

**Tc-99m und Deuterium markierte Gehirn-affine
Radiodiagnostika -
Vergleich von HMPAO mit Cytectren-Derivaten
cyclischer Amine**

M. Wenzel, C. Klinge† und M. Saidi

Pharmazeutisches Institut, Freie Universität Berlin

Tc-99m and deuterium labelled radiodiagnostics -
Comparison of HMPAO with Cytectrene derivatives of cyclic amines.

Summary:

HMPAO-d₂ and Deuterium labelled esters of Cytectrenecarbonic ester with alcohols of cyclic amines were synthesized and additional labelled with Tc-99m. The organ distribution in rats showed a higher brain uptake of the cytectrene ester than HMPAO with a far higher Tc-99m concentration ratio brain/blood.

The deuterated compounds showed a lower Tc-99m concentration in blood, but no higher uptake in brain.

Key words: Tc-99m, deuterium, cytectren, HMPAO, brain uptake

Einleitung

Die Markierung Gehirn-affiner Substanzen mit dem klinisch bewährten Radioisotop Tc-99m ist von großem Interesse für die Nuclearmedizin. Während Technetium-markierte Verbindungen, die gezielt Receptor-Areale im Gehirn darstellen, bisher nicht existieren, gelingt die Darstellung der Gehirn-Durchblutung durch zwei Tc-99m Komplex-Verbindungen, das

Hexamethylen-propylenamin-oxim (HMPAO) und das Dimere des Ethyl-Cysteinat ECD (1 - 5).

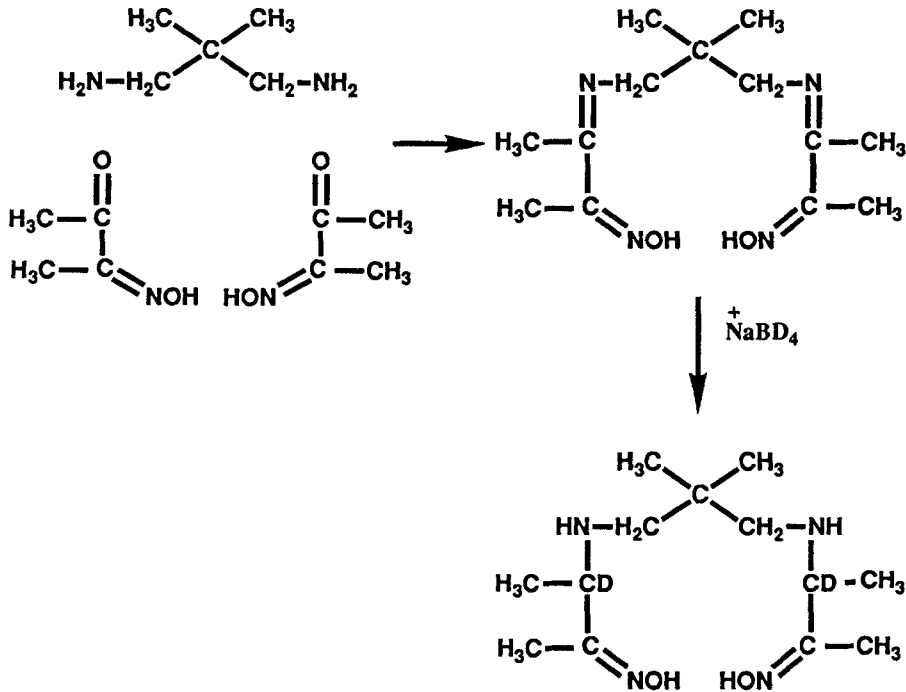
In der folgenden Arbeit beschreiben wir Versuche, um zu verbesserten biochemischen Parametern bei der Gehirn-Darstellung mit Tc-99m markierten Substanzen zu kommen. Als eine Möglichkeit dafür erschien eine Deuterierung des HMPAO, da Jod-markierte Amphetamin-Derivate bei einer zusätzlichen Deuterierung eine erhöhte Gehirn-Affinität aufwiesen (6).

Im Vergleich zum HMPAO wurden 2 Ester der Tc-99m markierten Cytecrencarbonsäure mit Alkoholen cyclischer Amine untersucht, die Gehirn-affine Verbindungen darstellen. Für diese Synthesen dienten als Ausgangsprodukte Ferrocen-Derivate cyclischer Amine, die sich nach einem einfachen Verfahren in analoge Tc-99m-Derivate überführen lassen (7, 9).

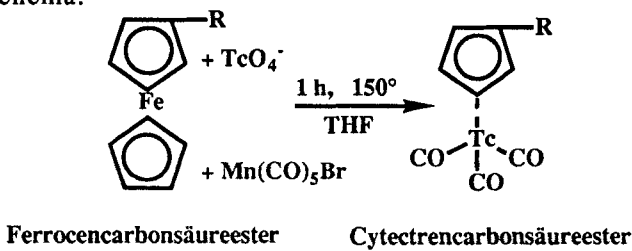
Ergebnisse und Diskussion

Synthesen

Der Einbau des Deuteriums in das HMPAO-d₂ erfolgt analog zu (5) in zwei Stufen. Im ersten Schritt wird aus 2,3-Butandionmonoxim und 2,2-Dimethyl-1,3-propandiamin das HMPAO-Diimin dargestellt, im zweiten Syntheseschritt wird das Diimin mit Natriumbordeuterid zum Hexamethylpropylenaminnoxim reduziert.



Als Ausgangsprodukte für die Tc-99m-Markierung von Cytectren-Derivaten haben sich Ester aus Ferrocen-Carbonsäuren mit den Alkoholen cyclischer Amine bewährt. Aus diesen erhält man beim Erhitzen mit Pertechnetat die analogen Cytectren-Carbonsäureester durch Zentralatom-Austausch und Carbonyl-Einlagerung (7, 9) nach folgendem Reaktionsschema.



Es gibt Anzeichen dafür, daß die Ester der Cytectren-Carbonsäure *in vivo* zu der freien Tc-99m markierten Cytectren-Carbonsäure hydrolysiert werden. Daher wurde versucht, durch Deuterium-Substitution des H-Atoms am OH-Gruppe tragenden Kohlenstoff⁺⁾ des cyclischen Amins zu Ester-Derivaten zu kommen, deren Hydrolyse verlangsamt war. Zur Deuterierung wurden die entsprechenden Ketone N-Methyl-piperidon bzw. Chinuclidinon mit Hilfe von deuteriertem Lithium-Aluminium-Hydrid zu den Alkoholen reduziert.

Biochemische Untersuchungen

Der Ester der Cytectrencarbonsäure mit 4-Hydroxy-N-(methyl)-piperidin zeigt - im Vergleich zum Ester mit Chinuclidinol (Tab. 1) - eine ausgezeichnete Gehirn-Affinität bei Ratten (9). Daher war es interessant, die Tc-99m-Konzentration im Gehirn und den Konzentrations-Quotient Hirn/Blut dieser Verbindung mit den Werten des HMPAO unter eigenen Versuchsbedingungen zu vergleichen. Die von uns hier erhobenen Werte zur Organverteilung von Tc-99m markiertem HMPAO stimmen gut mit den Literaturbefunden überein. Wie Abb. 1 zeigt, ist die Tc-99m Konzentration im Gehirn von Ratten nach Gabe des Cytectrencarbonsäure-Esters in der Anfangsphase deutlich höher als beim HMPAO.

Ein noch größerer Vorteil des Esters gegenüber dem HMPAO ergibt sich beim Studium des Konzentrations-Quotienten Hirn/Blut: Dieser Quotient liegt beim Ester bis zum Faktor 18 höher als beim HMPAO, siehe Abb. 2.

Die Exkretion der Tc-99m-Radioaktivität ist bei Mäusen nach Gabe des Tc-99m markierten Cytectrenesters und des HMPAO annähernd identisch.

Die relativ hohe Anreicherung des Cytectrenesters im Gehirn führte zu der

^{+) Über die Auswirkung einer Alkylierung an diesem C-Atom, wird an anderer Stelle berichtet.}

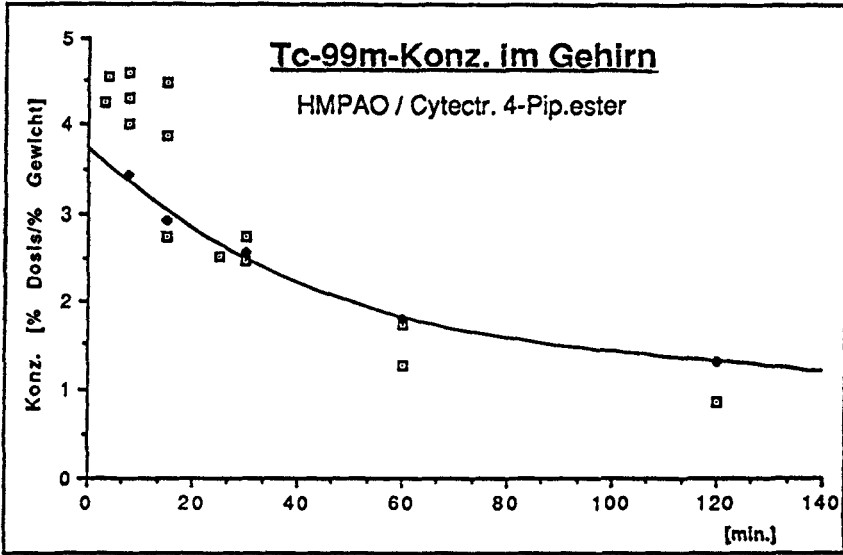


Abb. 1: Vergleich der Gehirn Konzentration von Tc-99m markiertem HMPAO (durchgezogene Kurve) und Cytectrencarbonsäure-ester mit N-(Methyl)-piperidin-4-ol (□). Jeder Meßpunkt Mittelwert von 3-4 Ratten ♀

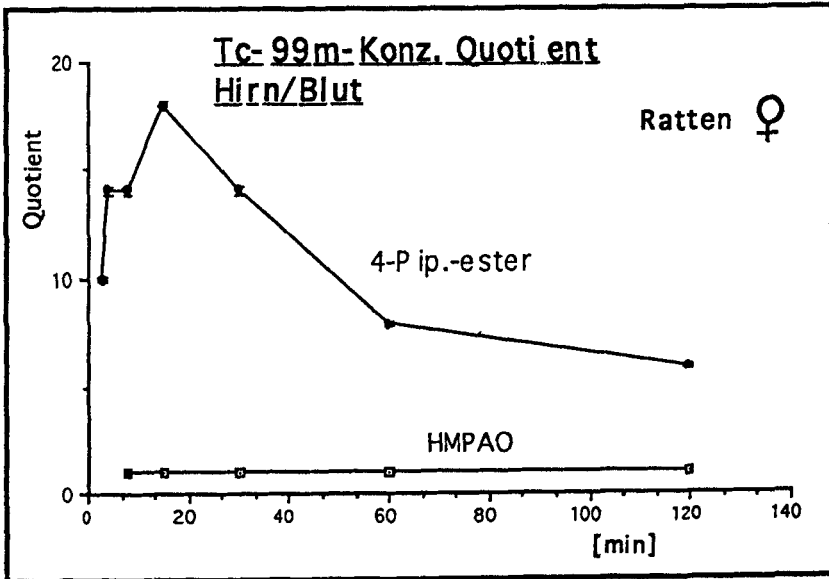


Abb. 2: Vergleich des Konz.-Quotienten Hirn/Blut

Frage, ob eine Deuterierung des Moleküls zu einer weiter erhöhten Gehirnaufnahme führt, wie es bei Jod-Amphetamin (6) gezeigt wurde.

Gemäß Tab. 1 wird bei dem Cytectrencarbonsäure-ester mit N-(Methyl)-piperidinol und dem Chinuclidinol nach Einführung eines Deuteriumatoms zwar die Organ-Verteilung der Technetium-markierten Verbindung geändert, eine erhöhte Gehirn-Affinität tritt jedoch nicht auf.

Auch beim HMPAO erhält man nach Einführung von 2 Deuterium-Atomen in das Molekül eine veränderte Organverteilung aber ebenfalls keine erhöhte Tc-99m-Konzentration im Gehirn, vgl. Tab. 2. Günstig ist dagegen die verminderte Konzentration in Blut und Muskel nach Deuterierung sowohl bei den beiden Estern als auch beim HMPAO. Dieser Effekt war schon beim deuterierten Jod-markierten Amphetamin und beim deuterierten Tc-99m markierten MIBI (8) nachweisbar.

Schlußfolgerungen

Wenn auch im Einzelfall die Deuterierung von Radiodiagnostika sinnvoll ist (6), kann man für dieses Vorgehen keine generelle Empfehlung aussprechen, da sich in dieser Arbeit im Zielorgan - hier das Gehirn - keine erhöhte Tc-99m-Anreicherung nach Deuterierung nachweisen läßt.

Die Ergebnisse zeigen weiter, daß der Ester der Cytectrencarbonsäure mit N-Methyl-piperidinol in den biochemischen Parametern dem HMPAO deutlich überlegen ist. Dazu kommt, daß der Tc-99m markierte Ester eine chemisch stabile Verbindung ist, während der Tc-99m-Komplex des HMPAO innerhalb von 60 Min. weitgehend zerfällt (10). Damit wäre - im Klinikbetrieb - bei dem Cytectrenester nur eine täglich einmalige Herstellung notwendig, was besonders bei einer zeitlich versetzten Patienten-Bestellung für die Gehirn-Szintigraphie vorteilhaft ist.

Tab. 1: Organ-Verteilung Tc-99m markierter Cytectrencarbonsäureester nach Deuterierung des Aminoalkohols bei Ratten, t = 15'; n = 3 O

Ester der Cytectren-carbonsäure mit:	Tc-99m-Konzentration [% Dosis/% Körpergewicht]							
	Muskel	Blut	Leber	Lunge	Niere	Herz	Gehirn	
Chinuclidinol-d	46 ± 8	23 ± 1	265 ± 30	720 ± 99	800 ± 40	88 ± 10	180 ± 20	
Chinuclidinol	62 ± 10	32 ± 5	405 ± 50	1290 ± 98	720 ± 40	149 ± 10	230 ± 30	
d/H [%]	74	72	65	56	111	59	78	
N(Methyl)-piperidinol-d	46 ± 3	19 ± 1	320 ± 50	560 ± 30	740 ± 10	110 ± 8	270 ± 20	
N(Methyl)-piperidinol	67 ± 1	23 ± 1	213 ± 8	980 ± 60	900 ± 80	160 ± 10	386 ± 7	
d/H [%]	69	83	150	57	82	69	70	

Tab. 2: Vergleich der Organ-Verteilung von HMPAO und HMPAO-d₂ bei Ratten Q, n = 4

Zeit nach i.v.Inj.		Tc-99m-Konzentration [% Dosis/% Körpergewicht] x 100							
		Muskel	Blut	Leber	Lunge	Niere	Gehirn		
HMPAO-d ₂	15'	63 ± 3	85 ± 4	626 ± 44	214 ± 21	254 ± 7	61 ± 4		
HMPAO		72 ± 8	67 ± 11	486 ± 61	407 ± 43	424 ± 75	129 ± 17		
d ₂ /H [%]		87	126	129	53	60	47		
HMPAO-d ₂	30'	34 ± 2	74 ± 10	438 ± 37	210 ± 14	221 ± 15	47 ± 5		
HMPAO		59 ± 11	114 ± 11	335 ± 13	456 ± 35	252 ± 9	102 ± 14		
d ₂ /H [%]		58	65	131	46	84	46		
HMPAO-d ₂	180'	23 ± 2	39 ± 2	482 ± 29	97 ± 2	128 ± 6	38 ± 2		
HMPAO		66 ± 8	67 ± 10	165 ± 8	296 ± 25	137 ± 8	147 ± 16		
d ₂ /H [%]		35	58	291	33	93	26		

Material und Methoden

HMPAO-Imin

Diese Vorschrift entspricht dem Beispiel 1 in (5).

12,0 g 2,3-Butandionmonoxim (118,7 mmol; MG 101,1) wurden in 40 ml Ethanol gelöst und unter Rückflußkühlung zum Sieden erhitzt. Unter ständigem Rühren wurden 5,86 g 2,2-Dimethyl-1,3-propandiamin (57,3 mmol; MG 102,2) langsam dazugegeben. Die Lösung wurde 10 Min. weiter erhitzt, auf Raumtemp. abgekühlt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die gebildeten Kristalle (Fp. 115°C.) wurden mit Petrolether 40/60 gewaschen und i. Vak. getrocknet und ohne Reinigung weiter verarbeitet.

Ausbeute an HMPAO-Imin: 9,2 g (60 % d. Th.)

HMPAO-d₂

Das HMPAO-Imin 7,4 g (27,6 mmol; MG 268) wurde in 50 ml Ethanol 95% suspendiert und auf 0°C. gekühlt. Unter ständigem Rühren wurden portionsweise über einen Zeitraum von 45 Min. 2,4 g Natriumbordeuterid NaBD₄ 2,4 g (53 mmol; MG 38) dazugegeben. Die Lösung wurde auf Raumtemp. erwärmt und über Nacht weitergerührt. 50 ml Wasser wurden hinzugefügt und das Ethanol i. Vak. am Rotavapor abgezogen. Der pH der Lösung wurde mit wenigen Tropfen verdünnter HCl auf pH 10,5 eingestellt und es wurde mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen wurden gesammelt und mit Natriumsulfat getrocknet. Durch Konzentrierung i. Vak. und Abziehen des Chloroforms wurde ein amorpher Rückstand erhalten.

Zweimalige Umkristallisation mit Ethanol ergab 4,45 g HMPAO-d₂ (59 % d. Th.) mit einem konstanten Fp. von 144°C. Fp. von nicht-deuteriertem HMPAO 144-145°C.

Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 F 254 Merck

mit Ether/Diethylamin 19 : 1; R_F = 0,24

(identisch mit Original HMPAO)

Detektion: 0,5 %ige Kupferchlorid-Lösung

Das NMR entspricht dem nicht-deuteriertem HMPAO, jedoch fehlt das Signal 3,13 ppm (2H, q, CHMe).

Herstellung von N-Methyl-4-piperidinol-4-d

Zu einer Suspension von 420 mg LiAlD₄ (10 mmol) in 14 ml trockenem Ether läßt man langsam eine Lösung von 2,3 g 1-Methyl-4-piperidon (20 mmol) in 15 ml Ether zutropfen. Danach erwärmt man die Lösung noch weitere 60 min. bei 40°C., anschließend wird überschüssiges LiAlD₄ mit 0,5 ml Wasser zersetzt, filtriert und mit Ether die wässrige Lösung extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels erhält man 2,1 g (92,7 %) des deuterierten Piperidinols.

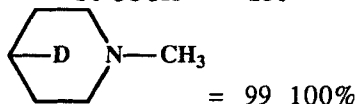
Herstellung des Esters mit Ferrocencarbonsäure (9)

Aus Ferrocencarbonsäure stellt man mit Hilfe von Oxalylchlorid das Säurechlorid her und setzt 1,24 g vom Säurechlorid (5 mmol) mit 585 mg deuteriertem Piperidinol (5 mmol) in 10 ml trockenem Pyridin um. Nach Zugabe des Säurechlorids erwärmt man noch 18 Std. auf 50°C. und gießt anschließend den Ansatz auf Wasser. Die wässrige Phase wird mit Ether extrahiert. Das Lösungsmittel wird abgezogen und über eine Kieselgelsäule

(15 x 3 cm) mit dem Laufmittel Aceton/Ethanol/Ammoniak (92 : 6 : 2) getrennt.

Das Lösungsmittel von Fraktion II wird abgezogen und aus N-Hexan umkristallisiert. Man erhält 650 mg der reinen Esters mit dem Schmelzpunkt von 90°C.

MS: M⁺ = 328 30%
Fc-COOH = 230 30%



Herstellung von deuterierten 3-Chinuclidinol-3-d

In eine Suspension von 840 mg LiAlD₄ (20 mmol) in 50 ml Ether wird langsam eine Lösung von 3,6 g Chinuclidinon (28,8 mmol) als freie Base in 50 ml Ether zugetropft. Danach wird noch 1 Std. am Rückfluß gekocht. Restliches LiAlD₄ wird mit 5 ml H₂O zersetzt und danach der Ansatz filtriert. Das Chinuclidinol wird mit Methylenchlorid extrahiert (in Ether schlecht löslich) Nach Abziehen des Lösungsmittels und Trocknen erhält man 2,4 g (65,4 % der Th.) des deuterierten Chinuclidinols, Schmelzpunkt 219°C. Die Substanz wurde direkt für die Esterbildung eingesetzt.

Umesterung von Ethyl-ferrocencarboxylat mit 3-Chinuclidinol.

Zu 2,1 g deuteriertem 3-Chinuclidinol (16,3 mmol) in 10 ml Toluol gibt man 50 mg Natriummetall und kocht anschließend 30 min. am Rückfluß. Zu dieser Lösung gibt man 680 mg Ethylferrocenylcarboxylat (2,63 mmol) in 10 ml Toluol und kocht weitere 24 Std. am Rückfluß. Der gewünschte Chinuclidinolester wird durch Chromatographie über präparative DC-

Platten abgetrennt. Man erhält 93 mg (11 % der Th.) des gewünschten Esters mit dem Schmelzpunkt 96.5°C.

Laufmittel: Ether/Diethylamin 95 : 5

Fc-COOC₂H₅ R_F = 0,76; Fc-COOH R_F = 0

Chinuclidinol-ferrocencarbonsäure-ester R_F = 0,23

Zur Analytik vergleiche (11).

Radioaktive Markierung

Die Tc-99m-Markierung von HMPAO erfolgte wie in (5) angegeben.

Zur Tc-99m-Markierung der Ferrocenderivate wurde jeweils 1-2 mg der Ferrocenverbindung mit 1 mg Mn(CO)₅Br in 50 µl Tetrahydrofuran unter Zugabe von Tc-99m-Pertheneat 1 h auf 130°C. in einer Ampulle erhitzt und aufgearbeitet, wie in (7, 9) beschrieben.

Bestimmung der Organverteilung

Die Messung der Tc-99m-Konzentration in den einzelnen Organen erfolgte wie in (6-8) beschrieben.

Danksagung:

Wir danken für gewissenhafte experimentelle Mitarbeit Frau G. Günther, Frau M. Scholl und Frau B. Brüggener sowie Herrn B. Kamann.

Die Arbeiten mit den deuterierten Verbindungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, die Arbeiten mit den Cytectren-Verbindung durch das Institut für Diagnostikforschung an der FU Berlin gefördert.

Für anregende Diskussionen danken wir Herrn Dr. P.E. Schulze und Herrn Priv. Doz. Dr. Semmler.

Literatur

- 1 J.R. Ballinger, K.Y. Gulenchyn, and R. H. Reid
Journal of Nuclear Medicine, (1990) 31: No. 1, 118-122.
- 2 K. Nakamura, Y. Tukatani, A. Kubo, S. Hashimoto et al.
Eur. J. Nucl. Med. (1989) 15: 100-107.
- 3 S. Vallabhajosula, R.E. Zimmerman, M. Picard, P. Stritzke et al.
J. Nucl. Med. (1989), 30: 599-604.
- 4 G. Lucignani, C. Rossetti, P. Ferrario, L. Zecca et al.
Eur. J. Nucl. Med. (1990) 16: 249-255.
- 5 L.R. Canning, D. Nowotnik, R. Neirinckx, i. Piper
Europa-Patent (1986); Nr. 194 843
- 6 M. Wenzel
J. Labelled Comp. Radiopharmac. (1989) 27: 1143-1155.
- 7 M. Wenzel
J. Labelled Comp. Radiopharmac. (1992) 31: No. 9
- 8 M. Wenzel
J. Labelled Comp. Radiopharmac. (1991); 29: 265-271.
- 9 M. Wenzel und M. Saidi
J. Labelled Comp. Radiopharmac; (1993) 33: No. 1: 77-80
- 10 J. Hung, W. Volkert, R. Holmes
Nucl. Med. Biol. (1989); 16: 675-680
- 11 M. Wenzel und D. Preiß
J. Labelled Comp. Radipharac. (1989); Vol. 27: 369-376