

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Fachbereich 09 – Chemie, Pharmazie, Geographie und Geowissenschaften

Biomedizinische Chemie (B.Sc.)



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Bachelorarbeit zum Thema:

**Nutzung der Mikroumgebung von Tumoren für therapeutische
Anwendungen und biologische Bildgebung**

Vorgelegt von:

Maximilian Johannes Zecher
Glefsweilerstraße 2, 68623 Lampertheim
mzecher@students.uni-mainz.de

Matrikelnummer: 2750352
Fachsemester: 6

Abgabedatum: 12.07.2021

Erstgutachter: Prof. Dr. Tanja Weil
Zweitgutachter: Dr. Christopher Synatschke

**Bachelorarbeit im Studiengang Chemie, Biomedizinische Chemie
oder Polymerchemie
an der Johannes Gutenberg - Universität Mainz**

Ich, Maximilian Johannes Zecher, Matrikelnummer 2750352
versichere, dass ich meine Bachelorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen
als die angegebenen schriftlichen und elektronischen Quellen sowie andere Hilfsmit-
tel benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß
entnommen wurden, habe ich kenntlich gemacht.

Leuningerheim, 25.06.2021
(Ort, Datum)


(Unterschrift)

Zusammenfassung

Die vorliegende Bachelorarbeit „Nutzung der Mikroumgebung von Tumoren für therapeutische Anwendungen und biologische Bildgebung“ beschreibt die Synthese von Glycosylaminen basierend auf der ^{19}F -Fluorodeoxyglucose (^{19}F -FDG) und ^{18}F -Fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG). Diese Moleküle können zunächst eine verbesserte Bildgebung von Tumoren durch die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ermöglichen, indem die Fluorodeoxyglucose nach saurer hydrolytischer Spaltung der Glycosylamine nur in den Arealen mit niedrigem pH-Wert in die Zellen aufgenommen wird. Durch die niedrigen pH-Werte der Mikroumgebung lassen sich Tumore besser abgrenzen von anderen Geweben mit hohem Glucosebedarf. Zum weiteren können die Glycosylamine eine gezieltere therapeutische Behandlung ermöglichen, indem sich an ihnen bestimmte verknüpfbare Gruppen befinden, an die ein Protein beispielsweise angebracht werden kann. Dies würde eine gezieltere therapeutische Behandlung ermöglichen, indem die Proteine nur in den Regionen mit niedrigem pH-Wert freigesetzt werden und dadurch die möglichen Nebenwirkungen der Behandlung gegen Tumoren verringern können. In der Arbeit wird zunächst die Synthese der literaturbekannten Verbindung des ^{18}F -FDG-4-Phenylbenzylamins beschrieben und dessen Verhalten bei einem pH-Wert von 6,5 für eine Stunde untersucht. Weiterhin wird eine Methode zur Synthese der radioaktiven Glycosylamine beschrieben, welche anschließend für die Synthese des ^{19}F -FDG-4-Phenylbenzylamins verwendet wird. Zuletzt wird die Methode der literaturbekannten Substanz verwendet, um Linkergruppen an die ^{18}F -FDG anzubringen. Dies wurde mit fünf verschiedenen Verbindungen versucht, wobei Schwierigkeiten bei der Isolierung der einzelnen Verbindungen aufgetreten sind. Um die Reaktion zu verstehen, wurde ebenfalls das Verhalten von ^{19}F -FDG in saurer Umgebung beobachtet.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich beim Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz bedanken, dass es mir ermöglicht wurde, hier meine Bachelorarbeit zu schreiben und dass alle notwendigen Materialien mir zur Verfügung gestellt worden sind. Außerdem habe ich viele neue Techniken und Methoden kennenlernen dürfen, die sich für meine Zukunft mit Sicherheit als wertvoll erweisen werden. Dabei gilt vor allem mein Dank Dr. Seah-Ling Kuan. Sie hat mir eine sehr nützliche Einführung gegeben und stand mir für zahlreiche Fragen zur Verfügung. Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern ihrer Gruppe bedanken, da ich mich im Labor immer an sie wenden konnte und ich nützliche Tipps zum Schreiben meiner Arbeit erhalten habe. Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Manfred Wagner für die Messungen meiner Proben beim 500 MHz NMR-Spektrometer und Dr. Hans-Joachim Räder für die Einleitung in die MS-Spektroskopie bedanken. Weiterhin möchte ich mich bei der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universitätsmedizin in Mainz bedanken, dass sie es mir ermöglicht haben mit ^{19}F -FDG zu arbeiten. Dabei wurde es mir ermöglicht zahlreiche Erfahrungen mit dem Umgang und arbeiten in der Radiopharmazie zu sammeln. Mein Dank hierbei gebührt Dennis Kerner und vor allem Dr. rer. nat. Christopher Waldmann, welcher mir die meiste Zeit zur Seite stand und meine Arbeit auch zur Korrektur gelesen hatte. Daneben hatte er mir viele Informationen und Techniken für radiopharmazeutisches Arbeiten beigebracht.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Theoretische Grundlagen | 3 |
| 2.1 | Tumore | 3 |
| 2.1.1 | Tumor Mikroumgebung | 4 |
| 2.1.1.1 | Aufbau des TMEs | 5 |
| 2.1.1.2 | Hypoxie | 6 |
| 2.1.1.3 | Saure Mikroumgebung von Tumoren und dessen Stoffwechsel | 6 |
| 2.2 | Positronen-Emission-Tomographie | 9 |
| 2.2.1 | PET-Diagnostik durch ¹⁸F-FDG | 11 |
| 2.2.2 | Synthese von ¹⁸F-FDG | 12 |
| 2.3 | Glycosylamine | 14 |
| 2.3.1 | Synthese | 14 |
| 2.3.2 | Hydrolyse | 15 |
| 3 | Zielsetzung | 17 |
| 4 | Ergebnisse und Diskussion | 18 |
| 4.1 | Synthese von ¹⁹F-N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin | 19 |
| 4.2 | Synthese von ¹⁸F-N-(2-Deoxy-2-fluoro-18-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin ... | 21 |
| 4.3 | Stabilitätstest von ¹⁸F-N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin bei pH 6,5 | 24 |
| 4.4 | Untersuchung der Reaktion mit sekundären Aminen | 26 |
| 4.5 | NMR-Überwachung von ¹⁹F-FDG unter Reaktionsbedingungen | 39 |
| 5 | Zusammenfassung | 41 |
| 6 | Materialien und Methodik | 42 |
| 6.1 | Materialien | 42 |
| 6.1.1 | Geräte | 42 |
| 6.1.1.1 | Allgemeine Geräte | 47 |
| 6.1.1.2 | LCMS | 48 |
| 6.1.1.3 | RP-HPLC | 48 |
| 6.1.1.4 | ESI-MS | 48 |
| 6.1.2 | Verbrauchsmaterialien | 44 |
| 6.1.3 | Chemikalien | 44 |
| 6.2 | Puffer und Laufmittel | 46 |
| 6.2.1 | HPLC-Laufmittel | 46 |

| | | |
|---------|---|----|
| 6.2.2 | Natriumphosphatpuffer | 46 |
| 6.2.3 | Programme..... | 46 |
| 6.3 | Methoden..... | 47 |
| 6.3.1 | Generelle Methoden..... | 47 |
| 6.3.1.1 | Generelle Synthese der ¹⁹ F-Glycosylamine..... | 52 |
| 6.3.1.2 | Generelle Synthese der ¹⁸ F-Glycosylamine..... | 53 |
| 6.3.1.3 | Untersuchung der Zersetzung der Glycosylamine bei pH 6,5..... | 54 |
| 6.3.1.4 | Untersuchung der Reaktionskinetik von ¹⁹ F-FDG..... | 55 |
| 7 | Synthesen..... | 51 |
| 7.1 | tert-Butyl-4-propioloyl-piperazin-1-carboxylat | 51 |
| 7.2 | 4-Propioloyl-piperazin-1-carboxylat | 53 |
| 7.3 | 1-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)- 4-Propioloyl-piperazin-1-carboxylat..... | 54 |
| 7.4 | N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin | 55 |
| 7.5 | N-(2-Deoxy-2- ¹⁸ F-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin | 56 |
| 7.6 | N-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin | 57 |
| 7.7 | N,N`-Benzoyl-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin..... | 58 |
| 7.8 | 1-(4-methoxyphenyl)-4-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin..... | 59 |
| 7.9 | N-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-tyrosin..... | 60 |
| 8 | Literaturverzeichnis..... | 61 |
| 9 | Abkürzungsverzeichnis | 64 |
| 10 | Abbildungsverzeichnis | 66 |
| 11 | Spektren..... | 68 |

1 Einleitung

Krebs ist eine der bedeutendsten Krankheiten auf der Welt. Jährlich erkranken daran etwa 500.000 Menschen und etwa 4,5 Millionen Menschen sind zur Zeit in Deutschland betroffen. Er ist Stand 2016 für die zweitmeisten Todesfälle nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen verantwortlich.^[1] In den Jahren von 2015 bis 2030 erwartet das Robert Koch-Institut einen Anstieg der Krebspatienten von 23%. Für eine erfolgreiche Therapie gegen Krebs ist es wichtig, dass dieser möglichst früh erkannt wird, da dies die vielversprechendsten Wahrscheinlichkeiten zur Bekämpfung des Krebses liefert. Derzeitig werden Tumore durch Chemotherapie, Strahlentherapie und Operationen bekämpft.^[2] Eine weitverbreitete Anwendung zur Diagnostik von Krebs ist die Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Hierbei werden, durch intravenöse Verabreichung von Tracer in den Patienten, die Tumore sichtbar gemacht. Der am häufigsten verwendete Tracer in der PET ist die ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG). Diese wird aufgrund des hohen Glucosebedarfs von Krebszellen vermehrt aufgenommen. Problematisch für die biologische Bildgebung mittels Fluorodesoxyglucose (FDG) ist, dass auch andere Regionen im Körper wie Gehirn oder auch Herz, aber auch Entzündungsherden, eine hohe Aufnahme an FDG aufzeigen, da diese Organe eine hohe Stoffwechselrate und dementsprechend einen hohen Glucoseverbrauch aufzeigen. Dadurch wird die Bildgebung von Tumoren in diesen Arealen und deren generelle Interpretation deutlich erschwert. Eine vielversprechende Möglichkeit hierzu zeigt die Mikroumgebung von Tumoren auf.^[3] Tumore sind im Vergleich zum physiologischen pH-Wert von 7,4 mit einem pH-Wert von 6,5 bis 6,8 leicht sauer. Diese saure Mikroumgebung begünstigt die Proliferation und somit auch die Metastasenbildung von Tumoren. Zudem begünstigt sie die Therapieresistenz.^[4] Eine interessante Möglichkeit liefern hierzu die Glycosylamine. Dabei wird die FDG als bildgebende Substanz mit einem Amin gekoppelt. Die Bindung der Glycosylamine lässt sich im sauren pH-Bereichen leicht spalten, wodurch das FDG wieder frei vorliegt und in die Zelle gelangen kann.^[3] Dadurch kann eine erhöhte Aufnahme von stark energiebedürftigen Arealen von FDG im Körper vermindert werden, wodurch eine bessere bildliche Darstellung von Tumoren erzielt werden kann. Dadurch kann die Interpretation der Bilder erleichtert werden. Die Glycosylamine liefern neben der bildlichen Darstellung von Tumoren auch eine vielversprechende Möglichkeit zu therapeutischen Anwendungen. Durch die Kopplung von Aminen mit

Linkergruppen an den Zucker ist es möglich, Reagenzien für therapeutische Zwecke wie beispielsweise Proteine mit dem Glycosylamin zu knüpfen. Der Vorteil dieser so erhaltenen Verbindungen ist, dass die therapeutische Gruppe nur in saurem Milieu freigesetzt wird und somit zielgerichtet für den sauren Tumor pH-Wert ist. Dadurch lassen sich Nebenwirkungen, die bei anderen Therapie-Interventionen bei der Tumorbekämpfung entstehen, vermindern. Dies würde neben einer noch zielgerichteteren Darstellung von Tumoren auch eine regionenspezifische Behandlung von Tumoren ermöglichen, wobei der Patient im Vergleich zu anderen Behandlungsmethoden besser geschont wird, da die Therapie größtenteils auf das saure Tumormikromilieu begrenzt ist.

Daher ist das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung einer Methode zur Synthese von radioaktiven Glycosylaminen sowie die Suche nach geeigneten Linkergruppen, die sich an das FDG substituieren lassen, um die Addition anderer Gruppen wie Proteine zu ermöglichen. Diese würden es ermöglichen, ein neues Feld für eine zielgerichtete Bekämpfung von Tumoren zu ergründen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Tumore

Tumore sind unkontrolliert wachsende und sich vermehrenden Zellen im Körper. Krebs lässt sich allgemein in gutartige (benigne) und bösartige (maligne) unterteilen. Diese Unterteilung beruht im Allgemeinen auf dessen Ausbreitungsverhalten sowie dessen Verbreitung. Bösartige Tumore sind invasiv und dringen in benachbarte Gewebe ein und verbreiten und versorgen sich über Blut und Lymphsysteme.^[1] Maligne Tumore werden auch als Krebs bezeichnet. Sie besitzen die Fähigkeit zur Metastasenbildung. Sie wachsen unkontrolliert und können umliegendes Gewebe schädigen.

Bösartige Tumore können noch weiter differenziert werden zwischen soliden Tumoren, die an einem Organ festgesetzt sind und systemischen Krebserkrankungen, wobei das Blut- und Lymphsystem betroffen ist. Beispiele für solide Tumore sind Blastome (embryonale Tumore), Karzinome (Tumore des Deckenepithels - die häufigste Tumorart) und Sarkome (Tumore des Binde- und Muskelgewebes). Gutartige Tumore sind räumlich begrenzt und dringen nicht in benachbarte Gewebe ein. Sie können aber auch Probleme bereiten, indem sie auf umliegendes Gewebe drücken. Die Bezeichnung der gutartigen Tumore erfolgt nach dem ursprünglichen Gewebe (z.B. Adenom aus Drüsengewebe).^[6]

Der klinische Verlauf wird bei dieser Verteilung hingegen nicht betrachtet, denn es wurde gezeigt, dass nicht invasive Tumore der Harnblase mit größeren Risiken für den Patienten verbunden ist, als das Schilddrüsenkarzinom, was ein klassisches Beispiel eines invasiven bzw. malignen Tumors ist. Bei Schilddrüsenkarzinome besitzen die betroffenen Patienten gute Heilungsprognosen.^[1] Es sind mehr als 100 verschiedene Tumore bekannt. Die Ursache für Tumore sind sehr oft genetische Defekte. Dabei sind mehrere Gene betroffen, die teilweise überexprimiert (Proliferation der Zelle), aber auch inaktiviert (Apoptose) sind.^[7,8] Normalerweise findet bei defekten Zellen die Apoptose statt.

Mutagene Substanzen sind Krebsauslöser. Beispiele sind Strahlung wie UV- und Röntgenstrahlung, Viren, aber auch chemische Substanzen. Merkmale von Tumoren sind das schnelle Wachstum und die rasche Zellteilung. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit genetischer Effekte erhöht. Dies erhöht ebenfalls die Möglichkeit

für Resistenzen bestimmter Arzneistoffe. Daher wird bei einer Chemotherapie auch oft eine Mischung aus verschiedenen Stoffen dem Patienten verabreicht.^[7,8]

2.1.1 Tumor Mikroumgebung

Ein Tumor ist ein organähnliches System aus einer Vielzahl verschiedener Zellen (siehe Abbildung 1), die dem Tumor seine Eigenschaften verleihen.

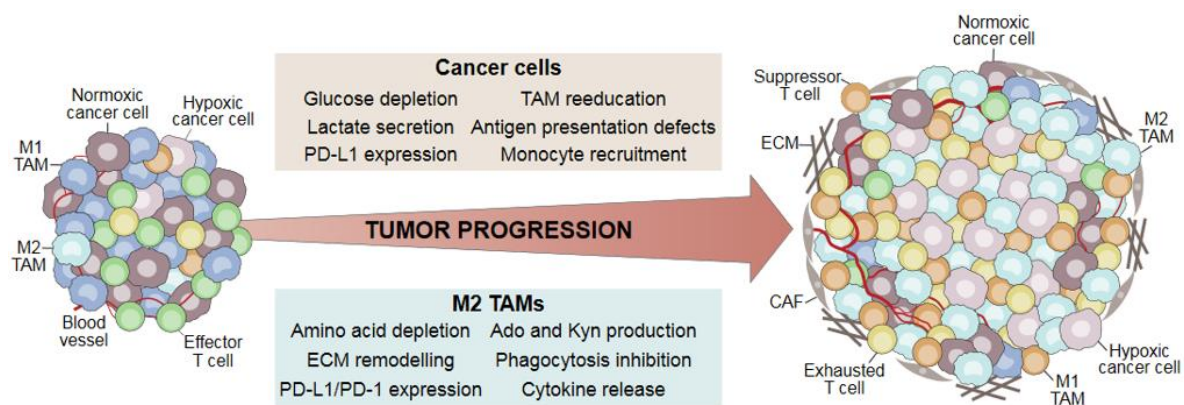


Abbildung 1: Darstellung der Zusammensetzung des Tumors und dessen Mikroumgebung, während der Fortschreitung.^[9]

Die verschiedenen Zellen der Mikroumgebung begünstigen zum einen die Proliferation des Tumors, wodurch das Wachstum und die Metastasenbildung gefördert wird. Zum anderen werden Apoptosemechanismen inhibiert, wodurch sie das Überleben des Tumors garantieren. Die Tumormikroumgebung (TME) wird während dem Frühstadiums der Tumorentwicklung gebildet.^[10] So beinhaltet der Tumor bzw. die Tumormikroumgebung Fibroblasten, neuroendokrine Zellen, Adipocyten sowie eine Reihe von Immun- und Entzündungszellen. Neben einer Reihe von verschiedenen Zellen bestehen sie auch aus extrazellulären Komponenten. Somit erschaffen sie ein komplexes Netzwerk verschiedener Substanzen. Sie verändern auch das umliegende Gewebe, um deren Wachstum und Verbreitung zu garantieren. Es wurde festgestellt, dass die Tumormikroumgebung einen sauren pH-Wert von 6,5 bis 6,8 aufzeigt.^[11] Gesundes Gewebe bzw. der pH-Wert im Organismus liegt normalerweise bei einem pH-Wert von etwa 7,4. Der Grund für den sauren pH-Wert wird im Kapitel 2.1.1.3 genauer erläutert. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Umgebung des Tumors, im

Vergleich zu andern Geweben, hypoxisch ist. Dies resultiert aus der schlechten Versorgung und der hohen Stoffwechselrate des Tumors. Die Tumormikroumgebung ist ein wichtiger Faktor, der für therapeutische Resistenzen eine wichtige Rolle spielt.^[12]

2.1.1.1 Aufbau des TMEs

Tumore bestehen aus einem komplexen Netzwerk bestehend aus zahlreichen extrazellulären Substanzen und einer großen Zahl von Zellen. Eine Gruppe von Zellen sind die tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs). Es hat sich gezeigt, dass eine erhöhte Zahl von CAFs bei Lungenkrebs die Prognosen zum Ausgang von Krebs verschlechtern.^[12] Die CAFs bilden den größten Teil von Zellen.^[13] Die Funktion der CAFs ist die Synthese und Sekretion der extrazellulären Matrix. Ebenfalls synthetisieren sie Wachstumsfaktoren und Zytokine, um das Wachstum, die Angiogenese sowie die Resistenz von Tumoren zu begünstigen.^[12] Neben den CAFs liegen in der Mikroumgebung von Tumoren auch Immunzellen vor. Die wichtigste Gruppe sind die Makrophagen. Es wurde gezeigt, dass eine große Zahl an Tumorassoziierten Makrophagen (TAM) bei Brustkrebs vorliegen und dass eine erhöhte Zahl an TAM die Prognose für Brustkrebs verschlechtern.^[13] Makrophagen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: M1 und M2. Diese beiden Formen lassen sich ineinander umwandeln. Sie fördern das Tumorwachstum, indem sie Enzyme oder vaskulären endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) produzieren. M1 ist die klassische Form der Makrophagen und für die Immunabwehr zuständig. M2 sind die Formen, die bei der Wundheilung aktiv sind, aber auch bei Tumoren in großer Zahl vorliegen, wodurch das Wachstum begünstigt wird, während die M1-Form antitumorale Eigenschaften besitzt. Daher begünstigt der Tumor die Bildung von M2-Form.^[9] Im Vergleich zu normalen Zellen zeigen Tumore eine veränderte extrazelluläre Matrix (ECM) auf. Sie ist ein komplexes Fasernetzwerk bestehend aus zahlreichen Kompartimenten wie Laminen, Vitronectin, Tenascin-C, Kollagen, Fibronectin. Im Vergleich zur ECM von gesundem Gewebe ist die ECM von Tumoren unstrukturiert. Immunzellen und CAFs sorgen für das veränderte ECM.^[13] Die ECM ist ein wichtiger Faktor, der das Eindringen von Arzneistoffen und die Metastase beeinflussen. Daneben besitzen Tumore ein steiferes Stroma, weshalb dies auch der Grund ist, weshalb man Tumore ertasten kann.^[13]

2.1.1.2 Hypoxie

Im Folgenden wird kurz auf die Hypoxie eingegangen. Aufgrund der nur geringen Bedeutung für meine Arbeit werden nur auf wichtige Merkmale dieser Eigenschaft des TMEs erwähnt. Es wurde gezeigt, dass das Gewebe von Tumoren hypoxisch ist, was aus der schlechten Sauerstoffversorgung bzw. der Blutgefäße resultiert.^[12] Diese verminderte Sauerstoffversorgung hindert die Apoptose von Zellen und begünstigt zudem verschiedene Faktoren, die die Angiogenese begünstigen.^[12] Die Tumorphypoxie kann ebenfalls den Stoffwechsel von Tumoren beeinflussen, indem sie die anaerobe Glykolyse begünstigt. Die Hypoxie ist eine Eigenschaft des Tumors, die eine Therapie behindern kann. Für Therapien wie die Photodynamische Therapie (PDT) ist Sauerstoff notwendig, da hierbei reaktive Sauerstoffspezies erzeugt werden.^[8] Ein Molekül, um die Hypoxie bildlich darzustellen, ist das ¹⁸F-Fluoromisonidazol (¹⁸F-FMISO). Dieses wird in sauerstoffarmen Regionen im Körper reduziert und kann dadurch an Makromolekülen binden. Dadurch können die Regionen über PET bildlich dargestellt werden.^[14]

2.1.1.3 Saure Mikroumgebung von Tumoren und dessen Stoffwechsel

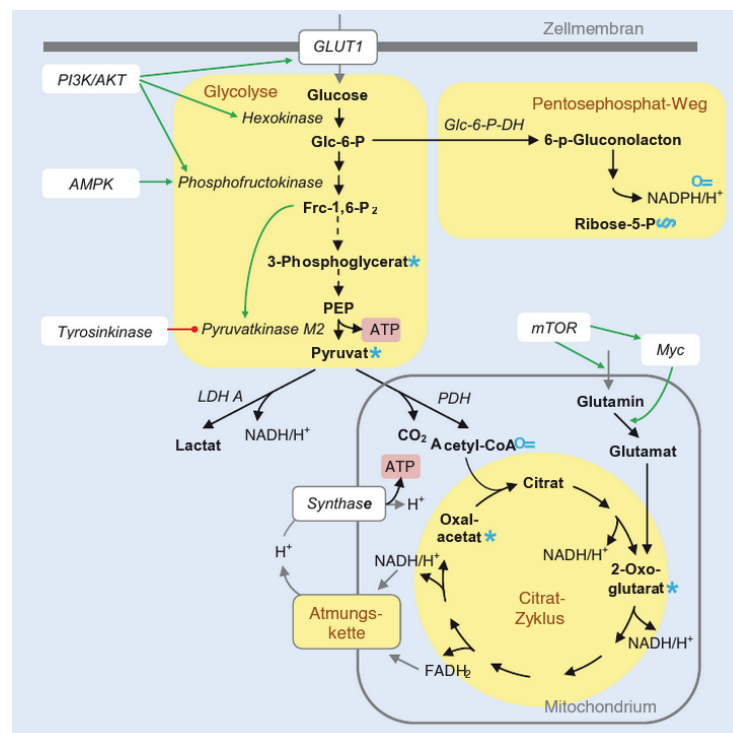


Abbildung 2: Darstellung des Glucose-Metabolismus in der Zelle.^[15]

Gesunde Zellen des menschlichen Körpers gewinnen ihre Energie, in Form von ATP, über die drei Schritte aus Glykolyse, Citratzyklus und Atmungskette (Abbildung 2). Die Gewinnung der Energie für die Zelle erfolgt größtenteils aus der Glucose, dem wichtigsten Energielieferanten im Körper. Die Glykolyse ist ein zehnstufiger Stoffwechselweg mit sieben reversiblen und drei irreversiblen Schritten im Cytosol der Zelle. Dadurch gelingt es der Zelle jeweils zwei Moleküle ATP, NADH und Pyruvat bereitzustellen. Bei Anwesenheit von Sauerstoff wird das Pyruvat zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches im Mitochondrium in den Citratzyklus eingeht. Dort wird das Pyruvat zu Kohlenstoffdioxid abgebaut, wodurch die Zelle die Hydridüberträger NADH synthetisiert. Dadurch gewinnt die Zelle ATP, FADH₂ und NADH. Schließlich durchläuft die Zelle im Mitochondrium die Atmungskette, dort wird ein Protonengradient aufgebaut, wodurch die ATP-Gewinnung durch die ATPase ermöglicht wird. Schließlich wird durch diesen dreistufigen Mechanismus der Zelle ermöglicht, aus einem Molekül Glucose, 36 Moleküle ATP zu erzeugen.^[7,8,16] Bei Tumoren wurde eine Veränderung im Stoffwechsel festgestellt. Es liegt eine veränderte Glucoseaufnahme, Glutaminolyse und Fettsäuresynthese vor.^[16] Es wurde festgestellt, dass die Krebszellen eine verminderte Aktivität des Citratzyklus, jedoch eine verstärkte Aktivität der Glykolyse haben.^[16] Daneben konnte auch gezeigt werden, dass die Glykolyse vermehrt in Krebszellen stattfindet. Entsprechend der erhöhten Glykolyserate verbrauchen Krebszellen das 10-fache an Glucose im Vergleich zu gesunden Zellen.^[17] Dies wird auch durch die Überexpression der Glucosetransporter-1 (GLUT-1-Transporter) deutlich, dessen Anzahl mit der Glykolyserate zusammenhängt.^[18] Dieses Phänomen wird bei der PET verwendet, um die Tumore bildlich sichtbar zu machen. Ebenso wird vermehrt der Hypoxie-induzierte Faktor-1 (HIF-1) erzeugt, wodurch eine vermehrte Expression der Hexokinase II erfolgt. Der Biochemiker Otto Warburg hat dieses Phänomen der veränderten Glykolyse beschrieben, in welchem die Tumorzellen diesen ineffizienten Weg zur Energiegewinnung des Stoffwechsels über die Glykolyse eingehen und 50% ihrer Energie über die Glykolyse gewinnen. Nur etwa 5% der Glucose werden vollständig zu Kohlenstoffdioxid abgebaut (vgl. Abbildung 3).^[15]

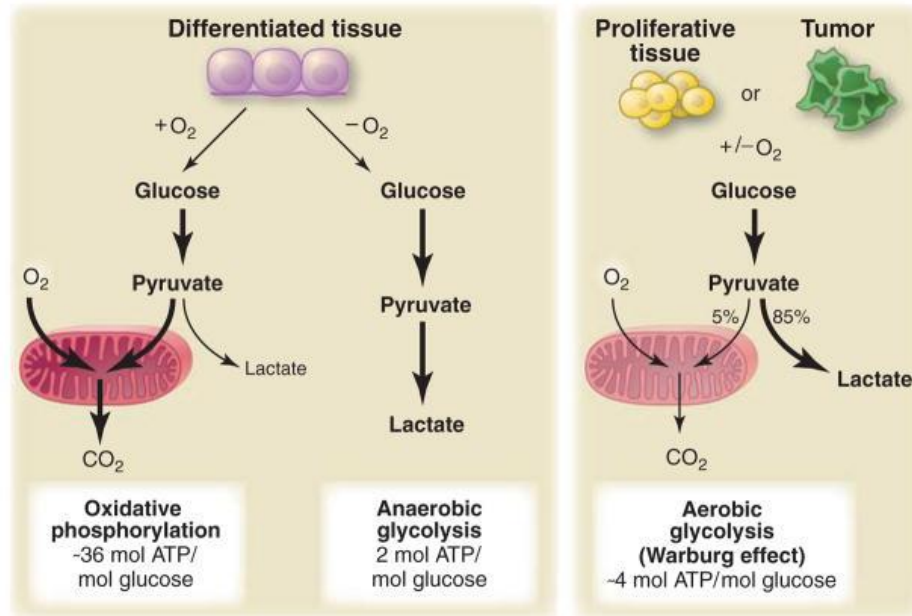


Abbildung 3: Vergleich der Stoffwechsel von gesunden Zellen (links) und Tumoren (rechts).^[18]

Nach ihm ist auch der Warburg Effekt benannt, welcher die auch bei ausreichender Sauerstoffversorgung durch Krebszellen präferierte anaerobe Glykolyse (Abbildung 3) beschreibt.^[16] Diese ist durch eine Umstellung des Stoffwechsels hervorgerufen. Aus dem erhöhten Glucosebedarf und der erhöhten Glucoseverstoffwechslung, resultieren eine vermehrte Erzeugung von Protonen sowie die Bildung von Laktat ^[20], die zur Ansäuerung des umliegenden Gewebes führt. Dieses begünstigt das Wachstum des Tumors, indem es die Apoptose von umliegenden Zellen begünstigt, aber die Tumorzellen dagegen weitgehend immunisiert.^[20] Dies schafft Raum für den Tumor, wodurch es ihm ermöglicht wird, weiter zu wachsen. Zudem liefern das Laktat aus der anaeroben Glykolyse und andere Zwischenprodukte wichtige Synthesebausteine zur Synthese von Nukleotiden, Aminosäuren und Lipiden.^[15,19,21] Diese sind für die Tumore wichtig, da sie ein erhöhtes Wachstum aufzeigen und eine Synthese dieser Bestandteile essenziell ist. Weiterhin wirkt Laktat immunsuppressiv und sorgt für die Bildung neuer Blutgefäße.^[22] Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine erhöhte Laktatkonzentration die Aussichten einer Strahlenbehandlung verschlechtern könnte.^[22] Der Grund hierfür ist, dass es als Radikalfänger für ROS dienen kann. Zwar können sie nur schlecht ROS auffangen, aber liegen in hoher Konzentration im Gewebe vor, weshalb die Zahl an ROS, die bei einer Strahlenbehandlung entstehen, reduziert werden.

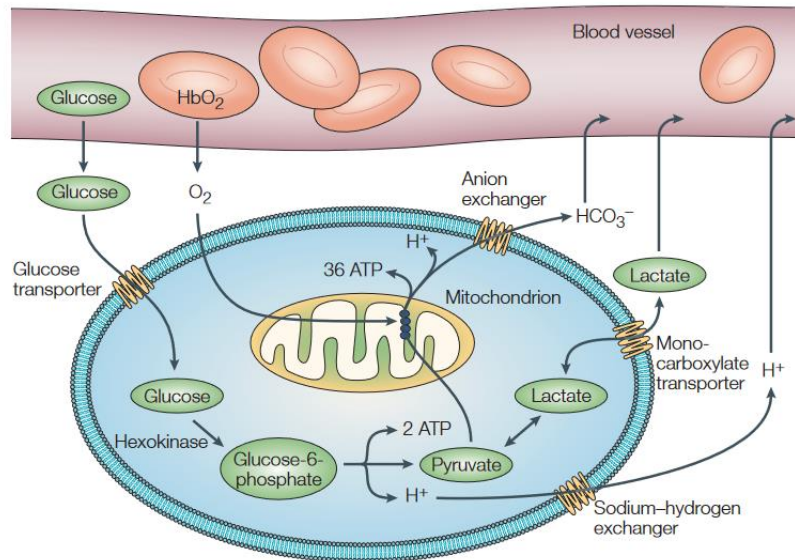


Abbildung 4: Darstellung des Glucose-Metabolismus der Tumorzelle und deren resultierenden Acidifizierung des extrazellulären Mediums.^[23]

So bewirkt die anaerobe Glykolyse eine Reduktion des pH-Werts im Cytoplasma (Abbildung 4).^[16] Na^+/H^+ -Austauscher, Carboanhydrasen und ATPasen bewirken schließlich, dass die Protonen vom intrazellulären in den extrazellulären Raum gelangen, welcher schließlich einen pH-Wert von 6,5 bis 6,8 erhält. Die Tumorazidität begünstigt schließlich die Migration des Tumors. Eine Behandlung der sauren Tumorumgebung wurde für zahlreiche Behandlungsmethoden untersucht. So hat sich gezeigt, dass eine Behandlung mit Bicarbonat den pH-Wert des Tumors erhöht.^[3]

2.2 Positronen-Emission-Tomographie

Die Positronen-Emission-Tomographie ist eine wichtige Methode zur bildlichen Darstellung in der Nuklearmedizin. Sie findet eine große Anwendung in der klinischen Onkologie, indem sie es ermöglicht, den Tumorstoffwechsel bildlich darzustellen. Hierzu werden radioaktiv-markierte und niedrig dosierte Radiotracer dem Patienten injiziert.^[24] Weitere Möglichkeiten liefert sie auch zur Diagnose im Bereich von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) und des Herz-Kreislaufs, wobei sich der Radiotracer ebenfalls in krankhaftem Gewebe anreichert. Neben der Diagnostik ermöglicht sie ebenfalls die Therapieüberwachung.^[24]

Das Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie beruht darauf, dass dem Patienten Radiotracer injiziert werden, die Positronen emittieren. Die Positronen legen eine Strecke von etwa 1 bis zwei Millimeter zurück und annihilieren mit einem Elektron aus der Umgebung von zum Beispiel Wasser. Dabei senden sie zwei γ -Quanten in einem 180° -Winkel zueinander aus, welche beide eine Energie von 511 keV besitzen. Die Reichweite der Positronen variiert je nach Isotop, da diese verschiedene Bindungsenergien haben, und Umgebung, in der sich der Tracer befindet.

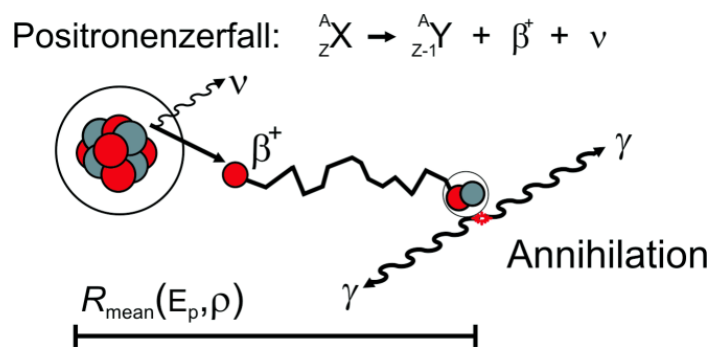


Abbildung 5: Darstellung eines β^+ -Zerfalls.^[25]

Die ausgesendeten γ -Quanten werden durch Detektoren mit Szintillatorkristallen detektiert, die ringförmig angeordnet sind und welche durch Computer zu einem Bild konstruiert werden. In dieser ringförmigen Anordnung befindet sich der Patient. Sie ermöglicht es nur dann ein Signal auszusenden, wenn koinzident im etwa 180° -Winkel zueinander zwei Positronen detektiert werden.

Die am meisten verwendeten Radioisotope in der PET sind ${}^{11}\text{C}$, ${}^{13}\text{N}$, ${}^{15}\text{O}$ und ${}^{18}\text{F}$. Sie sind deshalb von hoher Bedeutung, da sie alle Positronen Emittier sind. Geeignete Isotope müssen gute Halbwertszeiten, geeignete chemische Reaktivität und Bildgebung sowie eine geringe Strahlenbelastung für den Patienten aufweisen. Die meisten PET-Isotope werden über eine Zyklotron hergestellt. Heutzutage wird die PET häufig in Kombination mit der Computertomographie (CT) als PET/CT verwendet. Der Vorteil der PET/CT ist, dass die Vorteile der PET und CT miteinander kombiniert werden. Die PET liefert die notwendigen Information über biochemische Funktionen und die CT liefert anatomische Informationen, welche durch Röntgenstrahlen gewonnen werden. Dadurch können präzisere diagnostische Aussagen getroffen werden.^[25]

2.2.1 PET-Diagnostik durch ^{18}F -FDG

Einer bzw. der wichtigste Radiotracer der Tumordiagnostik ist das ^{18}F -FDG. Dabei handelt es sich um ein Analogon der Glucose, wobei an der zweiten Stelle die Hydroxygruppe durch ein Fluoratom ausgetauscht wurde. Das ^{18}F -FDG wird wegen des vermehrten Glucosebedarfs der Tumorzellen vermehrt über die GLUT-Transporter aufgenommen. Dadurch kann der Glucosebedarf vor, während und nach der Therapie durch die PET abgebildet werden.^[26]

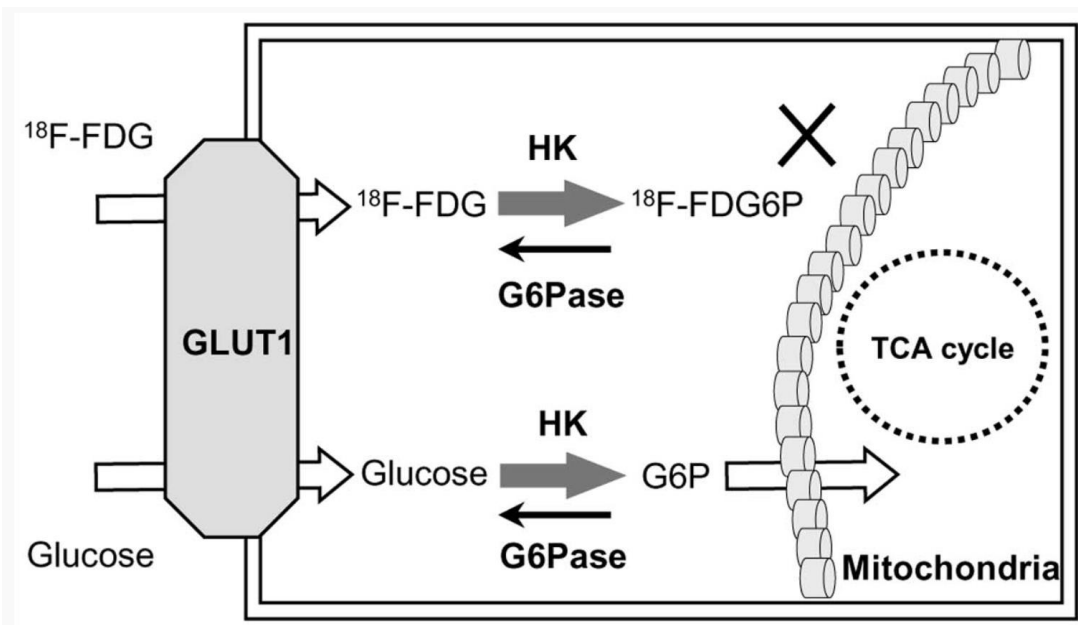


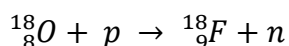
Abbildung 6: Vergleich der Aufnahme und des Stoffwechsels von ^{18}F -FDG und Glucose in der Zelle.^[27]

In der Zelle wird dann die Glucose über die Glykolyse verstoffwechselt. Das ^{18}F -FDG wird ebenfalls in der Zelle verstoffwechselt. Dabei wird es ebenfalls zunächst durch die Hexokinase zum ^{18}F -FDG-6-Phosphat oxidiert, kann aber nicht weiter in den Stoffwechselweg eingehen, da an der zweiten Position das Fluorid vorhanden ist. Dadurch ist das ^{18}F -FDG in der Zelle gefangen und reichert sich an. Nachteilig ist, dass neben den Tumoren auch andere Körperorgane wie Herz und Gehirn aber auch zum Beispiel Entzündungsherde einen hohen Glucosebedarfs haben können, weshalb sie ebenfalls ein hohes Signal in der PET aufzeigen.^[3] Die Halbwertszeit des ^{18}F -FDG, genauer des ^{18}F beträgt 110 Minuten, was vorteilhaft ist, da es zwar eine Synthese, Reinigung, Qualitätskontrolle, Injektion und Messung ermöglicht, aber nicht unnötig lange im Körper verweilt. Das Nuklid wird hergestellt, indem ^{18}O angereichertes

Wasser mit Protonen beschossen wird und dadurch das ^{18}F erzeugt wird. Das erzeugte ^{18}F wird durch nucleophile Substitution an das Molekül eingebracht. Nach Entfernung der Schutzgruppen, Aufreinigung und Formulierung, wird eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Nach Freigabe wird das synthetisierte ^{18}F -FDG intravenös verabreicht.^[28] Anschließend kann durch Detektion der γ -Strahlen das PET-Bild erhalten werden, welches durch den Arzt nach Ausprägung und Intensität sowie Lokalisation ausgewertet werden kann.

2.2.2 Synthese von ^{18}F -FDG

Es existieren zwei Möglichkeiten zur Synthese von ^{18}F -FDG. Die am häufigsten verwendete Variante ist die nukleophile Substitution. Daneben kann es aus einer elektrophilen Addition hergestellt werden. Wichtig für die Synthese von ^{18}F -FDG ist das ^{18}F . Dieses wird zuvor aus einem Zyklotron hergestellt, indem ^{18}O mit Protonen beschossen wird.



Die elektrophile Fluorierung beruht darauf, dass Fluor an eine Doppelbindung addiert wird. Als Ausgangsverbindung für die Doppelbindung dient hierzu das 3,4,6-tri-O-acetyl-D-glucal, welches mit ^{18}F -Fluor behandelt wird. Dabei entstehen zwei Produkte; die ^{18}F -Difluormannose und ^{18}F -Difluorglucose. Durch anschließende saure Aufarbeitung wird das ^{18}F -FDG erhalten. Heutzutage findet diese Art der Synthese eigentlich keine Anwendung aufgrund der schlechten Ausbeuten und des hohen Aufwandes.^[29]

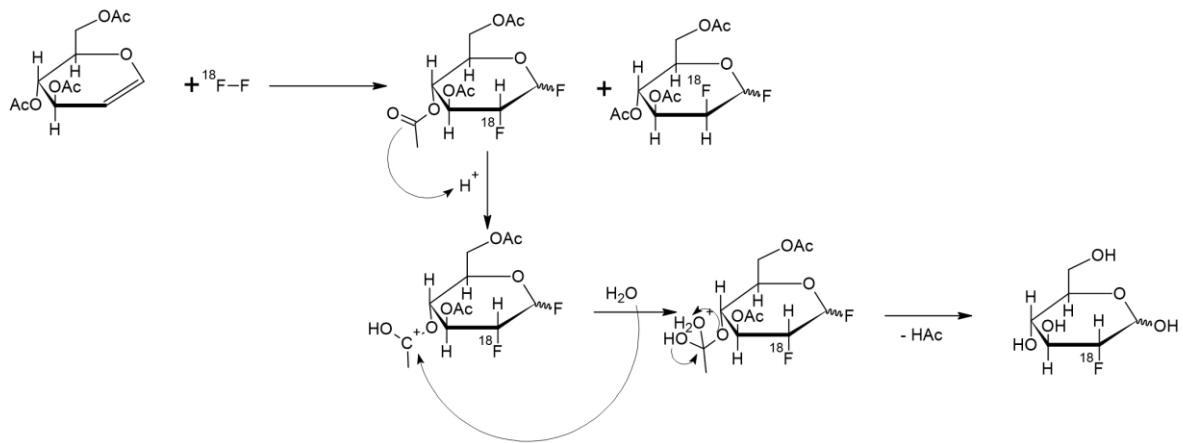


Abbildung 7: Darstellung der Synthese von ^{18}F -FDG durch elektrophile Addition.^[29]

Die weitverbreitetste Synthesemethode für ^{18}F -FDG ist die nukleophile Substitution (Abbildung 8). Dabei richtet sich die Synthese nach Hamacher aus dem Jahr 1986. Dabei dient als Ausgangssubstanz 1,3,4,6-Tetraacetylmanonosulfat. Zudem wird als Katalysator Kryptofix 222TM zugesetzt. Dadurch beträgt die Reaktionszeit etwa 50 Minuten. Das Kryptofix 222TM ist ein Kryptand und komplexiert das Kalium aus dem Wasser und erhöht die Nukleophilie des ^{18}F . Dieses greift in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion am zweiten Kohlenstoff an. Nach anschließender Abspaltung der Schutzgruppen wird das ^{18}F -FDG erhalten.^[29]

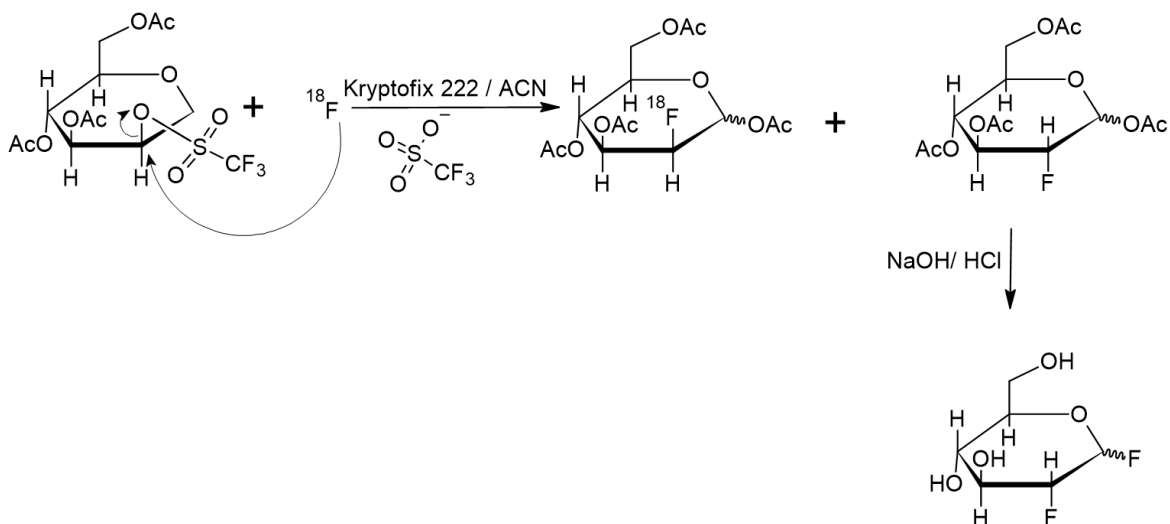


Abbildung 8: Darstellung der Synthese von ^{18}F -FDG durch nukleophile Substitution.^[29]

2.3 Glycosylamine

2.3.1 Synthese

Bei Glycosylaminen handelt es sich um eine besondere Form von Zuckern bzw. Kohlenhydraten. Dabei wurde eine Hydroxylgruppe durch ein Amin substituiert. Diese liegen auch im Organismus vor, wobei Aminosucker vorhanden sind, bei denen zum Beispiel ein Protein am Zucker gebunden ist. Die Synthese von Glycosylaminen ist eine säurekatalysierte und reversible Reaktion.^[30] Daher wird zur Substitution von Aminen an das FDG Essigsäure als Katalysator zugesetzt.^[3] Der Mechanismus ist folgend in Abbildung 9 dargestellt.

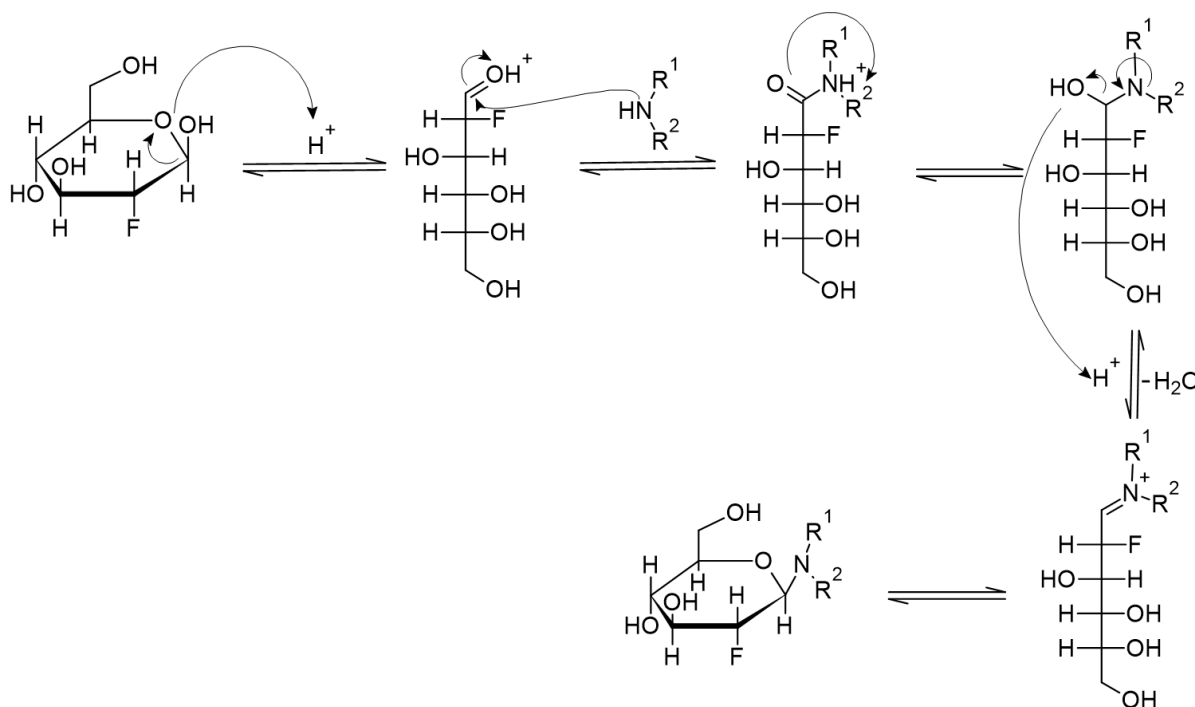


Abbildung 9: Mechanismus der Synthese von Glycosylaminen.^[30]

Zunächst wird das C5-Atom protoniert und es findet eine Ringöffnung der FDG statt. Der positiv polarisierte Kohlenstoff wird im folgenden Schritt nukleophil vom Amin angegriffen. Es folgt nun die Protonierung der Hydroxylgruppe und die Abspaltung von Wasser. Zuletzt kommt es zur Abspaltung eines Protons und das Glycosylamin ist gebildet worden. Diese kann sich erneut zu einem Ring formen. Unter stark sauren Bedingungen findet keine Bildung von Glycosylaminen statt, da sich stattdessen die Ammoniumsalze bilden.^[30] Die Reaktion ist stark pH-Wert und von der Basizität des

Amins abhängig.^[30] Das Hauptprodukt der Glycosylamine ist die β -Form. Der Grund hierbei resultiert aus der Ringstruktur, da alle Reste in äquatorialer Position vorliegen.^[30]

Der Vorteil von FDG gegenüber Glucose ist, dass es keine Amadori-Umlagerung eingehen kann. Diese ist typisch für Glycosylamine. Sie ist in der Abbildung 10 dargestellt.

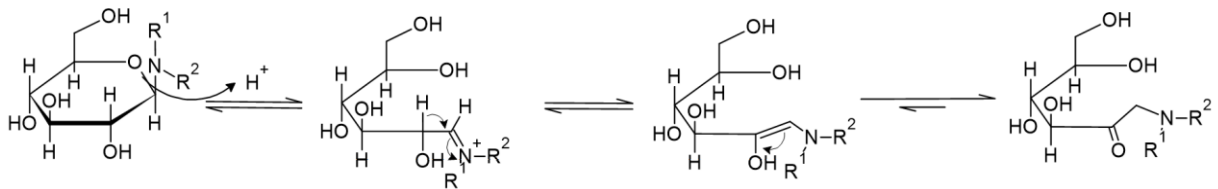


Abbildung 10: Darstellung der Amadori-Umlagerung.^[30]

Durch die saure Katalyse kann der Stickstoff protoniert werden. Es kommt zu einer Bildung eines Enols. Daraus formt sich die stabile Carbonylgruppe.^[30] Da im FDG an dem C2-Atom keine Hydroxylgruppe vorliegt, ist dementsprechend keine Umlagerung zum Keton möglich.^[3]

2.3.2 Hydrolyse

Die saure Hydrolyse ist in Abbildung 11 dargestellt.

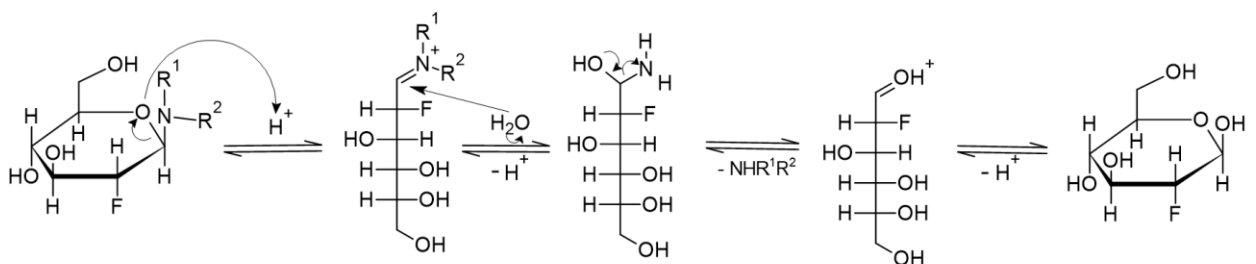


Abbildung 11: Darstellung des Mechanismus zur sauren hydrolytischen Spaltung von Glycosylaminen.^[30]

Dabei wird zunächst das C5-Atom protoniert. Es kommt zur Öffnung des Rings des FDGs. Anschließend wird an das C1-Atom ein Molekül Wasser addiert. Es wird ein Proton abgespalten. Danach wird das Amin abgespalten, nachdem es ebenfalls

protoniert wurde. Schließlich kann sich das FDG als Ring bilden. ^[29] Die Stärke der Hydrolyse ist stark vom pH-Wert des Mediums und vom pKs-Wert des Amins abhängig. Die bestmögliche Hydrolyse liegt vor, wenn der pH dem pKs-Wert des Amins entspricht.^[3] So hat sich gezeigt, dass im noch stärkeren Medium die Hydrolyse wieder abnimmt.^[30]

3 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Synthese des literaturbekannten N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin aus ^{18}F -FDG und ^{19}F -FDG und 4-Phenylbenzylamin. Zudem soll eine Methode entwickelt werden, um das radioaktive Glycosylamin zu erzeugen. Diese Methode dient dazu, um für spätere Synthesen weitere radioaktivmarkierte Glycosylamine basierend auf ^{18}F -FDG zu erzeugen. Auch soll die Stabilität der literaturbekannten Substanz bei einem pH-Wert von 6,5 bei 37°C und einer Inkubationszeit von einer Stunde analysiert werden. Weiterhin soll die gleiche Methode auf andere Amine angewendet werden. Hierzu sollen sekundäre Amine zunächst mit ^{19}F -FDG verknüpft werden und diese Glycosylamine isoliert werden. Zudem soll in dieser Arbeit das Verhalten von ^{19}F -FDG in saurem pH für die Reaktionen untersucht werden, damit die Reaktion eventuell besser verstanden werden kann.

4 Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel der Arbeit waren die Synthese der literaturbekannten nichtradioaktiven sowie radioaktiven Substanz bestehend aus 4-Phenylbenzylamin und FDG. Die Stabilität bei einem pH-Wert von 6,5 sollte, wie in der Literatur beschrieben, untersucht werden. Aufbauend darauf soll das Reaktionsverhalten von ^{19}F -FDG mit sekundären Aminen, wie dem zuvor synthetisierten N-Propiolylpiperazin, untersucht, sowie das generelle Verhalten von ^{19}F -FDG unter den aziden Bedingungen, die während der Reaktion vorliegen. Die durchgeführten Reaktionen sind in Abbildung 12 dargestellt.

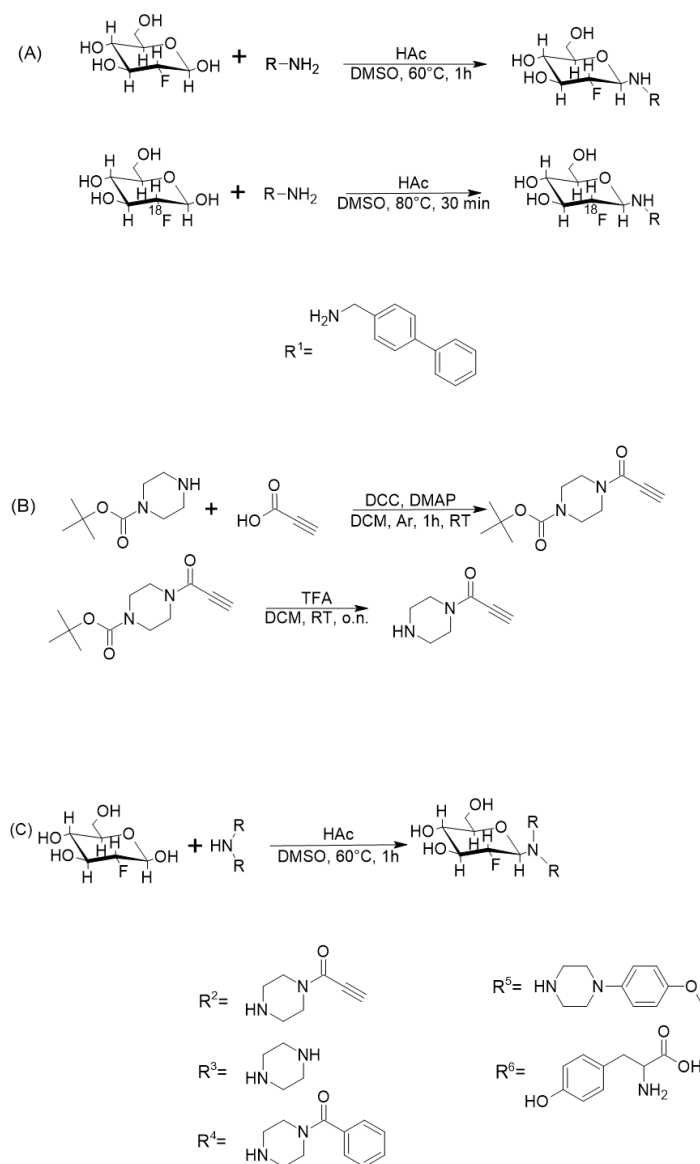
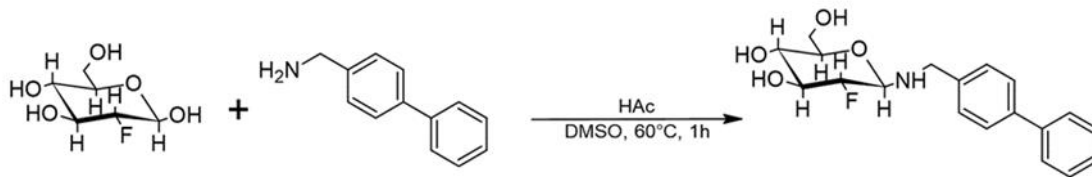


Abbildung 12: Darstellung der durchgeführten Synthesen.

4.1 Synthese von ¹⁹F-N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin



Die Synthese von N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin wurde bei 60°C für eine Stunde in DMSO in 0,25 M Essigsäure durchgeführt. Die Aufreinigung fand durch eine RP-HPLC statt, dessen Chromatogramme in Abbildung 13 dargestellt.

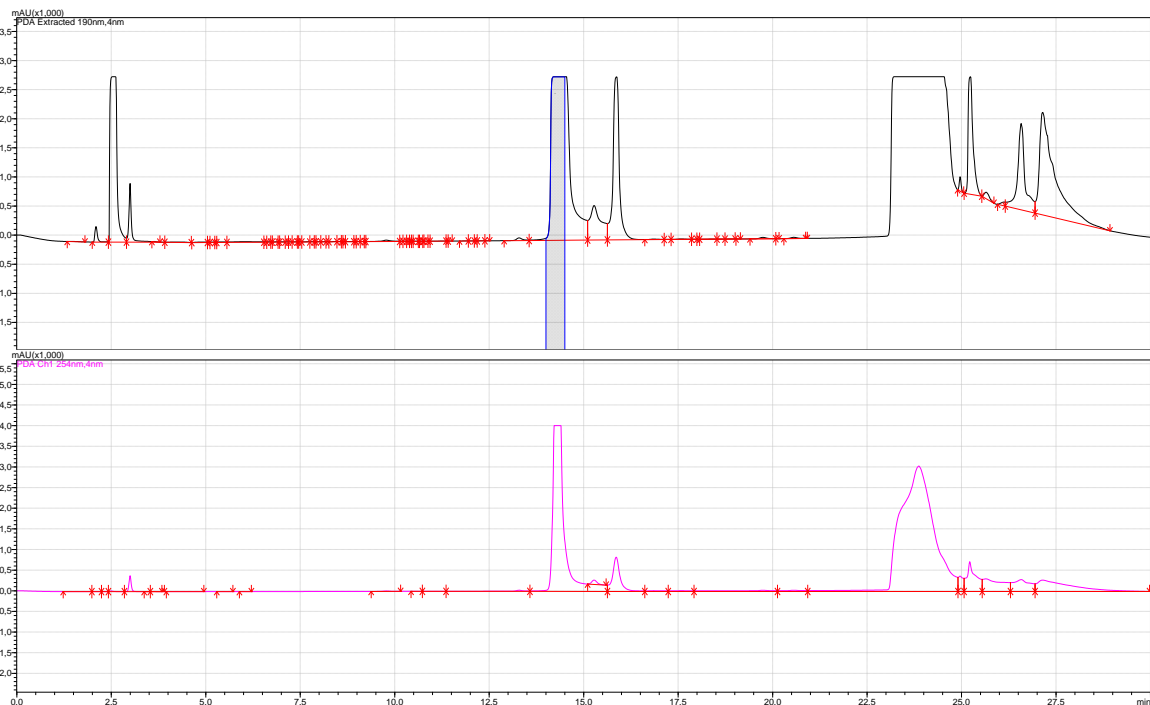


Abbildung 13: Darstellung der HPLC-Chromatogramm der Reaktion zur Synthese von ¹⁹F-N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamins (Absorption oben bei 154 nm; unten bei 254 nm). Die blau markierte Region stellt den Bereich dar, indem das Produkt aufgefangen wurde. Im

Die Chromatogramme zeigten dabei die erwartete Aufteilung. Zunächst eluierte bei etwa drei Minuten das ¹⁹F-FDG, gefolgt vom Produkt bei etwa 14 Minuten und zuletzt folgte ab etwa 22 Minuten das Amin. Die Ausbeute betrug dabei 1,31 mg. Mit einer Ausbeute von nur etwa 13% betrug diese nur ein Drittel von der Ausbeute der Literatur von 42%.^[3] Ein Grund für die niedrige Ausbeute kann durch die Essigsäure verursacht

sein, die zunächst als Katalysator für die Reaktion wichtig ist. Die Essigsäure katalysiert die Reaktion startet, indem der Zucker protoniert wird. Jedoch leitet die Essigsäure auch die sauer katalysierte Hydrolyse des Produktes ein, indem es ebenfalls das Glycosylamin protoniert. Eine Möglichkeit, um die Hydrolyse des Produktes zu verhindern, kann das Quenchen der Reaktionsmischung mit einem Ammoniumhydrogencarbonatpuffer sein, da Glycosylamine im basischen stabil sind.^[29] Ein weiterer Faktor zur Verbesserung der Ausbeute kann das Entfernen von Wasser gewährleisten. Denn Wasser ist unter aziden Bedingungen für die Hydrolyse wichtig. Ebenfalls könnte vermutlich eine Erhöhung der Temperatur die Ausbeute erhöhen. Wie in der Literatur zu sehen, haben die Reaktionen der radioaktiven Substanzen eine verbesserte Ausbeute, indem die Reaktion anstelle von nur einer Stunde bei 60°C bei 80°C für 30 Minuten durchgeführt wurde.^[3]

Die Synthese des nicht radioaktiven Glycosylamins ist für die nachfolgende Synthese des radioaktiven Glycosylamins notwendig, da sie als Referenzsubstanz dient, um die Retentionszeit der Verbindung mit der radioaktiven Verbindung zu vergleichen. Dadurch kann sichergestellt werden, dass das gewünschte radioaktive Produkt isoliert werden konnte. Eine genauere Identifikation mit den üblichen analytischen Methoden (NMR, ESI-MS, etc.) ist nicht möglich, da das radioaktive Produkt nur im nanomolaren Konzentrationen vorliegt. Zudem beträgt die Halbwertszeit von ^{18}F ca. 110 Minuten und eine eingehende Untersuchung ist aus Strahlenschutzgründen nicht wünschenswert. Nachfolgend ist das ESI-MS-Spektrum des nicht-radioaktiven Glycosylamins in Abbildung 14 dargestellt.

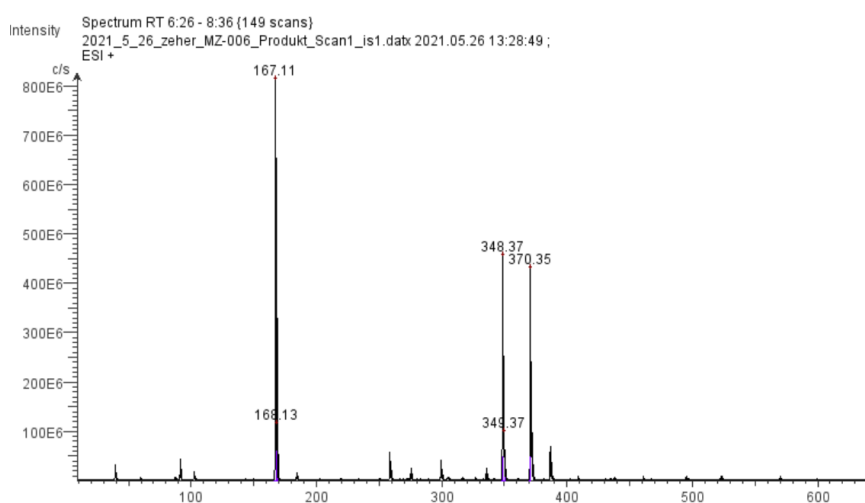
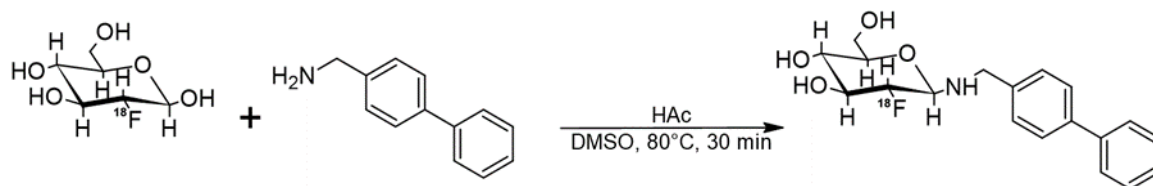


Abbildung 14: Darstellung des ESI-MS-Spektrum von ^{19}F -N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin.

Dabei sind die Fragmente von ^{19}F -N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin bei einer m/z von 348,37 mit einem Proton addiert, sowie mit Natrium bei einer m/z von 370,35 zu sehen.

4.2 Synthese von ^{18}F -N-(2-Deoxy-2-fluoro-18-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin



Die Synthese von ^{18}F -N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin wurde anhand der Literatur durchgeführt.^[3] Dazu wurde zunächst das ^{18}F -FDG zunächst getrocknet und dann mit dem 4-Phenylbenzylamin in DMSO und 0,25 M Essigsäure bei 80°C für 30 Minuten reagieren lassen. Anschließend wurde die Lösung direkt auf die RP-HPLC isokartisch bei einem Verhältnis von 35% ACN aufgetragen. Die Retentionszeit betrug 9 Minuten. Nach anschließendem Vergleich des HPLC-Spektrums mit der zuvor synthetisierten nichtradioaktiven Referenzverbindung konnte die Synthese des Produkts bestätigt werden (vgl. Abbildung 15).

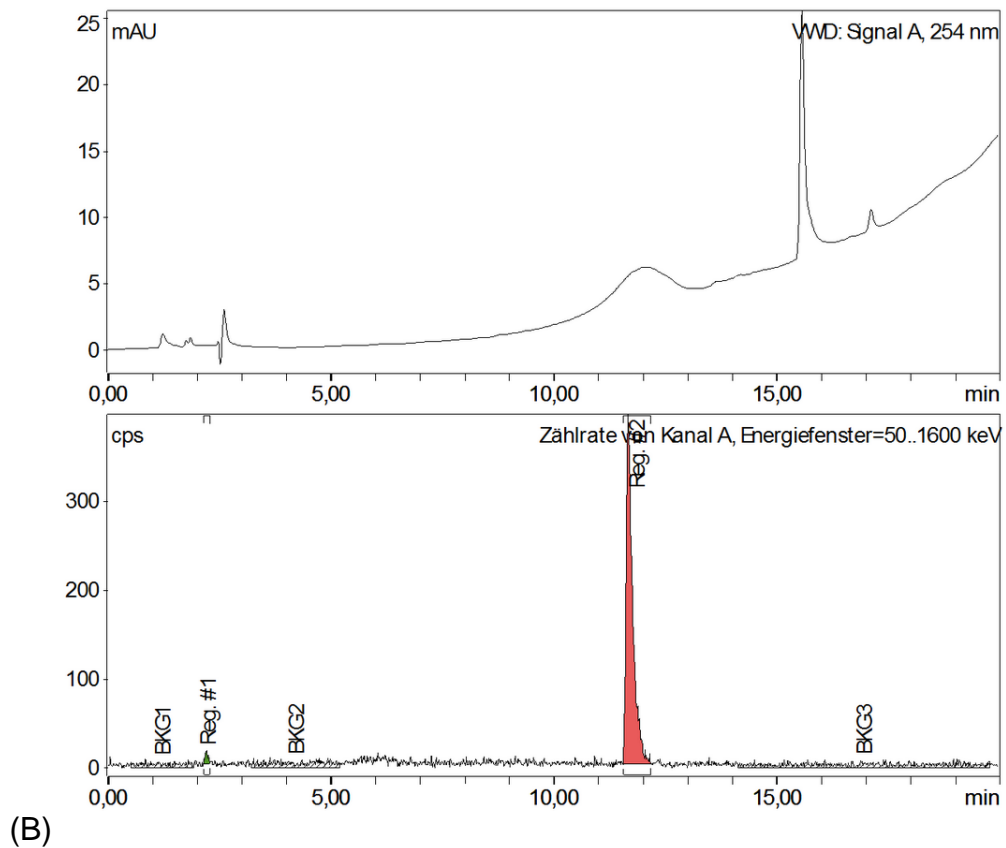
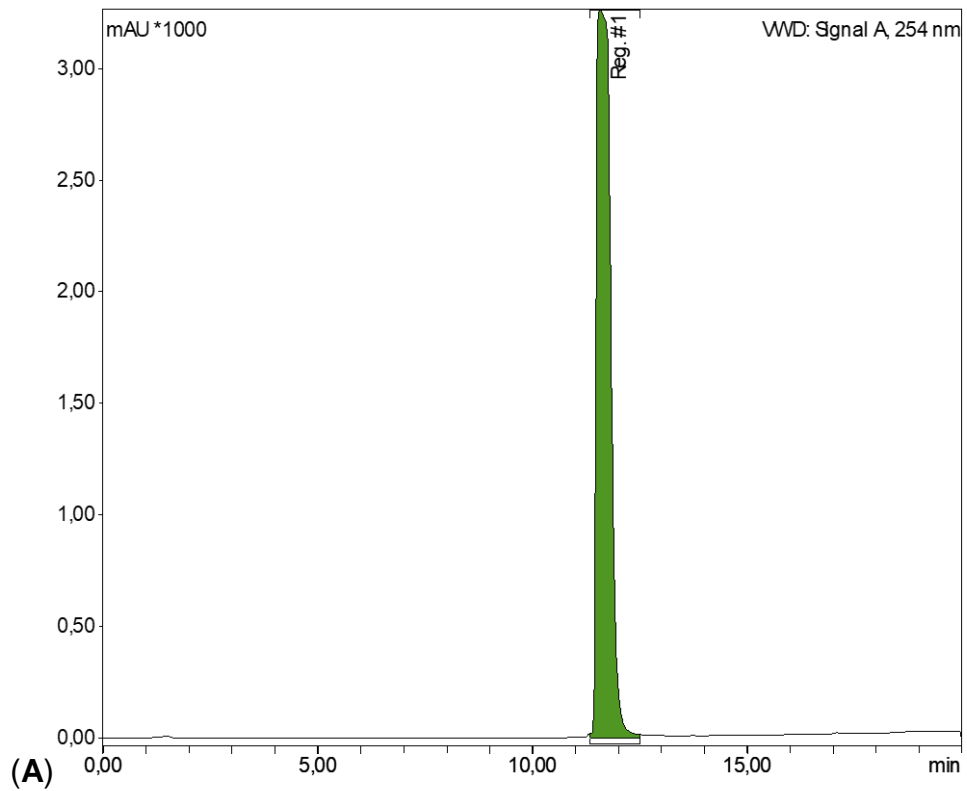


Abbildung 15: (A) Darstellung des UV-Chromatogramms der nicht-radioaktiven Referenzverbindung. Die Retentionszeit beträgt 11,58 Minuten. (B) Darstellung des UV-Chromatogramms der nicht-radioaktiven Referenzverbindung (oben) und des radioaktiven Chromatogramms (unten) des der radioaktiven Verbindung ^{18}F -N-(2-Deoxy-2-fluoro-18-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin.. Die Retentionszeit beträgt 11,62 Minuten..

Bei einer Retentionszeit von etwa 16 Minuten ist ein Signal von 4-Phenylbenzylamin zu sehen. Dieses konnte demnach bei der Aufreinigung der RP-HPLC nicht vollständig abgetrennt werden. Der Grund hierfür könnte sein, dass bedingt durch das Synthesemodul nicht ein Gradient, sondern eine isokratische Aufreinigungsmethode verwendet wurde. Trotzdem wurde die Bildung des Glycosylamins zweifelsohne aufgezeigt. Die radiochemische Ausbeute betrug im Schnitt bei einer Durchführung von zwei Syntheseläufen 43% (Synthese 1 = 44%; Synthese 2 = 42%). In der Literatur ist eine optimierte radiochemische Ausbeute von 74% beschrieben.^[3] Ein möglicher Grund für die verminderte Ausbeute ist die etwas höher verwendete Konzentration an Essigsäure, sowie die Verwendung von nicht wasserfreiem DMSO. Beides könnte eine Hydrolyse des Produktes und damit die Rückreaktion begünstigt haben. Ebenfalls ist zu erwähnen, dass die Reaktionszeit etwa 90 Minuten benötigt (von Einleiten des ^{18}F -FDG bis zur Retention des Glycosylamins). Dies war ähnlich vergleichbar mit der angegebenen Versuchszeit von 91,6 Minuten in der Literatur.^[3] Um eine verbesserte Anwendung für eventuelle spätere klinische Verwendungen zu haben, ist eine Verkürzung der Synthesezeit vorteilhaft. Dadurch müsste nicht mit größeren Aktivitäten gearbeitet werden, um geeignete Ausbeuten zu erhalten. Denn das verwendete Radioisotop ^{18}F besitzt eine Halbwertszeit von etwa 110 Minuten. Durch die Synthesezeit würde schon 75% einer Halbwertszeit benötigt werden, um den Radiotracer zu synthetisieren. Bei radiopharmazeutischen Synthesen im klinischen Gebrauch schließt sich nach der Synthese noch eine Qualitätskontrolle an. Diese ist wichtig, um sicherzustellen, dass dem Patienten die Substanz in gewünschter Reinheit zugegeben werden kann. Dies würde die Zeit von der Synthese bis zur Anwendung nochmals verlängern, wodurch mindestens eine Halbwertszeit des ^{18}F benötigt wird, bis das Produkt schließlich zur Anwendung bereitstünde. Daher wäre eine Verkürzung der Synthesezeit vorteilhaft, ist aber keine Grundvoraussetzung für die klinische Translation.

4.3 Stabilitätstest von ^{18}F -N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin bei pH 6,5

Zur Untersuchung der Stabilität von ^{18}F -N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin gegenüber saurer Hydrolyse, wurde ^{18}F -N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin nach der Aufreinigung über die RP-HPLC direkt verwendet. Davon wurden 200 μL entnommen und mit 1,8 mL des 0,2 M Natriumphosphatpuffers mit einem pH-Wert von 6,5 für eine Stunde bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50 μL davon auf eine analytische RP-HPLC aufgetragen. In Abbildung 16 ist das entsprechende Spektrum zu sehen.

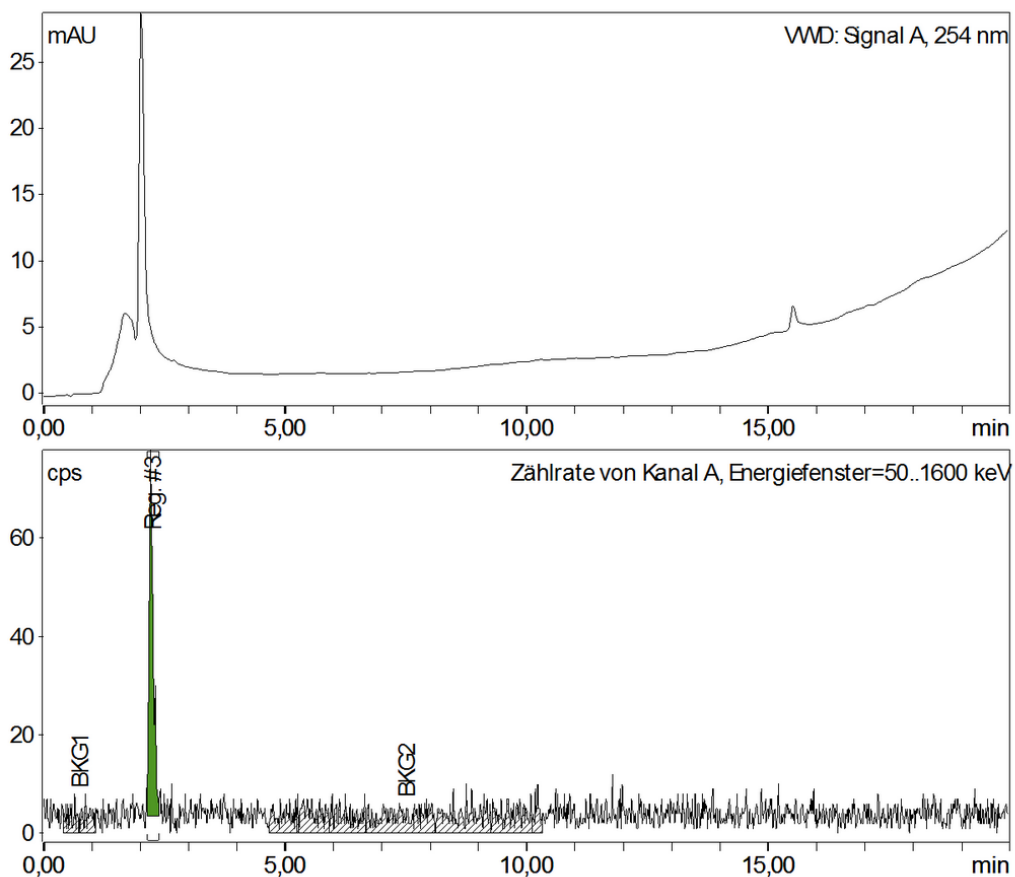


Abbildung 16: Darstellung der HPLC-Chromatogramme für den Stabilitätstest von ^{18}F -N-(2-Deoxy-2-fluoro-18-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin bei pH 6,5 nach einer Stunde.

Es ist zu erkennen, dass der Peak des Glycosylamins bei der Retentionszeit von 11,62 Minuten vollständig verschwunden ist. Dafür ist ein Peak bei einer Retentionszeit von 2,23 Minuten zu beobachten. Dieser entspricht dem ^{18}F -FDG. Dementsprechend wurde das gesamte Glycosylamin nach einer Inkubationszeit von

einer Stunde bei 37°C hydrolysiert. Es ist zu erwähnen, dass aufgrund der Verzögerungen des Chemikalien-Transports die Messung nicht unmittelbar nach einer Stunde stattgefunden hat. Das Ergebnis stimmt mit der Literatur überein.^[3] Dies bedeutet dementsprechend, dass die gesamte Menge an Glycosylamin bei einem sauren Tumor-pH-Wert von 6,5 nach einer Stunde vollständig hydrolysiert vorliegen würden und dadurch das ¹⁸F-FDG in die Tumorzellen aufgenommen werden könnte. Dadurch kann eine verbesserte Bildgebung gewährleistet werden. Dies würde den Kontrast mit dem Hintergrund erhöhen, was diagnostische Vorteile liefern kann.

4.4 Untersuchung der Reaktion mit sekundären Aminen

Die literaturbekannte Reaktion und dessen Vorschrift^[3] wurde im Folgenden für sekundäre Amine verwendet, welche später dazu dienen können, um zum Beispiel Proteine für therapeutische Interventionen bei Tumoren zu verwenden. Diese sind in Abbildung 17 dargestellt.

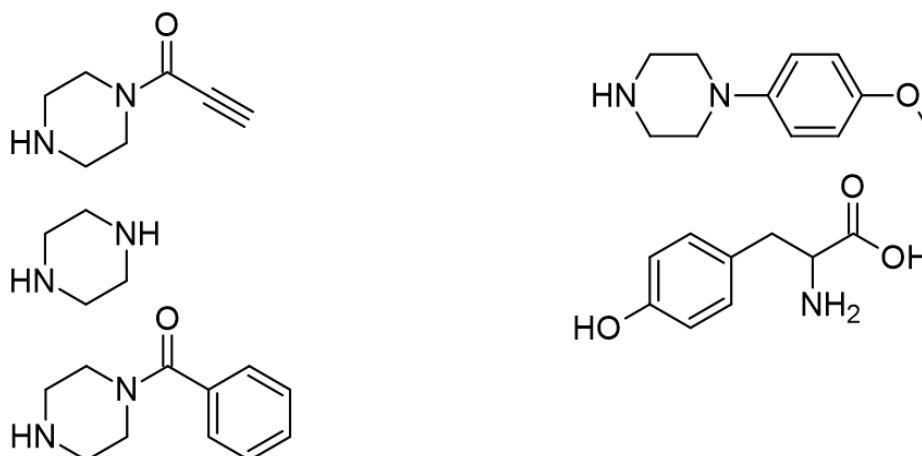
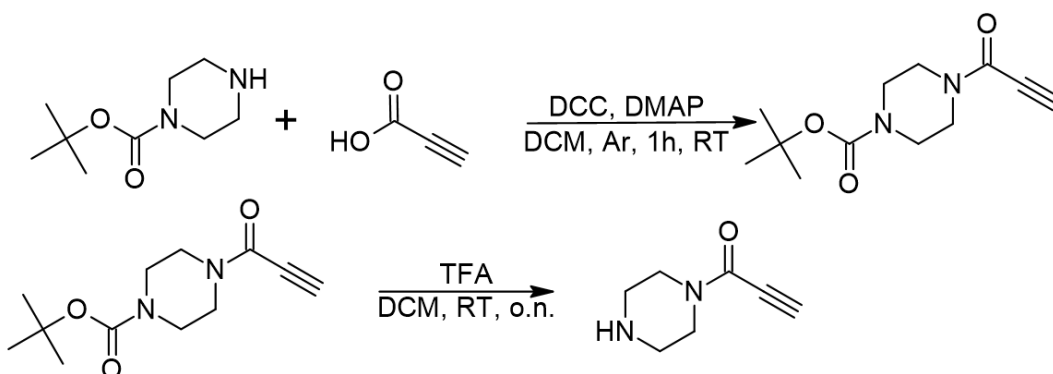


Abbildung 17: Abbildung der verwendeten Amine für das Reaktions-Screening.

Besonders interessant ist dabei das N-Propiolylpiperazin. Durch dessen Dreifachbindung ist eine weitere Funktionalisierung oder weitere Reaktionen möglich. Durch eine Cycloaddition könnten sich zum Beispiel weitere Moleküle oder auch Proteine koppeln lassen.

Das verwendete N-Propiolylpiperazin wurde zunächst in einer zweistufigen Synthese erzeugt.^[31,32]



Der Mechanismus ist in der Abbildung 18 dargestellt.

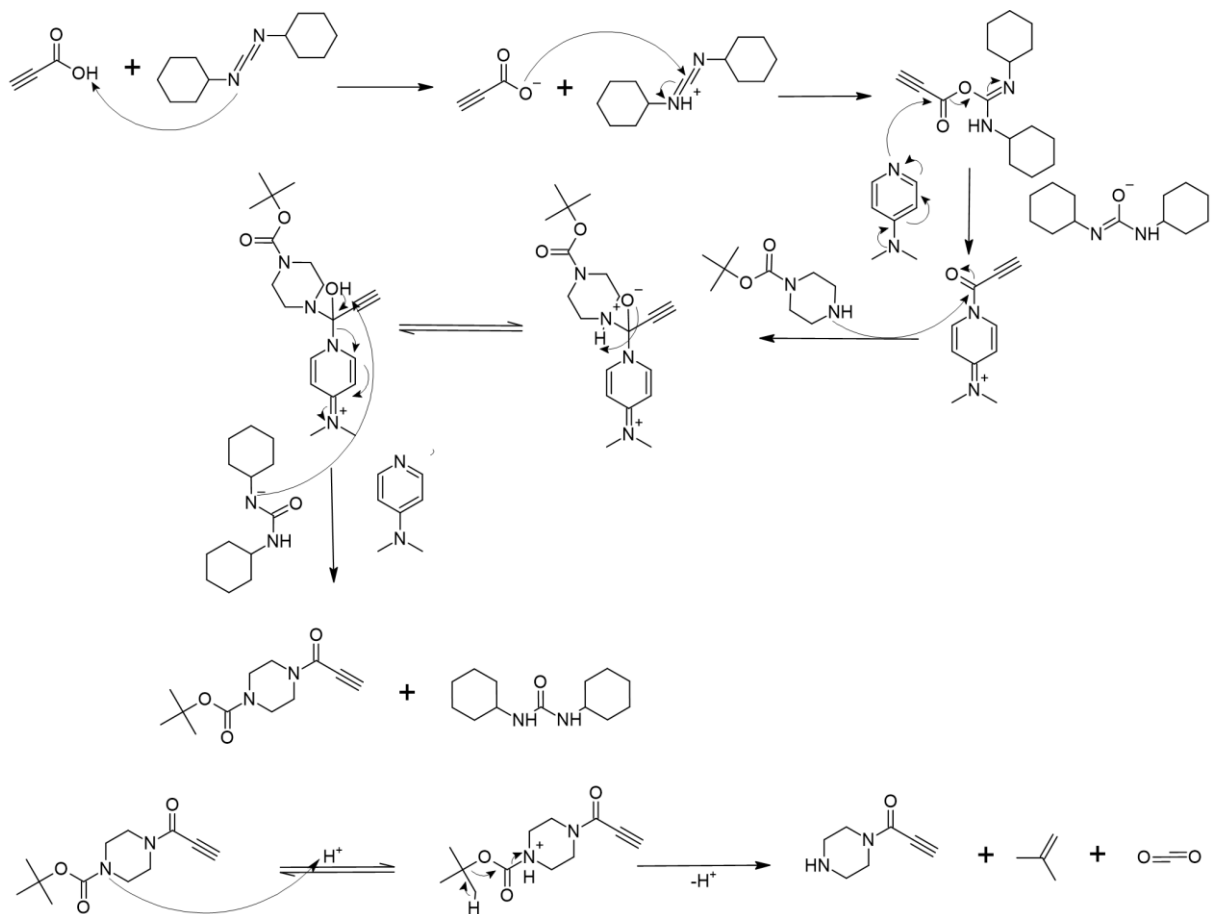


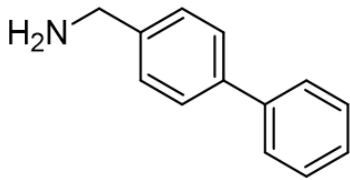
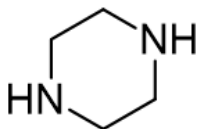
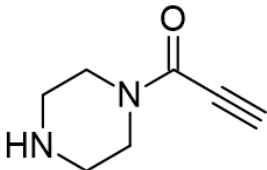
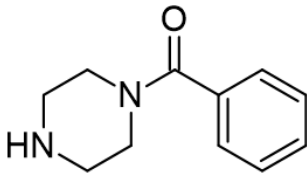
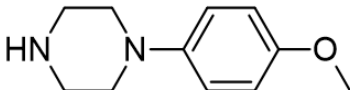
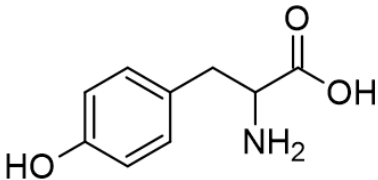
Abbildung 18: Darstellung des Reaktionsmechanismus zur Synthese von N-Propionylpiperazin.

Für die erste Stufe der Synthese dient der sogenannte Steglich-Mechanismus. Das Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) dient dazu, um die Carbonsäure zu addieren, indem es zunächst von der Propionsäure addiert wird. Dadurch kommt es zu einer Beschleunigung der Reaktion. Durch Verwendung von 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) werden die Ausbeuten erhöht, da hierbei durch Substitution das reaktive Carbonsäureamid gebildet wird. Dieses kann nun im nächsten Schritt mit dem Boc-Piperazin reagieren. Zuletzt wird die Bindung zum DMAP gespalten und es bildet sich das DMAP zurück und aus dem DCC bildet sich Dicyclohexylharnstoff (DCU). Im zweiten Schritt der Synthese wird die Boc-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure (TFA) gespalten. Dabei wird zunächst die Schutzgruppe durch die TFA protoniert. Anschließend kommt es zum Freisetzen von Kohlenstoffdioxid und Isobuten. Die Verwendung des Boc-geschützten Piperazins ist für die Reaktion notwendig, da sonst ein Gemisch aus einfach und doppelt substituierten Carbonsäureamiden erhalten wird. Mit einer Ausbeute von nur 16% ist die Ausbeute deutlich geringer als die der Literatur mit 82%. Eventuell hätte die Reaktionszeit, trotz der über die

Dünnschichtchromatographie (DC) fast entfernten Produktspots, nochmals verlängert werden können. Ebenfalls ist die orangene Farbe aus der Literatur^[30] nicht mehr der Farbe des Produktes übereinstimmend. Das Produkt war dementsprechend farblos. Trotzdem ist der Vergleich der Literaturspektren mit den Spektren der Reaktion übereinstimmend gewesen. Für die Entfernung der Boc-Schutzgruppe wurde sie mit TFA versetzt. Die Ausbeute hierfür war bei 100% und konnte vollständig entfernt werden. Dies ist auch durch das NMR belegt, wobei kein Peak bei 1,47 zu sehen ist (vgl. Abbildung 34 und 38).

In Tabelle 1 sind die Amine für das Reaktionsscreening der Synthese aufgelistet. Daneben ist der literaturbekannte logP-Wert, welcher von reaxys.com der jeweiligen Substanz entnommen wurde, danebengestellt. Zudem ist aufgezeigt, ob eine Bildung des Produktes über das ESI-MS festgestellt werden konnte und ob eine Trennung über die RP-HPLC festgestellt werden konnte.

Tabelle 1: Darstellung der verwendeten Amine für die Synthese von Glycosylamine. Danebengestellt sind die dazugehörigen logP-Werte und ob das Produkt im MS gesehen werden konnte und über RP-HPLC isoliert werden konnte (J = Ja; N = Nein).

| Screening | logP | Produkt im MS | RP-HPLC-Trennung |
|---|-------|---------------|------------------|
|  | 2,75 | J | J |
|  | -0,77 | J | N |
|  | -0,47 | J | N |
|  | 0,97 | J | N |
|  | 1,67 | J | N |
|  | 0,39 | N | N |

Zunächst ist die literaturbekannte Substanz dargestellt. Dort ist schon durch die Synthese und Isolierung bewiesen worden, dass die Reaktion zu Synthese der Glycosylamine stattfinden kann. Dementsprechend ist in der Tabelle ebenfalls die logP-Werte der Ausgangssubstanzen aufgelistet. Diese geben Aufschluss über die Polarität der Substanzen, wodurch festgestellt werden kann, ob dies Grund für eine eventuelle nicht mögliche Trennung des Produktes von den Edukten ist. Zunächst ist das 4-Phenylbenzylamin in der Tabelle aufgelistet ist. Wie schon in Abbildung 19 zu erkennen ist eine Trennung über die RP-HPLC möglich und es ist im Massenspektrum zu erkennen. Dementsprechend konnte es isoliert werden. Der logP-Wert des ^{19}F -FDG beträgt $-1,67$ und der des 4-Phenylbenzylamins $2,75$, wodurch die Polaritätsunterschiede groß genug sind und das Produkt sich dementsprechend gut isolieren lässt.

Folgend wurde das Piperazin untersucht. Wie in Abbildung 19 zu erkennen, ist die Bildung des Produktes bei einem m/z von $251,37$ ($[\text{M}+\text{H}^+]$) zu beobachten.

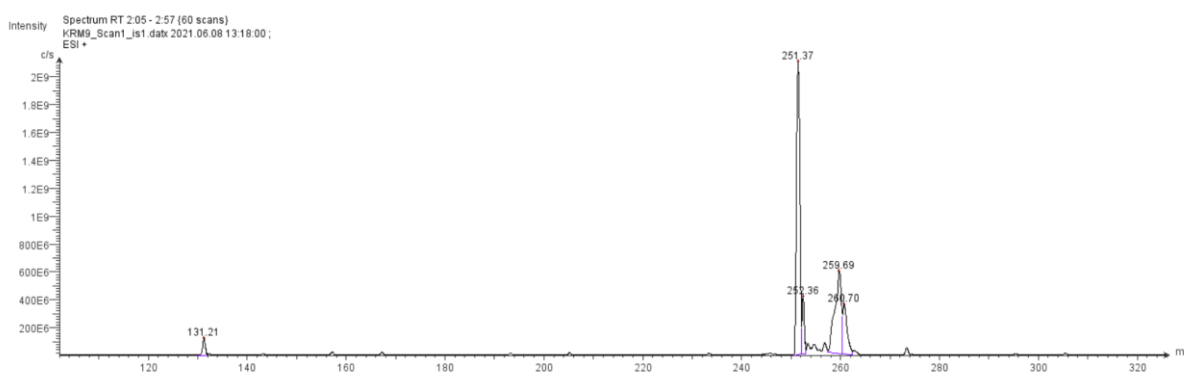


Abbildung 19: ESI-MS-Spektrum von aus der Reaktionslösung zur Synthese von N-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin.

Dementsprechend konnte nachgewiesen werden, dass die Reaktion mit sekundären Aminen stattfinden kann und funktioniert. Im zweiten Teil wurde versucht, das Produkt von den Edukten zu trennen. Hierzu wurde die RP-HPLC verwendet, dessen Chromatogramm in Abbildung 21 zu erkennen ist.

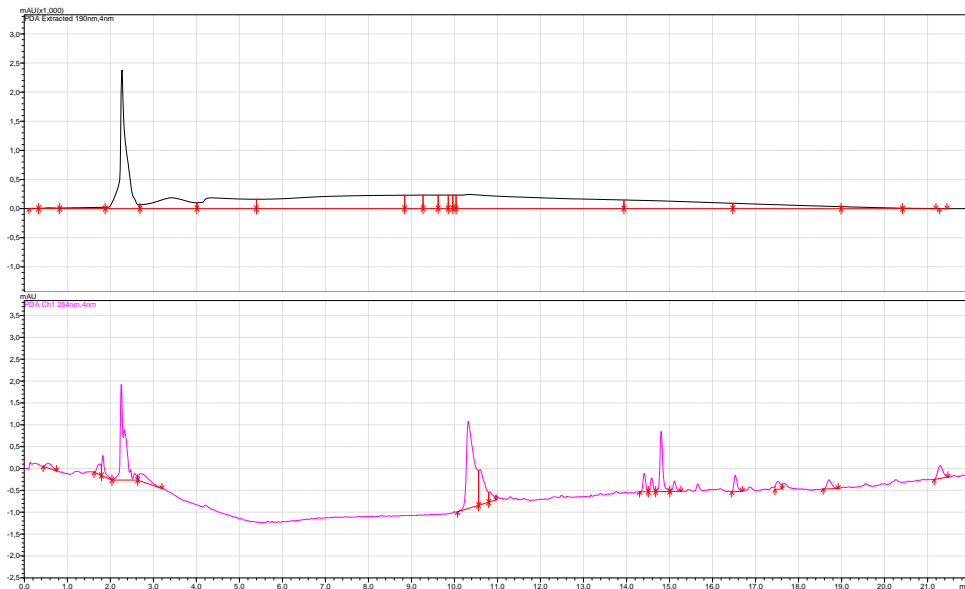


Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm von ^{19}F -FDG.

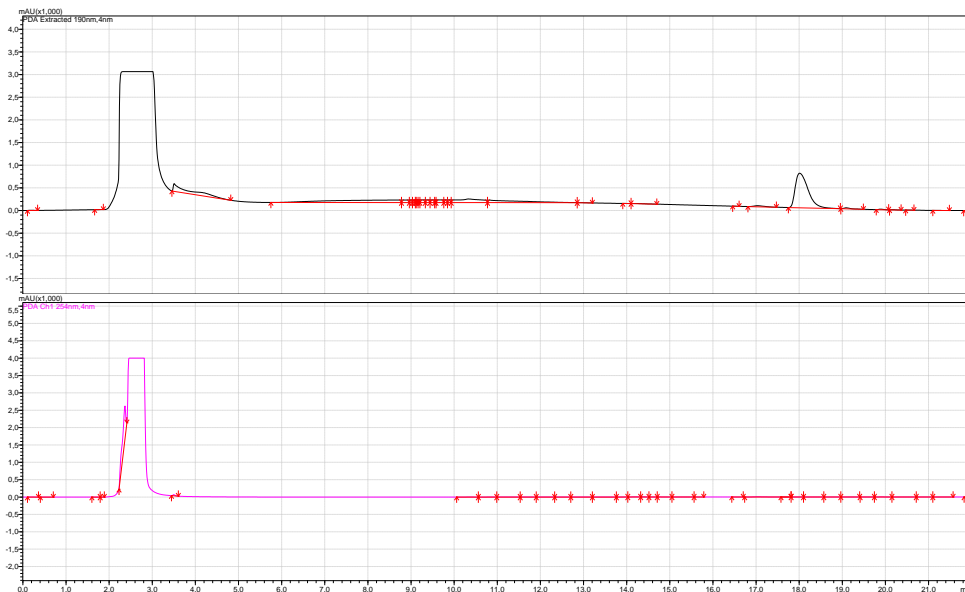


Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm zur Isolation der Synthese von N-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin

Dort sind im Vergleich mit dem Chromatogramm von ^{19}F -FDG (Abbildung 20) die Retentionszeiten zu ähnlich, weshalb sie überlagern und eine Isolation daher unmöglich machen.

Im zweiten Schritt wurde nun die Bildung eines Glycosylamins mit N-Propioly-N-Glycosylpiperazin untersucht. Im Massenspektrum (Abbildung 22) konnte zunächst

nach der Reaktion die Bildung des Produktes bei einem m/z 303,34 ($[M+H^+]$) von beobachtet werden.

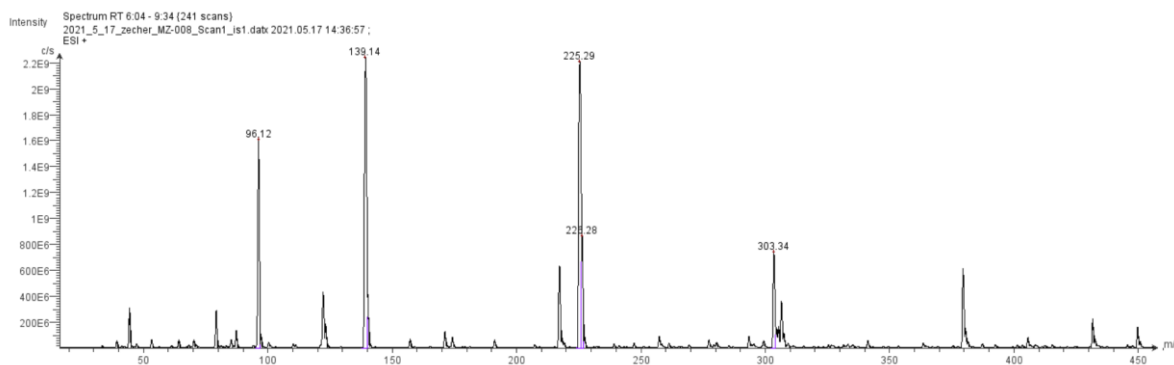


Abbildung 22: ESI-MS-Spektrum aus der Reaktionslösung zur Synthese von 1-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)- 4-Propioloyl-piperazin-1-carboxylat.

Bei der versuchten Trennung durch die RP-HPLC war es jedoch nicht möglich, das Produkt von den Edukten zu isolieren. Es wurde zwar ein Peak nach etwa 9 Minuten erhalten (vgl. Abbildung 24). Dabei handelt es sich nach anschließender Analyse nur um das Startmaterial. Zudem wurde beobachtet, dass eine Verschiebung der Retentionszeiten im Vergleich zum Chromatogramm von N-Propiolylpiperazin in Abbildung 23 zu beobachten waren. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die

Protonierung des sekundären Amins, weshalb sich die Retentionszeiten verschieben.
Eine Isolation des Produktes war hingegen nicht möglich.

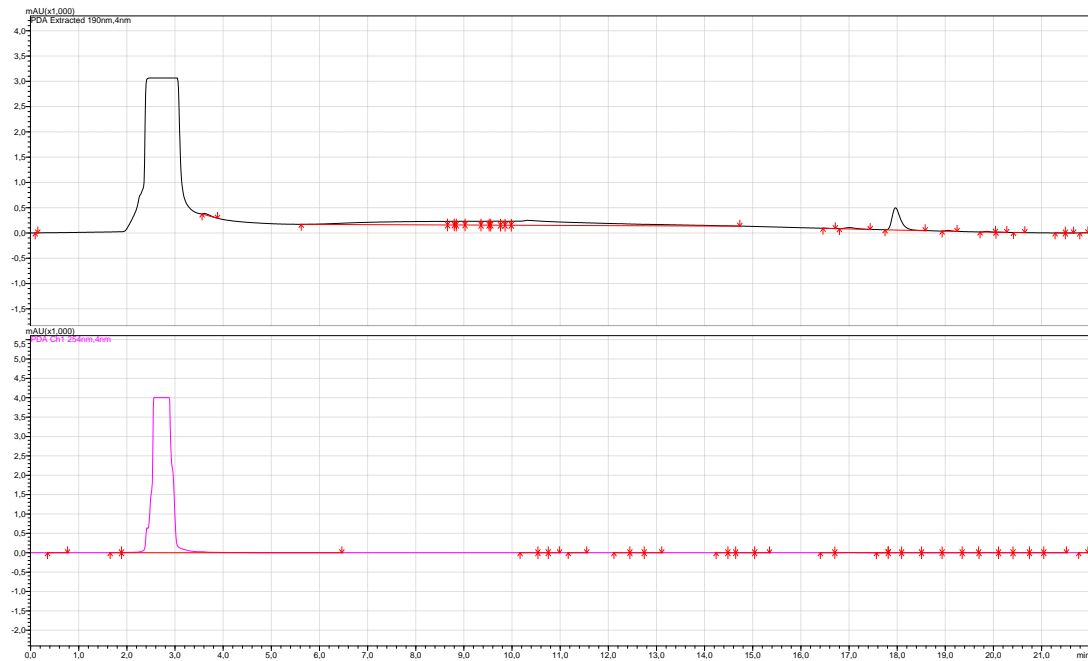


Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm von N-Propiolylpiperazin.

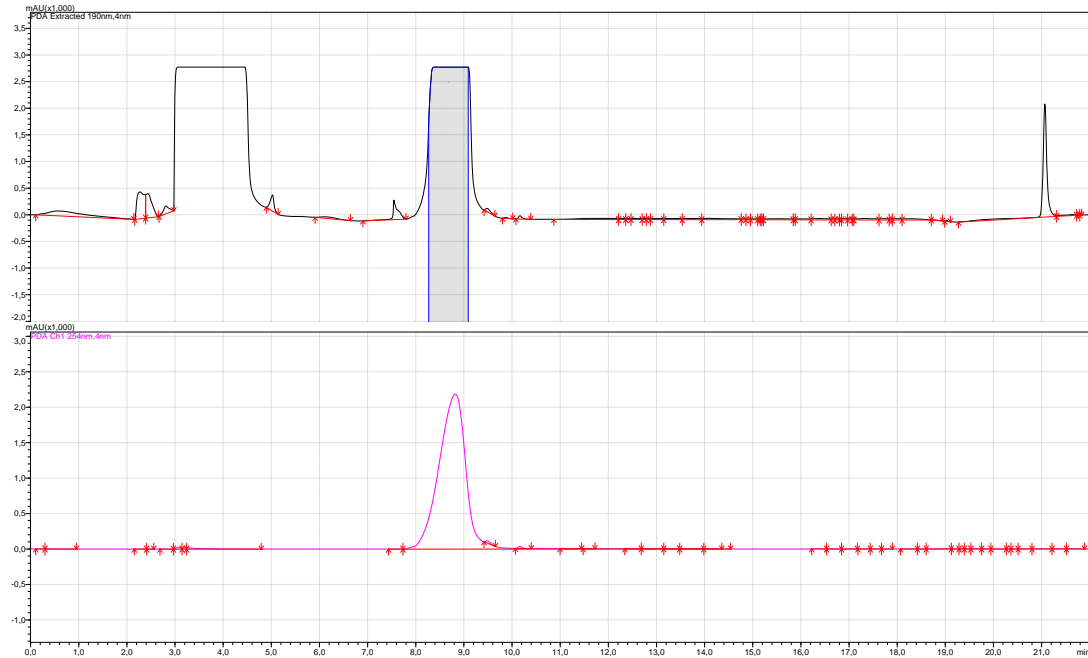


Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm zur Isolation von 1-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)- 4-Propiolylpiperazin-1-carboxylat.

Eine Möglichkeit der Erklärung, warum die Beobachtung keiner weiteren Peaks trotz Beobachtung der Produktbildung möglich ist, können die logP-Werte liefern. Der logP-Wert von 4-Propiolylpiperazin beträgt -0,47, der logP-Wert von ^{19}F -FDG beträgt -1,67. Das Produkt müsste dementsprechend einen logP-Wert zwischen den beiden Werten besitzen. Da sich die Polaritäten beider Substanzen nicht wesentlich unterscheiden, kann es sein, dass diese beide bzw. alle drei mit dem Produkt in dem einen Peak vorliegen. Dadurch würde erklärt werden, warum keine Isolierung möglich ist.

Nach dieser Erkenntnis wurde die Reaktion mit N-Benzoylpiperazin, einer etwas unpolaren Substanz durchgeführt. Bei dieser hatte nach dem ESI-MS-Spektrum (Abbildung 25) ebenfalls eine Bildung des Glycosylamins stattgefunden, da das m/z von 355,57 ($[\text{M}+\text{H}^+]$) gefunden werden konnte.

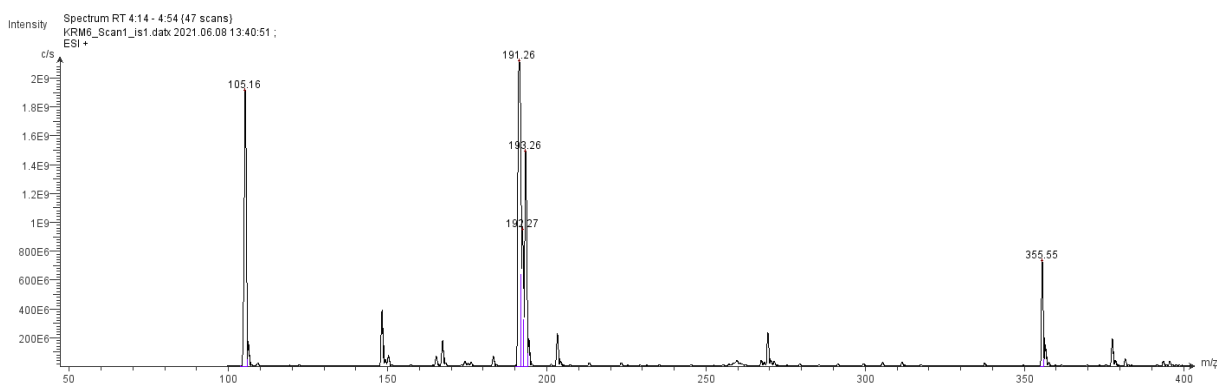


Abbildung 25: ESI-MS-Spektrum aus der Reaktionslösung der Synthese von N,N'-Benzoyl-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin.

Danach wurde mit der Bestätigung des Stattfindens der Reaktion die RP-HPLC-Analyse durchgeführt. Das HPLC-Spektrum ist in Abbildung 26 dargestellt.

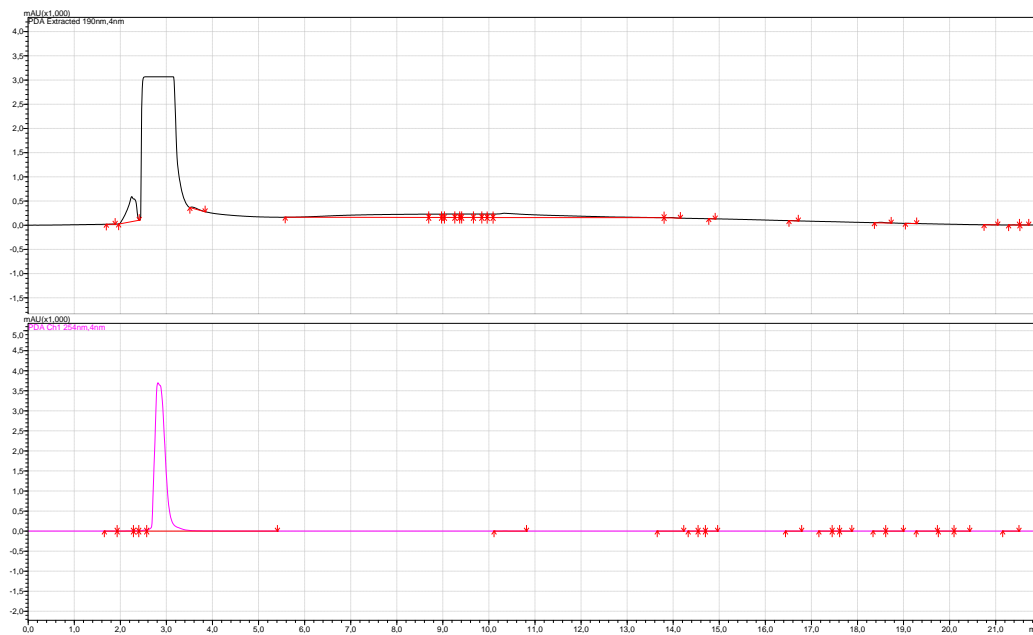


Abbildung 26: HPLC-Chromatogramm von N-Benzoylpiperazin.

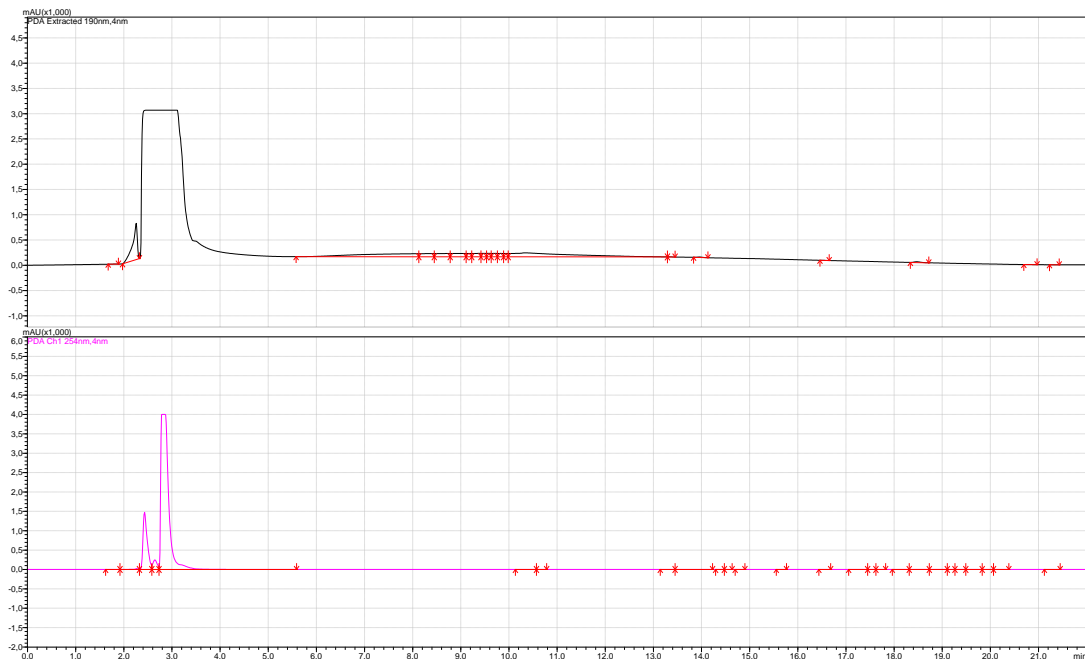


Abbildung 27: HPLC-Chromatogramm zur Isolation von N,N'-Benzoyl-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin.

Zu beobachten sind drei Peaks nahe der Laufmittelfront nach 2,5, 2,75 und 3 Minuten in Abbildung 27. Der vordere Peak bei etwa 2,5 Minuten entspricht dem ^{19}F -FDG, der mittlere Peak dem Glycosylamin und der hintere dem Startmaterial, was sich aus den HPLC-Chromatogrammen der Ausgangssubstanzen (Abbildung 20 und Abbildung 26) ergibt. Trotz der Erkenntnis von drei Peaks ist eine eindeutige Aufreinigung nicht

möglich. Dementsprechend war die Polarität der einzelnen Edukte und dem Produkt nicht unterschiedlich groß genug für eine geeignete Separation der einzelnen Substanzen. Es hat dementsprechend nicht gereicht, dass der logP-Wert von N-Benzoylpiperazin 0,97 beträgt. Somit ist die Reaktion nicht zur Synthese geeignet, da keine eindeutige Trennung der einzelnen Substanzen möglich ist, da die Polaritätsunterschiede nicht groß genug sind.

Im nächsten Schritt wurde die Reaktion mit einer weiteren Substanz durchgeführt. Das nächste Amin war 1-(4-Methoxyphenyl)piperazin. Nach der Reaktion von einer Stunde wurde ebenfalls ein MS-Spektrum gemessen. Dabei konnte erneut die Formierung eines Produktes bei m/z 357,57 ($[M+H^+]$) festgestellt werden.

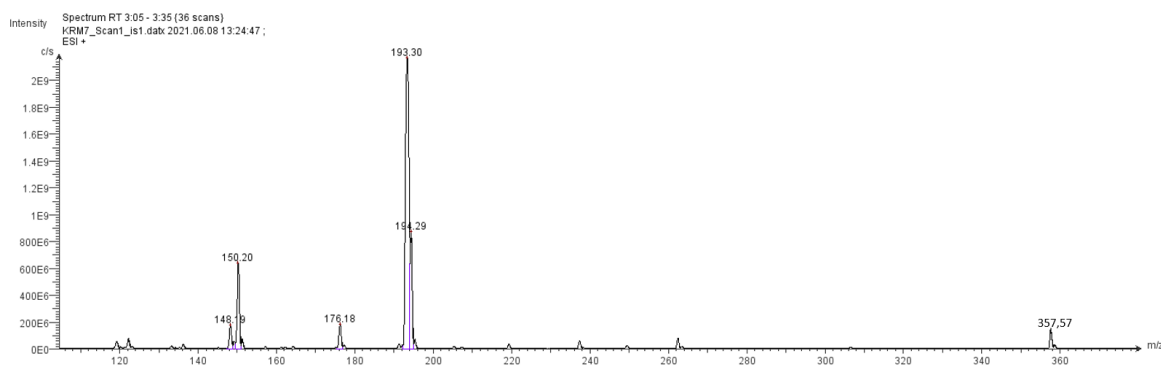


Abbildung 28: ESI-MS-Spektrum aus der Reaktionsmischung zur Synthese von 1-(4-methoxyphenyl)-4-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin.

Nachdem erkannt worden ist, dass ein Produkt gebildet worden ist, wurde versucht, eine Separation mittels RP-HPLC durchzuführen. Dabei sind die Chromatogramme in Abbildung 30 dargestellt.

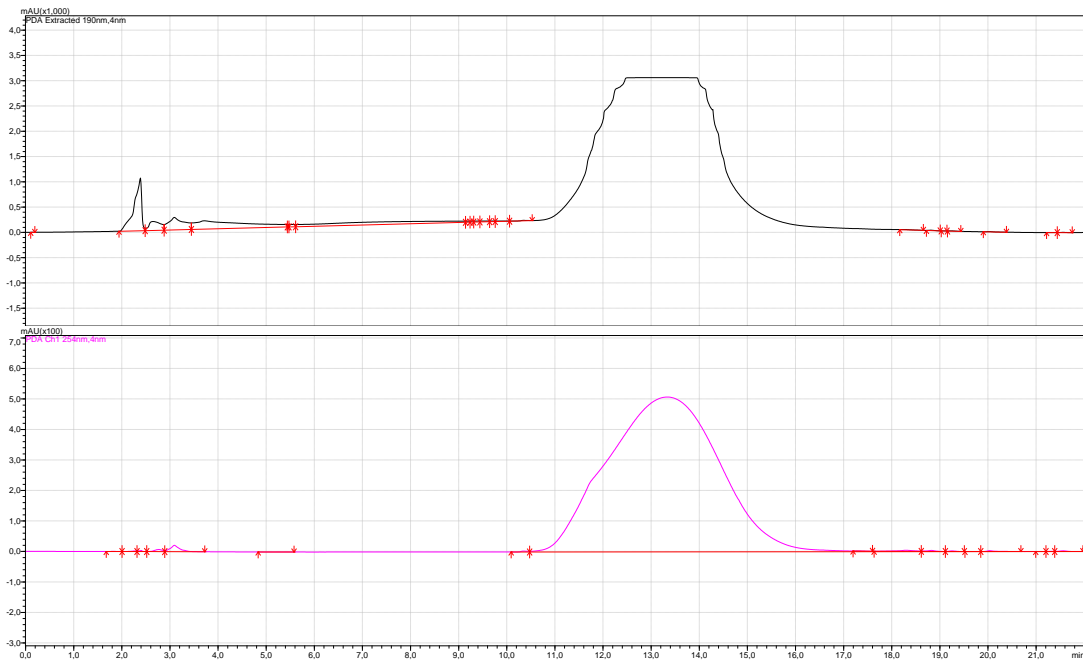


Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm von 1-(4-Methoxyphenyl)piperazin.

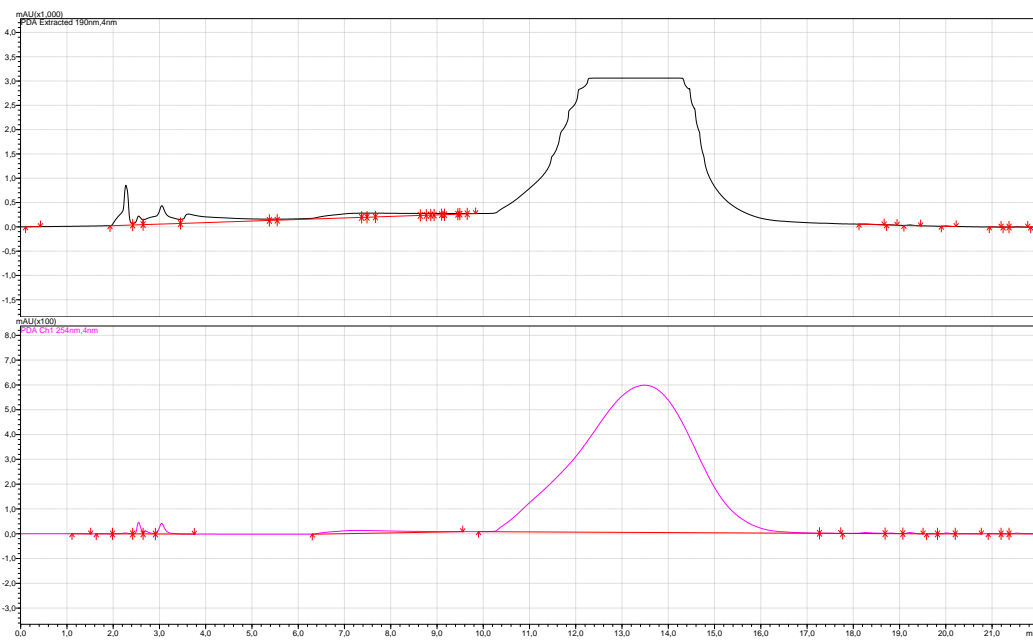


Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm zur Isolation von 1-(4-methoxyphenyl)-4-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin.

Dabei konnte erkannt werden, dass keine wirkliche Isolierung durch die RP-HPLC festzustellen war. Es ist zu erwarten, dass durch das aromatische System ein Produktpeak zwischen den 2,5 Minuten des Zuckers und den 13 Minuten des Amins vorliegt. Jedoch ist bei einer Wellenlänge von 254 nm keiner zu erkennen, der dem

Produkt zuzuordnen wäre. Eigentlich wäre zu erwarten, dass eine gute Separation zu erwarten ist, im Vergleich zu dem Zucker. Die experimentellen Ergebnisse haben jedoch keine vielversprechenden Ergebnisse geliefert.

Zuletzt wurde die Reaktion noch mit dem Tyrosin, einer Aminosäure, die auch eine gute Verknüpfungsmöglichkeit mit Proteinen bilden kann, durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die Reaktion anscheinend analysiert mit dem ESI-MS nicht stattgefunden hat (vgl. Abbildung 31). Die molekulare Masse müsste nämlich 345,32 g/mol betragen.

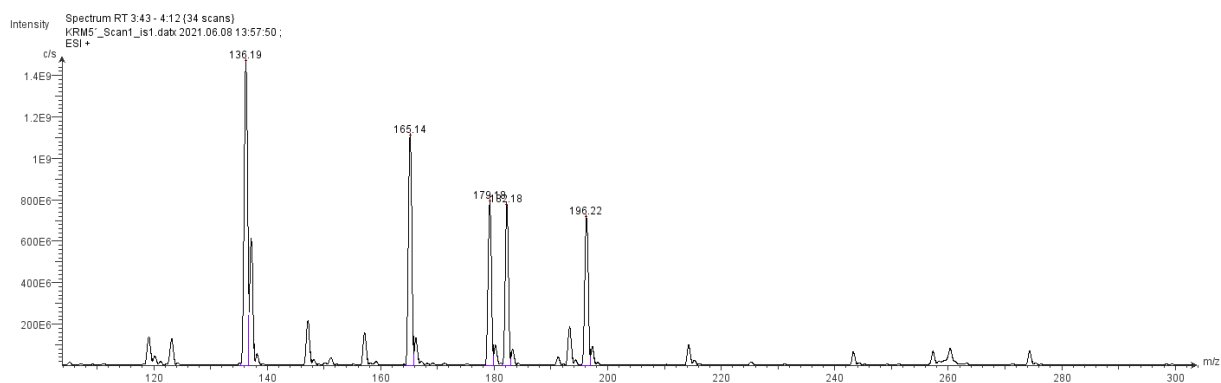


Abbildung 31: ESI-MS-Spektrum von der Reaktionsmischung zur Synthese von N-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-tyrosin.

Somit scheint es, dass für eine geeignete Reaktion und Separation, dass das Amin eine geeignete Lipophilie besitzen muss, damit es für die Reaktion verwendet werden kann, damit eine geeignete Trennung durch die RP-HPLC stattfinden kann. Ein geeigneter Faktor, um die Lipophilie der Amin-Verbindung zu betrachten ist der logP-Wert der jeweiligen Substanz. Weiterhin darf nicht der pKs-Wert der Amine vernachlässigt werden, denn für eine geeignete Hydrolyse im Tumor pH ist es wichtig, dass es einen pKs-Wert in diesem pH-Bereich besitzt. Dementsprechend scheinen ideale Verbindung zur therapeutischen Intervention und biologischen Bildgebungen mehrere Eigenschaften erfüllen zu müssen, damit sie zum einen optimal synthetisiert werden können und zum anderen eine gute Anwendungsmöglichkeit besitzen können.

4.5 NMR-Überwachung von ^{19}F -FDG unter Reaktionsbedingungen

Zur Überwachung der Synthese zur Erzeugung der Glycosylamine wurde ^{19}F -FDG den Reaktionsbedingungen unterzogen. Hierzu wurde es in DMSO und Essigsäure gelöst und auf 60° erwärmt. Bevor und nach der Reaktion wurde ein ^1H -NMR-Spektrum, ^{13}C -NMR-Spektrum, H,H-COSY und ein ^1H , ^{13}C -HSQC gemessen. In Abbildung 32 sind die ^1H -NMR-Spektren bevor und nach der Reaktion zu sehen.

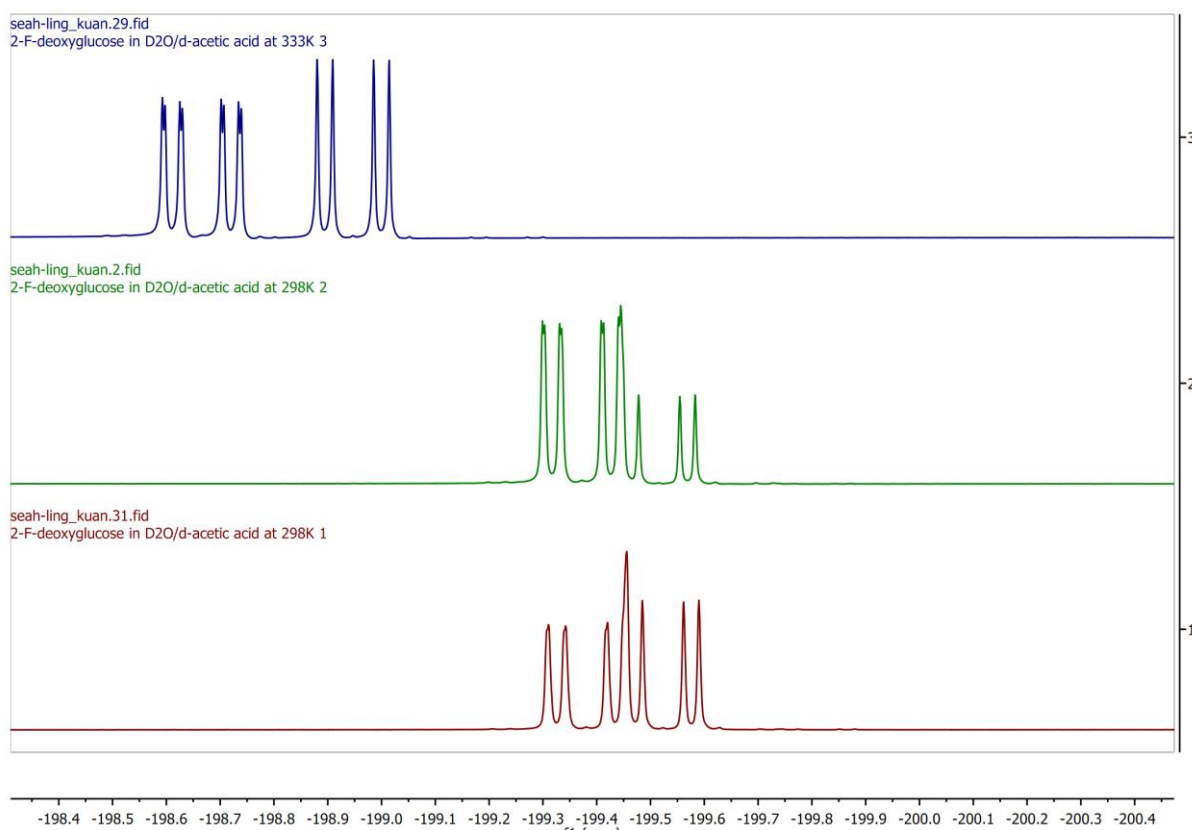
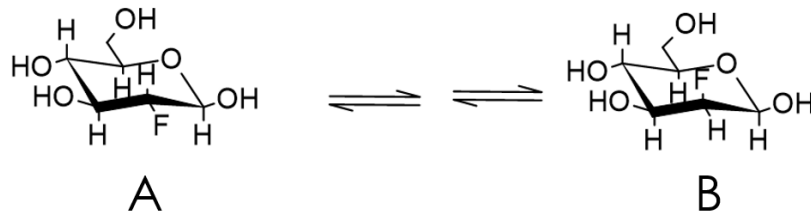


Abbildung 32: Auswahl des Bereiches der ^1H -NMR-Spektrum des ^{19}F -FDGs nach Inkubation bei 60°C in DMSO und Essigsäure für das Proton am C2-Kohlenstoff. Das grüne Spektrum zeigt dabei bei Raumtemperatur nach Erhitzen auf 60°C bei Raumtemperatur. Rote Spektrum zeigt die Reaktionslösung vor dem Erhitzen und das blaue Spektrum die Reaktionslösung nach 60°C .

Dabei ist eine Auffälligkeit zu beobachten gewesen. Bevor der Reaktion bzw. bevor Erhitzen auf 60°C befand sich 64% des ^{19}F -FDGs in der Isoform A und 36% in der Isoform B. Nach dem Erhitzen auf 60°C konnte festgestellt werden, dass sich das Verhältnis der Isoformen verändert hat. Dort lagen nur noch 55% in Der Form B und 45% in der Form A vor. Somit hat eine Umwandlung in die B-Form stattgefunden.



Eine Erklärung für dieses Phänomen kann saure Umgebung durch die Essigsäure in DMSO sein. Dadurch kann der Zucker protoniert werden und vom Ring (Halbacetal) in die Kettenform umwandeln. In der Kettenform ermöglicht es dem Kohlenstoff in zweiter Position zu rotieren. Durch die Rotation kann sich die Glucose bzw. das FDG in das Isomer der Mannose umwandeln. Diese Kettenform der Fluorodeoxymannose kann erneut ein Halbacetal bilden. Dadurch würde erklärt werden, weshalb unterschiedliche Isomere gefunden werden können. Durch anschließendes Erwärmen auf 60°C und der Dauer von einer Stunde kann dieser Prozess beschleunigt werden. Bei erhöhter Temperatur wird die Rotation von Molekülen nach der Boltzmann-Statistik angeregt, weshalb ein anderes Isomerenverhältnis zu erkennen ist.^[33] Überblickend stellt sich nun die Frage, ob die Isomerisierung des Zuckers ein Einfluss auf die Reaktivität und dadurch auf die Ausbeute hat.

5 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Synthese der literaturbekannten Verbindung als sowohl nicht-radioaktive und radioaktive Verbindung gelungen ist. Es konnte hingegen keines der verwendeten sekundären Amine an das ^{19}F -FDG gekoppelt werden. Dafür wurden neue Erkenntnisse für die Auswahl neuerer Amine gefunden. Diese müssen zunächst für eine geeignete Synthese eine bestimmte Lipophilie besitzen, damit eine geeignete Isolation des Glycosylamins vom Zucker stattfinden kann. Ein geeigneter Parameter, um dies abschätzen zu können, ist der logP-Wert. Zusätzlich muss das Amin auch einen bestimmten pKs-Wert besitzen. Es ist der Literatur zu entnehmen, dass eine optimale Hydrolyse dann stattfinden kann, wenn der pH-Wert der Umgebung, in diesem Fall der azide Tumor pH, dem pKs-Wert des Amins entspricht. Weiterhin konnte entdeckt werden, dass durch die Erwärmung des ^{19}F -FDGs auf 60°C eine Umwandlung des Isomerenverhältnisses stattgefunden hat. Es resultiert womöglich dadurch, dass das azide Reaktionsgemisch die Bildung der offenkettigen Struktur des Zuckers ermöglicht und die Erwärmung die Rotation anregt.

Für weitere zukünftige Analysen und Experimente ist nun das Ziel ein geeignetes Amin zu finden, das den Bedingungen erfüllt und zudem eine mögliche konjugationsfähige Gruppe besitzt, um es mit zum Beispiel mit Proteinen zu konjugieren. Folge dessen wird nach der Synthese der nicht-radioaktiven Verbindung die radioaktive Variante nach dem in dieser Arbeit postulierten Syntheseweg erzeugt und die Stabilitäts- sowie Cytotoxizitätsuntersuchungen vollzogen. Bei erfolgreichen Ergebnissen könnte, anschließend die Konjugation mit Polymeren wie Proteinen sowie erste Tierversuche stattfinden.

6 Materialien und Methodik

6.1 Materialien

6.1.1 Geräte

6.1.1.1 Allgemeine Geräte

| | |
|---|--|
| Dosis Zähler VDC-202 | Veenstra Instruments bv, Neustadt |
| Drehschieberpumpe, zweistufig RZ9 | Vacuubrand, Wertheim |
| Gefriertrocknungsanlage Ipha 2-4 LDplus | Christ, Osterode |
| Kontaminationsmonitor LB 124 SCINT | Berthold, Bad Wilbad |
| Magnetrührer HPS RT2 Advance | Thermo Fisher Scientific, Hamburg |
| Mini-Zentrifuge Sprout | Heathrow Scientific, Vernon Hills (USA) |
| PCMT Thermoshaker mit Kühlung (24x1,9 mL) (Niederlande) | Grant Instruments, Amsterdam |
| Präzessionswaage MX5 | Mettler Toledo, Gießen |
| pH-Messgerät | Mettler Toledo, Gießen |
| Rotationsverdampfer | Heidolph, Schwalbach |
| Transferpipetten (1 µL, 10 µL, 100 µL, 200 µL, ,1000 µL) | Brand, Wertheim |
| Trockenschrank | Heraeus Instruments, Hanau |
| Vacuum controller | Vacuubrand; Wertheim |
| Vortex-Schüttler Reax top | Heidolph, Schwabach |

Waage Entris 224i-S

Sartorius, Göttingen

6.1.1.2 LCMS

Autosampler 20AC

Shimadzu, Kyoto (Japan)

Column Oven CTO-10AS

Shimadzu, Kyoto (Japan)

Liquid Chromatograph, LC-20AD

Shimadzu, Kyoto (Japan)

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer,
LCMS-2020

Shimadzu, Kyoto (Japan)

UV/Vis Detector SPD-20A

Shimadzu, Kyoto (Japan)

6.1.1.3 RP-HPLC

Autosampler SIL-20AC

Shimadzu, Kyoto (Japan)

Column Oven CTO-20AC

Shimadzu, Kyoto (Japan)

Communication Bus Modul CBM-20A

Shimadzu, Kyoto (Japan)

Diode Array Detector SPD-20A

Shimadzu, Kyoto (Japan)

Fraction Collector FRC-10A

Shimadzu, Kyoto (Japan)

Liquid Chromatograph LC-20AT

Shimadzu, Kyoto (Japan)

6.1.1.4 ESI-MS

Massenspektrometer Expression L

Advion, Ithaca (USA)

Legato 185 Single-Syring Infuse Withdraw Pump KDS-scientific, Holliston (USA)

6.1.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--|
| Cellstar Teströhrchen 50 mL Frickenhausen | Greiner Bio-One, |
| Einmalspritze (1mL, 5mL, 20mL) | Braun, Melsungen |
| Filterpapier (gefaltet, d=150 mm) | Whatman, Maidstone (Großbritannien) |
| NMR-Röhrchen | Deutero, West Deptford (USA) |
| Safe-Lock Tubes 1,5 mL | Eppendorf, Hamburg |

6.1.3 Chemikalien

| | |
|---|---|
| 1-(4-Methoxyphenyl)piperazin-dihydrochlorid (90%) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 1-Acetylpiperazin (99%) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 1-Benzoylpiperazine (97%) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 1-(tert-Butoxycarbonyl)-piperazin (>98%) | TCl, Eschborn |
| 2-Deoxy-2-fluoro-D-Glucopyranose (¹⁸ F) | Advanced Accelerator Applications, Bonn |
| 2-Deoxy-2-fluoro-D-Glucopyranose (¹⁹ F)(>98%) | TCl, Eschborn |
| 4-(Aminomethyl)benzoesäure (97%) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 4-(Dimethylamino)pyridin | Arcros-Organic, Fair Lawn (USA) |
| 4-Phenylbenzylamin (97%) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Acetonitril (≥99%) | Honeywell, Morristown (USA) Merck, Darmstadt |

| | |
|---|-----------------------------|
| Cyclohexan | VWR-Chemicals, Darmstadt |
| Deuteriertes Dimethylsulfoxid (99,8%) | Fisher-Chemicals, Darmstadt |
| Seuteriumoxid (99,9%) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Deuteriochloroform (99,8%) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Dichlormethan ($\geq 99,8\%$) | Fisher-Chemicals, Darmstadt |
| Dicyclohexylcarbodiimid (99%) | Alfa-Aesar, Haverhill (USA) |
| Dimethylsulfoxid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| | Honeywell, Morristown (USA) |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Essigsäure | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| | Carl Roth, Karlsruhe |
| Methanol (100%) | VWR-Chemicals, Darmstadt |
| Methanol-d4 | AppliChem, Darmstadt |
| Natriumdihydrogenphosphat ($\geq 98\%$) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Propiolsäure (95%) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Trifluoressigsäure | Carl Roth, Karlsruhe |
| Wasser | AppliChem, Darmstadt |

6.2 Puffer und Laufmittel

6.2.1 HPLC-Laufmittel

Für die Auftrennung der nicht radioaktiven Glycosylamine mittels RP-HPLC wurden zwei Eluenten hergestellt. Eluent A war hierzu ein 10 mM Ammoniumbicarbonat Lösung in MilliQ-Wasser und Eluent B bestehend aus 20% einer 10 mM Ammoniumcarbonat-Lösung und 80% Acetonitril.

6.2.2 Natriumphosphatpuffer

Für die Untersuchung des Verhaltens der Glycosylamine in saurem pH-Milieu wurde ein 0,2 M Natriumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,5 hergestellt, welcher den leicht sauren pH-Wert der Mikroumgebung des Tumors darstellt. Für die Lagerung der radioaktiven Glycosylamine wurde zusätzlich ein weiterer 0,2 M Natriumphosphatpuffer mit dem pH-Wert von 8,1 hergestellt. Alle Puffer wurden mittels MilliQ-Wasser hergestellt.

6.2.3 Programme

| | |
|----------------------|------------------------------------|
| Advion CheMS Express | Advion, Ithaca (USA) |
| Advion Data Express | Advion, Ithaca (USA) |
| Microsoft Office | Microsoft, Redmond (USA) |
| MestReNova | Mestrelab Research, Bajo (Spanien) |
| Lab-Solution | Shimadzu, Kyoto (Japan) |
| ICON-NMR | Bruker, Billerica (USA) |

6.3 Methoden

6.3.1 Generelle Methoden

Der Reaktionsverlauf wurde über TLC überwacht, indem die Substanzen mit Ninhydrin angefärbt wurden.

Die ^1H -NMR-Spektren wurden durch einen Bruker AVANCE 300 Spektrometer bei Raumtemperatur und einer Frequenz von 300 MHz bestimmt. Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden mittels Bruker AVANCE 500 MHz Spektrometer gemessen. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in *parts per million* (ppm) angegeben.^[34] In der folgenden Tabelle sind die chemischen Verschiebungen der verwendeten Lösungsmittel angegeben.

Tabelle 2: Auflistung der NMR-Lösungsmittel und deren chemischen Verschiebungen.^[34]

| Lösungsmittel | ^1H -verschiebung / ppm | ^{13}C -Verschiebung / ppm |
|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| CDCl_3 | 7,26 | 77,16 |
| $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ | 2,50 | 39,52 |

Die Massenspektren wurden mit einer ESI (Elektrosprayionisation) bei Raumtemperatur gemessen. Dabei betrug die Flussrate 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ und alle Signale von 10 bis 1200 m/z wurden aufgezeichnet.

6.3.1.1 Generelle Synthese der ^{19}F -Glycosylamine

5 mg von ^{19}F -FDG wurden mit 110 μL einer 0,5 M Lösung des Amins und 0,5 M Essigsäurelösung in DMSO versetzt. Die Lösung wurde für eine Stunde bei 80°C unter Rühren erwärmt. Anschließend wurde die Mischung auf einer C18-Säule (Agilent Eclipse XDB-C18, 9,4x250mm) mittels RP-HPLC aufgereinigt. Die Aufreinigung fand über eine RP-HPLC statt, wobei Laufmittel A eine 10 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung und Laufmittel B eine 80%ige Ammoniumcarbonatlösung ist. Der Gradient betrug 35-80% B von Minute 2 bis 21 der Laufzeit, sowie anschließend für 4 Minuten isokratisch bei einem Gradienten von 80% B. Die Gesamtlaufzeit betrug 30 Minuten. Die Temperatur des Ofens betrug 40°C und die Flussrate 4 mL/min .

6.3.1.2 Generelle Synthese der ^{18}F -Glycosylamine

Für die Synthese der radioaktiven Glycosylamine wurde die SynChrom R&D Safira der Firma Elysia-Raytest (Straubenhardt) (Benutzeroberfläche in Abbildung 33) verwendet.

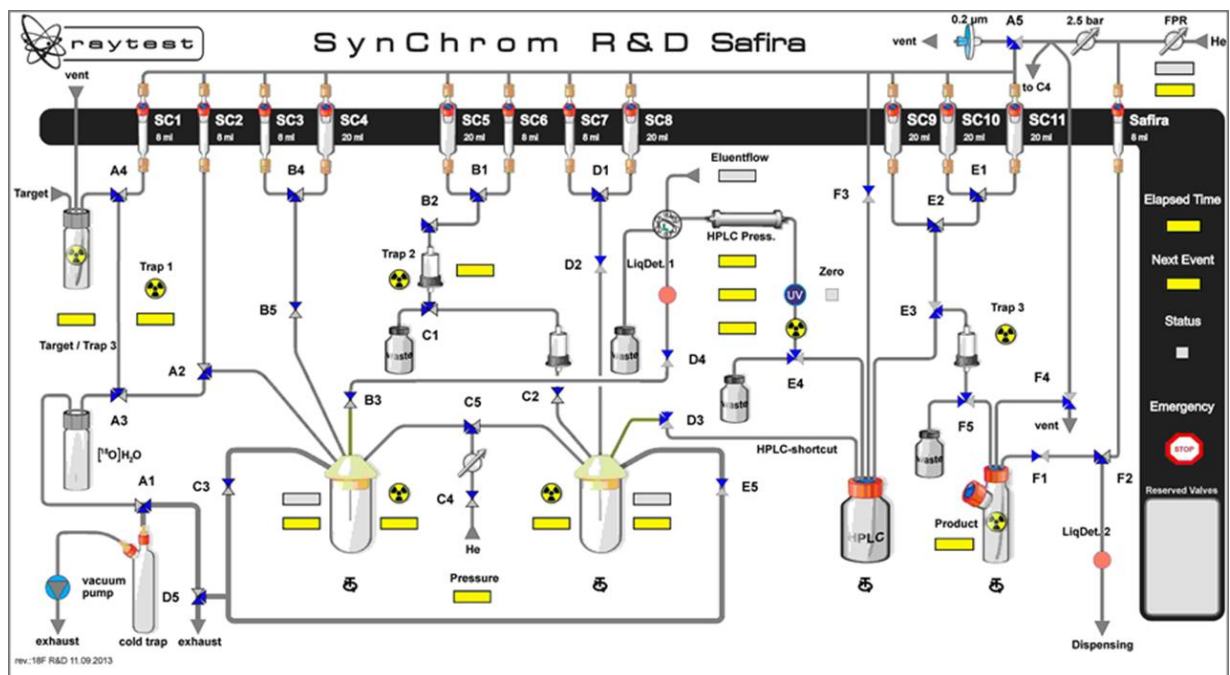


Abbildung 33: Darstellung des Versuchsaufbau von SynChrom R&D Safira der Firma Elysia-Raytest zur Synthese der radioaktiv markierten Glycosylaminen.

Hierzu wurde in das Target-Gefäß das ^{18}F -FDG vorgelegt. Zudem wurden SC1 und SC2 mit jeweils 500 μL ACN, SC3 mit 225 μL der 0,5 M Lösung des Amins und 0,25 M Essigsäure in DMSO befüllt. In das SC4-Gefäß wurden 4 mL Wasser gegeben und im HPLC-Gefäß 20 μL des 0,2 M Natriumphosphatpuffers mit pH 8,1 vorgelegt. Zunächst wird das ^{18}F -FDG mittels Vakuum in das Reaktionsgefäß 1 gezogen. Hierzu werden die Ventile D5 und A3 umgelegt und das Ventil C3 geöffnet. Anschließend wird die Pumpe angeschaltet. Nachdem das ^{18}F -FDG in das Reaktionsgefäß gelangt ist, wird der Rührer angeschaltet und auf 110°C Innentemperatur erhitzt, um es zu trocknen. Nach der Trocknung wird die Temperatur auf 90°C abgekühlt. Anschließend wird C3 geschlossen und A4 umgelegt. Es wird ein Stickstoffstrom von 1200 mbar erzeugt und A5 geöffnet, um 500 μL ACN in das Reaktionsgefäß zu geben. Nach Zugabe von SC1 wird C3 geöffnet und das ^{18}F -FDG azeotrop getrocknet. Nach der Trocknung wird C3

geschlossen und A4 umgelegt. Mit dem Umlegen von A2 wird nun das zweite Mal 500 µL ACN zur azeotropen Trocknung zugegeben. Danach wird C3 geöffnet und ¹⁸F-FDG azeotrop getrocknet. Es folgt anschließend die Zugabe der Aminlösung, indem A2 umgelegt wird, C3 geschlossen und die Pumpe ausgemacht wird. Die Temperatur wird auf 80°C abgekühlt und mit dem Öffnen von B5 wird das ¹⁸F-FDG mit der Lösung desamins versetzt. Nach der Zugabe werden A5 und B5 geschlossen und die Reaktionsmischung für 30 Minuten Rühren gelassen. Nach Beendigung der Reaktion wird auf 40°C abgekühlt und nach Erreichen der Temperatur mit 4 mL des Laufmittels (35%ige ACN) verdünnt, indem B4 und A5 umgelegt werden und B5 geöffnet wird. Nach kurzem Umrühren wird der Rührer ausgeschaltet und A5 geschlossen. Die Aufreinigung findet nun mit dem angeschlossenen RP-HPLC-System bei Raumtemperatur statt. Hierzu wird als Laufmittel eine 35% ACN-Lösung verwendet. Als Säule dient eine C18 Säule (10 µm, 300x8,0 mm) der Firma MZ-Analysetechnik. Die Fließgeschwindigkeit beträgt 4 mL/min. Die Schlaufe wird mit der Reaktionslösung aus dem Reaktionsgefäß 1 beladen, indem die Nadel im Reaktionsgefäßheruntergefahren wird und B3 und D4 geöffnet werden. Der Stickstoffstrom wird auf 1400 mbar erhöht und A5 geöffnet. Die Reaktionslösung wird auf die Schleife aufgetragen (Zustand „load“). Nach dem Auftragen wird die Schleife auf „inject“ umgestellt, B5, B3 und D4 geschlossen und der Stickstoffstrom ausgeschaltet. Bei Erkennen des Produktpeaks bei einer Retentionszeit von etwa 9 Minuten wird das Ventil E4 umgestellt und das Produkt im HPLC-Gefäß mit vorgelegten Natriumphosphatpuffer aufgefangen.

6.3.1.3 Stabilitätstest der Glycosylamine bei pH 6,5

Zur Bestimmung der Stabilität des Glycosylamins bei einem pH-Wert von 6,5, wurden direkt aus der RP-HPLC-Aufreinigung 200 µL des noch gelösten ¹⁸F-FDG-Amins entnommen. Dieses wurde mit 1,8 mL des Phosphatpuffers mit einem pH-Wert von 6,5 versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach findet über eine analytische HPLC (Agilent Technologies (Santa Clara, USA)) die Analyse statt, indem 50 µL der Lösung auf eine C18-Säule (Phenomenex Luna 5u C18 (2) 100 A, 250 x 4.6 mm, 5 µm) aufgetragen wird, wobei die Laufmittelzusammensetzung von A Wasser und B Acetonitril beträgt. Der Gradient beträgt 5-95% B über 20 Minuten.

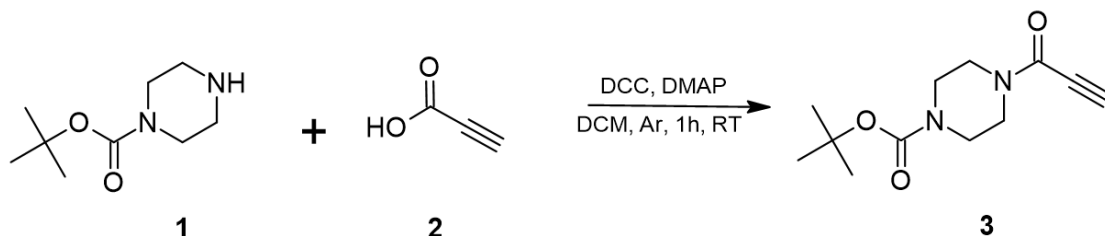
Durch Integration und Vergleich der Peaks kann schließlich das Ausmaß der Stabilität bzw. die Zersetzung analysiert werden.

6.3.1.4 Untersuchung der Reaktionskinetik von ^{19}F -FDG

Zur Untersuchung der Reaktionskinetik und dem Verhalten von ^{19}F -FDG wurde es in D_2O und 0,25 M Essigsäure gegeben und vor und nach einer Zeit von einer Stunde bei 60°C ein ^{19}F -NMR, bei einer Frequenz von 500 MHz gemessen.

7 Synthesen

7.1 tert-Butyl-4-propioloyl-piperazin-1-carboxylat



| Substanz | M / g/mol | n / mmol | m / mg | V / mL | eq |
|-------------------|-----------|----------|--------|--------|------|
| Boc-Piperazin (1) | 186,25 | 2,89 | 539 | - | 1 |
| Propiolsäure (2) | 70,05 | 3,23 | - | 0,2 | 1,12 |
| DCC | 206,33 | 1,96 | 404 | - | 0,68 |
| DMAP | 122,17 | 1,39 | 17 | - | 0,48 |
| DCM | 84,93 | 144,07 | - | 9,2 | - |

Die Reaktion fand unter Inertgas statt. In den Kolben wurde **1** (539 mg, 2,89 mmol, 1 eq) und DMAP (17 mg, 1,39 mmol, 0,48 eq) gegeben und in 8,2 mL DCM gelöst. Die Reaktionsmischung wurde mittels Eis auf 0°C abgekühlt und mit 0,2 mL **2** (3,23 mmol, 1,12 eq) versetzt. Danach wurde eine Mischung aus DCC (404 mg, 1,96 mmol, 0,68 eq) in 1,2 mL DCM zugegeben. Die Mischung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der farblose Niederschlag abfiltriert, das Filtrat mitzweifach mit 10-20 mL Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und ein farbloses Rohprodukt erhalten. Dieses wurde in Cyclohexan-Methanol umkristallisiert und schließlich ein farbloser Feststoff erhalten.

Analytik:

Ausbeute: 115 mg \equiv 16,72%

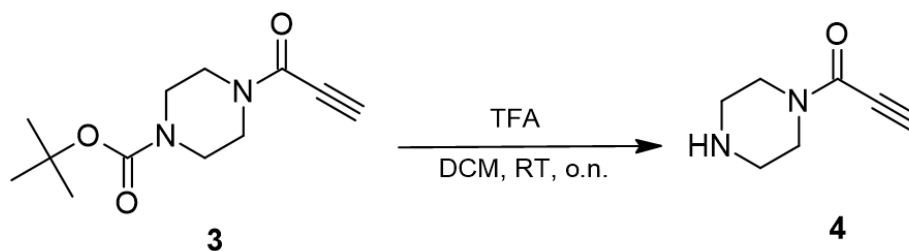
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 3,74$ (d, $J = 6$ Hz, 2H); 3,62 (m, 2H); 3,48 (d, $J = 3$ Hz, 2H); 3,43 (d, $J = 6$ Hz, 2H); 3,15 (s, 1H); 1,47 (s, 9H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 154,40$; 151,92; 80,54; 79,70; 75,13; 46,76; 41,38; 28,37

ESI-MS: $m/z = 261,25$ ($[\text{M}+\text{Na}^+]$); Berechnete Masse: 238,29 g/mol

R_f: 0,14 in 30% Essigsäureethylester in Cyclohexan

7.2 4-Propiolyl-piperazin-1-carboxylat



| Substanz | M / g/mol | n / mmol | m / mg | V / mL | eq |
|--|-----------|----------|--------|--------|--------|
| tert-Butyl-4-propiolyl-piperazin-1-carboxylat (3) | 238,29 | 0,23 | 54 | - | 1 |
| TFA | 114,02 | 26,14 | - | 2 | 113,65 |
| DCM | 84,93 | 125,28 | - | 8 | - |

2 (54 mg; 0,23 mmol; 1 eq) wurde in 8 mL DCM gelöst und anschließend mit 2 mL TFA versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel wurden daraufhin im Vakuum entfernt und ein farbloser Feststoff erhalten.

Analytik:

Ausbeute: 34 mg \equiv 100%

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 8,83 (s, 1H); 4,69 (s, 1H); 3,87 (t, 4H); 3,11 (t, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 151,27; 83,25; 75,03; 47,53; 37,71; 33,36; 25,48

ESI-MS: m/z = 139,11 ($[\text{M}+\text{H}^+]$); Berechnete Masse: 138,17 g/mol

7.3 1-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)- 4-Propioloyl-piperazin-1-carboxylat



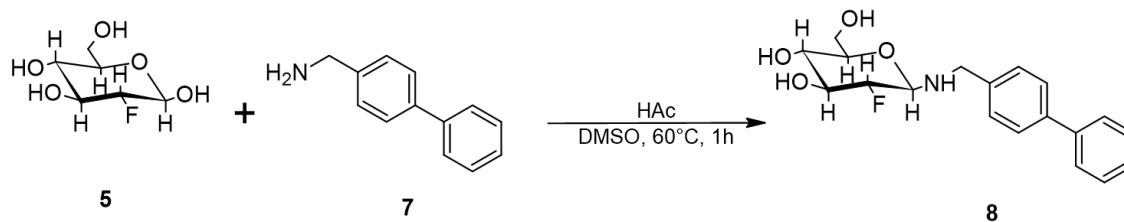
| Substanz | M / g/mol | n / mmol | m / mg | V / mL | eq |
|----------------------------------|-----------|----------|--------|--------|------|
| 4 | 138,19 | 58,76 | 8,12 | - | 2,12 |
| ¹⁹ F-FDG (5) | 182,15 | 27,67 | 5,04 | - | 1 |
| Essigsäure | 60,05 | 6,99 | - | 4 | 1,21 |
| DMSO | 78,13 | 613,85 | - | 436 | - |

¹⁹F-FDG (5,04 mg; 27,67 µmol; 1 eq) wurde mit einer Lösung bestehend aus 436 µL DMSO, 4 µL Essigsäure und **4** (8,12 mg; 58,76 µmol; 2,12 eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde bei 60°C geschüttelt. Anschließend fand die Auftrennung über eine RP-HPLC statt, wobei Laufmittel A eine 10 mM Ammoniumbicarbonatlösung und Laufmittel B eine 10% Ammoniumcarbonat-Lösung in 80% ACN mit einem Gradienten von 0-80% B über 19 Minuten war. Nach Auffangen des Produktes bei einer Retentionszeit von etwa 9 Minuten und Trocknung der Fraktion durch einen Gefriertrockner wurde ein farbloser Feststoff erhalten, wobei es sich herausgestellt hat, dass es sich dabei nicht um das Produkt gehandelt hat.

Analytik:

ESI-MS: $m/z = 303,34$ ($[M+H^+]$); Berechnete Masse: 303,30 g/mol

7.4 N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin



| Substanz | M / g/mol | n / mmol | m / mg | V / mL | eq |
|---------------------------|-----------|----------|--------|--------|------|
| 4-Phenylbenzylamin (7) | 183,25 | 55,01 | 10,08 | - | 1,91 |
| ¹⁹ F-FDG (5) | 182,15 | 28,87 | 5,26 | - | 1 |
| Essigsäure | 60,05 | 34,97 | - | 2 | 1,21 |
| DMSO | 78,13 | 152,05 | - | 108 | - |

¹⁹F-FDG (5,26 mg; 28,87 µmol; 1 eq) wurde mit einer Lösung bestehend aus 109 µL DMSO, 1 µL Essigsäure und 4-Phenylbenzylamin (10,08 mg; 28,87 µmol; 1,91 eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für eine Stunde bei 60°C unter Schütteln erwärmt. Die Aufreinigung fand durch eine RP-HPLC bei einem Gradienten von 35-80% innerhalb von 30 Minuten statt, wobei Lösungsmittel A eine 10 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung und B eine 10 mM Ammoniumcarbonat-Lösung in ACN war. Das Produkt wurde bei einer Retentionszeit von 13-13,5 Minuten aufgefangen und nach Gefriertrocknung ein farbloser Feststoff erhalten.

Analytik:

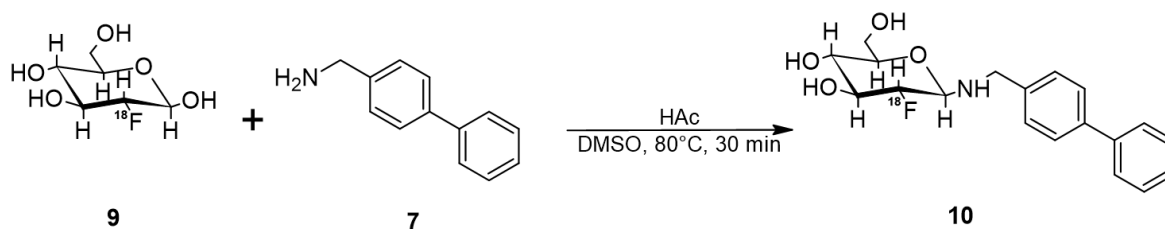
Ausbeute: 1,31 mg = 13%

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) = 7,58 (m, 4H); 7,46 (m, 4H); 7,31 (m, 1H); 4,08 (dt, J = 20 Hz, 2H); 3,96 (dt, J = 15 Hz, 2H); 3,88 (dd, J = 4 Hz, 2H); 3,68 (m, 2H); 3,56 (m, 2H); 3,22 (m, 2H)

¹⁹F-NMR (500 Hz, CD₃OD) = -196,73 (dd, J = 20 Hz, 35 Hz)

ESI-MS: *m/z* = 348,37 ([M+H⁺]); 370,36 ([M+Na⁺]); Berechnete Masse 347,38 g/mol

7.5 N-(2-Deoxy-2-¹⁸F-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin



| Substanz | M [g/mol] | n [μmol] | m [mg] | V [μL] |
|-------------------------|-----------|----------|-----------|--------|
| 4-Phenylbenzylamin (7) | 183,25 | 124,97 | 22,90 | - |
| ¹⁸ F-FDG (9) | 182,15 | - | 43,82 MBq | - |
| Essigsäure | 60,05 | 17,49 | - | 4 |
| DMSO | 78,13 | 373,31 | - | 325 |

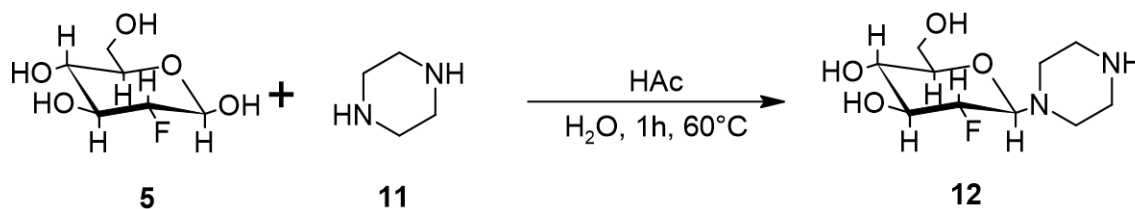
Zunächst wurde das ¹⁸F-FDG bei einer Temperatur von 110°C unter verminderten Druck getrocknet. Anschließend wurde zweimal jeweils 500 μL Acetonitril zugegeben und bei einer Temperatur von 90°C im Stickstoffstrom unter verminderten Druck getrocknet. Nach der Trocknung wurde das ¹⁸F-FDG mit 350 μL der 0,5 M Lösung an 4-Phenylbenzylamin (22,90 mg, 124,97 μmol) und 0,25 M Essigsäure in DMSO zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 30 Minuten bei einer Temperatur von 80°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit 4 mL einer 35% ACN-Lösung in Wasser verdünnt und durch eine RP-HPLC bei Raumtemperatur isokratisch aufgereinigt. Das Laufmittel war eine 35% ACN und die Flussgeschwindigkeit 4 mL/min. Das Produkt eluierte bei einer Retentionszeit von etwa 9 Minuten. Die nicht-zerfallskorrigierte radiochemische Ausbeute betrug 8,51 MBq.

Analytik:

Ausbeute: 8,51 MBq = 44%

Radiochemische Reinheit nach HPLC = 98%

7.6 N-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin



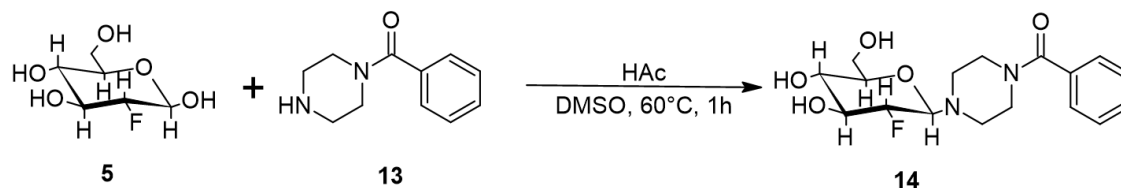
| Substanz | M / g/mol | n / mmol | m / mg | V / mL | eq |
|----------------------------------|-----------|----------|--------|--------|----|
| Piperazin (11) | 86,14 | 10,20 | 0,88 | - | 4 |
| ¹⁹ F-FDG (5) | 182,15 | 2,53 | 0,46 | - | 1 |
| Essigsäure (0,25 M) | 60,05 | - | - | 11 | - |
| Wasser | 18,02 | - | - | 33 | - |

¹⁹F-FDG (0,46 mg; 2,53 µmol; 1 eq) wurde in 5 µL einer 0,25 M Essigsäure gelöst. Dieses wurde mit 33 µL Wasser und einer 1,7 M Lösung an Piperazin (0,88 mg; 10,2 µmol; 4 eq) in 6 µL Wasser und 0,25 M Essigsäure gelöst versetzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für eine Stunde bei 60°C unter Schütteln erwärmt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µL einer Ammoniumbicarbonat-Lösung beendet. Die RP-HPLC-Analyse fand unter Verwendung eines Gradienten von 0-90% innerhalb von 22 Minuten statt, wobei Lösungsmittel A eine 10 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung und B eine 10 mM Ammoniumcarbonat-Lösung in ACN war. Dabei konnte kein Produkt isoliert werden. Aus der Reaktionsmischung wurde das Produkt über ESI/MS nachgewiesen.

Analytik:

ESI-MS: $m/z = 251,37$ ($[M+H^+]$); Berechnete Masse: 250,27 g/mol

7.7 N,N'-Benzoyl-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin



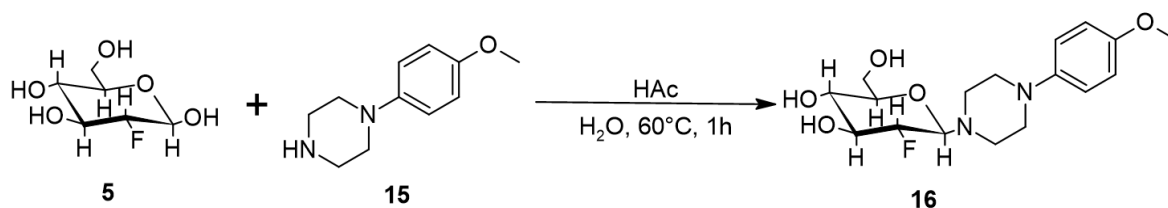
| Substanz | M / g/mol | n / mmol | m / mg | V / mL | eq |
|----------------------------|-----------|----------|--------|--------|----|
| N-Benzoylpiperazin (13) | 190,25 | 10,20 | 1,94 | - | 4 |
| ¹⁹ F-FDG (5) | 182,15 | 2,53 | 0,46 | - | 1 |
| Essigsäure (0,5 M) | 60,05 | - | - | 13,5 | - |
| Essigsäure (0,25 M) | 60,05 | - | - | 5 | - |
| DMSO | 78,13 | 152,05 | - | 19 | - |

¹⁹F-FDG (0,46 mg; 2,53 µmol; 1 eq) wurde in 5 µL einer 0,25 M Essigsäure gelöst. Dieses wurde mit einer 0,5 M Essigsäure und einer 0,55 M Lösung an N-Benzoylpiperazin (1,94 mg; 10,2 µmol; 4 eq) in 19 µL DMSO versetzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für eine Stunde bei 60°C unter Schütteln erwärmt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µL einer Ammoniumbicarbonat-Lösung beendet. Die RP-HPLC-Analyse fand unter Verwendung eines Gradienten von 0-90% B innerhalb von 22 Minuten statt, wobei Lösungsmittel A eine 10 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung und B eine 10 mM Ammoniumcarbonat-Lösung in ACN war. Dabei konnte kein Produkt isoliert werden.

Analytik:

ESI-MS: $m/z = 355,57$ ($[M+H^+]$); Berechnete Masse: 354,37 g/mol

7.8 1-(4-methoxyphenyl)-4-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin



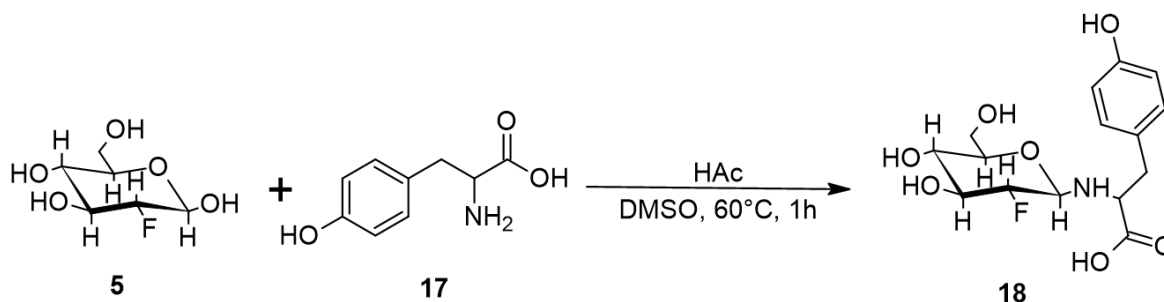
| Substanz | M / g/mol | n / mmol | m / mg | V / mL | eq |
|--------------------------------------|-----------|----------|--------|--------|----|
| 1-(4-methoxyphenyl)piperazin (15) | 192,26 | 10,20 | 1,96 | - | 4 |
| ¹⁹ F-FDG (5) | 182,15 | 2,53 | 0,46 | - | 1 |
| Essigsäure (0,25 M) | 60,05 | - | - | 22 | - |
| Wasser | 18,02 | - | - | 32 | - |

¹⁹F-FDG (0,46 mg; 2,53 µmol; 1 eq) wurde in 5 µL einer 0,25 M Essigsäure gelöst. Dieses wurde mit 32 µL Wasser und einer 0,38 M Lösung an 1-(4-methoxyphenyl)piperazin (1,96 mg; 10,20 µmol; 4 eq) in 27 µL Wasser und 0,25 M Essigsäure gelöst versetzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für eine Stunde bei 60°C unter Schütteln erwärmt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µL einer Ammoniumbicarbonat-Lösung beendet. Die RP-HPLC-Analyse fand unter Verwendung eines Gradienten von 0-90% innerhalb von 22 Minuten statt, wobei Lösungsmittel A eine 10 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung und B eine 10 mM Ammoniumcarbonat-Lösung in ACN war. Dabei konnte kein Produkt isoliert werden. Aus der Reaktionsmischung wurde das Produkt über ESI/MS nachgewiesen.

Analytik:

ESI-MS: $m/z = 357,57$ ($[M+H^+]$); Berechnete Masse 356,39 g/mol

7.9 N-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-tyrosin



| Substanz | M / g/mol | n / mmol | m / mg | V / mL | eq |
|---------------------|-----------|----------|--------|--------|----|
| Tyrosin | 181,19 | 10,21 | 1,85 | - | 4 |
| ¹⁹ F-FDG | 182,15 | 2,53 | 0,46 | - | 1 |
| Essigsäure (0,25 M) | 60,05 | - | - | 5 | - |
| DMSO | 78,13 | - | - | 57 | - |

¹⁹F-FDG (0,46 mg; 2,53 µmol; 1 eq) wurde in 5 µL einer 0,25 M Essigsäure gelöst. Dieses wurde mit 32 µL Wasser und einer 0,18 M Lösung an Tyrosin (1,85 mg; 10,21 µmol; 4 eq) in 57 µL DMSO versetzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für eine Stunde bei 60°C unter Schütteln erwärmt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µL einer Ammoniumbicarbonat-Lösung beendet. Die RP-HPLC-Analyse fand unter Verwendung eines Gradienten von 0-90% innerhalb von 22 Minuten statt, wobei Lösungsmittel A eine 10 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung und B eine 10 mM Ammoniumcarbonat-Lösung in ACN war. Dabei konnte kein Produkt isoliert oder nachgewiesen werden

8 Literaturverzeichnis

- [1] Bruns, Johannes; Mugele, Katrin; Wenz, Frederik (2019): Nationale Dekade gegen den Krebs: NKP 2.0? In: *Forum* 34 (6), S. 512–515. DOI: 10.1007/s12312-019-00689-8.
- [2] Feng, Liangzhu; Dong, Ziliang; Tao, Danlei; Zhang, Yicheng; Liu, Zhuang (2018): The acidic tumor microenvironment: a target for smart cancer nano-theranostics. In: *National Science Review* 5 (2), S. 269–286. DOI: 10.1093/nsr/nwx062.
- [3] Flavell, Robert R.; Truillet, Charles; Regan, Melanie K.; Ganguly, Tanushree; Blecha, Joseph E.; Kurhanewicz, John et al. (2016): Caged (18)FFDG Glycosylamines for Imaging Acidic Tumor Microenvironments Using Positron Emission Tomography. In: *Bioconjugate chemistry* 27 (1), S. 170–178. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00584.
- [4] Leiner, Peter (2017): Mikroumgebung: Mehr als ein Bett für den Tumor. In: *Im Focus Onkologie* 20 (12), S. 40–42. DOI: 10.1007/s15015-017-3686-z.
- [5] Koch-Institut, Robert; Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. (2019): Krebs in Deutschland 2015/2016. Unter Mitarbeit von Koch-Institut, Robert.
- [6] Bayerische Krebsgesellschaft e.V. (2021): Welche Tumoren gibt es? Online verfügbar unter <https://www.bayerische-krebsgesellschaft.de/informationen/fakten-ueber-krebs/16-fragen-zum-thema-krebs/welche-tumoren-gibt-es/?L=0>, zuletzt aktualisiert am 18.06.2021, zuletzt geprüft am 18.06.2021.
- [7] Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; Gatto, Gregory J.; Stryer, Lubert (2018): *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- [8] Müller-Esterl, Werner. (2018): *Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger*. 3. Aufl. 2018. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer Spektrum.
- [9] Vitale, Ilio; Manic, Gwenola; Coussens, Lisa M.; Kroemer, Guido; Galluzzi, Lorenzo (2019): Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. In: *Cell metabolism* 30 (1), S. 36–50. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.06.001.
- [10] Helfen, Anne; Roth, Johannes; Ng, Tony; Eisenblaetter, Michel (2018): In Vivo Imaging of Pro- and Antitumoral Cellular Components of the Tumor Microenvironment. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 59 (2), S. 183–188. DOI: 10.2967/jnumed.117.198952.
- [11] Liu, Jingjing; Chen, Qian; Feng, Liangzhu; Liu, Zhuang (2018): Nanomedicine for tumor microenvironment modulation and cancer treatment enhancement. In: *Nano Today* 21, S. 55–73. DOI: 10.1016/j.nantod.2018.06.008.
- [12] Wu, Ting; Dai, Yun (2017): Tumor microenvironment and therapeutic response. In: *Cancer letters* 387, S. 61–68. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.043

- [13] Soysal, Savas D.; Tzankov, Alexandar; Muenst, Simone E. (2015): Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. In: *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 82 (3-4), S. 142–152. DOI: 10.1159/000430499.
- [14] Thorwarth, Daniela; Alber, Markus (2008): Funktionelle Hypoxie-Bildgebung mit FMISO PET zur Individualisierung der Strahlentherapie. In: *Zeitschrift für medizinische Physik* 18 (1), S. 43–50. DOI: 10.1016/j.zemedi.2007.08.003.
- [15] Hille-Rehfeld, Annette (2016): Der Warburg-Effekt im Duell von Tumorzellen und Immunsystem. In: *Chemie in unserer Zeit* 50 (5), S. 305–309. DOI: 10.1002/ciuz.201600749.
- [16] Fadaka, Adewale; Ajiboye, Basiru; Ojo, Oluwafemi; Adewale, Olusola; Olayide, Israel; Emuowhochere, Rosemary (2017): Biology of glucose metabolism in cancer cells. In: *Journal of Oncological Sciences* 3 (2), S. 45–51. DOI: 10.1016/j.jons.2017.06.002. (Neri und Supuran 2011)
- [17] Butturini, Elena; Carcereri de Prati, Alessandra; Boriero, Diana; Mariotto, Sofia (2019): Tumor Dormancy and Interplay with Hypoxic Tumor Microenvironment. In: *International journal of molecular sciences* 20 (17). DOI: 10.3390/ijms20174305.
- [18] Estrella, Veronica; Chen, Tingan; Lloyd, Mark; Wojtkowiak, Jonathan; Cornnell, Heather H.; Ibrahim-Hashim, Arig et al. (2013): Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. In: *Cancer research* 73 (5), S. 1524–1535. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2796.
- [19] Vander Heiden, Matthew G.; Cantley, Lewis C.; Thompson, Craig B. (2009): Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. In: *Science (New York, N.Y.)* 324 (5930), S. 1029–1033. DOI: 10.1126/science.1160809.
- [20] Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. (1927): THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. In: *The Journal of general physiology* 8 (6), S. 519–530. DOI: 10.1085/jgp.8.6.519.
- [21] Neri, Dario; Supuran, Claudiu T. (2011): Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. In: *Nature reviews. Drug discovery* 10 (10), S. 767–777. DOI: 10.1038/nrd3554.
- [22] Sattler, U. G. A.; Walenta, S.; Mueller-Klieser, W. (2007): Laktat und Redoxstatus in malignen Tumoren. In: *Der Anaesthesist* 56 (5), S. 466–469. DOI: 10.1007/s00101-007-1164-2.
- [23] Gatenby, Robert A.; Gillies, Robert J. (2004): Why do cancers have high aerobic glycolysis? In: *Nature reviews. Cancer* 4 (11), S. 891–899. DOI: 10.1038/nrc1478.
- [24] Bauser, Marcus; Lehmann, Lutz (2012): Positronen-Emissions-Tomographie. In: *Chemie in unserer Zeit* 46 (2), S. 80–99. DOI: 10.1002/ciuz.201200564.
- [25] Schlegel, Wolfgang; Karger, Christian P.; Jäkel, Oliver (Hg.) (2018): *Medizinische Physik. Grundlagen - Bildgebung - Therapie - Technik*. 1. Aufl. 2018. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

- [26] Strauss, L. G.; Conti, P. S. (1991): The applications of PET in clinical oncology. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 32 (4), 623-48; discussion 649-50.
- [27] Izuishi, Kunihiro; Yamamoto, Yuka; Mori, Hirohito; Kameyama, Riko; Fujihara, Shintaro; Masaki, Tsutomu; Suzuki, Yasuyuki (2014): Molecular mechanisms of ¹⁸F-fluorodeoxyglucose accumulation in liver cancer. In: *Oncology reports* 31 (2), S. 701–706. DOI: 10.3892/or.2013.2886.
- [28] Waldmann, Christopher M.; Kopka, Klaus; Wagner, Stefan (2020): ¹⁸F-Labeled Small-Molecule and Low-Molecular-Weight PET Tracers for the Noninvasive Detection of Cancer. In: *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* 216, S. 283–318. DOI: 10.1007/978-3-030-42618-7_8
- [29] Yu, S. (2006): Review of F-FDG Synthesis and Quality Control. In: *Biomedical imaging and intervention journal* 2 (4), e57. DOI: 10.2349/bij.2.4.e57
- [30] ISBELL, HORACE S.; FRUSH, HARRIET L. (1958): Mutarotation, Hydrolysis, and Rearrangement Reactions of Glycosylamines 1. In: *J. Org. Chem.* 23 (9), S. 1309–1319. DOI: 10.1021/jo01103a019.
- [31] Oakdale, James S.; Sit, Rakesh K.; Fokin, Valery V. (2014): Ruthenium-catalyzed cycloadditions of 1-haloalkynes with nitrile oxides and organic azides: synthesis of 4-haloisoxazoles and 5-halotriazoles. In: *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 20 (35), S. 11101–11110. DOI: 10.1002/chem.201402559.
- [32] SHAO, Bin: THERAPEUTIC AGENTS USEFUL FOR TREATING PAIN. Angemeldet durch EURO-CELTIQUE S.A. Veröffentlichungsnr: WO/2005/056524.
- [33] Atkins, Peter W.; Paula, Julio de (2010): *Physikalische Chemie. Set aus Lehrbuch und Arbeitsbuch. 4., vollständig überarb. Aufl., 1. Nachdr.* Weinheim: Wiley-VCH.
- [34] Fulmer, Gregory R.; Miller, Alexander J. M.; Sherden, Nathaniel H.; Gottlieb, Hugo E.; Nudelman, Abraham; Stoltz, Brian M. et al. (2010): NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. In: *Organometallics* 29 (9), S. 2176–2179. DOI: 10.1021/om100106e.

9 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|---|
| ^{18}F -FDG | ^{18}F -Fluordesoxyglucose |
| ^{19}F -FDG | ^{19}F -Fluordesoxyglucose |
| ACN | Acetonitril |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| CAF | krebsassoziierte Fibroblast (<i>Cancer-associated fibroblast</i>) |
| CT | Comutertomographie |
| D ₂ O | Deuteriumoxid |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| DCU | N,N'-Dicyclohexylharnstoff |
| DCM | Dichlormethan |
| DIEPA | N,N-Diisopropylethylamin |
| DMAP | 4-(Dimethylamino)pyridin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| FDG | Fluordesoxyglucose |
| FMSIO | Fluoromisonidazol |
| HAc | Essigsäure |
| HIF-1 | Hypoxie-induzierter Faktor 1 |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| ROS | Reaktive sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species species</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| TAM | tumorassoziierte Makrophage |
| TFA | Trifluoressigsäure |

TME.....Tumormikroumgebung (*Tumor
microenvironment*)

VEGF.....vaskulären endotheliale
Wachstumsfaktoren (*Vascular
Endothelial Growth Factor*)

10 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Darstellung der Zusammensetzung des Tumors und dessen Mikroumgebung, während der Fortschreitung. ^[9] | 4 |
| Abbildung 2: Darstellung des Glucose-Metabolismus in der Zelle. ^[15] | 6 |
| Abbildung 3: Vergleich der Stoffwechsel von gesunden Zellen (links) und Tumoren (rechts). ^[18] | 8 |
| Abbildung 4: Darstellung des Glucose-Metabolismus der Tumorzelle und deren resultierenden Azidifizierung des extrazellulären Mediums. ^[23] | 9 |
| Abbildung 5: Darstellung eines β^+ -Zerfalls. ^[25] | 10 |
| Abbildung 6: Vergleich der Aufnahme und des Stoffwechsels von ^{18}F -FDG und Glucose in der Zelle. ^[27] | 11 |
| Abbildung 7: Darstellung der Synthese von ^{18}F -FDG durch elektrophile Addition. ^[28] | 13 |
| Abbildung 8: Darstellung der Synthese von ^{18}F -FDG durch nukleophile Substitution. ^[28] | 13 |
| Abbildung 9: Mechanismus der Synthese von Glycosylaminen. ^[29] | 14 |
| Abbildung 10: Darstellung der Amadori-Umlagerung. ^[29] | 15 |
| Abbildung 11: Darstellung des Mechanismus zur sauren hydrolytischen Spaltung von Glycosylaminen. ^[29] | 15 |
| Abbildung 12: Darstellung der durchgeführten Synthesen..... | 18 |
| Abbildung 13: Darstellung der HPLC-Chromatogramm der Reaktion zur Synthese von ^{19}F -N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamins. Die blau markierte Region stellt den Bereich dar, indem das Produkt aufgefangen wurde..... | 19 |
| Abbildung 14: Darstellung des ESI-MS-Spektrum von ^{19}F -N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin..... | 20 |
| Abbildung 15: (A) Darstellung des UV-Chromatogramms der nicht-radioaktiven Referenzverbindung. Die Retentionszeit beträgt 11,58 Minuten. (B) Darstellung des UV-Chromatogramms (oben) und des radioaktiven Chromatogramms (unten) des der radioaktiven Verbindung ^{18}F -N-(2-Deoxy-2-fluoro-18-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin. Die Retentionszeit beträgt 11,62 Minuten..... | 22 |
| Abbildung 16: Darstellung der HPLC-Spektren für den Stabilitätstest von N-(2-Deoxy-2-fluoro-18-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin bei pH 6,5 nach einer Stunde..... | 24 |
| Abbildung 17: Abbildung der verwendeten Amine für das Reaktions-Screening..... | 26 |
| Abbildung 18: Darstellung des Reaktionsmechanismus zur Synthese von N-Propiolylpiperazin..... | 27 |
| Abbildung 19: ESI-MS-Spektrum von aus der Reaktionslösung zur Synthese von N-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin..... | 30 |
| Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm von ^{19}F -FDG..... | 31 |
| Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm zur Isolation der Synthese von N-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin..... | 31 |
| Abbildung 22: ESI-MS-Spektrum aus der Reaktionslösung zur Synthese von 1-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Propioly-piperazin-1-carboxylat..... | 32 |
| Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm von N-Propiolylpiperazin..... | 33 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm zur Isolation von 1-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)- 4-Propioly-piperazin-1-carboxylat..... | 33 |
| Abbildung 25: ESI-MS-Spektrum aus der Reaktionslösung der Synthese von N,N'-Benzoyl-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin..... | 34 |
| Abbildung 26: HPLC-Chromatogramm von N-Benzoylpiperazin..... | 35 |
| Abbildung 27: HPLC- Chromatogramm zur Isolation von N,N'-Benzoyl-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin..... | 35 |
| Abbildung 28: ESI-MS-Spektrum aus der Reaktionsmischung zur Synthese von 1-(4-methoxyphenyl)-4-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin..... | 36 |
| Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm von 1-(4-Methoxyphenyl)piperazin..... | 37 |
| Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm zur Isolation von 1-(4-methoxyphenyl)-4-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-piperazin..... | 37 |
| Abbildung 31: ESI-MS-Spektrum von der Reaktionsmischung zur Synthese von N-(2-Deoxy-2-fluoro-Glycosyl)-tyrosin..... | 38 |
| Abbildung 32: Auswahl des Bereiches der H-NMR-Spektrum des ¹⁹ F-FDGs nach Inkubation bei 60°C in DMSO und Essigsäure für das Proton am C2-Kohlenstoff. Das grüne Spektrum zeigt dabei bei Raumtemperatur nach Erhitzen auf 60°C bei Raumtemperatur. Rote Spektrum zeigt die Reaktionslösung vor dem Erhitzen und das blaue Spektrum die Reaktionslösung nach 60°C..... | 39 |
| Abbildung 33: Darstellung des Versuchsaufbau von SynChrom R&D Safira der Firma Elysia-Raytest zur Synthese der radioaktiv markierten Glycosylaminen..... | 48 |
| Abbildung 34: ¹ H-NMR-Spektrum von tert-Butyl-4-propioly-piperazin-1-carboxylat bei (3) 300 MHz in CDCl ₃ | 68 |
| Abbildung 35: ESI-MS-Spektrum von 3 | 68 |
| Abbildung 36: ¹³ C-NMR-Spektrum von 3 bei 125 MHz in CDCl ₃ | 69 |
| Abbildung 37: ESI-MS-Spektrum von N-Propioly-piperazin (4)..... | 69 |
| Abbildung 38: ¹ H-NMR-Spektrum von 4 bei 300 MHz in DMSO-d ₆ | 70 |
| Abbildung 39: ¹³ C-NMR-Spektrum von 4 bei 125 MHz in DMSO-d ₆ | 71 |
| Abbildung 40: ¹ H, ¹³ C-HSQC von ¹⁹ F-FDG (5)..... | 72 |
| Abbildung 41: H,H-COSY von 5 | 72 |
| Abbildung 42: F-NMR-Ausschnitt von 5 bei 500 MHz vor dem Erhitzen auf 60°C..... | 73 |
| Abbildung 43: F-NMR-Ausschnitt von 5 bei 500 MHz bei Erhitzen 60°C..... | 73 |
| Abbildung 44: ¹³ C-NMR Spektrum von 5 bei 500 MHz vor Erhitzen auf 60°C..... | 74 |
| Abbildung 45: ¹ H-NMR Spektrum von 5 bei 500 MHz vor Erhitzen auf 60°C..... | 74 |
| Abbildung 46: ¹ H-NMR-Spektrum von N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin (8) in CDOD ₃ bei 500 MHz..... | 75 |
| Abbildung 47: ¹⁹ F-NMR-Ausschnitt von 8 bei 500 MHz..... | 75 |

11 Spektren

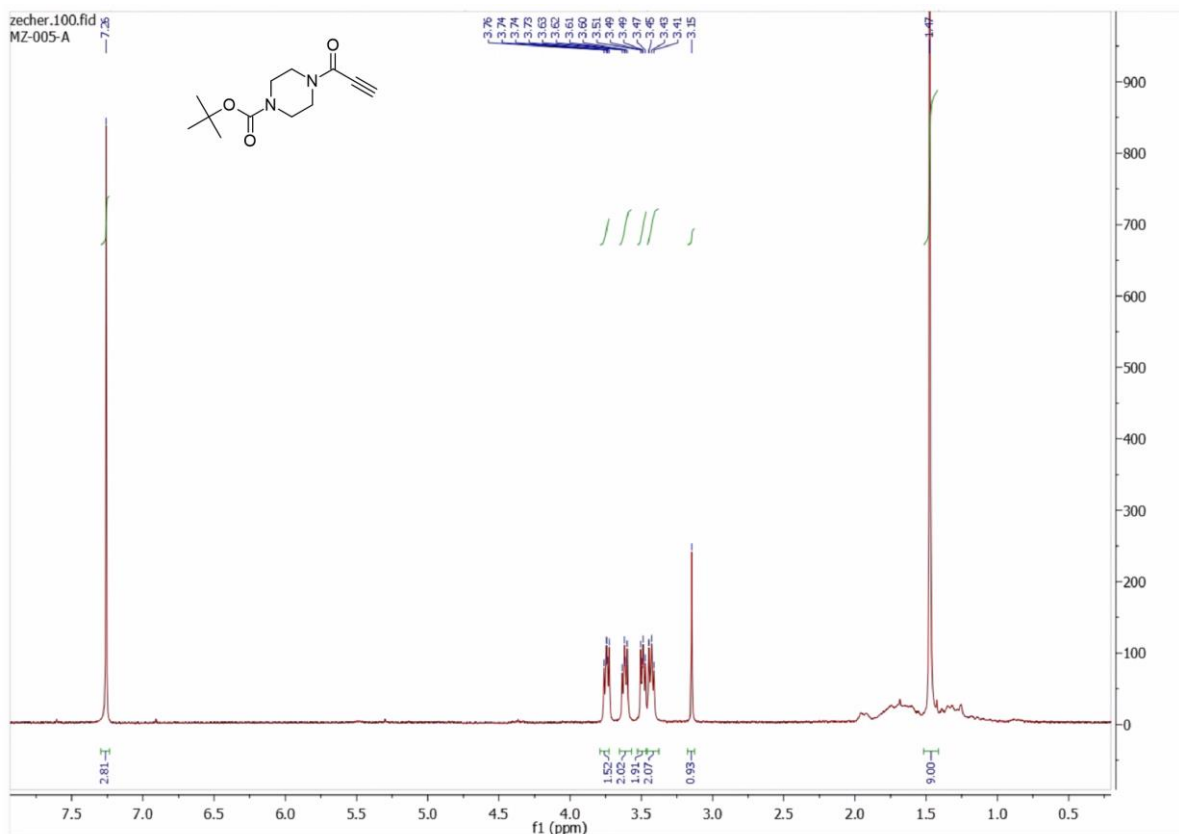


Abbildung 34: ^1H -NMR-Spektrum von tert-Butyl-4-propiolyl-piperazin-1-carboxylat (**3**) bei 300 Hz in CDCl_3 .

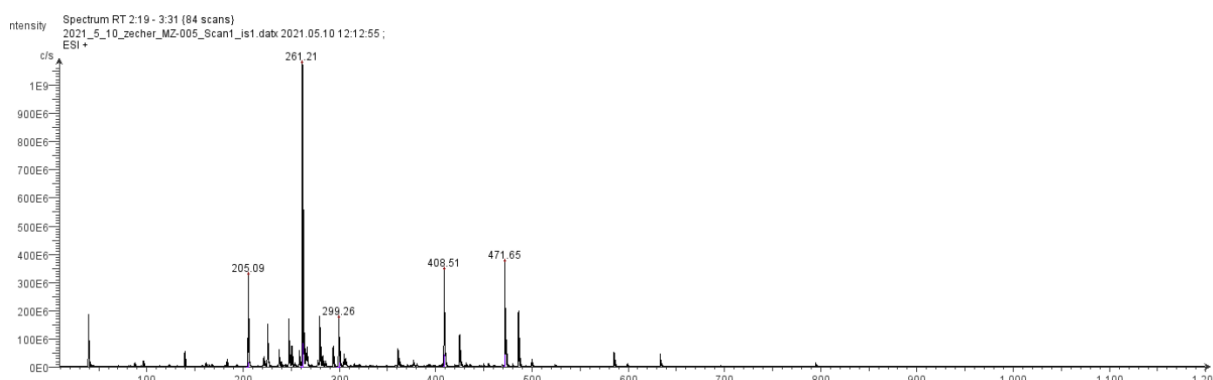


Abbildung 35: ESI-MS-Spektrum von **3**.

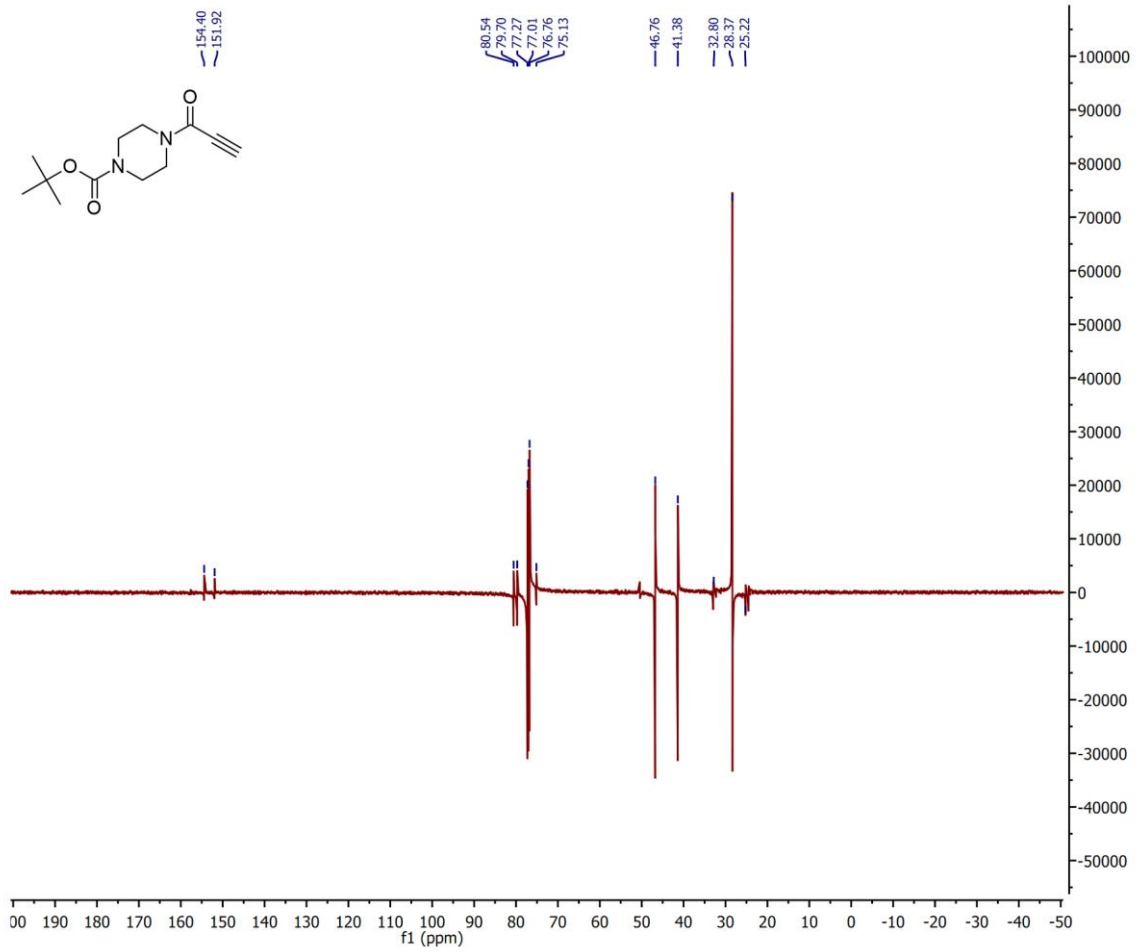


Abbildung 36: ^{13}C -NMR-Spektrum von **3** bei 125 Hz in CDCl_3 .

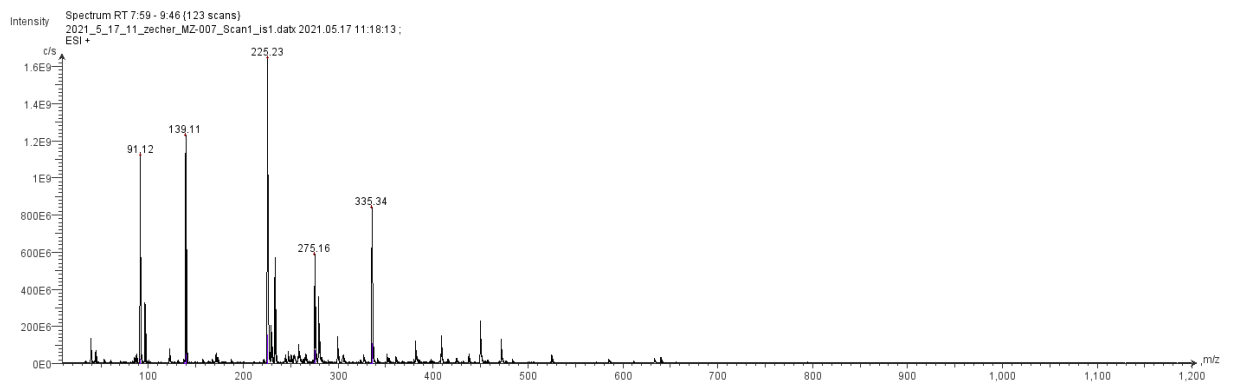


Abbildung 37: ESI-MS-Spektrum von N-Propiolylpiperazin (**4**).

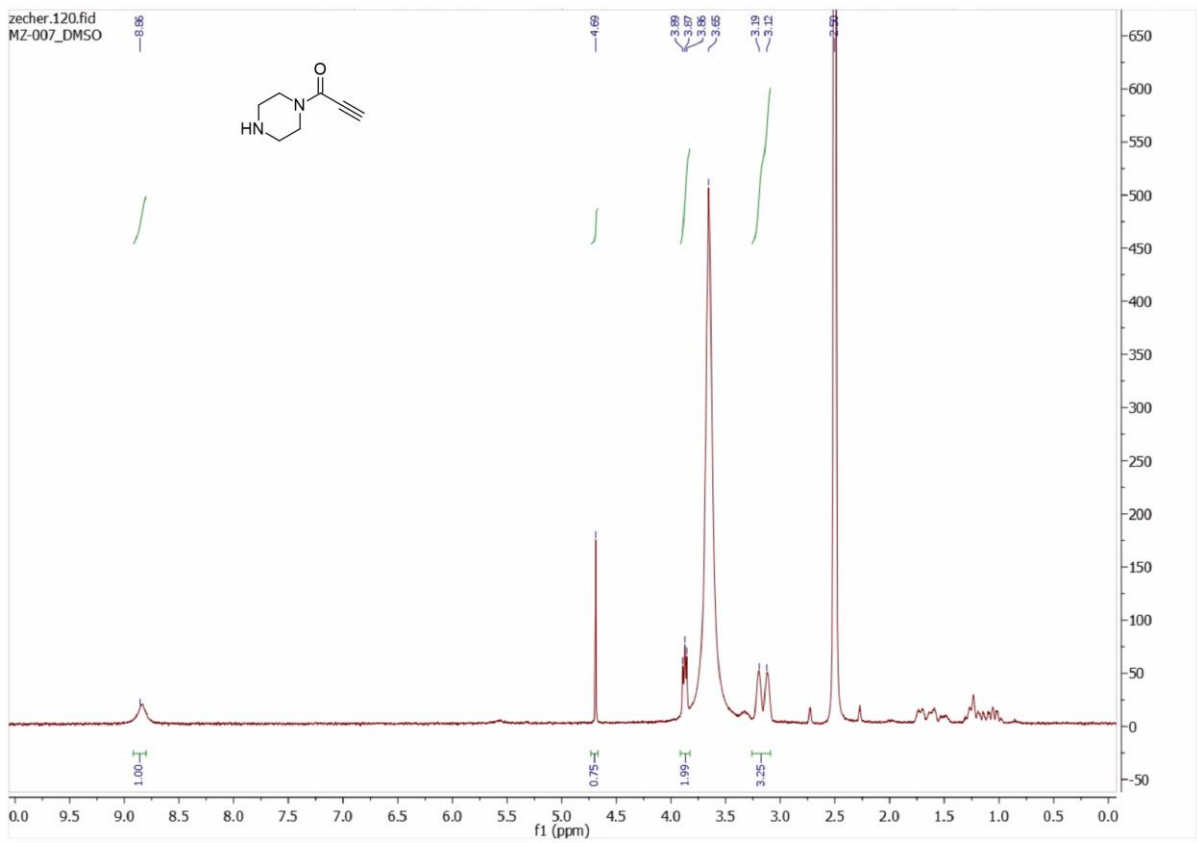


Abbildung 38: ^1H -NMR-Spektrum von **4** bei 300 MHz in DMSO- d_6 .

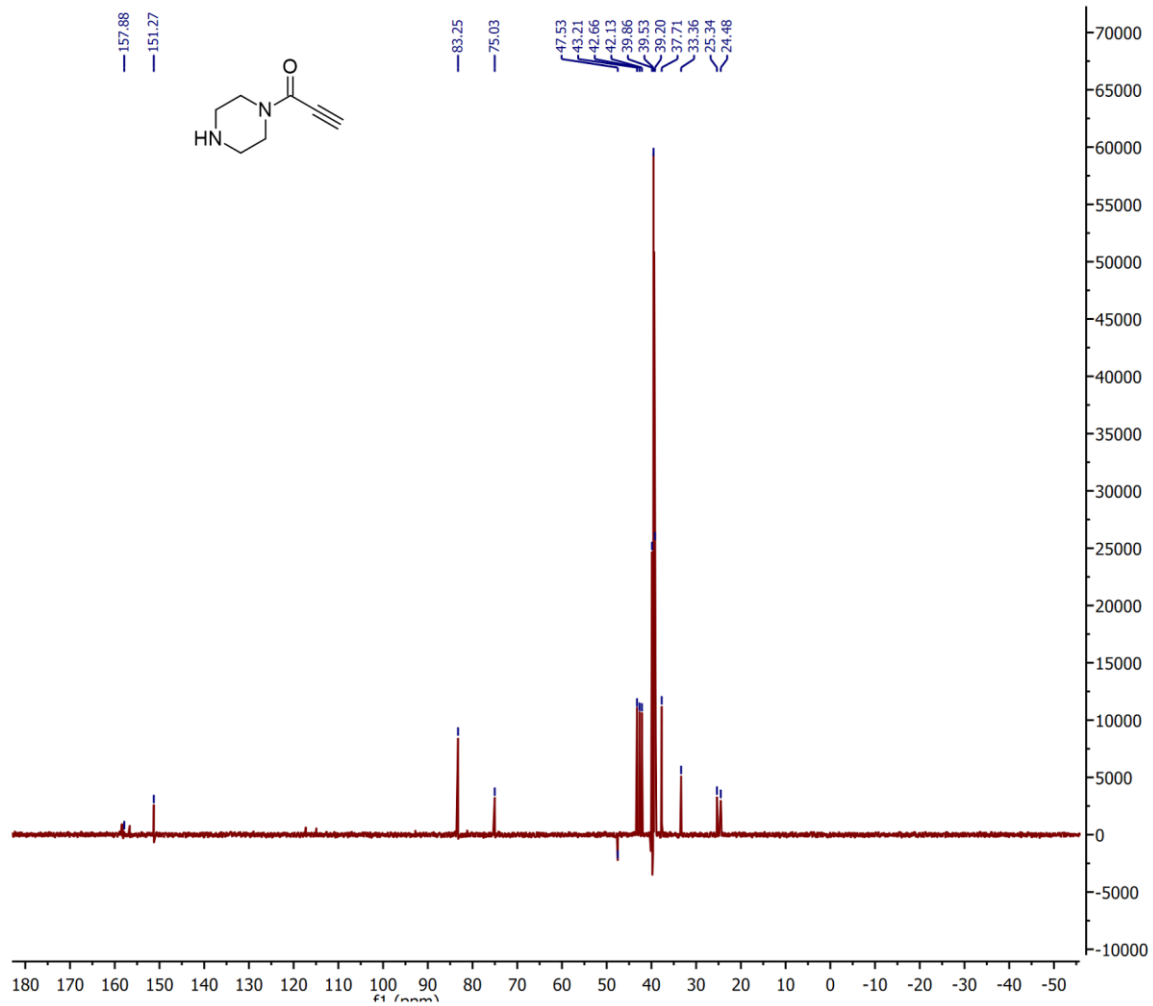


Abbildung 39: ^{13}C -NMR-Spektrum von **4** bei 125 MHz in DMSO-d₆.

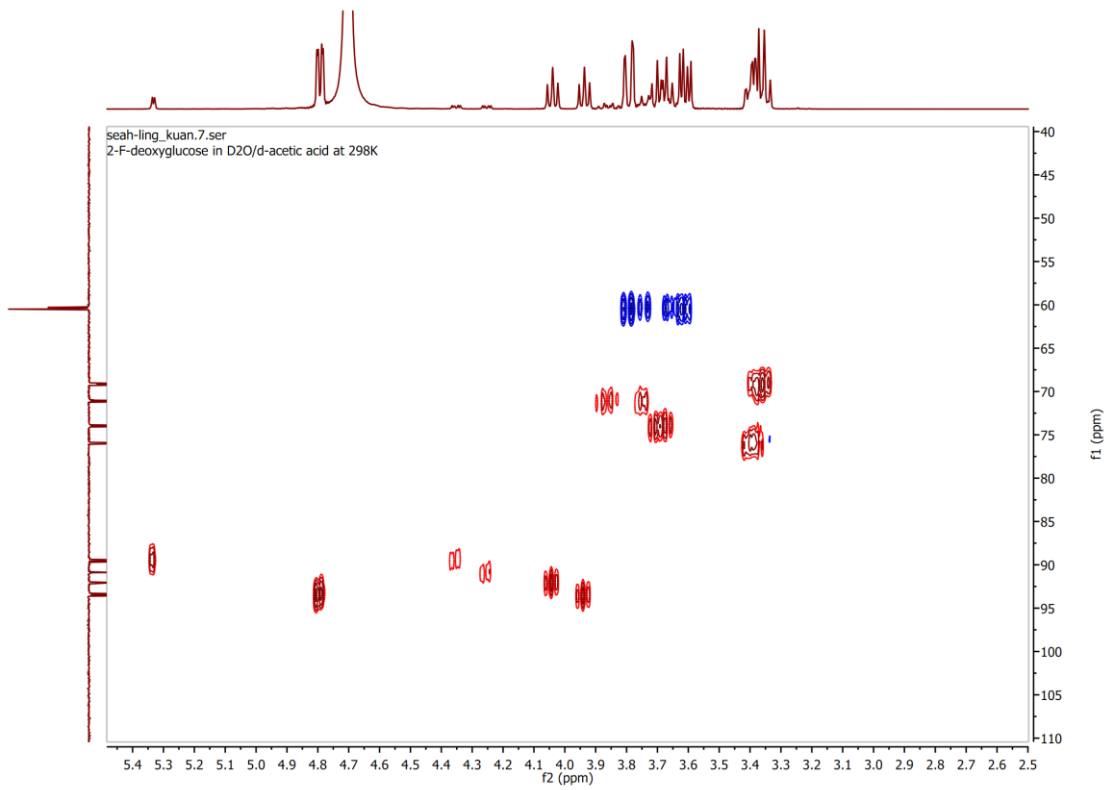


Abbildung 40: $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC von ^{19}F -FDG (5).

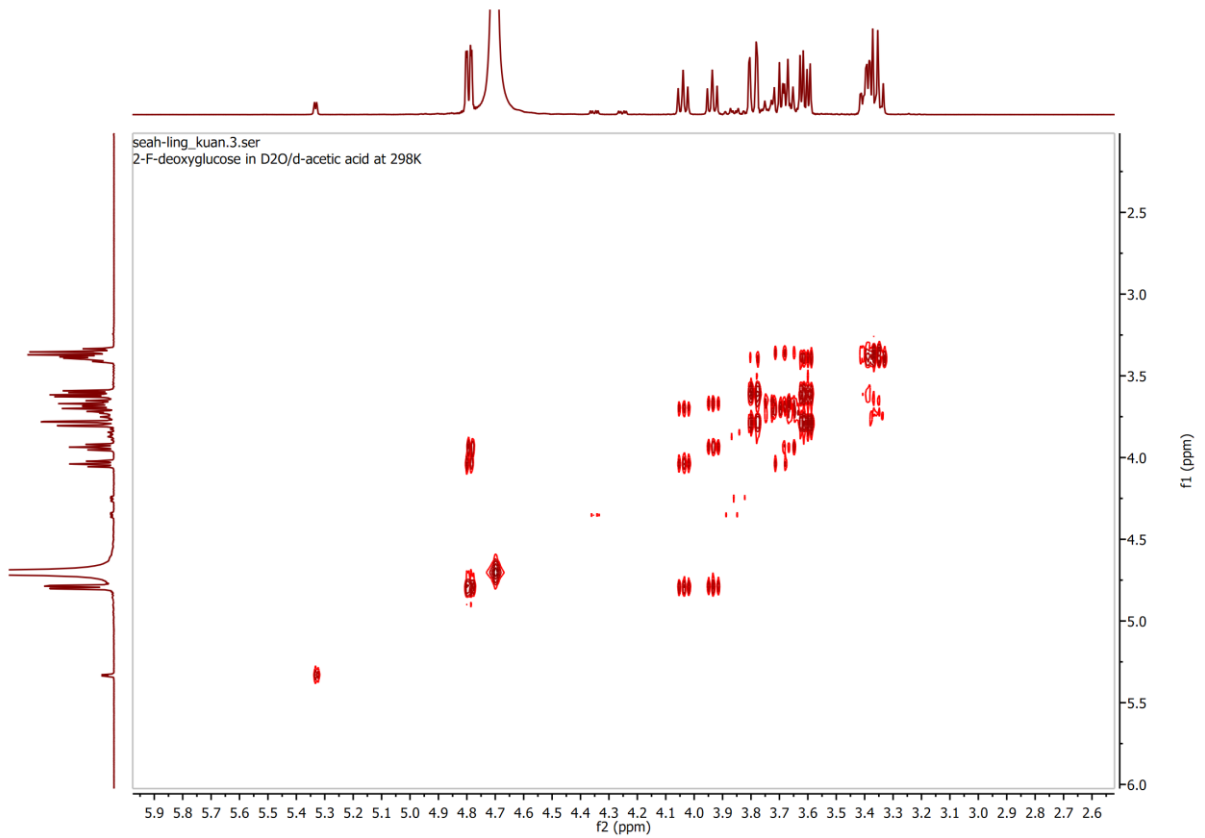


Abbildung 41: H,H-COSY von 5.

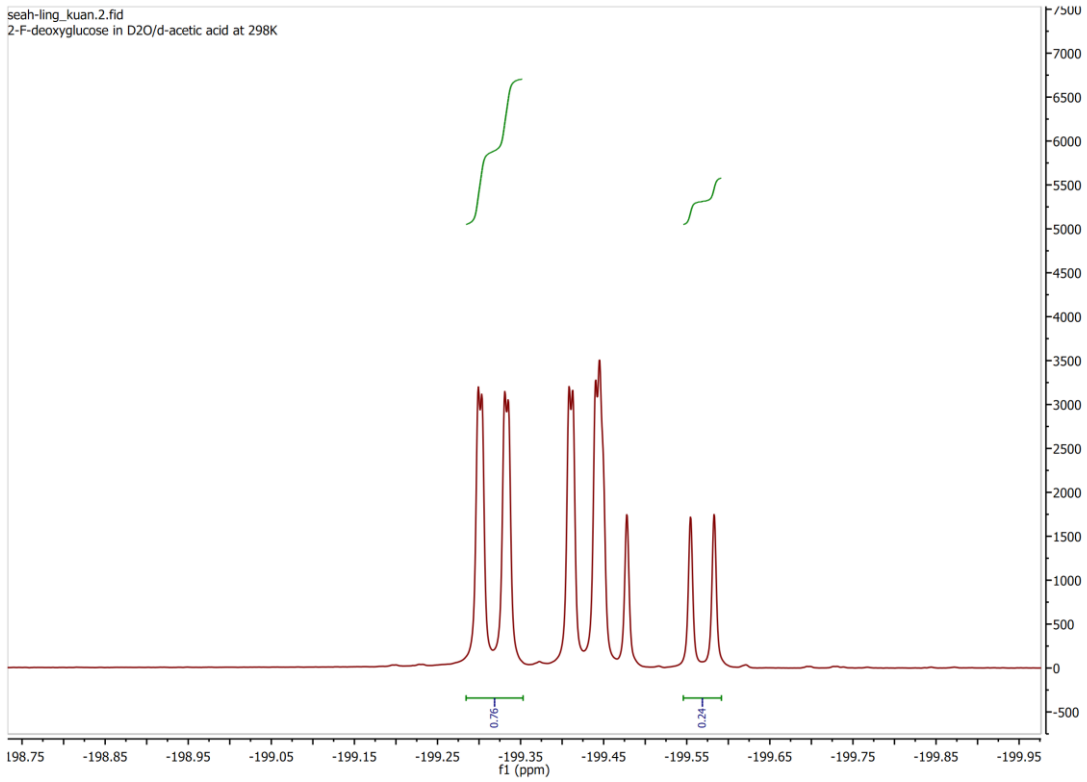


Abbildung 42: ^{19}F -NMR-Ausschnitt von **5** bei 500 MHz vor dem Erhitzen auf 60°C .

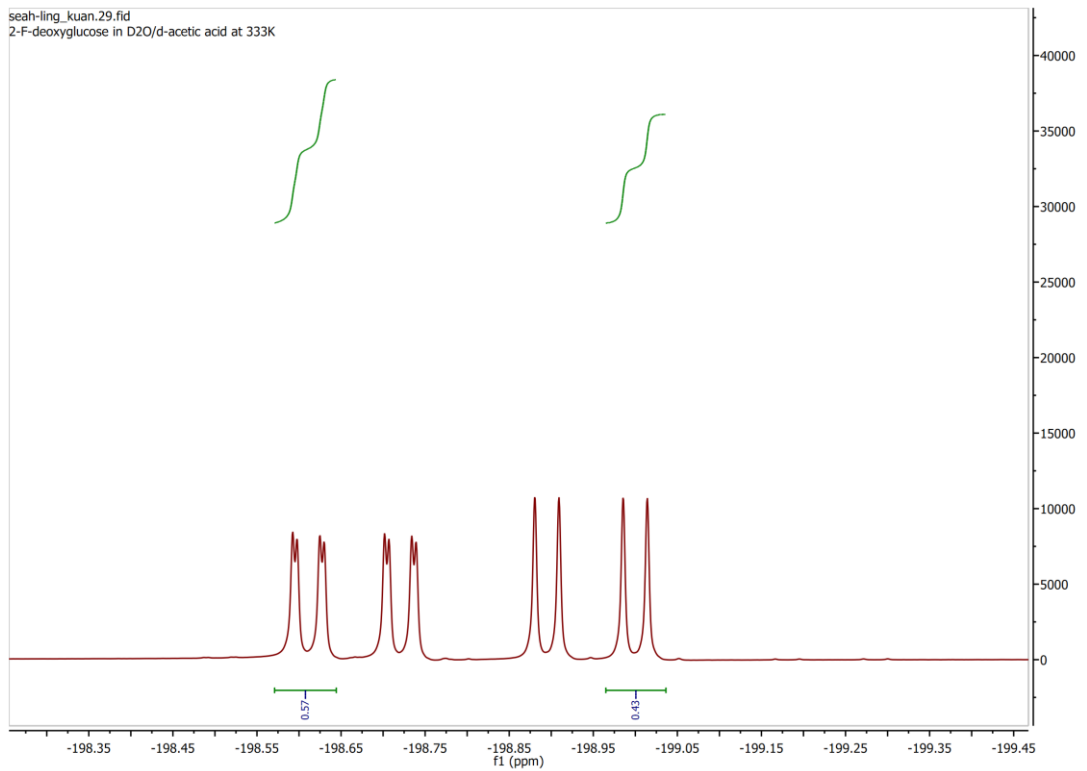


Abbildung 43: ^{19}F -NMR-Ausschnitt von **5** bei 500 MHz bei Erhitzen 60°C .

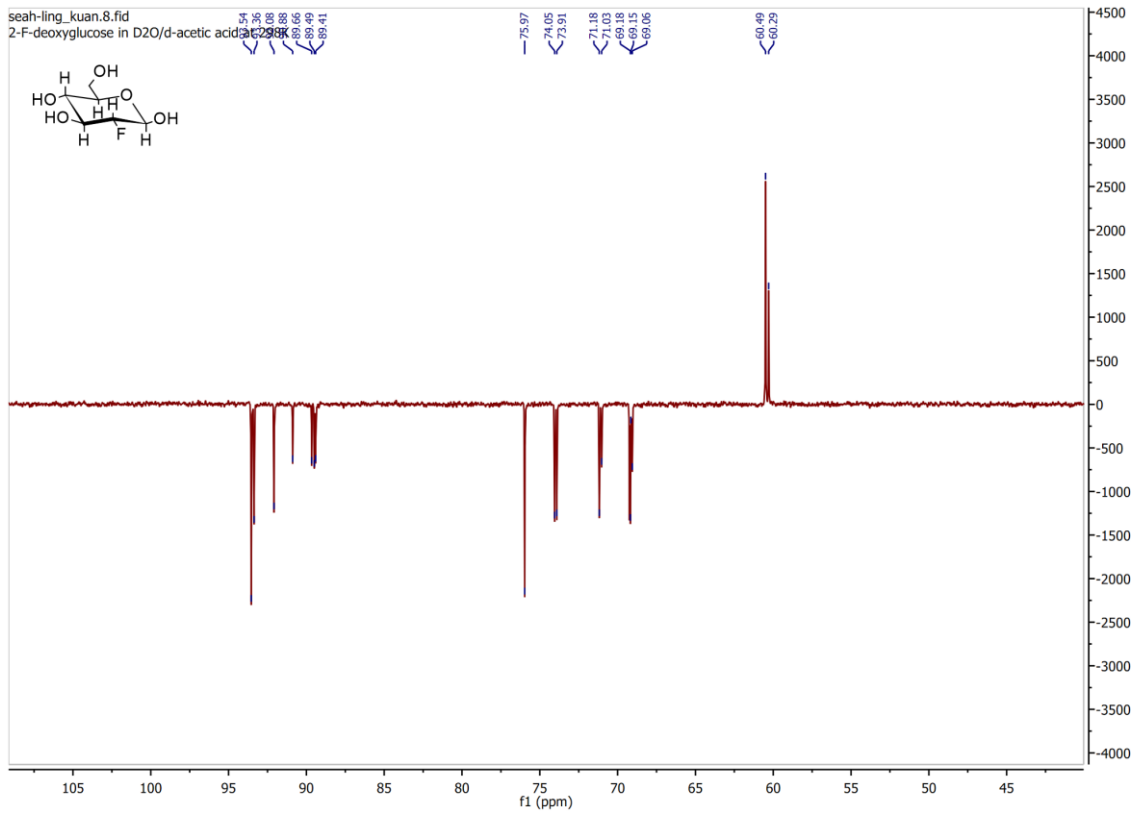


Abbildung 44: ^{13}C -NMR Spektrum von **5** bei 500 MHz vor Erhitzen auf 60°C .

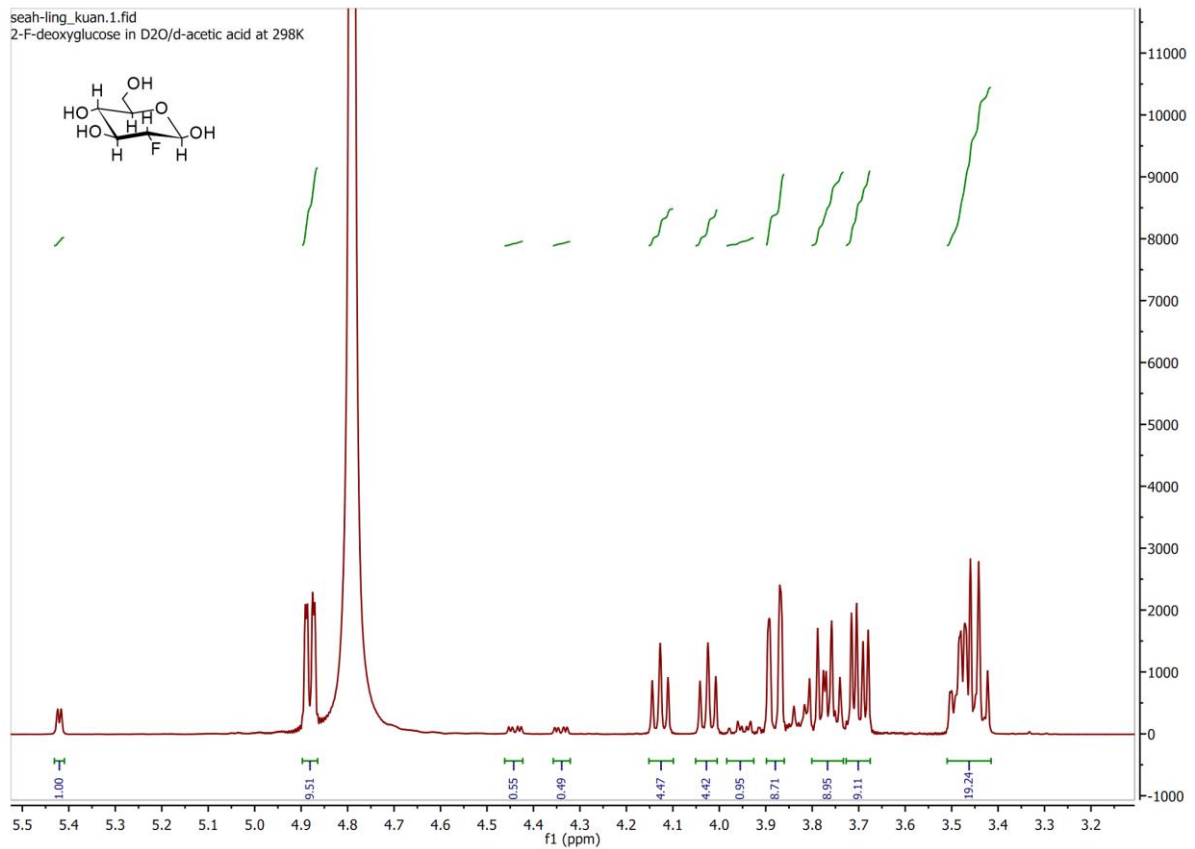


Abbildung 45: ^1H -NMR Spektrum von **5** bei 500 MHz vor Erhitzen auf 60°C .

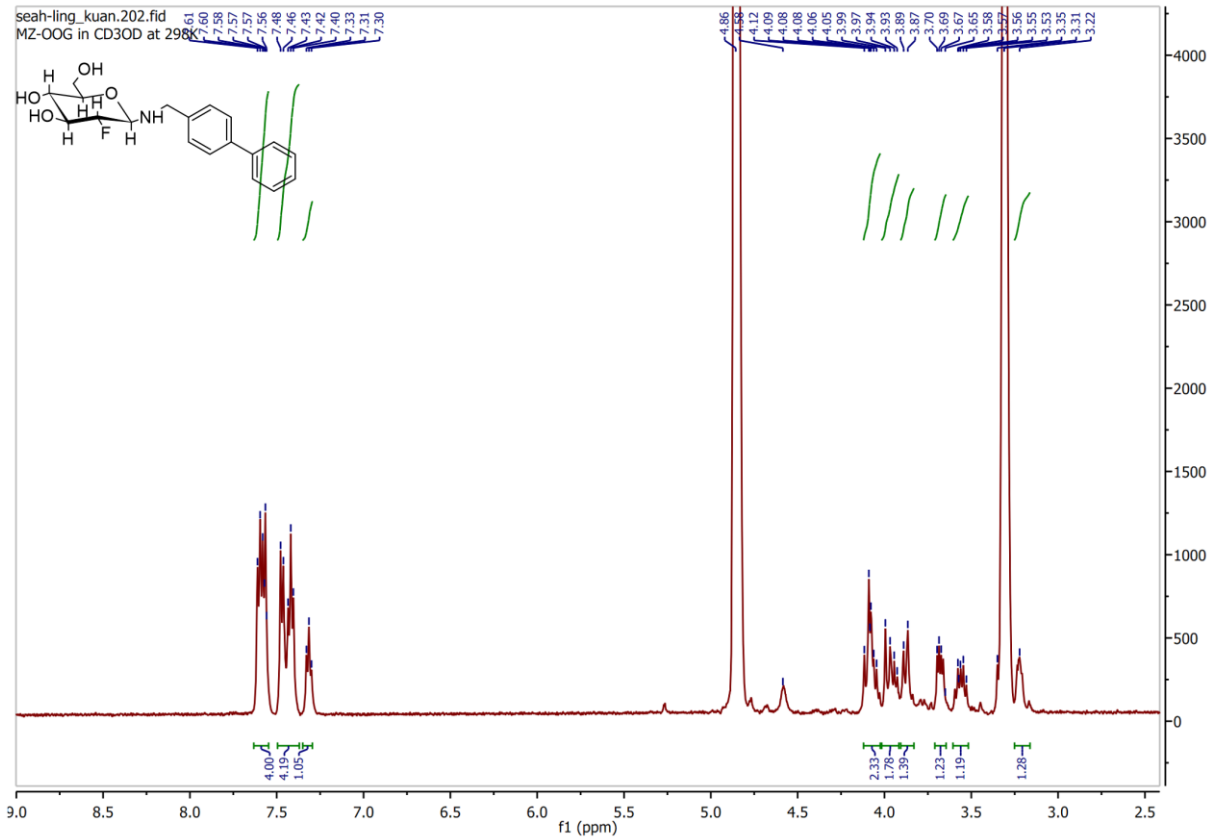


Abbildung 46: ^1H -NMR-Spektrum von N-(2-Deoxy-2-fluoro-D-Glycosyl)-4-Phenylbenzylamin (**8**) in CDOD_3 bei 500 MHz.

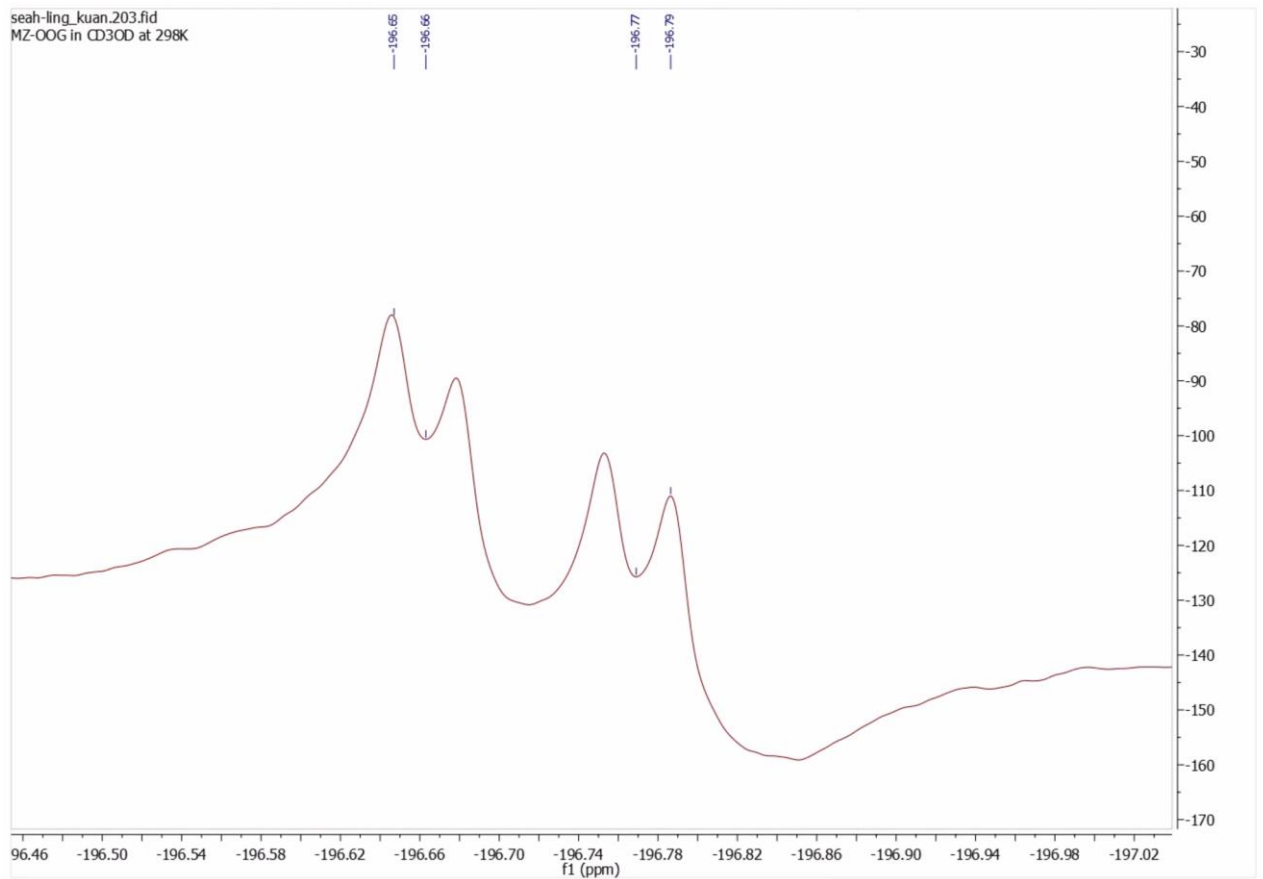


Abbildung 47: ^{19}F -NMR-Ausschnitt von **8** bei 500 MHz.