



Institut für Nuklearchemie

***Synthese des  $^{18}\text{F}$ -markierten Coenzym  
Uridindiphosphatglucose als Basis für die  
 $^{18}\text{F}$ -Glykosylierung von Glykoproteinen***

*Olaf Prante*



***Synthese des  $^{18}\text{F}$ -markierten Coenzym  
Uridindiphosphatglucose als Basis für die  
 $^{18}\text{F}$ -Glykosylierung von Glykoproteinen***

*Olaf Prante*

**Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3902**  
ISSN 0944-2952  
Institut für Nuklearchemie Jül-3902  
D 38 (Diss., Köln, Univ., 2001)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek  
52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland  
☎ 024 61/61-52 20 · Telefax: 02461/61-61 03 · e-mail: [zb-publikation@fz-juelich.de](mailto:zb-publikation@fz-juelich.de)

## Synthesis of $^{18}\text{F}$ -labelled uridine diphosphoglucose as a coenzyme for $^{18}\text{F}$ -glycosylation of glycoproteins

The chemo-enzymatic radiosynthesis of no carrier added (n.c.a.) uridine diphospho-2-deoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluoro- $\alpha$ -D-glucose (UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc) was developed. In order to overcome the problem of poor regioselectivity when using the commonly strategy to label proteins via  $^{18}\text{F}$ -labelled prosthetic groups, the use of enzyme systems in addition to the corresponding  $^{18}\text{F}$ -labelled coenzymes was shown to be a reliable, regioselective and mild labelling method.

With regard to the comparison and evaluation of the stereoselectivity of the phosphorylating agents used in the chemical synthesis of cold uridine diphospho-2-deoxy-2-fluoro- $\alpha$ -D-glucose,  $^{31}\text{P}$ -decoupled and  $^1\text{H}$ -NMR-studies were successfully realized. Uridine diphospho-2-deoxy-2-fluoro- $\alpha$ -D-glucose was obtained in a 7 step synthesis. Tetrabenzylpyrophosphate was shown to be a highly stereoselective phosphorylating agent for FDG ( $\alpha/\beta=3:1$ ). Moreover, a multienzymatic pathway for the synthesis of uridine diphospho-2-deoxy-2-fluoro- $\alpha$ -D-glucose was adopted starting from FDG and four commercially available enzymes. This strategy was adjusted to a mg-scale synthesis providing 35% chemical yield. Within the scope of this procedure, a comparison of the natural substrate  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate with 2-fluoro-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate indicated that the enzyme activity of UDP-glucose pyrophosphorylase (UDP-Glc PPase) was decreased by a factor of 30.

With regard to the adaptability of the multiple enzyme system for the radiosynthesis of n.c.a. uridine diphospho-2-deoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluoro- $\alpha$ -D-glucose a rapid hexokinase-mediated phosphorylation of  $^{18}\text{F}$ FDG utilizing ATP or UTP as phosphate donor was performed. A further enzymatic isomerization of n.c.a.  $^{18}\text{F}$ FDG-6-phosphate to n.c.a.  $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphate was limited due to the formation of  $^{18}\text{F}$ FDG-1.6-diphosphate as main product. Experiments using a multiple enzyme system to develop a fully enzymatic synthetic route to UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc turned out to be less efficient due to the necessity of carrier added conditions.

Thus, a chemo-enzymatic synthesis of n.c.a. UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc has been developed, starting from 1.3.4.6-tetra-O-acetyl-2- $^{18}\text{F}$ fluoro-2-deoxy-D-glucose, which occurs as an intermediate in the  $^{18}\text{F}$ FDG synthesis. The chemical phosphorylation via MacDonald reaction and subsequent deprotection led to a radiochemical yield of 55% of  $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphate. UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc was synthesized enzymatically by condensation of  $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphate with UTP in presence of UDP-Glc PPase. In order to overcome the problem of decreased enzyme activity the reaction was performed in a minimized reaction volume and optimized UTP-concentration of 0.5 mmol/l leading to an overall radiochemical yield of 20% of UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc within 110 min. The  $^{18}\text{F}$ -labelled coenzyme UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc was used as a tool for  $^{18}\text{F}$ -glycosylation of N-acetylglucosamine mediated by  $\beta$ -1.4-galactosyltransferase. The  $^{18}\text{F}$ -glycosylated product was obtained in a radiochemical yield of 56% and was easily isolated by solid phase extraction. In addition to the general availability of  $^{18}\text{F}$ FDG worldwide, this new strategy for enzymatic transfer of "activated  $^{18}\text{F}$ FDG" has demonstrated its potential as a highly selective and mild  $^{18}\text{F}$ -labelling method of glycosylated biopolymers to study their pharmacokinetics using positron-emission-tomography.

## Kurzzusammenfassung

Die chemoenzymatische Radiosynthese von no-carrier-added (n.c.a.) Uridindiphosphat-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc) wurde entwickelt. Mit dem Ziel, die Problematik der niedrigen Regioselektivität von herkömmlichen Markierungsmethoden für Proteine unter Verwendung von prosthetischen Gruppen zu bewältigen, wurde unter Verwendung von Enzymsystemen und eines korrespondierenden  $^{18}\text{F}$ -markierten Coenzym der Weg einer zuverlässigen, regioselektiven und milden Markierungsmethode gezeigt.

Im Hinblick auf den Vergleich und die Bewertung der Stereoselektivität von Phosphorylierungsmitteln im Rahmen der Synthese von kaltem Uridindiphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose wurden  $^{31}\text{P}$ -entkoppelte und  $^1\text{H}$ -NMR-Studien erfolgreich abgeschlossen. Uridindiphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose wurde nach einer 7-stufigen Synthese erhalten. Als hochselektives Phosphorylierungsmittel für FDG diente hierbei Tetrabenzylpyrophosphat ( $\alpha/\beta=3:1$ ). Ferner wurde eine multienzymatische Synthese von Uridindiphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose ausgehend von FDG und vier kommerziell erhältlichen Enzymen durchgeführt. Diese Strategie wurde für eine Synthese im mg-Maßstab ausgerichtet und lieferte eine chemische Ausbeute von 35% für das Produkt. Im Rahmen dieser Prozedur lieferte der Vergleich von dem natürlichen Substrat  $\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat mit 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat eine Herabsetzung der Enzymaktivität von UDP-glucose Pyrophosphorylase (UDP-Glc PPase) um den Faktor 30. Im Hinblick auf die Anwendbarkeit eines Multienzymsystems auf die Radiosynthese von n.c.a. Uridindiphosphat-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor- $\alpha$ -D-glucose wurde eine schnelle, hexokinase-katalysierte Phosphorylierung von  $^{18}\text{F}$ FDG mit Hilfe von ATP oder UTP als Phosphatdonor durchgeführt. Eine anschließende enzymatische Isomerisierung von n.c.a.  $^{18}\text{F}$ FDG-6-phosphat zu n.c.a.  $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphat war limitiert aufgrund der bevorzugten Bildung von  $^{18}\text{F}$ FDG-1,6-diphosphat. Demzufolge erwies sich ein Multienzymsystem für die Entwicklung einer rein-enzymatischen Synthese von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc wenig effizient aufgrund der Notwendigkeit von geträgerten Reaktionsbedingungen.

Daher wurde eine chemoenzymatische Synthese von n.c.a. UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc entwickelt, die von 1.3.4.6-Tetra-O-acetyl-2- $^{18}\text{F}$ fluor-2-desoxy-D-glucose ausgeht, welches als Zwischenprodukt in der  $^{18}\text{F}$ FDG-Synthese auftritt. Die chemische Phosphorylierung nach MacDonald und die anschließende Entschützung führte zu einer radiochemischen Ausbeute von 55% für  $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphat. UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc wurde enzymatisch durch Kondensation von  $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphat mit UTP unter Anwesenheit von UDP-Glc PPase synthetisiert. Mit dem Ziel, das Problem der erniedrigten Enzymaktivität zu überwinden, wurde die Synthese in einem minimierten Reaktionsvolumen und mit optimierter UTP-Konzentration von 0,5 mmol/l realisiert und führte zu einer radiochemischen Ausbeute von 20% für UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc innerhalb von 110 min. Das  $^{18}\text{F}$ -markierte Coenzym UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc wurde in der  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase-katalysierten  $^{18}\text{F}$ -Glykosylierung von N-Acetylglucosamin verwendet. Das  $^{18}\text{F}$ -glykosylierte Produkt wurde in einer radiochemischen Ausbeute von 56% erhalten und konnte mittels Festphasenextraktion isoliert werden. In Ergänzung zu der allgemeinen Verfügbarkeit von  $^{18}\text{F}$ FDG weltweit hat diese neue Strategie für den enzymatischen Transfer von "aktiviertem  $^{18}\text{F}$ FDG" das Potential einer hochselektiven und milden  $^{18}\text{F}$ -Markierungsmethode für glykosylierte Biopolymere aufgezeigt, die verwendet werden kann, um deren Biokinetik mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie zu ermitteln.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Bedeutung kurzlebiger Positronenstrahler in der Nuklearchemie und Nuklearmedizin	1
1.2	Produktion von Fluor-18	6
1.3	Chemische Methoden zur $^{18}\text{F}$ -Markierung organischer Moleküle	7
1.3.1	<i>Elektrophile Fluorierung</i>	7
1.3.2	<i>Nukleophile Fluorierung</i>	8
1.3.3	<i>Fluorierung von Proteinen und Peptiden mit Hilfe prosthetischer Gruppen</i>	10
1.4	Enzymatische und chemische Methoden zur Synthese von Glykokonjugaten	13
1.4.1	<i>Bedeutung von Glykokonjugaten</i>	13
1.4.2	<i>Aufbau und Biosynthese von Glycoproteinen</i>	16
1.4.3	<i>Chemische Methoden für die Synthese von Nucleotidzuckern</i>	19
1.4.4	<i>Enzymatische Synthese von Nuceotidzuckern und ihre Anwendung</i>	21
1.5	Anwendungsmöglichkeiten von enzymatischen Methoden in der Radiochemie	24
<b>2</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>28</b>
3.1	Chemische Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP-FGlc)	28
3.2	Multienzymatische makroskopische Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP-FGlc)	32
3.2.1	<i>Enzymatische Phosphorylierung mittels Hexokinase</i>	33
3.2.2	<i>Isomerisierung mittels Phosphoglucomutase</i>	34
3.2.3	<i>Das UDP-Glc Pyrophosphorylase System</i>	34
3.2.4	<i>Einfluß der Cofaktoren auf die Enzymaktivität von UDP-Glc Pyrophosphorylase</i>	35
3.2.5	<i>Isolierung und Reinigung von UDP-FGlc</i>	40

3.3	Geträgerte multienzymatische Radiosynthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2- <sup>18</sup> F]fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP-[ <sup>18</sup> F]FGlc)	43
3.3.1	<i>Enzymatische n.c.a. Phosphorylierung von 2-Desoxy-2-<sup>18</sup>F]fluor-<math>\alpha</math>-D-glucose</i>	44
3.3.1.1	<i>ATP als Phosphatdonor</i>	44
3.3.1.2	<i>UTP als Phosphatdonor</i>	46
3.3.1.3	<i>Einfluß der Trägerkonzentration</i>	47
3.3.1.4	<i>Reaktionsbedingungen der n.c.a. Phosphorylierung im Hinblick auf die Anwendung des Multienzymsystems für die Synthese von UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc</i>	49
3.3.2	<i>Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von n.c.a. UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc vom Cofaktor des PGM-Systems</i>	50
3.3.3	<i>Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc von der Trägerkonzentration</i>	55
3.4	Chemoenzymatische n.c.a. Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2- <sup>18</sup> F]fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP-[ <sup>18</sup> F]FGlc)	58
3.4.1	<i>Versuche zur Phosphorylierung von 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-<sup>18</sup>F]fluor-D-glucose mittels Tetrabenzylpyrophosphat</i>	60
3.4.2	<i>MacDonald-Phosphorylierung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-<sup>18</sup>F]fluor-<math>\beta</math>-D-glucose</i>	62
3.4.2.1	<i>Einfluß der H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Masse auf die radiochemische Ausbeute</i>	63
3.4.2.2	<i>Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Reaktionszeit und Temperatur</i>	65
3.4.2.3	<i>Vergleich des Einflusses des Gefäßmaterials Borosilikatglas (Duran) sowie Glaskohlenstoff (Sigradur G) auf die Phosphorylierung</i>	66
3.4.3	<i>Enzymatische n.c.a. Synthese von UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc</i>	67
3.4.3.1	<i>Abhängigkeit von der UTP-Konzentration</i>	67
3.4.3.2	<i>Abhängigkeit von der Pyrophosphorylase-Konzentration</i>	68
3.4.4	<i>Optimierung der Reaktionsführung</i>	70
3.5	Studie zur enzymatischen <sup>18</sup> F-Glycosylierung von N-Acetylglucosamin mit $\beta$ -(1,4)-Galactosyltransferase	73
<b>4</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>76</b>
4.1	Verwendete Chemikalien	76
4.2	Geräte	75
4.3	Darstellung der inaktiven Standardverbindungen	79
4.3.1	<i>Chemische Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor-<math>\alpha</math>-</i>	

	<i>D-glucose</i>	79
4.3.2	<i>Durchführung der MacDonald-Phosphorylierung</i>	83
4.3.3	<i>Multienzymatische Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor-<math>\alpha</math>-D-glucose</i>	84
4.4	<b>Radiosynthesen</b>	85
4.4.1	<i>1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[<math>^{18}</math>F]fluorglucose</i>	85
4.4.2	<i>2-Desoxy-2-[<math>^{18}</math>F]fluorglucose-1-phosphat</i>	86
4.4.3	<i>2-Desoxy-2-[<math>^{18}</math>F]fluorglucose-6-phosphat</i>	86
4.4.4	<i>3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-[<math>^{18}</math>F]fluorglucose</i>	87
4.4.5	<i>3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-[<math>^{18}</math>F]fluor-<math>\alpha</math>-D-glucose-1-dibenzylphosphat</i>	87
4.4.6	<i>Versuche zur multienzymatischen Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[<math>^{18}</math>F]fluor-<math>\alpha</math>-D-glucose</i>	88
4.4.7	<i>Chemoenzymatische Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[<math>^{18}</math>F]fluor-<math>\alpha</math>-D-glucose im Zwischenkornvolumen der festen Phase</i>	88
4.4.8	<i><math>^{18}</math>F-Glycosylierung von N-Acetyl-glucosamin</i>	89
4.5	<b>Analytische Verfahren</b>	90
4.5.1	<i>Anionenaustauscherchromatographie</i>	90
4.5.2	<i>Radio-HPLC</i>	90
4.5.3	<i>Radio-Dünnschichtchromatographie</i>	92
4.6	<b>Bestimmung der molaren Aktivität von n.c.a. Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[<math>^{18}</math>F]fluor-<math>\alpha</math>-D-glucose</b>	94
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>98</b>
	<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole</b>	<b>107</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung kurzlebiger Positronenstrahler in der Nuklearchemie und Nuklearmedizin

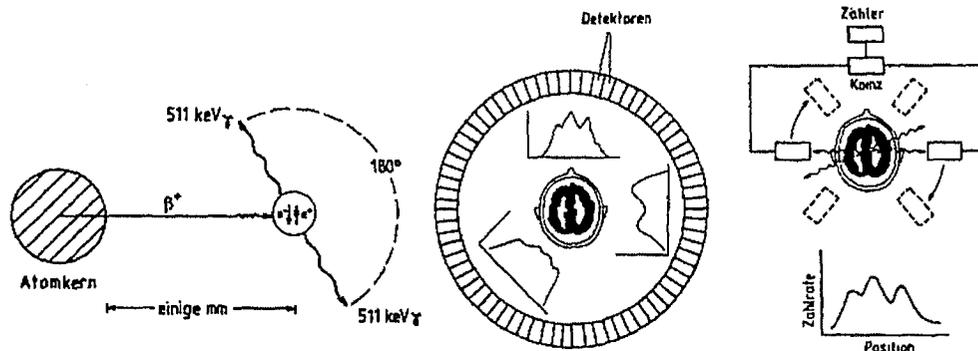
In den Lebenswissenschaften stellt das Tracerkonzept, welches auf den Arbeiten von G. von Hevesy (Chemiker, 1885-1966) beruht, eine Grundlage für den Einsatz natürlicher und künstlich erzeugter Radionuklide dar. Das Tracerkonzept definiert einen Radiotracer als Verbindung, die es erlaubt, aufgrund der chemischen Nichtunterscheidbarkeit der Isotope einen biochemischen Vorgang in vivo zu studieren, ohne ihn dabei zu beeinflussen.

Heute existieren sehr viele Teildisziplinen im Bereich der Lebenswissenschaften, in denen dieses Konzept in analytischen Verfahren, diagnostischen und therapeutischen Methoden etabliert ist und in der Routine angewendet wird. So werden in der organischen Chemie radioaktiv-markierte Verbindungen verwendet, um Reaktionsmechanismen aufzuklären, in der Biochemie wird die Markierung exogener und endogener Substrate für die Aufklärung des Metabolismus genutzt, und wichtige analytische Verfahren wie die Autoradiographie und insbesondere der Radioimmunoassay finden in der medizinischen Forschung ihre Anwendung [1,2].

Einen besonderen Stellenwert für die Anwendung von Radionukliden in der Nuklearmedizin nehmen zwei seit den siebziger Jahren stetig weiterentwickelte, bildgebende und computergestützte Verfahren ein: die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und die Einzel-Photonen-Emissions-Tomographie (SPET). Mit Hilfe dieser Verfahren können physiologische Prozesse nicht-invasiv diagnostiziert und (mittels PET) quantifiziert werden. Zudem ist es möglich, biochemische Folgereaktionen in vivo zu studieren [3-5]. Diese leistungsfähigen Methoden dienen ebenfalls der Pharmakologie, mit dem Ziel, Informationen zur Optimierung der Verteilungscharakteristik neuer pharmakologisch wirksamer Präparate zu erhalten.

Die PET erlaubt es, aufgrund der Charakteristik des Positronenzerfalls, biochemische Prozesse regional in vivo auch quantitativ zu erfassen, was den besonderen Stellenwert der PET hervorhebt. Positronenstrahler zerfallen unter Umwandlung eines Protons in ein Neutron, wobei gleichzeitig ein Positron ( $\beta^+$ ) und ein Neutrino ( $\nu$ ) frei werden [6]. Das emittierte Positron verliert seine hohe kinetische Energie durch Abbremsvorgänge im umgebenden Gewebe, wobei dessen Bremsweg nur einige Millimeter beträgt. Anschließend wird das Positron vernichtet, wenn es mit seinem Antiteilchen, dem Elektron, rekombiniert. Hierbei werden die Ruhemassen der beiden Teilchen bevorzugt in Form von zwei 511 keV  $\gamma$ -Quanten frei, die unter einem Winkel von  $180^\circ$  emittiert werden (Vernichtungsstrahlung). Die  $\gamma$ -Strahlung durchdringt das Körpergewebe leicht und kann von außen mittels zwei gegenüberliegender, in Koinzidenz geschalteten Detektoren extern nachgewiesen werden. Dadurch ist ein ortsabhängiger

Nachweis möglich, denn die zwei gegenüberliegenden Detektoren registrieren nur dann ein Zerfallsereignis, wenn sie gleichzeitig, d.h. innerhalb der Koinzidenzauflösungszeit von wenigen Nanosekunden, getroffen werden. In Abbildung 1.1 ist schematisch das Meßprinzip einer PET-Kamera dargestellt.



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung des Meßprinzips einer PET-Kamera

Die heutigen PET-Kameras bestehen im wesentlichen aus einer Vielzahl von ringförmig angeordneten Detektoren. Mehrere solcher Detektorsysteme, in denen jeder Detektor mit gegenüberliegenden Detektoren im gleichen und im benachbarten Ring in Koinzidenz geschaltet ist, erlauben es, Projektionen der Aktivitätsverteilung aufzunehmen. Unter Zuhilfenahme von mathematischen Modellen der zu beobachtenden biochemischen Prozesse und einer computergestützten Datenerfassung ist es so möglich, Schnittbilder von Organen wie Herz oder Gehirn zu erfassen und die Konzentrationen markierter Verbindungen im piko- bis nanomolaren Bereich in sehr kleinen Volumenelementen von weniger als einem Kubikzentimeter zu bestimmen [7]. Die tiefenunabhängige Detektorausbeute aufgrund des 180° Winkels der Vernichtungsstrahlung und die Möglichkeit der Bestimmung von Streu- und Absorptionsverlusten mit Hilfe eines Transmissionsexperimentes ermöglicht die Quantifizierung der Aktivitätskonzentrationen in einer PET-Studie. So werden z.B. Stoffwechselfunktionen wie der Sauerstoff- oder Glucoseumsatz sowie physiologische Funktionen wie der Blutfluß regional quantitativ erfaßt [8,9]. Zudem ist, bedingt durch die kurze Halbwertszeit der verwendeten Positronenstrahler, eine kurzzeitige Wiederholung der computergestützten Messung und somit die statistische Absicherung der ermittelten Aktivitätskonzentrationen möglich. Die hohe Ortsauflösung der Kameras und insbesondere die quantitative Erfassung der Aktivitätskonzentrationen begründen den hohen Stellenwert der PET in der modernen nuklearmedizinischen Diagnostik.

Die PET ist jedoch sehr teuer und steht demzufolge auch nur limitiert zur Verfügung, daher werden anstelle eines PET-Tracers alternative Radiotracer für die SPET zur Anwendung gebracht, die Informationen mit zeitlicher Auflösung liefern, allerdings mit geringerer räumlicher Auflösung und keiner Quantifizierung.

Die Grundlagen für die Anwendung der PET in der Nuklearmedizin ist die Produktion des Positronenstrahlers (siehe Absch. 1.2) und die Bereitstellung der markierten Verbindung (siehe Absch. 1.3). In diesem Zusammenhang zählt insbesondere das „Design“ neuer Radiopharmaka zum Aufgabenbereich des Radiochemikers. Der Radiochemiker setzt für synthetische Zwecke Positronenstrahler ein, die mit Hilfe eines Zyklotrons hergestellt werden. Dies setzt eine Arbeitstechnik für chemische Reaktionen im subnanomolaren Bereich voraus, d.h. der Positronenstrahler liegt im allgemeinen in hoher molarer Aktivität vor. Zum Verständnis des Begriffs „molare Aktivität“ ist die Bezeichnung „trägerfrei“ von Wichtigkeit. Der trägerfreie Zustand eines Radiotracers ist unter Bedingungen der vollkommenen Nuklidreinheit erreicht, wobei keinerlei isotope Verunreinigung erlaubt ist. Liegen isotope Beimischungen vor, z.B. aus dem Produktionsprozeß (siehe Absch. 1.3), so bezeichnet man diesen Zustand als „geträgert“. Im allgemeinen unterscheidet man:

- „geträgert“ (carrier-added, c.a.)
- „trägerarm“ (no-carrier-added, n.c.a.)
- „trägerfrei“ (carrier-free)

Die Abschätzung der maximalen theoretischen molaren Aktivität  $A_S$  kann über das Gesetz des radioaktiven Zerfalls erfolgen. Die molare Aktivität  $A_S$  ist über folgende Beziehung mit der Halbwertszeit  $T_{1/2}$  und der Anzahl radioaktiver Atome  $N$  verbunden ( $T_{1/2}$ : Halbwertszeit [s],  $\lambda$ : Zerfallskonstante [ $s^{-1}$ ],  $N$ : Anzahl der radioaktiven Atome) :

$$A_S = \frac{dN}{dt} = N \cdot \lambda = \frac{\ln 2}{T_{1/2}} \cdot N$$

Die theoretisch erzielbare molare Aktivität in (Bq/mol) hängt somit ausschließlich von der Halbwertszeit des Nuklides ab. Im Fall von Fluor-18 mit  $T_{1/2}=6582$  s ergibt sich somit eine theoretische molare Aktivität von  $6 \cdot 10^{10}$  GBq/mol.

Der trägerfreie Zustand ist allerdings grundsätzlich nur bei künstlichen Elementen wie z.B. Astat erreichbar, denn aufgrund der Allgegenwärtigkeit der natürlichen Elemente ist immer eine gewisse Verdünnung des erzeugten Radionuklids mit isotopem Träger gegeben. Auch bei den mit geringer Häufigkeit vorhandenen Halogenen ist es nicht möglich, eine Verdünnung um den Faktor 10-1000 zu vermeiden [9]. Man verwendet deshalb für Markierungssynthesen nicht den Ausdruck „trägerfrei“, sondern „ohne Trägerzusatz“ bzw. trägerarm (engl.: no carrier added = n.c.a.). In der Praxis spielt die maximal erreichbare molare Ausbeute insbesondere bei toxischen und bei rezeptorbindenden Radiopharmaka eine Rolle, da diese häufig nur im nanomolaren bzw. subnanomolaren Bereich eingesetzt werden können. Einige interessante Radiopharmaka wurden bis vor kurzem nur mit größeren Mengen inaktiver Verunreinigung her-

gestellt, so daß deren Einsatz am Menschen wegen zu erwartenden toxischen Dosen bisher nicht möglich war [10]. Die Entwicklung neuer Markierungsmethoden für diese Zielverbindungen kann dann den Zugang zu einem Radiopharmakon in n.c.a. Mengen eröffnen, dessen pharmakodynamische Wirkung bei einer Applikation zu vernachlässigen ist.

Relevante Kriterien für die Wahl eines geeigneten Radionuklids zur Synthese des Tracers für nuklearmedizinische Zwecke sind neben der molaren Aktivität die Zerfallsart, die Zerfallsenergie des Radionuklids, die physikalische Halbwertszeit des Nuklids, die mit der biochemischen Halbwertszeit des Tracers abgestimmt sein muß, sowie logistische Gesichtspunkte wie Verfügbarkeit eines Zyklotrons oder die Produktionskosten [8]. In Tabelle 1.1 sind wichtige Positronenstrahler für die Positron-Emissions-Tomographie aufgeführt.

**Tabelle 1.1:** Wichtige Positronenstrahler für die PET [aus 5, 11, 17]

Nuklid	Halbwertszeit	Zerfallsart (Häufigkeit in %) $E_{\max} (\beta^+) [\text{keV}]$
organische		
C-11	20,4 min	$\beta^+$ (99,8) ; 960
N-13	10 min	$\beta^+$ (100) ; 1190
O-15	2 min	$\beta^+$ (99,9) ; 1723
analoge		
F-18	109,6 min	$\beta^+$ (97) ; 635
Br-75	97 min	$\beta^+$ (75,5) ; 1740
Br-76	16 h	$\beta^+$ (57) ; 3900
Se-73	7 h	$\beta^+$ (65) ; 1320
I-124	4,2 d	$\beta^+$ (25) ; 2140
metallische		
Cu-62	9,7 min	$\beta^+$ (98) ; 2930
Ga-68	68,3 min	$\beta^+$ (90) ; 1900
Rb-82	1,3 min	$\beta^+$ (96) ; 3350
Y-86	14,7 h	$\beta^+$ (34) ; 1300
Tc-94m	52 min	$\beta^+$ (72) ; 2470

C-11-, N-13- und O-15-Markierungen erscheinen besonders interessant, da isotop markierte Verbindungen resultieren, deren biochemische Eigenschaften mit denen der

Stammverbindung identisch sind. Allerdings sollte die Synthese und Qualitätskontrolle eines Radiopharmakons innerhalb von drei Halbwertszeiten abgeschlossen sein, deshalb ist für die Anwendung dieser Positronenstrahler ein „in-house“-Zyklotron notwendig, und die Messungen bleiben beschränkt auf schnelle Stoffwechselprozesse. Für mehrstufige Markierungssynthesen sind N-13 und O-15 ungeeignet, sie finden nur in einfachen und schnell zugänglichen Verbindungen wie  $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ ,  $[^{15}\text{O}]\text{CO}_2$ ,  $[^{15}\text{O}]\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$  und  $[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$  Anwendung [12].

Die längerlebigen radioaktiven Halogene sind hingegen als Analogtracer interessant (siehe Tab. 1.1). Eine Fremdmarkierung mit diesen Isotopen führt zu einer chemischen Modifizierung und somit zu einer Änderung der physiologischen Eigenschaften der Verbindung. Auf der Grundlage von Struktur-Analogie-Beziehungen versucht man, diese Änderungen möglichst auszuschliessen. So nutzt man z.B. den ähnlichen sterischen Raumbedarf des Fremdatoms (z.B. Br-75 für Methyl oder F-18 für Wasserstoff) oder eine Analogie der chemischen Bindung (z.B. Se-73 für Schwefel). Die sterische Analogie von F und H wird sehr oft ausgenutzt, da der Van-der-Waals-Radius von Fluor (1,35 Å) dem Atomradius von Wasserstoff (1,20 Å) sehr ähnlich ist. Auf diesem Struktur-Analogie-Prinzip beruht z.B. die Anwendung von 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluortyrosin zur Bestimmung der regionalen Proteinsyntheserate im Gehirn [13]. Andererseits zeigt das Beispiel der weltweit routinemässig als Radiopharmakon eingesetzten 2- $[^{18}\text{F}]$ Fluordesoxyglucose (FDG) eindrucksvoll, daß die Einführung eines Fremdatoms auch zu einer erwünschten Änderung des Metabolismus des Radiopharmakons in vivo führen kann. FDG wird im Körper phosphoryliert und anschließend nicht weiter metabolisiert, wodurch das Radiopharmakon im Zielorgan „gefangen“ ist. Erst dieses metabolische „trapping“ erlaubt die Messung seiner räumlichen und zeitlichen Verteilung [14]. Ein weiteres Beispiel für metabolisches „trapping“ stellt die 14- $[^{18}\text{F}]$ Fluor-6-thiaheptadecansäure dar, die für die Untersuchung des Herzstoffwechsels mittels PET eine Rolle spielt [15].

Wie aus den genannten nuklearen Eigenschaften hervorgeht (siehe Tab. 1.1), hat Fluor-18 eine bedeutende und herausragende Position unter den PET-Radionukliden eingenommen. Dies liegt insbesondere an der günstigen Halbwertszeit von 109,7 min, der niedrigen  $\beta^+$ -Energie von 635 keV, die eine niedrige Strahlenbelastung des Patienten bedingt, und ebenso an der Stabilität der C-F-Bindung mit einer mittleren Bindungsenergie von 444 kJ/mol, die eine sehr gute Voraussetzung für die Stabilität von  $^{18}\text{F}$ -markierten Radiopharmaka darstellt. Zudem stehen für die Produktion von Fluor-18 Kernreaktionen zur Verfügung, die eine hohe molare Aktivität ermöglichen, so daß es insbesondere als PET-Nuklid für Rezeptordichtebestimmungen eine ausschlaggebende Rolle spielt [16].

## 1.2 Produktion von Fluor-18

Die Produktion von Positronenstrahlern setzt die Ermittlung einer Anregungsfunktion einer möglichen Kernreaktion voraus, die in einem optimalen Energiebereich einen hohen Wirkungsquerschnitt aufweist. Fluor-18 wird an einem kleinen stromstarken Teilchenbeschleuniger, einem sogenannten Minizyklotron oder „Baby“-Zyklotron, hergestellt. In Tabelle 1.2 sind die vier bedeutendsten Kernreaktionen für die Produktion von Fluor-18 zusammengestellt.

**Tabelle 1.2:** Wichtige Fluor-18-Produktionsprozesse am Zyklotron [aus 17]

Kernreaktion	$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	$^{16}\text{O}(^3\text{He},p)^{18}\text{F}$	$^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}^{(1)}$
Target	$\text{H}_2^{18}\text{O}$	$\text{H}_2\text{O}$	Ne (0,1-0,2% $\text{F}_2$ )	$^{18}\text{O}_2$ , Kr (1% $\text{F}_2$ )
Energie [MeV]	16 → 0	36 → 0	11,2 → 0	10 → 0
Chemische Form des Fluor-18	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$	$^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$
Targetausbeute [mCi/ $\mu\text{Ah}$ ]	60	7	10-12	10
Molare Aktivität [Ci/mmol]	bis zu $10^5$	Bis zu $10^5$	1-10	1-50

<sup>(1)</sup> es handelt sich hierbei um eine zweistufige Bestrahlungsmethode

Aufgrund des hohen Wirkungsquerschnittes der  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ -Kernreaktion hat sich heute der Produktionsprozeß von trägerarmem (n.c.a.) Fluor-18 (als solvatisiertes Anion) mittels Bestrahlung von  $^{18}\text{O}$ -angereichertem Wasser bei relativ geringen Protonenenergien (11 MeV) durchgesetzt [18]. Damit erhält man hohe Targetausbeuten und kann so die erforderliche Menge an Targetmaterial minimieren. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die hohen Kosten für des  $^{18}\text{O}$ -angereicherte Wasser sehr günstig, zudem wird das erzeugte  $^{18}\text{F}$ -Fluorid nach der Bestrahlung an einem Anionenaustauscher fixiert, was die einfache Rückgewinnung des  $^{18}\text{O}$ -angereicherten Wassers ermöglicht, so daß es nach photochemischer und destillativer Reinigung erneut als Targetmaterial genutzt werden kann [19].

Die Darstellung von Fluor-18 in Form von elektrophilem  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  gelingt über die Deuteronenbestrahlung von Neon ( $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ ) oder die Protonenbestrahlung von Sauerstoff-18 ( $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ ). Allerdings erhält man, aufgrund des notwendigen Zusatzes von  $\text{F}_2$  bei der Extraktion von Fluor-18 aus dem Gastarget, weit geringere molare Aktivitäten (siehe Tab. 1.2). Fluorierungsreaktionen mit elektrophilem Fluor-18 resultieren

daher in trägerhaltigen  $^{18}\text{F}$ -markierten Zielverbindungen mit deutlich verminderter molarer Aktivität [20].

### 1.3 Chemische Methoden zur $^{18}\text{F}$ -Markierung organischer Moleküle

Die chemische Form des Fluor-18, in der es nach dem Produktionsprozess vorliegt (vgl. Tab. 1.2), bestimmt den Reaktionstyp, der für eine gezielte  $^{18}\text{F}$ -Markierung organischer Zielverbindungen zur Anwendung kommt. Molekulares c.a.  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  steht als elektrophiles Agens zur Verfügung, dagegen eignet sich das  $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid-Ion}$ , isoliert aus wässriger Lösung, unter bestimmten Reaktionsbedingungen als gutes Nukleophil für n.c.a.  $^{18}\text{F}$ -Markierungen. Des weiteren findet die  $^{18}\text{F}$ -Fluorierung über prosthetische Gruppen in einer mehrstufigen Reaktion insbesondere bei der Markierung von Proteinen und Peptiden ihre Anwendung.

#### 1.3.1 Elektrophile Fluorierung

Die elektrophile Fluorierung ist mit dem Agens  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ , das direkt aus dem Gastarget gewonnen wird, möglich oder mit dessen Folgeprodukten, wie  $[^{18}\text{F}]\text{XeF}_2$ , oder dem milden Fluorierungsreagens  $[^{18}\text{F}]\text{Acetylhypofluorit}$ . Wie in Kapitel 1.2 bereits erläutert, sind diese Fluorierungsmittel nicht ohne Trägerzusatz darstellbar, des weiteren beträgt die radiochemische Ausbeute im Falle von  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  maximal 50%, da im  $^{18}\text{F}$ - $^{19}\text{F}$ -Molekül jedes Fluoratom gleichwertig reagiert. Alle elektrophile Fluorierungsreaktionen zeichnen sich durch ihre hohe Reaktivität und fehlende Selektivität aus, somit kommt es generell zu unerwünschten Nebenreaktionen, Reaktionen mit dem Lösungsmittel und zur Bildung von mehreren Produktisomeren. Daher ist es notwendig, die Reaktionsbedingungen gezielt auszuwählen, so daß die Bildung von Nebenprodukten limitiert wird und gleichzeitig eine möglichst hohe Regioselektivität erreicht wird. Dies ist beispielsweise für die direkte Radiofluorierung von Phenylalanin, Tyrosin und L-DOPA mittels  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  und  $[^{18}\text{F}]\text{Acetylhypofluorit}$  ( $[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{COOF}$ ) durchgeführt worden [21].  $[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{COOF}$  erwies sich als das mildere, selektivere Fluorierungsmittel und erzeugt weniger Nebenprodukte. Dennoch gelingt die gezielte Synthese nur eines Produktisomers nicht, z.B. ergibt die elektrophile aromatische Substitution von L-Phenylalanin mit  $[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{COOF}$  in Trifluoressigsäure ein Isomerengemisch aus 2-, 3- und 4- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorphenylalanin}$  mit der Verteilung 82:11:7 [21]. Somit ist es notwendig, insbesondere im Hinblick auf das unterschiedliche physiologische Verhalten der Isomere, eine Abtrennung des gewünschten Produkts vorzunehmen. Im Falle von  $[^{18}\text{F}]\text{Fluortyrosin}$  besteht die Möglichkeit die Regioselektivität der Reaktion durch Verwendung eines O-acetylierten Markierungsvorläufers zugunsten des 2- $[^{18}\text{F}]\text{Fluortyrosins}$  wesentlich zu verbessern [13].

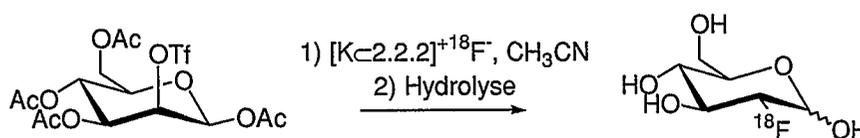
Eine nahezu vollständige Regioselektivität für elektrophile aromatische  $^{18}\text{F}$ -Fluorierungen läßt sich in besonderen Fällen durch Demetallierungsreaktionen erzielen [23]. Als Markierungsvorläufer eignen sich Organoquecksilber-, Organozinn-, Organogermanium- und Organosiliciumverbindungen. Die Markierungssynthesen finden mit  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  oder dem milderen Fluorierungsmittel  $\text{CH}_3\text{COOF}$  bei  $-78^\circ\text{C}$  bzw.  $0^\circ\text{C}$  statt und beinhalten für komplexe Moleküle, bei denen reaktive funktionelle Gruppen geschützt werden müssen, weitere Hydrolyseschritte, die der elektrophilen Markierung nachgeschaltet sind. Im Vergleich mit der direkten elektrophilen aromatischen Substitution eines Zielmoleküls muß man den Syntheseaufwand des Organometallvorläufers dem Aufwand der Isomerentrennung gegenüberstellen. Ein Beispiel für eine Demetallierungsreaktion ist die Darstellung von 6- $[^{18}\text{F}]$ Fluormetaraminol über die Demerkurierung des entsprechenden Vorläufermoleküls [24]. Insbesondere an diesem Beispiel ist das Problem aller elektrophilen  $^{18}\text{F}$ -Fluorierungen unverkennbar: Ihre Anwendung ist limitiert auf Zielverbindungen, die nicht toxisch sind und deren Tracereigenschaften nicht an eine hohe molare Aktivität gebunden sind. Im Falle von 6- $[^{18}\text{F}]$ Fluormetaraminol verläuft die Synthese via Fluordemerkurierung mit  $[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{COOF}$  zwar regiospezifisch, allerdings ergibt sie eine geringe molare Aktivität von 18-44 GBq/mmol (0,5-1,2 Ci/mmol) [24]. Die dem Patienten applizierten Stoffmengen der toxischen Substanz wären in diesem Falle einer elektrophilen Markierung pharmakologisch wirksam und aufgrund dessen war die Anwendung für PET-Studien am Menschen bisher nicht vertretbar. Erst vor kurzem wurde durch eine nukleophile n.c.a.  $^{18}\text{F}$ -Markierung eines geeigneten Vorläufers  $[^{18}\text{F}]$ Fluormetaraminol mit einer molaren Aktivität von 2000 Ci/mmol dargestellt und steht der klinischen Bewertung in der kardiologischen PET-Diagnostik routinemässig zur Verfügung [25].

### 1.3.2 Nukleophile Fluorierung

Die gebräuchlichste Methode zur Darstellung von  $^{18}\text{F}$ -markierten Radiopharmaka stellt die nukleophile Markierung mittels n.c.a.  $[^{18}\text{F}]$ Fluorid dar, bei der das Radionuklid theoretisch zu 100% umgesetzt werden kann. Nach dem Produktionsprozess liegt  $[^{18}\text{F}]$ Fluorid in wässriger Lösung stark solvatisiert vor und es neigt dazu, in Gegenwart von Protonen leicht protoniert zu werden. Daher ist eine Aktivierung von  $[^{18}\text{F}]$ Fluorid zu einem geeigneten Nukleophil notwendig, die durch die Zugabe von [2.2.2]Kryptand<sup>1</sup>, der als Phasentransferkatalysator die Löslichkeitssteigerung der Ionenpaare in dipolar aprotischen Lösungsmitteln bewirkt, und von nicht nukleophilen basischen Anionen (Carbonat, Oxalat) realisiert wird. Insbesondere die Kombination Kryptofix<sup>®</sup> 2.2.2/ $\text{K}_2\text{CO}_3$  hat sich für die Anionenaktivierung bewährt. Hierbei führt die Komplexierung der Kalium-Ionen durch den Aminopolyether ([2.2.2]Kryptand) in einem dipolar

<sup>1</sup> Nomenklatur nach J.M. Lehn [26]: Die Ziffern geben die Anzahl der Sauerstoffatome, die durch Ethyleneinheiten getrennt sind, pro Etherbrücke an.

aprotischen Lösungsmittel (z.B. Acetonitril, Dimethylsulfoxid, N,N-Dimethylformamid oder N,N-Dimethylacetamid) zu einem Fluorid-Ion hoher Nukleophilie. Als Abgangsgruppen für die nukleophile aliphatische Substitution dienen die in der klassischen organischen Chemie bewährten Substituenten wie Br, I, Mesylat, Tosylat, Triflat, cyclische Schwefelsäureester sowie cyclische Sulfamate. Neben der aliphatischen nukleophilen Substitution gelingt ebenso die aromatische Substitution mit Hilfe der Kryptat-gestützten Markierungsmethode. Neben einer geeigneten Abgangsgruppe (z.B. NO<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, F, Br, Cl) ist in diesem Fall eine Aktivierung des Aromaten durch elektronenziehende Substituenten (z.B. NO<sub>2</sub>, CN, CHO oder CH<sub>3</sub>CO) in ortho- oder para-Position zur Abgangsgruppe notwendig [zur Übersicht: 40, 27]. Die nukleophile aliphatische Fluorierung mit Hilfe des Kryptofix/Carbonat-Systems in einem dipolar aprotischen Lösungsmittel verläuft nach einem S<sub>N</sub>2-Reaktionsmechanismus. Daher kann durch Wahl der korrespondierenden Markierungsvorläufermoleküle eine stereospezifische <sup>18</sup>F-Markierung realisiert werden.



**Abbildung 1.2:** Reaktionsschema zur Darstellung von 2-[<sup>18</sup>F]Fluor-2-desoxy-D-glucose (FDG)

So gelingt z.B. die Darstellung von 2-[<sup>18</sup>F]Fluor-2-desoxy-D-glucose (FDG), des wichtigsten PET-Radiopharmakons überhaupt, durch <sup>18</sup>F-Markierung von 1,3,4,5-Tetra-O-acetyl-2-O-trifluormethansulfonyl-β-D-mannose (siehe Abb. 1.2) [28] und z.B. die enantiomerenreine Synthese von (1R,2S)-1-[<sup>18</sup>F]Fluor-1-desoxyephedrin (FDE) ausgehend von dem cyclischen Sulfamat des (1S,2S)-Pseudoephedrin [29]. Allerdings ist die Anwendbarkeit des Kryptofix/Carbonat-Systems beschränkt auf Edukte, die unter den basischen Bedingungen eine ausreichende Stabilität besitzen. Ist dies nicht der Fall, so kann eine nukleophile <sup>18</sup>F-Fluorierung im weniger basischen Oxalat-Carbonat-System erfolgreich sein. Ein wesentliches Beispiel dafür ist die Darstellung der Rezeptorliganden für das dopaminerge System, die Butyrophenon-Neuroleptika 3-N-[<sup>18</sup>F]Methylspiperon, [<sup>18</sup>F]Haloperidol oder [<sup>18</sup>F]Benperidol, durch eine einstufige F-für-NO<sub>2</sub> Substitution in einer radiochemischen Ausbeuten von bis zu 45% [30,31].

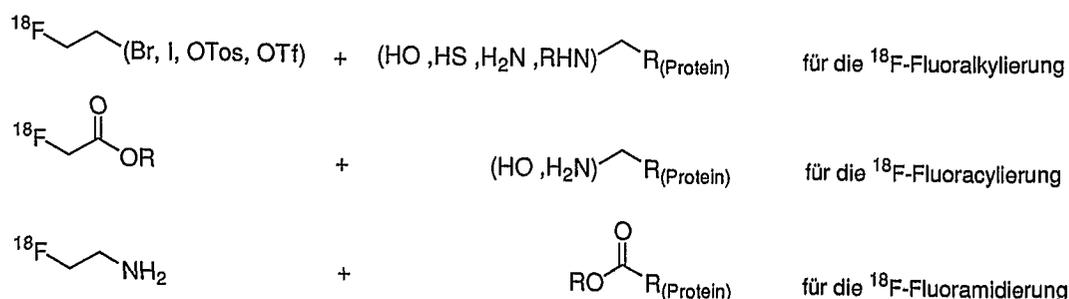
Das in Kapitel 1.3.1 bereits erwähnte [<sup>18</sup>F]Fluortyrosin oder [<sup>18</sup>F]Fluor-DOPA wurde ebenfalls in n.c.a.-Form dargestellt, allerdings beinhalten diese Synthesen eine sehr aufwendige chemische Aktivierung des Aromaten sowie eine mehrstufige nachfolgende Radiosynthese [32]. Der Vorteil auf diesem Wege zu einer höheren absoluten Produktaktivität der <sup>18</sup>F-Tracer zu gelangen, ist neben dem allgemeinen Vorteil einer „trägerfreien“ Synthese dennoch nicht zu unterschätzen.

Als ein weiteres Beispiel sei [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorprolin als einzige aliphatische  $^{18}\text{F}$ -markierte Aminosäure genannt, die nicht schnell im Körper metabolisiert. Die Darstellung erfolgt via  $^{18}\text{F}$ -für-Tos Substitution an (2S,4S)-N-BOC-4-O-tosyl-hydroxyprolinmethylester und einer nachgeschalteten sauren Schutzgruppenabspaltung innerhalb von ca. 80 min mit einer radiochemischen Ausbeute von etwa 35% [22]. Cis-4-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorprolin eignet sich als Tracer der Synthese von Strukturproteinen zur Diagnose von peripheren Tumoren [33].

### 1.3.3 Fluorierung von Proteinen und Peptiden mit Hilfe prosthetischer Gruppen

Falls die direkte nukleophile kryptatgestützte  $^{18}\text{F}$ -Fluorierung aufgrund der stark basischen Reaktionsbedingungen oder einer thermischen Instabilität der Edukte bzw. der  $^{18}\text{F}$ -markierten Produkte nicht möglich ist, bietet sich alternativ die  $^{18}\text{F}$ -Markierung kleiner, in guten radiochemischen Ausbeuten fluorierbarer Gruppen an. Eine sich anschließende  $^{18}\text{F}$ -Fluoralkylierungs-,  $^{18}\text{F}$ -Fluoracylierungs- oder  $^{18}\text{F}$ -Fluoramidierungsreaktion mit dem entsprechenden Vorläufer resultiert dann zu einem der direkten nukleophilen Fluorierung nicht zugänglichem  $^{18}\text{F}$ -Tracer. Einfache Synthesebeispiele für dieses Vorgehen sind die zweistufigen „Eintopfsynthesen“ von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethylspiperon [34,35], [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethyltyrosin [36] oder [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethylmetaraminol [37] und einigen  $^{18}\text{F}$ -markierten Benzodiazepinanaloga [38]. Die Fluoracylierungs- und Fluoramidierungsreagenzien sind von Vorteil für die  $^{18}\text{F}$ -Markierung von Proteinen und Peptiden, da sie auch für eine Konjugationsreaktion in wässriger Lösung geeignet sind. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zwei Synthesestrategien für die Markierung über  $^{18}\text{F}$ -markierte prosthetische Gruppen:

- A)  $^{18}\text{F}$ -Markierung von kleinen homo- oder heterobifunktionellen Molekülen und in einem zweiten Reaktionsschritt die Kondensationsreaktion mit einer funktionellen Gruppe des Proteins:



**Abbildung 1.3:** Reaktionspartner der Kondensationsreaktion für die Synthesestrategie der  $^{18}\text{F}$ -Markierung über prosthetische Gruppen

- B)  $^{18}\text{F}$ -Markierung eines heterobifunktionellen Moleküls, welches als Nukleophil in einem zweiten Reaktionsschritt an eine präkonjugierte Seitenkette des Zielproteins gekoppelt wird.

Für die Markierungsstrategie A kommen als zu markierende Seitenketten des Proteins Amino-, Thiol- sowie Hydroxylfunktionen in Frage, das heißt die Seitenketten der Aminosäuren Lysin ( $\text{NH}_2$ ), Cystein (SH), Tyrosin ( $\text{OH}_{\text{arom.}}$ ), Serin (OH) oder Threonin (OH), die  $^{18}\text{F}$ -fluoralkyliert oder  $^{18}\text{F}$ -fluoracyliert werden. Exemplarische Anwendungen für diese Strategie sind die Darstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]fluorbenzoylierten Immunglobulinen (IgG) [39] und die Synthese von 2-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorpropionyl-Octreotid [41] und 2-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorpropionyl-(Phe<sup>1</sup>)-(SMS 210-995), einem synthetischen Analogon des endogenen "Somatotropin-Release-Inhibiting-Factor" (SRIF) [42]. Die  $^{18}\text{F}$ -Fluoramidierung von Carboxylesterfunktionen eines Proteins findet bei der Darstellung von kleineren Peptiden Anwendung [43]. In neuerer Zeit wurde die  $^{18}\text{F}$ -Fluoramidierung von Oxytocin, ein auf die Muskulatur des Uterus wirkendes Peptidhormon, über eine in-situ Aktivierung von Oxytocinsäure realisiert [44].

Die Markierungsstrategie B erlaubt eine einfache Synthese der  $^{18}\text{F}$ -markierten prosthetischen Gruppe, erfordert allerdings eine vergleichsweise aufwendige Schutzgruppenchemie für das Protein. Daher besitzt diese Strategie insbesondere für kleine Peptide oder Proteine einen Vorteil, die nur über eine vorherige Präkonjugation, die den „Linker“ zu der eigentlichen  $^{18}\text{F}$ -markierten Gruppe darstellt, zu markieren sind. Ein Nachteil dieser Methode ist neben der notwendigen Synthese eines geschützten Proteinvorläufers die strukturelle Veränderung des Proteins, die auch zu einer Änderung des pharmakokinetischen Verhaltens führen kann. Ein Beispiel für diese Markierungsstrategie ist die  $^{18}\text{F}$ -Markierung von Insulin, die die selektive Einführung von zwei BOC-Schutzgruppen für die insgesamt drei Aminofunktionen des aus zwei Peptidketten aufgebauten bicyclischen Peptidhormons voraussetzt. Die ungeschützte N-terminale Aminosäure der B-Kette (Phenylalanin) wird im Präkonjugationsschritt mit Disuccinimidylsuberat aktiviert und anschließend in der eigentlichen  $^{18}\text{F}$ -Fluoramidierungsreaktion mit N-[4-( $^{18}\text{F}$ )Fluormethyl]benzoyl]-1,4-diaminobutan umgesetzt und mittels Trifluoressigsäure entschützt [45].

Es gibt auch Beispiele, in denen auf eine „hohe molare Aktivität“ verzichtet wurde, und als Alternative auf die elektrophile Fluorierung mittels Acetylhypofluorit zurückgegriffen wurde, wie im Falle der Darstellung eines tyrosinhaltigen Endorphinanalogs [46]. Die Anwendbarkeit dieser Methode ist begrenzt, zudem ist der Begriff „molare Aktivität“ im Falle von Peptid- und Proteinmarkierungen neu zu definieren.

Da der molare Massenunterschied der markierten Proteine zu den nicht-markierten Analoga für durchschnittliche Molmassen weniger als 1 % ausmacht, lassen sich Vor-

läufer und markierte Verbindung nur sehr schwer chromatographisch trennen. Daher bezieht man die molare Aktivität auf die Eduktstoffmenge des Proteins und nicht auf die Produktstoffmenge der „kalten“ Fluorverbindung und definiert somit die molare Aktivität als eine Funktion der Stoffmenge des eingesetzten Eduktes, die unabhängig ist von der molaren Aktivität der  $^{18}\text{F}$ -markierten prosthetischen Gruppe:

$$\text{molare Aktivität [Ci / mmol]} = \frac{\text{Aktivität des Produktes [Ci]}}{\text{Stoffmenge von Edukt und Produkt [mmol]}}$$

Zudem kommt es im Falle von Mehrfachmarkierungen, die in Abhängigkeit von der molaren Aktivität des  $^{18}\text{F}$ -Markierungsagens und der Stoffmenge des Eduktes durchaus statistisch wahrscheinlich sind, zu einer hohen molaren Aktivität und zu der steigenden Wahrscheinlichkeit des Verlustes der biologischen Aktivität des  $^{18}\text{F}$ -markierten Proteins. Die Mehrfachmarkierungen lassen sich zwar durch Einsatz größerer Eduktstoffmengen vermeiden, jedoch handelt es sich nicht selten um teure Substanzen, und die Applikation der pharmakologisch wirksamen Substanzen ist ebenfalls in ihrer Menge begrenzt. Es erscheint demnach sinnvoll, in diesem Fall die molare Aktivität als das Verhältnis von molarer Aktivität des Proteins pro Zahl der prosthetischen Gruppen anzugeben, um die Qualität der Markierungsreaktion beurteilen zu können. Sehr vorteilhaft ist es demnach, wenn man mit einem  $^{18}\text{F}$ -Markierungsreagens hoher molarer Aktivität arbeitet, um die statistische Wahrscheinlichkeit für Mehrfachmarkierungen vernachlässigen zu können. In diesem Zusammenhang stehen insbesondere die  $^{18}\text{F}$ -Fluoracylierung mittels  $[^{18}\text{F}]$ Fluorpropionsäuremethylester [47],  $[^{18}\text{F}]$ Fluorpropionsäurenitrophenylester [48] oder  $[^{18}\text{F}]$ Fluorbenzoesäuresuccinimidylester [49] mit guten radiochemischen Ausbeuten und annehmbaren Reaktionszeiten (15-90 min) im Vordergrund.

Der Syntheseaufwand, der besonders am Beispiel des  $^{18}\text{F}$ -Insulins deutlich wird, und die fehlende Regioselektivität der  $^{18}\text{F}$ -Markierung von Proteinen über prosthetische Gruppen sind jedoch deutliche Nachteile dieser Methode und limitieren ihr Anwendung erheblich.

Im Hinblick auf die Themenstellung dieser Arbeit werden im nächsten Kapitel chemische und enzymatische Methoden zur Synthese von Glykokonjugaten vorgestellt, die die Grundvoraussetzung für die Entwicklung einer neuen  $^{18}\text{F}$ -Markierungsmethode darstellen.

## 1.4 Enzymatische und chemische Methoden zur Synthese von Glycokonjugaten

### 1.4.1 Bedeutung von Glycokonjugaten

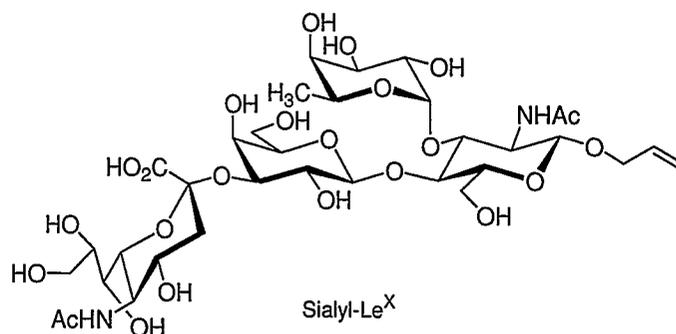
Die große Gruppe der Glycokonjugate besteht aus den Glycopeptiden und Glycoproteinen, sowie Proteoglycanan (Glycosylaminoglycane), Glycolipiden und Oligosacchariden.

Der Begriff „Glycokonjugat“ wurde 1973 erstmals von Montreuil eingeführt und beschreibt eine Klasse von Verbindungen, deren Polysaccharidketten als biologische Informationsträger fungieren [50]. Es erscheint sinnvoll, Glycoproteine und Oligosaccharide als bedeutendste Vertreter der Glycokonjugate besonders hervorzuheben.

Glycoproteine sind in allen Lebensformen weit verbreitet und finden sich in allen eukaryontischen Zellen sowohl in löslicher als auch membrangebundener Form mit einem kovalent gebundenem Polysaccharidanteil, der von weniger als 1% bis 70% variiert. Dieser Kohlenhydratanteil hat eine entscheidende Bedeutung für wichtige inter- und intrazelluläre Kommunikationsprozesse (Zell-Zell-Erkennung, Zelladhäsion, Akzeptoreigenschaften von Viren und Antikörpern usw.). Es konnte gezeigt werden, daß sie auf der Zelloberfläche maßgeblich in Prozesse wie Zellwachstum und Zelldifferenzierung, Immunantwort oder Metastasierung involviert sind [51,52]. Diese multifunktionelle Eigenschaft der informationstragenden Kohlenhydratstrukturen beruht auf der ungewöhnlich hohen Anzahl komplexer Strukturen, die man unter Berücksichtigung von Verzweigungen, Stereochemie der glycosidischen Bindung sowie Modifikation der Hydroxyl- und Aminogruppen aus den sieben oder acht in Säugetieren vorkommenden Monosacchariden aufbauen kann. So können beispielsweise mehrere Millionen unterschiedlicher Tetrasaccharide aus dieser begrenzten Anzahl von Monosacchariden entstehen, die effizient die riesige Datenmenge für die biologischen Erkennungsprozesse kodieren. Daher ist es nicht verwunderlich, wenn man Kohlenhydratstrukturen neben Nukleinsäuren und Proteinen als die dritte Dimension der molekularen Biologie bezeichnet [50].

Solche Verbindungen kommen nur in sehr kleinen Konzentrationen im Körper vor und sind schwierig zu isolieren, weil sie oft membrangebunden vorliegen. Die Synthese von ausreichenden Substanzmengen für biologische Untersuchungen, mit dem Ziel, ihren medizinischen Nutzen zu ermitteln, ist sehr mühsam. Aufgrund der Komplexität und Polyfunktionalität bleibt die Synthese von Verbindungen dieser Substanzklasse und deren Mimetika eine Herausforderung, die insbesondere für die Pharmaforschung einen wichtigen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe auf Saccharidbasis bieten kann.

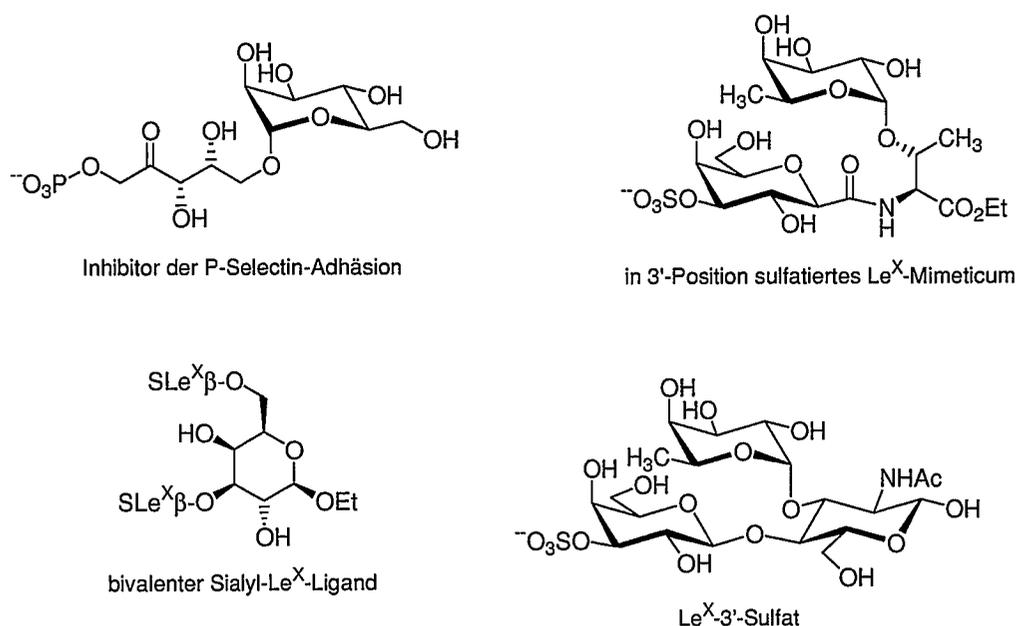
In diesem Zusammenhang ist ein durch Kohlenhydratstrukturen vermittelter Zelladhäsionsprozeß von großer Bedeutung, der durch Infektion oder Gefäßverletzung initiiert wird und ebenso am Vorgang der Metastase beteiligt ist [52,53]. Dieser erst in neuester Zeit entdeckte Adhäsionsprozeß ist die Wechselwirkung zwischen dem Glycoprotein E-Selectin (ein alter Name ist ELAM-1, engl.: Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule), das z.B. während einer Entzündung auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird, und dem Tetrasaccharid Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (SLe<sup>x</sup>, siehe Abbildung 1.4), das sich am Terminus von Glycolipiden an der Oberfläche von Neutrophilzellen befindet [54,55].



**Abbildung 1.4:** Chemische Struktur des Tetrasaccharids Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (Sialyl-Le<sup>x</sup>)

Dieser Adhäsionsprozeß bildet die Grundlage für weitere interzelluläre Wechselwirkungen, an denen das Protein ICAM-1 (engl.: Intercellular Adhesion Molecule) auf der Oberfläche der Endothelzellen beteiligt ist, und führt zu einem Transportmechanismus der Leukocyten durch Öffnungen zwischen den Endothelzellen in das dahinterliegende Gewebe, wo sie zur Reparatur der Verletzung beitragen. Ein überhöhter Transport von zu vielen Leukocyten führt jedoch zu einer Zerstörung gesunder Zellen, wie es bei chronischen Entzündungen (z.B. Schuppenflechte), rheumatischer Arthritis sowie bei der Reperfusionverletzung nach einem Herzinfarkt der Fall ist [52]. Ein hoher Anteil an Sialyl-Lewis<sup>x</sup> befindet sich ebenfalls auf der Oberfläche von einigen Tumorzellen (z.B. Darm- und Lungenkrebs) und legt somit die Vermutung nahe, daß Krebszellen den beschriebenen Adhäsionsprozess für ihre Metastase oder die Verbreitung über die Blutbahn nutzen [52,53]. Aufgrund der Tatsache, daß Sialyl-Lewis<sup>x</sup> in Lösung mit den Leukocyten um die Bindung von E-Selectin konkurriert, ist es in der Lage, den Adhäsionsprozeß der Leukocyten zu blockieren. Sialyl-Lewis<sup>x</sup> und geeignete Mimetika gelten daher als potentielle Antitumormittel, und es sind beachtliche Forschungsanstrengungen auf die chemische Synthese von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> verwendet worden [56,57]. Die rein enzymatische Synthese von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> mit Hilfe von Glycosyltransferasen hat sich durchgesetzt [58], und heute wird Sialyl-Lewis<sup>x</sup> in Kilogrammengen von der Firma Cytel Co. (San Diego, USA) in Hinblick auf die

Anwendung als Arzneimittel für Reperfusionsschäden produziert, obwohl die Untersuchungen über die Ligandenerkennung z.B. mittels NMR [59,60] noch lange nicht alle Fragestellungen geklärt haben.



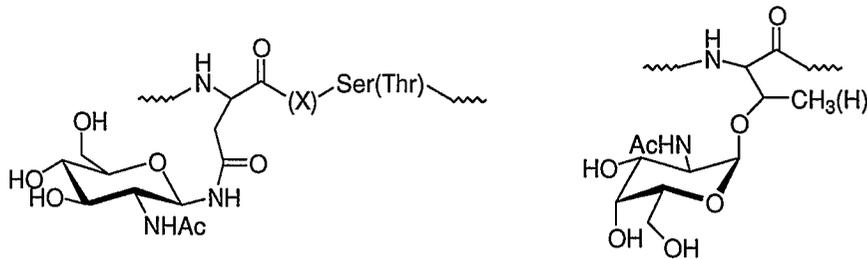
**Abbildung 1.5:** Einige chemische Strukturen von Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Mimetika

Für die Ligandenbindung ist in erster Linie die Galactose- und Fucoseeinheit sowie die Carboxylatgruppe der N-Acetylneuraminsäure verantwortlich (siehe Abb. 1.4)., allerdings ist mittels ELISA (engl.: Enzyme-linked Immunosorbant Assay) für ein synthetisch bivalentes Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Analogon (siehe Abb. 1.5) eine fünfmal bessere Inhibierung der Zelladhäsion ( $IC_{50}=0,4$  mM) im Vergleich zu dem monovalenten Sialyl-Lewis<sup>X</sup> bestimmt worden [61], was auf eine polyvalente Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung schließen lässt. Ebenso ist die Rolle von  $Ca^{2+}$ -Ionen, die mit Lewis<sup>X</sup> assoziiert sind, ungeklärt.

In jüngerer Zeit sind insbesondere durch den Fortschritt der Technik der DNA-Rekombination zur Klonierung und Überexpression von Enzymen mehrere synthetische Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Mimetika entwickelt worden, die ähnliche und oft höhere Inhibitor-Aktivitäten aufweisen als das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis<sup>X</sup> selbst [60,62]. Vor allem die Arbeitsgruppe um C.H. Wong hat sich aufgrund ihrer Arbeiten auf dem Gebiet der enzymatischen Synthese von Glycopeptidpartialstrukturen, in denen die Erfordernisse der Peptidsynthese effizient mit den Methoden der Kohlenhydratchemie verbunden sind, einen Namen gemacht [63].

### 1.4.2 Aufbau und Biosynthese von Glycoproteinen

Die kovalente Bindung von komplexen Kohlenhydratstrukturen an Glycokonjugate variiert trotz der großen Vielfalt der Strukturen nur wenig. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen N-Glycanen und O-Glycanen in Glycoproteinen, wobei an einem Protein in der Regel mehrere potentielle Bindungsstellen glycosyliert vorliegen.

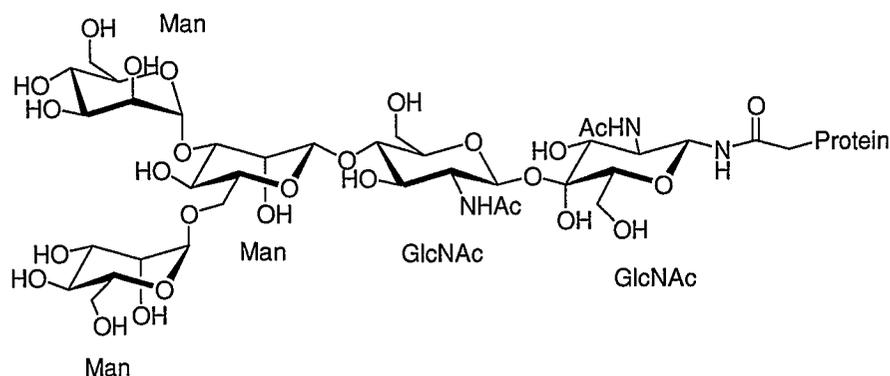


**Abbildung 1.6:** Verknüpfungsstellen von N- und O-Glycanan in Glycoproteinen

Im Falle der Biosynthese von N-Glycanen wird ein N-Acetylglucosaminrest (GlcNAc) mit dem Amidstickstoffatom eines Asparaginrestes  $\beta$ -N-glycosidisch verknüpft [zur Übersicht: 64]. In der C-terminalen Richtung von Asparagin folgt der Aminosäure X ( $X \neq \text{Pro, Asp}$ ) stets Serin oder Threonin (vgl. Abb. 1.6). In den weniger verbreiteten O-Glycanen findet man die  $\alpha$ -glycosidische Bindung von N-Acetylgalactosamin (GalNAc) mit Serin oder Threonin. Die Biosynthese von N- und O-glycosidischen Bindungen erfolgt enzymatisch im endoplasmatischen Reticulum (ER) und im Golgi-Apparat. Hier sind maßgeblich Enzyme des Leloir-Weges<sup>1</sup> beteiligt, wobei im Falle der Biosynthese von N-Glycoproteinen zunächst ein Dolicholpyrophosphoryl oligosaccharid im ER mittels GlcNAc-Transferasen und Mannosyltransferasen gebildet wird. Der Oligosaccharidteil wird nach weiterer Glycosylierung anschließend durch die Oligosaccharyltransferase auf den Asn-Rest übertragen [66]. Der nächste Schritt stellt das sog. „Trimming“ dar und besteht aus der enzymatischen Entfernung von Glucose- und einigen Mannoseeinheiten vor dem Transport in den Golgi-Apparat. Der resultierende Pentasaccharidkern wird als „core-region“ bezeichnet (siehe Abb. 1.7) und im Golgi-Apparat durch Glycosyltransferasen zu vier Gruppen von N-Glycanen modifiziert: einem „komplexen Typ“ großer struktureller Vielfalt, einem „Oligomannose-Typ“, der zusätzlich  $\alpha$ -Mannosylgruppen trägt, dem „Hybrid-Typ“, der die Strukturelemente beider vorher genannter Typen vereint und einem „Poly-N-acetyllactosamin-Typ“, der sich wiederholendes N-Acetyllactosamin (LacNAc) enthält. In allen vier Typen findet sich

<sup>1</sup> Luis F. Leloir erhielt 1970 für die Aufklärung der O-Glycosid-Biosynthese den Nobelpreis für Chemie

die an Asparagin gebundene Grundstruktur, die „core-region“ als eindeutiges Erkennungsmerkmal wieder [64].



**Abbildung 1.7:** Die Grundstruktur („core-region“) von N-Glycanen ( $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ )

Alle vier N-Glycan-Typen zeigen eine außerordentliche strukturelle Vielfalt und biologische Aktivität. Ein N-Glycoprotein wird vollständig nicht allein durch seine Aminosäuresequenz beschrieben, sondern es ist eine vollständige Charakterisierung seiner Polysaccharidstruktur notwendig, die ebenfalls einen signifikanten Einfluß auf die biologische Halbwertszeit des Glycoproteins hat. So verkürzt sich die Halbwertszeit des nativen Coeruloplasmins von 54 h auf 5 min durch enzymatischen Abbau des endständigen N-Acetylneuraminsäurerestes durch Neuramidase und einen damit verbundenen schnelleren Abbau des Peptids in der Leber [67].

Die Komplexität der N-Glycan-Strukturen und ihre enorme Bedeutung wird ebenso am Beispiel des Acquired Immunodeficient Syndrome (AIDS) deutlich. Auf der Oberfläche des human immunodeficiency virus (HIV) befindet sich das stark glycosylierte Protein gp120, von dem bisher 29 N-glycosidisch gebundene Oligosaccharide identifiziert wurden. Es konnte gezeigt werden, daß diese Oligosaccharidstrukturen für die Adhäsion an CD4-Akzeptoren auf der Oberfläche von humanen T-Lymphozyten verantwortlich sind und somit die Infektion initiieren, die durch deglycosylierte Strukturen nicht erfolgt. Daraus ergibt sich der Ansatz für eine Entwicklung eines pharmakologischen Wirkstoffes, der entweder die CD4-Rezeptoren blockiert oder die Glycosylierung von gp120 inhibiert [68].

Generell verläuft die Biosynthese der O-Glycoproteine im Golgi-Apparat andersartig und zwar über die sukzessive Kettenverlängerung mittels Leloir-Glycosyltransferasen, die als Glycosyldonoren nucleotid-aktivierte Monosaccharide umsetzen. Im wesentlichen beschränken sich die Leloir-Glycosyltransferasen auf acht Zuckernucleotide: UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, GDP-Man, GDP-Fuc, UDP-GlcUA

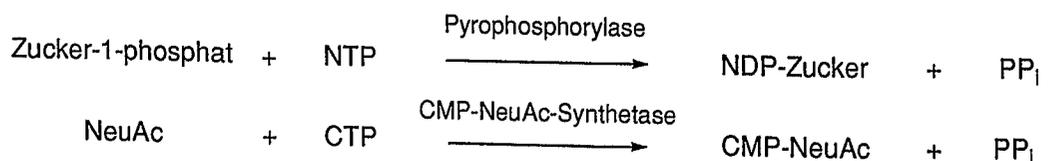
und CMP-NeuAc, deren in-vitro Synthese großes Interesse gefunden hat (siehe Tab. 1.3).

**Tabelle 1.3:** Zusammenfassung der Nucleotidzucker

(Die angegebene Syntheseprozedur bezieht sich auf chemische Ausbeuten von mindestens 1g)

Nucleotidzucker	Kurzform	Ausgangsverbindung der Syntheseprozedur (E: enzymatisch, C: chemisch, CE: chemoenzymatisch )	Lit.
Uridin-5'-diphosphat- $\alpha$ -D-glucose	UDP-Glc	Glc oder Glc-6-phosphat (E)	[71, 72]
Uridin-5'-diphosphat- $\alpha$ -D-galactose	UDP-Gal	UDP-Glc (E) Gal oder Gal-1-phosphat (E)	[72] [74]
Uridin-5'-diphosphat- $\alpha$ -D-mannose	UDP-Man	Man oder Man-1-phosphat (CE)	[73]
Guanosin-5'-diphosphat- $\beta$ -L-fucose	GDP-Fuc	Fucose (C)	[70]
Uridin-5'-diphosphat-N-acetyl- $\alpha$ -D-glucosamin	UDP-GlcNAc	GlcN oder GlcN-6-phosphat (CE) GlcNAc oder GlcNAc-1-phosphat (CE)	[69]
Uridin-5'-diphosphat-N-acetyl- $\alpha$ -D-glucosamin	UDP-GalNAc	GalN oder GalN-1-phosphat (CE)	[74]
Uridin-5'-diphosphat- $\alpha$ -D-glucuronsäure	UDP-GlcUA	UDP-Glc (E)	[75]
Cytidin-5'-monophosphat-N-acetylneuraminsäure	CMP-NeuAc	NeuAc (E)	[76]

Diese werden in vivo aus den entsprechenden Monosacchariden aufgebaut, wobei der erste Schritt eine Phosphorylierung zum Glycosylphosphat darstellt, die durch eine Kinase katalysiert wird. Anschließend wird das Glycosylphosphat durch eine Pyrophosphorylase katalysiert mit einem Nucleosidtriphosphat (NTP) zum Zuckernucleosiddiphosphat umgesetzt (siehe Abb. 1.8).



**Abbildung 1.8:** Biosynthese von Nucleotidzuckern, die als Glycosyldonorsubstrate für Glycosyltransferasen des Leloir-Weges dienen

(NTP = Nucleosidtriphosphat, N = Uridin, Guanosin, NeuAc = N-Acetylneuraminsäure, PP<sub>i</sub> = Pyrophosphat)

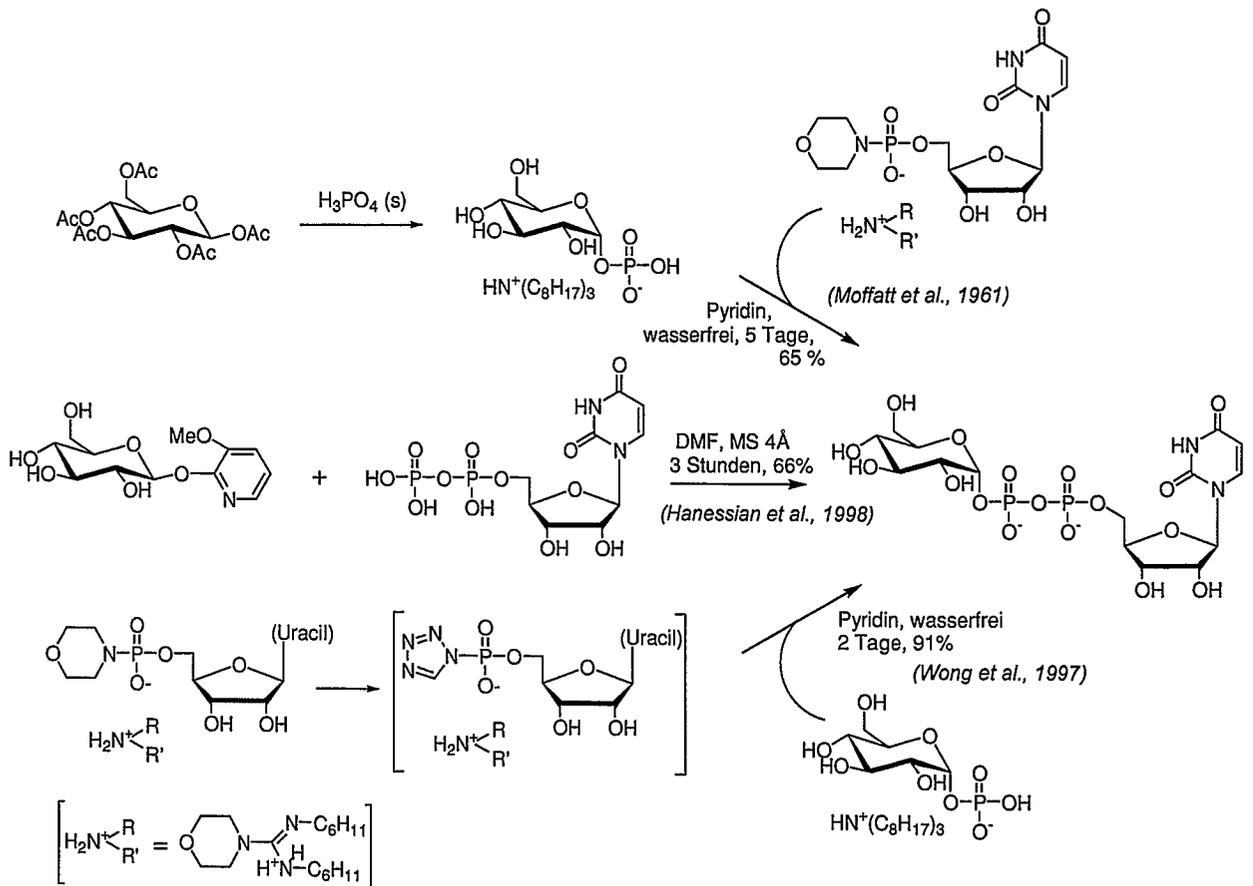
Im Falle von GDP-Fuc oder UDP-GlcUA erfolgt zusätzlich eine weitere enzymatische Modifizierung des nucleotid-aktivierten Monosaccharids. Ebenso stellt CMP-N-Acetyl-

neuraminsäure eine Ausnahme dar, da es direkt aus NeuAc und CTP gebildet wird (siehe Abb. 1.8). Die Enzyme, die an diesem in-vivo-Prozeß beteiligt sind, zeichnen sich durch ihre Spezifität für das jeweilige aktivierte Kohlenhydrat, die Art der Glycosidbindung, den Glycosyldonor und eine bestimmte Hydroxygruppe im Glycosylakzeptor aus. Die sich daraus ergebende Vorstellung, daß jeweils genau ein Enzym für die Ausbildung einer bestimmten Glycosidbindung verantwortlich ist („one enzyme – one linkage concept“ [78]), erscheint allerdings veraltet und insbesondere für in-vitro Synthesen nicht anwendbar, da die Substratkonzentrationen in-vivo um Größenordnungen kleiner sind.

In den letzten Jahren sind chemische und insbesondere enzymatische Methoden für die Synthese von Nucleotidzuckern als wertvolle Substrate für Glycosylierungsreaktionen stetig weiterentwickelt worden [77]. Die Verfügbarkeit geeigneter Enzyme wurde aufgrund der Fortschritte der DNA-Rekombinationstechnik erweitert und bietet dem Chemiker ein sehr wertvolles Spektrum von Katalysatoren für die Synthese oder Manipulation an der Oligosaccharidstruktur von Glycoproteinen.

### **1.4.3 Chemische Methoden für die Synthese von Nucleotidzuckern**

Die organisch-chemischen Methoden, die im Hinblick auf die Synthese von Nucleotidzuckern eine Rolle spielen, sind die Phosphorylierung von Monosacchariden und die Kondensation der Glycosyl-1-phosphate mit geeigneten 5'-aktivierten Nucleosidmonophosphaten. Für eine effiziente Nutzung von Glycosyltransferasen ist die Synthese dieser Verbindungen Grundvoraussetzung. Im folgenden Schema ist das Prinzip der chemischen Synthese von Nucleotidzuckern am Beispiel von UDP-Glc dargestellt.



**Abbildung 1.9:** Reaktionswege für die chemische Synthese von Uridin-5'-diphosphat- $\alpha$ -D-glucose (UDP-Glc) [70, 79, 80]

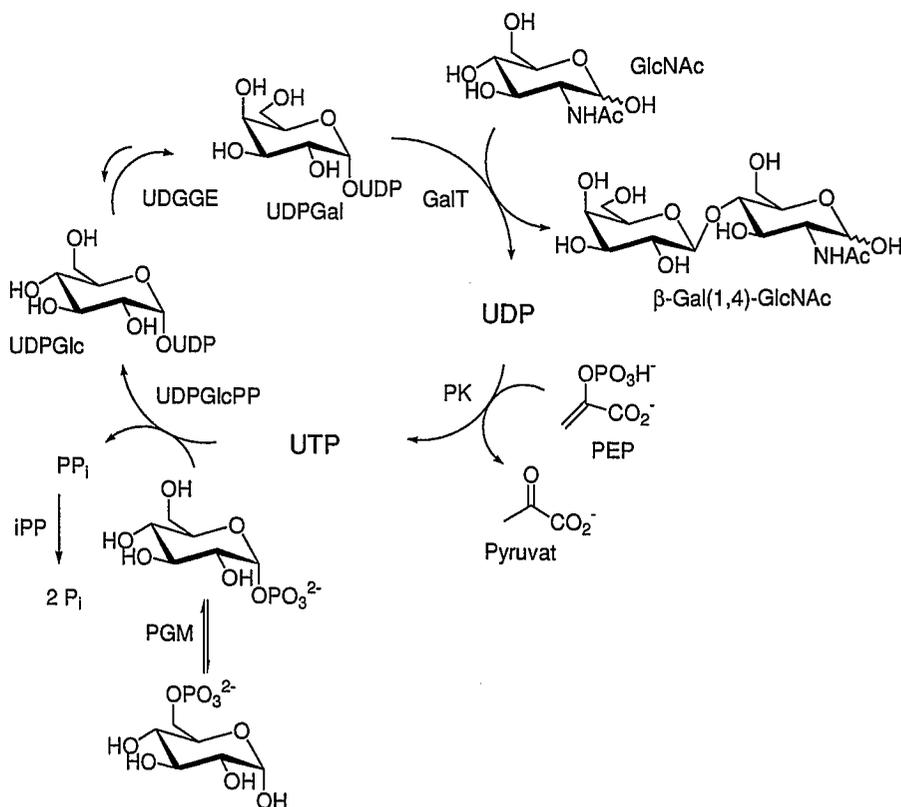
Die gebräuchlichste Methode für die Darstellung von nucleotid-aktivierten Zuckern ist die Synthese nach Moffatt und Khorana unter Verwendung von Nucleosid-5'-monophosphoamidaten, insbesondere von Nucleosid-5'-monophosphomorpholidat, unter wasserfreien Bedingungen und Pyridin als Lösungsmittel (vgl. Abb. 1.9) [79]. Diese Reaktion ist sehr langsam und die Reaktionszeit beträgt 5 Tage, zudem liegen die Ausbeuten höchstens bei 70%. Kürzlich wurden verbesserte Methoden für die Synthese von UDP-Glc von Wong et al. [70] und Hanessian et al. [80] veröffentlicht.

Nach Wong führt die Morpholidat-Methode nach Moffatt unter Verwendung von 1H-Tetrazol zu einer Protonierung des Morpholins am Stickstoffatom und der Bildung einer reaktiveren Zwischenstufe, was sowohl zu einer Erhöhung der Ausbeute der Reaktion als auch zu einer signifikanten Verkürzung der Reaktionszeit von 5 Tagen auf 2 Tage führt [70]. Hanessian et al. stellten kürzlich UDPGlc mit guter Ausbeute über die Reaktion des Methoxypyridinglycosids von Glucose mit Uridin-5'-diphosphorsäure in DMF her und verkürzten den Zeitbedarf der Reaktion auf 3 Stunden [80].

#### 1.4.4 Enzymatische Synthese von Nucleotidzuckern und ihre Anwendung

Die enzymatischen Synthesen von Nucleotidzuckern bieten den großen Vorteil, daß sie unter milden Bedingungen in wässriger Lösung ablaufen, so daß eine Glycosylierungsreaktion mit Hilfe von geeigneten Glycosyltransferasen in einer Eintopfreaktion möglich ist, ohne den Nucleotidzucker vorher isolieren zu müssen. Die enzym-katalysierten Synthesen von UDP-Glc oder UDP-Gal (siehe Tab. 1.3) verlaufen mit Hilfe eines Multienzymsystems, deren Enzymkomponenten käuflich erhältlich und relativ stabil zu lagern sind. Diese Systeme nutzen insgesamt fünf Enzyme oder mehr. In der Regel tritt bei hohen Substratkonzentrationen für eine Synthese im größeren Maßstab („large-scale“-Synthese) eine Inhibierung der Enzyme ein, die jedoch durch geeignete, an den Reaktionscyclus gekoppelte, enzymatische in-situ Regenerierungen einzelner Substrate effizient vermieden werden kann. Eine solche in-situ Regenerierung wurde erstmal 1982 von Whitesides et al. für UDP-Glc veröffentlicht [72] (siehe Abb. 1.10) und ist mittlerweile für sieben der acht in Säugetierzellen vorkommenden Nucleotidzucker beschrieben worden [58, 81-83].

Mit Hilfe dieses Multienzymsystems lassen sich unter Verwendung von nur drei käuflich erhältlichen Enzymen (Hexokinase (HK), Phosphoglucomutase (PGM) und UDP-Glucose Pyrophosphorylase (UDPGlc PP)) bis zu 40 mmol UDP-Glc in einer „large-scale“ Eintopfreaktion synthetisieren. Abbildung 1.10 zeigt den vollständigen enzymatischen Reaktionscyclus unter Berücksichtigung der „nachgeschalteten“ Glycosylierung von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) zu N-Acetyllactosamin mittels  $\beta$ -(1,4)-Galactosyltransferase (GalT), bei dem in situ UDP-Glc gebildet wird. Ausgehend von Glucose-6-phosphat, das man mittels einer Hexokinase-katalysierten Reaktion aus Glucose und ATP in einer vorgeschalteten Reaktion gewinnt [84] (in Abb. 1.10 nicht dargestellt), erreicht man durch Phosphoglucomutase die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Glucose-6- und Glucose-1-phosphat. In Gegenwart von UTP und UDP-Glucose-pyrophosphorylase (UDPGlcPP) entsteht UDP-Glc und Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>), welches durch anorganische Pyrophosphatase (iPP) zu Phosphat hydrolysiert und somit dem Reaktionscyclus entzogen wird. UDP-Glc wird durch UDP-Glucose-4'-Epimerase (UDPGE) zu UDP-Gal epimerisiert und steht für die Galactosylierung von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) mittels GalT zur Verfügung.



**Abbildung 1.10:** Enzymatische Synthese von N-Acetyllactosamin ( $\beta$ -Gal(1,4)-GlcNAc) mittels  $\beta$ -(1,4)-Galactosyltransferase (GalT) ausgehend von Glucose-6-phosphat unter Regenerierung von Uridintriphosphat (UTP) mittels Pyruvatkinase (PK) und Phosphoenolpyruvat (PEP) [72]

Das dabei freiwerdende UDP wird in Gegenwart von Phosphoenolpyruvat durch Pyruvatkinase in UTP umgewandelt und steht der Pyrophosphorylase-katalysierten Kondensationsreaktion zu UDP-Glc wieder zur Verfügung.

Neben der rein chemischen Glycosylierung [85-87] hat in der synthetischen organischen Chemie die Anwendung von enzymatischen Glycosylierungsreaktionen mit Hilfe von Glycosyltransferasen im Hinblick auf die Oligosaccharidsynthese einen wichtigen Platz eingenommen. Enzymatische Methoden sind stereo- und regioselektiv und eine komplizierte Schutzgruppenchemie, wie sie bei chemischen Glycosylierungsverfahren üblich ist, entfällt vollkommen. Allerdings sind nicht alle Glycosyltransferasen leicht zu isolieren, weil sie nur in sehr geringer Konzentration und membrangebunden vorkommen. Eine Möglichkeit zur Überwindung dieses Nachteils ist die Klonierung und Überexpression der Transferasen in Gastorganismen, was für  $\beta$ -(1,4)-Galactosyl- und  $\alpha$ -(2,6)-Sialyltransferasen bereits realisiert ist. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von Glycosyltransferasen für Synthesen im größeren Maßstab ist die Verfügbarkeit der Nucleotidzucker, deren chemische oder enzymatische Synthese, die in den

vorherigen Abschnitten erläutert wurde, relativ aufwendig ist. Daher sind Nucleotidzucker teuer und es bietet sich an, auch hier auf die oben erwähnten in-situ Regenerierungsverfahren für Nucleotidzucker zurückzugreifen, die den Einsatz katalytischer Mengen an Nucleotidzucker erlauben [83].

**Tabelle 1.4:** Wichtige Glycosyltransferasen und ihre resultierende glycosidische Bindung ( $\alpha$  oder  $\beta$  ist die Konfiguration am anomeren Zentrum, ausgehend vom ursprünglichen Glycosyldonor in der neu geknüpften glycosidischen Bindung)

Glycosyltransferase	Art der Verknüpfung
Galactosyl	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)
Sialyl	$\alpha$ (2 $\rightarrow$ 6), $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 3), $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)
Fucosyl	$\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3), $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)
Mannosyl	$\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)

Glycosyltransferasen (siehe Tab. 1.4) stellen insbesondere sehr wertvolle Hilfsmittel für ein gezieltes „Glycopeptidmodeling“ dar, d.h. dem selektiven Abspalten und Hinzufügen von Kohlenhydrateinheiten. Viele Proteine, die als pharmazeutische Wirkstoffe interessant sind, wie der Gewebefibrinogenaktivator, das juvenile menschliche Wachstumshormon oder CD4-Akzeptoren, sind Glycoproteine. Durch Modifizierung der Oligosaccharidstrukturen erhofft man sich eine Verbesserung der Halbwertszeit im Serum, der Hydrophilie des Proteins und insbesondere der Aufnahme im Zielgewebe [88].

Das am häufigsten in der Synthese genutzte und am besten untersuchte Enzym aus der Klasse der Glycosyltransferasen ist aufgrund ihrer relativ einfachen Zugänglichkeit die  $\beta$ -(1,4)-Galactosyltransferase (GalT), die entweder aus Kuhmilch isoliert oder gentechnologisch in *Escherichia coli* produziert wird. Das natürliche Akzeptorsubstrat des Enzyms für die Reaktion mit UDP-Gal ist N-Acetylglucosamin (GlcNAc) (vgl. Abb.1.10).

Hinsichtlich der Akzeptor- und Donorspezifität des Enzyms wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. So sind z.B. 3- oder 6-Position modifizierte GlcNAc-Derivate,  $\beta$ -Glucoside, 2-Desoxyglucose, Xylose, 5-Thiogluucose oder Myoinositol ebenfalls Akzeptorsubstrate, auf die das Enzym Galactosyleinheiten überträgt [91-94]. Als Donorsubstrate (Nucleotidzucker) akzeptiert GalT außer UDP-Gal beispielsweise auch die UDP-Derivate von Glucose, Arabinose, Glucosamin, N-Acetylgalactosamin, 5-Thiogalactose oder 2-Desoxygalactose [89,90]. Anhand dieser Beispiele erkennt man die erstaunliche Flexibilität des Enzyms, die es für synthetische Fragestellungen in der

Oligosaccharidchemie von Glycokonjugaten interessant macht. Die Geschwindigkeit der enzym-katalysierten Umsetzung der nicht-natürlichen Substrate ist allerdings teilweise sehr gering und für präparative Zwecke ungeeignet. Andere Glycosyltransferasen sind hinsichtlich ihrer Donor- und Akzeptorspezifität erst sehr wenig untersucht, so daß auf diesem Gebiet in der Zukunft neue Erkenntnisse zu erwarten sind.

## **1.5 Anwendungsmöglichkeiten von enzymatischen Methoden in der $^{18}\text{F}$ -Markierungschemie**

Der Vorteil einer stereo- und regioselektiven Reaktion ist für die  $^{18}\text{F}$ -Markierungschemie besonders interessant. Durch den Einsatz von Enzymen in der „trägerfreien“ Chemie kann eine schwierige Schutzgruppenchemie für die Synthese der Markierungsvorläufermoleküle vollständig vermieden werden. Auf der anderen Seite können Enzymreaktionen, wie z.B. die regioselektive Lipase-katalysierte Esterhydrolyse von Saccharoseoctaacetat, in Kombination mit der klassischen organischen Chemie, eine elegante Methode für die Einführung von Abgangsgruppen im Hinblick auf eine nukleophile  $^{18}\text{F}$ -Fluorierung darstellen [95].

Mit dem Ziel der Synthese von  $^{18}\text{F}$ -markierten pharmakologisch interessanten Oligosaccharidstrukturen, wie die Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Struktur (siehe Abb. 1.4), gelang erst kürzlich die Darstellung von N-Acetyl-3- $^{18}\text{F}$ fluorneuraminsäure mittels aldolase-katalysierter Addition von  $^{18}\text{F}$ Fluorpyruvat an N-Acetyl-mannosamin [96]. N-Acetylneuraminsäure kommt häufig in Glycolipiden von Krebszellen vor, so daß grundsätzlich auch die Hoffnung einer spezifischen Anreicherung von N-Acetyl-3- $^{18}\text{F}$ fluorneuraminsäure besteht, die auf eine Anwendung in der PET-Tumordiagnostik abzielt.

Ein weiteres Ziel ist die Aktivierung der  $^{18}\text{F}$ -markierten Monosaccharide zu Nucleotidzuckern, die sie als potentielle Substrate für Glycosyltransferasen interessant machen. Für die Synthese eines  $^{18}\text{F}$ -markierten Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Liganden ist aus radiochemischer Sicht die Entwicklung einer schnellen Methode für die enzymatische Nucleotidaktivierung von N-Acetyl-3- $^{18}\text{F}$ fluorneuraminsäure mit hoher radiochemischer Ausbeute mittels CTP in Gegenwart von CMP-NeuAc-Synthetase die Grundvoraussetzung.

Die Oligosaccharidstruktur eines Glycoproteins bietet prinzipiell die Möglichkeit einer gezielten  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung, ohne dabei eine signifikante Änderung der physiologischen Eigenschaften des Proteins oder Oligosaccharids zu verursachen.

Diesbezüglich und im Zusammenhang der Themenstellung dieser Arbeit ist die Verfügbarkeit der  $^{18}\text{F}$ -markierten Nucleotidzucker von besonderem Interesse, denn sie stellen als potentielle Substrate für geeignete Transferasen die Schlüsselverbindungen für die Ausarbeitung einer alternativen, regiospezifischen, enzymatischen  $^{18}\text{F}$ -Markierungsmethode für Glycoproteine dar (vgl. Absch. 1.3.3).

Allerdings ist das Substratspektrum vieler Glycosyltransferasen noch lange nicht vollständig bekannt, so daß auch die Enzymkinetik der Glycosylierung mit den fluorierten Substraten ungewiß ist. Aus radiochemischer Sicht ist es *kein* Nachteil, daß viele nicht-natürliche Substrate der GalT nur sehr langsam umgesetzt werden, denn die Umsetzung von  $^{18}\text{F}$ -markierten Verbindungen im submikromolaren Bereich und die Anwendung hoher Enzymkonzentrationen eröffnet die Möglichkeit, die Reaktionsgeschwindigkeit hinreichend zu erhöhen.

## 2 Problemstellung

Die Entwicklung  $^{18}\text{F}$ -markierter Radiopharmaka auf der Basis von Peptiden und Proteinen ist für die nuklearmedizinische Funktionsdiagnostik von stetig wachsender Bedeutung. So hat das Interesse, die pharmakokinetischen Eigenschaften von Biopolymeren nicht-invasiv mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zu untersuchen, auf dem Gebiet der Nuklearchemie zur Ausarbeitung verschiedener Markierungsmethoden für diese Verbindungsklasse geführt. Die wichtigste Methode der Proteinmarkierung ausgehend von n.c.a. nukleophilem  $^{18}\text{F}$ Fluorid ist die Markierung über prosthetische Gruppen.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist eine Erweiterung des Spektrums der selektiven  $^{18}\text{F}$ -Markierungsmethoden. Mit Hilfe von Glycosyltransferasen sollte das Prinzip einer enzymatischen n.c.a.  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung zur regioselektiven Markierung glycosylierter Peptide und Proteine oder Oligosaccharidstrukturen verifiziert werden.

Als  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierungsreagens bietet sich, insbesondere im Hinblick auf die weit verbreitete Verfügbarkeit von  $^{18}\text{F}$ FDG, eine Nucleotid-aktivierte  $^{18}\text{F}$ FDG an, die ein potentielles Substrat für geeignete Glycosyltransferasen darstellt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte unter Zuhilfenahme enzymatischer sowie chemischer Methoden eine trägerfreie, effiziente Synthese des Coenzym Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc) als potentielles  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierungsreagens entwickelt werden.

Die grundsätzliche Anwendbarkeit eines Multienzymsystems für die trägerfreie, enzymatische Nucleotidaktivierung von  $^{18}\text{F}$ FDG sollte geprüft werden und in einer vergleichenden Studie insbesondere im Hinblick auf Trägereffekte einer chemoenzymatischen Reaktionsführung gegenübergestellt werden.

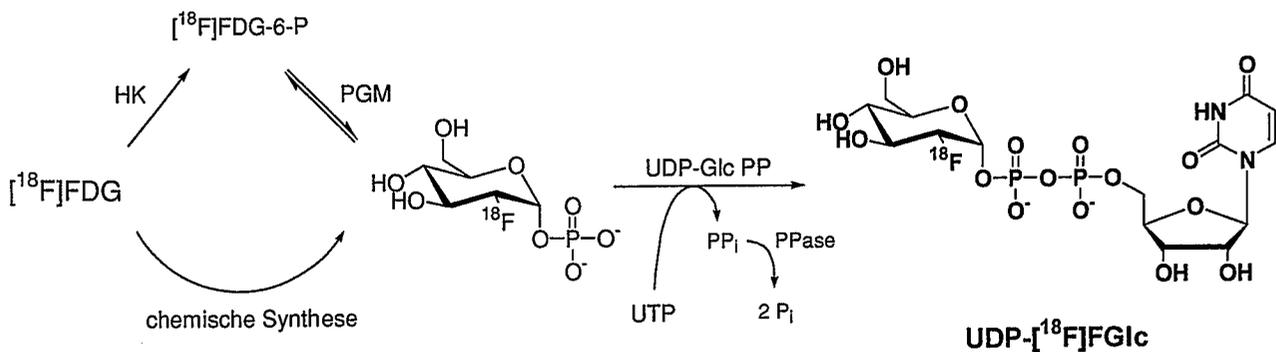
In diesem Zusammenhang ist die Ausarbeitung einer schnellen, trägerfreien Phosphorylierung von FDG Grundvoraussetzung. Hierfür sollte eine chemische, stereoselektive Phosphorylierungsmethode entwickelt werden und mit der Hexokinase-katalysierten Phosphorylierung von FDG verglichen werden.

Für n.c.a.  $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphat sollte in einem nachgeschalteten zweiten Reaktionsschritt eine Pyrophosphorylase-katalysierte Aktivierung zu UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc realisiert werden und die erforderliche UTP-Cofaktorkonzentration hinsichtlich einer maximalen radiochemischen Ausbeute optimiert werden.

Darüber hinaus sollte die Enzymkinetik von UDP-Glc Pyrophosphorylase für das nicht-natürliche Substrat 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose hinsichtlich Substratkonzentration und Cofaktorkonzentration untersucht werden, um diese Ergebnisse auf die trägerfreie Synthese von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc zu adaptieren.

Die Kombination von enzymatischen und chemischen Synthesestrategien soll zu einer optimierten Reaktionsführung der trägerfreien Synthese des Glycosylierungsreagens UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc führen.

In einer abschließenden Studie soll die  $\beta$ -(1,4)-Galactosyltransferase-katalysierte  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung von geeigneten Akzeptorsubstraten mittels UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc gezeigt werden.



**Abbildung 2.1:** Enzymatische und chemische Synthesestrategie zur Synthese von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Chemische Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP-FGlc)

Für die rein chemische Synthese von UDP-FGlc ist es notwendig, geeignete Vorläufermoleküle zu finden, die eine stereoselektive Phosphorylierung von FDG ermöglichen, da bekannt ist, daß Glycosyltransferasen wie  $\beta$ -(1,4)-Galactosyltransferase ausschließlich  $\alpha$ -glycosidisch gebundene Nucleotidzucker erkennen und unter Inversion der Konfiguration am anomeren Zentrum die Hexose stereospezifisch übertragen [97].

Die Einführung von Fluor in die 2-Position der Glucoseeinheit des Nucleotidzuckers erfolgte mit Hilfe einer schonenden F-für-OH Substitution mit Hilfe von Diethylaminosulfurtrifluorid (DAST) und der Anwendung einer vorteilhaften Schutzgruppenchemie, wie sie für die Synthese des [ $^{18}$ F]FDG-Vorläufers 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-O-trifluormethansulfonyl- $\beta$ -D-mannose bereits bekannt war [98] (vgl. Abb. 3.1).

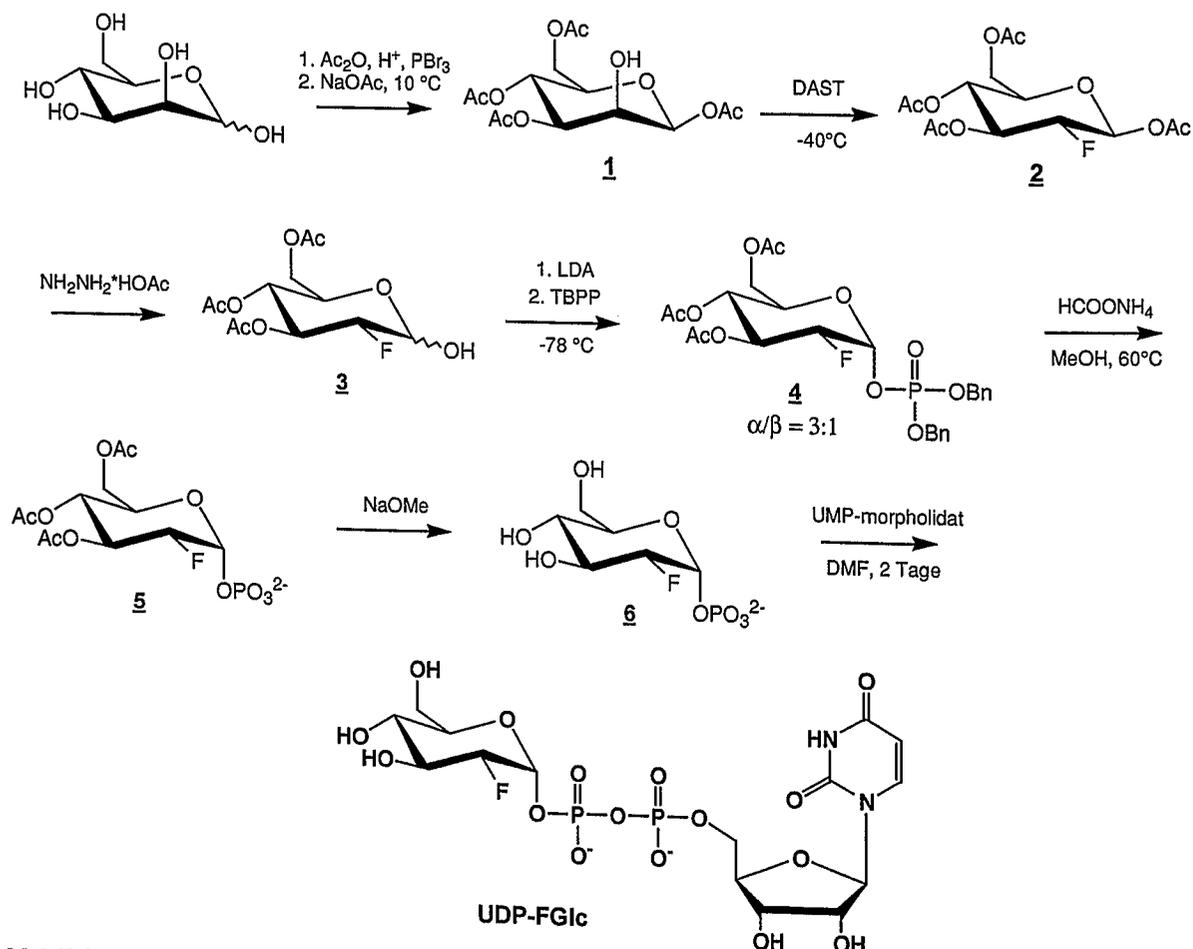
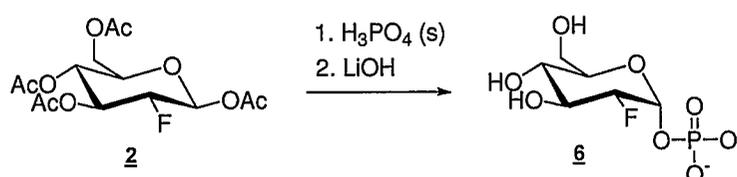


Abbildung 3.1: Chemische Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP-FGlc)

Im Anschluß an die Entschützung des in 1-Position stereoselektiv phosphorylierten FDG erfolgt im letzten Reaktionsschritt der Synthese die Kopplungsreaktion mit Uridinmonophosphat zum nucleotid-aktivierten FDG unter wasserfreien Bedingungen nach Moffatt und Khorona [79].

Zunächst mußte jedoch die Phosphorylierung von **2** bzw. **3** realisiert werden. Nach MacDonald sollte der vollständig acetylierte Zucker 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-Glucose (**2**) durch Umsetzung in einer Phosphorsäureschmelze unter wasserfreien Reaktionsbedingungen das 1-Phosphat von FDG in einem Reaktionsschritt liefern [vgl. 99]. Die MacDonald-Phosphorylierung von **2** wurde unter extrem wasserarmen Bedingungen und Hochvakuum durchgeführt.



**Abbildung 3.2:** Schema der Phosphorylierungsmethode nach MacDonald [nach 99]

Die Anwendung dieser Phosphorylierungsmethode (siehe Abb. 3.2) bei Temperaturen von 60°C bis 100°C führte jedoch nur in geringen bis moderaten Ausbeuten von maximal 20 % und in nicht reproduzierbarer Stereoselektivität zu 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat.

In der Literatur ist die Methode von MacDonald vor allem im Falle von in 2-Position substituierten oder modifizierten, acetylierten Zuckerderivaten durch andere alternative Phosphorylierungsmethoden ersetzt worden. So eignet sich beispielsweise die MacDonald-Phosphorylierung von tetraacetyliertem N-Acetylglucosamin ebenfalls nicht für die stereospezifische Synthese des entsprechenden  $\alpha$ -Glycosylphosphates [69] oder die Methode führt zu einem Produkt, das unter den sauren Reaktionsbedingungen nicht hydrolysestabil ist, wie im Falle von 2-Desoxygalactose-1-phosphat [100].

In Tabelle 3.1 sind die Reaktionsbedingungen der hier durchgeführten Umsetzungen von **2** mit trockener kristalliner Phosphorsäure und deren Ergebnisse zusammengefaßt.

**Tabelle 3.1:** Reaktionsbedingungen der MacDonald-Phosphorylierung nach Abb. 3.2

Stoffmengenverhältnis ( $\text{H}_3\text{PO}_4(\text{s}) : \underline{2}$ )	Temperatur	Ausbeute	Produktverhältnis ( $\alpha/\beta$ )
3:1	50°C	5 %	2:5
4:1	70-80°C	17 %	1:1
4:1	100°C	10 %	1:3

Das  $\alpha/\beta$ -Anomerenverhältnis wurde mittels NMR-Spektroskopie ermittelt (siehe Kap. 4). Allerdings hängt dieses Ergebnis nicht maßgeblich von den Reaktionsbedingungen wie Reaktionstemperatur oder dem Eduktstoffmengenverhältnis ab, sondern vielmehr von äußeren Bedingungen, die das Kristallisationsverhalten des Produktgemisches im Verlauf der Kristallisation beeinflussen können. Zudem wurden Nebenprodukte der Synthese beobachtet, die jedoch nicht durch eine Hydrolyseempfindlichkeit von 2-Desoxy-2-fluor-glucose-1-phosphat zu erklären sind, da ein elektronegativer Substituent in 2-Position eine Hydrolyse, die über ein Oxoniumkation verläuft, erschwert.

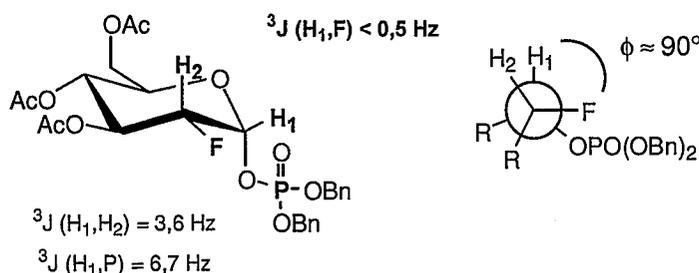
Somit eignet sich die Phosphorylierung von FDG nach der MacDonald-Methode nicht als Teilschritt in einer stereoselektiven mehrstufigen Synthese des  $\alpha$ -glycosidisch aktivierten Nucleotidzuckers UDP-FGlc.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher nach einem alternativen stereospezifischen Phosphorylierungsschritt unter milden, basischen Reaktionsbedingungen gesucht.

Eine erfolgreiche Phosphorylierung mit hinreichender Stereoselektivität wurde über eine regioselektive Deacetylierung am anomeren Kohlenstoff von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-glucose (**2**) mit Hilfe von Hydrazinacetat realisiert (siehe Abb. 3.1). Diese Methode der selektiven Entschützung verläuft nahezu quantitativ unter milden Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur) [101]. Die anschließende Phosphorylierung mit Hilfe von Tetrabenzoldiphosphorsäureester (Tetrabenzylpyrophosphat, TBPP) unter basischen Reaktionsbedingungen verläuft in hohem Maße stereoselektiv unter bevorzugter Bildung des  $\alpha$ -Isomers und stellt den Schlüsselschritt in der insgesamt 7 Reaktionsschritte umfassenden makroskopischen Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP-FGlc) dar (siehe Abb. 3.1).

Die Stereoselektivität dieser Phosphorylierung wurde eindrucksvoll durch  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie gezeigt ( $\alpha/\beta=3:1$ ). Dabei ist zu beachten, daß das Produkt der Phosphorylierungsreaktion eine Sesselkonformation einnimmt, die mit dem „Verlust“

der beobachteten  $^3J(\text{H-1}, \text{F})$ -Kopplung im Spektrum verbunden ist, welche mit einem Diederwinkel von nahezu  $90^\circ$  zwischen dem anomeren Proton und dem Fluoratom in 2-Position des Rings erklärt werden kann (siehe Abb. 3.3) [nach 102].



**Abbildung 3.3:** Struktur von 3,4,6-O-Triacetyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-dibenzylphosphat (**4**) mit  $^1\text{H}$ -NMR-Kopplungskonstanten und einer Projektion entlang der  $\text{C}_2$ - $\text{C}_1$ -Bindungsachse (rechts)

Dieses Ergebnis wurde durch  $^{31}\text{P}$ -entkoppelte  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren und spezielle NMR-Einstrahlexperimente bestätigt. Das Anomerenverhältnis im Produktgemisch konnte zu  $\alpha/\beta = 3:1$  bestimmt werden und die in Abb. 3.3 angegebenen Kopplungskonstanten des anomeren Protons konnten eindeutig dem  $\alpha$ -Isomer zugeordnet werden.

Die anschließende Entschützung des Phosphorylierungsproduktes (**4**) verläuft in zwei Schritten quantitativ (siehe Abb. 3.1). An die katalytische Hydrogenolyse mittels Ammoniumformiat als Wasserstoffdonor [nach 103] schließt sich die basische Verseifung der Acetylschutzgruppen an.

Die Gesamtausbeute der Synthese von UDP-FGlc beträgt 10% und wird im wesentlichen vom letzten Reaktionsschritt bestimmt, der die Kopplungsreaktion des freien Zuckerphosphates (**6**) mit UMP-morpholidat unter wasserfreien Bedingungen nach Moffatt und Khorana darstellt (siehe Abb. 3.1) [79].

### 3.2 Multienzymatische makroskopische Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP-FGlc)

Die Voraussetzung für den Einsatz eines Multienzymsystems für die Synthese von UDP-FGlc ist die Verfügbarkeit der einzelnen Enzymkomponenten. Das hier verwendete Multienzymsystem wurde in Anlehnung an die bekannte enzymatische Synthese von UDP-Glc ausgewählt [71, 104]. Die benötigten Enzyme sind käuflich zu erwerben und teilweise ist ihre Anwendbarkeit auf die in 2-Position fluoridierte Desoxyglucose in der Literatur beschrieben [105, 106]. Die folgende Abbildung (Abb. 3.4) zeigt die enzymatische Reaktionskette für die Synthese von UDP-FGlc unter Beteiligung der vier Enzyme Hexokinase (HK), Phosphoglucomutase (PGM), Uridindiphosphatglucose Pyrophosphorylase (UDP-Glc PP) und anorganischer Pyrophosphatase (iPP). Die Anwendung von UDP-Glc PP auf das nicht-natürliche Substrat 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat (FGlc-1-P) ist bisher nicht beschrieben und wurde im Rahmen dieser Arbeit explizit untersucht.

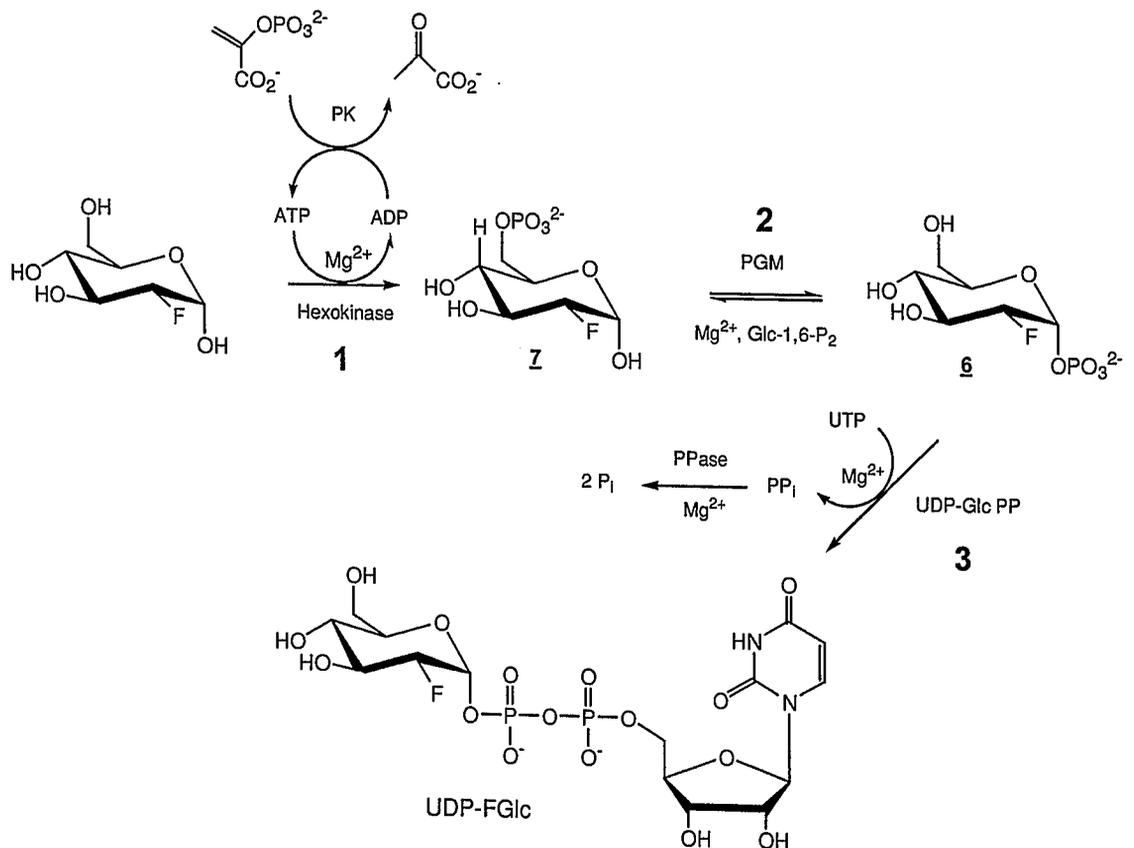


Abbildung 3.4: Reaktionsschema der multienzymatischen Synthese von UDP-FGlc

Im Folgenden werden die in Abbildung 3.4 gekennzeichneten Reaktionschritte **1-3** diskutiert.

### 3.2.1 Enzymatische Phosphorylierung mittels Hexokinase

Die Ausgangsverbindung der Synthese ist 2-Desoxy-2-fluor-D-glucopyranose (FDG), die in Reaktionsschritt **1** mittels Hexokinase in 6-Position phosphoryliert wird (vgl. Abb. 3.4). Die Substratspezifität der Hexokinase ist sehr gut untersucht [84, 107]. Zudem ist bekannt, daß FDG ein gutes Substrat für die Hexokinase-katalysierte Phosphorylierung darstellt ( $K_m(\text{FDG})=0,19 \text{ mM}$ ,  $V_{\text{max,rel.}}=0,5$ ;  $K_m(\text{Glc})=0,17 \text{ mM}$ ) [105]. Es ist möglich, als Phosphatdonor das natürliche Substrat ATP oder das nicht-natürliche Substrat UTP einzusetzen. Im Hinblick auf eine Reaktionsführung als Eintopfsynthese war der Einsatz von UTP interessant, da UTP ebenfalls für die UDP-Glc Pyrophosphorylase in Reaktionsschritt **3** als Substrat dient (siehe Abb. 3.4).

Jedoch war unter den angegebenen Reaktionsbedingungen keine Eintopfsynthese von UDP-FGlc möglich. In Gegenwart aller Enzyme und aller notwendigen Cofaktoren erfolgte ausschließlich die hexokinase-katalysierte Umsetzung von FDG zu FDG-6-phosphat.

Dies ist wahrscheinlich auf inhibitorische Effekte zurückzuführen, da ATP, UTP, ADP und UDP, die als Substrate oder Produkte in der Reaktionskette auftreten, Inhibitoren der Phosphoglucomutase (PGM) sind. Zudem sind Sulfat-Ionen<sup>1</sup> und entstehendes Pyrophosphat sowie wahrscheinlich UDP-FGlc Inhibitoren der UDP-Glc PP [104, 108].

Aus diesem Grund wurde für die Synthese von UDP-FGlc als Ausgangsverbindung 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat (**7**) gewählt, welches in einem vorgeschalteten Reaktionsschritt durch enzymatische Phosphorylierung mit in-situ Regenerierung von ATP synthetisiert wurde (siehe Abb. 3.4). Anschließend wurden die folgenden Schritte als Eintopfsynthese durchgeführt. Eine vollständige Isolierung der Ausgangssubstanz (**7**) war nicht notwendig. Vielmehr war eine Denaturierung der Enzyme und anschließendes Zentrifugieren vor Zugabe weiterer Reaktionspartner und Enzyme vollkommen ausreichend.

Mit dem Ziel, die Konzentration des Nucleosidtriphosphats, welches den Phosphatdonor in der Hexokinase-reaktion darstellt, zu limitieren, wurde ein enzymatisches in-situ Regenerierungsverfahren angewendet. ATP wurde in Reaktionsschritt **1** (siehe Abb. 3.4) nur in katalytischen Mengen eingesetzt und

---

<sup>1</sup> Phosphoglucomutase (PGM) ist kommerziell in einer Ammoniumsulfatsuspension erhältlich (Sigma-Aldrich). Eine Erhöhung der PGM-Konzentration und somit der Sulfat-Konzentration führt zu einer Inhibierung der UDP-Glc PP [108].

verbrauchtes ATP wurde mittels Pyruvatkinase (PK) und Phosphoenolpyruvat (PEP) in-situ wieder zurückgewonnen. Daher ist für eine quantitative Phosphorylierung von FDG eine äquimolare Menge PEP notwendig. Die Anwendung der in-situ Regenerierung von ATP in Reaktionsschritt 1 vermindert die effektiven Konzentrationen von ATP und ADP vor Zugabe des Enzyms UDPGlc PP und wirkt somit einer Inhibierung entgegen.

### 3.2.2 Isomerisierung mittels Phosphoglucomutase

Die anschließende Isomerisierung von 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat (FGlc-6-P, **6**) zu 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat (FGlc-1-P, **7**) wird mittels Phosphoglucomutase (PGM) katalysiert (Reaktionsschritt 2 in Abb 3.4), wobei das Gleichgewicht der Reaktion stark auf Seiten von **6** liegt. Erst in neuerer Zeit sind ausführliche Untersuchungen über den Mechanismus der Phosphoglucomutase-katalysierten Isomerisierung durchgeführt worden [106]. Diese Studien zeigen den Einfluß wichtiger Strukturmerkmale der Substrate von PGM. Als signifikantes Strukturmerkmal hat sich die Hydroxy-Gruppe in 3-Position des Zuckers erwiesen, da der Einsatz eines entsprechenden 3-Desoxyzuckers mit einem nahezu 100fachen Verlust der Bindungsaffinität zum Enzym verbunden war [106]. Somit erscheint z.B. für die Synthese einer Nucleotid-aktivierten 3-Desoxy-3-fluorglucose die Anwendung eines Multienzymsystems unter Beteiligung von PGM sehr ungünstig. Dagegen führt eine strukturelle Manipulation in 2-Position des Zuckers zu keiner wesentlichen Änderung der Bindungsaffinität [106].

Als Cofaktor benötigt das Enzym katalytische Mengen von Glucose-1,6-diphosphat (Glc-1,6-P<sub>2</sub>). Dessen Aufgabe ist es, bestimmte Zentren des Enzyms während der Reaktion zu phosphorylieren und das isomerisierte Produkt aus dem Enzym-Substrat-Komplex zu verdrängen. Höhere Konzentrationen von Glc-1,6-P<sub>2</sub> (> 5  $\mu$ M) wirken inhibitorisch, daher wurden im Rahmen dieser Arbeit nur Konzentrationen < 5  $\mu$ M eingesetzt.

### 3.2.3 Das UDP-Glc Pyrophosphorylase System

Die zentrale Reaktion der multienzymatischen Synthese von UDP-FGlc stellt die Kopplungsreaktion von UTP und FGlc-1-P (**7**) dar, die durch UDP-Glc PP katalysiert wird (Reaktionsschritt 3 in Abb. 3.4). Das Enzym überträgt aus UTP eine UMP-Einheit auf 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat (**7**), wobei Pyrophosphat frei wird. In einer Folgereaktion wird Pyrophosphat durch anorganische Phosphatase (iPP) hydrolytisch zu Phosphat (P<sub>i</sub>) gespalten. Somit wird das Gleichgewicht der PGM-katalysierten Isomerisierung von **6** und **7** auf die Seite von **7** und die

enzymatische Reaktionskette vollständig auf die Seite des Endproduktes UDP-FGlc verschoben [nach 109].

Die durch UDP-Glc PP katalysierte Enzymreaktion benötigt die Anwesenheit von Magnesiumionen, die von UTP komplexiert werden. Dieser Komplex stellt das eigentliche Substrat dar, das an das aktive Zentrum der UDP-Glc PP binden kann. Freies, nicht-komplexiertes UTP ist ein kompetitiver Inhibitor der UDP-Glc PP, so daß die Enzymaktivität von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration und dem Verhältnis  $UTP/Mg^{2+}$  abhängig ist [110].

Im Hinblick auf die Substratspezifität von UDP-Glc PP aus einer pflanzlichen Quelle (Gerste) für verschiedene Zucker-1-phosphate wurden beispielsweise Gal-1-P, GalNH<sub>2</sub>-1-P, GlcNH<sub>2</sub>-1-P, GlcNAc-1-P und GalNAc-1-P getestet [110]. Dabei erwies sich das Enzym aus pflanzlicher Quelle als hoch-spezifisch für Glc-1-P, dagegen ist das Substratspektrum des Enzyms aus tierischen Quellen (Rinderleber, Hefe) breiter und nicht vollständig untersucht [110].

Aus diesem Grunde wurde eine Charakterisierung der Kinetik der UDP-Glc Pyrophosphorylase aus Rinderleber für die enzymatische Kopplungsreaktion von 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat (**6**) und UTP vorgenommen. Dabei standen insbesondere der Einfluß der  $Mg^{2+}$ -Konzentration und der UTP-Konzentration auf die Enzymaktivität im Mittelpunkt, da die Optimierung dieser Parameter ebenfalls für die Anwendung einer enzymatischen Nucleotidaktivierung von n.c.a. [<sup>18</sup>F]FDG von Interesse ist.

### 3.2.4 Einfluß der Cofaktoren auf die Enzymaktivität von UDP-Glc Pyrophosphorylase

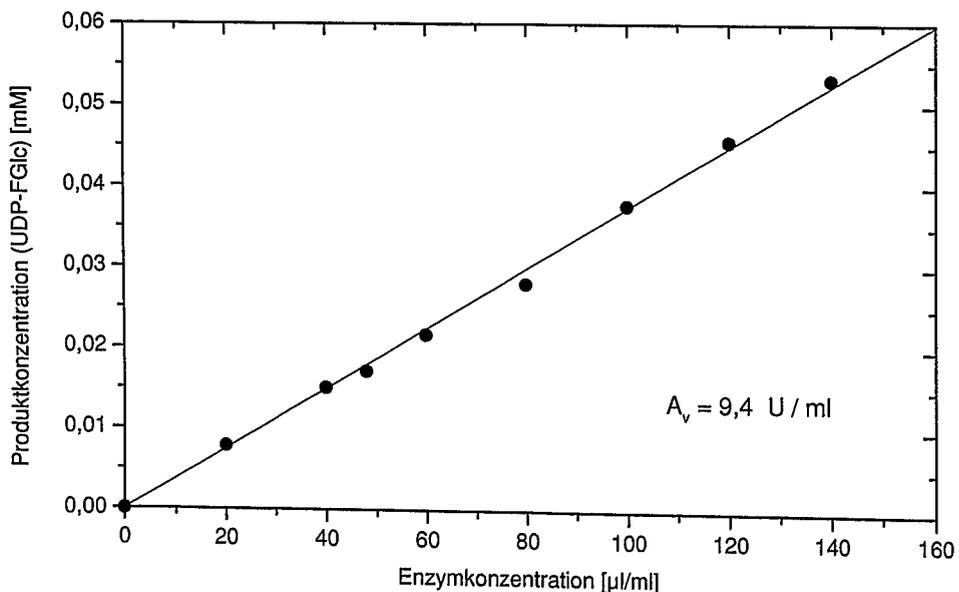
Zunächst wurde die Eignung eines IP-HPLC-Assays zur Messung der Kinetik der UDP-Glc PP erprobt. Mit Hilfe einer Gradientenelution gelang eine vollständige Trennung der FDG-phosphate, UDP-FGlc und der Nucleosidphosphate (ATP, UTP, ADP und UDP) in Anlehnung an die Literatur [111]. Für die Messung wurde das aus der chemischen Synthese gewonnene 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat (**6**) (siehe Absch. 3.1) und UDP-Glc PP aus Rinderleber (Sigma-Aldrich) verwendet. Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, daß die Umsätze unterhalb 5% lagen. Aus der gebildeten Menge UDP-FGlc läßt sich so die Enzymaktivität durch Division der UDP-FGlc-Konzentration mit der Reaktionszeit bestimmen. Abbildung 3.5 zeigt, daß die mit Hilfe des HPLC-Assays gemessene UDP-FGlc-Konzentration proportional zur eingesetzten Enzymkonzentration ist.

Die lineare Regression der sich ergebenden Geraden ergibt durch Division der Steigung der Geraden durch die Reaktionszeit die auf das Volumen bezogene

spezifische Enzymaktivität  $A_v$ , die in [U/ml] angegeben wird. Per Definition gilt für den Umsatz einer enzymatisch-katalysierten Reaktion:

$$1 \text{ U ( 1 unit )} = 1 \text{ } \mu\text{mol / min}$$

Die lineare Abhängigkeit der HPLChromatographisch ermittelten UDP-FGlc-Konzentration von der Enzymkonzentration zeigt die Zuverlässigkeit des Assays. Die Reaktion wurde jeweils durch Hitzedenaturierung der einzelnen Proben abgebrochen. Ein nicht-linearer Verlauf wäre beispielsweise ein Hinweis auf eine vermehrte Produktbildung oder -zersetzung während der Denaturierung des Enzyms in der Hitze. Dies konnte ausgeschlossen werden und somit mit Hilfe des HPLC-Assays der Einfluß der  $\text{Mg}^{2+}$ -Cofaktorkonzentration bzw. des Verhältnisses  $\text{Mg}^{2+}/\text{UTP}$  auf die Enzymaktivität von UDP-Glc PP in Anwesenheit von 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat (**6**, FDG-1-P) bestimmt werden.

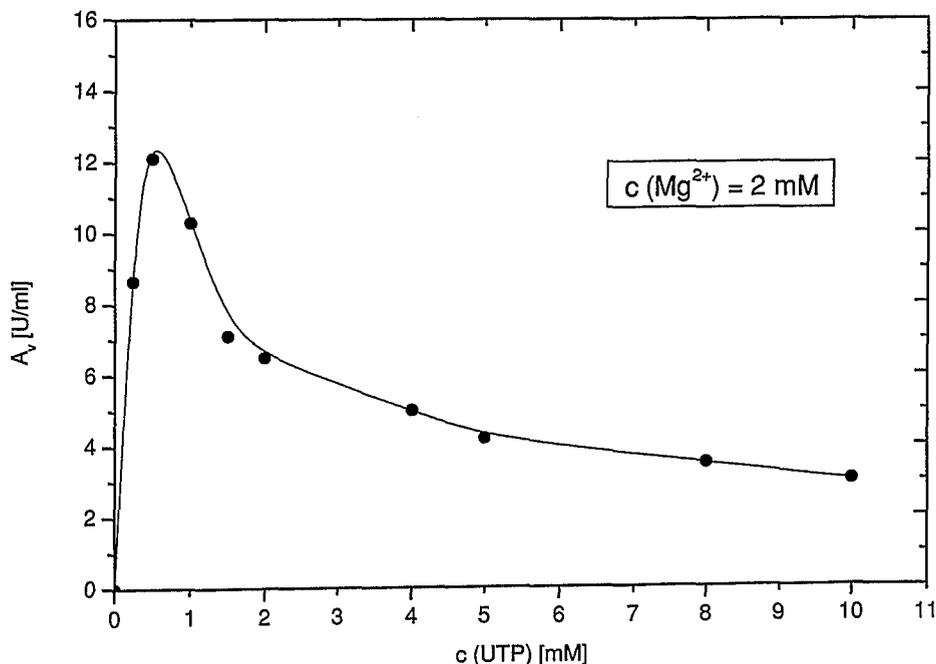


**Abbildung 3.5:** Lineare Abhängigkeit der mittels HPLC bestimmten UDP-FGlc-Konzentration von der UDP-Glc PP-Enzymkonzentration in Lösung (  $R = 0,99886$ ; 1 mM FGlc-1-P, 1mM UTP, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM Tris-Puffer, pH = 8,  $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $t = 40$  min., die Reaktion wurde jeweils durch Erhitzen auf  $100^\circ\text{C}$  (5min.) gestoppt )

Es wurde für zwei verschiedene  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen jeweils die Konzentration von UTP variiert und mittels HPLC die Enzymaktivität bestimmt. Dabei wurde die eingesetzte FDG-1-P-Konzentration konstant gehalten (  $c(\text{FDG-1-P}) = c(\text{UTP})$  ). In Abbildung 3.6 sind die Ergebnisse der ermittelten Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der UTP-Konzentration und der Cofaktorkonzentration dargestellt.

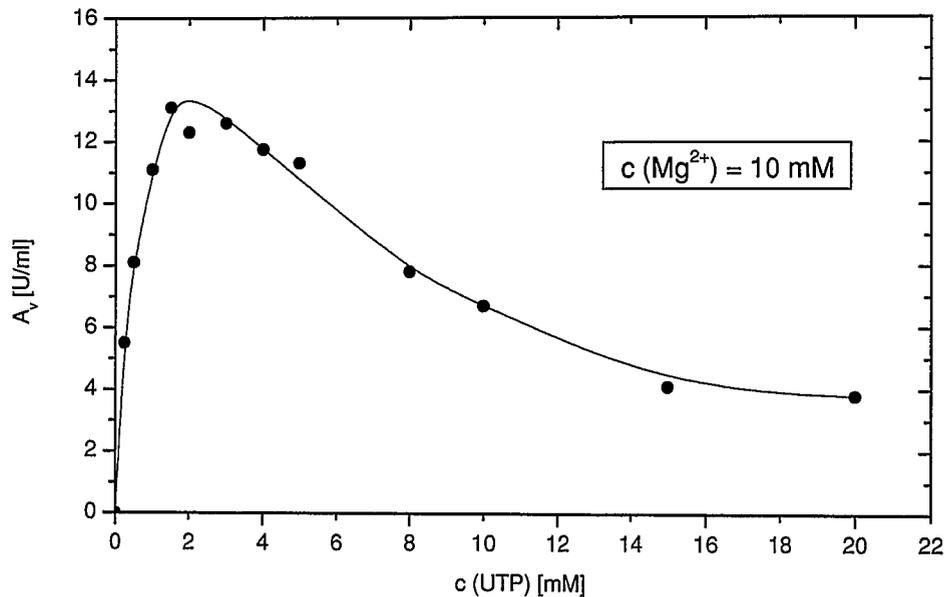
Aus Abbildung 3.6 wird deutlich, daß freies, nicht durch  $\text{Mg}^{2+}$  komplexiertes UTP eindeutig zu einer Substratüberschußinhibierung des Enzyms führt. Bei einer  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von 10mM steigt die Enzymaktivität zunächst steil an, bis sie ein Maximum erreicht, um daraufhin wieder zu sinken. Das Maximum der Enzymaktivität ist bei einem  $\text{Mg}^{2+}$ /UTP-Verhältnis von ca. 2 bis 7 erreicht (siehe Abb. 3.6b). Im Vergleich mit Abbildung 3.6a erkennt man, daß dieser Kurvenverlauf stark von der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration abhängig ist. Für eine Magnesiumkonzentration von 2 mM ist das Maximum der Enzymaktivität weniger breit ausgeprägt und entspricht einem  $\text{Mg}^{2+}$ /UTP-Verhältnis von ca. 2,5 bis 4 (siehe Abb. 3.6a).

Die höchste Enzymaktivität für UDP-Glc PP beobachtet man bei Verwendung einer  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von 10 mM und einer UTP-Konzentration zwischen 1,4 mM und 3,5 mM. Vergleicht man die Lage der Maxima, so erscheint für höhere Magnesiumkonzentrationen das Maximum der Enzymaktivität zu höheren UTP-Konzentrationen verschoben. Des weiteren erkennt man über den gesamten UTP-Konzentrationsbereich für  $c(\text{Mg}^{2+}) = 2 \text{ mM}$  kleinere Enzymaktivitäten von UDP-Glc PP als für  $c(\text{Mg}^{2+}) = 10 \text{ mM}$ .



**Abbildung 3.6a:** Abhängigkeit der UDP-Glc PP-Enzymaktivität von der UTP-Konzentration für  $c(\text{Mg}^{2+}) = 2 \text{ mM}$

Reaktionsbedingungen: 1 mM FGlc-1-P; 50 mM Tris-Puffer; pH = 8; T=25°C



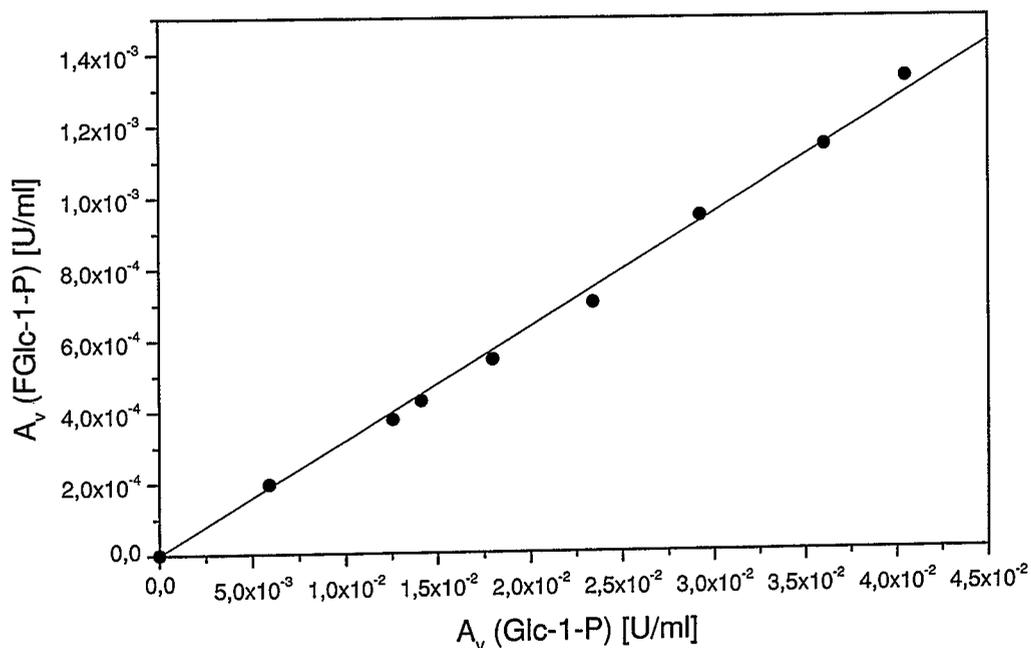
**Abbildung 3.6b:** Abhängigkeit der UDP-Glc PP-Enzymaktivität von der UTP-Konzentration für  $c(\text{Mg}^{2+}) = 10 \text{ mM}$

Reaktionsbedingungen: 1 mM FGlc-1-P; 50 mM Tris-Puffer; pH = 8; T=25°C

Dies zeigt, daß je höher das Verhältnis von  $\text{Mg}^{2+}$ -komplexiertem UTP zu freiem UTP in Lösung ist, desto weniger Inhibierung des Enzyms UDP-Glc PP ist zu beobachten. Es liegt die Vermutung nahe, daß ähnlich wie im Falle der UDP-Glc PP aus Gerste [110] freies UTP mit dem eigentlichen Substrat des Enzyms ( $\text{Mg}^{2+}$ -UTP-Komplex) um die gleiche Bindungsstelle am Enzym in Konkurrenz tritt. Die experimentellen Daten liefern weiterhin die wichtige Erkenntnis, daß ein solcher Inhibierungseffekt bereits bei einem äquimolaren Stoffmengenverhältnis von  $\text{Mg}^{2+}$  und UTP auftritt.

Wie gezeigt, kann dieser Inhibierungseffekt aufgrund von freiem UTP jedoch durch die Wahl eines ausreichend hohen  $\text{Mg}^{2+}$ /UTP-Verhältnisses von 2 bis 7 (für  $c(\text{Mg}^{2+}) = 10 \text{ mM}$ , siehe Abb. 3.6b) vermieden werden. Insbesondere für die Anwendung der UDP-Glc Pyrophosphorylase in einer enzymatischen Kopplungsreaktion von UTP mit n.c.a. 2-Desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat, das ohnehin in einem submikromolaren Stoffmengenbereich vorliegt, spielt die Optimierung der Enzymaktivität eine wichtige Rolle. Es liegt nahe, daß die radiochemische Ausbeute einer solchen enzymatischen Umsetzung im wesentlichen eine Funktion der Enzymaktivität  $A_v$  sein sollte.

Mit dem Ziel einen Vergleich der ermittelten Enzymaktivitäten bezüglich der Umsetzung mit 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat (FGlc-1-P) zu ziehen, wurde der HPLC-Assay auch für die Standardsubstanz  $\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat durchgeführt. Es wurden die gleichen Enzymkonzentrationen und Substratkonzentrationen verwendet, und der Umsatz wurde durch Variation der Reaktionszeit auf unter 10% beschränkt. Die Enzymaktivität in jeder Probe wurde auf das Probenvolumen bezogen und HPLChromatographisch durch Bestimmung der UDP-Glc-Konzentration bestimmt. Ein Vergleich der ermittelten Enzymaktivitäten mit denen im Falle einer Umsetzung von FGlc-1-P kann dann unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Reaktionszeiten pro Probe erfolgen. In Abbildung 3.7 erkennt man, daß 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat ein deutlich schlechteres Substrat für die UDP-Glc PP als  $\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat darstellt.



**Abbildung 3.7:** Vergleich der Enzymaktivitäten für FGlc-1-P mit dem Standard Glc-1-P; aus linearer Regression ergibt sich:  $A_v(\text{FGlc-1-P}) = 0,0318 A_v(\text{Glc-1-P})$ ;  $R=0,9985$   
Reaktionsbedingungen: siehe Abb. 3.5

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß im Rahmen dieser Arbeit sichergestellt wurde, daß 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat ein Substrat der UDP-Glc Pyrophosphorylase ist. Allerdings ist die Enzymaktivität für 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat im Vergleich zu  $\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat als Standardsubstrat unter den Bedingungen des HPLC-Assays um den Faktor 30 erniedrigt.

### 3.2.5 Isolierung und Reinigung von UDP-FGlc

Die Aufarbeitung und Isolierung von UDP-FGlc ist aufwendig, da nach der multienzymatischen Synthese ein komplexes Reaktionsgemisch vorliegt, das neben dem Produkt UDP-FGlc die Mono-, Di- und Triphosphate der Nucleoside Adenosin und Uridin, die Zuckerphosphate (FDG-phosphate), die Komponenten des in-situ Regenerierungssystems (Pyruvat als Produkt) und die benötigten Cofaktoren (z.B. Glc-1,6-P<sub>2</sub>) in einer proteinhaltigen Pufferlösung beinhaltet (vgl. Abb. 3.4). Im Folgenden sollen einige Besonderheiten und Vereinfachungen im Hinblick auf eine effiziente Aufarbeitung und Isolierung von UDP-FGlc aus dem komplexen Reaktionsgemisch diskutiert und erläutert werden.

Das Verfahren zur Isolierung von UDP-FGlc beinhaltet eine enzymatische Aufbereitung des Reaktionsgemisches mittels einer Phosphatase aus Kälberdarm, die Abtrennung der Enzymfraktion, eine Gradienten-Anionenaustauscherchromatographie und eine Gelpermeationschromatographie mit anschließender Lyophilisation zur Reinigung des Produktes. Diese Strategie für die Isolierung und Reinigung von UDP-FGlc im mg-Maßstab ist in Tabelle 3.2 zusammengefaßt dargestellt.

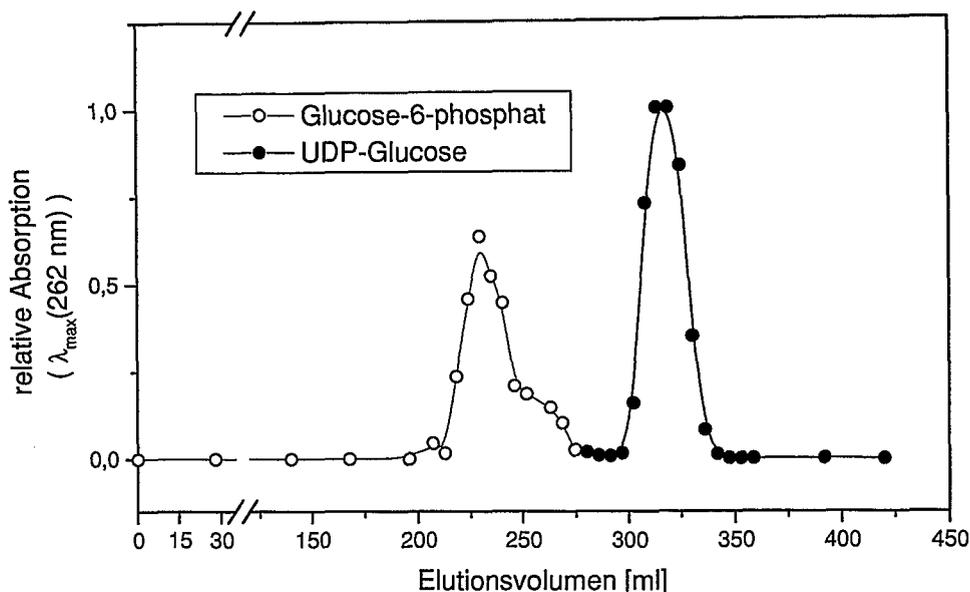
**Tabelle 3.2 :** Strategie für die effiziente Isolierung von UDP-FGlc

Methode	Hilfsmittel	Abtrennung von ...
1 Hydrolyse der Nucleotide	alkalische Phosphatase	UTP, UDP, UMP
2 Ultrafiltration	Membran (Amicon)	Enzyme
3 Anionenaustauscherchromatographie	DEAE-Sephadex	Uridin, Salze, Zucker
4 Gelpermeationschromatographie	Biogel-P2 (Bio-Rad)	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
5 Lyophilisation	Hochvakuum	Wasser

Vor allem die Anwendung von alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP, EC 3.1.3.1) stellte eine elegante Vereinfachung des Trennproblems dar. Dieses Enzym katalysiert, im Gegensatz zu anderen Phosphatasen, selektiv die Hydrolyse von terminalen Phosphorsäureestern, so daß UTP, UDP und UMP zu Uridin dephosphoryliert werden. Die Methode der enzymatischen Hydrolyse mittels CIAP wird ebenfalls zur Vermeidung von Inhibierungseffekten, die auf hohen Konzentrationen von Nucleotiden beruhen, im Rahmen von Sialyltransferase-Reaktionen verwendet [112].

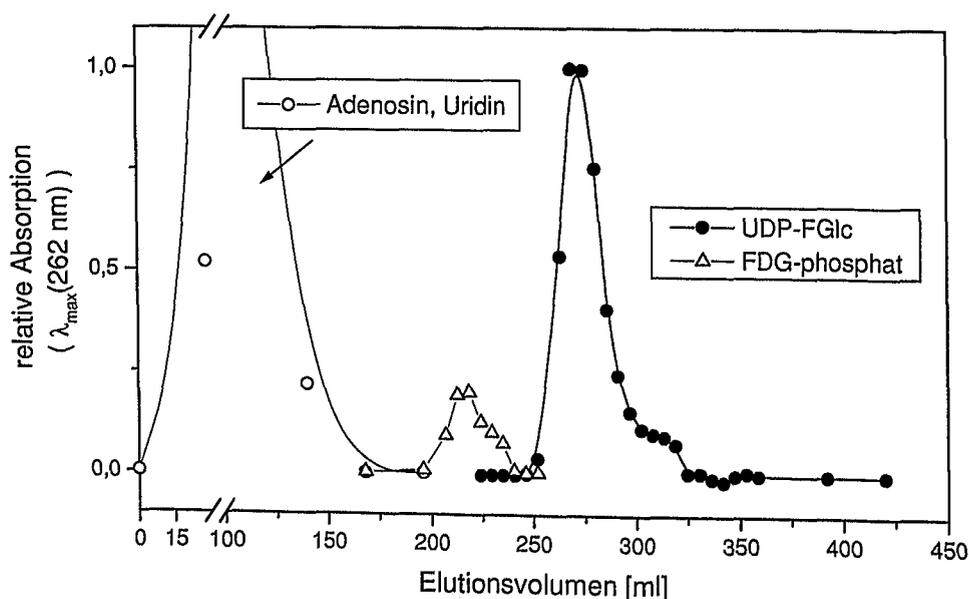
UDP-FGlc ist kein Substrat der alkalischen Phosphatase (CIAP), so daß sich aus einem nicht trivialen Trennproblem aufgrund ähnlicher Teilchengröße und Ladung von UDP-FGlc und den anderen Nucleotiden eine wesentlich einfachere anionenchromatographische Trennung von UDP-FGlc und Uridin bzw. Adenosin ergibt. Die Stabilität von UDP-FGlc in Gegenwart von CIAP konnte mit Hilfe der HPLC nachgewiesen werden. Dabei ergeben sich deutlich vereinfachte Chromatogramme, so daß der Einsatz von CIAP auch für die analytische Kontrolle der enzymatischen Eintopfsynthese von Bedeutung ist. Die selektive Hydrolyse der Nucleotide erfolgte unter den Reaktionsbedingungen der multienzymatischen Synthese von UDP-FGlc und war in wenigen Stunden quantitativ. Die Enzyme wurden anschließend mit Hilfe von Amicon-Membranen mittels Ultrafiltration abgetrennt.

Für die Anionenaustauscherchromatographie von Nucleosidzuckern eignen sich prinzipiell Dowex-Harze, die mit Trimethylammonium-Gruppen funktionalisiert sind. Allerdings fungieren diese als stark basische Anionenaustauscher, so daß die Elutionen mit Lithiumchloridlösungen erfolgen und die Produktfraktion anschließend noch entsalzt werden muß. Das hier angewendete Verfahren der Anionenaustauscherchromatographie macht Gebrauch von einem schwach basischen Anionenaustauscher (DEAE-Sephadex), der mit Diethylaminoethyl-Gruppen funktionalisiert ist. Dies bietet prinzipiell den Vorteil, mit einem Puffer eluieren zu können, der im Vakuum vollständig flüchtig ist, wie z.B. Ammoniumformiat oder Ammoniumhydrogencarbonat. Die Optimierung der Gradienten-Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sephadex erfolgte mit den Substanzen Uridindiphosphatglucose (UDP-Glc) und Glucose-6-phosphat. Die besten Ergebnisse wurden mit  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung als Eluens und einem Konzentrationsgradienten von 30 mM bis 200 mM erzielt (siehe Abb. 3.8).



**Abbildung 3.8:** Optimierte anionenchromatographische Trennung von UDP-Glucose und Glucose-6-phosphat an DEAE-Sephadex unter Verwendung eines  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Gradienten (30 mM  $\rightarrow$  200 mM)

Die Intensitäten der UV-Absorptionen der Fraktionen in Abbildung 3.8 wurden den Intensitäten aus dem HPL-Chromatogramm nach der Endpunktbestimmung der Synthese zugeordnet. Dabei wurde der Produkt-Fraktion mit maximaler Absorption bei  $\lambda = 262 \text{ nm}$  die Intensität 1 zugeordnet. Die optimierten Chromatographiebedingungen wurden für die Abtrennung von UDP-FGlc übernommen (siehe Abb. 3.9).



**Abbildung 3.9:** Anionenchromatographische Trennung von UDP-FGlc an DEAE-Sephadex

Man erkennt in Abbildung 3.9, daß zunächst die Hydrolyseprodukte (Uridin, Adenosin) der enzymatischen Aufarbeitung eluieren, gefolgt von einer Zuckerphosphat-Fraktion und dem Produkt UDP-FGlc, das bei einer  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Konzentration von ca. 60 mM eluiert. Das Auftreten der Zuckerphosphat-Fraktion (FDG-phosphat) in Abbildung 3.9 ist prinzipiell nach der Phosphatase-katalysierten Hydrolyse nicht zu erwarten, es läßt sich jedoch vermuten, daß 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat nur ein schlechtes Substrat der verwendeten Phosphatase darstellt. Allerdings könnte auch während der Probenvorbereitung eine partielle Hydrolyse von UDP-FGlc erfolgt sein. Die Substratstabilität von 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat gegenüber CIAP wurde nicht untersucht. Die UDP-FGlc-Fraktion der Anionenaustauscherchromatographie kann durch mehrmalige Lyophilisation vom flüchtigen Salz ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) befreit werden.

Für eine effiziente Reinigung von UDP-FGlc im mg-Bereich wurde die Gelpermeationschromatographie an Biogel-P2 eingesetzt (Trennbereich bis zu 1000 Da). Die Isolierung und Reinigung von UDP-FGlc mit Hilfe dieser fünf Schritte (vgl. Tab. 3.2) lieferte UDP-FGlc in 90%iger Reinheit (HPLC) und einer chemischen Ausbeute von ca. 35 % bezüglich eingesetzter 2-Desoxy-2-fluor-glucose (siehe Abb. 3.4).

### **3.3 Geträgerte multienzymatische Radiosynthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc)**

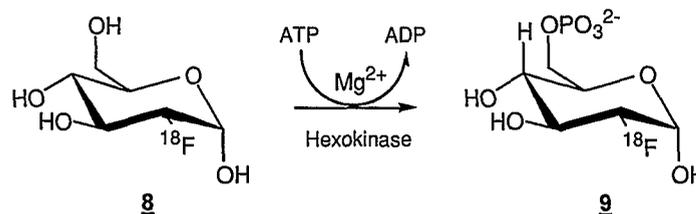
In Kapitel 3.2 wurde das Multienzymsystem für die Synthese von UDP-FGlc ausgetestet. Es stellt sich aus radiochemischer Sicht die Frage, ob trägerarme Substratkonzentrationen von FDG mit Hilfe dieses Enzymsystems unter geeigneten Reaktionsbedingungen umgesetzt werden können und zu einer hinreichenden radiochemischen Ausbeute führen. Unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses der Trägerkonzentration und der Enzymaktivität wird im Folgenden die Möglichkeit einer multienzymatischen n.c.a. Radiosynthese von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc untersucht.

### 3.3.1 Enzymatische n.c.a. Phosphorylierung von 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor- $\alpha$ -D-glucose ([<sup>18</sup>F]FDG)

#### 3.3.1.1 ATP als Phosphatdonor

Die Hexokinase-katalysierte Phosphorylierung wurde in der kalten Synthese mit ATP und FDG in äquimolaren Mengen durchgeführt bzw. mittels in-situ-Regenerierung von ATP (vgl. Absch. 3.2.1).

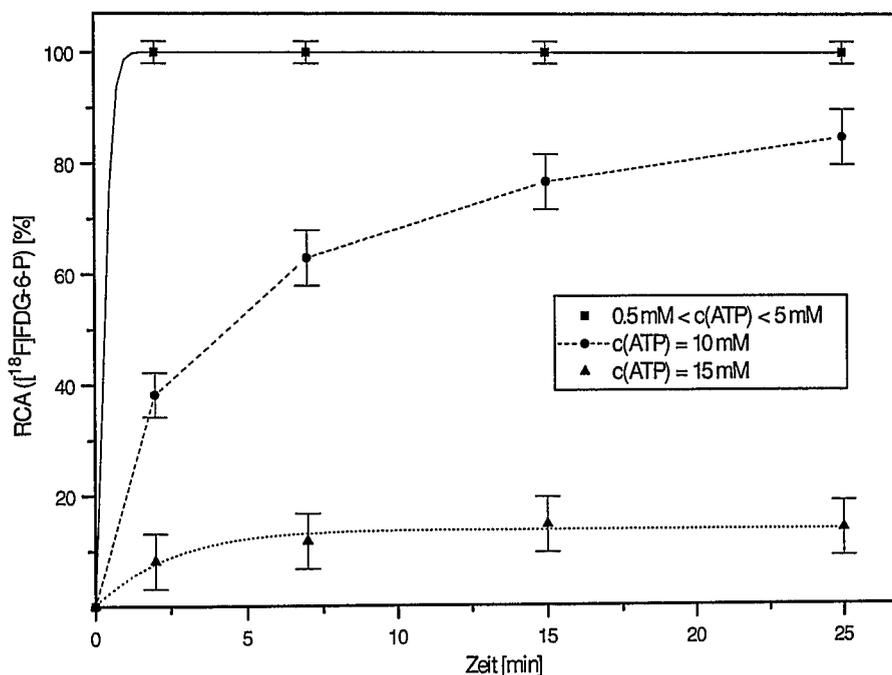
Für die Radiosynthese von 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat ([<sup>18</sup>F]FDG-6-P, **9**) nach Abbildung 3.10 wurde der Einfluß der ATP-Konzentration untersucht sowie die Eignung von UTP als Phosphatdonor getestet.



**Abbildung 3.10:** Schema der enzymatischen Phosphorylierung von [<sup>18</sup>F]FDG (**8**) mittels ATP in Gegenwart von Hexokinase

Die Konzentration von ATP wurde mit dem Ziel variiert, die minimal notwendige ATP-Konzentration zu bestimmen, die für eine maximale radiochemische Ausbeute notwendig ist. Die Anwendung des ATP-Regenerierungsverfahren mittels PEP und PK (vgl. Absch. 3.2.1) ist zwar möglich, aber nicht sinnvoll, da ATP im Verhältnis zu den submikromolaren Mengen des Substrates [<sup>18</sup>F]FDG ohnehin in einem großen Überschuss vorliegt.

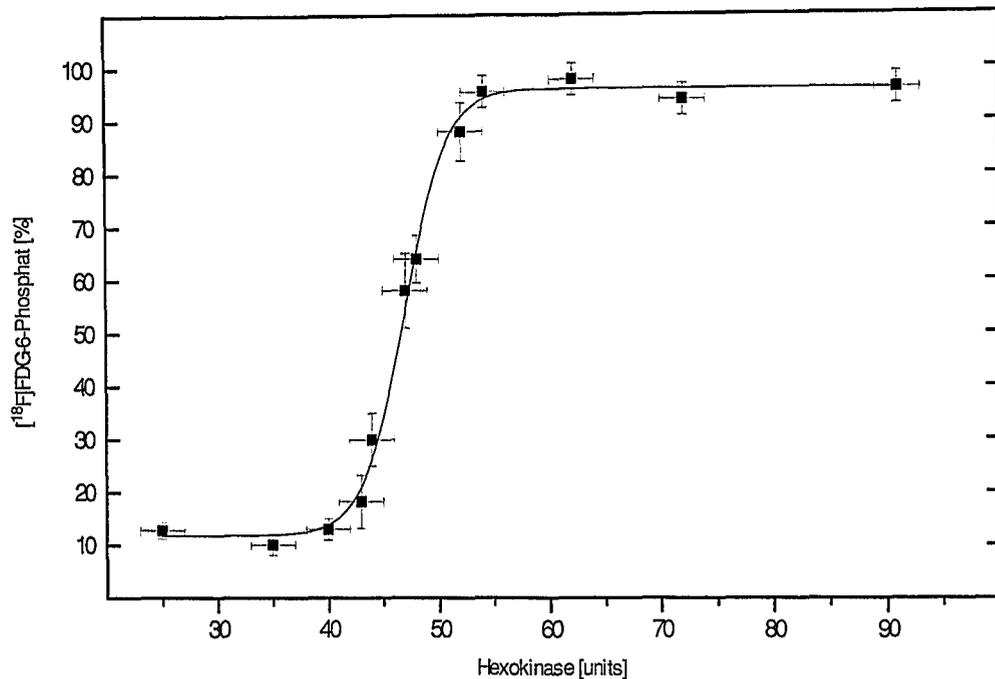
Durch Erniedrigung der ATP-Konzentration in einen Bereich zwischen 0,5 bis 5 mM (ATP/Mg = 1:1) erhält man eine radiochemische Ausbeute von nahezu 100 % nach bereits weniger als einer Minute Reaktionszeit unter den angegebenen Reaktionsbedingungen. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 3.11 dargestellt.



**Abbildung 3.11:** Einfluß der ATP-Konzentration auf die radiochemische Ausbeute der enzymatischen Phosphorylierung von  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  zu  $[^{18}\text{F}]\text{FDG-6-phosphat}$

Reaktionsbedingungen: 50mM Tris Puffer, pH = 7.12, T = 37 °C, ATP:Mg = 1:1, 10 units Hexokinase

Desweiteren ergeben höhere Konzentrationen von ATP nur sehr geringe radiochemische Ausbeuten für  $[^{18}\text{F}]\text{FDG-6-phosphat}$  von ungefähr 15 %. Dieser Effekt ist auf eine Substratüberschußinhibierung zurückzuführen [113]. Das eigentliche Substrat der Hexokinase-katalysierten Phosphorylierung ist der Magnesium-ATP-Komplex, der im ersten Schritt des Phosphorylierungsmechanismus an das Enzym gebunden wird. Der Cofaktor  $\text{Mg}^{2+}$  ist essentiell für die Reaktion und maskiert die negative Ladung des Nucleosids und aktiviert somit das Phosphoratom der terminalen Phosphatgruppe von ATP für einen nukleophilen Angriff der primären Hydroxy-Funktion in 6-Position des Zuckers. Im Falle einer hohen ATP-Konzentration fungiert der Mg-ATP-Komplex als kompetetiver Inhibitor und die aktiven Zentren der Hexokinase werden vollständig besetzt [114], so daß n.c.a.  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit umgesetzt wird. Dieser Effekt ist durch Erhöhung der Enzymkonzentration umkehrbar, wie Abbildung 3.12 zeigt.



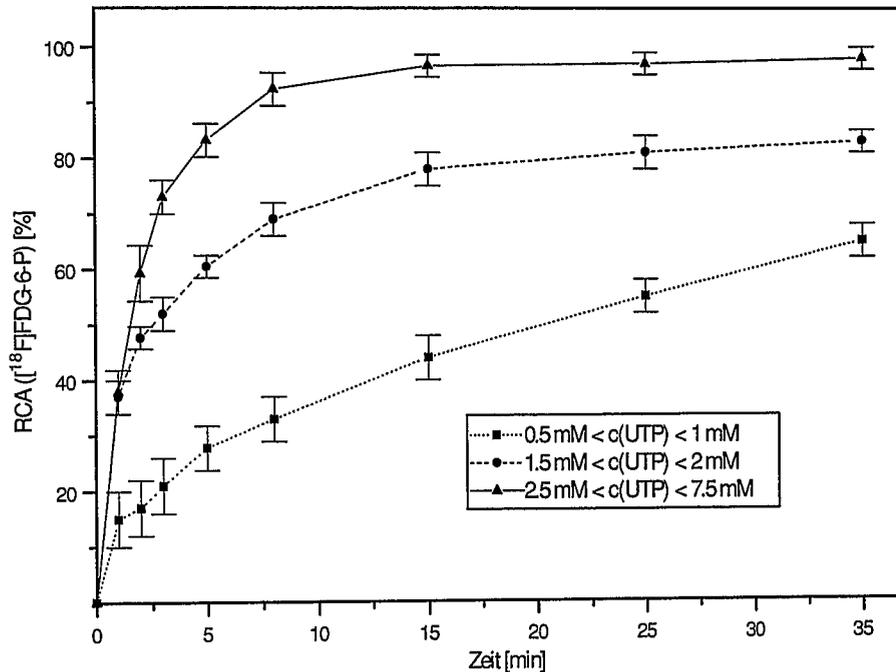
**Abbildung 3.12:** Radiochemische Ausbeute für die enzymatische Phosphorylierung von  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

Reaktionsbedingungen: 50mM Tris-Puffer; pH 7,12;  $c(\text{ATP})=17 \text{ mM}$ ;  $\text{ATP}/\text{Mg}^{2+} 1:1$ ;  $V_{\text{ges}}=230 \mu\text{l}$ ;  $t=25 \text{ min}$

Für eine ATP-Konzentration von 15 mM erhält man erst nach Erhöhung der Hexokinasekonzentration auf das 6-fache im Vergleich zu einer optimierten Phosphorylierung (siehe Abb. 3.11) die zu erwartende radiochemische Ausbeute von nahezu 100 %. Der Einfluß von geringen Trägerkonzentrationen an FDG kann in Abbildung 3.12 vernachlässigt werden. Hohe Trägerkonzentrationen von FDG im millimolaren Bereich lassen den Inhibierungseffekt (kompetitive Inhibierung) definitionsgemäß nicht erkennen.

### 3.3.1.2 UTP als Phosphatdonor

Uridintriphosphat (UTP) wurde ebenfalls als Phosphatdonor in der Hexokinase-katalysierten Phosphorylierung von n.c.a.  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  eingesetzt. In diesem Fall beobachtet man allerdings unter den angegebenen Reaktionsbedingungen einen sehr deutlichen Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit der Phosphorylierung bei Erhöhung der UTP-Konzentration (siehe Abb. 3.13).



**Abbildung 3.13:** Einfluß der UTP-Konzentration auf die radiochemische Ausbeute der enzymatischen Phosphorylierung von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG

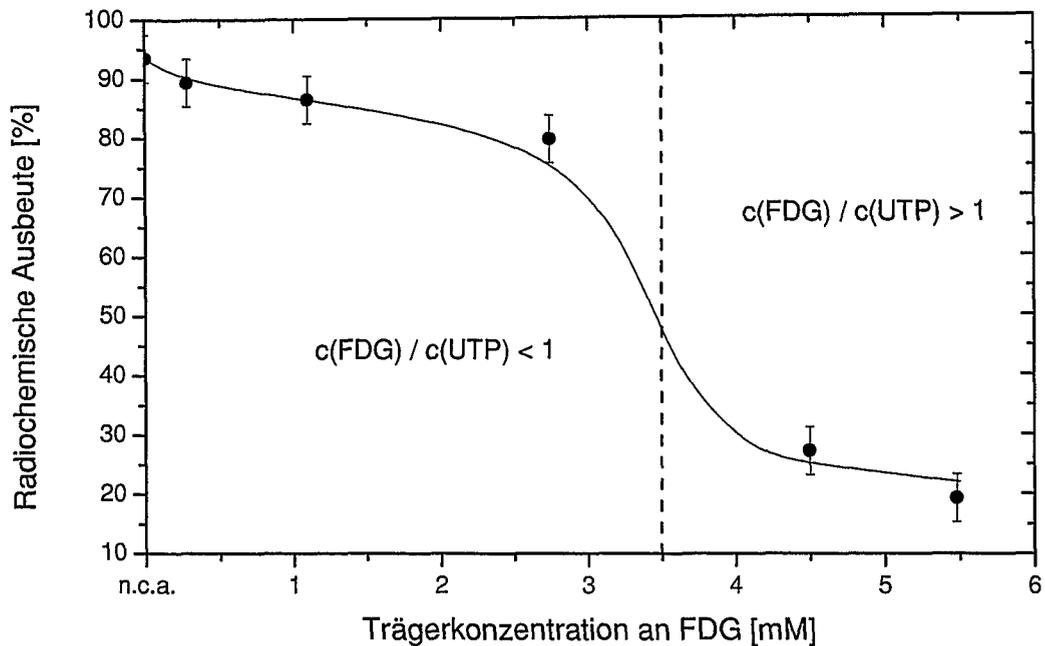
Reaktionsbedingungen: 50mM Tris Puffer; pH 7,12; UTP:Mg=1:1; 10 units Hexokinase; 37°C

Dieser Effekt ist dagegen für den Fall von ATP als Phosphatdonor im Konzentrationsbereich von 0,5 mM bis 5 mM nicht zu erkennen (vgl. Abb. 3.11 und 3.13). Die Phosphorylierung mittels ATP ist innerhalb von weniger als einer Minute quantitativ, während unter Verwendung von UTP-Konzentrationen von 2,5 mM bis 7,5 mM eine nahezu quantitative radiochemische Ausbeute erst nach ca. 15 Minuten erhalten wird. Eine weitere Erhöhung der UTP-Konzentration mit dem Ziel, die Reaktionszeit zu minimieren, führte auch hier zu einer Substratüberschußinhibierung für  $c(\text{UTP}) > 10 \text{ mM}$  (in Abb. 3.13 nicht dargestellt).

### 3.3.1.3 Einfluß der Trägerkonzentration

Der Einfluß der Trägerkonzentration von FDG auf die radiochemische Ausbeute wurde für ein Konzentrationsverhältnis  $c(\text{FDG})/c(\text{UTP}) < 1$ , sowie für überschüssiges FDG ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 dargestellt.

Die radiochemische Ausbeute zeigt unter der Variation der Trägerkonzentration für  $c(\text{FDG})/c(\text{UTP}) < 1$  nur eine geringe Trägerabhängigkeit, die im Bereich des Meßfehlers liegt. Bei Erhöhung der FDG-Konzentration in einen Bereich für den  $c(\text{FDG})/c(\text{UTP}) > 1$  gilt befindet sich der Phosphatdonor im Unterschuß, so daß „kaltes“ FDG nicht quantitativ phosphoryliert werden kann. Bei der in Abbildung 3.14



**Abbildung 3.14:** Einfluß der Trägerkonzentration auf die radiochemische Ausbeute von  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -6-phosphat in der enzymatischen Phosphorylierung von  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$

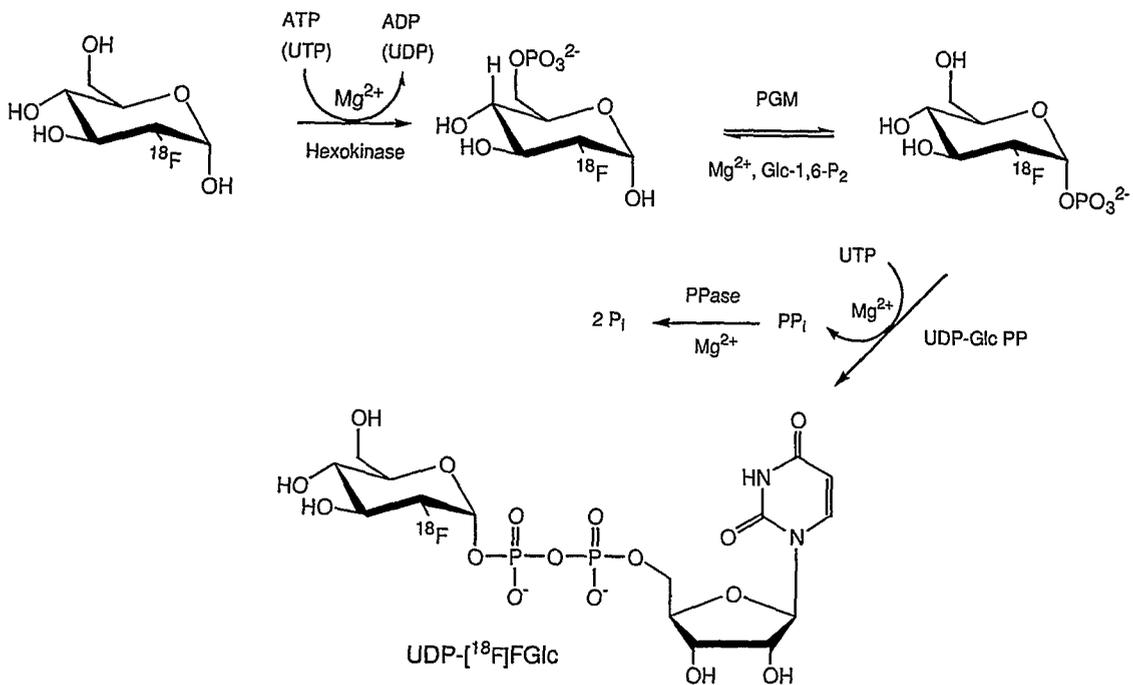
Reaktionsbedingungen: 50 mM Tris Puffer; 3,5 mM UTP; UTP:Mg=1:1; 10 units Hexokinase; pH 7,12; 37°C

dargestellten Abnahme der radiochemischen Ausbeute mit der Konzentration von FDG handelt es sich somit nicht um einen echten Trägereffekt; d.h. bei mehr als äquimolarer Konzentration an FDG kann diese aus statistischen Gründen nicht mehr umgesetzt werden.

Anhand dieser Untersuchungen wurde gezeigt, daß die radiochemische Ausbeute der enzymatischen Phosphorylierung von n.c.a.  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ , die den ersten Teilschritt der multienzymatischen Reaktionskette (siehe Abb. 3.4) darstellt, im wesentlichen eine Funktion der Enzymaktivität ist und somit die Kinetik der Phosphorylierungsreaktion insbesondere von der UTP- bzw. ATP-Konzentration abhängig ist (siehe Abb. 3.11 und 3.13).

### 3.3.1.4 Reaktionsbedingungen der n.c.a. Phosphorylierung im Hinblick auf die Anwendung des Multienzymsystems für die Synthese von UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc

Die Synthesestrategie für die multienzymatische Synthese von UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc ist zur Übersichtlichkeit in Abbildung 3.15 nochmals im Detail dargestellt (vgl. Abb. 2.1 und 3.4).



**Abbildung 3.15:** Synthesestrategie für die multienzymatische Synthese von UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc unter Beteiligung der Enzyme Hexokinase (HK), Phosphoglucosyltransferase (PGM), Uridindiphosphatglucose Pyrophosphorylase (UDP-Glc PP) und anorganischer Pyrophosphatase (PPase)

Aus den Ergebnissen der Phosphorylierungsstudien mittels Hexokinase (Absch. 3.3.1) ergaben sich für die multienzymatische Radiosynthese von n.c.a. UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc grundsätzlich zwei Möglichkeiten der Reaktionsführung:

1. Einsatz von 0,5 mM ATP in der vorgeschalteten Hexokinase-reaktion mit einer radiochemischen Aubeute von nahezu 100 % (siehe Abb. 3.11), Abbruch der Reaktion nach weniger als einer Minute durch Denaturierung des Enzyms und anschließende Zugabe weiterer Enzyme und Cofaktoren unter Berücksichtigung der Bedingung  $c(\text{Mg}^{2+})/c(\text{UTP}) = 4:1$  für eine optimierte UDP-Glc PP-Enzymaktivität (vgl. Abb. 3.6b).

2. Einsatz von 3,5 mM UTP in der vorgeschalteten Hexokinasereaktion mit einer radiochemischen Ausbeute von nahezu 100 % nach 15 Minuten (siehe Abb. 3.13), Abbruch der Reaktion durch Denaturierung und Zusatz weiterer Enzyme unter Berücksichtigung einer Erhöhung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration auf ca. 10-12 mM.

Die erste Möglichkeit zeichnet sich besonders durch die kurze Reaktionszeit und die hohe radiochemische Ausbeute im ersten Teilschritt der Reaktionskette aus. Zudem besteht durch Verwendung von ATP die Möglichkeit, die erforderliche Konzentration für die nachgeschaltete Pyrophosphorylase-katalysierte Kopplungsreaktion im Bereich  $< 3$  mM zu variieren. Somit besteht ebenfalls die Möglichkeit, eine  $Mg^{2+}$ -Konzentration im Bereich  $< 10$  mM einzusetzen. Da  $Mg^{2+}$  in hohen Konzentrationen als Inhibitor der Phosphoglucomutase (PGM) bekannt ist [116], aber auf der anderen Seite die Bedingung  $c(Mg^{2+})/c(UTP) = 4:1$  (siehe Abb. 3.6b) für eine gute Enzymaktivität von UDP-Glc PP vorteilhaft ist, gilt es, durch Variation der UTP-Konzentration bzw. der Magnesiumkonzentration oder der Enzymkonzentration Reaktionsbedingungen im Hinblick auf eine Optimierung der radiochemischen Ausbeute an UDP- $[^{18}F]FGlc$  auszuarbeiten.

Die zweite Möglichkeit limitiert die  $Mg^{2+}$ -Konzentration auf den Bereich  $> 3,5$  mM. Eine  $Mg^{2+}$ -Konzentration von 10-12 mM wäre somit für UDP-Glc PP optimal. In diesem Fall müßte man insbesondere durch Erhöhung der Phosphoglucomutase-Konzentration die Einstellung des Isomerengleichgewichtes zwischen  $[^{18}F]FDG-6$ -phosphat und  $[^{18}F]FDG-1$ -phosphat beschleunigen (vgl. Abb. 3.15).

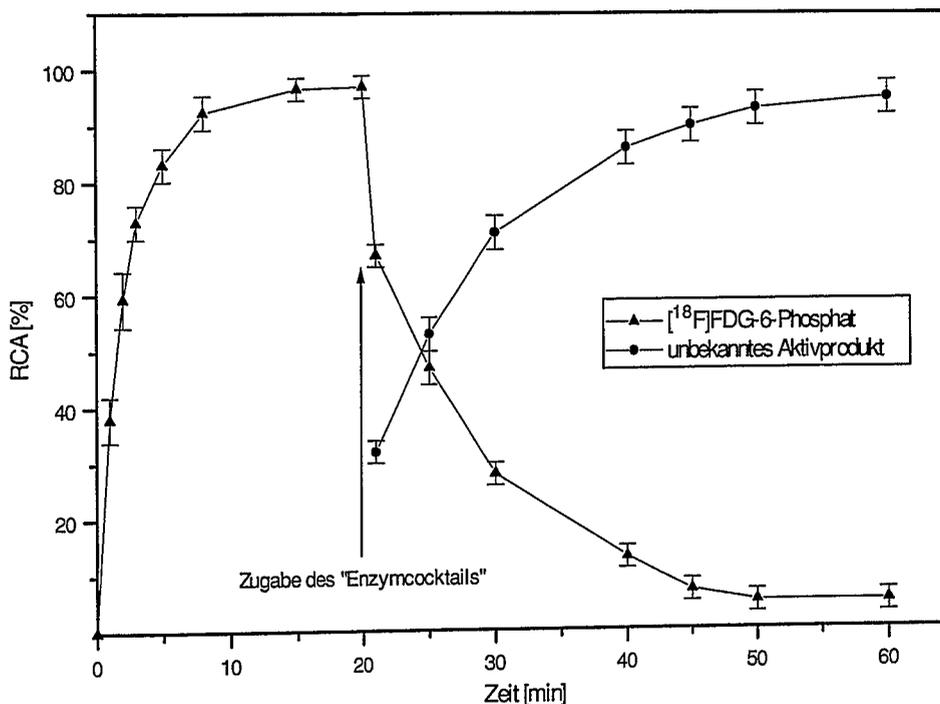
Im Folgenden wird das Phosphoglucomutase-System und insbesondere der Einfluß von Glucose-1,6-diphosphat als Cofaktor der Phosphoglucomutase auf die Radiosynthese von UDP- $[^{18}F]FGlc$  unter n.c.a.-Bedingungen sowie unter geträgerten Bedingungen diskutiert.

### **3.3.2 Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von n.c.a. UDP- $[^{18}F]FGlc$ vom Cofaktor des PGM-Systems**

Der erste Teilschritt der in Abbildung 3.15 angegebenen enzymatischen Reaktionskette wurde mit UTP als Phosphatdonor durchgeführt und die Reaktion nach 15 Minuten durch Denaturierung des Enzyms in der Hitze abgebrochen (siehe Abb. 3.16). Anschließend sollte nach Zugabe von PGM das Isomerisierungsgleichgewicht zwischen  $[^{18}F]FDG-6$ -phosphat und  $[^{18}F]FDG-1$ -phosphat erfolgen, daß die Anwesenheit von Glucose-1,6-diphosphat (Glc-1,6- $P_2$ ) als Cofaktor benötigt.

Unter n.c.a. Bedingungen und Variation der UTP- bzw. der  $Mg^{2+}$ -Konzentration und Zugabe der UDP-Glc PP konnte jedoch keine Folgereaktion zu dem gewünschten Produkt UDP- $[^{18}F]FGlc$  beobachtet werden.

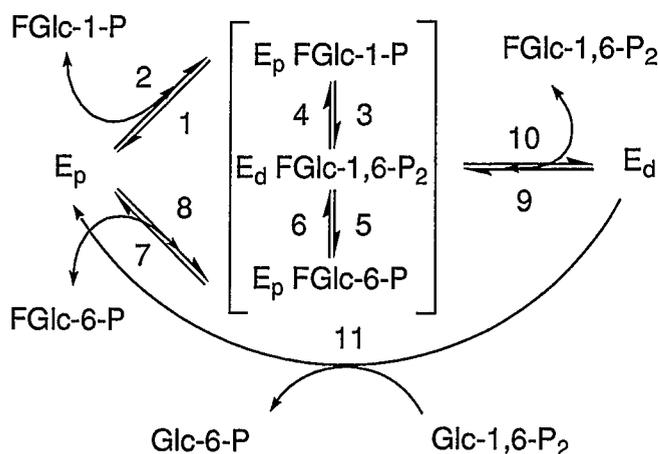
Es wurde vielmehr festgestellt, daß unter trägerarmen Bedingungen die  $[^{18}F]FDG$ -phosphate während der Isomerisierung mittels Phosphoglucomutase zu einem unerwünschten Aktivprodukt abreagieren. Die HPLC-Analyse zeigt für das Aktivprodukt eine Retentionszeit, die annähernd im Bereich von Glucose-1,6-diphosphat liegt. Die Reaktionsbedingungen für diese Umsetzung sind in Abbildung 3.16 angegeben.



**Abbildung 3.16:** Radiochemische Ausbeute (RCA) für die Umsetzung von n.c.a.  $[^{18}F]FDG$  in einem Multienzymsystem in Abhängigkeit von der Reaktionszeit

Reaktionsbedingungen: 50 mM Tris-Puffer, n.c.a.  $[^{18}F]FDG$ ; 5 mM Mg; 3,5 mM UTP, 5u HK; 0,1mM Glc-1,6- $P_2$ ; 30 u PGM; 10 u UDPGlcPP; 10 u IPP; T=25°C; pH=7,7

Die Ursache für diese unerwünschte Reaktion ist wahrscheinlich im Reaktionsmechanismus der Phosphoglucomutase-katalysierten Isomerisierung begründet. Für die Reaktion eines Zuckerderivates wie 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat in Anwesenheit des Cofaktors Glucose-1,6-diphosphat gilt nach [106] folgender Reaktionsmechanismus:



**Abbildung 3.17:** Reaktionsmechanismus der Phosphoglucomutase für 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat (FGlc-1-P) in Gegenwart von Glucose-1,6-diphosphat (Glc-1,6-P<sub>2</sub>) [106] (E<sub>p</sub>, E<sub>d</sub>: (de)phosphorylierte Form des Enzyms, FGlc-6-P: 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat, FGlc-1,6-P<sub>2</sub>: 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1,6-diphosphat, Glc-6-P:  $\alpha$ -D-Glucose-6-phosphat)

Im ersten Schritt bindet FGlc-6-P an das Phosphoenzym (E<sub>p</sub>) und wird in 1-Position phosphoryliert. Es entsteht ein Komplex aus dephosphoryliertem Enzym und FGlc-1,6-P<sub>2</sub>, das durch den Cofaktor Glc-1,6-P<sub>2</sub> verdrängt wird, so daß sich die Konzentration von freiem FGlc-1,6-P<sub>2</sub> in Lösung erhöht. Glc-1,6-P<sub>2</sub> phosphoryliert das Enzym und reagiert zu Glc-6-P. Dieser Schritt ist sehr schnell und nicht geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion [115]. Somit folgt die Reaktion zunächst den Schritten 8, 6, 10 und 11, die in Abbildung 3.17 gekennzeichnet sind. Somit resultiert folgende Reaktionsgleichung:



Diese Reaktion wird bis zur Erfüllung folgender zwei Bedingungen im Sinne der Reaktionsgleichung verlaufen:

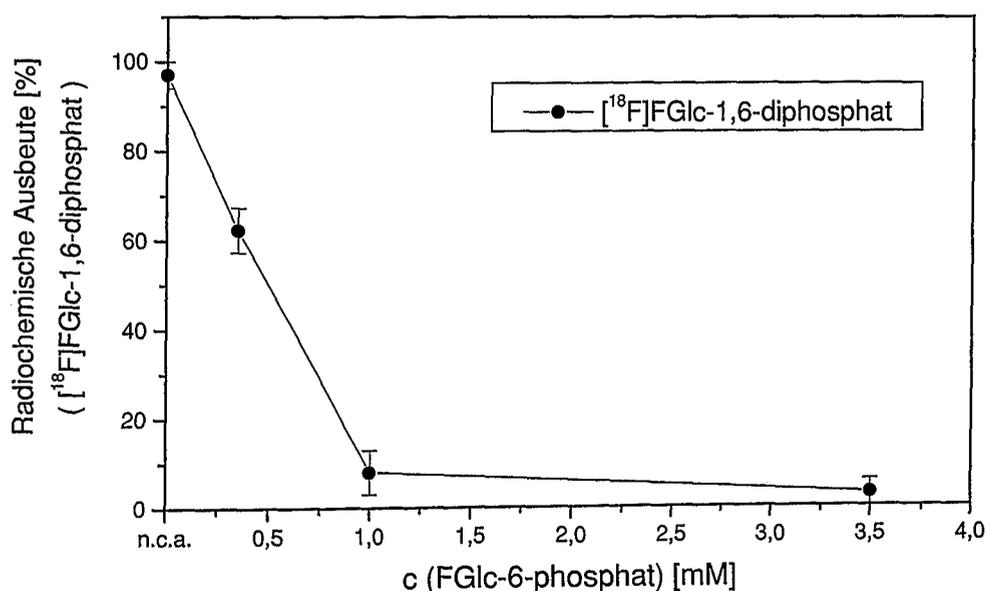
1. Glc-1,6-P<sub>2</sub> ist vollständig verbraucht.
2. Die Konzentration von FGlc-1,6-P<sub>2</sub> erreicht einen Wert, bei der sie mit der Konzentration von Glc-1,6-P<sub>2</sub> konkurrieren kann.

Ist eine dieser Bedingungen erfüllt, stellt sich das Gleichgewicht gemäß der Schritte 8, 6, 4 und 1 ein (siehe Abb. 3.17).

Für den trägerarmen Fall der Umsetzung mit [<sup>18</sup>F]FDG-6-P kann keine dieser Bedingungen erfüllt werden, da Glc-1,6-P<sub>2</sub> immer im Überschuß zu [<sup>18</sup>F]FGlc-1,6-P<sub>2</sub>

vorliegen wird. Die Anwesenheit des Cofaktors Glc-1,6-P<sub>2</sub> katalysiert somit ausschließlich den Reaktionskanal über die Schritte 8, 6, 10 und 11 (siehe Abb. 3.17). Daher handelt es sich sehr wahrscheinlich bei dem beobachteten Aktivprodukt in Abbildung 3.16 um [<sup>18</sup>F]FGlc-1,6-P<sub>2</sub>. Die Bildung von [<sup>18</sup>F]FGlc-1-P ist im trägerarmen Konzentrationsbereich nicht möglich, da das Isomergleichgewicht der in 6- und 1-Position phosphorylierten Zucker (Schritte 3-6) deutlich auf Seiten des 6-Phosphates liegt [115] und die Produktbildung (Schritt 10) durch die schnelle Phosphorylierung des Enzyms durch den zugegebenen Cofaktor Glc-1,6-P<sub>2</sub> bestimmt wird (Schritt 11) [106].

Entsprechend kann die Bildung von [<sup>18</sup>F]FGlc-1,6-P<sub>2</sub> durch Trägerzusatz jedoch vollständig unterdrückt werden und zeigt dann eine Abhängigkeit von der Konzentration des Cofaktors Glc-1,6-P<sub>2</sub>. In Abbildung 3.18 ist der Einfluß der Trägerkonzentration von 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat auf die Bildung von [<sup>18</sup>F]FGlc-1,6-P<sub>2</sub> dargestellt.

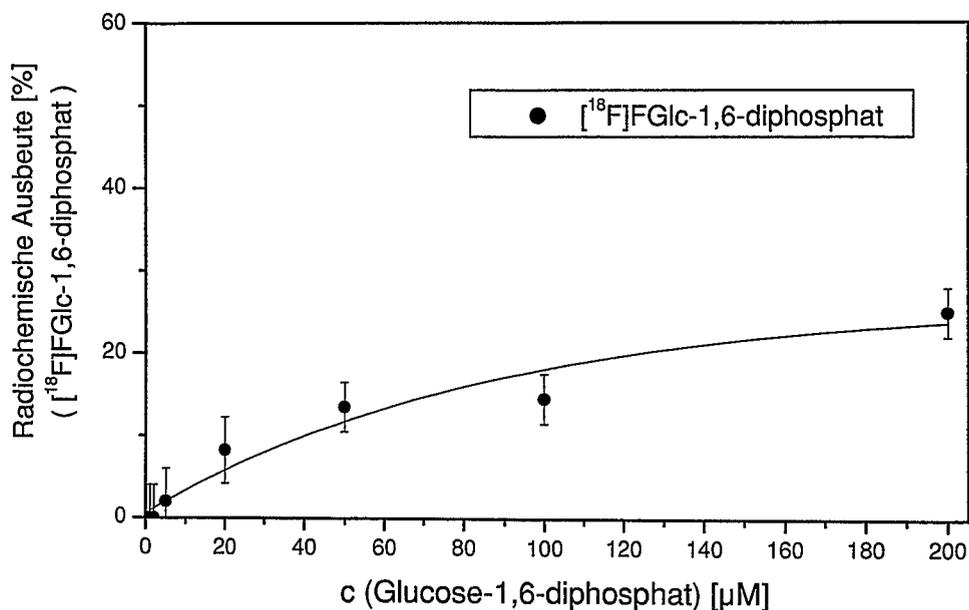


**Abbildung 3.18:** Einfluß der Trägerkonzentration von 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat (FGlc-6-phosphat) auf die radiochemische Ausbeute von [<sup>18</sup>F]FGlc-1,6-P<sub>2</sub>

Reaktionsbedingungen: 50 mM Tris-Puffer; n.c.a. [<sup>18</sup>F]FGlc-6-phosphat; 5 mM Mg; 3,5 mM UTP; 5 u HK; 0,1 mM Glc-1,6-P<sub>2</sub>; 30 u PGM; 10 u UDPGlcPP; 10 u iPP; T=25°C; pH=8

Für Trägerkonzentrationen von 1 mM ist die Bildung von [<sup>18</sup>F]FGlc-1,6-P<sub>2</sub> unter den angegebenen Reaktionsbedingungen auf unter 10 % zurückgedrängt. Bei einer konstanten Trägerkonzentration von 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat besteht eine Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute für [<sup>18</sup>F]FGlc-1,6-P<sub>2</sub> von

der Glc-1,6-P<sub>2</sub>-Konzentration. Im Falle von sehr hohen Konzentrationen von Glc-1,6-P<sub>2</sub> im Bereich von 0,2 mM tritt das unerwünschte Aktivprodukt [<sup>18</sup>F]FGlc-1,6-P<sub>2</sub> merklich auf. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 3.19 für eine Trägerkonzentration von 3,5 mM FGlc-6-phosphat dargestellt.



**Abbildung 3.19:** Einfluß der Cofaktorkonzentration von  $\alpha$ -D-Glucose-1,6-diphosphat (Glc-1,6-P<sub>2</sub>) bei konstanter Konzentration von FGlc-6-phosphat (3,5 mM) auf die radiochemische Ausbeute von [<sup>18</sup>F]FGlc-1,6-P<sub>2</sub>

Reaktionsbedingungen: 50 mM Tris-Puffer; [<sup>18</sup>F]FGlc-6-phosphat; 5 mM Mg; 3,5 mM UTP; 5 u HK; 30 u PGM; 10 u UDPGlc PP; 10 u iPP; T=25 °C; pH=8; Reaktionszeit: 30 min

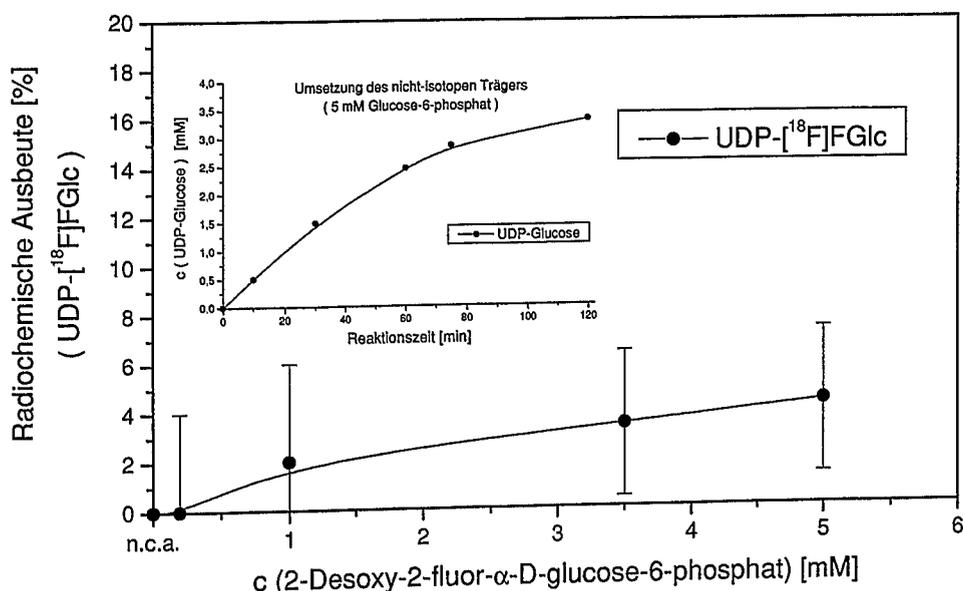
Im Fall der „kalten“ Synthese von UDP-FGlc (vgl. Absch. 3.2) wurde ein ähnliches Verhalten nicht gefunden, da hier die Konzentration von Glc-1,6-P<sub>2</sub> im Bereich von 5 µM gewählt wurde.

Erfolgt die multienzymatische Synthese jedoch unter n.c.a. Bedingungen, so kann durch Variation der Cofaktorkonzentration die hier diskutierte Nebenreaktion zu [<sup>18</sup>F]FGlc-1,6-P<sub>2</sub> nicht unterdrückt werden und aus den genannten Gründen keine Umsetzung von n.c.a. [<sup>18</sup>F]FGlc-6-phosphat zu UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc erfolgen. Daher wurde die multienzymatische Synthese von UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc notwendigerweise mit Trägerzusatz durchgeführt.

### 3.3.3 Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc von der Trägerkonzentration

Als Trägersubstanzen für die multienzymatische Reaktionskette - ausgehend von [<sup>18</sup>F]FDG - (siehe Abb. 3.15) kommen der isotope Träger 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose sowie nicht-isotope Träger in Frage, die Substrate der beteiligten Enzyme sind. Hier bietet sich 2-Desoxy- $\alpha$ -D-glucose als nicht isotoper Träger an, die bezüglich Hexokinase [113] und Phosphoglucomutase [106] den gleichen Reaktionsmechanismus zeigt wie 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose (vgl. Absch. 3.3.2), ebenso wie  $\alpha$ -D-Glucose, die ein sehr gutes Substrat aller beteiligten Enzyme darstellt [72].

Die geträgerte Synthese wurde als zweistufige Eintopfsynthese durchgeführt (vgl. Abb. 3.15). 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose,  $\alpha$ -D-Glucose bzw. 2-Desoxy- $\alpha$ -D-glucose wurden jeweils zusammen mit [<sup>18</sup>F]FDG in einem ersten Schritt durch die Hexokinase-katalysierte Phosphorylierung mittels ATP quantitativ zum entsprechenden Zucker-6-phosphat umgesetzt. Die Reaktion wurde mittels HPLC bis zum vollständigen Umsatz verfolgt, bevor die Zugabe der weiteren Enzyme und Cofaktoren erfolgte.



**Abbildung 3.20:** Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute für UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc von der Trägerkonzentration des isotopen Trägers 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat (FGlc-6-P) in der multienzymatischen Synthese

Reaktionsbedingungen: 50 mM Tris-Puffer; [<sup>18</sup>F]FGlc-6-P; 15 mM Mg; c (UTP) = 1,5 c (FGlc-6-P); 5 mM Glc-6-P; 5  $\mu$ M Glc-1,6-P<sub>2</sub>; 30 u PGM; 10 u UDPGlcPP; 10 u iPP; T=25°C; pH=8, V<sub>ges</sub> = 400  $\mu$ l; Reaktionszeit: 120 min

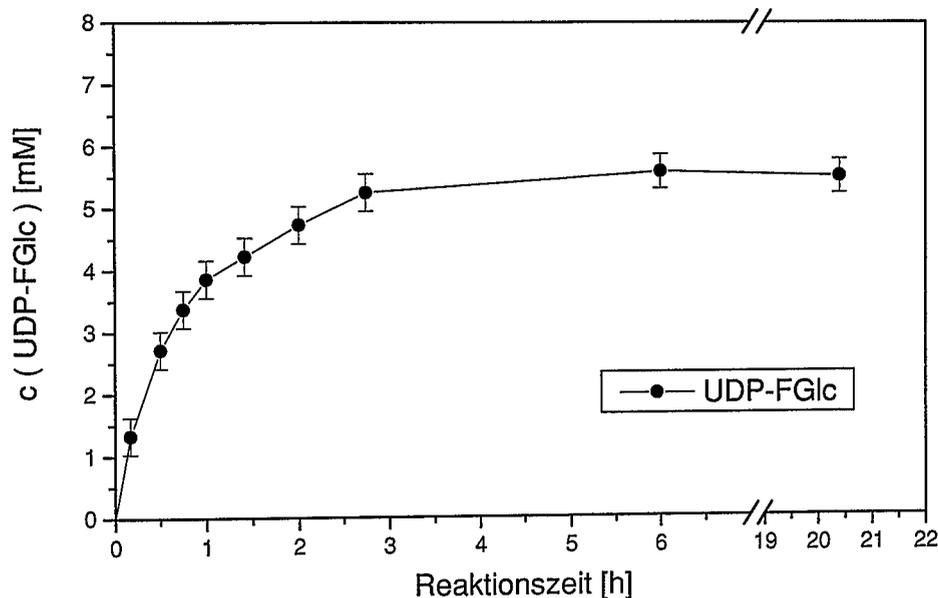
In Abbildung 3.20 ist die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc von der eingesetzten Konzentration des isotopen Trägers FGlc-6-P in Gegenwart von 5 mM Glc-6-P nicht-isotopem Träger nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden dargestellt. Mit Hilfe der HPLC-Analyse des Reaktionsgemisches wurde eine radiochemische Ausbeute für die isotop-geträngerte Synthese von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden von ungefähr 4 % bestimmt. Die Konzentration des isotopen Trägers betrug dabei 3-5 mM. Die Konzentration des nicht-isotopen Trägers Glucose wurde für alle Meßpunkte in Abbildung 3.20 konstant gehalten (5 mM). Im Falle der Verwendung von ausschließlich nicht-isotopem Träger Glucose, d.h. ohne Zusatz des isotopen Trägers FDG, wurde keine radiochemische Ausbeute von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc erhalten (siehe Abb. 3.20). Der nicht-isotope Träger selbst wurde unabhängig von eingesetztem  $^{18}\text{F}$ FGlc-6-phosphat umgesetzt, wie am Beispiel von  $\alpha$ -D-Glucose-6-phosphat in einem integrierten Diagramm (siehe Abb. 3.20) ebenfalls dargestellt ist. So erhielt man für den Fall von 5 mM  $\alpha$ -D-Glucose-6-phosphat als Trägersubstanz bereits nach 60 Minuten eine Umsetzung zu UDP-Glucose von etwa 50 % unter den angegebenen Reaktionsbedingungen. Die Zugabe von nicht-isotopem Träger beeinflusst die radiochemische Ausbeute der enzymatischen Synthese von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc offensichtlich nicht; sie eignet sich nur für die Anzeige der vorhandenen Enzymaktivität in Lösung (siehe Abb. 3.20).

Dieses Ergebnis zeigt, daß es prinzipiell möglich ist, den Nucleotidzucker UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc mit Hilfe des Multienzymsystems isotop-geträngert zu generieren. Allerdings ist es von Nachteil, daß die ungünstige Einstellung des Phosphoglucomutase-katalysierten Isomerengleichgewichtes zwischen  $^{18}\text{F}$ FGlc-6-phosphat und  $^{18}\text{F}$ FGlc-1-phosphat die radiochemische Ausbeute von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc innerhalb einer akzeptablen Reaktionszeit erheblich limitiert.

Mit dem Ziel, den enzymatischen Isomerisierungsschritt von  $^{18}\text{F}$ FGlc-6-phosphat im Rahmen der Synthese von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc zu umgehen, wurde eine „kalte“ enzymatische Synthese von UDP-FGlc ausgehend von FGlc-1-phosphat unter ähnlichen Reaktionsbedingungen wie in der geträngerten multienzymatischen Synthese von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc (siehe Abb. 3.20) durchgeführt. Es wurde FGlc-1-phosphat mit äquimolaren Mengen UTP in Gegenwart von Uridindiphosphatglucose Pyrophosphorylase zu UDP-FGlc im analytischen Maßstab umgesetzt. Die zeitliche Abhängigkeit dieser enzymatischen Umsetzung ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

Unter diesen Reaktionsbedingungen erfolgt ein merklicher Umsatz von 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat (FGlc-1-phosphat) zu UDP-FGlc bereits nach 10 Minuten (20 %). Nach 2 Stunden erreicht die Konzentration von UDP-FGlc in Lösung nahezu den Wert 4,7 mM, was einer chemischen Ausbeute von 62 % entspricht, bis

für  $c(\text{UDP-FGlc}) = 5,5 \text{ mM}$  (72 %) die Sättigungskonzentration erreicht ist. Im Gegensatz dazu konnten unter Verwendung des Multienzymsystems ausgehend von 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat lediglich 4 % Ausbeute erreicht werden (vgl. Abb. 3.20).



**Abbildung 3.21:** Umsetzung von FGlc-1-phosphat mit äquimolaren Mengen UTP in Gegenwart von Uridindiphosphatglucose Pyrophosphorylase zu UDP-FGlc

Reaktionbedingungen: 50 mM Tris-Puffer; 15 mM Mg; 7,6 mM FGlc-1-phosphat; 7,6 mM UTP; 10 u UDP-Glc PP; 10 u PPase;  $T=25^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH}=8$

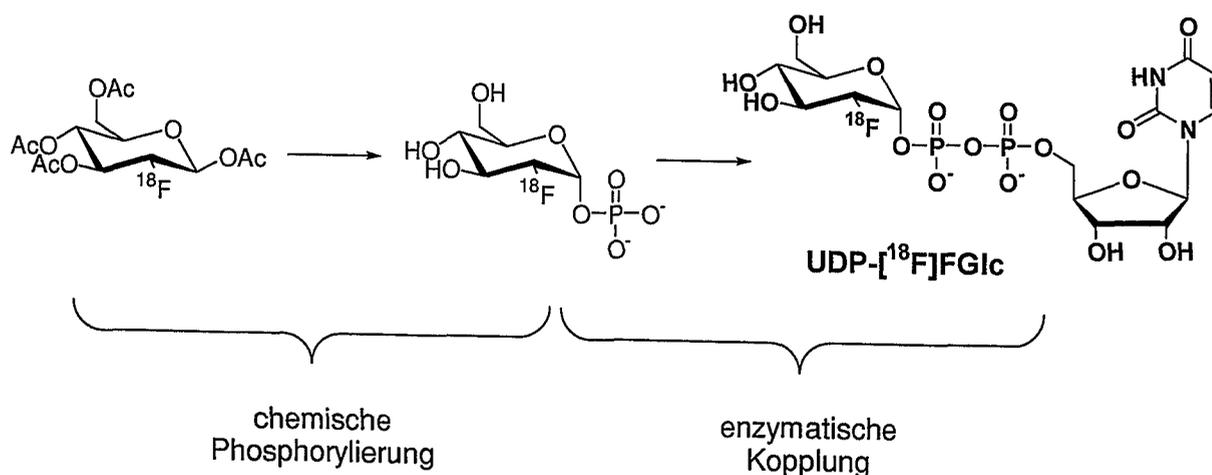
Daher ist das Isomerisierungsgleichgewicht des PGM-Systems zwischen 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat und 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat offensichtlich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der geträgerten Synthese von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc. Durch die Zugabe von isotopem Träger (FGlc-6-phosphat) oder nicht-isotopem Träger (Glc-6-phosphat) wird die unerwünschte Umsetzung von 2-Desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat zu  $^{18}\text{F}$ FGlc-1,6-diphosphat (siehe Absch. 3.3.2) zwar vollständig unterdrückt, die radiochemische Ausbeute für UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc ist jedoch auf ca. 4 % nach 2 Stunden limitiert (siehe Abb. 3.20).

Wie Abbildung 3.21 zeigt, bietet sich die Pyrophosphorylase-katalysierte Umsetzung von FGlc-1-phosphat mit UTP besser für eine geträgerte Synthese von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc an, da der Isomerisierungsschritt im Gegensatz zur multienzymatischen Synthese in diesem Fall entfällt.

Zudem stimuliert dieses Ergebnis, die Zugänglichkeit von n.c.a. UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc mit Hilfe einer n.c.a. Synthese von [<sup>18</sup>F]FGlc-1-phosphat mittels klassisch-chemischer Methoden und einer nachfolgenden Pyrophosphorylase-katalysierten Umsetzung mit UTP in einer chemoenzymatischen Synthesestrategie auszutesten. Die Reaktionsbedingungen dieser chemoenzymatischen Synthese von n.c.a. UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc werden im Folgenden diskutiert.

### 3.4 Chemoenzymatische n.c.a. Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc)

Das Konzept der chemoenzymatischen Synthese von UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc, die den Nucleotidzucker im trägerarmen Zustand liefert, ist in Abbildung 3.22 dargestellt.

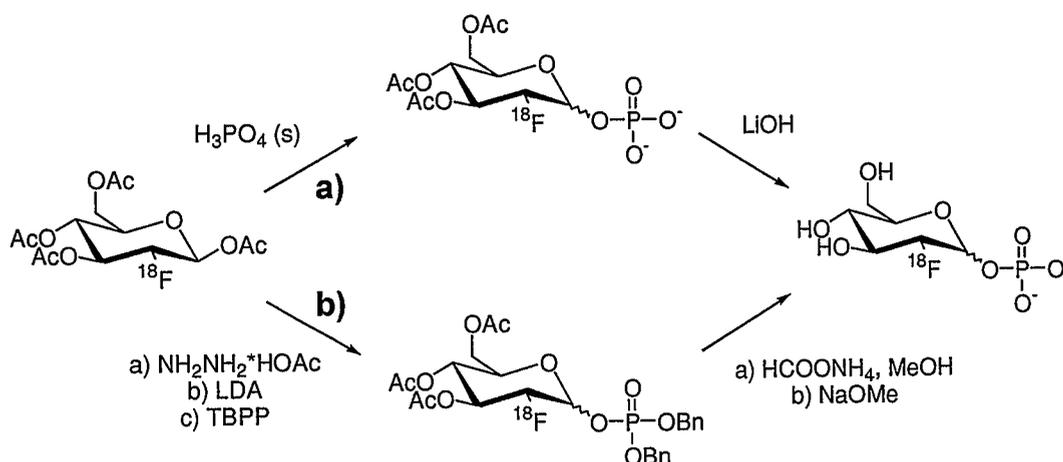


**Abbildung 3.22:** Chemoenzymatische Synthesestrategie für die Synthese von n.c.a. UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc

Aufgrund der Tatsache, daß im nachgeschalteten pyrophosphorylase-katalysierten Reaktionsschritt stereospezifisch das  $\alpha$ -Anomer des Zuckerphosphates umgesetzt wird, ist die maximale radiochemische Ausbeute für n.c.a. UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc wesentlich durch die Stereoselektivität der chemischen Phosphorylierungsmethode bestimmt.

Für eine Optimierung der chemoenzymatischen Synthese von UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc war es somit erforderlich, eine effiziente Phosphorylierungsmethode zu finden, die eine hohe radiochemische Ausbeute für 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor- $\alpha$ -D-glucose liefert und die die Bildung des  $\beta$ -Anomers weitgehend ausschließt. Eine enzymatische

Phosphorylierung in 1-Position von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG ist nicht möglich, da die einzige bekannte Kinase (Galactokinase), die den Phosphat-Transfer auf die 1-Position des Zuckerakzeptors katalysiert, spezifisch für  $\alpha$ -Anomere von D-Galactopyranosederivate ist [117]. Aus den Erfahrungen der chemischen Synthese von UDP-FGlc (siehe Absch. 3.1.1) standen grundsätzlich zwei chemische Phosphorylierungsmethoden zur Auswahl.



**Abbildung 3.23:** Schemata der chemischen Phosphorylierung von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG

- a) MacDonal-Phosphorylierung mittels kristalliner Phosphorsäure
- b) Phosphorylierung mittels Tetrabenzylpyrophosphat (TBPP)

Beide Phosphorylierungsmethoden gehen von dem Edukt 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluor- $\beta$ -D-glucose (TAFG) aus, das als Intermediat der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Synthese auftritt [28] und somit gut verfügbar ist.

Die Phosphorylierungsmethode mittels TBPP zeichnet sich insbesondere durch die relativ hohe Stereoselektivität aus, wobei das bevorzugte Produkt das gewünschte  $\alpha$ -Anomer darstellt (vgl. Absch. 3.1). Allerdings setzt die Methode die selektive Deacetylierung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluor- $\beta$ -D-glucose voraus. Einen weiteren Nachteil der Methode für ihre Anwendung in der schnellen Phosphorylierung von n.c.a. [ $^{18}\text{F}$ ]FDG stellen die zwei verschiedenartigen Schutzgruppen des phosphorylierten Produktes dar (Acetyl- und Benzyl-Gruppen), die nicht unter identischen Reaktionsbedingungen entfernt werden können [vgl. 118]. Dem Vorteil, daß die Reaktion in hohem Maße stereoselektiv abläuft, steht somit der Nachteil einer komplexen Reaktionsfolge gegenüber.

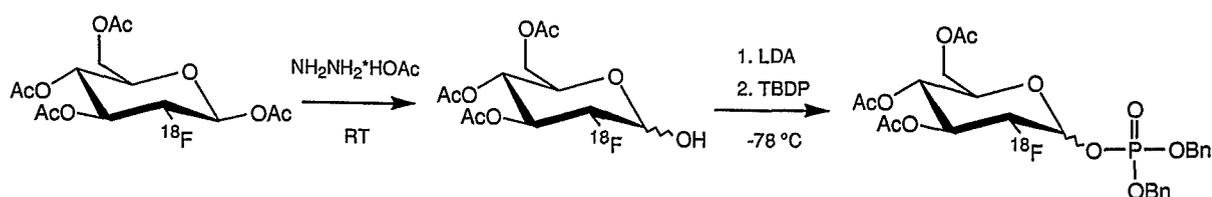
Die MacDonal-Phosphorylierung hat sich im Rahmen der kalten Synthese von UDP-2-FGlc nicht bewährt (siehe Absch. 3.1). Sie bietet jedoch den Vorteil, daß man

nach einer einfachen basischen Hydrolyse in wässriger Lösung direkt zum ungeschützten 2-Desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor-D-glucose-1-phosphat gelangt. Allerdings ist eine Vorhersage der Stereoselektivität der MacDonald-Phosphorylierung in vielen Fällen erschwert [69] und zudem abhängig vom Eduktstoffmengenverhältnis [99]. Daher ist eine qualitative Vorhersage der Anwendbarkeit der Phosphorylierung nach MacDonald unter trägerarmen Bedingungen nicht ohne weiteres möglich.

Der enzymatische Teilschritt der Synthese von n.c.a. UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc (siehe Abb. 3.22) sollte im Hinblick auf eine optimierte radiochemische Ausbeute mit einer hohen Enzymkonzentration durchgeführt werden. Daher war der Einfluß der UTP- bzw.  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration zu klären. Im Folgenden wird die Optimierung der Reaktionsbedingungen für die einzelnen Teilschritte der chemoenzymatische Synthese von n.c.a. UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc dargestellt.

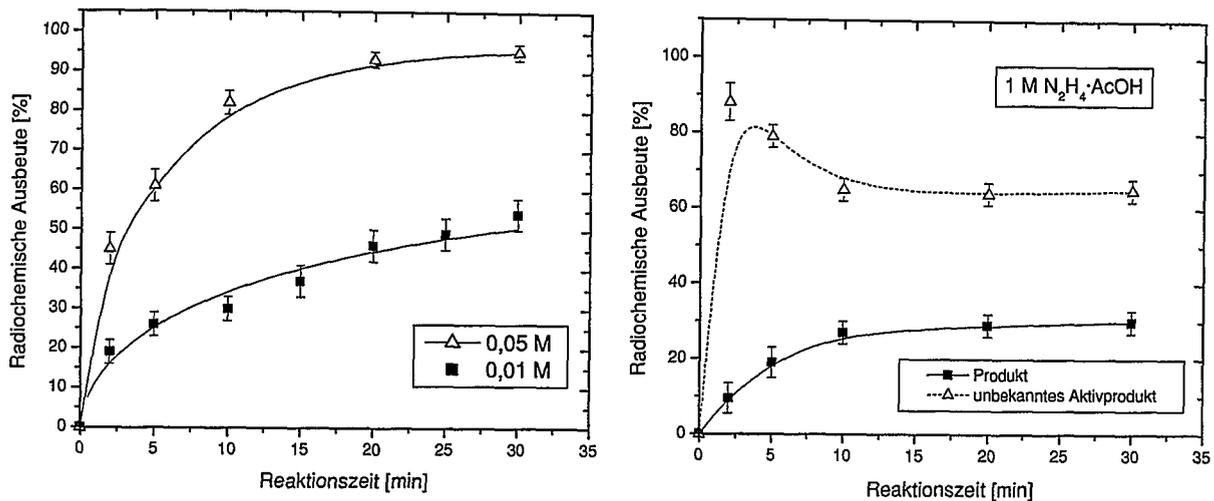
### 3.4.1 Versuche zur Phosphorylierung von n.c.a. 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor-D-glucose mittels Tetrabenzylpyrophosphat

Die Phosphorylierung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor- $\beta$ -D-glucose (TAFG) mittels Tetrabenzylpyrophosphat (TBPP) setzt eine vorherige Entschützung der anomeren Acetatfunktion mit Hilfe von Hydrazinacetat voraus. Diese Methode der regioselektiven Entschützung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die anschließende Veresterung mittels TBPP erfordert tiefe Temperaturen und den Einsatz von Lithiumdiisopropylamid (LDA) als Base (siehe Abb. 3.24).



**Abbildung 3.24:** Phosphorylierungsmethode mittels TBPP ausgehend von n.c.a. 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor- $\beta$ -D-glucose (TAFG)

Im Folgenden werden die Reaktionsbedingungen für die regioselektive Entschützung von TAFG skizziert und die Ergebnisse der nachfolgenden Veresterung mittels TBPP unter n.c.a.-Bedingungen diskutiert.



**Abbildung 3.25:** Radiochemische Ausbeute der regioselektiven Entschützung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2- $[^{18}F]$ fluor- $\beta$ -D-glucose (TAFG) zu 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2- $[^{18}F]$ fluor-D-glucose mit Hilfe von Hydrazinacetat in DMF bei Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (vgl. Abb. 3.24, die Hydrazin-Konzentration ist in den Graphen angegeben)

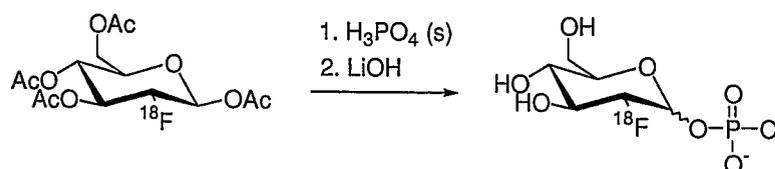
Die regioselektive Entschützung von TAFG mittels 0,05 M Hydrazinacetat in DMF wurde innerhalb von 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einer radiochemischen Ausbeute von über 90 % realisiert. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur führt ebenso wie Erhöhung der Hydrazinkonzentration zu einer unerwünschten Nebenreaktion (siehe Abb. 3.25 rechts). So erhält man z.B. für eine Hydrazinkonzentration von 0,1 M nach 10 Minuten 35% Nebenprodukt (hier nicht abgebildet). Bei dem Nebenprodukt könnte es sich um  $[^{18}F]$ Fluorid handeln. Die Bildung des Nebenproduktes ist bei Verwendung einer 0,05 M Hydrazinlösung vollständig vermeidbar. DMF als Lösungsmittel ist unbedingt erforderlich, da eine hinreichende Löslichkeit von Hydrazinacetat gegeben sein muß. So erzielt man z.B. in Acetonitril unter identischen Reaktionsbedingungen eine radiochemische Ausbeute von weniger als 5 %.

Für die nachfolgende Phosphorylierung (siehe Abb. 3.24) müssen wasserfreie Reaktionsbedingungen eingehalten werden, die die Umsetzung mit LDA und TBPP erlauben. Es zeigte sich jedoch, daß in der Regel keine hinreichenden radiochemischen Ausbeuten reproduzierbar erreicht werden konnten, die eine weitere Umsetzung des geschützten FDG-1-phosphats sinnvoll erscheinen lassen. Es konnte lediglich in einem Versuch eine erfolgreiche Phosphorylierung von 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2- $[^{18}F]$ fluor-D-glucose mit einer radiochemischen Ausbeute von ca. 22 % durchgeführt werden. Versuche, dieses Ergebnis zu reproduzieren und die radiochemischen Ausbeuten zu verbessern, verliefen erfolglos, da während der

Temperaturerhöhung nach Beendigung der Reaktion eine Zersetzung des Produktes unter den basischen Reaktionsbedingungen beobachtet wurde.

Aus diesem Grunde wurde die MacDonald-Phosphorylierung der oben beschriebenen Methode vorgezogen.

### 3.4.2 MacDonald-Phosphorylierung von n.c.a. 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor-β-D-glucose



**Abbildung 3.26:** Reaktionsschema der MacDonald-Phosphorylierung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor-D-β-glucose (TAFG) mit anschließender basischer Deacetylierung

Die MacDonald-Phosphorylierung nach dem in Abbildung 3.26 angegebenen Schema verläuft in Gegenwart von getrockneter kristalliner Phosphorsäure unter absolut trockenen Reaktionsbedingungen im Hochvakuum. Wie bereits erwähnt, erhält man ein Anomerengemisch von triacetyliertem [<sup>18</sup>F]FDG-1-phosphat als Zwischenprodukt, das mit Hilfe von wäßriger Lithiumhydroxidlösung deacetyliert wird. Dadurch wird der Säureüberschuß neutralisiert und nicht umgesetzte TAFG zu [<sup>18</sup>F]FDG hydrolysiert. Da die Aufarbeitung der Hochvakuumerschmelze in wäßriger Lösung möglich ist und die Verwendung von organischen Lösungsmitteln nicht notwendig ist, bietet diese Vorgehensweise gute Voraussetzungen für eine nachfolgende enzymatische Umsetzung (vgl. Abb. 3.22), die ein gepuffertes wäßriges System voraussetzt.

Die Reaktionsbedingungen für die n.c.a. Phosphorylierung von [<sup>18</sup>F]FDG zu 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose-1-phosphat ausgehend von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor-β-D-glucose wurden durch gezielte Veränderung folgender Parameter und Randbedingungen optimiert:

- Art und Weise der H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(s)-Zugabe (kristallin oder gelöst in THF)
- Stoffmenge der eingesetzten Phosphorsäure
- Reaktionszeit und Reaktionstemperatur
- Material und Volumen des Reaktionsgefäßes

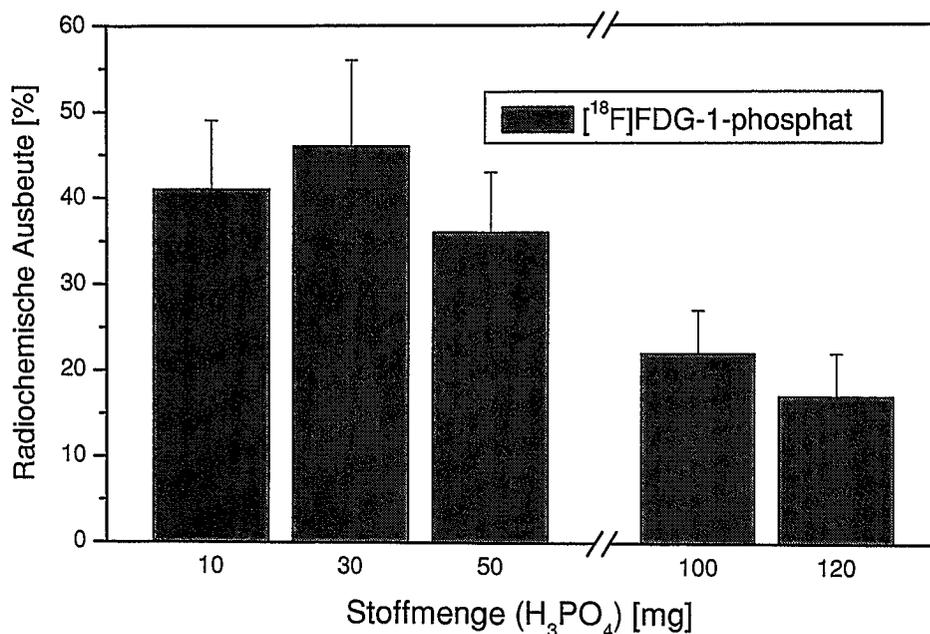
Die Experimente zeigten, daß die radiochemische Ausbeute von 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor-D-glucose-1-phosphat nicht durch die Art und Weise der H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Zugabe beeinflußt wird. Jedoch hat die Qualität der getrockneten kristallinen Phosphorsäure einen großen Einfluß auf der radiochemische Ausbeute von 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor-D-glucose-1-phosphat. Die Phosphorsäure kann in getrockneter kristalliner Form im Reaktionsgefäß vorgelegt werden oder in absolutem THF gelöst zu 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor-β-D-glucose gegeben werden. Die Zugabe von H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in Form einer THF-Lösung eignet sich insbesondere im Hinblick auf eine Automatisierung der Synthese.

#### 3.4.2.1 Einfluß der H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Masse auf die radiochemische Ausbeute

In der präparativen Anwendung der MacDonald-Phosphorylierung in der organischen Chemie kann durch Variation des Verhältnisses H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> / acetylierter Zucker die Stereoselektivität der Reaktion beeinflußt werden [99]. Die verwendete Phosphorsäure wird in einem hohen molaren Überschuß eingesetzt. Am Beispiel von pentaacetylierter Glucose konnte durch Verwendung eines Eduktstoffmengenverhältnisses zwischen 4:1 bis 7:1 gezeigt werden, daß durch einen hohen Phosphorsäureüberschuß die Ausbeute der Reaktion steigt und die Stereoselektivität verbessert wird [119].

Für die Umsetzung von submikromolaren Stoffmengen von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor-β-D-glucose sollte der Einfluß einer Variation der Phosphorsäure-Stoffmenge eher gering sein, allerdings sollte ein hinreichendes Reaktionsvolumen der Schmelze sichergestellt sein und das Einbringen von Feuchtigkeit durch Verwendung von zu hohen Mengen der hygroskopischen kristallinen Phosphorsäure vermieden werden.

Die folgende Abbildung (Abb. 3.27) zeigt den Einfluß der Variation der H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Masse auf die radiochemische Ausbeute von 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor-D-glucose-1-phosphat nach Aufarbeitung der Hochvakuumerschmelze. Eine Differenzierung zwischen α- und β-Anomer konnte nicht vorgenommen werden, da mit den verwendeten analytischen Methoden keine Trennung der Anomere möglich war (vgl. Absch. 4.5.2). Dies ist nur über die Folgereaktion der enzymatischen Umsetzung möglich, wobei deren Ausbeute jedoch unabhängig zu bestimmen ist, um das Anomerenverhältnis zu berechnen.



**Abbildung 3.27:** Einfluß der  $H_3PO_4$ -Masse auf die radiochemische Ausbeute von  $[^{18}F]$ FDG-1-phosphat nach der Hochvakkumschmelze von  $H_3PO_4$  mit 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2- $[^{18}F]$ fluor-D- $\beta$ -glucose

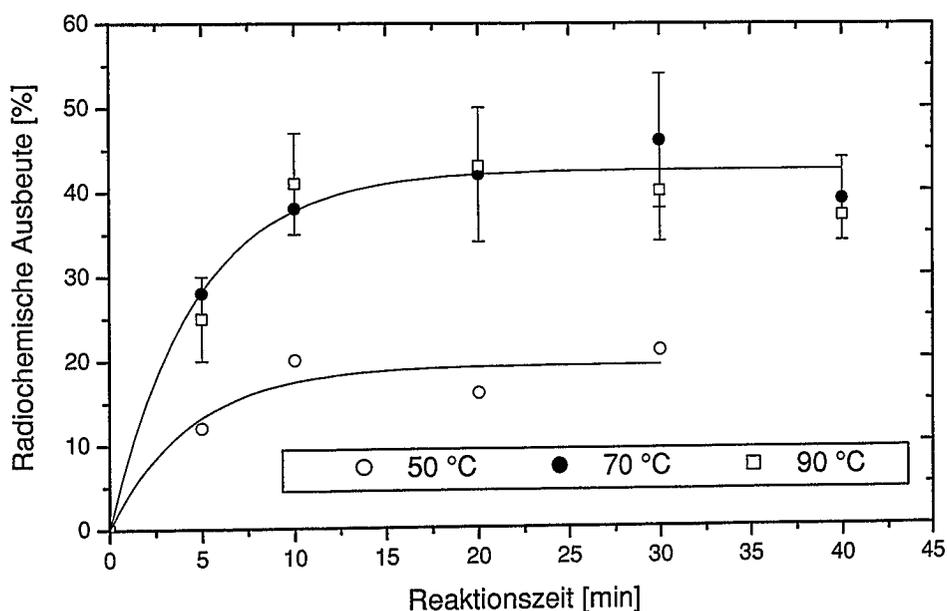
Reaktionsbedingungen:  $T=70^\circ C$ ;  $t = 30$  min; Glas-Vial

Wie Abbildung 3.27 zeigt, ist die radiochemische Ausbeute für  $[^{18}F]$ FDG-1-phosphat bei Verwendung von mehr als 100 mg  $H_3PO_4(s)$  auf unter 20% erniedrigt. Dies kann damit zusammenhängen, daß das Einbringen von Wasser unter den experimentellen Bedingungen dann nicht mehr hinreichend vermieden werden kann. Die verwendete Phosphorsäuremenge sollte auf 20 bis 30 mg beschränkt sein, um die eingebrachte Wasserkonzentration in der Schmelze zu limitieren. Ein Zusatz von Phosphorpentaoxid im Reaktionsgefäß war nicht vorteilhaft, da er die Schmelzeigenschaften der Phosphorsäure negativ beeinflusste.

Die Schmelzreaktion von ca. 10 bis 30 mg kristalliner Phosphorsäure mit trägerarmer 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2- $[^{18}F]$ fluor- $\beta$ -D-glucose verläuft unter wasserfreien Bedingungen und im Hochvakuum mit einer guten radiochemischen Ausbeute für  $[^{18}F]$ FDG-1-phosphat von etwa 46 % nach 30 Minuten.

### 3.4.2.2 Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Reaktionszeit und Temperatur

Die Reaktionstemperatur der Umesterung von TAFG mit Phosphorsäure wurde im Bereich von 50°C bis 90°C variiert. Die Reaktion in der Hochvakuumschmelze wurde nach verschiedenen Reaktionszeiten durch Abkühlung und Zugabe von Lithiumhydroxid abgebrochen. Das Ergebnis für die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von diesen Reaktionsbedingungen ist in Abbildung 3.28 dargestellt.



**Abbildung 3.28:** Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute für  $[^{18}\text{F}]\text{FDG-1-phosphat}$  von der Reaktionstemperatur und Reaktionszeit nach der MacDonald-Phosphorylierung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2- $[^{18}\text{F}]\text{fluor-}\beta\text{-D-glucose}$  (die angegebene Reaktionstemperatur bezieht sich auf die Temperatur des Ölbad)

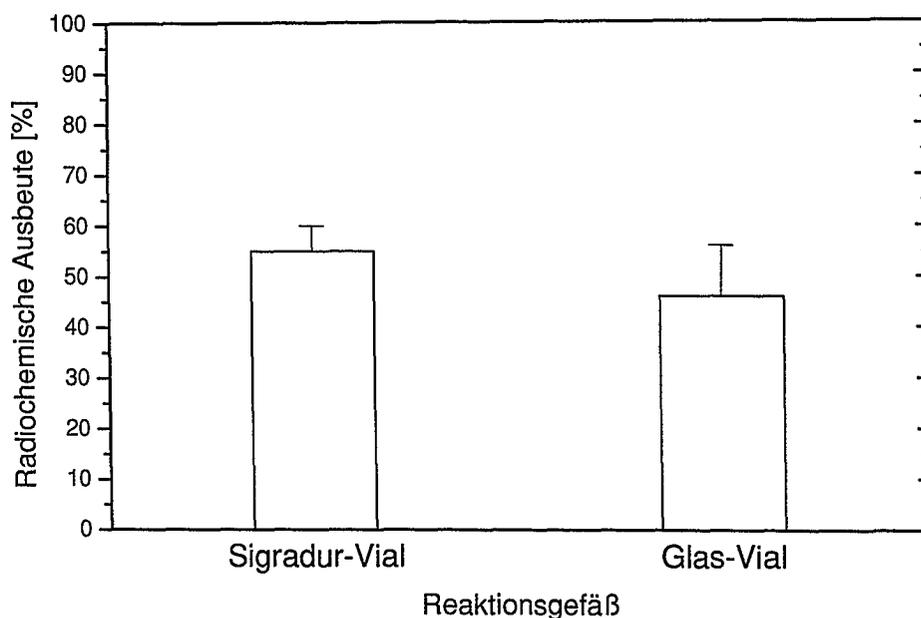
Reaktionsbedingungen: 30 mg  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Vial aus Borosilikatglas

Bei einer Temperatur von 50 °C wurden deutlich niedrigere radiochemische Ausbeuten erreicht als für höhere Temperaturen, da unterhalb einer Reaktionstemperatur von 70 °C (Ölbad) die Schmelze sehr viskos und schlecht zu durchmischen ist. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von 70 °C auf 90 °C führte nicht zur einer höheren radiochemischen Ausbeute. Im allgemeinen wurde festgestellt, daß die radiochemische Ausbeute von  $[^{18}\text{F}]\text{FDG-1-phosphat}$  in der Hochvakuumschmelze wenig reproduzierbar erhalten wurde. Dies ist wahrscheinlich vor allem auf die Qualität der eingesetzten Phosphorsäure zurückzuführen, die unter

den experimentellen Bedingungen nicht immer vollkommen wasserfrei in das Reaktionsgefäß überführt werden konnte.

### 3.4.2.3 Vergleich des Einflusses des Gefäßmaterials Borosilikatglas (Duran) sowie Glaskohlenstoff (Sigradur G) auf die Phosphorylierung

Ein signifikanter Unterschied der radiochemischen Ausbeute ist unter identischen Reaktionsbedingungen bei einem Vergleich verschiedener Reaktionsgefäßmaterialien zu beobachten (siehe Abb. 3.29).



**Abbildung 3.29:** Einfluß unterschiedlicher Reaktionsgefäßmaterialien auf die radiochemische Ausbeute von  $[^{18}\text{F}]\text{FDG-1-phosphat}$  bei der MacDonald-Phosphorylierung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2- $[^{18}\text{F}]\text{fluor-}\beta\text{-D-glucose}$

Reaktionsbedingungen: 10-30 mg  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ;  $T = 70^\circ\text{C}$ ;  $t = 30 \text{ min}$

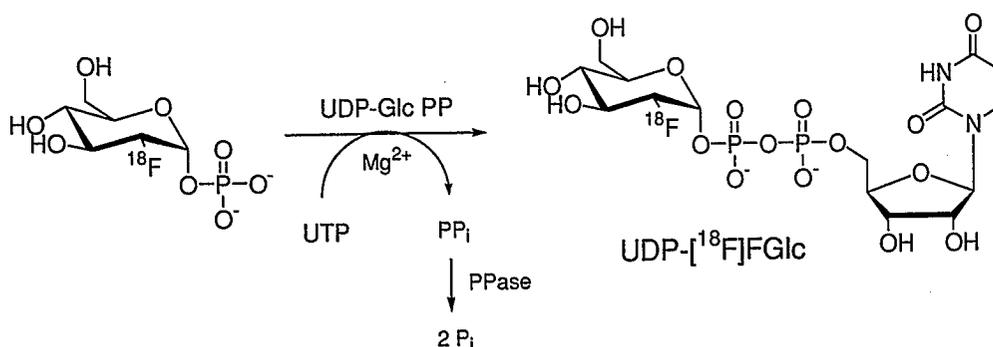
Bei Verwendung des Sigradur-Materials erhält man einerseits eine höhere radiochemische Ausbeute ( $55 \pm 5 \%$ ,  $n=10$ ) im Vergleich zu einem Glas-Material ( $46 \pm 10 \%$ ,  $n=10$ ) und andererseits auch eine höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Abbildung 3.29 zeigt die Auswertung von je 10 Hochvakuumschmelzen in den verschiedenen Reaktoren. Die Standardabweichung beträgt für das Sigradur-Material nur 5 %, während unter Verwendung eines Glas-Vials die radiochemische Ausbeute vom Mittelwert um 10 % abweichen kann.

Das Sigradur-Material ist sehr gut geeignet für die MacDonald-Reaktion. Das Material ist inert gegenüber der Phosphorsäureschmelze und hat einen günstigen Einfluß auf die Fließigenschaften der Schmelze.

Unter den optimierten Reaktionsbedingungen (10-30 mg  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $T = 70\text{ }^\circ\text{C}$ , Sigradur-Vial) lieferte die MacDonald-Phosphorylierung nach Abb. 3.26 eine radiochemische Ausbeute von 50-60 % nach ca. 15-20 Minuten. Das Produkt [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-1-phosphat wurde anschließend durch Festphasenextraktion gereinigt und auf der festen Phase (Accell QMA, Waters<sup>®</sup>) fixiert, wobei es sich bei den Verunreinigungen im wesentlichen um nicht umgesetzte 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluor- $\beta$ -D-glucose handelt, die aufgrund der Aufarbeitung mit wässriger Lithiumhydroxidlösung zu [ $^{18}\text{F}$ ]FDG hydrolysiert wurde.

### 3.4.3 Enzymatische n.c.a. Synthese von UDP-[ $^{18}\text{F}$ ]FGlc

Im Anschluß an die Phosphorylierung nach MacDonald wurde das Produktgemisch von n.c.a.  $\beta$ - und  $\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]FDG-1-phosphat als Substrat für die Pyrophosphorylase-katalysierte Umsetzung mit UTP eingesetzt (siehe Abb. 3.30).

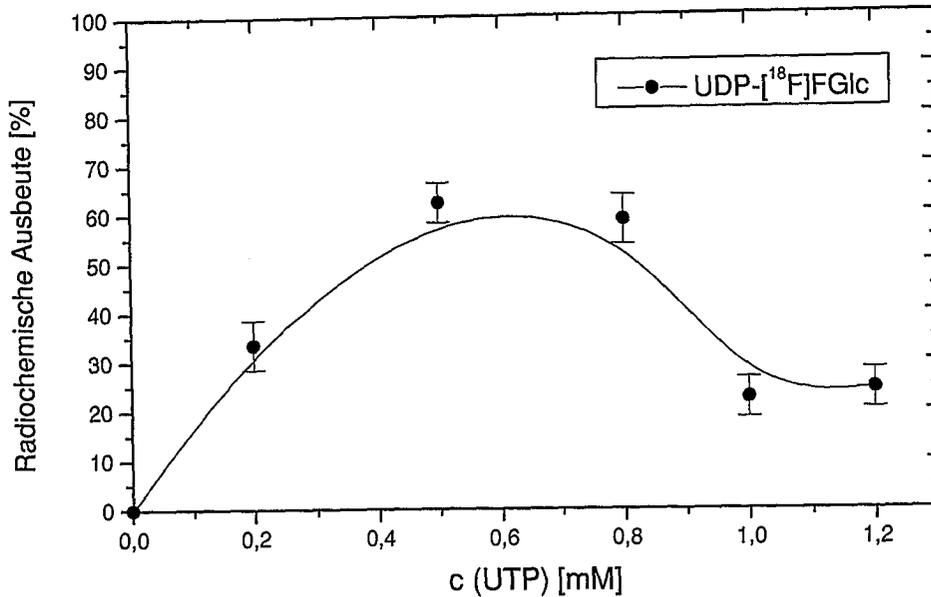


**Abbildung 3.30:** Reaktionsschema der Pyrophosphorylase-katalysierten Aktivierung von n.c.a. [ $^{18}\text{F}$ ]FDG

Von besonderem Interesse im Hinblick auf eine Optimierung der radiochemischen Ausbeute der trägerarmen enzymatischen Umsetzung war der Einfluß der UTP-Konzentration und die Frage, inwiefern die Möglichkeit besteht, die Reaktionsgeschwindigkeit durch Erhöhung der Enzymkonzentration zu beeinflussen.

#### 3.4.3.1 Abhängigkeit von der UTP-Konzentration

Zu diesem Zweck wurde ein Aliquot aus der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-1-phosphat Fraktion nach der Festphasenelution entnommen und unter definierten Reaktionsbedingungen als trägerarmes Substrat für UDP-Glc PP verwendet.



**Abbildung 3.31:** Einfluß der UTP-Konzentration auf die radiochemische Ausbeute von UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc in der n.c.a. UDP-Glc PP-katalysierten Umsetzung von [<sup>18</sup>F]FDG-1-phosphat mit UTP

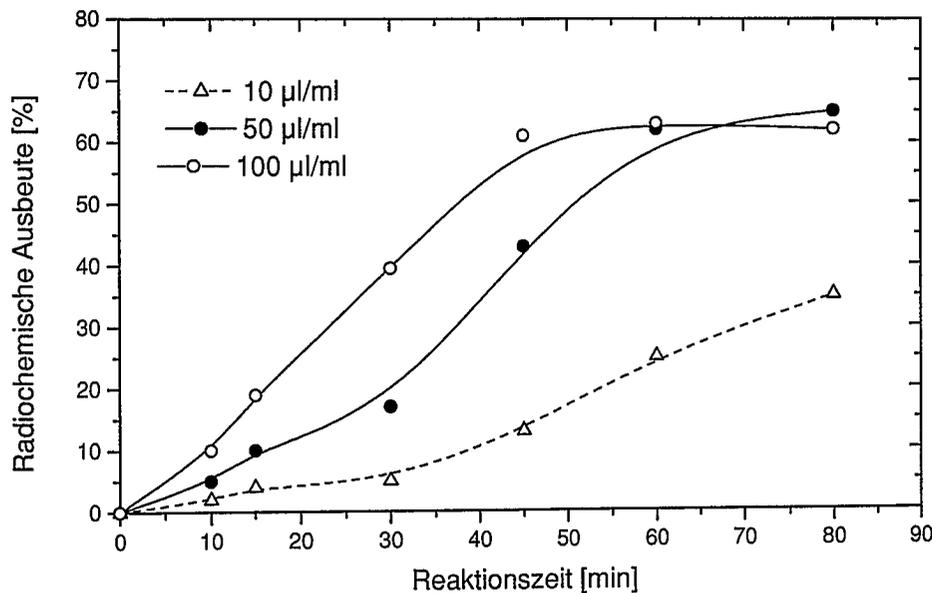
Reaktionsbedingungen: 0,1 M Tris-Puffer;  $c(\text{Mg}^{2+})=4 \cdot c(\text{UTP})$ ; 10 u UDP-Glc PP, 10 u PPase;  $V_{\text{ges}}=200 \mu\text{l}$ ;  $T=37,5^\circ\text{C}$ ; pH 8;  $t = 60 \text{ min}$

Bei konstanter Enzymkonzentration wurde die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc von der UTP-Konzentration bestimmt. Es zeigt sich, daß für einen Konzentrationsbereich für UTP zwischen 0,5 und 0,8 mM eine maximale radiochemische Ausbeute von ca. 60 % erreicht wird. Für eine UTP-Konzentration > 0,8 mM, wurde eine Hemmung der Reaktion unter den verwendeten Reaktionsbedingungen beobachtet. Die  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration wurde so gewählt, daß kein freies (nicht-komplexiertes) UTP in Lösung vorlag (vgl. Absch. 3.2.4). Der Einsatz von n.c.a. [<sup>18</sup>F]FDG-1-phosphat im submikromolaren Konzentrationsbereich bedingt jedoch eine deutliche Verminderung der Enzymaktivität von UDP-Glc PP für eine UTP-Konzentration > 0,8 mM unter den in Abb. 3.31 angegebenen Reaktionsbedingungen. Dieser Effekt kann im Falle einer geträgerten Synthese erst für hohe UTP-Konzentrationen beobachtet werden (vgl. Abb. 3.21).

#### 3.4.3.2 Abhängigkeit von der Pyrophosphorylase-Konzentration

Wie bereits in Kapitel 3.2.3 gezeigt wurde, ist 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat ein Substrat der Uridindiphosphatglucose Pyrophosphorylase. Allerdings ist die Enzymaktivität im Vergleich zu  $\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat um den Faktor 30 erniedrigt. Daher ist es insbesondere für eine trägerarme Umsetzung erforderlich, die

enzymatische Umsetzung mit Hilfe hoher Enzymkonzentrationen zu beschleunigen. Da es sich zudem im Falle vieler Enzyme um recht teure Substanzen handelt, ist eine hohe Enzymkonzentration am einfachsten durch Minimierung des Reaktionsvolumens zu realisieren. Es wurde für drei verschiedene Enzymkonzentrationen die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Reaktionszeit ermittelt (siehe Abb. 3.32).



**Abbildung 3.32:** Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute für UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc von der Reaktionszeit unter Variation der Enzymkonzentration an UDP-Glc PP

Reaktionsbedingungen: 100 mM Tris-Puffer;  $c(\text{Mg}^{2+})=2,5 \text{ mM}$ ;  $c(\text{UTP})=0,6 \text{ mM}$ ; 10 u Ppase;  $\text{pH}=8,0$ ;  $T=37,5^\circ\text{C}$ ;  $V_{\text{ges}} = 100 \mu\text{l}$

Eine Erhöhung der Enzymkonzentration führt zu einer Beschleunigung der Reaktion, die sich vor allem unmittelbar nach Zugabe des Enzyms bemerkbar macht. Allerdings ist eine Verdoppelung der Enzymkonzentration notwendig, um eine wesentliche Verkürzung der Reaktionszeit zum Erreichen der maximalen radiochemischen Ausbeute zu bewirken. Die unter den angegebenen Reaktionsbedingungen (siehe Abb. 3.32) erreichbare maximale radiochemische Ausbeute beträgt ca. 60 % und wird für eine Enzymkonzentration von 50 µl/ml nach 60 Minuten erreicht. Eine Verdoppelung der Enzymkonzentration führt zu einer Verkürzung der Reaktionszeit um ca. 15 Minuten.

Diese Voruntersuchungen wurden im Hinblick auf eine Optimierung der Gesamtsynthese von n.c.a. UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc durchgeführt, bei der in einem minimierten Reaktionsvolumen die Gesamtaktivität des Produktes [<sup>18</sup>F]FDG-1-phosphat aus der chemischen Phosphorylierung mit Hilfe einer hohen Enzymaktivität von UDP-Glc PP in Gegenwart von UTP umgesetzt wurde.

### 3.4.4 Optimierung der Reaktionsführung

Im Folgenden wird das Verfahren zur Herstellung des trägerarm  $^{18}\text{F}$ -markierten Nucleotidzuckers Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor- $\alpha$ -D-glucose beschrieben, das als Anwendungsbeispiel für eine allgemeine chemoenzymatische Synthese von nucleotid-aktivierten  $^{18}\text{F}$ Fluordesoxy-hexosen angesehen werden kann. Das hier beschriebene Verfahren wurde zum Patent angemeldet [120].

Den ersten Reaktionsschritt stellt die MacDonald-Phosphorylierung ausgehend von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor- $\beta$ -D-glucose gemäß Abbildung 3.26 dar. In diesem Reaktionsschritt kann unter Verwendung von 10 bis 30 mg kristalliner Phosphorsäure und obligat wasserfreien Reaktionsbedingungen (vgl. Absch. 3.4.1) in einem Sigradur<sup>®</sup>-Gefäß eine radiochemische Ausbeute von 50-60 % für 3,4,6-Tri-O-acetyl- $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphat nach etwa 15 Minuten erreicht werden.

Anschließend erfolgt die basische Hydrolyse nach Aufnahme der Schmelze in Tetrahydrofuran mit Hilfe von wäßriger Lithiumhydroxidlösung unter gleichzeitiger Präzipitation überschüssiger Phosphorsäure in Form von  $\text{Li}_3\text{PO}_4$ .

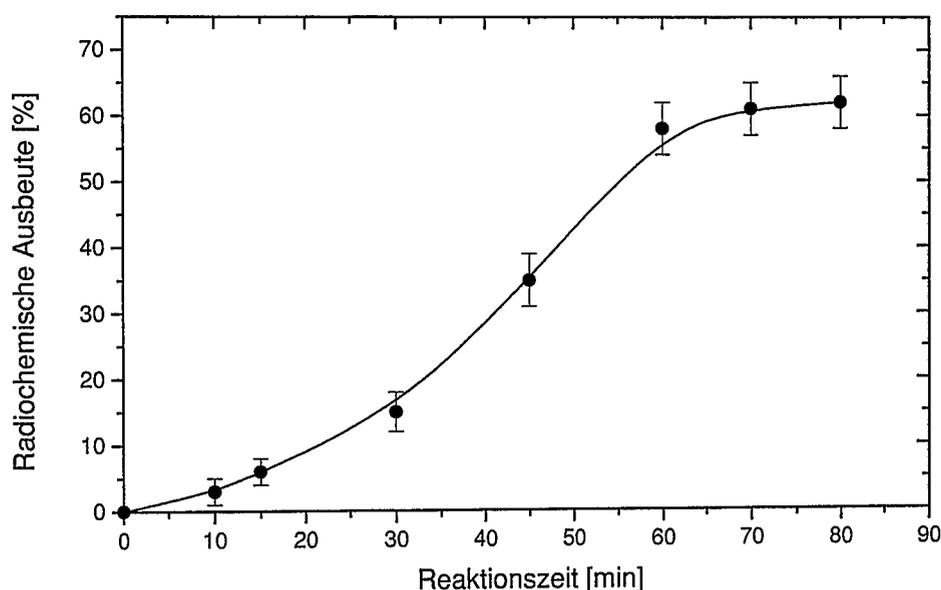
Das Produkt  $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphat wird auf einem Anionenaustauscher (Accell QMA, Firma Waters<sup>®</sup>) fixiert.

Die anschließende enzymatische Umsetzung mit Hilfe von Uridindiphosphatglucose Pyrophosphorylase (UDP-Glc PP) und anorganischer Pyrophosphatase (PPase) im Sinne von Abbildung 3.30 wurde im Zwischenkornvolumen der Polymermatrix des Anionenaustauschers durchgeführt, auf dem  $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphat fixiert wurde. Dabei wurde eine UTP-Konzentration von 0,5 mM gewählt (vgl. Abb. 3.31) und die benötigte Enzymaktivität mit Hilfe des minimierten Reaktionsvolumens sichergestellt. Die enzymatische Umsetzung auf der festen Phase vereinfacht die praktische Durchführbarkeit der Synthese erheblich und ist insbesondere im Hinblick auf eine Automatisierung des Verfahrens sehr vorteilhaft.

Die trägerarme enzymatische Festphasenreaktion lieferte nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten unter den angegebenen Reaktionsbedingungen eine radiochemische Ausbeute von ca. 60 % an UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc ausgehend von  $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphat. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 3.33 dargestellt.

Nach Beendigung der Reaktion kann der  $^{18}\text{F}$ -markierte Nucleotidzucker UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc eluiert werden und durch die Anwendung der Festphasenextraktionstechnik auf einer Sep-Pak<sup>™</sup> C-18 Plus Kartusche gereinigt werden [nach 121]. Allerdings ist dies nicht notwendig, falls unter Einsatz entsprechender Glycosyltransferasen eine

$^{18}\text{F}$ -Glycosylierung von Akzeptorsubstraten als Folgereaktion ebenfalls direkt auf der festen Phase durchgeführt werden kann.

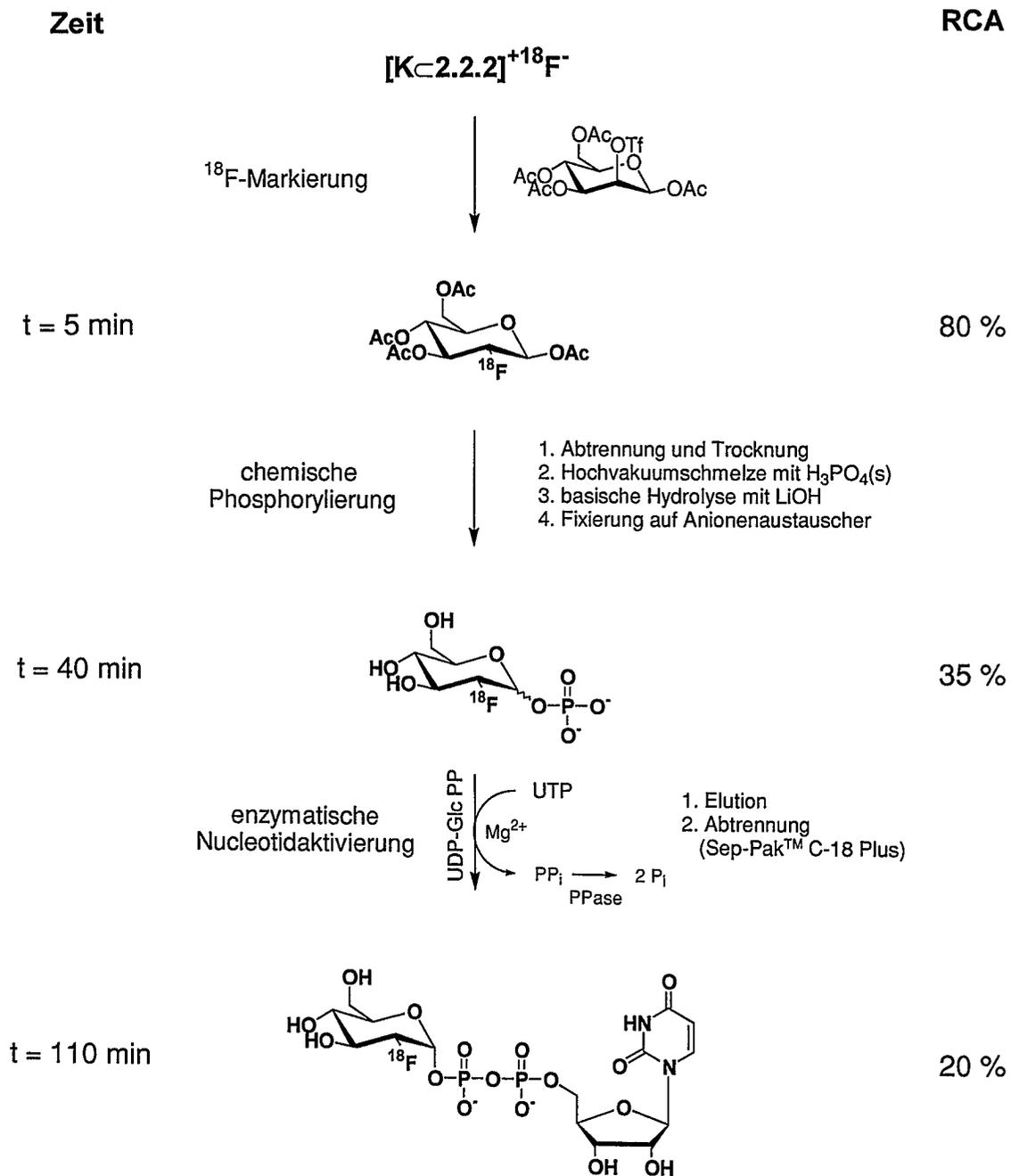


**Abbildung 3.33:** Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute an UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc von der Reaktionszeit für die enzymatische Umsetzung von  $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphat und UTP im Zwischenkornvolumen einer Festphase

Reaktionsbedingungen: n.c.a.  $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphat auf 50 mg Accel QMA (Waters®); 100 mM Tris-Puffer; 0,5 mM UTP; 4 mM Mg; 10 u UDP-Glc PP; 10 u Ppase; T = 40 °C; pH = 8,0;  $V_{\text{ges}}$  = 120  $\mu\text{l}$

In Abbildung 3.34 ist das Reaktionsschema der trägerarmen chemoenzymatischen Synthese von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc unter Berücksichtigung des Zeitbedarfs sowie der radiochemischen Ausbeuten ausgehend von  $^{18}\text{F}$ Fluorid dargestellt. Da der erste radiochemischen Ausbeuten ausgehend von  $^{18}\text{F}$ Fluorid dargestellt. Da der erste Reaktionsschritt die kryptatgestützte nukleophile  $^{18}\text{F}$ -Markierung der  $^{18}\text{F}$ FDG-Synthese darstellt, besteht die Möglichkeit, das vorgestellte Herstellungsverfahren von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc an die automatisierte Synthese von  $^{18}\text{F}$ FDG zu koppeln (siehe Abb. 3.34). Die Anwendung der pyrophosphorylase-katalysierten Umsetzung im Zwischenkornvolumen der festen Phase des Anionenaustauschers bietet hierfür die besten Voraussetzungen.

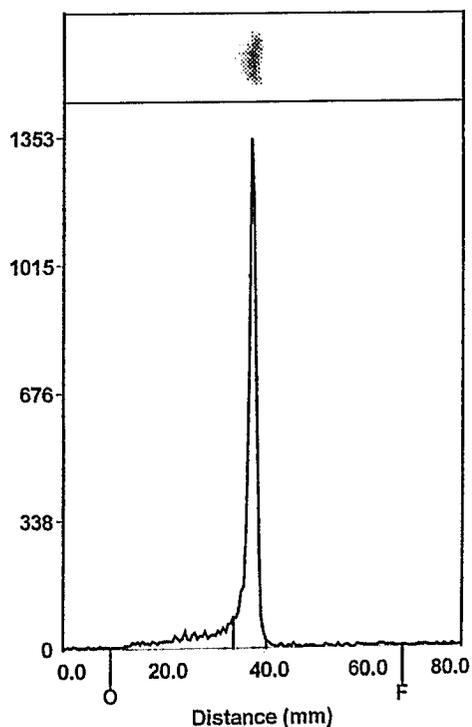
Die radiochemische Ausbeute für das trägerarme  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierungsreagens UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc beträgt 20 % nach einer Gesamtsynthesezeit von 110 Minuten (siehe Abb. 3.34).



**Abbildung 3.34:** Reaktionsschema der an die FDG-Synthese [28] gekoppelten chemo-enzymatischen Synthese von n.c.a. UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc

### 3.5 Studie zur enzymatischen $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung von N-Acetylglucosamin mit $\beta$ -(1,4)-Galactosyltransferase

Zunächst wurde eine saubere Abtrennung des trägerarmen  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierungsreagens UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc nach der Bildung im Zwischenkornvolumen der Anionenaustauschermatrix (siehe Absch. 3.4.4) durchgeführt, um eine enzymatische  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung durchführen zu können. Die Abtrennung von nicht-umgesetztem  $^{18}\text{F}$ FDG-1-phosphat gelingt durch Anwendung der Festphasenextraktionstechnik mit Hilfe einer Sep-Pak-Plus-Kartusche (RP-18) und der Elution mit einem Triethylammoniumhydrogencarbonat/Methanol-Gemisch. Die Produktfraktion wurde auf ihre radiochemische Reinheit dünnschichtchromatographisch geprüft (siehe Abb. 3.35) und in Pufferlösung für eine  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung verwendet.



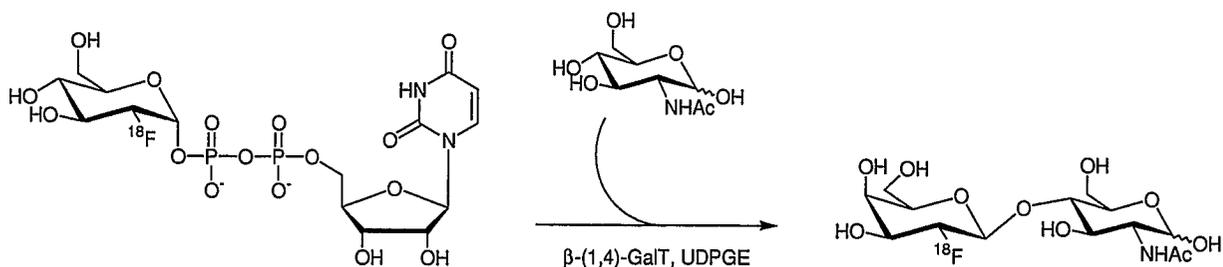
**Abbildung 3.35:**

DC-Chromatogramm von UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc (Silicagel, Laufmittel: Acetonitril/ 9,5 mM Tetrabutylammoniumhydroxid, 8:2 (v/v) )

Für die  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung wurde als Modellverbindung das Akzeptorsubstrat N-Acetylglucosamin gewählt. N-Acetylglucosamin ist ein häufiger Bestandteil von Partialstrukturen vieler N-Glycoproteine (siehe Absch. 1.4) und stellt für  $\beta$ -(1,4)-Galactosyltransferase ein bekanntes Akzeptorsubstrat dar [72, 127].

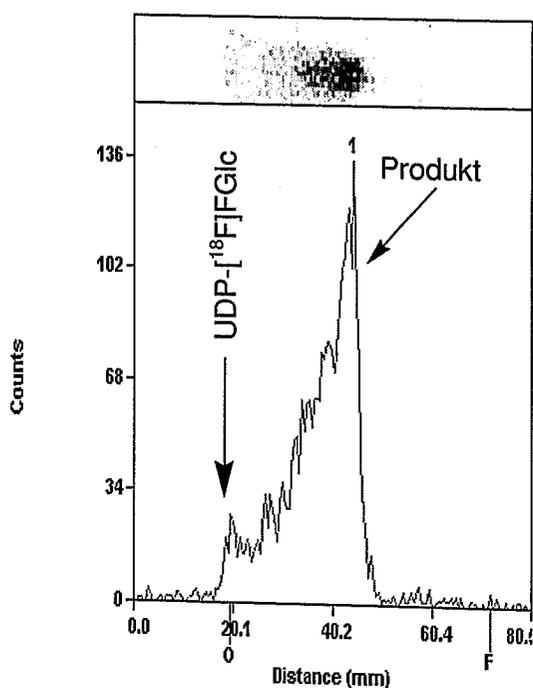
Die als Transferase eingesetzte  $\beta$ -(1,4)-Galactosyltransferase ist kommerziell erhältlich (Sigma) und besitzt nach bisherigen Untersuchungen eine hohe Substratflexibilität (siehe Absch. 1.4.4, [131]). Zudem wurde das Enzym UDP-Glucose-4'-Epimerase, das die Epimerisierung von UDP-Glc zu UDP-Gal katalysiert, eingesetzt [nach 72].

Die folgende Abbildung zeigt das Reaktionsschema der n.c.a.  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung von N-Acetylglucosamin.



**Abbildung 3.36:** Reaktionsschema der n.c.a.  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung von N-Acetylglucosamin

Nach einem Test der Umsetzung in wässriger Lösung wurde die Reaktion in die beschriebene Festphasenreaktion (siehe Abschn. 3.4.3) als Folgereaktion integriert. Die Analyse des Reaktionsgemisches nach 20 Minuten Reaktionszeit zeigte die nahezu vollständige Umsetzung des  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierungsreagens UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc. Es wurde ein radioaktives Produkt detektiert, welches in der DC-Analyse das gleiche Retentionsverhalten wie die Vergleichssubstanz N-Acetyllactosamin zeigte (siehe Abb. 3.37) und es sich somit mit hoher Wahrscheinlichkeit um N-Acetyl-2'-desoxy-2'- $^{18}\text{F}$ fluorlactosamin handelt. Auf einer Sep-Pak-Plus Kartusche ließ sich das  $^{18}\text{F}$ -glycosylierte Produkt zusammen mit N-Acetyllactosamin eluieren (siehe Abschn. 4.4.8).



**Abbildung 3.37:** DC-Chromatogramm des Reaktionsproduktes der  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung von N-Acetylglucosamin (Silicagel, Laufmittel: n-Propanol/ Essigsäure/ Wasser 85:12:3 (v/v) )

Die radiochemische Ausbeute von N-Acetyl-2'-desoxy-2'-[<sup>18</sup>F]fluorlactosamin betrug nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten 56 % bezüglich eingesetztem [<sup>18</sup>F]FDG-1-phosphat aus der vorgeschalteten MacDonald-Phosphorylierung.

Diese erstmals durchgeführten Studien zum enzymatischen Transfer von n.c.a. [<sup>18</sup>F]FDG auf ein Akzeptorsubstrat zeigt, daß das trägerarm <sup>18</sup>F-markierte Coenzym Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor- $\alpha$ -D-glucose ein Donorsubstrat der  $\beta$ -(1,4)-Galactosyltransferase darstellt.

Aufgrund der bekannten Akzeptorsubstratflexibilität der  $\beta$ -(1,4)-Galactosyltransferase [91-94, 131] und der noch unzureichend untersuchten Spezifität anderer Glycosyltransferasen wie z.B. Fucosyltransferasen (FucT) [128, 129] oder N-Acetylglucosaminyltransferasen (GlcNAcT) [88, 130] bietet die in dieser Arbeit entwickelte regioselektive, enzymatische <sup>18</sup>F-Markierungsmethode für die Zukunft eine variable Einsatzmöglichkeit im Bereich der Entwicklung neuartiger <sup>18</sup>F-markierter Glycoproteine oder Oligosaccharide, die für die in vivo pharmakokinetische Bewertung wie auch für diagnostische Zwecke in der Nuklearmedizin von großem Interesse sind.

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 4.1: Verwendete Chemikalien

	Hersteller	Qualität
2-Desoxy-2-fluor-D-glucose	Sigma	> 90 %
Aceton	Riedel-de Hæn	p.a.
Acetonitril	Fluka	absolut
Acetonitril	Riedel-de Hæn	für die HPLC
Acetonitril	Merck	für die DNA-Analyse
ADP	Sigma	95-99 %
Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1)	Roche	Quelle: Kälberdarm
Ammoniumformiat	Fluka	p.a.
Ammoniumhydrogencarbonat	Fluka	p.a.
Ammoniummolybdat	k.A.	p.a.
AMP	Sigma	> 99 %
Anorganische Pyrophosphatase (EC 3.6.1.1)	Sigma	Quelle: Bäckerhefe (lyophilisiertes Pulver, 85 % Puffersalze, 500-1000 units pro mg Protein)
ATP	Sigma	> 99 %
Biogel P-2	Bio-Rad Lab.	45-90 µm
Celite®-Filter	Fluka	k.A.
DEAE-Sephadex A-25	Pharmacia Fine Chemicals	40-120 µm, 3,5 meq/g
Dichlormethan	Fluka	absolut
Diethylaminosulfurtrifluorid (DAST)	Aldrich	> 90 %
Diethylether	Merck	p.a.
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck	p.a.
D-Mannose (Anomerengemisch)	Sigma	99%
Dowex 50W-X8 (H <sup>+</sup> -Form)	Fluka	50-100 mesh
Essigsäureanhydrid	Merck	p.a.
Essigsäureethylester	Riedel-de Hæn	p.a.
Ethanol	Riedel-de Hæn	absolut
β-(1,4)-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.22)	Sigma	Quelle: Rindermilch (lyophilisiertes Pulver, 50 % Proteingehalt, 3-15 units pro mg Protein)
D-Glucose	Sigma	99,5 %

	Hersteller	Qualität
$\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat	Sigma	98-99 %
$\alpha$ -D-Glucose-6-phosphat	Sigma	98-100 %
$\alpha$ -D-Glucose-1,6-diphosphat	Sigma	95-100 %
Hexokinase (EC 2.7.1.1)	Sigma	Quelle: Bäckerhefe (Lyophilisat, 15 % Protein, > 350 units pro mg Protein)
Hydrazinacetat	Aldrich	99 %
Isopropanol	Fluka	p.a.
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	p.a.
Lithiumdiisopropylamid	Fluka	> 90 % ( Lösung in Cyclohexan)
Lithiumhydroxid	Merck	p.a.
Magnesiumchlorid	Sigma	> 99 %
Manganchlorid	Sigma	> 99 %
Methanol	Riedel-de Häen	p.a.
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Fluka	> 99,5 %
Natriumacetat	Merck	p.a.
Natriumchlorid	Merck	p.a.
Natriumhydrogencarbonat	Merck	p.a.
Natriummethanolat	Fluka	p.a.
Natriumsulfat	Merck	p.a.
n-Hexan	Merck	p.a.
ortho-Phosphorsäure (kristallin)	Fluka	99 %
Palladium auf Aktivkohle	Aldrich	10% Pd
Perchlorsäure	Merck	p.a.
Phosphoenolpyruvat	Sigma	> 90 %
Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2)	Sigma	Quelle: Hühnermuskel (Ammoniumsulfatsuspension, 0,01 % EDTA, <0,01 % PK) zur Synthese
Phosphortribromid	Aldrich	
Pyruvatkinase	Sigma	Quelle: Kaninchenleber (lyophilisiertes Pulver, 10-20 units pro mg Protein)
Pyridin	Fluka	> 99 %
Silicagel	Fluka	für die Flash-Chromatographie
Tetrabenzylpyrophosphat	Fluka	> 99 %
Tetrabutylammoniumhydroxid	Merck	20%ige Lösung in Wasser
Tetrabutylammoniumhydrogensulfat	Aldrich	> 99 %
Tetrahydrofuran (THF)	Fluka	> 99 %
Toluol	Merck	p.a.
Tris-Puffer	Fluka	> 95 %

	Hersteller	Qualität
UDP	Sigma	95-100 %
UDP-Glucose Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9)	Sigma	sulfat-frei, < 0,1 % anorganische Pyrophosphatase
UMP	Sigma	98-100 %
	Hersteller	Qualität
Uridin	Sigma	> 99 %
Uridin-5'-monophosphormorpho- lidat	Sigma	90-95 %
Uridin-5'-diphosphatglucose	Sigma	98 %
Uridin-5'-diphosphogalactose 4- Epimerase (EC 5.1.3.2)	Sigma	10-20 units pro mg Protein, ca. 40 % Puffersalze
UTP	Sigma	97 %
Zinkpulver	Merck	p.a.

## 4.2 Geräte

**NMR-Spektroskopie:** Die  $^1\text{H}$ -,  $^{19}\text{F}$ -,  $^{31}\text{P}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie erfolgte mit Hilfe eines 200 MHz Gerätes der Firma Bruker (Avance-200). Einige  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden mit einem 300 MHz Gerät der Firma Bruker an den organisch-chemischen Instituten der Universität zu Köln aufgenommen.

**Massenspektrometrie:** Automass III mit Dual ESI / APCI-Interface, Elektrospray-Ionisation (ESI) mit Negativionendetektion, Cone-Spannung: +50 V

**IR-Spektroskopie:** Shimadzu IR-440 (Firma Shimadzu Europa GmbH)

**Ultrafiltration:** Ultrafiltrationsmembran Microcon-3 (MWCO 3000) (Amicon GmbH, Witten), Eppendorf-Zentrifuge 5417 R (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH)

**Autoradiographie:** Instant Imager (Canberra Packard GmbH)

**Lyophilisation:** Gefriertrockner Christ® Alpha 1-2 (Firma Christ, Osterode)

**Schmelzpunkt:** Mettler FP-61 (unkorrigierte Angabe)

## 4.3 Darstellung der inaktiven Standardverbindungen

### 4.3.1 Chemische Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose

Im Folgenden wird die Synthese nach Abbildung 3.1 beschrieben.

#### 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-mannose [nach 122]

In einem 250 ml Dreihalskolben mit Thermometer werden 50 ml Essigsäureanhydrid mit 0,4 ml Perchlorsäure vorgelegt. Unter Kühlung mit einem Wasserbad werden langsam unter Rühren 13,2 g (73 mmol) D-Mannose zugegeben, so daß die Temperatur des Reaktionsgemisches nicht über 45 °C ansteigt. Das Reaktionsgemisch wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf ca. 10 °C abgekühlt. Es werden vorsichtig und langsam zunächst 15 ml (0,16 mol) Phosphortribromid und dann 4,6 ml Wasser zugegeben, wobei die Temperatur der Lösung mittels geeigneter Kühlung nahe bei 25 °C gehalten wird. Nach P. Kovac stellt diese Vorgehensweise eine vollständige Umsetzung des Intermediats 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-mannose in das korrespondierende Glycosylbromid sicher [123]. Die weitere Zugabe einer gesättigten Natriumacetatlösung und die wäßrige Aufarbeitung wird wie in [122] beschrieben durchgeführt. Die Ausbeute an 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-mannose beträgt 3,4 g (14 %). Fp.: 124 °C (Lit.: 164 °C [122]).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.76 (1H, d,  $J_{1,2}=1.5$  Hz, H-1), 5.37 (1H, dd,  $J_{4,3}\approx J_{4,5}=9.9$  Hz, H-4), 5.01 (1H, dd,  $J_{3,2}=3.0$  Hz,  $J_{3,4}=9.9$  Hz, H-3), 4.28 (1H, dd,  $J_{6a,5}=5.0$  Hz,  $J_{6a,6b}=12.4$  Hz, H-6a), 4.18 (1H, m,  $J_{2,3}=3.0$  Hz, H-2), 4.09 (1H, dd,  $J_{6b,5}=2.3$  Hz,  $J_{6b,6a}=12.4$  Hz, H-6b), 3.76 (1H, ddd,  $J_{5,4}=9.8$  Hz,  $J_{5,6a}=4.8$  Hz,  $J_{5,6b}=2.3$  Hz, H-5), 2.30 (1H, d,  $J_{2,\text{OH}}=3.9$  Hz, OH), 2.15 (3H, s, OAc), 2.09 (3H, s, OAc), 2.06 (3H, s, OAc), 2.02 (3H, s, OAc).

#### 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-glucose [nach 124]

3,45 g (10,35 mmol) 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-mannose werden in 50 ml absolutem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird unter Stickstoffatmosphäre auf  $-40$  °C abgekühlt (Isopropanol/Trockeneis). Es werden 5 ml (40 mmol) Diethylaminsulfurtrifluorid (DAST) langsam zugetropft, und das Reaktionsgemisch wird nach vollständiger Zugabe von DAST ca. 30 min in der Kälte gerührt. Anschließend wird die Kühlung entfernt und das Reaktionsgemisch unter Stickstoffatmosphäre über Nacht gerührt. Durch Zugabe von 30 ml Methanol in der Kälte wird vorsichtig der vorhandene DAST-Überschuß entfernt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt an Kieselgel mit Toluol/Aceton (9:1) chromatographiert. Die Fraktionen

werden dünnschichtchromatographisch (Ether/Hexan 7:3) analysiert. Man erhält nach Entfernung des Lösungsmittels 2,2 g (6,3 mmol, 61 %) 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-glucose in Form farbloser nadelförmiger Kristalle. Fp.: 92 °C (Lit.: 91-92 °C [125]).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.81 (1H, dd,  $J_{1,2}=8.1$  Hz,  $J_{1,\text{F}}=3.1$  Hz, H-1), 5.40 (1H, dt,  $J_{3,\text{F}}=14.3$  Hz,  $J_{2,3}=9.1$  Hz,  $J_{3,4}=9.2$  Hz, H-3), 5.10 (1H, t (dd),  $J_{4,3}\approx J_{4,5}=9.8$  Hz, H-4), 4.46 (1H, ddd,  $J_{2,3}=9.1$  Hz,  $J_{2,\text{F}}=51$  Hz,  $J_{2,1}=8.2$  Hz, H-2), 4.33 (1H, dd,  $J_{6a,6b}=12.3$  Hz, H-6a), 4.13 (1H, dd,  $J_{6b,5}=2.3$  Hz, H-6b), 3.89 (1H, ddd,  $J_{5,6a}=4.5$  Hz,  $J_{5,6b}=2.2$  Hz, H-5), 2.22 (3H, s, OAc), 2.13 (3H, s, OAc), 2.11 (3H, s, OAc), 2.07 (3H, s, OAc).

$^{19}\text{F-NMR}$  (188 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -201.3 (ddd,  $J_{\text{F},2}=51$  Hz,  $J_{\text{F},1}=3.0$  Hz,  $J_{\text{F},3}=15$  Hz).

### **3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor-D-glucose [nach 101]**

0,15 g (0,43 mmol) 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-glucose werden in 5-10 ml N,N-Dimethylformamid gelöst. Unter Stickstoffatmosphäre werden 50 mg (0,52 mmol) Hydrazinacetat in wenig N,N-Dimethylformamid gelöst und bei Raumtemperatur zugetropft. Die Reaktion wird per DC (Essigester/Hexan 7:3) kontrolliert. Nach 30 min wird durch Zugabe einer zusätzlichen geringen Menge (0,1-0,2 mmol) Hydrazinacetat der vollständige Umsatz des Eduktes erreicht. Das Reaktionsgemisch wird in 20 ml Essigester aufgenommen und zweimal mit 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, und man erhält 0,13 g (0,41 mmol, 96 %) 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor-D-glucose als farbloses Öl, das in dieser Form für weitere Umsetzungen eingesetzt werden kann.

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3300 (OH), 1780, 1245.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.70 (1H, m,  $J_{1,2}=8.1$  Hz, H-1), 5.46 (1H, dt,  $J_{3,\text{F}}=14.3$  Hz,  $J_{3,4}=9.2$  Hz, H-3), 5.05 (1H, t (dd),  $J_{4,3}\approx J_{4,5}=9.6$  Hz, H-4), 4.78 (1H, ddd,  $J_{2,3}=9.1$  Hz,  $J_{2,\text{F}}=51$  Hz, H-2), 4.33 (1H, dd,  $J_{6a,6b}=12.1$  Hz, H-6a), 4.24 (1H, dd,  $J_{6b,5}=2.2$  Hz, H-6b), 4.21 (1H, ddd,  $J_{5,6a}=4.6$  Hz, H-5), 2.14 (3H, s, OAc), 2.11 (3H, s, OAc), 2.08 (3H, s, OAc).

### **3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-dibenzylphosphat [nach 118]**

0,13 g (0,41 mmol) 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor-D-glucose werden in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und unter Stickstoffatmosphäre auf -40 °C gekühlt. Es werden 0,4 ml einer 1,5 M Lösung (0,6 mmol) von Lithiumdiisopropylamid in Tetrahydrofuran langsam zugetropft. Nach 15 min Rühren wird eine Lösung von 0,29 g (0,54 mmol) Tetrabenzylpyrophosphat (TBPP) in 6 ml absolutem THF zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird langsam auf 0 °C gebracht und bei dieser

Temperatur etwa 40 min gehalten. Anschließend wird durch Zugabe von 40 ml Diethylether die Reaktionslösung verdünnt. Die organische Phase mit 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt auf Kieselgel flash-chromatographiert (Essigester/Hexan 1:1). Die Identifizierung der einzelnen Fraktionen gelingt über Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Essigester/Hexan 7:3). Nach Entfernung des organischen Lösungsmittels im Vakuum erhält man 0,17 g (0,3 mmol, 72 %) 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor-D-glucose-1-dibenzylphosphat in analytisch reiner Form. Das Anomerenverhältnis  $\alpha/\beta$  konnte mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ermittelt werden ( $\alpha/\beta = 3:1$ ). Ein  $^{31}\text{P}$ -entkoppeltes  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erlaubt zudem die Zuordnung der Kopplungskonstanten und läßt eine „long range“-Kopplung zwischen Phosphor und Fluor erkennen ( $^4\text{J}$ -Kopplung).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.34-7.24 (m, ArH), 5.94 (1H, dd,  $J_{1,\text{P}}=6.7$  Hz,  $J_{1,2}=3.6$  Hz,  $J_{1,\text{F}}<0.5$  Hz, H-1( $\alpha$ )), 5.50 (1H, dt,  $J_{3,\text{F}}=12.0$  Hz,  $J_{3,2}=J_{3,4}=9.6$  Hz, H-3), 5.40 (ddd, H-1( $\beta$ )), 5.11-5.05 (m,  $J_{\text{H,P}}=8.4$  Hz, ArCH<sub>2</sub>OP), 5.02 (1H, t (dd),  $J_{4,3}\approx J_{4,5}=9.9$  Hz, H-4), 4.55 (1H, dddd,  $J_{2,\text{F}}=48.5$  Hz,  $J_{2,3}=9.5$  Hz,  $J_{2,1}=3.6$  Hz,  $^4J_{2,\text{P}}=2.9$  Hz, H-2), 4.13 (1H, dd,  $J_{6a,5}=4.1$  Hz, H-6a), 3.99 (1H, ddd,  $J_{5,6a}=4.3$  Hz,  $J_{5,6b}=2.2$  Hz, H-5), 3.84 (1H, dd,  $J_{6b,6a}=12.5$ ,  $J_{6b,5}=2.2$  Hz, H-6b), 2.04 (3H, s, OAc), 1.99 (3H, s, OAc), 1.95 (3H, s, OAc).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $^{31}\text{P}$ -entkoppelt) : u.a.  $\delta$  5.94 (d,  $J_{1,2}=3.6$  Hz,  $J_{1,\text{F}}<0.5$  Hz, H-1( $\alpha$ )), 5.40 (dd,  $J_{1,2}=7.7$  Hz,  $J_{1,\text{F}}=3.0$  Hz, H-1( $\beta$ )).

### 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat [nach 103]

0,17 g (0,3 mmol) 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-dibenzylphosphat werden in einem Lösungsmittelgemisch von absolutem Methanol und Essigester (3:1) (10 ml) gelöst. Nach der Zugabe von 0,6 g Palladium (10 %) auf Aktivkohle und 0,1 g (1,5 mmol) Ammoniumformiat wird das Reaktionsgemisch unter Rückfluß gerührt. Nach 60 min wird in 10 ml Methanol aufgenommen und der Katalysator abfiltriert. Man wäscht mit kaltem Methanol nach und entfernt das Lösungsmittel unter reduziertem Druck. Man erhält 0,12 g (0,28 mmol, 94 %) 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat in der Form des Ammoniumsalzes als weißen Feststoff. Fp.: 155-160 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  5.44 (1H, dd,  $J_{1,\text{P}}=8.3$  Hz,  $J_{1,2}=3.6$  Hz,  $J_{1,\text{F}}<0.5$  Hz, H-1), 4.92 (1H, m, H-3), 4.23 (1H, dddd,  $J_{2,\text{F}}=49.6$  Hz,  $J_{2,3}=9.8$  Hz,  $J_{2,1}=3.6$  Hz,  $^4J_{2,\text{P}}=1.9$  Hz, H-2), 3.91-3.70 (1H, m, H-6a), 3.71-3.65 (1H, m, H-5), 3.61-3.52 (1H, m, H-6b), 2.05 (3H, s, OAc), 2.01 (3H, s, OAc), 1.97 (3H, s, OAc).

$^{19}\text{F-NMR}$  (188 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  -199.7 (dd,  $J_{\text{F},2}=49$  Hz,  $J_{\text{F},3}=14$  Hz).

**2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat**

0,12 g (0,28 mmol) 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat werden in 10 ml absolutem Methanol suspendiert. Man gibt 53 mg (1 mmol) Natriummethanolat hinzu und rührt die Lösung bei Raumtemperatur. Nach einer Stunde Reaktionszeit wird durch Zugabe von Ionenaustauschermaterial (Dowex 50W-X8, H<sup>+</sup>-Form) ein pH-Wert von 6,5-7 eingestellt. Die Lösung wird filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Man erhält einen weißen Feststoff, der in wenig 30 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung aufgenommen und mittels Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sephadex gereinigt wird (Gradientenelution: 30-200 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). Die Fraktionen werden über die UV-Absorption bei 830 nm nach Zugabe einer Mo(V)-Mo(VI)-Reagenzlösung identifiziert, und die Produktfraktionen werden vereinigt und lyophilisiert. Nach wiederholter Lyophilisation erhält man 0,1 g (0,25 mmol, 95 %) 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat als weißen Feststoff. Fp.: 135 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  5.43 (1H, dd, J<sub>1,P</sub>=8.2 Hz, J<sub>1,2</sub>=3.6 Hz, J<sub>1,F</sub><0.5 Hz, H-1), 4.23 (1H, dddd, J<sub>2,F</sub>=51.8 Hz, J<sub>2,3</sub>=9.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>2,P</sub>=1.7 Hz, H-2), 3.88 (1H, dd, J<sub>6a,6b</sub>=9.4 Hz, J<sub>6a,5</sub>=3.8 Hz, H-6a), 3.78 (1H, ddd, H-5), 3.72 (1H, dd, J<sub>6b,5</sub>=2.3 Hz, H-6b).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  91.3 (C-1, J<sub>C-1,F</sub>=26 Hz), 90.3 (C-2, J<sub>C-2,F</sub>=181 Hz, J<sub>C-2,P</sub>=10 Hz), 72,1 (C-4), 71.5 (C-3, J<sub>C-3,F</sub>=17.7 Hz), 69.7 (C-5), 60.9 (C-6).

<sup>19</sup>F-NMR (188 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  -199.72 (dd, J<sub>F,2</sub>=53 Hz, J<sub>F,3</sub>=14 Hz).

<sup>31</sup>P-NMR (81 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  3.48 (d (br.), J<sub>1,P</sub>=8.1 Hz).

<sup>31</sup>P-NMR (81 MHz, D<sub>2</sub>O, <sup>1</sup>H-entkoppelt) :  $\delta$  3.48 (s, COPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>).

**Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose [nach 79]**

0,2 g (0,5 mmol) 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat werden in 20 ml absolutem N,N-Dimethylformamid gelöst. Unter Stickstoffatmosphäre werden 0,34 g (0,5 mmol) Uridin-5'-monophosphomorpholidat zugegeben und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur 7 Tage gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 ml 30 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung aufgenommen. Die Isolierung des Produktes erfolgt mittels Gradienten-Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sephadex (Gradientenelution: 30-200 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). Die Produktfraktionen eluieren bei einer Pufferkonzentration von etwa 60 mM und werden durch die Messung der UV-Absorption bei 260 nm identifiziert. Die vereinten Fraktionen werden wiederholt lyophilisiert oder durch Gelpermationschromatographie an Biogel-P2 mit bidestilliertem Wasser als

Eluens einer vollständigen Entsalzung unterzogen. Nach Lyophilisation erhält man 0,12 g (0,2 mmol) des Ammoniumsalzes von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose als weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7.85 (1H, d,  $J_{5,6}=8.1$  Hz, U:H-6), 5.90-5.81 (2H, s,d,  $J_{5,6}=8.1$  Hz, U:H-5, rib-H-1'), 5.67 (1H, dd,  $J_{1,P}=7.7$  Hz,  $J_{1,2}=3.5$  Hz,  $J_{1,F}<0.6$  Hz, H-1), 4.30-4.0 (5H, m, H-3, H-4, H-5, rib-H-2', rib-H-3'), 3.97-3.65 (5H, m, rib-H-4', rib-H-2-5', H-2-6).

$^{19}\text{F-NMR}$  (188 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  -200.73 (dd,  $J_{F,2}=49$  Hz,  $J_{F,3}=11$  Hz).

$^{31}\text{P-NMR}$  (81 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  -12.2 (dm,  $J_{P,P}=19.4$  Hz), -10.4 (dm,  $J_{P,P}=19.4$  Hz).

ESI-MS: m/z 566,8  $[\text{M}]^{2-}$

### 4.3.2 Durchführung der MacDonald-Phosphorylierung

#### 2-Desoxy-2-fluor-( $\alpha,\beta$ )-D-glucose-1-phosphat [nach 99]

0,3 g (0,82 mmol) 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\beta$ -D-glucose werden unter Hochvakuum zusammen mit 320 mg (3,26 mmol) trockener kristalliner Phosphorsäure langsam unter starkem Rühren bei 50 °C (Ölbadtemperatur) zur Reaktion gebracht. Die Schmelze färbt sich braun und wird unter Rühren und Hochvakuum ( $10^{-2}$  mbar) 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Anschließend wird die Ölbadtemperatur auf 70-80 °C erhöht und die Schmelze weitere 48 Stunden auf dieser Temperatur gehalten. Unter Inertgas (Stickstoff) wird die Schmelze im Eisbad gekühlt und unter Rühren langsam mit ca. 6,7 ml einer 2 M Lithiumhydroxidlösung (13,4 mmol LiOH) versetzt. Man läßt den entstandenen Lithiumphosphat-Niederschlag sedimentieren und die wäßrige Lösung 16 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Der Niederschlag wird durch Celite<sup>®</sup>-Filter abfiltriert und mit 0,2 M Lithiumhydroxidlösung gewaschen. Das Filtrat wird durch Zugabe von Ionenaustauschermaterial (Dowex 50W-X8, H<sup>+</sup>-Form) auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Die Lösung wird filtriert und lyophilisiert. Man erhält einen weißen Feststoff als Rohprodukt, der in wenig 30 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung aufgenommen wird und an DEAE-Sephadex chromatographiert wird (Gradientenelution: 30-200 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). Die Produktfraktionen werden über die UV-Absorption bei 830 nm nach Zugabe einer Mo(V)-Mo(VI)-Reagenzlösung identifiziert, vereinigt und lyophilisiert. Nach wiederholter Lyophilisation erhält man 0,06 g (0,14 mmol, 17 %) des Ammoniumsalzes von 2-Desoxy-2-fluor-D-glucose-1-phosphat als weißen Feststoff.

Die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Untersuchungen sind in Kapitel 3.1 (Tabelle 3.1) zusammengefaßt. Die Temperatur der Schmelze wurde gemäß Tabelle

3.1 variiert. Das Produkt stellt ein Anomerengemisch dar, dessen Verhältnis ( $\alpha$ : $\beta$ )  $^1\text{H}$ - sowie  $^{19}\text{F}$ -NMR-spektroskopisch ermittelt werden kann.

$^1\text{H}$ -NMR (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  5.43 (dd,  $J_{1,\text{P}}=8.2$  Hz,  $J_{1,2}=3.6$  Hz,  $J_{1,\text{F}}<0.5$  Hz, H-1( $\alpha$ )), 4.94 (ddd (q),  $J_{1,\text{P}}=J_{1,2}=7.8$  Hz,  $J_{1,\text{F}}=2.7$  Hz, H-1( $\beta$ )).

$^{19}\text{F}$ -NMR (188 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  -199.7 (dd,  $J_{\text{F},2}=54$  Hz,  $J_{\text{F},3}=14$  Hz, F ( $\alpha$ -Anomer)), -199.4 (ddd,  $J_{\text{F},2}=51$  Hz,  $J_{\text{F},3}=15$  Hz,  $J_{\text{F},1}=2.8$  Hz, F ( $\beta$ -Anomer)).

#### 4.3.3 Multienzymatische Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose

Es werden insgesamt 10 Reaktionsgefäße (Eppendorf 1,5 ml) mit jeweils 2,2 mg (12,1  $\mu\text{mol}$ ) 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose, 7 mg (12,6  $\mu\text{mol}$ ) ATP und 3,9 mg (18,9  $\mu\text{mol}$ ) Magnesiumchlorid in einem Gesamtvolumen von 0,48 ml (50 mM Tris-Puffer, pH 7,2) in einem Thermostat (Eppendorf-Thermomixer 5436) auf 25 °C vortemperiert und entgast. Anschließend erfolgt die Zugabe von jeweils 20  $\mu\text{l}$  einer frischen Pufferlösung der Hexokinase (10-15 units in 20  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer (pH 7,2)). Die Reaktionsgefäße werden über Nacht auf 25 °C gehalten und der Verlauf der Reaktion wird mittels HPLC-Analyse kontrolliert. Die Hexokinase-katalysierte Phosphorylierung gilt als beendet, wenn der ADP-Peak im HPL-Chromatogramm sein Maximum erreicht hat. Die Reaktionsgefäße werden dann 2 min im Ölbad bei 90-100 °C erhitzt und das denaturierte Enzym anschließend abzentrifugiert. Bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C werden in jedes Reaktionsgefäß folgende Lösungen pipettiert: 1,2 mg (2,1  $\mu\text{mol}$ ) UTP in 20  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer, 10  $\mu\text{l}$  einer frischen Tris-Pufferlösung (pH 8) von Phosphoglucomutase (15 units in 10  $\mu\text{l}$ ), 10  $\mu\text{l}$  einer Tris-Pufferlösung (pH 8) von Glucose-1,6-diphosphat (20 nmol in 100  $\mu\text{l}$ ), 20  $\mu\text{l}$  anorganische Pyrophosphorylase-Pufferlösung (10 units in 20  $\mu\text{l}$ ) und 20  $\mu\text{l}$  einer Tris-Pufferlösung (pH 8) von Uridindiphosphatglucose Pyrophosphorylase (10 units in 20  $\mu\text{l}$ ). In einer vorgeschalteten Ultrafiltrationsprozedur wird die Ammoniumsulfatsuspension, in der die Phosphoglucomutase (Sigma) geliefert wird, ausgetauscht gegen Tris-Puffer, indem man die gewünschte Enzymaktivität aus dem Originalbehälter entnimmt, mit 100  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer verdünnt und bei 8300  $\text{min}^{-1}$  durch die Microcon-3 Ultrafiltrationsmembran zentrifugiert und zweimal mit 50  $\mu\text{l}$  bzw. 30  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer nachwäscht bevor man das Enzym in frischem Tris-Puffer (pH 8) aufnimmt. Nach Zugabe aller Enzyme wird der pH-Wert in jedem Reaktionsgefäß auf 7,8 eingestellt.

Nach 6 Tagen wird mittels HPLC eine Ausbeute für Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose von ca. 60 % ermittelt. Die Reaktion wird durch Hitzedenaturierung (2-3 min bei 95 °C) abgebrochen und die denaturierten Enzyme abzentrifugiert. Die endständigen Phosphatester wie ATP, ADP, UTP oder UDP bzw. Spuren der entsprechenden Monophosphate werden durch Zugabe von 5-10 units alkalischer Phosphatase (aus Kälberdarm, Roche) über Nacht hydrolytisch gespalten, wobei

ortho-Phosphat entsteht. Nach Hitzedenaturierung, Zentrifugieren und HPLC-Kontrolle der enzymatischen Hydrolyse wird das Volumen der einzelnen Reaktionsgefäße vereint und mittels Schlauchpumpe auf die Chromatographie-Säule (DEAE-Sephadex, 1,0 x 30 cm) gegeben. Die Elution erfolgt mit Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer, wie bereits in Abschnitt 4.3.1 beschrieben. Die Produktfraktionen werden lyophilisiert und mittels Gelpermationschromatographie an Biogel-P2 (1,6 x 13 cm) mit bidestilliertem Wasser als Eluens einer vollständigen Entsalzung unterzogen. Man erhält 4,8  $\mu\text{mol}$  des Ammoniumsalzes von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose als weißen Feststoff. Die NMR-spektroskopischen Daten und die massenspektrometrische Analyse (ESI-MS) sind deckungsgleich mit den in Abschnitt 4.3.1 aufgeführten.

## 4.4 Radiosynthesen

[ $^{18}\text{F}$ ]FDG wurde nach Standardverfahren hergestellt [28] und über das Labor für Qualitätskontrolle der Radiopharmaka-Servicegruppe am Babyzyklotron des Instituts für Nuklearchemie bezogen.

### 4.4.1 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorglucose

Als Ausgangsverbindung für die Synthese von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorglucose wurde zunächst 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-O-trifluormethylsulfonyl- $\beta$ -D-mannose [98] gewählt und die nukleophile  $^{18}\text{F}$ -Markierung nach [28] durchgeführt.

Für laborexperimentelle Studien bot sich vor allem im Hinblick auf die nachfolgenden Reaktionsschritte (MacDonald-Phosphorylierung) folgende Synthese ausgehend von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG an. Eine Probe einer gepufferten wässrigen Lösung von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG wird durch portionsweise Zugabe von Acetonitril im Stickstoffstrom azeotrop bei 80 °C getrocknet. Man nimmt mit 0,3 ml wasserfreiem Pyridin auf und gibt 0,2 ml Essigsäureanhydrid zu. Die Acetylierung kann dünnschichtchromatographisch an Silicagel (Essigester/Hexan: 7:3) kontrolliert werden. Die Reaktion ist bei Raumtemperatur nach 30 min vollständig. Bei einer Reaktionstemperatur von 80 °C läßt sich die vollständige Acetylierung von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG bereits innerhalb von 5 min erreichen. 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorglucose läßt sich auf einer Sep-Pak-Kartusche (RP-18) vollständig fixieren. Man wäscht mit 0,1 N Salzsäure und 10 ml Wasser und eluiert das Produkt mit Acetonitril.

#### 4.4.2 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose-1-phosphat

Eine Lösung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose in Acetonitril wird im Sigradur-Vial unter Vakuum getrocknet. Anschließend trocknet man 10 min im Hochvakuum ( $10^{-3}$  mbar) bei 50 °C und läßt den Reaktor unter Schutzgas abkühlen. Es werden 20 mg kristalline Phosphorsäure, die vorher über Phosphorpentaoxid im Vakuum gründlich getrocknet wurde, unter Schutzgas zugegeben. Der Reaktor wird dicht verschlossen und im Hochvakuum langsam auf ca. 70 °C im Ölbad erhitzt. Eine Variante der Reaktionsführung ist durch Zugabe einer Lösung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose in absolutem Tetrahydrofuran in einen Reaktor, der trockene kristalline Phosphorsäure enthält, möglich. Nach ca. 30 min Reaktionszeit wird die Schmelze in 0,4 ml Tetrahydrofuran aufgenommen. Es ist möglich an dieser Stelle die radiochemische Ausbeute der MacDonald-Phosphorylierung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose chromatographisch zu bestimmen. Die dünnschichtchromatographische Analyse auf Silicagel (Essigester/Hexan 7:3) zeigt neben 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose-1-phosphat zwei unpolare radioaktive Produkte ( $R_f=0,84$  und  $R_f=0,74$ ), wobei es sich um unumgesetzte 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose und das Hydrolyseprodukt 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose handelt. Es wird in der Kälte mit 0,2 ml 1 M Lithiumhydroxidlösung versetzt und der entstehende Niederschlag abzentrifugiert. Die überstehende Lösung (pH 7 !) wird in einer 10 ml-Einwegspritze mit 4 ml Wasser verdünnt und auf eine Accell-Plus-Kartusche (Waters) gegeben. Man wäscht mit 6 ml Wasser nach, um überschüssiges [<sup>18</sup>F]FDG zu entfernen, und kann das Produkt mit 0,1 M Tris-Puffer (pH 8) eluieren. Die Elution erfolgt vollständig mit 2 ml Eluens. Die radiochemische Ausbeute für die Synthese von 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose-1-phosphat beträgt unter den angegebenen Reaktionsbedingungen etwa 55 %. Für weitere enzymatische Umsetzungen im analytischen Maßstab wurden Aliquots der Produktfraktion verwendet.

#### 4.4.3 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose-6-phosphat

Es wird in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß eine 0,05 M Tris-Pufferlösung (pH 7,12) mit ATP (1 mM) und Magnesiumchlorid (1-2 mM) und [<sup>18</sup>F]FDG vorgelegt. Das Gesamtreaktionsvolumen beträgt zwischen 30 und 250 µl. Für die im Rahmen von Kapitel 3.3.1 durchgeführten Studien wird ATP durch UTP ersetzt. Die Konzentration von ATP wurde im Bereich von 0,5 bis 18 mM und die von UTP im Bereich von 0,5 bis 25 mM variiert. Die Tris-Pufferlösung wird auf 37 °C im Eppendorf-Thermomixer (Model 5436) temperiert. Die Zugabe von 10 units Hexokinase in 20 µl Tris-Puffer (pH 7,2) erfolgt zuletzt, um die Reaktion zu starten. Die Kontrolle der enzymatischen Umsetzung erfolgt dünnschichtchromatographisch auf Silicagel (Acetonitril/ 9,5 mM

Tetrabutylammoniumhydroxid 8:2) oder auf Cellulose (Ethanol/ 1 M Ammoniumacetat 3:2). Das Enzym wird durch Hitzedenaturierung oder Ultrafiltration (Microcon-3, Amicon) abgetrennt. Die hexokinase-katalysierte Phosphorylierung von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG verläuft quantitativ. Die erhaltene Pufferlösung wurde für weitere Umsetzungen im analytischen Maßstab verwendet. Eine Variation der Reaktionsführung ist durch den Einsatz einer erniedrigten ATP-Konzentration (0,01 mM) und dem Enzym Pyruvatkinase (10 units) unter Anwesenheit von 1 mM Phosphoenolpyruvat (PEP) ebenso möglich (Regeneration von ATP durch Phosphorylierung des entstehenden ADP).

#### 4.4.4 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluorglucose

Die Synthese von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluorglucose wird wie beschrieben durchgeführt, jedoch findet die Elution von der Sep-Pak-Kartusche mit N,N-Dimethylformamid statt. Die Produktfraktion (1 ml) wird unter Rühren im Wheaton-Reaktor mit 6,5 mg (0,07 M) Hydrazinacetat versetzt. Die Suspension wird bei Raumtemperatur gerührt und nach 15 min mit 10 ml Wasser aufgenommen, um die Hydrazinolyse zu beenden. Die radiochemische Ausbeute der regioselektiven Entschützung beträgt 93 %. Die DC-Analyse auf Silicagel (Essigester/Hexan 7:3) zeigt einige polare Nebenprodukte (vgl. Abb. 3.25). Man fixiert auf einer Sep-Pak-Kartusche (RP-18) und wäscht mit 5 ml Wasser nach. Die Kartusche wird getrocknet, und die Elution mit absolutem Tetrahydrofuran liefert das Produkt in einem Elutionsvolumen von ca. 1,5 ml und einer radiochemischen Reinheit von >98 % (DC).

#### 4.4.5 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-dibenzylphosphat

Die Lösung von 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluorglucose in Tetrahydrofuran wird auf  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und unter Argon mit 10  $\mu\text{l}$  (15  $\mu\text{mol}$ ) einer 1,5 M Lithiumdiisopropylamidlösung versetzt. Man läßt 5 min rühren und gibt bei  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  eine Lösung von 6 mg (11  $\mu\text{mol}$ ) Tetrabenzylpyrophosphat in 0,1 ml Tetrahydrofuran zu. Für die Ermittlung der radiochemischen Ausbeute entnimmt man Proben (20  $\mu\text{l}$ ) mit einer Hamilton-Spritze und verdünnt diese in Diethylether. Die radiochemische Ausbeute der Phosphorylierung beträgt nach 20 min etwa 20-26 % bezüglich eingesetzter 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluorglucose. Nach Erreichen der Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch in 0,4 ml Methanol aufgenommen (siehe Absch. 3.4.1).

#### 4.4.6 Versuche zur multienzymatischen Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor- $\alpha$ -D-glucose

Ausgehend von der Tris-Pufferlösung von 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose-6-phosphat (siehe Absch. 4.4.3) wurde eine Inkubation unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

5 mM Magnesiumchloridlösung, 3,5 mM UTP, 30 units Phosphoglucomutase in 50 mM Tris-Puffer (pH 8, nach Ultrafiltration (Microcon-3)), 10 units Uridindiphosphat-glucose Pyrophosphorylase in 50 mM Tris-Puffer (pH 8) und 10 units anorganische Pyrophosphatase in 50 mM Tris-Puffer (pH 8). Es erfolgt vor Zugabe aller Enzyme die Zugabe des Cofaktors Glucose-1,6-diphosphat in Variation seiner Konzentration von 2  $\mu$ M bis 0,2 mM. Ebenso erfolgt für die Untersuchung der Trägerabhängigkeit die Zugabe von 2-Desoxy-2-fluorglucose-6-phosphat in Variation der Konzentration von 0,3 bis 5 mM (vgl. Absch. 3.3.2). Das Gesamtvolumen jedes Ansatzes beträgt 0,4 ml. Die Inkubation erfolgt im Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 25 °C und pH 7,8 im Thermomixer (Eppendorf, Model 5436). Die radiochemische Ausbeute für Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor- $\alpha$ -D-glucose beträgt für eine geträgerte Synthese (5 mM 2-Desoxy-2-fluorglucose-6-phosphat) etwa 4 % (HPLC) nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden unter den angegebenen Reaktionsbedingungen.

#### 4.4.7 Chemoenzymatische Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor- $\alpha$ -D-glucose im Zwischenkornvolumen der festen Phase [nach 120]

Als Ausgangsverbindung wird getrocknete 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose eingesetzt und die MacDonald-Phosphorylierung gemäß Abschnitt 4.4.2 durchgeführt. Eine Vereinfachung der Reaktionsführung der Phosphorylierung ist durch Zugabe einer Lösung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose in absolutem Tetrahydrofuran in einen Reaktor, der trockene kristalline Phosphorsäure enthält, möglich. Die radiochemische Ausbeute der MacDonald-Phosphorylierung ist vor allem von obligat wasserarmen Reaktionsbedingungen abhängig (siehe Absch. 3.4.2).

Die basische Hydrolyse mit Hilfe von wäßriger Lithiumhydroxidlösung nach Aufnahme der Schmelze in Tetrahydrofuran kann vorsichtig bei Raumtemperatur vorgenommen werden. Zudem läßt sich der entstehende Niederschlag (Lithiumphosphat) während der Fixierung des Produktes an zwei Glasfilterritten zurückhalten. Es sollte sichergestellt sein, daß vor der Fixierung am Anionenaustauscher ein pH-Wert von 7 eingestellt ist. Die Fixierung des Produktes 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose-1-phosphat erfolgt auf einem Anionenaustauschermaterial (50-100 mg, Accell QMA, Waters).

Nach der Fixierung wird mit höchstens 4 ml Wasser gewaschen und die Kartusche im Argonstrom getrocknet.

Anschließend werden mit Hilfe einer Tuberkulinspritze 120 µl einer 0,1 M Tris-Pufferlösung (pH 8,0), die UTP (0,5 mM), Magnesiumchlorid (4 mM), 10 units Uridindiphosphatglucose Pyrophosphorylase (UDP-Glc PP, E.C. 2.7.7.9) und 10 units anorganische Pyrophosphatase (E.C. 3.6.1.1) in das Zwischenkornvolumen der Polymermatrix gegeben. Die Kartusche wird im Wasserbad bei 40 °C (Badtemperatur) eine Stunde erwärmt und anschließend mit 1 ml 0,1 M Tris-Puffer eluiert, mit dem Ziel, die radiochemische Ausbeute zu bestimmen. Die radiochemische Ausbeute für Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor-α-D-glucose (UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc beträgt ausgehend von [<sup>18</sup>F]FDG 20 % nach einer Gesamtsynthesezeit von 110 min.

Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor-α-D-glucose kann durch Fixierung auf einer Sep-Pak-Plus-Kartusche (RP-18) und Elution mit 3 ml 0,1 M Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend 7 ml Methanol / 0,1 M Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung (1:1) von unumgesetztem Zuckerphosphat abgetrennt und gleichzeitig entsalzt werden. Dies ist nicht notwendig, falls unter Einsatz von Glycosyltransferasen eine <sup>18</sup>F-Glykosylierung von Akzeptorsubstraten als Folgereaktion ebenfalls auf der festen Phase durchgeführt werden soll (siehe Absch. 4.4.8).

#### 4.4.8 <sup>18</sup>F-Glykosylierung von N-Acetylglucosamin

Die Synthese von 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose-1-phosphat erfolgt wie in Absch. 4.4.2 bzw. 4.4.7 beschrieben. Nach der Fixierung von 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucose-1-phosphat auf einem Anionenaustauschermaterial (50-100 mg, Accell QMA, Waters) wird die Kartusche im Argonstrom getrocknet. Anschließend werden mit Hilfe einer Tuberkulinspritze 120 µl einer 0,1 M Tris-Pufferlösung (pH 8,0), die UTP (0,5 mM), Magnesiumchlorid (4 mM), Manganchlorid (8 mM), N-Acetylglucosamin (0,18 mM), 10 units Uridindiphosphatglucose Pyrophosphorylase (UDP-Glc PP, E.C. 2.7.7.9), 10 units anorganische Pyrophosphatase (E.C. 3.6.1.1), 2 mU Uridin-5'-diphosphatgalactose 4-Epimerase (EC 5.1.3.2) und 1 unit β-1,4-Galactosyltransferase enthält, in das Zwischenkornvolumen der Polymermatrix gegeben. Die Kartusche wird im Wasserbad bei 40 °C (Badtemperatur) eine Stunde erwärmt und anschließend mit 1 ml 0,1 M Tris-Puffer eluiert, mit dem Ziel, die radiochemische Ausbeute für das <sup>18</sup>F-glykosylierte Produkt zu bestimmen. Dies gelingt dünnschichtchromatographisch an Silicagel (Propanol/Essigsäure/Wasser 85:12:3). Nach 60 min Reaktionszeit ist kein <sup>18</sup>F-Glykosylierungsreagens (UDP-[<sup>18</sup>F]FGlc) mehr nachzuweisen. Es entsteht ein Produkt ( $R_f=0,47$ ), das auf einer Sep-Pak-Plus-Kartusche (RP-18) die Laufeigenschaften von 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2'-N-acetylglucosamin besitzt (vgl. N-Acetyllactosamin,  $R_f=0,51$ ). Die Sep-Pak-Reinigung erfolgt durch

Elution mit 5 ml Wasser und anschließend mit 3 ml Methanol. Die ersten 1,5 ml der Methanol-Fraktion enthalten das  $^{18}\text{F}$ -glykosylierte Produkt ( $R_f=0,47$ ) in einer radiochemischen Reinheit von >95 %.

## 4.5 Analytische Verfahren

### 4.5.1 Anionenaustauscherchromatographie

Die in Abschnitt 4.3 beschriebene Anionenaustauscherchromatographie wurde an DEAE-Sephadex durchgeführt. Die Trennung der Zuckerphosphate von Nukleosidzuckern ist durch Gradientenelution möglich (siehe Absch. 3.2.4). Als Eluens wurde der im Vakuum flüchtige Puffer Ammoniumhydrogencarbonat gewählt. Die Gradientenelution mit einer Schlauchpumpe wurde durch kontinuierliches Zumischen einer 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung (Reservoir,  $V=1\text{ L}$ ) in eine Mischkammer ( $V=300\text{ ml}$ ), aus der das Eluens mit gleichem Volumenfluß entnommen wurde, realisiert. Die Fraktionen wurden über ihre UV-Absorption bei 260 nm oder 830 nm identifiziert. Die Detektion der Zuckerphosphate bei 830 nm erfolgte nach der Zugabe einer Mo(V)-Mo(VI)-Reagenzlösung (nach [126]) zu einer verdünnten Probe einer Fraktion und anschließendem Erhitzen der Lösung auf 95 °C für 20 min.

Volumenfluß: 0,6 ml/min, Säule: DEAE-Sephadex (1,0x30 cm)

Ausgangskonzentration: 30 mmol Ammoniumhydrogencarbonat / l (Mischkammer)

### 4.5.2 Radio-HPLC

Die Analyse der Reaktionsgemische wurde mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC = High Performance Liquid Chromatography) durchgeführt. Die Identifizierung der n.c.a.  $^{18}\text{F}$ -markierten Verbindungen wurde durch den Vergleich der Retentionszeiten des Peaks im Kanal des Radiodetektors mit dem UV-Peak des inaktiven Standards erreicht. Die verwendete HPLC-Anlage bestand aus einer Merck-Hitachi HPLC Pumpe L-6000, einem Merck-Hitachi UV-Detektor L-4000 (variable Wellenlänge) und einem NaI(Tl)-Bohrlochkristalldetektor der Firma EG&G Ortec mit Photomultiplier (Model 276 Photomultiplier Base) und Verstärker (EG&G ACE Mate<sup>TM</sup> Model 925). Die Probenaufgabe erfolgte über ein Rheodyne-Injektionsventil (Typ 7125) mit einer 20 µl bzw. 100 µl Probenschleife sowohl vor der Trennsäule als auch hinter der Trennsäule zwecks Ermittlung der Markierungsausbeute (Aliquotinjektion). Die Meßdaten der Detektoren wurden durch die Auswertesoftware Nina (Version 1.4) der Firma Nuclear Interface auf einem handelsüblichen Rechner (PC) gespeichert und analysiert. Die Detektionswellenlänge des UV-Detektors betrug bei allen Analysen 266 nm.

Für die Anwendung der Radio-HPLC-Analytik wurde eine RP-18-Phase gewählt und mittels Gradientenelution und Ionenpaarbildung (8 mM TBHS) eine Trennmethode realisiert, die universell für jede analytische Fragestellung im Rahmen dieser Arbeit anwendbar war. Die Differenzierung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomeren der in 1-Position phosphorylierten Zucker gelingt jedoch auch durch Gradientenelution nicht, sondern nur NMR-spektroskopisch (vgl. Absch. 4.3.1). Eine HPL-chromatographische Analyse unter isochratischen Bedingungen war nur in Einzelfällen möglich. Insbesondere im Falle der enzym-katalysierten Umsetzungen mit UDP-Glucose Pyrophosphorylase in Anwesenheit von UTP war eine eindeutige chromatographische Trennung von UDP und UDP- $^{18}\text{F}$ FGlc unter isochratischen Bedingungen nicht möglich. Die folgende Tabelle definiert die Bedingungen der Gradienten-Ionenpaar-HPLC. Die ermittelten  $k'$ -Werte der Verbindungen sind in Tabelle 4.3 zusammengestellt.

**Tabelle 4.2:** Bedingungen der Gradienten-IP-HPLC

Zeit	Laufmittelgemisch
2,5 min	0 % B
14 min	50 % B
15 min	100 % B
23 min	100 % B
24 min	0 % B
30 min	0 % B

Laufmittel A: 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, 8 mM TBHS (pH 6)

Laufmittel B: 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, 8 mM TBHS (pH 6), 30 % Methanol (v/v)

HPLC-Säule: RP-18 (7  $\mu\text{m}$ ) LiChrosorb, 250x4 mm

Volumenfluß: 1 ml/min

**Tabelle 4.3:** Retentionszeiten ( $k'$ -Werte) in der IP-HPLC  
(Trennbedingungen wie in Tabelle 4.2 angegeben)

Verbindung	Retentionszeit	$k'$ -Wert
2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose (FDG)	02'41"	0,24
2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat	04'47"	1,21
$\alpha$ -D-Glucose-1,6-diphosphat (*)	05'25"	1,50
Uridin-5'-diphosphat- $\alpha$ -D-glucose (UDP-Glc)	11'22"	4,25
Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP-FGlc)	12'36"	4,82
Uridin-5'-diphosphat (UDP)	15'06"	5,97
Adenosin-5'-monophosphat (AMP)	18'30"	7,54
Uridin-5'-triphosphat (UTP)	19'36"	8,05
Adenosin-5'-diphosphat (ADP)	20'44"	8,57
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	21'51"	9,09

(\*) Die Retentionszeit dieser Verbindung wurde mit Hilfe eines Durchfluß-Refraktometers der Firma Knauer ermittelt und entspricht nahezu der von 2-Desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluor- $\alpha$ -D-glucose-1,6-diphosphat ( $t=5'22''$ ;  $k'=1,48$ ) (vgl. Abschnitt 3.3.2).

### 4.5.3 Radio-Dünnschichtchromatographie

Die Radioaktivitätsverteilung der dünnschichtchromatographischen Analysen, die insbesondere im Bereich der Reaktionskontrolle von enzymatischen Umsetzungen zum Einsatz kamen, wurden am Autoradiographie-System Instant Imager<sup>TM</sup> der Firma Canberra Packard gemessen. Das Gerät erlaubt die quantitative Analyse der  $^{18}\text{F}$ -Aktivität der DC-Platten mit Hilfe einer Datenerfassungssoftware, die die Integration der Chromatogramme unterstützt. Die folgende Tabelle zeigt die  $R_f$ -Werte der Standardverbindungen, die durch Entwicklung der DC-Platten mit einer Anisaldehyd-Lösung (2 % Anisaldehyd in Eisessig und 5 % konz. Schwefelsäure) ermittelt wurden.

**Tabelle 4.4:** R<sub>f</sub>-Werte in der Radio-Dünnschichtchromatographie

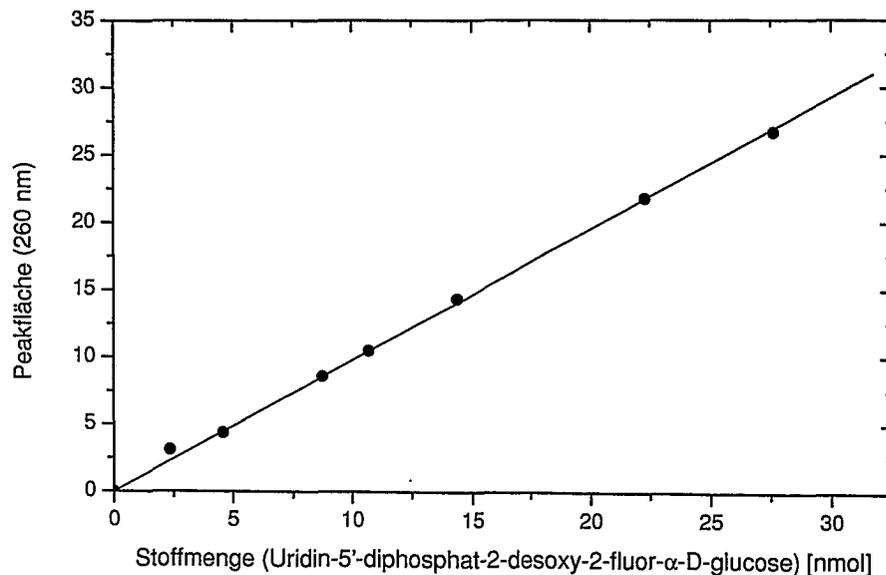
Verbindung	R <sub>f</sub> -Wert (Methode)
1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-fluorglucose	0,84 (B); 0,93 (A)
3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluorglucose	0,74 (B)
3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-dibenzylphosphat	0,63 (B)
2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose (FDG)	0,75 (A); 0,87 (C)
2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat (FGlc-1-P)	0,18..0,26 (A)
2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat (FGlc-6-P)	0,23 (A); 0,43 (C)
$\alpha$ -D-Glucose-1,6-diphosphat	0,07 (C); 0,0 (B)
3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat	0,35 (A); 0,0 (B)
Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose (UDP-FGlc)	0,53 (A); 0,0 (D)
Uridin-5'-diphosphat- $\alpha$ -D-glucose (UDP-Glc)	0,54 (C)
$\beta$ -D-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2'-N-acetylglucosamin (N-Acetyllactosamin)	0,51 (D)

## Methoden:

- A: Acetonitril/ 9,5 mM Tetrabutylammoniumhydroxid, 8:2 (v/v) (Silicagel)
- B: Essigester/Hexan 7:3 (v/v) (Silicagel)
- C: Ethanol/1 M Ammoniumacetat 3:2 (v/v) (Cellulose)
- D: n-Propanol/Essigsäure/Wasser 85:12:3 (v/v) (Silicagel)

#### 4.6 Bestimmung der molaren Aktivität von n.c.a. Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor- $\alpha$ -D-glucose

Die Ermittlung der molaren Aktivität von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor- $\alpha$ -D-glucose erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden für die HPLC. Die applizierte Stoffmenge der inaktiven Standardverbindung ist proportional zum Integral des erhaltenen HPLC-UV-Signals (siehe Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1:** Abhängigkeit der Fläche des HPLC-UV-Signals bei 260 nm von der Stoffmenge von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose

Die Auswertung des Flächenintegrals des korrespondierenden UV-Signals nach Auftrennung einer typischen Präparation von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluor- $\alpha$ -D-glucose mit Hilfe der HPLC ergab unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze des UV-Detektors (1 nmol) eine molare Aktivität von mindestens 28 TBq/mmol (760 Ci/mmol).

## 5 Zusammenfassung

Die nuklearmedizinische Diagnostik mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) stellt ein Verfahren von stetig wachsender Bedeutung und Verbreitung dar. Dadurch ist die Notwendigkeit einer Expansion der Markierungsmethoden für bisher nicht erschlossene Stoffklassen gegeben. Die multifunktionellen Eigenschaften der Glykokonjugate machen insbesondere diese Verbindungsklasse für die Ausarbeitung einer regiospezifischen  $^{18}\text{F}$ -Markierungsmethode interessant. Eine wesentliche Grundvoraussetzung für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist die gute Verfügbarkeit des weltweit routinemäßig eingesetzten Radiotracers 2-Desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluorglucose ( $^{18}\text{F}$ FDG). Ziel dieser Arbeit war es daher, auf der Basis der etablierten FDG-Synthese ein  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierungsreagens zur Verfügung zu stellen, das als Substrat für geeignete Glycosyltransferasen fungiert und für die regioselektive, enzymatische  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung glycosylierter Peptide und Proteine oder Oligosaccharidstrukturen eingesetzt werden kann.

Zunächst wurde die rein chemische Synthese des Nukleotidzuckers Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose in einer sieben Reaktionsschritte umfassenden Synthese erfolgreich durchgeführt. Im Rahmen dieser Synthese zeigte sich die hohe Stereoselektivität ( $\alpha/\beta=3:1$ ) der 1-Phosphorylierung von FDG mit Hilfe von Tetrabenzylidiphosphorsäureester im Gegensatz zu der Phosphorylierung nach MacDonald. Die Stereoselektivität wurde durch die Anwendung der  $^{31}\text{P}$ -entkoppelten  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie in Verbindung mit NMR-Einstrahlexperimenten ermittelt.

Die multienzymatische Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose ausgehend von 2-Desoxy-2-fluorglucose unter Verwendung von vier kommerziell erhältlichen Enzymen lieferte das Produkt im mg-Maßstab mit einer Ausbeute von 35 %. Durch die Anwendung einer enzymatischen Hydrolyse der Nukleotide mit Hilfe von alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm und anschließender Gradienten-Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sephadex konnte Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose in 90 %iger Reinheit (HPLC) isoliert werden.

Im Rahmen dieser Studien wurde hier erstmals die Kinetik der Uridindiphosphat-glucose Pyrophosphorylase aus Rinderleber (E.C. 2.7.7.9) für das nicht-natürliche Substrat 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat gemessen. Es konnte mit Hilfe eines IP-HPLC-Assays gezeigt werden, daß 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat ein Substrat der Uridindiphosphatglucose Pyrophosphorylase ist und die Enzymaktivität eine Funktion der Cofaktorkonzentrationen darstellt. Im Vergleich zu  $\alpha$ -D-Glu-

cose-1-phosphat ist die Enzymaktivität für 2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat um den Faktor 30 erniedrigt.

Im Hinblick auf die Anwendbarkeit des Multienzymsystems für die trägerarme, enzymatische Nukleotidaktivierung von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG wurde die Hexokinase-katalysierte Phosphorylierung mit ATP sowie UTP als Phosphatdonor hinsichtlich der radiochemischen Ausbeute von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-6-phosphat optimiert. Dieser erste Teilschritt der multienzymatischen Reaktionskette verläuft für eine ATP-Konzentration zwischen 0,5 und 5 mM in weniger als einer Minute mit einer radiochemischen Ausbeute von nahezu 100%.

Es wurde gezeigt, daß unter trägerarmen Reaktionsbedingungen die Phosphoglucomutase-katalysierte Isomerisierung von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-6-phosphat zu [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-1-phosphat nicht stattfindet, sondern die Bildung von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-1,6-diphosphat bevorzugt ist. Der Reaktionsmechanismus der enzymatischen Isomerisierung beschränkt in diesem Fall die Anwendung des Enzyms auf geträgerte Synthesen in der Radiochemie. Durch isotopen Träger kann die Bildung von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-1,6-diphosphat vollständig unterdrückt werden, die ebenfalls eine Abhängigkeit von der Konzentration des Cofaktors Glucose-1,6-diphosphat zeigt.

Daher wurde die multienzymatische Synthese von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluor- $\alpha$ -D-glucose notwendigerweise geträgert durchgeführt. In einer zweistufigen Eintopfreaktion konnte gezeigt werden, daß es prinzipiell möglich ist, Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluor- $\alpha$ -D-glucose mit Hilfe des Multienzymsystems mit einer radiochemischen Ausbeute von 4 % nach 2 Stunden geträgert zu generieren.

Alternativ wurde eine chemoenzymatische Synthese von n.c.a. Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluor- $\alpha$ -D-glucose erarbeitet. Diese beinhaltet die MacDonald-Phosphorylierung von n.c.a. 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorglucose unter obligat wasserarmen Bedingungen in einer Hochvakuumschmelze mit kristalliner Phosphorsäure und die nachfolgende Pyrophosphorylase-katalysierte Nukleotidaktivierung von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-1-phosphat in Gegenwart von UTP.

Die Reaktionsparameter der MacDonald-Phosphorylierung wurden hinsichtlich einer maximalen radiochemischen Ausbeute optimiert. Die Durchführung der Phosphorsäureschmelze in einem Glaskohlenstoff-Gefäß (Sigradur G) mit 10-30 mg trockener, kristalliner Phosphorsäure und einer Reaktionstemperatur von 70 °C erlaubt eine maximale radiochemische Ausbeute von  $55 \pm 5$  % nach 30 min Reaktionszeit.

Die radiochemische Ausbeute der Pyrophosphorylase-katalysierten Synthese von trägerarmer Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluor- $\alpha$ -D-glucose beträgt nach

60 Minuten unter Verwendung einer optimierten UTP-Cofaktorkonzentration (0,5 mM) 60 % bezüglich eingesetztem [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-1-phosphat.

Mit dem Ziel, die Enzymaktivität in der chemoenzymatischen Synthese von n.c.a. Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluor- $\alpha$ -D-glucose zu maximieren, wurde eine Minimierung des Reaktionsvolumens erfolgreich durchgeführt, indem die Synthese nach Fixierung von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-1-phosphat auf einem Anionenaustauschermaterial (Accell QMA, Waters) direkt im Zwischenkornvolumen der festen Phase realisiert wurde.

Unter dieser optimierten Reaktionsführung betrug die radiochemische Gesamtausbeute für das trägerarme  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierungsreagens Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluor- $\alpha$ -D-glucose ausgehend von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG 20 % nach einer Gesamtsynthesedauer von 110 Minuten.

In einer abschließenden Studie wurde die Modellverbindung N-Acetylglucosamin als Akzeptorsubstrat für die n.c.a.  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung mit Hilfe von  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase eingesetzt. Die  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung wurde als direkte Folgereaktion an das Verfahren der Herstellung von Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluor- $\alpha$ -D-glucose angeschlossen. Das  $^{18}\text{F}$ -glycosylierte Produkt wurde mit einer radiochemischen Ausbeute von 56 % bezüglich eingesetztem [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-1-phosphat nach 20 Minuten erhalten und kann mit Hilfe der Festphasenextraktionstechnik (Sep-Pak) in einer radiochemischen Reinheit von >95 % isoliert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß n.c.a. Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluor- $\alpha$ -D-glucose vor allem aufgrund der guten Verfügbarkeit von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG und des im Rahmen dieser Arbeit optimierten Herstellungsverfahrens in Verbindung mit  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase als potentes und regioselektives  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierungsreagens für die trägerarme  $^{18}\text{F}$ -Glycosylierung von Saccharidstrukturen, die terminale N-Acetylglucosaminyl-Reste tragen, eingesetzt werden kann.

## 6 Literatur

- [1] D. Billington, G.G. Jayson und P.J. Maltby: Radioisotopes, Introduction to Biotechniques. Eds: J.M. Grham und D. Billington. Bios Scientific Publishers Limited, Liverpool (1992).
- [2] T. Chard: An introduction to radioimmunoassays and related techniques. In: Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Eds: T.S. Work und E. Work, Vol. 6, Part 2 (1978).
- [3] K. Wienhard, R. Wagner und W.-D. Heiss: PET, Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie; Springer Verlag, Berlin, 1989.
- [4] H.H. Coenen: Biochemistry and evaluation of fluoroaminoacids. In: PET studies on amino acid metabolism and protein synthesis. Eds.: B.M. Mazoyer, W.-D. Heiss und D. Comer. Kluwer Academic Publishers, 109-129 (1993).
- [5] H.H. Coenen: Radiopharmazeutische Chemie: Grundlagen zur in vivo Untersuchung molekularer Vorgänge mit PET, *Der Nuklearmediziner* **17**, 203-214 (1994).
- [6] H.J. Ache: Chemie des Positrons und Positroniums, *Angew. Chem.* **84**, 234 (1972).
- [7] K. Ziemons: Optimierung der Bildauflösung eines PET, Berichte des Forschungszentrum Jülich, Jül-2827, Oktober 1993.
- [8] G. Stöcklin: Tracers for metabolic imaging of brain and heart. Radiochemistry and Radiopharmacology, *Eur. J. Nucl. Med.* **19**, 527-551 (1992).
- [9] G. Stöcklin: Spezielle Syntheseverfahren mit kurzlebigen Radionukliden und Qualitätskontrolle. In: Handbuch der medizinischen Radiologie, Band 15/1B, Emissions-Computertomographie mit kurzlebigen zyklotron-produzierten Radiopharmaka; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1988.
- [10] P. Mélon und M. Schwaiger: Imaging of metabolism and autonomic innervation of the heart by positron emission tomography, *Eur. J. Nucl. Med.* **19**, 453-464 (1992).
- [11] C.M. Lederer und V.S. Shirley: Tables of Isotopes, 7. Auflage, John Wiley Verlag, New York.
- [12] G.W. Kabalka, R.M. Lambrecht, M. Sajjad, J.S. Fowler, S.A. Kunda, G.W. McCollum und R. McGregor: *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **36**, 853 (1985).
- [13] H.H. Coenen, P. Kling, und G. Stöcklin: Cerebral Metabolism of L-2-[<sup>18</sup>F]Fluortyrosine, a New PET Tracer of Protein Synthesis, *J. Nucl. Med.* **30**, 1367 (1989).
- [14] M. Reivich, D. Kuhl, A. Wolf, J. Greenberg, M. Phelps, T. Ido, V. Casella, J. Fowler, E. Hoffman, A. Alavi, P. Som und L. Sokoloff: The [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization in man, *Circ. Res.* **44**, 127-137 (1979).
- [15] T.R. DeGrado, H.H. Coenen und G. Stöcklin: 14(R,S)-[<sup>18</sup>F]Fluoro-6-thia-heptadecanoic acid (FTHA): evaluation in mouse of a new probe of myocardial utilization of long chain fatty acids, *J. Nucl. Med.* **32**, 1888 (1991).

- [16] G.J. Meyer, H.H. Coenen, S. Walters, B. Långström, R. Cantineau, K. Strijckmans, W. Vaalburg, C. Halldin, C. Crouzel, B. Mazière und A. Luxen: Quality assurance and quality control of short lived radiopharmaceuticals for PET. In: Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography, Methodical aspects. Eds.: G. Stöcklin und V.W. Pike. Developments in Nuclear Medicine, Kluwer Academic Publishers, Vol. 24, Kap. 3, 91-150 (1993).
- [17] S.M. Qaim und G. Stöcklin: Production of some medically important short-lived neutron deficient radioisotopes of halogens, *Radiochim. Acta* **34**, 25 (1983).
- [18] T. Ruth und A.P. Wolf: Absolute cross section for the production of  $^{18}\text{F}$  via the  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$  reaction, *Radiochim. Acta* **26**, 21 (1979).
- [19] K. Hamacher, G. Blessing und B. Nebeling: Computer aided synthesis (CAS) of no-carrier-added 2- $^{18}\text{F}$ fluoro-2-deoxy-D-glucose: an efficient automated system for the aminopolyether-supported nucleophilic fluorination, *Appl. Radiat. Isot.* **41**, 49-55 (1990).
- [20] S.M. Qaim, J.C. Clark, C. Crouzel, M. Guillaume, H.J. Helmke, B. Nebeling, V.W. Pike und G. Stöcklin: PET Radionuclide production. In: Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography, Methodical Aspects. Eds.: G. Stöcklin und V.W. Pike, Kluwer Academic Publishers (1993).
- [21] H.H. Coenen, K. Franken, P. Kling und G. Stöcklin: Direct electrophilic radiofluorination of phenylalanine, tyrosine and Dopa, *Appl. Radiat. Isot.* **39**, 1243-1250 (1988).
- [22] K. Hamacher und G. Stöcklin: Synthesis of N.C.A. (2S,4R)-4- $^{18}\text{F}$ Fluoroproline: A Potential Amino Acid for PET Measurements of Procollagen and Matrix Protein Synthesis, *11<sup>th</sup> International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry*, Vancouver, Symposium Abstract 175 (1995).
- [23] H.H. Coenen und S.M. Moerlein: Regiospecific Aromatic Fluordemetallation of Group Ivb Metalloarenes using Elemental Fluorine or Acetyl Hypofluorite, *J. Fluor. Chem.* **36**, 63 (1987).
- [24] S.G. Mislankar, D.L. Gildersleeve, D.M. Wieland, C.C. Massin, G.K. Mulholland und S.A. Toorongian: 6- $^{18}\text{F}$ Fluorometaraminol: A Radiotracer for in Vivo Mapping of Adrenergic Nerves of the heart, *J. Med. Chem.* **31**, 362 (1988).
- [25] J. Ermert: Zur trägerarmen Markierung von Arylalkylaminen mit n.c.a.  $^{18}\text{F}$ Fluorid am Beispiel von Nor-ephedrin und Metaraminol, Berichte des Forschungszentrum Jülich, Jül-3499 (1998).
- [26] B. Dietrich, J.M. Lehn und J.P. Sauvage: Diaza-Polyoxa-Macrocycles et Macrobicycles, *Tetrahedron Lett.*, 2885 (1969).
- [27] M.R. Kilbourn: Fluorine-18 Labeling of Radiopharmaceuticals, Nuclear Science Series, National Academic Press, Washington D.C. (1990).
- [28] K. Hamacher, H.H. Coenen, G. Stöcklin: Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2- $^{18}\text{F}$ fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution, *J. Nucl. Med.* **27**, 235-238 (1986).
- [29] M.E. Van Dort, Y.-W. Jung, D.S. Sherman, M.R. Kilbourn und D.M. Wieland: Fluorine for Hydroxy Substitution in Biogenic Amines, *J. Med. Chem.* **38**, 810-815 (1995).
- [30] K. Hamacher, H.H. Coenen und G. Stöcklin: N.c.a. radiofluorination of spiperone and N-methylspiperone via aminopolyether supported direct nucleophilic substitution, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **23**, 1047 (1986).

- [31] A. Katsifis, K. Hamacher, J. Schnitter und G. Stöcklin: Optimization Studies concerning the Direct Nucleophilic Fluorination of Butyrophenone Neuroleptics, *Appl. Radiat. Isot.* **44**, 1015 (1993).
- [32] C. Lemaire: Production of L-[<sup>18</sup>F]fluoro amino acids for protein synthesis: overview and recent developments in nucleophilic synthesis. In: PET studies on amino acid metabolism and protein synthesis. Eds.: B.M. Mazoyer, W.-D. Heiss und D. Comer. Kluwer Academic Publishers, Vol. 23, Kap. 2, 89-108 (1993).
- [33] A.R. Börner, K. Hamacher, T. Schmitz, V. Müller-Mattheis und H.H. Coenen: 4-cis-[<sup>18</sup>F]Fluorprolin – erste Ergebnisse bei Patienten mit renalen und abdominellen Raumforderungen, *Nuklearmedizin*, April 99 (Kongressausgabe), A 78, P49.
- [34] D. Block, H.H. Coenen, P. Laufer und G. Stöcklin: N.c.a. [<sup>18</sup>F]Fluoroalkylation via nucleophilic fluorination of disubstituted alkanes and application to the preparation of N-[<sup>18</sup>F]-fluoroethylspiperone, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **23**, 1042-1044 (1986).
- [35] H.H. Coenen, P. Laufer, G. Stöcklin, K. Wienhard, G. Pawlik, H.G. Böcker-Schwarz und H.-D. Heiss: 3-N-(2'-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl)spiperone: a new ligand for cerebral dopamine receptor studies with PET, *Life Sci.* **40**, 81-88 (1987).
- [36] H.J. Wester, M. Herz, W. Weber, P. Heiss, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Schwaiger und G. Stöcklin: Synthesis and Radiopharmacology of O-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl)-L-Tyrosine for Tumor Imaging, *J. Nucl. Med.* **40**, 205-212 (1999).
- [37] O. Prante: Zur regiospezifischen, nukleophilen n.c.a. <sup>18</sup>F-Markierung biogener Amine am Beispiel des Metaraminols, Diplomarbeit, Universität zu Köln (1996).
- [38] S.M. Moerlein, J.S. Permuter und D. Parkinson: Synthesis and evaluation of fluorine-18 labeled benzodiazepine antagonists as PET tracers, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **32**, 316 (1993).
- [39] P.K. Garg, S. Gark und M.R. Zalutsky: Fluorine-18 Labeling of Monoclonal Antibodies and Fragments with Preservation of Immunoreactivity, *Bioconjugate Chem.* **2**, 44-49 (1991).
- [40] H.H. Coenen: No-carrier-added <sup>18</sup>F-chemistry of radiopharmaceuticals. In: Synthesis and Applications of Isotopically Labeled Compounds. Eds.: T.A. Baillie und J.R. Jones. Elsevier Publ., Amsterdam, 443-448 (1989).
- [41] S. Gohlke, H.J. Wester, C. Bruns und G. Stöcklin: (2-[<sup>18</sup>F]Fluoropropionyl-(D)-phe<sup>1</sup>)-octreotide, a potential Radiopharmaceutical for quantitative Somatostatin Receptor Imaging with PET: Synthesis, Radiolabeling, In Vitro Validation and Biodistribution in Mice, *Nucl. Med. Biol.* **21**, 819-825 (1994).
- [42] H.J. Wester: Zur praktisch trägerfreien <sup>18</sup>F-Fluorierung von Proteinen, Peptiden und Tyrosin, Berichte des Forschungszentrum Jülich, Jül-3206 (1996).
- [43] S. Gohlke: Zur trägerarmen Radiofluorierung von Peptiden und Proteinen über prothetische Gruppen, Berichte des Forschungszentrum Jülich, Jül-3136 (1995).
- [44] M. Jelinski, K. Hamacher und H.H. Coenen: N.c.a. [<sup>18</sup>F]Fluoramidierung des Peptidhormons Oxytocin, *Nuklearmedizin* **38**, A22 (V18) (1999).
- [45] Y. Shai, K.L. Kirk, M.A. Channing, B.B. Dunn, M.A. Lesniak, R.C. Eastman, R.D. Finn, J. Roth und K.A. Jacobson: <sup>18</sup>F-Labeled Insulin: A Prosthetic Group Methodology for Incorporation of a Positron Emitter into Peptides and Proteins, *Biochemistry* **28**, 4801-4806 (1989).

- [46] D. Hebel, K.L. Kirk, L.A. Cohen und V.M. Labroo: First direct fluorination of tyrosine containing biologically active peptides, *Tetrahedron Lett.* **31**, 619 (1990).
- [47] D. Block, H.H. Coenen und G. Stöcklin: N.c.a.  $^{18}\text{F}$ -fluoroacylation via fluorocarboxylic acid esters, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **25**, 185-200 (1988).
- [48] S. Guhlke, H.H. Coenen und G. Stöcklin: Fluoroacylation agents based on small n.c.a. [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorocarboxylic acids, *Appl. Radiat. Isot.* **45**, 715-727 (1994).
- [49] G. Vaidyanathan und M.R. Zalutsky: Labeling proteins with fluorine-18 using N-Succinimidyl-4- $^{18}\text{F}$ fluorobenzoate, *Nucl. Med. Biol.* **19**, 275-281 (1992).
- [50] J. Montreuil: The history of glycoprotein research, a personal view. In: Glycoproteins. New Comprehensive Biochemistry. Eds.: J. Montreuil, J.F.G. Vliegthart und H. Schachter, Elsevier Science, Vol. 29a, Amsterdam (1995).
- [51] R.A. Dwek: Glycobiology: Toward understanding the function of sugars, *Chem. Rev.* **96**, 683-720 (1996).
- [52] M. Fukuda: Carbohydrate-dependent cell adhesion, *Bioorg. Med. Chem.* **3**, 207-215 (1995).
- [53] L.A. Lasky: Selectins: Interpreters of Cell-Specific Carbohydrate Information During Inflammation, *Science* **258**, 964 (1992).
- [54] M.L. Phillips, E. Nudelman, F.C.A. Gaeta, M. Perez, A.K. Singhal, S. Hakomori und J.C. Paulson: ELAM-1 mediates Cell Adhesion by Recognition of a Carbohydrate Ligand, Sialyl-Le<sup>x</sup>, *Science* **250**, 1130 (1990).
- [55] C.-H. Wong, R.L. Halcomb, Y. Ichikawa und T. Kajimoto: Enzyme in der organischen Synthese: das Problem der molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (Teil 2), *Angew. Chem.* **107**, 569-593 (1995).
- [56] S.J. Danishefsky, K. Koseki, D.A. Griffith, J. Gervay, J.M. Peterson, F.E. McDonald und T. Oriyama: Azaglycosylation of Complex Stannyl Alkoxides with Glycal-Derived Iodo Sulfonamides: A Straightforward Synthesis of Sialyl-Lewis X Antigen an Other Oligosaccharide Domains, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 8331 (1992).
- [57] C.M. Huwe, T.J. Woltering, J. Jiricek, G. Weitz-Schmidt und C.-H. Wong: Design, synthesis and biological evaluation of aryl-substituted sialyl Lewis X mimetics prepared via cross-metathesis of C-fucopeptides, *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 773-788 (1999).
- [58] Y. Ichikawa, Y.-C. Lin, D.P. Dumas, G.-J. Shen, E. Garcia-Junceda, M.A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L.E. Walker, J.C. Paulson und C.-H. Wong: Chemical-enzymatic synthesis and conformational analysis of sialyl Lewis x and derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9283 (1992).
- [59] P. Sears und C.-H. Wong: Intervention of carbohydrate recognition by proteins and nucleic acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 12086 (1996).
- [60] C.-H. Wong, F. Moris-Varas, S.-C. Hung, T.G. Marron, C.-H. Lin, K.W. Gong und G. Weitz-Schmidt: Small Molecules as Structural and Functional Mimics of Sialyl Lewis X Tetrasaccharide in Selectin Inhibition: A Remarkable Enhancement of Inhibition by Additional Negative Charge and/or Hydrophobic Group, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8152 (1997).
- [61] S.A. De Frees, F.C.A. Gaeta, Y.-C. Lin, Y. Ichikawa und C.-H. Wong: Ligand Recognition by E-Selectin: Analysis of Conformation and Activity of Synthetic Monomeric and Bivalent Sialyl Lewis X Analogs, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7549 (1993).

- [62] S.A. De Frees, W. Kosch, W. Way, J.C. Paulson, S. Sabesan, R.L. Halcomb, D.-H. Huang, Y. Ichikawa und C.-H. Wong: Ligand Recognition by E-Selectin: Synthesis, Inhibitory Activity, and Conformational Analysis of Bivalent Sialyl Lewis X Analogs, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 66 (1995).
- [63] S. Takayama, G.J. McGarvey und C.-H. Wong: Enzymes in organic synthesis: recent developments in aldol reactions and glycosylations, *Chem. Soc. Rev.* **26**, 407-415 (1997).
- [64] R. Kornfeld und S. Kornfeld: Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides, *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 631-664 (1985).
- [65] L.F. Leloir: Two decades of research on the biosynthesis of saccharides, *Science* **172**, 1299-1303 (1971).
- [66] B. Imperiali: Protein glycosylation: The clash of the titans, *Acc. Chem. Res.* **30**, 452-459 (1997).
- [67] G. Ashwell und A.G. Morell: The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **41**, 99 (1974)
- [68] T. Mizuochi, M.W. Spellman, M.W. Larkin, J. Soloman, L.J. Basa und T. Feizi: Carbohydrate structures of the human-immunodeficiency-virus (HIV) recombinant envelope glycoprotein gp120 produced in chinese-hamster ovary cells, *Biochem. J.* **254**, 599-603 (1988).
- [69] J.E. Heidlas, W.J. Lees, P. Pale und G.M. Whitesides: Gram-Scale Synthesis of Uridine 5'-Diphospho-N-acetylglucosamine: Comparison of Enzymatic and Chemical Route, *J. Org. Chem.* **57**, 146-151 (1992).
- [70] V. Wittmann und C.-H. Wong: 1H-Tetrazole as Catalyst in Phosphoramidite Coupling Reactions: Efficient Synthesis of GDP-Fucose, GDP-Mannose and UDP-Galactose, *J. Org. Chem.* **62**, 2144-2147 (1997).
- [71] B. Hirschbein, F.P. Mazonod und G.M. Whitesides: Synthesis of Phosphoenolpyruvate and its use in Adenosine Triphosphate Cofactor regeneration, *J. Org. Chem.* **47**, 3765 (1982).
- [72] C.-H. Wong, S.L. Haynie und G.M. Whitesides: Enzyme-Catalyzed Synthesis of N-Acetyllactosamine with in Situ Regeneration of Uridine 5'-Diphosphate Glucose and Uridine 5'-Diphosphate Galactose, *J. Org. Chem.* **47**, 5416 (1982).
- [73] E.S. Simon, S. Grabowski und G.M. Whitesides: Convenient Synthesis of Cytidine 5'-Triphosphate, Guanosine 5'-Triphosphate and Uridine 5'-Triphosphate and their use in the preparation of UDP-glucose, UDP-glucuronic acid and GDP-mannose, *J. Org. Chem.* **55**, 1834 (1990).
- [74] J.E. Heidlas, W.J. Lees und G.M. Whitesides: Practical enzyme-based Syntheses of Uridine 5'-Diphosphogalactose and Uridine 5'-Diphospho-N-acetylgalactosamine on a gram scale, *J. Org. Chem.* **57**, 152-157 (1992).
- [75] E.J. Toone, E.S. Simon und G.M. Whitesides: Enzymatic synthesis of uridine 5'-diphosphoglucuronic acid on a gram scale, *J. Org. Chem.* **56**, 5603-5606 (1991).
- [76] E.S. Simon, M.D. Bednarski und G.M. Whitesides: Synthesis of CMP-Neu5Ac from N-acetylglucosamine: generation of CTP from CMP using adenylate kinase, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7159-7163 (1988).
- [77] J.E. Heidlas, K.E. Williams und G.M. Whitesides: Nucleoside Phosphate Sugars: Synthesis on Practical Scales for Use as Reagents in the Enzymatic Preparation of Oligosaccharides and Glycoconjugates, *Acc. Chem. Res.* **25**, 307-314 (1992).

- [78] H. Waldmann: Enzymatische O-Glycosid-Synthesen, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **40**, 828-834 (1992).
- [79] J.G. Moffatt und H.G. Khorana: Nucleoside polyphosphates. The synthesis and some reactions of nucleoside-5' phosphomorpholidates and related compounds. Improved methods for the preparation of Nucleoside-5' polyphosphates, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 649-658 (1961).
- [80] S. Hanessian, P.-P. Lu und H. Ishida: One-Step, Stereocontrolled Synthesis of Glycosyl 1-Phosphates, Uridine-5'-diphosphogalactose, and Uridine-5'-diphosphoglucose from Unprotected Glycosyl Donors, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 13296-13300 (1998).
- [81] G.C. Look, Y. Ichikawa, G.-S. Shen, P.-W. Cheng und C.-H. Wong: A combined chemical and enzymatic strategy for the construction of carbohydrate-containing antigen core units: *J. Org. Chem.* **58**, 4326-4330 (1993).
- [82] C.-H. Wong, R. Wang und Y. Ichikawa: Regeneration of Sugar Nucleotide for enzymatic Oligosaccharide Synthesis: Use of Gal-1-Phosphate Uridyltransferase in the regeneration of UDP-Glucose, UDP-2-Deoxygalactose and UDP-Galactosamin, *J. Org. Chem.* **57**, 4343-4344 (1992).
- [83] Y. Ichikawa, G.-J. Dhen und C.-H. Wong: Enzyme-catalyzed synthesis of sialyl oligosaccharide with in situ regeneration of CMP-sialic acid, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4698-4700 (1991).
- [84] H.K. Chenault, R.F. Mandes und K.R. Hornberger: Synthetic utility of yeast hexokinase. Substrate specificity, cofactor regeneration and product inhibition, *J. Org. Chem.* **62**, 331-336 (1997).
- [85] S.J. Danishefsky und M.T. Bilodeau: Synthesis of Biologically Important Oligosaccharides and Other Glycoconjugates by the Glycal Assembly Method, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**, 1380 (1996).
- [86] C.M. Taylor: Glycopeptides and Glycoproteins: Focus on the Glycosidic Linkage, *Tetrahedron* **54**, 11317-11362 (1998).
- [87] D.M. Whitfield und S.P. Douglas: Glycosylation reactions – present status and future directions, *Glycoconj. J.* **13**, 5-17 (1996).
- [88] C.-H. Wong und G.M. Whitesides: Enzymes in Synthetic Organic Chemistry. In: *Tetrahedron Organic Chemistry Series*. Eds.: J.E. Baldwin und P.D. Magnus, Elsevier Science, Vol. 12, 296 (1994).
- [89] M.M. Palcic und O. Hindsgaul: Flexibility in the donor substrate specificity of  $\beta$  1,4-galactosyltransferase: application in the synthesis of complex carbohydrates: *Glycobiology* **1**, 205-209 (1991).
- [90] L.J. Berliner und R.D. Robinson: Structure-Function relationship in lactose synthase. Structural requirements of the Uridine 5'-Diphosphate Galactose binding site, *Biochemistry* **21**, 6340-6343 (1982).
- [91] M. Schulz und H. Kunz: Synthetic O-Glycopeptides as Model Substrates for Glycosyltransferases, *Tetrahedron Asymmetry* **4**, 1205-1220 (1993).
- [92] J. Thiem und T. Wiemann: Synthesis of Galactose terminated oligosaccharides by use of Galactosyltransferase, *Synthesis* **1**, 141-145 (1992).
- [93] O. Hindsgaul, K.J. Kaur, U.B. Gokhale, G. Srivastava, G. Alton und M.M. Palcic: Use of Glycosyltransferases in synthesis of unnatural oligosaccharide analogs, *ACS Symposium Series* **466**, 38-50 (1991).
- [94] L. Panza, P.L. Chiappini, G. Russo, D. Monti und S. Riva: Stereoselective enzymatic galactosylation of C-glucosides, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, 1255 (1997).

- [95] M. Kluge: N.c.a. [<sup>18</sup>F]Fluorsaccharid-Derivate als hydrophile prosthetische Gruppen zur Markierung von Peptiden, Diplomarbeit, Universität zu Köln (1998).
- [96] T. Tierling: Zur Synthese von 3-[<sup>18</sup>F]Fluorsialinsäure durch enzymatische Addition von [<sup>18</sup>F]Fluorpyruvat an Mannosamin, Diplomarbeit, Universität zu Köln (1997).
- [97] B. Capon: *Chem. Rev.* **69**, 407-498 (1969).
- [98] K. Hamacher: Phase-transfer catalysed synthesis of 4-S-β-D-glucopyranose-4-thio-D-glucopyranose (thiocellobiose), *Carbohydr. Res.* **128**, 291-295 (1984).
- [99] D.L. MacDonald: A New Route to Glycosyl Phosphates, *J. Org. Chem.* **27**, 1107 (1962).
- [100] G. Srivastava, O. Hindsgaul und M.M. Palcic: Chemical synthesis and kinetic characteration of UDP-2-deoxy-D-lyxo-hexose("UDP-2-deoxy-D-galactose"), a donor substrate for β-(1 → 4)-D-galactosyl-transferase, *Carbohydr. Res.* **245**, 137-144 (1993).
- [101] G. Excoffier, D. Gagnaire und J.-P. Utile: Coupure sélective par l'hydrazine des groupements acétyles anomères de résidus glycosyles acétyles, *Carbohydr. Res.* **39**, 368-373 (1975).
- [102] M. Hesse, H. Meier und B. Zeeh: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 4. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart (1991).
- [103] T. Bieg und W. Szeja: Removal of O-Benzyl Protective Groups by Catalytic Transfer Hydrogenation, *Synthesis Communications*, **76** (1985).
- [104] S.Y. Liu und J.P.N. Rosazza: An enzymatic preparation of UDP (U-<sup>13</sup>C) glucose, *Biocat. Biotrans.* **14**, 157-165 (1996).
- [105] E.M. Bessell, A.B. Foster und J.H. Westwood: The use of Deoxyfluoro-D-glucopyranoses and related compounds in a study of yeast hexokinase specificity, *Biochem. J.* **128**, 199 (1972).
- [106] M.D. Percival und S.G. Withers: Binding Energy and Catalysis: Deoxyfluoro Sugars as Probes of Hydrogen Bonding in Phosphoglucosyltransferase, *Biochemistry* **31**, 498-505 (1992).
- [107] D.G. Drueckhammer und C.-H. Wong: Chemoenzymatic synthesis of Fluoro sugar phosphates and analogues, *J. Org. Chem.* **50**, 5912-13 (1985).
- [108] H. Zollner: *Handbook of Enzyme Inhibitors*, 2. Auflage, VCH-Verlag, Weinheim (1993).
- [109] B.S. Cooperman: The mechanism of action of yeast inorganic pyrophosphatase, *Methods Enzymol.* **87**, 526-548 (1982).
- [110] L. Elling: Kinetic characterization of UDP-glucose pyrophosphorylase from germinated barley (malt), *Phytochemistry* **42**, 955-960 (1996).
- [111] T. Ryll und R. Wagner: Improved ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the quantification of a wide variety of nucleotides and sugar nucleotides in animal cells, *J. Chromatogr.* **570**, 77-88 (1991).
- [112] C. Unverzagt, H. Kunz und J.C. Paulson: High-Efficiency Synthesis of Sialyloligosaccharides and Sialoglycopeptides, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9308 (1990).

- [113] A. Sols, G. de la Fuente, C. Villar-Palasi und C. Asensio: Substrate Specificity and some other properties of baker's yeast hexokinase, *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 92-101 (1958).
- [114] R.E. Viola, F.M. Raushel, A.R. Rendina und W.W. Cleland: Substrate Synergism and the kinetic mechanism of yeast hexokinase, *Biochemistry* **21**, 1295-1302 (1982).
- [115] W.J. Ray Jr., C.B. Post und J.M. Puvathingal: Comparison of rate constants for  $(\text{PO}_3^-)$  transfer by the Mg(II), Cd(II), and Li(I) forms of phosphoglucomutase, *Biochemistry* **28**, 559-569 (1989).
- [116] W.J. Ray Jr., G.A. Roscelli und D.S. Kirkpatrick: The addition and release of magnesium in the Phosphoglucomutase reaction, *J. Biol. Chem.* **241**, 2603-2610 (1966).
- [117] P. Thomas, E.M. Bessell und J.H. Westwood: The use of Deoxyfluoro-D-galactopyranoses in a study of yeast galactokinase specificity, *Biochem. J.* **139**, 661 (1974).
- [118] J. Lee und J.K. Coward: Enzyme-Catalyzed Glycosylation of Peptides Using a Synthetic Lipid Disaccharide Substrate, *J. Org. Chem.* **57**, 4126-4135 (1992).
- [119] D.L. MacDonald: Chemical Synthesis of Aldose 1-Phosphates, *Methods Enzymol.* **8**, 121-125 (1966).
- [120] O. Prante, K. Hamacher und H.H. Coenen: Verfahren zur Herstellung eines  $^{18}\text{F}$ -markierten Glykosylierungsreagenz sowie  $^{18}\text{F}$ -Glykosylierungsreagenz und dessen Verwendung, *Patent, EU 103937.9-2112*, Forschungszentrum Jülich GmbH (1999).
- [121] G. Weckbecker und D.O.R. Keppler: Separation and Analysis of 4'-epimeric UDP-sugars by Borate High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Biochem.* **132**, 405-412 (1983).
- [122] J.O. Deferrari, E.G. Gros und I.O. Mastronardi: Methylation of carbohydrates bearing base-labile substituents, with diazomethane-boron trifluoride etherate – A new synthesis of 2-O-methyl-D-mannose, *Carbohydr. Res.* **4**, 432-434 (1967).
- [123] P. Kovac: A short synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, *Carbohydr. Res.* **153**, 168-170 (1986).
- [124] P.J. Card: Fluorinated Carbohydrates. Use of (Diethylamino)sulfur Trifluoride in the Synthesis of Fluorinated Sugars, *J. Org. Chem.* **48**, 393-395 (1983).
- [125] J. Adamson, A.B. Foster und J.H. Westwood: 2-Deoxy-2,2-difluoro-D-arabino-hexose ("2,2-difluoroglucose"), *Carbohydr. Res.* **18**, 345-347 (1971).
- [126] Y. Baba, M. Tsuchioka und N. Yoza: Rapid and sensitive determination of nucleoside H-phosphonates and inorganic H-phosphonates by high-performance liquid chromatography coupled with flow-injection analysis, *J. Chromatogr.* **507**, 103-111 (1990).
- [127] C.-H. Wong, Y. Ichikawa, T. Krach, C. Gautheron-Le Narvor, D.P. Dumas und G.C. Look: Probing the Acceptor Specificity of  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase for the Development of Enzymatic Synthesis of Novel Oligosaccharides, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 8137-8145 (1991).
- [128] C.-H. Wong, D.P. Dumas, Y. Ichikawa, K. Koseki, S.J. Danishefsky, B. Weston und J.B. Lowe, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7321 (1992).
- [129] G. Srivastava, K.J. Kaur, O. Hindsgaul und M.M. Palcic: Enzymatic transfer of a preassembled trisaccharide antigen to cell surfaces using a fucosyltransferase, *J. Biol. Chem.* **267**, 22356-22361 (1992).

- [130] G. Srivstava, G. Alton und O. Hindsgaul: Combined chemical-enzymatic synthesis of deoxygenated oligosaccharide analogs: transfer of deoxygenated D-GlcpNAc residues from their UDP-GlcpNAc derivatives using N-acetylglucosaminyltransferase I, *Carbohydr. Res.* **207**, 259-276 (1990).
- [131] B. Ernst und R. Oehrlein: Substrate and donor specificity of glycosyl transferases, *Glycoconj. J.* **16**, 161-170 (1999).

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

Å	1 Å = 10 <sup>-10</sup> m
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Asn	Asparagin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Av	volumenspezifische Enzymaktivität (U/ml)
Bq	Bequerel (Zerfälle/s)
c.a.	carrier-added
Ci	Curie (1 Ci = 3,7·10 <sup>10</sup> Bq)
CIAP	calf intestinal alkaline pyrophosphatase (EC 3.1.3.1)
CMP-NeuAc	Cytidin-5'-monophosphat-N-acetylneuraminsäure
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
E.C.	Enzyme Commission (International Union of Biochemistry)
FDG	2-Desoxy-2-fluor-D-glucopyranose
FDG-1-P	2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat
FDG-6-P	2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat
[ <sup>18</sup> F]FDG-1-phosphat	2-Desoxy-2-[ <sup>18</sup> F]fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat
FGlc-1,6-P <sub>2</sub>	2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1,6-diphosphat
FGlc-1-P	2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphat
FGlc-6-P	2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-6-phosphat
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GalT	$\beta$ -(1,4)-Galactosyltransferase
GDP-Fuc	Guanosin-5'-diphosphat- $\beta$ -L-fucose
GDP-Man	Guanosin-5'-diphosphat- $\alpha$ -D-mannose
Glc-1,6-P <sub>2</sub>	2-Desoxy-2-fluor- $\alpha$ -D-glucose-1,6-diphosphat
Glc-1-P	$\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HK	Hexokinase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
iPP	anorganische Pyrophosphatase (EC 3.6.1.1)
LacNAc	N-Acetyllactosamin
LDA	Lithiumdiisopropylamid
min	Minuten
mM	mmol / l
n.c.a.	no-carrier-added
NeuAc	N-Acetylneuraminsäure

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NTP	Nucleosidtriphosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGM	Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2)
PK	Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40)
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
Pro	Prolin
RCA	radiochemische Ausbeute
RP	Reversed Phase
TAFG	1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[ <sup>18</sup> F]fluor-β-D-glucose
Tab.	Tabelle
TBPP	Tetrabenzylidiphosphorsäureester
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	1 unit = 1 μmol / min
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDP-FGlc	Uridin-5'-diphosphat-2-desoxy-2-fluor-α-D-glucose
UDP-Gal	Uridin-5'-diphosphat-α-D-galactose
UDP-GalNAc	Uridin-5'-diphosphat-N-acetyl-α-D-galactose
UDPGE	Uridindiphosphatglucose Epimerase
UDP-Glc PP	Uridindiphosphatglucose Pyrophosphorylase
UDP-Glc	Uridin-5'-diphosphat-α-D-glucose
UDP-GlcNAc	Uridin-5'-diphosphat-N-acetyl-α-D-glucosamin
UDP-GlcUA	Uridin-5'-diphosphat-α-D-glucuronsäure
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat

## Danksagung

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.H. Coenen für die interessante und vielseitige Themenstellung und die Bereitstellung von hervorragenden Rahmenbedingungen, die erheblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. K. Hamacher möchte ich herzlich danken für die Betreuung der Arbeit und für seinen sehr kompetenten Rat und wertvollen Hilfestellungen.

Für einige sehr interessante Diskussionen über die Phänomene der Enzymkinetik möchte ich mich recht herzlich bei Frau Dipl. Chem. J. Beliczey vom Institut für Biotechnologie und Herrn PD Dr. L. Elling vom Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bedanken.

Für die Aufnahme einiger NMR-Spektren und wertvollen Interpretationshilfen danke ich Herrn Dr. R. Tappe vom Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln.

Bei der Betriebsgruppe des Babyzyklotrons des Instituts für Nuklearchemie des Forschungszentrums Jülich GmbH möchte ich mich für die Bereitstellung der FDG-Proben bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dipl. Chem. E. Heß, Frau Dipl. Chem. M. Jelinski, Herrn Dipl. Chem. C. Dittmar, Herrn Dr. J. Ermert, Herrn Dipl. Chem. T. Hirschfelder, Herrn Dipl. Chem. C. Hocke, Herrn Dr. M. Holschbach, Herrn Dipl. Chem. A. Hohn, Herrn Dipl. Chem. T. Ludwig, Herrn Dipl. Chem. E. Mennicke und Herrn Dipl. Chem. T. Tierling für eine sehr angenehme gemeinsame Zeit in Jülich.

Der generelle Dank gilt den technischen Angestellten und allen bisher nicht genannten wissenschaftlichen Mitarbeitern und Kommilitonen am Institut für Nuklearchemie des Forschungszentrums Jülich GmbH für ein ausgezeichnetes Arbeitsklima.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3895  
August 2001  
ISSN 0944-2952