

Tc-99m markierte Östradiol-Derivate Synthese, Organverteilung und Tumor-Affinität

M. Wenzel und C. Klinge†

Pharmazeutisches Institut der Freien Universität Berlin

Tc-99m labelled estradiol-derivatives - Synthesis, organ distribution and tumor affinity

Summary:

As starting material for the Tc-99m labelling 17-(Ferrocenyl-ethinyl)-estradiol and 16-(Ferrocenyliden)-estron were synthesized.

These ferrocene derivatives were heated with Mn-Br(CO)₅ and Tc-99m-pertechnetate to yield the labelled corresponding cyctectrene steroid compounds. In organ distribution studies with infantile female rats a binding of the Tc-99m labelled steroids to the estradiol receptor in the rat uterus was demonstrated. The binding to MXT-mamma tumors in mice yielded a Tc-99m concentration ratio tumor/muscle of 3 : 1.

Key words: Tc-99m, estradiol, cyctectrene, mammatumor, ferrocene

Einleitung

Ein zentrales Ziel der Radiopharmazie ist die Markierung niedermolekularer Rezeptor-Liganden mit γ -Strahlern. In der Nuclearmedizin wird zur Markierung meist Tc-99m verwendet, in der Regel in Form von Chelatverbindungen. Chelate sind aber in ihrer chemischen Variabilität sehr begrenzt. Dagegen zeigen die neuen Halbsandwich-Komplexe des Technetiums vom Cymantrentyp (Cyctectrene) eine ausgezeichnete Variabilität. Sie sind außerdem chemisch sehr stabil (1, 2).

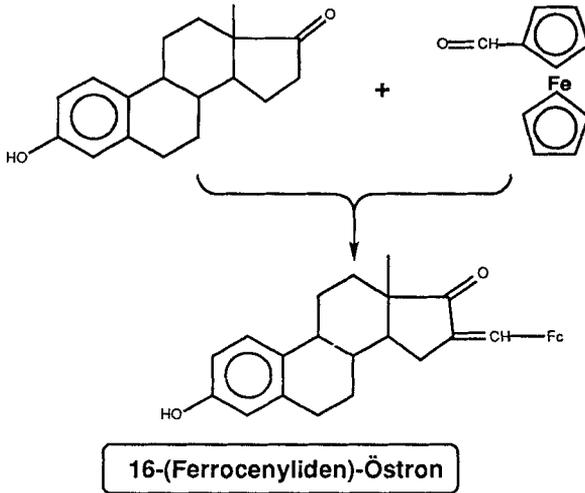
Somit bieten Technetium-99 markierte Cyctectren-Derivate neue Möglichkeiten zur Markierung biologisch interessanter Moleküle.

Als Beispiel beschreiben wir nachstehend die Technetiummarkierung von Östradiolderivaten, die potentielle Rezeptorliganden für Östrogen-Rezeptoren darstellen.

Synthesen

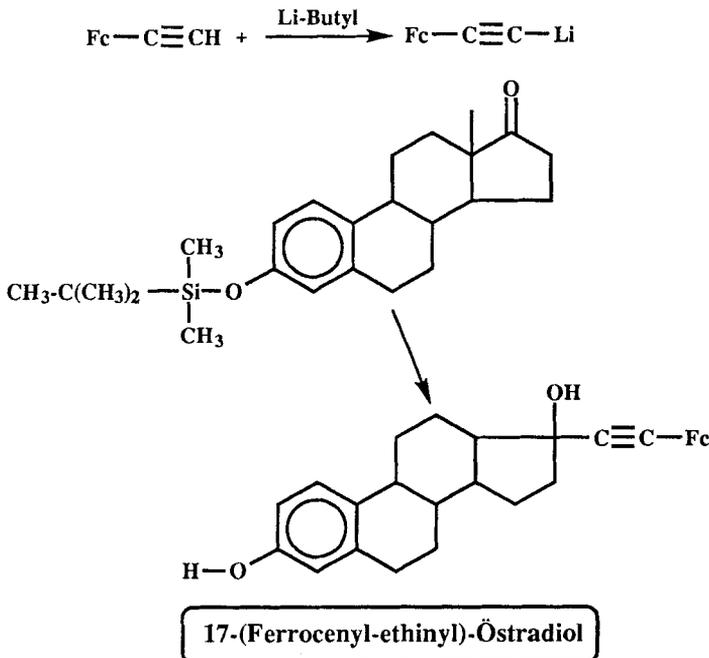
Ausgangspunkte für die radioaktiven Synthesen waren Ferrocen*-Derivate vom Östradiol bzw. Östron. Zum Beispiel ist das 16-(Ferrocenyliden)-östron erhältlich durch Kondensation von Ferrocenaldehyd an die Position 16 des Östron:

* Fc- = Ferrocenyl-



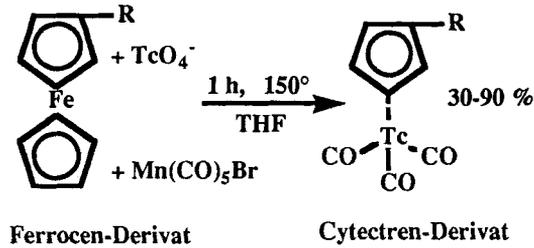
Für die radioaktive Markierung mit Tc-99m wurde die oben beschriebene Östron-Ferrocen-Verbindung und nicht das Östradiol-Derivat eingesetzt, weil so die Synthese des radioaktiven Cytectrens mit erheblich besseren Ausbeuten verlief. Die Tc-99m markierte Östron-Verbindung wurde anschließend mit NaBH_4 zum gewünschten radioaktiven Östradiol-Derivat reduziert.

Zur Herstellung von 17-(Ferrocenyl*-ethinyl)-Östradiol wurde zunächst nach K. Schlögl (3) Ferrocenyl-acetylen über Ferrocenylchloracrolein synthetisiert. Durch Umsatz mit Butyllithium erhielt man das Lithium-Salz, das mit Östron-Silylether nach G. Jaouen und A. Vessieres (4) umgesetzt wurde (nächstes Schema). Die Abspaltung der Silylgruppe gelang problemlos (4, 5).



* Fc- = Ferrocenyl-

Die Ferrocen-Derivate der Steroide wurden nach einer früher beschriebenen Methode bei Anwesenheit von Carbonyl-Donatoren durch Zentralatomaustausch mit radioaktiven Per technetat in Tc-99m-markierte Steroid-Cytectren-Derivate überführt (1).



Die markierten Rezeptorliganden wurden anschließend durch chromatographische Methoden von inaktiven und radioaktiven Verunreinigungen befreit und danach für Studien der Organverteilung eingesetzt.

Biochemische Untersuchungen

Von den Tc-99m markierten Östradiol-Derivaten wurde die Organverteilung und die Affinität der Steroid-Derivate für die Östrogen-Rezeptoren im Uterus nach i.v. Injektion bei infantilen Rattenweibchen bestimmt (6).

Tab. 1 zeigt die Organverteilung von zwei Tc-99 markierten Östradiol-Derivaten und den Quotient der Technetium-Konzentration Uterus/Blut. Den höchsten Tc-99m-Konzentrations-Quotienten Uterus/Blut erhält man mit Ferrocenyl-ethinyl-Östradiol bzw. mit C₁₆-(Ferrocenyliden)-Östradiol.

Tab. 1: Organverteilung von Tc-99m markierten Östradiol-Derivaten bei infantilen Rattenweibchen.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die radioaktiven Lösungen in die mittlere Schwanzvene injiziert. Mittelwerte von 3-4 Tieren.

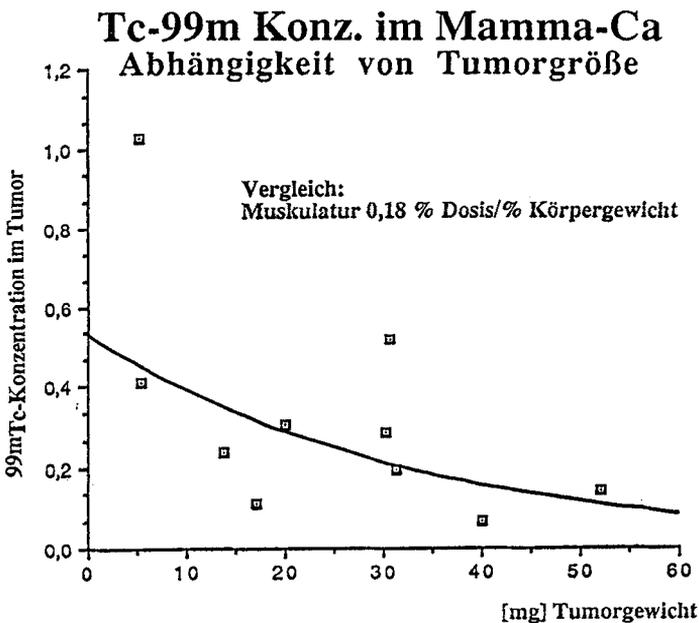
Substanz	Tc-99m-Konz. [% Dosis / % Körpergewicht]					Quotient Uterus/Blut
	Muskel	Blut	Leber	Uterus	Ovar	
17-(Cytectrenyl-ethinyl)-Östradiol						
" 15'	0,51	0,34	6,53	2,72	1,89	7,9
" 120'	0,11	0,17	7,70	0,43	0,53	2,5
16-(Cytectrenyl-methylen)-Östradiol						
" 15'	0,73	0,30	5,64	0,93	0,84	3,1
" 120'	0,41	0,15	16,8	1,36	1,01	8,9
" 120' + Östradiol*	0,35	0,14	15,6	0,53	0,59	3,7
" 120' i.p.	0,33	0,19	6,48	7,83	5,22	42,0
" 120' i.m.	0,09	0,15	2,03	0,22	0,28	1,9

*) Vorbehandlung mit 50 µg Östradiol ; t = - 60 min.

Bei beiden Verbindungen liegen die Quotienten der Tc-99-Konzentration Uterus/Blut im Bereich 6 bis 9. Der Konzentrations-Quotient sinkt, wenn die Östrogen-Receptoren im Uterus durch Vorbehandlung mit Östradiol blockiert waren, vergl. Tab. 1. Für diese Untersuchungen waren in der Regel die radioaktiven Substanzen i.v. injiziert worden. Appliziert man jedoch die gleichen Verbindungen i.p. erhält man Tc-90m-Konzentrations-Quotienten Uterus/Blut, die mehr als 10-fach so hoch sind.

Außerdem untersuchten wir bei Mäusen mit Mammatumoren (7) die Affinität dieser östrogenabhängigen Tumoren zu den Technetium-markierten Östradiol-Derivaten.

Gemäß Abb. 1 liegt bei Mäusen mit MXT-Mammatumoren nach Gabe von 16-(Cytectrenyl-methylen)-Östradiol der Tc-99m-Konzentrations-Quotient Tumor/Muskel bei 3 bis 2. Erstaunlicherweise scheint dieser Quotient bei kleineren Tumoren höher zu sein als bei größeren Tumoren.



Material und Methoden

Herstellung von 16-(Ferrocenyliden)-östron

1,5 g Östron (5,56 mMol) und 0,753 g KOH (13,45 mMol) werden in 15 ml trockenem Methanol gelöst. Unter Röhren und Eiskühlung wird innerhalb von 30 min. eine Lösung von 1,22 g Ferrocen-aldehyd (5,71 mMol) in 7,5 ml trockenem MeOH zutropft; danach wird der Tropftrichter mit 2 ml MeOH nachgespült. Der Reaktionsansatz wird noch 2 Tage unter Lichtausschluß bei Raumtemp. geröhrt, anschließend mit 100 ml Wasser verdünnt, mit Eisessig neutralisiert und 4 mal mit je 50 ml Ether extrahiert.

Die vereinigten dunkelroten Etherextrakte werden 2 mal mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen.

Ein Aliquot zeigte im DC in $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ 95 : 5 neben dem Hauptprodukt (Fc-CH=Östron, R_F : 0,38) noch drei Verunreinigungen:

R_F : Fc-CHO 0,49; violett gefärbte Substanz: 0,54; Östron 0,31.

Zur Reinigung wird der tiefrote Rückstand getrocknet, in CHCl_3 gelöst und auf eine Kieselgelsäule 15 x 1,5 cm gegeben. Anschließend wird mit $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ 95 : 5 eluiert.

Die erste braun-rot gefärbte Fraktion wird verworfen.

Die zweite rote Fraktion enthält neben dem gewünschten Produkt noch etwas Östron, das über präparative DC im gleichen Laufmittel abgetrennt werden kann. Ausbeute: 1,87 g (72 % der Th.);

Fp 117°C (Zersetzung)

MS: M^+ = 466 (100%); $M-C_5H_5$ = 401 (20%).

Herstellung von 16-(Ferrocenyliden)-östradiol

500 mg Fc-CH=E₁ (1,07 m Mol) in 20 ml trockenem Methanol und 50 mg NaBH_4 (1,35 m Mol). 1 h bei Raumtemp. rühren. Anschließend wird der Ansatz auf 5 ml eingeeengt und 3x mit je 15 ml Ether extrahiert. Der eingeeengte Etherextrakt wird über präparative DC-Platten gereinigt.

Laufmittel: Toluol/EtOH 9 : 1; R_F -Werte: Fc-CH=E₂: 0,17; Fc-CH=E₁: 0,29

Ausbeute: 71 % der Th.; Fp: 210°C. (Zersetzung)

C/H-Analyse: berechnet C 74,36 % H 6,84 %, gef. C 74,52 % H 7,13 %

MS: M^+ = 468 (100%); $M-C_5H_5$ = 403 (10%); Fc = 186 (5%).

Herstellung von 17-(Ferrocenyl-ethinyl)-östradiol

169 mg Ferrocenyl-acetylen (0,806 mmol) wurde als Öl in einen Dreihalskolben pipettiert und 1 ml getrocknetem Ether gelöst. Danach wird mit einer Spritze 1 ml 1,6 molare Butyllithium-Lösung (1,6 mmol) dazugegeben. Die zunächst braune Lösung wird hellgelb. Danach rührt man weitere 20 min. bei Raumtemp.

Schließlich wird der Reaktionsansatz in einen Trockeneis Acetonbad (-60°) eingesetzt und 310 mg Östronsilylether (0,807 mmol) gelöst in 10 ml Ether mit 2,5 ml Tetrahydrofuran dazugetropft. Es wird weiter 3 h bei der tiefen Temperatur gerührt. Anschließend langsame Erwärmung auf Raumtemperatur.

Aufarbeitung:

Man gibt zum Ansatz vorsichtig 100 ml Wasser und extrahiert mehrmals mit Ether. Die gelbe Etherphase wird getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Danach verbleiben 380 mg eines gelben Rückstandes, der im Vak. getrocknet wird.

Die Endreinigung erfolgt durch präparative Dünnschichtchromatographie auf 1 mm dicken präparativen Kieselgelplatten.

Die in Tetrahydrofuran gelöste Substanz wird auf 3 Dünnschichtplatten aufgetragen. Laufmittel: Pentan/Ether 80 : 20

Man erhält zwei gelbgefärbte Ferrocen-haltige Banden.

R_F 0,66 = Ferrocenylacetylen; R_F 0,30 Silylether der gewünschten Östradiolverbindung.

Außerdem sieht man im UV bei R_F 0,36 eine Bande von restlichen Östron-Silylether. Das gelbe Östradiol-Derivat bei R_F 0,30 wird abgekratzt und mit Tetrahydrofuran eluiert.

Nach Abziehen des Lösungsmittels erhält man eine gelbe Substanz mit dem Schmelzpunkt 125° , die noch mit einem kleinen Anteil Östron-Silylether verunreinigt ist. Ausbeute 33 %.

MS: $C_{36}H_{46}O_2SiFe$; MG 594; M^+ 594 (100 %).

Zur Abspaltung der Silyl-Schutzgruppe (4, 5) wird das Produkt in 5 ml Tetrahydrofuran gelöst, dann gibt man 0,5 ml Tetrabutyl-Ammoniumchlorid in Tetrahydrofuran dazu. Man rührt einige Min. und gibt anschließend Wasser dazu und extrahiert mit Methylenchlorid. Nach Einengen gibt man wenig n-Penten hinzu und erhält rote Kristalle Fp. $191^\circ C$. $C_{30}H_{32}FeO_2$; MG 480.

MS: M^+ = 480 (100 %); $M-H_2O$ = 462 (12 %); $M-cp$ = 415 (5 %); $Fc-C\equiv CH$ = 210 (38 %); Östron = 270 (21 %).

Tc-99m-Markierung der Ferrocen-Steroid-Derivate*)

Direkt-Markierung von $Fc-CH=Östron$ (E_1)

1) 2 mg $Fc-CH=Östron$, 1 mg $Mn(CO)_5Br$ und 1 mg Tl -acetat werden in eine Ampulle eingewogen. 120 KBq $^{99m}TcO_4^-$ in 50 μl Methanol werden zupipettiert, unter leichtem Vakuum abgeschmolzen und 1 h auf $175^\circ C$. erhitzt. DC des Ampulleninhalts in Toluol/Ethanol 9 : 1; R_F -Werte: $Fc-CH=E_1$: 0,37; $Cytec.-CH=E_1$: 0,37; E_1 : 0,42; radiochem. Verunreinigung: 0,81; Radiochem. Ausb. an $Cytec.-CH=E_1$: 43,2 %

2) Reduktion von $Cytec.-CH=E_1$ zu $Cytec.-CH=E_2$:

Man schabt von der Dünnschichtplatte $Cytec.-CH=E_1$ ab und eluiert mit ca. 2 ml trockenem MeOH und reduziert mit 1 mg $NaBH_4$. Das Lösungsmittel wird unter N_2 bis ca. 50 μl abgezogen. DC in Cyclohexan/Essigester 6 : 4

RF $Fc-CH=E_1$ = 0,4; $Fc-CH=E_2$ = 0,35; E_1 = 0,34; E_2 = 0,21; $Cytec.-CH=E_2$ = 0,31

Radiochem. Ausbeute bezogen auf eingesetztes $Cytec.-CH=E_1$: 93,4 %.

3) $Fc-CH=Östradiol$ (E_2)

2 mg $Fc-CH=Östradiol$, 1 mg $Mn(CO)_5Br$ und 1 mg Tl -acetat werden in eine Ampulle eingewogen.

120 KBq $^{99m}TcO_4^-$ in 50 μl Methanol werden zupipettiert, unter leichtem Vakuum abgeschmolzen und 1 h auf $175^\circ C$. erhitzt.

DC des Ampulleninhalts in Toluol/EtOH 9 : 1; R_F $Fc-CH=E_2$ = 0,31; $Cytec.-CH=E_2$ = 0,30; E_2 = 0,22 radiochem. Verunreinigung: 0,81 und 0,17;

Radiochem. Ausbeute an $Cytec.-CH=E_2$: 21,2 %.

Danksagung

Für interessierte experimentelle Mitarbeit danken wir Frau Barbara Brüggener,

Frau Gisela Günther, Frau Marianne Scholl und Herrn B. Kamann.

Für wertvolle Diskussion danken wir Herrn Priv. Doz. Dr. Semmler und Dr. P.E. Schulze.

Die Arbeiten wurden teilweise vom Institut für Diagnostikforschung an der Freien Universität

*) Östron-Derivate werden mit E_1 ; Östradiol-Derivate werden mit E_2 abgekratzt.

unterstützt. Herrn Dr. Schneider, Schering AG, Berlin, danken wir für die Überlassung von Mäusen mit implantierten Mamma-Tumoren.

Literatur

- 1 M. Wenzel; J. Labelled Comp. Radiopharmac. 31, No. 9, (1992).
- 2 M. Wenzel, C. Klinge und M. Saidi;
J. Labelled Comp. Radiopharmac. 33, No. 11; 1039-1051 (1993).
- 3 K. Schlögl; Monatshefte Chem. 96, 1520 (1965).
- 4 G. Jaouen und A. Vessieres; Europa Patent 345 153 (1989).
- 5 H. Hezoda, K. Yamashita, H. Sagae und T. Nambara;
Chem. Pharm. Bull. 23, 2118 (1975).
- 6 D.O. Kiesewetter, M. Kilbourn, Sc. Landvatter et al.;
J. Nucl. Med. 25, 1212 (1984).
- 7 M.R. Schneider, H. Michna, Y. Nishino und M. El Etreby;
Europ. J. Cancer Clin. Oncology 25, 691 (1989).
- 8 J. Shani, T. Livshitz und M. Wenzel;
Int. J. Nucl. Med. Biol.. 12, 13 (1985).
- 9 M. Wenzel, M. Schneider, J. Bier, P. Benders et al.;
J. Cancer Res. Clin. Oncology 95, 147 (1979).