



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 07 C 53/21
A 61 K 49/02

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪ **641 754**

②① Gesuchsnummer:	5617/79	⑦③ Inhaber:	Kernforschungsanlage Jülich Gesellschaft mit beschränkter Haftung, Jülich (DE)
②② Anmeldungsdatum:	15.06.1979		
③③ Priorität(en):	29.06.1978 DE 2828623	⑦② Erfinder:	Dr. Ernst Joachim Knust, Jülich (DE) Dr. Christiane Kupfernagel, Aachen (DE) Prof. Gerhard Stöcklin, Jülich (DE)
②④ Patent erteilt:	15.03.1984		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	15.03.1984	⑦④ Vertreter:	Patentanwälte Dr.-Ing. Hans A. Troesch und Dipl.-Ing. Jacques J. Troesch, Zürich

⑤④ Mit radioaktivem Halogen markierte Fettsäuren und ein Verfahren zu ihrer Herstellung.

⑤⑦ Es fehlt ein Produkt für Organuntersuchungen, insbesondere Untersuchungen des Herzmuskelstoffwechsels. Bei der Abklärung der Möglichkeit, den Metabolismus von Fettsäuren im Herzmuskel in vivo zu untersuchen, hat sich überraschenderweise gezeigt, dass die Maximalaufnahme der ω -F-Fettsäuren noch über derjenigen der ω -Jod-Fettsäuren liegt: so konnte mit ω -¹⁸F-Heptadecansäure eine rasche, bei 40 % der injizierten Dosis, bezogen auf das standardisierte Gramm-Herz, liegende Maximalaufnahme durch den Herzmuskel festgestellt werden. Als derartige Produkte ergaben sich End- oder mittelständig mit ¹⁸F markierte Fettsäuren mit Ausnahme der α -¹⁸F-Fettsäuren, insbesondere C₁₆-C₁₈-Fettsäuren. Zur Herstellung von ¹⁸F-markierten Fettsäuren setzt man ¹⁸F-haltiges Kaliumfluorid mit einem Ester der entsprechend bromierten Fettsäure unter Halogenaustausch um. Das Produkt wird hydrolysiert. Die Reaktion wird in wasserfreiem Acetamid durchgeführt. Eine abschliessende Hochdruck-flüssigkeitschromatographie dient der Reinigung des Produktes.

PATENTANSPRÜCHE

1. End- oder mittelständig mit ^{18}F markierte Fettsäuren mit Ausnahme der α - ^{18}F -Fettsäuren.

2. C_{16} - C_{18} -Fettsäuren nach Anspruch 1.

3. Verfahren zur Herstellung von ^{18}F -markierten Fettsäuren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ^{18}F -haltiges Kaliumfluorid mit einem Ester der entsprechend bromierten Fettsäure unter Halogenaustausch umgesetzt und das Produkt hydrolysiert wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion in wasserfreiem Acetamid durchgeführt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, gekennzeichnet durch eine abschliessende Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur Reinigung des Produktes.

6. Präparat für Aktivitätsaufnahmestudien an Organen, gekennzeichnet durch einen Gehalt an ^{18}F -markierter Fettsäure nach Anspruch 1.

7. Präparat nach Anspruch 6, gekennzeichnet durch einen Gehalt an zumindest einer markierten Fettsäure aus der Gruppe 16- ^{18}F -Palmitinsäure, 17- ^{18}F -Heptadecansäure und (9/10)- ^{18}F -Stearinsäure.

8. Präparat nach Anspruch 6 oder 7, gekennzeichnet durch eine Humanserumalbuminlösung als Lösungsmittel.

9. Präparat nach Anspruch 6 für Myocarduntersuchungen.

Die Erfindung betrifft ^{18}F -markierte Fettsäuren bzw. ^{18}F -Monocarbonsäuren und ein Verfahren zu ihrer Herstellung.

Die Möglichkeit, den Metabolismus von Fettsäuren im Herzmuskel in vivo zu untersuchen, ist mit α -halogenierten Fettsäuren, die mit ^{34}mCl , ^{77}Br und ^{123}I markiert waren, sowie mit ω - ^{77}Br - oder ω - ^{123}I -markierten Fettsäuren gezeigt worden (siehe H.-J. Machulla et al., «Preparation, Quality Control and Stability of ^{11}C -, ^{34}mCl -, ^{77}Br - and ^{123}I -Labelled Fatty Acids for Heart Muscle Metabolism Studies», Proc. XIV. International Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, Berlin, Sept. 15–18, 1976). Die Ergebnisse führten zur klinischen Anwendung von 17- ^{123}I -Heptadecansäure für die in vivo Diagnose von myokardialen Stoffwechselstörungen – (siehe Ch. Freundlieb et al., «Use of 17- ^{123}I -labelled Heptadecanoic Acid for Non-Invasively Measuring Myocardial Metabolism», Proc. XV. International Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, Groningen, Sept. 13–16, 1977).

Die analogen ^{18}F -markierten Säuren wurden möglicherweise wegen der stärkeren Toxizität – insbesondere bei gerader Anzahl von Kohlenstoffatomen – für solche Myocarduntersuchungen bislang offensichtlich nicht in Betracht gezogen, wofür auch die innerhalb der Reihe der ω -Chlor-, ω -Brom- und ω -Jod-markierten Säuren günstigste (maximale) Aufnahme der jodierten Verbindungen durch den Herzmuskel ein Grund sein mag.

Überraschenderweise hat sich jedoch gezeigt, dass die Maximalaufnahme der ω -F-Fettsäuren noch über derjenigen der ω -Jod-Fettsäuren liegt: so konnte mit ω - ^{18}F -Heptadecansäure eine rasche, bei 40% der injizierten Dosis, bezogen auf das standardisierte Gramm-Herz, liegende Maximalaufnahme durch den Herzmuskel festgestellt werden.

Diese günstige Maximalaufnahme, deren Ausmass mit derjenigen von 1- ^{11}C -markierten Fettsäuren vergleichbar ist, wird von einer für radiografische Untersuchungen erwünschten verzögerten Elimination begleitet, so dass sich die

ω - ^{18}F -markierten Fettsäuren insgesamt als besonders vorteilhaft für Myocarduntersuchungen erweisen.

Der stärkeren Allgemeintoxizität der fluorierten Verbindungen kann durch die Anwendung praktisch trägerfreier Präparate ohne weiteres begegnet werden.

Speziell für radiografische Untersuchungen sind die ω - ^{18}F -Fettsäuren besonders geeignet, da ^{18}F ein Positronenstrahler ist und die rasche und gute Maximalaufnahme im Verein mit der verzögerten Abgabe optimale Untersuchungsbedingungen bietet, die mit den bislang bekannten, unterschiedlichen Präparaten nicht erreicht werden konnten.

Die Halbwertszeit des ^{18}F von 110 min gestattet eine Verteilung von ^{18}F -markierten Verbindungen bis in eine Entfernung von einigen 100 km. Auch in dieser Hinsicht sind die mit ^{18}F markierten, ω -fluorierten Fettsäuren den ^{11}C -markierten Verbindungen für die Anwendung in der Positronenemissionstomographie von Organen, insbesondere des Herzmuskels, überlegen.

Zwar wird bereits von G. D. Robinson in den «Proc. Symp. New Devel. Radiopharm. Labelled Comp.», Kopenhagen, Bd. I, IAEA Wien: S. 423 (1973), angeregt, in α -Stellung mit ^{18}F substituierte Fettsäuren mit bis zu 14 C-Atomen wie 2- ^{18}F -Fluorhexanat und 2- ^{18}F -Fluortetradecanat, unter anderem als Mittel für Myocard-Untersuchungen einzusetzen. Ferner wird die Herstellung von entsprechenden α - ^{18}F -markierten Fettsäureestern von H. M. A. Karim und G. Stöcklin im J. Lab. Comp. Radiopharm, 13 (1977) 519, beschrieben.

Die mit solchen α - ^{18}F -Fluor-Fettsäuren bei Herzmuskeluntersuchungen erzielten Maximalanreicherungen sind jedoch geringer als die der entsprechenden Chlor-, Brom- oder Jodverbindungen, so dass keinesfalls mit einer besonders günstigen Wirkungsweise der ω -Fluorfettsäuren bei Herzmuskeluntersuchungen gerechnet werden konnte, wie sie nun überraschenderweise ermittelt wurden.

Gegenstand der Erfindung sind mithin end- oder mittelständig mit ^{18}F markierte Fettsäuren mit Ausnahme der α - ^{18}F -Fettsäuren.

Speziell die gegebenenfalls auch ungesättigten, geradketigen Monocarbonsäuren mit grösserer Kettenlänge – insbesondere mit etwa 10 bis 20 C-Atomen, die in ω -Stellung oder in mittlerer Position monofluoriert wurden, sind als geeignet anzusehen.

Aus der vorgenannten Gruppe wurden insbesondere die ω -fluorierten C_{16} - bis C_{18} -Alkansäuren untersucht, ebenso die in 9- bzw. 10-Stellung monofluorierte, ein Isomeregemisch darstellende (9/10)- ^{18}F -Fluorostearinsäure als mittelständig ^{18}F -markierte Säure. Dabei wurden gute Maximalaufnahmewerte erzielt.

Besondere Bedeutung kommt im Hinblick auf die Toxizität fluorierter Verbindungen einem Herstellungsverfahren mit trägerarmer und gleichzeitig schneller Synthese und Reinigung zu, das innerhalb von höchstens zwei Halbwertszeiten abgeschlossen sein sollte (siehe auch Karim und Stöcklin, loc. cit. S. 520).

Bezüglich der toxischen Eigenschaften weisen endständige ^{18}F -markierte Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl von Kohlenstoffatomen günstigere Eigenschaften auf als die geradzahigen Verbindungen. Bei Applikation der trägerfreien oder trägerarmen Verbindung unterhalb der kritischen Konzentrationswerte ist die Toxizität von untergeordneter Bedeutung, so dass sich eventuell auftretende Anreicherungs- oder Blockierungsmechanismen beobachten lassen könnten.

Die Herstellung der neuen ^{18}F -markierten Fettsäuren erfolgt durch Umsetzung von ^{18}F -haltigem Kaliumfluorid mit einem Ester der entsprechenden Bromfettsäure unter Halogenaustausch, wonach das Produkt hydrolysiert wird. Für

kinetische Untersuchungen des Herzmuskelstoffwechsels wird zweckmässigerweise ein Produkt verwendet, das mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie gereinigt worden ist.

Vorzugsweise wird die Reaktion in wasserfreiem Acetamid durchgeführt. Der Austausch von Brom gegen ^{18}F in organischen Verbindungen unter Verwendung von K^{18}F in wasserfreiem Acetamid ist an sich bekannt (siehe J. P. de Kleijn et al., « K^{18}F from Reactor-Produced Fluorine-18. Synthesis of Ethyl-2-Fluoropropionate- ^{18}F and 4-Toluene-sulfonyl Fluoride- ^{18}F », Radiochem. Radionucl. Letters 23, (1975) 139).

Vorzugsweise wird ein K^{18}F verwendet, welches durch Zusatz von KF zu ^{18}F -haltigem H_2O erhalten worden ist.

Die Erfindung ist im nachstehenden durch bevorzugte Ausführungsbeispiele erläutert.

Herstellungsbeispiel

Die Herstellung von ω - ^{18}F -Palmitinsäure, ω - ^{18}F -Heptadecansäure und (9/10)- ^{18}F -Stearinsäure aus den entsprechenden Bromfettsäuren erfolgte in jeweils analoger Weise und wird daher nachfolgend gemeinsam beschrieben.

Zu ^{18}F -haltigem Wasser, das durch ^3He -Bestrahlung von 10 ml H_2O gemäss der Kernreaktion $^{16}\text{O}(^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$ erhalten worden war, wurde 1 mg Kaliumfluorid zugesetzt. Die Lösung wurde durch Destillation auf ein Volumen von circa 200 μl eingengt und dann mit Hilfe einer Mikroliter-Spritze in eine 3 ml-Brechsiegelampulle aus Quarz übergeführt. In dieser wurde die Lösung an einer Vakuumapparatur unter leichtem Erwärmen und anschliessendem Erhitzen bis zum Erreichen eines Vakuums von 10^{-6} bar zur Trockene eingedampft.

Nach dem Abkühlen wurde der Rückstand mit 20 mg Brom-Fettsäuremethylester (dessen Säureanteil der herzustellenden ^{18}F -Fettsäure entsprach) und 100 mg Acetamid (aus Benzol umkristallisiert) versetzt. Die Ampulle wurde evakuiert und verschlossen (abgeschmolzen) und dann 1 Stunde unter Bewegung im Ölbad auf 150°C erhitzt. Die anschliessende Verseifung des Esters erfolgte (nach Öffnen des Brechsiegels) durch halbstündiges Kochen in 2 ml methanolischer Kalilauge (5 N) unter Rückfluss. Der Ampulleninhalt wurde durch Auswaschen mit 10 ml Wasser in ein Schüttelgefäss von ca. 60 ml Volumen überführt. Nach Ansäuern der Lösung mit 3 ml Schwefelsäure (1 : 6) wurde das Produkt dreimal mit n-Heptan (1 $\times$ 10 ml, 2 $\times$ je 5 ml) bei 80°C extrahiert, wobei die Phasen durch Zentrifugieren getrennt wurden. Die vereinigten Heptanfraktionen wurden zur Trock-

kene eingedampft, mit ca. 2 ml Eluens aufgenommen und erwärmt, worauf die ^{18}F -Fettsäure mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) abgetrennt wurde.

Gute Trennergebnisse wurden dabei mit der Phasenumkehr-Chromatographie unter folgenden Bedingungen erreicht:

Chromatograph: Waters; Säule: Waters, μ - NH_2 Bondapak $30 \times 0,4$ cm; Eluens: n-Heptan/ CH_3COOH = 998/2, 3 ml/min.

Im Falle der 17- ^{18}F -Heptadecansäure wurde dabei eine radiochemische Ausbeute von $30 \pm 2\%$ erzielt. Ausgehend von einer ^{18}F -Produktion in einem Kompaktzyklotron durch Bestrahlung von Wasser, können somit spezifische Aktivitäten von > 10 mCi/mg erzielt werden. Bei der Herstellung der ω - ^{18}F -Palmitinsäure wurden ähnliche Ausbeuten erzielt. Die radiochemische Ausbeute der (9/10)- ^{18}F -Stearinsäure lag bei 4%.

Pharmakologische Untersuchungen

Für die Tierexperimente (an Mäusen) wurde das Eluat im Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft, das Produkt in Humanserumalbuminlösung aufgenommen, die Lösung filtriert und ein aliquoter Teil in die Schwanzvene der Tiere injiziert.

Im Tierexperiment (mit NMRI-Mäusen) wurde mit 16- ^{18}F -Hexadecansäure, 17- ^{18}F -Heptadecansäure und (9/10)- ^{18}F -Stearinsäure ein rascher Anstieg der ^{18}F -Aktivität im Herzmuskel festgestellt, die schon innerhalb von etwa 2 Minuten ihr Maximum von ca. 40%/g Herz erreichte. Anschliessend erfolgte eine zunächst rasche und dann langsamere Elimination (entsprechend einer Eliminierungshalbwertszeit von 2 bis 6 beziehungsweise 18 bis 51 Minuten).

Der Aktivitätsverlauf lässt sich unter Zugrundelegen der β -Oxidationstheorie von Fettsäuren so deuten, dass die Fettsäure nach ihrer schnellen Extraktion durch den Herzmuskel zunächst zu Acetyl-Coenzym A und einer niedermolekularen ^{18}F -Carbonsäure abgebaut wird.

Neben der Anreicherung im Herzmuskel lässt sich die ^{18}F -Aktivität auch in den Organen Leber, Lunge, Nieren, Magen, Darm und Blut nachweisen. Die ebenfalls bei den drei genannten Fettsäuren beobachteten unterschiedlichen Aktivitäten im Oberschenkelknochen deuten auf verschiedene Metabolisierungs- und Ausscheidungsmechanismen hin.

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Zusammenstellung von Vergleichsergebnissen, die mit den erfindungsgemässen ^{18}F -Fettsäuren einerseits und bekannten analogen Verbindungen andererseits erhalten wurden. Die Messwerte in Spalte 2 der Tabelle sind auf das individuelle Herz bezogen.

Fettsäure	Max. Anreicherung in % der injizierten Dosis pro Herz	Zeitpunkt der maximalen Anreicherung [min]	Eliminierungshalbwertszeit [min]	
			schnelle Elimination	langsame Elimination
1-[^{11}C]-Palmitinsäure	$3,8 \pm 1,0$	0,25	$0,4 \pm 0,1$	$33 \pm 6,5$
16- ^{123}J -Palmitinsäure	$3,3 \pm 0,4$	0,5	$2,4 \pm 0,5$	$33 \pm 6,6$
17- ^{123}J -Heptadecansäure	$3,9 \pm 0,4$	0,25	$2,1 \pm 0,4$	$25 \pm 5,0$
17- ^{77}Br -Heptadecansäure	$2,2 \pm 0,6$	0,5	$0,6 \pm 0,1$	$36 \pm 7,2$
17- $^{34\text{m}}\text{Cl}$ -Heptadecansäure	$2,1 \pm 0,6$	0,25	$0,9 \pm 0,2$	$23 \pm 4,7$
16- ^{18}F -Palmitinsäure	$4,3 \pm 1,3$	0,25	$3 \pm 0,8$	44 ± 11
17- ^{18}F -Heptadecansäure	$4,8 \pm 0,8$	0,5	$6 \pm 1,5$	18 ± 6
9/10- ^{18}F -Stearinsäure	$4,2 \pm 0,9$	0,5	4 ± 1	24 ± 7
2- ^{123}J -Stearinsäure	$1,4 \pm 0,1$	0,5-1	$2 \pm 0,4$	$13 \pm 2,7$
2- ^{77}Br -Stearinsäure	$1,4 \pm 0,3$	1	$1 \pm 0,2$	$18 \pm 3,6$
2- $^{34\text{m}}\text{Cl}$ -Stearinsäure	$2,0 \pm 0,1$	1	$0,9 \pm 0,2$	$9 \pm 1,8$
2- ^{18}F -Stearinsäure	$1,3 \pm 0,1$	1	$0,5 \pm 0,1$	$5 \pm 1,5$

Man sieht deutlich die höhere Maximalaufnahme und die verzögerte Abgabe, insbesondere in der ersten Phase, der erfindungsgemässen Verbindungen.