

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

РЫЖИКОВ НИКОЛАЙ НИКОЛАЕВИЧ

**ПОЛУЧЕНИЕ ФЛЮМАЗЕНИЛА, МЕЧЕННОГО ФТОРОМ-18,
НОВОГО РАДИОЛИГАНДА ДЛЯ ПОЗИТРОННОЙ
ЭМИССИОННОЙ ТОМОГРАФИИ**

Специальность 02.00.14 –Радиохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ 2005

Работа выполнена на кафедре радиохимии химического факультета Санкт-Петербургского Государственного Университета и в лаборатории радиохимии Института Мозга Человека Российской Академии Наук

Научные руководители:

доктор химических наук, профессор,
заведующий кафедрой радиохимии
ВЛАСОВ ЮРИЙ ГЕОРГИЕВИЧ

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией
ГРАЧЕВ СТАНИСЛАВ АЛЕКСАНДРОВИЧ

кандидат химических наук,
научный сотрудник
ГОРШКОВ НИКОЛАЙ ИВАНОВИЧ

Ведущая организация:

Московский Государственный
Университет им. М.В.Ломоносова

Защита состоится 1 декабря 2005 г в 15 час. 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.232.41 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199004, Санкт-Петербург. Средний проспект В.О., д. 41/43. Большая химическая аудитория

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. А.М. Горького Санкт-Петербургского университета.

Автореферат разослан <__> октября 2005 г

Ученый секретарь диссертационного совета _____ М.Д. Бальмаков

2006-4
19258

2195840

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

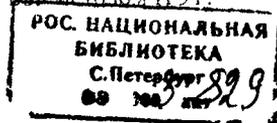
Актуальность темы. Позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) - современный метод ядерной медицины, позволяющий определять количественные характеристики биохимических и физиологических процессов в норме и патологии *in-vivo*. В основе ПЭТ лежит использование соединений, меченных короткоживущими радиоактивными изотопами с позитронным типом распада, распределение которых в организме может быть измерено с помощью специальной системы детекторов (ПЭТ сканнера). Возможности ПЭТ в значительной степени определяются доступностью радиофармпрепаратов (РФП), синтез которых, ввиду малого периода полураспада изотопов, представляет собой нетривиальную задачу. Именно выбор подходящего РФП позволяет изучать методом ПЭТ такие процессы, как метаболизм, транспорт веществ, лиганд-рецепторные взаимодействия, экспрессию генов.

Из четырех основных ПЭТ радионуклидов (^{11}C , $T_{1/2} = 20,4$ мин, ^{13}N , $T_{1/2} = 9,96$ мин; ^{15}O , $T_{1/2} = 2,03$ мин и ^{18}F , $T_{1/2} = 109,8$ мин), фтор-18 является наиболее перспективным. Период полураспада фтора-18 достаточно высок для проведения синтеза сложных молекул и поставки РФП на его основе в ПЭТ центры, не имеющие собственного циклотрона. Низкая энергия позитронного излучения радиоиотопа обеспечивает высокую разрешающую способность и получение высоко контрастных ПЭТ изображений при минимальной дозовой нагрузке.

Уникальными преимуществами ПЭТ является высокая чувствительность и возможность использования РФП высокой удельной активности (до 10^3 ГБк/ μM), что позволяет исследовать процессы с участием рецепторов, концентрация которых находится на уровне пикомолей. Традиционно в качестве РФП для рецепторных исследований (рецепторных радиолигандов) использовались соединения, меченные углеродом-11, однако в последние годы стремительно растет интерес к использованию радиотрейсеров на основе более долгоживущего фтора-18. Широко известным ПЭТ радиолигандом для визуализации центральных бензодиазепиновых рецепторов (БЗР) является меченный углеродом-11 флюмазенил (^{11}C флюмазенил), используемый в диагностике эпилепсии. В состав молекулы флюмазенила входит атом фтора, и введение фтора-18 в соответствующую позицию не должно сопровождаться изменениями в биохимическом и фармакокинетическом поведении. Это делает использование ^{18}F флюмазенила в ПЭТ очень привлекательным.

Настоящая работа направлена на создание метода синтеза ^{18}F флюмазенила высокой удельной активности с последующей оценкой этого соединения в качестве нового радиолиганда для визуализации БЗР методом ПЭТ.

Цель работы. Целью настоящей работы являлось создание нового метода синтеза 8- ^{18}F фтор-имидазо[1.5-a][1.4]бензодиазепин-3-карбоксилэтилового эфира (^{18}F флюмазенила), основанного на реакции ароматического нуклеофильного радиофторирования, и проведение доклинических исследований с ^{18}F флюмазенилом для подтверждения возможности его использования в качестве нового радиолиганда для исследования БЗР методом ПЭТ.



Научная новизна. Впервые проведено изучение кинетики изотопного $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмена в молекуле флюмазенила, протекающего в условиях ароматического нуклеофильного замещения. Изучено влияние природы растворителя и $[^{18}\text{F}]$ фторировющего агента, концентрации флюмазенила, температуры, времени реакции и других параметров на радиохимический выход $[^{18}\text{F}]$ флюмазенила. Определены константы скорости изотопного обмена при различных температурах, на основании чего рассчитаны активационные параметры уравнения Эйринга: $\Delta H^\ddagger = 110$ кДж/моль, $\Delta S^\ddagger = -10$ Дж K^{-1} моль $^{-1}$ ($R = 0.989$)

На основе результатов изучения процесса изотопного $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмена предложен оригинальный метод синтеза $[^{18}\text{F}]$ флюмазенила с высокой удельной активностью, включающий реакцию нуклеофильного радиофторирования нитро аналога флюмазенила (8-нитро-имидазо[1,5-a][1,4]бензодиазепин-3-карбоксилэтиловый эфир, Ro 15-2344) и последующую очистку методом полупрепаративной ВЭЖХ.

В сотрудничестве с Каролинским институтом (Швеция) впервые проведен полный спектр доклинических исследований $[^{18}\text{F}]$ флюмазенила: *post-mortem* авторалиография срезов головного мозга человека, сравнительные ПЭТ исследования $[^{18}\text{F}]$ флюмазенила и известного радиолиганда, $[^{11}\text{C}]$ флюмазенила, на обезьянах (*Супомолгус монкеу*), определение метаболитов $[^{18}\text{F}]$ флюмазенила в плазме крови обезьян. Продемонстрирована функциональная пригодность $[^{18}\text{F}]$ флюмазенила для использования в качестве нового ПЭТ радиолиганда для визуализации БЗР и исследований больных эпилепсией.

Практическая ценность работы. Благодаря более высокому периоду полураспада фтора-18 $[^{18}\text{F}]$ флюмазенил имеет ряд преимуществ по сравнению с $[^{11}\text{C}]$ флюмазенилом, широко применяемым в практике ПЭТ. В случае $[^{18}\text{F}]$ флюмазенила возможно получение нескольких клинических доз РФП в одном синтезе и, в итоге, снижение стоимости единичного ПЭТ исследования. В отличие от $[^{11}\text{C}]$ флюмазенила, $[^{18}\text{F}]$ флюмазенил может доставляться в ПЭТ центры, не имеющие циклотронно-радиохимического комплекса, что расширяет границы его использования. Более низкая энергия позитронного излучения фтора-18 позволяет получать ПЭТ изображения с большим пространственным разрешением, что крайне важно для использования в ПЭТ сканнерах нового поколения.

Положения, выносимые на защиту

- $[^{18}\text{F}]$ Флюмазенил может быть получен с высоким радиохимическим выходом методом нуклеофильного радиофторирования флюмазенила (изотопный $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмен) и его нитро-аналога (Ro 15-2344). Радиофторирование Ro 15-2344 с последующей очисткой методом полупрепаративной ВЭЖХ позволяет получать $[^{18}\text{F}]$ флюмазенил высокой удельной активности (> 185 ГБк/моль) необходимой для проведения рецепторных исследований мозга методом позитронной эмиссионной томографии.
- Нуклеофильное радиофторирование флюмазенила и Ro 15-2344 протекает по механизму ароматического нуклеофильного замещения. Относительные константы скорости радиофторирования флюмазенила и Ro 15-2344 на два порядка ниже чем для ароматических соединений, содержащих атомы

электроакцепторные заместители (NO_2 , CN) в *орто*- и *пара*-положении к уходящей группе (F , NO_2). Сравнение реакционной способности флюмазенила и Ro 15-2344 показывает, что в реакции ароматического нуклеофильного замещения с ^{18}F фторит-анионом подвижность нитрогруппы в составе Ro 15-2344 существенно ниже чем фтора в молекуле флюмазенила.

- Методом автордиографии на срезах головного мозга человека и в ПЭТ исследованиях на обезьянах впервые продемонстрировано сходство в фармакокинетическом поведении ^{18}F флюмазенила и ^{11}C флюмазенила, широко применяемого в практике ПЭТ. Благодаря более высокому периоду полураспада фтора-18 (110 мин), ^{18}F флюмазенил имеет ряд преимуществ перед ^{11}C флюмазенилом, и является новым перспективным радиолигандом для визуализации центральных бензодиазепиновых рецепторов методом ПЭТ.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на международных и российских конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005», Москва, 2005; The Annual Congress of the EANM, Helsinki, Finland, 2004, The Fifth International Symposium on Functional Neuroreceptor Mapping of the Living Brain, Vancouver, Canada, 2004; IV Всероссийская конференция по радиохимии «Радиохимия-2003», Озерск, 2003; 15th International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry, Sydney, Australia, 2003; «Современные проблемы ядерной медицины и радиофармацевтики», Обнинск, 2002;

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 2 статьи и 6 тезисов докладов на конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 166 страницах и включает 29 рисунков, 31 таблицу. Библиография содержит литературные ссылки на 179 научных публикаций.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении рассматривается актуальность разработки метода получения ^{18}F флюмазенила, нового меченого фтором-18 радиолиганда для изучения центральных бензодиазепиновых рецепторов методом ПЭТ. Здесь же сформулированы цель работы, ее новизна и практическая значимость.

Обзор литературы. Глава состоит из шести частей. Подробно обсуждаются принципы метода ПЭТ и роль радиохимии в его развитии. Описаны ядерно-физические характеристики основных ПЭТ радионуклидов и методы получения РФП на их основе. Более подробно рассмотрены методы получения фтора-18 в медицинских циклотронах и современные подходы к введению метки фтора-18 в различные молекулы. Особое внимание уделено методам введения фтора-18 в ароматические соединения, основанным на реакции ароматического нуклеофильного замещения. В заключение обсуждаются уникальные

возможности ПЭТ в рецепторных исследованиях мозга и дается сравнительный обзор ПЭТ радиолигандов для центральных бензодиазепиновых рецепторов

Экспериментальная часть

В данной главе описаны следующие методики:

- получение фтора-18 на циклотроне МС-17 (ИМЧ РАН) по ядерной реакции $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ при облучении водной мишени ($^{18}\text{O}[\text{H}_2\text{O}]$) протонами с энергией 17 МэВ;
- выделение фтора-18 методом анионообменной хроматографии и получения нуклеофильных радиофторирующих агентов криптата $[\text{F}^{18}]$ фторида калия ($\text{K}222/[\text{F}^{18}]\text{KF}$) и тетрабутиламоний $[\text{F}^{18}]$ фторида ($[\text{F}^{18}]\text{ТБАК}$).
- нуклеофильное радиофторирование флюмазенила и ряда модельных соединений;
- идентификация меченных фтором-18 соединений методами радиоТСХ и ВЭЖХ;
- эксперименты по изучению влияния на выход реакции изотопного $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмена природы растворителя и фторирующего агента, температуры и концентрации реагентов;
- эксперименты по изучению химической кинетики изотопного $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмена в молекуле флюмазенила и относительной реакционной способности флюмазенила Ro 15-2344 и ряда модельных соединений в реакции ароматического нуклеофильного радиофторирования;
- получение $[\text{F}^{18}]$ флюмазенила высокой удельной активности;
- *post-mortem* автордиография на срезах человеческого мозга и ПЭТ исследования на обезьянах с использованием $[\text{F}^{18}]$ флюмазенила.

Результаты и обсуждение. В настоящее время для изучения центральных бензодиазепиновых рецепторов методом ПЭТ широко используется $[\text{C}^{11}]$ флюмазенил (Рис 1. I) В качестве альтернативы $[\text{C}^{11}]$ флюмазенилу было предложено два аналога флюмазенила, меченных фтором-18: N-(2'- $[\text{F}^{18}]$ фторэтил)флюмазенил ($[\text{F}^{18}]$ ФЭФ, II) и $[\text{F}^{18}]$ фторфлюмазенил ($[\text{F}^{18}]$ ФФМЗ, III) Однако, как показали ПЭТ исследования, по ряду фармакокинетических параметров эти радиолиганды уступают $[\text{C}^{11}]$ флюмазенилу.

Идеальным радиолигандом для ПЭТ может служить $[\text{F}^{18}]$ флюмазенил (IV), отличающийся от $[\text{C}^{11}]$ флюмазенила лишь изотопным составом Биохимическое поведение $[\text{F}^{18}]$ флюмазенила должно быть идентично поведению $[\text{C}^{11}]$ флюмазенила.

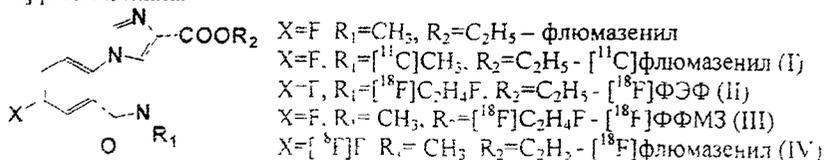


Рис. 1. Радиолиганды для изучения БЗР методом ПЭТ.

Однако, введение фтора-18 в «естественное» положение фтора в молекуле флюмазенила (положение X) путем ароматического нуклеофильного замещения затруднено, поскольку имеющаяся электроноакцепторная амидная группа находится в *мета*-положении к атому углерода, при котором происходит замещение. Для изучения принципиальной возможности использования этого подхода была выбрана реакция нуклеофильного замещения фтора в молекуле флюмазенила [^{18}F]фторид-анионом в присутствии межфазных катализаторов (МФК) – криптат (криптофикс 222) карбоната калия или тетрабутиламмоний карбоната, традиционно используемых в синтезе меченных фтором-18 соединений.

При использовании флюмазенила в качестве субстрата изучаемый процесс представляет собой реакцию изотопного ^{19}F , ^{18}F -обмена (Рис.2).

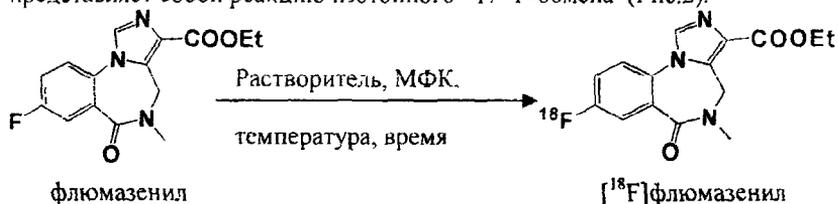


Рис. 2. Синтез [^{18}F]флюмазенила (изотопный обмен в условиях нуклеофильного замещения).

Для идентификации продуктов реакции были разработаны методики ВЭЖХ анализа в трех хроматографических системах (обращенно-фазной, прямофазной и катионообменной). Во всех использованных системах времена удерживания основного меченого продукта и стандарта флюмазенила совпадали (Рис.3).

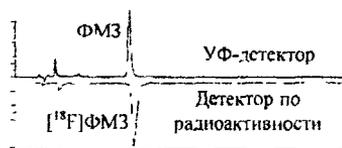


Рис. 3. Идентификация [^{18}F]флюмазенила методом катионообменной ВЭЖХ (SCX Supelco[®], 250 × 4 мм, 0,01 M H₃PO₄ · CH₃CN – 3:1, 1 мл/мин, 254 нм. Условия реакции: C₁₀ 222 K₂₅, [F⁻] = 30 мМ, C_{ФМЗ} = 30 мМ, ДМСО, 160°C, 15 мин.)

Изучение реакции изотопного обмена проводили в трех растворителях: ацетонитриле, диметилсульфоксиде (ДМСО) и диметилформамиде (ДМФ). Получаемый в мишени циклотрона радионуклид в форме [^{18}F]фторид-аниона переводили в реакционноспособный комплекс: тетрабутиламмоний [^{18}F]фторид ([^{18}F]ТБАФ) или криптат [^{18}F]фторида калия ([К⁺К₂.2] $[^{18}\text{F}]$ F⁻). Реакцию нуклеофильного фторирования проводили при температуре 100-170°C в области концентраций флюмазенила 7-30 мМ. Радиохимический выход флюмазенила

определяти по результатам радиоТСХ анализа реакционной смеси. На Рис.4 приведена зависимость выхода $[^{18}\text{F}]$ флюмазенила от природы растворителя и радиофторирующего агента

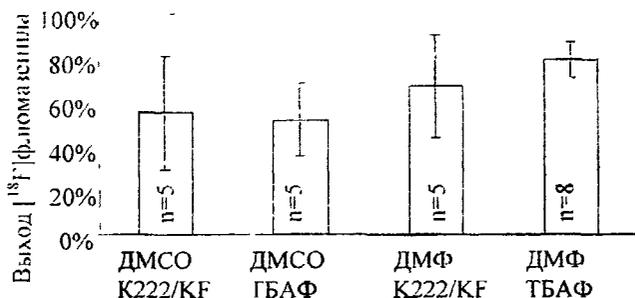


Рис. 4. Зависимость радиохимического выхода $[^{18}\text{F}]$ флюмазенила от природы растворителя и фторирующего агента ($T=160^\circ\text{C}$, 15 мин $C_{\text{K222/K2CO}_2}$ или $C_{\text{ТБАК}}=30$ мМ, $C_{\text{ФМЗ}}=30$ мМ).

В кипящем ацетонитриле реакция изотопного обмена практически не протекала, что, возможно, обусловлено недостаточной термической активацией. Наибольший выход $[^{18}\text{F}]$ флюмазенила и наилучшая воспроизводимость достигались при использовании $[^{18}\text{F}]$ ТБАФ в ДМФ и концентрации флюмазенила 30 мМ

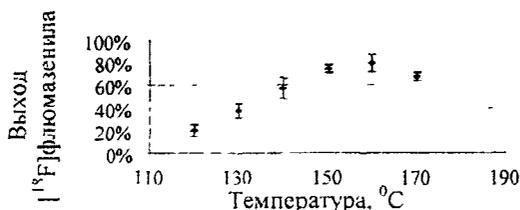


Рис. 5. Зависимость выхода $[^{18}\text{F}]$ флюмазенила от температуры (ДМФ). $C_{\text{ФМЗ}}=30$ мМ, $C_{\text{ТБАК}}=30$ мМ, время реакции 15 мин ($n>5$)

Было показано, что с увеличением температуры скорость реакции резко возрастает (Рис 5), снижаясь по достижении 170°C . Это обусловлено неустойчивостью флюмазенила продукты разложения которого были обнаружены при ВЭЖХ анализе реакционной смеси. С ростом концентрации выход $[^{18}\text{F}]$ флюмазенила увеличился, достигая плато в области 40 - 60 мМ (Рис 6)



Рис. 6. Зависимость выхода $[^{18}\text{F}]$ флюмазенила от концентрации флюмазенила (ДМФ $T=160^\circ\text{C}$ $C_{\text{ГЛЧ}}=30$ мМ, время реакции 15 мин ($n>5$))

Для подтверждения того, что изотопный $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмен в молекуле флюмазенила протекает по механизму ароматического нуклеофильного замещения, было проведено изучение кинетики этой реакции. На основании экспериментальных данных было показано, что скорость изотопного обмена подчиняется кинетическому уравнению, характерному для процессов нуклеофильного замещения, и линейно зависит от концентрации флюмазенила и радиофторировующего агента. В табл. 1 приведены константы скорости изотопного $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмена.

Табл. 1. Константы скорости изотопного $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмена в молекуле флюмазенила при разных температурах (ДМФ, $[^{18}\text{F}]\text{ТБАФ}$)

$T, ^\circ\text{C}$	$k \times 10^3, \text{л моль}^{-1} \text{с}^{-1}$	$T, ^\circ\text{C}$	$k \times 10^3, \text{л моль}^{-1} \text{с}^{-1}$
100	0,67 ($R=0,989$)	130	10,4 ($R=0,991$)
110	1,77 ($R=0,997$)	160	111 ($R=0,986$)

Из полученной температурной зависимости были рассчитаны активационные параметры уравнения Эйринга для реакции изотопного $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмена: $\Delta H^\ddagger=110$ кДж/моль, $\Delta S^\ddagger=-10$ Дж K^{-1} моль $^{-1}$ ($R=0,989$). Полученные данные имеют величины, характерные для большинства реакций ароматического нуклеофильного замещения. Следует отметить, что эти результаты имеют и самостоятельное значение для радиохимии, поскольку процессы изотопного $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмена протекающие по механизму ароматического нуклеофильного замещения, мало исследованы.

Несмотря на то, что метод изотопного обмена отличается простотой и обеспечивает высокий радиохимический выход в реакции фторирования, его использование в синтезе рецепторных радиолигандов ограничено. Ввиду малой концентрации рецепторов в мозге для ПЭТ исследований необходимы радиотрейсеры высокой удельной активности (для $[^{11}\text{C}]\text{флюмазенила} > 400$ Ки/моль) $[^1\text{C}]\text{флюмазенил}$ низкой удельной активности (6-11 Ки/моль) был успешно применен в экспериментальном протоколе динамического ПЭТ исследования (Delforge J и др., 1997), однако для доказательства возможности

использования этого протокола в ПЭТ с [^{18}F]флюмазенилом низкой удельной активности необходимы отдельные исследования

Поэтому следующей задачей работы было изучение возможности синтеза [^{18}F]флюмазенила высокой удельной активности (без добавления носителя) реакцией нуклеофильного радиофторирования нитро-аналога флюмазенила. Ro 15-2344. При этом следовало учитывать различия в нуклеофугности фтора и нитрогруппы, оценить которые теоретически в случае таких сложных молекул крайне трудно

Для решения этой задачи было предложено использовать метод конкурентных реакций, позволяющий определить относительную реакционную способность флюмазенила и Ro 15-2344 в реакции нуклеофильного фторирования в сравнении с модельными ароматическими соединениями (Табл. 2). Для этой цели в реакционный сосуд с радиофторировующим агентом ($[^{18}\text{F}]\text{TBAF}$) одновременно вводили два различных субстрата, проводили реакцию нуклеофильного замещения, и реакционную смесь анализировали методом ВЭЖХ (Рис 7). Исходя из предположения о том, что механизм радиофторирования изучаемых субстратов одинаков ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$), из отношения концентраций меченых продуктов были рассчитаны относительные константы скорости радиофторирования различных субстратов (Табл. 2).

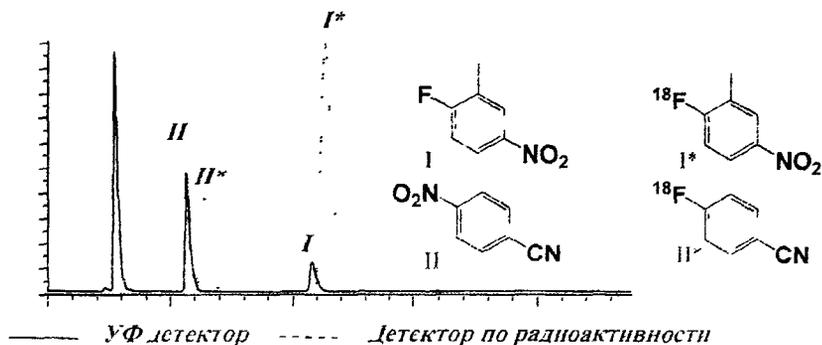
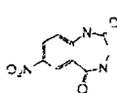


Рис. 7. ВЭЖХ анализ реакционной смеси при конкурентном радиофторировании (Lichrosphere 100RP 18e (Merck); 0.01M H_3PO_4 ; $\text{CH}_2\text{CN}=3$ 1: 1мл мин, 254 нм)

Табл. 2 Относительные константы скорости радиофторирования различных соединений (ДМФ, T-130°C, [¹⁸F]ТБАФ)

Соединение						
k' (n=5)	2570±356	1	1.58±0.067	0.83±0.049	0.34±0.072	< 0.001

В случае флюмазенила константа скорости реакции ароматического нуклеофильного фторирования (константа скорости изотопного обмена, $k'_{\text{ФМЗ}}$) составляла $0,0081 \pm 0,0009$, что на два порядка ниже по сравнению с 2-фтор-5-нитротолуолом (1). Это согласуется с представлениями о том, что молекула флюмазенила слабо активирована в отношении ароматического нуклеофильного радиофторирования, поскольку электроноакцепторная амидная группа находится в *мета*-положении к уходящей группе. При данной постановке эксперимента относительная константа скорости радиофторирования R_0 15-2344 оказалась ниже предела определения ($k'_{R_0 \text{ 15-2344}} < 0,001$), что говорит о меньшей подвижности нитрогруппы по сравнению с фтором в реакции ароматического нуклеофильного радиофторирования.

Таким образом, проведение процесса нуклеофильного фторирования нитро-аналога флюмазенила (Рис.8) требует более жестких условий по сравнению с реакцией изотопного обмена. Так, при радиофторировании R_0 15-2344 в ДМСО в течение 15 мин радиохимический выход не превышал 5% (Табл. 3), тогда как в этих условиях в реакции изотопного обмена выход достигал 50-60%. Исследования процесса ароматического нуклеофильного фторирования R_0 15-2344 в различных условиях позволили определить оптимальные условия реакции (Табл. 3, последняя строка), которые и были использованы в синтезе [¹⁸F]флюмазенила высокой удельной активности

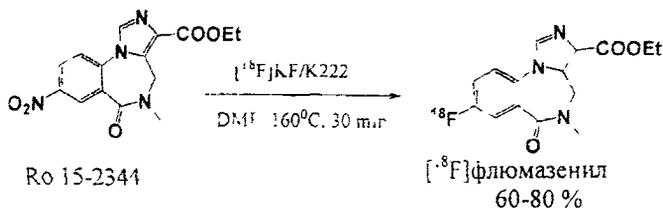


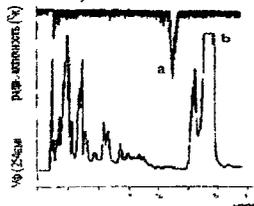
Рис. 8. Схема синтеза [¹⁸F]флюмазенила высокой удельной активности.

Табл. 3. Результаты нуклеофильного радиофторирования Ro 15-2344
(K222 [¹⁸F]KF, C₁₆H₂₂N₂O₂·C₆H₁₃-1)

Температура (С) время (мин)	Растворитель	C _{Рн} % мМ	Радиохимический выход [¹⁸ F]флюмазенила °о*	Min °о	Max °о	S	r
130/15	DMCO	-	5	-	-	-	1
130/15	DMCO	30	17	4	19	12	3
160/15	DMCO	30	18	8	20	10	3
160/15	DMCO	40	17	-	-	-	1
160/30	DMФ	15	48	43	54	8	3
160/15	DMФ	30	40	32	40	4	3
160/30	DMФ	30	66	57	80	18	3

* результаты радиоТСХ анализа реакционной смеси

Для выделения [¹⁸F]флюмазенила из реакционной смеси была разработана оригинальная методика полупрепаративной ВЭЖХ очистки, обеспечивающая эффективное разделение исходного субстрата, Ro 15-2344, и меченого продукта (Рис 9) Процессы синтеза и очистки [¹⁸F]флюмазенила были полностью автоматизированы с помощью лабораторного робота или автоматического модуля. Радиохимический выход очищенного [¹⁸F]флюмазенила достигал 30% (с поправкой на радиоактивный распад) при продолжительности синтеза 75-80 минут, включая ВЭЖХ очистку. Удельная активность [¹⁸F]флюмазенила на момент окончания синтеза превышала 185 ТБк/ммоль (5000 Ки/ммоль).



Условия очистки
Waters μ-Bondapak C-18 (300×7.8 мм, 10 μм)
ацетонитрил/0,01М Н₃РО₄ (80/20),
поток - 4 мл/мин
УФ детектором (254 нм)

a - [¹⁸F]флюмазенил
b - Ro 15-2344

Рис. 9. Очистка [¹⁸F]флюмазенила методом полупрепаративной ВЭЖХ.

Завершающим этапом работы были доклинические испытания [¹⁸F]флюмазенила, включающие post-mortem автордиографию на срезах головного мозга человека, ПЭТ исследование на обезьянах (Cynomolgus monkey) и идентификацию основных метаболитов [¹⁸F]флюмазенила в плазме крови обезьян. Исследования проводили в сотрудничестве с Каролинским Институтом (Швеция).



Автордиограмма среза
человеческого мозга
с [¹⁸F]флюмазенил



1) 1) изображения мозга обезьяны после введения
[¹⁸F]флюмазенила (А) [¹⁸F]флюмазенила (В) и вытеснения
[¹⁸F]флюмазенила не меченым флюмазенилом (С)

Рис. 10. Доклинические исследования с [¹⁸F]флюмазенилом.

Результаты post-mortem автордиографии продемонстрировали сходство в распределении [^{18}F]флюмазенила, [^{11}C]флюмазенила и [^3H]флюмазенила и высокое накопление [^{18}F]флюмазенила в структурах мозга с высокой плотностью БЗР. Добавление немеченого флюмазенила приводило к практически полному вытеснению [^{18}F]флюмазенила из областей связывания, что указывало на специфичность взаимодействия радиотганда с БЗР.

ПЭТ исследования на обезьянах продемонстрировали высокие уровни накопления [^{18}F]флюмазенила в лобных, височных и затылочных долях, в то время как в мозгу и мозжечке отмечено пониженное накопление радиотганда. Максимум радиоактивности (5-7% от введенной дозы) достигался через 10 минут после инъекции. При введении немеченого флюмазенила концентрация с [^{18}F]флюмазенила в областях с высокой концентрацией БЗР быстро снижалась, что свидетельствовало о его специфическом связывании. Сравнительные ПЭТ исследования с [^{11}C]флюмазенилом на тех же обезьянах показали сходство в фармакокинетическом и биохимическом поведении [^{11}C]флюмазенила и [^{18}F]флюмазенила (Рис. 10, справа).

При изучении метаболизма [^{18}F]флюмазенила в крови обезьян методом ВЭЖХ были идентифицированы два меченых продукта (Рис. 11), структура которых аналогична известным метаболитам для [^{11}C]флюмазенила. Поскольку данные метаболиты являются менее полярными, чем флюмазенил, и не проходят через гематоэнцефалический барьер, их образование не влияет на качество ПЭТ изображений.

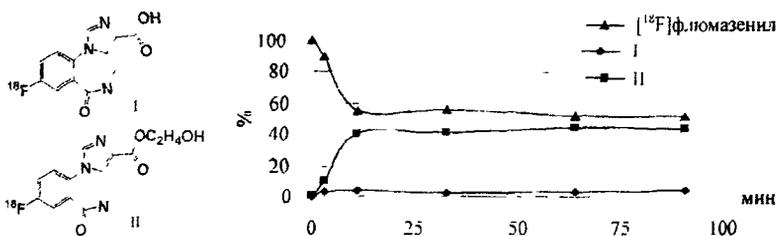


Рис. 11. Метаболизм [^{18}F]флюмазенила в крови обезьян и зависимость концентрации метаболитов в плазме от времени.

В целом, проведенные исследования показывают, что по своим фармакокинетическим параметрам [^{18}F]флюмазенил идентичен [^{11}C]флюмазенилу и может быть использован в качестве радиотганда для *in vivo* визуализации БЗР методом ПЭТ. Предложенный новый метод синтеза [^{18}F]флюмазенила по реакции радиофторирования нитро-аналога флюмазенила, Ro 15-2344, обеспечивает высокую удельную активность препарата, более чем достаточную для использования в ПЭТ. Метод легко адаптируется к стандартным модулям для получения РФП и может быть релюче дован и использованно в рутинных ПЭТ исследованиях.

ВЫВОДЫ

- Разработан метод синтеза [^{18}F]флюмазенила, основанный на реакции ароматического нуклеофильного радиофторирования нитро-аналога флюмазенила (Ro 15-2344) с последующей очисткой методом полупрепаративной ВЭЖХ, позволяющий получать [^{18}F]флюмазенил высокой удельной активности, необходимой для использования в рецепторных исследованиях мозга методом ПЭТ. Предложенный метод обеспечивает получение [^{18}F]флюмазенила с радиохимическим выходом 50-60%, что существенно превышает результат, достигнутый другими исследователями (2-12%) и позволяет производить этот РФП с активностью, достаточной для обеспечения ПЭТ исследований мозга человека. Метод легко поддается автоматизации в стандартных современных модулях для нуклеофильного фторирования и может быть легко внедрен в практику ПЭТ.
- Впервые проведено изучение кинетики изотопного $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмена в молекуле флюмазенила. Показано, что протекание изотопного $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмена подчиняется кинетическому уравнению бимолекулярной реакции. Определены константы скорости изотопного $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмена в диметилформамиде при разных температурах; рассчитаны энергия активации изотопного $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмена, энтальпия и энтропия образования переходного комплекса. На основании полученных данных сделан вывод, что изотопный $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -обмен в молекуле флюмазенила протекает по механизму ароматического нуклеофильного замещения.
- Методом конкурентных реакций изучена относительная реакционная способность флюмазенила, нитро-аналога флюмазенила Ro 15-2344 и модельных соединений в реакции ароматического нуклеофильного радиофторирования и определены относительные константы скоростей реакции.
- В сотрудничестве с Каролинским институтом (Швеция) впервые проведен полный спектр исследований направленных на доказательство функциональной пригодности [^{18}F]флюмазенила в качестве нового рецепторного радиолганда для исследования центральных бензодиазепиновых рецепторов методом ПЭТ

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях

Статьи:

- Рыжиков Н.Н., Гомзина Н.А., Федорова О.С., Васильев Д.А., Костиков А.П., Красикова Р.Н., Использование метода изотопного обмена для получения [^{18}F]флюмазенила, потенциального радиолиганда для визуализации центральных бензодиазепиновых рецепторов методом ПЭТ. Радиохимия. 2004. Том 46. № 3. стр 267–271
- Ryzhikov N.N., Seneca N., Krasikova R.N., Gomzina N.A., Shchukin E., Fedorova O.S., Vassiliev D.A., Gulyas B., Hall H., Savic I. and Halldin C., Preparation of highly specific radioactivity [^{18}F]flumazenil and its evaluation in cynomolgus monkey by positron emission tomography// Nuclear Medicine and Biology. 2005. Vol. 32. Issue 2. p. 109-116.

Тезисы докладов:

- Рыжиков Н.Н., Красикова Р.Н., Синтез [^{18}F]флюмазенила: кинетические аспекты ароматического нуклеофильного радиофторирования// Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2005», секция «Химия», Москва, 12-15 апреля 2005 г., том 2, стр. 125
- Krasikova R.N., Seneca N., Ryzhikov N.N., Gomzina N.A., Fedorova O.S., Shchukin E., Gulyas B., Hall H., Savic I., Halldin C., A preliminary PET comparison of [^{18}F]flumazenil and [^{11}C]flumazenil in monkey// Neuroimage, 2004, V 22, Suppl 2, p. 152.
- Krasikova R.N., Ryzhikov N.N., Gomzina N.A., Fedorova O.S., Shchukin E., Seneca N., Gulyas B., Hall H., Savic I., Halldin C. One-step Synthesis of n.c.a. [^{18}F]Flumazenil and a Preliminary Evaluation in Monkey by PET// European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2004, V. 31, p. 217.
- Krasikova R.N., Ryzhikov N.N., Gomzina N.A., Vassiliev D.A., Kostikov A.P., Fedorova O.S., Isotopic $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -exchange in the flumazenil molecule using [^{19}F]KF/Kryptofix complex// Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. 2003, V. 46, p. 213
- Рыжиков Н.Н., Гомзина Н.А., Костиков А.П., Федорова О.С., Васильев Д.А., Красикова Р.Н. Изучение реакции изотопного $^{18}\text{F},^{19}\text{F}$ обмена в молекуле флюмазенила в условиях ароматического нуклеофильного замещения// тезисы докладов IV Всероссийской конференции по радиохимии "Радиохимия-2003". Озерск. 20-24 октября 2003 г. стр. 74.
- Рыжиков Н.Н., Гомзина Н.А., Костиков А.П., Федорова О.С., Васильев Д.А., Красикова Р.Н. Получение флюмазенила, меченного фтором-18, методом изотопного обмена // Тезисы докладов Международной конференции "Современные проблемы ядерной медицины и радиофармацевтики". Обнинск. 23-27 октября 2002. стр 98-99

20723

РНБ Русский фонд

2006-4

19258

Отпечатано в ООО "БАРС"
Печать ризографическая
Тираж 100 экз.
Подписано в печать 20.10.05