

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

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

Uridindiphosphat-2-desoxy-2- ^{18}F fluor-a-D-glucose (UDP- ^{18}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}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}P -entkoppelte und ^1H -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}F fluor-a-D-glucose wurde eine schnelle, hexokinase-katalysierte Phosphorylierung von ^{18}F FDG mit Hilfe von ATP oder UTP als Phosphatdonor durchgeführt. Eine anschließende enzymatische Isomerisierung von n.c.a. ^{18}F FDG-6-phosphat zu n.c.a.

^{18}F FDG-1-phosphat war limitiert aufgrund der bevorzugten Bildung von ^{18}F FDG-1,6-diphosphat. Demzufolge erwies sich ein Multienzymsystem für die Entwicklung einer rein-enzymatischen Synthese von UDP- ^{18}F FGlc wenig effizient aufgrund der Notwendigkeit von geträgerten Reaktionsbedingungen.

Daher wurde eine chemoenzymatische Synthese von n.c.a. UDP- ^{18}F FGlc entwickelt, die von 1.3.4.6-Tetra-O-acetyl-2- ^{18}F fluor-2-desoxy-D-glucose ausgeht, welches als Zwischenprodukt in der ^{18}F FDG-Synthese auftritt. Die chemische Phosphorylierung nach MacDonald und die anschließende Entschützung führte zu einer radiochemischen Ausbeute von 55% für ^{18}F FDG-1-phosphat. UDP- ^{18}F FGlc wurde enzymatisch durch Kondensation von ^{18}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}F FGlc innerhalb von 110 min. Das ^{18}F -markierte Coenzym UDP- ^{18}F FGlc wurde in der b-1,4-galactosyltransferase-katalysierten ^{18}F -Glykosylierung von N-Acetylglucosamin verwendet. Das ^{18}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}F FDG weltweit hat diese neue Strategie für den enzymatischen Transfer von "aktiviertem ^{18}F FDG" das Potential einer hochselektiven und milden ^{18}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}F fluoro-a-D-glucose (UDP- ^{18}F FGlc) was developed. In order to overcome the problem of poor regioselectivity when using the commonly strategy to label proteins via ^{18}F -labelled prosthetic groups, the use of enzyme systems in addition to the corresponding ^{18}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- α -D-glucose, ^{31}P -decoupled and ^1H -NMR-studies were successfully realized. Uridine diphospho-2-deoxy-2-fluoro- α -D-glucose was obtained in a 7 step synthesis. Tetrabenzylpyrophosphate was shown to be a highly stereoselective phosphorylating agent for FDG (a/b=3:1). Moreover, a multienzymatic pathway for the synthesis of uridine diphospho-2-deoxy-2-fluoro- α -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 α -D-glucose-1-phosphate with 2-fluoro-2-deoxy- α -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}F fluoro- α -D-glucose a rapid hexokinase-mediated phosphorylation of ^{18}F FDG utilizing ATP or UTP as phosphate donor was performed. A further enzymatic isomerization of n.c.a. ^{18}F FDG-6-phosphate to n.c.a. ^{18}F FDG-1-phosphate was limited due to the formation of ^{18}F FDG-1.6-diphosphate as main product. Experiments using a multiple enzyme system to develop a fully enzymatic synthetic route to UDP- ^{18}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}F FGlc has been developed, starting from 1.3.4.6-tetra-O-acetyl-2- ^{18}F fluoro-2-deoxy-D-glucose, which occurs as an intermediate in the ^{18}F FDG synthesis. The chemical phosphorylation via MacDonald reaction and subsequent deprotection led to a radiochemical yield of 55% of ^{18}F FDG-1-phosphate. UDP- ^{18}F FGlc was synthesized enzymatically by condensation of ^{18}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}F FGlc within 110 min. The ^{18}F -labelled coenzyme UDP- ^{18}F FGlc was used as a tool for ^{18}F -glycosylation of N-acetylglucosamine mediated by β -1.4-galactosyltransferase. The ^{18}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}F FDG worldwide, this new strategy for enzymatic transfer of "activated ^{18}F FDG" has demonstrated its potential as a highly selective and mild ^{18}F -labelling method of glycosylated biopolymers to study their pharmacokinetics using positron-emission-tomography.