

## Olaf Prante: Synthese des $^{18}\text{F}$ -markierten Coenzym Uridindiphosphatglucose als Basis für die $^{18}\text{F}$ -Glykosylierung von Glykoproteinen . 2000

Die chemoenzymatische Radiosynthese von no-carrier-added (n.c.a.)

Uridindiphosphat-2-desoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluor-a-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-a-D-glucose wurden  $^{31}\text{P}$ -entkoppelte und  $^1\text{H}$ -NMR-Studien erfolgreich abgeschlossen.

Uridindiphosphat-2-desoxy-2-fluor-a-D-glucose wurde nach einer 7-stufigen Synthese erhalten. Als hochselektives Phosphorylierungsmittel für FDG diente hierbei Tetrabenzylpyrophosphat (a/b=3:1). Ferner wurde eine multienzymatische Synthese von Uridindiphosphat-2-desoxy-2-fluor-a-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 a-D-Glucose-1-phosphat mit 2-Desoxy-2-fluor-a-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-a-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 b-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.

---

The chemo-enzymatic radiosynthesis of no carrier added (n.c.a.) uridine diphospho-2-deoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluoro-a-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.