

BR 8919417

ISSN 0101-3084

IPEN - PUB - 177.

CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

**SÍNTESE E PREPARAÇÃO DE CONJUNTOS DE REATIVOS
LIOFILIZADOS DO ÁCIDO p - (BIS - CARBOXIMETIL)
AMINOMETIL CARBOXIAMINO HIPÚRICO**

**Maria Aparecida T. Marcilio de Almeida, Eliens Setuko Hamada, Emiko Muramoto,
Maria Tereza Colturato e Rosana Herrerias**

PUBLICAÇÃO IPEN 177

JULHO/1988

SÃO PAULO

**SÍNTESE E PREPARAÇÃO DE CONJUNTOS DE REATIVOS
LIOFILIZADOS DO ÁCIDO p - (BIS - CARBOXIMETIL)
AMINOMETIL CARBOXIAMINO HIPÚRICO**

**Maria Aparecida T. Marcílio de Almeida, Elena Setuko Hamada, Emiko Muramoto,
Maria Tereza Colturato e Rosane Herrerias**

DEPARTAMENTO DE PROCESSAMENTO

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

B 13.30

C 21.20

AMINES

HIPPURIC ACID

SYNTHESIS

LYOPHILIZATION

TECHNETIUM 99

METASTABLE STATES

LABELLING

RADIONUCLIDE KINETICS

KIDNEYS

SCINTISCANNING

IPEN - Doc - 3042

Publicação aprovada pela CNEN em 30.06.87

Note: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).

SÍNTESE E PREPARAÇÃO DE CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS DO
ÁCIDO p-(BIS-CARBOXIMETIL) AMINOMETIL CARBOXIAMINO HIPÚRICO

Maria Aparecida T. Marcílio de Almeida, Elena Setuko Hamada,
Emiko Muramoto, Maria Tereza Coiturato e Rosana Herrerias

RESUMO

Tendo em vista o crescente interesse da Medicina Nuclear em utilizar um agente marcado com ^{99m}Tc cuja eficiência seja semelhante a do Hippurato de Sódio ^{131}I para filtração glomerular, preparou-se por síntese química um análogo do ácido Amino Hippúrico: Ácido p-(bis-carboximetil)-aminometil carboxiamino hippúrico (PAHIDA).

A pureza físico química foi determinada por ponto de fusão e espectros de Ressonância Nuclear Magnética e Infra-vermelho.

Prepararam-se Conjuntos de Reativos Liofilizados destinados à marcação com ^{99m}Tc .

Cada frasco contendo 10 mg de PAHIDA e 0,25 mg de Cloreto Estanoso foi submetido a análises cromatográficas em ITLC para determinação de pureza radioquímica e estabilidade do produto liofilizado.

Realizaram-se também estudos de distribuição biológica em ratos: houve concordância entre a eliminação urinária e o clareamento do produto no plasma.

THE SYNTHESIS AND PREPARATION OF LYOPHILIZED KIT OF p-(BIS -
CARBOXYMETHYL)-AMINOMETHYL CARBOXYAMINO HIPPURIC ACID

ABSTRACT

A renal agent labeled with ^{99m}Tc and quantitatively secreted by the tubules constitutes an interesting radiopharmaceutical in substitution to ^{131}I sodium hippurate.

To meet this need we have synthesized a radiopharmaceutical studied previously by Chervu et al. The purity was achieved by melting

Trabalho apresentado no "XI Congreso de la Asociación Latino Americana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear". CIUDADE DO MÉXICO -de 16 a 21 de Novembro de 1987 - MÉXICO.

point, infra-red spectra and Proton Magnetic Resonance.

Each lyophilized kit contains 10 mg PAHIDA and 0,25 mg stannous chloride; the radiochemical purity and the stability of the ^{99m}Tc complex have been established by ITLC chromatography.

Biological studies were performed in Wistar rats.

INTRODUÇÃO

A detecção de patologias do aparelho renal tem sido estudada desde a década de 50 utilizando-se técnicas radioisotópicas, possibilitando desse modo diferentes estudos clínicos de função renal: estudos dinâmicos de filtração glomerular e secreção tubular, morfologia dos rins, volume residual de urina, desobstrução do trato urinário superior, fluxo plasmático renal e funções renais individuais (1) (2). Nesse sentido tem sido largamente utilizado o Hippurato de Sódio marcado com I-131 ou (I-123), que possui alto nível de captação renal (80% excretado pelas células tubulares). Contudo esse produto apresenta desvantagem quando marcado com I-131 pois, a dose ao paciente é relativamente elevada e as imagens obtidas apresentam nitidez reduzida pela presença da radiação de fundo (3). O emprego do I-123 viria reduzir os problemas de imagens porém os preços de produção e comercialização excessivamente altos não estimulam seu emprego em larga escala.

Quanto aos radiofármacos para cintilografias renais que utilizam o radioisótopo Tc-99m temos em Medicina Nuclear o uso difundido do ácido dietileno-triamino-pentacético (DTPA) que é filtrado por secreção glomerular com eficiência de apenas 25% (4).

Dado o interesse da Medicina Nuclear em utilizar produtos marcados com Tc-99m em substituição a outros com I-131, também para a detecção de problemas renais tem havido grandes avanços dos pesquisadores em produzir compostos marcados com Tc-99m. Em 1979 Davidson e col. (5) sintetizaram e marcaram o Tc-99m N-N'-bis-mercapto acetil etilenodiamina (Tc-DADS) e alguns análogos desse produto. O resultado clínico foi a obtenção de imagens com melhor resolução, sem o excessivo sombreamento causado pela radiação de fundo, embora a filtração glomerular fosse menor do que a do Hippurato de Sódio (20 a 25%) (6). O maior problema re-

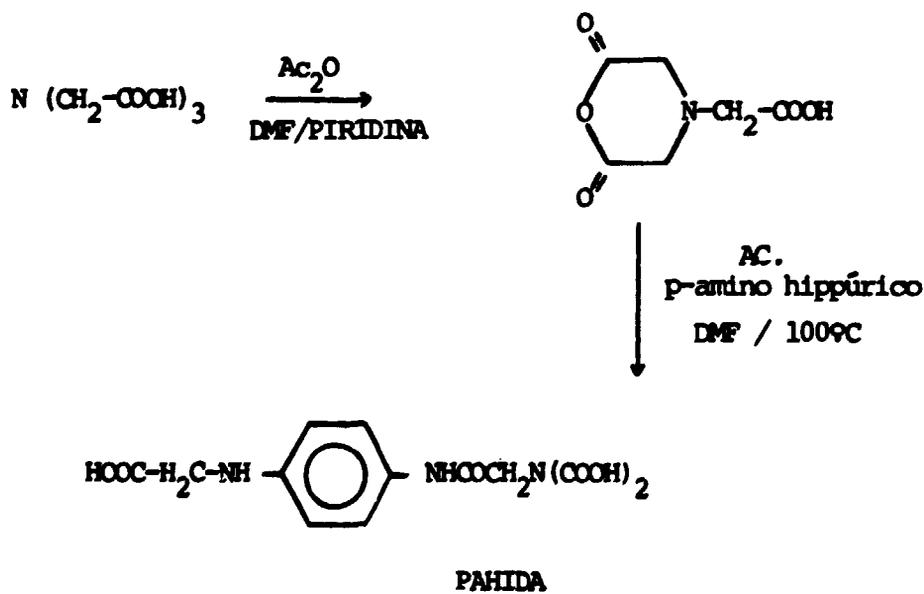
si \tilde{d} ia por \tilde{e} m na prepara \tilde{c} o e purifica \tilde{c} o do radiofarmaco, que exigia a-parelhagem custosa (HPLC), limitando-se seu uso apenas aos grandes cen-tros bem equipados.

Chervu e col. (6) apresentaram outro radiofarmaco marcado com Tc-99m sob forma de dois derivados do \tilde{a} cido amino-hipp \tilde{u} rico: p-bis-carboxi-metil-amino hipp \tilde{u} rico: p-(bis-carboximetil)-aminometil carboxiamino hipp \tilde{u} rico (PAHIDA). Ambos derivados, procuram aliar as vantagens do emprego do Tc-99m e a facilidade de prepara \tilde{c} o para oferecer \tilde{a} Medicina Nuclear uma alternativa na cintilografia renal.

MATERIAIS E M \tilde{E} TODOS

A t \tilde{e} cnic \tilde{a} para s \tilde{i} ntese do PAHIDA-2 baseou-se nos trabalhos de BURNS e col., CHERVU e col. reelaborada na Divis \tilde{a} o de Radiofarmacia(5) (6).

S \tilde{i} ntese do PAHIDA - Condensa \tilde{c} o do \tilde{a} cido nitrilo-ac \tilde{e} tico em presen- \tilde{c} a do anidrido ac \tilde{e} tico e posterior rea \tilde{c} o com \tilde{a} cido p-aminohipp \tilde{u} rico.



PONTO DE FUS \tilde{A} O DO PRODUTO AP \tilde{O} S DUAS RECRISTALIZA \tilde{C} AO EM \tilde{A} GUA/
ACETONA 1:1 = 222 - 223 $^\circ$ C

RENDIMENTO - 70%

5g (26mM) de ácido nitriloacético, 40 ml de piridina, 40 ml de DMF foram colocados em um balão com condensador e a mistura foi aquecida a 50°C por 10 minutos até dissolução do produto. Foram adicionados 0,7 ml de anidrido acético e sob atmosfera de nitrogênio a temperatura foi elevada a 100°C; foram colocados 5g de ácido p-amino-hippúrico em 20ml de piridina e 20ml de DMF e a mistura foi deixada sob refluxo por 2 horas, mantido o fluxo de nitrogênio. Os solventes foram então parcialmente retirados por evaporação e adicionados à mistura igual volume de NH_4OH ; em seguida a solução foi extraída com 3 porções de éter etílico. A camada aquosa contendo o produto foi separada, descolorida com carvão ativado e a solução foi levada a pH 3, sendo lavada ao congelador em temperatura de cerca de -10°C precipitando-se o produto. Este foi filtrado e lavado com água/acetona 1:1 .

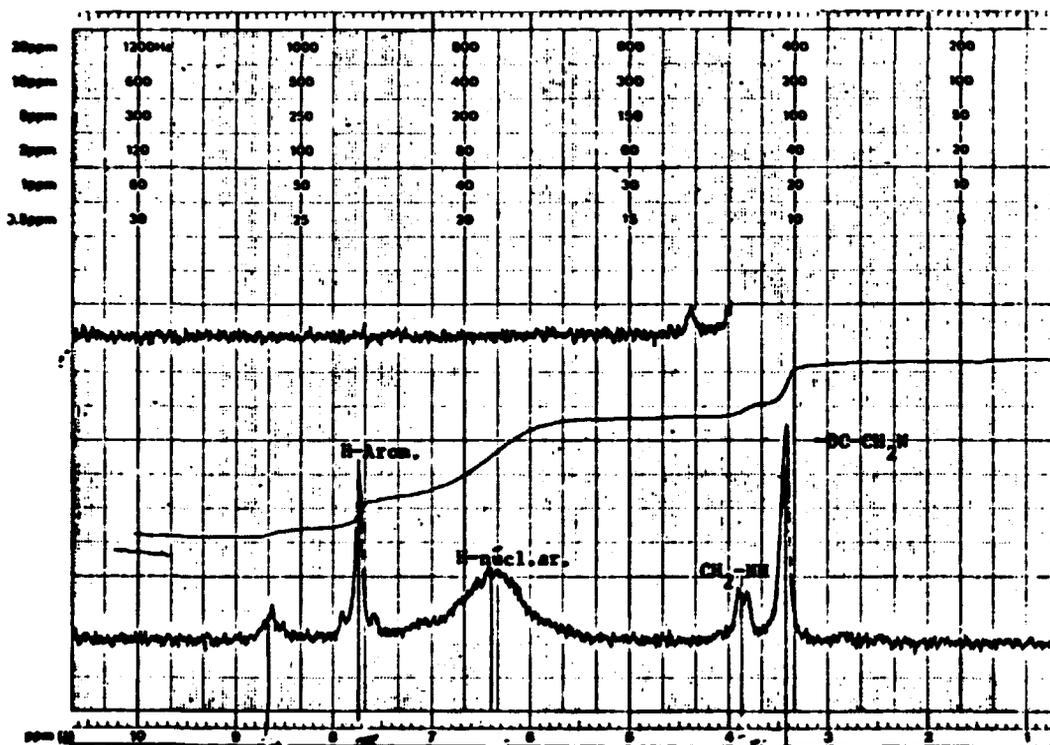
ESPECTROS DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA

Espectros de Ressonância Nuclear Magnética foram obtidos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O aparelho utilizado foi um Espectrógrafo VARIAN EM - 360MHz. (Figura 1).

Solvente utilizado: DIMETILSULFÓXIDO:

PICOS OBTIDOS (δ)	GRUPO CORRESPONDENTE (6) (7)
8,7 S	H aromático
7,7 M	Idem
6,4 M	Idem
3,9 D	CH_2NH
3,4 S	COCH_2N

FIGURA 1



PREPARAÇÃO DE CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS

Os Conjuntos de Reativos Liofilizados foram preparados segundo técnicas usuais de preparação de radiofármacos liofilizados, empregada na Divisão de Radiofarmácia. Cada frasco liofilizado se constitui de 10 mg de PAHIDA 0,25 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. No momento da marcação foram colocados 2 ml de solução de pertecnetato de sódio eluído de um gerador preparado no IPEN-CNEN/SP, na atividade desejada.

CONTROLES RADIOCROMATOGRAFICOS

Para detecção de impureza radioativa constituída por Tc não ligado à molécula, foram realizados controles radiocromatográficos. O suporte utilizado foi o papel ITLC em fitas de 1x15 cm e os solventes para cromatografia foram:

SOLVENTE A- Solução NaCl a 0,9%

SOLVENTE B- Acetona

No solvente A temos: $R_f=1$ para $^{99m}\text{Tc}_4^-$ livre e complexo PAHIDA.

No solvente B temos: $R_f=0$ para o PAHIDA e $R_f=1$ para $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre.

DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA

Foi realizada em alguns lotes de ratos WISTAR pesando de 250g a 300g. Os ratos receberam por via endovenosa, 0,125 ml do PAHIDA-Tc-99m (62 µg) na atividade de cerca de 120 µCi. Cada lote era representado por 3 animais. (Tabela 1).

RESULTADOS

O produto sintetizado por nós e dispensado sob forma de Conjuntos de Reativos Liofilizados, mostrou-se satisfatório quanto à marcação com Tc-99m pois os ensaios cromatográficos apresentaram percentagens de marcação da ordem de 99% após 30 minutos de reação prologando-se até 180 minutos após a adição de pertecnetato. Os Conjuntos de Reativos Liofilizados controlados 1 mês após a data de fabricação ainda apresentavam rendimentos de marcação na ordem de 99%. (Tabela 2 e 3).

O produto injetado em animais mostrou boa captação renal conforme dados da literatura e os níveis plasmáticos após 15 minutos, baixaram de 90%, indicando uma captação ideal por órgão ou compartimentos específicos. (Tabela 4 e Figura 2)

CONCLUSÃO

Dada a necessidade de acompanharmos os progressos no campo da Radiofarmácia, preparamos um novo radiofármaco para mapeamento renal marcado com ^{99m}Tc , de forma liofilizada e de fácil utilização no campo da Medicina Nuclear.

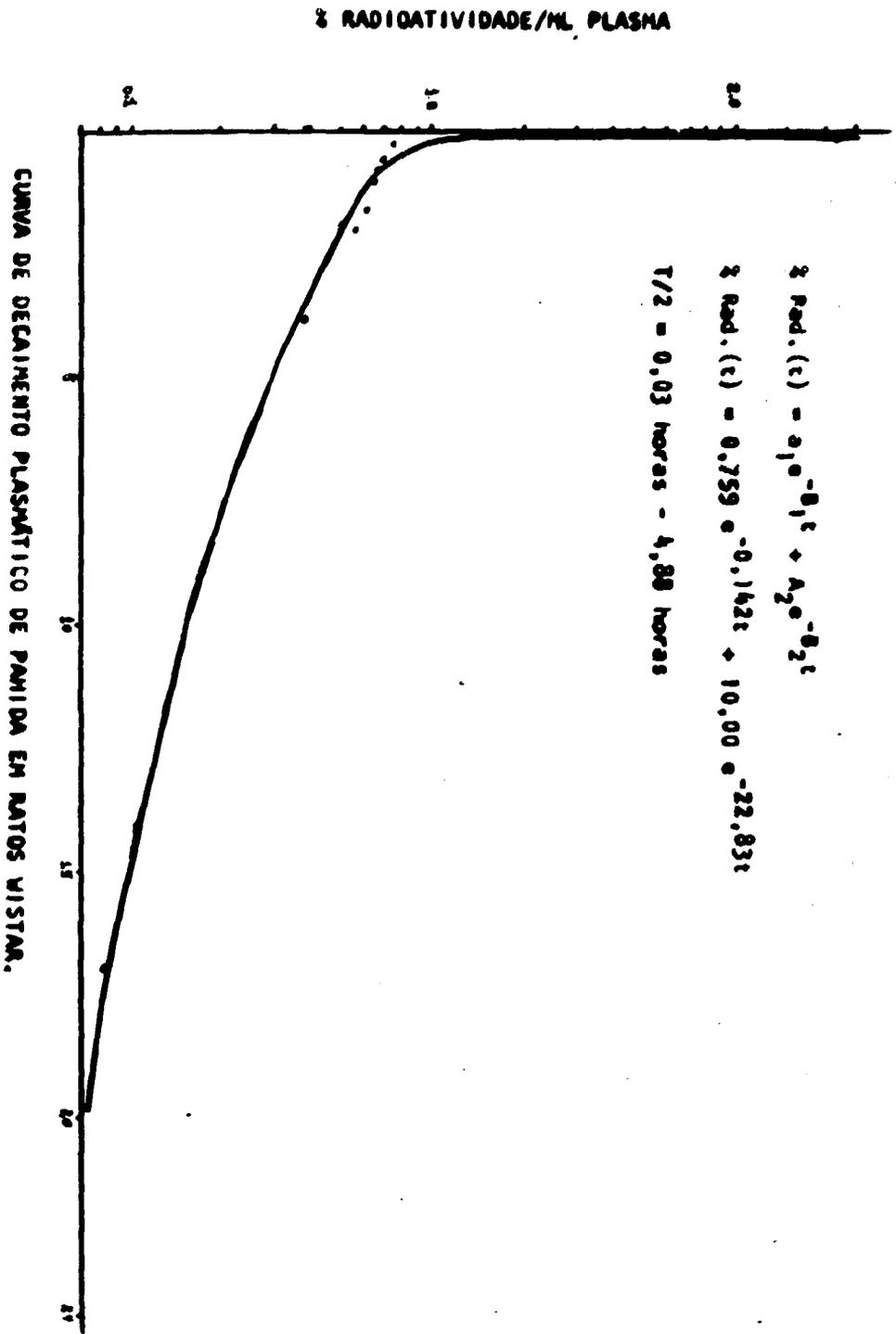


FIGURA 2

TABELA 1

DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA EM RATOS WISTAR APÓS ADMINISTRAÇÃO POR VIA ENDOVENOSA DE 1 MG/0,2 ML - MÉDIA DE ANIMAIS / ENSAIO - % DE RADIOATIVIDADE/G DE ÓRGÃO.

ÓRGÃOS TEMPO (HORAS)	CORAÇÃO	PULMÃO	FÍGADO	ESTÔMAGO	BAÇO
0,083	0,34±0,06	-	0,28±0,05	0,35±0,08	0,29±0,02
0,25	0,24±0,09	0,49±0,20	0,22±0,11	0,29±0,12	0,20±0,07
0,50	0,21±0,05	0,35±0,08	0,20±0,06	0,27±0,04	0,18±0,04
0,75	0,17±0,05	0,43±0,12	0,26±0,05	0,26±0,07	0,18±0,02
1,00	0,07±0,04	0,26±0,04	0,16±0,04	0,20±0,05	0,12±0,02
1,30	0,16±0,06	0,19±0,02	0,23±0,13	0,10±0,06	0,10±0,06
2,00	0,10±0,04	0,30±0,07	0,20±0,03	0,17±0,01	0,13±0,03
4,00	0,04±0,02	-	0,21±0,06	0,07±0,03	0,09±0,02
17,00	0,01±0,00	0,13±0,09	0,14±0,09	0,01±0,005	0,06±0,04
24,00	0,01±0,00	0,07±0,05	0,12±0,06	0,01±0,00	0,05±0,03

TABELA 2

PAHIDA ^{99m}Tc

CONTROLE RADIOQUÍMICO - CROMATOGRAFIA ASCENDENTE - SUPORTE ITLC
 SOLVENTES : NaCl 0,9%; ACETONA

TEMPO (MIN) ATIVIDADE ^{99m}Tc	15	30	45	60	120	180
1 mCi	99,00	99,00	98,00	99,00	98,50	99,30
6,3 mCi	99,55	98,62	-	99,68	99,57	-
36 mCi	99,88	99,96	-	99,89	99,90	98,66
48 mCi	99,22	99,86	-	99,67	99,85	99,82

TABELA 3

TEMPO (MIN) TEMPO DE ESTOCAGEM	5	15	30	60	120	180
30 DIAS	99,94	99,90	99,98	99,95	99,90	99,29
60 DIAS	99,36	99,80	99,40	99,69	99,69	99,86

TABELA 4

PAHIDA-^{99m}Tc

CAPTAÇÃO EM RINS DE RATOS WISTAR

TEMPO (HORAS)	% DE RADIOATIVIDADE/ATIVIDADE TOTAL DOS ÓRGÃOS
0,083	80,81 ± 3,80
0,50	88,79 ± 4,52
0,75	84,19 ± 5,17
1,00	84,32 ± 4,98
1,30	91,06 ± 5,31
2,00	70,76 ± 7,02
4,00	79,01 ± 11,64
17,00	71,20 ± 16,07
24,00	68,55 ± 4,96

% ELIMINADA PELA URINA EM 24 HORAS: 70,25% ± 2,00%

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BURNS, H.; SOWA, D.; MARZILLI, L. Improved synthesis of N-(2,6 Dimethylphenylrearbamoylmethyl) iminodiacetic acid and analogs. J.Pharm. Sci., 67 (10):1434-6, 1978.
2. CHERVU, L. & BLAUFox, M. Renal radiopharmaceuticals - An uptake. Semin.Nucl.Med., 12:224-45, 1982.
3. COLOMBETTI, L. Principles of radiopharmacology. Florida, CRC, 1979. p.97-116.
4. DAVIDSON, A.; JONES, A.; ORVIG, C. A new class of oxotechnetium(5+) chelate complexes containing a $TcON_2S_2$ core. Inorg. Chem., 20:1629 - 32, 1981.
5. KLINGESMITH, W.; FRITZBERG, A.; SPTIZER, D.; KUNI, C.; WILLIANSON, M.; WASHER, G.; WEIL, R. Clinical evaluation of Tc-99m N,N'-bis(mercaptoacetil) - 2,3 - Diaminopropanoate as a replacement for I-131 Hippurate: concise communication J.Nucl.Med., 25:42-8, 1984.
6. KLINGESMITH, W.; GIRHOLD, J.; FRITZBERG, A.; SPITZEN, V. KUNI, C. ; SINGER, C.; WEIL, R. Clinical comparison of ^{99m}Tc N-N'-bis(mercaptoacetamido) ethylenediamine and ^{131}I -ortho-iodohippurate for evaluation of renal tubular function. J.Nucl.Med., 23:377-80, 1982.
7. WILLIAMS, D. & FLEMING, I. Spectroscopic methods in organic chemistry. 2. ed. London, McGraw-Hill, 1973. p. 74.