

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 143733 B

- (21) Ansøgning nr. 3148/76 (51) Int.Cl.³ A 61 K 49/02
(22) Indleveringsdag 12. jul. 1976
(24) Løbedag 12. jul. 1976
(41) Alm. tilgængelig 13. jan. 1978
(44) Fremlagt 5. okt. 1981
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet -

(71) Ansøger THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, Cincinnati, US.

(72) Opfinder Frederick Anthony Hartman, US: Herbert Charles Kretschmar, US: Andrew John Tofe, US.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree.

(54) Fysiologisk acceptabel, partikelformig bærer for radionuclidet technetium-99m.

Opfindelsen angår en fysiologisk acceptabel, partikelformig bærer for radionuclidet technetium-99m i form af et modificeret stivelsesderivat, som indeholder en anionisk phosphorholdig substituent.

Gennem nogen tid har det været erkendt, at sædvanlige organscanningsteknikker ikke er helt tilfredsstillende til afbildning af særlige organer i legemet. Man har almindeligvis givet vanskeligheden ved at fremstille et stabilt, radioaktivt mærket diagnosticeringsmiddel, som risikofrit kan tilføres et nærmere bestemt receptororgan, skylden for manglerne ved de kendte metoder.

I forsøg på at overvinde disse mangler har man undersøgt en række radionuclider med henblik på deres anvendelse som diagnos-

DK 143733 B

ticeringsmidler. I den senere tid har man koncentreret interessen om brugen af technetium-99m (^{99m}Tc) som det foretrukne radioaktive mærkningsstof til diagnosticeringsmidler. ^{99m}Tc har vist sig at være et særligt ønskeligt radionuclid på grund af dets fordelagtige halveringstid på ca. 6 timer, dets anvendelighed i forbindelse med eksisterende afbildningsudstyr og lethed ved at fremskaffe det. Det er normal praksis at anvende et stabilt pertechnetatkomplex ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), såsom natriumpertechnetat, som en hensigtsmæssig ^{99m}Tc -kilde. En $^{99m}\text{TcO}_4^-$ opløsning på den oxiderede pertechnetat-form tilvejebringes f.eks. ud fra i handelen værende generatorer ved at eluere dem med en isotonisk saltopløsning. ^{99m}Tc adskiller sig imidlertid fra andre radionuclider ved, at det som radioaktiv mærkning til diagnosticeringsformål generelt kun er anvendeligt på sin reducerede form. Følgelig må bærere, som er egnede til anvendelse i forbindelse med ^{99m}Tc -radionuclidet danne forbindelse med eller på anden måde tilvejebringe et reduktionsmiddel, som er i stand til at reducere pertechnetationen til dennes lavere valenstrin.

Den senere tids forsøg på at tilvejebringe virkningsfulde radiodiagnostiske bærere har været rettet mod brugen af partikelformigt materiale af kritisk størrelse, som, når det én gang er mærket og indgivet, selektivt afsættes i det nærmere bestemte receptororgan. F.eks. har det vist sig, at partikler, hvis størrelse er mindre end $1\text{ }\mu\text{m}$, af størrelsesordenen fra $0,5$ til $1\text{ }\mu\text{m}$, har tendens til at akkumuleres i leveren, mens partikler af størrelsesordenen 10 til $100\text{ }\mu\text{m}$ har tendens til at akkumuleres i lungerne. Bærere, hvis størrelse er mindre end $1\text{ }\mu\text{m}$ er følgelig blevet anvendt til selektivt at tilføre gamma-emitterende radionuclider til leveren, mens større bærere er blevet anvendt til at tilføre radionuclider til lungerne.

Generelt er en egnet partikelformig bærer en bærer, som let kan fremstilles, er stabil, har et snævert partikelstørrelsesspektrum, let mærkes radioaktivt og let metaboliseres af eller afgives fra receptororganet, efter at diagnosticeringsprocesserne er afsluttet. Kolloider, chelater og makroaggregater af albumin eller polysaccharider er blevet foreslået som partikelformige radionuclidbærere.

Fra beskrivelsen til USA-patent nr. 3.758.678 er det kendt at fremstille partikelformige bærere med kritiske diametre, som er valgt således, at der opnås organspecificitet som anført

ovenfor. Disse partikelformige bærere fremstilles af stivelsesphosphat og kan opbevares til brug ved fremstilling af et radioaktivt mærket diagnosticeringsmiddel ved kontaktning med frisk radioaktivitet, som ikke har undergået henfald. Det er i patentskriftet eksemplificeret, hvorledes det partikelformige stivelsesphosphat kan mærkes med cerium-144, og det er nævnt, men ikke eksemplificeret, at der også kan benyttes technetium til mærkningen. Hvis den partikelformige bærer kombineres med et reduceret radionuclid, såsom en opløsning af et stanno-technetiumkomplex, dannes der, ud over technetiummærkede bærerpartikler, uønskede kolloide aggregater af forskellig størrelse, og disse aggregater vil i en diagnosticeringssituation afsættes i ikke-receptororganer. Den diagnostiske nøjagtighed af den partikelformige bærer vil derfor blive reduceret. Denne nøjagtighedsreduktion gør ikke blot scannings-effektiviteten mindre, men bevirker også, at organer, som ikke er involveret i undersøgelsen, vil unødigt blive udsat for radioaktive materialers virkning. Hvis disse ulemper skulle undgås, måtte de blandede kolloide aggregater frarenses inden anvendelsen af diagnosticeringsmidlet, men dette vil involvere besværlige og tidkrævende rensningsprocedurer, hvorved arbejdsgangen i diagnosticeringssituationen vil blive stærkt kompliceret, som anført nedenfor.

Fra beskrivelsen til USA-patent nr. 3.852.413 er det kendt at fremstille et diagnosticeringsmiddel bestående af et sulfateret polysaccharid (sulfateret kartoffelstivelsesamylopectin, amylosulfat) og hertil bundet technetium-99m. Det er også nævnt, men ikke eksemplificeret, at der i stedet for sulfateret polysaccharid kan anvendes phosphoryleret polysaccharid. Ifølge dette patentskrift fremstilles diagnosticeringsmidlet ved til en netop genereret technetium-99m natriumpertechneatopløsning at tilsætte syre og et effektivt reduktionsmiddel, såsom ferri-chlorid i forbindelse med ascorbinsyre. Efter nogle minutters reduktion tilsættes derpå det sulfaterede polysaccharid. Fremstillingen af diagnosticeringsmidlet er imidlertid ikke hermed afsluttet. Tilbage står nemlig en tidsmæssigt yderst krævende fjernelse af ikke-bundet technetium-99m. Denne fjernelse kan foretages ved dialyse eller ved at lede den frembragte opløsning gennem en ionbytnings- eller gelfiltreringssøjle. Det fremgår af patentskriftets eksempler, at der til denne fjernelse af ikke-bundet technetium-99m medgår et tidsforbrug af størrelsesordenen

5½ time. Det vil således ses, at de på denne måde fremstillede radioaktivt mærkede bærere ikke på kort tid kan færdigfremstilles til brug i en undersøgelsessituation, men at der hertil vil medgå mere end det halve af en normal arbejdsdag på 8 timer. Det skal endvidere bemærkes, at de ifølge dette patentskrift frembragte, radioaktivt mærkede bærere ikke er partikelformige med veldefineret størrelse.

De ovenfor beskrevne, radioaktivt mærkede bærere repræsenterer ikke en præfremstillet, klar-til-brug-bærer, som er fordelagtig set ud fra følgende synspunkter:

1) Ved arbejde med radioaktive materialer er det altid set ud fra et strålehygiejnisk synspunkt en fordel, at den tid, der medgår til fremstilling af det radioaktive materiale i sin anvendelige form og i hvilken den radioaktive del af materialet er med i tilberedningsprocedurerne, er så kortvarig som mulig,

2) ved arbejde med "kortlivede" radioaktive isotoper, (såsom technetium-99m) er det yderligere påkrævet - på grund af den hurtigt aftagende aktivitet - at den del af tilberedningsprocedurerne, i hvilke den kortlivede radioaktive isotop er med, er så kortvarig som mulig, og

3) set ud fra et arbejdstilrettelægnings-synspunkt i en patientundersøgelsessituation er det vigtigt, at fremstillingen af det radioaktive materiale i sin til undersøgelsen anvendelige form er så lidt tidkrævende som muligt; hvis færdigfremstillingen af diagnosticeringsmidlet eksempelvis kræver en tid svarende til det halve af en normal arbejdsdag eller mere, vil dette enten nødvendiggøre, at personalet arbejder på skiftehold eller på overtid, eller at alle patienter skal møde til undersøgelse kort før arbejdsdagens slutning og derfor alle mere eller mindre samtidigt. Det u hensigtsmæssige i disse alternative situationer er indlysende.

Med den foreliggende opfindelse tilvejebringes der en fysiologisk acceptabel, partikelformig bærer for radionuclidet technetium-99m, hvilken bærer ikke lider af de ovenfor omtalte kendte bæreres ulemper og i fuldt omfang tilgodeser det ovenfor under punkterne 1-3 omhandlede, eftersom den partikelformige bærer i brugssituationen kun skal kontaktes med radionuclidet i sin oxiderede form (en pertechnetatopløsning) for at tilvejebringe et radiomærket, partikelformigt diagnosticeringsmiddel, som kan indgives patienten i undersøgelsesøjemed.

Dette opnås med en bærer af den i indledningen omtalte

art, hvilken bærer er ejendommelig ved, at stivelsesderivatet indeholder fra ca. 1 til ca. 20 vægtprocent af den anioniske phosphorholdige substituent, og at bæreren yderligere indeholder fra 0,1 til 1,5 vægtprocent af et reduktionsmiddel.

Den partikelformige bærer ifølge opfindelsen giver ved simpel blanding med radionuclidet et stabilt, radioaktivt mærket diagnosticeringsmiddel.

En udførelsesform for den partikelformige bærer ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at den indeholder fra ca. 0,2 til ca. 0,8 vægtprocent stanno-kation bundet til det anioniske stivelsesderivat med gennemsnitlig fra ca. 4 til ca. 5 vægtprocent phosphatsubstituent.

Denne udførelsesform for bæreren ifølge opfindelsen er fordelagtig derved, at stivelsen i denne bærer er speciel vanduopløselig, at reduktionsmidlet og indholdet af anionisk substituent repræsenterer et optimum med hensyn til effektiv reduktion af radionuclidet og effektiv fastholdelse af det reducerede radionuclid, således at der frigøres mindst mulig ikke-bundne kolloide reduktionsmiddel/radionuclid-komplekser.

Stivelser, som kan derivatiseres og modificeres som angivet nærmere nedenfor, og som er egnede til anvendelse ved den foreliggende opfindelse, indbefatter såvel naturlige som forarbejdede partikelformige stivelser, såsom dextrineret, hydrolyseret, oxideret, alkyleret, hydroxyalkyleret, acetyleret eller fraktioneret stivelse (amylose og amylopectin). Yderligere kan stivelsen være af en hvilken som helst oprindelse, f.eks. majsstivelse, hvedestivelse, kartoffelstivelse, risstivelse, tapiokastivelse o.l.

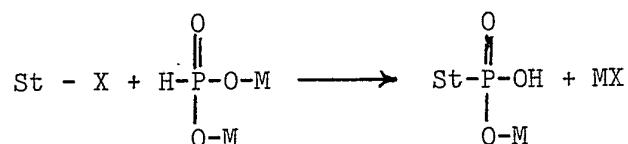
De partikelformige bærere ifølge opfindelsen fremstilles ved en tottrinsændring af den stivelsespartikel, man går ud fra. I det første trin fremstilles et anionisk stivelsesderivat ved at indføre gennemsnitligt fra ca. 1 til ca. 20 vægtprocent anioniske phosphorholdige substituent i molekylstrukturen af den stivelsespartikel, man går ud fra. I det andet trin bindes det anioniske stivelsesderivat fra trin 1 til fra 0,1 til ca. 1,5 vægtprocent af et reduktionsmiddel. Det har vist sig, at substitutionsgraden (heri udtrykt som vægtprocent) af såvel de anioniske substituent som reduktionsmiddelsubstituenterne ændrer bærernes virkningsfuldhed som radio-diagnosticeringsmiddel.

Anioniske phosphorholdige stivelsesderivater er velkendte indenfor teknikken og kan fremstilles ved forskellige kendte metoder. F.eks. kan den stivelsespartikel, man går ud fra, ekstraheres under anvendelse af et

hydrophilt lipid-opløsningsmiddel, såsom en lavere alkohol, for at fjerne adhærerende fedt, og derefter behandles under vandfrie betingelser med en uorganisk syre eller et uorganisk syrederivat, som indeholder den valgte anion. Hvis det ønskes, kan det fremkomne anioniske stivelsesderivat neutraliseres for at fremstille et stivelsesderivat, som indeholder anioner af de tilsvarende salte.

Nærmere bestemt kan eksempler på anioniske stivelsesderivater fremstilles ved følgende fremgangsmåder:

(1) Phosphatderivater af stivelser fremstilles ved en fortrængningsreaktion under anvendelse af et phosphit og halid- eller sulfonatderivatet af stivelsen. Denne fremstilling illustreres af nedenstående reaktionsskema:



hvor M er et alkalimetall, og St - X er et chlor-, brom- eller ioderivat af stivelse eller en sulfonat- eller aarylsulfonatester af en stivelse.

(2) Stivelsesalkylphosphonatforbindelser kan fremstilles ved at omsætte et stivelsesalkoholat, som fremstillet ifølge beskrivelsen til U.S.A. patent nr. 2.609.368 med et haloalkylphosphonat. Haloalkylphosphonatet er et chlor-, brom- eller ioderivat af alkylphosphonater med fra 1 til ca. 6 carbonatomer. Denne reaktion vises i nedenstående ligning:



hvor St-OM er et stivelsesalkoholat, X et halogen, M og M' alkalimetaller og n et helt tal på fra 1 til ca. 6, og

(3) Stivelsesalkyldiphosphonater kan fremstilles på den for stivelsesalkylphosphonater beskrevne måde, idet et haloalkyldiphosphonat anvendes i stedet for et haloalkylphosphonat.

Indføring af de anioniske substituenten bør gennemføres i stort set vandfri tilstand for at sikre, at de modificerede stivelsespartikler forbliver på ugelatiniseret form, d.v.s. vandopløselig form. Som ovenfor beskrevet omfatter egnede fysiologisk acceptable anioniske substituenten f.eks. anionerne af phosphor-, polyphosphon-, polyphosphor-, phosphon-, pyrophosphor-, alkylphosphor-, alkylpolyphosphon-,

alkylpolyphosphor-, og alkylphosphonsyre eller alkalimetall- (f.eks. natrium og kalium) saltene af disse, ammoniumsaltene af disse eller de med grupper af lav molekylvægt substituerede ammoniumsalte af disse (f.eks. mono-, di-, og triethanolammoniumsaltene). Foretrukne anioniske substituentter omfatter phosphorsyre, pyrophosphorsyre, phosphonsyre, polyphosphorsyre og polyphosphonsyreanioner. De særligt foretrukne anioner omfatter pyrophosphat-, ethyl-1-hydroxy-1,1-diphosphonat og phosphatanioner. Phosphatanionen foretrækkes navnlig.

I alle tilfælde er det nødvendigt at stivelsesderivatets anionindhold afpasses således, at den fremkomne partikel forbliver stort set vandopløselig og biologisk stabil. Endvidere har det vist sig, at et anionisk substituentindhold over ca. 20 vægtprocent af det fremkomne anioniske stivelsesderivat bevirker, at partiklen kvælder og til sidst nedbrydes. Yderligere har et anionisk substituentindhold på mindre end ca. 1 vægtprocent vist sig utilstrækkeligt til at sikre binding af et passende indhold af reduktionsmiddel som beskrevet i det følgende. Følgelig udgør anioniske substituentter gennemsnitligt fra ca. 1 til ca. 20 vægtprocent, fortrinsvis fra ca. 3 til ca. 10 vægtprocent af det anioniske stivelsesderivat.

Efter derivatiseringen modificeres det fremkomne anioniske stivelsesderivat ved at binde reduktionsmiddelsubstituentter til den anioniske stivelsesstruktur. Binding tilvejebringes ved at bringe det anioniske derivat i kontakt med en sur opløsning af et reduktionsmiddel. Betegnelsen "reduktionsmiddel" omfatter normalt og også her substituentter, som er i stand til at afgive elektroner til en oxideret radionuclid-kilde. F.eks. omfatter egnede reduktionsmidler de metalliske stanno-, ferro-, chromo- og cuproioner, men andre reduktionsmidler som f.eks. hydraziner, bisulfitaddukter, mercaptaner og sulfider kan også bindes til det anioniske stivelsesderivat. De metalliske kationer foretrækkes. Stannoionen er et særligt foretrukket reduktionsmiddel.

Som tidligere anført er bærerne ifølge opfindelsen beregnet til brug i forbindelse med technetium-99m, som anvendes på sit reducerede valenstrin. Det er derfor nødvendigt, at det til det anioniske stivelsesderivat bundne reduktionsmiddel er tilgængelig i tilstrækkelig mængde til at reducere radionuclidkilden, pertechnetat, tilstrækkeligt. Det har vist sig, at et reduktionsmiddelindhold under et gennemsnit på ca. 0,1 vægtprocent ikke er tilstrækkeligt til at sikre reduktion af radionuclidkilden. Endvidere har det vist sig, at et reduktionsmiddelindhold over ca. 1,5 vægtprocent vil resultere i

frigivelse af frie substituenten, som danner særskilte kolloide bærere, som er i stand til at reducere radionuclidet og danne komplekser hermed. Sådanne kolloide bærere kan frit transportere radionuclidet til ikke-receptororganer og reducerer dermed scannings effektivitet og udsætter ikke-receptororganer unødigt for radioaktive materialer. Følgelig omfatter reduktionsmidlet gennemsnitligt fra ca. 0,1% til ca. 1,5%, fortrinsvis fra ca. 0,2 til ca. 0,8 vægtprocent, af bærersammensætningen. Ved anvendelsen foreligger de partikelformige bærere ifølge opfindelsen med forudsorteret størrelse alt efter receptororgan-selektiviteten, og de opbevares enten som et tørt pulver eller i isotonisk saltopløsning. Til dannelse af et radioaktivt mærket diagnosticeringsmiddel bringes de størrelsessorterede bærere i berøring med technetium-99m, som reduceres og bindes til bærerpartiklen.

Som radiomærket diagnosticeringsmiddel indgives en portion af de i størrelse afpassede partikler parenteralt i patienten til radiodiagnosticering. Partiklerne cirkulerer gennem legemet i blodstrømmen og vil som følge af den valgte partikelstørrelse gå ind i et nærmere bestemt på forhånd valgt organ. Strålingsdetektorer kan derefter anvendes til at udvikle et billede af organet. Derefter metaboliseres partiklerne eller nedbrydes på anden måde og udskilles fra legemet.

Nedenstående eksempel skal belyse opfindelsen.

EKSEMPEL 1

Den foretrukne sammensætning ifølge opfindelsen, en phosphoryleret stivelse-stannosammensætning indeholdende fra ca. 4 til ca. 5 vægtprocent fosfat og fra ca. 0,2 til ca. 0,8 vægtprocent stannokation, fremstilledes som følger:

Fjernelse af lipider. Hovedparten af lipiderne fjernes fra majsstivelse under anvendelse af en sædvanlig ekstraktionsteknik. 200 g majsstivelse blandedes med 1,2 l chloroform, 400 ml methanol og omrørtes ved 26°C i 16 timer. Stivelsen fik lov at bundfælde sig og væsken dekanteredes. Yderligere 1 liter methanol tilsattes, og suspensionen omrørtes igen ved 26°C i 16 timer. Stivelsen opsamledes ved sugefiltrering og vaskedes tre gange med 1-liter portioner vand efterfulgt af tre vasketrin med 1-liter portioner acetone. Stivelseskagen blev opbrudt og tørret under vacuum (60°C/0,1 mm) i 16 timer. Det isolerede udbytte af affedtet majsstivelse var 162 g (81%).

Phosphorylering. Phosphoryleret majsstivelse fremstilledes ved den af Rolland Lohman m.fl. beskrevne fremgangsmåde i Journal of the

American Chemical Society, 72, side 5717 (1950), "Phosphorylation of Starch". Idet denne fremgangsmåde fulgtes, og majsstivelse og 0,5 mol-ækvivalent phosphoroxychlorid anvendtes, tilvejebragtes phosphoryleret majsstivelse indeholdende 3,5% phosphatanion i 97% udbytte.

Dannelse af phosphoryleret stivelse-stannobærer. En opløsning af 16 ml koncentreret saltsyre indeholdende 200 mg stannochloridihydrat ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) fortyndedes til 200 ml med deoxygeneret vand og blandedes med 10 g phosphoryleret stivelse. Denne suspension omrørtes i 20 minutter, fik lov at bundfælde sig, og væsken dekanteredes. Yderligere 400 ml 0,1N saltsyre tilsattes, og suspensionen omrørtes i 5 minutter. Stivelsen fik lov at bundfælde sig, og væsken dekanteredes. Sidstnævnte proces gentoges. Det modificerede stivelsesderivat blandedes med 60 ml acetone og opsamledes ved sugefiltrering. Efter lufttørring gennemførtes afsluttende tørring under vacuum (0,1 mm) i 16 timer. Udbyttet af tør partikelformig sammensætning var 9,65 g (94%).

Størrelsesindstilling til 10-45 micron. Sammensætningen fandtes i en morter og sorterendes gennem en ATM Sonic Sifter (ATM Corporation, Milwaukee, Wisconsin) under anvendelse af præcisions-sigter nr. L 3-M 45 (43-47 μm), L 3-M 30 (32-38 μm), L 3-M 20 (18-20 μm), L 3-M 10 (8-12 μm). Sortering gennemførtes over 5 minutter under anvendelse af amplitudeindstillinger 2 eller 3 og en amplitudepulsindstilling på 5. Sortering kan også gennemføres manuelt under anvendelse af en Tyler Standard Screen 325 mesh (43 μm). Når det drejer sig om phosphoryleret majsstivelse-stanno, er mere end 95% af partiklerne 10-45 μm .

Når de sorterede bærere bringes i kontakt med kaliumpertech-netat, reducerer og kompleksbinder de technetiumradionuclidet under tilvejebringelse af et virkningsfuldt radioaktivt mærket radiodiagnosticeringsmiddel.

De mærkede bærere indgaves parenteralt i patienter og viste sig selektivt at gå ind i lungerne, således at der derved tilvejebragtes et virkningsfuldt radiodiagnosticeringsmiddel.

Ris-, hvede-, kartoffel-, tapioca-, batat-, maranta-, canna-, voksmajs-, tarostivelse og dextrineret stivelse anvendes i stedet for majsstivelse i ovennævnte tilberedning. Tilsvarende resultater opnås, idet de sorterede partikler, når de bringes i kontakt med sure opløsninger af reduktionsmidler, danner stabile sammensætninger, som kan mærkes radioaktivt til dannelse af organspecifikke radiodiagnosticeringsmidler.

Ved ovenstående fremgangsmåde erstattes stannochloriddihydrat af ferrochlorid, chromochlorid, stannochlorid, ferrobromid, chromobromid og stannobromid, og den tilsvarende stivelsesphosphatsammensætning fremstilles.

Ved ovenstående fremgangsmåde erstattes den phosphorylerede stivelse af stivelsesdiphosfonat, stivelsesethylphosfonat og stivelsesnatriumpropyldiphosfonat, og den tilsvarende anioniske stivelsesstannoforbindelse fremstilles.

P a t e n t k r a v .

1. Fysiologisk acceptabel, partikelformig bærer for radio-nuclidet technetium-99m i form af et modificeret stivelsesderivat, som indeholder en anionisk phosphorholdig substituent, k e n d e t e g n e t ved, at stivelsesderivatet indeholder fra ca. 1 til ca. 20 vægtprocent af den anioniske phosphorholdige substituent, og at bæreren yderligere indeholder fra 0,1 til 1,5 vægtprocent af et reduktionsmiddel.

2. Fysiologisk acceptabel, partikelformig bærer ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den indeholder fra ca. 0,2 til ca. 0,8 vægtprocent stannokation bundet til det anioniske stivelsesderivat med gennemsnitligt fra ca. 4 til ca. 5 vægtprocent phosphatsubstituenten.

Fremdragne publikationer:

Tysk offentliggørelsesskrift nr. 2424496
USA patenter nr. 3758678, 3852413.