

Synthesen und Prozessentwicklung zur radioaktiven [¹⁸F]Fluorierung von PET-Tracern via Flow-Chemie

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Florian Menzel
aus Zschopau

Tübingen
2024

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

07.08.2024

Dekan:

Professor Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter:

Professor Dr. Thomas Ziegler

2. Berichterstatter:

Professor Dr. Martin E. Maier

3. Berichterstatter:

Professor Dr. Matthias Eder

Vorwort

Die folgende Dissertation handelt von der Prozessentwicklung und Synthesen von radioaktiv markierten Krebsmarkern für das PET-CT Verfahren. Dafür werden die wichtigsten Ergebnisse vorangegangener Forschungsarbeiten sowie den eigenen Erkenntnissen zusammengefasst. Die Arbeit entstand vom 01.03.2020 bis 27.03.2024 am Institut für Organische Chemie der Eberhard Karls Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Ziegler und Dr. Jochen Neumaier in Kooperation mit dem Werner Siemens Imaging Center Tübingen. Finanziert wurde die Forschung von der Karl & Anna Buck Stiftung. Teile dieser Arbeit wurden auf nationaler sowie internationaler Konferenz in Form eines Posters sowie einer mündlichen Präsentation vorgestellt.

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Menschen in meinem Leben nicht so geworden, wie sie jetzt ist. Ich kann bei Weitem nicht alle nennen, aber ich möchte dennoch die Gelegenheit nutzen mich bei einigen besonders zu bedanken.

Mein Dank gilt zuallererst meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Ziegler*, der mich in seinen Arbeitskreis aufgenommen und mir ermöglicht hat an diesem anspruchsvollen und interessanten Thema frei nach eigenem Ermessen zu Forschen. Vielen Dank für das Vertrauen und die Möglichkeit mich so vielseitig weiterentwickeln zu können. Nicht weniger Dank gilt meinem Betreuer, Mentor und guten Freund *Dr. Jochen M. Neumaier*. Wir haben in den 4 Jahren erstaunliches erreicht und dabei jeden Rückschlag mit Humor genommen. Danke für die vielen Unterhaltungen, Diskussionen und die Hilfe bei der Umsetzung meiner (manchmal) etwas verrückten Ideen. Des Weiteren möchte ich mich bei meinem 2ten Berichterstatter *Prof. Dr. Martin E. Maier* bedanken.

Mein Dank gilt auch den Angestellten des Werner Siemens Imaging Centers. Vor allem *Dr. Jonathan Cotton* für die permanente Betreuung im Umgang mit radioaktivem Material, der Hilfe bei den Synthesen, den Veröffentlichungen und dem entgegengebrachten Vertrauen in das Projekt. „*It was a privilege sharing radioactive exposure with you.*“ Außerdem möchte ich mich bei *Dr. Andreas Maurer* bedanken, welcher mir immer Vertrauen und Rückhalt in meine Forschung gab. Bei *Dr. Francisco José Reche Pérez* möchte ich mich für die Unterstützung, die Durchführung und die Hilfe bei den Analysen der Zellversuche bedanken.

Dr. Gregor Lemanski danke ich für die Unterstützung in organisatorischen und chemischen Fragestellungen. Unserer CTA *Petra Schülzle* danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft, das Besorgen von allem, was ich gebraucht habe und ihre freundliche Art.

Dem Team der Massenabteilung bestehend aus *Dr. Norbert Grzegorzek*, *Dr. Peter Haiss*, *Claudia Krause* und *Veronika Mair* möchte ich für das Aufnehmen sämtlicher Massenspektren und Chromatogramme bedanken. Vielen Dank an die NMR-Abteilung: *Dr. Markus Kramer*, *Priska Kolb*, *Thomas Kienzle* und *Dominik Brzecki* für die Instandhaltung der Geräte und der Möglichkeit selbständig messen zu dürfen.

An alle ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreis Zieglers, insbesondere *Annette Berroth, Dr. Axel Daikeler, Katharina Fegert, Carsten Jeuck, Dr. Alexander Klaiber, Dr. Jurij Kessler, Dennis Köhn, Christian Mahlenbrey, Dr. Vincent Mehrmann, Dr. Patricia Hafner, Dr. Felix Preusch, Dr. Laura Sršan, Dr. Simon Stocker* und *Tobias Zweiböhmer*, vielen Dank für die tolle Arbeitsatmosphäre, die tatkräftige Unterstützung sowie das tiefe (und geteilte) Mitgefühl bei Misserfolgen. Besonderer Dank gilt *Christian Mahlenbrey* und *Tobias Zweiböhmer* für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Karl und Anna Buck Stiftung für die finanzielle Unterstützung recht herzlich bedanken. Ohne diese Unterstützung hätte sich dieses Projekt nicht so entwickeln können.

Besonderer Dank gilt auch meinem ehemaligen Kommilitonen und Kumpel *Dr. Torben Saatkamp*. Danke für deine Freundschaft und den moralischen Aufbau bei aufkommenden Selbstzweifeln.

Meinen Eltern *Heidrun & Thomas* kann ich gar nicht genug Danken und ich möchte an dieser Stelle nicht zu ausführlich werden. Vielen Dank, dass ihr an mich geglaubt habt, mich unterstützt habt und wir auch in schwierigen Situationen als Familie stets zusammenhalten. Zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau *Shannon* bedanken. Danke, dass du immer für mich da bist, mir so viel Freude im Leben gibst, mich motivierst und mich zu einem besseren Menschen machst.

Zusammenfassung

Flow-Chemie gilt als eine der modernsten und vielversprechendsten Synthesemethoden der Neuzeit. Vor allem die Industrie macht sich ihre Vorteile schon seit einigen Jahren zu eigen. In universitären Forschungseinrichtungen fehlt jedoch preisgünstiges und flexibel einsetzbares Equipment. Das gilt sowohl für den Ausbildungs- als auch für den aktiven Forschungsbetrieb. Ein wichtiges Forschungsgebiet, in der die Vorteile von flexibel einsetzbaren und zuverlässig automatisierten Flowprozessen zur Geltung kommen würde, ist die Radiochemie. Hier wird, unter anderem, an radioaktiven Krebsmarkern, sogenannten PET-Tracern mit radioaktiven Isotopen wie ^{18}F , ^{11}C oder ^{64}Cu gearbeitet. Aufgrund der geringen Halbwertszeiten mancher Isotope wird bevorzugt mit kleinen Volumina und hohen Konzentrationen gearbeitet. Dabei ist die Strahlungsbelastung bei manuell durchgeführten Synthesen für das Laborpersonal eine Gefahr, die nicht unterschätzt werden sollte. Diese Arbeit befasst sich mit allen Aspekten, die für eine erfolgreiche, automatisierte PET-Tracersynthese notwendig sind. Das beinhaltet die Konstruktion und Entwicklung von Laborequipment, die Synthese neuer Precursor, die Automatisierung von Synthesen, sowie die *in-vivo* und *in-vitro* pharmakokinetische Auswertung im Mausmodell. Zuerst wurde das Kernelement, der Reaktor, entwickelt. Dafür wurden verschiedene Designs bezüglich Kanalbreite und Mischkammereffizienz untersucht. Die Reaktoren wurden je nach Anwendung am PC konstruiert und über das 3D-Druckverfahren verwirklicht. Als Reaktormaterial wurde PEEK (Polyetheretherketon) verwendet, da sich dies aufgrund hoher chemischer und thermischer Resistenz besonders gut dafür eignet. Nach erfolgreicher Entwicklung einer dualen Spritzenpumpe, eines Drucksensors, sowie eines Druckregulators konnte das vollständige Flow-System unter dem Namen **FOMSy** (*flexible open-source microfluidic system*) publiziert werden.

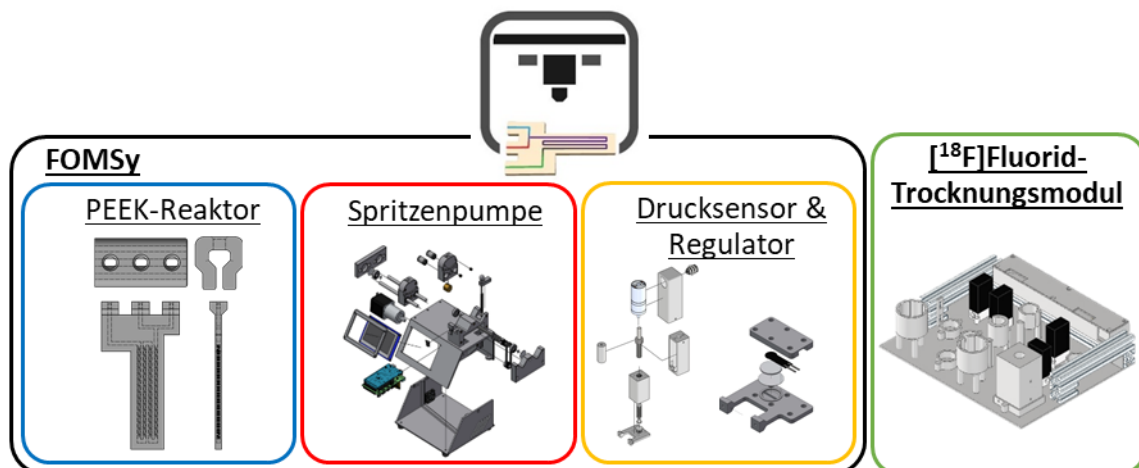


Abbildung 1: Übersicht der Systeme: FOMSy sowie [^{18}F]Fluorid-Trocknungsmodul.

Zur Überprüfung von Zuverlässigkeit und Einsatzfähigkeit des Systems wurde als „*Proof of Concept*“ im gleichen Zug ein Flowprozess zur Darstellung von [^{18}F]Fluordeoxyglucose ([^{18}F]FDG) veröffentlicht. Eine weitere Herausforderung stellt die Trocknung zum Erhalt von nukleophilen [^{18}F]Fluorid dar. Aus diesem Anlass wurde ein eigenständiges Modul entwickelt, welches die azeotrope Trocknung von wässrigem [^{18}F]Fluorid umgeht. Als Grundlage dient die Darstellung von [^{18}F]Triflylfluorid, einem radioaktiven Gas, welches mit Hilfe eines Argonstroms durch Trocknungskartuschen geleitet wird und in geeigneten Lösungen (z.B. KHCO_3 / K 222/ MeCN) gebunden werden kann. Mit diesen zwei Systemen konnten halbautomatisierte Flowprozesse für verschiedene PET-Tracer entwickelt und mit dem Batch-Verfahren verglichen werden. Vor allem die Synthese von [^{18}F]Fluorethyltriflat, einem Liganden für die radioaktive Fluoralkylierung, zeigte dabei eine erhebliche Verbesserung gegenüber der Batch-Synthese.

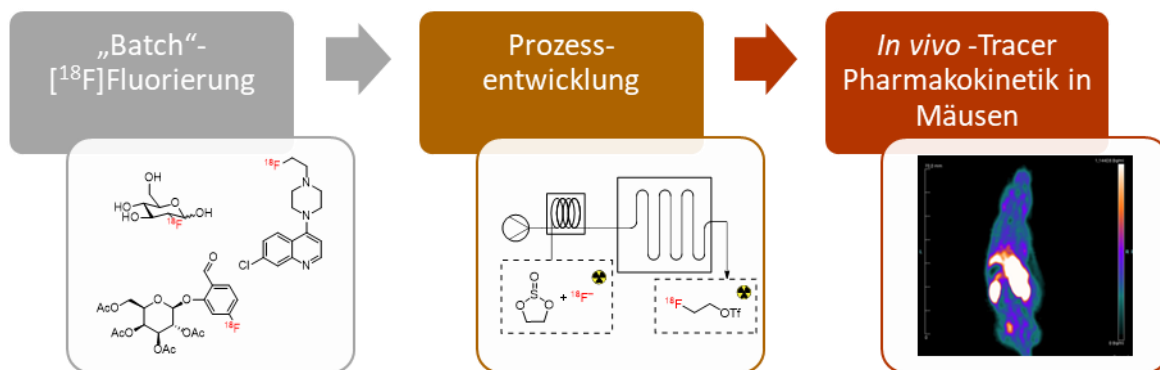


Abbildung 2: Entwicklungsverlauf: i) Pilotversuch im Batchverfahren, ii) Prozessentwicklung im Flowverfahren, iii) Test im *in vivo*-Modell.

Zusätzlich wurde ein neu entwickelter Tracer basierend auf β -Galactose vorgestellt ([^{18}F]FGal-Al), welcher zur Detektion seneszenten Zellen dienen soll. Aufgrund der hohen Strahlenbelastung bei der Synthese wurde dafür ein automatisierter Prozess auf einem kommerziell erhältlichen Synthesemodul (FN X Pro, TRACERlab) entwickelt. Der Tracer wurde im Anschluss sowohl im *in vitro* als auch im *in vivo* Mausmodell an hepatozellulären Karzinomzellen (AMp19-Tumorzellen), welche mit CMX-5461 behandelt wurden, getestet. Das AMp19-Modell weist dabei ein hohes Maß an seneszenten Tumorzellen auf, was durch *in vitro*-Färbungen mit 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) bestätigt werden konnte. Auffällig hierbei ist, dass bei einer Vorbehandlung mit CX-5461, AMp19-Tumorzellen eine 4-fach höhere Akkumulation des Tracers gegenüber den unbehandelten Zellen zeigen. Diese Ergebnisse konnten auch im *in-vivo* Experiment in Tumor- sowie Lebergewebe beobachtet werden.

Summary

Flow chemistry is considered one of the most modern and promising synthesis methods of modern times. Industry in particular has been utilizing its advantages for several years. University research facilities, however, lack inexpensive and flexible equipment. This applies to both the academic teaching and research sector. Radiochemistry is one of the fields of research that stands to benefit from the advantages of flexible and reliable flow processes. Radiochemical research relies on radiolabeled molecules that can be used to study, diagnose, or treat diseases such as cancer. PET tracers typically incorporate short living radioactive isotopes such as ^{18}F , ^{11}C or ^{64}Cu . Due to the short half-lives of some isotopes, small volumes and high concentrations are also preferred. The radiation exposure for laboratory staff during manual syntheses is a risk that should not be underestimated. This thesis deals with all aspects necessary for successful automated PET tracer synthesis. This includes the design and development of laboratory equipment, the synthesis of new precursor, the automation of syntheses and *in-vivo* and *in-vitro* pharmacokinetic evaluation in mouse model. First, a core component, the reactor, was developed. Various designs were examined in terms of channel width and mixing chamber efficiency. Depending on the application, the reactors were designed on a PC and manufactured using 3D printing. PEEK (polyether ether ketone) was used as the reactor material as it is particularly suitable due to its high chemical and thermal resistance. Following the successful development of a dual syringe pump, a pressure sensor and a pressure regulator, the complete flow system was published under the name *FOMSy* (*flexible open-source microfluidic system*).

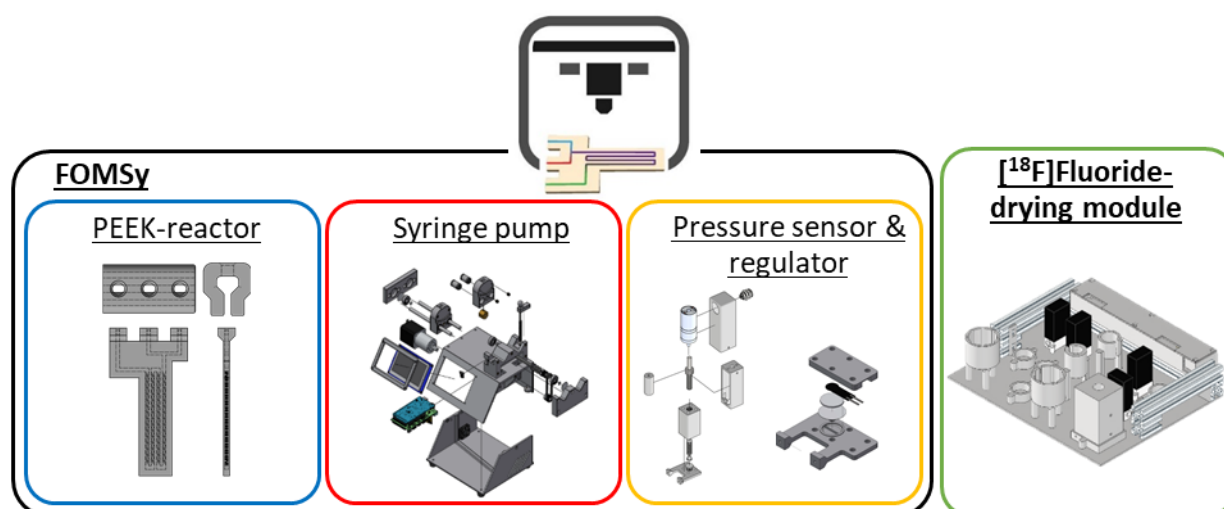


Figure 1: Overview of the systems: FOMSy and [^{18}F]fluoride-drying module.

As proof of the reliability and usability of the system, a flow process for the visualization of [^{18}F]Fluorodeoxyglucose ([^{18}F]FDG) was published at the same time. Drying to obtain nucleophilic [^{18}F]fluoride poses a further challenge. For this reason, an independent module was developed that avoids azeotropic drying of aqueous [^{18}F]fluoride. It is based on the preparation of [^{18}F]triflyl fluoride, a radioactive gas which is passed through drying cartridges with a flow of argon and can be trapped by decomposition in a suitable solution (e.g., $\text{KHCO}_3/\text{K 222}/\text{MeCN}$). With those two inventions, semi-automated flow processes for various PET tracers could be developed and compared with the batch process. In particular, the synthesis of [^{18}F]fluoroethyl triflate, a ligand for radioactive fluoroalkylation, showed a considerable improvement compared to the batch synthesis.

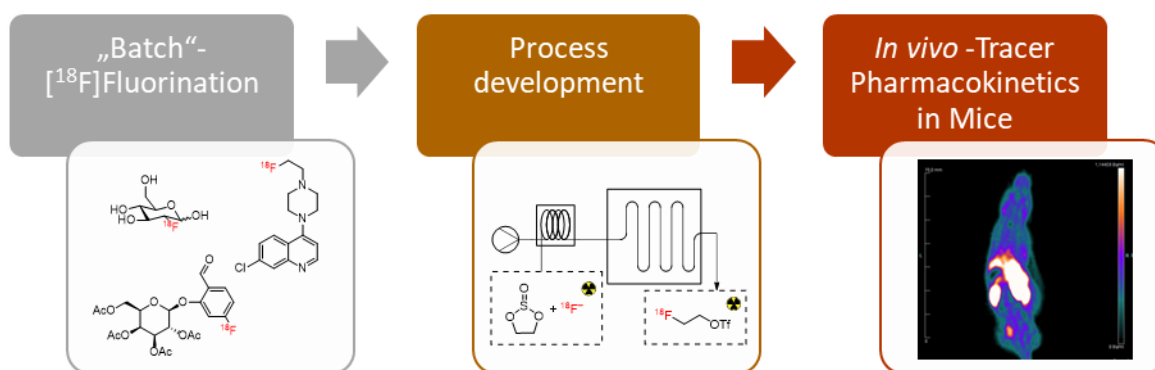


Figure 2: Development process: i) pilot test in batch process, ii) process development under flow condition, iii) *in vivo* mice model test.

In addition, for the detection of senescent cells, a newly developed tracer based on β -galactose will be presented. An automated synthesis was developed on a commercially available synthesis module (FN X Pro, TRACERlab) and evaluated both *in vitro* and *in vivo* mouse model on hepatocellular carcinoma cells (AMp19 tumor cells) treated with CX-5461. The AMp19 model exhibits a high level of senescent tumor cells, which was confirmed by *in vitro* staining with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (X-Gal). Remarkably, when pretreated with CX-5461, AMp19 tumor cells show a 4-fold higher accumulation compared to the untreated controls. Similar results were also observed in *in-vivo* experiments involving tumor and liver tissue.

Publikationen& Konferenzen

Publikationen

Paper 1: 3D-printed PEEK reactors and development of a complete continuous flow system for chemical synthesis

Florian Menzel, Thomas Klein, Thomas Ziegler, Jochen M. Neumaier,

React. Chem. Eng. **2020**, *5*, 1300–1310.

DOI: 10.1039/d0re00206b

Paper 2: FOMSy: 3D-printed flexible open-source microfluidic system and flow synthesis of PET-tracer

Florian Menzel, Jonathan Cotton, Thomas Klein, Andreas Maurer, Thomas Ziegler, Jochen M. Neumaier,

J. Flow Chem. **2023**, *13*, 247–256.

DOI: 10.1007/s41981-023-00267-z

Paper 3: Open-source flow setup for rapid and efficient [¹⁸F]fluoride drying for automation of PET tracer syntheses

Florian Menzel, Jonathan Cotton, Andreas Maurer, Thomas Ziegler, Jochen M. Neumaier,

J. Labelled Compd. Radiopharm. **2023**, *67*(2), 40–58.

DOI: 10.1002/jlcr.4080

Konferenzen

Poster: Evaluation of an open-source 3D-printed microfluidic system for the production of PET tracer

Florian Menzel, Jonathan Cotton, Thomas Klein, Andreas Maurer, Thomas Ziegler, Jochen M. Neumaier

Select Biosciences - Flow Chemistry Summit 2023,

Rotterdam, Niederlande, 26–28ter März **2023**.

Vortrag: 3D-Druck und Prozessentwicklung in der Radiopharmazie
Florian Menzel, Jonathan Cotton, Andreas Maurer, Thomas Ziegler, Jochen
M. Neumaier,
29. Jahrestagung der AGRR und 1. Jahrestagung der grpw,
Bad Salzuflen, Deutschland, 28ter August – 3ter September **2023**.
Auszeichnung: Preis für den besten Vortrag (Nachwuchswissenschaftler).

Erklärung der Eigenleistung

Ich, Florian Menzel, erkläre hiermit, dass diese Dissertation meine eigene Originalarbeit ist. Andere Kenntnisse oder Vorarbeiten wurden ordnungsgemäß durch Verwendung von Zitaten und Referenzen kenntlich gemacht. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die Unterstützung durch andere Personen ist in dieser Dissertation deutlich gekennzeichnet und wird als solche anerkannt.

In jedem der in dieser Arbeit enthaltenen Projekte konzentrierte sich meine Arbeit in erster Linie auf der Entwicklung des Flow-Systems, die Synthese der vorgestellten Moleküle, sowie der Automatisierung dieser. Der Beitrag von Co-Autoren wird gemäß § 6 Abs. 2 Satz 3 der Promotionsordnung im Folgenden aufgeführt.

Paper 1: 3D-printed PEEK reactors and development of a complete continuous flow system for chemical synthesis^[1]

Alle chemischen Reaktionen sowie die dazugehörigen Analysen wurden von mir geplant und durchgeführt. Die Entwicklung der Reaktoren sowie die Untersuchung der Mischeffizienz wurde von mir, Dr. Jochen M. Neumaier und Thomas Klein im gleichen Maße vorangetrieben. Die im Paper vorgestellte kontinuierliche Pumpe wurde von Dr. Jochen M. Neumaier und Thomas Klein entwickelt. Die Programmierung übernahm dabei Dr. Jochen M. Neumaier. Die Entwicklung des Flowprozesses wurde von mir geplant, durchgeführt und analysiert. Das Manuskript wurde von mir, Dr. Jochen M. Neumaier und Thomas Klein geschrieben.

Paper 2: FOMSy: 3D-printed flexible open-source microfluidic system and flow synthesis of PET-tracer^[2]

Alle radiochemischen Reaktionen sowie die dazugehörige Analytik wurden von mir und Dr. Jonathan Cotton geplant und durchgeführt. Das vorgestellte Flowsystem, dies beinhaltet die duale Spritzenpumpe, den Gegendrucksensor sowie den automatisierten Gegendruckregulator, wurde von mir und Dr. Jochen M. Neumaier entwickelt und getestet. Die Programmierung übernahm dabei Dr. Jochen M. Neumaier. Die Entwicklung des Flowprozesses für [¹⁸F]FDG

wurde von mir und Dr. Jonathan Cotton geplant, durchgeführt und ausgewertet. Das Manuskript wurde von mir und Dr. Jochen M. Neumaier geschrieben.

Paper 3: Open-source Flow Setup for Rapid and Efficient [^{18}F]Fluoride Drying for Automation of PET Tracer^[3]

Alle radiochemischen Reaktionen sowie die dazugehörige Analytik wurden von mir und Dr. Jonathan Cotton geplant und durchgeführt. Die Synthesen der nichtradioaktiven Referenzen sowie die Synthese der benötigten Precursor wurde von mir geplant, durchgeführt und analysiert. Das [^{18}F]Trocknungsmodul wurde von mir geplant, entwickelt und getestet. Die Programmierung übernahm dabei Dr. Jochen M. Neumaier. Die Entwicklung der Flowprozesse für [^{18}F]FEtOTs und [^{18}F]FEtOTf wurde von mir und Dr. Jonathan Cotton geplant, durchgeführt und analysiert. Das Manuskript wurde von mir, Dr. Jonathan Cotton und Dr. Jochen M. Neumaier geschrieben.

Abkürzungsverzeichnis

α	Stereodeskriptor für Kohlenhydrate
$^{\circ}\text{C}$	Temperatur in Grad Celsius
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	absolutiert
Ac	Acetyl-
aq.	wässrig
β	Stereodeskriptor für Kohlenhydrate
β^{+}	Positron
BPR	back pressure regulator
COSY	correlation spectroscopy (NMR)
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
CAD	computer-aided design
CT	Computertomographie
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
DSMO	Dimethylsulfoxid
dt	Dublett vom Triplett
EE/EtOAc	Ethylacetat
eq.	Äquivalente
ESI	Elektronenspray-Ionisation
Et	Ethyl-
EtOH	Ethanol
[^{18}F]FDG	[^{18}F]Fluordesoxyglucose

FDM	fused deposition modeling
Gal	D-Galactose
ges.	gesättigt
Glc	D-Glucose
h	Stunde
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation (NMR)
HSQC	heteronuclear single quantum correlation (NMR)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
Hz	Hertz
J	Kopplungskonstante [Hz]
K 222	Kryptofix
keV	Kiloelektronenvolt
M	Molar
m	Multipllett
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
Man	D-Mannose
Me	Methyl-
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
N	Normal
NMR	nuclear magnetic resonance
Nu	Nukleophil
OTf	Triflat-
OTs	Tosylat-
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PE	Petrolether (60/90)
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
Ph	Phenyl-
ppm	parts per million
pTSA	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
Py	Pyridin
q	Quartett

quant.	quantitativ
R	Organischer Rest
RCY	radiochemical yield (radiochemische Ausbeute)
RCP	radiochemical purity (radiochemische Reinheit)
R_f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Singulett
SG	Schutzgruppe
SPECT	Single-Photon-Emissionscomputertomographie
t	Triplet
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
theor.	theoretisch
UV	Ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

Teil A: Theorie	1
1 Hintergrund	1
1.1 Zellzyklus	1
1.2 Seneszenz	3
2 Medizinische Bildgebung	4
2.1 Das Tracer Prinzip	4
2.2 Positronen-Emissions-Tomographie	6
2.3 Magnetresonanztomographie	8
2.4 PET/MRT – Imaging	8
3 Radionuklide für die nuklearmedizinische Bildgebung	9
3.1 Produktion von Radionukliden	10
3.2 Beta⁺ – Zerfall	11
3.3 [¹⁸F]Fluor: Markierung organischer Moleküle	12
3.3.1 Elektrophile Fluorierung	12
3.3.2 Nukleophile Fluorierung	14
3.3.3 [¹⁸ F]Fluorierung mit Hilfe prosthetischer Gruppen	17
4 Kohlenhydrate: Die glykosidische Knüpfung	21
4.1 Königs & Knorr-Methode	22
4.2 Schmidt-Methode	23
5 Flowchemie	25
6 Additives Fertigungsverfahren: 3D-Druck	28
Teil B: Zielsetzung	30
Teil C: Ergebnisse und Diskussion	31
Paper 1	31
3D-printed PEEK reactors and development of a complete continuous flow system for chemical synthesis	31

Paper 2	37
FOMSy: 3D-printed flexible open-source microfluidic system and flow synthesis of PET-tracer	37
Paper 3	44
Open-source Flow Setup for Rapid and Efficient [¹⁸F]Fluoride Drying for Automation of PET Tracer	44
Unveröffentlichte Ergebnisse:	54
Synthese der Precursor:	56
Precursor für [¹⁸ F]FGal-An	56
Precursor für [¹⁸ F]FGal-Al	57
Automatisierung:	60
Biologische Auswertung:	64
Serumstabilität:.....	65
Enzymatische Spaltung:	66
<i>In-Vitro</i> -Modell:	67
<i>In-Vivo</i> -Modell:	68
Experimentalteil:	72
Geräte und Methoden	72
Vorbereitung der Zellen:	74
Färbungen und Aufnahmemethode:	75
Arbeitstechniken:	76
Synthese der Verbindungen:	76
Teil D: Literatur	83
Teil E: Anhang	91
Paper 1	91
Paper 2	117
Paper 3	151
Unveröffentlichte Ergebnisse	197

Teil A: Theorie

1 Hintergrund

In allen Ländern der Welt gehört Krebs zu einer der häufigsten Todesursachen. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation WHO aus dem Jahr 2019 steht Krebs bei 112 von 183 Ländern an erster oder zweiter Stelle der Todesursachen vor dem 70ten Lebensjahr.^[4] Dabei umfasst der Begriff „Krebs“ mehr als 277 verschiedene Arten von Krebserkrankungen.^[5] Trotz des wissenschaftlichen Fortschritts, ist die Zahl an Krebserkrankungen, auch aufgrund demografischer Entwicklung sowie steigender Lebenserwartung, in den letzten Jahrzehnten gestiegen.^[6] Um eine bestmögliche, erfolgreiche Therapie zu gewährleisten, spielt die Früherkennung eine entscheidende Rolle.^[7] Generell handelt es sich bei Krebs um eine Genmutation, die zu einer abnormalen Zellvermehrung führt. Grund dafür ist meist die Mutation von Desoxyribonukleinsäuren (DNS), der Gengruppen der Onkogene, der Tumorsuppressoren sowie der DNS-Reparatursysteme. Onkogene beschreiben Gene, die durch eine Überstimulation aktiviert werden, ein verstärktes Zellwachstum aufweisen und auf diesem Weg die Entstehung von Tumoren aktiv fördern.^[8] Ein Tumorsuppressor kontrolliert den Zellzyklus und damit das Wachstum einer Zelle. Durch eine Mutation kommt es hierbei zur Störung und zum unkontrollierten Ablauf des Zellzyklus. Dabei bilden sich maligne (bösartige) Tumorzellen.^[9] Zu den am besten erforschten Tumorsuppressoren zählen unter anderem p16, p21 sowie p27.^[10-12] DNS-Reparatursysteme wechselwirken mit den Tumorsuppressoren und sind für die Detektion sowie der Reparatur von beschädigten Zellen verantwortlich. Mutierte DNS-Reparatursysteme erfüllen diesen Zweck nicht und ermöglichen unter anderem die Zellteilung von beschädigten, mutierten Zellen.^[13]

1.1 Zellzyklus

Der gesamte Ablauf der Zellteilung wird als Zellzyklus bezeichnet. Er ist die Voraussetzung für das Leben und das Bestehen aller mehrzelligen Organismen. Er wird in zwei verschiedene Phasen aufgeteilt. i) Die Interphase und ii) die M-Phase. Die Interphase wird zusätzlich in vier weitere Phasen gegliedert. Die G1-Phase (gap-1), die S-Phase (Synthese), die G2-Phase (gap-2) sowie die G0-Phase. Die G0-Phase beschreibt eine Ruhephase der Zelle und wird oft als „*Quiescence*“ beschrieben. Dabei begeben sich die Zellen in eine Homeostasis, in der keine

weitere Energie in die Zellteilung investiert wird. Zellen, die sich nicht weiter Teilen sollen, wie etwa Nervenzellen, verweilen in diesem Zustand. Zellen, die nach einer gewissen Zeit geteilt werden sollen, können wieder in die G1-Phase wechseln und am Zellzyklus teilnehmen. Die G1-Phase, auch Wachstumsphase oder Gap-Phase genannt, beginnt direkt am Ende der M-Phase. Während dieser Phase wächst die Zelle und bildet Proteine und Enzyme, welche für die Replikation der DNS benötigt werden. In der anschließenden S- oder auch Synthese-Phase wird die DNS dann repliziert. Die Zelle verdoppelt dabei ihre genetische Information im Zellkern und bereitet sich in der zweiten Wachstumsphase, der G2-Phase, auf die Zellteilung vor. Hierbei wächst die Zelle nochmals stark aufgrund Flüssigkeitsaufnahme und bildet dabei Mitoseproteine. ^[14]

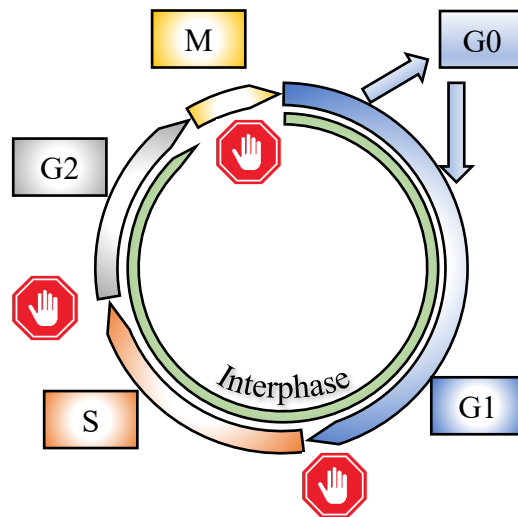


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zellzyklus.

In der letzten Phase, der M-Phase findet die Mitose, also die Teilung des Kerns und die Cytokinese, die eigentliche Zellteilung statt. Aus einer Zelle mit doppeltem Chromosomensatz entstehen dabei zwei genetisch identische Tochterzellen. ^[14]

Es gibt eine Reihe von hochregulierten Kontrollpunkten, die das Fortschreiten in die darauffolgende Phase kontrollieren. Der Übergang der G1- zur S-Phase wird als G1-Kontrollpunkt, der Übergang der G2- zur M-Phase als G2-Kontrollpunkt und der Kontrollpunkt innerhalb der Metaphase als Spindelkontrollpunkt bezeichnet. Tritt eine Störung ein, wird der entsprechende Kontrollpunkt nicht überschritten und es kommt zum Zellzyklusstopp. Dieser kann sowohl reversibel als auch irreversibel sein. Bei einem irreversiblen Zellstopp, dem sogenannten Zellzyklusarrest spricht man dabei auch von Seneszenz. ^[15]

1.2 Seneszenz

Bei der Untersuchung von menschlichen Bindegewebszellen, genauer Fibroblasten, beobachteten 1961 Leonard Hayflick und Paul Moorhead einen Rückgang der Zellproliferation.^[16] Obwohl angenommen wurde, dass unter Haltung und Zucht von Zellen in Kultur unbegrenztes Wachstum stattfinden würde, kam es zum Zellzyklusstopp. Dabei blieben unerwarteterweise Zellen über viele Wochen hinweg lebensfähig. Dieses Phänomen ist heute als zelluläre Seneszenz oder replikative Seneszenz bekannt.^[16] Dabei hat sich gezeigt, dass trotz ausreichend viel Platz, einem Überschuss an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren dieser Stillstand permanent und nicht reversibel ist.^[16]

Für die Krebsforschung ergeben sich aus diesen Erkenntnissen zwei fundamentale, aber in sich widersprüchliche Hypothesen. Da sich viele Krebszellen in Kultur unendlich vermehren, könnte die Seneszenz als Anti-Krebs bzw. Anti-Tumor Faktor fungieren und durch gezielte Initiierung als krebsbekämpfender Mechanismus eingesetzt werden. Die zweite Hypothese bezieht die Abnahme der Geweberegenerationsfähigkeit im Alter mit ein. Es wurde vorgeschlagen, dass die zelluläre Seneszenz der grundlegende Faktor des Alterns ist. Förderung dessen würde zur Verschlechterung der Geweberegeneration sowie Gewebeerneuerung führen und wäre nicht erstrebenswert.^[17, 18] Allgemein hat sich gezeigt, dass die Seneszenz vor allem bei biologischen Prozessen, wie Krebs, Entzündungen und Wundheilung eine wichtige Rolle spielt.^[19-22] Um den komplexen Zusammenhang von Krebs und dem Altern von Zellen zu verstehen und zukünftig effektive Krebstherapien zu entwickeln, ist die Forschung an Seneszenzzellen unbedingt notwendig. Die Tatsache, dass seneszente Zellen neben der Morphologie auch einen veränderten Stoffwechsel als andere Zellen aufweisen, hilft der Forschung dabei sehr. So weisen seneszente Zellen oft einen erhöhten Galactosebedarf auf. Diese erhöhte Aktivität der β -Galactosidase, kann als biologischer Marker für seneszente Zellen dienen.^[23-25]

2 Medizinische Bildgebung

Die nuklearmedizinische Bildgebung (*nuclear medical imaging*, NMI) ist ein Teilgebiet der Nuklearmedizin, welche radioaktive Isotope als Strahlungsquelle nutzt. Mit ihrer Hilfe können Strukturen und Prozesse im Körper bildlich dargestellt und analysiert werden. Während bei Röntgen- und CT-Aufnahmen externe Strahlungsquellen verwendet werden und Bilder "durch" ihre Probanden aufgenommen werden, beruhen die wichtigsten NMI-Techniken, das PET- (Positronen-Emissions-Tomografie) sowie das SPECT- (Single-Photon-Emissions-computertomographie) Verfahren auf der Verabreichung von Radiopharmaka. Diese sogenannten Radiotracer reichern sich im Zielgewebe gezielt an und können während des Zerfallsprozesses der radioaktiven Isotope detektiert werden.^[26]

2.1 Das Tracer Prinzip

1943 erhielt George de Hevesy den Chemie-Nobelpreis "*für seine Arbeiten über die Anwendung der Isotope als Indikatoren bei der Erforschung chemischer Prozesse*", welche den Grundstein für die Erfindung der Tracer-Methode bzw. des Tracer-Prinzips legte.^[27] Dabei wird angenommen, dass: i) chemische und biologische Eigenschaften eines radioaktiven Isotops mit dem seines nicht-radioaktiven Gegenelements identisch sind und ii) der radioaktiver Zerfall ein hochenergetisches Ereignis ist, welches eine niedrige Nachweisgrenze benötigt (pico-molare Konzentration). Dies erlaubt es chemisch-biologische Prozesse mit einer hohen Empfindlichkeit direkt zu identifizieren und quantifizieren. Da nur „Spuren“ des Radionuklid benötigt werden, wird der beobachtete Prozess während der Messung nicht beeinflusst.^[26] Der Weg des Tracers durch die Anatomie des Probanden ist dabei *live* zu folgen und erlaubt es Schlüsse über die Stoffwechselmechanismen zu ziehen. Wie in *in-vivo*-Umgebung üblich, wird der Tracer dabei durch physiologische und pathologische biochemische Prozesse metabolisiert und verändert. Um gezielt Prozesse untersuchen zu können, ist es wichtig Tracer so zu entwickeln, dass diese unerwünschte Stoffwechselwege effektiv umgehen können. Die Anreicherung des Tracers muss dabei hochspezifisch und mit hoher Affinität im Zellgewebe sein oder während des Stoffwechsels so verändert werden, dass dieser das Gewebe in dem die Metabolisierung stattfindet, nicht mehr verlassen kann. Dies wird entweder durch die Blockierung des folgenden Stoffwechsels oder durch biosynthetische Inkorporation erreicht. Diese Anreicherung wird als "metabolisches Trapping" bezeichnet.^[28]

PET-Tracer bestehen gewöhnlich aus drei Teilen. Dem Radionuklid (A), wie etwa [^{18}F]Fluorid, [^{11}C]Kohlenstoff oder [^{64}Cu]Kupfer, einem stabilen Linker (B) sowie dem aktiven Teil (C), welcher die chemische Information enthält und mit dem biologischen Ziel (D) wechselwirkt.^[29]

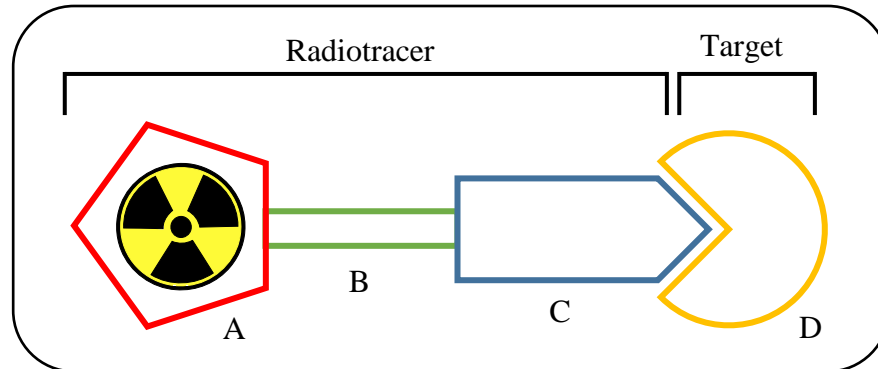


Abbildung 4: Typischer Aufbau eines Radiotracer.^[29]

Zusammengefasst bilden das Tracer-Prinzip sowie das Konzept des metabolischen Trappings die Eckpfeiler des Positronen-Emissions-Tomographie- (PET) sowie des Einzel-Photonen-Emissions-Tomographie- (SPECT) Verfahrens. Dabei hat sowohl die Stabilität des Tracers, die Selektivität seiner Wechselwirkung mit dem gewünschten Zielgewebe, sowie dessen Metabolisierung Einfluss auf die Information, die aus der Bildgebung gewonnen werden kann.

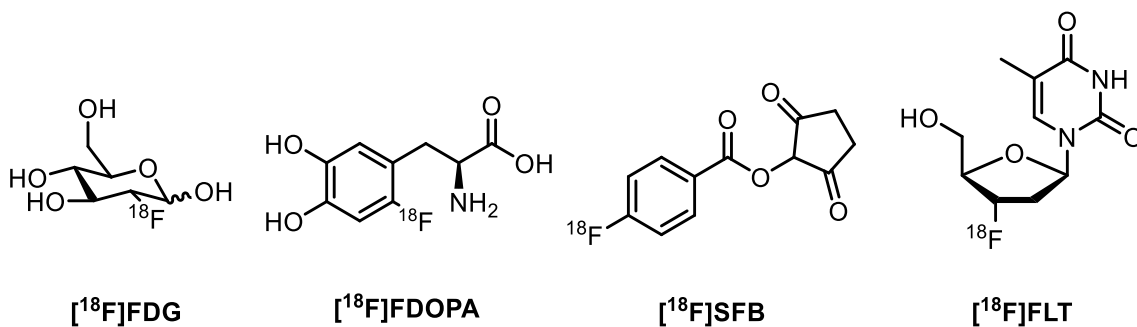


Abbildung 5: Auswahl einiger PET-Tracer für humanmedizinische Anwendung.

Der bekannteste Radiotracer ist 2- $[^{18}\text{F}]$ -Fluor-2-desoxy-D-glucose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$), welcher 1968 von Josef Pacák, Zdeněk Točík und Miloslav Černý an der Karls-Universität in Prag entwickelt wurde. Dieser dient zur Detektion eines erhöhten Glucosestoffwechsels, welcher typisch für viele Krebszellen ist.^[30] Das Glucosederivat $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ fungiert dabei wie Glucose und wird vom menschlichen Organismus mittels der Proteine GLUT-1 und GLUT-3 aufgenommen, zur Tumorzelle transportiert und enzymatisch mit Hexokinase phosphoryliert. Nach der

Phosphorylierung kann das [^{18}F]FDG-Derivat nicht weiter verstoffwechselt werden und reichert sich in der Tumorzelle an.^[31, 32] Jeder Radiotracer hat ein spezifisches Einsatzgebiet. So kann zum Beispiel [^{18}F]FDG aufgrund des zu hohen Glucosestoffwechsel im Gehirn nicht verwendet werden. Auch radiofluorierte Aminosäuren wie 6- ^{18}F Fluor-3,4-dihydroxy-L-phenylalanin (^{18}F FDOPA) bieten sich als PET-Tracer an. Neuroendokrine Tumorzellen besitzen neben einem erhöhten Glucosestoffwechsel, einem gesteigerten Aminosäurebedarf auch eine erhöhte Proteinsyntheserate. Zusätzlich bieten sie den Vorteil, eine Abgrenzung zwischen entzündeten und tumorösen Geweben machen zu können, da in entzündetem Gewebe meistens die Proteinsyntheserate nicht erhöht ist.^[33] Für die gezielte Markierung von Biomolekülen, wie Peptide, Proteine oder Antikörper, welche zur Diagnostik oder zur Therapie eingesetzt werden sollen, können prosthetische Liganden wie etwa *N*-Succinimidyl-4- ^{18}F fluorbenzoat (^{18}F SFB) verwendet werden.^[34] Auch Nukleoside wie 3- ^{18}F Fluor-3-desoxythymidin (^{18}F FLT) werden als Radiopharmazeutika verwendet. Es fungiert dabei als Thymidin-Derivat, welches anstelle von Thymidin mit Hilfe von Thymidinkinase TK1 in die DNS eingebaut wird. Durch das Fehlen der Hydroxygruppe an C3-Position wird die Transkription nach Aufnahme von [^{18}F]FLT verhindert. Dies führt zum Abbruch des Stoffwechsels und schlussendlich zum Zelltod.^[35]

2.2 Positronen-Emissions-Tomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) beschreibt ein molekulares Bildgebungsverfahren, welches in der Diagnostik, der Therapieplanung sowie in präklinischer Forschung der Humanmedizin verstärkt Anwendung findet.^[36] Der vorab verabreichte Tracer emittiert radioaktive Strahlung, welche aufgrund unterschiedlicher lokaler Anreicherung im Körper räumlich, quantitativ und temporal sichtbar gemacht werden kann. Das PET-Verfahren bietet insgesamt herausragende Vorteile: i) PET ist nichtinvasiv: Von der Injektion abgesehen, ist kein weiteres Einbringen von Fremdkörpern bei der Bildgebung erforderlich; ii) PET ist sensitiv: Die hohe Detektionsempfindlichkeit ermöglicht die Verwendung von pico- bis femtomolaren Konzentrationen des Radiotracers; iii) PET ist dynamisch: die schnelle Aufnahme (Sekundenbereich) ermöglicht rapide physiologische und pharmakologische Prozesse zu detektieren.; iv) PET ist quantitativ: Theoretisch kann jeder einzelne Zerfall des Isotops an Ort und Zeit aufgenommen und untersucht werden, welches das Messen in absoluten Einheiten und den Vergleich verschiedener Messungen ermöglicht.^[36, 37] Diese Eigenschaften machen sich neben der Humanmedizin auch andere Wissenschaften zum Vorteil. So wird zum Beispiel auch in der Biologie für die Untersuchung von Stoffwechselabläufe in Pflanzen oder in der Geologie

für die Bestimmung der Zusammensetzungen von Gesteinsproben das PET-Verfahren verwendet.^[38-40]

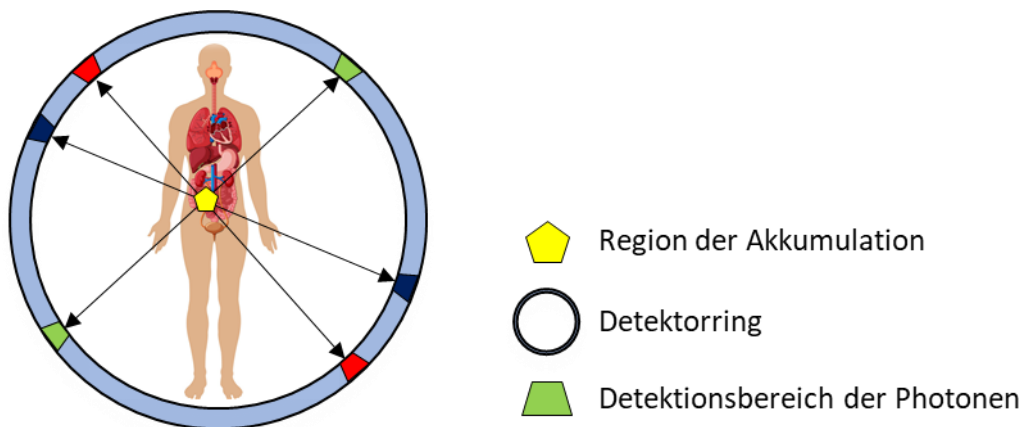


Abbildung 5: Schematische Darstellung des PET-Aufnahmeprinzips.^[41]

Emittierte Photonen werden mittels mehrerer ringförmig angeordneten Szintillatordetektoren, welche meist aus Szintillationskristallen wie Bismutgermanat ($\text{Bi}_4\text{Ge}_4\text{O}_{12}$), Lutetiumoxyorthosilikat (Lu_2SiO_5) oder Lutetiumoxyorthosilikat (Lu_2SiO_5) bestehen, detektiert.^[42, 43] Der gleichzeitige Nachweis von zwei γ -Photonen wird als Koinzidenz bezeichnet. Diese werden aufgezeichnet und später zur Rekonstruktion des endgültigen Bildes verwendet. Jedes Zusammentreffen liefert eine Antwortlinie (*line of response*, LOR), die jedes Annihilationsereignis auf einer Linie zwischen zwei Detektoren lokalisiert. Ein Problem der PET ist ihre begrenzte Auflösung.^[44] Aufgrund der Positronenreichweite und der technischen Grenzen der Detektoren wird das Signal in kleinen Objekten oft unterschätzt. Dieses Phänomen wird als partieller Volumeneffekt bezeichnet.^[41] Um PET-Rohdaten zu brauchbaren Bildern zu verarbeiten, werden LORs zu einem Histogramm von Ereignissen zusammengestellt. Diese werden einer Bildrekonstruktion unterzogen, welche eine Visualisierung der dreidimensionalen Verteilung des Tracers erleichtert, und eine Quantifizierung des Radiotracers ermöglicht. Zwei der gebräuchlichen Rekonstruktionsmethoden sind die gefilterte Rückprojektion (*filtered back projection*, FBP) und der "ordered subset expectation maximization" - (OSEM) Algorithmus.^[45]

2.3 Magnetresonanztomographie

Das MRT (*magnetic resonance imaging*) nutzt den Kernmagnetismus und das Prinzip der kernmagnetischen Resonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR), welches von Bloch und Purcell (1946) entdeckt und entwickelt wurde.^[46, 47] Es gehört zu einem der am häufigsten verwendeten klinischen und präklinischen Bildgebungsverfahren der Neuzeit. Dabei kommt es ohne ionisierende Strahlung aus, besitzt eine hohe räumliche Auflösung, weist einen hervorragenden Weichteilkontrast auf und kann durch den Einsatz geeigneter Kontrastmittel markiertes Gewebe spezifisch identifizieren.^[48, 49] Von allen molekularen Bildgebungsverfahren ist das MRT-Verfahren jedoch eine der unempfindlichsten Methode und liegt um viele Größenordnungen hinter der PET-Methode.^[49]

2.4 PET/MRT – Imaging

Die Kombination beider Bildgebungsverfahren ermöglicht, die räumliche sowie zeitliche Korrelation (MRT) mit molekularen Abläufen (PET) in Verbindung zu bringen. Die simultane Aufnahme hochauflösender MRT-Bildern, welche einen hohen Weichteilkontrast bietet und die Aufnahme von hochempfindlichen PET-Bilder, ermöglicht es präzise Bilder für die Diagnostik zu generieren. Des Weiteren profitieren die PET-Daten immens durch die MRT-basierte Bewegungskorrektur.^[50]

3 Radionuklide für die nuklearmedizinische Bildgebung

PET erfordert die Verwendung von Positronen emittierenden (neutronenarmen) Radionukliden, bei denen ein Proton durch die Emission eines Positrons und eines Neutrinos in ein Neutron zerfällt. Die Anzahl an Positronen emittierenden Isotopen kann grob in zwei Gruppen eingeteilt werden, die jeweils durch ihre chemischen Eigenschaften charakterisiert werden: i) die "Hauptgruppenelemente", zu denen Isotope wie ^{11}C , ^{15}O und ^{18}F gehören, und ii) die "Radiometalle", Metallisotope wie ^{64}Cu , ^{68}Ga und ^{89}Zr . Die Auswahl des richtigen Isotops für einen Tracer wird dabei von den chemischen als auch den physikalischen Eigenschaften bestimmt.^[51-53]

Tabelle 1: Übersicht Radionuklide für die nuklearmedizinische Bildgebung.^[54]

Gruppe	Isotop	Zerfall	Halbwertszeit	β^+ E_{max}
Hauptgruppen- elemente	^{11}C	β^+ (99.8%) EC (0.2%)	20.4 min	0.39 MeV
	^{13}N	β^+ (100.0%)	9.97 min	0.49 MeV
	^{15}O	β^+ (99.9%); EC (0.1%)	2.04 min	0.74 MeV
	^{18}F	β^+ (97.0%); EC (3.0%)	109.7 min	0.25 MeV
Radiometalle	^{68}Ga	β^+ (18.0%); β^- (18.0%); EC (3.0%)	67.7 min	1.90 MeV
	^{64}Cu	β^+ (90.0%); EC (10.0%)	12.7 h	0.65 MeV
	^{89}Zr	β^+ (22.8%); EC (77.2%)	78.4 h	0.90 MeV

Die Eigenschaften des Radioisotops bestimmt nicht nur, wie und wo es an ein Molekül gebunden werden kann (entweder kovalent oder durch Chelatbildung), sondern auch das gesamte AVME-Verhalten (Absorption, Verteilung, Metabolismus, Ausscheidung) des Tracers. Für stark kovalente Bindungen werden Radioisotope der Hauptgruppenelemente zur Markierung kleiner Moleküle und prosthetischer Gruppen verwendet.^[55] Dies erfordert oft aggressive Reagenzien und Reaktionsbedingungen, welche für große Biomoleküle (wie Peptide, Hormone und Antikörper) nicht geeignet sind. Große Moleküle werden in der Regel vorzugsweise mit einem Chelatbildner konjugiert und mit Radiometallen markiert; ein Prozess, der aufgrund seiner thermodynamischen Vorzüge unter relativ milden Reaktionsbedingungen durchgeführt werden kann. Das pharmakologische Verhalten großer Biomoleküle wird durch die Zugabe eines Radiometall-Chelatkomplexes nicht wesentlich verändert. Würde man kleine lipophile Moleküle auf die gleiche Art markieren, wäre der Einfluss wesentlich größer und nicht

vernachlässigbar. Auch die physikalischen Eigenschaften des verwendeten Isotops, einschließlich seiner Zerfallsart, der Zerfallsenergie, der Positronenreichweite im Gewebe und der Halbwertszeit, müssen bei der Wahl des passenden Tracerisotops berücksichtigt werden.^[55]

Die PET-Bildgebung beruht zwar auf dem Zerfall und der Detektion von Positronenemission unter Abgabe von β^+ -Strahlung, jedoch zerfallen viele Radioisotope (wie ^{64}Cu , ^{18}F , ^{89}Zr , ^{68}Ga) auch auf anderen Wegen. So zerfällt zum Beispiel ^{68}Ga zusätzlich durch Elektroneneinfang (*electron capture*, EC), was zu einem Rauschen in der Bildgebung führt, sowie durch β^- und Auger-Elektronenemission, was sich negativ auf die Radiotoxizität auswirkt. Auch die Zerfallsenergie und die Positronenreichweite eines Radioisotops können sich stark auf die Bildauflösung auswirken. Isotope mit großer Positronenreichweite führen zu einer geringeren räumlichen Auflösung, da das Positron weiter vom Zerfallsereignis im Zielgewebe entfernt ist.^[56]

Die Halbwertszeit des Isotops ist nicht nur von praktischer Bedeutung, wenn es um Synthese, Handhabung und Verwendung des PET-Tracers geht, sondern sollte auch mit der biologischen Halbwertszeit des vorgesehenen Tracers übereinstimmen. Kleine Moleküle erreichen relativ schnell ihr Ziel und werden anschließend zügig metabolisiert (Minuten bis Stunden). Große Biomoleküle brauchen viele Stunden bis Tage bis sie ausreichend angereichert sind und einen geeigneten Ziel-Hintergrund-Kontrast aufweisen. Langlebige Isotope, welche an ein schnell metabolisiertes Molekül konjugiert sind, führen zu unerwünschter Akkumulation von Metaboliten im Gewebe außerhalb des Ziels (z.B. im Darm, in der Leber oder in den Harnwegen). Dies wirkt sich negativ auf die Strahlenbelastung des Patienten aus. Kurzlebige Isotope, welche an große Moleküle konjugiert sind, können dagegen am Zeitpunkt der Anreicherung am Zielort bereits vollständig zerfallen sein.^[56]

3.1 Produktion von Radionukliden

PET-Isotope werden mit Hilfe eines Zyklotrons durch Protonen- oder Deuteronenbeschuss des Ausgangsmaterials erzeugt. Dafür werden Strahlenergien zwischen 10–20 MeV verwendet. Das Zyklotron, erfunden und entwickelt von Nobelpreisträger Ernest Lawrence (1939), ist ein Teilchenbeschleuniger, der ein statisches homogenes Magnetfeld sowie ein elektrostatisches Wechselfeld nutzt, um einen kontinuierlichen Strahl geladener Ionen (Protonen: H^+ , oder Deuteriumion: D^+) auf ausreichend hohe Energien zu beschleunigen und eine Kernreaktion zu erzwingen.^[57]

Tabelle 2: Radionuklide, Halbwertszeit und Ausgangsmaterial.^[54]

Gruppe	Isotop	Synthesereaktion
Hauptgruppenelemente	^{11}C	$^{14}\text{N}(\text{p}, \alpha)$
	^{13}N	$^{16}\text{O}(\text{p}, \alpha)$
	^{15}O	$^{15}\text{N}(\text{p}, \text{n})$
	^{18}F	$^{18}\text{O}(\text{p}, \text{n})$
Radiometalle	^{68}Ga	^{68}Ga -Generator
	^{64}Cu	$^{64}\text{Ni}(\text{p}, \text{n})$
	^{89}Zr	$^{89}\text{Y}(\text{p}, \text{n})$

^{18}F Fluorid wird beispielsweise durch die Kernreaktion $^{18}\text{O}(\text{p}, \text{n})^{18}\text{F}$ erzeugt. Dabei dient $^{18}\text{O}\text{H}_2\text{O}$ als Ausgangsmaterial, welches mit einem Protonenstrahl beschossen und dabei $^{18}\text{F}\text{HF}$ in hoher spezifischer Aktivität erzeugt wird (Targetausbeute: $\sim 60 \text{ mCi}/\mu\text{Ah}$, molare Aktivität: $\sim 10^5 \text{ Ci}/\text{mmol}$).^[58]

3.2 Beta⁺ – Zerfall

Besitzen Atomkerne einen relativ zu ihrem Neutronengehalt gesehenen Protonenüberschuss, streben sie einen stabileren Energiezustand an. Dies erreichen sie im Falle von ^{18}F Fluorid durch den β^+ -Zerfall. Dabei zerfällt ein Proton (p) in ein Neutron (n), wobei ein Positron (e^+) und ein Elektronneutrino (ν^-) emittiert wird. Die Reaktion kann mit folgender Gleichung beschrieben werden.^[59]



Die Nukleonenzahl bleibt dabei im Kern gleich. Die Ordnungszahl wird um den Wert eins erniedrigt. Im Falle des radioaktiven β^+ -Zerfalls von ^{18}F entsteht dabei das stabile Sauerstoffisotop ^{18}O . Positronen unterscheiden sich nur aufgrund ihres Vorzeichens von Elektronen und werden auch als Antiteilchen des Elektrons bezeichnet. Sie werden durch das Gewebe im Körper abgebremst und rekombinieren sich mit einem in der Umgebung vorkommenden Elektron, wobei ein Positronium entsteht. In anschließender Paarvernichtung, auch Annihilation genannt, wandelt sich die Masse der beiden Teilchen in messbare elektromagnetische Strahlung (γ -Quanten, Energie jedes Photon 511 keV) gegensätzlicher Richtung um.^[60]

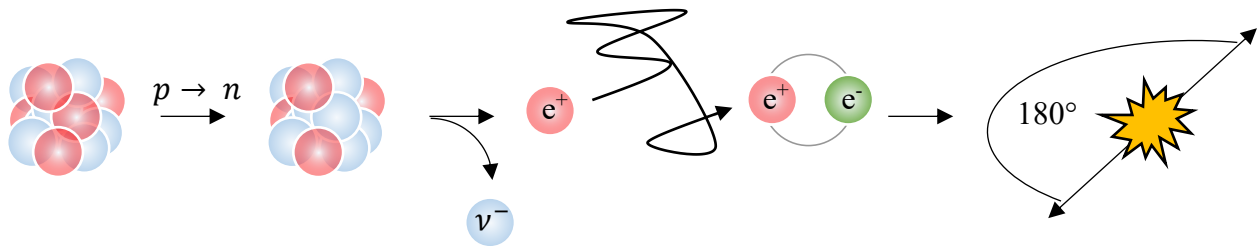


Abbildung 6: Zerfallsmechanismus eines β^+ -emittierenden Isotops.^[60]

3.3 [^{18}F]Fluor: Markierung organischer Moleküle

Das wohl wichtigste PET-Isotop, welches sich aufgrund seiner niedrigen kinetischen Positronenenergie ($E_{\text{max}} = 635 \text{ keV}$, $E_{\text{mean}} = 250 \text{ keV}$), die daraus kurzen Positronenreichweite von 2.4 mm in Wasser, der hohen Stabilität der C-F-Bindung (444 kJ/mol) und einer effizienten Produktion am Zyklotron (Strahlenergie 10–16 MeV) ist [^{18}F]Fluor. Die dabei relativ hohe Halbwertszeit von 109.7 Minuten ermöglicht es zusätzlich komplexe, mehrstufige Synthesen durchführen zu können.^[59, 60]

Die Art der Fluorierungsmethode wird von der chemischen Form des ^{18}F -Isotops bestimmt. Abhängig vom Produktionsprozess steht die elektrophile, die nukleophile oder die Fluorierung über prosthetische Gruppen zur Verfügung. Für die elektrophile Fluorierung wird [^{18}F]F₂, welches aus den Kernreaktionen $^{20}\text{Ne}(d, \alpha)^{18}\text{F}$ oder $^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$ als Gas generiert wird, verwendet. Als Target für die nukleophile Fluorierung wird vorzugsweise [^{18}O]H₂O verwendet, wobei wässriges [^{18}F]HF generiert wird.^[54] Radiofluorierungen über prosthetische Gruppen finden insbesondere bei der Markierung von Proteinen und Peptiden Anwendung.^[54]

3.3.1 Elektrophile Fluorierung

Wie bereits erwähnt, wird [^{18}F]F₂ aus den Kernreaktionen $^{20}\text{Ne}(d, \alpha)^{18}\text{F}$ oder $^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$ als Gas generiert. Unter Verwendung von $^{19}\text{F}_2$ als Trägergas bildet sich $^{18}\text{F}-^{19}\text{F}$ als neue Fluorquelle. Diese „Doppelspezies“ besitzt jedoch durch das Vorhandensein des nichtradioaktiven ^{19}F -Isotopes, eine relativ niedrige spezifische Aktivität (A_s).^[61]

$$A_s = \frac{\text{Radioaktivität [GBq]}}{\text{ges. Stoffmenge [mol]}}$$

Nukleophile können sowohl am ^{18}F - als auch am ^{19}F - Isotop angreifen. Unter optimalen Bedingungen ist somit eine Ausbeute von maximal 50% möglich.

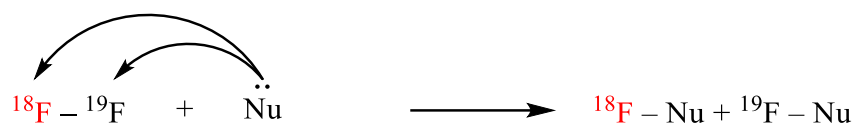


Abbildung 7: Schematische Darstellung der elektrophilen Fluorierung mittels $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$.^[62]

Leider bietet dieses Verfahren in der Regel nur eine geringe molare Radioaktivität von etwa $0.5 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$. Ein weiterer Nachteil dieser Fluorierungsmethode ist die schwierige Handhabung des Reaktanten in Gasphase. Alle elektrophilen Fluorierungsmittel zeichnen sich durch eine hohe Reaktivität aus. Darunter hat jedoch oft die Selektivität der Reaktionen zu leiden.^[62] Nebenreaktionen oder Reaktionen mit dem Lösemittel können zur Bildung mehrerer Produktisomere oder unerwünschter Nebenprodukte führen. Dies verringert die radiochemische Ausbeute zusätzlich. Um die Selektivitäten der Reaktionen zu verbessern, kann $^{18}\text{F}-^{19}\text{F}$ in mildere, elektrophile Fluorierungsmittel wie zum Beispiel $[^{18}\text{F}]\text{Acetylfuorid}$ (**AA**), 1- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$ -2-pyridon (**AB**), N - $[^{18}\text{F}]\text{Fluorpyridiniumtriflat}$ (**AC**), $[^{18}\text{F}]\text{Perchlorylfluorid}$ (**AD**) oder $[^{18}\text{F}]\text{N-Fluorbenzolsulfonimid}$ ($[^{18}\text{F}]\text{NFSI}$, **AE**) umgewandelt werden.^[62]

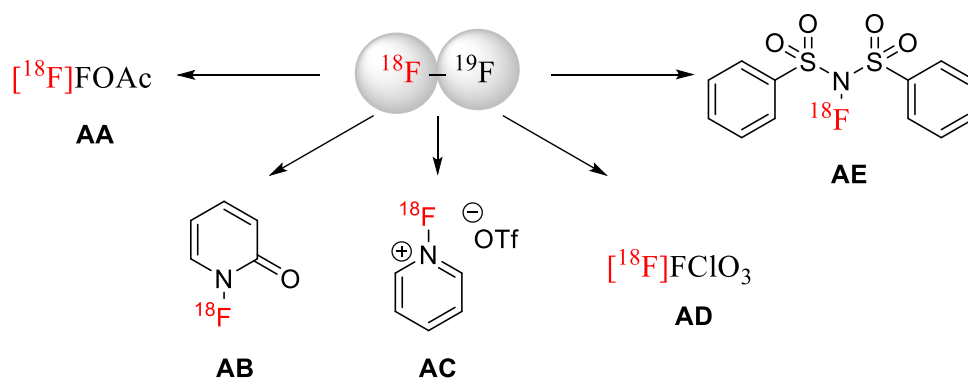


Abbildung 8: Auswahl verschiedener $[^{18}\text{F}]\text{F}^+$ -Spezies, die aus $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ synthetisiert werden.^[62]

Als Beispiel für eine elektrophile Fluorierung dient exemplarisch der Goldstandard der Radiotracer, 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$ -2-desoxy-D-glucose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$). Dieser wurde erstmals 1978 erfolgreich über eine elektrophile Substitution von Triacetylglucal (**B**) mit $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ synthetisiert.^[63] Dabei konnte eine RCY (*radiochemical yield*) von etwa 10% erzielt werden. Als unerwünschtes Nebenprodukt entstand dabei 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$ -2-desoxy-D-mannose

(^{18}F]FDM) im Verhältnis 3 zu 1. Verwendet man anstatt ^{18}F]F₂ das wesentlich mildere Fluorierungsmittel ^{18}F]Acetylhypofluorid, kurz ^{18}F]FOAc, führt dies zu einer erheblichen Verbesserung der Selektivität (7:1) sowie einer RCY von 30%.^[62]

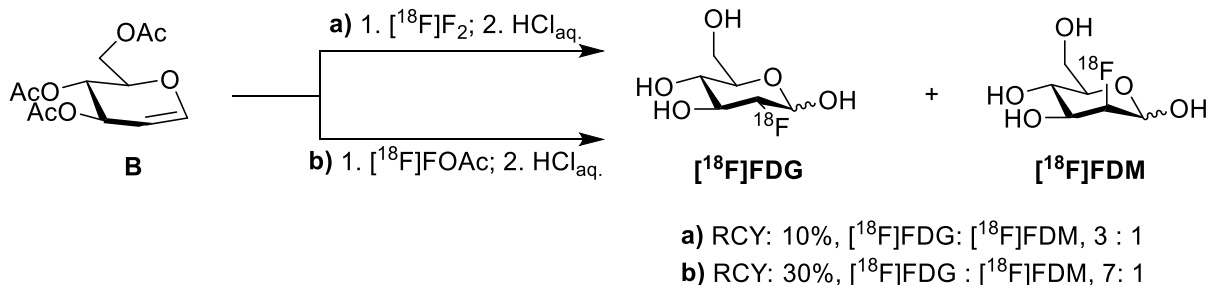


Abbildung 9: Elektrophile Fluorierung von Triacetylglucal mit ^{18}F]F₂ und ^{18}F]FOAc.^[62, 63]

3.3.2 Nukleophile Fluorierung

Im Gegensatz zur elektrophilen Fluorierung steht ^{18}F]Fluorid einfacher und in hoher molaren Aktivität ($\leq 400 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$) zur Verfügung.^[64] Tracer, welche in der medizinischen Routine Anwendung finden, werden bevorzugter Weise über diese Methode fluoriert. Aufgrund physikalisch-chemischer Eigenschaften ist die Markierung mit ^{18}F]Fluorid nicht ganz trivial.^[65] Das ^{18}F]Isotop wird nach der Kernreaktion normalerweise aus einer wässrigen Lösung in Form von ^{18}F]HF entnommen. Aufgrund seiner hohen Ladungsdichte ist dies jedoch stark hydratisiert und bildet eine Solvathülle, welche die Nukleophilie erheblich mindert. In diesem Zustand eignet es sich nicht für die nukleophile Substitutionsreaktion und muss aufbereitet werden. Um es zu aktivieren werden Kationen (z.B. Kalium⁺), Komplexbildner (z.B. Kryptofix 222) sowie Ionentauscher (*positively charged quaternary methylammonium*, QMA) verwendet.^[66]

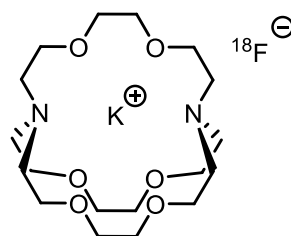


Abbildung 10: Kryptofix 222/ ^{18}F]KF⁻ Komplex.^[66]

Als Beispiel soll die wohl gängigste Methode der Aufarbeitung besprochen werden, die azeotrope Trocknung. Als nicht isotope Träger dienen schwache Anionen wie Carbonate. Trägergebundene Ammoniumsalze werden dabei als Ionenaustauschmaterial verwendet. Der

Trocknungsprozess beginnt damit, wässriges $[^{18}\text{F}]\text{HF}$ über eine QMA zu leiten und auf der Kartusche zu binden. Im Anschluss wird es mit einer geeigneten Base (z.B. K_2CO_3) und einem organischen Lösemittel (z.B. abs. Acetonitril) von der Kartusche in ein V-Vial eluiert. Restliches Wasser wird im Anschluss über mehrfache azeotrope Destillation mit abs. MeCN im Argongegenstrom entfernt.^[67]

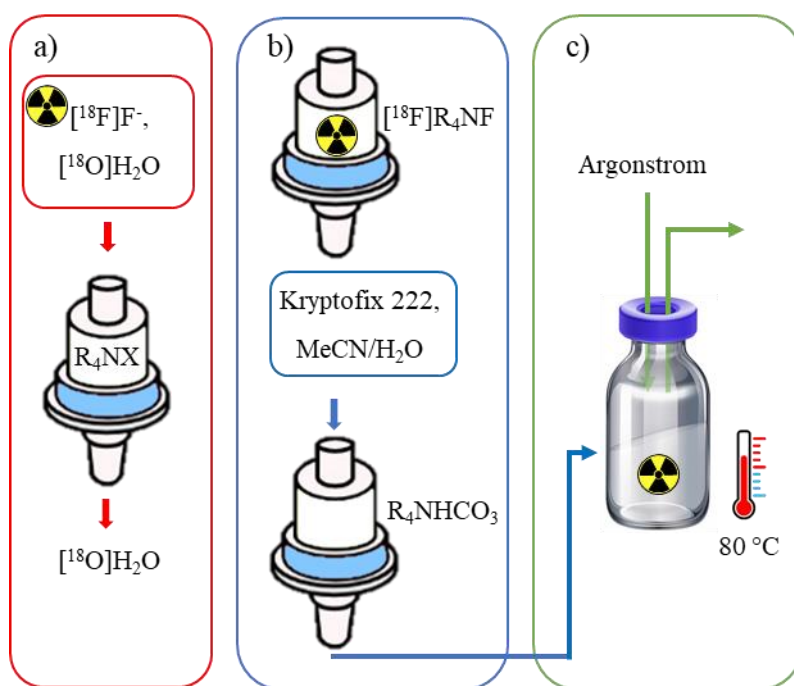


Abbildung 11: Schematischer Ablauf der azeotropen Trocknung: Beladen des Ionenauschers (a), Elution des Fluorids (b), azeotrope Trocknung (c).^[67]

Eine der bekanntesten nukleophilen Substitutionsreaktionen ist die $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion. Als Abgangsgruppen (*leaving group*, LG) bieten sich dabei besonders Halogenide, wie Cl^- , Br^- , I^- sowie Sulfonsäureester an. Die Reaktion wird in der Regel bei hohen Temperaturen in polar aprotischen Lösungsmitteln, wie DMSO oder Acetonitril durchgeführt. Das Nukleophil greift dabei am sp^3 -hybridisierten Kohlenstoff an. Bindungsbildung sowie Bindungsbruch erfolgen dabei simultan, wobei es bei Abspaltung der Abgangsgruppe zur Inversion am Stereozentrum kommt.^[68]

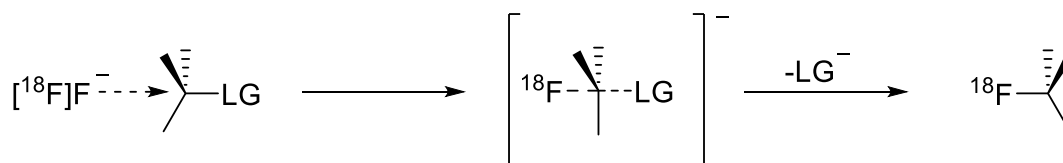


Abbildung 12: Reaktionsmechanismus $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion.^[68]

Für die Markierung aromatischer Grundstrukturen dient der Additions-Eliminierungs-Mechanismus der nukleophilen aromatischen Substitution S_NAr . Vor allem elektronenziehende Gruppen (*electron withdrawing groups*, EWG) in *ortho*- oder *para*- Stellung tragen dabei zum Erfolg der Reaktion bei. Ihr elektronenziehender Charakter stabilisiert dabei die entstandene negative Ladung im aromatischen Ring. Man spricht hierbei auch vom Meisenheimer-Komplex. Im Vergleich zur aliphatischen Fluorierung wird bei der aromatischen Substitution jedoch mehr Reaktionsenergie benötigt.^[69]

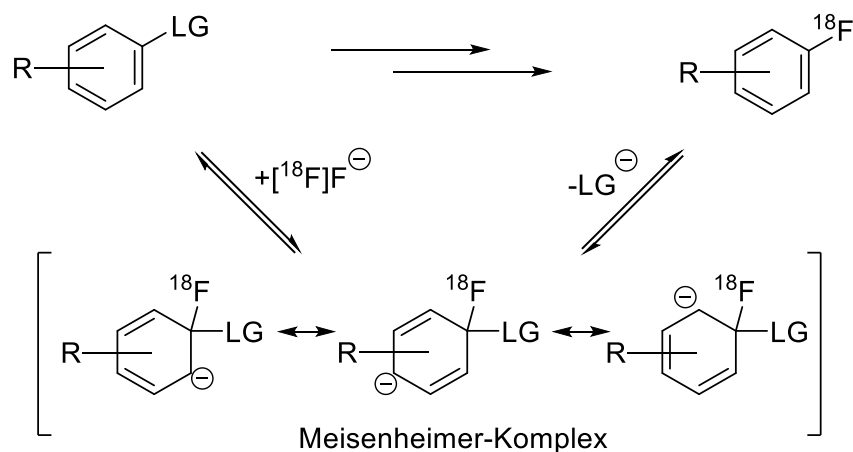


Abbildung 13: Schematische Darstellung zur Bildung des Meisenheimer-Komplexes.^[69]

Als Beispiel für die nucleophile Fluorierung soll die Synthese von $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ betrachtet werden, welches neben $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ einer der wichtigsten fluorbasierten Radiotracer ist. Obwohl es sich bei $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ um eine simple Struktur handelt, kommt es aufgrund des elektronenreichen Catecholrings bei der Fluorierung mit $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ zu Problemen. Die Synthese muss mehrstufig erfolgen. Zunächst wird eine nucleophile Radiofluorierung eines Benzaldehyd-Derivates (**CA**) mit geeigneter Abgangsgruppe durchgeführt. Nach Reduktion mit Natriumborhydrid und Bromierung des entstandenen Alkohols (**CC**) mit HBr , wird mit chiralen Reagenzien (wie *tert*-Butyl-*N*-(diphenylmethyl)glycinat) (**CE**) die Aminosäurekette aufgebaut. Nach Entschützung mit HI , kann nach etwa 100 min $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ (RCY: $5 \pm 1\%$) erhalten werden.^[70]

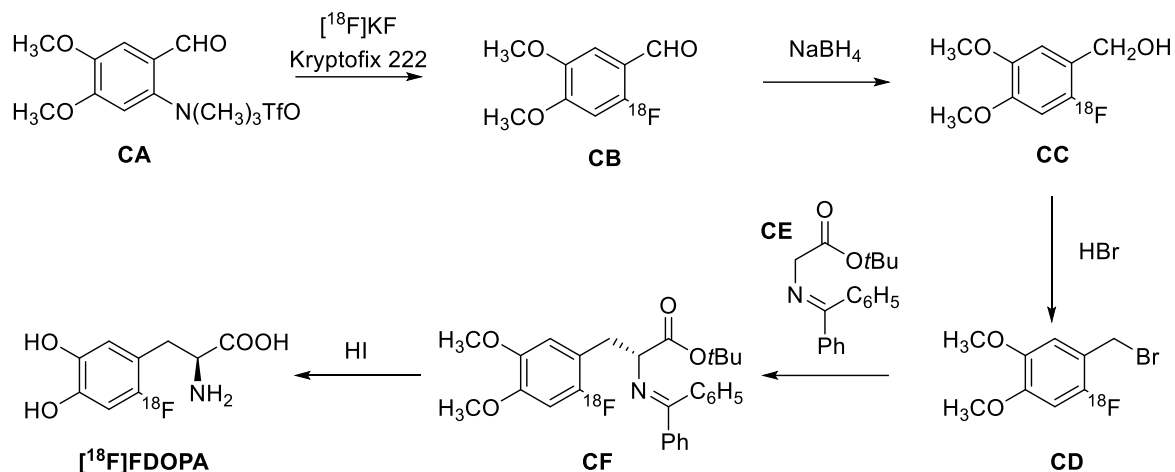


Abbildung 14: Syntheseroute von $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$.^[70]

3.3.3 $[^{18}\text{F}]\text{Fluorierung}$ mit Hilfe prosthetischer Gruppen

Eine Alternative zur Markierung von Tracern mit radioaktiven $[^{18}\text{F}]$ -Isotop stellen prosthetische Gruppen dar. Diese Moleküle fungieren als kleine, hoch reaktive, bifunktionale Liganden, welche unter anderem in der Lage sind Phenole, Thiophenole, Amine oder auch Carboxylate zu alkylieren. Darunter zählen zum Beispiel: Brom- $[^{18}\text{F}]$ fluormethan (**DA**), 1-Brom-2- $[^{18}\text{F}]$ fluorethan ($[^{18}\text{F}]\text{FEB}$, **DB**), 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltriflat ($[^{18}\text{F}]\text{FEtOTf}$, **DC**) oder 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat ($[^{18}\text{F}]\text{FEtOTf}$, **DD**).^[71, 72]

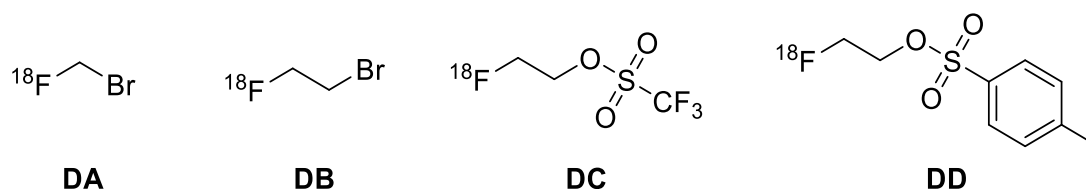


Abbildung 15: Auswahl verschiedener $[^{18}\text{F}]\text{Fluoralkylierungsliganden}$.

Da sich diese Arbeit vor allem auf die Synthese und der Prozessentwicklung von 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltriflat ($[^{18}\text{F}]\text{FEtOTf}$, **DC**) sowie 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat ($[^{18}\text{F}]\text{FEtOTf}$, **DD**) beschäftigt hat, soll auf diese im Folgenden etwas genauer eingegangen werden.

Bereits 1987 stellte Stöcklin *et al.* die Radiosynthese von [^{18}F]FETOTs und den entsprechenden Methyl- und Propylanaloga ([^{18}F]Fluormethyltosylat bzw. 3-[^{18}F]Fluorpropyltosylat) vor.^[73]

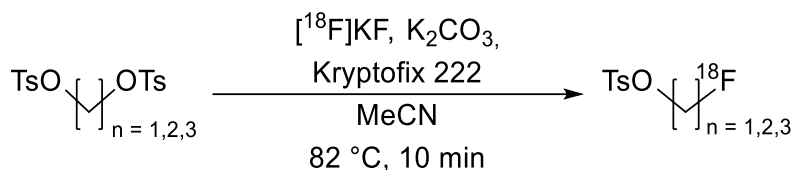


Abbildung 16: Stöcklins *et al.* vorgestellte Syntheseroute für [^{18}F]FETOTs.^[73]

Auffällig dabei sind die großen Unterschiede der radiochemischen Ausbeute. Für [^{18}F]Fluormethyltosylat betrug die RCY nur etwa 1%. Für 2-[^{18}F]FETOTs (RCY: 82%) und 3-[^{18}F]Fluorpropyltosylat (RCY: 89%) konnten wesentlich höhere RCY erzielt werden. Es wird vermutet dass dies vor allem sterische Gründe hat.^[73]

Ein Beispiel für die [^{18}F]Fluorethylierung von primären Aminen ist die leicht modifizierte Reaktion mit *p*-Anisidin (**EA**), welche 2003 von Rösch *et al.* vorgestellt wurde.^[74] Dabei wurde eine deutliche Erhöhung der radiochemischen Ausbeute durch den Zusatz von Alkalimetalliodiden beobachtet. Die höhere RCY wird von den Autoren durch die intermediäre Bildung von 1-Iod-2-[^{18}F]fluorethan erklärt, welches ein stärkeres Alkylierungsmittel als das entsprechende Tosylat darstellt.

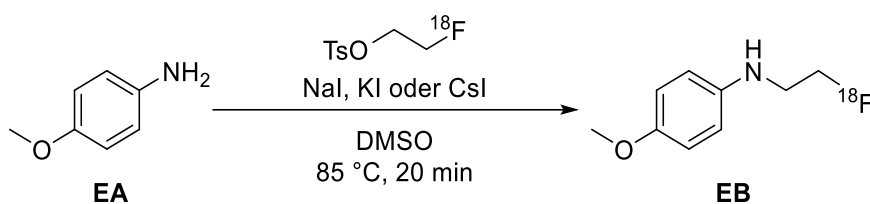


Abbildung 17: [^{18}F]Fluoralkylierung von *p*-Anisidin.^[74]

Auch für viele Phenole und Thiophenole eignen sich die [^{18}F]Fluorethylierung mit [^{18}F]FETOTs. So wurde 2015 von Schieferstein *et al.* die [^{18}F]Fluorethylierung von Harmol (**FA**)^[75] und 2010 von Robins *et al.* die [^{18}F]Fluorethylierung von 3-(2-Chlor-5-mercaptophenyl)-1-methyl-1-(3-(methylthio)phenyl)guanidine (**GA**) durchgeführt.^[76]

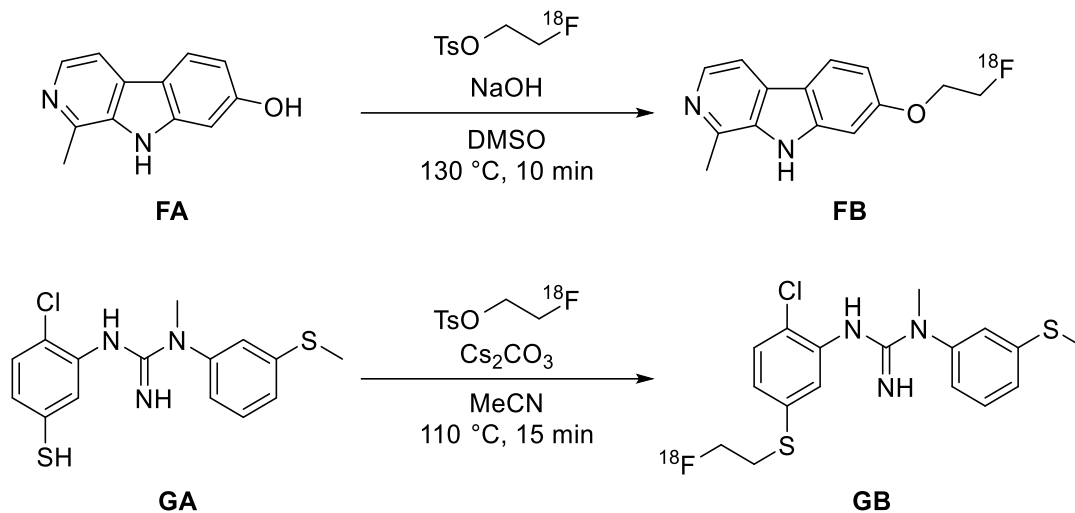


Abbildung 18: [^{18}F]Fluoralkylierung von Harmol und 3-(2-Chloro-5-mercaptophenyl)-1-methyl-1-(3-(methylthio)phenyl)guanidine.^[75, 76]

Für die Darstellung radioaktiv markierter Estern werden Carbonsäuren mit [^{18}F]FEtOTs zur Reaktion gebracht^[77]. Beispielhaft soll hier die Veresterung der Rhodamin B-Base (**HA**) von Heinrich *et al.* genannt werden.^[78]

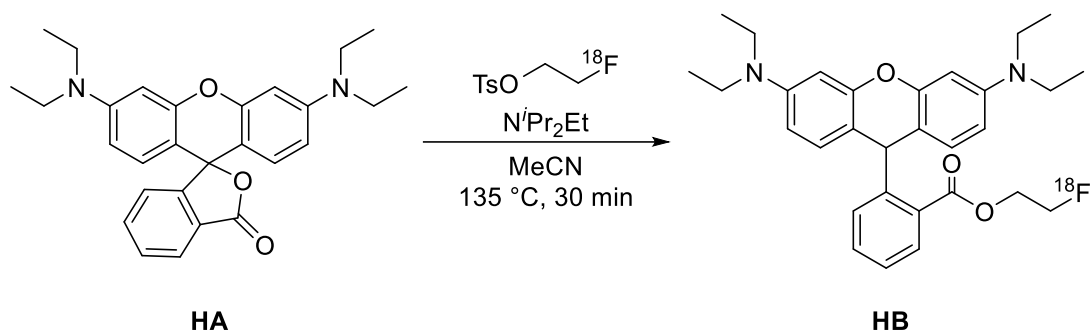


Abbildung 19: Veresterung von Rhodamin B-Base.^[78]

Eine Alternative zu [^{18}F]FEtOTs (**DC**) bietet [^{18}F]FEtOTf (**DD**), welches sich besonders für schwach nukleophile, thermisch oder im Basischen instabile Moleküle eignet. Es wird bevorzugt mit der von Peters *et al.* 2014 vorgestellten Methode synthetisiert.^[79]

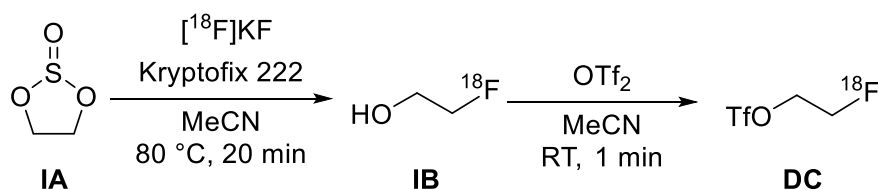


Abbildung 20: Peters *et al.* vorgestellte Syntheseroute für [^{18}F]FEtOTf.^[79]

Ausgehend von Ethylensulfit (**IA**) wird zunächst durch Reaktion mit nukleophilen [^{18}F]Fluorid 2- ^{18}F Fluorethanol (**IB**) gebildet, welches anschließend mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid zu ^{18}F FEtOTf (**DC**) umgesetzt wird. Vor allem die gesteigerte Reaktivität unter milderen Reaktionsbedingungen ist dabei positiv zu beachten. So konnte Zhang *et al.* 2003 am Beispiel eines Phenols (**EA**) zeigen, dass die Fluoralkylierung mit ^{18}F FEtOTf bereits bei Raumtemperatur eine RCY von 68% (**EB**) erreicht, während die gleiche RCY (**EC**) mit ^{18}F FEB erst bei einer Temperatur von 110 °C erzielt werden konnte.^[80]

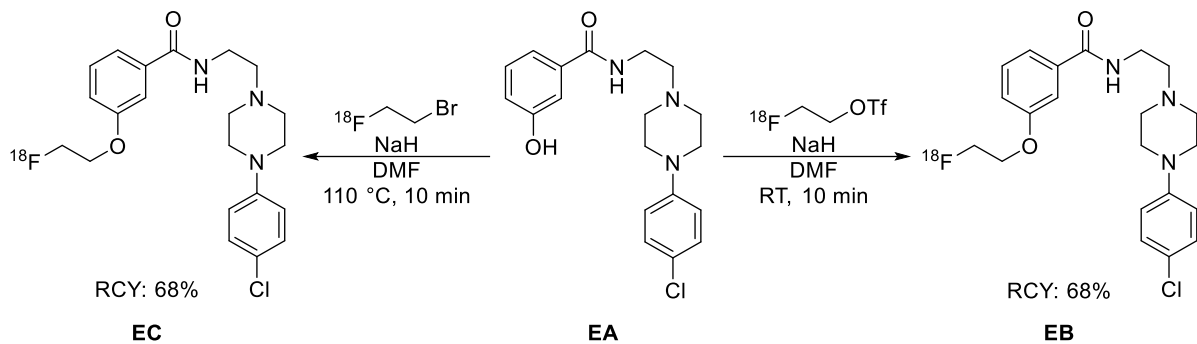


Abbildung 21: Radioaktive Fluoralkylierung von *N*-[2-[4-(4-Chlorphenyl)piperazin-1-yl]ethyl]-3-hydroxybenzamid mit ^{18}F FEB und ^{18}F FEtOTf.^[80]

4 Kohlenhydrate: Die glykosidische Knüpfung

Kohlenhydratverbindungen bilden die größte Klasse an natürlich vorkommenden Verbindungen und spielen bei grundlegenden biochemischen Prozessen eine wichtige Rolle. Sie dienen zum Beispiel in der DNS sowie in der RNS als Grundbausteine und liefern bei biologischen Prozessen leichtzugängliche Energie.^[81] Die häufigste Form bilden die Glycoside, wobei der Kohlenhydratbaustein, das Glycon, über eine glykosidische Bindung am anomeren Zentrum mit dem Aglycon verknüpft ist. Abhängig vom „Linker“- Atom (X) werden Glycoside in *O*-, *C*-, *N*- oder *S*-Glycoside unterschieden. Als Reste dienen meist organische Alkyl-, Aryl- oder Phosphat-Reste. Besteht der Rest aus einem weiteren Kohlenhydrat, spricht man hierbei auch von einem Disaccharid.^[82]

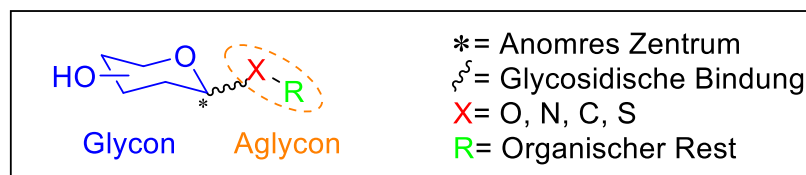


Abbildung 22: Allgemeine Struktur eines Glycosids.^[82]

Auch die Humanmedizin nutzt die biologisch, relevante Bedeutung von Kohlenhydraten im Körper und entwickelt dementsprechend PET-Tracer die diesem Prinzip folgen.^[83]

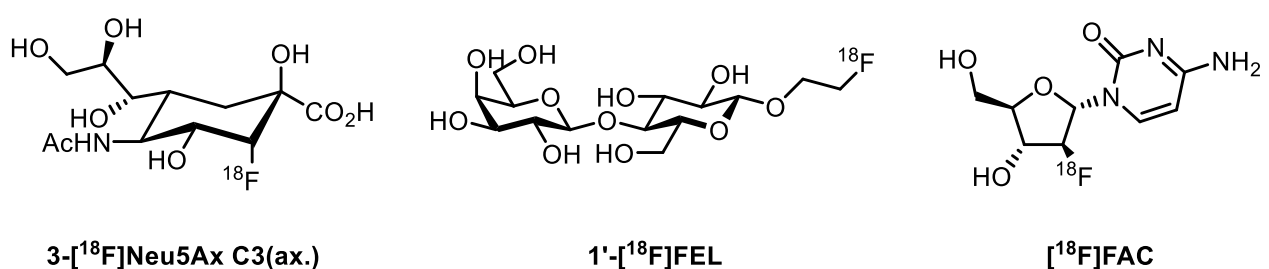


Abbildung 23: Auswahl verschiedener PET-Tracer basierend auf Kohlenhydraten.

Salicylsäuren an Zelloberflächen tragen beim Prozess der Zellerkennung bei. Inspiriert durch das Vorhandensein von Salicylsäuren auf regulatorischen Gangliosiden, entwickelte Ishiwata *et al.* bereits 1990 den Tracer **3-[¹⁸F]Neu5Ac-C3(ax.)** und untersuchte damit den Glycokonjugat-Stoffwechsel von Tumoren.^[84] Laktose entsteht aus der Verbindung von D-Glucose und D-Galactose durch eine charakteristische β -(1,4)-glykosidische Bindung. Das *Hepatocarcinoma-Intestine-Pancreas/Pancreatitis-Associated* Protein (HIP/PAP) wird im

peritumoralen Pankreas überexprimiert und hat eine hohe Affinität für D-Lactose. Um die Bildgebung von Pankreaskarzinomen zu verbessern gelang es Turkman *et al.* im Jahr 2011, **1'-[¹⁸F]FEL** für diesen Zweck zu entwickeln.^[85] Auch Cytosin basierte PET-Tracer wie 2-Desoxy-2-[¹⁸F]fluor-D-arabinofuranosylcytosin, kurz [¹⁸F]FAC gewinnen zunehmend an Bedeutung. So konnte bisher gezeigt werden, dass mit [¹⁸F]FAC die Biodistribution bei Mäusen eine höhere Akkumulation im Thymus und in der Milz zeigt, als vergleichsweise mit [¹⁸F]FDG beobachtet wurde.^[86]

Für die *O*-Glycosylierung gibt es diverse Synthesestrategien, welche je nach Struktur der Verbindung, Eigenschaften der Edukte, Nebengruppeneffekte und der Wahl des Lösemittels variiert.^[87, 88] Die zwei häufigsten Methoden, die Königs & Knorr- sowie die Schmidt-Glycosylierung sollen im Folgenden beschrieben werden.

4.1 Königs & Knorr-Methode

Bis heute ist die Herstellung von *O*-Glycosiden nach der Königs & Knorr-Methode weit verbreitet und wird stetig weiterentwickelt.^[89] Es entstehen Alkyl- oder Aryl-*O*-Glycoside aus den entsprechenden Alkyl- oder Arylalkoholen und einem Glycosylhalogenid unter Verwendung eines Schwermetallsalzes oder einer Lewissäure. Bereits im Jahr 1901 erkannten die Wissenschaftler Wilhelm Königs und Eduard Knorr die Verwendungsmöglichkeit von Glycosylbromiden und -chloriden als Glycosyldonoren. Sie verwendeten Silber(I)-Salze wie Ag₂CO₃ als sogenannte Promotoren, um das Halogenid als Abgangsgruppe aus dem Kohlenhydrat zu verdrängen.^[90] Besonders vorteilhaft ist, dass die entstehenden Silber-Halogenid-Salze wie AgBr aus der Reaktionsmischung ausfallen und das Gleichgewicht der Reaktion somit auf die Seite der Produkte verschoben wird. Das entstehende Oxocarbeniumion kann dabei durch Nachbargruppeneffekte stabilisiert werden. Da der Angriff am anomeren Zentrum stattfindet ist diese Methode zusätzlich regiospezifisch. Die Stabilität und Reaktivität des Glycosylsubstrats variieren je nach Halogenid, Temperatur, Schutzgruppen und Aktivator. Chloride und Fluoride sind im Allgemeinen stabiler als Bromide, während Iodide tendenziell instabiler sind.^[91] Da Halogenide aufgrund ihrer thermodynamischen Instabilität leicht eliminiert oder hydrolysiert werden können, finden die Reaktionen unter Inertbedingungen und unterhalb von 25 °C statt. Als Aktivator dienen Silbersalze wie Ag₂CO₃, AgOTf, Ag₂O, AgNO₃ und AgClO₄.^[92] Eine Adaption der König & Knorr-Methode stellt die Helferich-Variante dar. Bei dieser Methode werden Quecksilbersalze wie HgI₂, HgCl₂ oder Hg(CN)₂ verwendet.^[93]

Nachbargruppeneffekte an der C2-Position sind charakteristisch und wirken sich regiospezifisch auf die Reaktion aus.^[94] So kann unter Verwendung von Ester- und Phenylthiogruppen an Position C2 sowohl aus dem α - als auch aus dem β -Glycosylhalogeniden nur das β -*O*-Glycosid entstehen. Fehlt der Nachbargruppeneffekt zum Beispiel unter Verwendung von Alkyl- und Benzylgruppen, dominiert der anomere Effekt und es wird primär das α -*O*-Glycosid gebildet.^[95, 96]

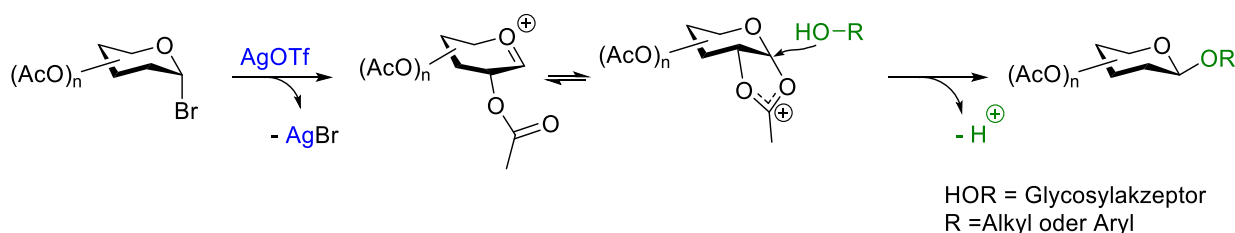


Abbildung 24: Reaktionsmechanismus mit Nachbargruppeneffekt der Königs & Knorr-Reaktion.^[95]

4.2 Schmidt-Methode

Im Verlauf des vergangenen Jahrhunderts wurden die Konzepte von König, Knorr und Helferich fortlaufend aufgegriffen und weiterentwickelt. Es zeigte sich, dass für eine erfolgreiche Glycosilierung eine effektive Abgangsgruppe sowie ein geeigneter Promotor entscheidend sind.^[96, 97] Ein Nachteil bisheriger Methoden lag in der mangelnden Kontrolle der Stereoselektivität zwischen den α - und β -Anomeren der Glycoside. Richard R. Schmidt ging dieses Problem an und erkannte 1984 die Möglichkeit, eine Trichloracetimidat als Abgangsgruppe an C-1 einzusetzen, wobei verschiedene Lewis-Säuren als Promotoren dienten.^[98] Dabei wird der Trichloracetimidat-substituierte Kohlenhydrat mittels einfacher Reaktion zwischen einem C-1-entschützten Kohlenhydrat und Trichloracetonitril unter basischen Bedingungen synthetisiert.^[98] Schmidt postulierte, dass laut Erkenntnissen von Raymond U. Lemieux und J. T. Edwards das Verhältnis der α - und β -Anomeren der Glycosilierung von der Temperatur und durch die Wahl der Base abhängt.^[99, 100] Aufgrund des anomeren Effekts (Edwards-Lemieux-Effekt) entsteht ein stereoelektronischer Unterschied bei der Bildung der α - und β -Anomere. Das β -Anomer bildet sich schneller (kinetisch kontrolliertes Produkt), das thermodynamisch stabilere α -Anomer langsamer (thermodynamisch kontrolliertes Produkt).^[100]

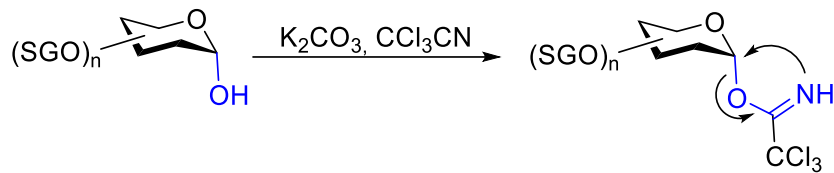


Abbildung 25: Reaktionsmechanismus der Schmidtglycosilierung.^[100]

Das α -Anomer entsteht mit starken Basen wie zum Beispiel Natriumhydrid oder 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) oder mit schwachen Basen bei längeren Reaktionszeiten (z.B. K_2CO_3 , 48 Stunden). Das β -Anomer dagegen mit schwachen Basen und kurzen Reaktionszeiten (z.B. K_2CO_3 , 3 h).^[101, 102] Ein großer Vorteil ist die hohe Stabilität der Trichloracetimide, die im Gegensatz zu den Glycosyl-Halogeniden mehrere Monate bei -25 °C lagerfähig sind. Für die eigentliche Glycosilierung werden die Trichloracetimide mit einer katalytischen Menge Lewisäure aktiviert (z.B. TMSOTf, $BF_3 \cdot Et_2O$). Ähnlich der Königs & Knorr-Reaktion verläuft dieser Schritt der Reaktion über einen S_N2 -Mechanismus mit Nachbargruppeneffekt ab. Bei Glucose und Galactose bildet das α -Trichloracetimide das entsprechende β -*O*-Glycosid, bei Mannose entsteht das α -*O*-Glycosid.^[82, 98]

5 Flowchemie

In den vergangenen 30 Jahren hat die Flow-Chemie stetig an Bedeutung gewonnen. Insbesondere die Industrie macht sich dieses Syntheseverfahren zu Nutze und findet dort sowohl in der Analytik als auch in der Synthese Verwendung.^[103, 104] Vor allem die Entwicklung von milli- und mikrofluidischen Reaktoren hat dazu beigetragen, Flow-Chemie auch in akademischen Einrichtungen zu etablieren. Dabei profitiert dieses Syntheseverfahren hauptsächlich von folgenden Eigenschaften: i) gute Wärmeübertragung aufgrund Diffusions- oder Mischelemente im Reaktor, ii) hoher Stoffaustausch, iii) einer guten Skalierbarkeit, iv) einfache Optimierungsmöglichkeiten, v) hohe Reaktionseffizienz, vi) sichere Handhabung, vii) hohe Reproduzierbarkeit und viii) hohe Selektivität.^[105] Durch Reaktionen mit höheren Konzentrationen können zusätzlich Kosten für Lösemittel eingespart und gleichzeitig der Umgang mit toxischen oder explosiven Stoffen sicherer gestaltet werden. Mikrofluidische Systeme haben Kanaldurchmesser von 100 nm – 1 mm, während millifluidische Systeme Durchmesser von 1–10 mm aufweisen.^[106] Kleinere Kanäle bedeuten ein größeres Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis (A/V).^[107] Im Vergleich zu herkömmlichen Reagenzgefäßen ist dieses Verhältnis erheblich größer. Ein höheres A/V-Verhältnis ermöglicht eine effizientere Mischung der Reagenzien und eine präzisere Kontrolle des Wärmeaustauschs. Reaktionen in mikro- und millifluidischen Systemen führen in der Regel zu besseren Ausbeuten des gewünschten Produktes in kürzerer Zeit.^[108]

Tabelle 3: A/V-Verhältnisse unterschiedlicher Reaktionsgefäße.^[107]

Reaktionsgefäß	A/V [$\frac{m^2}{m^3}$]
5 mL Rundkolben	~ 141
50 mL Rundkolben	~ 66
250 mL Rundkolben	~ 38
Millifluidale Systeme	~ 50 – 2000
Mikrofluidales System	~ 3400 – 18 000

Obwohl Zeit und Ressourcen für die Entwicklung und Optimierung einer Syntheseroute unter Durchflussbedingungen erforderlich sind, lohnt sich diese Investition. Ein Flow-System besteht standardmäßig aus vier Komponenten: i) einem Reaktor, ii) einer Pumpe, iii) einem Druckmesser und einem iv) Druckregulator. Geeignete Reaktoren müssen gegenüber hohen Temperaturen, verschiedenen Lösemitteln, Reaktanden und hohem Druck beständig sein.

Reaktionssysteme können in 3 verschiedene Typen eingeteilt werden: i) Flüssig-Flüssig-Systeme, ii) Fest-Flüssig-Systeme und iii) Flüssig-Gas-Systeme.^[108] Da in dieser Arbeit starker Fokus auf dem Flüssig-Flüssig-Reaktorsystem liegt, soll darauf näher eingegangen werden.

Für Flüssig-Flüssig-Reaktionen werden neben einfachen Schläuchen hauptsächlich Chip-Reaktoren eingesetzt. Ihr geringer Kanaldurchmesser und die große Oberfläche ermöglichen eine schnelle und präzise Temperaturregelung. Sie bestehen größtenteils aus Glas, Keramik, Metall oder verschiedenen Kunststoffen. Zwei flüssige Reaktanten werden über separate *inlets* mit Pumpen in den Reaktor transportiert, reagieren und verlassen über ein *outlet* den Reaktor. Die Durchmischung erfolgt durch laminare und turbulente Strömungen. Laminare Strömungen verlaufen entlang der Kanalwand in Richtung der Flussrichtung. Ein Stoffaustausch erfolgt hierbei hauptsächlich über Diffusion. Im Gegensatz dazu mischen turbulente Strömungen aktiv das Reaktionsgemisch. Der Stoff- und Wärmeaustausch verläuft dabei wesentlich effizienter.^[108]

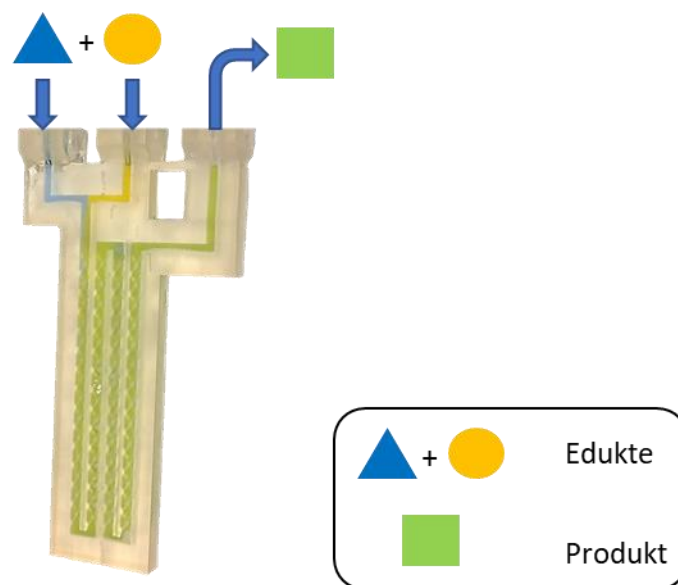


Abbildung 26: Flüssig-flüssig Flow-Reaktor.

Welches Verhältnis die beiden Strömungsarten zueinander haben, lässt sich durch die Reynolds-Zahl (Re) berechnen. Sie beschreibt das Verhältnis von Trägheits- und Zähigkeitskräften im System. Die Gleichung wird durch den Innendurchmesser des Systems (d) in [m], die dynamische Viskosität (η) in $\left[\frac{kg}{m \cdot s}\right]$, die Fließgeschwindigkeit (ϑ) in $\left[\frac{m^2}{s}\right]$ und die Dichte (ρ) in $\left[\frac{kg}{m^3}\right]$ beschrieben. Die kritische Reynolds-Zahl liegt bei 2040 ± 10 . Oberhalb dieser Zahl überwiegt turbulente Strömung, während darunter die laminare Strömung dominiert.^[109]

$$Re = \frac{d\vartheta\rho}{\eta}$$

Mikrofluidische Systeme weisen in der Regel niedrige Reynolds-Zahlen (~ 100) auf. Durch das hohe Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis kommt es zu intensiven statischen Wechselwirkungen zwischen Kanälen und Reaktionsphasen. Vor allem bei laminarer Strömung bewirken dabei Kohäsions- und Adhäsionskräfte. Um dem entgegenzuwirken, werden gezielt Unebenheiten, spezielle Kanalverläufe oder Mischelemente in den Kanal eingebracht. Ein potenzielles Problem dieser Chipreaktoren ist dabei der Durchsatz. Selbst kleinste Ablagerungen können die oftmals sehr dünnen Kanäle (mit oder ohne Mischelemente) verstopfen und die Synthese zum Scheitern bringen.^[109]

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Kontrolle des Druckes im System während der Synthese. Dazu wird ein Gegendruckventil (*back pressure regulator*, BPR) sowie ein Drucksensor (*pressure sensor*, PS) verwendet. Dieses erlaubt die Verwendung einer Reaktionstemperatur über dem Siedepunkt des Lösungsmittels, was sich wiederum positiv auf die Reaktionskinetik auswirken kann. Eine weitere Schlüsselkomponente befasst sich mit der Förderung des Laufmittels oder der Reagenzien. Im Labormaßstab werden üblicherweise Spritzen- oder HPLC-Pumpen eingesetzt. Über Schläuche gelangen die Reaktionslösungen zu den Reaktoranschlüssen (*inlets*). Im Reaktor werden die Komponenten vereint, gemischt und zur Reaktion gebracht. Eine externe Wärmequelle wie ein Ölbad oder ein Aluminiumblock kann für die Temperaturregulierung verwendet werden. Das Reaktionsgemisch verlässt den Reaktor am *outlet* und wird in einem Gefäß aufgefangen. Je nach Reaktionsbedingungen kann es erforderlich sein, das Setup mit zusätzlichen Reaktoren, einer Extraktionseinheit oder anderen technischen Bauteilen zu erweitern.^[108]

6 Additives Fertigungsverfahren: 3D-Druck

Additive Fertigungstechniken eröffnen neue Möglichkeiten für die Flow-Chemie.^[110] Durchflussreaktoren können individuell angepasst und aus einer Vielzahl von Materialien wie Kunststoffen, Metallen, Keramiken oder Glas gedruckt werden. Insbesondere Kunststoffe wie PLA (Polymilchsäure), ABS (Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer), PP (Polypropylen) und PET-G (Polyethylenterephthalat-Glycol modifiziert) haben sich als kosteneffizient und praktikabel erwiesen.^[111] Die Beständigkeit gegenüber organischen Lösungsmitteln und Chemikalien ist bei diesen Kunststoffen jedoch sehr begrenzt. Ein für die Chemie interessanter Kunststoff ist PEEK (Polyetheretherketon). Er zeichnet sich durch eine hohe Temperaturbeständigkeit (bis 250 °C) und einer hohen chemische Resistenz aus.^[112, 113]

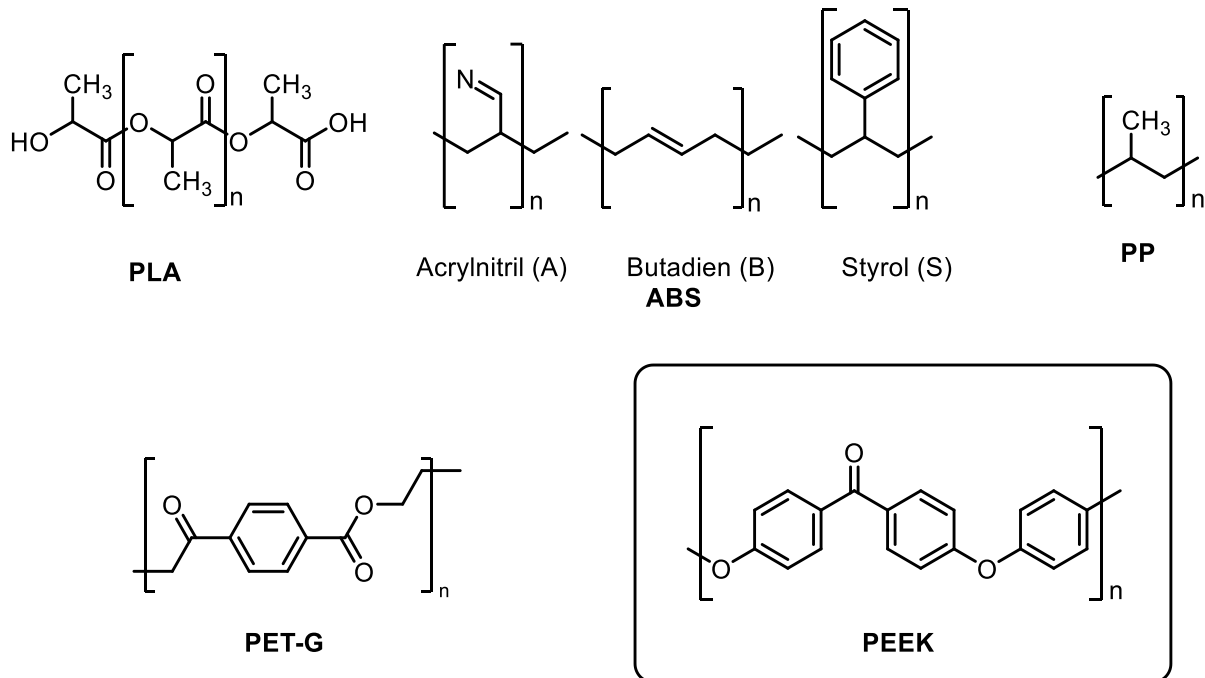


Abbildung 27: Auswahl an Polymeren für den 3D-Druck.

Für den 3D-Druck von Reaktoren werden diese zunächst mittels CAD-Zeichenprogrammen wie *Autodesk Inventor* am PC entworfen und im passenden Format (z.B. *standard template library*, STL) gespeichert. Dieses Format kann mit Hilfe eines *Slicer*-Programmes wie *Simplify3D* oder *Ultimaker Cura* in einen G-Code umgewandelt werden. Bei einem G-Code handelt es sich um einen numerischen Code, welcher die Steuerung des 3D-Druckers ermöglicht. Dieser Vorgang ist bei jeder 3D-Druckmethode identisch.

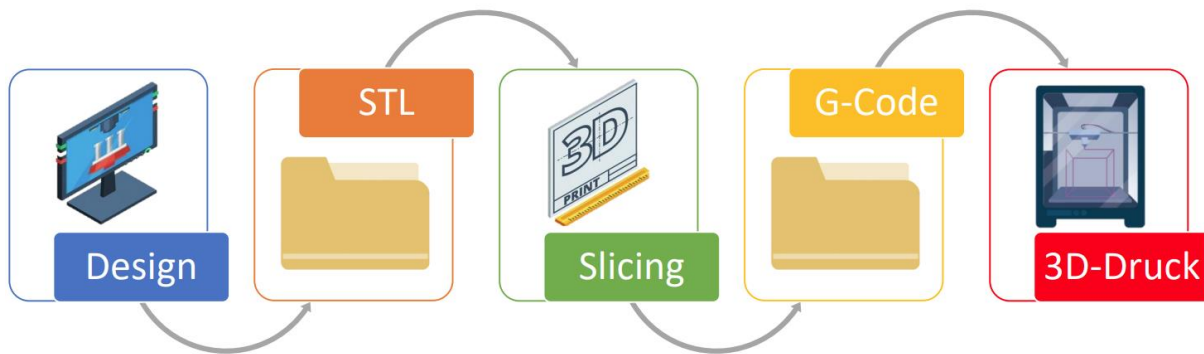


Abbildung 28: Entwicklungsprozess vom Design bis zum 3D-Druck.^[114]

Die älteste Methode, die Stereolithographie (SLA), verwendet Kunststoffe wie Epoxid-, Vinyl- oder Acrylharze in monomerer Form, welche schichtweise mit einem HeCd-Laser auf einer Bauplattform ausgehärtet werden.^[110] Die wohl bekannteste Methode ist die in den 1980er Jahren entwickelte Schmelzschichtmethode (*fused deposition modeling*; FDM). Dabei wird ein Polymer, in Form eines Filaments mit Hilfe eines Motors durch eine beheizte Düse (*nozzle*) geschoben und verflüssigt. Die Gesamtheit dieses Bauteils wird als Extruder bezeichnet. Die Drucktemperatur wird hierbei der Schmelztemperatur des Kunststoffs angepasst. Das geschmolzene Filament härtet auf einer beweglichen Bauplattform, wobei die Düse meist in X- und Y-Achse und die Bauplattform in der Z-Achse beweglich ist, schichtweise aus.^[115]

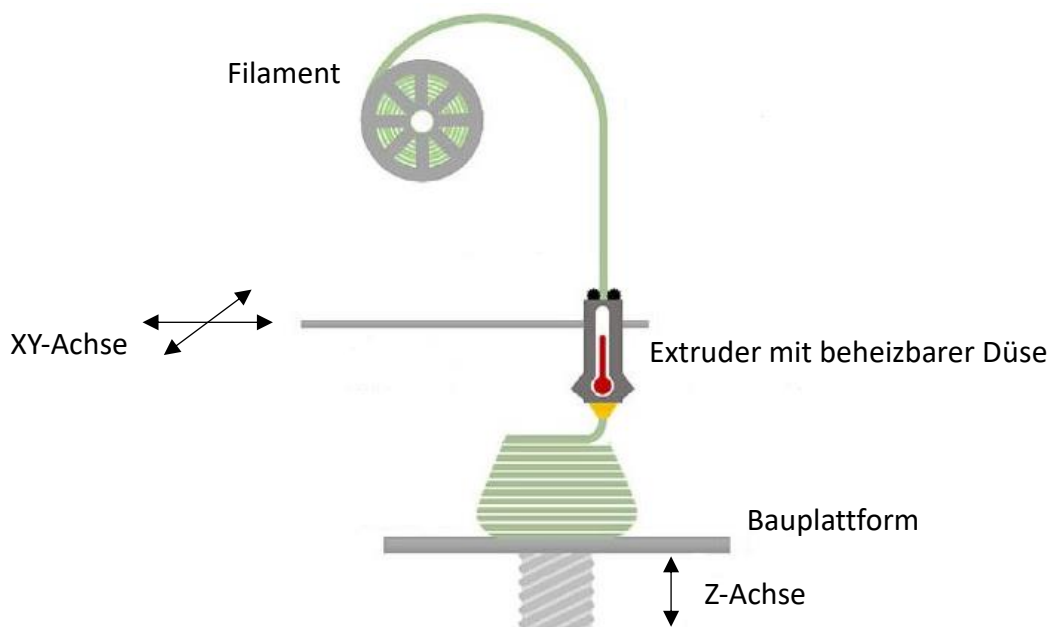
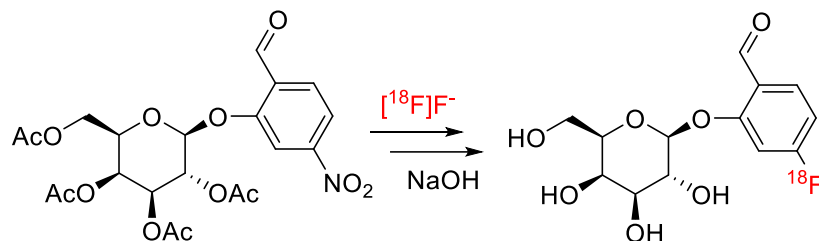


Abbildung 29: Schematischer Aufbau eines FDM-Druckers (Adaptiert mit Erlaubnis von Rossi *et al.*).^[110]

Teil B: Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines flexiblen und preisgünstigen Flow-Systems, welches die hohen Anforderungen radiochemischer Forschungseinrichtungen erfüllt und einfach bedient werden kann. Hauptfokus liegt dabei auf den Kernkomponenten eines Flowsystems. Darunter zählen Durchflussreaktor, Spritzenpumpe, Drucksensor sowie ein Druckregulator. Bei der Entwicklung der Durchflussreaktoren soll dabei besonders auf die Mischeffizienz eingegangen werden. Die Spritzenpumpe soll zuverlässig Flüsse von 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ bis 2500 $\mu\text{L}/\text{min}$ fördern. Darüber hinaus soll ein Druckmesssystem implementiert werden, welches bei Überschreiten des eingestellten Maximaldrucks die Pumpe ausschaltet. Dies ist ein wichtiger Sicherheitsfaktor, da ein Bersten des Reaktors durch etwaige Blockade zur Kontamination und somit zu einer Gefährdung führt. Das System soll unter kontinuierlichen Durchfluss Drücke bis 10 bar zuverlässig halten. Der Druck im System soll dabei *live* ablesbar sein. Mit diesem Setup sollen Flowprozesse für bekannte PET-Tracer neu entwickelt und mit den Ergebnissen der herkömmlichen Batch-Verfahren verglichen werden.

Des Weiteren soll ein neu entwickelter Tracer basierend auf β -Galactose synthetisiert werden. Dieser soll zur Detektion von seneszenten Zellen, welche ein Indiz für Krebs sein können, dienen.



Um die benötigte Menge des radioaktiven Tracers zu produzieren, ist es notwendig, einen vollautomatisierten Prozess auf einem Routinegerät (FN X Pro, TRACERlab) zu entwickeln und zu optimieren. Im Anschluss soll der Tracer im *in-vitro* sowie im *in-vivo* Mausmodell an AMp19-Tumorzellen getestet und evaluiert werden.

Teil C: Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Hauptergebnisse der einzelnen Projekte zusammengefasst. Dabei wird vor der detaillierten Diskussion ein inhaltlicher Überblick der Publikation angeführt. Die Veröffentlichungen werden geordnet nach dem Datum der Veröffentlichung diskutiert. Im Anschluss werden relevante Ergebnisse, die nicht publiziert wurden, separat betrachtet. Zu beachten ist, dass Teilarbeiten, wie die Synthese der Ausgangsverbindungen, das Designen der Reaktoren, der Druck der verschiedenen Komponenten, die Elektronik und die Programmierung in diesem Abschnitt nicht diskutiert wird. Diese können in den jeweiligen Papern sowie den dazugehörigen ESIs (*electronic supplementary informations*) im Anhang nachgeschlagen werden.

Paper 1

3D-printed PEEK reactors and development of a complete continuous flow system for chemical synthesis

Inhalt: Die Nutzung von Hochtemperatur-beständigen und chemisch-resistenten Polymeren im 3D-Druck eröffnet neue Möglichkeiten für die Flowchemie. In diesem Zusammenhang präsentieren wir die Entwicklung von milli- und mikrofluidischen Reaktoren aus Polyetheretherketon (PEEK). Fokus liegt dabei vor allem auf der Mischeffizienz der Reaktoren sowie deren Temperatur- und Chemikalienbeständigkeit. Für die Untersuchung der Mischeffizienz wurden verschiedene Mischgeometrien 3D-gedruckt und anhand von Strömungsuntersuchungen analysiert.

Ergebnisse und Diskussion:

Auch in der Pharmaindustrie nimmt die Bedeutung von Flowchemie bei der Herstellung von pharmazeutischen Wirkstoffen (*active pharmaceutical ingredient*, API) immer mehr zu.^[116] Ein Beispiel für einen solchen Wirkstoff ist Gemcitabin, das bei der Behandlung von Bauchspeicheldrüsenkrebs eingesetzt wird. Es handelt sich dabei um ein Derivat von

Desoxycytidin, das von der Desoxycytidin-Kinase (dCK) phosphoryliert wird und die dCTP-Synthese hemmt.^[117] Ein weiteres Derivat von Gemcitabin ist 1-(2'-Desoxy-2'-fluorarabino-furanosyl)cytosin (FAC). Es stellt ebenfalls ein Substrat für die dCK dar und könnte durch Markierung mit [¹⁸F]F für den Nachweis der dCK-Aktivität mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) verwendet werden.^[118] Insbesondere bei der Synthese radioaktiver PET-Tracer könnten Mikroreaktoren die Ausbeute, Reinheit und Reaktionszeit verbessern, was zu einer höheren spezifischen Aktivität führen würde.^[119] Eine mögliche Vorstufe für diesen PET-Tracer ist 2-Desoxy-2-fluor-3,5-di-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranosylbromid (**1**), welches mit den neu entwickelten Reaktoren in einem Mehrstufenprozess synthetisiert werden soll.^[120, 121]

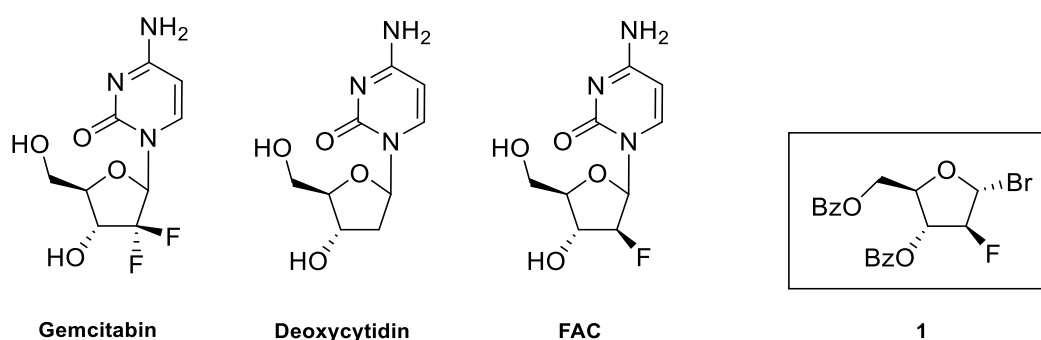
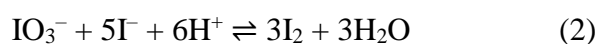
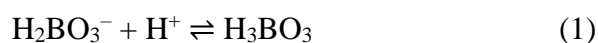


Abbildung 30: Übersicht möglicher Radiotracer ausgehend von 2-Desoxy-2-fluor-3,5-di-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranosylbromid (**1**).

Für die Reaktorentwicklung wird Polypropylen (PP) sowie Polyetheretherketon (PEEK) als Reaktormaterial verwendet. Obwohl PP hohen Temperaturen, chlorierten Lösungsmitteln oder Kohlenwasserstoffen nicht über einen längeren Zeitraum standhalten kann, bietet dieses Material Vorteile in Bezug auf Transparenz, guter Druckbarkeit und Preis. Im Gegensatz dazu zeichnet sich PEEK durch eine ausgezeichnete chemische Beständigkeit gegenüber einer Vielzahl von Chemikalien aus und kann Temperaturen von bis zu 250 °C standhalten.^[112, 113] Für die Untersuchung der Mischeffizienz wurden zunächst diverse Mischgeometrien mithilfe von PP gedruckt und in Villermaux-Dushman (VD)-Experimenten analysiert.^[122] Die VD-Reaktion basiert auf der Konkurrenzreaktion zwischen der sofortigen Neutralisierung von Dihydrogenborat-Anionen (1) und der langsameren Redoxreaktion von Iodat und Iodid zur Bildung von Iod (2):



Für die Durchführung des Villermaux-Dushman (VD)-Experimenten braucht man: i) zwei Spritzenpumpen, ii) einen Reaktor, iii) Kapillaren und Anschlüsse, sowie iv) einen UV-Detektor. Spritze A enthält Protonen in Form von einer verdünnten H_2SO_4 -Lösung ($0.010 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$), Spritze B enthält eine Pufferlösung bestehend aus H_2BO_3^- ($0.030 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$), NaOH ($0.030 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$), KI ($0.011 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$) und KIO_3 ($0.002 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$). Bei idealer Mischung werden alle Protonen der H_2SO_4 -haltigen Lösung durch den Überschuss des Dihydrogenborats verbraucht. Unter schlechten Mischungsbedingungen kommt es nach Verbrauch von H_2BO_3^- zur lokalen Überkonzentration der Säure. Dadurch kann die langsamere Redoxreaktion (2) zur Bildung von I_2 und die sehr schnelle Komproportionierungsreaktion (3) zu I_3^- erfolgen. Triiodid, kann dank UV/VIS-Spektroskopie leicht nachgewiesen werden. Die Absorptionswerte (λ : 353 nm) der jeweiligen Mischer werden in Abhängigkeit zur Durchflussrate in den Segregationsindex (X_S) umgerechnet. Ein X_S -Wert von 0 deutet dabei auf eine perfekte Durchmischung hin, während ein X_S -Wert von 1 keine Durchmischung aufweist.^[123]

Zu Beginn wurde ein Mixer mit geradem Kanal (M1) sowie ein einfacher Zickzackmischer (M2) untersucht. Anschließend wurden komplexere Mischgeometrien, wie einem "Split-and-Recombine"-Mixer (M3), einem Mixer mit gekreuzten Barrieren (M4), einem Mixer mit spiralförmiger Geometrie (M5) sowie einem Mixer mit parallel angeordneten Kreuzen (M6) untersucht.

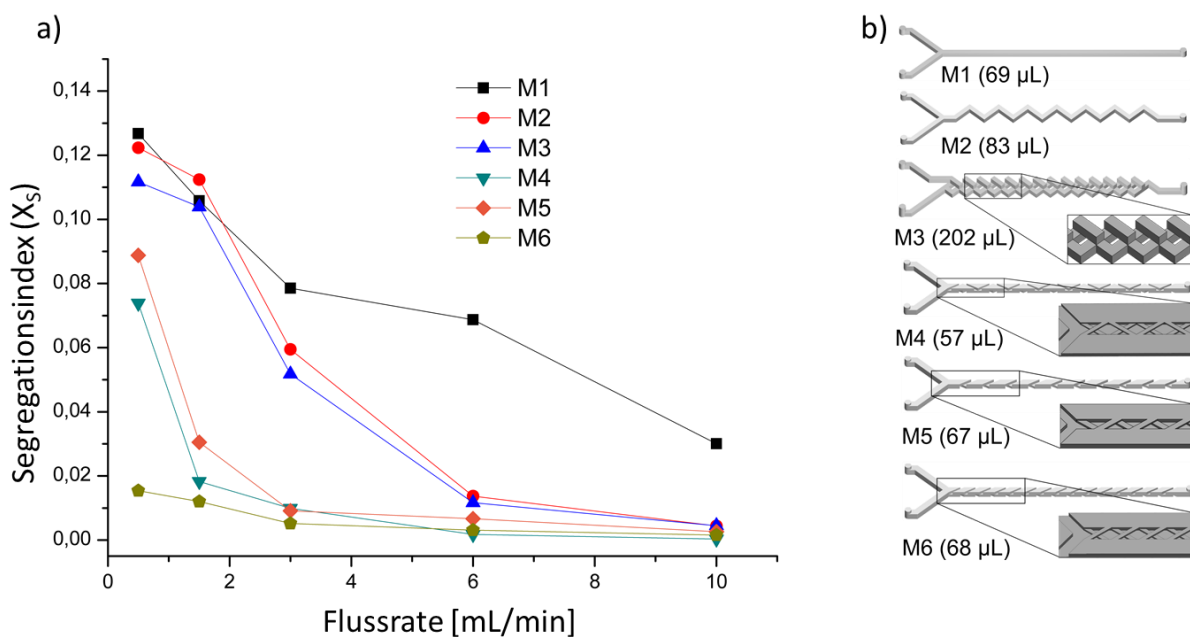


Abbildung 31: Segregationsindex X_S der unterschiedlichen Mixer in Abhängigkeit der Flussrate (a), CAD-Zeichnung der Mischgeometrien der Mixer (b).

Die VD-Experimente zeigen, dass M1 und M2 bei niedrigen Durchflussraten nahezu gleich gut mischen und bei steigender Durchflussrate eine verbesserte Mischleistung für die Zickzack-Geometrie auftritt. Überraschenderweise zeigt M3 im Vergleich zu M4, M5 und M6 relativ schlechte Ergebnisse. In einem Experiment mit einer Farbstofflösung wurde festgestellt, dass nicht alle Kanalbereiche von M3 gleichermaßen gefüllt wurden. Ein möglicher Grund hierfür könnten Ungenauigkeiten im Produktionsprozess sowie eine ungünstige Druckgeometrie sein. Insbesondere bei niedrigen Durchflussraten wird die Reaktionslösung durch die Mischelemente nicht geteilt und folgt dem Weg des kleinsten Widerstandes. Die Mixer M4 bis M6 zeigen eine deutlich verbesserte Mischleistung im Vergleich zu M1 bis M3, insbesondere bei Durchflussraten von 1.5 bis 3 mL/min. Bei einer Durchflussrate von 0.5 mL/min zeigen die VD-Experimente eine wesentlich höhere Mischeffizienz für M6 verglichen zu M4 und M5. Anhand dieser Ergebnisse wird M6 als optimale druckbare Mischgeometrie angesehen. Neben der Geometrie der Mischkammern hat auch die Kanalbreite Einfluss auf die Mischeffizienz. Versuche haben gezeigt, dass eine Kanalbreite von 1.6 mm optimal für die gewählte Reaktorgeometrie ist. Durch die Fehlertoleranz des 3D-Druckers konnten kleinere Kanaldurchmesser mit Mischelementen nicht reproduzierbar gedruckt werden. Es kam wiederholt zur Blockade des Reaktors. Bei größerer Kanalbreite nahm die Mischeffizienz ab. Die Reaktoren aller folgenden Versuche wurden deshalb mit Reaktordesign M6 und einer Kanalbreite von 1.6 mm durchgeführt.

Wie bereits erwähnt, sollte nun für 2-Desoxy-2-fluor-3,5-di-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranosylbromid (**1**) ein Mehrstufenprozess entwickelt werden. Bei der ersten Reaktion handelt es sich um die Fluorierungsreaktion von 1,3,5-Tri-*O*-benzoyl- α -D-ribofuranose (**2**) mit Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST). Die Fluorierung wurde bei vier Temperaturen (zwischen 60 und 90 °C) und vier verschiedenen Reaktionszeiten (3 bis 15 Minuten) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 33** dargestellt.

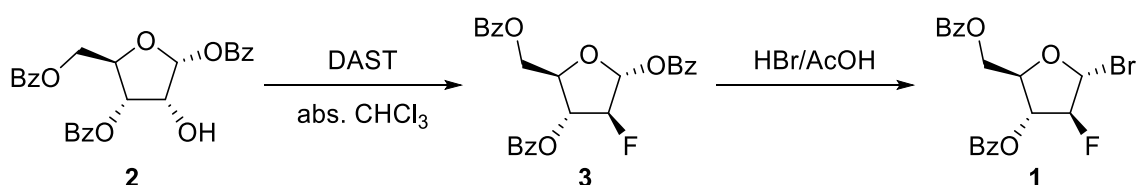


Abbildung 32: Syntheseroute für 1-Brom-2-fluor-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranose (**1**)

Allgemein verläuft die Fluorierung bei höheren Temperaturen wesentlich schneller ab. Bei 90 °C und einer Reaktionszeit von 15 Minuten konnte ein Umsatz von 99% beobachtet werden.

Der Umsatz wurde über HPLC-Messungen ermittelt, wobei zuvor stoffspezifische Kalibrierungsfunktionen erstellt wurden.

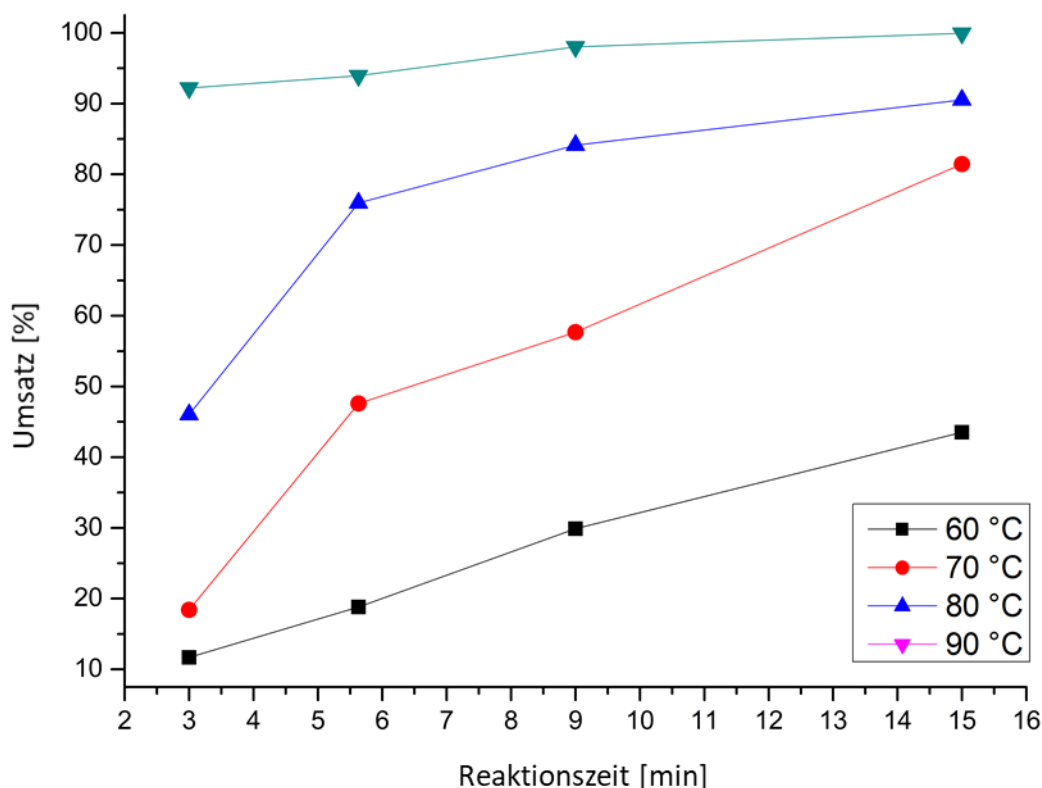


Abbildung 33: Umsatz zu 2-Desoxy-2-fluor-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranose (**3**).

Die anschließende Bromierung wurde zunächst bei 55 °C mit unterschiedlichen HBr-Verhältnissen (10 eq. und 25 eq.) sowie drei verschiedenen Reaktionszeiten (5, 10 und 20 Minuten) durchgeführt. Die besten Ergebnisse für die Bromierung wurden zwischen 10 und 20 Minuten mit 25 Äquivalenten HBr (>99% Umsatz) erzielt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein mehrstufiger Prozess für 2-Desoxy-2-fluor-3,5-di-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranosylbromid (**1**) entwickelt. Da die Temperatur den Siedepunkt von Chloroform überschritt, wurde der BPR auf einen Druck von 3 bar eingestellt.

Das System für die Mehrstufensynthese besteht aus drei Reaktoren. Im ersten findet die Fluorierung statt, im zweiten die darauffolgende Bromierung. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in einem dritten Reaktor mit Wasser gewaschen und somit die Reaktion beendet. Die organische und die wässrige Phase wurden durch einen Membranseparator voneinander getrennt. Trotz der vorangegangenen Optimierungen konnte in den HPLC-Messungen Reste von 2-Desoxy-2-fluor-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranose (**3**)

nachgewiesen werden. Die Bromierung im Gesamtprozess schien nicht wie erwartet quantitativ abzulaufen. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde die Reaktionstemperatur der Bromierung auf 75 °C erhöht. Mit dieser Optimierung konnte ein Umsatz von >99% und einer Ausbeute von 79% (isoliert) des gewünschten Produktes 1-Brom-2-fluor-1,3,5-tri-*O*-benzoyl-D-arabinofuranose (**1**) erzielt werden.

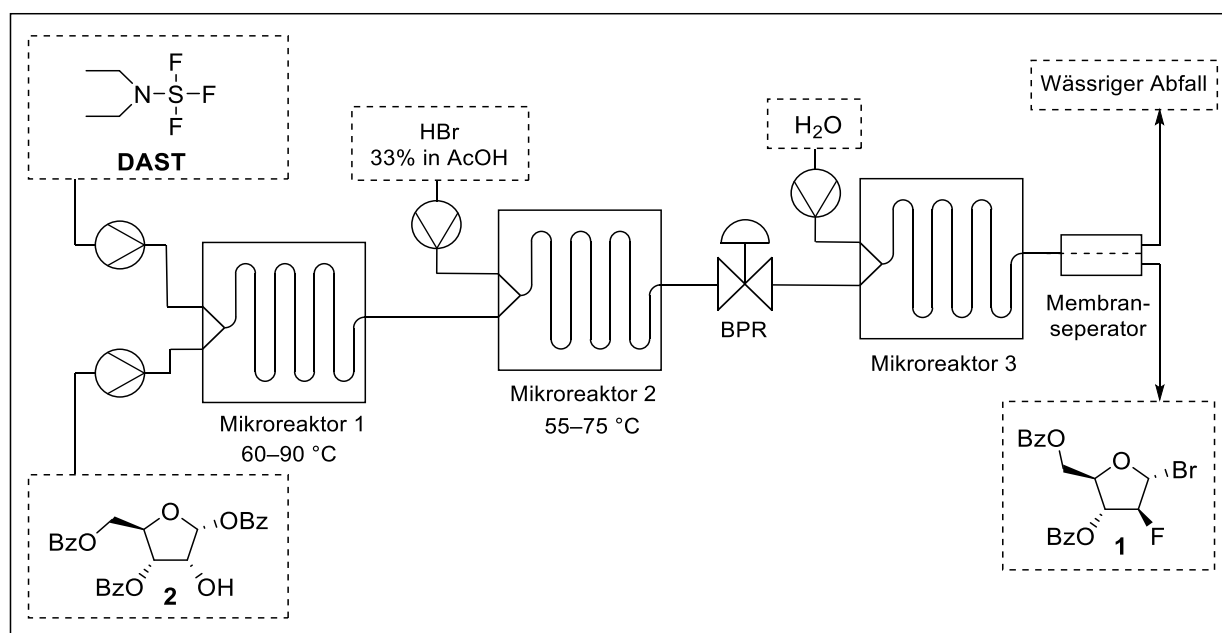


Abbildung 34: Schematische Darstellung des Flowprozesses für 1-Brom-2-fluor-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranose (**1**).

Paper 2

FOMSy: 3D-printed flexible open-source microfluidic system and flow synthesis of PET-tracer

Inhalt: Dieses Projekt präsentiert ein kostengünstiges Open-Source-Flow-System, welches eine Doppelspritzenpumpe mit separatem Drucksensor sowie eine verbesserte Version unseres zuvor vorgestellten Gegendruckreglers beinhaltet. Das gesamte System kann für etwa 500 € nachgebaut werden. Im Vergleich dazu kosten kommerziell erhältliche Flow-Systeme oft über 10.000 €. Diese hohen Einstiegskosten machen diese Technologie für viele Forschungsgruppen finanziell unzugänglich. Ein kostengünstiges und zuverlässiges Setup könnte die Etablierung dieser effizienten Synthesemethode erheblich vorantreiben. Ein potenzielles, vielversprechendes Anwendungsgebiet für Flow-Chemie bietet die Radiochemie. Aufgrund der benötigten Bleiabschirmung ist hierbei der Platz für ein System stark begrenzt. Handelsübliche Flow-Systeme sind in der Regel recht groß und unhandlich. Ein kompaktes und anpassbares System ist für diese Art der Anwendung von immensem Vorteil. Unser kompaktes 3D-gedrucktes System erfüllt all diese Anforderungen. Als *Proof of Concept* haben wir mit dem von uns vorgestellten Flow-System die Synthese von 2-[¹⁸F]Fluor-2-deoxy-D-glucose ([¹⁸F]FDG), dem am häufigsten verwendeten PET-Tracer, automatisiert und optimiert.

Ergebnisse und Diskussion:

Das vorgestellte System besteht aus einer Doppelspritzenpumpe, einem Gegendruckregler (BPR) und einem Drucksensor (PS). Durch die Integration unserer zuvor veröffentlichten 3D-gedruckten Mikroreaktoren kann das System so konfiguriert werden, dass es entscheidende radiosynthetische Schritte wie Fluorierung, Verdünnung, SPE-Trapping (*solid phase extraction*, SPE), Entschützung und SPE-Elution automatisiert durchführt. Dies ermöglicht eine platzsparende Herstellung einer breiten Palette von Tracern und prosthetischen Radioliganden mit hoher molarer Aktivität in kurzer Zeit.

Die vorgestellte Spritzenpumpe besteht aus zwei separat steuerbaren Spritzenkanälen. Durch die Verwendung von Spritzen als Lösungsmittelreservoir lässt sich ein breites Spektrum von

Fließgeschwindigkeiten (abhängig von der Wahl der Spritze) zuverlässig einstellen. Fast alle Komponenten, abgesehen von der Elektronik und den mechanischen Teilen, wie Schrauben und Stangen, wurden im 3D-Druckverfahren hergestellt.

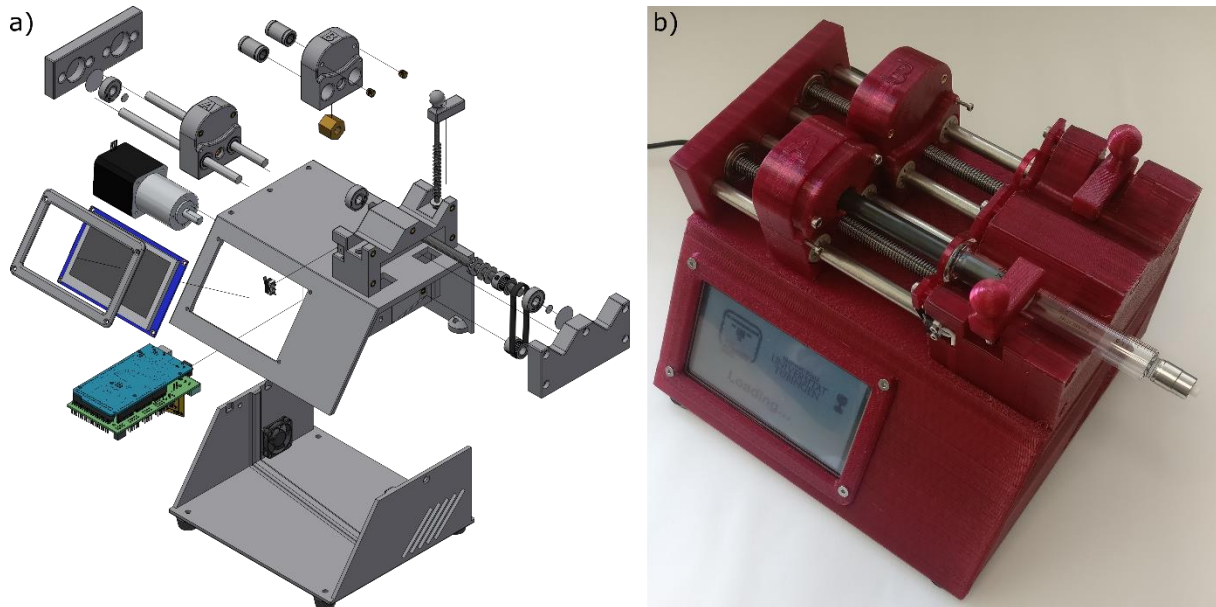


Abbildung 35: CAD-Explosions-Zeichnung der Spritzenpumpe (a) und Fotografie der montierten Spritzenpumpe (b).

Die übliche Ausstattung für mehrstufige Durchflussreaktionen umfasst, neben Pumpe und Reaktor, einen Drucksensor sowie einen Druckregulator. Die Kontrolle des Systemdrucks spielt eine entscheidende Rolle in der Durchfluschemie. Durch einen erhöhten Innendruck können Lösungsmittel über ihren Siedepunkt hinaus erhitzt werden, was zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit führen kann.^[124] Zudem kann die Bildung von Gasen flüchtiger Stoffe während der Reaktion verhindert werden, was zu einer Unregelmäßigkeit in der Flussrate führen würde. Auch diese Komponenten wurden entwickelt und sollen kurz vorgestellt werden.

Das Funktionsprinzip des Drucksensors basiert auf der Widerstandsänderung eines kraftsensitiven Widerstandes (*force sensing resistor*, FSR). Unterschiedliche Drücke ergeben unterschiedliche Signalpunkte. Mit Hilfe eines Manometers konnte somit eine Kalibriergerade mit entsprechender Gleichung erstellt werden. Während des Betriebs der Pumpe erfolgt die Berechnung des Drucks über einen Arduino Mega. Der Kanal im 3D-gedruckten Teil ist geöffnet, um einen Hohlraum zu schaffen, der den Druck des Systems auf den FSR überträgt. Dieser Hohlraum wird mit einer PTFE-Scheibe abgedichtet. Um den Kontakt mit Lösemittel zu vermeiden und den Druck auf den FSR dämpfen wurden verschiedene Kombinationen von

Silikon- und PTFE-Scheiben getestet. Für Drücke zwischen 1–10 bar, bewährte sich die Kombination aus einer 1mm dicken Silikon und einer 0.1 mm dicken PTFE-Scheibe.

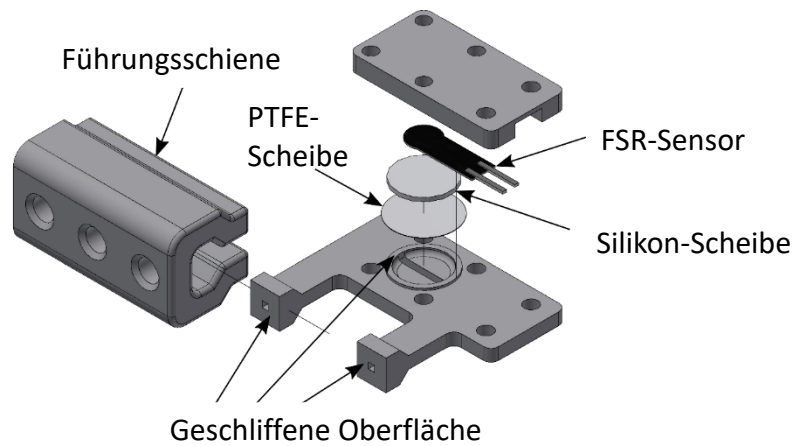


Abbildung 36: CAD-Explosions-Zeichnung des Drucksensors.

In der vorangegangenen Publikation haben wir ein federbasierten BPR vorgestellt. Es gelang uns eine neue Version mit integriertem 12 V-Getriebemotor zu entwickeln. Die Steuerung des Gegendrucks über den Motor ermöglicht eine automatisierte Druckeinstellung, insbesondere wenn der BPR während des Experiments unzugänglich ist. Dies ist beispielsweise der Fall, bei Verwendung in Blei abgeschirmten *hotcells*.

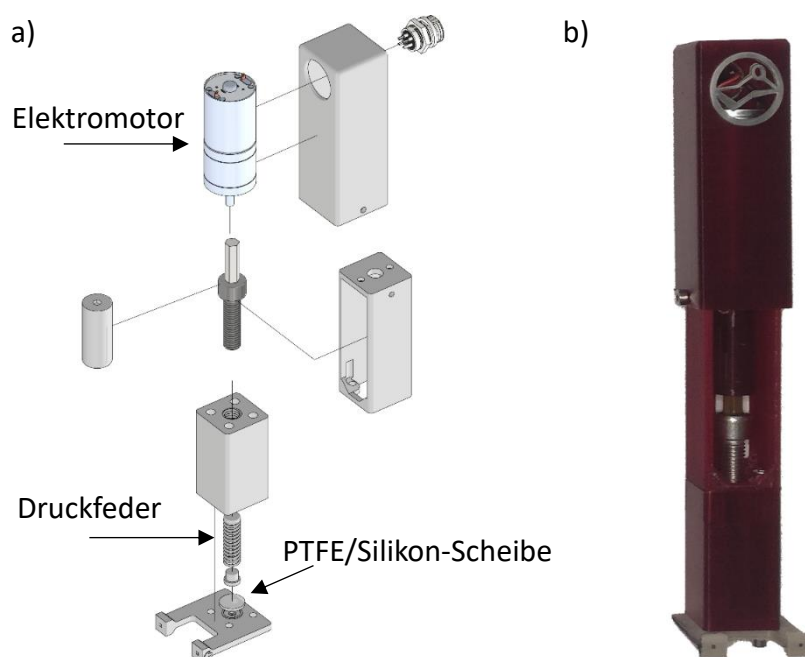


Abbildung 37: CAD-Explosions-Zeichnung des BPR (a) und Fotografie des BPR (b).

Der eingestellte Druck wird dabei live über ein Display visualisiert und kann flexibel kontrolliert werden. Für unsere Anwendungen wurden alle lösungsmittelberührenden Teile aus PEEK hergestellt. Mit dem vorgestellten Equipment war es möglich, zuverlässig Drücke bis zu 10 bar zu generieren, zu visualisieren und zu kontrollieren.

Für die Prozessentwicklung des diagnostischen Radiopharmaka [^{18}F]FDG wurde besonderes auf folgende Punkte Wert gelegt:

- 1) Reaktionszeit: Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des ^{18}F -Isotops (109.7 min) sollte die Gesamtreaktionszeit, einschließlich aller Aufreinigungsschritte, so kurz wie möglich sein.
- 2) Strahlenschutz: Die Handhabung von radioaktivem Material sollte höchsten Sicherheitsstandards genügen.
- 3) Effizienz und Reproduzierbarkeit: Die Reaktion soll effizient und reproduzierbar sein. Die Produktion von radioaktiven und chemischen Nebenprodukten sollte auf ein Minimum reduziert werden, um zeitaufwändige Reinigungsschritte wie Festphasenextraktion (SPE) oder präparative HPLC zu vermeiden.

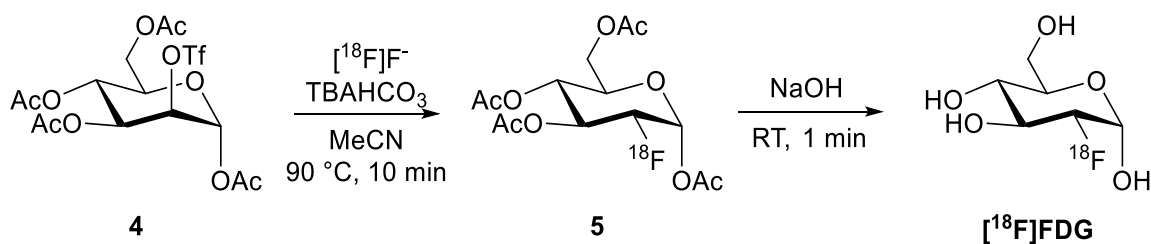


Abbildung 38: Syntheseroute von [^{18}F]FDG.

Der gängigste radiosynthetischer Weg zur Herstellung von [^{18}F]FDG erfolgt durch die nukleophile $\text{S}_{\text{N}}2$ -Substitution von Tetra-*O*-acetylmannosyltriflat (**4**), gefolgt von einer Immobilisierung mittels C18-SPE, einer Basenhydrolyse und anschließender Elution. Oft wird eine Aluminiumoxid-SPE-Kartusche vorangeschaltet, um chemische Verunreinigungen wie [^{18}F]Fluorid, Tetrabutylammoniumhydrogencarbonat (TBAHCO_3) und Kryptofix 222 zu entfernen. Die Synthese von [^{18}F]FDG für den klinischen Einsatz mit handelsüblichen vollautomatischen Synthesemaschinen dauert üblicherweise über 30 Minuten und erreicht eine radiochemische Reinheit (*radiochemical purity*, RCP) von etwa 95%.^[125]

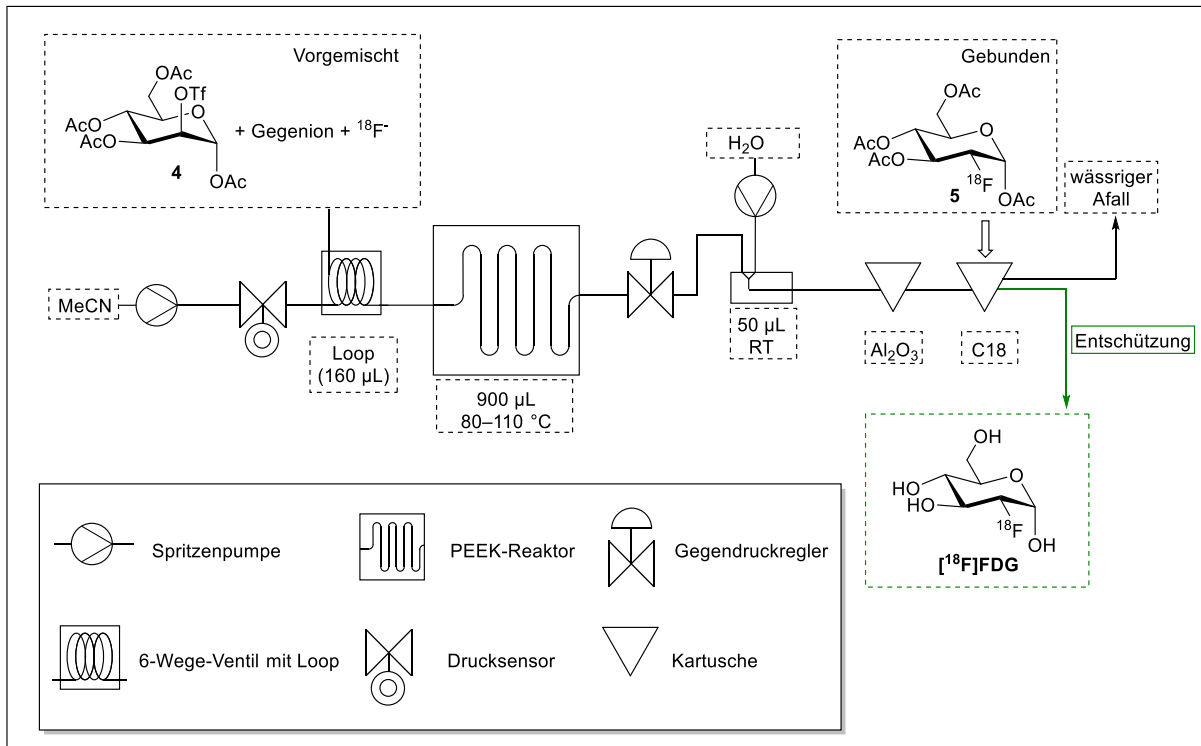


Abbildung 39: Schematische Darstellung des Flowprozesses für $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$

Für unseren Prozess wurde $[^{18}\text{F}]\text{HF}$ in Form einer wässrigen Lösung in einem Zyklotron generiert und anschließend mittels eines vorab behandelten Ionenaustauschers konzentriert. Die darauffolgende Elution erfolgte mit einer Lösung aus Acetonitril (MeCN) und TBA-Hydrogencarbonat. Die resultierende Reaktionslösung wurde mehrmals azeotrop mit abs. MeCN bei 100 $^\circ\text{C}$ getrocknet. Das trockene $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ wurde daraufhin in einer Lösung aus abs. MeCN, Kryptofix 222 und KHCO_3 gelöst, und diente als Fluorierungsmittel. Das Flowsystem für $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ besteht aus der vorgestellten Spritzenpumpe, einem 6-Wege-Ventil mit integrierter PEEK-Loop (160 μL), dem Drucksensor, dem Druckregler, zwei PEEK-Reaktoren (900 μL und 50 μL) sowie zwei Kartuschen (SEP-Pak Alumina N und Sep-Pak Plus Light C18). Trockenes Acetonitril diente als Lösungs-/Laufmittel und wurde kontinuierlich aus einer 10 mL Spritze gefördert. Durch die Verwendung eines 6-Wege-Ventils kann der Druck im System auch unter kontinuierlichem Durchfluss konstant gehalten werden. Der Systemdruck wurde auf 2.5 bar eingestellt. Zur Vorbereitung des Reaktionsgemisches wurden 100 μL der $[^{18}\text{F}]\text{Fluoridlösung}$ mit 60 μL acetyliertem Mannosetriflat (1 mg/0.1 mL abs. MeCN) vorgemischt und mit Hilfe des 6-Wege-Ventils in den laufenden Prozess injiziert. Für die Prozessentwicklung von $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ wurde die Reaktionszeit (5, 10 und 15 min) sowie die Reaktionstemperatur (80, 90, 100 und 110 $^\circ\text{C}$) variiert, analysiert und mit den Ergebnissen aus

dem Batch-Verfahren verglichen. Jeder Zustand wurde durch Radio-DC und HPLC-Messungen quantifiziert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Tabelle 4: Radiochemische Ausbeute [^{18}F]FDG; Batch vs. Flow

Temperatur [°C]	Reaktionszeit [min]	RCY Batch	RCY Flow
80	5	27.1%	25.2%
	10	31.2%	29.2%
	15	33.8%	30.1%
90	5	45.9%	37.2%
	10	52.3% ± 1.9% (n=4)	47.6% ± 1.2% (n=5)
	15	55.8%	48.1%
100	5	38.2%	28.1%
	10	45.6%	38.4%
	15	47.9%	39.1%
110	5	22.5%	15.2%
	10	20.2%	13.2%
	15	16.5%	9.2%

Bei Temperaturen über 100 °C konnte eine Zersetzung des Precursor beobachtet werden. Bei Temperaturen unter 90 °C ist die radiochemische Ausbeute signifikant niedriger. Obwohl bei einer Reaktionszeit von 15 min eine etwas bessere RCY (*radiochemical yield*) erzielt wurde, ist diese Abweichung dem Fehlerbereich der Analysenmethode zu verschulden. Sowohl unter Batch- als auch unter Flow-Bedingungen konnte eine optimale Temperatur von 90 °C bei einer Reaktionszeit von 10 min ermittelt werden. Um statistische Aussagen zu ermöglichen, wurden diese Reaktionsbedingung wiederholt durchgeführt. Für die Batch-Synthese konnte ein RCY von 52.3% ± 1.9% (n=4) ermittelt werden. Für das Flow-System beträgt die RCY 47.6% ± 1.2% (n=5). Beide RCYs liegen in einem ähnlichen Bereich. Auffällig ist, dass unter Flowbedingungen deutlich weniger radioaktive Nebenprodukte entstehen. Dies stellt einen bemerkenswerten Vorteil gegenüber der Batchsynthese dar, da bei ausreichend hoher radiochemischer Reinheit kein aufwändiger HPLC-Reinigungsschritt nötig wäre, was sich wiederum positiv auf die Syntheszeit auswirkt.

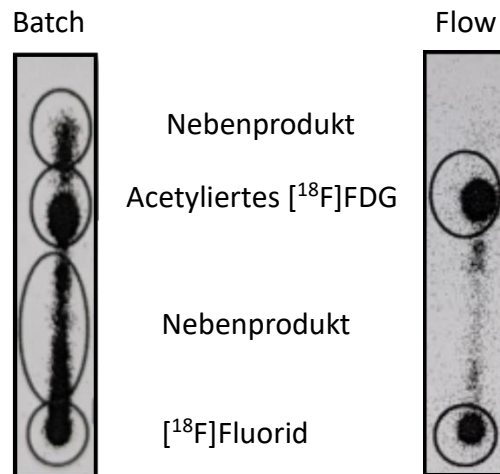


Abbildung 40: Radiochemische Reinheit; Batch vs. Flow.

Ein weiterer Vorteil des Flow-Systems besteht darin, dass die Reinigung und Entschützung automatisch in den Prozess integriert werden konnte. Hierzu wurde die Reaktionslösung zehnfach mit Wasser verdünnt und durch eine Sep-Pak-Aluminiumoxid-Kartusche geleitet, was zur Entfernung unerwünschter polarer Verunreinigungen wie $[^{18}\text{F}]$ Fluorid führte. Das acetylierte Zwischenprodukt konnte im Anschluss auf einer C18-SPE-Kartusche gebunden werden. Dabei hat sich gezeigt, dass eine Mischung von 1:9, MeCN : H_2O notwendig ist. Bereits bei einer Mischung von 1.5: 8.5, MeCN : H_2O wurde das acetylierte Zwischenprodukt nicht mehr zuverlässig auf der C18-Kartusche immobilisiert. Zur Überprüfung der Reinigungsqualität wurde das acetylierte $[^{18}\text{F}]$ FDG mit Ethanol von der C18-SPE-Kartusche eluiert und mittels Radio-DC und HPLC untersucht. Die Analysen ergaben dabei eine RCP von $99.1\% \pm 0.7\%$ ($n=5$). Im Vergleich dazu wurde die Aufreinigung der Batch-Synthese manuell durchgeführt, wobei eine RCP von $93.5\% \pm 1.4\%$ ($n=4$) erzielt werden konnte. Wie erwartet, war die Reinigung von $[^{18}\text{F}]$ FDG aus der Flow-Synthese aufgrund der geringeren Bildung von Nebenprodukten einfacher und effizienter. Die Entschützung wurde in beiden Fällen manuell durchgeführt und mittels radioaktiver DC quantifiziert. Die Gesamtzeit für die halbautomatische Radiofluorierung sowie die Immobilisierung des acetylierten Zwischenprodukts auf der C18-SPE-Kartusche betrug 14 Minuten. Die manuelle Entschützung mit wässriger NaOH benötigte eine zusätzliche Minute. $[^{18}\text{F}]$ FDG konnte somit in nur 15 Minuten und einer RCP von über 99% hergestellt werden.

Paper 3

Open-source Flow Setup for Rapid and Efficient [^{18}F]Fluoride Drying for Automation of PET Tracer

Inhalt: Eine essenzielle Strategie im Umgang mit Radioaktivität besteht in der Automatisierung von Syntheseprozessen. Unnötige, manuelle Eingriffe sollen minimiert und die Strahlenbelastung des Laborpersonals reduziert werden. Gleichzeitig trägt dies auch zur Reproduzierbarkeit der Synthesen bei. Vor allem die Trocknung des nukleophilen [^{18}F]Fluorids und die anschließende Synthese damit stellt radiochemische Forschungseinrichtungen alltäglich vor eine Herausforderung. Aus diesem Grund stellen wir ein voll automatisiertes Modul zur schnellen und effektiven Trocknung von wässrigem [^{18}F]Fluorid vor, welches direkt an das Zyklotron angeschlossen werden kann. Das Verfahren basiert dabei auf der Darstellung von [^{18}F]Triflylfluorid, und ermöglicht innerhalb 10 Minuten nukleophiles [^{18}F]Fluorid, abgeschirmt in einer *hotcell* zu generieren und wieder zu binden. In Kombination damit haben wir Flowprozesse der prosthetischen Liganden [^{18}F]Fluorethyltosylat (FETOTs) und [^{18}F]Fluorethyltriflat (FETOTf) entwickelt. Diese Liganden genießen als Fluorierungsmittel hohe Beliebtheit in radiochemischen Synthesen. Als *Proof of Concept* und um die Funktionsweise dieser prosthetischen Liganden zu testen, wurden Modellmoleküle mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen markiert und miteinander verglichen.

Ergebnisse und Diskussion:

Trocknungsmodul

Eine der kritischsten und wichtigsten Schritte der nukleophilen Radiofluorierung besteht in der Trocknung bzw. der Vorbereitung des [^{18}F]Fluor-Isotops, welches vom Zyklotron in Form von wässrigem [^{18}F]HF produziert wird. Wasser bildet eine starke Solvathülle um das radioaktive Isotop und fungiert selbst als Nukleophil. Aus diesem Grund muss es restlos entfernt werden. In der Regel geschieht dies manuell über eine azeotrope Trocknung mittels trockenen Acetonitrils und nimmt etwa 15 und 25 Minuten in Anspruch.^[71, 126] Bei diesem Vorgang ist

eine wiederholte, manuelle Zugabe von Acetonitril erforderlich. Während der Trocknung bei 100 °C wird zusätzlich ein Argonstrom in den Glasreaktor gelegt, was den Prozess des Abdampfens erheblich beschleunigt. Der Anwender ist dadurch einer unnötig hohen Strahlendosis ausgesetzt. Die kürzlich veröffentlichte Methode von Pees *et al.* bietet eine Alternative.^[127] Beruhend auf der Generierung von gasförmigen [¹⁸F]Triflylfluorid (**7**), welches durch geeignete Trocknungsmedien geleitet und anschließend in Gegenwart einer Base in nukleophiles [¹⁸F]Fluorid zersetzt wird, kommt dieses Verfahren ohne azeotrope Trocknung aus. Die Synthese von [¹⁸F]Triflylfluorid (**7**) erfolgt aus Phenyltriflimid (**6**) mit wässrigem [¹⁸F]F⁻ in DMF bei 50 °C.^[128]

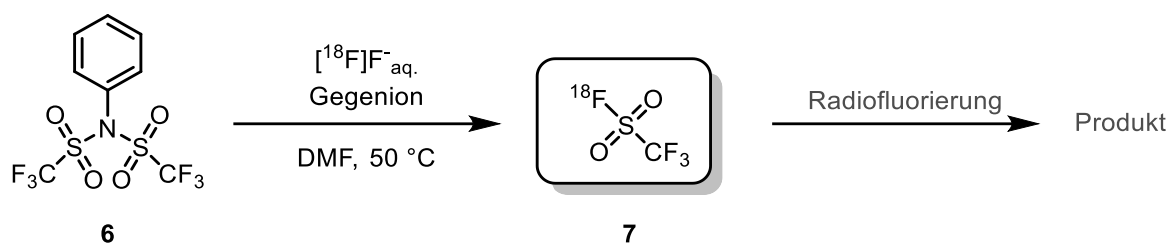


Abbildung 41: Syntheseroute von [¹⁸F]Triflylfluorid.^[127]

Im Vergleich zur herkömmlichen azeotropen Trocknung bietet dieser Ansatz mehrere Vorteile. Das Verfahren ist äußerst schnell und die Erzeugung von [¹⁸F]Triflylfluorid (**7**) toleriert einen Wassergehalt von bis zu 30%.^[79, 129]

Um ein manuelles Eingreifen zu vermeiden, wurde ein vollautomatisiertes Modul entwickelt. Es kann dabei sicher, vor der Zufuhr des wässrigen [¹⁸F]HF, vorbereitet und von außerhalb der *hotcell* gesteuert werden. Es wurde dabei so konfiguriert, dass es sowohl als eigenständiges Modul für anschließend manuell durchgeführte Synthesen verwendet werden kann als auch in Verbindung mit einem voll automatisierten Synthesemodul. Durch diese flexible Einsatzmöglichkeit können beispielsweise ¹¹C-Synthesemodule, welche aufgrund der fehlenden Möglichkeit [¹⁸F]HF zu trocknen, keine ¹⁸F-Synthesen durchführen können so modifiziert werden, dass dies möglich ist.

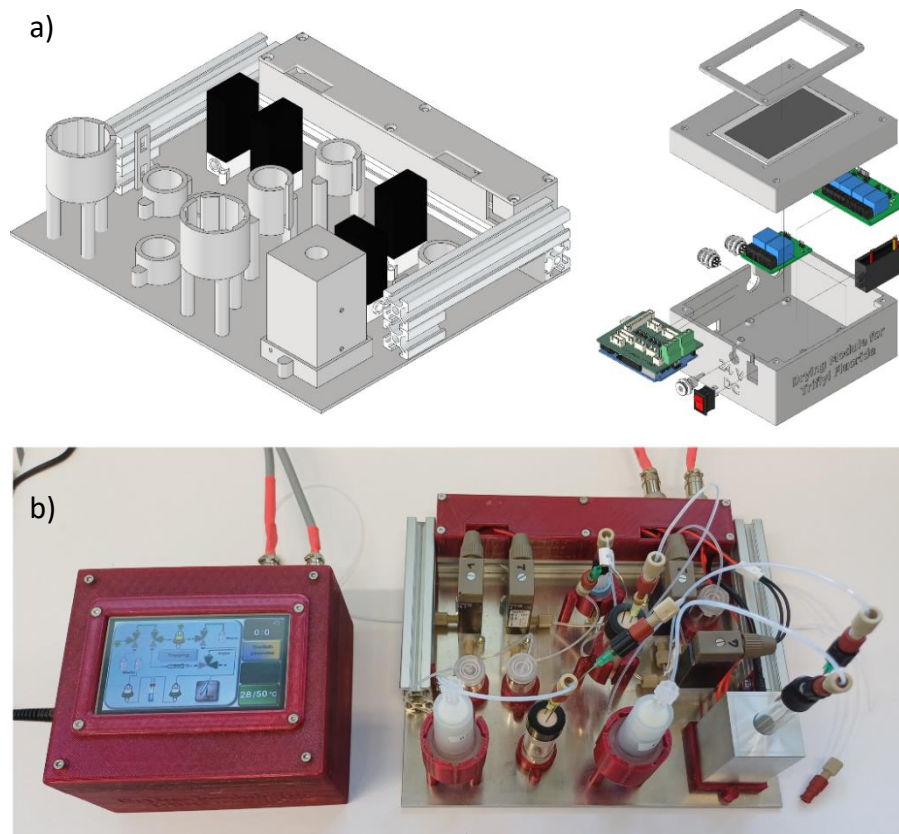


Abbildung 42: CAD-Zeichnung (a) und Fotografie des Trocknungsmoduls mit Steuereinheit (b).

Um die Steuerung zu erleichtern, wurde ein vorprogrammiertes Trocknungsprogramm für $[^{18}\text{F}]$ Triflylfluorid (7) entwickelt, welches mit einem Touchpad kontrolliert wird. Das Programm umfasst zwei vordefinierte Zyklen zur Steuerung des Gasflusses. Mit dem "Switch process"-Feld können beide Kreisläufe, ohne weitere manuelle Interaktion, simultan gewechselt werden.

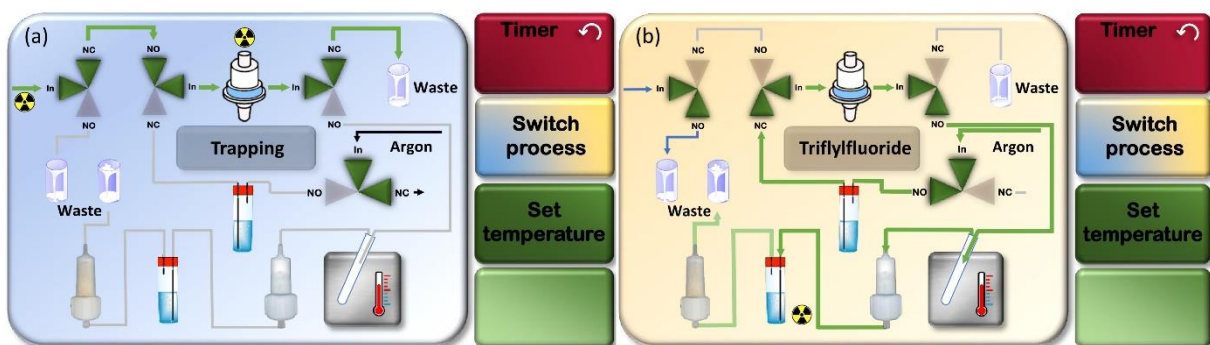


Abbildung 43: Graphische Benutzeroberfläche des Bindungsprozesses (a) und des Syntheseprozesses (b) für $[^{18}\text{F}]$ Triflylfluorid (7).

Für das Trocknungsverfahren wird wässriges [^{18}F]Fluorid auf einer QMA-Kartusche immobilisiert und anschließend mit KHSO_4 in einen mit Phenyltriflimid (**6**) befüllten, beheizten Glasreaktor eluiert. Über eine Transferleitung wird das [^{18}F]Triflylfluorid/Argon-Gasgemisch über eine mit P_4O_{10} und MgSO_4 gefüllte Trocknungskartusche geleitet und in ein V-Vial mit geeigneter basischer Lösung überführt. Nach 10 Minuten konnte mit dem vorgestellten Modul wasserfreies [^{18}F]Fluorid mit einer Effizienz von $91.7\% \pm 1.6\%$ ($n=5$, basische Lösung: KHCO_3 /Kryptofix 222) zurückgewonnen werden. Die Experimente wurden mit Radioaktivitäten von 2–25 GBq durchgeführt.

Prosthetische Liganden

Eine verbreitete Strategie bei der Entwicklung von PET-Tracern besteht in der Verwendung von ^{18}F -fluorierten prosthetischen Liganden, die für die späte Markierung geeigneter Precursor dienen. Die Komplexität dieser Synthesen, die Automatisierung sowie die Integration dieses zusätzlichen Syntheseschrittes ist, aufgrund der begrenzten Anzahl an Reaktoreinheiten, in automatisierte Synthesemodulen sehr schwierig. Da die Anzahl erhältlicher Radiosynthesemodule sehr begrenzt ist, ist jeder Anwender gezwungen, ein maßgeschneidertes System zu entwickeln, um den gewünschten radiofluorierten prosthetischen Liganden in den Routineanwendungen zu implementieren.^[130-132] [^{18}F]Fluorethyltosylat ([^{18}F]FEtOTs, **9**) zählt zu den am häufigsten verwendeten prosthetischen Gruppen und wurde bereits erfolgreich für die Fluorethylierung vieler bekannter Radiotracer eingesetzt.^[71, 133]

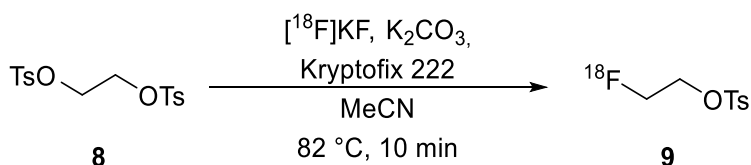


Abbildung 44: Synthese von [^{18}F]Fluorethyltosylat (**9**).

Trotz seiner weiten Verbreitung ist die Reaktivität von [^{18}F]FEtOTs (**9**) manchmal nicht ausreichend.^[77] Insbesondere bei der Markierung von schwachen Nukleophilen wie Thiolen oder Carbonsäuren sowie deaktivierten aromatischen Aminen können Schwierigkeiten auftreten. Als Alternative dazu wurde [^{18}F]Fluorethyltriflat ([^{18}F]FEtOTf, **12**) als effizienter Ligand für schnelle Fluorethylierungen im Spätstadium vorgeschlagen.^[79]

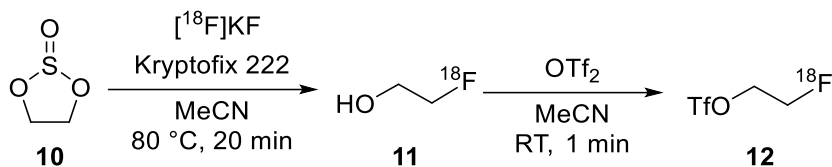


Abbildung 45: Synthese von $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltriflat (**12**).

$[^{18}\text{F}]$ FEtOTf (**12**) kann leicht aus 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluorethanol (**11**) gebildet werden, das wiederum aus der direkten Fluorierung von handelsüblichem Ethylensulfit gewonnen wird.^[73, 134] Für beide Fluoralkylierungsliganden konnten Flowprozesse unter Verwendung des bereits vorgestellten Flowsystems (FOMSy) entwickelt werden.

$[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat

Die Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat (FEtOTs, **9**) erfolgt aus Ethylenglykol-bis-*p*-toluolsulfonat (**8**) in MeCN. Für die Optimierung des Flowprozesses wurden Reaktionstemperaturen zwischen 75–130 °C und Reaktionszeiten von 3 bis 15 Minuten untersucht. Aliquote des getrockneten Fluorids, vorgemischt mit dem Precursor, wurden als Reaktionsgemisch mit Hilfe eines 6-Wege-Ventil in den laufenden Prozess injiziert. Das Setup besteht aus zwei Spritzenpumpen, einem 6-Wege-Ventil mit Loop, einem Drucksensor, einem Druckregulator, zwei Reaktoren, einem 0.45 µm Filter und einer C18 SPE Kartusche.

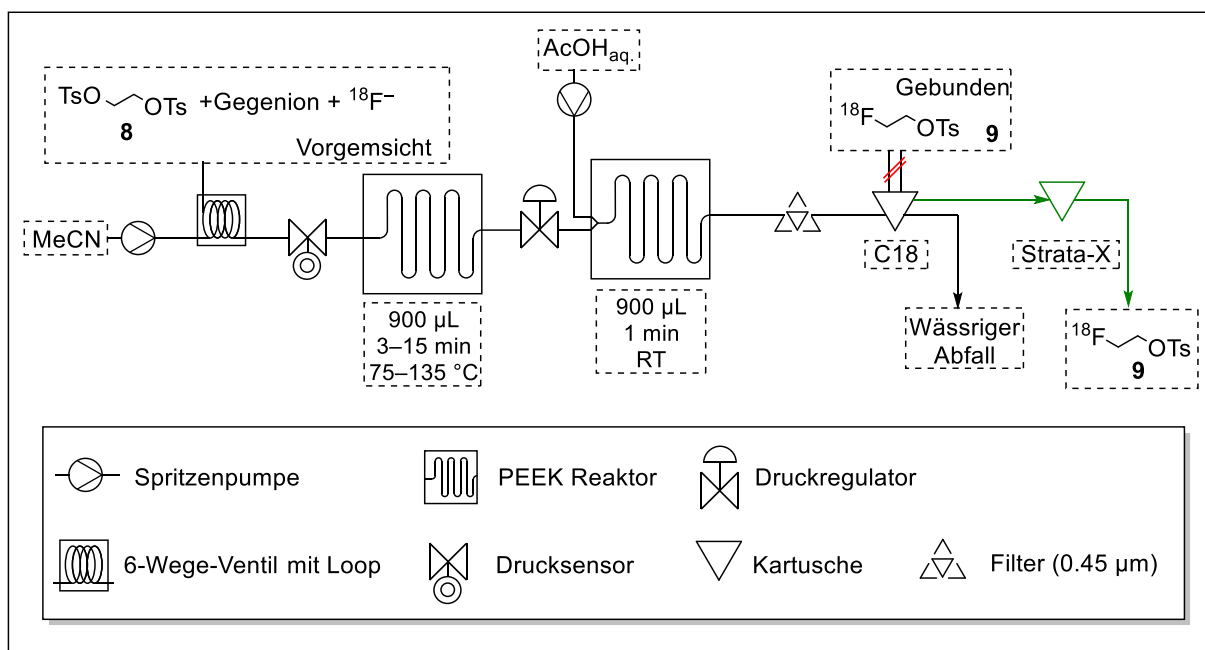


Abbildung 46: Schematische Darstellung des Flowprozesses von $[^{18}\text{F}]$ Fluorethyltosylat (**9**).

Der Druck im System wurde auf 3 bar eingestellt. Bis auf die SPE-Elution wurden alle Reaktionsschritte unter Flowbedingungen durchgeführt. Um restliches nicht umgesetzt

Ethylenglykol-bis-*p*-toluolsulfonat (**8**) zu entfernen, nutzt man die schlechte Wasserlöslichkeit dessen. Aus diesem Grund erfolgte im Anschluss der Reaktion im ersten Reaktor ein Verdünnungsschritt in einem zweiten Reaktor mit einer 12 mM Essigsäurelösung. Eine sechsfache Verdünnung und eine einminütige Reaktionszeit waren ausreichend nicht umgesetztes Ethylenglykol-bis-*p*-toluolsulfonat ausfallen zu lassen und mit einem 0.45 µm-Filter zu entfernen. [¹⁸F]FEtOTs konnte daraufhin direkt auf einer C18-SPE-Kartusche immobilisiert werden. Zur Aufarbeitung wurde [¹⁸F]FEtOTs mit einer Lösung von 35% Methanol in Wasser eluiert, auf einer Strata-X-SPE-Kartusche immobilisiert und mit Druckluft getrocknet. Dieser Schritt dient zur Entfernung von restlichem Wasser und ist essenziell, bevor [¹⁸F]FEtOTs mit trockenem Acetonitril für nachfolgende Reaktionen von der Strata-X-SPE-Kartusche eluiert wird.

Die besten Ergebnisse konnten bei einer Reaktionszeit von 5 min und 90 °C erzielt werden. Die Gesamtsynthesezeit betrug 8 Minuten und erzielte eine radiochemische Ausbeute (RCY) von 53.6% ± 5.2% (n=9). Im Vergleich zur Batch-Synthese wurden keine signifikanten Verbesserungen festgestellt (RCY: 53.7% ± 4.9%, n=3). Obwohl die Implementierung und Automatisierung der erforderlichen C18-SPE-Immobilisierung im mikrofluidischen System zwar technisch möglich ist, würde dies erheblichen Aufwand und ein manuelles Eingreifen erfordern. Für diesen Prozess konnte somit keine signifikante Verbesserung im Vergleich zur manuellen Batchmethode erzielt werden.

[¹⁸F]Fluorethyltriflat

Bei der Zweistufensynthese von [¹⁸F]Fluorethyltriflat (**12**) ist vor allem die Bildung von 2-[¹⁸F]Fluorethanol (**11**) geschwindigkeits- bzw. erfolgsbestimmend. Der zweite Schritt, die Umsetzung zum Triflat erfolgt quantitativ binnen weniger Sekunden. Aus diesem Grund wurde der Hauptfokus auf den Teilschritt, der Bildung von 2-[¹⁸F]Fluorethanol (**11**) gelegt. Dabei wurde sowohl die Batch- als auch die mikrofluidische Methode bei Temperaturen von 70–110 °C und Reaktionszeiten von 1–15 Minuten durchgeführt. Teilergebnisse werden in **Abbildung 47** dargestellt:

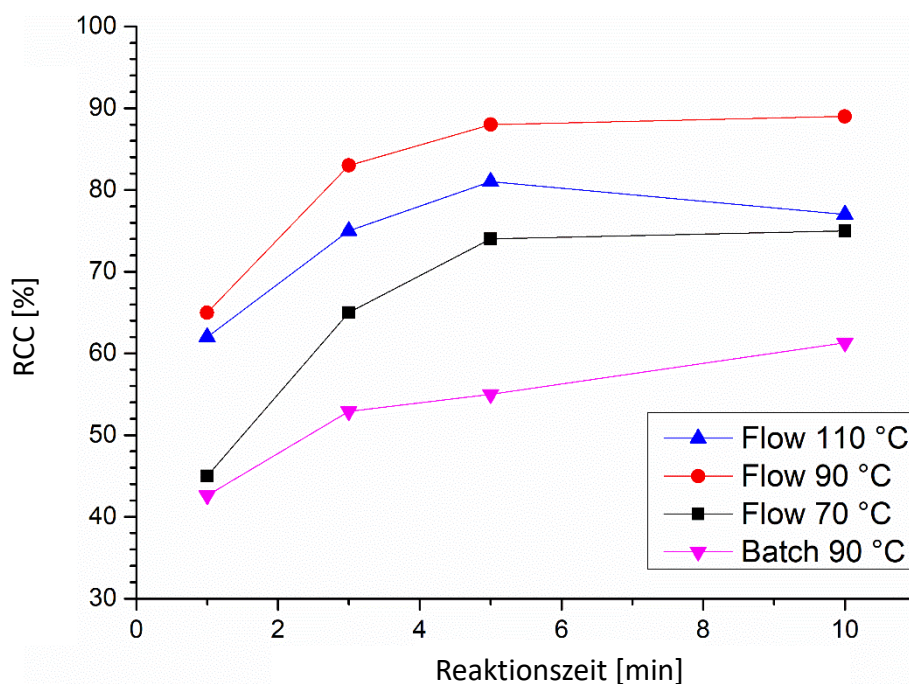


Abbildung 47: RCC (radiochemical conversion) von Ethylensulfit zu [^{18}F]FEOH (**11**) bei verschiedenen Temperaturen und Reaktionszeiten; Batch vs. Flow.

Sowohl im Flowprozess als auch in der Batchsynthese erwies sich eine Temperatur von 90 °C in Kombination mit einer Reaktionszeit von 5 Minuten als optimal. Es konnte ein radiochemischer Umsatz (radiochemical conversion, RCC) von $92.4\% \pm 1.7\%$ ($n=20$) im Flow- bzw. $75.1 \pm 2.2\%$ ($n=3$) im Batchprozess ermittelt werden. Interessanterweise zeigte sich neben der RCC auch ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der RCP. Bei der Batch-Synthese konnten bei 90 °C und einer Reaktionszeit von 5 Minuten etwa 23.5% Nebenprodukte und 21.5% nicht umgesetztes [^{18}F]Fluorid ermittelt werden. Im Vergleich dazu wurde unter gleichen Reaktionsbedingungen bei der Flowsynthese nur etwa 3.5% Nebenprodukte und 8.3% nicht umgesetztes [^{18}F]Fluorid festgestellt. Die Reaktion im mikrofluidischen System erwies sich somit als effizienter als das Batch-Verfahren. Auch das Setup erwies sich als unkompliziert.

Aliquote des trockenen [^{18}F]Fluorids vorgemischt mit Ethylensulfit (**10**) wurden durch einen Mikroreaktor geleitet und anschließend direkt in ein 15 mL Falcon-Tube, gefüllt mit einer Lösung aus Trifluormethansulfonsäureanhydrid (Tf_2O) in abs. MeCN, überführt. Nach manueller Aufreinigung mittels Aluminiumoxid-SPE-Kartusche konnte sowohl im Flow- als auch im Batchverfahren eine radiochemische Reinheit von über 97% ermittelt werden.

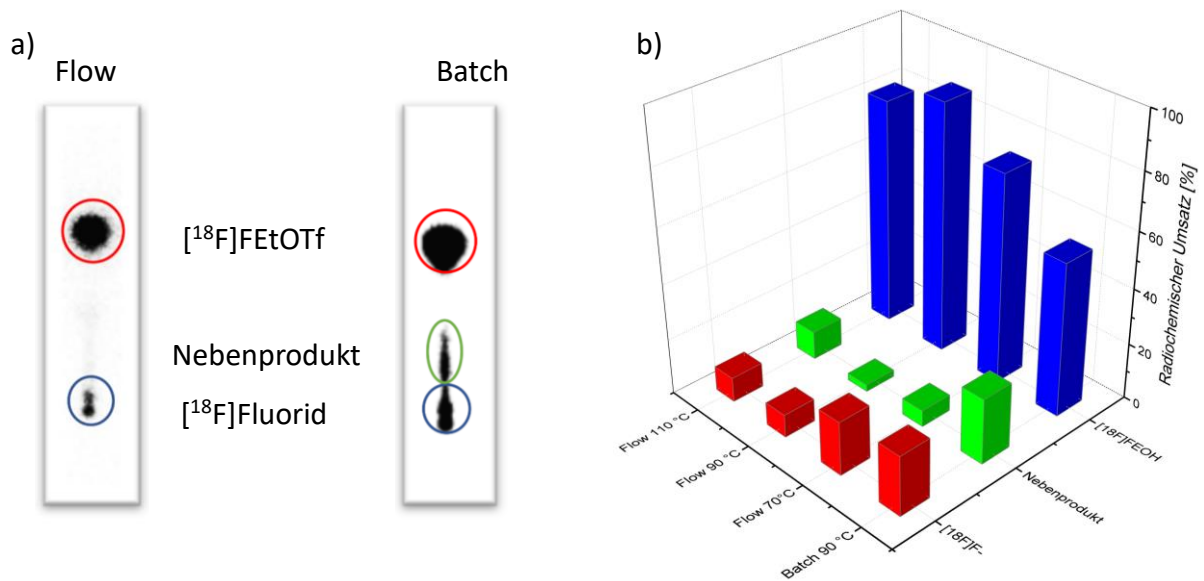


Abbildung 48: Radio-DC der RCC Flow vs. Batch (a) und HPLC-Messung der RCC Flow vs. Batch (b).

Der mikrofluidische Prozess benötigte dabei insgesamt etwa 7 Minuten. Der Batch-Prozess dagegen etwa 12 Minuten. Auch die RCY ist mit $79.0\% \pm 6.6\%$ ($n=20$) für das Flow-Verfahren deutlich besser als die RCY im Batch-Verfahren ($58.0\% \pm 3.5\%$ ($n=3$)).

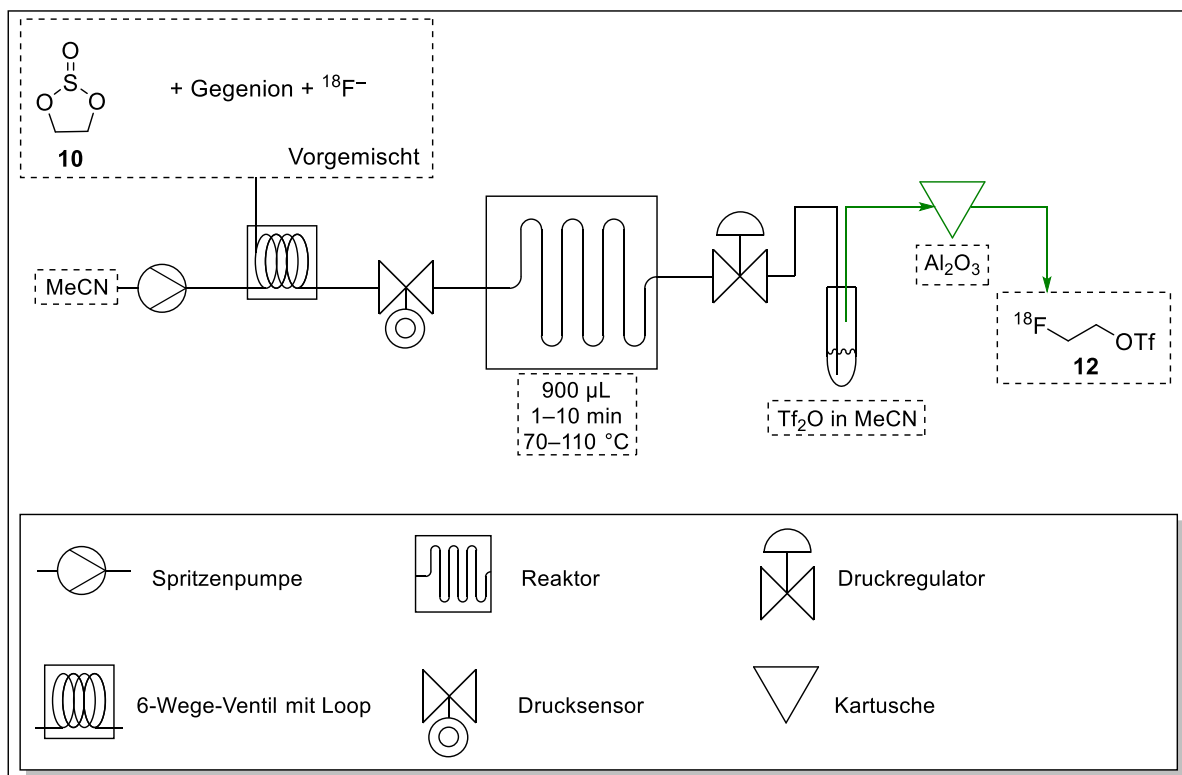


Abbildung 49: Schematische Darstellung des Flowprozesses von $[^{18}\text{F}]\text{Fluorethyltriflat}$ (12).

[¹⁸F]Fluorethyltosylat vs. [¹⁸F]Fluorethyltriflat

Während die Ergebnisse bezüglich RCY und RCC bei der einstufigen Synthese von [¹⁸F]Fluorethyltosylat (**9**) im Batch- und Flowverfahren im ähnlichen Bereich liegen, zeigt sich, dass die zweistufige Synthese von [¹⁸F]Fluorethyltriflat im Flowprozess einfacher, schneller und mit höherer Reinheit durchgeführt werden kann. Auch die Aufreinigung ist im Fall des Tosylates **9** komplizierter und zeitaufwändiger. Das Edukt, Ethylenglykol-bis-*p*-toluolsulfonat, muss sorgfältig vom [¹⁸F]Fluorethyltosylat (**9**) getrennt werden, um eine konkurrierende Alkylierung zu vermeiden. [¹⁸F]Fluorethyltriflat (**12**) kann im Durchflussverfahren wesentlich effizienter hergestellt werden. Im Batchverfahren betrug die RCY 58.0% ± 3.5% (n=3); im Vergleich dazu konnte unter Flowbedingungen eine RCY von 79.0% ± 6.6% (n=20) erzielt werden. Dies entspricht einer durchschnittlichen Steigerung von 21%.

Um eine Aussage über die Reaktivität und Qualität der beiden Fluoralkylierungsliganden treffen zu können, wurden beide Liganden an Modellverbindungen mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen getestet. Als Testmolekül wurden ein Phenol, eine Carbonsäure, ein Thiol und ein Amin gewählt. Für die *O*-Alkylierung wurde 4-Methoxyphenol (**13**) sowie 3,5-Dimethoxybenzoesäure (**14**) verwendet. Für die *N*-Alkylierung wurde das sekundäre Amin 7-Chlor-4-(piperazin-1-yl)-chinolin (**16**) gewählt. Für die Synthese des *S*-[¹⁸F]Fluorethylthioethers dient 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio-D-galactopyranosid (**15**) als Ausgangsverbindung.

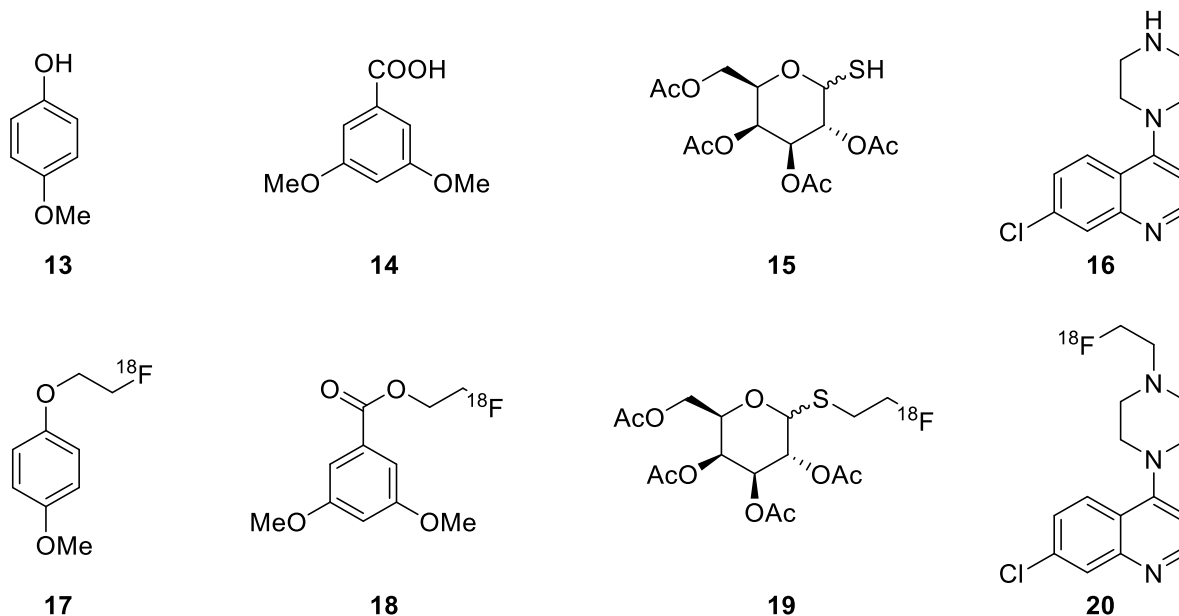


Abbildung 50: Modellverbindungen für die radioaktiven Fluoralkylierung mittels [¹⁸F]FEtOTs und [¹⁸F]FEtOTf.

Leider konnten keine geeigneten Bedingungen für die radioaktive Fluoralkylierung des Phenols ermittelt werden. Allgemein kam es unter Verwendung von 0.1 M NaOH als Base mit $[^{18}\text{F}]\text{FEtOTf}$ zur Rückreaktion zu $[^{18}\text{F}]\text{FEtOH}$. DIPEA (Diisopropylethylamin) erwies sich dagegen als geeignete Base und wurde aus diesem Grund für nachfolgende Untersuchungen gewählt. Die Veresterung von 3,5-Dimethoxybenzoesäure war bereits vielversprechend. Unter Verwendung von $[^{18}\text{F}]\text{FEtOTf}$ konnte ein RCC von $79.2\% \pm 0.3\%$ (RT, 10 min) erzielt werden. Im Gegensatz dazu zeigte $[^{18}\text{F}]\text{FEtOTs}$ selbst nach weiteren 10 Minuten bei $90\text{ }^\circ\text{C}$ keine Reaktion. Bei der Reaktion des Thiols mit $[^{18}\text{F}]\text{FEtOTf}$ wurde eine RCC von $83.2\% \pm 1.1\%$ (RT, 10 min) gemessen, während mit $[^{18}\text{F}]\text{FEtOTs}$ nur eine RCC von $11.1\% \pm 0.2\%$ (RT, 10 min) erzielt wurde. Bei der *N*-Alkylierungsreaktion von 7-Chlor-4-(piperazin-1-yl)-chinolin (**16**) wurde mit $[^{18}\text{F}]\text{FEtOTf}$ eine RCC von $77.4\% \pm 0.4\%$ (RT, 10 min) und mit $[^{18}\text{F}]\text{FEtOTs}$ nur $9.8\% \pm 1.3\%$ (RT, 10 min) erreicht.

Tabelle 5: RCC der Fluoralkylierung mit $[^{18}\text{F}]\text{FEtOTf}$ vs. $[^{18}\text{F}]\text{FEtOTs}$, (50 μL der Precursor (12.5 mg/mL; abs. MeCN) wurden mit 30 μL Base und 200 μL $[^{18}\text{F}]\text{FEtOTs}$ oder $[^{18}\text{F}]\text{FEtOTf}$ gemischt, (Reaktionszeit: 10 min).

Edukt	Produkt	Base	RCC mit $[^{18}\text{F}]\text{FEtOTf}$	RCC mit $[^{18}\text{F}]\text{FEtOTs}$
13	17	DIPEA	0% ^{a,b}	0% ^{a,b}
13	17	K_2CO_3	0% ^{a,b}	0% ^{a,b}
13	17	Cs_2CO_3	0% ^{a,b}	0% ^{a,b}
13	17	NaOH	0% ^{a,b}	0% ^{a,b}
14	18	DIPEA	$79.2 \pm 0.3\%$ ^a	0% ^{a,b}
15	19	DIPEA	$83.2 \pm 1.1\%$ ^a	$11.1 \pm 0.2\%$ ^a
16	20	DIPEA	$77.4 \pm 0.4\%$ ^a	$9.8 \pm 1.3\%$ ^a

^a Reaktion bei Raumtemperatur; ^b Reaktion bei $90\text{ }^\circ\text{C}$.

$[^{18}\text{F}]\text{FEtOTf}$ (**12**) erwies sich sowohl bei der Synthese als auch in der Fluoralkylierung der Modellverbindungen als effektiverer Ligand. Es hat sich gezeigt, dass Flowprozesse abhängig von der Synthese effektiver und sicherer durchgeführt werden können als im Batch-Verfahren. Zusätzlich konnte durch die Kombination mit dem vorgestellten Trocknungsmodul die Strahlenbelastung für den Anwender verringert und eine Verbesserung im Laboralltag herbeigeführt werden.

Unveröffentlichte Ergebnisse

Die Ergebnisse dieses Teils wurden in enger Kooperation mit dem Werner Siemens Imaging Center generiert. Die Synthese der Moleküle, die Analytik und die vorgestellten biochemischen Auswertungen können für nachfolgende Publikationen von *Dr. Jonathan Cotton* verwendet werden.

Inhalt: Die Detektion von seneszenten Zellen kann für eine individuell gestaltete Krebstherapie von hoher Bedeutung sein. Die Erkennung von Seneszenz bei Patienten ist derzeit nur durch Seneszenz-assoziierten Markern in *ex-vivo*-Analysen möglich. Diese Marker umfassen unter anderem: p16, p53, p21 sowie die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SABG).^[135, 136] Basierend auf der Annahme, dass die Seneszenz aufgrund der erhöhten β -Galaktosidase-Aktivität nicht-invasiv nachgewiesen werden kann, haben wir zwei PET-Tracer entwickelt: [^{18}F]FGal-An und [^{18}F]FGal-Al (**Abbildung 51**).

AMp19-Tumorzellen dienen dabei als Testzellen. Durch eine vorangegangene Behandlung der AMp19-Tumorzellen mit CX-5461 soll gezielt Seneszenz induziert werden. Wird dabei die Aktivität der SABG einer Zelle erhöht, kann es zur Anreicherung des β -Galactose-basierte Tracers im Gewebe kommen. Diese Hypothese soll durch MRT/PET-Aufnahmen überprüft werden.

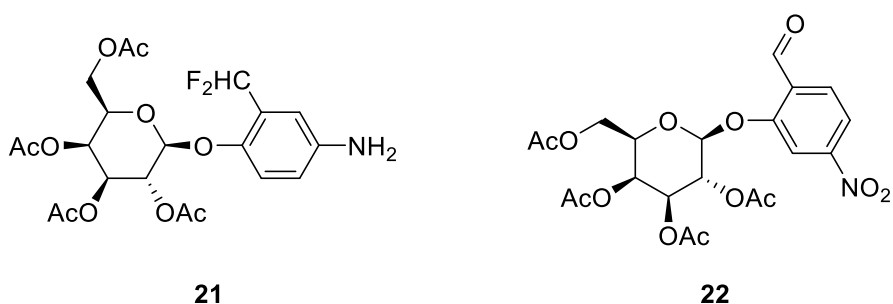


Abbildung 51: Synthetisierte Precursor: 4-[(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)oxy]-(3-difluormethyl)-anilin (**21**) und 2-[(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)oxy]-(4-nitro)-benzaldehyd (**22**).

Die Synthese der Tracer konnte bis zum Schritt der radioaktiven Fluorierung im Labor durchgeführt werden. Die radioaktive Fluorierung muss aufgrund der hohen Strahlenbelastung unter Bleiabschirmung in einem Speziallabor durchgeführt und möglichst automatisiert

werden. Dies beinhaltet sowohl die Vorbereitung des Fluorids, die Fluorierung selbst sowie die Entschützung und Aufreinigung mittels präparativer HPLC der finalen Tracer **[¹⁸F]FGal-An** und **[¹⁸F]FGal-AI** (Abbildung 52). Erste Test-Synthesen wurden im Vorfeld mit geringer Aktivität (~200 MBq) in offenen *hotcells* per Hand durchgeführt. Dabei ging es hauptsächlich um die Ermittlung und Optimierung von Reaktionsbedingungen für die Automatisierung im Synthesemodul. Nach Etablierung einer Synthese auf dem Routinegerät (TRACERlab FX N Pro) wurden die Tracer im *in-vitro* sowie *in-vivo*-Modell getestet.

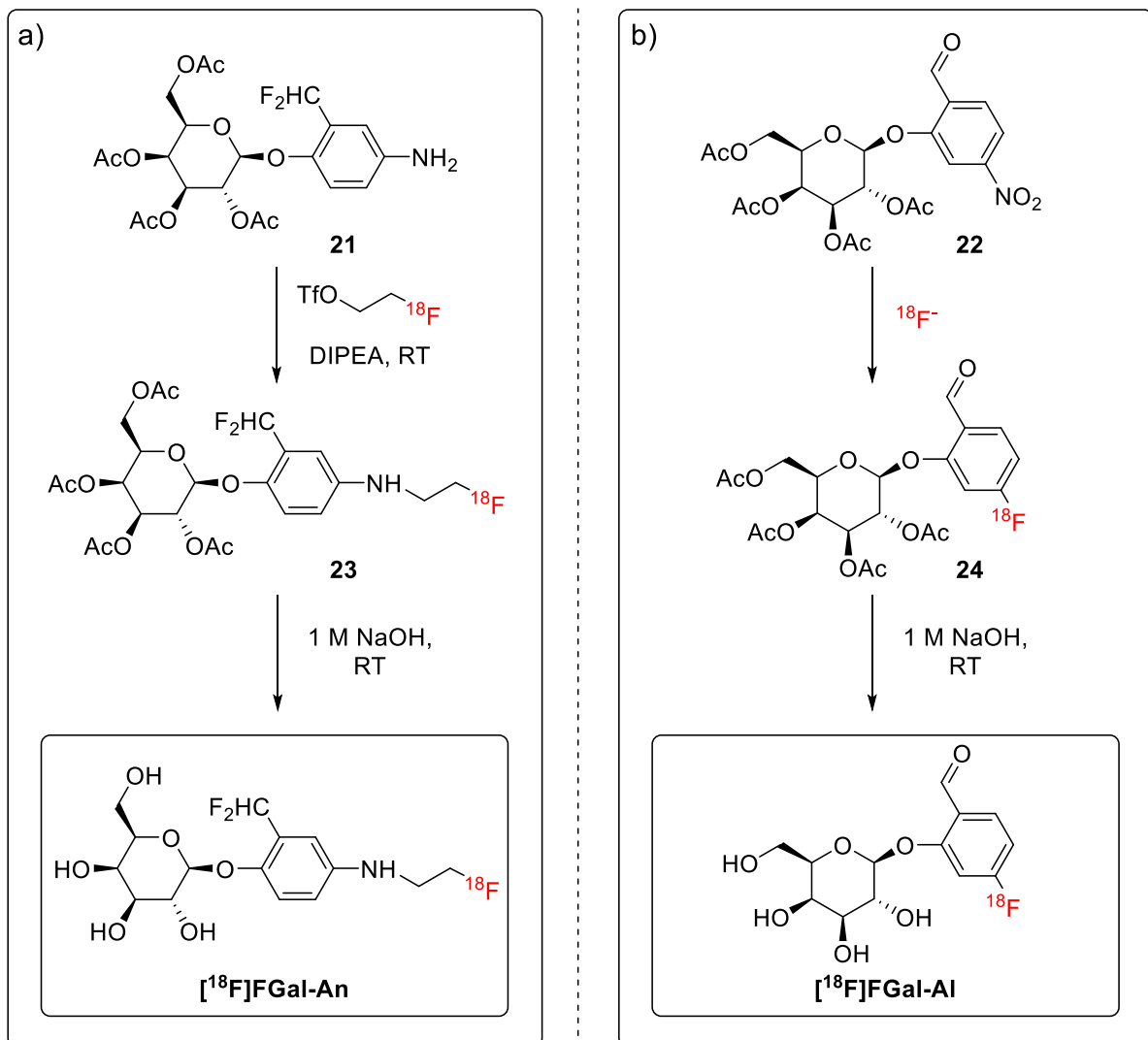


Abbildung 52: Synthese von: (a) 4-[(2,3,4,6-Tetra-hydroxy- β -D-galacto-pyranosyl)oxy]-(3-difluormethyl-*N*-(2-[¹⁸F]fluorehtly)-anilin (**[¹⁸F]FGal-An**) und (b) 2-[(2,3,4,6-Tetra-hydroxy- β -D-galactopyranosyl)oxy]-(4-[¹⁸F]fluor)-benzaldehyd (**[¹⁸F]FGal-AI**).

Synthese der Precursor:

Precursor für [¹⁸F]FGal-An

Ausgehend von der erfolgreichen Automatisierung von [¹⁸F]FEtOTf wurde ein Tracer mit einem Anilinbaustein entwickelt. Das primäre Amin soll im Anschluss mit [¹⁸F]FEtOTf radioaktiv fluoralkyliert werden. Für die Synthese wurden zwei unterschiedliche Routen gewählt.

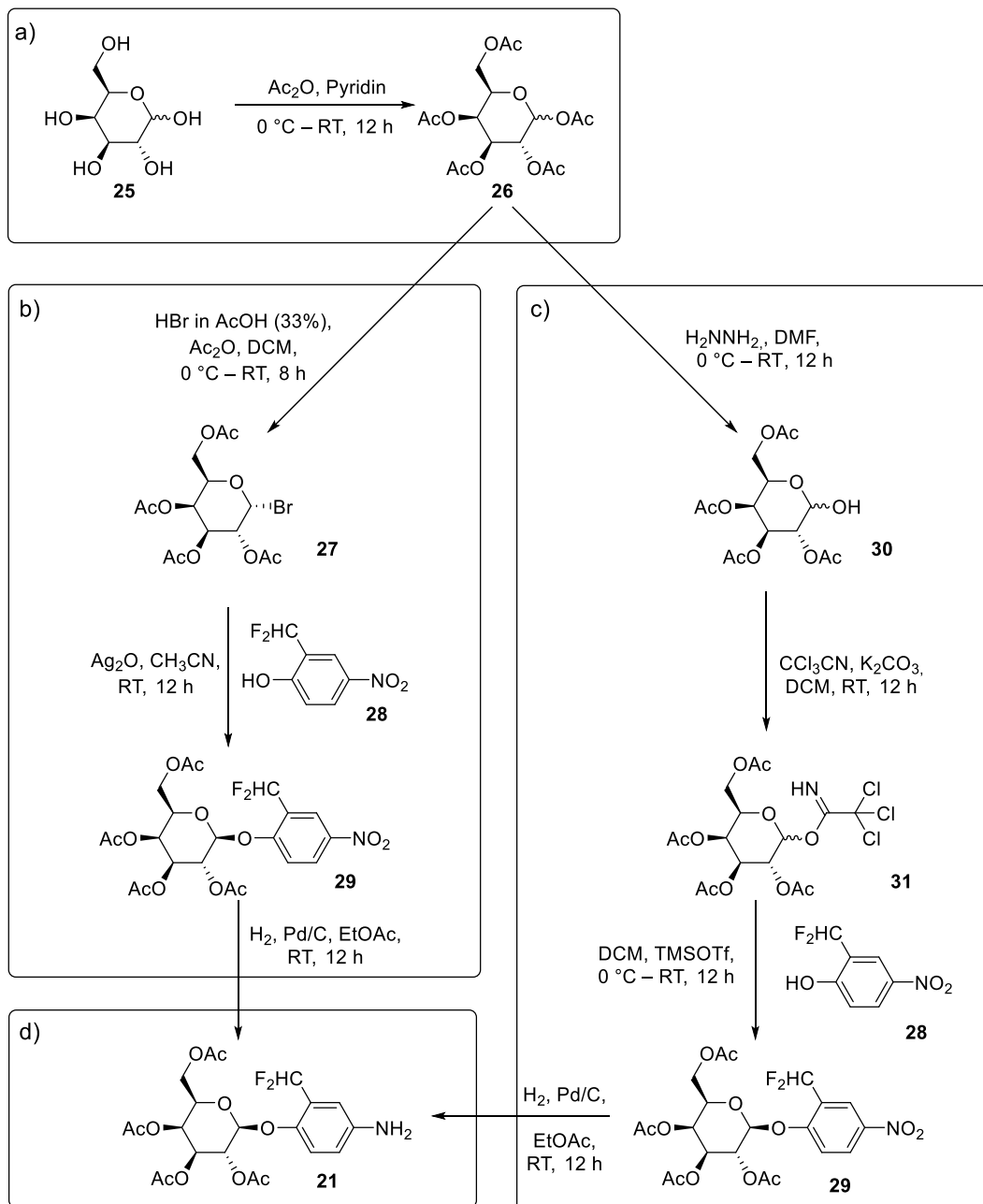


Abbildung 53: Synthese von Tracern **21** (d) über die König & Knorr- (b) und Schmidt-Route (c) ausgehend von D-Galactose (a).

Zum einen wurde die *O*-glycosidische Knüpfung über die Königs & Knorr- (b), zum anderen über die Schmidt-Methode (c) realisiert. Dafür wurde für beide Syntheserouten ausgehend von D-Galactose (**25**) das D-Galactosepentaacetat **26** synthetisiert (a).

Für die Königs & Knorr- Methode wurde im Anschluss mit HBr in Essigsäure an C1 bromiert. Unter Verwendung von Diisopropylethylamin (DIPEA) in trockenem Acetonitril konnte mit Phenol **28** nukleophil am C1 angegriffen werden. Die CHF₂-Gruppe verleiht organischen Molekülen häufig spezielle biologische Eigenschaften. Neben einer hohen Lipophilie, die der CF₃-Gruppe ähnelt, kann die CHF₂-Gruppe als Wasserstoffdonor durch Wasserstoffbrückenbindungen agieren^[137] und wird aktiv zur Steigerung biologischer Aktivitäten eingesetzt.^[138]

In der zweiten Syntheseroute (Schmidt-Glycosylierung) wurde zunächst mit Hydrazin in Essigsäure die C1-Position des D-Galactosepentaacetat entschützt. Anschließend wurde mit Trichloracetonitril und K₂CO₃ das Trichloracetimidat **31** synthetisiert und mit Phenol **28** zum *O*-Glycosid **29** umgesetzt.

Ausgehend von *O*-Glycosid **29** wurde die Nitrogruppe mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle zum primären Amin reduziert. Zu beachten ist, dass die Ausbeute der Schmidt-Methode geringer (18.1% über alle Stufen) gegenüber der Königs & Knorr-Methode (37.2% über alle Stufen) ist. Dies liegt zum einen an dem zusätzlich benötigten Syntheseschritt und zum anderen an der Bildung des *alpha*- sowie des *beta*-Anomers bei der *O*-glycosidischen Knüpfung. Da der gewünschte Precursor **21** erfolgreich durch die Königs & Knorr- Route hergestellt wurde und diese Methode ausschließlich das gewünschte *beta*-Anomer liefert, ist diese Route klar zu favorisieren.

Precursor für [¹⁸F]FGal-Al

Da die Integration zur Darstellung von [¹⁸F]FEtOTf unter Flowbedingungen mit dem Routinegerät nicht möglich war, wurde ein weitere Tracer entwickelt. Als Abgangsgruppe für die nukleophile aromatische Substitution dient dabei eine Nitro-Gruppe, welche in *para*-Stellung zu einem Aldehyd steht. Die Aldehyd-Gruppe stabilisiert dabei den Meisenheimer-Komplex im aromatischen System.^[69] Ausgehend von D-Galactosepentaacetat **26** erfolgte die Synthese des Tracer **22** analog wie für Tracer **21** über die Königs & Knorr- (b) und Schmidt-

Glycosylierung (c), wobei auch hier die Königs & Knorr-Methode aus denselben Gründen zu präferieren ist.

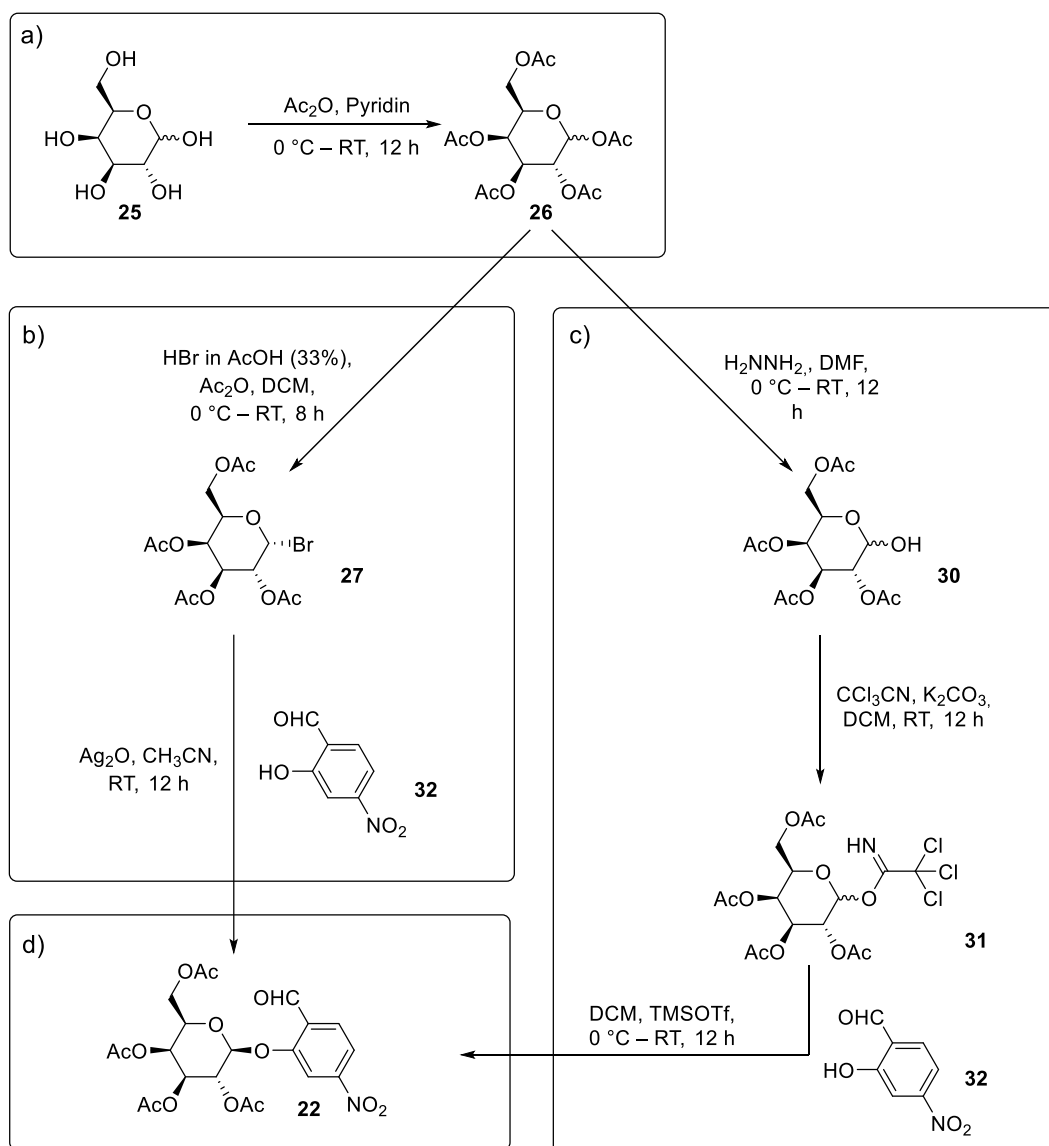


Abbildung 54: Synthese des Tracern **22** (d) über die Königs & Knorr- (b) und Schmidt-Routen (c) ausgehend von D-Galactose (a).

Des Weiteren wurden unterschiedliche Phenole (**32**, **32-1** **32-2**) für die *O*-glycosidische Knüpfung gewählt. Tracer **22** konnte mit einer Ausbeute von 44% synthetisiert werden. Die Aufreinigung erfolgte dabei über eine Kristallisation. Tracer **22-1** konnte nicht ohne Verunreinigungen erhalten werden. Auch die Ausbeute von 8% fällt wesentlich schlechter aus als von Tracer **22**. Tracer **22-2** konnte nur in Spuren nachgewiesen werden. Für die radioaktive Fluorierung und die Entwicklung des vollautomatisierten Prozesses wurde Tracer **22** verwendet.

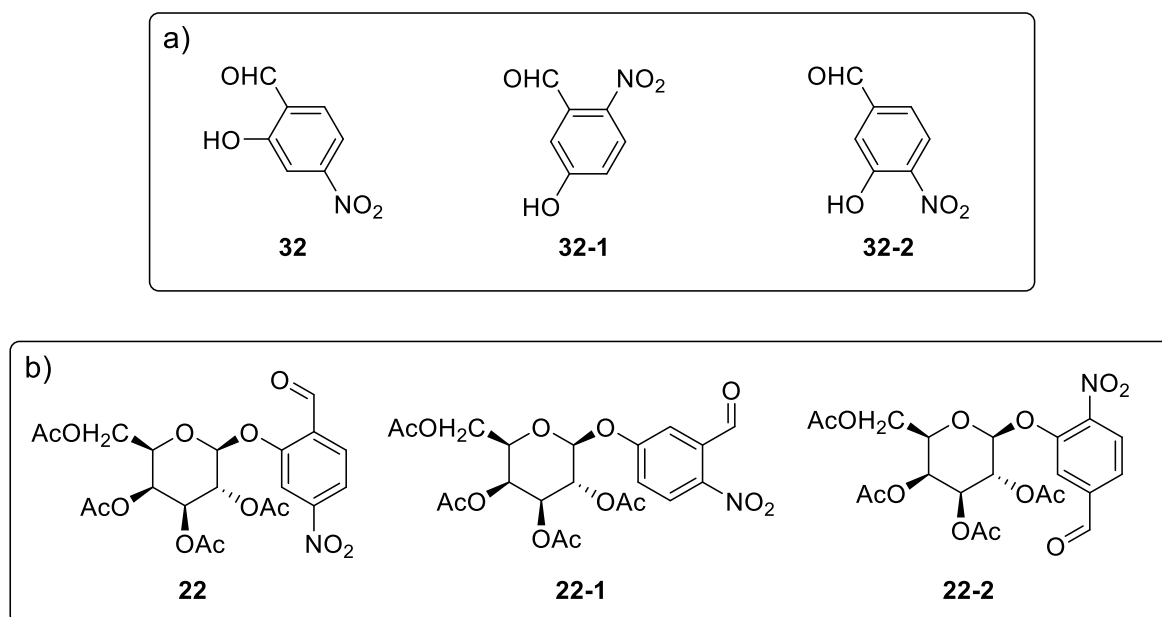


Abbildung 55: Verwendete Phenole (a) und die daraus erwarteten Tracer (b).

Um sicher zu stellen, dass es sich bei dem radioaktiven Peak in der HPLC-Messung um den gewünschten Tracer handelt, wurde die „kalte“, nicht radioaktiv markierte, Referenzsubstanz synthetisiert. Da die Konzentration des radioaktiven Tracers im Allgemeinen sehr gering ist und der Radiodetektor der HPLC viel empfindlicher ist als der UV-Detektor, sieht man meist kein UV-Signal bei der HPLC-Messung der radioaktiven Substanz. Aus diesem Grund ist die Synthese des nichtradioaktiven Derivates für eine Charakterisierung unumgänglich. Durch Abgleichen der Retentionszeiten des radioaktiven Tracers **24** mit dem UV-Chromatogramm der Referenzsubstanz **34**, kann Tracer **24** bestätigt werden. Die Effizienz der Synthese ist abhängig vom Umsatz, der Reinheit und von der Synthesedauer. Für erste Testversuche und Optimierungen wurde die radioaktive Fluorierung manuell durchgeführt. Dafür wurde [^{18}F]Fluorid durch das in Paper 3 vorgestellte Trocknungsverfahren getrocknet und mit dem Precursor **22** zur Reaktion gebracht. Als Reaktionsbedingungen hat sich DMF als Lösemittel, eine Reaktionstemperatur von 160 °C und eine Reaktionszeit von 5 Minuten bewährt. Über radioaktive DC sowie HPLC-Messungen konnte ein Umsatz von 69.3% zum gewünschten Produkt (Retentionszeit: 15.70 min) und 27.3% restliches, nicht umgesetztes [^{18}F]Fluorid (Retentionszeit: 3.33 min) ermittelt werden. Der UV-Peak der Referenzsubstanz **34** liegt wie erwartet 0.05 min vor dem Radiosignal von Tracers **24**. Da die Detektoren in Reihe geschaltet sind (UV-Detektor vor Radiodetektor) liegt dies an der Konfiguration der HPLC.

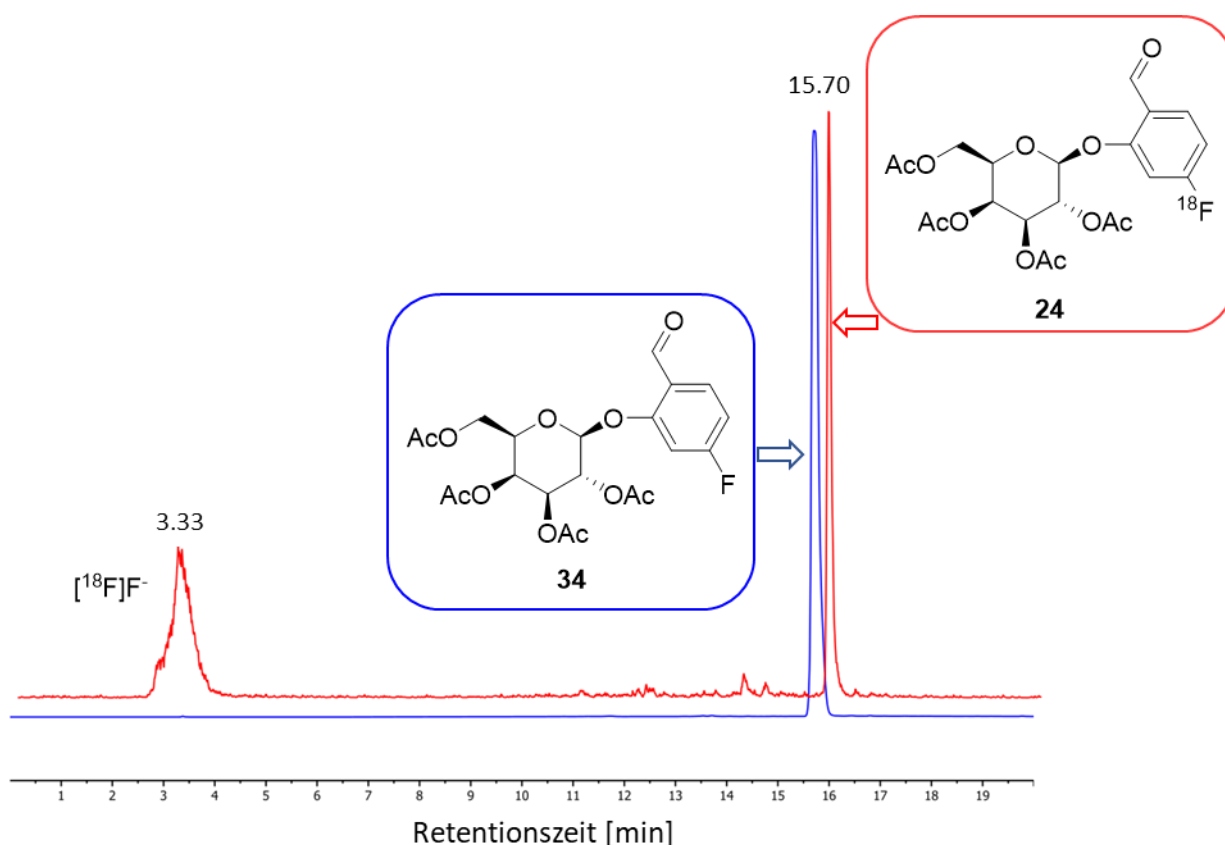


Abbildung 56: HPLC-Messung von Tracer **24** (rot, radioaktiver Peak) und Referenzsubstanz **34** (blau, UV-Peak).

Automatisierung:

Die automatisierte Synthese wurde auf einem Routinegerät (TRACERlab FX N Pro) des Werner Siemens Imaging Centers entwickelt. Das Interface ist auf **Abbildung 59** zu sehen. Der Prozess besteht aus vier Phasen: i) die Trocknung des radioaktiven Fluorids, ii) die Fluorierung des Precursor **22**, iii) die Aufarbeitung mittels HPLC und iv) die Abspaltung der Acetylenschutzgruppen. Zur Übersicht wurden die eingesetzten Chemikalien und Komponenten in **Tabelle 6** aufgeführt. Die Programmierung sowie die dazugehörige Zeitabfolge können im Anhang nachgeschlagen werden. Wässriges ^{18}F Fluorid wird mit Hilfe eines Zyklotrons generiert und in ein Auffanggefäß überführt. Im ersten Schritt muss das radioaktive Fluorid getrocknet und mit K 222 aktiviert werden. Um den Wassergehalt zu verringern wird die wässrige radioaktive Lösung mittels Unterdrucks über eine QMA (verbunden zwischen V10 und V11), welche zuvor konditioniert wurde (10 mL 1 M NaHCO_3 , 10 mL Luft, 10 mL Wasser, 10 mL Luft) geleitet und darauf gebunden. Im Anschluss wird das gebundene Isotop mit der in Vial 1 befindlichen K 222-Lösung in Reaktor 1 gespült und ein Trocknungsprogramm gestartet. Nach erfolgreicher Trocknung wird der Precursor aus Vial 3 hinzugegeben und ein

Temperaturprofil gestartet. Das Reaktionsgemisch wird dabei binnen 5 min auf 150 °C erhitzt. Ab 150 °C wird die Reaktionstemperatur für 3 min um weitere 10 °C erhöht und anschließend mit Druckluft binnen 3–5 min auf 35 °C abgekühlt.

Tabelle 6: Benötigte Materialien und Chemikalien.

Vial	Chemikalie & Komponente
-	QMA
-	Strata-X
3	Tracer 22 (4.2 mg in 0.7 mL DMF)
1	2 mL, K 222-Lsg. (9.5 mg K 222/1.7 mg K ₂ CO ₃ in 1 mL MeCN)
43	1.5 mL NaOH (1 M)
42	0.85 mL HCl (2 M)
Produkt-Vial	0.4 mL NaHCO ₃ (1 M)
H ₂ O Reservoir	50 mL H ₂ O
4	3 mL, 33.7% MeCN _{aq.}
41	3 mL, 15% EtOH _{aq.}

Für die Vorbereitung der präparativen HPLC wird die Reaktionslösung mit 3 mL wässrigen MeCN-Lösung (33.7%) aus Vial 4 verdünnt und über ein 6-Wege-Ventil mit Flüssigkeitsdetektor auf eine Luna C18-Säule (100 µ) aufgebracht. Das Laufmittel besteht aus 45% MeCN_{aq.} Aufgrund des sehr hohen DMF-Anteils der Reaktionslösung muss auf den Druck (≤150 bar) im HPLC-Systems besonders geachtet werden. Als Flussprofil hat sich folgendes bewährt: i) Minute 0–1: 1 mL/min, ii) Minute 1–3: 2 mL/min, iii) Minute 3–6: 3 mL/min und iii) ab Minute 6: 6 mL/min.

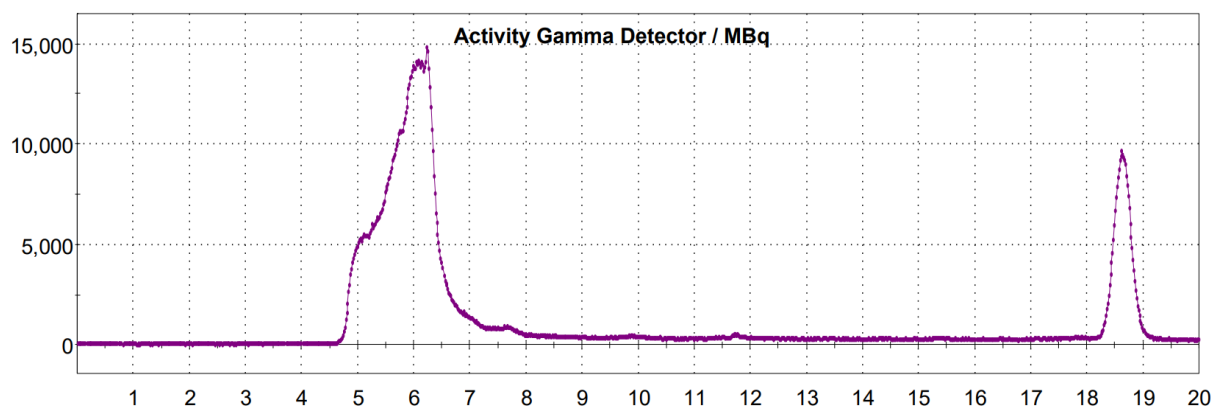


Abbildung 57: Radioaktives Chromatogramm der präparativen HPLC von Tracer **24**.

Mit einer Retentionszeit von 18.7 min konnte das acetylierte Derivat **24** mittels präparativen HPLC erfolgreich abgetrennt und in einem H₂O-Reservoir mit 50 mL H₂O überführt werden. Dieser Schritt ist notwendig, da das Laufmittel aus der präparativen HPLC zu unpolar ist. Um die acetylierte Verbindung **24** erfolgreich auf einer Strata-X Kartusche zu binden, muss das Lösemittel polarer sein. Die Abspaltung der Acetylschutzgruppen auf der Strata-X Kartusche erfolgt mit 1 M Natronlauge. Um die Effektivität der Abspaltung zu erhöhen, wird die Natronlauge aus Vial 43 pulsartig in Zeitabständen von 3×1 min über die Strata-X geleitet. Dies erhöht die Reaktionszeit der Entschützung auf der Strata-X Kartusche und steigert die Effektivität erheblich. Im Anschluss wird mit 2 M Salzsäure aus Vial 43 neutralisiert und [¹⁸F]FGal-AI mit 3 mL 15% Ethanol_{aq} in das Produkt-Vial eluiert. Das Produkt-Vial enthält 0.4 mL Natriumhydrogencarbonatlösung.

Beginnend mit einer Aktivität von 35 Gbq [¹⁸F]HF konnte nach 1.5 h Syntheszeit [¹⁸F]FGal-AI mit einer Aktivität von 1.5 GBq synthetisiert und isoliert werden. Das entspricht einer radiochemischen Ausbeute (RCY) von 12.9%. Für die Qualitätskontrolle wurde der Tracer mit der „kalten“ Referenzsubstanz FGal-AI mittels HPLC-Messung abgeglichen. Dabei konnte eine radiochemische Reinheit (RCP) von >99.9% festgestellt werden.

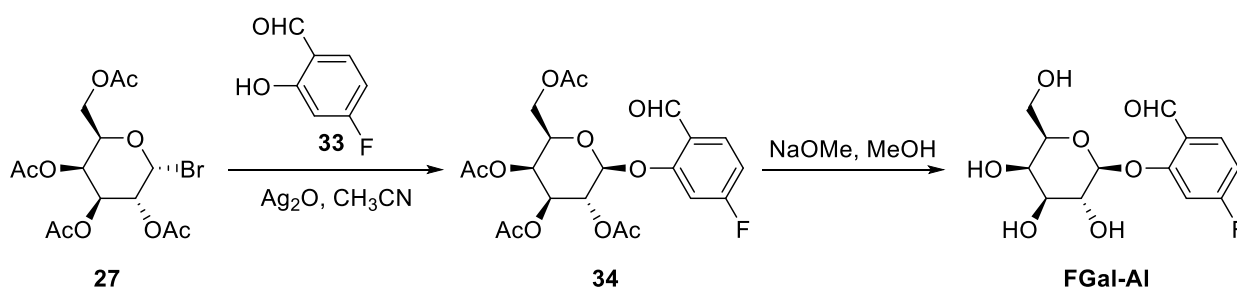


Abbildung 58: Syntheseroute der Referenzsubstanzen **34** und FGal-AI.

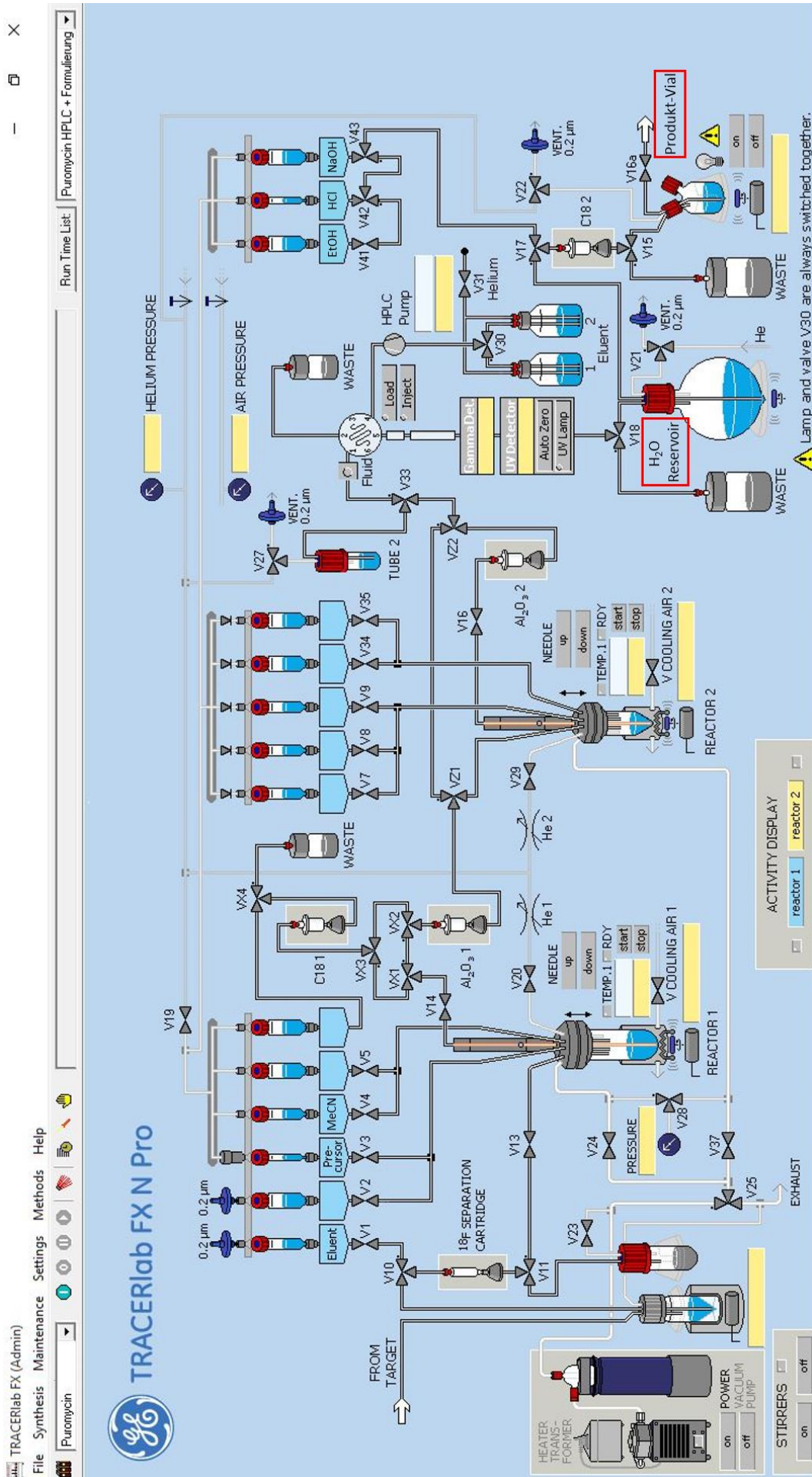


Abbildung 59: Interface TRACERlab FX N Pro.

Biologische Auswertung:

Die Funktionsweise des Tracers beruht wie bereits erwähnt auf der höheren Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität (SABG). Der finale Tracer $[^{18}\text{F}]\text{FGal-AI}$ wird einer Maus mit AMP19-Tumorzellen über die Schwanzvene verabreicht und somit in den Metabolismus eingebracht. In den Zellen soll mit Hilfe von β -Galaktosidase die *O*-glycosidische Bindung an C1 gespalten werden. Es wird angenommen dass der Metabolit ohne den Zuckerbaustein nur noch erschwert die Zelle über ein GLUT-Transportprotein verlassen kann und sich dadurch verstärkt in der Zelle anreichert.^[139, 140]

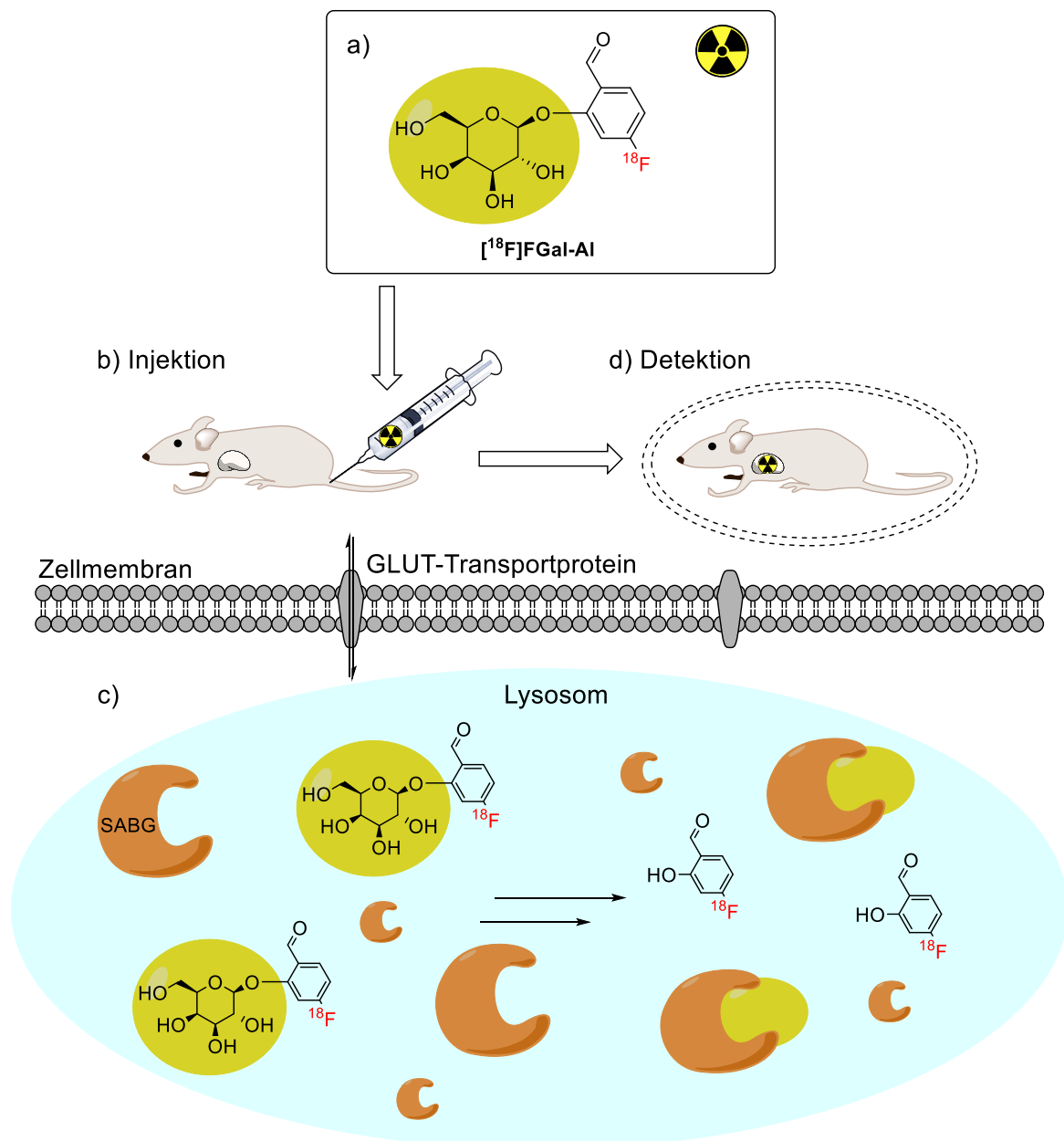


Abbildung 60: Schematische Darstellung der Metabolisierung. PET-Tracer (a) wird durch Injektion (b) der Maus verabreicht und über ein GLUT-Transportprotein im Lysosom (c) aufgenommen und angereichert. Im Anschluss folgt die Detektion (d) über das PET-Verfahren.

Serumstabilität:

Um die metabolische Stabilität von [^{18}F]FGal-AI zu bewerten, wurde der Tracer in Human-, Maus- und Rattenserum für bis zu 2 Stunden inkubiert und anschließend untersucht. Die HPLC-Analyse aller untersuchten Tracer-Serum-Gemische zeigte dabei auch nach zwei Stunden Inkubationszeit keinen Abbau. Der Tracer kann somit als stabil eingestuft werden. Als Beispiel wird in **Abbildung 61** die HPLC-Messungen des Ratten-Serum-Tracer-Gemisches dargestellt.

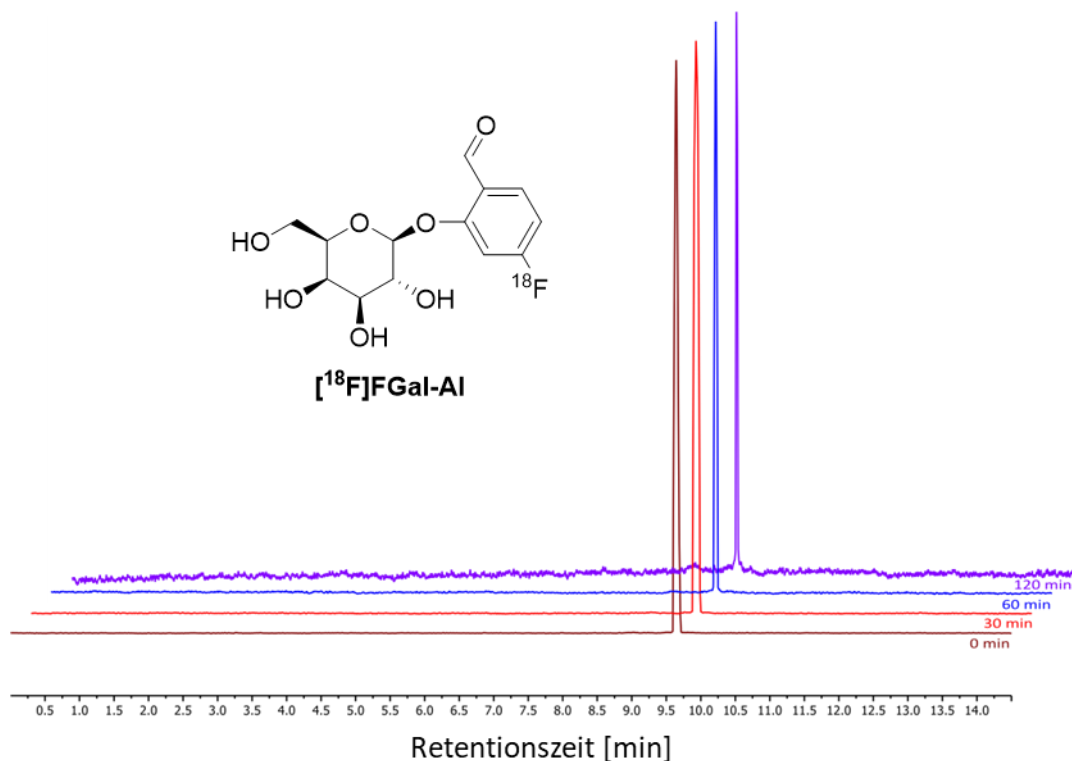


Abbildung 61: Radio-HPLC von [^{18}F]FGal-AI nach 0 (braun), 30 (rot), 60 (blau) und 120 Minuten (lila) nach Inkubation (37 °C) von 200 μL Serum (Ratte) + 350 μL [^{18}F]FGal-AI. Entnahme von 100 μL Tracer, Hinzugabe von 100 μL eiskaltem MeCN, Mischen, 3 min Eiskühlung, 3 min Zentrifugieren bei 10000 rpm, Entnahme von 100 μL Überstand, zweifacher Verdünnung mit H_2O (+TFA 0.1%) und HPLC-Messung.

Enzymatische Spaltung:

Um nachzuweisen, dass [^{18}F]FGal-AI ein Substrat der β -Galaktosidase ist, wurde der Tracer mit dem Enzym β -Galaktosidase (SigmaAldrich) inkubiert.

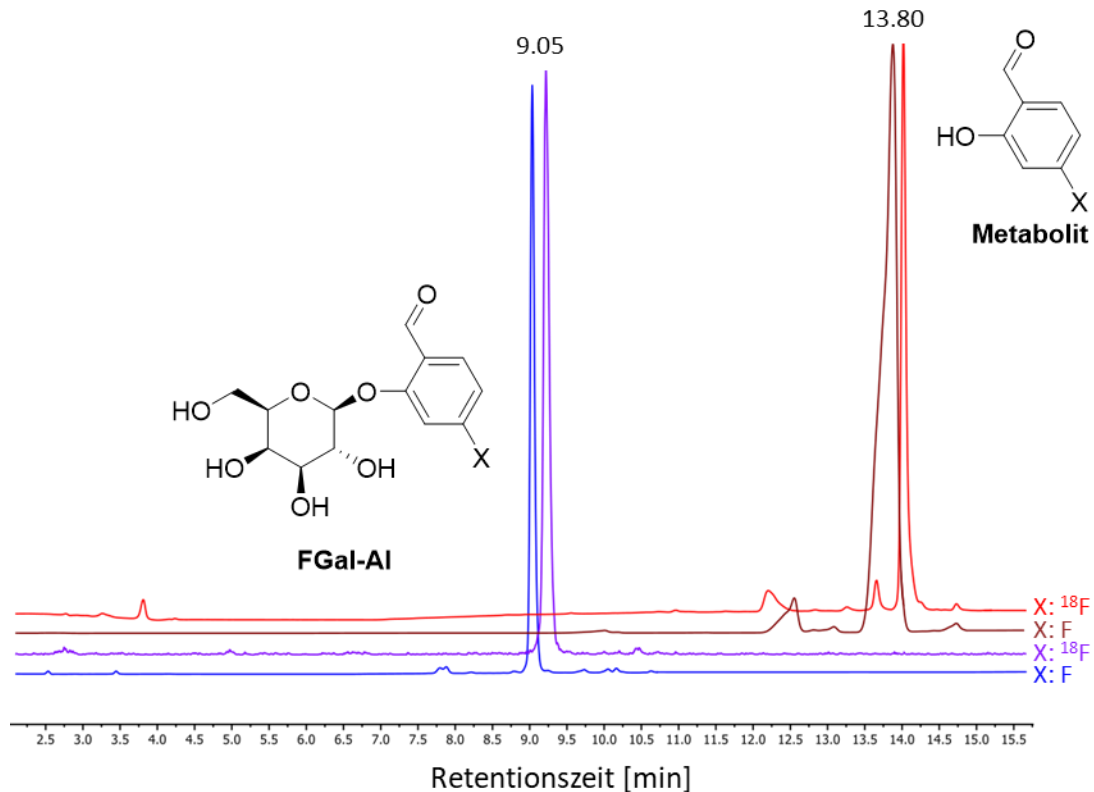


Abbildung 62: Inkubation von [^{18}F]FGal-AI mit β -Galaktosidase, Bruch der glycosidischen Bindung und Bildung des Metaboliten. [^{18}F]FGal-AI (lila), Referenzsubstanz FGal-AI (blau), radioaktiver Metabolit (rot), Referenzsubstanz des Metaboliten (braun).

Alle enzymatischen Tests wurden bei einem pH-Wert von 4.5 und gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. 10 Einheiten β -Galactosidase (~ 1.25 mg) wurden zu einer Mischung aus 50 μL [^{18}F]FGal-AI und 300 μL Citratpuffer gegeben. Nach dem Mischen via Vortex-Mischer, wurde die Lösung 1 h lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μL eiskalter MeCN gestoppt. Anschließend wurde die Enzym-Tracer-Mischung 3 min lang bei 0 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und für 3 min lang bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Radio-HPLC analysiert und mit dem nicht-radioaktiven Metaboliten verglichen. Mit Hilfe der Radio-HPLC-Analyse und dem Vergleich des UV-Chromatogramm der Referenzsubstanze kann man das Verschwinden des Tracer-Peaks bei 9.05 min, und das Erscheinen des Metaboliten bei 13.8 min beobachten. Zur vollständigen Charakterisierung wurden zusätzlich die Referenzsubstanze des Tracers, als auch die des Metaboliten gemessen und mit dem Signal der radioaktiven Substanzen verglichen. Da die

Retentionszeiten der Referenzsubstanzen und den radioaktiven Stoffen übereinstimmen, konnte die enzymatische Spaltung durch β -Galaktosidase bestätigt werden.

In-Vitro-Modell:

Um gezielt Seneszenz zu induzieren, wurden fünf Proben der AMp19-Zellen mit dem ribosomalen Checkpoint-Inhibitor CX-5461 behandelt und mit [^{18}F]FGal-AI inkubiert (22.12 MBq, 40 min, 37 °C).^[141] Des Weiteren wurden fünf Proben ohne Vorbehandlung mit CX-5461 als Kontrolle mit [^{18}F]FGal-AI inkubiert. Die Tracer-Aufnahme war in den Seneszenz-initiierten (CX-5461) Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen um das 4.92 ± 0.63 -fache erhöht. Diese Ergebnisse beweisen das Funktionsprinzip des Tracers. Im Allgemeinen werden zuerst *in-vitro*-Experimente durchgeführt. Es geht darum einen ersten Eindruck zu bekommen, ob der Tracer sich für den Einsatz im *in-vivo*-Modell eignet und sich ein Tierversuch moralisch vertreten lässt. Da dies der Fall ist, und ein bestehender Tierversuchsantrag vorlag, konnte [^{18}F]FGal-AI im *in-vivo*-Modell getestet werden.

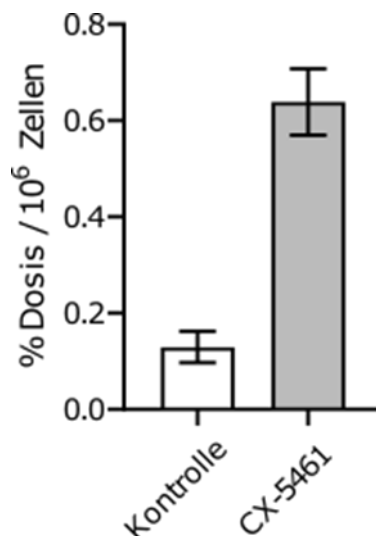


Abbildung 63: Akkumulation von [^{18}F]FGal-AI im *in-vitro*-Modell an AMp19-Zellen, Kontrolle (n=5), Proben behandelt mit CX-5461 (n=5).

In-Vivo-Modell:

Für das *in-vivo*-Mausmodell wurden zehn, 6–8 Wochen alte Mäuse vom Stamm CB17.Cg-Prkdc^{scid}Lyst^{bg-J}/Cr verwendet und nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen eingeteilt. Allen Mäusen wurden AMp19-Zellen unter die rechte Flanke injiziert und somit die Bildung des Tumors initiiert. Das Befinden sowie das Gewicht (**Abbildung 64a**) wurde dabei täglich überprüft. Etwa drei Wochen nach der Injektion hatten die meisten Tumore eine Größe von etwa 100 mm³ erreicht (**Abbildung 64b**). Eine Gruppe erhielt zur Seneszenzinduktion täglich beginnend von Tag 18 bis Tag 22 intraperitoneal 25 mg/kg/d CX-5461, während die Kontrollgruppe ein Vehikel (50 mM Mononatriumphosphat, pH 4.5) erhielt. Das Gewicht der Mäuse nahm nach Behandlungstag zwei zwar leicht ab, befindet sich aber noch im akzeptablen Bereich. Die Tumore sind in beiden Gruppen konstant gewachsen. Da somit die Parameter für die Vergleichbarkeit gegeben sind, lassen sich die Daten beider Gruppen in Korrelation setzen.

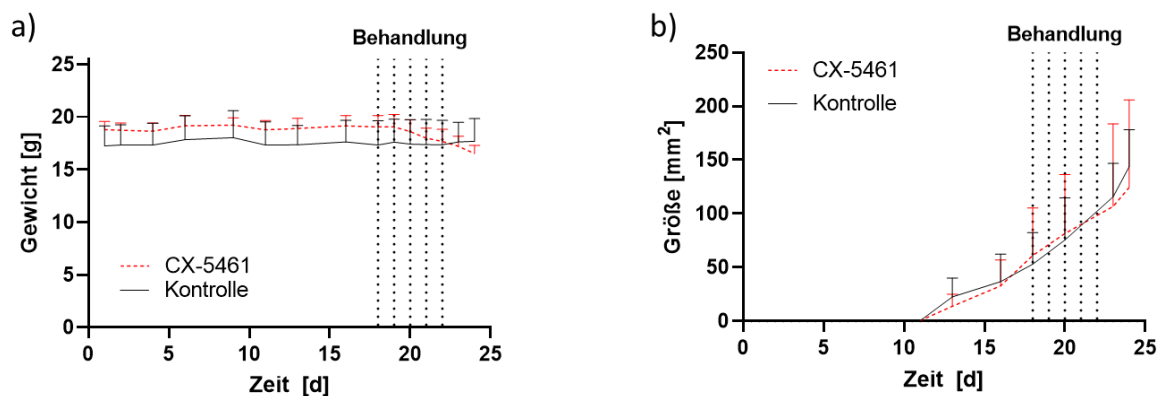


Abbildung 64: Gewicht der Mäuse (a) sowie Größe des Tumors (b) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Behandlung mit CX-5461.

Ein MRT/PET-Scan ermöglicht die Segmentierung von Tumor und umliegendem Gewebe. Dabei können Schichtdicken von 600 µm aufgenommen und analysiert werden. Es ist wichtig, dass das Tier während den Aufnahmen und dem Wechsel zwischen MRT- und PET-Scanner nicht bewegt wird. Dafür wurde die Maus in Narkose gelegt und stetig Temperatur und Kreislauf überprüft. Für die dynamische PET-Bildgebung erfolgte fünf Sekunden nach Beginn des dynamischen Emissionsscans die Injektion von 12 ± 1 MBq [¹⁸F]FGal-AI über einen Schwanzvenenkatheter. Ein 60-minütiger Emissionsscan sowie ein 803-sekündiger Transmissionsscan wurden durchgeführt.

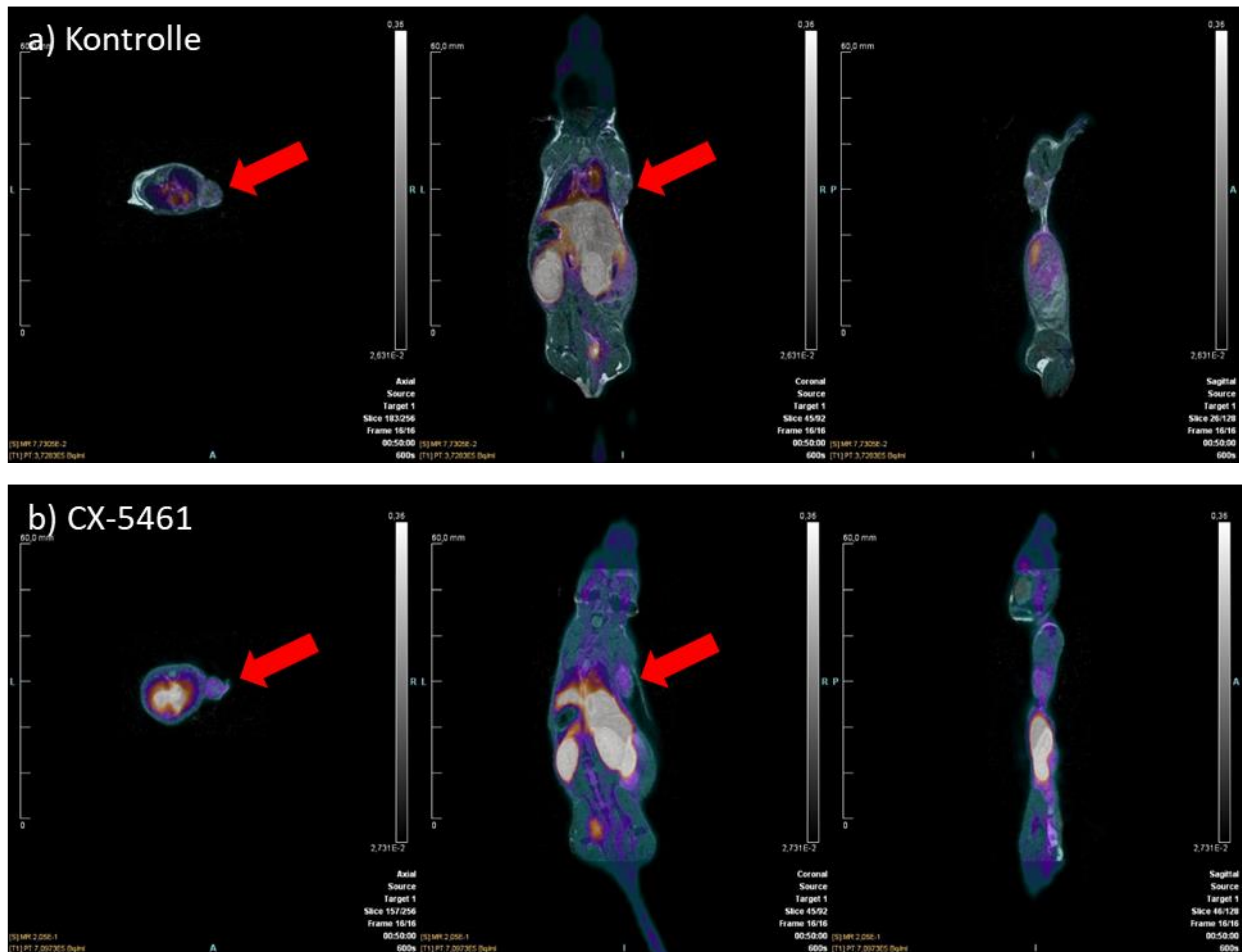


Abbildung 65: *In-vivo*-MRT/PET-Aufnahmen des [^{18}F]FGal-AI-Tracers von Mäusen mit AMp19-Tumorzellen ohne Behandlung (a) und mit Behandlung (b) mit CX-5461. Die roten Pfeile zeigen die Position des Tumors am rechten Schulterblatt der Maus.

Durch die Überlagerung der MRT- und PET-Scans lässt sich erkennen, dass bei der mit CX-5461 behandelten Maus mehr Tracer im Tumor akkumuliert wird als bei der Kontrolle. Weiterführend wurden die Tumore entnommen und biohistologische Analysen durchgeführt. Für die Auswertung der Daten wurde die Menge des Tracers die vom Tumor aufgenommen wurde in das Verhältnis von injizierter Dosis pro Kubikzentimeter des Tumors gesetzt (%ID/cc). Bei AMp19-Tumoren zeigten die dynamischen PET-Scans eine statistisch signifikant höhere Tracer-Aufnahme in den durch Seneszenz initiierten (+CX-5461) Tumoren. Die mittlere Aufnahme nach fünf Minuten in Seneszenz-initiierten Tumoren (+CX-5461) betrug 6.06 ± 0.85 %ID/cc und 3.55 ± 0.49 %ID/cc in den Kontrolltumoren. 55 Minuten nach der Tracer-Injektion jedoch nur noch 3.86 ± 1.24 %ID/cc in Seneszenz-initiierten (+CX-5461) Tumoren und 3.13 ± 1.10 %ID/cc in nicht Seneszenz-initiierten (+Vehikel) Kontrollen. Auffällig dabei ist, die durch Perfusion verursachte kontinuierliche Auswaschung des Tracers in CX-5461 behandelten Mäusen (**Abbildung 66a**). Der signifikante Unterschied zwischen

CX-5461 behandelten und unbehandelten Tieren nimmt somit im Laufe der Zeit immer mehr ab. Die Hypothese des „metabolisches Trapping“ konnte für $[^{18}\text{F}]\text{FGal-AI}$ nicht bestätigt werden.

Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin-Lösung (H&E) zeigte, dass sowohl bei den Kontrollen als auch bei der Behandlung mit CX-5461, Gewebe nicht geschädigt wurde. Es kam zu keiner offensichtlichen Immunfiltration, Nekrosen oder anderen Gewebeschäden.

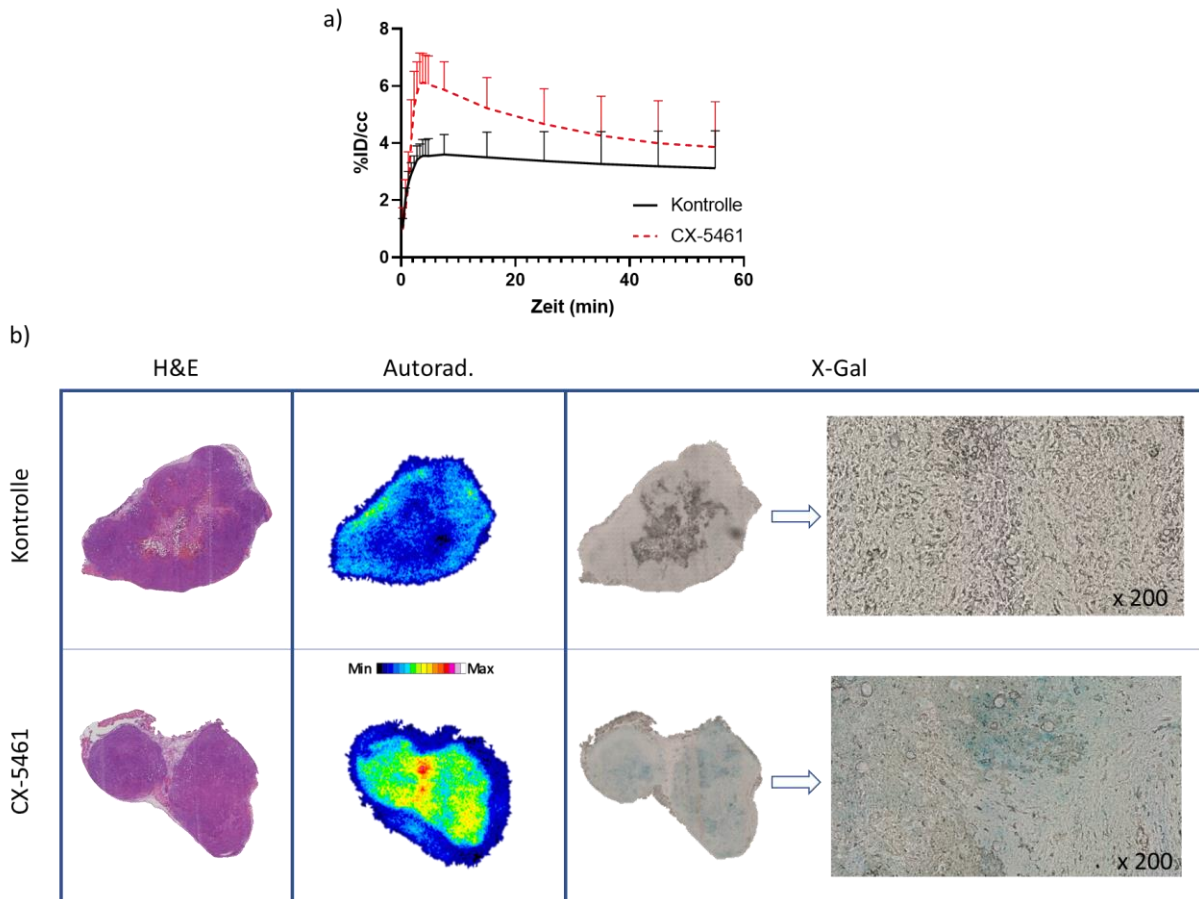


Abbildung 66: *In-vivo* time activity curves (TACs) der PET-Aufnahmen über einen Zeitraum von 60 min (a). H&E-Färbung, Autoradiographie sowie X-Gal-Färbung eines AMp19-Tumors ohne sowie mit Behandlung mit CX-5461 (b).

Die Autoradiographie der Tumorschnitte zeigte wie bereits aus den Ergebnissen des *in-vivo*-PET-Scans bekannt, eine höhere Tracerakkumulation in den mit CX-5461 behandelten Mäusen. Die X-Gal-Färbung unterstützte dies durch die Detektion eines positiven Seneszenz-Phänotyps. Die Seneszenz-initiierten Tumorschnitte wiesen dabei ein erhöhtes und breit verteiltes positives X-Gal-Signal auf (blaue Färbung), während die nicht-seneszente Tumorabschnitte weitgehend ungefärbt blieben.

Des Weiteren wurden Blut-, Darm-, Nieren-, Muskel- und Leber-Proben entnommen und biohistologisch untersucht. Dies wurde gemacht, um zu untersuchen, ob sich der Tracer in anderen Gewebezellen unterschiedlich verhält. Für die Auswertung wurde der *standard uptake value* (SUV) berechnet.^[142]

$$SUV = \frac{\text{Lokale radioaktive Konzentration} \left[\frac{\text{kBq}}{\text{mL}} \right]}{\text{Injizierte Dosis}[\text{kBq}]/\text{Gewicht}[\text{kg}]}$$

Die Untersuchung der Blut-, Darm- und Muskel-Proben ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen CX-5461 behandelten und unbehandelten Mäusen. Bei der Untersuchung von Nieren- sowie Leber-Gewebe konnte eine Signifikanz festgestellt werden.

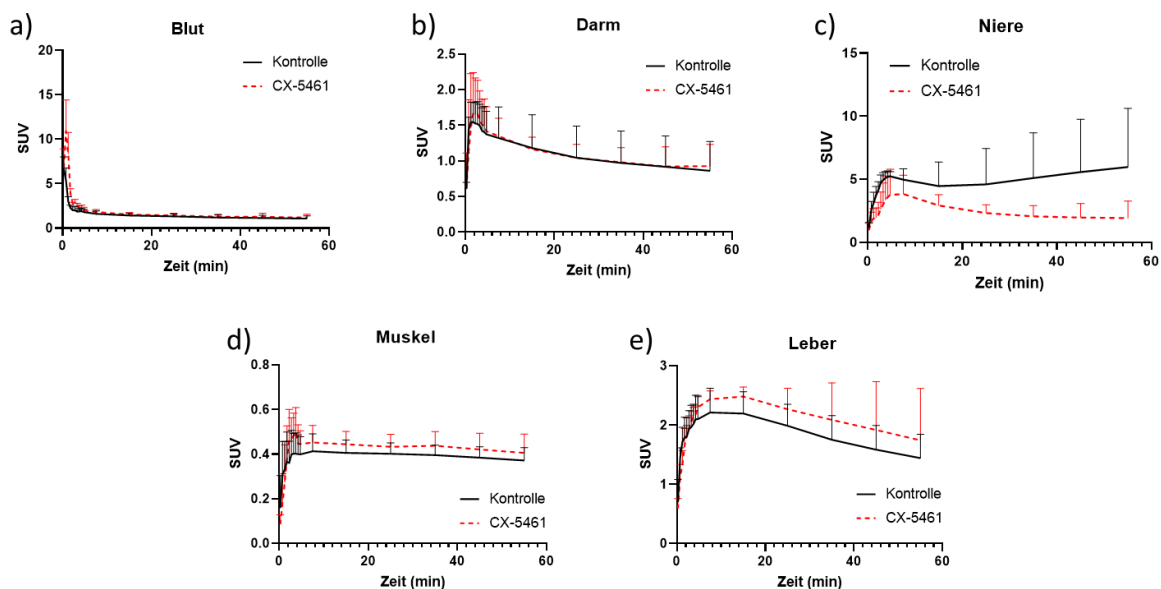


Abbildung 67: (a) Blut-, (b) Darm-, (c) Nieren-, (d) Muskel- und (e) Leber-SUVs (*standardized uptake value*) der *in-vivo*-Untersuchungen von AMP19-Zellen ohne sowie mit Behandlung (CX-5461).

In der Niere akkumulierte $[^{18}\text{F}]\text{FGal-AI}$, bzw. der Metabolit deutlich weniger in CX-5461 behandelten Mäusen als in den unbehandelten. Nach 55 min ergab sich ein SUV von 5.98 ± 3.35 für die unbehandelten und 1.92 ± 1.01 für die mit CX-5461 behandelten Mäuse. In der Leber kann man Gegenteiliges beobachten. Hier ergab sich nach 55 min ein SUV von 1.44 ± 0.33 für die unbehandelten und 1.74 ± 0.65 für die mit CX-5461 behandelten Mäuse.

Es konnte gezeigt werden, dass $[^{18}\text{F}]\text{FGal-AI}$ für die Detektion von seneszenten Zellen im Tumor- und Lebergewebe in Verbindung mit CX-5461 durchaus geeignet ist.

Experimentaltteil:

Geräte und Methoden

3D-Drucker

Bauteile, welche aus PEEK gedruckt wurden, wurden auf einem 3D-Drucker der Marke Apium Additive Technologies GmbH (Modell: Apium P220) gedruckt. Für andere Polymere (PLA, PET-G, Nylon, ...) wurde ein Drucker von Qidi Tech (Modell: X-CF Pro) verwendet.

Filamente

Das PEEK-Filament wurden von Apium (Apium PEEK 4000, \varnothing 1.75mm) bezogen. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Druckgeschwindigkeit von 25 mm/s, einer Nozletemperatur von 470 °C, einer Filament-Fördermenge (extrusion multiplier) von 91%, einer Extrusionsbreite (extrusion width) von 0.48 mm, einer Schichtdicke von 0.1 mm sowie einer Druckbetttemperatur von 130 °C erhalten. Um den Halt von PEEK an der Druckoberfläche zu erhöhen und „warping“ (Ablösen und Wölbung) möglichst zu vermeiden wurde die Druckoberfläche vor jedem Druck gereinigt und mit DimaFix von DIMA3D behandelt. Um das PEEK-Filament zu Trocknen wurde es vor dem Druck über Nacht im Trockenschrank bei 70 °C gelagert.

Für die Bauteile aus PLA, PET-G und diverser anderer Polymere wurden Filamente unterschiedlicher Marken mit einem Durchmesser von 1.75 mm verwendet. Druckgeschwindigkeit, Nozletemperatur, Filament-Fördermenge, Extrusionsbreite, Drucktemperatur sowie Druckbetttemperatur wurden individuell nach den Vorgaben des Herstellers eingestellt.

Schläuche und Anschlüsse

Die Reaktionslösungen wurden durch ETFE- Schläuche mit Innendurchmesser von 0.5 mm und einem Außendurchmesser von 1/16" gepumpt. Als Anschlüsse wurden passende Anschlüsse mit 10-32 UNF-Gewinde sowie flanschlose Anschlüsse mit 1/4"-28 Flachboden verwendet.

Software

Für das Designen am PC wurde das CAD-Programm *Autodesk Inventor Professional 2022* verwendet. Die Datei wurde als STL-Datei exportiert und mit Hilfe der Software *Simplyfy 3D* in einen G-Code umgewandelt.

Kernspinresonanzspektroskopie

Alle NMR-Spektren wurden an einem Bruker Avance III HD 300 Nano Bay, Bruker Avance III 400 oder Bruker Avance III HDX 600 aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ wird in ppm angegeben. Kopplungskonstanten (J) werden in Hz angegeben. Alle ^{13}C -NMR-Spektren wurden ^1H -breitbandenkoppelt aufgenommen. Zur Beschreibung der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: d (Dublett), m (Multipllett), s (Singulett), t (Tripllett) und deren Kombinationen. Die NMR-Spektren wurden nach dem jeweiligen Lösemittelrestprotonensignal referenziert und angegeben (^1H -NMR CDCl_3 7.26, CDCl_2 5.32, DMF- d_7 2.75, 2.92, 8.03; ^{13}C -NMR CDCl_3 77.2, CDCl_2 53.84, DMF- d_7 29.8, 34.9, 163.2).^[143] Die Signalzuweisung erfolgte durch 2D-Korrelationsspektren (^1H - ^1H -COESY, ^1H - ^{13}C -HSQC und ^1H - ^{13}C -HMBC).

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die HPLC-Messungen wurde mit einem System der Serie Agilent 1260 (Agilent, Santa Clara, USA) mit einer Umkehrphasen-Analysesäule (Luna C18(2), 100 Å, 250 × 4.6 mm, 5 µm; Phenomenex, Torrance, Kalifornien, USA) durchgeführt. Für die Detektion des radioaktiven Isotops wurde ein Flow-Count-Detektionssystem (Modell 106, Eckert & Ziegler, Berlin, Deutschland) in Kombination mit einem Diodendetektor (B-FC-3500-A, Eckert & Ziegler, Berlin, Deutschland) verwendet. Die mobilen Phasen bestand aus CH_3CN und H_2O (+ 0.1% TFA), die Flussrate betrug 1 mL/min. Das Standard-Gradientenprogramm begann mit 5% CH_3CN für 2 Minuten. Der CH_3CN -Anteil wurde im Anschluss über 15 Minuten sukzessiv auf 100 % erhöht und für weitere 6 Minuten gehalten.

Radioaktive DC

Radioaktive Verhältnisse der Reaktionsprodukte wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC, PolyGram Sil G/UV254, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) analysiert und mit einem Cyclone Plus Phosphorimager (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) ausgewertet. Als Programm für die Auswertung diente dabei *OptiQuant*.

Vorbereitung der Zellen:

Die HCC-Zelllinien AMp19 wurden aus Lebertumoren abgeleitet, die mittels hydrodynamischer Schwanzveneninjektion (HDTV) und Transposition erzeugt wurden.^[144, 145]

Die Zelllinien wurde vom Zender-Labor bereitgestellt.

Für das Wachstum der Zellen wurden diese in einem feuchten Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Zur Verbesserung der Wachstumsbedingungen wurde fötales Rinderserum (*fetal bovine serum*, FBS) für 30 Minuten zur Zellkultur gegeben und bei 57 °C hitzeinaktiviert. Dies ist notwendig, um Komplementproteine im Serum zu deaktivieren. Komplementproteine sind Bestandteile des angeborenen Immunsystems und tragen zur Bekämpfung von Entzündungen und Krankheitserreger bei. Um ungewollte Wechselwirkungen zu vermeiden müssen diese inaktiviert werden.^[146] Für die Bestimmung der Zellzahl wurden Einzelzellsuspensionen mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Kammer gezählt. Vor Erreichen einer Konfluenz (lückenlose Bedeckung der Oberfläche des Kulturgefäßes mit Zellen) von 80% wurden die Zellen passagiert. Nach einer kurzen Spülung der Zellen mit phosphatgepufferter Dulbecco-Salzlösung (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, DPBS) wurden sie mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert und abgelöst. Das Zellpellet wurde abzentrifugiert und resuspendiert. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen in FBS angereichertem Medium mit 10% Dimethylsulfoxid und bei -80 °C eingefroren.

Für die *in-vitro*-Untersuchungen von [¹⁸F]FGal-AI wurden sowohl seneszente als auch nicht-seneszente Zellen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, geerntet und quantifiziert. 1×10^6 Zellen wurden in 1 mL PBS in ein Gammazählrohr überführt und 40 Minuten lang bei 37 °C mit 22.12 MBq in 600 µL Tracer inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, zentrifugiert (1500 rpm), der Überstand abgetrennt und wieder in 1 mL PBS resuspendiert. Die in den Zellen verbliebende Radioaktivität wurde mithilfe eines Wallac 1480 WIZARD 3 (Perkin-Elmer) in Verbindung mit einem radioaktiven Standard (2.3 MBq/50 mL) gemessen.^[147]

Um Lebertumore für die *in-vivo*-Experimente zu erzeugen, wurden sechs bis sieben Wochen alte Mäuse vom Stamm: CB17.Cg-Prkdc^{scid}Lyst^{bg-J}/Cr verwendet. AMp19-Zellen wurden frisch aufgetaut, dreimal passagiert und als Einzelzellsuspensionen vor der Verwendung auf Eis gelagert. Die Mäuse wurden unter Verwendung von 1.5% Isofluran, in Sauerstoff, betäubt.

Nach der Betäubung wurden sie rasiert und es wurden 0.5×10^6 AMp19-Zellen subkutan in die rasierte rechte Flanke der Mäuse injiziert. Etwa drei Wochen nach der Injektion, hatten die meisten Tumore eine Größe von etwa 100 mm^3 erreicht. Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe erhielt zur Seneszenzinduktion intraperitoneal an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 25 mg/kg/d CX-5461, während die Kontrollgruppe ein Vehikel (50 mM Mononatriumphosphat, $\text{pH } 4.5$) erhielt.

Färbungen und Aufnahmemethode:

Für die X-Gal-Färbung wurden die Zellen in einer Lösung von 0.25% Glutaraldehyd und 2% Formaldehyd in DPBS bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte zweimaliges Waschen mit 1 mM Magnesiumchlorid in DPBS ($\text{pH } 6.0$). Die fixierten Zellen wurden bei 37°C in einer frisch hergestellten, vorgewärmten und gefilterten Färbelösung Licht- und vor Verdunstung geschützt inkubiert. Diese Färbelösung enthielt 1 mg/mL 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal), 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] und 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(II) [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$] in 1 mM MgCl_2 /DPBS-Lösung.^[148] Die Färbung wurde durch zweimaliges Waschen mit 1 mM MgCl_2 /DPBS-Lösung gestoppt und mit einem Lichtmikroskop (Axiovert 200, ausgestattet mit AxioCam und AxioVision, Carl Zeiss) untersucht. Es wurden zufällig Bilder generiert, manuell ausgezählt, und der prozentuale Anteil an SA- β -Gal-positiven Zellen (Seneszenz-assoziierte Aktivität, SA) im Verhältnis zu den Gesamtzellen berechnet.

Die Hämatoxylin-Eosinfärbung (H&E) der Autoradiographieschnitte wurde von Fachleuten der Hautklinik am Universitätsklinikum Tübingen durchgeführt.

Für die Autoradiographiemessungen wurden frisch isolierte Tumore in *TissueTek Optimal Cutting Temperature Compound* eingebettet und bei -20°C mit Hilfe eines Kryotom (Leica) geschnitten. Die $20 \mu\text{m}$ dicken Kryoschnitte wurden auf Objektträger aufgetragen. Für die Autoradiographie wurden die Objektträger über Nacht mit dem Phosphorschirm in einer Belichtungskassette (Molecular Dynamics von GE Healthcare) belichtet. Anschließend wurde der Schirm mit einem Phosphorimager (Storm 840, GE Healthcare) mit einer Auflösung von $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ gescannt.

Die Magnetresonanztomographie erfolgte mittels eines 7-Tesla-Kleintier-MRT-Scanners mit Ganzkörperspule (Bruker Biospin). Die PET-Messungen erfolgte auf drei identischen, speziell für Kleintiere entwickelten PET-Scannern von Inveon.

Arbeitstechniken:

Aufgeführte Reagenzien und Lösemittel wurden von der Chemikalienversorgung der Universität Tübingen oder von folgenden Firmen bezogen: ABCR Chemicals, Acros Organics, Alfa Aesar, Applichem, Carbolution Chemicals, Fluka, Fluorochem und Merck. Lösemittel wurden in technischer Qualität bezogen und nach literaturbekannter Methode gereinigt und getrocknet.^[149] Luftpfindliche Reaktionen wurden, falls nicht anders beschrieben, mittels Schlenk-Technik unter Stickstoff-Schutzatmosphäre durchgeführt.

Synthese der Verbindungen:

AAV 1: Königs & Knorr Glycosylierung^[93]

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-galactopyranosylbromid **27** (3.0 eq.) wird zusammen mit 2-(Difluormethyl)-5-nitrophenol **28**, 4-Fluor-2-hydroxybenzaldehyd **33** oder mit einem der Hydroxynitrobenzaldehyd **32**, **32-1**, **32-2** (1.0 eq.) sowie Ag₂O (2 eq.) in einem Rundkolben vorgelegt und inertisiert. Trockenes MeCN wird hinzugegeben. Die entstandene Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wird die Suspension über Celite gefiltert und mit EtOAc nachgewaschen. Das Lösemittel wird am Vakuum entfernt. Das getrocknete Rohprodukt wird wieder in EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wird mit H₂O, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die organische Phase wird anschließend am Vakuum entfernt. Das gewaschene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt oder kristallisiert.

AAV 2: Trichloracetimidat-Methode^[98]

Das Trichloracetimidat **31** (3.00 eq.) sowie 2-(Difluormethyl)-5-nitrophenol **28**, 4-Fluor-2-hydroxybenzaldehyd **33** oder eines der Hydroxynitrobenzaldehyd **32**, **32-1**, **32-2** (1.0 eq.) werden mit wasserfreiem Na₂SO₄ unter Stickstoff-Atmosphäre in trockenem DCM gelöst und 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf 0 °C abgekühlt und es wird TMSOTf (3.0 eq.) hinzugegeben. Nach 30 Minuten wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 3 Stunden gerührt. Die Reaktion wird mit Hilfe von

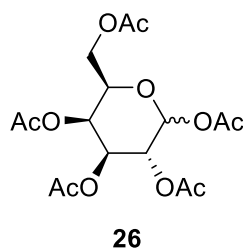
4.23 (m, 3H, 5'-H u. 6'-H), 2.21 (s, 3H, CH₃), 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 3H; CH₃), 2.03 (s, 3H; CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 187.7 (CHO), 170.6 (Carbonyl-C), 170.0 (Carbonyl-C), 169.9 (Carbonyl-C), 169.3 (Carbonyl-C), 158.4, 151.8, 129.5, 129.5, 117.9, 111.2 (I-C bis 6-C), 99.2 (1'-C), 72.2 (5'-C), 70.3 (3'-C), 68.1 (2'-C), 66.9 (4'-C), 62.0 (6'-C), 20.6 (CH₃), 20.6 (CH₃), 20.5 (CH₃), 20.5 (CH₃).

MS: m/z [M + Na]⁺ = 520,11; m/z [M + K + MeOH]⁺ = 552.14.

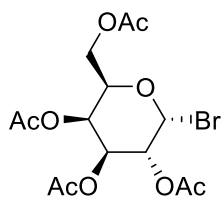
Retentionszeit HPLC: 15.91 min.

1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-galactopyranose (26)



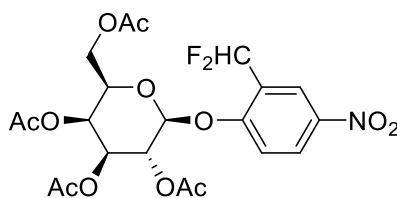
D-Galactose (2.51 g, 13.9 mmol, 1 eq.) wird in einem Rundkolben vorgelegt, inertisiert und anschließend in Pyridin (13 mL) gelöst. Nachdem die Lösung auf 0 °C heruntergekühlt wurde, wird Essigsäureanhydrid (13.0 mL, 138 mmol, 14 eq.) zugegeben. Das entstandene Reaktionsgemisch wird langsam auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Die Reaktion wird durch die Zugabe von Eiswasser (20 mL) gestoppt und die wässrige Phase mit EtOAc (2 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 10% HCl (1 × 15 mL), gesättigter NaHCO₃-Lösung (3 × 15 mL), gesättigter NaCl-Lösung (2 × 15 mL) gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Die organische Phase wird am Vakuum eingedunstet und überschüssiges Pyridin mit Toluol (3 × 15 mL) co-evaporiert. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie (SiO₂, PE/EtOAc 3:2) aufgereinigt. Ausbeute: 89%.

Die Analytik entspricht der Literatur.^[151]

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylbromid (**27**)**27**

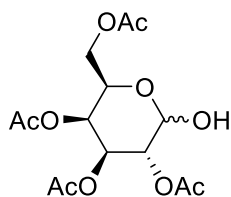
1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- β -D-galactopyranose (**26**) (2.00 g, 5.12 mmol, 1 eq.) wird in einem Rundkolben vorgelegt, inertisiert und in trockenem DCM (10 mL) gelöst. Das Reaktionsgemisch wird auf 0 °C gekühlt und anschließend nacheinander Essigsäureanhydrid (1 mL) und 33% HBr in Eisessig (4.0 mL, 23.1 mmol, 6 eq.) hinzugegeben. Unter langsamer Erwärmung auf RT wird das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Anschließend wird das Gemisch auf Eiswasser gekippt und die wässrige Phase mit EtOAc (2 \times 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H₂O (3 \times 15 mL), gesättigter NaHCO₃-Lösung (3 \times 15 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (3 \times 15 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösemittel werden am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt (orangefarbener Sirup) wird ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

Die Analytik entspricht der Literatur.^[152]

4-[(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)oxy]-(3-difluormethyl)-nitrobenzol (**29**):**29**

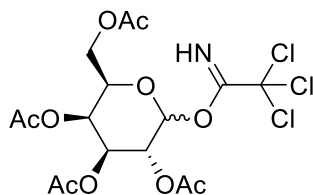
Produkt **29** (0.5g, 0.97 mmol) wurde nach AVV1 und AVV2 hergestellt und anschließend aus PE/EA 1:1 kristallisiert. Derivat **29** konnte nach AVV1 mit einer Ausbeute von 45.1% und nach AVV2 mit 28.9% erhalten werden. Das Produkt **29** wird durch Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH 19:1, R_f = 0.53) aufgereinigt.

Die Analytik entspricht der Literatur.^[150]

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-galactopyranose (30)**30**

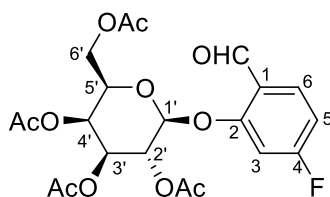
1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-galactopyranose (**26**) (2.00 g, 5.12 mmol, 1 eq.) wird in einem Rundkolben vorgelegt, inertisiert und in trockenem DMF (30 mL) gelöst. Das Reaktionsgemisch wird auf 0 °C gekühlt und Hydrazinacetat (0.72 g, 7.81 mmol, 1.5 eq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird unter langsamer Erwärmung auf RT über Nacht gerührt. Anschließend wird die Suspension mit 30 mL DCM verdünnt. Die organische Phase wird mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (2 × 15 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (1 × 20 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösemittel werden am Vakuum entfernt und das erhaltene Rohrprodukt wird durch SiO₂-Gel Säulenchromatographie (PE/EtOAc 1:1) aufgereinigt. Produkt **30** konnte mit einer Ausbeute von 76 % erhalten werden.

Die Analytik entspricht der Literatur.^[152]

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-galactopyranosyl-trichloracetimidat (31)**31**

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-galactopyranose (**30**) (1.00 g, 2.88 mmol, 1 eq.) wird in einem Rundkolben vorgelegt und inertisiert. Nacheinander werden abs. DCM (20 mL), K₂CO₃ (3.2 g, 23.2 mmol, 8 eq.) und Trichloracetonitril (3,6 mL, 35.9 mmol, 12.5 eq.) bei Raumtemperatur hinzugegeben. Die entstandene Reaktionsmischung wird für 50 h gerührt. Anschließend wird die Suspension über Celite gefiltert und das Lösemittel am Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohrprodukt wird durch SiO₂-Gel Säulenchromatographie (PE/EtOAc 1:1 v/v) aufgereinigt. Produkt **31** konnte mit einer Ausbeute von 73% isoliert werden.

Die Analytik entspricht der Literatur^[152]

2-[(2,3,4,6 -Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)oxy]-(4-fluor)-benzaldehyd (**34**):**34**

Produkt **34** (0.3g, 0.64 mmol) wurde nach AAV 1 hergestellt und konnte aus PE/EA 1:1 kristallisiert werden. Glycosid **34** wurde mit einer Ausbeute von 43.7% erhalten (SiO₂ mit PE/EA 1:1; R_f = 0.52).

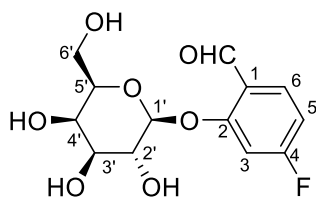
¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂): δ [ppm] = 10.20 (s; 1H, CHO), 7.86 (dd; J = 8.8 Hz, J = 6.8 Hz, 1H, 6-*H*), 6.93 (dd; J = 10.5 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, 5-*H*), 6.89 (m; 1H, 3-*H*), 5.54 (dd, J = 10.5 Hz, J = 7.9 Hz, 1H, 2'-*H*), 5.53 (d; J = 3,5 Hz, 1H, 4'-*H*), 5.17 (m, 2H, 1'-*H* u. 3'-*H*), 4.18 (m, 3H, 5'-*H* u. 6'-*H*), 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.05 (s, 3H; CH₃), 2.00 (s, 3H; CH₃).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₂Cl₂): δ [ppm] = 188.0 (CHO), 170.8 (Carbonyl-C), 170.7 (Carbonyl-C), 170.5 (Carbonyl-C), 169.9 (Carbonyl-C), 168.5 (d; J = 255.7 Hz, 4-C), 160.7(d; J = 11.3 Hz, 2-C), 131.0 (d; J = 11.3 Hz, 6-C), 123.3(d; J = 2.8 Hz, 1-C), 111.2 (d; J = 22.1 Hz, 3-C), 104.3 (d; J = 22.5 Hz, 5-C), 99.2 (1'-C), 72.2 (5'-C), 70.3 (3'-C), 68.1 (2'-C), 66.9 (4'-C), 62.0 (6'-C), 20.6 (CH₃), 20.6 (CH₃), 20.5 (CH₃), 20.5 (CH₃).

¹⁹F-NMR (565 MHz, CD₂Cl₂): δ [ppm]: -100.6.

MS: m/z [M + Na]⁺ = 493.07.

Retentionszeit HPLC: 15.79 min.

2-[(β -D-Galactopyranosyl)oxy]-(4-fluor)-benzaldehyd (**FGal-AI**):**FGal-AI**

Produkt **34** (0.1g, 0.21 mmol, 1eq.) wurde in trockenem Methanol und unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Eine 0.5 M Lösung NaOMe in Methanol (0.25 mL, 6.75 mmol, 32 eq.) wurde der Reaktionslösung hinzuge tropft und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Amberlight IR 120 (H^+) neutralisiert (pH 8.0). Das Gemisch wurde über Watte gefiltert und alle flüchtigen Stoffe am Vakuum entfernt.^[150] Ausbeute: 78.2%.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = δ [ppm] = 10.38 (s; 1H, CHO), 7.78 (dd; $J = 8.5$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1H, 6-H), 7.18 (dd; $J = 11.2$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, 5-H), 7.00 (m; 1H, 3-H), 5.39 (s; 1H, OH), 4.99 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.68 (s; 2H, OH), 3.71 (m; 3H, 2'-H, 4'-H u. 5'-H), 3.55 (m, 1H, 6'-H), 3.45 (m, 2H, 3'-H u. OH).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 188.7 (CHO), 168.5 (d; $J = 252.7$ Hz, 4-C), 161.2 (d; $J = 12.2$ Hz, 2-C), 129.6 (d; $J = 11.6$ Hz, 6-C), 121.9 (d; $J = 2.8$ Hz, 1-C), 109.5 (d; $J = 22.7$ Hz, 3-C), 103.8 (d; $J = 25.9$ Hz, 5-C), 101.5 (1'-C), 75.9 (5'-C), 72.8 (3'-C), 70.1 (2'-C), 68.1 (4'-C), 60.4 (6'-C).

^{19}F -NMR (282 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]: -100.5.

MS: m/z [M + Na] $^+$ = 325.11.

Retentionszeit HPLC: 9.05 min.

Teil D: Literatur

1. F. Menzel, T. Klein, T. Ziegler, and J. M. Neumaier, *React. Chem. Eng.* **2020**, 5(7), 1300-1310.
2. F. Menzel, J. Cotton, T. Klein, A. Maurer, T. Ziegler, and J. M. Neumaier, *J. Flow Chem.* **2023**, 13, 247-256.
3. F. Menzel, J. Cotton, T. Ziegler, A. Maurer, and J. M. Neumaier, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2023**, 67(2), 40-58.
4. H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, *Ca-Cancer J. Clin.* **2021**, 71(3), 209-249.
5. S. H. Hassanpour and M. Dehghani, *Journal of Cancer Research and Practice* **2017**, 4(4), 127-129.
6. M. Brussig, *KZfSS Kölner Zeitschrift für Soziologie und Sozialpsychologie* **2015**, 67(1), 295-324.
7. D. Crosby, S. Bhatia, K. M. Brindle, L. M. Coussens, C. Dive, M. Emberton, S. Esener, R. C. Fitzgerald, S. S. Gambhir, P. Kuhn, T. R. Rebbeck, and S. Balasubramanian, *Science* **2022**, 375(6586).
8. N. A. Giraldo, P. Nguyen, E. L. Engle, G. J. Kaunitz, T. R. Cottrell, S. Berry, B. Green, A. Soni, J. D. Cuda, J. E. Stein, J. C. Sunshine, F. Succaria, H. Xu, A. Ogurtsova, L. Danilova, C. D. Church, N. J. Miller, S. Fling, L. Lundgren, N. Ramchurren, J. H. Yearley, E. J. Lipson, M. Cheever, R. A. Anders, P. T. Nghiem, S. L. Topalian, and J. M. Taube, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **2018**, 6(1), 99.
9. Y. Liu, X. Hu, C. Han, L. Wang, X. Zhang, X. He, and X. Lu, *BioEssays* **2015**, 37(12), 1277-1286.
10. M. A. Al-Mohanna, P. S. Manogaran, Z. Al-Mukhalafi, K. A Al-Hussein, and A. Aboussekhra, *Oncogene* **2004**, 23(1), 201-212.
11. B. Shamloo and S. Usluer, *Cancers* **2019**, 11(8).
12. A. W. Currier, E. A. Kolb, R. G. Gorlick, M. E. Roth, V. Gopalakrishnan, and V. B. Sampson, *Sci. Rep.* **2019**, 9(1), 6161.
13. S. P. Jackson and J. Bartek, *Nature* **2009**, 461(7267), 1071-1078.
14. K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman, *Cell Prolif.* **2003**, 36(3), 131-149.
15. R. Yosef, N. Pilpel, N. Papismadov, H. Gal, Y. Ovadya, E. Vadai, S. Miller, Z. Porat, S. Ben-Dor, and V. Krizhanovsky, *The EMBO Journal* **2017**, 36(15), 2280-2295.

16. L. Hayflick and P. S. Moorhead, *Exp. Cell Res.* **1961**, 25(3), 585-621.
17. J. Campisi and F. d'Adda di Fagagna, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8(9), 729-740.
18. M. Collado, M. A. Blasco, and M. Serrano, *Cell* **2007**, 130(2), 223-233.
19. A. Calcinotto, J. Kohli, E. Zagato, L. Pellegrini, M. Demaria, and A. Alimonti, *Physiol. Rev.* **2019**, 99(2), 1047-1078.
20. C. A. Schmitt, B. Wang, and M. Demaria, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2022**, 19(10), 619-636.
21. J. Papaconstantinou, *Cells* **2019**, 8(11), 1383.
22. M. Demaria, N. Ohtani, Sameh A. Youssef, F. Rodier, W. Toussaint, James R. Mitchell, R.-M. Laberge, J. Vijg, H. Van Steeg, Martijn E. T. Dollé, Jan H. J. Hoeijmakers, A. de Bruin, E. Hara, and J. Campisi, *Dev. Cell* **2014**, 31(6), 722-733.
23. J. Severino, R. G. Allen, S. Balin, A. Balin, and V. J. Cristofalo, *Exp. Cell Res.* **2000**, 257(1), 162-171.
24. D. J. Kurz, S. Decary, Y. Hong, and J. D. Erusalimsky, *J. Cell Sci.* **2000**, 113(20), 3613-3622.
25. B. van der Loo, M. J. Fenton, and J. D. Erusalimsky, *Exp. Cell Res.* **1998**, 241(2), 309-315.
26. J. J. Vaquero and P. Kinahan, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2015**, 17, 385-414.
27. H. W. Strauss, B. Zaret, P. Pieri, and A. Lahiri, *J. Nucl. Cardiol.* **2017**, 24(6), 1848-1849.
28. S. M. Larson, *Journal of Nuclear Medicine* **2020**, 61, 74S-82S.
29. V. Benfante, A. Stefano, M. Ali, R. Laudicella, W. Arancio, A. Cucchiara, F. Caruso, F. P. Cammarata, C. Coronello, G. Russo, M. Miele, A. Vieni, A. Tuttolomondo, A. Yezzi, and A. Comelli, *Diagnostics* **2023**, 13(7), 1210.
30. J. Pacák, Z. Točík, and M. Černý, *Chem. Commun.* **1969**, 77.
31. Z. G. Wang, M. M. Yu, Y. Han, F. Y. Wu, G. J. Yang, D. C. Li, and S. M. Liu, *Medicine* **2016**, 95(48).
32. S. Yu, *Biomed. Imaging Intervention J.* **2006**, 2(4).
33. C. Nanni, S. Fanti, and D. Rubello, *J. Nucl. Med.* **2007**, 48(10), 1577.
34. H.-K. Kim, M. R. Javed, S. Chen, K. A. Zettlitz, J. Collins, A. M. Wu, C.-J. C. J. Kim, R. Michael van Dam, and P. Y. Keng, *RSC Adv.* **2019**, 9(55), 32175-32183.
35. M. Wagner, U. Seitz, A. Buck, B. Neumaier, S. Schultheiss, M. Bangerter, M. Bommer, F. Leithäuser, E. Wawra, G. Munzert, and S. N. Reske, *Cancer Res* **2003**, 63(10), 2681-2687.

36. K. Wienhard, *PET : Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie*, ed. R. Wagner, W.D. Heiss, and K. Wienhard. **1989**, Berlin: Springer.
37. M. E. Phelps, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97(16), 9226-9233.
38. J. Mincke, J. Courtyn, C. Vanhove, S. Vandenberghe, and K. Steppe, *Front. Plant. Sci.* **2021**, 12, 602550.
39. M. P. Schmidt, S. D. Mamet, R. A. Ferrieri, D. Peak, and S. D. Siciliano, *Mol. Imaging* **2020**, 19.
40. P. Goethals, A. Volkaert, P. Jacobs, S. Roels, and J. Carmeliet, *Eng. Geol.* **2009**, 103(3), 134-138.
41. Y. Li, S. Matej, J. S. Karp, and S. D. Metzler, *Phys. Med. Biol.* **2015**, 60(2), 647-670.
42. C. L. Melcher, *J. Nucl. Med.* **2000**, 41(6), 1051-1055.
43. A. Rahmim and H. Zaidi, *Nucl. Med. Commun.* **2008**, 29(3), 193-207.
44. M. M. Khalil, J. L. Tremoleda, T. B. Bayomy, and W. Gsell, *Int. J. Mol. Imaging* **2011**, 2011.
45. R. Boellaard, A. van Lingen, and A. A. Lammertsma, *J. Nucl. Med.* **2001**, 42(5), 808-817.
46. F. Bloch, W. W. Hansen, and M. Packard, *Phys. Rev.* **1946**, 70(7-8), 474-485.
47. E. M. Purcell, H. C. Torrey, and R. V. Pound, *Phys. Rev.* **1946**, 69(1-2), 37-38.
48. A. Webb, *Introduction to biomedical imaging*. **2022**: John Wiley & Sons.
49. C. Catana, A. R. Guimaraes, and B. R. Rosen, *J. Nucl. Med.* **2013**, 54(5), 815-824.
50. R. F. Muzic, Jr. and F. P. DiFilippo, *Semin Roentgenol* **2014**, 49(3), 242-254.
51. M. P. Unterweger and R. Fitzgerald, *Appl. Radiat. Isot.* **2020**, 159.
52. M. A. Synowiecki, L. R. Perk, and J. F. W. Nijssen, *EJNMMI radiopharm. chem.* **2018**, 3(1), 3.
53. J. A. P. H. Jadvar *Clinical PET and PET/CT* **2005**, London: Springer.
54. M. Conti and L. Eriksson, *EJNMMI Physics* **2016**, 3(1), 8.
55. M. E. Phelps, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97(16), 9226-9233.
56. M. E. Phelps and J. C. Mazziotta, *Science* **1985**, 228(4701), 799.
57. U. Amaldi, R. Bonomi, S. Braccini, M. Crescenti, A. Degiovanni, M. Garlasché, A. Garonna, G. Magrin, C. Mellace, P. Pearce, G. Pittà, P. Puggioni, E. Rosso, S. Verdú Andrés, R. Wegner, M. Weiss, and R. Zennaro, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* **2010**, 620(2), 563-577.
58. G. Stöcklin and V. W. Pike, *Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography - Methodological Aspects*. Vol. 24. **1993**: Springer.

59. T. G. Turkington, *J. Nucl. Med. Technol.* **2001**, 29(1), 4-11.
60. C. R. Wade, A. E. J. Broomsgrove, S. Aldridge, and F. P. Gabbai, *Chem. Rev.* **2010**, 110(7), 3958-3984.
61. G. Luurtsema, V. Pichler, S. Bongarzone, Y. Seimbille, P. Elsinga, A. Gee, and J. Vercoillie, *EJNMMI radiopharm. chem.* **2021**, 6(1), 34.
62. J. Rong and S. H. Liang, *Aliphatic [¹⁸F]Fluorination Chemistry for Positron Emission Tomography*. Fluorination. **2018**, Singapore: Springer.
63. T. Ido, C.-N. Wan, V. Casella, J. S. Fowler, A. P. Wolf, M. Reivich, and D. E. Kuhl, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1978**, 14(2), 175-183.
64. J. Ajenjo, G. Destro, B. Cornelissen, and V. Gouverneur, *EJNMMI radiopharm. chem.* **2021**, 6(1), 33.
65. E. L. Cole, M. N. Stewart, R. Littich, R. Hoareau, and P. J. Scott, *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, 14(7), 875-900.
66. A. F. Hollemann and E. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. 102 ed. **2019**: deGruyter.
67. S. Preshlock, M. Tredwell, and V. Gouverneur, *Chem. Rev.* **2016**, 116(2), 719-766.
68. T. A. Hamlin, M. Swart, and F. M. Bickelhaupt, *ChemPhysChem* **2018**, 19(11), 1315-1330.
69. B. Chiavarino, M. E. Crestoni, S. Fornarini, F. Lanucara, J. Lemaire, and P. Maître, *Angew. Chem.* **2007**, 46(12), 1995-1998.
70. A. V. Mossine, S. S. Tanzey, A. F. Brooks, K. J. Makaravage, N. Ichiishi, J. M. Miller, B. D. Henderson, T. Erhard, C. Bruetting, M. B. Skaddan, M. S. Sanford, and P. J. H. Scott, *Nat. Protoc.* **2020**, 15(5), 1742-1759.
71. T. Kniess, M. Laube, P. Brust, and J. Steinbach, *MedChemComm* **2015**, 6(10), 1714-1754.
72. M. R. Zhang and K. Suzuki, *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, 7(18), 1817-1828.
73. D. Block, H. H. Coenen, and G. Stöcklin, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1987**, 24(9), 1029-1042.
74. A. Bauman, M. Piel, R. Schirmacher, and F. Rösch, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 9165-9167.
75. H. Schieferstein, M. Piel, F. Beyerlein, H. Lüddens, N. Bausbacher, H.-G. Buchholz, T. L. Ross, and F. Rösch, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23(3), 612-623.
76. E. G. Robins, Y. Zhao, I. Khan, A. Wilson, S. K. Luthra, and E. Årstad, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20(5), 1749-1751.

77. D. van der Born, A. Pees, A. J. Poot, R. V. A. Orru, A. D. Windhorst, and D. J. Vugts, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46(15), 4709-4773.
78. T. K. Heinrich, V. Gottumukkala, E. Snay, P. Dunning, F. H. Fahey, S. Ted Treves, and A. B. Packard, *Appl. Radiat. Isot.* **2010**, 68(1), 96-100.
79. T. Peters, A. Vogg, I. M. Oppel, and J. Schmaljohann, *Appl. Radiat. Isot.* **2014**, 94, 141-146.
80. M.-R. Zhang, K. Furutsuka, Y. Yoshida, and K. Suzuki, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2003**, 46(6), 587-598.
81. S. Minchin and J. Lodge, *Essays Biochem.* **2019**, 63(4), 433-456.
82. T. K. Lindhorst, *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry.* **2007**: John Wiley & Sons.
83. E. Campbell, C. Jordan, and R. Gilmour, *Chem. Soc. Rev.* **2023**, 52(11), 3599-3626.
84. K. Ishiwata, T. Ido, T. Nakajima, H. Ohru, I. Kijima-Suda, and M. Itoh, *Nucl. Med. Biol.* **1990**, 17(4), 363-367.
85. N. Turkman, A. Pal, W. P. Tong, J. G. Gelovani, and M. M. Alauddin, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2011**, 54(5), 233-238.
86. J. R. Salas, B. Y. Chen, A. Wong, D. Cheng, J. S. Van Arnam, O. N. Witte, and P. M. Clark, *J. Nucl. Med.* **2018**, 59(10), 1616-1623.
87. H. Paulsen, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1982**, 21(3), 155-173.
88. X. Zhu and R. R. Schmidt, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48(11), 1900-1934.
89. S. A. Geringer, Y. Singh, D. J. Hoard, and A. V. Demchenko, *Chem. Eur. J.* **2020**, 26(36), 8053-8063.
90. W. Koenigs and E. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, 34(1), 957-981.
91. M. J. Hadd and J. Gervay, *Carbohydr. Res.* **1999**, 320(1), 61-69.
92. Y. Singh and A. V. Demchenko, *Chem. Eur. J.* **2020**, 26(5), 1042-1051.
93. B. Helferich and E. Schmitz-Hillebrecht, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1933**, 66(3), 378-383.
94. V. A. Demchenko, *Curr. Org. Chem.* **2003**, 7(1), 35-79.
95. K. C. Nicolaou and H. J. Mitchell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40(9), 1576-1624.
96. R. Das and B. Mukhopadhyay, *ChemistryOpen* **2016**, 5(5), 401-433.
97. S. S. Nigudkar and A. V. Demchenko, *Chem. Sci.* **2015**, 6(5), 2687-2704.
98. R. R. Schmidt and J. Michel, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25(8), 821-824.
99. R. U. Lemieux, *Pure Appl. Chem.* **1971**, 25(3), 527-548.
100. M. Miljkovic, *Anomeric Effect and Related Stereoelectronic Effects.* **2014**, US: Springer.

101. B. N. A. Mbadugha and F. M. Menger, *Org. Lett.* **2003**, 5(22), 4041-4044.
102. F. S. Ekholm, M. Poláková, A. J. Pawłowicz, and R. Leino, *Synthesis* **2009**, 2009(04), 567-576.
103. M. Movsisyan, E. I. P. Delbeke, J. K. E. T. Berton, C. Battilocchio, S. V. Ley, and C. V. Stevens, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45(18), 4892-4928.
104. C. F. Carter, H. Lange, S. V. Ley, I. R. Baxendale, B. Wittkamp, J. G. Goode, and N. L. Gaunt, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, 14(2), 393-404.
105. J. Wegner, S. Ceylan, and A. Kirschning, *Chem. Commun.* **2011**, 47(16), 4583-4592.
106. P. J. Kitson, M. H. Rosnes, V. Sans, V. Dragone, and L. Cronin, *Lab Chip* **2012**, 12(18), 3267-3271.
107. C. J. Mallia and I. R. Baxendale, *Org. Process Res. Dev.* **2016**, 20(2), 327-360.
108. M. B. Plutschack, B. Pieber, K. Gilmore, and P. H. Seeberger, *Chem. Rev.* **2017**, 117(18), 11796-11893.
109. T. A. Franke and A. Wixforth, *ChemPhysChem* **2008**, 9(15), 2140-2156.
110. S. Rossi, A. Puglisi, and M. Benaglia, *ChemCatChem* **2018**, 10(7), 1512-1525.
111. I. T. S. Heikkinen, C. Kauppinen, Z. Liu, S. M. Asikainen, S. Spoljaric, J. V. Seppälä, H. Savin, and J. M. Pearce, *Additive Manufacturing* **2018**, 23, 99-107.
112. F. N. Cogswell, *Thermoplastic Aromatic Polymer Composites : A Study of the Structure, Processing and Properties of Carbon Fibre Reinforced Polyetheretherketone and Related Materials.* **1992**: Butterworth-Heinemann.
113. P. A. Schweitzer, *Mechanical and Corrosion-Resistant Properties of Plastics and Elastomers.* **2000**: CRC Press.
114. *Graphical design by Macrovector, Vectormarket.* Freepik.
115. S. H. Ahn, M. Montero, D. Odell, S. Roundy, and P. K. Wright, *Rapid Prototyping Journal* **2002**, 8(4), 248-257.
116. A. R. Bogdan and A. W. Dombrowski, *J. Med. Chem.* **2019**, 62(14), 6422-6468.
117. J. Russell, N. Pillarsetty, R. M. Kramer, P. B. Romesser, P. Desai, A. Haimovitz-Friedman, M. A. Lowery, and J. L. Humm, *Mol. Imaging Biol.* **2017**, 19(6), 885-892.
118. R. E. Laing, M. A. Walter, D. O. Campbell, H. R. Herschman, N. Satyamurthy, M. E. Phelps, J. Czernin, O. N. Witte, and C. G. Radu, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, 106(8), 2847-2852.
119. P. Watts, G. Pascali, and P. A. Salvadori, *J. Flow Chem.* **2012**, 2(2), 37-42.

120. I. V. Fateev, K. V. Antonov, I. D. Konstantinova, T. I. Muravyova, F. Seela, R. S. Esipov, A. I. Miroshnikov, and I. A. Mikhailopulo, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1657-1669.
121. W. E. Bauta, B. E. Schulmeier, B. Burke, J. F. Puente, W. R. Cantrell, D. Lovett, J. Goebel, B. Anderson, D. Ionescu, and R. Guo, *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*(6), 889-896.
122. J.-M. Commenge and L. Falk, *Chem. Eng. Process.* **2011**, *50*(10), 979-990.
123. J. M. Reckamp, A. Bindels, S. Duffield, Y. C. Liu, E. Bradford, E. Ricci, F. Susanne, and A. Rutter, *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21*(6), 816-820.
124. R. L. Hartman, J. P. McMullen, and K. F. Jensen, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*(33), 7502-7519.
125. P. Saxena, A. K. Singh, M. Dixit, S. C. Kheruka, T. Mahmood, and S. Gambhir, *Indian J. Nucl. Med.* **2021**, *36*(2), 120-124.
126. S. J. Lee, M. T. Morales-Colón, A. F. Brooks, J. S. Wright, K. J. Makaravage, P. J. H. Scott, and M. S. Sanford, *J. Org. Chem.* **2021**, *86*(20), 14121-14130.
127. A. Pees, C. Sewing, M. J. W. D. Vosjan, V. Tadino, J. D. M. Herscheid, A. D. Windhorst, and D. J. Vugts, *Chem. Commun.* **2018**, *54*(72), 10179-10182.
128. D. Zhou and J. A. Katzenellenbogen, *Tetrahedron Lett.* **2021**, 78.
129. K. Dahl, A. Garcia, N. A. Stephenson, and N. Vasdev, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2019**, *62*(7), 292-297.
130. A. Amor-Coarasa, J. M. Kelly, and J. W. Babich, *Sci. Adv.* **2019**, *5*(9).
131. C. Barnes, M. Nair, E. O. Aboagye, S. J. Archibald, and L. Allott, *React. Chem. Eng.* **2022**, *7*(11), 2265-2279.
132. S. Li, A. Schmitz, H. Lee, and R. H. Mach, *EJNMMI radiopharm. chem.* **2016**, *1*(1), 15.
133. G. Pascali, G. Nannavecchia, S. Pitzianti, and P. A. Salvadori, *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38*(5), 637-644.
134. F. Beyerlein, M. Piel, S. Höhnemann, and F. Rösch, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2013**, *56*(7), 360-363.
135. U. Herbig, W. A. Jobling, B. P. Chen, D. J. Chen, and J. M. Sedivy, *Molecular Cell* **2004**, *14*(4), 501-513.
136. M. Collado and M. Serrano, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*(6), 472-476.
137. J. A. Erickson and J. I. McLoughlin, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*(6), 1626-1631.
138. Y. M. Pu, D. S. Torok, H. Ziffer, X.-Q. Pan, and S. R. Meshnick, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*(20), 4120-4124.

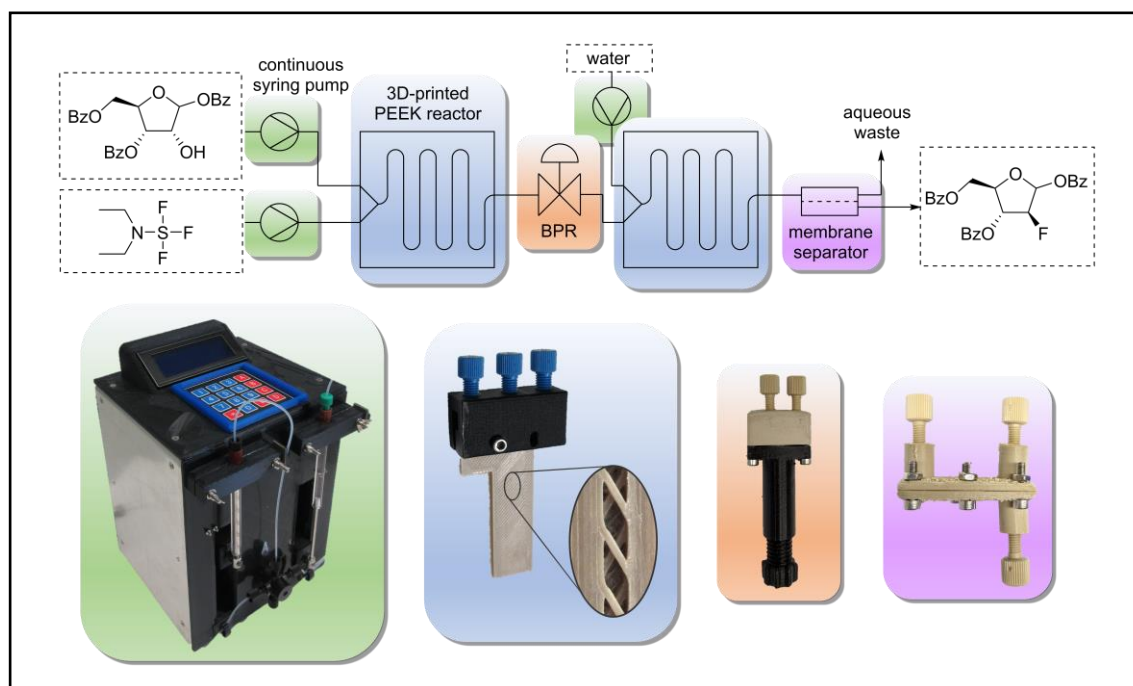
139. C. Horiuchi, M. Tsukuda, T. Taguchi, Y. Ishiguro, K. Okudera, and T. Inoue, *Ann. Nucl. Med.* **2008**, 22(8), 693-698.
140. B. P. Rempel, E. W. Price, and C. P. Phenix, *Mol Imaging* **2017**, 16, 1-30.
141. H. Xu, M. Di Antonio, S. McKinney, V. Mathew, B. Ho, N. J. O'Neil, N. D. Santos, J. Silvester, V. Wei, J. Garcia, F. Kabeer, D. Lai, P. Soriano, J. Banáth, D. S. Chiu, D. Yap, D. D. Le, F. B. Ye, A. Zhang, K. Thu, J. Soong, S.-c. Lin, A. H. C. Tsai, T. Osako, T. Algara, D. N. Saunders, J. Wong, J. Xian, M. B. Bally, J. D. Brenton, G. W. Brown, S. P. Shah, D. Cescon, T. W. Mak, C. Caldas, P. C. Stirling, P. Hieter, S. Balasubramanian, and S. Aparicio, *Nat. Commun.* **2017**, 8(1).
142. A. Z. Win and C. M. Aparici, *PLoS One* **2014**, 9(9).
143. N. R. Babij, E. O. McCusker, G. T. Whiteker, B. Canturk, N. Choy, L. C. Creemer, C. V. D. Amicis, N. M. Hewlett, P. L. Johnson, J. A. Knobelsdorf, F. Li, B. A. Lorsbach, B. M. Nugent, S. J. Ryan, M. R. Smith, and Q. Yang, *Org. Process Res. Dev.* **2016**, 20(3), 661-667.
144. T.-W. Kang, T. Yevsa, N. Woller, L. Hoenicke, T. Wuestefeld, D. Dauch, A. Hohmeyer, M. Gereke, R. Rudalska, A. Potapova, M. Iken, M. Vucur, S. Weiss, M. Heikenwalder, S. Khan, J. Gil, D. Bruder, M. Manns, P. Schirmacher, F. Tacke, M. Ott, T. Luedde, T. Longerich, S. Kubicka, and L. Zender, *Nature* **2011**, 479(7374), 547-551.
145. C. M. Carlson, J. L. Frandsen, N. Kirchhof, R. S. McIvor, and D. A. Largaespada, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102(47), 17059-17064.
146. J. Tate and G. Ward, *Clin Biochem Rev* **2004**, 25(2), 105-120.
147. O. A. Ojelabi, K. P. Lloyd, A. H. Simon, J. K. De Zutter, and A. Carruthers, *J. Biol. Chem.* **2016**, 291(52), 26762-26772.
148. G. P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, and et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92(20), 9363-9367.
149. W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*. **2017**: Elsevier.
150. M. A. Lumba, L. M. Willis, S. Santra, R. Rana, L. Schito, S. Rey, B. G. Wouters, and M. Nitz, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15(30), 6388-6392.
151. L. Deng, P. Tsybina, K. J. Gregg, R. Mosi, W. F. Zandberg, A. B. Boraston, and D. J. Vocadlo, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21(16), 4839-4845.
152. L. Wu and N. S. Sampson, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9(2), 468-475.

Teil E: Anhang

Paper 1

3D-printed PEEK reactors and development of a complete continuous flow system for chemical synthesis

Florian Menzel, Thomas Klein, Thomas Ziegler, Jochen M. Neumaier, *React. Chem. Eng.*, **2020**, 5, 1300–1310, DOI: 10.1039/d0re00206b.





Cite this: *React. Chem. Eng.*, 2020, 5, 1300

3D-printed PEEK reactors and development of a complete continuous flow system for chemical synthesis†

Florian Menzel,  Thomas Klein, 
Thomas Ziegler  and Jochen M. Neumaier *

The possibility of 3D printing high temperature and chemically resistant polymers creates opportunities for applications in flow chemistry. Herein we describe the development of milli- and microfluidic reactors made of polyether ether ketone (PEEK) with a high temperature 3D printer and examine their mixing performance and suitability for flow reactions at elevated temperatures. Additionally, we present a 3D-printed separator, back pressure regulator and continuous syringe pump, which provide a complete flow system for a fraction of the cost of commercially available flow equipment. Different 3D printed mixing geometries were tested and the influence of mixing on fluorination of a ribose derivative was evaluated. To demonstrate the usability of our self-made flow equipment we performed a multistep reaction of a ribose derivative in excellent yield which could be used as a precursor for the synthesis of nucleoside anti-cancer drugs.

Received 22nd May 2020,
Accepted 5th June 2020

DOI: 10.1039/d0re00206b

rsc.li/reaction-engineering

Introduction

Over the last two decades flow chemistry attracted considerable attention in academic research.^{1–4} The chemical industry takes full advantage of reactions in flow like an easier scale up of a production process due to better mixing and heat transfer.⁵ Another benefit of performing reactions in flow lies in better control over reaction parameters, which is especially important when working with hazardous chemicals and unstable intermediates.⁶ In the pharmaceutical industry flow chemistry also has become an important technology for the manufacture of active pharmaceutical ingredients (APIs).⁷ One example of an API is gemcitabine (**1**), which is used for treatment of pancreatic cancer. It is a deoxycytidine (**2**) derivative and can be phosphorylated by deoxycytidine kinase (dCK) and inhibits the dCTP synthesis.⁸ A derivative of gemcitabine, 1-(2'-deoxy-2'-fluoroarabinofuranosyl)cytosine (FAC, **3**), is also a substrate for dCK and could be used for detection of dCK activity by using positron emission tomography (PET), if it is labeled with ¹⁸F.⁹ Particularly for the synthesis of radioactive PET tracers, the use of microreactors could increase yields, purity and reaction time, leading to higher specific activity.¹⁰ Another nucleoside analogue is clofarabine (**4**),¹¹ which is used as an anticancer

drug for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. One possible precursor for the synthesis of clofarabine is 2-deoxy-2-fluoro-3,5-di-*O*-benzoyl- α -*D*-arabinofuranosyl bromide (**5**) (Chart 1).^{12,13} In this work we performed a multistep flow reaction for the synthesis of this precursor **5** in excellent yield using 3D-printed PEEK flow reactors (Scheme 1). The use of 3D printers for manufacturing microreactors is a great opportunity for fast and easy prototyping and had a great impact on flow chemistry in the last few years.^{14–22} There are

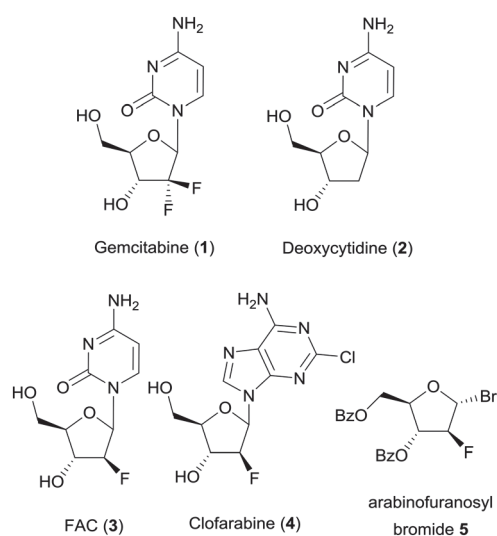
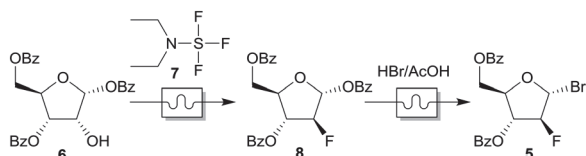


Chart 1 Several nucleoside analogues.

Institute of Organic Chemistry, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen, Germany. E-mail: jochen.neumaier@uni-tuebingen.de

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0re00206b





Scheme 1 Multistep reaction of the precursor 5.

several technologies for 3D printing of flow reactors which all have advantages and disadvantages.^{23,24} Although technologies like selective laser sintering (SLS) or stereolithography (SLA) achieve very good resolution, our focus lies on the technology of fused deposition molding (FDM) because of the wide range of chemically resistant printing materials. We chose polypropylene (PP) which could be printed on a low-cost desktop 3D printer and polyether ether ketone (PEEK) which needs a special high temperature 3D printer.

Although PP can't withstand high temperatures, chlorinated solvents or hydrocarbons for an extended period of time,²⁵ the benefits are *e.g.* the transparency and the good printability of this material. In contrast, PEEK shows an excellent chemical resistance to a wide range of chemicals and withstands temperatures up to 250 °C,^{26,27} which makes it an excellent material for flow reactors for organic synthesis.

Most common equipment for multistep flow reactions consists of pumps, reactors, pressure regulators and liquid-liquid extraction systems.²⁸ The regulation of the system pressure is very important in flow chemistry.²⁹ An increased system pressure could be obtained using a back pressure regulator (BPR). Operating under an increased inner pressure, solvents can be heated above their boiling points which could lead to faster kinetics.³⁰ Also, if volatiles or gases are formed during the reaction, it can prevent outgassing and reduces possible inhomogeneity of the flow rate.

For multistep synthesis, liquid-liquid extraction steps followed by phase separation are common processes.²⁸ Membrane-based separation techniques are widely used in analytical^{31,32} and synthetic chemistry³³⁻³⁵ and are excellent tools for true continuous liquid-liquid separation. The basic idea behind a membrane separator is that the mixture of organic and aqueous phases is separated using a hydrophobic, porous membrane.

Commercially available continuous flow systems are rather expensive which is why we decided to develop a completely 3D-printed flow system with all the components mentioned above.

In our previous publication we focused on constructing inexpensive flow equipment without the need to buy costly, commercially available flow reactors or syringe pumps.³⁶

In this work we first printed various mixing geometries with PP and performed Villiermaux-Dushman (VD) experiments to evaluate their printability and mixing efficiency. Further, we printed flow reactors and crucial flow equipment from PEEK which opens up new possibilities for flow chemistry. The aim of this paper is to show that 3D printed PEEK flow equipment meets the same requirements for multistep synthesis as a

commercial flow setup with additional advantages of being cheaper, more customizable and almost instantly available.

Experimental

Fabrication of 3D printed parts

Manufacturing of mixers and reactors. All PP parts and the mixers M1-M6 (see Fig. 1) were printed with an inexpensive, slightly modified 3D printer A8 from Anet. One of the biggest problems was the lack of adhesion on the printing bed. We could solve this problem by sticking one layer of adhesive PP tape on the top of the printing bed and heating it to 80 °C throughout the entire printing process. Another disadvantage of polypropylene is its softness. If some parts needed threads for HPLC fittings both the tap and the parts had to be cooled with liquid nitrogen before cutting the threads. Afterwards the threads were relatively weak and wore out very quickly. The advantage of this property is that it is self-sealing and the cone angle of a standard 10-32 HPLC fitting does not need to be as precise as that for harder materials. Therefore, we decided to use stainless steel nuts to provide the contact pressure, keeping the beneficial characteristics of PP. First, we imprinted the nuts into the fitting, as described in our previous publication about PP reactors.³⁶ A much simpler solution is sliding the nuts in the fitting from the side, as shown in Fig. 1b and c. As mentioned above, PEEK is superior to PP concerning its rigidity and resistance to chemicals. The downside is that in order to print PEEK a professional printer with a high temperature print head and closed printing chamber is required. Thus, to print all the reactors, mixers and laboratory equipment out of PEEK we used the P220 from Apium. A very common problem in 3D printing, particularly with PEEK, is warping. This means the bending of the printed parts away from the printing bed due to internal stress caused by uneven cooling of the layers.³⁷ There are several ways to address this problem. It's necessary to level

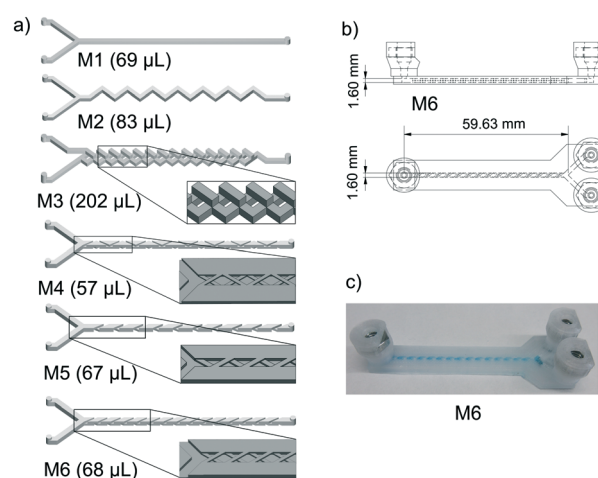


Fig. 1 Flow path of mixers M1 to M6 with detailed mixing geometries (a); CAD drawing (b) and picture (c) of M6.



the printing bed very well and to use an adhesive on the printing bed which helps to avoid warping. When printing PEEK, DimaFix adhesive from DIMA 3D was used, which, according to the manufacturer, doesn't stick at 60 °C but has a strong holding power above 95 °C. Another way to address this issue is to avoid big contiguous sections in the parts. This strategy is shown in the later versions of the flow reactors where the connections are divided into separate blocks (see Fig. 2). Generally, it helps to print at the highest bed- and chamber temperatures possible to prevent warping, and with high nozzle temperatures the adhesion between the layers is improved as well. In our experience, printing with high temperatures is at the expense of precision. Small holes and fine channels are blocked and threads have to be post processed with a die. Among other parameters the right filament flow and extrusion width are crucial for stable and precise parts. Therefore, the nozzle has to be perfectly clean and without burnt PEEK residue inside. It is a balancing act between over extrusion with plugging as a result and gaps in the printed parts causing leakages and structural failures at the fittings. We found that drying the PEEK filament is very important for the print quality, due to its moisture sensitivity during extrusion. To ensure reproducible print quality we dried the PEEK filament every night in an oven at 80 °C. Lastly, the dimensions of the printed parts should match the printer's extrusion width. This means that the wall dimensions should always be an integral multiple of the extrusion width of the printer or the slicer program to avoid gaps in the parts. With all these measures (leveling, adhesion, optimal printing parameters, drying and appropriate dimensions) it is possible to obtain reliably usable reactors.

When printing with PEEK, one problem is polymer spreading during extrusion, resulting in a channel width which is always smaller than the theoretical channel width in the CAD drawing.²³ Thus, channels containing the crossed barriers could only be scaled down to a nominal channel width of 1.6 mm. Additionally, every second layer of the mixing geometry had to be removed in the CAD model to reduce the material flow (see Fig. 3a). A picture of M7 and an

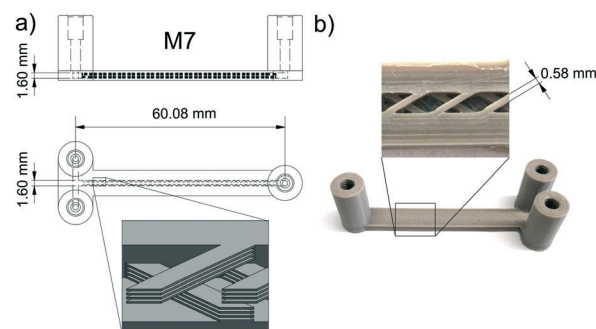


Fig. 3 CAD drawing (a) and photograph (b) of PEEK mixer M7.

open cutout is shown in Fig. 3b. The measured volume of M7 shows that it's reduced by 33% in comparison to the CAD drawing.

One critical component of every flow chemistry device is the connection to the tubes. In the beginning, we used an exact replica of a 10-32 female HPLC fitting as a connection to the PEEK reactors. Because of the printer's inaccuracy, we just designed a step at the bottom and cut the cone afterwards with a center drill. This method did not reliably result in leakproof reactors and it limits the tube size to 1/16". Therefore, we switched to a system with a guide rail printed from PEEK where the reactor is slit in. Here the flangeless flat bottom 1/4"-28 fitting is just pressed against the flat honed surface of the reactor (Fig. 2). Not only is this system leakproof but it also allows the use of 1/8" tubing.

Manufacturing of the BPR. For the BPR we used PTFE foil (100 μm) and an overlying silicone sheet (500 μm) which is pressed using a spring-loaded piston. The spring force could be adjusted with a screw to control the back pressure (see Fig. 4a, No. 5). We used different spring wire diameters to create BPRs for two pressure ranges. For low back pressure (from 1–4 bar) we used a weaker spring with 0.5 × 6.5 × 25 mm, for back pressure up to 20 bar we used a spring with 0.8 × 7.7 × 25 mm.

The top parts (No. 2–6) are printed with polylactic acid (PLA), since they have no contact to the solvent. The solvent conducting part (No. 1) was made from PEEK and the upper,

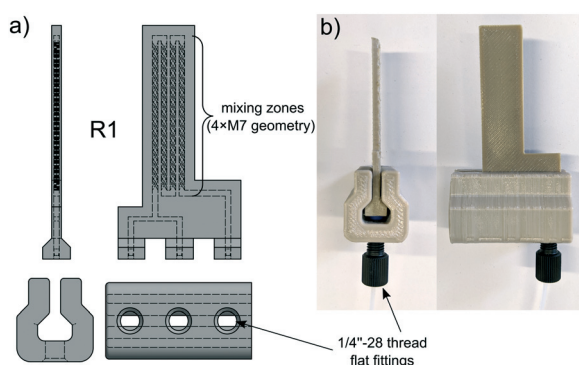


Fig. 2 CAD drawing (a) and photograph (b) with a connected 1/4"-28 fitting of reactor R1.

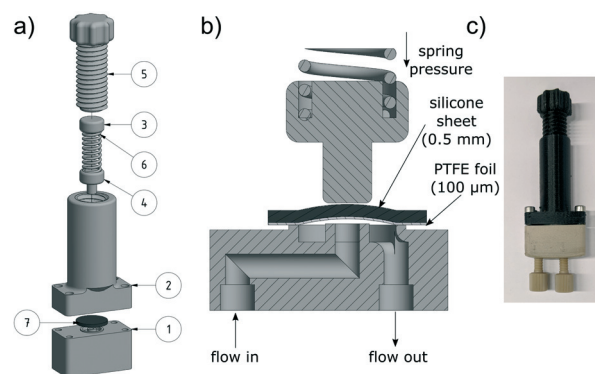


Fig. 4 Exploded CAD view (a), working principle (b) and photograph (c) of the BPR.



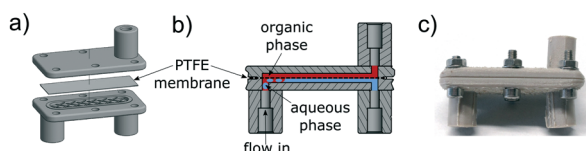


Fig. 5 Exploded CAD view (a), working principle (b) and photograph (c) of the membrane separator.

PTFE touching side was sanded with 1000 grit abrasive paper to ensure a smooth surface.

Manufacturing of the membrane separator. We designed our membrane separator as shown in Fig. 5. A channel of $35 \times 8 \times 1$ mm was used for each of the two parts, in which diagonal support lines prevent bending of the membrane. For the membrane a hydrophobic PTFE membrane with a pore size of $1 \mu\text{m}$ and a thickness of $100 \mu\text{m}$ from Pieper Filter GmbH was used. For an effective separation of the two phases, a slightly higher pressure in the aqueous phase is needed. By placing the aqueous outlet tube 40 cm higher than the organic outlet tube, the resulting hydrostatic pressure is sufficient.

Previous versions of the back pressure regulator and the membrane separator were made out of PP. Although these devices worked very well in most situations, the softness of the PP forced us to use custom aluminium plates on top of the screw fittings to distribute the contact pressure evenly. The upgrade to PEEK as a printing material makes reinforcing plates redundant and eliminates the risk of malfunctions because of swelling, for instance. Even if it's entirely possible to make the presented laboratory equipment with a low-cost printer and polypropylene, PEEK devices are more reliable, especially under harsher reaction conditions.

Manufacturing of the continuous syringe pump. The pump consists of mainly three sections. The solvent conveying part comprises two $500 \mu\text{L}$ glass syringes with PTFE plungers and a four-way valve with diagonal flow, which is connected through PTFE tubing (0.5 mm ID). The frame

section was mostly 3D-printed with PLA, only a bent aluminium plate was used as a housing and for the assembly of the 3D-printed parts (see Fig. 6). Although it is not necessary to 3D-print simple parts of the pump or this flow system, an alternative would be to machine these parts out of plastic or aluminium. Some of these parts are not easy to make and would mean more labor time and higher cost of materials. The electronics of the pump are based on an Arduino Mega 2560, which controls the three stepper motors with three DRV8825 stepper motor drivers. A full and detailed part list, the CAD files of the printed parts, manufacturing details and the Arduino program code can be found in the ESI.†

Principally this pump works like a dual piston pump. While the first syringe pumps the solution into the reactor, the second syringe draws the solution from a reservoir. To realize this, we chose a four-way valve with diagonal flow from UPCHURCH SCIENTIFIC. After manufacturing, the pump has been tested for its accuracy and calibrated to ensure a deviation of around 1%. The minimum reasonable flow rate is $1.0 \mu\text{L min}^{-1}$ and the maximum is $3000 \mu\text{L min}^{-1}$, which should be sufficient for most continuous flow applications. At lower flow rates, the slow movement of the stepper motor could result in pulsation of the flow. At higher flow rates, the motors could reach their maximum power level and skip steps, which would lead to an inappropriate flow rate.

Mixing tests

For the Villermaux–Dushman (VD) experiments we used water (HiPerSolv CHROMANORM® for HPLC) from VWR. The acid and buffer solutions were freshly prepared before use with set concentrations, shown in Table 1. The chemicals for these solutions were used without further purification and obtained from AppliChem, Honeywell, Merck and Sigma-Aldrich. As syringe pumps we used previously described self-made Arduino driven pumps³⁶ with two 60 mL polyethylene

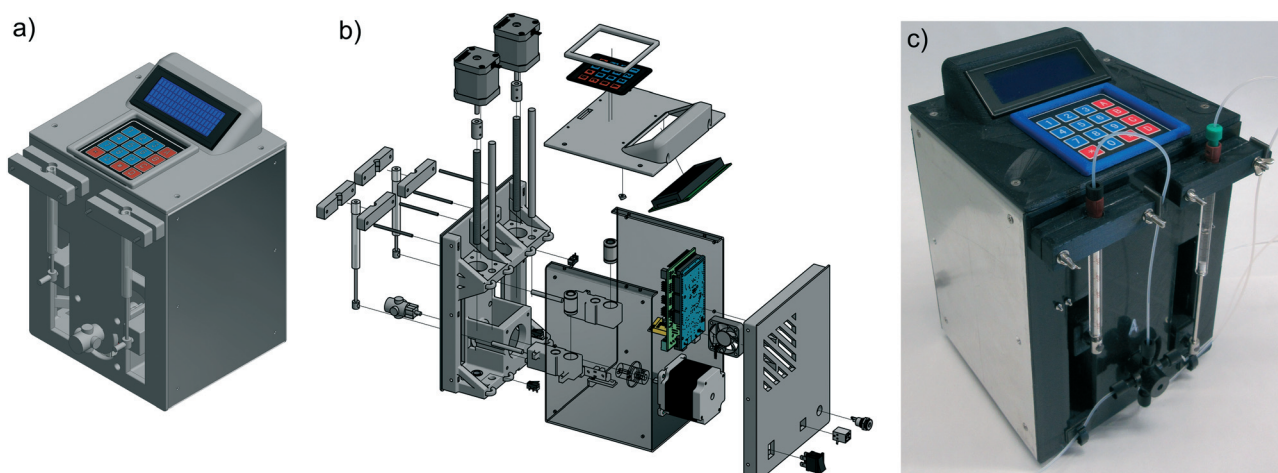


Fig. 6 CAD drawing (a), exploded view (b) and photograph (c) of the continuous syringe pump.



Table 1 Concentration of buffer and acid solutions used in VD experiments

Solution	Reagent	Concentration [mol L ⁻¹]
Buffer solution	H ₃ BO ₃	0.030
	NaOH	0.030
	KI	0.011
	KIO ₃	0.002
Acid solution	H ₂ SO ₄ (97%)	0.010

syringes. For measuring the absorbance, we made a flow cell from two QS quartz panes sandwiched in a holder (path length $d = 0.53$ cm) printed out of PLA. The absorbance of I₃⁻ was measured on a Lambda 25 UV-vis spectrometer from Perkin Elmer at different flow rates from 5 ml min⁻¹ per syringe to 0.25 ml min⁻¹. After each change of the flow rate we waited until a constant absorption value was reached and afterwards we performed three one minute runs with 20 single measurements at 353 nm (ϵ_{353} of triiodide = 26 400 L mol⁻¹ cm⁻¹).³⁸

Chemical reactions

As references for HPLC measurements, 2-deoxy-2-fluoro-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranose (**8**) and 2-deoxy-2-fluoro-3,5-di-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranosyl bromide (**5**) were produced in a conventional batch-synthesis.

Batch synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranose (8**)**³⁹. DAST (0.28 mL, 2.16 mmol, 4 eq.) was added under a nitrogen atmosphere to a solution of 1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-ribofuranose (**6**) (0.25 g, 0.54 mmol, 1 eq.) in toluene (5.5 mL). The mixture was stirred at room temperature for 1 h. Afterwards, the temperature was raised to 90 °C for 2 hours. The mixture was cooled in an ice bath and sat. NaHCO₃ solution was added carefully. The organic phase was separated and the aqueous phase was extracted with methylene chloride (3 × 5 mL). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and concentrated in a vacuum. After column chromatography (*n*-hexane/ethylacetate 4:1) a colorless oil (0.22 g, 88%) was obtained.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.00$ – 8.16 (m, 6H, aryl-H), 7.52–7.69 (m, 3H, aryl-H), 7.35–7.51 (m, 6H, aryl-H), 6.77 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 1-H), 5.65 (ddd, $J = 19.5$ Hz, 3.1 Hz, 0.8 Hz, 1H, 3-H), 5.29–5.52 (d, $J = 50.0$ Hz, 1H, 2-H), 4.78–4.85 (m, 1H, 4-H), 4.74 (m, 5-H/5-H') ppm. ¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): $\delta = -190.77$ ppm.

Batch synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-3,5-di-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranosyl bromide (5**)**⁴⁰. Under a nitrogen atmosphere 2-deoxy-2-fluoro-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranose (**8**) (0.11 g, 0.24 mmol, 1 eq.) was dissolved in dry methylene chloride (3 mL). HBr (0.6 mL, 3.34 mmol, 14 eq., 33% in AcOH) was added to the solution and stirred for 16 h at room temperature. Afterwards, the mixture was washed with sat. NaHCO₃ solution. The organic phase was then dried over Na₂SO₄ and concentrated in a vacuum. After column

chromatography (*n*-hexane/ethylacetate 4:1) a yellowish oil (0.09 g, 93%) was obtained.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.98$ – 8.23 (m, 4H, aryl-H), 7.54–7.68 (m, 2H, aryl-H), 7.39–7.52 (m, 4H, aryl-H), 6.65 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, 1-H), 5.53–5.69 (d, $J = 50.0$ Hz, 1H, 2-H), 5.52–5.59 (ddd, $J = 20.0$ Hz, 4.0 Hz, 0.8 Hz, 1H, 3-H), 4.78–4.86 (m, 1H, 4-H), 4.65–4.77 (m, 2H, 5-H/5-H') ppm. ¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): $\delta = -165.92$ ppm.

Flow synthesis

For flow reactions the self-built continuous syringe pump was used with additional syringe pumps LA-30 from Landgraf Laborsysteme HLL GmbH. HPLC grade CHCl₃ was passed through a column filled with molecular sieves (4 Å, 1 g mL⁻¹ CHCl₃) prior to use. The chemicals for the flow reactions were used without further purification and obtained from Sigma Aldrich, Merck, TCI, and Acros Organics. NMR spectra were recorded on a Bruker "Avance 400" spectrometer and calibrated to the solvent signal (CDCl₃: 1H 7.27 ppm, 13C 77.0 ppm). HPLC measurements were made on a HPLC system containing a Sykam S 1121 solvent delivering system, a Sykam S5200 sample injector and a Linear UVVIS-205 absorbance detector (254 nm). As a column a GROM-SIL 120 ODS-3 CP, 5 μ m column (250 × 4 mm) was used. Diethylaminosulfur trifluoride (DAST) must be handled with caution and must not be heated above 90 °C due to its highly reactive decomposition products.

Conversion calculation

All used and manufactured substances have different extinction coefficients. A direct comparison of the peak integrals in relation to the concentration is therefore not possible. To determine each concentration, the concentration series of 1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-ribofuranose (**6**), 2-deoxy-2-fluoro-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranose (**8**) and 2-deoxy-2-fluoro-3,5-di-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranosyl bromide (**5**) were examined by HPLC measurements. By determination of the integrals a calibration line was created, with which the concentration could be calculated.

Flow synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranose (8**)**. A solution of 1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-ribofuranose (**6**) (0.3 M in dry CHCl₃, 1 eq.) and a solution of DAST (**7**) (0.3 M in dry CHCl₃, 3 eq.) were pumped through flow reactors R1–R4 at 60–90 °C. The BPR was set to a pressure above the vapor pressure of the solvent (2 bar). The overall flow rate was set resulting in a residence time of 2 to 15 min for each experiment (see the ESI†). 500 μ L of the reaction mixture was collected in a glass vial containing sat. NaHCO₃ solution (1 mL). 50 μ L of the organic phase was diluted with 950 μ L acetonitrile (HPLC grade) for HPLC measurements.

Batch synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-3,5-di-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranosyl bromide (5**)**. A solution of 2-deoxy-2-fluoro-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranose (**8**) (0.3 M in dry CHCl₃, 1 eq.) and HBr (33% in dry AcOH, 10 and 25 eq.) were



pumped through flow reactor R1, at 55 °C. The BPR was set to 2 bar. The overall flow rate was set resulting in a residence time of 5, 10 and 20 min for each experiment (see the ESI†). 500 µL of the reaction mixture was collected in a glass vial containing sat. NaHCO₃ solution (1 mL). 50 µL of the organic phase was diluted with 950 µL acetonitrile (HPLC grade) for HPLC measurements.

Multistep flow synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-3,5-di-O-benzoyl-α-D-arabinofuranosyl bromide (5). A solution of 1,3,5-tri-O-benzoyl-α-D-ribofuranose (6) (0.4 M in dry CHCl₃, 1 eq.) and a solution of diethylaminosulfur trifluoride (7) (0.4 M in dry CHCl₃, 3 eq.) were pumped through flow reactor R5 at 75 °C. The flow rates were set resulting in a residence time of 20 min for the first step. For the directly following second step, HBr (33% in dry AcOH, 25 eq.) and the reaction mixture of step one were pumped through an additional flow reactor R5 at 55–75 °C. The residence time was set to 14 min. The subsequent BPR was set to 2 bar. 500 µL of the reaction mixture was collected in a glass vial containing sat. NaHCO₃ solution (1 mL). 50 µL of the organic phase was diluted with 700 µL acetonitrile (HPLC grade) for HPLC measurements. Optional further purification is possible. Therefore, the reaction mixture of step two and H₂O were pumped through a third reactor R1, serving as an extractor followed by the membrane separator mentioned above. The residence time was set to 3 min for the extraction and 1 min for the separation. 500 µL of the freshly washed organic mixture was collected in a glass vial. 50 µL of the organic phase was diluted with 700 µL acetonitrile (HPLC grade) for HPLC measurements.

Further information for manufacturing and CAD files of the 3D printed parts, reactors, pressure tests of the BPR, mixing tests, and chemical reactions can be found in the ESI.†

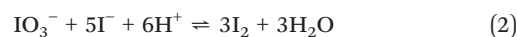
Results and discussion

Mixing efficiency evaluation

For reactions in flow, the efficient mixing of the reagents is one of the most important factors. Mixing techniques can be divided into two different types: active and passive mixing. While active mixing requires an external force like ultrasound or small impellers, passive mixing is based on restructuring the laminar flows to intersect each other.⁴¹ Special geometries of these channels or microstructured objects in the channels induce chaotic mixing or force the flow to split and recombine, thus creating multi-laminar flow patterns.^{42–45}

Because mixing in flow reactions is essential, many tests for mixing characterization have been developed.⁴⁶ Some are based on the mixing of two dyes or the dilution of one dye.^{47,48} Measuring the combination color or the time one dye is fully diluted allows a qualitative estimation of the mixing efficiency because initially, the dyes can be monitored very well. However, these tests are restricted to translucent mixers. Besides that, this sort of test can be misleading because the dyes seem to be mixed but in reality, the streams

just overlay and the observer sees an averaged color through the mixing channels.^{49,50} This shortcoming can be addressed with confocal laser microscopy in order to obtain either cross sectional or three dimensional images of the mixing channels.^{44,51} Another type of test requires a reaction where a dye is formed or a color change is induced.^{52,53} Furthermore, it's possible to quantify the mixing performance of micromixers with competitive reactions.^{54–56} One of these is the VD reaction which is by far the most commonly used reaction.^{57,58} Because this is the benchmark reaction to investigate the mixing performance, the mixers in this work were tested according to the VD protocol. This method is based on the competition between the instantaneous neutralization of dihydrogenoborate anions (1) and the fast redox reaction of iodate and iodide to form iodine (2):



Under poor mixing conditions the dihydrogenoborate ions are consumed by acid and a local over-concentration of acid enables the comproportionation reaction (2). Then iodine reacts with iodide to form triiodide (3) which can be detected by UV-vis spectroscopy. In contrast to that, in the case of ideal mixing, all protons are consumed by the dihydrogenoborate due to the stoichiometric deficiency of acid in relation to the base. The absorbance values for every mixer at a specific flow rate are converted to the segregation index (X_S) for better comparability. If $X_S = 0$, it indicates perfect mixing, while in the case of total segregation, X_S shows a maximum of one. As a mixing model we used the incorporation model because of its simplicity and flexibility.⁵⁹ Assuming that the amount of formed triiodide is equal to the amount of iodine (because (3) is quasi-instantaneous), X_S is calculated as follows:⁶⁰

$$X_S = \frac{Y}{Y_{ST}} \quad (4)$$

where

$$Y = 2 \frac{Q_{\text{I}_3^-} C_{\text{I}_3^-}}{Q_{\text{H}_3\text{O}^+} C_{\text{H}_3\text{O}^+}} \quad (5)$$

and

$$Y_{ST} = \frac{6(C_{\text{IO}_3^-})_0 / (C_{\text{H}_2\text{BO}_3^-})_0}{6(C_{\text{IO}_3^-})_0 / (C_{\text{H}_2\text{BO}_3^-})_0 + 1} \quad (6)$$

Y denotes the ratio of the acid mole number consumed by (2) to the total acid mole number while Y_{ST} is the value of Y in the case of total segregation meaning that mixing occurs infinitely slow.

In our previous work we designed and manufactured several PP reactors and performed some glycosylation reactions.³⁶ In this work, we tested some mixing geometries



in order to improve the mixing efficiency. First, we started with one straight channel (M1) and a zigzag pattern (M2) to optimize printing quality. Next, we moved on to more complicated mixing geometries (see Fig. 1) like the “split and recombine” (SAR) mixer M3, derived from Xia *et al.*,⁶¹ or mixers M4, M5 and M6 containing crossed barriers, inspired by the work of Yoo *et al.*⁶² The authors designed mixers with alternating crosses which we scaled up to match our channel size (M4). Additionally, we modified the barrier geometry to a barely overlapping, helical geometry (M5) and parallel crosses (M6) in which the bars of a level in the mixer are arranged in parallel. All the mixers have a mixing zone of about 60 mm.

The VD experiments show that at low flow rates M1 and M2 are almost equal in mixing efficiency but with increasing flow rate the zigzag geometry has a better mixing performance. Surprisingly M3 performs relatively poorly in comparison to M4, M5 and M6. We noticed in some experiments with a dye solution that not all parts of M3 are filled. One possible reason for this behavior could be inaccuracies in the production process leaving split channels with an uneven width. Particularly at low flow rates, the fluid is not split and follows the easiest path which is essentially a smaller version of zigzag mixer M2. The mixers M4 to M6 exhibit a much better mixing performance than M1 to M3, particularly at flow rates of 1.5 and 3 mL min⁻¹ (see Fig. 7). At a combined flow rate of 0.5 mL min⁻¹ (0.25 mL min⁻¹ per syringe) the VD experiments show a much higher mixing efficiency for M6 than for M4 and M5.

The best mixer M6 of this set was also printed with the same mixer geometry in PEEK (M7) to evaluate if there is any difference in the performance from the one made of PP. Additionally, the channel width was widened to 1.8 mm (M8) in order to see if this causes a difference in the mixing performance. As expected, M8 shows similar curve characteristics but slightly higher X_S -values than M7 due to the lower energy dissipation rate in wider channels (see Fig. 8).⁶⁰ Comparing the almost identical mixers M6 and M7 there are no major differences except at a flow rate of 0.5 mL

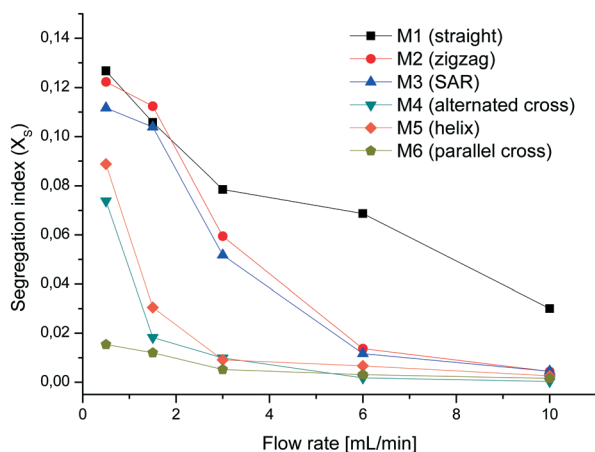


Fig. 7 Segregation index of PP mixers.

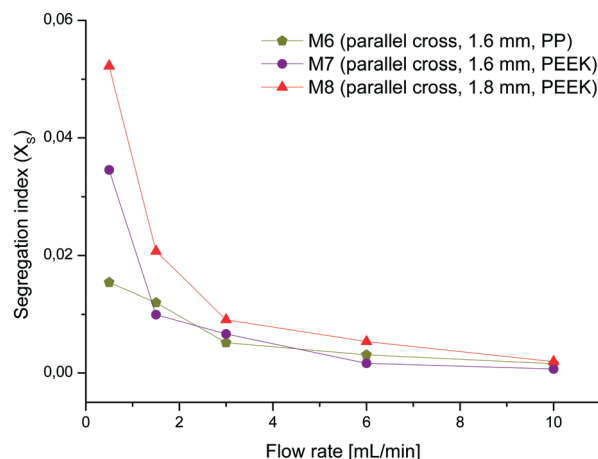


Fig. 8 Segregation index of PEEK mixers (M7, M8) and PP mixer M6.

min⁻¹. This variance could again be attributed to uneven or blocked channel sections, which impinge on the mixing efficiency at low flow rates. These tests demonstrate that the mixing efficiency of the mixer with parallel crosses and a channel width of 1.6 mm is superior to the others and therefore this geometry was chosen for the chemical reactions.

Channel width tests

With the standard printing parameters, we also tested how narrow straight channels could be printed without being blocked. We designed a test piece with various channel sizes down to 0.4 mm in width (see Fig. 9). We saw that the obtained channel width is about 0.2 mm to 0.24 mm smaller than that in the CAD drawing (see Table 2). Further, the channel with a width of 0.4 mm shows inaccurately printed areas, which could lead to blockage in a reactor.

Next, we printed reactors with channel cross sections of 0.8 × 0.8 mm, 0.6 × 0.6 mm and 0.4 × 0.4 mm. The reactor with the smallest dimensions was blocked which had already been indicated by the test piece. We determined the volume of the two working reactors with bigger cross sections and found that their volume is significantly smaller than that in the CAD drawing. The volumes of the reactors with lateral dimensions of 0.8 mm and 0.6 mm were just 38% and 42% of the volumes calculated with the CAD program, respectively. These tests

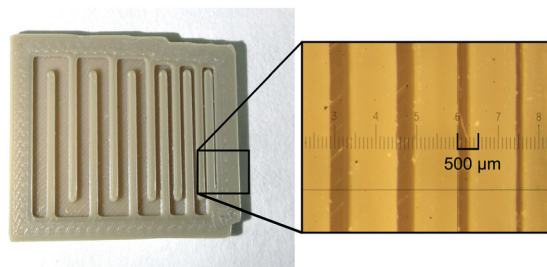


Fig. 9 Test piece for channel width measurements.



Table 2 Comparison of channel widths from the test piece and the CAD drawings

Printed part	Channel width (channel width in CAD) [mm]	Width difference [mm]
Test piece (PEEK)	1.76 (2.0)	0.24 (13.6%)
	1.59 (1.8)	0.21 (13.2%)
	1.38 (1.6)	0.22 (15.9%)
	0.57 (0.8)	0.23 (40.4%)
	0.40 (0.6)	0.20 (50.0%)
	0.18 (0.4)	0.22 (122.2%)

demonstrate that it is possible to obtain 3D-printed PEEK reactors with channel dimensions below 0.5 mm, which falls in the category of microreactors.^{24,63}

Chemical reactions

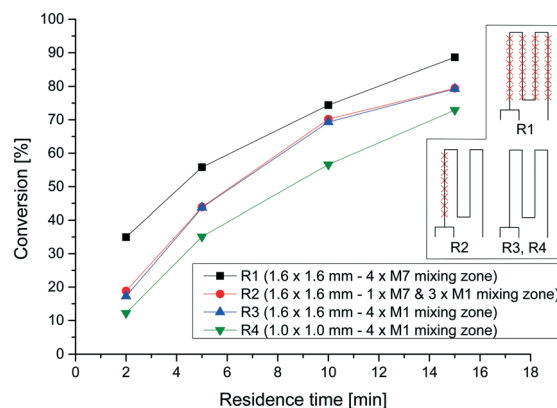
As a proof of concept for the utility of our 3D-printed continuous flow equipment, we wanted to synthesize glycosyl bromide **5** in a continuous multistep reaction (Scheme 1). The bromide **5** could be used as a precursor for the synthesis of gemcitabine analogs, like FAC (**3**), as mentioned in the Introduction. ¹⁸F-fluorination to fluoride [¹⁸F]-**8** using our 3D-printed PEEK reactors, as well as a complete synthesis of [¹⁸F]-FAC, is currently in progress and will be published as soon as possible.

First, the fluorination reaction of ribose derivative **6** with DAST (**7**) was investigated using four different reactors (Table 3). We used two reactors consisting of straight lines as mixing zones (M1) with different cross sections (R3 and R4). Reactor R1 contains four mixing zones (M7) (see Fig. 2), and reactor R2 contains only one mixing zone (M7). For all reactions the temperature was set to 75 °C and four different residence times were chosen. Fig. 10 shows the conversion to the desired product for all reactors and residence times. As expected, the conversion with just straight channels is lower compared to that of reactor R1 with four mixing zones. We found that for this particular reaction one mixing zone (R2) is not sufficient to increase the conversion compared to reactor R3. Further, the reactor with a smaller cross section (1.0 × 1.0 mm) shows a lower conversion. A lower flow rate at this regime of Reynolds number results in a decreased energy dissipation rate and thus lowers the mixing efficiency.⁶⁰

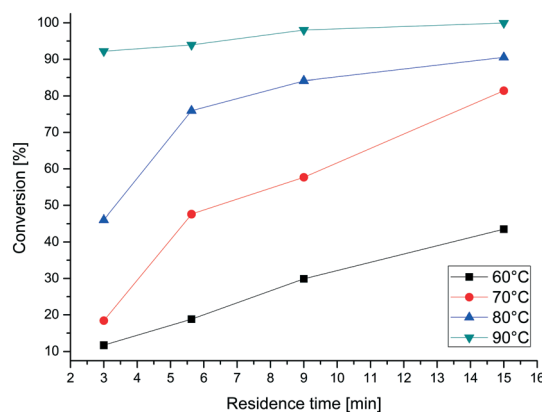
The fluorination itself was optimized using four temperatures between 60 and 90 °C and four different residence times between 3 and 15 minutes. Fig. 11 shows the

Table 3 Construction details of the different reactors R1–R4

Reactor	Volume [μL]	Channel cross section	Number of mixing zones M7
R1	360	1.6 × 1.6 mm	4
R2	480	1.6 × 1.6 mm	1
R3	510	1.6 × 1.6 mm	0
R4	290	1.0 × 1.0 mm	0

**Fig. 10** Conversion of ribose derivative **6** to 2-fluoro-arabinose derivative **8** with reactors R1–R4.

conversion of the reaction, determined by HPLC. At higher temperature the reaction proceeded much faster and the conversion reached 99% at 90 °C and a residence time of 15 minutes. In addition, different ratios of **6** and **7** were applied and different temperatures were used to optimize the reaction conditions (Table 4). Therefore a residence time of 15 min was set. The highest conversion of 90% could be measured with 3 equivalents of **7** at 85 °C. In comparison, several equivalents produce lower yields and are therefore not necessary. The yield at 75 °C is only slightly less than that at 85 °C. Due to the low boiling point of chloroform and the

**Fig. 11** Conversion of ribose derivative **6** to 2-fluoro-arabinose derivative **8** at different temperatures.**Table 4** Reaction optimization for fluorination

Temperature	Residence time	Equivalents DAST	Conversion
85 °C	15 min	3	90%
85 °C	15 min	6	74%
75 °C	15 min	3	89%
75 °C	15 min	6	72%
65 °C	15 min	3	44%
65 °C	15 min	6	31%



Table 5 Reaction optimization for bromination

Temperature	Residence time	Equivalents HBr	Conversion [%]
55 °C	5 min	10	80%
	10 min	10	99%
	20 min	10	>99%
	5 min	25	98%
	10 min	25	>99%
	20 min	25	>99%

resulting high pressure, 75 °C is set as the optimal reaction temperature for the following experiments.

The bromination was first optimized at 55 °C using two different ratios of HBr (10 eq. and 25 eq.) and three different residence times of 5, 10 and 20 minutes (Table 5). The best results for the bromination of **8** to **5** were achieved between

10 and 20 min with 25 eq. HBr (>99% conversion). With these results a multistep synthesis of **5** was set up.

For the multistep reaction, an individual reactor with a volume of 820 μL and three mixing channels (R5) was printed to generate higher flow rates and higher production capacity.

In Fig. 12 the setup of the multistep reaction is shown, consisting of four pumps, three PEEK reactors, one BPR and a membrane separator. For the extraction step our self-built syringe pump was used. In the first reactor R5 the fluorination reaction took place at 75 °C with an increased residence time of 20 min to ensure complete conversion to the fluoride **8**. In the additional bromination the reaction mixture of step one and HBr (33% in AcOH) were pumped through a second PEEK reactor R5 at 55 °C and a residence time of 14 min. Since the temperature exceeded the boiling point of chloroform, the BPR was set to a pressure of 3 bar.

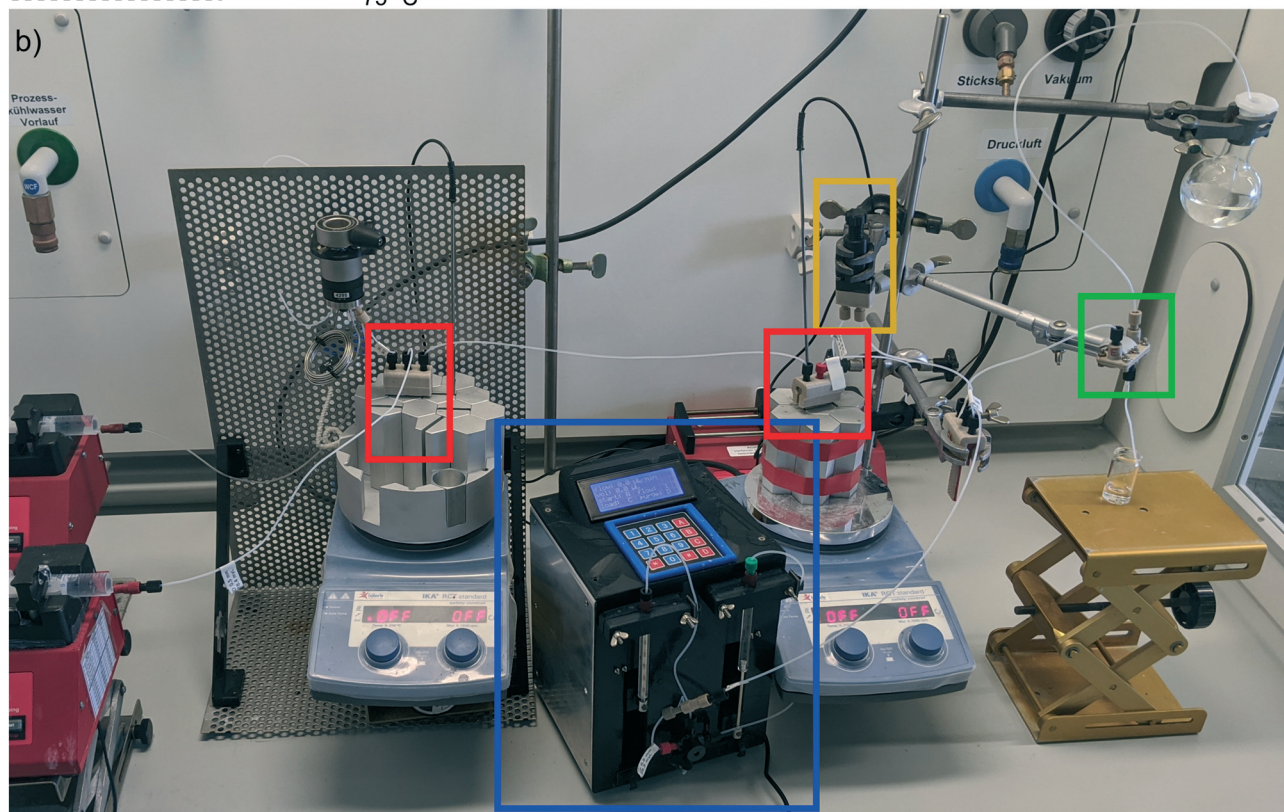
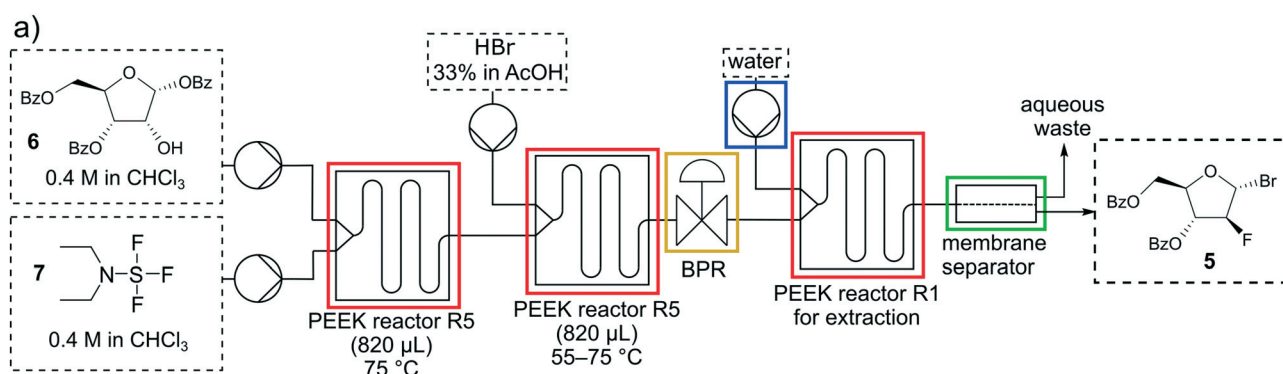


Fig. 12 Schematic drawing (a) and photograph (b) of the multistep synthesis.



Table 6 Reaction optimization for the multistep synthesis

Temperature	Residence time	Equivalents HBr	Conversion to 5 [%]
55 °C	14 min	25	93%
65 °C	14 min	25	99%
75 °C	14 min	25	>99%

The reaction mixture was quenched and washed with water in the third reactor R1 (residence time: 3 min) and the organic and water phases were separated through the membrane separator. The conversion was not complete at 55 °C so more optimization was necessary. Therefore, the temperature of the bromination was raised to 65 and 75 °C resulting in a conversion of >99% at 75 °C (Table 6).

With these conditions the multistep reaction was run continuously. A one hour sample of 2-deoxy-2-fluoro-3,5-di-O-benzoyl- α -D-arabinofuranosyl bromide (5) was collected (about 148 mg). Washing with water in the third reactor was sufficient to obtain very pure compound 5 with an isolated yield of 79%.

Conclusion

In this work, we present the development and fabrication of 3D-printed reactors and mixers out of PEEK. We tested several mixers made out of PP and PEEK with the Villiermaux–Dushman reaction to evaluate their mixing efficiency. The mixer with parallel crossed barriers in the channel showed the best mixing performance with both materials. Further, the miniaturization of straight channels printed with PEEK was tested, which showed that it is possible to print microreactors with channel dimensions below 500 μ m. The reactors we designed are fully customizable with CAD software and it takes only a few hours to obtain a finished flow reactor from an idea. Additionally, we presented a low-cost continuous syringe pump, back pressure regulator and membrane separator, which could be printed with either PEEK or PP. With a continuous multistep synthesis of a halogenated arabinose derivative we demonstrated the utility of our 3D-printed flow system. This facilitates the entry in flow chemistry and could be an alternative to commercially available flow equipment.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We thank the Karl und Anna Buck Stiftung for funding the high temperature 3D printer.

Notes and references

- A. R. Bogdan and A. W. Dombrowski, *J. Med. Chem.*, 2019, **62**, 6422–6468.
- B. Gutmann and C. O. Kappe, *J. Flow Chem.*, 2017, **7**, 65–71.
- R. L. Hartman and K. F. Jensen, *Lab Chip*, 2009, **9**, 2495–2507.
- C. Wiles and P. Watts, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, 1655–1671.
- N. Kockmann, M. Gottspöner and D. M. Roberge, *Chem. Eng. J.*, 2011, **167**, 718–726.
- M. Movsisyan, E. I. P. Delbeke, J. K. E. T. Berton, C. Battilocchio, S. V. Ley and C. V. Stevens, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**, 4892–4928.
- A. R. Bogdan and A. W. Dombrowski, *J. Med. Chem.*, 2019, **62**, 6422–6468.
- J. Russell, N. Pillarsetty, R. M. Kramer, P. B. Romesser, P. Desai, A. Haimovitz-Friedman, M. A. Lowery and J. L. Humm, *Mol. Imaging Biol.*, 2017, **19**, 885–892.
- R. E. Laing, M. A. Walter, D. O. Campbell, H. R. Herschman, N. Satyamurthy, M. E. Phelps, J. Czernin, O. N. Witte and C. G. Radu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 2847.
- P. Watts, G. Pascali and P. A. Salvadori, *J. Flow Chem.*, 2012, **2**, 37–42.
- P. L. Bonate, L. Arthaud, W. R. Cantrell, K. Stephenson, J. A. Secrist and S. Weitman, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2006, **5**, 855–863.
- I. V. Fateev, K. V. Antonov, I. D. Konstantinova, T. I. Muravyova, F. Seela, R. S. Esipov, A. I. Miroshnikov and I. A. Mikhailopulo, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2014, **10**, 1657–1669.
- W. E. Bauta, B. E. Schulmeier, B. Burke, J. F. Puente, W. R. Cantrell, D. Lovett, J. Goebel, B. Anderson, D. Ionescu and R. Guo, *Org. Process Res. Dev.*, 2004, **8**, 889–896.
- A. Enders, I. G. Siller, K. Urmann, M. R. Hoffmann and J. Bahnemann, *Small*, 2019, **15**, 1804326.
- M. R. Penny, Z. X. Rao, B. F. Peniche and S. T. Hilton, *Eur. J. Org. Chem.*, 2019, **2019**, 3783–3787.
- S. Rossi, A. Puglisi and M. Benaglia, *ChemCatChem*, 2018, **10**, 1512–1525.
- C. Parra-Cabrera, C. Achille, S. Kuhn and R. Ameloot, *Chem. Soc. Rev.*, 2018, **47**, 209–230.
- C. Chen, B. T. Mehl, A. S. Munshi, A. D. Townsend, D. M. Spence and R. S. Martin, *Anal. Methods*, 2016, **8**, 6005–6012.
- N. Bhattacharjee, A. Urrios, S. Kang and A. Folch, *Lab Chip*, 2016, **16**, 1720–1742.
- V. Dragone, V. Sans, M. H. Rosnes, P. J. Kitson and L. Cronin, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2013, **9**, 951–959.
- A. J. Capel, S. Edmondson, S. D. R. Christie, R. D. Goodridge, R. J. Bibb and M. Thurstans, *Lab Chip*, 2013, **13**, 4583–4590.
- P. J. Kitson, M. H. Rosnes, V. Sans, V. Dragone and L. Cronin, *Lab Chip*, 2012, **12**, 3267–3271.
- N. P. Macdonald, J. M. Cabot, P. Smejkal, R. M. Guijt, B. Paull and M. C. Breadmore, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 3858–3866.
- M. J. Beauchamp, G. P. Nordin and A. T. Woolley, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 4311–4319.
- D. Tripathi, *Practical Guide to Polypropylene*, RAPRA Technology, Shawbury, UK, 2002.
- F. N. Cogswell, *Thermoplastic Aromatic Polymer Composites*, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 1992.



- 27 P. A. Schweitzer, *Mechanical and Corrosion-Resistant Properties of Plastics and Elastomers*, Taylor & Francis, Boca Raton, 2000.
- 28 J. Britton and C. L. Raston, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 1250–1271.
- 29 M. B. Plutschack, B. Pieber, K. Gilmore and P. H. Seeberger, *Chem. Rev.*, 2017, **117**, 11796–11893.
- 30 R. L. Hartman, J. P. McMullen and K. F. Jensen, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 7502–7519.
- 31 T. Barri and J. Å. Jönsson, *Chromatographia*, 2004, **59**, 161–165.
- 32 Z.-X. Cai, Q. Fang, H.-W. Chen and Z.-L. Fang, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **556**, 151–156.
- 33 J. G. Kralj, H. R. Sahoo and K. F. Jensen, *Lab Chip*, 2007, **7**, 256–263.
- 34 K. Wang and G. Luo, *Chem. Eng. Sci.*, 2017, **169**, 18–33.
- 35 A. Adamo, P. L. Heider, N. Weeranoppanant and K. F. Jensen, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2013, **52**, 10802–10808.
- 36 J. M. Neumaier, A. Madani, T. Klein and T. Ziegler, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2019, **15**, 558–566.
- 37 K. Singh, *Int. J. Plast. Technol.*, 2018, **22**, 177–184.
- 38 A. D. Awtrey and R. E. Connick, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 1842–1843.
- 39 M. I. Elzagheid, E. Viazovkina and M. J. Damha, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, 2002, **10**, 1718–1719.
- 40 F. T. Chin, M. Namavari, J. Levi, M. Subbarayan, P. Ray, X. Chen and S. S. Gambhir, *Mol. Imaging Biol.*, 2008, **10**, 82–91.
- 41 V. Hessel, H. Löwe and F. Schönfeld, *Chem. Eng. Sci.*, 2005, **60**, 2479–2501.
- 42 S. Hossain and K.-Y. Kim, *Micromachines*, 2014, **5**, 913–928.
- 43 L. Wang, S. Ma, W. Jing, H. Bi and X. Han, *Asia-Pac. J. Chem. Eng.*, 2014, **9**, 877–885.
- 44 A. D. Stroock, S. K. W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezić, H. A. Stone and G. M. Whitesides, *Science*, 2002, **295**, 647–651.
- 45 F. Schönfeld, V. Hessel and C. Hofmann, *Lab Chip*, 2004, **4**, 65–69.
- 46 J.-M. Commenge and L. Falk, *Chem. Eng. Process.*, 2011, **50**, 979–990.
- 47 Z. A. Li, J. Yang, K. Li, L. Zhu and W. Tang, *RSC Adv.*, 2017, **7**, 3313–3320.
- 48 M. Engler, N. Kockmann, T. Kiefer and P. Woias, *Chem. Eng. J.*, 2004, **101**, 315–322.
- 49 X. Fu, S. Liu, X. Ruan and H. Yang, *Sens. Actuators, B*, 2006, **114**, 618–624.
- 50 V. Hessel, S. Hardt, H. Löwe and F. Schönfeld, *AIChE J.*, 2003, **49**, 566–577.
- 51 M. Hoffmann, M. Schlüter and N. Rübiger, *Chem. Eng. Sci.*, 2006, **61**, 2968–2976.
- 52 S. H. Wong, M. C. L. Ward and C. W. Wharton, *Sens. Actuators, B*, 2004, **100**, 359–379.
- 53 K. Karthikeyan and L. Sujatha, *Int. J. Chem. React. Eng.*, 2018, **17**, 20180047.
- 54 K. J. Hecht, A. Kölbl, M. Kraut and K. Schubert, *Chem. Eng. Technol.*, 2008, **31**, 1176–1181.
- 55 S. Schwolow, J. Hollmann, B. Schenkel and T. Röder, *Org. Process Res. Dev.*, 2012, **16**, 1513–1522.
- 56 M. Tebboth, A. Kogelbauer and A. Bismarck, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2015, **54**, 5974–5981.
- 57 L. Falk and J. M. Commenge, *Chem. Eng. Sci.*, 2010, **65**, 405–411.
- 58 K. Wang, H. Zhang, Y. Shen, A. Adamo and K. F. Jensen, *React. Chem. Eng.*, 2018, **3**, 707–713.
- 59 L. h. Nouri, L. Abouda and J. Legrand, *Chem. Eng. Process.*, 2014, **78**, 37–43.
- 60 S. R. L. Gobert, S. Kuhn, L. Braeken and L. C. J. Thomassen, *Org. Process Res. Dev.*, 2017, **21**, 531–542.
- 61 H. M. Xia, S. Y. M. Wan, C. Shu and Y. T. Chew, *Lab Chip*, 2005, **5**, 748–755.
- 62 W.-S. Yoo, J. Go, S. Park and S.-H. Park, *J. Micromech. Microeng.*, 2012, **22**, 035007.
- 63 J. Wegner, S. Ceylan and A. Kirschning, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 4583–4592.



Electronic Supplementary Information (ESI)

3D-printed PEEK reactors and development of a complete continuous flow system for chemical synthesis

Florian Menzel,^a Thomas Klein,^a Thomas Ziegler^a and Jochen M. Neumaier^{*a}

^a Institute of Organic Chemistry, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen, Germany.

*E-Mail: jochen.neumaier@uni-tuebingen.de

Table of contents

3D printer setup	2
Continuous syringe pump	3
Back pressure regulator (BPR) and membrane phase separator	7
Pressure test.....	9
Mixing tests	9
Printing tests.....	10
Chemical reactions	10
Procedure of the flow synthesis of 2-fluoro-1,3,5-tri- <i>O</i> -benzoyl- α -D-arabinofuranose (8) in different reactors	10
Optimization procedure for the flow synthesis of 2-fluoro-1,3,5-tri- <i>O</i> -benzoyl- α -D-arabinofuranose (8).....	11
Procedure and optimization of the flow synthesis of 1-bromo-2-fluoro-1,3,5-tri- <i>O</i> -benzoyl- β -D-arabinofuranose (5).....	12
Continuous flow procedure for the synthesis of 2-fluoro-1,3,5-tri- <i>O</i> -benzoyl- α -D-arabinofuranose (5).....	13
Notes and references	13

3D printer setup

Two 3D printers were used for this work. 3D-printed parts out of polypropylene (PP) and polylactic acid (PLA) are printed on an A8 from Anet. In our previous paper more information and the modification of this printer can be found.¹ 3D-printed parts out of PEEK are printed on an Apium P220 from Apium Additive Technologies GmbH.

Software: The lab equipment and flow reactors used in this work were designed with Autodesk Inventor Professional 2018. After modelling, the files were exported as stl files and sliced with the software simplify3D or cura 3.7.

PP parts: The reactors were printed with Verbatim PP filament 1.75 mm - Natural Transparent on the Anet A8 3D-printer. The best results were obtained using following settings:

Print speed = 30 mm/s

Filament flow = 105%

Nozzle temp. = 200 °C

Bed temperature = 80 °C, glass plate with transparent PP packaging tape from Lyreco with a brim of 10 mm

Layer height: 0.1 mm

Wall thickness: 2.0 mm = 5 × nozzle diameter (0.4 mm)

Fan speed: 100% beginning at layer 3

PEEK parts: The reactors were printed with Apium PEEK 450 Natural filament with an Apium P220 3D-printer. The best results were obtained using following settings:

Print speed = 25 mm/s

Extrusion width: 0.48 mm

Extrusion multiplier = 0.91

Nozzle temp. = 470 °C

Bed temperature = 130 °C, glass plate coated with DimaFix pen from DIMA3D with a brim of 11.52 mm (24 perimeters)

Layer height: 0.1 mm

PLA parts: PLA 1.75 mm from Janbex was used on the Anet A8 3D-printer.

The best results for PLA were obtained using following settings:

Print speed = 60 mm/s

Filament flow = 100%

Nozzle temp. = 200 °C

Bed temperature = 60 °C, printed on a glass plate, coated with hairspray before each print.

Layer height: 0.2 mm – 0.3 mm

Continuous syringe pump

For all 3D-printed parts PLA was used. The STP and STL files of all printed parts can be found in the zip-file. **Figure S1** shows the exploded-view CAD drawing of the pump. The part numbers can be found in **Table S1**. The pump was mounted in 3 parts, the frontside with the motors and syringes, the backside with the controlling unit and the top cover with the keypad and the display. The wires were connected as shown in **Figure S2a** and all parts were put together to the bent and drilled aluminum plate. The connection of the syringes to the valve is shown in **Figure S2b**

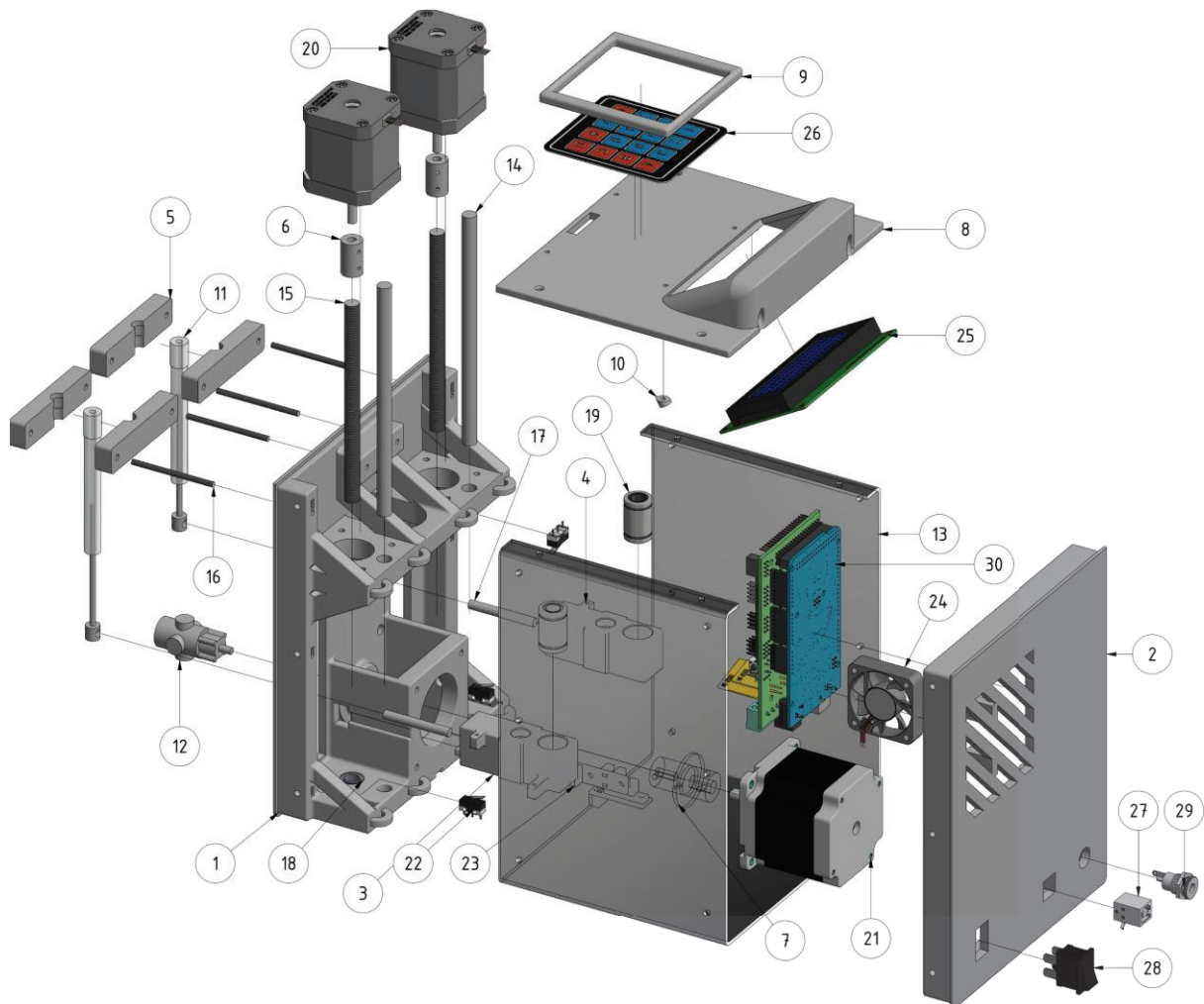


Figure S1: Exploded-view CAD drawings of the pump.

Table S1: Part list for continuous syringe pump with integrated Arduino controller, in brackets the screws and nuts are given, which are needed for mounting of each part

Quant.	Part	Source	No.
1	Frontside (6 × countersunk screws PH, M3 × 16 mm, 6 × M3 nuts)	3D-printed	1
1	Backside (6 × countersunk screws PH, M3 × 16 mm, 6 × M3 nuts)	3D-printed	2
1	Plunger carrier (2 × cheese head screw, M2 × 16 mm for manual justification of the endstops)	3D-printed	3
1	Plunger carrier, mirrored (2 × cheese head screw, M2 × 16 mm for manual justification of the endstops)	3D-printed	4
4	Syringe holder	3D-printed	5
2	Motor coupling	3D-printed	6
1	Motor coupling for valve (2 × set screw, M3 × 6 mm)	3D-printed	7
1	Top cover (4 × countersunk screws PH, M3 × 8 mm)	3D-printed	8
1	Keypad frame (4 × countersunk screws PH, M2.5 × 4 mm)	3D-printed	9
2	Display seat	3D-printed	10
2	Syringe, 500 µl SYR H-XL PTFE-seal	ILS, Innovative Labor Systeme GmbH	11
1	V-100 D, 4-Way valve PEEK diagonal flow IDEX H&S V-100D	Roland Vetter Laborbedarf OHG	12
1	Aluminium plate 586 × 140 mm × 2mm, bended	In-house workshop	13
2	Round rod, 8 × 146 mm	In-house workshop	14
2	Trapezium thread spindle, Tr8×1.5 × 120 mm	HFB-Gewindetechnik	15
2	Hexagon nut, Tr8×1.5, inprinted in part No. 3 and 4	HFB-Gewindetechnik	
4	Threaded rod, M3 × 50 mm (Wing nut, M3)	In-house workshop	16
2	Round rod, 5 × 40 mm	In-house workshop	17
2	Plain bearing, 8 mm	Igus	18
2	RJ4JP-01-08 drylin® R - bearing 8mm	Igus	19
2	ACT 17HM5417 hybrid stepper motor NEMA 17, 0.9 °, 1.7 A, 3.06 V (8 × cheese head screw with hexagon socket, M3 × 12 mm)	Reichelt elektronik GmbH & Co. KG	20

Quant.	Part	Source	No.
1	ACT 23HS6430 stepper motor, 4 pole, 1.8 °, 2.4 V DC (4 × cheese head screw with hexagon socket, M3 ×16 mm, 4 × M3 nuts)	Reichelt elektronik GmbH & Co. KG	21
4	Pololu mini snap-action switch with 13.5mm lever (8 × cheese head screw with hexagon socket, M2 ×10 mm)	Eckstein GmbH	22
2	Optical endstop switch (4 × cheese head screw with hexagon socket, M2.5 ×8 mm)	Eckstein GmbH	23
1	Fan, 40x40x10 mm, 12 VDC (2 × cheese head screw with hexagon socket, M3 × 20 mm, 2 × M3 nuts)	Reichelt elektronik GmbH & Co. KG	24
1	Character 20x4 LCD display module (4 × countersunk screws PH, M2.5 × 6 mm)	Eckstein GmbH	25
1	4x4 matrix array keypad 8 pin 16 key membrane keyboard for Arduino	Eckstein GmbH	26
1	USB panel socket, series B (cheese head screw with hexagon socket, M3 ×8 mm)	Reichelt elektronik GmbH & Co. KG	27
1	Rocker switch, 3-Pin	Eckstein GmbH	28
1	DC-socket 2.1/5.5mm	Reichelt elektronik GmbH & Co. KG	29
1	HIMALAYA basic MEGA 2560	Eckstein GmbH	30
1	Ramps 1.4 controller (3 × countersunk screws PH, M3 × 20 mm)	Eckstein GmbH	30
3	DRV8825 stepper motor driver	Eckstein GmbH	
1	Single output power supply 12 V, 3 A	Reichelt elektronik GmbH & Co. KG	
	4-Pin 20 cm jumper wire cable female to female	Eckstein GmbH	

Wiring of the Arduino and motors: For controlling the motors of the syringes and valve we use a RAMPS 1.4 controller, which was attached to the Arduino Mega 2560. The DRV8825 Stepper Motor Driver was clipped to the RAPMS controller at X, Y, Z position and the jumper settings was set to half steps (MS1 jumpered). The current limiting was adjusted to around 1.6 A with the integrated trimmer potentiometer (0.8 V). The assignment of the stepper motors, end stop switches, display and keypad are shown in **Figure S2a**. The RAPMS controller was connected to a standard 12 V DC, 3 A power supply over a rocker switch and a DC socket. Be careful, not to connect the power supply and the USB of the Arduino at the same time! All

parts were connected using female-to-female or female-to-male jumper wires to minimize soldering operations.

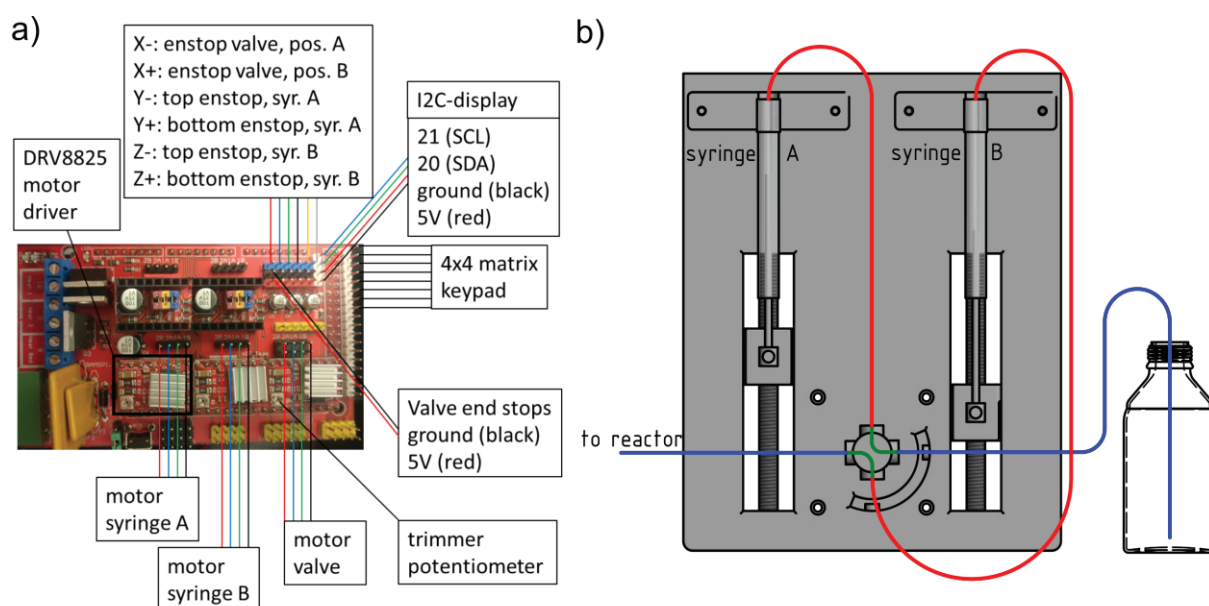


Figure S2: a) Wiring diagram of the Arduino. b) Connection of the syringes and valve

Programming with Arduino software: The software was written on the open-source Arduino software. If the motor and end stop ports are connected with the Arduino as mentioned above, the written software can be used instantly, otherwise the pins of the Arduino have to be edited to the corresponding pins. We choose 500 μL syringes with a stroke of 60 mm which results in a syringe factor of 120 mm/mL. This factor is as defined in the program code as “float syringe factor”, which could easily be modified, if other syringes are used. After the first accuracy test (see below) the syringe factor was corrected corresponding to the measured volumes to give a final syringe factor of 120.69. With this method different syringes can be inserted in the code and a very accurate dispensing is achieved. The complete program code can be found in the zip-file.

Accuracy test of the syringe pump: The pump was tested with flow rates from 2.5 to 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$. Distilled water was dispensed at room temperature for 1 to 10 min, weight and compared to the theoretical volume. **Table S2** shows the measured weight after correction of the syringe factor. In all flow rates a deviation between 0 and 1.7% were measured.

Table S2: Accuracy test of the used syringes.

Flow rate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Time [min]	Weight [g]	Deviation
1000	1	1.017	+1.7%
500	3	1.503	+0.2%
200	3	0.599	-0.16%
100	4	0.401	+0.25%
50	12	0.597	-0.5%
20	20	0.400	0%
2.5	30	0.076	+1.33%

Brief instruction for using the syringe pump: After starting up the pump, the syringes go to their starting position. By pressing the key C, a loading program can be started to remove air from the syringes and load the syringes with the desired solution. By pressing the key D, a purging program could be started. With the key 1 the flow rates can be set with one decimal place in $\mu\text{L}/\text{min}$. The key A starts and stops the pump. During change of the flow rate the pump stops! Due to a delay in the program loop during actualization of the display, the display will not refresh automatically. The 0-key has to be pressed to refresh the display manually. After refresh, it shows the actual dispensed volume. With the key 5 the dispensed volume can be reset to 0.

Back pressure regulator (BPR) and membrane phase separator

The STP and STL files of all printed parts can also be found in the zip-file. **Figure S3** shows the exploded-view CAD drawing of the BPR and the membrane separator. The part numbers can be found in **Table S3**.

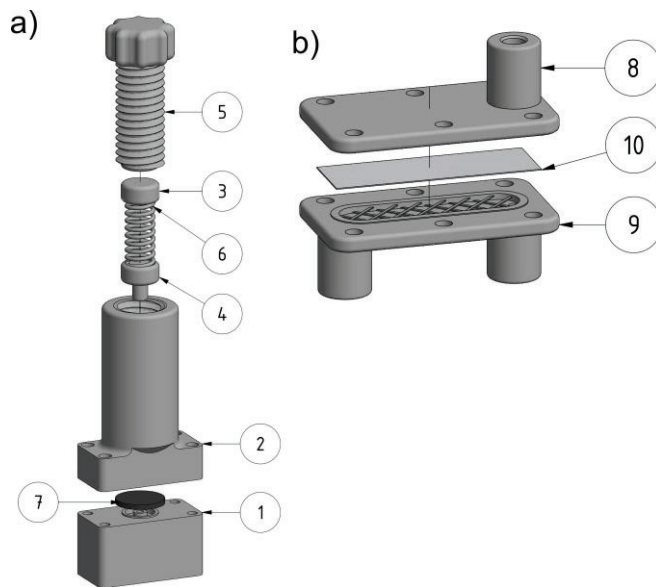


Figure S3: a) BPR b) membrane phase separator

The parts No. 8 and 9 were printed of PEEK with the connectors facing to the build plate. This is important, because warping during the print do not provide a flat surface which is necessary for a tight fit of the two plates. Also, the flat side was sanded with 1000 grit abrasive paper.

Table S3: Part list for BPR and membrane phase separator

Quant.	Part	Source	No.
1	Bottom part	3D-printed out of PEEK	1
1	Top part	3D-printed out of PLA	2
1	Top spring holder	3D-printed out of PLA	3
1	Stamp	3D-printed out of PLA	4
1	Top screw	3D-printed out of PLA	5
1	Spring 0.5 × 6.5 × 25 mm	IVO Industriebedarf	6
1	Spring 0.8 × 7,7 × 25 mm	IVO Industriebedarf	6
1	PTFE foil (100 μm) + silicone sheet (500 μm)	In-house workshop	7
1	Separator part 1	3D-printed out of PEEK	8
1	Separator part 2	3D-printed out of PEEK	9
1	PTFE membrane, pore size 1 μm, 100 μm thickness	Pieper Filter GmbH	10

Pressure test

For the pressure test of the two different springs in the BPR a HPLC pump S1100 from Sykam was used with isopropanol as solvent. The pressure was measured with two types of manometer. For pressures between 1 and 6 bar a manometer CI 2.5 from WIKA was used, for pressures up to 30 bar a manometer from Messer Griesheim was used.

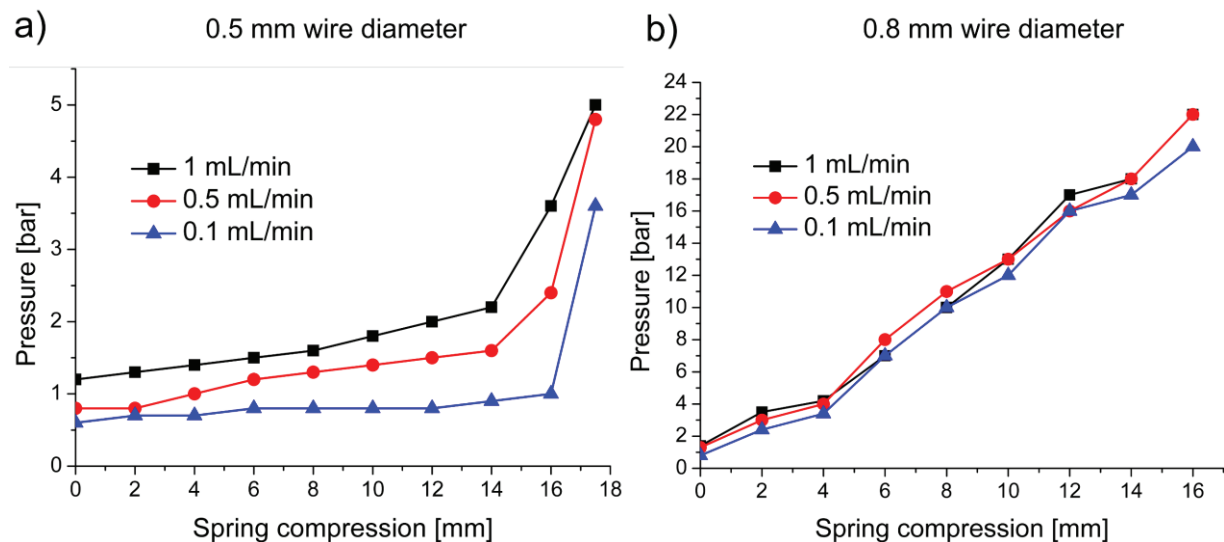


Figure S4: Back pressure regulator with two springs (a: 0.5 mm wire diameter, b: 0.8 mm wire diameter) at different flow rates.

The pressure test with a weaker spring ($0.5 \times 6.5 \times 25$ mm) in the BPR shows, that in the range of 0 to 14 mm spring compression the pressure rises very constantly. Beyond 14 mm compression the pressure rises dramatically, probably because it's beyond the maximum travel of the spring. It is possible to adjust the pressure with the stronger spring ($0.8 \times 7.7 \times 25$ mm) very precisely, due to the almost linear increase.

Mixing tests

Every mixing geometry was tested with equal flow rates for both syringes. The combined flow rates were 10, 5, 3, 1.5 and 0.5 mL/min. We started with the highest flowrate and took 3×20 measurements after reaching a reasonably constant absorption. The mean value of the 60 measurements was used to calculate the segregation index. We used a reactor outlet tube with a length of 1 m to ensure the completion of the VD reaction. As tubes we used 1/16" ETFE tubes with 1 mm ID. The chemicals for the mixing tests were obtained from Applichem, Honeywell, Merck and Sigma-Aldrich.

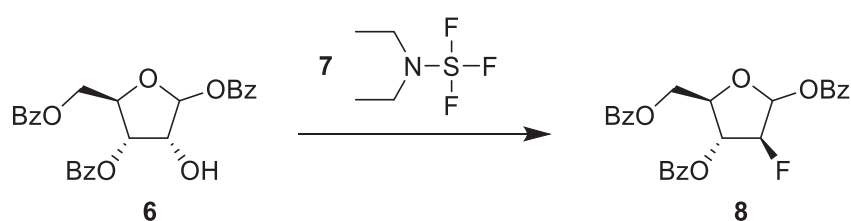
Printing tests

The volumes of the mixers and the test reactors were measured by pumping a dye solution (brilliant blue) through the channels with a 250 μL gas tight glass syringe from Hamilton and observing the volume dispensed when the solution reaches the outlet. The dimensions of wider channels of the open test piece we measured with a caliper and a digital microscope, the narrower channels (0.8 mm and smaller) with a microscope that has a built-in scale.

Chemical reactions

For flow reactions the self-built continuous syringe pump was used and additional syringe pumps LA-30 from Landgraf Laborsysteme HLL GmbH. HPLC grade CHCl_3 were passed through a column filled with molecular sieve (4 \AA , 1 g/mL CHCl_3) prior use. NMR spectra were recorded on a Bruker "Avance 400" spectrometer and calibrated to the solvent signal (CDCl_3 : ^1H 7.27 ppm, ^{13}C 77.0 ppm). HPLC measurements were made on HPLC system containing a Sykam S 1121 solvent delivering system, a Sykam S5200 sample injector and a Linear UVVIS-205 absorbance detector (254 nm). As column a GROM-SIL 120 ODS-3 CP, 5 μm column (250 \times 4 mm) was used. Diethylaminosulfur trifluoride (DAST) must be handled with caution and must not be heated above 90 $^\circ\text{C}$ due to highly reactive decomposition products.

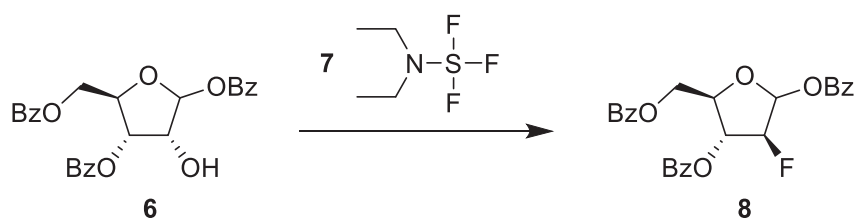
Procedure of the flow synthesis of 2-fluoro-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranose (**8**) in different reactors



A solution of 1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-ribofuranose (**6**) (0.3 M in dry CHCl_3 , 1 eq.) and a solution of diethylaminosulfur trifluoride (**7**) (0.3 M in dry CHCl_3 , 3 eq.) were pumped through flow reactor R1-R4, respectively, at 75 $^\circ\text{C}$. The BPR was set to 2 bar. The flow rates was set according to **Table S4**. 500 μL of the reaction mixture was collected in a glass vial containing sat. NaHCO_3 solution (1 mL). 50 μL of the organic phase was diluted with 950 μL acetonitrile (HPLC grade) for HPLC measurements.

Table S4: Conditions for fluorination

Exp. No.	Reactor (μL)	flow rate of 6 [$\mu\text{L}/\text{min}$]	flow rate of DAST [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Residence time [min]
1	R1 (320 μL)	40	120	2
2		16	48	5
3		8	24	10
4		5	16	15
5	R2 (480 μL)	60	180	2
6		24	72	5
7		12	36	10
8		8	24	15
9	R3 (510 μL)	64	191	2
10		26	77	5
11		13	38	10
12		9	26	15
13	R4 (290 μL)	36	109	2
14		15	44	5
15		7	22	10
16		5	14	15

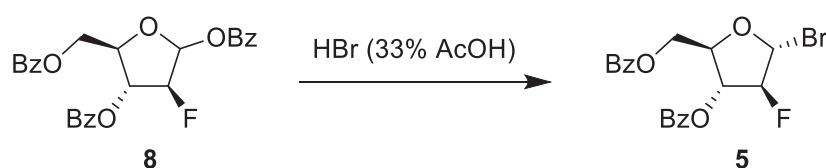
Optimization procedure for the flow synthesis of 2-fluoro-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranose (8**)**

A solution of 1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-ribofuranose (**6**) (0.3 M in dry CHCl_3 , 1 eq.) and a solution of diethylaminosulfur trifluoride (**7**) (0.3 M in dry CHCl_3 , 3 eq.) were pumped through flow reactor R1 (320 μL) and a BPR set to 2 bar. The temperature, the overall flow rate and the resulting residence time are shown in **Table S5**. For each experiment 500 μL of the reaction mixture was collected in a glass vial containing sat. NaHCO_3 solution (1 mL). 50 μL of the organic phase was diluted with 950 μL acetonitrile (HPLC grade) for HPLC measurements.

Table S5: Conditions for fluorination

Exp. No.	Temperature	Overall flow rate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Residence time [min]
1–16	60–90 °C	21	15
		9	27
		57	5.6
		107	3

Procedure and optimization of the flow synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-3,5-di-O-benzoyl- α -D-arabinofuranosyl bromide (5)

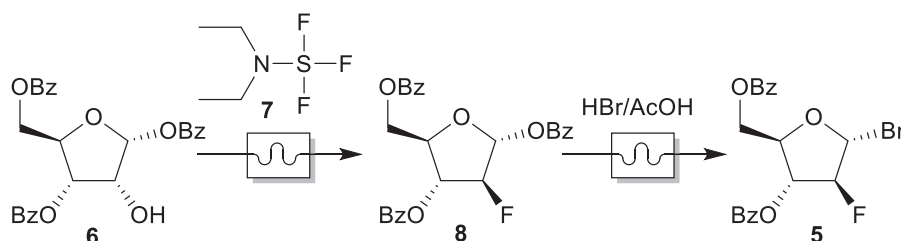


A solution of 2-fluoro-1,3,5-tri-O-benzoyl- α -D-arabinofuranose (**8**) (0.3 M in dry CHCl_3 , 1 eq.) and a solution of HBr (33% in AcOH, 10 and 25 eq.) were pumped through flow reactor R5 (820 μL) and a BPR set to 2 bar. The temperature was set to 55 °C, the overall flow rate and the resulting residence time are shown in **Table S6**. For each experiment 500 μL of the reaction mixture was collected in a glass vial containing sat. NaHCO_3 solution (1 mL). 50 μL of the organic phase was diluted with 950 μL acetonitrile (HPLC grade) for HPLC measurements.

Table S6: Conditions for bromination

Exp. No.	Equivalents of HBr	flow rate of 8 [$\mu\text{L}/\text{min}$]	flow rate of HBr [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Residence time [min]
1–3	10	107	57	5
		54	28	10
		27	14	20
4–6	25	71	93	5
		35	47	10
		18	23	20

Continuous flow procedure for the synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-3,5-di-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranosyl bromide (**5**)



A solution of 1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-ribofuranose (**6**) (0.4 M in dry CHCl_3 , 1 eq.) and a solution of diethylaminosulfur trifluoride (**7**) (0.4 M in dry CHCl_3 , 3 eq.) were pumped through flow reactor R5 (820 μL), respectively, at 75 $^\circ\text{C}$. For the directly following second step, HBr (33% in dry AcOH, 25 eq.) and the reaction mixture of step one were pumped through an additional flow reactor R5 (820 μL) at 55-75 $^\circ\text{C}$. The BPR was set to 2 bar. For further purification the reaction mixture of step two and H_2O were pumped through a third reactor R1 (320 μL), serving as an extractor followed by the membrane separator (150 μL). The flow rates were set according to **Table S7**. 500 μL of the organic phase was collected in a glass vial. 50 μL of the organic phase was diluted with 700 μL acetonitrile (HPLC grade) for HPLC measurements.

Table S7: Conditions for the multistep synthesis

Reaction	Reactor (μL)	flow rate of 6 [$\mu\text{L}/\text{min}$]	flow rate of DAST [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Residence time [min]
Fluorination	R5 (820 μL)	10	31	20
		flow rate of 8 [$\mu\text{L}/\text{min}$]	flow rate of HBr [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Residence time [min]
Bromination	R5 (820 μL)	41	17	14
		flow rate of 5 [$\mu\text{L}/\text{min}$]	flow rate of H_2O [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Residence time [min]
Quenching	R1 (320 μL)	58	49	3
Seperation	membrane separator (150 μL)			1

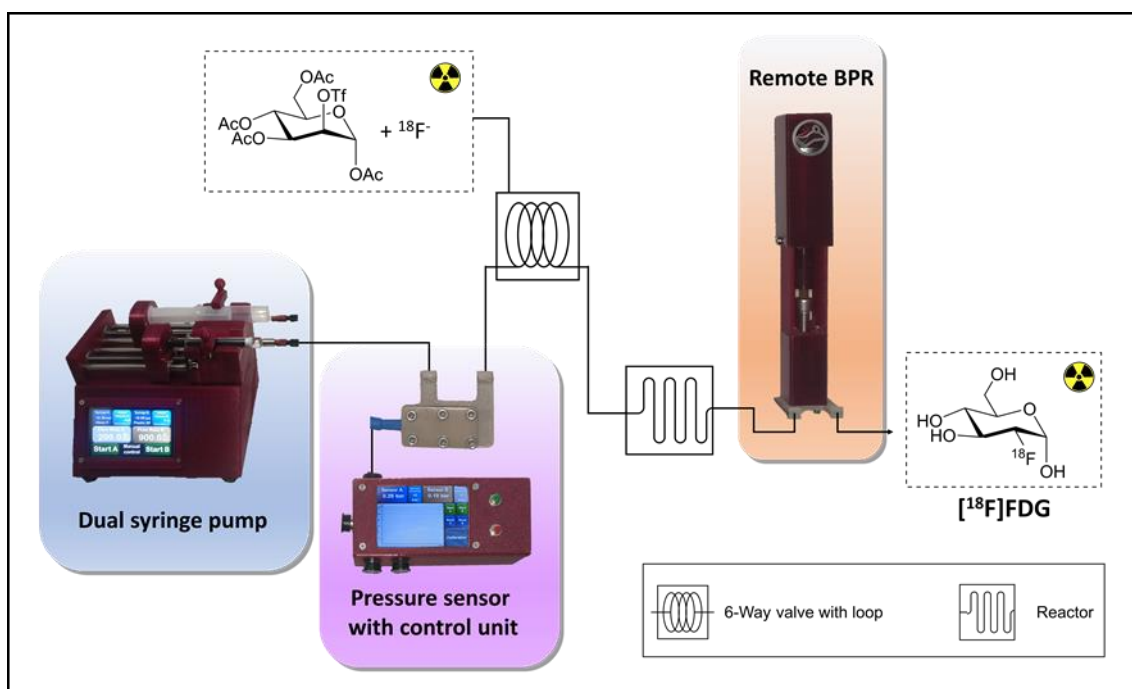
Notes and references

1. J. M. Neumaier, A. Madani, T. Klein and T. Ziegler, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2019, **15**, 558–566.

Paper 2

FOMSy: 3D-printed flexible open-source microfluidic system and flow synthesis of PET-tracer

Florian Menzel, Jonathan Cotton, Thomas Klein, Andreas Maurer, Thomas Ziegler, Jochen M. Neumaier, *J. Flow Chem.*, **2023**, *13*, 247–256, DOI: 10.1007/s41981-023-00267-z.





FOMSy: 3D-printed flexible open-source microfluidic system and flow synthesis of PET-tracer

Florian Menzel^{1,2} · Jonathan Cotton^{2,3} · Thomas Klein¹ · Andreas Maurer^{2,3} · Thomas Ziegler¹ · Jochen M. Neumaier¹

Received: 6 February 2023 / Accepted: 7 March 2023 / Published online: 22 March 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

In this work, we introduce a low-cost open-source flow system that includes a dual syringe pump with implemented pressure sensor and back pressure regulator. The entire system can be built for around 500 €. Commercially available flow systems can be very expensive with equipment starting at, but often greatly exceeding, 10,000 €. This high price of entry makes such technology prohibitively expensive for many research groups. Such systems stand to benefit the emerging academic pharmaceutical field by providing the experience and availability of reliable and affordable solutions. To implement accessible flow chemistry at research facilities, the systems must be made affordable. In addition, space in research laboratories is usually limited and commercially available flow systems can be very bulky. Having a compact and individually adjustable system is thus beneficial, with 3D printing technology offering the solution. Our compact 3D-printed system meets the needs of many applications in flow chemistry research as well as educational requirements for universities. As a proof of concept, we conceptualized, developed, and tested a custom flow system that can be used to synthesize [¹⁸F]2-fluoro-2-desoxy-d-glucose ([¹⁸F]FDG), the most commonly used PET-tracer. This system was designed to perform the typical functions and operations required in radiotracer production i.e. radiofluorination, dilution, SPE-trapping, deprotection, and SPE-elution. With this proof-of-concept in hand, the system can be easily customized to produce other radiopharmaceuticals.

Keywords Flow chemistry · Chemical engineering · 3D printing · Radiochemistry · Open hardware

Introduction

Continuous flow chemistry has undergone rapid growth over the last two decades [1–4]. Flow chemistry offers the unique benefits of improved mixing and heating efficiency as well as easy scale-up while reducing reaction time and solvent consumption [5–8]. Due to its beneficial properties, many applications for research and industrial organic synthesis have been developed. It can be combined with almost

every technology, like photochemistry [9], catalysis [10], or electrochemistry [11]. One of the drawbacks is the prerequisite for expensive proprietary equipment that is not always affordable or obtainable. The combination of 3D printing and flow chemistry has emerged in recent years and could solve the hurdle of expensive equipment. Both, microreactors and various pump systems have already been described using 3D printing [12–19]. It can also be a useful tool for other sciences, printing various scientific devices such as microscopes, centrifuges, or 3D models for educational purposes [20].

One application in which the full potential of flow chemistry is utilized is the synthesis of radiopharmaceuticals and PET-tracers [21–23]. This is mostly reliant on automation using expensive and proprietary equipment that is unobtainable to many researchers. To address this need, we developed an open-source 3D printed microfluidic system that can be produced for around 500 €. The system includes a dual syringe pump, a back pressure regulator (BPR) as well as a pressure sensor (PS). In combination with our 3D-printed microreactors,

✉ Jochen M. Neumaier
jochen.neumaier@uni-tuebingen.de

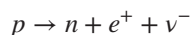
¹ Institute of Organic Chemistry, University of Tuebingen, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tuebingen, Germany

² Werner Siemens Imaging Center, Department of Preclinical Imaging and Radiopharmacy, Eberhard Karls University, Tuebingen, Roentgenweg 15, 72076 Tuebingen, Germany

³ Cluster of Excellence iFIT “Image-Guided and Functionally Instructed Tumor Therapies” (EXC 2180), University of Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany

which were published in our previous work [14], the system can be customized to perform crucial radiosynthetic steps such as fluorination, dilution, and SPE (solid phase extraction) trapping/eluting. This system can be customized to rapidly produce a wide range of tracers and prosthetic radioligands with high molar activity and activity concentration, all within a small footprint. In this work, we evaluated this new system by synthesizing [^{18}F]2-fluoro-2-deoxy-d-glucose ([^{18}F]FDG), the gold standard of PET radiotracers (Fig. 1).

[^{18}F]FDG is the most common and approved radiopharmaceutical for positron emission tomography (PET) and is used for non-invasive in vivo measurements of glucose metabolism [24]. Tumor cells, because of the Warburg effect, exhibit characteristically high glucose metabolism and can thus be differentiated from other normal tissue in PET by their high tracer uptake [25–27]. Lung cancer, brain cancer, lymphoma, melanoma as well as breast cancer are examples of cancer cells with higher glucose metabolism [28, 29]. [^{18}F]FDG is a structural analog of glucose and recognized by cells accordingly. After being transported via GLUT-1 and GLUT-3 into cells, it is phosphorylated by hexokinase to [^{18}F]FDG-6-phosphate. This cannot be further metabolized and is thus trapped in the cell [30, 31]. Being deficient of neutrons, the radioactive ^{18}F -isotope strives for a more stable energy state, which is achieved through a β^+ -decay. In this process a proton (p) decays into a neutron (n), emitting a positron (e^+) and an electron neutrino (ν^-) [32]. The reaction can be described by the following equation.



The nucleon number in the nucleus remains the same, while the atomic number is decreased by the value of one. In the case of radioactive β^+ -decay of ^{18}F , the stable oxygen isotope ^{18}O is formed. Positrons are antiparticles of electrons and differ only by their sign. They dissipate kinetic energy by inelastic interactions with the tissue in the body and recombine with an electron present in the environment, forming a positronium exotic atom. In subsequent annihilation, the mass of the two particles converts into a pair of anti-parallel 511 keV gamma photons. These photons are simultaneously detected within a ring of scintillator detectors and a tomographical map of tracer accumulation (PET image) can be generated [33].

The synthesis of [^{18}F]FDG has already been excessively well described in the literature [23, 34, 35] and the GMP tracer is routinely produced in multi-patient doses from commercially available kits designed for expensive automated radiosynthesis

devices. The requirements and considerations for our custom system address several of the factors that play a role in typical diagnostic radiopharmaceutical production: (1) Due to the half-life of the ^{18}F -Isotope (109.5 min) [36], the total reaction time, including all purification, should be as short as possible. (2) Handling radioactive material should be as safe as possible. The transition to highly adaptable automated systems decreases the radiation exposure of the operator. (3) The reactions should be efficient and reproducible. The tracer precursors are expensive, and the amount used for each synthesis should be minimized. More so, the production of radioactive and chemical by-products should be minimized as their presence would require time-consuming purification by solid phase extraction (SPE) or HPLC. (4) Furthermore, the system should be affordable and easy to handle. The most common radiosynthetic route to [^{18}F]FDG is via the $\text{S}_{\text{N}}2$ nucleophilic substitution of tetraacetyl mannose triflate, followed by C18 SPE immobilization, base hydrolysis, and elution. An alumina SPE cartridge is often included in series to remove chemical impurities such as [^{18}F]fluoride, tetrabutylammonium bicarbonate (TBAHCO₃), or Kryptofix®. The synthesis of [^{18}F]FDG for clinical use by common fully automated synthesizers requires over 30 min and achieves a radiochemical purity of over 95%. With the benchmarks established, we set out to test our open-source system [37].

Results and discussion

Development of the pump system

The flexible open-source microfluidic system we describe allows for the development of semi-automated flow processes. Parameters such as reaction conditions and flow rates were investigated and optimized. To fulfill the respective requirements, essential basic elements are needed. The most important task is to guarantee a continuous flow during the experiment. For this purpose, we built a syringe pump with two syringe holders that can be separately controlled. By using syringes as solvent reservoirs, a wide range of flow rates can be reliably covered.

Apart from the electronics and the mechanical parts, such as screws and rods, almost all components were 3D-printed. Figure 2 shows the CAD drawing and the assembled pump. We printed two versions of the pump, one in PLA (polylactic acid) and one in PETG (polyethylene terephthalate glycol copolymer), but also more chemical resistant materials like Nylon or any other non-flexible material should be possible.

Fig. 1 Synthesis of [^{18}F]FDG

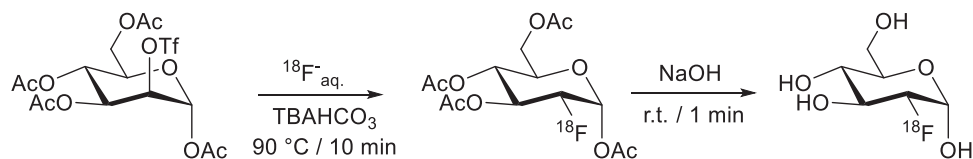
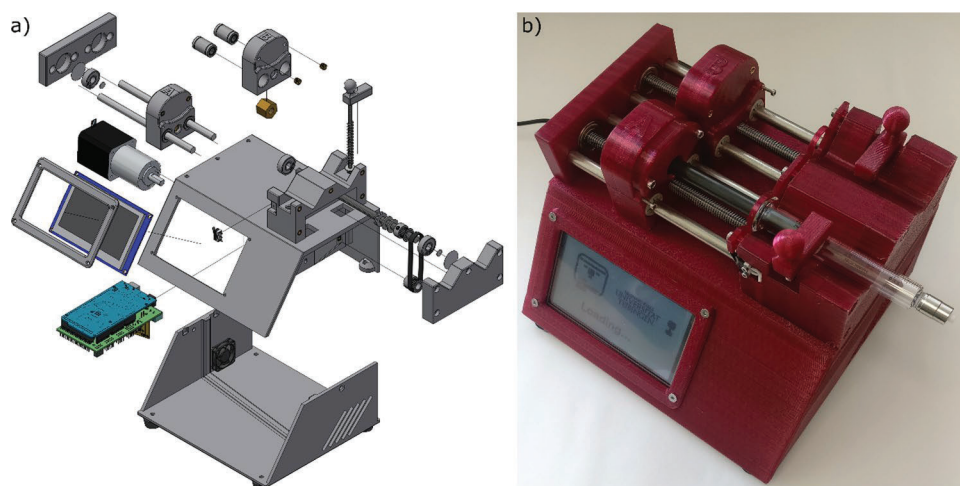


Fig. 2 Exploded view CAD drawing (a) and photograph (b) of the syringe pump



The 3D-printed parts were assembled using threaded inserts ensuring a firm fixation. The moving parts were guided by two rods and various ball and plain bearings. To transfer the motor movement to a linear movement, a trapezoidal thread spindle was used, which ensures a better power transmission than a standard V-threaded rod.

For controlling the pump, an Arduino Mega 2560 in combination with a programmable Nextion display was used. A RAMPS shield and TMC 2208 drivers were used to control the stepper motors. One drawback of using stepper motors is that pulsation of the flow can occur at low flow rates. This is caused when the pauses between steps are too long. For this reason, we chose geared stepper motors with a ratio of 27:1, resulting in two advantages. First, by increasing the number of steps required for one rotation, a constant flow could be ensured even at low flow rates. Second, the geared motor pump is much more powerful than the stepper motor and can easily generate pressures up to 10 bar, depending on the used syringes. One disadvantage is that the maximum pump speed is reduced. If needed, the gear motor can be easily changed to a smaller gear ratio, and the variable “gear-ratio” could be simply changed in the Arduino software (line 39: `int gear-ratio = 27`). Of course, a smaller gear ratio leads not only to a faster pump speed but also a decrease in power and maximum pressure.

The system can be used with Hamilton glass syringes as well as commercially available disposable plastic syringes. To determine flow accuracy and reliability, the syringes were filled with water at r.t. and atmospheric pressure, the flow rate was set and the amount of collected water was weighed after equilibration of the system at the end of the collection time. Next, flow rates from 0.1 to 10% of the syringe volume were investigated. A modest deviation of 2.5%, which could not be decoupled from experimental error, was determined.

From the data of the measurements, deviations for each examined flow rate can be created. If the deviation is over 2.5% the syringe/flowrate combination was deemed

unsuitable for the pump. The results for the suggested flow rates are summarized in Table 1.

The measurements were carried out on both the PLA flow system and the PETG flow system. No significant differences were found. It was also investigated on both systems whether there were differences in the flow rate accuracy at higher pressure. For this purpose, all measurements of the Hamilton glass syringes were repeated at a pressure of 5 bar. Again, no significant differences were found. Detailed experimental data can be found in the ESI.

Development of the pressure sensor and BPR

Another important point is the continuous measurement of the pressure. Due to varying flow resistances at different flow rates, different viscosities of the running fluids, as well as lengths of the capillaries or other components used in the system, a unique basic pressure is established for the process. This pressure must be measured and displayed live so that real-time flow adjustments can be made. For this purpose, we have developed a pressure sensor (PS), which can communicate with the pump. The system was designed such that the designated maximum pressure will not be exceeded as the pump stops automatically, preventing the reactor from

Table 1 Suggested flow-range for Hamilton-syringes

Syringe: Volume [mL]	Suggested flow-range [$\mu\text{L}/\text{min}$]
0.1	1–10
0.25	1.25–25
1	5–100
2.5	2.5–250
5	5–500
10	10–1000
25	25–2500

bursting or another system component from rupturing. In addition, by tracking the pressure live, it is possible to know when the system is in equilibrium and ready to use.

The working principle of the pressure sensor is based on the resistance change of a force-sensitive resistor (FSR). To process the resistance change, the FSR is connected to an Arduino Mega on an analog Pin with enabled internal pull-up resistor. The channel in the 3D-printed part is opened to form a cavity, allowing for the pressure of the system to be transmitted to the FSR. The cavity is sealed by a PTFE disc and damped by a silicone disc. We have used different materials and thicknesses for the discs and found that silicone with a thickness of 1 mm and PTFE with a thickness of 0.1 mm gives the best results for pressures between 0 and 6 bar.

As described in our previous publication [14], we found that a system with a guide rail gives reliably leakproof connections. The surfaces shown in Fig. 3 were sanded and the flangeless flat bottom 1/4"-28 fittings were pressed against the flat-honed surfaces.

Since each sensor is unique and has slight differences in measured pressure, it must be calibrated before use. The calibration can be done using a commercial manometer. Therefore, multiple data points from 0.5 to 6 bar were measured in 0.2 bar increments and converted to a calibration function. Detailed instructions for the calibration can be found in the ESI. The accuracy of our calibration was checked by multiple measurements of HPLC resistance cartridges. A maximum deviation of 0.7% at 6 bars could be determined.

The kinetics of a reaction often correlate to temperature and reactant concentration. By increasing the pressure of the system, higher reaction temperatures (above the boiling point of the solvent) can be examined. For this purpose, we have designed an externally controllable back pressure regulator (BPR). In our previous publication [14] we developed a spring-based 3D-printed BPR. We have adapted the previous version to fit our guide rail (Fig. 3), which for us is the best and most reliable system. Also, we installed a 12 V gear motor to remotely tension and release the spring (Fig. 4). The motor is controlled using an L298N motor driver,

Fig. 3 Exploded view CAD drawing (a) and photograph (b) of the pressure sensor

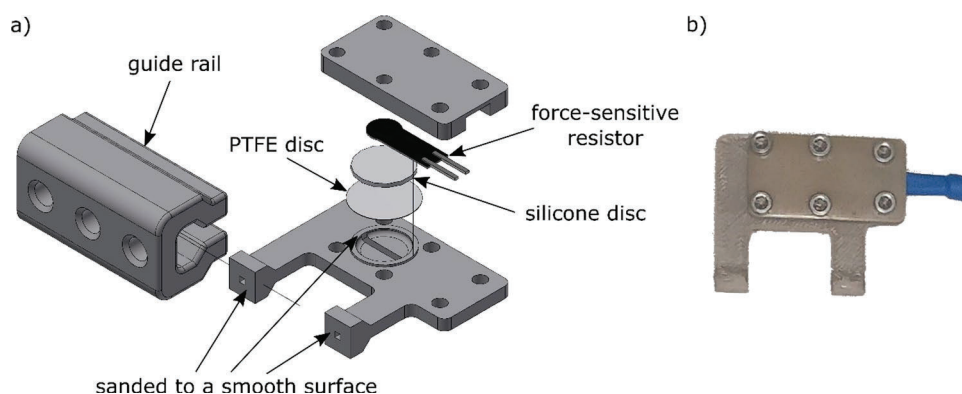
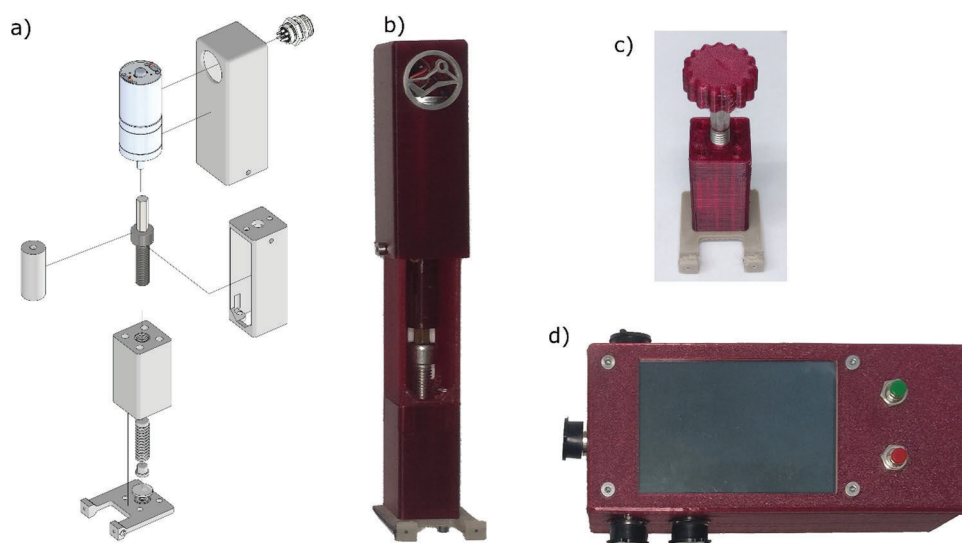


Fig. 4 Exploded view CAD drawings and photographs of the motorized BPR (a, b), the manual BPR (c), and the control unit (d)



which is connected to the Arduino Mega from the sensor. This remote control makes it possible to set the desired pressure when the setup is not easily accessible during the experiment. An example of this is when the components are placed in a shielded lead hotcell during experiments with high amounts of radioactivity. For our applications (PS and BPR), the solvent touching parts were 3D-printed with PEEK (polyether ether ketone), due to its high chemical and temperature resistance, but we also evaluated PP, PVDF, and PETG. All parts are working equally well with all tested materials, so a suitable material for each application can be selected. With the selected components, pressures up to 10 bar could be reliably reached.

Radiofluorination

Radiochemical syntheses are generally performed behind shielding as this reduces the radiation dose and contributes to safer working. Thus, non-direct intervention in the synthesis to control or vary the reaction parameters is a major benefit to the chemist.

To determine whether the system meets the high requirements of an established synthesis, a semi-automated process for the preparation of [^{18}F]2-fluoro-2-deoxy-d-glucose ([^{18}F]FDG) was developed and compared to the conventional batch process. Therefore, the synthesis was investigated under the same reaction conditions for both methods. For quantification, the radio-TLC measurement and HPLC measurements are used to determine the corrected radiochemical yield (RCY) and the radiochemical purity (RCP).

[^{18}F]HF was obtained as an aqueous solution from the cyclotron, concentrated using a preconditioned ion exchange SPE, and eluted with a solution of MeCN and TBA bicarbonate. The reaction solution was azeotropically dried with anhydrous MeCN at 100 °C under an argon stream. After several drying cycles, the dry [^{18}F]fluoride was dissolved in 1 mL of anhydrous MeCN. This reaction solution serves as the fluorinating agent.

For the batch synthesis, aliquots of 100 μL of the azeotropically dried [^{18}F]fluoride were added to 60 μL of the acetylated mannose triflate solution into a disposable Pyrex tube and quickly vortexed. The radiofluorination reactions were carried out at 80, 90, 110, and 110 °C. The reaction time was set to 5, 10, and 15 min. The quality of the fluorination of each condition was quantified via radio-TLC and HPLC. After cooling to around 50 °C, the reaction mixtures were diluted with water. The diluted solution was then pushed through a SEP-Pak Alumina N SPE cartridge, connected in series to a C18 SPE cartridge.

The flow synthesis system of [^{18}F]FDG consists of our syringe pump, a 6-way valve with a built-in PEEK loop (160 μL), our pressure sensor, the remotely controllable pressure

regulator, two 3D-printed PEEK reactors (900 μL and 50 μL) and two cartridges (SEP-Pak Alumina N (Waters) and Sep-Pak Plus Light C18 cartridge) (Fig. 5). Acetonitrile is used as a solvent and is continuously delivered to the system from a 10 mL syringe by the syringe pump. All components are connected using ETFE capillaries with an inner diameter of 0.5 mm and flangeless flat bottom 1/4"-28 HPLC fittings. The use of a 6-way valve allows pressure to be applied to the system at continuous flow. Reactions can thus be carried out at temperatures above the boiling point of the solvent under continuous flow. The pressure sensor is connected between the 6-way valve and the pump to avoid unnecessary radioactive contamination and unnecessary dead volume.

Aliquots of 100 μL of the [^{18}F]fluoride in MeCN were premixed with 60 μL of the acetylated mannose triflate in dry MeCN. The pressure of the system was set to 2.5 bar. The reaction mixture was injected onto the loop of the 6-way valve, and into the running process by switching the 6-way valve. By changing the flow rate of the solvent, the residence or reaction time can be directly determined. Reaction times of 5, 10, and 15 min at 80, 90, 100, and 110 °C were investigated. Every condition was quantified via radio-TLC and HPLC. The results are summarized in Table 2.

Temperatures above 100 °C appear to destroy the precursor, and at temperatures below 90 °C the conversion is significantly lower. While a clear trend can be seen in the reaction times, one must also consider the half-life of the isotope of choice. Although a slightly better conversion is obtained with a residence time of 15 min, it is negligible. Under batch as well as under flow conditions, the optimum temperature was found to be 90 °C with a residence time of 10 min. To be able to make a statistical statement, repetitions of these conditions were carried out. For the batch synthesis, an RCY value of $52.3\% \pm 1.9\%$ ($n=4$) could be determined. For the flow system, an RCY value of $47.6\% \pm 1.2\%$ ($n=5$) could be determined (Table 3). Both radiochemical yields are in a similar range.

It is noticeable that considerably fewer radioactive by-products are produced under flow conditions (Fig. 6). This is a notable advantage of our flow synthesis for tracers with no included HPLC purification step such as [^{18}F]FDG.

Another advantage of the flow system is that purification and deprotection can be automatically integrated into the process. For this purpose, the reaction solution is diluted 9-fold with water and passed through a Sep-Pak alumina cartridge, which is used to remove unwanted polar impurities such as [^{18}F]fluoride. The acetylated intermediate can then be trapped on a C18 SPE cartridge that is connected afterward in series. Tests have shown that a dilution of 10% MeCN to 90% H_2O is necessary. Even with 15% MeCN to 85% H_2O , the fully acetylated intermediate is no longer reliably immobilized on the C18 cartridge. To verify the

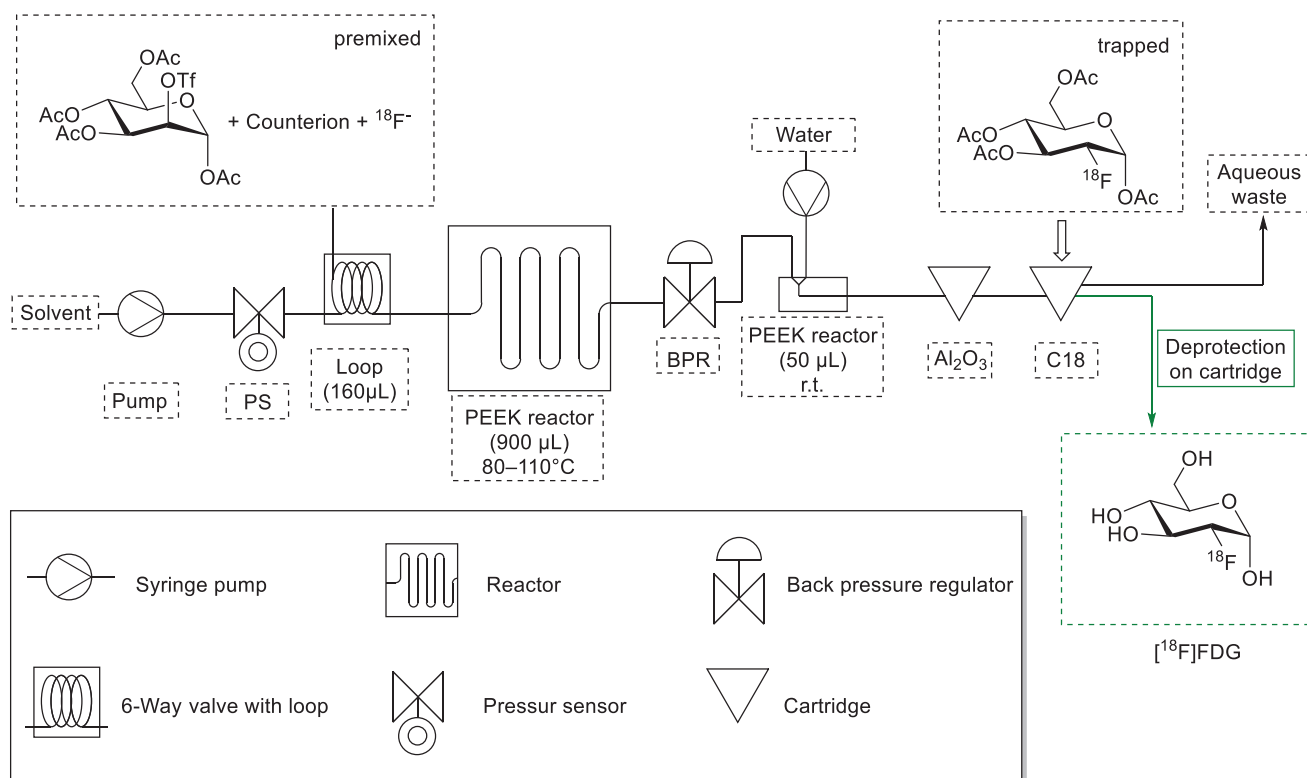


Fig. 5 Schematic drawing of the flow process for [^{18}F]FDG.

Table 2 Results fluorination

Temperature [°C]	Residence time [min]	RCY Batch [%]	RCY Flow [%]
80	5	27.1	25.2
	10	31.2	29.2
	15	33.8	30.1
90	5	45.9	37.2
	10	54.9	47.2
	15	55.8	48.1
100	5	38.2	28.1
	10	45.6	38.4
	15	47.9	39.1
110	5	22.5	15.2
	10	20.2	13.2
	15	16.5	9.2

quality of the purification, the acetylated [^{18}F]FDG was eluted from the C18 SPE cartridge with ethanol and examined by radio-TLC and HPLC. A radiochemical purity (RCP) of $99.1\% \pm 0.7\%$ ($n=5$) was observed. In comparison, the purification of the batch synthesis was performed manually. In this case, a purity of $93.5\% \pm 1.4\%$ ($n=4$) was determined. As expected, the purification of flow synthesis is simpler and more efficient than the manual batch process

Table 3 Labelling at 90 °C/10 min

Number #	RCY Batch [%]	RCY Flow [%]
1	49.2	47.2
2	54.9	45.2
3	53.7	46.1
4	51.5	48.2
5		51.2
	$52.3\% \pm 1.9\%$ ($n=4$)	$47.6\% \pm 1.2\%$ ($n=5$)

due to fewer by-products. Considering only small differences in RCY, this is an immense gain for radiochemical applications.

Deprotection was, in both cases, manually performed directly on the cartridge by passing 0.5 mL of 2 M NaOH through the C18 SPE cartridge. We performed a subsequent neutralization and formulation with 0.25 mL of 6 M HCl, followed by 1 mL of 1 M NaHCO_3 . The deprotected [^{18}F]FDG was quantified via radioactive TLC.

The total time required for the semiautomated radiofluorination and immobilization of the acetylated intermediate on the C18 SPE cartridge was 14 min. The manual deprotection with aqueous NaOH required an additional minute. Thus, [^{18}F]FDG was produced in under 15 min and had, according to radio-TLC, a radiochemical purity above 99%.

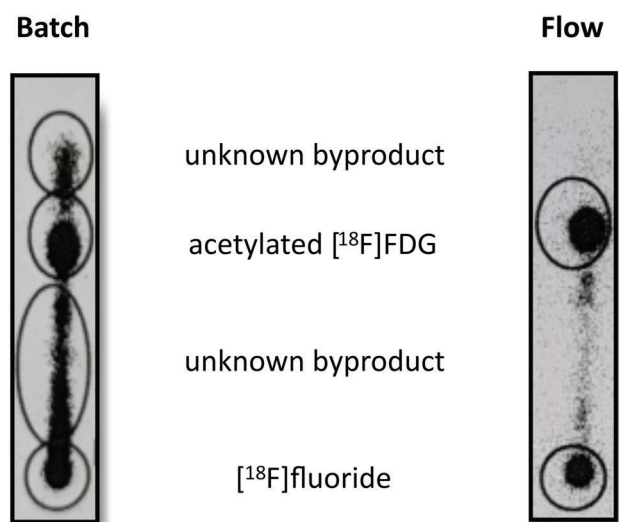


Fig. 6 Radio TLC batch vs. flow after ^{18}F -labelling

Experimental

Chemical reactions

If not mentioned, all reagents and solvents were purchased from commercial suppliers and used without further purification. The precursor, mannose triflate ultra-pure was purchased from ABX, Germany.

General radiochemistry

The ^{18}F fluoride was produced on a medical cyclotron (PETtrace 800, GE Healthcare) using the nuclear reaction of $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$. Content of free ^{18}F fluoride as well as reaction products were analyzed by thin layer chromatography (TLC, PolyGram Sil G/UV254, Macherey–Nagel, Dueren, Germany) and analyzed on a Cyclone Plus phosphorimager (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Radio-HPLC was performed using an Agilent 1260 series system (Agilent, Santa Clara, USA), with a reverse-phase analytical column (Luna C18(2), 100 Å, 250 × 4.6 mm, 5 μm; Phenomenex, Torrance, California, USA) connected to a Flow Count detection system (Model 106, Eckert & Ziegler, Berlin, Germany) coupled to a diode detector (B-FC-3500-A, Eckert & Ziegler, Berlin, Germany). The mobile phases comprised CH_3CN and water (+ 0.1% TFA) and the flow rate was 1 mL/min. The standard gradient program started with 5% CH_3CN for 2 min. The CH_3CN component was then increased to 100% over 15 min, where it was maintained for a further 6 min.

Table 4 Calculated flow rates

Reaction time [min]	Fluorination flow rate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Dilution with water flow rate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Retention time dilution with water [min]	Water content
5	180	1620	0.03	90%
	180	1530	0.03	85%
10	90	810	0.06	90%
	90	765	0.06	85%
15	60	540	0.08	90%
	60	510	0.09	85%

General procedure for fluoride preparation

Sep-Pak Plus Light QMA Carb (Waters, Waltham, MA, USA) was preconditioned with 10 mL 1 M NaHCO_3 , 10 mL air, 10 mL H_2O , and 10 mL air. Sep-Pak Plus Light C18 SPE cartridge (Waters) was preconditioned with 10 mL ethanol and 10 mL H_2O . SEP-Pak Alumina N (Waters) was preconditioned with 5 mL MeCN.

^{18}F fluoride was immobilized on the QMA cartridge and eluted into a glass reactor with 0.6 mL of a premixed solution containing TBA- HCO_3 (300 μL , 0.075 M, ABX, Germany) diluted with 0.3 mL dry MeCN. Azeotropic drying was carried out at 100 °C under a flow of argon and aided by multiple additions of MeCN (4 × 1 mL).

General procedure for the flow-synthesis of ^{18}F FDG [38, 39]

Aliquots (100 μL) of the azeotropically dried ^{18}F fluoride were dissolved in MeCN. 60 μL of mannose triflate solution (3 mg, 0.3 mL dry MeCN) was added to the 100 μL ^{18}F fluoride aliquot and quickly vortexed. The pressure of the setup was set to 2.5 bar. In a continuous flow, the premixed reaction mixture was injected through a 6-way valve into the running process. The radiofluorination was carried out at 80, 90, 110, and 110 °C. The flow rates were adjusted so that reaction times of 5, 10, and 15 min could be investigated (calculation of flow rates: Table 4). To determine the quality of the radio-fluorination, the acetylated intermediate was qualified via radio-TLC (petroleum ether/ ethyl acetate 50:50) and HPLC ($t_r = 14.34$ min) before the deprotection took place. The process was repeated at reaction temperatures of 80, 90, 100, and 110 °C, and the optimal conditions were ascertained. To continue the process, a second syringe delivering water facilitated the dilution in the second 50 μL PEEK reactor. The diluted mixture passed through a SEP-Pak Alumina N (Waters) SPE cartridge connected in series to a Sep-Pak Plus Light C18 SPE cartridge, resulting in the immobilization of the acetylated intermediate on the latter. The deprotection was performed manually with 0.5 mL 2 M

NaOH. The solution was neutralized with 0.25 mL 6 M HCl and buffered with 1 mL sat. NaHCO₃ afterward. The deprotected [¹⁸F]FDG was qualified via HPLC (*t_r* = 2.88 min) and radioactive TLC (MeCN/H₂O 95:5).

Acetylated [¹⁸F]FDG intermediate RCY: 47.6% ± 1.2% (*n* = 5). Radiochemical purities of [¹⁸F]FDG (RCPs): 99.1% ± 0.7% (*n* = 5).

General procedure for the batch-synthesis of [¹⁸F]FDG

The fluoride and aliquot preparation were performed as described above. The radiofluorination reactions were performed in disposable Pyrex 7 mL tubes and were carried out at 80, 90, 110, and 110 °C. The reaction time was set to 5, 10, and 15 min. After cooling to around 50 °C, the reaction mixtures were diluted with 2 mL H₂O. The diluted solution was then pushed through a SEP-Pak Alumina N SPE (Waters), connected in series to a C18 SPE cartridge. Either the acetylated intermediate was eluted with ethanol (0.5 mL) or deprotection was carried out as described above. The radiochemical yield of the acetylated intermediate was measured by radio-TLC (petroleum ether/ ethyl acetate 50:50) before the purification by alumina SPE. Purity was determined afterward. The deprotection was performed by passing 0.5 mL 2 M NaOH directly through the Sep-Pak Plus Light C18 cartridge (Waters) containing the acetylated derivative. The solution was neutralized with 0.25 mL 6 M HCl and buffered with 1 mL sat. NaHCO₃ afterward. The products were qualitatively assessed as described above.

Acetylated [¹⁸F]FDG intermediate RCY: 52.3% ± 1.9% (*n* = 4). Radiochemical purities of [¹⁸F]FDG (RCPs): 93.5% ± 1.4% (*n* = 4).

Conclusion

In this work, we have developed a 3D-printed open-source microfluidic system that includes a dual syringe pump, a pressure sensor, and a remotely controlled back pressure regulator, all of which can be built for around 500 €. Owing to its high customizability, this low-cost open-source microfluidic system shows great potential in all fields of chemical research. Especially, due to its small footprint, the ever-expanding world of radiochemistry could benefit significantly. Using the [¹⁸F]FDG radiosynthesis as a benchmark, we confirmed that our system can reliably perform the functions and operations that are carried out by proprietary and expensive radiosynthesizers e.g. radiofluorination, dilution, and SPE purification. The system was thoroughly evaluated and shown to be suitable for research radiochemistry, producing results that are comparable to common

batch syntheses. It can be used to synthesize radiotracers in good yield with fewer radioactive side-products compared to batch syntheses. The system is easily expandable and can be adapted to include multiple reactors and SPE purification steps, all while maintaining a footprint small enough to fit in a hotcell. The potential for this system is immense for both manual and automated radiochemistry. The automation of manual steps would reduce the overall radiation exposure to the laboratory staff while increasing reliability and reproducibility by eliminating human error. The system could also be coupled to existing radiosynthesizers, producing radioactive prosthetic ligands for more complicated, multistep radiosynthesis.

With the presented plans, descriptions, and schematics of this open-source flow system we aim to inspire other scientists to use this technology and ultimately remove some of the barriers surrounding the fascinating fields of flow- and radiochemistry.

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s41981-023-00267-z>.

Acknowledgements We thank the Karl und Anna Buck Stiftung for funding this work.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Declarations

Conflict of interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Plutschack MB, Pieber B, Gilmore K, Seeberger PH (2017) The Hitchhiker's guide to flow chemistry. *Chem Rev* 117:11796–11893. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00183>
2. Gutmann B, Kappe CO (2017) Forbidden chemistries — paths to a sustainable future engaging continuous processing. *J Flow Chem* 7:65–71. <https://doi.org/10.1556/1846.2017.00009>
3. Hughes DL (2020) Applications of flow chemistry in the pharmaceutical industry—Highlights of the recent patent literature. *Org. Process Res Dev* 24:1850–1860. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00156>
4. Bogdan AR, Dombrowski AW (2019) Emerging trends in flow chemistry and applications to the pharmaceutical industry. *J*

- Med Chem 62:6422–6468. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01760>
- Wegner J, Ceylan S, Kirschning A (2011) Ten key issues in modern flow chemistry. *Chem Commun* 47:4583–4592. <https://doi.org/10.1039/C0CC05060A>
 - Zhang J, Wang K, Teixeira AR, Jensen KF, Luo G (2017) Design and scaling up of microchemical systems: a review. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 8:285–305. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060816-101443>
 - Berton M, de Souza JM, Abdiaj I, McQuade DT, Snead DR (2020) Scaling continuous API synthesis from milligram to kilogram: extending the enabling benefits of micro to the plant. *J Flow Chem* 10:73–92. <https://doi.org/10.1007/s41981-019-00060-x>
 - Dong Z, Wen Z, Zhao F, Kuhn S, Noël T (2021) Scale-up of micro- and milli-reactors: an overview of strategies, design principles and applications. *Chem Eng Sci* : X 10:100097. <https://doi.org/10.1016/j.cesx.2021.100097>
 - Buglioni L, Raymenants F, Slattery A, Zondag SDA, Noël T (2022) Technological innovations in photochemistry for organic synthesis: Flow chemistry, high-throughput experimentation, scale-up, and photoelectrochemistry. *Chem Rev* 122:2752–2906. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00332>
 - Tanimu A, Jaenicke S, Alhooshani K (2017) Heterogeneous catalysis in continuous flow microreactors: a review of methods and applications. *Chem Eng J* 327:792–821. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.161>
 - Pletcher D, Green RA, Brown RCD (2018) Flow electrolysis cells for the synthetic organic chemistry laboratory. *Chem Rev* 118:4573–4591. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00360>
 - Price AJN, Capel AJ, Lee RJ, Pradel P, Christie SDR (2020) An open source toolkit for 3D printed fluidics. *J Flow Chem.* <https://doi.org/10.1007/s41981-020-00117-2>
 - Neumaier JM, Madani A, Klein T, Ziegler T (2019) Low-budget 3D-printed equipment for continuous flow reactions. *Beilstein J Org Chem* 15:558–566. <https://doi.org/10.3762/bjoc.15.50>
 - Menzel F, Klein T, Ziegler T, Neumaier JM (2020) 3D-printed PEEK reactors and development of a complete continuous flow system for chemical synthesis. *React Chem Eng* 5:1300–1310. <https://doi.org/10.1039/D0RE00206B>
 - Parra-Cabrera C, Achille C, Kuhn S, Ameloot R (2018) 3D printing in chemical engineering and catalytic technology: structured catalysts, mixers and reactors. *Chem Soc Rev* 47:209–230. <https://doi.org/10.1039/C7CS00631D>
 - Alimi OA, Meijboom R (2021) Current and future trends of additive manufacturing for chemistry applications: a review. *J Mater Sci* 56:16824–16850. <https://doi.org/10.1007/s10853-021-06362-7>
 - Capel AJ, Rimington RP, Lewis MP, Christie SDR (2018) 3D printing for chemical, pharmaceutical and biological applications. *Nat Rev Chem* 2:422–436. <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0058-y>
 - Baas S, Saggiomo V (2021) Ender3 3D printer kit transformed into open, programmable syringe pump set. *HardwareX* 10:e00219. <https://doi.org/10.1016/j.ohx.2021.e00219>
 - Wijnen B, Hunt EJ, Anzalone GC, Pearce JM (2014) Open-source syringe pump library. *PLoS ONE* 9:e107216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107216>
 - Saggiomo V (2022) A 3D printer in the lab: not only a Toy. *Adv Sci* 9:2202610. <https://doi.org/10.1002/adv.202202610>
 - Steel CJ, O'Brien AT, Luthra SK, Brady F (2007) Automated PET radiosyntheses using microfluidic devices. *J Label Compd Radiopharm* 50:308–311. <https://doi.org/10.1002/jlcr.1259>
 - Koag MC, Kim H-K, Kim AS (2014) Efficient microscale synthesis of [¹⁸F]-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose. *Chem Eng J* 258:62–68. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.07.077>
 - Watts P, Pascali G, Salvadori PA (2012) Positron emission tomography radiosynthesis in microreactors. *J Flow Chem* 2:37–42. <https://doi.org/10.1556/jfc-d-12-00010>
 - Culbert PA, Adam MJ, Hurtado ET, Huser JMA, Jivan S, Lu J, Ruth TJ, Zeisler SK (1995) Automated synthesis of [¹⁸F] FDG using tetrabutylammonium bicarbonate. *Appl Radiat Isot* 46:887–891. [https://doi.org/10.1016/0969-8043\(95\)00177-F](https://doi.org/10.1016/0969-8043(95)00177-F)
 - Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
 - Palsson-McDermott EM, O'Neill LA (2013) The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *BioEssays* 35:965–973. <https://doi.org/10.1002/bies.20130084>
 - Robey IF, Stephen RM, Brown KS, Baggett BK, Gatenby RA, Gillies RJ (2008) Regulation of the Warburg effect in early-passage breast cancer cells. *Neoplasia* 10:745–756. <https://doi.org/10.1593/neo.07724>
 - Glaudemans AW, Signore A (2010) FDG-PET/CT in infections: the imaging method of choice? *Eur. J Nucl Med Mol Imaging* 37:1986–1991. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1587-x>
 - Gafter-Gvili A, Raibman S, Grossman A, Avni T, Paul M, Leibovici L, Tadmor B, Groszhar D, Bernstine H (2015) [¹⁸F]FDG-PET/CT for the diagnosis of patients with fever of unknown origin. *QJM* 108:289–298. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcu193>
 - Wang ZG, Yu MM, Han Y, Wu FY, Yang GJ, Li DC, Liu SM (2016) Correlation of Glut-1 and Glut-3 expression with F-18 FDG uptake in pulmonary inflammatory lesions. *Med (Baltim)* 95:e5462. <https://doi.org/10.1097/md.0000000000005462>
 - Yu S (2006) Review of F-FDG synthesis and quality control. *Biomed Imaging Interv J* 2:e57. <https://doi.org/10.2349/bij.2.4.e57>
 - Turkington TG (2001) Introduction to PET instrumentation. *J Nucl Med Technol* 29:4–11. <https://tech.snmjournals.org/content/29/1/4>
 - Melcher CL (2000) Scintillation crystals for PET. *J Nucl Med* 41:1051–1055. <https://jnm.snmjournals.org/content/41/6/1051>
 - Oh SJ, Chi DY, Mosdzianowski C, Kim JY, Gil HS, Kang SH, Ryu JS, Moon DH (2005) Fully automated synthesis of [¹⁸F] fluoromisonidazole using a conventional [¹⁸F]FDG module. *Nucl Med Biol* 32:899–905. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2005.06.003>
 - Decristoforo C (2007) Challenges in the small-scale preparation of radiopharmaceuticals -A European perspective. *FABAD J Pharm Sci* 32:131–138. http://dergi.fabad.org.tr/index/issue/abstract/32_03_5.htm
 - Unterweger MP, Fitzgerald R (2020) Corrigendum to “Update of NIST half-life results corrected for ionization chamber sourceholder instability” [Appl. Radiat. Isot. 87 (2014) 92–94]. *Appl Radiat Isot* 159:108976. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2019.108976>
 - Saxena P, Singh AK, Dixit M, Kheruka SC, Mahmood T, Gambhir S (2021) Establishing the [¹⁸F]-FDG production via two different automated synthesizers for routine clinical studies: our

- institutional experiences of 4 years. *Indian J Nucl Med* 36:120–124. https://doi.org/10.4103/ijnm.IJNM_137_20
38. Gomzina NA, Zaitsev VV, Krasikova RN (2001) Optimization of nucleophilic fluorination step in the synthesis of various compounds labelled with fluorine-18 for their use as pet radiotracers. *J Label Compd Radiopharm* 44:S895–S897. <https://doi.org/10.1002/jlcr.25804401314>
39. Zhou X, Li Y, Jiang X, Wang X, Chen S, Shen T, You J, Lu H, Liao H, Li Z, Cheng Z (2020) Intra-individual comparison of 18F-PSMA-1007 and 18F-FDG PET/CT in the evaluation of patients with prostate cancer. *Front Oncol* 10:585213. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.585213>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Electronic Supplementary Informations

FOMSy: 3D-Printed Flexible Open-Source Microfluidic System and Flow Synthesis of PET-Tracer

Florian Menzel^{a,b}, Jonathan Cotton^{b,c}, Thomas Klein^a, Andreas Maurer^{b,c}, Thomas Ziegler^a and Jochen M. Neumaier^{*a}

^a Institute of Organic Chemistry, University of Tuebingen, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tuebingen, Germany.

^b Werner Siemens Imaging Center, Department of Preclinical Imaging and Radiopharmacy, Eberhard Karls University, Tuebingen, Roentgenweg 15, 72076 Tuebingen, Germany

^c Cluster of Excellence iFIT “Image-Guided and Functionally Instructed Tumor Therapies“ (EXC 2180), University of Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany

*E-Mail: jochen.neumaier@uni-tuebingen.de

Table of contents

3D printer setup	2
Dual syringe pump	3
Detailed step-by-step assembly instruction	6
Electronic setup of the pump	10
Pressure Sensor	14
Detailed step-by-step assembly instruction	16
Back pressure regulator (BPR)	17
Detailed step-by-step assembly of the motor controlled BPR	18
Electronic setup of the sensor and BPR	20
Calibration of the pressure sensor	21
Notes and references	22

3D printer setup

Two 3D printers were used for this work. 3D-printed parts out of PLA (polylactic acid) and PETG (polyethylene terephthalate glycol-modified) were printed on an X-CF Pro from Qidi. 3D-printed parts out of PEEK (Polyetheretherketone) were printed on an Apium P220 from Apium Additive Technologies GmbH.

Software: All parts were designed with Autodesk Inventor Professional 2022. After modeling, the files were exported as STL files and sliced with the software simplify3D.

PEEK parts: The parts out of PEEK were printed with Apium PEEK 4000 Natural filament with an Apium P220 3D printer. The filament roll was dried in a vacuum oven at 80 °C and 50 mbar overnight to ensure proper drying of the PEEK.

Print speed = 25 mm/s

Extrusion width: 0.40 mm

Extrusion multiplier = 0.90

Nozzle temp. = 480 °C

Bed temperature = 130 °C, glass plate coated with DimaFix pen with a brim of 24 perimeters

Layer height: 0.1 mm

PLA parts: PLA 1.75 mm from Janbex was used on the Qidi X-CF Pro 3D printer.

The following settings were used:

Print speed = 60 mm/s

Extrusion multiplier = 1.00

Nozzle temp. = 200 °C

Bed temperature = 60 °C, printed on a flexible metal PEI sheet, coated with DimaFix Spray or pen.

Layer height: 0.2 mm – 0.3 mm

PETG parts: PETG 1.75 mm from Fiberlogy was used on the Qidi X-CF Pro 3D printer. The filament roll was stored in a sealed box with silica gel bags inside to ensure proper drying of the PETG.

The following settings were used:

Print speed = 60 mm/s

Extrusion multiplier = 1.00

Nozzle temp. = 230 °C

Bed temperature = 80 °C, printed on a flexible metal PEI sheet, coated with DimaFix Spray or pen.

Layer height: 0.2 mm (if a part was printed with 0.3 mm layer height, it is indicated in the parts list)

The STP and STL files of all printed parts can be found in the zip file “Data Files” in the supplementary information. For more information also see our previous publications. [1], [2]

Dual syringe pump

All 3D-printed parts were printed in PLA (black) and PETG (bordeaux red). The exploded-view CAD drawing of the syringe pump can be found in **Figure S1**, the single parts in **Figure S2**, and the full parts list in **Table S1**.

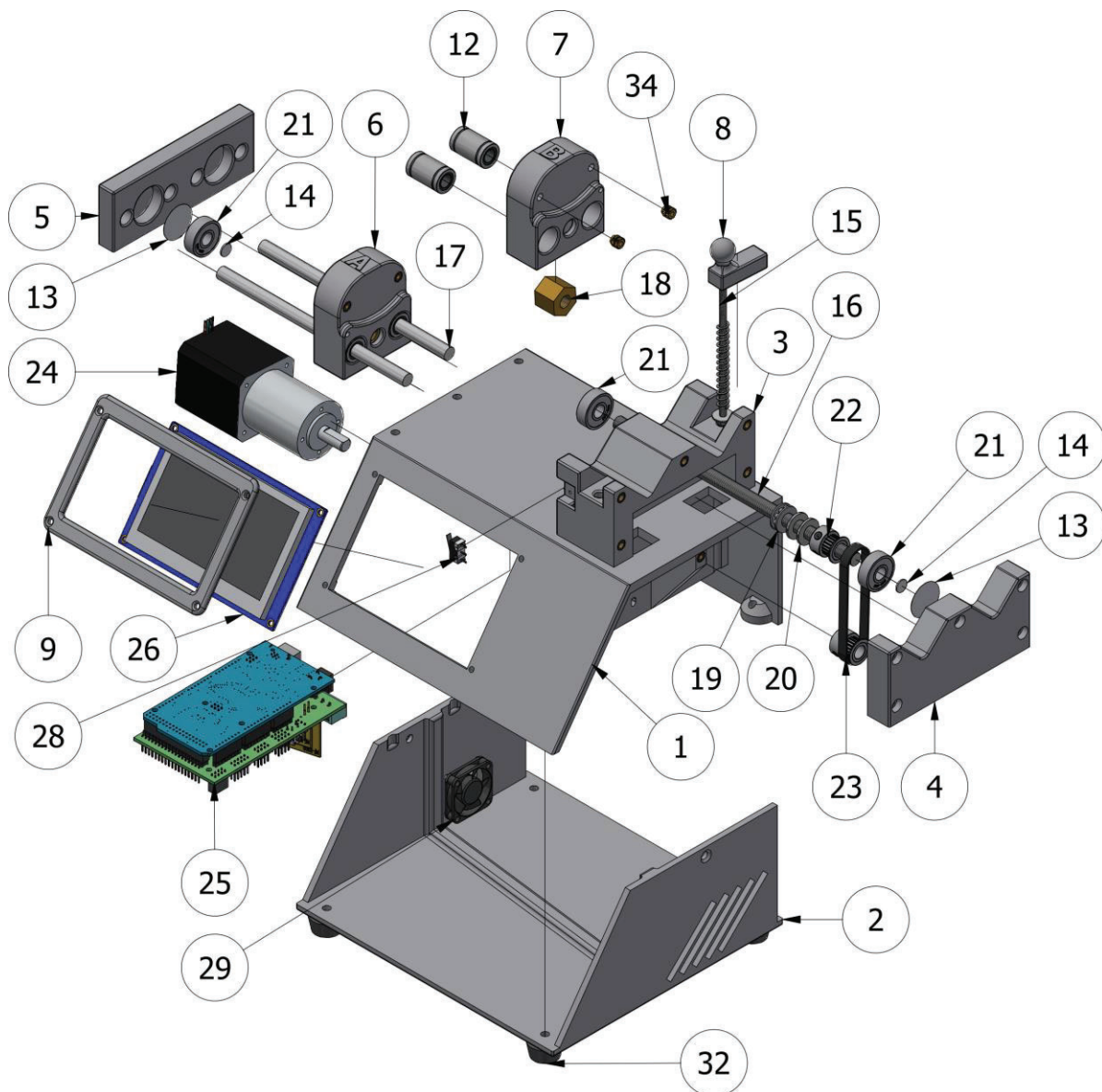


Figure S1: Exploded-view CAD drawings of the syringe pump.

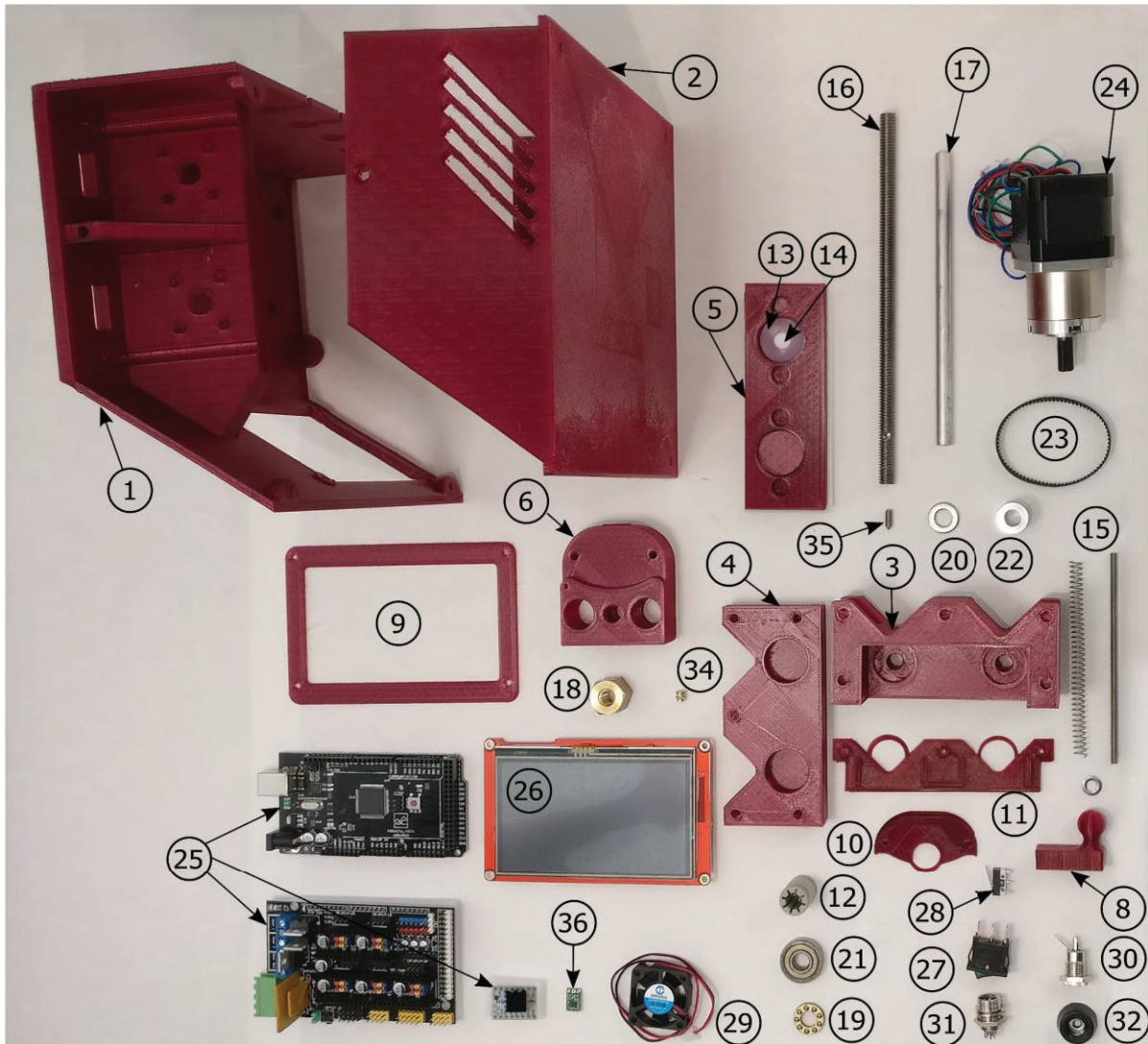


Figure S2: All 3D-printed, mechanical, and electronic parts with numbers.

Table S1: Parts list for the syringe pump. The screws and nuts that are needed for mounting each part are given in brackets.


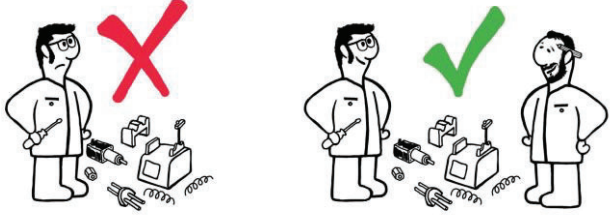

Quant.	Part	Source	No.
1	Main pump body (printed with 0.3 mm layer height)	3D-printed	1
1	Bottom part (printed with 0.3 mm layer height)	3D-printed	2
1	Syringe holding block	3D-printed	3
1	Front plate	3D-printed	4
1	End plate	3D-printed	5
1	Carrier block A	3D-printed	6
1	Carrier block B	3D-printed	7
1	Syringe clamp	3D-printed	8
1	Display frame	3D-printed	9

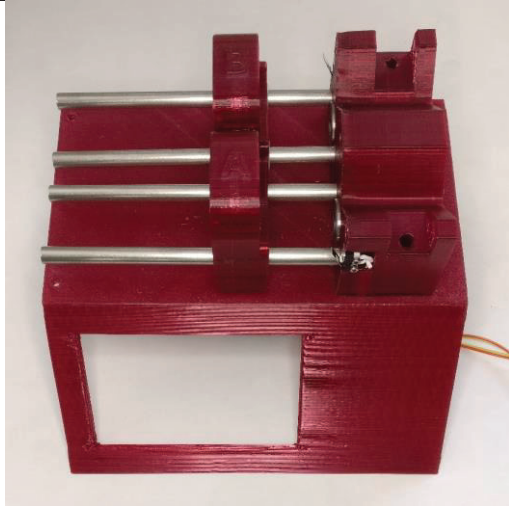
Quant.	Part	Source	No.
2	Syringe retainer back	3D-printed	10
1	Syringe retainer front	3D-printed	11
4	RJ4JP-01-08 drylin® R - bearing 8mm	Amazon	12
4	PTFE washer (22 mm × 0,1 mm)	In-house workshop	13
4	PTFE washer (8 mm × 2 mm)	In-house workshop	14
2	M4 Threaded rod	In-house workshop	15.1
2	compression spring 45 × 7 mm × 0.6 mm	In-house workshop	15.2
2	M4 locknut and washer, 12 mm	In-house workshop	15.3
2	Trapezoidal thread spindle, Tr8 × 1.5 × 185 mm	HFB-Gewindetechnik	16
4	Round rod, stainless steel, 8 × 145 mm	In-house workshop	17
2	Hexagon nut, Tr8 × 1.5	HFB-Gewindetechnik	18
2	Thrust bearing, F8-16M 8 × 16 × 5mm	Amazon	19
4	Washer 8×16×15mm	In-house workshop	20
6	Ball bearing 608RS	Amazon	21
4	GT2 timing pulley, 8 mm bore, 20 teeth, for 6 mm belt	Amazon	22
F4	GT2 closed loop timing belt, 6 mm, 158 mm	Amazon	23
2	Nema 17 Stepper Motor Bipolar L=40mm w/ Gear Ratio 27:1 Planetary Gearbox	stepperonline	24
1	HIMALAYA basic MEGA 2560	Eckstein GmbH	25.1
1	Ramps 1.4 controller	Eckstein GmbH	25.2
3	TMC2208 V1.2 stepper motor driver	Eckstein GmbH	25.3
1	Nextion NX4827T043 Display	Antratek Electronics	26
1	Rocker switch, 3-Pin	Eckstein GmbH	27
2	Pololu mini snap-action switch with 13.5mm lever	Eckstein GmbH	28
1	Cooling fan (30 × 30 × 10 mm), 5 V	Amazon	29
1	DC-socket 2.1/5.5mm	Reichelt elektronik GmbH & Co. KG	30
1	GX12 aviation socket, Pins 5 or 6 (+ aviation plug on the cable)	Amazon	31
4	Rubber feet, 20 × 9 mm	Amazon	32
	Threaded inserts M4 × 8 or M4 × 6	Amazon	33
	Threaded inserts M3 × 6	Amazon	34
2	Grub screw, M4 ×10 mm (ISO 4027)	In-house workshop	35
1	Pololu 5V Step-Up/Step-Down Voltage Regulator S9V11F5	Eckstein GmbH	36
	Hex Socket Head Cap Screws (ISO 4762), various sizes	In-house workshop	37

Quant.	Part	Source	No.
	Hexagon socket countersunk screws (ISO 10642), various sizes	In-house workshop	38
1	Single output power supply 12 V, 3 A	Reichelt elektronik GmbH & Co. KG	39
	jumper wire cables, female to female	Eckstein GmbH	

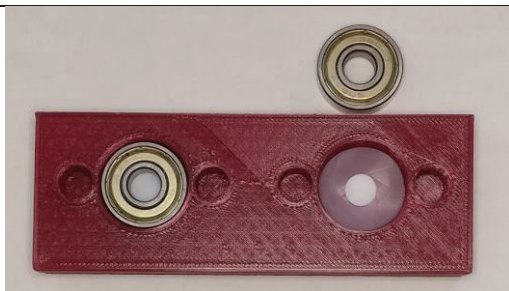
Detailed step-by-step assembly instruction

In the following, a detailed assembly instruction with example photos is given. Together with the exploded CAD view, it should be possible to assemble the pump without using special tools. A bench drill with a vise is recommended in step 11 to drill an accurate hole.

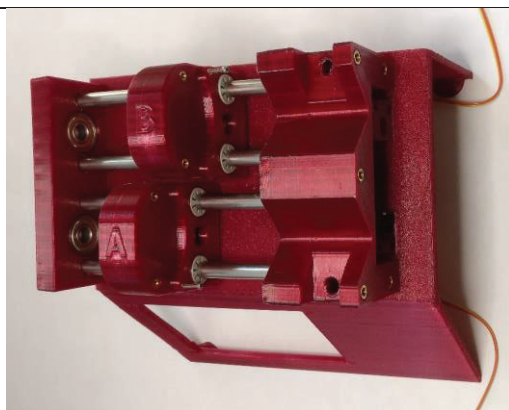
	<div style="text-align: center;">  </div> <p>Step 1: All Threaded inserts (33 and 34) were inserted using a soldering iron</p> <p>Step 2: The two core wires for the end switch were pulled through the main pump body (1) and the syringe holding block (3).</p> <p>Step 3: The syringe holding block (3) was screwed (M4 head cap screws) on the main pump body (1).</p>
	<p>Step 4: The linear bearing (12) and the nut (18) were inserted into the carrier blocks A and B (6 and 7).</p> <p><i>Care should be taken that the round rod (17) runs without friction through the linear bearing! If not, increase the hole size of the carrier block.</i></p>



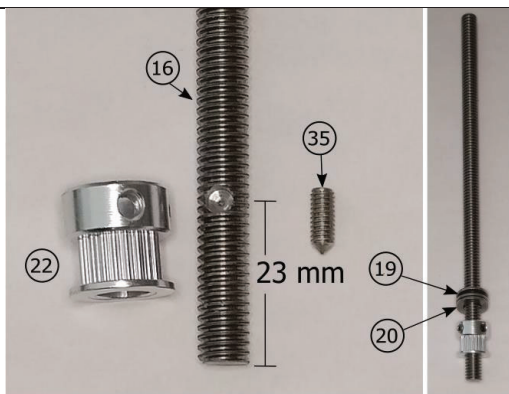
Step 5: The end switches (28) were soldered to the wires and attached to the syringe holding block.
Step 6: The round rod (17) and two ball bearings (21) were inserted into the syringe holding block (3).
Step 7: The two carrier blocks A and B (6 and 7) were slid in the round rods.



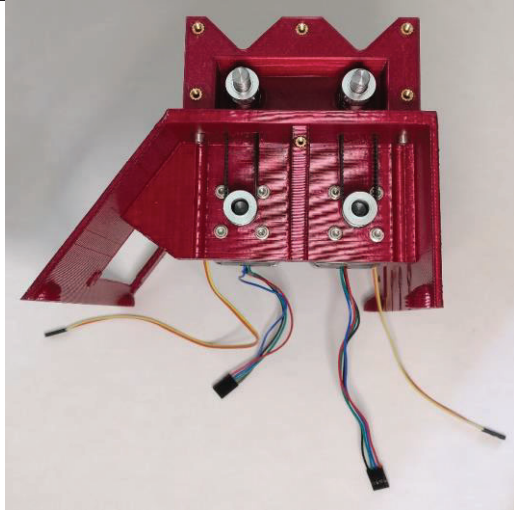
Step 8: The two 22 mm PTFE washers (13) and the two ball bearings (21) were inserted in the end plate (5).
Step 9: The two 8 mm PTFE washers (14) were inserted into the two ball bearings (21).



Step 10: The end plate (5) was screwed (M4 head cap screws) to the main pump body (1).
Care should be taken that the carrier blocks move without friction!



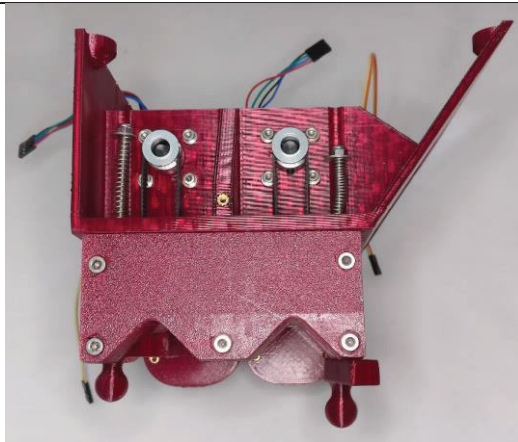
Step 11: A hole (4mm) was drilled halfway through the trapezium thread spindle (16) with a distance of 23 mm from center to end
(bench drill with a vise is recommended).
Step 12: The timing pulley (22) was screwed to the threaded spindle with a grub screw (35).
Step 13: Two washers (20) and the thrust bearing (19) were attached (total thickness of 8mm).



Step 14: The spindles from step 13 were inserted. *Make sure that the spindle can be rotated without much resistance!*

Step 15: The gear stepper motors (24) were loosely attached (M3 head cap screws with washers) to the main pump body (1).

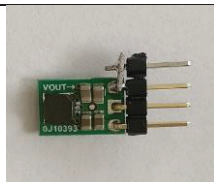
Step 16: The timing pulleys (22) and the timing belts (23) were attached. The timing belts were put under tension and the motors and pulleys were tightened firmly.



Step 17: The front plate (4) was screwed (M4 head cap screws) to the pump.

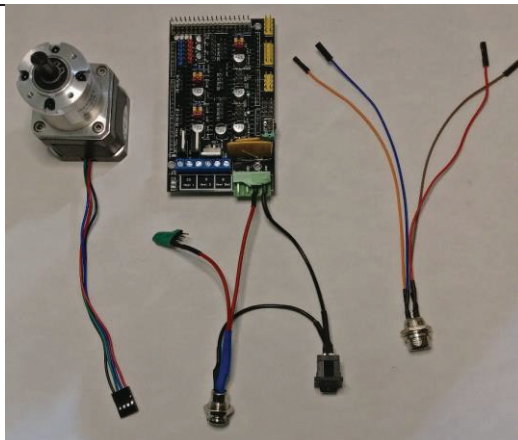
Step 18: The M4 threaded rods (15.1) were screwed into the syringe clamps (8) and inserted through the holes.

Step 19: The compression spring (15.2) was inserted and fixed with the washer and lock nut.



Step 20 (optional): A second 5 V output was soldered to the Voltage Regulator (36).

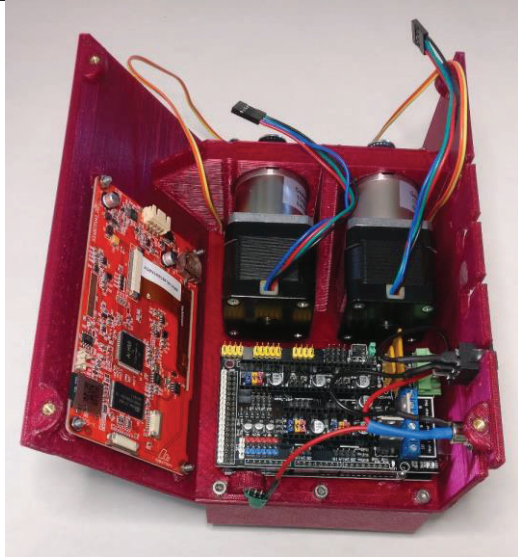
This could be used to supply power to the sensor module if no motorized BPR is used! If a separate power supply on the sensor module is used, do not connect power from pump to sensor!



Step 21: The cables of the motors were shortened and connected to a 4-pin plug (black – green – blue – red).

Step 22: Cables were soldered (see figure S3) to the components (27, 30, 31, 36). The 12 V (+ and -) input cable was soldered directly to the RAMPS controller (25.2)

The voltage regulator (36) should be encased in heat shrink tubing to prevent accidental electrical contact with other parts.



Step 23: The Arduino Mega (25.1) was screwed (M3 head cap screws) to the Main pump body (1).

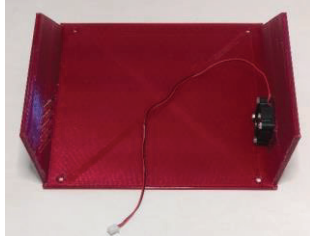
Step 24: The electronic part from step 22 was attached to the main pump body. The RAMPS controller (25.2) was plugged on the Arduino.

Step 25: The Nextion display (26) was screwed (M3 countersunk screws with M3 nuts) with the display frame (9) to the main pump body.



Step 26: The TMC2208 stepper motor drivers (25.3) were plugged on the RAMPS (Jumper to MS2, middle position).

Step 27: The wires were connected as described in Figure S3.



Step 28: The cooling fan was screwed (M3 countersunk screws with M3 nuts) to the bottom part (2)



Step 29: The bottom part (2) with the rubber feet (32) was screwed (M3 countersunk and head cap screws) to the main pump body (1).

PLA version of the pump:

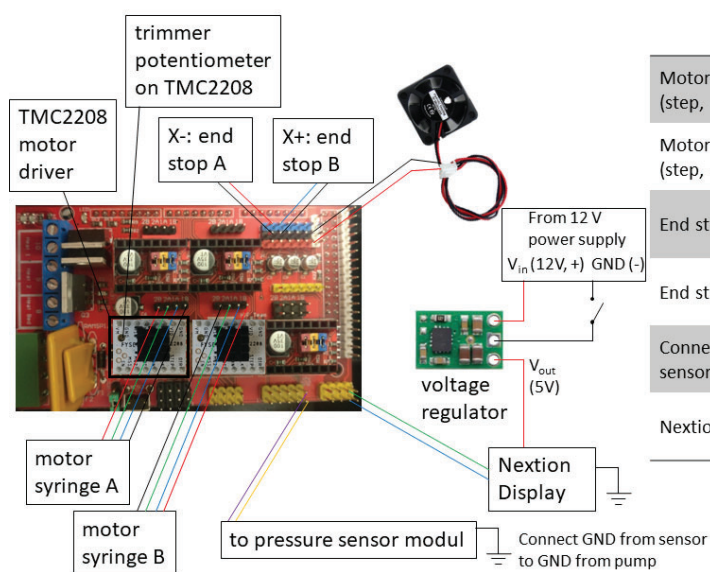




Optional: Syringe retainers (10 and 11) can be used to hold the syringes in place when drawing up a solution into the syringe using the motors.
The syringe retainers must be adjusted for each syringe itself so that it fits optimally (change hole diameter and thickness).
 The uploaded retainers are optimized for a Hamilton 5 mL Gastight Syringe Model 1005

Electronic setup of the pump

For controlling the motors of the pump an Arduino Mega 2560 was used with a RAMPS 1.4 controller shield attached. TMC2208 stepper motor driver was connected to the RAPMS controller at X and Y positions and the jumper settings were set to 1/4 microsteps (jumper on MS2, middle position). The current limiting was adjusted on the TMC2208 stepper motor driver to around 2.4 A with the integrated trimmer potentiometer (1.2 V). For a constant voltage of 5 V for the Nextion Display, a Pololu S9V11F5 5 V Step-Up/Step-Down Voltage Regulator was used. The RAMPS controller was connected to a standard 12 V DC, 3 A power supply over a rocker switch, and a DC socket. The detailed assignment of the electronics is shown in **Figure S3**. All electronic parts were connected using standard female-to-female or female-to-male jumper wires.



	PIN Arduino	PIN RAMPS
Motor Syringe A (step, dir, enable)	A0, A1, 38	2B, 2A, 1A, 1B on Motor X
Motor Syringe B (step, dir, enable)	A6, A7, A2	2B, 2A, 1A, 1B on Motor Y
End stop switch A	2, GND	X+ end stop, GND
End stop switch B	3, GND	X- end stop, GND
Connection to pressure sensor module	A11, A12, GND	A11, A12, GND
Nextion Display (TX, RX)	50, 51	50, 51

Figure S3: Wiring diagram of the Arduino with PIN assignment.

Programming with Arduino and Nextion software: The software was written on the open-source Arduino software (Ver. 1.8.15) and the Nextion Editor (Ver. 1.63.3.). The codes can be downloaded from the supplementary files. In the software, five Hamilton gastight syringes and five disposable syringes were implemented. The diameters of these syringes were taken from the corresponding company’s website. Detailed Information (company, diameter, accuracy) can be found in **Table S2**. For changing the syringes to other predefined syringes, the Nextion code on pages “syA” and “syB” has to be edited. The text in the buttons b0 – b9 could be changed to the corresponding value in the attribute window (change txt). The diameter of new syringes has to be edited in the event window. An example is given here:

Old syringe	New syringe	Changes
n1.val=4 t13.txt="69" main.t5.txt="Plastic 1"	n1.val=6 t13.txt="12" main.t5.txt="Metal 1"	The diameter was changed from 4.69 mm to 6.12 mm. The name, which appears on the main page, was changed from Plastic 1 to Metal 1.

Accuracy test of the syringe pump: Each kind of pre-programmed syringes were tested with typical flow rates for continuous flow reactions. Distilled water was dispensed at room temperature for 1 to 10 min and the measured weight was compared to the theoretical weight.

Table S2: Accuracy test of the pre-programmed syringes.

Volume	Syringe	Flow rate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Time [min]	Weight [g]	Deviation [%]
1 mL	HSW NORM-JECT®	100	5	0.498	0.08
		50	10	0.497	0.29
		10	20	0.197	1.52
		5	30	0.147	1.78
		1	50	0.048	3.47

Volume	Syringe	Flow rate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Time [min]	Weight [g]	Deviation [%]
2 mL	BD Discardit II	200	5	0.995	0.27
		100	10	0.995	0.30
		20	20	0.397	0.42
		10	30	0.295	1.54
		2	50	0.098	2.09
5 mL	BD Discardit II	500	5	2.474	0.81
		250	10	2.481	0.50
		50	20	0.993	0.44
		25	30	0.737	1.56
		5	50	0.243	2.53
10 mL	HSW NORM-JECT [®]	1000	5	4.970	0.34
		500	10	4.961	0.53
		100	20	1.987	0.40
		50	30	1.474	1.48
		10	50	0.488	2.18
20 mL	BD Discardit II	2000	5	9.897	0.78
		1000	10	9.913	0.62
		200	20	3.972	0.46
		100	30	2.928	2.21
		20	50	0.973	2.49
0.1 mL	Hamilton Gastight 1710	10	5	0.049	0.04
		5	10	0.049	0.45
		1	20	0.019	0.85
		0.5	30	0.014	5.26
		0.1	50	0.005	10.71
0.25 mL	Hamilton Gastight 1725	25	5	0.125	0.04
		12.5	10	0.124	0.20
		2.5	20	0.049	2.73
		1.25	30	0.036	2.94
		0.25	50	0.012	5.55

Volume	Syringe	Flow rate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Time [min]	Weight [g]	Deviation [%]
1 mL	Hamilton Gastight 1001	100	5	0.498	0.00
		50	10	0.498	0.10
		10	20	0.197	1.26
		5	30	0.147	1.54
		1	50	0.048	4.01
2.5 mL	Hamilton Gastight 1002	250	5	1.245	0.06
		125	10	1.245	0.08
		25	20	0.498	0.12
		12.5	30	0.373	0.26
		2.5	50	0.123	1.51
5 mL	Hamilton Gastight 1005	500	5	2.475	0.67
		250	10	2.480	0.44
		50	20	0.993	0.31
		25	30	0.737	1.46
		5	50	0.243	2.35
10 mL	Hamilton Gastight 1010	1000	5	4.970	0.24
		500	10	4.961	0.43
		100	20	1.970	1.16
		50	30	1.475	1.32
		10	50	0.488	2.01
25 mL	Hamilton Gastight 1025	2500	5	12.397	0.47
		1250	10	12.413	0.34
		250	20	4.971	0.22
		125	30	3.728	0.24
		25	50	1.221	2.01

Table S3: Accuracy test of the pre-programmed syringes at 5 bar (PETG system).

Volume	Syringe	Flow rate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Time [min]	Weight [g]	Deviation [%]
1 mL	Hamilton Gastight 1001	50	10	0.493	1.16
		5	30	0.146	2.30
10 mL	Hamilton Gastight 1010	1000	5	4.965	0.35
		100	20	1.968	1.27

Table S4: Accuracy test of the pre-programmed syringes at 5 bar (PLA system).

Volume	Syringe	Flow rate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Time [min]	Weight [g]	Deviation [%]
1 mL	Hamilton Gastight 1001	50	10	0.494	0.96
		5	30	0.146	2.16
10 mL	Hamilton Gastight 1010	1000	5	4.961	0.42
		100	20	1.969	1.22

Pressure Sensor

The case for the electronic component was printed in PETG (bordeaux red). For our applications, the solvent touching part No. 40 was printed out of PEEK, but other materials such as PP or PVDF are also possible. The exploded-view CAD drawing of the pressure sensor case and the sensor can be found in **Figure S4**, and the part numbers can be found in **Table S5**.

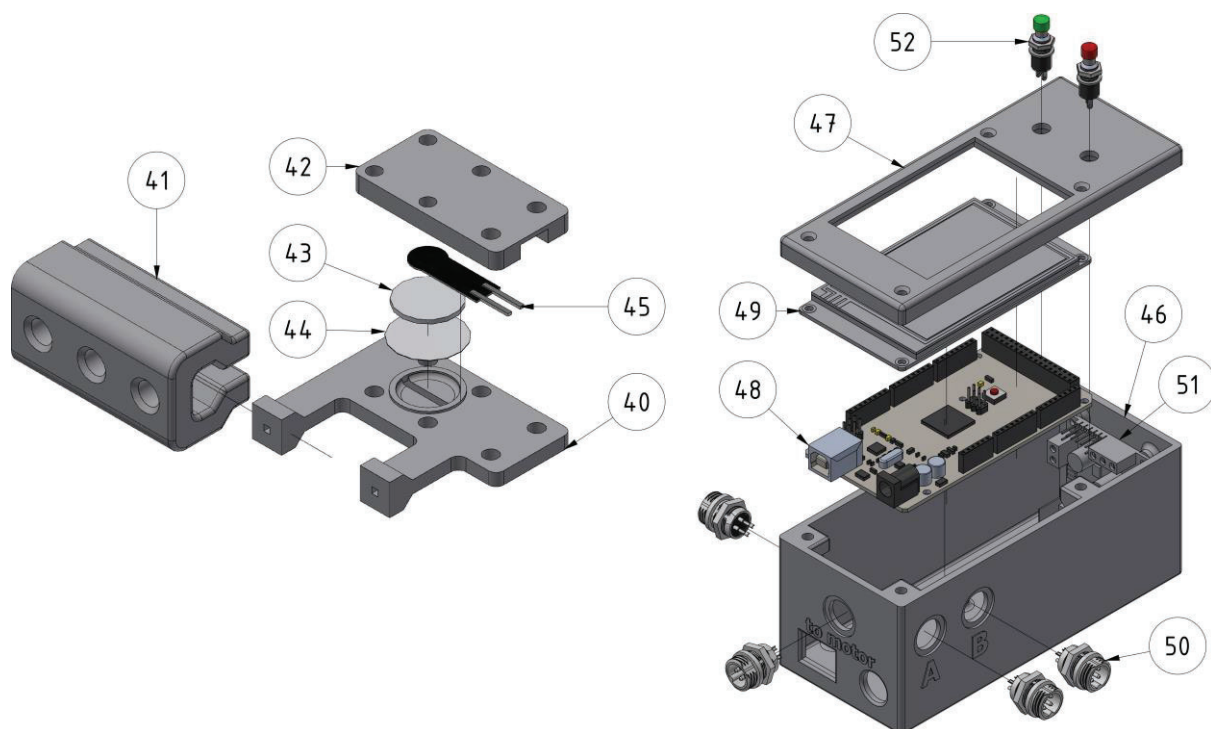


Figure S4: Exploded-view CAD drawings of pressure sensor and case.

As described in our latest publication,^[2] the flat side of the sensor, on which the flat bottom 1/4"-28 fitting is pressed, was sanded with 220 – 1500 grit abrasive paper to ensure a smooth surface and a leakproof connection. The ring, upon which the septum is placed, was sanded the same way.

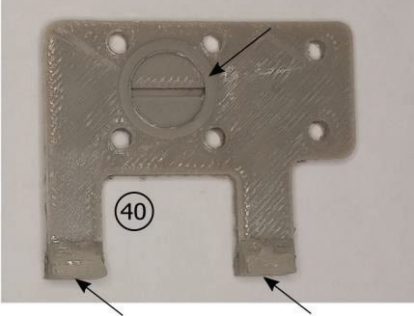
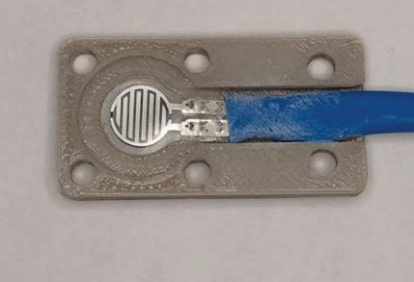

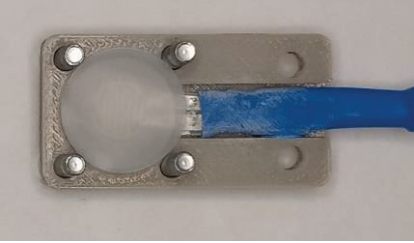
Table S5: Part list for the sensor case and the sensor. The screws and nuts that are needed for mounting each part are given in brackets.

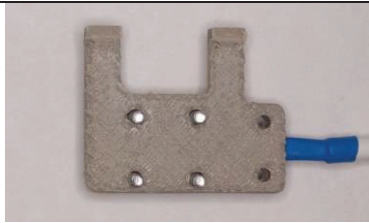
Quant.	Parts Sensor and case	Source	No.
1	Pressure sensor main body (printed with 0.1 mm layer height)	3D-printed	40
1	Guide rail	3D-printed	41
1	Pressure sensor lid	3D-printed	42
1	Silicone disc, 14 mm diameter, 1 mm thickness	In-house workshop	43
1	PTFE disc, 16 mm diameter, 0.1 mm thickness	In-house workshop	44
1	Force sensing resistor, 0 – 10 kg, 9 × 0.25 mm	Amazon	45
1	Electronic case	3D-printed	46
1	Electronic case lid	3D-printed	47
1	HIMALAYA basic MEGA 2560	Eckstein GmbH	48
1	Nextion NX4832T035 Display	Antratek Electronics	49

Quant.	Parts Sensor and case	Source	No.
3	GX12 aviation socket, Pins 5 or 6 (+ aviation plug on the cable)	Amazon	50
1	L298N Motor Drive Controller	Amazon	51
2	Push button switch, 6 mm hat diameter	Amazon	52
	jumper wire cables, female to female	Eckstein GmbH	53
1	Optional: pressure gauge holder	3D-printed	54
1	Optional: manometer CI 2.5 from WIKA with an O-Ring 10 × 2.5 mm	WIKA	55

Detailed step-by-step assembly instruction

In the following, a detailed assembly instruction with example photos is given. Together with the exploded CAD view, it should be possible to assemble the pressure sensor without using special tools.

	<p>Step 1: The flat sides (marked with an arrow) of the pressure sensor main body (40) were sanded with 220 – 1500 grit abrasive paper to ensure a smooth surface.</p>
	<p>Step 2: The force sensing resistor (44) was soldered to a two-core wire and sealed with heat shrink tubing. Step 3: The force sensing resistor (44) was glued in the pressure sensor lid (42) on the hose with super glue. <i>Do not use superglue under the sensor plate!</i></p>
	<p>Step 4: The silicone disc (43) was inserted</p>
	<p>Step 5: The M3 head cap screws and the PTFE disc (44) were inserted.</p>



Step 6: The pressure sensor main body (40) was carefully applied to the prepared pressure sensor lid (step 5) without shifting the silicone disc and screwed on it (M3 nuts and washers).

Back pressure regulator (BPR)

The exploded-view CAD drawing of two variations of the BPR can be found in **Figure S5** and the part numbers can be found in **Table S6**. The STP and STL files of all printed parts can also be found in the supplementary download file. As for the pressure sensor, the flat side and the ring in the middle of the BPR were sanded with 220 – 1500 grit abrasive paper to ensure a smooth surface and a leakproof connection. For our applications, the solvent touching part No. 56 was printed out of PEEK, but other materials such as PP or PVDF are also possible.

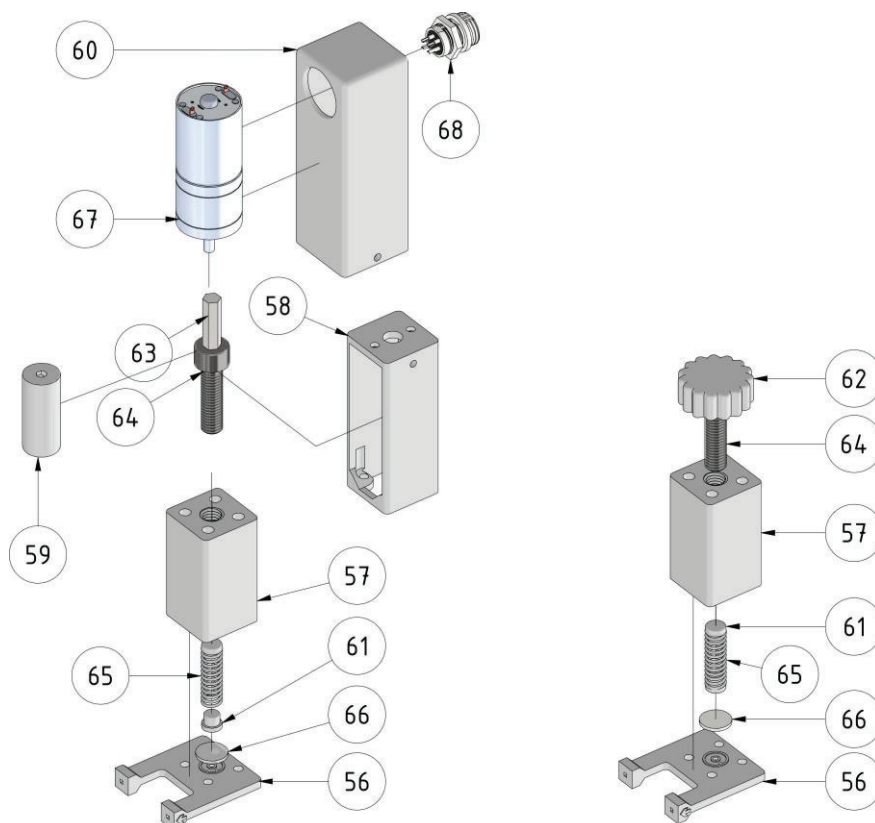


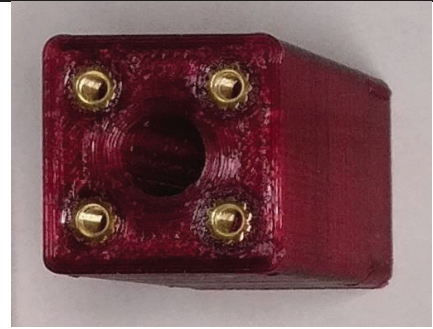
Figure S5: Exploded-view CAD drawings of the motor-controlled BPR and the manual-controlled BPR.

Table S6 Parts list for the BPRs



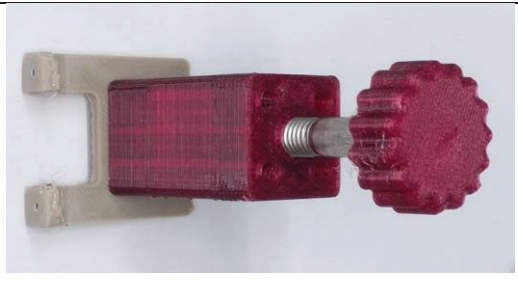
Quant.	Parts spring pressured BPR	Source	No.
1	BPR Main body (printed with 0.1 mm layer height)	3D-printed	56
1	BPR top part	3D-printed	57
1	Motor mount	3D-printed	58
1	Motor shaft coupler	3D-printed	59
1	Motor cover	3D-printed	60
2	Spring cap	3D-printed	61
1	M8 press-fit head	3D-printed	62
1	6 mm hexagonal rod (25 mm)	In-house workshop	63
1	Cheese head screw with hexagon socket, M8 × 30 mm)	In-house workshop	64
1	Spring 1.0 × 8 × 25 mm	IVO Industriebedarf	65
1	Septum 12 mm, PTFE red/Silicone white, 1 mm thickness	Sigma-Aldrich	66
1	12 V DC gear motor, 25mm, 10 rpm	Amazon	67
1	GX12 aviation socket, Pins 5 or 6 (+ aviation plug on the cable)	Amazon	68

Detailed step-by-step assembly of the motor-controlled BPR

In the following, a detailed assembly instruction with example photos is given. Together with the exploded CAD view, it should be possible to assemble the pressure sensor without using special tools.

	<p>Step 1: All threaded inserts (M6, Pos. 34) were inserted into the BPR top part (57) using a soldering iron</p>
---	--

	<p>Step 2: The flat sides (marked with an arrow) of the BPR main body (56) were sanded with 220 – 1500 grit abrasive paper to ensure a smooth surface.</p>
	<p>Step 3: Spring caps (61) were inserted into the spring (65).</p>
	<p>Step 4: The Septum (66) was inserted. Red side (PTFE) facing to the bottom part, white side facing (silicone) to the spring cap</p> <p>Step 5: The spring with caps from step 3 was inserted.</p>
	<p>Step 6: The BPR main body (56) was carefully applied to the prepared BPR top part (57) without shifting the septum and screwed on it (M3 nuts and washers).</p>
	<p>Step 7: The hexagonal rod (63) was glued into the cheese head screw with hexagon socket, M8 × 30 mm (64) using super glue.</p>
	<p>Step 8: The prepared M8 screw from step 7 was screwed into the BPR top part from step 6. Prior retapping of the thread with an M8 tap may be necessary.</p>

	<p>Step 9: The aviation socket (68) was soldered to the gear motor (67).</p> <p>Step 10: The gear motor (67) was screwed to the motor mount (58) and the motor shaft coupler was inserted (with M4 × 6 threaded insert and an M4 grub screw).</p>
	<p>Step 11: The prepared motor mount from step 9 was screwed to the BPR top part from step 8.</p> <p>Step 12: the motor cover was screwed to the motor mount and the aviation socket was fixed to the motor cover through the hole.</p>
	<p>To assemble the manually controlled BPR, follow steps 1 - 6. Instead of gluing the hexagonal rod onto the M8 screw, press the M8 press-fit head (62) into the screw using a vise.</p>

Electronic setup of the sensor and BPR

For controlling the pressure sensor an Arduino Mega 2560 was used. The motor of the BPR was controlled with an L298N motor drive controller using 12 V from the power source. For a constant voltage of 5 V for the Nextion Display, a step-up/step-down voltage regulator was used. The Arduino was connected directly to a standard 12 V DC, 3 A power supply. The L298N and the voltage regulator were connected to 12 V using the V_{in} pin from the Arduino Mega. The detailed assignment of the electronics is shown in **Figure S6**. All electronic parts were connected using standard female-to-female or female-to-male jumper wires.

For the connector cables between the components, two core wires with aviation plugs were used. To ensure correct signal transmission from the sensor to the pump, 10 k Ω resistors were placed behind pins 7 and 8 respectively.

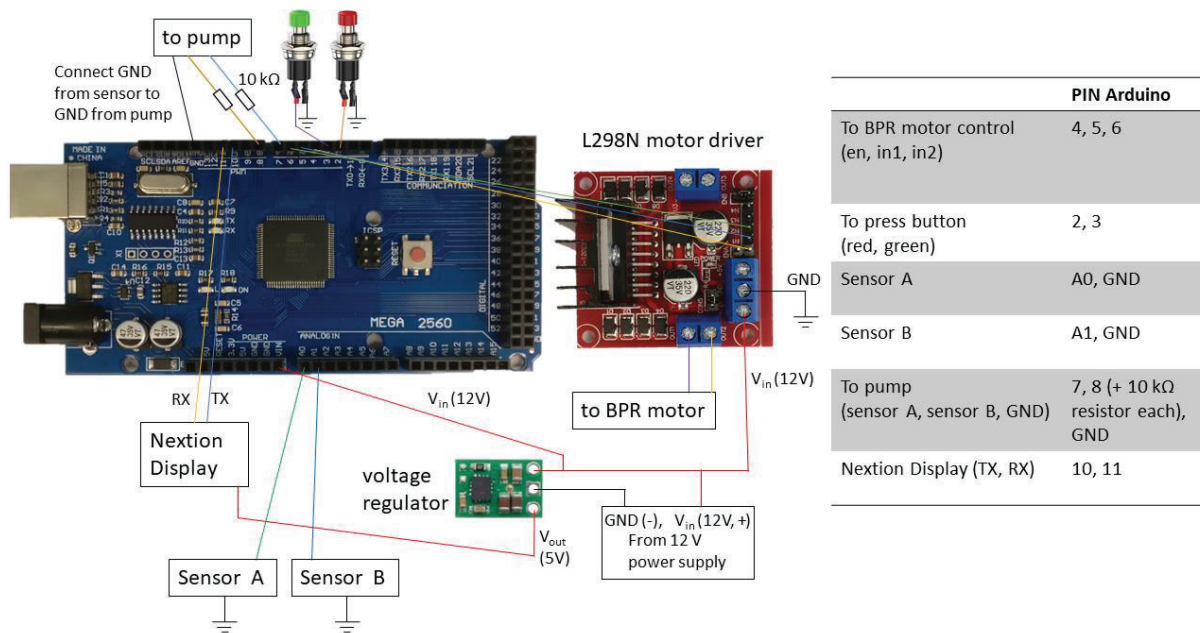


Figure S6: Wiring diagram of the pressure sensor and BPR with PIN assignment.

Calibration of the pressure sensor

For the calibration of the pressure sensor, the sensor was connected to a manometer (CI 2.5 from WIKA (6 bar)). The Arduino Mega has an 8-bit analog-to-digital converter (1024 data points) that is used with the force-sensing resistor. 20 datapoints, ranging from 0.5 to 6 bar, were measured and the protocol from Kenji Ohgane^[3] was used to perform a sigmoid plotting of the data points. The excel table, which can be used for individual calibration, can also be found as a supplementary file.

	<p>Step 1: The assembled sensor was connected to any external pressure sensor using the guide rail (41) with 1/4-28 flat-bottom fitting (IDEX H&S XP-230) and 1/16" ETFE tubing. Here, we use the pressure gauge holder (54) with a monometer (CI 2.5 from WIKA) (55) sealed by an O-ring. The cable from the sensor was connected to the electronic case (sensor A/B).</p> <p>Step 2: Pressurize the system from 0 to 6 bar and collect approx. 20 corresponding data points (from 0 to 1024)</p> <p>Step 3: Open the solver excel file and follow the steps in the excel file to bring the data points to the Arduino (the excel file can be found in the supporting information)</p>
--	--

	G	H	
	8-bit datapoints	measured pressure	c
	1023		0
	1023		0,2
	830		0,4
	725		0,6
	695		0,8

	C	D
	copy the value of C1	
	case 1: bar = 137.6; break;	
	case 2: bar = 157.03; break;	
	case 3: bar = 120.19; break;	

Step 4: Follow the instructions in the excel file:

- (1) Paste the 8-bit data points and the measured pressure into columns G and H.
- (2) Start Excel Solver (Tools > Solver)
- (3) Set "Target cell" to "B7" (Sum of squared residuals).
- (4) Click "Solve" to perform the fitting.
- (5) Close the solver window and check the graph to see if the calculated curve fitted well.
- (6) go to sheet "switch case - one line"
- (7) copy the value of C1 to the Arduino software (line 364 for sensor A, line 372 for sensor B). Make sure to have "." as a decimal separator

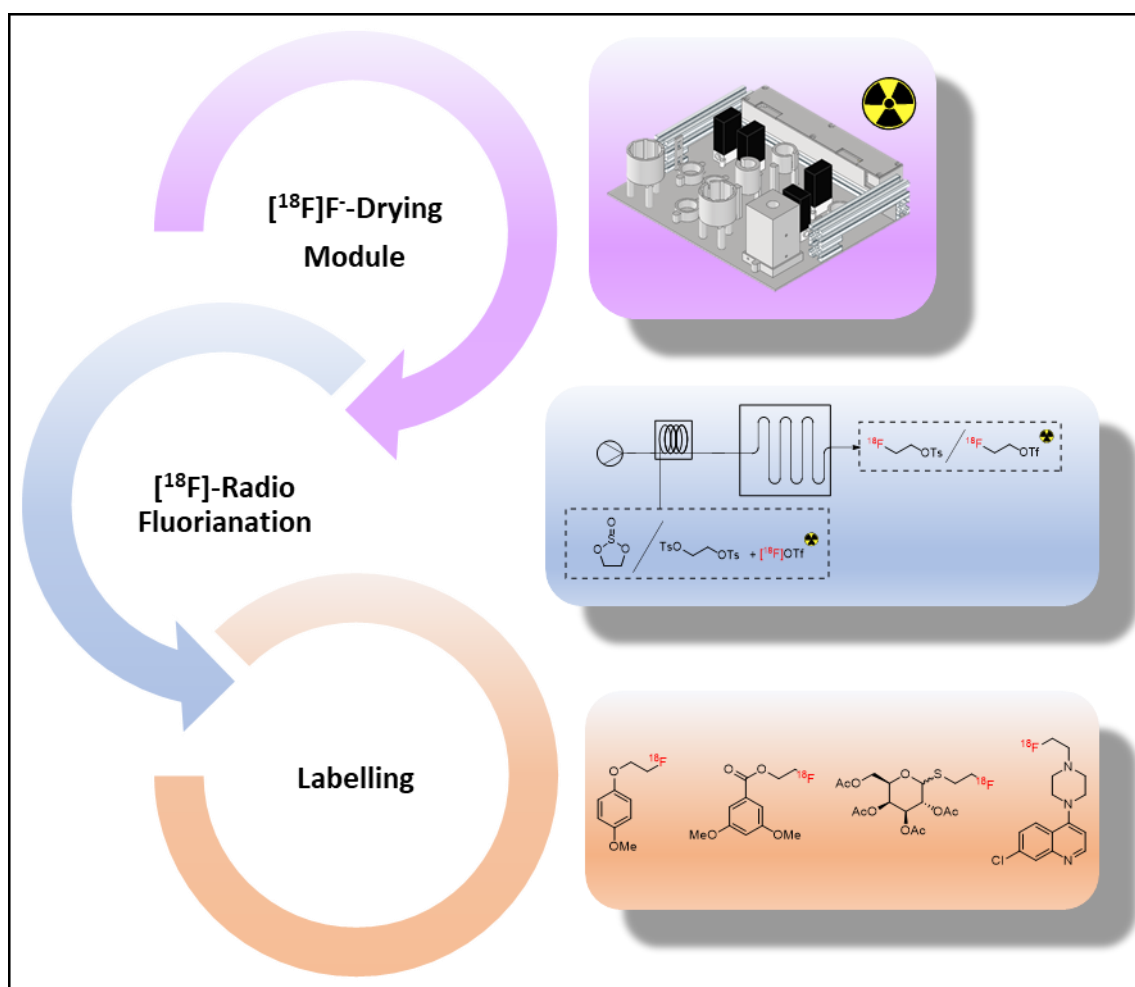
Notes and references

-
- [1] Neumaier JM, Madani A, Klein T, Ziegler T (2019) Low-budget 3D-printed equipment for continuous flow reactions. *Beilstein J. Org. Chem.* 15:558–566.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.15.50>
 - [2] Menzel F, Klein T, Ziegler T, Neumaier JM (2020) 3D-printed PEEK reactors and development of a complete continuous flow system for chemical synthesis. *React. Chem. Eng.* 5:1300-1310.
<https://doi.org/10.1039/D0RE00206B>
 - [3] Ohgane K (2019) Sigmoid fitting in Excel (Excel Solver Add-In), protocols.io,
<https://doi.org/10.17504/protocols.io.78ihvue>

Paper 3

Open-source flow setup for rapid and efficient [^{18}F]fluoride drying for automation of PET tracer syntheses

Florian Menzel, Jonathan Cotton, Andreas Maurer, Thomas Ziegler, Jochen M. Neumaier, *J. Labelled Compd Radiopharm.*, **2023**, 67(2), 40–58, DOI: 10.1002/jlcr.4080.



Open-source flow setup for rapid and efficient [^{18}F]fluoride drying for automation of PET tracer syntheses

Florian Menzel^{1,2}  | Jonathan Cotton^{2,3}  | Thomas Ziegler¹  |
Andreas Maurer^{2,3}  | Jochen M. Neumaier¹ 

¹Institute of Organic Chemistry,
University of Tuebingen, Tuebingen,
Germany

²Werner Siemens Imaging Center,
Department of Preclinical Imaging and
Radiopharmacy, University of Tuebingen,
Tuebingen, Germany

³Cluster of Excellence iFIT “Image-
Guided and Functionally Instructed
Tumor Therapies” (EXC 2180), University
of Tuebingen, Tuebingen, Germany

Correspondence

Jochen M. Neumaier, Institute of Organic
Chemistry, University of Tuebingen, Auf
der Morgenstelle 18, 72076 Tuebingen,
Germany.

Email: jochen.neumaier@uni-tuebingen.de

Funding information

Karl und Anna Buck Stiftung

One of the key strategies for radiochemical research facilities is the automation of synthesis processes. Unnecessary manual operations increase the radiation exposure of personnel, while simultaneously threatening the reliability of syntheses. We have previously reported an affordable open-source system comprising 3D-printed continuous flow reactors, a custom syringe pump, and a pressure regulator that can be used to perform radiofluorinations. In this paper, we address additional essential processes that are needed for radiotracer development and synthesis, with the aim of making laboratory work safer and research more efficient. We have designed and evaluated a fully automated system for rapidly and effectively processing and drying aqueous [^{18}F]fluoride that can be directly connected to the cyclotron. This process relies on triflyl fluoride gas generation and allows nucleophilic [^{18}F]fluoride to be prepared safely in a hotcell within 10 min and an activity recovery of $91.7 \pm 1.6\%$ ($n = 5$). Owing to the need for convenient radiofluorinated prosthetic ligands, we have adapted our continuous flow system to produce [^{18}F]fluoroethyl tosylate (FEOTs) and [^{18}F]fluoroethyl triflate (FEOTf), prosthetic groups that are widely used for late-stage fluoroethylation of PET tracers. The processes as well as the radiolabeling of different groups are compared and comprehensively discussed. Having a method providing [^{18}F]fluoroethyl tosylate (FEOTs) as well as [^{18}F]fluoroethyl triflate (FEOTf) quickly and highly efficiently is beneficial for radiochemical research.

KEYWORDS

3D printing, automation, F-18, flow chemistry, fluoroethyl triflate, radiochemistry, triflyl fluoride

1 | INTRODUCTION

Flow chemistry has attracted considerable attention over the last two decades. It conveys several benefits that have seen it widely used in the chemical industry.^{1–4} It allows

Florian Menzel and Jonathan Cotton Shared first Authorship

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* published by John Wiley & Sons Ltd.

for the easy scale-up of production processes because of better mixing and heat transfer compared with standard reactor batch syntheses.^{5–8} Furthermore, shorter reaction times because of increased reaction kinetics, better control as well as adjustment of reaction conditions, which could lead to higher purity, are just some of the other major advantages. All the aforementioned properties make flow chemistry especially suitable for working with hazardous chemicals and radioactive nuclides, considering the short half-life of isotopes such as ^{18}F (109.77 min).⁹ Because of high costs, large footprint, and limited availability and flexibility, commercial flow systems remain underutilized in radiopharmaceutical research institutes.

We have previously reported on an in-house designed open-source continuous flow system that comprises several 3D-printed components.¹⁰ The system can be produced at low cost and customized to perform several important radiochemical processes.

At the heart of the system is a 3D-printed reactor that can be customized for volumes ranging from 50–2500 μl . The reactor is printed from heat, solvent, and chemical resistant PEEK polymer, making it suitable for the diverse range of reagents and reaction conditions needed for radiochemical research.¹¹ The flow of solvent through the system is driven by dual syringe pumps that can continuously drive solvent through the reactor and perform tasks such as dilutions. A custom pressure sensor and pressure regulator allow for reactions to be run at temperatures exceeding the boiling point of the chosen solvent and safely monitored and controlled from outside the lead-shielded work space. In its current form, our system is intended to supplement current radiosynthesizers and has been designed to have the smallest possible footprint so that it can be safely placed in a shielded hot cell and integrated into currently used synthesis modules.

The system has already been used to produce ^{18}F FDG, performing several of the crucial operations required from a radiosynthesizer, such as the nucleophilic radiofluorination of mannose triflate and subsequent dilution and immobilization on a C18 SPE

cartridge. To address the remaining crucial functional components of a complete radiosynthesizer we have set out to automate the fluoride drying process, which would ideally be performed quickly, and efficiently resulting in a concentrated solution of ^{18}F fluoride that can be further used in our custom system. In addition, we further explore the utility of our continuous flow system to synthesize useful radiofluorinated prosthetic ligands that aid in tracer development.

An unfortunate prerequisite for most radiofluorination reactions is the robust exclusion of water. Aqueous ^{18}F fluoride from the cyclotron must be thoroughly dried, often under harsh conditions, with the process taking between 15 and 25 min.^{12,13} When performing manual azeotropic drying, multiple additions of acetonitrile are often required, limiting the radiochemist to low working activities or exposing them to high doses of radiation.¹⁴ The recently published method by Pees et al. describes the rapid generation of reactive ^{18}F fluoride species for radiofluorinations without the need for azeotropic drying.¹⁵ This technique relies on the generation of volatile ^{18}F triflyl fluoride gas (**2**), which is passed through a suitable drying column and subsequently decomposed in the presence of base into nucleophilic ^{18}F fluoride that can be used for further reactions. ^{18}F triflyl fluoride can be obtained by the reaction of phenyl triflimide (**1**) with aqueous ^{18}F fluoride in DMF at 50°C (Figure 1).¹⁶

This approach has several benefits compared with traditional azeotropic drying. The process is quick and the generation ^{18}F triflyl fluoride tolerates water content up to 30%.^{17,18} Exploiting this method, we present an automated module that can be used to safely, efficiently, and reliably produce dry ^{18}F fluoride, all within a hot cell that already contains other synthesis modules (Figure 2). This module also presents benefits to manual batch radiosyntheses as the anhydrous fluoride can be produced without the dose acquired during the typical drying procedures.

A common strategy in PET tracer development exploits ^{18}F -fluorinated prosthetic groups, which can be

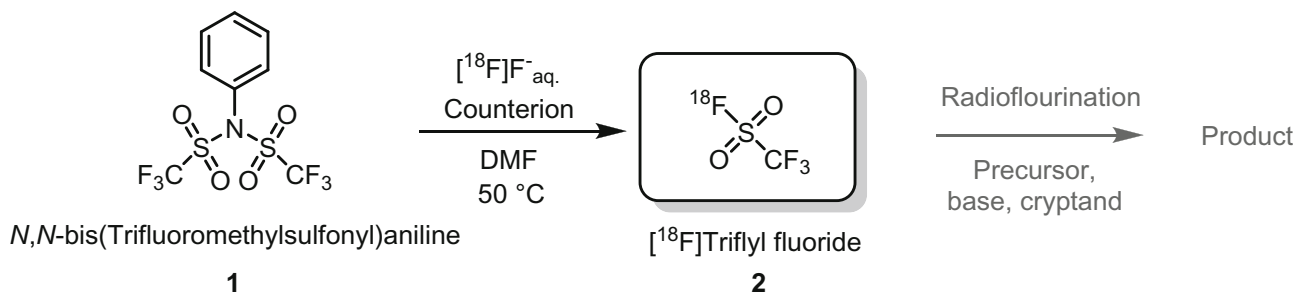


FIGURE 1 Synthesis of ^{18}F triflyl fluoride.

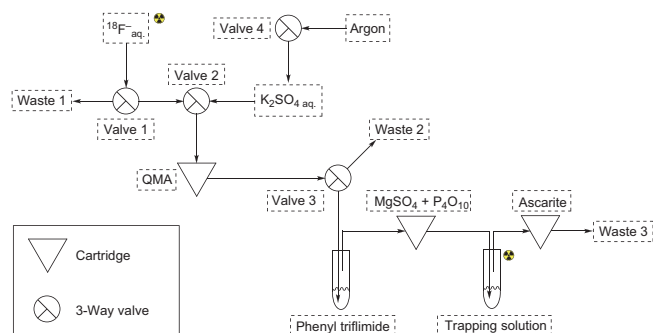


FIGURE 2 Schematic illustration of the intended drying module.

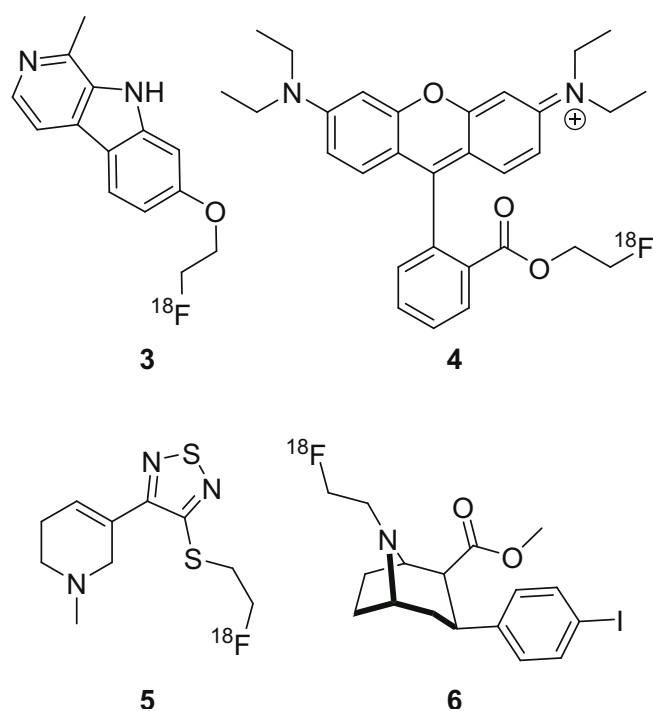


FIGURE 3 Fluoroalkylation examples of different PET-Tracer, ¹⁹ 2-[¹⁸F]fluoroethyl harmol as monoamino oxidase tracer (3), 2-[¹⁸F]-fluoroethylrhodamine B as P-glycoprotein tracer (4), [¹⁸F]FP-TZTP as muscarinic tracer (5), [¹⁸F]FE-β-CIT as dopamine transport tracer (6).^{20–23}

used for the late-stage labeling of suitable precursors (Figure 3). This is an attractive approach as one can directly label a precursor, provided it contains a suitable reactive moiety. Such precursors are often easier to synthesize, more stable, and commercially available. There is a significant body of work describing the associated fluoroalkylation of preclinical and clinical radiopharmaceuticals, for example, compounds 3–6.

[¹⁸F]Fluoroethyl tosylate (FEOTs) (11) is among the most commonly used prosthetic groups and has already been implemented into the fluoroethylation of many reported radiotracers.^{24,25} Although widely used, FEOTs

can exhibit restricted reactivity that stems from the poor nucleofugality of the associated tosylate ([−]OTs) leaving group. FEOTs has notable difficulty in labeling soft nucleophiles such as thiols or carboxylic acids and deactivated aromatic amines, with long reactions that require aggressive heating and strong bases.¹⁹ [¹⁸F]Fluoroethyl triflate (FEOTf) (9) has been offered as an alternative ligand for rapid late-stage fluoroethylations and has been shown to effectively label deactivated aromatic amines. It can be easily prepared from 2-[¹⁸F]fluoroethanol, which is in turn produced from the direct fluorination of commercially available ethylene sulfite.^{26,27}

One of the major drawbacks of prosthetic ligands is the inherent complexity of synthesis, automatization, and integration into expensive commercial radiosynthesis modules, which are often configured with only a single reactor. Owing to the limited distinct radiosynthesizers on the market, each user is required to engineer a custom setup to implement their desired radiofluorinated prosthetic ligand into routine syntheses.^{28–30} The synthesis of suitable prosthetic ligands in a custom external device, that can be connected to a synthesis module, would expand the versatility of such devices by allowing for multi-step radiofluorination reactions to be performed using already-owned machinery. Some of the technical limitations to this idea include the restricted space within the hot cell and the complicated fluorine drying procedures. We aimed to address this issue by expanding the reaction scope of our recently published flexible open-access microfluidic system (FOMSy) to synthesize fluoroalkylating reagents.¹⁰ This in combination with the automated fluoride-drying module represent distinct and valuable steps towards the full implementation of such a system. With this technology, we aim to make affordable and fully customizable 3D-printed continuous flow radiosynthesizers more accessible to the ever growing and developing community.

2 | RESULTS AND DISCUSSION

2.1 | Automated ¹⁸F-drying module

The automated [¹⁸F]fluoride drying system was designed so that it could be directly connected to the cyclotron and not interfere with routine delivery line washing and drying procedures. The module can be safely prepared before the fluoride delivery and all monitoring and operation processes can be controlled from the outside of the hot-box. A solution of K₂222/KHCO₃/¹⁸F with high activity concentration is obtained within 10 min of the delivery of aqueous [¹⁸F]HF. A description of the design of the fluoride-drying module is illustrated below:

As a base for the module, a 2 mm thick aluminum plate was used, which is partially reinforced on the outside with aluminum profiles. The framework and non-electronic components of the control unit were 3D printed (Figure 4). All printing was performed with affordable materials, for example, polyethylene terephthalate glycol-modified (PETG) or polylactic acid (PLA). Alternatively, the complete module including all holders can be 3D-printed in one piece. For both variants, all CAD files could be found in the ESI (Data S2). The drying tube is made by filling an empty 10 g plastic flash chromatography column with Sicapent[®] (Merck Millipore, 4/5 of the volume) and MgSO₄ (1/5 of the volume). Compacted glass wool was used between each layer to

prevent spillage and mixing of reagents. The drying column was oriented in the system such that the triflyl fluoride passed first through the small MgSO₄ layer. This ensured that the bulk of any liquid or water vapor was first captured by the non-reactive desiccant, thus prolonging the life and use of the column. The system was exhausted through a similarly filled cartridge containing Ascarite[®] (Sigma Aldrich) to ensure that any unreacted triflyl fluoride was safely contained. Controlling the flow is essential for this setup. Therefore, we use four 3/2-way-solenoid valves (Bürkert, Ingelfingen, Germany). All gas and liquid handling components were connected with ETFE tubing of 0.5 mm inner diameter (ID) and flangeless 1/4"-28 flat bottom fittings. The electronics are based

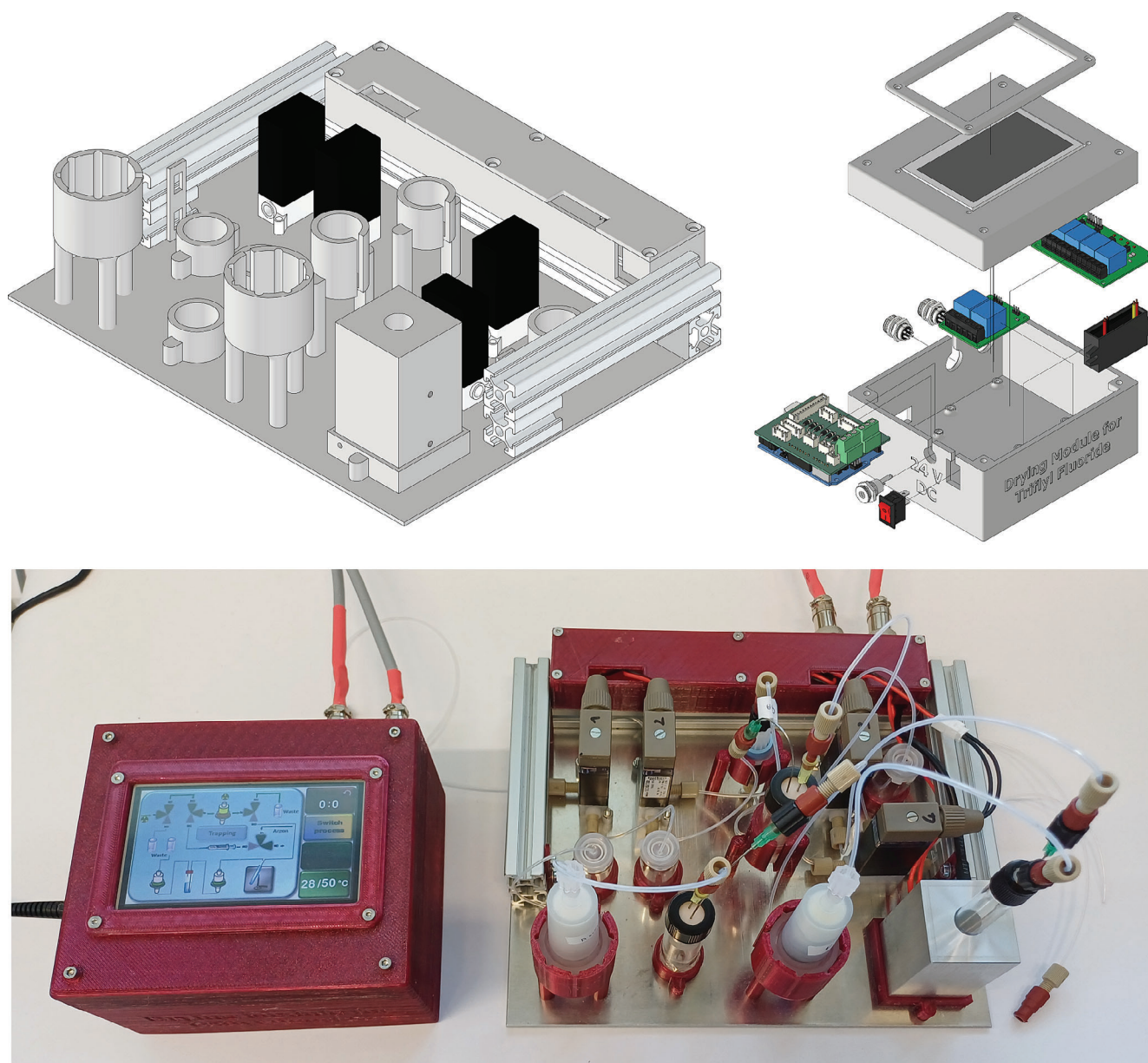


FIGURE 4 CAD drawing and photograph of the 3D-printed, assembled drying module and the control unit.

on an Arduino UNO connected to six optocoupler relays. To simplify assembly, an Arduino shield has been designed specifically for this purpose and the Gerber files for PCB production can be found in the supplementary information (Data S2) together with all program files, STLs for printing, and detailed assembly instructions (Data S1). The Arduino itself controls the optocoupler relays, which control the heating element and the magnetic valves. The heating element and the magnetic valves run on 24 Volts, the Arduino, the Nextion display, and the thermo sensor require 5 V. The differing needs of the electronic components necessitated the implementation of a voltage converter. The whole system can be easily rebuilt for about 500 €.

To simplify operation, a pre-programmed drying program for [^{18}F]triflyl fluoride (**2**) has been developed and integrated into the Arduino program (Figure 5). The program consists of two pre-programmed cycles controlling the flow of [^{18}F] species during the process. Via “switch process”, the two cycles switching simultaneously without requiring any further manual interaction. For time management we also implement a timer function.

For the drying procedure, aqueous [^{18}F]fluoride (2 ml from target wash) was immobilized on a NaHCO_3 pre-conditioned QMA cartridge (Waters, Waltham, MA, USA) and subsequently eluted into the heated reactor containing phenyl triflimide in DMF using 0.7 ml 0.1 M KHSO_4 . Because the subsequent reaction is reported to tolerate up to 30% water and maintaining a small footprint was a design prerequisite, this step served to concentrate the aqueous [^{18}F]fluoride. This concentration step can be omitted and the target delivery used directly if a sufficiently large reaction vessel is preferred.

The glass reactor was sealed with a Teflon cap and silicon septum, allowing for a simple connection to the argon and transfer line. The transfer line was then connected to a v-vial via the drying cartridge filled with Sicapent[®] and MgSO_4 . The v-vial was further connected

to the Ascarite-filled cartridge. The argon flow was adjusted so that approximately 10 ml/min was observed. Higher gas flow led to inefficient trapping of fluoride in the v-vial.

The glass reactor containing 2.5–3 ml of the 10 mg/ml solution of *N,N*-bis (trifluoromethylsulfonyl)aniline (**1**) in DMF was preheated to 50°C. After eluting the [^{18}F]fluoride from the QMA cartridge into the glass reactor, a constant and gentle flow of argon was bubbled through for 10 min at 50–80°C. This allowed for complete conversion of the source fluoride into triflyl fluoride gas as well as efficient trapping and decomposition of the triflyl fluoride into a usable fluoride source for further reactions. Several trapping and reaction conditions were tested (Table 1).

We evaluated trapping the [^{18}F]triflyl fluoride (**2**) in solutions containing either TEAB in DMF or KHCO_3 /Kryptofix 2.2.2. in MeCN and observed satisfactory results when the water content was kept under 20%. In accordance with current reported procedures, heating up to 50°C was necessary. The trapping solution comprise KHCO_3 and Kryptofix 2.2.2. in MeCN was ultimately adopted. After 10 min, the anhydrous [^{18}F]fluoride was obtained with a trapping efficiency of $91.7 \pm 1.6\%$ ($n = 5$). The experiments No. 7 are performed with a radioactivity of 2–25 GBq.

2.2 | Prosthetic ligands, FEOTs, and FEOTf

2.2.1 | About the flow microfluidic system

The basic system we use is our custom-built “Flexible Open Source Microfluidic System (FOMSy)”, which consists of a syringe pump, microreactors, a pressure sensor, a back pressure regulator (BPR), a 6-way valve, and various cartridges (Figure 6).¹⁰ Most of the parts can be 3D-printed. Non-solvent touching parts, such as the

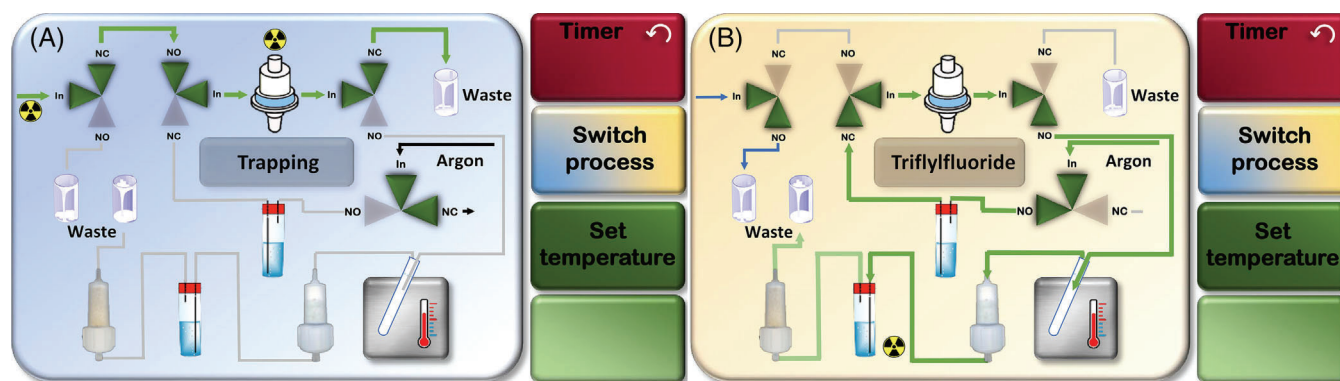


FIGURE 5 Preprogrammed graphical user interface (GUI) of the trapping (a) and synthesis process (b) for [^{18}F]triflyl fluoride.

TABLE 1 Trapping efficiency for various conditions determined by the ratio of activity on the QMA cartridge and the trapping solution.

Entry	Reactant	Water content	Trapping solution	Temperature	Trapping efficiency
1	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$ /Phenyl triflimide (1.4 mg/ml in DMF)	33.3%	TEAB (37.0 mg/ml DMF)	50°C	44.6%
2	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$ /Phenyl triflimide (1.4 mg/ml in DMF)	20.0%	TEAB (37.0 mg/ml DMF)	50°C	71.9%
3	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$ /Phenyl triflimide (1.4 mg/ml in DMF)	13.3%	TEAB (37.0 mg/ml DMF)	50°C	72.2%
4	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$ /Phenyl triflimide (2.8 mg/ml in DMF)	13.3%	TEAB (37.0 mg/ml DMF)	80°C	55.0%
5	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$ /Phenyl triflimide (7.3 mg/ml in DMF)	33.3%	(1.7 mg KHCO_3 /8.0 mg K 2.2.2.)/ml MeCN	50°C	69.9%
6	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$ /Phenyl triflimide (10 mg/ml in DMF)	33.3%	(2.6 mg KHCO_3 /10.0 mg K 2.2.2.)/ml MeCN	50°C	87.9%
7	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$ /Phenyl triflimide (10 mg/ml in DMF)	20.0%	(2.6 mg KHCO_3 /10.0 mg K 2.2.2.)/ml MeCN	50°C	91.7 ± 1.6% (n = 5)

**FIGURE 6** Flexible Open Source Microfluidic System (FOMSy), dual syringe pump, pressure sensor, automated pressure regulator, control unit, and PEEK microreactor.^{10,11}

framework of our dual syringe pump, the top of the pressure sensor, and the BPR were printed out of affordable materials like PETG or PLA. Because of its high resistance to a wide range of chemicals and temperature stability up to 250°C, the solvent-touching parts (microreactors, bottom part of the pressure sensor, and the back pressure regulator) were 3D-printed with PEEK (polyether ether ketone).

For parts made of PEEK, we used a high temperature 3D printer from Apium (P220). For parts made of PETG, we used a Quidi X-CF Pro, but they could be printed with any standard 3D printer. All custom components were designed using Autodesk Inventor Professional 2022 and sliced with Simplify 3D. This system is a self-built, 3D-

printed, highly adaptable system (FOMSy) that can be individually compiled by the needs of the synthesis. It has already been published in previous works and is available open access. Nevertheless, it is not necessary to use our system. The processes presented here are possible with any other flow device containing the key parts mentioned above.

Building upon our previous work using the microfluidic system to synthesize [^{18}F]FDG and with our fluoride drying module in hand, we set out to extend the scope of our customizable setup to produce radiofluorinated prosthetic ligands that could be directly implemented into our ongoing research. As a starting point, we focused on [^{18}F]fluoroethylating ligands as these are widely and commonly used in radiochemistry research.

2.2.2 | 2-[^{18}F]Fluoroethyl triflate

[^{18}F]Fluoroethyl triflate (**9**) has been proposed as an alternative to [^{18}F]fluoroethyl tosylate (**11**), leading to the desired [^{18}F]fluoroethylated products under milder reaction conditions. Reactions at room temperature and without the addition of base, as well as [^{18}F]fluoroethylation of less nucleophilic starting materials, can be achieved. Peters et al. developed a procedure using [^{18}F]fluoroethanol (**8**) as an intermediate, previously synthesized from ethylene sulfite in MeCN at 80°C.¹⁸ After transferring the crude reaction mixture through a QMA light cartridge, the generated [^{18}F]fluoroethanol (**8**) was treated with triflic anhydride for 1 min at room temperature and passed through an alumina N light cartridge. [^{18}F]Fluoroethyl triflate (**9**) with a radiochemical yield of 78% (TLC) was

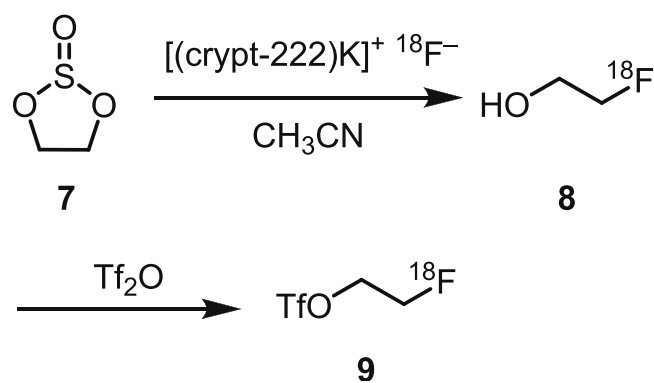
obtained (Scheme 1). We hypothesized that this method could be easily transferred to our microfluidic system and set out to evaluate and automate the process.

We first evaluated the efficiency of the synthesis of 2-[¹⁸F]fluoroethanol (**8**). Conventional and microfluidic methods were run from 70–110 °C for 1–15 min and gave RCY of 58–79%. A temperature of 90 °C and a residence time of 5 min was found to be optimal for the synthesis of [¹⁸F]fluoroethanol (**8**) in both cases, resulting in the best conversion in the continuous flow process of 92.4 ± 1.7% (n = 20) and 75.1 ± 2.2% (n = 3) for the reactor synthesis (measured by TLC). Interestingly, a clear difference can be observed in terms of radiochemical purity (RCP), radiochemical yield (RCY), and radiochemical conversion (RCC). The reaction in the microfluidic system is more efficient than in conventional reactors (batch). Residence times of 5 min produced sufficiently high activity yields, although small improvements were observed when 10-minute residence time was evaluated. The reactor syntheses run for 5 min at 90 °C produced an RCY of only 55%, which after 10 min, was marginally improved to 61% (Figure 7).

The flow reaction was performed multiple times (n = 20) under the best conditions and the mixture of ethylene sulfite (**7**) and dried [¹⁸F]fluoride was passed through the microreactor and collected in a Falcon tube containing dry MeCN and Tf₂O. The resulting [¹⁸F]FEOTf was then quickly pushed through a Sep-Pak alumina N cartridge to afford the [¹⁸F]fluoroethyl triflate (**9**).

A clear trend can also be seen here concerning byproducts (Figure 8). At 90 °C and a residence time of 5 min, around 23.5% byproducts and 21.5% unreacted [¹⁸F]fluoride can be measured. In the flow synthesis, only about 3.5% byproducts and 8.3% unreacted [¹⁸F]fluoride can be detected, which is advantageous for the subsequent fluor-ethylation reactions and purification.

At the end of the flow process, freshly produced 2-[¹⁸F]fluoroethanol (**8**) is collected directly in a 15 ml Falcon tube containing trifluoromethanesulfonic anhydride (Tf₂O)



SCHEME 1 Synthesis of [¹⁸F]fluoroethyl triflate (**9**).

in dry MeCN (Figure 9). The automation and integration of this step into our current system is trivial, but beyond the scope of this preliminary work. The RCC was measured via TLC before the subsequent alumina SPE purification. For the batch syntheses, we achieved an RCC of 75.1 ± 2.2% (n = 3) and noted that the resulting solution still contained 2-[¹⁸F]fluoroethanol (**8**) after treatment with Tf₂O. In the microfluidic system, we obtained an RCC of 92.4 ± 1.7% (n = 20) and no observable 2-[¹⁸F]fluoroethanol (**8**) (Figure 10).

After alumina SPE purification, an RCP of over 97% was observed in all cases. The time needed for the microfluidic system was 7 min compared with 12 min for the reactor synthesis. A notable further advantage of the flow system is that no additional cooling time is required for reactions that run above the boiling point of the applied solvent.

2.2.3 | 2-[¹⁸F]Fluoroethyl tosylate

The radiosynthesis of [¹⁸F]FEOTs (**11**) from the radiofluorination of ethylene glycol bis-*p*-toluenesulfonate (**10**) has been reported and has been extensively used to produce this valuable prosthetic ligand without the need for HPLC purification (Scheme 2). Block et al. first reported the synthesis of [¹⁸F]FEOTs (**11**) in 1987.²⁶ We evaluated the radiofluorination of ethylene glycol bis-*p*-toluenesulfonate (**10**) in MeCN using our microfluidic device and compared it with conventional reactor labeling. Temperatures for this reaction varied from 75 to 130 °C and, reaction times ranged from 3 to 15 min. The radiochemical yields, in this case, were 20–90%, depending on the purification and preparation method (Figure 11).

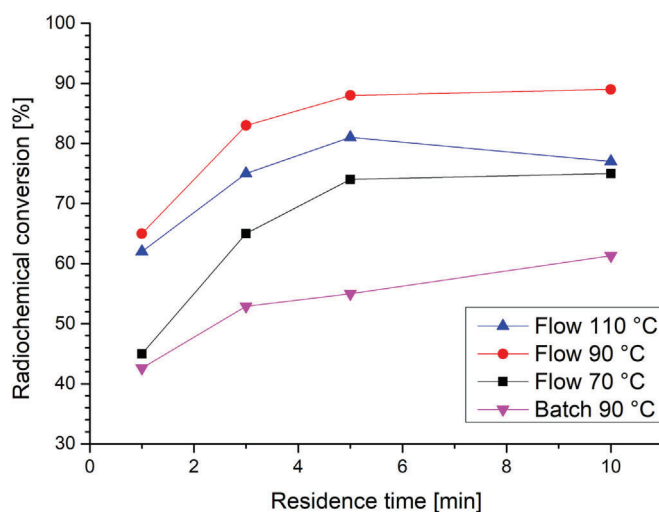


FIGURE 7 Radiochemical conversion of ethylene sulfite (**7**) to [¹⁸F]FEOH (**8**), at different temperatures and residence time.

FIGURE 8 Radiochemical purity (RCP) of [^{18}F]FEOH (**10**) after 5 min of reaction time at different temperatures.

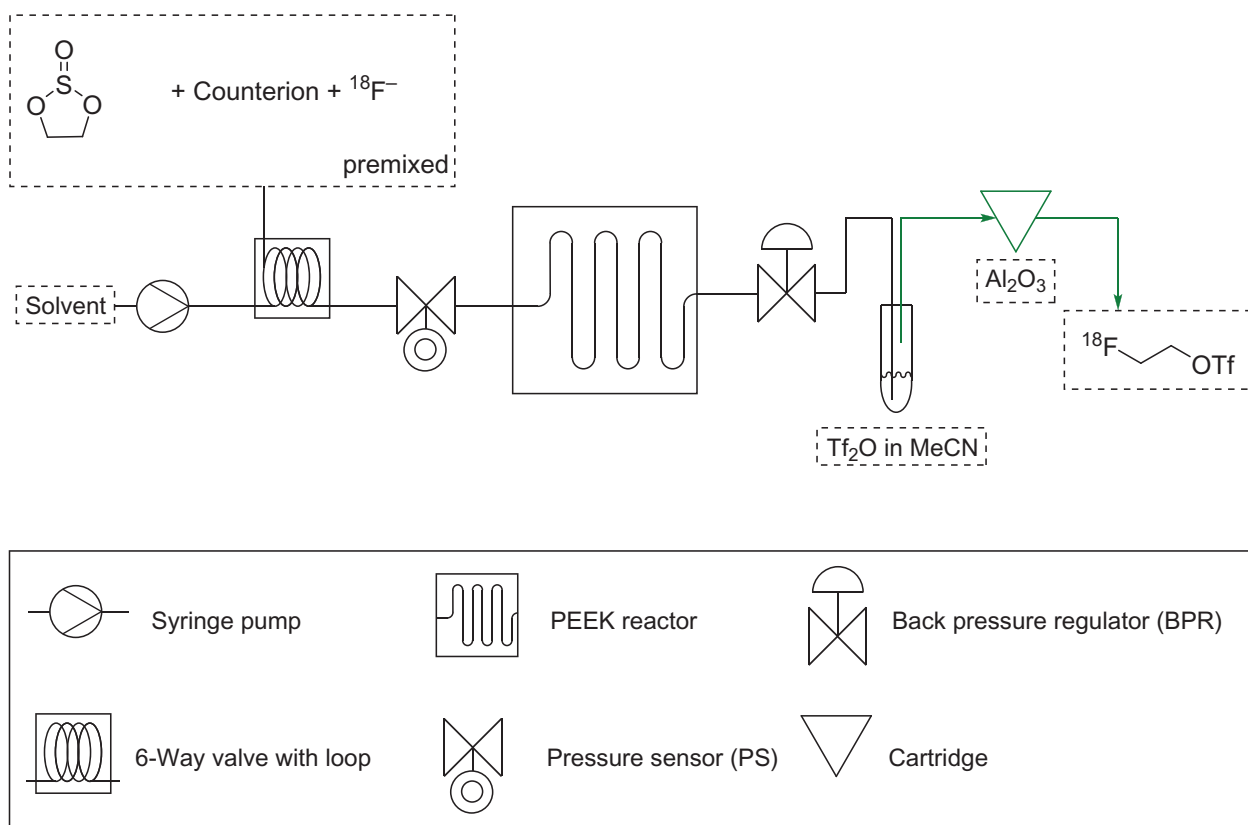
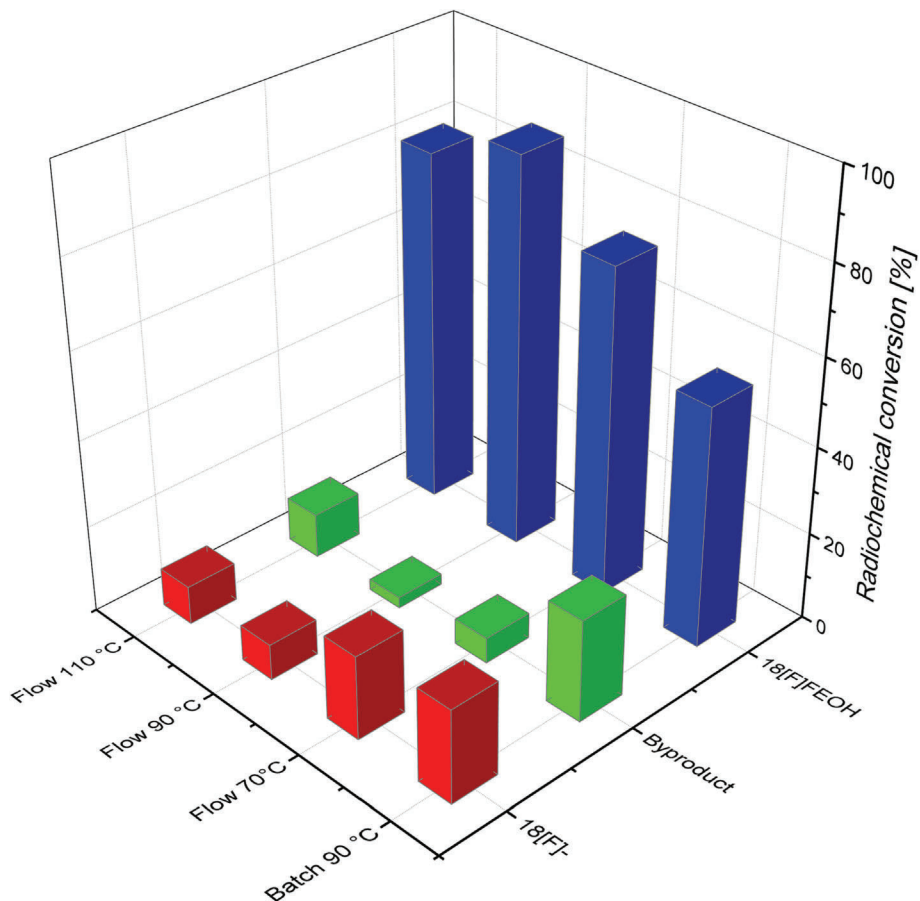


FIGURE 9 Schematic drawing of the developed [^{18}F]FEOTf process.

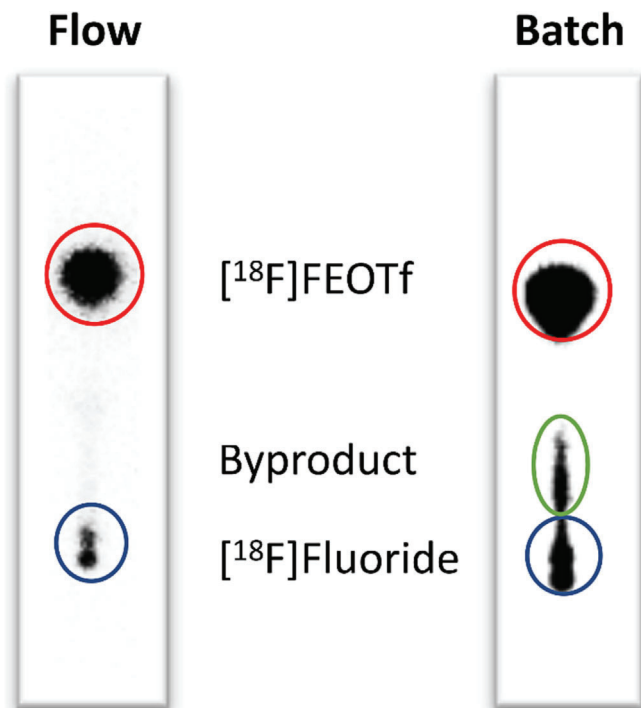
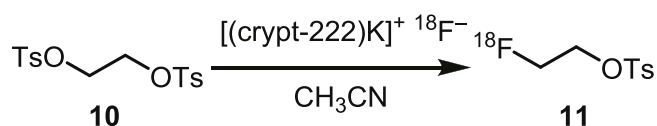


FIGURE 10 Radiochemical conversion (RCC), $[^{18}\text{F}]\text{FEOTf}$ (**9**) via TLC (before Alox), flow (left) vs. reactor (right).



SCHEME 2 Synthesis of 2- $[^{18}\text{F}]\text{fluoroethyl}$ tosylate (**11**).

Our results led us to perform subsequent reactions at 90°C and a residence time of 5 min (for the microfluidic evaluation). This resulted in RCYs of $85.9 \pm 1.2\%$ ($n = 9$) for the microfluidic system and $83.7 \pm 1.9\%$ ($n = 3$) for batch syntheses, before purification (Figure 12).

Owing to the poor aqueous solubility of the bis-tosylate precursor, dilution of the reaction mixture results in its precipitation and subsequent removal by filtration. The desired $[^{18}\text{F}]\text{FEOTs}$ (**11**) can be subsequently immobilized on a C18 SPE cartridge. The $[^{18}\text{F}]\text{FEOTs}$ (**11**) is then eluted from the cartridge with 35% methanol in water and further trapped on a second StrataX SPE cartridge, after which it can be eluted into a reactor with acetonitrile. Using our microfluidic setup, aliquots of dried fluoride and precursor were injected into the reactor via a loop and a six-way valve. This allows the system to run constantly, building up pressure (3 bar) to ensure that the solvent remains in the liquid state, even at temperatures exceeding its boiling point (Figure 13). For this process only, the reaction step was performed using the flow system, the latter steps starting from the SPE elution were performed manually.

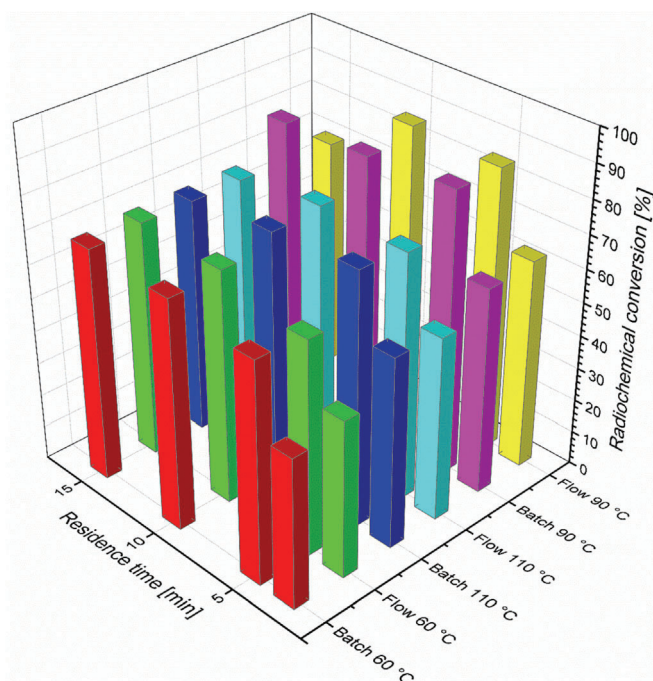


FIGURE 11 Radiochemical conversion (RCC) to 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluoroethyl}$ tosylate (**11**) before dilution/filtration.

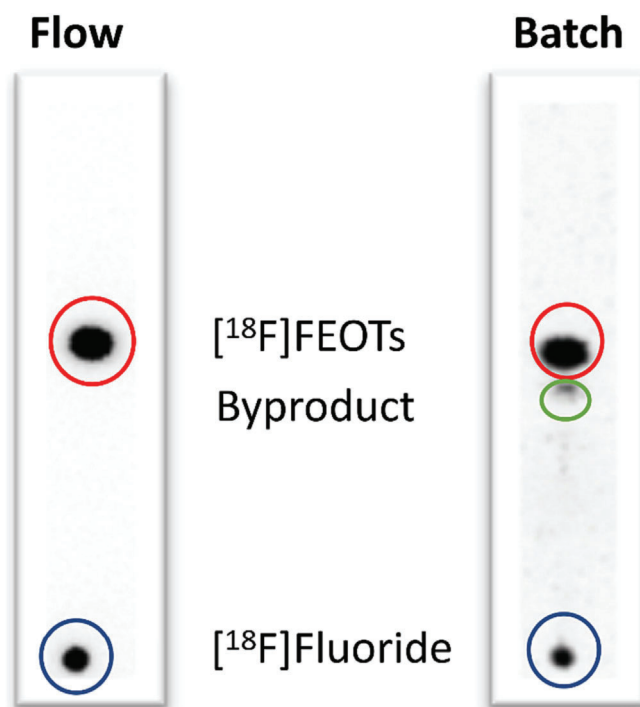


FIGURE 12 Radiochemical conversion $[^{18}\text{F}]\text{FEOTs}$ (**11**) via TLC (before Alox), flow (left) vs. batch (right).

The flow reaction was performed multiple times ($n = 9$) under the best conditions. The flow was driven through the reactor by a continuous stream of

FIGURE 13 Schematic drawing of the developed [^{18}F]FEOTs (**11**) process.

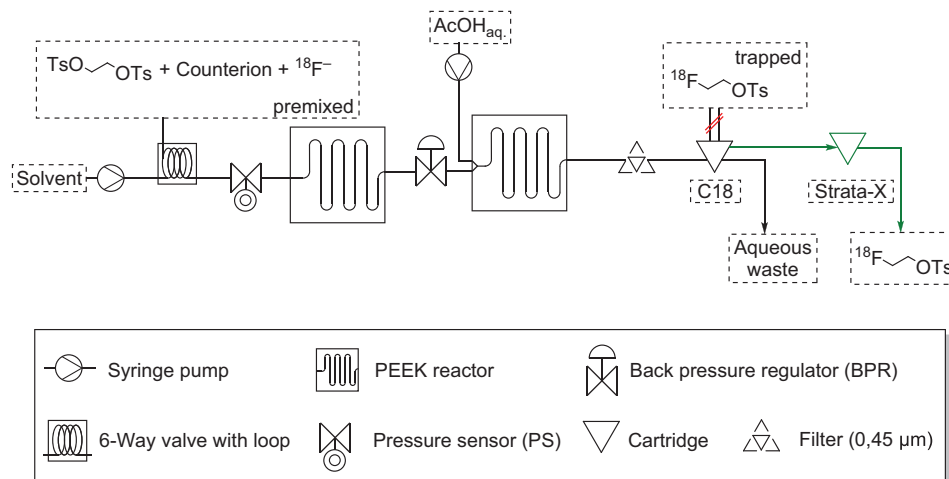


TABLE 2 Radiochemical yields (RCY) for [^{18}F]FEOH (**8**), [^{18}F]FEOTf (**9**), and [^{18}F]FEOTs (**11**).

Entry	Precursor	Product	RCY flow	RCY batch
1			$88.2 \pm 1.2\%$ (n = 3)	$61.3 \pm 1.7\%$ (n = 3)
2			$79.0 \pm 6.6\%$ (n = 20) ^a	$58.0 \pm 3.5\%$ (n = 3) ^a
3			$53.3 \pm 5.3\%$ (n = 9)	$53.7 \pm 4.9\%$ (n = 3)

^aOverall RCY.

acetonitrile, corresponding to a residence time of 5 min at 90°C. After the first reactor, the reaction mixture is passed through a second dilution reactor, which was subjected to a continuous flow of 12mM acetic acid solution. The flow rate was set to 720 $\mu\text{l}/\text{min}$, which is sufficient to ensure that the reaction mixture was diluted five-fold, ending up with a residence time of 1 min. This ensured an adequate precipitation of the unreacted precursor. The diluted mixture was passed through a 0.45 μm filter, which was connected to a preconditioned waters C18 SPE cartridge. The C18 SPE cartridge was connected to a StrataX cartridge and elution was performed as before. The total synthesis time was 8 min, with an RCY of $53.6 \pm 5.2\%$ (n = 9). Compared with the standard reactor synthesis, no notable improvements were observed (RCY batch: $53.7 \pm 4.9\%$ (n = 3)). Neither the RCY nor the total synthesis time of 10 min was enhanced. Although the implementation and automation of the required C18 SPE trapping is achievable on the microfluidic system, it would require significant effort without substantial gains.

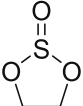
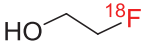
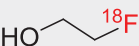
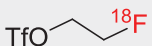
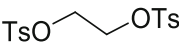
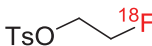
2.2.4 | Fluoroalkylation 2-[^{18}F]fluoroethyl tosylate vs. 2-[^{18}F]fluoroethyl triflate

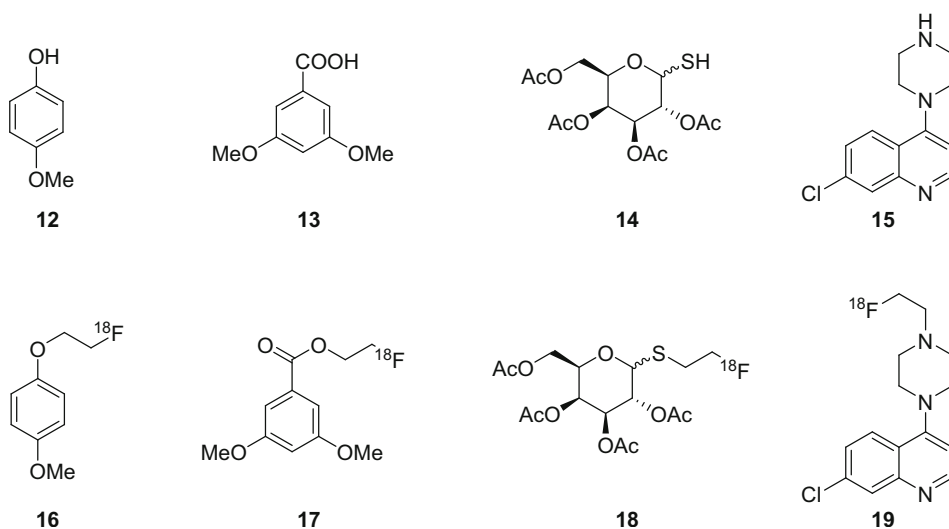
While the results regarding RCY and RCC of the one-step synthesis of [^{18}F]fluoroethyl tosylate (**11**) in the batch

and the flow process are in the same range, the two-step synthesis of [^{18}F]fluoroethyl triflate (**9**) is simpler, faster and produced with higher purity in flow. The purification itself is also more complicated and time-consuming in the case of the tosylate. The precursor, ethylene glycol bis-*p*-toluenesulfonate (**10**), must be carefully separated from the tosylate to avoid a competitive alkylation, making a fully automated application more complex. [^{18}F]Fluoroethyl triflate (**9**) can be prepared much more efficiently in terms of RCY and RCC in the flow process. The maximum RCY for [^{18}F]fluoroethyl triflate (**9**) in the batch was $58.0 \pm 3.5\%$ (n = 3); in comparison, an RCY of $79.0 \pm 6.6\%$ (n = 20) was determined under flow conditions (Table 2). This is an average 21% increase, which makes it the better synthesis method for this ligand. Furthermore, the measured RCC of $92.4 \pm 1.7\%$ (n = 20) is on average more than 17% better than in the batch process ($75.1 \pm 2.2\%$ (n = 3)). This also favors the formation of fewer byproducts and simpler purification (Table 3).

We then set out to test both ligands and decided to investigate their reactivity towards a variety of nucleophiles in a set of model compounds. The set of molecules thus contained phenols, carboxylic acids, thiols, and amines. We set out to label each compound manually with [^{18}F]FEOTs (**11**) and [^{18}F]FEOTf (**9**) and compare the two different alkylation reagents with each other. For *O*-alkylation, we chose to label 4-methoxy phenol (**12**) and

TABLE 3 Radiochemical conversion (RCC) before purification (measured by TLC).

Entry	Precursor	Product	RCC flow	RCC batch
1			93.1 ± 1.4% (n = 3)	77.8 ± 2.7% (n = 3)
2			92.4 ± 1.7% (n = 20) ^a	75.1 ± 2.2% (n = 3) ^a
3			85.9 ± 1.2% (n = 9)	83.7 ± 1.9% (n = 3)

^aOverall RCC.**FIGURE 14** Model molecules **12–19** for fluoroalkylation.

3,5-dimethoxy benzoic acid (**13**), which are transformed by fluoroalkylation to the corresponding ether and ester. For the *N*-alkylation, we chose the fluoroalkylation of the secondary amine 7-chloro-4-(piperazine-1-yl)quinoline (**15**). For the synthesis of *S*-[¹⁸F]fluoroethyl thioethers, we used 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-*D*-galactopyranoside (**14**) as a model compound (Figure 14). We subjected each precursor to the same labeling conditions (Table 4).

No alkylation of the phenol was observed under all conditions and the use of 0.1 M NaOH resulted in the unsurprising conversion of [¹⁸F]FEOTf (**9**) into [¹⁸F]FEtOH (**8**). However, we observed that DIPEA does not convert [¹⁸F]FEOTf (**9**) to [¹⁸F]FEtOH (**8**) at r.t., which made it our base of choice for subsequent reactions. This allowed us to compare both ligands in terms of reactivity. The esterification of 3,5-dimethoxy benzoic acid, for example, already showed promise. Here, an RCC of 79.2 ± 0.3% could be measured at r.t in 10 min using [¹⁸F]FEOTf (**9**). With [¹⁸F]FEOTs (**11**), on the other hand, no reaction was detected even after a further 10 min at 90°C. This tendency is also evident for the thiol (**14**) and the *N*-alkylation. Thus, in the reaction of the thiol (**14**) with the triflate (**9**), an RCC of 83.2 ± 1.1% (**18**) was measured, while with the tosylate (**11**), we only observed an RCC of 11.1 ± 0.2%. For the *N*-alkylation reaction of **19**, an RCC of 77.4 ± 0.4% was determined for the triflate (**9**),

and under the same conditions only 9.8 ± 1.3% using the tosylate (**11**).

Looking at the results of the reactions with the presented methods, it is clear that a simple method for generating [¹⁸F]FEOTf (**9**) is useful for research and development. We were able to provide a solution for this with our affordable 3D-printed and flexibly adaptable system, which even allows this to be performed without expensive commercially available radiosynthesis equipment.

3 | EXPERIMENTAL

3.1 | Chemical reactions

If not mentioned, all reagents and solvents were purchased from commercial suppliers and used without further purification.

3.2 | General radiochemistry

The [¹⁸F]fluoride was produced on a medical cyclotron (PET trace 800, GE Healthcare) using the nuclear reaction of ¹⁸O(p,n)¹⁸F.

TABLE 4 Reaction conditions; 50 μl of the precursor solution (12.5 mg/ml in dry MeCN) was mixed with 30 μl base and 200 μl of [^{18}F]FEOTs (**11**) or [^{18}F]FEOTf (**9**). All reactions took place at room temperature for 10 min. If no product was detected, the reaction temperature was raised to 90°C for further 10 min. The radiochemical conversion was measured via HPLC.

Entry	Precursor	Product	Base	RCC from FEOTf (n = 3)	RCC from FEOTs (n = 3)
1	12	16	DIPEA	0% ^{a,b}	0% ^{a,b}
2	12	16	K ₂ CO ₃	0% ^{a,b}	0% ^{a,b}
3	12	16	Cs ₂ CO ₃	0% ^{a,b}	0% ^{a,b}
4	12	16	NaOH	0% ^{a,b}	0% ^{a,b}
5	13	17	DIPEA	79.2 \pm 0.3% ^a	0% ^{a,b}
6	14	18	DIPEA	83.2 \pm 1.1% ^a	11.1 \pm 0.2% ^a
7	15	19	DIPEA	77.4 \pm 0.4% ^a	9.8 \pm 1.3% ^a

^aReaction at room temperature.

^bReaction at 90°C.

Content of free [^{18}F]fluoride as well as reaction products were analyzed by thin layer chromatography (TLC, PolyGram Sil G/UV254, Macherey–Nagel, Dueren, Germany) and analyzed on a Cyclone Plus phosphorimager (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Radio-HPLC was performed using an Agilent 1,260 series system (Agilent, Santa Clara, USA), with a reverse-phase analytical column (Luna C18(2), 100 Å, 250 \times 4.6 mm, 5 μm ; Phenomenex, Torrance, California, USA) connected to a Flow Count detection system (Model 106, Eckert & Ziegler, Berlin, Germany) equipped with a diode detector (B-FC-3500-A, Eckert & Ziegler, Berlin, Germany). The mobile phases comprised CH₃CN and water (+ 0.1% TFA) and the flow rate was 1 ml/min. The standard gradient program started with 5% CH₃CN for 2 min. The CH₃CN component was then increased to 100% over 15 min, where it was maintained for a further 6 min.

Sep-Pak Plus Light QMA Carb (Waters, Waltham, MA, USA) was preconditioned with 10 ml 1 M NaHCO₃ solution, 10 ml air, 10 ml H₂O, and 10 ml air. Sep-Pak Plus Light C18 SPE cartridges (Waters) were preconditioned with 10 ml ethanol and 10 ml H₂O. SEP-Pak Alumina N (Waters) was preconditioned with 5 ml MeCN. The StraTA-X (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) was preconditioned with 1 ml MeOH and equilibrated with 1 ml H₂O. For filtration, we used a 0.45 μm Polypropylene filter from Whatman (GE Healthcare UK Limited, UK).

3.3 | General procedure for fluoride preparation

The [^{18}F]fluoride preparation was performed with our presented module. Aqueous [^{18}F]fluoride was immobilized on a bicarbonate preconditioned QMA cartridge and eluted using an argon line into a glass reactor containing 2.5 ml of phenyl triflimide with 0.7 ml of 0.1 M K₂SO₄. Argon flow was maintained over the course of the reaction and

was bubbled through for 10 min at 50°C. The generated triflyl fluoride was allowed to pass through a cartridge filled with MgSO₄ and P₄O₁₀. The trapping solution containing TBA-HCO₃ in DMF or KHCO₃/K₂.2.2. in MeCN. Non-trapped [^{18}F]triflyl fluoride (**2**) was trapped onto an Ascarite cartridge that was connected to the system exhaust. The trapped [^{18}F]triflyl fluoride (**2**) converts to an K[^{18}F]F-K₂.2.2. complex, which can be used without further purification for labeling.

3.3.1 | [^{18}F]FEOTf preparation

Batch reactor synthesis

For the batch synthesis, aliquots of 160 μl of dried [^{18}F]fluoride were premixed with 5 μl ethylene sulfite (**7**) before being transferred to a glass reaction vial. Reaction times of 1, 3, 5, and 10 min at 70, 90, and 110°C were investigated. After cooling to 50°C, a solution of 10 μl Tf₂O in 500 μl dry MeCN was added. The mixture was reacted at room temperature for 5 min. The purification was performed manually, pushing the reaction mixture through a Sep-Pak alumina cartridge. Every condition was quantified via radio-TLC and HPLC. The results are summarized in Table 5.

Microfluidic reaction

The flow synthesis system of [^{18}F]FEOTf consists of our syringe pump, a 6-way valve with a built-in PEEK loop (160 μl), a pressure sensor, a pressure regulator, one 3D-printed PEEK reactor (900 μl) and a 15 ml falcon-tube for collection. Acetonitrile was used as a solvent and is continuously delivered to the system from a 10 ml glass syringe (Hamilton Gastight Syringe Model 1010 TLL) by the syringe pump. Aliquots of 160 μl of the dry [^{18}F]fluoride solution were premixed with 5 μl ethylene sulfite (**10**). The pressure of the system was set to 3 bar. The reaction mixture was manually injected into the loop

Temperature [°C]	Residence time [min]	RCC batch [%]	RCY batch [%]
90	1	48.2	42.6
90	3	69.6	52.9
90	5	77.3	55.3
90	10	76.1	61.0

TABLE 5 Results of the batch synthesis of 2-^[18F]fluoroethanol (**8**).

Temperature [°C]	Residence time [min]	RCC flow [%]	RCY flow [%]
70	1	42.9	45.2
70	3	55.2	55.5
70	5	75.3	74.1
70	10	72.4	65.2
90	1	51.2	65.1
90	3	77.5	83.4
90	5	93.4	88.3
90	10	91.4	89.1
110	1	59.5	62.1
110	3	74.2	75.4
110	5	89.1	81.5
110	10	84.2	77.5

TABLE 6 Results of the flow synthesis of 2-^[18F]fluoroethanol (**8**).

Temperature [°C]	Residence time [min]	RCC batch [%]	RCY batch [%]
90	3	62.4	41.2
90	5	85.1	52.9
90	10	83.2	55.0
90	15	82.1	57.3

TABLE 7 Results of the batch synthesis of 2-^[18F]fluorotosylate (**11**).

(165 µl) of the 6-way valve, and into the running process by switching the 6-way valve. By changing the flow rate of the solvent, the residence or reaction time can be directly determined. Reaction times of 1, 3, 5, and 10 min at 70, 90, and 110°C were investigated. The reaction mixture is passed through the microreactor, into a 15 ml Falcon tube containing 500 µl dry MeCN and 10 µl Tf₂O. The purification was performed manually, pushing the reaction mixture through a Sep-Pak alumina cartridge. Each condition was quantified via radio-TLC and HPLC. The results are summarized in Table 6.

3.3.2 | [¹⁸F]FEOTs preparation

Batch reactor synthesis

For the batch synthesis, aliquots containing 150 µl of dry [¹⁸F]fluoride and 15 µl ethylene glycol bis-*p*-toluenesulfonate (**10**) were added to a glass reactor. The radiofluorination reactions were carried out at 70, 90, and 110°C. The reaction time was set to 5, 10, and 15 min. The quality of the fluorination of each condition was

quantified via radio-TLC and HPLC. After cooling to around 50°C, the reaction mixtures were diluted with 500 µl 12mM acetic acid solution. The diluted mixture was passed through a 0.45 µm filter, which was connected to a preconditioned C18 SPE cartridge. The [¹⁸F]FEOTs (**8**) was then eluted from the SPE cartridge with 35% methanol in water and further trapped on a second Strata-X cartridge. The purified [¹⁸F]FEOTs can then be eluted into a reactor with acetonitrile. Each condition was quantified via radio-TLC and HPLC. The results are summarized in Table 7.

Microfluidic reaction

The flow synthesis system comprised a syringe pump, a 6-way valve (Rheodyne 7725i or 7,125 with manual injector) with a built-in PEEK loop (160 µl), a pressure sensor, a pressure regulator, two 3D-printed PEEK reactors (2 × 900 µl), a 0.45 µm filter and two cartridges (Sep-Pak Plus Light C18 and StrataX SPE cartridge). Acetonitrile is used as a solvent and is continuously delivered to the system from a 10 ml glass syringe (Hamilton Gastight Syringe Model 1010 TLL) by the syringe pump. All

TABLE 8 Results of the flow synthesis of 2-¹⁸F]fluorotosylate (**11**).

Temperature [°C]	Residence time [min]	RCC flow [%]	RCY flow [%]
70	3	47.2	39.5
70	5	64.2	47.8
70	10	70.6	49.2
70	15	71.1	48.2
90	3	63.2	53.1
90	5	85.1	54.8
90	10	86.3	55.4
90	15	70.9	53.1
110	3	55.3	47.2
110	5	74.2	48.5
110	10	75.5	51.2
110	15	71.3	49.4

components are connected using ETFE capillaries with an inner diameter of 0.5 mm and flangeless flat bottom 1/4"-28 fittings. The use of a 6-way valve allows pressure to be applied to the system at continuous flow. The pressure sensor is connected between the 6-way valve and the pump to avoid unnecessary radioactive contamination and unnecessary dead volume. Aliquots of 150 µl dry [¹⁸F]fluoride were mixed with 15 µl ethylene glycol bis-*p*-toluenesulfonate (**10**). The pressure of the system was set to 3 bar. The reaction mixture was manually injected into the loop (165 µl) of the 6-way valve, and into the running process by switching the 6-way valve. By changing the flow rate of the solvent, the residence or reaction time can be directly determined. Reaction times of 5, 10, and 15 min at 70, 90, and 110°C were investigated. The reaction mixture was passed through a dilution reactor, diluted with a continuous flow of 12mM acetic acid solution. The flow rate was set to 720 µl/min, which is sufficient to ensure that the reaction mixture was diluted five-fold, ending up with a residence time of 1 min. The diluted mixture was then passed through a 0.45 µm filter, which was connected to a preconditioned C18 SPE cartridge. The waters C18 SPE cartridge was disconnected and manually connected to a StrataX SPE cartridge and elution was performed as mentioned for the batch synthesis. Each condition was quantified via radio-TLC and HPLC. The results are summarized in Table 8.

3.4 | Synthesis of reference compounds

3.4.1 | Synthesis of 1-(2-fluoroethoxy)-4-methoxybenzene (**21**)

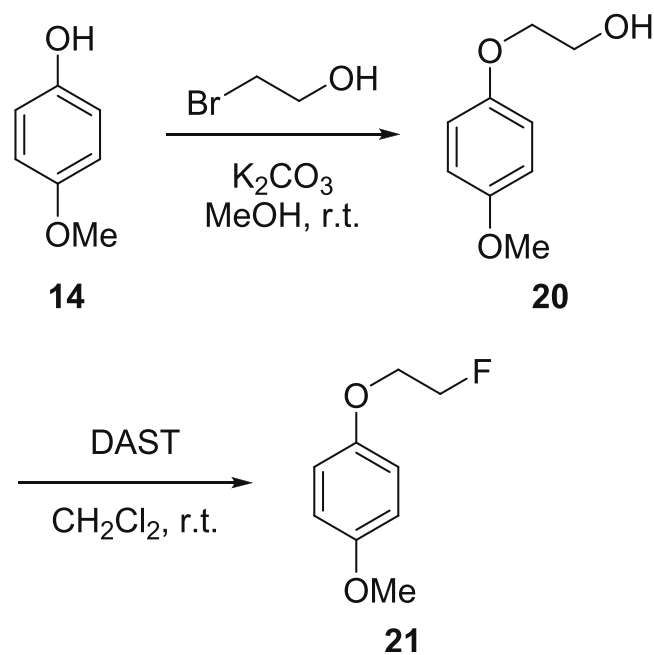
Synthesis of 2-(4-methoxyphenyl)-ethan-1-ol (**20**)³¹
4-Methoxyphenol (0.250 g; 2.01 mmol; 1 eq.) and potassium carbonate (0.830 g; 6.03 mmol; 3 eq.) were

suspended in methanol. Then, 2-bromoethanol (0.44 ml; 6.03 mmol; 3 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at r.t. for 3 days. After the addition of water (10 ml), the reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 15 ml). The combined organic phases were washed with saturated aqueous NaHCO₃ solution (10 ml) and saturated NaCl solution (10 ml) and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product **20** was purified by column chromatography (PE/EA 1:1; R_f = 0.13). Yield: 64% (0.217 g; 1.29 mmol; 64%) (Scheme 3).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.86 (m; 4H; H₂, H₃, H₅, H₆); 4.04 (m; 2H; H-8); 3.94 (m; 2H; H-7); 3.78 (s; 3H; CH₃); 2.10 (s; 1H; OH). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 154.1 (C-4); 152.7 (C-1); 115.6 (C-2, C-6); 114.7 (C-3, C-5); 69.9 (C-8); 61.6 (C-7); 55.7 (OCH₃). MS: m/z [M + Na]⁺ = 191.02; m/z [M + K]⁺ = 206.98; m/z [2 M + Na]⁺ = 359.12.

Synthesis of 1-(2-fluoroethoxy)-4-methoxybenzene (**21**)³²
Under a nitrogen atmosphere, compound **20** (0.217 g; 1.29 mmol; 1 eq) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (1 ml) in a reaction flask. Diethylamino sulfur trifluoride (DAST) (0.34 ml; 2.58 mmol; 2 eq.) was then added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. After the slow addition of methanol (5 ml) and saturated NaHCO₃ solution (10 ml), the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 15 ml). The combined organic phases were washed with saturated NaCl solution (10 ml) and dried over Na₂SO₄. After removal of the solvent under reduced pressure, the crude product was purified by column chromatography (SiO₂ with PE/EA 1:1; R_f = 0.50) to give 1-(2-fluoroethoxy)-4-methoxybenzene (**21**). Yield: 42% (0.093 g; 0.548 mmol).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.87 (m; 4H; H₂, H₃, H₅, H₆); 4.82–4.65 (m; 2H; H-8); 4.23–4.12 (m; 2H; H-7); 3.78 (s; 3H; CH₃). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):



SCHEME 3 Synthesis of 1-(2-fluoroethoxy)-4-methoxybenzene (21).

δ [ppm] = 154.2 (C-4); 152.5 (C-1); 115.8 (C-2, C-6); 114.7 (C-3, C-5); 82.1 (d; $J = 170.9$ Hz; C-8); 67.9 (d; $J = 20.5$ Hz; C-7); 55.7 (OCH_3). **MS:** m/z $[M + Na]^+ = 193.02$. **HPLC-retention time:** 15.158 min.

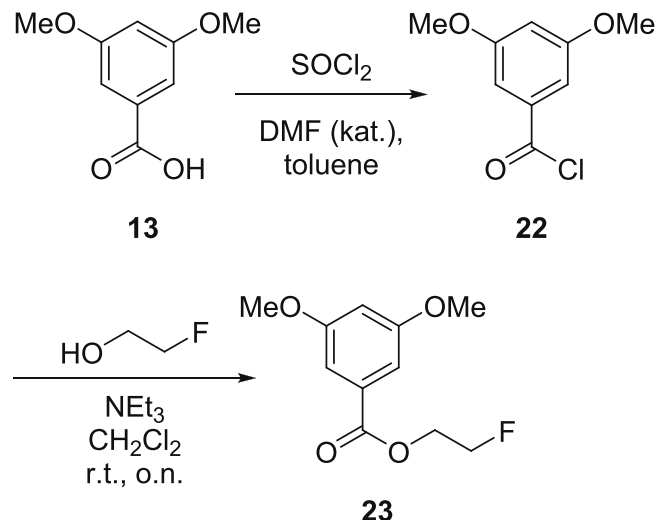
3.4.2 | Synthesis of 2-fluoroethyl-3,5-dimethoxy benzoate (23)

*Synthesis of 3,5-dimethoxy benzoyl chloride (22)*³³

3,5-Dimethoxybenzoic acid (5.00 g; 27.4 mmol; 1 eq.) was placed in a reaction flask, dissolved in toluene (50 ml), and placed under argon. To this mixture, thionyl chloride (2.4 ml; 32.9 mmol; 1.2 eq.) and catalytic amounts of DMF were added. The reaction solution was then stirred at 100°C for 6 h. After cooling, the solvent was removed under reduced pressure. The acid chloride **22** was used without further purification or analysis (Scheme 4).

*Synthesis of 2-fluoroethyl-3,5-dimethoxy benzoate (23)*³⁴

Under nitrogen atmosphere, **22** (2.68 g; 13.33 mmol; 1 eq.) was placed in a reaction flask and dissolved in dry CH_2Cl_2 (17 ml). Triethylamine (3.5 ml; 25.3 mmol; 1.9 eq.) and 2-fluoroethanol (0.85 ml; 14.1 mmol; 1.05 eq.) were then added and stirred overnight at r.t. After adding water (15 ml), the organic phase was washed with saturated $NaHCO_3$ solution (2 \times 15 ml), saturated $NaCl$ solution (15 ml) and dried over Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure. The crude product obtained was



SCHEME 4 Synthesis of 2-fluoroethyl-3,5-dimethoxy benzoate (23).

purified by column chromatography (SiO_2 with PE/EA 5:1; $R_f = 0.40$) to afford **25**. Yield: 72% (2.20 g; 9.64 mmol).

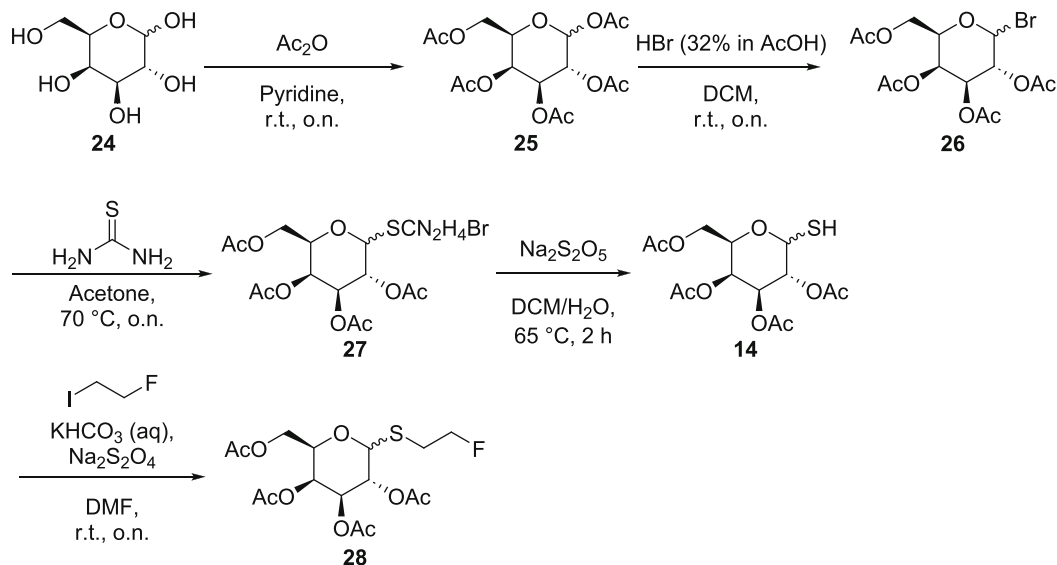
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.22 (d; $J = 2.3$ Hz; 2H; H-6, H-2); 6.67 (t; $J = 2.3$ Hz; 1H; H-4); 4.74 (m; 2H; H-9); 4.56 (m; 2H; H-8); 3.84 (s; 6H; CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 166.1 (C-7); 160.7 (C-3, C-5); 131.5 (C-1); 107.3 (C-2, C-6); 106.0 (C-4); 82.3 (d; $J = 170.4$ Hz; C-9); 64.0 (d; $J = 20.5$ Hz; C-8); 55.6 (C-10, C-11). **MS:** m/z $[M + H]^+ = 229.06$; m/z $[M + Na]^+ = 251.05$; m/z $[M + K]^+ = 267.02$; m/z $[2 M + Na]^+ = 479.07$. **HPLC-retention time:** 15.928 min.

3.4.3 | Synthesis of 2-fluoroethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-D-galactopyranoside (28)

*Synthesis of 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-D-galactopyranose (25)*³⁵

Under a nitrogen atmosphere, D-galactose (5.02 g, 27.8 mmol, 1 eq.) was suspended in pyridine (26 ml) and stirred at 0°C for 10 min. Acetic anhydride (27 ml, 287 mmol, 10, 3 eq) was then added slowly and stirred overnight at r.t. Ice water (20 ml) and saturated $NaHCO_3$ solution (50 ml) was added and the aqueous phase was extracted with EA (ethyl acetate) (2 \times 50 ml). The organic phase was washed with water (30 ml), 10% HCl (2 \times 15 ml), saturated $NaHCO_3$ solution (5 \times 15 ml), saturated $NaCl$ solution (2 \times 15 ml), and dried over Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (SiO_2 with PE/EA [petroleum ether/ethyl acetate] 3:2, $R_f = 0.27$). Yield (**25**): 94% (10.2 g, 26.1 mmol) (Scheme 5).



SCHEME 5 Synthesis of 2-flourethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-D-galactopyranoside (**28**).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.37 (m, 1H); 5.50 (m, 1H); 5.33 (m, 2H); 4.34 (m, 1H); 4.10 (m, 2H); 2.15 (m, 6H); 2.04 (s, 3H); 2.01 (s, 3H); 2.00 (s, 3H). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.3; 170.1; 169.9; 169.3; 168.9 (5C, C=O); 89.7; 68.7; 67.4; 67.3; 61.2; 20.9 (CH₃); 20.6 (CH₃); 20.6 (CH₃); 20.6 (CH₃); 20.5 (CH₃). **MS**: m/z [M + Na]⁺ = 413.12; m/z [M + K]⁺ = 429.0.

Synthesis of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-galactopyranosyl bromide (**26**)³⁵

Under a nitrogen atmosphere, 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-D-galactopyranose (**25**) (4.06 g; 10.4 mmol; 1 eq) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (30 ml) in a round bottom flask. Subsequently, 32% HBr in glacial acetic acid (30 ml; 168 mmol; 16.8 eq) was added and the reaction solution was stirred overnight at r.t. The reaction was quenched by the addition of water (80 ml) and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 50 ml). The combined organic phase was mixed with saturated NaHCO₃ solution (3 × 50 ml), saturated NaCl solution (50 ml), and dried over Na₂SO₄. After removing the solvent in vacuo, 79% of **26** (3.38 g; 8.22 mmol) was obtained. Compound **26** was used without further purification or analysis.

Synthesis of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-galactopyranosyl-1-isothio-uronium bromide (**27**)³⁵

Under nitrogen atmosphere, Tetrabromo-glucose **26** (3.35 g; 8.16 mmol; 1 eq) was suspended together with thiourea (0.94 g; 12.34 mmol; 1.5 eq) in a round bottom flask in dry acetone (40 ml). The reaction mixture was heated to 70°C overnight. After cooling, CH₂Cl₂ (50 ml) and water (30 ml) were added and the organic phase was washed with saturated NaHCO₃ solution (2 × 30 ml) and saturated NaCl solution (30 ml). After drying over Na₂SO₄, the solvent was removed under reduced pressure

to give 99% of **27** (3.97 g; 8.15 mmol). Compound **27** was used without further purification or analysis.

Synthesis of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-D-galactopyranoside (**14**)³⁵

Under nitrogen atmosphere, **27** (3.97 g; 8.15 mmol; 1 eq) was suspended together with sodium disulfite (2.02 g; 10.6 mmol; 1.3 eq) in a round bottom flask in CH₂Cl₂/water (70 ml, 3:2). The reaction mixture was heated to 65°C for 2.5 h. After cooling, the phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 50 ml). The combined organic phase was washed with water (2 × 40 ml) and dried over Na₂SO₄. After removing the solvent under reduced pressure, the crude product was purified by column chromatography (SiO₂ with PE/EA 1:1, R_f = 0.42) to afford 66% of the desired product **14** (1.97 g, 5.38 mmol).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.44 (dd, J = 3.4 Hz, J = 0.9 Hz, 1H, H-4); 5.19 (dd, J = 9.9 Hz, J = 9.9 Hz, 1H, H-2); 5.02 (dd, J = 9.9 Hz, J = 3.4 Hz, 1H, H-3); 4.54 (dd, J = 9.9 Hz, J = 9.9 Hz, 1H, H-1); 4.13 (d, J = 6.5 Hz, 2H, H-6); 3.95 (td, J = 6.5 Hz, J = 0.9 Hz, 1H, H-5); 2.37 (d [α, β], 1H, SH); 2.17 (s, 3H, CH₃); 2.09 (s, 3H, CH₃); 2.05 (s, 3H, CH₃); 1.99 (s, 3H, CH₃). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.4; 170.1; 170.0; 169.8 (4C, C=O); 79.2 (C-1); 78.0 (C-5); 71.6 (C-3); 70.8 (C-2); 67.2 (C-4); 61.5 (C-6); 20.8 (CH₃); 20.7 (CH₃); 20.7 (CH₃); 20.6 (CH₃). **MS**: m/z [M + Na]⁺ = 387.10.

Synthesis of 2-flourethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-D-galactopyranoside (**28**)³⁶

The thiol **14** (0.250 g; 0.69 mmol; 1 eq) was dissolved in DMF (4 ml) under a nitrogen atmosphere. After cooling to 0°C, saturated NaHCO₃ solution (4 ml), sodium dithionite (0.120 g; 0.69 mmol; 1 eq), and 1-iodo-

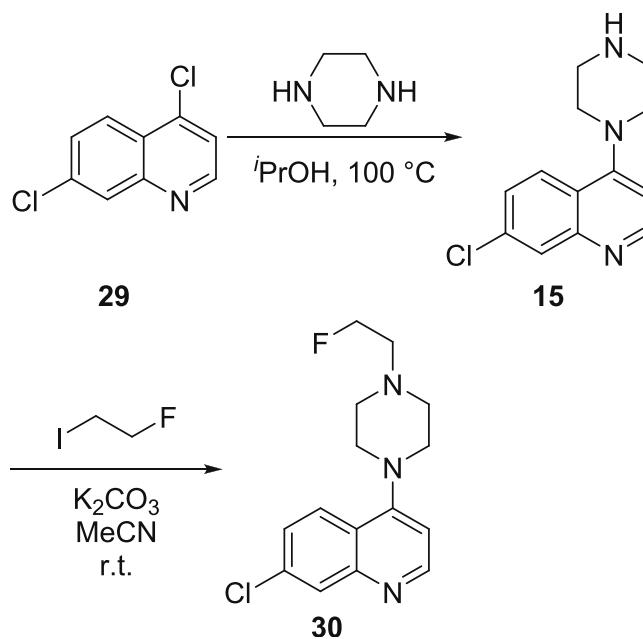
2-fluoroethane (0.240 g; 0.11 ml; 1.38 mmol; 2 eq.) were added. The reaction mixture was stirred overnight at r.t. After adding water (10 ml) and saturated NaCl solution (10 ml), the aqueous phase was extracted with EA (3 × 20 ml). The combined organic phase was washed repeatedly with saturated NaCl solution (20 ml), water (20 ml) and dried over Na₂SO₄. After removing the solvent under reduced pressure, the crude product was recrystallized (PE/EA 1:1) to give 57% of the product **28** (0.163 g; 0.397 mmol).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.44 (dd; *J* = 3.4 Hz; *J* = 1.0 Hz; 1H; *H*-4); 5.23 (dd; *J* = 10.0 Hz; *J* = 10.0 Hz; 1H; *H*-2); 5.05 (dd; *J* = 10.0 Hz; *J* = 3.4 Hz; 1H; *H*-3); 4.71–4.47 (m; 2H; *H*-8); 4.54 (d; *J* = 10.0 Hz; 1H; *H*-1); 4.13 (m; 2H; *H*-6); 3.94 (td; *J* = 7.0 Hz; *J* = 1.0 Hz; 1H; *H*-5); 3.16–2.79 (m; 2H; *H*-7); 2.16 (s, 3H, CH₃); 2.08 (s, 3H, CH₃); 2.05 (s, 3H, CH₃); 1.99 (s, 3H, CH₃). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.3; 170.1; 170.0; 169.6 (4C, C=O); 84. (C-1); 82.9 (d; *J* = 170.9 Hz; C-8); 74.6 (C-5); 71.7 (C-3); 67.2 (C-4); 67.1 (C-2); 61.4 (C-6); 29.8 (d; *J* = 22.0 Hz; C-7); 20.7 (CH₃); 20.6 (CH₃); 20.6 (CH₃); 20.5 (CH₃). **MS**: *m/z* [M + Na]⁺ = 433.09; *m/z* [M + K]⁺ = 449.0 **HPLC-retention time**: 14.774 min.

3.4.4 | Synthesis of 7-chloro-4-(4-[2-fluoroethyl]piperazine-1-yl)quinoline (30)

*Synthesis of 7-chloro-4-(piperazine-1-yl)-quinoline (15)*³⁷ 4,7-Dichloroquinoline (5.28 g; 26.6 mmol; 1 eq.) and piperazine (3.44 g; 40.0 mmol; 1.5 eq.) were dissolved in 2-propanol (20 ml) and heated to 100°C for 5.5 h. After cooling to r.t., EA (40 ml) was added and the suspension was filtered. The filtrate was washed with water (2 × 20 ml) and dried over Na₂SO₄. After removing the solvent under reduced pressure, the starting material was separated from the product by column chromatography (SiO₂ with PE/EA 3:2; *R*_f [starting material] = 0.66). Product **15** (1.80g; 7.26 mmol; 27%) was eluted from the column by changing the solvent to methanol (*R*_f [product] = 0.18) (Scheme 6).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.72 (d; *J* = 5.0 Hz; 1H; *H*-2); 8.04 (d; *J* = 2.1 Hz; 1H; *H*-8); 7.95 (d; *J* = 9.0 Hz; 1H; *H*-5); 7.42 (dd; *J* = 9.0 Hz; *J* = 2.1 Hz; 1H; *H*-6); 6.84 (d; *J* = 5.0 Hz; 1H; *H*-3); 3.19 (m, 8H; *H*-9, *H*-10, *H*-11, *H*-12); 2.35 (s; 1H; *NH*). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 157.2 (C-4); 151.9 (C-2); 150.2 (C-7); 134.9 (C-8a); 128.9 (C-8); 126.1 (C-6); 125.1 (C-5); 121.9 (C-4a); 109.0 (C-3); 53.3 (C-9, C-12); 45.9 (C-10, C-11). **MS**: *m/z* [M + H]⁺ = 248.10.



SCHEME 6 Synthesis of 7-chloro-4-(4-[2-fluoroethyl]piperazine-1-yl)quinoline (**30**).

*Synthesis of 7-chloro-4-(4-[2-fluoroethyl]piperazin-1-yl)quinoline (30)*³⁷

15 (0.500 g; 2.02 mmol; 1 eq.) together with potassium carbonate (0.420 g; 3.04 mmol; 1.5 eq.) were dissolved in dry MeCN (8 ml) under a nitrogen atmosphere. Next, 1-fluoro-2-iodoethane (0.2 ml; 2.44 mmol; 1.2 eq.) was added and the reaction mixture was stirred overnight at r.t. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was taken up in CH₂Cl₂ (50 ml). The organic phase was washed with water (3 × 20 ml), saturated NaHCO₃ solution (2 × 20 ml), saturated NaCl solution (20 ml), and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂ with EA/MeOH 1:3; *R*_f = 0.45) to give 44% of product **30** (0.264 g; 0.90 mmol).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.70 (d; *J* = 5.0 Hz; 1H; *H*-2); 8.03 (d; *J* = 2.1 Hz; 1H; *H*-8); 7.93 (d; *J* = 9.0 Hz; 1H; *H*-5); 7.40 (dd; *J* = 9.0 Hz; *J* = 2.1 Hz; 1H; *H*-6); 6.83 (d; *J* = 5.0 Hz; 1H; *H*-3); 4.64 (dt; *J*_{HF} = 47.7 Hz; *J* = 4.9 Hz; 2H; *H*-14); 3.26 (t; *J* = 4.8 Hz; 4H; *H*-9, *H*-12) 2.84 (t; *J* = 4.8 Hz; 2H; *H*-10, *H*-11); 2.84 (dt; *J*_{HF} = 28.5 Hz; *J* = 4.9 Hz; 2H; *H*-13). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 156.9 (C-4); 151.8 (C-2); 150.0 (C-7); 134.9 (C-8a); 128.7 (C-8); 126.1 (C-6); 125.1 (C-5); 121.8 (C-4a); 108.9 (C-3); 81.9 (d; *J* = 168.0 Hz; C-14); 58.1 (d; *J* = 19.8 Hz; C-13); 53.3 (C-10, C-11); 52.0 (C-9, C-12). **MS**: *m/z* [M + H]⁺ = 294.05. **HPLC-retention time**: 8.433 min.

4 | CONCLUSION

Process automation increases both safety and the efficiency of laboratory work. We have shown that it is possible to accomplish this using 3D printing technology with minimal financial investment. Automated flow applications such as our introduced [^{18}F]fluoride drying module generating [^{18}F]triflyl fluoride reduce laboratory personnel exposure and help create safer working conditions, while providing a more reliable [^{18}F]fluoride source than the standard azeotropic drying method. Our automated drying process obtained a [^{18}F]fluoride recovery of 92% within 10 min. In addition, we have presented flow processes for the prosthetic ligands [^{18}F]FEOTs and [^{18}F]FEOTf on an affordable, open access available module, which provides similar or even better results than reported conventional reactor syntheses. In particular, the synthesis process of [^{18}F]FEOTf proved to be extremely successful and promising. This useful prosthetic ligand was reliably obtained after a synthesis time of only 7 min with an RCC of 92% and an RCY of 79%. Compared with the reported conventional method, the synthesis time was shortened by half, the radiochemical yield (RCY) and the radiochemical conversion (RCC) were slightly improved. The continuous flow system generated fewer byproducts, making subsequent purifications easier. In addition, compared with the already known automated process for [^{18}F]FEOTs, the flow process of [^{18}F]FEOTf is much easier to handle, while offering a more reactive ligand for [^{18}F]fluoroalkylation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Karl und Anna Buck Stiftung for funding this work. We also thank the team of Dr. Gerald Reischl for the delivery of [^{18}F]fluoride. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Florian Menzel  <https://orcid.org/0000-0002-1400-549X>
Jonathan Cotton  <https://orcid.org/0000-0002-2727-7945>
Thomas Ziegler  <https://orcid.org/0000-0002-2922-8506>
Andreas Maurer  <https://orcid.org/0000-0003-2412-5361>
Jochen M. Neumaier  <https://orcid.org/0000-0002-7996-1490>

REFERENCES

- Plutschack MB, Pieber B, Gilmore K, Seeberger PH. The Hitchhiker's guide to flow chemistry. *Chem Rev.* 2017;117(18):11796-11893. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00183
- Gutmann B, Kappe CO. Forbidden chemistries — paths to a sustainable future engaging continuous processing. *J Flow Chem.* 2017;7(3-4):65-71. doi:10.1556/1846.2017.00009
- Hughes DL. Applications of flow chemistry in the pharmaceutical industry—highlights of the recent patent literature. *Org Process Res Dev.* 2020;24(10):1850-1860. doi:10.1021/acs.oprd.0c00156
- Bogdan AR, Dombrowski AW. Emerging trends in flow chemistry and applications to the pharmaceutical industry. *J Med Chem.* 2019;62(14):6422-6468. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01760
- Wegner J, Ceylan S, Kirschning A. Ten key issues in modern flow chemistry. *Chem Commun.* 2011;47(16):4583-4592. doi:10.1039/C0CC05060A
- Zhang J, Wang K, Teixeira AR, Jensen KF, Luo G. Design and scaling up of microchemical systems: a review. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2017;8(1):285-305. doi:10.1146/annurev-chembioeng-060816-101443
- Berton M, de Souza JM, Abdiaj I, McQuade DT, Snead DR. Scaling continuous API synthesis from milligram to kilogram: extending the enabling benefits of micro to the plant. *J Flow Chem.* 2020;10(1):73-92. doi:10.1007/s41981-019-00060-x
- Dong Z, Wen Z, Zhao F, Kuhn S, Noël T. Scale-up of micro- and milli-reactors: an overview of strategies, design principles and applications. *Chem Eng Sci: X.* 2021;10:100097. doi:10.1016/j.cesx.2021.100097
- Unterweger MP, Fitzgerald R. Corrigendum to “update of NIST half-life results corrected for ionization chamber source-holder instability” [Appl. Radiat. Isot. 87 (2014) 92-94]. *Appl Radiat Isot.* 2020(159):108976. doi:10.1016/j.apradiso.2019.108976
- Menzel F, Cotton J, Klein T, Maurer A, Ziegler T, Neumaier JM. FOMSy: 3D-printed flexible open-source microfluidic system and flow synthesis of PET-tracer. *J Flow Chem.* 2023;13(3):247-256. doi:10.1007/s41981-023-00267-z
- Menzel F, Klein T, Ziegler T, Neumaier JM. 3D-printed PEEK reactors and development of a complete continuous flow system for chemical synthesis. *React Chem Eng.* 2020;5(7):1300-1310. doi:10.1039/D0RE00206B
- Lee SJ, Morales-Colón MT, Brooks AF, et al. SNAr Radiofluorination with in situ generated [^{18}F]Tetramethylammonium fluoride. *J Org Chem.* 2021;86(20):14121-14130. doi:10.1021/acs.joc.1c01491
- Kniess T, Laube M, Steinbach J. “Hydrous 18F-fluoroethylation” — leaving off the azeotropic drying. *Appl Radiat Isot.* 2017;127:260-268. doi:10.1016/j.apradiso.2017.06.010
- Gomzina NA, Zaitsev VV, Krasikova RN. Optimization of nucleophilic fluorination step in the synthesis of various compounds labelled with fluorine-18 for their use as pet radio-tracers. *J Label Compd Radiopharm.* 2001;44(S1):S895-S897. doi:10.1002/jlcr.25804401314
- Pees A, Sewing C, Vosjan MJWD, et al. Fast and reliable generation of [^{18}F]triflyl fluoride, a gaseous [^{18}F]fluoride source. *Chem Commun.* 2018;54(72):10179-10182. doi:10.1039/C8CC03206H
- Zhou D, Katzenellenbogen JA. A simple method to generate [^{18}F]triflyl fluoride for 18F radiosynthesis. *Tetrahedron Lett.* 2021;78:153273. doi:10.1016/j.tetlet.2021.153273
- Dahl K, Garcia A, Stephenson NA, Vasdev N. “In-loop” 18F-fluorination: a proof-of-concept study. *J Label Compd Radiopharm.* 2019;62(7):292-297. doi:10.1002/jlcr.3751

18. Peters T, Vogg A, Oappel IM, Schmaljohann J. Simple and efficient synthesis of 2-[(18F)fluoroethyl triflate for high yield (18F)fluoroethylation. *Appl Radiat Isot.* 2014;94:141-146. doi:10.1016/j.apradiso.2014.07.016
19. van der Born D, Pees A, Poot AJ, Orru RVA, Windhorst AD, Vugts DJ. Fluorine-18 labelled building blocks for PET tracer synthesis. *Chem Soc Rev.* 2017;46(15):4709-4773. doi:10.1039/C6CS00492J
20. Kiesewetter DO, Carson RE, Jagoda EM, Herscovitch P, Eckelman WC. In vivo muscarinic binding of 3-(alkylthio)-3-thiadiazolyl tetrahydropyridines. *Synapse.* 1999;31(1):29-40. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(199901)31:13.0.CO;2-9
21. Schieferstein H, Piel M, Beyerlein F, et al. Selective binding to monoamine oxidase a: in vitro and in vivo evaluation of 18F-labeled β -carboline derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2015;23(3):612-623. doi:10.1016/j.bmc.2014.11.040
22. Trencsényi G, Kertész I, Krasznai ZT, et al. 2'[(18F)fluoroethylrhodamine B is a promising radiotracer to measure P-glycoprotein function. *Eur J Pharm Sci.* 2015;74:27-35. doi:10.1016/j.ejps.2015.03.026
23. Riss PJ, Hoehnemann S, Piel M, Roesch F. Two-step radiosynthesis of [18F]FE- β -CIT and [18F]PR04.MZ. *J Label Compd Radiopharm.* 2013;56(7):356-359. doi:10.1002/jlcr.3032
24. Pascali G, Nannavecchia G, Pitzianti S, Salvadori PA. Dose-on-demand of diverse 18F-fluorocholine derivatives through a two-step microfluidic approach. *Nucl Med Biol.* 2011;38(5):637-644. doi:10.1016/j.nucmedbio.2011.01.005
25. Knies T, Laube M, Brust P, Steinbach J. 2-[(18F)fluoroethyl tosylate — a versatile tool for building 18F-based radiotracers for positron emission tomography. *Med Chem Commun.* 2015;6(10):1714-1754. doi:10.1039/C5MD00303B
26. Block D, Coenen HH, Stöcklin G. The N.C.A. Nucleophilic 18F-fluorination of 1,N-disubstituted alkanes as fluoroalkylation agents. *J Label Compd Radiopharm.* 1987;24:1029-1042. doi:10.1002/jlcr.2580240904
27. Beyerlein F, Piel M, Höhnemann S, Rösch F. Automated synthesis and purification of [18F]fluoro-[di-deutero]methyl tosylate. *J Label Compd Radiopharm.* 2013;56(7):360-363. doi:10.1002/jlcr.3043
28. Amor-Coarasa A, Kelly JM, Babich JW. 3D-printed automation for optimized PET radiochemistry. *Sci Adv.* 2019;5(9):eaax4762. doi:10.1126/sciadv.aax4762
29. Barnes C, Nair M, Aboagye EO, Archibald SJ, Allott L. A practical guide to automating fluorine-18 PET radiochemistry using commercially available cassette-based platforms. *React Chem Eng.* 2022;7(11):2265-2279. doi:10.1039/D2RE00219A
30. Li S, Schmitz A, Lee H, Mach RH. Automation of the Radiosynthesis of six different 18F-labeled radiotracers on the AllinOne. *EJNMMI Radiopharm Chem.* 2016;1(1):15. doi:10.1186/s41181-016-0018-0
31. Sonawane RB, Sonawane SR, Rasal NK, Jagtap SV. Room-temperature, base-mediated selective synthesis of 2-(Arylamino)ethanols and 2-Aryloxyethanols. *SynOpen.* 2019;03(04):124-137. doi:10.1055/s-0039-1690334
32. S. Lal G, P. Pez G, J. Pesaresi R, M. Prozonic F. Bis(2-methoxyethyl)aminosulfur trifluoride: a new broad-spectrum deoxyfluorinating agent with enhanced thermal stability. *Chem Commun.* 1999;(2):215-216. doi:10.1039/A808517J
33. Dialer L, Petrovic D, Weigl U; *Process for the production of cannabidiol and delta-9-tetrahydrocannabinol.* international patent WO 2017/011210 A1. 19 January 2017.
34. Playa H, Lewis TA, Ting A, et al. Dilazep analogues for the study of equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 (ENT1 and ENT2). *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(24):5801-5804. doi:10.1016/j.bmcl.2014.10.026
35. Yu Z, Cui M, Yan J, You Y. One-pot synthesis of hyperbranched poly (amido amine) clicked with a sugar shell via Michael addition polymerization and thiol click reaction. *Sci China: Chem.* 2010;53(8):1663-1668. doi:10.1007/s11426-010-4050-8
36. Schwäbisch D, Hein M, Miethchen R. Organofluorine compounds and fluorinating agents. *J Fluorine Chem.* 2004;125(1):119-124. doi:10.1016/j.jfluchem.2003.11.006
37. Kurteva VB, Shivachev BL, Nikolova RP. Spontaneous conversion of O-tosylates of 2-(piperazin-1-yl)ethanols into chlorides during classical tosylation procedure. *R Soc Open Sci.* 2019;6(2):181840. doi:10.1098/rsos.181840

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Menzel F, Cotton J, Ziegler T, Maurer A, Neumaier JM. Open-source flow setup for rapid and efficient [¹⁸F]fluoride drying for automation of PET tracer syntheses. *J Label Compd Radiopharm.* 2024;67(2):40-58. doi:10.1002/jlcr.4080

Electronic Supplementary Information (ESI)

Open-source Flow Setup for Rapid and Efficient [¹⁸F]Fluoride Drying for Automation of PET Tracer Syntheses

Florian Menzel^{*,a,b}, Jonathan Cotton^{*,b,c}, Thomas Ziegler^a, Andreas Maurer^{b,c} and Jochen M. Neumaier^{**a}

^a Institute of Organic Chemistry, University of Tuebingen, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tuebingen, Germany.

^b Werner Siemens Imaging Center, Department of Preclinical Imaging and Radiopharmacy, Eberhard Karls University, Tuebingen, Roentgenweg 15, 72076 Tuebingen, Germany

^c Cluster of Excellence iFIT “Image-Guided and Functionally Instructed Tumor Therapies” (EXC 2180), University of Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany

*Shared first Authorship

**E-Mail: jochen.neumaier@uni-tuebingen.de

Table of contents

3D printer setup	2
Drying Module.....	3
Electronic setup of the drying module	5
Detailed step-by-step assembly instruction.....	8
NMR.....	14
HPLC.....	22
Notes and references	24

3D printer setup

Two 3D printers were used for this work. 3D-printed parts out of PLA (polylactic acid) and PETG (polyethylene terephthalate glycol-modified) were printed on an X-CF Pro from Qidi. 3D-printed parts out of PEEK (Polyetheretherketone) were printed on an Apium P220 from Apium Additive Technologies GmbH.

Software: All parts were designed with Autodesk Inventor Professional 2022. After modeling, the files were exported as STL files and sliced with the software simplify3D.

PEEK parts: The parts out of PEEK were printed with Apium PEEK 4000 Natural filament with an Apium P220 3D printer. The filament roll was dried in a vacuum oven at 80 °C and 50 mbar overnight to ensure proper drying of the PEEK.

Print speed = 25 mm/s

Extrusion width: 0.40 mm

Extrusion multiplier = 0.90

Nozzle temp. = 480 °C

Bed temperature = 130 °C, glass plate coated with DimaFix pen with a brim of 24 perimeters

Layer height: 0.1 mm

PETG parts: PETG 1.75 mm from Fiberlogy was used on the Qidi X-CF Pro 3D printer. The filament roll was stored in a sealed box with silica gel bags inside to ensure proper drying of the PETG.

The following settings were used:

Print speed = 60 mm/s

Extrusion multiplier = 1.00

Nozzle temp. = 230 °C

Bed temperature = 80 °C, printed on a flexible metal PEI sheet, coated with DimaFix Spray or pen.

Layer height: 0.2 – 0.3 mm

Nozzle diameter: 0.4 or 0.6 mm (0.6 mm was used for larger parts)

The STP and STL files of all printed parts can be found in the online supplementary information.

For more information also see our previous publications about 3D-printed flow equipment. ^[1],

[2], [3]

Drying Module

All 3D-printed parts were printed in PETG (bordeaux red). CAD drawings of the drying module unit can be found in **Figure S1**, the control unit and the complete drying module in **Figure S2**, and the full parts list in **Table S1**.

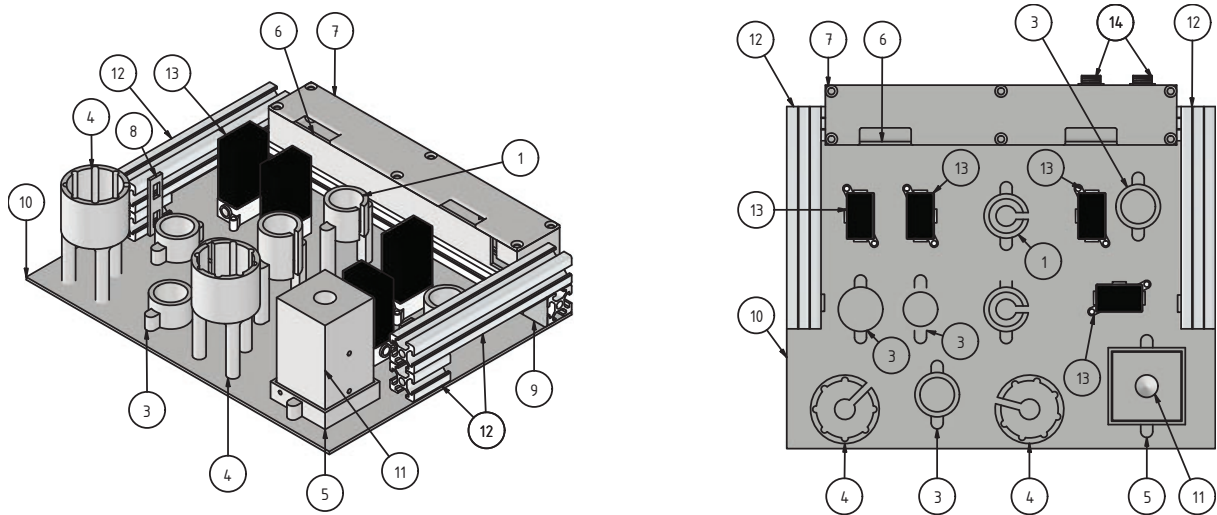


Figure S1: CAD drawings of the drying module unit.

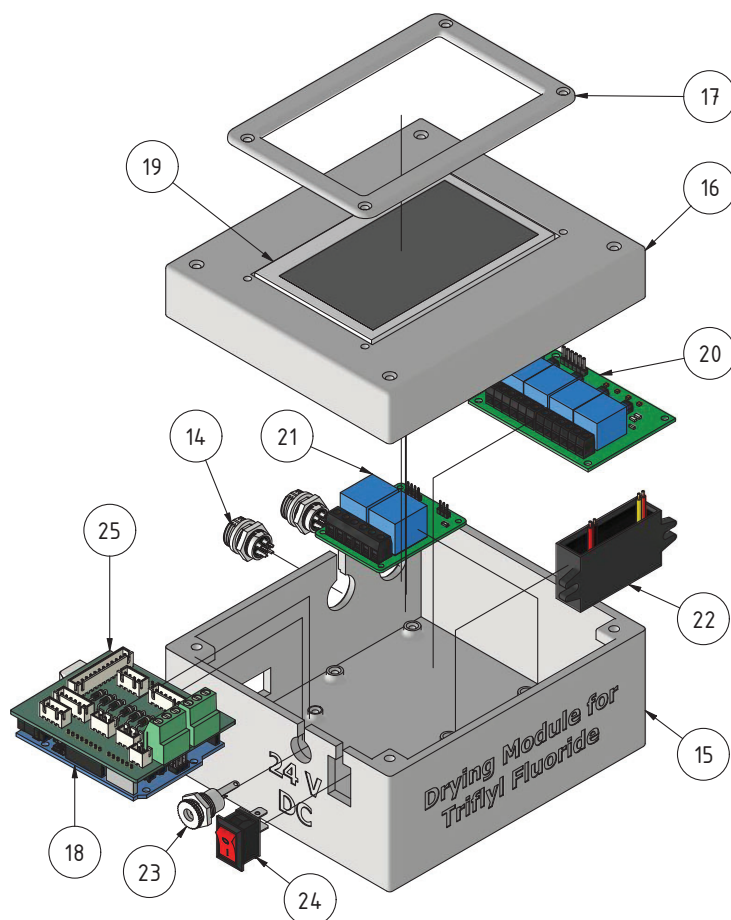


Figure S2: Exploded view CAD drawing of the control unit.

Table S1: Parts list for the drying module.

Quant.	Part	Source	No.
1	Holder QMA	3D-printed	1
1	Holder v-vial, high	3D-printed	2
4	Holder waste, v-vial low	3D-printed	3
2	Holder cartridge	3D-printed	4
1	Holder heating block	3D-printed	5
1	Cable box	3D-printed	6
1	Cable box lid	3D-printed	7
2	Profile connector straight	3D-printed	8
2	Profile connector 90 degree	3D-printed	9
2	Aluminium plate, 250×200×2 mm	In-house workshop	10
1	Heating block, aluminium	In-house workshop	11
1	Aluminium profile nut 6, 20×20 mm, 250 mm	Amazon	12.1
2	Aluminium profile nut 6, 20×20 mm, 130 mm	Amazon	12.2
2	Aluminium profile nut 6, 20×20 mm, 30 mm	Amazon	12.3
4	24 V 3-way-solenoid valve, Type 0127, Article No. 120433	Bürkert	13
4	GX16 aviation socket, Pins 5 and 8 (+ aviation plug on the cable)	Amazon	14.1
2	GX16 aviation cable, double female head, Pins 5 and 8	Ebay	14.2
1	Case control unit	3D-printed	15
1	Case lid	3D-printed	16
1	Display frame	3D-printed	17
1	Arduino UNO	Eckstein GmbH	18
1	Nextion NX4827P043 Display	Antratek Electronics	19
1	4 Channel Optocouplers Relay	Eckstein GmbH	20
1	2 Channel Optocouplers Relay	Eckstein GmbH	21
1	DC 8V-32V to 5V Voltage Converter	Amazon	22
1	DC-socket 2.1/5.5mm	Reichelt elektronik	23
1	Rocker switch, 3-Pin	Eckstein GmbH	24
1	Arduino shield for 6 24V devices V1.2 (selfmade with Kicad software)	JLCPCB PCB Manufacturing	25
	T-Nut hammer head + M4 countersunk screw	Amazon	26
	Threaded inserts M3 × 6	Amazon	27
	Hexagon Socket Head Cap Screws (ISO 4762), various sizes	In-house workshop	28
	Hexagon socket countersunk screws (ISO 10642), various sizes	In-house workshop	29

Quant.	Part	Source	No.
	Single output power supply 24 V, 2,5 A	Reichelt elektronik GmbH & Co. KG	30
	JST cable and sockets (3 pins, 4 pins, 6 pins, 12 pins)	Amazon	31
	0.25 mm ² and 0.5 mm ² stranded cables	Amazon	32
2	Plug-in screw terminal - 3-pin, RM 5 mm, 0°	Amazon	33
1	4.7 k Ohm resistor	Amazon	34
4	1N4007 Diode	Amazon	35
	Pin headers 2.54 mm	Amazon	36
	Jumper wires, female	Amazon	37
26	1/4"-28 flat bottom fitting, IDEX H&S XP-230	Techlab	38
9	Adapter Luer Lock male to 1/4"-28 female, IDEX H&S P-655	Techlab	39
3	Adapter Luer Lock female to 1/4"-28 female, IDEX H&S P-658	Techlab	40
1	Temperature sensor DS18B20	Amazon	41
1	24 V, 40 W heating cartridge	Amazon	42
	M3 grub screw	In-house workshop	43
	Pre-conditioned Sep-Pak Light QMA cartridge with CO ₃ ²⁻ as counter ions	ABX	44
	Wheaton V-Vial 5.0 mL, graduated, with screw cap and septum	neolab	45
	EasyVarioFlash D17 cartridge, 5 g	Götec Labortechnik GmbH	46
	PYREX® 13x100 mm Disposable Round Bottom Threaded Culture Tubes, with screw cap and septum	VWR	47
	Braun Sterican 0.8 × 120 mm	Amazon	48
	Braun Sterican 0.9 × 40 mm	Amazon	49
1	All-in-one base plate	3D-printed	50

Electronic setup of the drying module

For controlling the solenoid valves and the cartridge heater an Arduino Uno was used with a self-made controller shield attached. The electronic schematic and the PCB are shown in **Figure S3**. Due to the self-induction of the coil in the solenoid valve, a standard 1N4007 diode was used as a flyback diode. For the control of the temperature sensor, a 4.7k resistor was used.

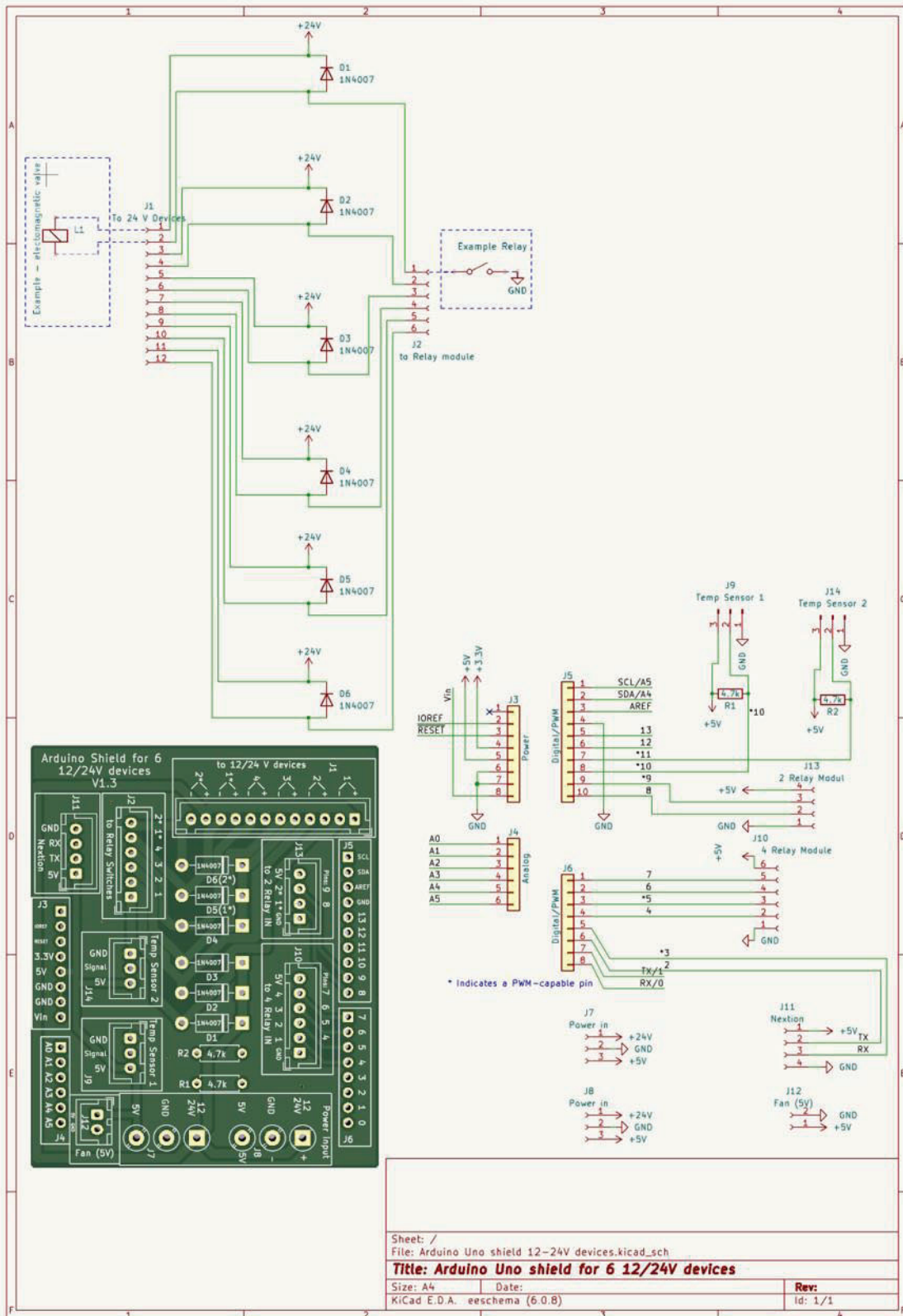


Figure S3: electronic schematic and PCB layout of the self-made Arduino shield.

For a constant voltage of 5 V for the Nextion Display and the temperature sensor, a DC 8V-32V to 5V Voltage Converter was used (No. 22). The shield was connected to a 24 V DC, 2.5 A power supply over a rocker switch, and a DC socket. The detailed assignment of the electronics is shown in **Figure S4**. All electronic parts were connected using standard JST cables and sockets with various pins.

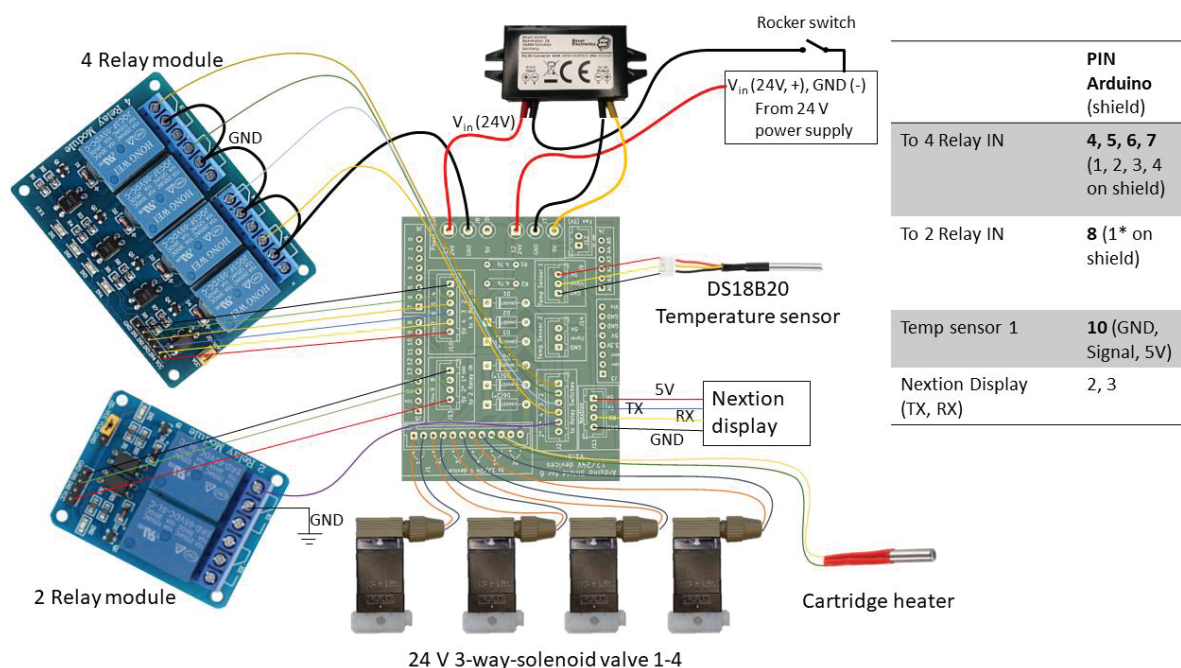


Figure S4: Wiring diagram of the Arduino shield with PIN assignment.

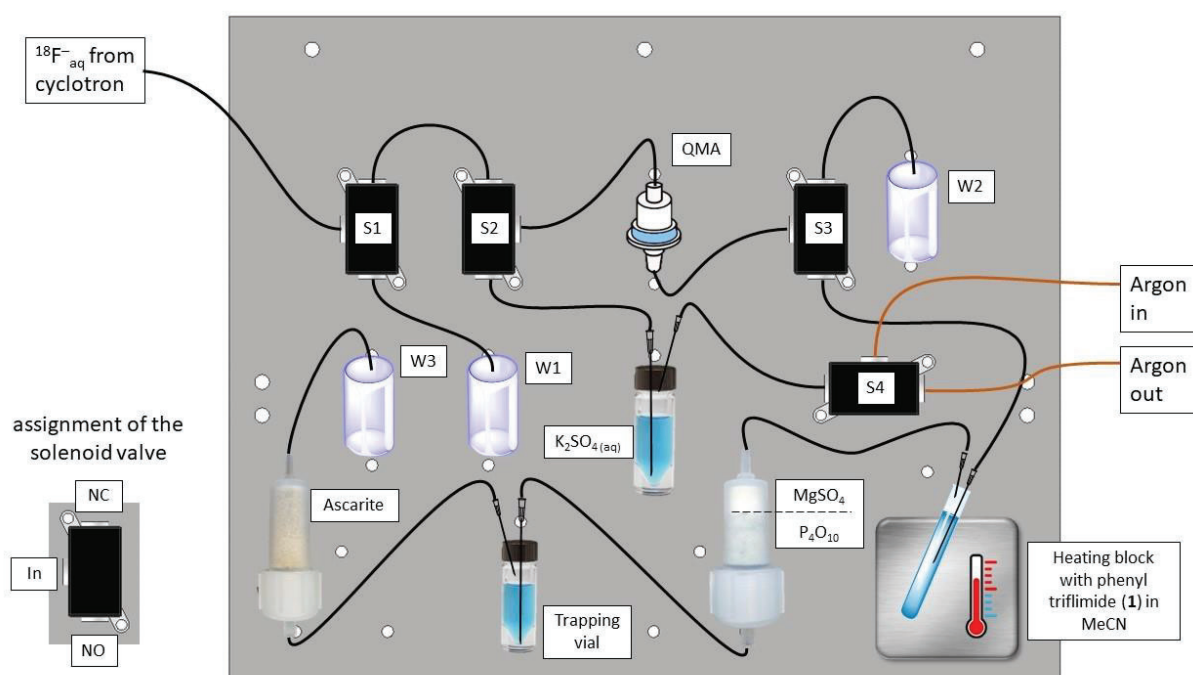

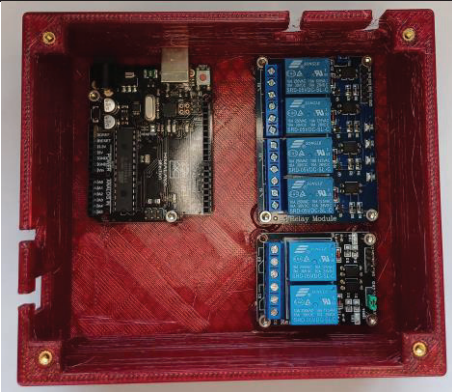



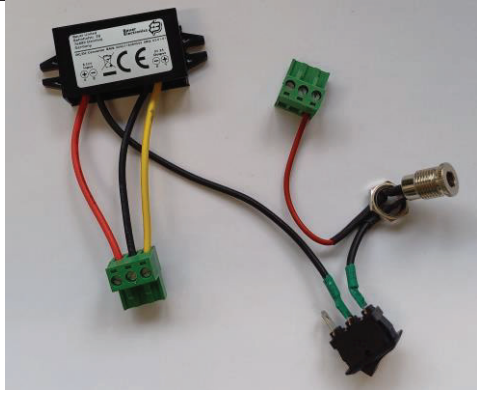
Figure S5: ETFE Tubing schematic.

Programming with Arduino and Nextion software: The software was written on the open-source Arduino software (Ver. 1.8.15) and the Nextion Editor (Ver. 1.65.1.). The codes can be downloaded from the supplementary files.

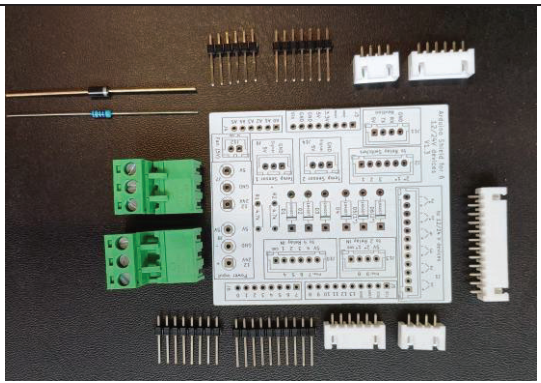
Detailed step-by-step assembly instruction

In the following, a detailed assembly instruction with example photos is given. No special tools are needed for manufacturing. The drilling template for the aluminium plate (required for step 11) can be downloaded from the supplementary files.

	<p>Step 1: Threaded inserts (No. 27) were inserted into the following components using a soldering iron:</p> <ul style="list-style-type: none">• Case control unit (No. 15)• Holder QMA (No. 1)• Holder v-vial (No. 2)• Holder waste (No. 3)• Holder cartridge (No. 4)• Holder heating block (No. 5)• Cable box (No. 6)
	<p>Step 2: The Arduino Uno (No. 18), and the 4 and 2 Channel Optocouplers Relay (No. 20 and 21) were screwed into the Case control unit (No. 15) using M3x6 screws (No. 28)</p>
	<p>Step 3: The 4 and 2 channel optocouplers relays (No. 20 and 21) were connected to ground (middle position) with 0.25 mm² cables. For a detailed schematic, see figure S4</p>

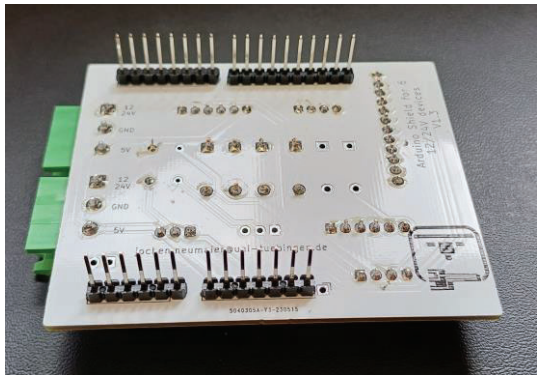
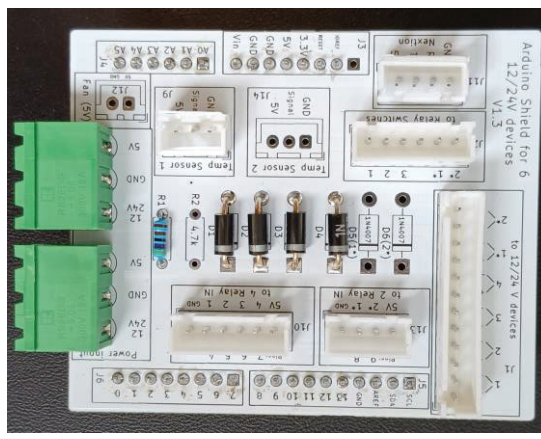


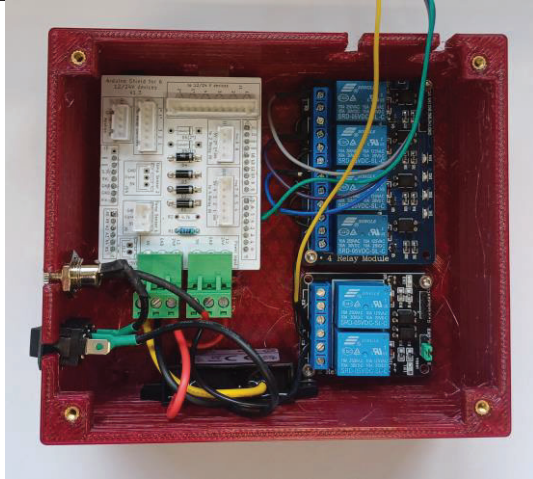
Step 4: 0.5 mm² Cables (No. 32) for the power management were soldered (see figure S4) to the components (No. 22, 23, 24) and connected to the plug-in screw terminal (No. 33)



Step 5: Following components were soldered on the self-designed PCB (No. 25):

- 4.7 k Ohm resistor (No. 34) on R1
- 4 × 1N4007 Diode (No. 35) on places D1-D4
- 2 × Plug-in screw terminal (No. 33)
- Various JST sockets (3 pins, 4 pins, 6 pins, 12 pins)(No. 31)
- Various Pin headers (No. 36)





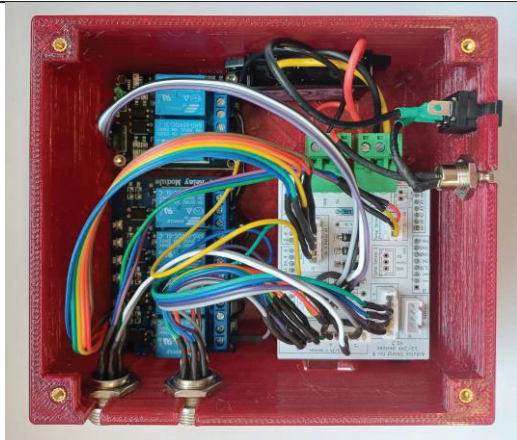
Step 5: The shield (from step 5) was attached to the Arduino.

Step 6: The connected power cables (from step 4) were mounted in the case control unit (No. 15). Ground (from step 3) was connected to the Arduino ground

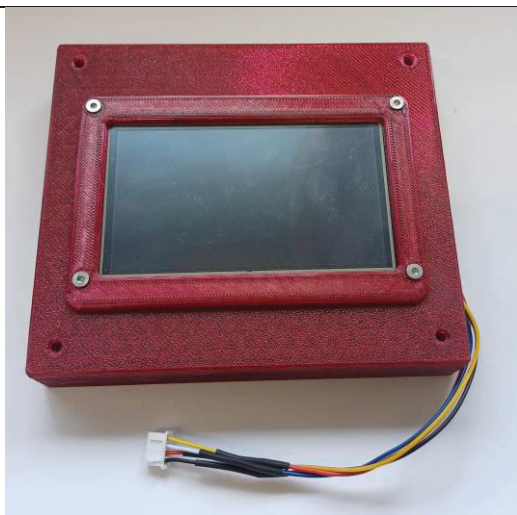
The voltage converter (No. 22) can be attached with double-sided adhesive tape if required.



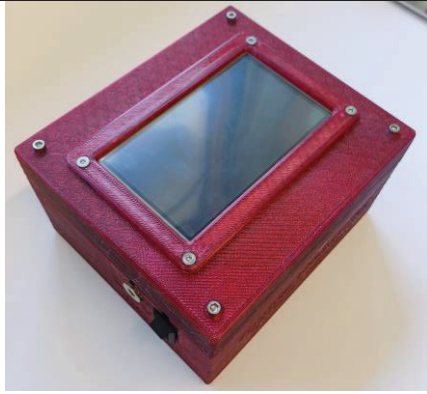
Step 7: Various JST cables (No. 31) were soldered to female jumper wires (No. 37) or GX16 aviation sockets (No.14) as shown in Figure S4



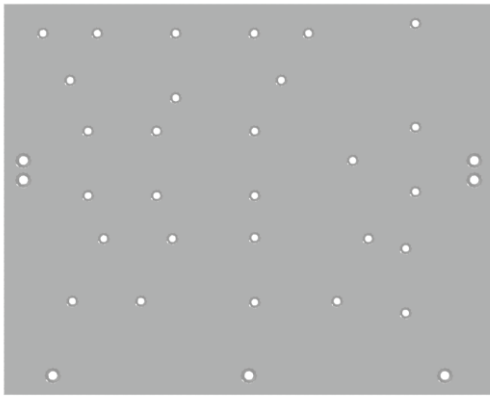
Step 8: The prepared cables (from step 7) were attached to the shield and the relays as shown in Figure S4.



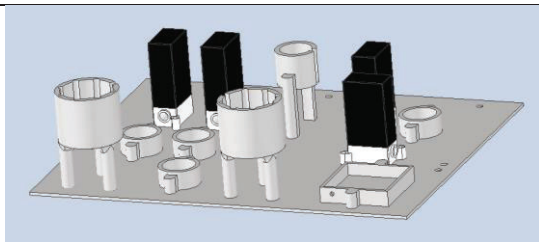
Step 9: The Nextion display (No. 19) was attached to the case lid (No. 16) and the display frame (No. 17) using M3×8 countersunk screws (No. 29) and M3 nuts.



Step 10: The Nextion display was connected to the shield and the prepared case lid (from step 9) was attached to the case using M3×30 countersunk screws (No. 29)

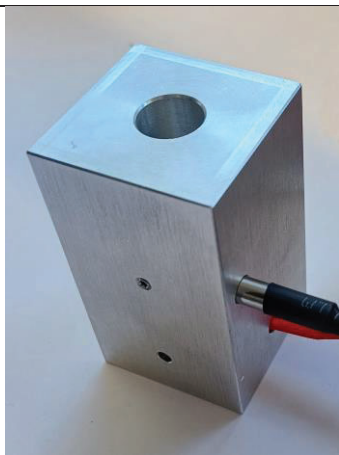


Step 11: The aluminium plate was drilled according to the drilling template (in ESI) using 3.5 mm and 4.5 mm drills. The boreholes were countersunk with a countersink bit.



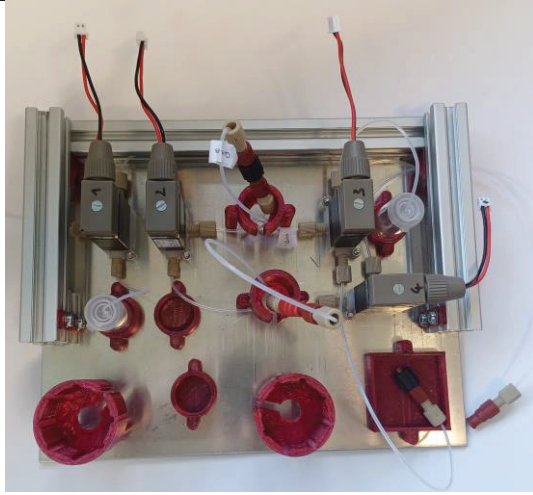
Step 12: The following components were attached to the aluminium plate using M3 countersunk screws (No. 29):

- 3-way-solenoid valve (No. 13)
- Holder QMA (No. 1)
- Holder v-vial (No. 2)
- Holder waste (No. 3)
- Holder cartridge (No. 4)
- Holder heating block (No. 5)

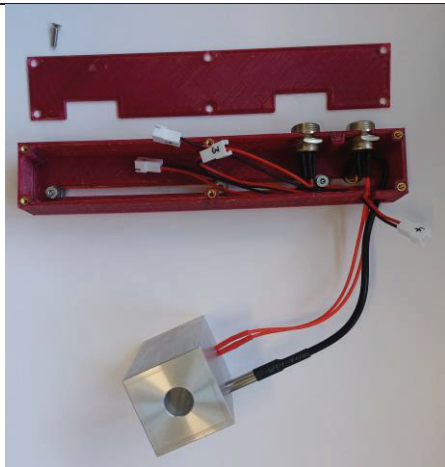


Step 13: ETFE tubings were connected as shown in Figure S5 using 1/4"-28 flat bottom fitting (No. 38) and luer lock adapters (No. 39, 40).

Step 14: The heating block was built according to the heating block.pdf (in ESI) and connected to the temperature sensor (No. 41) and the heating cartridge (red, No. 42).

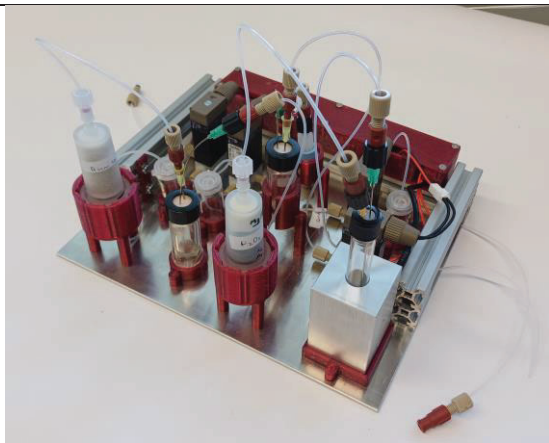


Step 15: The aluminium profiles (No. 12) were attached to the aluminium plate using profile connectors (No. 8, 9) and T-nut hammer head + M4 countersunk screw (No. 26)

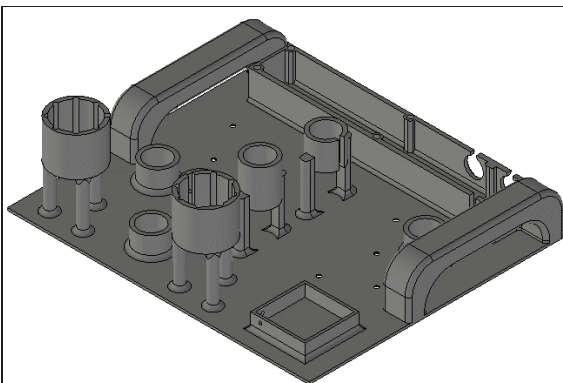


Step 16: GX16 aviation sockets (No. 14) were soldered according to Figure S4 and placed into the cable box (No. 6). It was attached to the aluminium profile using T-nut hammer head (No. 26) and M4 head cap screws + washers (No. 28)

Step 17: All cables were connected to the solenoid valves.



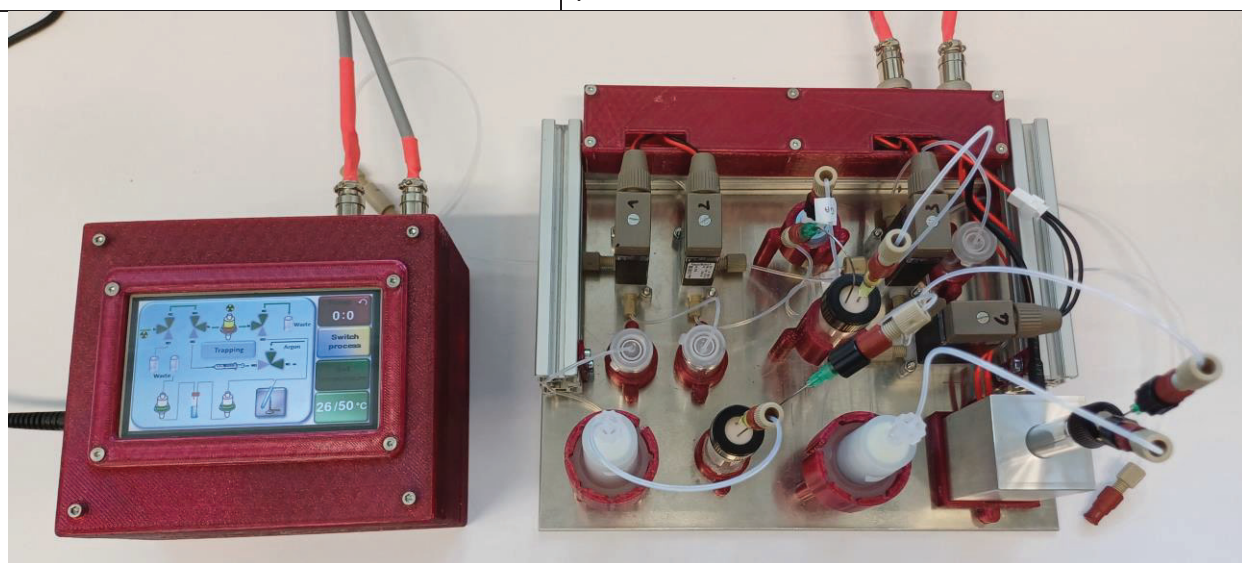
Step 18: For usage, the v-vials (No. 45), the QMA cartridge (No. 44), and the glass reactor (No. 47), the filled cartridges (see below) were prepared according to the description in the paper.



Optional: If no flexibility is needed, the complete module including all holders can be 3d-printed in one piece (No. 50).

This makes the production very much easier, only the part No. 50 and the Cable box lid (No. 7) have to be 3d-printed.

This makes production much easier, as only part No. 50 and the cable box lid (No. 7) need to be 3D printed. Steps 11, 12, and 15 can be skipped and some steps had to be adapted to the all-in-one base plate.



Filling of drying cartridge:

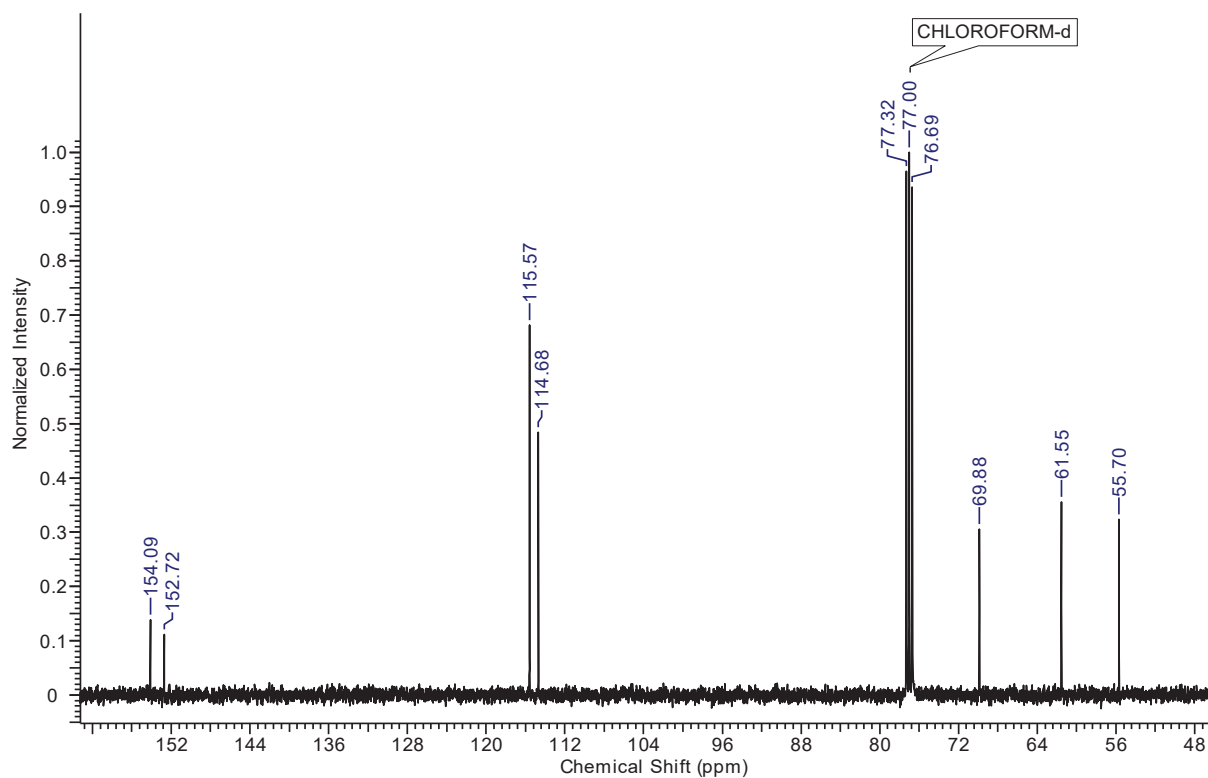
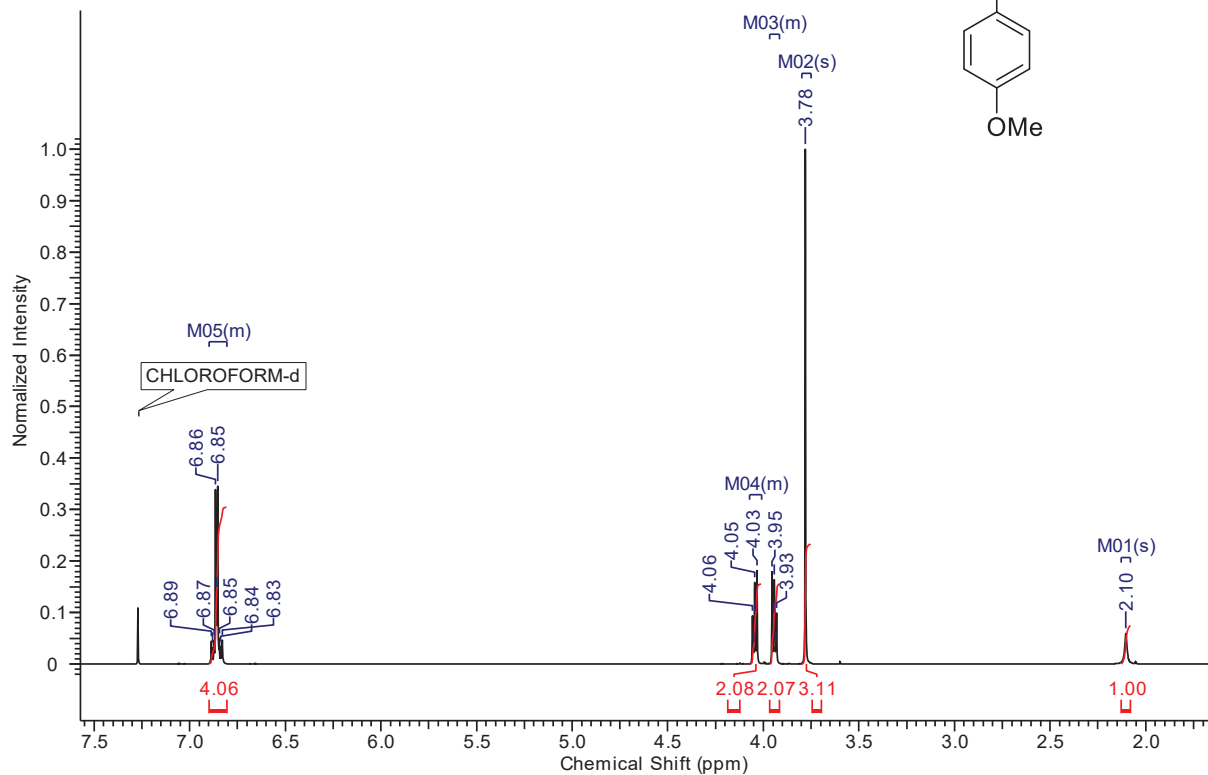
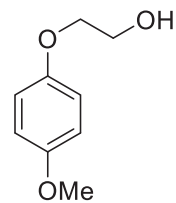
EasyVarioFlash D17 cartridges (No. 46) were filled with MgSO_4 and P_4O_{10} . The in- and outlets, as well as the two layers, were separated with glass wool.

Filling of trapping cartridge:

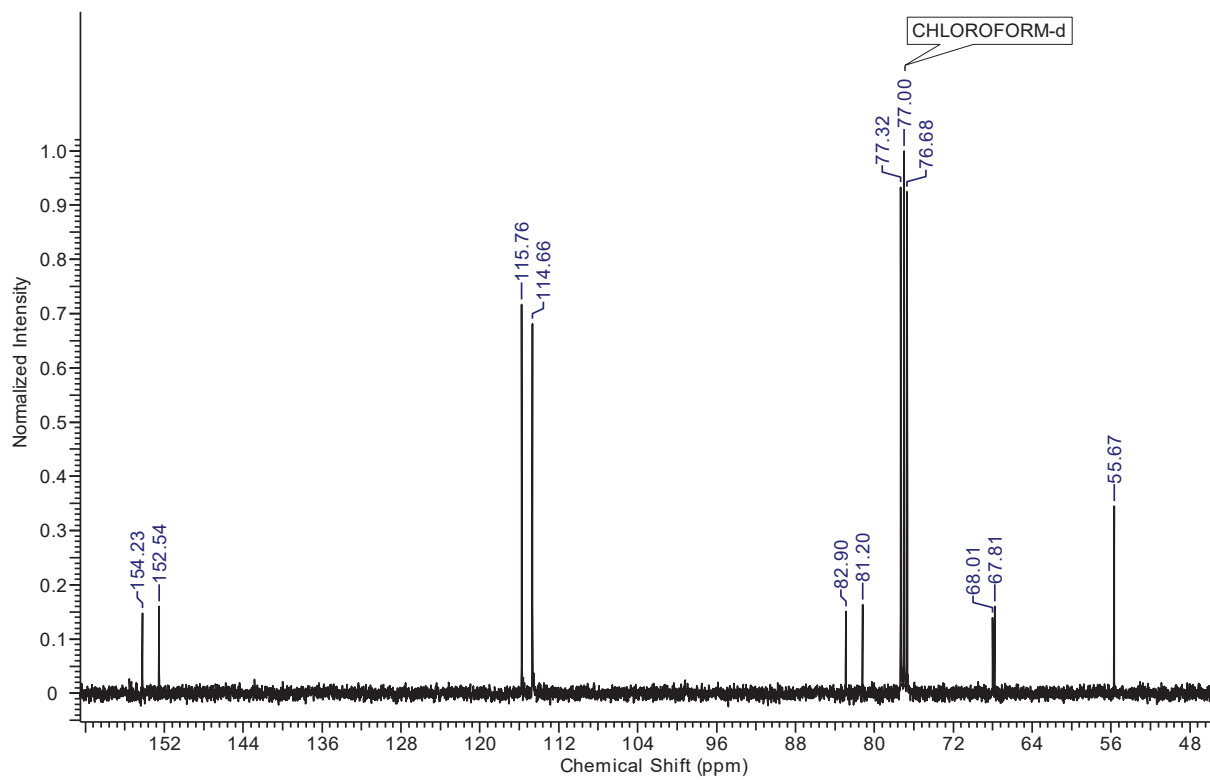
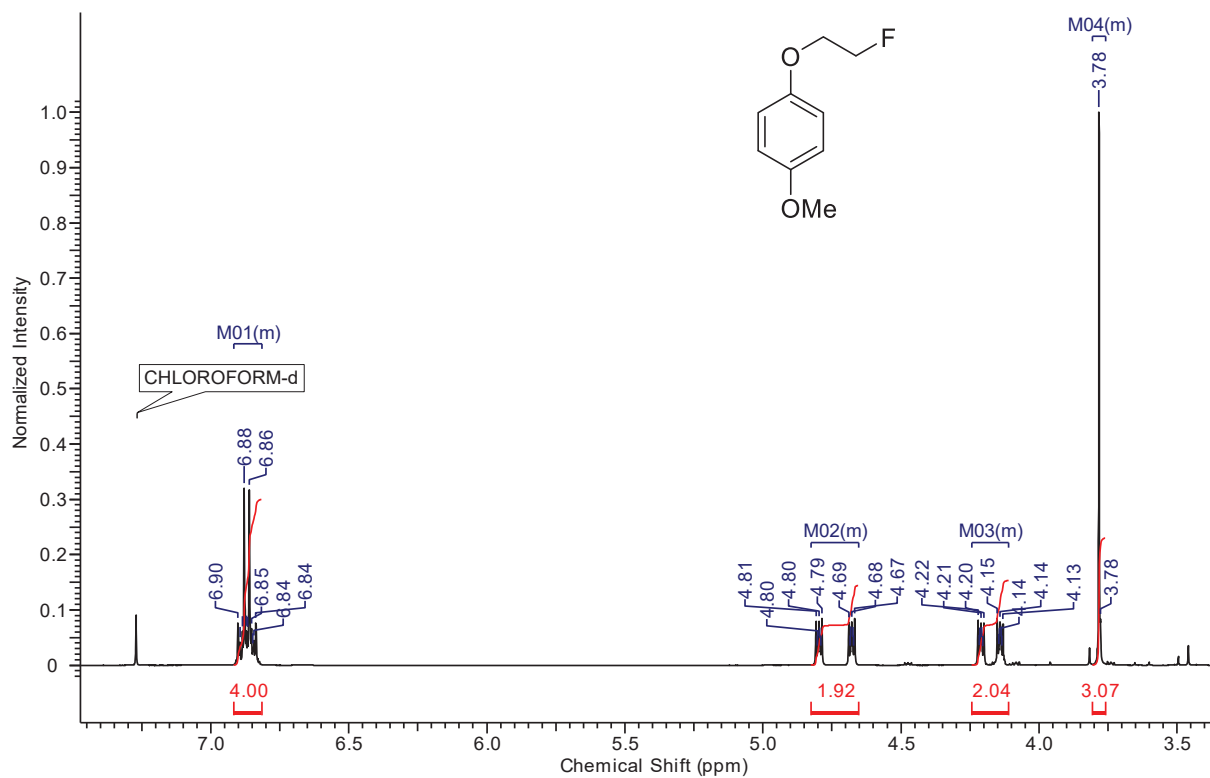
EasyVarioFlash D17 cartridges (No. 46) were filled with ascarite. The in- and outlets were separated with glass wool.

NMR

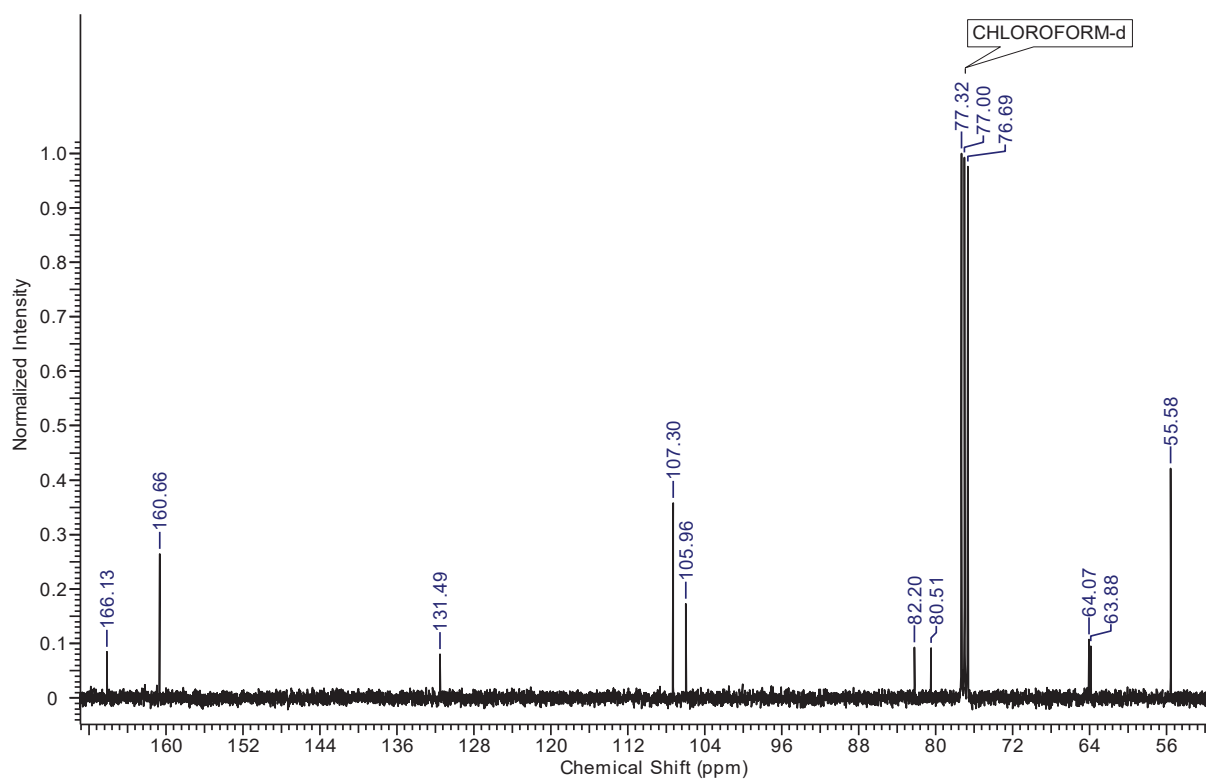
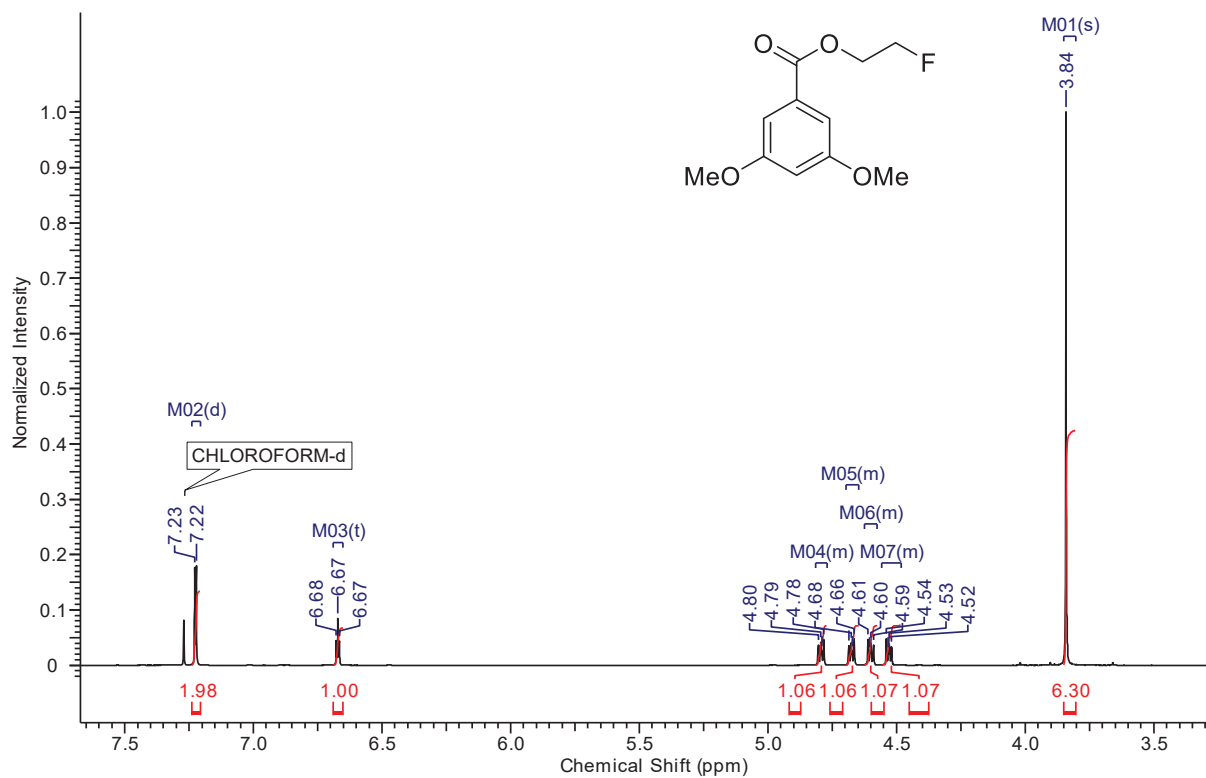
2-(4-Methoxyphenyl)-ethan-1-ol (**20**)



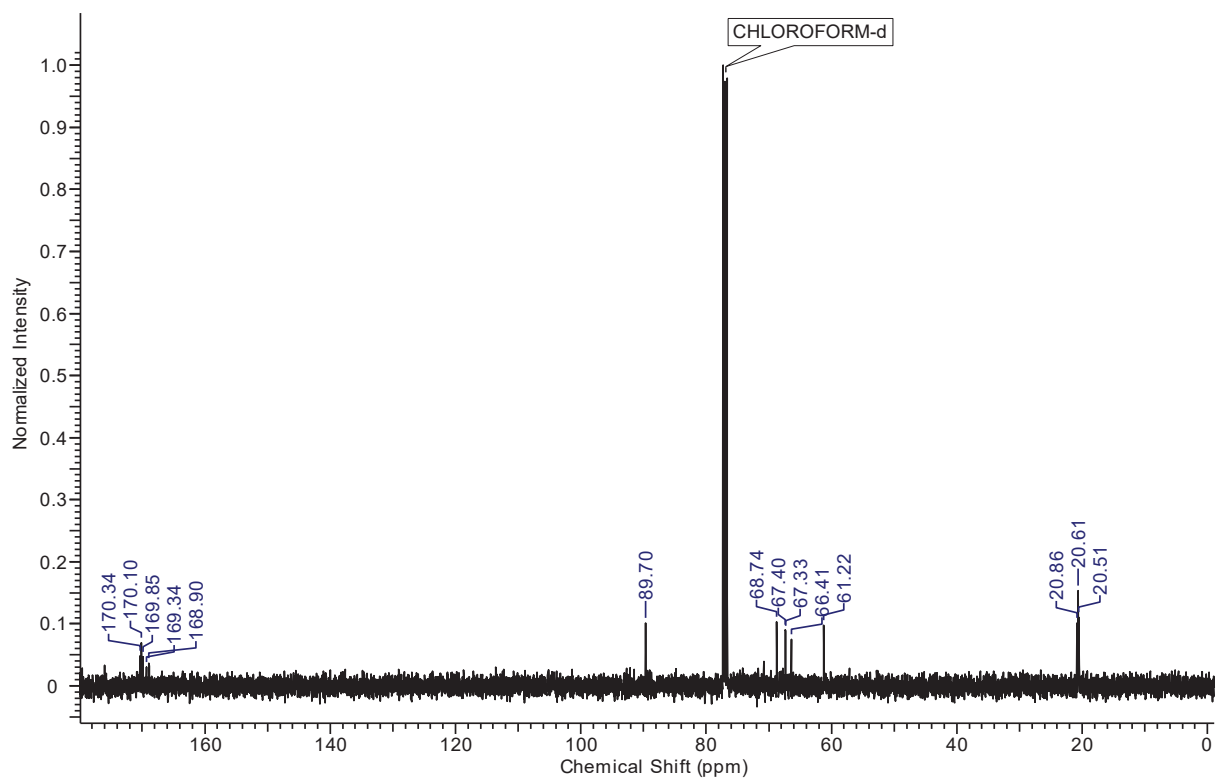
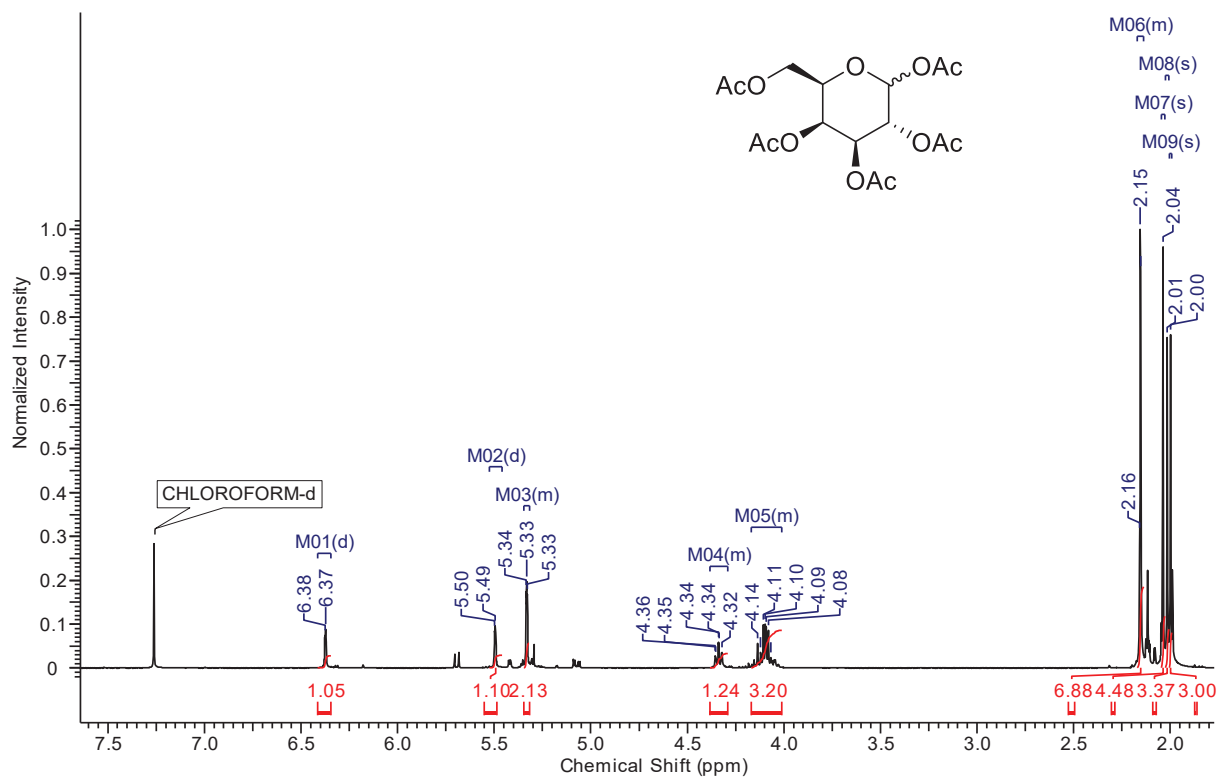
1-(2-Fluoroethoxy)-4-methoxybenzene (21)



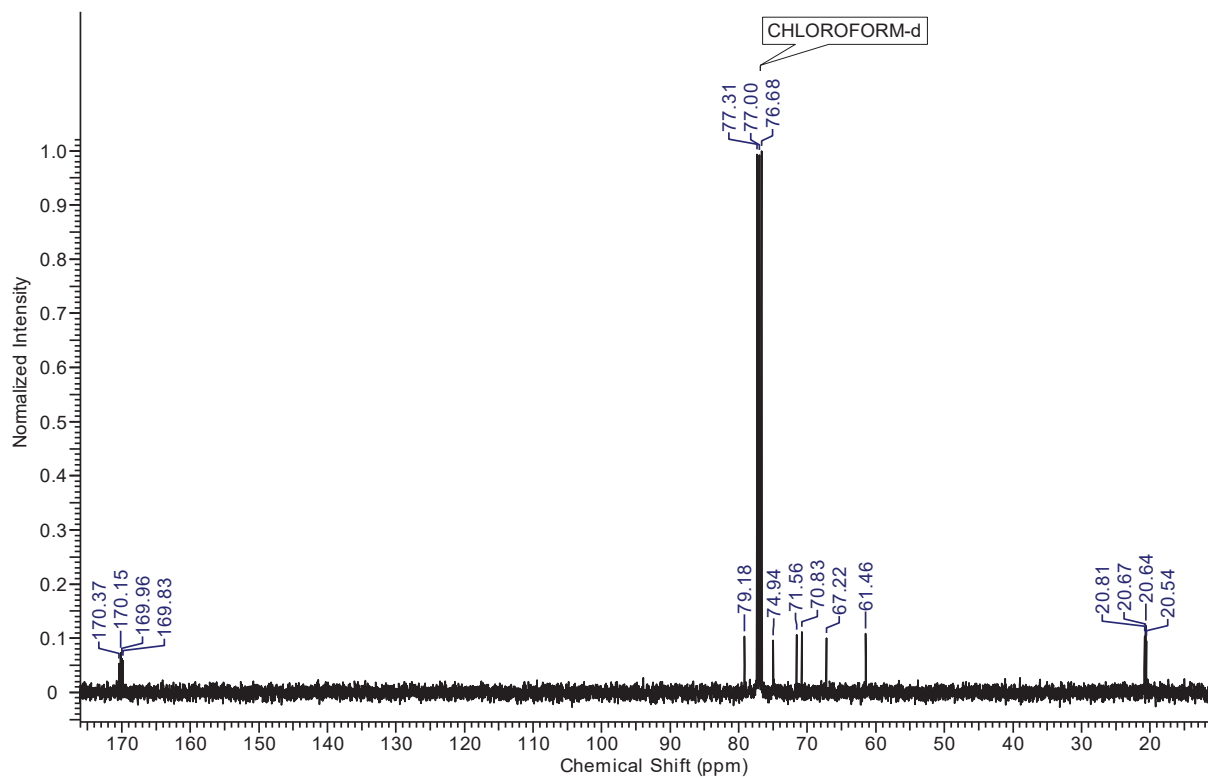
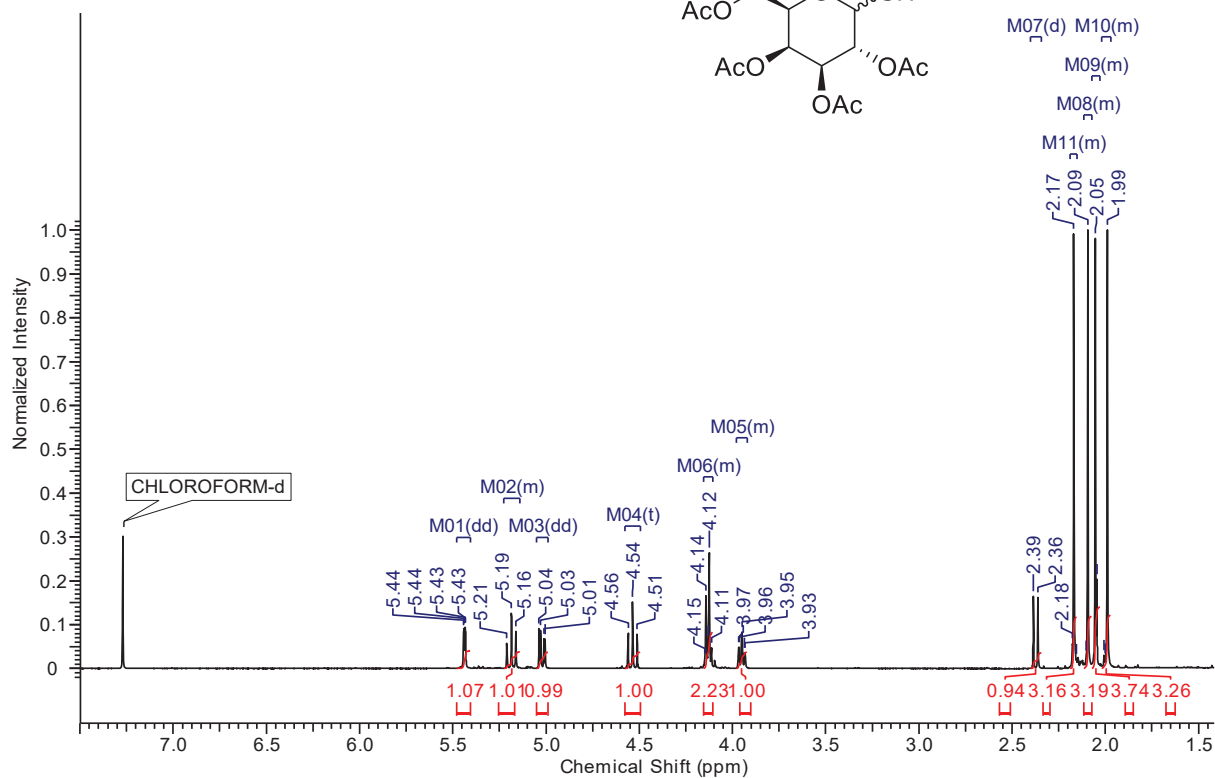
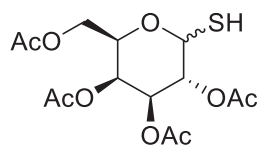
2-Fluoroethyl-3,5-dimethoxy benzoate (**23**)



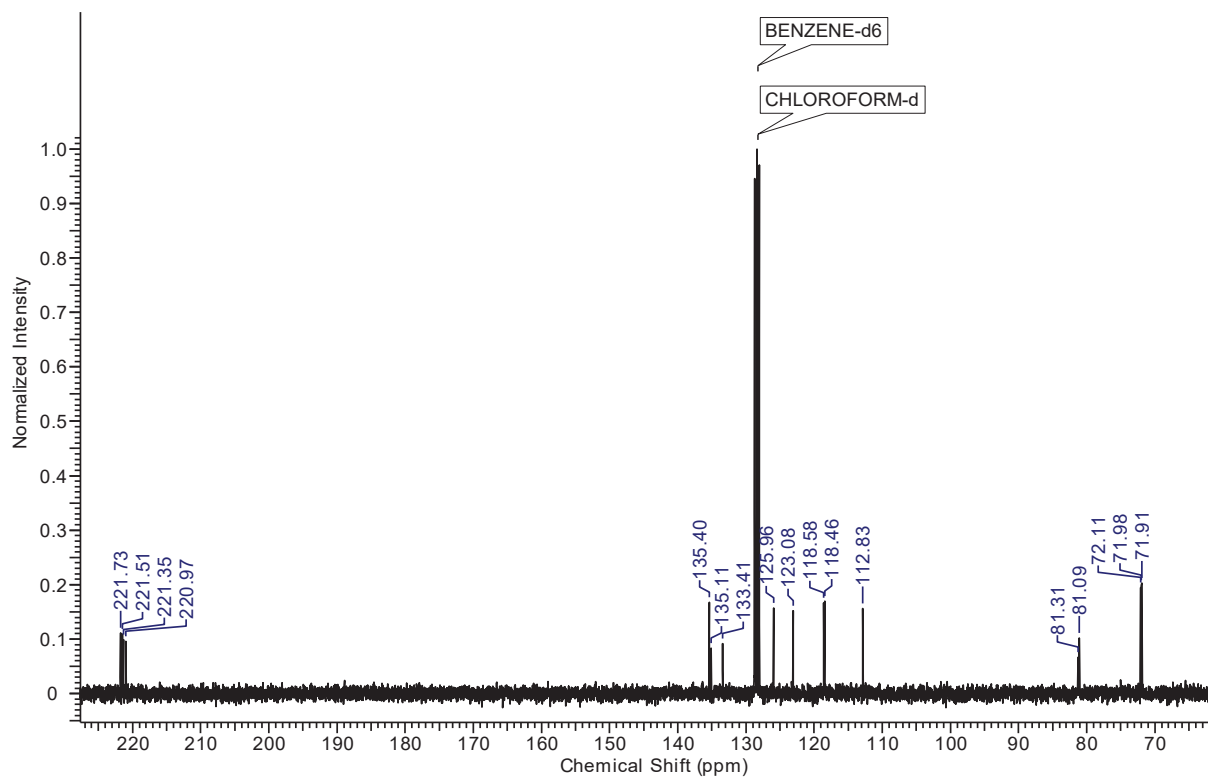
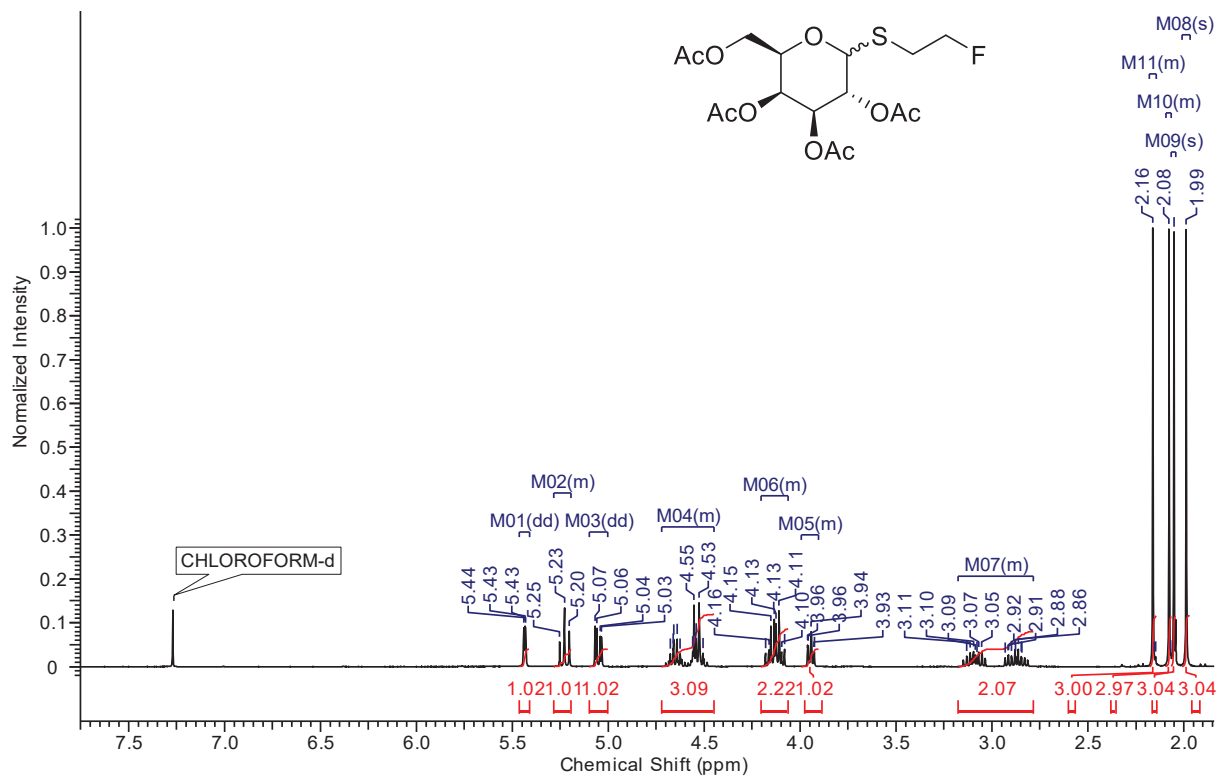
1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-galactopyranose (25)



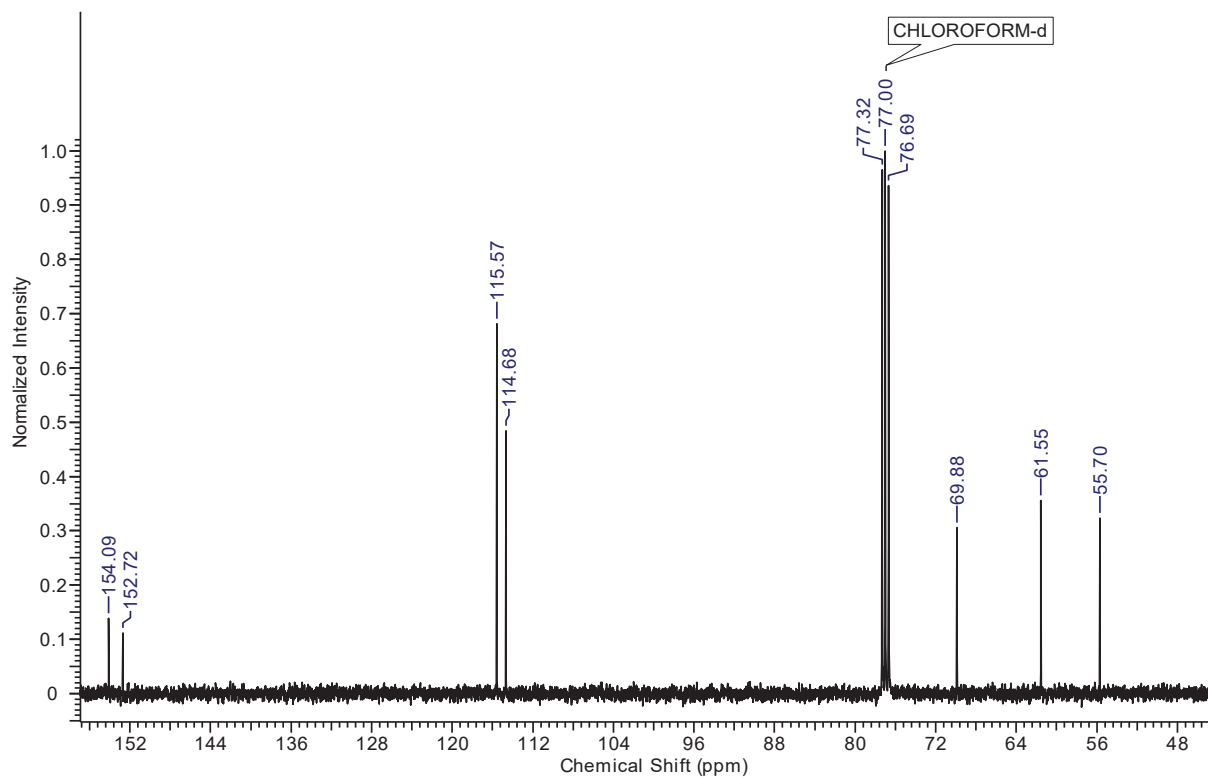
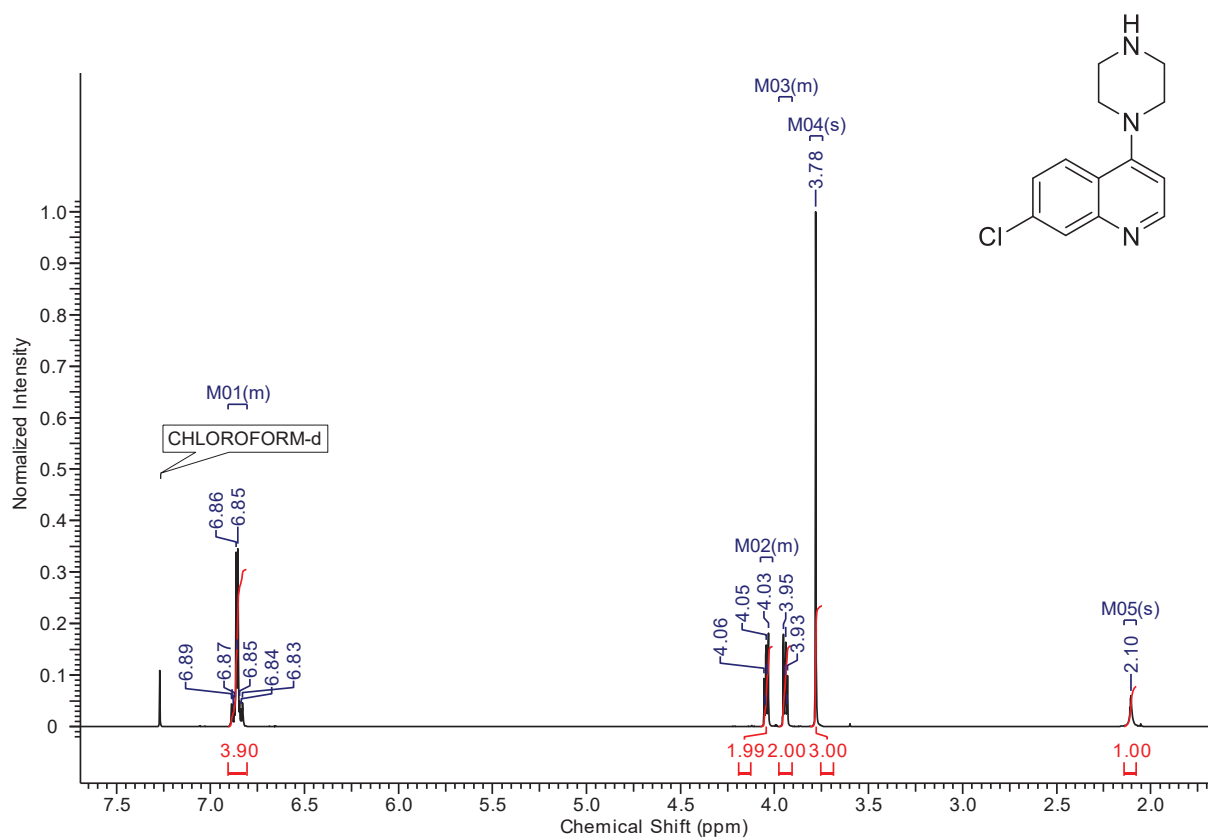
2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio-D-galactopyranoside (14)



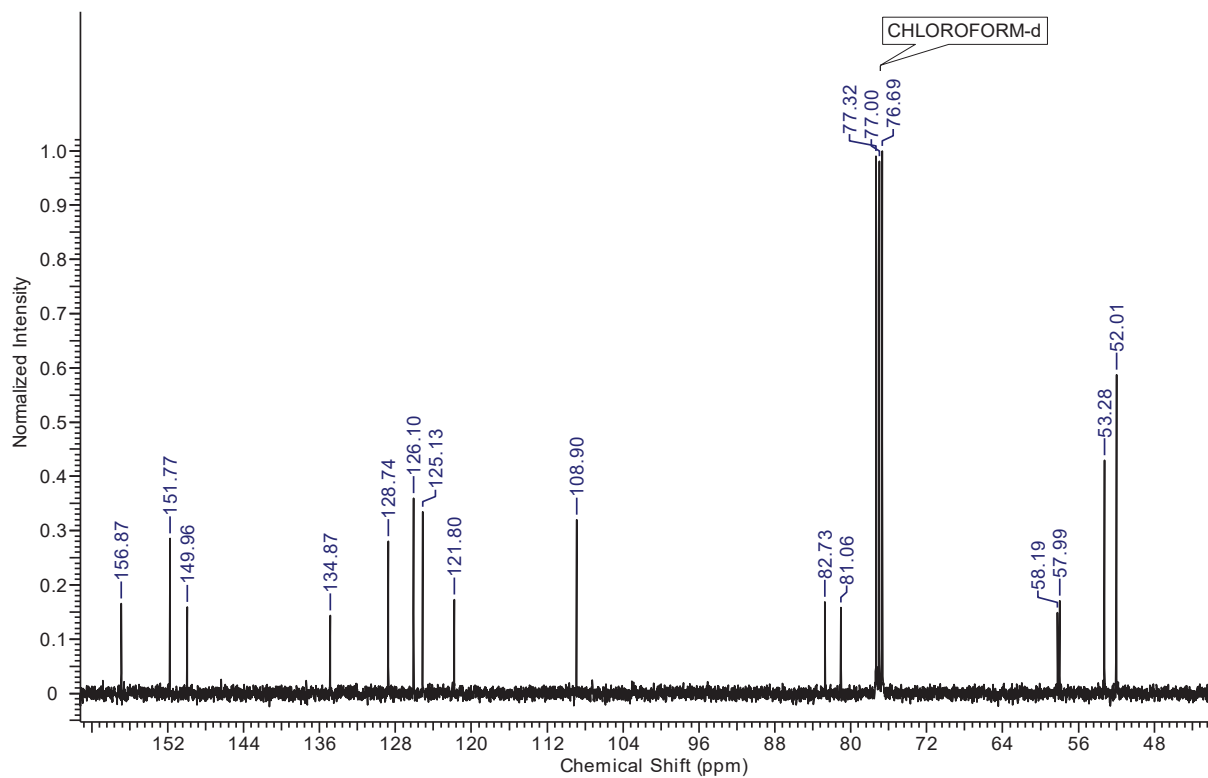
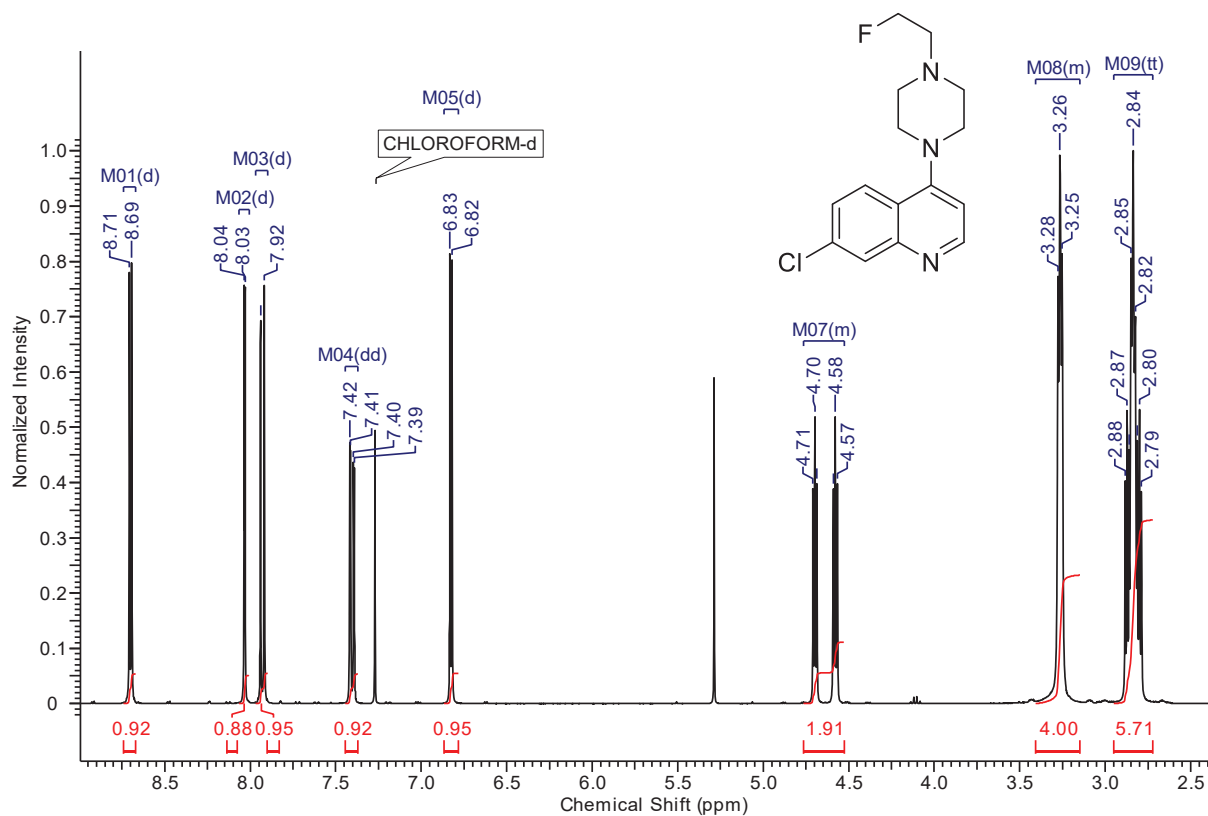
2-Fluorethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-D-galactopyranoside (**28**)



7-Chloro-4-(piperazine-1-yl)-quinoline (15)



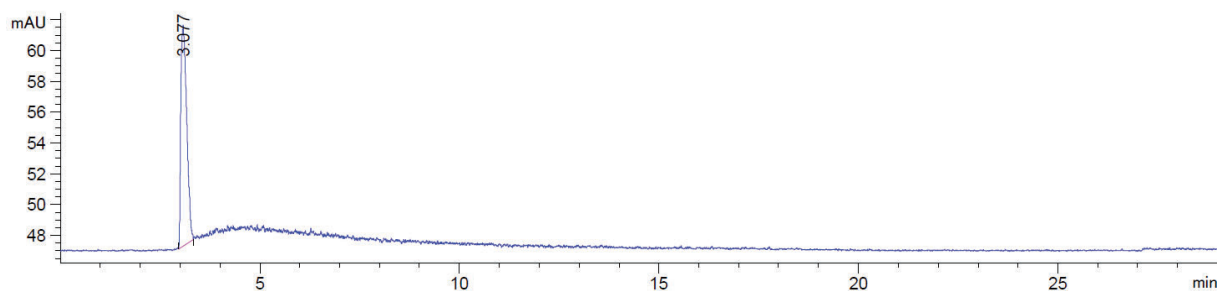
7-Chloro-4-(4-(2-fluoroethyl)piperazine-1-yl)quinoline (30)



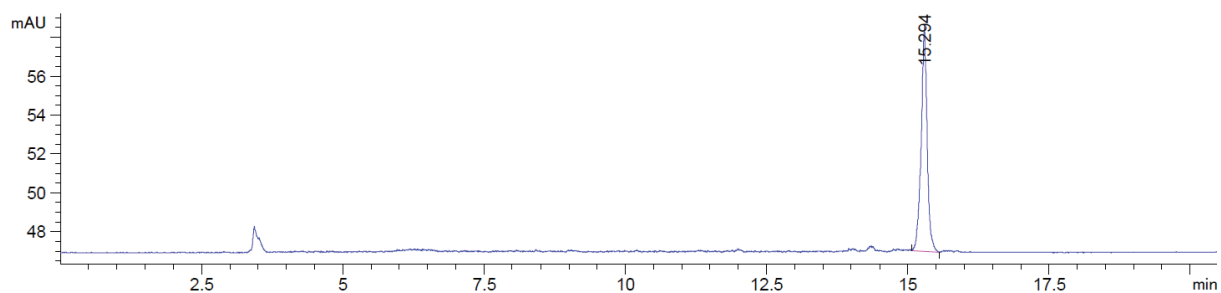
HPLC

Radioactive molecules were quantified by comparing the ^{18}F - signal with the UV signal (254 or 214 nm) of the non-radioactive reference. For the thiol, we used 214 nm HPLC due to the lack of a π -system. The other references were quantified with 254 nm. The ^{18}F -detector is connected in series shortly after the UV detector, which increases the retention time by 0.1 min.

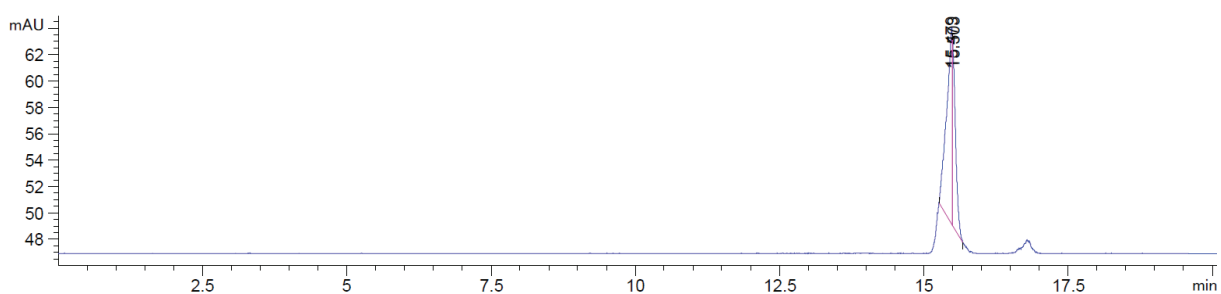
2- ^{18}F Fluoroethanol (8)



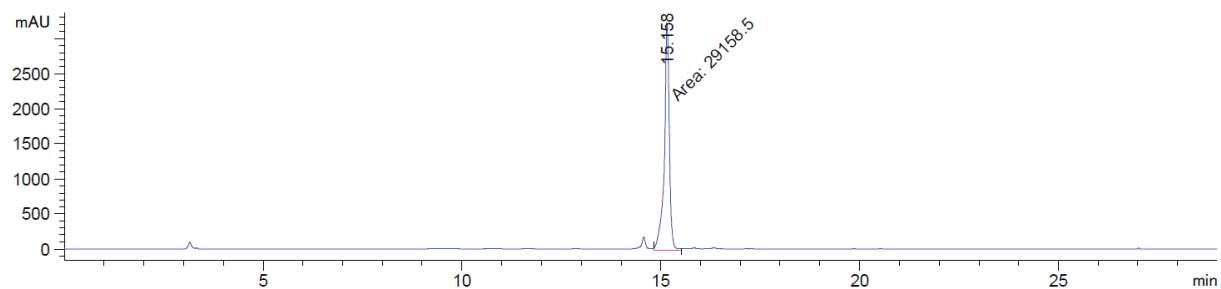
2- ^{18}F Fluoroethyl triflate (9)



2- ^{18}F Fluoroethyl tosylate (11)

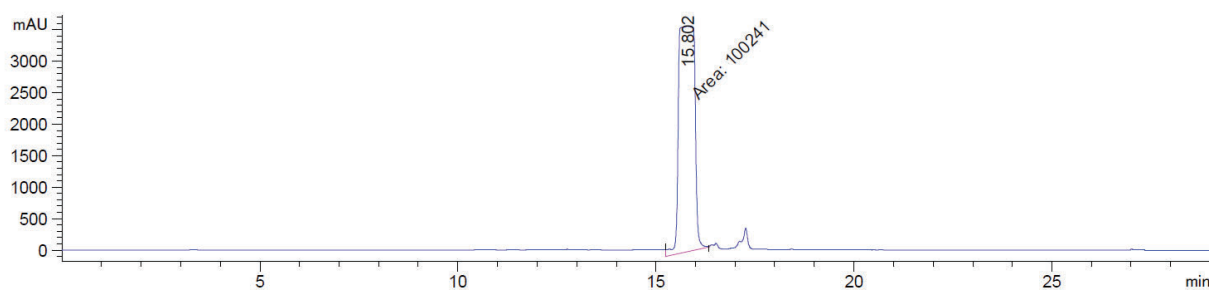
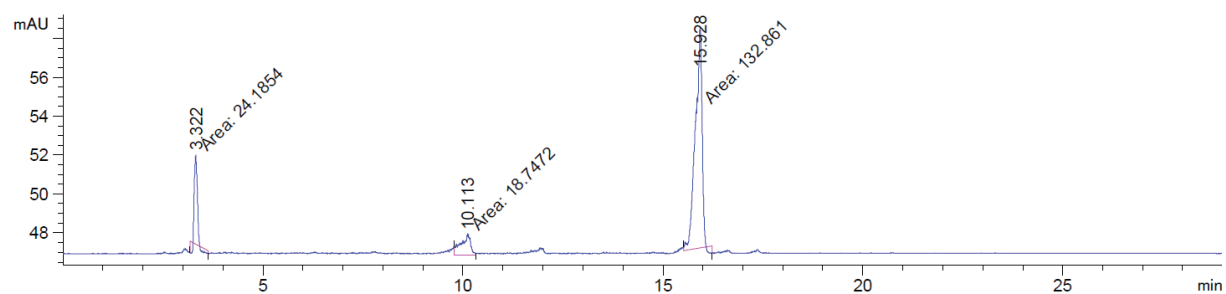


1-(2-Fluoroethoxy)-4-methoxybenzene (21)

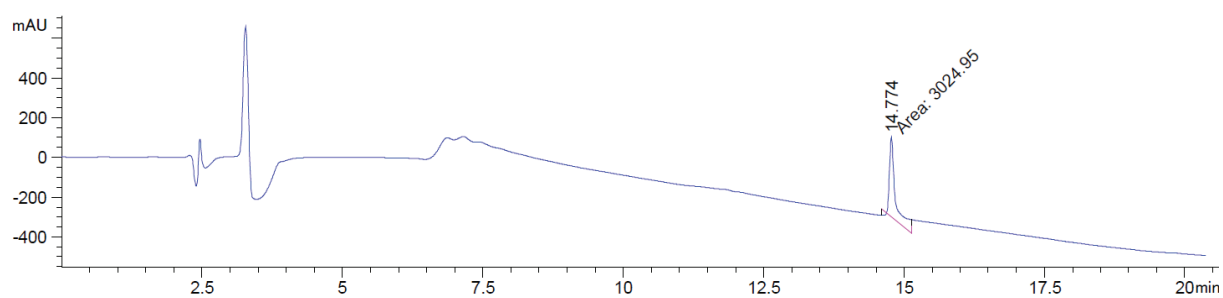
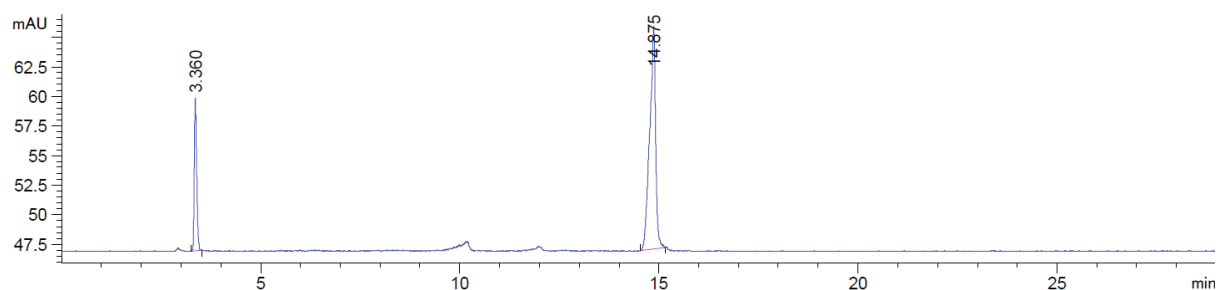


2-[¹⁸F]Fluoroethyl-3,5-dimethoxy benzoate (17) and 2-fluoroethyl-3,5-dimethoxy benzoate

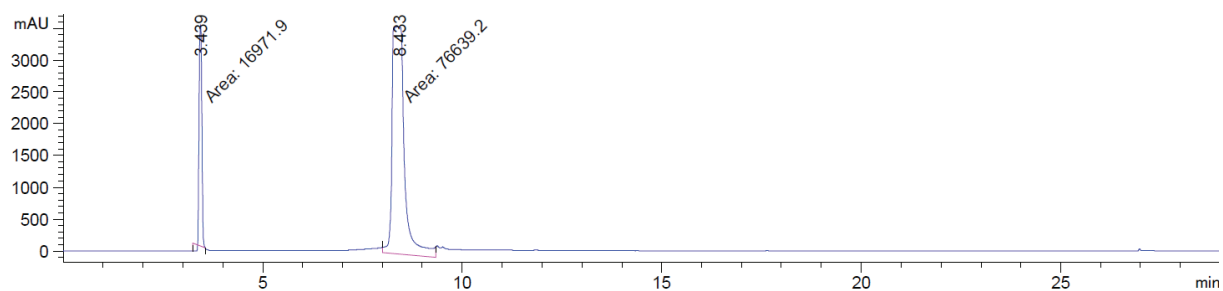
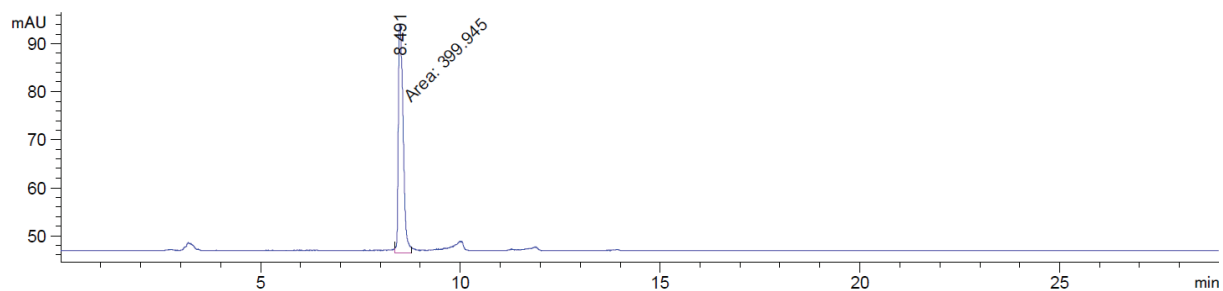
(23)



2-[¹⁸F]Flourethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-D-galactopyranoside (18) and 2-flourethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-D-galactopyranoside (28)




7-Chloro-4-(4-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)piperazine-1-yl)quinoline (19) and 7-chloro-4-(4-(2-fluoroethyl)piperazine-1-yl)quinoline (30)



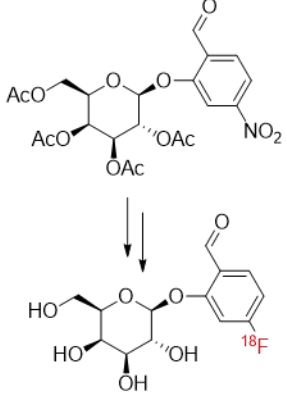
Notes and references

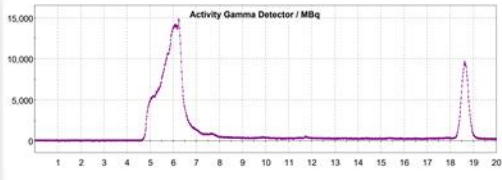
-
- [1] Neumaier JM, Madani A, Klein T, Ziegler T. Low-budget 3D-printed equipment for continuous flow reactions. *Beilstein J. Org. Chem.* 2019;15:558-566. <https://doi.org/10.3762/bjoc.15.50>
- [2] Menzel F, Klein T, Ziegler T, Neumaier JM. 3D-printed PEEK reactors and development of a complete continuous flow system for chemical synthesis. *React. Chem. Eng.* 2020;5:1300-1310. <https://doi.org/10.1039/D0RE00206B>
- [3] Menzel F, Cotton J, Klein T, Maurer A, Ziegler T, Neumaier JM. FOMSy: 3D-printed flexible open-source microfluidic system and flow synthesis of PET-tracer. *J. Flow Chem.* 2023; <https://doi.org/10.1007/s41981-023-00267-z>

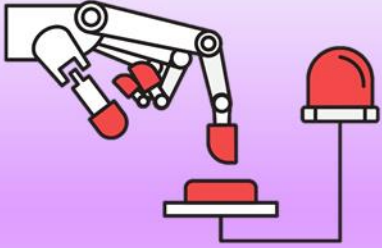
Unveröffentlichte Ergebnisse




Synthesen



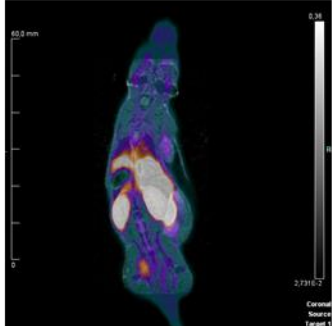


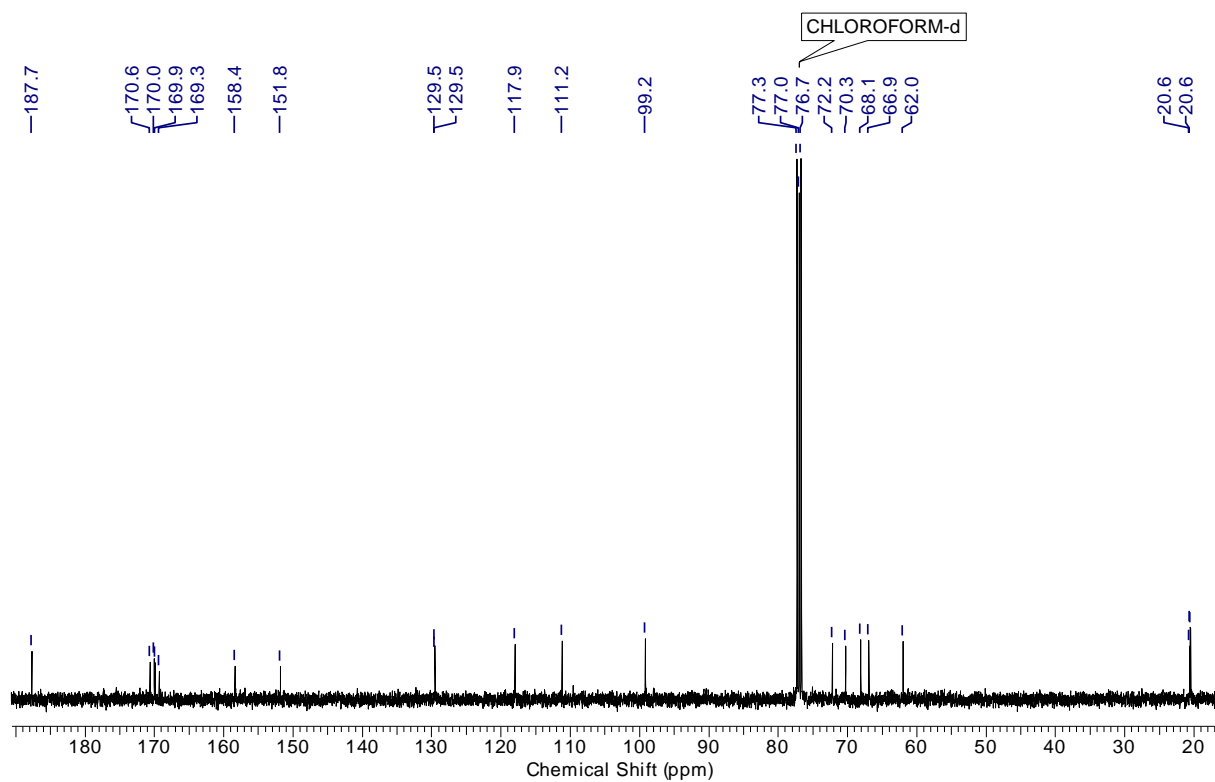
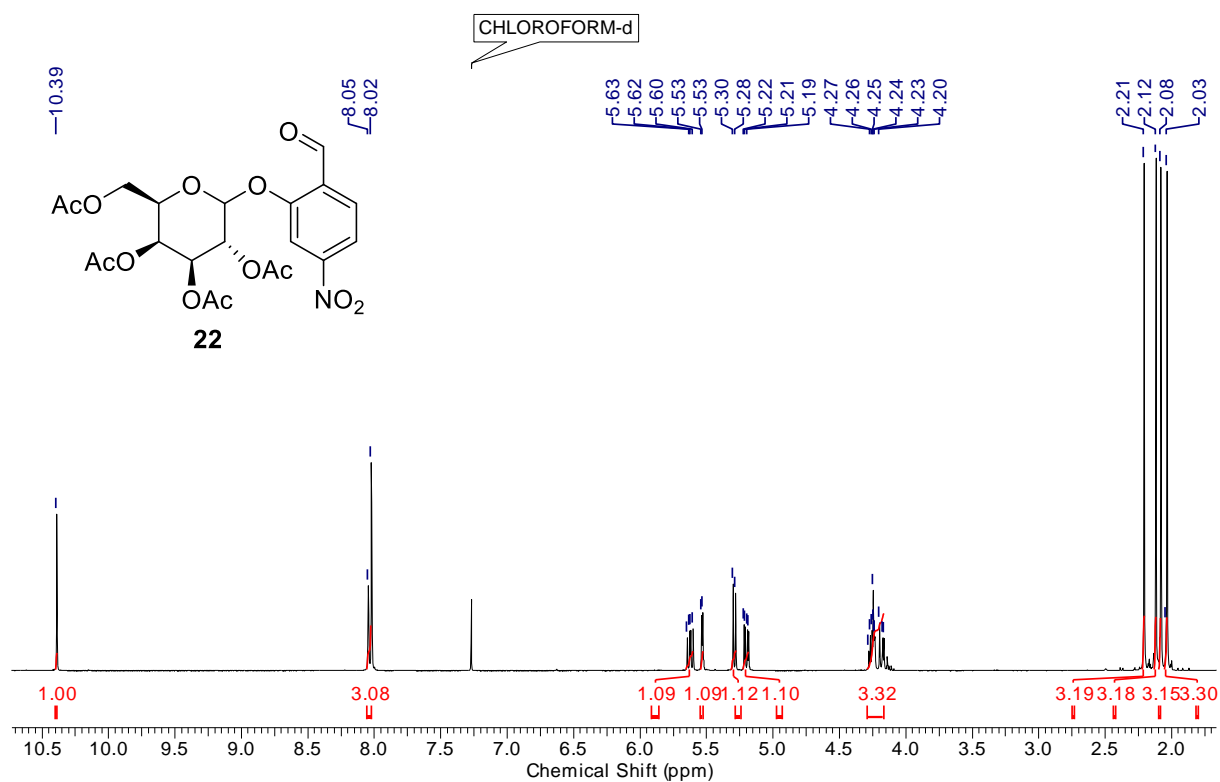


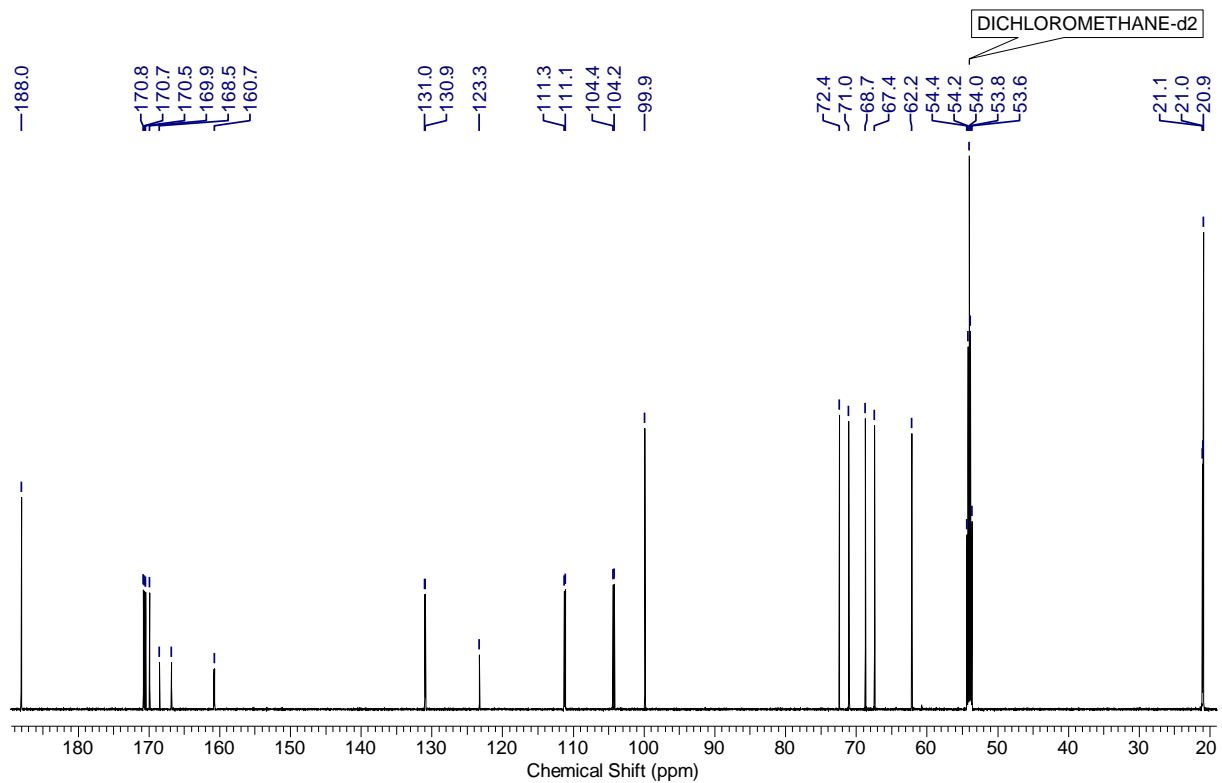
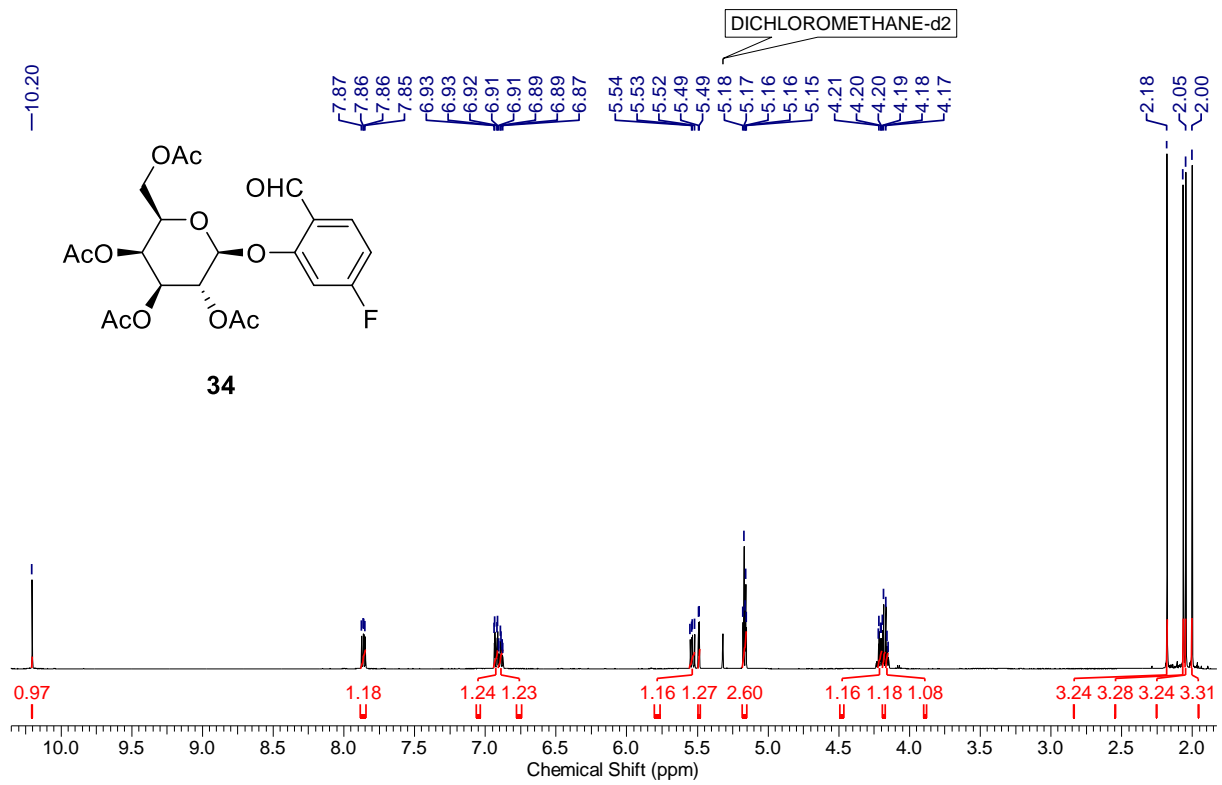
Automatisierung

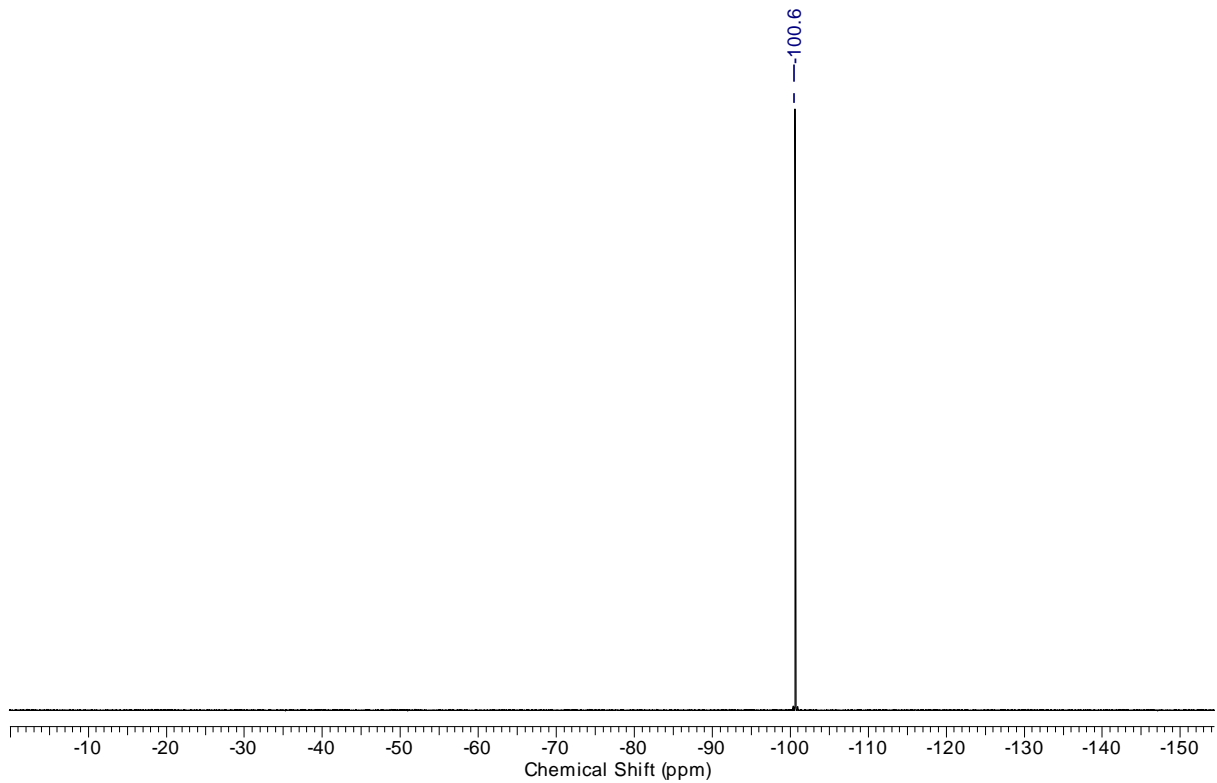


Zellversuche

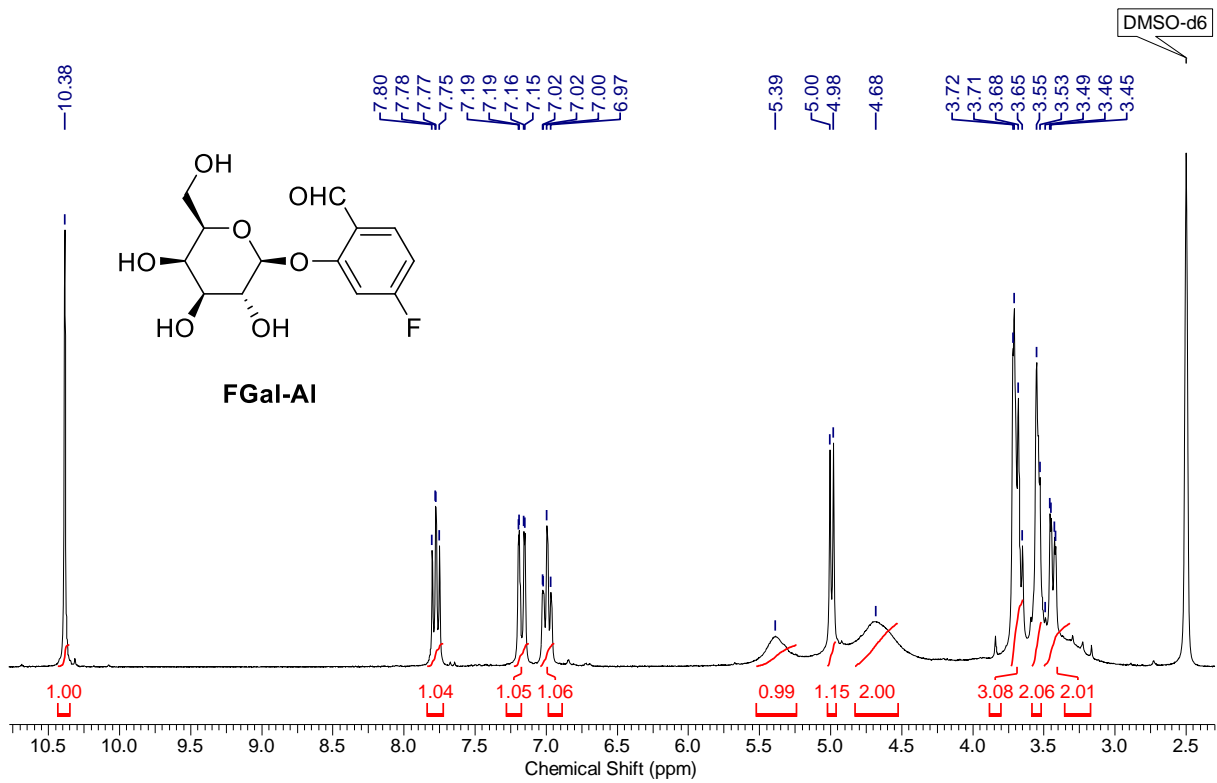


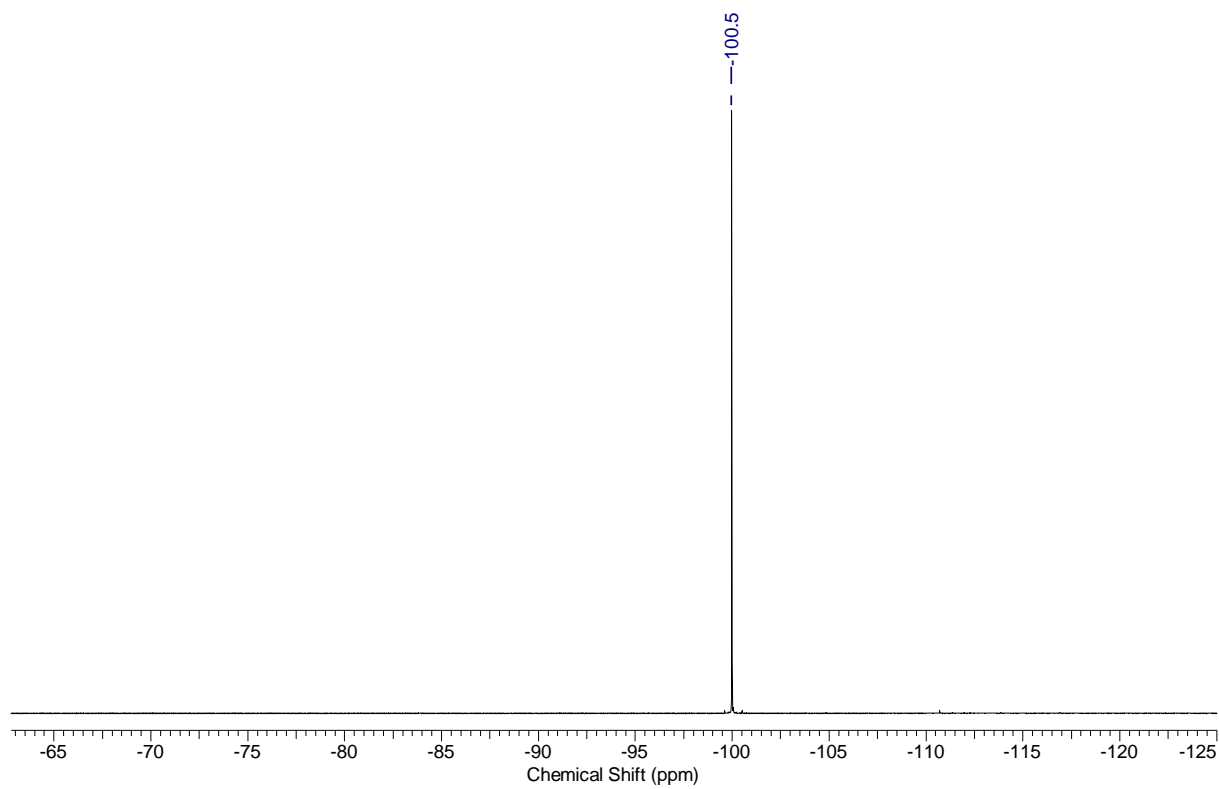
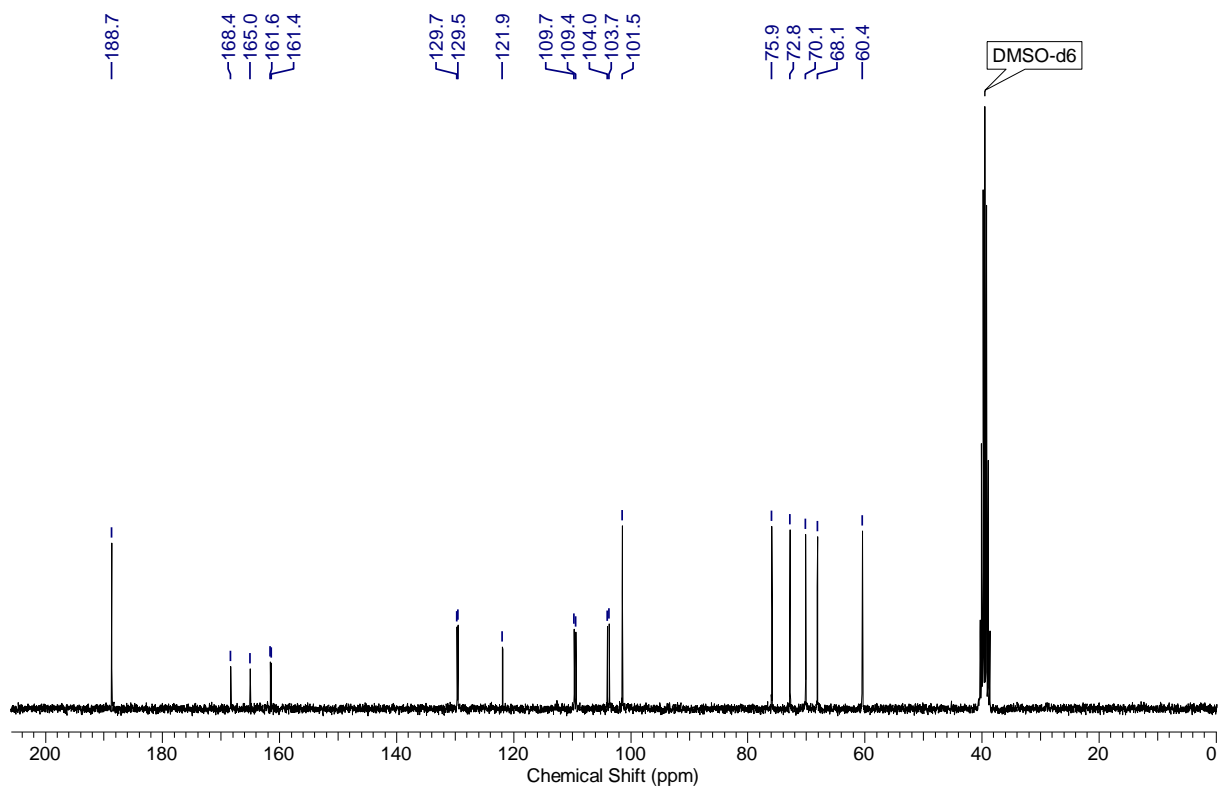
2-[(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl)oxy]-(4-nitro)-benzaldehyd (**22**):

2-[(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)oxy]-(4-fluor)-benzaldehyd (**34**):




2-[(β-D-Galactopyranosyl)oxy]-(4-fluor)-benzaldehyde (FGal-AI):





Time	Device	Value	Dur. Comme
0	Set Process Control	= Reset	
0.2	Set Vacuum Pump on/off	= On	
0.4	Set Process Control	= Show message with abort button a	Delivery abgeschlossen?
t1+0.2	Set V24	= Open	Vakuum auf Reaktor
t1+10	Set V24	= Close	
t1+10.4	Set V10	= b (left)	
t1+10.5	Set V11	= b (left)	
t1+10.7	Set V23	= Open	Vakuum auf O-18 Wasser Sammelgefäß
t1+40	Set V23	= Close	
t1+41	Set V10	= a (right)	
t1+41.2	Set V11	= a (right)	
t1+41.4	Set V01 Vial 1	= Open	Elution des Fluorids von der QMA
t1+41.5	Set V13	= Open	
t1+41.7	Set Stirrer on/off	= On	
t1+55	Set V24	= Open	
t1+1'0	Set V02 Vial 2	= Open	
t1+1'19	Set V13	= Close	
t1+1'19	Set V01 Vial 1	= Close	
t1+1'20	Set V02 Vial 2	= Close	
t1+1'20	Set V20	= Open	
t1+1'21	Set Temp. Setpoint Reactor 1	= 80	
t1+1'21	Wait Temp. Regulator Status Reactor	= Temp. OK	
t2+9'0	Set Temp. Setpoint Reactor 1	= 140	
t2+9'0	Wait Temp. Regulator Status Reactor	= Temp. OK	
t3+3'0	Set V20	= Close	
t3+8'0	Set V20	= Open	
t3+8'0	Set V25	= b (down)	
t3+8'0	Set Temp. Setpoint Reactor 1	= 40	
t3+8'1	Wait Temp. Regulator Status Reactor	= Temp. OK	
t4+0.8	Set V20	= Close	
t4+1	Set V24	= Close	
t4+1.1	Set V25	= a (up)	

Time	Device	Value	Dur.	Comme
0	Set Process Control	= Reset		
0.1	Set Vacuum Pump on/off	= On		
0.2	Set Load/Inject valve	= Load		
0.4	Set Stirrer on/off	= On		
0.5	Set HPLC Pump Flow Set Point	= 4		
0.6	Set HPLC UV Detector Lamp on/off	= On		
0.7	Set V19	= Open		
0.8	Set V20	= Open		ventilate reactor
2.6	Set V20	= Close		
2.8	Set V25	= b (down)		equalize oressure
3	Set V24	= Open		
3.2	Set V03 Vial 3	= Open		add precursor from v3
14	Set V03 Vial 3	= Close		
14.2	Set V24	= Close		
14.4	Set V25	= a (up)		
14.6	Set Temp. Setpoint Reactor 1	= 150		heat for radiolabeling
14.8	Wait Temp. Regulator Status Reactor	= Temp. OK		
t1+5'1	Set Temp. Setpoint Reactor 1	= 35		cool reactor
t1+5'1	Wait Temp. Regulator Status Reactor	= Temp. OK		
t2+1	Set V24	= Open		equalize pressure
t2+1.2	Set V25	= b (down)		
t2+1.4	Set V04 Vial 4	= Open		dillute with solvent
t2+3	Set HPLC Pump Flow Set Point	= 6		
t2+15	Set V04 Vial 4	= Close		
t2+15.2	Set V24	= Close		
t2+15.4	Set V25	= a (up)		
t2+15.6	Set V20	= Open		pressure on reactor
t2+15.8	Set Reactor 1 Needle up/down	= Down		start transfer to tube 2
t2+16	Set V14	= Open		
t2+16.1	Set V33	= b (down)		
t2+56	Set Reactor 1 Needle up/down	= Up		
t2+56.1	Set V33	= a (up)		
t2+56.2	Set V14	= Close		
t2+56.3	Set V27	= b (left)		start transfer onto loop
t2+56.4	Set HPLC UV Detector Auto Zero	= On		autozero UV-detector
t2+56.5	Set HPLC UV Detector Auto Zero	= Off		
t2+56.6	Wait Fluid Detector	= On		
t3+5	Wait Fluid Detector	= Off		
t4+0.2	Set Load/Inject valve	= Inject		
t4+3	Wait Chromatography Peak Detector	= Start of Peak		
t5+2	Wait Chromatography Peak Detector	= End of Peak		
t6+0.4	Set V21	= b (down)		empty crystal ball
t6+8'0	Set V21	= a (up)		
t6+8'0	Set V17	= b (right)		
t6+8'0	Set V15	= b (right)		prepare for deprotection
t6+8'1	Set V43 Vial 14	= b (up)		deprotection with NaOH
t6+8'2	Set V43 Vial 14	= a (down)		
t6+9'0	Set V43 Vial 14	= b (up)		
t6+9'2	Set V43 Vial 14	= a (down)		
t6+10'1	Set V43 Vial 14	= b (up)		
t6+10'3	Set V43 Vial 14	= a (down)		
t6+11'3	Set V43 Vial 14	= b (up)		
t6+11'10	Set V43 Vial 14	= a (down)		
t6+11'11	Set V42 Vial 13	= b (up)		wash C-18 cart with EtOH-H2O
t6+12'0	Set V42 Vial 13	= a (down)		
t6+12'30	Set V41 Vial 12	= Open		Neutralize witiH HCl
t6+13'0	Set V41 Vial 12	= Close		
t6+13'5	Set V17	= a (left)		
t6+13'10	Set Stirrer on/off	= Off		
t6+13'15	Set Process Control	= Show message and wait		Ready to deliver product?
t7+2.5	Set V16a	= Open		empty product vial

Time	Device	Value	Dur. Comme
t7+5	Set V22	= b (left)	
t7+50	Set V22	= a (right)	
t7+50.4	Set V16a	= Close	
t7+50.6	Set Process Control	= Reset	