



UNIVERSITEIT GENT
FACULTEIT VAN DE FARMACEUTISCHE WETENSCHAPPEN
LABORATORIUM VOOR RADIOFARMACIE

RADIOSYNTHESE VAN
GEHALOGENEERDE ANTAGONISTEN VAN DE *N*-METHYL-
D-ASPARTAAT- EN
DE PERIFERE BENZODIAZEPINERECEPTOR
VOOR SPECT STUDIES VAN
DE ZIEKTE VAN ALZHEIMER

door:
Apr. F. DUMONT

Proefschrift voorgelegd ter verkrijging van de graad van
Doctor in de Farmaceutische Wetenschappen
1999

Promotor: Prof.dr.sc.apr.G.Slegers

Inhoud

Woord vooraf

Doelstelling 1

Deel I Inleiding 3

Hoofdstuk 1 Medische beeldvorming 5

1.1 Computed Tomography (CT) 5

1.2 Magnetic Resonance Imaging (MRI) 6

1.3 Positron Emission Tomography (PET) 7

1.4 Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) 9

1.5 Radionucliden voor medische beeldvorming 10

1.6 Radiodiagnostica 11

1.7 Specifieke activiteit 13

Referenties 14

Hoofdstuk 2 Radiohalogenering van organische molecules 15

2.1 Soorten isotopen - productie – verval 15

2.1.1 Broomisotopen 15

2.1.2 Joodisotopen 16

2.2 Radiohalogenering 18

2.2.1 Radiohalogenering van organische molecules 18

2.2.2 De Cu⁺-gesteunde nucleofiele uitwisseling in zuur en reducerend milieu 19

2.2.3 De vaste fase transfer 19

Referenties 21

Deel II Radiogehalogeneerde dihydroquinolines als tracers voor SPECT studies van de N-methyl-D-aspartaat receptor 25

Hoofdstuk 3 De N-methyl-D-aspartaat (NMDA) receptor 27

3.1 Endogene liganden - Excitotoxiciteit – Neuropathologieën 27

3.2 Receptor types 29

3.3 Het NMDA receptor complex en zijn liganden 30

3.4 Kynureninezuurderivaten en afgeleiden 34

3.5 Geselecteerde molecules 37

Referenties 38

Hoofdstuk 4 Radiogehalogeneerde dihydroquinolines	43
4.1 Synthese van [⁷⁷ Br] 5,7-dibroomkynureninezuur	44
4.1.1 Synthese van standaard en precursor	44
4.1.1.1 Synthese van 5,7-dibroomkynureninezuur	44
4.1.1.2 Synthese van 7-broom-5-joodkynureninezuur	48
4.1.2 Synthese van [⁷⁷ Br] 5,7-dibroomkynureninezuur	56
4.1.2.1 Reactieschema	56
4.1.2.2 Initiële parameters	56
4.1.2.3 HPLC analyse en bepaling van het radiochemisch rendement	57
4.1.2.4 Optimalisatie van de parameters	58
4.1.2.5 Geoptimaliseerde tracersynthese en zuiveringsprocedure	62
4.1.2.6 Bepaling chemische en radiochemische zuiverheid	62
4.1.2.7 Bepaling specifieke activiteit	64
4.1.3 Dierexperimenten	64
4.1.3.1 Biodistributie	64
4.1.3.2 Metabolisatie	68
4.2 Synthese van 7-broom-5-[¹²³ I]-joodkynureninezuur	70
4.2.1 Synthese van standaard, precursor en tracer	70
4.2.1.1 Reactieschema	70
4.2.1.2 Synthese van standaard en precursor	70
4.2.1.3 Stabiliteitstudie van de precursor	70
4.2.1.4 Initiële parameters van de precursorsynthese	71
4.2.1.5 HPLC analyse	72
4.2.1.6 Bepaling radiochemisch rendement	72
4.2.1.7 Optimalisatie van de parameters	73
4.2.1.8 Geoptimaliseerde tracersynthese en zuiveringsprocedure	76
4.2.1.9 Bepaling chemische en radiochemische zuiverheid	77
4.2.1.10 Bepaling specifieke activiteit	77
4.2.3 Dierexperimenten	78
4.2.3.1 Biodistributie	78
4.2.3.2 Metabolisatie	81
4.3 Synthese van 7-chloor-5-[¹²³ I]-joodkynureninezuur	83
4.3.1 Synthese van standaard en precursor	83
4.3.1.1 Synthese van de precursor	83
4.3.1.2 Verdere isolatie van de precursor	86
4.3.1.3 Isotopische radiobromering van het mengsel	87
4.3.1.4 Synthese van 7-chloor-5-joodkynureninezuur	89
4.3.2 Synthese van 7-chloor-5-[¹²³ I]-joodkynureninezuur	90
4.3.2.1 Reactieschema	90
4.3.2.2 Initiële parameters	91
4.3.2.3 HPLC analyse	91
4.3.2.4 Bepaling radiochemisch rendement	92
4.3.2.5 Optimalisatie van de parameters	92
4.3.2.6 Geoptimaliseerde tracersynthese en zuiveringsprocedure	95

4.3.2.7	Chemische en radiochemische zuiverheid	95
4.3.2.8	Bepaling specifieke activiteit	96
4.3.2.9	Andere synthesesmogelijkheden	96
4.3.3	Dierexperimenten	97
4.3.3.1	Biodistributie	97
4.3.3.2	Metabolisatie	100
	Referenties	103

Deel III Evaluatie van [¹²³I]-I-PK11195 als tracer voor SPECT studies van de perifere benzodiazepine receptor

105

	Hoofdstuk 5 De perifere benzodiazepine receptor	107
5.1	Types benzodiazepinereceptoren	107
5.2	Distributie van PBR's - microglia – macrofagen	108
5.3	De PBR's: functie en endogene liganden	109
5.4	Liganden	109
5.5	PBR's en hersenen	113
5.6	PBR's en hart	114
5.7	Geselecteerde molecule	115
5.8	Farmacologie van PK11195	116
	Referenties	117

	Hoofdstuk 6 Synthese en <i>in vivo</i> evaluatie van [¹²³ I]-I-PK11195	123
6.1	Synthese van standaard en precursor	124
6.2	Synthese van [¹²³ I]-I-PK11195	130
6.2.1	Reactieschema	130
6.2.2	Experimenteel	130
6.2.3	HPLC-analyse	130
6.2.4	Bepaling radiochemisch rendement	131
6.2.5	Geoptimaliseerde tracersynthese en zuiveringsprocedure	131
6.2.6	Bepaling chemische en radiochemische zuiverheid	132
6.2.7	Bepaling specifieke activiteit	132
6.2.8	Farmaceutische aspecten	133
6.2.9	Stabiliteit van de tracer in oplossing	134
6.3	Dierexperimenten	134
6.3.1	Biodistributie	135
6.3.2	Verdringing	138
6.3.3	Metabolisatie	144

6.4	Experimenten bij gezonde vrijwilligers	147
6.4.1	Biodistributie	147
6.4.2	Bloed- en plasma-activiteitscurves	150
6.4.3	Metabolisatie	152
6.4.4	[¹²³ I]-I-PK11195 in bloed en plasma	154
6.4.4.1	% van de geïnjecteerde dosis in bloed	154
6.4.4.2	Verdeling van [¹²³ I]-I-PK11195 over bloed	155
6.4.4.3	% ¹²³ I-PK11195 in plasma	156
6.4.5	Metabolieten in urine	156
6.4.6	Dosimetrie	157
6.5	Hersenonderzoek met [¹²³ I]-I-PK11195	160
6.5.1	Hersen-SPECT van gezonde vrijwilligers	160
6.5.2	Onderzoek van patiënten met de ziekte van Alzheimer	161
	Referenties	162
	Samenvatting	163
	Résumé	165
	Summary	167

Doelstelling

Aandoeningen zoals de ziekte van Alzheimer en andere vormen van dementie worden de laatste decennia bij tal van patiënten waargenomen. Uit onderzoek is gebleken dat de *N*-methyl-D-aspartaat (NMDA)-receptor een belangrijke schakel is bij deze ziektebeelden en dat het bestuderen van dementie dus ook een studie is van de receptor. 'Positron Emission Tomography' (PET) en 'Single Photon Emission Computed Tomography' (SPECT) bieden de mogelijkheid om de receptor *in vivo* en zonder invasieve ingrepen te visualiseren. Dit kan gebeuren aan de hand van radioactief gemerkte NMDA-antagonisten. Vergelijking van de verdeling van deze tracers in het centraal zenuwstelsel van gezonde vrijwilligers met dit van dementen kan ons een stap verder brengen in het onderzoek naar deze aandoeningen. Het is dan ook de betrachting geweest een aantal met gamma-stralers gemerkte, meer bepaald halogeengemerkte, NMDA-antagonisten te synthetiseren die eventueel bruikbaar zouden zijn als radiodiagnostica.

Een tweede manier om de ziekte van Alzheimer te visualiseren is het in beeld brengen van de mate van inflammatie in bepaalde gebieden van de hersenen. Inflammatie gaat gepaard met een verhoging van het aantal perifere benzodiazepinereceptoren (PBR's) ten gevolge van de stijging van het aantal gliacellen in de hersenen. Onderzoek met een radioactief gemerkte antagonist van deze receptoren zou dus eveneens bruikbaar kunnen zijn als diagnose voor dementie.

De (radio)synthese, de biologische evaluatie en het eventuele gebruik van antagonisten van de NMDA receptor en van de PBR maken, naast een aantal algemene begrippen, het onderwerp uit van deze thesis.

Hoofdstuk 1

Medische beeldvorming

In 1895 werd de eerste stap gezet om het menselijk lichaam binnenin te bekijken zonder dat er heelkundige ingrepen bij te pas kwamen door de ontdekking van de X-stralen door Röntgen. De moderne versie van deze niet-invasieve techniek is de CT-scan (Computerized Tomography). Ongeveer een halve eeuw later ontdekte men het verschijnsel van de kernspinresonantie. De MRI (Magnetic Resonance Imaging) is de medische scantechniek die daaruit voortvloeide. Nog eens dertig jaar later werd de PET (Positron Emission Tomography) ontwikkeld, een techniek in de medische beeldvorming die gebruik maakt van radioactieve straling waarbij positronen vrijkomen. Deze worden omgezet in fotonen die door middel van een camera kunnen worden gedetecteerd. Ook SPECT (Single Photon Emission Computerized Tomography) is gebaseerd op het gebruik van radioactiviteit. Hierbij worden echter dadelijk fotonen uitgestraald door de isotopen. Eén eeuw na het begin van de ontwikkeling van de niet-invasieve technieken worden CT- en NMR-scanners en SPECT- en PET-camera's voor verschillende doeleinden in uiteenlopende gebieden van de geneeskunde gebruikt. Het grote verschil tussen SPECT en PET enerzijds en CT en NMR anderzijds is dat de eerste biochemische processen in beeld kunnen brengen (glucoseverbruik, O₂-opname in de hersenen,...), terwijl de andere twee vooral (NMR) of enkel en alleen (CT) informatie geven over de anatomie van bepaalde delen van het lichaam.

1.1 Computerized Tomography (CT)

X-stralen hebben een groot doordringend vermogen en hiervan wordt gebruik gemaakt bij de CT techniek. Met de CT-scanner worden verschillende weefsels en organen van elkaar onderscheiden door een verschil in het atteneren van X-stralen. Door rond een deel van het lichaam een X-stralen uitzendende buis evenals een detector te plaatsen verkrijgt men een doorsnedebeeld van de gewenste plaats van het lichaam. Vóór de komst van de axiale tomograaf waren deze beelden tweedimensioneel. Tegenwoordig kan men echter driedimensionele beelden bekomen met een goede resolutie (< 1mm).

Het gebruik van contraststoffen en de schadelijkheid van X-stralen zijn de grote nadelen van deze techniek. De CT-techniek wordt vooral gebruikt bij de voorbereiding van algemene chirurgische ingrepen en het kwantificeren van tumoren voor de bepaling van de stralingsdosis bij radiotherapie.

1.2 Magnetic Resonance Imaging (MRI)

Zowel protonen als neutronen draaien (=spinnen) rond hun as en veroorzaken daardoor een kernspin bij atomen met een oneven aantal neutronen en protonen, zoals ¹H, ¹³C, ¹⁹F, ³¹P. Onder invloed van een uitwendig aangelegd sterk magnetisch veld zullen deze magneetjes in dezelfde richting worden georiënteerd. Als gevolg van een elektromagnetische puls (een radiosignaal) veranderen de spins van oriëntatie. Dit verschijnsel wordt 'excitatie' genoemd. Wanneer het radiosignaal stopt keren de kernen terug naar hun uitgangspositie ('relaxatie') waarbij ze de opgenomen energie afgeven onder de vorm van een zwak radiosignaal. De sterkte van dit signaal is afhankelijk van de dichtheid en de aard van de kernen en de intensiteit van het aangelegd magnetisch veld.

Aangezien het verschil in protonendichtheid tussen de verschillende weefsels te gering is om een relevant beeld te verkrijgen wordt tevens de relaxatietijd gemeten. Dit is de tijd die de geëxciteerde protonen nodig hebben om na het stopzetten van het radiosignaal terug te keren naar hun grondtoestand. Na computerverwerking van deze gegevens verkrijgt men een duidelijk anatomisch beeld van een bepaald deel van het lichaam. Naast het visualiseren van de anatomie van weefsels kan MRI ook stofwisselingsprocessen volgen in deze weefsels. Terwijl bij de zuiver anatomische benadering gebruik wordt gemaakt van waterstofkernen, gaat de aandacht hier vooral naar fosforkernen. Adenosinedifosfaat, adenosinetrifosfaat en fosfocreatinine zijn een paar voorbeelden van belangrijke fosforhoudende chemische componenten die met MRI *in vivo* kunnen worden gevolgd.

In tegenstelling tot de CT-scan moet hier geen gebruik gemaakt worden van schadelijke straling noch van contraststoffen. Het enige nadeel is het gebruik van een grote magnetische veldsterkte.

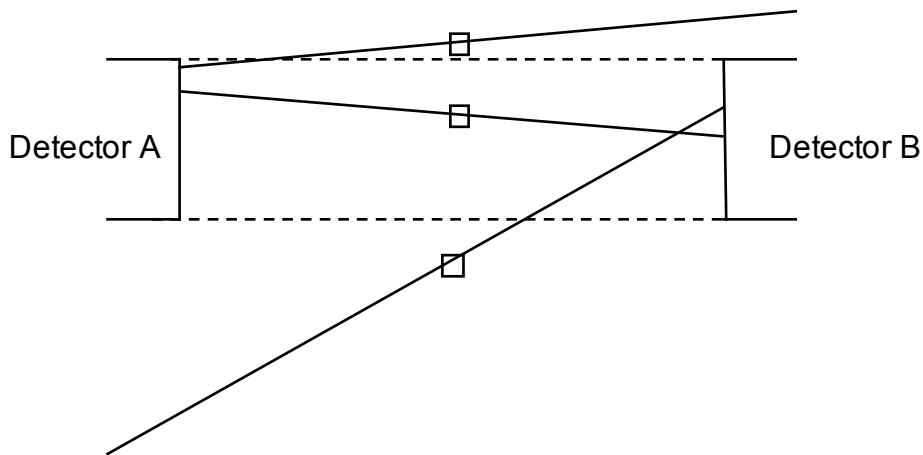
1.3 Positron Emission Tomography (PET)

Positronen zijn positief geladen elektronen die uitgezonden worden door bepaalde onstabiele kernen ('positronenstralers') wanneer deze vervallen tot een stabiele toestand. Wanneer een positron wordt uitgezonden uit een onstabiele kern, legt het een welbepaalde afstand af ('positron range') alvorens het een elektron tegenkomt. Deze afstand is afhankelijk van de energie van het uitgezonden positrondeeltje en dus verschillend voor elk positronuitzendend isotoop. Wanneer een elektron en een positron met elkaar in contact komen gebeurt een annihilatie. Hierbij zullen de elektrische ladingen elkaar neutraliseren en worden de massa's van elektron en positron omgezet in elektromagnetische straling onder de vorm van een paar hoogenergetische (511 keV) fotonen. Het unieke hieraan is dat de twee annihilatiefotonen uitgezonden worden in tegenovergestelde richting onder een hoek van $180^\circ (\pm 0.5^\circ)$. Positron Emissie Tomografie maakt van deze unieke vorm van straling gebruik. Tabel 1.1 geeft een overzicht van enkele positron-uitstralende isotopen die tot dusver in PET-studies zijn gebruikt.

Tabel 1.1 *Positron-uitstralende isotopen voor PET-studies*

Isotoop	Halfleven
^{11}C	20.3 min
^{13}N	10 min
^{15}O	1.8 min
^{18}F	109 min
^{75}Br	102 min

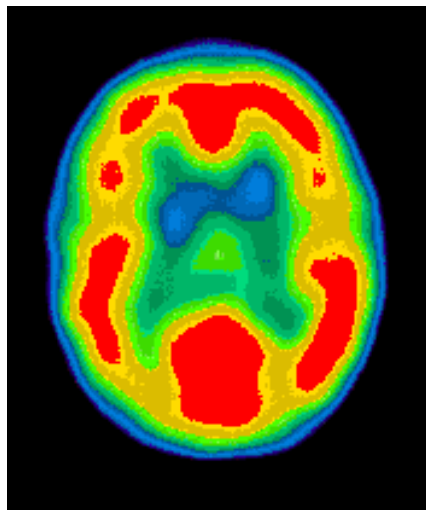
Bij PET worden de detectoren in een ring geplaatst rond een deel van het lichaam. Indien twee bepaalde detectoren een coïncidentie tellen, d.w.z. dat ze op hetzelfde ogenblik of binnen een zeer klein tijdsinterval fotonen detecteren, dan besluit men dat er annihilatie is opgetreden in de coïncidentiestrook die deze detectoren verbindt (Fig. 1.1). Annihilatiefotonen die buiten deze strook ontstaan kunnen slechts één van de twee detectoren bereiken aangezien hun banen ongeveer op een rechte verlopen. Dit heeft als voordeel dat de resolutie verhoogt en dat de achtergrondstraling nagenoeg volledig wordt uitgesloten.



Figuur 1.1 *Coïncidentiestrook (aangeduid met stippellijn)*

Het is nu ook theoretisch mogelijk om te bepalen waar langs die rechte de annihilatie gebeurt door het verschil in detectietijd in de twee detectoren te meten.

De detectorenring die een deel van het lichaam van de patiënt omgeeft is samengesteld uit een groot aantal afzonderlijke scintillatiedetectoren. De elektronica die hiermee samenhangt is nu zó ingesteld dat enkel een signaal naar de computer wordt doorgestuurd wanneer twee tegenovergestelde detectoren op hetzelfde tijdstip (of binnen een zeer korte tijdspanne) een γ -straal detecteren. Dit noemt men coïncidentiedetectie. Wanneer men het aantal coïncidenties in een voldoende hoeveelheid stroken kan meten, is het mogelijk om de verdeling van de tracerconcentratie in het beeldvlak te reconstrueren. Om de resolutie nog te verhogen voeren de detectoren tijdens het scannen nog kleine bewegingen uit: translaties en rotaties. De data van alle detectoren worden gecollecteerd en via computerverwerking wordt de verdeling van de radioactiviteit in doorsnedebeelden gereconstrueerd. Een voorbeeld hiervan wordt getoond in figuur 1.2.



Figuur 1.2 *Voorbeeld van de reconstructie van de verdeling van de radioactiviteit in een doorsnedebeeld van de hersenen*

PET wordt gebruikt in verschillende gebieden van de geneeskunde:

In de **oncologie** maakt men gebruik van tracers die het tumormetabolisme en de respons op geneesmiddelen bestuderen en ook van monoclonale antilichamen die tumoren op zeer selectieve wijze opsporen. In de

cardiologie vindt PET zijn toepassing bij het opsporen van coronaire ziekten en kan door myocardmetabolisme levend en dood weefsel van elkaar onderscheiden worden. In de **neurologie** gebruikt men de PET-camera zowel voor algemeen hersenonderzoek zoals hersenmetabolisme en bloeddebiet als voor specifiek receptoronderzoek.

1.4 Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT)

Fotonen (of γ -stralen) worden eveneens uitgezonden door bepaalde onstabiele kernen (γ -stralers) bij verval tot een stabiele toestand. Directe meting van deze vrijgekomen γ -straling wordt toegepast in de Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT). Tabel 1.2 geeft enkele γ -stralers, bruikbaar voor SPECT.

Tabel 1.2 Fotonuitstralende isotopen voor SPECT-studies

Isotoop	Halfleven
^{77}Br	57 uren
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6.05 uren
^{123}I	13.3 uren

Bij SPECT worden de metingen uitgevoerd met behulp van een γ -camera. Deze bestaat uit een NaI-kristal waarop enkel de gewenste γ -stralen invallen. Daarvoor wordt gebruik gemaakt van een loden collimator voorzien van een aantal parallelle openingen. Deze zorgt ervoor dat enkel de fotonen die zich parallel met de stand van de collimator bewegen het NaI-kristal bereiken. Bij het nieuwste type collimator, de fan beam, zijn de openingen niet meer parallel geplaatst, maar in de vorm van een boog. Hierdoor wordt een vergroot beeld bekomen van het gescande orgaan. De gevoeligheid van de γ -camera en de resolutie worden bepaald door de dikte van de collimator, de diameter en het aantal van de openingen in de collimator. Eventuele achtergrondstraling wordt nagenoeg uitgesloten doordat enkel γ -stralen met de gewenste energie gemeten worden. Na een meting wordt een tweedimensioneel beeld verkregen. Wanneer nu de camera bewogen wordt en vanuit verschillende posities metingen worden uitgevoerd, kan men via software tot een driedimensioneel beeld komen.

Naast ^{123}I wordt vooral gebruik gemaakt van $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Het was dan ook de synthese van het $^{99\text{m}}\text{Tc}$ gemerkt hexamethylpropyleenamineoxime (HMPAO) dat het gebruik van de SPECT in de neurologie in een stroomversnelling heeft gebracht.

Zoals PET wordt ook SPECT gebruikt in verschillende disciplines in de geneeskunde, zowel voor algemeen- als voor receptoronderzoek. Het is dit laatste dat het onderwerp uitmaakt van deze thesis, meer bepaald een bijdrage tot de studie van zowel de N-methyl-D-aspartaat (NMDA)- als de perifere benzodiazepinereceptor (PBR) door de synthese en de *in vivo* evaluatie van radiogehalogeneerde antagonisten van beide receptoren.

1.5 Radionucliden voor medische beeldvorming

Radionucliden die voor medische beeldvorming in aanmerking komen moeten voldoen aan een aantal vereisten. Ze moeten fotonen uitzenden (X- en γ -stralen) of ertoe aanleiding geven (β^+ -stralen) omdat dit de enige vorm van straling is die gedetecteerd kan worden van buitenaf. Vervolgens mogen ze geen α -partikels en liefst geen of zo weinig mogelijk β^- -partikels uitzenden. Deze leveren geen bijdrage tot de beeldvorming en belasten nodeloos de patiënt. De uitgezonden fotonen moeten een geschikte energie hebben; voor SPECT ligt deze tussen 100 en 200 keV en voor PET is deze uiteraard 511 keV. De halfwaardetijd van het radionuclide mag niet te kort zijn om de synthese en het scannen mogelijk te maken, maar tevens niet te lang om de stralingsbelasting voor de patiënt niet te verhogen. In de praktijk gebruikt men isotopen met een halfwaardetijd van enkele minuten tot een 10-tal uur. Tenslotte moet het radionuclide kunnen worden ingebouwd in de geschikte tracer molecule.

Voor PET komen vooral C-11 en F-18 in aanmerking, terwijl bij SPECT I-123 en vooral Tc-99m kunnen worden gebruikt.

1.6 Radiodiagnostica

Moleculen die als radiodiagnostica kunnen worden gebruikt, moeten voldoen aan een aantal **vereisten**.

Wanneer het een studie betreft van receptoren in de hersenen is het belangrijk dat de molecule de bloedhersenbarrière passeert. Heel polaire of heel apolaire stoffen evenals moleculen met een groot moleculair gewicht (> 500) komen dus zeker niet in aanmerking. Een idee over de polariteit kan verkregen worden door de verdeling van de molecule over een mengsel van octanol en water. De ratio octanol/water moet voor goede liganden tussen 0,5 en 2,5 liggen.

Voor alle radiodiagnostica geldt tevens dat de stof een hoge affiniteit moet bezitten voor de te onderzoeken receptor. Deze affiniteit wordt uitgedrukt in de IC_{50} waarde: dit is de concentratie van een product nodig om de helft van een agonist van de receptor (in bvb. een hersenpreparaat) te verdringen. Voor een goed radiodiagnosticum heeft men een IC_{50} waarde nodig die kleiner is dan 10 nM. Vervolgens moet de molecule ook selectief zijn voor de te onderzoeken receptor om een duidelijk onderscheid te kunnen maken met de rest van de aanwezige receptoren. De tracer mag geen te vlugge metabolisatie vertonen en mag geen metaboliëten hebben die in het 'target'-orgaan een specifieke binding vertonen. Sommige liganden, die *in vitro* een hoge affiniteit bezitten en eveneens de geschikte polariteit hebben, kunnen door de zeer vlugge metabolisatie nooit doordringen tot de bindingsplaats en zijn dus niet geschikt als radiodiagnosticum. Anderzijds meten zowel PET als SPECT enkel radioactiviteit in een bepaald deel van het lichaam zonder onderscheid te maken tussen oorspronkelijke tracer en eventuele afbraakproducten. Metaboliëten die een specifieke binding vertonen aan het 'target'-orgaan worden dus eveneens gescand, wat kan leiden tot een verkeerde interpretatie. De tracer moet een vlugge binding ter hoogte van de receptor vertonen. Dit is vooral belangrijk bij kortlevende isotopen. Wanneer de binding van de ligand aan de receptor traag verloopt, zal men eerder gebruik maken van isotopen met langere halfwaardetijden (^{18}F , ^{76}Br , ^{123}I , ...) zodat het tijdstip van scannen kan verlengd worden. Tenslotte moet de klaring van de tracer uit het bloed snel verlopen, aangezien de ratio targetorgaan/bloed belangrijk is.

Op basis van deze vereisten wordt een ligand geselecteerd en kan worden gestart met de **synthese** van het radiodiagnosticum. Deze verloopt in een aantal fasen. In een eerste stadium moet de vooropgestelde molecule onder 'koude voorwaarden', d. i. zonder radio-isotoop, gesynthetiseerd worden op mmol-schaal; dat is nodig voor de karakterisering d.m.v. spectroscopische technieken zoals nucleaire magnetische resonantie (NMR),

massaspectrometrie (MS) en infrarood spectrometrie (IR). In een volgende fase wordt de stof gesynthetiseerd op µmol-schaal; hierbij gebeurt tevens een optimalisatie van de reactieparameters, al dan niet met het gebruik van een kleine hoeveelheid radio-isotoop. Wanneer alle parameters geoptimaliseerd zijn, wordt de synthese uitgevoerd met hoge activiteit en het diagnosticum in een voor intraveneuze toediening geschikte oplossing gebracht. Ook voor deze oplossing zijn er een aantal vereisten. Ze moet steriel en pyrogeenvrij zijn en liefst een fysiologische pH en osmolariteit hebben. Ook de chemische en radiochemische zuiverheid moeten groter zijn dan 95%.

Alvorens de gemerkte molecule als radiodiagnosticum bij patiënten kan worden gebruikt moet nog het stadium van de **dierproeven** worden doorlopen. De penetratie doorheen de bloedsheerbarrière en een biodistributie wordt nagegaan door injectie van de tracer in muizen die op verschillende tijdstippen worden gedood en gedisseceerd en waarbij men de verdeling van de tracer over de verschillende organen berekent. Vervolgens wordt de specifieke binding bepaald door injectie (voorafgaandelijk of na de tracer) van een overmaat niet-radioactieve antagonist met een hoge affiniteit voor de receptor. Door de aanwezigheid van een massale hoeveelheid product (in vergelijking met de tracer) worden alle specifieke bindingsplaatsen bezet en wordt de mogelijkheid van tracerbinding gevoelig verminderd. Een daling van activiteit in een orgaan in vergelijking met de gewone distributie betekent een specifieke binding op receptoren. Tenslotte wordt de eventuele aanwezigheid van afbraakproducten in bloed en targetorganen bepaald door analyse van bloed- en weefselstalen door middel van hogedruk vloeistofchromatografie (high performance liquid chromatography of HPLC). Een laatste stap is de regionale distributie van de molecule in de hersenen. Deze moet overeenstemmen met de gegevens bekomen uit post-mortem autoradiografie.

1.7 Specifieke activiteit

Wanneer een oplossing van een tracer die een grote hoeveelheid niet gemerkte component (drager) bevat wordt ingespoten, worden ongeveer alle bindingsplaatsen hierdoor bezet en kan er wegens te geringe aanwezigheid van radioactiviteit ter hoogte van de receptor geen PET- of SPECT-scan worden opgenomen. Het is dus de bedoeling de hoeveelheid drager in een traceroplossing zo laag mogelijk te houden. Andere voordelen hiervan zijn dat er ook geen biologisch effect zal optreden en dat de toxiciteitsgrens nooit zal worden overschreden. De aanwezige massa wordt uitgedrukt door de specifieke activiteit. Dit is de hoeveelheid radioactiviteit per totale massa radioactieve en niet radioactieve component. Bij het opgeven van de specifieke activiteit moet steeds een tijdstip worden vermeld omdat van een bepaalde oplossing de specifieke activiteit steeds afneemt in functie van de tijd: de totale massa blijft namelijk constant terwijl er een verval optreedt van radioactiviteit. De maximale specifieke activiteit, die in de praktijk nooit kan worden bekomen, is omgekeerd evenredig met de halfwaardetijd en dus verschillend naargelang het soort radio-isotoop. Het grote voordeel van kortlevende isotopen is dus de mogelijkheid om heel hoge specifieke activiteiten te bekomen.

Referenties

Fundamentals of Nuclear Pharmacy. G.B. Saha, ed., **1979**. Springer-Verlag.

Computed Emission Tomography. P.J. Ell and B.L. Holman, eds., **1982**. Oxford medical publications.

Positron Emission Tomography and Autoradiography. Principles and applications for the brain and heart. M.E. Phelps, J.C. Mazziotta and H.R. Schelbert, eds., **1986**, Raven press.

Pharmaceuticals in Medical Imaging. D.P. Swanson, H.M. Chilton and J.H. Thrall, eds., **1990**. MacMillan publishing co., inc..

Radioisotopes. D Billington, G.G. Jayson, P.J. Maltby, eds., **1992**. βios scientific publishers.

Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography. Methodological aspects. G. Stöcklin and V.W. Pike, eds., **1993**. Kluwer academic publishers.

PET for drug development and evaluation. D. Comar, ed., **1995** Kluwer academic publishers.

Nuclear Medicine. The requisites. J.H. Thrall, H.A. Ziessman, eds., **1995**. Mosby.

SPECT imaging of the brain. R. Duncan, ed., **1997**. Kluwer academic publishers.

Hoofdstuk 2

Radiohalogenering van organische moleculen

De beste manier om een biologisch actief radiodiagnosticum te maken bestaat erin één atoom in een biologisch actieve molecule te vervangen door één van zijn radio-isotopen. Aangezien het overgrote deel van de organische moleculen C, N en/of O bevat, heeft de omwisseling met ^{11}C , ^{13}N of ^{15}O geen invloed op de biologische activiteit van de molecule. Wanneer echter een tracer van een biologisch actieve molecule wordt gemaakt door inbrengen van een halogeenradio-isotoop bekomt men een licht gewijzigde molecule en kan dit grote gevolgen hebben voor de distributie, de affiniteit en het metabolisme van de component. Om deze veranderingen in biologische activiteit zo miniem mogelijk te houden moet de radio-isotoop zo ver mogelijk van de farmacologisch actieve plaats worden ingebracht.

Een voordeel van de halogeengemerkte tracer is dat deze wordt gesynthetiseerd uitgaande van de dragervrije radio-isotoop, waardoor men dus een hoge specifieke activiteit verkrijgt. In dit hoofdstuk volgt een korte bespreking van de verschillende broom- en joodisotopen en hoe deze in organische moleculen kunnen worden ingebouwd.

2.1 Soorten isotopen - productie - verval

2.1.1 Broomisotopen

Broom heeft verschillende radioactieve isotopen die kunnen gebruikt worden voor radiodiagnostische doeleinden. De meest interessante zijn de neutronendeficiënte isotopen ^{75}Br ($t_{1/2} = 98$ min), ^{76}Br ($t_{1/2} = 13.3$ u) en ^{77}Br ($t_{1/2} = 57$ u). De eerste twee zijn positronenstralers en kunnen dus gebruikt worden in de Positron Emissie Tomografie (cfr. 1.3). De halfwaardetijden zijn aanvaardbaar voor gebruik in de medische radiodiagnose, maar de maximale energie van ^{76}Br (β^+ max = 3.98 MeV) is vrij hoog zodat ^{75}Br (β^+ max = 1.74 MeV) de beste isotoop is voor *in vivo* gebruik. ^{77}Br is meer geschikt voor langere studies met een γ -camera uitgerust met een hoogenergetische collimator (EC (99.3 %), β^+ (0.7 %); E = 239 keV (22.8 %), 521 keV (22.1 %)). In dit onderzoek wordt ^{77}Br wordt eveneens aangewend voor de optimalisatie van de reactieparameters in de tracersynthese.

Verschiedende nucleaire reacties werden voorgesteld voor de productie van ^{75}Br : directe methodes¹⁻⁵ zoals de $^{75}\text{As}(^3\text{He}, 3n)^{75}\text{Br}$, $^{76}\text{Se}(p, 2n)^{75}\text{Br}$ en $^{78}\text{Kr}(p, \alpha)^{75}\text{Br}$ reacties en een indirecte methode⁶ $^{\text{nat}}\text{Br}(d, xn)^{75}\text{Kr}$ gevolgd door het β^+ , EC verval van ^{75}Kr tot ^{75}Br . Voor productie van ^{75}Br op grote schaal gebruikt men enkel de arseen- en seleniumtargets. Aangezien geen van beide echter de geschikte fysische eigenschappen hebben (hoog smeltpunt, goede geleiding) voor bestraling, worden dikwijls legeringen van arseen en selenium gebruikt. Beide reacties vereisen het gebruik van een middelgroot cyclotron.

Voor het ^{76}Br wordt gebruik gemaakt van directe methodes⁷⁻⁸ $^{75}\text{As}(^3\text{He}, 2n)^{76}\text{Br}$, $^{76}\text{Se}(p, n)^{76}\text{Br}$ en $^{77}\text{Se}(p, 2n)^{76}\text{Br}$ of van indirecte methodes⁹⁻¹¹ $^{\text{nat}}\text{Br}(d, xn)^{76}\text{Kr}$, $^{\text{nat}}\text{Br}(p, xn)^{76}\text{Kr}$, en $^{76}\text{Se}(^3\text{He}, 3n)^{76}\text{Kr}$ gevolgd door het β^+ , EC verval van ^{76}Kr tot ^{76}Br . De ($^3\text{He}, 2n$) methode is de keuze voor de productie van ^{76}Br op grote schaal.

Voor de productie van ^{77}Br zijn er eveneens directe methodes¹²⁻¹⁶ $^{75}\text{As}(\alpha, 2n)^{77}\text{Br}$, $^{77}\text{Se}(p, n)^{77}\text{Br}$ en $^{78}\text{Se}(p, 2n)$ en indirecte methodes¹⁷⁻¹⁹ $^{\text{nat}}\text{Br}(d, xn)^{77}\text{Kr}$ en $^{\text{nat}}\text{Br}(p, 3n)^{77}\text{Kr}$ gevolgd door het β^+ , EC verval van ^{77}Kr tot ^{77}Br . Het

(α , 2n) proces is het meest gebruikte systeem en het wordt ook in het cyclotron aan de VUB toegepast voor de productie van ^{77}Br . Er wordt vertrokken van 400 mg As_2O_3 (p.a.) welke in een roestvrije stalen houder (diepte 0.1 mm, diameter 19 mm) wordt geperst door middel van een druk van 42×10^6 Pa. De target wordt bedekt met een 15 μm dikke Al-folie en bestraald met α -deeltjes met een maximum energie van 30 MeV. Dit levert bijna zuiver ^{77}Br op via de $^{75}\text{As}(\alpha, 2n)^{77}\text{Br}$ reactie. Na zuivering²⁰ wordt een oplossing van ^{77}Br in dubbel gedestilleerd water bekomen. De pH van deze oplossing bedraagt ± 7 , wat bruikbaar is voor de radiobromering van vrijwel alle organische moleculen.

2.1.2 Joodisotopen

Jood heeft als belangrijkste radio-isotopen ^{123}I ($t_{1/2} = 13.2$ uur), ^{125}I ($t_{1/2} = 60$ dagen) en ^{131}I ($t_{1/2} = 8$ dagen). ^{123}I heeft van de drie isotopen de meest gunstige nucleaire kenmerken voor diagnostische doeleinden, zowel door de energie van zijn voornaamste γ -stralen (159 keV is optimaal voor scannen met de klassieke γ -camera's) als door zijn halfwaardetijd (13,2 uur is voldoende voor de synthese van het radiodiagnosticum en voor het scannen). Het is dan ook het joodisotoop dat het meest gebruikt wordt in de diagnostiek. De γ -stralen uitgezonden door ^{125}I hebben een te lage energie (35 keV) om van enig nut te zijn voor *in vivo* gebruik. Deze radio-isotoop kan wel in het labo gebruikt worden voor langer durende studies. ^{131}I daarentegen heeft te hoog energetische fotonen (365 keV). Tevens verhogen én de langere halfwaardetijd én de uitgezonden β^- -stralen de stralingsbelasting van de patiënt aanzienlijk. Deze laatste isotoop wordt in de nucleaire geneeskunde gebruikt voor therapie.

Voor de productie van ^{123}I kan gebruik gemaakt worden van een groot aantal verschillende processen, die kunnen onderverdeeld worden in twee grote groepen. De directe methodes²¹⁻²⁴ vereisen een klein tot middelgroot cyclotron en bestaan in het algemeen over proton- of deutron-geïnduceerde nucleaire reacties met aangerijkte telluriumisotopen. Van de drie belangrijkste reacties, namelijk $^{124}\text{Te}(p, 2n)^{123}\text{I}$, $^{123}\text{Te}(p, n)^{123}\text{I}$ en $^{122}\text{Te}(d, n)^{123}\text{I}$, is de eerste veruit het meest onderzocht. Het is een reactie met hoge rendementen maar de aanwezigheid van ^{124}I onzuiverheden verhindert het gebruik voor productiedoeleinden. Bij de indirecte methodes²⁵⁻²⁷ wordt gebruik gemaakt van het $^{123}\text{Xe} \rightarrow ^{123}\text{I}$ precursor systeem, waarvoor men middelgrote tot grote cyclotrons nodig heeft en waarbij heel onzuiver ^{123}I wordt aangemaakt. De belangrijkste onzuiverheid is ^{125}I (0,1-0,4 %). Voor routineproducties werden $^{127}\text{I}(p, 5n)^{123}\text{Xe}$, $^{127}\text{I}(d, 6n)^{123}\text{Xe}$ en Cs,La(p,spall) ^{123}Xe methodes beschreven, alhoewel de eerste de meest gebruikte methode is.

De productie van ^{125}I gebeurt door bestraling van ^{124}Xe met neutronen²⁸, gevolgd door de omzetting van ^{125}Xe tot ^{125}I .

^{131}I kan bekomen worden ofwel als ^{235}U splitsingsproduct²⁹⁻³⁰ ofwel na bestraling van een telluriumtarget³¹. In het eerste geval wordt ^{235}U bestraald met neutronen, wat ^{236}U oplevert. Dit geeft aanleiding tot verschillende fissieproducten waaronder ^{131}I volgens de reactie $^{236}\text{U} \rightarrow ^{131}\text{I} + ^{102}\text{Y} + 3n$. Het ^{131}I bekomen uit deze methode heeft een heel hoge specifieke activiteit wegens de lage contaminatie met ^{127}I . De andere methode berust op een $^{131}\text{Te} \rightarrow ^{131}\text{I}$ precursor methode, waarbij ^{131}Te bekomen wordt door bestraling van ^{130}Te met neutronen: $^{130}\text{Te}(n, \gamma)^{131}\text{Te}$. Wanneer bij deze methode gebruik wordt gemaakt van natuurlijk voorkomend Te bevat het geproduceerde ^{131}I 20% stabiel ^{127}I , 20 % ^{129}I en sporen van stabiel tellurium.

2.2 Radiohalogenering

2.2.1 Radiohalogenering van organische molecules

Radiohalogeneringsreacties kunnen onderverdeeld worden in elektrofile en nucleofiele substitutiereacties³²⁻³⁵.

Bij de **elektrofile substitutiereacties** gebruikt men meestal oxydantia om het halogeen in situ in de juiste toestand (Br^+ of I^+) te brengen voor een elektrofile aanval. De meest gebruikte oxydantia zijn chloramine-T³⁶⁻³⁸, N-chloorsuccinimide³⁹⁻⁴⁰, Iodogen⁴¹⁻⁴⁴ en iodobeads⁴⁵. Hierbij worden meestal zowel mono-, di- als multigehalogeneerde derivaten bekomen. Een meer specifieke radiohalogenering gebeurt door middel van het gebruik van arylhalogeendemetalleringreacties⁴⁶⁻⁴⁸. De metalen die het meest gebruikt worden zijn tin, silicium en boor. Een laatste mogelijke elektrofile substitutiereactie gebeurt met enzymen⁴⁹⁻⁵². Deze methode wordt meestal gebruikt wanneer de te halogeneren molecules weinig stabiel zijn (proteïnen).

De **nucleofiele substitutiereacties** verlopen, naast de uitwisseling op diazoniumverbindingen³⁵ (Sandmeyer-type reacties), allemaal via isotopische of niet-isotopische uitwisselingsreacties op de overeenkomstige jood- en broomderivaten. Het grote voordeel hierbij is dat deze reacties specifieke radiohalogenering toelaten. De niet-isotopische uitwisselingsreactie geeft daarenboven radiodiagnostica met hoge specifieke activiteit. Een nadeel echter is dat de uit te wisselen halogeen zich meestal op een niet- of weinig geactiveerde plaats bevindt, zodat men gebruik moet maken van katalysatoren. Er wordt overwegend gebruik gemaakt van koperzouten, maar ook nikkel- en paladiumcomplexen worden aangewend. Zoals bij de nucleofiele substitutie bestaan ook hier verschillende mogelijke reacties, met name de vaste fase transfer in ammoniumsulfaat⁵³⁻⁵⁶, de uitwisseling in pseudo-gesmolten toestand zonder gebruik van een katalysator⁵⁷⁻⁵⁹, de Cu^{2+} -gekatalyseerde reactie in waterig midden⁶⁰⁻⁶³, de Cu^+ -gekatalyseerde reactie in dipolaire aprotische solventen⁶⁴⁻⁶⁵ en de Cu^+ -gekatalyseerde reactie in zuur en reducerend midden.

De Cu^+ -gekatalyseerde reactie in zuur en reducerend midden, gebruikt bij de radiohalogenering van de NMDA/glycine antagonisten, en de vaste fase transfer in ammoniumsulfaat, gebruikt voor de synthese van ¹²³I gemerkt I-PK 11195, worden hieronder iets uitgebreider besproken.

2.2.2 De Cu^+ -gesteunde nucleofiele uitwisseling in zuur en reducerend milieu⁶⁶⁻⁶⁸

De Cu^+ -gesteunde (niet-isotopische) nucleofiele uitwisseling in zuur en reducerend milieu is gebaseerd op de *in situ* vorming van Cu^+ door de toevoeging van een overmaat reductantia aan Cu^{2+} -zouten. Tijdens de reactie verhindert de overmaat reductans de vorming van Cu^{2+} zodat enkel Cu^+ in de oplossing aanwezig is. Als reductantia kunnen Sn^{2+} , gentsinezuur en ascorbinezuur gebruikt worden, terwijl citroenzuur dienst doet als steunend complexon. Sn^{2+} -toevoeging laat ook toe hogere oxidatietoestanden van jood, zoals jodaat en perjodaat, te reduceren zodat de volledige hoeveelheid jodide beschikbaar is voor uitwisseling. De oplosbaarheid van Sn^{2+} in water is sterk pH-afhankelijk: bij een $\text{pH} \geq 2.0$ ontstaat $\text{Sn}(\text{OH})_2$ dat onmiddellijk neerslaat. Bij een $\text{pH} \geq 4.5$ kan deze precipitatie echter vermeden worden door een overmaat citroenzuur aan het reactiemengsel toe te voegen. Dankzij zijn complexerende eigenschappen houdt dit Sn^{2+} in oplossing. Doorborreling met N_2 zorgt voor de afwezigheid van zuurstofmoleculen die een nefaste werking hebben op de reactie, aangezien Cu^+ en O_2 de vorming van Cu^{2+} tot gevolg hebben. Ook dient er op gelet dat er noch hydrochloridezouten noch SnCl_2 worden gebruikt; de aanwezige chloride-ionen treden, ondanks een kleinere reactiesnelheidsconstante, in competitie met de radiojodide-ionen. Zo werd door Mertens *et al.*⁶⁸ gezien dat bij gebruik van SnCl_2 in plaats van SnSO_4

merkelijk lagere merkingsrendementen bekomen werden en dat door gebruik van sulfaat-zouten van het substraat de reactiesnelheid merkkelijk hoger is dan wanneer chloridezouten werden gebruikt.

2.2.3 De vaste fase transfer⁵³⁻⁵⁶

Een andere mogelijke halogeneringsmethode is de vaste fase transfer in aanwezigheid van ammoniumsulfaat en onder verhoogde temperatuur. Deze wordt vooral gebruikt voor de halogenering van moleculen waarbij het uit te wisselen halogeenatoom niet geactiveerd is voor nucleofiele substitutie. De functie van het ammoniumsulfaat zou er in bestaan een graduele verhoging van de pH te veroorzaken via een temperatuursafhankelijke afbraak tot ammoniumbisulfaat en vorming van ammoniak. Uit studies blijkt dat het ammoniumsulfaat echter niet volledig wordt afgebroken en dat de reactie dus doorgaat in een mengsel van ammoniumsulfaat en -bisulfaat. Eveneens blijkt dat na toevoeging van verschillende hoeveelheden ammoniumsulfaat de pH van het reactiemengsel steeds 3 is zodat men kan concluderen dat de toevoeging van het ammoniumsulfaat geen kritische parameter is. Wanneer de synthese in een reducerend milieu wordt uitgevoerd betekent dit een nefaste invloed op het rendement. Verlaagde rendementen worden eveneens waargenomen in afwezigheid van zuurstof. Anderzijds verliep de uitwisseling ook niet in aanwezigheid van oxydantia bij een pH=6, wat doet vermoeden dat een evenwichtsmengsel van ammoniumsulfaat en -bisulfaat aanleiding geeft tot de ideale zure omgeving, nodig voor de uitwisselingsreactie.

Een groot voordeel van deze methode is dat er geen gebruik moet gemaakt worden van organische solventen of eventuele toxische additieven wat de uiteindelijke afwerking van de formulatie vergemakkelijkt.

Referenties

1. Paans AMJ, Welleweerd J, Vaalburg W, Reiffers S, Woldring MG. *Int J Appl Radiat Isot*, **1980**, 31, 267-273.
2. Blessing G, Weinreich R, Qaim SM, Stöcklin G. *Int J Appl Radiat Isot*, **1982**, 33, 333-339.
3. Vaalburg W, Paans AMJ, Terpstra JW, Wiegman T, Dekens K, Rijskamp A, Woldring MG *Int J Appl Radiat Isot*, **1985**, 36, 961-964.
4. Kovacs Z, Blessing G, Qaim SM, Stöcklin G. *Int J Appl Radiat Isot*, **1985**, 36, 635-642.
5. Friedman AM, DeJesus OJ, Harper P, Armstrong CJ. *J Labeled Compd Radiopharm*, **1982**, 19, 1427.
6. Qaim SM, Weinreich R. *Int J Appl Radiat Isot*, **1981**, 32, 823-827.
7. Mazière B, Loc'h C, Hantraye P, Guillon R, Duquesnoy N, Soussaline F, Naquet R, D, Mazière M. *Life Sci*, **1984**, 35, 1349. Comar
8. Qaim SM. *Appl Radiat Isot*, **1986**, 37, 803-810.
9. Qaim SM, Stöcklin G, Weinreich R. *Int J Appl Radiat Isot*, **1977**, 28, 947-953.
10. De Jong D, Kooiman H, Veenboer J. *Int J Appl Radiat Isot*, **1979**, 30, 786-788.

11. Youfeng HE, Qaim SM, Stöcklin G. *Int J Appl Radiat Isot*, **1982**, 33, 13-19.
12. Helus F. *Radiochem Radioanal Lett*, **1970**, 3, 45.
13. Nunn AD, Waters SL. *Int J Appl Radiat Isot*, **1975**, 26, 731-735.
14. Norton EF, Kondo K, Karlstrom K, Lambrecht RM, Wolf AP, Treves S. *J Radioanal Chem*, **1978**, 44, 207-213.
15. Madhusudhan CP, Treves S, Wolf AP, Lambrecht RM. *J Radioanal Chem*, **1979**, 53, 299-305.
16. Janssen AGM, van den Bosch RLP, de Goeij JJM, Theelen HMJ. *Int J Appl Radiat Isot*, **1980**, 31, 405-409.
17. Qaim SM, Stöcklin G, Weinreich R. *Int J Appl Radiat Isot*, **1977**, 28, 947-953.
18. De Jong D, Kooiman H, Veenboer Jth. *Int J Appl Radiat Isot*, **1979**, 30, 786-788.
19. Lundqvist H, Malmborg P, Langstrom B, Chiengmai SN. *Int J Appl Radiat Isot*, **1979**, 30, 39-43.
20. Doctoraatsthesis F. Lambert
21. Acerbi E, Birattari C, Castiglioni M, Resmini F, Villa M. *Int J Appl Radiat Isot*, **1975**, 26, 741-747.
22. Van den Bosch R, De Goeij JJM, Van der Heide JA, Tertoolen JFW, Theelen HMJ, Zegers C. *Int J Appl Radiat Isot*, **1977**, 28, 255-261.
23. Kondo K, Lambrecht RM, Wolf AP. *Int J Appl Radiat Isot*, **1977**, 28, 395-401.
24. Kondo K, Lambrecht RM, Norton EF, Wolf AP. *Int J Appl Radiat Isot*, **1977**, 28, 765-771.
25. Wilkins SR, Shimose ST, Hines HH, Jungerman JA, Hegedus F, DeNardo GL. *Int J Appl Radiat Isot*, **1975**, 26, 279-283.
26. Paans AMJ, Vaalburg W, van Herk G, Woldring MG. *Int J Appl Radiat Isot*, **1976**, 27, 465-467.
27. Syme DB, Wood E, Blair IM, Kew S, Perry M, Cooper P. *Int J Appl Radiat Isot*, **1978**, 29, 29-38.
28. Harper PV, Siemens WD, Lathrop KA, Endlich, H. *J Nucl Med*, **1963**, 4, 277-289.
29. Kahn M, Freedman AJ, Schultz, CG. *Nucleonics*, **1954**, 12, 72.
30. Kazarinov VE. *Nucleonics*, **1954**, 12, 75.
31. Green FL, Martin JA. *Nucl Sci Abstr*, **1960**, 14, 1682.
32. Maziere B, Loc'h C. *Appl Radiat Isot*, **1986**, 37(8), 703-713.
33. Seevers RH, Counsell RE. *Chem Rev*, **1982**, 82, 575-590.
34. Machulla HJ, Knust EJ. *Nuklearmedizin*, **1986**, 3, 111-118.
35. Coenen HH, Moerlein SM, Stöcklin G. *Radiochimica Acta*, **1983**, 34, 47-68.
36. Hunter WM, Greenwood FC. *Nature*, **1962**, 194, 495.
37. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. *Biochem J*, **1963**, 89, 114.
38. McConahey PJ, Dixon FJ. *Methods Enzymol*, **1980**, 70, 210.
39. Wibur DS, Bentley GE, O'Brien Jr HA. *J Labeled Compd Radiopharm*, **1981**, 18, 1693.
40. Zhou Y-G, Shiu C-Y, Wolf AP. *J Labeled Compd Radiopharm*, **1982**, 19, 1623.
41. Salcinski PRP, McClean C, Sykes JEC, Clement-Jones VV, Lowry PJ. *Anal Biochem*, **1981**, 117, 136.
42. Nieuwenhuizen W, Emeis JJ, Vermond A, Kurver P, Van der Heide D. *Biochem Biophys Res Commun*, **1980**, 97, 49.
43. Knight LC, Budzynski AZ, Olexa SA. *J Labeled Compd Radiopharm*, **1981**, 18, 50.

44. Salisbury JG, Graham JM. *Biochem J*, **1981**, 194, 351.
45. Markwell MAK. *Anal Biochem*, **1982**, 125, 427.
46. Kabalka GW, Sastry KAR, Pagni PG. *J Radioanal Chem*, **1982**, 74, 315-321.
47. Adam MJ, Ruth TJ, Homma Y, Pate BD. *Int J Appl Radiat Isot*, **1985**, 12, 935-937.
48. Wilbur DS, Anderson KW, Stone WE, O'Brien Jr HA. *J Labeled Compd Radiopharm*, **1982**, 19, 1171-1188.
49. Knight LC, Harwig SSL, Welch MJ. *J Nucl Med*, **1977**, 18, 282-288.
50. McElvany KD, Knight LC, Welch MJ. *J Nucl Med*, **1978**, 19, 702.
51. McElvany KD, Welch MJ. *J Nucl Med*, **1980**, 21, 953-960.
52. McElvany KD, Barnes JW, Welch MJ. *J Appl Radiat Isot*, **1980**, 31, 679-688.
53. Mangner TJ, Wu JL, Wieland DM, Beierwaltes. *J Nucl Med*, **1981**, 22, P12.
54. Mangner TJ, Wu JL, Wieland DM. *J Org Chem*, **1982**, 47, 1484.
55. Angelberger P, Wagner-Loffler M, Hruby E, Hofer O. *J Labeled Compd Radiopharm*, **1984**, 21, 1110-1112.
56. Fortman D, Robbins P, Sodd V. *Int J Appl Radiat Isot*, **1978**, 29, 449-451.
57. Wieland D, Wu J, Brown L. *J Nucl Med*, **1980**, 21, 349-353.
58. Kuhl D, Barrio J, Huang S. *J Nucl Med*, **1982**, 23, 196-203.
59. Eisenhut M, Kimmig B, Bubeck B, Sinn H, zum Winkel K, Taylor DM. *J Labeled Compd Radiopharm*, **1984**, 21, 1130-1132.
60. Hinkle GH, Basmadjan GP, Kirchener AS. *J Pharm Sciences*, **1981**, 70, 312-316.
61. Carlsen L, Andresen K. *Eur J Nucl Med*, **1982**, 7, 280-281.
62. Hawkins LA, Elliot AT, Shields R, Herman K, Horton P, Little W, Umbers C. *Eur J Nucl Med*, **1982**, 7, 58-61.
63. Mills S. *Int J Appl Radiat Isot*, **1982**, 33, 467-468.
64. Moerlein SM, Hwang DR, Welch MJ. *Int J Appl Radiat Isot*, **1988**, 39, 369-372.
65. Stanko VI, Iroshnikova NG, Volov AF, Klimova AI. *Int J Appl Radiat Isot*, **1984**, 35, 1129-1132.
66. Mertens J, Vanryckegem W, Gysemans M, Eersels J, Finda-Panek E, Carlsen L. *Eur J Nucl Med*, **1987**, 13, 380-381.
67. Gysemans M, Mertens J. *J Labeled Comp Radiopharm*, **1991**, 30, 364.
68. Mertens J, Gysemans M. *New Trends in Radiopharmaceutical Synthesis, Quality Assurance and Regulatory Control. Edited by A.M. Emran, Plenum Press, New York, 1991*, 51.

Hoofdstuk 3

De *N*-methyl-*D*-aspartaat (NMDA)-receptor

3.1 Endogene liganden - Excito-toxiciteit - Neuropathologieën

Dat het L-glutamaat niet alleen signalen tussen de hersenzenuwen doorseint maar ook aanleiding geeft tot verhoging van zenuwactiviteit bij katten¹, het uitlokken van convulsies bij honden² en het vernietigen van retinazenuwen bij muizen³ is reeds lang gekend. Het is echter pas in de jaren 70 en 80 dat onderzoek aangetoond heeft dat bepaalde zure aminozuren in normale omstandigheden optreden als exciterende synaptische transmitters in het centraal zenuwstelsel en dat ze werken via specifieke membraanreceptoren en in abnormale omstandigheden aanleiding kunnen geven tot neurodegeneratieve aandoeningen. L-glutamaat wordt nu algemeen aanvaard als de belangrijkste neurotransmitter⁴⁻⁷ en dus tevens als de belangrijkste kandidaat endogeen neurotoxine⁸⁻¹¹. Van analogen van L-glutamaat, zoals L-aspartaat, L-homocysteaat, L-cysteïnesulfinaat en quinolaat, die eveneens in hersenweefsel voorkomen, is het nog niet geweten of ze een rol spelen als exciterende neurotransmitters en endogene neurotoxines. Zo is quinolaat wel een NMDA-agonist⁷, maar de vrijstelling ervan wordt echter niet door fysiologische stimuli uitgelokt zodat het niet de functie van een neurotransmitter kan worden toegeschreven. Nochtans bleek blootstelling aan lage concentraties van quinolaat te leiden tot afsterving van zenuwen¹³ en zou de stof een rol spelen in neurodegeneratieve aandoeningen zoals ziekte van Huntington en AIDS-gebonden dementie^{12,14-15}.

Het begrip 'excito-toxiciteit' werd voor het eerst gebruikt in de jaren '70 als een semi-mechanische beschrijving van het afsterven van zenuwen als gevolg van blootstelling van weefsel van het centraal zenuwstelsel aan exciterende aminozuren. Men bemerkte dat L-glutamaat en analogen, toegediend aan onvolwassen knaagdieren, degeneratieve veranderingen teweeg brachten in zenuwen van de hypothalamus en andere delen van de hersenen met een weinig gevormde bloedhersenbarrière¹⁶⁻¹⁷. Verder onderzoek toonde aan dat er een goede correlatie bestond tussen neuro-exciterende en neurotoxische eigenschappen van een reeks aminozuren en men stelde een direct oorzakelijk verband vast tussen cellulaire activiteit en celdood¹⁸.

Neurodegeneratieve aandoeningen worden gekarakteriseerd door afsterven van bepaalde types zenuwen in verschillende gebieden van het centraal zenuwstelsel¹⁹. Zo speelt enerzijds de degeneratie van dopamine-neuronen in de basale ganglia een rol in de ziekte van Parkinson en zijn anderzijds degeneratie van acetylcholine- en serotonine-neuronen in de cortex en de hypothalamus een oorzaak van de ziekte van Alzheimer²⁰. Verschillende factoren kunnen hier aan de basis liggen¹⁹ met name vrije-radicalenprocessen, genetische dispositie en misschien zelfs auto-immuun mechanismen. Meer recente studies onderzochten echter vooral de rol van exciterende aminozuurtransmitters in afsterving en dood van zenuwen²¹⁻²⁴. De wetenschap dat overactivering van centrale Glu-neuronen een belangrijke oorzakelijke factor is in neurodegeneratieve processen wordt bevestigd door *in vitro* en *in vivo* studies. Tabel 3.1 geeft een overzicht van pathologieën waarbij zure aminozuren een invloed zouden hebben. In alle gevallen zou een overactivering van een aminozuurtransmittersysteem een oorzaak zijn²⁵.

Tabel 3.1 Neuropathologieën waarbij exciterende aminozuren een rol zouden spelen.

	OORZAAK	NEUROPATHOLOGIE
	Traumatisch	Cerebrale ischemie Hypoglycemie Traumata v/h
CZS		Pijn -
Spasticiteit	Endogeen	Epilepsie Ziekte van
Alzheimer	Genetisch	Angst Schizofrenie Ziekte van Huntington
	Olivopontocerebellaire atrofie	Niet-ketonische
hyperglycemie	Omgeving	Lathyrisme Guam
ALS/PD/dementie		

3.2 Receptor types

Tijdens de jaren '70 werd het duidelijk dat er meer dan één receptor bestond door de vaststelling dat zenuwen van katten anders reageerden op exciterende effecten van verschillende zure aminozuuranalogen²⁶. De ontdekking van bepaalde stoffen die de exciterende werking van deze aminozuren konden blokkeren leidde tot een duidelijkere onderverdeling van zenuwresponsen en zo werden drie verschillende klassen van membraanreceptoren vooropgesteld: de *N*-methyl-D-aspartaat (NMDA)-, de kainaat (KAIN)- en de quisqualaatreceptor²⁷⁻³¹ (deze laatste heeft in de loop der jaren de naam AMPA receptor gekregen, gebaseerd op de grotere selectiviteit van 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionzuur t.o.v. deze van quisqualaat). Neurologisch, farmacologisch en moleculairbiologisch onderzoek brachten echter aan het licht dat de centrale exciterende aminozuurreceptoren kunnen worden onderverdeeld in vijf klassen, waarvan sommigen en misschien allemaal heterogeen zijn³²⁻³⁷. De twee 'nieuwe' receptoren (die in feite niet exciterend mogen worden genoemd, daar er geen zekerheid bestaat of ze al dan niet leiden tot neurologische depolarisatie en excitatie) zijn de L-AP4-receptor³⁸⁻⁴⁰, gevoelig voor lage concentraties aan L-2-amino-4-phosphonobutanoaat, en de Glu_G-receptor⁴¹⁻⁴³, verbonden met het fosfatidylinositol-metabolisme in de postsynaptische zenuw. De NMDA-, KAIN- en AMPA-receptoren bezitten, in tegenstelling tot de 2 anderen, zeker een ionenkanaal dat van belang is bij de functie van deze receptoren. AMPA- en KAIN-receptoren (ook de 'niet-NMDA'-receptoren genoemd) zijn verantwoordelijk voor vlugge, exciterende postsynaptische potentialen in gans het centraal zenuwstelsel en blijken een rol te vervullen in processen aan exciterende synapsen⁴⁴. NMDA receptoren hebben een meer gespecialiseerde functie

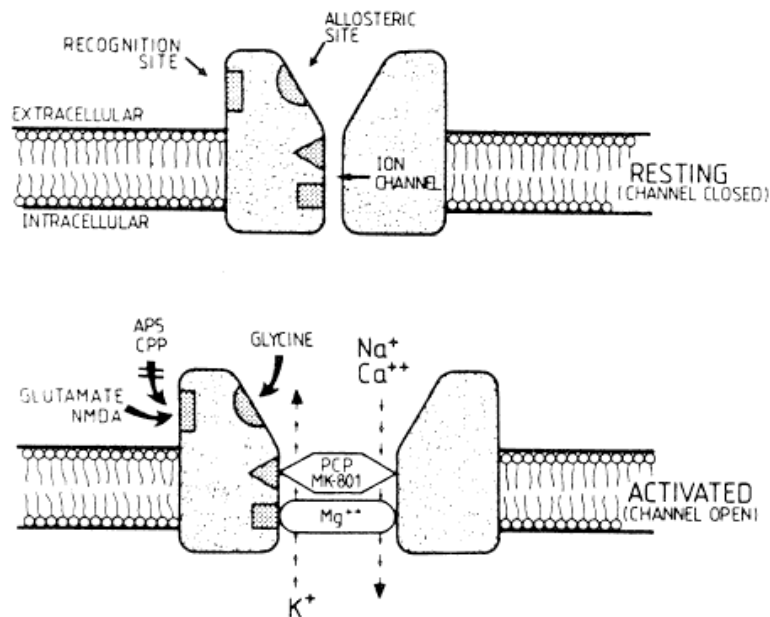
door de unieke eigenschappen van het ionenkanaal (cfr 3.3). De receptoren participeren in verschillende plastische neuronale evenementen waaronder de initiatie van het fenomeen van verlengde nawerking⁴⁵⁻⁴⁶ (LTP of Long Term Potentiation) en instandhouding van synaptische contacten gedurende zenuwontwikkeling⁴⁷.

3.3 Het NMDA-receptorcomplex en zijn liganden

De NMDA-receptor bezit zoals ook de nicotine- en de γ -aminoboterzuur A (GABA_A)-receptoren, verschillende functionele domeinen⁴⁸ (cfr. infra), zodat we kunnen spreken van een receptorcomplex (Figuur 3.1). Eveneens maakt de NMDA-receptor, samen met de KAIN- en de AMPA-receptoren, deel uit van een familie van transmitterreceptoren die een ionenkanaal bezitten⁴⁹. Het is precies dit ionenkanaal dat de NMDA-receptor uniek maakt. Terwijl de ionenkanalen van de andere receptorsystemen enkel doorlaatbaar zijn voor Na⁺ en K⁺, is de NMDA-receptor selectief permeabel voor Ca²⁺⁵⁰. Waarschijnlijk heeft de NMDA-receptor zelfs als enige een ionenkanaal dat doorlaatbaar is voor Ca²⁺, wat van belang kan zijn voor zijn rol in het fenomeen van de verlengde nawerking en in neuropathologieën⁵¹. Fysiologische stijging van het intracellulair Ca²⁺ als gevolg van receptoractivatie kan aanleiding geven tot metabole veranderingen in de cel. Een grote of langdurige stijging van intracellulair Ca²⁺ na excessieve NMDA-receptorstimulatie is toxisch voor de cel. Dit aspect maakt de NMDA-receptor belangrijk in de hersenpathologie.

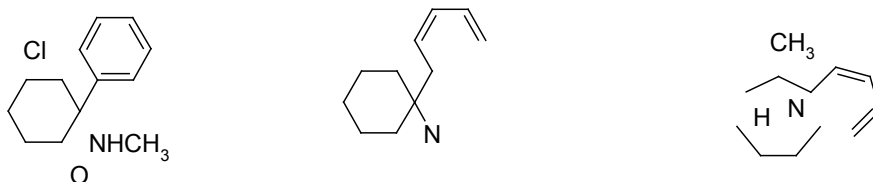
Een spanningsafhankelijke blokkering door Mg²⁺⁵²⁻⁵⁵ is een tweede uniek feit van de NMDA-receptor. Bij normale extracellulaire Mg²⁺-concentraties wordt het NMDA-receptorionenkanaal geblokkeerd in rustpotential (ongeveer -70 mV). Bij depolarisatie wordt de drijvende kracht voor het binnenvloeien van Mg²⁺ verminderd en wordt de blokkering opgeheven. Zelfs wanneer de receptor geactiveerd wordt door een agonist, is de respons afhankelijk van de membraanpotential van de zenuw. Dit is een belangrijk gegeven in verband met het zenuwmechanisme in LTP.

Zoals reeds vermeld is de NMDA-receptor een complex dat uit verschillende functionele domeinen bestaat: naast het ionenkanaal is er een transmitterherkenningszone, een allosterische zone en nog andere onopgehelderde zones (Figuur 3.1).



Figuur 3.1 Het NMDA-receptorcomplex met de verschillende functionele zones

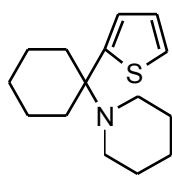
Het **ionenkanaal** kan niet alleen door Mg^{2+} , maar ook door organische moleculen worden geblokkeerd. Naast de anesthetica ketamine (**1**) en phencyclidine⁵⁶ (PCP, **2**) is er ook het meer potente MK-801 (=dizocilpine, **3**)⁵⁷. Deze stoffen werken niet in competitie met een agonist en worden dan ook de 'niet-competitieve antagonisten' genoemd⁵⁸. Ze hebben voor hun blokkerende werking zelfs agonist-activatie nodig, en ze zijn tevens spanningsafhankelijk⁵⁸, wat suggereert dat deze 'open-kanaalblokkers' binden aan een zijde binnenin het ionenkanaal.



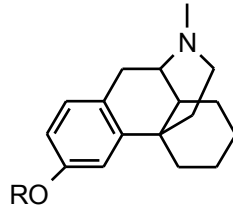
Figuur 3.2 1 Niet-competitieve NMDA antagonisten I

3

Andere componenten die volgens hetzelfde principe werken zijn N-(1-(2-thienyl)cyclohexyl)piperidine (TCP, **4**), de morfinederivaten dextrorphan en dextromethorphan (**5**), cyclazocine, pentazocine en N-allylnormetazocine (**6**), dexoxadrol (**7**) en LY 154045⁵⁹ (**8**).

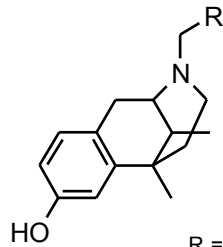


4



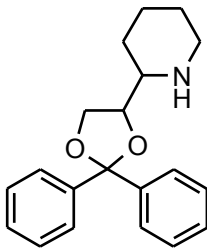
5

R = -H: dextrophan
R = -OCH₃: dextromethorphan

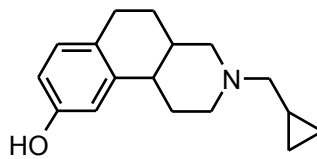


6

R = cyclopropan: cyclazocine
R = -CH=C(CH₃)₂: pentazocine
R = -CH=CH₂: N-allylnormetazocine (SKF 1004)



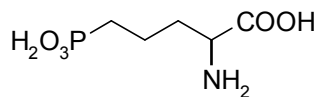
7



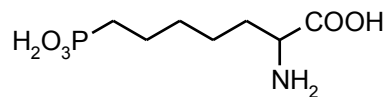
8

Figuur 3.3 Niet-competitieve NMDA antagonisten II

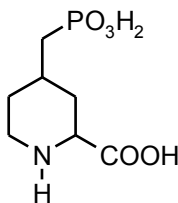
Aan de **transmitterherkenningszone** binden de agonisten L-glutamaat en L-aspartaat. Een aantal glutamaatanalogen die op deze plaats binden en in competitie treden met de agonisten werden gesynthetiseerd. Van deze 'competitieve antagonisten' zijn de α -amino- ω -phosphonocarboxylaten de belangrijkste: AP5 (**9**) en AP7 (**10**), CGS19755 (**11**) en CPP (**12**), die een ringstructuur bezitten en CGP37849 (**13**), met een dubbele binding en een methylgroep in de koolstofketen (Fig. 3.4).



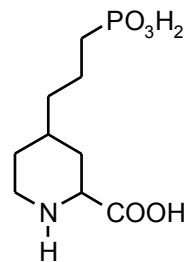
9



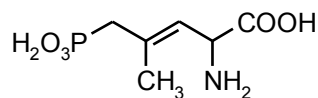
10



11



12



13

Figuur 3.4 Competitieve NMDA antagonisten

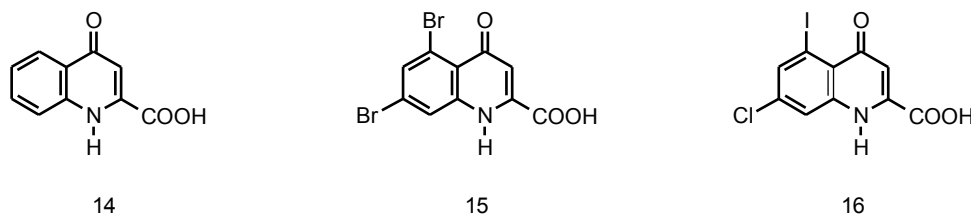
Een derde bindingsplaats is de **allosterische zijde**. Het bestaan hiervan werd in 1987 voor het eerst gesuggereerd steunend op het feit dat glycine NMDA-receptorresponsen vergemakkelijkt in zenuwculturen⁶⁰. Het glycine verhoogde de probaliteit voor ionenkanaalopening en er werd aangenomen dat glycine bond op een bepaalde plaats en zo de receptorfunctie 'allosterisch' vergemakkelijkt. Wanneer glycine weggenomen wordt van de receptor, blijkt de respons op NMDA te verdwijnen, zodat glycine werd aanzien als een absolute noodzaak voor NMDA-receptoractiviteit⁶¹ en aldus samen met L-glutamaat co-agonist is voor de receptor. Dit is in feite een derde unieke eigenschap van de NMDA-receptor. Ook voor deze bindingsplaats werden reeksen antagonisten gesynthetiseerd die verder uitvoerig worden besproken.

Een aantal componenten blijkt ook een effect uit te oefenen op de NMDA-receptor, maar de effecten kunnen niet worden uitgelegd door interactie met één van de bovenvermelde bindingsplaatsen. Waar Zn^{2+} ⁶²⁻⁶⁴, derivaten van chlorpromazine en tricyclische antidepressiva⁶⁵, spermine en spermidine⁶⁶ en ifenprodil⁶⁷ precies inwerken en wat hun eventuele betekenis is, blijkt nog onduidelijk.

3.4 Kynureninezuurderivaten en afgeleiden

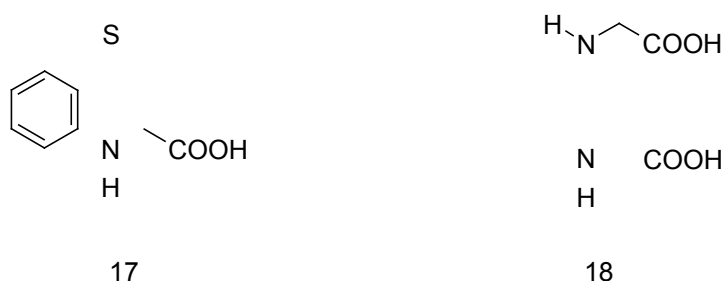
Dadelijk na de ontdekking van de stimulerende werking van glycine aan de NMDA-receptor⁶⁰ werden zowel agonisten, partiële agonisten als antagonisten gesynthetiseerd. Uit studies met eenvoudige aminozuren bleek dat bepaalde groepen noodzakelijk zijn voor binding aan de NMDA-receptor⁶⁶: zo bleek zowel de zure carboxylgroep als de basische aminogroep nodig voor affiniteit. De bedoeling van een volgende reeks studies was antagonisten te synthetiseren die een goede affiniteit vertoonden voor de NMDA-receptor, maar die tevens een betere werking en minder nevenwerkingen vertoonden dan de reeds bestaande ionkanaalblockers en de antagonisten van de glutamaatbindingsplaats.

Eén van die producten die een affiniteit - zwak en niet selectief - bleek te bezitten voor de glycinebindingsplaats was het kynureninezuur (**14**) (4-oxo-1,4-dihydroquinoline-2-carbonzuur)⁶⁹⁻⁷⁰. Substitutie op plaatsen 5 en/of 7 gaf een verhoogde affiniteit. Optimalisatie leidde tot zowel het 5,7-dibroom- (**15**) als het 7-chloor-5-iodo-derivaat (**16**)⁷¹ (Figuur 3.5), met IC₅₀-waarden van respectievelijk 86 en 32 nM tegenover [³H] glycine. Dit betekende een 1000-voudige verhoging van affiniteit ten opzichte van kynureninezuur zelf. Daarenboven gaf een 5,7-disubstitutie derivaten met een sterk uitgesproken selectiviteit voor de glycine bindingsplaats. Zo heeft het 7-chloor-5-iodo-derivaat IC₅₀-waarden van meer dan 100 µM tegenover zowel [³H] glutamaat, [³H] AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionaat) als [³H] kaïnezuur. Substitutie op plaats 6 daarentegen gaf derivaten met een antagonistische werking aan de niet-NMDA receptoren terwijl substitutie op plaats 8 aanleiding gaf tot vrijwel volledig verdwijnen van antagonisme aan zowel de NMDA als de niet-NMDA receptoren.



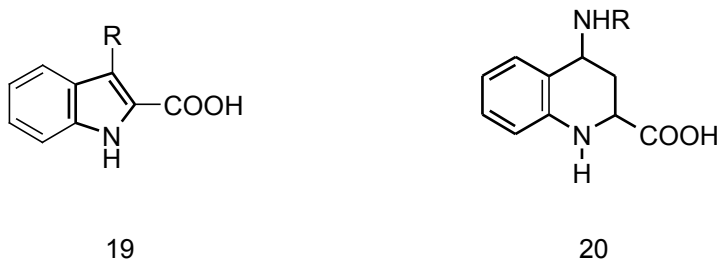
Figuur 3.5 Kynureninezuur en 5,7-dibroom- en 7-chloor-5-iodo-derivaten

Modificatie van de 4-oxogroep resulteerde in thiokynureninezuurderivaten⁷² (**17**) en 4-carboxymethylaminoquinolines⁷³ (**18**), met vrijwel gelijkwaardige affiniteiten (Figuur 3.6).



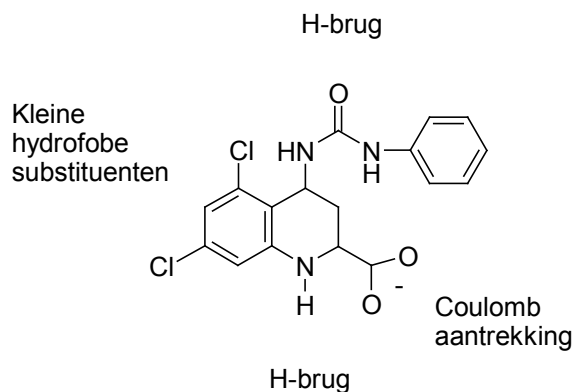
Figuur 3.6 Thiokynureninezuurderivaten en 4-carboxymethylaminoquinolines

Veranderingen aan de heterocyclische ring gaven verder aanleiding tot 2 klassen potente glycine-antagonisten, de 2-carboxyindoles⁷⁴⁻⁷⁶ (**19**) en de 2-carboxytetrahydroquinolines⁷⁷⁻⁷⁹ (**20**) (Figuur 3.7).



Figuur 3.7 2-carboxyindoles en de 2-carboxytetrahydroquinolines

Als besluit werd een algemeen model voor moleculen die *in vitro* affiniteit vertonen voor de NMDA-receptor voorgesteld (Figuur 3.8).

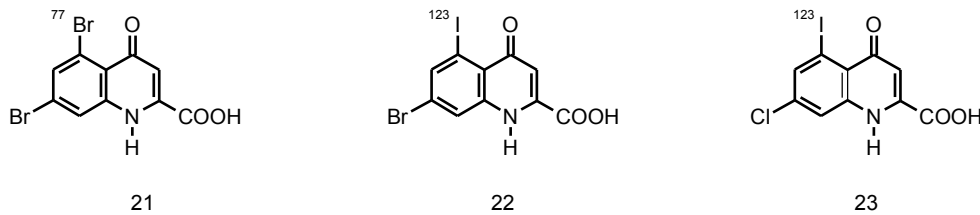


Figuur 3.8 Algemeen model voor antagonisten van de glycinebindingsplaats van de NMDA-receptor

Hieruit bleek dat aan een aantal voorwaarden moet worden voldaan voor binding van een ligand aan de receptor. Zo is er een Coulomb aantrekking nodig tussen de receptor en de carboxylzuregroep op plaats 2. Dit betekent dat een esterderivaat een sterke vermindering in affiniteit voor gevolg heeft. Tevens moet er een waterstofbrug kunnen worden gevormd via de substituent van de N in de ring zodat een alkylering eveneens een vermindering in affiniteit inhoudt. Een tweede waterstofbrug moet kunnen gevormd worden via een carbonylgroep op plaats 4. Invoeren van substituenten op plaats 4 die geen waterstofbrug kunnen vormen geven eveneens aanleiding tot een verminderde affiniteit. Een laatste vereiste is de aanwezigheid van kleine hydrofobe substituenten op plaatsen 5 en/of 7. Het invoeren van halogenen heeft hier dus een positief effect op de affiniteit van de molecule voor de receptor.

3.5 Geselecteerde moleculen

Zoals reeds vermeld is het de bedoeling de NMDA receptor *in vivo* te visualiseren met behulp van antagonisten gemerkt met een halogeengammastraler. Uit voorafgaand overzicht blijkt dat kynureninezuurderivaten, meer bepaald de 5,7-digesubstitueerde, hoge *in vitro* affiniteiten bezitten en dat ze eveneens selectief zijn voor de glycine bindingsplaats van de receptor. Op basis van deze eigenschappen werden uit deze groep dan ook drie componenten uitgekozen voor radiosynthese. Het betreft het 5,7-dibroomkynureninezuur dat gemerkt kan worden met Br-77 (**21**), het 7-broom-5-joodkynureninezuur waarbij het joodatoom kan worden uitgewisseld voor een I-123 (**22**) en het 7-chloor-5-joodkynureninezuur waarvan eveneens een joodgemerkt analogoog kan worden gemaakt (**23**) (Figuur 3.9).



Figuur 3.9 Structuurformules van [⁷⁷Br]5,7-dibroomkynureninezuur, [¹²³I]7-broom-5-joodkynureninezuur en [¹²³I]7-chloor-5-joodkynureninezuur.

Referenties

1. Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC *Nature*, **1959**, 183, 611.
2. Hayashi T *Keio J Med*, **1954**, 3, 183-192.
3. Lucas DR, Newhouse JP *Arch Ophthalmol*, **1957**, 58, 193-201.
4. Watkins JC, Evans RH *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1981**, 21, 165-204.
5. Dingledine R, Boland LM, Chamberlin NL, Kawasaki K, Kleckner NW, Traynelis SF, Verdoorn T *CRC Critical Rev Neurobiol*, **1988**, 4, 1-96.
6. Fagg GE and Foster AC *Neuroscience*, **1983**, 4, 701-719.
7. Collingridge GL and Lester RA *Pharmacol Rev*, **1989**, 40, 143-210.
8. Olney JW, Oi Lan Ho, Rhee V *Exp Brain Res*, **1971**, 14, 61-76.
9. Choi DW *Neuron*, **1988**, 1, 623-634.
10. Choi In: Meldrum BS (ed.) *Excitatory Amino Acid Antagonists*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1991**, 265-286.
11. Meldrum BS and Garthwaite J *Trends Pharmacol Sci*, **1990**, 11, 379-387.
12. Stone TW and Burton NR *Prog Neurobiol*, **1988**, 30, 333-368.
13. Whetsell WO Jr., Schwarcz R *Neurosci Lett*, **1989**, 97, 271-275.
14. Schwarcz R and Meldrum BS *Lancet ii*, **1986**, 140-143.
15. Heyes MP, Rubinow D, Lane C, Markey SP *Ann Neurol*, **1989**, 26, 275-277.
16. Olney JW *J Neuropath Exp Neurobiol*, **1971**, 30, 75-90.
17. Olney JW, Oi Lan Ho, Rhee V *Exp Brain Res*, **1971**, 14, 61-76.

18. Olney JW In: *McGeer and Olney (eds.)*, **1978**, 95-121.
19. Nappi G, Hornykiewicz, Fariello RG, Agnoli A, Klawans H (eds.) *Neurodegenerative Disorders. The role played by Endotoxines and Xenobiotics*. Raven Press, New York, **1988**.
20. Wurtzman RJ, Corkin S, Growdon JH, Ritter-Walker E (eds.) *Alzheimer's Disease*. Raven Press, New York, **1990**.
21. Rothman SM, Olney JW *Ann Neurol*, **1986**, 19, 1052-1110.
22. Lodge D *Excitatory Amino Acids in Health and Disease*. Wiley, New York, **1988**.
23. Bridges RJ, Geddes JW, Monaghan DT, Cotman CW In: Lodge D (ed.) *Excitatory Amino Acids in Health and Disease*. Wiley, New York, **1988**
24. Greenamyre JT and Young AB *Neurobiol Ag*, **1989**, 10, 593-602.
25. Foster AC, Gill R, Iversen LL, Kemp JA, Wong EHF, Woodruff GN *Current and Trends in AntiConvulsant, Anxiety, and Stroke Therapy*, **1990**, 301-329. Future
26. Johnston GAR, Curtis DR, Davies J, McCulloch RM *Nature*, **1974**, 248, 804-805.
27. Watkins JC and Evans RH *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1981**, 21, 165-204.
28. Davies J, Watkins JC *J Physiol*, **1979**, 297, 621-635.
29. McLennan H, Lodge D *Brain Res*, **1979**, 169, 83-90.
30. Ault B, Evans RH, Francis AA, Oakes DJ, Watkins JC *J Physiol*, **1980**, 307, 413-428.
31. McLennan H *Prog Neurobiol*, **1983**, 20, 251-271.
32. Fagg GE, Massieu L In: Meldrum BS eds. *Excitatory Amino Acid Antagonists*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 39-63, **1991**.
33. Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1989**, 29, 365-402.
34. Watkins JC, Krogsgars-Larsen P, Honoré T *Trends Pharmacol Sci*, **1990**, 11, 25-33.
35. Hanssen JJ and Krogsgaard-Larsen P *Med Res Rev*, **1990**, 10, 55-94.
36. Watkins JC, Krogsgars-Larsen P, Honoré T *Trends Pharmacol Sci*, **1990**, 11, 25-33.
37. Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1989**, 29, 365-402.
38. Koerner JF, Cotman CW *Brain Res*, **1981**, 216, 192-198.
39. Cotman CW, Flatman JA, Ganong AH, Perkins MN *J Physiol*, **1986**, 378, 403-415.
40. Johnson RL, Koerner JF *J Med Chem*, **1988**, 31, 2057-2066.
41. Sugiyama H, Ito I, Hirono C *Nature*, **1987**, 325, 531-533.
42. Schoepp DD, Bockaert J, Sladeczek F *Trends Pharmacol Sci*, **1990**, 11, 508-515.
43. Sladeczek F, Pin J-P, RecasensM, Bockaert J, Weiss S *Nature*, **1985**, 317, 717-719.
44. Mayer GL, Westbrook GL *Prog Neurobiol*, **1987**, 28, 197-276.
45. Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H *J Physiol*, **1983**, 334, 33-46.
46. Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry *Nature*, **1986**, 319, 774-776.
47. Kleinschmidt A, Bear MF, Singer W *Science*, **1987**, 238, 355-358.
48. Foster AC, Fagg GE *Nature*, **1987**, 329, 395-396.
49. Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA, Seeburg PH, Barnard EA *Nature*, **1987**, 328, 221-227.
50. MacDermot AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL *Nature*, **1986**, 321, 519-522.
51. Choi DW *Trends Neurosci*, **1988**, 11, 465-469.
52. Evans RH, Francis AA, Watkins JC *Brain Res*, **1978**, 148, 536-542.

53. Watkins *Adv Biochem Psychopharmacol*, **1981**, 29: 205-212.
54. Nowak L, Bregestovski P, Asher P, Herbet A, Prochiantz A *Nature*, **1984**, 307, 462-465.
55. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB *Nature*, **1984**, 309, 261-263.
56. Anis NA, Berry SC, Burton NR, Lodge D *Br J Pharmacol*, **1983**, 79, 565-575.
57. Wong EHF, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL *Proc Natl Acad Sci (USA)*, **1986**, 83, 7104-7108. Acad
58. Kemp JA, Foster AC, Wong EHF *Trends Neurosci*, **1987**, 10, 294-298.
59. Lodge et al **1987**
60. Johnson JW, Ascher P *Nature*, **1987**, 325, 529-531.
61. Kleckner NW, Dingledine R *Science*, **1988**, 241, 835-837.
62. Peters S, Koh J, Choi DW *Science*, **1987**, 236, 589-593.
63. Mayer ML and Westbrook GL *Prog Neurobiol*, **1987**, 28, 197-276.
64. Westbrook GL and Mayer ML *Nature*, **1987**, 328, 640-643.
65. Reynolds IJ, Miller RJ *Br J Pharmacol*, **1988**, 95, 95-102.
66. Ransom RW, Stec NL *J Neurochem*, **1988**, 51, 830-836.
67. Carter C, Benavides J, Legendre P, Vincent JD, Noel F, Thuret F, Lloyd KG, Erbillia S, Zivkovic B, Mackenzie ET, Scatten B, Langer SZ *J Pharmac Exp Therap*, **1989**, 247, 1222-1232.
68. McBain CJ, Kleckner NW, Wyrick S, Dingledine R *Mol Pharmacol*, **1989**, 36, 556-565.
69. Ganong AH, Lanthorn TH, Cotman CW *Brain Res*, **1983**, 273, 170-174.
70. Kessler M, Baudry M, Terramani T, Lynch G *Soc Neurosci Abs*, **1987**, 13, 760.
71. Leeson PD, Baker R, Carling RW, Curtis NR, Moore KW, Williams BJ, Foster AC, AE, Kemp JA, Marshall GR *J Med Chem*, **1991**, 34, 1243-1252. Donald
72. Moroni F, Alesiani M, Galli A, Mori A, Pecorari A, Carla V, Cherici G, Pellicciari R *Eur J Pharmacol*, **1991**, 199, 227-232. Eur J
73. Harrison BL, Baron BM, Cousino DM, McDonald IA *J Med Chem*, **1990**, 33, 3130-3132.
74. Salituro FG, Harrison BL, Baron BM, Nyce PL, Stewart KT, McDonald IA *J Med Chem*, **1992**, 35, 1791-1799. Chem,
75. Gray NM, Dappen MS, Cheng BK, Cordi AA, Blesterfeldt JP, Hood WF, Monaghan JB *J Med Chem*, **1991**, 34, 1283-1292. JB J
76. Salituro FG, Tomlinson R, Baron BM, Demeter DA, Weintraub HJR, McDonald IA *Med Chem Lett*, **1991**, 1, 455-460. Bioorg
77. Stevenson et al *Bioorg Med Chem Lett*, **1992**, 2, 371-374.
78. Carling RW, Leeson PD, Moseley AM, Baker R, Foster AC, Grimwood S, Kemp JA, Marshall GR *J Med Chem*, **1992**, 35, 1942-1953.
79. Leeson PD, Carling RW, Moore KW, Moseley AM, Smith JD, Stevenson G, Chan Baker R, Foster AC, Grimwood S, Kemp JA, Marshall, Hoogsteen K *J Med Chem*, **1992**, 35, 1954-1968. T, Chem, 1992,

Hoofdstuk 4

Radiogehalogeneerde dihydroquinolinederivaten

In dit hoofdstuk worden de syntheses besproken van de drie geselecteerde radioactieve antagonisten van de N-methyl-D-aspartaat receptor (cfr. Hoofdstuk 3). Het eerste deel omvat de synthese van [^{77}Br] 5,7-dibroomkynureninezuur, het tweede deel beschrijft deze van 7-broom-5- ^{123}I] joodkynureninezuur en in een laatste deel wordt de synthese van 7-chloor-5- ^{123}I] joodkynureninezuur uitgediept. Voor elke molecule wordt eerst de synthese van het koud product op milligram-schaal besproken, gevolgd door de eigenlijke synthese van de tracer en de bepaling van de optimale parameters. Tenslotte worden enkele dierenexperimenten uitgevoerd om de biodistributie en de metabolisatie in muizen te bestuderen.

Het volgen van de syntheses op milligram-schaal gebeurt aan de hand van dunnelaagchromatografie (TLC, silica, Merck). Eventuele opzuiveringen gebeuren met flashchromatografie (silica: LOS, RUG; kolomlengte: ± 20 cm; kolomdiameter: ± 3 cm) en fractiecollectie (Pharmacia) of met hogedruk vloeistofchromatografie (HPLC, Waters). Bij de eerste methode worden de zuivere fracties bepaald door TLC, bij de tweede methode door UV-detectie (Pye Unicam). Analyses en opzuiveringen van radiochemische synthesesmengsels daarentegen worden steeds uitgevoerd met behulp van HPLC en gammadetectie (Mini-Instruments en Bicon). NMR- (Brucker WP500 spectrometer) en massaspectra (HP-5988) worden opgenomen op het LOS, RUG. Kwantitatieve radioactiviteitsmetingen gebeuren met een éénkanaals gammaspectrometer (Canberra Packard).

Zowel voor de synthese op milligram-schaal als voor de synthese van de radio-actieve componenten wordt gebruik gemaakt van een koper-gesteunde uitwisselingsreactie in zuur en reducerend milieu. Naast deze methode bestaan er nog andere mogelijkheden om halogeenuitwisselingen uit te voeren. Daarom worden in het derde deel eveneens de resultaten van de andere reacties, die worden toegepast voor de synthese 7-chloor-5- ^{123}I] joodkynureninezuur, in het kort besproken.

4.1 Synthese van [^{77}Br] 5,7-dibroomkynureninezuur

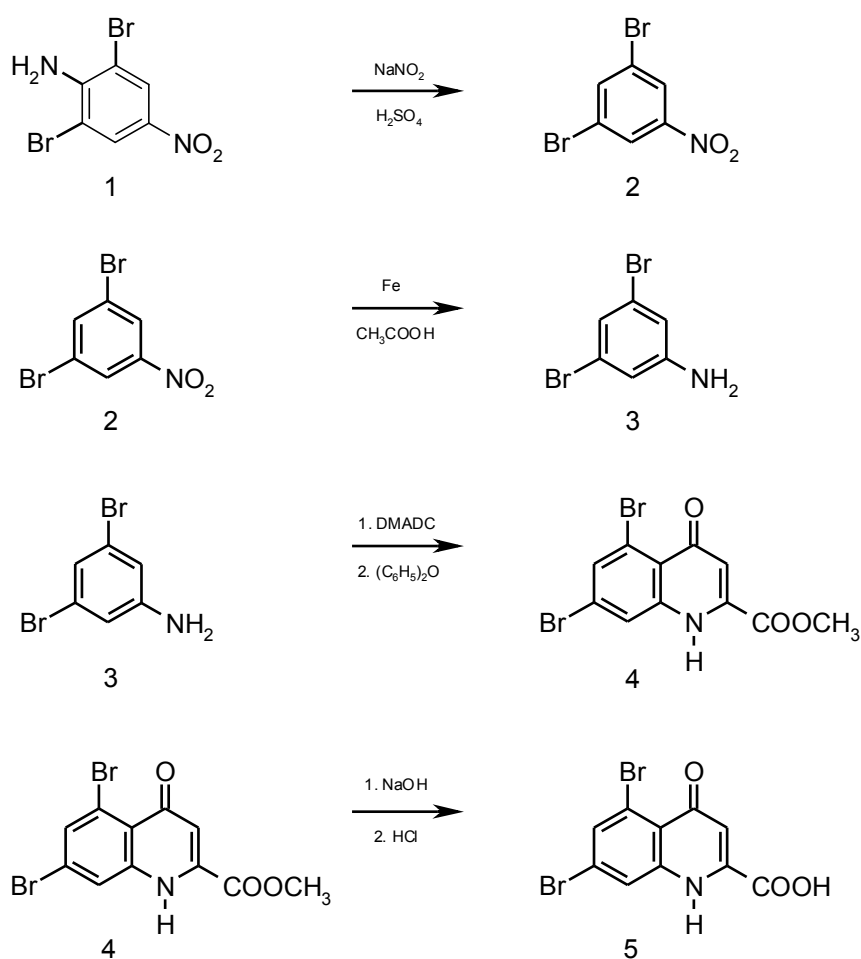
4.1.1 Synthese van standaard en precursor

De synthese van het [^{77}Br] 5,7-dibroomkynureninezuur verloopt via een niet-isotopische halogeenuitwisseling (een broomatoom voor een joodatoom) in aanwezigheid van Cu(I) en een overmaat reducerende (tinsulfaat en gentsinezuur) en complexerende (citroenzuur) stoffen¹⁻³. De precursor voor deze synthese is een geïodeerd derivaat, het 7-broom-5-iodokynureninezuur. Het niet-radioactieve 5,7-dibroomkynureninezuur wordt ook aangemaakt als standaard voor de bepaling van de retentietijd op hogedruk vloeistofchromatografie (high performance liquid chromatography of HPLC), alsook voor de karakterisering van het product met spectroscopische technieken. De synthese van zowel de standaard als van de precursor worden hieronder besproken.

4.1.1.1 Synthese van 5,7-dibroomkynureninezuur⁴⁻⁵

De synthese van het 5,7-dibroomkynureninezuur verloopt volgens een gemodificeerde Conrad-Limpachmethode⁶⁻⁷ (Schema 4.1). Hiervoor moet eerst het 3,5-dibroomaniline (**3**) worden aangemaakt. Dit gebeurt door desaminering van het 2,6-dibroom-4-nitroaniline (**1**), gevolgd door reductie van het gevormde 3,5-dibroomnitrobenzeen (**2**). Na condensatie van het 3,5-dibroomaniline met dimethylacetyleendicarboxylaate bekamt men het overeenkomstige arylaminofumaraat. Dit intermediair wordt door ringsluiting omgezet in de ester (**4**), die na verzeping het 5,7-dibroomkynureninezuur oplevert (**5**).

Reactieschema



Schema 4.1

Synthese van het 5,7-dibroomkynureninezuur via een gemodificeerde Conrad-Limpachreactie.

Experimenteel

Een mengsel van 2,6-dibroom-4-nitroaniline (**1**) (20 g, 67.5 mmol), opgelost in ethanol (350 ml), en sterk zwavelzuur (20 ml) wordt opgewarmd tot refluxen. Over een periode van 15 minuten wordt hieraan natriumnitriet (20 g, 290 mmol) toegevoegd. Na 3 uur refluxen wordt het mengsel afgekoeld en aan een overmaat ijswater toegevoegd. Het gevormde neerslag wordt afgefilterd, gewassen (met water) en gedroogd (16,7 g, 88 %).

MS m/e 278.8 (M^+)

$^1\text{H-NMR } \delta$ (360 MHz, DMSO- d_6) 8.38 (d, 1H, 4-H), 8.40 (d, 2H, 2-H 6-H)

Aan 3,5-dibroomaniline (**2**) (10 g, 35.6 mmol), gesuspendeerd in ethanol (350 ml), voegt men ijszijn (100 ml) en ijzer poeder (15 g, 270 mmol) toe. Men brengt tot refluxen en na 3 uur laat men het mengsel afkoelen. Na afdampen van het solvent wordt water (150 ml) toegevoegd en alkalisch gemaakt tot pH 12. Het mengsel wordt vervolgens geëxtraheerd met diëthylether (3 x 150 ml) en de samengevoegde organische fazen worden drooggedampt. Het bekomen produkt wordt gedroogd (7,4 g, 83 %).

MS m/e 248.9 (M^+)

$^1\text{H-NMR } \delta$ (360 MHz, DMSO- d_6) 5.72 (bs, 2H, NH_2), 6.72 (d, 2H, 2-H 6-H), 6.77 (t, 1H, 4-H)

Diethylacetyleendicarboxylaar (DMADC) (5 ml, 31 mmol) wordt toegevoegd aan een oplossing van 3,5-dibroomaniline (**3**) (5 g, 13.8 mmol) in methanol (50 ml). Na 10 uur refluxen wordt het solvent afgedampt en het residu toegevoegd aan difenylether (20 ml) dat reeds verhit is tot een temperatuur van 250 °C. Na 15 minuten wordt het mengsel afgekoeld en het gevormde neerslag afgefilterd, gewassen (met hexaan) en gedroogd. Na analyse blijken 2 producten te zijn gevormd die door middel van kolomchromatografie (silicagel - chloroform/aceton/triethylamine 90/9/1) worden gescheiden. Uit NMR en MS kan besloten worden dat zowel de methyl- als de ethylester werden gevormd (3,6 g, 71 %). (Alhoewel de estergroep in een volgende reactiestap wordt gehydrolyseerd, wordt toch geopteerd voor het gebruik van dimethylacetyleendicarboxylaar, zodat enkel de methylester wordt gevormd).

ethyl MS m/e 373 (M^+)

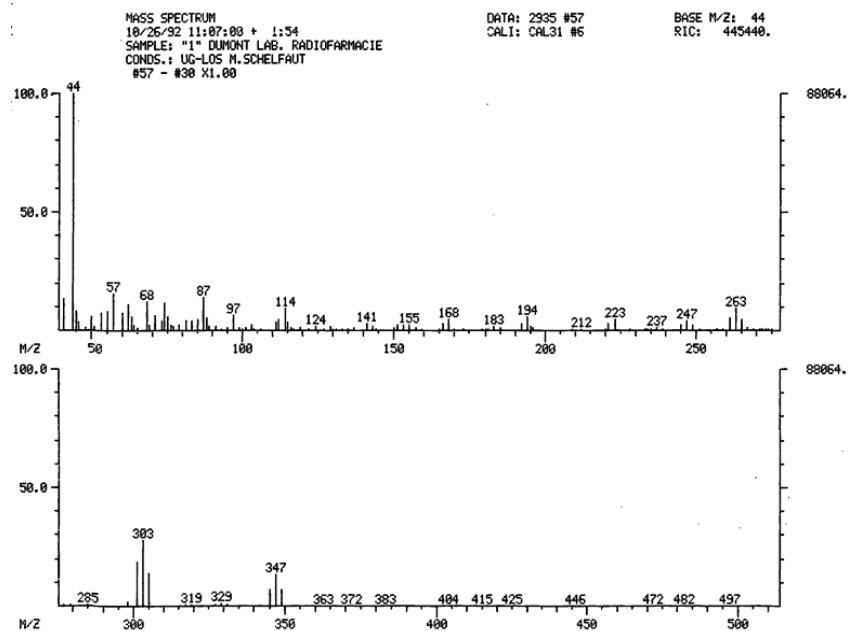
$^1\text{H-NMR } \delta$ (360 MHz, DMSO- d_6) 1.36 (t, 3H, $-\text{CH}_3$), 4.43 (q, 2H, $-\text{CH}_2-$), 6.59 (s, 1H, 3-H), 7.71 (s, 1H, 6-H), 8.17 (d, 1H, 8-H), 11.96 (bs, 1H, NH)

methyl MS m/e 359 (M^+)

$^1\text{H-NMR } \delta$ (360 MHz, DMSO- d_6) 3.93 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 6.58 (s, 1H, 3-H), 7.69 (s, 1H, 6-H), 8.18 (d, 1H, 8-H), 12.01 (bs, 1H, NH)

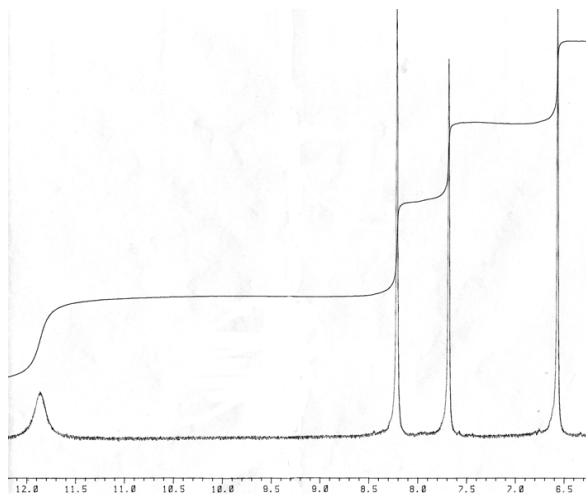
De ester (**4**) (2 g, 5.8 mmol) wordt gesuspendeerd in ethanol (50 ml) en natriumhydroxide (2 g, 50 mmol) opgelost in water (200 ml) wordt daaraan toegevoegd. Na 1 uur refluxen wordt het mengsel afgekoeld en aangezuurd met 1N HCl tot pH 2. Het gevormde neerslag wordt afgefilterd, gewassen met water (10 ml), ethanol (10 ml) en diëthylether (5 ml) en gedroogd (1,84 g, 91 %).

MS m/e 345 (M^+)



Figuur 4.1 Massaspectrum van 5,7-dibroomkynureninezuur

$^1\text{H-NMR } \delta$ (360 MHz, DMSO-d_6) 6.58 (s, 1H, 3-H), 7.68 (s, 1H, 6-H),
 8.21 (s, 1H, 8-H), 11.88 (bs, 1H, NH)



Figuur 4.2 NMR-spectrum van 5,7-dibroomkynureninezuur

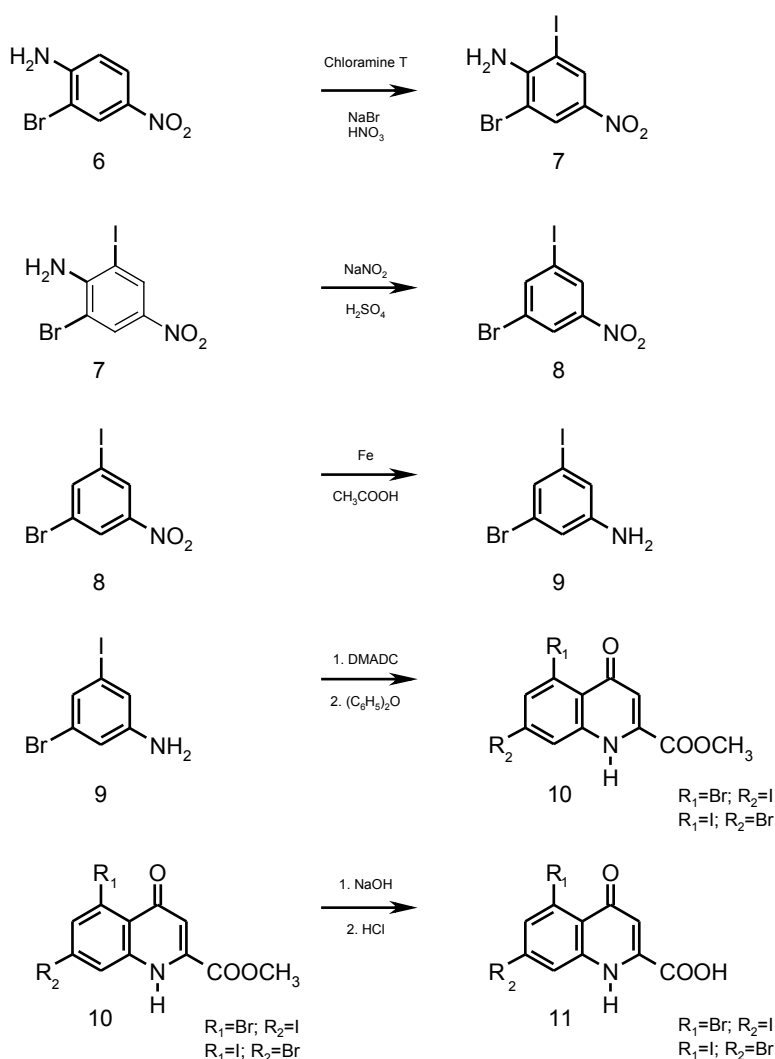
4.1.1.2 Synthese van 7-broom-5-joodkynureninezuur⁴⁻⁵

7-broom-5-joodkynureninezuur, precursor voor de synthese van $[^{77}\text{Br}]$ 5,7-dibroomkynureninezuur, kan op twee verschillende manieren aangemaakt worden. Methode 1 is de Conrad-Limpachreactie op 3-broom-5-joodaniline (9). Deze component wordt gesynthetiseerd door jodering van 2-broom-4-nitroaniline (6), gevolgd door desaminering van 2-broom-6-jood-4-nitroaniline (7) en reductie van het gevormde 3-broom-5-joodnitrobenzeen (8). Na condensatie van 3-broom-5-joodaniline met dimethylacetylendicarboxylaet en ringsluiting wordt een

mengsel bekomen van 5-broom-7-jood- en 7-broom-5-joodkynurenine methylester (**10**). Dat mengsel wordt na verzeeping met natriumhydroxide en aanzuren met zoutzuur omgezet in de overeenkomstige zuren (**11**). (Schema 4.2). Methode 2 is gebaseerd op de Cu^+ -gesteunde joderingsreactie waarbij het broomatoom op plaats 5 van 5,7-dibroomkynureninezuur wordt uitgewisseld voor een joodatoom (Schema 4.3). Na synthese moeten start- en eindproduct bij beide methodes van elkaar gescheiden worden met RP-HPLC. Het voordeel van de laatste methode echter is dat het verschil in elutietijden tussen 5,7-dibroom- en 7-broom-5-joodkynureninezuur groter is dan in methode 1 tussen 5-broom-7-jood- en 7-broom-5-joodkynureninezuur, wat de scheiding en dus de zuivering gemakkelijker maakt.

Methode 1

Reactieschema



Schema 4.2

Synthese van het 7-broom-5-joodkynureninezuur via een gemodificeerde Conrad-Limpachreactie.

Experimenteel

Een oplossing van 2-broom-4-nitroaniline (**6**) (20 g, 93 mmol) in methanol (40 ml) en een oplossing van chloramine-T (21,5 g, 95 mmol) en kaliumjodide (18.8 g, 190 mmol) in water (350 ml) worden samengevoegd. Na toevoeging van rokend salpeterzuur (200 ml) wordt het mengsel 10 minuten geroerd op kamertemperatuur en het gevormde neerslag wordt afgefilterd, gewassen (met water) en gedroogd (29.3 g, 92 %).

MS m/e	342 (M ⁺)
¹ H-NMR δ	(360 MHz, DMSO-d ₆) 6.57 (br s, 1H, NH), 8.29 (d, 1H, 3-H), 8.42 (d, 1H, 5-H)

Aan een oplossing van 2-broom-6-jood-4-nitroaniline (**7**) (25 g, 73 mmol) in ethanol wordt sterk zwavelzuur (60 ml) toegevoegd. Het mengsel wordt opgewarmd tot refluxen en natriumnitriet (17.5 g, 250 mmol) wordt toegevoegd. Na 3 uur refluxen wordt het mengsel afgekoeld en aan een overmaat ijswater toegevoegd. Het gevormde neerslag wordt afgefilterd, gewassen (met water) en gedroogd (21 g, 88 %).

MS m/e	327 (M ⁺)
¹ H-NMR δ	(360 MHz, DMSO-d ₆) 8.40 (d, 1H, 4-H), 8.48 (d, 1H, 2-H), 8.50 (d, 1H, 6-H)

Aan 3-broom-5-joodnitrobenzeen (**8**) (20 g, 61.2 mmol) gesuspendeerd in ethanol (260 ml) voegt men ijszijn (75 ml) en ijzer (33g, 590 mmol) toe. Na 3 uur refluxen wordt het mengsel afgekoeld en gefiltreerd. Na afdampen van het solvent wordt water toegevoegd en alkalisch gemaakt tot pH 12. De waterige fase wordt geëxtraheerd met ethylacetaat (3 x 200 ml) en de samengevoegde organische fasen worden na drogen afgedampt. Het bekomen product wordt gedroogd en verdere zuivering gebeurt met kolomchromatografie (silicagel - hexaan/ethylacetaat 90/10) (14.2 g, 78 %).

MS m/e	297 (M ⁺)
¹ H-NMR	(360 MHz, DMSO-d ₆) 5.60 (br s, 2H, NH), 6.72 (d, 1H, 2-H), 6.91 (d, 1H, 6-H), 6.92 (d, 1H, 4-H)

Dimethylacetyleendicarboxylaar (DMADC) (6.5 ml, 50 mmol) wordt toegevoegd aan een oplossing van 3-broom-5-joodaniline (**9**) (10 g, 33.7 mmol) in methanol (100 ml). Na 10 uur refluxen wordt het solvent afgedampt. Het residu wordt toegevoegd aan difenylether (50 ml) die vooraf verhit was tot 250 °C en dit mengsel wordt nog gedurende 15 minuten op deze temperatuur gehouden. Na afkoelen wordt een overmaat hexaan toegevoegd. Het gevormde neerslag wordt gewassen (met water) en gedroogd (9.3 g, 68 %). Na analyse met HPLC (RP-select B, methanol/water 50/50) blijken er twee producten te zijn gevormd (**10**) (Schema 4.2). Het mengsel wordt niet gescheiden en de analyse gebeurt enkel aan de hand van MS.

MS m/e	407 (M ⁺)
--------	-----------------------

Het estermengsel (**10**) (8 g, 19.7 mmol) wordt gesuspendeerd in ethanol (200 mL) en natriumhydroxide (8 g, 200 mmol) opgelost in water (150 ml) wordt hieraan toegevoegd. Na 1 uur refluxen wordt het mengsel afgekoeld en aangezuurd met HCl (1N) tot pH 2. Het gevormde neerslag wordt afgefilterd, gewassen met water (100 ml), ethanol (100 ml) en diëthylether (50 ml) en gedroogd (7.2 g, 93 %). Het synthesemengsel wordt geanalyseerd met RP-HPLC. De condities waaronder dit gebeurt worden beschreven in tabel 4.1.

Tabel 4.1 *Analytische HPLC condities*

	Kolom	:	
	Machery-Nägel Nucleosil 100 RP-18,		
	125 x 4.6 mm, 5 µm		
	Eluens	:	
	H ₂ O/DMF/AcCN/TFA		65/20/15/0.1
	Debiet	:	
	1.5 ml/min		
254 nm	Detectie	:	UV
	Retentietijden	:	5-
	broom-7-joodderivaat = 7.1 min		
	7-broom-5-joodderivaat = 7.9 min		

Scheiding van de broom/joodderivaten

Voor de karakterisering van de twee broom/joodderivaten moeten deze van elkaar gescheiden worden. Dit gebeurt door middel van semi-preparatieve RP-HPLC. De HPLC condities worden beschreven in tabel 4.2.

Tabel 4.2 *Preparatieve HPLC condities*

	Kolom	:	
	Alltech Econosil RP18,		
	250 x 10 mm, 10 µm		
	Eluens	:	
	H ₂ O/DMF/AcCN/TFA		65/20/15/0.1
	Debiet	:	
	7 ml/min		
254 nm	Detectie	:	UV
	Retentietijden	:	5-
	broom-7-joodderivaat = 43 min		
	7-broom-5-joodderivaat = 48 min		

De gecollecteerde producten worden gekarakteriseerd met NMR en MS

5-broom-7-joodkyna
 MS m/e 392 (M⁺)
¹H-NMR δ (360 MHz, DMSO-d₆) 6.60 (s, 1H, 3-H), 7.75 (s, 1H, 6-H),

8.37 (d, 1H, 8-H), 11.96 (bs, 1H, NH)

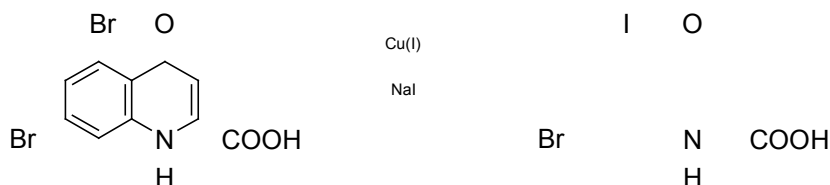
7-broom-5-joodkyna
 MS m/e 392 (M⁺)
¹H-NMR δ (360 MHz, DMSO-d₆) 6.61 (s, 1H,3-H), 8.02 (s, 1H, 6-H),

8.20 (d, 1H, 8-H), 11.95 (bs, 1H, NH)

7-broom-5-joodkynureninezuur, precursor voor de synthese van het [⁷⁷Br] 5,7-dibroomkynureninezuur, wordt op deze manier bekomen. Aangezien de retentietijden echter te weinig verschillen om grotere hoeveelheden product gemakkelijk op te zuiveren werd gekozen voor de tweede methode, namelijk de uitwisseling van het broomatoom op plaats 5 door een joodatoom.

Methode 2⁸

Reactieschema



Schema 4.3 Synthese van het 7-broom-5-joodkynureninezuur via een nucleofiele uitwisselingsreactie.

Experimenteel

In een tweehalzenkolf brengt men 5,7-dibroomkynureninezuur (940 mg, 2.7 mmol), 2,5-dihydroxybenzoëzuur (5 g, 32.4 mmol), citroenzuurmonohydraat (11 g, 52.4 mmol), tin(II)sulfaat (1 g, 4.7 mmol), koper(II)sulfaat (130 mg, 0.53 mmol), azijnzuur (50 ml), ethanol (350 ml) en water (100 ml). De kolf, voorzien van een waterkoeler, wordt 15 minuten in een ultrasoonbad geplaatst en vervolgens 15 minuten doorborreld met stikstof. Na additie van een kaliumjodide-oplossing (450 mg, 2.7 mmol) laat men het mengsel 1 uur refluxen. Na afkoelen wordt de oplossing ingedampd en gecentrifugeerd. Het residu wordt gewassen (met water) en gedroogd (773 mg, 73 %). De condities waaronder het synthesemengsel wordt geanalyseerd met RP-HPLC worden beschreven in tabel 4.3.

Tabel 4.3 *Analytische HPLC condities*

	Kolom	:	
	Machery-Nägel Nucleosil 100 C-18,		
	125 x 5 mm, 5 µm		
	Eluens	:	
	H ₂ O/DMF/AcCN/TFA		65/20/15/0.1
	Debiet	:	
	1.5 ml/min		
	Detectie	:	UV
254 nm	Retentietijden	:	
	dibroomderivaat = 5.3 min		
	gevormde product = 7.9 min		

Scheiding van begin- en eindproduct

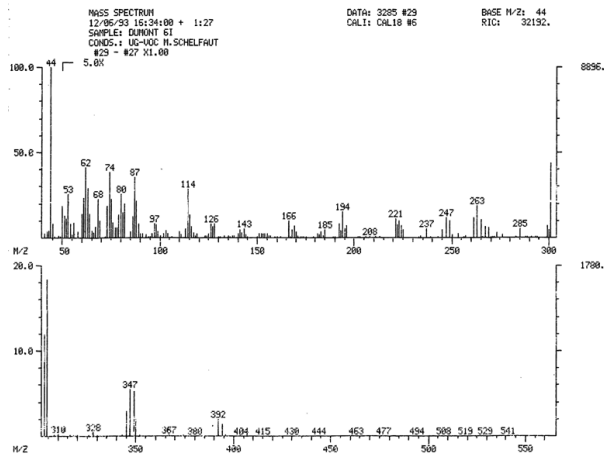
Voor de karakterisering moet het gevormde product wordt gescheiden van het beginproduct (5,7-dibroomkynureninezuur) en van eventuele nevenproducten. Dit gebeurt door middel van semi-preparatieve RP-HPLC, waarvan de omstandigheden worden beschreven in tabel 4.4.

Tabel 4.4 *Preparatieve HPLC condities*

	Kolom	:	
	Alltech Econosil C18,		
	250 x 10 mm, 10 µm		
	Eluens	:	
	H ₂ O/DMF/AcCN/TFA		65/20/15/0.1
	Debiet	:	
	7 mL/min		
	Detectie	:	UV
254 nm	Retentietijden	:	
	dibroomderivaat = 30 min		
	gevormde produkt = 48 min		

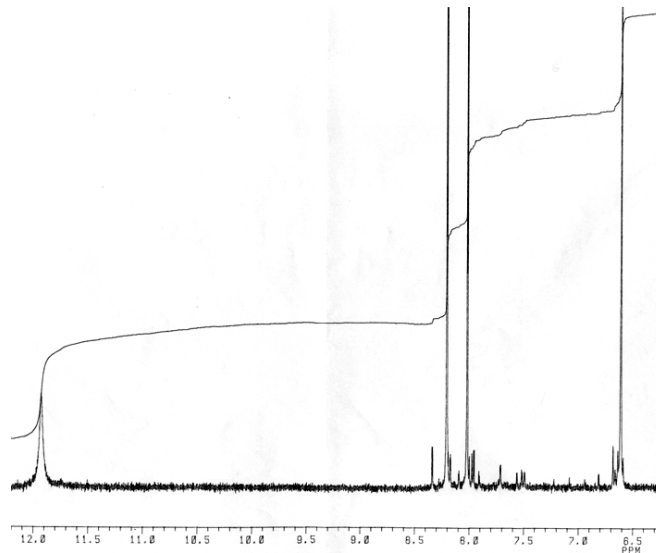
Het gecollecteerde product met retentietijd 48 minuten wordt gekarakteriseerd met NMR en MS.

MS m/e 392 (M⁺)



Figuur 4.3 Massaspectrum van 7-broom-5-joodkynureninezuur

$^1\text{H-NMR } \delta$ (360 MHz, DMSO-d_6) 6.61 (s, 1H, 3-H), 8.02 (s, 1H, 6-H), 8.20 (d, 1H, 8-H), 11.95 (bs, 1H, NH)

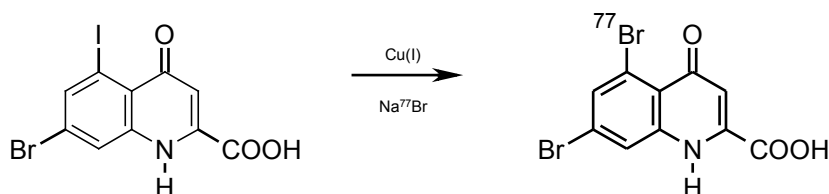


Figuur 4.4 NMR-spectrum van 7-broom-5-joodkynureninezuur

De minder uitgebreide synthese en de gemakkelijker scheiding van de begin- en eindproducten maken dat deze tweede methode eenvoudiger en vlugger het gewenste product in zuivere vorm oplevert. Daarom wordt deze manier dan ook gebruikt om grotere hoeveelheden 7-broom-5-joodkynureninezuur te synthetiseren.

4.1.2 Synthese van [⁷⁷Br] 5,7-dibroomkynureninezuur⁹

4.1.2.1 Reactieschema



Schema 4.4 Synthese van het [⁷⁷Br] 5,7-dibroomkynureninezuur via een nucleofiele uitwisselingsreactie.

4.1.2.2 Initiële parameters

Drie verschillende oplossingen worden aangemaakt: A: een oplossing van 7-broom-5-joodkynureninezuur (6.6 mg, 16.7 μmol) in ethanol (10 ml), B: een oplossing van koper(II)sulfaat (100 mg, 400 μmol) in water (10 ml), C: een waterige oplossing (10 ml) die tin(II)sulfaat (43 mg, 200 μmol), gentisinezuur (308 mg, 2 mmol), citroenzuurmonohydraat (420 mg, 2 mmol) en ijsazijn (1 ml) bevat.

In een conische reactievial van 1 ml wordt 5-jood-7-broomkynureninezuuroplossing (600 μl , 1 μmol *) gebracht. Hieraan worden achtereenvolgens oplossing B (100 μl), oplossing C (25 μl), azijnzuur (65 μl) en tenslotte Br-77 isotoop (± 20 μCi) toegevoegd. De vial, afgesloten met een schroefdop voorzien van een septum, wordt 15 minuten in een ultrasoonbad geplaatst, gedurende 15 minuten doorborreld met stikstof en gedurende 1 uur in een waterbad (100 °C) geplaatst. Na reactie wordt de vial afgekoeld onder koud water en wordt een deel (100 μl) van het synthesemengsel ingespoten op HPLC voor de bepaling van het radiochemisch rendement en voor de bepaling van de optimale syntheseparameters.

* Daar _____ $M = 6.18 \times 10^{-14} \times A \times A$

λ

waarbij M: massa van n aantal kernen (in g), A: de kernmassa (in amu), A: de activiteit (in Ci) en λ de desintegratieconstante (in sec⁻¹) kan berekend worden dat met een activiteit van 20 mCi – gebruikt voor de synthese van patiëntenproducties – een massa van 28 ng of 0.36 nmol overeenstemt. Daarom is het gebruik van 1 μmol precursor genoeg voor de optimalisatie van de parameters.

4.1.2.3 HPLC-analyse en bepaling van het radiochemisch rendement

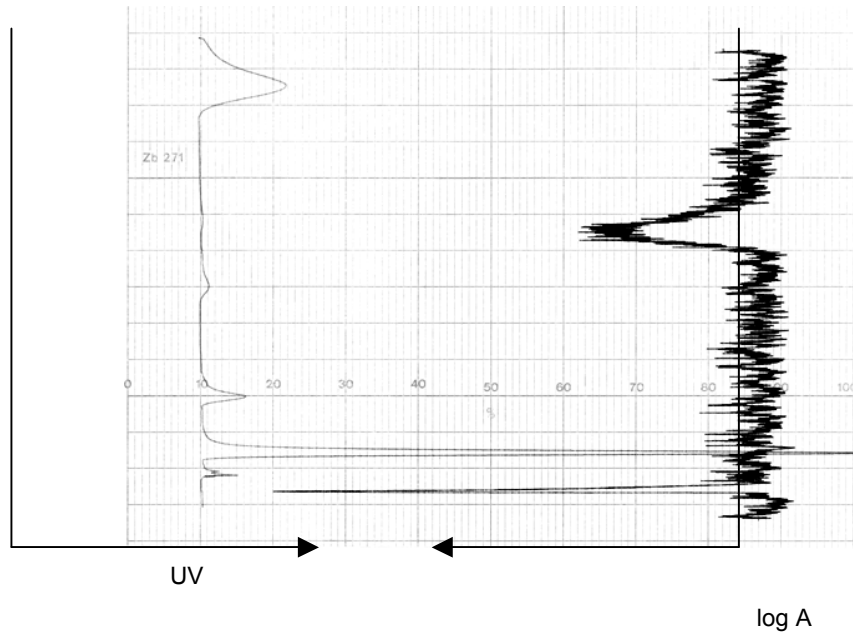
Voor de bepaling van het radiochemisch rendement en dus ook van de optimale reactieparameters is het noodzakelijk de verschillende radioactieve componenten van elkaar te scheiden, te collecteren en te kwantificeren. De scheiding wordt uitgevoerd met behulp van RP-HPLC. De condities waaronder dit gebeurt worden weergegeven in tabel 4.5. Zowel radioactieve als niet-radioactieve componenten worden gedetecteerd door gebruik van enerzijds een NaI(Tl)-detector en anderzijds een UV-detector. Een voorbeeld van een analytisch radiochromatogram wordt weergegeven in figuur 4.5.

Het radiochemisch rendement wordt bepaald door het inspuiten van een bepaalde hoeveelheid van het synthesesmengsel op de analytische HPLC-kolom. Het eluens wordt opgevangen in fracties van 0.5 ml (collectietijd: 20 sec) en van deze fracties wordt de radioactiviteit geteld in een éénkanaalsgammaspectrometer. Het radiochemisch rendement wordt berekend als de hoeveelheid radioactiviteit afkomstig van het gesynthetiseerde product gedeeld door de totale radioactiviteit en vermenigvuldigd met 100.

Tabel 4.5 Analytische HPLC condities

	Kolom	:	
Machery-Nägel Nucleosil 100 RP-18			125 x 4.6 mm, 5 µm
	Eluens	:	
H ₂ O/EtOH/TFA			
65/35/0.1			
	Debiet	:	
1.5 ml/min			
	Detectie	:	UV
254 nm en NaI(Tl)-detector			
	Retentietijden	:	tracer
= 5.6 min			

precursor = 8.3 min



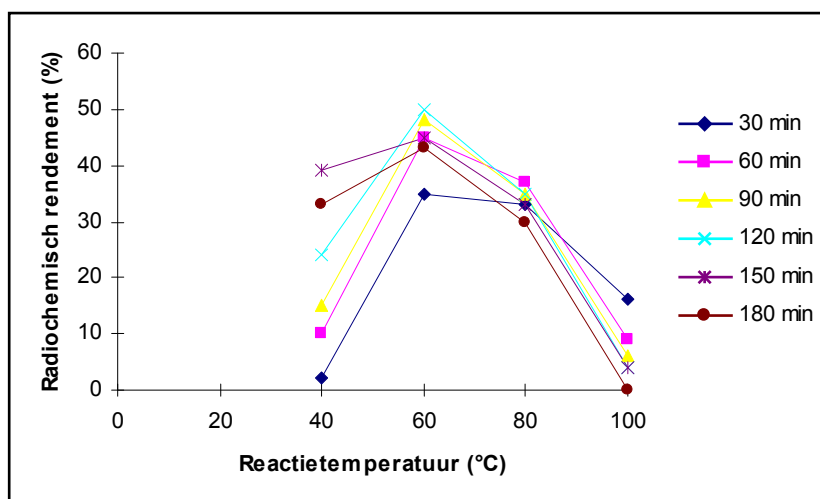
Figuur 4.5 Analytisch radiochromatogram van de synthese van [^{77}Br] 5,7-dibroom kynureninezuur

4.1.2.4 Optimalisatie van de parameters

Optimalisatie reactietijd en -temperatuur

Reactietijd en -temperatuur worden samen geoptimaliseerd omdat zowel de precursor als de tracer onderhevig kunnen zijn aan afbraak (dehalogenering in waterig milieu) en deze afbraak het gevolg kan zijn van zowel de duur als de temperatuur van de reactie.

Voor de bepaling van het radiochemisch rendement in functie van de reactietijd en de reactietemperatuur, wordt 300 μl oplossing A (0.5 μmol precursor) toegevoegd aan 25 μl oplossing B (1 μmol kopersulfaat), 25 μl oplossing C, 65 μl azijnzuur en 300 μl ethanol. Na toevoeging van 10 μl broom-77-isotoop wordt de vial in een ultrasoonbad geplaatst en nadien doorborreld met stikstof, telkens gedurende 15 minuten. De vial wordt verhit op verschillende temperaturen (40-100 $^{\circ}\text{C}$) en gedurende verschillende tijden (30-180 min). Na afkoelen wordt 100 μl mengsel ingespoten op HPLC voor de bepaling van het radiochemisch rendement. De bekomen rendementen (het gemiddelde van tenminste 3 syntheses) zijn weergegeven in figuur 4.6. Standaarddeviaties - voor alle waarden lager dan 5 % - werden weggelaten voor de duidelijkheid van de figuur.



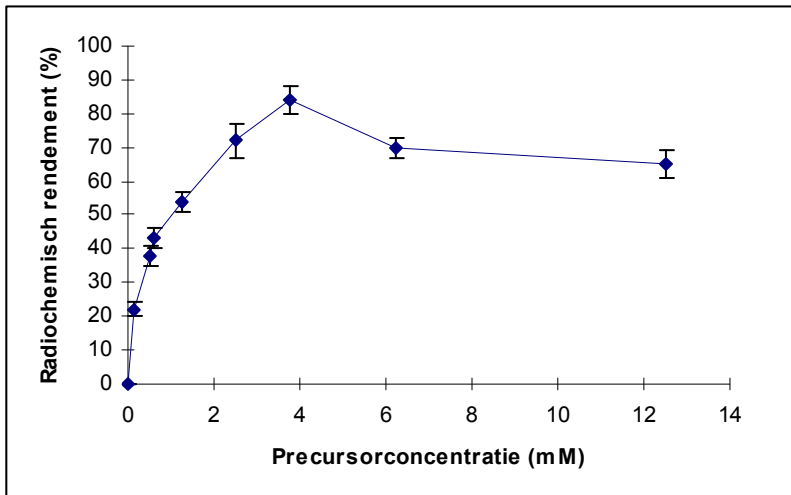
Figuur 4.6 Invloed van de reactietijd en de reactietemperatuur op het radiochemisch rendement van de synthese van $[^{77}\text{Br}]$ 5,7-dibroomkynureninezuur

Uit figuur 4.6 blijkt dat de reactietijd enkel een grote invloed heeft bij lage reactietemperatuur: een reactie bij 40 °C geeft na 30 minuten slechts een heel laag rendement (2 ± 0.6 %), terwijl reactietijden tussen 2 en 3 uur radiochemische rendementen tussen 25 ± 0.6 en 40 ± 1.7 % opleveren. Vanaf 60 °C is de tijd echter een minder belangrijke factor geworden en is het vooral de temperatuur die een grote rol speelt. De oorzaak hiervan is waarschijnlijk de afbraak van de precursor. Opmerkelijk is dat daardoor bij lage temperaturen de laagste rendementen worden bekomen bij de kortste reactietijden terwijl dit bij hoge temperaturen compleet tegenovergesteld is. De parameters die zullen gebruikt worden voor de volgende optimalisaties zijn 60 °C als reactietemperatuur en 1 uur als reactietijd.

Er dient opgemerkt dat het hier radiochemische rendementen betreft die berekend zijn door de verhouding te nemen van de radioactiviteit van het gevormd product ten opzichte de totale radioactiviteit op hetzelfde moment. Dit betekent dat er nog geen rekening is gehouden met het verval van het isotoop. De halfwaardetijd van Br-77 is echter van die grootte (57 uur) dat er na 3 uur vrijwel geen vermindering aan radioactiviteit zal hebben plaatsgevonden, zodat het werkelijke radiochemische rendement vrijwel overeenkomt met het berekende radiochemische rendement.

Optimalisatie precursorconcentratie

Bepaling van het radiochemisch rendement in functie van de precursorconcentratie wordt uitgevoerd door toevoeging van verschillende hoeveelheden precursor (0.1 - 10 μmol) aan een mengsel van 25 μl oplossing B (1 μmol kopersulfaat), 100 μl oplossing C, 65 μl azijnzuur en 600 μl ethanol. Om reacties met grotere hoeveelheden aan precursor toe te laten worden verschillende volumina van de precursor stockoplossing in verschillende vials gepipeteerd, wordt het ethanol telkens afgedampt (onder stikstof) en wordt achteraf overal dezelfde hoeveelheid ethanol (600 μl) toegevoegd. 10 μl radio-isotoop wordt toegevoegd aan de vial die in een ultrasoonbad wordt geplaatst (15 min), doorborreld wordt met stikstof, (15 min) en gedurende 1 uur wordt verhit op 60 °C. Het radiochemisch rendement wordt bepaald door analyse van 100 μl synthesemengsel via HPLC. De resultaten met standaarddeviaties zijn weergegeven in figuur 4.7.

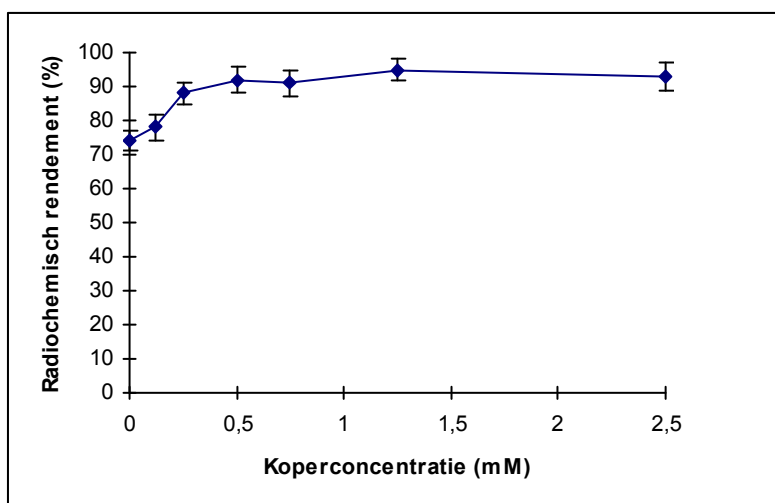


Figuur 4.7 Invloed van de precursorconcentratie op het radiochemisch rendement van de synthese van [⁷⁷Br] 5,7-dibroomkynureninezuur

Tot een concentratie van 3.75 mM aan precursor (= 3 µmol) wordt geleidelijk aan een steeds hoger radiochemisch rendement bekomen. Nadien is er echter een kleine daling, die waarschijnlijk te wijten is aan oplosbaarheidsproblemen van de precursor. Deze vermindering aan rendement wordt namelijk ook waargenomen wanneer de hoeveelheid ethanol tijdens de synthese minder dan 600 µl bedraagt. Voor de optimalisatie van de laatste parameter, namelijk de koper(II)sulfaat concentratie wordt gebruik gemaakt van een reactietijd van 60 minuten, een reactietemperatuur van 60 °C en een precursorconcentratie van 3.75 mM.

Optimalisatie koper(II)sulfaat concentratie

Het effect van het kopersulfaat op het radiochemisch rendement wordt onderzocht door toevoeging van verschillende hoeveelheden oplossing B (0 - 50 µl) aan een mengsel van 3 µmol precursor in 600 µl ethanol, 100 µl oplossing C, 65 µl azijnzuur en 600 µl ethanol. Daaraan wordt 10 µl broom-77-isotoop toegevoegd, de vial wordt in een ultrasoonbad geplaatst (15 min), doorborreld met stikstof (15 min) en 1 uur verhit op 60°C.



Figuur 4.8 Invloed van de koper(II)sulfaatconcentratie op het radiochemisch rendement van de synthese van [⁷⁷Br] 5,7-dibroomkynureninezuur

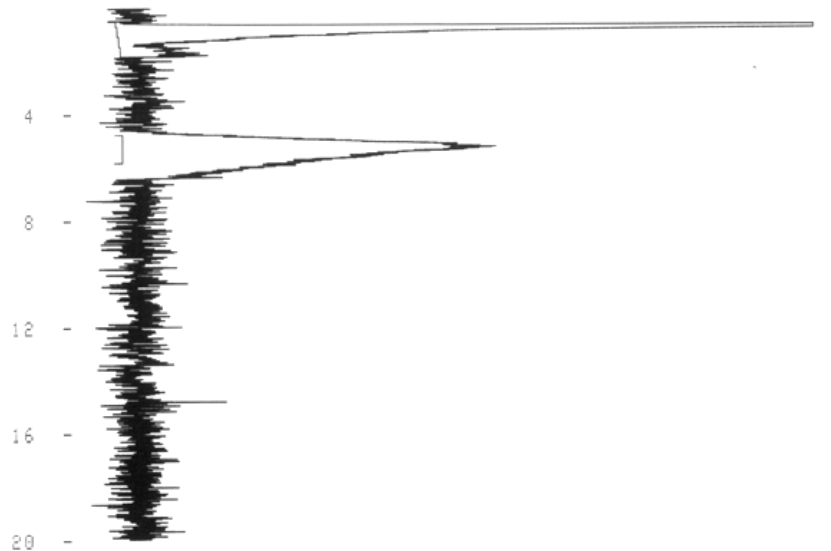
Ondanks het feit dat een ‘koper gesteunde’ nucleofiele substitutie gebruikt wordt voor de synthese, blijkt kopersulfaat bij de bromering van het 5-jood-7-broomkynureninezuur allesbehalve een kritische factor. Zelfs in afwezigheid van kopersulfaat wordt meer dan 70 % rendement verkregen. Dit is waarschijnlijk te danken aan de sterke activatie van de molecule voor elektrofile uitwisseling door de aanwezigheid van de 4-oxo-functie. De aanwezigheid van 0.5 mM kopersulfaat in het reactiemengsel volstaat voor het verkrijgen van het maximale rendement.

4.1.2.5 Geoptimaliseerde tracersynthese en zuiveringsprocedure

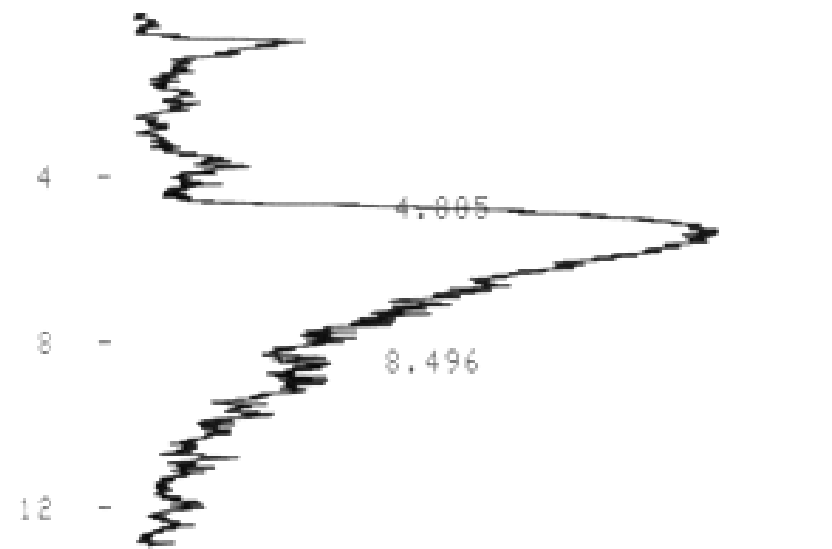
Voor het routinematig aanmaken van de tracer wordt steeds uitgegaan van 3 μmol 5-iodo-7-bromokynureninezuur opgelost in 600 μl ethanol waaraan in een vial 0,4 μmol koper(II)sulfaat, 2 μmol tin(II)sulfaat, 20 μmol gentisinezuur en 20 μmol citroenzuur opgelost in 125 μl water en 65 μl azijnzuur worden toegevoegd. Na additie van de gewenste hoeveelheid bromide-isotoop wordt het mengsel 15 minuten in een ultrasoonbad geplaatst, 15 minuten doorborreld met stikstof en gedurende 1 uur verhit bij 60 °C. Na het beëindigen van de uitwisselingsreactie wordt [^{77}Br] 5,7-dibroomkynureninezuur gescheiden van de precursor, de reducerende en complexerende stoffen, eventuele nevenproducten van de synthese en radiochemische contaminanten. Dit gebeurt door middel van een semi-preparatieve HPLC-scheiding. De condities waaronder deze scheiding gebeurt zijn weergegeven in tabel 4.4 (4.1.1.2). Na elutie van de solventpiek en de reducerende en complexerende stoffen wordt de piek van [^{77}Br] 5,7-dibroomkynureninezuur ($R_t = 30$ min) gecollecteerd. De precursor elueert pas na 48 minuten. De opgevangen vloeistof wordt drooggedampt onder verminderde druk en het residu wordt opgelost in 1 ml ethanol. De ethanoloplossing wordt in een steriele vial gebracht via een 0.22 μm filter (Spartan) en net voor injectie in proefdieren wordt hieraan de vereiste hoeveelheid (9 ml) steriel water toegevoegd.

4.1.2.6 Bepaling chemische en radiochemische zuiverheid

Een tracer die ingespoten wordt bij proefdieren voor de bepaling van de biodistributie, verdringing en metabolisatie en (eventueel) later bij patiënten voor in *vivo imaging* van de receptor, moet zowel aan een chemische als een radiochemische zuiverheid van meer dan 95 % voldoen. Voor de bepaling hiervan wordt een gezuiverde oplossing van tracer ingespoten op een analytische HPLC- kolom. De HPLC condities zijn dezelfde als beschreven in tabel 4.5 (4.1.2.3). De oplossing bevat ongeveer 100 μCi . In figuur 4.9 wordt een voorbeeld van de analyse van de chemische en radiochemische zuiverheid weergegeven.



Figuur 4.9a UV-chromatogram van gezuiverd syntheseproduct voor de bepaling van de chemische zuiverheid.



Figuur 4.9b Radiochromatogram van gezuiverd syntheseproduct voor de bepaling van de radiochemische zuiverheid.

4.1.2.7 Bepaling specifieke activiteit

De bepaling gebeurt bij de opzuivering van de tracer na synthese (semipreparatieve HPLC kolom) of bij de kwaliteitscontrole van de gezuiverde tracer (analytische HPLC kolom). In beide gevallen wordt enerzijds de piek van de radioactieve component opgevangen en geteld op radioactiviteit en anderzijds de hoeveelheid aanwezige component berekend door injectie van een standaard. In alle producties werd een specifieke activiteit van ongeveer 1 Ci / μ mol of 37 GBq/ μ mol verkregen, wat voldoende is voor eventueel latere SPECT-opnames.

4.1.3 Dierexperimenten

Aangezien het de betrachting is de gesynthetiseerde component te gebruiken voor de visualisering van de NMDA-receptor (en dus ook van bepaalde hersenaandoeningen) is het van belang dat de tracer doordringt tot in die plaatsen in de hersenen waar de NMDA-receptor aanwezig is. Daarom moet de tracer zowel de bloedhersenbarrière passeren als binden ter hoogte van de receptor. Uit *in vitro* testen is gebleken dat de kynureninezuurderivaten inderdaad een hoge affiniteit vertonen voor de glycinebindingsplaats van de NMDA-receptor (IC_{50} -waarden < 100 nM tegenover [3H]glycine), zodat enkel nog de passage doorheen de bloedhersenbarrière moet worden onderzocht. Tevens is het belangrijk dat de metabolisatie van de tracer zo klein mogelijk is en dat eventuele metabolieten niet doorheen de bloedhersenbarrière passeren. Daarom worden in het volgende deel zowel de biodistributie als de metabolisatie van de tracer onderzocht.

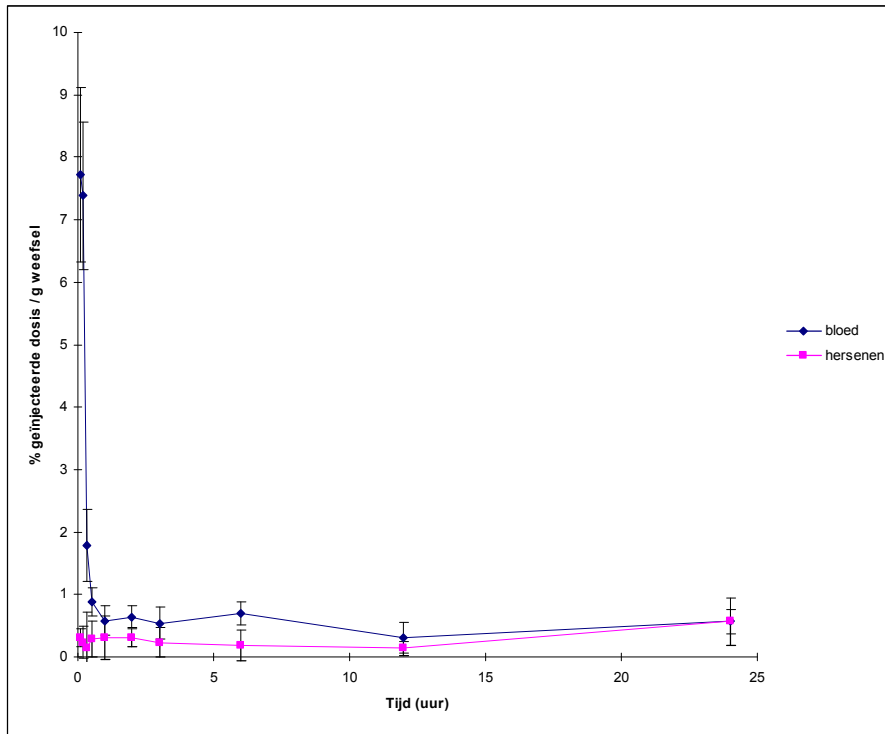
4.1.3.1 Biodistributie

Experimenteel

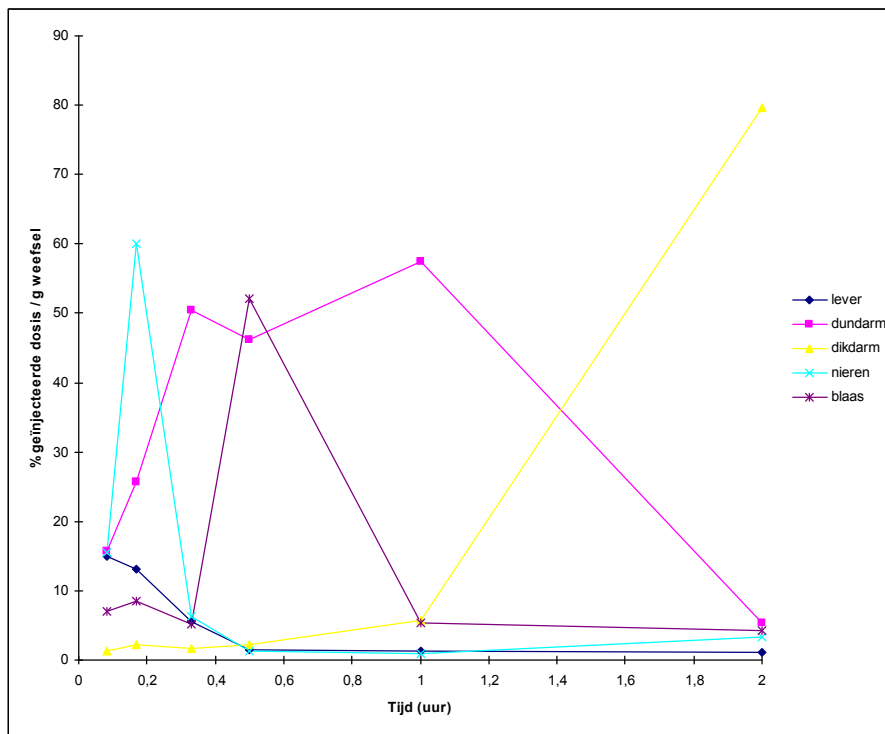
Ongeveer 2 μCi [^{77}Br] 5,7-dibroomkynureninezuur opgelost in 100-200 μl ethanol/water (10/90) wordt ingespoten in de staartvenen van 3 reeksen van 10 witte muizen (NMRI, 20-25 g) van beide geslachten. 5, 10, 20 en 30 minuten en 1, 2, 3, 6, 12 en 24 uur na injectie worden de muizen gedood na anesthesie met diëthylether. Bloed wordt afgenomen, organen en weefsels worden weggenomen, gewogen en geteld op radioactiviteit.

Resultaten

De resultaten van de verdeling van de radioactiviteit over de lichamen worden weergegeven als % van de geïnjecteerde dosis per gram orgaan. Figuur 4.10 geeft de activiteiten weer in functie van de tijd in bloed en hersenen. Figuur 4.11 toont de verdeling van de activiteit in de verschillende excretie-organen en figuur 4.12 tenslotte geeft een beeld van de excretie van de radioactiviteit in functie van de tijd. Alle waarden zijn gecorrigeerd voor achtergrondstraling en radioactief verval.



Figuur 4.10 Verdeling van radioactiviteit in bloed en hersenen in functie van de tijd na injectie van [^{77}Br] 5,7-dibroomkynureninezuur

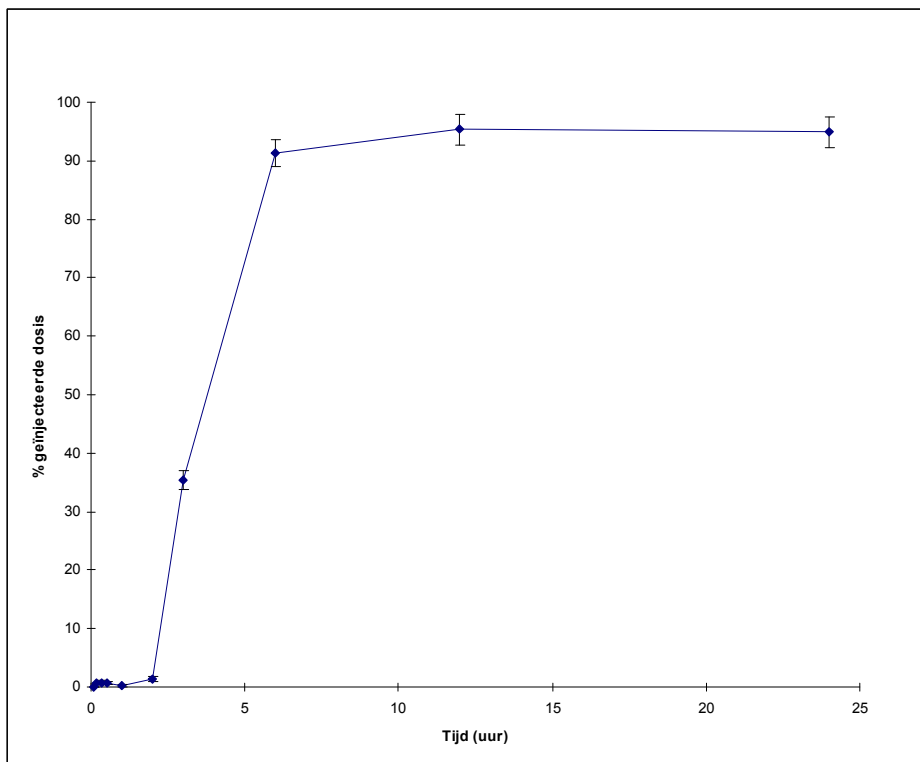


Figuur 4.11 Verdeling van radioactiviteit in excretieorganen in functie van de tijd na injectie van [^{77}Br] 5,7-dibroomkynureninezuur

Zoals blijkt uit figuur 4.10 ligt de hersenenactiviteitscurve op geen enkel tijdstip boven de bloedactiviteitscurve, zodat kan worden afgeleid dat de component de bloedhersenbarrière niet passeert. De oorzaak hiervan is ofwel een te vlugge afbraak ofwel het te hydrofiele karakter van de ingespoten verbinding.

In figuur 4.11 wordt de verdeling van de activiteit in de excretieorganen voorgesteld. De standaarddeviaties (voor de lagere waarden lager dan 10 % en voor de hogere waarden lager dan 5 %) zijn weggelaten voor de duidelijkheid van de figuur.

De verschillende fasen in de excretie van de radioactiviteit kunnen worden gevolgd. De verhoging van activiteit die zich na 10 minuten in de nieren manifesteert is 10 minuten later vrijwel volledig verdwenen, terwijl op hetzelfde moment een sterke stijging in de blaas wordt waargenomen. Na 1 uur is de radioactiviteit volledig uit de blaas verdwenen. Een gelijkaardig patroon wordt gezien bij de faecale excretie. Een vermindering van activiteit in de lever wordt gevolgd door een verhoging van activiteit in de dunne darm en vervolgens in de dikke darm. Het grote verschil met de urinaire excretie is de tragere passage doorheen de excretie-organen: pas na 1 uur stijgt de activiteit in de dikke darm.



Figuur 4.12 Excretie van radioactiviteit na injectie van $[^{77}\text{Br}]$ 5,7-dibromokynureninezuur

Terwijl uit figuur 4.11 blijkt dat reeds na 1 uur de activiteit in nieren en blaas volledig is verdwenen, wordt pas 3 uur na injectie van de traceroplossing een groot percentage van de radioactiviteit teruggevonden in de excretie (Figuur 4.12). Dit betekent dus dat de excretie van de radioactiviteit bijna uitsluitend faecaal verloopt. Na 6 uur is nagenoeg alle activiteit uit het lichaam geëxcreteerd.

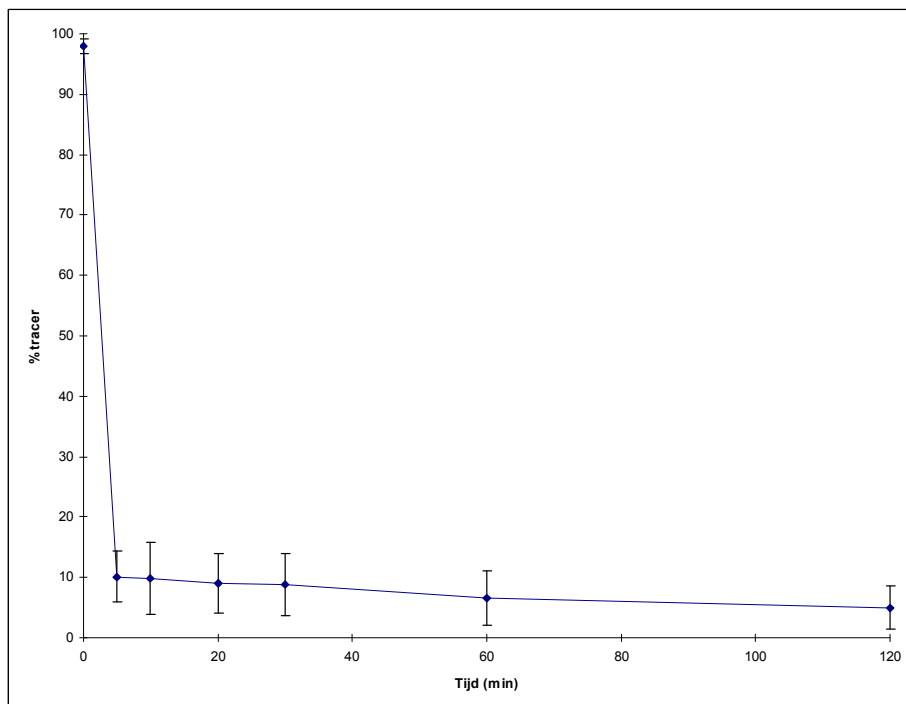
4.1.3.2 Metabolisatie

Experimenteel

In de staartvenen van drie reeksen witte muizen (NMRI, 20-25 g) van beide geslachten wordt 100 - 200 μCi [^{77}Br] 5,7-dibroomkynureninezuur, opgelost in 200-300 μl ethanol/water (10/90), ingespoten. 5, 10, 20 en 30 minuten en 1, 2, 3, 6, 12 en 24 uur na injectie worden de muizen gedood. Bloed wordt afgenomen en gecentrifugeerd (3 min bij 3000 g) en aan 200 μl plasma wordt 800 μl acetonitrile toegevoegd. Na vortexen gedurende 10 seconden wordt het mengsel gecentrifugeerd gedurende 3 minuten bij 3000 g. De pellet en het supernatans worden van elkaar gescheiden. Het extractierendement wordt berekend als de radioactiviteit aanwezig in het supernatans gedeeld door de totaal aanwezige radioactiviteit in pellet en supernatans, vermenigvuldigd met 100. Om te controleren of de metabolisatie niet plaats grijpt tijdens het extractieproces wordt aan blanco bloed – van muizen niet ingespoten met [^{77}Br] 5,7-dibroomkynureninezuur - 1 μCi [^{123}I] 5,7-dibroomkynureninezuur toegevoegd. De extractiemethode voor de blanco's is dezelfde als hierboven beschreven. Van elke extractie wordt 750 μl ingespoten op een HPLC systeem, waarvan de parameters beschreven zijn in tabel 4.4 (4.1.1.2). Alle radioactieve componenten worden gecollecteerd en geteld op radioactiviteit.

Resultaten

In blanco bloed wordt > 90 % van de ingespoten tracer teruggevonden en dus kan de extractieprocedure als bruikbaar beschouwd worden. De extractierendementen van zowel blanco's als stalen liggen hoger dan 90 % en dus kan een betrouwbare analyse van de metabolieten worden uitgevoerd. In figuur 4.13 worden de resultaten weergegeven als resterend procent van de geïnjecteerde tracer in functie van de tijd.



Figuur 4.13 Metabolisatie van [^{77}Br] 5,7-dibroomkynureninezuur in functie van de tijd

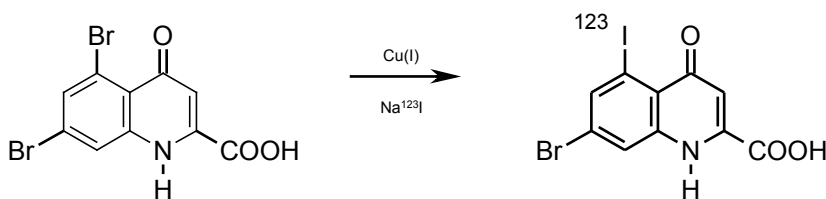
Uit figuur 4.13 blijkt een heel sterke metabolisatie van het [^{77}Br] 5,7-dibroomkynureninezuur bij proefdieren. Reeds 5 minuten na injectie van de tracer is 90 % van de initieel ingespoten tracer gemetaboliseerd. (De gevormde metaboliet elueert uit het HPLC-systeem met een retentietijd die overeenkomt met vrij jodide, wat een dehalogenatie doet vermoeden). Daarna volgt een geleidelijke afbraak zodat 2 uur na injectie het [^{77}Br] 5,7-dibroomkynureninezuur slechts 5 % van de resterende activiteit uitmaakt. Dit is waarschijnlijk de belangrijkste reden waarom de tracer niet in de hersenen wordt teruggevonden. Verder gebruik van deze tracer voor humane studies lijkt dus uitgesloten.

4.2 Synthese van 7-broom-5- ^{123}I -joodkynureninezuur

4.2.1 Synthese van standaard, precursor en tracer

De precursor voor de synthese van het 7-broom-5- ^{123}I -joodkynureninezuur is het overeenkomstige broomderivaat, namelijk het 5,7-dibroomkynureninezuur. De tracer wordt hieruit gesynthetiseerd via een 'Cu-gesteunde' niet-isotopische halogeenuitwisseling in zuur en reducerend milieu (Schema 4.5).

4.2.1.1 Reactieschema



Schema 4.5 Synthese van 7-broom-5- ^{123}I -joodkynureninezuur via een nucleofiele uitwisselingsreactie

4.2.1.2 Synthese van standaard en precursor

De syntheses van de precursor (5,7-dibroomkynureninezuur) en van de standaard (7-bromo-5-joodkynureninezuur) werden reeds beschreven in deel 4.1.1.

4.2.1.3 Stabiliteitsstudie van de precursor

Omdat bij de synthese van [⁷⁷Br] 5,7-dibroomkynureninezuur een vermindering aan rendement werd waargenomen bij langere reactietijden en hogere reactietemperaturen (cfr. 4.1.2.4), wordt eerst de stabiliteit van de precursor onder verschillende omstandigheden onderzocht. Eerst wordt de temperatuurgevoeligheid van een oplossing van het 5,7-dibroomkynureninezuur in ethanol nagegaan. Hieruit blijkt dat de precursor volledig intact blijft, ook na verhitting op 100 °C gedurende 60 minuten. Vervolgens wordt de invloed van azijnzuur bestudeerd. Zelfs verwarmen in sterk zuur midden blijkt de precursor niet aan te tasten. In een volgende reeks experimenten worden de reducerende en complexerende stoffen toegevoegd en wordt de precursor gedurende dezelfde tijden en op dezelfde temperaturen verwarmd als bij de syntheses. Ook hier blijkt de hoeveelheid aanwezige precursor niet te wijzigen na 60 minuten op 100°C. Wanneer echter naast het azijnzuur en de reducerende en complexerende stoffen, ook koper(II)sulfaat wordt toegevoegd, is de hoeveelheid precursor reeds sterk verminderd bij verwarmen gedurende 15 minuten bij 60 °C. Na 60 minuten bij 100 °C blijkt de precursor zo goed als verdwenen. Na toevoeging van een equivalente hoeveelheid bromide-ionen aan de vorige oplossingen blijkt de precursor echter volledig intact te blijven. Minder dan een equivalente hoeveelheid geeft echter terug aanleiding tot vermindering van de hoeveelheid precursor. Aangezien bij radiosyntheses steeds minder dan equivalente hoeveelheden isotoop aanwezig is, zal dus ook een vermindering van de precursor worden waargenomen. Naast een vermindering aan precursor werd eveneens de vorming van een nieuwe component gezien. Deze elueert met dezelfde retentietijd als het 7-broomkynureninezuur, wat wijst op een mogelijke dehalogenatie.

4.2.1.4 Initiële parameters van de tracersynthese

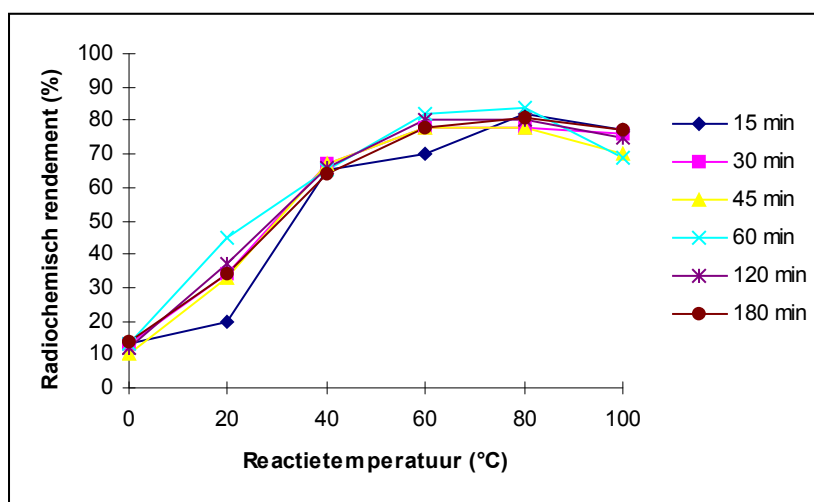
Drie verschillende oplossingen worden aangemaakt: A: een oplossing van 5,7-dibroomkynureninezuur (5,8 mg, 16,7 µmol) in ethanol (10 ml), B: een oplossing van koper(II)sulfaat (100 mg, 0.4 mmol) in water (10 ml), C: een waterige oplossing (10 ml) die tin(II)sulfaat (43 mg, 200 µmol), gentisinezuur (308 mg, 2 mmol), citroenzuurmonohydraat (420 mg, 2 mmol) en azijnzuur (1 ml) bevat. In een conische reactievial van 1 ml wordt 5,7-dibroomkynureninezuuroplossing (600 µL) gebracht. Hieraan worden oplossing B (25 µl), oplossing C (100 µl) en azijnzuur (65 µl) toegevoegd en de vial wordt afgesloten met een schroef dop, voorzien van een septum, en 15 minuten in een ultrasoonbad geplaatst. Nadien wordt I-123 isotoop (± 20 µCi) toegevoegd via het septum en wordt de vial gedurende 15 minuten doorborreld met stikstof en gedurende 1 uur in een waterbad (100 °C) geplaatst. Na reactie wordt de vial afgekoeld onder koud water en wordt een deel (100 µl) van het synthesemengsel ingespoten op HPLC voor de bepaling van het radiochemisch rendement.

4.2.1.7 Optimalisatie van de parameters

Optimalisatie reactietijd en -temperatuur

Uit de stabiliteitsstudie van de precursor (4.2.1.3) is gebleken dat in aanwezigheid van koper(II)sulfaat en een te kleine hoeveelheid aan bromide-ionen de precursor zowel afbreekt in functie van de tijd als van de temperatuur. Daarom werd geopteerd om reactietijd en -temperatuur samen te optimaliseren. Aan 600 µl oplossing A (1 µmol precursor) wordt in een vial 25 µl oplossing B (1 µmol kopersulfaat), 100 µl oplossing C en 65 µl azijnzuur toegevoegd. Na additie van 10 µl jood-123 isotoop wordt de vial 15 minuten in een ultrasoonbad geplaatst en 15 minuten doorborreld met stikstof. De rendementen van syntheses met verschillende reactietijden (15-180 min) en verschillende reactietemperaturen (0-100 °C) worden bepaald door injectie van 100 µl mengsel in het HPLC-systeem. De gemiddelde waarden van telkens 3 syntheses worden weergegeven in figuur 4.14. De standaarddeviaties zijn niet in de figuur opgenomen omwille van de duidelijkheid. Er werden echter nooit sterk afwijkende rendementen bekomen (SD < 5 %).

Figuur 4.14 Invloed van de reactietijd en de reactietemperatuur op het radiochemisch

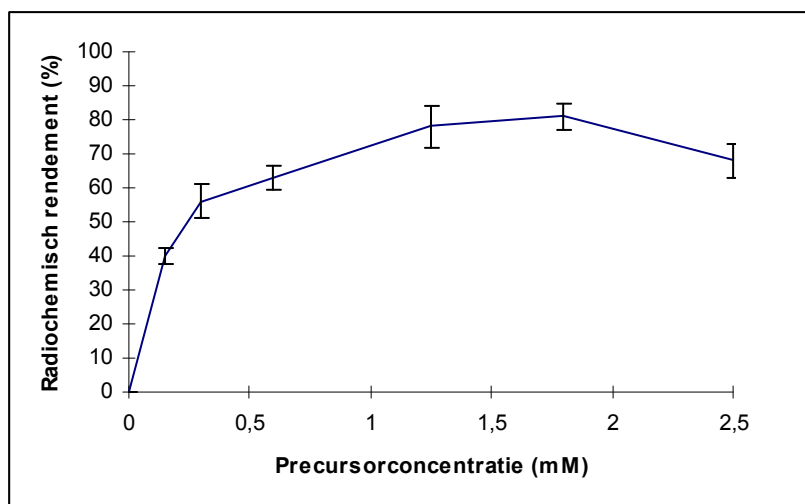


rendement van de synthese van 7-broom-5- ^{123}I -joodkynureninezuur

Onafhankelijk van de tijdsduur van de reactie is er een vrijwel lineaire stijging te bemerken van het reactierendement bij temperaturen tussen 0 en 60 °C. Vanaf 60 °C is deze verhoging veel minder uitgesproken en nadien is er zelfs een lichte daling merkbaar. De oorzaak ligt vermoedelijk bij de vermindering van stabiliteit van de tracer bij verhoogde temperaturen. De volgende optimalisaties worden uitgevoerd op 60 °C gedurende 30 minuten. Zoals bij de optimalisatie van de syntheseparameters van ^{77}Br 5,7-dibroomkynureninezuur gaat het hier over radiochemische rendementen. De halfwaardetijd van I-123 is echter 13,2 uur zodat na 30 minuten vrijwel geen vermindering aan radioactiviteit zal hebben plaatsgevonden en het totale rendement vrijwel overeenkomt met het radiochemische rendement.

Optimalisatie precursor concentratie

Voor deze bepaling wordt aan verschillende hoeveelheden van oplossing A (0 - 2 μmol precursor) opgelost in 600 μl ethanol, 25 μl oplossing B (1 μmol kopersulfaat), 100 μl oplossing C en 65 μl azijnzuur toegevoegd. Na additie van I-123 isotoop wordt de vial achtereenvolgens in een ultrasoonbad geplaatst (15 min), met stikstof doorborreld (15 min) en verwarmd gedurende 30 minuten op 60 °C. Na afkoeling wordt 100 μl ingespoten op HPLC ter bepaling van het rendement. De resultaten hiervan zijn weergegeven in figuur 4.15.

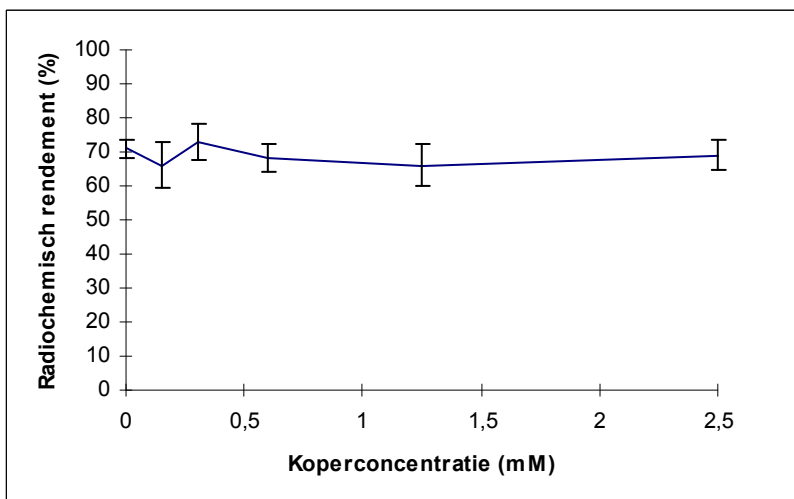


Figuur 4.15 Invloed van de precursorconcentratie op het radiochemisch rendement van de synthese van 7-broom-5- ^{123}I -joodkynureninezuur

Tot een concentratie van 1,8 mM wordt met stijgende precursorconcentratie ook een hoger rendement bekomen. Toevoegen van 2 μmol of meer precursor aan het synthesemengsel zorgt echter voor een vermindering van het rendement. Problemen met de oplosbaarheid liggen hier waarschijnlijk aan de basis, want na toevoeging van alle componenten werd een neerslag waargenomen bij syntheses met hogere hoeveelheden aan precursor. Daarom wordt 1,5 μmol precursor dan ook als optimaal beschouwd en gebruikt voor de laatste optimalisatie.

Optimalisatie koper(II)sulfaat concentratie

Om een idee te krijgen wat de invloed is van het koper(II)sulfaat op het rendement van de reactie worden verschillende hoeveelheden van oplossing B (0-2 μmol kopersulfaat) toegevoegd aan een mengsel van 1,5 μmol precursor opgelost in 600 μl ethanol, 100 μl oplossing C en 65 μl azijnzuur. I-123 isotoop wordt eveneens toegevoegd, waarna de vial wordt gesloten, in een ultrasoonbad geplaatst en met stikstof doorborreld. Na verwarmen op 60 °C gedurende 30 minuten wordt de vial afgekoeld en 100 μl mengsel wordt geanalyseerd. De resultaten hiervan worden weergegeven in figuur 4.16.



Figuur 4.16 Invloed van de koper(II)sulfaatconcentratie op het radiochemisch rendement van de synthese van 7-broom-5-¹²³I]-joodkynureninezuur

Vrijwel gelijke rendementen worden bereikt bij syntheses zowel in aanwezigheid als in afwezigheid van kopers(II)sulfaat. Deze resultaten stemmen overeen met deze bekomen bij de bromering van het geïodeerd derivaat (4.1.2.4). Ook dan bleek het kopersulfaat weinig of geen rol van betekenis te spelen. De aanwezigheid van de 4-oxo-groep maakt dat de molecule sterk geactiveerd is voor nucleofiele substitutie en neemt zo de taak van het koper(II)sulfaat over.

4.2.1.8 Geoptimaliseerde tracersynthese en zuiveringsprocedure

Na verwarming (30 min op 60 °C) van 1,5 µmol precursor, opgelost in 600 µl ethanol, 100 µl oplossing C en 65 µl azijnzuur onder N₂ atmosfeer wordt gebruik gemaakt van een semi-preparatieve HPLC voor de scheiding en de zuivering van het 7-broom-5-¹²³I]-joodkynureninezuur. De condities, detectiemethodes en de retentietijden van precursor en tracer worden weergegeven in tabel 4.7.

4.2.1.10 Bepaling specifieke activiteit

De bepaling gebeurt bij de kwaliteitscontrole van de gezuiverde tracer (analytische HPLC kolom). Enerzijds wordt de piek van de radioactieve component opgevangen en geteld op radioactiviteit en anderzijds wordt de hoeveelheid aanwezige component berekend door injectie van een standaard. Analyse van de gezuiverde oplossing gaf steeds een specifieke activiteit van ongeveer 1 Ci / μmol of 37 GBq / μmol , voldoende voor visualisatie met SPECT.

4.2.2 Dierexperimenten

4.2.2.1 Biodistributie

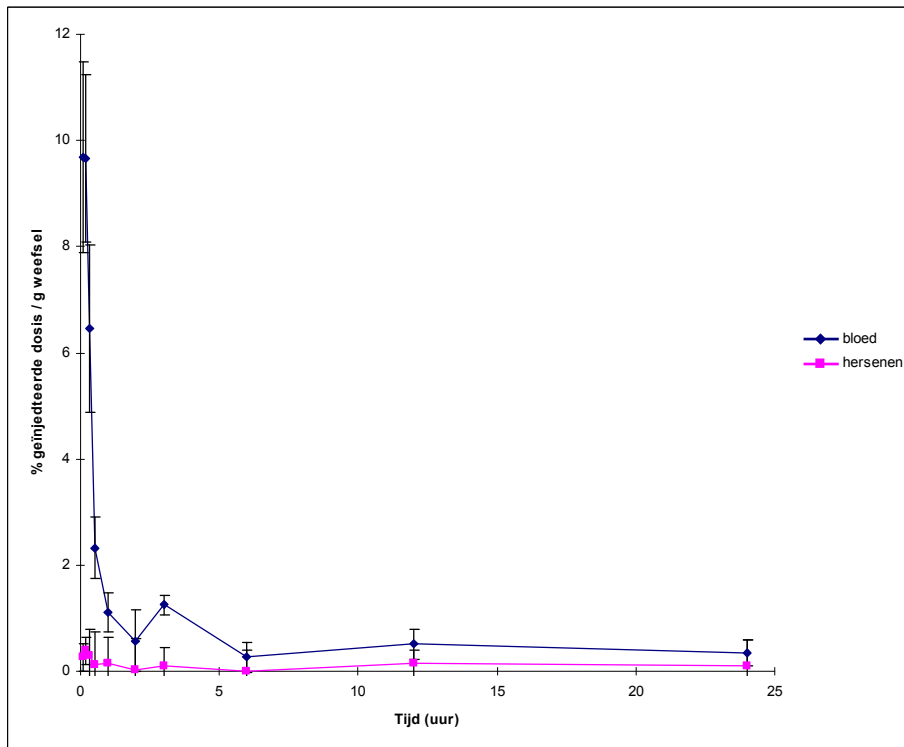
Experimenteel

Ongeveer 2 μCi 7-broom-5- ^{123}I -joodkynureninezuur opgelost in 100-200 μl ethanol/water (10/90) wordt ingespoten in de staartvenen van 3 reeksen van 10 witte muizen (NMRI, 20-25 g) van beide geslachten. 5, 10, 20 en 30 minuten en 1, 2, 3, 6, 12 en 24 uur na injectie worden de muizen gedood na anesthesie met diëthylether. Bloed wordt afgenomen, organen en weefsels worden weggenomen, gewogen en geteld op radioactiviteit.

Resultaten

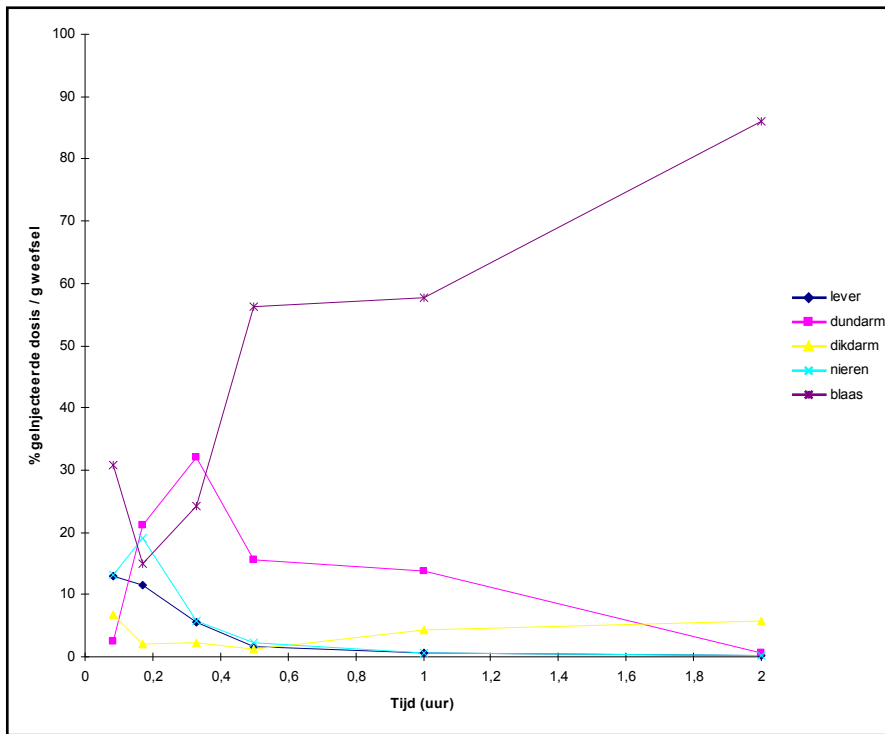
Het biodistributie- en excretiepatroon is weergegeven in 3 figuren. Figuur 4.17 toont de verdeling van de radioactiviteit in bloed en hersenen, figuur 4.18 de verdeling in de verschillende excretie-organen en figuur 4.19 tenslotte de excretie in functie van de tijd. De resultaten voor de biodistributie zijn vermeld als % van de geïnjecteerde dosis per gram orgaan, terwijl voor de excretie de waarden als % van de geïnjecteerde dosis worden uitgedrukt. Alle waarden zijn gecorrigeerd voor achtergrondstraling en radioactief verval.

Uit figuur 4.17 kan worden geconcludeerd dat de tracer de bloedhersenbarrière niet passeert, daar op geen enkel moment de activiteitscurve van de hersenen deze van het bloed overschrijdt. Vergelijkbare resultaten werden waargenomen bij het ^{77}Br 5,7-dibroomkynureninezuur (Figuur 4.10). Dezelfde oorzaken kunnen hier dan ook worden vermeld. Ofwel is de molecule te hydrofiel om de bloedhersenbarrière te passeren ofwel is de metabolisatie te sterk uitgesproken zodat de component de tijd niet krijgt om de hersenen te bereiken.

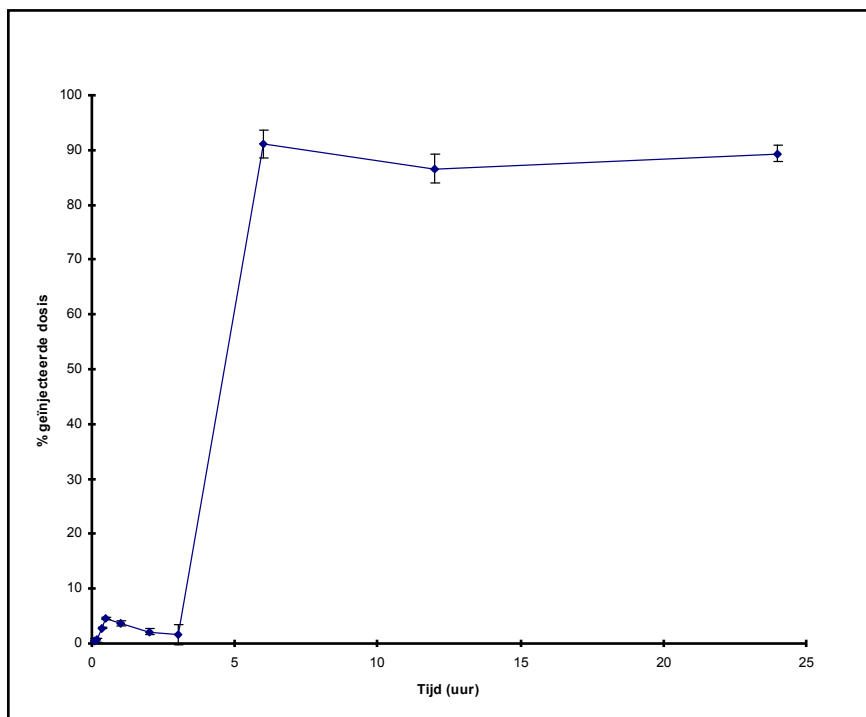


Figuur 4.17 Verdeling van radioactiviteit in bloed en hersenen na injectie van 7-broom-5-¹²³I-joodkynureninezuur

Zoals bij de biodistributie van [⁷⁷Br] 5,7-dibroomkynureninezuur (figuur 4.11) kan ook hier de uitscheiding van de radioactiviteit gemakkelijk worden gevolgd in de verschillende excretie-organen. Bij de faecale excretie is er een daling van radioactiviteit in de lever die onmiddellijk wordt gevolgd door een stijging in respectievelijk de dunne en de dikke darm. Het enige verschil met [⁷⁷Br] 5,7-dibroomkynureninezuur is dat de inbreng van de faecale excretie beduidend minder is en de activiteit dus meer via de urine wordt uitgescheiden. De hoge waarden in de blaas bevestigen deze waarneming.



Figuur 4.18 Verdeling van radioactiviteit in excretieorganen na injectie van 7-broom-5- ^{123}I -joodkynureninezuur



Figuur 4.19 Excretie van radioactiviteit na injectie van 7-broom-5- ^{123}I -joodkynureninezuur

Uit figuur 4.19 blijkt dat na 3 uur nagenoeg geen radioactiviteit wordt teruggevonden in de excretie terwijl na 6 uur meer dan 90 % is uitgescheiden. Uit figuur 4.18 kan worden geconcludeerd dat de activiteit zich vooral in de urine bevindt.

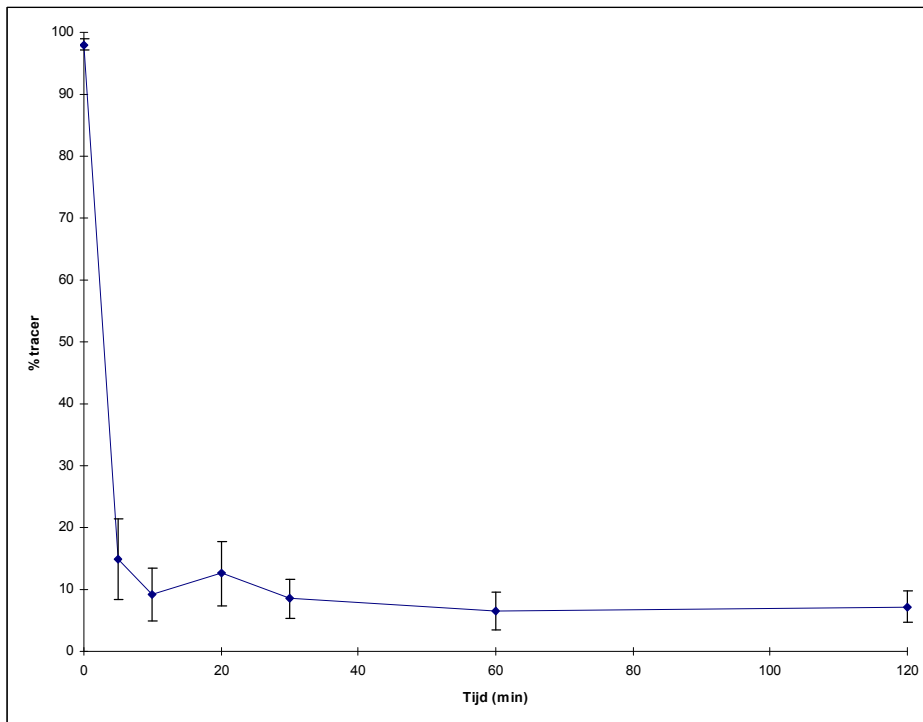
4.2.2.2 Metabolisatie

Experimenteel

In de staartvenen van drie reeksen witte muizen (NMRI, 20-25 g) van beide geslachten wordt 100 - 200 μCi 7-broom-5- ^{123}I]-joodkynureninezuur, opgelost in 200-300 μl ethanol/water (10/90), ingespoten. 5, 10, 20 en 30 minuten en 1, 2, 3, 6, 12 en 24 uur na injectie worden de muizen gedood. Bloed wordt afgenomen en gecentrifugeerd (3 min bij 3000 g) en aan 200 μl plasma wordt 800 μl acetonitrile toegevoegd. Na vortexen gedurende 10 seconden wordt het mengsel gecentrifugeerd gedurende 3 minuten bij 3000 g. De pellet en het supernatans worden van elkaar gescheiden. Het extractierendement wordt berekend als de radioactiviteit aanwezig in het supernatans gedeeld door de totaal aanwezige radioactiviteit in pellet en supernatans, vermenigvuldigd met 100. Om te controleren of de metabolisatie niet plaats grijpt tijdens het extractieproces wordt aan blanco bloed – van muizen niet ingespoten met 7-broom-5- ^{123}I]-joodkynureninezuur - 1 μCi 7-broom-5- ^{123}I]-joodkynureninezuur toegevoegd. De extractiemethode voor de blanco's is dezelfde als hierboven beschreven. Van elke extractie wordt 750 μl ingespoten op een HPLC systeem, waarvan de parameters beschreven zijn in tabel 4.7 (4.2.1.8). Alle radioactieve componenten worden gecollecteerd en geteld op radioactiviteit.

Resultaten

De resultaten, uitgedrukt als resterend procent van de geïnjecteerde dosis in functie van de tijd, zijn weergegeven in figuur 4.20.



Figuur 4.20 Metabolisatie van 7-broom-5-¹²³I-joodkynureninezuur in functie van de tijd

In blanco bloed wordt > 90 % van de ingespoten tracer teruggevonden en de extractierendementen van zowel blanco's als stalen liggen hoger dan 90 % zodat een betrouwbare analyse van de metabolieten kan worden uitgevoerd.

Slechts 15 % 7-broom-5-¹²³I-joodkynureninezuur wordt 5 minuten na injectie in het bloed teruggevonden. De overige activiteit is afkomstig van een polaire metaboliet die op HPLC elueert met dezelfde retentietijd als het vrije jodide. Daarna blijft de hoeveelheid tracer nagenoeg constant. Deze snelle metabolisatie is, samen met het te polaire karakter van de component, vermoedelijk de oorzaak dat het radioactieve product niet doordringt tot in de hersenen.

4.3 Synthese van 7-chloor-5-[¹²³I]-joodkynureninezuur

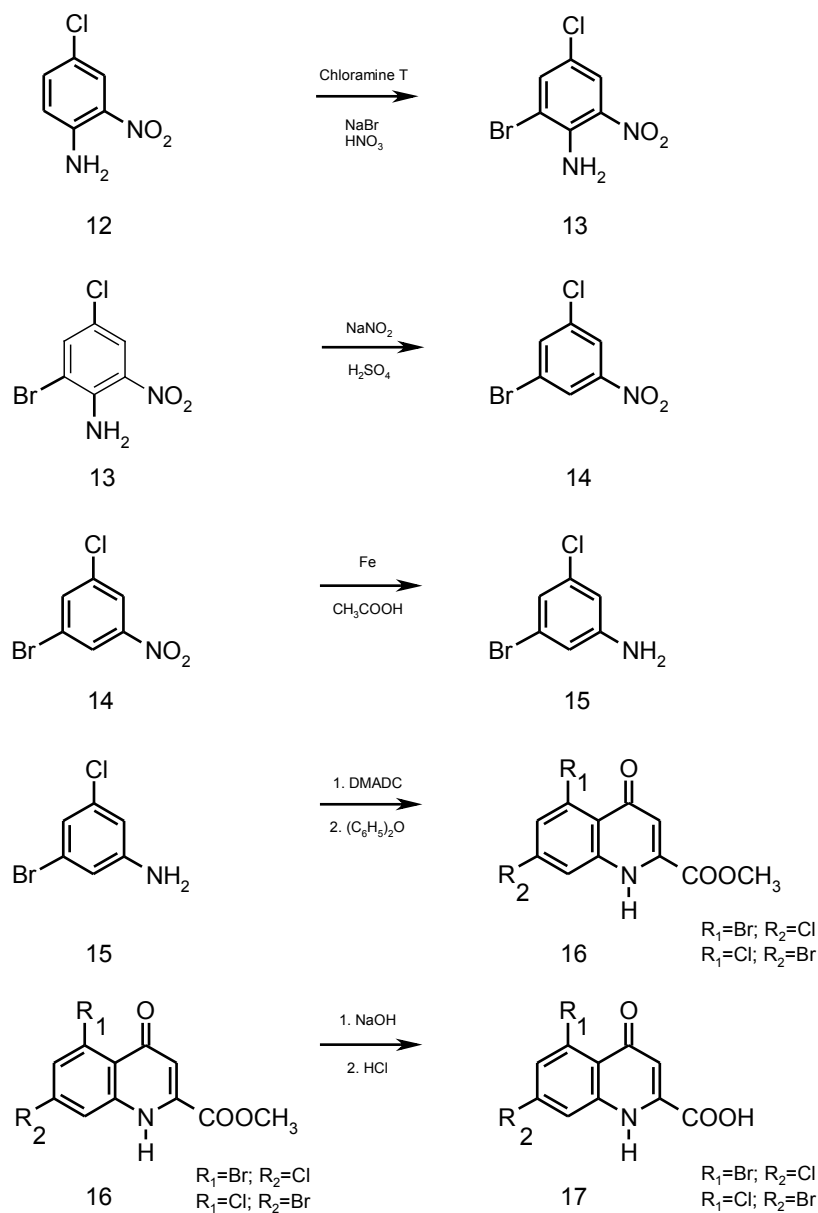
4.3.1 Synthese van precursor en standaard

5-broom-7-chloorkynureninezuur is de precursor voor de synthese van het standaardmateriaal en van de overeenkomstige tracer, het 7-chloor-5-[¹²³I]-joodkynureninezuur. Deze precursor wordt eveneens gemaakt door middel van een gemodificeerde Conrad-Limpach methode. Het niet gemerkte 7-chloor-5-joodkynureninezuur en het 7-chloor-5-[¹²³I]joodkynureninezuur worden gesynthetiseerd via een koper gekatalyseerde niet-isotopische halogeenuitwisseling in zuur en reducerend milieu. Het eerstgenoemde wordt gebruikt als standaard in de ontwikkeling van een HPLC methode voor de scheiding van de precursor en de tracer.

4.3.1.1 Synthese van de precursor⁴⁻⁵

Na bromering van het 4-chloor-2-nitroaniline, gevolgd door een desaminering en een reductie, wordt het 3-broom-5-chlooraniline verkregen. Verhitting met dimethylacetylendicarboxylaat (DMADC), gevolgd door ringsluiting en verzeping levert twee broom/chloorderivaten op, het 5-broom-7-chloorkynureninezuur en het 7-broom-5-chloorkynureninezuur (Schema 4.6). Deze worden gescheiden door middel van RP-HPLC.

Reactieschema



Schema 4.6 Synthese van het mengsel 5-broom-7-chloor- en 7-broom-5-chloor Kynureninezuur

Experimenteel

Een oplossing van 4-chloor-2-nitroaniline (**12**) (20 g, 116 mmol) in methanol (40 ml) en een oplossing van chloramine-T (27 g, 120 mmol) en natriumbromide (23 g, 232 mmol) in water (350 ml) worden samengevoegd. Na toevoeging van rokend salpeterzuur (200 ml) wordt het mengsel 10 minuten geroerd op kamertemperatuur en het gevormde neerslag wordt afgefilterd, gewassen met water en gedroogd (27.5 g, 95 %).

MS m/e 250
¹H-NMR δ (360 MHz, DMSO-d₆) 7.31 (2H, bs, NH₂), 8.01 (1H, d, 3-H), 8.08 (1H, d, 5-H)

Aan een oplossing van 2-broom-4-chloor-6-nitroaniline (**13**) (25 g, 99 mmol) in ethanol wordt sterk zwavelzuur (60 ml) toegevoegd. Het mengsel wordt opgewarmd tot refluxen en natriumnitriet (17.5 g, 250 mmol) wordt toegevoegd. Na 3 uur refluxen wordt het mengsel afgekoeld en aan een overmaat ijswater toegevoegd. Het gevormde neerslag wordt afgefiltreerd, gewassen met water en gedroogd (21 g, 89 %).

MS m/e 235
¹H-NMR δ (360 MHz, DMSO-d₆) 8.29 (1H, d, 4-H), 8.32 (1H, d, 2-H), 8.38 (1H, d, 6-H)

Aan 5-broom-3-chloornitrobenzeen (**14**) (20 g, 84.5 mmol), gesuspendeerd in ethanol (260 ml), voegt men ijsazijn (75 ml) en ijzer (33g, 590 mmol) toe. Na 3 uur refluxen wordt het mengsel afgekoeld en gefiltreerd. Na afdampen van het solvent wordt water toegevoegd en alkalisch gemaakt tot pH 12. De waterige fase wordt geëxtraheerd met ethylacetaat (3 x 200 ml) en de samengevoegde organische fasen worden na drogen afgedampt. Het bekomen product wordt gedroogd en verdere zuivering gebeurt met kolomchromatografie (silicagel - hexaan/ethylacetaat 90/10) (14 g, 81 %).

MS m/e 205
¹H-NMR δ (360 MHz, DMSO-d₆) 5.74 (2H, bs, NH₂), 6.58 (1H, d, 2-H), 6.67 (1H, d, 6-H), 6.70 (1H, d, 4-H)

Dimethylacetyleendicarboxylaar (DMADC) (6.5 ml, 50 mmol) wordt toegevoegd aan een oplossing van 3-broom-5-chlooraniline (**15**) (10 g, 48.5 mmol) in methanol (100 ml). Na 10 uur refluxen wordt het solvent afgedampt. Het residu wordt toegevoegd aan difenylether (50 ml), vooraf verhit tot 250 °C. Na 15 minuten wordt het mengsel afgekoeld en een overmaat hexaan wordt hieraan toegevoegd. Het gevormde mengsel wordt gewassen en gedroogd (10.7 g, 70 %). Na analyse met HPLC (RP-select B, methanol/water 50/50) blijken er twee producten te zijn gevormd (**16**) (Schema 4.6). Het mengsel wordt niet gescheiden en de analyse gebeurt enkel aan de hand van MS.

MS m/e 315

Het estermengsel (**16**) (10 g, 31.5 mmol) wordt gesuspendeerd in ethanol (200 ml) en natriumhydroxide, opgelost in water (250 ml), wordt hieraan toegevoegd. Na 1 uur refluxen wordt het mengsel afgekoeld en aangezuurd met HCl (1N) tot pH 2. Het gevormde neerslag wordt afgefiltreerd, gewassen met water (100 ml), ethanol (100 ml) en diëthylether (50 ml) en gedroogd (**17**) (8.3 g, 88 %). Het syntheseproduct wordt geanalyseerd met HPLC. De condities waaronder dit gebeurt zijn beschreven in tabel 4.8.

Tabel 4.8

Analytische en preparatieve HPLC condities

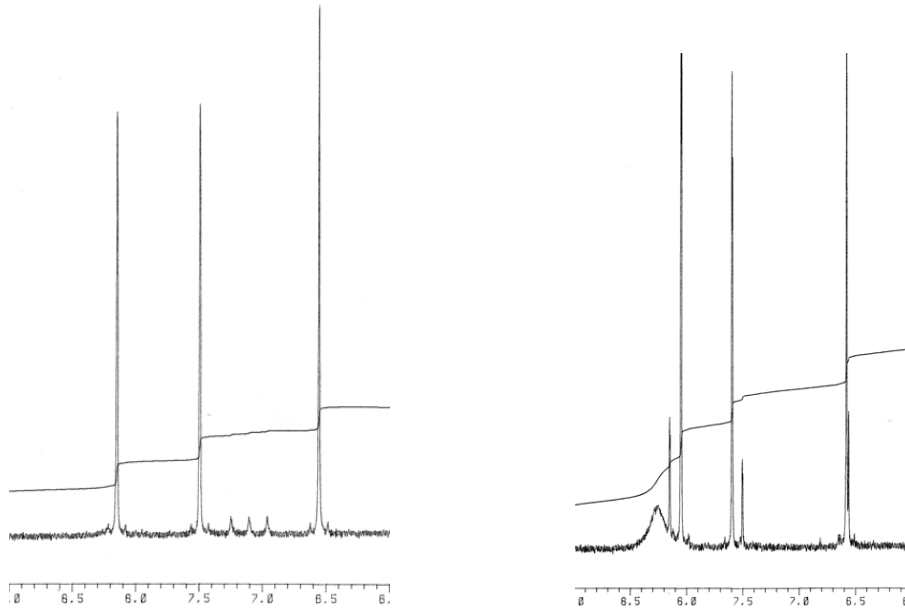
	Kolom	:	
Alltech Alltima RP-18,			
250 x 10 mm, 10 μ m			
	Eluens	:	
H ₂ O/DMF/AcCN/TFA			65/20/15/0.1
	Debiet	:	
7 ml/min			
	Detectie	:	UV
254 nm			
	Retentietijden	:	7-
broom-5-chloor: 22 min			
5-broom-7-chloor: 25 min			

4.3.1.2 Verdere isolatie van de precursor¹¹

Voor de karakterisering van de twee afzonderlijke broom/chloor derivaten is een scheiding nodig. Deze gebeurt met hetzelfde HPLC-systeem als voor de analyse, beschreven in tabel 4.8. De twee derivaten worden gekarakteriseerd met behulp van NMR (Figuur 4.21) en MS.

7-broom-5-chloorkyna
 MS m/e 301 (M⁺)
¹H-NMR δ (360 MHz, DMSO-d₆) 6.56 (s, 1H, 3-H), 7.49 (s, 1H, 6-H), 8.16 (d, 1H, 8-H),
 11.94 (bs, 1H, NH)

5-broom-7-chloorkyna
 MS m/e 301 (M⁺)
¹H-NMR δ (360 MHz, DMSO-d₆) 6.58 (s, 1H, 3-H), 7.60 (s, 1H, 6-H), 8.06 (d, 1H, 8-H),
 11.95 (bs, 1H, NH)

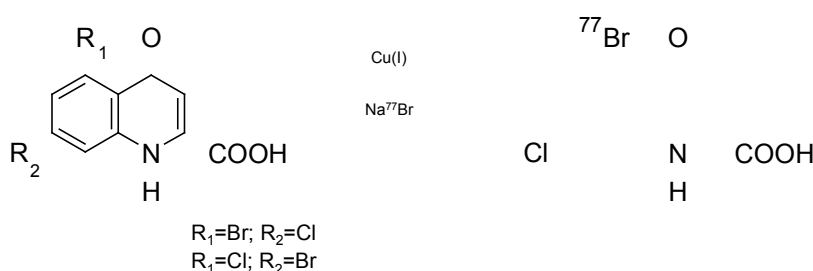


Figuur 4.21 NMR-spectra van 7-broom-5-chloor (links) en van 5-broom-7-chloorkynureninezuur (rechts)

4.3.1.3 Isotopische radiobromering van het mengsel¹¹

Om een voldoende hoeveelheid 5-broom-7-chloorkynureninezuur precursor te verkrijgen voor de optimalisatie van de verschillende parameters bij de tracersynthese en voor de dierexperimenten is het noodzakelijk de bovenstaande HPLC-scheiding (Tabel 4.8) meerdere malen uit te voeren. Dit is echter heel tijdrovend en daarom werd een andere denkpiste gevolgd. Aangezien de vervanging van een chlooratoom door een joodatoom slechts mogelijk is onder heel extreme omstandigheden en aangezien zelfs met een overmaat aan jodide-ionen het broomatoom op plaats 7 van 5,7-dibroomkynureninezuur niet door een joodatoom wordt uitgewisseld, zou voor de synthese van het 7-chloor-5-¹²³I-joodkynureninezuur uitgegaan kunnen worden van het mengsel van 5-broom-7-chloor- en 7-broom-5-chloorkynureninezuur. Daar een isotopische uitwisseling vlotter verloopt dan een niet-isotopische en aangezien de twee broom/chloor derivaten voorhanden zijn, wordt eerst nagegaan of er inderdaad slechts één gemerkt broom/chloor derivaat wordt gevormd na een isotopische radiobromering van het mengsel.

Reactieschema



Schema 4.7 Synthese van [^{77}Br]-5-broom-7-chloorkynureninezuur via een isotopische nucleofiele uitwisselingsreactie

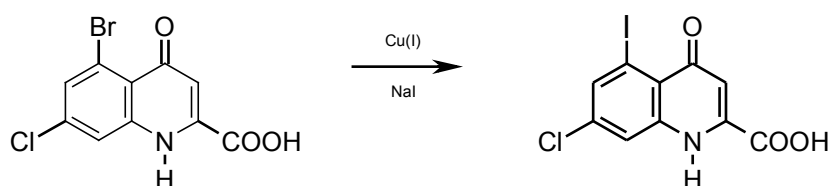
Experimenteel

In een conische reactievial van 1 ml wordt het mengsel van 7-broom-5-chloor- en 5-broom-7-chloorkynureninezuur (605 μg , 2 μmol) opgelost in ethanol (600 μl). Hieraan wordt een waterige oplossing (100 μl) toegevoegd die tinsulfaat (430 μg , 2 μmol), gentisinezuur (3,1 mg, 20 μmol), citroenzuurmonohydraat (4,2 mg, 20 μmol) en azijnzuur (10 μl) bevat. Vervolgens wordt een waterige kopersulfaatoplossing (25 μl 0.008 M, 0.2 μmol) toegevoegd. De vial wordt afgesloten met een schroefdop voorzien van een septum en 15 minuten in een ultrasoonbad geplaatst. Nadien wordt Br-77 isotoop ($\pm 20 \mu\text{Ci}$) toegevoegd via het septum en wordt de vial gedurende 15 minuten doorborreld met stikstof en gedurende 1 uur in een waterbad bij 60 °C geplaatst. Na reactie wordt de vial afgekoeld onder koud water en wordt een deel van het synthesemengsel ingespoten op HPLC voor analyse. Dit gebeurt op het systeem beschreven in tabel 4.8.

Uit het chromatogram kan worden afgeleid dat inderdaad slechts één radioactief product werd gevormd, namelijk het [^{77}Br]-5-broom-7-chloorkynureninezuur.

4.3.1.4 Synthese van 7-chloor-5-joodkynureninezuur¹¹

Reactieschema



Schema 4.8 Synthese van 7-chloor-5-joodkynureninezuur via een niet-isotopische nucleofiele uitwisselingsreactie

Experimenteel

In een reactiekolf (50 ml) wordt het mengsel van 7-broom-5-chloor en 5-broom-7-chloorkynureninezuur (60,5 mg, 200 μmol) opgelost in ethanol (20 ml). Hieraan wordt een waterige oplossing (10 ml) toegevoegd die tinsulfaat (43 mg, 200 μmol), gentisinezuur (308 mg, 2 mmol), citroenzuurmonohydraat (420 mg, 2 mmol) en azijnzuur (1 ml)

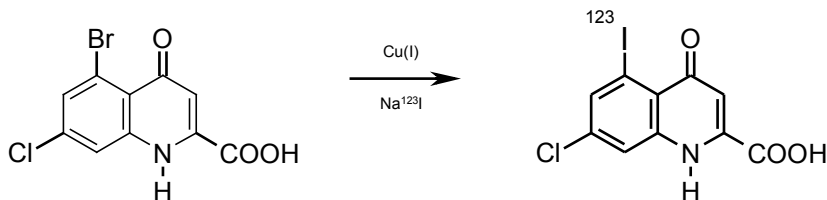
bevat. Vervolgens wordt een waterige kopersulfaatoplossing (2,5 ml 0.008 M, 20 μ mol) toegevoegd. De vial wordt 15 minuten in een ultrasoonbad geplaatst. Nadien wordt kaliumjodide-oplossing (200 μ mol) toegevoegd via het septum en wordt de vial gedurende 15 minuten doorborreld met stikstof en gedurende 1 uur in een waterbad bij 60 °C geplaatst. Na reactie wordt de vial afgekoeld onder koud water en wordt een deel van het synthesesmengsel ingespoten op HPLC. Zowel de analyse als de scheiding gebeurt met het HPLC systeem weergegeven in tabel 4.9.

Tabel 4.9 Analytische/preparatieve HPLC condities

	Kolom	:	
Alltech Alltima RP-18,			
250 x 10 mm, 10 μ m			
	Eluens	:	
H ₂ O/DMF/AcCN/TFA			65/20/15/0.1
	Debiet	:	
7 ml/min			
	Detectie	:	UV
254 nm			
	Retentietijden	:	7-
broom-5-chloorkyna: 22 min			
5-broom-7-chloorkyna: 25 min			
7-chloor-5-iodkyna: 41 min			
7-chloor-5-iodkyna			
MS m/e	349 (M ⁺)		
¹ H-NMR δ	(360 MHz, DMSO-d ₆)	6.57 (s, 1H, 3-H), 7.89 (s,	
1H, 6-H),		8.09 (d, 1H, 8-H), 11.91 (bs, 1H, NH)	

4.3.2 Synthese van 7-chloor-5-[¹²³I]-joodkynureninezuur¹¹

4.3.2.1 Reactieschema



Schema 4.9 Synthese van 7-chloor-5-[¹²³I]-joodkynureninezuur via een niet-isotopische nucleofiele uitwisselingsreactie

4.3.2.2 Initiële parameters

Drie verschillende oplossingen worden aangemaakt: A: een oplossing van het mengsel 5-chloor-7-broom- en 7-chloor-5-broomkynureninezuur (10 mg) in ethanol (10 ml), B: een oplossing van kopersulfaat (100 mg, 0.4 mmol) in water (10 ml), C: een waterige oplossing (10 ml) die tinsulfaat (43 mg, 200 μmol), gentisinezuur (308 mg, 2 mmol), citroenzuurmonohydraat (420 mg, 2 mmol) en azijnzuur (1 ml) bevat.

In een conische reactievial van 1 ml wordt een oplossing van het mengsel van 5-broom-7-chloor-en 7-broom-5-chloorkynureninezuur (600 μl, 2 μmol waarvan ± 1 μmol 5-broom-7-chloorkynureninezuur) gebracht. Hieraan worden achtereenvolgens oplossing B (25 μl), oplossing C (100 μl), azijnzuur (65 μl) en tenslotte I-123 isotoop (± 20 μCi) toegevoegd. De vial, afgesloten met een schroefdop voorzien van een septum, wordt 15 minuten in een ultrasoonbad geplaatst, gedurende 15 minuten doorborreld met stikstof en gedurende 1 uur in een waterbad (100 °C) geplaatst. Na reactie wordt de vial afgekoeld onder koud water en wordt een deel (100 μl) van het synthesemengsel ingespoten op HPLC voor de bepaling van het radiochemisch rendement en voor de bepaling van de optimale syntheseparameters.

4.3.2.3 HPLC-analyse

De condities waaronder de chromatografie gebeurt zijn weergegeven in tabel 4.10.

<i>Tabel 4.10</i>		<i>Analytische HPLC condities</i>	
	Kolom	:	
Machery-Nägel, Nucleosil RP-18,			
125 x 4.6 mm, 5 µm			
	Eluens	:	
H ₂ O/DMF/AcCN/TFA			65/20/15/0.1
	Debiet	:	
1,5 ml/min			
	Detectie	:	UV
254 nm en NaI(Tl) detector			
	Retentietijden	:	7-
broom-5-chloor: 4.5 min			
5-broom-7-chloor: 4.7 min			
7-chloor-5-[¹²³ I]joodkyna: 7.2 min			

4.3.2.4 Bepaling radiochemisch rendement

Het radiochemisch rendement wordt bepaald door het inspuiten van een bepaalde hoeveelheid van het synthesesmengsel op de analytische HPLC-kolom (Tabel 4.10). Het eluens wordt opgevangen in fracties van 0.5 ml (collectietijd: 20 sec) en van deze fracties wordt de radioactiviteit geteld in een éénkanaalsgamma-spectrometer. Het radiochemisch rendement wordt berekend als de hoeveelheid radioactiviteit afkomstig van de gesynthetiseerde tracer gedeeld door de totale radioactiviteit en vermenigvuldigd met 100.

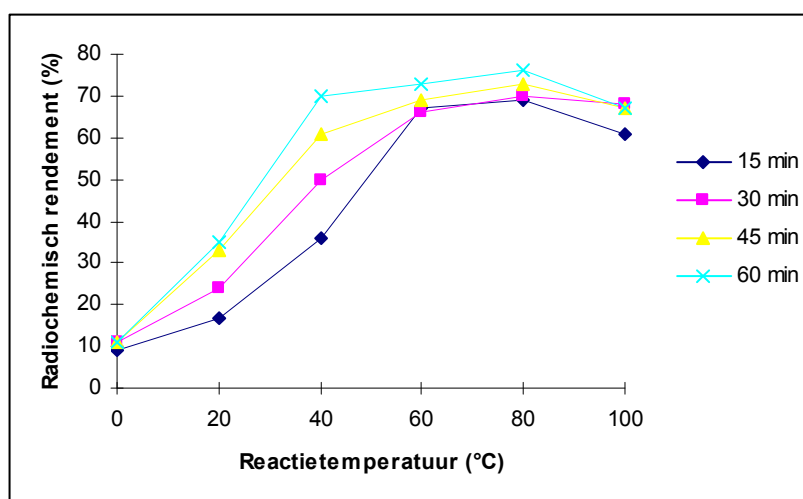
4.3.2.5 Optimalisatie van de parameters

Optimalisatie reactietijd en -temperatuur

Omdat bij de syntheses van de andere radioactieve componenten werd waargenomen dat reactietijd en -temperatuur moeilijk onafhankelijk van elkaar kunnen worden geoptimaliseerd gebeurt de optimalisatie ook hier samen. Aan 600 µl oplossing A (2 µmol mengsel, waarvan ± 1 µmol 5-broom-7-chloorkynureninezuur) wordt in een vial 25 µl oplossing B (1 µmol kopersulfaat), 100 µL oplossing C en 65 µl azijnzuur toegevoegd. Na additie van 10 µl jood-123 isotoop wordt de vial 15 minuten in een ultrasoonbad geplaatst en 15 minuten doorborreld met stikstof. Bepaling van de optimale tijd en temperatuur wordt bepaald door injectie van 100 µl mengsel in het analytisch HPLC-systeem (Tabel 4.10) van syntheses met verschillende reactietijden (15-60 min) en verschillende reactietemperaturen (0-100 °C). De gemiddelde waarden van minstens 3 syntheses - zonder standaarddeviaties (< 5 %) omwille van de duidelijkheid - worden weergegeven in figuur 4.22.

Figuur 4.22 vertoont hetzelfde patroon als figuur 4.10. Tot 60 °C is er een gevoelige stijging van het rendement en vanaf 60 °C is de stijging veel minder uitgesproken. Boven 80 °C treedt er een daling van het rendement op, waarvan de vermindering van de stabiliteit van de precursor de vermoedelijke oorzaak is. Verwarming van het reactiemengsel gedurende 1 uur bij 80 °C geeft het beste rendement en wordt voor de volgende optimalisaties gebruikt.

Zoals bij de optimalisaties van de syntheseparameters van [⁷⁷Br] 5,7-dibroom- en 7-broom-5-[¹²³I]-joodkynureninezuur zal ook hier het verlies aan radioactiviteit door verval beperkt blijven door de lange halfwaardetijd van het isotoop (13,2 uur) in vergelijking met de reactietijd.

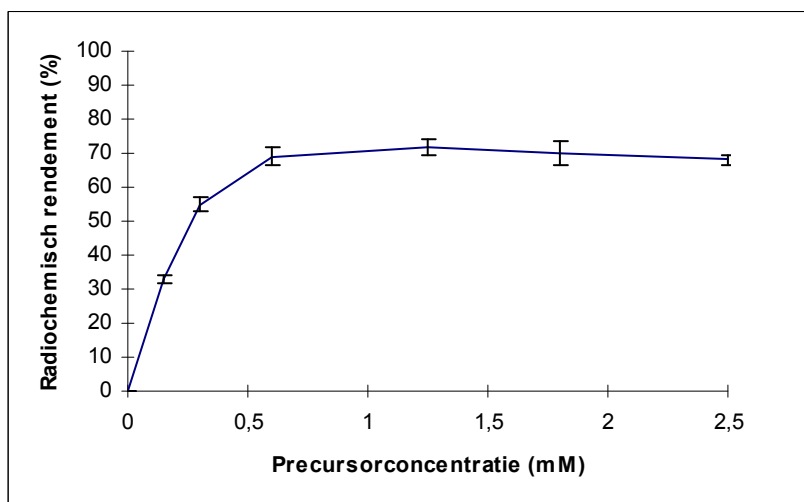


Figuur 4.22 Invloed van de reactietijd en -temperatuur op het radiochemisch rendement van de synthese van 7-chloor-5-[¹²³I]-joodkynureninezuur

Optimalisatie precursorconcentratie

Hiervoor wordt aan verschillende hoeveelheden van oplossing A (0 - 4 µmol mengsel, waarvan ongeveer de helft 5-broom-7-chloorkynureninezuur), opgelost in 600 µl ethanol, 25 µl oplossing B (1 µmol kopersulfaat), 100 µl oplossing C en 65 µl azijnzuur toegevoegd. Na additie van I-123 isotoop wordt de vial achtereenvolgens in een ultrasoonbad geplaatst (15 min), met stikstof doorborreld (15 min) en verhit op 80 °C (60 min). Na afkoeling wordt 100 µl ingespoten op HPLC ter bepaling van het rendement. De resultaten hiervan zijn weergegeven in figuur 4.23.

Vanaf een hoeveelheid van 0,5 µmol (= 0,6 mM) aan 5-broom-7-chloorkynureninezuur werd ≥ 70 % rendement verkregen. Toevoeging van meer dan 1 µmol (= 1,25 mM) gaf echter aanleiding tot een neerslag in het reactiemengsel wat een vermindering in het rendement voor gevolg had. 1 µmol precursor werd dan ook gebruikt voor de optimalisatie van de koper(II)sulfaatconcentratie.

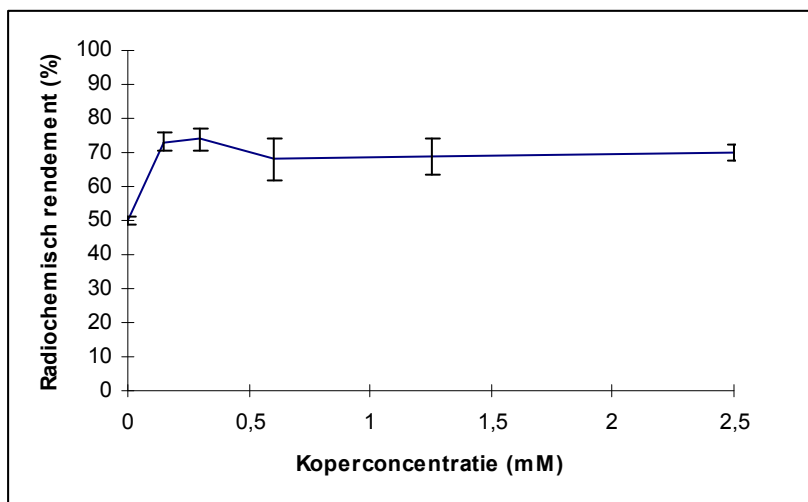


Figuur 4.23 Invloed van de precursorconcentratie op het radiochemisch rendement van de synthese van 7-chloor-5-[¹²³I]-joodkynureninezuur

Optimalisatie koper(II)sulfaatconcentratie

Om de invloed van het koper(II)sulfaat op het rendement van de reactie na te gaan worden verschillende hoeveelheden van oplossing B (0-2 μmol kopersulfaat) toegevoegd aan een mengsel van 1 μmol precursor opgelost in 600 μl ethanol, 100 μl oplossing C en 65 μl azijnzuur. Joodisotoop wordt eveneens toegevoegd, waarna de vial wordt gesloten, in een ultrasoonbad geplaatst en met stikstof doorborreld. Na verwarmen gedurende 60 minuten op 80 °C wordt de vial afgekoeld en 100 μl mengsel wordt geanalyseerd. De resultaten hiervan worden weergegeven in figuur 4.24.

Zoals reeds bij de vorige optimalisaties werd waargenomen blijkt de aanwezigheid van koper(II)sulfaat in het reactiemengsel niet noodzakelijk voor de uitwisseling. Bij afwezigheid van koper(II)sulfaat wordt 50 % rendement verkregen. Een minimale concentratie (0.15 mM) blijkt te volstaan voor het verkrijgen van rendementen rond 70 %. Het gehalte koper(II)sulfaat verhogen geeft geen verbetering zodat 1,2 μmol koper(II)sulfaat wordt gebruikt in de syntheses voor de dierexperimenten.



Figuur 4.24 Invloed van de koperconcentratie op het radiochemisch rendement van de synthese van 7-chloor-5- ^{123}I -joodkynureninezuur

4.3.2.6 Geoptimaliseerde tracersynthese en zuiveringsprocedure

1 μmol precursor opgelost in 600 μl ethanol, toegevoegd aan 1,2 μmol koper(II)sulfaat opgelost in 25 μl water, 100 μl oplossing C en 65 μl azijnzuur wordt verhit op 80 °C gedurende 60 minuten. De gevormde radioactieve component wordt van de overige producten gescheiden met HPLC (Tabel 4.9) en voor de verdere afwerking wordt gebruik gemaakt van een opzuivering met een Extract-Clean-kolom, waarvan de volledige procedure beschreven is in deel 4.2.1.8.

4.3.2.7 Chemische en radiochemische zuiverheid

Voor de bepaling van de chemische en radiochemische zuiverheid wordt een gezuiverde traceroplossing ingespoten op een analytische HPLC- kolom. De HPLC condities zijn dezelfde als beschreven in tabel 4.10 (4.3.2.3). Analyse van de gezuiverde oplossing gaf steeds een (radio)chemische zuiverheid $\geq 95\%$.

4.3.2.8 Bepaling specifieke activiteit

De bepaling gebeurt bij de kwaliteitscontrole van de gezuiverde tracer (analytische HPLC kolom). Enerzijds wordt de piek van de radioactieve component opgevangen en geteld op radioactiviteit en anderzijds wordt de hoeveelheid aanwezige component berekend door injectie van een standaard. Analyse van de gezuiverde oplossing gaf steeds een specifieke activiteit van ongeveer 1 Ci / μmol of 37 GBq / μmol , wat voldoende is voor visualisatie met SPECT.

4.3.2.9 Andere synthesesmogelijkheden

Naast de hier gebruikte 'Cu⁺-gesteunde' nucleofiele uitwisselingsreactie in zuur en reducerend midden zijn in de literatuur nog andere synthesesmogelijkheden beschreven (zie 2.2.1). Enkele hiervan werden toegepast voor de synthese van 7-chloor-5-[¹²³I]-joodkynureninezuur. De resultaten van de verschillende syntheses worden hieronder kort besproken.

Met jodide

Bij deze methode wordt bij de precursor, opgelost in ethanol, enkel jodide-isotoop toegevoegd en het mengsel wordt verwarmd op verschillende temperaturen gedurende bepaalde tijden. Bij temperaturen tussen 0 en 60 °C werd geen tracer gevormd na 1 uur reactietijd. Bij 80 °C werd 0-5 % tracer gevormd na 45 minuten en na 30 minuten bij 100 °C tenslotte was het rendement 0-15 %.

Met koper(I)chloride

Hier wordt bij de precursor, opgelost in dimethylsulfoxide (DMSO), naast het jodide-isotoop ook koper(I)chloride toegevoegd. Gelijkaardige resultaten worden bekomen als bij de vorige methode: geen reactie bij temperaturen lager dan 60 °C, ongeveer 10 % rendement na 45 minuten bij 80 °C en ongeveer 15 % na 30 minuten bij 100 °C.

Met koper (II)

De laatste methode die toegepast wordt is de uitwisseling in aanwezigheid van Cu²⁺ (kopernitraat) en azijnzuur. Het rendement van de verschillende syntheses bleek onafhankelijk van de tijd: bij 60, 80 en 100 °C werden bij reactietijden tussen 15 en 60 minuten respectievelijk 0, 10 en 20 % rendement verkregen.

Uit bovenstaande resultaten blijkt duidelijk dat bij de andere in de literatuur beschreven methodes, toegepast voor de synthese van 7-chloor-5-[¹²³I]-joodkynureninezuur, rendementen bekomen worden die beduidend lager liggen dan wanneer de uitwisseling in zuur en reducerend milieu wordt gebruikt.

4.3.3 Dierexperimenten¹¹

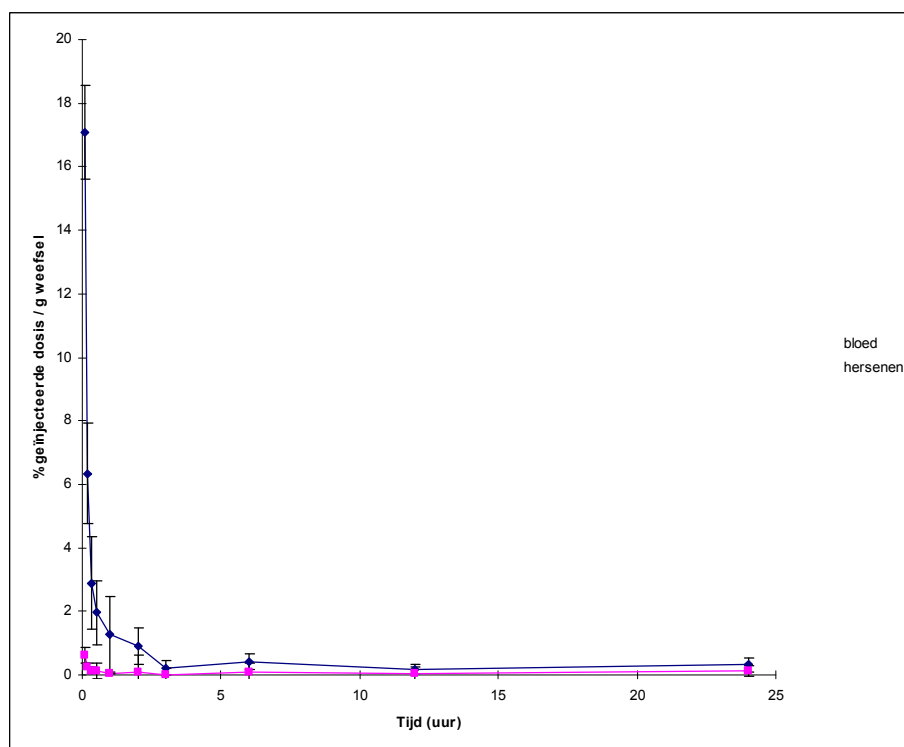
4.3.3.1 Biodistributie

Experimenteel

Ongeveer 2 μCi 7-chloor-5- ^{123}I -joodkynureninezuur opgelost in 100-200 μl ethanol/water (10/90) wordt ingespoten in de staartvenen van 3 reeksen van 10 witte muizen (NMRI, 20-25 g) van beide geslachten. 5, 10, 20 en 30 minuten en 1, 2, 3, 6, 12 en 24 uur na injectie worden de muizen gedood na anesthesie met diëthylether. Bloed wordt afgenomen, organen en weefsels worden weggenomen, gewogen en geteld op radioactiviteit.

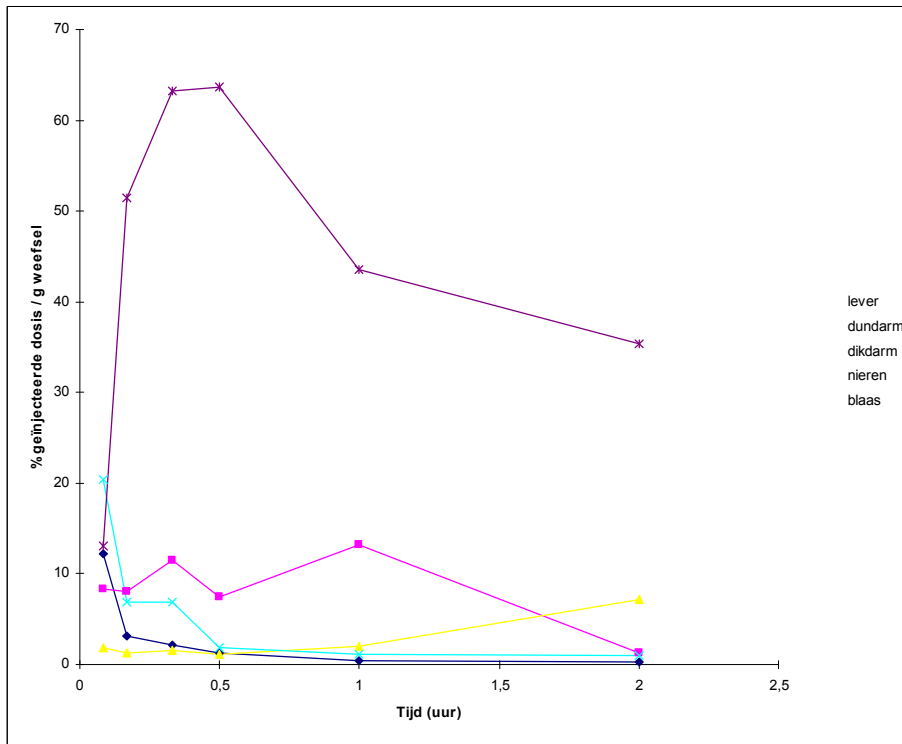
Resultaten

Het biodistributie- en excretiepatroon is weergegeven in 3 figuren. Figuur 4.25 toont de verdeling van de radioactiviteit in bloed en hersenen, figuur 4.26 de verdeling in de verschillende excretie-organen en figuur 4.27 tenslotte de excretie in functie van de tijd. De resultaten voor de biodistributie zijn vermeld als % van de geïnjecteerde dosis per gram orgaan, terwijl voor de excretie de waarden als % van de geïnjecteerde dosis worden uitgedrukt. Alle waarden zijn gecorrigeerd voor achtergrondstraling en radioactief verval.



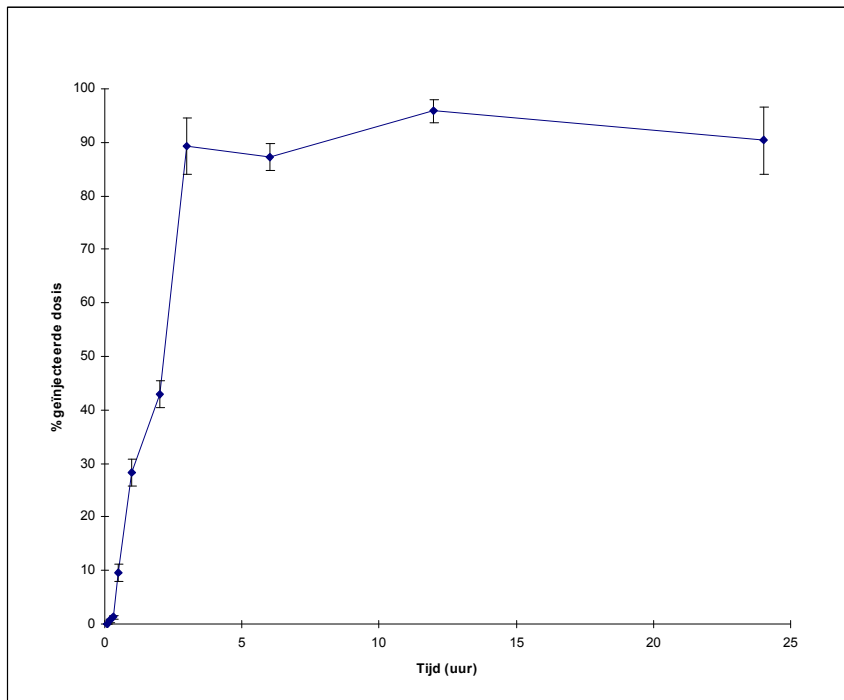
Figuur 4.25 Verdeling van radioactiviteit in bloed en hersenen na injectie van 7-chloor-5- ^{123}I -joodkynureninezuur

Zoals bij de twee voorgaande tracers, $[^{77}\text{Br}]$ 5,7-dibroomkynureninezuur en 7-broom-5- $[^{123}\text{I}]$ -joodkynureninezuur (Figuren 4.10 en 4.17) blijkt ook hier de hersenactiviteitscurve nooit de bloedactiviteitscurve te overschrijden zodat eveneens kan worden geconcludeerd dat de radioactiviteit de bloedhersenbarrière niet passeert. Dezelfde oorzaken liggen aan de basis: het te hydrofiele karakter van de component, de te vlugge metabolisatie of een combinatie van beide, waardoor het product niet tot in de hersenen doordringt.



Figuur 4.26 Verdeling van radioactiviteit in excretieorganen na injectie van 7-chloor-5- $[^{123}\text{I}]$ -joodkynureninezuur

Uit de verdeling van de radioactiviteit over de excretieorganen blijkt dat de excretie volledig identiek verloopt als bij de andere radiogelabelde component, 7-broom-5- $[^{123}\text{I}]$ -joodkynureninezuur (Figuur 4.18). Het grootste gedeelte van de radioactiviteit wordt geëxcreteerd via de nieren en de blaas terwijl de faecale excretie slechts een kleine bijdrage levert. De passage doorheen de gastro-intestinale organen kan eveneens duidelijk worden gevolgd. Vermindering van activiteit in de lever wordt gevolgd door een stijging in de dunne darm en vervolgens in de dikke darm.



Figuur 4.27 Excretie van radioactiviteit na injectie van 7-chloor-5- ^{123}I -joodkynureninezuur

Reeds 30 minuten na injectie van de tracer wordt de eerste activiteit waargenomen in de excretie, terwijl na 2 uur meer dan 90 % van de activiteit blijkt te zijn uitgescheiden. Uit figuur 4.26 en 4.27 kan dus worden geconcludeerd dat er snelle urinaire excretie plaatsgrijpt na injectie van 7-chloor-5- ^{123}I -joodkynureninezuur.

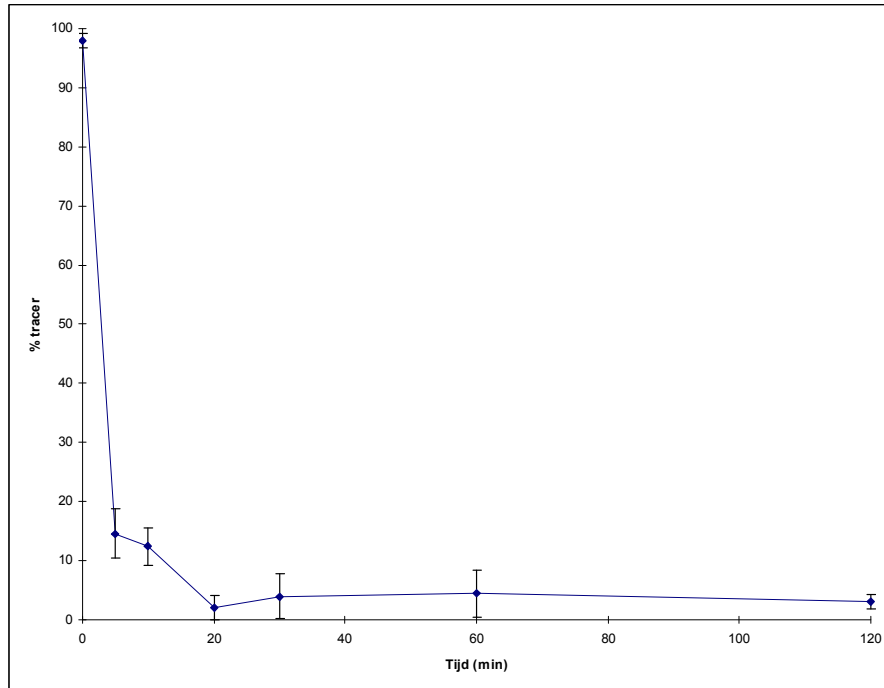
4.3.3.2 Metabolisatie

Experimenteel

In de staartvenen van drie reeksen witte muizen (NMRI, 20-25 g) van beide geslachten wordt 100 - 200 μCi 7-chloor-5- ^{123}I -joodkynureninezuur, opgelost in 200-300 μl ethanol/water (10/90), ingespoten. 5, 10, 20 en 30 minuten en 1, 2, 3, 6, 12 en 24 uur na injectie worden de muizen gedood. Bloed wordt afgenomen en gecentrifugeerd (3 min bij 3000 g) en aan 200 μl plasma wordt 800 μl acetonitrile toegevoegd. Na vortexen gedurende 10 seconden wordt het mengsel gecentrifugeerd gedurende 3 minuten bij 3000 g. De pellet en het supernatans worden van elkaar gescheiden. Het extractierendement wordt berekend als de radioactiviteit aanwezig in het supernatans gedeeld door de totaal aanwezige radioactiviteit in pellet en supernatans, vermenigvuldigd met 100. Om te controleren of de metabolisatie niet plaats grijpt tijdens het extractieproces wordt aan blanco bloed – van muizen niet ingespoten met 7-chloor-5- ^{123}I -joodkynureninezuur - 1 μCi 7-chloor-5- ^{123}I -joodkynureninezuur toegevoegd. De extractiemethode voor de blanco's is dezelfde als hierboven beschreven. Van elke extractie wordt 750 μl ingespoten op een HPLC systeem, waarvan de parameters beschreven zijn in tabel 4.9 (4.3.1.4). Alle radioactieve componenten worden gecollecteerd en geteld op radioactiviteit.

Resultaten

De resultaten, uitgedrukt als resterend procent van de geïnjecteerde dosis in functie van de tijd, zijn weergegeven in figuur 4.28



Figuur 4.28 Metabolisatie van 7-chloor-5- ^{123}I -joodkynureninezuur in functie van de tijd

Enerzijds wordt in 'blanco' bloed $\geq 90\%$ van de ingespoten tracer teruggevonden en anderzijds liggen de extractierendementen van zowel blanco's als stalen hoger dan 90% zodat een betrouwbare analyse van de metabolieten kan worden uitgevoerd.

Slechts 15% van de oorspronkelijke dosis wordt 5 minuten na injectie van 7-chloor-5- ^{123}I -joodkynureninezuur in het bloed teruggevonden. Daarna blijft de hoeveelheid tracer nagenoeg constant. Deze snelle metabolisatie is, samen met het te polaire karakter van de component, vermoedelijk de oorzaak dat het radioactieve product niet doordringt tot in de hersenen.

Zowel bij het ^{77}Br 5,7-dibroom-, het 7-broom-5- ^{123}I -jood- als het 7-chloor-5- ^{123}I -joodkynureninezuur verloopt de synthese met radiochemische rendementen groter dan 85% . In de drie gevallen is er echter een uitgesproken afbraak (naar alle waarschijnlijkheid een dehalogenatie) *in vivo* waar te nemen. Bij onderzoek naar de stabiliteit van de precursor voor de synthese van het 7-broom-5- ^{123}I -joodkynureninezuur blijkt dat er eveneens een dehalogenatie optreedt op plaats 5 van 5,7-dibroomkynureninezuur. Uitwisselingen op plaats 7 van de verschillende molecules daarentegen blijken met de gebruikte methodes niet te gebeuren. Deze plaats is namelijk minder geactiveerd dan plaats 5. Synthese van de 3 geselecteerde molecules met de isotoop op plaats 7 zou een oplossing kunnen zijn voor het stabiliteitsprobleem *in vivo*. Een andere mogelijkheid zijn de monogesubstitueerde 7-dihydroquinolines. De stabiliteit van deze componenten is waarschijnlijk ook groter en dus zouden ze misschien meer geschikt zijn als mogelijke NMDA receptor tracers.

Referenties

1. Mertens J, Vanryckegem W, Gysemans M, Eersels J, Finda-Panek E, Carlsen L. *Eur J Nucl Med*, **1987**, 13, 380-381.
2. Gysemans M, Mertens J. *J Labeled Comp Radiopharm*, **1991**, 30, 364 (abstract).
3. Mertens J, Gysemans M *New Trends in Radiopharmaceutical Synthesis, Quality Assurance and Regulatory Control. Edited by A.M. Emran, Plenum Press, New York, 1991*, 53-65.
4. Leeson PD, Baker R, Carling RW, Curtis NR, Moore KW, Williams BW, Foster AC, Donald AE, Kemp JA, Marshall GR *J Med Chem*, **1991**, 34, 1243-1252.
5. Leeson PD, Iverson LI *J Med Chem*, **1994**, 37, 4053-4067.
6. Manske RH *Chem Rev*, **1942**, 30, 113-144.
7. Reitsema RH *Chem Rev*, **1948**, 43, 43-68.
8. Dumont F, Slegers G *Bull Soc Chim Belg*, **1995**, 104(8), 505-507.
9. Dumont F, Slegers G *J Labelled Comp Radiopharm*, **1996**, 38(9), 795-802.
10. Dumont F, Slegers G *J Radioanal Nucl Chem*, **1997**, 218(2), 239-241.
11. Dumont F, Slegers G *Appl Radiat Isot*, **1997**, 48(9), 1173-1177.

Hoofdstuk 5

De perifere benzodiazepinereceptor

5.1 Types benzodiazepinereceptoren

In 1977 identificeerden ligandbindingstudies benzodiazepinereceptoren in hersenen van ratten door gebruik te maken van [³H]diazepam¹⁻². Gelijkaardige receptoren werden eveneens gekarakteriseerd in humane hersenen met behulp van [³H]flunitrazepam³. De anxiolytische en anticonvulsieve eigenschappen van benzodiazepines kwamen overeen met hun affiniteit voor deze centrale benzodiazepinereceptor (CBR)⁴⁻⁶. Verdere farmacologische karakterisering leidde tot de opsplitsing in twee groepen, met name CBR₁ en CBR₂, gebaseerd op hun affiniteit voor het triazolopyridazine CL 218,872⁷⁻⁹ (CBR₁ heeft een 5-10 maal grotere affiniteit voor CL 218,872 dan CBR₂). CBR₁ is aanwezig in het cerebellum en werd later ook de ω₁-receptor genoemd terwijl CBR₂ aanwezig is in de hippocampus en de naam kreeg van ω₂-receptor. Latere studies toonden echter de noodzaak aan om deze onderverdeling nog verder uit te werken.

Er werd aangenomen dat de belangrijke anxiolytische en anticonvulsieve effecten van de benzodiazepines gemedieerd werden door receptoren enkel en alleen gelokaliseerd in het centraal zenuwstelsel. In perifeer weefsel van ratten, gebruikt als negatieve controle, werd echter ook een hoge affiniteit voor [³H]diazepam waargenomen. Deze perifere bindingsplaatsen waren wel farmacologisch verschillend van de CBR's^{1,9,10-12}. Gebaseerd op hun localisatie buiten het centraal zenuwstelsel en hun hoge affiniteit voor verschillende 1,4-benzodiazepines werden deze bindingsplaatsen 'perifeer-type' benzodiazepine bindingsplaatsen of 'perifeer-type' benzodiazepinereceptoren (PBR) genoemd. Gelukkig werd bij de eerste studies gebruik gemaakt van perifeer weefsel van ratten, want PBR's in veel andere species vertonen slechts een heel lage affiniteit voor benzodiazepines zodat deze perifere bindingsplaatsen nooit door radiogemerkte liganden zouden zijn gedetecteerd. Latere studies toonden ook PBR's in het centraal zenuwstelsel aan¹¹⁻¹³. Naast de 'perifere benzodiazepinereceptor' werden verschillende namen voorgesteld voor deze receptor: de mitochondriën benzodiazepine receptor, de ω₃-receptor en de mitochondriën diazepam binding inhibitor receptor. In het verloop van deze thesis wordt echter steeds de 'perifere benzodiazepinereceptor' gebruikt.

5.2 Distributie van PBR's - microglia - macrofagen

Perifere benzodiazepine-receptoren zijn wijd verspreid in perifere organen zoals nieren¹⁴, hart¹⁵ bijnieren¹⁶ en testes¹⁷, maar komen slechts heel sporadisch voor in het centraal zenuwstelsel. PBR's komen vooral voor op de buitenmembraan van mitochondriën^{12,15,42} en werden daarom eerst 'mitochondriën benzodiazepinereceptor' genoemd. Deze naam is echter niet correct aangezien PBR's ook voorkomen op andere intracellulaire structuren⁴³ en tevens op rode bloedcellen⁴⁴, die geen mitochondriën bezitten. In de hersenen zijn PBR's vooral aanwezig in periventriculaire gebieden zoals de choroid plexus, area postrema en ependyma¹⁸. Lagere hoeveelheden komen voor in hersenparenchym¹⁹. Deze verdeling, samen met *in vitro* studies²⁰⁻²⁶, deed veronderstellen dat PBR's voorkomen op niet-neurale gliacellen zoals astrocyten^{20,26} en macrofagen²⁷⁻²⁸.

Eén van de karakteristieken van gliacellen is hun activatie in een heel vroeg stadium als respons op verwondingen in het centraal zenuwstelsel²⁹⁻³². Activatie van microglia gaat meestal reacties van andere types cellen in de hersenen vooraf. Ze reageren niet alleen op structurele veranderingen in de hersenen, maar op heel kleine wijzigingen die pathologische veranderingen voorafgaan³³. Waarschijnlijk ligt het unieke geheel van membraankanalen van de microglia hier aan de basis³⁴⁻³⁵. Tevens bezitten ze receptoren voor verschillende soorten moleculen, zoals ATP³⁶⁻³⁷, CGRP³⁸ en noradrenaline³⁹. Door het feit dat ze selectief reageren op moleculen die tussenkomen in neurotransmissie kunnen ze in een soort van rusttoestand hun omgeving controleren op fysiologische integriteit en snel reageren op eventuele pathologische veranderingen. Deze snelle omvorming van de rusttoestand tot een geactiveerde toestand is reeds lang gekend⁴⁰. Het is deze geactiveerde toestand van de microglia die een rol speelt in het herstel van weefsel na verwondingen zoals de macrofagen dit doen in perifere organen.

Injectie van een neuronale excitotoxine doet de PBR-concentratie aan de rand van de geïnduceerde necrose tot 12 maal toenemen⁴¹. Verhoging in PBR-concentratie werd eveneens waargenomen bij verschillende neuropathologische aandoeningen (cfr. 5.5). Daarom werd vooropgesteld dat hoge densiteiten van PBR's in beschadigd weefsel gebruikt kunnen worden als een indicator voor schade in het centraal zenuwstelsel.

5.3 De PBR's: functie en endogene liganden

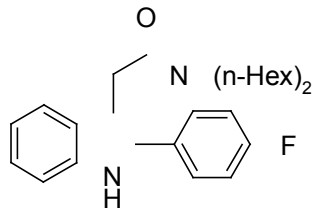
In perifere organen zouden PBR's een rol spelen in de inhibitie van cellulaire proliferatie⁴⁵, de controle van het immuunsysteem⁴⁶⁻⁴⁸, porfyriene transport en heembiosynthese⁴⁹, aniontransport⁵⁰ en regeling van de steroid biosynthese⁵¹. De functie van PBR's in het centraal zenuwstelsel daarentegen is nog niet gekend.

Diazepam binding inhibitor (DBI), een polypeptide, werd het eerst ontdekt als endogene ligand die de binding van diazepam aan hersenmembranen en GABA-geactiveerde chloridekanaalopeningen blokkeert⁵²⁻⁵³. Het heeft ongeveer dezelfde affiniteit voor de CBR als voor de PBR en het is dus niet selectief. DBI zou de steroidsynthese stimuleren door middel van de PBR⁵⁴. Trikontatetraneuropeptide, een fragment van DBI, is meer selectief voor de PBR⁵². Verschillende porfyrienes, hemoglobine en heemproteïnes bleken eveneens affiniteit te vertonen voor de receptor⁵⁵. De meest recent ontdekte reeks van endogene liganden zijn enkele benzodiazepine gelijkende moleculen die voorkomen in de hersenen van ratten en mensen⁵⁶.

5.4 Liganden

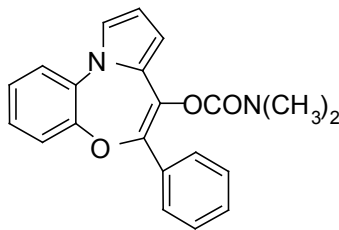
Verschillende synthetische componenten met name benzodiazepines, isoquinolines en imidazopyridines interageren reversibel met perifere benzodiazepine-receptoren. De drie klassen zijn tevens reversibele competitieve inhibitoren van elkaars binding.

De groep van de **benzodiazepines** heeft echter een lage affiniteit in veel species met uitzondering van de meeste knaagdieren. Benzodiazepines zoals 4'-chlorodiazepam (**1**), diazepam (**1**), flunitrazepam (**2**) en clonazepam (**3**) werden oorspronkelijk gebruikt voor de karakterisering van de PBR van de rat die een unieke rangschikking voor benzodiazepine affiniteit heeft in vergelijking met de CBR van de rat^{1,9-13}. De karakteristieke rangschikking van de benzodiazepines voor wat betreft affiniteit voor de PBR van de rat is 4'-chlorodiazepam > diazepam > flunitrazepam >>> clonazepam, met dissociatieconstanten gaande van 6nM voor de eerste tot meer dan 10 µM voor de laatste. De rangschikking voor wat betreft affiniteit voor de CBR van de rat is echter totaal



Figuur 5.4 Structuurformule van FGIN-1-27

De laatste jaren werd een nieuwe reeks PBR liganden gesynthetiseerd op basis van een **pyrolobenzoxapineskelet**⁷⁶. Een voorbeeld van deze reeks is het NF 182.



Figuur 5.5 Structuurformule van NF 182

Andere componenten die eveneens affiniteit vertonen voor de PBR zijn porfyrynes⁷⁷, pyrethoid insecticides⁷⁸, hydropyridines⁷⁹, sommige steroides⁸⁰ en linaan⁸¹.

5.5 PBR's en hersenen

De verhoging van het aantal PBR's in enkele hersenpathologiën werd reeds bestudeerd aan de hand van experimentele *in vitro* studies, post mortem onderzoeken en *in vivo* studies met C-11 en F-18 gemerkt tracers. Hieronder volgt een kort overzicht van de verschillende resultaten.

Multiple Sclerosis

In vivo studies met [¹¹C]-PK11195 bij 15 patiënten met chronische multiple sclerosis toonde een verhoging van de binding van de tracer aan in gebieden van de hersenen waar eveneens een verandering bij MRI-beelden werden waargenomen. Er werden zelfs geactiveerde microglia gedetecteerd in zones met een normaal MRI signaal⁸²⁻⁸³. Dit betekent dat *in vivo* onderzoek met deze tracer een zeer gevoelige methode is voor het opsporen van de ziekteactiviteit.

Ziekte van Alzheimer

In vitro studies met post-mortem stalen en [³H] PK11195 toonden een verhoging aan van perifere benzodiazepinebinding in de cerebrale cortex van Alzheimer patiënten⁸⁴. Deze stijging werd vooral waargenomen in de temporale cortex en in mindere mate in de frontale cortex. Deze bevindingen konden echter niet worden doorgetrokken *in vivo*, want PET onderzoek met [¹¹C]-PK11195 kon de aanwezigheid van microgliose of cellulaire inflammatie bij patiënten met een lichte tot middelmatige vorm van de ziekte van Alzheimer niet aantonen⁸⁵.

Hersentumoren

Experimentele en humane post-mortem studies toonden een grote densiteit aan van PBR's in hersentumoren, zodat deze receptoren zouden kunnen gebruikt worden voor het aantonen van celdensiteit in humane hersentumoren⁸⁶⁻⁹¹. Zo kon worden aangetoond dat bij een patiënt met glioblastoma de [¹¹C]-PK11195 binding dubbel zo groot was in de tumor als in normale grijze zone en dat 30 % van de binding kon worden verdrongen door toediening van een grote overmaat niet-radioactieve component⁹²⁻⁹⁴. Bij [¹¹C]-4-chloordiazepam was de opname in glioma's, astrocytoma's en meningioma's echter lager dan in hersenregio's gebruikt voor controle⁹⁵⁻⁹⁶. *In vitro* studies toonden nochtans grote hoeveelheden PBR's in deze tumoren aan. Met het radiogefluoreerde analoog 3-^[18F]-fluorodiazepam werden gelijkaardige resultaten waargenomen. Deze bevindingen kunnen wellicht verklaard worden door de speciesverschillen in de affiniteit van de componenten voor de PBR.

Beroerte

Een studie in The Lancet toonde aan dat bij een patiënt met een beroerte de verhoging van macrofagen ten gevolge van een respons op hersenbeschadiging kan worden gevisualiseerd met PET en ¹¹C-PK11195⁹⁷.

5.6 PBR's en hart

Een studie met calciumkanaalblockers (verapamil, diltiazem en nitrendipine) en een kaliumkanaalblocker (tetraethylammonium) toonde aan dat de werking van de eerste kon geïnhibeerd worden door PK11195, terwijl het geen effect veroorzaakte op de stimulerende activiteit van TEA. Deze resultaten wijzen op een koppeling van de perifere benzodiazepine receptor met calciumkanalen in het hart⁹⁸.

De eerste beelden van de aanwezigheid van perifere benzodiazepinereceptoren in het hart van honden en humane vrijwilligers werd verkregen door middel van PET en ¹¹C-PK11195⁹⁹.

Bij honden bleef in een tijdspanne van 4 tot 30 minuten na injectie de activiteit in het hart vrijwel constant, terwijl de activiteit in de longen na 30 minuten niet meer te detecteren was. Injectie van een grote dosis niet-gemerkt PK-11195 gaf aanleiding tot een sterke vermindering van radio-activiteit in het hart. Andere agonisten en antagonist van de benzodiazepinereceptor werden eveneens ingespoten; enkel de liganden (RO5-4864 en diazepam) waarvan geweten is dat ze binden aan de perifere benzodiazepinereceptor gaven een inhibitie van de ¹¹C-PK11195 binding. Andere zoals clonazepam en RO15-1788, een centrale antagonist, waren niet in staat in competitie te treden met de gemerkte ligand.

In tegenstelling met de honden werd waargenomen dat bij humane vrijwilligers de activiteit langer in de longen weerhouden werd maar dat het hart vlugger kon worden gevisualiseerd.

5.7 Geselecteerde molecule

Uit verschillende studies bleek dat PK11195 de beste molecule was voor het visualiseren van perifere benzodiazepinereceptoren; het isoquinoline heeft niet enkel een hoge affiniteit voor de receptoren maar is, in tegenstelling tot de andere molecules die interageren met de PBR's, zeer selectief voor de receptor. Vandaar dat het C-11-gemerkte product werd ontwikkeld als een ligand voor de detectie van hersenschade bij mensen. Verschillende studies (cfr. 5.5 en 5.6) hebben de bruikbaarheid van deze tracer aangetoond. Aangezien onderzoek met een C-11-gemerkte tracer echter voorbehouden blijft voor centra die een toegang hebben tot

positronenstralers (en dus tot een cyclotron) en een PET-camera, werd geopteerd om een I-123-gemerkte analoog van PK11195 te maken (Figuur 5.6). Daar er slechts weinig gekend is over deze tracer en gezien zijn potentiële bruikbaarheid in de detectie van cellulaire inflammatie in hart- en hersentraumata met SPECT, hebben we deze component gesynthetiseerd en geëvalueerd. Er dient opgemerkt dat het gebruik van het I-PK11195 een groot voordeel bezit ten opzichte van PK11195. Zowel het [¹²³I] I-PK11195 als het [¹¹C] I-PK11195 (Figuur 5.6) kunnen namelijk worden gesynthetiseerd, zodat dezelfde molecuule zowel voor PET als voor SPECT kan worden gebruikt.



Figuur 5.6 Structuurformules van [¹²³I] iood-PK11195 en [¹¹C] iood-PK11195

5.8 Farmacologie van PK11195

Voor de farmacodynamiek en de farmacokinetiek wordt verwezen naar een studie waarbij PK11195 zowel intraveneus (10 mg) als oraal (100, 200 en 400 mg) werd toegediend aan 10 gezonde vrijwilligers¹⁰⁰. De eliminatie werd gekarakteriseerd door een groot interindividueel verschil in halfleven; het gemiddelde halfleven is 3.72 uur met een range van 0.61 tot 9.27 uur. Eveneens werd verhogingen in de plasma concentratie waargenomen na 8 à 10 uur en na 22 à 24 uur. Dit werd toegeschreven aan de enterohepatische cyclus. De studie toonde ook de afwezigheid van onveranderd PK11195 in de urine aan.

Referenties

1. Braestrup C, Squires RF. *Proc Natl Acad Sci*, **1977**, 74, 3805-3808.
2. Mohler H, Okada T. *Science*, **1977**, 198, 849-851.
3. Speth RC, Wastek GJ, Johnson PC, Yamamura HI. *Life Sci*, **1978**, 23, 859-866.
4. Braestrup C, Squires RF. *Eur J Pharmacol*, **1978**, 48, 263-270.
5. Speth RC, Johnson RW, Regan JW, Reisine TD, Kobayashi RM, Bresolin N, Roeske WR, Yamamura HI. *Fed Proc*, **1980**, 39; 3032-3038.
6. Tallman JF, Paul SM, Skolnick P, Gallager DW. *Science*, **1980**, 207, 274-281.
7. Klepner CA, Lippa AS, Benson DI, Sano MC, Beer B. *Pharmacol Biochem Behav*, **1979**, 11, 457-462.
8. Squires RF, Benson DI, Braestrup C, Coupet J, Klepner CA, Myers V, Beer B. *Pharmacol Biochem Behav*, **1979**, 10, 825-830.
9. Regan JW, Yamamura HI, Yamada S, Roeske WR. *Eur J Pharmacol*, **1980**, 67, 167-168.

10. Regan JW, Yamamura HI, Yamada S, Roeske WR. *Life Sciences*, **1981**, 28, 991- 997.
11. Schoemaker H, Bliss M, Yamamura HI. *Eur J Pharmacol*, **1981**, 71, 473-475.
12. Marangos PJ, Patel J, Boulenger JP, Clark-Rosenberg R. *Mol Pharmacol*, **1982**, 22, 26- 33.
13. Schoemaker H, Boles RG, Horst WD, Yamamura HI. *J Pharmacol Exp Ther*, **1983**, 225, 61-69.
14. Gehlert DR, Yamamura HI, Wamsley JK. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **1985**, 328, 454-460.
15. Anholt RR, De Souza EB, Oster-Granite ML, Snyder SH. *J Pharmacol Exp Ther*, **1985**, 233, 517-526.
16. Benavides J, Malgouris C, Imbault F, Begassat F, Uzan A, Renault C, Dubroeuq MC, Gueremy C, Le Fur G. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **1983**, 266, 38-43.
17. De Souza EB, Anholt RR, Murphy KM, Snyder SH, Kuhar MJ. *Endocrinology*, **1985**, 116, 567-573.
18. Richards JG, Mohler H. *Neuropharmacology*, **1984**, 23, 233-242.
19. Benavides J, Quatreronet D, Imbault F, Malgouris C, Uzan A, Renault C, Dubroeuq MC, Gueremy C, Le Fur G. *J Neurochem*, **1983**, 41, 1744-1750.
20. Syapin PJ, Skolnick P. *J Neurochem*, **1979**, 32, 1047-1051.
21. McCarthy KD, Harden TK. *J Pharmacol Exp Ther*, **1981**, 261, 183-191.
22. Bender AS, Hertz L. *J Neurochem*, **1984**, 43, 1319-1327.
23. Sher PK, Machen VL. *Brain Res*, **1984**, 316, 1-6.
24. Olson JM, Junk L, Young AB, Penny JB, Mancini WR. *Cancer Res*, **1988**, 48, 5837-5841.
25. Black KL, Ikezaki K, Santori EM, Backer DP, Vinters HV. *Cancer*, **1990**, 656, 93-97.
26. Itzhak Y, Baker L, Norenberg M. *Glia*, **1993**, 9, 211-218.
27. Ruff MR, Pert CG, Weber RJ. *Science*, **1985**, 1281-1283.
28. Zavala F, Lenfant M. *Ann NY Acad Sci*, **1987**, 496, 240-249.
29. Perry VH, Andersson PB, Gordon S. *Trends Neurosci*, **1993**, 16, 268-273.
30. Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. *Brain Res Rev*, **1995**, 20, 269-287.
31. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. *Glia*, **1988**, 1, 301-307.
32. McGeer PL. *Acta Neuropathol*, **1988**, 76, 550-557.
33. Gehrman J, Mies G, Bonnekoh P, Banati R, Iijima T, Kreutzberg GW, Hossmann KA. *Brain Pathol*, **1993**, 3, 11-18.
34. Kettenmann H, Hoppe D, Gottmann K, Banati R, Kreutzberg G. *J Neurosci Sci*, **1990**, 26, 278-287.
35. Kettenmann H, Banati R, Walz W. *Glia*, **1993**, 7, 93-101.
36. Walz W, Ilschner S, Ohlmeyer C, Banati R, Kettenmann H. *J Neurosci*, 1993, **1993**, 13, 4403-4411.
37. Langosh JM, Gebicke-Haerter PJ, Norenberg W, Illes P. *Br J Pharmacol*, **1994**, 113, 29-34.
38. Priller J, Haas CA, Reddington M, Kreutzberg GW. *Glia*, **1995**, 15, 447-457.
39. Whitemore ER, Korotzer AR, Etebari A, Cotman CW. *Brain Res*, **1993**, 621, 59-64.
40. Nissl F. *Arch Psych*, **1989**, 32, 1-21.
41. Schoemaker H, Morelli M, Deshmukh P, Yamamura HI. *Brain Res*, **1982**, 248, 396- 401.
42. Anholt RRH, Pederson PL, De Souza EB, Snyder SH. *J Biol Chem*, **1986**, 261, 576-583.
43. O'Beirne GB, Woods MJ, Williams DC. *Eur J Biochem*, **1990**, 188, 131-138.
44. Olson JMM, Ciliax BJ, Mancini WR, Young AB. *Eur J Pharmac*, **1988**, 152, 47-53.
45. Wang JKT, Morgan JI, Spector S. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1984**, 81, 753-756.
46. Wang JKT, Taniguchi T, Sagikura M, Spector S. *Pharmacologist*, **1981**, 23, 160-161.
47. Benavides J, Dubois A, Dennis T, Hamel, Scatton B. *J Pharmac Exp Ther*, **1990**, 249, 333-339.
48. Moynagh PN, O'Neill LAJ, Williams DC. *Biochem Pharmac*, **1993**, 46, 821-827.
49. Verma A, Nye JS, Snyder SH. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1987**, 84, 2256-2260.
50. Basile AS, Leuddens HWM, Skolnick P. *Life Sci*, **1988**, 42, 715-726.

51. De Souza EB, Anholt RRH, Murphy KMM, Snyder SH, Kuhar MJ. *Endocrinology*, **1985**, 116, 567-573.
52. Berkovich A, McPhie P, Campagnone M, Guidotti A, Costa E. *Mol Pharmacol*, **1990**, 37, 164-172.
53. Guidotti A, Toffano G, Costa E. *Nature*, **1978**, 257, 533-535.
54. Besman MJ, Yanagibashi K, Lee TD, Kawamura M, Hall PF, Shively JE. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1989**, 86, 4897-4901.
55. Verma A, Snyder SH. *Mol Pharmacol*, **1988**, 34, 800-805.
56. Rothstein JD, Garland W, Puia G, Guidotti A, Weber RJ, Costa E. *J Neurochem*, **1992**, 58, 2101-2115.
57. Moingeon P, Dessaux JJ, Fellous R, Alberici GF, Bidart JM, Motte P, Bohuon C *Life Sci*, **1984**, 35, 2003-2009.
58. O'Beirne GB, Williams DC *Biochem Pharmacol*, **1984**, 33, 1568-1571.
59. Valtier D, Malgouris C, Gilbert JC, Guicheney PA, Uzan , Gueremy C, LeFur G, Saraux H, Meyer P *Neuropharmacol*, **1987**, 26, 549-552.
60. Olson JM, Ciliax BJ, Mancini WR, Young AB *Eur J Pharmacol*, **1988**, 152, 47-53.
61. Mihara S, Fujimoto M *Life Sci*, **1989**, 44, 1713-1720.
62. Broaddus WC, Bennett JP *Brain Res*, **1990**, 518, 199-208.
63. LeFur G, Perrier ML, Vaucher N, Imbault F, Flamier A, Benavides J, Uzan A, Renault C, Dubroeuq MC, Gueremy C. *Life Sci*, **1983**, 32, 1839-1847.
64. Awad M, Gavish M. *J Neurochem*, **1987**, 49, 1407-1414.
65. Awad M, Gavish M. *J Recept Res*, **1989**, 9, 369-384.
66. Awad M, Gavish M. *J Neurochem*, **1989**, 52, 1880-1885.
67. Awad M, Gavish M. *Biochem Pharmacol*, **1989**, 3843-3849.
68. Eshelman AJ, Murray TF. *J Neurochem*, **1989**, 53, 494-502.
69. Dubroeuq MC, Benavides J, Doble A, Guilloux F, Allam D, Vaucher N, Bertrand P, Gueremy C, Renault C, Uzan A. *Eur J Pharmacol*, **1986**, 128, 269-272.
70. Doble A, Burgevin MC, Menager J, Ferris O, Begassat F, Renault C, Dubroeuq MC, Gueremy C, Uzan A, LeFur G. *J Recept Res*, **1987**, 7, 55-70.
71. French JF, Papoport RM, Matlib MA. *J Cardiovasc Pharmacol*, **1989**, 14, 405-411.
72. Mukhin AG, Papadopoulos V, Costa E, Krueger KE. *Proc Natl Acad Sci*, **1989**, 86, 9813-9816.
73. Langer SZ, Arbilla S, Tan S, Lloyd KG, George P, Allen J, Wick AE. *Pharmacopsychiatry*, **1990**, 23, 103-107.
74. Langer SZ, Arbilla S. *Pharmacol Biochem Behav*, **1988**, 29, 763-766.
75. Romeo E, Auta J, Kozikowski A, Ma A, Papadopoulos V, Puia G, Costa E, Guidotti A. *J Pharmacol Exp Ther*, **1992**, 262, 971-978.
76. Campiani G, Fiorini I, De Filippis MP, Garofalo A, Nacci V, Ciani SM, Greco G, Novellino E, Williams DC, Zisterer DM, Woods MJ, Mihai C, Manzoni C, Mennini T. *J Med Chem*, **1996**, 39, 3435-3450.
77. Verma A, Nye JS, Snyder SH. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1987**, 84, 2256-2260.
78. Devaud LL, Murray TF. *J Pharmacol Exp Ther*, **1988**, 247, 14-22.
79. Cantor EH, Kenessey G, Semenuk G, Spector S. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1984**, 81, 1549-1552.
80. Deckert J, Marangos PJ. *Life Sci*, **1986**, 39, 675-683.
81. Zisterer DM, Moynagh PN, Williams DC. *Biochem Pharmacol*, **1996**, 51, 1303-1308.
82. Banati RB, Myers R, Goerres G. *Neurology*, **1997**, 48, A313.
83. Vowinckel E, Reutens D, Becher B, Verge G, Evans A, Owens T, Antel PA. *J Neurosci Res*, **1997**, 50, 345-353.

84. Diorio D, Welner SA, Butterworth RF, Meaney MJ, Surnyi-Cadotte E. *Neurobiol Aging*, **1991**, 12, 255-258.
85. Groom GN, Junck L, Foster NL, Frey KA, Kuhl DE. *J Nucl Med*, **1995**, 36, 2207-2210.
86. Starosta-Rubinstein S, Ciliax BJ, Penney JB. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1987**, 84, 891-895.
87. Olson JNM, Junck L, Young AB. *Cancer Res*, **1988**, 48, 5837-5841.
88. Richfield EK, Ciliax BJ, Starosta-Rubinstein SR. *Neurology*, **1988**, 38, 1255-1262.
89. Black KL, Ikezaki K, Toga AW. *J Neurosurg*, **1989**, 71, 113-118.
90. Benavides J, Cornu P, Dennis T. *Ann Neurol*, **1988**, 24, 708-712.
91. Ferrarese C, Appollonio I, Frigo M. *Ann Neurol*, **1989**, 26, 564-568.
92. Pappata S, Cornu P, Samson Y, Prenant C, Benavides J, Scatton B, Crouzel C, Hauw JJ, Syrota A. *J Nucl Med*, **1991**, 32, 1608-1610.
93. Pappata S, Samson Y, Cornu P, Prenant C, Crouzel C, Benavides J, Levasseur M, Leroy-Willig A, Hauw JJ, Syrota A. *J Cereb Blood Flow Metab*, **1991**, 11, S593.
94. Pappata S, Samson Y, Cornu P, Prenant C, Crouzel C, Benavides J, Levasseur M, Leroy-Willig A, Hauw JJ, Syrota A. *J Nucl Med*, **1991**, 32, 1078.
95. Bergström M, Mosskin M, Ericson K, Ehrin E, Thorell J-O, von Holst H, Norén G, Persson A, Halldin C, Stone-Elander S, Collins VP. *Acta Radiologica (Scand.) (Suppl.)*, **1986**, 409-411.
96. Junck L, Olson JM, Ciliax BJ, Koeppe RA, Watkins GL, Jewett DM, McKeever PE, Wieland DM, Kilbourn MR, Starosta-Rubinstein S, Mancini WR, Kuhl DE, Greenberg HS, Young AB. *Ann Neurol*, **1989**, 26, 752-758.
97. Ramsay SC, Weiller C, Myers R, Cremer JE, Luthra SK, Lammertsma AA, Frackowiak RSJ. *The Lancet*, **1992**, 339, 1054-1055.
98. Mestre M, Carriot T, Belin C, Uzan A, Renault C, Dubroeuq MC, Guérémy C, Doble A, Le Fur G. *Life Sci*, **1985**, 36, 391-400.
99. Charbonneau P, Syrota A, Crouzel C, Valois J-M, Prenant C, Crouzel M. *Circulation*, **1986**, 73 (3), 476-483.
100. Ferry A, Jaillon P, Lecocq B, Lecocq V, Jozefczak C. *Fundam Clin Pharmacol*, **1989**, 3, 383-392.

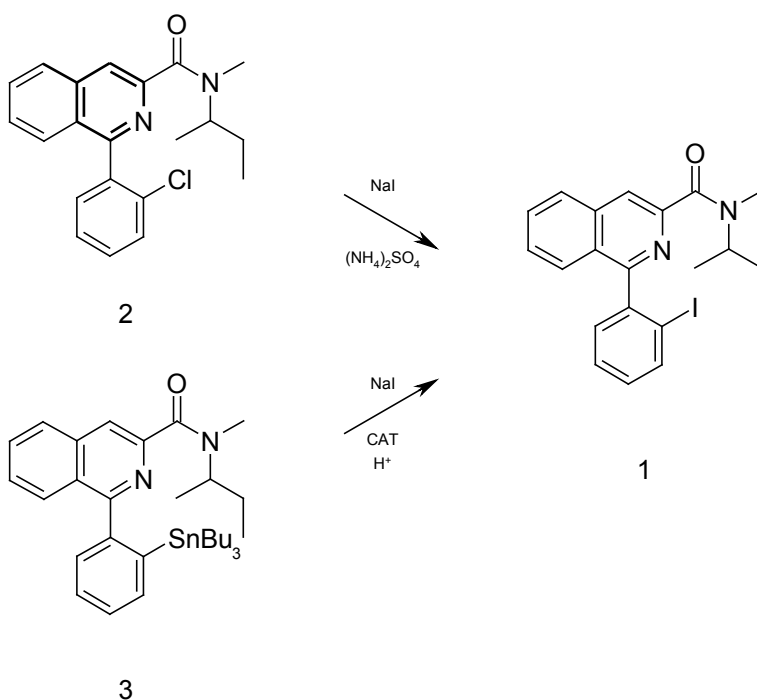
Hoofdstuk 6

Synthese en *in vivo* evaluatie van [¹²³I]-I-PK11195

In dit hoofdstuk worden de synthese, de *in vivo* evaluatie bij proefdieren en gezonde vrijwilligers en het gebruik bij patiënten besproken van I-123 gemerkt I-PK11195, een antagonist van de perifere benzodiazepinereceptor. Een eerste deel behandelt de synthese op mmol-schaal van de standaard en de precursor van de tracer. Vervolgens wordt de volledige radiochemische productie besproken. Dit behelst niet alleen de eigenlijke radiosynthese maar ook de volledige kwaliteitscontrole, zoals radiochemisch rendement, chemische en radiochemische zuiverheid, steriliteit In een derde deel wordt de *in vivo* evaluatie van de tracer in proefdieren bekeken waaronder de verdeling over het lichaam, de verdringing of de verdeling over het lichaam na voorafgaandelijke inspuiting van een overmaat aan niet-radioactief PK11195 en de metabolisatie. Vervolgens worden de verdeling over het lichaam en de metabolisatie bij gezonde vrijwilligers nagegaan en wordt de stralingsbelasting berekend na injectie van een bepaalde dosis van de tracer. In het laatste deel tenslotte worden de *in vivo* resultaten bij patiënten vergeleken met resultaten bij gezonde vrijwilligers.

6.1 Synthese van standaard en precursor

De synthese van het geïodeerde PK11195 (**1**) kan gebeuren op twee verschillende manieren (Schema 6.1). Ofwel kan PK11195 (**2**) als precursor dienen en wordt via een vaste fase transfer het chlooratoom uitgewisseld voor een joodatoom¹. Ofwel wordt eerst een tributyltinderivaat (**3**) aangemaakt om dan via een elektrofile substitutiereactie het gewenste geïodeerde derivaat te bekomen.

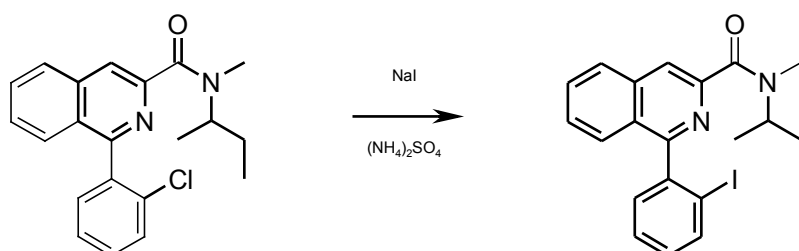


Schema 6.1 Mogelijke syntheses van het I-PK11195 (1).

Het voordeel van de vaste fase transfer is dat het beginproduct (PK11195, **2**) in de handel verkrijgbaar is. Het nadeel daarentegen is dat het een reactie betreft onder extreme omstandigheden¹ (zonder solventen en bij een temperatuur van 230 °C) en dat zowel de reproduceerbaarheid als het rendement aan de lage kant liggen. Voor de elektrofile substitutiereactie moet eerst de precursor (het tributyltinderivaat, **3**) worden aangemaakt, maar de reactie zelf verloopt onder veel mildere omstandigheden. Uiteindelijk wordt geopteerd voor de eerste methode omdat daarmee sneller tracer kon worden aangemaakt en het rendement niet van primordiaal belang is bij de dierexperimenten. Indien later wordt gestart met humane studies kan, indien nodig, voor de andere synthesesmogelijkheid worden gekozen.

Aangezien uitgegaan wordt van het in de handel verkrijgbare PK11195 wordt hieronder enkel de synthese van de standaard, het I-PK11195, via een vaste fase transfer besproken.

Reactieschema



Schema 6.2 Synthese van het I-PK11195 via een vaste fase transfer.

Experimenteel

Een oplossing van PK11195 (3,5 mg, 10 μ mol) in ethanol (3 ml) en een oplossing van ammoniumsulfaat (200 mg, 1.5 mmol) in water (1 ml) worden samengevoegd in een 10-ml borosilicaatvial en gevortext. Aan het mengsel wordt een oplossing van KI (3.3 mg, 20 μ mol) in water (0,5 ml) toegevoegd evenals 50 borosilicaat glaspereels en de vial wordt zonder schroefdop in een oliebad bij 120 °C gebracht. Na 30 minuten - of wanneer het solvent volledig is uitgedampt - wordt de schroefdop op de vial gedraaid en wordt deze gedurende 20 minuten in een oliebad bij 230 °C gebracht. Na afkoelen wordt 100 μ l water en 150 μ l ethanol aan de vial toegevoegd en wordt deze gedurende 2 minuten verwarmd bij 120 °C. De warme oplossing wordt overgebracht in een polypropyleencup en vervolgens ingespoten op HPLC.

Scheiding van begin- en eindproduct

Voor de karakterisering moet het gevormde product worden gescheiden van het beginproduct en van eventuele nevenproducten. Dit gebeurt door middel van semi-preparatieve RP-HPLC, waarvan de condities worden beschreven in tabel 6.1.

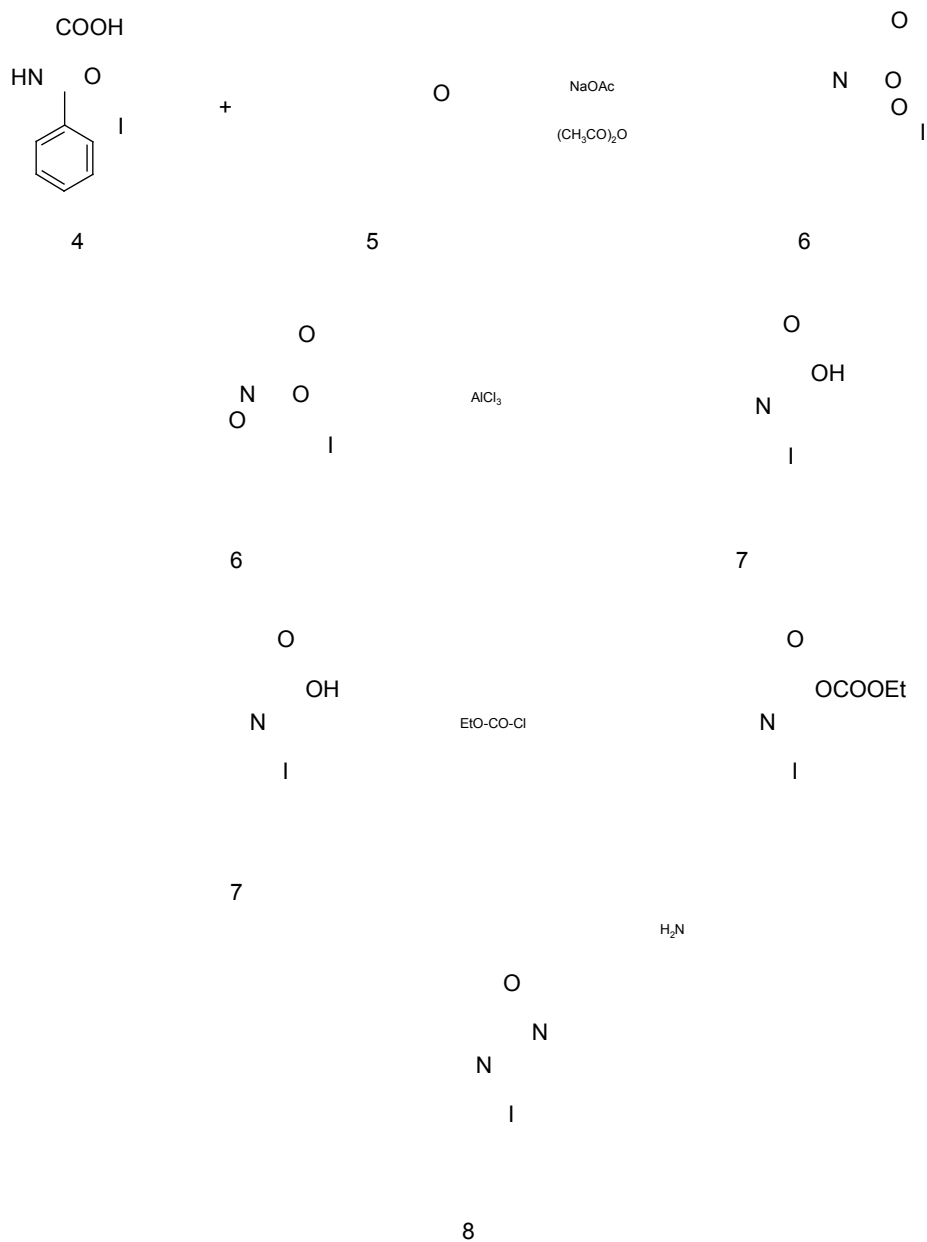
Tabel 6.1 Semi-preparatieve HPLC condities

Kolom	:	Alltech Econosil RP-18 250 x 10 mm, 10 μ m
Eluens	:	EtOH / H ₂ O 70 / 30
Debiet	:	5 ml/min
Detectie	:	UV 254 nm
Retentietijden	:	PK11195 = 7,2 min I-PK11195 = 7,5 min

Het verschil in retentietijd tussen de twee componenten is echter te gering om een goede scheiding mogelijk te maken en daarom wordt nog een andere methode gebruikt voor de synthese en de opzuivering van het I-PK11195, namelijk eerst de synthese van het desmethyl-I-PK11195 en vervolgens de methylering tot I-PK11195. Op deze manier wordt de scheiding PK11195 en I-PK11195 overbodig. Een bijkomend voordeel van deze alternatieve weg is de beschikbaarheid van desmethyl-I-PK11195 als precursor voor de synthese van [¹¹C]-I-PK11195. Dit opent, zoals reeds besproken in hoofdstuk 5 (5.7), de mogelijkheid om met éénzelfde molecule vergelijkende studies met PET en SPECT uit te voeren. De synthese van desmethyl-I-PK11195 evenals de methylering worden hieronder besproken.

Synthese van het desmethyl-I-PK11195

Reactieschema¹



Schema 6.3 Synthese van desmethyl-I-PK11195 (**8**).

Experimenteel¹

O-joodhippuurzuur (**4**) (9.4 g, 30.8 mmol), natriumacetaat (2.32 g, 283 mmol) en benzaldehyde (**5**) (2.94 g, 27.8 mmol, 2.82 ml) worden opgelost in azijnzuuranhydride bij 70 °C. Na 30 minuten verwarmen bij 90 °C wordt het mengsel afgekoeld en aan de koek die ontstaat wordt ethanol (100 ml) toegevoegd. Nadat de koek volledig losgeweekt is in een ultrasoonbad wordt het geheel 3 uur in de ijskast geplaatst. Het gevormde neerslag wordt afgefiltreerd en gewassen met kokend water (100 ml) en ethanol (25 ml) (5g, 48 %).

MS m/e 375 (M⁺)
¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃) 7.2-7.3 (m, 1H, arom), 7.35 (s, 1H, vinyl), 7.45-7.55 (m, 4H, arom), 8.05 (dd, 1H, arom), 8.17 (dd, 1H, arom), 8.35 (m, 2H, arom)

2-(2-joodfenyl)-4-benzylidone-5(4H)-oxazolone (**6**) (1.876 g, 5 mmol) en aluminiumchloride 1M in nitrobenzeen (15 ml, 15 mmol) worden 15 uur verwarmd bij een temperatuur < 80 °C. Na overbrengen van het synthesesmengsel in een mengsel van water (100 ml) en 37% zoutzuur (10 ml), wordt een stoomdestillatie uitgevoerd om de nitrobenzeen te verwijderen. Het residu wordt geëxtraheerd met dichloormethaan (2 x 200 ml) en de verkregen oplossing wordt gespoeld met water (2 x 100 ml) en ingedampt. Het eindproduct wordt verder gezuiverd door omkristallisatie uit een mengsel van benzeen en hexaan (1/1) (1,35 g, 72 %).

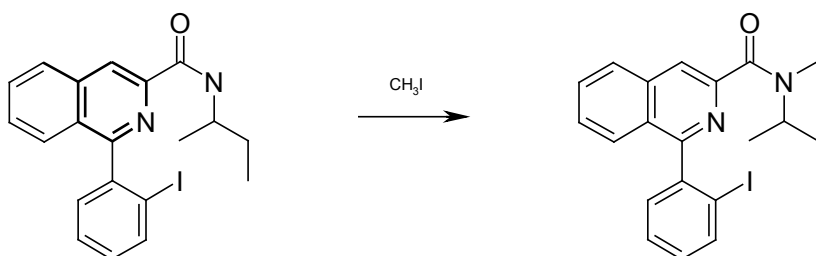
MS m/e 375 (M⁺)
¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃) 7.25 (m, 1H, arom), 7.45 (d, 1H, arom), 7.55-7.6 (m, 1H, arom), 7.75 (m, 2H, arom), 7.85 (m, 1H, arom), 8.07 (d, 1H, arom), 8.13 (d, 1H, arom), 8,74 (s, 1H, isoquin)

1-(2'-joodfenyl)-isoquinoline-3-carbonzuur (**7**) (375.2 mg, 1 mmol) wordt opgelost in droge koolstoftetrachloride en de oplossing wordt gekoeld tot onder 10 °C. Triëthylamine (0,122 g, 1.2 mmol, 168 µl) en ethylchloroformaat (0,130 g, 1.2 mmol, 115 µl) worden toegevoegd en het mengsel wordt gedurende 45 minuten geroerd op kamertemperatuur. Na additie van sec-butylamine (0,095 g, 1.3 mmol, 130 µl) wordt het mengsel verder geroerd gedurende 15 uur. Na indampen wordt het residu geëxtraheerd met dichloormethaan (50 ml). Vervolgens wordt de oplossing gespoeld met water (50 ml) en drooggedampt. Verdere opzuivering gebeurt met kolomchromatografie (silicagel- hexaan/ethylacetaat 80/20) (**8**) (383 mg, 89 %).

MS m/e 430 (M⁺)
¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃) 0.85-1 (q 2t, 3H, -CH₂CH₃), 1.15-1.25 (q d, 3H, -CHCH₃), 1.45-1.60 (m, 2H, -CHCH₂CH₃), 2.95-3 (2s, 3H, -NCH₃), 4-4.8 (2m, 1H, -CHCH₃), 7.2-7.25 (m, 1H, arom), 7.40-7.45 (m, 1H, arom), 7.55-7.65 (m, 3H, arom), 7.70-7.75 (m, 1H, arom), 8.05-8.15 (m, 3H, arom)

Methyleringsreactie

Reactieschema



Schema 6.4 Methylering van desmethyl-I-PK11195

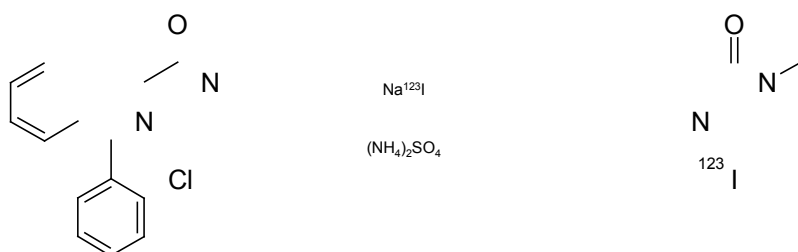
Experimenteel

Aan het desmethyl-PK11195 (3 μmol) opgelost in DMSO (100 μl) wordt methyljodide (1 μmol) opgelost in dimethylformamide (40 μl) en tetrabutylammoniumhydroxide (3 μmol) opgelost in dimethylsulfoxide (10 μl) toegevoegd. Na 5 minuten reactie op kamertemperatuur wordt 100 μl HPLC-eluens toegevoegd en begin- en eindproduct van de methylering worden van elkaar gescheiden met behulp van het analytisch HPLC-systeem beschreven in tabel 6.1. De retentietijd van het gedemethyleerde I-PK11195 bedraagt \pm 9 minuten en is gemakkelijk te scheiden van I-PK11195 (retentietijd 7,5 minuten).

MS m/e	444 (M^+)
$^1\text{H-NMR}$	(360 MHz, CDCl_3) 0.75-0.88, 0.98 (q 2t, 3H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.17, 1.23 (q d, 3H, $-\text{CHCH}_3$), 1.40, 1.59 (m, 2H, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_3$), 2.94, 2.98 (2s, 3H, $-\text{NCH}_3$), 4.02, 4.82 (2m, 1H, $-\text{CHCH}_3$), 7.17-7.24 (m, 1H, arom), 7.33-7.40 (m, 1H, arom), 7.46-7.60 (m, 3H, arom), 7.70-7.77 (m, 1H, arom), 7.92-8.07 (m, 3H, arom)

6.2 Synthese van [^{123}I]-I-PK11195

6.2.1 Reactieschema



Schema 6.5 Synthese van het [^{123}I]-I-PK11195 via een vaste fase transfer.

6.2.2 Experimenteel

Aangezien de radiojodering van I-PK11195 reeds beschreven is in de literatuur hoeven we geen verdere optimalisatie van de verschillende parameters uit te voeren. Nochtans werd bij de vaste fase transfer één reactieparameter licht gewijzigd. Het uitdampen van het solvent (mengsel van ethanol en water) gebeurt in een open vial, omdat het volledig uitdampen van het solvent in een gesloten vial, zoals beschreven in de literatuur, nogal omslachtig bleek en de aanwezigheid van de minste hoeveelheid solvent nefast was voor het rendement van de synthese.

6.2.3 HPLC-analyse

Voor de bepaling van het radiochemisch rendement is het noodzakelijk de verschillende radio-actieve componenten van elkaar te scheiden en te collecteren. De scheiding gebeurt door middel van analytische HPLC. In tegenstelling tot de synthese, hebben we hier wel geopteerd voor een nieuwe methode. De gebruikte kolom, het eluens en de andere HPLC parameters die gebruikt worden zijn weergegeven in tabel 6.2. Zowel radioactieve als niet-radioactieve componenten worden gedetecteerd door gebruik van zowel een NaI-teller als een UV-detector.

Tabel 6.2 Analytische HPLC-condities

Kolom	:	Alltech Alltima RP-18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m
Eluens	:	H ₂ O/EtOH 40/60
Debiet	:	1 ml/min
Detectie	:	UV 254 nm en NaI(Tl) detector
Retentietijden	:	PK11195 = 11 min [¹²³ I]-I-PK11195 = 12 min

6.2.4 Bepaling radiochemisch rendement

Het radiochemisch rendement wordt bepaald door het inspuiten van een bepaalde hoeveelheid van het synthesemengsel op de analytische HPLC-kolom (Tabel 6.2). Het radiochemisch rendement wordt berekend als de hoeveelheid radioactiviteit afkomstig van het gesynthetiseerde product gedeeld door de totale radioactiviteit en vermenigvuldigd met 100.

6.2.5 Geoptimaliseerde tracersynthese en zuiveringsprocedure

Een oplossing van PK11195 (0,1 mg, 0.28 μ mol) in ethanol (100 μ l) en een oplossing van ammoniumsulfaat (6 mg, 45 μ mol) in water (50 μ l) worden samengevoegd in een 5-ml vial. Na toevoegen van de I-123 isotoop (\pm 20 mCi) wordt het solvent afgedampt door verwarming van de open vial gedurende 10 minuten bij 110 °C. Nadien wordt de gesloten vial verhit gedurende 20 minuten bij 230 °C. Na afkoelen wordt het synthesemengsel opgelost in het eluens dat zal gebruikt worden voor HPLC-scheiding. Na de synthese moet de tracer immers gescheiden worden van de precursor, het ammoniumsulfaat, eventuele nevenproducten van de synthese en radiochemische contaminanten. Dit gebeurt door middel van een analytische HPLC-scheiding. De gebruikte apparatuur, de kolom en het eluens zijn weergegeven in tabel 6.2. Na elutie van de solventpiek en enkele nevenproducten wordt de piek van [¹²³I]-I-PK11195 (R_t = 12 min) geïsoleerd. De opgevangen vloeistof (1,75 ml) wordt rechtstreeks in een steriele vial gebracht via een 0.22 μ m filter. Voor injectie bij proefdieren, gezonde vrijwilligers en patiënten wordt hieraan de vereiste hoeveelheid steriel water (8,25 ml) toegevoegd, zodat een oplossing verkregen wordt die intraveneus mag worden ingespoten (ethanolconcentratie = 10,5 %).

6.2.6 Bepaling chemische en radiochemische zuiverheid

Een tracer die ingespoten wordt bij proefdieren voor de bepaling van de biodistributie en (eventueel) later bij patiënten voor in *vivo imaging* van de receptor moet zowel aan een chemische als een radiochemische zuiverheid van meer dan 95 % voldoen. Voor de bepaling hiervan wordt een gezuiverde oplossing van tracer ingespoten op een analytische HPLC-kolom. De gebruikte toestellen, de kolom en het eluens zijn dezelfde als onder 6.2.2. Alle producties, zowel voor de dierexperimenten, de vrijwilligers als voor de patiënten voldeden aan de vereisten inzake (radio)chemische zuiverheid.

6.2.7 Bepaling specifieke activiteit

Voor de bepaling van de specifieke activiteit moet enerzijds een meting uitgevoerd worden van de radioactiviteit afkomstig van de tracer en anderzijds de aanwezige hoeveelheid drager worden berekend. Een deel van de traceroplossing, bekomen na synthese, wordt ingespoten op het HPLC-systeem en de radioactieve tracerpiek wordt opgevangen en geteld in een ionisatiekamer. Aan de hand van een standaardoplossing met gekende concentratie wordt tevens de hoeveelheid aanwezige drager bepaald. De apparatuur, de kolom en het eluens die worden gebruikt zijn beschreven in 6.2.2. De specifieke activiteit berekend op basis van de gemeten radioactiviteit en van de chromatogrammen schommelt steeds tussen 1 en 5 Ci/ μ mol of tussen 37 en 185 GBq/ μ mol. Dit is hoog genoeg om receptoronderzoek toe te laten.

6.2.7 Farmaceutische aspecten

Steriliteit en pyrogenen

Bij de productie van een oplossing voor intraveneuze inspuiting is het belangrijk dat noch kiemen noch pyrogenen in het staal voorkomen. Om de microbiële contaminatie tijdens gans het productieproces zo laag mogelijk te houden, worden een aantal voorzorgsmaatregelen getroffen. Zo wordt het glaswerk, waarin het eluens van de HPLC wordt bereid, steriel en pyrogeenvrij gemaakt. Het eluens wordt hierin steriel afgevuld en de gebruikte kolom werd gedurende een lange tijd met dit eluens gespoeld. De gewenste fractie van het eluens wordt tenslotte door een 0,22 μ m filter gestuurd alvorens het in een steriele en pyrogeenvrije vial wordt opgevangen. Stalen van verschillende producties worden getest op hun steriliteit, zoals beschreven in de Europese Farmacopee, 3e editie supplement 1998, 2.6.1. Hierbij wordt het synthesemengsel in een LAF-kast gefiltreerd over een membraanfilter en wordt deze filter geïncubeerd op een CSA- (Caseine Soy bouillon) bodem bij 20-25 °C voor de bepaling van schimmels en gisten en op een VTM- (vloeibaar thioglycolaatmedium) bodem bij 30-35 °C voor de bepaling van bacteriën. Op geen enkele van de filters wordt contaminatie vastgesteld en dus zijn alle stalen steriel.

De afwezigheid van pyrogenen wordt nagegaan met de konijntest zoals beschreven in de Europese Farmacopee 1997, 3e editie, biologische testen, hoofdstuk 2.6.8. pyrogenen. Van de stalen wordt 1 ml/kg lichaamsgewicht ingespoten en de lichaamstemperatuur van de konijnen wordt gevolgd anderhalf uur vòòr en drie uren na injectie. Bij geen enkel konijn is er een temperatuurstijging waar te nemen die hoger is dan toegelaten en dus kan worden geconcludeerd dat de stalen pyrogeen-vrij zijn.

Toxiciteit

Niettegenstaande de aanwezigheid van slechts een minimale hoeveelheid ($5 \text{ mCi} \times 1\text{-}5 \text{ Ci}/\mu\text{mol} = 1\text{-}5 \text{ nmol}$) product wordt de traceroplossing gecontroleerd op abnormale toxiciteit, zoals beschreven in de Europese Farmacopee 1997, 3e editie, biologische testen, hoofdstuk 2.6.9, abnormale toxiciteit. Deze bepaling wordt uitgevoerd door intraveneuze injectie van $500 \mu\text{l}$ van de oplossing bij 5 muizen (NMRI, 17-22 g). Alle muizen overleefden deze test en dus wordt de oplossing als niet-toxisch beschouwd.

pH en isotoniciteit

De pH van de traceroplossing bedraagt 7.4. De aanwezigheid van 10,5 % ethanol zorgt voor een hypertone oplossing: 2055 mOsm.

6.2.9 Stabiliteit van de tracer in oplossing

Daar tussen het einde van de productie van het radiofarmacon en de toediening ervan aan vrijwilligers en patiënten een tijd van 1 à 2 uur verloopt waarin de tracer kan afbreken is het noodzakelijk de stabiliteit van de component in oplossing na te gaan. Daarom wordt van de oplossing van de tracer, verkregen na de synthese, op geregelde tijdstippen een fractie ingespoten op HPLC. De condities waaronder dit gebeurt worden beschreven in tabel 6.2. Er wordt tot 24 uur na synthese een radiochemische zuiverheid van meer dan 95 % vastgesteld (afbraak < 5 %).

6.3 Dierexperimenten

Alvorens de tracer routinematig te gebruiken bij patiënten is het noodzakelijk het *in vivo* gedrag ervan bij proefdieren na te gaan. In het volgende deel worden de biodistributie, de verdringing (of biodistributie na voorafgaande inspuiting van een niet-radioactieve, structureel gelijkende component) en de metabolisatie van [^{123}I]-I-PK11195 bij muizen besproken. Bij elk experiment worden de dieren voorzien van water en voedsel *ad libitum*. Het doden gebeurt door decapitatie na voorafgaandelijke anesthesie met diëthylether. Alle weggenomen organen worden gespoeld met 0,9 % NaCl-oplossing en gedroogd op absorberend papier.

6.3.1 Biodistributie

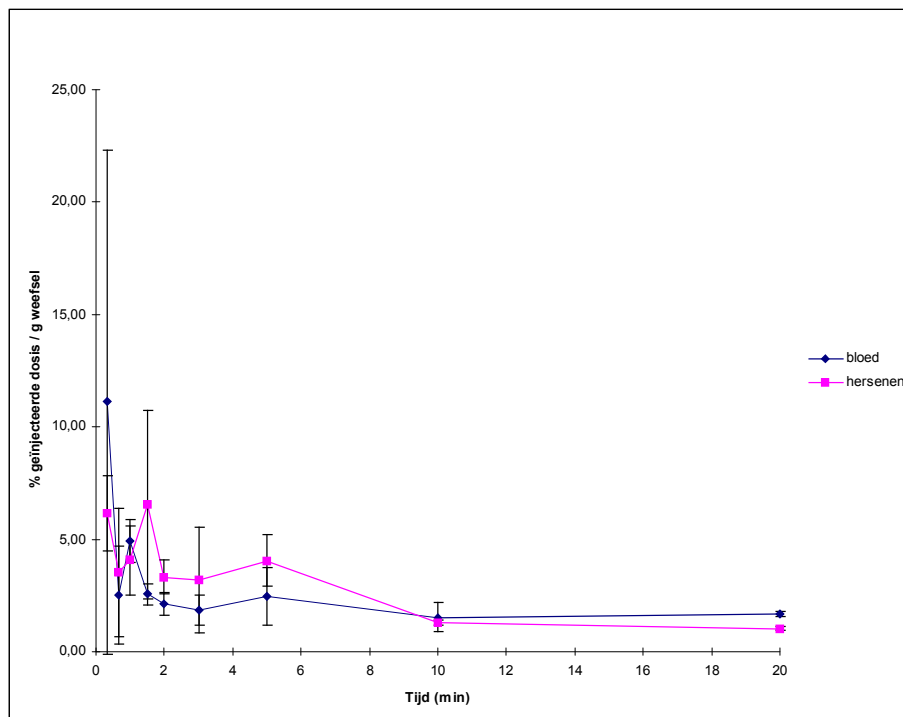
Experimenteel

Ongeveer $2 \mu\text{Ci}$ [^{123}I]-I-PK11195 opgelost in $100\text{-}200 \mu\text{l}$ ethanol/water (5/95) wordt ingespoten in de staartvene van 3 reeksen van 18 witte muizen (NMRI, 20-25 g). 20 en 40 seconden, 1, 1.5, 2, 3, 5, 10, 20 en 40 minuten en 1, 2, 3, 6, 9, 15, 24 en 48 uur na injectie worden de muizen gedood. Bloed wordt afgenomen, organen en

weefsels worden weggenomen, gewogen en geteld op radioactiviteit. De resultaten van de verdeling van de radioactiviteit over de lichamen worden weergegeven als % van de geïnjecteerde dosis per gram orgaan.

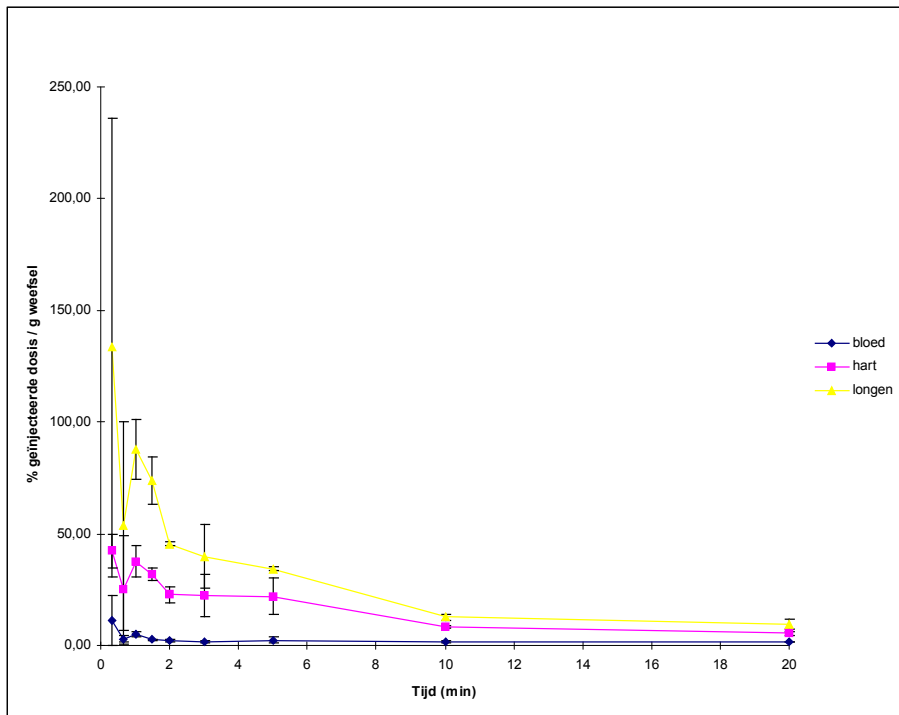
Resultaten

Aangezien het bij patiënten de bedoeling is [^{123}I]-I-PK11195 te gebruiken voor het opsporen van inflammatie in hersenen en hart, wordt vooral de verdeling van radioactiviteit in deze organen belicht. Figuur 6.1 geeft de activiteit weer in bloed en hersenen, terwijl figuur 6.2 de verdeling in bloed, hart en longen toont. De activiteit in de longen wordt hier eveneens weergegeven omdat deze bij een latere hartscan een storend effect zou kunnen teweegbrengen. De excretie van de tracer wordt weergegeven in figuur 6.3. In alle figuren zijn de resultaten gecorrigeerd voor achtergrondstraling en radioactief verval.



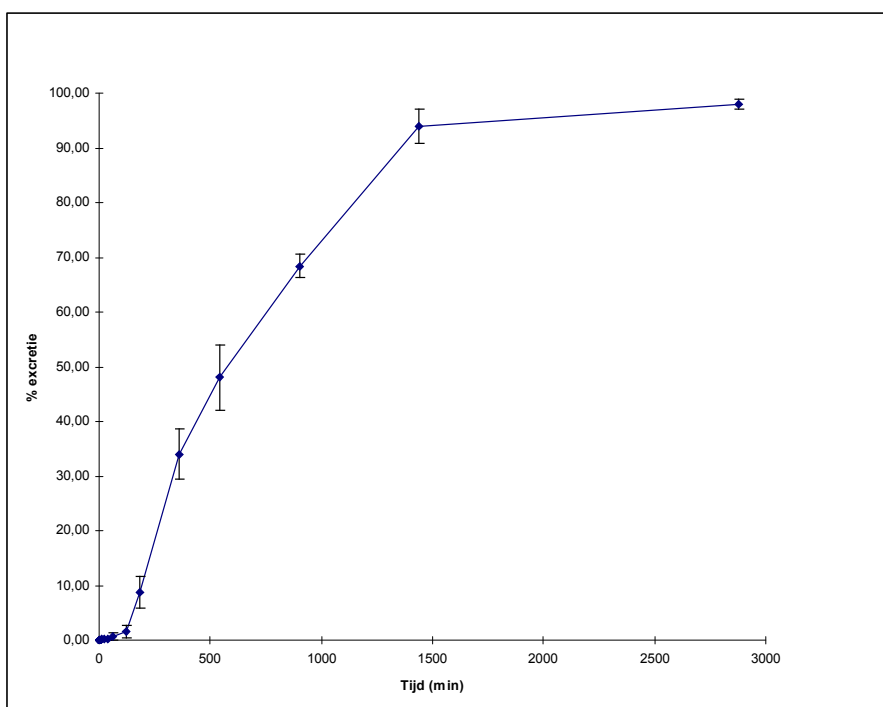
Figuur 6.1 *Tijd-activiteitscurve in bloed en hersenen van muizen (n=3) na inspuiten van $2\ \mu\text{Ci}$ [^{123}I]-I-PK11195.*

Uit figuur 6.1 blijkt dat in de tijdspanne tussen 40 seconden en 10 minuten na injectie de % geïnjecteerde activiteit per gram in de hersenen hoger ligt dan in bloed. Eerst is er een sterke stijging waar te nemen van de hersenradioactiviteitscurve, waarna deze geleidelijk aan afneemt en na 10 minuten terug onder de bloedcurve ligt. Hieruit kunnen we besluiten dat er een vlugge inflow van radioactiviteit in de hersenen plaatsgrijpt, waarna deze langzaam wordt weggevoerd. De radioactiviteit passeert dus de bloed-hersenbarrière maar blijft niet in de hersenen gebonden. Dit wijst op de afwezigheid (of de kleine aanwezigheid) van receptoren in de hersenen. Dit komt overeen met de bevindingen in de literatuur die een lage concentratie aan perifere benzodiazepinereceptoren beschrijven in gezonde hersenen. Vanaf 10 minuten blijft de bloed-hersenratio nagenoeg constant. Gedurende het ganse experiment zijn er op geregelde tijdstippen wel lichte fluctuaties te bemerken in de bloedactiviteitscurve. Dit kan worden verklaard door de entero-hepatische cyclus waarbij in de gal opgenomen [^{123}I]-I-PK11195 terug vrijgesteld wordt in de algemene circulatie.



Figuur 6.2 Tijd-activiteitcurve in bloed, hart en longen van muizen ($n=3$) na inspuiten van $2 \mu\text{Ci}$ [^{123}I]-I-PK11195.

Uit figuur 6.2 blijkt een snelle en hoge opname van radioactiviteit in hart en longen. Vervolgens neemt in beide organen de radioactiviteit eerst vlug en daarna trager af en vanaf 10 minuten na injectie ontstaat er een evenwichtssituatie.



Figuur 6.3 Excretie (via urine en faeces) van radioactiviteit bij muizen ($n=3$) in functie van de tijd na inspuiten van $2 \mu\text{Ci } [^{123}\text{I}]\text{-I-PK11195}$.

De eerste radioactiviteit wordt uitgescheiden 2 uur (= 120 min) na injectie van het $[^{123}\text{I}]\text{-I-PK11195}$ en na 24 uur (= 1440 min) blijkt bijna alle activiteit uit het lichaam te zijn verdwenen. De excretie verloopt hoofdzakelijk via de faeces. Slechts een kleine fractie (< 15 %) wordt via de urine uitgescheiden.

6.3.2 Verdringing

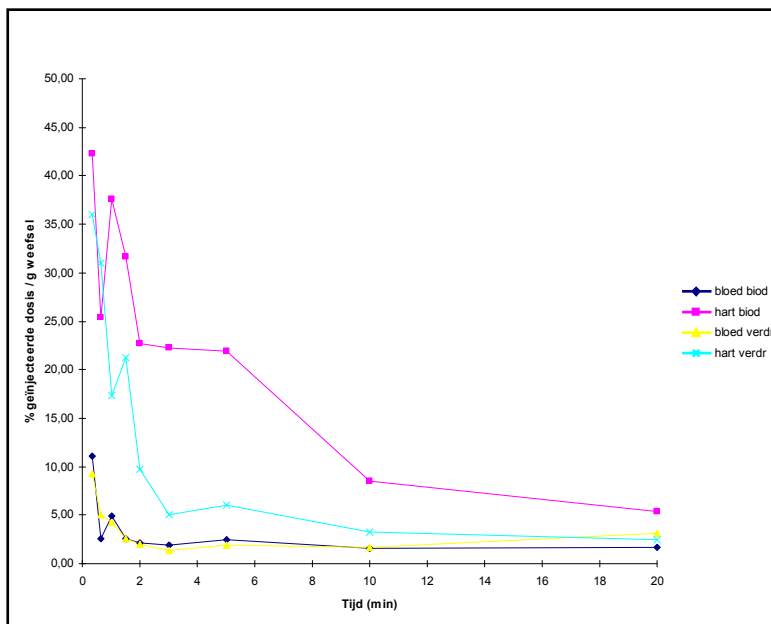
Om na te gaan of de verdeling van radioactiviteit in de targetorganen wel degelijk berust op specifieke binding en niet aspecifiek is, wordt een verdringingsstudie uitgevoerd. Hierbij wordt voorafgaandelijk een overmaat van een structureel gelijkende antagonist ingespoten die alle specifieke en een deel van de niet-specifieke bindingsplaatsen zal bezetten. De eigenlijke tracer wordt nadien ingespoten en kan slechts binden op de resterende aspecifieke bindingsplaatsen. Vermindering van het % activiteit per gram weefsel in vergelijking met de gewone biodistributie betekent de aanwezigheid van specifieke bindingsplaatsen.

Experimenteel

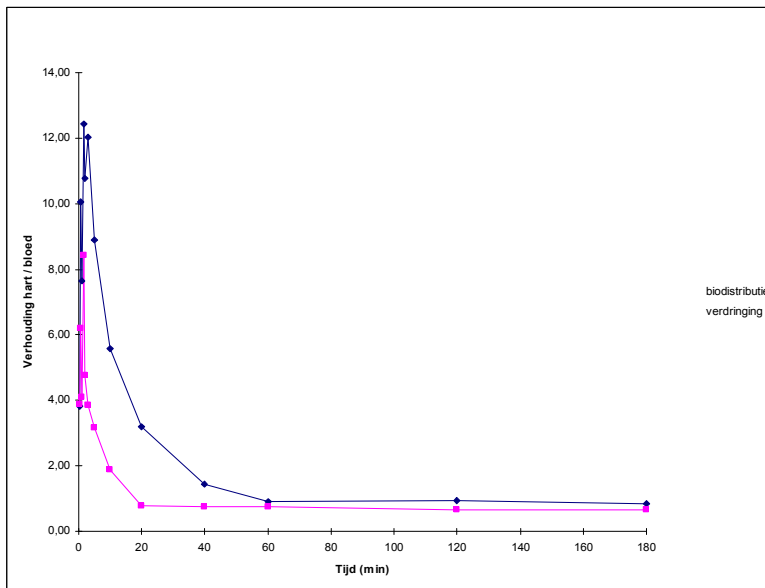
$25 \mu\text{g}$ PK11195 (= $\pm 1 \text{ mg}$ per kg lichaamsgewicht) opgelost in $150 \mu\text{l}$ van een mengsel ethanol/water 25/75 (v/v) wordt ingespoten in de staartvene van 3 reeksen van 13 muizen (NMRI, 20-25 g). Dezelfde muizen worden 10 minuten later ingespoten met $2 \mu\text{Ci } [^{123}\text{I}]\text{-I-PK11195}$ ($100 \mu\text{l}$) en op dezelfde tijdstippen als in de biodistributiestudie worden ze gedood, gedisseceerd en worden de organen gewogen en de radioactiviteit geteld. De verdeling van de radioactiviteit wordt weergegeven als % van de geïnjecteerde dosis per gram orgaan.

Resultaten

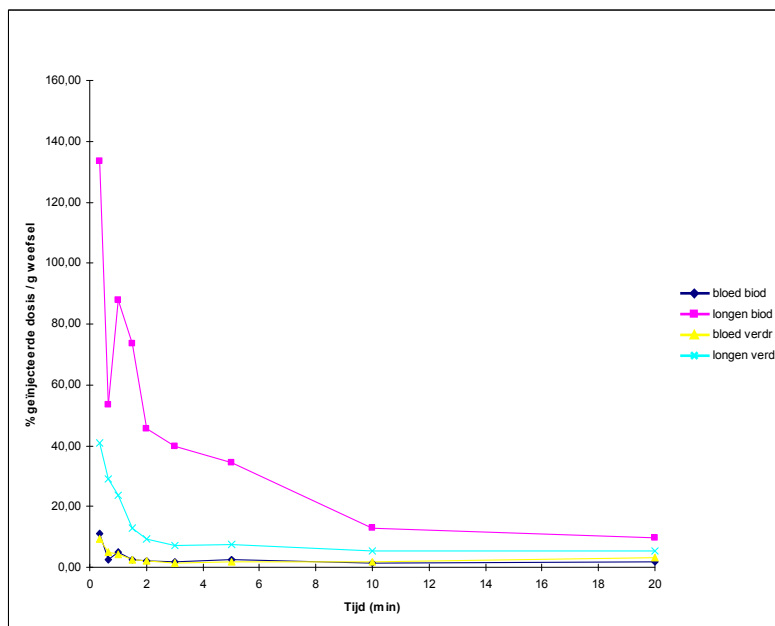
De resultaten van de verdringingstudies in de hersenen en in de organen waarin de verdeling van de radioactiviteit het hoogst is na inspuiten van 2 μCi [^{123}I]-I-PK11195, namelijk hart, longen en nieren (cfr. 6.3.1), worden weergegeven op twee verschillende manieren. In figuren 6.4a, 6.5a en 6.6a worden zowel de biodistributie- als de verdringingscurves van respectievelijk hart, longen en nieren en tevens van bloed weergegeven. In figuren 6.4b, 6.5b en 6.6b wordt de verhouding van de radioactiviteit in een orgaan ten opzichte van de radioactiviteit in bloed voor zowel biodistributie als verdringing getoond. In figuren 6.4a, 6.5a en 6.6a wordt telkens een vlugge afname van de radioactiviteit uit hart, longen of nieren (lichtblauwe curves) waargenomen wanneer er een voorafgaande injectie van PK11195 heeft plaatsgehad. Dit resulteert in figuren 6.4a, 6.5a en 6.6a in een verlaagde verhouding van de radioactiviteit in het orgaan tot deze in het bloed voor de verdringing in vergelijking met de biodistributie. Dit betekent dat in de drie organen de specifieke bindingsplaatsen zijn bezet door niet-radioactief product en dat de tracer enkel op de aspecifieke bindingsplaatsen kan binden. In hersenen (Figuur 6.7a) zien we dat er geen verschil is tussen de biodistributiecure (roze) en de verdringingscurve (lichtblauw) zodat de verhouding (Figuur 6.7b) niet wijzigt en er dus kan geconcludeerd worden dat er in de hersenen geen specifieke bindingsplaatsen aanwezig zijn bij gezonde proefdieren.



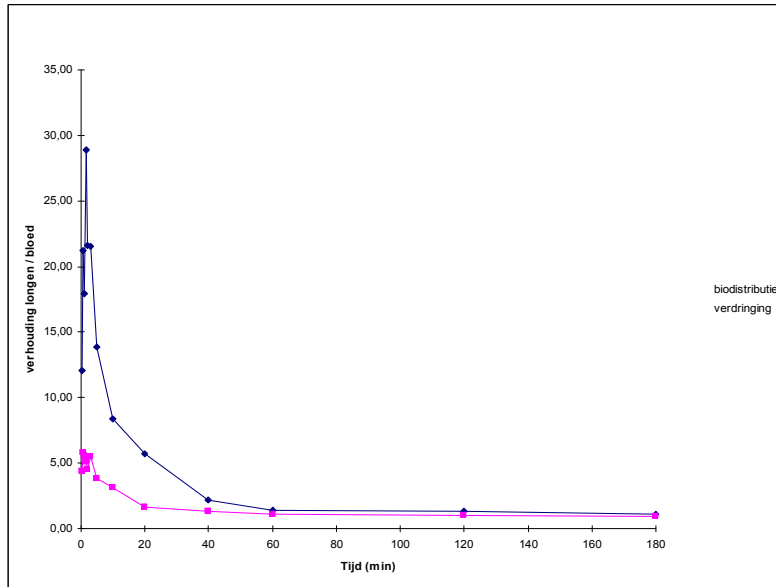
Figuur 6.4a Tijd-activiteitscurve van biodistributie en verdringing in hart en bloed van muizen (n=3) .



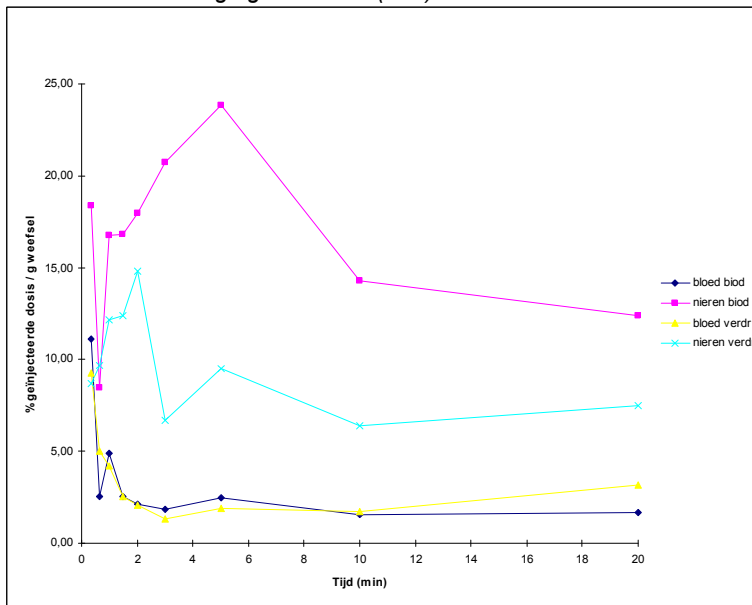
Figuur 6.4b Verhouding van de radioactiviteit in hart tot de radioactiviteit in bloed voor biodistributie en de verdringing in muizen (n=3) de



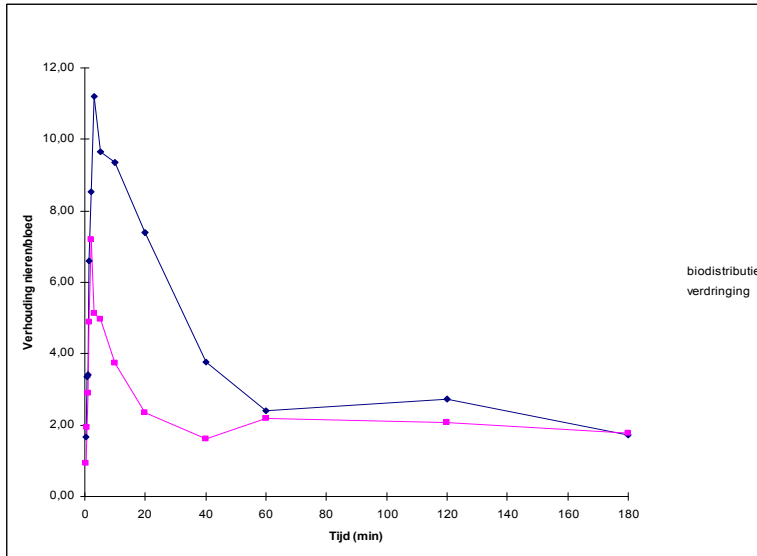
Figuur 6.5a Tijd-activiteitscurve van biodistributie en verdringing in longen en bloed van muizen (n=3) .



Figuur 6.5b Verhouding van de radioactiviteit in longen tot de radioactiviteit in bloed voor de biodistributie en de verdringing in muizen (n=3)

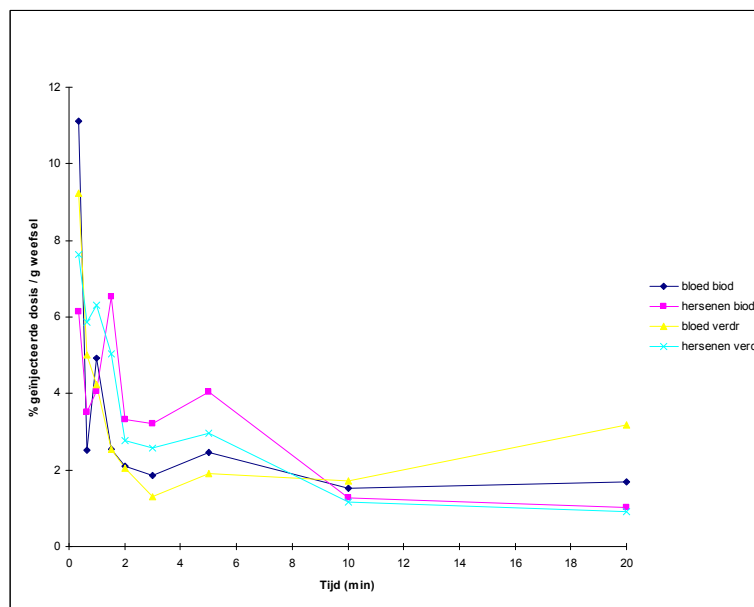


Figuur 6.6a Tijd-activiteitscurve van biodistributie en verdringing in nieren en bloed van muizen (n=3) .



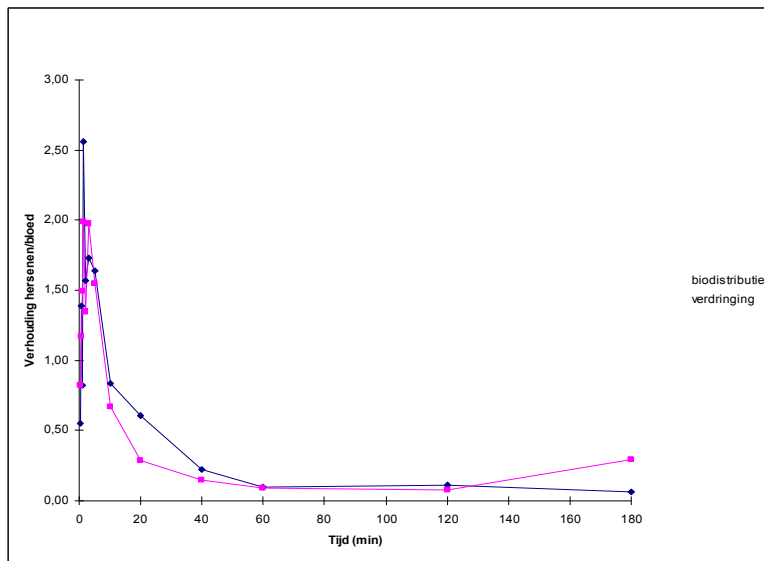
Figuur 6.6b Verhouding van de radioactiviteit in nieren tot de radioactiviteit in bloed voor de biodistributie en de verdringing in muizen (n=3)

voor



Figuur 6.7a Tijd-activiteitscurve van biodistributie en verdringing in hersenen en van muizen (n=3).

bloed



Figuur 6.7b Verhouding van de radioactiviteit in hersenen tot de radioactiviteit in bloed voor de biodistributie en de verdringing in muizen (n=3)

6.3.3 Metabolisatie

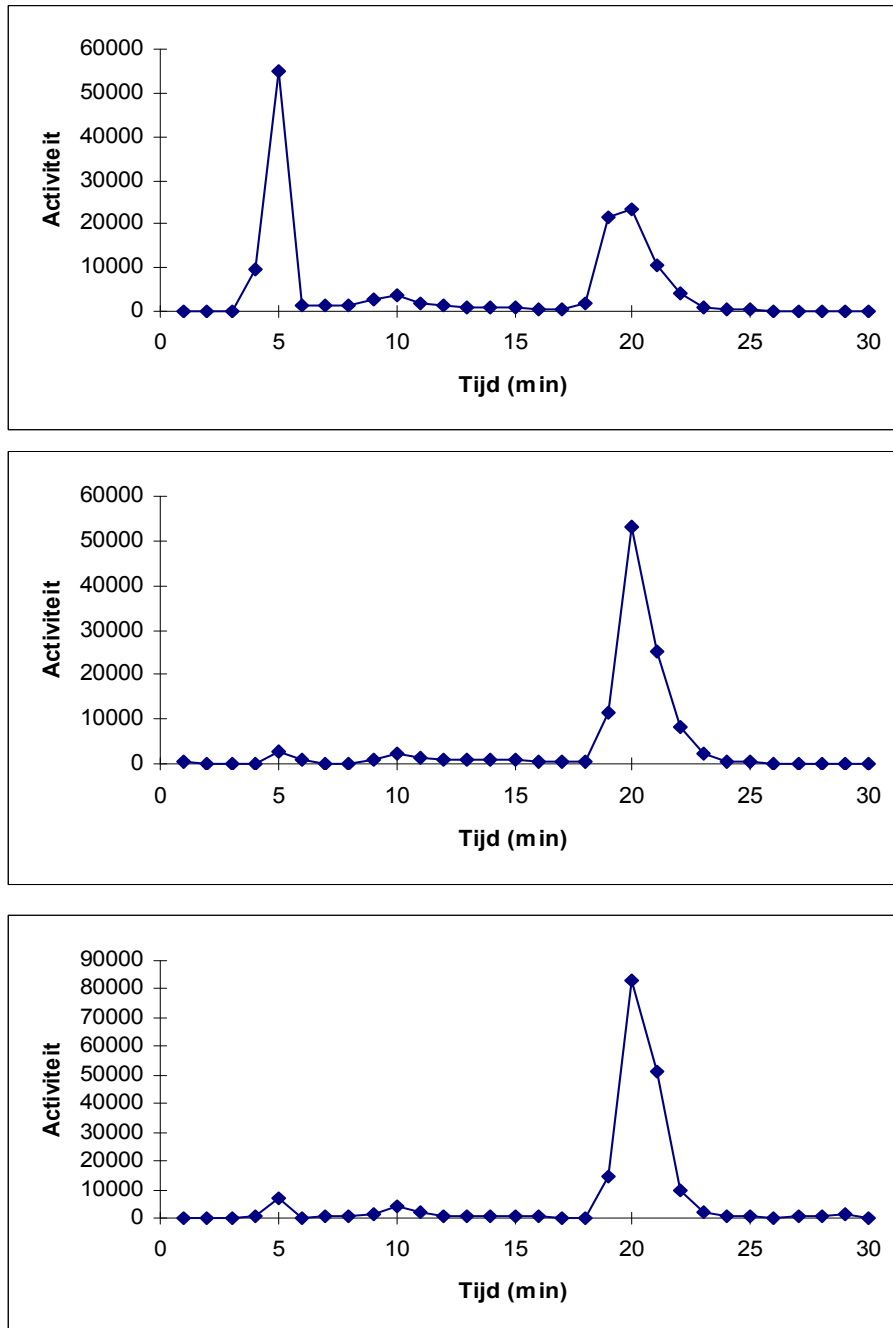
Bij onderzoek van patiënten is het van groot belang dat alleen het geïnjecteerde [^{123}I]-I-PK11195 wordt gescand. Aangezien SPECT geen onderscheid kan maken tussen [^{123}I]-I-PK11195 en ^{123}I gemerkte metabolieten, moet worden aangetoond dat in de organen die zullen gescand worden geen metabolieten aanwezig zijn. Dit kan enkel gebeuren bij proefdieren. Er moet worden aangetoond dat de metabolieten uitsluitend in het bloed voorkomen en niet in de organen worden opgenomen.

Experimenteel

Ongeveer 100 μCi [^{123}I]-I-PK11195 opgelost in 200-300 μl ethanol/water (5/95) wordt ingespoten in de staartvene van drie witte muizen (20-25 g). Deze worden na 10 minuten gedood door onthoofding na voorafgaande anesthesie (met diethylether). Een bloedstaal wordt genomen en hersenen en hart worden weggenomen. Het bloed wordt gecentrifugeerd gedurende 3 minuten bij 3000 g en aan een fractie (200 μl) van het plasma wordt 800 μl acetonitrile toegevoegd. Na vortexen gedurende 10 seconden wordt het mengsel gecentrifugeerd gedurende 3 minuten bij 3000 g. Aan hersenen en hart wordt 1500 μl acetonitrile toegevoegd en na 10 seconden mixen wordt gecentrifugeerd gedurende 3 minuten bij 3000 g. Bij plasma, hersenen en hart worden de pellet en het supernatans van elkaar gescheiden en van beide wordt de radioactiviteit geteld. Het extractierendement wordt berekend als de radioactiviteit aanwezig in het supernatans gedeeld door de totaal aanwezige radioactiviteit in pellet en supernatans, vermenigvuldigd met 100. Om te bewijzen dat geen metabolisatie plaats grijpt tijdens het extractieproces wordt aan bloed, hersenen en hart van niet behandelde muizen 1 μCi [^{123}I]-I-PK11195 toegevoegd. De extractiemethode voor de blanco's is dezelfde als hierboven beschreven. Van elke extractie wordt 750 μl ingespoten op een HPLC-systeem, waarvan de condities beschreven zijn in tabel 6.3.

Resultaten

De resultaten van de analyse van de metabolieten in bloed, hersenen en hart van muizen zijn weergegeven in figuur 6.8.



Figuur 6.8 Analyse van metabolieten in bloed (boven), hersenen (midden) en hart (onder) van muizen (n=3)

hart

Bij de blanco van zowel bloed, hersenen en hart wordt meer dan 95 % van het toegevoegde [123 I]-I-PK11195 teruggevonden (tabel 6.3), wat wijst op een bruikbare extractiemethode.

Het extractierendement van alle stalen ligt hoger dan 90 % en dus is een betrouwbare analyse van de metabolieten mogelijk.

In tabel 6.3 worden de gemiddelde waarden en de standaarddeviaties weergegeven van [¹²³I]-I-PK11195 in het bloed, de hersenen en het hart van 3 muizen. De gemiddelde waarden van de blanco's zijn eveneens in de tabel opgenomen.

Tabel 6.3 % van het oorspronkelijk geïnjecteerde [¹²³I]-I-PK11195 in bloed, hersenen en hart van muizen 10 minuten na injectie

	Blanco (n=2)	stand.dev.	Staal (n=3)	stand.dev.
Bloed	97,5	1	33	9
Hersenen	98	0	89	2
Hart	97,5	1	87	1

Uit figuur 6.8 en tabel 6.3 blijkt dat er, ondanks het feit dat er een sterke metabolisatie heeft plaats gegrepen, in de hersenen en het hart van muizen nagenoeg enkel oorspronkelijke tracer aanwezig is. In de veronderstelling dat het metabolisatieprofiel bij de mens overeenkomt met dit van een muis, zal deze uitgesproken metabolisatie dan ook geen probleem opleveren bij eventuele SPECT-opnames.

6.4 Experimenten bij gezonde vrijwilligers

Er wordt een studie opgestart met zeven gezonde vrijwilligers, twee vrouwen en vijf mannen, met een gemiddelde leeftijd van 35 jaar (range: 18-55 jaar) en een gemiddeld gewicht van 72 kg (range: 55-94 kg). Om de biodistributie, de metabolisatie en de dosimetrie te kunnen onderzoeken wordt bij elk van de vrijwilligers 1-5 mCi [¹²³I]-I-PK11195 intraveneus ingespoten. De tracer wordt net voor de inspuiting bereid en de radiochemische zuiverheid bedraagt telkens meer dan 99 %. Om de schildklieropname te verminderen wordt een oplossing bevattende 100 mg kaliumjodide en 50 mg jood per os 24 en 1 uur voor de inspuiting gegeven. Om contaminatie te voorkomen worden de bloedstalen geïncubeerd aan de linkerarm terwijl het [¹²³I]-I-PK11195 als bolus in de rechterarm wordt geïnjecteerd. Een geschreven 'informed consent' werd door alle vrijwilligers ondertekend en het doel van de studie werd duidelijk uitgelegd. De ganse studie is goedgekeurd door de Ethische Commissie van het UZ-Gent.

6.4.1 Biodistributie

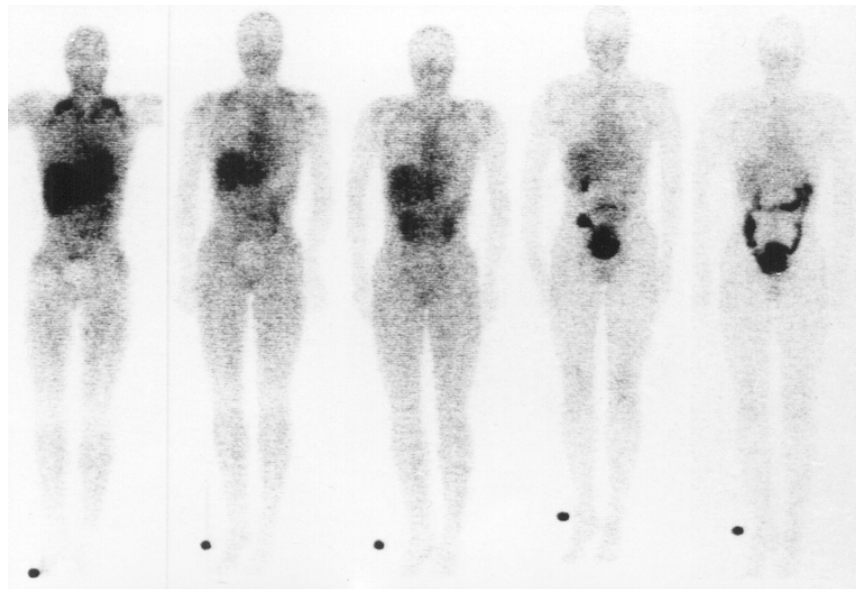
Alvorens men kan starten met tomografieën van de hersenen en het hart van patiënten, is het noodzakelijk te bepalen aan welke stralingsbelasting de patiënt is blootgesteld na intraveneuze toediening van een bepaalde dosis tracer. De berekening van deze hoeveelheid noemt men de dosimetrie (cfr. 6.4.6). Dit kan enerzijds gebeuren door de dosimetrie bij muizen te bepalen, uitgaande van de biodistributie, en deze te extrapoleren naar de mens of anderzijds ze rechtstreeks te bepalen uit de biodistributie bij gezonde vrijwilligers. Het is deze laatste methode waarvan gebruik is gemaakt voor de bepaling van de dosimetrie van [¹²³I]-I-PK11195. Daarom wordt hier eerst de biodistributie beschreven van de tracer bij gezonde vrijwilligers.

Experimenteel

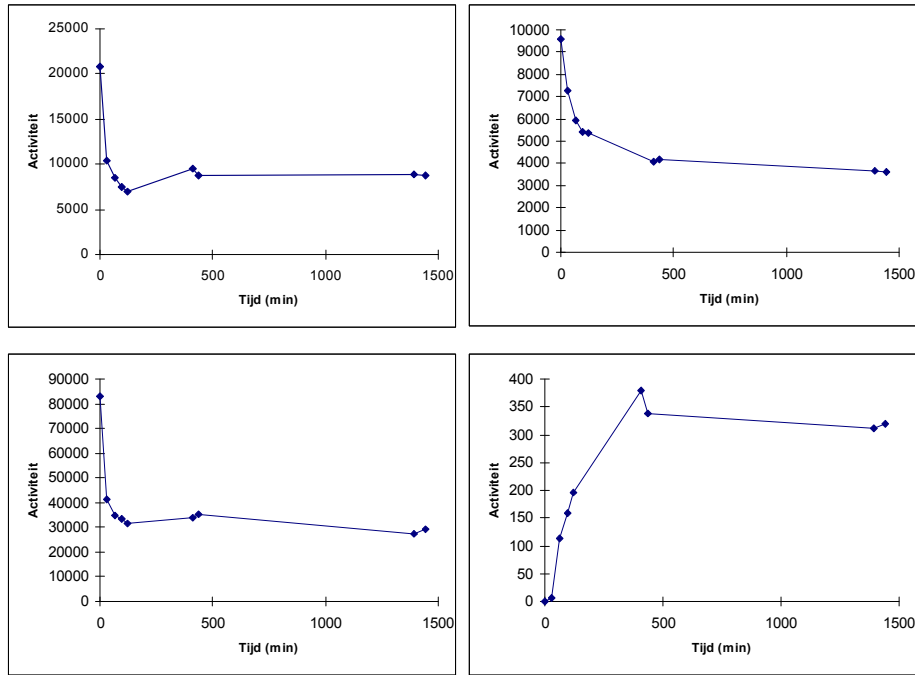
Voor de bepaling van de biodistributie wordt een relatief lage dosis (1-5 mCi) tracer intraveneus ingespoten bij gezonde vrijwilligers en wordt het lichaam op bepaalde tijdstippen na injectie in zijn totaliteit gescand ("whole-body" scans). De scans werden opgenomen met een tweekopsgammacamera voorzien van een lage energie collimator. De scans gebeuren met een snelheid van 6 (voor de laatste scans) tot 12 (voor de eerste scans) cm per minuut en nemen dus telkens ongeveer 15 à 30 minuten in beslag. Op de beelden, bekomen na computerverwerking, is de verdeling van de radioactiviteit over de verschillende lichaamsweefsels te zien. Per tijdstip worden de verschillende 'Regions of Interest (ROI's)' bepaald. Dit zijn welomlijnde delen in het menselijk lichaam (de maag, de lever, de dunne darm, ...) die belangrijk zijn voor het berekenen van de dosimetrie. De dikke darm wordt opgesplitst in twee delen: het bovenste deel (ULI of Upper Large Intestine), dat bestaat uit het opwaartse en transversaal gedeelte van de dikke darm, en het onderste deel (LLI of Lower Large Intestine), waarvan het neerwaartse gedeelte, het sigmoïd en het rectum deel uit maken. Deze opsplitsing is gebaseerd op een verschillend verblijf in de twee delen. Aan de hand van deze ROI's wordt de verdeling van de radioactiviteit in de verschillende organen en weefsels bepaald in functie van de tijd. Als achtergrond wordt een stuk weefsel in de dij gebruikt.

Resultaten

In figuur 6.9 worden enkele 'whole-body' scans van één gezonde vrijwilliger weergegeven (t= 1, 2, 6, 12 en 24 uur na injectie). In figuur 6.10 wordt de verdeling van de radioactiviteit in functie van de tijd in enkele organen en weefsels van deze patiënt weergegeven.



Figuur 6.9 'Whole-body'-scans van één gezonde vrijwilliger 1, 2, 6, 12 en 24 uur na injectie van 1,5 mCi ^{123}I -PK11195.



Figuur 6.10 Verdeling van de radioactiviteit in enkele organen en weefsels in functie van de tijd. Linksboven: hart, rechtsboven: vasculair, linksonder: lever, rechtsonder: testes.

Visuele analyse van de 'whole-body' scans toont een snelle opname van de tracer in de lever. De hoeveelheid activiteit in de galblaas, de dunne en de dikke darm bewijst de excretie via enterohepatische weg. Geen enkel ander belangrijk orgaan vertoont een significante opname van [123 I]-I-PK11195; enkel in het hart (gemiddeld 1,9 % opname met een maximum van 3,1 % direct na injectie), in de testes bij 2 van de 4 mannelijke vrijwilligers (gemiddeld 0,5 % opname met een maximum van 0,6 % 7 uur na injectie) en in de schildklier (gemiddelde opname 0,4 % met een maximum van 0,7 % 24 uur na injectie) is er een lichte stijging waar te nemen. De aanwezigheid van radioactiviteit in het hart en in de testes strookt met de gekende aanwezigheid van PBR's in het hart en in bepaalde cellen van de testes, terwijl de activiteit in de schildklier kan verklaard worden als opname van vrij jodide afkomstig van *in vivo* dehalogenatie.

6.4.2 Bloed- en plasma-activiteitscurves

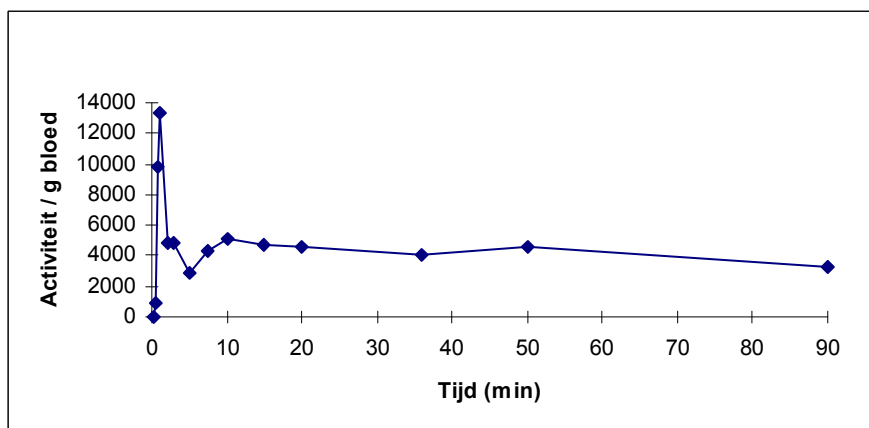
Een van de belangrijkste parameters bij de biodistributie en nodig voor de berekening van de dosimetrie is de bepaling van de hoeveelheid radioactiviteit (tracer en metabolieten) in bloed en plasma en de mate en de snelheid van verdeling ervan over de verschillende organen.

Experimenteel

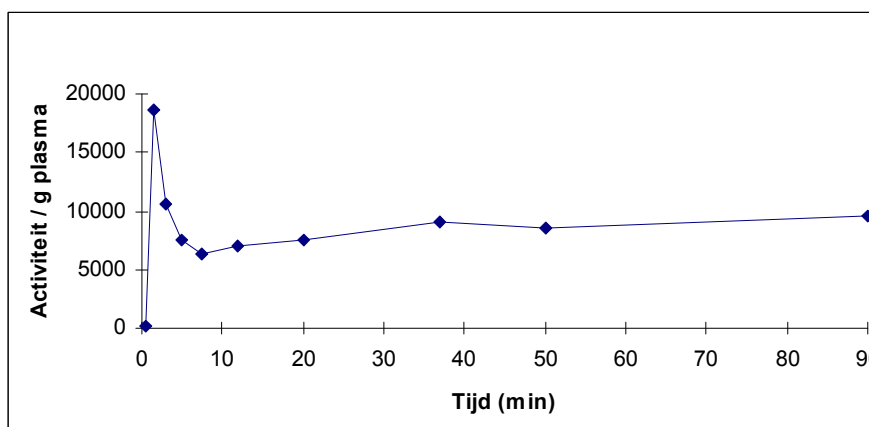
Van een gezonde vrijwilliger, ingespoten met 1,75 mCi [^{123}I]-I-PK11195, worden op geregelde tijdstippen bloedstalen afgenomen. 500 μl bloed wordt overgebracht in een eppendorfcup, gewogen en geteld op radioactiviteit. 1 ml bloed wordt gecentrifugeerd gedurende 5 min bij 3000 g en 500 μl van de bovenstaande laag (plasma) wordt eveneens gewogen en geteld.

Resultaten

Figuur 6.11 toont de bloedactiviteitcurve, figuur 6.12 de plasma-activiteitcurve; dit is de hoeveelheid radioactiviteit die per g bloed of plasma aanwezig is in functie van de tijd.

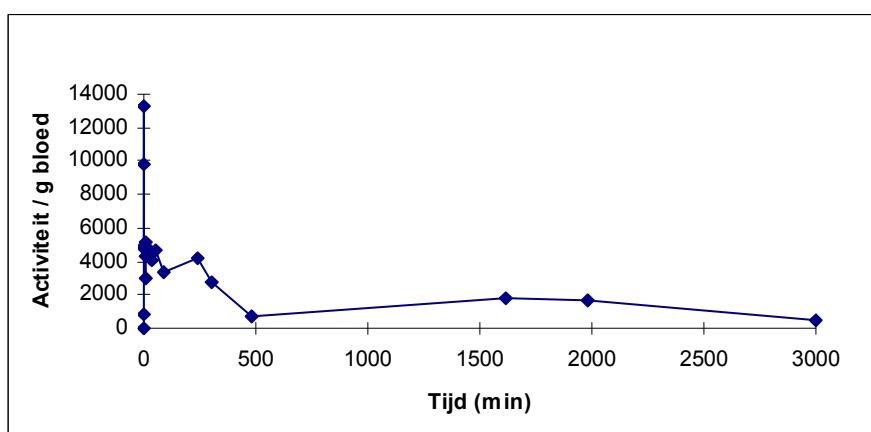


Figuur 6.11 Bloedactiviteitcurves bij één gezonde vrijwilliger na injectie van 1 mCi [^{123}I]-I-PK11195



Figuur 6.12 Plasma-activiteitcurves bij één gezonde vrijwilliger na injectie van 1 mCi [^{123}I]-I-PK11195

Aangezien het [^{123}I]-I-PK11195 geïnjecteerd wordt in de linkerarm en het collecteren van bloed gebeurt aan de rechterarm duurt het iets minder dan een minuut alvorens de radioactiviteit deze plaats bereikt. In beide figuren is dan ook in deze eerste fase een sterke toename aan radioactiviteit waar te nemen. Daarna komt de tweede fase, namelijk de verdeling van de radioactiviteit over de verschillende organen en weefsels, waardoor de hoeveelheid radioactiviteit in het bloed geleidelijk zakt. In een derde fase zou men verwachten dat de radioactiviteit langzaam afneemt ten gevolge van klaring en verval. In figuren 6.11 en 6.12 is echter een lichte stijging waar te nemen. Dit kan verklaard worden door het feit dat beide figuren de som weergeven van de radioactiviteit van de tracer en van eventuele afbraakproducten. De radioactiviteit afkomstig van de oorspronkelijke tracer zal inderdaad langzaam dalen, maar de radioactiviteit afkomstig van de afbraakproducten stijgt (cfr. 6.4.3), waardoor het totaal aan radioactiviteit lichtjes stijgt. Vanaf het moment dat de stijging aan radioactiviteit van de afbraakproducten gelijk is aan de daling van radioactiviteit via excretie en verval wordt er een daling waargenomen in totale radioactiviteit (Figuur 6.13). De kleine stijging die op deze figuur waarneembaar is na 1620 minuten (=27 uur), is waarschijnlijk gelegen aan de enterohepatische cyclus of re-absorptie vanuit de gastro-intestinale tractus.



Figuur 6.13 Bloedactiviteitscurves in één gezonde vrijwilliger na injectie van 1 mCi [^{123}I]-I-PK11195

6.4.3 Metabolisatie

Zoals reeds vermeld is het van zeer groot belang dat de radioactiviteit in de te onderzoeken organen enkel afkomstig is van de tracer en niet van metabolieten. Bij muizen werden de metabolieten onderzocht in het bloed en in de doelorganen, namelijk hersenen en hart. Bij gezonde vrijwilligers is het uiteraard enkel mogelijk om metabolieten te bepalen in het bloed. Er wordt echter aangenomen dat, wanneer het metabolisatieproces gelijkaardig verloopt als bij muizen, de aanwezigheid van metabolieten in hersenen en hart van humane vrijwilligers eveneens gelijkend is aan dat van muizen.

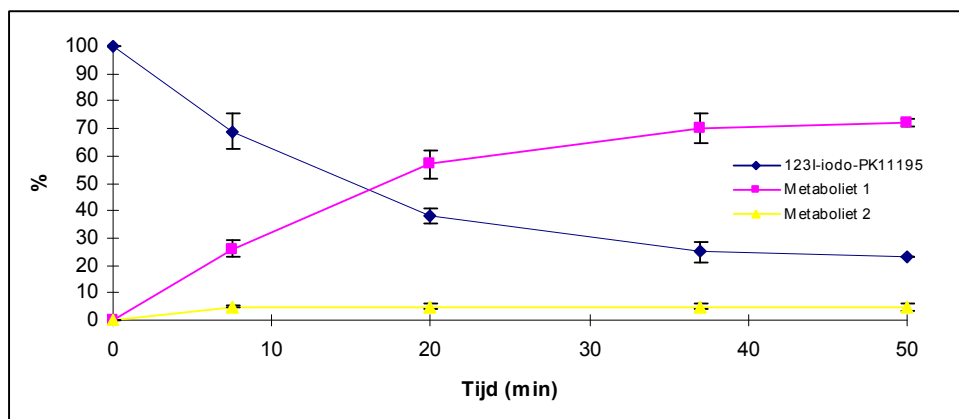
Experimenteel

Van een gezonde vrijwilliger, ingespoten met 1,75 mCi [^{123}I]-I-PK11195, worden op geregelde tijdstippen bloedstalen afgenomen. 1 mL bloed wordt gecentrifugeerd gedurende 5 min bij 3000 g. Aan 500 μL van de bovenstaande laag wordt 500 μL acetonitrile toegevoegd en opnieuw gecentrifugeerd gedurende 5 min bij 3000

g. Pellet en supernatans worden van elkaar gescheiden en elk afzonderlijk geteld. Het extractierendement wordt berekend als de hoeveelheid radioactiviteit in het supernatans gedeeld door de totale activiteit in pellet en supernatans en vermenigvuldigd met 100. Van elke extractie wordt 750 µl ingespoten op een HPLC-systeem, waarvan de condities beschreven zijn in tabel 6.3. Tevens wordt de betrouwbaarheid van de extractiemethode nagegaan. Hiervoor wordt een kleine hoeveelheid tracer toegevoegd aan bloed van een vrijwilliger die niet is ingespoten ('blanco bloed') en wordt dezelfde extractieprocedure gebruikt.

Resultaten

Uit 'blanco bloed' wordt telkens meer dan 95 % oorspronkelijke tracer geëxtraheerd waardoor we de methode als betrouwbaar mogen beschouwen. Het extractierendement van alle stalen ligt eveneens hoger dan 90 % en dus is een betrouwbare analyse van de metabolieten mogelijk. De metabolisatie van [¹²³I]-I-PK11195 in functie van de tijd in het bloed van drie vrijwilligers wordt weergegeven in figuur 6.14 en in tabel 6.5.



Figuur 6.14 Metabolisatie van [¹²³I]-I-PK11195 bij gezonde vrijwilligers (n=3)

Tabel 6.5 [¹²³I]-I-PK11195 als procent van de totale activiteit aanwezig in het bloed van gezonde vrijwilligers in functie van de tijd.

Tijd (min)	Vrijw. 1	Vrijw. 2	Vrijw.3	Gem.	Standdev.
0	100	100	100	100	0
7,5	69	76	63	69,3	6,5
20	38	41	43	40,7	2,5
37	25	29	22	25,3	3,5
50	23	23	23	23	0

6.4.4 [¹²³I]-I-PK11195 in bloed en plasma

6.4.4.1 % van de geïnjecteerde dosis in bloed

Aangezien gewerkt wordt met een gecalibreerde gammaspectrometer kan een gemeten hoeveelheid tellen omgerekend worden naar totale radioactiviteit en kan dus steeds de totale hoeveelheid activiteit in het bloed worden berekend. In tabel 6.6 worden deze waarden voor één patiënt weergegeven.

Tabel 6.6 Procent van oorspronkelijk geïnjecteerde [^{123}I]-I-PK11195 aanwezig in het bloed van één patiënt in functie van de tijd in.

	Tijd (min)	% in bloed
	0,25	0,0
	0,5	1,2
	0,75	13,9
	1	19,0
	2	9,7
	3	6,8
	5	5,2
	7,5	6,1
	10	7,4
15		6,8
	20	6,6
	36	5,8
	50	6,6
	90	5,7
240		6,0
	300	3,8
	480	1,1
	1620	2,6
	1980	2,3
	3000	0,7

Uit deze tabel kan een heel snelle verdeling van radioactiviteit over het lichaam worden afgeleid. Na ongeveer 1 minuut - of het moment waarop de maximale hoeveelheid radioactiviteit in het bloed aanwezig is – is er reeds 80 % van de totale hoeveelheid radioactiviteit over het lichaam verspreid.

6.4.4.2 Verdeling van [^{123}I]-I-PK11195 over bloed

Uit de gemeten activiteit in bloed en plasma en rekening houdend met de hematocriet van de vrijwilligers kan de verdeling van [^{123}I]-I-PK11195 over bloed worden berekend. Hieruit blijkt dat de tracer zich voor ongeveer 90 % in het plasma bevindt en dat 10 % aan bloedcellen is gebonden. Tevens kan worden nagegaan welke fractie van de tracer die zich in het plasma bevindt, gebonden is aan eiwitten en dus wat de vrije fractie is.

Experimenteel

Voor de bepaling van de vrije fractie wordt van een gezonde vrijwilliger, ingespoten met 1,75 mCi [^{123}I]-I-PK11195, kort na injectie (na ongeveer 1 min) een bloedstaal afgenomen. 1 ml bloed wordt gecentrifugeerd gedurende 5 min bij 3000 g. Van het verkregen plasma wordt 500 μl op een ultrafilter (Centricon 30, cut-off 30000 kD) gebracht en gedurende 1 uur gecentrifugeerd bij 3000 g. Na centrifugeren wordt de radioactiviteit op de filter en in het filtraat geteld en de verhouding van de radioactiviteit in het filtraat tegenover de totale radioactiviteit komt

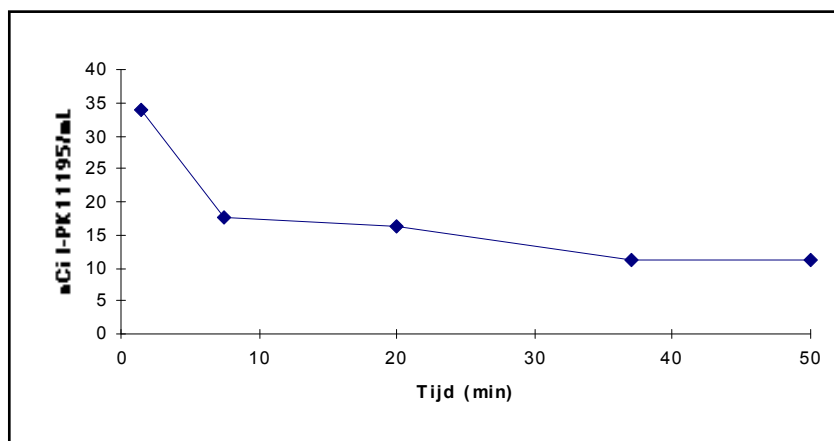
overeen met de vrije fractie van de tracer. Om uit te sluiten dat geen verkeerd resultaat wordt bekomen doordat de tracer geadsorbeerd wordt op de filter, wordt eveneens een blanco - een oplossing van de tracer in een mengsel van ethanol en water - op een filter gebracht en gecentrifugeerd. Ook nu wordt de radioactiviteit op de filter en in het filtraat geteld en de verhouding genomen.

Resultaten

Wanneer de verhouding wordt genomen na ultrafiltratie van het 'blanco' staal wordt 90 % van de radioactiviteit teruggevonden in het filtraat. Bij analyse van een bloedstaal van een vrijwilliger blijkt amper 1 minuut na injectie 1 % van de radioactiviteit zich in het filtraat te bevinden. De vrije fractie van de tracer bedraagt dus ongeveer 1 %.

6.4.4.3 % [^{123}I]-I-PK11195 in plasma

Rekening houdend met de plasma-activiteitscurve (6.4.2) en met de metabolisatie (6.4.3) van [^{123}I]-I-PK11195 kan men de precieze hoeveelheid ^{123}I -PK11195 berekenen in plasma. Deze waarden (per ml plasma) in functie van de tijd zijn weergegeven in figuur 6.15.



Figuur 6.15 Plasmacurve van [^{123}I]-I-PK11195 bij een gezonde vrijwilliger na injectie van 1.6 mCi [^{123}I]-I-PK11195

Na respectievelijk 1, 7.5, 20, 37 en 50 minuten is er 6.9, 1.9, 1.1, 0.8 en 0.6 % van de oorspronkelijk ingespoten tracer in het plasma aanwezig. Verschillen tussen de vrijwilligers zijn te wijten aan tijdsverschillen waarop de stalen werden genomen, interindividuele variaties en andere experimentele fouten.

6.4.5 Metabolieten in urine

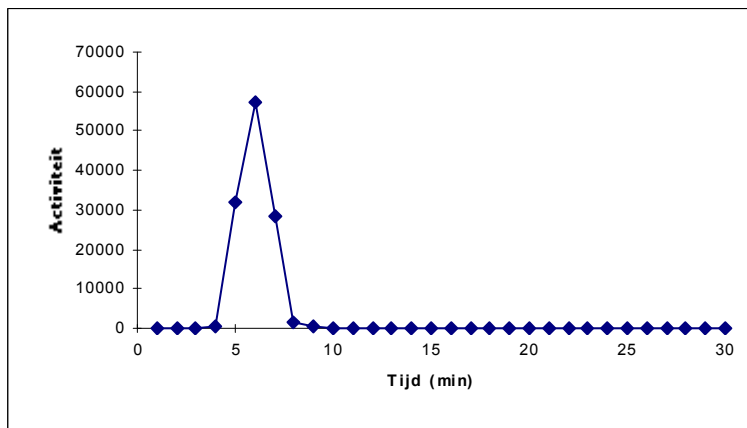
Voor de bepaling van de dosimetrie is het eveneens van belang een idee te hebben van de procentuele uitscheiding van [^{123}I]-I-PK11195 via de urine en de faeces. Tevens kan worden nagegaan of er in de urine al dan niet nog oorspronkelijke tracer aanwezig is.

Experimenteel

Van 3 gezonde vrijwilligers, ingespoten met 1-5 mCi [^{123}I]-I-PK11195, wordt tot 48 uur na injectie van de tracer de urine in fracties gecollecteerd. Telkens wordt het volume bepaald en wordt van een fractie de radio-activiteit gemeten. Rekening houdend met het verval wordt de procentuele uitscheiding van ^{123}I gemerkte componenten via de urine berekend. Voor de bepaling van de gemerkte producten wordt 750 μl ingespoten in het HPLC systeem dat beschreven is in tabel 6.3.

Resultaten

De procentuele uitscheiding van ^{123}I gemerkte producten via de urine is bij de 3 gezonde vrijwilligers 20-25 % van de geïnjecteerde radioactiviteit. Het radiochromatogram van de urine wordt weergegeven in figuur 6.16. Daaruit blijkt dat geen oorspronkelijke tracer meer aanwezig is.



Figuur 6.16 Radiochromatogram van de urine van gezonde vrijwilligers na injectie van 1 - 5 mCi [^{123}I]-I-PK11195.

6.4.6 Dosimetrie

Het inspuiten van een hoeveelheid radioactiviteit kan voor de betrokken persoon een stralingsrisico opleveren. Dosimetrie heeft als doel de bepaling van dit risico en het voorop stellen van dosissen waarbij noch somatische, noch genetische effecten worden verwacht. Twee berekeningswijzen zijn hiervoor beschikbaar: ofwel deze voorgesteld door de International Commission on Radiological Protection (ICRP, 1979), gebruikt voor radioprotectiedoeleinden ofwel deze van het Medical Internal Radiation Dose Committee (MIRD, 1968), voor toepassing in de nucleaire geneeskunde. Voor de bepaling van de dosimetrie na intraveuze injectie van [^{123}I]-I-PK11195 wordt van deze tweede methode gebruik gemaakt³.

Experimenteel

Aan de hand van de waarden bekomen uit de biodistributie (cfr. 6.3.1) worden de verblijftijden en de stralingsdosissen in de verschillende organen bepaald.

Resultaten

Tabel 6.9 toont de verblijftijden van de radio-activiteit in de organen van de verschillende vrijwilligers. Hieruit kan worden besloten dat de waarden in de lever bij alle vrijwilligers de hoogste zijn. Gemiddelde verblijftijden zijn $0,74 \pm 0,18$ h, $0,44 \pm 0,29$ h en $0,29 \pm 0,19$ h voor respectievelijk de lever, het bovenste en het onderste deel van de dikke darm.

Tabel 6. 9 *Verblijftijden (h) in elk orgaan van de verschillende vrijwilligers*

Orgaan	Patient				
	1	2	3	4	5
Hartwand	0,24	0,39	0,36	0,22	0,17
Galblaas	0,17	0,15	-	0,12	0,25
Lever (+galbl)	0,47	0,85	0,80	0,71	0,87
Dunne darm	0,12	0,09	0,35	0,34	0,47
Dikke darm b	0,20	0,15	0,56	0,54	0,76
Dikke darm o	0,13	0,10	0,36	0,35	0,49
Urineblaas	0,23	0,22	0,20	0,23	0,27
Rest	15,60	15,30	16,40	15,40	14,30

Tabel 6. 10 *Geabsorbeerde stralingsdosissen voor ^{123}I -I-PK11195*

Doelorgaan	Gemiddelde ($\mu\text{Gy}/\text{MBq}$)	Standaard deviatie
Bijnieren	16,4	0,6
Beenderoppervlakten	23,8	1,0
Hersenen	11,9	0,6
Borsten	10,2	0,5
Galblaaswand	48,8	19,4
Hartwand	31,6	7,8
Nieren	15,3	0,6
Lever	21,9	3,4
Wand dikke darm onderste deel	38,2	14,7
Longen	14,3	0,7
Spiere	13,1	0,5
Ovariën	20,9	2,9
Pancreas	17,7	0,5
Rood beenmerg	13,1	0,6
Huid	9,1	0,4
Dunne darm	25	6,7
Milt	14,8	0,6
Maag	15,9	0,7

Testes	12,5	0,5
Thymus	14,1	0,9
Schildklier	13,5	0,6
Lichaam	14,3	0,6
Wand dikke darm bovenste deel	40,0	16,2
Urineblaaswand	29,8	1,7
Uterus	19,4	1,4
Effectieve dosis ($\mu\text{Sv}/\text{MBq}$)	20,6	3,3

In tabel 6.10 zijn de geabsorbeerde dosissen en de effectieve dosis voor [^{123}I]-I-PK11195 vermeld. De galblaaswand krijgt de hoogste stralingsbelasting, namelijk $48,8 \pm 19,4 \mu\text{Gy}/\text{MBq}$. Het bovenste deel van de dikke darm, het onderste deel van de dikke darm, de hartwand en de urineblaaswand krijgen stralingsdosissen die respectievelijk $40,0 \pm 16,2$, $38,2 \pm 14,7$, $31,6 \pm 7,8$ en $29,8 \pm 1,7 \mu\text{Gy}/\text{MBq}$ bedragen. De stralingsbelasting van alle andere organen bedraagt $25 \mu\text{Gy}/\text{MBq}$ of minder.

De gemiddelde effectieve dosis voor de normale volwassene bedraagt $20,6 \pm 3,3 \mu\text{Sv}/\text{MBq}$. De verschillen tussen de vrijwilligers worden uitgedrukt als de standaard deviatie. Een injectie van 5 mCi of 185 MBq [^{123}I]-I-PK11195 geeft dus aanleiding tot een stralingsdosis van $3,8 \pm 0,6 \text{ mSv}$. Deze waarde ligt in de range van 0,5 tot 5 mSv van risicocategorie IIa van de WHO⁴ en IIb van het ICRP⁵. Dit betekent concreet dat [^{123}I]-I-PK11195 op een veilige manier kan worden gebruikt voor het onderzoek van de PBR in neuro-inflammatoire aandoeningen.

6.5 Hersenonderzoek met [^{123}I]-I-PK11195

6.5.1 Hersen-SPECT van gezonde vrijwilligers

Tot slot wordt de gesynthetiseerde, radioactieve PBR-ligand gebruikt voor onderzoek van de ziekte van Alzheimer. Er wordt nagegaan of er een verhoging van radioactiviteit kon worden waargenomen in bepaalde delen van de hersenen van patiënten ten opzichte van gezonde vrijwilligers.

Een eerste stap is de berekening van de verdeling van de radioactiviteit over de hersenen van gezonde vrijwilligers na injectie van [^{123}I]-I-PK11195. Tien oudere gezonde vrijwilligers (67 jaar, range: 53 – 77 jaar) werden hiertoe ingespoten met $\pm 5 \text{ mCi}$ van de tracer. Ze dienden als vergelijkingspunt voor de ziekte van Alzheimer. Na 1 uur werden de vrijwilligers gescand gedurende 20 minuten en na verwerking van de resultaten werd een soort normaalbeeld verkregen. Hiermee werden de hersenscans van de patiënten vergeleken.

6.5.2 Onderzoek van patiënten met de ziekte van Alzheimer

Experimenteel

10 patiënten met de ziekte van Alzheimer (80 jaar, range:56 – 88 jaar) werden geïnjecteerd met 5 mCi [¹²³I]-I-PK11195 en na 1 uur werd een SPECT-scan opgenomen gedurende 20 minuten. Na computerverwerking werden de beelden vergeleken met deze van de gezonde vrijwilligers.

Resultaten

In vrijwel alle delen van de hersenen wordt een verhoging van radioactiviteit waargenomen, behalve temporaal en medio-temporaal links. Precies van deze twee gebieden is geweten dat de ziekte van Alzheimer er haar oorsprong vindt. Een verminderde doorbloeding - aangetoond door middel van een flowtracer - ten gevolge van een sterk uitgesproken inflammatie zou aan de basis kunnen liggen van deze, op het eerste zicht, vreemde resultaten.

Referenties

1. Gildersleeve DL, Lin T-Y, Wieland DM, Ciliax BJ, Olson JMM, Young AB.. *Nucl Med Biol*, **1989**, 16 (4), 423-429.
2. Gildersleeve DL, Van Dort ME, Johnson JW, Sherman PS, Wieland DM. *Nucl Med Biol*, **1996**, 23, 23-28.
3. Stabin MG. *J Nucl Med*, **1996**, 37, 538-546.
4. Use of ionizing radiation and radionuclides on human beings for medical research, training and nonmedical purposes. World Health Organisation Technical Report Series 611. Geneva, 1977.
5. Radiological protection in biomedical research. *Annals of the ICRP*, 1991, 22, 3. Oxford, Pergamon Press. ICRP publication 62.

Samenvatting

Het doel van dit doctoraat was de synthese van enkele radiogehalogeneerde liganden van de N-methyl-D-aspartaat (NMDA) receptor en van de perifere benzodiazepinereceptor (PBR). *In vivo* visualisering van deze receptoren met 'positron emission tomography' (PET) of 'single photon emission computed tomography' (SPECT) zou meer informatie kunnen verschaffen over de ziekte van Alzheimer, daar de NMDA-receptor een rol speelt in verschillende vormen van dementie en de PBR-receptor inflammatie aantoonde.

Het eerste deel van de thesis behandelde enkele inleidende begrippen. Enerzijds werden de verschillende mogelijkheden voor medische beeldvorming toegelicht en anderzijds werd de radiobromering en radiojodering van organische moleculen besproken.

In een tweede deel werd een aantal radiogehalogeneerde antagonisten van de NMDA-receptor te gesynthetiseerd. 5,7-dibroom-, 7-broom-5-jood- en 7-chloor-5-joodkynureninezuur zijn potente en selectieve antagonisten van de glycinebindingsplaats van het NMDA-receptorcomplex. Substitutie van de halogenen door hun radio-isotopen maakt van deze moleculen potentiële ligandtracers. Eerst werd de synthese van de precursoren en de standaarden op mmol-schaal besproken. Deze is nodig voor de karakterisering van de moleculen met spectroscopische technieken en als standaard bij de chromatografische opzuivering van de latere radiochemische synthesesmengsels. Vervolgens werden de optimale parameters van de radiochemische syntheses bepaald. De radiohalogenering van de drie bovenvermelde tracers verliep via een koper-gesteunde niet-isotopische nucleofiele uitwisselingsreactie. Hierbij werden telkens radiochemische rendementen bekomen tussen 80 en 90 %, zelfs in afwezigheid van kopersulfaat (dit laatste kan verklaard worden door de sterke activatie van de moleculen voor nucleofiele uitwisseling). Tenslotte toonden biodistributiestudies bij muizen aan dat zowel het [⁷⁷Br] 5,7-dibroom-, het 7-broom-5-[¹²³I]-jood- als het 7-chloor-5-[¹²³I]-joodkynureninezuur vrijwel niet terug te vinden zijn in de hersenen na intraveneuze injectie. Uit metabolisatiestudies bleek een sterk uitgesproken dehalogenering *in vivo*: na 5 minuten was 80 à 90 % van de drie tracers reeds afgebroken. Deze sterke metabolisatie kan, samen met het te polaire karakter van de moleculen, als belangrijkste factor worden beschouwd voor het niet penetreren van de tracers doorheen de bloedhersenbarrière.

In een derde deel werd de biologische evaluatie van een radiogehalogeneerde antagonist van PBR-receptor, het 1-(2-[¹²³I]-joodfenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)isoquinoline-3-carboxamide of [¹²³I]-jood-PK11195, besproken. De synthese, die werd overgenomen uit de literatuur, was zoals bij de NMDA-receptor antagonisten een uitwisselingsreactie, meer bepaald een vaste fase transfer in aanwezigheid van ammoniumsulfaat. De scheidingsmethode voorgesteld in de literatuur werd sterk vereenvoudigd en specifieke activiteiten van 1 à 5 Ci/μmol (meer dan een vijfvoudige verbetering) werden bekomen. Biodistributiestudies in muizen werden uitgevoerd en er werd een duidelijke inflow van tracer in de hersenen waargenomen. Organen zoals het hart, de longen en de nieren vertoonden een hoge opname van activiteit, wat een bevestiging was van vroegere bevindingen. Aan de hand van verdringsstudies - het bepalen van de biodistributie na het voorafgaandelijk inspuiten van een overmaat aan niet-radioactieve antagonist - werd de specifieke binding van de tracer ter hoogte van voorgenoemde organen aangetoond. Metabolisatiestudies in muizen bewezen dat, ondanks een sterk uitgesproken afbraak in het bloed, de tracer vrijwel intact terug te vinden was in het hart en de hersenen. Metabolisatie van de tracer bij humane vrijwilligers gaf sterk gelijkende resultaten weer. De stralingsbelasting werd berekend aan de hand van de distributie van de tracer bij gezonde vrijwilligers en de effectieve dosis

bedroeg $20,6 \pm 3,3 \mu\text{Sv}/\text{MBq}$ of $3,8 \text{ mSv}$ voor 5 mCi (185 MBq). Deze waarde ligt in de range van $0,5$ tot 5 mSv van risicocategorie IIa van de WHO en van risicocategorie IIb van het ICRP. Tot slot werd - voor het eerst met deze tracer - de ziekte van Alzheimer onderzocht. Bemoedigende resultaten werden bekomen. Een grotere populatie moet echter nog worden onderzocht om de waargenomen veranderingen in radioactiviteit (en dus ook in inflammatie) in bepaalde delen van de hersenen ten opzichte van gezonde vrijwilligers te kunnen bevestigen.

Summary

The goal of this doctorate was the synthesis of some radiolabelled ligands of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and the peripheral benzodiazepine receptor (PBR). *In vivo* visualisation of these receptors with Positron Emission Tomography (PET) or Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) could give more information about Alzheimer's disease, because the NMDA receptor plays a role in different kinds of dementia and the PBR receptor is a marker for inflammation.

The first part of the thesis deals with some elementary notions. On one hand the various possibilities of medicinal imaging are given while on the other hand radio iodination and radio bromination of organic molecules is discussed.

In a second part the syntheses of some radiolabelled antagonists of the NMDA receptor are described. 5,7-dibromo-, 7-bromo-5-iodo- and 7-chloro-5-iodokynurenic acid are potent and selective glycine/NMDA antagonists. Substitution of the halogens by their radioisotopes gives possible tracers. First, the precursors and the standards are synthesised on mmol scale. This is needed for the characterisation of the compounds by spectroscopic techniques and as a standard for the chromatography of the radiochemical reaction mixtures. Subsequently the reaction parameters were optimised. Radiohalogenation of the three compounds was done by a copper assisted non-isotopic nucleophilic exchange reaction. Radiochemical yields of 80 - 90 % were achieved, even without the use of copper sulphate (this can be explained by a strong activation of the molecules for nucleophilic substitution). Biodistribution studies in mice showed the absence of [⁷⁷Br] 5,7-dibromo-, 7-bromo-5-[¹²³I]-iodo- and 7-chloro-5-[¹²³I]-iodokynurenic acid in brain after intravenous injection. Dehalogenation *in vivo* was proven by metabolism studies: after 5 minutes 80 - 90 % of the three tracers was metabolised. This fact and the hydrophilic character of the molecules are probably the main reason for the absence of compound in the brain.

In a third part the biological evaluation of a radioiodinated antagonist of the PBR receptor, 1-(2-[¹²³I]-iodophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)isoquinoline-3-carboxamide or [¹²³I] iodo-PK11195, is discussed. The synthesis, largely taken from the literature, is an exchange reaction, a solid phase transfer in the presence of ammonium sulphate. A chromatographic separation was developed and a specific activity of 1 - 5 Ci/ μ mol was achieved (more than fivefold higher). Biodistribution studies in mice were carried out and an inflow of tracer in the brain was observed. Heart, lungs and kidneys showed a high uptake of radioactivity, confirming previous results. Specific binding was proven by displacement studies (biodistribution after injection of a non-radioactive antagonist). Metabolism studies in mice indicated that in brain and heart the tracer was nearly intact, while in blood a dramatic metabolism took place. Similar results are observed in blood of human volunteers. Radiation dosimetry was investigated and the effective dose was calculated $20,6 \pm 3,3 \mu\text{Gy/MBq}$ or $3,8 \text{ mSv}$ for 5 mCi (185 Mbq), making this within the range of 0,5 and 5 mSv of risk category IIa of the WHO and IIb of the ICRP. Finally, patients with Alzheimer's disease (AD) were scanned and the results were hopeful, but a larger population must be studied to confirm these findings.

Résumé

L'objectif de ce doctorat est d'établir la synthèse de quelques ligands radio-halogénés du récepteur N-méthyle-D-aspartate (NMDA) et du récepteur benzodiazépine périphérique (PBR). La visualisation *in vivo* de ces récepteurs par 'positron emission tomography' (PET) ou 'single photon emission computed tomography' (SPECT) pourrait fournir plus d'information au sujet de la maladie d'Alzheimer, puisque le récepteur NMDA joue un rôle dans différentes formes de démence et que le récepteur PBR indique une inflammation.

La première partie de la thèse décrit quelques notions élémentaires: les différentes techniques d'imagerie médicale, la radio-bromation et la radio-iodation de molécules organiques.

Dans la seconde partie différents antagonistes radio-halogénés du récepteur NMDA ont été synthétisés. 5,7-dibrome-, 7-brome-5-iodo- et 7-chlore-5-iodo acide kynurénique sont des antagonistes puissants et sélectifs de la liaison de la glycine du récepteur NMDA. La substitution des halogènes par leurs isotopes radioactifs transforme ces molécules en traceurs potentiels. En premier lieu la synthèse des précurseurs et des étalons à échelle mmol est prise en considération. Ceux-ci sont nécessaires pour caractériser les molécules par des techniques spectroscopiques et en tant qu'étalons pour clarifier la chromatographie des mélanges radiochimique ultérieurs. Ensuite les valeurs critiques des paramètres pour les synthèses radiochimiques sont déterminés. La radio-halogénéisation des trois traceurs possibles mentionnés plus haut, se déroule par une réaction-échange nucléophile non-isotopique, basée sur du cuivre. On obtient chaque fois des rendements radiochimique entre 80 et 90 %, même en absence de sulfate de cuivre (l'explication de ce phénomène peut être donnée par l'activation puissante des molécules pour un échange nucléophile). Finalement des études de biodistribution chez des souris démontrent que ni le [⁷⁷Br] 5,7-dibromo-, ni le 7-bromo-5-[¹²³I]-iodo- ou le 7-chlore-5-[¹²³I]-iodo acide kynurénique ne se retrouvent pratiquement pas dans le cerveau après une injection intraveineuse. Par des études de métabolisation une déhalogénéisation *in vivo* semble fort prononcée: après 5 minutes 80 à 90 % des trois traceurs est détruit. Cette forte métabolisation, ainsi que le caractère des molécules, peut être considérée comme facteur principal de la non-pénétration des traceurs à travers la barrière sang-cerveau.

Dans la troisième partie de la thèse l'évaluation biologique d'un antagoniste radio-iodé du PBR, le 1-(2-[¹²³I]-iodophenyle)-N-méthyle-N-(1-méthylepropyle)isoquinoline-3-carboxamide ou le [¹²³I]-iodo-PK11195 est commentée. La synthèse, empruntée en grande partie à la littérature, est à l'instar des antagonistes du récepteur NMDA, une réaction-échange, et même un transfert d'une phase solide en présence de sulfate d'ammonium. Une méthode de séparation a été développée et des activités spécifiques de 1 à 5 Ci/μmol ont été obtenues (une amélioration au moins quintuplée). Des études de biodistribution chez des souris ont été faites et un passage net du traceur dans le cerveau a été constaté. Une grande activité a été observée dans des organes comme le coeur, les poumons et les reins; ce qui confirme les résultats antérieurs. Par des études de refoulement - la détermination des composants après avoir injecté un surplus d'antagoniste non-radioactif - la liaison spécifique du traceur à la hauteur des organes déjà mentionnés a été démontrée. Des études de métabolisation chez des souris prouvent que le traceur se retrouve quasi intact dans le coeur et le cerveau, ceci malgré une destruction prononcée dans le sang. La métabolisation du traceur chez des volontaires humains donne des résultats fort analoges. La dose de radiation a été calculée au moyen de la distribution du traceur chez des volontaires en bonne santé et la dose effective compte $20,6 \pm 3,3 \mu\text{Sv/MBq}$ ou 3,8 mSv pour 5 mCi (185 MBq). Cette valeur se trouve entre 0,5 et 5 mCi de la catégorie de risque IIa de la 'WHO' et de la catégorie de risque IIb de la 'ICPR' Finalement - et pour la première fois avec ce traceur - la maladie d'Alzheimer a été examinée. Des résultats

encourageants ont été obtenus, mais il faudrait encore examiner une population plus vaste pour pouvoir confirmer les changements observés par rapport au volontaires sains.
