
Octrooiraad



[10] A Terinzagelegging [11] 7604022

Nederland

[19] NL

- [54] Werkwijze ter bereiding van een chelaat.
- [51] Int.Cl²: A61K29/00.
- [71] Aanvrager: Research Corporation te New York.
- [74] Gem.: Ir. C.M.R. Davidson c.s.
Octroobureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuyperstraat 6
's-Gravenhage.

-
- [21] Aanvraag Nr. 7604022.
- [22] Ingediend 15 april 1976.
- [32] Voorrang vanaf 2 september 1975.
- [33] Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- [31] Nummer van de voorrangsaanvraag: 609545.
- [23] --
- [61] --
- [62] --

[43] Ter inzage gelegd 4 maart 1977.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

RESEARCH CORPORATION, te New York, New York, Ver.St.v.Amerika.

Werkwijze ter bereiding van een chelaat.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze ter bereiding van een chelaat.

Tot nu toe zijn radiofarmaceutische beeldvormende middelen gebruikt voor het uitwendig vormen van een beeld van verschillende delen van de anatomie. Alleen radiofarmaceutica die gamma-fotonen uitstralen zijn voor deze toepassing geschikt. Het toepassingsgebied is beperkt wegens het feit, dat van de radiokernen die gammastralen afgeven, slechts zeer weinig voldoen aan de aanvullende vereisten die daaraan gesteld worden door de inherente begrenzings van exiterende beeldsystemen en door de noodzaak om de stralingsdosis zo laag mogelijk te houden. Tot deze vereisten behoren de noodzaak van een eenvoudig gammaspectrum, een hoge opbrengst aan fotonen met een energie die laag genoeg is om doelmatig collimeren toe te laten en doelmatige detectie en een halfwaardetijd die kort genoeg is om toediening van millicurie hoeveelheden toe te laten zonder een overmatige stralingsdosis na de proef.

De gebruikelijke methode voor het uitwendig vormen van een beeld bestaat in het algemeen uit het merken van een voor toediening aan een patiënt geschikte organische verbinding met een geschikt radio-isotoop. Meer in het bijzonder wordt een biologisch middel waarvan bekend is dat het zich verzamelt in het bepaalde orgaan of anatomisch gedeelte waarvan een beeld moet worden gevormd, in geringe mate gemerkt met een radio-isotoop. Het aldus gemerkte biologische middel maakt het dan mogelijk om een uitwendig beeld te vormen van het gewenste orgaan met behulp van gebruikelijke stralingsmeettechnieken.

De problemen die gepaard gaan met bekende pogingen in deze richting concentreren zich in hoofdzaak op het combineren van de vereisten (1) dat het biologische middel specifiek is voor het orgaan waarvan een beeld moet worden gevormd, (2) dat een geschikte radiokern

7604022

gebruikt wordt als merkmiddel, (3) dat het gemerkte middel voldoende stabiel is in vivo om een doelmatige beeldvorming toe te laten en (4) dat het gemerkte biologische middel z'n orgaanspecificiteit behoudt.

De uitvinding heeft ten doel een radio-actief gemerkt biologisch middel te verschaffen met een hoge mate van in vivo stabiliteit, en dat sterk orgaanselectief is. Verder heeft de uitvinding ten doel een werkwijze te verschaffen voor het vervaardigen van een uitwendig beeld met behulp van dit middel.

De bovenstaande doeleinden worden bereikt met een werkwijze voor het bereiden van een radio gemerkt diagnostisch middel, dat hoge doelorgaanspecificiteit van verschillende geneesmiddelen en biochemische verbindingen koppelt met de uitstekende kernbeeldeigenschappen van de radiometalen technetium-99m, cobalt-57, gallium-67, gallium-68, indium-111 en indium-113m.

De uitvinding berust op de ontdekking, dat chelaten van de bovenstaande radio-actieve metalen met een gesubstitueerd iminodiazijnzuur of een 8-hydroxychinoline een hoge mate van in vivo stabiliteit bezitten, sterk specifiek zijn voor bepaalde organen of anatomische gedeelten en uitstekende kernbeeldvormende eigenschappen bezitten.

De bovengenoemde chelaten kunnen worden bereid door het gewenste radio-isotoop met het cheleermiddel te laten reageren.

Technetium-99m is in de handel verkrijgbaar hetzij uit een isotoop generator als een dochterprodukt van molybdeen-99 of als een direct produkt van een leverancier. Het is ook beschikbaar als een oplosmiddelextractieprodukt uit molybdeen-99 oplossingen, in het algemeen als alkalimetaalpertechneetaatoplossingen van 5-100 mCi. Nadere bereidingsmethoden zijn vermeld in de Amerikaanse Octrooischriften 3.468.808 en 3.382.152.

Het technetium-99m chelaat wordt het liefst bereid door een oplossing van pertechneetaat, b.v. een alkalimetaalpertechneetaat te reduceren in aanwezigheid van het cheleermiddel. De reductie wordt bij voorkeur uitgevoerd met behulp van tin(II)chloride als reductiemiddel. Ieder geschikt reductiemiddel kan worden gebruikt, met inbegrip van andere tin(II)zouten, zoals tin(II)pyrofosfaat. Ten gevolge van deze

7604022

reductietrap bevat het produkt ook een aanmerkelijke hoeveelheid van het tin(II)chelaat. Het zal duidelijk zijn, dat de uitvinding ook betrekking heeft op het produktmengsel, dat zowel het radiometaalchelaat als het overeenkomstige tin(II)chelaat bevat.

5 In de praktijk worden de volgens de uitvinding bereide preparaten het geschiktst verschaft als een steriele verpakking die bestaat uit niet-radioactieve chemicaliën voor het mengen met de radiometaalbron voorafgaande aan het gebruik. De verpakking bevat bij voorkeur een tin(II)zoutoplossing, cheleermiddeloplossing, pH-bufferoplossing of een combinatie daarvan. Onder gebruikmaking van steriele reagentia 10 en aseptische technieken worden de respectieve oplossingen met elkaar gemengd in willekeurige volgorde en daarna met de radiometaalbronoplossing. De verkregen oplossing die het radiometaalchelaat, het tin(II)chelaat en eventueel vrij chelaat bevat, kan dan direct worden gebruikt voor het 15 maken van beelden.

In het algemeen wordt aan de patiënt een oplossing toegediend die geschikt is voor intraveneuze toediening en tot 15 mCi radio-activiteit bevat. In het algemeen kan dit worden bereikt door 0,2-1 ml toe te dienen van een oplossing die 2-100 mg gecombineerd chelaat- 20 produkt bevat. Radioproeven van het radio-isotoop in het gewenste orgaan kunnen worden uitgevoerd met behulp van gebruikelijke apparatuur, zoals een sintillatie-camera.

Orgaanspecificiteit wordt bepaald door het bepaalde gebruikte cheleermiddel. Alle volgens de uitvinding verkregen chelaten 25 worden echter hetzij door de nieren of door de lever afgevoerd. Derhalve kunnen de volgens de uitvinding verkregen chelaten van de bovenstaande radiometalen met de meeste gesubstitueerde iminodiazijnzuren en 8-hydroxy-chinolinen worden gebruikt voor het maken van een beeld van deze organen.

Bij voorkeur voldoen de volgens de uitvinding 30 verkregen cheleermiddelen aan formule 1 of formule 2, waarin R een alkyl-groep met tot 24 koolstofatomen, bij voorkeur 14 koolstofatomen, een alkenyl, arylalkyl of cyclo-alifatische groep, gesubstitueerd door halogeën, hydroxy, carboxy, nitro, amino, keto of heterocyclische groepen, is. De groepen kunnen onderbroken zijn door ether of thio-etherbruggen.

35 De grootste voorkeur gaat uit naar cheleermiddelen

7604022

die gesubstitueerde iminodiazijnzuur en 8-hydroxychinoline homologen zijn van geneesmiddelen en biochemische verbindingen waarvan de orgaan specifieke kenmerken bekend zijn.

Andere specifieke cheleermiddelen die geschikt zijn om te worden gebruikt bij de toepassing van de uitvinding zijn N-methyl-iminodiazijnzuur, N-(10-carboxydecyl)iminodiazijnzuur, N- \bar{N}' -(2,6-dimethylfenyl)carbamoylemethyl \bar{N} iminodiazijnzuur, N-(o-broombenzyl)-iminodiazijnzuur, N- \bar{N} -(1-naftyloxy)-2-hydroxypropyl \bar{N} iminodiazijnzuur, nitrilotriazijnzuur en 5,7-dijood-8-hydroxychinoline.

Het zal duidelijk zijn, dat de uitdrukking "gesubstitueerd iminodiazijnzuur" de verbindingen omvat, waarin R in de genoemde structuurformules combineert met een methyleengroep onder vorming van een heterocyclische ring. Een voorbeeld van een dergelijk zuur is 2,6-pyridinedicarbonzuur.

De gallium en indiumchelaten worden bereid door toevoegen van hetzij GaCl₃ of indiumchloride in 0,05 molair HCl, aan het geschikte cheleermiddel bij een pH van 3,5. Na een incubatieperiode van 25 min. wordt de pH verhoogd tot 5-7.

De onderstaande voorbeelden dienen ter nadere toelichting van de uitvinding.

Voorbeeld I

2 g (0,01 mol) α -chloor-2,6-acetyloxylicide en 2 g (0,01 mol) iminodiazijnzuur (dinatriumzout) worden 48 uur onder terugvloeiën verwarmd in 200 ml van een 3:1 EtOH/H₂O mengsel. Het mengsel werd tot droog ingedampt waardoor een geel residu werd verkregen. 25 ml water werden aan het residu toegevoegd. Het gedeelte dat niet in oplossing ging werd door vacuümfiltratie verzameld. Aan het filtraat werd geconcentreerd zoutzuur druppelsgewijze toegevoegd en de pH werd gemeten. Bij pH 3 werd de heldere oplossing troebel en deze werd een nacht lang gekoeld. Een gebroken wit neerslag werd verzameld en dit werd omgekristalliseerd uit kokend water. Het produkt werd geïdentificeerd als N- \bar{N}' -(2,6-dimethylfenyl)carbamoylemethyl \bar{N} iminodiazijnzuur met smpt. 201-203°C. Opbrengst 20 % van de theoretische.

KMR: DMSO-d₆ δ = 7,11 (s, 3, aromatische protonen)

δ = 3,63 (s, 4, CH₂-COO-)

7604022

$$\delta = 3,57 (s, 2, -CH_2-N \langle)$$

$$\delta = 2,20 (s, 6, CH_3)$$

CHN: 57,13 C; 6,16 H; 9,52N Theor.

57,10 C; 6,23 H; 9,43N Exp.

Voorbeeld II

Het overeenkomstig voorbeeld I bereide N-N'-(2,6-dimethylfenyl)carbamoylmethyliminodiazijnzuur werd in een hoeveelheid van 150 mg (0,51 mmol) opgelost in 3 ml 0,1 n NaOH. De pH van de oplossing werd ingesteld op 3,5 met 1n HCl. Aanvullend 0,1 n NaOH werd daaraan toegevoegd om de daarna toegevoegde zure SnCl₂ oplossing te compenseren. 0,3 cm³ van een oplossing van SnCl₂ (20 mg, 0,11 mmol in 10 ml 1n HCl) werden toegevoegd. Na 5 min. wachten werden 80 mCi technetium-99m als natriumpertechneaat toegevoegd. Het produkt werd gechromatografeerd in een zoutoplossing en gemeten op een radiochromatogram meetapparaat. De verkregen grafiek vertoonde een piek aan de voorkant van het oplosmiddel, R_f=1 ten gevolge van de chelaatverbinding. Er was weinig colloïdvorming. Er werd nagenoeg geen vrij technetium-99m (TR_f=0,75) gemeten.

Voorbeeld III

Methyliminodiazijnzuur werd in een hoeveelheid van 150 mg opgelost in 3 ml 0,1 n NaOH. De pH van de oplossing werd ingesteld op 3,5 met 1 n HCl. Aanvullend 0,1 n NaOH werd toegevoegd om de zure SnCl₂ oplossing die daarna werd toegevoegd, te compenseren. Er werden 0,3 cm³ toegevoegd van een oplossing van SnCl₂ (20 mg, 0,11 mmol in 10 ml 1n HCl). Na 5 min. wachten werden 80 mCi technetium-99m als natriumpertechneaat toegevoegd. Het produkt werd gechromatografeerd in zoutoplossing en gemeten op een radiochromatogram meetapparaat. De verkregen grafiek vertoonde een piek aan de voorkant van het oplosmiddel, R_f=1 ten gevolge van de chelaatverbinding. Er was weinig colloïdvorming. Er werd nagenoeg geen vrij technetium-99m (TR_f=0,75) gemeten.

Voorbeeld IV

2 μ Ci (technetium-99m) van het produkt uit voorbeeld II werden intraveneus bij muizen geïnjecteerd. De dieren werden in serie afgemaakt na de injectie en de activiteiten van de belangrijkste

7604022

organen werden bepaald door een aantal monsters uit ieder orgaan in een sintillatieteller te tellen. De in vivo verdeling van het produkt uit voorbeeld II bij muizen werd uitgezet als een functie van de tijd. Zie fig. 1 met langs de horizontale as de tijd in min. langs de verticale as het percentage dosering per gram, de stippellijn voor bloed, de lijn met de meetpunten als Δ voor de maag, de lijn met π voor de nieren, de lijn met x voor de lever en de lijn met o voor de darmen.

Voorbeeld V

De methode van voorbeeld IV werd gevolgd met gebruikmaking van het produkt van voorbeeld III. De in vivo verdeling van dit produkt bij muizen als een functie van de tijd werd uitgezet. Zie fig. 2 waarin langs de horizontale as de tijd in min., langs de verticale as het percentage van de dosering per gram, de onderste lijn voor de maag, de middelste lijn voor de lever en bovenste lijn voor de nieren.

Voorbeeld VI

4 mCi (technetium-99m) van het produkt uit voorbeeld II werden intraveneus geïnjecteerd in laboratoriumhonden. Eén dier werd genomen voor het met tijdsintervallen vervaardigen van beelden met behulp van een sintillatiecamera. De camerabeelden werden door meervoudige belichting verkregen en toonden de localisatie van technetium-99m in de lever aan. Zie fig. 3, waarin voorafgaande beeldstudies zijn weergegeven en waaruit de snelle opname door de lever blijkt, die duidelijk wordt geïdentificeerd na 5 min. (Opname A). De galblaas verschijnt als een koud defect. Daaropvolgende beelden, genomen na 25, 40 en 50 min. zijn weergegeven in de opnamen B, C en D, waarbij verwijdering uit de lever werd aangetoond met toenemende opeenhoping van het radiofarmaceuticum in de galblaas. Minder dan 10 % en 3 % van de geïnjecteerde dosis bleef in het bloed na respectievelijk 10 min. en 60 min. Voldoende cholecystokinine werd intraveneus in de hond geïnjecteerd om een samentrekking van de galblaas te veroorzaken. Daaropvolgend onderzoek onthulde radiofarmaceutische activiteit die door de dunne darmen voortschrijdt. Zie fig. 4. Binnen 1 min. na injectie van cholecystokinine ziet men het technetium-99m gemerkte produkt de galblaas verlaten (opname E). De opnames F, G en H die na 5, 10 en 35 min.

7604022

werden genomen vertonen een bolusactiviteit die voortschrijdt door de dunne darm. De beelden werden verkregen met gebruikmaking van een gamma-sintillatie-camera (Pho Gamma III) en een hoge sensitiviteit-collimator met parallel opening.

5 Voorbeeld VII

De methode van voorbeeld VI werd uitgevoerd en de resultaten werden vergeleken met de resultaten verkregen na injectie van dezelfde hond op een later tijdstip met I-131 Bengaals Rood. Zowel vóór als na plasma toediening met broomsulftaleïne (BSP) om hyperbilirubemie te simuleren, veranderde de BSP gehalten van 4-7 mg % de plasma verwijdering of beeldkenmerken van het met technetium-99m gemerkte produkt nagenoeg niet. Deze beelden waren van een veel betere kwaliteit dan de beelden die achtereenvolgens verkregen worden bij dezelfde hond met gebruikmaking van I-131 Bengaals Rood. Zie fig. 5.

15 Voorbeeld VIII

De methode van de voorbeelden II en III werd gevolgd voor het bereiden van het technetium-99m chelaat van 8-hydroxychinoline waarbij een 7 m molaire oplossing van 8-hydroxychinoline en een zure tin(II)chlorideoplossing als reductiemiddel werden gebruikt. Het chelaat werd teruggewonnen door chloroform-extractie in een opbrengst van meer dan 90 %.

De bioverdelingsonderzoeken werden uitgevoerd met gebruikmaking van de methode van voorbeeld IV. 2 μ Ci (technetium-99m) van het bovengenoemde chelaat werden intraveneus geïnjecteerd in muizen van 25 g. De dieren werden na 60 min. afgemaakt en de activiteiten in de voornaamste organen werden bepaald door een aantal monsters van hetzelfde orgaan te tellen in een sintillatieteller. Vastgesteld werd, dat gemiddeld 40 % van de geïnjecteerde dosis in de lever aanwezig was en 20 % in de darmen.

30 Voorbeeld IX

Het gallium-67 chelaat van 8-hydroxychinoline werd bereid door Ga Cl_3 in 0,05 molair HCl toe te voegen aan een waterige 7m molaire 8-hydroxychinoline-oplossing met een pH van 3,5. Na 25 min. incubatieperiode werd de pH verhoogd tot 6. Chloroform-extractie van het reactieproduct leverde een opbrengst van meer dan 90 % van het chelaat.

7604022

Bioverdelingsonderzoekingen werden uitgevoerd volgens de methode als beschreven in voorbeeld VIII. Na intraveneuze injectie van het chelaat bij muizen van 25 g werd 25 % van de geïnjecteerde dosis in de lever gevonden, 13 % in de darmen en 20 % in het bloed na 60 min.

5 Voorbeeld X

Het technetium-99m chelaat van nitrilotriazijnzuur werd bereid volgens de tin(II)chloride reductiemethode als beschreven in de voorbeelden II, III en VIII. Het chelaat is water-oplosbaar met een meer dan 95 %'ige migratie bij papierchromatografie met gebruikmaking van een zoutoplossing. Bioverdelingsonderzoekingen werden uitgevoerd volgens de methode als beschreven in voorbeeld VIII. Het chelaat bleek snel door de nieren te gaan naar de urine (40 % in de urine verwijderd na 60 min.) terwijl minder dan 5 % van de geïnjecteerde dosis in de lever en de darmen werd gevonden.

15 Voorbeeld XI

Het cobalt-57 chelaat van N- \bar{N} '-(2,6-dimethylfenyl)-carbamoylmethyl/iminodiazijnzuur werd bereid door 2-5 μ Ci van $Co^{57}Cl_2$ te verwarmen in aanwezigheid van 1 ml (20 mg/ml) van een oplossing van de verbinding (pH 4-5) gedurende 1 uur bij 100°C. Het chelaat werd gechromatografeerd en de bioverdelingsonderzoekingen werden uitgevoerd volgens de methode van voorbeeld VIII. Na 30 min. komt 28 % van de geïnjecteerde dosis voor in de lever en 12 % in de darmen.

25 Voorbeeld XII

Het technetium-99m chelaat van 10-carboxydecyliminodiazijnzuur werd bereid overeenkomstig de tin(II)chloride reductie methode van de voorbeelden II, III en VIII. Het produkt werd gechromatografeerd in zoutoplossing. Meer dan 98 % van het materiaal bezat een $R_f=1$. De bioverdelingsonderzoekingen van het chelaat overeenkomstig volgens voorbeeld VIII bij 10 muizen van 25 g vertoonde een snelle verwijdering uit het bloed waarbij minder dan 6 % van de geïnjecteerde dosis na 60 min. nog in het bloed aanwezig was. De radio-activiteit werd afgevoerd door zowel de nieren als de lever, waarbij een achterblijvende activiteit in de lever en de longen werd vastgesteld.

35 Voorbeeld XIII

Het technetium-99m chelaat van N-(o-broombenzyl)-

7604022

iminodiazijnzuur werd bereid volgens de tin(II)chloride reductiemethode als beschreven in voorbeelden II, III en VIII. Het produkt werd onderworpen aan papierchromatografie in zoutoplossing (98% bezat een $R_f = 1$). Bioverdelingsonderzoekingen werden uitgevoerd met 12 muizen van 25 g volgens de methode van voorbeeld VIII waarbij een snelle verwijdering uit het bloed werd waargenomen (minder dan 5% is nog aanwezig na 60 min.) en een hoge opname in de lever (40%) en de darmen (30%) na 30 min.

Voorbeeld XIV

De methode van voorbeeld XI werd gevolgd voor het bereiden van een cobalt-57 chelaat van methyliminodiazijnzuur.

Voorbeeld XV

De methode van voorbeeld IX werd gevolgd voor het bereiden van het gallium-67 chelaat van methyliminodiazijnzuur.

Bioverdelingsproeven werden uitgevoerd volgens de methode van voorbeeld VIII en deze toonden een snelle verwijdering uit de nieren aan.

Voorbeeld XVI

De tin(II)chloride reductiemethode van de voorbeelden II, III en VIII werd gebruikt voor het bereiden van het technetium-99m chelaat van 4,7-dijood-8-hydroxychinoline.

Voorbeeld XVII

De tin(II)chloridereductiemethode van de voorbeelden II, III en VIII werd gebruikt voor het bereiden van het technetium-99m chelaat van 2,6-pyridinedicarbonzuur.

C o n c l u s i e s

1. Werkwijze ter bereiding van een chelaat, met het kenmerk, dat men een chelaat bereidt van technetium-99m, cobalt-57, gallium-67, gallium-68, indium-111 of indium-113m en een gesubstitueerd iminodiazijnzuur.

2. Werkwijze ter bereiding van een chelaat, met het kenmerk, dat men een chelaat bereidt van technetium-99m, cobalt-57, gallium-67, gallium-68, indium-111 of indium-113m en 8-hydroxychinoline.

3. Werkwijze ter bereiding van een preparaat, met het kenmerk, dat men een mengsel bereidt van het technetium-99m chelaat en het tin(II) chelaat van het gebruikte cheleermiddel.

7604022

4. Werkwijze ter bereiding van een preparaat, met het kenmerk, dat men een mengsel bereidt van het technetium-99m chelaat, het tin(II) chelaat van het cheleermiddel en het cheleermiddel zelf.

5 5. Werkwijze volgens conclusie 1,3 of 4, met het kenmerk, dat men als iminodiazijnzuur cheleermiddel N-methyl-iminodiazijnzuur, N-N'-(2,6-dimethylfenyl)carbamoylmethyl/iminodiazijnzuur, N-(10-carboxydecyl)iminodiazijnzuur, N-(o-broombenzyl)iminodiazijnzuur, N/3-(1-nafthyloxy)-2-hydroxypropyl/iminodiazijnzuur, nitrilotriazijnzuur of 2,6-pyridinedicarbonzuur gebruikt.

10 6. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men N-N'-(2,6-dimethylfenyl)carbamoylmethyl/imino-diazijnzuur bereidt.

7. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men het radio-isotoop met het cheleermiddel laat reageren.

15 8. Werkwijze volgens conclusie 7, met het kenmerk, dat men als radio-isotoop technetium-99m toepast.

9. Werkwijze volgens conclusie 8, met het kenmerk, dat men een pertechnetaat reduceert in aanwezigheid van het cheleermiddel.

10. Werkwijze volgens conclusie 9, met het kenmerk, dat men de reductie uitvoert met behulp van tin(II)chloride als reductiemiddel.

20 11. Werkwijze voor de bereiding van een chelaat, zoals hierin beschreven.

25 12. Werkwijze voor de bereiding van een diagnostisch preparaat, met het kenmerk, dat men een chelaat van technetium-99m, cobalt-57, gallium-67, gallium-68, indium-111 of indium-113m met een gesubstitueerd iminodiazijnzuur in voor toepassing geschikte vorm brengt.

13. Gevormd diagnostisch preparaat, verkregen met de werkwijze volgens conclusie 12.

7604022

4
F

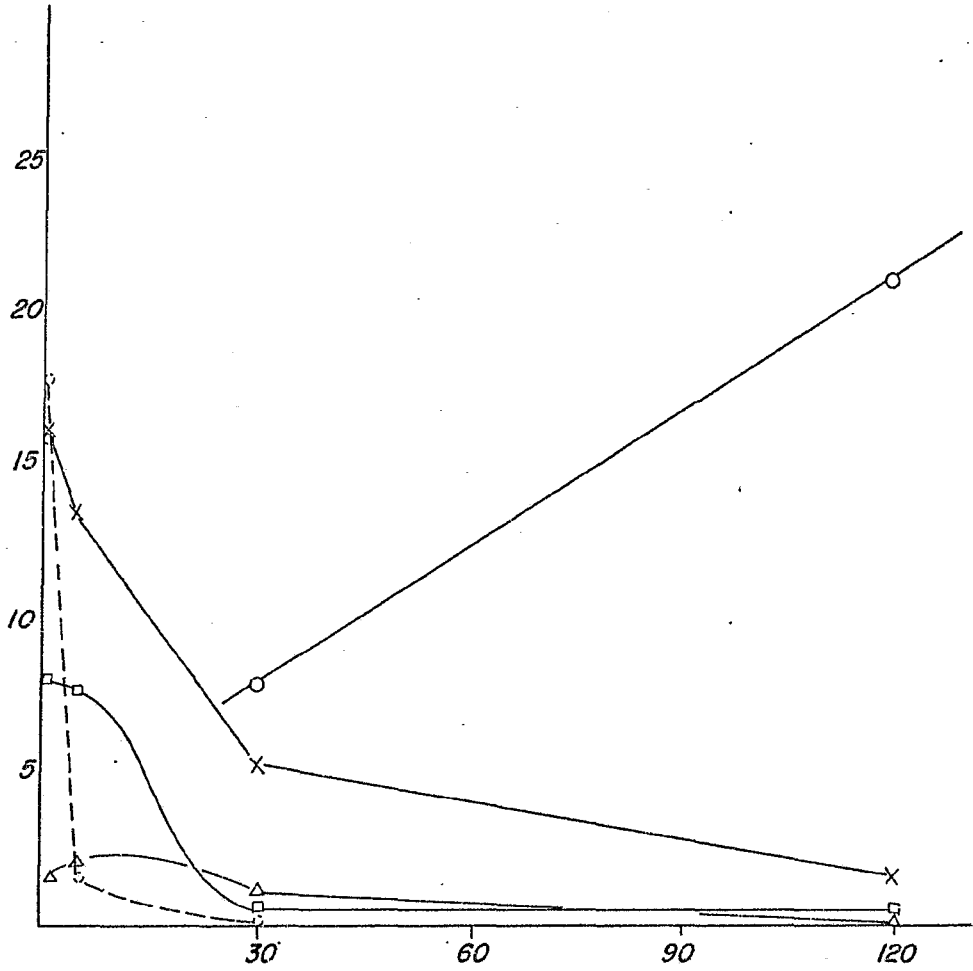


Fig. 1

7604022

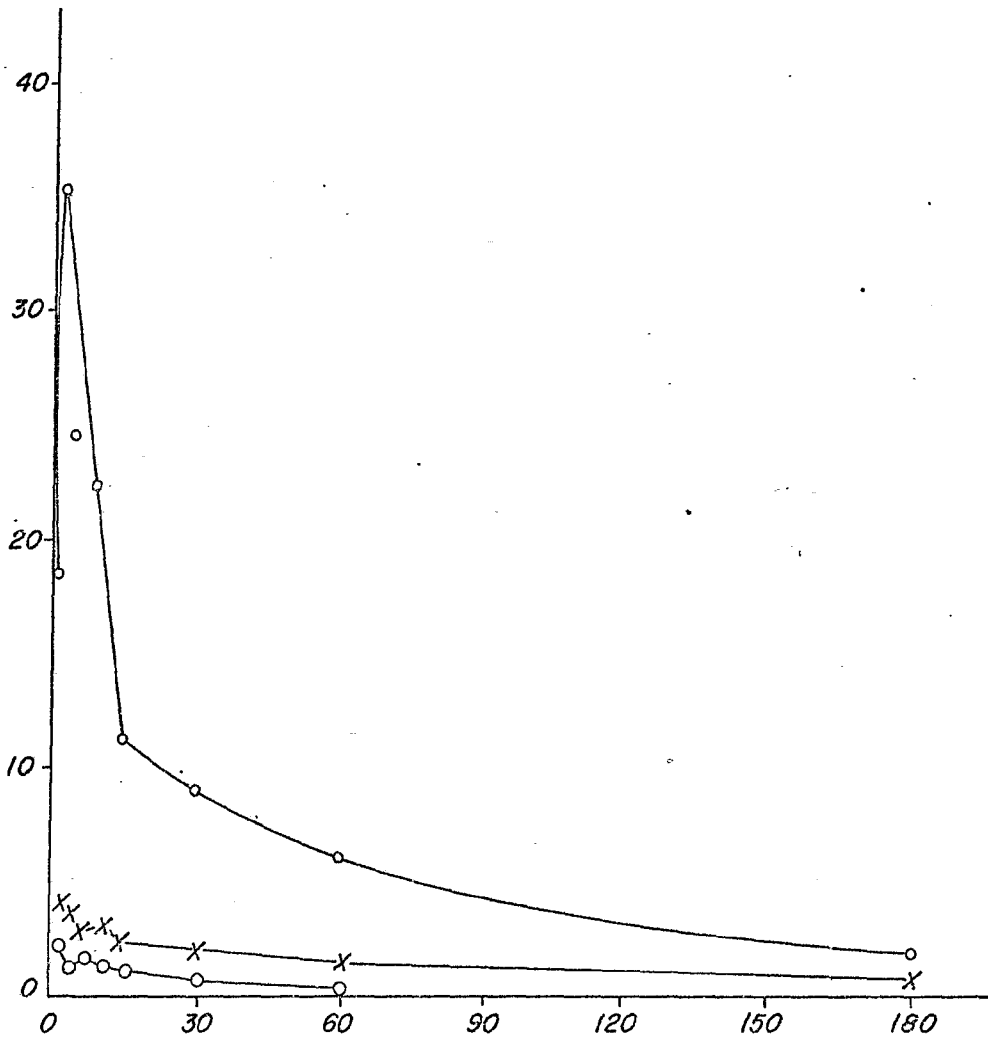


Fig. 2

7604022

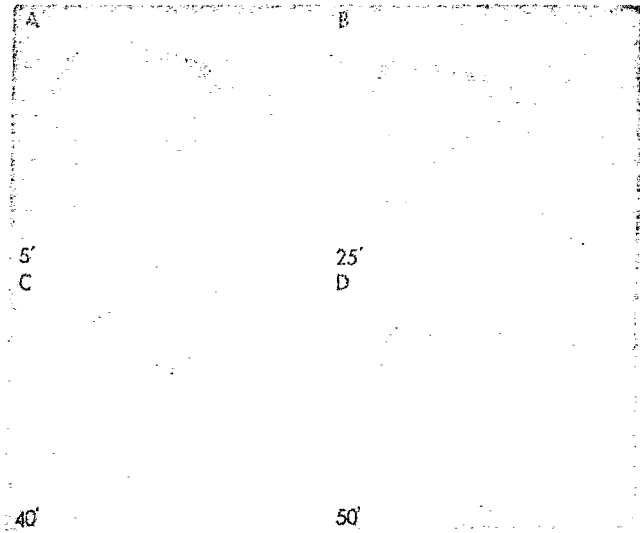


FIG. 3

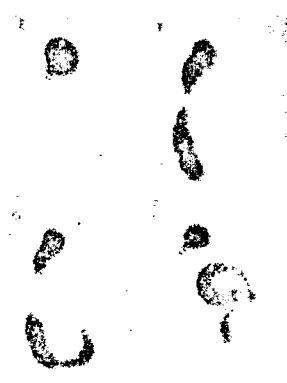
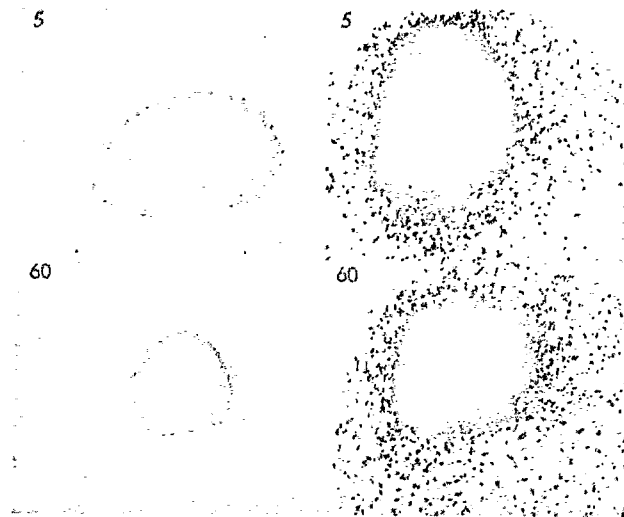


FIG. 4

FIG. 5



Tc 99m

I 131

7604022