



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

N° 883.304

Classif. Internat.: C07B/A61K/C07D

Mis en lecture le:

14-11-1980

Le Ministre des Affaires Économiques,

*Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention;**Vu la Convention d'Union pour la Protection de la Propriété Industrielle;**Vu le procès-verbal dressé le 14 mai 1978 à 14 h. 30*

au Service de la Propriété industrielle;

ARRÊTE :

Article 1. — Il est délivré à : UNIVERSITE DE SHERBROOKE,
boulevard de l'Université, à Sherbrooke, Québec,
(Canada),

repr. par le Cabinet Bede à Bruxelles,

un brevet d'invention pour : Complexes d'acide phtalocyanine
tetrasulfonique et d'isotopes de métaux émettant des
radiations gamma de courte durée de vie et leurs
applications comme agents de diagnostic,

qu'elle déclare avoir fait l'objet de demandes de brevet
déposées aux Etats-Unis d'Amérique le 18 mai 1979,
n° 40.181 et le 24 avril 1980, n° 143.526 au nom de
J. Van Lier, J. Rousseau et D. Autenrieth dont elle
est l'ayant cause.

Article 2. — Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et
périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit
de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

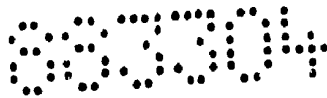
Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention
(mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui
de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 14 novembre 1978

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE :

Le Directeur

L. SALPETEUR



SHERU-45 BE

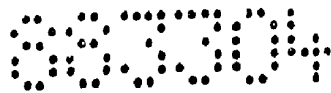
UNIVERSITE DE SHERBROOKE

à Sherbrooke, Quebec

(Canada)

"Complexes d'acide phtalocyanine tetrasulfonique
et d'isotopes de métaux émettant des radiations
gamma de courte durée de vie et leurs applications
comme agents de diagnostic"

C.I.: Demandes de brevets des Etats-Unis d'Amérique
n° 40.181 déposée le 18 mai 1979 et n° 143.526
déposée le 24 avril 1980 aux noms de Johannes
VAN LIER, Jacques ROUSSEAU et Dieter AUTENRIETH
dont la demanderesse est l'ayant droit.

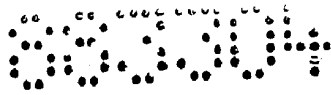


L'invention concerne un nouveau complexe organo-métallique contenant un isotope d'un métal émettant des radiations γ à courte vie. Plus précisément, l'invention concerne la production de nouveaux complexes entre l'acide phtalocyanine tétrasulfonique et des isotopes de métaux émettant des radiations γ à courte vie. Les nouveaux produits selon l'invention sont destinés à être injectés dans le sang d'un mammifère, à l'état dissous ou dispersé dans un milieu aqueux biologiquement stérile, pratiquement isotonique, avec des fluides corporels de mammifères, pour permettre la détection de tumeurs malignes par les procédés usuels de balayage.

La technique radiochimique a trouvé de nombreuses applications dans les domaines de la médecine et de la biologie. On sait depuis longtemps que l'introduction dans un organisme de composés contenant (ou marqués avec) un radioisotope peut donner un aperçu de l'anatomie, de la physiologie et des processus métaboliques de l'organisme. Ces composés, généralement appelés " produits pharmaceutiques radioactifs", sont particulièrement utiles dans les techniques de diagnostic qui impliquent l'étude de la structure ou de la fonction de divers organes internes, par exemple le cerveau, le rein ou le foie par des moyens de détection radioactifs. Pour une étude diagnostique, on préfère des isotopes ayant une courte durée de demi-vie et un spectre d'émission riche en rayons gamma (par opposition aux particules alpha ou bêta).

L'isotope métastable ^{99m}Tc a une durée de demi-vie de 6 heures et un spectre d'émission, 99 % de radiation gamma à 140 KeV, qui convient particulièrement bien à des techniques de médecine diagnostic nucléaire. C'est ainsi que le ^{99m}Tc a une activité spécifique élevée, $5,28 \times 10^2$ millicuries par gramme (mc/g) et une grande vitesse de désintégration appropriée, alors que son produit de filtration le ^{99}Tc , a une activité spécifique qui est presque 90 fois plus faible et une durée de demi-vie approximativement 90 fois plus longue. Pour l'organisme à étudier ou dont on veut faire le diagnostic, la lente vitesse de désintégration du ^{99}Tc à faible activité,

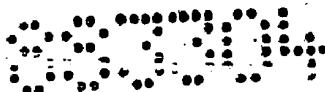
9



relativement stable, en son produit de dégradation (le ruthénium) ne devrait normalement pas produire de quantités de radiation dangereuses, quel que soit le moyen biologique ou la voie d'élimination d'un produit pharmaceutique radioactif au ^{99m}Tc . Pour le chercheur ou le clinicien, le spectre d'émission du ^{99m}Tc peut fournir des taux de précision élevés dans des mesures et des calculs radiodiagnostiques. Depuis peu de temps, le ^{99m}Tc est devenu facilement disponible dans les hopitaux, grâce à l'utilisation d'une élution sélective à partir d'un générateur de $^{99}\text{molybdène}$ (^{99}Mo). L'isotope ^{99}Mo produit le ^{99m}Tc comme produit de désintégration radioactif.

Bien que les composés de ^{99m}Tc semblent être des produits pharmaceutiques radioactifs idéaux pour une utilisation diagnostique, l'attention ou la sélection de composés ou de complexes de Tc, en tenant compte de la spécificité vis à vis des organes et des taux de toxicité tolérables, est une tâche complexe. Evidemment, des composés avec une très faible DL_{50} sont inappropriés pour une utilisation chez l'homme ou l'animal, même aux faibles quantités impliquées dans un examen diagnostique. Des composés avec une stabilité "in vivo" insuffisante peuvent être de médiocres outils diagnostiques, car ils peuvent libérer des ions ou d'autres espèces chimiques radioactifs avec une spécificité insuffisante ou indésirable vis à vis des organes. Des composés stables qui peuvent être distribués généralement dans tout l'organisme, malgré leur stabilité, ou qui n'atteignent pas une destination désirée dans l'organisme, sont également peu appropriés pour de nombreuses études de la fonction ou de la structure des organes, par exemple des études de la vésicule biliaire ou du foie. Pour ces études de la fonction des organes, des composés qui sont spécifiques vis à vis d'un organe, mais qui ne sont pas excrétés par lui (ou s'ils sont excrétés, sont facilement ré-absorbés) sont également peu intéressants.

Certains composés ou complexes de Tc ont été développés pour des recherches spécifiques. Par exemple un complexe de ^{99m}Tc et d'acide 6,8-dihydrothiooctique a été développé



pour fournir une image significative de la fonction du foie en mesurant la radioactivité émise à partir du foie, de la vésicule biliaire, des intestins et des matières fécales de l'organisme ou du patient examiné (brevet US 3 873 680).

- 5 Le ^{99m}Tc technetium associé à des chélates organiques de calcium en présence de sulfate ferreux s'est avéré utile comme agents pour une visualisation des reins, une étude de la fonction rénale et d'autres études vasculaires, (brevet US 3 446 361). Une préparation d'éthane-1-hydroxy-1,1-diphosphoré
- 10 dans une solution acide de chlorure stanneux et mélangée avec $^{99m}\text{TcO}_4$ a été proposée pour être utilisée dans des procédés de balayage radiographique du squelette osseux (brevet US 3 735 001). Le cerveau et les reins peuvent être examinés avec un complexe de fer marqué avec le ^{99m}Tc (brevet US
- 15 3 787 565). On sait également que des macro-agrégats de sérum-albumine marquée avec le ^{99m}Tc sont particulièrement utilisables dans des recherches sur la fonction des poumons (Brevets US 3 803 299 et 3 862 299). D'autres dérivés du $^{99m}\text{technetium}$ ont été proposés à diverses fins dans les
- 20 brevets US 3 812 264, 3 852 413, 3 863 004 et 3 683 066.

On a rapporté dans J. Nucl. Med. 5, 462 (1964) que des dérivés de tétraphényl porphyrine sulfate marqués au ^{57}Co peuvent être utilisés dans la détection de tumeurs cérébrales, à l'exception de toute autre tumeur. 40 % environ du ^{57}Co

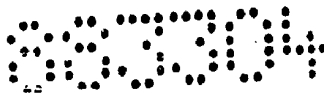
25 sont dissociés, ce qui explique en partie le fait que le radioisotope ne se localise pas dans les tumeurs.

Malgré ces développements, il reste nécessaire de disposer de produits pharmaceutiques radioactifs qui s'accumulent rapidement et sélectivement dans des tissus spécifiques.

- 30 Il semble particulièrement souhaitable de fournir des produits pharmaceutiques radioactifs qui montrent une affinité pour les tumeurs malignes ou les cellules tumorales afin de fournir un diagnostic précoce des tumeurs et des métastases tumorales.

On sait également que des phtalocyanines et précisément

35 leurs dérivés d'acide tétrasulfonique ont tendance à se comporter comme les porphyrines naturelles. Une phtalocyanine est



- 4 -

un composé hétérocyclique constitué de 4 noyaux de benziso-
indole reliés entre eux par des ponts azote. Ces composés
sont connus pour former des chélates stables avec des ions
métalliques et certains oxydes métalliques. Des phtalocyanines
5 métalliques peuvent être préparées par échange de l'ion métal-
lique désiré avec l'ion central de la phtalocyanine de lithium.
Une telle classe de phtalocyanines métalliques ainsi prépa-
rées est représentée par les phtalocyanines de terres rares
d'actinide et de lanthanide et plus particulièrement par
10 la phtalocyanine sulfonée d'uranyle, qui sont décrites
dans le brevet US 3 027 391 comme étant utilisables dans le
traitement d'une tumeur localisable par injection directe
de la phtalocyanine d'uranyle dans la tumeur de l'animal.

Comme on peut s'en rendre compte, ces phtalocyanines
15 sulfonées de métaux lourds ne sont utilisables que lorsqu'une
tumeur a déjà été localisée par d'autres moyens et uniquement
pour le traitement thérapeutique de la tumeur localisée, soit
lorsque le métal lourd de départ est un nucléide radioactif
où les radiations détruisent la tumeur, soit lorsque le métal
20 lourd est un nucléide fissile ou activable par des neutrons.
Malheureusement, ce procédé ne permet pas de localiser une
tumeur et ne permet qu'un traitement radioactif d'une tumeur,
ce qui ne laisse aucune place pour détecter la présence d'une
tumeur et la traiter par d'autres moyens, la chirurgie par
25 exemple.

Depuis, on sait que le principal problème associé aux
tumeurs malignes est leur détection précoce afin de pouvoir
commencer un traitement adéquat aussitôt que possible, il
semble donc particulièrement souhaitable de fournir un procédé
30 radioactif sûr pour ce type de détection,

Conformément à l'invention, on a maintenant trouvé qu'il
est possible de détecter facilement des tumeurs malignes en
utilisant de nouveaux complexes d'isotopes de métaux émettant
des rayons gamma de courte vie et d'acide phtalocyanine tétra-
35 sulfonique. On a trouvé que ces nouveaux complexes, en raison
de l'affinité pour les tumeurs malignes, peuvent être particu-

7



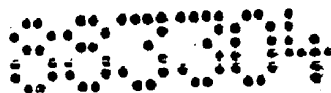
lièrement utiles dans la détection de la présence, de l'emplacement et de l'importance d'une tumeur maligne par le procédé usuel de balayage par radioactivité.

Les isotopes de métaux émettant des radiations gamma de courte vie, qui peuvent être combinés avec l'acide phtalocyanine sulfonique pour donner les nouveaux complexes pharmaceutiques radioactifs selon l'invention sont le 99m technetium, le 67 gallium, le 68 gallium, le 197 mercure, le 64 cuivre, le 51 chrome, le 57 cobalt, le 111 indium et le 62 zinc. Les complexes préférés pour des études requérant une visualisation dans les 12 heures sont l'acide phtalocyanine tétrasulfonique 99m technetium et l'acide phtalocyanine tétrasulfonique 68 gallium, car le 99m technetium et le 68 gallium sont faciles à obtenir, lorsqu'on le désire à partir d'un générateur, et en raison de leur courte durée de demi-vie de 8 heures et de 68 minutes respectivement. Bien que le 99 technetium soit le principal isotope actuellement utilisé dans la pratique clinique, le 68 gallium acquiert ainsi une place également importante, à la suite de développements récents dans l'instrumentation tomographique par positron. Pour une application requérant une visualisation à des intervalles plus éloignés, jusqu'à 120 heures après l'injection, on préfère des complexes d'isotopes de métaux ayant une durée de demi-vie d'environ 3 jours, tels que l'acide phtalocyanine tétrasulfonique 67 gallium et l'acide phtalocyanine tétrasulfonique 111 indium.

Les nouveaux composés selon l'invention peuvent être préparés soit par le procédé de condensation décrit dans Inor. Chem. 4, 469 (1965) par Weber et al, soit par le procédé de marquage direct.

Le procédé de condensation consiste essentiellement à condenser le sel monosodique de l'acide sulfophtalique avec l'isotope du métal émettant des radiations gamma de courte vie, dans le nitrobenzène à 200°C ou plus, dans une atmosphère de gaz inerte en présence d'un agent réducteur constitué d'hydroxylamine, d'urée et de chlorure d'ammonium et en présence d'un catalyseur tel que le molybdate d'ammonium. On chauffe le

9



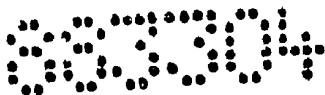
mélange réactionnel vers 90°C et on concentre dans un courant d'azote. Une condensation a lieu en chauffant le résidu à 235°C ou plus, selon l'isotope de métal choisi, pendant environ 0,5 heure.

5 . Néanmoins, ce procédé présente des inconvénients en ce qu'on obtient un mélange d'isotopes marqués de complexes de tétrasulfophtalocyanine qu'on doit purifier afin d'éliminer les matériaux de départ qui n'ont pas réagi, tels que les réactifs et l'isotope de métal libre, ce qui se traduit par
10 une certaine perte de temps qui devient un inconvénient lorsqu'on utilise un isotope de métal ayant une très courte durée de demi-vie, de 3 heures environ, d'où une course contre la montre jusqu'à l'injection à l'hôte à examiner. Cependant, ce procédé est le seul possible lorsqu'on utilise un isotope
15 de métal tel que le technetium qui ne s'avère pas spécialement approprié dans le procédé de marquage direct, en raison de ses propriétés chimiques.

On peut également obtenir les produits désirés selon l'invention par le procédé de marquage direct. Dans ce procédé,
20 on sépare la tétrasulfophtalocyanine obtenue par sulfonation de la phtalocyanine, de façon à recueillir le constituant principal qu'on marque ensuite directement avec l'isotope de métal désiré selon des procédés connus dans la technique. Ce procédé est appliqué de préférence avec des isotopes de
25 métaux autres que le technetium. Dans le procédé de marquage direct, on ajoute l'isotope de métal à la solution aqueuse de tétrasulfophtalocyanine et on chauffe pendant 10 à 30 minutes à 100°C, après avoir ajusté à un pH neutre ou légèrement basique.

30 Les nouveaux complexes d'acide phtalocyanine tétrasulfonique et d'isotopes de métaux émettant des radiations gamma de courte vie sont utilisables en injections dans le circuit sanguin pour diagnostiquer la présence de tumeurs chez l'animal.

35 Les phtalocyanines et leurs analogues sulfonés ne sont pas toxiques, et même leurs complexes avec des métaux toxiques



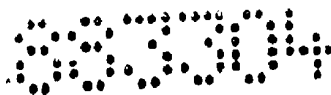
donnent des complexes métalliques non-toxiques. En outre, étant donné que la quantité réelle d'isotopes de métaux de courte vie, requise pour des applications de balayage chez les animaux, est négligeable, les complexes d'acide phtalocyanine tétrasulfonique correspondants ne montrent aucune possibilité notable d'avoir des effets pharmacologiques contraires lorsqu'ils sont administrés à des animaux dans un but de détection.

L'invention est illustrée par les exemples non-limitatifs suivants.

EXEMPLE 1

Production d'acide phtalocyanine tétrasulfonique ^{99m}technetium (PcTs - ^{99m}Tc)

A une solution de pertechnetate ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) fraîchement élue (2 ml contenant 50 à 150 μCi de ^{99m}Tc , provenant d'un générateur de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$), on ajoute 8,04 mg (3×10^{-5} mole) du sel monosodique de l'acide sulfophtalique, 6 mg (10^{-4} mole) d'urée et 0,1 ml d'une solution contenant 6×10^{-4} mole de molybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) et 10^{-1} mole de chlorure d'ammonium. Après l'addition de 8,34 mg (12×10^{-5} mole) d'hydroxylamine dans le but de réduire le pertechnetate, probablement en oxyde de technetium ($^{99m}\text{TcO}_2$), on chauffe le mélange à 90°C et on concentre dans un courant d'azote. En 25 minutes, on chauffe le résidu à 235°C pour que la condensation puisse avoir lieu. Après avoir refroidi le mélange à la température ambiante, on reprend le résidu par 1 ml d'eau et on applique sur une colonne à faible pouvoir d'échange d'anion (1 ml d'Amberlite[®] 1R-45-(OH), chargé dans une seringue en plastique d'un ml, colonne A). On lave la colonne avec 9 ml d'eau distillée et on élue en direction inverse avec 10 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 N. On fait directement passer l'éluat sur une colonne échangeuse de cation (0,5 ml d'Amberlite[®] 12-120 (H), colonne B), en séparant 5 fractions de 2ml chacune. On recueille le PcTs - ^{99m}Tc (rendement 10 % par rapport à la radioactivité de l'échantillon de pertechnetate initial), dans la troi-

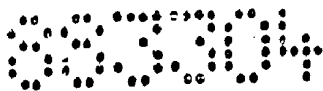


sième fraction (Fraction III, colonne B). Après avoir ajusté le pH à 7,0 avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N (environ 0,1 ml), la préparation est prête à injecter à des animaux de laboratoire.

- 5 En procédant de la même façon et en partant du nitrate ou du chlorure de ^{67}Ga gallium, de ^{64}Cu cuivre, de ^{51}Cr chrome, de ^{57}Co cobalt, de ^{111}In indium et de ^{62}Zn zinc, on obtient l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ^{67}Ga gallium, l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ^{64}Cu cuivre, l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ^{51}Cr chrome, l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ^{57}Co cobalt, l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ^{111}In indium et l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ^{62}Zn zinc correspondants.

EXEMPLE 2

- 15 Afin de déterminer la nature chimique de l'entité $^{99\text{m}}\text{Tc}$ dans la fraction de PCTs - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ purifiée (exemple 1, fraction III, de la colonne B), on a conduit une expérience de condensation avec le ^{99}Tc , le produit de désintégration de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, de longue durée de vie. On dissout 49,5 mg ($0,5 \times 10^{-3}$ mole)
- 20 de ^{99}Tc technetium métallique dans quelques gouttes d'acide nitrique concentré, après quoi on ajoute une faible quantité d'urée pour détruire tout nitrite (HNO_2) formé. Après avoir ajouté une faible quantité d'hydroxylamine, on sèche le mélange sous vide pour obtenir un solide vert pâle. On reprend
- 25 le matériau dans 2 ml d'une solution aqueuse d'hydroxylamine contenant 432 mg ($1,61 \times 10^{-3}$ mole) d'acide 3-sulfophtalique, 600 mg (10^{-2} mole) d'urée, 7,4 mg (6×10^{-6} mole) de molybdate d'ammonium et 53 mg (10^{-3} mole) de chlorure d'ammonium. On recouvre le mélange réactionnel de nitrobenzène (point
- 30 d'ébullition $210,9^\circ\text{C}$) et on chauffe sur un bain d'huile sous atmosphère d'azote. Après l'évaporation de l'eau, l'hydroxylamine se décompose, comme le montre la formation soudaine de gaz. La couleur du mélange réactionnel vire du violet pâle au noir. Après addition de 5 autres ml de nitrobenzène, on
- 35 porte le mélange réactionnel au reflux pendant 20 minutes. On recueille le précipité noir, on met en suspension dans



du méthanol absolu, on filtre, on lave soigneusement avec du méthanol absolu et on sèche, afin de recueillir 235 mg d'une poudre noire. L'activité spécifique (désintégration γ du ^{99}Tc) indique la présence de 15,3 % en poids de Tc, ou un excès de 5,6 % de Tc calculé pour un rapport Tc:PcTs de 1:1. En conséquence, ou bien la préparation est contaminée par des sels de Tc autres que le complexe PcTs - ^{99}Tc , ou bien le dernier complexe contient plus d'une mole de Tc par mole de PcTs.

On a également chromatographié 1 mg de PcTs - ^{99}Tc et une préparation de PcTs - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ dans le système d'échange d'ion (voir exemple 1, puis analysé par spectrophotographie UV le PcTs - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ purifié (fraction III de la colonne B). Le spectre UV montre les maxima d'absorption caractéristiques à 685 et 595 nm avec une forte absorption en-deçà de 300 nm et un épaulement à 305 nm, ce qui confirme que le matériau élué a bien une nature de sulfophthalocyanine.

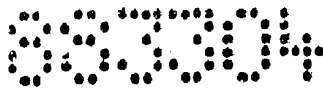
EXEMPLE 3

Distribution in vivo du PcTs - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (fraction III de la colonne B, voir exemple 1)

On anesthésie des lapines de 2 kg par injection intrapéritonéale de Nembutal^R de sodium (pentobarbital, 30 mg/kg). Dans la veine marginale de l'oreille, on injecte la fraction de PcTs - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ purifiée (2 ml, 30 μCi). On visualise la distribution de la radioactivité par un balayage par scintillation avec une caméra Dyna^R-IV (Picker Nuclear). Cette caméra est équipée d'un collimateur parallèle à haute résolution et contient une matrice de 37 phototubes pour obtenir une résolution intrinsèque de 3,7 mm.

Cinq minutes après l'injection, la radioactivité s'accumule dans le coeur et dans la région hépatique. Les reins sont devenus visibles alors que les os, et en particulier les articulations des pattes postérieures, peuvent également être reconnus. Six heures après l'injection, on observe une fixation prononcée dans le foie, la région cardiaque, les reins et la rate. La stabilité du complexe de PcTs - $^{99\text{m}}\text{Tc}$

9



est mise en évidence par l'absence d'activité dans l'estomac, la thyroïde et les glandes salivaires. A titre de comparaison, un balayage par scintillation d'un lapin auquel on a injecté une dose semblable d'activité sous la forme de l'ion pertechnate libre, montre que contrairement à l'expérience avec le $PcTs - {}^{99m}Tc$, l'estomac, les glandes salivaires et la thyroïde sont alors fortement marqués.

EXEMPLE 4

Afin d'étudier la distribution du $PcTs - {}^{99m}Tc$ dans les organes en fonction du temps, on injecte à 7 rats femelles Fisher 344 CRBL, par la veine caudale, le produit pharmaceutique radioactif purifié (45 μCi dans 0,2 ml de solution saline par rat). On sacrifie les animaux à différents intervalles de temps et on les dissèque. On prélève des échantillons du foie, des reins, des poumons, des muscles, de la rate et du sang, on pèse et on détermine la teneur en ${}^{99m}Tc$ au moyen d'un analyseur Spectron-100^R à canaux multiples, étalonné pour des photons de 140 KeV (Picker Nuclear). On ajuste les valeurs quant à la désintégration du ${}^{99m}Tc$ et aux différences de poids entre les animaux et on trace les courbes de variation des activités spécifiques. Le diagramme permet de mettre en évidence certains modes de distribution. Une activité spécifique élevée dans les reins est maintenue pendant la durée de l'étude, indiquant une fixation irréversible du $PcTs - {}^{99m}Tc$ dans ces organes. La fixation hépatique, avec un maximum après 12 heures, est aussi significative. La rate et les poumons sont moins actifs, bien que leurs activités spécifiques restent constantes pendant l'expérience. L'activité du système sanguin diminue exponentiellement avec une demi-période d'élimination de 12 heures. La fixation du $PcTs - {}^{99m}Tc$ par les muscles est insignifiante et est parallèle à l'activité du sang.

En conclusion, ces résultats indiquent que le tissu rénal montre une forte affinité pour le $PcTs - {}^{99m}Tc$. Plusieurs autres organes, dont le foie, la rate, les poumons et le coeur, retiennent également ce produit. Le mode de distribu-



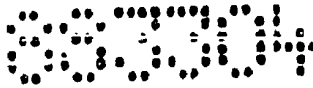
tion suggère une fixation significative au niveau du système réticulo-endothélial.

EXEMPLE 5

Le mode d'excrétion du PcTs - ^{99m}Tc permet également
5 d'avoir une idée de la fixation de ce produit pharmaceutique
radioactif par les différents organes. On détermine l'excré-
tion du ^{99m}Tc sur 3 rats mâles (Sprague-Sawley) d'environ
100 g chacun. Pour obtenir des données uniformes, on soumet
les animaux à une cystectomie (J.P. Bonjour, Helv. Acta 24
10 24 (1966)). Chaque rat reçoit une dose de $0,4 \mu\text{Ci/g}$ de
PcTs - ^{99m}Tc par la veine caudale. On mesure l'activité
totale des animaux à différents intervalles de temps au moyen
d'une caméra PHO-V (Searle) équipée d'un collimateur parallèle
à haute résolution. Les animaux sont maintenus dans une cage
15 étroite pour régler leur maintien par rapport au détecteur.
Pendant l'expérience, ils peuvent boire et manger. On trace
une courbe à l'échelle semi-logarithmique de la moyenne des
valeurs obtenues avec les 3 animaux, exprimées en pourcentage
par rapport à l'activité au moment de l'injection.

20 On corrige les valeurs en tenant compte de la désintégration
du ^{99m}Tc et celles-ci ne représentent donc que l'excré-
tion biologique du PcTs - Tc. On obtient une courbe en deux
parties indiquant qu'un équilibre de distribution est atteint
en 3 heures. Ce point d'intersection des deux courbes coïn-
25 cide avec la fixation maximale dans les divers organes et dans
le système sanguin. Il est évident que pendant les trois pre-
mières heures après l'injection, environ 20 % du ^{99m}Tc ont
été directement excrétés du système sanguin. Le reste du
 ^{99m}Tc est libéré par les tissus cible à une vitesse extrême-
30 ment lente (0,5 % par heure). Ces observations, ainsi que
l'absence d'activité dans l'estomac, la thyroïde et les glandes
salivaires (exemple 3), indiquent qu'il n'y a pas de pertech-
netate libéré à partir du complexe de PcTs - Tc. Elles sug-
gèrent également une fixation irréversible du PcTs - Tc sur
35 les sites récepteurs des organes cible.

9



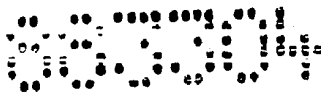
EXEMPLE 6

Afin d'évaluer le PcTs - ^{99m}Tc comme agent d'exploration des tumeurs, on a choisi comme modèle un adénocarcinome mammaire 13 762 sensible aux hormones chez des rats femelles Fisher 344/CRBL. Cette tumeur est maintenue sous la forme ascite. Mais une fois inoculée par voie sous-cutanée ou dans un tissu mou, une tumeur solide se développe. Dans cette étude, on inocule 5 animaux pesant 250 g chacun avec 0,5 ml de liquide d'ascite (10^6 cellules) dans la cuisse. A des intervalles de temps de 3, 6, 8 et 11 jours après l'inoculation, on injecte du PcTs - ^{99m}Tc (500 μCi dans 1 ml) dans la veine caudale de chaque animal. On suit la distribution de l'activité dans les animaux par balayage par scintillation au moyen d'une caméra Dyna-IV^R associée à un système d'ordinateur Cybernex^(R) (Chromemco). On enregistre des images sélectionnées sur une disque magnétique qui permet leur représentation sur une matrice de 128 x 128 points. L'activité de chaque point est exprimée au moyen d'une échelle de 8 couleurs qui se répètent 4 fois pour couvrir une activité de 0 à 256 comptages. En plus de la visualisation dramatique due au balayage par scintillation, cette technique permet une étude quantitative des résultats.

Les images obtenues 3 et 6 jours après l'inoculation de la tumeur révèlent déjà une légère augmentation de l'activité au site d'inoculation. Cependant, une expérience de balayage avec le PcTs - ^{99m}Tc chez des animaux 8 jours après l'inoculation révèle clairement une fixation sélective du ^{99m}Tc dans la tumeur. On sacrifie et on dissèque un des animaux après l'étude scintigraphique. La tumeur s'est développée dans la cuisse sous forme d'un nodule blanc, solide non-vascularisé de 0,5 cm (25 mg). L'activité de la tumeur est 4 fois plus élevée que celle du tissu musculaire prélevé dans la cuisse saine. 11 jours après l'inoculation, la tumeur atteint un diamètre d'un cm (455 mg) et est également bien visualisée avec le nouveau produit pharmaceutique radioactif selon l'invention (rapport tumeur/muscle 5:1).

La fixation appropriée du PcTs - ^{99m}Tc dans les lésions

9



malignes aux stades de développement de la tumeur, bien avant la phase de vascularisation, indique nettement l'utilité de ce nouveau produit pharmaceutique radioactif comme agent de détection pour un diagnostic précoce des tumeurs malignes et de leurs métastases.

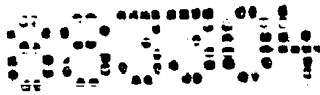
EXEMPLE 7

Production d'acide phtalocyanine tétrasulfonique ⁶⁷ gallium (PcTs - ⁶⁷Ga) par marquage direct

On convertit la phtalocyanine en le dérivé tétrasulfonique par le procédé de R.P. Linstead et F.T. Weiss, J. Chem. Soc. 2975 (1950). A une solution de 4 mg ($1,5 \times 10^{-5}$ mole) d'acide phtalocyanine tétrasulfonique dans 0,6 ml d'un tampon de phosphate 0,1 M (pH 7,3), on ajoute 0,1 ml du même tampon contenant du gallium sans support (⁶⁷Ga⁺⁺⁺, 30 à 50 microcuries) et 40 µg de citrate de sodium. On chauffe le mélange pendant 10 minutes à 100°C, après quoi on applique un échantillon de 10 à 25 µl sur une plaque de gel de silice pour chromatographie en couche mince. Après avoir développé la plaque dans l'acétone : acétate d'éthyle : eau : NH₄OH (7:3:3:0,3), un autoradiogramme révèle la présence de 4 zones radioactives avec des tracés de migration identiques comme constituants majeurs résolus en bleu de la préparation d'acide phtalocyanine tétrasulfonique non-marqué. Le gallium qui n'a pas réagi demeure à l'origine (84 %) alors que 16 % de la radioactivité est associée aux zones de PcTs - ⁶⁷Ga.

On purifie le PcTs - ⁶⁷Ga en appliquant le mélange réactionnel sur une colonne de gel de silice (2 x 0,5 cm) en éluant avec 1 ml de solution saline à 0,9 %. La préparation est alors prête à l'emploi.

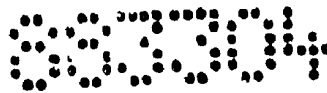
En procédant de la même manière, mais en partant du nitrate ou du chlorure de ⁶⁸gallium, de ⁶⁴cuivre, de ⁵¹chrome, de ⁵⁷cobalt, de ¹¹¹indium, de ¹⁹⁷mercure et de ⁶²zinc, on obtient l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ⁶⁸gallium, l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ⁶⁴cuivre, l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ⁵¹chrome, l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ⁵⁷cobalt, l'acide phtalocyanine tétrasulfonique



- 14 -

¹⁹⁷mercure, l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ¹¹¹indium
et l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ⁶²zinc correspon-
dants.

2



REVENDEICATIONS

1. Complexes d'acide phtalocyanine tétrasulfonique et d'un métal choisi parmi le 99m technetium, le 67 gallium, le 68 gallium, le 64 cuivre, le 51 chrome, le 57 cobalt, le 111 indium, le 197 mercure et le 62 zinc.

2. Acide phtalocyanine tétrasulfonique 99m technetium.

3. Procédé de détection des tumeurs dans le corps d'un animal, caractérisé en ce qu'il consiste à administrer à l'animal une dose diagnostique d'un complexe d'acide phtalocyanine tétrasulfonique et d'un métal choisi parmi le 99m technetium, le 67 gallium, le 68 gallium, le 64 cuivre, le 51 chrome, le 57 cobalt, le 111 indium, le 197 mercure et le 62 zinc, puis à procéder à un examen avec un dispositif de visualisation des radiations pour déterminer toute tumeur sur laquelle s'est fixé l'agent diagnostique marqué.

4. Procédé de détection des tumeurs dans le corps d'un animal, caractérisé en ce qu'il consiste à administrer à l'animal une dose diagnostique d'acide phtalocyanine tétrasulfonique 99m technetium, puis à procéder à un examen avec un dispositif de visualisation des radiations, afin de déterminer toute tumeur sur laquelle s'est fixé l'agent diagnostique marqué.

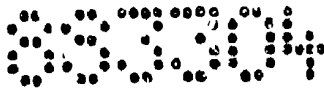
5. Acide phtalocyanine tétrasulfonique 67 gallium.

6. Composition pour la détection d'une tumeur, radioactive, métabolisable, caractérisée en ce qu'elle comprend un complexe d'acide phtalocyanine tétrasulfonique et d'un métal radio-actif choisi parmi le 99m technetium, le 67 gallium, le 68 gallium, le 64 cuivre, le 51 chrome, le 57 cobalt, le 111 indium, le 197 mercure et le 62 zinc, et un véhicule liquide approprié.

7. Composition pour la détection d'une tumeur, radioactive, métabolisable, caractérisée en ce qu'elle comprend l'acide phtalocyanine tétrasulfonique 99m technetium et un véhicule liquide approprié.

8. Composition pour la détection d'une tumeur, radioactive, métabolisable, caractérisée en ce qu'elle comprend l'acide phtalocyanine tétrasulfonique 67 gallium et un

9



véhicule liquide approprié.

9. Composition pour la détection d'une tumeur, radioactive, métabolisable, caractérisée en ce qu'elle comprend l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ¹¹¹indium et un véhicule liquide approprié.

10. Composition pour la détection d'une tumeur, radioactive, métabolisable, caractérisée en ce qu'elle comprend l'acide phtalocyanine tétrasulfonique ⁶⁸gallium et un véhicule liquide approprié.

15

Bruxelles, le 14 mai 1980
P.Pon. Université de Sherbrooke
P.Pon. CABINET BEDE, R. van Schoonbeek