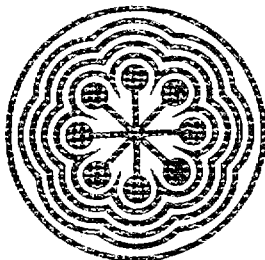




MX0600277

220  
Ej. 2

**instituto nacional de investigaciones nucleares**



SINTESIS DEL D, I-HM-PAO Y FORMULACION DE  
NUCLEO-EQUIPOS PARA LA OBTENCION DE  $^{99m}\text{Tc}$ -  
(4 1)-HM-PAO

**INFORME TECNICO**

**MR-RF-02  
PROYECTO BA-180**

**SINTESIS DEL d,l-HM-PAO Y FORMULACION DE NUCLEO-EQUIPOS  
PARA LA OBTENCION DE <sup>99m</sup>Tc-(d,l)-HM-PAO**

**Judith Lezama C., Guillermina Ferro F. y Patricia Alcázar A.**

**Septiembre de 1991  
Departamento de Materiales Radiactivos  
Gerencia de Servicios Técnicos Nucleares  
División de Servicios Técnicos  
Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares  
Sierra Mojada # 447 Col. Lomas de Barrilaco  
C.P. 11010 México, D.F.**

## **CONTENIDO**

- 1. RESUMEN**
- 2. INTRODUCCION**
- 3. MATERIAL Y METODOS**
- 4. RESULTADOS Y DISCUSION**
- 5. CONCLUSIONES**
- 6. BIBLIOGRAFIA**

## ABSTRACT

Most brain imaging radiopharmaceuticals are conventional hydrophilic compounds that are excluded from entering the normal brain by an intact blood-brain barrier (BBB). Under pathologic conditions, the barrier is disrupted and radiotracer concentrates in the lesion for positive identification.  $^{99m}\text{Tc}$ -hexamethylpropyleneamineoxime ( $^{99m}\text{Tc}$ -HM-PAO) is a newer-type lipophilic agent that enters the normal brain through an intact BBB. Studies with this agent offer the promise of measuring cerebral perfusion in the normal and diseased brain. In this paper we present the synthesis and  $\text{Tc-}^{99m}$  labelling of d,l-HM-PAO. The synthesis of the ligand was carried out by condensation of two molecular equivalents of butanedione monoxime with one molecular equivalent of 1,3-propanediamine provided a bisimine intermediate, which was reduced with sodium borohydride to get the meso and d,l diastereoisomers of HM-PAO. Separation of these was achieved by fractional crystallisation.  $^{99m}\text{Tc}$ -(d,l)HM-PAO was obtained by stannous ion reduction of Mo-99/ $^{99m}\text{Tc}$  generator eluate in the presence of the ligand. Complex radiochemical purity was determined by instant thin layer chromatography and paper chromatography. Finally, we obtained  $^{99m}\text{Tc}$ -(d,l)HM-PAO with a high radiochemical yield, in excess of 90%. However, for subsequent clinical studies the preparation has to be done a few minutes before application because our product has a low stability.

## 1. RESUMEN

La mayoría de los radiofármacos utilizados en medicina nuclear para imágenes cerebrales, son compuestos hidrofílicos que sólo funcionan cuando la barrera hematoencefálica (BHE) se encuentra alterada. El  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA,  $^{99m}\text{Tc}$ -Glucoheptonato y  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  se acumulan momentáneamente en tejidos cerebrales cuando la BHE se ve afectada por lesiones vasculares, tumorales o traumatismos. El  $^{99m}\text{Tc}$ -hexametipropilenoaminaoxima ( $^{99m}\text{Tc}$ -HM-PAO) es un nuevo agente lipofílico que cruza la barrera hematoencefálica inalterada, permitiendo realizar estudios de perfusión cerebral y detectar enfermedades como demencia, epilepsia, migraña y mal de Alzheimer por mencionar algunas. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue realizar la síntesis del ligante d,l-HM-PAO y su marcaje con Tc-99m.

La síntesis del ligante fue llevada a cabo por la condensación de dos equivalentes moleculares de 2,3-butanedionaminoxima con un equivalente de 1,3-propanodiamina. La bisimina resultante fue reducida con borohidruro de sodio para obtener la mezcla de diastereoisómeros meso y d,l del HM-PAO, cuya separación se logró por cristalización fraccionada. El desarrollo de la formulación del núcleo-equipo para la formación del complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -HM-PAO se realizó utilizando diferentes concentraciones de d,l-HM-PAO y  $\text{SnCl}_2$  así como diversos potenciales de hidrógeno (pH). La pureza radioquímica del compuesto y su estabilidad, se determinó por cromatografía ascendente, utilizando ITLC-SG (metiletilcetona y NaCl 0.9%) y tiras de papel Whatman # 1 (acetoniitrilo : agua 1:1) para separar el complejo lipofílico de impurezas hidrofílicas,  $\text{TcO}_2$  y  $\text{TcO}_4^-$ .

El rendimiento global de la síntesis fue muy bajo (1.2%), ya que la reacción de condensación es altamente reversible en presencia de unas cuantas moléculas de agua y la bisimina obtenida sumamente inestable. Los resultados en la formulación del núcleo-equipo mostraron que con 1.16mg de ligante, 0.017mg de  $\text{SnCl}_2$  y pH 9.0 en presencia de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  se obtiene  $^{99m}\text{Tc}$ -HM-PAO con una pureza radioquímica superior al 90%, sin embargo, sólo es estable dentro de los primeros 20 minutos. El núcleo-equipo congelado provee un complejo con pureza radioquímica aproximada de 80% después de dos semanas de su preparación.

Concluyendo, se obtuvo el complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -(d,l)-HM-PAO en una solución estéril, apirógena e isotónica con una pureza radioquímica superior al 90% para estudios de perfusión cerebral y marcado de leucocitos. Debido al costo y a la inestabilidad del compuesto, sólo será posible utilizarlo en algunos hospitales a nivel piloto pero no distribuirse comercialmente.

## 2. INTRODUCCION

Durante algún tiempo, el éxito de la medicina nuclear se debió a la obtención imágenes tumorales cerebrales mediante el uso de radiofármacos que servían para detectar cambios en la barrera hematoencefálica. El  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA ( $^{99m}\text{Tc}$ -dietilentriaminopentacético),  $^{99m}\text{Tc}$ -GH ( $^{99m}\text{Tc}$ -glucoheptonato) y el  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , se acumulaban momentáneamente en tejidos cerebrales cuando la barrera hematoencefálica se veía alterada por afecciones tumorales, lesiones vasculares o traumatismos.

La aparición de la tomografía computarizada y luego de la resonancia magnética nuclear, disminuyó notablemente la frecuencia de estudios realizados para imágenes cerebrales planares. Sin embargo, la medicina nuclear volvió a brillar con el desarrollo reciente de la tomografía computarizada por emisión de positrones (PET) y la tomografía computarizada por emisión de un solo fotón (SPECT), que con el uso de nuevos radiofármacos altamente lipofílicos que atraviesan la barrera hematoencefálica inalterada, pueden llevarse a cabo estudios de metabolismo y perfusión cerebral.

En el grupo de nuevos radiofármacos cerebrales se pueden incluir aminas radioyodadas, llamadas yodoanfetaminas, y una serie de ligantes para formar complejos con tecnecio. De estos últimos podemos mencionar la PnAO (propilenaminaoxima), TM-PAO (tetrametilpropilenaminaoxima), PM-PAO (pentametilpropilenaminaoxima), HM-PAO (hexametilpropilenaminaoxima) y CB-PAO (ciclobutanopropilenamina-oxima), todos ligantes tetradentados que forman con el oxo-tecnecio (V) complejos del tipo  $[\text{TcO-L}]$ .

Diversos estudios han concluido que el d,l-HM-PAO marcado con tecnecio posee las mejores características fisicoquímicas para ser utilizado como agente cerebral, ya que:

- A. Cruza eficientemente la barrera hematoencefálica inalterada.
- B. En el primer paso la extracción vascular-cerebral es mayor de 80%.
- C. Se conserva una alta concentración por más de 24 horas en el tejido cerebral, especialmente en la materia gris, cerebelo y ganglios basales.
- D. Su distribución refleja el flujo sanguíneo cerebral y no hay redistribución posterior, por ello:
  - Detecta cambios en el patrón de distribución en varias patologías y trastornos mentales como: demencia, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, migraña, ruptura de aneurismas, hemorragias subaracnoideas.
  - Localiza tempranamente el infarto agudo cerebral, incluso antes que con tomografía computarizada.

- Delimita el tamaño real o verdadero de zonas isquémicas y adyacentes a cambios morfológicos y ataque de isquemia transitoria.

E. Es útil para valorar traumatismo cerebral.

F. Las imágenes obtenidas con SPECT son de excelente calidad, sin embargo, las obtenidas con cámara de centelleo son de utilidad clínica.

G. Es útil para marcar leucocitos.

En base a lo anteriormente mencionado, el objetivo principal de este trabajo, fue desarrollar la síntesis y formulación de núcleo-equipos para la obtención de  $^{99m}\text{Tc}$ -HM-PAO utilizado en estudios de perfusión cerebral.

### 3. MATERIAL Y METODOS

La síntesis del HM-PAO fue llevada a cabo mediante la condensación de la 2,2-dimetil-1,3-propanodiamina (Aldrich, No. Cat. 22-690-0) con la 2,3-butanedionamonoxima (Aldrich, No. Cat. 11,213-5) y posterior reducción de la bisimina resultante con borohidruro de sodio (ICN-BIOCHEMICAL) bajo el siguiente procedimiento:

#### 1. PREPARACION DE LA 4,8-DIAZA-3,6,6,9-TETRAMETIL-3,8-UNDECADIENO-2,10-DIONA BISOXIMA.

1.1. En un matraz bola de tres bocas de 250ml se agregó 12.0g (118.8 mmol) de 2,3-butanedionamonoxima y se disolvió en 50ml de benceno conteniendo 75µl de ác. acético glacial, la solución se refluxó en un aparato provisto de una trampa de Dean-Stark bajo atmósfera de nitrógeno.

1.2. Mediante un embudo de adición se agregó, gota a gota, 7ml (59 mmol) de la 2,2-dimetil-1,3-propanodiamina disuelta en 100ml de benceno, la mezcla se refluxó por 20 hrs. y posteriormente se dejó enfriar por 24 hrs. a temperatura ambiente.

1.3. El sólido resultante se filtró y se lavó con dos porciones de 5ml de acetonitrilo frío con la finalidad de eliminar subproductos de oxidación de la amina.

1.4. Los cristales obtenidos se colocan en 30ml de benceno a 50° C, disolviéndose así la 2,3-butanedionamonoxima que no reaccionó. El producto que no se disolvió es la bisoxima deseada. La recristalización en benceno provee un polvo blanco que funde a 130-132° C. Rendimiento 25%.

## 2. PREPARACION DE 4,8-DIAZA-3,6,6,9-TETRAMETILUNDECANO-2,10-DIONA BISOXIMA.

2.1. Se disolvieron 2.0g de la diimina en 25ml en etanol al 95% a 0°C y se adicionó, poco a poco, 300mg de NaBH<sub>4</sub>.

2.2. La mezcla se dejó en agitación a 0° C por dos horas y entonces se adicionaron 8ml de agua dejándose, nuevamente, en agitación por dos horas.

2.3. El etanol de la reacción fue removido mediante vacío e inyección de nitrógeno.

2.4. Se agregaron 3ml más de agua y se ajustó el pH a 11, dejando la mezcla al vacío por 24 hrs.

2.5. El sólido resultante se filtró y lavó con pequeñas porciones de agua. La recristalización en acetonitrilo provee la mezcla de diastereoisómeros p.f. 110-118° C. Rendimiento 32%.

2.6. Cuando se recristaliza en acetato de etilo, la primera fracción que cristaliza es el d,l-HM-PAO p.f. 124-126° C. Rendimiento 15%.

El desarrollo de la formulación del nucleo-equipo para la formación del complejo <sup>99m</sup>Tc-HM-PAO se llevó a cabo utilizando diferentes concentraciones de ligante y SnCl<sub>2</sub> así como diversos potenciales de hidrógeno (pH):

No.	HM-PAO (mg)	SnCl <sub>2</sub> (mg)	pH
1	1.06	0.3	3,5 y 8
2	1.12	0.16	3,5 y 8
3	1.16	0.025	3,5 y 8
4	1.6	0.017	3,5 y 8
5	1.16	0.017	5,8 y 9

El procedimiento general que se siguió para la preparación de las diferentes formulaciones del radiofármaco fue el siguiente:

A. Se disolvió la hexametilpropilenoaminaoxima en 3ml de solución salina ajustando el pH a 8.5.

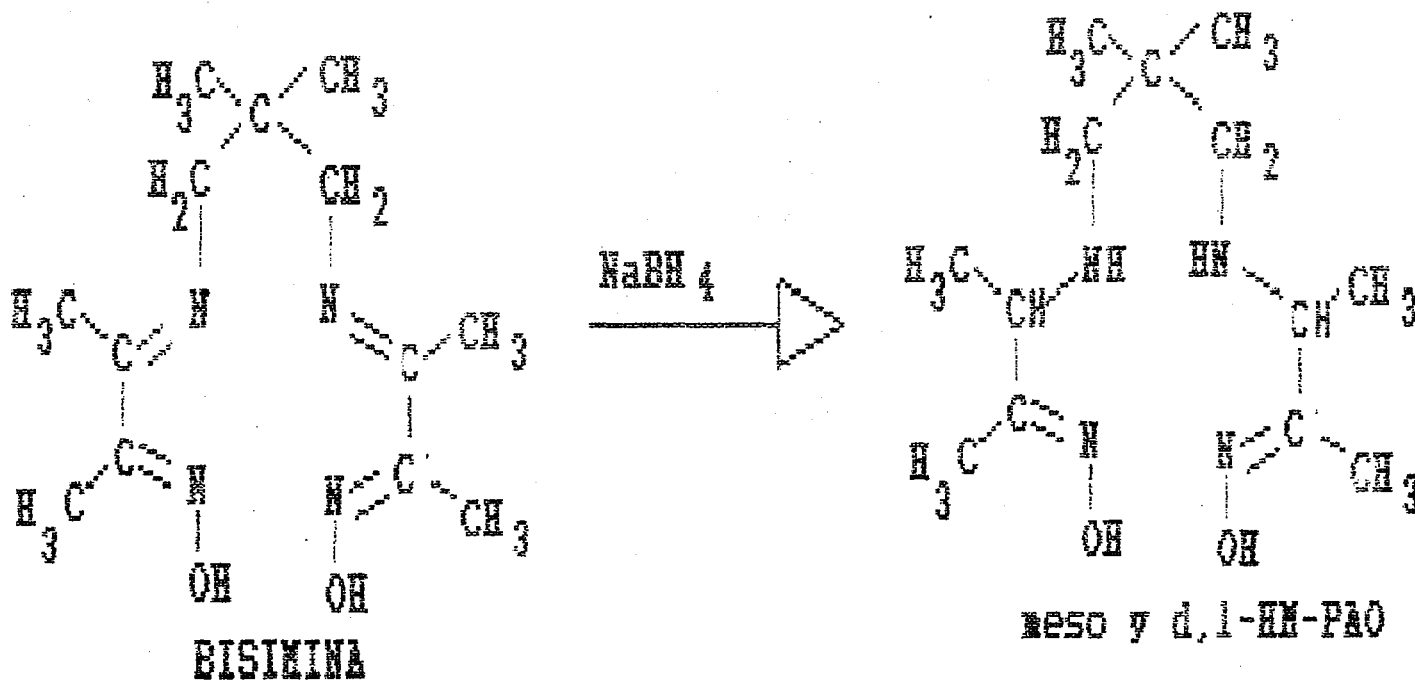
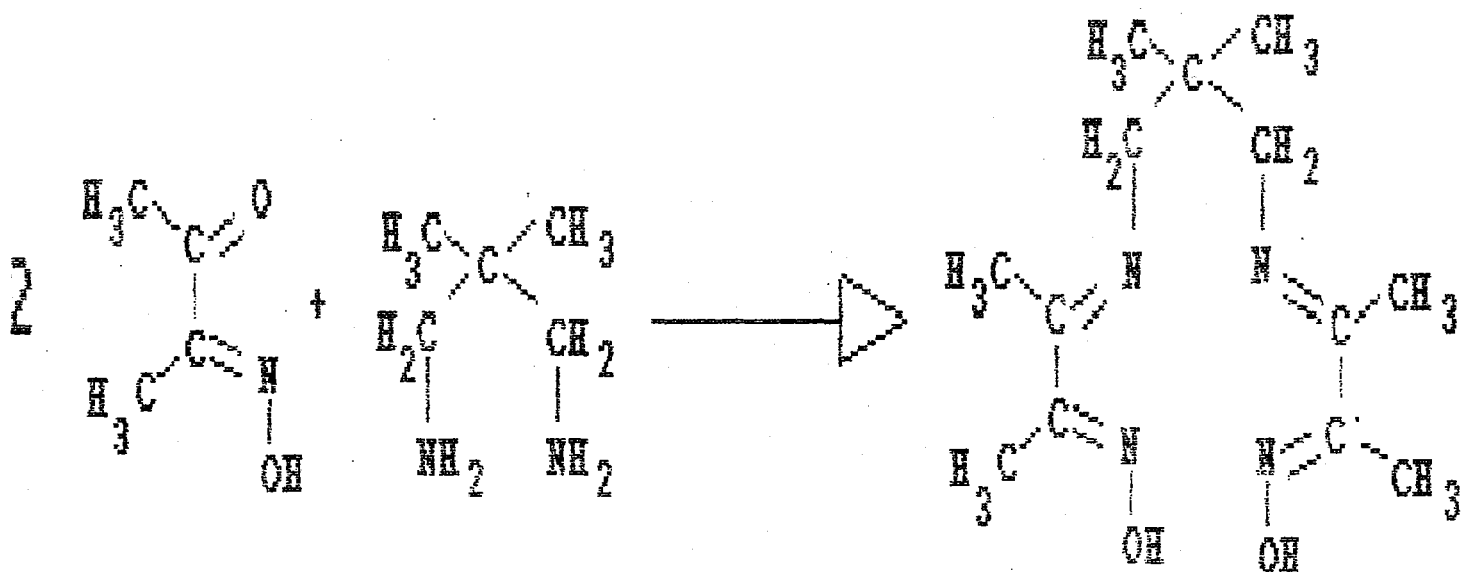
B. Aparte, el cloruro estannoso se mezcló en 1.0 ml de hidróxido de sodio 1N, agitándose en vórtex hasta completa disolución.

C. A la solución "A" se le agregó 15µl de la solución "B" ajustando la mezcla al respectivo pH.

D. La solución se esterilizó haciéndola pasar a través de un filtro millipore de 0.22µ estéril.



# SINTESIS DEL LIGANTE d,l-HH-PAO



meso y d,l-HH-PAO  $\xrightarrow{\text{CRISTALIZACION FRACCIONADA}}$  d,l-HH-PAO

E. Finalmente, la solución se traccionó en alícuotas de 350µl en frascos tipo penicilina de 5 ml, se sellaron con retapas de aluminio y algunos se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido mientras que otros se liofilizaron.

La formación del complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -HM-PAO, se realizó añadiendo a las soluciones congeladas o liofilizadas de 2 a 5 ml de solución de pertechnetato de sodio obtenida de un generador de  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$  (GETEC).

La pureza radioquímica del compuesto se determinó por cromatografía ascendente, utilizando como soportes ITLC-SG y tiras de papel Whatman # 1 con diferentes sistemas eluyentes separando:

COMPUESTO	SISTEMA (Rf)		
	1	2	3
$^{99m}\text{Tc}$ -HM-PAO-primario	0.9-1.0	0	0.9-1.0
$^{99m}\text{Tc}$ -HM-PAO-secundario	0	0	0.9-1.0
$^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0	0	0
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	0.9-1.0	0.9-1.0	0.9-1.0

Donde:

1= ITLC-SG, metiletilcetona

2= ITLC-SG, NaCl 0.9%

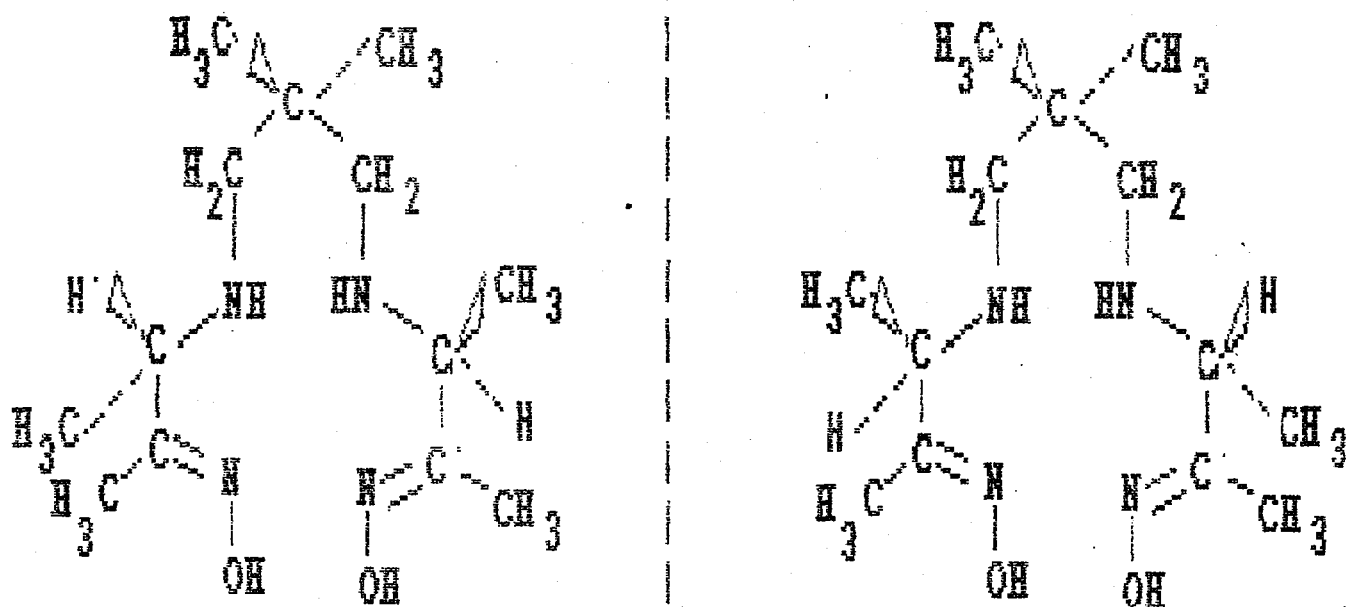
3= Papel Whatman #1, acetonitrilo:agua (1:1)

Una vez que el HM-PAO se formuló, se analizó su estabilidad mediante el marcado con  $\text{Tc-}^{99m}$  a: 2 minutos, 30 minutos, 24 horas, 48 horas, 2 y 3 semanas.

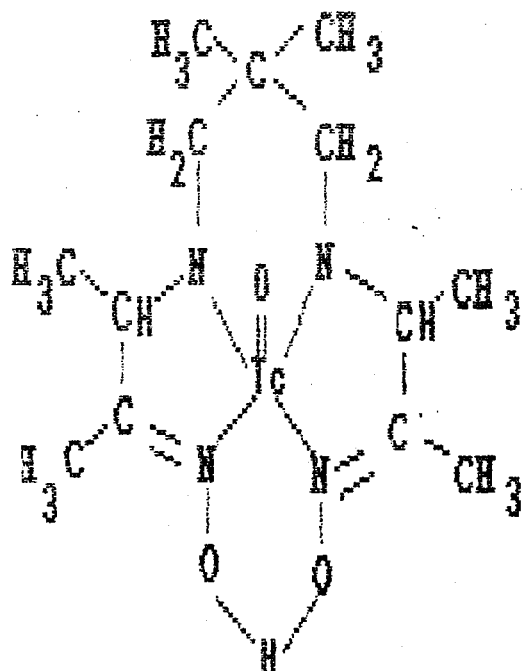
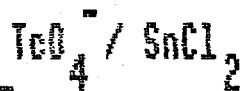
#### 4. RESULTADOS Y DISCUSION

Por cada lote de síntesis del ligante se obtuvo 160mg de d,l-HM-PAO con las siguientes características: p.f. 124-126° C; IR (KBr) 1640  $\text{cm}^{-1}$  (C=N; C=NOH); RMN<sup>1</sup>H (DMSO) 3.2 ppm (4H,s,CH<sub>2</sub>N), 1.9 ppm (12 H,s, CH<sub>3</sub>C), 1.0 ppm (6H,s,C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), además de los espectros de masa que confirman la estructura. El rendimiento global de la síntesis fue muy bajo (1.2%), ya que la reacción de condensación es altamente reversible en presencia de unas cuantas moléculas de agua y la bisimina obtenida sumamente inestable.

MARCAJE DEL LIGANTE d,1-NM-PAO CON  $^{99m}\text{Tc}$



d,1-NM-PAO



$^{99m}\text{Tc}-(d,1)\text{-NM-PAO}$

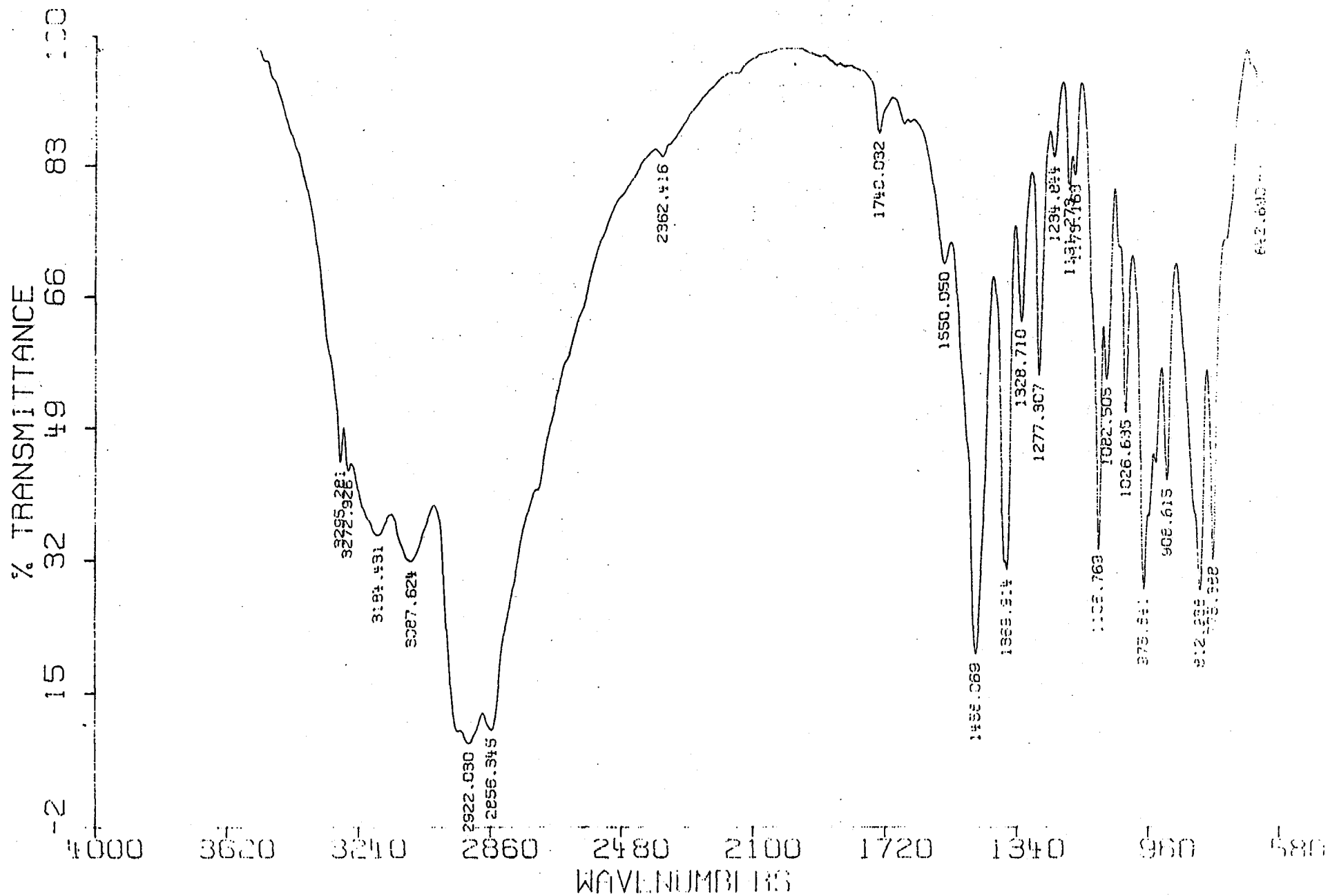
Como puede observarse en la Tabla I, la formulación No. 5 (1.16 mg d,l-HM-PAO y 0.017mg de SnCl<sub>2</sub>) es la que presentó una mayor pureza radioquímica pero claramente influenciada por el pH básico. Esto nos hizo suponer que la formación de complejos de Tc-99m con ligantes N (nitrógeno), se ve favorecido a pH's alcalinos por lo que, como puede observarse en la Tabla II, se obtuvo una pureza superior al 90% en las formulaciones preparadas a pH 9.0-9.5.

La Tabla III muestra la estabilidad del complejo marcado. Si suponemos que el compuesto podría utilizarse con no menos del 80% de pureza radioquímica, entonces sólo sería útil dentro de los primeros 20 minutos post-marcaje. Las pruebas de estabilidad del núcleo-eQUIPO congelado, muestran que en esta forma, podría almacenarse por un período aproximado de dos semanas (Tabla IV). Sin embargo, cada vez que el núcleo-eQUIPO trataba de liofilizarse la pureza radioquímica descendía hasta un 65-70%.

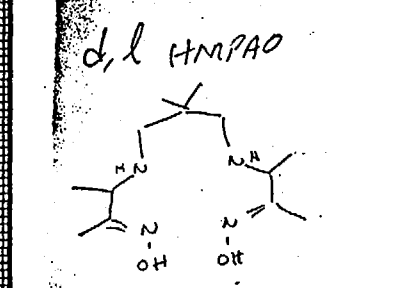
De todo lo anterior, podemos decir que a nivel piloto fue posible obtener el complejo <sup>99m</sup>Tc-HM-PAO en una solución estéril, apirógena e isotónica con una pureza radioquímica superior al 90%, lista para ser utilizada en estudios de perfusión cerebral o en el marcaje de glóbulos blancos (Leucocitos). Con la formulación obtenida es posible realizar algunos trabajos de investigación clínica, ya que preparando el radiofármaco "in-situ" podrían detectarse enfermedades cerebrales o procesos infecciosos ocultos. No obstante, los bajos rendimientos durante su proceso de síntesis lo hacen ser un producto muy costoso. Además, su gran inestabilidad al ser liofilizado y/o congelado hacen prácticamente imposible su distribución comercial.

## 5. CONCLUSIONES

Se obtuvo el complejo <sup>99m</sup>Tc-HM-PAO en una solución estéril, apirógena e isotónica con una pureza radioquímica superior al 90% para estudios de perfusión cerebral y marcaje de leucocitos. Debido al costo y a la inestabilidad del compuesto, sólo será posible utilizarlo en algunos hospitales a nivel piloto pero no distribuirse comercialmente.



CFT-20  
 SPECTRUM NO. 3280  
 OPERATOR RG DATE 13-V-10  
 SAMPLE M.M.T.Z.  
 TUBE OD: 5mm  8mm  10mm



NUCLEI:  <sup>1</sup>H  <sup>13</sup>C  <sup>31</sup>P

LOCK  INTERNAL  EXTERNAL  
 LOCK SIGNAL DMO + CDCl3  
 SPIN RATE \_\_\_\_\_ rps. TEMP \_\_\_\_\_ °C

ACQUISITION  
 SPECTRAL WIDTH (SW) \_\_\_\_\_ Hz  
 NO. OF TRANSIENTS (NT) \_\_\_\_\_  
 ACQUISITION TIME (AT) \_\_\_\_\_ sec.  
 PULSE WIDTH (PW) \_\_\_\_\_ μ sec.  
 PULSE DELAY (PD) \_\_\_\_\_ sec.  
 DATA POINTS (DP) \_\_\_\_\_

TRANSMITTER OFFSET (TO) \_\_\_\_\_  
 HIGH FIELD \_\_\_\_\_ LOW FIELD \_\_\_\_\_  
 RECEIVER GAIN (RG) \_\_\_\_\_

DECOUPLER MODE (DM) \_\_\_\_\_  
 DECOUPLER OFFSET (DO) \_\_\_\_\_  
 NOISE BANDWIDTH (NB) \_\_\_\_\_ kHz  
 ACQUISITION MODE (AM) \_\_\_\_\_

DISPLAY  
 SENS. ENHANCEMENT (SE) \_\_\_\_\_ sec.  
 WIDTH OF PLOT (WP) \_\_\_\_\_ Hz  
 END OF PLOT (EP) \_\_\_\_\_ Hz  
 WIDTH OF CHART (WC) \_\_\_\_\_ Hz  
 END OF CHART (EC) \_\_\_\_\_ Hz  
 VERTICAL SCALE (VS) \_\_\_\_\_  
 REFERENCE LINE (RL) TMS

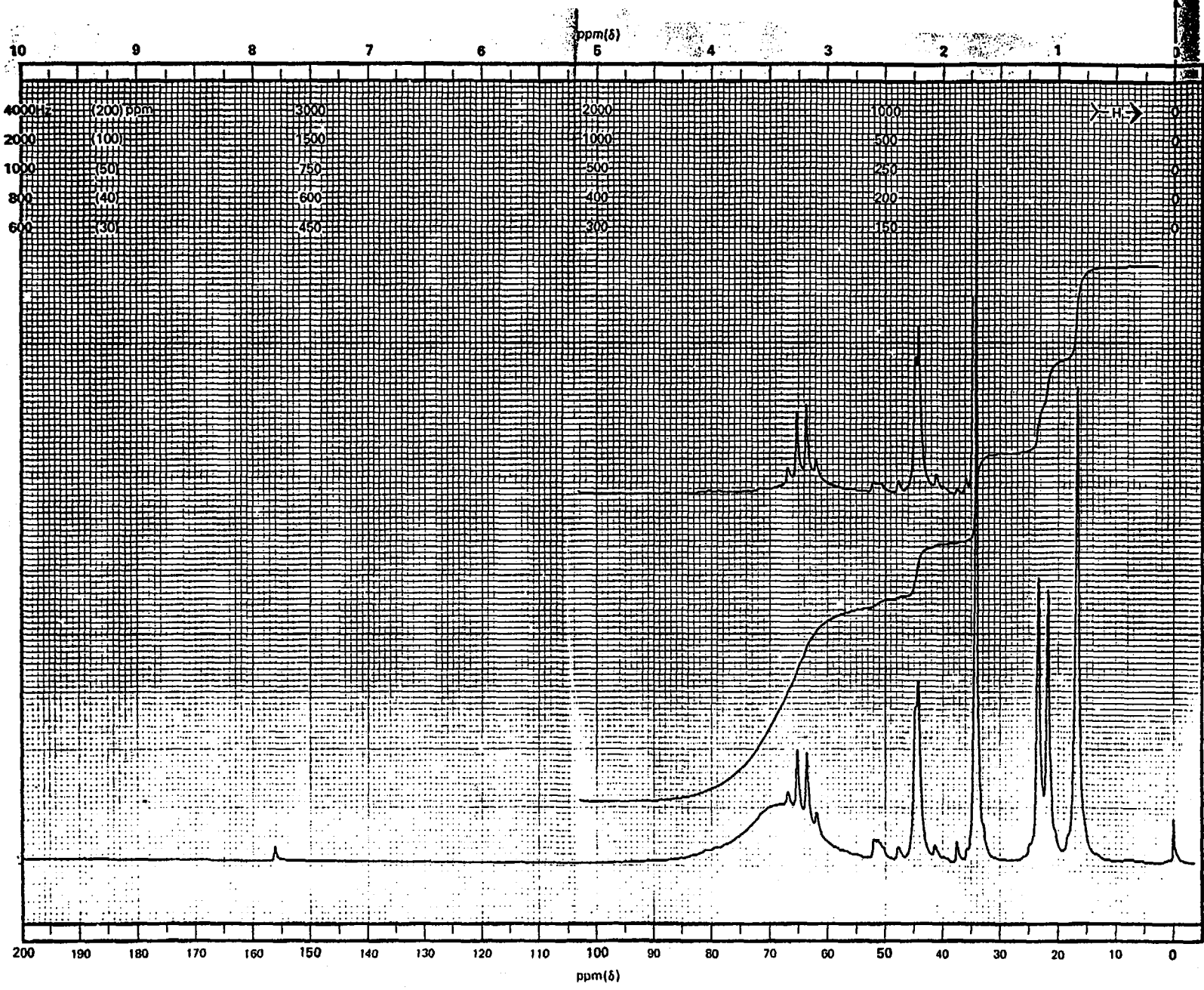


TABLA I. PUREZA RADIOQUIMICA (%) DEL  $^{99m}\text{Tc}-(d,1)\text{-HM-PAO}$  EN DIFERENTES FORMULACIONES.

FORMULACION \ pH	pH		
	3	5	8
1.06mg de HM-PAO 0.3 ng de SnCl <sub>2</sub>	38.8 31.1	34.1 33.0	* *
1.12mg de HM-PAO 0.16mg de SnCl <sub>2</sub>	34.3 35.1	38.2 36.0	* *
1.16mg de HM-PAO 0.825mg de SnCl <sub>2</sub>	24.8 25.9	63.5 65.2	78.5 76.0
1.6mg de HM-PAO 0.817mg de SnCl <sub>2</sub>	19.5 20.2	55.6 57.1	70.1 69.2

NOTA: LA NOTACION \* INDICA ENTURBIAMIENTO TOTAL DE LA SOLUCION POR HIDROLISIS DEL CLORURO ESTANOSO.

TABLA II. PUREZA RADIOQUIMICA (%) DEL  $^{99m}\text{Tc}$ -HM-PAO  
EN 5 DIFERENTES LOTES PARA CADA pH.

FORMULACION \ pH	5	8	9-9.5
1.16 mg DE	82.3	89.2	94.8
HM-PAO	79.2	84.9	92.4
+	76.46	80.1	90.0
0.017 mg DE	78.23	84.1	92.9
$\text{SnCl}_2$	80.4	83.9	91.1



TABLA III. ESTABILIDAD DEL COMPLEJO  $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$   
EN 5 DIFERENTES LOTES.

FORMULACION	TIEMPO POST-MARCAJE (minutos)			
	2	10	20	40
1.16 mg DE	92.4	90.2	80.4	78.4
HM-PAO	94.8	90.3	81.3	76.0
+				
0.017 mg DE	93.7	87.6	83.2	74.3
$\text{SnCl}_2$	90.4	88.3	87.0	76.8
pH 9	91.0	90.0	80.2	77.3

TABLA IV. PRUEBAS DE ESTABILIDAD DEL NUCLEO-EQUIPO CONGELADO PARA LA PRODUCCION DEL  $^{99m}\text{Tc-HK-PAO}$  EN 5 DIFERENTES LOTES (% DE PUREZA RADIOQUIMICA)

LOTE	TIEMPO						
	2min	30min	60min	24hrs	48hrs	2semanas	3semanas
1	91.1	83.0	83.6	81.0	74.3	73.9	68.5
2	93.8	87.5	87.8	87.7	86.0	85.1	74.2
3	92.9	85.8	85.0	86.7	84.0	83.1	77.4
4	94.3	83.3	82.0	81.4	82.2	80.9	78.3
5	91.5	86.0	82.0	82.9	81.5	80.6	72.9

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Kung H.F., Molnar M., Billings J., Wicks R., Blau M.: Synthesis and biodistribution of neutral lipid-soluble Tc-99m complexes that cross the Blood-Brain-Barrier. *J. Nucl. Med.*, 25: 326-332, 1984.
- Holmes R.A., et al: Cerebral uptake and retention of Tc-99m hexamethyl propileneamineoxime (Tc-99m-HM-PAO). *Nucl. Med. Commun.*, 6: 443-447, 1985
- Sharp P.F., Smith F.W., Gemel H.G., Tyrrell D.A., Pickett R.D.: Technetium-99m HM-PAO stereoisomers as potential agents blood flow. Human volunteer studies. *J. Nucl. Med.*, 27: 171-177, 1986.
- Troutner D.E., Volkert W.A., Hoffman J.T., Holmes R.A.: A neutral lipophilic complex of Tc with a multidentate amine oxime. *J. Appl. Radiact. Isot.* 35,6: 467-470, 1984.
- Feinstein J.I., Boazi M., Tor Y.: Assesment of the purity of d,l-HM-PAO from diastereomeric mixtures using NMR techniques. *J. Nucl. Med.* 30: 106-109, 1989.
- Kowalsky R.J., Perry J.R.: *Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine Practice.* Appleton and Lange, California U.S.A., 1987.