

Faculteit Wetenschappen
Vakgroep Analytische Chemie
Instituut voor Nucleaire Wetenschappen



Onderzoek naar het werkingsmechanisme van acamprosaat, een geneesmiddel tegen alcoholverslaving, met behulp van een radiotracer voor positron emissie tomografie

Jan Courtyn

Proefschrift voorgelegd tot het behalen van de graad van
doctor in de wetenschappen: scheikunde

Promotors: prof. em. dr. R. Dams
prof. dr. K. Strijckmans

Academiejaar 2003-2004

Faculteit Wetenschappen
Vakgroep Analytische Chemie
Instituut voor Nucleaire Wetenschappen



Onderzoek naar het werkingsmechanisme van acamprosaat, een geneesmiddel tegen alcoholverslaving, met behulp van een radiotracer voor positron emissie tomografie

Jan Courtyn

Proefschrift voorgelegd tot het behalen van de graad van
doctor in de wetenschappen: scheikunde

Promotors: prof. em. dr. R. Dams
prof. dr. K. Strijckmans

Academiejaar 2003-2004

Voorwoord

"Ik weet niet meer, of ik ben gaan drinken, omdat mijn vrouw mij heeft verlaten, of dat mijn vrouw me heeft verlaten, omdat ik ben gaan drinken".

Ben is een onverbeterlijke alcoholist. Wanneer hij zijn gezin, zijn baan en ieder toekomst perspectief verliest, besluit hij z'n schepen achter zich te verbranden. Hij vertrekt naar Las Vegas waar hij in een lange uitbarsting van drank en zelfdestructie zijn einde tegemoet gaat. Zelfs de liefde van Sera kan hem niet weerhouden van zijn reis naar het einde van het delirium.

Twee weken na ondertekening van het contract voor de verfilming van zijn semi-autobiografisch boek pleegde schrijver John O'Brian zelfmoord. Hij was een ongeneeslijk alcoholist.

Leaving Las Vegas – film, fictie en realiteit

Zonder de steun, inzet en hulp van velen zou dit onderzoek nooit mogelijk geweest zijn.

Mijn promotors prof. Richard Dams en prof. Karel Strijckmans wens ik te bedanken voor de mogelijkheid te doctoreren op het INW. U bood me de wetenschappelijke vrijheid in een onderzoek zonder rijke laboratoriumtraditie.

In het bijzonder wil ik mijn hotcel-collega Johan Sambre in de bloemen zetten. Je wetenschappelijke ervaring, technische kennis en kritische natuur waren belangrijke elementen in het welslagen van dit werk. Onze professionele en minder professionele babbels waren de oase in een zee van noeste arbeid.

Verder gaat mijn oprechte dank uit naar Freddy De Guchteneire en Rudi Dolieslager voor de snelle protonen, Jaques Dewaele voor de liters en kilo's chemische producten, Marijn Van Hulle voor de massaspectra, Marc Leys voor de hulp in het atelier, Lucien Mortier voor alles en nog wat, Tony De Wispelaere en prof. Frans De Corte voor de gammaspectra en Chantal Hufkens voor de administratie.

Dimitri, Marijn, Jordy en Frans, bedankt voor de gastvrijheid op het tweede. Het was een verlichting bij jullie de eenzaamheid van het cyclotron te ontvluchten.

De hulp en de steun vanuit het laboratorium voor organische en bio-organische synthese en het laboratorium voor radiofarmacie waren cruciaal. Dank aan prof. Johan Van der Eycken, Jan Goeman en Jurgen Caroen voor de opname en analyse van de NMR-spectra, de expertise bij de organische syntheses en de nuttige tips. Dank aan prof. Guido Slegers, Bart Cornelissen, Marleen Van De Capelle, Ruth Oltenfreiter en Philippe Joye voor de helpende handen bij de dierexperimenten, de leerzame gesprekken en de immer hartelijke ontvangst.

Ik wil al diegenen die reeds vertrokken, bleven en kwamen op het laboratorium voor analytische chemie bedanken voor de aangename werksfeer. Barbecue, recepties, het beruchte kerstfeestje,...het was hier fijn vertoeven en mindere momenten waren snel vergeten.

Tenslotte wil ik mijn liefste snoepie, mijn ouders en mijn vrienden bedanken. Er kwam wellicht vaak chinees uit mijn mond wanneer ik vertelde over het onderzoek op het INW. Niettemin was jullie interesse een bron van moed en inspiratie.

Bedankt!

Jan

Gebruikte afkortingen

BGO	Bismut Germanaat
BHB	Bloed Hersen Barrière
CA	Carrier Added
CT	Computed Tomography
CZS	Centraal Zenuwstelsel
DMF	Dimethylformamide
DMO	5,5-dimethyloxazolidine-2,4-dione
DMSO	Dimethylsulfoxide
ECT	Emission Computed Tomography
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
EOB	End Of Bombardment
EOS	End Of Synthesis
ES	Electro-Spray
FDC	Ftaloyldichloride
FDG	Fluoro-2-deoxy-D-glucose
FID	Flame Ionisation Detection
fMRI	functional Magnetic Resonance Imaging
FOV	Field Of View
FWHM	Full Width at Half Maximum
GABA	Gama-aminobutyric acid
GC	Gaschromatografie
GM	Geiger-Muller
GSO	Gadolinium orthosilicate
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I.S.	Inwendige Standaard
LD	Lethal Dose
LOEL	Lowest Observed Effect Level
LOR	Line Of response
LSO	Lutetium Oxyorthosilicaat
MEK	Methylethylketon
MRS	Magnetic Resonance Spectroscopy
MS	Massaspectrometrie
NCA	No Carrier Added
NMDA	N-methyl-D-aspartaat

NMR	Nucleaire Magnetische Resonantie
NOEL	No Observed Effect Level
PDE	Permitted Daily Exposure
PET	Positron Emissie Tomografie
PLC	Programmable Logic Control
PMT	Photomultiplier Tube
rCBF	regional Cerebral Blood Flow
rCBV	regional Cerebral Blood Volume
rCMR ₀₂	regional Cerebral Metabolic Rate of oxygen
rCMR _{glc}	regional Cerebral Metabolic Rate of glucose
rOEF	regional Oxygen Extraction Fraction
ROI	Region Of Interest
SPE	Solid Phase Extraction
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SUR	Standard Uptake Ratio
TBA	Tetrabutylammonium
THF	Tetrahydrofuraan
TLC	Thin Layer Chromatography
WHO	World Health Organisation

Inhoudsopgave

Voorwoord	1
Gebruikte afkortingen	3
Inhoudsopgave.....	5
1. Alcohol, alcoholisme en acamprosaat	15
1.1. Inleiding.....	17
1.2. Alcoholisme, een medisch probleem.....	18
1.3. Alcohol en het centrale zenuwstelsel.....	20
1.3.1. Hoe ontstaan tolerantie en afhankelijkheid?	21
1.3.2. Tolerantie en afhankelijkheid: de biochemische achtergrond.....	22
1.3.2.1. Prikkelgeleiding via de zenuwcel	23
1.3.2.2. De invloed van chronische blootstelling aan alcohol op het inhiberende GABA-neurotransmittersysteem	25
1.3.2.3. De invloed van chronische blootstelling aan alcohol op het exciterende glutamaatneurotransmittersysteem	26
1.3.2.4. De invloed van chronische blootstelling aan alcohol op de spanningsgevoelige Ca^{2+} -kanalen	27
1.3.2.5. Besluit.....	27
1.4. Het werkingsmechanisme van acamprosaat, een hypothese	28
1.4.1. Chemische structuur van acamprosaat.....	29
1.4.2. Acamprosaat en het GABA-neurotransmittersysteem.....	30
1.4.3. Acamprosaat en het exciterend aminozuur neurotransmittersysteem.....	32
1.4.4. Acamprosaat en andere mogelijke doelwitten in het CZS	33
1.5. Doelstelling: zoeken naar de ‘action site’	33
1.6. Referenties	34
2. Positron emissie tomografie in het onderzoek naar het werkings-mechanisme van acamprosaat	39
2.1. Inleiding.....	41
2.2. Positron emissie tomografie	42
2.2.1. Morfologische en functionele beeldvorming: een (r)evolutie.....	42
2.2.2. Beeldvorming met PET: het basisprincipe	43
2.2.2.1. Positron-elektronannihilatie.....	44
2.2.2.2. Coïncidentiedetectie	44
2.2.2.3. Tomografie	44
2.2.2.4. Beeldreconstructie	45
2.2.3. PET: de hardware	47
2.2.3.1. Het detectiesysteem	47

2.2.3.2.	Opbouw van de PET-scanner	48
2.2.4.	PET: karakteristieken van de scanner	50
2.2.4.1.	Ruimtelijke resolutie.....	50
2.2.4.2.	Uniformiteit van de resolutie binnen de FOV	51
2.2.4.3.	Gevoeligheid.....	51
2.2.4.4.	Telkadanlineariteit	52
2.2.5.	PET: de meetprocedure.....	52
2.2.5.1.	Normalisatiescan	52
2.2.5.2.	Blankoscan	52
2.2.5.3.	Transmissiescan.....	53
2.2.5.4.	Emissiescan	53
2.2.6.	Recente ontwikkelingen.....	53
2.3.	Functionele beeldvorming met PET	54
2.3.1.	Kinetische modellen	55
2.3.2.	Detectie van een verstoorde bloed/hersenbarrière via PET	56
2.3.3.	Meting van bloedvolume, doorbloeding en zuurstofmetabolisme.....	57
2.3.3.1.	Bloedvolume.....	58
2.3.3.2.	Cerebrale doorbloeding	58
2.3.3.3.	Zuurstofmetabolisme.....	59
2.3.3.4.	Functionele PET-beelden	59
2.3.3.5.	Andere methodes voor meting van de bloedflow	60
2.3.4.	Meting van het glucosemetabolisme.....	60
2.3.5.	Bepaling van andere fysiologische parameters via PET.....	62
2.3.5.1.	Bepaling van de cerebrale pH.....	62
2.3.5.2.	Bepaling van de proteïnesynthese	63
2.3.5.3.	Beeldvorming van neuroreceptoren.....	63
2.4.	Geneesmiddelenonderzoek met PET.....	64
2.5.	Referenties	65
3.	De ontwikkeling van een koolstof-11-gemerkte PET-tracer – Algemene principes.....	71
3.1.	De ontwikkeling van PET-tracers: een strategie	73
3.2.	De radio-isotoop koolstof-11	73
3.2.1.	Koolstof-11, een vanzelfsprekende keuze?.....	74
3.2.1.1.	Halveringstijd	74
3.2.1.2.	Straling	75
3.2.1.3.	Isotopische merking.....	76
3.2.1.4.	Beschikbaarheid van de radionuclide	76
3.2.2.	Productie van koolstof-11	77
3.3.	Synthese met koolstof-11	78
3.3.1.	Problemen en beperkingen.....	78

3.3.2.	Synthese van koolstof-11-gemerkte precursoren.....	79
3.3.3.	Synthese van koolstof-11-gemerkte radiofarmaca.....	81
3.4.	Kwaliteitscontrole van koolstof-11-gemerkte radiofarmaca	82
3.4.1.	Radionuclidische zuiverheid.....	83
3.4.2.	Radiochemische zuiverheid.....	83
3.4.3.	Chemische zuiverheid.....	84
3.4.4.	Specifieke activiteit	84
3.4.5.	Farmaceutische kwaliteit	85
3.4.5.1.	Steriliteit	85
3.4.5.2.	Apyrogeniciteit	86
3.4.5.3.	pH	86
3.4.5.4.	Isotoniciteit.....	86
3.4.5.5.	Toxiciteit.....	86
3.5.	Referenties.....	87
4.	Synthese van koolstof-11-gemerkt acamprosaat.....	91
4.1.	Productie van ^{11}C en $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$	93
4.1.1.	Apparatuur: doelwithouder voor productie van $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$	93
4.1.2.	Experimentele $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ opbrengst.....	95
4.2.	Productie van de precursor $[^{11}\text{C}]\text{acetylchloride}$	98
4.2.1.	Beschrijving van de synthese van $[^{11}\text{C}]\text{acetylchloride}$	98
4.2.2.	Apparatuur: de syntheseopstelling voor de productie van $[1\text{-}^{11}\text{C}]\text{acetylchloride}$	99
4.2.3.	Productie van $[1\text{-}^{11}\text{C}]\text{acetylchloride}$: experimentele gegevens	103
4.2.3.1.	$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en Grignardreagens	103
4.2.3.2.	$[1\text{-}^{11}\text{C}]\text{Acetylchloride}$	103
4.2.4.	Besluit.....	106
4.3.	Synthese van $[^{11}\text{C}]\text{acetylhomotaurine}$	106
4.3.1.	Directe acyleringsreactie met homotaurine	106
4.3.1.1.	Ontwikkeling van een scheidingsmethode voor homotaurine en acetylhomotaurine	107
4.3.1.2.	Synthese van $[^{11}\text{C}]\text{acetylhomotaurine}$	109
4.3.1.3.	Rendement en opbrengst	111
4.3.1.4.	Identificatie van het synthesepreparaat.....	112
4.3.1.5.	Samenvatting en besluit.....	113
4.3.2.	Acyleringsreactie met fenyl-3-aminopropaansulfonaat	114
4.3.2.1.	Synthese van fenyl-3-aminopropaansulfonaat en fenyl-(N)acetyl-3-aminopropaansulfonaat.....	115
4.3.2.2.	Ontwikkeling van een scheidingsmethode tussen fenyl-3-aminopropaansulfonaat en fenyl-(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat	121
4.3.2.3.	Synthese van fenyl- $[^{11}\text{C}](\text{N})\text{-acetyl-3-aminopropaansulfonaat}$	122

4.3.2.4.	Radiochemisch rendement en opbrengst	123
4.3.2.5.	Identificatie van het synthesepreparaat.....	124
4.3.2.6.	Hydrolyse van de sulfonaatester.....	125
4.3.2.7.	Besluit.....	127
4.3.3.	Acyleringsreactie met tetrabutylammonium-3-aminopropaan-sulfonaat	128
4.3.3.1.	Omkeerfase ionpaar chromatografie voor de scheiding van homotaurine en acetylhomotaurine	129
4.3.3.2.	Synthese van TBA-[¹¹ C]N-acetylhomotaurine.....	130
4.3.3.3.	De invloed van de reactieparameters op het reactierendement.....	131
4.3.3.4.	Syntheserendement en opbrengst	135
4.3.3.5.	Identificatie van het synthesepreparaat.....	135
4.3.3.6.	Besluit.....	135
4.4.	Referenties.....	136
5.	Kwaliteitscontrole van het synthesepreparaat	139
5.1.	Radionuclidische zuiverheid.....	141
5.2.	Radiochemische zuiverheid.....	143
5.3.	Chemische zuiverheid.....	145
5.3.1.	Identificatie van het radiofarmacon d.m.v. proton-NMR	146
5.3.2.	Bepaling van solventconcentraties via GC/FID.....	147
5.3.2.1.	Chromatografie.....	148
5.3.2.2.	Kalibratie	149
5.3.2.3.	Resultaten	149
5.3.3.	De bepaling van homotaurine via HPLC en derivatisatie met diëthyl ethoxymethyleenmalonaat	150
5.3.3.1.	Derivatisatie.....	151
5.3.3.2.	Chromatografie.....	152
5.3.3.3.	Kalibratie	153
5.3.3.4.	Resultaten	154
5.3.4.	Bepaling van tetrabutylammonium via ES-MS	154
5.3.4.1.	Analyse van TBA met ES-MS.....	155
5.3.4.2.	Kalibratie	155
5.3.4.3.	Resultaten	156
5.4.	Specifieke activiteit	157
5.4.1.	Bepaling van acetylhomotaurine via de semi-preparatieve HPLC	159
5.4.1.1.	Chromatografie.....	159
5.4.1.2.	Kalibratie	159
5.4.2.	Bronnen van stabiel koolstof	160
5.4.2.1.	CO ₂ als onzuiverheid in het N ₂ -doelwitgas	160
5.4.2.2.	Potentiële koolstofbronnen in reagentia	160

5.4.2.3. Andere bronnen van stabiel koolstof	161
5.4.3. Resultaten	162
5.5. Farmaceutische kwaliteit	163
5.5.1. Steriliteit en apyrogeniciteit.....	163
5.5.2. Isotoniciteit en pH.....	164
5.5.3. Toxiciteit.....	164
5.6. Besluit.....	164
5.7. Referenties.....	165
6. <i>In vitro</i> en <i>in vivo</i>-studies met koolstof-11-gemerkt acamprosaat	169
6.1. Acamprosaat: gekende farmacokinetische gegevens.....	171
6.1.1. Resorptie en biologische beschikbaarheid	172
6.1.1.1. Dierstudies.....	172
6.1.1.2. Studies in de mens	172
6.1.2. Verdeling	173
6.1.2.1. Dierstudies.....	174
6.1.2.2. Studies in de mens	174
6.1.3. Eliminatie.....	174
6.1.3.1. Dierstudies.....	174
6.1.3.2. Studies in de mens	175
6.1.4. Dosis	175
6.1.5. Farmacokinetiek van acamprosaat in patiënten	176
6.1.6. Besluit.....	176
6.2. Biodistributie van [¹¹ C]acamprosaat.....	176
6.2.1. Procedure.....	176
6.2.2. Resultaten van de biodistributie.....	178
6.2.3. Besluit.....	182
6.3. Eliminatie van [¹¹ C]acamprosaat via metabolisme.....	182
6.3.1. Metabolieten van [¹¹ C]acamprosaat in het plasma	183
6.3.1.1. Procedure.....	183
6.3.1.2. Resultaten	184
6.3.1.3. Conclusie	185
6.3.2. Metabolieten van [¹¹ C]acamprosaat in de uitgeademde lucht.....	186
6.3.2.1. Procedure.....	187
6.3.2.2. Resultaten	187
6.3.2.3. Precieze bepaling van de radiochemische zuiverheid van [¹¹ C]acetylhomotaurine na synthese.....	188
6.3.2.4. Conclusie	188
6.4. Biodistributie van [¹¹ C]acamprosaat in de hersenen.....	189

6.4.1. <i>In vitro</i> -evaluatie van de BHB-permeabiliteit: octanol/water partitiecoëfficiënt	189
6.4.1.1. Definitie	190
6.4.1.2. Berekende partitiecoëfficiënt.....	190
6.4.1.3. Procedure van de experimentele bepaling	191
6.4.1.4. Experimentele waarden	192
6.4.1.5. Besluit.....	193
6.4.2. <i>In vivo</i> -evaluatie van de BHB-permeabiliteit	193
6.4.2.1. Resultaten	193
6.4.2.2. Besluit.....	195
6.4.3. Hersendistributie van [¹¹ C]acamprosaat	195
6.4.3.1. Procedure.....	195
6.4.3.2. Resultaten en besluit van de hersendistributie.....	196
6.5. Besluit.....	197
6.6. Referenties.....	198
Samenvatting en besluit	201
Resultaten	203
Besluit.....	204
Summary and conclusion.....	207
Results	209
Conclusion.....	210

1. Alcohol, alcoholisme enacamprosaat

1.1. Inleiding

Alcohol is na koffie het meest gebruikte genotsmiddel ter wereld. In onze westerse beschaving is de consumptie van alcohol heel dikwijls verbonden met de eerder aangename aspecten van onze cultuur. Feestjes, fuiven, concerten en recepties, ze kaderen heel dikwijls in het vooruitzicht en de aantrekkingskracht van alcoholhoudende dranken.

Het is vooral in de economisch betere regio's (Europa en Noord-Amerika) waar alcohol rijkelijk geconsumeerd wordt en het gebruik ervan als genotsmiddel algemeen sociaal aanvaard is. Per inwoner ouder dan 15 jaar werd in België in 1996 10,94 liter pure alcohol geconsumeerd: 55% bier, 33% wijn en 12% sterke drank (Global Status Report On Alcohol, World Health Organisation, WHO, Genève 1999).

Naast de positieve eigenschappen van alcohol op sociaal gebied bestaan er ook uitgesproken negatieve kanten aan het gebruik van alcohol. Onder invloed verminderen sociale remmingen maar evenzeer het juiste inschattingsvermogen. Deze combinatie kan in sommige gevallen nefast zijn voor de morele, relationele, financiële en lichamelijke gezondheid van de consument. Volgens officiële statistieken (Belgisch Instituut voor Verkeersveiligheid) voor het jaar 2000 is 8,5 % (4.168) van alle letselongevallen alcohol gerelateerd, terwijl 10,2 % van alle ongevallen met doden en ernstig gewonden alcohol gerelateerd zijn. 7,7 % van alle bestuurders van personenwagens, betrokken in een ongeval met minstens 1 dode of ernstig gewonde weggebruiker was onder invloed van alcohol. In totaal vielen er 97 doden in een alcohol gerelateerd verkeersongeval, 1090 ernstig gewonden en 5047 lichtgewonden (<http://www.bivv.be>).

Een tweede kwalijke reputatie die alcohol heeft opgebouwd, is zijn sterk verslavende karakter. De maatschappelijke aanvaarding van alcoholgebruik, de beschikbaarheid van alcoholhoudende dranken en het typische effect van de stof op het centrale zenuwstelsel (CZS) maken dat consumptie gemakkelijk kan leiden tot overconsumptie, misbruik en tenslotte verslaving. Geschat wordt dat ongeveer 5 à 10 % van de Belgische volwassenen in bepaalde mate kampt met een alcoholprobleem.

De gevolgen van alcoholverslaving zijn zeer uiteenlopend, pijnlijk voor het individu en zijn naaste omgeving, kostelijk voor de maatschappij én het individu. Een studie uit de VS berekende dat de totale kostprijs geassocieerd met alcoholmisbruik in 1995 opliep tot bijna 170 miljard dollar – ongeveer 600 dollar per inwoner. Voor Europa becijferde de WHO de totale kost ten gevolge van alcoholmisbruik in 1993 op 5 à 6 % van het BNP van elk land (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. NIH Publication No. 98-4327, Sept 1998).

1.2. Alcoholisme, een medisch probleem

Ondanks de belangrijke impact van alcoholmisbruik op het maatschappelijk gebeuren werd alcoholverslaving maar vrij recent beschouwd als een medisch probleem op zich. De medische behandeling concentreerde zich voordien enkel op de onderdrukking van complicaties van de verslaving terwijl de oorzaak van het probleem, overmatig drinken, het domein was van *raadgevers*, advocaten of ontwende alcoholiekers in een organisatie zoals Anonieme Alcoholiekers.

De Amerikaanse arts E.M. Jellinek (1890-1963) was de pionier in het definiëren van alcoholisme. Na een enquête onder meer dan 2000 alcoholisten kwam hij tot de conclusie dat alcoholisme een ziekte is, te behandelen maar niet te genezen. Hij beschreef 4 verschillende stadia van deze chronische degeneratieve kwaal in 1952. (<http://www.stoppen.be>)

Het eerste stadium: Wie alcohol gebruikt ervaart een sterke vermindering van stress en gevoelens van spanning. In een periode die uiteenloopt van zes maanden tot twee jaar gaat de toekomstige alcoholist vrijwel dagelijks drinken om dit gevoel van ontspanning te ervaren. Over het algemeen heeft hij of zij een hogere tolerantiedrempel voor alcohol dan gemiddeld.

Het tweede stadium: Wanneer plotseling black-outs en geheugenverlies optreden is het tweede stadium van alcoholisme bereikt. De black-outs hebben meestal betrekking op het middellange termijn geheugen, bijvoorbeeld activiteiten of gesprekken die de dag ervoor plaatsvonden, tijdens de periode dat gedronken werd. De herinneringen aan gebeurtenissen voor en na de black-out worden niet aangetast. In dit stadium begint de betrokkene te beseffen dat zijn of haar drinkgedrag een nieuw niveau heeft bereikt en gaat het drinken steeds vaker gepaard met schuldgevoel en spanning. Vaak gaat hij of zij stiekem drinken.

Het derde stadium: In de oorspronkelijke formulering van Jellinek is dit de cruciale fase, waarin de betrokkene de overgang doormaakt van een min of meer beheerste opzet naar onbeheersbaar gedrag. De verslaafde reageert nu onmiddellijk op elke spanning door te gaan drinken en kan zelfs incidenten uitlokken of verzinnen om het drinken te rechtvaardigen. Vaak begint hij de dag met een glas en wordt hij in de loop van de avond heel dronken. Dit stadium kan vele jaren duren. De verslaafde slaagt er in die tijd zijn werk te blijven doen en zich maatschappelijk te handhaven, maar intieme relaties komen onder grote druk te staan.

Het vierde stadium: Jellinek noemde dit de chronische fase van de alcoholverslaving, die zich kenmerkt door langdurige perioden van dronkenschap. Dit leidt tot ernstige

gezondheidsproblemen, zowel lichamelijk als geestelijk, problemen in persoonlijke en beroepsmatige relaties, en contacten met de politie. Zelfs een korte onthouding van alcohol leidt tot onaangename en beangstigende symptomen, zodat de verslaafde drinkt om de symptomen te vermijden. De tolerantie voor alcohol neemt abrupt af, zodat zelfs een geringe hoeveelheid nu tot dronkenschap leidt.

Onder invloed van een langzaam veranderende publieke opinie, de sociaal-economische relevantie en het groeiend inzicht in de psychosociale en biochemische achtergrond van alcoholisme stegen de afgelopen jaren de inspanningen van de gezondheidszorg voor de behandeling van alcoholverslaving. De huidige alcoholontwenningprogramma's passen een multidisciplinaire methode toe die bestaat uit 3 onderdelen. Allereerst volgt de alcoholafhankelijke patiënt een geschikte psychotherapie om na de initiële alcoholontwenning of detoxificatie te rehabiliteren. Ten tweede volgen psychosociale maatregelen die de patiënt moet helpen inzicht te krijgen in de omstandigheden rondom zijn of haar alcoholafhankelijkheid. Steun van gespecialiseerde maatschappelijke werkers, familie en ex-patiënten in bijstandclubs zoals AA zijn hierbij zeer belangrijk.

Ten derde beogen geneesmiddelen de symptomatische behandeling van alcoholontwenningssverschijnselen (het op korte termijn onderdrukken van de ontwenningssverschijnselen met kalmerings- en slaapmiddelen) én de instandhouding van de alcoholonthouding op langere termijn. Het eerste geneesmiddel dat geïntroduceerd werd met het specifieke doel de instandhouding van alcoholabstinentie was disulfiram, beter bekend onder de merknaam Antabus®. (Terenius, 1998)

Tegenwoordig bestaan een 5-tal verschillende soorten geneesmiddelen waarvan de doeltreffendheid als adjuvans bij psychotherapie werd onderzocht:

- (1) het aversiemiddel disulfiram (Antabus® of Refusal®)
- (2) de opiaatantagonist naltrexon (Revia®)
- (3) acamprosaat (Campral®)
- (4) geneesmiddelen werkend op de serotoninebalans
- (5) lithiumcarbonaat .

De resultaten van een overzichtsstudie worden als volgt samengevat:

- (1) Disulfiram is reeds lange tijd in gebruik, maar niettemin staat nog steeds niet vast dat deze stof het drinken beperkt. Disulfiram versterkt de onaangename effecten van alcohol door verstoring van de afbraak ervan. Door het blokkeren van het enzym acetaldehyde-dehydrogenase stapelt acetaldehyde, het eerste metaboliet van ethanol, zich op in het lichaam. Hierdoor krijgt de betrokkene last van overmatig blozen en zweten, braken,

misselijkheid, hoofdpijn, hartkloppingen,... Het gebruik van het product valt te overwegen als het wordt ingenomen onder toezicht of continu wordt toegediend via een onderhuidse inplanting. Het middel is niet geschikt bij slecht gemotiveerde, impulsieve, psychotische of zelfdestructieve patiënten of indien er sprake is van zwangerschap of een cardiovasculaire, neurologische, hepatische of nefrologische problematiek. Conclusie: onduidelijk; wisselende resultaten.

- (2) Naltrexon voorkomt terugval en vermindert drinken, maar heeft geen effect op algehele onthouding. De belangrijkste werking van naltrexon is het blokkeren van de opiaatreceptoren waardoor het gewaardeerde effect van alcohol verdwijnt. De stof zwakt ook de *craving* (onweerstaanbare hunkering naar alcohol) af. Naltrexon kan een (overkomelijk) probleem vormen bij personen met leverstoornissen. Conclusie: waarschijnlijk effectief.
- (3) Acamprosaat is vooral in Europa beproefd. Dit middel beperkt de mate van drinken door onthoudingsverschijnselen en *craving* te reduceren en beperkt zo de kans op een mogelijke terugval. Of de stof ook bijdraagt aan algehele onthouding is nog onduidelijk. Hoe acamprosaat werkt is niet helemaal bekend. Vermoedelijk heeft het middel invloed op de boodschapperstoffen GABA en glutamaat in het centrale zenuwstelsel. Conclusie: waarschijnlijk effectief.
- (4) Middelen die de heropname van serotonine in zenuwcellen remmen (*serotonin reuptake inhibitors*) zoals bijvoorbeeld fluoxetine (prozac[®]) zijn veel bestudeerd, met wisselende en de laatste tijd meestal negatieve resultaten. Conclusie: onduidelijk.
- (5) Lithiumcarbonaat helpt niet bij alcoholisme: bewezen ineffectief.

De algemene conclusie van de overzichtsstudie is dat alcoholisten baat kunnen hebben bij therapie met geneesmiddelen zoals acamprosaat en naltrexon. Het nut van disulfiram is omstreden, terwijl nader onderzoek nodig is of middelen die op serotonine inwerken iets te betekenen hebben bij alcoholisten met bepaalde bijkomende psychische stoornissen (Rockville, 1999; Garbutt *et al*, 1999).

1.3. Alcohol en het centrale zenuwstelsel

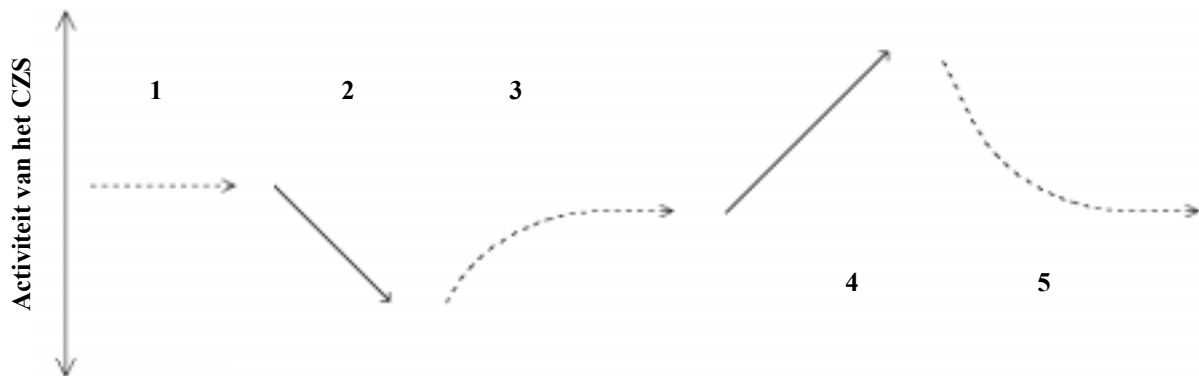
Na de detoxificatie, de eerste stap na het beëindigen van alcoholconsumptie, wordt de patiënt geconfronteerd met wat de moeilijkste uitdaging is: de post-ontwenningfase. Een persoon

begint vaak met drinken vanwege sociale, economische of psychische problemen en zijn drinkgedrag zal deze problemen wellicht alleen verergerd hebben. Op dat moment wordt de patiënt in heldere toestand geconfronteerd met de problemen die aan de basis liggen van zijn drinkgedrag én met de problemen die ontstaan zijn als gevolg van dat drinkgedrag. Bovendien krijgt hij te maken met de fysieke effecten van alcoholafhankelijkheid: symptomen zoals tremor (beven), paresthesie (stoornis in de gevoelswaarneming, waarbij zonder dat er aanwijsbare prikkels inwerken, jeuk of tintelingen worden waargenomen), tachycardie (versneld hartritme), transpireren, slapeloosheid en psychische problemen zoals angsten, nervositeit, prikkelbaarheid en depressie. Het is dus niet zo vreemd dat veel patiënten, ondanks psychotherapie en sociale en farmacologische ondersteuning, in hun oude drinkgedrag vervallen. De nood aan alcohol om een *normaal* leven te kunnen leiden, is bij de alcoholist immers zeer groot.

1.3.1. Hoe ontstaan tolerantie en afhankelijkheid?

Acute alcoholintoxicatie, t.t.z. een occasionele dronken toestand, wordt gekenmerkt door een geremde activiteit van het CZS. De ervaring leert dat dit zich uit onder de vorm van evenwichtsproblemen, ongecontroleerde en ongecoördineerde bewegingen, niet-helder of verward denken, enz. Fysieke afhankelijkheid van alcohol ontstaat wanneer occasioneel drinken evolueert naar chronische consumptie van grote hoeveelheden alcohol. Als het lichaam gedurende een lange periode constant onder invloed verkeert van de inhiberende werking van alcohol, zal het als respons bepaalde fysiologische processen geleidelijk aan de heersende omstandigheden aanpassen. Het komt er op neer dat het CZS gevoeliger wordt voor externe en interne prikkels. Hierdoor wordt het lichaam, en in het bijzonder het CZS, beter bestand tegenover de hoge alcoholconcentratie in het bloed. Ondanks de effecten die alcohol teweegbrengt is het nog steeds min of meer in staat is normaal te functioneren. Dit fenomeen staat bekend onder de naam tolerantie of gewenning.

Deze tolerantie brengt met zich mee dat een steeds grotere hoeveelheid alcohol moet geconsumeerd worden om het gewenste effect te verkrijgen, met desastreuze gevolgen voor de fysieke en mentale gezondheid van de persoon. Bovendien verdwijnt de geobserveerde neurologische nivellering niet wanneer de alcoholconsumptie gestaakt wordt. Zonder de onderdrukkende werking van alcohol wordt het CZS overgevoelig voor prikkels en ontstaan ontwenningssverschijnselen.



Figuur 1.1: Schematische weergave van de invloed van acute en chronische alcoholintoxicatie op het CZS en de reactie van het CZS bij onthouding na chronische alcoholintoxicatie: (1) alcoholonthouding bij een gezond persoon: normale activiteit van het CZS; (2) acute (occasionele) alcoholintoxicatie: door de inhiberende werking van alcohol daalt de activiteit van het CZS; (3) chronische alcoholintoxicatie: het CZS past zich langzaam aan de inhiberende condities aan door de activiteit van het CZS te verhogen, er ontstaat tolerantie t.o.v. alcohol; (4) alcoholonthouding bij een alcoholverslaafde: het wegvallen van de inhiberende werking van alcohol en de aanpassing van het CZS (zie 4) veroorzaakt overactiviteit in het CZS, er ontstaan ontwenningsverschijnselen; (5) langzaam keert de activiteit van het CZS terug naar een normaal niveau.

Vanaf het moment dat bij het stoppen van de alcoholconsumptie deze ontwenningsverschijnselen worden ervaren, is er sprake van lichamelijke afhankelijkheid. In figuur 1.1 wordt schematisch de invloed van acute en chronische alcoholintoxicatie op de werking van het CZS en de reactie van het CZS bij onthouding weergegeven.

1.3.2. Tolerantie en afhankelijkheid: de biochemische achtergrond

Vroeger bestond het idee dat fenomenen als alcoholtolerantie en alcoholafhankelijkheid moesten begrepen worden als een reactie van het lichaam op een niet-specifieke invloed van alcohol. Er werd namelijk lang verondersteld dat alcohol inwerkte op het CZS doordat de stof kon doordringen in neurale membranen. De daaruit voortvloeiende verandering van fysisch-chemische eigenschappen van deze membranen verklaarde het acute effect van alcohol, de reactie van het lichaam ter hoogte van deze membranen het verschijnsel tolerantie.

Deze hypothese werd echter de laatste 25 jaar vervangen door het begrip dat alcohol specifiek inwerkt op bepaalde enzymen en receptoren van het zenuwstelsel. Uit diverse studies is gebleken dat overmatig alcoholgebruik een specifieke invloed heeft op de verschillende neurotransmittersystemen van het CZS. Met betrekking tot de ontwikkeling van tolerantie en fysieke afhankelijkheid zijn de neurotransmittersystemen gebaseerd op de aminozuurneurotransmitters γ -aminoboterzuur (GABA) en glutamaat bijzonder belangrijk.

1.3.2.1. Prikkelgeleiding via de zenuwcel

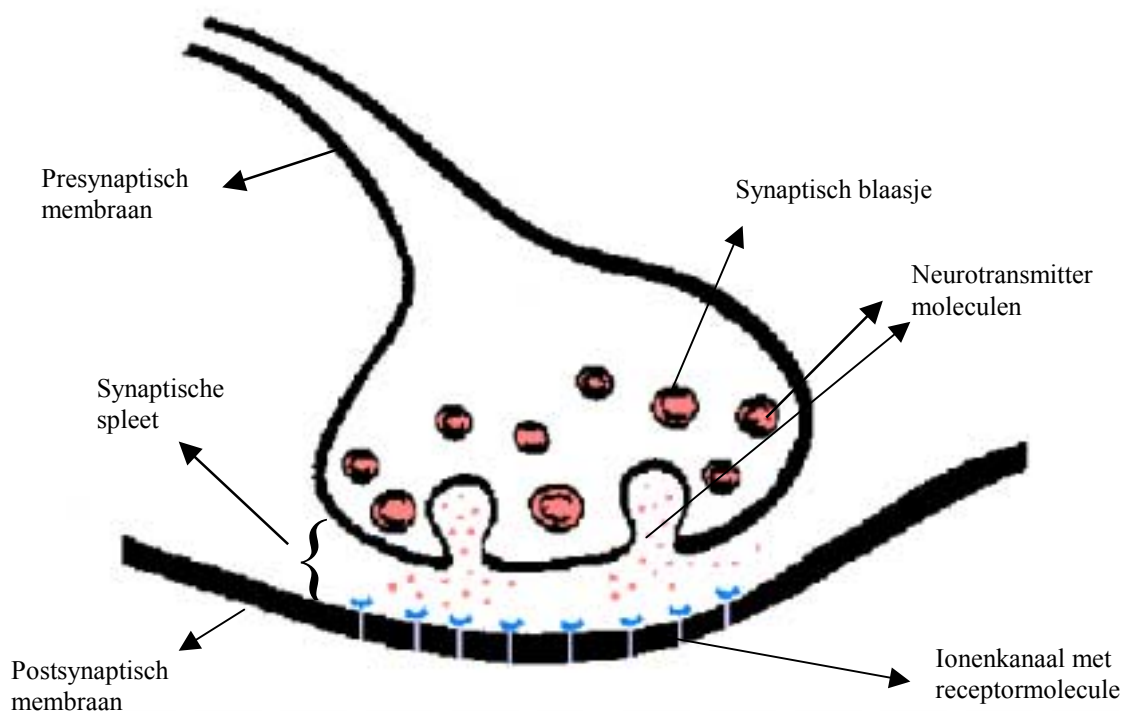
Het zenuwstelsel maakt het mogelijk dat dieren interne en externe stimuli kunnen waarnemen en er snel en gecoördineerd kunnen op reageren. Het zenuwstelsel maakt hiervoor gebruik van een hele reeks elektrische en chemische signalen die ontstaan in receptor systemen, zenuwcellen en effector systemen.

De basis van elk transport van informatie door een zenuwcel is de aanwezigheid van een elektrische potentiaal over het semi-permeabel membraan van de zenuwcel. Deze elektrische potentiaal ontstaat doordat een ionenpomp in de celmembraan constant Na^+ -ionen uitwisselt voor K^+ -ionen over de celmembraan (Na/K pomp). Door de werking van deze ionenpomp wordt Na^+ verplaatst van binnen de cel naar buiten, en *vice versa* voor K^+ . In rust is de celmembraan via selectieve ionenkanalen permeabel voor K^+ -ionen (niet voor Na^+ !) waardoor deze door de heersende concentratiegradiënt van binnen naar buiten diffunderen. Als gevolg hiervan ontstaat een tekort aan positieve ladingen in de cel en een overmaat aan positieve lading buiten de cel. De uitwaartse diffusie van K^+ gaat door totdat de elektrische tegenkracht groot genoeg geworden is om de verdere uitstroom ervan tegen te werken. De elektrische potentiaal over het celmembraan van een niet-actieve zenuwcel noemt men de "rustpotentiaal". Deze bedraagt 30-100 mV.

Wanneer de cel geprikkeld wordt, openen selectieve ionenkanaaltjes voor Na^+ -ionen en sluiten deze voor K^+ . De instroom van Na^+ -ionen depolariseert de celmembraan. Na korte tijd sluiten en openen de respectievelijke ionenkanaaltjes zich opnieuw en wordt de rustpotentiaal terug opgebouwd: repolarisatie. Deze opeenvolging van elektrische fenomenen (depolarisatie - repolarisatie) vormt de "actiepotentiaal". Dit fenomeen verplaatst zich snel (100 m/s) over de gehele lengte van de zenuwcel.

Een actiepotentiaal die het uiteinde van een zenuwcel bereikt, veroorzaakt daar het vrijstellen van een overdrachtstof of neurotransmitter uit de synaptische blaasjes van het synaptisch element (zie figuur 1.2). Deze neurotransmitter diffundeert in de synaptische spleet naar het postsynaptische membraan van de volgende zenuwcel waar hij aan speciale

receptormoleculen gebonden wordt. Deze receptormoleculen maken deel uit van de macromoleculaire structuur van specifieke ionenkanalen ingebed in het membraan van de postsynaptische cel. Door de binding tussen receptor en het neurotransmitterligand kan het ionenkanaal zich openen waardoor het celmembraan permeabel wordt voor bepaalde ionen. Afhankelijk van het type neurotransmitter (en dus het type receptor) zal dit leiden tot een excitatie of inhibitie van de postsynaptische zenuwcel. Exciterende aminozuren zullen door het binden aan receptoren, ionenkanalen openen voor extracellulaire ionen zoals Na^+ of deze voor K^+ sluiten. Dit zorgt voor een lokale depolarisatie. Naarmate de bezettingsgraad van de receptoren toeneemt, vergroot de kans op een algemene depolarisatie van de postsynaptische zenuwcel, t.t.z. het ontstaan van een actiepotentiaal. Inhiberende neurotransmitters activeren receptoren verbonden aan ionenkanalen voor andere ionen zoals Cl^- . De instroom van deze Cl^- ionen veroorzaakt een hyperpolarisatie van de postsynaptische cel waardoor de kans sterk afneemt dat deze alsnog depolariseert.



figuur 1.2: Prikkeloverdracht tussen 2 zenuwcellen via neurotransmitters en receptoren.

De meeste neurotransmitters interageren met hun receptoren om de elektrische eigenschappen van de post-synaptische cel te wijzigen. Sommige neurotransmitterinteracties (met een ander type receptor) veranderen de chemische eigenschappen van de postsynaptische cel. Dit gebeurt door het veroorzaken (exciterend) of blokkeren (inhiberend) van de vorming van *second messenger* moleculen. Deze boodschappermoleculen werken in op de genexpressie: de vorming en activering van enzymen, en oefenen zo een invloed uit op de functie van de cel.

Op basis van hun chemische structuur kunnen 4 verschillende types neurotransmitters onderscheiden worden. De eerste en best gekende groep van neurotransmitters zijn de zogenaamde amine-neurotransmitters. Tot deze groep behoren onder andere acetylcholine, norepinephrine, dopamine en serotonine. Tot de tweede groep neurotransmitters behoren de aminozuren glycine, glutamaat, aspartaat en GABA. Glutamaat en GABA zijn de meest voorkomende neurotransmitters in het CZS en zijn verantwoordelijk voor de belangrijkste inhiberende (GABA) en exciterende (glutamaat) stimuli. De derde groep van neurotransmitters vormen de minder goed gekende neuropeptides, structuren met minstens 2 oplopend tot 100 aminozuren. Tot de vierde familie behoren een variatie aan stoffen met neurotransmittereigenschappen zoals N_2O en purines zoals adenine en ATP (Siegel *et al*, 1989).

1.3.2.2. De invloed van chronische blootstelling aan alcohol op het inhiberende GABA-neurotransmittersysteem

Het GABA_A-receptorcomplex¹ bestaat uit verschillende subunits die een zodanige quaternaire structuur vormen dat het geheel functioneert als een ionenkanaal. Binding van GABA aan deze receptor heeft een structurele verandering in het ionenkanaal tot gevolg zodat deze permeabel wordt voor Cl^- -ionen. Het neuron ondergaat door de instroom van deze negatief geladen ionen hyperpolarisatie waardoor de prikkeloverdracht in de zenuwcel tijdelijk onmogelijk is (Cl^- -ionen diffunderen tegen de elektrochemische gradiënt in wegens een groot concentratieverschil tussen cytosol en extracellulaire vloeistof) (Siegel *et al*, 1989).

Naast de bindingsplaats voor GABA wordt het GABA_A-receptorcomplex geassocieerd en gemoduleerd door verschillende additionele units die gekarakteriseerd worden als de bindingssite voor benzodiazepines en barbituraten.

Verschillende jaren bestond er twijfel omtrent de invloed van alcohol ten opzichte van de functie van het GABA-neurotransmittersysteem. Ondertussen hebben moleculair

¹ Naast de GABA_A-receptor bestaan nog receptoren waarop GABA als neurotransmitter kan binden zoals bijv. de GABA_B-receptor (zie 1.4.2).

farmacologische studies uitgewezen dat alcohol de affiniteit van sommige GABA_A-receptoren voor GABA verhoogt. Als gevolg hiervan neemt het aantal elektrische impulsen in de neuronen af waardoor de totale activiteit (prikkelbaarheid) van het CZS wordt verminderd. Bij hogere bloedalcohol concentraties (> 250 mg/dl) vertoont alcohol een directe invloed op de receptor, eveneens resulterend in een opening van het chloridekanaal en een inhibitie van de zenuwprikkeling.

Ten gevolge van een chronische blootstelling aan alcohol past het lichaam zich aan door de gevoeligheid van de GABA_A-receptor ten opzichte van GABA te verminderen. Hierdoor kan tolerantie ten opzichte van de anxiolytische (angstwerende) en sederende (kalmerende) effecten van alcohol optreden. De verminderde activiteit van het GABA-neurotransmittersysteem wordt dan ook in verband gebracht met het ontstaan van fysieke afhankelijkheid voor alcohol en ontwenningsverschijnselen bij alcoholonthouding. (Samson and Harris, 1992; Hoffman and Tabakoff, 1996; Nutt, 1999; Dahchour and De Witte, 2000).

1.3.2.3. De invloed van chronische blootstelling aan alcohol op het exciterende glutamaatneurotransmittersysteem

De *N*-methyl-*D*-aspartaat-(NMDA)receptor is de postsynaptische receptor voor de exciterende neurotransmitter *L*-glutamaat. Als het NMDA-receptorcomplex geactiveerd wordt door glutamaatbinding gedraagt deze zich als een ionenkanaal voor de instroom van positief geladen Ca²⁺-ionen. Op die manier kan het neuron depolariseren en zenuwimpulsen veroorzaken. Bovendien kan de instroom van Ca²⁺-ionen bepaalde enzymen activeren die een langdurige invloed kunnen hebben op de neurale activiteit van de zenuwcel. Het glutamaat-gemedieerde neurotransmittersysteem is het belangrijkste excitatiemechanisme in het CZS. (Siegel *et al*, 1989)

Alcohol werkt de invloed van glutamaat op de NMDA-receptor tegen door het rechtstreeks blokkeren van het ionenkanaal door ethanolmoleculen. Hierdoor kunnen Ca²⁺-ionen minder gemakkelijk de cel binnenstromen en een eventuele zenuwprikkel induceren. Bij chronische blootstelling aan alcohol zullen de hersenen proberen te compenseren met een overexpressie van het glutamaatsysteem. Vermoedelijk gebeurt dit niet via een eenvoudige toename van het aantal receptoren, maar door een overwaardering van sommige NMDA-receptor subunits waardoor de compositie en de werking van de NMDA-receptor verandert. Hierdoor bereikt het exciterend systeem, ondanks de storende invloed van alcohol, zijn quasi normale niveau en draagt op deze manier bij tot de ontwikkeling van tolerantie en, bij alcoholonthouding, tot

ontweningsverschijnselen (Samson and Harris, 1992; Hoffman and Tabakoff, 1996; Nutt, 1999; Dahchour and De Witte, 2000).

1.3.2.4. De invloed van chronische blootstelling aan alcohol op de spanningsgevoelige Ca^{2+} -kanalen

Naast het exciterend/inhiberend aminozuursysteem spelen ook selectieve spanningsgevoelige Ca^{2+} -kanalen¹ een rol in de ontwikkeling van alcoholafhankelijkheid. De instroom van Ca^{2+} doorheen deze ionenkanalen levert een snelle potentiaalverandering over het celmembraan nodig voor het doorgeven van de zenuwprikkel. Eén van de acute effecten van alcohol is een inhibitie van deze Ca^{2+} -kanalen, waardoor de instroom van Ca^{2+} en de bijhorende depolarisatie verhinderd wordt. Men heeft geconstateerd dat door chronische alcoholconsumptie het aantal Ca^{2+} -kanalen in neuronen toeneemt.

1.3.2.5. Besluit

Zowel de gewijzigde neurotransmitteractiviteit van GABA en glutamaat als de toename van het aantal Ca^{2+} -kanalen zijn een aanpassingsmechanisme van het lichaam. Deze aanpassing heeft als resultaat dat de drempel voor prikkeling van neuronen verlaagt als compensatie voor de remmende werking van alcohol (zie tabel 1.1).

Tabel 1.1: De invloed van alcohol op de verschillende receptorfuncties, de aanpassing van de functie aan chronisch alcohol en de gevolgen hiervan op de neurale activiteit.

	Receptorfunctie	Invloed van alcohol op de receptorfunctie	Aanpassing van de functie aan chronisch alcoholgebruik	Alcoholonthouding
GABA_A	Inhiberend	+	-	-
NMDA	Exciterend	-	+	+
Ca^{2+}-kanalen	Exciterend	-	+	+
Neurale activiteit	Evenwicht	- - -	+/- evenwicht	+ + +

¹ Spanningsgevoelige ionenkanalen functioneren onder invloed van een wijzigende spanning en niet door het binden van bepaalde boodschapperstoffen (zoals bijv. de NMDA-receptor).

Dit verklaart het ontstaan van tolerantie en gewenning. De verlaging van de prikkelingsdrempel verklaart tevens de symptomen die volgen op alcoholonthouding. Wanneer het gebruik van alcohol wordt gestaakt, verdwijnt het inhiberende effect en worden de neuronen overgevoelig voor prikkels. Het duurt vele maanden voordat de hersenen zich opnieuw hebben aangepast. Gedurende die periode ervaart men alcoholontwenningssymptomen zoals tremor, angsten, depressies en slapeloosheid. (Samson and Harris, 1992; Hoffman and Tabakoff, 1996; Nutt, 1999; Dahchour and De Witte, 2000).

1.4. Het werkingsmechanisme van acamprosaat, een hypothese

Omtrent het werkingsmechanisme van acamprosaat bestaat tot op heden nog geen zekerheid. Verschillende onderzoeksgroepen hebben reeds getracht het juiste moleculaire doelwit van de stof te achterhalen maar steeds met beperkt succes. Waar ondertussen wel reeds zekerheid over bestaat is dat acamprosaat in staat is de instandhouding van alcoholabstinentie te bevorderen.

Reeds in 1984 werd een eerste maal aangetoond dat acamprosaat in staat was de vrijwillige alcoholconsumptie in alcoholverslaafde ratten te reduceren (Boismare *et al*, 1984). Een jaar later werd door dezelfde Franse onderzoeksgroep als eerste aangetoond dat acamprosaat kan verhinderen dat ontwende alcoholisten hervallen – 32 % succes na 3 maanden in de *placebogroep* tegen 61 % succes in de *acamprosaatgroep* na 3 maanden (Lhuintre *et al.*, 1985).

Sinds 1988 heeft *groupe Lipla*, de producent van acamprosaat en een onderzoekseenheid van Merck, in Europa een klinisch onderzoeksprogramma uitgevoerd die deze voorlopige klinische resultaten bevestigen: acamprosaat ondersteunt de abstinentie bij alcoholafhankelijke patiënten na detoxificatie. Het programma omvatte 12 *gerandomiseerde*, dubbelblinde, parallelle en placebogecontroleerde onderzoeken die in diverse centra werden uitgevoerd en waaraan in totaal ongeveer 4000 patiënten deelnamen. Uit het globale resultaat van de studies kon geconcludeerd worden dat het gebruik van acamprosaat het aantal personen dat abtinent blijft gedurende een jaar verdubbelde ten opzichte van placebo. Aan het einde van een jaar behandeling met acamprosaat gevolgd door een jaar zonder behandeling bleven 39 % van de patiënten die acamprosaat kregen abtinent, tegen 17 % voor

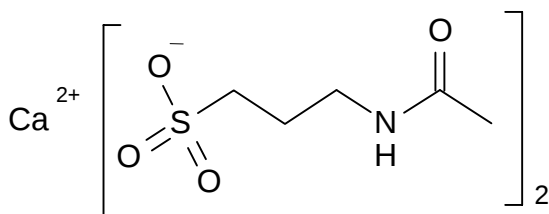
de placebogroep. (Lhuintre *et al*, 1990; Paille *et al*, 1995; Sass *et al*, 1996; Whitworth *et al*, 1996; Pelc *et al*, 1997; Spanagel and Zieglgänsberger, 1997; Wilde and Wagstaff, 1997).

Gelijkaardige resultaten werden ook gevonden in proefdiermodellen. Het grote voordeel van proefdieren in deze materie is dat geen rekening dient gehouden te worden met allerlei psychologische, culturele en omgevingsfactoren. Experimenteel werd aangetoond dat acamprosaat de vrijwillige inname van ethanol in ratten reduceert (Boismare *et al*, 1984). Bovendien werd gevonden dat acamprosaat, dosisafhankelijk het *deprivation effect*¹ vermindert. Eveneens werd aangetoond dat acamprosaat sommige tekenen van alcoholontwenning, zoals hyperactiviteit en hyperreactiviteit in proefdieren, kan reduceren (Spanagel *et al*, 1996).

De resultaten van deze proefdierexperimenten en de opgetekende ervaringen van patiënten behandeld met acamprosaat, sterken het vermoeden dat de werking van acamprosaat rechtstreeks de fysieke gevolgen van alcoholonthouding beïnvloedt. Het juiste biochemisch mechanisme mag op dit moment nog hypothetisch zijn, zeker is dat de werking van acamprosaat berust op een zogenaamd *anti-craving*-effect, m.a.w. de patiënt voelt minder de onweerstaanbare drang om alcohol te consumeren. Studies tonen bovendien aan dat acamprosaat op geen enkele manier ethanol vervangt zoals methadon voor heroïneverslaving (Spanagel *et al*, 1996) of aversie opwekt tegen alcohol zoals disulfiram.

1.4.1. Chemische structuur van acamprosaat

Acamprosaat is een wit, reukloos poeder met een bittere smaak. Het is perfect oplosbaar in water en in de meeste fysiologische vloeistoffen. Acamprosaat is een sterk elektrolyt en splitst dus volledig in zijn samenstellende ionen (zie figuur 1.3). Het is niet of nauwelijks oplosbaar in organische solventen (zie later).



Figuur 1.3: De chemische structuur van acamprosaat of calcium acetylhomotaurinaat.

¹ Het *deprivation effect* is het fenomeen waarbij een periode van alcoholonthouding gevolgd wordt door een verhoogde consumptie van alcohol dan voor de onthouding (Spanagel *et al*, 1996).

Vanwege het feit dat acamprosaat of calcium acetylhomotaurinaat volledig splitst in Ca^{2+} en het werkzame bestanddeel acetylhomotaurinaat, zal verder geen onderscheid gemaakt worden tussen acamprosaat en acetylhomotaurinaat (anion) of acetylhomotaurine (zuur). De benaming acamprosaat zal bij voorkeur gebruikt worden bij de bespreking van de biologische en biochemische aspecten van de molecule, de benaming acetylhomotaurine of acetylhomotaurinaat in het bijzonder bij de behandeling van de chemische aspecten.

1.4.2. Acamprosaat en het GABA-neurotransmittersysteem

In het beginstadium van het onderzoek naar het werkingsmechanisme van acamprosaat werd ervan uitgegaan dat de stof een invloed had op het GABA_A-neurotransmissiesysteem. Gezien de invloed van chronische blootstelling aan alcohol op de inhiberende GABA_A-receptoren leek het niet onwaarschijnlijk dat de *anti-craving*-capaciteit van acamprosaat voortvloeide uit een bepaalde binding met deze receptoren. De structurele verwantschap tussen γ -aminoboterzuur en acamprosaat (zie figuur 1.4) en het feit dat homotaurine, de niet-geacetaliseerde vorm van acamprosaat, een gekende GABA_A-receptoragonist¹ is, versterkte het vermoeden van waarheid achter deze hypothese.



Figuur 1.4: De verwantschap in chemische structuur tussen γ -aminoboterzuur en actylhomotaurine

Het idee kreeg extra bevestiging toen bleek dat bicucullin, een gekende GABA_A-receptorantagonist², het effect van acamprosaat op de vrijwillige inname van alcohol door verslaafde ratten, kon blokkeren (Boismare et al. 1984). Later werd a.h.v.

¹ Homotaurine als GABA_A-receptoragonist bindt op een specifieke plaats van de GABA_A-receptor en verhoogt door deze binding de affiniteit van de receptor voor zijn neurotransmitter GABA.

² bicucullin als GABA_A-receptorantagonist bindt op een specifieke plaats in de GABA_A-receptor maar wijzigt door deze binding de affiniteit van de receptor voor zijn neurotransmitter GABA niet of nauwelijks.

verdringingsexperimenten aangetoond dat acamprosaat een zekere affiniteit vertoont voor GABA-receptoren. Door toediening van acamprosaat werd [^3H]GABA immers competitief van zijn receptorplaatsen verdrongen (Daoust *et al*, 1985). Uiteindelijk bleek uit de resultaten van doorgevoerde *in vivo* proefdierstudies dat acamprosaat de GABA-transmissie in het CZS van alcoholverslaafde ratten kon beïnvloeden. (Daoust *et al*, 1986; 1990; 1992).

De geloofwaardigheid van deze ‘GABA-hypothese’ kreeg een deuk toen onderzoekers van het Max-Planck-instituut in Munich (Duitsland) ondervonden dat acamprosaat geen invloed had op de inhibitie van spontane (niet extern geïnduceerde) activiteit van neuronen in rattenhersenen (neocortex) door GABA (Zeise *et al*, 1992). M.b.v. micro-elektrodes werd de ontlading van het celmembraan van de zenuwcel onderzocht wanneer verschillende stoffen werden toegediend. GABA reduceerde, zoals zijn inhiberende werking veronderstelt, het aantal pulsen terwijl het toedienen van glutamaat, het exciterend aminozuur bij uitstek, resulteerde in een drastische toename van het aantal pulsen. De aanwezigheid van acamprosaat veranderde, tegen de verwachtingen in, niets aan de inhibitie van de zenuwcellen door GABA. Acamprosaat reduceerde anderzijds wel het aantal pulsen veroorzaakt door glutamaat (zie later).

Hoewel een zekere interactie van acamprosaat op het GABA-neurotransmittersysteem werd gevonden en dit ook werd aangetoond in de mens (Gerra *et al*, 1992), werd door deze experimenten duidelijk dat de werking van acamprosaat niet kon verklaard worden op de klassieke manier zoals geldt voor bijv. benzodiazepines en barbituraten (Gewiss *et al*, 1991).

De klassieke ‘GABA-hypothese’ werd volledig verlaten toen de onderzoekers van hetzelfde Duitse instituut publiceerden dat acamprosaat niet bindt op GABA_A-receptoren en geen enkele invloed heeft op de Cl⁻-stroom geregeld door deze receptoren (Zieglgänsberger *et al*, 1995).

Op het eerste gezicht staan deze bevindingen in direct contrast met de eerder vermelde bindingsstudies (Daoust *et al*, 1985). Recent werd echter aangetoond dat acamprosaat een mogelijke invloed heeft op een tweede type GABA-receptor (Berton *et al*, 1998). De GABA_B-receptor vertoont niet de klassieke postsynaptische inhiberende werking zoals de GABA_A-receptor, maar door binding van GABA reduceert deze receptor via een *second messenger* systeem (zie 1.3.2.1.) de presynaptische uitstroom van andere neurotransmitters, waaronder dopamine, serotonine, GABA én glutamaat. Volgens de studie zou acamprosaat in staat zijn deze GABA_B-receptoren te blokkeren.

Samengevat kan gesteld worden dat de klassieke GABA-theorie over de werking van acamprosaat recent vervangen werd door een meer complexere GABA-theorie met andere receptoren en andere mechanismen. De invloed van acamprosaat op de GABA-activiteit draagt wellicht bij tot het *anti-craving*-mechanisme van acamprosaat maar het is zeer

waarschijnlijk dat het glutamaat-gecontroleerde neurotransmittersysteem hierin een belangrijkere rol speelt.

1.4.3. Acamprosaat en het exciterend aminozuur neurotransmittersysteem

Zoals eerder besproken verhoogt chronisch alcoholgebruik de prikkelbaarheid van zenuwcellen met typische onthoudingsverschijnselen tot gevolg (zie 1.3.1.). In proefdiermodellen bestudeert men deze onthoudingsverschijnselen via gedragstudies. De ontwenningfase wordt hierin getypeerd door hyperactiviteit en hyperreactiviteit van de proefdieren. Al verschillende jaren is bekend dat proefdieren die fysiek afhankelijk werden gemaakt van alcohol, hetzij door orale opname van ethanol hetzij door inademen van ethanoldampen, een verminderd “hypergedrag” vertonen wanneer zij tegelijkertijd behandeld worden met acamprosaat.



Figuur 1.5: De verwantschap in chemische structuur tussen glutamaat en actylhomotaurinaat

Het eerste model dat de effecten van acamprosaat op de exciterende aminozuurtransmissie bestudeerde is de reeds besproken micro-elektrodestudie. Zowel *in vitro* als *in vivo* toonden wetenschappers aan dat acamprosaat een remmende invloed had op de door glutamaat geïnduceerde activiteit van het CZS (Zeise *et al*, 1993; Madamba *et al*, 1996). Een ander model dat de betrokkenheid van acamprosaat in het exciterend aminozuursysteem deed vermoeden was een studie waaruit bleek dat acamprosaat in staat is de toename van de glutamaatconcentratie in het CZS tijdens de alcoholonthouding te blokkeren. Dit verschijnsel werd geobserveerd in alcoholafhankelijke ratten (Dahchour *et al*, 1998) en in de mens (Bolo *et al*, 1998). Tenslotte werd met behulp van de [³H]acamprosaat-tracer aangetoond dat

acamprosaat bindt aan een spermidine-gevoelige site op de NMDA-receptor en door binding in staat is het gehele receptorcomplex te beïnvloeden (Naassila *et al*, 1998).

Enkele recente studies bevestigen de waarneming dat acamprosaat werkt als een antagonist van de NMDA-receptor en is zo in staat de hyperexciterende activiteit van glutamaat (en vergelijkbare exciterende aminozuren) tijdens de alcoholontwenningfase te reduceren (Harris *et al*, 2002; Cano-Cebrian *et al*, 2003). Aangezien reeds geruime tijd werd gesugereerd dat *craving* (gedeeltelijk) werd veroorzaakt door exciterende aminozuren (Littleton, 1995) kan volgens deze hypothese het exciterende aminozuurantagonisme een biochemische verklaring betekenen voor de klinische resultaten van acamprosaat in de mens.

1.4.4. Acamprosaat en andere mogelijke doelwitten in het CZS

De hierboven besproken neurotransmittersystemen zijn totnogtoe de enige waarop acamprosaat een significant effect vertoonde. Verschillende studies onderzochten de inwerking van acamprosaat op andere belangrijke neurotransmittersystemen verbonden aan dopamine, acetylcholine en serotonine, maar de resultaten toonden geen (belangrijke) invloed. Recent werd wel aangetoond dat acamprosaat verantwoordelijk is voor een verhoogde uitscheiding van taurine in rattenhersenen *in vivo* (Dahchour *et al*, 1995) en een zekere invloed van acamprosaat op spanningsgevoelige Ca^{2+} -kanalen (al Qatari and Littleton, 1995; al Qatari *et al*, 1996). Deze 2 observaties kunnen nieuwe inzichten leveren aangezien beide verbonden kunnen zijn met hyperexcitatie: taurine als inhiberend aminozuur en Ca^{2+} als intracellulaire boodschapper van neurale excitatie.

1.5. Doelstelling: zoeken naar de ‘action site’

De meeste studies, besproken in de vorige paragrafen, probeerden het *acamprosaatvraagstuk* op te lossen door het bestuderen van een respons op de toediening van therapeutische of supertherapeutische hoeveelheden acamprosaat. In eerste instantie werd de invloed van acamprosaat op het ontstaan van de neurotransmittergeïnduceerde prikkelgeleiding van de zenuwcel elektrofysiologisch bestudeerd (Zeise *et al*, 1992; Madamba *et al*, 1996 en Berton *et al*, 1998). Een tweede serie experimenten had tot doel de invloed van acamprosaat op de binding van bepaalde liganden met hun receptor te observeren (Daoust *et al*, 1985 en 1992;

Naassila *et al*, 1998; al Qatari *et al*, 1998; Harris *et al*, 2002). Tenslotte werd het effect van acamprosaat bepaald door het meten van neurotransmitterconcentraties *in vivo* voor en na toediening van acamprosaat (Dahchour *et al*, 1998).

Via magnetische resonantie spectroscopie (MRS) werd een eerste maal getracht de *in vivo* karakteristieken van acamprosaat in de mens in beeld te brengen. Net zoals de vorige studies werd ook hier de aandacht gericht op de invloed van acamprosaat op de hersenfysiologie, meer bepaald op de concentratie van glutamaat en *N*-acetylaspartaat (precursor voor bepaalde exciterende aminozuren) in bepaalde hersenregio's van een aantal gezonde vrijwilligers (Bolo *et al*, 1998).

Een directere manier om de opheldering van het werkingsmechanisme van acamprosaat te benaderen is het zoeken naar de plaats/plaatsen waar de stof inwerkt op het CZS. M.b.v een ¹⁴C-tracer van acamprosaat werd nagegaan in welke mate deze stof in staat was de bloed/hersenbarrière (BHB) te doorkruisen. Uit *in vivo* experimenten in ratten bleek dat na orale en intraveneuze toediening acamprosaat doorheen BHB geraakte en kon worden teruggevonden in zowat alle delen van de hersenen (Durbin and Belleville, 1995). *In vitro*-experimenten met [³H]acamprosaat toonden bovendien aan dat deze stof een satureerbare specifieke bindingsplaats bezat in hersenpreparaten van ratten die wordt geassocieerd met het NMDA-receptorcomplex (Naassila *et al*, 1998).

In dit ingekorte lijstje van experimenten ontbreekt echter nog één type onderzoek, namelijk een studie die rechtstreeks het *in vivo* gedrag van acamprosaat in de mens onderzoekt. Het doel van dit werk is dan ook de mogelijkheid na te gaan van een dergelijke studie met behulp van positron emissie tomografie (PET).

1.6. Referenties

1. **al Qatari M, Bouchenafa O and Littleton J** (1998) Mechanism of action of acamprosate. Part II. Ethanol dependence modifies effects of acamprosate on NMDA receptor binding in membranes from rat cerebral cortex. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 22: 810-814.
2. **al Qatari M, Khan S and Littleton JM** (1996) Acamprosate inhibits excitatory amino acid K⁺-induced calcium flux into cortical neurons in vitro. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 20: 92A.
3. **al Qatari M and Littleton J** (1995) The anti-craving drug acamprosate inhibits calcium channel antagonist binding to membranes from rat cerebral cortex. *Alcohol and Alcoholism* 30: 551.

4. **Berton F, Francesconi WG, Madamba SG, Zieglängsberger W and Siggins GR** (1998) Acamprosate enhances *N*-methyl-*D*-aspartate receptor-mediated neurotransmission but inhibits presynaptic GABA_B receptors in nucleus accumbens neurons. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 22: 183-191.
5. **Boismare F, Daoust M, Moore N, Saligaut C, Lhuintre J-P, Chretiens P and Durlach J** (1984) A homotaurine derivative reduces the voluntary intake of ethanol by rats: Are GABA cerebral receptors involved? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 21: 787-789.
6. **Bolo N, Nédélec J-F, Muzet M, De Witte P, Dahchour A, Durbin P and Macher J-P** (1998) Central effects of acamprosate : Part 2. Acamprosate modifies the brain in-vivo proton magnetic resonance spectrum in healthy young male volunteers. *Psychiatry Research: Neuroimaging Section* 82: 115-127.
7. **Cano-Cebrian MJ, Zornoza-Sabina T, Guerri C, Polache A and Granero L** (2003) Local acamprosate modulates dopamine release in the rat nucleus accumbens through NMDA receptors: an in vivo microdialysis study. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology* 367: 119-125.
8. **Dahchour A and De Witte P** (2000) Ethanol and amino acids in the central nervous system: assessment of the pharmacological actions of acamprosate. *Process in Neurobiology* 60: 343-362.
9. **Dahchour A, De Witte P, Bolo N, Nédélec J-F, Muzet M, Durbin P and Macher J-P** (1998) Central effects of acamprosate: Part 1. Acamprosate blocks the glutamate increase in the nucleus accumbens microdialysate in ethanol withdrawn rats. *Psychiatry Research: Neuroimaging Section* 82: 107-114.
10. **Dahchour A, Durbin P and De Witte P** (1995) Ethanol and acamprosate increase the extracellular taurine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. *Alcohol and Alcoholism* 30: 483.
11. **Daoust M, Legrand E and Durbin P** (1993) 3H-Acamprosate (AOTAL) binding in hippocampal membrane preparation of alcoholism rats. *Alcohol and Alcoholism* 28: C2.9.
12. **Daoust M, Legrand E, Gewiss M, Heidbreder C, Dewitte P, Tran G and Durbin P** (1992) Acamprosate modulates synaptosomal GABA transmission in chronically alcoholized rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 41: 669-674.
13. **Daoust M, Legrand E, Tran G, Durbin P, Gewiss M, Heidbreder C and Dewitte P** (1990) Acamprosate treatment differentially modulates synaptosomal GABA-uptake in chronically alcoholized rats. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 14: 281
14. **Daoust M, Lhuintre JP, Saligaut C, Moore N, Chrétiens P and Boismare F** (1985) Calcium bis acétyl homotaurine : une nouvelle substance gabaergique. *Association des Pharmacologues* 16: 108.
15. **Daoust M, Prevost M, Salicaut C, Flipo J-L, Moore N, Lhuintre J-P and Boismare F** (1986) Calcium bis acetyl homotaurine increases the number of GABA uptake sites in alcohol preferring rat hippocampus. *Alcohol and Alcoholism* 21: A31.
16. **Durbin P and Belleville M** (1995) Rat pharmacokinetic profile of acamprosate in plasma, brain and CSF. *Alcohol and Alcoholism* 30: 548.
17. **Garbut JC, West SL, Carey TS, Lohr KN and Crews FT** (1999) Pharmacological treatment of alcohol dependence. *Journal of the American Medical Association* 281: 1318-1325.

18. **Gerra G, Caccavari R, Delsignore R, Vourna S, Maestri D, Ugolotti G and Passeri M** (1992) Pituitary responses to Ca-acetyl homotaurinate in normal subjects and alcoholics. *Neuroendocrinology Letters* 14: 119-125.
19. **Gewiss M, Heidebreder C, Opsomer L, Durbin P and De Witte P** (1991) Acamprosate and diazepam differentially modulate alcohol-induced behavioral and cortical alterations in rats following chronic inhalation of ethanol vapor. *Alcohol and Alcoholism* 26: 129.
20. **Harris BR, Prendergast MA, Gibson DA, Rogers DT, Blanchard JA, Holley RC, Fu MC, Hart SR, Pedigo NW and Littleton JM** (2002) Acamprosate inhibits the binding and neurotoxic effects of Trans-ACPD, suggesting a novel site of action at metabotropic glutamate receptors. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 26: 1779-1793.
21. **Hoffman PL and Tabakoff B** (1996) Alcohol dependence: A commentary on mechanisms. *Alcohol and alcoholism* 31: 333-340.
22. **Lhuintre J-P, Daoust M, Moore ND, Chretien P, Saligaut C, Tran G, Boismare F and Hildemand B** (1985) Ability of calcium bis acetyl homotaurine, a GABA agonist, to prevent relapse in weaned alcoholics. *The Lancet* 8436: 1014-1016.
23. **Lhuintre J-P, Moore N, Tran G, Steru L, Langrenon S, Daoust M, Parot P, Ladure P, Libert C, Boismare F and Hillemand B** (1990) acamprosate appears to decrease alcohol intake in weaned alcoholics. *Alcohol and Alcoholism* 25: 613-622.
24. **Littleton JM** (1995) Acamprosate in alcohol dependence – How does it work? *Addiction* 90: 1179-1188.
25. **Madamba SG, Schweitzer P, Zieglgänsberger W and Siggins GR** (1996) Acamprosate (calcium acetylhomotaurinate) enhances the N-methyl-D-aspartaat component of excitatory neurotransmission in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 20: 651-658.
26. **Naassila M, Hammoumi S, Legrand E, Durbin P and Daoust M** (1998) Mechanism of action of acamprosate. Part 1. Characterization of spermidine-sensitive acamprosate binding site in rat brain. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 22: 802-809.
27. **Nutt D** (1999) Alcohol and the brain – Pharmacological insights for psychiatrists. *British Journal of psychiatry* 175: 114-119.
28. **Paille FM, Guelfi JD, Perkins AC, Royer RJ, Steru L and Parot P** (1995) Double-blind randomized multicenter trial of acamprosate in maintaining abstinence from alcohol. *Alcohol and Alcoholism* 30: 239-247.
29. **Pelc I, Verbanck P, Le Bon O, Gavrilovic M, Lion K and Leheret P** (1997) Efficacy ad safety of acamprosate in the treatment of detoxified alcohol-dependent patients – A 90-day placebo-controlled dose-finding study. *British Journal of Psychiatry* 171: 73-77.
30. **Rockville MD** (1999) Pharmacotherapy for Alcohol Dependence. Summary, Evidence Report/Technology Assessment: Number 3, January 1999. Agency for Health Care Policy and Research. <http://www.ahrq.gov/clinic/epcsu/alcsumm.htm>
31. **Samson HH and Harris RA** (1992) Neurobiology of alcohol abuse. *Trents in pharmacological sciences* 13: 206-211.
32. **Sass H, Soyka M, Mann K, Zieglgänsberger W, Hippus H, et al** (1996) Relapse prevention by acamprosate – Results from a placebo-controlled study on alcohol dependence. *Archives of General Psychiatry* 53: 673-680.

33. **Spaganel R and Zieglgänsberger W** (1997) Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. *Trends in Pharmacological Sciences* 18: 54-59.
34. **Spanagel R, Hölter SM, Allingha K, Landgraf R and Zieglgänsberger W** (1996) Acamprosate and alcohol: I. Effects on alcohol intake following alcohol depreivation in the rat. *European Journal of Pharmacology* 305: 39-44.
35. **Spanagel R, Putzke J, Steffel A, Schöbitz B and Zieglgänsberger W** (1996) Acamprosate and alcohol: II. Effects on alcohol withdrawal in the rat. *European Journal of Pharmacology* 305: 45-50.
36. **Spanagel R, Zieglgänsberger W and Hundt W** (1996) Acamprosate and alcohol: III. Effects on alcohol discrimination in the rat. *European Journal of Pharmacology* 305: 51-56.
37. **Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW and Molinoff PB** (1989) Basic Neurochemistry – Molecular, Cellular, and Medical Aspects (4th edition). *Raven Press, New York*.
38. **Terenius L** (1998) Rational treatment of addiction. *Current Opinion in Chemical Biology* 2: 541-547.
39. **Whitworth AB, Fisher F, Lesch OM et. al.** (1996) Comparison of acamprosate and placebo in long-term treatment of alcohol dependence. *The Lancet* 347: 1438-1442.
40. **Wilde MI and Wagstaff AJ** (1997) Acamprosate - A review of its pharmacology and Clinical potential in the Management of Alcohol Dependence After Detoxification. *Drugs* 53: 1038-1053.
41. **Zeise M L, Kasparov S, Capogna M and Zieglgänsberger W** (1993) Acamprosate (calciumacetylhomotaurinate) decreases postsynaptic potentials in the rat neocortex: possible involvement of excitatory amino acid receptors. *European Journal of Pharmacology* 231: 47-52.
42. **Zieglgänsberger W, Hauser C, Putzke J, Spanagel R and Wetzel C** (1995) The enhanced excitability of central neurons following chronic alcohol intake is reduced by acamprosate. *Alcohol and Alcoholism* 30: 552.

2. Positron emissie tomografie in het onderzoek naar het werkingsmechanisme van acamprosaat

2.1. Inleiding

De studie het werkingsmechanisme van acamprosaat is sinds midden jaren '80 uitgegroeid tot een multidisciplinair onderzoek. Verschillende technieken zijn reeds aangewend om het juiste doelwit van het geneesmiddel te achterhalen op fysiologisch en biochemisch niveau. Zeker is dat de werking van acamprosaat berust op het onderdrukken van de neurologische excitatie die ontstaat in de periode die volgt op alcoholonthouding. Minder zekerheid bestaat over het juiste biochemische mechanisme dat deze werking moet verklaren. Sommige studies spreken over binding van acamprosaat op een modulerende site van het GABA- of NMDA-receptorcomplex of vermelden een invloed van acamprosaat op de aanwezigheid van inhiberende of exciterende aminozuren, andere studies bespreken de invloed van acamprosaat op de neurologische activiteit volgend op excitatie of inhibitie met aminozuur-neurotransmitters. Nog andere studies rapporteren een werking van acamprosaat ter hoogte van een type Ca^{2+} -ionenkanalen of op basis van een invloed op de taurine balans (zie 1.4.). Het is m.a.w. duidelijk dat de werking van acamprosaat bijna even complex is als deze van de stof die zijn gebruik veroorzaakt: alcohol.

Totnogtoe is slechts één studie uitgevoerd met als doel het *in vivo* onderzoek naar het werkingsmechanisme van acamprosaat in de mens. Met behulp van magnetische resonantie spectroscopie (MRS) werd de invloed van acamprosaat op de aanwezigheid van exciterende aminozuren in menselijke hersenen bestudeerd (Bolo *et al*, 1998). Met deze techniek werd dus de werking van acamprosaat bestudeerd door het in beeld brengen van zijn invloed op bepaalde processen in de hersenen. Via een andere functionele beeldvormingstechniek: positron emissie tomografie, zou het mogelijk zijn de actie van acamprosaat te bestuderen door het in beeld brengen van de stof acamprosaat zelf. De mogelijkheid om acamprosaat *in vivo* te kunnen bestuderen in de hersenen m.b.v. PET en misschien de combinatie van beide technieken: PET en MRS, zou een nieuwe impuls kunnen geven aan het onderzoek naar het werkingsmechanisme van acamprosaat.

2.2. Positron emissie tomografie

2.2.1. Morfologische en functionele beeldvorming: een (r)evolutie

Het *doorlichten* van weefsels met behulp van röntgenstralen was sinds hun ontdekking op het einde van de 19^{de} eeuw reeds goed gekend. Röntgenstralen of X-stralen bezitten door hun korte golflengte een groot doordringend vermogen en waren in staat een fotogevoelige plaat te *zwarten*. Door het bestralen van een lichaamsdeel met deze elektromagnetische straling werden de verschillen in absorptievermogen van de verschillende weefsels of organen in een 2-dimensionaal beeld van dat lichaamsdeel vastgelegd.

Sinds de introductie van de *computed axial x-ray tomography* of CT begin jaren '70 onderging de diagnose van neurologische aandoeningen een revolutie. Met behulp van speciale computeralgoritmes die de informatie van vele X-straalprojecties omrekenen, werd een beeld bekomen van de anatomie van het lichaam in flinterdunne transaxiale sneden. De combinatie van deze 2-dimensionele beelden in de axiale richting maakte het mogelijk een 3-dimensioneel beeld van de weefselmorfologie in kleine weefselvolumes (resolutie < 1 mm) te verkrijgen. De CT-scanner wordt uitgerust met een X-stralenbuis en detectorsysteem die roteren rondom een centraal en beweegbaar bed (Hounsfield, 1973).

Elk pathologisch proces dat de absorptie van X-stralen in het getroffen weefsel, t.t.z. het morfologisch beeld ervan geproduceerd door de CT-scanner, wijzigt, kan met deze methode gedetecteerd en bestudeerd worden. In vele gevallen wordt hierbij een jodium- of bariumhoudende contrastvloeistof gebruikt om de geproduceerde beelden te verscherpen of om bepaalde organen of weefsels duidelijker zichtbaar te maken zoals bijv. de bloedvaten (I) of het gastrointestinaal systeem (Ba). De fysiologische veranderingen die aan de grondslag liggen van het ziektebeeld, en dus veel eerder aanwezig zijn dan de morfologische veranderingen, kunnen behalve in enkele exceptionele gevallen¹ niet gevisualiseerd worden met de CT-scanner.

Functionele beeldvorming is meer het domein van de nucleaire geneeskunde en de recenter ontwikkelde functionele magnetische resonantie spectroscopie, beter bekend onder de benaming *functional magnetic resonance imaging* of fMRI. In deze context wordt deze MRI-techniek verder buiten beschouwing gelaten.

¹ Met behulp van functionele CT kan naast de morfologie van de hersenen ook in beperkte mate fysiologische informatie zoals *cerebral blood flow* verkregen worden door gebruik te maken van xenon als contraststof (Drayer *et al*, 1978; Jungreis *et al*, 1999).

In tegenstelling tot CT, waar het lichaam van de patient met een externe bron van ioniserende straling (X-stralenbuis) wordt doorgeïllustreerd, gebruiken nucleaire beeldvormingstechnieken de straling die uitgezonden wordt door het lichaam van de patiënt, na toediening van een radioactief gemerkte stof. De doordringende straling van de gebruikte radionucliden wordt uitwendig gedetecteerd en de plaats van oorsprong gelokaliseerd. Afhankelijk van de (bio)chemische eigenschappen van de *tracer* wordt op die manier fysiologische (functionele) informatie verkregen zoals glucose-, zuurstof- of vetzuurmetabolisme, doorbloeding, renale klaring, receptorbinding, enz.

De eerste apparaten voor nucleaire beeldvorming werden ontwikkeld eind jaren '40 - begin jaren '50 en bestonden uit Geigerdetectoren of scintillatiedetectoren die mechanisch het lichaam van de patiënt scannen waarbij de geobserveerde telkens werd geregistreerd. De ontwikkeling van de scintillatiecamera of gammacamera (Anger, 1958) en de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -generator (Harper *et al*, 1962, 1965) waren mijlpalen in de geschiedenis van de nucleaire geneeskunde. Nog steeds is nucleaire beeldvorming grotendeels gebaseerd op $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -gemerkte radiofarmaca en scintillatiecamera's van het Anger-ontwerp.

De ontwikkeling van geschikte detectorsystemen, radiofarmaca en reconstructiestrategieën (gebaseerd op eerder ontwikkelde CT-technologie) en de snelle evolutie van computer en elektronica maakte gecomputeriseerde emissie tomografie (*emission computed tomography* of ECT) mogelijk. ECT beoogt de bepaling van de 3-dimensionale verdeling van radionuclideconcentraties binnenin organen en weefsels. De instrumentatie en beeldreconstructiestrategie wordt daarbij bepaald door de emissiekenmerken van de 2 types radionucliden die worden gebruikt: positron emissie tomografie of PET werkt via detectie van 2 coïncidente 511 keV fotonen afkomstig van positron-elektronannihilatie, *single photon emission computed tomography* of SPECT werkt via de detectie van gammastralen.

2.2.2. Beeldvorming met PET: het basisprincipe

Het merken van radiofarmaca met radio-isotopen die vervallen via positronemissie heeft enkele fundamentele voordelen ten opzichte van radio-isotopen die gammastralen emitteren. Ten eerste valt het bestaan op van positronemitterende radio-isotopen van fysiologisch belangrijke elementen zoals ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O en ^{18}F . PET laat op die manier toe belangrijke biochemische processen *in vivo* te bestuderen via isotopisch gemerkte tracers.

Ten tweede maakt de typische natuur van de op positronemissie volgende elektron-positronannihilatie een hoge ruimtelijke resolutie van tomografische beelden mogelijk.

2.2.2.1. Positron-elektronannihilatie

Het positron (positief geladen elektron) uitgezonden door de neutronendeficiënte kern, verliest zijn kinetische energie bij doorgang door materie. In water of waterrijk milieu zoals lichaamsweefsel is de dracht van het positron, afhankelijk van zijn energie, gewoonlijk een aantal millimeter vooraleer het combineert met een elektron. Voor ^{11}C is de $E_{\text{max}} = 0,96 \text{ MeV}$ wat overeenkomt met een lineaire dracht van 4 mm in water. Kortstondig (8 ns) vormen elektron en positron een positroniumcomplex, vergelijkbaar met het ^1H -atoom, waarna beide massa's annihileren. Hierbij worden twee fotonen gevormd met elk een energie van $E = m_e c^2 = 511 \text{ keV}$. Aangezien het moment van het zwaartepunt van het positroniumcomplex voor annihilatie ongeveer 0 is, verschijnen de 2 fotonen co-lineair en bewegen in tegengestelde zin. *Nonzero* momenten kunnen afwijkingen veroorzaken ten opzichte van de theoretische hoek van 180° tussen 2 annihilatiekwanta. De distributie rond de 180° kan beschreven worden door een gaussian met een FWHM (*full-width at half-maximum*) van $0,5^\circ$ (Vaalburg and Paans, 1983).

2.2.2.2. Coïncidentiedetectie

De basiseenheid in een PET-detectiering bestaat uit 2 scintillatiedetectoren verbonden in een coïncidentiecircuit. Als beide detectoren binnen het ingestelde tijdsvenster (10 tot 20 ns in a BGO PET systeem, zie verder) elk een annihilatiefoton waarnemen, dan wordt een annihilatie geregistreerd die zich moet hebben voorgedaan op de lijn die beide detectoren verbindt. Blijft de range van het positron beperkt dan kan bij benadering gesteld worden dat het positronemitterend radionuclide zich eveneens op deze lijn bevond.

2.2.2.3. Tomografie

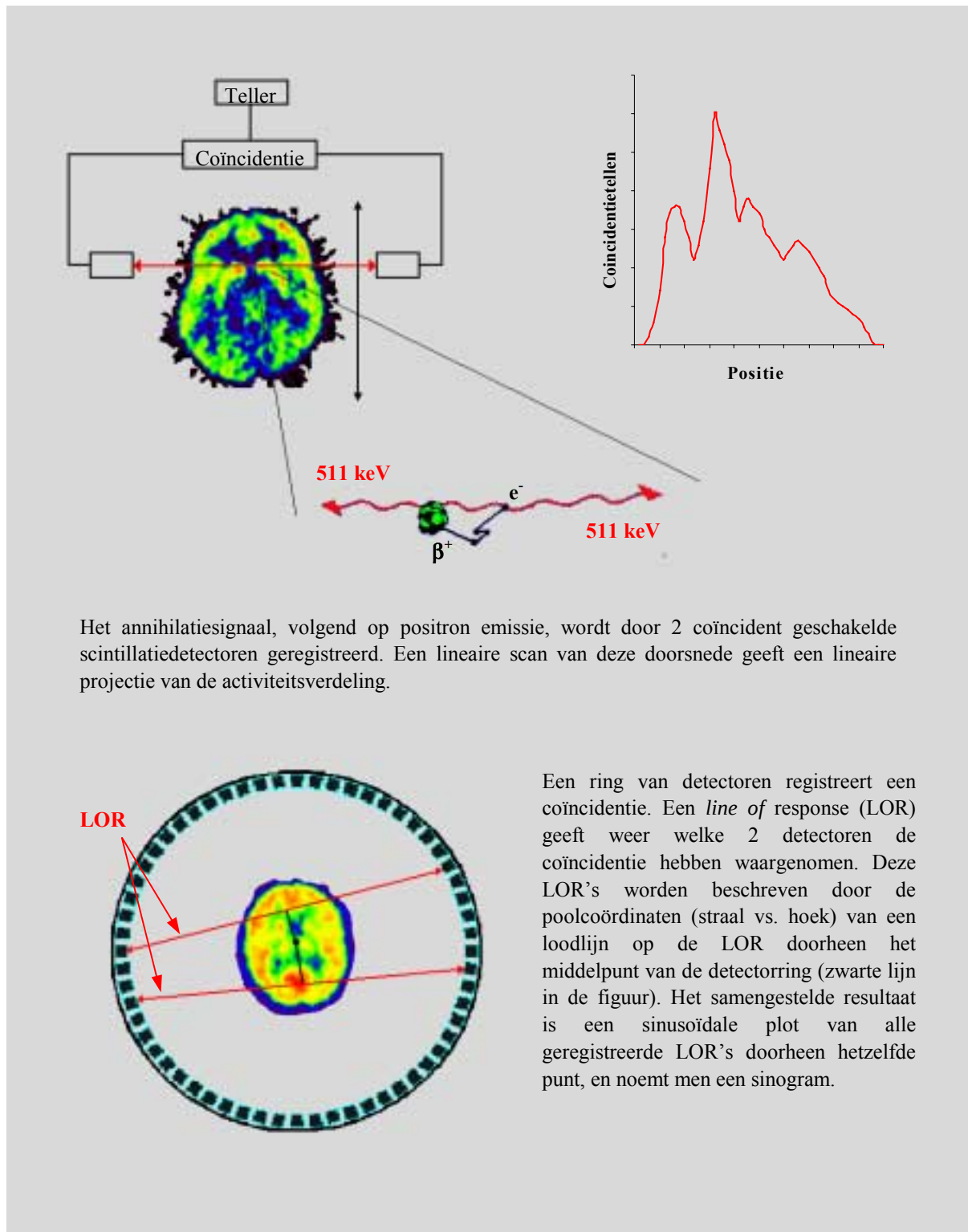
Als deze basiseenheid van 2 coïncidentiedetectoren verschoven wordt over een te onderzoeken doorsnede (bijv. een doorsnede van de hersenen) krijgen we een projectie van de activiteitsverdeling in deze doorsnede onder een bepaalde hoek (zie figuur 2.1 - deel 1). Om een beeld te krijgen van de verdeling van de activiteit in de doorsnede moeten dit soort projecties opgemeten vanuit verschillende hoeken tussen 0° en 180° . Om een artefactvrij beeld te verkrijgen met goede resolutie zou deze basiseenheid in principe metingen moeten verrichten in enkele duizenden verschillende posities. Een PET-scanner detecteert de annihilatiefotonen daarom via een groot aantal coïncident geschakelde detectoren opgesteld in

een cirkelvormig patroon. Op die manier kan een groot aantal van deze projecties simultaan worden opgenomen. Het ontstaan van een projectie en simultane opname via de tomograaf wordt weergegeven in figuur 2.1.

Een combinatie van verschillende van deze detectorringen maakt het bovendien mogelijk om tegelertijd projecties te maken van verschillende doorsneden. Hierdoor kan de verdeling van de activiteit in grote objecten zoals menselijke hersenen via aan elkaar grenzende transaxiale beelden in een enkele scan worden gevisualiseerd. In deze configuratie worden detectoren coïncident geschakeld met tegenoverstaande detectoren uit de eigen ring én uit aangrenzende ringen. De coïncidenties van verschillende duizenden detectorcombinaties worden simultaan gedetecteerd, geregistreerd door de computer en georganiseerd in sinogrammen (zie figuur 2.1).

2.2.2.4. Beeldreconstructie

Met behulp van gesofisticeerde berekeningsmethodes, vergelijkbaar met deze gebruikt in de X-stralen CT, kunnen de sinogrammen omgezet worden tot transaxiale beelden van de activiteitsverdeling. De projecties worden verwerkt via een filterfunctie en teruggeprojecteerd op het beeldvlak (*filtered back projection*).



Figuur 2.1: Het principe van de beeldvorming met PET: annihilatie, coïncidentie, projectie en tomografie

2.2.3. PET: de hardware

2.2.3.1. Het detectiesysteem

Het detectiesysteem van een positron emissie tomograaf bestaat uit grofweg 3 onderdelen: het scintillatiekristal, de elektronenvermenigvuldigingsbuis (*photomultiplier tube* of PMT) en de detectie-elektronica. Het scintillatiekristal absorbeert de annihilatiestraling en emitteert daarop de geabsorbeerde hoeveelheid energie als ultraviolet/zichtbaar licht. De PMT zet deze scintillatiestraling om in een evenredige elektrische puls.

De detectie-elektronica beoordeelt vervolgens de elektrische pulsen van de individuele detectoren op hun energie en plaats van ontstaan (welke detector) vooraleer het signaal door te sturen naar de coïncidentiediscriminator.

De eerste generatie PET-scanners gebruikten grote NaI kristalen als scintillatiemateriaal en haalde een ruimtelijke resolutie (zie 2.2.4.1.) van 15 tot 30 mm FWHM (Phelps *et al*, 1978). De tweede generatie gebruikte relatief grote bismut germanaat (BGO) kristalen (Cho *et al*, 1977), elk gekoppeld aan hun eigen PMT. Deze configuratie leverde een ruimtelijke resolutie van 7 tot 12 mm FWHM (Thompson *et al*, 1978; Nohara *et al*, 1979; Hoffman *et al*, 1983; Litton *et al*, 1984; Kanno *et al*, 1985).

Midden jaren '80 ontstond de derde generatie PET-scanners toen kleine BGO kristalen gegroepeerd werden gemonteerd en via een gesofisticeerde lichtschakeling gekoppeld werden aan de PMT's: de zogenaamde blokdetectoren (*block detectors*). Hiermee werden FWHM-resoluties van 3 tot 6 mm mogelijk (Holte *et al*, 1988; Iida *et al*, 1989; Wienhard *et al*, 1992; Wienhard *et al*, 1994).

Recent ontwikkelde systemen gebruiken nieuwe scintillatormaterialen zoals met cerium gedopeerd lutetium oxyorthosilicaat (LSO) of gadolinium orthosilicate (GSO) (Daghighian *et al*, 1993; Yamamoto *et al*, 1998), speciale lichtkoppelingen al dan niet op basis van optische vezeltechnologie (Cherry *et al*, 1995, 1997; Chatziioannou *et al*, 1999) en positiegevoelige (*position-sensitive*) meerkanaals- (*multi channel*) PMT's (Watanabe *et al*, 1995). De nieuwste PET-scanners kunnen hiermee resoluties halen van minder dan 3 mm (Eriksson *et al*, 2002; Wienhard *et al*, 2002). De recentste *small animal* PET-systemen halen dankzij hun kleinere doorsnede dan klinische systemen resoluties tot 2 mm en lager (Cherry, 1997; Chatziioannou *et al*, 2001).

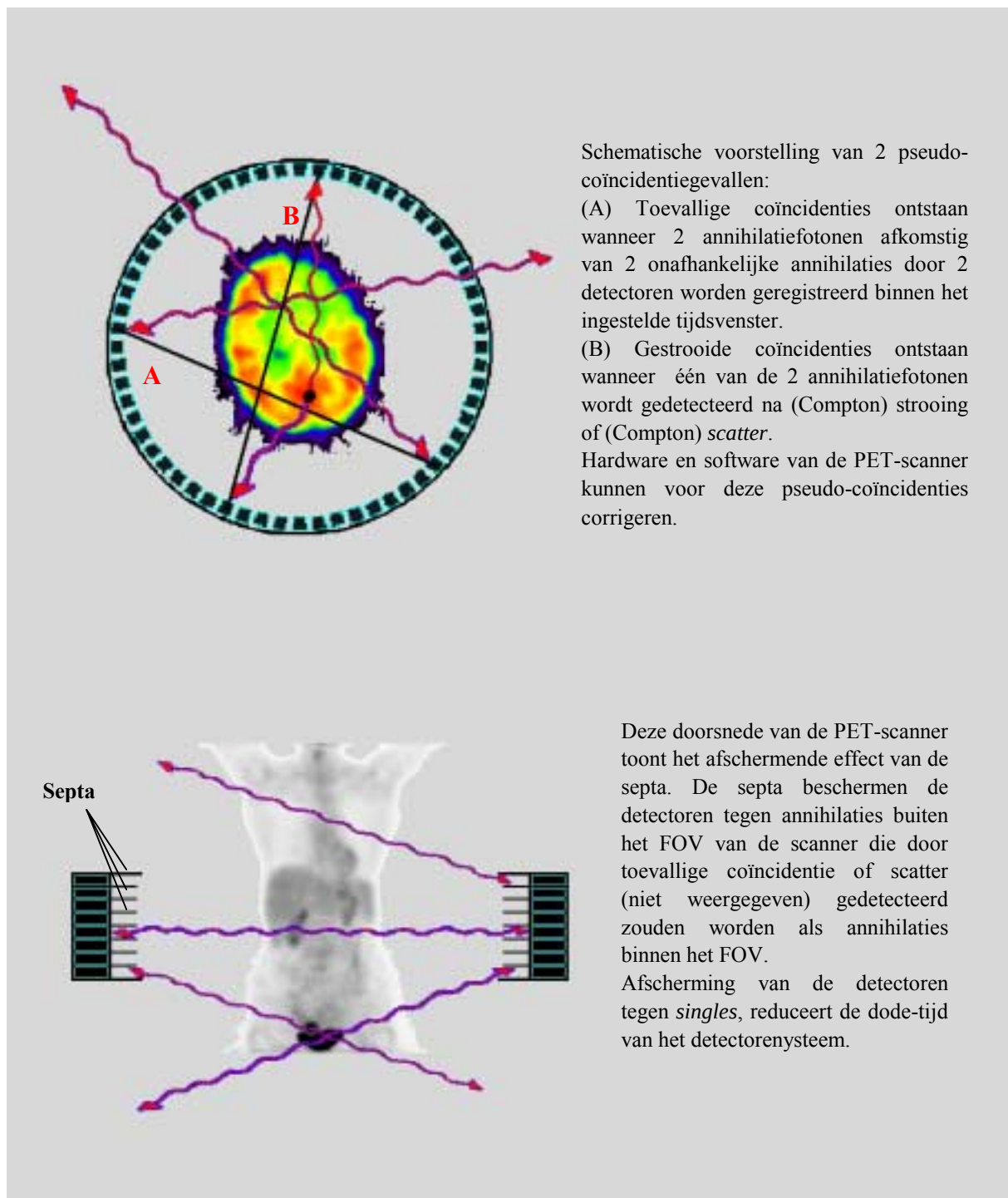
2.2.3.2. Opbouw van de PET-scanner

In moderne PET-scanners worden verschillende detectorringen gecombineerd. Hierdoor krijgt de scanner een grotere axiale *field of view* (FOV). Coïncidenties binnenin de eigen detectorring geven een intra-ring beeld (*direct-plane*), coïncidenties tussen aangrenzende detectorringen leveren een inter-ring beeld (*cross plane*). Op die manier is het mogelijk om met een PET-scanner met 8 onafhankelijke detectorringen, 15 beeldvlakken te reconstrueren: 8 *direct-planes*, 7 *cross-planes*. Afhankelijk van de dimensies van de PET-scanner (ringdiameter en septa, zie later) variëren de meet- en beeldkarakteristieken tussen beide beeldvlakken zoals bijv. axiale resolutie, gevoeligheid en telcadanslineariteit.

De diameter van de detectorringen varieert van 50 tot 60 cm voor neurologische PET tot 80 cm voor *whole-body* PET. Tussen 2 aangrenzende detectorringen in wordt een schijf uit lood of wolfram gefixeerd: het septum. Deze septa reduceren strooing (*scatter*) en toevallige coïncidentie en verhogen de verhouding coïncidentietellen/niet-coïncidentietellen (zie figuur 2.2). Hierdoor vermindert de dode-tijd van het meetsysteem, en kunnen hogere activiteiten binnen het FOV worden toegelaten. Anderzijds beperkten deze septa, door hun axiale collimatie, de gevoeligheid (detectie-efficiëntie) van de scanner. Moderne systemen laten ook metingen toe zonder septa, de zogenaamde 3D PET. Deze compenseren de toename in pseudo-coïncidenties en *singles* van buiten het FOV met snellere detectoren en elektronica en vernuftige beeldreconstructietechnieken.

Detectoren, detectorelektronica, septa en coïncidentie-elektronica worden gemonteerd in een beweegbare opstelling (*gantry*). Zo kan gescand worden onder een bepaalde helling (typisch voor hersenstudies) of pivoteren tot een bepaalde hoek (bijv. voor hartstudies).

De patiënt wordt op een in de hoogte regelbaar bed horizontaal in de scanner geschoven. Aangezien immobilisatie van de patiënt gedurende de scan een vereiste is, is een comfortabele houding essentieel voor het verkrijgen van beelden van hoge kwaliteit.



Figuur 2.2: Scatter en toevallige coincidentie en correctie hiervoor via PET-hardware

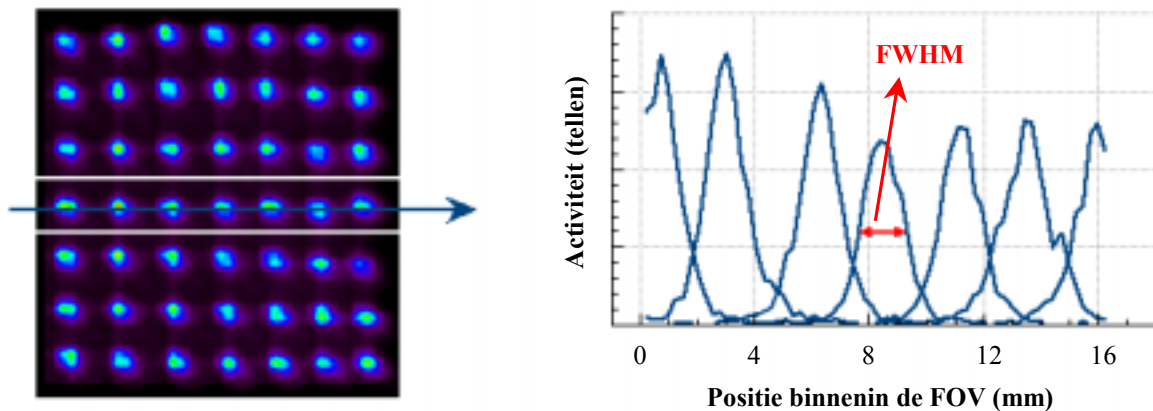
2.2.4. PET: karakteristieken van de scanner

De prestaties van een PET-scanner worden beoordeeld op basis van de kwaliteit van de beelden die hij onder bepaalde experimentele omstandigheden kan produceren. De essentiële fysieke karakteristieken van het PET-systeem daarvoor zijn: ruimtelijke resolutie, uniformiteit van deze resolutie binnenin de FOV, sensitiviteit en telcadanslineariteit.

2.2.4.1. Ruimtelijke resolutie

De ruimtelijke resolutie van de PET-scanner is het belangrijkste criterium om een bepaald systeem qua kwaliteit te typeren. De resolutie geeft immers aan in welke mate op de PET-beelden details kunnen herkend worden, kortweg: ‘de scherpte van de foto’.

De resolutie van een PET-systeem wordt aangeduid als de breedte bij halve hoogte of *full width at half maximum* (FWHM) van het beeld van een puntbron. Dit wordt verduidelijkt in figuur 2.3.



Figuur 2.3: Links: beeld van een ^{22}Na -puntbron (0,5 mm) gescant op verschillende plaatsen binnen het FOV van een μ -PET-scanner, rechts: activiteitsverdeling t.o.v. de positie binnenin het FOV.

De resolutie van een PET-beeld wordt bepaald door:

- (1) Positronrange en de hoekonzekerheid tijdens annihilatie (zie 2.2.2.1.). Deze bijdrage is door het belang van de positronrange afhankelijk van het gebruikte radionuclide en bepaalt de fysisch mogelijke ondergrens aan de resolutie. Het verlies aan resolutie ten gevolge van de positronrange is minder dan 1 mm FWHM (Phelps *et al*, 1975; Cho *et al*, 1975). Het effect op de resolutie van de afwijking t.o.v. de annihilatiehoek bedraagt tot 1 mm FWHM.
- (2) De intrinsieke resolutie van het detectiesysteem (zie 2.2.3.1.). Vooral deze bijdrage bepaalt de totale resolutie van het systeem. Bovendien verslechtert de resolutie ook door de onderlinge verschillen en detectorresolutie, typisch met een factor 1,1 à 1,2.
- (3) De resolutie van de beeldreconstructie.

Voor het verkrijgen van 3D PET-beelden moet naast de transaxiale richting (in het vlak van de detectoring) ook in axiale richting (volgens de as van de scanner) worden gescand. De daarbij horende axiale resolutie is doorgaans 50 tot 100% groter dan de transaxiale resolutie.

2.2.4.2. Uniformiteit van de resolutie binnen de FOV

De transaxiale resolutie neemt af naarmate de afstand tot het middelpunt van het FOV (m.a.w. de afstand tot de centrale as van de PET-scanner) toeneemt. De reden hiervoor is dat de hoek waarmee het invallende foton de detector (scintillator) raakt, steeds meer van de ideale loodrechte richting gaat afwijken naarmate de afstand van het centrum toeneemt. Immers, hoe rechter het foton op de detector valt hoe meer accuraat de detectie-elektronica kan uitmaken welke individuele detector van de blokdetector het foton heeft gedetecteerd en dus hoe beter de resolutie wordt.

De axiale richting wordt geconfronteerd met een niet-uniformiteit tussen *direct*- en *cross-planes*. De axiale FWHM van de *cross-plane* is kleiner dan deze van de *direct-plane* in het centrum van de FOV en groter in de periferie van de FOV.

2.2.4.3. Gevoeligheid

De gevoeligheid van een PET-scanner, m.a.w. zijn detectie-efficiëntie, wordt bepaald door de prestaties van de detectoren en de geometrie (ringdiameter, septa,...). Naarmate de sensitiviteit

van het meetsysteem toeneemt, kan met een lagere activiteit (in klinische studies dus een lagere stralingsdosis voor de patiënt) een betere beeldkwaliteit bekomen worden.

2.2.4.4. Telkadanslineariteit

Voor de bepaling van de energie van het foton heeft de elektronica een bepaalde tijd - afhankelijk van het systeem 200 tot 900 ns – nodig: de *dode tijd*. Tot een bepaalde activiteit zal de telkadans lineair toenemen met de activiteit. Wordt de grens overschreden, dan neemt de telkadans niet langer lineair toe met de activiteit en zal zelfs dalen bij zeer hoge activiteiten.

Bij niet-lineaire telkadansen is de elektronica niet langer in staat annihilatiefotonen steeds correct te positioneren. Bovendien kunnen 2 gestrooide fotonen (met te lage energie om te worden toegelaten) combineren en hun sompiek aanleiding geven tot een onjuiste coïncidentie. Deze verschijnselen kunnen leiden tot een verlies van contrast in het beeld.

2.2.5. PET: de meetprocedure

2.2.5.1. Normalisatiescan

Om tijdens de emissiescan (zie 2.2.5.3.) voor verschillen in detectie-efficiëntie tussen de individuele detectoren in de PET-scanner te kunnen corrigeren worden deze genormaliseerd. Daarom wordt, afhankelijk van de stabiliteit van het systeem, 1 maal per week tot 1 maal per maand een uniforme ^{68}Ge - ^{68}Ga bron gescand.

2.2.5.2. Blankoscan

Een blancometing levert de referentiegegevens nodig om via de transmissiescan (zie 2.2.5.3.) te kunnen corrigeren voor attenuatie. Attenuatie is het verschijnsel waarbij een annihilatiefoton door het omringende materiaal geheel of gedeeltelijk wordt geabsorbeerd en dus niet wordt gedetecteerd. De dichtheid en samenstelling van het materiaal en de verdeling ervan binnen het FOV zal bepalen in welke mate attenuatie voorkomt.

De blankoscan gebeurt door het meten van een homogene ringvormige of roterende staafvormige ^{68}Ge - ^{68}Ga -bron van een ledige PET-scanner.

2.2.5.3. Transmissiescan

Na de blancoscan wordt de patiënt in de scanner gebracht en een meting van dezelfde ^{68}Ge - ^{68}Ga -bron gestart. De verhouding tussen de blancoscan en de transmissiescan toont de attenuatie van het weefsel in de scanner.

2.2.5.4. Emissiescan

Tenslotte wordt een hoeveelheid tracer aan de patiënt toegediend en de emissiescan gestart. Afhankelijk van de aard van de studie kan dynamisch (verdeling van de tracer in functie van de tijd) of statisch (opstapeling van de tracer tijdens de *steady state*-toestand) gebeuren.

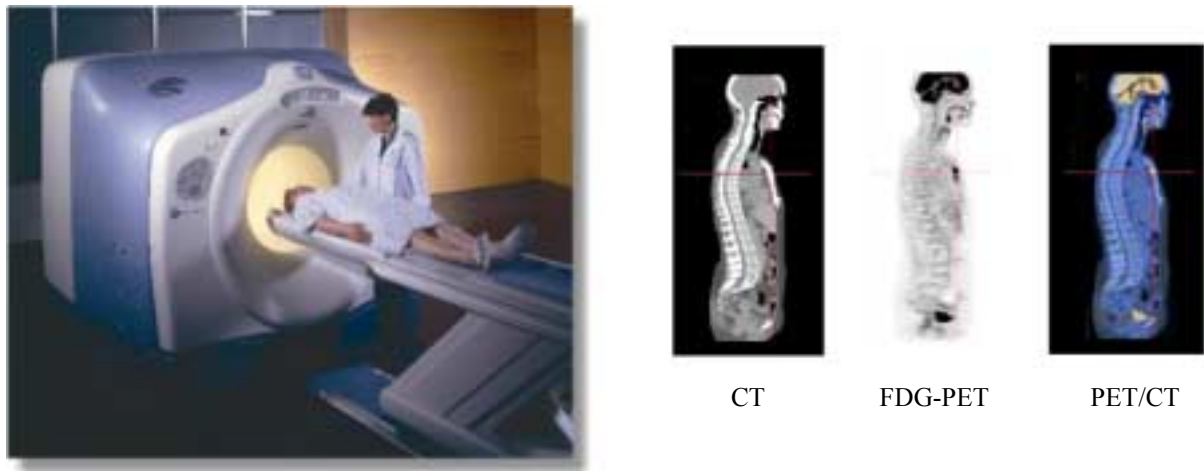
De emissiegegevens worden op dezelfde manier verwerkt als de transmissiegegevens en geordend in een sinogram. Door het verwerken van de emissie en transmissie net voor de beeldreconstructie krijgen we een kwantitatief beeld van de verdeling van de activiteit binnen het FOV van de scanner.

2.2.6. Recente ontwikkelingen

Naast de recente ontwikkelingen op het niveau van nieuwe detectoren en detectormaterialen (LSO en GSO waarmee de nieuwste klinische PET-scanners resoluties bereiken < 3 mm (zie 2.2.3.1.) springt vooral de introductie van het hybride systeem PET/CT in het oog. De combinatie van de CT en de PET maakt het mogelijk om in één enkele scan zowel de morfologie als de fysiologie van de patiënt in beeld te brengen. De samenvoeging van beide beelden maakt het nog meer dan vroeger mogelijk om in een vroeg stadium een bepaalde aandoening aan te tonen en te lokaliseren.

In 1998 werd de eerste PET/CT-scanner werd getest in de medisch centrum van de universiteit van Pittsburgh (*University of Pittsburgh Medical Center*). Deze scanner was een ontwerp van CTI PET Systems, een *joint venture* tussen Siemens (ECAT-systemen) en CTI, Inc.

In figuur 2.4 is het commerciële PET/CT-systeem *DiscoveryTM LS* te zien en de combinatie van een morfologisch en een fysiologisch beeld.



Figuur 2.4: Links: *DiscoveryTM LS PET/CT* (GE Medical Systems) van de universiteit van Zurich (Zwitserland), rechts: *het FDG-PET beeld toont metastasen (uitzaaiingen) ter hoogte van de long; het fusiebeeld de juiste localisatie ervan in de linkerlong.*

2.3. Functionele beeldvorming met PET

Het gebruik van positron emitterende radio-isotopen in de geneeskunde voor het lokaliseren van hersentumoren werd het eerst voorgesteld door Wrenn *et al* (Wrenn *et al*, 1951). Het werk bevatte reeds de belangrijkste principes van het huidige positron emissie tomografie: simultane detectie van de 2 annihilatiefotonen via coïncident geschakelde scintillatiedetectoren (NaI) en lokalisatie van de positronelektron annihilatie door de projectie van de geregistreerde activiteit (zie 2.2.2.2. en 2.2.2.3.). Kort daarop werden deze principes toegepast voor de lokalisatie van hersentumoren m.b.v. ^{74}As ($T_{1/2} = 17,77$ d) (Sweet and Brownell, 1955).

Door de beperkte beschikbaarheid van ^{74}As enerzijds en de geassocieerde stralingsdosis anderzijds werd de evolutie van de positron emissie scanning overschaduwd door de ontwikkeling van tracers voor hersenscanning op basis van gammastralers: bijv. albumine gemerkt met ^{131}I ($T_{1/2}=8,02$ d), ^{203}Hg ($T_{1/2}=64,61$ d), ^{197}Hg ($T_{1/2}=2,67$ d) en $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($T_{1/2}=6,01$ h). Fysiologisch belangrijke items zoals bloed/hersenbarrière (*blood brain barrier*) en bloed/tumorbarrière (*blood tumor barrier*) werden het eerst met tracers op basis van gammastralers bestudeerd.

In 1966 werd de draad terug opgenomen met de studie van de bloedstroom in de hersenen (*cerebral blood flow* of CBF) met het positronemitterend ^{79}Kr ($T_{1/2}=1,46$ d) (Yamamoto and Robertson, 1966).

Positron tomografische beeldvorming werd het eerst mogelijk in 1975 (*Montreal Neurological Institute*) met behulp van een positron camera op basis van een circulaire opstelling van NaI-detectors (*Brookhaven National Laboratory*). Met behulp van ^{68}Ga -EDTA ($T_{1/2}=1,13$ h), afkomstig van de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator ($T_{1/2}=271$ d), werden de eerste PET-beelden gemaakt van hersentumoren en infarcten (Yamamoto *et al*, 1977). De hersendistributie van dit ^{68}Ga -EDTA leverde de eerste dynamische PET-beelden van waaruit de kinetiek van de traceropname doorheen een verstoorde bloed/hersenbarrière kon worden berekend. Met behulp van ^{77}Kr ($T_{1/2}=1,24$ h) werden de eerste bloedperfusie-experimenten in de hersenen verricht (Yamamoto *et al*, 1978).

Naast de evolutie op het gebied van detectortechnologie gaf de ontwikkeling van het minicyclotron door *Japanese Steel Works* in 1980 een belangrijke impuls aan de vooruitgang van PET. Met dit compacte acceleratorsysteem werd de *on-site* productie van de ‘metabool-interessante’ PET-nucliden zoals ^{15}O ($T_{1/2}=2,04$ min), ^{13}N ($T_{1/2}=9,97$ min), ^{11}C ($T_{1/2}=20,39$ min) en ^{18}F ($T_{1/2}=1,83$ h) mogelijk. Via radiochemische synthese werden deze positronstralers in een zeer groot aantal structuren ingebouwd waarmee biologische processen in verschillende weefsels en organen, in het bijzonder de hersenen, *in vivo* konden worden bestudeerd. Bovendien zijn deze PET-radiofarmaca dikwijls chemisch identiek aan de endogene stoffen of interessante geneesmiddelen waarvan het biochemisch gedrag moet onderzocht worden. PET laat op die manier toe de biochemie of fysiologie op een directe manier te onderzoeken i.p.v. gebruik te maken van vreemde stoffen waarvan het gedrag niet of nauwelijks bekend is (zoals de met $^{99\text{m}}\text{Tc}$ of ^{131}I -gemerkte radiofarmaca bij SPECT).

2.3.1. Kinetische modellen

Verschillende fysiologische processen kunnen m.b.v. PET gemeten worden na toediening van de geschikte tracermolecule. Om een kwantitatieve bepaling van deze biologische processen mogelijk te maken, wordt gebruik gemaakt van kinetische modellen. Deze geven een complex systeem weer onder de vorm van een vereenvoudigde voorstelling bestaande uit een aantal afzonderlijke compartimenten. Het mathematisch model beschrijft dan de transfersnelheid van bepaalde stoffen, in dit geval de tracer en eventuele gemerkte metabolieten, tussen de verschillende compartimenten. Het onderzochte fysiologische proces kan dan kwantitatief berekend worden op basis van (1) de tracerconcentratie in bepaalde lichaamsdelen in functie van de tijd via PET-metingen en (2) de tracerconcentratie in het bloedcompartiment in functie van de tijd via metingen van bloedstalen.

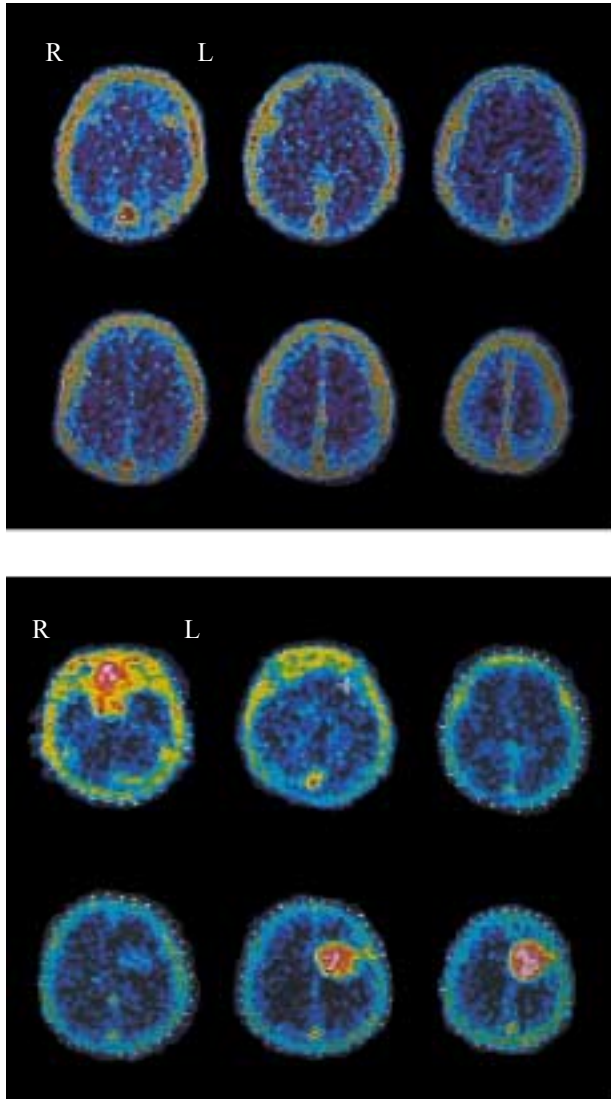
Dergelijke modellen werden ontwikkeld en reeds uitvoerig bestudeerd voor het bepalen van de regionale cerebrale doorbloeding, het zuurstof- en glucosemetabolisme, de concentratie neuronreceptoren, enz. (zie verder).

2.3.2. Detectie van een verstoorde bloed/hersenbarrière via PET

De uitwisseling van stoffen tussen het bloed en de hersenen is totaal verschillend van deze tussen bloed en andere organen en weefsels. De specifieke structuur van de BHB laat immers enkel de transfer van een beperkt aantal (metabole) substraten toe vanuit het bloed naar gezond hersenweefsel. Dit kan gebeuren door passieve diffusie (enkel mogelijk voor eerder lipofiele stoffen) of actief transport (bijv. glucose).

Verschillende pathologieën zoals tumoren, infarcten of inflammatie kunnen de lokale werking van de BHB verstoren door het fysisch beschadigen van de BHB of door het beïnvloeden van actieve transportsystemen. Daardoor kunnen bepaalde stoffen (in hogere concentraties) in hersenregio's binnendringen waar dat voorheen onmogelijk was (Heiss *et al*, 1985).

^{68}Ga is een positronstraler die, o.a. door zijn hoge proteïne bindingscapaciteit, onder normale omstandigheden de BHB niet kan doorkruisen. In gezonde personen zal ^{68}Ga (onder gecomplexeerde vorm met EDTA) zich in de hersenen verdelen naargelang de vascularisatie van het weefsel. In de hersengebieden getroffen door infarcten of tumoren is de BHB zodanig verstoort dat deze permeabel wordt voor tracers gebonden aan eiwitten of grote chemische complexen. Hierdoor gaan deze tracers zich verspreiden in bepaalde hersendelen waar dit niet verwacht wordt. Dit is duidelijk te zien in de PET-beelden weergegeven in figuur 2.5. Op die manier kan de omvang van het gebied getroffen door een infarct beter afgelijnd worden (Ericson *et al*, 1981). In hersentumoren zal ^{68}Ga -EDTA binnendringen en accumuleren in de aangetaste cellen afhankelijk van de BHB-verstoring en de vascularisatie. De mate waarin de tracer accumuleert in het tumorweefsel is grotendeels afhankelijk van de aard van de tumor. De meer kwaadaardige tumoren vertonen dikwijls een sterker verstoorde BHB en een hogere graad van doorbloeding en zullen daarom meer tracer opnemen dan minder agressieve varianten (Ilsen *et al*, 1984).



Figuur 2.5:

Normale distributie van $^{68}\text{Ga-EDTA}$ in een gezonde persoon, de activiteit verdeelt zich mooi volgens het normale doorbloeding-spatroon rondom de hersenen en bepaalde belangrijke bloedvaten in de hersenen. Weinig activiteit is te vinden in de hersenen zelf.

De activiteitsverdeling wordt weergegeven volgens een universele kleurcode: blauw = lage activiteit, rood = hoge activiteit.

Verstoorde distributie van $^{68}\text{Ga-EDTA}$ in een patiënt met een hersentumor in de linkerhelft van de hersenen.

2.3.3. Meting van bloedvolume, doorbloeding en zuurstofmetabolisme

De studie van de hersenfunctie door het meten van de regionale cerebrale doorbloeding (*regional cerebral blood flow* of rCBF) en het regionale cerebrale zuurstofmetabolisme (*cerebral metabolic rate of O_2* of rCMRO₂) is, naast meting van het glucosemetabolisme met [^{18}F]fluoro-2-deoxy-D-glucose, de meest uitgevoerde PET-studie. Meestal gebeuren de

bepaling van rCBF en rCMRO₂ in combinatie met de meting van het bloedvolume in de hersenen (*regional cerebral blood volume* of rCBV).

De korte halveringstijd van ¹⁵O ($T_{1/2}=2,035$ min) maakt het mogelijk dat in een zelfde individu meerdere studies kunnen gebeuren gedurende een korte periode met een beperkte stralingsdosis en verwaarloosbare interferentie van residuele radioactiviteit. De meest gebruikte tracers voor de bepaling van rCBV, rCBF en rCMRO₂ zijn daarom respectievelijk [¹⁵O]CO, [¹⁵O]CO₂ of [¹⁵O]H₂O en [¹⁵O]O₂.

2.3.3.1. Bloedvolume

Voor de bepaling van het rCBV wordt de circulerende bloed gevisualiseerd door het *in vivo* labellen van het intravasculaire carboxyhemoglobine. Dit gebeurt door continue inhalatie van een mengsel van lucht en de [¹⁵O]CO-tracer met hoge specifieke activiteit (Phelps *et al*, 1979). Na een equilibratie periode van ongeveer 2 minuten nodig voor het uniform labellen van de volledige bloedpoel, wordt een PET-scan uitgevoerd. Gedurende deze scan worden één of meerdere bloedmonsters genomen en de ¹⁵O-activiteit daarin bepaald. Op basis van de activiteitsverdeling in de hersenen (via de PET-metingen) en de bloedactiviteit kan m.b.v. een geschikt kinetisch model het rCBV berekend worden.

De bepaling van het bloedvolume in de hersenen is een belangrijke fysiologische parameter voor de volledige evaluatie van de hemodynamica van de hersenen. Daarnaast is de kennis van rCBV vereist voor het corrigeren van andere PET-data voor intravasculaire ¹⁵O-activiteit. Dit is bijv. het geval voor de bepaling van het zuurstofmetabolisme of rCMRO₂ (Meyer, 1991).

2.3.3.2. Cerebrale doorbloeding

De bepaling van de rCBF vormt net als het rCBV een onderdeel van de sequentie van PET-studies voor de bepaling van het cerebrale zuurstofverbruik. In tegenstelling tot het rCBV geldt de bepaling van de *blood flow* eerder als een volkomen onafhankelijke studie.

De meeste PET CBF methodes gebruiken [¹⁵O]H₂O als tracer. Deze tracer is biologisch inert, gemakkelijk aan te maken en heeft een hoge permeabiliteit t.o.v. de BHB. Naast de voor de hand liggende intraveneuze injectie (bolus of continu) van [¹⁵O]H₂O kan ook [¹⁵O]CO₂ geïnhaleerd worden (bolus of continu). [¹⁵O]H₂O wordt dan in de longen *in vivo* aangemaakt via het enzyme *carbonic anhydrase*.

Elke methode voor toediening van de radiotracer: bolus of continu, injectie of inhalatie, heeft een eigen mathematisch model voor de evaluatie van de perfusiedata. Tegenwoordig gebeurt de bepaling van de rCBF via PET bijna uitsluitend via bolusinjectie van [^{15}O]H₂O. De rCBF wordt via deze methode bepaald door het meten van de *wash out* van de radioactiviteit in de hersenen (via PET) en in het bloed (via bloedmonsters) volgend op toediening van de tracer (Meyer, 1991).

2.3.3.3. Zuurstofmetabolisme

De bepaling van het zuurstofverbruik in de hersenen gebeurt a.h.v. een serie van 3 PET-experimenten waarbij achtereenvolgens CBF, CBV en de zuurstofextractie uit het bloed (regional oxygen extraction fraction of rOEF) worden gemeten. Deze extractiefractie (het gedeelte van de zuurstof in het bloed dat een bepaalde hersenregio opneemt) wordt bepaald door het meten van de hersen- en bloedactiviteit na bolus of continue inhalatie van [^{15}O]O₂. Via kennis van de zuurstofconcentratie in het (arteriële) bloed kan dan via een geschikt model de rCMRO₂ bepaald worden (Meyer, 1991).

2.3.3.4. Functionele PET-beelden

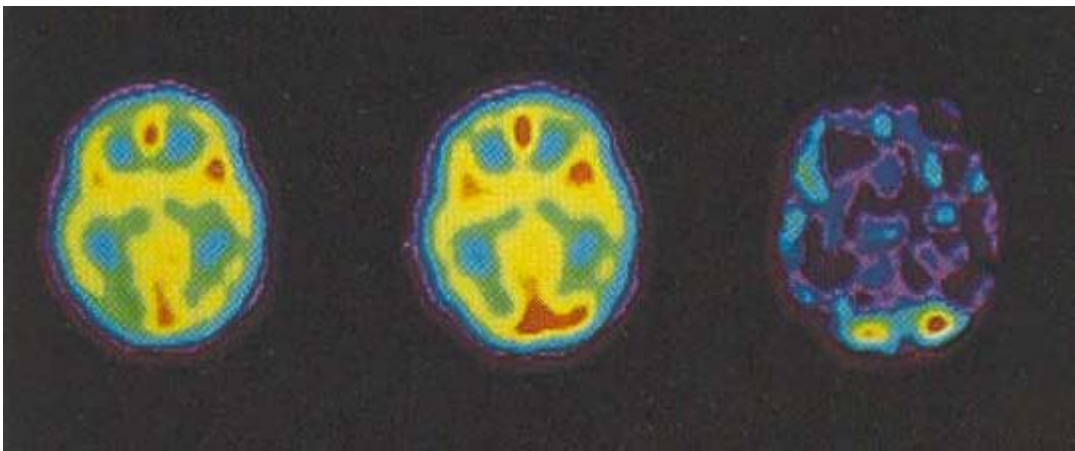
De resultaten van een PET-studie worden gewoonlijk weergegeven onder de vorm van functionele tomografische beelden waarbij de beeldelementen via een kleurcode de numerieke waarde voor rCBV, rCBF, rOEF en rCMRO₂ weergeven. Dit soort beelden ontstaan door pixel-per-pixel berekeningen op basis van de vergelijkingen van de kinetische modellen.

Een interessante toepassing van deze functionele PET-beelden is het in kaart brengen van de functionele activiteit van de hersenen d.m.v. zogenaamde CBF activeringstudies. Daarbij wordt aangenomen dat neurale activiteit nauw verbonden is met de rCBF. Functionele beeldvorming terwijl bepaalde (cognitieve) taken of handelingen worden verricht, tezamen met de besproken methodes voor de beeldanalyse laten toe voor een bepaalde functie de verantwoordelijke hersenstructuren te lokaliseren en de mate waarin ze een rol spelen te bepalen. In figuur 2.6 wordt een voorbeeld gegeven van een CBF activeringstudie waarbij de hersenregio's die ingeschakeld worden bij het lezen gedefinieerd werden.

Andere toepassingen van rCBV, rCBF en rCMRO₂ concentreren zich vooral op het gebied van epilepsie, dementie, tumoren en cerebrovasculaire aandoeningen.

2.3.3.5. Andere methodes voor meting van de bloedflow

Naast de inhalatie of intraveneuze injectie van de ^{15}O -houdende tracers $[^{15}\text{O}]\text{CO}_2$ en $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ kan ook gebruik gemaakt worden van de inerte gasen ^{77}Kr en $[^{18}\text{F}]\text{fluoromethaan}$, $[^{13}\text{N}]\text{ammoniak}$ en ^{15}O - of ^{11}C -gemerkt butanol voor de bepaling van de CBF (Heiss *et al*, 1985).



Figuur 2.6: PET-activeringstudie na bolusinjectie met $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$. Links: rCBF van een vrijwilliger in rust (ogen gesloten), midden: rCBF van dezelfde vrijwilliger tijdens het lezen, rechts: verschil tussen beide PET-beelden. De rCBF wordt met dezelfde kleurcode (zie figuur 2.5) aangegeven: blauw = lage rCBF, rood = hoge rCBF.

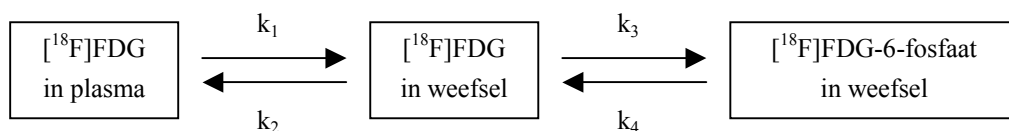
2.3.4. Meting van het glucosemetabolisme

Aangezien de hersenen voor hun energievoorziening bijna volledig afhankelijk zijn van glucose, is de metabolisatiesnelheid van glucose een maat voor de functionele toestand van het hersenweefsel. De meest gebruikte PET-methode maakt gebruik van $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-2-deoxy-D-glucose}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$) voor de kwantitatieve beeldvorming van het regionale cerebrale glucosemetabolisme (*regional cerebral metabolic rate of glucose* of rCMRglc).

$[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ wordt op dezelfde manier als glucose getransporteerd naar de (hersen)cel en via het enzym hexokinase gefosforyleerd tot $[^{18}\text{F}]\text{deoxyglucose-6-fosfaat}$. In tegenstelling tot glucose is dit $[^{18}\text{F}]\text{deoxyglucose-6-fosfaat}$ geen substraat meer voor verdere omzetting naar fructose-6-fosfaat en degradatie tot CO_2 en H_2O . Aangezien de snelheid van de terugreactie (via het

enzym fosforylase) naar deoxyglucose veel trager verloopt en diffusie van $[^{18}\text{F}]$ deoxyglucose-6-fosfaat doorheen het celmembraan minimaal is, stapelt de radioactiviteit zich op in de glucose-consumerende cel.

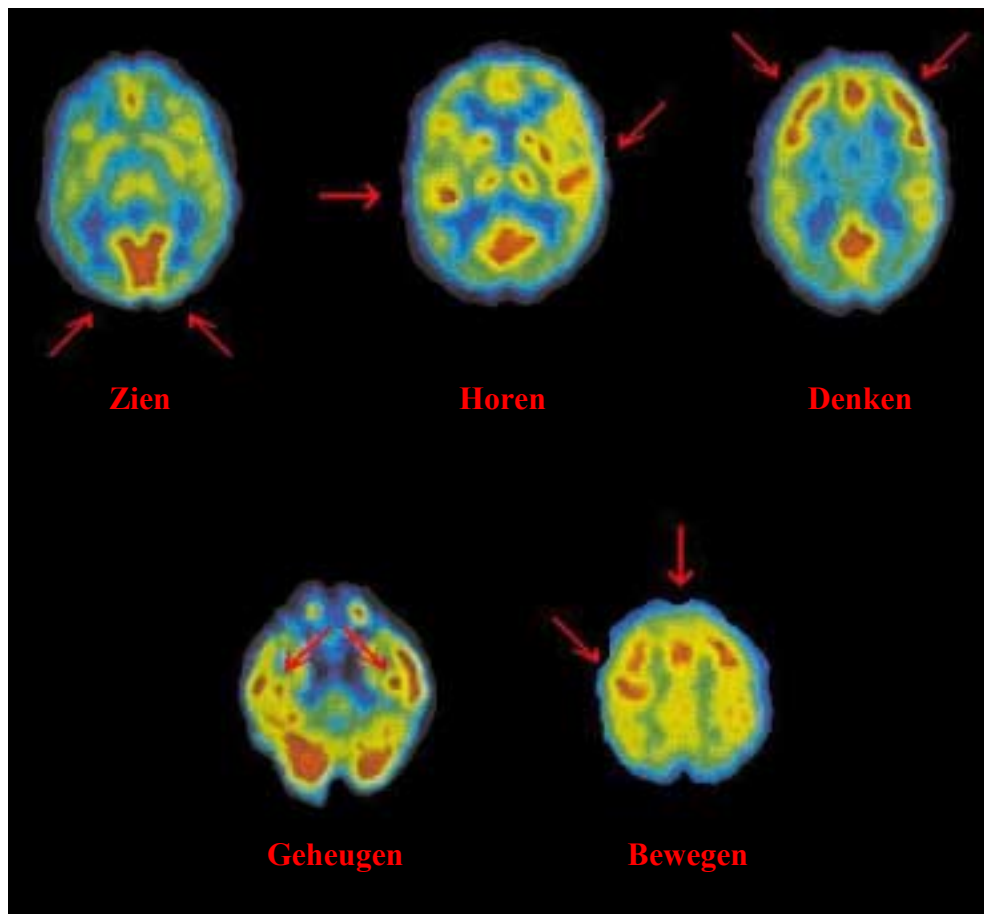
De kinetiek van de accumulatie van $[^{18}\text{F}]$ deoxyglucose-6-fosfaat kan worden beschreven via de transport- en reactiesnelheidsconstanten van een drie-compartimentenmodel (zie figuur 2.7). De bepaling van rCMR_{glc} is net als voor de rCMRO_2 gebaseerd op de relatie tussen de tracerconcentratie in het weefsel gemeten via de PET-scan en de corresponderende arteriële tracerconcentratie in het bloed of plasma (Gjedde and Kuwabara, 1991).



Figuur 2.7: Drie-compartimentenmodel voor de kwantitatieve bepaling van het glucosemetabolisme in de hersenen via $[^{18}\text{F}]$ FDG met k_1 , k_2 , k_3 en k_4 respectievelijk als de snelheidsconstante voor: transport van $[^{18}\text{F}]$ FDG vanuit het plasma naar het hersenweefsel, transport van $[^{18}\text{F}]$ FDG van het weefsel naar het plasma, fosforylatie van $[^{18}\text{F}]$ FDG en defosforylatie van $[^{18}\text{F}]$ FDG.

$[^{18}\text{F}]$ FDG is tegenwoordig veruit de meest gebruikte PET-tracer. De halveringstijd van ^{18}F ($T_{1/2} = 110$ min) laat bovendien een beperkt transport toe van $[^{18}\text{F}]$ FDG. De commerciële verkoop van deze tracer maakt het voor klinische centra mogelijk PET-studies uit te voeren zonder de financieel zware last van de productie te moeten dragen. De beschikbaarheid van de tracer heeft ervoor gezorgd dat vele geneeskundige toepassingen werden onderzocht. De nadruk ligt vooralsnog op het neurologisch en oncologisch onderzoek (zie ook figuur 2.4).

Net zoals de rCBF (zie 2.3.3.4.) kan aangenomen worden dat het glucoseverbruik sterk afhankelijk is van de neurologische activiteit. Deze waarneming maakt het mogelijk om m.b.v. $[^{18}\text{F}]$ FDG hersenactiveringstudies uit te voeren. Figuur 2.8 toont een verhoogde glucoseconsumptie in bepaalde hersenregio's als respons op verschillende stimuli (Heiss *et al*, 1985).



Figuur 2.8: Localisatie van de hersenfuncties via de studie van het regionale cerebrale glucosemetabolisme gedurende verschillende stimuli of taken m.b.v. FDG-PET,. Blauw = lage rCMRglc, rood = hoge rCMRglc.

2.3.5. Bepaling van andere fysiologische parameters via PET

2.3.5.1. Bepaling van de cerebrale pH

De zuur/base-balans van normaal hersenweefsel wordt zeer accuraat geregeld waardoor de pH zich steeds binnen strikte grenzen bevindt ($\text{pH} = 7,0$ tot $7,1$). In pathologische situaties zoals zuurstofgebrek, hersentumoren of infecties kan de lokale pH buiten deze grenzen treden. Deze pH-verschuiving kan additionele schade toebrengen aan het omringende hersenweefsel en de distributie van toegediende geneesmiddelen beïnvloeden. Kennis van de pH in de getroffen

hersenen regio's is cruciaal voor het begrijpen van de pathologische mechanismen en de ontwikkeling van doeltreffende geneesmiddelen.

De methode voor de bepaling van de cerebrale pH via PET is gebaseerd op basis van de distributie van zwakke zuren of basen in hersenweefsel als functie van hun ionisatiegraad (en dus van de pH). In niet-geïoniseerde toestand kunnen deze stoffen doorheen de membranen van de BHB dringen, in geïoniseerde toestand niet.

Voor de bepaling van cerebrale pH worden de zwakke zuren CO₂ en DMO (5,5-dimethyloxazolidine-2,4-dione) gemerkt met ¹¹C. Op basis van een voor de tracer geschikt model kan de pH bepaald worden a.h.v. de regionale verdeling van de radioactiviteit van de gebruikte tracer in de hersenen (Buxton *et al*, 1984; Kearfott *et al*, 1983; Alpert *et al*, 1991).

2.3.5.2. Bepaling van de proteïnesynthese

De synthese van proteïnen wordt, in contrast met het zuurstof- en glucosemetabolisme, de bloedflow en het bloedvolume, slechts in geringe mate bepaald door de functionele toestand van het hersenweefsel. De syntheseactiviteit is meer waarschijnlijk verbonden aan factoren die verband houden met leren en geheugen, ontwikkeling en plasticiteit van de hersenen. De proteïnesynthese wordt meestal gekenmerkt door zijn invloed op langere termijn. Veranderingen in de proteïnesynthese kan hierdoor een vroegtijdige detectie toelaten van pathologische processen zoals degeneratieve aandoeningen en tumoren maar ook inzichten over de invloeden van geneesmiddelen en hormonen op het regeneratiemechanisme na een letsel of ziekte.

Voor de bepaling van de proteïnesynthese wordt de snelheid van incorporatie van een aminozuur in proteïne m.b.v. een geschikt model bepaald. De meest gebruikte aminozuren zijn ¹¹C-gemerkt methionine, leucine en fenylalanine (Heiss *et al*, 1985).

2.3.5.3. Beeldvorming van neuroreceptoren

Sinds de ontwikkeling van zeer selectieve liganden voor de belangrijkste neuroreceptoren (dopamine-, serotonine- en benzodiazepinereceptoren) en hun respectievelijke kinetisch modellen is het mogelijk de receptordichtheid in de hersenen *in vivo* te bestuderen met PET. Hiervoor worden deze liganden doorgaans gemerkt met ¹¹C en ¹⁸F. Toepassingen richten zich vooral op neurologische aandoeningen zoals parkinson en epilepsie en leveren inzichten in het biochemische mechanisme achter depressie, angststoornissen, schizofrenie, enz. (Wagner, 1991).

2.4. Geneesmiddelenonderzoek met PET

De ontwikkeling van een nieuw geneesmiddel doorloopt 3 grote stappen: (1) het chemisch en biologisch onderzoek, (2) het klinisch onderzoek en (3) de registratie.

In de eerste stap wordt een zo economisch mogelijke synthese- en opzuiveringsprocedure voor het geneesmiddel ontwikkeld. Tezelfdertijd wordt een geschikte formulering (tablet, zalf, oplossing,...) voor het product gezocht. Simultaan met het chemisch onderzoek, worden de farmacologische eigenschappen: farmacokinetiek (opname, transport, opstapeling, metabolisme en uitscheiding) en farmacodynamiek (interactie en werking), van het product onderzocht. Dit biologisch onderzoek heeft tot doel de heilzame werking van het product vast te stellen, kwalitatief en kwantitatief, en mogelijke nevenwerkingen op te sporen. Het arbeidsintensieve en tijdrovende karakter van dit onderzoek en het ethisch beladen gebruik van grote aantallen proefdieren vormen dikwijls de zwakke schakel in het onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen.

In de klinische fase van het onderzoek wordt m.b.v. humane proeven in vrijwilligers en patienten de werking, de dosering en eventuele nevenwerkingen van het geneesmiddel onderzocht. Tenslotte kan het geneesmiddel na registratie door een officiële instantie op de markt gebracht worden.

Door nieuwe ontwikkelingen op het vlak van PET-synthese (commerciële apparaten, snelle en efficiënte syntheseprocedures) en PET-scanning (hoge resolutie *small animal PET*) wordt het steeds aantrekkelijker om positron emissie tomografie bij het geneesmiddelenonderzoek te betrekken. Er bestaan in dit geval drie mogelijke benaderingen om de farmacologie – de mechanismen die het verloop van de concentratie van een geneesmiddel in het organisme bepaalt (kinetiek) evenals de aangrijpingspunten via dewelke het geneesmiddel zijn effect tot stand brengt (dynamiek) - van het product te onderzoeken.

Via de meest directe methode wordt een geschikte syntheseprocedure ontwikkeld om het potentiële geneesmiddel te merken met een geschikte positronstraler (in de meerderheid van de gevallen ^{11}C of ^{18}F). M.b.v. PET kan dan de volledige anatomische distributie van de tracer bestudeerd worden en kan worden nagegaan of de stof een selectieve binding vertoont ter hoogte van de aangeduide doelsite. Op deze manier kan de volledige farmacologie van het geneesmiddel onderzocht worden. Omwille van deze mogelijkheid wordt in dit onderzoek de rechtstreekse methode toegepast voor de studie van het fysiologisch werkingsmechanisme van acamprosaat.

Een tweede benadering bestudeert de bezettingsgraad van het moleculaire doelwit (receptorbinding) door niet-gemerkt geneesmiddel met behulp van goed gekarakteriseerde selectieve PET-liganden. Het voordeel van deze aanpak is dat reeds bestaande procedures en

radiofarmaca kunnen worden gebruikt. Deze methode is zeer nuttig voor het optimaliseren van de klinische dosis en dosisregime met een minimum aan experimenten.

De derde benadering bestudeert de invloed van de niet-gemerkte onderzochte stof op fysiologisch-biochemische parameters zoals het glucose- of zuurstofmetabolisme, de bloedflow en het bloedvolume, m.b.v. respectievelijk [^{18}F]FDG, [^{15}O]O₂, [^{15}O]H₂O en [^{15}O]CO.

Met behulp van zowel de directe als de 2 indirecte methoden kunnen op korte tijd en met een minimum aan experimenten en proefdieren de farmacodynamiek (+ farmacokinetiek via de rechtstreekse methode) van het geneesmiddel onderzocht worden. Bovendien kan via positron emissie tomografie het biologisch onderzoek bijna naadloos overgaan in de tweede grote stap van de ontwikkeling van het geneesmiddel: het klinisch onderzoek.

2.5. Referenties

43. **Alpert NM, Senda M and Correia** (1991) Mapping of Local Cerebral pH with Positron Emission Tomography in Radiopharmaceuticals and brain pathology studied with PET and SPECT. Editors: Diksic M and Reba RC, CRC press, Inc., chapter 14: 268-278.
44. **Anger HO** (1958) Scintillation camera. *Review of Scientific Instruments* 29: 27.
45. **Bolo N, Nédélec J-F, Muzet M, De Witte P, Dahchour A, Durbin P and Macher J-P** (1998) Central effects of acamprostate : Part 2. Acamprostate modifies the brain in-vivo proton magnetic resonance spectrum in healthy young male volunteers. *Psychiatry Research: Neuroimaging Section* 82: 115-127.
46. **Buxton RB, Wechsler LR, Alpert NM, Ackerman RH, Elmaleh DR and Correia JA** (1994) Measurement of brain pH using (CO₂)-C-11 and positron emission tomography. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 4: 8-16.
47. **Chatziioannou A, Tai YC, Doshi N and Cherry SR** (2001) Detector development for microPET II: a 1 µl resolution PET scanner for small animal imaging. *Physics in Medicine and Biology* 46: 2899-2910.
48. **Cho ZH, Chan JK, Ericksson L, Singh M, Graham S, Macdonald NS and Yano Y** (1975) Positron ranges obtained from biomedically important positron-emitting radionuclides. *Journal of nuclear medicine* 16: 1174-1176.
49. **Cho ZH and Farukhi MR** (1977) Bismuth germanate as a potential scintillation detector in positron camera. *Journal of Nuclear Medicine* 18: 840.
50. **Chatziioannou AF, Cherry SR, Shao YP, Silverman RW, Meadors K, Farquhar TH, Pedarsani M and Phelps ME** (1999) Performance evaluation of microPET: A high-resolution lutetium oxyorthosilicate PET scanner for animal imaging. *Journal of Nuclear Medicine* 40: 1164-1175.

51. **Cherry SR, Shao YP, Silverman RW, Meadors K, Siegel S, Chatziioannou A, Young JW, Jones WF, Moyers JC, Newport D, Boutefnouchet A, Farquhar TH, Andreaco M, Paulus MJ, Binkley DM, Nutt R and Phelps ME** (1997) MicroPET: A high resolution PET scanner for imaging small animals. *IEEE Transactions on Nuclear Science* 44: 1161-1166.
52. **Cherry SR, Shao YP, Tornai MP, Siegel S, Ricci AR and Phelps ME** (1995) Collection of scintillation light from small BGO crystals. *IEEE Transactions on Nuclear Science* 42: 1058-1063.
53. **Daghighian F, Shenderov P, Pentlow KS, Graham MC, Eshaghian B, Melcher CL and Schweitzer JS** (1993) Evaluation of cerium-doped lutetium oxyorthosilicate (LSO) scintillation crystal for PET. *IEEE Transactions on Nuclear Science* 40: 1045-1047.
54. **Drayer BP, Wolfson SK, Reinmuth OM, Dujovny M, Boehnke M and Cook EE** (1978) Xenon enhanced CT for analysis of cerebral integrity, perfusion and blood-flow. *Stroke* 9: 123-130.
55. **Ericson K, Bergström M, Eriksson L, Hatam A., Greitz T., Söderström C.E. and Widén L.** (1981) Positron emission tomography with ⁶⁸Ga-EDTA compared with transmission computed tomography in the evaluation of brain infarcts. *Acta Radiology* 22: 385-398.
56. **Eriksson L, Wienhard K, Eriksson M, Casey ME, Knoess C, Bruckbauer T, Hamill J, Schmand M, Gremillion T, Lenox M, Conti M, Bendriem B, Heiss WD and Nutt R** (2002) The ECAT HRRT: NEMA NEC evaluation of the HRRT system, the new high-resolution research tomograph. *IEEE Transaction on Nuclear Science* 49: 2085-2088.
57. **Gjedde A and Kuwabara H** (1991) Kinetic analysis of glucose tracer uptake and metabolism by brain *in vivo* in Radiopharmaceuticals and brain pathology studied with PET and SPECT. Editors: Diksic M and Reba RC, CRC press, Inc., chapter 8: 136-138.
58. **Harper PV, Andros G, Tathrop KA, Siemens W and Weiss L** (1962) Technetium-99 (sic), as a biological tracer. *Journal of Nuclear Medicine* 3: 209.
59. **Harper PV, Lathrop KA, Kiminez F, Fink R, and Gottschalk A** (1965) Technetium-99m as a scanning agent. *Radiology* 85: 101.
60. **Heiss W-D, Beil C, Herholz K, Pawlik G, Wagner R and Wienhard K** (1985) Atlas of Positron Emission Tomography of the Brain. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo* 17-21, 27, 38-46, 59, 94-100.
61. **Hoffman EJ, Phelps ME and Huang SC** (1983) Performance evaluation of a positron tomograph designed for brain imaging. *Journal of Nuclear Imaging* 24: 245-257.
62. **Holte S, Eriksson L, Larsson JE, Ericson T, Stjernberg H, Hansen P, Bohm C, Kesselberg M, Rota E, Herzog H and Feinendegen L.** (1988) A preliminary evaluation of a positron camera system using weighted decoding of individual crystals. *IEEE Transactions on Nuclear Science* 35: 730-734.
63. **Hounsfield GN** (1995) Computerized transverse axial scanning (tomography).1. Description of system (reprinted from British Journal of Radiology, 46: 1016-1022, 1973) *British Journal of Radiology* 68: H166-H172.
64. **Iida H, Miura S, Kanno I, Murakami M, Takahashi K, Uemura K, Hirose Y, Amano M, Yamamoto S and Tanaka K** (1989) Design and evaluation of Headtome-IV, a whole-body positron emission tomograph. *IEEE Transactions on Nuclear Science* 36: 1006-1010.

65. **Ilsen HW, Sato M, Pawlik G, Herholz K, Wienhard K and Heiss WD** (1984) (⁶⁸Ga)-EDTA positron emission tomography in the diagnosis of brain tumors. *Neuroradiology* 26: 393-398.
66. **Jungreis CA, Yonas H, Firlik AD and Wechsler LR** (1999) Advanced CT imaging (functional CT) *Neuroimaging Clinics of North America* 9: 455.
67. **Kanno I, Miura S, Yamamoto S, Iida H, Murakami M, Takahashi K and Uemura K** (1985) Design and evaluation of a positron emission tomograph – Headtome-III. *Journal of Computer Assisted Tomography* 9: 931-939.
68. **Kearfott KJ, Junck L and Rottenberg DA** (1983) C-11 dimethyloxazolidinedione (DMO) – biodistribution, radiation absorbed dose, and potential for PET measurement of regional brain pH – concise communication. *Journal of nuclear medicine* 24: 805-811.
69. **Lammertsma AA and Jones T** (1983) Correction for the presence of intravascular oxygen-15 in the steady-state technique for measuring regional oxygen extraction ratio in the brain. I. Description of the method. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 3: 416.
70. **Litton J, Bergstrom M, Eriksson L, Bohm C, Blomqvist G and Kesselberg M** (1984) Performance study of the PC-384 positron camera system for emission tomography of the brain. *Journal of Computer Assisted Tomography* 8: 74-87.
71. **Meyer E** (1991) ¹⁵O Studies with PET in Radiopharmaceuticals and brain pathology studied with PET and SPECT. Editors: Diksic M and Reba RC, CRC press, Inc., chapter 9: 165-183.
72. **Nohara N, Tanaka E, Tomitani T, Yamamoto M, Murayama H, Suda Y, Endo M, Iinuma T, Tateno Y, Shishido F, Ishimatsu K, Ueda K and Takami K** (1980) Positologica – A positron ECT device with a continuously rotating detector ring. *IEEE transactions on nuclear science* 27: 1128-1136.
73. **Phelps ME, Hoffman EJ, Huang SC and Kuhl DE** (1978) ECAT: a new computerized tomographic imaging system for positron-emitting radiopharmaceuticals. *Journal of Nuclear Medicine* 19: 635.
74. **Phelps ME, Hoffman EJ, Huang SC and Kuhl DE** (1979) Validation of tomographic measurement of cerebral blood volume with C-11-labelled carboxyhemoglobin. *Journal of nuclear medicine* 20: 328-334.
75. **Phelps ME, Hoffman EJ, Huang SC and Terpogossian MM** (1975) Effect of positron range on spatial-resolution. *Journal of nuclear medicine* 16: 649-652.
76. **Sweet WH and Brownell GL** (1955) Localization of intracranial lesions by scanning with positron-emitting arsenic. *Journal of the American Medical Association* 157: 1183.
77. **Thompson CJ, Yamamoto YL and Meyer E** (1978) Positome-II – High-efficiency PET device for dynamic studies. *Journal of Computer Assisted Tomography* 2: 650-651.
78. **Vaalburg W and Paans AMJ** (1983) Short-Lived Positron Emitting Radionuclides in Radionuclides Production – Volume II. Editors: Helus F and Colombetti LG, *CRC series in radiotracers in biology and medicine* CRC Press, Inc., Florida, Chapter 2: 49.
79. **Wagner HN Jr.** (1991) Positron emission tomography (PET) imaging of neuroreceptors in mental illness in Radiopharmaceuticals and brain pathology studied with PET and SPECT. Editors: Diksic M and Reba RC, CRC press, Inc., chapter 19: 382-387.
80. **Watanabe M, Omura T, Kyushima H, Hasegawa Y and Yamashita T** (1995) A compact position-sensitive detector for PET. *IEEE Transaction on Nuclear Science* 42: 1090-1094.

81. **Wienhard K, Dahlbom M, Eriksson L, Michel C, Bruckbauer T, Pietrzyk U and Heiss WD** (1994) The ECAT HR – Performance of a new high-resolution positron scanner. *Journal of Computer Assisted Tomography* 18: 110-118.
82. **Wienhard K, Eriksson L, Grootenboer S, Casey M, Pietrzyk U and Heiss WD** (1992) Performance evaluation of the positron scanner ECAT Exact. *Journal of Computer Assisted Tomography* 16: 804-813.
83. **Wienhard K, Schmand M, Casey ME, Baker K, Bao J, Eriksson L, Jones WF, Knoess C, Lenox M, Lercher M, Luk P, Michel C, Reed JH, Richerzhagen N, Treffert J, Vollmar S, Young JW, Heiss WD and Nutt R** (2002) The ECAT HRRT: Performance and first clinical application of the new high resolution research tomograph. *IEEE Transactions on Nuclear Science* 49: 104-110.
84. **Wrenn FR Jr., Good ML and Handler P** (1951) Use of positron-emitting radioisotopes for localization of brain tumors. *Science* 157: 525.
85. **Yamamoto S and Ishibashi H** (1998) A GSO depth of interaction detector for PET. *IEEE Transactions on Nuclear Science* 45: 1078-1082.
86. **Yamamoto YL and Robertson JS** (1966) Study of quantitative assessment of section micro-regional cerebral blood flow in man by multiple positron detecting system using krypton-79. *BNL Medical department Circulation No. 28, Brookhaven National Laboratory, Islip, NY.*
87. **Yamamoto YL, Thompson CJ, Meyer E, Robertson JS and Feindel W** (1977) Dynamic positron emission tomography for study of cerebral hemodynamics in a cross section of the head using positron-emitting ⁶⁸Ga-EDTA and ⁷⁷Kr. *Journal of Computer Assisted Tomography* 1: 43.
88. **Yamamoto TL, Little J, Meyer E, Thompson C, Ethier R and Feindel W** (1978) Evaluation of krypton-77 positron emission tomography studies in strokes. *Journal of Computer Assisted Tomography* 2: 638.

3. De ontwikkeling van een koolstof-11-gemerkte PET-tracer – Algemene principes

3.1. De ontwikkeling van PET-tracers: een strategie

De ontwikkeling en de productie van een radiofarmacon voor positron emissie tomografie is doorgaans een lang en langzaam proces, bestaande uit verschillende stappen in verschillende wetenschappelijke disciplines.

De eerste stap van het onderzoek is de keuze en de productie van de radio-isotoop. Welke isotoop gebruikt zal worden is afhankelijk van het doel van de studie en de mogelijkheid om de nuclide aan te maken (accelerator- of generatorsysteem, nucleaire data,...). Nucleaire gegevens en jarenlange expertise bepalen onder welke omstandigheden (target, bestraling,...) de beste resultaten (opbrengst, zuiverheid, specifieke activiteit,...) worden geboekt.

De tweede stap in de ontwikkeling van de PET-tracer is de productie van de radioactief gemerkte molecule. Voor sommige zeer elementaire moleculen kan de radionuclide reeds tijdens de productie van de radio-isotoop in de gewenste chemische vorm gebracht worden. Grotere en complexere (organische) moleculen worden voorzien van een radioactieve label via een radiochemische syntheseseweg. De chemie gebeurt daarbij in speciaal daarvoor ontworpen syntheseopstellingen die, gezien het gevaar van radioactieve straling, van op afstand en eventueel automatisch bestuurd worden.

De derde stap in de productie van de radiotracer betreft de opzuivering van het eindproduct, meestal met behulp van een chromatografische techniek, en de aflevering onder een geschikte farmaceutische vorm.

Als laatste stap wordt de kwaliteit van het product gevalideerd. De kwaliteitscontrole moet de radionuclidische-, chemische- en radiochemische zuiverheid van het eindproduct bevestigen, een voldoende hoge specifieke activiteit verzekeren en een goede farmaceutische kwaliteit garanderen.

Het is duidelijk dat bij de ontwikkeling van een synthese voor een PET-tracer met een aantal specifieke eisen en beperkingen moet rekening worden gehouden. Niet enkel de kwaliteit en de opbrengst van het uiteindelijke preparaat zijn toonaangevende factoren, ook aspecten zoals veiligheid, betrouwbaarheid en herhaalbaarheid zijn van prioritair belang.

3.2. De radio-isotoop koolstof-11

Elke studie die gebruik maakt van radioactief gemerkte moleculen begint met de keuze van de radio-isotoop. De karakteristieken van de gekozen isotoop (halveringstijd, type en energie van

de straling, atoomnummer,...) bepalen niet enkel de *chemie* van het productieproces maar ook de experimenten die met de toekomstige tracer kunnen uitgevoerd worden. De kostprijs van de productie (of aankoop) van de isotoop bepalen in belangrijke mate het financiële aspect van de volledige studie.

In deze paragraaf worden enkele aspecten m.b.t. de keuze en de productie van de radio-isotoop samengevat.

3.2.1. Koolstof-11, een vanzelfsprekende keuze?

3.2.1.1. Halveringstijd

De keuze van de radio-isotoop wordt in belangrijke mate bepaald door de halveringstijd van de radionuclide. Langdurige experimenten vereisen radionucliden met een voldoende hoge halveringstijd terwijl de radionucliden voor korte repetitieve experimenten of experimenten met proefdieren of personen eerder kleine halveringstijden moeten bezitten¹. Het is duidelijk dat tracers gemerkt met ^{11}C ($T_{1/2}=20,39$ min) slechts kunnen toegepast worden voor korte onderzoeken (maximaal enkele uren). Feit blijft dat een dergelijk korte halveringstijd zeer strenge eisen stelt aan de productie van de radionuclide en de synthese van de radiotracer (zie later).

Eén van de belangrijkste vereisten m.b.t. het gebruik van radioactief gemerkte stoffen als tracer is dat de chemische bijdrage van de tracer geen meetbare invloed mag hebben op de evenwichten binnen in het bestudeerde systeem. De specifieke activiteit (zie 3.3.3.4.) moet daardoor voldoende hoog zijn.

De verhouding tussen de radioactiviteit ($-dN/dt$) en het aantal aanwezige radionucliden wordt bepaald door de halveringstijd via:

$$-dN/dt = \lambda N \quad (1)$$

$$\lambda = \ln 2 / T_{1/2} \quad (2)$$

¹ Voor *in vivo*-experimenten betekent de korte halveringstijd dat de stralingsbelasting voor mens en dier beperkt blijft. Naast de halveringstijd van de radionuclide wordt de stralingsbelasting ook bepaald door de biologische halveringstijd, een maat voor de verblijftijd van de tracer in het lichaam.

met N : het aantal radionucliden op het moment t
 λ : de desintegratieconstante van de radionuclide
 $T_{1/2}$: de halveringstijd van de radionuclide

Naarmate de halveringstijd van de radionuclide toeneemt, neemt de bereikbare specifieke activiteit af. Als voorbeeld wordt in tabel 3.1 de theoretisch maximale specifieke activiteit van ^{14}C (hoge $T_{1/2}$) en ^{11}C (lage $T_{1/2}$) vergeleken. Voor meer informatie over de specifieke activiteit van ^{11}C -gemerkte moleculen wordt verwezen naar paragraaf 3.3.3.

Tabel 3.1: Maximale specifieke activiteit te behalen met ^{14}C en ^{11}C (met 1 radionuclide per molecule).

Radionuclide	Halveringstijd	Specifieke activiteit
^{14}C	5736 jaar	2,3 GBq/mmol ($6,2 \cdot 10^{-2}$ Ci/mmol)
^{11}C	20,39 minuten	$3,4 \cdot 10^8$ GBq/mmol ($9,2 \cdot 10^6$ Ci/mmol)

3.2.1.2. Straling

Radio-isotopen worden gebruikt in vele disciplines van de biowetenschappen. Het grote voordeel van het gebruik van radionucliden is de grote gevoeligheid en eenvoud waarmee experimenten kunnen uitgevoerd worden. Radioactiviteit laat zich doorgaans zeer gevoelig, eenvoudig en relatief goedkoop meten. De volgende vraag die dus gesteld moet worden in het kader van het onderzoek met radiotracers, is het type straling dat de radionuclide uitzendt.

Onderzoek met positron emissie tomografie vereist logischerwijze een radionuclide dat positronen emitteert; bij voorkeur een pure β^+ -straler (om redenen van stralingsbelasting voor patiënt en proefdier) en met een zo laag mogelijke positronenergie (om redenen van PET-beeldresolutie). De nucleaire gegevens van ^{11}C , en ter vergelijking deze van ^{18}F , zijn weergegeven in tabel 3.2.

Tabel 3.2: Nucleaire karakteristieken van ^{11}C en ^{18}F (<http://nucleardata.nuclear.lu.se/database/nudat/>)

	^{11}C	^{18}F
Z	6	9
Radioactief verval	β^+ (99,76%) ; E.C. (0,24 %)	β^+ (96,73 %) ; E.C. (3,27 %)
Halveringstijd ($T_{1/2}$) (min)	20,39	109,8
$E_{\text{max.}} / E_{\text{gemiddeld}} (\beta^+) \text{ (keV)}$	960 / 385,6	633,2 / 249,8

3.2.1.3. Isotopische merking

Aangezien de radionuclide deel zal uitmaken van een groter geheel: gebonden aan een organische molecule, omvat in een chemisch complex of fysisch gebonden aan een vaste drager, zal het mee de (bio)chemische eigenschappen hiervan bepalen. De vervanging van een functionele groep of een enkel atoom kan verstrekende gevolgen hebben voor de biochemische activiteit van gemerkte moleculen.

Om deze invloed te minimaliseren is het aangewezen isotopisch te merken, m.a.w. een atoom te vervangen door een radioactief isotoop van hetzelfde element¹. Aangezien drie van vier belangrijkste atomen in organische structuren - koolstof, stikstof en zuurstof - kunnen vervangen worden door de beschikbare positronemitters - ^{11}C ($T_{1/2}=20,4$ min), ^{13}N ($T_{1/2}=9,96$ min) en ^{15}O ($T_{1/2}=2,07$ min) - is het mogelijk zowat elke organische stof te merken met een positronemitter. De belangrijke positronstraler fluor-18 ($t_{1/2}=109,7$ min) wordt vaak gebruikt als substituuut voor waterstof ($[^{18}\text{F}]6\text{-fluorodopa}$) of een hydroxidegroep ($[^{18}\text{F}]\text{fluoro-2-deoxy-D-glucose}$).

3.2.1.4. Beschikbaarheid van de radionuclide

Naast de fysische eigenschappen van de radionuclide worden de keuze van de isotoop en de haalbaarheid van het experiment bepaald door de beschikbaarheid van de gekozen radio-isotoop. Radio-isotopen met een grote halveringstijd zoals ^{14}C ($T_{1/2} = 5736$ jaar) en ^3H ($T_{1/2} = 12,33$ jaar) kunnen eenvoudigweg aangekocht worden onder de gewenste moleculaire vorm. Radio-isotopen met een korte halveringstijd (maximaal enkele uren) kunnen ook aangekocht worden, op voorwaarde dat de productie ervan *in situ* kan gebeuren via een generatorsysteem.

¹ Door isotopisch te labelen blijft het verschil in (bio)chemische activiteit tussen de gemerkte - en ongemerkte molecule beperkt tot het *isotoopeffect*. Voor ^{11}C is dit effect waarschijnlijk verwaarloosbaar.

Een belangrijk voorbeeld is de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -generator ($T_{1/2}(^{99}\text{Mo}) = 2,7 \text{ d}$; $T_{1/2}(^{99\text{m}}\text{Tc}) = 6 \text{ u}$). Ook enkele *PET-nucliden* zijn via een generatorsysteem beschikbaar: $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ -generator ($T_{1/2}(^{62}\text{Zn}) = 9,2 \text{ u}$; $T_{1/2}(^{62}\text{Cu}) = 9,7 \text{ min}$), $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator ($T_{1/2}(^{68}\text{Ge}) = 271 \text{ d}$; $T_{1/2}(^{68}\text{Ga}) = 68,3 \text{ min}$) en $^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Ru}$ -generator ($T_{1/2}(^{82}\text{Sr}) = 25 \text{ d}$; $T_{1/2}(^{82}\text{Ru}) = 1,3 \text{ min}$).

De belangrijkste PET-nucliden ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N en ^{15}O kunnen uitsluitend aangemaakt worden via cyclotron bestraling. Bovendien laten de korte halveringstijden van deze radionucliden geen langdurig transport toe (uitgezonderd ^{18}F). De productie van de tracer en de uitvoering van het experiment (PET-scan) moeten dus noodzakelijkerwijs op dezelfde locatie en kort na elkaar gebeuren. Speciaal voor deze toepassingen werden acceleratorsystemen ontwikkeld, gericht op de productie van één of meerdere van deze radionucliden. Het grote nadeel is hier ongetwijfeld de extreem hoge kostprijs van de nodige apparatuur en infrastructuur. Dit maakt van PET een financieel weinig aantrekkelijke experimentele techniek.

3.2.2. Productie van koolstof-11

In de literatuur worden drie reacties beschreven voor de productie van ^{11}C . Tabel 3.3 geeft enkele karakteristieken van deze reacties weer.

Tabel 3.3: Nucleaire reacties voor de productie van ^{11}C . (Stöcklin and Pike ,1993)

Reactie	Doelwit	Natuurlijk isotopisch voorkomen
$^{10}\text{B}(\text{d},\text{n})^{11}\text{C}$	B_2O_3	19,7 %
$^{11}\text{B}(\text{p},\text{n})^{11}\text{C}$	B_2O_3	80,3 %
$^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)^{11}\text{C}$	N_2	99,6 %

Gezien het geringe isotopisch voorkomen van boor-10 en de geringe drempelenergieën voor elk van de drie reacties ($< 3 \text{ MeV}$) komen slechts de laatste 2 reacties in aanmerking voor de productie van ^{11}C . De keuze tussen deze twee reacties hangt dan in grote mate af van de eenvoud van het gebruik in routineproductie. De aggregatietoestand van het doelwit en de chemische vorm en de aggregatietoestand van de verkregen isotoop spelen hier een cruciale rol. Gasvormige en vloeibare doelwitten genieten de voorkeur op vaste doelwitten met het oog op de voorbereiding van een bestraling (vullen van de doelwithouder), de koeling van het doelwit tijdens de bestraling en de *recovery* van het geproduceerde radionuclide uit het doelwitmateriaal. Indien de gevormde isotoop gasvormig is of oplosbaar in de bestraalde

vloeistof is het transport van de bestraalplaats naar de syntheseopstelling eenvoudig uit te voeren. Ten slotte is de chemische vorm waaronder de isotoop wordt bekomen van belang bij verdere reacties en de reeds vermelde *recovery* uit het doelwitmateriaal.

Het is duidelijk dat de nucleaire reactie van hoogenergetische protonen op stikstofgas de voorkeur geniet. De ^{11}C -atomen die hierbij ontstaan ondergaan onmiddellijk na hun ontstaan chemische reacties in de gasfase, afhankelijk van de samenstelling van het doelwitgas en de stralingsdosis. Bestaat het doelwitgas uit puur stikstofgas dan volstaat een spoor zuurstof in het targetgas om de ontstane ^{11}C -atomen te oxideren tot $[^{11}\text{C}]$ koolstof monoxide (vooral bij zeer lage stralingsdosis) en $[^{11}\text{C}]$ koolstof dioxide (bij gemiddelde en hoge stralingsdosis). Als de doelwithouder gevuld wordt met 5 % waterstof in zuiver stikstof dan ontstaat $[^{11}\text{C}]$ methaan (Stöcklin and Pike, 1993).

3.3. Synthese met koolstof-11

3.3.1. Problemen en beperkingen

In de inleiding van dit hoofdstuk werd reeds vermeld dat de ontwikkeling van een radiofarmacon belangrijke beperkingen kent. Hoewel de regels en methodes die gebruikt worden in de organische of anorganische synthese eveneens gelden en toegepast worden voor de synthese van radioactief gemerkte moleculen, zijn er door de typische aard van de productie van deze stoffen speciale aanpassingen en vereisten nodig.

Ten eerste moet rekening worden gehouden met de grootte van de halveringstijd van de isotoop. Voor kortlevende isotopen zoals ^{11}C zal na het beëindigen van de productie van de radionuclide elke handeling of reactie zo snel mogelijk moeten gebeuren. Dit betekent o.a. dat voor het rendement van trage chemische reacties een compromis moet worden gezocht tussen 2 tegengestelde factoren, nl. de reactiesnelheid, gekenmerkt door een bepaalde reactiesnelheidsconstante en het radioactief verval, gekenmerkt door een bepaalde desintegratieconstante. Ook tijdrovende bewerkingen zoals opzuivering van het ruwe synthesesmengsel en bewerking van het product tot een aanvaardbare farmaceutisch preparaat zullen aan eisen qua snelheid moeten voldoen.

De tweede beperking betreft de chemische schaal van de synthese van ^{11}C -gemerkte moleculen. De procedure voor het merken van een stof met de radionuclide start dikwijls met

het verkleinen van de productieschaal van klassieke stoechiometrische (milli)mol-hoeveelheden naar niet-stoechiometrische nano- en picomolhoeveelheden. Deze concentratieverschuiving heeft gevolgen voor de ideale reactieomstandigheden (temperatuur, druk, reactietijd, katalysator,...) en de behaalde reactieresultaten (rendement, nevenreacties,...). Deze schaalverkleining stelt ook strengere eisen aan de opzuivering van het eindproduct. Heel kleine hoeveelheden eindproduct moeten immers met hoge resolutie en *recovery* gescheiden worden van 10^3 tot 10^6 keer grotere hoeveelheden beginproduct. Ook miniaturisatie van de syntheseparaatuur en het werken met microlitervolumes zorgen dikwijls voor problemen.

Ten derde moet opgemerkt worden dat het syntheseproduct gebruikt zal worden voor fysiologisch onderzoek, *in vitro* of *in vivo*. Gedurende de productie moet steeds rekening worden gehouden met de eisen die het onderzoek aan het finale product stellen (zie 3.3.3.).

Een laatste belangrijke beperking van de synthese met ^{11}C is de radioactiviteit waarmee dit gepaard gaat. Om het verlies aan opbrengst door fysisch verval tijdens de synthese te compenseren wordt gestart met een grote hoeveelheid ^{11}C , dikwijls meer dan 1 Ci (37 GBq). Dit betekent evenwel dat, ter bescherming van het personeel, de synthese moet gebeuren m.b.v. een afstandsgestuurde syntheseparaatstelling. Deze opstelling wordt bovendien geplaatst in een zogenaamde *hot-cel*: een trekkast met loden afscherming. Zonder manuele interventie worden bepaalde handelingen, zoals bijv. extraheren, decanteren, enz., die in de *normale* organische synthese frequent worden toegepast zeer gecompliceerd of zelfs onmogelijk.

3.3.2. Synthese van koolstof-11-gemerkte precursoren

Aangezien het aspect tijd bij de ^{11}C -synthese van het allergrootste belang is, moet de radionuclide op een snelle en efficiënte manier tot de finale tracer opgebouwd worden. Daarom vertrekt men bij de synthese van ^{11}C -gemerkte radiofarmaca vanuit de zogenaamde *precursoren*: kleine, meestal zeer reactieve moleculen die het ^{11}C -aatom dragen. De belangrijkste (meest gebruikte) ^{11}C -precursoren en hun gebruikelijke synthese worden weergegeven in tabel 3.3.

Tabel 3.3: De belangrijkste ^{11}C -precursoren en hun synthese

Precursor	Doelwitproduct	Synthese
$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$	$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$	$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2 \xrightarrow[2) \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}]{1) \text{LiAlH}_4/\text{THF}} [^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH} \xrightarrow[\text{reflux}]{\text{HI (57\% v/v)}} [^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$
$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{SO}_3\text{CF}_3$	$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$	$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2 \longrightarrow [^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I} \xrightarrow[200^\circ\text{C}]{\text{AgSO}_3\text{CF}_3/\text{C}} [^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{SO}_3\text{CF}_3$
$[^{11}\text{C}]\text{CH}_2\text{O}$	$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$	$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2 \xrightarrow[2) \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}]{1) \text{LiAlH}_4/\text{THF}} [^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH} \xrightarrow[390^\circ\text{C}]{\text{O}_2/\text{Ag}} [^{11}\text{C}]\text{CH}_2\text{O}$
$[^{11}\text{C}]\text{HCN}$	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_4 \xrightarrow[1000^\circ\text{C}]{\text{NH}_3/\text{Pt}} [^{11}\text{C}]\text{HCN}$
$[^{11}\text{C}]\text{COCl}_2$	$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$	$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2 \xrightarrow[400^\circ\text{C}]{\text{Zn}} [^{11}\text{C}]\text{CO} \xrightarrow[380^\circ\text{C}]{\text{PtCl}_4} [^{11}\text{C}]\text{COCl}_2$ $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4 \xrightarrow[380^\circ\text{C}]{\text{Cl}_2/\text{CuCl}_2} [^{11}\text{C}]\text{CCl}_4 \xrightarrow[300^\circ\text{C}]{\text{Fe}} [^{11}\text{C}]\text{COCl}_2$

Veruit de meest gebruikte precursor is ^{11}C -gemerkt methyl jodide (Langström en Lunquist, 1976 ; Crouzel *et al*, 1987). Met deze precursor wordt via methylering van een amine ($-\text{NH}_2$) of hydroxide ($-\text{OH}$) de radionuclide in een organische structuur ingevoerd. Vanwege het grote succes van deze precursor zijn reeds vele jaren commerciële syntheseopstellingen voor $[^{11}\text{C}]$ methyl jodide beschikbaar. Methylering kan eveneens uitgevoerd worden met het recenter ontwikkelde $[^{11}\text{C}]$ methyl triflaaat of $[^{11}\text{C}]$ methyl trifluoromethaansulfonaat (Jewett, 1992 ; Någren *et al*, 1995). Ten opzichte van methyl jodide vertoont methyl triflaaat een hogere reactiviteit en biedt daarmee het voordeel van een hoger rendement bij mildere condities en kortere reactietijden. Een logisch gevolg is evenwel een verlies aan selectiviteit.

De methyleringreactie van een secundair amine (R_2NH) is soms niet mogelijk met methyl jodide of methyl triflaaat. Deze reactie is echter wel mogelijk met formaldehyde (Marzano *et al*, 1977 ; Mulholland *et al*, 1988 ; Nader *et al*, 1998). $[^{11}\text{C}]$ formaldehyde reageert met het amine in eerste instantie tot een intermediair imine ($\text{R}_2\text{N}=\text{CH}_2$). Dit wordt in situ gereduceerd tot het gewenste methylamine. De klassieke synthese van $[^{11}\text{C}]$ formaldehyde is weergegeven in tabel 3.3. Zoals voor de meeste syntheses zijn in de loop van de jaren alternatieven uitgedacht om aan bepaalde eisen te voldoen. Voor de synthese van $[^{11}\text{C}]$ formaldehyde werd bijvoorbeeld een biochemische synthesesweg ontwikkeld. Met geïmmobiliseerde enzymen alcohol oxidase en catalase werd $[^{11}\text{C}]$ methanol snel en reproduceerbaar omgezet tot $[^{11}\text{C}]$ formaldehyde (Slegers *et al*, 1984).

Een precursor die veel gebruikt wordt voor de synthese van ^{11}C -gemerkte aminozuren, amines en suikers is $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ (Christman *et al*, 1975 ; Iwata *et al*, 1987). De functionele groep wordt ingevoerd via een nucleofiele substitutiereactie op een electroofiel koolstofcentrum. Vervolgens kan de cyanidegroep gehydrolyseerd worden tot een carbonzuur of gereduceerd tot een amine.

Voor de synthese van een ^{11}C -gemerkte carbamaat- ($\text{RNH}^{11}\text{CONR}'$) of urethaanfunctie ($\text{RNH}^{11}\text{COOR}'$) wordt $[^{11}\text{C}]\text{fosgeen}$ gebruikt (Crouzel *et al*, 1983 ; Landais and Crouzel, 1987 ; Crouzel *et al*, 1995). In een eerste reactiestap reageert fosgeen met een amine tot een intermediaire isocyanaatverbinding. Met een alcohol of amine reageert het in een tweede stap respectievelijk tot de gewenste carbamaat- of urethaanverbinding.

Voor de synthese van ^{11}C -gemerkte carbonzuren wordt rechtstreeks het targetproduct $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ als precursor gebruikt. Met behulp van de geschikte Grignard- of organolithiumverbinding wordt $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ covalent gebonden.

Verschillende andere precursoren zoals $[^{11}\text{C}]\text{zuurchlorides}$ (zie later), $[^{11}\text{C}]\text{aceton}$, $[^{11}\text{C}]\text{alkyl-}$ en aryl jodiden , $[^{11}\text{C}]\text{nitromethaan}$, $[^{11}\text{C}]\text{methylchloroformate}$,... werden voor specifieke toepassingen gesynthetiseerd.

3.3.3. Synthese van koolstof-11-gemerkte radiofarmaca

Met de beschreven precursoren werden in het verleden verschillende tientallen moleculen gemerkt met ^{11}C . In de meeste gevallen gebeurt dit in vier stappen.

Aangezien het startproduct en/of referentieproduct in de meeste gevallen niet commercieel verkrijgbaar is, moet in een eerste stap een hoeveelheid hiervan worden aangemaakt op *grote* schaal (milligram- tot gramhoeveelheden). Vervolgens moet gezocht worden naar een geschikte scheidingsmethode tussen uitgangproduct en eindproduct. Ook een analysemethode voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van het eindproduct moet worden ontwikkeld.

In een tweede fase wordt bekeken onder welke omstandigheden (temperatuur, solvent, katalysator,...) de precursor met het hoogste rendement en in een zo kort mogelijke tijd kan worden gekoppeld aan het startproduct. Deze voorbereidende synthese wordt *koud*, t.t.z. zonder radioactiviteit, uitgevoerd. Toch zal reeds rekening worden gehouden met de moeilijke reactieomstandigheden (afstandsgestuurde opstelling, synthese op μmol -schaal, tijdsdruk,...) tijdens de productie met ^{11}C .

Vervolgens wordt de synthese met ^{11}C uitgevoerd. In eerste instantie wordt gewerkt met een kleine hoeveelheid radioactiviteit ($< 100 \mu\text{Ci}$ of $3,7 \text{ MBq}$) om zonder totale afscherming de

synthese te kunnen volgen. Op die manier kan via lokale radioactiviteitsmetingen het rendement van de verschillende reactiestappen geschat worden. Het is eerder regel dan uitzondering dat de reactieomstandigheden die werden geoptimaliseerd voor de *koude* synthese in dit stadium nog moeten aangepast worden.

Tenslotte wordt de synthese uitgevoerd met hoge activiteit (> 10 mCi of 37 MBq). In de definitieve vorm van de productie zijn ook de zuiveringsstap en de formulering van het radiofarmacon in een geschikte farmaceutische vorm begrepen.

3.4. Kwaliteitscontrole van koolstof-11-gemerkte radiofarmaca

Radioactief gemerkte moleculen voor PET vergen doorgedreven procedures voor veiligheid, kwaliteitsborging en kwaliteitscontrole. Deze radiofarmaca worden immers geproduceerd en toegediend binnen strikte tijdslimieten. Hierdoor blijft er onvoldoende ruimte over tussen productie en gebruik van het radiofarmacon om standaardcontroles uit te voeren. De enigste manier om de kwaliteit van het product te garanderen, is het gebruik van betrouwbare apparatuur, het werken onder gestandaardiseerde en reproduceerbare condities en het uitvoeren van controles tijdens de productie. Deze *in-process*-controle kan gebeuren door het integreren van radio-GC of radio-HPLC in het productieproces en door het continue monitoren van de systeemparemeters (temperatuur, gas- of vloeistofdebiet, druk,...) en de reactieparemeters (radioactiviteit, concentratie,...). Op deze manier kunnen abnormaliteiten in het productieproces tijdig opgespoord en eventueel bijgestuurd worden.

Het gebruik van het radiofarmacon wordt voorafgegaan door een uitvoerige testperiode. Tijdens deze fase van de ontwikkeling van het radiofarmacon wordt het product gecontroleerd op 5 verschillende criteria: radionuclidische- chemische en radiochemische zuiverheid, specifieke activiteit en farmaceutische kwaliteit. In deze paragraaf worden de verschillende kwaliteitscriteria voor PET-radiofarmaca beschreven.

Ook op dit niveau verstoort de typische aard van deze ^{11}C -tracers de normale werking via beschreven procedures. Niet enkel de alomtegenwoordige tijdsdruk bemoeilijkt (bepaalde onderdelen van) de kwaliteitscontrole van het eindproduct. Het hoge radioactiviteitsniveau tijdens en na de productie vergt in vele gevallen een aangepaste analyseprocedure. Tenslotte eist het onderzoek van radiofarmaca op *no-carrier-added*-niveau grote gevoeligheid en specificiteit van de gebruikte analytische methodes.

3.4.1. Radionuclidische zuiverheid

Radionuclidische zuiverheid kan gedefinieerd worden als *‘de fractie van de totale radioactiviteit aanwezig onder de vorm van het gewenste radionuclide’*. Radionuclidische onzuiverheden kunnen isotopisch of niet-isotopisch zijn en een kortere of langere halveringstijd bezitten dan het gewenste nuclide. Dit betekent dat het aandeel van de radioactiviteit door onzuiverheden kan afnemen of toenemen in functie van de tijd.

De aard en de hoeveelheid radionuclidische onzuiverheden worden bepaald door de productiewijze van het gewenste radionuclide. Deze kunnen ontstaan enerzijds door ongewenste nucleaire reacties op doelwitkernen of onzuiverheden in het doelwitmateriaal of anderzijds door nucleaire interacties met het materiaal van de doelwithouder.

Voor ^{11}C -gemerkte producten is de radionuclidische zuiverheid doorgaans een verwaarloosbaar probleem. Mogelijke onzuiverheden worden gedurende de synthese geëlimineerd, zowel chemisch als fysisch (door radioactief verval). In de praktijk volstaat hierdoor een eenmalige controle van de nuclidische zuiverheid gedurende de testfase van het radiofarmacon. Deze controle houdt een analyse van het radioactiviteitspectrum in, en aangezien γ -spectroscopie geen onderscheid kan maken tussen verschillende positronstralers, een aanvullende analyse van de vervalcurve.

3.4.2. Radiochemische zuiverheid

Radiochemische zuiverheid wordt gedefinieerd als *‘de fractie van de radionuclide aanwezig onder de gewenste chemische vorm en in de gewenste structurele positie’*.

Radiochemische onzuiverheden in het eindproduct zijn enerzijds het gevolg van een falende preparatieve scheiding tussen het radiofarmacon en ongewenste gemerkte moleculen. Deze onzuiverheden ontstaan door: niet-gereageerde precursor, nevenreacties, reacties met onzuiverheden of solvent, onvolledige verwijdering van beschermende groepen,... Radiochemische onzuiverheden kunnen anderzijds ook ontstaan als gevolg van chemische instabiliteit van het radiofarmacon.

In tegenstelling tot de radionuclidische zuiverheid wordt veel aandacht besteed aan de radiochemische zuiverheid van ^{11}C -gemerkte producten. PET is immers een techniek waarmee kwantitatieve metingen uitgevoerd worden. Aangezien PET geen onderscheid maakt tussen de verschillende chemische vormen waarin de radionuclide voorkomt, moet de hoogst mogelijke radiochemische zuiverheid worden nagestreefd.

Radio-HPLC (een klassieke HPLC-opstelling uitgebreid met radioactiviteitsdetectie) is de meest gebruikte techniek voor de controle van de radiochemische zuiverheid. De analyse moet uitgevoerd worden op het gescheiden eindproduct via een methode onafhankelijk van de preparatieve HPLC. Data van de preparatieve HPLC volstaan niet vanwege de beperkte resolutie en/of onduidelijke fractiecollectie.

3.4.3. Chemische zuiverheid

De chemische zuiverheid van een radiofarmacon kan gedefinieerd worden als “*de fractie van de stof in het farmaceutisch preparaat aanwezig onder de gewenste moleculaire vorm*”.

De term *chemische zuiverheid* is tweeledig. Ten eerste betekent het de verificatie van de chemische identiteit van het gemerkte product. Wegens de kleine hoeveelheden gesynthetiseerd product worden gemerkte moleculen doorgaans geïdentificeerd door vergelijking met standaarden. Meestal gebeurt dit door vergelijking van de retentie van het gemerkt product en de niet-radioactieve standaard op een bepaalde stationaire fase (TLC, HPLC of GC). Deze combineert het radioactief signaal van een radioactiviteitsdetector met het signaal van een detector voor de bepaling van standaard. Heel dikwijls wordt deze procedure gekoppeld aan de bepaling van de radiochemische zuiverheid.

Daarnaast kunnen ook traditionele technieken zoals NMR- en massaspectrometrie toegepast voor de identificatie van het eindproduct, indien de hoeveelheid drager dit toelaat.

Ten tweede betekent chemische zuiverheid de afwezigheid van elke ongewenste stof in het preparaat. Vooral stoffen die op moleculair niveau kunnen interfereren met het biochemisch proces waar het radiofarmacon aan deelneemt, moeten absoluut vermeden worden. Niet zelden behoort het uitgangspunt, dat (bio)chemisch soms sterk verwant is met het eindproduct, tot deze groep. Stoffen die deze interferentie niet vertonen kunnen, afhankelijk van hun toxiciteit, in hogere concentraties getolereerd worden.

3.4.4. Specifieke activiteit

De specifieke activiteit van een radiofarmacon is ‘*de verhouding tussen de hoeveelheid radioactiviteit en de hoeveelheid radiochemisch zuiver product*’ en wordt meestal uitgedrukt als Bq per mol. In sommige toepassingen zoals receptoronderzoek is de specifieke activiteit van de gebruikte radiofarmaca cruciaal met betrekking tot de kwaliteit van een preparaat. Ten

eerste moet de toegediende hoeveelheid product voldoende laag zijn om farmacologische effecten uit te sluiten. Anderzijds is het voor het verkrijgen van duidelijke resultaten belangrijk om zoveel mogelijk van de in lage concentraties aanwezige receptorplaatsen te bezetten met gemerkte moleculen (en dus zo weinig mogelijk met niet-radioactieve dragermoleculen). Het is duidelijk dat dit slechts mogelijk is wanneer de verhouding gemerkte moleculen (^{11}C) / niet-gemerkte moleculen ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$) groot genoeg is.

In principe kan ^{11}C door de nucleaire reactie op stikstof dragervrij (*carrier-free*) aangemaakt worden. De halveringstijd van ^{11}C bepaalt dan dat theoretisch een specifieke activiteit van $3,4 \cdot 10^5 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ($9,2 \cdot 10^3 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$) mogelijk is (zie 3.2.1.1.). In de praktijk kan echter onmogelijk vermeden worden dat gedurende de productie van ^{11}C en de synthese van de ^{11}C -gemerkte molecule isotopische dilutie optreedt. Dit is te wijten aan onzuiverheden in doelwitgassen en reagentia of door lekken in het transport- en/of synthesesysteem waardoor stabiele koolstofatomen (onder de vorm van atmosferisch koolstofdioxide) in het systeem kunnen dringen. Om deze reden spreekt men tegenwoordig meer van *no-carrier-added* (NCA) of *carrier-added* (CA) om de synthese qua specifieke activiteit te typeren.

In de praktijk is de maximale specifieke activiteit voor ^{11}C -gemerkte tracers die totnogtoe gerapporteerd werd, beperkt tot ongeveer 100 GBq per μmol . Dit betekent dat per molecule gemerkt met ^{11}C niet minder dan 10^4 à 10^5 stabiele dragermoleculen voorkomen.

Belangrijk om te vermelden is dat de specifieke activiteit afneemt in functie van de tijd door het radioactief verval van de radionuclide. Het tijdstip waarop deze bepaald werd moet dus steeds expliciet vermeld worden.

3.4.5. Farmaceutische kwaliteit

3.4.5.1. Steriliteit

Sterilisatie verwijst naar het vernietigen en/of verwijderen van microbiële contaminatie. Omwille van de korte halveringstijd van ^{11}C en de hittegevoeligheid van vele radiofarmaca wordt de steriliteit niet door autoklaveren maar door steriele filtratie (poriën van de filter: $0,22 \mu\text{m}$) gewaarborgd.

3.4.5.2. Apyrogeniciteit

Pyrogenen zijn stoffen die koorts veroorzaken. Dikwijls zijn ze afbraakproducten van bacteriën. Pyrogenen kunnen niet verwijderd worden door koken of membraan filtratie. Voor het vermijden van deze vorm van contaminatie wordt aangeraden om pyrogeen-vrije waterige oplossingen, reagentia en glaswerk te gebruiken.

De controle van apyrogeniciteit en steriliteit moet verricht worden door een onafhankelijke instelling door gekwalificeerd personeel en algemeen aanvaarde procedures.

3.4.5.3. pH

De pH van een farmaceutische preparatie moet binnen de fysiologisch aanvaardbare grenzen van 5,5 en 8 liggen. Fysiologische buffers op basis van (waterstof)carbonaat en fosfaat worden daarvoor dikwijls aangewend.

3.4.5.4. Isotoniciteit

Een farmaceutisch product voor intraveneuze injectie moet isotoon zijn m.a.w. dezelfde osmotische druk veroorzaken als bloed. De isotoniciteit van een preparaat wordt gewaarborgd door het radiofarmacon in een geschikt medium zoals een isotone zout- of suikeroplossing op te lossen (formulering van het geneesmiddel) als laatste stap van de synthese.

3.4.5.5. Toxiciteit

Alvorens geneesmiddelen, maar ook chemische stoffen, pesticiden, voedseladditieven en cosmetica op de markt mogen verschijnen, moet onderzocht worden of ze veilig zijn voor de mens en zijn omgeving. Dit gebeurt meestal via extrapolatie van gegevens verkregen bij levende proefdieren naar de menselijke situatie. Deze testen zijn wettelijk vereist en zijn in detail weergegeven in nationale wetgevingen en Europese richtlijnen. De resultaten staan vervat in het toxicologisch dossier van de betrokken stof. De voornaamste gegevens hebben betrekking op:

- acute toxiciteit (LD₅₀, muis, rat)
- lokale toxiciteit: oog- en huidirritatie (konijn, cavia)

- sensibilisatie (cavia), subacute, subchronische (rat/hond) en chronische (rat/hond) toxiciteit
- reproductieve toxiciteit (rat/konijn)
- teratogeniciteit (rat/konijn)
- mutageniciteit (muis/rat/bacteriën)
- carcinogeniciteit (muis/rat)

Zoals in 3.4.4. reeds werd vermeld, moet de specifieke activiteit van de gesynthetiseerde tracer voldoende hoog zijn, zodat de hoeveelheid toegediende drager farmacologische, en dus ook toxische, effecten uitsluit. Bovendien vereist de chemische zuiverheid van het product de afwezigheid van giftige hoeveelheden solventen, uitgangs- en nevenproducten.

3.5. Referenties

89. **Christman DR, Finn RD, Karlstrom KI and Wolf AP** (1975) The production of ultra high activity ^{11}C -labeled hydrogen cyanide, carbon dioxide, carbon monoxide and methane via the $^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)^{11}\text{C}$ reaction. *International Journal of Applied Radiation and Isotopes* 26: 435-442.
90. **Crouzel C, Hinnen F and Maître E** (1995). Radiosynthesis of methyl and heptyl [C-11] isocyanates from [C-11]phosgene, application to the synthesis of carbamates – [C-11]physostigmine and [C-11]heptyl-physostigmine. *Applied Radiation and Isotopes* 46: 167-170.
91. **Crouzel C, Langström B, Pike VW and Coenen H.H.** (1987) Recommendations for a practical production of [^{11}C]methyl iodide. *International Journal of Applied Radiation and Isotopes* 38: 601-603.
92. **Crouzel C, Roeda D, Berridge M, et al** (1983) C-11-labelled phosgene – An improved procedure and synthesis device. *International Journal of Applied Radiation and Isotopes* 34: 1558-1559.
93. **Ferrieri RA and Wolf AP** (1983) The chemistry of positron emitting nucleogenic (hot) atoms with regard to preparation of labelled compounds of practical utility. *Radiochemical Acta* 34: 69-83.
94. <http://nucleardata.nuclear.lu.se/database/nudat>
95. **Iwata R, Ido T, Takahashi T, Nakanishi H and Iida S** (1987) Optimization of [^{11}C]HCN production and no-carrier-added [1- ^{11}C]amino acid synthesis. *Applied Radiation and Isotopes* 38: 97-102.
96. **Jewett DM** (1992) A simple synthesis of [C-11]methyl triflate. *Applied radiation and isotopes* 43: 1383-1385.

97. **Landais P en Crouzel C** (1987) A new synthesis of carbon-11 labelled phosgene. *Applied Radiation and Isotopes* 38: 297-300.
98. **Langström B and Lunquist H** (1976) The preparation of ^{11}C -methyl iodide and its use in the synthesis of ^{11}C -methyl-L-methionine. *International Journal of Applied Radiation and Isotopes* 27: 357.
99. **Marzano C, Mazière M, Berger G and Comar D** (1977) Synthesis of methyl-iodide- ^{11}C and formaldehyde- ^{11}C . *International Journal of Applied Radiation and Isotopes* 28: 49.
100. **Mulholland GK, Jewett DM and Toorongian SA** (1988) Routine synthesis of N-[C-11-methyl]scopolamine by phosphite mediated reductive methylation with [C-11]formaldehyde. *Applied Radiation and Isotopes* 39: 373-379.
101. **Nader MW, Zeisler SK, Theobald A, et al** (1998) Low temperature synthesis of no-carrier added [C-11]formaldehyde with metal hydrides and preparation of [1-C-11]1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-derivatives. *Applied Radiation and Isotopes* 49: 1599-1603.
102. **Någren K, Muller L, Halldin C, Swahn CG, and Lehtikoinen P** (1995) Improved synthesis of some commonly used PET radioligands by the use of [^{11}C]methyl triflate. *Nuclear medicine and biology* 22: 235-239.
103. **Slegers G, Lambrecht RHD, Vandewalle T, Meulewaeter L and Vandecasteele C** (1984) Enzymatic synthesis of C-11 formaldehyde – Concise communication. *Journal of nuclear medicine* 25: 338-342.
104. **Stöcklin G and Pike VW** (1993, volume 24) Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography – Methodological Aspects. *Kluwer Academic Publishers*.
105. **Straatmann MG and Welch MJ** (1975) General method for labeling proteins with C-11. *Journal of nuclear medicine* 16: 425-428.
106. **Vandewalle T** (1984) De produktie van $^{11}\text{CO}_2$, $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ en ^{11}C -gemerkte moleculen. Doctoraatsthesis, Rijksuniversiteit Gent.
107. **Wolf AP and Redvanly CS** (1977) C-11 and Radiopharmaceuticals. *International Journal of Applied Radiation and Isotopes* 28: 29-48.

4. Synthese van koolstof-11-gemerkt acamprosaat

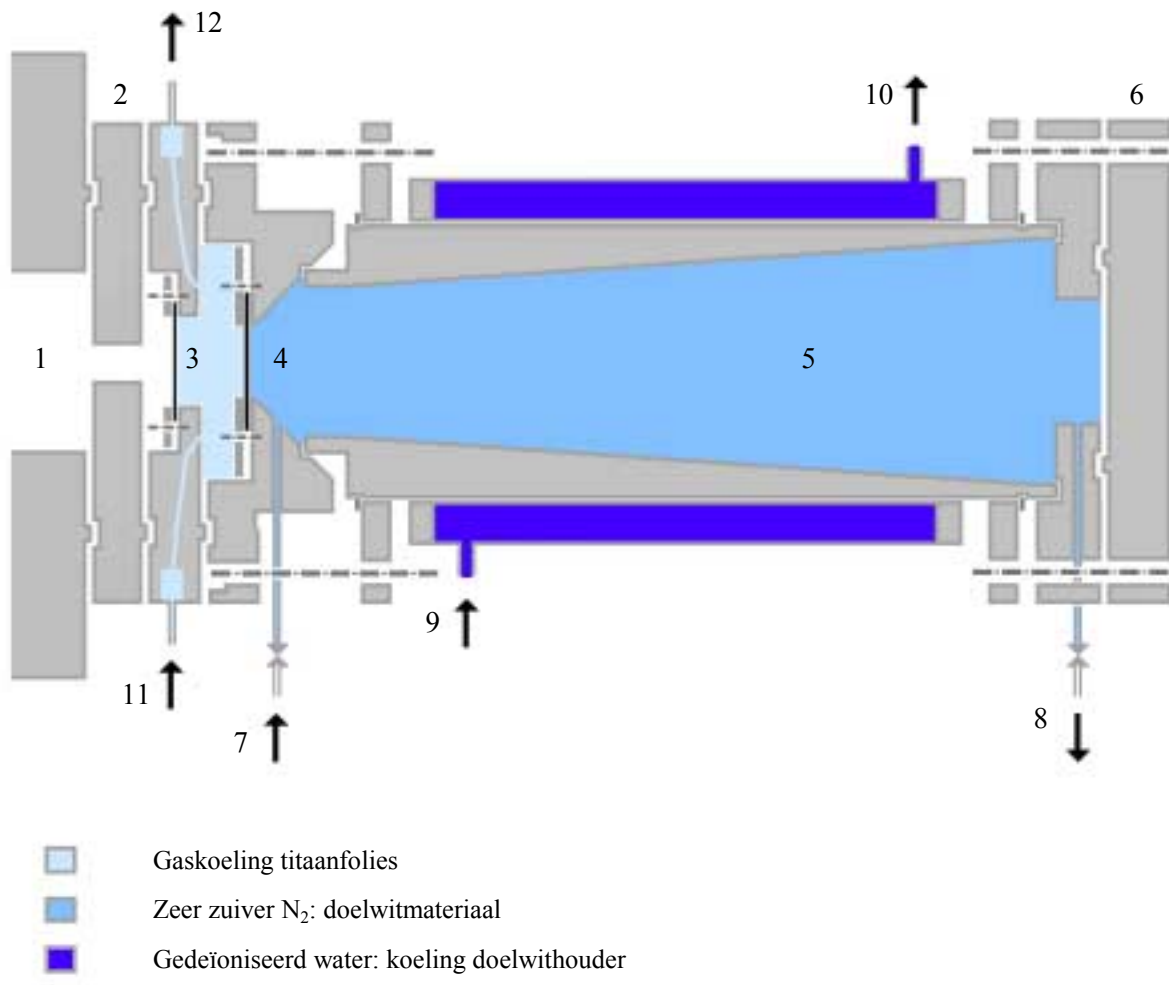
4.1. Productie van ^{11}C en $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

4.1.1. Apparatuur: doelwithouder voor productie van $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

Voor de productie van ^{11}C verkiezen we de nucleaire reactie van hoogenergetische protonen op zeer zuiver stikstofgas (zie 3.1.2.). De protonen worden versneld in een cyclotron van het type CGR-MeV 520 op het Instituut voor Nucleaire Wetenschappen, Vakgroep Analytische Chemie van de Universiteit Gent. Voor een gedetailleerde beschrijving van de werking van een cyclotron en van de specificaties van het gebruikte toestel wordt verwezen naar de literatuur (Strijckmans, 1980, 1994 en 2001).

Het doelwitgas wordt onder hoge druk bestraald in een doelwithouder zoals weergegeven in figuur 4.1.

Heel zuiver stikstofgas wordt via de inlaatklep (7) in een conische cilinder (5) geladen. Deze cilinder is vooraan afgesloten door een titaanfolie (4) met een dikte van 50 μm en achteraan door een aluminium plaat (6) met een dikte van 2 cm. Een tweede titaanfolie (dikte 25 μm) (3) sluit het vacuüm van het cyclotron en bundeltransportsysteem (1) af. Een gasstroom zorgt voor de koeling van de beide Ti-folies (11 en 12). De dimensies van de bestraalbundel worden gelimiteerd door de collimator (2) tot een maximale diameter van 2 cm. Na bestraling van het doelwitgas wordt de inhoud van de doelwithouder via de uitlaatklep (8) en een ondergrondse, met lood afgeschermd leiding, naar de syntheseopstelling in de hotcel (zie 4.2.2.) getransporteerd. De doelwithouder heeft een inwendig volume van 1040 ml, is voor het grootste gedeelte opgebouwd uit aluminium en is voorzien van een watergekoelde mantel (9 en 10).



Figuur 4.1: Schematische voorstelling van de doelwithouder voor de productie van ^{11}C : (1) bundeltransport-systeem, (2) collimator, (3) Ti-folie (25 μm), (4) Ti-folie (50 μm), (5) conische cylinder, (6) achterplaat, (7) inlaatklep doelwitmateriaal, (8) uitlaatklep doelwitmateriaal, (9) en (10) in- en uitlaat waterkoeling en (11) en (12) in- en uitlaat gaskoeling titaanfolies.

De standaard bestraalcondities die voor het experiment gebruikt werden, worden weergegeven in tabel 4.1.

Tabel 4.1: Standaardbestraalcondities voor de productie van ^{11}C en $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

Protonenergie	18 MeV
Bundelintensiteit	15 μA of $9,3 \cdot 10^{13}$ protonen/s
Bestraaltijd	20 min
Doelwitmateriaal	Stikstof - Air liquide, alfagaz 2
Stikstofdruk (relatief)	10 bar

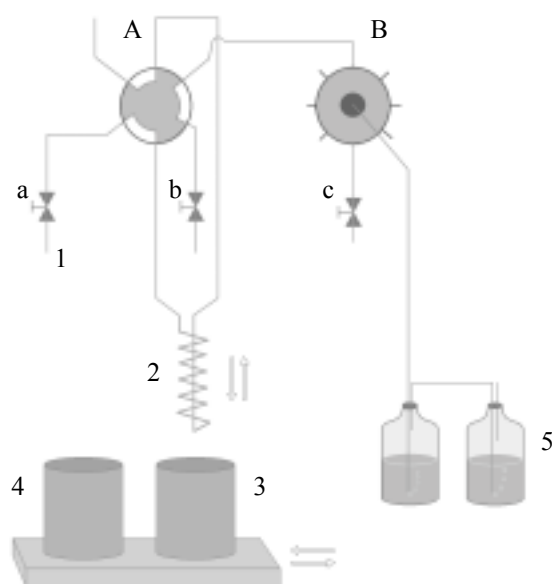
Na de bestraling wordt het doelwitgas samen met het gevormde $[^{11}\text{C}]$ koolstof dioxide (zie 3.1.2.) via een ondergrondse koperen leiding naar de syntheseopstelling in de hotcel getransporteerd met een debiet van ongeveer 2 l/min. In de syntheseopstelling wordt het ^{11}C , in eerste instantie aanwezig onder de vorm van $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, chemisch omgevormd naar de gewenste moleculaire vorm.

4.1.2. Experimentele $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ opbrengst

Om de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ opbrengst te bepalen wordt de doelwithouder gedurende 20 min bestraald onder standaard-bestraalcondities (zie tabel 4.1). In de syntheseopstelling in de hotcel (zie figuur 4.2) wordt het $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ in het doelwitgas in een cryogene trap vastgehouden. Deze cryogene trap bestaat uit een aluminium spiraal (2) (lengte: 130 cm, inwendige diameter: 2 mm) ondergedompeld in vloeibare argon (3) (-186°C). Bij deze temperatuur zal gasvormig koolstof dioxide tegen de wand van de koelspiraal uitvriezen ($T_s = -79,8^\circ\text{C}$), terwijl het N_2 -doelwitgas ($T_b = -196^\circ\text{C}$) ongehinderd afgevoerd kan worden. Na het opwarmen van de cryogene trap tot kamertemperatuur (4) wordt de gecollecteerde hoeveelheid $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ terug vrijgesteld en met een laag debiet helium dragergas (b) (10 ml/min) doorheen 2 in serie geplaatste wasflessen (5) met 100 ml 1 M NaOH geleid. Het concentreren van het gevormde $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ uit het doelwitgas en het oplossen van het $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ in de basische oplossing gebeurt in een syntheseopstelling, schematisch weergegeven in figuur 4.2.

Vermits in de tweede wasfles telkens slechts een verwaarloosbare hoeveelheid radioactiviteit te meten is ($\ll 1\%$), kan aangenomen worden dat CO_2 kwantitatief wordt vastgehouden in de basische oplossing. Tezelfdertijd wordt verondersteld dat CO , dat als nevenproduct voor enkele procenten kan gevormd worden, helemaal niet wordt vastgehouden in deze oplossing. Tenslotte moet ook rekening worden gehouden met kleine hoeveelheden ^{13}N -verbindingen die in het doelwit worden gevormd. Bestraling van stikstofgas met protonen levert immers via de

$^{14}\text{N}(\text{p,pn})^{13}\text{N}$ reactie niet-verwaarloosbare hoeveelheden ^{13}N . Volgens een onderzoek naar de samenstelling van het doelwitgas na bestraling in een dergelijke opstelling (Vandewalle, 1984) bestaat het radioactieve gasmengsel in de doelwithouder uit circa 93 % ^{11}C en 7 % ^{13}N . Overschatting van de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ opbrengst kan eenvoudigweg vermeden worden door de gecollecteerde radioactiviteit te meten na het uitsterven van ^{13}N . Een eenvoudige berekening leert ons dat 2 uur na het beëindigen van de bestraling, de initiële 7 % ^{13}N in het targetgas nog slechts een verwaarloosbare 0,1 % van de totale radioactiviteit veroorzaakt. Bovendien is de moleculaire vorm waarin het ^{13}N naar alle waarschijnlijkheid voorkomt, N_2 . Zoals reeds eerder vermeld werd, wordt dit gas niet weerhouden in de cryogene trap.



Figuur 4.2: Schematische voorstelling van de syntheseopstelling gebruikt voor het bepalen van de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ – opbrengst: (A) 6-weg kraan, (B) 8-weg kraan, (a) regelbare debietmeter (2 l/min), (b) regelbare debietmeter (10 ml/min), (c) naaldventiel (1 à 2 ml/min), (1) inlaat voor $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ afkomstig van de doelwithouder, (2) koelspiraalgemonteerd op een hydraulisch liftstelsel, (3) Dewarvaatje met vloeibare argon ($-186\text{ }^\circ\text{C}$) op beweegbaar platform, (4) beker met water op kamertemperatuur, (5) 2 wasflessen met 100 ml 1 M NaOH. De opeenvolging van de verschillende handelingen wordt geautomatiseerd m.b.v. een PLC (zie 3.3.2).

De radioactiviteit, gecollecteerd in beide wasflessen, wordt gemeten in een gekalibreerde ionisatiekamer (Capintec) minstens 2 uur na het beëindigen van de bestraling. Bij de bepaling van de activiteit wordt rekening gehouden met de invloed van het volume van de bron (100 ml) op de detectie-efficiëntie. De correctiefactor die het verschil in detectie-efficiëntie weergeeft tussen een puntbron ($\leq 1\text{ ml}$) en de wasflessen (100 ml) werd experimenteel bepaald en bedraagt voor deze detector $1,1062 \pm 0,0091$.

Dit experiment werd een aantal maal herhaald op verschillende momenten, gespreid over de duur van het onderzoek. De resultaten werden telkens gebruikt om de radioactiviteitsdetector die de opvang van het $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ controleert te ijken (zie 4.2.2.).

De resultaten van de proefopzet worden samengevat in tabel 4.2.

Tabel 4.2: Experimentele $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ opbrengst na een standaardbestraling. De waarden werden gecorrigeerd voor radioactief verval naar het einde van de bestraling (EOB of End of bombardment).

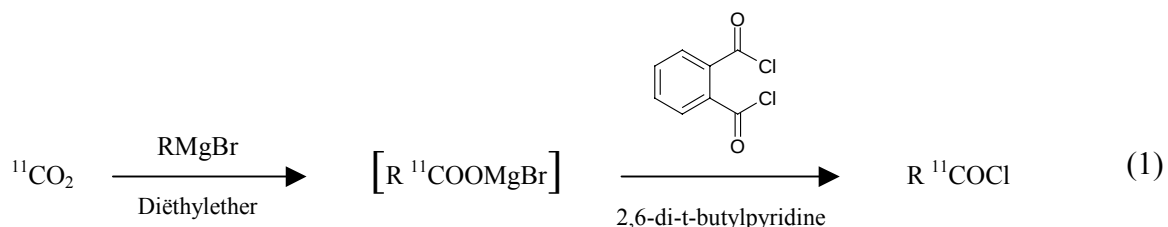
Experiment	Activiteit wasfles 1 (GBq)	Activiteit wasfles 2 (GBq)	Totale activiteit (GBq)
1	39,60	0,12	39,72
2	37,85	0,04	37,89
3	39,27	0,06	39,34
4	37,12	0,04	37,16
5	38,37	0,02	38,39
Gemiddelde	$38,4 \pm 1,3$	$0,056 \pm 0,048$	$38,5 \pm 1,3$

Gedurende een standaardbestraling (zie tabel 4.1) werd gemiddeld ($n=5$) $38,5 \pm 1,3$ GBq (1040 ± 35 mCi) $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ geproduceerd op EOB. Omgerekend betekent dit een opbrengst van gemiddeld $5,20 \pm 0,18$ GBq/ μA ($140,5 \pm 4,9$ mCi/ μA) bij saturatie. Ter vergelijking: de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ -opbrengst bepaald door T. Vandewalle (Vandewalle, 1984) onder vergelijkbare experimentele condities: conische doelwithouder met inwendig volume van 1040 ml, 10 bar hoog zuiver N_2 -doelwitgas, een bundelintensiteit van 15 μA met een protonenenergie van 18 MeV en een bestraling van 10 min bedroeg $6,95 \pm 0,59$ GBq/ μA (188 ± 16 mCi/ μA) bij saturatie.

4.2. Productie van de precursor [^{11}C]acetylchloride

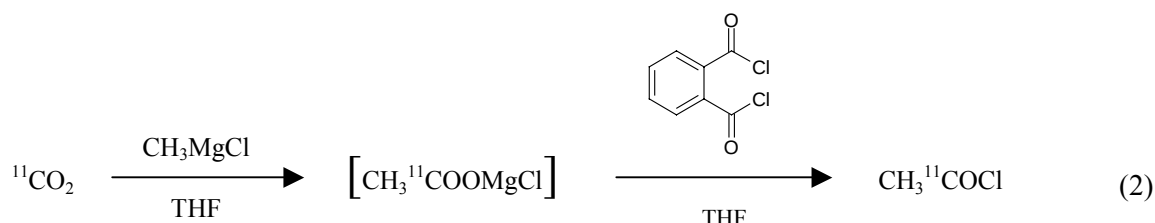
4.2.1. Beschrijving van de synthese van [^{11}C]acetylchloride

In de structuur van acetylhomotaurine is de amidefunctie de meest toegankelijke plaats om de molecule met ^{11}C te merken. Hiervoor werd de synthese van [$1\text{-}^{11}\text{C}$]acetylchloride ontwikkeld, gebaseerd op de methode beschreven door Le Bars (Le Bars *et al*, 1987) en Luthra (Luthra *et al*, 1990). Deze auteurs beschrijven de reactie van [^{11}C]CO₂ met verschillende Grignardreagentia in diëthylether: R-magnesium bromide met R = methyl, ethyl, propyl, cyclo-butyl en fenyl. Na telkens 2 min wordt deze reactie afgebroken door additie van ftaloyldichloride (FDC) - het hoogkokend dizuurchloride van ftaalzuur – en 2,6-di-t-butylpyridine. Door het verwarmen van dit reactiemengsel ontstaat het R-[$1\text{-}^{11}\text{C}$]zuurchloride. Deze precursor wordt vervolgens met behulp van een draagstroom uit het reactiemengsel gedestilleerd en gecollecteerd in een geschikt reactiemengsel.



De synthese van deze [$1\text{-}^{11}\text{C}$]zuurchlorides, zoals beschreven in de literatuur, werd tijdens dit onderzoek op 2 punten gewijzigd. Ten eerste werd het Grignardreagens methylmagnesium *bromide* in diëthylether vervangen door commercieel verkrijgbaar methylmagnesium *chloride* in tetrahydrofuraan (THF). Een kortere reactietijd dan eerst beschreven bleek voldoende te zijn voor een kwantitatieve omzetting van de gecollecteerde [^{11}C]CO₂ (30 s i.p.v. 2 min, zie 4.3.2.1). Ten tweede werd wegens de potentiële toxiciteit van pyridine en pyridinederivaten het gebruik van 2,6-di-t-butylpyridine vermeden. Als oplosmiddel werd het vervangen door THF, een katalysator voor de vorming van acetylchloride uit acetaat bleek overbodig (zie 4.3.2.2).

De productie van $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride uit $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ wordt samengevat in reactie (2).



4.2.2. Apparatuur: de syntheseeopstelling voor de productie van $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride

Om een molecule te merken met ^{11}C via de beschreven syntheseseweg (zie 4.2.1.) moeten verschillende opeenvolgende handelingen verricht worden met als doel:

- De productie en opvang van ^{11}C (onder de vorm van $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$)
- De synthese van de precursor ($[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride)
- De synthese van het eindproduct met de precursor ($[^{11}\text{C}]$ acamprosaat)
- De opzuivering van het product en formulering in een geschikt farmaceutisch medium

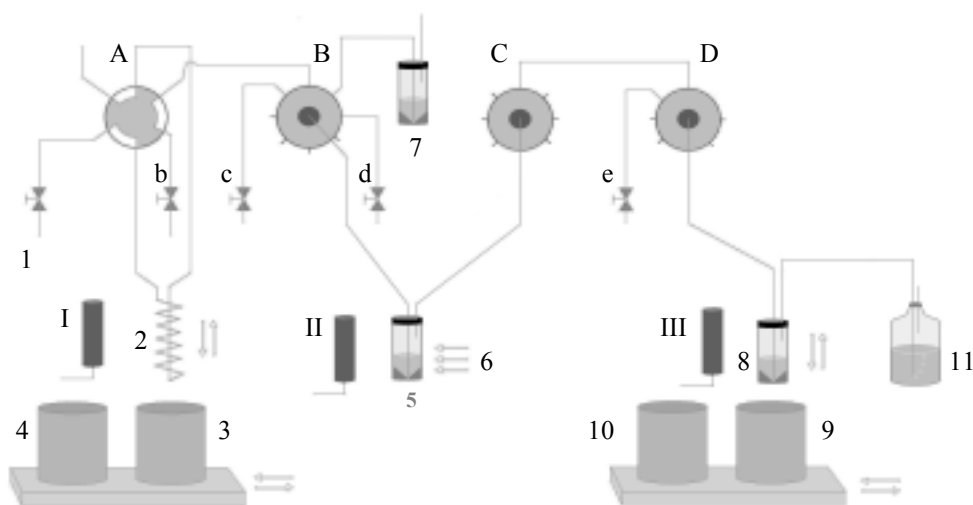
Zoals in hoofdstuk 3 werd besproken moet, gezien de hoge stralingsdosis tijdens het productieproces, om veiligheidsredenen elke manipulatie afstandsgestuurd gebeuren in een afgeschermd syntheseeopstelling (zie 3.3.1.). Om de noodzaak aan snelheid en efficiëntie enerzijds en reproduceerbaarheid en betrouwbaarheid anderzijds met elkaar te verenigen kan overwogen worden het productieproces, of althans enkele stappen ervan, te automatiseren. Automatisering gebeurde met behulp van een PLC (*Programmable Logic Control* ; Hitachi). In de praktijk werden voor de synthese van $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride en $[^{11}\text{C}]$ acamprosaat de volgende stappen afstandsgestuurd (AG) of geautomatiseerd (AU).

1. Radionuclide productie (AG): koeling van de target en folies, vullen en ledigen van de doelwithouder

2. Concentreren van $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ vanuit de N_2 -draagstroom en vrijstellen voor reactie met Grignardreagens (AU)
3. Synthese van de precursor en opvang in het reactiemengsel (AU)
4. Reactie van precursor tot eindproduct (AU)
5. HPLC-opzuivering (AG)
6. Afwerking tot een geschikt farmaceutisch preparaat (gedeeltelijk AU)

De reiniging van de verschillende onderdelen en het aanvullen van de nodige reagentia dient manueel te gebeuren. Om deze reden is het onmogelijk om kort na elkaar verschillende syntheses uit te voeren. In de praktijk is daarom het aantal producties met hoge activiteit (> 37 MBq) beperkt tot 1 per dag.

De synthesepopstelling die gebruikt wordt voor de synthese van $[1\text{-}^{11}\text{C}]\text{acetylchloride}$, wordt schematisch weergegeven in figuur 4.3.

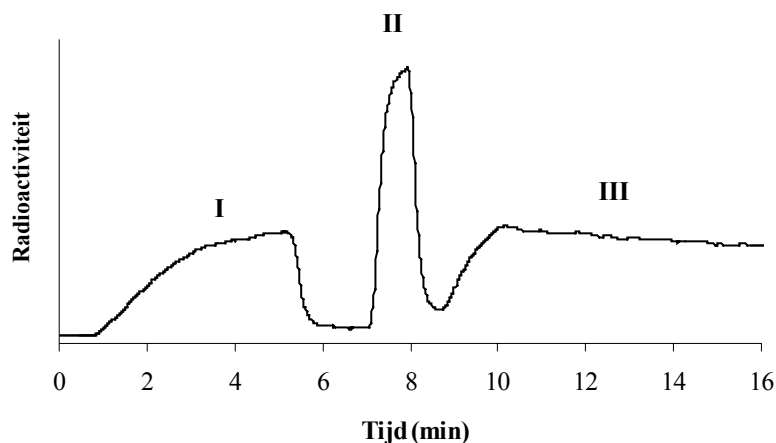


Figuur 4.3: Synthesepopstelling voor productie van $[1\text{-}^{11}\text{C}]\text{acetylchloride}$: (A) 6-wegkraan, (B,C en D) 8-wegkraan, (a) regelbare debietmeter (2 l/min), (b) regelbare debietmeter (10 ml/min), (c) naaldventiel (1 à 2 ml/min), (d) regelbare debietmeter (30 ml/min), (e) naaldventiel (1 à 2 ml/min), (1) inlaat $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ afkomstig van de doelwithouder, (2) spiraal gemonteerd op een hydrolisch liftsysteem, (3) Dewarvaatje met vloeibare argon op bewegend platform, (4) beker met water op kamertemperatuur, (5) reactievaatje voor Grignardreagens, (6) warme luchtblazer, (7) vaatje voor ftaaloyldichloride, (8) Reactievaatje met 1 ml ethanol gemonteerd op een hydrolisch liftsysteem, (9) Dewarvaatje met gekoelde acetone (-40°C) op beweegbaar platform, (10) beker met water op kamertemperatuur, (11) wasfles met 100 ml 1 M NaOH ; (I,II,III) Geiger-Müller radioactiviteitsdetectoren.

De belangrijkste functies van de opstelling zijn:

- Transport van gassen en vloeistoffen via een serie 8-weg kranen (B,C,D) door middel van gasdruk (helium).
- Het verplaatsen van een reactievaatjes (8) of cryogene trap (2) door middel van 2 hydraulische liftsystemen.
- Een warme luchtblazer (6) voor het opwarmen van een reactiemengsel of uitdampen van een solvent.
- Sturing (via getimede stappen) en controle (via feedback van de bewegende onderdelen) van de verschillende onderdelen via PLC.

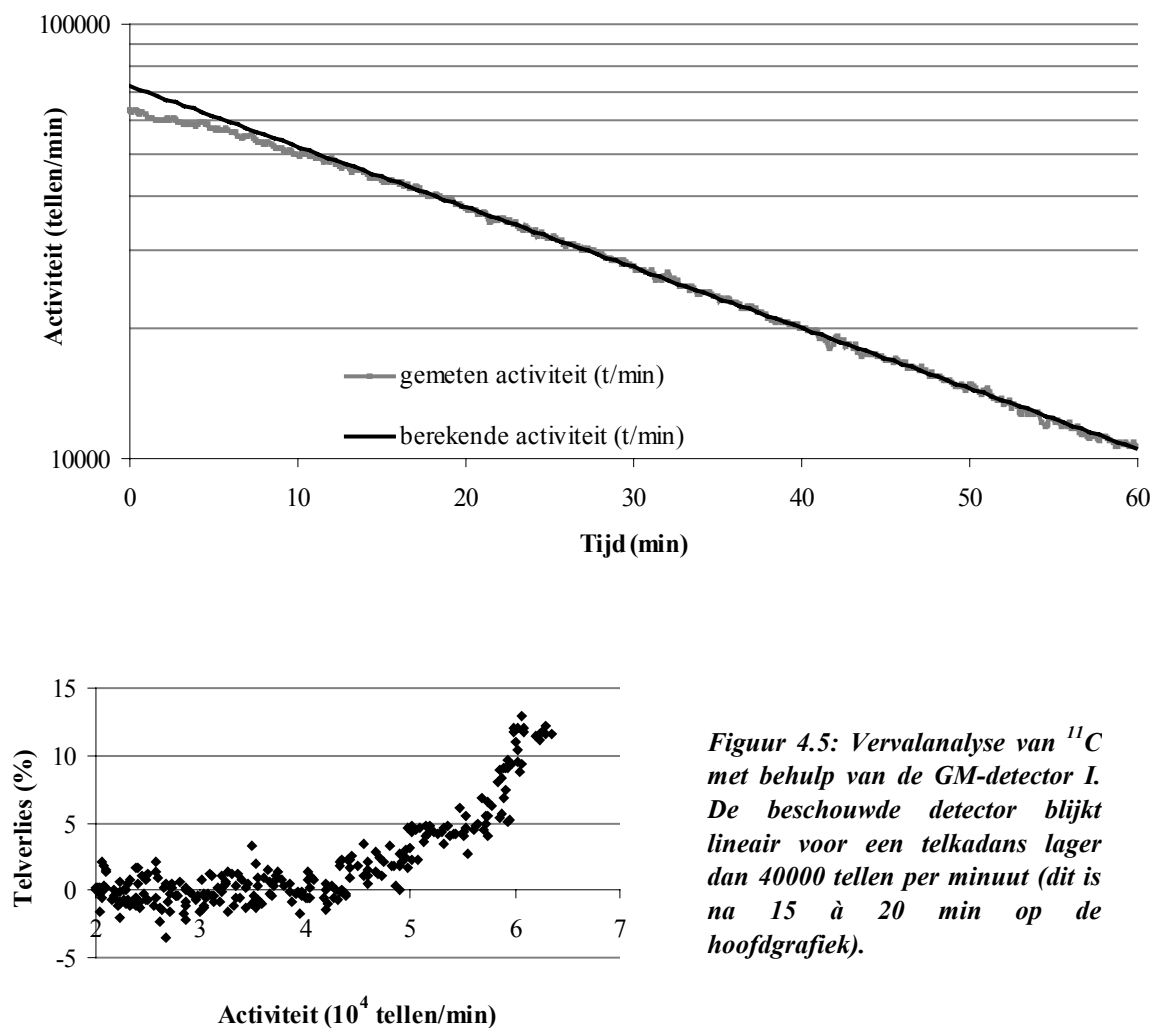
Het verloop van de synthese wordt in serie gevolgd door 3 radioactiviteitsdetectoren (zie figuur 4.3). De GM-detectoren worden zodanig opgesteld en met lood afgeschermd dat ze vrij selectief de radioactiviteit tijdens de verschillende syntheseschappen kunnen meten. In figuur 4.4 is het verloop van de radioactiviteit tijdens de productie van $[1-^{11}\text{C}]\text{acetylchloride}$ (zoals beschreven wordt in 4.2.3.) weergegeven.



Figuur 4.4: Voorbeeld van de productie van $[1-^{11}\text{C}]\text{acetylchloride}$. De activiteit wordt seriëel gevolgd door 3 verschillende GM-radioactiviteitsdetectoren: GM I: opvang van $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ in de cryogene trap, GM II: opvang van $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ in Grignardreagens, GM III: opvang van $[1-^{11}\text{C}]\text{acetylchloride}$. De verschillen in detectie-efficiëntie tussen de GM-detectoren verklaren de verschillende activiteitsniveaus.

Om de lineariteit van de detectoren te garanderen, ook onder omstandigheden met hoge radioactiviteit, wordt er naar gestreefd het telverlies te beperken tot maximaal 5 %. Enkel onder lineaire omstandigheden is het immers mogelijk om correcte metingen van de activiteit

te verrichten en eventueel, mits bepaling van de detectie-efficiëntie, absolute activiteiten te schatten. De aanvaarbare maximale telkadans van de verschillende detectoren werd hiervoor experimenteel bepaald. Dit gebeurde door analyse van de vervalcurve van ^{11}C (voor GM I weergegeven in figuur 4.5). Alle detectoren werden, ter beperking van het telverlies, voorzien van de nodige loodafscherming.



Figuur 4.5: Vervalanalyse van ^{11}C met behulp van de GM-detector I. De beschouwde detector blijkt lineair voor een telkadans lager dan 40000 tellen per minuut (dit is na 15 à 20 min op de hoofdgrafiek).

4.2.3. Productie van [1-¹¹C]acetylchloride: experimentele gegevens

4.2.3.1. [¹¹C]CO₂ en Grignardreagens

De productie van [1-¹¹C]acetaat, een tracer voor myocardiaal metabolisme, wordt in de literatuur uitvoerig beschreven (Pike *et al*, 1982; Kruijer *et al*, 1995). Op basis hiervan werd de reactie van [¹¹C]CO₂ met een Grignardreagens ontwikkeld en geoptimaliseerd.

Na de productie van ¹¹C en opvang van [¹¹C]CO₂ in de cryogene trap, zoals beschreven in 4.2.1. en 4.2.2., wordt het [¹¹C]CO₂ met een klein debiet (10 ml/min) door een oplossing van MeMgCl in THF geborreld.

Om de reactie van het [¹¹C]CO₂ met het Grignardreagens kwantitatief te laten verlopen moet (1) de MeMgCl-concentratie voldoende hoog zijn en (2) de reactie voldoende lang kunnen doorgaan. Om een optimale opvangcapaciteit te kunnen garanderen dient echter het volume van de Grignardoplossing voldoende groot te zijn. Een nadeel is dat te grote concentraties Grignard en te lange reactietijden tot vorming van niet-verwaarloosbare hoeveelheden [¹¹C]aceton en/of andere gemerkte nevenproducten kunnen leiden. Bovendien kan het gebruik van een te grote hoeveelheid Grignardreagens een negatieve invloed hebben op de specifieke activiteit van het eindproduct (zie 5.4.2.2.).

De reactie werd uitgevoerd bij kamertemperatuur gedurende 30 s. Een concentratie van 0,2 M MeMgCl in THF wordt gebruikt. Deze oplossing wordt voor elke synthese vers bereid door het verdunnen van een commercieel beschikbare 3 M oplossing (Aldrich) met THF (op natrium gedroogd met benzofenon als kleurindicator).

Niet weerhouden [¹¹C]CO₂ in het Grignardreagens wordt in deze proefopzet opgevangen in een wasfles met 100 ml 1M NaOH. Meting van de activiteit in de wasfles en het reactievaatje geeft de verdeling van [¹¹C]CO₂ weer en laat zo toe de opvang van [¹¹C]CO₂ in het Grignardreagens te controleren. Met een volume van 100 µl (20 µmol MeMgCl) werd telkens > 90 % van het geproduceerde [¹¹C]CO₂ in het reactievaatje opgevangen zonder een belangrijke invloed te hebben op de specifieke activiteit.

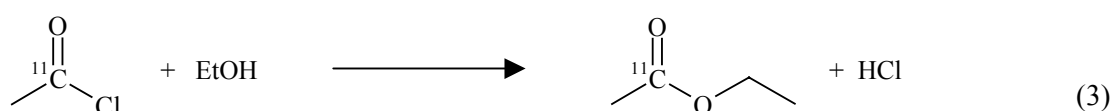
4.2.3.2. [1-¹¹C]Acetylchloride

Na 30 s wordt de reactie beëindigd door het toevoegen van een overmaat ftaloyldichloride (50 µl in 150 µl droge THF; 350 µmol). Vervolgens wordt het reactiemengsel gedurende 3 min

4. Synthese van koolstof-11-gemerkt acamprosaat

verwarmd en het gevormde $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride met behulp van een draagstroom helium (30 ml/min) overgedestilleerd in een gekoeld reactievatje ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Ter evaluatie van de synthese van $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride werd het opvangvatje gevuld met 1 ml ethanol en 10 μl triethylamine (katalysator en base). $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride reageert met ethanol tot $[1-^{11}\text{C}]$ ethylacetaat.



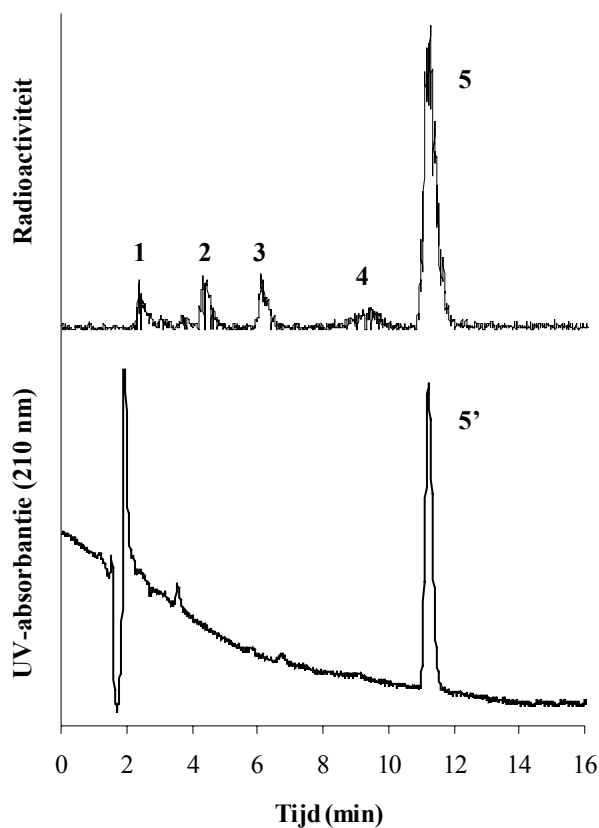
Om de retentie van de overgedestilleerde radioactiviteit in het reactiemengsel te controleren, wordt het dragergas na doorgang door de gekoelde ethanol doorheen een wasfles met 100 ml 1 M NaOH geleid.

Als verondersteld wordt dat de bovenstaande reactie kwantitatief verloopt dan kan door bepaling van de hoeveelheid $[1-^{11}\text{C}]$ ethylacetaat in het reactiemengsel het rendement van de synthese van $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride berekend worden. Voor de berekening van de opbrengst en het rendement van de reactie van $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ tot $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride wordt:

- (1) A.h.v. de geijkte radioactiviteitsdetector GM1 (zie figuur 4.3) de gecollecteerde hoeveelheid $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ bepaald.
- (2) De radioactiviteit in het reactievatje en wasfles gemeten (om redenen aangehaald in 4.2.2. minstens 2 uur na bestraling). De correctiefactor, besproken in 4.1.2, maakt een correcte vergelijking tussen de radioactiviteit in het reactievatje (1 ml) en de radioactiviteit in de wasfles (100 ml) mogelijk.
- (3) De verhouding $[1-^{11}\text{C}]$ ethylacetaat / ^{11}C -gemerkte nevenproducten in het reactiemengsel bepaald. Het is niet uitgesloten dat gedurende de 3 reactiestappen nevenproducten worden gevormd. Aangezien enkel $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride aanleiding geeft tot $[1-^{11}\text{C}]$ ethylacetaat moet voor de berekening van het rendement met deze verhouding rekening worden gehouden.

Om de verhouding aan gevormde radioactieve producten te bepalen wordt het reactiemengsel via HPLC in de verschillende radioactieve fracties gescheiden. De karakteristieken van deze HPLC- scheiding en een chromatogram worden weergegeven in figuur 4.6.

4. Synthese van koolstof-11-gemerkt acamprosaat



Figuur 4.6: HPLC-chromatogram van de scheiding van het reactieproduct na reactie van $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride met ethanol.

Kolom: Alltima C18, Alltech (4,6 mm × 250 mm; korreldiameter 5 μm)

Debiet: 1 ml/min

Mobiele fase: 35 % methanol in water

Injectievolume: 20 μl

Detectoren: UV-detector (210 nm) en NaI(Tl)-detector

(1,2,3 en 4) ^{11}C -gemerkte nevenproducten en (5) $[1-^{11}\text{C}]$ ethylacetaat

(5') standaard- ethylacetaat

De resultaten van de productie van $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride worden samengevat in tabel 4.3.

Tabel 4.3: De resultaten van de productie van $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride. Alle waarden werden gecorrigeerd voor radioactief verval naar EOB. De gemiddelde opbrengst en het gemiddelde rendement (n=5) worden weergegeven samen met hun 95 % confidentie-interval.

Experiment	Activiteit reactievatje (GBq)	Activiteit wasfles (GBq)	Fractie $[1-^{11}\text{C}]$ ethylacetaat (%)	Totale opbrengst $[1-^{11}\text{C}]$ ethylacetaat (GBq)	Rendement op basis van $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (%)
1	36,98	2,16	62,9	24,62	63,1
2	35,60	3,53	48,2	18,86	48,43
3	35,52	2,14	54,2	20,41	52,4
4	39,09	2,74	54,6	22,84	56,3
5	35,31	0,81	42,8	15,47	41,41
			gemiddelde	20,4 ± 4,4	52 ± 10

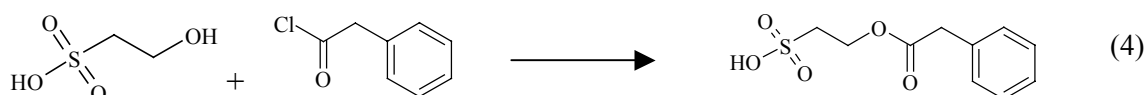
4.2.4. Besluit

[1-¹¹C]acetylchloride wordt gesynthetiseerd via een variatie van de synthese beschreven in de literatuur. Een PLC-geautomatiseerde opstelling voor de productie van [¹¹C]methyljodide werd hiervoor omgevormd en aangepast. 3 GM-radioactiviteitsdetectoren controleren serieel het verloop van de synthese van de precursor. In ongeveer 10 min (zie figuur 4.4) kan gemiddeld (n=5) $14,5 \pm 3,1$ GBq (392 ± 84 mCi) [1-¹¹C]acetylchloride geproduceerd worden. M.b.v. de radioactiviteitsdetector die de opvang van [¹¹C]CO₂ in de hotcel controleert (GM I), wordt het rendement van de synthese op basis van [¹¹C]CO₂ geschat op gemiddeld 52 ± 10 %.

4.3. Synthese van [¹¹C]acetylhomotaurine

4.3.1. Directe acyleringsreactie met homotaurine

Homotaurine of 3-aminopropaansulfonzuur heeft niet de meest gunstige fysische eigenschappen voor reactie met een zuurchloride. Wegens de hoge watergevoeligheid moeten alle reactie met zuurchlorides uitgevoerd worden in *droog* – watervrij – milieu. De hoge polariteit van homotaurine brengt echter mee dat deze molecule enkel oplosbaar is in water of mengsels van water en organische solventen. Ondanks deze waarneming wordt in eerste instantie toch de rechtstreekse reactie van de precursor [1-¹¹C]acetylchloride op homotaurine in watervrij milieu uitgetest. Deze overweging is gebaseerd op een publicatie die de rechtstreekse acylering van 2-hydroxy-ethaansulfonzuur met fenylacetylchloride beschrijft (Goldberg *et al*, 1942). De reactie werd uitgevoerd bij 140°C gedurende 4 uur (solvent onbekend).



Het is vanzelfsprekend dat een reactietijd van meerdere uren niet haalbaar is voor een synthese met ^{11}C . Of een reactietijd van maximaal een tiental min voldoende is voor de reactie van homotaurine met $[1-^{11}\text{C}]\text{acetylchloride}$ moet onderzocht worden. De eerste stap in het onderzoek met als doel de synthese van $[^{11}\text{C}]\text{acamprosaat}$ via directe acylering is de ontwikkeling van een scheidingsmethode voor homotaurine en acetylhomotaurine.

4.3.1.1. Ontwikkeling van een scheidingsmethode voor homotaurine en acetylhomotaurine

Vooraleer de opbrengst en het reactierendement van de synthese van $[^{11}\text{C}]\text{acamprosaat}$ kan bepaald worden, moet het product kunnen gescheiden worden van het uitgangspaan, de nevenproducten en het oplosmiddel. Bovendien is de zuiverheid, zowel chemisch als radiochemisch, van een radiofarmacon van groot belang (zie 3.4.2. en 3.4.3.). Daarom werd in eerste instantie gezocht naar een geschikte scheidingsmethode tussen acetylhomotaurine en homotaurine op semi-preparatieve schaal (mg-hoeveelheden).

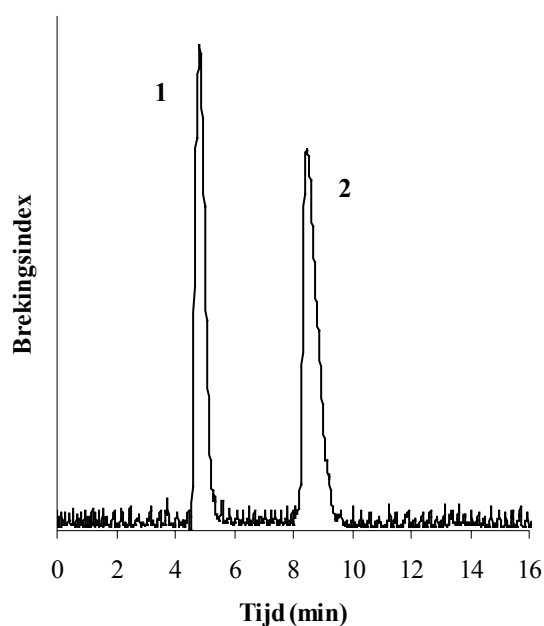
Beide moleculen zijn eerder kleine organische structuren met een uitgesproken hydrofiel karakter. Op basis van deze karakteristieken kunnen al enkele voorspellingen gedaan worden i.v.m. een mogelijke HPLC-methode. Ten eerste kan verwacht worden dat de retentie van zowel homotaurine als acetylhomotaurine op een stationaire fase van het type *omkeerfase* (C_{18} of C_8) vrij gering zal zijn. Het alternatief, het gebruik van een *normale fase* (silica), is onmogelijk wegens de onoplosbaarheid van beide stoffen in organische solventen. Ten tweede kan verwacht worden dat, mits een goede retentie van acetylhomotaurine op een stationaire fase, een scheiding met goede resolutie tussen product en uitgangspaan moet mogelijk zijn. De acylering van de aminefunctie van homotaurine betekent immers ongetwijfeld een belangrijke verandering in fysische karakteristieken van een dergelijke kleine molecule.

Een reeks HPLC-methodes werden uitgetoet. De omstandigheden en gebruikte materialen worden weergegeven in tabel 4.4.

Tabel 4.4: De scheiding van acetylhomotaurine en homotaurine d.m.v. semi-preparatieve HPLC: de gebruikte stationaire en mobiele fasen en de respectievelijk bereikte resoluties.

Experiment	HPLC-kolom	Eluens	Dimensies (mm)	Resolutie
1	Bio-Rad Bio-Sil C ₁₈	5 % MeOH in H ₂ O	10 × 250	< 1
2	Bio-Rad Bio-Sil C ₁₈	H ₂ O	10 × 250	1,87
3	Bio-Rad Bio-Sil C ₁₈	0,9 % NaCl in H ₂ O	10 × 250	2,96
4	Bio-Rad Bio-Sil C ₁₈	0,9 % NaCl in 10 mM Na ₂ PO ₄ in H ₂ O (pH=7)	10 × 250	2,60
5	Waters Spherisorb Silica	25 % MeOH in H ₂ O	10 × 250	0,67
6	Alltech Mixed Mode (C ₁₈ /Anion)	5 % MeOH in H ₂ O	4,6 × 250	< 1

De enige stationaire fase van de onderzochte waarop acetylhomotaurine voldoende retentie vertoonde was een sferische silicafase gecoat met een vloeibare octadodecyl-laag (C₁₈-omkeersfase). Deze werd geëluëerd met een methanol/watermengsel, water of een, al dan niet gebufferde, fysiologische natriumchlorideoplossing. Het beste resultaat qua resolutie werd bekomen met de niet-gebufferde 0,9 % NaCl-oplossing (zie tabel 4.4). Een HPLC-chromatogram voor deze scheiding wordt weergegeven in figuur 4.7.



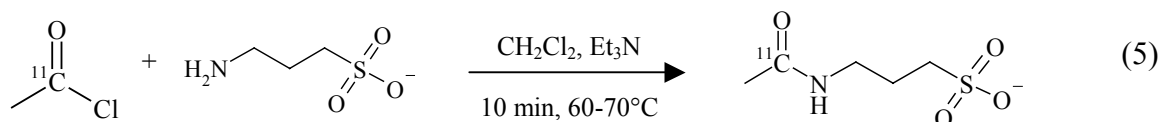
Figuur 4.7: HPLC-chromatogram voor de semi-preparatieve scheiding van homotaurine en acetylhomotaurine
 Kolom: Bio-Rad Bio-Sil C18 (10 × 250 mm ; korreldiameter: 10 µm); mobiele fase: 0,9 % NaCl in H₂O; debiet: 3 ml/min; detector: brekingsindex detector

(1) homotaurine en (2) acetylhomotaurine

Het gebruik van een dergelijke HPLC-scheidingsmethode werd ook beschreven voor de preparatieve scheiding van enkele [^{18}F]-radiofarmaca en [^{11}C]methionine (Ishiwata *et al*, 1993). Een 0,9 % NaCl-oplossing in water als mobiele fase kent een aantal voordelen. Ten eerste vermijden we op deze manier dat schadelijke en toxische solventen (methanol, acetonitrile,...), die courant aangewend worden als mobiele fase ter hoogte van de zuiveringstap in het productieproces, worden gebruikt. Een langdurige en meestal onvolledige verwijdering van deze solventen wordt hierdoor overbodig. Ten tweede vermijden we door het gebruik van de fysiologische NaCl-oplossing een extra productiestap waar het preparaat in een geschikt farmaceutisch medium moet worden gebracht. Nu is het preparaat klaar voor intraveneuze injectie vlak na het beëindigen van de collectie van de juiste radioactieve fractie.

4.3.1.2. Synthese van [^{11}C]acetylhomotaurine

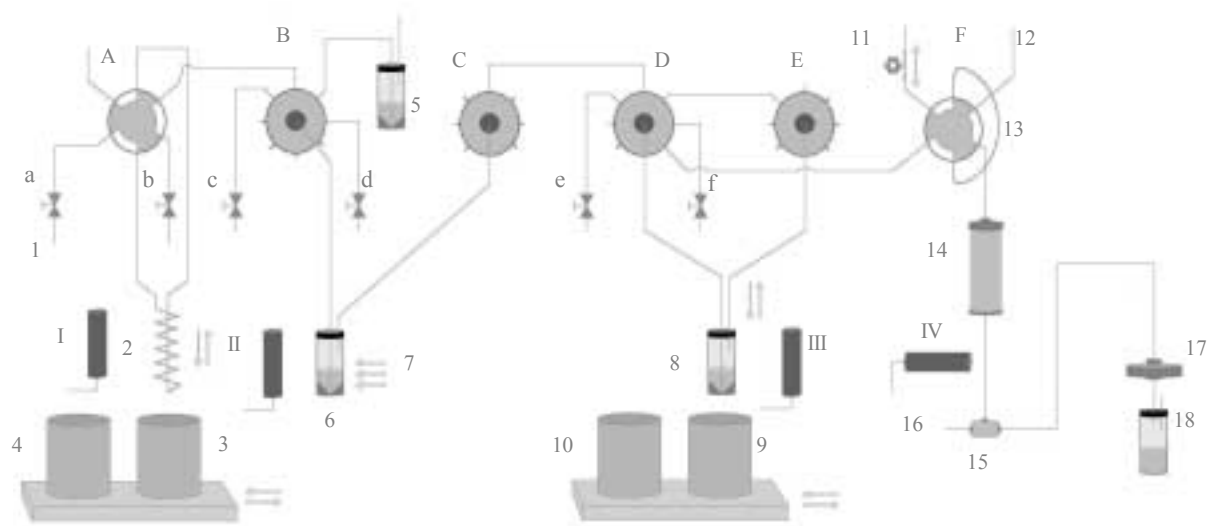
In navolging van de gekende synthese (zie reactie nr. 4) wordt homotaurine rechtstreeks geacyleerd met [$1\text{-}^{11}\text{C}$]acetylchloride.



[$1\text{-}^{11}\text{C}$]acetylchloride wordt geproduceerd zoals beschreven in 3.3.3. De precursor wordt opgevangen in een gekoeld (-40°C) reactievatje gevuld met homotaurine (2,0 mg; 14 μmol), triëthylamine als base en katalysator (10 μl , 72 μmol) and dichloromethaan als reactiesolvent (500 μL). Na het overdestilleren van [$1\text{-}^{11}\text{C}$]acetylchloride wordt het reactievatje gesloten en het reactiemengsel in een oliebad verwarmd tot 60-70 $^\circ\text{C}$. Gedurende 10 min wordt het reactiemengsel magnetisch geroerd. Vervolgens wordt het reactievatje terug geopend en het solvent verdampt m.b.v. een heliumstroom (30 ml/min). Het reactiemengsel wordt nadien opgelost in mobiele fase (250 μl) en m.b.v. een peristaltische pomp getransporteerd naar de HPLC-loop. De oplossing wordt gescheiden via HPLC (zie 4.3.1.1.) in de hotcel. De radioactieve fractie met dezelfde retentietijd als referentie acetylhomotaurine wordt opgevangen en na doorgang door een bacteriënfilter (poriëngrootte 0,2 μm) gecollecteerd in een steriel recipiënt.

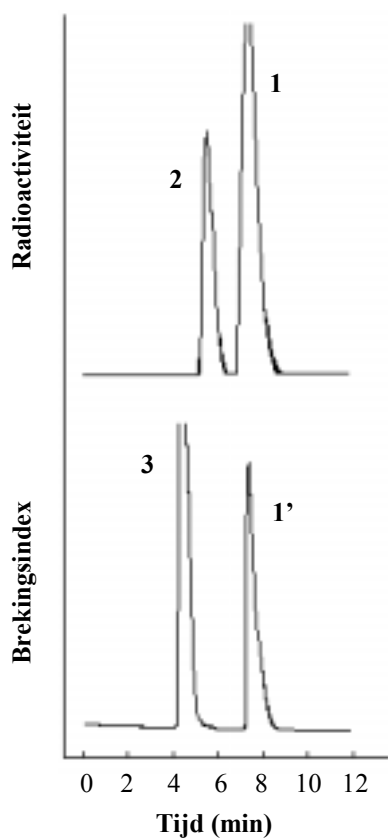
Een schematische voorstelling van de syntheseopstelling voor de synthese van [^{11}C]acetylhomotaurine via directe acylering van homotaurine is weergegeven in figuur 4.8.

Dit is dezelfde opstelling als deze gebruikt voor de synthese van $[1-^{11}\text{C}]$ acetylacetaat (zie figuur 4.3), maar vervolledigd met een HPLC-opstelling voor de opzuivering van het preparaat. Het PLC-programma werd uitbereid met een gedeelte voor de synthese van $[^{11}\text{C}]$ acetylhomotaurine en de HPLC-scheiding.



Figuur 4.8: Schematische voorstelling van de geautomatiseerde opstelling voor de synthese van $[^{11}\text{C}]$ acetylhomotaurine: (A) en (F) 6-weg kraan; (B),(C),(D) en (E) 8-weg kraan; (a) regelbare debieteter (2 l/min); (b) regelbare debietmeter (10 ml/min); (c) naalddventiel (1 à 2 ml/min); (d) regelbare debietmeter (30 ml/min); (e) naalddventiel (1 à 2 ml/min); (f) regelbare debietmeter (30 ml/min); (1) inlaat $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ van doelwithubouder; (2) spiraal; (3) vloeibare argon in Dewarvat; (4) water op kamertemperatuur; (5) vaatje onder druk met fitaloyldichloride; (6) reactievaatje met Grignardreagens; (7) warme luchtblazer; (8) reactievaatje voor acetyleringsreactie; (9) Dewar met gekoelde aceton (-40°C); (10) warm oliebad; (11) peristaltische pomp; (12) HPLC pomp; (13) HPLC loop (250 μl); (14) HPLC kolom; (15) driewegkraan; (16) waste; (17) bacteriënfilter; (18) opvangrecipiënt in loden vervoercontainer (niet weergegeven); (I),(II),(III) en (IV) Geiger-Müller radioactiviteitsdetectoren.

Een typisch chromatogram voor de semi-preparatieve scheiding tijdens de synthese, wordt weergegeven in figuur 4.9. Voor het preparatieve chromatogram in figuur 4.9 is een hoeveelheid standaard-acetylhomotaurine toegevoegd. Door de lage gevoeligheid van de brekingsindexdetector zijn dragerhoeveelheden immers niet te meten. Tijdens een ‘normale’ synthese wordt de hoeveelheid *koud* product geminimaliseerd met het oog op een hoge specifieke activiteit.



Figuur 4.9: Semi-preparatieve HPLC-scheiding in de hotcel; kolom: Bio-Rad Bio-Sil C₁₈ (10 × 250 mm, korreldiameter: 10 µm); mobiele fase: 0,9 % NaCl in H₂O; debiet: 3 ml/min; detectoren: brekingsindex detector; GM-detector (IV)

(1) [¹¹C]acetylhomotaurine; (1') standaard-acetylhomotaurine; (2) niet-geïdentificeerd nevenproduct gemerkt met ¹¹C en (3) homotaurine

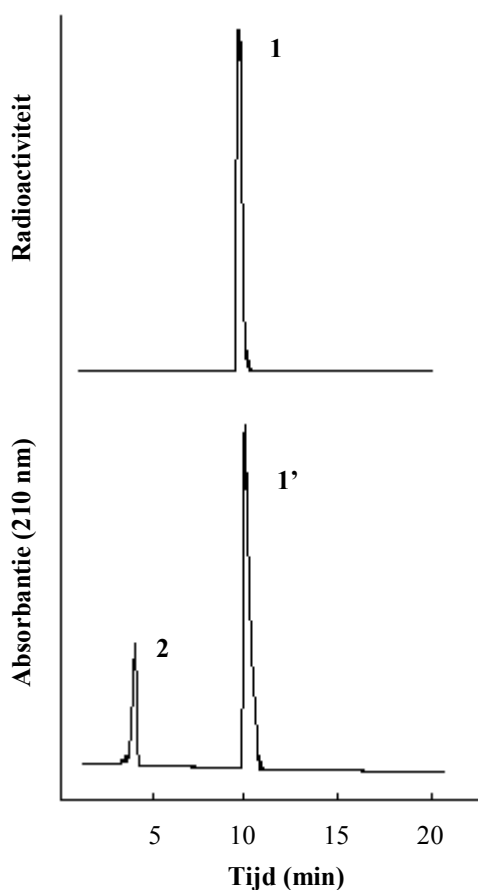
4.3.1.3. Rendement en opbrengst

Een aantal syntheses (n=26) werd uitgevoerd zoals beschreven in 3.4.1.2. De radioactiviteit in het gescheiden eindpreparaat wordt onmiddellijk na de productie bepaald m.b.v. een gekalibreerde ionisatiekamer (Capintec). De gemiddelde opbrengst na een standaardbestraling (stikstofgas onder een druk van 10 bar, 18 MeV protonen, bundelintensiteit 15 µA, 20 min bestraaltijd) bedroeg op het einde van de synthese (EOS) $0,78 \pm 0,22$ GBq ($21 \pm 6,1$ mCi ; max. 50 mCi – min. 1 mCi).

M.b.v. de geijkte GM-detector in de hotcel (zie 4.1.2.) kan het rendement van de synthese op basis van de gecollecteerde hoeveelheid [¹¹C]CO₂ geschat worden. Voor deze reeks experimenten bedroeg het rendement - gecorrigeerd voor radioactief verval - gemiddeld 6,4 % $\pm$ 9,1 % (max. 15 % - min. 1%).

4.3.1.4. Identificatie van het synthesepreparaat

Ter bevestiging van de identiteit van de gecollecteerde radioactieve fractie uit het semi-preparatieve HPLC-chromatogram, wordt telkens het bekomen preparaat onderzocht met behulp van analytische HPLC. Een kleine hoeveelheid preparaat wordt tezamen met standaard-acetylhomotaurine geanalyseerd. Een voorbeeld van een analytisch HPLC-chromatogram is te zien in figuur 4.10.



Figuur 4.10 : Analytische HPLC ter identificatie van het synthesepreparaat. Kolom: Bio-Rad Bio-Sil C18 (10 × 250 mm; korrelgrootte: 10 µm); mobiele fase: 0,001 M NaH₂PO₄ (pH = 2 met fosforzuur); debiet: 3 ml/min; injectievolume: 250 µl; detectoren: UV-detector (210 nm) en NaI(Tl)-radioactiviteitsdetector.

(1) [¹¹C]acetylhomotaurine; (1') standaard acetylhomotaurine en (2) NaCl-frontpiek

In het chromatogram (figuur 4.10) is duidelijk te zien dat standaard-acetylhomotaurine en ¹¹C-gemerkt product tezelfdertijd elueren (retentietijd: 9-10 min). Met grote zekerheid kan gesteld worden dat beide signalen afkomstig zijn van hetzelfde product.

4.3.1.5. Samenvatting en besluit

[^{11}C]acetylhomotaurine of [^{11}C]acamprosaat kan gesynthetiseerd worden via directe acylering van homotaurine met [$1\text{-}^{11}\text{C}$]acetylchloride. Zuivering van het ruwe synthesesmengsel gebeurt d.m.v. semi-preparatieve omkeerfase HPLC met 0,9 % NaCl in water als eluens. Na filtratie doorheen een bacteriënfilter is het radiofarmacon klaar voor gebruik. De totale synthesesetijd bedraagt ongeveer 35 min. Gemiddeld ($n = 26$) werd $0,8 \pm 1,2$ GBq (21 ± 31 mCi) [^{11}C]acetylhomotaurine geproduceerd.

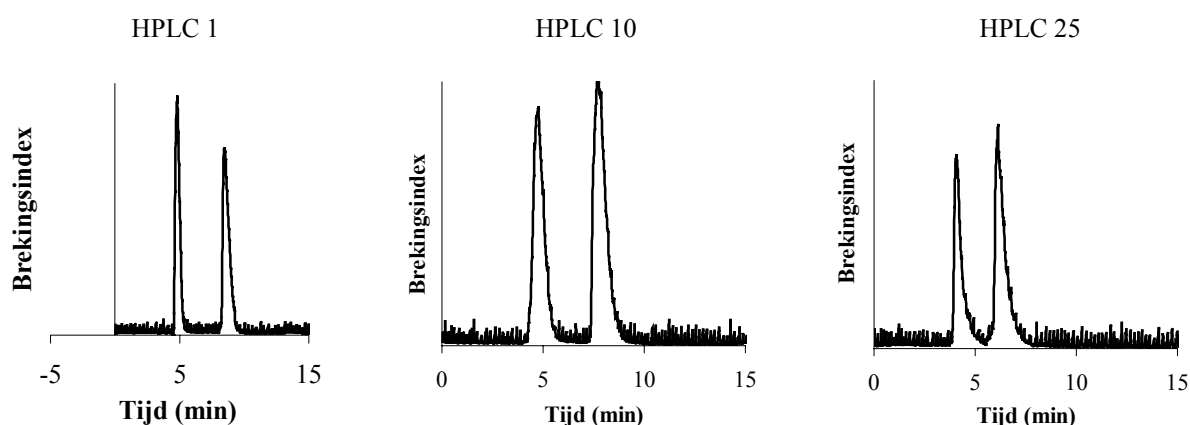
Om 2 belangrijke redenen voldoet deze syntheseseweg *niet* voor de productie van ^{11}C -acamprosaat met het oog op farmacodynamische studies. In de eerste plaats blijkt de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van de productie met betrekking tot het radiochemisch rendement ruim onvoldoende. Hierdoor schommelde de opbrengst van maximaal 1,85 GBq (50 mCi) tot minimaal 0,037 GBq (1 mCi). De laagste opbrengst is misschien nog net voldoende voor onderzoek in kleinere proefdieren zoals muizen en ratten, maar ontoereikend voor onderzoek in grotere proefdieren en de mens. Vermoedelijk is de onoplosbaarheid van homotaurine in het gebruikte reactiesolvent (dichloromethaan) de belangrijkste oorzaak van de grote fluctuaties in de reactieopbrengst. Constant roeren van het reactiemengsel en het gebruik van andere solventen zoals THF, acetonitrile en triethylamine bleken geen nuttige alternatieven.

Een tweede reden om de besproken productiewijze niet langer te volgen, is het falen van de gebruikte opzuiveringsmethode. Zoals besproken in 3.4.1.1. wordt acetylhomotaurine gescheiden van het uitgangproduct homotaurine met 0,9 % NaCl in water als eluens op een C_{18} -omkeerfase HPLC-kolom. Het preparatieve chromatogram (figuur 4.9) toont aan dat de acetylhomotaurinefractie met goede resolutie gescheiden is van andere gemerkte producten in het reactiemengsel (*basislijnscheiding*). Er dient evenwel opgemerkt te worden dat de chemische- en radiochemische zuiverheid van het product scherp in de gaten moet worden gehouden. Ten eerste is homotaurine in veel hogere concentraties aanwezig in het ruwe synthesesmengsel dan het reactieproduct acetylhomotaurine. Daardoor is het mogelijk dat door *tailing* van de homotaurinefractie een relatief kleine maar fysiologisch significante hoeveelheid van deze stof in de opvangfractie terecht komt. Bovendien is de gebruikte brekingsindexdetector (homotaurine is niet UV-actief) niet gevoelig genoeg om dergelijke hoeveelheden te detecteren.

Ten tweede is de basislijnscheiding tussen de verschillende gemerkte moleculen zeer nipt. Een kleine verschuiving van retentietijden zou een belangrijke invloed kunnen hebben op de radiochemische zuiverheid van het eindpreparaat.

Ten derde stelt het gebruik van 0,9 % NaCl in water de stationaire fase van de semi-preparatieve HPLC-kolom zwaar op de proef. Daarom wordt het zeer corrosieve eluens na

elke synthese weggespoeld met zuiver water en de kolom tussentijds bewaard op 70 % ethanol in water. Deze regeneratieprocedure kon echter niet verhinderen dat na verloop van tijd (in praktijk een 25-tal separaties) de separatie resultaten verslechterden: retentietijden en resolutie daalden en chemische- en radiochemische onzuiverheden slopen in het preparaat. Hierdoor was een HPLC-kolom na korte tijd onbruikbaar (zie figuur 4.11).



Figuur 4.11: De semi-preparatieve chromatografie na 1, 10 en 25 separaties: door het inwerken van het corrosieve 0,9 % NaCl in water verschuiven de retentietijden van homotaurine en acetylhomotaurine. Voor de separatieomstandigheden wordt verwezen naar figuur 4.9.

Om bovenstaande redenen werd de productie van ^{11}C -gemerkt acamprosaat zoals het werd voorgesteld in deze paragraaf, gestopt. In de zoektocht naar een alternatieve synthesemanier werd gepoogd de rendementproblemen en de separatieproblemen met één cruciale ingreep op te lossen. Het principe van de directe acylering van homotaurine met $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride werd hierbij onhoudbaar.

4.3.2. Acyleringsreactie met fenyl-3-aminopropaansulfonaat

Zoals besproken in 4.3.1.5. wordt de rechtstreekse acyleringsreactie verlaten omwille van een onreproduceerbare syntheseopbrengst en preparatieve scheiding. Om deze problemen op te lossen werd een nieuwe synthese uitgewerkt waarbij de sulfonzure functie van homotaurine verbonden werd met een beschermende groep. Aan deze beschermende groep worden enkele voorwaarden gesteld:

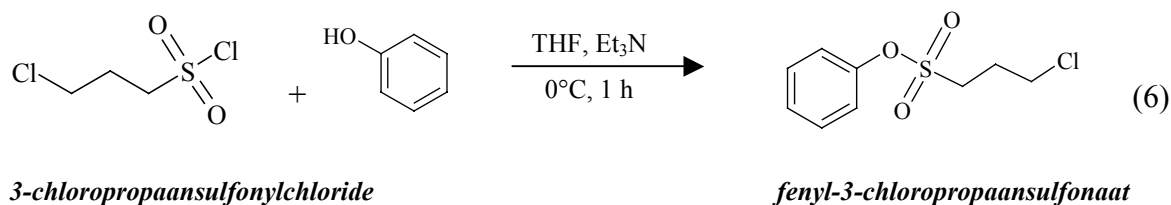
1. Een snelle, kwantitatieve en selectieve afsplitsingreactie met vorming van [^{11}C]acetylhomotaurine.
2. Goede oplosbaarheid van het uitgangspunt in de bruikbare solventen (dichloromethaan, THF,...).
3. Een reproduceerbare scheiding tussen het ^{11}C -gemerkt product en uitgangspunt.
4. Een eenvoudige en gevoelige detectie van product en uitgangspunt.

Het belangrijkste selectie criterium bij de zoektocht naar een geschikte beschermende groep is vanzelfsprekend de eerste voorwaarde. In de literatuur zijn enkele voorbeelden te vinden van reacties waarbij de binding tussen een sulfonaatfunctie en een beschermende groep op een selectieve wijze verbroken wordt. In de beschreven gevallen worden isobutylesters (Xie *et al*, 1996), 2,2,2-trifluoroethylesters (Meese *et al*, 1984) of neopentylesters (Roberts *et al*, 1997) gebruikt. Deze reacties zijn echter van weinig nut in het kader van de ^{11}C synthese: tijdrovend en het gebruik van schadelijke reagentia en solventen die een extra scheiding noodzakelijk maken. Een mogelijk alternatief is het gebruik van sulfonylesters van fenol of sulfonamides van imidazol; stabiele verbindingen die gemakkelijk verbroken worden door inwerking van een base (Plattner *et al*, 1988 en Dannley *et al*, 1966). Omdat esters doorgaans gevoeliger zijn voor basische hydrolyse dan amides werd fenol als beschermende groep gekozen. Bovendien is te verwachten dat de 3-aminopropaansulfonylester van fenol goed oplosbaar is in organische solventen, eenvoudiger te scheiden is van het geacetylerde product en een gevoelige UV-detectie mogelijk maakt.

4.3.2.1. Synthese van fenyl-3-aminopropaansulfonaat en fenyl-(N)acetyl-3-aminopropaansulfonaat

In tegenstelling tot homotaurine is de fenylester niet commercieel beschikbaar. Daarom wordt dit product via een eenvoudige organische synthese in 3 stappen gesynthetiseerd.

Stap 1: (Truce *et al*, 1969)



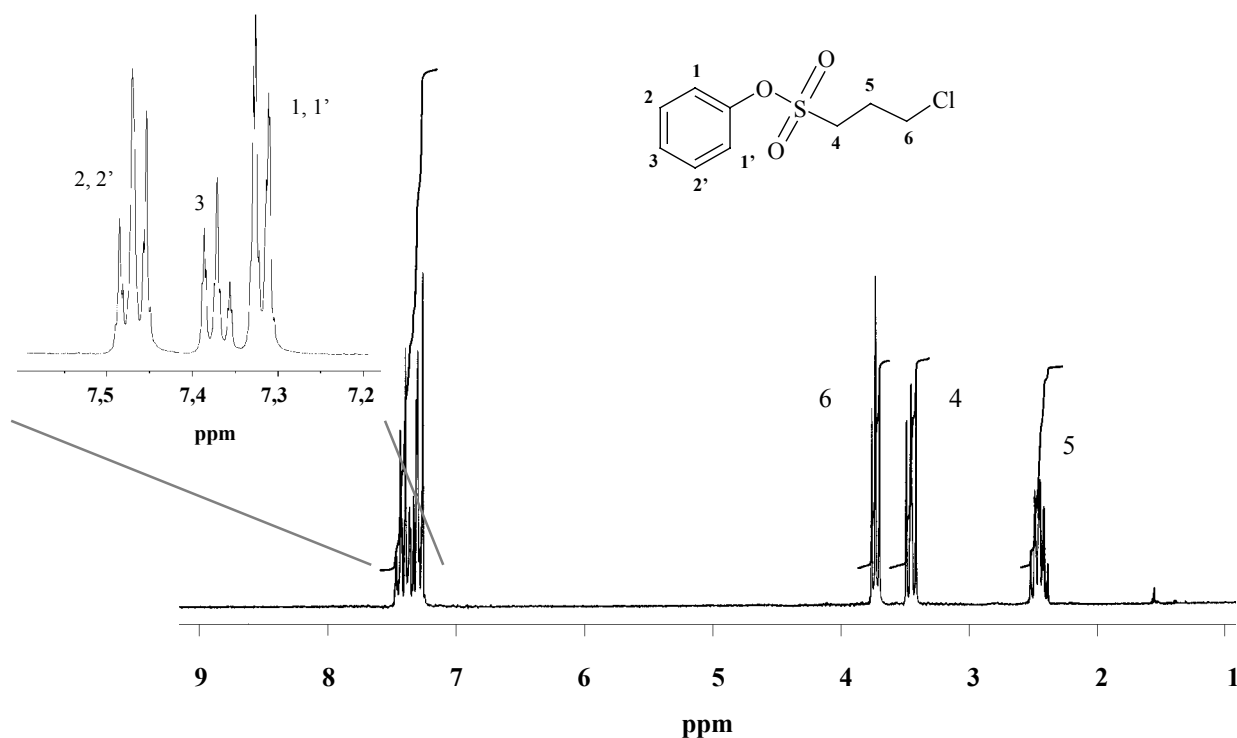
Onder argonatmosfeer wordt 4,71 g fenol (50 mmol) opgelost in 5 ml THF (gedroogd op natrium met benzofenon als indicator) en de oplossing wordt gekoeld in een ijsbad. Langzaam wordt 8,85 g 3-chloropropaansulfonylchloride (50 mmol; 6,8 ml) toegevoegd. Vervolgens wordt al roerend 5 g triëthylamine (50 mmol; 6,9 ml) in 5 ml droge THF over een periode van 0,5 uur toegedruppeld. Daarna wordt het reactiemengsel nog 0,5 uur geroerd bij 0°C.

Na de reactie wordt het neergeslagen triëthylamine hydrochloride afgefiltreerd en het neerslag 3 × nagespoeld met droge THF. De gecollecteerde THF-fracties worden vervolgens bij verminderde druk uitgedampt (rotavapor).

De resterende lichtgele olie wordt opgezuiverd m.b.v. gravitatiechromatografie op silicagel met hexaan/diëthylether (5:1) als eluens.

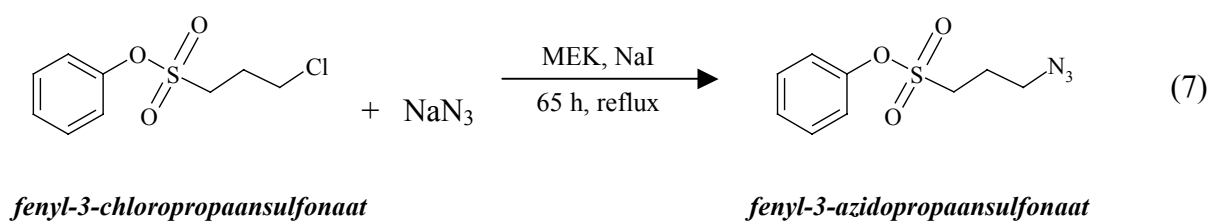
De zuiverheid van het product wordt gecontroleerd m.b.v. dunne laag chromatografie (*thin layer chromatography* of TLC). De R_f-waarde bedraagt 0,63 na elutie op silica met pentaan/ethylacetaat (1:1). Het rendement van de reactie bedraagt 70 %. De identiteit van het product wordt gecontroleerd m.b.v. [¹H]NMR-spectroscopie (spectrometer van het type Bruker AM-500 – S4, vakgroep organische chemie). Het spectrum, opgenomen in CDCl₃, is weergegeven in figuur 4.12.

4. Synthese van koolstof-11-gemerkt acamprosaat



Figuur 4.12: ^1H NMR-spectrum van het opgezuiverde syntheseproduct van stap 1 opgenomen in CDCl_3 bij 500 MHz.

Stap 2 : (Adamczyk *et al*, 1998)



Onder argonatmosfeer wordt 8 g fenyl-3-chloropropaansulfonaat (34 mmol) opgelost in 60 ml methylethylketon (MEK). Hieraan worden 2 g natriumjodide (10 mmol) en 3,4 g natriumazide (52 mmol) toegevoegd. Dit mengsel reageert vervolgens gedurende 66 uur onder reflux.

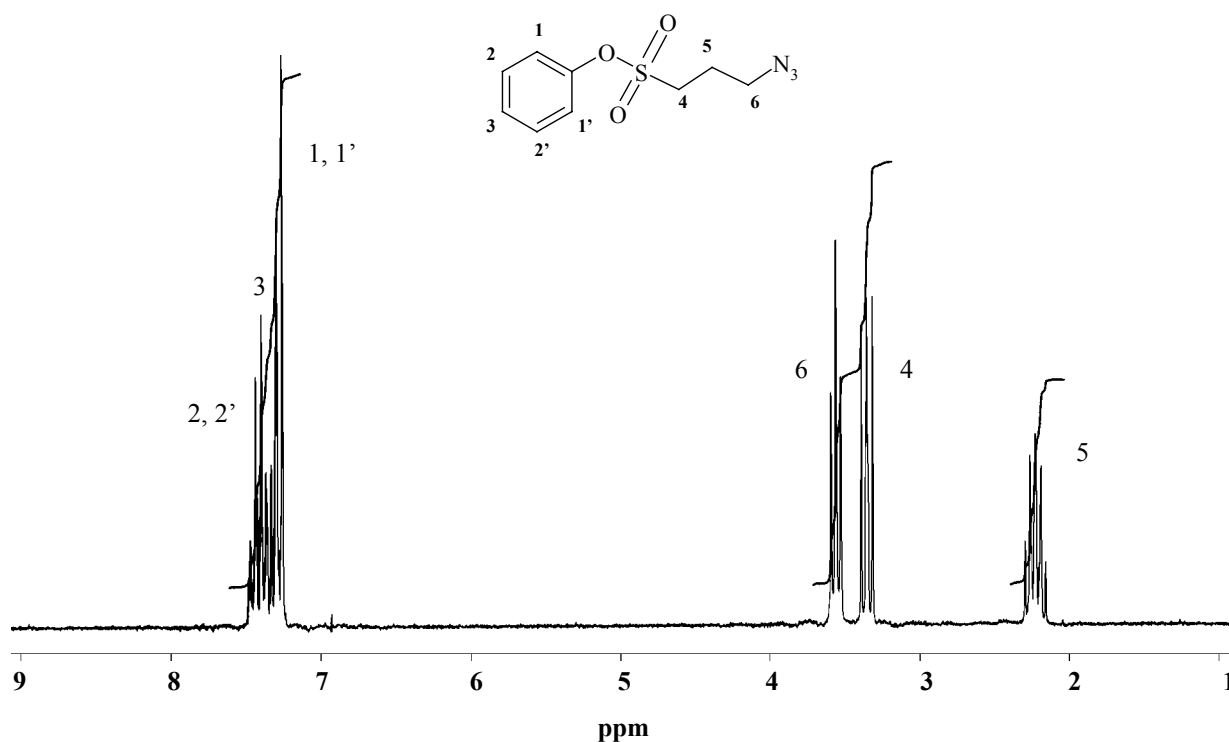
Na de reactie wordt het neerslag afgefiltreerd en het neerslag 3 $\times$ gespoeld met MEK. De MEK-fracties worden daarna bij verminderde druk uitgedampt (rotavapor). De bekomen

4. Synthese van koolstof-11-gemerkt acamprosaat

substantie wordt terug opgelost in 20 ml dichloromethaan en het neerslag afgefiltreerd. Het filtraat en de wasfracties van het neerslag worden uitgedampt (rotavapor).

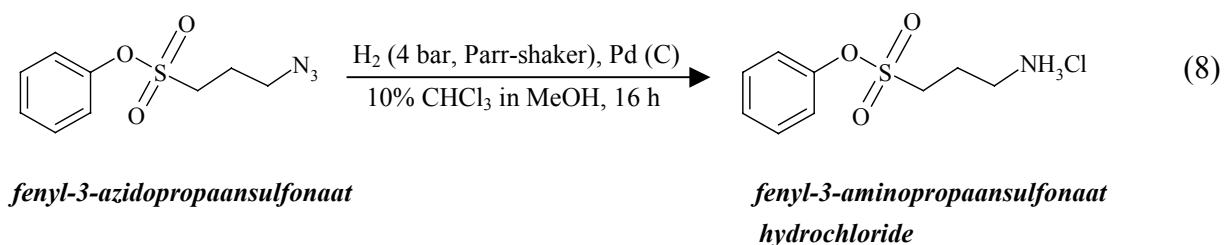
De resterende gele olie wordt opgezuiverd met gravitatiechromatografie op silicagel met hexaan/ethylacetaat (17:3) als eluens.

De zuiverheid van het product wordt gecontroleerd m.b.v. TLC. De R_f-waarde bedraagt 0,58 na elutie op silica met pentaan/ethylacetaat (1:1). Het rendement van de reactie is 82 %. De identiteit van het product wordt gecontroleerd m.b.v. [¹H]NMR- en IR-spectroscopie. Zoals verwacht voor een azide vertoont het product een absorptieband bij 2100 cm⁻¹ (karakteristiek signaal van N₃-stretching). Het [¹H]NMR spectrum is weergegeven in figuur 4.13.



Figuur 4.13: [¹H]NMR-spectrum van het opgezuiverde syntheseproduct van stap 2 opgenomen in CDCl₃ bij 500 MHz.

Stap 3: (Adamczyk *et al*, 1998)



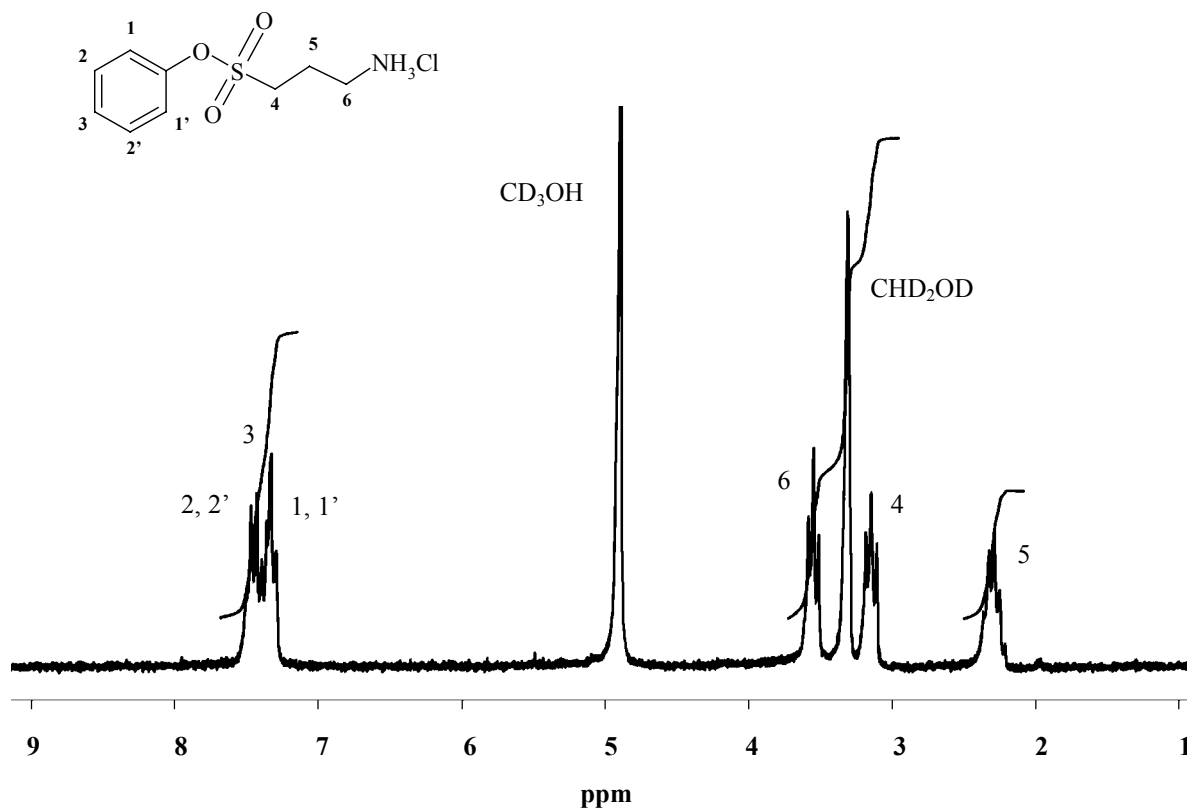
6,5 g fenyl-3-azidopropaansulfonaat (27 mmol) wordt opgelost in 100 ml 10 % chloroform in methanol. Hieraan wordt 0,65 g 10 % palladium op actieve kool toegevoegd. Dit mengsel wordt onder waterstofatmosfeer gebracht (4 bar) en 16 uur geschud in een Parr-shaker.

Na reactie wordt de katalysator afgefilterd en 2 × nagespoeld met 10 % chloroform in methanol. De fracties worden uitgedampt (rotavapor) en de vaste substantie wordt 2 maal gewassen in diëthylether. Tenslotte wordt de vaste stof gekristalliseerd in ethylacetaat, de witte fenyl-3-aminopropaansulfonaat hydrochloridekristallen afgefilterd en gedroogd onder vacuüm.

De zuiverheid van het product wordt gecontroleerd m.b.v. TLC. Fenyl-3-aminopropaansulfonaat hydrochloride vertoont geen elutie op silica met pentaan/ethylacetaat (1:1) ($R_f \approx 0$). Het rendement van de reactie is 60 %. De identiteit van het product wordt gecontroleerd [^1H]NMR-spectroscopie in CD_3OD bij 200 MHz.

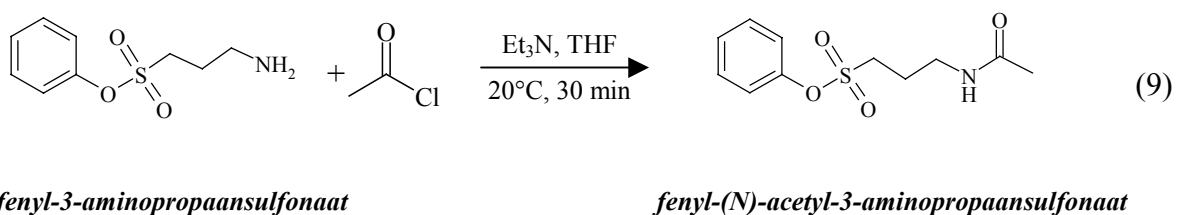
Het [^1H]NMR spectrum (spectrometer van het type Varian Gemini-200 – S4, vakgroep organische chemie) is weergegeven in figuur 4.14.

4. Synthese van koolstof-11-gemerkt acamprosaat



Figuur 4.14: $[^1\text{H}]$ NMR-spectrum van het opgezuiverde syntheseproduct van stap 3 opgenomen in CD_3OD bij 200 MHz.

Stap 4:



Onder argonatmosfeer worden 100 mg fenyl-3-aminopropaansulfonaat hydrochloride (0,4 mmol) en 112 μl triëthylamine (0,8 mmol) opgelost in 0,5 ml THF. Al roerend wordt druppelsgewijs 23 μl acetylchloride (0,4 mmol) in 0,5 ml THF toegevoegd. Het reactiemengsel wordt vervolgens nog 30 min geroerd bij kamertemperatuur. Na de reactie

wordt het oplosmiddel uitgedampt. De substantie wordt terug opgelost in 10 % chloroform in diëthylether en het neerslag afgefiltreerd. Ten slotte wordt het neerslag $2 \times$ gespoeld en het filtraat onder verminderde druk uitgedampt. Het product wordt niet verder opgezuiverd.

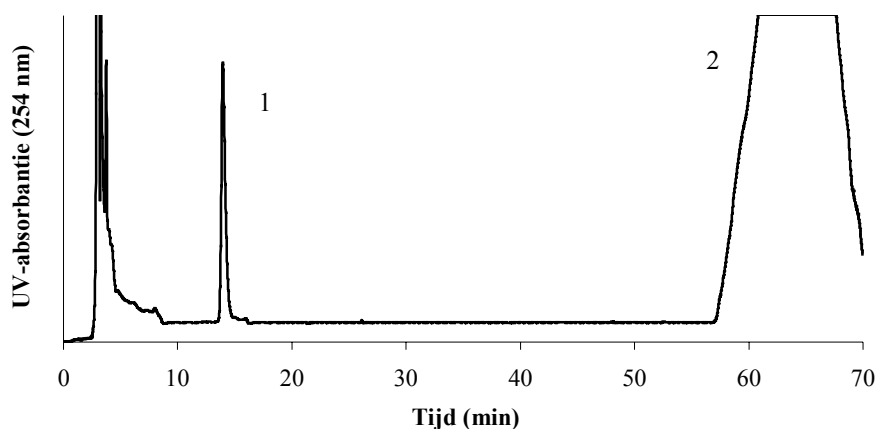
De omzetting van fenyl-3-aminopropaansulfonaat hydrochloride naar fenyl-(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat en de zuiverheid van het product worden gecontroleerd m.b.v. TLC. De R_f-waarde bedraagt 0,07 na elutie op silica met pentaan/ethylacetaat (1:1).

4.3.2.2. Ontwikkeling van een scheidingsmethode tussen fenyl-3-aminopropaansulfonaat en fenyl-(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat

De ontwikkeling van een geschikte scheidingsmethode tussen fenyl-3-aminopropaansulfonaat en fenyl-(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat is gebaseerd op de resultaten van de dunne laag chromatografie gedurende de synthese van beide stoffen. Zowel fenyl-3-aminopropaansulfonaat als fenyl-(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat vertonen een hoge affiniteit voor de stationaire silicafase (zie 4.3.2.1.).

Om deze reden wordt de voorkeur gegeven aan een scheiding op basis van normale-fase chromatografie. Met behulp van TLC wordt de ideale eluenssamenstelling bepaald. Vanwege zijn laag kookpunt wordt dichloromethaan (40°C) als basis voor het eluens verkozen. Het eluens zal immers na scheiding zo snel en volledig mogelijk moeten verwijderd worden. Verschillende co-solventen zoals methanol, aceton en ethylacetaat werden uitgetest. Met het mengsel dichloromethaan/ethylacetaat in een verhouding 3:1 worden de beste resultaten qua resolutie en retentietijden behaald. De R_f-waarden voor dit eluens op silicagel zijn voor fenyl-3-aminopropaansulfonaat en fenyl-(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat respectievelijk 0,08 en 0,14.

Op basis van deze gegevens werd een semi-preparatieve HPLC-scheiding ontwikkeld. In figuur 4.16 worden een chromatogram en de omstandigheden van de HPLC-scheiding weergegeven.



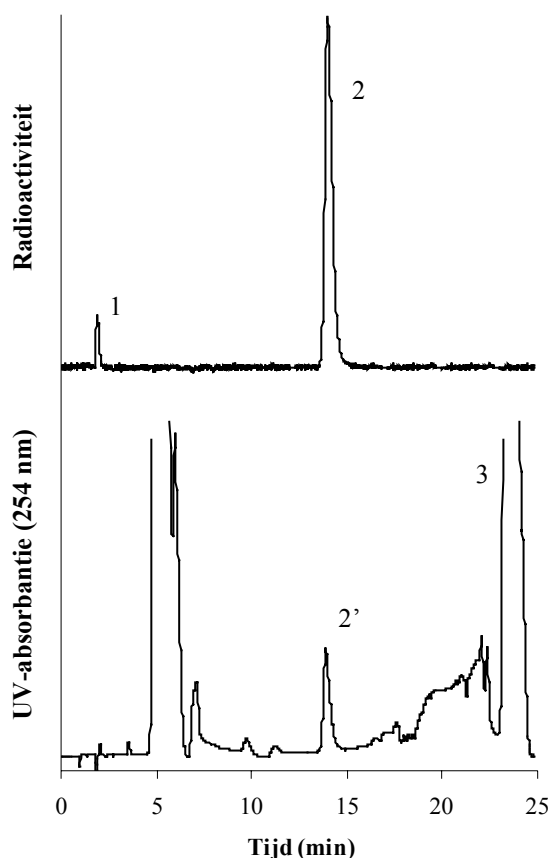
Figuur 4.16: Semi-preparatieve HPLC-scheiding tussen standaard-fenyl-(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat (2,5 mg) en standaard-fenyl-3-aminopropaansulfonaat (10 µg). Kolom: Waters Spherisorb Silica (10 × 250 mm, korreldiameter: 10 µm); mobiele fase: dichloromethaan/ethylacetaat (3:1); debiet: 5 ml/min; injectievolume: 250 µl; detector: UV-detector (254 nm); (1) fenyl-(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat en (2) fenyl-3-aminopropaansulfonaat.

4.3.2.3. Synthese van fenyl-[¹¹C](N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat

[1-¹¹C]acetylchloride wordt geproduceerd zoals beschreven in 3.3.3. De precursor wordt opgevangen in een gekoeld (-40°C) reactievatje. Dit bevat een mengsel van 2,5 mg fenyl-3-aminopropaansulfonaat hydrochloride (9,9 µmol) in droge THF (500 µl). Triëthylamine (14 µl, 100 µmol) is de base en katalyseert de reactie.

Onmiddellijk na de collectie van [1-¹¹C]acetylchloride wordt het reactiemengsel opgewarmd en het oplosmiddel wordt met een heliumstroom (30 ml/min) uitgedampt. Vervolgens wordt het reactiemengsel opgelost in mobiele fase (250 µl) en m.b.v. een peristaltische pomp getransporteerd naar de HPLC-loop. Een typisch chromatogram voor de semi-preparatieve scheiding tijdens de synthese van fenyl-[¹¹C](N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat is weergegeven in figuur 4.17.

De radioactieve fractie met dezelfde retentietijd als standaard-fenyl-(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat wordt opgevangen. Daarna wordt de mobiele fase met een heliumstroom (100 ml/min) uitgedampt. Het syntheseproduct wordt tenslotte terug opgelost in 5 ml methanol en m.b.v. een peristaltische pomp getransporteerd naar een afgesloten recipiënt.



Figuur 4.17: Semi-preparatieve HPLC-scheiding in de hotcel voor de synthese van fenyl- ^{11}C -(N)acetyl-3-aminopropaansulfonaat.

Kolom: Waters Spherisorb Silica (10×250 mm, korreldiameter: $10\ \mu\text{m}$)

Mobiele fase: dichloromethaan/ethylacetaat (3:1) – na elutie van het syntheseproduct wordt de kolom geëluëerd met 100 % methanol

Debiet: 5 ml/min

Injectievolume: 250 μl

Detectoren: UV-detector (254 nm) en GM-detector IV

(1) Niet-geïdentificeerd gemerkt nevenproduct; (2) fenyl- ^{11}C -(N)acetyl-3-aminopropaansulfonaat; (2') drager fenyl-(N)acetyl-3-aminopropaansulfonaat en (3) fenyl-3-aminopropaansulfonaat

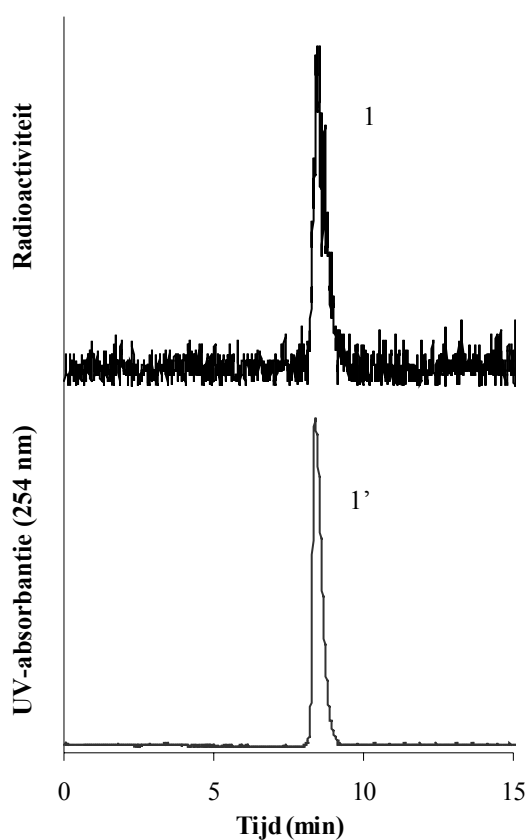
De syntheseopstelling voor deze synthese is quasi dezelfde als weergegeven in figuur 4.8 (3.4.1.2.). Een uitbreiding was echter nodig voor het uitdampen van de mobiele fase, het terug in oplossing brengen van het preparaat en het transport van het product naar een afgesloten recipiënt. Het PLC-programma werd aangepast aan de nieuwe reactiecondities en uitgebreid voor de bewerkingen na HPLC.

4.3.2.4. Radiochemisch rendement en opbrengst

Een beperkt aantal ($n=10$) syntheses werd uitgevoerd zoals beschreven in 4.3.2.3. De radioactiviteit in het gescheiden eindpreparaat werd onmiddellijk na de productie bepaald m.b.v. een gekalibreerde ionisatiekamer (Capintec). De gemiddelde opbrengst na een standaardbestraling bedraagt $2,7 \pm 1,7$ GBq (72 ± 46 mCi). Het gemiddelde rendement (gecorrigeerd voor radioactief verval) ten opzichte van ^{11}C CO₂ is 26 ± 16 % (max. 45 %, min. 19 %).

4.3.2.5. Identificatie van het synthesepreparaat

Ter bevestiging dat de opgevangen radioactieve fractie fenyl- ^{11}C -(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat is, wordt het preparaat onderzocht met behulp van analytische HPLC. Een kleine hoeveelheid preparaat wordt tezamen met standaard-fenyl-(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat geanalyseerd. Een voorbeeld van de analytische HPLC en de scheidingscondities zijn te zien in figuur 4.18.



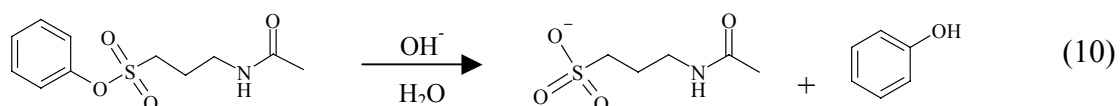
Figuur 4.18: Analytische HPLC ter identificatie van het syntheseproduct: kolom: Beckmann C₁₈ (4,6 × 250 mm ; korreldiameter: 5 μm); mobiele fase: 40 % methanol in water; debiet: 1 ml/min; injectievolume: 20 μl; detectoren: UV-detector (254 nm) en NaI(Tl)-detector.

(1) fenyl- ^{11}C -(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat en (1') standaard-fenyl-(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat

In figuur 4.18 is duidelijk te zien dat standaard fenyl-(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat en het radioactief gemerkte product tegelijkertijd elueren (retentietijd: 8-9 min). Met grote zekerheid kan gesteld worden dat beide signalen afkomstig zijn van hetzelfde product, nl. fenyl- ^{11}C -(N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat.

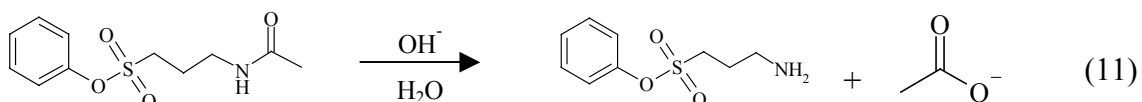
4.3.2.6. Hydrolyse van de sulfonaatester

In de inleiding van deze paragraaf werden verschillende eisen gesteld aan de beschermende groep die werd ingevoerd op het uitgangspunt van de synthese van [^{11}C]acamprosaat. De belangrijkste vereiste was de mogelijkheid tot een snelle, kwantitatieve en selectieve afsplitsingsreactie met vorming van [^{11}C]acetylhomotaurine. Uit de literatuurgegevens (Dannley *et al*, 1966) kon begrepen worden dat de gesynthetiseerde sulfonylester via basische katalyse gemakkelijk zou gehydrolyseerd worden.



Om de ideale condities voor de basische hydrolyse te zoeken werd het product van de synthese (zie 4.3.2.3.) als volgt behandeld: (1) het product wordt verdeeld in 3 verschillende reactievaatjes, (2) het oplosmiddel (methanol) wordt verdampt m.b.v. een hete luchtblazer en (3) 0,1 tot 1 ml van een gekozen hydrolysereagens wordt toegevoegd. Vervolgens worden de reactievaatjes gesloten en gedurende een bepaalde tijd op een zekere temperatuur gebracht. Na de reactie wordt elk reactiemengsel geneutraliseerd en verdund met methanol. De oplossingen worden tenslotte geanalyseerd m.b.v. analytische HPLC.

In de eerste plaats wordt m.b.v. de analytische HPLC-methode, beschreven in 4.3.2.5., nagegaan in welke mate de fenylester door het hydrolysereagens verbroken werd. Een voorbeeld hiervan is te zien in figuur 4.19. In een tweede stap wordt de radiochemische zuiverheid van het hydrolyseproduct meer in detail bekeken. Het is immers niet uitgesloten dat onder invloed van sterk hydrolyserende omstandigheden naast de verzeping van de sulfonaatester ook hydrolyse van de amidebinding, met deacetylering tot gevolg, zou kunnen optreden.



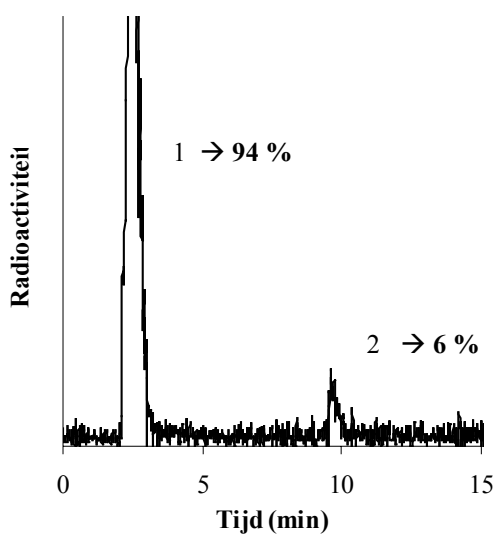
4. Synthese van koolstof-11-gemerkt acamprosaat

Een voortgezette hydrolyse van reeds gevormd acetylhomotaurine is natuurlijk ook een optie, maar met hetzelfde resultaat: deacetylering.

Om de selectiviteit van de hydrolyse te kunnen controleren, werd een tweede HPLC-methode ontwikkeld. De omstandigheden en het resultaat zijn te zien in figuur 4.20. De verschillende reactiecondities van de hydrolyse en de bijhorende resultaten worden samengevat in tabel 4.5.

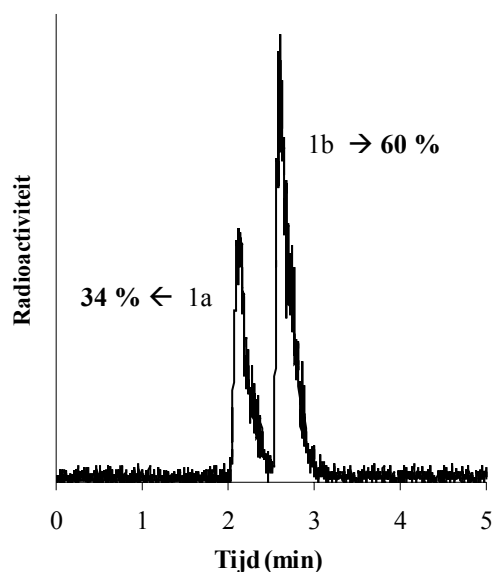
Tabel 4.5: Overzicht van de geteste hydrolysecondities.

Experiment	Reagens	Tijd (min)	Temp. (°C)	% [¹¹ C]acamprosaat	% [¹¹ C]acetaat	% onveranderd
1	0,1 M NaHCO ₃ (pH=9)	10	100	-	-	> 95
2	0,001 M NaOH	5	20	-	-	> 95
3	0,001 M NaOH	10	20	-	-	> 95
4	0,001 M NaOH	5	100	-	-	> 95
5	0,1 M NaOH	2	100	26	25	49
6	1 M NaOH	5	20	11	5	84
7	1 M NaOH	2	100	34	60	6
8	0,1 M Bu ₄ NOH	10	100	12	18	70



Figuur 4.19: Hydrolyse van fenyl-[¹¹C](N)acetyl-3-aminopropaansulfonaat: experiment nr.7 - analytische HPLC (deel 1): Kolom: Beckmann C₁₈; mobiele fase: 40 % methanol in water; debiet: 1 ml/min; injectievolume: 20 µl; detector: NaI(Tl)-detector

(1) gehydrolyseerde fractie en (2) onveranderd fenyl-[¹¹C](N)acetyl-3-aminopropaansulfonaat



Figuur 4.20: Hydrolyse van fenyl-[¹¹C](N)acetyl-3-aminopropaansulfonaat: experiment nr.7 - analytische HPLC (deel 2): kolom: Beckmann C18; mobiele fase: 5mM H₂SO₄ in 10 % methanol in water; debiet: 1 ml/min; injectievolume (20 µl); detector: NaI(Tl)-detector.

(1a) [¹¹C]acetylhomotaurine en (1b) [1-¹¹C]acetaat

4.3.2.7. Besluit

Zoals verwacht is de acylering van fenyl-3-aminopropaansulfonaat duidelijk meer reproduceerbaar dan de directe acylering van 3-aminopropaansulfonzuur. In ongeveer 35 min wordt gemiddeld (n=10) $2,7 \pm 1,7$ GBq (72 ± 46 mCi) fenyl-[¹¹C](N)-acetyl-3-aminopropaansulfonaat geproduceerd. De preparatieve HPLC-methode op basis van normale fase garandeert een goede scheiding tussen het ¹¹C-gemerkte product en uitgangproduct of nevenproducten. Bovendien kunnen zowel product als uitgangproduct gevoelig gedetecteerd worden via UV-absorbantie bij 254 nm. Hierdoor wordt het omslachtig gebruik van de weinig gevoelige brekingsindexdetector vermeden.

De fenyl-sulfonylester blijkt zoals verwacht onstabiel in basisch milieu. Om echter op korte tijd een hoog hydrolyserendement te verkrijgen moeten drastische reactieomstandigheden gebruikt worden: sterke base, hoge concentraties en hoge temperatuur. Experiment nr. 7 (zie tabel 4.5 en figuur 4.19) toont aan dat hydrolyse met 1 M NaOH bij 100°C een quasi kwantitatieve hydrolyse veroorzaakt binnen een korte tijdsspanne van 2 min. Hetzelfde experiment leert ook dat bij deze condities een gedeeltelijke hydrolyse van de amidebinding (deacetylering) niet te vermijden valt. Hierbij wordt [¹¹C]acetaat gevormd.

Na de 8 experimenten uit tabel 4.5 werden geen verdere pogingen ondernomen om het resultaat van de hydrolyse te verbeteren. Eerder intuïtief werd besloten dat in vereiste nr. 1 (snelle, kwantitatieve en selectieve afsplitsingreactie) ‘snel’ en ‘kwantitatief’ enerzijds en ‘selectief’ anderzijds, niet te combineren waren. Een mogelijke oplossing zou kunnen zijn om

via het invoeren van een gesubstitueerde fenylgroep als beschermende groep, de esterbinding extra te verzwakken ten opzichte van basische omstandigheden. Deze mogelijkheid werd echter niet onderzocht. Er werd wel nagegaan of een ionaire binding tussen de sulfonzure groep en een geschikt tegenion de functie van een covalent gebonden beschermende groep kon overnemen.

4.3.3. Acyleringsreactie met tetrabutylammonium-3-aminopropaan-sulfonaat

Proefondervindelijk werd vastgesteld dat homotaurine enkel oplosbaar is in water of mengsels van water en wateroplosbare organische solventen. Door toevoeging van een base kan het sulfonzuur wel in oplossing worden gebracht in methanol (20 µl 1M NaOH in water, 5 mg homotaurine, 1 ml methanol) maar deze procedure werkt niet voor andere solventen zoals aceton, THF of dichloromethaan. Additie van een zelfde hoeveelheid tetrabutylammonium hydroxide volstaat echter wel om homotaurine (beperkt) oplosbaar te maken in deze solventen.

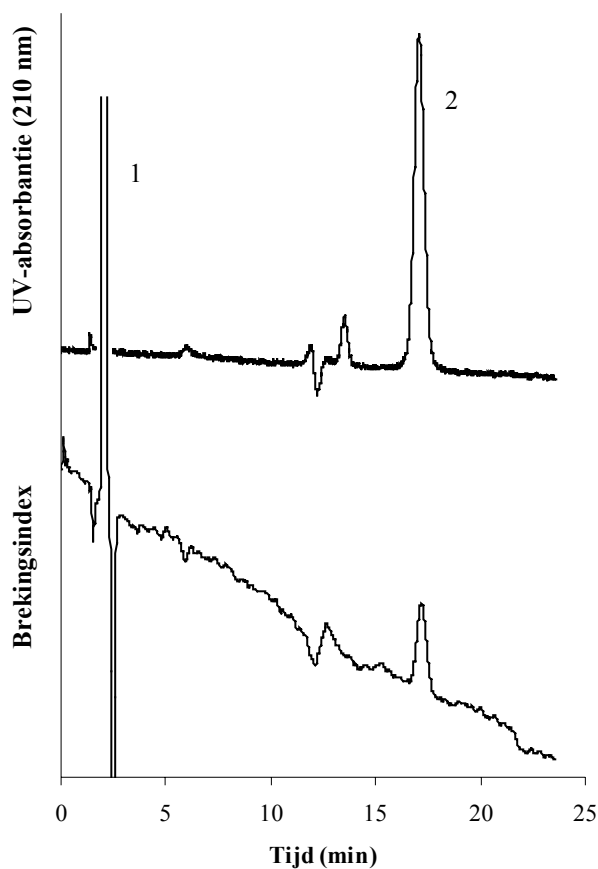
Tetrabutylammonium hydroxide (Pascali *et al*, 1992) en -fluoride (Mading *et al*, 2000) worden dikwijls gebruikt als base, bijvoorbeeld bij methylatiereacties met [¹¹C]methyljodide. Deze basen vertonen dikwijls een veel hogere activiteit in solventen zoals dimethylformamide (DMF) en dimethylsulfoxide (DMSO) dan bijvoorbeeld hun respectievelijke natriumzouten. Dit heeft ongetwijfeld te maken met het hydrofobe karakter van het tetrabutylammoniumion en de daarmee verbonden hogere oplosbaarheid van de gehele base in het hydrofoob milieu. In dit kader valt ook het gebruik van tetrabutylammonium hydroxide als fase-transferkatalysator (Halldin *et al*, 1992) en het tetrabutylammoniumion als ionpaarreagens voor omkeerfase chromatografie te verklaren (Bartha *et al*, 1983).

Op basis van de experimenteel beschouwde oplosbaarheid van homotaurine in organische solventen met tetrabutylammonium hydroxide als base en de vermelde literatuurgegevens over het gebruik van tetrabutylammonium (TBA) als ionpaarreagens, werd TBA als tegenion en beschermende groep voor homotaurine gekozen.

4.3.3.1. Omkeerfase ionpaar chromatografie voor de scheiding van homotaurine en acetylhomotaurine

De ontwikkelde scheiding van homotaurine en acetylhomotaurine is gebaseerd op bepaling van aromatische sulfonzuren in oppervlaktewaters via omkeerfase ionpaar chromatografie (Brouwer *et al*, 1992 en Lange *et al*, 1995). De condities van de beschreven analytische HPLC-methode werden aangepast voor de semi-preparatieve scheiding van homotaurine (of TBA-homotaurinaat) en acetylhomotaurine (of TBA-acetylhomotaurinaat).

In figuur 4.21 zijn de nadelen van de brekingsindexdetector duidelijk te zien: driftende basislijn en lage gevoeligheid. De UV-detector (detectie bij 210 nm) is stabiel en gevoeliger maar heeft dan weer het nadeel dat homotaurine niet gedetecteerd wordt. De combinatie van beide detectoren toont echter duidelijk aan dat de nieuwe HPLC-methode een betrouwbare scheiding tussen homotaurine en acetylhomotaurine mogelijk maakt.

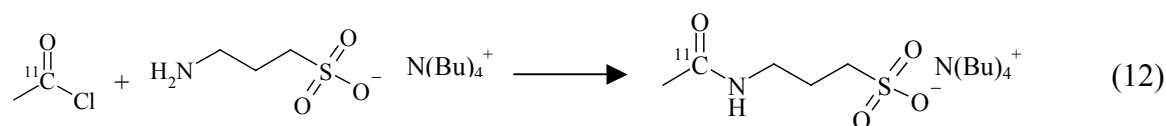


Figuur 4.21: HPLC-chromatogram voor de scheiding van acetylhomotaurine en homotaurine via omkeerfase ion-paar chromatografie: kolom: Lichrosorb RP-select B (10 × 250 mm, korrelgrootte: 10 µm); mobiele fase: 350 mg TBA chloride in 17 % methanol in water; debiet: 6 ml/min; injectievolume: 250 µl; detectoren: brekingsindex detector en UV-detector (210 nm).

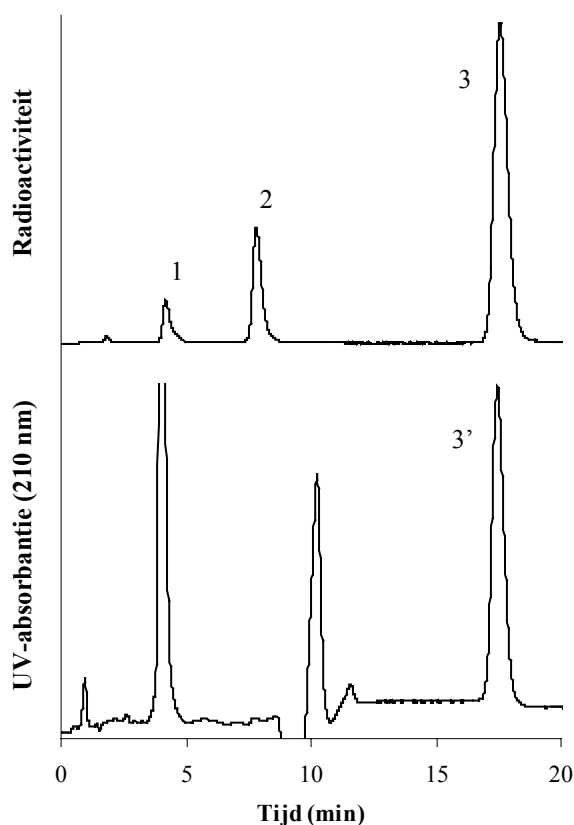
(1) Homotaurine en (2) acetylhomotaurine

4.3.3.2. Synthese van TBA- $[^{11}\text{C}]$ N-acetylhomotaurine

$[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride wordt geproduceerd zoals beschreven in 3.3.3. De precursor wordt opgevangen in een gekoeld (-40°C) reactievaatje. Dit bevat een mengsel van homotaurine, tetrabutylammonium chloride en triëthylamine in droge THF. Na de collectie van $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride wordt het reactievaatje gesloten en opgewarmd in een oliebad.



Na de reactie wordt het solvent uitgedampt en het reactiemengsel opgelost in 17 % methanol in water (250 μl). M.b.v. een peristaltische pomp wordt de oplossing vervolgens getransporteerd naar de HPLC-loop. Figuur 4.22 toont een typisch chromatogram voor de semi-preparatieve HPLC tijdens de synthese.



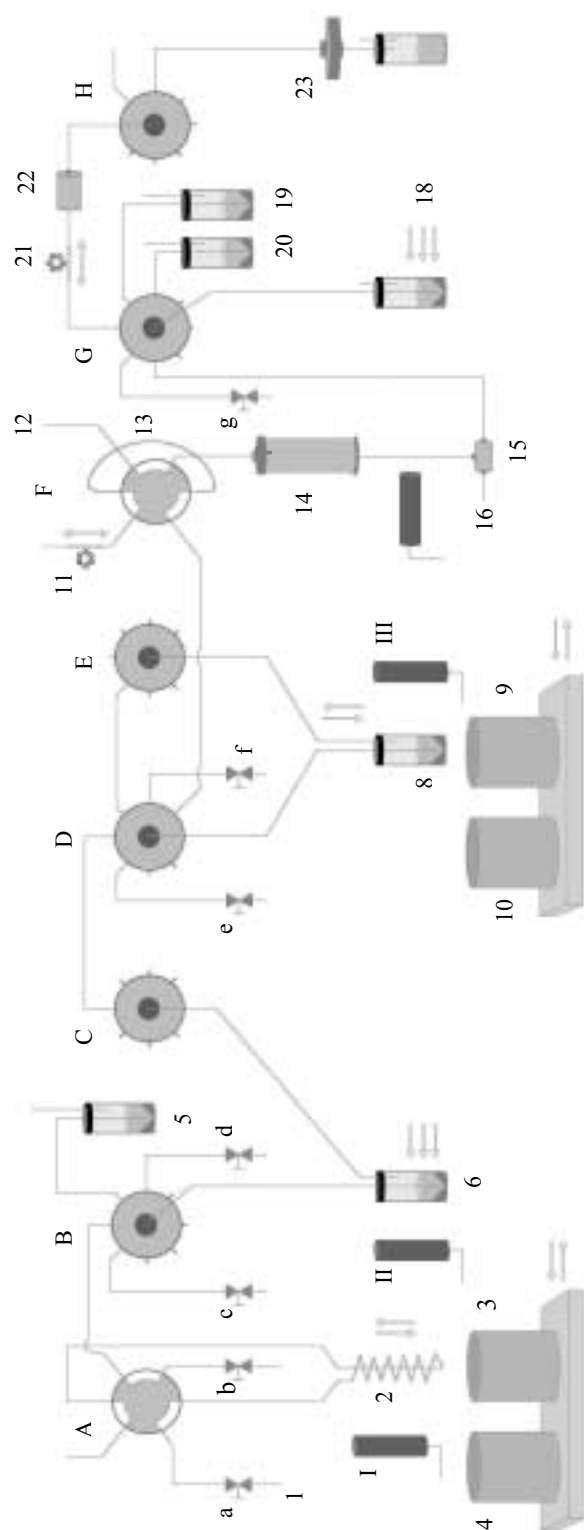
Figuur 4.22: Semi-preparatieve HPLC-scheiding voor de synthese van $[^{11}\text{C}]$ acetylhomotaurine: condities: zie figuur 4.21; detectoren: UV-detector (210 nm) en GM-detector IV.

(1) en (2) niet-geïdentificeerde nevenproducten gemerkt met ^{11}C ; (3) $[^{11}\text{C}]$ acetylhomotaurine en (3') drager acetylhomotaurine

De radioactieve fractie met dezelfde retentietijd als standaard-acetylhomotaurine wordt opgevangen. De gecollecteerde vloeistof wordt vervolgens opgewarmd tot kooktemperatuur gedurende 3 min. M.b.v. een heliumstroom (100 ml/min) wordt grotendeels de methanol uit de opgevangen fractie verwijderd. De resterende oplossing wordt via een peristaltische pomp door een *Solid Phase Extraction* (SPE) C₁₈-kolommetje (Waters, Sep-Pak[®]) gestuurd. TBA-[¹¹C]acetylhomotaurine blijft onder deze omstandigheden op het SPE-kolommetje gebonden. Resten methanol worden daarna weggespoeld met water (10 ml – water voor injecties, Baxter). Uiteindelijk wordt het [¹¹C]acetylhomotaurine afgeëluëerd met fysiologische fosfaatbuffer (pH=7,2; 5 ml) en gecollecteerd in een steriele recipiënt. De syntheseopstelling voor deze synthese is weergegeven in figuur 4.23.

4.3.3.3. De invloed van de reactieparameters op het reactierendement

Doorgaans worden de reactieparameters voor een synthese met ¹¹C (en vermoedelijk zowat alle radiochemische syntheses) geoptimaliseerd onder *koude* (niet-radioactieve) omstandigheden (zie 3.3.3.). Deze werkwijze heeft het grote voordeel dat een groot aantal experimenten simultaan kan uitgevoerd worden zonder de belemmerende *hotcelcondities* (radioactiviteit, afstandsgestuurde opstelling,...). Het nadeel van deze aanpak is evenwel dat het praktisch onmogelijk is om de omstandigheden die heersen tijdens de radiochemische synthese perfect na te bootsen. Het gevolg hiervan is dat de optimale reactiecondities in de hotcel soms grondig verschillen van deze die bepaald werden in het *niet-nucleaire* labo. Aangezien de syntheseopstelling reeds voldoende bewezen heeft betrouwbaar te zijn, werd geopteerd om de invloed van de verschillende reactieparameters rechtstreeks te bepalen a.h.v. een aantal syntheses in de hotcel onmiddellijk op hoog radioactiviteitsniveau. Om het totaal aantal experimenten te minimaliseren - een synthese kan immers slechts 1 maal per dag worden uitgevoerd - wordt de gewenste kennis van de beschouwde reactieparameters beperkt tot zijn hoofdeffect op het reactierendement. Hiervoor wordt een zogenaamd *Plackett-Burman design* opgesteld (Strijckmans, 2002). De daaruit volgende designmatrix met 7 reactieparameters en 8 experimenten is weergegeven in tabel 4.7. Alle syntheseparameters behalve de onderzochte worden gedurende het designexperiment constant gehouden. De 8 experimenten worden in willekeurige volgorde uitgevoerd zoals beschreven in 4.3.3.2. De symbolen en reactieomstandigheden worden verklaard en beschreven in tabel 4.6.



Figuur 4.23: Schematische voorstelling van de geautomatiseerde opstelling voor de synthese van $[^{11}\text{C}]$ acamprosaat. (A) en (F) 6-weg kraan, (B),(C),(D),(E),(G) en (H) 8-weg kraan, (a) regelbare debietmeter (2 l/min), (b) regelbare debietmeter (10 ml/min), (c) naalddventiel (1 à 2 ml/min), (d) regelbare debietmeter (30 ml/min), (e) naalddventiel (1 à 2 ml/min), (f) regelbare debietmeter (30 ml/min), (g) regelbare debietmeter (100 ml/min), (1) inlaat $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ van target, (2) spiraal, (3) vloeibare argon in Dewarvat, (4) water op kamertemperatuur, (5) vaatje onder druk met ftaalylchloride, (6) reactievatje met Grignard, (7) warme luchtblazer, (8) reactievatje voor acetyleringsreactie, (9) Dewar met gekoelde acetone (-40°C), (10) warm oliebad, (11) peristaltische pomp, (12) HPLC pomp, (13) HPLC loop (250 μl), (14) HPLC kolom (10 $\times$ 250 mm), (15) driewegkraan, (16) waste, (17) opvangvatje eluens, (18) warme luchtblazer, (19) vaatje met water, (20) vaatje met isotone buffer, (21) peristaltische pomp, (22) C18 - SPE-kolommetje, (23) bacteriënfilter, (24) opvangrecipiënt in loden vervoercontainer (niet weergegeven), (I),(II),(III) en (IV) Geiger-Müller radioactiviteitsdetectoren.

4. Synthese van koolstof-11-gemerkt acamprosaat

Tabel 4.6: De reactieparameters beschouwd in het Plackett-Burman design met hun respectievelijke symbolen

Reactieparameters (factoren)	symbool	+	-
Homotaurine (μmol)	x ₁	14	7
Molverhouding TBACl/homotaurine	x ₂	2	1
Molverhouding triëthylamine/homotaurine	x ₃	2	1
Solvent	x ₄	THF	CH ₂ Cl ₂
Reactietijd (min)	x ₅	5	2
Reactietemperatuur (°C)	x ₆	100	70
Volume solvent (μl)	x ₇	1000	500

Tabel 4.7: Designmatrix van de Plackett-Burman design met 8 experimenten en hun resultaat: het rendement op basis van [¹¹C]CO₂.

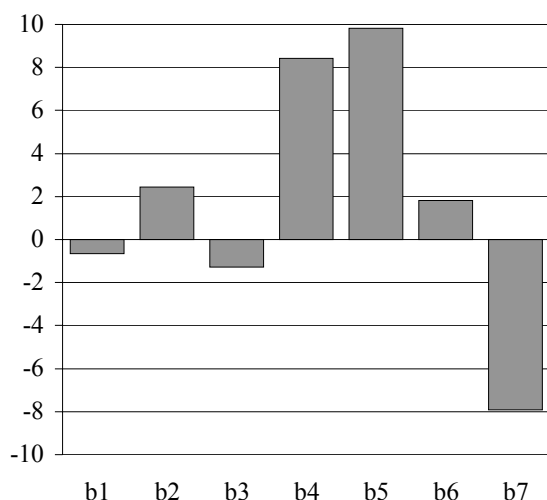
experiment	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	x ₇	Rendement op basis van [¹¹ C]CO ₂ (%)
1	-	-	-	-	-	-	-	5,06
2	+	-	-	+	-	+	+	8,41
3	+	+	-	-	+	-	+	12,42
4	+	+	+	-	-	+	-	9,72
5	-	+	+	+	-	-	+	8,35
6	+	-	+	+	+	-	-	37,66
7	-	+	-	+	+	+	-	50,00
8	-	-	+	-	+	+	+	9,95

Op basis van deze resultaten wordt via lineaire regressie de invloed van de afzonderlijke reactieparameters (hoofdeffect) bepaald, m.a.w. de “b”-coëfficiënt bepaald in de vergelijking:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5 + b_6x_6 + b_7x_7$$

In totaal kunnen met 8 experimenten 8 vergelijkingen worden opgesteld. In figuur 4.24 worden de resultaten voor de hoofdeffecten weergegeven.

4. Synthese van koolstof-11-gemerkt acamprosaat



b ₁	-0,644
b ₂	2,426
b ₃	-1,276
b ₄	8,409
b ₅	9,811
b ₆	1,824
b ₇	-7,914

Figuur 4.24: De hoofdeffecten van de afzonderlijke reactieparameters op het rendement van de synthese

In figuur 4.24 is te zien dat de invloed van de reactieparameters 1, 3 en 6, respectievelijk: de hoeveelheid homotaurine, de molverhouding triëthylamine/homotaurine en de reactietemperatuur ondergeschikt zijn aan de andere, in het experiment beschouwde reactieparameters. Wegens hun eerder kleine invloed op het reactierendement worden deze parameters niet verder onderzocht of geoptimaliseerd. A.h.v. de waarde van de 'b'-coëfficiënt (positief of negatief) wordt de meest geschikte massa, molverhouding en temperatuur gekozen (zie tabel 4.6).

De 2 belangrijkste parameters voor de synthese zijn: de duur van de reactie en de keuze van het reactiesolvent. Het verlengen van de reactietijd van 2 min tot 5 min heeft een uitgesproken positief effect op het rendement. Wat de optimale reactietijd voor deze reactie is, kan uit deze gegevens niet afgeleid worden. Dat THF als reactiesolvent betere resultaten geeft dan dichloromethaan is wel rechtstreeks uit deze gegevens te halen.

In tegenstelling tot de 2 voorgaande parameters valt het belang van het reduceren van het solventvolume van 1000 µl naar 500 µl moeilijker te verklaren. De invloed van een verhoogde (precursor)concentratie of tijdwinst bij het uitdampen van het solvent na reactie kan dit waarschijnlijk maar ten dele verklaren. Toch is de voorkeur voor kleine reactievolumes een algemene trend in de synthese van *no-carrier-added*-PET-tracers.

De concentratie aan TBA in het reactiemengsel is een parameter die een uiterst belangrijke invloed uitoefent op het reactierendement. Nochtans plaatst het experiment de concentratie aan TBA slechts op een vierde plaats. Er mag echter niet vergeten worden dat de invloed van elke parameter berekend wordt binnen de aangeduide grenzen (zie tabel 4.6). Als we het

rendement van de reactie *met* TBA (zie 4.3.3.2.) vergelijken met deze zonder (zie 4.3.2.1.) dan kan ongetwijfeld geconcludeerd worden dat de algemene invloed van TBA op de reactie veruit de belangrijkste is.

Gezien de goede resultaten die behaald werden met de reactieomstandigheden uit experiment nr. 7 (zie tabel 4.7 en 4.6) werden de reactieparameters reactietijd, solventvolume en verhouding TBA/homotaurine niet verder systematisch geoptimaliseerd. De omstandigheden werden gewoon overgenomen voor alle volgende producties van [^{11}C]acamprosaat.

4.3.3.4. Syntheserendement en opbrengst

Gedurende het onderzoek werden in totaal 20 syntheses uitgevoerd zoals beschreven in 4.3.3.2., rekening houdend met de bevindingen in 4.3.3.3. Het gemiddelde rendement ten opzichte van [^{11}C]CO₂ was $48,2 \pm 3,8$ % (max. 65 %, min. 35 %). De gemiddelde opbrengst na een standaardbestraling bedroeg $4,42 \pm 0,31$ GBq ($119,4 \pm 8,5$ mCi).

4.3.3.5. Identificatie van het synthesepreparaat

Zie 5.3.1.

4.3.3.6. Besluit

De synthese van [^{11}C]acetylhomotaurine via acylering van homotaurine met TBA als tegenion is superieur aan de eerder beschreven reacties. Het koppelt een hoog en reproduceerbaar rendement aan een eenvoudige *recovery* van het eindproduct (in een waterige oplossing splitsen product en beschermende groep in afzonderlijke ionen). Zuivering gebeurt d.m.v. semi-preparatieve omkeerfase HPLC met TBA als ionpaarreagens. Het verwijderen van resten methanol (organisch solvent in het eluens) uit het eindpreparaat gebeurt zeer efficiënt door (1) verwijderen van de hoofdfractie aan methanol door uitdampen en (2) het binden van TBA-[^{11}C]acetylhomotaurinaat op een SPE-C₁₈-kolommetje en naspoelen met water. [^{11}C]acetylhomotaurine wordt vrijgesteld door elutie met isotone fosfaatbuffer, terwijl het TBA onder deze omstandigheden op de kolom gebonden blijft. De *recovery* van [^{11}C]acetylhomotaurine is bij deze procedure steeds $> 98,5$ %. De totale synthesesetijd bedraagt 42 min. Gemiddeld ($n=20$) wordt $4,4 \pm 1,4$ GBq (119 ± 39 mCi) [^{11}C]acetylhomotaurine geproduceerd. Het totale volume van het preparaat is 5 ml.

De synthese van [^{11}C]acetylhomotaurine volgens de *ionpaarmethode* zal gebruikt worden voor experimenteel onderzoek naar het werkingsmechanisme van acamprosaat. De kwaliteitscontrole van het syntheseproduct wordt dan ook volledig gewijd aan preparaten die volgens deze methode gesynthetiseerd worden.

4.4. Referenties

108. **Adamczyk M, Chen Y-Y, Mattingly PG, Pan Y and Rege S** (1998) Neopentyl 3-triflyloxypropanesulfonate: a reactive sulfopropylation reagent for the preparation of chemiluminescent labels. *Journal of Organic Chemistry (Technical Note)* 63, 5636-5639.
109. **Bartha A and Vigh G** (1983) Studies in ion-pair chromatography .2. Retention of positive and negative-ions and neutral solutes in tetrabutylammonium bromide-containing methanol water eluents on lichrosorb RP-18. *Journal of chromatography* 265, 171-182.
110. **Bartha A and Vigh G** (1983) Studies in reversed-phase ion-pair chromatography .1. Adsorption-isotherms of tetraalkylammonium ion-pair reagents on lichrosorb-RP-18 in methanol water eluents. *Journal of chromatography* 260, 337-345.
111. **Brouwer ER, Slobodnik J, Lingeman H and Brinkman UAT** (1992) Determination by reversed-phase ion-pair chromatography of aromatic sulfonic-acids in surface-water. *Analisis* 20, 121,126.
112. **Dannley RL and Corbett GE** (1966) Nitrobenzenesulfonyl Peroxides as Reagents for Aromatic Substitution *Journal of Organic Chemistry* 31, 153-156.
113. **Goldberg AA** (1942) Acetylation *Journal of the Chemical Society* 716.
114. **Halldin C, Nägren K, Swahn CG, Langström B en Nyback H** (1992) (S)[C-11]nicotine and (R)[C-11]nicotine and the metabolite (R/S)[C-11]cotinine-preparation, metabolite studies and in vivo distribution in the human brain using PET. *Nuclear Medicine and Biology* 19, 871-880.
115. **Ishiwata K, Ishii SI and Senda M** (1993) HPLC using physiological saline for the quality control of radiopharmaceuticals used in PET studies. *Applied Radiation and Isotopes* 44, 1119-1124.
116. **Kruijer PS, Ter Linden T, Mooij R, Visser FC and Herscheid JDM** (1995) A practical method for the preparation of [^{11}C]acetate. *Applied Radiation and Isotopes* 46, 317-321.
117. **Lange FT, Wenz M and Brauch HJ** (1995) Trace-level determination of aromatic sulfonates in water by online ion-pair extraction ion-pair chromatography and their behavior in the aquatic environment. *HRC-Journal of High Resolution Chromatography* 18, 243-252.
118. **Le Bars D, Luthra SK, Pike VW and Luu Duc C** (1987) The preparation of a carbon-11 labelled neurohormone – [^{11}C]melatonin. *Applied Radiation and Isotopes* 38, 1073-1077.
119. **Luthra SK, Pike VW and Brady F** (1990) Preparation of some NCA [^{11}C]acid chlorides as labelling agents. *Applied Radiation and Isotopes* 41, 471-476.

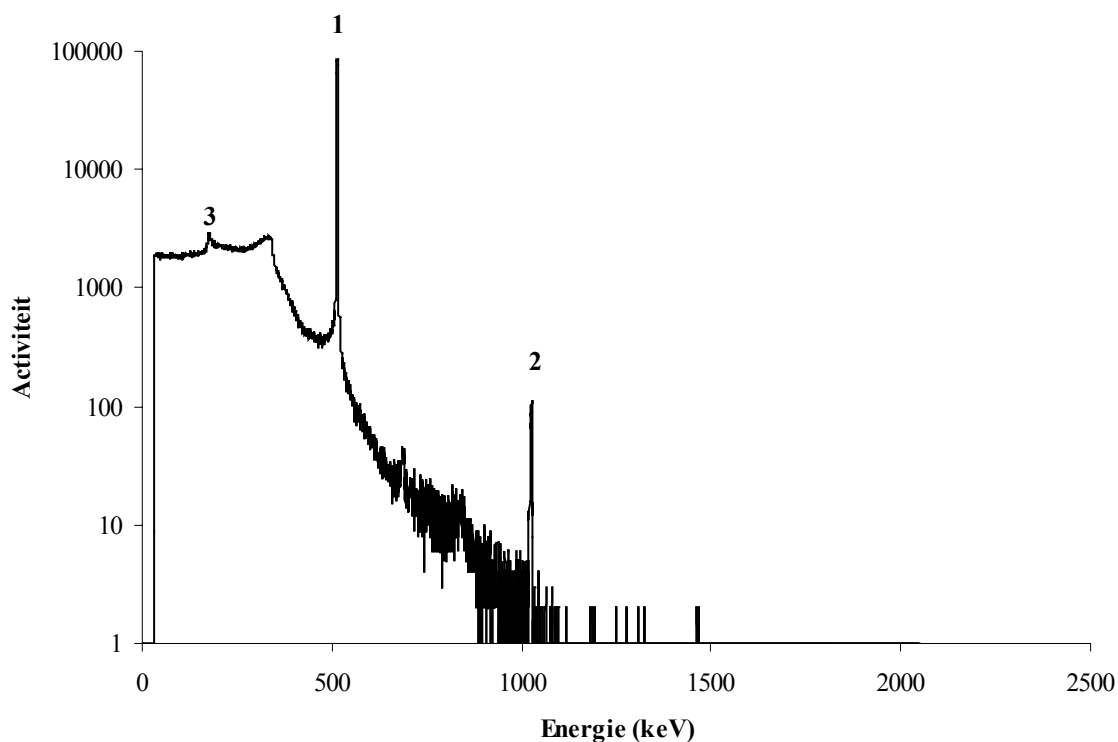
120. **Mading P, Steinbach J and Johannsen B** (2000) No-carrier-added C-11-labelling of benzenoid compounds in ring positions by condensation of nitro-[C-11]methane with pyrylium salts. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals*. 43, 565-583.
121. **Meese CQ** (1984) Selective cleavage of sulphonic esters. *Synthesis* 1041.
122. **Pascali C, Iwata R and Ido T** (1992) Comparative-study on the influence of bases on (3-N-[C-11]methyl)piperone synthesis. *Applied Radiation and Isotopes*. 43, 1526-1528.
123. **Pike VW, Eakins MN, Allan RM and Selwyn AP** (1982) Preparation of [1-¹¹C]acetate- An agent for the study of myocardial metabolism by positron emission tomography. *International Journal for Applied Radiation and Isotopes* 33, 505-512.
124. **Plattner JJ, Marcotte PA, Kleinert HD, Stein HH, Greer J, Bolis G, Fung AKL, Bopp BA, Luly JR, et al** (1988) Renin inhibitors. Dipeptide analogs of angiotensinogen utilizing a structurally modified phenylalanine residue to impart proteolytic stability. *Journal of Medical Chemistry* 31, 2277-2288.
125. **Roberts JC, Gao H, Gopalsamy A, Kongsjahju A and Patch RJ** (1997) Neopentyl ester protecting groups for arylsulfonic acids. *Tetrahedron Letters* 38, 355.
126. **Strijckmans K** (1980) De bepaling van stikstof in Ti, Ni, Zr, Nb, Mo, Ta en W door aktiveringsanalyse met geladen deeltjes. *Doctoraatsthesis Rijksuniversiteit Gent*, 33-39.
127. **Strijckmans K** (1994) Charged particle accelerators in: Chemical analysis by nuclear methods. Editor: Alfassi ZB, J. Wiley, Chichester, 64-74.
128. **Strijckmans K** (2001) The isochronous cyclotron: principles and recent developments. *Computed Medical Imaging Graphics* 25: 69-78.
129. **Strijckmans K** (2002) Chemometrie – Keuzevak 1^e licentie scheikunde.
130. **Truce WE and Goralski CT** (1969) Trans-1-(Arylsulfonyl)-2-arylcyclopropanes and derivatives of cyclopropanesulfonic acid. *Journal of Organic Chemistry* 34, 3324-3328.
131. **Vandewalle T** (1984) De produktie van ¹¹CO₂, ¹¹CH₃I en ¹¹C-gemerkte moleculen. *Doctoraatsthesis Rijksuniversiteit Gent*.
132. **Xie M and Widlanski TS** (1996) Use of the isobutyl group for sulphonate protection in the synthesis of nucleoside 3'-methanesulphonates. *Tetrahedron Letters* 37, 4443.

5. Kwaliteitscontrole van het syntheseparaat

[^{11}C]acetylhomotaurine wordt gesynthetiseerd door het acyleren van TBA-homotaurine met [^{11}C]acetylchloride (zie 4.3.3.2.). De kwaliteit van het preparaat wordt gecontroleerd a.h.v. de criteria beschreven in 3.1.6.

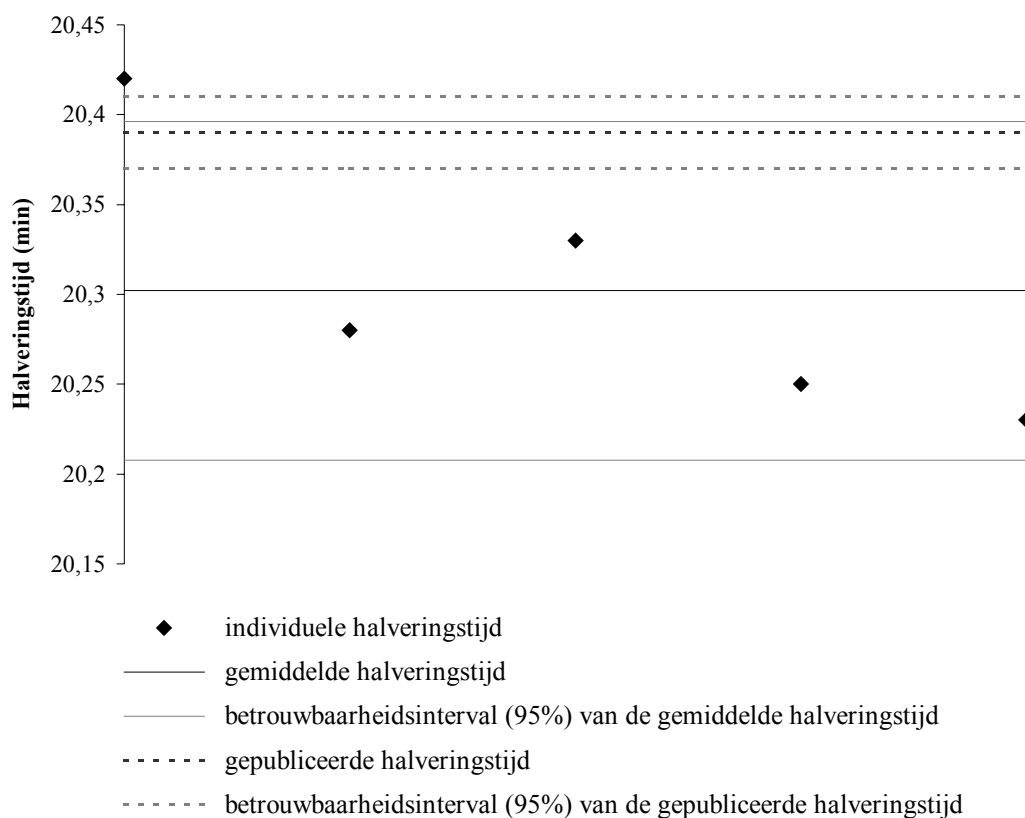
5.1. Radionuclidische zuiverheid

Ter bevestiging van de radionuclidische zuiverheid wordt het γ -spectrum van enkele ($n=5$) synthesepreparaten onderzocht. Voor een zuivere positronstraler zoals ^{11}C ($\beta^+ > 99\%$) betekent dit enkel een annihilatiesignaal bij 511 keV. Figuur 5.1 toont een typisch γ -spectrum van een [^{11}C]acetylhomotaurinepreparaat. Het spectrum werd opgenomen met een single open ended Ge(Li) Philips detector (75 cm³ actief volume; pre-amplifier Philips 56056; versterker Canberra 2020 met Dead Time Stabilizer; MCA Canberra S40 en ADC (100 MHz) Canberra).



Figuur 5.1: Het γ -spectrum van een [^{11}C]acetylhomotaurine-preparaat. Dit is het spectrum van een zuivere β^+ -straler: (1) fotopiek 511 keV annihilatie, (2) sompiek 1022 keV, (3) Pb-terugstrooipiek circa 200 keV.

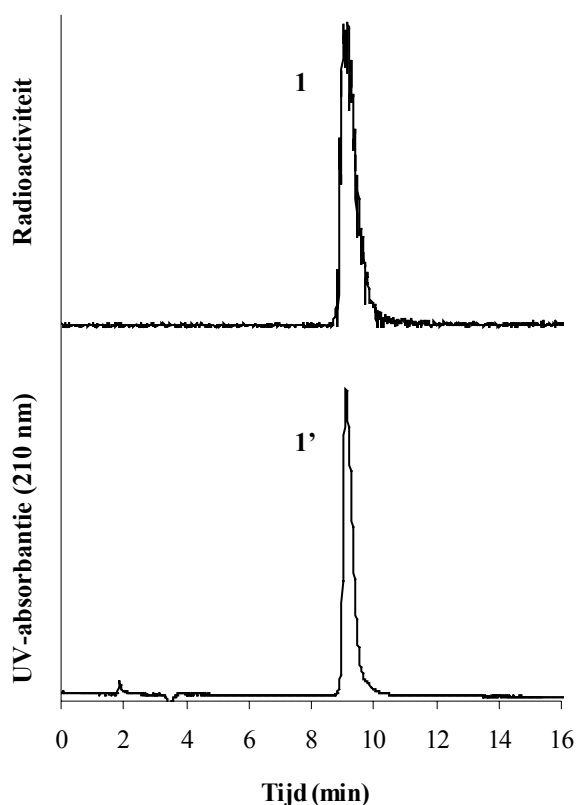
Voor de identificatie van de positronstraler wordt de halveringstijd van de radionuclide in het synthesepreparaat bepaald. De metingen worden verricht m.b.v. een γ - γ coïncidentieteller (Ortec) en de gegevens geanalyseerd met het statistisch softwarepakket DCA (Cumming, 1994). De 5 synthesepreparaten waarvan het γ -spectrum werd onderzocht, werden eveneens gebruikt om de halveringstijd van de radionuclide te bepalen. Zoals uit figuur 5.2 kan afgeleid worden, is het resultaat van het experiment (gemiddelde halveringstijd: $20,30 \pm 0,08$ min) niet-significant verschillend met de gepubliceerde waarde voor ^{11}C : $20,39 \pm 0,02$ min. (Decay data search - NuDat database). Met grote zekerheid kan dus gesteld worden dat het synthesepreparaat radionuclidisch zuiver is.



Figuur 5.2: Analyse van de halveringstijd van de radionuclide aanwezig in 5 synthesepreparaten.

5.2. Radiochemische zuiverheid

Om de radiochemische zuiverheid van het preparaat te controleren wordt een analytische HPLC-methode ontwikkeld. Zoals in 3.1.6.2. reeds werd vermeld, moet deze methode onafhankelijk zijn van de semi-preparatieve HPLC-methode voor de opzuivering van het product tijdens de synthese (zie 4.3.3.1.). Niettemin wordt voor deze toepassing ook een chromatografische methode op basis van ionpaarvorming met TBA gebruikt. De juiste condities worden vermeld in figuur 5.3. Het chromatogram toont een enkele radioactieve piek die tezelfdertijd elueert als standaard-acetylhomotaurine. Tezamen met de radiochemische zuiverheid wordt op deze manier ook de identiteit van de gemerkte molecule bevestigd.

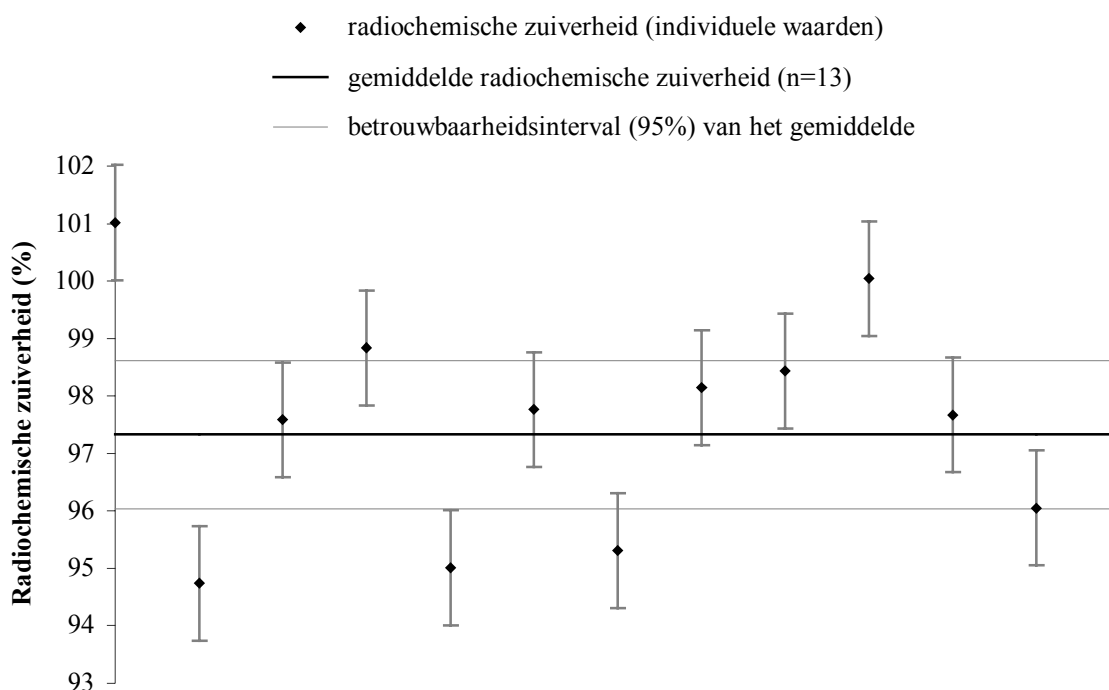


Figuur 5.3: Analytische HPLC voor de controle van de radiochemische zuiverheid en identiteit van het [^{11}C]acetylhomotaurinepreparaat: kolom: Alltima C18, Alltech (4,6 mm $\times$ 250 mm; korreldiameter 5 μm); debiet: 1 ml/min; mobiele fase: 5 mM TBACl in 15 % acetonitrile in water; injectievolume: 20 μl ; detectoren: UV-detector (210 nm) en NaI(Tl)-detector.

(1) [^{11}C]acetylhomotaurine en (1') standaard-acetylhomotaurine

Voor elk synthesepreparaat (uitgezonderd deze voor proefdierstudies) wordt op basis van het radiochromatogram systematisch de radiochemische zuiverheid bepaald. Dit gebeurt door de gemeten radioactiviteit binnen de [^{11}C]acetylhomotaurinepiek te vergelijken met de radioactiviteit gemeten tijdens de totale duur van de chromatografie. Hierbij wordt een

volledige recovery van de geïnjecteerde radioactiviteit van de HPLC-kolom verondersteld. De data worden verwerkt m.b.v. een aangepaste versie van het ACCUSPEC-software pakket (Canberra). De resultaten van de radiochromatografie m.b.t. de radiochemische zuiverheid worden weergegeven in figuur 5.4.

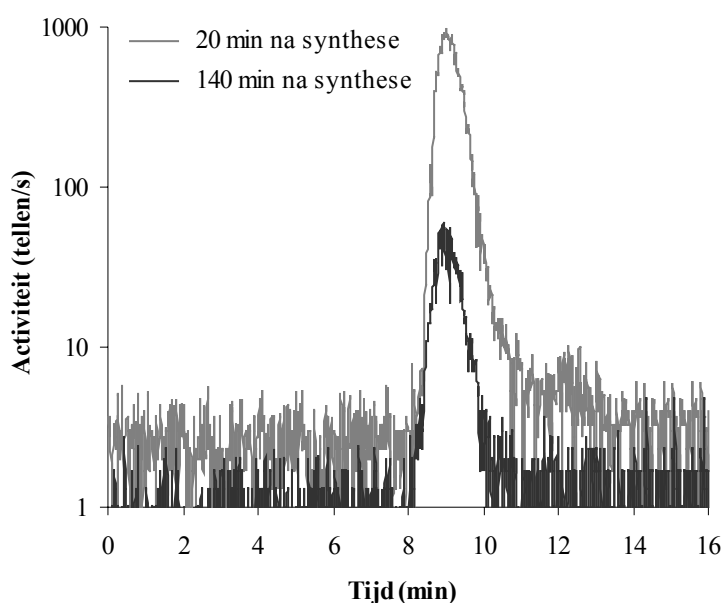


Figuur 5.4: De radiochemische zuiverheid werd onderzocht in 13 verschillende synthesepreparaten. De foutenvlaggen bij de individuele waarden stellen de 95 % confidentie-intervallen (telstatistiek) van deze waarden weer.

De geobserveerde radiochemische zuiverheid schommelt van minimaal 94,7 % tot maximaal 101,0 % en is gemiddeld (n=13) $97,3 \pm 1,3$ %. Gesteld kan dus worden dat de geobserveerde radiochemische zuiverheid van het synthesepreparaat gemiddeld ≥ 96 %.

Met dezelfde HPLC-methode wordt ook nagegaan of het synthesepreparaat stabiel is. Het is evident dat de stabiliteit van een radioactief gemerkte molecule beperkt wordt door de stabiliteit van de radionuclide, m.a.w. door halveringstijd. Er bestaan echter nog limiteringen aan de stabiliteit van gemerkte moleculen. Deze kunnen van chemische aard zijn (hydrolyse, oxidatie,...) of het gevolg van de inwerking van radioactieve straling op de molecule

(radiolyse). Het chromatogram in figuur 5.5 toont aan dat het preparaat gedurende verschillende halveringstijden radiochemisch zuiver blijft m.a.w. [^{11}C]acetylhomotaurine is stabiel.



Figuur 5.5: Analytische HPLC voor de controle van de stabiliteit van [^{11}C]acetylhomotaurine. Specificaties van de HPLC: zie figuur 4.28

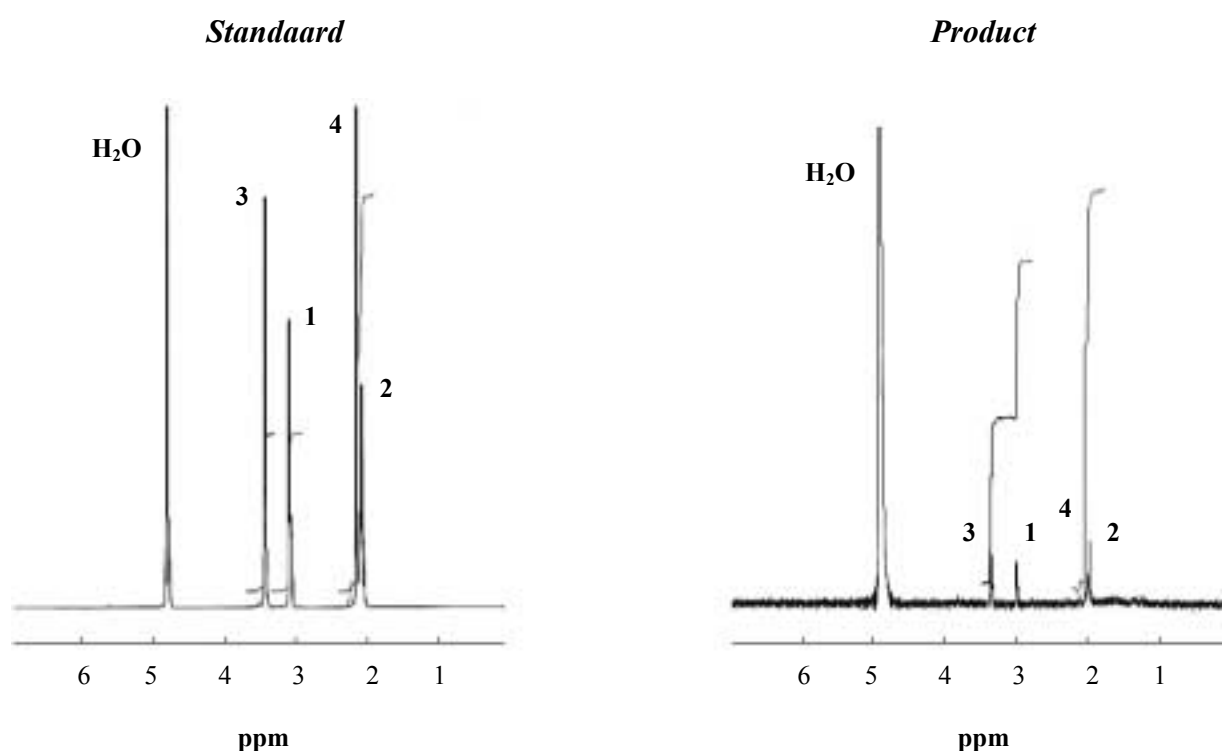
Radiochemische zuiverheid: na 20 min: $97,8 \pm 1,3$ % en na 120 min: 96 ± 12 %.

5.3. Chemische zuiverheid

Het eerste aspect van chemische zuiverheid: de identificatie van de gemerkte molecule, werd reeds gecontroleerd in 5.2. m.b.v. radio-HPLC en standaarden. De bevestiging van de identiteit van de gemerkte molecule gebeurt d.m.v. [^1H]NMR. Verder gaat alle aandacht in deze alinea naar de aan- of afwezigheid van ongewenste chemische onzuiverheden in het preparaat. Een inventaris van de gebruikte reagentia en solventen leert ons dat vooral de solventen methanol, ethanol, aceton en THF, het uitgangspunt homotaurine en het ionpaarreagens tetrabutylammonium chloride als chemische onzuiverheden in het preparaat kunnen opduiken. In deze volgorde worden ze behandeld.

5.3.1. Identificatie van het radiofarmacon d.m.v. proton-NMR

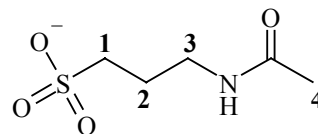
Ter bevestiging van de identiteit van het product wordt een [^1H]NMR-spectrum opgenomen. Om over voldoende analysemateriaal te beschikken worden een 10-tal syntheses uitgevoerd en de gecollecteerde fracties samengevoegd. Na uitsterven van de radioactiviteit worden de verzamelde preparaten onder verminderde druk gevriesdroogd en de droge stof terug opgelost in D_2O . Deze oplossing wordt vervolgens geanalyseerd met een NMR-spectrometer van het type Bruker AM-500 (S4 - vakgroep organische chemie). De NMR-spectra van standaard en product zijn weergegeven in figuur 5.6. In tabel 5.1 worden de signalen van het spectrum gedefinieerd.



Figuur 5.6: ^1H -NMR spectra van standaard en product opgenomen in D_2O bij 500 MHz.

Tabel 5.1: Toewijzing van het ^1H -NMR spectra van acetylhomotaurine

Koolstof atoom	Chemische shift, δ_{TMS}
1	3,08 ppm, triplet, 2H
2	2,07 ppm, pentaplet, 2H
3	3,34 ppm, triplet, 2H
4	2,14 ppm, singlet, 3H



5.3.2. Bepaling van solventconcentraties via GC/FID

De aanwezigheid van solventresten in radiofarmaca moet met de meeste aandacht gecontroleerd worden, zeker als toxische solventen zoals methanol of acetonitrile in de zuiveringsstap als organisch bestanddeel in het eluens voorkomen. Omwille van hun intrinsieke toxiciteit worden methanol en acetonitrile heel dikwijls vervangen door het veel minder schadelijke ethanol. In vele preparaten wordt ethanol dan ook toegelaten in concentraties die tot 10 % kunnen oplopen. Het is evenwel duidelijk dat in het kader van dit onderzoek: acamprosaat versus alcohol(ethanol)verslaving, de aanwezigheid van ethanol in het eindpreparaat even strikt en streng wordt behandeld als die van het giftige methanol of acetonitrile.

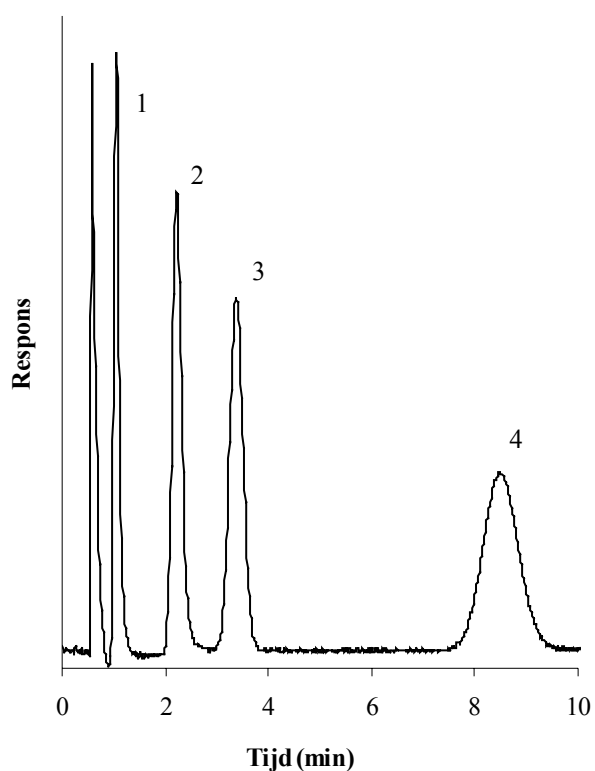
Permitted Daily Exposure- (PDE) waarden, zoals gepubliceerd in de ICH Guideline on Residual Solvents worden berekend op basis van verschillende veiligheidsfactoren zoals het NOEL (*No Observed Effect Level*) of het LOEL (*Lowest Observed Effect Level*) voor dat solvent, een factor die het lichaamsgewicht in rekening brengt en verschillende types veiligheidsfactoren. Voor de berekeningen en toelichting bij PDE wordt verwezen naar de literatuur (ICH Guideline – Residual Solvents, 1997). LD₅₀ (lethal dose for 50 % of subjects) is de hoeveelheid van een vergif die bij 50 % van een populatie tot de dood leidt en is een maat voor de acute toxiciteit van de stof. PDE en LD₅₀-waarden voor de gebruikte solventen worden weergegeven in tabel 5.2.

Tabel 5.2: De gebruikte solventen in de synthese, hun functie en hun toxiciteit (LD_{50} – oraal, rat) en Permitted Daily Exposure- (PDE) waarden (ICH Guideline on Residual Solvents)

Solvent	Functie	LD_{50} (mg/kg)	PDE (mg/dag)
Methanol	Organische modifier in het eluens van de semi-preparatieve HPLC	3560	30
Ethanol	Als 70 % oplossing in water gebruikt voor: (1) de conditionering van de SPE- C_{18} -kolommetjes (2) als anti-scepticum in de syntheseopstelling.	11000	170
Aceton	Solvent gebruikt voor de reiniging van de syntheseopstelling	8460	210
THF	Reactiesolvent	2820	120

5.3.2.1. Chromatografie

De concentratie aan solventresten methanol, ethanol, aceton en THF in het synthesepreparaat worden bepaald via GC-FID (*FID: Flame Ionisation Detection*). Een typisch chromatogram en de details van de chromatografie zijn te vinden in figuur 5.7.

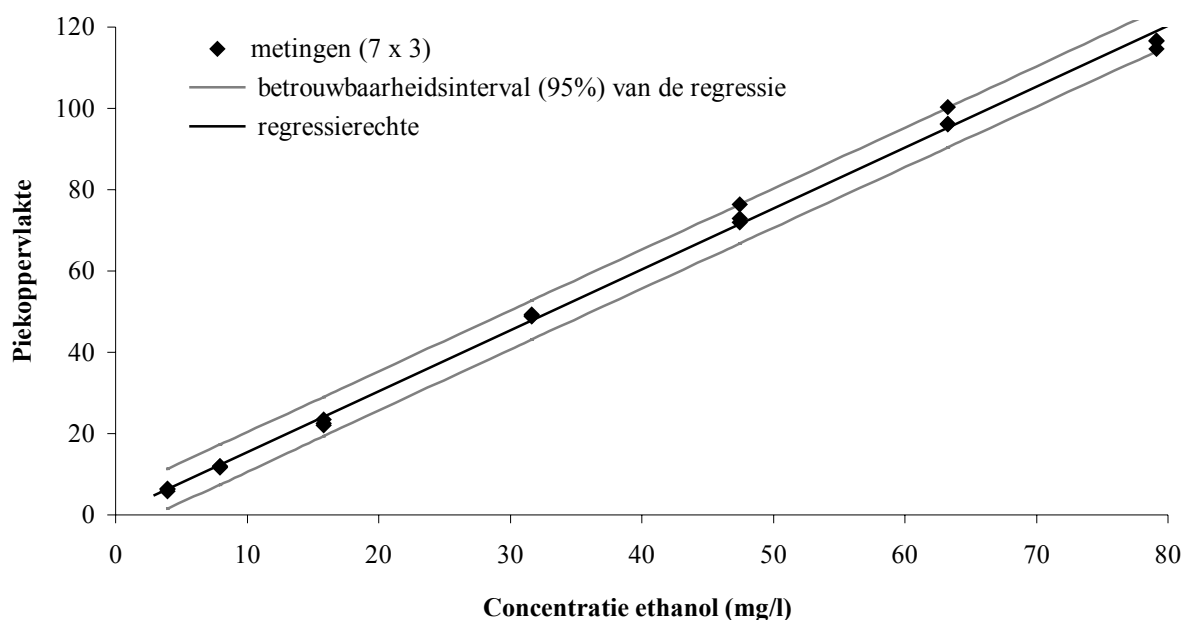


Figuur 5.7: Typisch chromatogram voor de bepaling van solventresten via GC/FID: Kolom (140°C): Porapak-Q (Alltech); eluens: helium; injector (250°C): directe injectie; injectievolume: $0,6\ \mu\text{l}$; detector (220°C): vlam ionisatie.

Standaardmengsel met (1) methanol, (2) ethanol, (3) aceton en (4) THF.

5.3.2.2. Kalibratie

De FI-detector wordt gekalibreerd met standaardmengsels van de onderzochte solventen. Op basis van de piekoppervlakte wordt een kalibratierechte opgesteld voor elk solvent. Een kalibratierechte voor ethanol is als voorbeeld te zien in figuur 5.8. De lineariteit van de analysemethode werd bevestigd tussen 4 en 80 mg/l voor ethanol en aceton en tussen 10 en 100 mg/l voor methanol en THF. De detectielimiet voor methanol, ethanol, aceton en THF werd experimenteel bepaald en bedraagt respectievelijk 2,6 mg/l, 1,5 mg/l, 0,74 mg/l en 4,9 mg/l.



Figuur 5.8: Kalibratie van de GC-FID voor de bepaling van ethanol in het synthesepreparaat.

5.3.2.3. Resultaten

Na kalibratie werd in 10 preparaten het gehalte aan solventresten bepaald. De resultaten worden samengevat in tabel 5.3. De analyses tonen aan dat de solventconcentraties ver beneden het maximum toegelaten niveau blijven (zie PDE-waarden tabel 5.1). Zelfs indien een volledig preparaat (5 ml) zou worden toegediend aan een proefpersoon, wat gezien de totale hoeveelheid radioactiviteit in één enkele productie (~ 3,7 GBq) niet mogelijk is, dan

blijft de hoeveelheid solvent in het slechtste geval steeds 100 keer beneden het toegelaten niveau voor dagelijkse blootstelling.

Tabel 5.3: Solventresten methanol, ethanol, aceton en THF in 10 synthesepreparaten. De waarden tonen de massa aan solvent in het gehele preparaat (5ml). (*) geëxtrapoleerde waarde

preparaat	Methanol (mg)	Ethanol (mg)	Aceton (mg)	THF (mg)
1	0,057 ± 0,011	0,0993 ± 0,0075	< 0,0037	< 0,024
2	0,420 ± 0,013 (*)	0,0813 ± 0,0076	< 0,0037	< 0,024
3	0,375 ± 0,012	< 0,0074	< 0,0037	< 0,024
4	0,085 ± 0,011	0,0193 ± 0,0080 (*)	0,0131 ± 0,0084 (*)	< 0,024
5	0,066 ± 0,011	< 0,0074	< 0,0037	< 0,024
6	< 0,014	< 0,0074	< 0,0037	< 0,024
7	< 0,014	0,0677 ± 0,0093	0,1524 ± 0,0077	< 0,024
8	0,1928 ± 0,0061	0,0772 ± 0,0092	0,0078 ± 0,0085 (*)	< 0,024
9	0,0067 ± 0,0064	0,0460 ± 0,0095	< 0,0037	< 0,024
10	0,2110 ± 0,0062	0,0524 ± 0,0094	< 0,0037	0,085 ± 0,012
PDE	30	170	210	120

5.3.3. De bepaling van homotaurine via HPLC en derivatisatie met diëthyl ethoxymethyleenmalonaat

Bij het controleren van de chemische zuiverheid van een synthesepreparaat gaat doorgaans de meeste aandacht uit naar de aan- of afwezigheid van uitgangspaan. De verwantschap in chemische structuur tussen product en uitgangspaan vertaalt zich dikwijls in een verwantschap op biochemisch niveau. Zo kunnen mogelijke sporen uitgangspaan competitief receptor- of enzymebindingsplaatsen bezetten, transport via specifieke transporteiwitten beïnvloeden, enz... Dit betekent dat een kleine hoeveelheid van dit uitgangspaan als chemische onzuiverheid in het preparaat een belangrijke invloed kan hebben op het uiteindelijke resultaat van de studie.

In hoofdstuk 1 werd beschreven dat acamprosaat mogelijk inwerkt op het GABA- en NMDA-receptorsysteem. De aanwezigheid, hoe miniem ook, van een stof die eveneens affiniteit

vertoont voor deze receptoren moet vermeden worden. Aangezien het uitgangspunt homotaurine bekend staat als een GABA-agonist (Fariello *et al*, 1980) moet een gevoelige bepaling van dit product in het synthesepreparaat kunnen gebeuren. Door de lage gevoeligheid van de brekingsindexdetector (homotaurine is niet detecteerbaar via UV-absorptie, zie 4.3.3.1.) is het immers niet uit te sluiten dat kleine hoeveelheden homotaurine via *tailing* tijdens de semi-preparatieve chromatografie in de opvangfractie terechtkomen.

Een bepalingmethode voor homotaurine als onzuiverheid in acamprosaat, gebaseerd op derivatisatie met fluorescamine, scheiding met capillaire zone elektroforese en UV-detectie bij 205 nm werd reeds beschreven (Fabre *et al*, 1999). De gerapporteerde detectielimiet bedraagt 0,004 % (m/m) homotaurine ten opzichte van acetylhomotaurine.

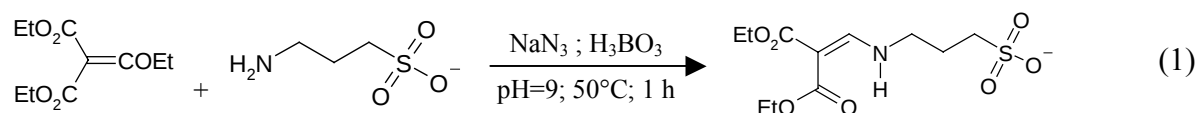
In de literatuur zijn een hele reeks HPLC-methoden beschreven om verwante structuren zoals taurine (Sakai *et al*, 1992; Stocchi *et al*, 1994; Ferreira *et al*, 1997; McMahon *et al*, 1996), amines (de Montigny *et al*, 1987; Beale *et al*, 1988; Imai *et al*, 1984) en aminozuren (Lindroth *et al*, 1979; Hill *et al*, 1979) in diverse media te bepalen. Deze analysemethoden zijn gebaseerd op de vorming van sterk fluorescerende en/of UV-actieve derivaten met moleculen zoals o-ftaalaldehyde, fluorescamine, dansyl chloride en vele andere. Naast de zeer gevoelige detectie die deze derivaten mogelijk maken, moet afhankelijk van het derivatisatieproduct, rekening gehouden worden met een langdurige derivatisatieprocedure, een moeilijk te reproduceren monstervoorbereiding, het ontstaan van onstabiele derivaten, het voorkomen van reagenssignalen en, niet onbelangrijk, een hoge kostprijs van het gewenste derivatisatieproduct.

Voor de bepaling van homotaurine in het synthesepreparaat werd een soortgelijke analysemethode ontwikkeld. Deze is gebaseerd op een minder bekende methode voor de analyse van aminozuren via HPLC na derivatisatie met diëthyl ethoxymethyleenmalonaat en UV-detectie bij 280 nm (Alaiz *et al*, 1991).

5.3.3.1. Derivatisatie

Aan standaard-homotaurine of een gekend volume te analyseren synthesepreparaat wordt in eerste instantie een bepaalde hoeveelheid inwendige standaard (I.S.) taurine ($\text{HO}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) toegevoegd (5 à 50 μg). Daarna wordt elke oplossing (standaard en synthesepreparaat) gedroogd bij 110 °C. Vervolgens wordt de droge stof opgelost in 960 μl 0,1M boraatbuffer (pH=9), 20 μl 1% (m/m) natriumazide in water en 20 μl 4 % (v/v) diëthyl ethoxymethyleenmalonaat in acetonitrile. Het mengsel wordt stevig geroerd en tenslotte gedurende 1 uur verwarmd tot 50°C.

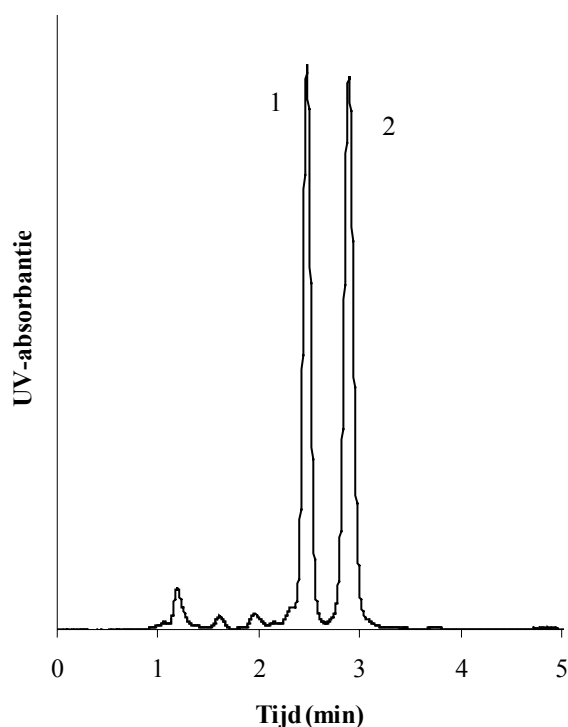
Hierbij wordt homotaurine omgezet volgens:



Uit initiële experimenten is gebleken dat de hoge zoutconcentraties in een standaard synthesepreparaat (fosfaatbuffer in isotone NaCl-oplossing) de derivatisatie met diëthyl ethoxymethyleenmalonaat verstoort. Daarom werd in een aantal proefsynthesen (n=8) het SPE C₁₈ kolommetje geëluëerd met 20 % ethanol in water in plaats van de gebruikelijke isotone fosfaatbuffer. Het verloop van deze proefsynthesen is voor de rest identiek aan deze beschreven in 4.3.3.2. De preparaten werden uitsluitend aangemaakt voor de analyse van restsporen homotaurine.

5.3.3.2. Chromatografie

Na afkoelen tot kamertemperatuur wordt het derivatisatiemengsel via HPLC geanalyseerd. Een chromatogram en details van de chromatografie worden weergegeven in figuur 5.9.



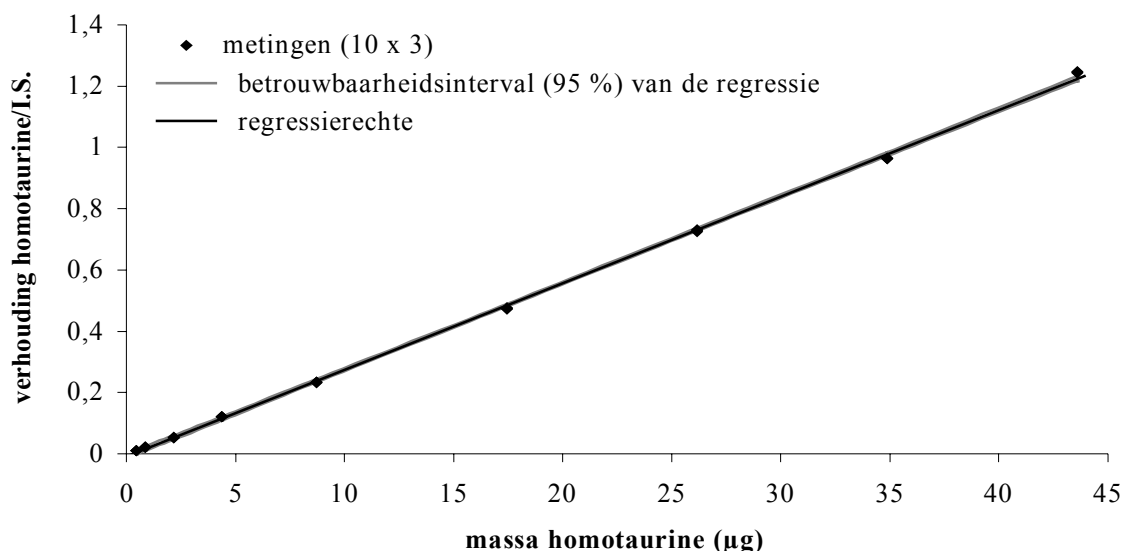
Figuur 5.9: Analytische HPLC voor de bepaling van homotaurine: kolom: Pharmacia μ RPC C2/C18 ($100 \times 4,6$ mm, 5μ m); eluens: 15% acetonitrile in 25mM natrium acetaat (pH=6 met azijnzuur) in water; debiet: 1 mL/min; injectievolume: 10 μ L; detector: UV- detector (280 nm).

(1) taurine-derivaat (I.S.) en (2) homotaurine-derivaat

5.3.3.3. Kalibratie

Aangezien mogelijke sporen homotaurine in het preparaat worden bepaald in aanwezigheid van acetylhomotaurine (actief bestanddeel in het preparaat) moet rekening worden gehouden met een mogelijke hydrolyse van acetylhomotaurine tot homotaurine gedurende de derivatisatie. Daarom wordt in eerste instantie het achtergrondsignaal van een blanco vergeleken met deze van een 1 mM acetylhomotaurineoplossing (180 mg/l) voor derivatisatietijden gaande van 30 minuten tot 20 uur. Er werden op geen enkel tijdstip significante verschillen gemeten tussen de blanco-oplossing en de 1 mM acetylhomotaurineoplossing. Aangezien de waarden ver beneden de detectielimiet (zie later) blijven, wordt aangenomen dat onder de heersende omstandigheden acetylhomotaurine niet of nauwelijks wordt gehydrolyseerd tot homotaurine. In elk geval worden geen blancoproblemen verwacht bij de analyse van werkelijke synthesepreparaten aangezien de acetylhomotaurine-concentratie hier bovendien nog 250 keer lager ligt dan de gebruikte 1 mmol/l.

Op basis van de piekoppervlakteverhouding homotaurine/I.S. wordt vervolgens een kalibratierechte opgesteld voor de bepaling van resten homotaurine (figuur 5.10). De lineariteit van de analysemethode werd bevestigd tussen 0,44 en 44 μ g homotaurine. De detectielimiet bedraagt 0,17 μ g homotaurine.



Figuur 5.10: Kalibratie van de UV- detector voor de bepaling van homotaurine na derivatisatie.

5.3.3.4. Resultaten

Acht preparaten werden onderzocht op de aanwezigheid van homotaurine. In elk preparaat bleef de hoeveelheid homotaurine in het synthesesmengsel beneden de detectielimiet. Afhankelijk van het bemonsterde volume preparaat varieerde het analyseresultaat zo van $< 0,21 \mu\text{g}$ tot $< 0,32 \mu\text{g}$ homotaurine per preparaat. Uitgaande van deze gegevens kan berekend worden dat per homotaurinemolecule die mogelijk voorkomt in het synthesepreparaat er minstens 100 acetylhomotaurinemoleculen aanwezig zijn.

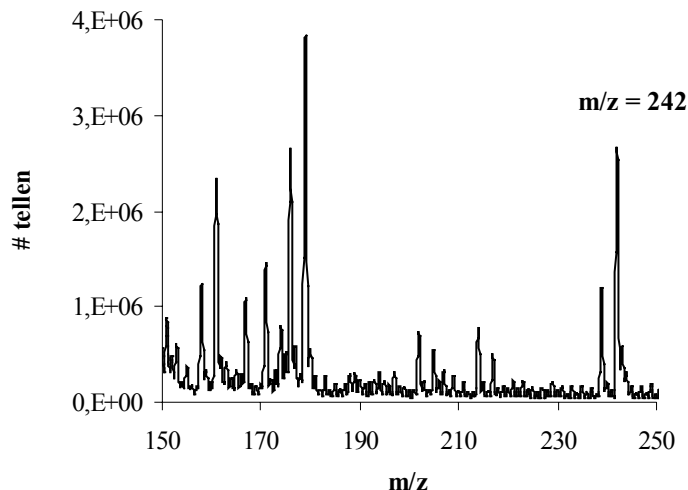
5.3.4. Bepaling van tetrabutylammonium via ES-MS

Zoals besproken in 4.3.3. wordt het tetrabutylammoniumion gebruikt als ionpaarreagens, zowel voor de reactie met $[1-^{11}\text{C}]$ acetylchloride als tijdens de semi-preparatieve HPLC. Vooral dit laatste betekent dat in de opvangfractie, het volume eluens waarin $[^{11}\text{C}]$ acamprosaat elueert, belangrijke hoeveelheden TBA zullen voorkomen. Voor een gebruikelijk opvangvolume van ca. 10 ml kan zo gemakkelijk 3,5 à 4 mg TBA in het preparaat sluipen. Uit de volgende gegevens over de concentratie van het ionpaarreagens in het eindpreparaat zal echter blijken dat de SPE-procedure (zie 4.3.3.2.), in eerste instantie

bedoeld om resten methanol te verwijderen, ook in staat is het gehalte aan schadelijk TBA drastisch te reduceren. Vermoedelijk blijft het TBA-ion gebonden aan de hydrofobe stationaire fase op het moment dat de ionaire binding tussen het positief geladen TBA en het negatief geladen acamprosaat verbroken wordt door elutie met de fysiologische bufferoplossing. Zoals werd aangetoond in 4.3.3.6. elueert acamprosaat wel met groot gemak.

5.3.4.1. Analyse van TBA met ES-MS

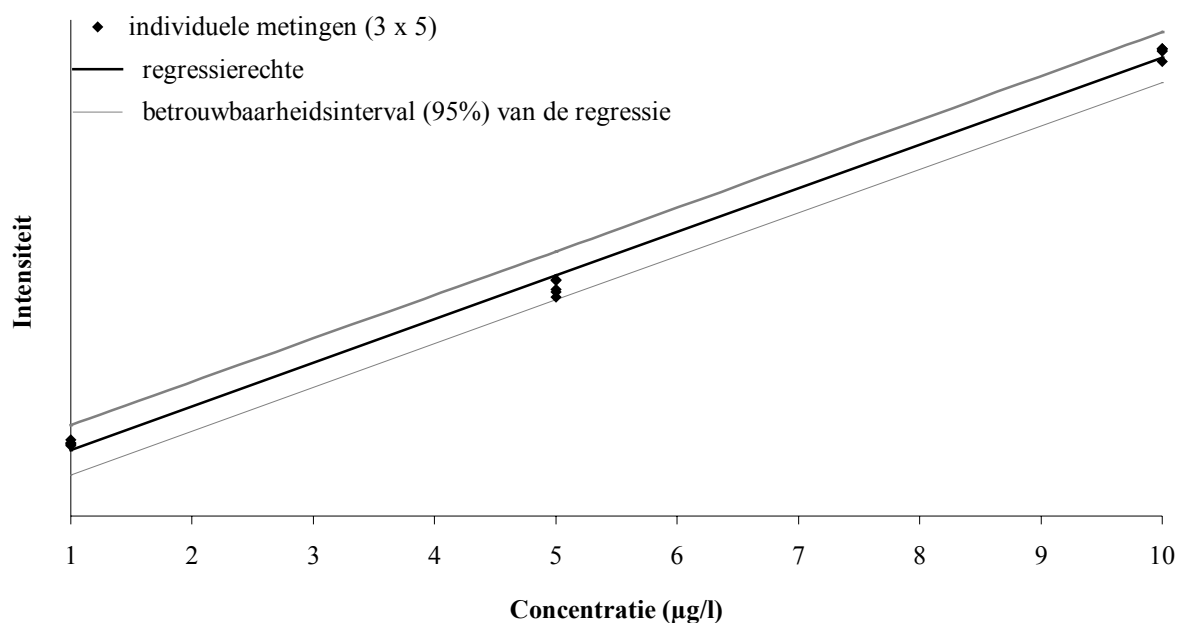
Voor de bepaling van TBA ($M=242$ g/mol; $Z=+1$) in het synthesepreparaat werd gebruik gemaakt van de electrospray-massaspectrometer (ES-MS) van het type Quatro Micro Triple Quadrupol (Micromass UK Ltd, Floatsroad Wytenshaw) op het Laboratorium voor Analytische Chemie. Voor een bespreking van het toestel en de werking ervan wordt verwezen naar Vanhulle *et al* (Vanhulle *et al*, 2002). Een voorbeeld van een massaspectrum en de meest relevante experimentele omstandigheden worden gegeven in figuur 5.11.



Figuur 5.11: Massaspectrum van een verdund synthesepreparaat: scan duration: 1 s; retention window: 0 tot 0,5 min; mass range: 50 tot 260; capillary: 3200 V; cone: 30 V; multiplier: -650 V; Source temp.: 120°C; desolvation temp.: 200 °C

5.3.4.2. Kalibratie

Standaard-TBA chloride en een aantal synthesepreparaten werden verdund met 50 % acetonitrile in water. Standaarden en monsters werden geanalyseerd via directe infusie en het signaal met m/z -verhouding 242 geïntegreerd. Figuur 5.12 toont een kalibratierechte voor de bepaling van TBA in het synthesepreparaat.



Figuur 5.12: Kalibratie van de ES-MS voor de bepaling van TBA.

5.3.4.3. Resultaten

In totaal werd in 5 preparaten de hoeveelheid TBA bepaald. De resultaten worden samengevat in tabel 5.4.

Tabel 5.4: TBA in 5 synthesepreparaten. De waarden tonen de massa aan TBA in het gehele preparaat (5ml). (*) geëxtrapoleerde waarde

preparaat	TBA (mg)
1	0,0087 ± 0,0083 (*)
2	0,0754 ± 0,0072
3	0,0641 ± 0,0074
4	0,0762 ± 0,0072
5	0,0828 ± 0,0071
<i>LD₅₀ (TBAI, rat, oraal) (mg/kg)</i>	<i>1990</i>
<i>LD₅₀ (TBAI, muis, oraal) (mg/kg)</i>	<i>1600</i>

Voor tetrabutylammonium chloride werden geen toxiciteitsdata teruggevonden. Daarom wordt er verondersteld dat de toxiciteit van tetrabutylammonium jodide (TBAI) (http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/TE/tetrabutylammonium_iodide.html) en tetrabutylammonium chloride sterk gelijkend zijn.

Met uitzondering van 'preparaat 1' werd gemiddeld $75 \pm 22 \mu\text{g}$ TBA in het eindpreparaat teruggevonden. Dit betekent dat de opzuiveringprocedure met het C₁₈ SEP-PAK kolommetje het gehalte aan TBA in het eindpreparaat met een factor van ongeveer 50 reduceert. Hieruit kan besloten worden dat de kleine hoeveelheid TBA die nog in het preparaat achterblijft onschadelijk zal zijn en hoogstwaarschijnlijk de resultaten van de *in vivo*-studie niet zal beïnvloeden.

5.4. Specifieke activiteit

De specifieke activiteit (A_m) van een radiotracer is de verhouding van de radioactiviteit (A) en de massa (m) van het product (zie 3.3.4.):

$$A_m = \frac{A \text{ (Bq)}}{m \text{ (g)}} \quad (2)$$

Voor de bepaling van de specifieke activiteit moeten dus zowel de radioactiviteit van het (radiochemisch zuivere) preparaat als de concentratie aan (chemisch zuiver) product bepaald worden. Doorgaans wordt niet de specifieke activiteit van een product berekend maar de molaire activiteit, met als eenheid (Bq/mol).

De meest eenvoudige manier om de specifieke activiteit van een gemerkte molecule te bepalen volgt de volgende strategie:

1. Met behulp van een analytische HPLC-methode en een geschikte detector wordt de concentratie (massa of molhoeveelheid) aan product in het preparaat bepaald. Deze bepaling kan tegelijkertijd gebeuren met de eerder besproken controle op de (radio)chemische zuiverheid.
2. Gedurende de analytische HPLC wordt de fractie waarin het product elueert opgevangen en de activiteit bepaald met een gekalibreerde radioactiviteitsdetector

(NaI(Tl)- of Ge-detector). Voor een radionuclide met korte halveringstijd zoals ^{11}C is het van het grootste belang om het tijdstip van de bepaling van de activiteit en het tijdstip waarop de specifieke activiteit moet gekend zijn (einde van de synthese of bestraling, moment van toepassing, ...) goed te noteren. Via de halveringstijd kan zo de juiste specifieke activiteit berekend worden.

Twee analytische methodes werden reeds beschreven voor de bepaling van acetylhomotaurine (in plasma en urine). De eerste methode maakt gebruik van HPLC met fluometrische en elektrochemische detectie (Chabenat *et al*, 1987), een tweede en gevoeligere methode gebeurt via GC-MS na derivatisatie (Girault *et al*, 1990).

Bij gebrek aan de juiste detectorsystemen werd gepoogd acetylhomotaurine in het synthesepreparaat te bepalen via analytische HPLC en UV-detectie bij 210 nm. De gevoeligheid van deze methode bleek echter onvoldoende om de kleine gehalten aan acetylhomotaurine in het preparaat te detecteren. Om deze reden werd de procedure zoals die hierboven werd beschreven rechtstreeks toegepast op de semi-preparatieve HPLC tijdens de synthese van [^{11}C]acamprosaat als volgt:

1. Met behulp van de semi-preparatieve HPLC tijdens de synthese van [^{11}C]acamprosaat wordt de concentratie aan product bepaald (via UV-detectie bij 210 nm). Omdat hier alle product gelijktijd op de kolom wordt gebracht is de detectie van acetylhomotaurine in dit geval wel gevoelig genoeg. Het nadeel is echter dat bij deze bepaling geen replicametingen kunnen worden verricht.
2. Tijdens de synthese wordt sowieso de fractie waarin het product elueert opgevangen. Onmiddellijk na de synthese wordt de activiteit in het preparaat gemeten met een gekalibreerde ionisatiekamer (Capintec). Deze activiteit is de radiochemische opbrengst van de synthese waaruit later het rendement en de specifieke activiteit kunnen berekend worden.

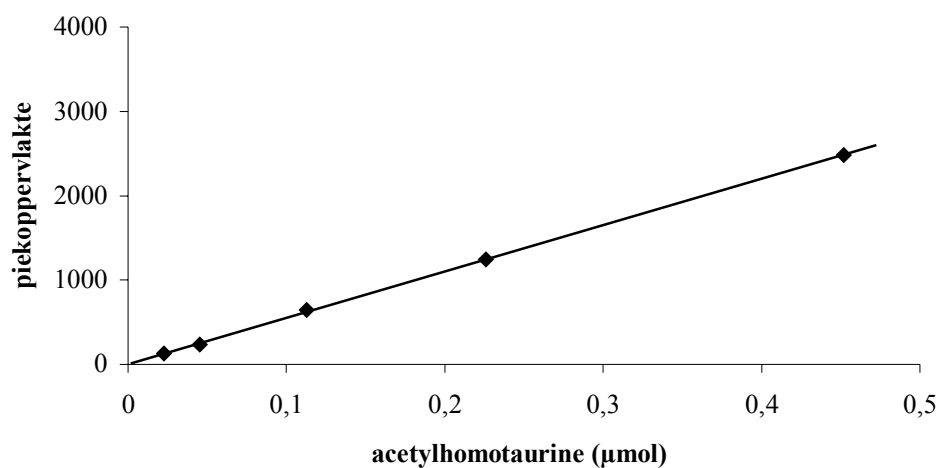
5.4.1. Bepaling van acetylhomotaurine via de semi-preparatieve HPLC

5.4.1.1. Chromatografie

Zie 4.3.3.1. en 4.3.3.2.

5.4.1.2. Kalibratie

Standaard-acetylhomotaurine werd opgelost in water en verschillende malen verdund. Een standaardreeks werd vervolgens geanalyseerd m.b.v. de semi-preparatieve HPLC van de syntheseopstelling. Figuur 5.13 toont een kalibratie voor de bepaling van acetylhomotaurine. De lineariteit van de analyse werd bevestigd tussen de grenzen 0,02 μmol en 0,5 μmol . De detectielimiet bedraagt 0,0057 μmol .



Figuur 5.13: Kalibratie van de semi-preparatieve HPLC voor de bepaling van acetylhomotaurine.

5.4.2. Bronnen van stabiel koolstof

In 3.4.4. werd reeds besproken dat bij de productie van ^{11}C in principe geen stabiele koolstofisotopen worden gevormd, hoewel tijdens de synthese, en dit zal uit de resultaten van deze paragraaf volgen, een grote overmaat dragerproduct wordt gevormd. Dit is hoofdzakelijk te wijten aan koolstofbevattende onzuiverheden in doelwitgassen en reagentia of door lekken in het transport- en/of synthesesysteem waardoor stabiele koolstofatomen (onder de vorm van atmosferisch koolstofdioxide) in het systeem kunnen dringen. Met het oog op de optimalisatie van de specifieke activiteit wordt gepoogd een idee te krijgen over het belang van de afzonderlijke koolstofbronnen. Deze werden in 3 categorieën verdeeld: CO_2 als onzuiverheid in het N_2 -doelwitgas, potentiële bronnen van stabiel koolstof in reagentia en andere bronnen.

5.4.2.1. CO_2 als onzuiverheid in het N_2 -doelwitgas

Als doelwitgas wordt zeer zuiver N_2 gebruikt (Alphagas 2, Air Liquide). Het certificaat vermeldt onzuiverheden CO_2 kleiner dan 0,1 ppm. Voor een doelwitvolume van 1 liter en een gasdruk van 10 bar kan dit omgerekend worden naar een totale hoeveelheid CO_2 van minder dan 0,039 μmol . Op de totale hoeveelheid drager die in het preparaat aanwezig is (zie tabel 5.5), vertegenwoordigt deze bron dus minder dan 18 %.

Aangezien dit gas het zuiverste is dat commercieel beschikbaar is, is de enigste mogelijkheid om deze bron van stabiel koolstof te reduceren, het optimaliseren van de dimensies van de doelwithouder. Daarom bezitten gastargets een conische structuur. Deze volgt immers de uitwaaiende vorm van de protonenbundel in het doelwitgas en minimaliseert zo het onbruikbare *dode* volume van de doelwithouder (Vandewalle, 1984).

5.4.2.2. Potentiële koolstofbronnen in reagentia

Het reagens waar isotopische onzuiverheden de meeste kans hebben om de specifieke activiteit te beïnvloeden is het grignardreagens gebruikt voor het binden van $^{11}\text{C}[\text{CO}_2]$. Atmosferisch CO_2 kan immers tijdens de bereiding van het grignardreagens, het stockeren en gedurende de synthese de oplossing binnendringen. Het is daarom absoluut noodzakelijk de nodige voorzorgen te nemen om deze *verontreiniging* tegen te gaan.

Tijdens de bereiding, de vorming van een grignardreagens uit alkylhalides en magnesium of de verdunning van een commercieel beschikbare oplossing, dient elk contact met de lucht vermeden te worden. Dit is slechts mogelijk door het werken onder een inerte atmosfeer en

licht verhoogde druk in een goed afgesloten systeem. Dit zijn in feite dezelfde voorzorgen als die genomen moeten worden voor het watervrij houden van de oplossing, een andere vereiste voor de bereiding van grignardreagentia.

De reagentia worden eveneens bewaard onder inerte atmosfeer, bij voorkeur onder licht verhoogde druk, in een hermetisch afgesloten recipiënt. De reagentia werden telkens kort voor de synthese vers aangemaakt en de gebruikte stockoplossing werd regelmatig vervangen.

Het grignardreagens wordt pas op het laatste moment overgebracht naar de syntheseopstelling en daar eveneens bewaard onder inerte atmosfeer. Deze werkwijze wordt in principe gehanteerd voor elk reagens in de syntheseopstelling.

Om het aandeel van de stabiele koolstofbron in de gebruikte reagentia te bepalen werd een 3-tal syntheses, identiek aan deze beschreven in 4.3.3.2., uitgevoerd, maar zonder gebruik te maken van doelwitgas of cryogene trap. Steeds werd een dragerhoeveelheid gevonden die lager was dan de detectielimiet van het semi-preparatieve HPLC-systeem (detectielimiet: 0,0057 μmol). Op de totale hoeveelheid drager die in het preparaat aanwezig is (zie tabel 5.4), vertegenwoordigt deze bron, dankzij de genomen voorzorgen, minder dan 3 %.

5.4.2.3. Andere bronnen van stabiel koolstof

De belangrijkste bijdrage aan dragerhoeveelheid in het synthesepreparaat (> 79 %) wordt geleverd ter hoogte van het doelwit, het transportsysteem van doelwitgas van de doelwithouder naar de cryogene trap in de syntheseopstelling en de cryogene trap. Door lekken in deze onderdelen kunnen blijkaar belangrijke hoeveelheden atmosferisch CO_2 in het systeem binnendringen en de specifieke activiteit van het preparaat negatief beïnvloeden. Daarom bleek het van cruciaal belang voor elke synthese de doelwithouder, het transportsysteem en de cryogene trap uitvoerig te spoelen met zuiver doelwitgas.

Om deze bron van stabiel koolstof te minimaliseren werken moderne systemen voor de productie van ^{11}C met veel kleinere doelwithouders. Met deze aanpassing wordt niet zozeer een reductie van het volume doelwitgas beoogd: deze doelwithouders opereren immers onder hogere druk om de protonenbundel te kunnen stoppen. Kleinere doelwithouders (en kleinere transportsystemen voor doelwitgas) kunnen door hun constructie lekken van atmosferisch CO_2 beter vermijden en laten een eenvoudiger onderhoud toe. Moderne systemen laten bovendien toe hogere bundelintensiteiten te gebruiken (tot 35 à 40 μA). Dit betekent een hogere ^{11}C -opbrengst zonder dat dit aanleiding geeft tot een verhoging van de dragerhoeveelheid.

Tenslotte wordt, indien de chemische achtergrond van de synthese het toelaat, steeds meer vertrokken van $[^{11}\text{C}]\text{methaan}$ i.p.v. $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (zie 3.2.2.). Omwille van de veel lagere

methaanconcentraties in de atmosfeer t.o.v. CO₂ kunnen zo veel lagere dragerconcentraties bekomen worden. De synthese van [¹¹C]methyl jodide via de ‘gasfase’-methode is de meest gekende (Larsen *et al*,1997).

5.4.3. Resultaten

In totaal werd de specifieke activiteit van 11 synthesepreparaten onderzocht. In tabel 5.5 worden alle gegevens samengevat. Gemiddeld (n=11) is de specifieke activiteit van [¹¹C]acetylhomotaurine $20,8 \pm 2,0$ GBq/μmol ($0,562 \pm 0,054$ Ci/μmol).

Tabel 5.5: De specifieke activiteit van [¹¹C]acetylhomotaurine in de 11 onderzochte synthesepreparaten. (EOS=End of Synthesis)

preparaat	Acetylhomotaurine (μmol)	Activiteit (EOS) (GBq)	Specifieke activiteit (EOS) (GBq/μmol)
1	0,238	4,40	18,5
2	0,194	4,96	25,5
3	0,256	4,77	18,7
4	0,237	4,63	19,5
5	0,180	4,88	27,2
6	0,227	4,37	19,3
7	0,215	4,55	21,2
8	0,182	3,45	19,0
9	0,211	4,63	21,9
10	0,241	4,44	18,4
11	0,244	4,74	19,4
gemiddeld	0,220 ± 0,018	4,53 ± 0,27	20,8 ± 2,0

5.5. Farmaceutische kwaliteit

5.5.1. Steriliteit en apyrogeniciteit

De farmaceutische kwaliteitsnormen stellen dezelfde eisen aan PET-radiofarmaca inzake steriliteit en apyrogeniciteit als elk ander farmaceutisch product. Zoals in 3.4.5.1. en 3.4.5.2. al werd aangehaald, zijn door het typisch karakter van de productie van dit type radiofarmaca en vooral de korte halveringstijd van het gebruikte radionuclide de normale methodes ter garantie van deze kwaliteitsnormen onmogelijk toepasbaar. Ook de controle van deze farmaceutische kwaliteitsnormen kan niet via de gangbare procedures verlopen. Het is immers onmogelijk om de tijdrovende testen op steriliteit en apyrogeniciteit uit te voeren tussen de productie en de toepassing van het preparaat in. Daarom wordt meestal in de laatste fase vóór de start van de routineproductie van een PET-tracer een aantal preparaten volgens de gestandaardiseerde werkwijze aangemaakt en gecontroleerd. Indien elk preparaat van een volledige reeks voldoet, dan kan de routine gestart worden. Het is vanzelfsprekend dat op regelmatige tijdstippen en cruciale momenten (wijzigingen in werkwijze of syntheseresultaten, na verlofperiodes, ...) controles moeten herhaald worden en dat de productie goed opgevolgd moet worden.

In dit werk wordt steriliteit beoogd door het gebruik van steriele waterige oplossingen (Baxter), steriele filtratie van het eindpreparaat doorheen een steriele bacteriënfilter (Sartorius) in geautoclaveerd glaswerk (Alltech) en het gebruik van steriele naalden (Microlance) en spuiten (Plastipak).

Apyrogeniciteit wordt nagestreefd door het gebruik van pyrogeenvrij materiaal: het water en de filters, naalden en spuiten die hierboven vermeld werden zijn eveneens gegarandeerd apyrogeen; het gebruikte glaswerk wordt vóór gebruik behandeld met geconcentreerd anorganische zuur (waterstofchloride, 37 % w/w), gespoeld met pyrogeenvrij water en gedroogd bij 110°C.

Aangezien de in dit werk geproduceerde preparaten uitsluitend toegediend werden aan proefdieren werden geen controles op steriliteit en apyrogeniciteit uitgevoerd.

5.5.2. Isotoniciteit en pH

De isotoniciteit en de pH van de preparaten wordt binnen fysiologische grenzen gehouden d.m.v. een isotone fosfaatbuffer (6,13 g/l Na_2HPO_4 , 1,49 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 7,20 g/l NaCl). Aangezien deze bufferoplossing pas in de laatste stap van de productie wordt geïntroduceerd zijn pH en isotoniciteit zo goed als zeker gegarandeerd.

In 9 preparaten werd de pH gecontroleerd en gemiddeld bedroeg die $7,19 \pm 0,11$. De isotoniciteit werd niet gecontroleerd.

5.5.3. Toxiciteit

In 5.3 werd de aanwezigheid van mogelijke toxische contaminanten reeds uitvoerig bestudeerd (zie 5.3.2., 5.3.3. en 5.3.4.). Er werd aangetoond dat de concentratie van deze stoffen ruim beneden de acute toxiciteitsniveaus bleven. Op basis van de toegediende dosis acamprosaat aan patienten (zie 6.1.4.) kan geconcludeerd worden dat de hoeveelheid drager-acamprosaat in het eindpreparaat eveneens geen problemen qua giftigheid zal opleveren. Om deze redenen werden geen toxiciteitstesten uitgevoerd.

5.6. Besluit

Het synthesepreparaat werd gecontroleerd op basis van de kwaliteitsnormen die gelden voor PET-radiofarmaca. Radionuclidische en radiochemische zuiverheid, alsook de identiteit van het syntheseproduct werden daarbij bevestigd. De chemische onzuiverheden bleven duidelijk beneden elke drempelwaarde. De specifieke activiteit van het product is wellicht voldoende om binnen een korte tijdsspanne receptorbindingproeven mogelijk te maken. De farmaceutische kwaliteit is, hoewel niet volledig onderzocht, voldoende gegarandeerd om dierstudies aan te vatten.

5.7. Referenties

133. **Alaiz M, Navarro JL, Giron J and Vioque E** (1992) Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate *Journal of chromatography* 591, 181-186.
134. **Beale SC, Savage JC, Wiesler D, Wietstock SM and Novotny M** (1988) Fluorescence reagents for high-sensitivity chromatographic measurements of primary amines. *Analytical Chemistry* 60, 1765- 1769.
135. **Chabenat C, Ladure P, Moore P, Boucly P and Boismare F** (1987) Determination of calcium acetylhomotaurinate by liquid chromatography with fluorimetric and electrochemical detection. *Journal of Chromatography* 414 (2), 417-422.
136. **Cumming JB** (1962) CLSQ, the Brookhaven Decay Curve Analysis Program, *Brookhaven Natl. Lab., [Rep.] BNL* (6470) (unpublished) – Reference 48 in Chapter 10: Strijckmans K (1994) Charged Particle Activation Analysis in *Chemical Analysis by Nuclear Methods* Edited by Alfassi ZB, John Wiley & Sons Ltd.
137. **de Montigny P, Stobaugh JF, Givens RS, Carlson RG, Srinivasachar K, Sternson LA and Higuchi T** (1987) Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/Cyanide Ion: A Rationally Designed Fluorogenic Reagent for Primary Amines. *Analytical Chemistry* 59, 1096-1101.
138. **Decay data search - NuDat database:** <http://nucleardata.nuclear.lu.se/Database/Nudat/>
139. **Fabre H, Perrin C and Bose N** (1999) Determination of homotaurine as impurity in calcium acamprosate by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 853, 421-430.
140. **Fariello RG and Golden GT** (1980) Homotaurine – A GABA Agonist With Anticonvulsant Effects. *Brain Research Bulletin* 5 (Suppl. 2), 691-699.
141. **Ferreira IMPLVO, Nunes MV, Mendes E, Remiao F and Ferreira MA** (1997) Development of an HPLC-UV method for determination of taurine in infant formulae and breast milk. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 20, 1269-1278.
142. **Girault J, Gobin P and Fourtillan JB** (1990) Determination of calcium acetylhomotaurinate in human plasma and urine by combined gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 530, 295-305.
143. **Hill DW, Walters FH, Wilson TD and Stuart JD** (1979) High performance liquid chromatographic determination of amino acids in the picomole range. *Analytical Chemistry* 51, 1338-1341.
144. **ICH Guideline – Residual Solvents** (1997) Connelly JC, Hasegawa R, McArdle JV and Tucker ML (1997) *PHARMEUROPA* 9, Nr. 1 – Supplement, edited by Council of Europe.
145. **Imai K, Toyooka T and Miyano H** (1984) Fluorogenic reagents for primary and secondary amines and thiols in high-performance liquid chromatography. *Analyst* 109, 1365-1373.
146. **Larsen P, Ulin J, Dahlstrøm K and Jensen M** (1997) Synthesis of [¹¹C]iodomethane by iodination of [¹¹C]methane. *Applied Radiation and Isotopes* 48, 153-157.
147. **Lindroth P and Mopper K** (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Analytical Chemistry* 51, 1667-1674.

148. **Mc. Mahon GP, O Kennendy R and Kelly MT** (1996) High-performance liquid chromatographic determination of taurine in human plasma using pre-column extraction and derivatisation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* 14, 1287-1294.
149. **Sakai T and Nagasawa T** (1992) Simple, rapid and sensitive determination of plasma taurine by high-performance liquid-chromatography using precolumn derivative formation with fluorecamine. *Journal of chromatography-Biomedical Applications* 576, 155-157.
150. **Stocchi V, Palma F, Piccoli G, Biagiarelli B, Cucchiarini I and Magnani M** (1994) HPLC analysis of taurine in human plasma sample using the DABS-Cl reagent with sensitivity at picomole level. *Journal of liquid chromatography* 17, 347-357.
151. **Vandewalle T** (1984) De productie van $^{11}\text{CO}_2$, $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ en ^{11}C -gemerkte moleculen. *Doctoraatsthesis Rijksuniversiteit Gent*.
152. **Vanhulle M, Zhang C, Zhang X and Cornelis R** (2002) Arsenic speciation in Chinese seaweeds using HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS. *The Analyst* 127, 634-640.

6. *In vitro* en *in vivo*-studies met koolstof-11-gemerkt acamprosaat

In hoofdstuk 1 werd de doelstelling van dit onderzoek geformuleerd: de mogelijkheid nagaan om acamprosaat in het centrale zenuwstelsel van de mens te bestuderen met behulp van PET. In hoofdstuk 2. (paragraaf 2.4.) werd het bestaan van drie mogelijke benaderingen om de farmacodynamiek van het product te onderzoeken, geformuleerd. In eerste instantie werd hierbij gekozen voor de “rechtstreekse” benadering. In de hoofdstukken 4. en 5. werd tenslotte beschreven hoe het eerste deel van de doelstelling kon worden verwezenlijkt: de synthese van een hoogkwalitatieve PET-tracer voor acamprosaat.

In dit hoofdstuk wordt nagegaan of de bekomen tracer over de geschikte farmacologische karakteristieken beschikt om PET-studies te kunnen verrichten. Cruciale eigenschappen van de molecule daarbij zijn (1) een snelle klaring uit het bloed, (2) een zo klein mogelijke metabolisatie van de gemerkte molecule en (3) een goede penetratie doorheen de BHB.

Een snelle klaring uit het bloed, tezamen met een goede doordringing van de BHB is van groot belang voor het verkrijgen van duidelijke PET-beelden. Beide bevorderen immers de hersenactiviteit/bloedactiviteit ratio, die voldoende hoog moet zijn om tot significante resultaten te komen tijdens receptorstudies.

Een zo klein mogelijk tracermetabolisme is eveneens een belangrijk gegeven aangezien PET geen onderscheid kan maken tussen de verschillende moleculaire vormen die een PET-radionuclide dragen.

Vooraf worden de gekende farmacokinetische eigenschappen van acamprosaat besproken, vervolgens wordt bestudeerd of [^{11}C]acamprosaat aan de farmacologische vereisten voldoet om met PET te kunnen bestudeerd worden.

6.1. Acamprosaat: gekende farmacokinetische gegevens

Verschillende farmacokinetische studies werden reeds uitgevoerd in proefdieren en gezonde vrijwilligers maar de meeste data werden, wellicht vanuit commercieel oogpunt, niet gepubliceerd. De belangrijkste gegevens werden samengevat in 2 overzichtartikels (Wilde *et al*, 1997 en Saivin *et al*, 1998) en in de proceedings van het eerste Campralsymposium¹ (Durbin *et al*, 1995).

¹ Totnogtoe werd slechts één Campralsymposium gehouden

6.1.1. Resorptie en biologische beschikbaarheid

Om zijn plaats van inwerking te bereiken, moet het geneesmiddel in eerste instantie in het bloedplasma worden opgenomen. Behalve in het geval het geneesmiddel direct in de bloedbaan wordt gebracht (intravasculaire toediening) is resorptie nodig, d.w.z. het overbrengen van het geneesmiddel vanuit de buitenwereld tot in het plasma. Om uit te drukken hoe snel en in welke mate het geneesmiddel de algemene circulatie bereikt, wordt het begrip biologische beschikbaarheid gebruikt. De biologische beschikbaarheid van een geneesmiddel is de fractie van de toegediende dosis die onveranderd de algemene circulatie bereikt binnen een bepaalde periode.

6.1.1.1. Dierstudies

Studies tonen aan dat acamprosaat snel, maar in beperkte mate wordt opgenomen via het gastro-intestinaal systeem. In de gebruikte diersystemen worden kleine verschillen genoteerd voor de resorptiesnelheid en biologische beschikbaarheid. Na orale toediening verschijnt acamprosaat snel in het plasma (na 15 tot 30 min), gedissocieerd in calcium en het werkzame bestanddeel acetylhomotaurine. De biologische beschikbaarheid na orale toediening is maximaal 16 % in ratten. In honden is de biologische beschikbaarheid na orale toediening van een dosis van 25 mg/kg gelijk aan 60 %.

6.1.1.2. Studies in de mens

De resorptie van acamprosaat werd eerst bestudeerd in 4 gezonde vrijwilligers via een orale inname van ^{14}C -gemerkt acamprosaat. In totaal werd 11 % van de radioactiviteit teruggevonden in de urine tegenover 88 % in faeces. Aangezien de oraal ingenomen radioactiviteit slechts in de urine kan terechtkomen na opname in de bloedbaan, kan uit de urineconcentratie de biologische beschikbaarheid bepaald worden. De snelheid van opname is onderhevig aan sterke individuele variatie maar doorgaans gebeurt de resorptie van acamprosaat binnen de 4 uur. De hoogste plasmaconcentraties ($C_{\max}$, $T_{\max}$) werden waargenomen tussen 1 en 2,5 uur na inname.

Een tweede studie onderzocht de orale biologische beschikbaarheid in 24 gezonde mannelijke vrijwilligers. Deze kregen een enkele orale dosis van 666 mg acamprosaat, 14 dagen later gevolgd door een inname van 666 mg, 3 maal per dag gedurende 7 dagen en tenslotte na 17 dagen een 15 minuten durende intraveneuze infusie van 666 mg acamprosaat. Bloed- en

urinestalen werden afgenomen respectievelijk gedurende 72 uur en 96 uur na de enkele orale en intraveneuze dosis. Gedurende de multiële-dosis procedure werden bloedstalen afgenomen op de 1^e, 7^{de} en 8^{ste} dag en urine verzameld op de 1^e en 7^{de} dag. De gemiddelde absolute biologische beschikbaarheid bedroeg $11 \pm 1 \%$.

Verschillende studies toonden aan dat een maximale plasmaconcentratie werd gevonden van $162 \pm 22 \mu\text{g/l}$ tot $212 \pm 83 \mu\text{g/l}$ tussen $4,3 \pm 1,2$ uur en $15,3 \pm 2,2$ uur na toediening na een enkele orale dosis van 666 mg acamprosaat. *Steady-state* concentraties van acamprosaat in het plasma werden bereikt op de 7^{de} dag van de gedoseerde inname. Bij een dagelijkse inname (3 keer 666 mg of 2 maal 1000 mg) van 2000 mg acamprosaat werd een *steady-state* C_{max} bereikt van $370 \pm 145 \mu\text{g/l}$ tot $644 \pm 386 \mu\text{g/l}$ voor een T_{max} van $3,5 \pm 0,5$ uur tot $9,5 \pm 2,1$ uur.

6.1.2. Verdeling

Vanuit het plasma verdeelt het geneesmiddel zich naar de verschillende weefsels, structuren die instaan voor het effect en naar de organen die instaan voor de eliminatie. De snelheid van verdeling naar een weefsel hangt af enerzijds van het bloeddebiet naar dat weefsel en anderzijds van de fysisch-chemische eigenschappen van het geneesmiddel. Om uit te drukken hoe in welke mate het geneesmiddel zich vanuit het plasma verdeelt naar de verschillende weefsels, wordt het begrip verdelingsvolume gebruikt. Het verdelingsvolume van een geneesmiddel wordt berekend uit de verhouding tussen de hoeveelheid geneesmiddel aanwezig in het lichaam, de dosis van deze stof (D), en de totale bloedplasmaconcentratie (C_p) op hetzelfde ogenblik.

$$V_d (\text{l}) = \frac{D (\text{mg})}{C_p (\text{mg/l})} \quad (1)$$

Dit volume geeft m.a.w. weer in welk volume lichaamsvocht het geneesmiddel zich schijnbaar verdeelt met een concentratie gelijk aan die in het plasma. Dit berekende volume komt meestal niet overeen met een anatomisch of fysiologisch deel van het organisme. Nochtans geeft het een idee over de verdeling van het geneesmiddel.

Wanneer het geneesmiddel noch in het plasma, noch in de weefsels (intracellulair) wordt gebonden, dan verdeelt het zich evenredig over het totale lichaamswater. Het

verdelingsvolume bedraagt dan ongeveer 42 liter per 70 kg. In het geval de binding in plasma belangrijker is dan in de weefsels zal het schijnbare verdelingsvolume kleiner zijn dan het totale lichaamswater. In het geval de weefselbinding van het geneesmiddel belangrijker is dan de plasmabinding, dan zal het schijnbare verdelingsvolume van het geneesmiddel groter zijn dan het totale lichaamswater.

6.1.2.1. Dierstudies

Via een [^{14}C]acamprosaat tracerstudie in proefdieren werd aangetoond dat acamprosaat zich in beperkte mate verdeelt in de verschillende organen en weefsels. Enkel in de lever en de nieren werden hoge concentraties [^{14}C]acamprosaat teruggevonden. 96 uren na toediening kon geen radioactiviteit meer worden gemeten in het proefdier. Er werd ook aangetoond dat acetylhomotaurine niet bindt op plasma-eiwitten.

Met behulp van de ^{14}C -tracer werd eveneens aangetoond dat acamprosaat doorheen de BHB kan dringen en zich quasi homogeen in de hersenen verdeelt (Durbin *et al*, 1995).

6.1.2.2. Studies in de mens

Na een enkele 15 minuten durende infusie van 666 mg acamprosaat werd een verdelingsvolume (V_d) van 72 ± 3 l gevonden; de V_d -waarde tijdens *steady-state* bedroeg 24 ± 1 l. Andere studies tonen met een infusie van 10, 20 en 30 mg/kg een V_d van respectievelijk 19 ± 4 l, 19 ± 5 l en 20 ± 4 l. Deze waarden duiden op een matige distributie van acamprosaat.

6.1.3. Eliminatie

Biotransformatie (metabolisme) en renale excretie zijn de voornaamste eliminatiemechanismen. Minder belangrijk of minder frequent is eliminatie via de gal, de long en zweet.

6.1.3.1. Dierstudies

De faeces- en urinestalen van ratten, konijnen en honden werden verzameld na toediening van [^{14}C]acamprosaat en onderzocht via HPLC. De resultaten toonden een enkele radioactieve

component identiek aan acetylhomotaurine. Dit suggereert dat deze stof niet gemetaboliseerd wordt.

Acamprosate wordt geëlimineerd uit het plasma via de nieren binnen de 120 uren na orale toediening. 72 uren na intraveneuze toediening van acamprosate in ratten wordt 90 % van de dosis teruggevonden in de urine en 8,6 % in de faeces. Het meest waarschijnlijke excretiemechanisme is glomerulaire filtratie via de nieren, maar excretie via de galblaas en het intestinaal systeem kan eveneens voorkomen.

6.1.3.2. Studies in de mens

Net als in de dierstudies werden de faeces- en urinestalen van de onderzochte vrijwilligers verzameld na toediening van [¹⁴C]acamprosaat en onderzocht via HPLC. Op basis van de resultaten werd, net als bij de proefdierstudie, geen metabolisatie van acamprosaat vastgesteld.

De resultaten van de verschillende studies naar de excretie van acamprosaat vertonen sterke onderlinge verschillen. Vast staat dat na intraveneuze toediening ruim 90 % van de geïnjecteerde dosis onveranderd wordt teruggevonden in de urine. Wellicht gebeurt de eliminatie uit het plasma via glomerulaire filtratie. De gemiddelde halveringstijd van acamprosaat na intraveneuze infusie was $3,2 \pm 0,2$ uur.

Aangezien de absorptie van acamprosaat de snelheidsbepalende stap (langzaamste mechanisme) is in de farmacokinetiek van acamprosaat, wordt de halveringstijd na orale inname verlengd tot ongeveer 13 uur (flipflop-mechanisme).

6.1.4. Dosis

Acamprosaat is commercieel beschikbaar onder de vorm van een maagresistente manteltablet van 333 mg (Campral[®]) en wordt 3 maal per dag oraal ingenomen. De aangewezen dosis bedraagt 1,3 g/dag voor patiënten met een lichaamsgewicht < 60 kg (2 tabletten 's morgens, 1 tablet 's middags en 1 tablet 's nachts) of 2,0 g/dag voor patiënten met een lichaamsgewicht > 60 kg (2 tabletten 's morgens, 2 tabletten 's middags en 2 tabletten 's nachts). De aangewezen duur van de acamprosaatkuur is 1 jaar.

6.1.5. Farmacokinetiek van acamprosaat in patiënten

De farmacokinetische parameters voor acamprosaat werden ook onderzocht in patiënten met alcoholverslaving. Uit de studie bleek dat er geen verschil kon worden gevonden tussen gezonde personen en alcoholverslaafden die een ontwenningperiode hadden doorgemaakt.

6.1.6. Besluit

Acamprosaat wordt na orale inname slechts in beperkte mate via het gastro-intestinaal systeem opgenomen in het bloed. De stof verspreidt zich matig in de verschillende organen en weefsels, met uitzondering van de lever en de nieren, maar is in staat de bloed/hersenbarrière te doorkruisen. De stof wordt snel via de nieren uitgescheiden in de urine zonder te worden gemetaboliseerd.

6.2. Biodistributie van [^{11}C]acamprosaat

Voor de studie van de verdeling van [^{11}C]acamprosaat in het lichaam, werden muizen (NMRI-stam) van het mannelijk geslacht gebruikt. Tot aan het begin van het experiment werden de dieren voorzien van water en voedsel *ad libitum*. De dierexperimenten werden uitgevoerd volgens de erkende wettelijke en ethische regels na positief advies van de Ethische Commissie Proefdieren van de Faculteit Geneeskunde van de Universiteit Gent op de dienst radiofarmacie, geneesmiddelenleer, faculteit farmaceutische wetenschappen, Harelbekestraat 72 - 9000 Gent.

6.2.1. Procedure

Ongeveer 37 MBq (1 mCi) [^{11}C]acetylhomotaurine in 100 μl isotone fosfaatbuffer wordt via de staartvene in de muizen geïnjecteerd. Na 11 vastgestelde tijdstippen (20 en 40 s; 1; 1,5; 2; 3; 5; 10; 20; 40 en 60 min) worden de dieren verdoofd met diëthylether en gedood door decapitatie. Bloed wordt opgevangen en de belangrijkste organen en weefsels: hersenen, hart,

longen, lever, nieren, maag, dikke en dunne darm, milt, blaas en vetweefsel afgezonderd. Alle organen en weefsels worden gewassen in 0,9 % NaCl-oplossing, gedroogd met absorberend papier en bewaard in vooraf gewogen telflesjes. De ^{11}C -activiteit in de verschillende preparaten wordt bepaald met een NaI(Tl)-detector. Tenslotte wordt de massa van alle monsters bepaald en via de dichtheid (een dichtheid van 1 g/ml wordt aangenomen) het volume berekend.

Na correctie voor radioactief verval worden de resultaten weergegeven als SUR (*Standard Uptake Ratio*) waarde. Deze waarde geeft de verhouding weer tussen de ROI-activiteit per ml ROI-volume (ROI = *Region of Interest*, t.t.z. het weefsel of orgaan waarin de activiteit bepaald wordt) en de geïnjecteerde dosis per g lichaamsgewicht:

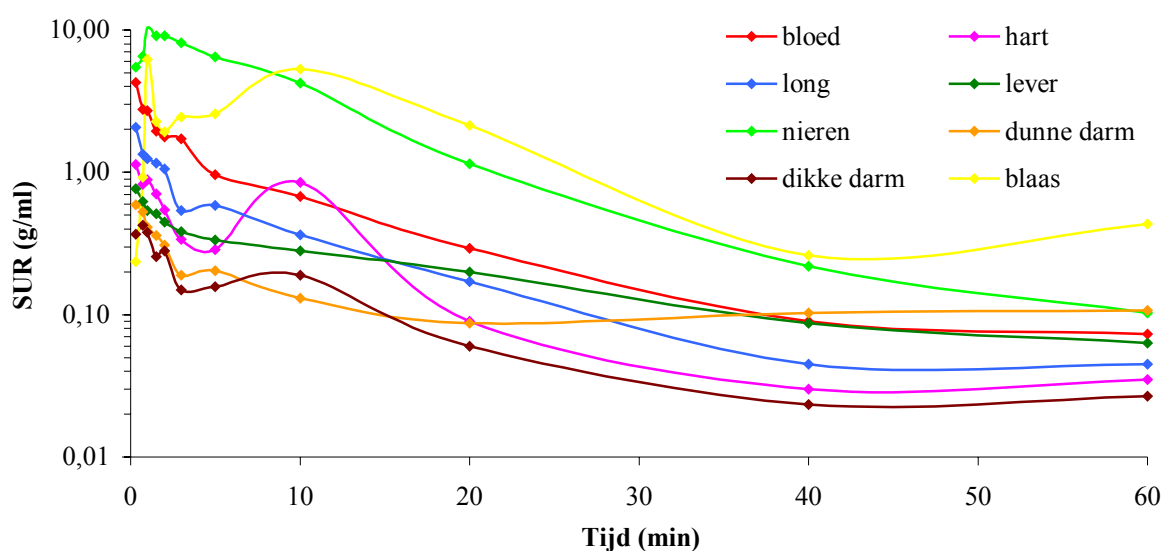
$$\text{SUR (g/ml)} = \frac{\text{ROI-activiteit (tellen/s)} / \text{ROI-volume (ml)}}{\text{Geïnjecteerde activiteit (tellen/s)} / \text{massa proefdier (g)}} \quad (3)$$

De data worden eveneens weergegeven als % geïnjecteerde dosis:

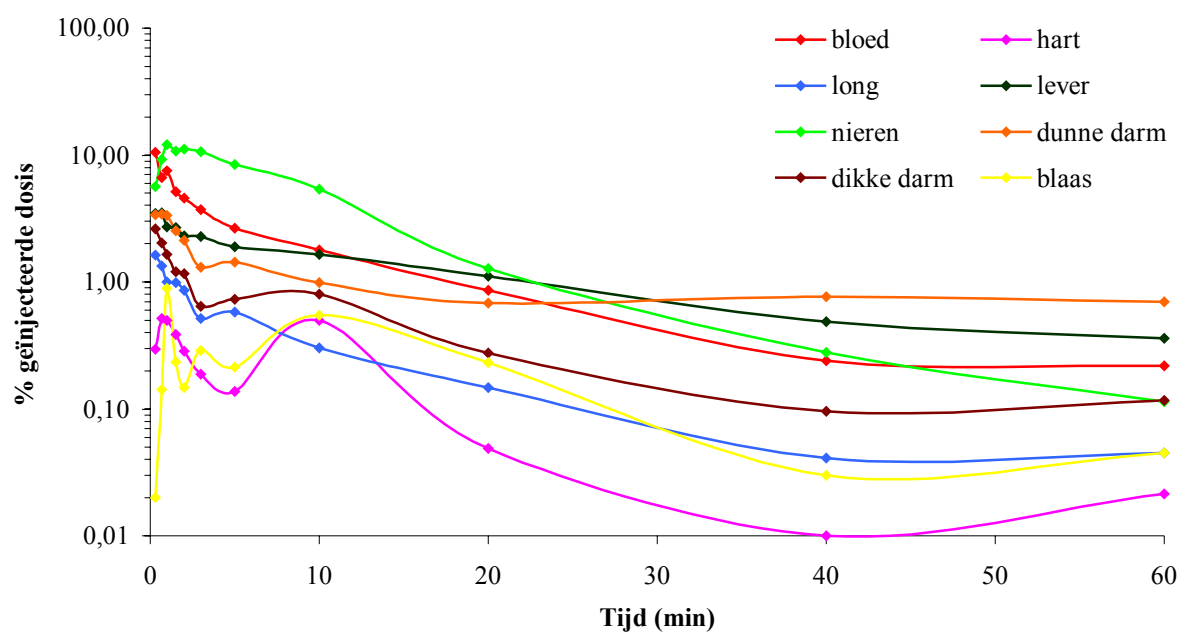
$$\% \text{ Geïnjecteerde dosis} = \frac{100 * \text{ROI-activiteit (tellen/s)}}{\text{Geïnjecteerde activiteit (tellen/s)}} \quad (4)$$

6.2.2. Resultaten van de biodistributie

Het experiment werden in drievoud uitgevoerd. De resultaten worden weergegeven in tabel 6.1 en 6.2 en grafisch voorgesteld in figuur 6.1 en figuur 6.2.



Figuur 6.1: Biodistributie van ^{11}C -activiteit na intraveneuze injectie van 37 mBq (100 μl) [^{11}C]acetylhomotaurine in mannelijke NMRI muizen. Voor de duidelijkheid van de verschillende grafieken werd een logaritmische ordinaat gebruikt.



Figuur 6.2: Biodistributie van ^{11}C -activiteit na intraveneuze injectie van 37 mBq (100 μl) [^{11}C]acetylhomotaurine in mannelijke NMRI muizen. Voor de duidelijkheid van de verschillende grafieken werd een logaritmische ordinaat gebruikt.

Tabel 6.1: Biodistributie van ^{11}C -activiteit in mannelijke NMRI muizen na intraveneuze injectie van 37 mBq (100 μl) [^{11}C]acetylhomotaurine. De resultaten zijn het gemiddelde van 3 onafhankelijke experimenten en worden weergegeven als SUR-waarde (g/ml) en hun standaarddeviatie. Voor alle weefsels en organen wordt een dichtheid van 1 g/ml aangenomen.

Orgaan of weefsel	20 s	40 s	1 min	1,5 min	2 min	3 min	5 min	10 min	20 min	40 min	60 min
Bloed	4,26 $\pm$ 0,74	2,78 $\pm$ 0,30	2,72 $\pm$ 0,76	1,94 $\pm$ 0,63	1,77 $\pm$ 0,41	1,72 $\pm$ 0,86	0,96 $\pm$ 0,28	0,68 $\pm$ 0,24	0,29 $\pm$ 0,16	0,09 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,01
Hart	1,14 $\pm$ 0,16	0,82 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,26	0,71 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,10	0,34 $\pm$ 0,20	0,29 $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 1,13	0,09 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,04
Lever	0,76 $\pm$ 0,09	0,62 $\pm$ 0,12	0,54 $\pm$ 0,09	0,51 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,13	0,33 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,05	0,09 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,02
Nieren	5,49 $\pm$ 2,25	6,57 $\pm$ 2,12	10,3 $\pm$ 3,2	9,12 $\pm$ 2,14	9,08 $\pm$ 0,31	8,16 $\pm$ 2,39	6,45 $\pm$ 3,13	4,22 $\pm$ 1,06	1,15 $\pm$ 1,03	0,22 $\pm$ 0,12	0,10 $\pm$ 0,03
Dunne darm	0,59 $\pm$ 0,06	0,53 $\pm$ 0,17	0,41 $\pm$ 0,11	0,36 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,08	0,20 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,05	0,09 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,06	0,11 $\pm$ 0,09
Dikke darm	0,37 $\pm$ 0,08	0,43 $\pm$ 0,11	0,38 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,08	0,15 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01
Blaas	0,24 $\pm$ 0,33	0,92 $\pm$ 0,55	6,20 $\pm$ 6,93	2,28 $\pm$ 0,35	1,93 $\pm$ 1,71	2,44 $\pm$ 0,62	2,58 $\pm$ 1,03	5,32 $\pm$ 3,40	2,15 $\pm$ 1,27	0,26 $\pm$ 0,26	0,44 $\pm$ 0,04
Long	2,08 $\pm$ 0,25	1,34 $\pm$ 0,33	1,25 $\pm$ 0,25	1,16 $\pm$ 0,39	1,06 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,24	0,58 $\pm$ 0,21	0,36 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,08	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01
Maag	0,28 $\pm$ 0,24	0,28 $\pm$ 0,22	0,23 $\pm$ 0,17	0,31 $\pm$ 0,33	0,20 $\pm$ 0,15	0,10 $\pm$ 0,07	0,14 $\pm$ 0,09	0,10 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,03
Milt	0,57 $\pm$ 0,12	0,44 $\pm$ 0,12	0,41 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,04	0,33 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,08	0,19 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,09	0,08 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,01

Tabel 6.2: Biodistributie van ^{11}C -activiteit in mannelijke NMRI muizen na intraveneuze injectie van 37 mBq (100 μl) [^{11}C]acetylthomaurine. De resultaten zijn het gemiddelde van 3 onafhankelijke experimenten en worden weergegeven als % geïnjecteerde dosis en hun standaarddeviatie.

Orgaan of weefsel	20 s	40 s	1 min	1.5 min	2 min	3 min	5 min	10 min	20 min	40 min	60 min
Bloed	10,5 $\pm$ 3,2	6,6 $\pm$ 2,2	7,5 $\pm$ 2,8	5,2 $\pm$ 1,8	4,6 $\pm$ 1,2	3,7 $\pm$ 2,1	2,65 $\pm$ 0,83	1,8 $\pm$ 1,1	0,86 $\pm$ 0,48	0,24 $\pm$ 0,07	0,22 $\pm$ 0,01
Hart	0,30 $\pm$ 0,26	0,52 $\pm$ 0,05	0,50 $\pm$ 0,18	0,39 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,10	0,19 $\pm$ 0,12	0,14 $\pm$ 0,02	0,50 $\pm$ 0,63	0,05 $\pm$ 0,03	0,01 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,02
Lever	3,44 $\pm$ 1,70	3,52 $\pm$ 0,45	2,70 $\pm$ 0,65	2,68 $\pm$ 0,45	2,31 $\pm$ 0,43	2,28 $\pm$ 0,87	1,88 $\pm$ 0,30	1,65 $\pm$ 0,44	1,11 $\pm$ 0,39	0,49 $\pm$ 0,21	0,36 $\pm$ 0,14
Nieren	5,62 $\pm$ 4,13	9,28 $\pm$ 2,91	12,1 $\pm$ 1,9	10,8 $\pm$ 1,3	11,2 $\pm$ 2,5	10,7 $\pm$ 1,2	8,45 $\pm$ 3,91	5,37 $\pm$ 0,83	1,28 $\pm$ 0,94	0,28 $\pm$ 0,19	0,11 $\pm$ 0,03
Dunne darm	3,38 $\pm$ 2,72	3,40 $\pm$ 0,55	3,36 $\pm$ 0,28	2,53 $\pm$ 0,36	2,12 $\pm$ 0,41	1,30 $\pm$ 0,52	1,43 $\pm$ 0,33	0,99 $\pm$ 0,32	0,68 $\pm$ 0,22	0,76 $\pm$ 0,39	0,69 $\pm$ 0,52
Dikke darm	2,61 $\pm$ 1,16	2,02 $\pm$ 0,75	1,64 $\pm$ 0,21	1,21 $\pm$ 0,25	1,16 $\pm$ 0,25	0,65 $\pm$ 0,25	0,74 $\pm$ 0,16	0,80 $\pm$ 0,19	0,27 $\pm$ 0,16	0,10 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,05
Blaas	0,02 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,11	0,89 $\pm$ 1,04	0,24 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,12	0,29 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,08	0,55 $\pm$ 0,32	0,23 $\pm$ 0,15	0,03 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,02
Long	1,62 $\pm$ 0,11	1,34 $\pm$ 0,23	1,00 $\pm$ 0,17	0,99 $\pm$ 0,26	0,86 $\pm$ 0,11	0,52 $\pm$ 0,14	0,58 $\pm$ 0,25	0,30 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,07	0,04 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01
Maag	0,94 $\pm$ 0,72	0,83 $\pm$ 0,49	0,85 $\pm$ 0,05	0,69 $\pm$ 0,11	0,52 $\pm$ 0,06	0,32 $\pm$ 0,12	0,39 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,07	0,07 $\pm$ 0,04
Milt	0,29 $\pm$ 0,12	0,24 $\pm$ 0,07	0,21 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,08	0,14 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,04	0,01 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02

6.2.3. Besluit

Uit het biodistributie-experiment kan geconcludeerd worden dat:

1. [^{11}C]acamprosaat vertoont een snelle klaring uit het bloedcompartiment. Na 2 minuten is reeds meer dan 95 % van de geïnjecteerde activiteit uit het bloed verdwenen. Dit wijst op een snelle distributie naar andere weefsels en organen.
2. Net als werd aangetoond in eerdere dierstudies (zie 6.1.2.1.) wordt de hoogste activiteit waargenomen in de nieren en de lever. Hoge activiteiten worden eveneens waargenomen in de dikke en dunne darm (zie figuur 6.1). De activiteit in de ingewanden bereikt na een initiële daling van de activiteit een plateau. Dit kan wijzen op een beperkte eliminatie via de galblaas naar het darmkanaal (biliaire excretie).
3. Wordt de grootte van het orgaan of weefsel meegerekend dan valt vooral het belang van de blaas (renale excretie van [^{11}C]acamprosaat) en de long op (zie figuur 6.2).

Het is duidelijk dat de potentiële PET-tracer van acamprosaat voldoet aan de eerste farmacokinetische voorwaarde, nl. een snelle bloedklaring. Op basis van de literatuurgegevens over de eliminatie van acamprosaat en de bevindingen in dit experiment (hoge tracerconcentraties in de nieren en in de urine - gegevens niet weergegeven) kan die snelle bloedklaring verklaard worden door de snelle eliminatie van de bloedactiviteit via de nieren.

6.3. Eliminatie van [^{11}C]acamprosaat via metabolisme

Vanaf het moment dat een radiofarmacon aan een levend wezen wordt toegediend, is het onderhevig aan *in vivo* transformatie of metabolisme. Om de resultaten van de biodistributie op een juiste manier te kunnen interpreteren moet rekening worden gehouden met dit metabolisme. Bovendien is kennis van de gemetaboliseerde fractie essentieel voor het bekomen van kwantitatieve PET-gegevens.

Hydrolyse van acetylhomotaurine werd in de loop van het onderzoek naar een geschikte synthesesmethode voor [^{11}C]acetylhomotaurine vastgesteld bij extreme omstandigheden: sterk

basisch milieu en hoge temperatuur (zie 4.3.2.6.). *In vivo* zijn deze drastische omstandigheden dikwijls niet nodig omwille van de katalytische werking van enzymen.

In de natuur kunnen 2 verschillende metabolisatiewegen onderscheiden worden. Bij de zogenaamde “fase 1 reacties” worden door oxidatie, reductie of hydrolyse nieuwe functionele groepen in de molecule aangebracht. “Fase 2 reacties” staan in voor de binding van de moedermolecule of van de metabolieten, gevormd door *fase 1 metabolisme*, met endogene moleculen. Meestal worden geneesmiddelen door meerdere reacties parallel of in serie afgebroken (Belpaire, 1999).

Volgens het ^{14}C -tracer-experiment vertoont acetylhomotaurine de geobserveerde hydrolyse niet *in vivo* (zie 6.1.1.3. en 6.1.2.4.). Het onderzoek naar het metabolisme werd herhaald en uitgebreid met behulp van de ^{11}C -tracer.

6.3.1. Metabolieten van [^{11}C]acamprosaat in het plasma

Zoals besproken in 6.1.3 werden in eerdere tracerstudies urine- en faecesstalen onderzocht op de aanwezigheid van ^{14}C -gemarkte metabolieten. Noch in dierlijke, noch in menselijke excretie werden deze metabolieten gevonden. Daaruit werd besloten dat acamprosaat niet gemetaboliseerd wordt. Echter, het ontbreken van metabolieten in de urine, en in mindere mate de faeces, betekent niet noodzakelijk het ontbreken van metabolisme. Metabolisme kan immers het (bio)chemisch karakter van de molecule zo sterk wijzigen dat het eliminatiemechanisme van de metaboliet grondig verschilt van deze van de moedermolecule. Dit betekent dat een potentiële acamprosaatmetaboliet niet noodzakelijk via renale klaring (via de nieren) of biliaire klaring (via de galblaas) wordt geëlimineerd en dus niet in de urine of de faeces terecht hoeft te komen.

Om dit punt van discussie te vermijden werd het metabolisme van acamprosaat bestudeerd door het rechtstreeks opzoeken van metabolieten in het bloedplasma. Het uitgangspunt van de analyse was het aantonen van de meest voor de hand liggende potentiële metaboliet, nl. [1- ^{11}C]acetaat. Deze kan ontstaat door hydrolyse van de amidebinding van acamprosaat (zie later).

6.3.1.1. Procedure

Ongeveer 37 MBq (1 mCi) [^{11}C]acetylhomotaurine in 100 μl isotone fosfaatbuffer wordt via de staartvene in de muizen (mannelijk, NMRI-stam) geïnjecteerd. Bloedstalen worden

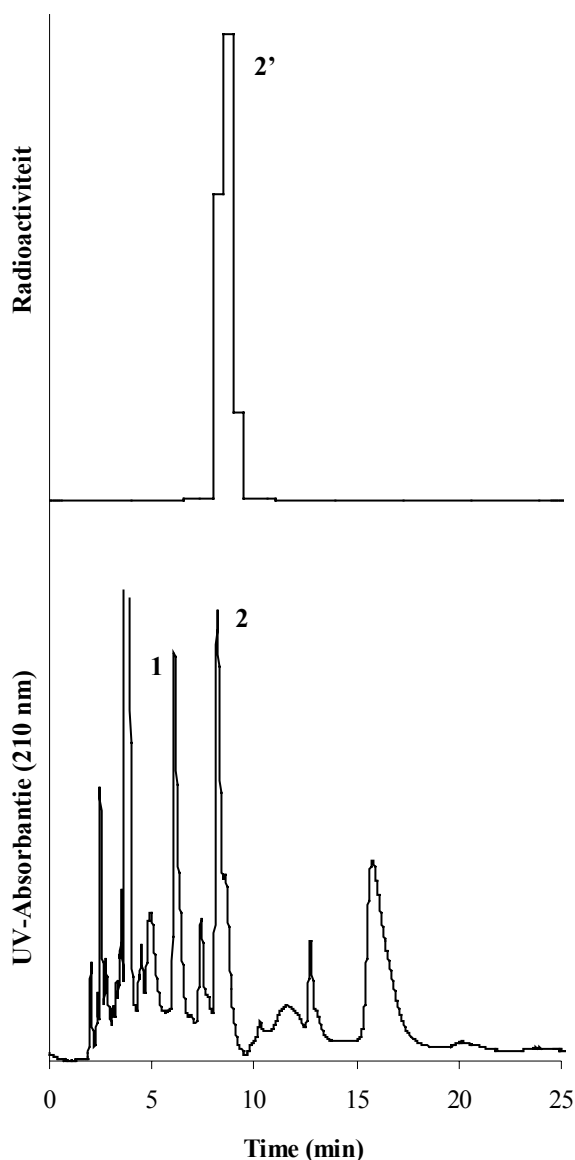
genomen op 5, 10 en 20 minuten na injectie door decapitatie na etherverdooving (1 experiment per tijdstip). De gecollecteerde bloedstalen worden gecentrifugeerd en het plasma afgescheiden. Aan de plasmastalen wordt een kleine hoeveelheid standaard-acetylhomotaurine en standaard-natriumacetaat toegevoegd. Vervolgens worden de plasmastalen na filtratie doorheen een membraanfilter (poriëndiameter: 0,22 µm) geanalyseerd via HPLC. De gebruikte HPLC-procedure is een variatie op deze beschreven in 5.2. Omwille van de lage radioactiviteit in de verschillende plasmastalen wordt het eluaat van de HPLC gecollecteerd met een fractiecollector en de fracties *off-line* geteld met een NaI(Tl)-detector.

6.3.1.2. Resultaten

Het HPLC-chromatogram van een typisch plasmastaal en de gebruikte condities zijn weergegeven in figuur 6.3. Tijdens en na de collectie van de verschillende fracties (25 min; 0,5 minuten per fractie; 50 fracties) wordt de activiteit in elke fractie gedurende 1 minuut gemeten. Na correctie voor radioactief verval en achtergrond wordt uit het radiochromatogram de radiochemische zuiverheid van [¹¹C]acetylhomotaurine bepaald. Hiervoor wordt de verhouding berekend van de activiteit in de *acetylhomotaurinefracties* (de fracties waarin [¹¹C]acetylhomotaurine elueert, gecontroleerd met standaarden – zie figuur 6.3) en de totale activiteit van alle verzamelde fracties. De resultaten voor de verschillende tijdstippen worden samengevat in tabel 6.3.

Tabel 6.3: Resultaten van de analytische HPLC met fractiecollectie voor de bepaling van ¹¹C-gemerkte metabolieten van [¹¹C]acetylhomotaurine in plasma van muizen na intraveneuze injectie. Voor elk tijdstip wordt de fractie onveranderd [¹¹C]acetylhomotaurine en het 95% betrouwbaarheidsinterval weergegeven.

Tijd na injectie (min)	Fractie ongewijzigd [¹¹ C]acetylhomotaurine (%)
5	97,5 ± 3,2
10	94,4 ± 5,0
20	> 79



Figuur 6.3: Analytische HPLC voor de bepaling van ^{11}C -gemarkte metabolieten van $[^{11}\text{C}]$ acetylhomotaurine in plasma van muizen, 5 min na intraveneuze injectie: kolom: Alltima C18, Alltech (4,6 mm $\times$ 250 mm; korreldiameter 5 μm); debiet: 1 ml/min; mobiele fase: 5 mM TBACl en 20 mM NH_4HCO_3 in 10 % acetonitrile in water; injectievolume: 20 μl ; detectoren: UV-detector (210 nm) en NaI(Tl)-detector.

(1) standaard-natriumacetaat, (2) standaard-acetylhomotaurine en (2') $[^{11}\text{C}]$ acetylhomotaurine

6.3.1.3. Conclusie

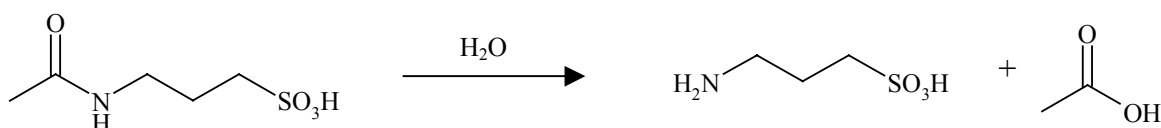
Op basis van deze gegevens kan gesteld worden dat geen ^{11}C -gemarkte metabolieten in het plasma werden waargenomen. Op geen enkel tijdstip werd een radioactief signaal waargenomen dat kon wijzen op de aanwezigheden van gemerkte metabolieten, bijv. ter hoogte van de standaardpiek van acetaat. De berekende radiochemische zuiverheid wijst eveneens op het ontbreken van metabolisatie. Er kunnen immers geen significante verschillen gevonden worden tussen de radiochemische zuiverheid na synthese ($97,3 \pm 1,3$ %; zie 5.2) en na *in vivo*-blootstelling.

Er moet wel opgemerkt worden dat de precisie van de bepaling, vooral voor het laatste tijdstip, onvoldoende is om een goed interpreteerbaar resultaat van de radiochemische zuiverheid te geven. Door de kleine fysische halveringstijd van ^{11}C en dito biologische halveringstijd voor acetylhomotaurine is de activiteit in het plasmastaal zeer laag. Hierdoor lijdt het resultaat aan een grote statistische spreiding. Deze onzekerheid laat in principe een beperkte maar significante biotransformatie van $[^{11}\text{C}]$ acetylhomotaurine toe zonder dat dit met deze HPLC-procedure kan opgespoord worden.

6.3.2. Metabolieten van $[^{11}\text{C}]$ acamprosaat in de uitgeademde lucht

Het is duidelijk dat de voorgaande HPLC-methode geen sluitend bewijs levert voor het ontbreken van metabolisme van acamprosaat. Een alternatieve methode om het metabolisme van $[^{11}\text{C}]$ acetylhomotaurine te kunnen bestuderen, berust op de bemonstering van de uitgeademde lucht. Acetylhomotaurine is op zich niet vervluchtigbaar en zal dus niet voorkomen in de uitgeademde lucht. Indien toch ^{11}C -activiteit in de uitgeademde lucht voorkomt, is dit een duidelijke aanwijzing dat $[^{11}\text{C}]$ acetylhomotaurine in het lichaam kan afgebroken worden.

Het aantonen van metabolisme via de uitgeademde lucht gaat uit van de veronderstelling dat indien $[^{11}\text{C}]$ acetylhomotaurine gemetaboliseerd wordt, dit uitsluitend kan gebeuren via hydrolyse van de amidebinding. Op die manier ontstaat $[1\text{-}^{11}\text{C}]$ acetaat en homotaurine (zie figuur 6.4). Bekend is dat acetaat in het lichaam snel omgezet wordt tot acetyl-coënzyme A, wat op zijn beurt in de citroenzuurcyclus geoxideerd wordt tot CO_2 . Volgens deze “hydrolysehypothese” is het mogelijk via radioactiviteitsmetingen van de uitgeademde lucht metabolisme van $[^{11}\text{C}]$ acetylhomotaurine aan te tonen.



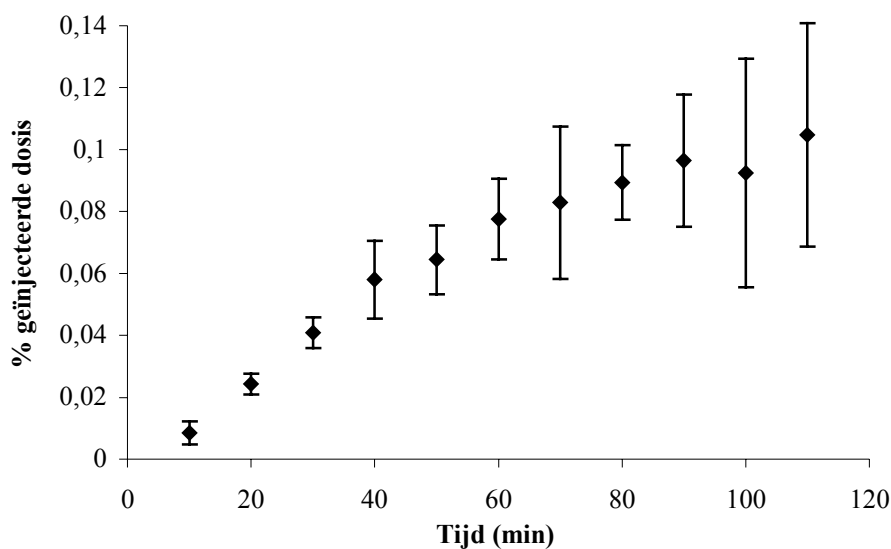
Figuur 6.4: *Hypothetisch metabolisme van acamprosaat via hydrolyse van de amidebinding*

6.3.2.1. Procedure

In 3 muizen (mannelijk, NMRI-stam) wordt ongeveer 37 MBq (1 mCi) [^{11}C]acetylhomotaurine in 100 μl isotone fosfaatbuffer via de staartvene geïnjecteerd. Onmiddellijk daarna worden de muizen ondergebracht in een kooi geplaatst in een hermetisch afgesloten systeem. Constant wordt lucht met een constant debiet (ongeveer 500 ml/min) doorheen de kooi gestuurd. Na doorgang wordt de lucht doorheen 2 wasflessen met 100 ml 1 M NaOH geborreld. Elke 10 minuten wordt een staal (1 ml) uit elke wasfles genomen en de aanwezige radioactiviteit gemeten op een NaI(Tl)-detector. Dit experiment werd in drievoud uitgevoerd.

6.3.2.2. Resultaten

De resultaten van de bemonstering van de uitgeademde lucht worden weergegeven in figuur 6.5.



Figuur 6.5: Radioactiviteit in de uitgeademde lucht van mannelijke NMRI muizen na intraveneuze injectie van [^{11}C]acetylhomotaurine. De gemiddelde ($n=3$) cumulatieve waarden worden weergegeven als % geïnjecteerde dosis. De “foutenvlaggen” geven de respectievelijke 95% betrouwbaarheidsniveaus weer.

Hier is duidelijk te zien dat een beperkte hoeveelheid ^{11}C wordt uitgeademd, volgens de hypothese onder de vorm van $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. Ongeveer 2 uur na injectie bereikt het cumulatieve verloop van de ^{11}C -uitstoot een plateau. Gemiddeld ($n=3$) werd $0,105 \pm 0,036$ % van de oorspronkelijk geïnjecteerde dosis teruggevonden in de uitgeademde lucht.

6.3.2.3. Precieze bepaling van de radiochemische zuiverheid van $[^{11}\text{C}]\text{acetylhomotaurine}$ na synthese

De beschreven radiochemische zuiverheid van $[^{11}\text{C}]\text{acetylhomotaurine}$ ($97,3 \pm 1,3$ %; zie 5.2) is onvoldoende om met grote zekerheid te kunnen stellen dat de ^{11}C -activiteit in de uitgeademde lucht het gevolg is van metabolisme van $[^{11}\text{C}]\text{acetylhomotaurine}$. Het is immers niet uitgesloten dat eventuele ^{11}C -gemerkte onzuiverheden in het eindpreparaat (tot maximaal 4 %) aanleiding kunnen geven tot ^{11}C -activiteit in de uitgeademde lucht. Als voorbeeld kan de aanwezigheid van ^{11}C -gemerkt acetaat in het eindpreparaat worden gegeven.

Het vermoeden bestaat dat de radiochemische zuiverheid bepaald via de methode beschreven in 5.2., de werkelijke zuiverheid onderschat. Daarom werd de radiochemische zuiverheid van het eindpreparaat met grotere precisie bepaald via de HPLC-methode met fractiecollectie beschreven in 6.3.1.2. De resultaten van de HPLC worden samengevat in tabel 6.4.

Tabel 6.4: Resultaten van de analytische HPLC met fractiecollectie voor de bepaling van de radiochemische zuiverheid van het synthesepreparaat. De fractie $[^{11}\text{C}]\text{acetylhomotaurine}$ en het 95% confidentieinterval wordt voor 3 experimenten en het gemiddelde weergegeven.

HPLC-experiment	Fractie $[^{11}\text{C}]\text{acetylhomotaurine}$ (%)
1	$99,8192 \pm 0,0066$
2	$99,7828 \pm 0,0043$
3	$99,7632 \pm 0,0060$
gemiddelde	$99,788 \pm 0,052$

6.3.2.4. Conclusie

De resultaten van de analytische HPLC met fractiecollectie tonen aan dat de werkelijke radiochemische zuiverheid van het synthesepreparaat hoger ligt dan eerder werd aangenomen. De correcte radiochemische zuiverheid wordt nu $> 99,7$ %. Deze waarde laat slechts onzuiverheden toe tot maximaal 0,3 % (in tegenstelling tot de eerder aangenomen 4 %).

Het resultaat van de bemonstering van uitgeademde lucht na intraveneuze injectie van [^{11}C]acetylhomotaurine toont met grote waarschijnlijkheid aan dat acetylhomotaurine gemetaboliseerd wordt. Het is immers onwaarschijnlijk dat de uiterst geringe radiochemische onzuiverheden verantwoordelijk zouden zijn voor de radioactiviteit in de uitgeademde lucht. Dit geobserveerde metabolisme is echter zo gering dat geen ^{11}C -gemarkte metabolieten konden worden vastgesteld in het bloed (zie 6.3.2.2.).

De combinatie van de plasma-experimenten (6.3.1.) en de experimenten met uitgeademde lucht (6.3.2.) toont duidelijk aan dat de potentiële PET-tracer van acamprosaat voldoet aan de tweede farmacokinetische voorwaarde, nl. een beperkt metabolisme.

6.4. Biodistributie van [^{11}C]acamprosaat in de hersenen

In de inleiding werd het belang van een goede BHB-permeabiliteit van de PET-tracer reeds aangegeven. In combinatie met de reeds aangetoonde snelle bloedklaring (zie 6.2.3.) bevordert dit de zogenaamde hersenen/bloed ratio. Dit betekent dat terwijl de PET-tracer in het hersenweefsel accumuleert, de bloedactiviteit snel daalt. Dit maakt het mogelijk om met PET een beeld te creëren van de radioactiviteitsverdeling in het hersenweefsel met een minimale verstoring door resterende bloedactiviteit.

In het verleden werd reeds de doordringbaarheid van acamprosaat in de hersenen bestudeerd (zie 6.1.2.). Volgens Durbin *et al* kunnen we stellen dat: “*Acamprosate was shown to cross the blood brain barrier and penetrate the brain depending on its plasma concentration, according to an action on Central Nervous System*”. Aangezien gedetailleerde gegevens hier ontbreken, werd de BHB-permeabiliteit van acamprosaat m.b.v. de ontwikkelde PET-tracer onderzocht.

6.4.1. *In vitro*-evaluatie van de BHB-permeabiliteit: octanol/water partitiecoëfficiënt

De partitiecoëfficiënt van een bepaalde stof tussen water en een lipofiel solvent is de modelparameter die gebruikt kan worden om de transfer van deze stof vanuit een waterig milieu in een organisme en de potentiële bioaccumulatie ervan te voorspellen. Studies tonen

bijv. een significante relatie tussen de partitiecoëfficiënt van bepaalde chemische stoffen in het octanol/watersysteem en de opstapeling van deze stoffen in vis.

Naast deze toepassing kent de octanol/water-partitiecoëfficiënt tal van toepassingen als parameter voor het biologisch gedrag van bepaalde stoffen. Zo zal de partitiecoëfficiënt van een potentiële neurotracer voorspellen in welke mate de stof in staat zal zijn de BHB te doorkruisen. Een te hoge hydrofiliciteit zal het penetreren van het BHB-membraan zeker verhinderen terwijl een te hoge lipofiliciteit de passage van de BHB eveneens kan vermoeilijken door binding van de stof aan plasma-eiwitten of de BHB zelf.

6.4.1.1. Definitie

De partitiecoëfficiënt (P) wordt gedefinieerd als de verhouding van de evenwichtsconcentraties van een bepaalde stof (C_i) opgelost in een 2-fasensysteem bestaande uit 2 niet-mengbare solventen bij een bepaalde temperatuur. Voor het octanol/watersysteem wordt de partitiecoëfficiënt voor acamprosaat gegeven door:

$$P = (C_{\text{acamprosaat}})_{\text{n-octanol}} / (C_{\text{acamprosaat}})_{\text{water}} \quad (2)$$

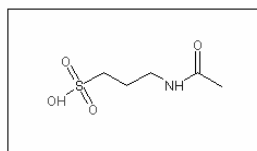
De partitiecoëfficiënt wordt meestal weergegeven via de logaritmische waarde $\log P$. Stoffen met een goede BHB-penetratie bezitten een $\log P$ gelegen tussen 1 en 3 (Dichino *et al*, 1983).

6.4.1.2. Berekende partitiecoëfficiënt

Op voorhand werd op basis van demoversies van 2 verschillende softwarepakketten voor de berekening van molecuulair-fysische karakteristieken de “ $\log P$ ” van acetylhomotaurine berekend. Voor de werking van deze programma’s (“ milogP1.2 ” en “ KowWin Program ”) wordt verwezen naar de respectievelijke websites (zie 6.6.).

De berekende $\log P$ waarden worden weergegeven in figuur 6.6.

molinspiration

SMILES CC(=O)NCCCC(=O)(=O)O

miLogP -1.609
 TPSA 83.468
 natoms 11
 MW 181.206

KowWin (LogKow) Log P Calculation:

SMILES : CC(=O)NCCCC(=O)(=O)O
 CHEM :
 MOL FOR: C5 H11 N1 O4 S1
 MOL WT : 181.21

TYPE	NUM	LOGKOW v1.66 FRAGMENT DESCRIPTION	COEFF	VALUE
Frag	1	-CH3 [aliphatic carbon]	0.5473	0.5473
Frag	3	-CH2- [aliphatic carbon]	0.4911	1.4733
Frag	1	-NH- [aliphatic attach]	-1.4962	-1.4962
Frag	1	-C(=O)N [aliphatic attach]	-0.5236	-0.5236
Frag	1	-SO2-OH [sulfonic], [coef*(1+0.3*(NUM-1))]	-3.1580	-3.1580
Const		Equation Constant		0.2290

Log Kow = -2.9282

LogKow Estimated Log P: -2.93

Figuur 6.6: Berekende log *P*-waarden voor acetylhomotaurine op basis van de online-versie van het softwarepakket “milogP1.2” en “KowWin”.

De log *P*-waarden voor acetylhomotaurine berekend via “milogP1.2” en “KowWin” zijn respectievelijk –1,609 en –2,93. Het grote verschil tussen deze waarden is vermoedelijk te wijten aan het feit dat “milogP1.2”, in tegenstelling tot “KowWin”, geen rekening houdt met de dissociatie van de sulfonzure groep in water. Ondanks dit verschil wijzen beide waarden op een sterke hydrofiel karakter voor acetylhomotaurine. Op basis van de moleculaire structuur van acetylhomotaurine, de sterke wateroplosbaarheid (zie 1.4.1.) en de beperkte retentie op de C₁₈-stationaire fase van de HPLC-procedure beschreven in 4.3.1.1. kon dit reeds enigszins voorspeld worden.

6.4.1.3. Procedure van de experimentele bepaling

De gebruikte methode voor de bepaling van de partiticoëfficiënt berust op de procedure beschreven door Wilson (Wilson *et al*, 2001). Deze methode gaat uit van een eenvoudige *partition coefficient (n-octanol/water) shake flask method*. Om te verhinderen dat kleine radiochemische onzuiverheden de partiticoëfficiënt drastisch gaan beïnvloeden wordt deze eenvoudige procedure uitgebreid met een dubbele *pre-washing* fase.

Een kleine hoeveelheid [¹¹C]acetylhomotaurineoplossing (50 µl; 0,5 mCi) wordt toegevoegd aan 20 ml *n*-octanol en 20 ml 0,02 M fosfaatbuffer (pH = 7,4) in een extractievat. Het mengsel wordt vervolgens gedurende 15 minuten mechanisch geroerd. De 2 fasen ontmengen

gedurende 15 minuten en de waterige fase wordt onderaan opgevangen. Aan de geïncubeerde waterige fase (15 ml) wordt opnieuw een gelijk volume n-octanol toegevoegd¹. Beide fasen worden opnieuw gedurende 15 minuten mechanisch geroerd, de 2 fasen ontmengen gedurende 15 minuten en 10 ml waterige fase wordt onderaan opgevangen. De waterige fase wordt evenredig verdeeld over 5 proefbuisjes, elk gevuld met 2 ml n-octanol. Beide fasen worden gemengd m.b.v. een vortex-mixer gedurende 5 minuten. De fasen worden gescheiden door centrifuge (5 min, 4000 rpm). Tenslotte wordt uit elk proefbuisje 100 µl van elke fase overgebracht in een telbuisje en de radioactiviteit gemeten met een NaI(Tl)-detector. De partiticoëfficiënt werd berekend als: $P = \text{tellen in octanolfase} / \text{tellen in buffer}$, na correctie voor radioactief verval en achtergrond.

6.4.1.4. Experimentele waarden

A.h.v. de beschreven procedure (zie 6.4.1.3.) werd de partiticoëfficiënt voor acetylhomotaurine bepaald. De totale procedure werd 2 maal herhaald. De resultaten worden weergegeven in tabel 6.5.

Tabel 6.5: Experimentele octanol/water-partiticoëfficiënt voor acetylhomotaurine m.b.v. de ¹¹C-tracer

Experiment	P ($\times 10^{-4}$)	Log P
1 a	3,986 $\pm$ 0,080	-3,3995 $\pm$ 0,0089
1 b	4,189 $\pm$ 0,088	-3,3779 $\pm$ 0,0092
1 c	4,29 $\pm$ 0,10	-3,367 $\pm$ 0,010
1 d	4,871 $\pm$ 0,069	-3,3124 $\pm$ 0,0062
1 e	3,704 $\pm$ 0,063	-3,4313 $\pm$ 0,0074
2 a	3,353 $\pm$ 0,076	-3,475 $\pm$ 0,010
2 b	4,422 $\pm$ 0,096	-3,3544 $\pm$ 0,0095
2 c	4,181 $\pm$ 0,084	-3,3787 $\pm$ 0,0088
2 d	3,722 $\pm$ 0,074	-3,4292 $\pm$ 0,0088
2 e	\	\
Gemiddelde (n=9)	4,08 $\pm$ 0,35	-3,392 $\pm$ 0,037

¹ In de door Wilson beschreven methode wordt verder gewerkt met de organische fase.

6.4.1.5. Besluit

Op basis van zowel de berekende als de experimenteel bepaalde waarde voor de octanol/water-partitiecoëfficiënt kan geconcludeerd worden dat acetylhomotaurine of acamprosaat vermoedelijk niet de gunstige eigenschappen bezit om doorheen de BHB te geraken. Afgaande op de zeer negatieve waarde van de log P lijkt dit in principe uitgesloten. Deze bevindingen scheppen een duidelijk contrast met de bevindingen beschreven in de literatuur.

6.4.2. *In vivo*-evaluatie van de BHB-permeabiliteit

Voor de *in vivo* studie van de BHB-permeabiliteit van [^{11}C]acamprosaat in het lichaam, werden muizen (NMRI-stam) van het mannelijk geslacht gebruikt. Tot aan het begin van het experiment werden de dieren voorzien van water en voedsel *ad libitum*. De dierexperimenten werden uitgevoerd volgens de erkende wettelijke en ethische regels na positief advies van de Ethische Commissie Proefdieren van de Faculteit Geneeskunde van de Universiteit Gent op de dienst radiofarmacie, geneesmiddelenleer, faculteit farmaceutische wetenschappen, Harelbekestraat 72 - 9000 Gent.

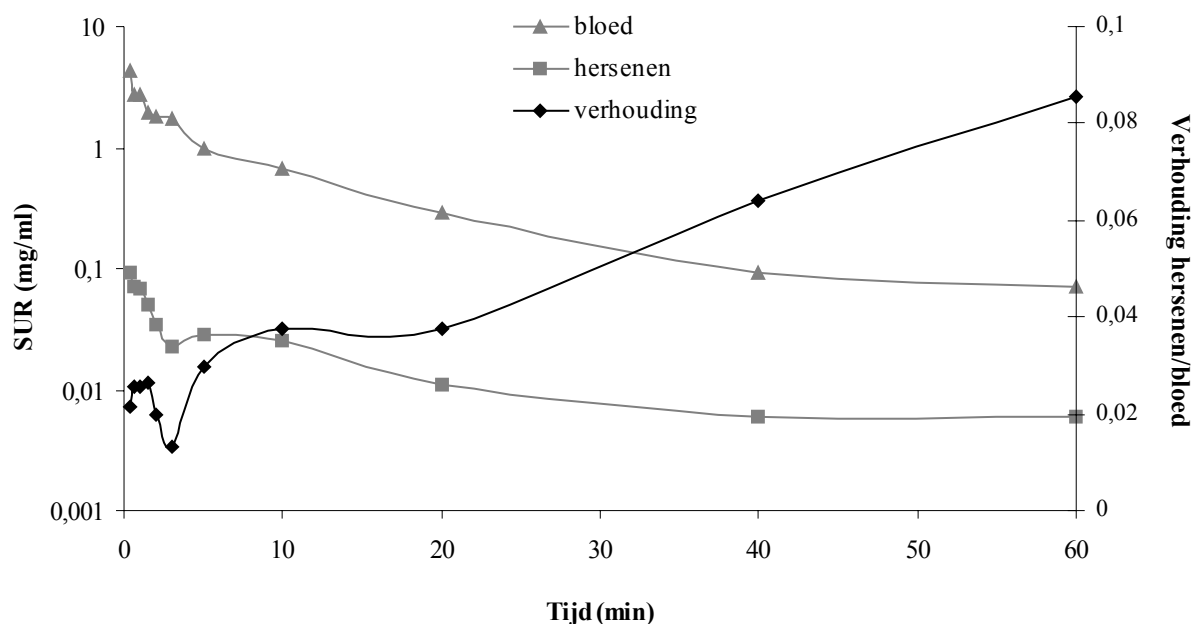
Voor de experimentele gegevens van deze studie wordt verwezen naar 6.2.1. Uit de volledige dataset (zie 6.2.2.), bekomen via de volledige biodistributie van [^{11}C]acamprosaat in muizen, worden de gegevens over de hersenen in detail bestudeerd.

6.4.2.1. Resultaten

De resultaten worden samengevat in tabel 6.6 en grafisch voorgesteld in figuur 6.7.

Tabel 6.6: Biodistributie van ^{11}C -activiteit in mannelijke NMRI muizen na intraveneuze injectie van 37 mBq (100 μl) [^{11}C]acetyl-homotaurine. De resultaten zijn het gemiddelde van 3 onafhankelijke experimenten en worden weergegeven als SUR-waarde (g/ml) en hun standaarddeviatie. Voor de hersenen en het bloed wordt een dichtheid van 1 g/ml aangenomen.

Tijdstip	Hersenen	Bloed	Verhouding
20 s	$0,091 \pm 0,016$	$4,26 \pm 0,43$	$0,0214 \pm 0,0044$
40 s	$0,0708 \pm 0,0041$	$2,78 \pm 0,18$	$0,0255 \pm 0,0022$
1 min	$0,0696 \pm 0,0064$	$2,73 \pm 0,44$	$0,0255 \pm 0,0048$
1,5 min	$0,0513 \pm 0,0052$	$1,94 \pm 0,36$	$0,0264 \pm 0,0056$
2 min	$0,035 \pm 0,015$	$1,77 \pm 0,24$	$0,0198 \pm 0,0089$
3 min	$0,0231 \pm 0,0052$	$1,72 \pm 0,50$	$0,0134 \pm 0,0049$
5 min	$0,0287 \pm 0,0016$	$0,96 \pm 0,16$	$0,0299 \pm 0,0054$
10 min	$0,02544 \pm 0,00033$	$0,68 \pm 0,14$	$0,0375 \pm 0,0078$
20 min	$0,0110 \pm 0,0063$	$0,293 \pm 0,095$	$0,038 \pm 0,025$
40 min	$0,00591 \pm 0,00091$	$0,092 \pm 0,011$	$0,064 \pm 0,012$
60 min	$0,0061 \pm 0,0024$	$0,0711 \pm 0,0032$	$0,085 \pm 0,033$



Figuur 6.7: Biodistributie van ^{11}C -activiteit in mannelijke NMRI muizen na intraveneuze injectie van 37 mBq (100 μl) [^{11}C]acetylhomotaurine. Voor de duidelijkheid van de grafiek werd een logaritmische ordinaat gebruikt voor de SUR i.f.v de tijd. De verhouding wordt lineair weergegeven.

Uit het biodistributie-experiment kan geconcludeerd worden dat:

1. De opname van [^{11}C]acamprosaat in de hersenen blijft tijdens het experiment (1 uur) ruim onder de radioactiviteit in het bloedcompartiment.
2. Ondanks de zeer negatieve log-P waarde vertoont [^{11}C]acamprosaat een beperkte opname in de hersenen. De verhouding tussen de radioactiviteit in de hersenen en in het bloed neemt gedurende het experiment langzaam toe van ongeveer 2,6 % na 1 minut na injectie tot 8,5 % na 1 uur na injectie.

6.4.2.2. Besluit

Ondanks de zeer negatieve log P waarde lijkt [^{11}C]acamprosaat een zekere opname in de hersenen te vertonen. Ondanks deze beperkte opname en de schijnbaar stijgende hersenen/bloed ratio, blijft gedurende het ganse experiment de bloedactiviteit superieur t.o.v. die in de hersenen.

De kwantitatieve resultaten van deze studie moeten met een zekere terughoudendheid behandeld worden. Ten eerste is wegens de vrij grote variabiliteit van de resultaten de statistische betrouwbaarheid vrij laag. Ten tweede moet de vraag gesteld worden of de vermeende radioactiviteit in de hersenen niet afkomstig is van slecht weggewassen bloedactiviteit.

6.4.3. Hersendistributie van [^{11}C]acamprosaat

De zeer negatieve waarde van de octanol/water partiticoëfficiënt en de resultaten van de algemene biodistributie in muizen hebben reeds duidelijk aangetoond dat het werkzame bestanddeel van acamprosaat, acetylhomotaurine, slechts in beperkte mate in staat is de BHB te doorkruisen. Toch werd de verdeling van [^{11}C]acamprosaat in de hersenen onderzocht. Dit gebeurde in konijnen (*New Zealand*) van het mannelijk geslacht.

6.4.3.1. Procedure

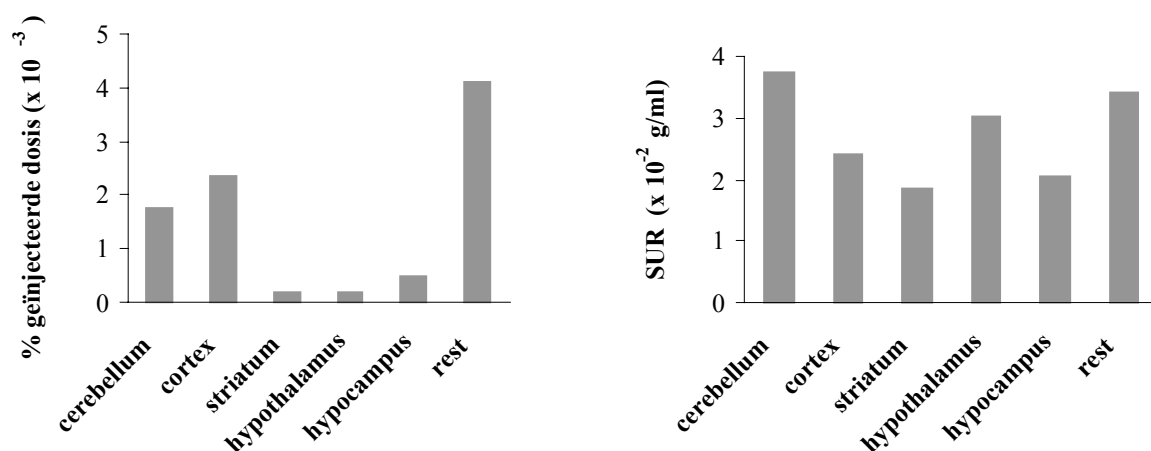
Ongeveer 180 MBq (5 mCi) [^{11}C]acetylhomotaurine in 1 ml isotone fosfaatbuffer wordt via een oorvene in de konijnen geïnjecteerd. Na 20 minuten worden de dieren gedood door

cervicale dislocatie, gevolgd door decapitatie. Bloed wordt opgevangen en de belangrijkste hersenregio's: cerebellum, cortex, striatum, hypothalamus en hippocampus afgezonderd. Alle hersenstalen worden gewassen in 0,9 % NaCl-oplossing, gedroogd met absorberend papier en bewaard in vooraf gewogen telflesjes. De ^{11}C -activiteit in de verschillende preparaten wordt bepaald met een NaI(Tl)-detector. Tenslotte wordt de massa van alle monsters bepaald en via de dichtheid (een dichtheid van 1 g/ml wordt aangenomen) het volume berekend.

Na correctie voor radioactief verval worden de resultaten weergegeven als SUR en % geïnjecteerde dosis.

6.4.3.2. Resultaten en besluit van de hersendistributie

Het experiment werden in drievoud uitgevoerd. De resultaten worden weergegeven in figuur 6.8 en tabel 6.7.



Figuur 6.8: Distributie van ^{11}C -activiteit in de hersene van mannelijke New Zealand konijnen na intraveneuze injectie van 180 MBq (1 ml) [^{11}C]acetylhomotaurine. De waarden worden uitgedrukt als % geïnjecteerde dosis en SUR.

Tabel 6.7: Distributie van ^{11}C -activiteit in de hersenen van mannelijke New Zealand konijnen na intraveneuze injectie van 180 MBq (1 ml) [^{11}C]acetylhomotaurine. De waarden worden uitgedrukt als % geïnjecteerde dosis en SUR met hun respectievelijke standaarddeviaties.

	% Geïnjecteerde dosis (10^{-3})	SD (10^{-3})	SUR (10^{-2} g/ml)	SD (10^{-2} g/ml)
Bloed			105	16
Cerebellum	1,7	1,5	3,7	2,4
Cortex	2,33	0,28	2,41	0,56
Striatum	0,193	0,030	1,87	0,18
Hypothalamus	0,18	0,10	3,02	0,96
Hypocampus	0,493	0,087	2,05	0,44
Rest	4,1	2,1	3,4	1,3

Uit de studie van de hersendistributie in konijnen kan geconcludeerd worden dat:

- 1) De verhouding (van de SUR's) tussen de activiteit in de hersenen en het bloed van konijnen na 20 minuten ongeveer 0,17 bedraagt.
- 2) De activiteit in de hersenen zo goed als homogeen wordt verdeeld.

6.5. Besluit

In 4.2. werden de 3 verschillende benaderingen voor het geneesmiddelenonderzoek met PET opgesomd: de rechtstreekse en 2 onrechtstreekse methodes. Omwille van de mogelijkheid om de totale farmacologie (kinetiek + dynamiek) van het geneesmiddel te onderzoeken werd de rechtstreekse methode - acamprosaat gemerkt met de PET-isotoop ^{11}C - toegepast.

De besproken *in vitro* en *in vivo*-studies hadden tot doel na te gaan of de gesynthetiseerde [^{11}C]acetylhomotaurinetracer over de geschikte farmacokinetische karakteristieken beschikte om het werkingsmechanisme van acamprosaat met PET te kunnen bestuderen. In eerste instantie werd een volledige biodistributie in muizen uitgevoerd. Hieruit bleek dat acamprosaat snel uit het lichaam wordt geëlimineerd via de nieren. Metabolietstudies toonden bovendien aan dat eliminatie van acamprosaat via biotransformatie verwaarloosbaar is. De hersendistributie van de ^{11}C -tracer werd vervolgens onderzocht in muizen en konijnen.

Acamprosaat vertoonde ondanks de negatieve logP-waarde een zeer geringe opname in de hersenen.

Samengevat kunnen we stellen dat de tracer voldoet aan 2 voorwaarden: een snelle klaring uit het bloed en een verwaarloosbaar metabolisme. Aan de derde cruciale voorwaarde: een goede penetratie van de BHB, is niet voldaan. Hierdoor blijft de hersenactiviteit steeds ondergeschikt aan de bloedactiviteit. Dit betekent dat het cerebrale PET-beeld met [¹¹C]acetylhomotaurine grotendeels een weerspiegeling zal zijn van de bloeddistributie. Een eventuele correctie van dit beeld a.h.v. een meting van het bloedvolume naar analogie van de studie van de bloedperfusie (zie 2.3.3.1.) is gezien het uitgesproken verschil tussen de hersenen en bloed activiteit niet mogelijk.

Op basis van deze bevindingen kunnen we concluderen dat de gesynthetiseerde tracer geen verder uitsluitsel kan geven over het werkingsmechanisme van acamprosaat. Het is evenwel duidelijk dat, gezien de zeer lage opname van het actieve bestanddeel van het geneesmiddel in het CZS, een zeer gerichte werking aan de oorsprong moet liggen van het therapeutisch effect van acamprosaat. Vanuit deze wetenschap kan het nuttig zijn de invloed van therapeutische hoeveelheden acamprosaat op de biodistributie van gekende PET-liganden in het CZS te bestuderen. Of deze onrechtstreekse PET-methode het werkingsmechanisme van acamprosaat kan ophelderen, moet de toekomst uitwijzen.

6.6. Referenties

153. **Belpaire F** (1999) Geneesmiddelendispositie en farmacokinetiek, cursus opleidingsonderdeel 2^{de} Proef Farmacie, academiejaar 1999-2000.
154. **Dichino DD, Welch MJ, Kilbourn MR and Raichle ME** (1983) Relationship between lipophilicity and brain extraction of C-11 labelled radiopharmaceuticals. *Journal of Nuclear Medicine* 24: 1030-1038.
155. **Durbin P, Hulot T and Chabac S** (1995) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of acamprosate: an overview. In: Soyka M, editor, *Acamprosate in relapse prevention of alcoholism. Proceedings of the 1st Campral-symposium ESBRA Stuttgart, Germany, Springer* 47-64.
156. **Huang YY, Hwang DR, Zhu ZH, Bae SA, Guo NN, Sudo YS, Kegeles LS and Laruelle M** (2002) Synthesis and pharmacological characterization of a new PET ligand for the serotonin transporter: [C-11]5-bromo-2-[2(dimethylaminomethyl)phenylsulfanyl]phenylamine ([C-11] DAPA). *Nuclear Medicine and Biology* 29: 741-751.
157. **KowWin Program**: <http://esc.syrres.com/interkow/kowdemo.htm>
158. **milogP1.2**: <http://www.molinspiration.com/services/logp.html>

159. **Saivin S, Hulot T, Chabac S, Potgieter A, Durbin P and Houin G** (1998) Clinical pharmacokinetics of acamprosaat. *Clinical Pharmacokinetics* 35: 331-345.
160. **Wilde M and Wagstaff AJ** (1997) Acamprosaat, a review of its pharmacology and clinical potential in the management of alcohol dependence after detoxification. *Drugs* 53: 1038-1053.
161. **Wilson AA, Jin L, Garcia A, DaSilva JN and Houle S** (2001) An admonition when measuring the lipophilicity of radiotracers using counting techniques. *Applied Radiation And Isotopes* 54: 203-208.

Samenvatting en besluit

Acamprosaattherapie wordt reeds verschillende jaren gebruikt als farmacologische ondersteuning tegen herval van ontwende alcoholverslaafden. Nochtans is het juiste mechanisme waardoor acamprosaat alcoholinname en herval reduceert onduidelijk.

De farmacodynamische eigenschappen van acamprosaat waren reeds het onderwerp van een hele reeks *in vitro* en *in vivo*-studies. Met behulp van micro-elektrodes werd de invloed van acamprosaat op de prikkelgeleiding van neuronen bestudeerd en via microdialyse werd de vrijstelling van neurotransmitters als gevolg van acamprosaatblootstelling bestudeerd.

Met de introductie van positron emissie tomografie (PET), een functionele beeldvormingstechniek, in dit onderzoeksgebied, wordt de mogelijkheid onderzocht om op een directe manier het fysiologische gedrag van acamprosaat *in vivo* te bestuderen. Door het rechtstreeks merken van de acamprosaatmolecule met een PET-radionuclide behoren beeldvorming van de biodistributie in de hersenen en karakterisering van potentiële bindingsplaatsen via verdringingsstudies tot de mogelijkheden.

Deze studie moet daarom (1) een syntheseseweg vinden voor het merken van acamprosaat met een positron-emitter (2) de nodige procedures ontwikkelen voor de kwaliteitscontrole van het bekomen product en (3) de biodistributie en farmacokinetiek van de tracer bestuderen via *in vitro* en *in vivo*-experimenten.

Resultaten

Via een geschikte radiosynthese wordt acamprosaat gemerkt met cyclotron geproduceerd ^{11}C ($T_{1/2} = 20,4$ min). Een hoge (radio)chemische opbrengst van $4,2 \pm 1,7$ GBq wordt behaald en het rendement op basis van het geproduceerde ^{11}C bedraagt 48 ± 16 %. De tracer wordt gesynthetiseerd in een PLC geautomatiseerde opstelling in minder dan 45 minuten na radionuclide productie. Het product wordt afgeleverd in een 5 ml oplossing klaar voor intraveneuze injectie.

De kwaliteit van het product wordt volledig onderzocht: (1) de radionuclidische zuiverheid wordt bevestigd via γ -spectroscopie en de bepaling van de halveringstijd, (2) de radiochemische zuiverheid is beter dan 99,7 %, (3) de chemische zuiverheid wordt bevestigd via proton-NMR, hoge druk vloeistofchromatografie, gaschromatografie en massaspectrometrie en (4) de specifieke activiteit van het product bedraagt $20,7 \pm 6,7$ GBq/ μmol , voldoende voor receptorstudies via PET.

Biodistributiestudies met [^{11}C]acamprosaat in muizen tonen een zeer snelle klaring van de tracer uit het bloed na intraveneuze injectie. Dit gebeurt voornamelijk via de nieren naar de urine. Na ongeveer 20 minuten is de bloedconcentratie gedaald tot minder dan 1 % van de

initieel geïnjecteerde dosis. De opname in de hersenen is zeer gering (max. 0,2 %) en overstijgt nooit de bloedconcentratie. In het plasma werden geen metabolieten van de geïnjecteerde tracer vastgesteld, hoewel toch kleine hoeveelheden [^{11}C] CO_2 (< 0,1 %) werden uitgeademd. Biodistributiestudies in konijnen tonen een zo goed als evenredige verdeling in de verschillende hersenregio's. Opnieuw werd slechts een kleine hoeveelheid tracer in de hersenen waargenomen. Deze waarnemingen zijn in overeenstemming met de zeer negatieve waarde van de log P waarde voor acamprosaat (log P = -3,38).

Besluit

De besproken syntheseprocedure maakt het mogelijk om ^{11}C -gemerkt acamprosaat met hoog rendement te produceren. Het product voldoet bovendien aan de kwaliteitscriteria die gesteld worden aan radiotracers voor biologisch onderzoek.

Op basis van dit en voorgaand onderzoek kan het farmacokinetisch profiel van acamprosaat als volgt worden geschetst. Acamprosaat vertoont een snelle maar beperkte opname vanuit het gastro-intestinaal systeem naar de algemene circulatie. De totale biologische beschikbaarheid van acamprosaat na orale inname bedraagt ongeveer 10 %. Vanuit het bloedcompartiment verdeelt het product zich in beperkte mate over het volledige lichaam. Dit uit zich in een verdelingsvolume van ongeveer 20 l, wat de helft is van het normale volume lichaamswater. De hoogste concentraties acamprosaat worden teruggevonden in de nieren, langs waar zo goed als uitsluitend de eliminatie van het product gebeurt. De opname van acamprosaat doorheen de BHB in de hersenen is uiterst gering. Hierdoor is de verhouding hersenactiviteit/bloedactiviteit gedurende het gevoerde experiment steeds < 1. *In vivo* metabolisme van acamprosaat is verwaarloosbaar. Acamprosaat verdwijnt snel uit het lichaam. De biologische halveringstijd van acamprosaat in muizen bedraagt $10,6 \pm 2,5$ minuten.

Op basis van deze bevindingen, in het bijzonder de lage radioactiviteitsverhouding hersenen/bloed, kunnen we concluderen dat de gesynthetiseerde tracer geen verder uitsluitsel kan geven over het werkingsmechanisme van acamprosaat. Het is evenwel duidelijk dat een zeer gerichte werking aan de oorsprong moet liggen van het therapeutisch effect van acamprosaat. De combinatie van een zeer geringe BHB-permeabiliteit, een beperkte biologische beschikbaarheid en een snelle renale klaring laten, ondanks een hoge toegediende dosis, slechts een heel kleine hoeveelheid acamprosaat in het centrale zenuwstelsel toe. Enkel op receptorniveau kan een dergelijk lage concentratie een duidelijk farmacodynamisch effect veroorzaken.

Vanuit deze wetenschap kan het nuttig zijn de invloed van therapeutische hoeveelheden acamprosaat op de biodistributie van gekende PET-liganden en de bezettingsgraad van de potentiële receptoren door deze liganden in het CZS te bestuderen. Of deze aanpak van het acamprosaatonderzoek m.b.v. PET meer succes zal kennen moet de toekomst uitwijzen.

Summary and conclusion

Although acamprosate is used therapeutically for several years to reduce relapse in weaned alcoholics, the mechanisms by which acamprosate decreases alcohol consumption and relapse rates of alcoholics are still not clear.

For the investigation of the pharmacodynamic properties of acamprosate several *in vitro* and *in vivo* studies were performed using techniques as microelectrodes for measuring the influence of acamprosate on the conduction of stimuli by neurons or micro dialysis for the determination of neurotransmitter release induced by administration of acamprosate.

With the introduction of positron emission tomography (PET), a functional imaging technique, in this field of research, it might be possible to look directly to the physiological behaviour of acamprosate *in vivo*: it's biodistribution in the brain via direct imaging of the labelled pharmaceutical and the characterisation of it's neural binding sites by replacement studies. Therefore, this study aimed (1) to find a way of synthesis for the positron emitting radiotracer of acamprosate (2) to develop the necessary quality control procedures for the obtained product and (3) to study the biodistribution and pharmacokinetics of the tracer by *in vitro* and *in vivo* experiments.

Results

The radiosynthesis succeeded in labelling acamprosate with cyclotron produced ^{11}C ($T_{1/2}=20.4$ min) with high (radio)chemical yield: 4.2 ± 1.7 GBq or 48 ± 16 % based on initial ^{11}C . The tracer is synthesised in an automated set-up in less than 45 min after radionuclide production and is delivered in a 5 ml solution ready for intravenous injection.

The quality of the product is fully examined: (1) the radionuclidic purity is confirmed by γ -spectroscopy and by half life determination, (2) the radiochemical purity is better than 99.7 %, (3) the chemical purity is confirmed by proton-NMR, HPLC, gas chromatography and mass spectrometry and (4) the specific activity of the product is 20.7 ± 6.7 GBq/ μmol , which is sufficient for receptor studies with PET.

Biodistribution studies with [^{11}C]acamprosate in mice show a very fast clearance of the tracer from the blood pool after intravenous administration, mainly via the kidneys to the urine. In about 20 min the blood concentration drops below 1 % of the initially injected dose. Uptake in the brain is poor (max. 0.2 %) and never exceeds the blood concentration. No metabolites of injected tracer are found in plasma, nevertheless small amounts of [^{11}C]CO₂ (< 0.1 %) are found in the expired air. Biodistribution studies in rabbits show a nearly uniform distribution of the [^{11}C]acamprosate-tracer in the different brain regions. Again, only small amounts of

tracer can penetrate the blood brain barrier (BBB). This is in accordance with the very negative log P value for acamprosate (log P = -3.38).

Conclusion

The presented synthesis procedure enables a high yield production of the PET-tracer for acamprosate. The product satisfies the quality criteria for radiotracers for biological research. Based on this and earlier reported research, the pharmacokinetic profile of acamprosate can be summarised as follows. Acamprosate shows a fast but limited uptake from the gastro intestinal system to the general blood circulation. The total biological availability of acamprosate after oral administration is approximately 10 %. The distribution of acamprosate from the blood compartment to the whole body is moderate, leading to a distribution volume of approximately 20 L, which is half of the normal body water. The highest concentrations of acamprosate were found in the kidneys, where the elimination of the product from the body occurs. The uptake of acamprosate through the BBB into the brain is low. Therefore, the ratio brain activity/blood activity is always < 1 during the experiment. Metabolism of acamprosate is neglectable. Acamprosate disappears fastly from the body. The biological half-life of acamprosate in mice is 10.6 ± 2.5 min.

Based on these findings, especially the small ratio brain activity/blood activity, we can conclude that the synthesized tracer will not offer any certainty about the action mechanism of acamprosate. On the other hand, the supposition that acamprosate acts by a very specific receptor interaction is strengthened by the obtained pharmacokinetic data in the brain. Indeed, despite the large administered dose, the combination of a low BBB permeability, a restricted biological availability and a fast renal clearance permits the entry of only a very small amount of acamprosate in the central nerve system. A clear pharmacodynamic and therapeutic effect at such a low concentration can only be caused by an action at the receptor level.

Because of the important indications towards a receptor dependent activity, the action mechanism of acamprosate might be investigated by studying the influence of therapeutic doses of acamprosate on the biodistribution of well-characterised selective PET-ligands and on their binding to receptors. The success of this indirect approach might have more success in the future.