannaisia. Näiden johdannaisten ongelma oli kuitenkin niiden valikoimattomuus eli ne eivät olleet täysin selektiivisiä halutulle P2X₇-reseptorille.⁶¹

Yksi ensimmäisistä P2X₇-reseptorille potenteista ja selektiivisistä antagonisteista on vuonna 2000 Jiang et al.⁶² tutkima Brilliant Blue G -molekyyli, natrium-3-[[4-[(E)-[4-(4-etoksianiliini)fenyyli]-[4-[etyyli-[(3-sulfonaattifenyyli)metyyli]atsaniumiyliidiini]-2-metyylisykloheksa-2,5-dien-1-yyliideeni]metyyli]-N-etyyli-3-metyylianiiliini]metyyli]-bentseenisulfonaatti. Kuitenkin tämän antagonistin haasteeksi osoittautui sen sitoutuminen P2X₄-reseptoriin jopa 15-kertaisesti paremmin kuin P2X₇-reseptoriin.

Isokinoliini toimii runkona useille P2X₇-reseptorin antagonisteille ja vuonna 2001 Jacobson et al.⁶³ esittelivät P2X₇-reseptorille potentin ja selektiivisen antagonistin, isokinoliinijohdannaisen,

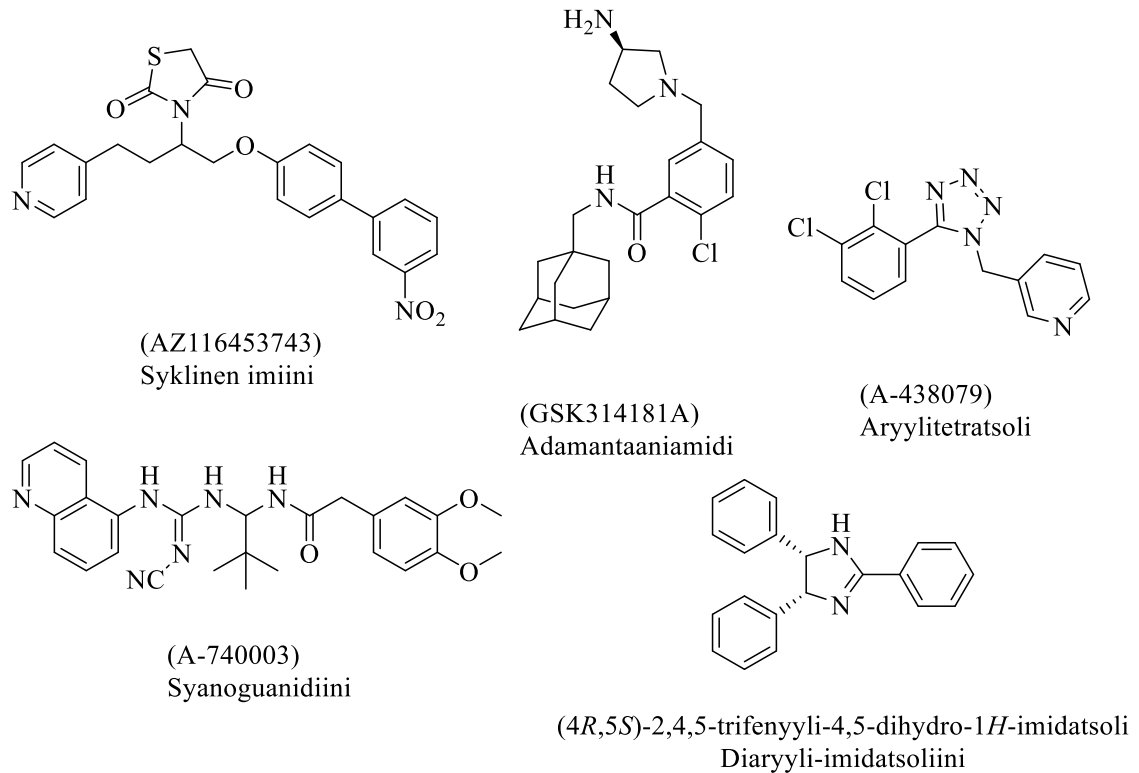
1-(*N,O*-bis(5-isokinoliinisulfonyyli)-*N*-metyyli-*L*-tyrosyyli)-4-fenyyli-piperatsiini (KN-62). Kuvassa 9 on esitetty sekä Brilliant Blue G:n ja KN-62:n rakenteet, että isokinoliinirunko, joka näkyy KN-62:n rakenteessa.



Kuva 9. Brilliant Blue G:n ja KN-62:n rakenteet. Isokinoliinirunko on merkattu sinisellä värillä.

Baraldi et al.⁶⁴ esittelivät vuonna 2003 KN-62:n johdannaisia mahdollisina antagonisteina P2X₇-reseptorille. Tutkimuksessa selvitettiin eri funktionaalisten ryhmien vaikutusta siihen, kuinka molekyylit sitoutuvat P2X₇-reseptoriin. Useiden tutkittujen KN-62 johdannaisten huomattiin olevan jopa hieman parempia antagonisteja kuin alkuperäinen molekyyli. Näiden molekyylien löytäminen avasi uusia mahdollisuuksia antagonistien etsimiselle. Nyt syklisten

imiinien,^{65,66} adamantaaniamidien,⁶⁶ diaryyli-imidatsoliinien,⁶⁷ syanoguanidiinien⁶⁸ ja substituoitujen aryyli-tetratsolien⁶⁸ tutkimus on johtanut monien uusien rakenteellisesti toisistaan eroavien antagonistien löytymiseen. Kuvassa 10 on esitettyä edellä mainittuja P2X₇-reseptorin antagonisteina toimivia molekyylejä.



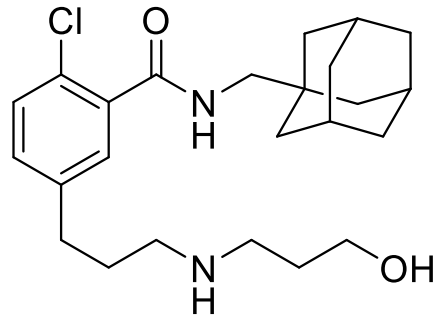
Kuva 10. P2X₇-reseptorin antagonisteina toimivien: imiinien,^{65,66} adamantaaniamidien,⁶⁶ diaryyli-imidatsoliinien,⁶⁷ syanoguanidiinien⁶⁸ ja substituoitujen aryyli-tetratsolien⁶⁸ yhdisteiden esimerkkirakenteet. Mukailtu lähteistä.

Vuonna 2003 Baxter et al.⁶⁹ tutkivat erilaisia adamantaanihäkin sisältäviä molekyylejä ja havaitsivat, että adamantaani-indatsoliamidi on todella potentti ja kaikin puolin P2X₇-reseptorin antagonistin kriteereihin sopiva molekyyli. Tämän tutkimuksen jälkeen adamantaanijohdannaiset alkoivat kiinnostaa potentteina ja selektiivisinä antagonisteina. Adamantaanijohdannaisien etu on näiden molekyylien pieni koko ja mahdollisuudet yhdistellä eri funktionaalisia ryhmiä molekyylin rakenteeseen.

2.5.1.1 Adamantyylibentsamidiyhdisteet

Myös useat lääkeyhtiöt kiinnostuivat adamantaanijohdannaisista antagonisteina ja AstraZeneca oli ensimmäinen yhtiö, joka alkoi tutkimaan mahdollisia P2X₇-reseptorin antagonisteja myös kliinisissä tutkimuksissa. *N*-(((3*R*,5*R*,7*R*)-adamantaan-1-yyli)metyyli)-2-kloori-5-(3-((3-hydroksipropyli)amino)propyyli)-bentsamidi (AZD9056), kuvassa 11, oli

ensimmäinen AstraZenecan kliinisiin tutkimuksiin edennyt P2X₇-reseptorin antagonisti, sillä sen oli aiemmin todettu olevan potenti ja selektiivinen. Faasi Ila -vaiheen tutkimuksessa havaittiin, että AZD9056 sekä vähensi nivelien turvotusta ja arkuutta että paransi potilaiden fyysistä suorituskykyä, mutta Faasi Iib -vaiheen tutkimuksessa ei saatu haluttuja tuloksia suuremmalla testiryhmällä, joten AZD9056 ei edennyt pidemmälle tutkimuksiin.⁷⁰

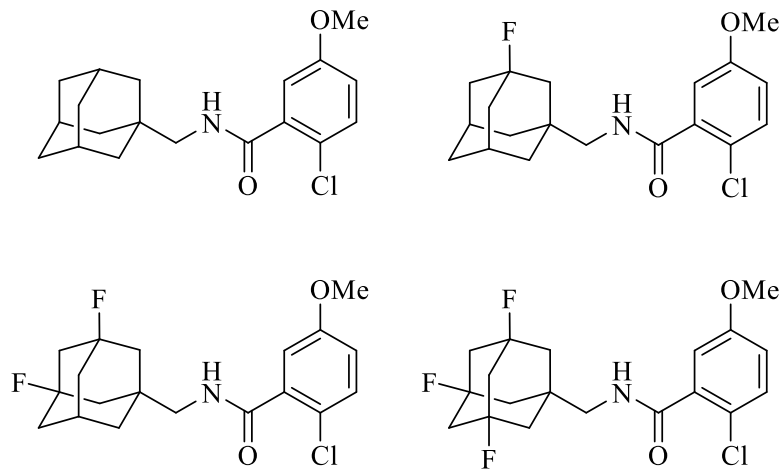


AZD9056

Kuva 11. AZD9056 molekyylin rakenne.

AZD9056:n ja muutamien muiden molekyylien epäonnistuneiden tutkimusten jälkeen mielenkiinto adamantaanijohdannaisia kohtaan ei kuitenkaan vähentynyt. Tutkimusta on tehty vuosien varrella funktionaalisten ryhmien vaikutuksesta molekyylien kykyyn sitoutua P2X₇-reseptoriin ja sen metabolisiin ominaisuuksiin elimistössä.⁷¹ Vuonna 2017 Wilkinson et al.⁷² havaitsivat, että useiden P2X₇-reseptorin antagonisteina toimivien molekyylien ongelma oli niiden suuri molekyylipaino, joka hidastaa molekyylin siirtymistä verestä kudoksiin. Lisäksi tutkimusryhmä havaitsi, että adamantaanihakkin sisältävien antagonistien lipofiilisyyden oli usein varsin korkea. Lipofiilisuutta yritettiin muuttaa korvaamalla adamantaanihakki jollakin pienemmällä hiiliketjulla, mutta sen havaittiin heikentävän molekyylien sitoutumista P2X₇-reseptoriin.⁷³

Wilkinsonin tutkimusryhmineen huomasi, että adamantaanihakkin tertiäärisiin hiiliin liitetyt fluoriatomit sekä lisäävät yhdisteen metabolista stabiilisuutta että vähentävät yhdisteen reagoitua elimistön entsyymien kanssa. Bentseeniryhmään liitetyt typpiatomit vähensivät yhdisteiden lipofiilisuutta.⁷² Tämän tutkimuksen jälkeen vuonna 2018 Janssen et al.⁷⁴ tutkivat, kuinka tällaiset fluoratut adamantaanijohdannaiset toimivat *in vivo*. Heidän tutkimuksissaan kävi ilmi, että trifluoratulla molekyyllillä on paras metabolinen stabiilisuus, sitoutumisaffiniteetti ja sen todettiin muodostavan vähiten metaboliitteja, verestä mitattuna, verrattuna fluoraamattomaan-, mono- ja difluorattuun molekyyliin verrattuna. Kuvassa 12 on esitetty Janssenin et al.⁷⁴ tutkimuksen neljän adamantaanijohdannaisen rakenteet.

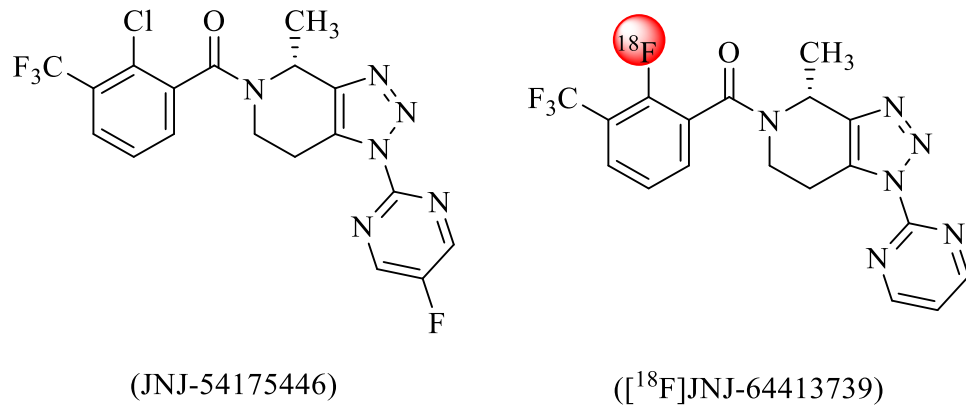


Kuva 12. Adamantaanijohdannaisten rakenteita.^{72,74}

2.5.1.2 P2X₇-reseptorin antagonistit PET-kuvantamisessa

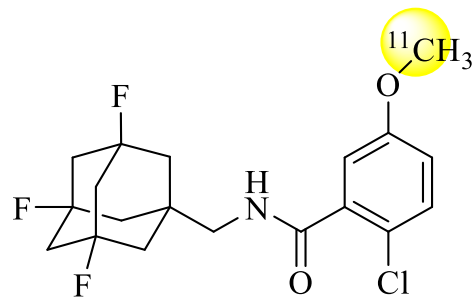
P2X₇-reseptorien antagonisteina toimivista molekyyleistä vain osaa on hyödynnetty myös PET-kuvantamisessa tai siihen liittyvässä tutkimuksessa. P2X₇-reseptorin antagonistien käyttö on selkeästi vähäisempää PET-kuvantamisessa kuin muissa kliinisissä tutkimuksissa. Kuitenkin muutamia antagonisteja on hyödynnetty myös PET-kuvantamiseen. PET-kuvantamisen avulla hyödynnettävät P2X₇-reseptorin antagonistit voisivat tarjota tarvittavaa lisätietoa keskushermostollisten sairauksien patofysiologiasta eli siitä, kuinka tauti syntyy ja kuinka se toimii ja etenee elimistössä. P2X₇-reseptorin antagonistina toimivaa

(*R*)-(2-kloori-3-(trifluorimetyyli)fenyyli)(1-(5-(fluoripyrimidin-2-yyli)-4-metyyli-1,4,6,7-tetrahydro-5*H*-[1,2,3]triatsolo[4,5-*c*]pyridin-5-yyli)metanonia (JNJ-54175446) mallinnettiin (*R*)-(3-[¹⁸F]fluori-2-(trifluorimetyyli)pyridin-4-yyli)((6*S*)-6-metyyli-1-(pyrimidin-2-yyli)-1,4,6,7-tetrahydro-5*H*-[1,2,3]triatsolo[4,5-*c*]pyridin-5-yyli)metanonilla ([¹⁸F]JNJ-64413739). Kuvassa 13 on esitetty molempien juuri mainittujen yhdisteiden rakenteet. Vuonna 2019 Koole et al.⁷⁵ tutkivat ensimmäistä kertaa P2X₇-reseptoriin vaikuttavan molekyylin, JNJ-54175446, biologista esiintymistä ihmiselimistössä ja annoksen vaikutusta molekyylin sitoutumiseen [¹⁸F]JNJ-64413739:lla. Tutkimuksessa todettiin antagonistin poistuvan elimistöstä sekä maksan että munuaisten kautta. Myös vuoden 2020 Xu et al.⁷⁶ tutkimuksessa JNJ-54175446:ia mallinnettiin fluori-18:lla leimatulla [¹⁸F]JNJ-64413739:lla.



Kuva 13. JNJ-54175446:in ja [¹⁸F]JNJ-64413739:n rakenteet.

Kuten jo aiemmin mainittu adamantaanijohdannaisten on todettu olevan potentteja ja selektiivisiä P2X₇-reseptorin antagonisteja. Kiinnostuksen kasvettua adamantaanijohdannaisten tutkimusta kohtaan vuonna 2018 Wilkinson et al.⁷⁴ tekivät tutkimuksen, jossa hyödynnettiin adamantaanijohdannaista SMW139:ia. Tässä tutkimuksessa radiolääkeaineena toimi hiili-11:llä leimattu [¹¹C]SMW139 ja suurin osa tehdyistä kokeista suoritettiin hiirillä. Kuvassa 14 on esitetty [¹¹C]SMW139:n rakenne.

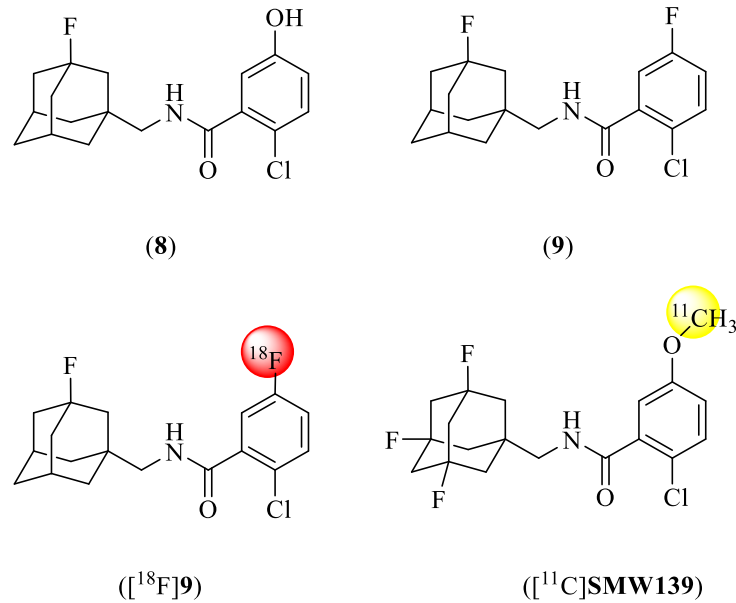


Kuva 14. [¹¹C]SMW139:n rakenne.

3 Tutkimusosa

3.1 Työn tarkoitus ja taustaa

Tutkimuksen tavoitteena oli syntetisoida ruteniumkompleksivälitteisesti 2-kloori-5-[¹⁸F]fluori-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidi, [¹⁸F]**9**. Työssä syntetisoitiin ensin referenssiyhdiste 2-kloori-5-fluori-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidi, **9**, jolle kehitettiin HPLC-puhdistusmenetelmä ja tämän jälkeen syntetisoitiin ruteniumvälitteisesti ¹⁸F-fluorattava lähtöaine, 2-kloori-5-hydroksi-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidi, **8**. Kuvassa 15 piirrettynä kaikkien kolmen edellä mainitun yhdisteen rakenteet sekä tutkimusta innoittaneen [¹¹C]SMW139:n rakenne.⁷⁴



Kuva 15. Yhdisteiden **8**, **9**, [¹⁸F]**9** ja [¹¹C]**SMW139** rakenteet.

Tutkimuksen innoittajana on toiminut [¹¹C]SMW139, jota on leimattu onnistuneesti hiili-11:llä ja, jonka on todettu toimivan erilaisten keskushermostollisten sairauksien PET-kuvantamisessa.⁷⁴ Tarkoituksena oli syntetisoida vastaavanlainen fluorattu adamantaanijohdannainen, sillä jo yhdenkin fluorin lisäämisen huomattiin hidastavan yhdisteen metaboloitumista elimistössä ja lisäävän sitoutumista P2X₇-purinoreseptoriin, joka on merkittävässä osassa useissa näissä keskushermostollisissa sairauksissa.⁷² Kuitenkin aiemmin bentseenirenkään radioleimattu funktionaalinen ryhmä oli [¹¹C]metoksi, joten tässä työssä haluttiin tutkia, voidaanko [¹¹C]metoksiryhmä korvata fluori-18:lla, jolla on paremmat ominaisuudet kuten pidempi puoliintumisaika (109,8 min) ja matalampi positronin maksimienergia (635 keV) kuin hiili-11:llä (20,4 min, 960 keV).

Työn toinen tavoite oli tutkia, onko emäksisen amidi-sivuryhmän sisältävää molekyyliä mahdollista radioleimata ruteniumkompleksivälitteisesti. Ruteniumkompleksien on todettu toimivan erilaisia sivuryhmiä sisältävien fenolien ¹⁸F-fluorauksessa,³⁷ mutta vielä ei ole tutkimusta, onnistuuko bentsamidien ¹⁸F-fluoraus tällä menetelmällä.

3.2 Materiaalit, kemikaalit ja yleiset menetelmät

3.2.1 Kemikaalit

Työssä käytetyt reagenssit, katalyytit ja liuottimet olivat peräisin kaupallisista lähteistä ja käytettiin sellaisenaan, ellei toisin mainittu. Kaikki liuottimet olivat Honeywelliltä ja reagenssit, kuten XtalFluor M[®], adamantaanikarboksylihappo ja 1,1'-karbonyyliidi-imidatsoli (CDI) olivat SigmaAldrichilta. 2-kloori-5-hydroksibentsoehappo ja 2-kloori-5-fluoribentsoehappo olivat TCI:ltä. Tarvittaessa liuottimet kuivattiin molekyyliseuloilla. Ruteniumkompleksi on valmistettu aiemmin valtakunnallisessa PET-keskuksessa.

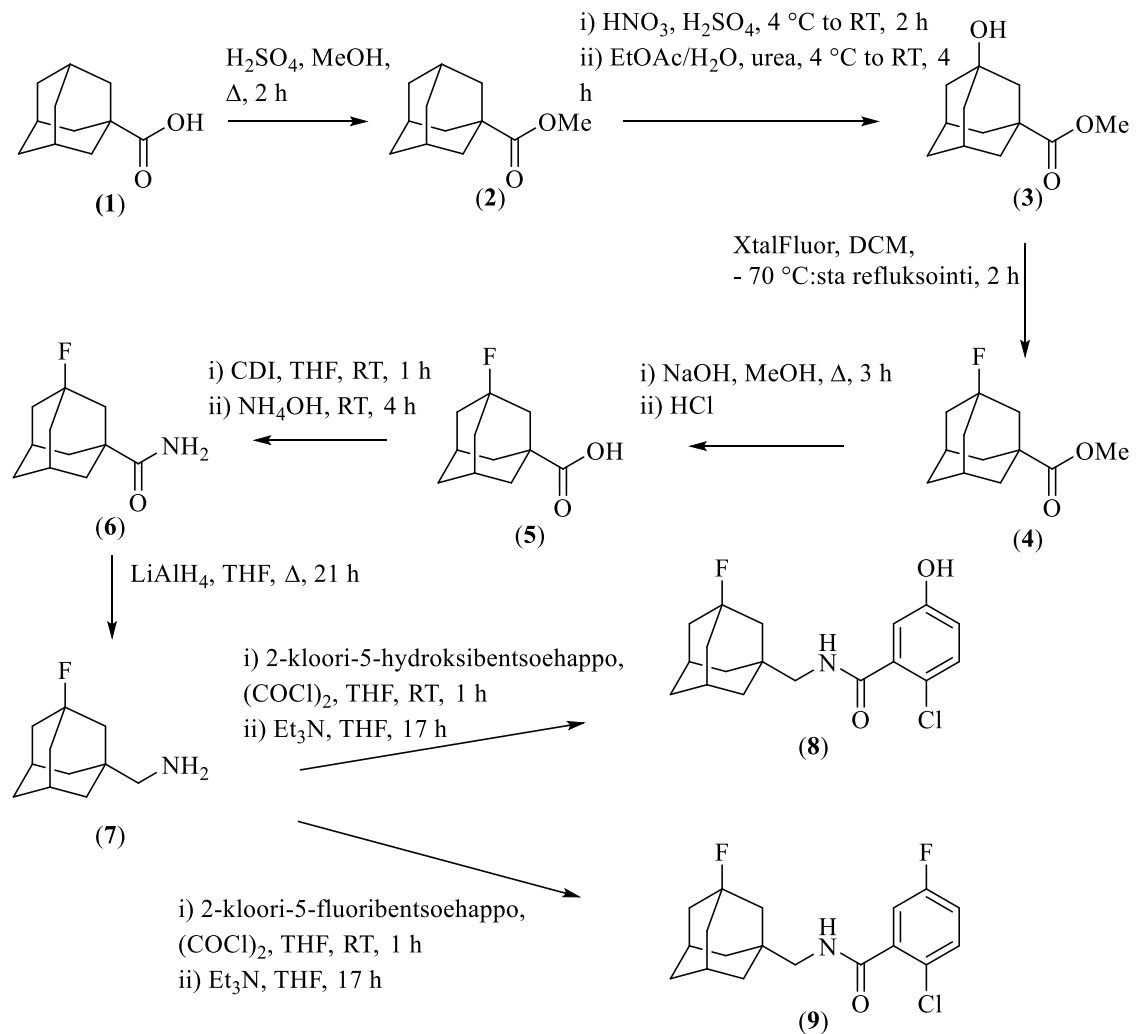
3.2.2 Materiaalit ja menetelmät

Orgaaniset synteesit suoritettiin vetokaapissa Valtakunnallisen PET-keskuksen tiloissa. Argon-ilmakehässä tehdyt reaktiovaiheet suoritettiin ensin kuivaamalla keittopullot huolellisesti uunissa (120 °C). Reaktioiden etenemistä seurattiin ohutkerroskromatografialevyillä (TLC), jotka olivat SigmaAldrichin Silica gel 60 F254. Kaikki haihdutukset suoritettiin Valtakunnallisen PET-keskuksen tiloista löytyvällä Büchi RE111 Rotavapor, pyöröhaihduttimella. Kaikki ydinmagneettiresonanssinäytteet (NMR) ajettiin Turun yliopiston ja Åbo Akademin ylläpitämässä Laitekeskuksessa, TYBruker500 (500 MHz Bruker AVANCE-III NMR-system) -laitteella. Näytteet liuotettiin sopivaan deuteroituun NMR-liuottimeen, noin 1–5 mg/ml konsentraatiolla, ja siirrettiin NMR-putkeen, jossa ne voitiin suoraan sijoittaa NMR-laitteistoon. Referenssiyhdisteen HPLC-ajoihin käytettiin Elite LaChrome-laitteistoa, jossa oli L-7100 VWR Hitachi pumppu (VWR International AB, Stockholm, Sweden), L-7400 VWR Hitachi UV-detektori (VWR International AB, Stockholm, Sweden) ja kolonnina Waters SymmetryShield RP18 (3,9 x 150 mm, partikkelikoko 5 µm). Tulosten analysointiin käytettiin Merck – Hitachi Model D-7000 Chromatography Data Station Software -ohjelmaa, versio 4.0. Analyysissä käytetty ultravioletti (UV) aallonpituus oli 285 nm ja ajo oli isokraattinen (1:1 MeCN:H₂O) ja virtausnopeus oli vakio (1 ml/min).

Kaikki radioaktiivinen työ suoritettiin lyijykaapissa ja kaikki radioaktiivisuus tuotettiin Valtakunnallisen PET-keskuksen CC-18/19 syklotronilla. Säteilytyksen kesto oli kaikissa vaiheissa vakio (5 min), säteilytyksessä käytettiin 17 MeV:in protoneita ja säteilytysvirta oli vakio (36 µA). Radioaktiiviset näytteet analysoitiin radioHPLC-laitteistolla. Ajo oli gradientti (1 minuuttiin asti 100 % H₂O ja tämän jälkeen nostettiin MeCN:n määrää kunnes 3 minuutin kohdalla eluentin suhde MeCN:H₂O 1:1) ja virtausnopeus oli vakio (1 ml/min). Jokaisella ajokerralla injisoitiin 20 µl:aa näytettä. Analyysissä käytettiin Elite LaChrome-laitteistoa, jossa oli L-2130 VWR Hitachi pumppu (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany), L-2400 VWR Hitachi UV-detektori (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany), ORTEC NaI(Tl) tuikeilmaisina radioaktiivisuusdetektorina (ORTEC, Oak Ridge, Tennessee, USA), sekä SCA

925-SCINTvahvistin ja kolonnina Waters SymmetryShield RP18 (3,9 x 150 mm, partikkelikoko 5 µm). Tulosten analysointiin käytettiin Agilent OpenLAB CDS (EZChrom)-ohjelmaa, versio A.04.08. Analyysissä käytetty UV-aallonpituus oli 280 nm. Radioaktiivisten näytteen kuivaamiseen käytettiin erilaisia kaupallisia SPE-patruunoita, jotka oli hankittu Watersilta.

3.3 2-kloori-5-hydroksi-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)-bentsamidin ja 2-kloori-5-fluori-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin synteesi

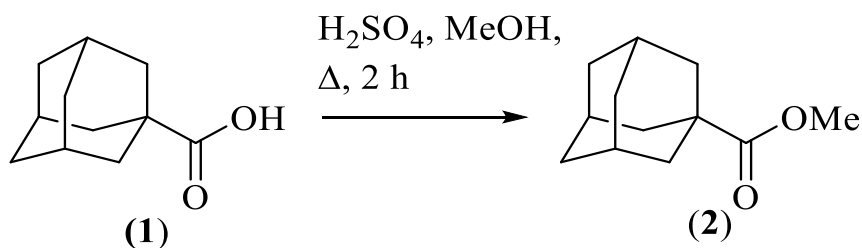


Kaavio 1. Lähtöaineen **8** ja referenssiyhdisteen **9** kokonaissynteesi. Adamantaanikarbosyylihappoa ja molempia bentsoehappoja lukuun ottamatta kaikki muut synteesivaiheiden yhdisteet syntetisoitiin itse.

Referenssiyhdisteen, **9** ja lähtöaineen, **8** synteesi suoritettiin Wilkinson et al.⁷² vuonna 2017 julkaiseman artikkelin mukaan. Ensin syntetisoitiin metyyliadamantaanikarboksylaatti **2**, Fischerin esteröintireaktiolla adamantaanikarboksyylilihaposta

1. Metyyliadamantaanikarboksylaattista **2** valmistettiin metyyli-3-hydroksiadamantaanikarboksylaatti **3**, typpi- ja rikkihapon seoksessa hapettamalla, jonka jälkeen hydroksyyli-ryhmä korvattiin fluorausreaktiossa, jossa käytettiin fluorausreagenssina XtalFluor M[®]:ää. Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksylaatti **4** syntetisoitiin metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksyylilihapoksi **5**, demetylaatiolla, josta jatkettiin amidikondensaatioreaktioon, jolla valmistettiin 3-fluoriadamantaanikarboksamidia **6**. (3-fluoriadamantaan-1-yyli)metanamiinia **7**, valmistettiin pelkistysreaktiolla, jonka jälkeen lopulta saatiin amidikoplauksella valmistettua halutut referenssi-, 2-kloori-5-fluori-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidi **9**, ja lähtöaine, 2-kloori-5-hydroksi-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidi **8**.

3.3.1 Metyyliadamantaanikarboksylaatin synteesi

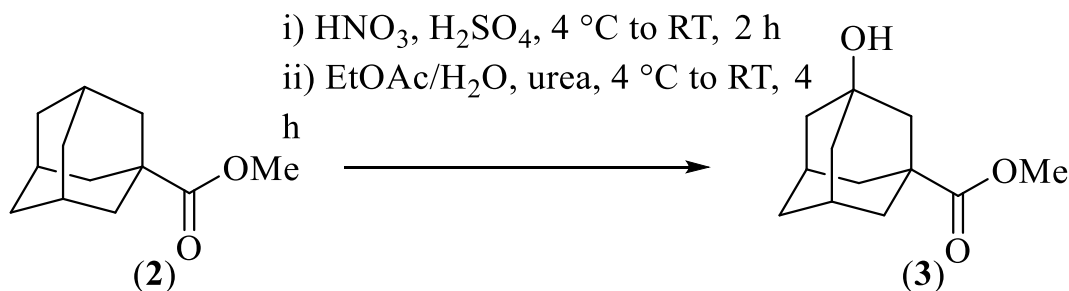


Kaavio 2. Metyyliadamantaanikarboksylaatin esteröintireaktio.

Adamantaanikarboksyylilihapo (15 g) metanolissa (MeOH, 150 ml) liuotettiin rikkihappoon (4,5 ml) ja refluksoitettiin kunnes reaktio oli valmis n. 3 h, tarkistettiin TLC:lla (1:1 etyyliasettaatti:heksaani). Seoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön ja haihdutettiin. Haihdutusjäännös liuotettiin etyyliasettaattiin (90 ml) ja pestiin natriumhydroksidilla (NaOH, 3 M, 45 ml). Vesifaasia pestiin vielä etyyliasettaatilla (2 x 90 ml) ja orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin magnesiumsulfaattilla (MgSO₄), suodatettiin ja haihdutettiin. Tuotteen puhtaus varmistettiin ¹H NMR:lla ja verrattiin kirjallisuusarvoihin.⁷² Tuotetta **2** punnittiin (11,6 g, 72 %) valkoisena jauheena. Tuotteen **2** ¹H NMR-spektri löytyy liitteestä 1.

¹H NMR (500 MHz, asetoni-d₆): δ 3,63 (3H, s, H6), δ 1,99 (3H, br s, H4), δ 1,87 (6H, d, *J* = 6 Hz, H3), δ 1,73 (6H, m, H5) ppm.

3.3.2 Metyyli-3-hydroksiadamantaanikarboksyylaatin synteesi

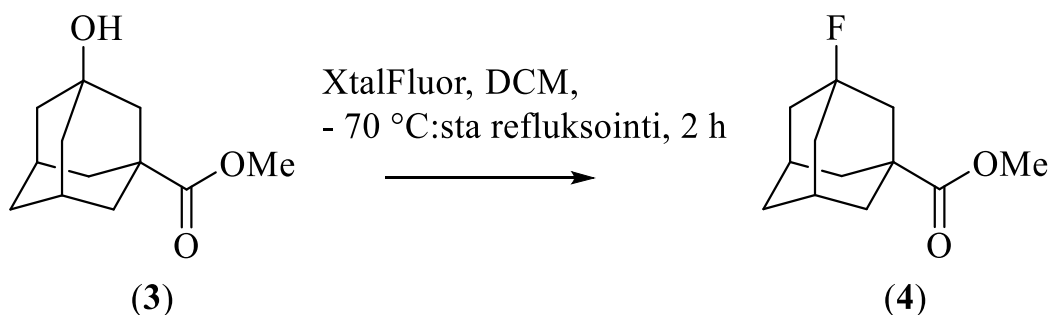


Kaavio 3. Metyyli-3-hydroksiadamantaanikarboksyylaatin hapetusreaktio.

Typpihappoa (30 %, 4,9 ml) lisättiin tipoitain rikkihappoon (98 %, 60 ml), jota jäädytettiin jää-vesihauteessa. Metyyliadamantaanikarboksyylaattia **2** (11,6 g, 59,9 mmol), lisättiin muutamassa osassa jäädytettyyn happoseokseen voimakkaasti sekoittaen. Jää-vesihaude poistettiin ja reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämmössä 2 tuntia. Saatua seosta lisättiin hitaasti jääkylmään etyyliasetaatin (250 ml), veden (280 ml) ja urean (8,9 g, 149 mmol) seokseen, josta poistettiin ensin jää-vesihaude ja sitten sekoitettiin huoneenlämmössä 4 tuntia. Muodostuneet faasit eroteltiin ja vesifaasia pestiin vielä etyyliasetaatilla (2 x 120 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin, pestiin vedellä (120 ml) ja natriumkarbonaatin (NaCO_3) vesiliuoksella (10 %, 120 ml) kunnes liuoksen mitattiin olevan emäksistä. Tämän jälkeen orgaanista faasia pestiin vielä kylläisellä suolaliuoksella (120 ml) ja kerätty orgaaninen faasi kuivattiin MgSO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Tuotetta **3** punnittiin (6,0 g, 48 %) kellertävänä öljynä. Tuotteen puhtaus todettiin ^1H NMR:lla ja tuloksia verrattiin kirjallisuusarvoihin.⁷² Tuotteen **3** ^1H NMR-spektri löytyy liitteestä 2.

^1H NMR (500 MHz, asetoni- d_6): δ 3,66 (3H, s, H9), δ 2,25 (2H, br s, H6), δ 1,84 (2H, m, H3), δ 1,78 (4H, m, H5), δ 1,70 (4H, m, H7), δ 1,58 (2H, m, H8) ppm.

3.3.3 Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksylaatin synteesi



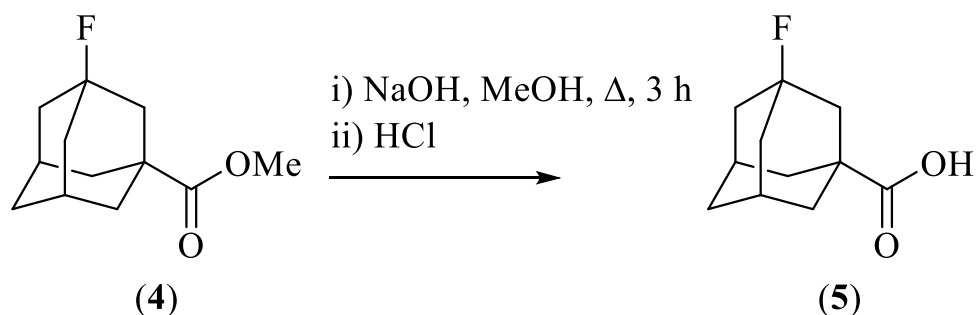
Kaavio 4. Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksylaatin fluorausreaktio.

XtalFluor M[®]-reagenssia (8,35 g, 34,36 mmol), kuivassa dikloorimetaanissa (DCM) (70 ml), jäädytettiin noin -80 °C:seen argonilmakehässä. Tuote **3** (28,63 mmol), kuivassa DCM:ssa (86 ml), lisättiin pisaroittain ja sekoittaen jäädytettyyn fluorausseokseen. Lisäyksen jälkeen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön n. 30 minuuttia ja refluksoitiin noin 2 tuntia. Refluksoinnin jälkeen seoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön ja kylläinen natriumvetykarbonaattiliuos (NaHCO₃) (120 ml) kaadettiin jäähtyneeseen seokseen. Kuohunnan loputtua lisättiin DCM:ia (2 x 120 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin ja kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Saatu tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (1:2 etyyliasetaatti:heksaani). Puhdasta tuotetta **4** punnittiin (5,1 g, 84 %) vaaleana jauheena. Tuotteen puhtaus todettiin ¹H NMR:lla ja tuloksia verrattiin kirjallisuusarvoihin.⁷² Tuotteen **4** ¹H ja ¹⁹F NMR-spektrit löytyvät liitteistä 3 ja 4.

¹H NMR (500 MHz, asetoni-d₆): δ 3,67 (3H, s, H9), δ 2,36 (2H, br s, H6), δ 2,02 (2H, d, ³J_{H3-F} = 11 Hz, H3), δ 1,89 (4H, m, H7), δ 1,64 (2H, m, H8) ppm.

¹⁹F NMR⁷² (500 MHz, asetoni-d₆): δ -132,0 (s, C4-F) ppm.

3.3.4 Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksylihapon synteesi



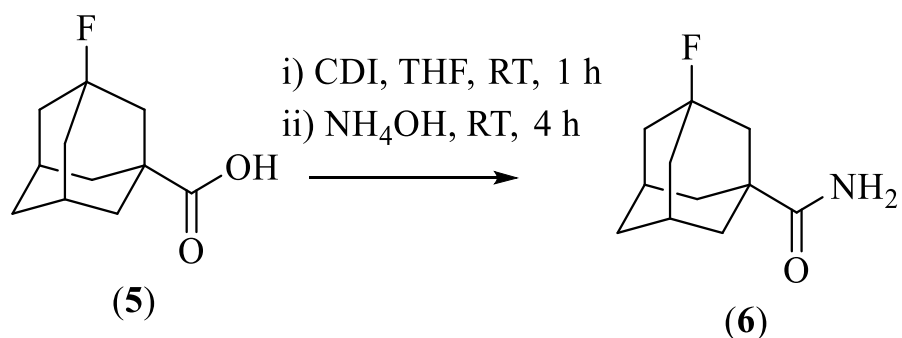
Kaavio 5. Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksylihapon demetylaatioreaktio.

NaOH:n vesiliuosta (1 M, 48 ml) lisättiin metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksyylaattiin **4** (24 mmol) metanolissa (48 ml). Seosta refluksottiin noin 3 tuntia ja reaktion eteneminen tarkistettiin TLC:lla (1:2 etyyliasetaatti:heksaani). Metanoli haihdutettiin ja haihdutusjäännöstä pestiin sekä vedellä (120 ml) että dietyylieetterillä (120 ml). Vesifaasi kerättiin ja siihen lisättiin suolahappoa (HCl), kunnes sen pH:ksi saatiin noin 1. Valkea jäännös erotettiin etyyliasetaattiin (2 x 200 ml), kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Tuotetta **5** punnittiin (4,2 g, 88 %) vaaleana jauheena. Tuotteen puhtaus todettiin ¹H NMR:lla ja tuloksia verrattiin kirjallisuusarvoihin.⁷² Tuotteen **5** ¹H ja ¹⁹F NMR-spektrit löytyvät liitteistä 5 ja 6.

¹H NMR (500 MHz, asetoni-d₆): δ 2,34 (2H, br s, H6), δ 1,99 (2H, d, ³J_{H3-F} = 11 Hz, H3), δ 1,87 (4H, m, H7), δ 1,84 (4H, m, H5), δ 1,80 (2H, m, H8) ppm.

¹⁹F NMR (500 MHz, asetoni-d₆): δ -132,5 (s, C4-F) ppm.

3.3.5 3-fluoriadamantaanikarboksiamidin synteesi



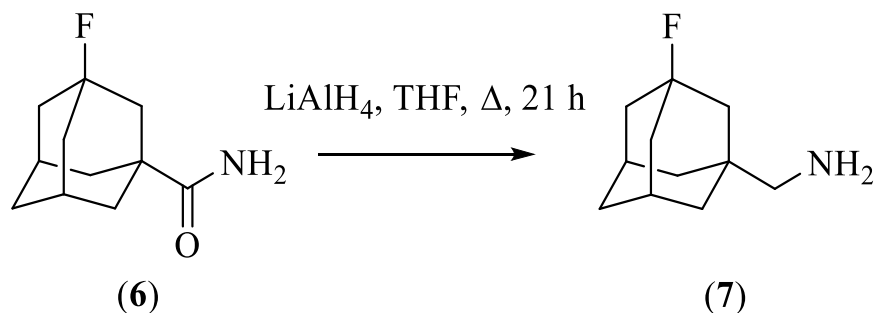
Kaavio 6. 3-fluoriadamantaanikarboksiamidin amidikoplausreaktio.

3-fluoriadamantaanikarboksylihappo **5** (16,1 mmol) ja CDI (19,3 mmol) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (THF) (64 ml) ja sekoitettiin argonilmakehässä, huoneenlämmössä noin tunnin ajan. Reaktioseos jäähdytettiin jää-vesihauteessa ja sinne lisättiin ammoniakkin vesiliuosta (25 %, 9 ml). Seoksen jää-vesihaude poistettiin ja sen annettiin ammoniakkilisäyksen jälkeen sekoittua 4 tuntia huoneenlämmössä. Liuotin haihdutettiin ja haihdutusjäännöstä, DCM:ssa (240 ml), pestiin NaOH:n vesiliuoksella (1 M, 80 ml), HCl:n vesiliuoksella (1 M, 80 ml) ja vedellä (80 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuotetta **6** punnittiin (2,4 g, 74 %) vaaleana jauheena. Tuotteen puhtaus tarkastettiin ¹H NMR:lla ja tuloksia verrattiin kirjallisuusarvoihin.⁷² Tuotteen **6** ¹H ja ¹⁹F NMR-spektrit löytyvät liitteistä 7 ja 8.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 5,76 (2H, s, NH₂), δ 2,26 (2H, br s, H6), δ 1,78 (2H, d, ³J_{H3-F} = 11 Hz, H3), δ 1,70 (4H, m, H7), δ 1,68 (4H, m, H5), δ 1,62 (2H, m, H8) ppm.

¹⁹F NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ -128,4 (s, C4-F) ppm.

3.3.6 (3-fluoriadamantaan-1-yyli)metamiinin synteesi

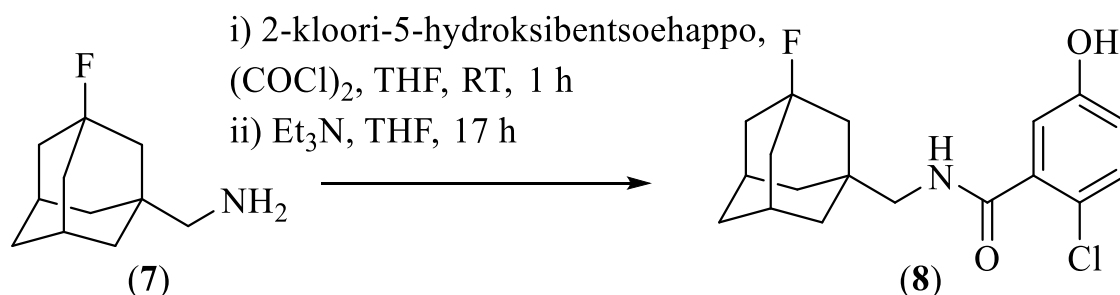


Kaavio 7. (3-fluoriadamantaan-1-yyli)metamiinin pelkistysreaktio.

Tuotetta **6** (11,9 mmol) THF:ssa (41 ml) sekoitettiin kylmähauteessa, argonilmakehässä litiumalumiinihydridin (LiAlH_4 , 48 mmol) kanssa kunnes haude poistettiin ja seoksen annettiin lämmitä huoneenlämpöön. 2 tunnin kuluttua seosta kuumennettiin ja sen annettiin refluksoitua 16 tuntia kunnes se taas jäähdytettiin jäällä. Kylmää vettä (1,8 ml) lisättiin pisaroittain seokseen ja sekoitettiin voimakkaasti. Sitten seokseen lisättiin NaOH:n vesiliuosta (15 % w/v, 1,8 ml) ja vettä (6 ml). Seoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä, kunnes kuohunta lakkasi ja harmaa jauhe muuttui valkoiseksi n. 15 minuuttia. Seos kuivattiin MgSO_4 :lla ja suodatettiin. Saatua jäännöstä pestiin vielä DCM:lla (2 x 48 ml). Orgaaniset faasit pestiin sekä NaOH-liuoksella (1 M, 60 ml) että vedellä (60 ml) ja kuivattiin MgSO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Saatu haihdutusjäännös liuotettiin HCl:oon (4 M, 24 ml), jossa dioksaania. Seokseen muodostunut kiinteä tuote suodatettiin ja pestiin vielä dietyylieetterillä. Tuotetta **7** saatiin (1,5 g, 70 %) värittömänä öljynä. Tuotteen puhtaus tarkastettiin ^1H NMR:lla ja tuloksia verrattiin kirjallisuusarvoihin.⁷² Tuotteen **7** ^1H NMR-spektri löytyy liitteestä 9.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2,27 (2H, s, H1), δ 2,23 (2H, br s, H6), δ 1,77 (4H, br quart, $J = 11$ Hz, H7), δ 1,54 (2H, d, $^3J_{\text{H3-F}} = 13$ Hz, H3), δ 1,41 (2H, m, H8), δ 1,37 (4H, m, H5) ppm.

3.3.7 2-kloori-5-hydroksi-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin synteesi



Kaavio 8. 2-kloori-5-hydroksi-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin, 8 amidikoplausreaktio.

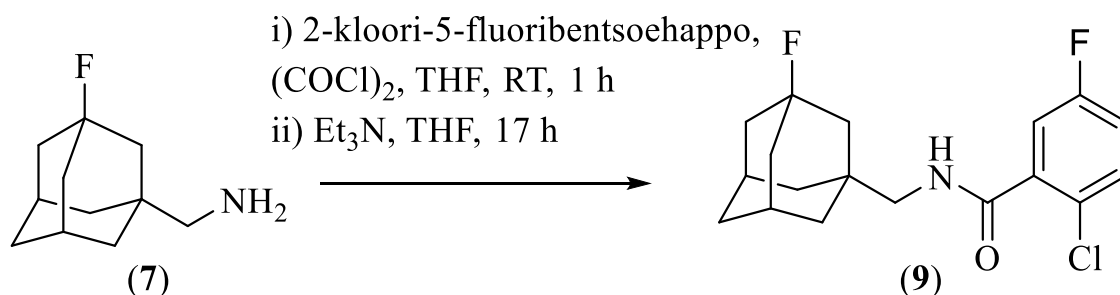
Oksalyylikloridia $(\text{COCl})_2$, 14,4 mmol) lisättiin 2-kloori-5-hydroksibentsoehappoon (2,45 mmol) THF:ssa (10 ml). Seokseen lisättiin tippa dimetyyliformamidia, jonka ansiosta seos alkoi kuohumaan ja se jätettiin sekoittumaan huoneenlämpöön, argonilmakehässä noin tunniksi. Tunnin kuluttua liuotin haihdutettiin ja kloridihapon annettiin kuivua alipaineessa. Kuivattu kloridihappo liuotettiin THF:iin (10 ml) ja sekaan lisättiin (3-fluoriadamantaan-1-yyli)metamiini (1,195 g, 6,5 mmol) THF:ssa (5 ml). Trietyyliamiini (Et_3N , 2 ml) lisättiin seokseen ja annettiin sekoittua huoneenlämmössä, argonilmakehässä yön yli. Liuotin haihdutettiin ja haihdutusjäännöstä pestiin DCM:lla (73 ml) ja NaOH:n vesiliuoksella (1 M, 37 ml). Orgaaninen faasi pestiin vielä HCl:n vesiliuoksella (1 M, 37 ml), kuivattiin MgSO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Saatu tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (1:3 etyyliasetaatti:heksaani) ja puhdas lähtöaine **8** punnittiin (340 mg, 16 %) kellertävänä jauheena. Tuotteen puhtaus tarkastettiin ^1H NMR:lla ja tuloksia verrattiin kirjallisuusarvoihin.⁷² Tuotteen **8** ^1H ja ^{19}F NMR-spektrit löytyvät liitteistä 10 ja 11.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7,34 (1H, d, $3^3J_{\text{H12-H13}} = 6$ Hz, H12), δ 7,27 (1H, d, $4J_{\text{H15-H13}} = 17$ Hz, H15), δ 6,89 (1H, dd, $3J_{\text{H13-H12}} = 23$ Hz, $4J_{\text{H15-H13}} = 7,6$ Hz, H13), δ 3,25 (2H, d, $3J = 13$ Hz, H1), δ 2,34 (2H, br s, H6), δ 1,86 (4H, m, H7), δ 1,75 (2H, d, $3J_{\text{H3-F}} = 11$ Hz, H3), δ 1,67 (2H, m, H8), δ 1,59 (4H, br s, H5) ppm.

^{19}F NMR (500 MHz, CDCl_3): δ -60, δ -134 (s, C4-F) ppm.

3.3.8 Referenssin,

2-kloori-5-fluori-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin synteesi



Kaavio 9. Referenssin, 2-kloori-5-fluori-*N*-((3-fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin, **9** amidikoplausreaktio.

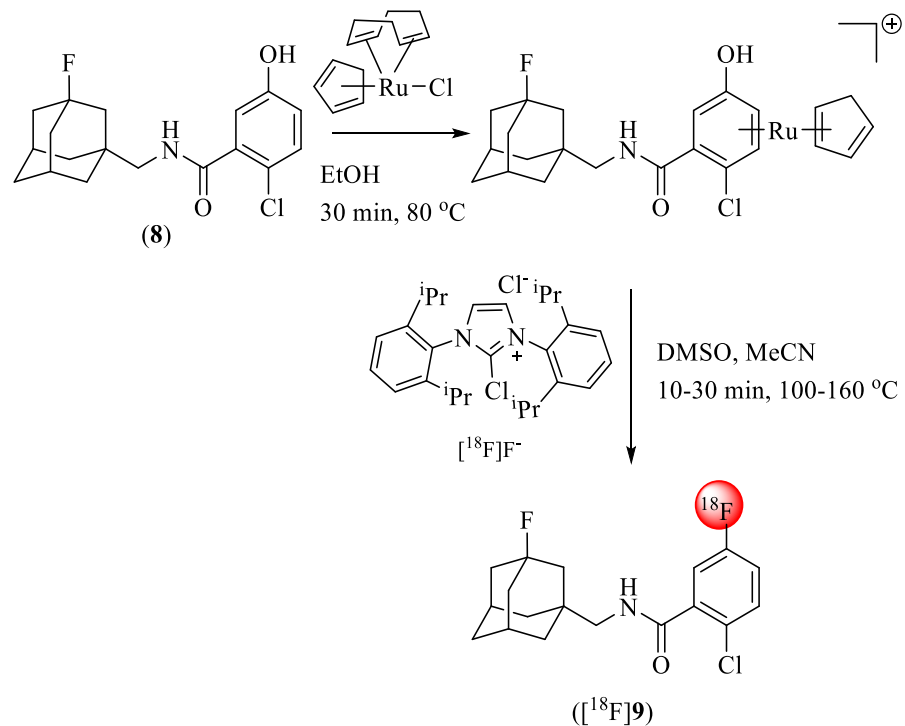
Oksalyylikloridia ((COCl)₂, 0,2 mmol) lisättiin 2-kloori-5-fluoribentsoehappoon (0,1 mmol) THF:ssa (400 µl). Seokseen lisättiin tippa dimetyyliformamidia, jonka ansiosta seos alkoi kuohumaan ja se jätettiin sekoittumaan huoneenlämpöön, argonilmakehässä noin tunniksi. Tunnin kuluttua liuotin haihdutettiin ja kloridihapon annettiin kuivua alipaineessa. Kuivattu kloridihappo liuotettiin THF:iin (400 µl) ja sekaan lisättiin (3-fluoriadamantaan-1-yyli)metamiini (50 mg, 0,27 mmol) THF:ssa (200 µl). Trietyyliamiini (Et₃N, 80 µl) lisättiin seokseen ja annettiin sekoittua huoneenlämmössä, argonilmakehässä yön yli. Liuotin haihdutettiin ja haihdutusjäännöstä pestiin DCM:lla (3 ml) ja NaOH:n vesiliuoksella (1 M, 1,5 ml). Orgaaninen faasi pestiin vielä HCl:n vesiliuoksella (1 M, 1,5 ml), kuivattiin MgSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Saatu tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (1:3 etyyliasetaatti:heksaani) ja puhdas referenssi **9** punnittiin (54 mg, 59 %) vaaleana jauheena. Tuotteen puhtaus tarkastettiin ¹H NMR:lla ja tuloksia verrattiin kirjallisuusarvoihin.⁷² Tuotteen **9** ¹H ja ¹⁹F NMR-spektrit löytyvät liitteistä 12 ja 13.

Referenssiyhdisteen **9** synteessin jälkeen sille optimoitiin sopivan pituinen HPLC-puhdistusmetodi, jota voitiin käyttää myös radioHPLC-ajoissa.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7,47 (1H, d, ³J_{H12-H13} = 11 Hz, H12), δ 7,45 (1H, d, ⁴J_{H15-H13} = 6 Hz, H15), δ 7,41 (1H, dd, ³J_{H13-H12} = 27 Hz, ⁴J_{H13-H15} = 9 Hz, H13), δ 3,32 (2H, d, ³J_{H1-NH} = 13 Hz, H1), δ 2,35 (2H, br s, H6), δ 1,89 (4H, m, H7), δ 1,75 (2H, d, ³J_{H3-F} = 12 Hz, H3), δ 1,62 (2H, m, H8), δ 1,58 (4H, s, H5) ppm.

¹⁹F NMR (500 MHz, CDCl₃): δ -113,7, δ -131,9 (s, C4-F) ppm.

3.4 Ruteniumkompleksivälitteiset ^{18}F -fluoraukset



Kaavio 10. Ruteniumkompleksivälitteinen lähtöaineen **8** ^{18}F -fluoraus. Työssä käytetty ruteniumkompleksi on tuotettu Valtakunnallisessa PET-keskuksessa ja $i\text{PrImCl}$ on kaupallinen.

Ruteniumkompleksivälitteinen ^{18}F -fluoraus toteutettiin Ritter et al.³⁷ vuonna 2017 julkaiseman artikkelin mukaan. Yleisesti menetelmässä ensin annettiin $\text{Ru}(\text{COD})\text{Cl}$ -kompleksin reagoida valmistetun lähtöaineen **8** kanssa. Sen jälkeen imidatsoliumkloridi ja $[\text{}^{18}\text{F}]\text{fluoridi}$ lisättiin ja kuumennettiin, jotta saatiin nukleofiilisellä substituutiolla, aromaattiseen renkaaseen tuotettua $[\text{}^{18}\text{F}]\text{9}$. Radioleimauksen onnistumisen varmistamiseksi näytteitä ajettiin radioHPLC:lla.

Työssä päädyttiin tutkimaan erilaisia tapoja aktivoida $[\text{}^{18}\text{F}]\text{fluoridia}$ radioleimauksissa. Käytettäväksi menetelmiksi valittiin $[\text{}^{18}\text{F}]\text{fluoridin}$ atseotrooppinen tislauk ja $[\text{}^{18}\text{F}]\text{fluoridin}$ aktivointi QMA-patruunalla. Radioleimauksissa $[\text{}^{18}\text{F}]\text{fluoridin}$ annettiin reagoida 10, 20 ja 30 minuuttia ja aina reaktioajan kuluttua, näyte ajettiin radioHPLC:lla reaktion etenemisen seuraamiseksi. Työssä kokeiltiin myös ruteniumkompleksivälitteistä ^{18}F -fluorausta pelkän 2-kloori-5-hydroksibentsoehapon radioleimaamiseen.

3.4.1 Atseotrooppinen [¹⁸F]fluoridin kuivaus

Lähtöaine **8** (1 ekv., 6,75 µmol) ja Ru(COD)Cl -kompleksi (3 ekv., 23,6 µmol) punnittiin eppendorf-putkeen, liuotettiin EtOH:iin (50 µl) ja sekoitettiin 30 minuuttia 80 °C:ssa. Puolen tunnin kuluttua seokseen lisättiin 1,3-*bis*(2,6-diisopropyylifenyyli)imidatsoliumkloridia (3 ekv., 20,2 µmol) MeCN:ssä (150 µl). Punnittiin Kryptofix222:ta (K222, 16,0 µmol, 6 mg) reaktioastiaan ja liuotettiin se MeCN:iin (100 µl). [¹⁸F]fluoridi siirrettiin lyijykaappiin ja kapillaaria pitkin ruiskuun. Ruiskusta se injisoitiin reaktioastiaan, jossa oli valmiina K222:ta. Seosta kuivattiin 125 °C:ssa 4 minuuttia vakuumin ja He-virtauksen avulla. Seokseen lisättiin kahdessa erässä MeCN:iä (1 ml) ja kuivausta jatkettiin noin 6 minuutin ajan molempien lisäysten jälkeen. Kuivaamisen jälkeen reaktioseokseen lisättiin lähtöaineen **8**, rutenium- ja imidatsoliumkompleksin, EtOH:ia ja MeCN:iä sisältävä seos (150 µl), dimetyylisulfoksidia (DMSO, 600 µl) ja annettiin reagoida 10–30 minuuttia 160 °C:ssa. Tämä toistettiin kaikkien kolmen verrokkierän kanssa samalla tavalla. Taulukossa 4 ovat kirjattuna kaikkien käytettyjen reagenssien määrät.

Jokaisesta kolmesta verrokkireaktiosta otettiin 10, 20 ja 30 minuutin välein 20 µl:aa, joka laimennettiin 80–100 µl:aan MeCN:H₂O-liuosta (1:1). Näistä jokaisesta laimennoksesta otettiin vielä 20 µl:n näyte, joka injisoitiin HPLC-kolonnein. Reaktioseoksesta otettavien näytteiden sekä radiokemiallinen saanto (RCY) ja oikeellisuus että reaktion eteneminen määritettiin radioHPLC:n avulla.

Taulukko 4. Käytettyjen reagenssien määrät, kun radioleimaus suoritettiin atseotrooppisella kuivauksella käsitellyllä [¹⁸F]fluoridilla.

Reagenssit	Ekvivalentti	Mitattu määrä			Yksikkö
		1	2	3	
Ru-(COD)-Cl	3	6,7	6,9	7,3	mg
Lähtöaine 8	1	2,4	2,2	2,1	mg
EtOH		50	50	50	µl
ⁱ PrImCl	3	9,3	9,3	9,3	mg
MeCN		150	150	150	µl
DMSO		150	150	150	µl
MeCN:DMSO (1:1)		50	50	50	µl
Reaktiolämpötila		100	120	160	°C

3.4.2 [¹⁸F]fluoridin aktivointi QMA-patruunalla

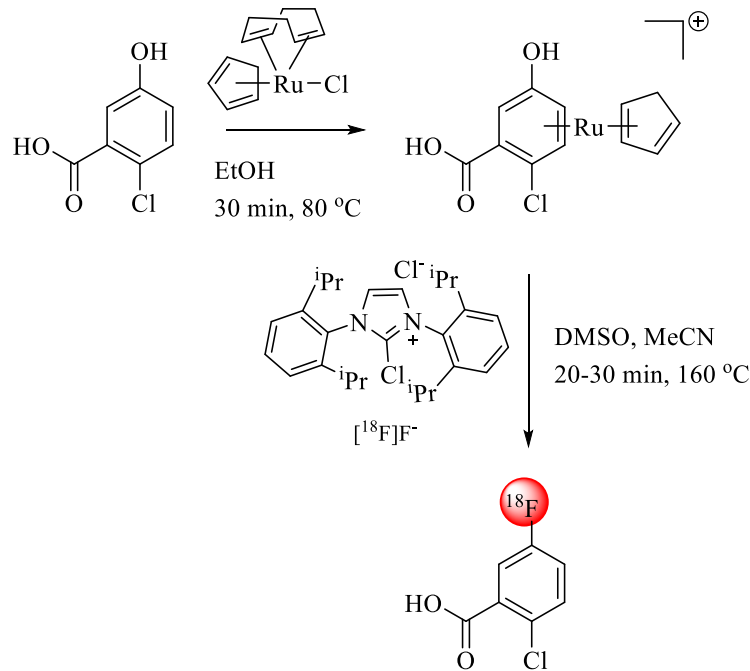
Lähtöaine **8** (1 ekv., 6,75 µmol) ja Ru(COD)Cl-kompleksi (3 ekv., 23,6 µmol) punnittiin eppendorf-putkeen ja liuotettiin EtOH:iin (50 µl). Seosta sekoitettiin 30 minuuttia 80 °C:ssa. Seuraavaksi reaktioseokseen lisättiin ⁱPrImCl:ia (3 ekv., 20,2 µmol) ja MeCN:iä (150 µl). Anioninvaihtopatruuna aktivoitiin kaliumoksaalilla (K₂C₂O₄, 18,0 µmol, c = 10 mg/ml, 3 ml) ja huuhdeltiin vedellä (2 ml). [¹⁸F]Fluoridi kuljetettiin lyijykaappiin suljettuun pulloon, joka sisälsi 12 ml vettä. [¹⁸F]Fluoridi ladattiin anioninvaihto-patruunaan, jossa se korvasi karbonaatti-ionit. Patruunaa pestiin MeCN:llä (1 ml), mahdollisen kosteuden poistamiseksi. Tämän jälkeen patruuna käännettiin ympäri ja [¹⁸F]fluoridi eluoiittiin painamalla lähtöaineen **8**, rutenium- ja imidatsoliumkompleksin, EtOH:ia ja MeCN:iä sisältävä seos ruiskulla hitaasti anioninvaihtopatruunan läpi reaktioastiaan. Patruunaa huuhdeltiin vielä DMSO:lla (150 µl) ja MeCN:DMSO-liuoksella (1:1, 50 µl) ja seoksen annettiin reagoida 10–30 minuuttia. Tämä toistettiin kaikkien kolmen verrokkierän kanssa samalla tavalla, mutta jokainen verrokkierä lämmitettiin eri lämpötiloissa (100–160 °C). Taulukossa 5 ovat kirjattuna kaikkien käytettyjen reagenssien määrät, joita käytettiin kolmessa verrokkireaktiossa ja lämpötilat jokaiselle kolmelle reaktiolle.

Näistä kolmesta verrokkireaktiosta otettiin 10, 20 ja 30 minuutin välein 20 µl:n näyte, joka laimennettiin 80–100 µl:aan MeCN:H₂O-liuosta (1:1). Näistä jokaisesta laimennoksesta otettiin injisoitiin HPLC:iin 20 µl:n näyte. Reaktioseoksesta otettavien näytteiden sekä radiokemiallinen saanto ja oikeellisuus että reaktion eteneminen määritettiin radioHPLC:n avulla.

Taulukko 5. Käytettyjen reagenssien määrät ja reaktiolämpötilat, kun radioleimaus suoritettiin QMA-patruunalla aktivoitulla [¹⁸F]fluoridilla.

Reagenssit	Ekvivalentti	Mitattu määrä			Yksikkö
		1	2	3	
Ru-(COD)-Cl	3	6,7	6,9	7,3	mg
Lähtöaine 8	1	2,4	2,2	2,1	mg
EtOH		50	50	50	µl
ⁱ PrImCl	3	9,3	9,3	9,3	mg
MeCN		150	150	150	µl
DMSO		150	150	150	µl
MeCN:DMSO (1:1)		50	50	50	µl
Reaktiolämpötila		100	120	160	°C

3.4.3 2-kloori-5-hydroksibentsoehapon [¹⁸F]fluoraus



Kaavio 11. 2-kloori-5-hydroksibentsoehapon [¹⁸F]fluoraus.

2-kloori-5-hydroksibentsoehappo (1 ekv., 7,0 μmol) ja Ru(COD)Cl-kompleksi (3 ekv., 23,6 μmol) punnittiin eppendorf-putkeen ja liuotettiin EtOH:iin (50 μl). Seosta sekoitettiin 30 minuuttia 80 °C:ssa. Seuraavaksi reaktioseokseen lisättiin ^{iPr}ImCl:ia (3 ekv., 20,2 μmol) MeCN:ssä (150 μl). Anioninvaihtopatruuna aktivoitiin kaliumoksalaatilla (K₂C₂O₄, 18 μmol, c = 10 mg/ml, 3 ml) ja huuhdeltiin vedellä (2 ml). [¹⁸F]Fluoridi kuljetettiin lyijykaappissa olevaan suljettuun pulloon, joka sisälsi 12 ml vettä. [¹⁸F]Fluoridi ladattiin anioninvaihto-patruunaan, jossa se korvasi karbonaatti-ionit. Patruunaa pestiin MeCN:llä (1 ml), mahdollisen kosteuden poistamiseksi. Tämän jälkeen patruuna käännettiin ympäri ja [¹⁸F]fluoridi eluoiitiin anioninvaihtopatruunasta 2-kloori-5-hydroksibentsoehapon, rutenium- ja imidatsoliumkompleksin, EtOH:ia ja MeCN:iä sisältävällä seoksella reaktioastiaan. Patruunaa huuhdeltiin vielä DMSO:lla (150 μl) ja MeCN:DMSO-liuoksella (1:1, 50 μl) ja seoksen annettiin reagoida 20–30 minuuttia 160 °C:ssa. Taulukossa 6 ovat kirjattuna kaikkien käytettyjen reagenssien määrät, joita käytettiin reaktiossa.

Reaktioseoksesta otettavien näytteiden sekä radiokemiallisen saanto ja oikeellisuus että reaktion eteneminen varmistettiin mittaamalla radioHPLC.

Taulukko 6. Käytettyjen reagenssien määrät, kun radioleimaus tehtiin 2-kloori-5-hydroksibentsoehappoon lähtöaineen **8** sijaan.

Reagenssit	Ekvivalentti	Mitattu määrä	Yksikkö
Ru-(COD)-Cl	3	6,6	mg
2-kloori-5-hydroksibentsoehappo	1	1,2	mg
EtOH		50	μl
ⁱ Pr ₃ ImCl	3	9,4	mg
MeCN		150	μl
DMSO		150	μl
MeCN:DMSO (1:1)		50	μl

3.5 Laskukaavat

Synteesien saantoprosenttien laskemiseen käytettiin kaavaa 1:

$$\text{saantoprosentti (\%)} = \frac{m(\text{punnittu tuote})}{m(\text{teoreettinen})}, \quad (1)$$

Radioaktiivisten tuotteiden radiokemialliset saannot on laskettu kaavalla 2:

$$RCY (\%) = \frac{\text{tuotteen mitattu aktiivisuus} - \text{taustan aktiivisuus}}{\text{HPLC:iin injisoitu aktiivisuus} - \text{tyhjän neulan aktiivisuus}} * 100 \%, \quad (2)$$

3.6 Tulokset ja niiden tarkastelu

3.6.1 Lähtöaine- **8** ja referenssiyhdisteen **9** synteesi

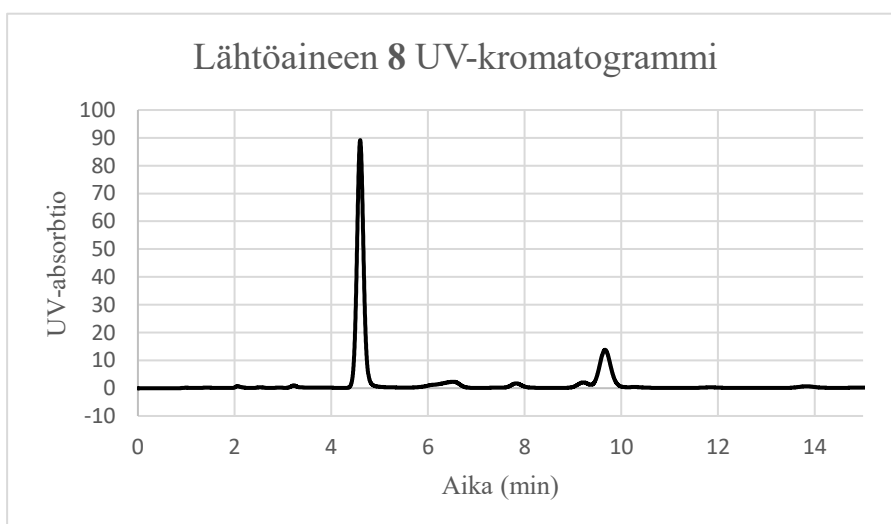
Lähtöaineen **8** ja referenssiyhdisteen **9** synteesit olivat samat välituotteeseen **7** asti. Synteesi onnistui kokonaisuudessaan hyvin tuotteeseen **6** asti, sillä mm. tuote **4** puhdistettiin pylväskromatografisesti ja sen ¹⁹F ja ¹H NMR-spektrit osoittivat, että tuote on puhdasta. Haastavimpia välivaiheita olivat ne, joissa jouduttiin käyttämään argonilmakehää mm. tuotteiden **4**, **6** ja **7** synteseissä, sillä ilmakehän ylläpito reagensseja lisätessä oli vaikeaa. Vaikka tuotteen **7** ¹H NMR-spektrissä oli paljon useiden piikkien päällekkäisyyksiä, jotka saattavat johtua reagoimattomasta lähtöaineesta tai muista epäpuhtauksista, päädyttiin sitä kuitenkin käyttämään sellaisenaan, sillä lopulliset synteesin tuotteet **8** ja **9** puhdistettiin pylväskromatografisesti. Taulukossa **7** on kirjattuna kaikkien synteesin välituotteiden punnitut massat ja saantoprosentit.

Taulukko 7. Lähtöaineen **8** ja referenssiyhdisteen **9** synteisin välituotteiden punnitut massat ja saantoprosentit.

Välituote	Punnittu massa (g)	Saanto (%)
2	11,6	72
3	6,0	48
4	5,1	84
5	4,2	88
6	2,4	74
7	1,5	70

3.6.1.1 Lähtöaineen **8** synteesi

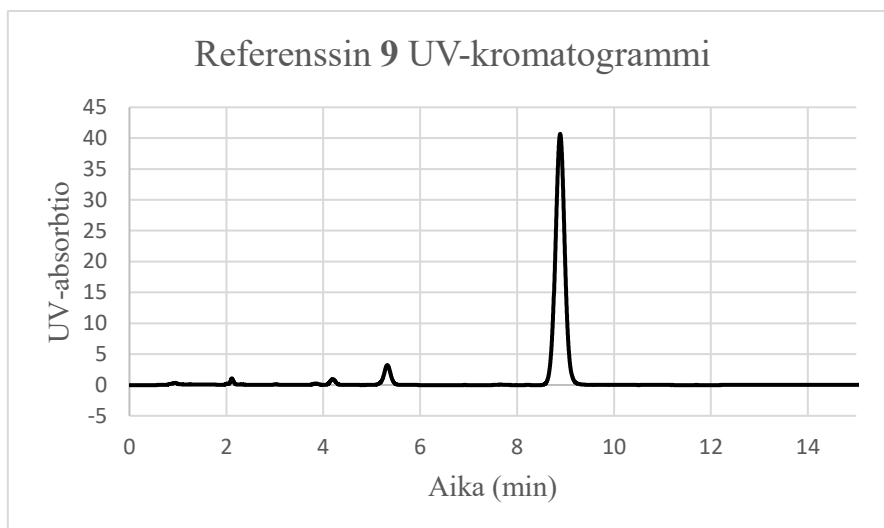
Lähtöaineen **8** synteesi tehtiin myös argonilmakehässä ja synteessissä reaktion annettiin reagoida yön yli huoneenlämmössä. Lähtöaineen **8** happona käytettiin 2-kloori-5-hydroksibentsoehappoa. Synteestistä saatu tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti, mutta siitä ei saatu kaikkia epäpuhtauksia poistettua, koska ^{19}F NMR-spektrissä havaittiin kaksi fluoripiikkiä toinen siirtymällä -60 ppm ja toinen -134 ppm. Suurin osa saadusta tuotteesta on kuitenkin haluttua yhdistettä, sillä fluorin suurempi piikki oli siirtymällä (-134 ppm) ja tästä syystä epäpuhtaudesta huolimatta työssä päädyttiin käyttämään lähtöainetta **8** [^{18}F]fluorauksissa sellaisenaan ilman toista puhdistusta. Lähtöainetta **8** punnittiin puhdistuksen jälkeen 344 mg:aa ja saanto oli 16 %:ia. Lähtöaine **8** ajettiin HPLC:lla 15 minuutin, isokraattisella (MeCN:H₂O 1:1) ohjelmalla. Yhdiste **8** (1 mg) oli liuotettu 1 ml:aan käytettyä eluenttia. Kuvassa 16 on lähtöaineen **8** HPLC-ajon UV-kromatogrammi. Lähtöaine **8** eluoiutui hyvin 4,6 minuutin kohdalla 91 %:sesti.



Kuva 16. Lähtöaineen **8** HPLC:n UV-kromatogrammi.

3.6.1.2 Referenssiyhdisteen 9 synteesi

Referenssin 9 synteesi tehtiin vastaavalla tavalla kuin lähtöaineen 8 synteesi, mutta 2-kloori-5-hydroksibentsoehapon tilalla käytettiin 2-kloori-5-fluoribentsoehappoa. Synteesistä saatu tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti, mutta siitäkään ei saatu kaikkea epäpuhtautta poistettua, koska ^{19}F NMR-spektrissä havaittiin myös kaksi fluoripiikkiä, toinen siirtymällä -113,7 ppm ja toinen -131,9 ppm. Referenssin 9 tapauksessa suurin osa saadusta tuotteesta oli kuitenkin haluttua yhdistettä, koska fluorin suurempi piikki oli siirtymällä (-131,9 ppm). Myös referenssiä 9 päädyttiin käyttämään sellaisenaan HPLC-ajoihin. Referenssiä 9 punnittiin puhdistuksen jälkeen 50 mg:aa ja saanto oli 59 %:ia. Referenssi 9 ajettiin HPLC:lla 15 minuutin, isokraattisella (MeCN:H₂O 1:1) ohjelmalla. Yhdiste 9 (1 mg) oli liuotettu 1 ml:aan käytettyä eluenttia. Kuvassa 17 referenssin 9 HPLC-ajon UV-kromatogrammi. Referenssi 9 eluoiu hyvin 8,9 minuutin kohdalla 93 %:sesti.



Kuva 17. Referenssin 9 HPLC:n UV-kromatogrammi.

3.6.2 Lähtöaineen 8 ruteniumvälitteiset ^{18}F -fluoraukset

Lähtöaineen 8 ^{18}F -fluoraus ei onnistunut odotetulla tavalla. Lähtöaineen 8 ^{18}F -fluoraukseen yritettiin erilaisilla [^{18}F]fluoridin aktivaatiomenetelmillä kuten atseotrooppisella kuivauksella ja QMA-patruunalla ja yritettiin leimata myös lähtöaineen 8 sijaan 2-kloori-5-hydroksibentsoehappoa. Taulukossa 8 on kirjattuna kaikkien radioleimauksien radiokemialliset saannot tuotteelle [^{18}F]9. QMA-patruunalla aktivoitulla [^{18}F]fluoridilla tehdyille leimauksille ei saatu tuloksia halutulle tuotteelle [^{18}F]9. Millään muulla menetelmällä ei saatu tuotettua ollenkaan haluttua [^{18}F]9 kuin atseotrooppisella kuivauksella aktivoitulla [^{18}F]fluoridilla suoritettulla ^{18}F -fluorauksella.

Taulukko 8. Radioleimausten radiokemialliset saannot.

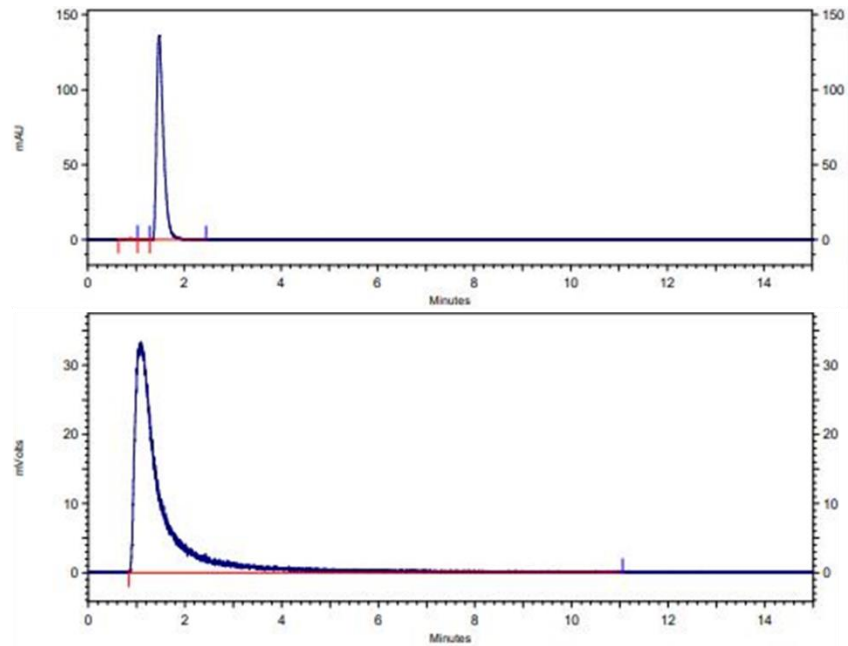
Reaktio	Reaktiolämpötila (°C)	RCY (radioHPLC) (%)		
		10 min	20 min	30 min
Atseotrooppinen kuivaus (n = 3)	160	4,9 ± 0,7	3,0 ± 2,0	5,9 ± 4,4
QMA-patruuna	100	-	-	-
	120	-	-	-
	160	-	-	-

3.6.2.1 Lähtöaineen 8 ¹⁸F-fluoraus atseotrooppisesti kuivatulla [¹⁸F]fluoridilla

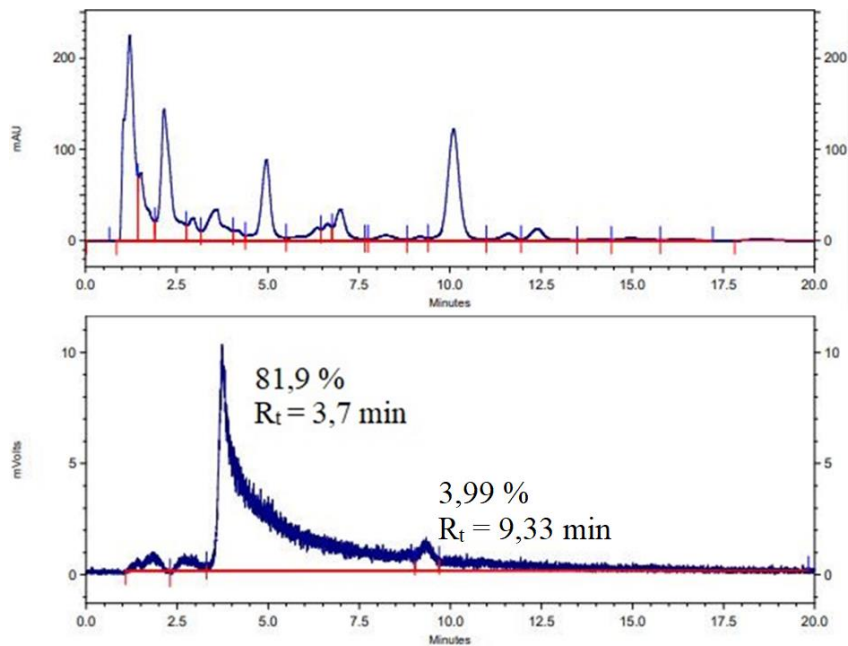
Lähtöaineen 8 ¹⁸F-fluoraus atseotrooppisesti kuivatulla [¹⁸F]fluoridilla ei onnistunut toivotusti. Koska saadun tuotteen [¹⁸F]9, radiokemiallinen saanto jäi todella matalaksi (3,4–4,0 %). Taulukossa 9 on kirjattuna atseotrooppisesti kuivatun [¹⁸F]fluoridin verrokkierien radiokemiallisen saannon keskiarvot jokaiselle reaktioseoksesta otetulle näytteelle ajanhetkellä (10, 20 tai 30 minuuttia). Kuvassa 18 on esitetty leimaamattoman [¹⁸F]fluoridin UV- ja radioaktiivisuuskromatogrammit. Kuvissa 19, 20 ja 21 on esitetty 10, 20 ja 30 minuutin jälkeen ajettujen HPLC-ajojen UV- ja radioaktiivisuuskromatogrammit.

Taulukko 9. Radiokemiallisten saantojen keskiarvot ja virheet ¹⁸F-fluoraukselle, jossa käytettiin atseotrooppisella kuivauksella aktivoitua [¹⁸F]fluoridia. Otokselle n = 3 ja keskiarvolle laskettu keskihajonta.

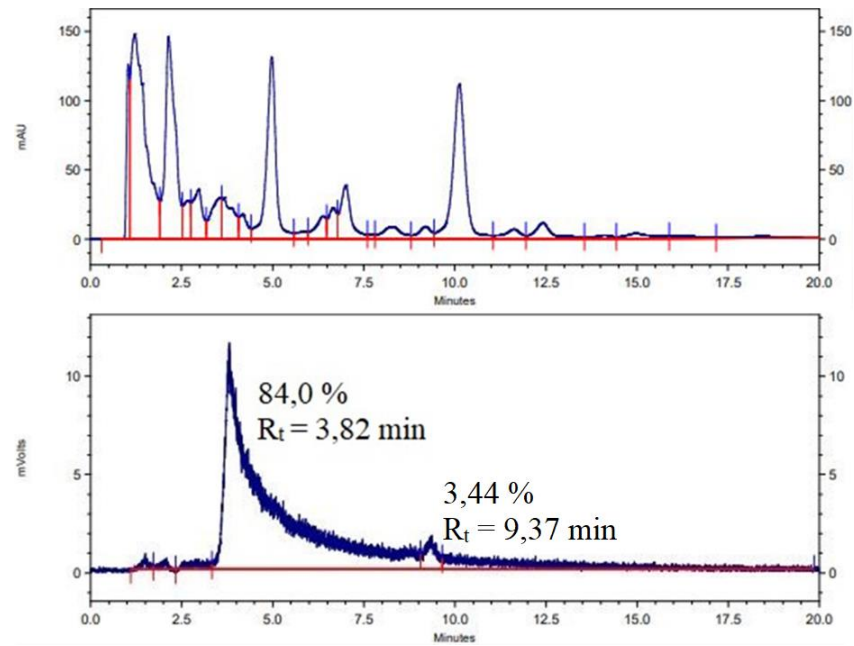
Aika	RCY (radioHPLC) (%)
10 min	4,9 ± 0,7
20 min	3,0 ± 2,0
30 min	5,9 ± 4,4



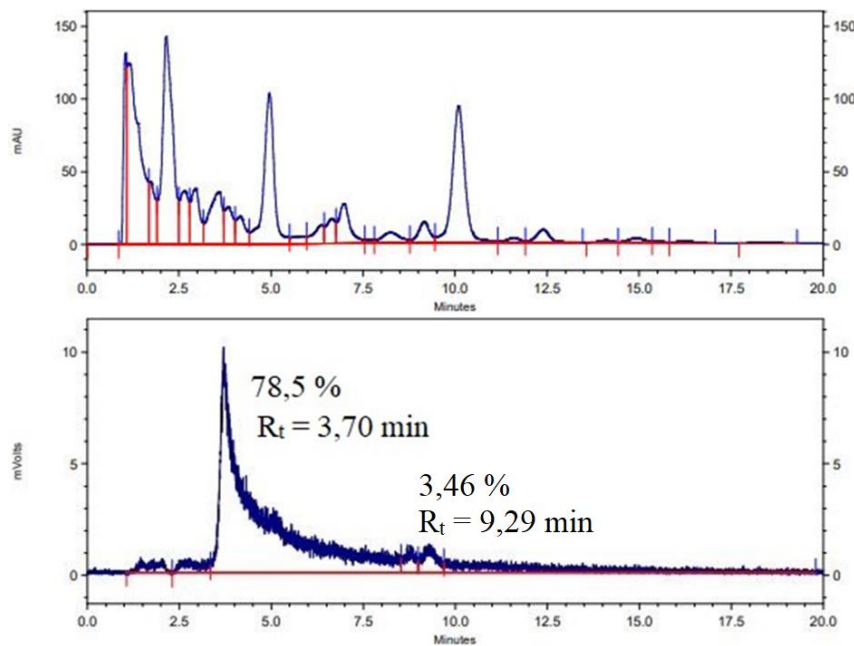
Kuva 18. Leimaamattoman $[^{18}\text{F}]$ fluoridin UV-kromatogrammi (ylempi) ja radioaktiivisuuskromatogrammi (alempi). HPLC-ajossa käytetty samoja asetuksia ja metodia kuin muissakin HPLC-ajoissa.



Kuva 19. Lähtöaineen **8** ^{18}F -fluoraus atseotrooppisesti kuivatulla $[^{18}\text{F}]$ fluoridilla. HPLC-näyte ajettiin, kun reaktiota oli kulunut 10 minuuttia. Ylempänä UV-kromatogrammi (aallonpituus 280 nm) ja alempana radioaktiivisuuskromatogrammi.



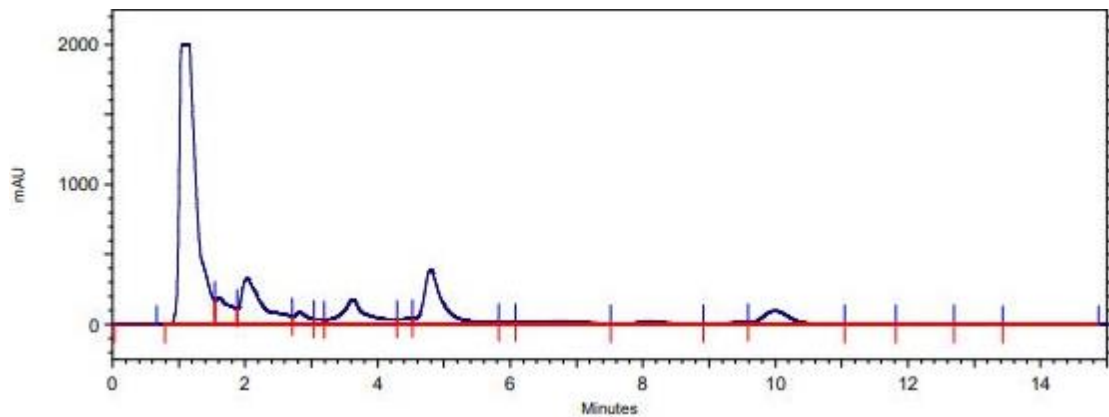
Kuva 20. Lähtöaineen **8** ^{18}F -fluoraus atseotrooppisesti kuivatulla $[^{18}\text{F}]$ fluoridilla. HPLC-näyte ajettiin, kun reaktiota oli kulunut 20 minuuttia. Ylempänä UV-kromatogrammi (aallonpituus 280 nm) ja alempana radioaktiivisuuskromatogrammi.



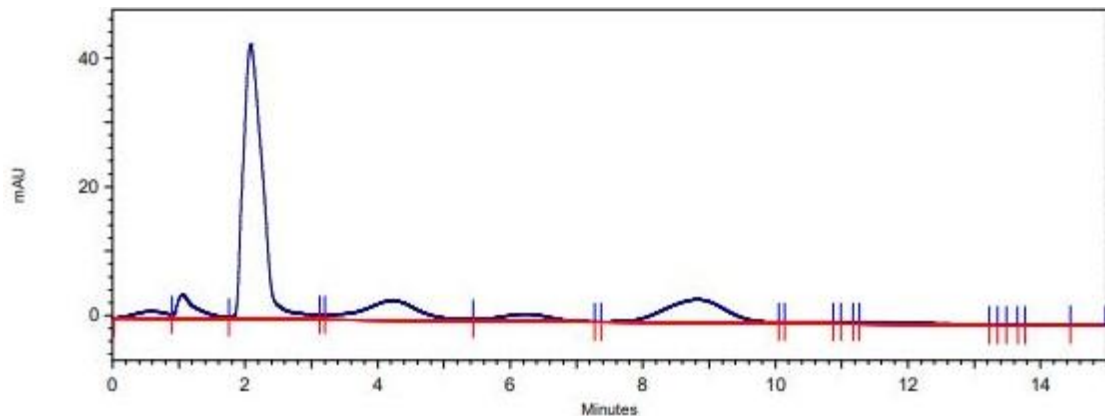
Kuva 21. Lähtöaineen **8** ^{18}F -fluoraus atseotrooppisesti kuivatulla $[^{18}\text{F}]$ fluoridilla. HPLC-näyte ajettiin, kun reaktiota oli kulunut 30 minuuttia. Ylempänä UV-kromatogrammi (aallonpituus 280 nm) ja alempana radioaktiivisuuskromatogrammi.

3.6.2.2 Lähtöaineen **8** ^{18}F -fluoraus QMA-patruunalla aktivoitulla ^{18}F fluoridilla

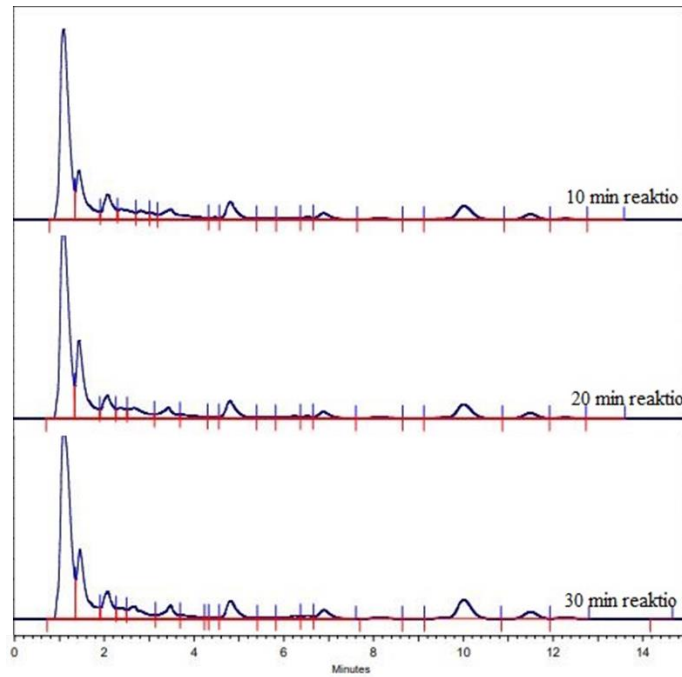
Lähtöaineen **8** ^{18}F -fluoraus QMA-patruunalla aktivoitulla ^{18}F fluoridilla ei onnistunut lainkaan. ^{18}F -fluorauksella ei saatu haluttua tuotetta ^{18}F **9** (RCY 0 %), vaan HPLC:lta saaduissa tuloksissa näkyy ainoastaan epäpuhtauksia. Kuvissa 22 ja 23 on esitetty sekä ruteniumkompleksin että $^{i\text{Pr}}\text{ImCl}$ -kompleksin UV-kromatogrammit. Kuvissa 24, 25, 26, 27, 28 ja 29 on esitetty eri lämpötiloissa reagoineiden synteesien HPLC-ajojen tulokset.



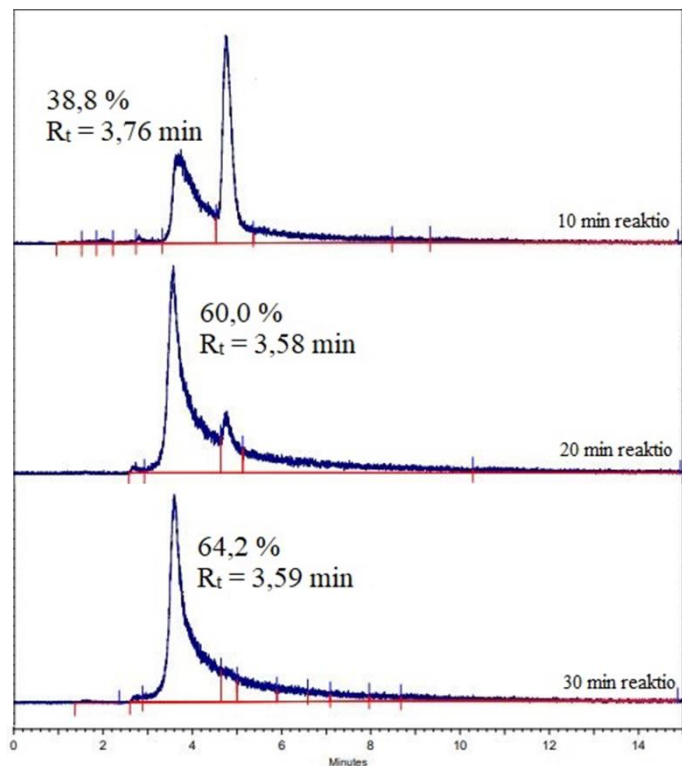
Kuva 22. Ruteniumkompleksin UV-kromatogrammi, jossa aallonpituus on 280 nm.



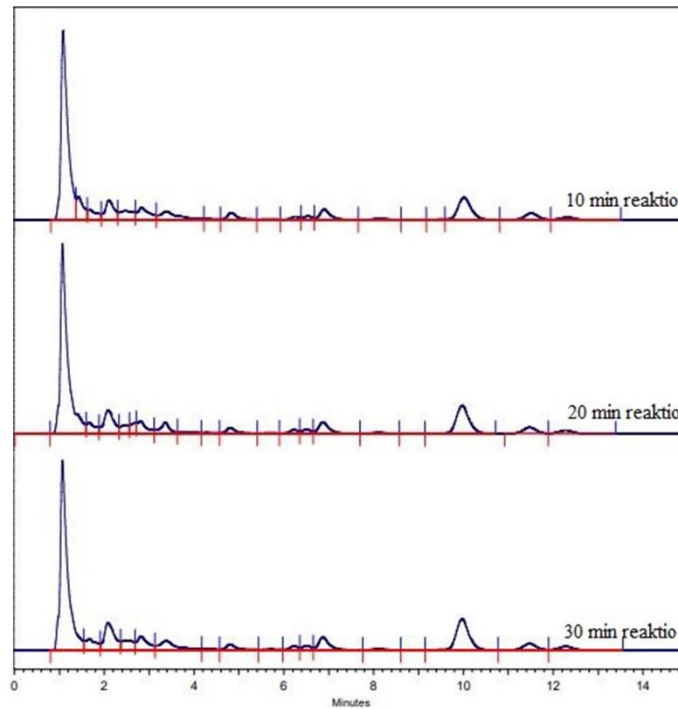
Kuva 23. $^{i\text{Pr}}\text{ImCl}$ -kompleksin UV-kromatogrammi, jossa aallonpituus on 280 nm.



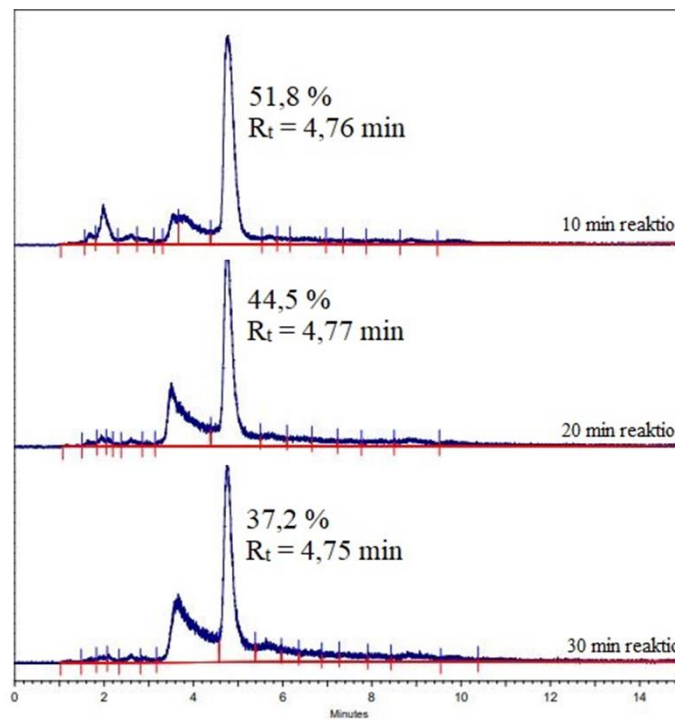
Kuva 24. Reaktion 1 (100 °C) HPLC:n UV-kromatogrammit (aallonpituus 280 nm) 10, 20 ja 30 minuutin reaktion jälkeen.



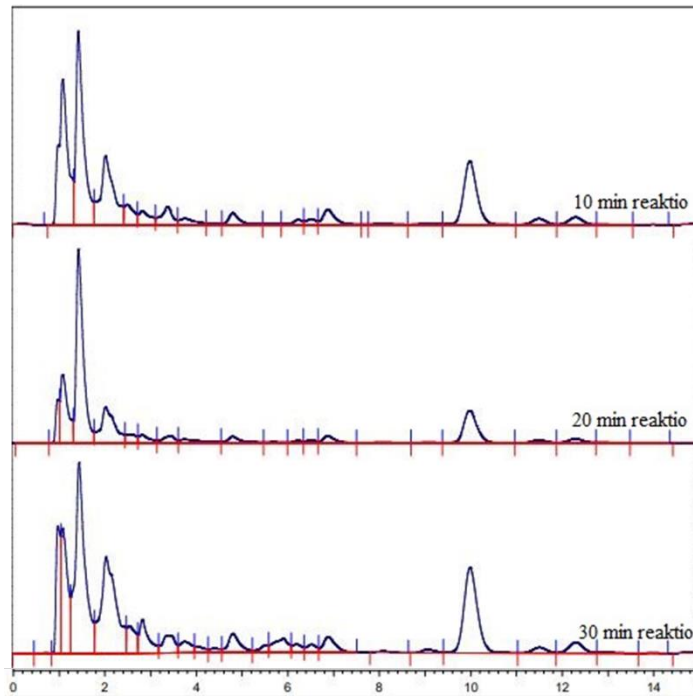
Kuva 25. Reaktion 1 (100 °C) HPLC:n radioaktiivisuuskromatogrammit 10, 20 ja 30 minuutin reaktion jälkeen.



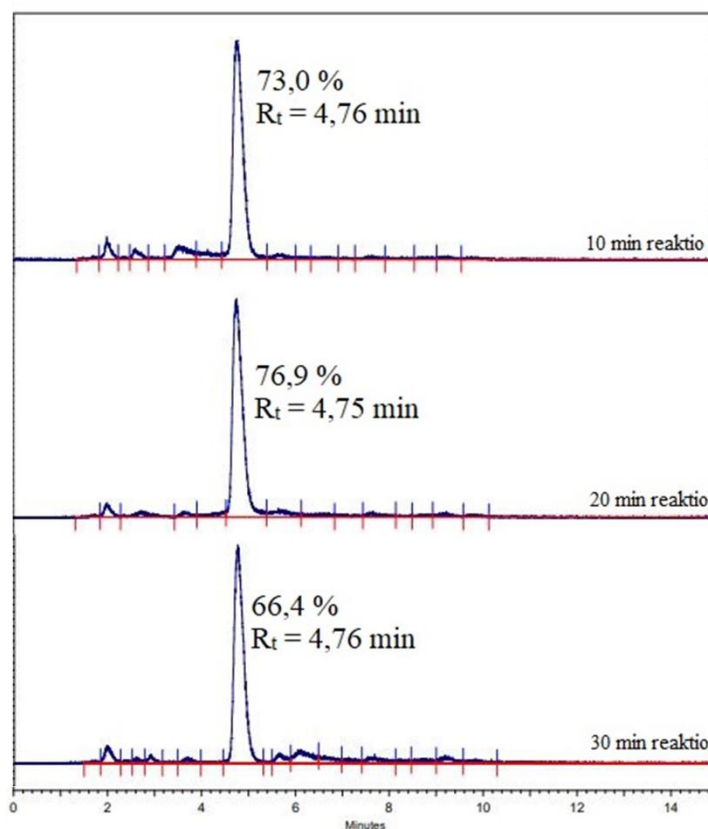
Kuva 26. Reaktion 2 (120 °C) HPLC:n UV-kromatogrammit (aallonpituus 280 nm) 10, 20 ja 30 minuutin reaktion jälkeen.



Kuva 27. Reaktion 2 (120 °C) HPLC:n radioaktiivisuuskromatogrammit 10, 20 ja 30 minuutin reaktion jälkeen.



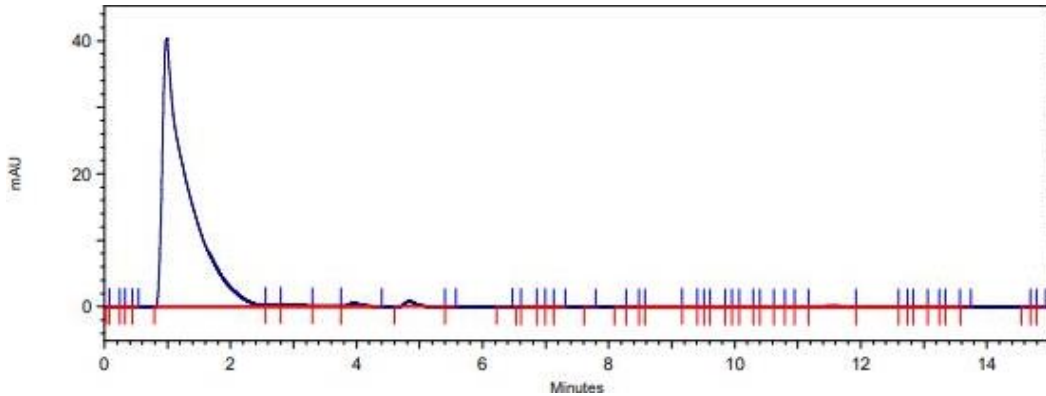
Kuva 28. Reaktion 3 (160 °C) HPLC:n UV-kromatogrammit (aallonpituus 280 nm) 10, 20 ja 30 minuutin reaktion jälkeen.



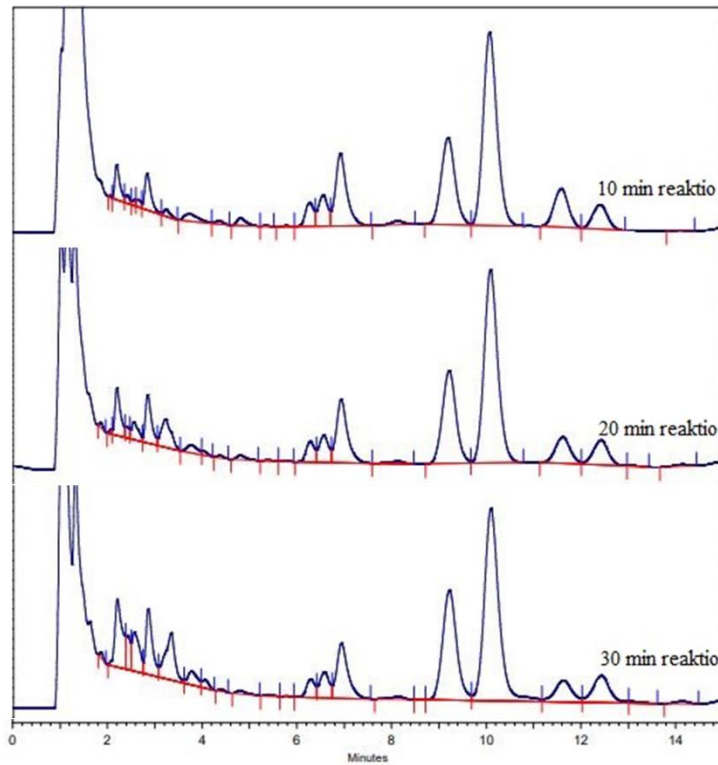
Kuva 29. Reaktion 3 (160 °C) HPLC:n radioaktiivisuuskromatogrammit 10, 20 ja 30 minuutin reaktion jälkeen.

3.6.2.3 2-kloori-5-hydroksibentsoehapon ^{18}F -fluoraus

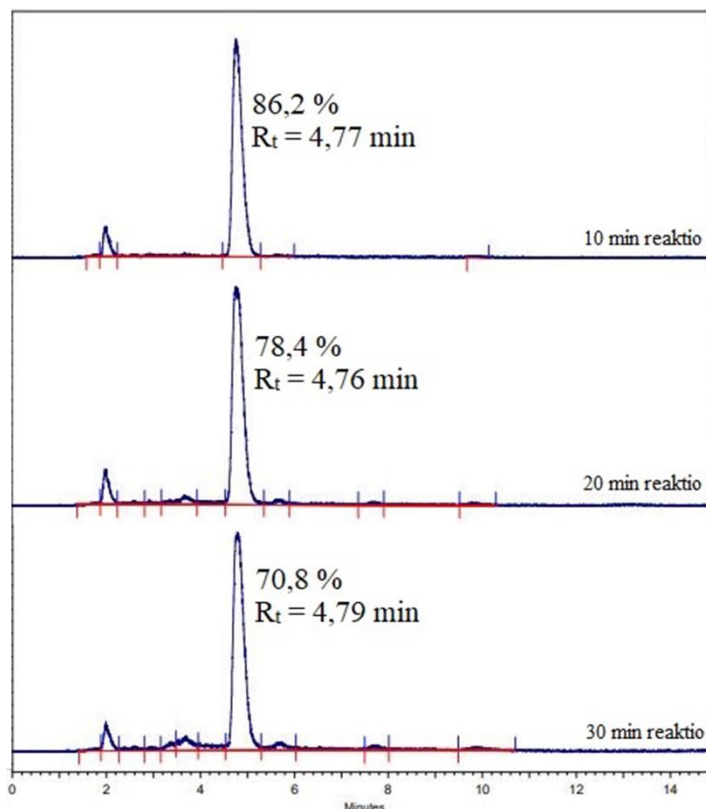
2-kloori-5-hydroksibentsoehapon ^{18}F -fluoraus tehtiin myös QMA-patruunalla aktivoitulla ^{18}F -fluoridilla. Tälläkään menetelmällä ei onnistuttu radioleimaamaan haluttua tuotetta 2-kloori-5- ^{18}F -fluoribentsoehappoa (RCY 0 %). Kuvassa 30 on esitetty 2-kloori-5-fluoribentsoehapon, joka toimii referenssinä 2-kloori-5- ^{18}F -fluoribentsoehapolle, HPLC:n UV-kromatogrammi. Kuvissa 31 ja 32 on esitetty synteesien HPLC-ajojen tulokset eri reaktioaikapisteissä.



Kuva 30. 2-kloori-5- ^{18}F -fluoribentsoehapon referenssiyhdisteen, 2-kloori-5-fluoribentsoehapon, UV-kromatogrammi (aallonpituus 280 nm).



Kuva 31. 2-kloori-5-hydroksibentsoehapon ^{18}F -fluorauksen UV-kromatogrammi (aallonpituus 280 nm).



Kuva 32. 2-kloori-5-hydroksibentsoehapon ^{18}F -fluorauksen radioaktiivisuuskromatogrammi.

4 Johtopäätökset

Lähtöaineen **8** ja referenssin **9** synteesi oli välituotteeseen **7** asti sama. Molempien lopputuotteiden synteesit onnistuivat, mutta kumpikaan tuote ei ollut täysin puhdas. Lopputuotteisiin **8** ja **9** jäi hieman epäpuhtauksia, jotka voitiin havaita ^{19}F NMR-spektreistä. Voidaan epäillä, että epäpuhtaudet ovat mahdollisia reagoimattomia lähtöaineita tai reagenssijäämiä. Näitä epäpuhtauksia olisi mahdollisesti voitu välttää puhdistamalla välituotteita synteesin aiemmissa vaiheissa. Työssä pylväskromatografinen puhdistus tehtiin vain välituotteelle **4** fluorauksen jälkeen ja lopullisille tuotteille **8** ja **9**. Epäpuhtaudet vaikuttivat ainoastaan ^{18}F -fluorattujen tuotteiden radiokemiallisiin puhtauksiin, vaikka sillä ei ollut lopputuloksen kannalta merkitystä, sillä radioleimuksilla ei saatu muodostettua haluttua lopputuotetta [^{18}F]**9**.

Lähtöaineen **8** ^{18}F -fluoraus atseotrooppisesti kuivatulla [^{18}F]fluoridilla epäonnistui, sillä HPLC:n radioaktiivisuuden kromatogrammeissa näkyvä suurin piikki ei ollut haluttu tuote [^{18}F]**9**. RadioHPLC-analyysissä näkyi ^{18}F -fluorattu epäpuhtaus, joka eluoitui jo 4 minuutin jälkeen. Referenssi **9** eluoitui (kuva 17) noin 9 minuutin kohdalla samalla HPLC-metodilla. Atseotrooppisella kuivauksella tuotteen [^{18}F]**9** radiokemiallinen saanto jäi todella heikoksi (3–6 %).

Lähtöaineen **8** ^{18}F -fluoraus QMA-patruunalla aktivoitulla ^{18}F fluoridilla epäonnistui. QMA-patruunalla tehdyn reaktion HPLC-ajojen tulokset olivat vastaavanlaiset kuin atseotrooppisella kuivauksella aktivoitulla ^{18}F fluoridilla radioleimatuilla reaktioilla eli ^{18}F -fluorattu epäpuhtaus eluoiutui jo 5 minuutin kohdalla, kun tuotteen ^{18}F 9 tulisi eluotua vasta noin 9 minuutin kohdalla. QMA-patruunalla aktivoitulla ^{18}F fluoridilla ei saatu syntetisoitua haluttua ^{18}F 9:ia. 2-kloori-5-hydroksibentsoehappoakaan ei onnistuttu radioleimaamaan. RadioHPLC:ssä näkyi suuri epäpuhtaus samassa kohtaa kuin atseotrooppisessa ja QMA-patruunalla aktivoituissa synteeseiden analyyseissä.

Todennäköistä on, että leimattava lähtöaine **8** hajoaa ruteniumkompleksia irrotettaessa (160 °C) ja mahdollisesti fenoli kuitenkin saadaan ^{18}F -fluorattua, sillä jotakin aktiivisuutta tuloksissa kuitenkin havaitaan. Mahdollinen kromatogrammeissa näkyvä piikki saattaisi olla 2-kloori-5-hydroksibentsoehappo, jossa mahdollisesti vielä ruteniumkompleksi kiinni, koska sama piikki näkyy sekä pelkkää 2-kloori-5-hydroksibentsoehappoa leimatessa, että lähtöainetta **8** leimatessa.

5 Viitteet

- (1) Shah, P.; Westwell, A. D. The Role of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22* (5), 527–540. <https://doi.org/10.1080/14756360701425014>.
- (2) Gillis, E. P.; Eastman, K. J.; Hill, M. D.; Donnelly, D. J.; Meanwell, N. A. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. **2015**. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00258>.
- (3) Tressaud A and Haufe G. *Fluorine and Health: Molecular Imaging, Biomedical Materials and Pharmaceuticals*, 1st ed.; Elsevier: Amsterdam, 2008.
- (4) Le Bars, D. Fluorine-18 and Medical Imaging: Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography. *J. Fluor. Chem.* **2006**, *127* (11), 1488–1493. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2006.09.015>.
- (5) Valk P E, Delbeke D, B. D. L.; Townsend D W, and M. M. N. *Positron Emission Tomography*, 10th ed.; Springer: London, 2006.
- (6) Li, Z.; Conti, P. S. Radiopharmaceutical Chemistry for Positron Emission Tomography. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (11), 1031–1051. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.09.007>.
- (7) Paans, A. M. J. Compact Cyclotrons for the Production of Tracers and Radiopharmaceuticals. *Nukleonika* **2003**, *48* (SUPPL.2), 1–4.
- (8) Jacobson, O.; Kiesewetter, D. O.; Chen, X. Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1021/bc500475e>.
- (9) Hess, E.; Blessing, G.; Coenen, H. H.; Qaim, S. M. Improved Target System for

- Production of High Purity [18F]Fluorine via the 18O(p,n)18F Reaction. *Appl. Radiat. Isot.* **2000**, 52 (6), 1431–1440. [https://doi.org/10.1016/S0969-8043\(99\)00248-1](https://doi.org/10.1016/S0969-8043(99)00248-1).
- (10) Füchtner, F.; Preusche, S.; Mäding, P.; Zessin, J.; Steinbach, J. Factors Affecting the Specific Activity of [18F]Fluoride from a [18O]Water Target. *Nukleomedizin* **2008**, 47 (3), 116–119.
- (11) Bergman, J.; Solin, O. Fluorine-18-Labeled Fluorine Gas for Synthesis of Tracer Molecules. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, 24 (7), 677–683. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(97\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(97)00078-4).
- (12) Lasne, M.-C.; Perrio, C.; Rouden, J.; Barré, L.; Roeda, D.; Dolle, F.; Crouzel, C. Chemistry of β +-Emitting Compounds Based on Fluorine-18. **2002**, 222, 201–258. https://doi.org/10.1007/3-540-46009-8_7.
- (13) Cai, L.; Lu, S.; Pike, V. W. Chemistry with [18F]Fluoride Ion. *European J. Org. Chem.* **2008**, No. 17, 2853–2873. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200800114>.
- (14) Lahdenpohja, S. O.; Rajala, N. A.; Rajander, J.; Kirjavainen, A. K. Fast and Efficient Copper-Mediated 18F-Fluorination of Arylstannanes, Aryl Boronic Acids, and Aryl Boronic Esters without Azeotropic Drying. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2019**, 4 (1). <https://doi.org/10.1186/s41181-019-0079-y>.
- (15) Cole, E.; Stewart, M.; Littich, R.; Hoareau, R.; Scott, P. Radiosyntheses Using Fluorine-18: The Art and Science of Late Stage Fluorination. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, 14 (7), 875–900. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140202205035>.
- (16) York, N.; Reivich, M. 18F-Labelled 2-Deoxy-2-Fluoro-D-Glucose, 2-Deoxy- 2-Fluoro-D-Mannose and 4C- 2-Deoxy- 2-Fluoro-D-Glucose. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1978**, 14 (2), 175–183.
- (17) Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Stocklin, G. Efficient Stereospecific Synthesis. **1986**, 27 (February), 235–238.
- (18) Tierling, T.; Hamacher, K.; Coenen, H. H. A New Nucleophilic Asymmetric Synthesis of 6-[18F]Fluoro-DOPA. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2001**, 44 (S1), S146–S147. <https://doi.org/10.1002/jlcr.2580440151>.
- (19) Berridge, M. S.; Tewson, T. J. Chemistry of Fluorine-18 Radiopharmaceuticals. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part* **1986**, 37 (8), 685–693. [https://doi.org/10.1016/0883-2889\(86\)90262-5](https://doi.org/10.1016/0883-2889(86)90262-5).
- (20) Miller, P. W.; Long, N. J.; Vilar, R.; Gee, A. D. Synthesis Of 11C, 18F, 15O, and 13N Radiolabels for Positron Emission Tomography. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, 47 (47), 8998–9033. <https://doi.org/10.1002/anie.200800222>.
- (21) Namavari, M.; Satyamurthy, N.; Barrio, J. R. Regioselective Synthesis of 6-Fluorodopamine, 6-Fluoro-m-Tyramine and 4-Fluoro-m-Tyramine Using Elemental Fluorine, Oxygen Difluoride and Acetyl Hypofluorite. *J. Fluor. Chem.* **1995**, 74 (1), 113–

121. [https://doi.org/10.1016/0022-1139\(95\)03259-G](https://doi.org/10.1016/0022-1139(95)03259-G).
- (22) Vanderborn, D.; Sewing, C.; Herscheid, J. D. M.; Windhorst, A. D.; Orru, R. V. A.; Vugts, D. J. A Universal Procedure for the [¹⁸F]Trifluoromethylation of Aryl Iodides and Aryl Boronic Acids with Highly Improved Specific Activity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (41), 11046–11050. <https://doi.org/10.1002/anie.201406221>.
- (23) Stenhagen, I. S. R.; Kirjavainen, A. K.; Forsback, S. J.; Jørgensen, C. G.; Robins, E. G.; Luthra, S. K.; Solin, O.; Gouverneur, V. [¹⁸F]Fluorination of an Arylboronic Ester Using [¹⁸F]Selectfluor Bis(Triflate): Application to 6-[¹⁸F]Fluoro-l-DOPA. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (14), 1386–1388. <https://doi.org/10.1039/c2cc38646a>.
- (24) Spectus, C. O. N. The Organometallic Fluorine Chemistry of Palladium and Rhodium: Studies toward Aromatic Fluorination. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43* (1), 160–171.
- (25) Coenen, H. H.; Ermert, J. ¹⁸F-Labeling Innovations and Their Potential for Clinical Application. *Clin. Transl. Imaging* **2018**, *6* (3), 169–193. <https://doi.org/10.1007/s40336-018-0280-0>.
- (26) Hollingworth, C.; Gouverneur, V. Transition Metal Catalysis and Nucleophilic Fluorination. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (24), 2929–2942. <https://doi.org/10.1039/c2cc16158c>.
- (27) Kamlet, A. S.; Neumann, C. N.; Lee, E.; Carlin, S. M.; Moseley, C. K.; Stephenson, N.; Hooker, J. M.; Ritter, T. Application of Palladium-Mediated ¹⁸F-Fluorination to PET Radiotracer Development: Overcoming Hurdles to Translation. *PLoS One* **2013**, *8* (3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059187>.
- (28) Furuya, T.; Ritter, T. Carbon-Fluorine Reductive Elimination from a High-Valent Palladium Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (31), 10060–10061. <https://doi.org/10.1021/ja803187x>.
- (29) Lee, E.; Hooker, J. M.; Ritter, T. Nickel-Mediated Oxidative Fluorination for PET with Aqueous [¹⁸F] Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (42), 17456–17458. <https://doi.org/10.1021/ja3084797>.
- (30) Hoover, A. J.; Lazari, M.; Ren, H.; Narayanam, M. K.; Murphy, J. M.; Van Dam, R. M.; Hooker, J. M.; Ritter, T. A Transmetalation Reaction Enables the Synthesis of [¹⁸F]5-Fluorouracil from [¹⁸F]Fluoride for Human PET Imaging. *Organometallics* **2016**, *35* (7), 1008–1014. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.6b00059>.
- (31) Zlatopolskiy, B. D.; Zischler, J.; Urusova, E. A.; Endepols, H.; Kordys, E.; Frauendorf, H.; Mottaghy, F. M.; Neumaier, B. A Practical One-Pot Synthesis of Positron Emission Tomography (PET) Tracers via Nickel-Mediated Radiofluorination. *ChemistryOpen* **2015**, *4* (4), 457–462. <https://doi.org/10.1002/open.201500056>.
- (32) Tredwell, M.; Preshlock, S. M.; Taylor, N. J.; Gruber, S.; Huiban, M.; Passchier, J.; Mercier, J.; Génicot, C.; Gouverneur, V. A General Copper-Mediated Nucleophilic ¹⁸F

- Fluorination of Arenes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (30), 7751–7755. <https://doi.org/10.1002/anie.201404436>.
- (33) Mossine, A. V.; Brooks, A. F.; Ichiishi, N.; Makaravage, K. J.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. Development of Customized [18F] Fluoride Elution Techniques for the Enhancement of Copper-Mediated Late-Stage Radiofluorination. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00110-1>.
- (34) Teare, H.; Robins, E. G.; Kirjavainen, A.; Forsback, S.; Sandford, G.; Solin, O.; Luthra, S. K.; Gouverneur, V. Radiosynthesis and Evaluation of [18F]Selectfluor Bis(Triflate). *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49* (38), 6821–6824. <https://doi.org/10.1002/anie.201002310>.
- (35) Verhoog, S.; Pfeifer, L.; Khotavivattana, T.; Calderwood, S.; Collier, T. L.; Wheelhouse, K.; Tredwell, M.; Gouverneur, V. Silver-Mediated 18F-Labeling of Aryl-CF₃ and Aryl-CHF₂ with 18F-Fluoride. *Synlett* **2016**, *27* (1), 25–28. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1560592>.
- (36) Yang, B.; Chansaenpak, K.; Wu, H.; Zhu, L.; Wang, M.; Li, Z.; Lu, H. Silver-Promoted (Radio)Fluorination of Unsaturated Carbamates via a Radical Process. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (24), 3497–3500. <https://doi.org/10.1039/c7cc01393k>.
- (37) Beyzavi, M. H.; Mandal, D.; Strebl, M. G.; Neumann, C. N.; D'Amato, E. M.; Chen, J.; Hooker, J. M.; Ritter, T. 18F-Deoxyfluorination of Phenols via Ru π -Complexes. *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3* (9), 944–948. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00195>.
- (38) Rickmeier, J.; Ritter, T. Site-Specific Deoxyfluorination of Small Peptides with [18F]Fluoride. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57* (43), 14207–14211. <https://doi.org/10.1002/anie.201807983>.
- (39) Lipshutz, B. H.; Taft, B. R.; Abela, A. R.; Ghorai, S.; Krasovskiy, A.; Duplais, C. Catalysis in the Service of Green Chemistry: Nobel Prize-Winning Palladium-Catalysed Cross-Couplings, Run in Water at Room Temperature: Heck, Suzuki-Miyaura and Negishi Reactions Carried out in the Absence of Organic Solvents, Enabled by Micellar Catalysis. *Platin. Met. Rev.* **2012**, *56* (2), 62–74. <https://doi.org/10.1595/147106712x629761>.
- (40) Lee, E.; Kamlet, A. S.; Powers, D. C.; Neumann, C. N.; Boursalian, G. B.; Furuya, T.; Choi, D. C.; Hooker, J. M.; Ritter, T. A Fluoride-Derived Electrophilic Late-Stage Fluorination Reagent for PET Imaging. *Science (80-.)*. **2011**, *334* (6056), 639–642. <https://doi.org/10.1126/science.1212625>.
- (41) Mazzotti, A. R.; Campbell, M. G.; Tang, P.; Murphy, J. M.; Ritter, T. Palladium(III)-Catalyzed Fluorination of Arylboronic Acid Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (38), 14012–14015. <https://doi.org/10.1021/ja405919z>.
- (42) Mossine, A. V.; Brooks, A. F.; Makaravage, K. J.; Miller, J. M.; Ichiishi, N.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. Synthesis of [18F]Arenes via the Copper-Mediated [18F]Fluorination of

- Boronic Acids. *Org. Lett.* **2015**, *17* (23), 5780–5783. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b02875>.
- (43) Makaravage, K. J.; Brooks, A. F.; Mossine, A. V.; Sanford, M. S.; Scott, P. J. H. Copper-Mediated Radiofluorination of Arylstannanes with [18F]KF. *Org. Lett.* **2016**, *18* (20), 5440–5443. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b02911>.
- (44) Bunnett, J. F. Mechanism and Reactivity in Aromatic Nucleophilic Substitution Reactions. *Q. Rev. Chem. Soc.* **1958**, *12* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1093/nq/s3-IV.94.316-a>.
- (45) Bunnett, J. F.; Zahler, R. E. Aromatic Nucleophilic Substitution Reactions. *Chem. Rev.* **1951**, *49* (2), 273–412. <https://doi.org/10.1021/cr60153a002>.
- (46) Neumann, C. N.; Hooker, J. M.; Ritter, T. Concerted Nucleophilic Aromatic Substitution with 19F- and 18F-. *Nature* **2016**, *534* (7607), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature17667>.
- (47) Lahdenpohja, S.; Rajala, N. A.; Helin, J. S.; Haaparanta-Solin, M.; Solin, O.; López-Picón, F. R.; Kirjavainen, A. K. Ruthenium-Mediated 18F-Fluorination and Preclinical Evaluation of a New CB1 Receptor Imaging Agent [18F]FPATPP. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11* (13), 2009–2018. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.0c00313>.
- (48) Surprenant, A.; Alan North, R. Signaling at Purinergic P2X Receptors. *Annu. Rev. Physiol.* **2009**, *71*, 333–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630>.
- (49) Burnstock, G.; Kennedy, C. *P2X Receptors in Health and Disease*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2011; Vol. 61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00011-4>.
- (50) North, R. A. Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol. Rev.* **2002**, *82* (4), 1013–1067. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>.
- (51) Coddou, C.; Yan, Z.; Obsil, T.; Pablo Huidobro-Toro, J.; Stojilkovic, S. S. Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63* (3), 641–683. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003129>.
- (52) Verkhatsky, A.; Pankratov, Y.; Lalo, U.; Nedergaard, M. P2X Receptors in Neuroglia. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **2012**, *1* (2), 151–161. <https://doi.org/10.1002/wmts.12>.
- (53) Burnstock, G.; Knight, G. E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. *Int. Rev. Cytol.* **2004**, *240* (SPEC.ISS.), 31–304. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3).
- (54) Carroll, W. A.; Donnelly-Roberts, D.; Jarvis, M. F. Selective P2X7 Receptor Antagonists for Chronic Inflammation and Pain. *Purinergic Signal.* **2009**, *5* (1), 63–73. <https://doi.org/10.1007/s11302-008-9110-6>.
- (55) Di Virgilio, F.; Dal Ben, D.; Sarti, A. C.; Giuliani, A. L.; Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* **2017**, *47* (1), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>.

- (56) Bhattacharya, A.; Biber, K. The Microglial ATP-Gated Ion Channel P2X7 as a CNS Drug Target. *Glia* **2016**, *64* (10), 1772–1787. <https://doi.org/10.1002/glia.23001>.
- (57) Sperlágh, B.; Illes, P. P2X7 Receptor: An Emerging Target in Central Nervous System Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd 2014, pp 537–547. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.08.002>.
- (58) Bartlett, R.; Stokes, L.; Sluyter, R. The P2x7 Receptor Channel: Recent Developments and the Use of P2x7 Antagonists in Models of Disease. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66* (3), 638–675. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008003>.
- (59) Sperlágh, B.; Vizi, E. S.; Wirkner, K.; Illes, P. P2X7 Receptors in the Nervous System. *Prog. Neurobiol.* **2006**, *78* (6), 327–346. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.03.007>.
- (60) Q99572 | SWISS-MODEL Repository <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q99572?csm=584C17EF6D5EC899> (accessed Jan 15, 2021).
- (61) King, B. F. Novel P2X 7 Receptor Antagonists Ease the Pain. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151* (5), 565–567. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707266>.
- (62) Jiang, L. H.; Mackenzie, A. B.; North, R. A.; Surprenant, A. Brilliant Blue G Selectively Blocks ATP-Gated Rat P2X7 Receptors. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58* (1), 82–88. <https://doi.org/10.1124/mol.58.1.82>.
- (63) Ravi, R. G.; Kertesy, S. B.; Dubyak, G. R.; Jacobson, K. A. Potent P2X7 Receptor Antagonists: Tyrosyl Derivatives Synthesized Using a Sequential Parallel Synthetic Approach. *Drug Dev. Res.* **2001**, *54* (2), 75–87. <https://doi.org/10.1002/ddr.1207>.
- (64) Baraldi, P. G.; Nuñez, M. del C.; Morelli, A.; Falzoni, S.; Di Virgilio, F.; Romagnoli, R. Synthesis and Biological Activity of N-Arylpiperazine-Modified Analogues of KN-62, a Potent Antagonist of the Purinergic P2X7 Receptor. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (8), 1318–1329. <https://doi.org/10.1021/jm021049d>.
- (65) Stokes, L.; Jiang, L. H.; Alcaraz, L.; Bent, J.; Bowers, K.; Fagura, M.; Furber, M.; Mortimore, M.; Lawson, M.; Theaker, J.; Laurent, C.; Braddock, M.; Surprenant, A. Characterization of a Selective and Potent Antagonist of Human P2X 7 Receptors, AZ11645373. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *149* (7), 880–887. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706933>.
- (66) Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Di Virgilio, F. Recent Progress in the Discovery of Antagonists Acting at P2X7 Receptor. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2005**, *15* (3), 271–287. <https://doi.org/10.1517/13543776.15.3.271>.
- (67) Gunosewoyo, H.; Coster, M.; Kassiou, M. Molecular Probes for P2X7 Receptor Studies. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14* (14), 1505–1523. <https://doi.org/10.2174/092986707780831023>.
- (68) Furber, M.; Alcaraz, L.; Bent, J. E.; Beyerbach, A.; Bowers, K.; Braddock, M.; Caffrey,

- M. V.; Cladingboel, D.; Collington, J.; Donald, D. K.; Fagura, M.; Ince, F.; Kinchin, E. C.; Laurent, C.; Lawson, M.; Luker, T. J.; Mortimore, M. M. P.; Pimm, A. D.; Riley, R. J.; Roberts, N.; Robertson, M.; Theaker, J.; Thorne, P. V.; Weaver, R.; Webborn, P.; Willis, P. Discovery of Potent and Selective Adamantane-Based Small-Molecule P2X₇ Receptor Antagonists/Interleukin-1 β Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (24), 5882–5885. <https://doi.org/10.1021/jm700949w>.
- (69) Baxter, A.; Bent, J.; Bowers, K.; Braddock, M.; Brough, S.; Fagura, M.; Lawson, M.; McNally, T.; Mortimore, M.; Robertson, M.; Weaver, R.; Webborn, P. Hit-to-Lead Studies: The Discovery of Potent Adamantane Amide P2X₇ Receptor Antagonists. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (22), 4047–4050. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.08.034>.
- (70) Keystone, E. C.; Wang, M. M.; Layton, M.; Hollis, S.; McInnes, I. B. Clinical Evaluation of the Efficacy of the P2X₇ Purinergic Receptor Antagonist AZD9056 on the Signs and Symptoms of Rheumatoid Arthritis in Patients with Active Disease despite Treatment with Methotrexate or Sulphasalazine. *Ann. Rheum. Dis.* **2012**, *71* (10), 1630–1635. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-143578>.
- (71) T. Pournara, D.; Durner, A.; Kritsi, E.; Papakostas, A.; Zoumpoulakis, P.; Nicke, A.; Koufaki, M. Design, Synthesis, and in Vitro Evaluation of P2X₇ Antagonists. *ChemMedChem* **2020**, *15* (24), 2530–2543. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000303>.
- (72) Wilkinson, S. M.; Barron, M. L.; O'Brien-Brown, J.; Janssen, B.; Stokes, L.; Werry, E. L.; Chishty, M.; Skarratt, K. K.; Ong, J. A.; Hibbs, D. E.; Vugts, D. J.; Fuller, S.; Windhorst, A. D.; Kassiou, M. Pharmacological Evaluation of Novel Bioisosteres of an Adamantanyl Benzamide P2X₇ Receptor Antagonist. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8* (11), 2374–2380. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.7b00272>.
- (73) Barniol-Xicotá, M.; Kwak, S. H.; Lee, S. D.; Caseley, E.; Valverde, E.; Jiang, L. H.; Kim, Y. C.; Vázquez, S. Escape from Adamantane: Scaffold Optimization of Novel P2X₇ Antagonists Featuring Complex Polycycles. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (4), 759–763. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.039>.
- (74) Janssen, B.; Vugts, D. J.; Wilkinson, S. M.; Ory, D.; Chalon, S.; Hoozemans, J. J. M.; Schuit, R. C.; Beaino, W.; Kooijman, E. J. M.; Van Den Hoek, J.; Chishty, M.; Doméné, A.; Van Der Perren, A.; Villa, A.; Maggi, A.; Molenaar, G. T.; Funke, U.; Shevchenko, R. V.; Baekelandt, V.; Bormans, G.; Lammertsma, A. A.; Kassiou, M.; Windhorst, A. D. Identification of the Allosteric P2X₇ Receptor Antagonist [11C]SMW139 as a PET Tracer of Microglial Activation. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24814-0>.
- (75) Koole, M.; Schmidt, M. E.; Hijzen, A.; Ravenstijn, P.; Vandermeulen, C.; Van Weehaeghe, D.; Serdons, K.; Celen, S.; Bormans, G.; Ceusters, M.; Zhang, W.; Van

- Nueten, L.; Kolb, H.; Hoon, J. de; Van Laere, K. 18F-JNJ-64413739, a Novel PET Ligand for the P2X7 Ion Channel: Radiation Dosimetry, Kinetic Modeling, Test-Retest Variability, and Occupancy of the P2X7 Antagonist JNJ-54175446. *J. Nucl. Med.* **2019**, *60* (5), 683–690. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.216747>.
- (76) Xu, Y.; Miao, X.; Ravenstijn, P.; Hijzen, A.; Schmidt, M. E.; Nandy, P.; Zhou, H. Translational Model-Informed Dose Selection for a Human Positron Emission Tomography Imaging Study of JNJ-54175446, a P2X7 Receptor Antagonist. *Clin. Transl. Sci.* **2020**, *13* (2), 309–317. <https://doi.org/10.1111/cts.12711>.

6 Liitteet

Lista liitteistä:

Liite 1. Metyyliadamantaanikarboksylaatin **2** ^1H NMR-spektri.

Liite 2. Metyyli-3-hydroksiadamantaanikarboksylaatin **3** ^1H NMR-spektri.

Liite 3. Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksylaatin **4** ^{19}F NMR-spektri.

Liite 4. Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksylaatin **4** ^1H NMR-spektri.

Liite 5. Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksylihapon **5** ^{19}F NMR-spektri.

Liite 6. Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksylihapon **5** ^1H NMR-spektri.

Liite 7. 3-fluoriadamantaanikarboksiamidin **6** ^{19}F NMR-spektri.

Liite 8. 3-fluoriadamantaanikarboksiamidin **6** ^1H NMR-spektri.

Liite 9. (3-fluoriadamantaan-1-yyli)metamiinin **7** ^1H NMR-spektri.

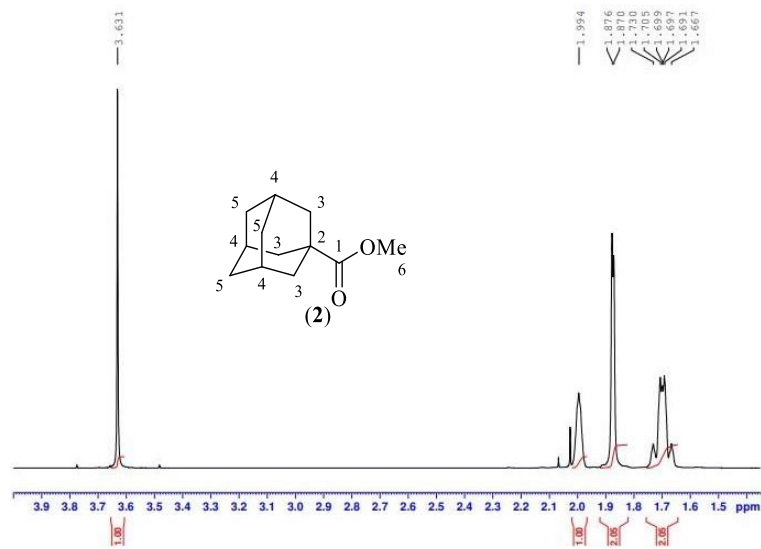
Liite 10. Lähtöaineen, 2-kloori-5-hydroksi-*N*-((3fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin **8** ^{19}F NMR-spektri.

Liite 11. Lähtöaineen, 2-kloori-5-hydroksi-*N*-((3fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin **8** ^1H NMR-spektri.

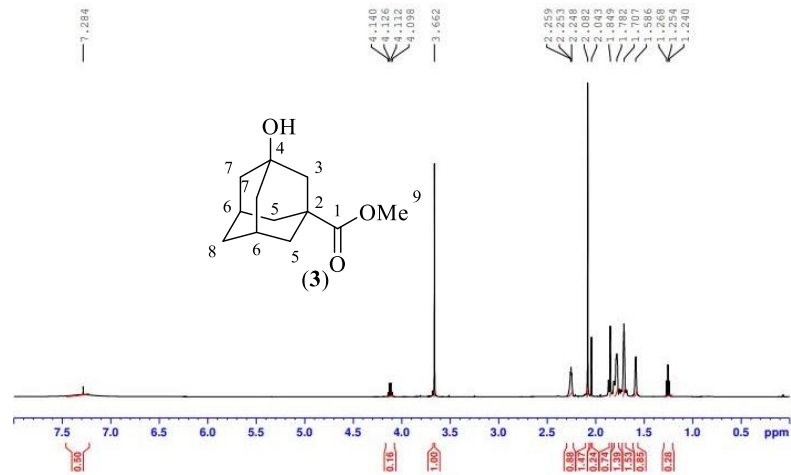
Liite 12. Referenssin, 2-kloori-5-fluori-*N*-((3fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin **9** ^{19}F NMR-spektri.

Liite 13. Referenssin, 2-kloori-5-fluori-*N*-((3fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin **9** ^1H NMR-spektrit.

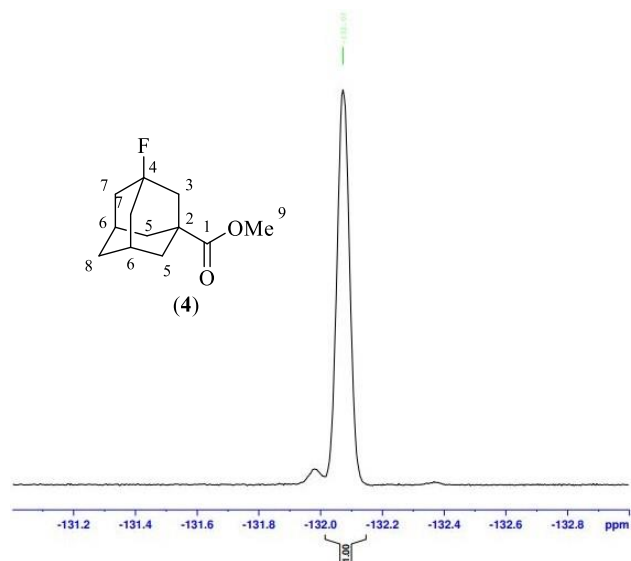
Liite 1. Metyyliadamantaanikarboksylaatin **2** ^1H NMR-spektri.



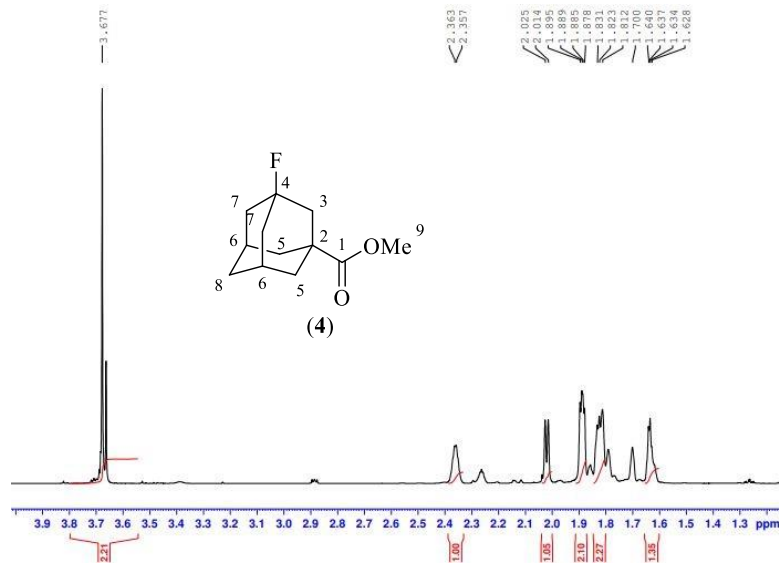
Liite 2. Metyyli-3-hydroksiadamantaanikarboksylaatin **3** ^1H NMR-spektri.



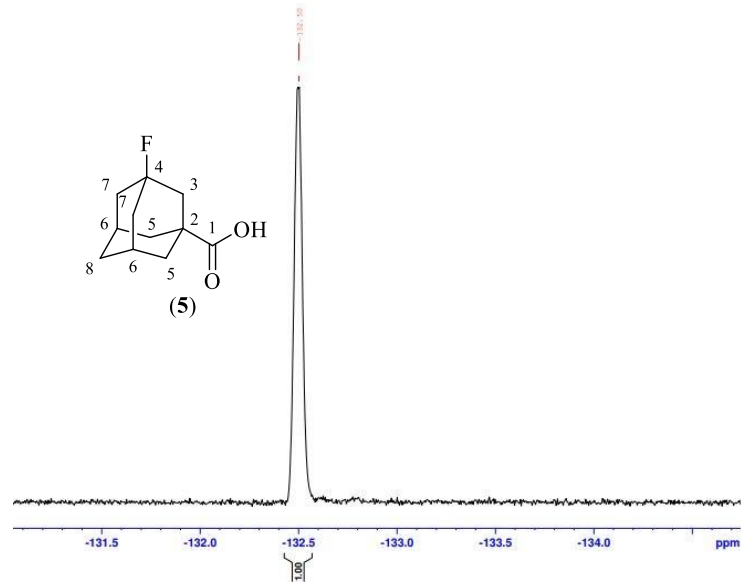
Liite 3. Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksylaatin **4** ^{19}F NMR-spektri.



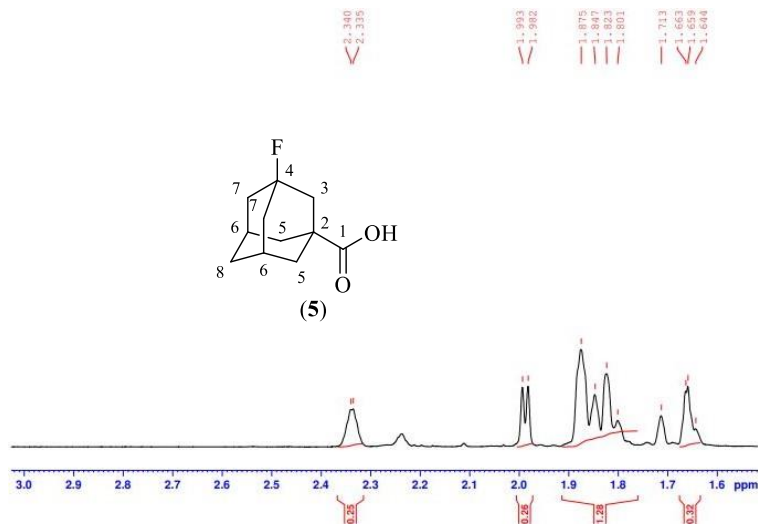
Liite 4. Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksylaatin **4** ^1H NMR-spektri.



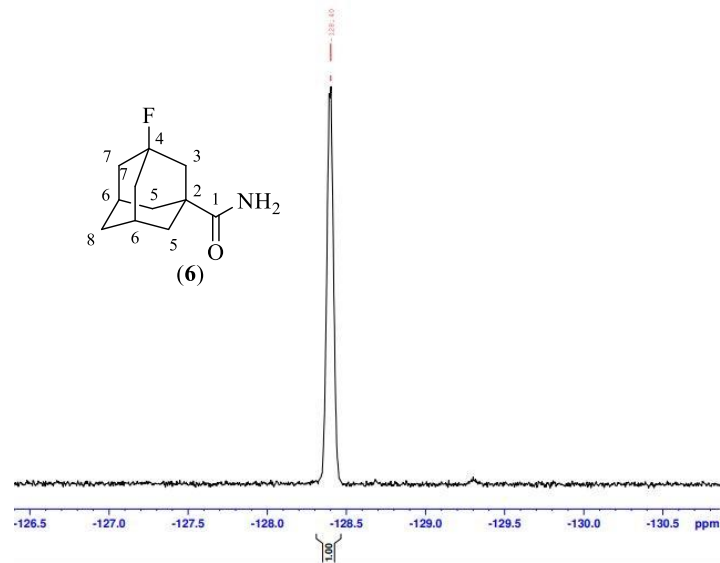
Liite 5. Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksylihapon **5** ^{19}F NMR-spektri.



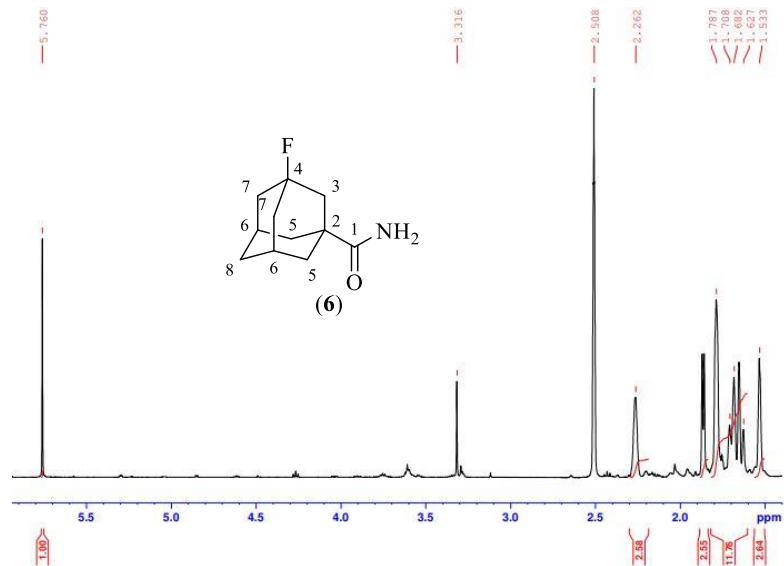
Liite 6. Metyyli-3-fluoriadamantaanikarboksylihapon **5** ^1H NMR-spektri.



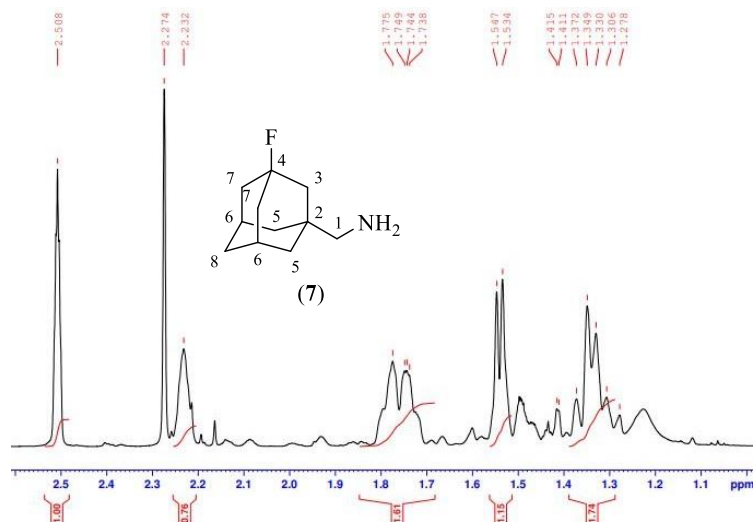
Liite 7. 3-fluoriadamantaanikarboksiamidin **6** ^{19}F NMR-spektri.



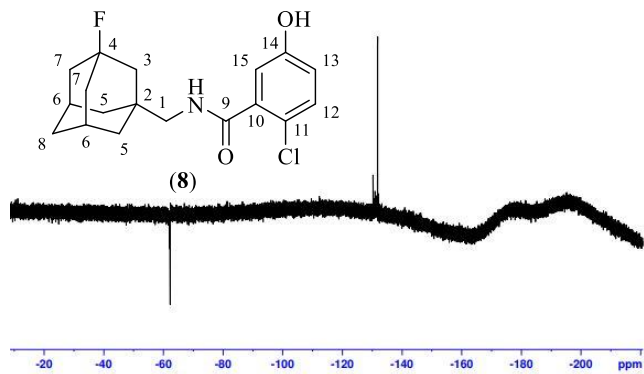
Liite 8. 3-fluoriadamantaanikarboksiamidin **6** ^1H NMR-spektri.



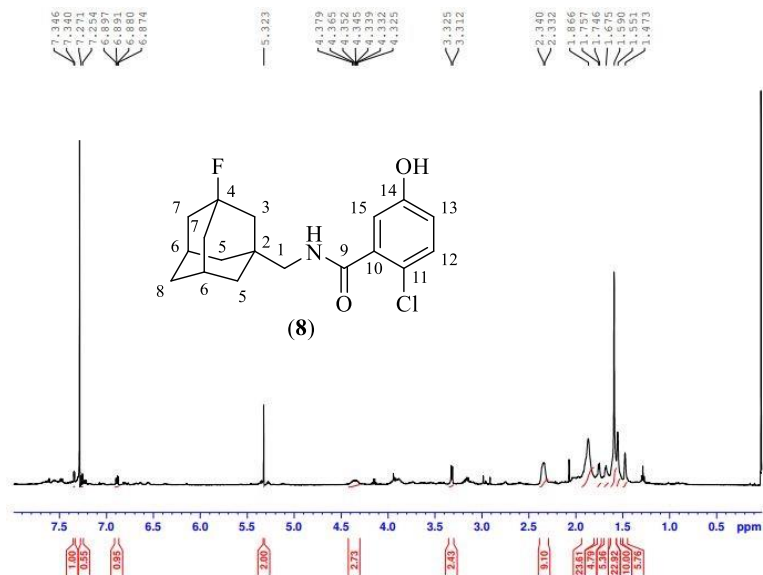
Liite 9. (3-fluoriadamantaan-1-yyli)metamiinin **7** ^1H NMR-spektri.



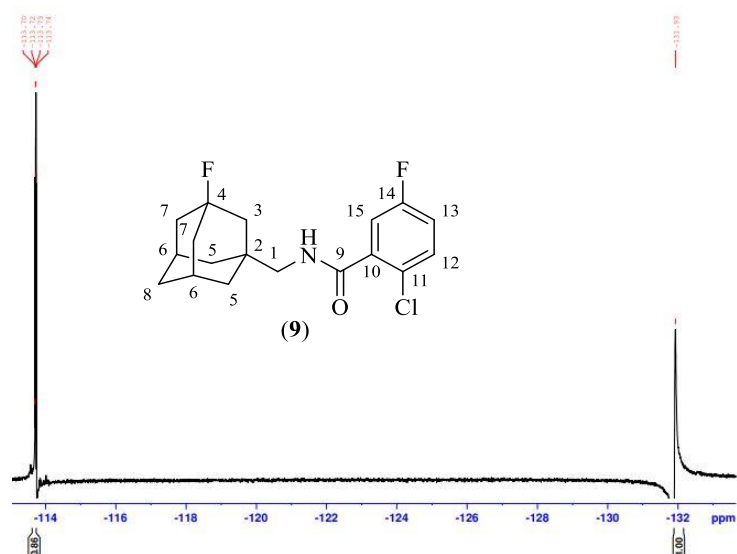
Liite 10. Lähtöaineen, 2-kloori-5-hydroksi-*N*-((3fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin **8** ^{19}F NMR-spektri.



Liite 11. Lähtöaineen, 2-kloori-5-hydroksi-*N*-((3fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin **8** ^1H NMR-spektri.



Liite 12. Referenssin, 2-kloori-5-fluori-*N*-((3fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin **9** ^{19}F NMR-spektri.



Liite 13. Referenssin, 2-kloori-5-fluori-*N*-((3fluoriadamantaan-1-yyli)metyyli)bentsamidin **9** ^1H NMR-spektrit.

