

BENZAMIDAS DE USO MEDICO

Argüelles, M.G.; Luppi Berlanga, I.S.; Torres, E. A.

Comisión Nacional de Energía Atómica, Centro Atómico Ezeiza.
Unidad de Actividad Radioquímica y Química de las Radiaciones.

Contacto: arguelle@cae.cnea.gov.ar

RESUMEN

El trabajo describe las alternativas de la síntesis y caracterización de las siguientes benzamidas: [^{125}I]N-(2-dietilaminoetil)-4-iodobenzamida, [^{131}I]N-(2-dietilaminoetil)-4-iodobenzamida, [^{125}I]N-(2-piperidinilaminoetil)-4-iodobenzamida y [^{131}I]N-(2-piperidinilaminoetil)-4-iodobenzamida. Se presentan, además los resultados de los ensayos realizados para la purificación y separación de las moléculas obtenidas por cromatografía en capa delgada y de alta precisión. Por último son consignados los resultados obtenidos en las experiencias en animales tendientes a determinar el comportamiento in vivo y la toxicidad de las moléculas obtenidas.

INTRODUCCIÓN

Dada la naturaleza agresiva del melanoma maligno, la detección temprana de su presencia y del desarrollo de metástasis es de suma importancia. Más aún, si la detección de esta patología se realiza en una etapa temprana, la posibilidad de sobrevida es cercana al 100%. El radiofármaco más utilizado y el menos específico para la detección de tumores es el citrato de ^{67}Ga , sin embargo los resultados en pacientes con melanoma han sido modestos. También se han desarrollado radiofármacos con afinidad por la melanina, pero hasta este momento ninguno tuvo éxito en la detección temprana de metástasis. Al principio de esta década se publicaron los primeros resultados de compuestos iodados aminoaromáticos, ^{1,2} marcados con ^{123}I para melanoma maligno, con resultados muy prometedores: ^{123}I -N-(2-dietilaminoetil)-4-iodobenzamida (IDAB) y ^{123}I -(2-piperidinil-aminoetil)-4-iodobenzamida (IPAB).

Nuestra Institución ha ido acumulando experiencia en la producción y control de calidad de moléculas marcadas con ^{131}I y ^{125}I ; contando con la infraestructura necesaria y personal capacitado para la tarea. Además, con la entrada en funcionamiento del ciclotrón de producción, en un futuro cercano se podrá contar con ^{123}I en forma regular, con lo cual está cercana la posibilidad de preparación en nuestro país de compuestos de este nucleico de gran valor diagnóstico en SPECT.

En este contexto se realizó la síntesis de IDAB e IPAB, marcadas con ^{125}I e ^{131}I , como paso preliminar a la obtención de benzamidas marcadas con ^{123}I .

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La síntesis se basó en una modificación del método que fuera publicado para la síntesis de N-(2-dietilaminoetil)-4-halobenzamida.³ El mismo se adaptó para la síntesis de (2-piperidinilaminoetil)-4-halobenzamida. Se basa en la reacción del cloruro de 4-halobenzoílo disuelto en dioxano/trietilamina con la 2-dietilaminoetilamina o la 1-(2-aminoetil)-piperidina. El producto de reacción se extrajo en medio básico, con diclorometano. Se cristalizó y se purificó por recristalización en acetato de etilo.

Para la caracterización de las moléculas frías se utilizaron las siguientes técnicas:^{4, 5, 6}

- 1) Determinación del punto de fusión.
- 2) Espectro ¹H-RMN, 200 MHz.
- 3) Espectros FT-IR.
- 4) Espectroscopía UV-VIS
- 5) Cromatografía en capa delgada (TLC) en cromatofolios de aluminio recubiertos con silicagel 60 F₂₅₄
- 6) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), isocrática, con columna de fase reversa y detector de arreglo de diodos.

Las moléculas sintetizadas se marcaron con ¹²⁵I y ¹³¹I. El primer radioisótopo se obtuvo comercialmente (New England Nuclear) sin portador, con una actividad específica de 17 Ci/mg. El ¹³¹I se obtuvo en el CAE por activación (n,γ) de un blanco de óxido de telurio. La actividad específica fue mayor de 10 Ci/mg.

Fueron estudiados varios métodos de iodación por intercambio isotópico y no isotópico: con catalizador de transferencia de fases, con catalizador metálico y por fusión. Para etapas posteriores se adoptó este último. Consiste en el calentamiento de la molécula a marcar y el yoduro radiactivo a una temperatura por encima de su punto de fusión (150°C) con el agregado de exceso de sulfato de amonio. El control de la pureza radioquímica del compuesto marcado se realizó por cromatografía ascendente en silicagel (TLC), utilizando etanol como eluyente.

En cuanto a estudios in vivo se realizaron de dos tipos. En primera instancia se determinó la dosis letal 50.⁷ Posteriormente se estudió la biocinética de las moléculas iodadas. En ambos casos se utilizaron ratones de la cepa NIH, de ambos sexos y con un peso comprendido entre 28 y 30 g. Para la realización del estudio DL-50 se inyectaron distintas masas del compuesto y se estudió el porcentaje de mortalidad en función de la dosis. El estudio de la biocinética comprendió la administración endovenosa del compuesto marcado y evaluación de la captación en los distintos órganos por sacrificio y disección de los animales. Los órganos de interés se midieron en un calibrador de dosis, calculándose los porcentajes con respecto a la dosis inyectada.

RESULTADOS

Los valores de punto de fusión de las moléculas sintetizadas se presentan en la tabla I.

Los espectros obtenidos por resonancia magnética nuclear ($^1\text{H-RMN}$) tienen una buena correspondencia con los datos de bibliografía.

δ $^1\text{H-RMN}$ BrDAB = 1,04 (t, 6H, CH_3); 2,58 (c, 4H, CH_2); 2,66 (t, 2H, CH_2); 3,48 (c, 2H, CH_2); 7,00 (s ancho, 1H, NH); 7,55-7,69 (c, 4H, Ar)

δ $^1\text{H-RMN}$ BrPAB = 1,49 (t, 2H, CH_2); 1,59 (c, 4H, CH_2); 2,43 (t, 4H, CH_2); 2,54 (t, 2H, CH_2); 3,49-3,52 (c, 2H, CH_2); 6,98 (s, 1H, NH); 7,55-7,68 (c, 4H, Ar)

s = singulete, t = triplete, c = cuarteto, m = multiplete, Ar = aromático.

En los espectros FT-IR obtenidos (en pastilla de KBr) para IDAB, BrDAB y BrPAB se observan: tensión C=O aromático ($\sim 1630\text{ cm}^{-1}$), tensión N-H de la amida ($\sim 3350\text{ cm}^{-1}$), flexión C-H aromático fuera del plano con 2 H adyacentes ($\sim 840\text{-}850\text{ cm}^{-1}$), tensión C-N del grupo amida ($\sim 1300\text{ cm}^{-1}$) y vibraciones de esqueleto aromático en el plano ($\sim 1590\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1480\text{ cm}^{-1}$). Estos valores se expresan aproximados, debido a que los tres compuestos dan estas absorciones, con valores muy cercanos a los citados.

Con respecto a la caracterización cromatográfica, después de estudiar distintos sistemas se adoptó el sistema de solventes para la purificación, a escala preparativa, de las benzamidas sintetizadas y como método alternativo a la extracción en diclorometano (Tabla II).

El sistema isocrático de HPLC fue evaluado para el estudio de la pureza de los productos de reacción y como método potencial de separación de la *IDAB de la BrDAB. Se consiguió una buena separación de los tiempos de retención, según se puede observar en la Tabla III. En la figura 1 se muestra un cromatograma típico.

Se comparó la eficiencia de marcación de los distintos métodos, observándose que ésta es menor cuando se trata de un método no isotópico. Para los estudios posteriores se adoptó el método de iodación por fusión. Para mejorar el rendimiento de éste se estudiaron algunas variaciones. Se observó que manteniendo la temperatura a $150\text{ }^\circ\text{C}$ los resultados mejoraban notablemente, a tal punto que cuando la temperatura se aumenta hasta $170\text{ }^\circ\text{C}$ el rendimiento de marcación baja abruptamente. En cuanto a la masa de sulfato de amonio se estableció en 5 mg (para 1 mg de benzamida). Para masas menores los resultados de la marcación son erráticos. Cuando la masa de sulfato de amonio es de 10 mg o mayor el rendimiento comienza a descender. Con estas condiciones (5 mg de sulfato de amonio y $150\text{ }^\circ\text{C}$) se alcanzaron rendimientos cercanos al 100%.

Los resultados de los cálculos de la dosis DL-50 se consignan en la tabla IV.

En los estudios de biodisponibilidad se observó que los compuestos tienen captación cerebral, siendo ésta mayor del 1% de la dosis inyectada, a los 15 minutos post inyección. En las tablas V y VI se presentan los resultados para IDAB e IPAB. Estos se expresan como % de la dosis inyectada \pm desvío estándar (n=5).

CONCLUSIONES

Se han obtenido las benzamidas propuestas, siendo caracterizadas por métodos

espectroscópicos y cromatográficos.

Se han probado distintos métodos de marcación con yodo, habiéndose optado por uno de fácil realización y alta reproducibilidad.

Los estudios de biodisponibilidad demuestran la alta afinidad cerebral de los compuestos, lo que nos hace pensar que se ha obtenido el comportamiento biológico esperado.

REFERENCIAS

1. John C.S., Baumgold J., Wilner B. J., McAfee J. G., Bowen W. D. “[¹²⁵I]N-(2-Piperidinylaminoethyl)4-iodobenzamide and related analogs as sigma receptor imaging agents; high affinity binding to human malignant melanoma and rat C6 glioma cell lines”, *J.Label.Comps.Radiopharm.* 35, 24: 244, (1994).
2. John C. S., Bowen W. D., Saga T, Kinuya S., Vilner B. J., Baumgold J., Paik C., Reba R. CC., Neuman R. D., Varma V. M., McAfee J. G. “A malignant melanoma imaging agent: Synthesis, characterization, in vitro binding and biodistribution of iodine-125-(2-piperidinylaminoethyl)4-iodobenzamide”. *J. Nucl. Med.* 34: 2169-2175, (1993).
3. Brandau W., Kirchner B., Bartenstein P., Sciuk J., Kamanbrou D., Schober O. “N-(2-diethylaminoethyl)-4-[¹²³I]iodobenzamide as a tracer for the detection of malignant melanoma: simple synthesis, improved labelling technique and first clinical results”. *Eur.J.Nucl. Med.* 20: 238-243, (1993).
4. Pasto, Daniel J.; Johnson, Carl R. *Determinación de estructuras orgánicas*. Barcelona: Reverté; (1974). Traducción de la edición en inglés “*Organic Structure Determination*”
5. Seevers, R. H., Counsell R. E. *Chem. Rev.* 82, 575-590, (1982).
6. Williams, Dudley H.; Fleming, Ian. *Spectroscopic methods in Organic Chemistry*. 2nd ed. London: McGraw-Hill, (1973)
7. Miller L. C., Tainter, M. L. “Estimation of DE₅₀ and its error by means of logarithmic-probit graph paper”. *Science* 79, 38, (1934)

FIGURAS Y TABLAS

TABLA I. Puntos de fusión

PF _{IDAB}	= 72-73 °C
PF _{BrDAB}	= 75-77 °C
PF _{IPAB}	= descompone a partir de 81 °C
PF _{BrPAB}	= descompone a partir de 85 °C

TABLA II. Cromatografía en capa delgada

SOLVENTE	R _f				
	BrDAB	IDAB	IBzOCl	BrBzOC I	ácido
Tolueno:acetato de etilo (80:20)	0	0	0	0	0
Tolueno:acetato de etilo:ácido acético (50:10:10)	0	0	0,6	0,5	0,6
Etanol:NH ₃ (50:1)	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6
Etanol:NH ₃ (50:0,5)	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5
Etanol:NH ₃ (80:20)	0,8	0,8	0,7	0,7	0,6
2-propanol: NH ₄ OH (80:20)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,5
Acetato de etilo:2-propanol (80:20)	0	0	0,7	0,7	0,2
Acetato de etilo:2-propanol (60:40)	0,06	0,06	0,7	0,7	0,35
Acetato de etilo:2-propanol: NH ₄ OH (55:45:10)	0,7	0,7	0,8	0,8	0,14
Acetato de etilo:2-propanol: NH ₄ OH (55:40:5)	0,8	0,6	0,8	0,6	0,09
Acetato de etilo: 2-propanol: NH ₄ OH (60:35:5)	0,5	0,5	0,8	0,8	0,07

TABLA III. HPLC, tiempos de retención según la composición del eluyente

SOLVENTE DE CORRIDA *	Tiempo de retención (minutos)				
	BrDAB	IDAB	BrBzCl	IBzCl	IBzOH
30:70	6,22	6,44	3,8	4,1	3,0
40:60	11,95	13,24	10,0	11,5	3,7
50:50	19,9	23,8	16,9	18,4	4,9

*Fosfato de trietilamonio 1% (pH 7,0)/metanol; BrBzCl: cloruro de 4-bromobenzoilo
IBzCl: cloruro de 4-iodobenzoilo; IBzOH: ácido iodo benzoico

TABLA IV. Dosis letal cincuenta

BrDAB	(54,5±6,4) mg/kg de peso
BrPAB	(23,3±2,2) mg/kg de peso

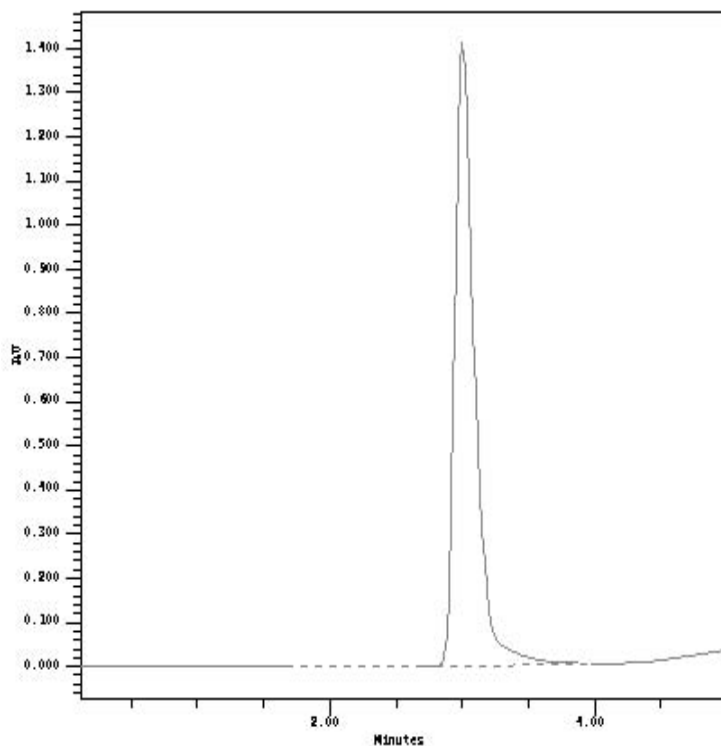
TABLA V. Distribución biológica de *IDAB

Organo	TIEMPO (minutos)				
	5	10	15	30	60
Cerebro	2,5±0,2	2,2±0,2	1,4±0,4	1,0±0,1	0,6±0,1
Hígado+bazo	13,1±2,5	14,4±1,9	14,2±1,5	12,2±0,6	9,3±0,9
Exc. Urinaria	6,2±0,8	12,3±0,7	19,6±2,2	29,1±0,2	40,4±7,2
Gastrointestinal	15,2±1,2	17,1±1,0	18,0±1,1	19,1±0,6	16,7±2,0
Pulmón	3,5±0,4	3,9±0,4	3,0±0,8	2,4±0,1	2,3±0,4

TABLA VI. Distribución biológica de *IPAB

Organo	TIEMPO (minutos)				
	5	10	15	30	60
Cerebro	2,5±0,2	1,8±0,3	1,4±0,2	1,1±0,1	0,6±0,2
Hígado+bazo	18,4±1,2	17,9±0,9	18,3±1,2	16,2±0,6	10,2±0,9
Exc. Urinaria	9,5±0,7	11,5±0,9	16,2±0,8	25,1±0,4	39,4±3,2
Gastrointestinal	19,7±1,0	20,8±1,2	21,3±0,4	22,9±1,6	21,8±1,4
Pulmón	2,5±0,1	2,4±0,2	1,8±0,3	1,7±0,3	1,7±0,3

Sample Name: IBzOH Dilution: 5.00000
 Sample Weight: 1.50000 Volume: 20.00
 Sample Type: Unknown Run Time: 5.0 min
 Channel: 996



_____ (1.41AU) SampleName: IBzOH Vial: 2 Injection: 1 Channel: 996

Figura 1. Cromatograma en HPLC de IDAB